

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

**KATEDRA ANORGANICKÉ CHEMIE**

Pyridin N-oxidový bifunkční derivát DOTA  
a jeho komplexy s lanthanoidy

Diplomová práce  
studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2007

Miroslava Šedinová

**Klíčová slova:**

nukleární magnetická rezonance, tomografie magnetické rezonance, luminiscence

**Předmětová hesla:**

kontrastní látka, DOTA, pyridin N-oxid, lanthanoidy

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Miloslava Poláška, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....*3. 9. 2007*.....

*Miloslav Polášek*  
.....

podpis

## Obsah:

Seznam zkratk a symbolů	4
1 Úvod	5
1.1 Obecný úvod do tomografie magnetické rezonance	5
1.2 Jaderná magnetická rezonance	7
1.3 Relaxační procesy v přítomnosti iontu $Gd^{3+}$	7
1.4 Model $Gd^{3+}$ kontrastních látek v roztoku	9
1.5 Relaxační procesy ve vnitřní sféře	10
1.6 Metody studia komplexů s lanthanoidy	12
1.6.1 Hydratační číslo	12
1.6.2 Residenční čas molekuly vody	13
1.6.3 Rotační korelační čas	14
1.6.4 Izomerie komplexů v roztocích	16
2 Experimentální část	17
2.1 Seznam použitých chemikálií	17
2.2 Metody charakterizace připravených látek	18
2.2.1 NMR spektroskopie	18
2.2.2 Relaxometrie	18
2.2.2 Hmotnostní spektrometrie	18
2.2.3 Elementární analýza	18
2.2.4 Rentgenostrukturní analýza	18
2.2.5 Měření a úprava pH roztoků	18
2.2.6 Luminiscence	18
2.3 Příprava ligandu a jeho komplexů	19
2.3.1 Příprava ligandu DO3A-pyNox-4A	19
2.3.2 Příprava komplexů s lanthanoidy	20
2.4 NMR experimenty	21
2.4.1 Stanovení koncentrace roztoků	21
2.4.2 Izomerie a $^1H$ NMR spektra	22
2.4.3 NMRD profily	22
2.4.4 $^{17}O$ teplotní profily	22
2.4.5 Závislost relaxivity na pH	24
2.5 Vyhodnocení dat	24
3 Výsledky a diskuze	25
3.1 Příprava ligandu a jeho $Ln^{3+}$ komplexů	25
3.1.1 Komplexy $Ln^{3+}$	25
3.1.2 Krystalová struktura ligandu	25
3.2 Zjištění hydratačního čísla	27
3.2.1 Luminiscenční metoda	27
3.2.2 Metoda $^{17}O$ DIS	28
3.3 Relaxometrické studium komplexů	29
3.3.1 Závislost relaxivity na pH	29
3.3.2 $^1H$ NMRD a teplotní $^{17}O$ profily	29
3.3.3 Studie parametrů ovlivňujících relaxivitu	31
3.4 Izomerie komplexů v roztocích	34
4 Závěr	37
5 Literatura	38
Příloha	42

## Seznam zkratek a symbolů

BM	Bohrův magneton ( $\mu_B = 9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$ )
BMS	Bulk Magnetic susceptibility Shift
BSM	Bloembergenova-Solomonova-Morganova (teorie)
CT	Computer Thomography
DD	Dipole-dipole interaction
DIS	Dysprosium Induced Shift
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklo dodekane-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DO3A-pyNox	1,4,7-tris(karboxymethyl)-10-[(1-oxo-1 $\lambda^5$ -pyridin-2-yl)methyl]- -1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DO3A-pyNox-4A	[4,7-Bis-Karboxymethyl-10-(1-oxy-pyridin-2-ylmethyl)- -1,4,7,10tetraaza-cyklododek-1-yl]-octová kyselina
$h$	Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$ )
IS	Inner Sphere
LD <sub>50</sub>	Letální dávka
LIS	Lanthanide Induced Shift
<b>m</b>	minor
<b>M</b>	major
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MS	Mass Spectroscopy
NMR	Nuklearní magnetická rezonance
NMRD	Nuclear Magnetic Resonance Dispersion
OS	Outer Sphere
PET	Pozitronová emisní tomografie
SAP	Square AntiPrism
SC	Scalar interaction
SS	Second Sphere
TSAP	Twisted Square AntiPrism
ZFC	Zero Field Splitting

# 1 Úvod

## 1.1 Obecný úvod do tomografie magnetické rezonance

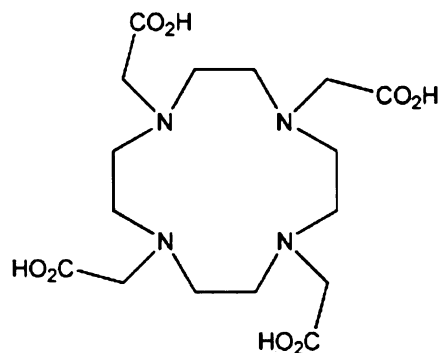
Tomografie magnetické rezonance neboli MRI (ang. Magnetic Resonance Imaging) se stala jednou z důležitých zobrazovacích technik v klinické medicíně. Ve srovnání s ostatními vyšetřovacími metodami dokáže MRI proniknout i do měkkých tkání a může podat informaci o patofyziologických změnách v tkáni. Pro pacienta je to metoda neinvazivní, neboť není vystaven škodlivému záření jako např. u vyšetření PET/CT (Pozitronová Emisní Tomografie v kombinaci s rentgenovým zářením). Kontraindikací měření může být přítomnost kovových implantátů nebo pacientova klaustrofobie.<sup>1</sup>

Metoda MRI vychází z nukleární magnetické rezonance (NMR). Využívá zejména signál  $^1\text{H}$  jader molekul vody. Kvalita obrazu MRI je dána souhrou několika faktorů zahrnujících protonovou hustotu, relaxační časy zobrazované tkáně a parametry magnetu. Pro zlepšení obrazu se zhruba v jedné třetině klinických případů před vyšetřením aplikují tzv. kontrastní látky, které mohou podstatně zvýšit kvalitu snímků.<sup>2</sup>

Jako jedny z neúčinnějších kontrastních látek se ukázaly být komplexy s  $\text{Gd}^{3+}$  iontem.<sup>3</sup> Volný iont  $\text{Gd}^{3+}$  je však toxický ( $\text{LD}_{50}$   $\text{Gd}^{3+}$  je 0,1 – 0,5 mmol/kg) (cit. <sup>4</sup>), proto musí být vázán v kineticky a termodynamicky stabilním komplexu. Takový komplex poskytuje např. DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina viz obr. 1). Základní motiv ligandu DOTA lze „chemicky ladit“, a to tak, že se záměnou pendantních skupin docílí derivátů s odlišnými vlastnostmi.

Pro kontrastní látky byla zavedena veličina zvaná relaxivita, která vyjadřuje schopnost urychlovat relaxaci  $^1\text{H}$  jader molekul vody (viz další kapitoly).<sup>3</sup> U klinicky používaných kontrastních látek je hodnota relaxivity relativně nízká, proto se výzkum

zaměřuje na její zvyšování. Vysoká relaxivita umožňuje aplikaci nižší dávky kontrastní látky, a tím i snížení ceny vyšetření a zátěže pacienta. Pro dosažení vyšší relaxivity je potřeba zvýšit rychlost výměny vody a zpomalit rotaci molekuly. Zatímco výměna vody již byla optimalizována v řadě případů,<sup>5,6</sup> u rotace nastávají dva hlavní problémy. Připojení komplexu

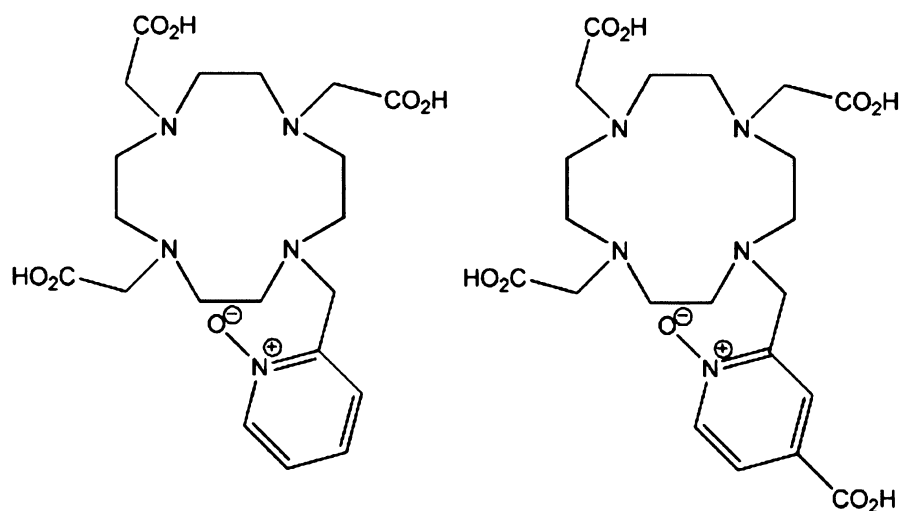


Obrázek 1. Struktura DOTA

k pomalu rotující makromolekule je buď příliš flexibilní<sup>7</sup> nebo se jím naruší koordinační okolí centrálního iontu,<sup>8</sup> a tím i rychlost výměny vody.

Pro potřeby současné optimalizace rychlosti výměny vody a rotace byl připraven ligand s pyridin N-oxidovou pendantní skupinou, DO3A-pyNox. Bylo zjištěno, že jeho komplexy mají téměř optimální rychlost výměny vody, nulový náboj a dobrou rozpustnost ve vodě.<sup>9, 10</sup> Pyridin N-oxidové jádro umožňuje relativně snadno připravit deriváty, přičemž taková změna struktury proběhne dostatečně daleko od centrálního iontu. Rychlost výměny vody a některé další vlastnosti by tak měly zůstat zachovány.

V rámci této práce byl připraven a studován derivát ligandu DO3A-pyNox s karboxylem v poloze 4 na pyridin N-oxidovém jádře (obr. 2), který byl zkráceně



Obrázek 2. Struktura ligandu s DO3A-pyNox a jeho derivátu DO3A-pyNox-4A

pojmenován jako DO3A-pyNox-4C<sup>‡</sup>. Karboxyl lze využít pro navázání ligandu na makromolekulu pomocí relativně rigidní amidové vazby. Úkolem této diplomové práce bylo zjistit, zda si nově připravený derivát skutečně ponechá vlastnosti původního ligandu,<sup>9</sup> popřípadě které z jeho vlastností se změní.

<sup>‡</sup> [4,7-bis-karboxymethyl-10-(1-oxy-pyridin-2-ylmethyl)-1,4,7,10-tetraaza-cyklo-dodek-1-yl]-octová kyselina

## 1.2 Jaderná magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance je založena na měření magnetických vlastností jader atomů. Magneticky aktivní jsou pouze jádra se spinovým kvantovým číslem  $I \neq 0$ . Např. jedno z nejdůležitějších NMR aktivních jader,  $^1\text{H}$ , má spinové kvantové číslo  $I = \frac{1}{2}$ . Vlastností NMR aktivních jader je vektorová veličina  $\mu$ , tzv. magnetický moment (1),

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \frac{h}{2\pi} \quad (1)$$

kde  $\gamma$  je gyromagnetická konstanta jádra,  $h$  je Planckova konstanta. Jádra s vyšší gyromagnetickou konstantou jsou citlivější a mají schopnost absorbovat více energie (např.  $^1\text{H}$  je citlivější než  $^{13}\text{C}$ ).

V základním stavu jaderné spiny respektive magnetické momenty nejsou uspořádány, jsou tzv. degenerované. Vlivem silného externího magnetického pole  $B_0$  dojde k jejich uspořádání v souhlasném či opačném směru vůči  $B_0$ . Mezi těmito opačně orientovanými magnetickými momenty je energetický rozdíl, který se řídí Boltzmannovým rozdělením. Energie jednoho spinu je přímo úměrná magnetickému momentu jádra a velikosti externího magnetického pole. Vektor magnetického momentu vykonává precesní pohyb okolo osy  $z$ , s tzv. Larmorovou frekvencí  $\omega$  (2),

$$\omega = \gamma B \quad (2)$$

kde  $B$  je magnetická indukce. Sečtením a zprůměrováním vektorů magnetických momentů velkého souboru jader dostaneme makroskopickou magnetizaci  $\vec{M}_0$ . Aplikací elektromagnetického pulzu  $B_1$  kolmého k  $B_0$  zavedeme do systému novou Larmorovu frekvenci  $\omega_1$  odpovídající poli  $B_1$ , kterou dojde k vychýlení vektoru makroskopické magnetizace  $\vec{M}_0$ . Po tomto pulzu nastává proces relaxace, kdy se vektor  $\vec{M}_0$  dostává zpět do původního energetického stavu. Relaxační procesy dělíme na longitudinální ( $T_1$ ) (podélnou; spin mřížkovou) a transversální  $T_2$  (příčnou; spin-spinovou) relaxaci. Složka vektoru magnetizace se v ose  $z$  (osa rovnoběžná s vektorem  $\vec{B}_0$ ) navrácí s  $T_1$  časovou konstantou, složka v rovině  $xy$  (rovina kolmá na vektor  $\vec{B}_0$ ) se navrácí s časovou konstantou  $T_2$  (cit. <sup>11</sup>).

## 1.3 Relaxační procesy v přítomnosti iontu $\text{Gd}^{3+}$

Cílem použití kontrastní látky v MRI je zrychlení relaxace  $^1\text{H}$  jader molekul vody v tkáni. Toho může být dosaženo pomocí paramagnetických látek.<sup>12</sup> Jak již bylo řečeno,

nejvhodnější je iont  $Gd^{3+}$ , který vlastní sedm nepárových elektronů, což ho řadí mezi nejvíce paramagnetické ionty vůbec. Iont  $Gd^{3+}$  má navíc symetrický S stav elektronů a jeho elektronová relaxace je relativně pomalá, což je významné z hlediska využití jako látky zrychlující relaxaci, tedy kontrastní látky.<sup>13</sup>

Pro zjednodušení se v následujícím textu budou výrazem **protony** rozumět  $^1H$  jádra molekul vody a **paramagnetikem** se bude rozumět iont  $Gd^{3+}$ , nebude-li řečeno jinak.

Základní teorie relaxace protonů v přítomnosti paramagnetika byla zavedena pracovními skupinami kolem Bloembergena a Solomona.<sup>14</sup> Gadolinité komplexy urychlují jak  $T_1$  tak  $T_2$  relaxační časy protonů. Významnější z hlediska použití jako MRI kontrastní látky je však příspěvek longitudinální, tedy ten co ovlivňuje relaxační čas  $T_1$ .

Převrácená hodnota relaxačního času  $T$  se označuje jako relaxační rychlost  $R$  (3),

$$R_i = \frac{1}{T_i} \quad i = 1, 2 \quad (3)$$

kde index  $i$  zastupuje longitudinální ( $i = 1$ ) nebo transverzální složku ( $i = 2$ ). Celková měřitelná rychlost relaxace protonů  $1/T_{obs}$  se dá vyjádřit součtem diamagnetické složky  $1/T_d$  a paramagnetické složky  $1/T_p$  jak je naznačeno v běžně používaném vztahu (4).

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}} \quad (4)$$

Diamagnetický člen  $T_d$  odpovídá relaxačnímu času rozpouštědla (vody) bez paramagnetika. Paramagnetický člen  $1/T_p$  vkládá do vztahu relaxační rychlost způsobenou paramagnetikem, která je přímo úměrná koncentraci iontů  $Gd^{3+}$  v roztoku. Upravením rovnice (4) dostaneme vztah konstanty úměrnosti  $r$  (5),

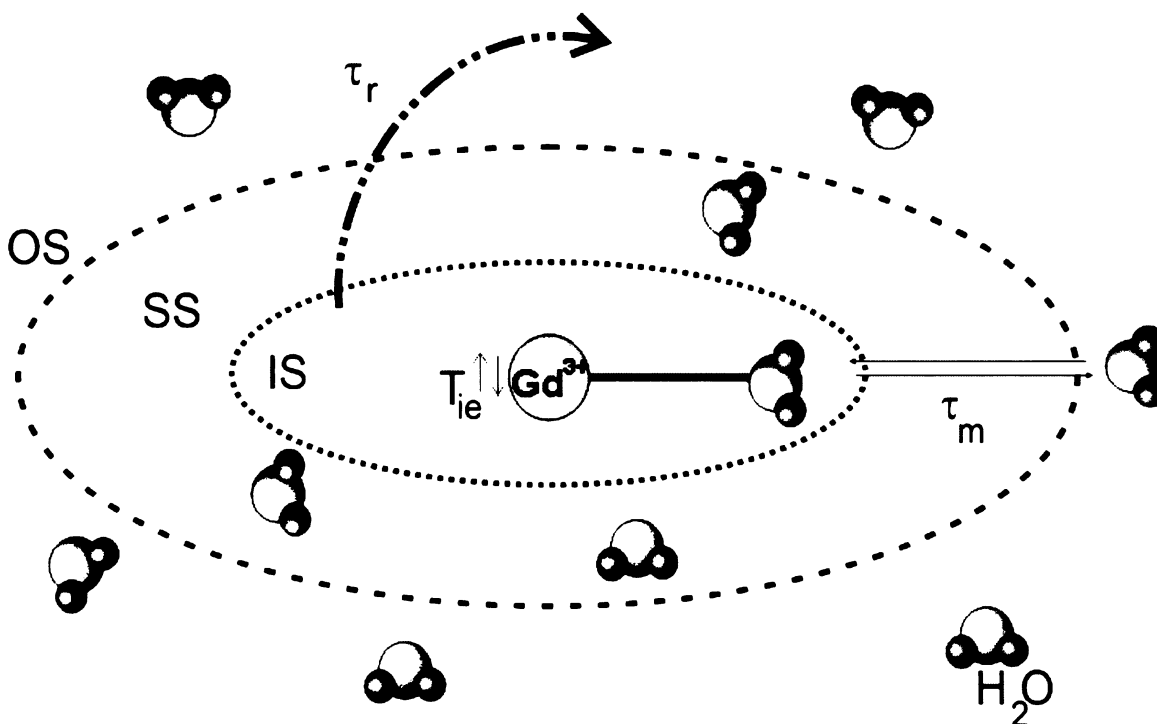
$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i [Gd^{3+}] \quad (5)$$

kde  $[Gd^{3+}]$  je koncentrace vyjádřená v mM. Konstanta  $r$  se nazývá relaxivita, vyjadřuje se v jednotkách  $mM^{-1}s^{-1}$  a je to schopnost kontrastních látek urychlovat relaxaci protonů.<sup>3</sup> U klinicky používaných kontrastních látek je relaxivita relativně nízká a její „ladění“ je jedním z hlavních cílů zájmu chemiků o MRI kontrastní látky.



## 1.4 Model $Gd^{3+}$ kontrastních látek v roztoku

V roztoku gadolinitého komplexu lze rozlišit tři typy molekul vody, které jsou různě ovlivňovány přítomností paramagnetika. Molekuly přímo koordinované na iont  $Gd^{3+}$  se nacházejí ve vnitřní koordinační sféře IS (ang. Inner Sphere). Jejich výměna s okolím probíhá s časovou konstantou  $\tau_m$ . Dále od paramagnetika, ve druhé sféře SS (ang. Second Sphere), jsou molekuly vody, které jsou poutány sítí vodíkových vazeb k přímo koordinované vodě nebo k pendantním skupinám. Ve sféře vnější OS (ang. Outer Sphere) se vyskytují molekuly vody volně difundující ke komplexu v okolním rozpouštědle. Paramagnetické vlastnosti  $Gd^{3+}$  iontu vyjadřuje elektronový relaxační čas  $T_{ie}$ . Celý systém rotuje s časovou konstantou  $\tau_r$ . Model paramagnetického komplexu v roztoku schématicky naznačuje obrázek 3.



Obrázek 3. Schéma vodného roztoku iontu  $Gd^{3+}$ , vnitřní sféra (IS), okolí (SS, OS),  $\tau_r$  rotační korelační čas komplexu,  $\tau_m$  residenční čas molekuly vody,  $T_{ie}$  elektronový relaxační čas

Mechanismy relaxace v roztocích paramagnetických látek se zabývá Bloembergenova-Solomonova-Morganova (BSM) teorie (viz další kapitoly).<sup>3, 15, 16, 17</sup> Celková relaxivita  $r$  (6) paramagnetického roztoku je dána součtem příspěvků z vnitřní sféry  $r^{IS}$ , vnější sféry  $r^{OS}$  a druhé sféry  $r^{SS}$ .

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} + r_i^{SS} \quad i = 1, 2 \quad (6)$$

Příspěvek druhé sféry<sup>18</sup> se v některých případech zanedbává.

## 1.5 Relaxační procesy ve vnitřní sféře

Příspěvek vnitřní sféry k celkové relaxivitě je obvykle nejvýznamnější. Jak už bylo řečeno, relaxivita vyjadřuje účinnost ve zvýšení rychlosti relaxace protonů v 1 mM roztoku paramagnetika. Relaxační rychlost  $R_{1p}$  ve vnitřní sféře (IS) popisuje vztah (7),

$$R_{1p}^{IS} = \left( \frac{1}{T_1} \right)^{IS} = \frac{[Gd^{3+}]q}{55,5(T_{1m} + \tau_m)} = \frac{P_m}{T_{1m} + \tau_m} \quad (7)$$

kde  $[Gd^{3+}]$  je molární koncentrace iontů  $Gd^{3+}$ ,  $q$  počet koordinovaných molekul vody (hydratační číslo),  $T_{1m}$  je longitudinální relaxační čas protonů přímo koordinované vody,  $\tau_m$  residenční čas molekul vody,  $P_m$  molární zlomek koordinovaných molekul vody v roztoku.

Relaxační rychlost protonů v magnetickém poli je řízena dipól-dipólovými (DD) a skalárními (SC) interakcemi. Dipól-dipólová interakce se šíří přes prostor a klesá s šestou mocninou vzdálenosti ( $1/r_{Gd-H}^6$ , kde  $r_{Gd-H}$  je vzdálenost mezi iontem  $Gd^{3+}$  a protonem). Vzdálenost  $r_{Gd-H}$  je proto kritická pro správnou interpretaci relaxivity a zároveň pro desing nových kontrastních látek.<sup>19</sup> Skalární interakce se šíří přes vazby (obecně je velmi slabá při přenosu přes více než 3 vazby).

Relaxační procesy zahrnující dipol-dipolární  $1/T^{DD}$  a  $1/T^{SC}$  skalární relaxační rychlosti jsou popsány vztahy (8-14) dle Solomona a Bloembergena (cit. <sup>14</sup>),

$$\frac{1}{T_m} = \frac{1}{T_i^{DD}} + \frac{1}{T_i^{SC}} \quad i = 1, 2 \quad (8)$$

$$\frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_i^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[ \frac{3\tau_{c1}}{(1 + \omega_i^2 \tau_{c1}^2)} + \frac{7\tau_{c2}}{(1 + \omega_s^2 \tau_{c2}^2)} \right] \quad (9)$$

$$\frac{1}{T_2^{DD}} = \frac{1}{15} \frac{\gamma_i^2 g^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[ \frac{3\tau_{c1}}{(1 + \omega_i^2 \tau_{c1}^2)} + \frac{13\tau_{c2}}{(1 + \omega_s^2 \tau_{c2}^2)} + 4\tau_{c1} \right] \quad (10)$$

$$\frac{1}{T_1^{SC}} = \frac{2}{3} S(S+1) \left( \frac{A}{\hbar} \right)^2 \left[ \frac{\tau_{e2}}{(1 + \omega_s^2 \tau_{e2}^2)} \right] \quad (11)$$

$$\frac{1}{T_2^{SC}} = \frac{1}{3} S(S+1) \left( \frac{A}{\hbar} \right)^2 \left[ \frac{\tau_{e2}}{(1 + \omega_s^2 \tau_{e2}^2)} + \tau_{e1} \right] \quad (12)$$

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_r} \quad i = 1, 2 \quad (13)$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{T_{ie}} + \frac{1}{\tau_m} \quad i = 1, 2 \quad (14)$$

kde  $\gamma_I$  je gyromagnetický poměr jádra,  $g$  je elektronový g-faktor,  $\mu_B$  je Bohrov magneton,  $\omega_I$  a  $\omega_S$  jsou Larmorovy frekvence protonů a elektronů,  $A/\hbar$  je konstanta hyperjemného štěpení mezi protonem koordinované molekuly vody a nepárovými elektrony iontu  $Gd^{3+}$ ,  $S$  je spinové kvantové číslo ( $S_{Gd^{3+}} = 7/2$ ) a  $r$  je vzdálenost mezi  $Gd^{3+}$  a protonem. Ve vztazích (13-14) jsou rozebrány tzv. celkové korelační časy  $\tau_c$  (dipol-dipólový) a  $\tau_e$  (skalární), kde  $\tau_r$  je rotační korelační čas molekul komplexu,  $\tau_m$  je rezidenční čas koordinované molekuly vody a  $T_{ie}$  je elektronový relaxační čas  $Gd^{3+}$  iontu (cit. <sup>20</sup>).

Pro gadolinité komplexy je obvykle elektronová relaxační rychlost  $1/T_{ie}$  vyjadřována ve spojení s tzv. ZFS (ang. Zero-Field Splitting) (cit. <sup>18</sup>), což je štěpení elektronových hladin iontu kovu bez přítomnosti vnějšího magnetického pole. Tento jev má za následek urychlení elektronové relaxace paramagnetického iontu. Popisuje jí Bloembergenova-Morganova teorie relaxace spinů elektronů paramagnetika (15-16),

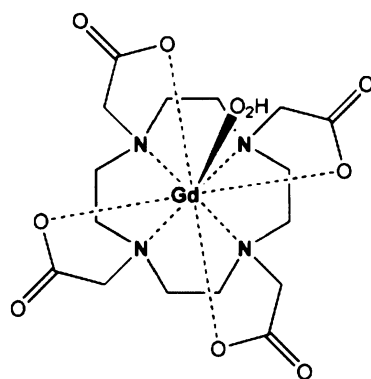
$$\left(\frac{1}{T_{ie}}\right)^{ZFS} = 2C \left( \frac{1}{1 + \omega_S^2 \tau_v^2} + \frac{4}{1 + 4\omega_S^2 \tau_v^2} \right) \quad (15)$$

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

kde  $\Delta^2$  je kvadrát ZFS energie a  $\tau_v$  je korelační čas pro modulaci ZFS interakce, které vycházejí z přechodných distorzí symetrie komplexu.

Z výčtu vztahů (8-16) je patrné, že relaxivita závisí na velkém množství vzájemně propojených parametrů, které je pro dosažení maximální účinnosti kontrastní látky nutno optimalizovat.

Kontrastní látky pro MRI používané v praxi mají relaxivitu kolem  $5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (např. Dotarem<sup>®</sup> obr. 4), avšak podle BSM teorie je maximální teoreticky dosažitelná hodnota přes  $100 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (cit. <sup>21</sup>).



Obrázek 4. Struktura kontrastní látky Dotarem<sup>®</sup>

## 1.6 Metody studia komplexů s lanthanoidy

Celá metodika vyšetření MRI je založena na jaderném magnetizmu, a také většina technik pro studium kontrastních látek používá NMR spektroskopii. Teorie BSM pomáhá objasnit, zda je potenciální kontrastní látka vhodná pro klinické použití.

Jak již bylo zmíněno iont  $Gd^{3+}$  má symetrický elektronový  $S$  stav a vysoký efektivní magnetický moment (7,94 BM), díky tomu jsou jeho elektronové relaxační časy ( $T_{e1}$ ,  $T_{e2}$ ) delší než u ostatních iontů lanthanoidů.<sup>22</sup> Z toho vyplývá, že gadolinitý iont je schopen relaxaci okolních jader urychlovat efektivněji. U vlastního komplexu  $Gd^{3+}$  je relaxace tak rychlá, že např. vůbec nelze měřit spektra  $^1H$  a  $^{13}C$  koordinovaného ligandu. Tím se však komplikuje možnost použít NMR spektroskopii pro jeho charakterizaci. Vzhledem k poloze gadolinia v periodickém systému je však možné předpokládat izostrukturalitu s okolními lanthanoidy (přesněji jejich  $Ln^{3+}$  ionty) a provádět některá měření na nich.<sup>3</sup> Následující kapitoly se budou věnovat metodám stanovení parametrů, které mají největší vliv na výslednou relaxivitu kontrastní látky.

### 1.6.1 Hydratační číslo

Hydratační číslo  $q$  je jedním z nejdůležitějších parametrů, který přímo ovlivňuje relaxivitu (5). Bohužel není příliš možností jak jej měnit. Ukázalo se totiž, že pro dostatečnou stabilitu komplexu musí mít ligand alespoň osm donorových atomů. Obvyklé koordinační číslo  $Ln^{3+}$  iontů je 8 - 9, takže pro koordinaci molekuly vody je ponecháno pouze jedno či žádné místo.

Pro stanovení hydratačního čísla se používají dvě techniky, obě vycházejí z podobnosti chemických vlastností lanthanoidů. První se zabývá luminiscencí excitovaných stavů komplexů iontů  $Eu^{3+}$  a  $Tb^{3+}$ , druhá studuje chemický posunu  $^{17}O$  signálu indukovaného ionty  $Dy^{3+}$  tzv. DIS (ang. Dysprosium Induced Shift) (čít. <sup>23</sup>).

#### Luminiscence

Komplexy některých  $f$  prvků, přesněji ionty  $Eu^{3+}$  a  $Tb^{3+}$ , mají neobvyklé luminiscenční vlastnosti, jako jsou dlouhé časy vyhasínání, vysoká hodnota Stokesova posunu (rozdíl energií mezi maximy absorpčního a emisního pásu) a úzké emisní píky odpovídající přechodům mezi energetickými hladinami  $Ln^{3+}$  iontů. Po excitaci přechází elektron z excitované hladiny do základní (u iontu  $Eu^{3+}$   $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$  a  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ ) za emise fotonů o energii rovnající se energetickému rozdílu mezi hladinami iontu. Intenzita emise je závislá na efektivitě přenosu energie mezi iontem  $Ln^{3+}$  a ligandem. Čas vyhasínání luminiscence

závisí na schopnosti okolí (např. koordinovaných molekul H<sub>2</sub>O) ji zhasět (tj. nezářivě odebrat energii). Oscilátory O-H a O-D mají rozdílnou schopnost odebírat energii excitovanému iontu. Zatímco O-H účinně zhasí luminiscenci, O-D oscilátor je méně efektivní pro nezářivý přenos energie. Čím více molekul vody je koordinováno na iont na Ln<sup>3+</sup>, tím více je luminiscence zhasena. Tohoto jevu je možno využít ke zjištění počtu molekul vody  $q$  koordinovaných na iont Ln<sup>3+</sup>, porovná-li se rychlost vyhasínání luminiscence roztoku studovaného komplexu v H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O. Nejčastěji se používáná empirický vztah zavedený Horrockem (17),

$$q = 1,05(\tau_H^{-1} - \tau_D^{-1}) \quad (17)$$

kde  $\tau_H$  je poločas vyhasínání luminiscence v H<sub>2</sub>O a  $\tau_D$  je poločas vyhasínání luminiscence v D<sub>2</sub>O.<sup>24, 25</sup>

### Metoda DIS

Tato metoda využívá schopnosti lanthanoidů měnit chemický posun NMR signálů jader ve svém okolí (tzv. efekt LIS, ang. Lanthanide Induced Shift) (cít. <sup>26</sup>). Použitelná je za předpokladu mnohem rychlejší výměny molekul vody, než je časová škála NMR měření. Bylo zjištěno, že v takovém případě je chemický posun signálu <sup>17</sup>O přímo úměrný frakci vázané vody a velikost posunu přepočtená na jednu koordinovanou molekulu vody je prakticky nezávislá na povaze dalších donorových atomů v komplexu. V praxi se změří chemický posun pro aqua-komplex [Dy(H<sub>2</sub>O)<sub>9</sub>]<sup>3+</sup>, u kterého je počet molekul vody známý.<sup>23</sup> Hodnota posunu přepočtená na jednu molekulu vody se porovná s velikostí posunu změřeného pro komplex Dy<sup>3+</sup> iontu. Pro větší přesnost stanovení se měří chemický posun <sup>17</sup>O při několika různých koncentracích Dy<sup>3+</sup> komplexu. Vynesením hodnot se získá přímková závislost, jejíž směrnice se opět porovná se směrnicí pro aqua-komplex. Odchylka metody se uvádí ± 0,2 molekuly vody.<sup>3</sup>

### 1.6.2 Residenční čas molekuly vody

Pro stanovení residenčního času  $\tau_m$  se používá měření teplotní závislosti transversálního relaxačního času  $T_2$  <sup>17</sup>O signálu molekul vody v roztoku gadolinitého komplexu.<sup>20, 27, 28</sup> Residenční čas  $\tau_m$  je převrácená hodnota rychlostní konstanty výměny vody ve vnitřní koordinační sféře  $k_{ex}$  (18).

$$k_{ex} = \frac{1}{\tau_m} \quad (18)$$

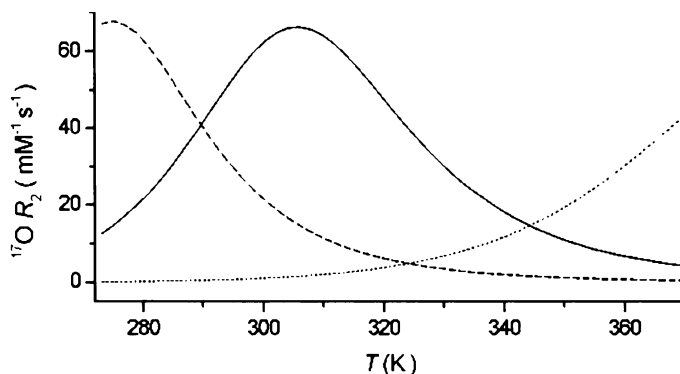
Závislosti konstanty  $k_{ex}$  na teplotě popisuje Eyringova rovnice (19),

$$k_{ex} = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}\right) = \frac{k_{ex}^{298} T}{298,15} \exp\left[\frac{\Delta H}{RT} \left(\frac{1}{298,15} - \frac{1}{T}\right)\right] \quad (19)$$

kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta,  $\Delta S$  a  $\Delta H$  jsou aktivační entropie a entalpie pro výměnu vody,  $h$  Planckova konstanta,  $T$  termodynamická teplota. Místo transversální relaxační rychlosti  $1/T_2$  je zavedena redukovaná relaxační rychlost  $1/T_{2r}$ , kterou popisuje vztah (20).

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2,dia}} \right) = \frac{1}{T_{2m} + \tau_m} \quad (20)$$

V rovnici je  $P_m$  molární frakce koordinovaných molekul vody,  $1/T_{2,dia}$  je transversální relaxační rychlost referentního diamagnetického vzorku.  $T_{2m}$  je relaxační čas koordinované  $H_2^{17}O$ . Relaxační časy lze měřit přímo pomocí  $^{17}O$  NMR spektroskopie. Oproti protonové relaxaci je u jádra  $^{17}O$  (koordinované molekuly vody) v případě transversálního relaxačního času dominantní skalární člen (viz vztah 12) (cit. <sup>14</sup>). Pro optimální funkci kontrastní látky by se hodnota  $\tau_m$  měla pohybovat mezi 10-40 ns, zatímco  $Gd^{3+}$  komplex DOTA má residenční čas 240 ns. Kvalitativně lze  $\tau_m$ , respektive rychlost výměny vody, stanovit již z charakteru změřeného teplotního profilu (viz obr. 6.). Přesná hodnota se však získá až při matematickém zpracování dat společně s teplotními profily  $^{17}O$   $T_1$  relaxačních časů, chemických posunů a  $^1H$  NMRD profilů (cit. <sup>12, 29</sup>).

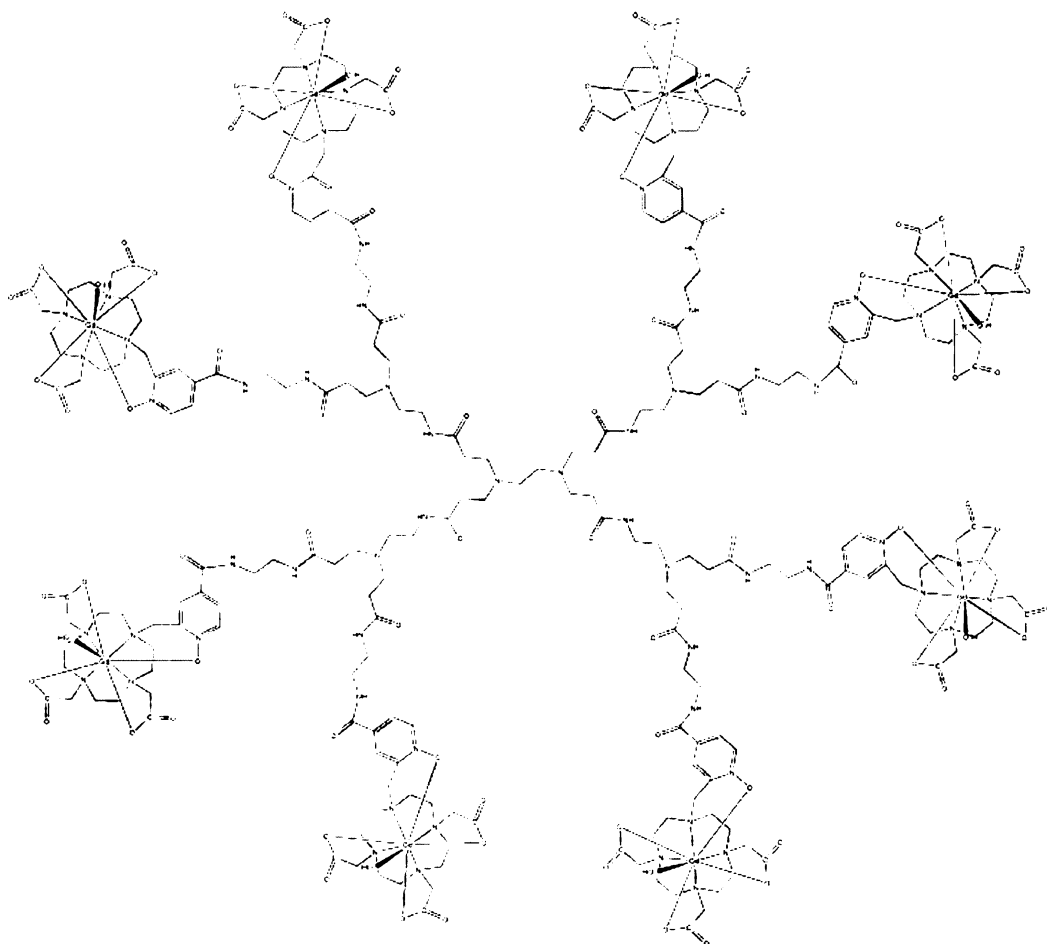


Obrázek 5. Simulace závislosti  $^{17}O$   $R_2$  relaxační rychlosti na teplotě  $T$ .  
Profily pro  $t_m$  20ns (-----), 500ns (—) a 20  $\mu$ s (.....).

### 1.6.3 Rotační korelační čas

Cíl zpomalení rotace komplexu byl již zmíněn (kap. 1.1). Jedna z metod, která podává o  $\tau_r$  nejvíce informací je technika  $^1H$  NMRD (ang. proton Nuclear Magnetic Resonance Dispersion). Charakterizuje průběh relaxivity v závislosti na síle magnetického pole. Ovlivnění výsledné relaxivity rotačním korelačním časem  $\tau_r$  vyjadřují vztahy (13 - 14).

Potřeba vyšší relaxivity u kontrastních látek vedla k designu pomalu rotujících makromolekul, jakými jsou např. konjugáty chelátů  $Gd^{3+}$  s dendrimery.<sup>7, 30, 31</sup> Dendrimery jsou velké molekuly s dobře prozkoumanou, pravidelnou a v prostoru rozvětvenou strukturou (viz obr. 6), skládající se ze tří stavebních prvků: jádra, větví a koncových skupin.



**Obrázek 6. Struktura potencionální kontrastní látky konjugátu ligandu DO3A-pyNox-4A s PAMAM dendrimerem 1. generace**

Prostudované komplexy s dendrimery splňují podmínku pomalé rotace,<sup>32</sup> ale jednotlivé větve, na kterých jsou navázány komplexy  $Gd^{3+}$  jsou samy o sobě částečně pohyblivé. Často bývá dosti flexibilní i spojení chelátu s makromolekulou (tzv. linker), jako je tomu např. u thiomocovinového můstku.<sup>7</sup> Design ligandu DO3A-pyNox-4A byl proto zvolen tak, aby se mohl vázat pomocí rigidní amidové vazby.

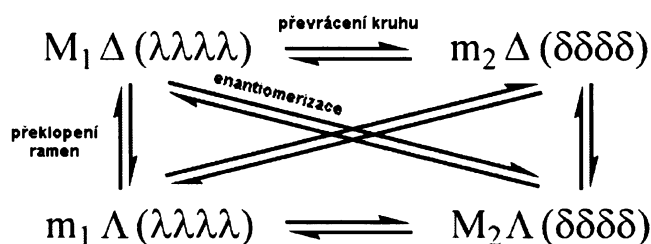
### 1.6.4 Izomerie komplexů v roztocích

Komplexy iontů  $\text{Ln}^{3+}$  s ligandy typu DOTA se v roztoku vyskytují ve čtyřech izomerních formách (enantiomerní pár diastereoizomerů).<sup>34</sup> Izomerie je dána dvěma způsoby konformace ehtylenových můstků makrocyclu ( $\lambda$ ,  $\delta$ ) a natočením pendantních ramen ( $\Delta$ ,  $\Lambda$ ).

Enantiomerní pár  $\Delta(\lambda\lambda\lambda\lambda)$  a  $\Lambda(\delta\delta\delta\delta)$  zaujímá konformaci SAP (ang. Square AntiPrism). U komplexu DOTA se obvykle označuje jako izomer **M** (ang. **M**ajor).

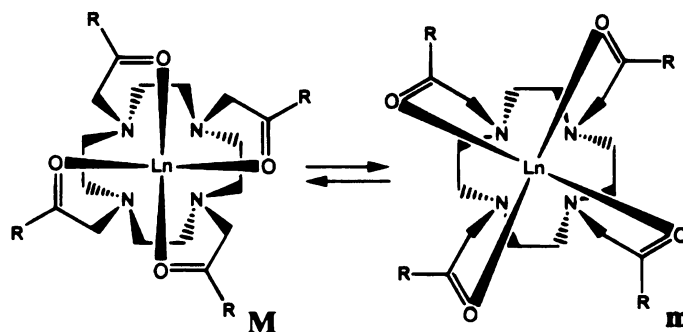
Enantiomerní pár  $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$  a  $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$  zaujímá konformaci TSAP (ang. Twisted Square AntiPrism) a u komplexu

DOTA se označuje jako izomer **m** (ang. **m**inor) (obr. 7).<sup>33</sup> Pomocí NMR spektroskopie jsou za normálních okolností odlišitelné pouze diastereoizomery (obr.8), které poskytují různá NMR spektra.



Obrázek 7. Formy izomerů u komplexů typu DOTA

Rentgenostrukturní analýzou monokrystalů  $\text{Ln}^{3+}$  komplexů ligandu DOTA se ukázalo, že izomery se liší zejména velikostí prostoru mezi rovinami kyslíkových a dusíkových atomů. Další odlišností je úhel mezi koordinovanými kyslíkovými atomy protilehlých pendantních ramen a centrálním iontem. V izomeru typu **m** je tento úhel menší, což oslabuje vazbu koordinované molekuly vody a komplex pak vykazuje vyšší rychlost výměny vody.<sup>21</sup> Hodnota relaxivity je tak vyšší, proto jeden ze současných trendů je zaměřovat se na komplexy preferující izomer **m**.<sup>34, 35, 36</sup> U komplexů DO3A-pyNox byla pozorována pouze přítomnost izomeru **M**, který přesto vykazoval relativně rychlou výměnu vody.<sup>10</sup> Přítomnost šestičlenného chelátového cyklu<sup>37</sup> zřejmě vyvolává v blízkosti koordinované molekuly vody stericke pnutí, které výměnu vody zrychluje, i když se jedná o izomer **M**.



Obrázek 8. Komplex  $\text{Ln}$  typu DOTA - diastereomery (SAP, TSAP) s odlišně natočenými pendanty



## 2 Experimentální část

### 2.1 Seznam použitých chemikálií

t-butanol, Aldrich

aceton, čistý, Lachema a.s.

methanol, p.a., Lachema a.s.

alumina, Merck

hydroxid lithný, Lachema a.s.

hydroxid sodný, Lachema a.s.

kyselina trifluoroctová, Lachema a.s.

kyselina chlorovodíková, Lachema a.s.

isopropanol, Lachema a.s.

amoniak, Lachema a.s.

Amberlite XAD – 1180, Fluka

Amberlite 50, Fluka

hexahydrát chloridu gadolinitého, p.a., Aldrich

hexahydrát chloridu europitého, p.a., STREM

hexahydrát chloridu terbitého, p.a., STREM

hexahydrát chloridu ytterbitého, p.a., STREM

hexahydrát chloridu neodymitého, p.a. STREM

hexahydrát chloridu dysprositého, p.a., Aldrich

hexahydrát chloridu yttritého, p.a. Aldrich

xylenová oranž, Lachema

Rozpouštědla pro NMR:

D<sub>2</sub>O, 99,95%, Chemotrade

H<sub>2</sub><sup>17</sup>O, Aldrich

CD<sub>3</sub>OD, Aldrich

Pokud nebude uvedeno jinak, tak byla v průběhu práce používána deionizovaná voda.

## 2.2 Metody charakterizace připravených látek

### 2.2.1 NMR spektroskopie

NMR spektra jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  byla měřena na přístrojích Varian <sup>UNITY</sup> INOVA 400 a 300 na chemickém ústavu PřF UK. Pracovní frekvence pro jádra  $^1\text{H}$  byla 399,95 MHz (400), 299,94 MHz (300) a pro jádra  $^{17}\text{O}$  54,22 MHz (400). Vzorky byly měřeny v kyvetách o průměru 5 mm a referencovány na signál t-butanolu (1,2 ppm pro  $^1\text{H}$ , 32,7 ppm pro  $^{13}\text{C}$ ). Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm.

### 2.2.2 Relaxometrie

Studium  $^1\text{H}$  NMRD profilu bylo provedeno na přístrojích Stellar SpinMaster FFC-2000 (0,02 - 15 MHz) a Bruker Minispec 20 MHz a Bruker Minispec mq - 60 MHz v NMR laboratoři Univerzity Mons-Hainaut (Belgie). Závislost relaxivity na pH byla změřena na přístroji Bruker Minispec 20 MHz (IKEM Praha).

### 2.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji Bruker ESQUIRE 3000 ES – iontrap na chemickém ústavu PřF UK. Měření probíhalo v pozitivním modu.

### 2.2.3 Elementární analýza

Stanovení hmotnostního obsahu C, H, N, Cl bylo provedeno na Ústavu makromolekulární chemie AVČR v Praze. Data jsou uvedena následovně: prvek; zjištěný obsah; vypočtený teoretický obsah odpovídající předpokládanému vzorci.

### 2.2.4 Rentgenostrukturní analýza

Struktura monokrystalu byla změřena na čtyřkruhovém difraktometru NONIUS KAPPA CCD se zářením Mo-K $\alpha$ . Struktury byly upraveny pomocí programu Supergui.

### 2.2.5 Měření a úprava pH roztoků

Hodnota pH byla kontrolována pomocí pH-metru Radiometer pIONeer 10 s třibodovou kalibrací. Pro měření byla použita kombinovaná NMR elektroda Mettler Toledo.

### 2.2.6 Luminiscence

Stanovení hydratačního čísla a vyhodnocení dat bylo provedeno na Katedře analytické chemie PřF UK na přístroji AMICO Bowman<sup>®</sup> Series 2 Luminiscence Spectrometer. Měření

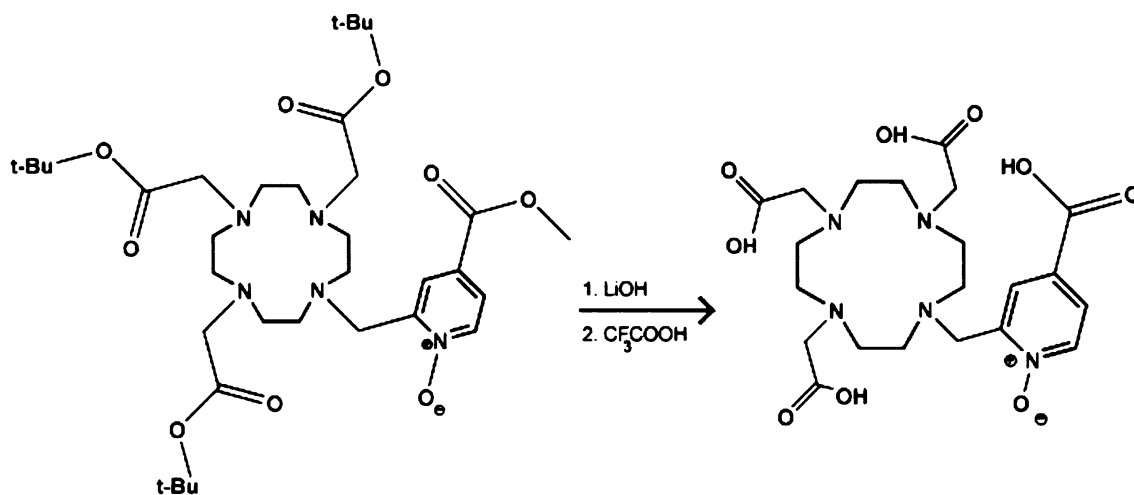
byla provedena ve skleněných vialkách o objemu 1,5 ml, které byly v přístroji fixovány pomocí gumového těsnění.

## 2.3 Příprava ligandu a jeho komplexů

### 2.3.1 Příprava ligandu DO3A-PyNox-4A

Práce vycházela z ligandu chráněného esterovými skupinami (679,86), který připravil a poskytl k práci M. Polášek.<sup>38</sup> Odstranění chránících esterových skupin bylo provedeno ve dvou krocích (obr. 9). V prvním kroku byla za bazické katalýzy hydrolyzována methylesterová funkce na pyridin N-oxidovém jádře, ve druhém kroku pak byly kyselou katalýzou odstraněny chránící t-butylové skupiny.

Ve 3 ml t-butanolu bylo rozpuštěno 100 mg ligandu (asi 0,14 mmol) a k roztoku bylo přidáno 1,2 molárního ekvivalentu hydroxidu lithného (6 mg rozpuštěného v 1 ml vody).



Obrázek 9. Dvoustupňová hydrolyza ligandu DO3A-PyNox-4A chráněného esterovými skupinami

Po 15 minutách míchání při laboratorní teplotě byla směs odpařena pomocí rotační vakuové odparky. K odparce byl přidán nadbytek kyseliny trifluoroctové (asi 5 ml) a po rozpuštění byla reakční směs ponechána míchat 48 h při laboratorní teplotě. Reakční směs byla po celou dobu chráněna před světlem. Po hydrolyze byla kyselina trifluoroctová odpařena na odparce opatřené vymrazovací nádobou s kapalným dusíkem. Odpařený produkt byl dvakrát rozpuštěn v 6 M kyselině chlorovodíkové a odpařen. V dalším kroku byl odparek třikrát rozpuštěn ve vodě a znovu odpařen.

Produkt byl poté rozpuštěn v 1 ml vody a nanesen na kolonku (8 x 2 cm) se sorbentem Amberlite XAD – 1180. Ligand byl eluován vodou a nepolární nečistoty zůstaly adsorbovány na koloně. Získaný eluát byl zkoncentrován na rotační vakuové odparce a ponechán krystalizovat několik dní při 4 °C. Rekrystalizací byl získán finální produkt ve formě

drobných bezbarvých krystalů. Výše popsaným způsobem bylo získáno několik šarží produktu, který byl po zhomogenizování v třecí misce používán pro veškerou další práci. Výtěžek reakce vzhledem k charakteru výchozí látky (viskózní olej s neznámým obsahem zbytkových rozpouštědel) nebyl spočten.

Charakterizace:

NMR:  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , ref. = *t*-butanol = 1,2) při 90 °C: 3,21 - 3,28 (m, 4H cyklus), 3,30 - 3,35 (m, 4H cyklus), 3,35 - 3,41 (m, 8H cyklus), 3,63 (s, 4H  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 3,92 (s, 2H  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 4,56 (s, 2H  $-\text{CH}_2$ -arom.), 8,08 (dd, 1H arom.  $J_{\text{HH}} = 2,3$  Hz,  $J_{\text{HH}} = 6,8$  Hz), 8,24 (d, 1H arom.  $J_{\text{HH}} = 2,1$  Hz), 8,43 (d, 1H arom.  $J_{\text{HH}} = 6,9$  Hz)

$^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , ref. = *t*-butanol = 32,7) při 90 °C: 51,9 (2C cyklus), 52,3 (2C, cyklus), 53,7 (2C, cyklus), 53,9 (2C, cyklus), 56,0 (2C,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 56,2 (1C,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 57,6 (1C,  $-\text{CH}_2$ -arom.), 130,9 (1C, arom. CH), 132,4 (1C, arom. CH), 133,8 (1C, arom. CH), 143,5 (1C, arom. kvarterní), 144,7 (1C, arom. kvarterní), 168,7 (1C, arom.  $-\text{CO}-$ ), 172,6 (1C,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 174,6 (2C,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ )

MS: 498,1 (100,  $\text{MH}^+$ )

Elementární analýza: C: 41,10 (41,58), H: 6,12 (6,15), N: 11,88 (11,55), Cl: 11,96 (11,69), počítáno pro složení  $\text{H}_4\text{DO}_3\text{A-pyNox-4C}\cdot 2\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{O}_{13}\text{N}_5\text{Cl}_2$ ,  $M_r = 606,60$

### 2.3.2 Příprava komplexů s lanthanoidy

Pro experimenty byly připraveny komplexy s vybranými chloridy lanthanoidů ( $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ).

Odvážené množství chloridu  $\text{Ln}^{3+}$  bylo smícháno s 1,07 ekvivalentu ligandu a rozpuštěno v malém množství vody (cca 1,5 ml). Za kontroly pH-metrem bylo upraveno pH roztoku na hodnotu  $7,0 \pm 0,1$  pomocí 2 M NaOH, případně 6 M HCl.

Roztok byl ponechán míchat 24 h při laboratorní teplotě. Po komplexaci byla provedena zkouška s xylenovou oranží v 2 M octanu sodném (pH = 5,5) pro ověření nepřítomnosti volného iontu  $\text{Ln}^{3+}$ . Jako standard byl použit roztok chloridu gadolinitého, který při testu mění barvu indikátoru z oranžové na fialovo-růžovou.<sup>39</sup>

Pro měření  $^1\text{H}$  spekter komplexů bylo třeba odstranit nadbytek volného ligandu. Toho bylo dosaženo kolonovou chromatografií na kationtovém iontoměničce Amberlite 50 v  $\text{H}^+$  cyklu. Pro tento účel byla použita 2 x 27 cm kolona s 21 cm vysokým sloupcem iontoměniče. Komplex  $\text{Ln}^{3+}$  byl nanesen na kolonu a eluován vodou. Byly odnímány frakce o objemu 25 ml. Nejprve vytékal volný ligand a chloridové ionty (pozitivní zkouška dusičnanem stříbrným), v 5 - 7 frakci vytékal čistý komplex. Frakce obsahující čistý komplex byly

smíchány a odpařeny na vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7 malým přídavkem 0,5 M hydroxidu lithného. Poté byl roztok znovu odpařen.

Charakterizace:

TLC: silikagel, isopropanol; 25 % vodný amoniak; voda (7:3:3), detekce zhášením fluorescence ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ )  $R_f = 0,6$  ( $\text{Nd}^{3+}$ );  $0,5$  ( $\text{Eu}^{3+}$ );  $0,6$  ( $\text{Gd}^{3+}$ );  $0,6$  ( $\text{Tb}^{3+}$ );  $0,6$  ( $\text{Yb}^{3+}$ )

MS: V tabulce 1 jsou signály pro nejvíce zastoupený izotop lanthanoidu, charakter iontů odpovídá  $\text{MNa}^+$ .

**Tabulka 1. Signály komplexů  $\text{Ln}^{3+}$  v MS**

Iont	Izotop	Signál
$\text{Nd}^{3+}$	$^{142}\text{Nd}$	659,1
$\text{Eu}^{3+}$	$^{153}\text{Eu}$	670,1
$\text{Gd}^{3+}$	$^{158}\text{Gd}$	675,1
$\text{Tb}^{3+}$	$^{159}\text{Tb}$	676,3
$\text{Yb}^{3+}$	$^{174}\text{Yb}$	691,1

## 2.4 NMR experimenty

### 2.4.1 Stanovení koncentrace roztoků

Pro některé experimenty bylo nutné znát přesné koncentrace roztoků komplexů  $\text{Ln}^{3+}$ , které z navážek chloridů  $\text{Ln}^{3+}$  nebylo možné spočítat. Chloridy  $\text{Ln}^{3+}$  jsou silně hydrofobické a uvedená molární hmotnost tak nemusí odpovídat skutečnosti. Pro stanovení přesné koncentrace byla použita tzv. Evansova metoda. Využívá indukovaný chemický posun označovaný jako BMS (ang. Bulk Magnetic susceptibility Shift) inertní látky (např. t-butanol) vyvolaný přítomností paramagnetické látky v roztoku.<sup>40</sup>

Roztok komplexu  $\text{Ln}^{3+}$  s 0,2 % t-butanolu byl přefiltrován přes membránový filtr (0,2  $\mu\text{m}$ ) do NMR kyvety. Před měřením signálu jader  $^1\text{H}$  byla do kyvety zasunuta inertní kyveta s roztokem t-butanolu v 99,97%  $\text{D}_2\text{O}$ . Ze spektra byl odečten rozdíl chemického posunu signálu t-butanolu mezi oběma roztoky a koncentrace v  $\text{mol/dm}^3$  byla spočtena podle vztahu (21),

$$c = \frac{\Delta_\chi T}{s4\pi} \left( \frac{2,84}{\mu_{eff}} \right)^2 \cdot 10^{-3} \quad (21)$$

kde  $s$  je geometrický faktor, který je pro válcovou kyvetu roven  $1/3$ ,  $T$  je teplota (zde 298 K),  $\mu_{eff}$  je efektivní magnetický moment iontů  $Ln^{3+}$  (čít. <sup>22</sup>) a  $\Delta\chi$  je rozdíl chemického posunu.<sup>41, 42</sup>

## 2.4.2 Izomerie a <sup>1</sup>H NMR spektra

Pro bližší zjištění struktury komplexů  $Ln^{3+}$  v roztoku byla změřena <sup>1</sup>H NMR spektra při 25 °C a -30 °C. Pro experiment byly připraveny asi 80 mM roztoky komplexů  $Nd^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$  ve směsi rozpouštědel  $CD_3OD/D_2O$  (4:1) s 0,5 % t-butanolu. Před vlastním měřením byly vzorky temperovány na požadovanou teplotu 20 minut v sondě NMR spektrometru.

## 2.4.3 NMRD profily

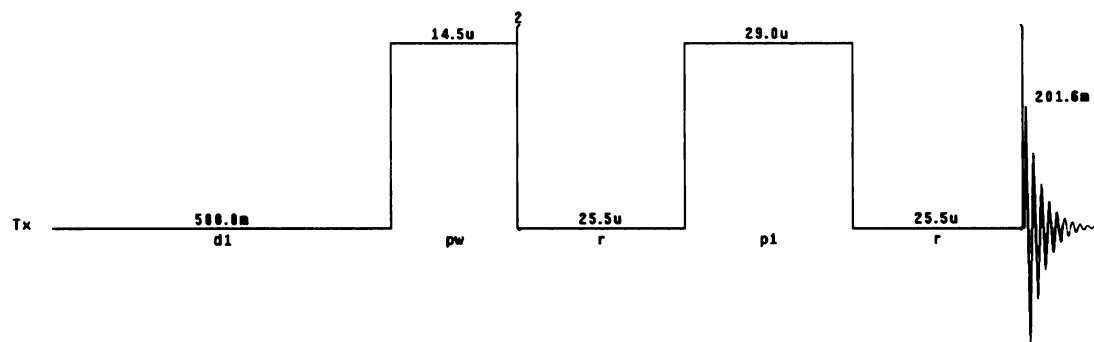
Pro měření <sup>1</sup>H NMRD profilu byl připraven roztok komplexu  $Gd^{3+}$  o koncentraci 1 mM. Měření bylo provedeno při teplotách 25 °C a 37 °C. Získané profily byly vyhodnoceny matematickým zpracováním společně s <sup>17</sup>O teplotními profily.

## 2.4.4 <sup>17</sup>O teplotní profily

Pro tento experiment byl použit 70 mM roztok  $Gd^{3+}$  komplexu v  $H_2O$ . K roztoku bylo přidáno 0,5 % t-butanolu a  $H_2O$  obohacená o izotop <sup>17</sup>O (6% obohacení), tak aby výsledné obohacení činilo 0,25 %. Stejným způsobem byl připraven i vzorek referentní, který místo roztoku paramagnetika obsahoval pouze vodu. Experiment probíhal v rozmezí teplot 5 - 90 °C s krokem 5 - 10 °C. Po nastavení teploty byly vzorky temperovány 20 minut v sondě NMR spektrometru. Byly měřeny relaxační časy  $T_1$  a  $T_2$  (transverzální, longitudinální) a byl sledován chemický posun signálu <sup>17</sup>O. Hodnoty byly následně korigovány na diamagnetický příspěvek (získán z hodnot změřených pro referentní vzorek) a příspěvek BMS. Ten byl zjištěn z <sup>1</sup>H spektra porovnáním chemického posunu signálu t-butanolu v paramagnetickém a diamagnetickém vzorku.

Chemické posuny byly měřeny standardní pulzní sekvencí s 90° pulzem. Relaxační časy  $T_1$  byly měřeny standardní pulzní sekvencí „inversion recovery“ s těmito časy:  $d_1 = 500$  ms,  $d_2 = 8 - 12$  inkrementů s exponenciálním vzorkováním,  $at = 200$  ms ( $d_1$  je repetiční čas sekvence,  $d_2$  je prodleva před pozorovacím pulzem,  $at$  je akviziční čas). Délka 90° pulzu byla kalibrována několikrát v průběhu experimentu, jelikož se mírně mění s teplotou.

Relaxační časy  $T_2$  byly změřeny metodou upravenou sekvencí Carr-Purcell Meiboom-Gill, ve které byla zahrnuta korekce na délku pulzu a časové prodlevy po pulzech (obr. 10, 12). Získané  $T_2$  hodnoty bylo nutné násobit faktorem 4.



Obrázek 10. Pulsní sekvence  $T_2$  experimentu s korekcí ( $r = d_2 - p1/2 - r0f2$ )

```

exp1 17ot2

SAMPLE          ACQUISITION    ACQUISITION ARRAYS
date   Jun  2 2007  sw             10000.0  array          d2
temp    25.0      fb              6000    arraydim       11
solvent  D2O      at              0.202
file    /home/houser/~np             4032    1             d2
Servis/Milos/_17-0~nt             32      1             5e-05
_parameter/17-0_T2~gain           60      2             7e-05
-25.Fid  11      y              3             9.8e-05
PULSE SEQUENCE  PROCESSING      4             0.0001372
d1         0.5    fn             not used  5             0.000192075
p1         29.0   lb             100.000  6             0.000268913
d2         arrayed  DISPLAY      7             0.000376475
pw         14.5   sp             -5039.1  8             0.000527062
OBSERVE      wp             9995.1   9             0.0007379
probe        5mmbb vs             8658    10            0.00103305
tn           017   sc              0       11            0.00144627
sfrq        54.218 wc             225
tof          223.3 axis            p
pw90         14.5  rf1            5043.9
tpwr         58   rfp              0
DECOUPLE     lp             -108.0
dn           H1    rp             174.5
dfrq        399.952 ai cdc ph
dof          223.3
pp           undefined
dm           nnn
dmw          c
dmf          200
dpwr         30
dseq
dres         1.0
homo         n

```

Obrázek 11. Typické parametry pro měření  $^{17}\text{O}$   $T_2$  relaxačních časů

### 2.4.5 Závislost relaxivity na pH

Závislost relaxivity na pH byla měřena na 4 mM roztoku komplexu  $Gd^{3+}$ . Hodnota pH byla měřena a upravována přímo v NMR kyvetě za pomoci kombinované (argentochloridové) elektrody. Úprava pH byla prováděna malými přídávky 2 M roztoků NaOH a HCl skleněnou kapilárou. Změny koncentrace roztoku způsobené úpravou pH byly zanedbány.

### 2.5 Vyhodnocení dat

Data byla zpracována v programech Microsoft Office Excel 2003 a Origin<sup>®</sup> 7 SR2 (v 7.0 383). Spektra NMR byla upravena v programu MestReC 4.9.9.6. Vyhodnocení relaxometrických dat a mutliparametrické zpracování bylo provedeno v programu Micromath Scientist (3.0).



## 3 Výsledky a diskuze

### 3.1 Příprava ligandu a jeho $\text{Ln}^{3+}$ komplexů

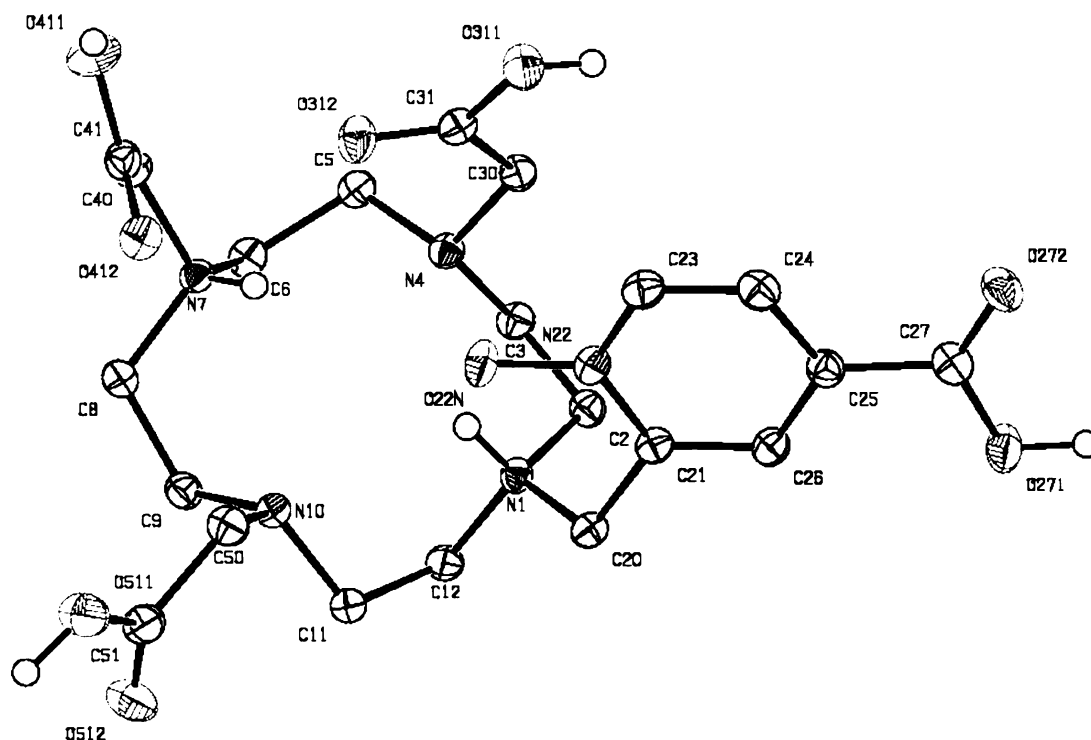
Syntéza vycházela z látky chráněné na karboxylech esterovými skupinami.<sup>38</sup> Methylestery se obvykle hydrolyzují bazicky a kyselá katalýza na ně nemá velký vliv. Naopak t-butylestery se snadno hydrolyzují kyselé. Proto musela hydrolyza proběhnout ve dvou krocích. Produkt byl vytěsněním kyseliny trifluoroctové kyselinou chlorovodíkovou převeden na hydrochlorid. Nepolární zbarvené nečistoty přítomné v hrubém produktu komplikovaly jeho krystalizaci, a tak byl pro jejich odstranění použit sorbent XAD (upravený polystyren). Produkt byl vysoce rozpustný ve vodě, a tak až velmi koncentrovaný roztok ligandu krystalizoval ve formě bezbarvých drobných krystalů. Identita produktu byla prokázána analýzou MS a NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ). Přesné složení krystalů podle elementární analýzy odpovídá vzorci  $\text{H}_4\text{DO3A-pyNox-4C}\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot 2\text{HCl}$ , což bylo potvrzeno i rentgenostrukturní analýzou.

#### 3.1.1 Komplexy $\text{Ln}^{3+}$

Komplexace iontů  $\text{Ln}^{3+}$  ligandem DO3A-pyNox-4C pobíhala při neutrálním pH rychle, podobně jako u DO3A-pyNox (cít. <sup>9</sup>). Po úpravě pH roztoků na hodnotu  $7,0 \pm 0,1$  se již pH neměnilo ani při míchání přes noc, z čehož lze usuzovat, že veškeré ionty  $\text{Ln}^{3+}$  byly komplexovány prakticky okamžitě. Složení komplexů bylo potvrzeno měřením MS spekter, v nichž byl vždy nalezen pík odpovídající  $\text{MNa}^+$ . Pro větší přehlednost  $^1\text{H}$  NMR spekter bylo třeba odstranit nadbytečný ligand, čehož bylo úspěšně docíleno pomocí sloupcové chromatografie na kationtovém iontoměniči.

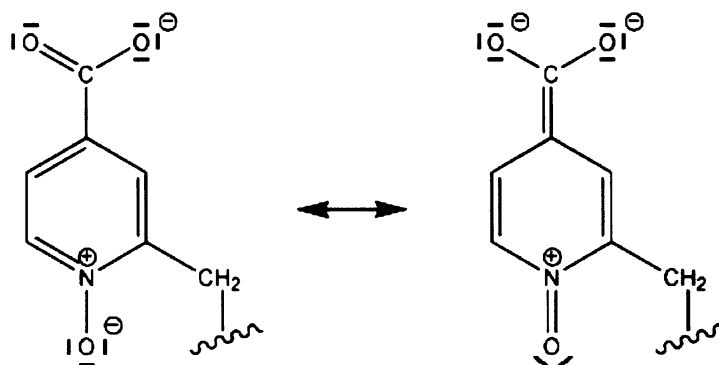
#### 3.1.2 Krystalová struktura ligandu

Struktura ligandu byla definitivně potvrzena rentgenostrukturní analýzou monokrystalu a odpovídá složení  $\text{H}_4\text{DO3A-pyNox-4C}\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot 2\text{HCl}$  (obr. 12), které je ve shodě s údaji získanými z elementární analýzy. Monokrystal byl získán krystalizací koncentrovaného roztoku ligandu při  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . V molekule jsou všechny karboxyly nedisociovány a na makrocyklu jsou protonizovány protilehlé dusíky, což je vysvětlováno elektrickým odpuzováním souhlasných nábojů protonů.<sup>43</sup> Zajímavé je, že v obdobné struktuře ligandu DO3A-pyNox byl protonizován druhý pár dusíkových atomů.<sup>9</sup> Tento jev pravděpodobně souvisí s hodnotami protonizačních konstant, které však zatím nebyly studovány.



Obrázek 12. Rentgenová struktura krystalu  $H_4DO3A\text{-pyNox}\cdot 4C\cdot 2H_2O\cdot 2HCl$ , pro přehlednost grafického znázornění byly vynechány molekuly vody, chlorovodíku a protony na uhlících, znázorněna je pouze pro strukturu významná protonizace

Délka N - O vazby v ligandu 1,312 Å je poněkud kratší než u  $DO3A\text{-pyNox}$  (1,339 Å pro volný ligand a 1,340 Å pro komplex  $Dy^{3+}$ ). Příčinou je pravděpodobně mezomerní efekt způsobený přítomností karboxylu na pyridin N-oxidovém jádře (viz obr. 13). Tímto efektem dochází k částečnému posílení dvojného charakteru N-O vazby a tím i k jejímu zkrácení.



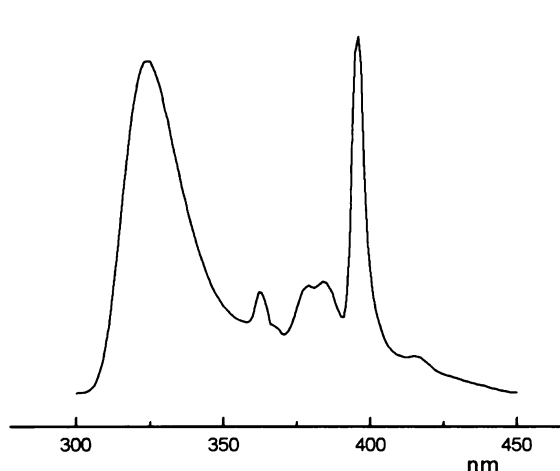
Obrázek 43. Mezomerní efekt na pyridin N-oxidu s karboxylem

## 3.2 Zjištění hydratačního čísla

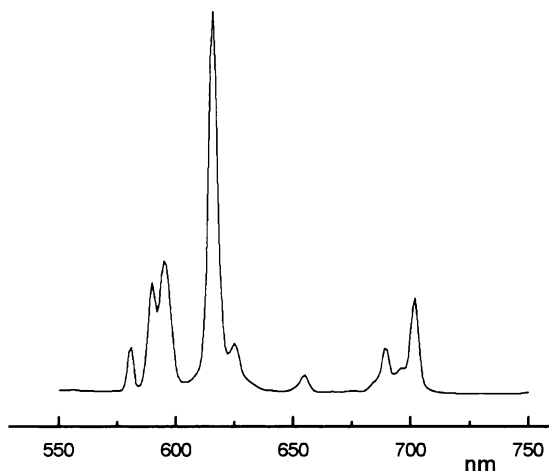
### 3.2.1 Luminiscenční metoda

Metoda byla použita pro stanovení počtu přímo koordinovaných molekul vody v europitém komplexu ligandu DO3A-pyNox-4A. Experiment je použitelný i pro terbité komplexy,<sup>24</sup> ale podmínky pro měření Tb<sup>3+</sup> se nepodařilo vyladit. Pro tento experiment byly připraveny dva 50 mM roztoky Eu<sup>3+</sup> komplexu v H<sub>2</sub>O a v D<sub>2</sub>O (99,98%).

Pro zjištění optimálních parametrů bylo nejprve změřeno excitační spektrum, ze kterého byla určena nejvhodnější excitační vlnová délka, a poté emisní spektrum, ze kterého byla určena nejvhodnější vlnová délka emise. Při měření excitačního spektra byla sledována intenzita emise při 616 nm (cit.<sup>44</sup>) v závislosti na vlnové délce excitačního záření (300 – 450 nm) znázorněná grafem 1. Nejintenzivnější pík byl nalezen při vlnové délce  $\lambda = 396$  nm. Tato vlnová délka byla použita jako excitační záření při měření emisního spektra (550 - 750 nm) v grafu 2, ze kterého bylo zjištěno emisní maximum při  $\lambda = 616$  nm.

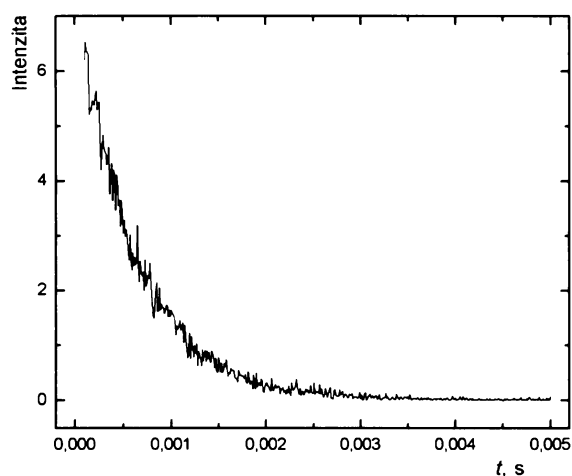


**Graf 1. Excitační spektrum Eu<sup>3+</sup> komplexu s maximem při 396 nm**

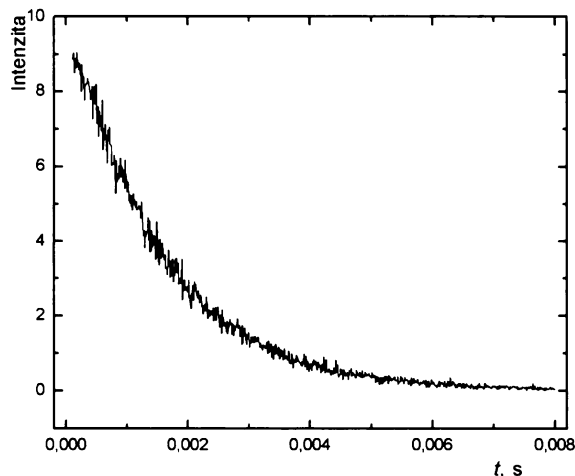


**Graf 2. Emisní spektrum Eu<sup>3+</sup> komplexu s maximem při 616 nm**

Kombinace vlnových délek 396 nm a 616 nm byla použita pro měření rychlosti vyhasínání luminiscence u obou roztoků. Vyhodnocením dat (graf 3, 4) byly získány časy vyhasínání  $\tau_{\text{H}_2\text{O}} = 0,617$  ms a  $\tau_{\text{D}_2\text{O}} = 1,525$  ms. Užitím empirického vztahu (17) (kap.1.6.1) byl vypočten počet koordinovaných molekul vody  $q = 1,03$ .



Graf 3. Křivka vyhasínání luminiscence  $\text{Eu}^{3+}$  komplexu v  $\text{H}_2\text{O}$

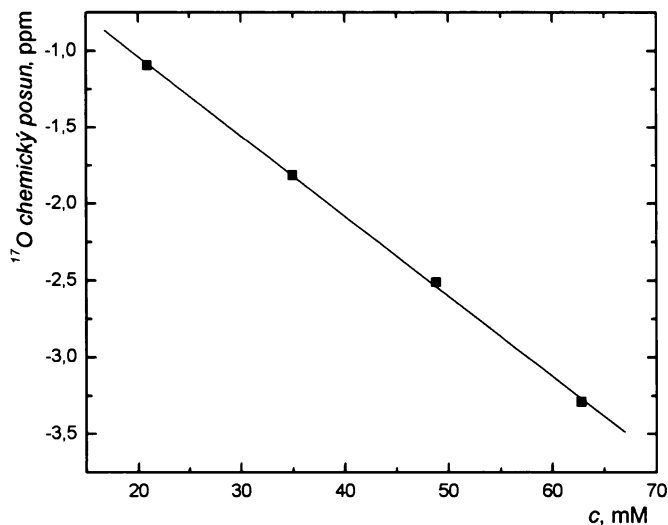


Graf 4. Křivka vyhasínání luminiscence  $\text{Eu}^{3+}$  komplexu v  $\text{D}_2\text{O}$

### 3.2.2 Metoda $^{17}\text{O}$ DIS

Stanovení hydratačního čísla bylo provedeno i metodou  $^{17}\text{O}$  DIS. Pro tento experiment byly připraveny roztoky dysprozitého komplexu ligandu DO3A-pyNox-4A o koncentracích 20 - 60 mM. Roztoky byly obohaceny o 0,5 % t-butanolu a 18 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Při měření byl použit „lock“ pro odstranění BMS příspěvku k chemickému posunu. Závislost naměřených chemických posunů signálu  $^{17}\text{O}$  molekul koordinované vody na koncentraci  $\text{Dy}^{3+}$  komplexu byla vynesena do grafu 5.

Lineární regresí byla získána hodnota směrnice  $-0,052 \text{ ppm} \cdot \text{mM}^{-1}$ . Hydratační číslo  $q = 1,3$  bylo získáno porovnáním se směrnicí standardu  $[\text{Dy}(\text{H}_2\text{O})_9]$ , jejíž hodnota činí  $-0,357 \text{ ppm} \cdot \text{mM}^{-1}$  (cit. <sup>23</sup>).



Graf 5. Závislost chemického posunu signálu  $^{17}\text{O}$  na koncentraci  $[\text{Dy}(\text{DO3A-pyNox-4A})(\text{H}_2\text{O})_q]^{3+}$

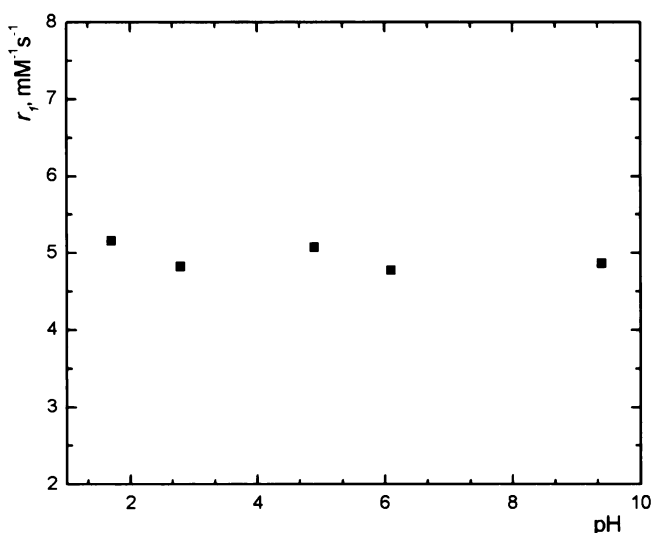
Hodnota zjištěná metodou  $^{17}\text{O}$  DIS je poněkud vyšší než hodnota získaná z luminiscencí. Sami autoři metody DIS však uvádějí, že přesný počet koordinovaných molekul vody v roztoku  $\text{Dy}^{3+}$  iontů není znám a odhaduje se na 8 či 9 podle použité metody měření. Pokud se použije jako standard  $[\text{Dy}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$ , pak touto metodou vychází  $q = 1,16$ ,

což je zcela v rámci chyby měření.<sup>3, 23</sup> Pomineme-li možnost rovnováhy mezi různě hydratovanými částicemi, pak z chemického hlediska dávají smysl pouze celočíselné hodnoty  $q$ . Hydratační číslo získané oběma metodami tak ukazuje na jednu koordinovanou molekulu vody, stejně jako v případě ligandu H<sub>3</sub>DO3A-pyNox. Při vypřesňování BSM modelu pro kontrastní látky bylo hydratační číslo fixováno na hodnotu  $q = 1$ . Komplex je tedy možné popsat vzorcem [Dy(DO3A-pyNox-4A)(H<sub>2</sub>O)]<sup>-</sup>.

### 3.3 Relaxometrické studium komplexů

#### 3.3.1 Závislost relaxivity na pH

Pro tento experiment byl připraven roztok gadolinitého komplexu o koncentraci 4 mM. Úprava pH byla prováděna přímo v kyvetě od bazické do kyselé oblasti, aby byl omezen vliv možného rozkladu komplexu v kyselém prostředí. Odchytky jednotlivých bodů závislosti byly zřejmě způsobeny chybou měření a mírou změnou koncentrace způsobenou měřením a úpravou pH. Kvalitativně lze z grafu 6 říci, že komplex je dostatečně kineticky stabilní vůči kyselé hydrolýze. V oblasti nízkého pH nedochází k významnému vzestupu relaxivity, kterým by se rozpad komplexu projevil. Protonizace karboxylu na pyridin N-oxidu nemá významný vliv na relaxivitu. To je v souladu s předpokladem, že karboxyl je příliš vzdálen centrálnímu iontu na to, aby ovlivňoval jeho okolí, a tím i relaxační vlastnosti. Studovaný ligand se tak v tomto experimentu chová podobně jako výchozí ligand DO3A-pyNox (cit. <sup>9</sup>).



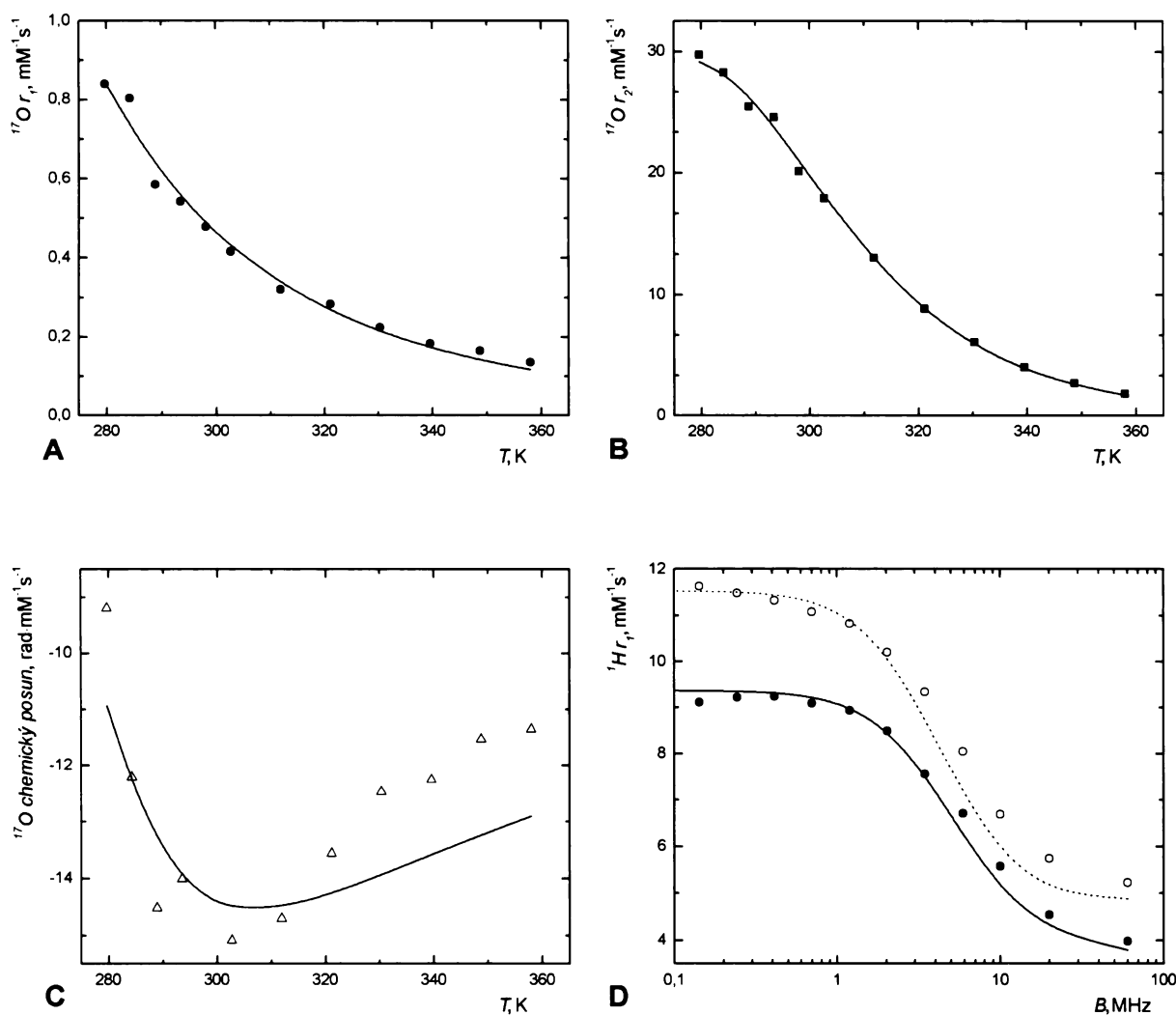
Graf 6. Závislost relaxivity na pH

#### 3.3.2 <sup>1</sup>H NMRD a teplotní <sup>17</sup>O profily

Závislost relaxivity na síle magnetického pole byla změřena na 1 mM gadolinitém komplexu. Průběh <sup>1</sup>H NMRD profilu (graf 7D) je typický pro nízkomolekulární látky, neboť

se v oblasti vyšších magnetických polí neprojevuje nárůst relaxivity typický pro pomalu rotující molekuly.<sup>29</sup> Hodnoty z tohoto experimentu byly použity při společném matematickém vypřesňování (viz kap. 3.3.3).

Závislosti  $^{17}\text{O}$  longitudinální ( $r_1$ ) a transverzální ( $r_2$ ) relaxivity a chemického posunu jader  $^{17}\text{O}$  na teplotě znázorňují grafy 7A, B a C. Průběh křivky transverzální relaxivity



Grafy 7 A, B, C, D. Kde graf A je teplotní závislost  $^{17}\text{O}$  longitudinální  $r_1$  a B transverzální  $r_2$  relaxivity a C je závislost chemického posunu signálu  $^{17}\text{O}$  molekuly vody. Graf D jsou NMRD profily při 25°C (tečkovaně) a 37°C (plná čára) roztoku  $[\text{Gd}(\text{DO3A-pyNox-4A})(\text{H}_2\text{O})]^-$ . Body v grafech znázorňují experimentálně získaná data a křivky jsou výsledkem fitování.

odpovídá látce s rychlou výměnou vody<sup>3</sup> (viz simulace v kap. 1.6.2). Hodnota longitudinální relaxivity je podstatně nižší než transverzální, jak je u gadolinitých komplexů běžné.<sup>13</sup> V profilu chemických posunů je patrný prudký nárůst křivky směrem k nízkým teplotám. To je v souladu s předpokladem, že při teplotě, při které u transverzální relaxivity pozorujeme

maximum, se u chemických posunů vyskytuje inflexní bod. Hodnoty získané v teplotních profilech jader  $^{17}\text{O}$  byly použity při společném matematickém zpracování (viz kap. 3.3.3).

### 3.3.3 Studie parametrů ovlivňujících relaxivitu

Data získaná z měření  $^{17}\text{O}$  teplotních závislostí a  $^1\text{H}$  NMRD profilů gadolinitého komplexu byla zpracována společně pomocí multiparametrického fitování. Použitý model zahrnoval vnitřní a vnější sféru, příspěvek druhé sféry byl stejně jako u ligandu DO3A-pyNox zanedbán. Model (viz příloha) obsahuje mnoho parametrů, z nichž některé je nutné zvolit jako fixní, aby bylo dosaženo smysluplného výsledku. Fixované parametry je třeba stanovit nezávisle, nebo je odhadnout na základě analogie s jinými látkami, u kterých jsou známy. V tomto případě bylo nezávisle stanoveno hydratační číslo, které bylo fixováno na hodnotu  $q = 1$  (viz kap. 3.2). Ostatní fixované parametry byly převzaty z literatury.<sup>3, 13, 19, 20</sup>

Výsledky fitování jsou shrnuty v tabulce 2, pro srovnání jsou uvedeny i hodnoty pro ligandy DO3A-pyNox a DOTA. Na první pohled jsou parametry odlišné od obou srovnávaných ligandů, ve většině případů jsou však hodnoty bližší ligandu DO3A-pyNox než ligandu DOTA.

**Tabulka 2. Porovnání parametrů  $[\text{Gd}(\text{DO3A-pyNox-4A})(\text{H}_2\text{O})]^-$  získaných pomocí matematického fitování a parametrů  $[\text{Gd}(\text{DO3A-pyNox})(\text{H}_2\text{O})]$  a  $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$**

Parametr	DO3A-pyNox-4A	DO3A-pyNox <sup>c</sup>	DOTA
$r_1^{310}$ [ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] <sup>f</sup>	4,54	4,04	3,83 <sup>c</sup>
$\Delta^2$ [ $10^{20}\text{s}^{-2}$ ]	$0,93 \pm 0,09$ ( $0,95 \pm 0,09$ )	0,69	0,16 <sup>a</sup>
$\tau_m^{298}$ [ns]	$34 \pm 1$ ( $34 \pm 1$ )	39	244 <sup>a</sup>
$\Delta H^\ddagger$ [ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	$46 \pm 2$ ( $46 \pm 2$ )	51	50 <sup>a</sup>
$\tau_r^{298}$ [ps]	$99 \pm 13$ ( $102 \pm 13$ )	74	77 <sup>a</sup>
$\tau_v^{298}$ [ps]	$4,9 \pm 0,5$ ( $5,0 \pm 0,5$ )	2,7	11,0 <sup>a</sup>
$A/\hbar$ [ $10^6\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	<u><math>-3,75^a</math></u>	$-3,75^a$	$-3,70^a$
$r_{\text{GdO}}$ [Å]	<u><math>2,5^a</math></u>	$2,50^a$	$2,45^b$
$r_{\text{GdH}}$ [Å]	<u><math>3,1^a</math></u>	$3,10^a$	$3,13^d$
$q$	<u>1</u>	1	1 <sup>b</sup>
$\chi(1+\eta^2/3)^{1/2}$ [MHz]	$12,96 \pm 4,40$ ( <u><math>7,58</math></u> )	$7,58^a$	$7,58^a$
$E_r$ [kJ/mol]	<u>18000</u>	16000	-
$A$ [Å]	<u><math>3,5^c</math></u>	3,5	-

Podtržené hodnoty byly při fitování fixovány. Hodnoty v závorkách byly získány při fixování parametru  $\chi(1+\eta^2/3)^{1/2}$ ; <sup>f</sup>longitudinální  $^1\text{H}$  relaxivita pro pole o intenzitě 20 MHz byla určena z NMRD profilu při 310 K; <sup>a</sup>hodnoty ligandu DO3A-pyNox (cit. <sup>9</sup>); hodnoty s indexem <sup>a,b,c,d</sup> byly převzaty z literatury (<sup>a</sup>cit. <sup>20</sup>; <sup>b</sup>cit. <sup>13</sup>; <sup>c</sup>cit. <sup>3</sup>; <sup>d</sup>cit. <sup>19</sup>).

Porovnáním struktur obou pyridin N-oxidových ligandů lze očekávat vliv dvou hlavních efektů. Zaprvé přítomností karboxylové skupiny dojde ke zvětšení hmotnosti a velikosti molekuly. Tento efekt bude pravděpodobně podpořen solvátovým obalem deprotonovaného karboxylu, neboť většina měření probíhala při neutrálním pH. Zadruhé účinkem mezomerního efektu dojde k částečnému odčerpání elektronové hustoty z pyridin N-oxidového kyslíkového atomu. To může mít vliv na symetrii rozložení náboje kolem centrálního iontu.

Významným rozdílem oproti ligandům DO3A-pyNox a DOTA je u studovaného ligandu vyšší hodnota rotačního korelačního času  $\tau_r$ . Tu lze vysvětlit právě zvětšením velikosti molekuly a následným snížením rychlosti rotace. Rotační korelační čas má významný vliv na relaxivitu při magnetických polích 20 – 60 MHz (cit. <sup>3</sup>). Pozorovaná relaxivita při 20 MHz je skutečně o 12 % vyšší než u DO3A-pyNox, což souhlasí s pozorovaným zpomalením rotace.

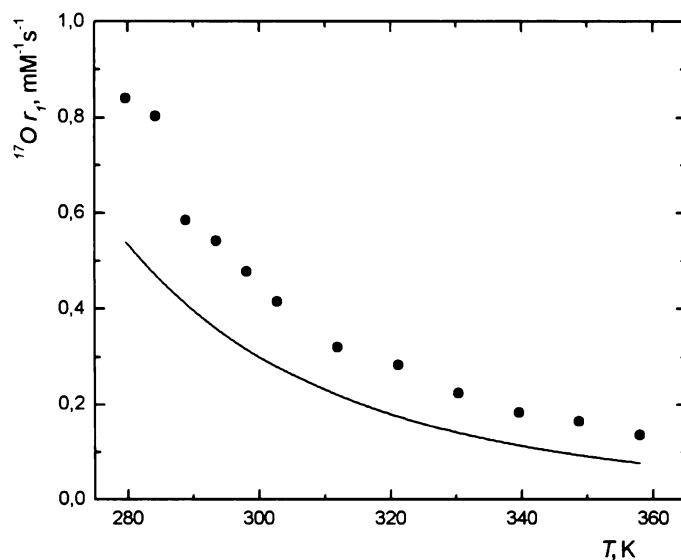
Přesné hodnoty parametrů souvisejících s elektronovou relaxací gadolinitého iontu,  $\Delta^2$  a  $\tau_r$ , je poněkud obtížnější správně interpretovat. Tyto parametry souvisejí hlavně s ZFS efektem, a tím se symetrií rozložení náboje kolem centrálního iontu. Zejména u parametru  $\Delta^2$  lze očekávat nárůst hodnoty při poklesu symetrie náboje. Jak již bylo řečeno v kapitole 3.1.3 dochází u ligandu DO3A-pyNox-4A vlivem mezomerního efektu karboxylové skupiny k posílení částečně dvojného charakteru vazby N-O. Zároveň dochází i ke snižování parciálního záporného náboje kyslíkového atomu N-oxidové skupiny. Tento efekt je pravděpodobně příčinou pozorovaného nárůstu  $\Delta^2$ .

Residenční čas molekuly vody  $\tau_m$  je jen o málo menší než u ligandu DO3A-pyNox a stále spadá do oblasti optimálních hodnot 20 – 40 ns. Hlavním cílem při designu studovaného ligandu bylo tento parametr zachovat i při vnesení nové karboxylové funkce a umožnit tak ladit hodnotu  $\tau_r$  nezávisle na  $\tau_m$ . Lze tedy říct, že tohoto cíle bylo úspěšně dosaženo.

V tabulce 2 jsou pro ligand DO3A-pyNox-4A uvedeny dvě sady dat. Příčinou bylo problematické dosažení shody modelu s průběhem <sup>17</sup>O longitudinální relaxivity. Ukázalo se, že hlavní vliv na průběh křivky má kvadrupólová konstanta  $\chi(1+\eta^2/3)^{1/2}$  (cit. <sup>45</sup>). Ta se obvykle fixuje na hodnotu 7,58 MHz, což je údaj změřený pro čistou vodu.<sup>20</sup> Při fixování konstanty na této hodnotě však nebylo možno žádnou kombinací zbylých parametrů dosáhnout shody fitu s naměřenými daty, proto byl tento parametr při fitování uvolněn. Jeho výsledná hodnota 12,96 MHz je v rozmezí hodnot uváděných v literatuře.<sup>45</sup> S touto hodnotou kvadrupólové konstanty se dosáhlo relativně dobré shody s naměřenými daty. Nicméně v případě, že byla hodnota konstanty při fitování fixována na 7,58 MHz, nedošlo k výrazné změně žádného



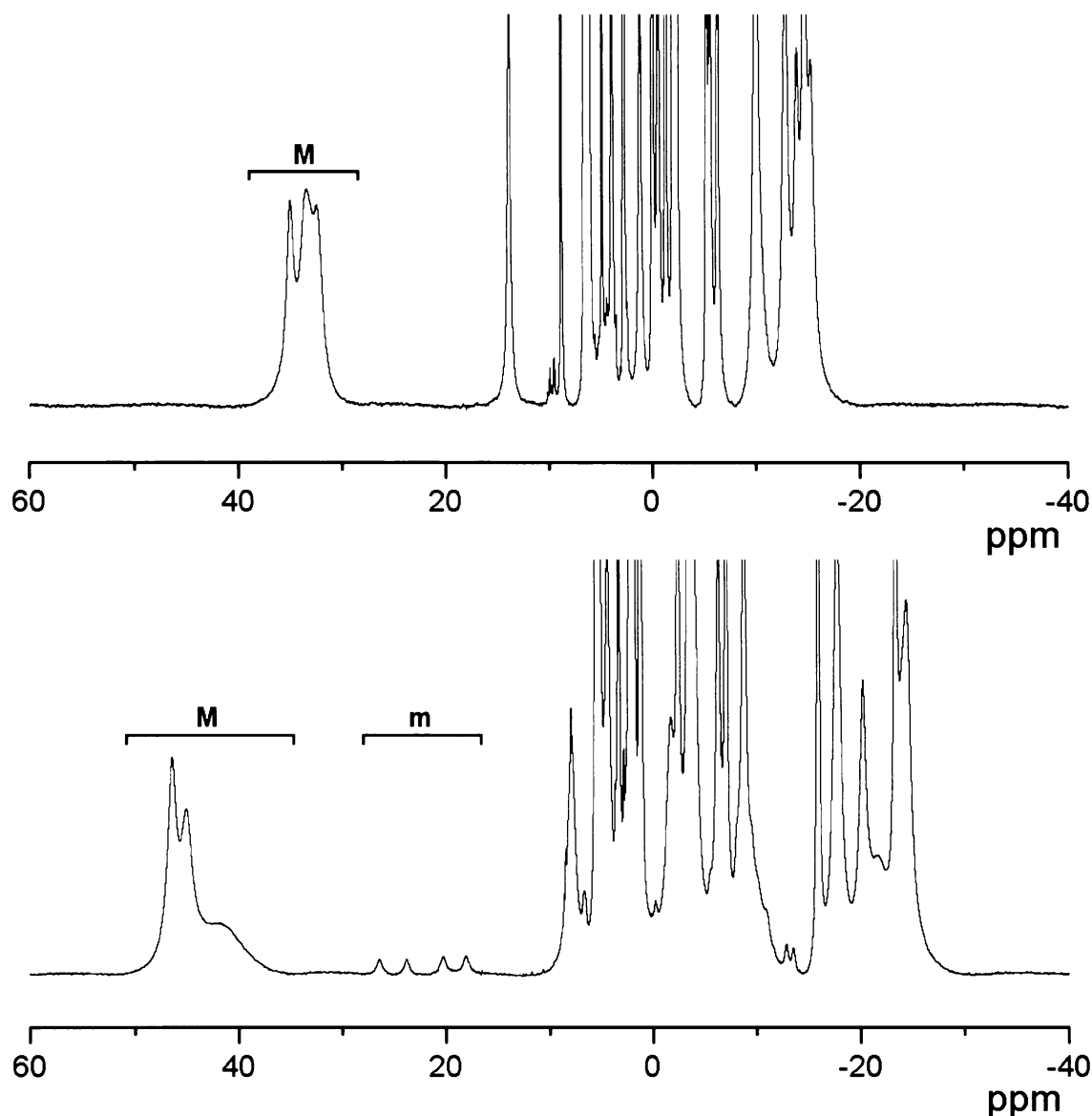
z významných parametrů (viz data v tabulce 2 uvedená v závorkách). Výsledkem byla pouze horší shoda experimentálních  $^{17}\text{O}$  longitudinálních dat s fitem (viz. graf 8). Hodnotu aktivační enthalpie rotace bylo třeba fixovat na průměrnou hodnotu  $E_r = 18000 \text{ KJ/mol}$  uváděnou v literatuře.<sup>20</sup> Jinak docházelo k výrazné neshodě strmosti křivky longitudinální relaxivity.



**Graf 8.** Výsledek fitování longitudinální relaxivity se zafixovaným parametrem  $\chi(1+\eta^2/3)^{1/2}$ .

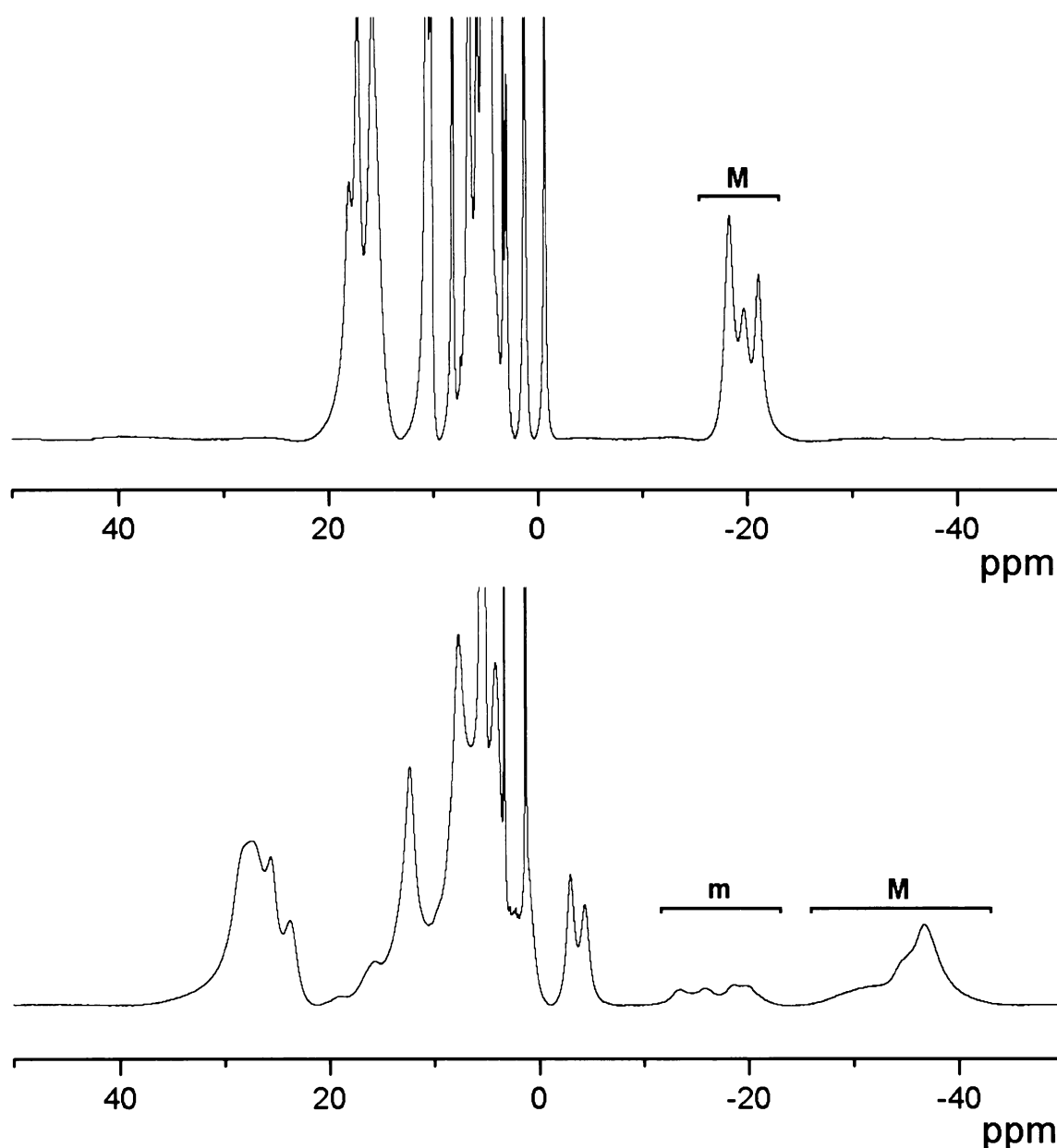
### 3.4 Izomerie komplexů v roztocích

Izomerie *m* / *M* byla studována pomocí  $^1\text{H}$  NMR spekter  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$  a  $\text{Yb}^{3+}$  komplexů DO3A-pyNox-4A měřených při teplotě 25 °C a -30 °C (cit. <sup>46</sup>). Diastereoizomery jsou odlišitelné pomocí rozdílu v chemických posunech protonů v literatuře označovaných jako H4 a H6 (cit. <sup>3</sup>), které se nacházejí nejbližší magnetické ose komplexu (absolutní indukovaný posun mají největší). Nejvhodnější pro toto měření jsou komplexy europité. Spektrum europitého komplexu ligandu DO3A-pyNox-4A je uvedeno na obrázku 14.



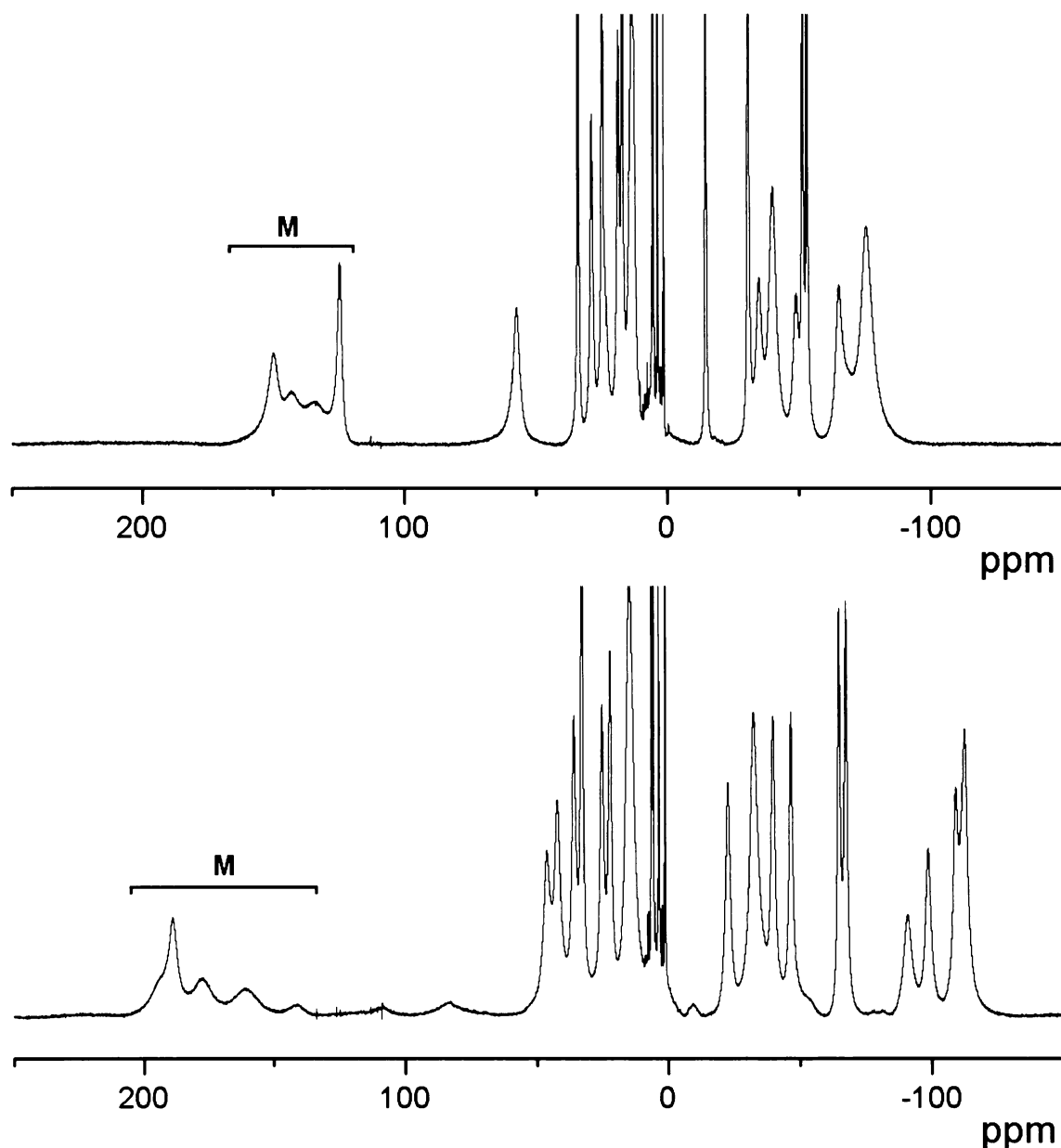
Obrázek 14.  $^1\text{H}$  spektrum komplexu  $[\text{Eu}(\text{DO3A-pyNox-4A})(\text{H}_2\text{O})]^-$  při 25 (nahore) a -30°C (dole) ve směsi  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1)

Při teplotě 25 °C byly pozorovány pouze signály izomeru **M**, při snížení teploty se ukázaly i signály izomeru **m**, což bylo zaznamenáno i u ligandu H<sub>3</sub>DO3A-pyNox (cit. <sup>9</sup>). Intenzita signálů **m** byla výrazně menší než pro **M** a vypovídá o nízkém zastoupení tohoto izomeru. Podobné pozorování bylo zaznamenáno i u neodymitého komplexu (obr. 15), u ytterbitého komplexu byl výsledek neprůkazný (obr. 16). U všech spekter je patrné rozšíření škály chemických posunů při nízkých teplotách, které je dáno teplotní závislostí efektu LIS.<sup>22</sup>



Obrázek 15. <sup>1</sup>H spektrum komplexu [Nd(DO3A-pyNox-4A)(H<sub>2</sub>O)]<sup>-</sup> při 25 (nahore) a -30°C (dole) ve směsi CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O (4:1)

Teplota koalescence signálů **M** a **m** nebyla přesně určena, leží přibližně v rozmezí -20 až -25 °C (cit. <sup>28</sup>) Z toho vyplývá, že změna konformace mezi izomery **M** a **m** probíhá neobvykle rychle a izomer **m** se dá spíše považovat za nestabilní přechodný stav při enantiomerizaci izomeru **M** (viz kap. 1.3.4). Vzhledem k nestabilitě izomeru **m** a jeho nízkému zastoupení lze hovořit o exkluzivní existenci izomeru **M** při laboratorní teplotě podobně jako u DO3A-pyNox (cit. <sup>10</sup>). Podobná výhradní existence izomeru **M** byla nalezena i u příbuzného ligandu se dvěma pyridin N-oxidovými skupinami.<sup>46</sup>



Obrázek 16. <sup>1</sup>H spektrum komplexu [Yb(DO3A-pyNox-4A)(H<sub>2</sub>O)]<sup>-</sup> při 25 (nahore) a -30°C (dole) ve směsi CD<sub>3</sub>OD/D<sub>2</sub>O (4:1)

## 4 Závěr

V této diplomové práci byl připraven nový ligand DO3A-pyNox-4C, jehož struktura vychází ze struktury ligandu DO3A-pyNox, u jehož  $Gd^{3+}$  komplexu kterého byly nalezeny vlastnosti vhodné pro použití jako kontrastní látky pro MRI. Od ligandu byly připraveny komplexy s ionty lanthanoidů, které byly studovány zejména pomocí NMR spektroskopie.

Bylo zjištěno, že přítomnost karboxylové skupiny na pyridinovém jádře ligandu mírně mění některé vlastnosti jeho komplexů, porovnájí-li se s původním ligandem DO3A-pyNox. Možným vysvětlením tohoto jevu je mezomerní efekt karboxylu, jímž dochází k ovlivnění N-oxidové skupiny na pyridinu, a to zejména délky vazby N-O a velikosti parciálního náboje na kyslíkovém atomu. Tento vliv je však dostatečně malý, takže neovlivňuje nejdůležitější charakteristiky gadolinitého komplexu. Bylo potvrzeno, že komplexy nového ligandu DO3A-pyNox-4C obsahují jednu molekulu vody v první koordinační sféře a rychlost její výměny s okolím je téměř optimální, stejně jako u ligandu DO3A-pyNox. Velká podobnost mezi oběma ligandy byla shledána i v případě izomerie komplexů. Za laboratorní teploty je pozorovatelný pouze izomer **M**, zatímco izomer **m** v roztoku existuje pouze jako nestabilní přechodný konformer.

Na základě této práce lze konstatovat, že hlavního cíle designu nového ligandu bylo dosaženo. Ligand DO3A-pyNox-4C umožňuje využít výhodných vlastností ligandu DO3A-pyNox a zároveň „ladit“ rychlost rotace lanthanoidových komplexů tvorbou konjugátů. Látka je tedy vhodná pro další výzkum z hlediska použití jako kontrastní látky pro MRI.

## 5 Literatura

1. Lorusso, V.; Pascolo, L.; Ferneti, C.; Anelli, P. L.; Uggeri, F.; Tiribelli, C.: Magnetic Resonance Contrast Agents: From the Bench to the Patient. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 4079-4098 (2005).
2. Lin, S-P.; Brown, J. J.: MR Contrast Agents: Physical and Pharmacologic Basics. *J. Magn. Reson. Imaging* **25**, 884–899 (2007).
3. Merbach, A. E.; Tóth, É.(edits.): *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Chichester, JohnWiley & Sons (2001).
4. Cacheris, W. P.; Quarry, S. C.; Rocklage, S. M.: The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *J. Magn. Reson. Imaging* **8**, 476-481 (1990).
5. Chan, K. W. Y.; Wong W. T.: Small molecular gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents for diagnostic imaging. *Coord. Chem. Rev.* (2007) (doi:10.1016/j.ccr.2007.04.018).
6. Pierre, V. C.; Botta, M.; Aime S.; Raymond, K.N.: Substituent effects on Gd(III)-based MRI contrast agents: Optimizing the stability and selectivity of the complex and the number of coordinated water molecules. *Inorg. Chem.* **45**:20, 8355-8364 (2006).
7. Rudovský, J.; Botta, M.; Hermann, P.; Hardcastle, K.I.; Lukeš, I.; Aime, S.: PAMAM Dendrimeric Conjugates with a Gd-DOTA Phosphinate Derivative and Their Adducts with Polyaminoacids: The Interplay of Global Motion, Internal Rotation, and Fast Water Exchange. *Bioconjugate Chem.* **17**, 975-987 (2006).
8. Zhang, S.; Jiang, X.; Sherry, D.: Modulation of the Lifetime of Water Bound to Lanthanide Metal Ions in Complexes with Ligands Derived from 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane Tetraacetate (DOTA). *Helv. Chim. Acta* **88**, 923-935 (2005).
9. Polášek, M.: NMR studie komplexů pyridin-N-oxidového analogu DOTA s lanthanoidy. *Diplomová práce*. Přf UK, Praha (2004).
10. Polášek, M.; Rudovský, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Vander Elst, L.; Muller, R. N.: Lanthanide(III) complexes of a pyridine N-oxide analogue of DOTA: exclusive M isomer formation induced by a six-membered chelate ring. *Chem. Commun.* 2602-2603 (2004).

11. Friebolin, H.: *Basic One- and Two- Dimensional NMR Spectroscopy*. Second, enlarged edition VCH, Weinheim (1993).
12. Helm, L.: Relaxivity in paramagnetic systems: Theory and mechanisms. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **49**, 45-64 (2006).
13. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R.B.: Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293-2352 (1999).
14. Solomon, I.; Bloembergen, N.: Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule. *J. Chem. Phys.* **25**:2, 261-266 (1956).
15. Bloembergen, N.; Morgan, L.O.: Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Spin Relaxation. *J. Chem. Phys.* **34**, 842-850 (1961).
16. Solomon, I.: Relaxation processes in a system of two spins. *Phys. Rev.* **99**, 559-65 (1955).
17. Bloembergen, N.: Proton relaxation times in paramagnetic solutions. *J. Chem. Phys.* **27**, 572-3 (1957).
18. Lauffer, R. E.: Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation Agents for NMR Imaging: Theory and Design. *Chem. Rev.* **87**, 901-927 (1987).
19. Caravan, P.; Astashkin, A.V.; Raitsimring, A.M.: The Gadolinium(III)-Water Hydrogen Distance in MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **42**:13, 3972-3974 (2003).
20. Powell, D. H.; Ni Dhubhghaill, O. M.; Pubanz, D.; Helm, L.; Lebedev, Y. S.; Schlaepfer, W.; Merbach, A. E.: Structural and Dynamic Parameters Obtained from <sup>17</sup>O NMR, EPR, and NMRD Studies of Monomeric and Dimeric Gd<sup>3+</sup> Complexes of Interest in Magnetic Resonance Imaging: An Integrated and Theoretically Self-Consistent Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9333-9346 (1996).
21. Aime, S.; Crich, S. G.; Gianolio, E.; Giovenzana, G. B.; Tei, L.; Terreno, E.: High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1562-1579 (2006).
22. Peters, J. A.; Huskens, J.; Raber, D. J.: Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **28**, 283-350 (1996).
23. Alpoim, M. C.; Urbano, A. M.; Geraldés, C. F. G. C.; Peters, J.A.: Determination of the number of inner-sphere water molecules in lanthanide(III) polyaminocarboxylate complexes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **3**, 463-467 (1992).
24. Horrocks Jr., W. DeW.; Sudnick, D.R.: Lanthanide Ion Probes of Structure in Biology. Laser-Induced Luminescence Decay Constants Provide a Direct Measure of the

- Number of Metal-Coordinated Water Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **101**:2, 334-340 (1979).
25. Táborský, P.; Svobodová, I.; Hnatejko, Z.; Lubal, P.; Lis, L.; Försterová, M.; Hermann, P.; Lukeš I.; Havel, J.: Spectroscopic Characterization of Eu(III) Complexes with New Monophosphorus Acid Derivatives of H<sub>4</sub>dota. *J. Fluoresc.* **15**:4, 507-512 (2005).
  26. Djanashvili, K.; Peters, J. A.: How to determine the number of inner-sphere water molecules in Lanthanide(III) complexes by <sup>17</sup>O NMR spectroscopy. A technical note. *Contrast Media Mol. Imaging* **2**, 67–71 (2007).
  27. Swift, T. J.; Connick, R. E.: NMR-Relaxation Mechanism of O<sup>17</sup> in Aqueous Solutions of Paramagnetic Cations and the Lifetime of Water Molecules in the First Coordination Sphere. *J. Chem. Phys.* **37**:2, 307-320 (1962).
  28. Woods, M.; Botta, M.; Avedano, S.; Wang, J.; Sherry D.: Towards the rational desing of MRI contrast agents: a practical approach to the synthesis of gadolinium complexes that exhibit optimal water exchange. *Dalton trans.* 3829-3837 (2005).
  29. Congreve, A.; Parker, D.; Gianolio. E.; Botta, M.: Steric control of lanthanide hydration state: fast water exchange at gadolinium in a mono-amide ‘DOTA’ complex. *Dalton Trans.* 1441-1445 (2004).
  30. Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Mainero, V.; Aime, S.: Synthesis of bifunctional monophosphibic acid DOTA analogue ligand and its lanthanide(III) complexes. A gadolinium(III) complex endowed with an optimal water exchange rate for MRI applications. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 112-117(2005).
  31. Rudovský, J.; Hermann, P.; Botta, M.; Aime, S.; Lukeš, I.: Dendrimeri Gd(III) complex of a monophosphinate DOTA analogue: optimizing relaxivity by reducing internal motion. *Chem. Commun.* 2390-2392 (2005).
  32. Kobayashi, H.; Brechbiel, M. W.: Dendrimer-Based Nanosized MRI Contrast Agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 539-549(2004).
  33. Marques, M. P. M.; Geraldles, C. F. G. C.; Sherry, A. D.; Merbach, A. E.; Powell, H.; Pubanz, D.; Aime, S.; Botta, M.: NMR conformational study of the lanthanide(III) complexes of DOTA in aqueous solution. *J. Alloys Compd.* **225**, 303-307 (1995).
  34. Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Marques, M. P. M.; Geraldles, C. F. G. C.; Pubanz, D.; Merbach, A. E.: Conformational and Coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy. *Inorg. Chem.* **36**, 2059-2068 (1997).



35. Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Terreno, E.: Prototropic and Water-Exchange Processes in Aqueous Solutions of Gd(III) Chelates. *Acc. Chem. Res.* **32**, 941-949 (1999).
36. Aime, S.; Botta, M.; Ermondi, G.: NMR Study of Solution Structures and Dynamics of Lanthanide(III) Complexes of DOTA. *Inorg. Chem.* **31**, 4291-4299 (1992)
37. Keire, D. A.; Jang, Y. H.; Li, L.; Dasgupta, S.; Goddard, W. A.; Shively, J. E.: Chelators for Radioimmunotherapy: I. NMR and Ab Initio Calculation Studies on 1,4,7,10-Tetra(carboxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO4Pr) and 1,4,7-Tris(carboxymethyl)-10-(carboxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DO3A1Pr). *Inorg. Chem.* **40**, 4310-4318 (2001).
38. Polášek, M.: připraveno k publikování
39. Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F.: How to determine free Gd and free ligand in solution of Gd chelates. A technical note. *Contrast Media Mol. Imaging* **1**, 184-188 (2006).
40. Corsi, D. M.; Platas-Iglesias, C.; van Bekkum H.; Peters J. A.: Determination of paramagnetic lanthanide(III) concentrations from bulk magnetic susceptibility shifts in NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* **39**, 723–726 (2001).
41. Evans, D. F.: The Determination of Paramagnetic Susceptibility of Substances in Solution by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Soc.* 2003-2005 (1959).
42. Piguet, C.: Paramagnetic Susceptibility by NMR: The “Solvent Correction” Removed for Large Paramagnetic Molecules. *J. Chem. Educ.* **74**, 815-816 (1997).
43. Meyer, M.; Dahaoui-Gindrey, V.; Lecomte, C; Guillard, R.: Conformations and coordination schemes of carboxylate and carbamoyl derivatives of the tetraazamacrocycles cyclen and cyclam, and the relation to their protonation states. *Coord. Chem. Rev.* 178–180, 1313–1405 (1998).
44. Barthelemy, P. B.; Choppin G. R.: Luminescence Study of Complexation of Europium and Dicarboxylic Acids. *Inorg. Chem.* **28**, 3354-3357 (1989).
45. Champmartin, D.; Rubini, P.: Determination of the  $^{17}\text{O}$  Quadrupolar Coupling Constant and of the  $^{13}\text{C}$  Chemical Shielding Tensor Anisotropy of the CO Groups of Pentane-2,4-dione and  $\alpha$ -Diketonate Complexes in Solution. NMR Relaxation Study. *Inorg. Chem.* **35**, 179-183 (1996).
46. Keizers, P. H. J.; Desreux, J. F.; Overhand M.; Ubbink M.: Increased Paramagnetic Effect of a Lanthanide Protein Probe by Two-Point Attachment. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9292-9293 (2007).

## Příloha

// Model pro společný fit dat z 1H NMRD a 17O T2, T1 a chemických posunů  
// Vnitřní a vnější sféra

IndVars: T,B  
DepVars: R2o,R1h,R1o,dwr  
Params:delta,Hm,tm0,Hr,tr0,Hv,tv0,acc,ro,rh,n,a,khi,C

### // Použité parametry

// T - teplota (K)  
// B - magnetická indukce použitého pole (MHz Larmorovy frekvence 1H)  
// R2o - 17O transverzální relaxivita (s-1.mmol-1)  
// R1o - 17O longitudinální relaxivita (s-1.mmol-1)  
// dwr - 17O chemický posun (rad.s-1.mmol-1)  
// R1h - 1H longitudinální relaxivita (s-1.mmol-1)  
// delta - kvadrát stopy tenzoru ZFS  
// tm0 - rezidenční čas vody při 298 K  
// Hm - aktivační enthalpie výměny vody  
// tr0 - rotační korelační čas při 298 K  
// Hr -aktivační enthalpie rotace  
// tv0 - korelační čas pro modulaci ZFS interakce  
// Hv - aktivační enthalpie pro modulaci ZFS interakce  
// acc - konstanta hyperjemného štěpení mezi Gd a O  
// ro - vzdálenost Gd-O (m)  
// rh - vzdálenost Gh-H (m)  
// n počet molekul vody v první koordinační sféře  
// s - spinová multiplicita Gd3+ iontu (3.5)  
// a - nejkratší vzdálenost pro přístup molekul vnější sféry k Gd3+ iontu  
// D - difúzní koeficient při 298 K

### // Použité fyzikální konstanty

// univ - univerzální plynová konstanta R = 8.31441  
//  $\mu_B$  - Bohrov magneton  $\mu_B = 9.274e-24$   
//  $\mu_0$  - magnetická susceptibilita vakua  $\mu_0 = 4\pi e-7$   
// h - Planckova konstanta  $h = 6.62617e-34$   
// hbar - redukovaná Planckova konstanta  $1.0546e-34$   
// NA - Avogadrova konstanta  $NA = 6.023e23$   
// k - Boltzmannova konstanta  $k = 1.38066e-23$   
//  $\gamma_o$  - gyromagnetický poměr 17O  $\gamma_o = -3.626e7$   
//  $\gamma_h$  - gyromagnetický poměr 1H  $\gamma_h = 2.675e8$   
// gs - gyromagnetický poměr elektronu  $gs = 1.75977e11$

### // Poznámky

// Larmorovy frekvence (Wo a WS) jsou počítány jako  $2*\pi*B*$ gyromagnetický poměr

// BMS rovnice:

// Definice konstant

s=3.5

univ=8.31441

sz=31.5

// Definice larmorových frekvencí

wh=6.28e6\*B

ws=658.21\*wh

wo=-0.133557\*wh

// Eyringovy rovnice

```

tm=((tm0^(-1))*T/298.15)*exp((Hm/univ)*(0.003354-(1/T)))^(-1)
tr=((tr0^(-1))*T/298.15)*exp((Hr/univ)*(0.003354-(1/T)))^(-1)
tv=((tv0^(-1))*T/298.15)*exp((Hv/univ)*(0.003354-(1/T)))^(-1)
// Electronová relaxace
T1e=((1/25)*delta*tv*(4*s^2+4*s-3)*((1/(1+ws^2*tv^2))+4/(1+4*ws^2*tv^2)))^(-1)
T2e=((0.02*(4*s^2+4*s-3)*tv*delta*(3+(5/(1+(ws^2*tv^2)))+(2/(1+(4*ws^2*tv^2))))))^(-1)
tc1=(T1e^(-1)+tr^(-1)+tm^(-1))^(-1)
tc2=(T2e^(-1)+tr^(-1)+tm^(-1))^(-1)
te1=(T1e^(-1)+tm^(-1))^(-1)
te2=(T2e^(-1)+tm^(-1))^(-1)
// R2 skalární - kontaktní příspěvek pro 17O
cont=(1/3)*s*(s+1)*acc^2*(te1+(te2/(1+ws^2*te2^2)))
// R2 dipolární - pseudokontaktní příspěvek pro 17O
dip1=((1/15)*4.535671e-45*s*(s+1))/(ro^6)
dip2=4*tc1
dip3=(13*tc2)/(1+ws^2*tc2^2)
dip4=(3*tc1)/(1+wo^2*tc1^2)
dip=dip1*(dip2+dip3+dip4)
// R2 dipolární Curieho příspěvek pro 17O
dip7=(1/5)*(wo^2*7.397e-107*7.94^4)/(9*1.9063324e-46*T^2*ro^6)
dip8=4*tr+(3*tr)/(1+wo^2*tr^2)
cur=dip7*dip8
// Totální dipolární příspěvek k R2 pro 17O
diptot=dip+cur
// Totální R2 relaxace
T2m=(cont+diptot)^(-1)
//Rozdíl radiální frekvence koordinované a volné vody (rad/s)
dwm=sz*9.274e-24/(3*1.38066e-23*T)*acc*(B*1E6*6.28/2.675E8)
// Celková redukovaná T2 relaxace pro 17O
num=(T2m^(-2))+T2m*tm^(-1)+dwm^2
denom=(tm^(-1)+T2m^(-1))^2+dwm^2
scam=num/denom
pm=n*1e-3/55.56
R2o=pm*scam/tm
// Celková redukovaná T1 relaxace pro 17O
1/T1mo=((1/15)*4.5283e-45*S*(S+1))/(ro^6)*(6*tc1+(14*tc2/(1+(ws*ws*tc2^2))))+(0.94748*khi*khi*tr)
R1o=pm/(T1mo+tm)
// Rozdíl radiální frekvence koordinované a volné vody (rad/s) – příspěvek vnější sféry a celková
// redukovaná hodnota
dwos=C*dwm
dwr=pm*(dwm/((tm/T2m+1)^2+(tm*dwm)^2)+dwos)
// R1 dipolární - pseudokontaktní příspěvek pro 1H
COST2=5.16963e-43/rh^6
R1DIP=(COST2*((7*TC2/(1+WS^2*TC2^2)))+(3*TC1/(1+Wh^2*TC1^2))))
// Celkový příspěvek vnitřní sféry k milimolární 1H relaxivitě
T1M=(R1DIP)^(-1)
R1IN=(N*1E-3/55.6)/(T1M+TM)
// Výpočet difúzního koeficientu podle J. C. Hindmanna
B1=3.118150E-04
B2=5.062560E+03
B3=1.547920E+02
B4=1.629310E+03
D=(1E-4)/((B1*EXP(B2/T))+(B3*EXP(B4/T)))
// Freedův model pro příspěvek vnější sféry k 1H relaxivitě
TAU=A^2/D
// Funkce spektrální hustoty J(i) pro protonové spiny
AI=TAU/T1e
CI=[0,1]*wh*tau

```

```

z2l=ai+ci
Jl=RE((1+0.25*(z2l^0.5))/(1+z2l^0.5+(4/9)*z2l+(1/9)*(z2l^1.5)))
// Funkce spektrální hustoty J(s) pro elektronové stavy gadolinia
AS=TAU/T2e
CS=[0,1]*ws*tau
z2S=aS+cS
JS=RE((1+0.25*(z2S^0.5))/(1+z2S^0.5+(4/9)*z2S+(1/9)*(z2S^1.5)))
// Výpočet příspěvku vnější sféry k 1H relaxivitě podle Freedsova modelu
COST3=3.68e-20*S*(S+1)
R1OS=(COST3/(A*D))*((3*Jl)+(7*JS))
// Celková R1 protonová relaxivita
R1h=R1IN+R1OS

```

**// Počáteční odhady parametrů (data z ligandu DOTA)**

```

delta=0.16E20
tm0=243E-9
Hm=49.8e3
tr0=77E-12
Hr=16.1E3
tv0=11.1E-12
Hv=1000
acc=-3.7E6
ro=2.5E-10
rh=3.1E-10
n=1
a=3.5E-10
khi=7.58e6
C=0.1

```

### **Poděkování:**

Děkuji rodičům za psychickou podporu. Děkuji M. Poláškoví za podnětné rady a trpělivost.

Děkuji I. Císařové za změření rentgenové struktury. Děkuji H. Kotkovi za zpracování struktury a zasvěcení do problematiky luminiscencí. Děkuji S. Laurent za změření NMRD profilů. A děkuji celé skupině kolem I. Lukeše za příjemnou pracovní atmosféru.