

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Soňa Kohúteková

SYNTÉZA A KOORDINAČNÉ VLASTNOSTI
FOSFINÁTOVÝCH DERIVÁTOV TACN

Synthesis and coordination properties of TACN phosphinate
derivatives

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Vojtěch Kubiček, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

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

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

V Praze, 26. května 2016

.....
Soňa Kohúteková

Abstrakt

Táto práca sa zaoberá prípravou ligandu, vhodného na selektívnu komplexáciu gália. Navrhnutý ligand je derivátom makrocyklu NOTA s bis(fosfinátovým) pendantným ramenom. Potenciometrickými titráciami boli stanovené protonizačné konštanty ligandu a konštanty stability komplexov s meďnatými, nikelnatými, zinočnatými a galitými kationmi. Následne bola študovaná kinetika komplexácie galitých iónov. Ligand by potenciálne mohol byť základom kontrastných látok pre ^{68}Ga -PET.

Kľúčové slová: makrocyclické komplexy, pozitronová emisná tomografia, termodynamická stabilita, formačná kinetika, rádiofarmaká

Abstract

The aim of this work is preparation and characterization of a ligand for a selective complexation of gallium (III). The ligand is a derivative of macrocycle NOTA with bis(phosphinic) pendant arm. Protonation constants and stability constants with copper (II), nickel (II), zinc (II) and gallium (III) cations were determined by potentiometric titrations. The ligand was also used for studying complexation kinetics with gallium (III) ions and might serve as a potential contrast agent for ^{68}Ga -PET.

Key words: macrocyclic complexes, positron emission tomography, thermodynamic stability, formation kinetics, radiopharmaceuticals

Obsah

1	Úvod.....	7
1.1	Radiológia a medicínske zobrazovacie techniky.....	7
1.1.1	Pozitrónová emisná tomografia.....	9
1.2	Kovové rádioizotopy	10
1.2.1	Rádioizotopy gália používané v nukleárnej medicíne.....	10
1.2.2	Gálium a jeho koordinačné vlastnosti	11
1.3	Makrocyclické deriváty ako ligandy	11
1.4	Fosforové pendantné ramená.....	14
1.5	Cieľ práce	17
2	Experimentálna časť	18
2.1	Použité chemikálie.....	18
2.2	Metódy charakterizácie.....	18
2.2.1	Elementárna analýza - EA.....	18
2.2.2	Hmotnostná spektrometria - MS	18
2.2.3	Nukleárna magnetická rezonancia - NMR	18
2.2.4	Röntgenoštruktúrna analýza	19
2.3	Syntéza.....	20
2.3.1	Kyselina 1,4,7-triazacyklononán-1-metylén-bis(fosfínová) (NOBP ⁱⁿ)	20
2.3.2	Kyselina 1,4,7-triazacyklononán-1-metylén-bis(fosfín)-4,7-bis(octová) (NO2ABP ⁱⁿ).....	21
2.4	Komplexácia iónov Ga ³⁺	22
2.5	NMR titrácie	22
2.6	Potenciometrické titrácie	22
3	Výsledky a diskusia	27
3.1	Syntéza.....	27
3.2	Komplexácia iónov Ga ³⁺	29
3.3	NMR titrácie	31
3.4	Potenciometrické titrácie	34
3.4.1	Acidobázické vlastnosti.....	34
3.4.2	Koordinačné vlastnosti	35
3.5	Röntgenoštruktúrna analýza	37
4	Záver.....	40
5	Zoznam použitých skratiek	41

6	Zoznam použitej literatúry	42
----------	-----------------------------------------	-----------

1 Úvod

V súčasnej medicíne nastáva výrazný rozvoj rádiofarmák a ich využitie na diagnózu a liečbu rôznych ochorení. Mnohé z nich sú značené rádioaktívnym izotopom kovu naviazanom na vhodnom nosiči. V poslednej dobe sú na tieto účely pomerne intenzívne skúmané rádioizotopy gália, ktorým je potrebné nájsť vhodné ligandy na ich selektívnu komplexáciu. Aby bola látka vhodná ako potenciálny základ rádiofarmák, je nutné, aby navrhnutý ligand vytváral stabilný komplex s gáliom dostatočne selektívne, aby nedochádzalo k jeho rozpadu v prítomnosti iných iónov kovov, a dostatočne rýchlo vzhľadom na polčas rozpadu použitého rádioizotopu gália.

1.1 Radiológia a medicínske zobrazovacie techniky

Rádiológia je medicínske odvetvie, využívajúce ionizujúce žiarenie pri určení diagnózy a liečení pacientov. Použité žiarenie - röntgenové alebo emitované rádioaktívnym izotopom, prechádza organizmom pacienta a umožňuje zobrazit' vnútorné orgány a kostné tkanivá.

Rádiológia sa začala rozvíjať od roku 1895, kedy Wilhelm Conrad Röntgen objavil röntgenové žiarenie.¹ Pri práci s katódovou trubicou zistil, že trubica emituje nový druh prenikavého žiarenia s veľmi krátkou vlnovou dĺžkou a vysokou energiou, vďaka čomu je žiarenie schopné prechádzať aj predmetmi, ktorými viditeľné svetlo nepreniká. Experimentmi objavil, že toto žiarenie prechádza menej hustými predmetmi, akými sú aj ľudské tkanivá, ale hustejšie látky ako kosti a kovové predmety ho absorbujú. Jedným z Röntgenových experimentov bola získaná snímka kostry ruky, pri jej exponovaní žiareniu proti fotografickej doštičke. Obmedzením röntgenových snímok je, že sa na nich jednotlivé orgány prekrývajú a nie je tak možné určiť presný anatomický obraz tela pacienta.

S rozvojom technológií do medicínskych zobrazovacích techník prenikli aj počítače.^{1,2} Na princípe vyslaného žiarenia, ktoré je zachytené detektorom a spojením s počítačom prevedené na snímku tela pacienta, funguje niekoľko zobrazovacích metód. Skiaskopia využíva röntgenové paprsky dopadajúce na zosilňovač alebo fluorescenčné tienidlo pripojené na monitor, čím je možné získavať obraz v reálnom čase. Pri vyšetrení môžu byť použité kontrastné látky, najčastejšie síran bárnatý alebo zlúčeniny jódu, ktoré absorbujú žiarenie inak ako tkanivá. Pre dosiahnutie presnejšej diagnostiky sa využíva výpočtová tomografia (CT). Pri tomto vyšetrení je pacient zasunutý do prístroja, kde okolo

neho po kruhovej trajektórii obieha röntgenka vysielajúca žiarenie do jeho tela. Na protíľahlej strane sú detektory, ktoré zaznamenávajú intenzitu prejdeho žiarenia. Pri CT sú tiež často využívané kontrastné látky pre lepšie vykreslenie snímok, najmä pre zobrazenie obrazu cievneho systému. Bezpečnejšou a finančne menej náročnou metódou je ultrazvuk. Pri vyšetreniach nie je organizmus vystavený ionizujúcemu žiareniu, ale zaznamenávajú sa vysokofrekvenčné zvukové vlny odrazené od tkanív. Využíva sa najmä v pôrodníctve na sledovanie plodu matky. Obmedzenie vyšetrenia je, že ultrazvuk neprechádza vzduchom ani kosťami (prechádza vodným prostredím). Vyšetrenie s najlepším rozlíšením tkanív organizmov je magnetická rezonancia (MRI). MRI využíva silné magnetické pole, najčastejšie s frekvenciou zhodnou s rezonančnou frekvenciou vodíka, ako najzastúpenejšieho prvku v tele s nenulovým spinom. Pôsobením magnetického poľa dochádza k vychýľovaniu spinov, ktoré svojim pohybom indukujú v cievke rôzne napätie, podľa toho v akom tkanive sa nachádzajú, a zaznamenaný signál je pomocou počítača prevedený na snímku.

Odvetvím rádiologie, ktoré využíva ionizujúce žiarenie z rádiofarmák aplikovaných do tela pacienta je nukleárna medicína.² Používanou diagnostickou metódou pri zobrazovaní skeletu je scintigrafia. Od ďalej spomínaných vyšetrení SPECT a PET sa líši tým, že neposkytuje trojrozmerný obraz. Zobrazovacie metódy SPECT (jednofotónová emisná výpočtová tomografia) a PET (pozitrónová emisná tomografia) patria k najčastejšie využívaným diagnostickým metódam nukleárnej medicíny. Využívané kontrastné látky obsahujú rádioaktívne izotopy s krátkym polčasom rozpadu, pre SPECT sú to najčastejšie ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{131}I a ^{201}Tl , pre PET napríklad ^{18}F alebo ^{11}C . Obe metódy sú používané na zobrazenie funkcie orgánov a metabolickej aktivity častí tela pacienta, a často sú kombinované s CT na súčasné zaznamenávanie jeho anatomického obrazu. SPECT využíva na detekciu emitovaných fotónov gama kamery, na ktorých je kolimátor, prepúšťajúci len tie fotóny, ktoré naň dopadnú kolmo. Výsledný signál je spracovaný počítačom a prevedený na snímku pacienta.

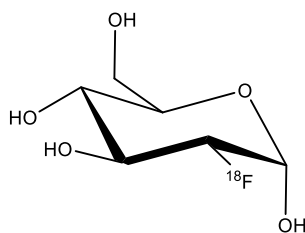
Vyšetrenie SPECT je oveľa viac používané ako PET.³ Je to spôsobené tým, že SPECT má podstatne lacnejšie vybavenie a izotopy používané pri vyšetreniach, sú lepšie dostupné. Jeho nevýhodou je menšie rozlíšenie snímok a trvanie, ktoré je spôsobené dlhšími polčasmi rozpadu používaných rádioizotopov (až 6 hodín) oproti bežným rádioizotopom PET (okolo 1 hodiny).

1.1.1 Pozitrónová emisná tomografia

Pozitrónová emisná tomografia je neinvazívna rádiodiagnostická zobrazovacia metóda používaná v medicíne. Využíva rádionuklidy prvkov, ktoré β^+ rozpadom uvoľňujú pozitron, vďaka čomu je možné sledovať ich distribúciu v organizme. Vzniknutý pozitron takmer ihneď anihiluje s elektrónom, za vzniku dvoch fotónov s opačnou dráhou letu a s presne známou energiou 511 keV. Fotóny sú detegované scintilačnými detektormi umiestnenými v kruhu okolo pacienta a zaznamenávajú sa len tie, ktorých dráhy zvierajú priamy uhol s odchýlkou maximálne $0,5^\circ$ a sú zachytené v rovnakom okamihu (s odchýlkou do 3 – 15 ns).

Pred vyšetrením je pacientovi podaný rádionuklid s polčasom rozpadu nepresahujúcim niekoľko desiatok minút.² Najpoužívanejším izotopom je ^{18}F , a vhodné a používané sú aj ^{11}C , ^{13}N a ^{15}O . Izotopy musia okrem vhodného polčasu rozpadu spĺňať aj to, aby energia emitovaných pozitronov bola čo najnižšia, pretože s ich rastúcou energiou rastie aj dráha, ktorú prejdú v tele, kým dôjde k anihilácii, čím sa znižuje rozlíšenie vyšetrenia.

Najčastejšie používaným rádiofarmakom je 2-deoxy-2(^{18}F)fluór-D-glukóza, známa pod skratkou ^{18}FDG (Obr. 1), značená izotopom ^{18}F , ktorého polčas rozpadu je 110 minút. Prvýkrát bola neznačená deoxyfluórglukóza pripravená v päťdesiatych rokoch na Prírodovedeckej fakulte UK tímom pod vedením Jaroslava Staněka ako potenciálne kancerostatikum.⁴ Predpokladalo sa, že atóm fluóru, ktorý nahradí v molekule D – glukózy hydroxidovú skupinu, bude vďaka jeho podobnej veľkosti a schopnosti tvoriť vodíkové mostíky natoľko podobný, že pripravená molekula deoxyfluórglukózy sa bude v organizme správať podobne ako D – glukóza. Predpoklad sa potvrdil, a molekula ^{18}FDG je distribuovaná v organizme najmä na miesta s vysokou spotrebou energie, ktorými sú okrem namáhaných orgánov aj nádorové bunky. Vďaka atómu fluóru, ktorý neumožňuje metabolizmus pripravenej FDG v procese glykolýzy, dochádza k jej hromadeniu a „uduseniu“ nádorových buniek. Neskôr, po vyvinutí pozitronovej emisnej tomografie bola molekula vďaka svojim vlastnostiam navrhnutá ako rádiofarmakum a značená izotopom ^{18}F bola prvýkrát pripravená Idom v roku 1978.⁵



Obr. 1: Štruktúrny vzorec ^{18}F FDG.

1.2 Kovové rádioizotopy

Záujem o pozitronovú emisnú tomografiu neustále rastie, vďaka čomu sa rozvíja nie len používaná technika, ale aj podávané rádiofarmaká. V súčasnosti sa pomerne intenzívne upriamuje pozornosť na skúmanie vhodných nosičov pre menej tradičné izotopy kovov ($^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{86}Y), medzi ktoré patrí aj niekoľko izotopov medi a gália (^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga).⁶ Jedným z najslubnejších z hľadiska dostupnosti a lekárskeho potenciálu sa zdá byť v súčasnosti intenzívne skúmaný rádioizotop gália ^{68}Ga [89% β^+ ; $\tau_{1/2} = 67.7$ min; $E_{\text{av}}(\beta^+) = 740$ keV],^{6c,7} ktorého polčas rozpadu aj energia uvoľneného pozitronu odpovedá požiadavkám na pozitronový žiarič PET.

1.2.1 Rádioizotopy gália používané v nukleárnej medicíne

Prírodné gárium sa vyskytuje v dvoch stabilných izotopoch, a to ^{69}Ga a ^{71}Ga . Okrem nich má gárium ešte asi tridsať rádioaktívnych izotopov, z ktorých pre účely nukleárnej medicíny sú najviac využívané ^{67}Ga , ^{68}Ga , a v poslednej dobe je skúmané aj ^{66}Ga .^{7b}

Izotop ^{67}Ga má z týchto izotopov gália najdlhší polčas rozpadu (3,26 dní) a ako žiarič, ktorý rozpadom emituje fotón, je vhodný pre vyšetrenia SPECT. Je produkován bombardovaním obohateného zinku-68 protónmi v cyklotróne.⁸ Pacientom sa podáva najčastejšie v podobe galitej soli kyseliny citrónovej, ktorá disociuje, a voľné, aktívne, galité ióny tak môžu interagovať s okolím.⁹ Predpokladá sa, že gárium je v oblastiach zápalov, nádorov a chronických infekcií vychytávané vďaka podobným koordinačným vlastnostiam so železom, a to najmä do proteínov obsahujúcich trojmocné železo, akými sú napríklad feritín, transferín alebo laktoferín. Po podaní sa počas prvých 24 hodín z tela väčšina podanej aktivity vylúči obličkami, avšak aj vďaka vysokej afinite gália k fosforečnanom je ešte niekoľko dní po podaní rádiofarmaka pozorovaná aktivita na skelete.

Izotop ^{68}Ga je naopak pre svoj kratší polčas rozpadu ($T_{1/2} = 67,7$ min) a emitujúce pozitrony vhodný pre vyšetrenia PET.^{6c,7e} Pripravuje sa v generátoroch^{7a,10} rozpadom materského nuklidu ^{68}Ge ($T_{1/2} = 271$ d), absorbovaného najčastejšie na matici TiO_2 alebo SnO_2 . Pacientom sa taktiež nepodáva voľný, ale viazaný na vhodnom nosiči.

1.2.2 Gárium a jeho koordinačné vlastnosti

Gárium je kov 4. periódy a 13. skupiny periodickej tabuľky prvkov s elektrónovou konfiguráciou $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^1$, a teda s najčastejším oxidačným číslom +3. Vo vodnom prostredí sú galitné katióny hydratované vo forme $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ a stabilné len v silno kyslom prostredí. Pri pH v rozmedzí približne 3,5 – 7 sa galitné katióny zrážajú ako koloidný $\text{Ga}(\text{OH})_3$ a pri vyššom pH sa tvorí vo vode rozpustný komplex $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$. Pre naviazanie galitých katiónov do komplexu je tak najvhodnejšie pH menšie ako 4, pretože koordinácia ligandu s voľnými iónmi Ga^{3+} je rýchlejšia ako výmena ligandu za hydroxidové anióny.

V rámci teórie HSAB je gárium charakterizované ako tvrdá kyselina, ktorá vytvára pevné komplexy s ligandmi obsahujúcimi tvrdé donorové atómy. Ide najmä o atómy kyslíka, ktoré sú napríklad v karboxylátoch, fosfonátoch a fosfinátoch. V komplexoch gárium preferuje koordinačné číslo 6 s oktaedrickým okolím.

Spomenuté podobné koordinačné vlastnosti gália so železom sú dané najmä tým, že iónové polomery katiónov Ga^{3+} a Fe^{3+} sú takmer zhodné (62 pm pre Ga^{3+} a 60 pm pre Fe^{3+}).¹¹ Táto podobnosť bola sledovaná na molekule transferínu, čo je bielkovina v krvnej plazme, zodpovedná za transport železa do tkanív. Obsahuje dve väzbové miesta veľmi selektívne pre katión Fe^{3+} ($\log K \approx 23$). Pri fyziologických podmienkach (pH = 7,4) bola sledovaná výmena Fe^{3+} za Ga^{3+} , s ktorým bielkovina takisto vytvárala veľmi stabilný komplex ($\log K \approx 20$).¹²

1.3 Makrocyclické deriváty ako ligandy

Voľný kov sa v organizme ukladá v tkanivách, preto ho treba viazať do komplexu, ktorý je termodynamicky stály a kineticky inertný. Vzniknutý komplex by následne vďaka svojim vlastnostiam, akými sú napríklad lipofilita či hydrofilita, hodnoty protonizačných konštánt alebo schopnosti naviazať sa na určitú biomolekulu, mohol byť vhodný pre transport a prípadné naviazanie na presne určené miesto.

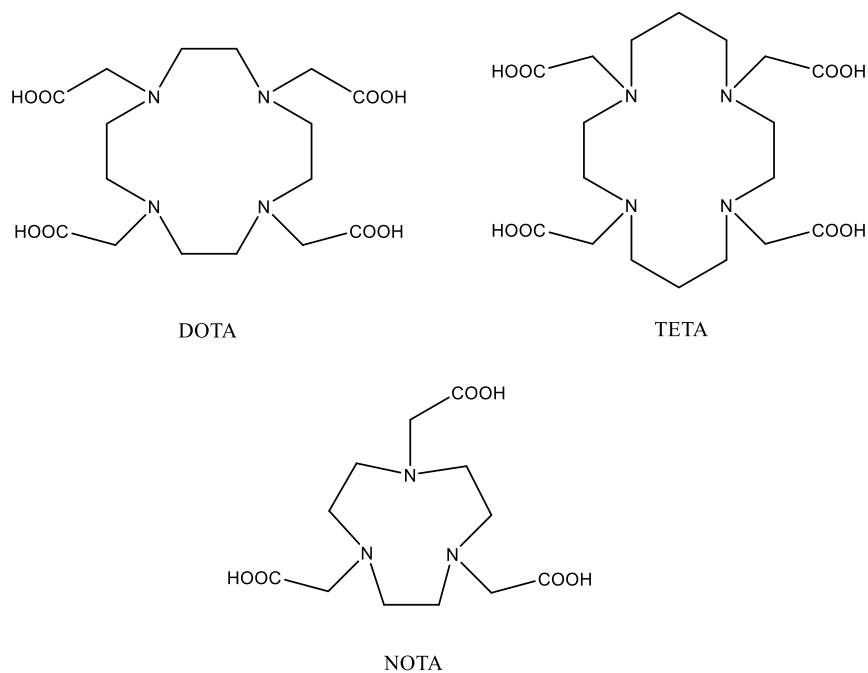
Ligandy, ktoré boli pripravené na selektívnu komplexáciu kovových iónov, možno rozdeliť na lineárne alebo cyklické, pričom obe skupiny vykazujú odlišné vlastnosti

z hľadiska tvorby a stálosti komplexu. Výhodou lineárnych ligandov je rýchlosť komplexácie a ich termodynamická stabilita, značnou nevýhodou je ich rýchly rozpad. Pre účely pozitronovej emisnej tomografie je nutná kinetická stálosť komplexu, aby nedochádzalo k nekontrolovanej distribúcii voľných katiónov kovov, a preto sú uprednostňované skôr cyklické ligandy. Tie síce vytvárajú komplexy s kovovými iónmi pomalšie, avšak značnou výhodou je ich vysoká termodynamická a kinetická stabilita.¹³

Z cyklických molekúl sú okrem iných látok skúmané makrocyclické molekuly, založené na 9, 12 alebo 14-členných kruhoch s 3 alebo 4 atómami dusíka. Ide najmä o deriváty substituovaných makrocyclov NOTA (derivát TACN), DOTA (derivát cyklénu) alebo TETA (derivát cyklámu)^a (Obr. 2), ktoré selektívne vytvárajú komplexy s iónmi kovov, pre ktoré dutina vo vnútri makrocyclov odpovedá ich veľkosti iónu.

Skúmaným ligandom pre gárium je makrocyclov TACN s dutinou vhodnou pre malé kovové ióny vyžadujúce oktaedrické okolie. Nesubstituovaný komplexuje pomaly,¹⁴ avšak rýchlosť komplexácie možno zvýšiť substituovaním vodíkov na dusíkoch makrocyclov, najmä ak pendantné rameno obsahuje viac ako jednu donorovú skupinu. Najčastejšie ide o skupiny $-\text{CH}_2\text{COOH}$ alebo zvyšky derivátov kyselín fosforu k makrocyclov viazaných metylénovou skupinou $(-\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{R})\text{OH})$. Ión kovu s takto substituovaným makrocyclovom môže vytvoriť buď stabilný in-cage komplex, v ktorom sú dusíky makrocyclov koordinované, alebo out-of-cage komplex s pendantnými ramenami, v ktorom sú dusíky makrocyclov protonizované. Out-of-cage komplex sa rýchlo rozpadá, avšak vzniká rýchlejšie. Preto sa predpokladá, že pendantné ramená s donorovými atómami najprv zachytia a stabilizujú katión kovu, čo spôsobí, že sa kovový ión priblíži k makrocyclovu, a tým sa urýchli vznik in-cage komplexu. Výhodou tohto mechanizmu pri koordinácii galitých iónov je, že vzniknutý out-of-cage komplex zabraňuje vzniku koloidného hydroxidu gália, ktorý by bránil komplexácii s makrocyclovom.

^a Ak nie je diskutované presné zloženie látok, nie je v skratke zohľadňovaný ani náboj ani protonizačný stav.



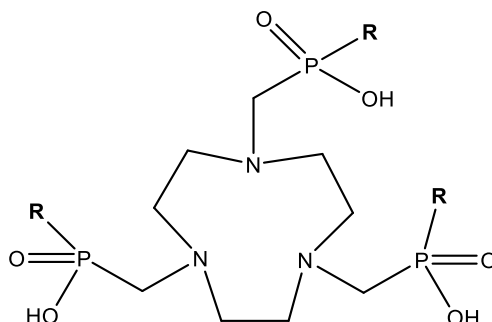
Obr. 2: Makrocyclické deriváty používané ako ligandy na selektívnu komplexáciu kovových iónov.

Najvýznamnejším derivátom TACN je NOTA. V prípade, že je nutné komplexovať kovový ión v silno kyslej oblasti pH (napr. gálium), je ako ligand lepší makrocyclus TACN s naviazanými fosfinátmi namiesto karboxylátových skupín. Širšia škála pH vhodná na komplexáciu kovov je možná vďaka nižšej hodnote pK_a fosfinovej kyseliny (<1 pre fosfinovú kyselinu, približne 4 pre alifatické karboxylové kyseliny).¹⁵ Acidita alebo bazicita skupiny obsahujúcej fosfor je závislá na jeho substituentoch.

Pre ^{68}Ga -PET boli na sledovanie funkcie obličiek, konkrétne glomerulárnej filtrácie, pre ^{68}Ga skúšané ligandy EDTA, DTPA, DOTA a NOTA, pričom bola sledovaná interakcia s červenými krvinkami a krvnou plazmou myši.¹⁶ Okrem DTPA vykazovali všetky ligandy kvantitatívny výtazok reakcie s ^{68}Ga , pričom komplex s NOTA sa v krvi rozpadal najmenej a ligand bol tak vyhodnotený ako nejperspektívnejší.

Pre selektívnu komplexáciu gália boli tiež navrhnuté a pripravené deriváty, tzv. TRAP (1,4,7-triazacyklononán-fosfinová kyselina) ligandy (Obr. 3).¹⁴ Deriváty obsahujúce naviazané metylénfosfinové (TRAP-H) a metyl(hydroxymetyl) fosfinové (TRAP-OH) pendantné rameno vykazujú vysokú termodynamickú selektivitu pre ióny Ga^{3+} oproti dvojmocným (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) a trojmocným katiónom (La^{3+} , Gd^{3+} , Y^{3+}) ($\log K_{\text{GaL}} - \log K_{\text{ML}} = 7-9$).

Zvlášť pripravený derivát obsahujúci propionátové pendantné rameno (TRAP-Pr) bol skúmaný hlavne ako nosič pre izotop ^{68}Ga na účely pozitronovej emisnej tomografie.^{7c} Vysokú stabilitu a rýchlu a selektívnu komplexáciu vykazoval aj v prípade rádiochemického značenia. Komplex taktiež vzniká predpokladaným mechanizmom cez out-of-cage komplex a rozpadá sa extrémne pomaly v silno kyslej a takisto alkalickéj oblasti pH, čo zabraňuje nekontrolovateľnému uvoľneniu iónov Ga^{3+} v tele pacienta.



Obr. 3: TRAP-ligandy: TRAP-H ($\mathbf{R}=\text{H}$), TRAP-OH ($\mathbf{R}=\text{CH}_2\text{OH}$) a TRAP-Pr ($\mathbf{R}=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$).^{7c,14}

Konštanty stabilit komplexov gália sú závislé na bazicite donorových atómov, čo spôsobuje, že hodnoty $\log K_{\text{GaL}}$ spomenutých TRAP-ligandov a ligandu NOTA, klesajú v poradí $[\text{Ga}(\text{NOTA})] > [\text{Ga}(\text{TRAP-Pr})] > [\text{Ga}(\text{TRAP-OH})] > [\text{Ga}(\text{TRAP-H})]$ (Tab. 1.3).^{7c,14}

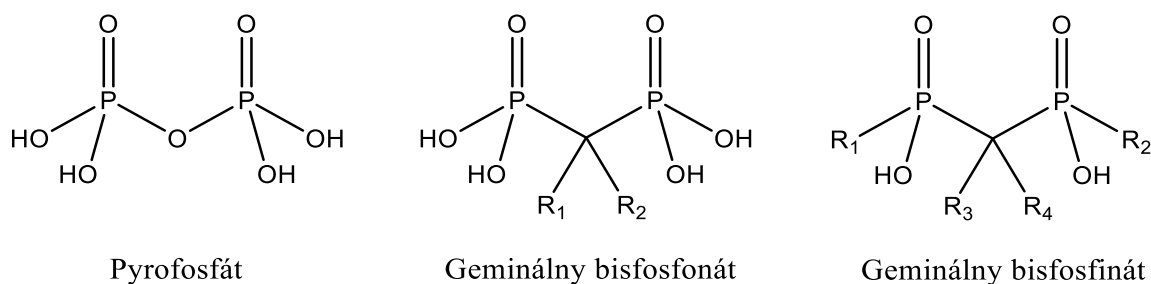
Tab. 1.3: Stanovené hodnoty konštant stability $\log K_{\text{GaL}}$ pre ligandy spomenuté v texte.^{7c,14}

	$[\text{Ga}(\text{TRAP-H})]$	$[\text{Ga}(\text{TRAP-OH})]$	$[\text{Ga}(\text{TRAP-Pr})]$	$[\text{Ga}(\text{NOTA})]$
$\log K_{\text{GaL}}$	21,9	23,3	26,2	29,6

1.4 Fosforové pendantné ramená

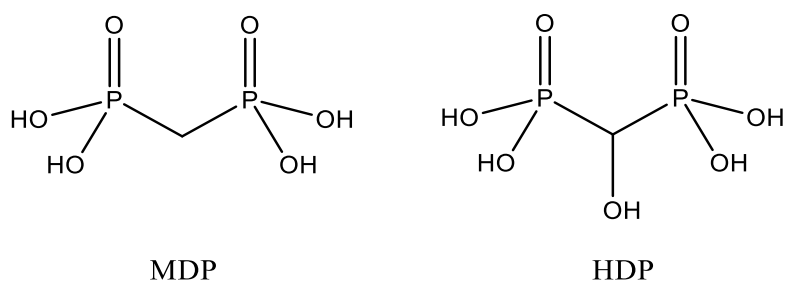
V súvislosti s nukleárnou medicínou založenou na rádioizotopoch kovov je spájaná rada organofosforových zlúčenín, z ktorých najintenzívnejšie skúmané sú bis(fosfonáty). Tieto zlúčeniny obsahujú dve fosfonátové skupiny a v prípade, že sú obe naviazané na jeden uhlík, patria do skupiny geminálnych bis(fosfonátov). Formálne ide o analógy pyrofosfátu (Obr. 4).

Vďaka malej vzdialenosti dvoch fosfonátových skupín majú geminálne bis(fosfonáty) silnú schopnosť chelatácie.¹⁷



Obr. 4: Štruktúra pyrofosfátu a jeho organofosforových analógov.

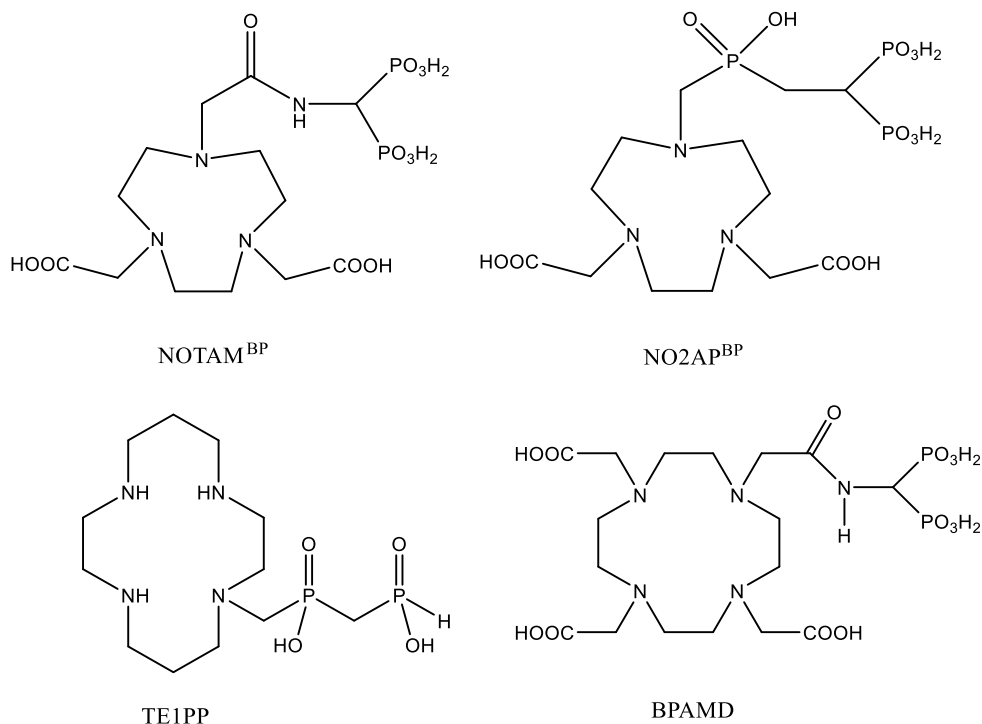
Geminálne bis(fosfonáty) sa začali vo väčšom používať od začiatku štyridsiatych rokov, kedy sa zistilo, že značené rádioizotopom sú dobrým rádiofarmakom pri scintigrafii. Jedným z prvých používaných izotopov bolo ^{99m}Tc, ktoré je používané dodnes, najčastejšie viazané na oxidronát (používaná skratka HDP) alebo metylén-bis(fosfonát) (používaná skratka MDP) (Obr. 5).¹⁸ Vyšetrenia využívajú vysokú afinitu geminálnych bis(fosfonátov) k hydroxyapatitu a to, že väzba P–C–P, ktorú obsahujú, je tepelne aj chemicky vysoko stabilná. Geminálne bis(fosfonáty) tvoria dôležitý základ pri liečení kostných ochorení, akými sú napríklad osteoporóza, Pagetova choroba alebo rakovina.¹⁹



Obr. 5: V scintigrafii používané fosfonáty spomenuté v texte.

Rozvojom nukleárnej medicíny sa rozšírila aj škála používaných rádioizotopov kovov (izotopy spomenuté pri metódach SPECT a PET), a tiež aj látok s naviazanými fosfonátmi. Intenzívne skúmané sú vlastnosti látok, v ktorých sú geminálne bis(fosfonáty) viazané na makrocikly ako pendantné ramená.^{6c}

Pre gárium boli s geminálnou bis(fosfonátovou) skupinou navrhnuté a charakterizované ligandy NOTAM^{BP} a NO2AP^{BP} (Obr. 6), ktoré boli značené izotopom ⁶⁸Ga a testované *in vivo* na myši.^{6c} Testy ukázali, že oba ligandy by mohli byť použiteľné pre vyšetrenia ⁶⁸Ga-PET pri sledovaní kostných tkanív.



Obr. 6: Ligandy obsahujúce geminálne bis(fosfonáty) a bis(fosfináty), spomínané v texte.^{6c,20,21}

Vhodným ligandom obsahujúcim makrocyklus s bis(fosfonátovou) pendantnou skupinou pre vyšetrenie PET/CT je aj ligand BPAMD (Obr. 6), ktorý bol testovaný v ľudskom organizme.²⁰ Ligand značený ⁶⁸Ga, produkovaným v ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátore, vykazoval pri testoch dobré vlastnosti na sledovanie kostných ochorení. Jeho hlavnou výhodou v porovnaní s rozšírenými ¹⁸F-PET vyšetreniami je, že jeho adsorpcia na kostné tkanivo nezávisí na prekrvení kosti, ale viaže sa najmä na miesta, kde je kostné tkanivo poškodené.

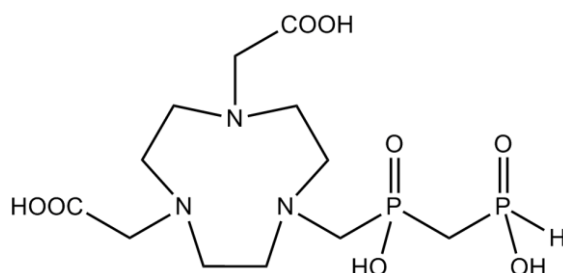
Nevýhodou geminálnych bis(fosfonátov) je, že vďaka ich vysokej afinite ku kostným tkanivám, nie je možné ich uplatnenie pri liečbe a diagnostike iných ochorení.¹⁹ Podobné koordinačné vlastnosti majú geminálne bis(fosfináty), ktoré takisto obsahujú stabilný fragment P–C–P, ale ich afinita k hydroxyapatitu je pomerne malá, čím sa ich použitie stáva viac univerzálne.²² Ponúkajú tiež väčšiu variabilitu tým, že je možné meniť substituenty na

atómoch fosforu. Pripravený derivát cyklámu TE1PP (Obr. 6) bol navrhnutý pre značenie rádioizotopom ^{64}Cu , s ktorým ligand vytváral rýchlo vznikajúci, termodynamicky stabilný a kineticky inertný komplex.²¹

1.5 Cieľ práce

Cieľom tejto práce je syntéza a charakterizácia ligandu, ktorý by urýchlil selektívnu komplexáciu gália do makrocyklu TACN. Navrhnutý ligand je substituovaný makrocyklus NOTA s bis(fosfínátovým) pendatným ramenom, ktoré by malo byť vďaka jeho vysokej afinite ku Ga^{3+} zodpovedné za urýchlenie koordinácie kovu na ligand.

Potenciometricky budú stanovené protonizačné konštanty ligandu a konštanty stability jeho komplexov s vybranými iónmi kovov. Bude sledovaná kinetika tvorby galitého komplexu s ligandom pri rôznych hodnotách pH. Zo získaných výsledkov bude tak možné zistiť, či je daný komplex možné použiť na selektívnu koordináciu galitých katiónov, potenciálne ako základ ^{68}Ga -PET.

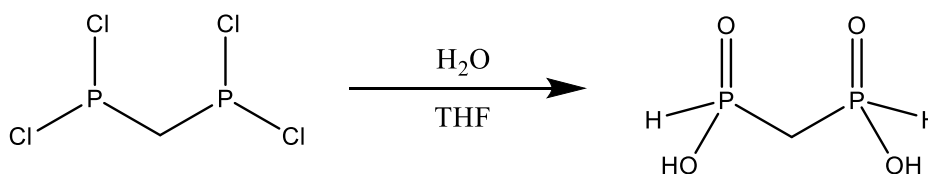


Obr. 7: Štruktúrny vzorec študovaného ligandu $\text{H}_4\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$.

2 Experimentálna časť

2.1 Použité chemikálie

Väčšina použitých chemikálií a všetky rozpúšťadlá boli získané z bežne dostupných komerčných zdrojov. Metylén-bis(fosfínová) kyselina bola získaná hydrolyzou $\text{CH}_2(\text{PCl}_2)_2$ (Obr. 8) podľa publikovaného postupu.²³



Obr. 8: Schéma syntézy metylén-bis(fosfínovej) kyseliny.

2.2 Metódy charakterizácie

2.2.1 Elementárna analýza - EA

Elementárna analýza bola prevedená v Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf (Nemecko). Výsledky sú uvedené v tvare: „vypočítaná hodnota“ („stanovená hodnota“).

2.2.2 Hmotnostná spektrometria - MS

Hmotnostné spektrá boli merané na prístroji Bruker ESQUIRE 300. Tento spektrometer využíva ionizáciu vzoriek pomocou elektrospreja a je vybavený iónovou pascou. Boli namerané spektrá kladných aj záporných iónov.

2.2.3 Nukleárna magnetická rezonancia - NMR

NMR spektrá boli merané na spektrometroch Varian NMR System 300MHz, Bruker AVANCE III HD 400 MHz a Bruker Avance III 600MHz. Rezonančné frekvencie meraných jadier pre príslušný spektrometer sú uvedené v Tab. 2.2.3.

Tab. 2.2.3: Merané jadrá a ich rezonančné frekvencie.

	VNMRS 300 (MHz)	BAlIHD 400 (MHz)	BAlI 600 (MHz)
¹ H	299,94	400,13	600,17
¹³ C	75,4	100,6	150,9
³¹ P	121,4	162,0	–
⁷¹ Ga	–	122,0	–

Spektrá boli merané v 5mm kyvetách a ako rozpúšťadlá boli používané H₂O, D₂O (99,95 %) alebo 10% D₂O. Chemické posuny ¹H a ¹³C-NMR spektier boli referencované na *t*BuOH ($\delta_{\text{H}} = 1,25$ ppm; $\delta_{\text{C}} = 30,3$ ppm). ³¹P-NMR spektrá boli referencované na externý štandard 85% H₃PO₄ ($\delta_{\text{P}} = 0,0$ ppm). ⁷¹Ga-NMR spektrá boli referencované na externý štandard [Ga(OH)₄]⁻ v 1M NaOH ($\delta_{\text{Ga}} = 224,4$ ppm).

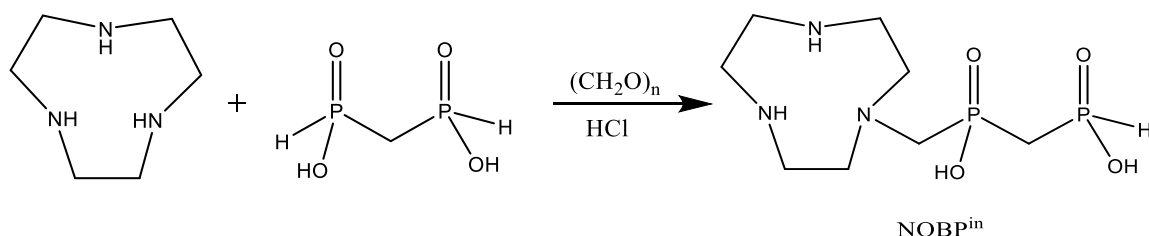
2.2.4 Röntgenoštruktúrna analýza

Kryštálové štruktúry boli merané Dr. Ivanou Čisařovou na difraktometre Bruker D8 VENTURE Kappa Duo PHOTON100 s použitím žiarenia CuK α s vlnovou dĺžkou 1.54178 Å. Kryštálové štruktúry boli spresnené doc. Janom Kotkom.

Do 4ml vialky bol v 50 μ l H₂O rozpustený ligand H₄NO₂ABPⁱⁿ·2,5 H₂O (0,0078 g; 17,5 μ mol) a hydroxid litný (0,0030 g; 71,5 μ mol). Roztok bol prevrstvený 3 ml izopropanolu. O 2 dni boli získané kryštály vhodné pre RTG analýzu.

2.3 Syntéza

2.3.1 Kyselina 1,4,7-triazacyklononán-1-metylén-bis(fosfínová) (NOBPⁱⁿ)



Obr. 9: Schéma 1. reakcie

Suspenzia TACN (7,02 g; 54,42 mmol), metylén-bis(fosfínovej) kyseliny (3,65 g; 25 mmol) a paraformaldehydu (0,40 g, 13,3 mmol) v 6M kyseline chlorovodíkovej (40 ml) bola 4 dni miešaná pri 40 °C. Po ochladení na RT bol obsah banky odparený na RVO. Odparok bol rozpustený vo vode a znova odparený na RVO. Získaný odparok bol rozpustený v malom množstve vody a čistený na silnom anexe (Amberlite IRA 402; OH⁻ cyklus; 200 ml; H₂O → 20% AcOH), kde bol zbavený nezreagovaného makrocyklu. Frakcie vymyté zriedenou kyselinou octovou boli spojené, a následne čistené na silnom katexe (DOWEX 50; H⁺ cyklus; 200 ml; H₂O → 10% pyridín). Pyridínové frakcie obsahujúce produkt boli spojené, odparené a lyofilizované. Produkt NOBPⁱⁿ bol získaný vo forme bieleho hygroskopického prášku (1,35 g; 36 %).

Charakterizácia:

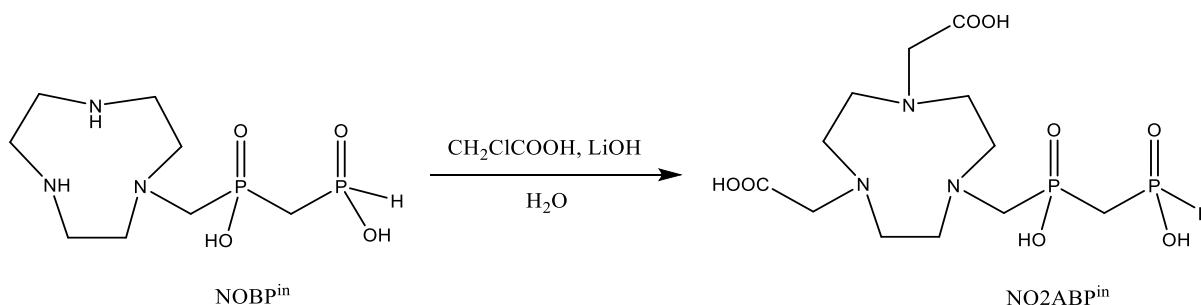
MS: (-) 284,0 [M-H⁺]⁻

(+) 286,2 [M+H⁺]⁺; 308,2 [M+Na⁺]⁺; 324,1 [M+K⁺]⁺

NMR (D₂O + NaOD, pD ~11): ¹H δ 2,06 (P—CH₂—P, ddd, 2H, ²J_{HP} = 18 Hz; ²J_{HP} = 16 Hz; ³J_{HH} = 2 Hz); 2,88 (cyklus, t, 4H, ³J_{HH} = 6 Hz); 2,94 (cyklus, t, 4H, ³J_{HH} = 6 Hz); 3,00 (N—CH₂—P, d, 2H, ²J_{HP} = 7 Hz); 3,02 (cyklus, s, 4H); 7,13 (PH, dd, 1H, ¹J_{HP} = 531 Hz, ³J_{HH} = 2 Hz); ¹³C{¹H} δ 35,8 (P—CH₂—P, dd, ¹J_{CP} = 77 Hz, ¹J_{CP} = 74 Hz); 43,8 (cyklus, s); 44,4 (cyklus, s); 52,2 (cyklus, d, ³J_{CP} = 6 Hz); 57,4 (N—CH₂—P, d, ¹J_{CP} = 110 Hz); ³¹P δ 18,3 (PH, dm, 1P, ¹J_{PH} = 531 Hz); 32,0 (P—CH₂—N, m, 1P)

2.3.2 Kyselina 1,4,7-triazacyklononán-1-metylén-bis(fosfín)-4,7-bis(octová) (NO2ABPⁱⁿ)

(produkt bol získaný vo forme H₄NO2ABPⁱⁿ·2,5 H₂O)



Obr. 10: Schéma 2. reakcie.

K roztoku H₂NOBPⁱⁿ (0,25 g; 0,88 mmol) a kyseliny chlóractovej (0,50 g; 5,31 mmol) v destilovanej vode (10 ml) bol pridaný hydroxid litný (0,63 g; 15,04 mmol). Vzniknutá suspenzia bola miešaná 2 dni pri 60 °C. Obsah banky bol odparený na RVO a čistený na silnom katexe (DOWEX 50; H⁺ cyklus; 200 ml; H₂O). Frakcie s produktom boli spojené a odparené na RVO. Produkt bol lyofilizovaný a získaný vo forme bieleho prášku (0,30 g; 76 %).

Reakcia bola ešte trikrát analogicky zopakovaná, pričom bol spotrebovaný všetok ligand NOBPⁱⁿ. Po všetkých reakciách boli lyofilizáty rozpustené v H₂O, spojené a opäť lyofilizované. Produkt NO2ABPⁱⁿ bol získaný vo forme bieleho prášku. (1,54 g; 73 %).

Charakterizácia:

EA: (C₁₂H₂₅N₃O₈P₂·2,5H₂O, M_R = 446,3): C 32,3 (32,4); H 6,8 (6,4); N 9,4 (9,7)

MS: (-) 400,5 [M-H⁺]⁻

(+) 402,7 [M+H⁺]⁺; 424,7 [M+Na⁺]⁺; 440,7 [M+K⁺]⁺

NMR (D₂O, pD = 1,05): ¹H δ 2,21 (CH₂-PH, t, 2H, ²J_{HP} = 16,8 Hz); 3,30 (cyklus, s, 4H); 3,36 (N-CH₂-P, d, 2H, ²J_{HP} = 10,3 Hz); 3,43 (cyklus, s, 4H); 3,51 (cyklus, s, 4H); 3,86 (CH₂-CO, s, 4H); 7,01 (PH, d, 1H, ¹J_{HP} = 555,6 Hz); ¹³C δ 35,7 (CH₂-PH, dd, ¹J_{CP} = 83,3 Hz, ¹J_{CP} = 78,1 Hz); 49,6 (cyklus, s); 51,3 (cyklus, s); 52,2 (cyklus, s); 56,2 (CH₂-CO, s); 57,2 (N-CH₂-P, d, ¹J_{CP} = 92,7 Hz); 171,2 (CO, s); ³¹P δ 20,0 (PH, dt, 1P, ¹J_{PH} = 555,6 Hz, ²J_{PH} = 16,6 Hz); 22,2 (P-CH₂-N, s, 1P)

2.4 Komplexácia iónov Ga³⁺

Bol sledovaný vznik komplexu ligandu NO₂ABPⁱⁿ s galitými iónmi pri pH 0, 1 a 2,8. Na zaistenie kyslého pH počas vytvárania komplexu boli použité roztoky kyselín/pufrov. Pre pH 0 bol použitý roztok 2M HClO₄, pre pH 1 0,2M HClO₄ a pre pH 2,8 bol použitý pufor 2M CH₂ClCOOH/NaOH.

Priebeh vzniku komplexov bol sledovaný pri 25 °C pomocou NMR spektrometra Bruker AVANCE III HD 400 MHz. Boli merané ⁷¹Ga-NMR spektrá, v ktorých boli signály ⁷¹Ga referencované a kvantifikované voči insertu [Ga(OH)₄]⁻ (δ_{Ga} = 224,4 ppm), pripraveného s koncentráciou 0,1M Ga³⁺ v 1M NaOH v D₂O.

Boli pripravené 3 vialky s celkovými objemami 0,5 ml. Do každej bolo automatickou pipetou napipetovaných 106 μl 47,1mM (0,0050 mmol) roztoku ligandu, 106 μl 47,1mM (0,0050 mmol) roztoku Ga(NO₃)₃, 250 μl roztoku príslušnej kyseliny/pufrov a 38 μl vody. Do každej kyvety bol vložený insert s [Ga(OH)₄]⁻ a v nastavených časových intervaloch boli merané ⁷¹Ga-NMR spektrá.

2.5 NMR titrácie

Bol pripravený zásobný roztok ligandu, rozpustením H₄NO₂ABPⁱⁿ·2,5 H₂O (100,5 mg; 0,23 mmol) v 5 ml 10% D₂O (4,5 ml H₂O a 0,5 ml D₂O). Do 10 NMR kyviet bolo napipetovaných 0,5 ml zásobného roztoku ligandu a pre jednu z týchto kyviet boli bez úpravy pH zmerané NMR posuny jadier ¹³C, ¹H a ³¹P. Následne bolo upravované pH vo všetkých kyvetách prídavkami 0 – 10 μl 3% roztoku HCl, 10% roztoku CsOH, 1% roztoku CsOH a 0,1% roztoku CsOH. Vzorky s bázičným pH 13,5 a 14 boli pripravené do ďalších kyviet, rozpustením ligandu H₄NO₂ABPⁱⁿ·2,5 H₂O (10 mg; 22,4 μmol) v 0,5 ml 0,3M a 1M CsOH v 10% D₂O. Spektrá boli merané na prístroji Bruker AVANCE III HD 400 MHz.

2.6 Potenciometrické titrácie

Protonizačné konštanty ligandu NO₂ABPⁱⁿ a konštanty stability s vybranými katiónmi boli sledované potenciometricky. Potenciál bol meraný kombinovanou sklenenou

argentochloridovou elektródou GK 240C na pH metri PHM 240 (s presnosťou 0,1 mV), titračný roztok bol pridávaný automatickou byretou 2-ml ABU 900 (s presnosťou 0,001 ml). Presné objemy používaných roztokov boli do titračnej nádoby pipetované pomocou pipiet s mikrometrickým šróbom s objemami ~2,5 ml, ~1,25 ml a ~0,5 ml (presný objem každej z nich bol zistený hmotnostnou kalibráciou redestilovanou vodou, výrobca VŠCHT Pardubice a META Brno).

Titračie a kalibrácie boli prevádzané pri teplote $25,0 \pm 0,1$ °C v inertnej atmosfére argónu, ktorý bol nasýtený vodnou parou (po nasýtení vodnou parou bol roztok argónu vedený cez $0,100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NMe₄Cl roztok). Titračným roztokom bol NMe₄OH s koncentráciou $0,2186 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Používaná deionizovaná voda bola pripravená na katedre Analytickej chémie PĚF UK. Celková doba titračie sa pohybovala v rozpätí 25–100 minút. Získané dáta boli spracované pomocou programu OPIUM.²⁴

Celkovú konštantu popisujúcu protonizáciu ligandu popisuje nasledujúci vzťah:

$$\beta_{\text{HL}} = [\text{H}_h\text{L}_l] / [\text{H}^h] \cdot [\text{L}^l]. \quad (2.1)$$

Celkové konštanty stability komplexov s iónmi kovu sú definované analogicky:

$$\beta_{\text{MHL}} = [\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l] / [\text{M}^m] \cdot [\text{H}^h] \cdot [\text{L}^l]. \quad (2.2)$$

Vzťah medzi celkovou konštantou β a konzekutívnymi disociačnými konštantami $\text{p}K_a$ vyjadruje nasledujúca rovnica:

$$\text{p}K_a = \log \beta_n - \log \beta_{(n-1)}. \quad (2.3)$$

Pri výpočtoch boli najprv z kalibračnej titračie získané hodnoty parametrov elektródy E_0 , S , J_a a J_b pre kalibračnú funkciu:

$$E = E_0 + S \cdot \log[\text{H}^+] + J_a \cdot [\text{H}^+] + J_b \cdot K_w / [\text{H}^+], \quad (2.4)$$

kde E_0 je štandardný potenciál elektródy, S je tzv. Nernstova smernica, J_a a J_b vyjadrujú odchýlku od lineárnej závislosti E na $-\log[\text{H}^+]$ v silno kyslej a zásaditej oblasti a K_w je iónový súčin vody.

Hodnota záporného dekadického logaritmu K_w ($\text{p}K_w = 13,81$) pre iónovú silu roztoku $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pri 25 °C a konštanty stability hydroxokomplexov jednotlivých iónov kovov boli prevzaté z literatúry.²⁵ Jednotlivé titračné krivky boli prepočítané na závislosti pH na prídavku titračného činidla. Následne boli nelineárnou

regresiou metódou najmenších štvorcov spočítané hodnoty konštant β_{HL} a β_{MHL} , z ktorých boli vypočítané teoretické titračné krivky a distribučné diagramy častíc v jednotlivých systémoch.

Zásobný roztok ligandu s približnou koncentráciou $0,020 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ bol pripravený kvantitatívnym prevedením ligandu ($0,4208 \text{ g}$; $0,94 \text{ mmol}$) naváženého diferenčným vážením do kalibrovanej 50 ml odmernej banky, v ktorej bol rozpustený v deionizovanej vode. Koncentrácia zásobného roztoku ligandu bola spresnená pri výpočte disociačných konštant programom OPIUM.²⁴

Roztoky dusičnanu nikelnatého, zinočnatého a galitého ($c = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ približne presne) a chloridu meďnatého ($c = 0,06 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ približne presne) boli pripravené rozpustením navážok rekryštalizovaných solí v deionizovanej vode. Ich presná koncentrácia bola stanovená chelatometricky.

Do titračnej nádoby (in-cell titrácie) boli pomocou pipiet s mikrometrickým šróbom napipetované presné objemy roztoku kyseliny chlorovodíkovej s koncentráciou $0,312 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (v $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku NMe_4Cl), deionizovanej vody, roztoku solí kovov, roztoku ligandu a v niektorých prípadoch aj roztoku kyseliny chlorovodíkovej s koncentráciou $0,245 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ tak, aby iónová sila konečného roztoku bola $0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a koncentrácia ligandu bola $4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Celkový objem v nádobke bol vždy 5 ml presne. Objemy pipetovaných roztokov sú uvedené v Tab. 2.6.1 – 2.6.4.

Pred každou sériou meraní bola titračná nádobka vymytá a vysušená, bubliny z hadíc boli odstránené, aparátúra bola vytemperovaná a bol nastavený prúd argónu. Elektróda bola pre urýchlenie odozvy dvakrát striedavo ponorená do kyslého a bázického roztoku (striedanie po cca 5 minútach v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztokoch HCl a KOH) a boli prevedené dve kalibračné titrácie. Pri nich bol titrovaný roztok pripravený zmiešaním $\sim 2,5 \text{ ml}$ deionizovanej vody a $\sim 2,5 \text{ ml}$ pripraveného roztoku zriedenej kyseliny chlorovodíkovej a titrovaný NMe_4OH pri rovnakých podmienkach ako pri vlastných titráciach v rozmedzí $\text{pH } 1,4 - 12,2$. Titračný roztok bol pridávaný automatickou byretou, pričom ústie teflónovej hadičky, pridávajúcej titračný roztok hydroxidu, bolo ponorené pod hladinu roztoku v titračnej nádobke blízko magnetického miešadla. Pre jednotlivé prídavky bola po určitej dobe odčítaná hodnota rovnovážneho potenciálu titrovanej zmesi. Výslednými dátami bola séria dvojíc hodnôt nameraného potenciálu pre príslušný prídavok titračného roztoku hydroxidu. Pred každou titráciou bola titračná nádobka dvakrát vypláchnutá destilovanou vodou a dvakrát acetónom.

Potom boli postupne prevádzané titrácie roztoku obsahujúceho ligand a kov v pomere 1:1 Každá vlastnej titrácii predchádzala kalibračná titrácia. Pred každou sériou titrácií ligand-kov bola prevedená poloautomatická titrácia, z ktorej podľa rýchlosti ustáľovania

rovnovážneho napätia na elektróde bol určený pravdepodobný koniec titrácie a následne aj dávkový súbor pre riadiaci program, ktorý okrem iného obsahoval príkazy určujúce prídavok titračného činidla, čakaciu dobu medzi prídavkami a odčítaním rovnovážneho potenciálu na elektróde a koniec titrácie.

Pre systém ligand – gárium bolo nutné z dôvodu pomalej kinetiky spraviť out-of-cell titráciu. Do každej z 20 ampúl boli pomocou pipiet s mikrometrickým šróbom napipetované presné objemy roztoku kyseliny chlorovodíkovej s koncentráciou $0,312 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (v $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku NMe_4Cl), deionizovanej vody, roztoku dusičnanu galitého a roztoku ligandu tak, aby iónová sila konečného roztoku bola $0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a koncentrácia ligandu bola $4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Celkový objem v každej ampule bol vždy 1 ml presne. Pipetované objemy sú uvedené v Tab. 2.6.5. Potom boli do každej ampule postupne pridané presné objemy titračného činidla – od prídavku $0,146 - 0,204 \text{ ml}$ s krokom $0,004 \text{ ml}$; od prídavku $0,204 - 0,244 \text{ ml}$ s krokom $0,008 \text{ ml}$. Po dvoch týždňoch státia a ustálení rovnováhy v ampulách, bol v každej ampule zmeraný potenciál. Dáta boli spracované analogicky ako pri ostatných titráciách.

Tab. 2.6.1: Pipetované objemy roztokov použité na stanovenie protonizačných konštánt ligandu.

HCl, $c \sim 0,0312 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ presne (v $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku NMe_4Cl)	$\sim 2,506 \text{ ml}$ presne	$\sim 2,005 \text{ ml}$ presne
HCl, $c \sim 0,2451 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ presne	–	$\sim 0,502 \text{ ml}$ presne
Ligand, $c \sim 0,0213 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,999 \text{ ml}$ presne	$\sim 0,999 \text{ ml}$ presne
Deionizovaná voda	$\sim 1,507 \text{ ml}$ presne	$\sim 1,507 \text{ ml}$ presne

Tab. 2.6.2: Pipetované objemy roztokov použité na stanovenie konštánt stability komplexu ligandu so zinočnatými kationmi.

HCl, $c \sim 0,0312 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ presne (v $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku NMe_4Cl)	$\sim 2,506 \text{ ml}$ presne
Ligand, $c \sim 0,0213 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,999 \text{ ml}$ presne
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $c \sim 0,0517 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,405 \text{ ml}$ presne
Deionizovaná voda	$\sim 1,105 \text{ ml}$ presne

Tab. 2.6.3: Pipetované objemy roztokov použité na stanovenie konštant stability komplexu s meďnatými kationmi.

HCl, $c \sim 0,0312 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne (v $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku NMe_4Cl)	$\sim 2,506 \text{ ml}$ presne	$\sim 2,005 \text{ ml}$ presne
HCl, $c \sim 0,2451 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne	–	$\sim 0,502 \text{ ml}$ presne
Ligand, $c \sim 0,0213 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$\sim 0,999 \text{ ml}$ presne	$\sim 0,999 \text{ ml}$ presne
CuCl_2 , $c \sim 0,0630 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,315 \text{ ml}$ presne	$\sim 0,315 \text{ ml}$ presne
Deionizovaná voda	$\sim 1,206 \text{ ml}$ presne	$\sim 1,206 \text{ ml}$ presne

Tab. 2.6.4: Pipetované objemy roztokov použité na stanovenie konštant stability komplexu s nikelnatými kationmi.

HCl, $c \sim 0,0312 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne (v $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku NMe_4Cl)	$\sim 2,506 \text{ ml}$ presne
Ligand, $c \sim 0,0213 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,999 \text{ ml}$ presne
$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $c \sim 0,0523 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,383 \text{ ml}$ presne
Deionizovaná voda	$\sim 1,105 \text{ ml}$ presne

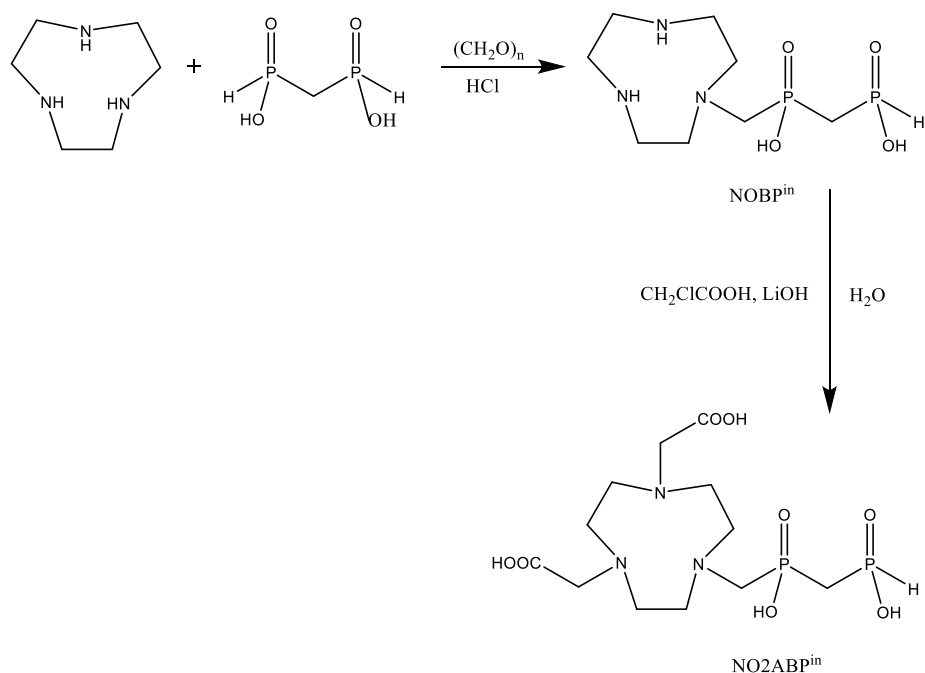
Tab. 2.6.5: Pipetované objemy roztokov do každej ampule, použité na stanovenie konštant stability komplexu s galitými kationmi.

HCl, $c \sim 0,0312 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne (v $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku NMe_4Cl)	$\sim 0,501 \text{ ml}$ presne
Ligand, $c \sim 0,0213 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,200 \text{ ml}$ presne
$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, $c \sim 0,0471 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ presne	$\sim 0,090 \text{ ml}$ presne
Deionizovaná voda	$\sim 0,211 \text{ ml}$ presne

3 Výsledky a diskusia

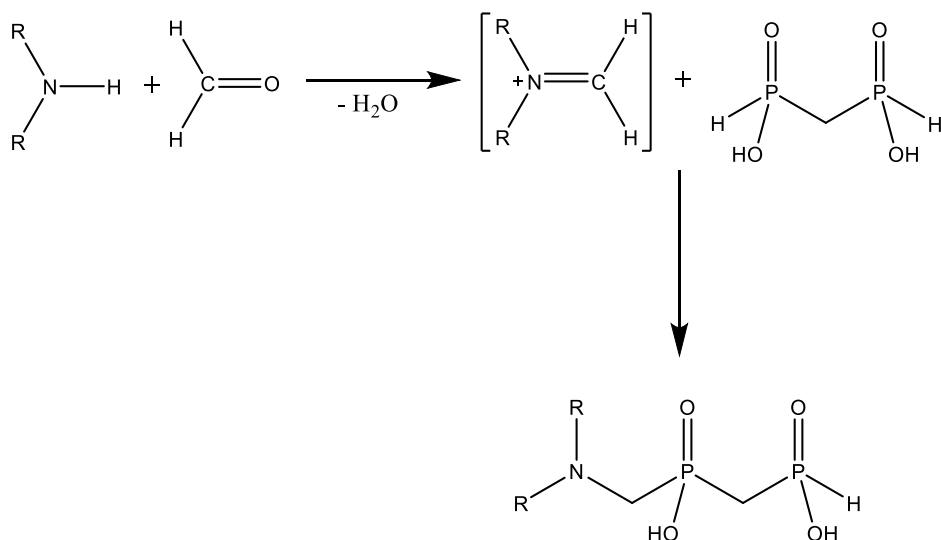
3.1 Syntéza

Ligand bol pripravený podľa postupu znázorneného na Obr. 11. Výhodou syntézy je, že je len dvojkroková, opakovateľná a produkty sa dajú jednoducho izolovať z reakčných zmesí. Nevýhodou syntézy môže byť vysoká cena vstupnej látky TACN. Tá je v prvej reakcii použitá v nadbytku, ale nezreagovaný TACN sa dá rekryštalizovať a použiť znova.



Obr. 11: Schéma syntézy.

Produkt NOBPⁱⁿ bol pripravený kondenzačnou reakciou Mannichovho typu. V týchto reakciách v prvom kroku dochádza k nukleofilnej adícii primárneho alebo sekundárneho amínu na karbonylový uhlík za odštiepenia molekuly vody. Vzniká medziprodukt - Schiffová báza, ktorá je elektrofil, obsahujúci skupinu R₂C = NR' (R' ≠ H). Tá v ďalšom kroku reakcie reaguje mechanizmom elektrofilnej adície s látkou obsahujúcou kyslý protón. V tejto syntéze bol sekundárnym amínom TACN, zdrojom karbonylového uhlíka paraformaldehyd a kyslý protón bol získaný z bis(fosfínovej) kyseliny. Priebeh reakcie je znázornený na Obr. 12.²⁶



Obr. 12: Priebeh reakcie Mannichovho typu.²⁶

V molekule TACN sú všetky 3 atómy dusíka rovnako reaktívne, čo by mohlo pri jednotkovej stechiometrii reaktantov viesť k vzniku nielen mono-, ale aj di- a trisubstituovaného makrocyklu. Z toho dôvodu bola v reakcii zvolená stechiometria TACN : metylén-bis(fosfinová) kyselina : paraformaldehyd ako 4 : 2 : 1. Na odseparovanie produktu od zvyšku reakčnej zmesi boli použité iónomeniče. Najprv bola reakčná zmes delená na silnom anexe, kde bola zbavená prebytočného TACN vymývaním 20% kyselinou octovou. Produkt bol ďalej zbavený metylén-bis(fosfinovej) kyseliny preliatím získaného eluátu silným katexom, z ktorého bol vymývaný 10% pyridínom. Frakcie s produktom boli spojené, odparené a čistota NOBPⁱⁿ bola overená pomocou NMR spektier.

NO2ABPⁱⁿ bol pripravený následnou elektrofilnou substitúcou atómov vodíka viazaných na zvyšné dva nesubstituované atómy dusíka makrocyklu získaného NOBPⁱⁿ, ktoré boli nahradené zvyškami kyseliny octovej. Pomer NOBPⁱⁿ : CH₂ClCOOH : LiOH v reakcii bol 1 : 7 : 20. Reakcia bola rozdelená na štyri analogické reakcie pre prípad, že by bolo nutné optimalizovať reakčné podmienky. Po dvoch dňoch miešania pri 60 °C všetky reakcie prebehli úspešne. Na delenie reakčnej zmesi bol opäť použitý silný katex, u ktorého sa využívala rozdielna afinita reaktantov a produktu k nemu, a ako elučné činidlo bola použitá destilovaná voda. V prvých dvoch frakciách boli vždy sledované nezreagované zvyšky kyseliny chlóractovej, ktorá kolónou pretiekla takmer bez zadržania a produkt bol eluovaný až neskôr. Po premeraní čistoty produktu v jednotlivých frakciách pomocou NMR spektroskopie boli čisté frakcie spojené a lyofilizované. Po všetkých štyroch reakciách boli

lyofilizáty spojené, znova lyofilizované a s produktom bolo ďalej pracované vo forme lyofilizátu.

3.2 Komplexácia iónov Ga^{3+}

Vznik komplexov galitých katiónov s ligandom $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ bol sledovaný pri pH 0, 1 a 2,8. Hodnoty pH boli zvolené tak, aby bolo možné porovnať výsledky s už nameranými dátami pre makrocyclus NOTA a pripravených TRAP-ligandov.¹⁴ Zvolené hodnoty pH spadajú do silno kyslej oblasti, kde sú galité ióny hydratované a netvorí hydroxo-zlúčeniny, substitúcia ktorých by spomaľovala vznik komplexu s ligandom. Namerané dáta pre $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ a publikované ligandy sú uvedené v Tab. 3.2.

Sledovanie priebehu pomocou ^{71}Ga -NMR bolo zvolené pre jednoduchosť výsledných spektier, v ktorých je možné pri pH 1 sledovať konštantný referenčný signál insertu pri 224,4 ppm, signál $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ pri 0,7 ppm a signál odpovedajúci vzniknutému komplexu pri 159,1 ppm. Problémom pri meraní spektier bolo, že jadro ^{71}Ga poskytuje signál len vtedy, ak má gálium symetrické koordinačné okolie. Pripravený ligand $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ signál poskytoval, ale signály väčšiny intermediátov nebolo možné sledovať.

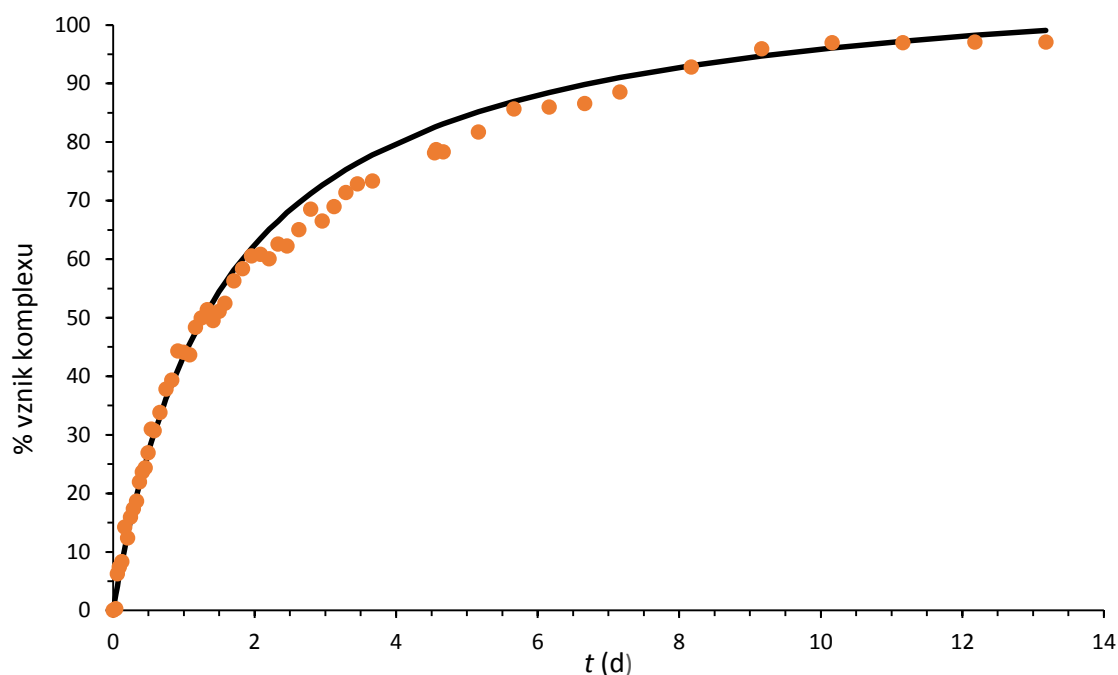
Pri pH 0 nebol pozorovaný vznik komplexu (po 3 dňoch nenastala žiadna zmena v ^{71}Ga -NMR spektre).

Pri pH 2,8 bol pozorovaný rýchly vznik komplexu a priebeh vzniku nebolo možné pomocou NMR sledovať. Po namiešaní roztoku boli ihneď merané NMR spektrá. Už v prvom spektre (cca 15 minút po zmiešaní) bol pozorovaný takmer 85% vznik komplexu. V druhom spektre (cca 45 minút po zmiešaní) už nebol v ^{71}Ga -NMR pozorovaný signál patriaci galitým iónom z $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, ale len signál odpovedajúci vzniknutému komplexu, ktorý už v ďalších spektrách nerástol.

Priebeh vzniku komplexu bolo možné zo zvolených hodnôt pH pri daných podmienkach pozorovať len pri pH 1. Graf závislosti percentuálneho vzniku komplexu na čase je zobrazený na Obr. 13. Experimentálne získané body boli preložené krivkou, získanou z rýchlostných rovníc pre kinetiku 2. poriadku.

Porovnaním získaných dát pre ligand $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ s nameranými dátami pre makrocyclus NOTA je zrejmé, že komplexy s NOTA vznikajú rýchlejšie.¹⁴ Pri pH 0 nebol pozorovaný vznik komplexu ani s NOTA, ani s ligandom $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$. Pri pH 1 a 2,8 vzniká komplex s

NO2ABPⁱⁿ pomalšie ako komplex s NOTA. Naviazaná metylén-bis(fosfínová) kyselina zrejme neurýchľuje vznik komplexov, ako v prípade spomínaného ligandu TE1PP²¹.



Obr. 13: Vznik komplexu pri pH 1 ($c_{\text{lig}} = c_{\text{Ga}} = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; 25 °C).

Tab. 3.2: Polčasy vznikov ($t_{1/2}$) a časy kvantitatívneho vzniku komplexu ($t_{100\%}$) [GaL] pripraveného ligandu NO2ABPⁱⁿ a publikovaných ligandov¹⁴ ($c_{\text{Ga}} = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; pomer L:Ga 1:1; 25 °C).

ligand	pH 0		pH 1		pH 2,8	
	$t_{1/2}$	$t_{100\%}$	$t_{1/2}$	$t_{100\%}$	$t_{1/2}$	$t_{100\%}$
NO2ABP ⁱⁿ	<i>a</i>	<i>a</i>	37,6 h	76,8 d	<5 min	<2 h
NOTA	<i>a</i>	<i>a</i>	270 min	6 d	<i>b</i>	<5 min
TRAP-H	36 d	240 d	21 h	15 d	30 min	220 min
TRAP-OH	3,8 d	31 d	14 min	60 min	<i>b</i>	<5 min
TRAP-Pr	–	12 d	3 min	12 min	<i>b</i>	<5 min

^a Reakcia nebola pozorovaná. ^b Nemerateľné, z dôvodu vysokej rýchlosti reakcie.

3.3 NMR titrácie

Boli sledované závislosti chemických posunov NMR-aktívnych jadier ^1H , ^{13}C a ^{31}P ligandu $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ na pH, z ktorých boli následne vypočítané celkové konštanty stability ligandu a konzekutívne protonizačné konštanty ligandu, uvedené v Tab. 3.3.1 a Tab. 3.3.2. Protonizačné konštanty sú potrebné na stanovenie konštant stability komplexov a na stanovenie rýchlostných konštant formačných a disociačných kinetík.

Tab. 3.3.1: Celkové protonizačné konštanty $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ stanovené NMR titráciami.

($c_{\text{lig}} = 0,045 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

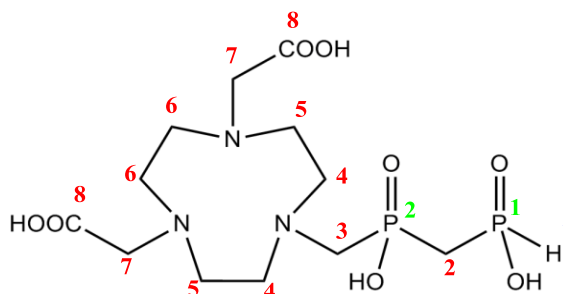
	$\log\beta_{\text{HL}}$	$\log\beta_{\text{H}_2\text{L}}$	$\log\beta_{\text{H}_3\text{L}}$	$\log\beta_{\text{H}_4\text{L}}$
$\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$	13,41(1)	18,88(2)	22,32(3)	23,96(6)

Tab. 3.3.2: Konzekutívne protonizačné konštanty ligandu $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ stanovené NMR

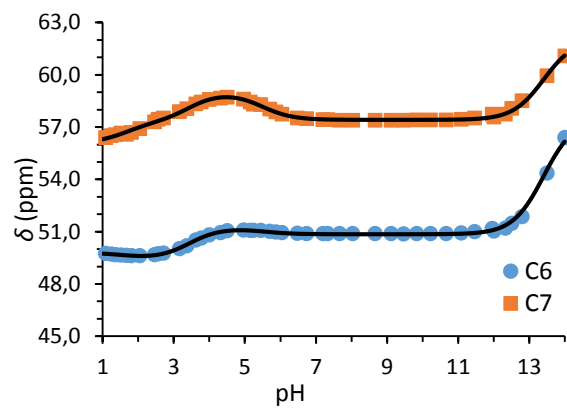
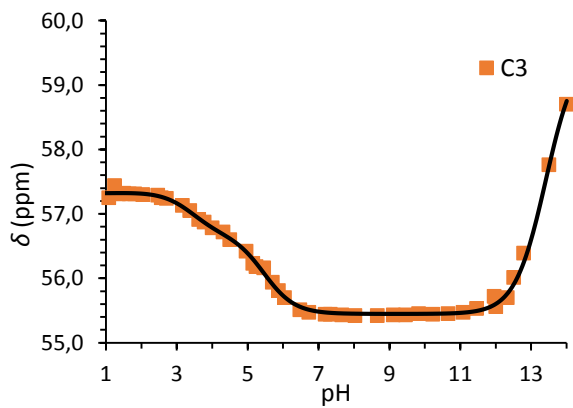
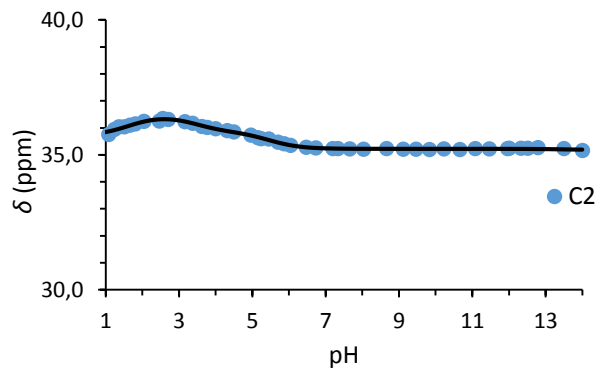
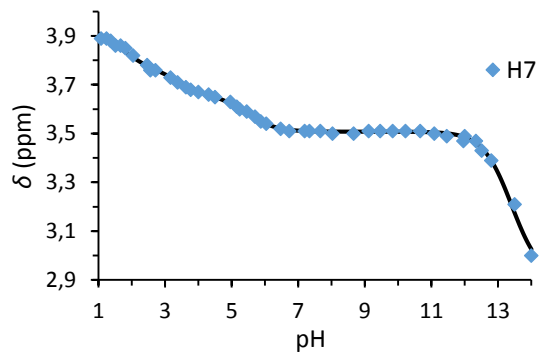
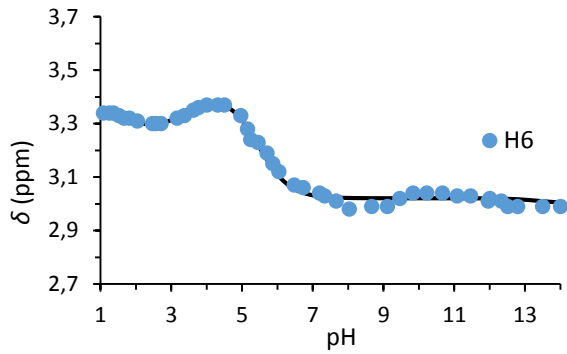
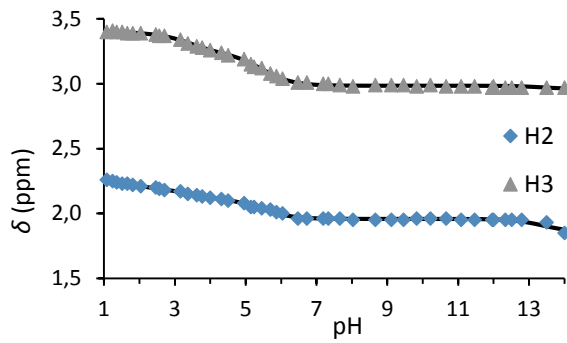
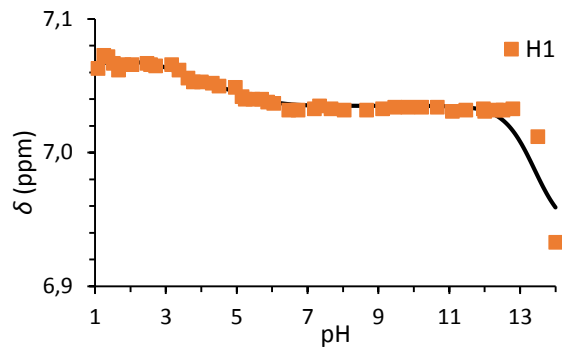
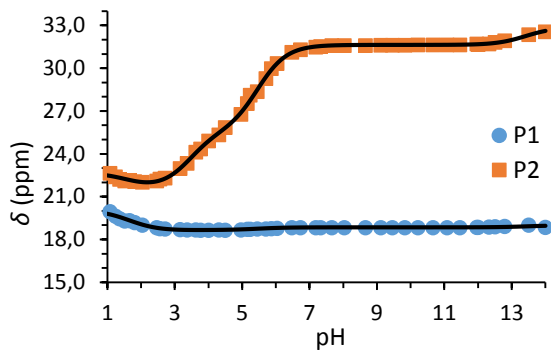
titráciami ($c_{\text{lig}} = 0,045 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

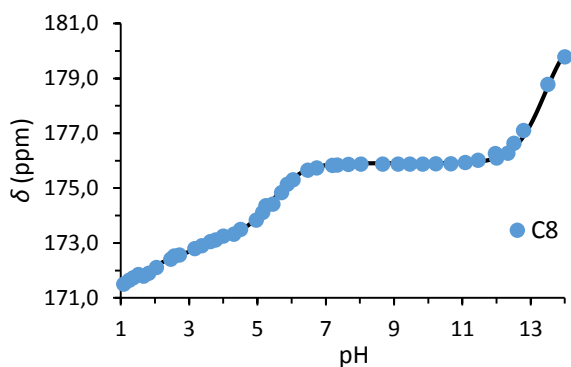
	$\text{p}K_{\text{HL}}$	$\text{p}K_{\text{H}_2\text{L}}$	$\text{p}K_{\text{H}_3\text{L}}$	$\text{p}K_{\text{H}_4\text{L}}$
$\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$	13,41	5,47	3,44	1,64

Namerané závislosti boli znázornené do grafov a následne preložené teoretickými krivkami, ktoré boli vypočítané zo získaných hodnôt $\text{p}K_{\text{a}}$. Grafy sú znázornené na Obr. 15. Jednotlivé atómy označené v grafoch sú číslované podľa Obr. 14 (uhlík a vodík naňho viazaný sú označené rovnakým číslom).



Obr. 14: Číslovanie atómov $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ v NMR titráciách.





Obr. 15: Závislosti chemickým posunov δ na pH pre atómy H1–H3, H6, H7, C2, C3, C6–C8, P1 a P2 ligandu NO2ABPin ($c_{\text{lig}} = 0,045 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

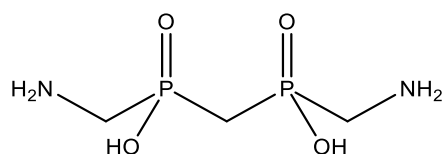
Pre atómy uhlíka a vodíka makrocyklu označené číslami 4 a 5 nebola vytvorená závislosť chemického posunu na pH. Ich signály nebolo možné rozlíšiť ani pomocou korelovaných HSQC a HMBC NMR spektier. Uhlíkové a vodíkové signály makrocyklu ležali v NMR spektrách blízko seba a neboli dobre rozlíšiteľné.

Z grafov je vidieť, že výrazné zmeny chemických posunov väčšiny atómov sú v oblasti pH okolo 13, čo odpovedá hodnote najviac bávickej protonizačnej konštanty ($\text{p}K_{\text{HL}} = 13,41$). Konštanta charakterizuje protonizáciu atómov dusíka makrocyklu s naviazanými acetátovými pendantmi, čo je zrejme pri pohľade na závislosti chemickým posunov na pH pre najbližšie atómy uhlíka (C6, C7, C8) v blízkosti týchto atómov dusíka. Zmenu chemického posunu v tejto oblasti pH je možné vidieť aj na atóme uhlíka C3.

Ďalšia protonizačná konštanta ($\text{p}K_{\text{H2L}} = 5,47$) patrí tretiemu atómu dusíka makrocyklu, pričom okrem atómov C6, C7, C8 sú najväčšie zmeny chemických posunov viditeľné pre atóm uhlíka naviazaného naň (C3). Prekvapivo je vidieť výraznú zmenu chemického posunu pre atóm fosforu, ktorý je vzdialenejší od makrocyklu (P1). Je to spôsobené tým, že atóm vodíka naň viazaný vytvára vodíkové väzby s týmto atómom dusíka. Podobná interakcia bola pozorovaná u metylén-bis[(aminometyl)fosfínovej kyseliny] (Obr. 16), kde došlo k vytvoreniu vodíkovej väzby medzi atómami vodíka hydroxyskupín viazaných na atómy fosforu a vzdialenejších atómov dusíka.²⁷

Protonizačné konštanty odpovedajúce karboxylovým skupinám ($\text{p}K_{\text{H3L}} = 3,44$; $\text{p}K_{\text{H4L}} = 1,64$) sa v zmenách chemických posunov prejavili menej výrazne.

Pre presnejšie určenie protonizačných konštánt boli uskutočnené aj potenciometrické titrácie.



Obr. 16: Metylén-bis(aminometyl)fosfínová kyselina.²⁷

3.4 Potenciometrické titrácie

Potenciometrickými titraciami boli stanovené protonizačné konštanty (Tab. 3.4.1) a konštanty stability komplexov ligandu NO2ABPⁱⁿ s Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ a Ga³⁺ iónmi (Tab 3.4.2). Získané hodnoty sú uvedené v tabuľkách a získané závislosti znázornené v grafoch (Obr. 17, 18).

3.4.1 Acidobázické vlastnosti

Potenciometricky boli stanovené len štyri protonizačné konštanty ligandu (Tab. 3.4.1). Prvá vypočítaná protonizačná konštantá vychádzala s veľkou chybou, z dôvodu malého zastúpenia neprotonizovanej častice ligandu. Konštantá preto nie je uvedená v tabuľke. Ďalšie hodnoty log β boli počítané s použitím hodnoty log β_{HL} získanou z NMR titracii.

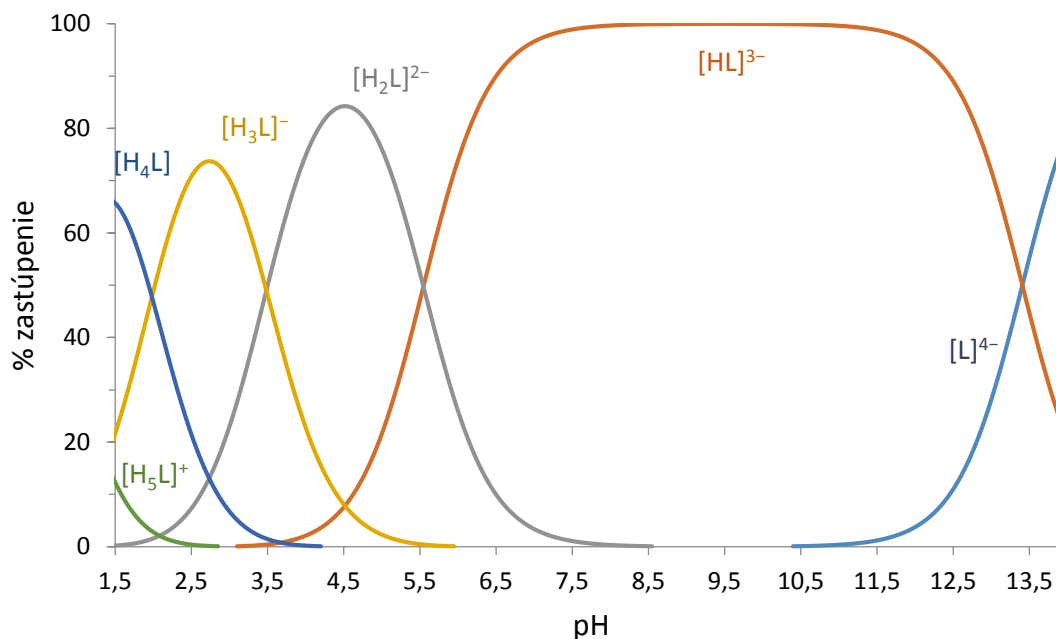
Tab. 3.4.1: Celkové disociačné konštanty ligandu NO2ABPⁱⁿ ($c_{\text{lig}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $I = 0,100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$; 25 °C) stanovené potenciometricky.

	log β_{HL}	log β_{H_2L}	log β_{H_3L}	log β_{H_4L}	log β_{H_5L}
NO2ABP ⁱⁿ	–	18,96(1)	22,44(1)	24,43(2)	25,21(6)

Najnižšia hodnota $pK_a = 0,78$ odpovedá protonizácii jednej z fosfínátových skupín. Hodnoty pK_a 1,99 a 3,48 odpovedajú protonizácii karboxylových skupín, pK_a 5,55 a 13,41 (hodnota získaná z NMR titracii) protonizácii atómov dusíka makrocyclu.

Na základe vypočítaných protonizačných konštánt ligandu bol zhotovený distribučný diagram zastúpenia jednotlivých, postupne deprotonizovaných, častíc ligandu (Obr. 17). Z grafu je vidieť, že na začiatku titrácie roztok obsahuje častice [H₅L]⁺, [H₄L] a menej zastúpené [H₃L][–]. Zastúpenia päťkrát a štyrikrát protonizovaných častíc [H₅L]⁺ a [H₄L] rýchlo klesajú a pri pH 3 už v roztoku prevažuje forma [H₃L][–]. Jej zastúpenie s rastúcim pH takisto

rýchlo klesá a pri pH 4,5 tvoria 80% zastúpenia častice $[H_2L]^{2-}$. Pri tomto pH začína narastať aj zastúpenie formy $[HL]^{3-}$, ktorá už pri pH okolo 6,5 nadobudne 90% zastúpenie, a v takmer 100% zastúpení prevažuje v roztoku nad ostatnými časticami až do pH 12,5, kedy začína narastať výskyt častíc $[L]^{4-}$. Táto forma je dominantná až od pH približne 13,5.



Obr. 17: Distribučný diagram ligandu NO2ABPⁱⁿ ($c_L = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $I = 0,100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NMe₄Cl; 25 °C).

3.4.2 Koordinačné vlastnosti

Potenciometricky boli stanovené konštanty stability komplexov NO2ABPⁱⁿ s iónmi Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ a Ga³⁺, získané konštanty sú uvedené v Tab 3.4.2. Titrácie boli vykonané v pomere ligand:kov 1:1. Počas titrácie nedochádzalo k vyzrážaniu hydroxidov príslušných kovov.

Ligand NO2ABPⁱⁿ tvorí so skúmanými iónmi kovov stabilné komplexy. Získané hodnoty konštant rastú v poradí Ni²⁺ \approx Cu²⁺ \approx Zn²⁺ < Ga³⁺. Najvyššia hodnota konštanty stability pre Ga³⁺ je daná najmä jeho vyšším nábojom. Poradie dvojmocných kovov neodpovedá Irwing-Williamsovej rade, podľa ktorej by najvyššiu stabilitu mal mať meďnatý komplex. Makrocyclus TACN a jeho deriváty s tromi atómami dusíka v ekvatoriálnej polohe neodpovedajú stérickým požiadavkám na koordinačné okolie atómu medi, ktorá preferuje tetragonálne bipyrimidálne okolie so štyrmi atómami dusíka v ekvatoriálnych polohách. Toto

usporiadanie je pre meď zvýhodňované vďaka Jahnovmu – Tellerovmu efektu, ktorý sa okrem iných výrazne uplatňuje práve pre elektrónovú konfiguráciu valenčných d-orbitálov d^9 (Cu^{2+}). Deriváty makrocyclu TACN neumožňujú toto usporiadanie, čo spôsobuje nižšiu stabilitu meďnatého komplexu s pripraveným ligandom.

Distribučné diagramy jednotlivých systémov ligand : kov sú znázornené na Obr. 18.

Tab. 3.4.2: Celkové konštanty stability $\log\beta$ ligandu $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ s príslušnými iónmi kovov stanovené potenciometricky ($I = 0,100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$; $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Ga^{3+}
[ML]	20,66(2)	19,09(1)	21,34(3)	26,9(4)
[HML]	23,79(2)	20,79(3)	23,48(4)	–
[MLOH]	7,81(4)	–	8,32(6)	19,7(2)

V porovnaní s publikovanými konštantami stability pre materský makrocyclus NOTA,¹⁴ uvedenými v Tab. 3.4.3, je zrejme, že konštanty stability sú približne rovnaké. Konštantu stability s Ga^{3+} iónmi je o trochu vyššia, naopak konštanty stability s danými dvojmocnými iónmi pripraveného ligandu sú o niečo nižšie.

Tab. 3.4.3: Konštanty stability makrocyclu NOTA s príslušnými iónmi kovov.¹⁴

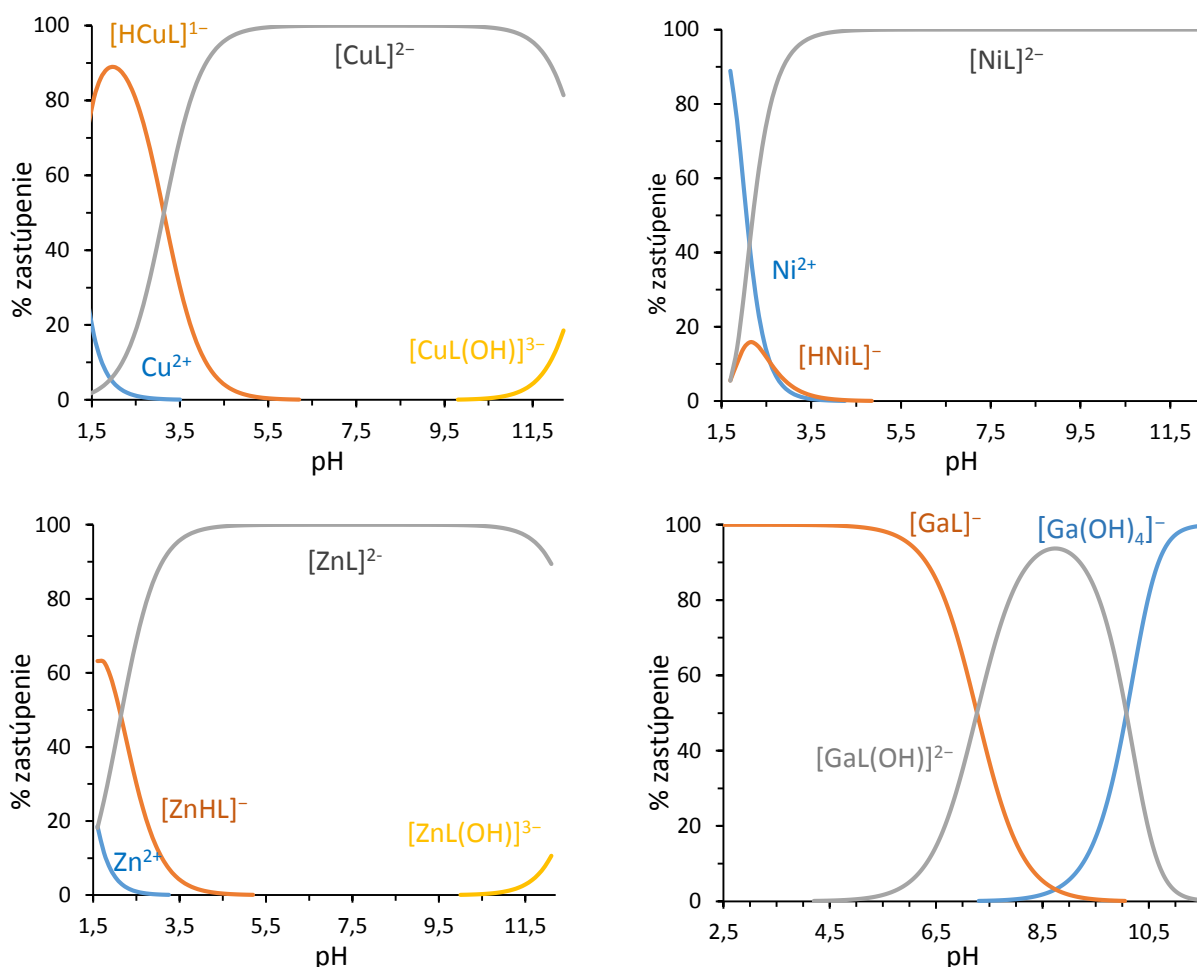
	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Ga^{3+}
$\log K_{\text{ML}}$	21,99	21,58	26,63

Z distribučných diagramov systémov s Cu^{2+} a Zn^{2+} kationmi je vidieť, že zastúpenie častíc komplexu s $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ je pre oba kovy podobné. Na začiatku titrácie je v reakčnej zmesi malé množstvo voľných iónov kovu a prevažuje raz protonizovaný komplex $[\text{MHL}]^-$. Ten s rastúcim pH rýchlo ubúda a pri pH cca. 3 je už takmer do konca titrácie dominantný komplex $[\text{ML}]^{2-}$. Pri pH 11 sa v systémoch pomaly začína vytvárať hydroxokomplex $[\text{ML}(\text{OH})]^{3-}$.

Priebeh vzniku nikelnatého komplexu sa od priebehu vzniku komplexu s Cu^{2+} a Zn^{2+} líši vyšším percentuálnym zastúpením voľných nikelnatých iónov a len malým zastúpením protonizovaného komplexu $[\text{NiHL}]^-$. Hydroxokomplex s nikelom nevzniká a od pH 3 až do konca titrácie sa v reakčnej zmesi nachádza len komplex $[\text{NiL}]^{2-}$.

Z distribučného diagramu systému s galitými kationmi je zrejme, že na začiatku titrácie komplex $[\text{GaL}]^-$ vzniká kvantitatívne a v reakčnej zmesi už nie sú prítomné voľné ióny Ga^{3+} .

Vysoká afinita gália ku kyslíku spôsobí, že s rastúcim pH rastie aj zastúpenie hydroxokomplexu $[\text{GaL}(\text{OH})]^{2-}$ a od pH 10 je už v systéme dominantný $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$.



Obr. 18: Distribučné diagramy systémov $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$: kov v pomere 1:1 ($c_{\text{L}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $I = 0,100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$; 25°C).

3.5 Röntgenoštruktúrna analýza

Bola vykryštalizovaná litná soľ ligandu $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ a pomocou RTG difrakcie bola získaná jej štruktúra (Obr. 19). Sumárny vzorec kryštálu je $\text{Li}_8(\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}})_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O} \cdot i\text{PrOH}$. Experimentálne dáta sú uvedené v Tab 3.5.

V nezávislej časti elementárnej bunky sú koordinované dve úplne deprotonované molekuly ligandu, osem litných kationov a dve molekuly vody (koordinované k atómom lítia). Zvyšných sedem molekúl vody, previazaných vodíkovými väzbami, a molekula izopropanolu tvoria solvát. Dva z litných kationov sú koordinované v dutinách makrocyclov

ligandu a zvyšné ióny lítia sú koordinované mimo kavitu, medzi pendantmi. Koordináciu litných katiónov s ligandom možno vysvetliť tým, že iónový polomer iónov Li^+ (76 pm)¹¹ je blízky polomeru iónov Ga^{3+} , s ktorými ligand vytvára komplex ochotne.

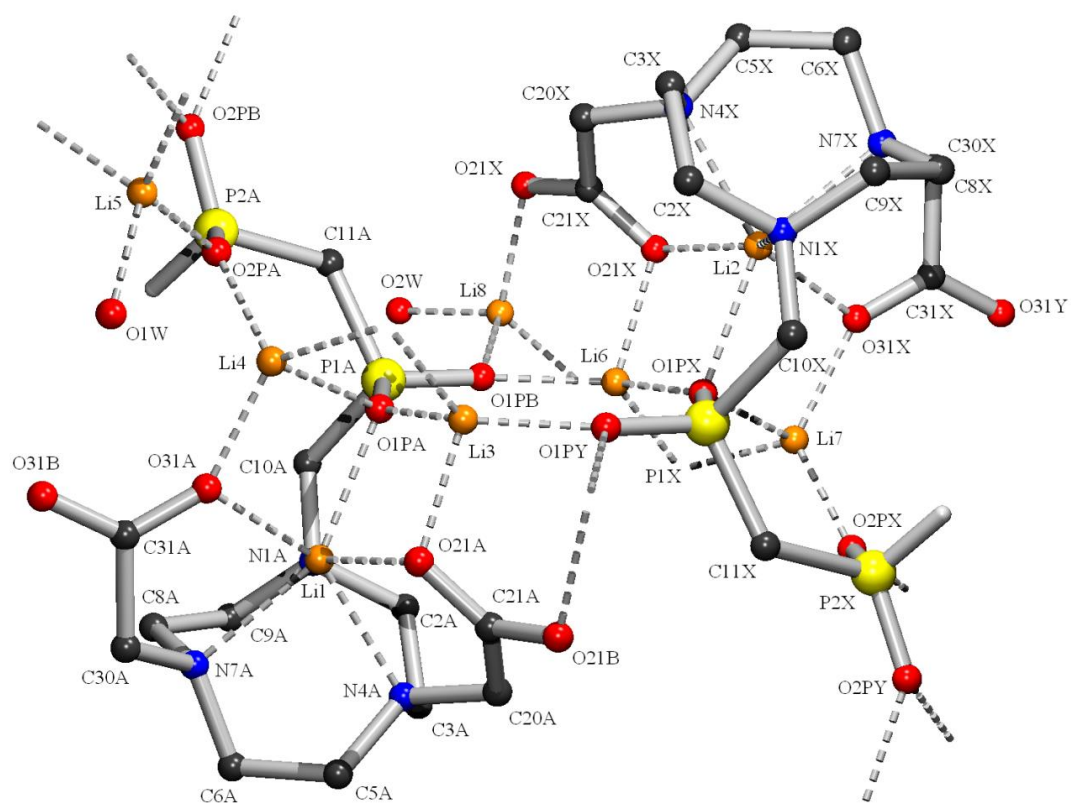
Tab 3.5: Experimentálne dáta stanovené pre kryštál so vzorcom:
 $\text{Li}_8(\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}})_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O} \cdot i\text{PrOH}$.

Sumárny vzorec	$\text{C}_{27}\text{H}_{68}\text{Li}_8\text{N}_6\text{O}_{26}\text{P}_4$
M_r	1072,27
Kryštalová sústava	Monoklinická
Priestorová grupa	$P2_1/c$
$a / \text{Å}$	15,2170(4)
$b / \text{Å}$	10,8887(3)
$c / \text{Å}$	30,8158(8)
$\alpha / ^\circ$	90,00
$\beta / ^\circ$	96,9520(10)
$\gamma / ^\circ$	90,00
$U / \text{Å}^3$	5068,4(2)
Z	8
Difrakcia celkom	9618
Difrakcia intenzívna	7732
$R (I > 2\sigma(I))$	0,0566
R'	0,0699
$wR (I > 2\sigma(I))$	0,1453
wR'	0,1533

Litné katióny vo vnútri makrocyklu sú hexakoordinované, čo pre atóm lítia nie je úplne bežné. Tieto litné katióny vytvárajú väzby s tromi atómami dusíka makrocyklov a s tromi atómami kyslíka, pričom dva atómy kyslíka pochádzajú z oboch karboxylových skupín každého z ligandov a tretí koordinovaný atóm kyslíka patrí fosfinátom bližším k makrocyklom. Väzby atómov lítia s atómami dusíka makrocyklov $d(\text{Li}-\text{N})$ sú o niečo dlhšie (2,22 – 2,24 Å) ako väzby s atómami kyslíka $d(\text{Li}-\text{O})$ (2,01 – 2,06 Å), čo je spôsobené obmedzenou deformovateľnosťou makrocyklu. Okolie atómov lítia má usporiadanie deformovaného oktaédra. Väzbové uhly týchto koordinovaných atómov lítia sú so všetkými naviazanými atómami približne rovnaké ($\angle(\text{N}-\text{Li}-\text{N}) = 80^\circ$, $\angle(\text{O}-\text{Li}-\text{OPR}) = 84^\circ$, $\angle(\text{O}-\text{Li}-\text{O}) = 96^\circ$).

Zvyšné koordinované litné katióny sú tetrakoordinované, s prevažne tetraedrickým okolím, čo je pre litný katión, ktorému chýbajú do stabilnej konfigurácie najbližšieho vzácneho plynu štyri elektrónové páry, viac bežné. Takto koordinované litné

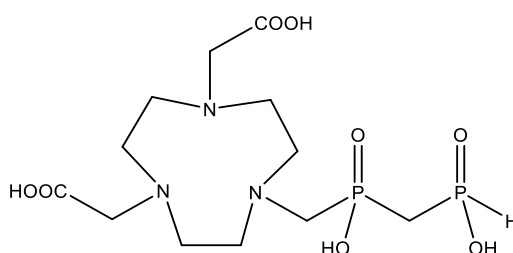
katióny prepájajú jednotlivé molekuly komplexov väzbami s atómami kyslíka karboxylových skupín, atómami kyslíka viazaných na atómy fosforu a atómami kyslíka molekuly vody. Tieto väzbové vzdialenosti $d(\text{Li}-\text{O})$ sú kratšie (1,89 – 1,99 Å) ako v prípade litného katiónu, koordinovaného v dutine makrocyklu.



Obr. 19: Nezávislá časť elementárnej bunky komplexu ligandu $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ s Li^+ kationmi, získaná RTG difrakciou.

4 Záver

Bol pripravený a charakterizovaný ligand $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$ (Obr. 21), ktorý je derivát makrocyklu NOTA s bis(fosfínátovou) pendantnou skupinou. Sledované boli najmä acidobázické a koordinačné vlastnosti. NMR titráciami a potenciometrickými titráciami boli stanovené protonizačné konštanty ligandu.



Obr. 20: Skúmaný ligand $\text{H}_4\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$.

Bol pripravený galitý komplex ligandu $\text{NO}_2\text{ABP}^{\text{in}}$, u ktorého bola pomocou ^{71}Ga -NMR sledovaná kinetika vzniku komplexu pri rôznych hodnotách pH. Pri pH 0 nebol pozorovaný vznik komplexu, pri pH 2,8 komplex vznikal rýchlo. Priebeh vzniku komplexu pomocou NMR spektroskopie bol pozorovaný len pri pH 1. Pri návrhu ligandu sa predpokladalo, že podobne ako u spomínaného ligandu TE1PP^{21} bis(fosfínátová) pendantná skupina urýchli komplexáciu kovu s makrocyklom v porovnaní s materským makrocyklom NOTA, čo sa nepotvrdilo.

Konštanty stability komplexov dvojmocných iónov kovov s ligandom boli podobné ako konštanty stability s makrocyklom NOTA. Konštantu stability komplexu ligandu s Ga^{3+} kationmi bola len zanedbateľne vyššia ako konštantu stability galitého komplexu s makrocyklom NOTA.

Pripravený ligand vytvára komplex s galitými kationmi selektívne a rýchlo, a môže byť vyhodnotený ako potenciálne vhodným základom pre ^{68}Ga -PET.

5 Zoznam použitých skratiek

AcOH	kyselina octová
CT	výpočtová tomografia (Computed Tomography)
cyklám	1,4,8,11-tetraazacyklotetradekán
cyklén	1,4,7,10-tetraazacyklododekán
DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová
DTPA	kyselina dietyléntriámín-pentaoctová
EDTA	kyselina etyléndiámín-tetraoctová
HSAB	teória tvrdých a mäkkých kyselín a zásad (Hard soft acid base theory)
<i>i</i> PrOH	izopropylalkohol
L	ligand
M	kov
MRI	magnetická rezonancia (Magnetic Resonance Imaging)
MS	hmotnostná spektrometria (Mass Spectroscopy)
NMR	nukleárna magnetická rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)
NOTA	kyselina 1,4,7-triazacyklononán-1,4,7-trioctová
NO ₂ A	kyselina 1,4,7-triazacyklononán-1,4-dioctová
PET	pozitronová emisná tomografia (Positron Emission Tomography)
RT	laboratórna teplota (room temperature)
RVO	rotačná vákuová odparka
SPECT	jednofotónová emisná výpočtová tomografia (Single Photon Emission Computed Tomography)
TACN	1,4,7-triazacyklononán
<i>t</i> BuOH	terc-butanol
TETA	kyselina 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekán-1,4,8,11-tetraoctová

6 Zoznam použitej literatúry

1. What is radiology? <http://www.news-medical.net/health/What-is-radiology.aspx> (citované 28.3.2016).
2. Nukleární medicína. https://cs.wikipedia.org/wiki/Nukle%C3%A1rn%C3%AD_medic%C3%ADna (citované 2.4.2016).
3. SPECT vs. PET, Which is Best? <http://www.dicardiology.com/article/spect-vs-pet-which-best> (citované 2.4.2016).
4. Pacák, J. Č., Miloslav, Deoxyfluorglukosa, mezník ve vývoji pozitronové emisní tomografie (historie jednoho výzkumu). *Chemické listy* **2002**, 707, 704–707.
5. Ido, T.; Wan, C. N.; Casella, V.; Fowler, J. S.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D. E., Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. Fluorine-18-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and ¹⁴C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1978**, 14 (2), 175–183.
6. (a) Kinoshita, T.; Fujii, H.; Hayashi, Y.; Kamiyama, I.; Ohtsuka, T.; Asamura, H., Prognostic significance of hypoxic PET using ¹⁸F-FAZA and ⁶²Cu-ATSM in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **2016**, 91, 56–66; (b) Chong, H.-S.; Chen, Y.; Kang, C. S.; Sun, X.; Wu, N., Novel ⁶⁴Cu-radiolabeled bile acid conjugates for targeted PET imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25 (5), 1082–1085; (c) Jan Holub; Marian Meckel; Vojtěch Kubiček; Frank Rösch; Petr Hermann, Gallium(III) complexes of NOTA-bis(phosphonate) conjugates as PET radiotracers for bone imaging. *Contrast Media Molecular Imaging* **2015**, 10 (2), 122–134; (d) Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J., Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nuclear Medicine and Biology* **1996**, 23 (8), 957–980.
7. (a) Banerjee, S. R.; Pomper, M. G., Clinical applications of Gallium-68. *Applied Radiation and Isotopes* **2013**, 76, 2–13; (b) Lewis, M. R.; Reichert, D. E.; Laforest, R.; Margenau, W. H.; Shefer, R. E.; Klinkowstein, R. E.; Hughey, B. J.; Welch, M. J., Production and purification of gallium-66 for preparation of tumor-targeting radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine and Biology* **2002**, 29 (6), 701–706; (c) Notni, J.; Hermann, P.; Jana, H.; Kotek, J.; Kubiček, V.; Plutnar, J.; Loktionova, N.; Riss, P. J.; Rösch, F.; Lukeš, I., A Triazacyclononane-Based Bifunctional Phosphinate Ligand for the Preparation of Multimeric ⁶⁸Ga Tracers for Positron Emission Tomography. *Chemistry - A European Journal* **2010**, 16, 7174–7185; (d) Sanchez-Crespo, A., Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography. *Applied Radiation and Isotopes* **2013**, 76, 55–62; (e) Smith, D. L.; Breeman, W. A. P.; Sims-Mourtada, J., The untapped potential of Gallium 68-PET: The next wave of ⁶⁸Ga-agents. *Applied Radiation and Isotopes* **2013**, 76, 14–23.
8. Hupf, H. B.; Beaver, J. E., Cyclotron production of carrier-free gallium-67. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1970**, 21 (2), 75–76.
9. Gallium (⁶⁷Ga) Citrate. <https://www.adcc.sk/web/humanne-lieky/pil/gallium-67ga-citrate-pil-8264.html> (citované 18.4.2016).
10. (a) Arino, H.; Skraba, W. J.; Kramer, H. H., A new ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radioisotope generator system. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1978**, 29 (2), 117–120; (b) Eppard, E.; Loktionova, N. S.; Rösch, F., ⁶⁸Ge content quality control of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generator eluates and ⁶⁸Ga radiopharmaceuticals – A protocol for determining the ⁶⁸Ge content using thin-layer chromatography. *Applied Radiation and Isotopes* **2014**, 91, 92–96.

11. Yoder, C. Metallic, Covalent and Ionic Radii(r).
<http://www.wiredchemist.com/chemistry/data/metallic-radii> (citované 18.4.2016).
12. Harris, W. R.; Pecoraro, V. L., Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry* **1983**, *22* (2), 292–299.
13. (a) Hancock, R. D.; Martell, A. E., Chelate ring geometry, and the metal ion selectivity of macrocyclic ligands. Some recent developments. *Supramolecular Chemistry* **1996**, *6* (3-4), 401–407; (b) Hancock, R. D., Chelate ring size and metal ion selection. The basis of selectivity for metal ions in open-chain ligands and macrocycles. *Journal of Chemical Education* **1992**, *69* (8), 615.
14. Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P., Complexation of Metal Ions with TRAP (1,4,7-Triazacyclononane Phosphinic Acid) Ligands and 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic Acid: Phosphinate-Containing Ligands as Unique Chelators for Trivalent Gallium. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (1), 577–590.
15. Lukeš, I.; Kotek, J.; Vojtíšek, P.; Hermann, P., Complexes of tetraazacycles bearing methylphosphinic/phosphonic acid pendant arms with copper(II), zinc(II) and lanthanides(III). A comparison with their acetic acid analogues. *Coordination Chemistry Reviews* **2001**, *216–217*, 287–312.
16. Lee, J. Y.; Jeong, J. M.; Kim, Y. J.; Jeong, H.-J.; Lee, Y.-S.; Lee, D. S.; Chung, J.-K., Preparation of Ga-68-NOTA as a renal PET agent and feasibility tests in mice. *Nuclear Medicine and Biology* **2014**, *41* (2), 210–215.
17. Matczak-Jon, E.; Videnova-Adrabinska, V., Supramolecular chemistry and complexation abilities of diphosphonic acids. *Coordination Chemistry Reviews* **2005**, *249* (21-22), 2458–2488.
18. Fruhling, J.; Verbist, A.; Balikdjian, D., Which diphosphonate for routine bone scintigraphy (MDP, HDP or DPD)? *Nuclear medicine communications* **1986**, *7* (6), 415–425.
19. Fleisch, H., *Bisphosphonates in Bone Disease – 4th ed.* London, 2000.
20. Fellner, M.; Baum, R. P.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Prasad, V.; Rosch, F., PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with (68)Ga-bisphosphonates: first human study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2010**, *37* (4), 834.
21. David, T.; Kubíček, V.; Gutten, O.; Lubal, P.; Kotek, J.; Pietzsch, H.-J. r.; Rulišek, L.; Hermann, P., Cyclam Derivatives with a Bis(phosphinate) or a Phosphinato–Phosphonate Pendant Arm: Ligands for Fast and Efficient Copper(II) Complexation for Nuclear Medical Applications. *Inorganic Chemistry* **2015**, (54), 11751–11766.
22. Luckman, S. P.; Coxon, F. P.; Ebetino, F. H.; Russell, R. G. G.; Rogers, M. J., Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *Journal of Bone and Mineral Research* **1998**, *13* (11), 1668–1678.
23. King, C.; Roundhill, D. M.; Fronczek, F. R., Synthesis and structural characterization of methylenebisphosphinic acid, CH₂[PH(O)OH]₂. *Inorganic Chemistry* **1986**, *25* (8), 1290–1292.
24. Kývala, M.; Lukeš, I., International Conference Chemometrics '95. **1995**.
25. Baes, C. F. J.; Mesmer, R. E., *The Hydrolysis of Cations*. New York, Wiley, 1976.
26. Mannich reaction. https://en.wikipedia.org/wiki/Mannich_reaction (citované 18.4.2016).

27. David, T.; Procházková, S.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Kubiček, V.; Hermann, P.; Lukeš, I., Methylene-bis[(aminomethyl)phosphinic acids]: synthesis, acid–base and coordination properties. *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 2414–2422.

Pod'akovanie

Na záver by som rada poďakovala všetkým, ktorí akokoľvek prispeli k vzniku tejto práce. V prvom rade ďakujem rodičom, bez ktorých by štúdium na vysokej škole nebolo možné.

Ďakujem Vojtovi, za cenné rady, trpezlivosť pri vysvetľovaní, a hlavne za ochotu viesť moju bakalársku prácu.

Ďakujem Sandrovi, za ochotu, veľkú pomoc takmer so všetkým a za *know-how* práce v labe, ktoré sa mi snažil vštípiť. Ďakujem za nekonečnú trpezlivosť pri vysvetľovaní, pomoc s návodmi a s meraním spektier

Ďakujem Zuzke, za pomoc s potenciometriou.

Ďakujem tiež celému osadenstvu „malého“ a „veľkého“ labu, ktoré vytváralo atmosféru, v ktorej sa príjemne pracovalo.

Nakoniec samozrejme ďakujem aj zvyšku rodiny a kamarátom, ktorých podpora a spoločnosť pomáhala a motivovala nielen pri vzniku práce, ale aj pri celom bakalárskom štúdiu.