

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie

Příprava fosforového analogu DOTA alkylací

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Petr Hermann, Ph.D.

prof. RNDr. Tomáš Trnka, CSc.

Vypracoval: Ing. Pavel Řezanka

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

V Praze dne 31. 8. 2006

Nezvalka
.....

podpis

Poděkování

Děkuji vedoucím diplomové práce doc. RNDr. Petru Hermannovi, Ph.D. a prof. RNDr. Tomáši Trnkovi, CSc. Dále spolupracovníkům z laboratoře „19“ a všem těm, kteří mi svými podněty, radami a trpělivou pomocí pomohli vypracovat tuto diplomovou práci.

Především však děkuji celé své rodině a přátelům za všestrannou podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

Seznam zkratk	5
1. Úvod	6
2. Cíle diplomové práce	7
3. Teoretická část	8
3.1 Makrocyclické ligandy	8
3.1.1 Příprava fosforových derivátů makrocyclických ligandů	11
3.2 Použití komplexů makrocyclických ligandů	25
3.2.1 Kontrastní látky pro tomografii magnetické rezonance	25
3.2.2 Radiofarmaka	34
3.2.3 Ostatní aplikace	35
3.3 Shrnutí	35
3.4 Přístup k řešení diplomové práce	36
4. Experimentální část	38
4.1 Použité chemikálie	38
4.2 Použité přístroje a metody	38
4.2.1 Nukleární magnetická rezonance	38
4.2.2 Hmotnostní spektrometrie	39
4.2.3 Tenkovrstvá chromatografie	39
4.2.4 Elementární analýza	39
4.3 Pracovní postup	40
5. Diskuze	54
6. Závěr	63
Seznam literatury	64

Seznam zkratek

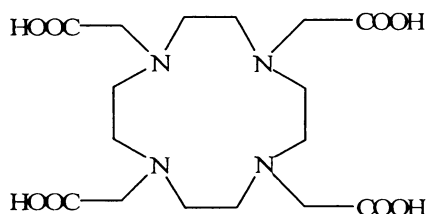
Ac	acetyl
Bu	butyl
<i>t</i> -Bu ₃ DO ₃ A	tri- <i>terc</i> -butyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-triacetát
<i>t</i> -BuOH	2-methylpropan-2-ol
cyklam	1,4,8,11-tetrazacyklotetradekan
cyklen	1,4,7,10-tetrazacyklododekan
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexyl-karbodiimid
DIPEA	diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DOTP	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetramethylenfosfonová kyselina
ekv.	ekvivalent
Et	ethyl
lit.	literatura
Me	methyl
MeCN	acetonitril
MRI	tomografie magnetické rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
MsCl	mesyl chlorid
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ph	fenyl
Pr	propyl
<i>i</i> -PrOH	propan-2-ol
TETA	1,4,8,11-tetrazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová kyselina
TFA	trifluorooctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan

1. Úvod

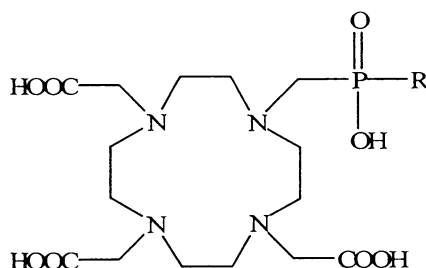
Komplexy makrocyclických ligandů s některými ionty kovu (nejčastěji Gd^{3+}) lze použít jako kontrastní látky pro tomografii magnetické rezonance (MRI, z anglického názvu „Magnetic Resonance Imaging“), neboť tyto komplexy zvyšují relaxační rychlost atomů vodíku, což má za následek zvýšení intenzity signálu. Používané kontrastní látky nejsou ale příliš specifické, a proto je nutné podávat velké dávky.

Řešením uvedeného problému je připravit bifunkční ligand, jenž by byl schopen navázat se na látku (peptid, monoklonální protilátku, sacharid, ...), která zajistí transport výsledné molekuly do požadované oblasti. Takový ligand musí mít ale stále vhodné vlastnosti z hlediska MRI.

Vhodnou látkou splňující zmíněné požadavky se zdá být derivát DOTA (viz obrázek 1.1), v němž je jedna karboxylová skupina nahrazena fosfinovou skupinou (viz obrázek 1.2). Tato skupina umožňuje navázání dalšího řetězce, který je zakončen vhodnou funkční skupinou.



Obrázek 1.1 Struktura DOTA

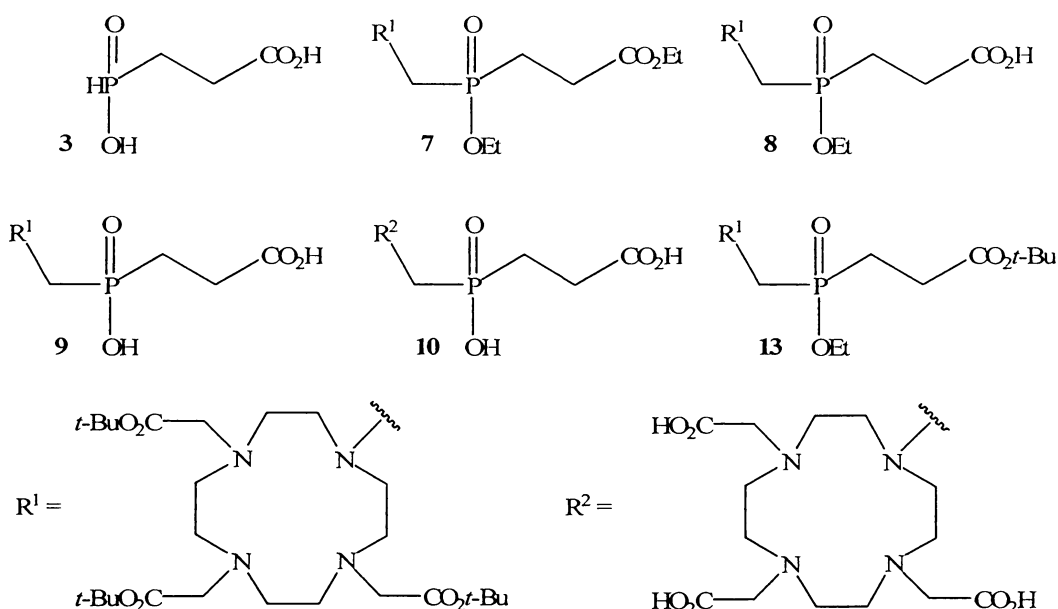


Obrázek 1.2 Struktura fosforových analogů DOTA

2. Cíle diplomové práce

Hlavní cíle diplomové práce lze shrnout do následujících bodů.

- Nalézt způsob přípravy čisté látky **3**.
- Připravit různé fosforové analogy DOTA (látky **7** a **13**) alkylací.
- Nalézt podmínky hydrolýzy látky **7** na látky **8** a **9**.
- Připravit látku **10** z látky **9** za použití technik používaných při peptidové syntéze.
- Nalézt podmínky hydrolýzy látky **13** na látku **10**.



Obrázek 2.1 Strukturální vzorce látek **3**, **7–10** a **13**

Látky **8** a **9** byly navrženy tak, aby mohly být navázány na peptidový řetězec pomocí volné karboxylové skupiny za tvorby peptidové vazby. Po tomto kroku by následovala hydrolýza za vzniku látky **10** navázané na daný peptidový řetězec. Výsledné molekuly by mohly být použity pro cílenou biodistribuci. Samotná látka **10** již byla studována a byla u ní zjištěna řada výhod^{1,2}.

3. Teoretická část

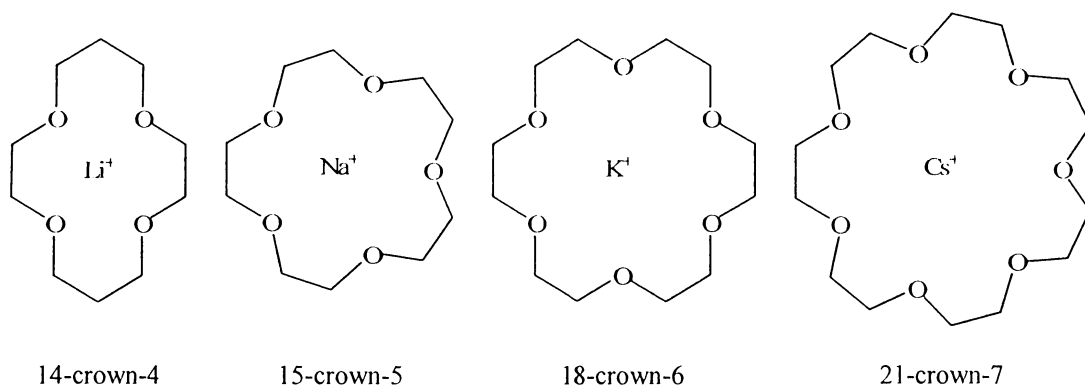
3.1 Makrocyclické ligandy

Již dlouho je známo, že se komplexy makrocyclických ligandů účastní dějů v mnoha základních biologických systémech. Příkladem může být fotosyntéza a transport kyslíku u savců. Syntéza makrocyclů se ale začala rozvíjet teprve v šedesátých letech 20. století. Před tím byly makrocycly připravovány pouze ojediněle. O rozvoji svědčí například fakt, že v roce 1967 byly publikovány přípravy 33 nových cyklických polyetherů³.

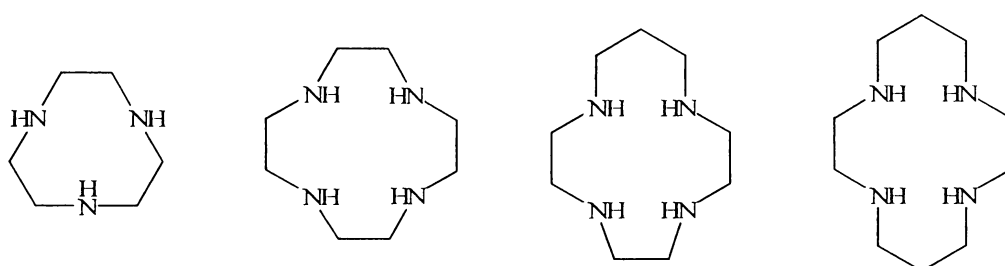
Makrocyclický ligand je cyklická sloučenina s devíti nebo více atomy včetně heteroatomů a se třemi nebo více donorovými atomy⁴. Tyto donorové atomy jsou obvykle umístěny tak, že při koordinaci s iontem kovu vznikají přednostně pěti nebo šestičlenné chelátové kruhy. Velikost kavity (tj. dutiny) makrocyclu je určena počtem atomů v makrocyclickém kruhu. Velikost kavity je také ovlivněna rigiditou molekuly a samozřejmě také hybridizací donorového atomu. Nenasycenost makrocyclického kruhu má na rigiditu značný vliv. Výsledkem je totiž ztráta flexibility, což má obvykle za následek zvýšení kinetické inertnosti vzniklého komplexu.

V závislosti na donorovém typu mohou být makrocyclické ligandy rozděleny na crownethery (donorové atomy jsou atomy kyslíku, viz obrázek 3.1), polyazamakrocycly nebo-li azacrownethery (donorové atomy jsou pouze atomy dusíku, viz obrázek 3.2), makrocycly obsahující atomy síry, fosforu, arsenu (viz obrázek 3.3) a makrocyclické ligandy s různými donorovými atomy (polyazapolyoxamakrocycly, lariatethery, viz obrázek 3.4). Makrocycly s pendantními funkčními skupinami zahrnují polyazamakrocycly, které mají postranní řetězec připojený k atomu dusíku (viz obrázek 3.5).

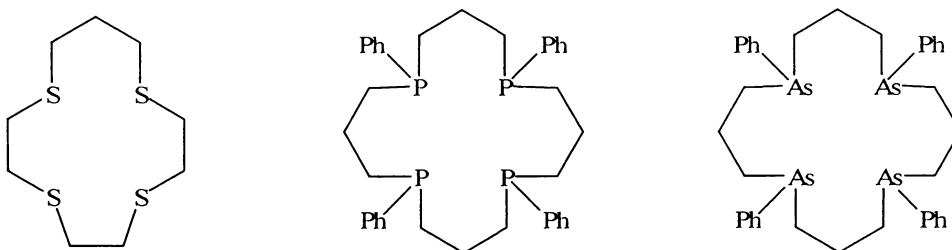
Další zajímavou skupinou makrocyclických ligandů tvořených makrobicyklickými polyazapolyoxo ligandy jsou kryptandy (viz obrázek 3.6), které mohou zcela obklopit koordinovaný ion kovu. Kryptandy mají stericky kontrolovanou kavitu, což zvyšuje specifičnost a stabilitu pro dané ionty kovů.



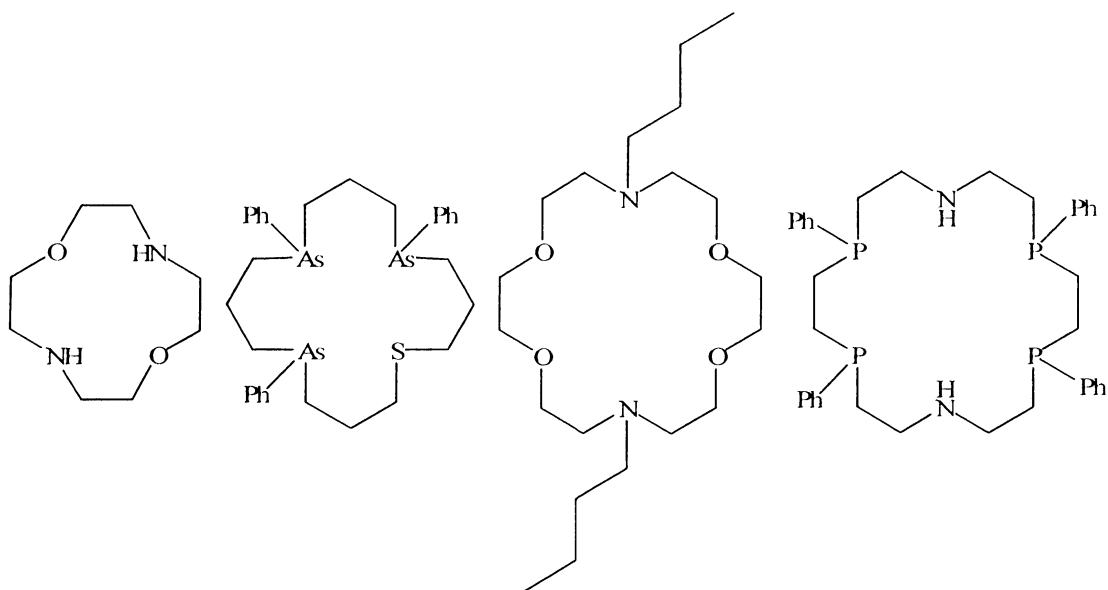
Obrázek 3.1 Příklady crownetherů a komplementárních kationtů⁵



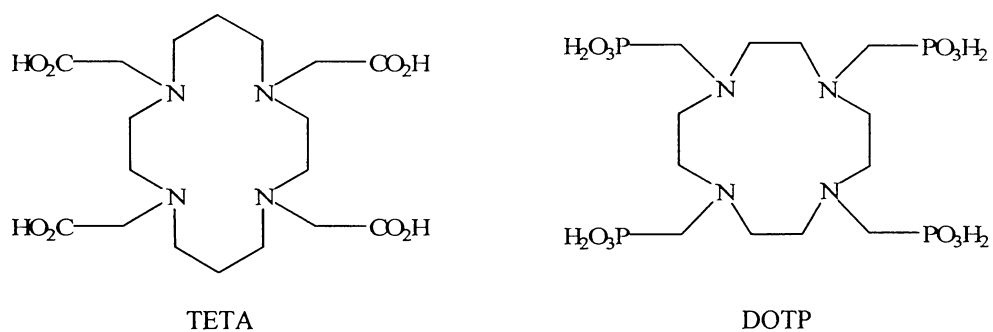
Obrázek 3.2 Příklady polyazamakrocyklů (azacrownetherů)



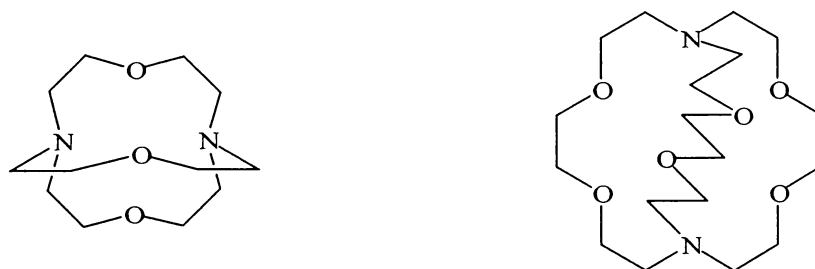
Obrázek 3.3 Příklady makrocyklů obsahujících atomy síry, fosforu a arsenu



Obrázek 3.4 Příklady makrocyclických ligandů s různými donorovými atomy



Obrázek 3.5 Příklady makrocyclů s pendantními funkčními skupinami



Obrázek 3.6 Příklady kryptandů

Zvýšení termodynamické stability makrocyclických komplexů oproti jejich lineárním analogům se stejným počtem chelátových kruhů se nazývá termodynamický makrocyclický efekt. Kinetický makrocyclický efekt obvykle způsobuje pomalou kinetiku disociace komplexů makrocyclických sloučenin ve srovnání s komplexy lineárních analogů.

3.1.1 Příprava fosforových derivátů makrocyclických ligandů

Využití fosforu v organických sloučeninách má několik výhod spočívajících v rozdílných vlastnostech karboxylové skupiny na jedné straně a fosfonové nebo fosfinové skupiny na straně druhé⁶. Karboxylová skupina je planární a většinou středně kyselá. Naproti tomu fosfonová i fosfinová skupina je tetraedrická, středně až silně kyselá a umožňuje velkou hydrataci. Fosfonová skupina má dále velkou tendenci tvořit vodíkové vazby a fosfinová skupina zase schopnost mít na sobě navázaný další uhlovodíkový řetězec, což může být využito pro zavedení specifické skupiny do molekuly, jak je uvedeno například v této diplomové práci.

V následujících dvou kapitolách budou popsány metody přípravy fosfonových a fosfinových derivátů makrocyclických ligandů. Příprava samotných fosforových reaktantů zde popsána nebude, neboť vychází z metod používaných v klasické organické chemii. Výjimkou je adice P-H vazby na násobnou vazbu.

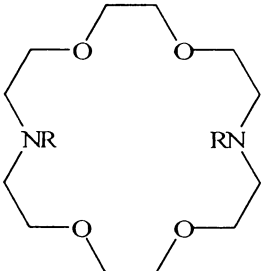
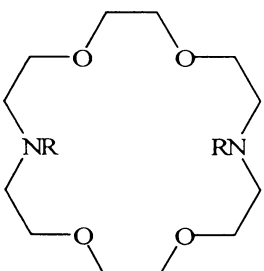
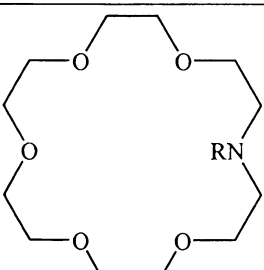
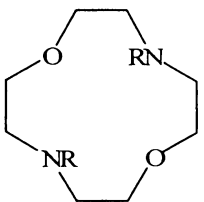
3.1.1.1 Příprava fosfonových derivátů makrocyclických ligandů

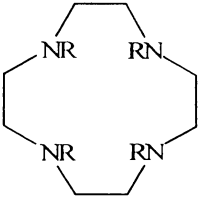
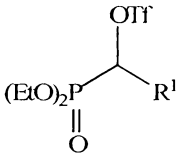
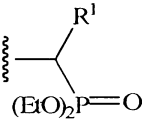
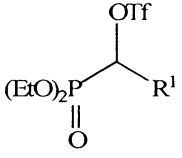
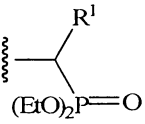
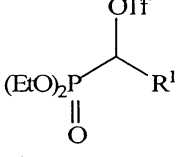
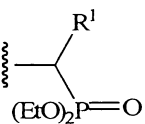
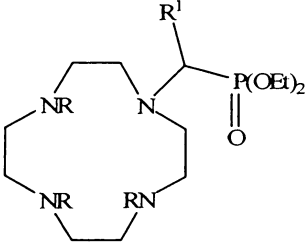
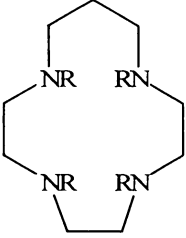
V literatuře lze nalézt několik způsobů přípravy fosforových analogů makrocyclických ligandů. Nejčastěji se používají různé varianty Mannichovy reakce⁷, která je založena na reakci sloučeniny s P-H vazbou, formaldehydu a sloučeniny s N-H vazbou. Tato reakce je prováděna buď ve vodném prostředí, nejčastěji za přítomnosti HCl⁸⁻¹³ (zředěná nebo koncentrovaná), nebo v organických rozpouštědlech, jako je benzen^{9,14,15} a tetrahydrofuran^{15,16}. Pokud se reakce provádí v nevodném prostředí, voda vznikající v průběhu reakce se odstraňuje azeotropickou destilací, nebo molekulárními sítí¹⁴. Kromě formaldehydu lze použít i jiné aldehydy, ale výtěžky jsou nižší, proto se vyšší aldehydy nepoužívají⁸. Vyšších výtěžků než s komerčním 37% roztokem formaldehydu je možné dosáhnout s paraformaldehydem¹⁴, který lze z roztoku získat postupem uvedeným v kapitole 4.1. Nevýhodou Mannichovy reakce je nejen vznik meziprojektu chlormethyl-methyletheru (CH₂ClOCH₃), jenž je velmi toxický a mutagenní, ale hlavně problém s čištěním reakční směsi, neboť při reakci vzniká mnoho různých produktů, které lze od sebe velmi špatně oddělit.

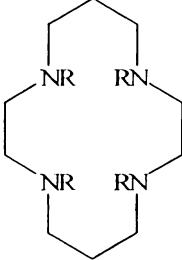
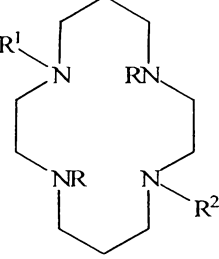
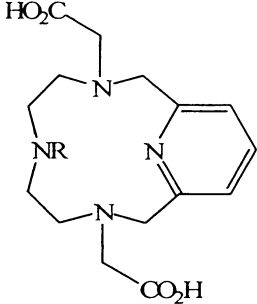
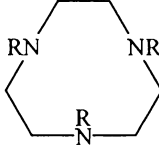
Další možností zavedení fosfonové skupiny do molekuly je alkylace, kdy se jako odstupující skupina používá chlor⁸, brom¹⁷ nebo triflát¹⁸. Tyto reakce se provádějí jak v kyselém, tak i v bazickém prostředí, a jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech (MeOH, MeCN, ...). Uvedená reakce má tu výhodu,

že mezi atomem dusíku a fosforu nemusí být jen methylenová skupina, ale i delší uhlovodíkový řetězec. Málo používanou reakcí je reakce alkylchloridu s triethylfosfitem⁸, i když má stejné výhody jako alkylace. Všechny tyto typy reakcí jsou vedeny v tabulce 3.1. Jako molekuly s aminovou skupinou byly vybrány již zmíněné makrocyclické ligandy, i když lze tyto reakce provádět i na jiných typech molekul včetně těch, které nemají sekundární, ale primární aminovou skupinu⁷. Dalším málo využívaným typem reakce je Michaelova adice¹⁷, která bývá kyselé katalyzovaná.

Tabulka 3.1 Příklady příprav fosfonových derivátů makrocyclických ligandů

makrocycklus	fosforová komponenta	provedení reakce	produkt (R =)	výtěžek*	lit.
 R = H	30% H ₃ PO ₃	a (lit. ¹⁹)	CH ₂ PO ₃ H ₂	84 %	⁸
	ClCH ₂ PO ₃ H ₂	b (lit. ¹⁹)	CH ₂ PO ₃ H ₂	< 10 %	⁸
	30% H ₃ PO ₃	c (lit. ⁷)	CH(CH ₃)PO ₃ H ₂	< 10 %	⁸
 R = CH ₂ CH ₂ Cl	P(OEt) ₃	d	(CH ₂) ₂ PO ₃ H ₂	74 %	⁸
 R = H	CH ₂ =CHP(O)(OEt) ₂	e	(CH ₂) ₂ P(O)(OEt) ₂	69 %	¹⁷
	Br(CH ₂) ₃ P(O)(OEt) ₂	f	(CH ₂) ₃ P(O)(OEt) ₂	58 %	¹⁷
	Br(CH ₂) ₄ P(O)(OEt) ₂	f	(CH ₂) ₄ P(O)(OEt) ₂	45 %	¹⁷
	Br(CH ₂) ₅ P(O)(OEt) ₂	f	(CH ₂) ₅ P(O)(OEt) ₂	46 %	¹⁷
 R = H	HP(O)(OEt) ₂	g	CH ₂ P(O)(OEt) ₂	43 %	⁹
	H ₃ PO ₃	a	CH ₂ PO ₃ H ₂	99 %	⁹

makrocyklus	fosforová komponenta	provedení reakce	produkt (R =)	výtěžek*	lit.
	H_3PO_3	a	$CH_2PO_3H_2$	65 %	¹⁰
	H_3PO_3	a	$CH_2PO_3H_2$	37 %	¹¹
	H_3PO_3	h	$CH_2PO_3H_2$	80 %	¹²
 R = H	 $R^1 = (CH_2)_7CH_3$	i		41 %	¹⁸
	 $R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	i		61 %	¹⁸
	 $R^1 = 4-C_2H_4-NO_2$	i		91 %	¹⁸
 R = H	$P(OEt)_3$ $R^1 = (CH_2)_7CH_3$	j	$CH_2P(O)(OEt)_2$	48 %	¹⁸
	$P(OEt)_3$ $R^1 = (CH_2)_{10}CH_3$	j	$CH_2P(O)(OEt)_2$	76 %	¹⁸
	$P(OEt)_3$ $R^1 = 4-C_2H_4-NO_2$	j	$CH_2P(O)(OEt)_2$	58 %	¹⁸
 R = H	H_3PO_3	a	$CH_2PO_3H_2$	46 %	¹¹

makrocyklus	fosforová komponenta	provedení reakce	produkt (R =)	výtěžek*	lit.
 <p>R = H</p>	H ₃ PO ₃	a	CH ₂ PO ₃ H ₂	53 %	¹¹
 <p>R = H</p>	HP(O)(OEt) ₂ R ¹ =R ² =CH ₂ Ph	k	CH ₂ PO ₃ H ₂	70 %	¹⁴
	HP(O)(OEt) ₂ R ¹ =CH ₃ , R ² =CH ₂ Ph	k	CH ₂ PO ₃ H ₂	85 %	¹⁴
	HP(O)(OEt) ₂ R ¹ =R ² =CH ₃	k	CH ₂ PO ₃ H ₂	80 %	¹⁴
 <p>R = H</p>	H ₃ PO ₃	h	CH ₂ PO ₃ H ₂	5 %	¹³
 <p>R = H</p>	HP(O)(OMe) ₂	l	CH ₂ P(O)(OMe) ₂	43 %	¹⁶
	HP(O)(OEt) ₂	l	CH ₂ P(O)(OEt) ₂	43 %	¹⁶
	HP(O)(OPr) ₂	l	CH ₂ P(O)(OPr) ₂	43 %	¹⁶
	HP(O)(OBu) ₂	l	CH ₂ P(O)(OBu) ₂	44 %	¹⁶
	HP(O)(OBu) ₂	m	CH ₂ P(O)(OBu) ₂	96 %	¹⁵
	HP(O)(OBu) ₂	l	CH ₂ P(O)(OBu) ₂	43 %	¹⁵

* vztaženo na makrocyklus

Provedení reakcí

- a) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v roztoku HCl : H₂O (1:1) byla zahřáta na 100 až 115 °C a během několika hodin byl při této teplotě přidán 37% roztok formaldehydu ve vodě. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 2,5 až 16 hodin.
- b) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné ve vodném roztoku NaOH (pH 10 až 12) byla refluxována 5 dní.
- c) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v roztoku HCl : H₂O (1:1) byla zahřáta na 100 °C a během hodiny byl při této teplotě přidán vodný roztok acetaldehydu. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 4 hodiny.
- d) 1. Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu byla míchána v inertní atmosféře 4 hodiny při 155 °C.
2. Po zpracování byla reakční směs refluxována v roztoku HCl : H₂O (1:1) 2 dny.
- e) K reakční směsi obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v MeOH bylo přidáno katalytické množství AcOH a reakční směs byla refluxována 10 dní.
- f) Do reakční směsi obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v MeCN byl přidán K₂CO₃ a reakční směs byla míchána 8 hodin při 82 °C.
- g) Do reakční směsi obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v benzenu byl přidán Et₃N. Reakční směs byla zahřáta k varu a během hodiny byl do vroucí reakční směsi přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována (s azeotropickým odstraňováním vody) přes noc.
- h) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v roztoku HCl : H₂O (1:3) byla zahřáta k varu a během hodiny byl do vroucí reakční směsi přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 1 hodinu.
- i) Do reakční směsi obsahující roztok makrocyklu v CHCl₃ byl za chladu během několik hodin přidán roztok fosforové komponenty a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 2 až 5 dní.

- j) Do reakční směsi obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu byl přidán paraformaldehyd a reakční směs byla míchána 4 dny při laboratorní teplotě.
- k) 1. Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v benzenu byla zahřáta k varu a během hodiny byl do vroucí reakční směsi přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována (s azeotropickým odstraňováním vody) 1,5 hodiny.
2. Po zpracování byla reakční směs rozpuštěna v roztoku HCl : H₂O (1:1), byla do ní přidána H₃PO₃ a reakční směs byla refluxována 1 hodinu. Potom byl do vroucí reakční směsi přidán 37% roztok formaldehydu ve vodě a reakční směs byla refluxována 4 hodiny.
- l) 1. Do reakční směsi obsahující makrocyklus byl přidán THF a kovový sodík. Reakční směs byla refluxována 1 až 1,5 hodiny. Po zpracování byl do reakční směsi přidán THF, CH₂ClOCH₃ a DIPEA a reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C.
2. Do zpracované reakční směsi rozpuštěné v benzenu byla přidána fosforová komponenta a reakční směs byla refluxována 15 minut.
- m) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v benzenu byla zahřáta k varu a během 45 minut byl do vroucí reakční směsi přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 30 minut.

Další přípravy fosfonových derivátů makrocyclických ligandů lze najít v patentech²⁰⁻²² a člancích^{15,23-26}. Způsoby přípravy jsou založeny na výše uvedených principech.

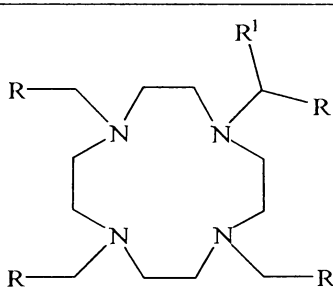
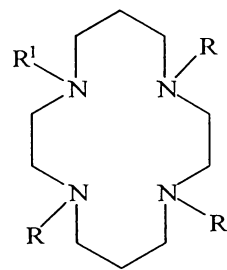
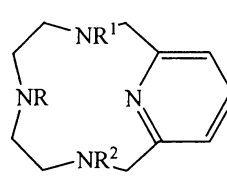
Kromě toho lze připravit fosfonové deriváty makrocyclických ligandů i adicí P-H vazby na dvojnou vazbu v makrocyklu (C=C, C=N)²⁷.

Zpracování reakční směsi po Mannichově reakci se provádí různými způsoby, například odpařením reakční směsi do sucha a rozpuštěním v ethanolu. Z tohoto roztoku se produkt vysráží ve formě hydrochloridu. Další možností je sloupcová chromatografie nebo použití ionexů. Podobné zpracování reakční směsi je i po provedení jiného způsobu přípravy fosfonové skupiny (alkylace, ...).

Pokud není produktem reakce fosfonová kyselina, ale fosfonát, je možné provést hydrolyzu. Někdy se provádí ihned po samotné reakci (viz tabulka 3.1), jindy

se napřed ester izoluje a pak se teprve provede hydrolyza (viz tabulka 3.2). Produkt bazické hydrolyzy závisí na množství přidané báze. Lze tak například připravit směs di- a monoesterů. Přednostně se hydrolyzuje diester, a proto je možné připravit produkt, ve kterém budou pouze monoestery²¹. Hydrolyza na fosfonovou kyselinu se nejčastěji provádí v kyselém prostředí^{18,21}.

Tabulka 3.2 Příklady příprav fosfonových kyselin z jejich esterů

makrocyklus	provedení reakce	produkt (R =)	výtěžek*	lit.
 <p>R = P(O)(OEt)₂</p>	a	CH ₂ P(O)(OH) ₂ R ¹ = (CH ₂) ₇ CH ₃	67 %	18
	a	CH ₂ P(O)(OH) ₂ R ¹ = (CH ₂) ₁₀ CH ₃	85 %	18
	a	CH ₂ P(O)(OH) ₂ R ¹ = 4-C ₂ H ₄ -NO ₂	88 %	18
 <p>R = CH₂P(O)(OEt)₂ R¹ = CH₂Ph</p>	b	CH ₂ P(O)(OH) ₂ R ¹ = H	95 %	14
 <p>R = CH₂P(O)(OEt)₂ R¹ = CH₂P(O)(OEt)₂ R² = CH₂P(O)(OEt)₂</p>	c	R = CH ₂ P(O)(OEt)(OH) R ¹ = CH ₂ P(O)(OEt) ₂ R ² = CH ₂ P(O)(OEt) ₂		21
	d	R = CH ₂ P(O)(OEt)(OH) R ¹ = CH ₂ P(O)(OEt)(OH) R ² = CH ₂ P(O)(OEt) ₂		21
	e	R = CH ₂ P(O)(OEt)(OH) R ¹ = CH ₂ P(O)(OEt)(OH) R ² = CH ₂ P(O)(OEt)(OH)		21
	f	CH ₂ PO ₃ H ₂		21

* vztaženo na makrocyklus

Provedení reakcí

- a) Reakční směs obsahující makrocyklus rozpuštěný v roztoku 30 % HBr v AcOH byla míchána 40 hodin při laboratorní teplotě.
- b) 1. Reakční směs obsahující makrocyklus rozpuštěný v EtOH byla okyselena HCOOH a bylo přidáno 10% Pd/C. Reakční směs byla míchána v atmosféře H₂ 48 hodin při laboratorní teplotě.
2. Po zpracování byla reakční směs rozpuštěna v roztoku 30 % HBr v AcOH a míchána při laboratorní teplotě přes noc.
- c) Reakční směs obsahující makrocyklus rozpuštěný ve vodném roztoku NaOH (1 ekv.) byla míchána při 30 až 110 °C.
- d) Reakční směs obsahující makrocyklus rozpuštěný ve vodném roztoku NaOH (2 ekv.) byla míchána při 30 až 110 °C.
- e) Reakční směs obsahující makrocyklus rozpuštěný ve vodném roztoku NaOH (3 ekv.) byla míchána při 30 až 110 °C.
- f) Reakční směs obsahující makrocyklus rozpuštěný v roztoku HCl : H₂O (1:1) byla míchána při 80 až 100 °C.

Další příklady hydrolýzy lze nalézt v patencích²⁰⁻²² a článcích^{15,25,28}. Způsoby přípravy jsou založeny na stejných principech jako výše.

Lze samozřejmě připravit i různě substituované deriváty makrocyklů. Jejich syntéza je velmi podobná, navíc zahrnuje pouze chránění aminových skupin.

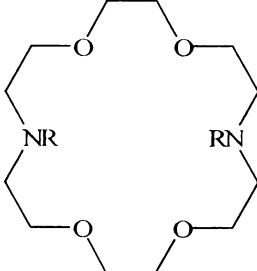
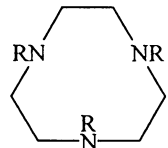
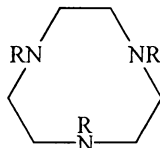
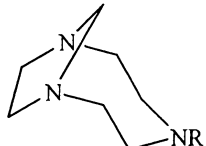
3.1.1.2 Příprava fosfinových derivátů makrocyclických ligandů

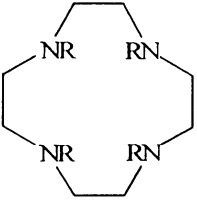
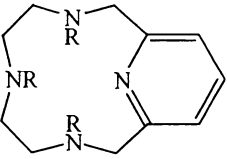
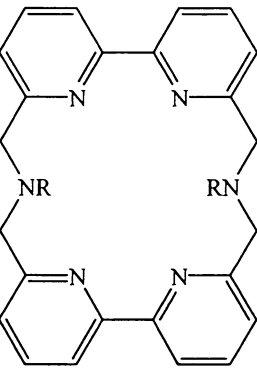
Stéricky nebráněné aminy reagují s fosforovými reaktanty, jako je fosforová kyselina a její estery nebo fosfinové kyseliny a jejich estery, a s formaldehydem nebo paraformaldehydem. V nevodných rozpouštědlech, jako je benzen^{15,16}, toluen nebo THF^{21,29-33}, je reakce obvykle prováděna s estery fosforových reaktantů. Formaldehyd je přidáván jako paraformaldehyd (2 až 4 ekv.). Ve vodě a jejích roztocích je reakce prováděna s fosforovými reaktanty rozpustnými ve vodě a formaldehyd je přidáván jako 37% vodný roztok (2 až 4 ekv.). Kromě samotné vody může být také použit vodný roztok HCl^{8,21,34} od zředěné až po koncentrovanou. Teplota se může pohybovat od 40 °C až po reflux. Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.1.1.1, při Mannichově reakci vzniká chlormethyl-methylether, a proto je potřeba při provádění této reakce pečlivě dodržovat bezpečnost práce.

Pokud se jako reaktant při Mannichově reakci použije dichlorethylfosfin^{15,20}, je také třeba pečlivě dodržovat bezpečnost práce, neboť jeho hydrolýza je velmi bouřlivá již při laboratorní teplotě a vzniká ethylfosfin nebo jeho deriváty, které spontánně vzplanou v kontaktu se vzduchem. Proto je třeba provádět tuto reakci za chladu. Samotný dichlorethylfosfin je velmi toxický, nepříjemného zápachu a je korozivní.

Další z možností přípravy fosfinových derivátů makrocyclických ligandů je alkylace²⁹, kdy se jako odstupující skupiny používají halogenidy (Cl, Br, I) nebo mesyl.

Tabulka 3.3 Příklady příprav fosfinových derivátů makrocyclických ligandů

makrocyklus	fosforová komponenta	provedení reakce	produkt (R =)	výtěžek*	lit.
 <p>R = H</p>	50% H ₃ PO ₂	a	CH ₂ PO ₂ H ₂	74 %	⁸
 <p>R = H</p>	MeP(OEt) ₂	b	 +  R = CH ₂ P(O)(Me)(OEt)	30 %	²⁹
	BrCH ₂ P(Me)(OEt)(O)	c	CH ₂ P(O)(Me)(OEt)	60 %	²⁹
	MeSO ₂ OCH ₂ P(Me)(OEt)(O)	c	CH ₂ P(O)(Me)(OEt)	60%	²⁹
	HP(O)(Et)(OEt)	d	CH ₂ P(O)(Et)(OEt)	41 %	¹⁶
	HP(O)(Et)(OEt)	e	CH ₂ P(O)(Et)(OEt)	32 %	¹⁵
	HP(O)(Et)(OEt)	d	CH ₂ P(O)(Et)(OEt)	41 %	¹⁵
	Cl ₂ PEt	f	CH ₂ P(O)(Et)(OH)	49 %	¹⁵
	MeP(OEt) ₂	g	CH ₂ P(O)(Me)(OEt)	84 %	³⁵

makrocyklus	fosforová komponenta	provedení reakce	produkt (R =)	výtěžek*	lit.
 R = H	MeP(OEt) ₂	b	CH ₂ P(O)(Me)(OEt)		30
	Cl ₂ PEt	f	CH ₂ P(O)(Et)(OH)	44 %	20
	PhP(OEt) ₂	b	CH ₂ P(O)(Ph)(OEt)	75 %	31
	PhCH ₂ P(OEt) ₂	b	CH ₂ P(O)(CH ₂ Ph)(OEt)	75 %	31
	BuP(OEt) ₂	b	CH ₂ P(O)(Bu)(OEt)	75 %	31
	MeOC ₆ H ₄ CH ₂ P(OEt) ₂	h	CH ₂ P(O)(CH ₂ C ₆ H ₄ OMe)(OEt)	24 %	32
	HP(O)(Ph)(OH)	i	CH ₂ P(O)(Ph)(OH)	65 %	34
 R = H	MeP(OEt) ₂	b	CH ₂ P(O)(Me)(OEt)		21
	HP(O)(OH)(Et)	a	CH ₂ P(O)(Et)(OH)		21
 R = H	PhP(OMe) ₂	h	CH ₂ P(O)(Ph)(OMe)	45 %	33

* vztaženo na makrocyklus

Provedení reakcí

- a) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v roztoku HCl : H₂O (1:1) byla zahřáta k varu a během hodiny byl do vroucí reakční směsi přidán 37% vodný roztok formaldehydu ve vodě. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 6 hodin.
- b) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v THF byla zahřáta k varu a během hodiny byl do vroucí reakční směsi přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 16 hodin.
- c) Do reakční směsi obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v DMF byl přidán K₂CO₃ a reakční směs byla míchána 6 hodin při 60 °C.
- d)
 1. Do reakční směsi obsahující makrocyklus byl přidán THF a kovový Na. Reakční směs byla refluxována 1 až 1,5 hodiny. Po zpracování byl do reakční směsi přidán THF, CH₂ClOCH₃ a DIPEA a reakční směs byla míchána 1 hodinu při 0 °C.
 2. Do zpracované reakční směsi rozpuštěné v benzenu byla přidána fosforová komponenta a reakční směs byla refluxována 15 minut.
- e) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v benzenu byla zahřáta k varu a během 25 minut byl do vroucí reakční směsi přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 25 minut.
- f) Dichlorethylfosfin byl pomalu smíchán s ledem za vzniku ethylfosfinové kyseliny. Po ohřátí na laboratorní teplotu byl přidán cyklen, reakční směs byla přivedena k varu v atmosféře dusíku a během 1 až 5 hodin byl do vroucí reakční směsi přidán roztok paraformaldehydu v roztoku HCl : H₂O (1:1). Potom byla reakční směs refluxována 1 hodinu.
- g) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu (fosforová komponenta byla použita jako rozpouštědlo) byla zahřáta na 80 °C a během hodiny byl při této teplotě přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs refluxována 16 hodin.

- h) Do roztoku makrocyklu a paraformaldehydu v THF byl přidán roztok fosforové komponenty v THF. Potom byla reakční směs refluxována v Soxhletově aparatuře s 3 Å nebo 4 Å molekulárním sítem 18 až 24 hodin pod atmosférou argonu.
- i) Reakční směs obsahující makrocyklus a fosforovou komponentu rozpuštěné v roztoku HCl : H₂O (1:1) byla zahřáta na 65 °C a během 2 hodin byl při této teplotě přidán paraformaldehyd. Po ukončení přidávání byla reakční směs míchána 3 hodiny při 65 °C.

Další příklady lze nalézt v několika patentech a člancích, způsoby příprav jsou podobné těm, které jsou uvedeny výše. Jako makrocyklus je většinou použit 1,4,7-triazacyklononan, 1,4,7,10-tetraazacyklododekan, nebo 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan. Příprava je většinou prováděna Mannichovou reakcí (fosforová kyselina²⁶, fenyfosfinová kyselina²⁶ – provedení reakce „a“, diethoxymethylfosfin^{25,36-43}, dimethoxyfenylfosfin^{44,45}, dimethoxymethylfosfin^{44,45} a další fosforové komponenty^{45,46} – provedení reakce „b“, dichlorethylfosfin^{24,28,47} – provedení reakce „f“, všechny polohové izomery diethoxy(methoxybenzyl)fosfinu³² – provedení reakce „h“, fenyfosfinová kyselina⁴⁸, 4-nitrofenylfosfinová kyselina⁴⁹, fosforová kyselina⁵⁰ – provedení reakce „i“) nebo alkylací (bromderivát³⁶, mesylderivát⁴⁶ – provedení reakce „c“).

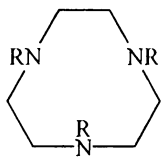
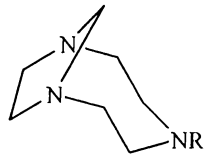
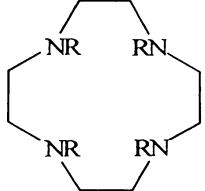
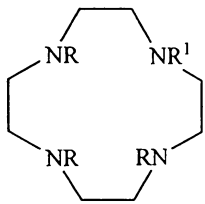
Další méně obvyklé fosforové komponenty lze nalézt v patentu zabývajícím se deriváty DOTA²².

Kromě toho lze připravit fosfinové deriváty makrocyclických ligandů též adicí P-H vazby na dvojnou vazbu v makrocyklu (C=C, C=N)²⁷.

Zpracování reakční směsi se provádí různými způsoby, například extrakcí nebo destilací za sníženého tlaku. Čištění se provádí použitím ionexů (pokud je produktem fosfinová kyselina) nebo sloupcovou chromatografií na silikagelu nebo alumině (pokud je produktem ester).

Pokud není produktem reakce fosfinová kyselina, ale fosfinát, je možné provést hydrolýzu. Někdy se provádí ihned po samotné reakci (viz tabulka 3.3), jindy se napřed ester izoluje a pak se teprve provede hydrolýza (viz tabulka 3.4). Výtěžky se obvykle pohybují od 80 do 100 %.

Tabulka 3.4 Příklady příprav fosfinových kyselin z jejich esterů

makrocyklus	provedení reakce	produkt (R =)	lit.
 $R = \text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Me})(\text{OEt})$	a	$\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Me})(\text{OH})$	²⁹
 $R = \text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Me})(\text{OEt})$	a	$\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Me})(\text{OH})$	²⁹
 $R = \text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Me})(\text{OEt})$	a	$\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Me})(\text{OH})$	³⁰
 $R = \text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Ph})(\text{OEt})$ $R^1 = \text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NMe}_2$	b	$\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{Ph})(\text{OH})$	³¹

Provedení reakcí

- Reakční směs obsahující makrocyklus rozpuštěný v roztoku HCl : H₂O (1:1) byla míchána 18 hodin při 125 až 140 °C.
- Do reakční směsi obsahující makrocyklus rozpuštěný v methanolu byl přidán 10% vodný roztok KOH a reakční směs byla míchána 12 až 24 hodin při 20 až 70 °C.

Další příklady lze nalézt v patentech a člancích, způsoby příprav jsou podobné těm, které jsou uvedeny výše. Jedná se tedy hydrolyzu v kyselém prostředí (methylester^{31,44,46}, ethylester^{15,21,31,35,36,43,46} – provedení reakce „a“) a bazickém prostředí (methylester⁴⁵, ethylester^{21,25,35,37,39,40,42,51} – provedení reakce „b“).

Lze samozřejmě připravit i různě substituované deriváty makrocyklů. Jejich syntéza je velmi podobná, navíc zahrnuje pouze chránění aminových skupin.

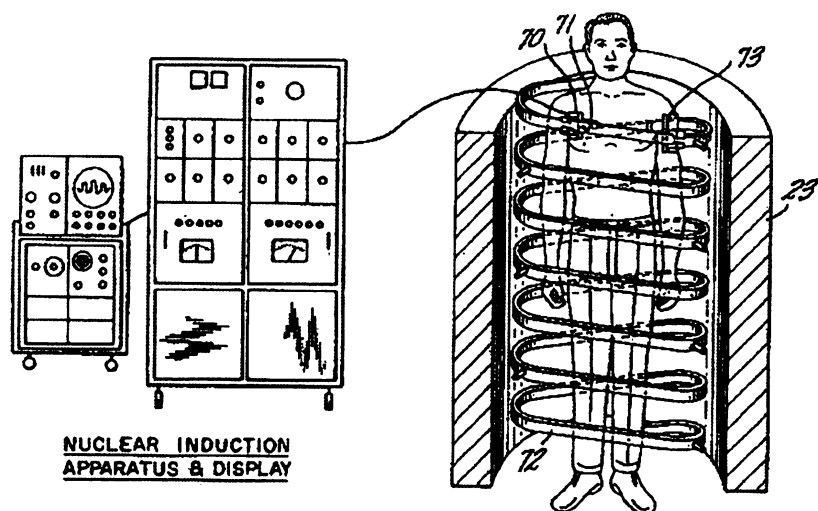
3.2 Použití komplexů makrocyclických ligandů

3.2.1 Kontrastní látky pro tomografii magnetické rezonance

Komplexy makrocyclických ligandů s některými ionty kovu (nejčastěji Gd^{3+}) lze použít jako kontrastní látky⁵² pro MRI⁵³, neboť tyto komplexy zvyšují relaxační rychlost atomů vodíku, což má za následek zvýšení intenzity signálu.

3.2.1.1 Historie MRI

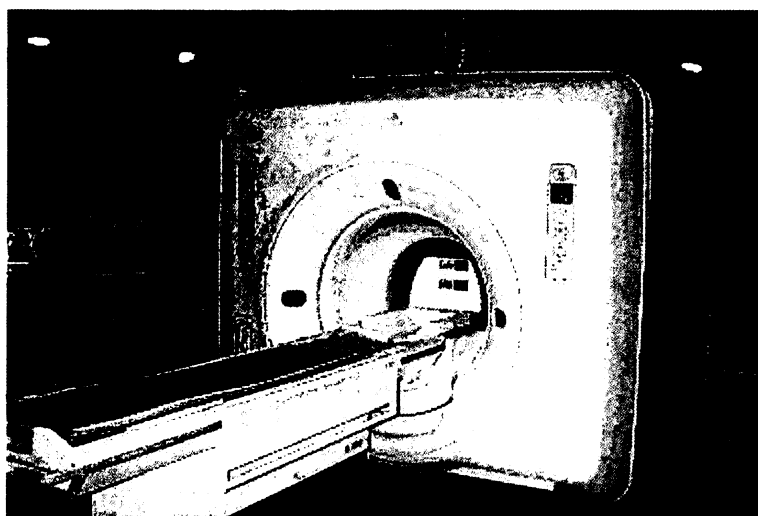
Tomografie magnetické rezonance je zobrazovací technika převážně používaná pro lékařské aplikace. Jejím výsledkem jsou snímky lidského těla. MRI je založena na principech nukleární magnetické rezonance (NMR), což je spektroskopická technika umožňující získat informace o molekulách. NMR je známa již dlouho a jako analytický nástroj se začala používat v padesátých letech 20. století, kdy byla také udělena Nobelova cena za fyziku za rozvoj nových metod pro přesná měření jaderného magnetismu a s tím spojené objevy (1952 – Felix Blochov a Edward Mills Purcell). V roce 1971 Raymond Damadian zjistil, že se relaxační čas tkání nádorů liší⁵⁴, a tak přišel s myšlenkou využít tuto skutečnost ke zjišťování nemocí. V roce 1974 si Raymond Damadian nechal patentovat aparaturu (viz obrázek 3.7) a metodu pro detekci nádoru v tkáni⁵⁵.



Obrázek 3.7 Aparatura na měření MRI; převzato z lit.⁵⁵

Vývoj pokračoval rychlým tempem dál, o čemž svědčí Nobelova cena za chemii v roce 1991 (Richard R. Ernst – za jeho příspěvek k rozvoji vysoce rozlišitelné nukleární magnetické rezonance) a Nobelova cena za fyziologii a

lékařství v roce 2003 (Paul Lauterbur a Sir Peter Mansfield – za objevy ve vztahu k zobrazování magnetickou resonancí). V roce 2003 už bylo ve světě přibližně 10 000 MRI přístrojů (viz obrázek 3.8) a stále jich přibývá.



Obrázek 3.8 MRI přístroj

3.2.1.2 Princip MRI

Při MRI experimentu se měří stejné vlastnosti NMR aktivních jader jako u klasického NMR experimentu⁵⁶. Jako aktivní jádro se ale v tomto případě používá pouze jádro vodíku (^1H), protože je v těle zastoupeno nejvíce (lidské tělo obsahuje přibližně 63 % vody a i v organických látkách jsou atomy vodíku přítomny).

Jak je známo z NMR, jádra vodíku v silném magnetickém poli o magnetické indukci B_0 začnou vykonávat precesní pohyb (Larmorova precese) s frekvencí ω_0 . Velikost frekvence závisí kromě intenzity magnetické indukce také na gyromagnetickém poměru jádra γ (viz rovnice 3.1).

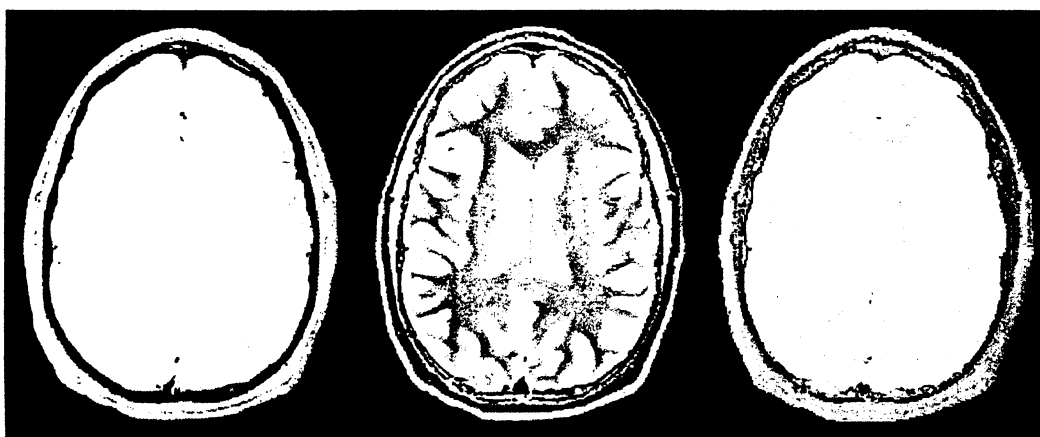
$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (3.1)$$

Při MRI vyšetřeních⁵³ se obvykle používají magnetická pole o velikosti 0,1 až 1,5 T (pro srovnání, magnetické pole Země má velikost 10^{-4} T). Vyšší intenzita, ač by šla dosáhnout (NMR spektrometry mají intenzitu magnetického pole až 21 T), se nepoužívá, neboť má nežádoucí účinky na člověka (nevolnost, ztráta orientace, ...).

MRI snímek je získán aplikací série elektromagnetických pulzů v kombinaci s použitím přechodných gradientů magnetického pole, což umožňuje získat snímky z různých částí těla. Výsledkem jsou 2D nebo 3D snímky, které zobrazují vodíková

jádra v různých částech těla. Tímto postupem je získán černobílý snímek, ve kterém stupeň šedi odpovídá hustotě atomů vodíku (viz obrázek 3.9A).

Další typy snímků využívají T_1 (viz obrázek 3.9B) a T_2 (viz obrázek 3.9C) procesy, ke kterým dochází po ukončení radiofrekvenčního měřicího pulzu, kdy nastává relaxace a jádra se vrací do původního energetického stavu. T_1 proces, který je také označován jako spin-mřížková (longitudinální, podélná) relaxace, je analogií tepelného vyzařování známého z klasické fyziky, kdy se energie rozptyluje do okolní tkáně. T_2 proces, který je také označován jako spin-spinová (transversální, příčná) relaxace, nemá v klasické fyzice obdobu a zahrnuje rozptyl energie mezi samotnými jádry. Zjišťováním T_1 a T_2 relaxačních časů atomů vodíku lze tedy vytvořit T_1 a T_2 vážené snímky.



Obrázek 3.9 MRI snímky lidského mozku; A – hustota jader vodíku; B – T_1 vážený; C – T_2 vážený; převzato z lit.⁵⁷

Protože různé typy tkání obsahují rozdílné koncentrace látek (iontů, organických molekul, ...), lze díky T_1 a T_2 váženým snímkům lze identifikovat různé druhy tkání a dokonce lze rozpoznat i zdravou a nemocnou tkáň stejného typu⁵³.

3.2.1.3 Relaxivita

Jak již bylo řečeno v úvodu, kontrastní látky zvyšují relaxační rychlost atomů vodíku. Tato vlastnost se nazývá relaxivita⁵² (viz rovnice 3.2).

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i[Gd], \text{ kde } i = 1, 2 \quad (3.2)$$

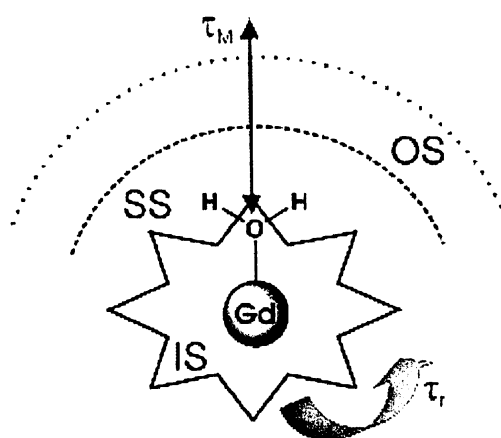
$T_{i,obs}$ je pozorovaná relaxační rychlost, $T_{i,d}$ je diamagnetický příspěvek, r_i je relaxivita a $[Gd]$ je koncentrace gadolinia v roztoku. Převrácená hodnota druhého členu je $T_{i,p}$, což je paramagnetický příspěvek (viz rovnice 3.3).

$$\frac{1}{T_{i,p}} = r_i[Gd], \text{ kde } i = 1, 2 \quad (3.3)$$

Koncentrace gadolinia se obvykle udává v mmol dm^{-3} , takže relaxivita je vyjadřována v $\text{mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ a u současných používaných kontrastních látek se pohybuje kolem $5 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$.

Matematické vyjádření mechanismů magnetické relaxace ve vodných roztocích paramagnetických látek popisuje Bloembergenova-Solomonova-Morganova teorie⁵⁸.

Jako model pro tuto teorii slouží roztok gadolinitého komplexu (viz obrázek 3.10), ve kterém jsou znázorněny tři typy molekul vody podle toho, jak jsou ovlivňovány paramagnetickou látkou. Jedná se o molekuly vody, které jsou přímo koordinované na komplex gadolinia (vnitřní sféra), molekuly interagující s komplexem (druhá sféra) a molekuly vody neovlivněné komplexem (vnější sféra).

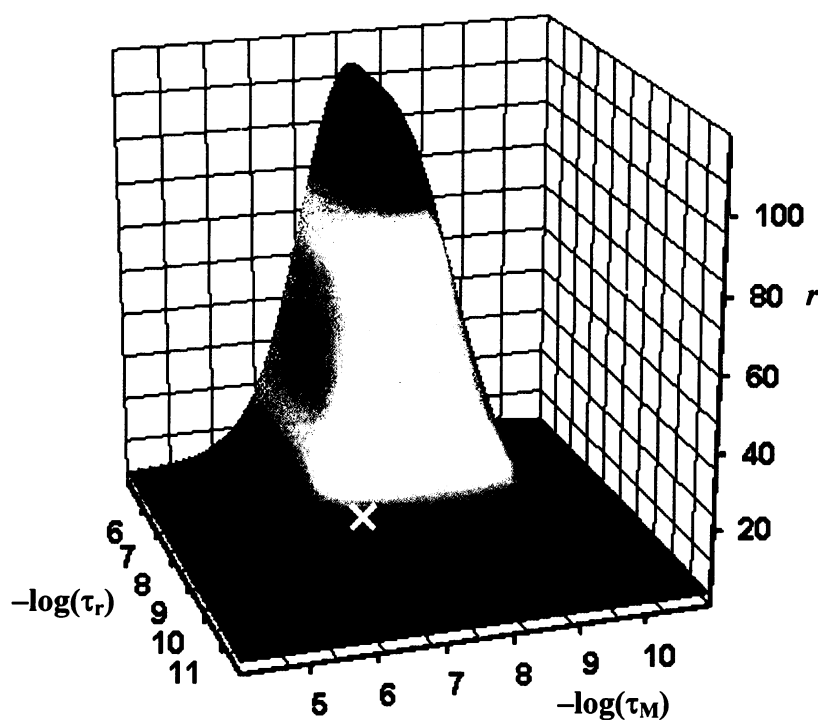


Obrázek 3.10 Schematické zobrazení kontrastní látky v roztoku; IS – vnitřní sféra; SS – druhá sféra; OS – vnější sféra; τ_M - residenční čas molekuly vody ve vnitřní sféře; τ_r – rotační korelační čas

Celková relaxace je pak vyjádřena jako součet dílčích relaxací (viz rovnice 3.4), přičemž tyto relaxace závisí mimo jiné na residenčním čase molekuly vody ve vnitřní sféře (τ_M), rotačním korelačním času (τ_r), koncentraci gadolinitého komplexu a na počtu molekul vody v první a druhé sféře.

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{SS} + r_i^{OS}, \text{ kde } i = 1, 2 \quad (3.4)$$

Tyto a další proměnné je nutno optimalizovat, aby bylo dosaženo vysoké relaxivity, a tím i lepší kvality MRI snímků. Kontrastní látky používané v současnosti mají relaxivitu kolem $5 \text{ mmol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, zatímco teoretická hodnota, kterou by bylo možné dosáhnout úpravou parametrů, je 20krát vyšší (viz obrázek 3.11)⁵⁹.



Obrázek 3.11 Simulace teoreticky dosažitelné relaxivity v závislosti na τ_r a τ_M ; simulace byla provedena při 0,5 T a 37 °C; křížek označuje oblast klinicky používaných kontrastních látek

Jak je vidět z obrázku 3.11, problémem je příliš dlouhý residenční čas molekuly vody ve vnitřní sféře (tj. pomalá výměna molekul vody) a krátký rotační korelační čas. Oba dva tyto parametry závisejí na struktuře molekuly, a lze je proto měnit. Residenční čas molekuly vody ve vnitřní sféře lze jednat měnit velikostí makrocyclu a jednak, což je účinnější, lze měnit postranní řetězce připojené k atomům dusíku. Čím jsou totiž postranní řetězce objemnější, tím rychleji je voda

vypuzována. Nicméně i zde existuje optimum, které je třeba experimentálně nalézt, což se před několika lety podařilo^{49,60}.

Rotační korelační čas odpovídá rychlosti, kterou se komplex v roztoku otáčí kolem své osy. Zvýšení hodnoty tohoto parametru lze tedy například dosáhnout navázáním makrocyclu na makromolekulu⁶¹, například připojením makrocyclů na dendrimer nebo na vhodnou biomolekulu.

3.2.1.4 Kontrastní látky pro MRI

Kontrastní látky jsou chemické substance, které jsou zavedeny do určitého orgánu nebo oblasti proto, aby zvýšily rozdíl mezi různými tkáněmi nebo mezi normální a abnormální tkání. MRI kontrastní látky jsou rozděleny podle různých změn v relaxačních časech po jejich podání.

Pozitivní kontrastní látky (na snímcích způsobují zesvětlení dané oblasti) způsobují zkrácení T_1 relaxačního času (tj. zvýšení intenzity signálu na T_1 vážených snímcích). Jsou to typicky komplexy molekul o malé molární hmotnosti s iontem gadolinitým, manganatým nebo železitým. Všechny tyto prvky mají nespárované valenční elektrony a dlouhé relaxivity. Kontrastní látky obsahující gadolinitý ion jsou většinou používané pro centrální nervovou soustavu a celkové vyšetření a komplexy s manganatým iontem jsou speciálně používané pro vyšetření jater.

Negativní kontrastní látky (na snímcích způsobují ztmavění dané oblasti) jsou malé agregáty částic často nazývané SPIO (z anglického názvu „superparamagnetic iron oxid“). Tyto látky přednostně způsobují spin-spinovou relaxaci (nehomogenity v magnetickém poli), což má za následek zkrácení T_1 a T_2 relaxačních časů. SPIO a USPIO (z anglického názvu „ultrasmall superparamagnetic iron oxid“) částice mají obvykle jádro z krystalického oxidu železitého, které obsahuje tisíce atomů železa. Povrch je pokryt například polymerem, dextranem, polyethylenglykolem. SPIO částice způsobují velmi vysoké T_2 relaxivity. USPIO částice menší než 300 nm způsobují značný T_1 relaxační a T_2 vážený efekt a jsou proto používány přednostně.

Zvláštní skupinou negativních kontrastních látek jsou deriváty perfluoruhlovodíků, protože jejich přítomnost vytěsňuje atomy vodíku (respektive molekuly, v nichž jsou přítomny), které jsou nutné pro získání MRI signálu.

Komplexy makrocyclů s ionty kovů patří do skupiny pozitivních kontrastních látek, které jsou také označovány jako T_1 -kontrastní látky. Jejich historie sahá do roku 1946, kdy byly použity železité ionty k urychlení relaxace protonových jader ve vodě⁶². V současné době se ale nepoužívanějšími kontrastními látkami staly gadolinité komplexy. Gadolinový ion má totiž sedm nespárovaných valenčních elektronů a je tudíž velmi paramagnetický. Navíc je jeho stav maximálně symetrický ($^8S_{7/2}$), což dále zvyšuje jeho účinnost. Jeho nevýhodou je vysoká toxicita, podávané množství (0,1 až 0,3 mmol kg^{-1}) je totiž přibližně stejné jako LD_{50} (0,1 až 0,2 mmol kg^{-1}). Je proto nutné, aby komplex s gadolinovým iontem byl termodynamicky i kineticky stálý⁵². Dále musí být komplex velmi dobře rozpustný ve vodě, neboť se dává v koncentraci 0,5 mol dm^{-3} , a musí mít nízkou osmolalitu, aby pacient neutrpěl osmotický šok, který je velmi bolestivý. Toho lze dosáhnout buď vhodnou volbou ligandu nebo vytvořením stabilního iontového páru mezi kontrastní látkou a vhodným komplementárním iontem.

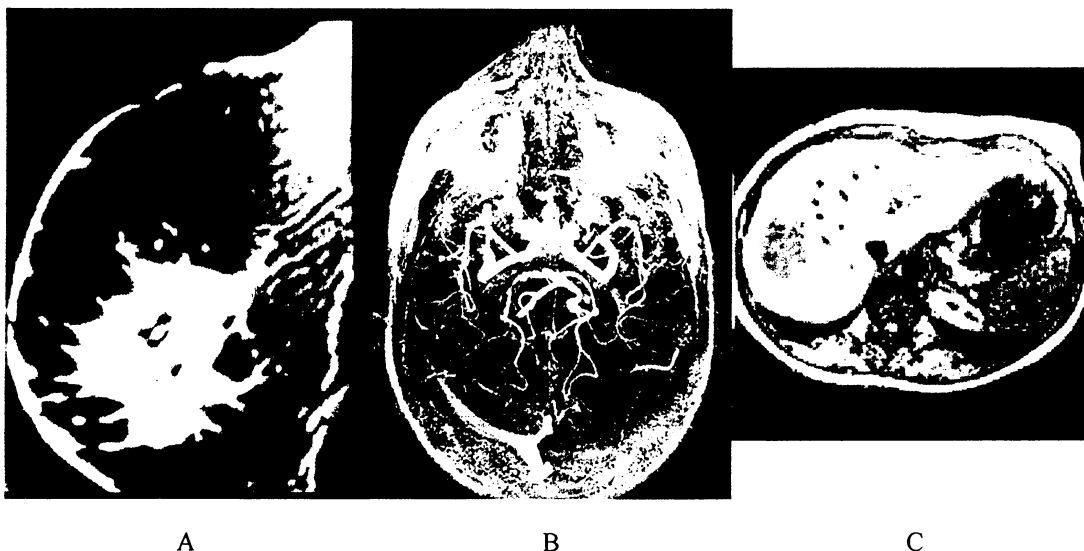
Kromě těchto podmínek je třeba připravit komplex, který má požadovanou biodistribuci, a tím i požadované zobrazení různých tkání. To lze docílit například celkovým nábojem komplexu (ovlivnění vylučování z organismu) a zavedením hydrofilních nebo hydrofobních skupin. Nejnovější generace kontrastních látek je navržena tak, že obsahuje biomolekulu (sacharid, peptid), díky níž je celý komplex cíleně dopraven pouze do jednoho typu tkáně, což má za následek zvýšení intenzity signálu v dané oblasti a možnost snížit potřebnou dávku kontrastního činidla, která se jinak pohybuje řádově v gramech na jedno vyšetření.

Podle místa účinku se kontrastní látky dělí na tři typy:

Nízkomolekulární a hydrofilní látky, které po aplikaci putují z cév do mezibuněčného prostoru a používají se nejčastěji v diagnostice nádorů (viz obrázek 3.12A).

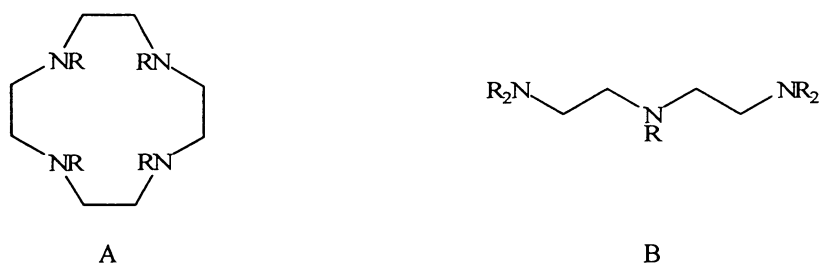
Látky s větší molekulovou hmotností, které působí intravaskulárně a jsou používány hlavně v MRI angiografii (viz obrázek 3.12B).

Orgánově specifické kontrastní látky, které jsou aktivně nebo pasivně směrovány pouze k určitému typu tkáně⁶³ (viz obrázek 3.12C).



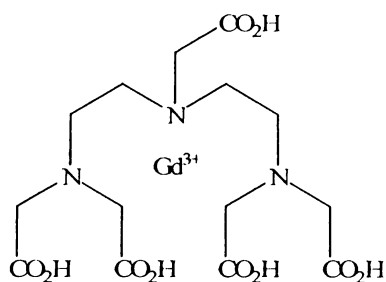
Obrázek 3.12 MRI snímky za použití různých typů kontrastních látek; A – detekce nádoru v prsu; B – angiografický snímek hlavy; C – zjišťování poškození jater

Ligandy využívané pro vytvoření komplexu s gadolinitým komplexem jsou znázorněny na obrázku 3.13. Jedná se buď o cyklické nebo lineární aminy.

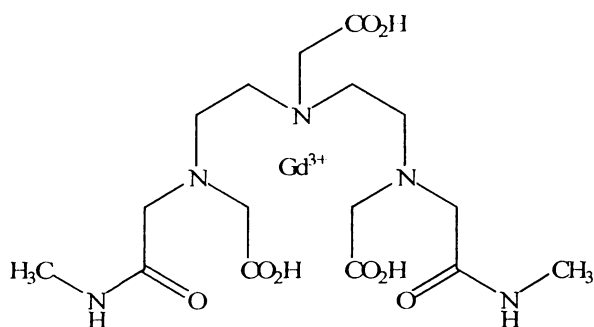


Obrázek 3.13 Obecné struktury ligandů vhodných pro přípravu kontrastních látek; A – 1,4,7,10-tetrazacyklododekanový skelet; B – diethylentriaminový skelet

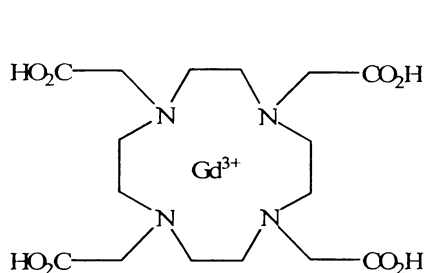
Substituenty jsou většinou další donorové skupiny jako jsou například acetátové, acetamidové, fosfonátové a fosfinátové, neboť gadolinitý ion má koordinační číslo 8 nebo 9 a z důvodu jeho toxicity je potřeba mít co nejstabilnější komplex. Příklady kontrastních látek používaných v praxi, jejichž základem jsou výše uvedené struktury (viz obrázek 3.13) jsou uvedeny na obrázku 3.14.



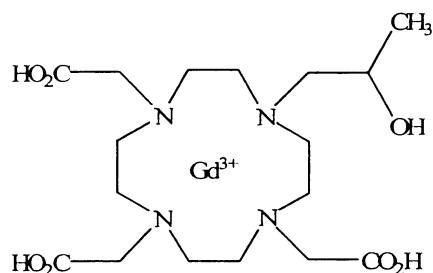
Magnevist® – Gd(DTPA)



Omniscan® – Gd(DTPA-BMA)



Dotarem® – Gd(DOTA)



ProHance® – Gd(HP-DO3A)

Obrázek 3.14 Některé komplexy Gd^{3+} komerčně používané v klinické praxi jako MRI kontrastní látky

Pro účely MRI bylo studováno mnoho komplexů obsahujících fosfonovou nebo fosfinovou funkční skupinu. Tyto komplexy byly nejčastěji s gadolinitým iontem, dále pak například s La, Ce, Nd, Eu, Gd, Tb, Er, Yb, nebo Y iontem. Nejčastěji byla sledována biodistribuce a vhodnost pro použití jako kontrastní látky^{22,24,32,64-76}. Kromě těchto praktických měření byly také vypočteny geometrické vlastnosti komplexů *ab initio* metodou⁷⁷.

3.2.2 Radiofarmaka

Léčení nádorových onemocnění se v současné době opírá o tři hlavní metody: chirurgie, chemoterapie a radioterapie, přičemž tyto tři hlavní terapeutické postupy se často kombinují⁷⁸. Radioterapie nádorových onemocnění je založena na účincích ionizujícího záření na živou tkáň, kdy dostatečně vysoké dávky záření jsou schopny usmrcovat buňky. Cílem radioterapie je selektivní likvidace nádorového ložiska při co nejmenším poškození okolních zdravých tkání. Ozáření okolních tkání se přitom nikdy nedá zcela vyhnout, což je problémem zejména u vnějšího ozařování. Do cílové oblasti je třeba zavést dostatečně vysokou dávku záření (pro nádorové buňky letální) takovým způsobem, aby okolní zdravé tkáně nebyly enormně poškozeny. Úkolem radioterapie v klinické praxi je najít optimální kompromis mezi těmito dvěma protichůdnými požadavky.

Alternativní metodou je radioizotopová terapie otevřenými zářiči, která spočívá v aplikaci radioaktivní látky do organismu. Tato látka vstoupí do metabolického procesu způsobem, který je dán chemickou formou látky – její farmakokinetikou. Podaří-li se označit vhodným radionuklidem látku, která se selektivně akumuluje v nádorové tkáni, získá se velmi efektivní způsob radiační likvidace nádoru „zevnitř“. Pro většinu nádorových procesů bohužel taková vhodná látka není k dispozici.

Pro terapii otevřenými radionuklidy je vhodné zejména záření β^- , jehož dosah v tkáni je zpravidla menší než 4 mm, což zajišťuje, že účinek záření je lokalizován na orgán či oblast tkáně, v níž se radioaktivní látka vyskytuje. Záření γ má u této metody jen malý terapeutický účinek a jeho přítomnost naopak způsobuje nežádoucí ozáření i jiných orgánů a tkání než cílové tkáně. U smíšených zářičů však záření gama může být s výhodou využito pro scintigrafické zobrazení distribuce radiofarmaka v organismu a monitorování průběhu terapie.

Jako potenciální radiofarmaka byly studovány různé komplexy obsahující fosfonovou nebo fosfinovou funkční skupinu. Tyto komplexy obsahovaly různé radioaktivní izotopy, například ^{67}Ga (lit.^{79,80}), ^{111}In (lit.^{76,79,80}), ^{153}Sm (lit.^{64,76,81}), ^{153}Gd (lit.⁸⁰), ^{166}Ho (lit.⁸¹) a ^{205}Bi (lit.⁸²).

3.2.3 Ostatní aplikace

Fosforové deriváty makrocyclických ligandů lze dále využít pro

- **posuvová činidla**⁸³⁻⁹⁰, která indukují posun rezonance určitého kationtu (Li, Na, ...), což může být využito při zjišťování pH tkáně^{73,74,91} nebo při měření její teploty⁹²,
- **zjišťování koncentrace Mg²⁺ v krevní plasmě**^{35,51,93-95}, čehož je využito pro diagnostické účely a také pro zjišťování pH (viz výše),
- **zjišťování koncentrace Cu²⁺ v roztoku**^{96,97} i za přítomnosti dalších interferujících iontů o řádově vyšší koncentraci než je koncentrace Cu²⁺.

Často jsou také studovány **luminiscenční vlastnosti** komplexů těchto látek s různými ionty, například Eu a Tb (lit.^{32,33,39,69,75,98-100}), Yb (lit.^{100,101}) a Nd (lit.¹⁰²), mezi které patří například cirkulárně polarizovaná^{103,104} nebo časově rozlišená luminiscence¹⁰⁵.

Sledováním luminiscence lze také například měřit pH^{38,40,41,106}, zjišťovat koncentraci rozpuštěného kyslíku^{41,106,107}, měřit koncentraci halogenidových a hydroxidových aniontů^{38,41} a sestavit logický obvod na molekulární úrovni^{42,108}.

3.3 Shrnutí

V posledních letech bylo napsáno mnoho článků o přípravě fosforových derivátů makrocyclických ligandů. Souhrnné informace o fosfonových^{61,109-116} a fosfinových^{61,109,111,117-123} derivátech lze nalézt v několika review týkajících se makrocyclických ligandů.

Vzrůstající počet článků zabývajících se studiem komplexů makrocyclických ligandů s ionty kovů naznačuje, že zmiňovaná oblast má stále co nabídnout a její prozkoumání je výzvou pro řadu lidí zabývajících se danou problematikou.

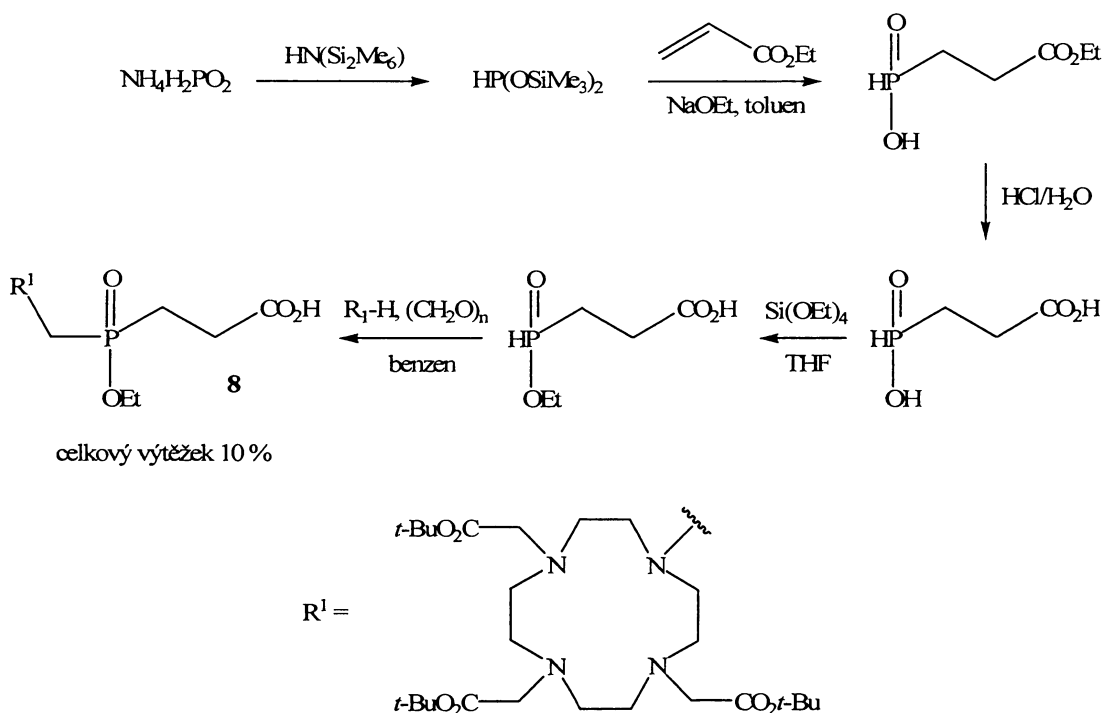
Nejslibnější použití fosforových derivátů makrocyclických ligandů je pro přípravu kontrastních látek, neboť nedávno bylo zjištěno, že nahrazení jedné acetátové skupiny fosfonátovou nebo fosfinátovou funkční skupinou má za následek významné urychlení výměny vody^{49,124}.

3.4 Přístup k řešení diplomové práce

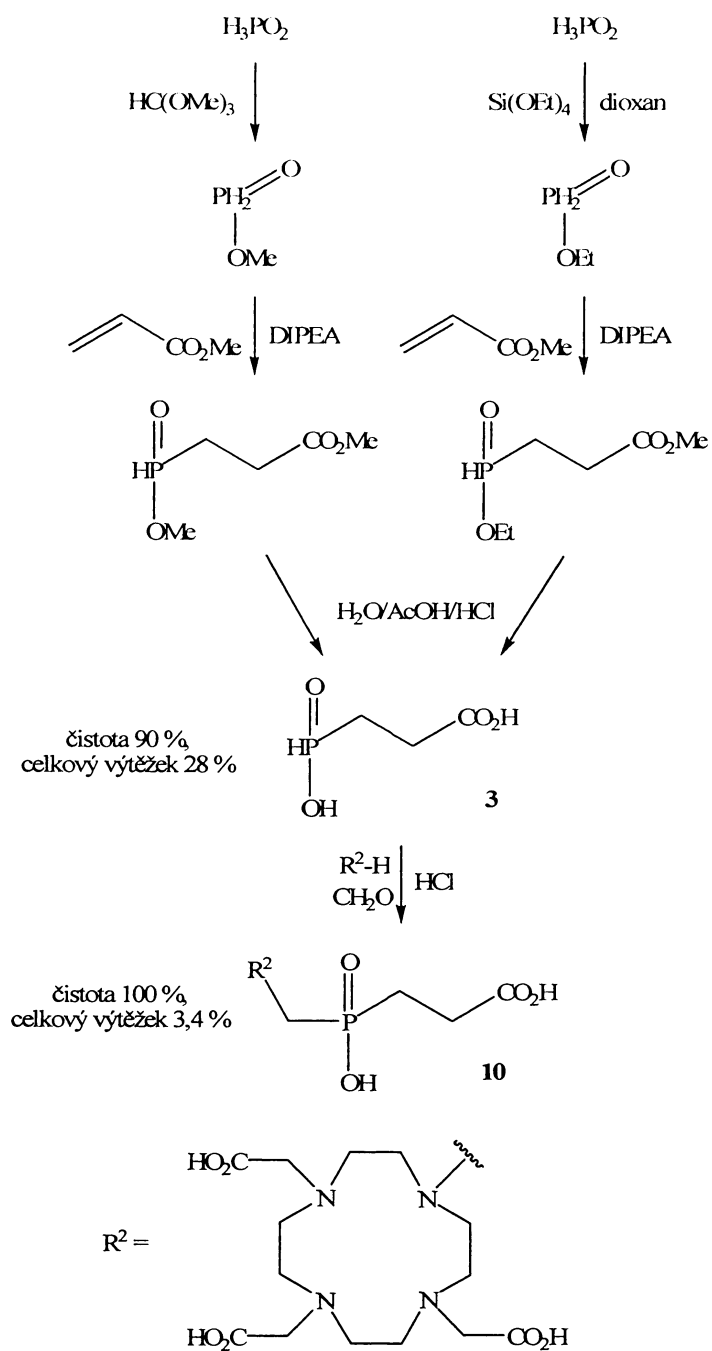
Kyselina **3**, která je meziproduktem při syntéze látky **10** (viz obrázek 3.16)², již byla připravena dříve, ale při její přípravě se vyskytlo mnoho problémů, zejména problém s izolací čisté látky, neboť se jí podařilo izolovat jen v 90% čistotě.

Rovněž látky **8** (viz obrázek 3.15)²² a **10** (viz obrázek 3.16)², jež jsou cílem této diplomové práce, byly již připraveny dříve. Při jejich syntéze byla použita Mannichova reakce, která sice poskytuje dobrý výtěžek (okolo 50 %), ovšem vzniklá reakční směs je velmi obtížně čistitelná, neboť k separaci požadované látky nelze použít chromatografii na silikagelu, ale musí být použito čištění na ionexech.

Alternativní cestou pro přípravu uvedených látek by mohla být alkylace *t*-Bu₃DO3A vhodným alkylačním činidlem, například mesylderivátem fosfinátu. Touto reakcí by bylo možno připravit látky **8** a **9** a látku **10** dokonce dvěma způsoby. Jednak hydrolyzou látky **8** nebo **9**, nebo kratší syntézou. Jedná se však o větší počet reakčních kroků, a proto je otázkou, zda bude výtěžek vyšší než u dříve použitých postupů.



Obrázek 3.15 Schéma přípravy látky **8** podle lit.²²



Obrázek 3.16 Schéma přípravy látek 3 a 10 podle lit.²

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Jako rozpouštědlo pro NMR byla použita D₂O (99,95 %, CHEMOTRADE) a CDCl₃ (99,8 %, ALDRICH).

Pokud není uvedeno jinak, EtOH je 96% ethanol.

Bezvodá rozpouštědla (MeCN, toluen, CH₂Cl₂) byla získána destilací po vysušení oxidem fosforečným, bezvodý THF byl získán destilací po vysušení sodíkem. Bezvodý EtOH byl zakoupen.

Paraformaldehyd použitý v níže uvedených reakcích byl získán odfiltrováním komerčního vodného roztoku formaldehydu (Lachema). Pevný paraformaldehyd byl usušen v exsikátoru nad P₂O₅, čímž byl získán (CH₂O)_n, který je reaktivnější než komerční.

„Krystalická“ kyselina fosforá byla získána odpařením komerčního 50% roztoku kyseliny fosforé na rotační vakuové odparce při 30 °C. Potom byla třikrát odpařena s bezvodým ethanolem a sušena v exsikátoru nad P₂O₅ po dobu jednoho týdne při 4 °C.

4.2 Použité přístroje a metody

4.2.1 Nukleární magnetická rezonance

Všechna NMR spektra byla měřena na přístroji Varian ^{UNITY} INOVA 400. Rezonanční frekvence měřených jader byly 399,95 MHz pro ¹H a 100,58 MHz pro ¹³C{¹H} a 161,92 MHz pro ³¹P. Není-li uvedeno jinak, probíhalo měření při 25 °C. Všechny uváděné hodnoty chemických posunů jsou v jednotkách ppm, interakční konstanty jsou v Hz. Chemické posuny signálů ¹H jsou uváděny na dvě desetinná místa, signály ¹³C a ³¹P na jedno desetinné místo.

Pro referenci v ³¹P NMR spektrech byl jako vnější standard používán 85% vodný roztok kyseliny fosforečné ($\delta_P = 0$).

4.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Bruker ESQUIRE 3000 ES-ion trap RNDr. Vojtěchem Kubíčkem a Mgr. Tomášem Vithou. Všechna spektra byla měřena v pozitivním modu, ionizace byla prováděna elektrosprejem. Při popisu spekter je zachováváno toto uspořádání:

hodnota m/z (intenzita v % nejintenzivnějšího signálu, charakter iontu).

4.2.3 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na dvou typech destiček: *Merck 5554* a *Silufol^(R)* (*Kavalier, Československo*) s hliníkovou fólií, sorbentem Silpearl (širokoporézní silikagel podle Pitry) a škrobem jako pojídlem. Příslušné mobilní fáze a způsoby detekce jsou uvedeny u jednotlivých látek.

Detekce byla prováděna

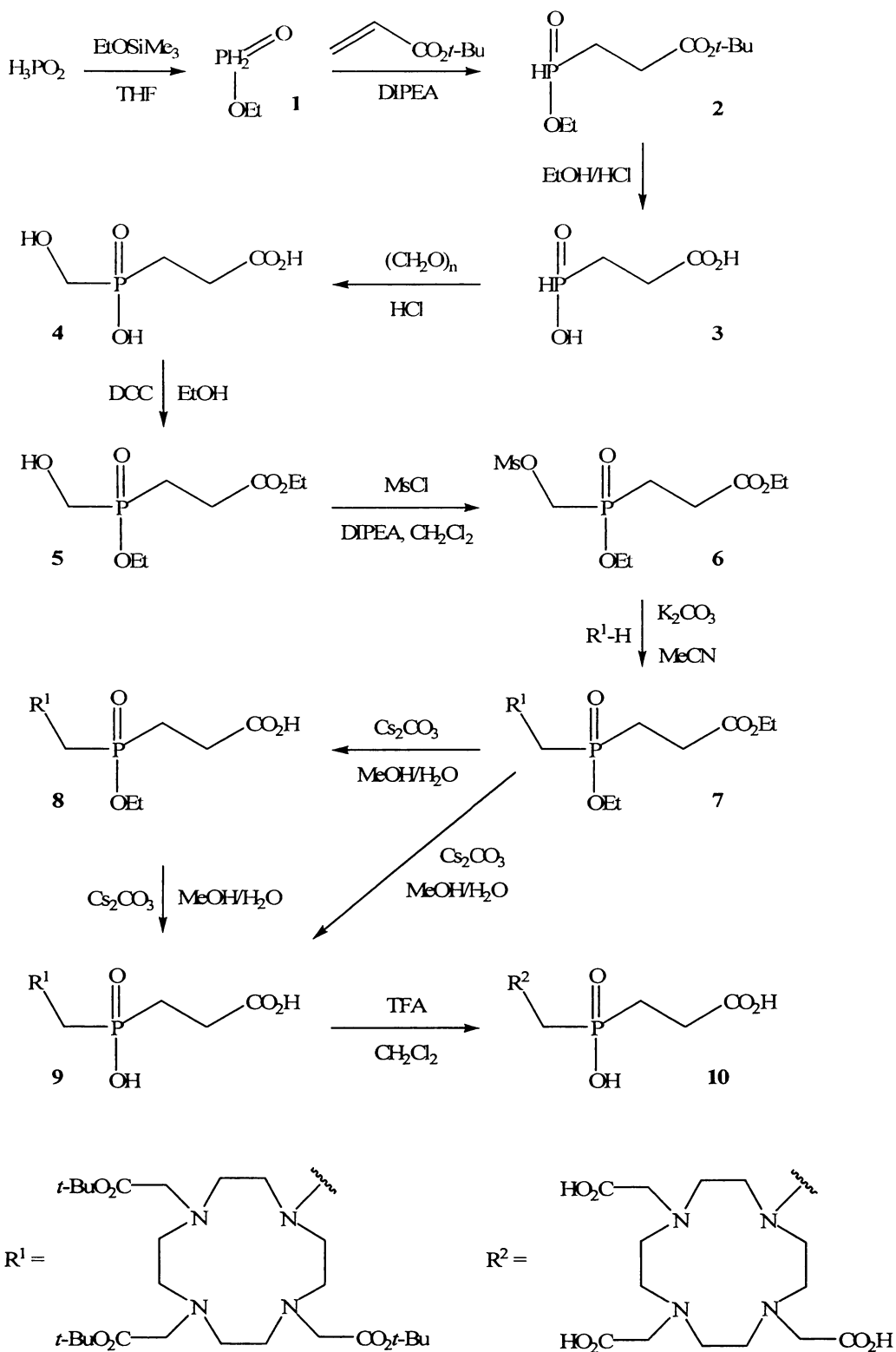
- činidlem 1 – jód,
- činidlem 2 – 0,5 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ + 12 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ + 250 ml 10 % H_2SO_4 ,
- činidlem 3 – Dragendorffovo činidlo (roztok A: 1,7 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ + 80 ml H_2O + 20 ml AcOH ; roztok B: 40 g KI + 100 ml H_2O ; míchání: 5 ml roztoku A + 5 ml roztoku B + 70 ml H_2O + 20 ml AcOH),
- činidlem 4 – 0,5% ethanolický roztok ninhydrinu.

4.2.4 Elementární analýza

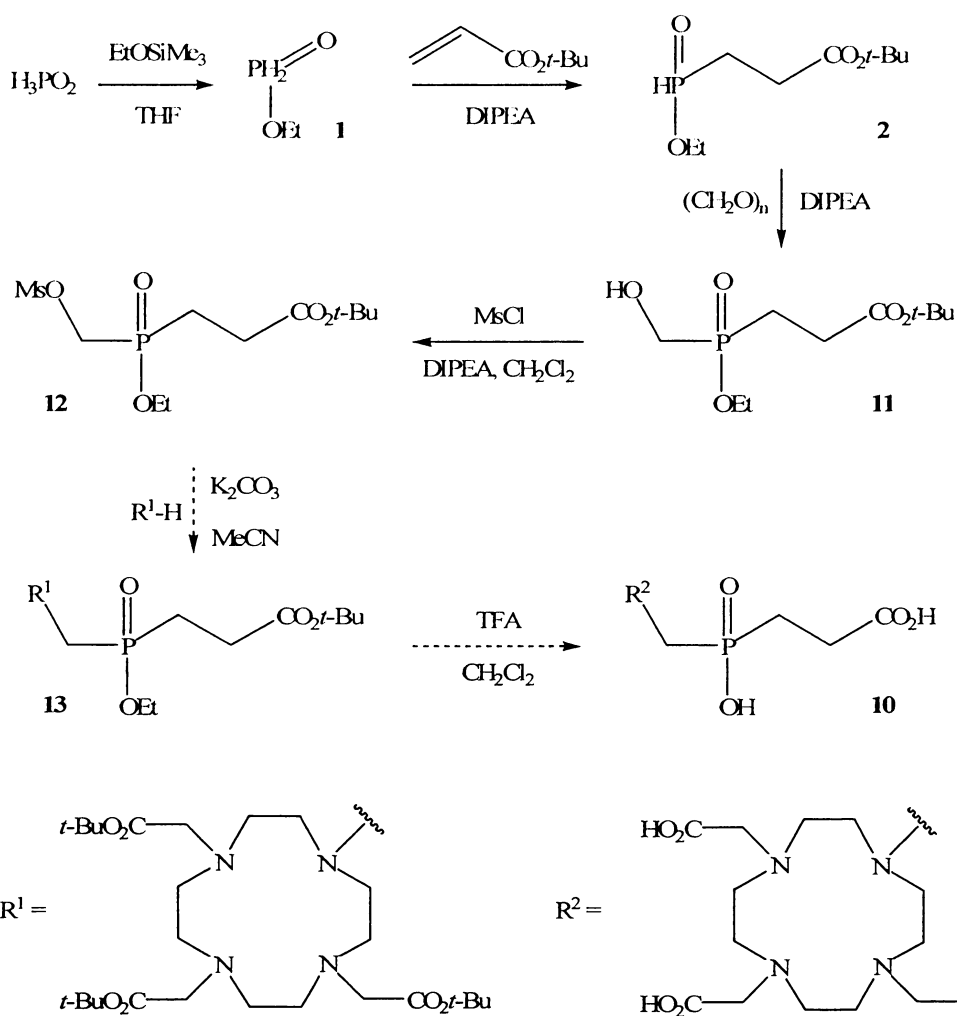
Elementární analýza byla provedena v Ústavu makromolekulární chemie AVČR v Praze na automatickém analyzátoru PerkinElemer 2400.

4.3 Pracovní postup

Sloučeniny, které byly cílem této diplomové práce, včetně postupů pro jejich přípravu, jsou uvedeny na obrázcích 4.1 a 4.2.



Obrázek 4.1 Schéma přípravy látky 10 – 1. návrh



Obrázek 4.2 Schéma přípravy látky 10 – 2. návrh

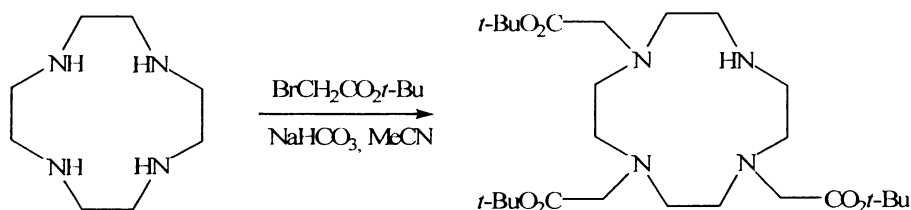
Reakční směsi po proběhnutí reakce byly většinou použity do další reakce bez izolace připravené látky. Kontrola stupně konverze byla v průběhu reakcí sledována pomocí ^{31}P -NMR tak, že vzorek byl odebrán přímo z reakční směsi. Procenta uvádějící zastoupení určité látky obsahující fosfor v reakční směsi jsou molární.

V níže uvedeném textu se odpařením myslí odpaření na rotační vakuové odparce. Teplota lázně se lišila v závislosti na přítomném rozpouštědle (viz tabulka 4.1).

Tabulka 4.1 Teplota lázně rotační vakuové odparky pro různé roztoky

rozpuštědlo/roztok	teplota ($^{\circ}\text{C}$)
reakční směs obsahující více než 90 % CH_2Cl_2	40
EtOAc	40
reakční směs obsahující více než 15 % H_2O	60
všechna ostatní rozpouštědla/roztoky	50

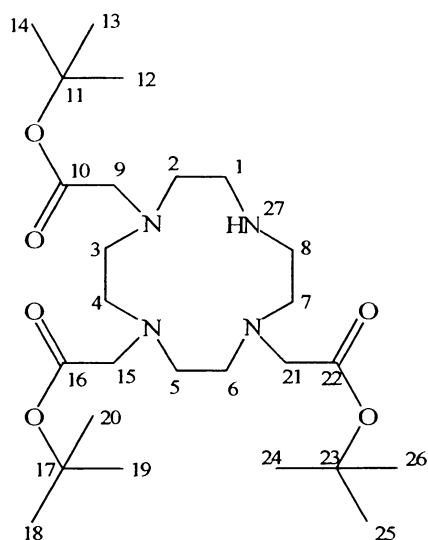
tri-*tert*-Butyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-triacetát hydrobromid



K cyklenu (15 g, 87 mmol) byl přidán MeCN (bezvodý, 500 ml) a NaHCO_3 (30,1 g, 358 mmol, 4,1 ekv.). Reakční směs v baňce byla ochlazena na $0\text{ }^\circ\text{C}$ a v průběhu 4 hodin byl přidán *tert*-butylbromacetát (52,7 g, 270 mmol, 3,1 ekv.). Reakční směs byla dále míchána 16 hodin při laboratorní teplotě.

Reakční směs byla filtrována na fritě S3 (tento typ byl použit i při dalších filtracích uvedených v této diplomové práci) a filtrát byl odpařen dosucha. K odparku byl přidán toluen (500 ml) a směs byla 16 hodin intenzivně míchána při laboratorní teplotě. Pevná fáze byla poté odfiltrována a rozpuštěna v dichlormethanu (400 ml). Do tohoto roztoku byla přidána H_2O (400 ml) a směs byla intenzivně míchána 16 hodin při laboratorní teplotě. Potom byly obě fáze odděleny a vodná fáze byla extrahována CH_2Cl_2 (2 x 50 ml). Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným a zahuštěny na 200 ml. K tomuto roztoku byl za míchání přidáván hexan, dokud nevznikl zákal. Ten byl rozpuštěn několika kapkami dichlormethanu. Roztok byl naočkován a ponechán stát 4 hodiny při laboratorní teplotě. *t*- $\text{Bu}_3\text{DO3A}$ byl získán po filtraci a vysušení ve vakuovém exsikátoru nad P_2O_5 jako bílý prášek ve formě hydrobromidu (23,3 g, 39,2 mmol, 45 %).

Charakterizace *t*-Bu₃DO3A.HBr:



TLC: mobilní fáze: *i*-PrOH : MeOH : NH₃ (3:2:0,3), detekce: činidlo 3 nebo 4,
 $R_f = 0,8$

¹H-NMR (CDCl₃, ref. = TMS = 0): 1,46 (s, 9H, H-18–20); 1,47 (s, 18H, H-12–14,24–26); 2,81–2,99 (m, 12H, H-2–7); 3,11 (m, 4H, H-1,8); 3,29 (s, 4H, H-9,21); 3,38 (s, 2H, H-15); 10,06 (s, 1H, H-27)

¹³C-NMR (CDCl₃, ref. = CDCl₃ = 77,0): 28,1 (s, C-12–14,24–26); 28,1 (s, C-18–20); 47,4 (s, C-3–6); 49,0 (s, C-1,8); 51,2 (s, C-2,7); 58,1 (s, C-9,15,21); 81,5 (s, C-11,23); 81,7 (s, C-17); 169,5 (s, C-16); 170,4 (s, C-10,22)

MS: 515,0 (100, [M+H]⁺)

Ethyl-fosfinát (1)

K H₃PO₂ (krystalická, 10 g, 152 mmol) byl přilít THF (bezvodý, 10 ml) a EtOSiMe₃ (50 ml, 321 mmol, 2,1 ekv.). Reakční směs v baňce uzavřené septem s jehlou byla míchána při laboratorní teplotě jednu hodinu. Analýzou ³¹P-NMR bylo zjištěno, že konverze na ethyl-fosfinát ($\delta_P = 15,8$ (t, ¹J_{PH} = 571)) byla 70 %.

Vzhledem k nestabilitě ethyl-fosfinátu (1) byla reakční směs použita do dalšího kroku bez jakékoliv úpravy.

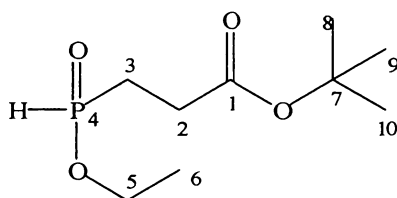
***tert*-Butyl-3-(ethoxyhydrofosforyl)propanoát (2)**

Do reakční směsi z minulého kroku obsahující podle ^{31}P -NMR 70 % ethyl-fosfinátu (1) byl při laboratorní teplotě přidán přes septum *tert*-butylester kyseliny prop-2-enové (15,9 g, 124 mmol, 0,82 ekv. na H_3PO_2) a během dvou hodin přikapán přes septum DIPEA (19,6 g, 152 mmol, 1 ekv. na H_3PO_2). Reakční směs byla potom míchána za laboratorní teploty 6 dní.

Reakční směs byla zředěna CH_2Cl_2 (100 ml) a promyta H_2O (200 ml), 1,5% vodným roztokem HCl (200 ml) a nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 (200 ml). Dichlormethanový roztok byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 . Takto zpracovaná reakční směs, která obsahovala z látek obsahující fosfor (na základě ^{31}P -NMR) 87 % esteru 2, byla použita do dalšího kroku.

Čistý ester 2 byl získán odpařením reakční směsi po extrakci a zpracováním chromatografií na silikagelu (eluent: EtOAc). Sledování chromatografie bylo prováděno pomocí ^{31}P -NMR a TLC (mobilní fáze: EtOAc, detekce: I_2). Byla získána bezbarvá viskózní kapalina (celkový výtěžek 30 %). Celkový výtěžek přes všechny reakční stupně je vztažen na kyselinu fosforovou a bude v tomto smyslu používán dále.

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: EtOAc, detekce: činidlo 1, $R_f = 0,4$

^1H -NMR (CDCl_3 , ref. = TMS = 0): 1,38 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,3$; 3H, H-6); 1,46 (s, 9H, H-8–10); 2,04 (dtd, $^2J_{\text{HP}} = 15,3$; $^3J_{\text{HH}} = 7,9$; $^3J_{\text{HH}} = 1,8$; 2H, H-3); 2,57 (m, 2H, H-2); 4,09 (m, 1H, H-5a), 4,19 (m, 1H, H-5b), 7,21 (dt, $^1J_{\text{HP}} = 545$; $^3J_{\text{HH}} = 1,8$; 1H, H-4)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , ref. = $\text{CDCl}_3 = 77,0$): 16,1 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6,1$; C-6); 24,0 (d, $^1J_{\text{CP}} = 96,1$; C-3); 27,0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3,1$; C-2); 27,9 (s, C-8–10); 62,4 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6,5$; C-5); 81,2 (s, C-7); 171,0 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13,0$; C-1)

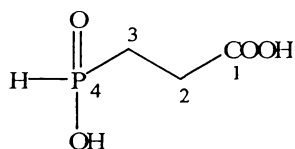
^{31}P -NMR (CDCl_3): 37,4 (dm, $^1J_{\text{PH}} = 545$)

3-(Hydrohydroxyfosforyl)propanová kyselina (3)

Do odpařené reakční směsi (2,5 g) z minulého kroku obsahující podle ^{31}P -NMR 87 % esteru **2** byl přilít EtOH (20 ml) a HCl (koncentrovaná, 20 ml). Reakční směs byla refluxována za míchání 16 hodin. Výsledná reakční směs, která obsahovala z látek obsahující fosfor (na základě ^{31}P -NMR) 87 % kyseliny **3** (tj. 100% konverze), byla použita do dalšího kroku.

Čistá kyselina **3** byla získána jako bezbarvá viskózní kapalina (výtěžek 100 %) z čistého esteru **2** stejným postupem, po hydrolyze ale byla třikrát odpařena s vodou.

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: MeOH, detekce: činidlo 1 nebo 2, $R_f = 0,6$

^1H -NMR (D_2O , ref. = *t*-BuOH = 1,25): 2,07 (dtd, $^2J_{\text{HP}} = 15,3$; $^3J_{\text{HH}} = 7,9$; $^3J_{\text{HH}} = 1,8$; 2H, H-3); 2,68 (dt, $^3J_{\text{HP}} = 15,3$; $^3J_{\text{HH}} = 7,9$; 2H, H-2); 7,14 (dt, $^1J_{\text{HP}} = 557$; $^3J_{\text{HH}} = 1,8$; 1H, H-4)

^{13}C -NMR (D_2O , ref. = *t*-BuOH = 32,7): 30,4 (d, $^1J_{\text{CP}} = 91,6$; C-3); 32,0 (s, C-2); 182,6 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13,0$; C-1)

^{31}P -NMR (D_2O): 38,2 (dp, $^1J_{\text{PH}} = 557$; $^{2,3}J_{\text{PH}} = 15,3$)

MS: 138,9 (75, $[\text{M}+\text{H}]^+$)

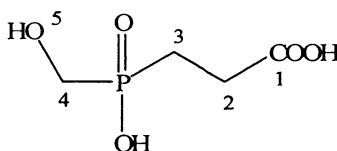
3-[Hydroxy(hydroxymethyl)fosforyl]propanová kyselina (4)

Do odpařené reakční směsi (1,8 g) z minulého kroku obsahující podle ^{31}P -NMR 87 % kyseliny **3** byla přilita H_2O (80 ml) a HCl (koncentrovaná, 40 ml). Reakční směs byla za míchání refluxována 30 minut. Potom byl přidán paraformaldehyd (1,1 g, 37 mmol) a reakční směs byla míchána v uzavřené aparatuře 16 hodin při teplotě 105 °C. Potom byl do reakční směsi přidán další paraformaldehyd (1,1 g, 37 mmol) a reakční směs byla míchána v uzavřené aparatuře 3 dny při teplotě 105 °C.

Reakční směs byla odpařena a dále odpařena třikrát s vodou, aby byla odstraněna HCl. Potom byla reakční směs nanesena na anex (Dowex 1X8-400 Ion-Exchange Resin, 200–400 mesh) v OH⁻ cyklu a po eluci vodou byly látky obsahující fosfor získány elucí 3% vodným roztokem HCl. Kvůli přeměně hydroxymethylderivátu **4** na neznámou sloučeninu byl roztok odpařen a byla k němu přilita HCl (koncentrovaná, 10 ml) a EtOH (10 ml). Roztok byl za míchání refluxován 16 hodin, což vedlo k převedení neznámé sloučeniny zpět na hydroxymethylderivát **4**. Takto upravený roztok, který obsahoval z látek obsahujících fosfor (na základě ³¹P-NMR) 66 % hydroxymethylderivátu **4** (tj. 76% konverze), byl použit do dalšího kroku.

Čistý hydroxymethylderivát **4** byl připraven podobným postupem. Jako reaktant byla ale použita čistá kyselina **3** (0,9 g, 6,5 mmol). Po zpracování na anexu (viz výše) bylo zjištěno, že v roztoku je z látek obsahující fosfor (na základě ³¹P-NMR) 76 % hydroxymethylderivátu **4**. Roztok byl odpařen a dále odpařen dvakrát s vodou. Čistý hydroxymethylderivát **4** (0,41 g, 2,4 mmol, výtěžek 37 %) byl získán ve formě bezbarvé viskózní kapaliny chromatografií na silikagelu (eluent: *i*-PrOH : NH₃ (3:2)). Amoniak byl v tomto a dalších případech použit jako 25% vodný roztok.

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: *i*-PrOH : NH₃ (3:2), detekce: činidlo 2, *R_f* = 0,45

¹H-NMR (D₂O, ref. = *t*-BuOH = 1,25): 1,85 (m, 2H, H-3); 2,44 (m, 2H, H-2); 3,63 (m, 2H, H-4); 7,22 (s, 1H, H-5)

¹³C-NMR (D₂O, ref. = *t*-BuOH = 32,7): 26,7 (d, ¹*J*_{CP} = 90,0; C-3); 32,0 (s, C-2); 62,3 (d, ¹*J*_{CP} = 108,7; C-4); 183,6 (d, ³*J*_{CP} = 16,0; C-1)

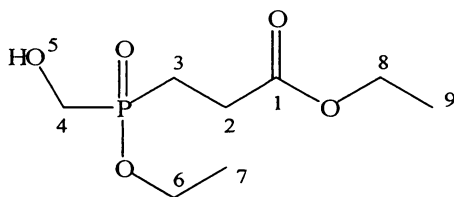
³¹P-NMR (D₂O): 43,0 (m)

MS: 168,8 (100, [M+H]⁺)

Ethyl-3-[ethoxy(hydroxymethyl)fosforyl]propanoát (5)

Roztok z minulého kroku obsahující podle ^{31}P -NMR 66 % hydroxymethyl-derivátu 4 byl odpařen a dále odpařen třikrát s vodou a třikrát s EtOH (bezvodý) za vzniku bezbarvé viskózní kapaliny (1,41 g). K ní byl přidán EtOH (bezvodý, 25 ml) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Postupně byl do reakční směsi přidán DCC (na začátku reakce (1,35 g, 6,5 mmol), po 16 hodinách (2,0 g, 9,7 mmol) a po třech dnech (2,0 g, 9,7 mmol)). Potom byla reakční směs míchána za laboratorní teploty 4 dny. Bylo zjištěno, že v reakční směsi je z látek obsahující fosfor (na základě ^{31}P -NMR) 63 % esteru 5 (tj. 95% konverze). Potom byla do reakční směsi přilita H_2O (10 ml) a reakční směs byla míchána 16 hodin. Pro dokonalé vyloučení dicyklohexylmočoviny vzniklé z DCC byla reakční směs přechovávána 6 měsíců při 4°C . Potom byla reakční směs filtrována a filtrát po odpaření chromatografován na koloně se silikagelem (eluent: CH_2Cl_2 : MeOH (96:4)). Byl získán čistý ester 5 jako bezbarvá viskózní kapalina (0,99 g, 4,4 mmol, celkový výtěžek 23 %).

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: CH_2Cl_2 : MeOH (96:4), detekce: čínidlo 2, $R_f = 0,5$

^1H -NMR (CDCl_3 , ref. = TMS = 0): 1,27 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$; 3H, H-9); 1,33 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$; 3H, H-7); 2,15 (m, 2H, H-3); 2,67 (m, 2H, H-2); 3,89 (m, 2H, H-4); 4,12 (m, 2H, H-6); 4,16 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$; 3H, H-8); 4,64 (s, 1H, H-5)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , ref. = $\text{CDCl}_3 = 77,0$): 14,1 (s, C-9); 16,6 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5,3$; C-7); 21,0 (d, $^1J_{\text{CP}} = 90,7$; C-3); 26,5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2,6$; C-2); 58,7 (d, $^1J_{\text{CP}} = 106,5$; C-4); 61,1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 7,6$; C-6); 61,2 (s, C-8); 172,5 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13,8$; C-1)

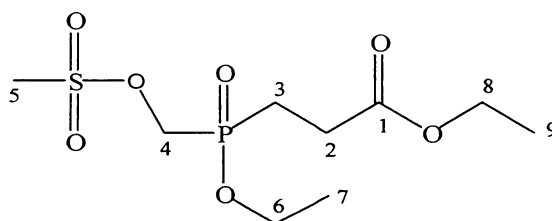
^{31}P -NMR (CDCl_3): 52,7 (m)

MS: 246,9 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

Ethyl-3-{ethoxy[(mesyloxy)methyl]fosforyl}propanoát (6)

K čistému esteru **5** (0,99 g, 4,4 mmol) byl přidán CH₂Cl₂ (bezvodý, 15 ml) a DIPEA (0,69 g, 5,3 mmol, 1,2 ekv.). Reakční směs byla ochlazena na -5 °C a během 1 hodiny byl při této teplotě přidán do reakční směsi roztok MsCl (0,56 g, 4,9 mmol, 1,1 ekv.) v CH₂Cl₂ (bezvodý, 10 ml). Potom byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě 16 hodin. K odpařené reakční směsi byl přidán CH₂Cl₂ (20 ml) a roztok byl promyt 1,5% vodným roztokem HCl (2 x 20 ml) a nasyceným vodným roztokem NaHCO₃ (2 x 20 ml). Vodné podíly byly spojeny a extrahovány CH₂Cl₂ (2 x 10 ml). Dichlormethanové podíly byly spojeny, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a roztok byl odpařen. Byl získán mesylderivát **6** jako žlutá viskózní kapalina (1,3 g, 4,3 mmol, výtěžek 97 %).

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: EtOAc : MeOH (7:1), detekce: činidlo 2 nebo 3, $R_f = 0,75$

¹H-NMR (CDCl₃, ref. = TMS = 0): 1,28 (t, ³J_{HH} = 7,2; 3H, H-9); 1,37 (t, ³J_{HH} = 7,2; 3H, H-7); 2,19 (m, 2H, H-3); 2,68 (m, 2H, H-2); 3,14 (s, 3H, H-5); 4,17 (q, ³J_{HH} = 7,2; 3H, H-8); 4,18 (m, 2H, H-4); 4,44 (m, 2H, H-6)

¹³C-NMR (CDCl₃, ref. = CDCl₃ = 77,0): 14,1 (s, C-9); 16,6 (d, ³J_{CP} = 6,0; C-7); 21,7 (d, ¹J_{CP} = 99,6; C-3); 26,1 (d, ²J_{CP} = 4,6; C-2); 37,7 (s, C-5); 61,1 (s, C-8); 61,8 (d, ²J_{CP} = 6,5; C-6); 62,2 (d, ¹J_{CP} = 104,5; C-4); 171,8 (d, ³J_{CP} = 14,1; C-1)

³¹P-NMR (CDCl₃): 44,9 (m)

MS: 302,9 (100, [M]⁺)

**tri-*tert*-Butyl-10-({ethoxy[2-(ethoxykarbonyl)ethyl]fosforyl}methyl)-
-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-triacetát (7)**

K mesylderivátu **6** (590 mg, 2,0 mmol) byl přidán MeCN (bezvodý, 50 ml), *t*-Bu₃DO3A.HBr (580 mg, 1,0 mmol, 0,5 ekv.) a K₂CO₃ (vyžiháný, 1,62 g, 12 mmol, 5 ekv.). Reakční směs byla za míchání refluxována (na chladiči byla nasazena sušící trubička) 4 dny. Potom byla zfiltrována. Tato reakční směs, která obsahovala z látek obsahující fosfor (na základě ³¹P-NMR) 50 % alkylovaného produktu **7** (tj. 50% konverze vzhledem k mesylderivátu **6**, 100% konverze vzhledem k *t*-Bu₃DO3A), byla použita do dalšího kroku.

**3-[Ethoxy({4,7,10-tris[*tert*-butoxykarbonyl)methyl]-1,4,7,10-tetraaza-
cyklododekan-1-yl}methyl)fosforyl]propanová kyselina (8)**

Do odpařené reakční směsi z minulého kroku obsahující podle ³¹P-NMR 50 % alkylovaného produktu **7** byl dán MeOH (14 ml), H₂O (7 ml) a Cs₂CO₃ (525 mg, 1,6 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 16 hodin. Na základě TLC (*i*-PrOH : MeOH : NH₃ (15:10:2), detekce: Dragendorffovo činidlo, *R*_f = 0,7), ³¹P-NMR (posun signálu alkylovaného produktu **7** o 2 ppm během reakce) a MS (715,0 (100, [M+Na]⁺)) bylo zjištěno, že po této době zřejmě došlo k hydrolyze ethylesteru karboxylové skupiny, zatímco ethylester na fosfinové skupině zůstal zachován. Reakční směs byla dále zpracována různými postupy (viz níže), a za použití stejných detekčních technik bylo zjištěno, že při těchto postupech došlo k hydrolyze i druhého ethylesteru. Nepodařilo se tedy připravit čistý ester **8**.

Zpracování reakční směsi

Metoda A. Reakční směs byla odpařena.

Metoda B. Báze přítomná v reakční směsi byla neutralizována 2% vodným roztokem HCl (výsledné pH bylo přibližně 6) a reakční směs byla potom odpařena.

Metoda C. Polovina reakční směsi byla dána na kolonu se zesíťovaným aromatickým polymerem na bázi polystyrenu (AMBERLITE XAD-1180, 20–50 mesh). Následovala eluce roztokem H₂O : MeOH (1:2), čímž se vymyla báze (detekce univerzálním indikátorovým pH papírkem) a část látek obsahujících fosfor (³¹P-NMR). Dále byla eluce prováděna MeOH, 50% vodným roztokem EtOH a EtOH, čímž se eluoval zbytek nanesené reakční směsi, ve které byl podle ³¹P-NMR

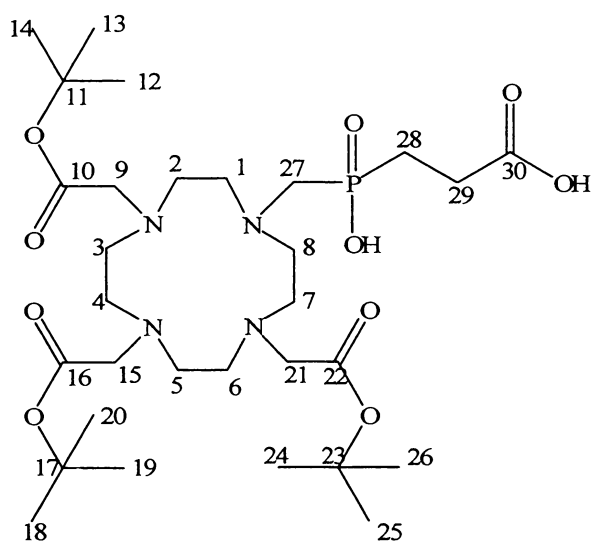
přítomen ester **9**. Následovala chromatografie podle postupu popsaného při přípravě esteru **9**, čímž byl získán čistý ester **9** (93 mg, 0,14 mmol, výtěžek 31 % vzhledem k *t*-Bu₃DO3A).

Metoda D. Reakční směs byla zředěna dichlormethanem a promyta vodou. Jednotlivé fáze byly odebrány a odpařeny. Bylo zjištěno (³¹P-NMR), že v obou fázích byl přítomen ester **9**.

3-[Hydroxy({4,7,10-tris[(*tert*-butoxykarbonyl)methyl]-1,4,7,10-tetraaza-cyklododekan-1-yl)methyl}fosforyl]propanová kyselina (**9**)

Do odpařené reakční směsi vzniklé reakcí **6** → **7** obsahující podle ³¹P-NMR 50 % alkylovaného produktu **7** byl dán MeOH (14 ml), H₂O (7 ml) a Cs₂CO₃ (525 mg, 1,6 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 16 hodin. Potom byla reakční směs odpařena a chromatografována na koloně se silikagelem (eluent: *i*-PrOH : MeOH : NH₃ (15:10:2)). Byl získán čistý ester **9** jako dihydrát sodné soli ve formě žluté viskózní kapaliny (340 mg, 0,47 mmol, výtěžek 49 % vzhledem k *t*-Bu₃DO3A, celkový výtěžek 5,5 %).

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: *i*-PrOH : MeOH : NH₃ (15:10:2), detekce: činidlo 3 nebo 4, *R_f* = 0,5

¹H-NMR (CDCl₃, ref. = TMS = 0): 1,37 (s, 18H, H-12–14,24–26); 1,39 (s, 9H, H-18–20); 1,80–4,20 (m, 28H, H-1–9,15,21,27–29)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , ref. = $\text{CDCl}_3 = 77,0$): 25,1 (d, $^1J_{\text{CP}} = 88,1$; C-28); 27,8 (s, C-18–20); 27,9 (s, C-12–14,24–26); 29,7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 4,6$; C-29); 48,8 (s, C-2,7); 51,9 (s, C-1,3–6,8); 52,9 (d, $^1J_{\text{CP}} = 103,8$; C-27); 55,5 (s, C-9,21); 55,6 (s, C-15); 81,5 (s, C-17); 81,8 (s, C-11,23); 172,1 (s, C-30); 175,9 (s, C-10,16,22)

^{31}P -NMR (CDCl_3): 34,6 (m)

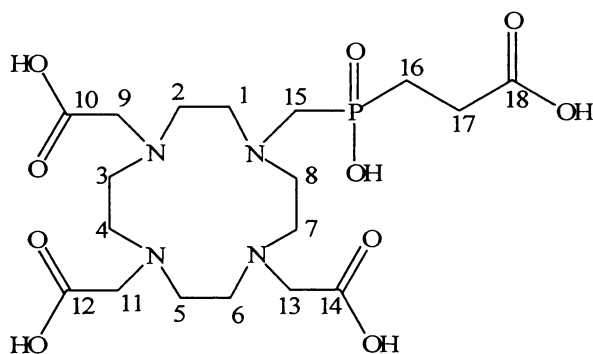
MS: 665,0 (100, $[\text{M}]^+$)

Elementární analýza pro $\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{PNa}$ (dihydrát sodné soli látky **9**).
Vypočteno: 49,85 % C; 8,37 % H; 7,75 % N. Nalezeno: 49,94 % C; 8,36 % H; 7,63 % N.

10-{{[Hydroxy(2-karboxyethyl)fosforyl]methyl}-1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7-trioctová kyselina (**10**)

K čistému esteru **9** (80 mg, 0,12 mmol) byl přidán CH_2Cl_2 (bezvodý, 4 ml) a TFA (16 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Potom byla reakční směs odpařena a dále odpařena dvakrát s vodou. Byla získána čistá kyselina **10** jako žlutá viskózní kapalina (60 mg, 0,12 mmol, výtěžek 100 %).

Charakterizace:



TLC (Silufol[®]): mobilní fáze: *i*-PrOH : NH_3 : H_2O (10:3:3), detekce: činidlo 4, $R_f = 0,3$

NMR analýza byla provedena při 90 °C.

^1H -NMR (D_2O , ref. = *t*-BuOH = 1,25): 2,04 (dt, $^2J_{\text{HP}} = 13,4$; $^3J_{\text{HH}} = 7,3$; 2H, H-16); 2,60 (dt, $^2J_{\text{HP}} = 13,4$; $^3J_{\text{HH}} = 7,3$; 2H, H-17); 3,21–3,46 (m, 16H, H-1–8); 3,63 (s, 2H, H-15); 3,84 (s, 4H, H-9,13); 3,86 (s, 2H, H-11)

^{13}C -NMR (D_2O , ref. = *t*-BuOH = 32,7): 24,9 (d, $^1J_{\text{CP}} = 94,6$; C-16); 26,1 (s, C-17); 49,4 (s, C-2,7); 49,6 (s, C-1,3–6,8); 50,6 (d, $^1J_{\text{CP}} = 99,3$; C-15); 53,8 (s, C-9,13); 53,9 (s, C-11); 170,3 (s, C-12); 171,0 (s, C-10,14); 175,9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13,4$; C-18)

^{31}P -NMR (D_2O): 43,1 (m)

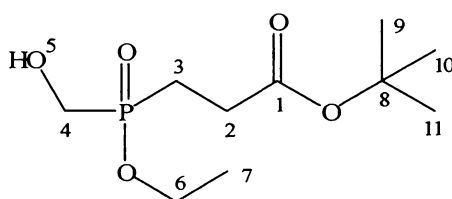
MS: 497,1 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$)

Elementární analýza pro $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P}$. Vypočteno: 43,55 % C; 6,70 % H; 11,29 % N. Nalezeno: 36,48 % C; 5,21 % H; 6,35 % N.

***tert*-Butyl-3-[ethoxy(hydroxymethyl)fosforyl]propanoát (11)**

Do odpařené reakční směsi (2,5 g) vzniklé reakcí **1** → **2** obsahující podle ^{31}P -NMR 87 % esteru **2** byl přidán rozetřený paraformaldehyd (440 mg, 15 mmol), MeCN (bezvodý, 20 ml) a DIPEA (2,9 g, 22 mmol). Reakční směs byla míchána při 45 °C 18 hodin. Potom byla reakční směs zfiltrována a odpařena. Byl k ní přilít CH_2Cl_2 (30 ml) a roztok byl promyt 1,5% vodným roztokem HCl (2 x 60 ml) a nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 (2 x 60 ml). Dichlormethanový roztok byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 a odpařen. Následovala chromatografie na silikagelu (eluent: EtOAc : MeOH (96:4)). Byl získán čistý hydroxymethylderivát **11** jako bezbarvá viskózní kapalina (0,49 g, 1,9 mmol, celkový výtěžek 10 %).

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: EtOAc : MeOH (9:1), detekce: činidlo 2, $R_f = 0,4$

^1H -NMR (CDCl_3 , ref. = TMS = 0): 1,33 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$; 3H, H-7); 1,45 (s, 9H, H-9–11); 2,10 (m, 2H, H-3); 2,58 (m, 2H, H-2); 3,87 (m, 2H, H-4), 4,12 (m, 2H, H-6); 4,68 (s, 1H, H-5)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , ref. = $\text{CDCl}_3 = 77,0$): 16,6 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5,3$; C-7); 21,0 (d, $^1J_{\text{CP}} = 90,7$; C-3); 27,5 (d, $^2J_{\text{CP}} = 2,3$; C-2); 27,9 (s, C-9–11); 58,6 (d, $^1J_{\text{CP}} = 106,1$; C-4); 61,1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6,8$; C-6); 81,2 (s, C-8); 171,8 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13,8$; C-1)

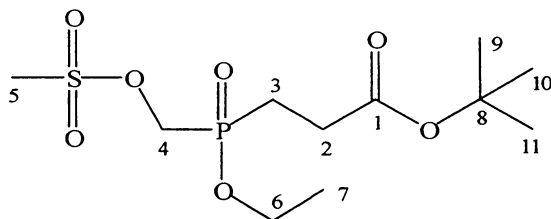
^{31}P -NMR (CDCl_3): 53,1 (m)

MS: 274,9 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

***tert*-Butyl-3-{{ethoxy}(mesyloxy)methyl}fosforyl}propanoát (12)**

K čistému hydroxymethylderivátu **11** (0,49 g, 1,9 mmol) byl přidán CH_2Cl_2 (bezvodý, 10 ml) a DIPEA (0,30 g, 2,3 mmol, 1,2 ekv.). Reakční směs byla ochlazena na $-5\text{ }^\circ\text{C}$ a během 1 hodiny byl při této teplotě přidán do reakční směsi roztok MsCl (0,24 g, 2,1 mmol, 1,1 ekv.) v CH_2Cl_2 (bezvodý, 8 ml). Potom byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě 16 hodin. K odpařené reakční směsi byl přidán CH_2Cl_2 (10 ml) a roztok byl promyt nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 (20 ml), 1,5% vodným roztokem HCl (20 ml) a nasyceným vodným roztokem NaHCO_3 (20 ml). Dichlormethanový roztok byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 a odpařen. Byl získán čistý mesylderivát **12** jako žlutá viskózní kapalina (0,61 g, 1,8 mmol, výtěžek 95 %).

Charakterizace:



TLC: mobilní fáze: EtOAc : MeOH (7:1), detekce: činidlo 2, $R_f = 0,8$

^1H -NMR (CDCl_3 , ref. = TMS = 0): 1,37 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$; 3H, H-7); 1,46 (s, 9H, H-9–11); 2,14 (m, 2H, H-3); 2,58 (m, 2H, H-2); 3,14 (s, 3H, H-5); 4,17 (m, 2H, H-4), 4,43 (m, 2H, H-6)

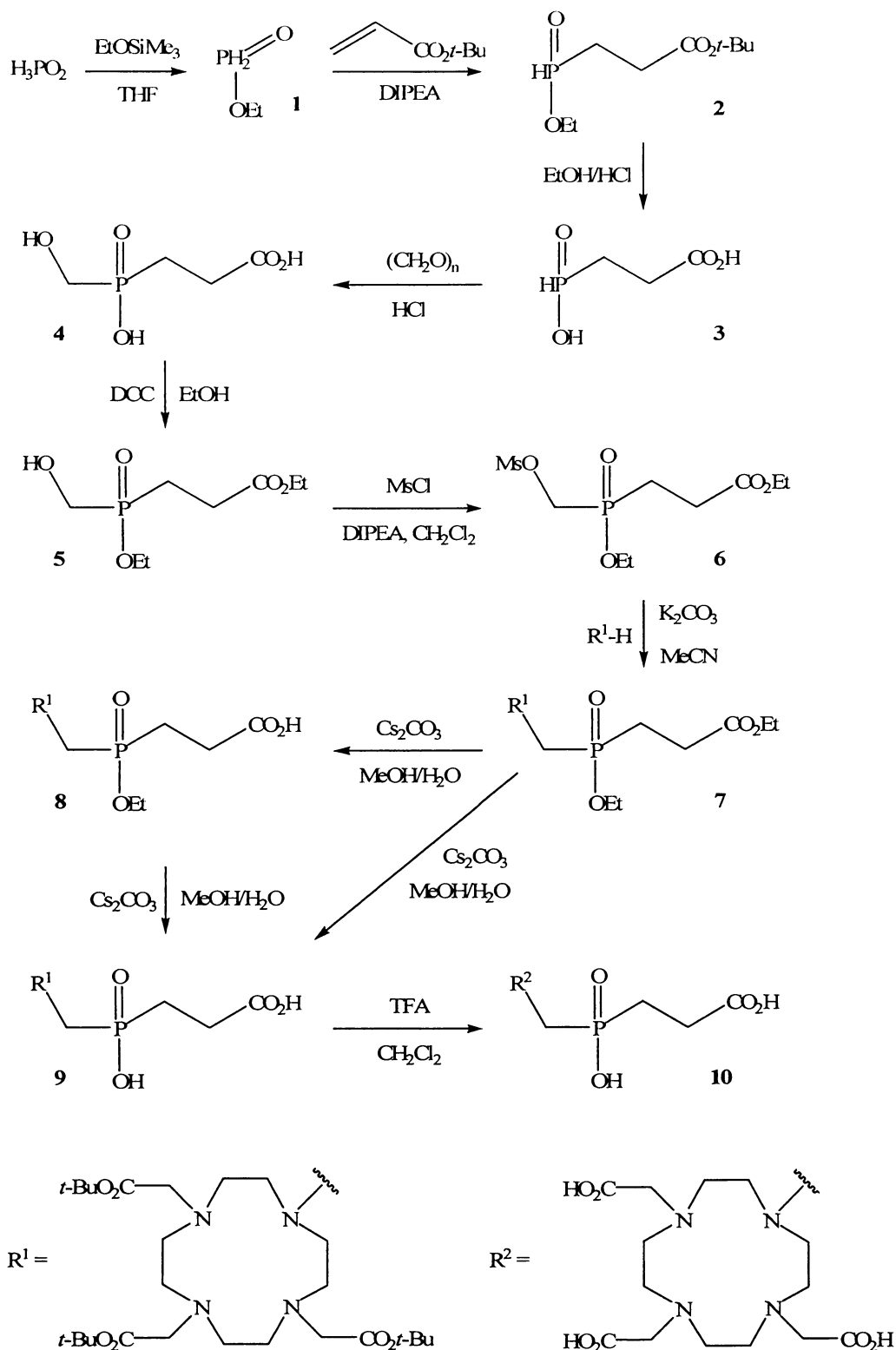
^{13}C -NMR (CDCl_3 , ref. = $\text{CDCl}_3 = 77,0$): 16,4 (d, $^3J_{\text{CP}} = 5,7$; C-7); 21,7 (d, $^1J_{\text{CP}} = 99,9$; C-3); 27,1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 3,1$; C-2); 27,9 (s, C-9–11); 37,6 (s, C-5); 61,7 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6,5$; C-6); 62,3 (d, $^1J_{\text{CP}} = 97,7$; C-4); 81,3 (s, C-8); 170,9 (d, $^3J_{\text{CP}} = 14,5$; C-1)

^{31}P -NMR (CDCl_3): 45,2 (m)

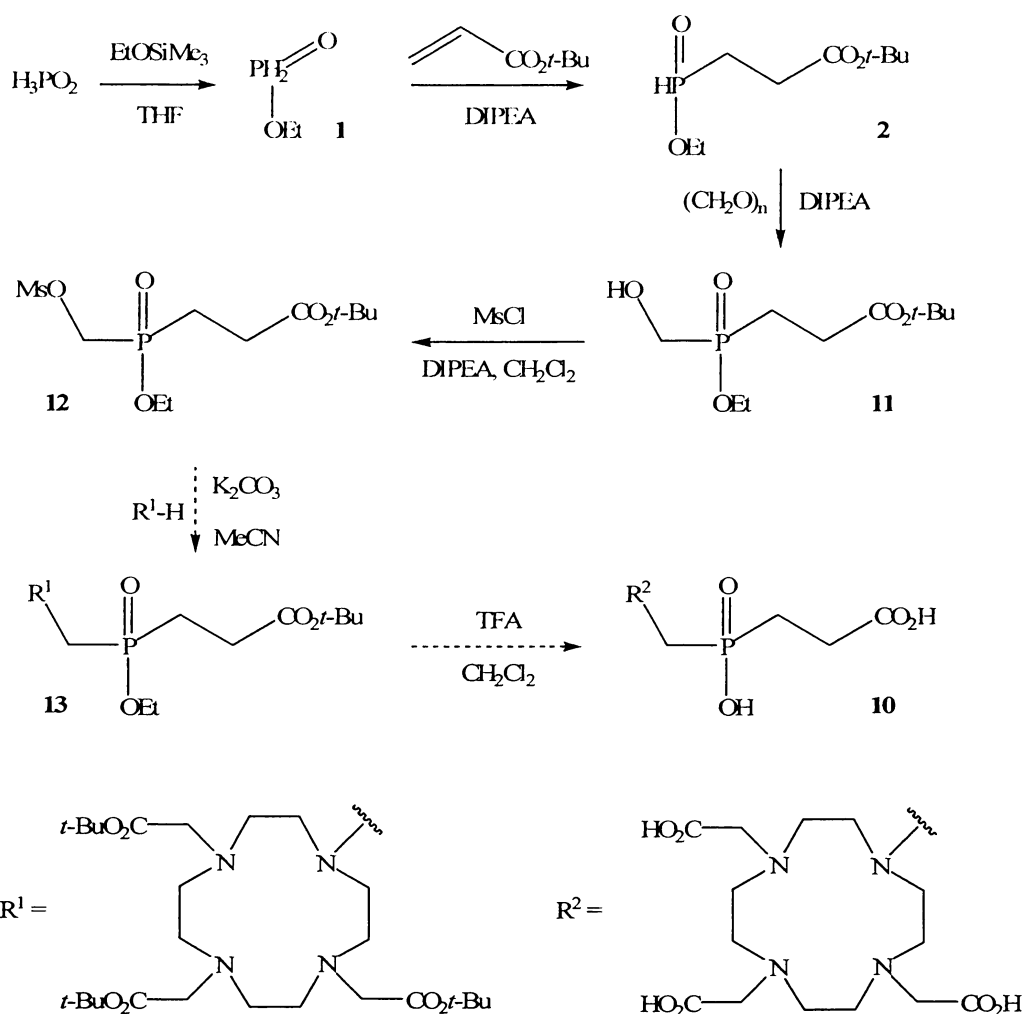
MS: 352,9 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

5. Diskuze

Sloučeniny, které byly cílem této diplomové práce, včetně postupů pro jejich přípravu, jsou uvedeny na obrázcích 5.1 a 5.2.



Obrázek 5.1 Schéma přípravy látky 10 – 1. návrh



Obrázek 5.2 Schéma přípravy látky 10 – 2. návrh

Potřebné reakční časy, které jsou uvedeny u příprav jednotlivých látek, byly zjišťovány analyzováním reakčních směsí v průběhu reakcí pomocí ^{31}P -NMR. Obsah jednotlivých látek obsahujících fosfor je vyjádřen v molárních procentech.

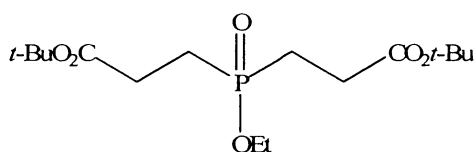
Příprava ethyl-fosfinátu (**1**) byla provedena podle částečně modifikovaného postupu¹²⁵, který byl nedávno publikován. Jeho výhodou je velmi snadné provedení a vedlejší produkty lze po adici *tert*-butylesteru kyseliny prop-2-enové snadno oddělit extrakcí.

Po provedení uvedené reakce byla v reakční směsi přítomna kromě ethyl-fosfinátu (70 %) i další látka (30 %), kterou se ale z důvodu nestability nepodařilo identifikovat. Nicméně z přítomnosti tripletu v ^{31}P -NMR spektru ($\delta_{\text{P}} = 6,1$ (t, $^1J_{\text{PH}} = 558$ Hz)) lze soudit, že tato látka má dva atomy vodíku navázané na atomu fosforu, a tudíž se zřejmě jedná o produkt reakce H_3PO_2 s EtOSiMe_3 . Dále byl v reakční směsi přítomen diethylfosfit, ale v množství menším než 1 %. Jak již bylo

zmíněno výše, ethyl-fosfinát (**1**) nebyl připraven čistý, protože je na vzduchu a za vyšší než laboratorní teploty nestálý, proto byla reakční směs přímo použita do dalšího reakčního kroku.

Při přípravě esteru **2** byl místo běžně používaného methylesteru¹²⁶ použit *tert*-butylester proto, aby mohl být výsledný ester **2** oddělen od ostatních látek obsahujících P-H vazbu (kyselina fosforová a fosfináty) extrakcí.

Pomocí ³¹P-NMR bylo zjištěno, že při reakci vznikají i 3 % dialkylovaného produktu (viz obrázek 5.3).



Obrázek 5.3 Jeden z možných vedlejších produktů vzniklých při přípravě esteru **2**

Problematické bylo u této reakce čištění reakční směsi. Pokud totiž není ester **2** čistý, snadno se za laboratorní teploty rozkládá. Dále bylo zjištěno, že ester **2** musí být skladován ve zředěném roztoku a v chladu, aby nedocházelo k rozkladu. Při hledání podmínek pro chromatografii se ukázalo, že musí být použit pouze EtOAc, i když směs EtOAc : NH₃ vykazovala lepší separační schopnost. Přítomný amoniak totiž způsoboval rozklad esteru **2**. Do dalšího reakčního kroku byla použita reakční směs po promytí.

Hydrolyza esteru **2** → **3** proběhla se 100% konverzí, nebylo třeba žádné optimalizace. Pokud byl jako reaktant použit čistý ester **2**, produktem byla čistá kyselina **3**.

Příprava hydroxymethylderivátu **4** byla nejprve zkoušena přímo z esteru **2**, ale neúspěšně.

Do odpařené reakční směsi (0,25 g) obsahující 87 % esteru **2** byl přidán paraformaldehyd (80 mg, 2,7 mmol), EtOH (2 ml) a HCl (koncentrovaná, 2 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 16 hodin. Potom bylo změřeno ³¹P-NMR spektrum a bylo zjištěno, že reakce neprobíhá. Reakční směs tedy byla míchána při 60 °C. V průběhu 20 hodin reakční směs změnila barvu z bezbarvé na černou, což zřejmě svědčilo o rozkladu.

Proto byla nejprve hydrolyzou esteru **2** připravena kyselina **3** a z ní hydroxymethylderivát **4**. Po chromatografii reakční směsi obsahující hydroxymethylderivát **4** na anexu bylo zjištěno, že se část hydroxymethylderivátu **4** přeměnila na neznámou sloučeninu. Proto byla frakce obsahující tuto neznámou sloučeninu povařena v roztoku HCl : EtOH (1:1), což vedlo k přeměně neznámé sloučeniny zpět na hydroxymethylderivát **4**. Při izolaci hydroxymethylderivátu **4** bylo zjištěno, že je za laboratorní teploty a v koncentrovaných roztocích nestálý, a proto byl skladován ve zředěném roztoku při 4 °C. Do dalšího reakčního kroku byla použita reakční směs po chromatografii na anexu.

Syntéza esteru **5** byla nejprve prováděna s přidavkem báze (DMAP), ale potom bylo zjištěno, že reakce bez přítomnosti této báze poskytuje dokonce vyšší výtěžek (95 %), a proto nebyla báze dále používána. Při ukončení reakce přidavkem vody vznikla z DCC dicyklohexylmočovina, kterou nebylo možné od esteru **5** odstranit ani extrakcí, ani chromatografií. Většina dicyklohexylmočoviny se vysrážela za 6 měsíců stání reakční směsi při 4 °C, přičemž z reakční směsi byla nově vysrážená dicyklohexylmočovina odfiltrována jednou za měsíc. Čistý ester **5** se pak podařilo připravit chromatografií reakční směsi. Nicméně z časových důvodů bylo v syntéze pokračováno dále hned po skončení reakce s vědomím, že reakční směs obsahuje dicyklohexylmočovinu.

Příprava mesylderivátu **6** probíhala se 100% konverzí. Při promývání bylo zjištěno, že látka přechází i do vodné fáze, a proto byla nakonec provedena extrakce vodné fáze, z níž byl získán další podíl čistého mesylderivátu **6**. Roztok mesylderivátu **6** byl skladován při 4 °C, ale i přesto se začal po několika měsících rozkládat, a proto byl připravený čistý mesylderivát **6** ihned použit do dalšího reakčního kroku.

Různé způsoby přípravy alkylovaného produktu **7** jsou uvedeny v tabulce 5.1. Jako reaktant byl použit mesylderivát **6** (0,20 mmol) a *t*-Bu₃DO3A.HBr (0,10 mmol), který byl připraven podle popsaného postupu¹²⁷. Vždy bylo použito 5 ml bezvodého rozpouštědla.

Tabulka 5.1 Podmínky reakce pro přípravu látky 7; r. t. – laboratorní teplota

experiment č.	čas (dny)	<i>t</i> (°C)	rozpouštědlo (5 ml)	báze*			zastoupení látky 7 v reakční směsi (%) po skončení reakce**
				název	<i>m</i> (mg)	ekv.	
1	4	reflux	MeCN	K ₂ CO ₃	162	6	50
2	6	reflux	MeCN	DIPEA	127	5	6
3	8	93	DMF	DIPEA	127	5	0
4	4	93	DMF	Cs ₂ CO ₃	318	5	0
5	4	r. t.	DMF	Cs ₂ CO ₃	318	5	0

* K₂CO₃ a Cs₂CO₃ byly použity vyžíhané

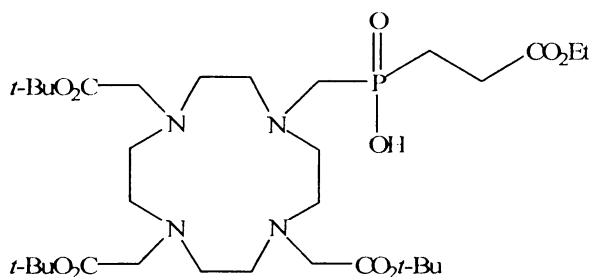
** Podle ³¹P-NMR

Nejvýhodnějším z provedených experimentů byl experiment č. 1, který byl proveden v desetkrát větším měřítku.

Analýzou reakční směsi bylo zjištěno, že reagoval všechny *t*-Bu₃DO3A, neboť v hmotnostním spektru této reakční směsi byl přítomen ion látky 7 (721,2 (100, [M+H]⁺)) a chyběl ion příslušející *t*-Bu₃DO3A a v ³¹P-NMR spektru reakční směsi byl alkylovaný produkt 7 přítomen z 50 %.

K pokusu o přípravu čistého alkylovaného produktu 7 byla použita chromatografie na koloně se silikagelem. Na základě výsledků z TLC bylo vyzkoušeno několik mobilních fází (EtOAc : *i*-PrOH : NH₃ (25:25:1, 25:25:2); *i*-PrOH : NH₃ (9:1); *i*-PrOH : THF : NH₃ (15:10:3); *i*-PrOH : MeOH : NH₃ (30:20:3, 30:20:4)), ale za přítomnosti silikagelu docházelo buď k reakci mezi sloučeninami tvořícími mobilní fázi (EtOAc + NH₃ → CH₃CONH₂ + EtOH), nebo k hydrolyze alkylovaného produktu 7 (všechny použité mobilní fáze), případně k rozkladu alkylovaného produktu 7 (EtOAc : *i*-PrOH : NH₃, *i*-PrOH : NH₃). Tyto informace byly zjištěny pomocí TLC, ³¹P, ¹H-NMR a MS.

Při rozkladu alkylovaného produktu 7 vznikal *t*-Bu₃DO3A (podle TLC a MS) a látka obsahující fosfor. Hydrolyza alkylovaného produktu 7 probíhala nejčastěji na ethylesteru fosfinové skupiny za vzniku tri-*terc*-butyl-10-({hydroxy[2-(ethoxykarbonyl)ethyl]fosforyl}methyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-triacetátu (viz obrázek 5.4). V některých případech byl produktem hydrolyzy i ester 9 (podle TLC, ³¹P-NMR a MS).



Obrázek 5.4 Jeden z možných produktů hydrolyzy látky **7** během chromatografie

Čistý alkylovaný produkt **7** se z výše uvedených důvodů nepodařilo připravit. Do dalšího reakčního kroku byla proto rovnou použita odpařená reakční směs obsahující alkylovaný produkt **7**.

Hydrolyza alkylovaného produktu **7** byla provedena podle modifikovaného postupu¹²⁸. Podle TLC, ³¹P-NMR a MS se podařilo připravit ester **8**, ale i přes různé pokusy se ho nepodařilo izolovat z reakční směsi, neboť při těchto pokusech dále hydrolyzoval na ester **9**. Proto nebyl ester **8** připraven čistý a ester **9** byl připravován přímo z reakční směsi obsahující alkylovaný produkt **7**. Při hledání vhodných elučnicích směsí pro chromatografii bylo zjištěno, že v některých případech dochází k rozkladu esteru **9**, podobně jako při chromatografii reakční směsi obsahující alkylovaný produkt **7**.

Ester **9** se podařilo izolovat chromatografií ve formě dihydrátu sodné soli (podle elementární analýzy). Je ale možné, že přítomná voda nemusí být ve formě hydrátu, ale může se jednat o nedostatečně vysušený vzorek, neboť ester **9** se podařilo izolovat jako viskózní kapalinu.

Různé způsoby přípravy kyseliny **10** jsou uvedeny v tabulce 5.2. Jako reaktant byl použit ester **9** (0,03 mmol). Dichlormethan byl použit bezvodý.

Tabulka 5.2 Podmínky reakce pro přípravu látky **10; r. t. – laboratorní teplota**

experiment č.	čas (hodiny)	t (°C)	V (CH ₂ Cl ₂) (ml)	čínidlo	V (čínidlo) (ml)	V (H ₂ O) (ml)	popis reakční směsi po skončení reakce*
1	1	reflux	3	TFA	3	0	směs neúplně hydrolyzovaných látek
2	16	r. t.	0	33% HBr v AcOH	5	0	úplný rozklad
3	1,5	reflux	1	TFA	4	0,15	část látky 10 , jinak rozkladné produkty
4	22	reflux	2	TFA	2	0	pouze látka 10
5	22	r. t.	1	TFA	4	0	pouze látka 10
6	22	r. t.	0	TFA	5	0,15	částečný rozklad

* Podle ³¹P-NMR a MS

Nejvýhodnějším z provedených experimentů byl experiment č. 5, který byl proveden v čtyřikrát větším měřítku.

Při hydrolyze esteru **9** bylo cílem najít takové reakční podmínky, které se běžně používají při syntéze peptidů¹²⁹. Proto byla vyzkoušena TFA a 33% roztok HBr v AcOH za různých podmínek a s různými rozpouštědly. Nakonec byla nalezena metoda (viz tabulka 5.2 – experiment 4 a 5), která vedla k přeměně esteru **9** na kyselinu **10** se 100% konverzí. Při charakterizaci kyseliny **10** se opět vyskytl problém jen u elementární analýzy, neboť kyselina **10** byla z reakční směsi získána ve formě viskózní kapaliny obsahující stopové množství H₂O a CF₃COOH, a proto není v tomto případě elementární analýza vhodnou charakterizační metodou. Nicméně údaje z NMR (³¹P, ¹H, ¹³C) a MS jsou shodné s literaturou²² a kyselina **10** je dle TLC čistá.

Při analýze kyseliny **10** pomocí NMR při 25 °C byly v ³¹P-NMR spektru přítomny dva pásy ($\delta_P = 34,4$ a $\delta_P = 51,4$), což svědčí o přítomnosti různých konformací kyseliny **10** způsobených cyklenovou částí. Při této teplotě byly také v ¹H-NMR spektru signály širší, což zhoršovalo jejich interpretaci. Z uvedených důvodů bylo měření NMR provedeno při 90 °C, kdy už byl v ³¹P-NMR přítomen pouze jeden signál a signály v ¹H-NMR spektru byly ostré.

Kromě výše uvedeného postupu přípravy kyseliny **10** byl vyzkoušen i jiný (viz obrázek 5.2), také vycházející z esteru **2**. Různé způsoby přípravy hydroxymethyl-derivátu **11** jsou uvedeny v tabulce 5.3. Jako reaktant byl použit rozetřený paraformaldehyd (1,5 mmol) a odpařená reakční směs (0,25 g) obsahující 87 % esteru **2**.

Tabulka 5.3 Podmínky reakce pro přípravu látky 11

experiment č.	čas (dny)	<i>t</i> (°C)	rozpouštědlo*	<i>V</i> (ml)	báze			zastoupení látky 11 v reakční směsi (%) po skončení reakce**
					název	<i>m</i> (mg)	<i>n</i> (mmol)	
1	3	20	-	-	DIPEA	150	1,2	8
2	0,75	45	MeCN	0,5	DIPEA	150	1,2	34
3	1,75	45	MeCN	0,5	DIPEA	150	1,2	27
4	3	20	MeCN	2,5	DIPEA	150	1,2	14
5	1	50	MeCN	2,5	DIPEA	150	1,2	32
6	3	20	MeCN	2,5	DBU	170	1,1	8
7	1	82	MeCN	2,5	-	-	-	17
8	1	20	-	-	DBU	17	0,1	11
9	1	65	MeCN	0,5	DBU	17	0,1	18
10	1	20	EtOH	2,5	EtONa	100	1,5	0
11	3	20	EtOH	50	EtONa	100	1,5	0
12	0,75	65	THF	2	-	-	-	24
13	0,75	80	toluen	2	-	-	-	7
14	0,75	80	EtOH	2	-	-	-	0
15	0,75	50	CH ₂ Cl ₂	2	-	-	-	3
16	0,75	50	MeCN	2	-	-	-	1
17	0,75	45	THF	2	DIPEA	290	2,2	10
18	4	62	THF	2	DIPEA	290	2,2	15
19	0,75	45	EtOH	2	DIPEA	290	2,2	6
20	4	62	EtOH	2	DIPEA	290	2,2	35
21	0,75	45	MeCN	2	DIPEA	290	2,2	36
22	4	62	MeCN	2	DIPEA	290	2,2	14
23	0,75	45	-	-	DIPEA	1460	11,3	20
24	4	62	-	-	DIPEA	1460	11,3	0
25	0,75	45	-	-	2,6-lutidin	1210	11,3	7
26	4	62	-	-	2,6-lutidin	1210	11,3	9
27	0,75	45	MeCN	2	K ₂ CO ₃	310	2,2	30
28	0,75	45	MeCN	2	K ₂ CO ₃	310	2,2	32

*Kromě experimentů 2 až 6 byla použita bezvodá rozpouštědla.

** Podle ³¹P-NMR

Nejvýhodnějším z provedených experimentů byl experiment č. 21, který byl proveden v desetkrát větším měřítku.

Další krok, tj. příprava mesylderivátu **12**, proběhl bez problémů, stejně tak izolace a charakterizace.

Příprava esteru **13** a kyseliny **10** už nebyla provedena vzhledem k nízkému výtěžku reakce **2** → **11** a z důvodu problematické přípravy a izolace látek **7** až **10**. Dalo se totiž očekávat, že se i při přípravě látek **10** a **13** vyskytnou problémy, které nakonec povedou k nižšímu celkovému výtěžku než při použití Mannichovy reakce (viz obrázek 3.16)².

6. Závěr

V rámci diplomové práce bylo připraveno 13 látek, z toho 9 nových. Tři látky (**3**, **8** a **10**), které byly známé již dříve, byly připraveny novým způsobem, přičemž bylo dosaženo přibližně stejných výtěžků, a to i přes větší počet reakčních kroků. Charakterizovat se podařilo 10 látek, zbylé látky nemohly být charakterizovány buď z důvodu nestability na vzduchu, nebo rozkladu během čištění.

Bylo zjištěno, že alkylace má ve srovnání s Mannichovou reakcí přibližně stejný celkový výtěžek, a to i přes větší počet reakčních kroků. Výhodou je možnost čištění reakční směsi na silikagelu, což u reakční směsi vzniklé Mannichovou reakcí nelze. Nevýhodou je větší počet reakčních kroků, a tím i větší časová náročnost.

Snaha připravit kyselinu **10** menším počtem reakčních kroků skončila neúspěšně z důvodu malé výtěžnosti reakce **2** → **11**.

Byl nalezen způsob pro přípravu čisté kyseliny **3**, která může být například použita pro již zmiňovanou Mannichovu reakci.

Podařilo se najít postup přípravy požadovaného esteru **9** a postup pro hydrolyzu této látky technikami používanými při peptidové syntéze. Tím byla zároveň nalezena alternativní cesta pro přípravu kyseliny **10** alkylací. Připravený ester **9** bude použit pro reakci s peptidy a výsledná molekula bude využita jako specifická kontrastní látka.

Seznam literatury

1. Táborský P., Svobodová I., Hnatejko Z., Lubal P., Lis S., Försterová M., Hermann P., Lukeš I., Havel J.: *J. Fluorescence* **2005**, *15*, 507.
2. Málková M.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova, Praha 2002.
3. Pedersen C. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017.
4. Lindoy L. F.: *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, Cambridge University Press, Cambridge 1989.
5. Greenwood N. N., Earnshaw A.: *Chemie Prvků*, str. 127, Informatorium, Praha 1993.
6. Lukeš I., Kotek J., Vojtíšek P., Hermann P.: *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216-217*, 287.
7. Redmore D.: *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 996.
8. Dejong F., Vanzon A., Reinhoudt D. N., Torny G. J., Tomassen H. P. M.: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1983**, *102*, 164.
9. Bosbach D., Coveney P. V., Griffin J. L. W., Putnis A., Risthaus P., Stackhouse S., Whiting A.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 1238.
10. Kabachnik M. I., Medved T. Y., Belskii F. I., Pisareva S. A.: *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1984**, *1984*, 844.
11. Delgado R., Siegfried L. C., Kaden T. A.: *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 140.
12. Lázár I., Hrcir D. C., Kim W. D., Kiefer G. E., Sherry A. D.: *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4422.
13. Aime S., Botta M., Frullano L., Crich S. G., Giovenzana G., Pagliarin R., Palmisano G., Sirtori F. R., Sisti M.: *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4017.
14. Kotek J., Vojtíšek P., Císařová I., Hermann P., Jurečka P., Rohovec J., Lukeš I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1289.
15. Lázár I., Sherry A. D.: *Synthesis* **1995**, 453.
16. Lázár I., Sherry A. D.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1252.
17. Novak T., Bako P., Imré T., Keglevich G., Dobo A., Töke L.: *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *38*, 435.
18. Li X., Zhang S., Zhao P., Kovacs Z., Sherry A. D.: *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6572.

19. Moedritzer K., Irani R. R.: *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1603.
20. Sherry A. D., Lázár I., Ramasamy R., Brücher E.: *PCT Int. Appl.* WO 9208725; *Chem. Abstr.* **1991**, *117*, 151153.
21. Kiefer G. E., Simon J., Garlich J. R.: *PCT Int. Appl.* WO 9311802; *Chem. Abstr.* **1993**, *119*, 285185.
22. Lukeš I., Hermann P.: *PCT Int. Appl.* WO 2003008394; *Chem. Abstr.* **2003**, *138*, 146685.
23. de Angelis S., Batsanov A. S., Norman T. J., Parker D., Senanayake K., Vepsäläinen J.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2361.
24. van Haveren J., Deteon L., Ramasamy R., van Westrenen J., Sherry A. D.: *NMR Biomed.* **1995**, *8*, 197.
25. Huskens J., Sherry A. D.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 177.
26. Fenton R. R., Lindoy L. F., Luckay R. C., Turville F. R., Wei G.: *Aust. J. Chem.* **2001**, *54*, 59.
27. Rohovec J., Vojtišek P., Lukeš I.: *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1999**, *148*, 79.
28. Huskens J., Torres D. A., Kovacs Z., André J. P., Geraldés C. F. G. C., Sherry A. D.: *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1495.
29. Broan C. J., Jankowski K. J., Kataký R., Parker D.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1738.
30. Broan C. J., Jankowski K. J., Kataký R., Parker D., Randall A. M., Harrison A.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1739.
31. Parker D., Pulukkody K., Norman T. J., Harrison A., Royle L., Walker C.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1441.
32. Aime S., Batsanov A. S., Botta M., Dickins R. S., Faulkner S., Foster C. E., Harrison A., Howard J. A. K., Moloney J. M., Norman T. J., Parker D., Royle L., Williams J. A. G.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 3623.
33. Sabbatini N., Guardigli M., Bolletta F., Manet I., Ziessel R.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **1994**, *33*, 1501.
34. Rohovec J., Kývala M., Vojtišek P., Hermann P., Lukeš I.: *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 195.

35. Huskens J., Sherry A. D.: *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4396.
36. Parker D., Eaton M. A. W.: *Eur. Pat. Appl.* EP 382582; *Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 122706.
37. Aime S., Botta M., Parker D., Williams J. A. G.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 2259.
38. Parker D., Senanayake K., Williams J. A. G.: *Chem. Commun.* **1997**, 1777.
39. Aime S., Botta M., Dickins R. S., Maupin C. L., Parker D., Riehl J. P., Williams J. A. G.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 881.
40. Gunnlaugsson T., Parker D.: *Chem. Commun.* **1998**, 511.
41. Parker D., Senanayake P. K., Williams J. A. G.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2129.
42. Gunnlaugsson T., Mac Donail D. A., Parker D.: *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12866.
43. Parker D., Eaton M. A. W.: *Eur. Pat. Appl.* EP 404605; *Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 92605.
44. Cole E., Parker D., Ferguson G., Gallagher J. F., Kaitner B.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1473.
45. Pulukkody K. P., Norman T. J., Parker D., Royle L., Broan C. J.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 605.
46. Broan C. J., Cole E., Jankowski K. J., Parker D., Pulukkody K., Boyce B. A., Beeley N. R. A., Millar K., Millican A. T.: *Synthesis* **1992**, 63.
47. Lázár I., Sherry A. D., Ramasamy R., Brucher E., Kiraly R.: *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 5016.
48. Rohovec J., Vojtíšek P., Hermann P., Ludvík J., Lukeš I.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 141.
49. Rudovsky J., Kotek J., Hermann P., Lukeš I., Mainero V., Aime S.: *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 112.
50. Bazakas K., Lukes I.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 1133.
51. Huskens J., Sherry A. D.: *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 5137.
52. Merbach A. E., Tóth É.: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester 2001.

53. Kuperman V.: *Magnetic Resonance Imaging*, Academic Press, San Diego 2000.
54. Damadian R. V.: *Science* **1971**, *171*, 1151.
55. Damadian R. V.: *Ger. Offen.* DE 2946847; *Chem. Abstr.* **1980**, *93*, 200577.
56. Akitt J. W., Mann B. E.: *NMR and Chemistry*, Stanley Thornes, Cheltenham 2000.
57. Fletcher L. M., Barsotti J. B., Hornak J. P.: *Magn. Reson. Med.* **1993**, *29*, 623.
58. Bloembergen N., Purcell E. M., Pound R. V.: *Phys. Rev.* **1947**, *73*, 679.
59. Šedinová M.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova, Praha 2005.
60. Laus S., Ruloff R., Tóth É., Merbach A. E.: *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3555.
61. Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J., Lauffer R. B.: *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293.
62. Bloch F., Hansen W. W., Packard M.: *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127.
63. Caravan P., Greenfield M. T., Li X., Sherry A. D.: *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6580.
64. Geraldies C. F. G. C., Sherry A. D., Lazar I., Miseta A., Bogner P., Berenyi E., Sumegi B., Kiefer G. E., McMillan K., Maton F., Muller R. N.: *Magn. Reson. Med.* **1993**, *30*, 696.
65. Harrison A., Walker C. A., Pereira K. A., Parker D., Royle L., Pulkukody K., Norman T. J.: *Magn. Reson. Imag.* **1993**, *11*, 761.
66. Aime S., Batsanov A. S., Botta M., Howard J. A. K., Parker D., Senanayake K., Williams G.: *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4696.
67. Dickins R. S., Parker D., de Sousa A. S., Williams J. A. G.: *Chem. Commun.* **1996**, 697.
68. Dickins R. S., Parker D., Bruce J. I., Tozer D. J.: *Dalton Trans.* **2003**, 1264.
69. Rohovec J., Vojtišek P., Hermann P., Mosinger J., Žák Z., Lukeš I.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 3585.
70. Aime S., Barge A., Bruce J. I., Botta M., Howard J. A. K., Moloney J. M., Parker D., de Sousa A. S., Woods M.: *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5762.
71. Borel A., Helm L., Merbach A. E.: *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 600.

72. Kotek J., Lubal P., Hermann P., Císařová I., Lukeš I., Godula T., Svobodová I., Táborský P., Havel J.: *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 233.
73. Peters M., Siegfried L., Kaden T. A.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 4664.
74. Raghunand N., Howison C., Sherry A. D., Zhang S. R., Gillies R. J.: *Magn. Reson. Med.* **2003**, *49*, 249.
75. Parker D., Williams J. A. G.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 3613.
76. Alves F. C., Donato P., Sherry A. D., Zaheer A., Zhang S. R., Lubag A. J. M., Merritt M. E., Lenkinski R. E., Frangioni J. V., Neves M., Prata M. I. M., Santos A. C., de Lima J. J. P., Geraldés C. F. G. C.: *Invest. Radiol.* **2003**, *38*, 750.
77. Villa A., Cosentino U., Pitea D., Moro G., Maiocchi A.: *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 3421.
78. Ullmann V.: *Jaderná Fyzika a Fyzika Ionizujícího Zářen*, Ostrava 2002.
79. Cole E., Copley R. C. B., Howard J. A. K., Parker D., Ferguson G., Gallagher J. F., Kaitner B., Harrison A., Royle L.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 1619.
80. Norman T. J., Smith F. C., Parker D., Harrison A., Royle L., Walker C. A.: *Supramol. Chem.* **1995**, *4*, 305.
81. Marques F., Guerra K. P., Gano L., Costa J., Campello M. P., Lima L. M. P., Delgado R., Santos I.: *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 859.
82. Hassfjell S., Ingebrigtsen K., Bruland O. S.: *Nucl. Med. Biol.* **2001**, *28*, 425.
83. Seshan V., Germann M. J., Preisig P., Malloy C. R., Sherry A. D., Bansal N.: *Magn. Reson. Med.* **1995**, *34*, 25.
84. Winter P. M., Bansal N.: *Magn. Reson. Med.* **2001**, *45*, 436.
85. Sherry A. D., Geraldés C. F. G. C., Cacheris W. P.: *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *193*, 137.
86. Weidensteiner C., Horn M., Fekete E., Neubauer S., von Kienlin M.: *Magn. Reson. Med.* **2002**, *48*, 89.
87. Colet J. M., Makos J. D., Malloy C. R., Sherry A. D.: *Magn. Reson. Med.* **1998**, *39*, 155.
88. Seshan V., Sherry A. D., Bansal N.: *Magn. Reson. Med.* **1997**, *38*, 821.

89. Colet J. M., Bansal N., Malloy C. R., Sherry A. D.: *Magn. Reson. Med.* **1999**, *41*, 1127.
90. Xia Z. F., Horton J. W., Zhao P. Y., Babcock E. E., Sherry A. D., Malloy C. R.: *J. Appl. Physiol.* **1996**, *81*, 1395.
91. Zhang S. R., Wu K. C., Sherry A. D.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 3192.
92. Rohovec J., Lukeš I., Hermann P.: *New J. Chem.* **1999**, *23*, 1129.
93. Huskens J., Main M., Malloy C. R., Sherry A. D.: *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1997**, *1336*, 434.
94. Corbett R., Batista A., Laptook A., Sherry A. D.: *Magnesium Res.* **1999**, *12*, 79.
95. Batista A., Corbett R., Tidor S., Castleman E., Laptook A., Sherry A. D.: *Magnesium Res.* **2000**, *13*, 3.
96. Svobodová I., Lubal P., Hermann P., Kotek J., Havel J.: *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2004**, *49*, 11.
97. Svobodová I., Lubal P., Hermann P., Kotek J., Havel J.: *Microchim. Acta* **2004**, *148*, 21.
98. Murru M., Parker D., Williams J. A. G., Beeby A.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1116.
99. Aime S., Botta M., Parker D., Williams J. A. G.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 17.
100. Beeby A., Clarkson I. M., Dickins R. S., Faulkner S., Parker D., Royle L., de Sousa A. S., Williams J. A. G., Woods M.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 493.
101. Beeby A., Dickins R. S., Faulkner S., Parker D., Williams J. A. G.: *Chem. Commun.* **1997**, 1401.
102. Beeby A., Faulkner S.: *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *266*, 116.
103. Huskowska E., Maupin C. L., Parker D., Williams J. A. G., Riehl J. P.: *Enantiomer* **1997**, *2*, 381.
104. Luck R. L., Maupin C. L., Parker D., Riehl J. P., Williams J. A. G.: *Inorg. Chim. Acta* **2001**, *317*, 331.
105. Faulkner S., Beeby A., Dickins R. S., Parker D., Williams J. A. G.: *J. Fluorescence* **1999**, *9*, 45.

106. Parker D., Williams J. A. G.: *Chem. Commun.* **1998**, 245.
107. Blair S., Katakly R., Parker D.: *New J. Chem.* **2002**, 26, 530.
108. Gunnlaugsson T., Mac Donail D. A., Parker D.: *Chem. Commun.* **2000**, 93.
109. Alexander V.: *Chem. Rev.* **1995**, 95, 273.
110. Habata Y., Akabori S.: *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 148, 97.
111. Parker D.: *Comprehensive Supramol. Chem.* **1996**, 10, 487.
112. Sherry A. D.: *J. Alloys Compd.* **1997**, 249, 153.
113. Aime S., Botta M., Fasano M., Terreno E.: *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 941.
114. Martell A. E., Motekaitis R. J., Sun Y., Ma R., Welch M. J., Pajeau T.: *Inorg. Chim. Acta* **1999**, 291, 238.
115. Fichna J., Janecka A.: *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 3.
116. Lowe M. P.: *Aust. J. Chem.* **2002**, 55, 551.
117. Parker D.: *Chem. Brit.* **1994**, 30, 818.
118. McWhinnie S. L. W.: *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A: Inorg. Chem.* **1995**, 91, 351.
119. Parker D., Williams J. A.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1996**, 3613.
120. Aime S., Botta M., Fasano M., Terreno E.: *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 19.
121. Botta M.: *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 399.
122. Parker D.: *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 109.
123. Wainwright K. P.: *Adv. Inorg. Chem.* **2001**, 52, 293.
124. Rudovský J., Cígler P., Kotek J., Hermann P., Vojtíšek P., Lukeš I., Peters J. A., Elst L. V., Muller R. N.: *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 2373.
125. Deprele S., Montchamp J.-L.: *J. Organomet. Chem.* **2002**, 643-644, 154.
126. Wróblewski A. E., Verkade J. G.: *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10168.
127. Dadabhoy A., Faulkner S., Sammes P. G.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 348.
128. Kaestle K. L., Anwer M. K., Audhya T. K., Goldstein G.: *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 327.
129. Anderson G. W., Callahan F. M.: *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 3359.