

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická Chemie



Jiří Špánek

Koordinační sloučeniny jako kontrastní látky pro ^{19}F -MRI

Coordination Compounds as Contrast Agents for ^{19}F -MRI

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha 2018

„Nikdo z nás není tak chytrý, jako my všichni dohromady.“

-Japonské přísloví

Prohlášení

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

Jsem si vědom 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 29.8.2018

Podpis

Abstrakt: Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) patří mezi neinvazivní zobrazovací a diagnostické metody v medicíně. Nejčastěji se využívá měření jader ^1H molekul vody v lidském těle. Existují však i metody využívající například jádro ^{19}F nebo přenos saturace signálu mezi kontrastní látkou a molekulou vody prostřednictvím vyměnitelných jader ^1H . V těchto ohledech nachází největší využití komplexy paramagnetických iontů kovů jako například Gd^{3+} , Eu^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} a Ni^{2+} , které svými magnetickými vlastnostmi ovlivňují relaxační časy a chemické posuny měřených jader.

Tato diplomová práce navazuje na práci bakalářskou, ve které byla nalezena syntetická cesta k ligandům **L1** a **L2**. Pozornost je věnována přípravě komplexů s vybranými ionty kovů a studiu jejich vlastností pro případné využití jako kontrastních látek pro metody ^{19}F -MRI a CEST.

Klíčová slova: ^{19}F -MRI, CEST, makrocyclické ligandy, koordinační chemie

Abstract: Magnetic Resonance Imaging (MRI) is one of noninvasive imaging and diagnostic methods in today's medicine. The most commonly measured nucleus is ^1H of the water molecules present in the human body. There are also methods that use signal saturation transfer between the contrast agent and water molecules via exchangeable ^1H nuclei, or use a different nucleus like ^{19}F . Compounds that show a high potential in this area are complexes of paramagnetic ions such as Gd^{3+} , Eu^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} and Ni^{2+} , which can affect relaxation times and chemical shifts of other atoms due to their magnetic properties.

This Master's thesis focuses on ligands **L1** and **L2** which were prepared in the Bachelor thesis. The main focus is on preparation of complexes with selected paramagnetic ions and subsequent study of their properties relevant for a potential use as contrast agents for ^{19}F -MRI and CEST methods.

Keywords: ^{19}F -MRI, CEST, macrocyclic ligands, coordination chemistry

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat celé rodině a všem přátelům za veškerou formu podpory, kterou mi projevili ve škole i mimo ni.

Jmenovitě bych pak rád poděkoval Janě Havlíčkové za pomoc s potenciometrickými titracemi, a hlavně za trpělivost u všech těch proklatých baniček, kterých byly doslova stovky. Adamovi a Kubovi bych rád poděkoval za pomoc s pekelným ohněm, i když na nás hodně štěkal. Velké díky patří i mému školiteli, Honzovi Kotkovi, za rychlé opravy, trpělivost a rady při mé práci. Elišce a Malé za trpělivost, když jsem jim zabavil pH elektrodu. Závěrem bych pak rád poděkoval panu Mgr. Velkému Vezírovi za ty týdny vstávání a nekonečného měření. Zároveň bych se chtěl omluvit Kamilovi za kopance. Už se to nestane.

Všem ještě jednou díky. Bez vás bych to nezvládl.

1 Teoretický úvod	7
1.1 NMR	7
1.1.1 Fyzikální princip NMR	7
1.1.2 Relaxace	10
1.1.3 Měření relaxačního času T_1	11
1.1.4 Měření relaxačního času T_2	11
1.2 MRI	12
1.2.1 Historie MRI	12
1.2.2 Kontrastní látky a jejich role v MRI	13
1.2.3 ^{19}F -MRI	14
1.2 CEST efekt	16
1.3.1 Mechanismus CEST	16
1.3.2 PARACEST	18
1.4 Cíle práce	19
2 Experimentální část	20
2.1 Metody charakterizace	20
2.1.1 NMR spektroskopie	20
2.1.2 Potenciometrické titrace	20
2.2 Syntéza ligandů	21
2.2.1 Syntéza 1,8-dibenzylcyklamu (1) ³⁰	22
2.2.2 Syntéza <i>N</i> -(2-bromethyl)ftalimidu ²⁹	23
2.2.3 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(2-ftalimidoethyl)cyklamu (2a)	23
2.2.4 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(2-aminoethyl)cyklamu (3a)	24
2.2.5 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(<i>N</i> -trifluoracetyl-2-aminoethyl)cyklamu (4a)	25
2.2.6 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(<i>N</i> -trifluorethyl-2-aminoethyl)cyklamu (5a)	25
2.2.7 Syntéza ligandu L1	26
2.2.8 Syntéza <i>N</i> -(3-brompropyl)ftalimidu	27
2.2.9 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(3-ftalimidopropyl)cyklamu (2b)	28
2.2.10 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(3-aminopropyl)cyklamu (3b)	28
2.2.11 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(<i>N</i> -trifluoracetyl-3-aminopropyl)cyklamu (4b)	29
2.2.12 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(<i>N</i> -trifluorethyl-3-aminopropyl)cyklamu (5b) ..	30
2.2.13 Syntéza ligandu L2	31
2.3 Příprava komplexů a měření	31
2.3.1 Roztoky ke krystalizaci	31

2.3.2 Potenciometrické titrace	32
2.3.3 NMR titrace.....	33
2.3.4 NMR studium komplexace a měření relaxačního času T_1	33
2.3.5 CEST	34
3 Výsledky a diskuze.....	36
3.1 Acidobazické vlastnosti ligandů L1 a L2	36
3.2 Koordinační vlastnosti ligandů L1 a L2	40
3.3 Relaxace T_1	44
3.4 CEST.....	45
4 Závěr	47
5 Přílohy.....	49
Použité zkratky	59
Seznam zdrojů	60

1 Teoretický úvod

1.1 NMR

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je metoda, která využívá interakci jaderných spinů s radiofrekvenčním zářením ve vnějším homogenním magnetickém poli.

Pomocí NMR můžeme sledovat struktury produktů reakcí a stanovit jejich čistotu. Užitím speciálních měřících metod je možné i studium mnohem složitějších struktur jako jsou například biopolymery. Principy NMR jsou přenositelné i do oblasti medicíny, kde pomocí MRI (Magnetic Resonance Imaging) můžeme neinvazivně pozorovat vnitřní orgány pacienta.¹

První NMR signál byl pozorován v roce 1945 E. M. Purcellem, H. C. Torreyem a R. V. Poundem, kteří naměřili ^1H signál vzorku parafínu. Později, v roce 1946, F. Bloch a W. W. Hansen úspěšně naměřili ^1H signál molekul vody. V roce 1952 tyto dvě skupiny vědců za tento objev sdílely Nobelovu cenu za fyziku.² O pět let později byla popsána první ^{13}C NMR spektra a od té doby se metoda velmi rychle rozvíjela, zvláště pak zavedením supravodivých magnetů, které umožnilo zvýšení intenzity vnějšího magnetického pole a zlepšení rozlišení a citlivosti měření.¹

1.1.1 Fyzikální princip NMR

Důležitou vlastností jádra pro měření NMR je jeho jaderný spin, který popisuje spinové kvantové číslo I . Podle hodnoty I lze klasifikovat jádra do následujících skupin:

1. Jádra se spinovým kvantovým číslem $I = 0$. Tato jádra mají sudý počet protonů i neutronů (^{12}C , ^{16}O , ^{32}S , ...) a nemají žádný vlastní magnetický moment μ . Důsledkem je nemožnost magnetické rezonance a není je tedy možné měřit pomocí NMR spektroskopie.
2. Jádra se spinovým kvantovým číslem $I = \frac{1}{2}$. Tato jádra mají vlastní magnetický moment a jsou tedy měřitelná. Nejběžnější jádro s tímto spinem je jádro vodíku ^1H , které má velké přírodní zastoupení a zároveň nejvyšší citlivost se všech známých jader.
3. Jádra se spinovým kvantovým číslem $I > \frac{1}{2}$. U těchto jader se vyskytuje zároveň i moment kvadrupólový a jejich měření je často velmi obtížné.¹

Magnetický moment μ u jader s $I \neq 0$ se dá vypočítat ze vztahu

$$\mu = \frac{\gamma \hbar \sqrt{I(I+1)}}{2\pi}, \quad (1)$$

kde γ je gyromagnetický poměr, konstanta charakteristická pro jádro každého izotopu, h je Planckova konstanta. Vztah (1) lze zjednodušit do formy

$$\mu = \gamma \hbar \sqrt{I(I+1)}, \quad (2)$$

kde \hbar je redukovaná Planckova konstanta. Bez vnějšího magnetického pole se jaderný spin ani jím vytvořený magnetický moment nijak neprojevují, jelikož jsou jednotlivá jádra v prostoru uspořádána náhodně. V magnetickém poli s intenzitou B_0 dojde k uspořádání magnetických momentů a jejich precesi kolem osy vnějšího magnetického pole (typicky volené jako osa z). Tento pohyb se nazývá Larmorova precese a jeho frekvence je

$$\nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi}, \quad (3)$$

kde ν_L je frekvence Larmorovy precese. Larmorova frekvence jádra ^1H v daném poli se používá jako označení NMR spektrometrů s tímto polem (např.: 300 MHz, 400 MHz, 600 MHz, ...).¹ Zároveň nás zajímá i z -ová složka magnetického momentu, která je určena vztahem

$$\mu_z = \gamma m_l \hbar, \quad (4)$$

kde m_l je magnetické kvantové číslo jádra, které nabývá hodnoty $I, I-1, \dots, -I$.¹

Po vložení vzorku obsahujícím jádro se spinem $I = \frac{1}{2}$ do magnetického pole dojde k energetickému rozštěpení degenerovaných stavů $m_l = \frac{1}{2}$ a $m_l = -\frac{1}{2}$. Energetický rozdíl mezi těmito hladinami (α, β) je závislý na intenzitě vnějšího magnetického pole a lze ho vypočítat ze vztahu

$$\Delta E = h\nu = \gamma \hbar B_0, \quad (5)$$

kde ΔE je energetický rozdíl rozštěpených hladin. Tato energie odpovídá frekvenci

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}. \quad (6)$$

Při ozařování vzorku radiofrekvenčním zářením o frekvenci $\nu = \nu_L$, dochází k tzv. rezonanční absorpci radiofrekvenčního pulzu a excitaci systému.³

Obsazení jednotlivých hladin můžeme vyjádřit pomocí Boltzmannova rozdělení

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}}, \quad (7)$$

kde N_β je obsazení vyšší energetické hladiny, N_α je obsazení nižší energetické hladiny, k je Boltzmannova konstanta a T je termodynamická teplota.³ Jelikož je energetické štěpení velmi malé, tak je malý i rozdíl populací jednotlivých hladin. Za pokojové teploty a v poli 7 T je pro ^1H tento rozdíl roven zhruba $5 \cdot 10^{-5}$. Se zvětšujícím se polem, resp. rozdílem populací hladin, roste i citlovost NMR metody.^{1,2}

Na každé jádro v molekule působí jiné lokální (efektivní) magnetické pole B_{ef} , které je menší než vnější pole o intenzitě B_0 . To je způsobeno pohybem elektronů v magnetickém poli v okolí atomů, který generuje vlastní magnetické pole působící proti poli B_0 . Lokální magnetické pole je tedy závislé na chemickém okolí jádra měřeného atomu podle:

$$B_{\text{ef}} = B_0(1 - \sigma), \quad (8)$$

kde σ je stínící konstanta jádra. Důsledkem tohoto stínění je rozdílná rezonanční frekvence pro každé neekvivalentní jádro v molekule. Pro vyjadřování rozdílných rezonančních frekvencí byla definována relativní veličina chemického posunu δ

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{st}}}{\nu_{\text{st}}} \cdot 10^6, \quad (9)$$

kde ν je rezonanční frekvence daného jádra a ν_{st} je rezonanční frekvence standardu (např.: tetramethylsilan pro ^1H). Chemický posun má jednotku ppm a slouží ke snazší interpretaci NMR spekter, jelikož každé jádro molekuly má svou charakteristickou pozici ve spektru nezávisle na síle magnetického pole přístroje.^{1,3}

Měření NMR spekter je v dnešní době prováděno aplikací vhodně dlouhého radiofrekvenčního pulzu (typicky v řádu μs), který otočí vektor magnetizace o námi zvolený úhel podle libovolné osy. Takto vychýlený vektor poté relaxuje zpět do rovnovážné polohy. Relaxace vektoru magnetizace se projeví na snímací cívice jako indukované napětí. Získaný záznam se označuje FID (Free Induction Decay) a má tvar exponenciálně tlumené periodické funkce, která je tvořena součtem sinusoid s frekvencemi jednotlivých signálů ve spektru a představuje závislost intenzity indukovaného proudu na čase. Pomocí Fourierovy transformace pak získáme spektrum, které je vyneseno jako závislost intenzity signálu na frekvenci. Výhodou této metody je možnost opakovaného měření FIDů a jejich následného sčítání pro zlepšení citlivosti měření a poměru signálu k šumu.¹ Tabulka 1 ukazuje vlastnosti vybraných NMR aktivních jader.

Tabulka 1: Vlastnosti NMR aktivních jader¹

Jádro	I	Výskyt [%]	γ [$10^7 \text{ radT}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	Frekvence (11,74T) [MHz]	Citlivost
^1H	1/2	99,99	26,75	500	100
^2H	1	0,01	4,11	76,8	0,0001
^{13}C	1/2	1,07	6,73	125,7	0,02
^{15}N	1/2	0,37	-2,71	50,7	0,0004
^{17}O	5/2	0,037	-3,63	67,8	0,001
^{19}F	1/2	100	25,18	470,4	83
^{31}P	1/2	100	10,84	202,4	6,6

1.1.2 Relaxace

Relaxací nazýváme proces návratu vektoru magnetického momentu excitovaného jádra do rovnovážné polohy v magnetickém poli. Rozlišují se dva základní typy relaxací:

- 1 Podélná (longitudinální/spin-mřížková) relaxace, která označuje návrat z -ové složky vektoru magnetického momentu do své původní hodnoty. Je charakterizována relaxačním časem T_1 . Znalost času T_1 je důležitá pro nastavení repetičního času pulzních experimentů, který musí být dostatečně dlouhý, aby systém mohl plně zrelaxovat před dalším pulzem. Nárůst z -ové složky magnetizace probíhá podle rovnice

$$M_z = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T_1}} \right), \quad (10)$$

kde M_z je velikost magnetizace v ose z , t je časová prodleva po excitačním pulzu a M_0 je rovnovážná magnetizace.

- 2 Příčná (transverzální/spin-spinová) relaxace, která je spojena s úbytkem x -ové a y -ové složky vektoru magnetického momentu. Je charakterizována časem T_2 . Krátké časy T_2 mají za důsledek rozšiřování signálů v NMR spektru. Úbytek magnetizace v rovině xy probíhá dle rovnice

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}}, \quad (11)$$

kde M_{xy} je velikost magnetizace v rovině xy a M_0 je velikost magnetizace v rovině xy po

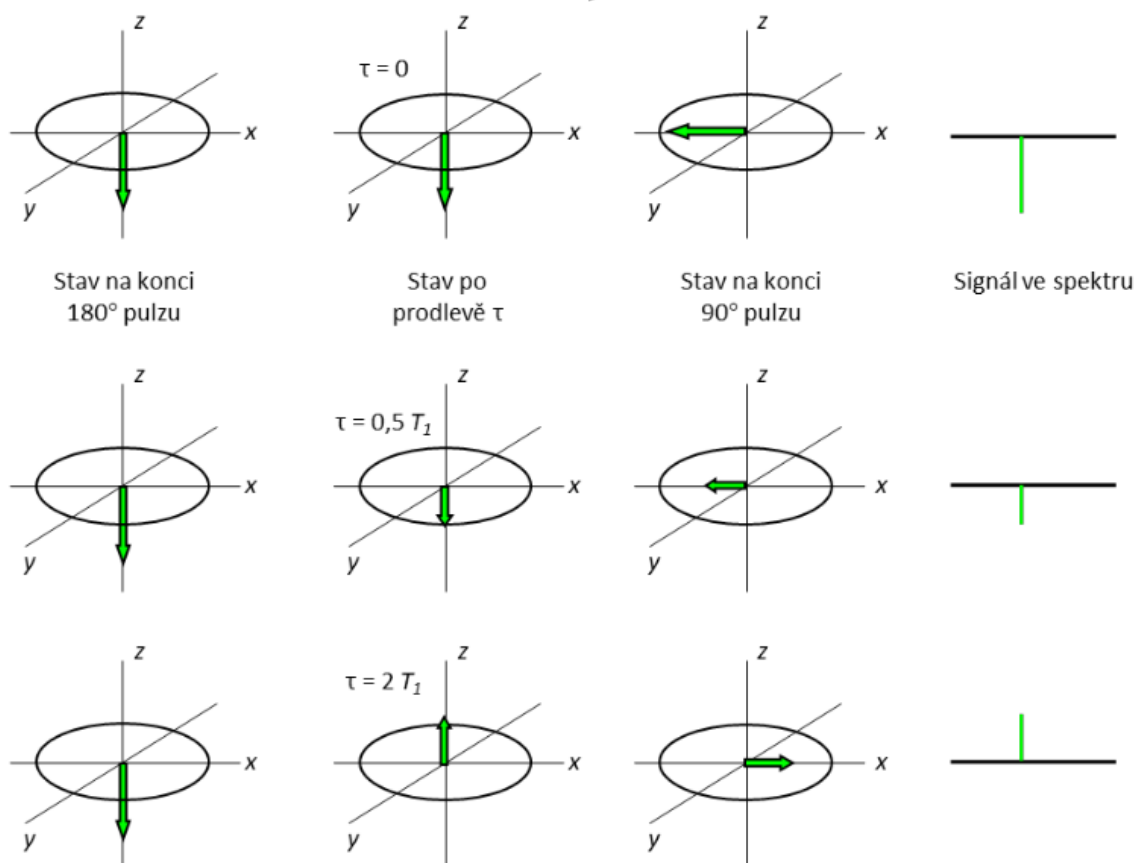
excitačním pulzu.^{1,4}

Pro relaxační časy platí nerovnost

$$T_1 \geq T_2. \quad (12)$$

1.1.3 Měření relaxačního času T_1

Relaxační čas T_1 se měří pulzní sekvencí zvanou „inversion recovery“. Sekvence začíná 180° pulzem, který otočí vektor magnetizace o 180° . Jelikož je vektor stále ve směru osy z , tak v rovině xy neměříme žádný signál. Po době τ je aplikován 90° pulz, který vychýlí relaxující vektor magnetizace do roviny xy a snímá se FID, ze kterého Fourierovou transformací získáme signál, jehož intenzita je závislá na relaxačním čase T_1 a na době τ , kterou můžeme měnit. Hodnota T_1 se získá proložení získané exponenciální závislosti intenzit signálů na délce doby τ .³



Obrázek 1: Sekvence inversion recovery¹

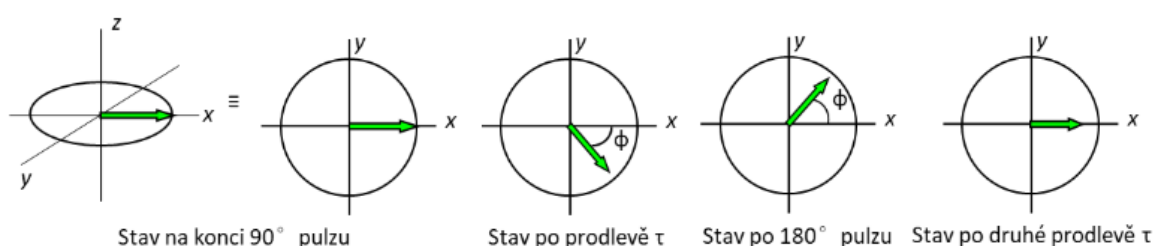
1.1.4 Měření relaxačního času T_2

Relaxační čas T_2 se měří pulzní sekvencí zvanou spinové echo. Sekvence začíná 90°

pulzem, kterým se vychýlí vektor magnetizace do roviny xy (konkrétně do osy x). Během doby τ vykonává magnetizace precesní pohyb s Larmorovou frekvencí. Za tuto dobu se vektor otočí o úhel ϕ . Poté následuje 180° pulz v podél osy x , který otočí vektor magnetizace na kolem osy x . Po stejné době τ se vektor magnetizace otočí o stejný úhel ϕ zpět do osy x . Tentokrát má však menší intenzitu kvůli příčné relaxaci, která během pulzní sekvence probíhá.¹ Exponenciální pokles intenzity signálu se používá pro stanovení relaxačního času T_2

$$M_e \approx e^{-\frac{\tau}{T_2}}, \quad (13)$$

kde M_e je intenzita signálu.³



Obrázek 2: Sekvence spinového echa¹

1.2 MRI

Kromě běžné laboratorní praxe nalézá nukleární magnetická rezonance velmi široké uplatnění v medicíně jako neinvazivní zobrazovací metoda pro studium a diagnostiku vnitřních tkání. Využívá se při tom skutečnosti, že lidské tělo je zhruba ze 70 % tvořeno vodou a lze tedy s výhodou měřit jádra ^1H .

1.2.1 Historie MRI

Poprvé se myšlenka o využití principů NMR v medicíně objevila, když R. Damadian demonstroval rozdílné relaxační časy T_1 a T_2 u zdravých a rakovinných tkání. Ukázal tak možnost diagnostiky rakoviny pomocí této techniky.

V následujících letech přišli P. C. Lauterbur (1972) a W. Hinshaw (1974) s technikami, které umožňovaly měření dvourozměrných obrazů. Jejich techniky však obraz získávaly pouze v přímkách a bylo tedy nutné proces několikrát opakovat, abychom získali příslušný obraz celé tkáně, což bylo časově velmi náročné. Postupem času se přešlo na využití širokopásmových radiofrekvenčních pulzů a Fourierovy transformace (FT). Metodou FT byl

zvýšen poměr signálu k šumu až 100x a zároveň bylo možné naměřit celý obraz najednou, čímž byl výrazně zkrácen čas potřebný k měření.⁵

1.2.2 Kontrastní látky a jejich role v MRI

Při měření MRI obrazu závisí chování vody na její koncentraci, pH, teplotě a přítomnosti jiných látek.⁶ To vede k rozdílným intenzitám signálů a výsledný MRI obraz je pak tvořen různými odstíny šedi (Obrázek 3). Přítomnost paramagnetických látek v tkáni (např. komplexů kovů) způsobuje výrazné zkrácení relaxačních časů molekul vody. Látkám ovlivňující relaxační časy říkáme kontrastní látky a

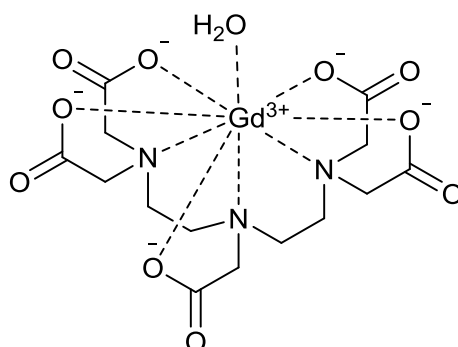


Obrázek 3: MRI obraz hlavy (mediální řez)³³

dělí se do dvou hlavních skupin podle toho, jestli primárně ovlivňují relaxační čas T_1 nebo T_2 . Látky zkracující čas T_1 vytváří pozitivní kontrast, tj. zvyšují intenzitu signálu jádra ^1H , což se projeví zesvětlením získaného obrazu. Kontrastní látky zkracující čas T_2 naopak způsobují kontrast negativní, tj. zeslabují intenzitu ^1H signálu, což způsobuje ztmavnutí výsledného obrazu.⁷ Jelikož nemocná tkáň (např.: rakovinná) má obecně rychlejší metabolismus, tak se v nich kontrastní látka často hromadí více než v tkáni zdravé. Díky tomu získáme v daném místě mnohem vyšší kontrast v porovnání s okolní tkání.⁸

Jedním z nejpoužívanějších iontů pro T_1 kontrastní látky je Gd^{3+} , které má ve svých f-orbitalech symetricky rozložených 7 nespárovaných elektronů. Díky tomu vytváří velký magnetický moment a zároveň má i vhodný elektronický relaxační čas. Volné ionty gadolinia (a dalších kovů) jsou velmi toxické a v těle se hromadí např. v kostech a játrech. Z tohoto důvodu je nutné používat kontrastní látky v podobě komplexů, které mají dostatečně vysokou termodynamickou stabilitu a jsou kineticky inertní.⁸ Jednou z prvních moderních kontrastních látek byl komplex Gd^{3+} s DTPA (kyselina

diethylentriaminpentaoctová) známý pod názvem Magnevist(Obrázek 4).⁶



Obrázek 4: Gd-DTPA (Magnevist)

Jako T_2 kontrastní látky se používají nejčastěji nanočástice oxidů železa, které jsou pokryté vrstvičkou siloxanů, aby nedocházelo k jejich shlukování.⁸

1.2.3 ^{19}F -MRI

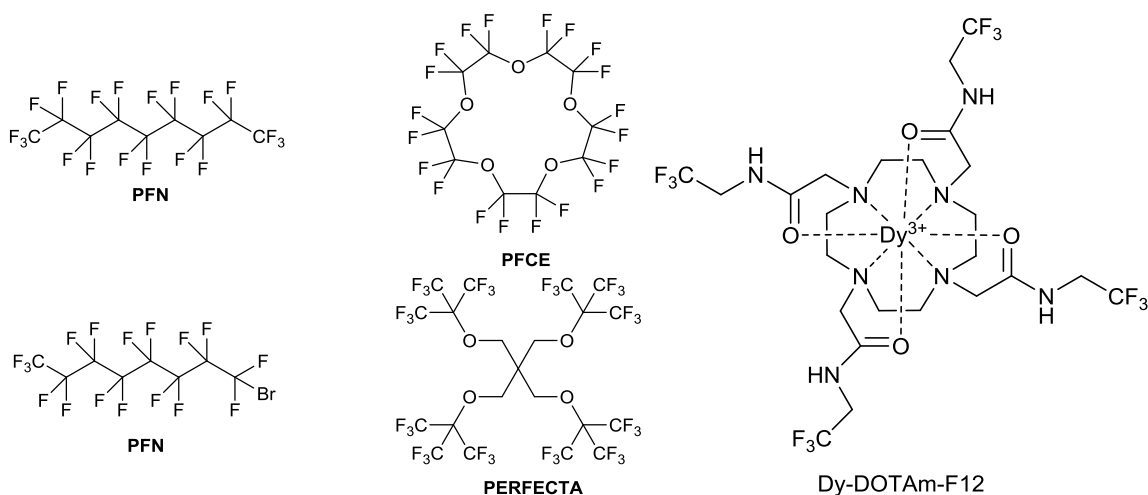
Studium a vývoj kontrastních látek výrazně zlepšil kvalitu a rychlost měření MRI obrazů. Nicméně je často nutné u měření jader ^1H měřit obraz před a po podání kontrastní látky, což prodlužuje měřicí čas. Zároveň je komplikací výrazné pozadí tvořené vodou v okolních tkáních. Další problém je nutnost použití relativně vysokých koncentrací, která může vést k problémům s toxicitou.⁹

Z tohoto důvodu jsou studovány i další techniky MRI. Jednou z nich je tzv. „hot spot imaging“, který je založen na měření NMR aktivních heteroatomů jako např. ^{19}F a ^{31}P . Základním principem této metody je současné měření ^1H obrazu a obrazu heteroatomu a jejich následné přeložení přes sebe (Obrázek 5).



Obrázek 5: Hot spot imaging s fluorovým heteroatomem³⁴

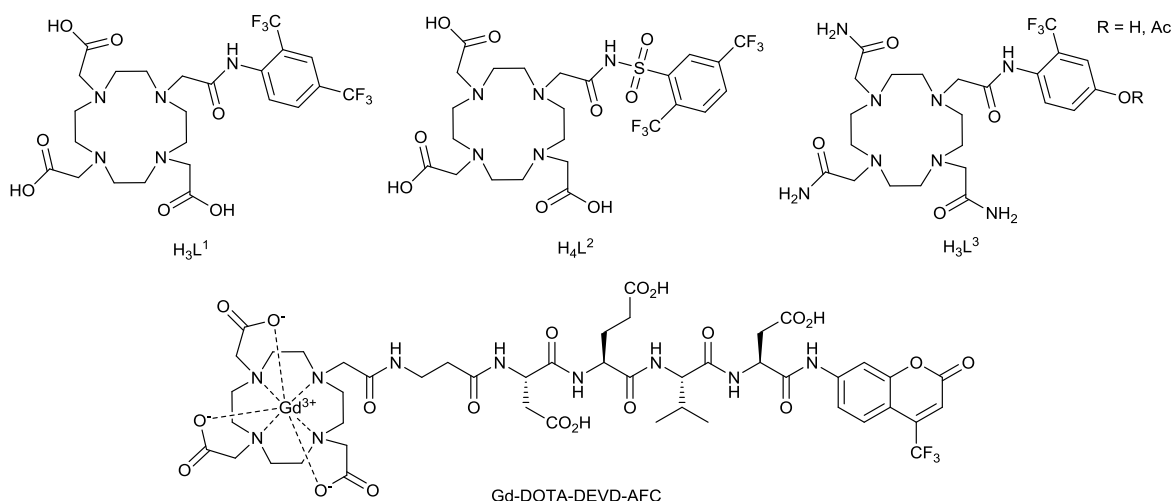
S velkou výhodou lze měřit právě jádra ^{19}F , která mají 100% izotopové zastoupení a zároveň rezonanční frekvenci velmi blízkou jádru ^1H , takže je lze měřit na běžných MRI přístrojích bez větších změn v jejich hardwaru. Další výhodou je nulové pozadí, protože v těle se fluor nachází pouze ve stopovém množství a navíc v pevné fázi (v kostech), což má za následek krátký relaxační čas T_2 a prakticky nulový signál. Pomocí MRI přístroje tedy vidíme jen signál použité kontrastní látky.⁹ Výhodou jádra ^{19}F je, že oproti jádru ^1H má fluor zhruba 83% citlivost, což je po jádru ^1H druhá největší citlivost z měřitelných jader, a proto je možné použít látky s relativně nízkým počtem ekvivalentních heteroatomů, a zároveň není nutné použití vysokých koncentrací kontrastních látek (Obrázek 6).¹⁰ Nevýhodou je však dlouhý relaxační čas T_1 . Jeho snížení lze dosáhnout přítomností paramagnetických jader (např. v komplexu), která mohou snížit tento čas z 1 s až na zhruba 10 ms.¹⁰ Použitím polyfluorovaných komplexů s paramagnetickými ionty kovů lze rovněž snížit koncentraci kontrastní látky potřebnou pro provedení měření. U komplexu s ionty lanthanoidů bylo pozorováno snížení z desítek mM až na desítky μM .¹¹ Pro optimální snížení relaxačních časů je nutné designovat molekuly, kde se jádro ^{19}F nachází ve vzdálenosti 4,5–7 Å od paramagnetického iontu. Pokud se nachází příliš daleko, pak je změna T_1 téměř zanedbatelná. Naopak pokud je příliš blízko, pak dochází k výraznému rozšiřování signálů.^{9,12}



Obrázek 6: Příklady fluorovaných kontrastních látek^{9,13}

Důležitá je i molekulová hmotnost použitých kontrastních látek. Nižší molekulová hmotnost často vede k rychlému vylučování z těla, a tedy k rychlému snižování intenzity signálu během měření. Proto je nutné designovat látky s vhodnou molekulovou hmotností a krátkými relaxačními časy.⁹ Obrázek 7 ukazuje struktury ligandů se střední až vyšší

molekulovou hmotností, jejichž studie byly v poslední době publikovány.



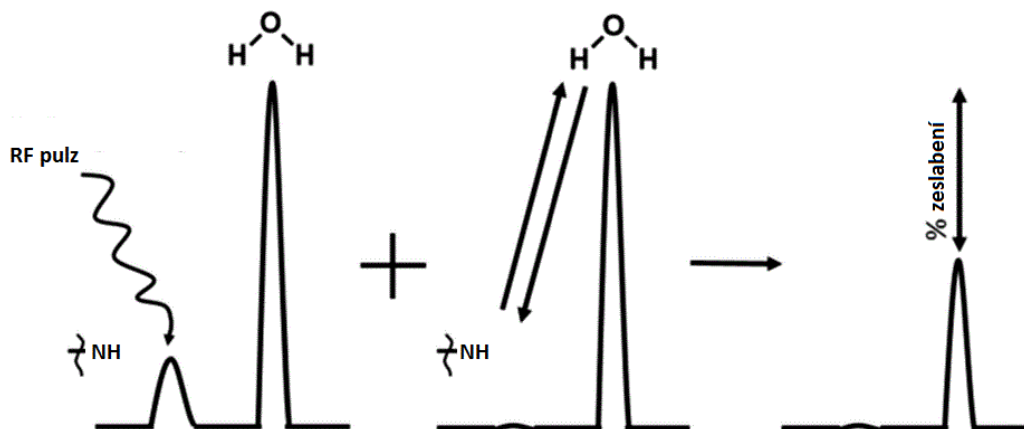
Obrázek 7: Struktury studovaných ligandů^{14,15}

1.2 CEST efekt

Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) neboli přenos saturace chemickou výměnou je efekt způsobující pokles signálu v 1H NMR spektru, resp. negativní kontrast v MRI. V principu se jedná o výměnu protonů vody za vyměnitelné protony funkčních skupin kontrastní látky (např.: $-OH$, $-NH_2$, $-NH-$).

1.3.1 Mechanismus CEST

Vyměnitelné protony kontrastní látky a protony molekuly vody rezonují každý při jiné rezonanční frekvenci. Tento fakt nám umožňuje selektivně saturovat protony kontrastní látky pomocí RF pulzu s danou frekvencí. Takto saturované protony se pak vyměňují s protony okolní vody, čímž klesá intenzita jejího signálu, tj. vzniká negativní kontrast (Obrázek 8).¹⁶ Výhodou CEST efektu je, že tento negativní kontrast lze dle potřeby



Obrázek 8: Mechanismus CEST efektu

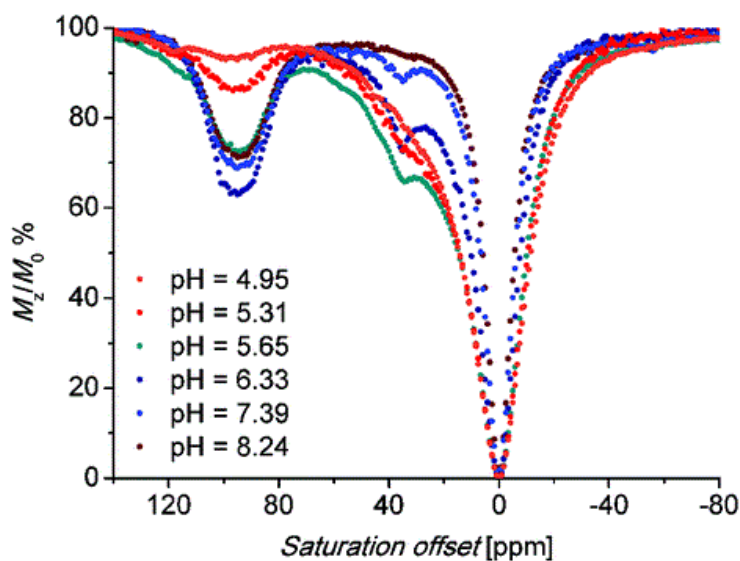
„vypnout“ a „zapnout“. Oproti klasickým kontrastním látkám ovlivňujícím relaxační časy T_1 a T_2 je měření kontrastu CEST rychlejší a nevyžaduje měření před a po injekci kontrastní látky.^{17,18} Zároveň je možné měření s více CEST kontrastními látkami nezávisle na sobě pouhou změnou saturačního RF pulzu.^{18,19}

Látky s potenciálem pro využití pro metodu CEST musí splňovat určité podmínky, aby byl kontrast dostatečně viditelný:

- rychlost relaxace T_1 saturevaného signálu musí být menší než rychlost chemické výměny
- rychlost chemické výměny musí být pomalejší než rozdíl rezonančních frekvencí vody a CEST kontrastní látky.

Splnění těchto podmínek a dostatečně dlouhá doba saturace (\sim s) vede ke značnému zesílení negativního kontrastu CEST i při malých koncentracích kontrastní látky. Důvodem zesílení je výměna saturevaného protonu kontrastní látky za nesaturevaný proton vody, který se následně saturuje a opět vyměňuje. V případě nesplnění uvedených podmínek by došlo k relaxaci saturevaných protonů ještě před jejich výměnou, nebo by došlo ke koalescenci signálu vody a kontrastní látky.^{16,18,19}

Experimenty CEST jsou běžně prezentovány jako Z-spektrum (Obrázek 9), které popisuje relativní intenzitu signálu vody v NMR spektru v závislosti na frekvenci saturačního RF pulzu. Intenzivnímu píku v Z-spektru, který odpovídá saturaci signálu vody, je přiřazena hodnota chemického posunu $\delta_v = 0$ ppm. Ostatní píky pak reprezentují CEST efekt způsobený vyměnitelnými protony.

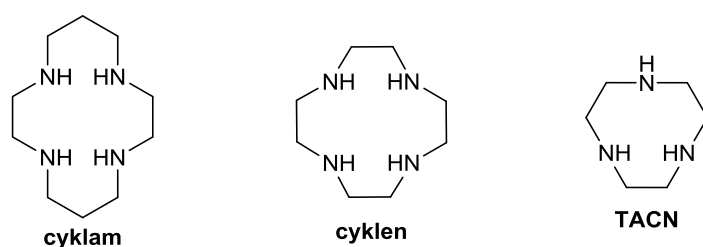


Obrázek 9: Příklad Z-spektra při různých pH²³

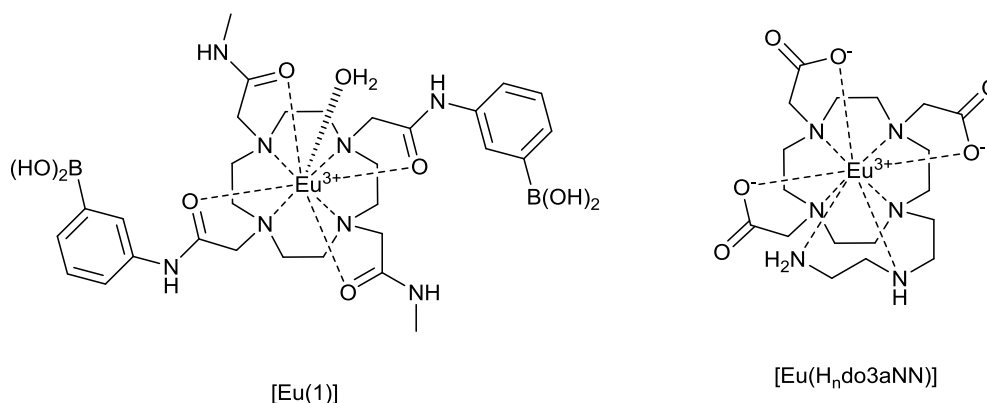
1.3.2 PARACEST

Běžné diamagnetické látky používané při CEST mají relativní chemický posun oproti molekule vody okolo 1-4 ppm. Díky tomu je selektivní saturace obtížnější, protože můžeme RF pulzem ovlivnit i signál vody.¹⁹ Z tohoto důvodu jsou studovány kontrastní látky obsahující paramagnetické ionty různých kovů. Nejčastěji se používají ionty lanthanoidů (např. Dy^{3+} , Eu^{3+})¹⁸ nebo přechodných kovů (např. Fe^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+}).²⁰ Přítomnost paramagnetického iontu způsobí velký posun signálu kontrastní látky řádově o desítky ppm, což značně rozšiřuje možnosti designu nových kontrastních látek^{19,21} a zároveň činí přenos saturace přibližně 10-krát účinnější a je tak snížena potřebná koncentrace kontrastní látky.¹⁸

Jako nejvhodnější kontrastní látky se ukázaly být komplexy s deriváty makrocyklů 1,4,7-triacyklononanu (TACN), 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu (cyklen) a 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanu (cyklam), viz Obrázek 10, jejichž komplexy se vyznačují vysokou termodynamickou stabilitou i kinetickou inertností, a tak neuvolňují toxické ionty kovů v přítomnosti jiných ligandů nebo konkurenčních iontů kovů.²⁰ Příklady CEST kontrastních látek ukazuje Obrázek 11.



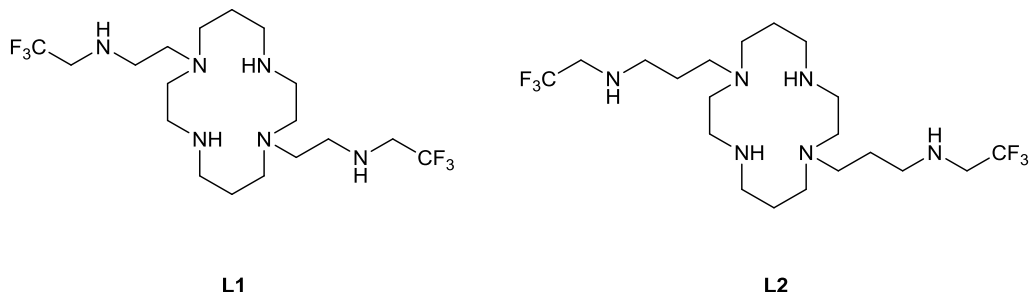
Obrázek 10: Makrocykly



Obrázek 11: Příklady CEST kontrastních látek^{22,23}

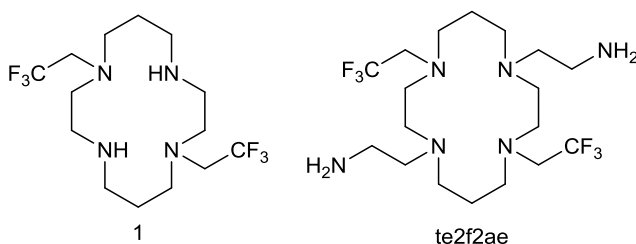
1.4 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je příprava ligandů **L1** a **L2** (Obrázek 12), ke kterým byla nalezena syntetická cesta v předchozí práci,²⁴ ve větší škále, jejich komplexace a následné studium vlastností připravených komplexů.



Obrázek 12: Studované ligandy

U komplexů se předpokládá vysoká termodynamická stabilita a kinetická inertnost vlivem makrocyclického efektu. Studovány budou především komplexy s ionty Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} a Zn^{2+} . Dále nás pak zajímá vliv těchto iontů na relaxační čas T_1 fluorových jader. Vliv Ni^{2+} iontů na relaxační čas jader ^{19}F byl již dříve pozorován u ligandů s podobnou strukturou (Obrázek 13),^{25,26} lze tedy alespoň v těchto případech očekávat podobné výsledky.



Obrázek 13: Podobné ligandy

Dále pak bude zjišťována případná přítomnost CEST efektu, který byl u komplexů přechodných kovů pozorován například u komplexovaných amidů.²⁷ Přítomnost trifluorethylové skupiny u ligandů **L1** a **L2** by mohla vést k dostatečné labilizaci M-N vazby, aby byl CEST efekt pozorovatelný i u koordinovaného sekundárního aminu.

2 Experimentální část

2.1 Metody charakterizace

2.1.1 NMR spektroskopie

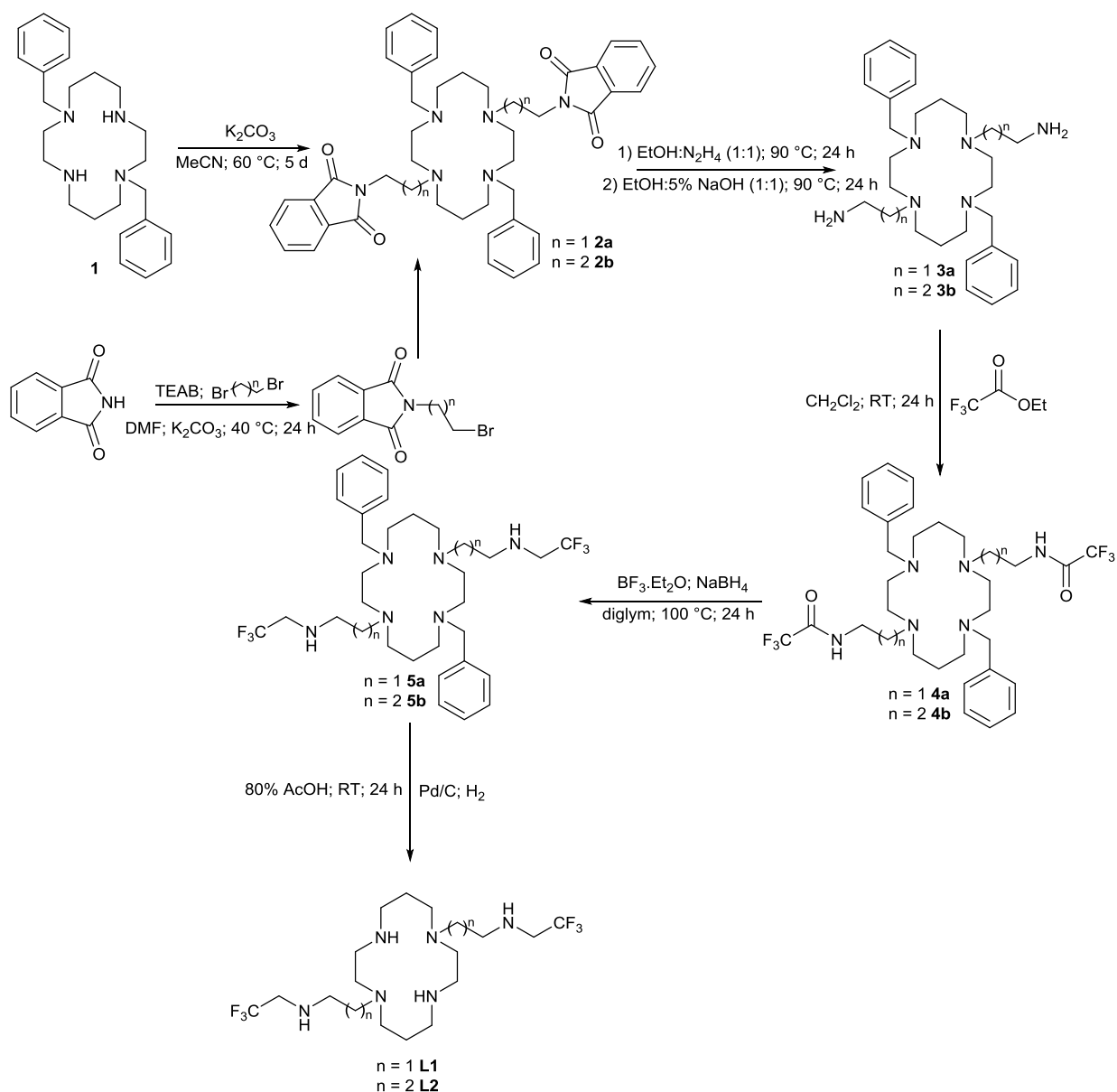
Spektra jader ^1H a ^{19}F byla měřena na spektrometrech VNMR300 a Varian^{UNITY} INOVA 400, pH u NMR titrací bylo měřeno pomocí pH metru Jenway 3505 s elektrodou H-PH 1 (Hamilton). Použitá rozpouštědla a rezonanční frekvence jsou uvedeny u příslušných látek. Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm zaokrouhlených na dvě desetinná místa. Měření relaxací a CEST efektu prováděl Mgr. Filip Koucký.

2.1.2 Potenciometrické titrace

K měření protonizačních konstant a konstant stability byl použit pH-meter pHM240 (Radiometer Analytical), kombinovaná elektroda GK2401 B a automatická byreta ABU 901 (Radiometer Analytical). Získaná data byla zpracována programem OPIUM²⁸ a zpracování prováděla RNDr. Jana Havlíčková a doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

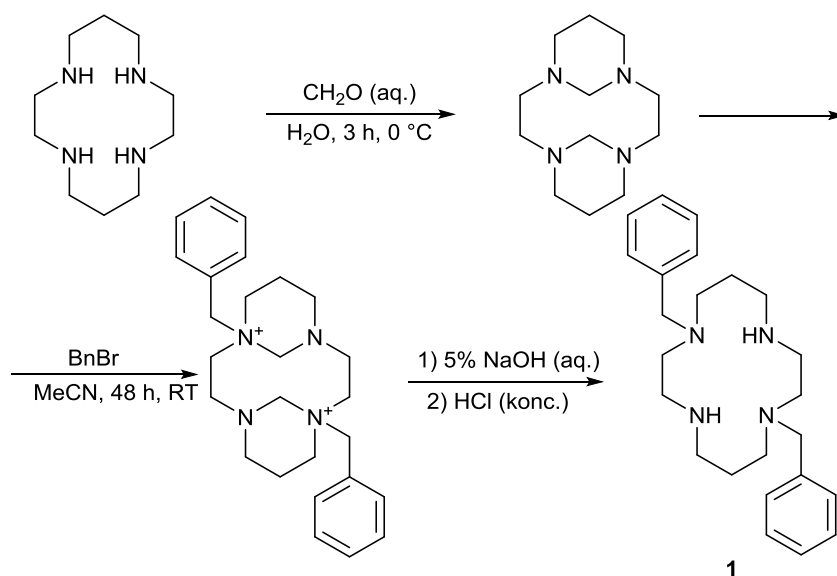
2.2 Syntéza ligandů

Syntéza výchozího 1,8-dibenzyl cyklamu a alkylačních činidel *N*-(2-bromomethyl)ftalimidu a *N*-(2-bromopropyl)ftalimidu byla provedena dle literatury.^{29,30} Následná syntéza ligandů **L1** a **L2** probíhala dle postupu nalezeného v předchozí práci.²⁴ Reakční schéma ukazuje Obrázek 14.



Obrázek 14: Schéma syntézy ligandů **L1** a **L2**

2.2.1 Syntéza 1,8-dibenzylcyklamu (1)³⁰

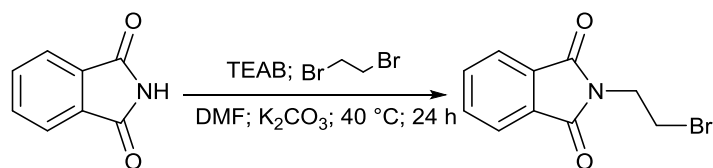


Do 1000ml baňky bylo naváženo 9,99 g cyklamů. Poté bylo přidáno 600 ml destilované vody a baňka byla vložena do ledové lázně (voda, led, NaCl). Do roztoku bylo přidáno 10 ml 35% roztoku formaldehydu. Reakční směs byla míchána po dobu 2 hodin. Vzniklá sraženina byla odfiltrována za sníženého tlaku na fritě S4 a promyta vodou. Sraženina byla převedena do 250 ml baňky opatřené chlorkalciovou sušicí trubičkou a byla sušena v při $120\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 4 hodin.

Bylo získáno 10,1 g bis(aminalu), který byl rozpustěn ve 200 ml bezvodého ACN. Do roztoku bylo přidáno 14 ml benzylbromidu (BnBr) a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě ve vodní lázni po dobu 2 dní. Vzniklá sraženina byla odsáta na fritě S4 a promyta acetonem. Poté byla rozptýlena v 500 ml 5% NaOH a extrahována CH_2Cl_2 (4x100ml). Organická fáze byla vysušena pomocí Na_2SO_4 a odpařena na rotační vakuové odparce (RVO). Získaný olej byl srážen koncentrovanou HCl .

Bylo připraveno 17,01 g látky ve formě $1 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \cdot 4\text{HCl}$ (56 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.³⁰

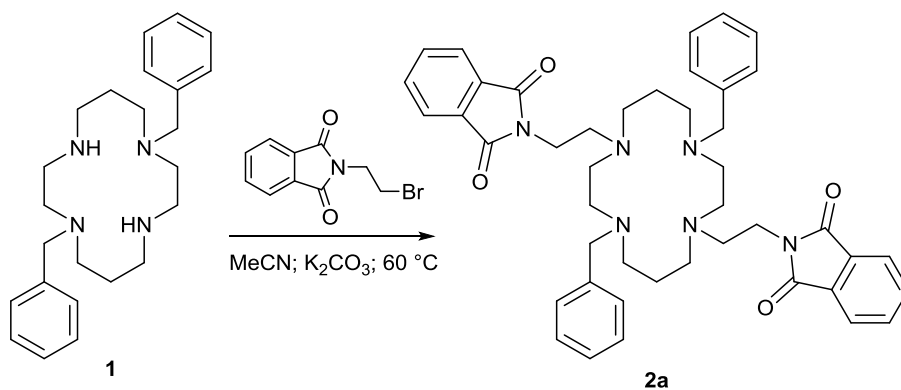
2.2.2 Syntéza *N*-(2-bromethyl)ftalimidu²⁹



Do 100ml baňky bylo naváženo 1,04 g TEAB a 10,0 g K₂CO₃. Dále bylo přidáno 30 ml bezvodého DMF a 30 ml (4 ekv.) 1,2-dibromethanu. Za míchání bylo do reakční směsi pomalu přisypáno 6,05 g ftalimidu. Směs byla míchána při 40 °C na olejové lázni po dobu 24 hodin.

Reakční směs byla odsáta na fritě S3. Filtrát byl zalit přibližně 100 ml destilované vody a byl extrahován CH₂Cl₂ (4x25 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena. K olejovitému odparku, obsahující zbytky DMF, bylo přidáno několik ml EtOH pro vyvolání krystalizace produktu. Bylo získáno 9,02 g produktu (86 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁹

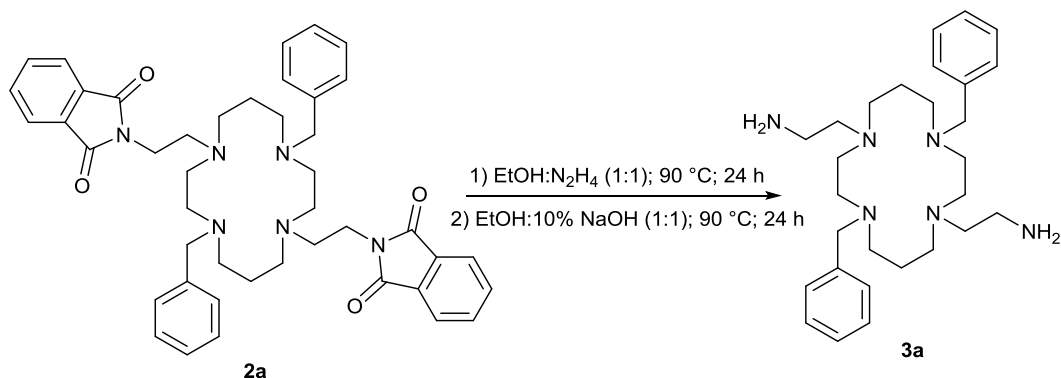
2.2.3 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(2-ftalimidoethyl)cyklamu (2a)



Ve 250ml kádince bylo rozpuštěno 4,02 g látky 1·4H₂O·4HCl ve 200 ml 5% NaOH. Roztok byl převeden do 500ml dělicí nálevky a extrahován CH₂Cl₂ (8x15 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 60 ml bezvodého ACN. Do roztoku bylo přidáno 7,42 g K₂CO₃ (8 ekv.) a 5,91 g *N*-(2-bromethyl)ftalimidu (1,1 ekv.). Baňka byla opatřena chlorkalciovou sušicí trubičkou a míchána na olejové lázni při 60 °C po dobu dvou dní. Poté bylo ke směsi přidáno 0,5 g K₂CO₃ a 0,2 g *N*-(2-bromethyl)ftalimidu. Tento přídavek byl proveden celkem 3x vždy po 24 hodinách. Poté se

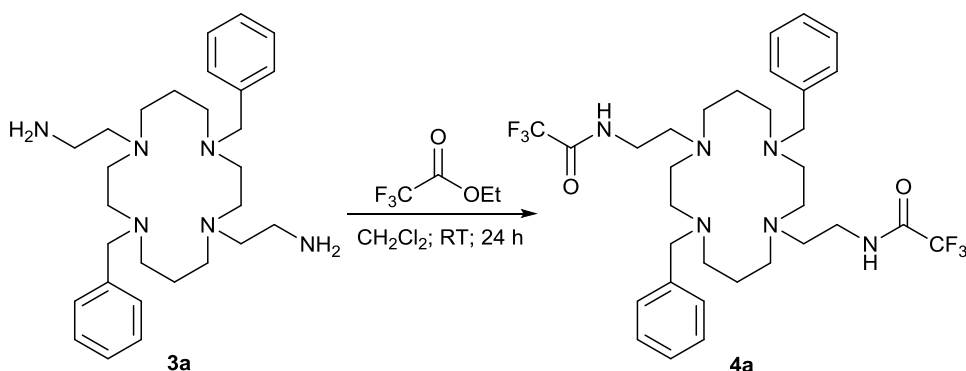
v reakční směsi začal vylučovat hnědý prášek. Směs byla odsáta na fritě S4 a promyta CH_2Cl_2 . Jímaný filtrát byl odpařen na RVO. Získaný olej byl přečištěn rekrystalizací z horkého EtOH. Bylo získáno 2,21 g produktu ve formě světle hnědého prášku (45 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

2.2.4 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(2-aminoethyl)cyklamů (3a)



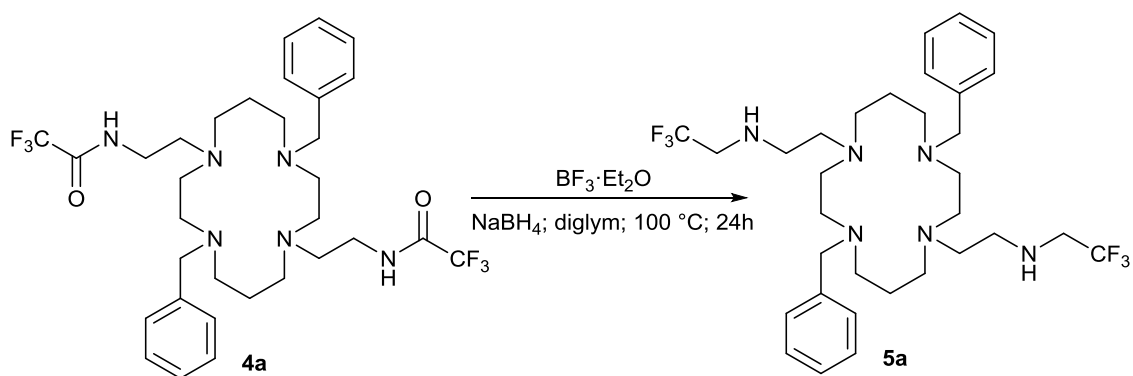
Do 250 ml baňky bylo naváženo 2,15 g látky **2a**, která byla následně rozpuštěna ve 140 ml EtOH:N₂H₄·H₂O (1:1). Baňka byla opatřena zpětným chladičem, míchána a zahřívána k varu na olejové lázni po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs odpařena na RVO a získaný odparek byl rozpuštěn ve 160 ml EtOH:5% NaOH (1:1). Reakční směs byla opět míchána na olejové lázni při 90 °C po dobu 24 hodin. Reakční směs byla následně odpařena na RVO, odparek byl rozpuštěn ve 150 ml 5% NaOH a extrahován CH_2Cl_2 (10x20 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Bylo získáno 1,2 g produktu ve formě žlutého oleje (87 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

2.2.5 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(*N*-trifluoracetyl-2-aminoethyl)cyklamu (4a)



Ve 250ml baňce bylo rozpuštěno 1,2 g latky **3a** v 85 ml bezvodého CH₂Cl₂. Poté bylo přidáno 1,9 ml CF₃COOEt (3 ekv.). Baňka byla opatřena chlorkalciovou sušící trubičkou a míchána za laboratorní teploty ve vodní lázni po dobu 24 hodin. Reakční směs byla následně odpařena na RVO. Bylo získáno 1,45 g produktu ve formě žlutého oleje (86 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

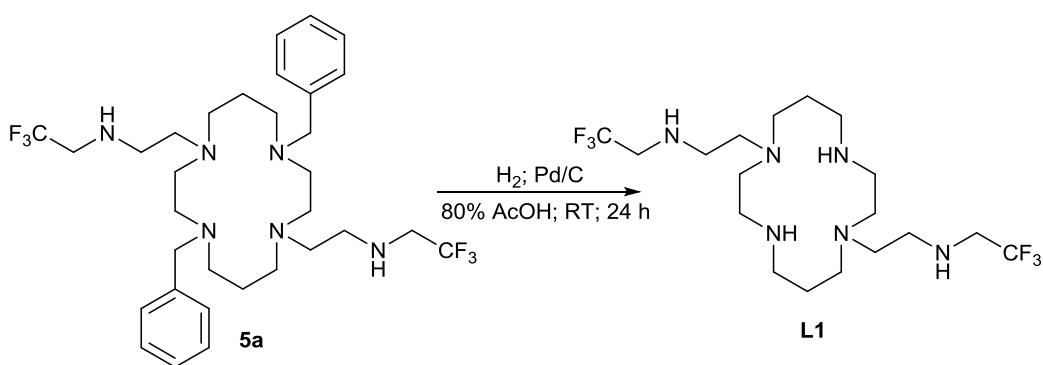
2.2.6 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(*N*-trifluorethyl-2-aminoethyl)cyklamu (5a)



Do 3-hrdlé 500ml baňky bylo naváženo 6,23 g NaBH₄ (15 ekv.). Baňka byla opatřena zpětným chladičem s bublačkou, přikapávačkou se septem, míchadlem a přívodem argonu. Aparatura byla 3x sekurována argonem. V 50 ml bezvodého diglymu bylo rozpuštěno 3,6 g

látky **4a**. Roztok byl přes septum převeden do aparatury. Dále bylo přes septum přidáno dalších 120 ml diglymu. Do přikapávačky byla připravena směs tvořená 60 ml diglymu a 6 ml $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (4,5 ekv). Za bublačku byla připojena promývačka s 200 ml 5% $\text{NaOH}:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1). Pod stálým proudem argonu byla do reakční směsi pomalu přikapána směs z přikapávačky (zhruba 1 kapka/s). Po přikapání byla aparatura ponořena do olejové lázně a zahřívána na 100 °C. Směs byla míchána po dobu 24 hodin. Poté byla aparatura ponechána vytemperovat na laboratorní teplotu. Přes septum byla opatrně přikapána $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) dokud směs nepřestala silně pění po přidavku kyseliny. Vyloučená sůl byla odsáta na fritě S4 a filtrát byl odpařen pod vysokým vakuem tvořeným dvěma sériově zapojenými membránovými pumpami při 80 °C. Odparek a dříve odfiltrovaná sůl byly rozpuštěny v 500 ml 5% NaOH a extrahovány CH_2Cl_2 (10x25 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 a odpařena. Bylo získáno 1,1 g produktu ve formě oleje (32 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

2.2.7 Syntéza ligandu L1



Ve 250ml baňce bylo rozpuštěno 1,05 g látky **5a** ve 180 ml 80% AcOH . Roztok byl následně převeden do autoklávu s míchadlem. Do roztoku bylo přidáno 118 mg Pd/C jako katalyzátoru. Autokláv byl uzavřen a evakuován. Do aparatury byl zaveden plynný H_2 pod tlakem přibližně 7 atmosfér. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 4 dní. Poté byl katalyzátor odfiltrován na fritě S4 a promyt destilovanou vodou. Jímaný filtrát byl odpařen na RVO do sucha a následně ještě 2x s $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Bylo získáno 0,95 g hydrochloridu ligandu **L1** ve formě bílého prášku (85 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

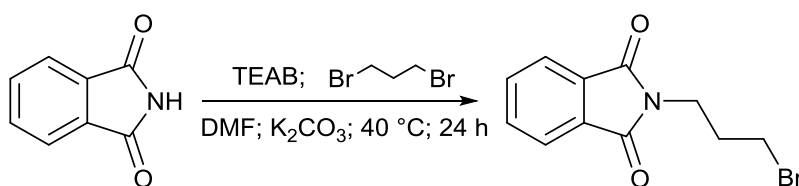
NMR charakterizace:

^1H (300 MHz, D_2O , pD = 1,46): δ 2,02 (4H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2,80; 2,94; 3,01; 3,23; 3,35; 3,43 (28H, m, CH_2); 4,05 (4H, q, $^3J = 8,7$ Hz, CH_2CF_3)

^{19}F (282 MHz, D_2O , pD = 1,46): δ -65,99 (6F, t, $^3J = 8,8$ Hz, CF_3)

^{13}C (100 MHz, D_2O , pD = 1,46): δ 23,34 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 43,81; 44,68; 47,14; 47,26; 50,38 (12C, CH_2); 48,28 (2C, q, $^3J = 35,0$ Hz CF_3CH_2); 122,84 (2C, q, $^3J = 277,4$ Hz CF_3)

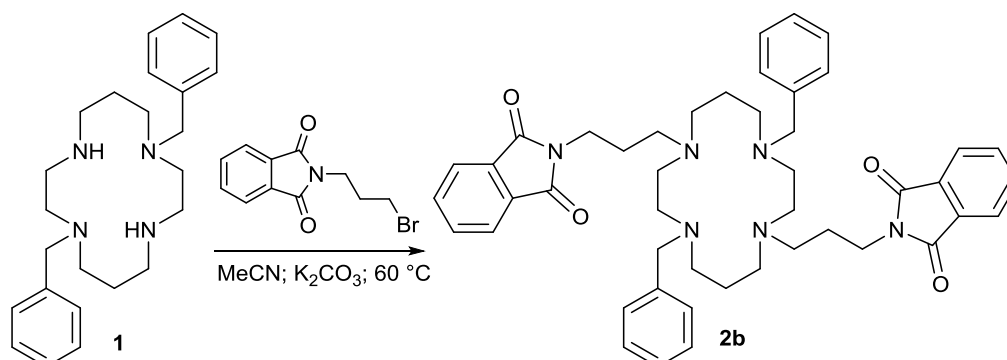
2.2.8 Syntéza *N*-(3-brompropyl)ftalimidu



Do 100ml baňky bylo naváženo 1,15 g TEAB a 9,86 g K_2CO_3 . Poté bylo do baňky přidáno 25 ml bezvodého DMF a 15 ml 1,3-dibromopropanu (4 ekv.). Za míchání bylo do směsi pomalu přisypáno 5,08 g ftalimidu. Reakční směs byla míchána na olejové lázni při $40\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin.

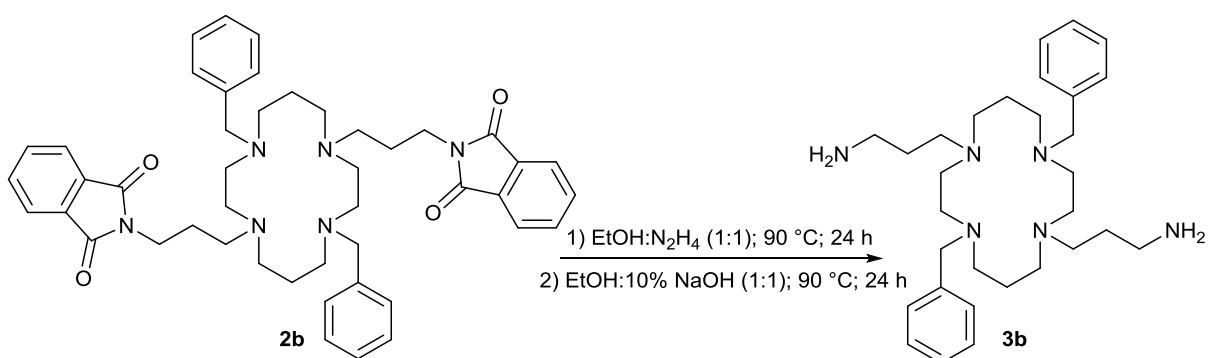
Reakční směs byla odsáta na fritě S3. Poté byl filtrát zalit přibližně 120 ml destilované vody a extrahován CH_2Cl_2 (4x25 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 a odpařena na RVO. K olejovitému odparku bylo přidáno několik ml EtOH pro vyvolání krystalizace produktu. Bylo získáno 8,39 g produktu (91 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

2.2.9 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(3-ftalimidopropyl)cyklamu (2b)



Ve 250ml kádince bylo rozpuštěno 3,98 g látky $1 \cdot 4H_2O \cdot 4HCl$ ve 200 ml 5% NaOH. Roztok byl extrahován CH_2Cl_2 (8x20 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn ve 200 ml bezvodého ACN. Do roztoku bylo přidáno 6,29 g K_2CO_3 (8 ekv.) a 4,71 g *N*-brompropylftalimidu (1,1 ekv.). Baňka byla opatřena chlorkalciovou sušící trubičkou a byla ponechána míchat na olejové lázni při $60\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 dní. Následně byla směs odsáta na fritě S4 a promyta ACN. Jímaný filtrát byl odpařen na RVO. Získaný olej byl přečištěn rekrystalizací z horkého EtOH. Bylo připraveno 4,21 g produktu (84 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

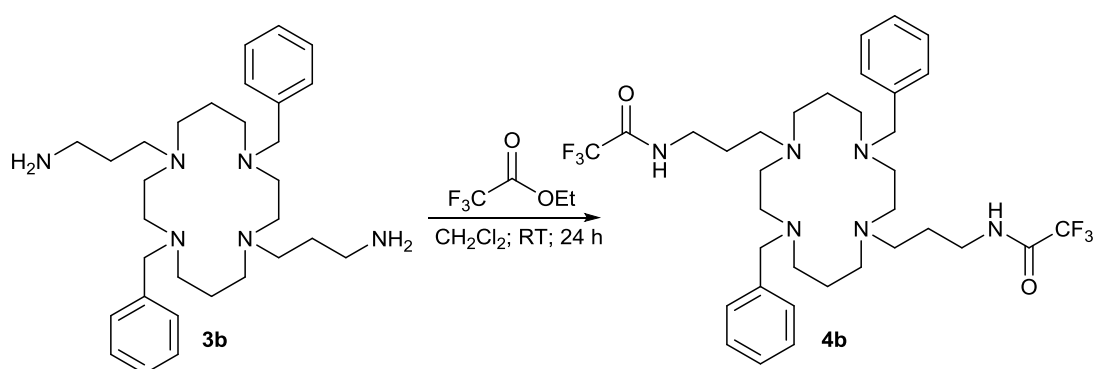
2.2.10 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(3-aminopropyl)cyklamu (3b)



Do 500ml baňky bylo naváženo 4,05 g látky **2b**, která byla následně rozpuštěna ve 300 ml $EtOH:N_2H_4 \cdot H_2O$ (1:1). Baňka byla opatřena zpětným chladičem a míchána na

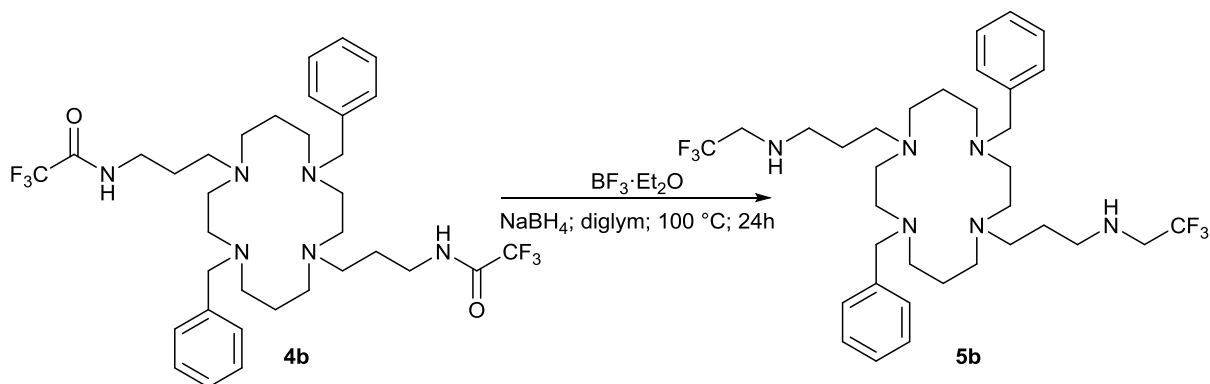
olejové lázni při 90 °C po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs odpařena a odparek byl rozpuštěn ve 300 ml EtOH:5% NaOH (1:1). Směs byla opět míchána na olejové lázni při 90 °C po dobu 24 hodin. Následně byla reakční směs odpařena, odparek byl rozpuštěn ve 170 ml 5% NaOH a extrahován CH₂Cl₂ (10x20 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena na RVO. Bylo získáno 2,6 g produktu ve formě žlutého oleje (98 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

2.2.11 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(*N*-trifluoracetyl-3-aminopropyl)cyklamu (4b)



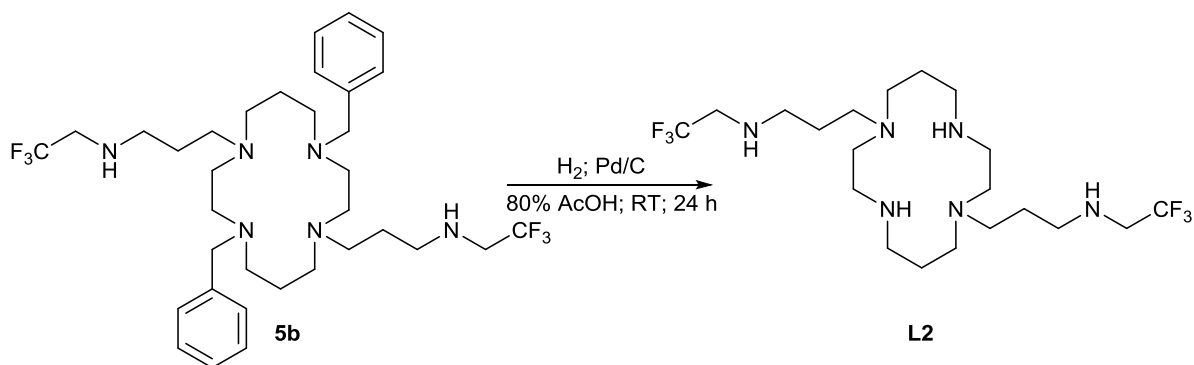
Do 250ml baňky bylo naváženo 2,50 g látky **3b**, která byla následně rozpuštěna ve 100 ml bezvodého CH₂Cl₂. Do roztoku byly přidány 4 ml CF₃COOEt (3ekv.). Baňka byla opatřena chlorkalciovou sušící trubičkou a míchána ve vodní lázni za laboratorní teploty po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs odpařena a bylo získáno 3,41 g produktu ve formě žlutého oleje (98 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

2.2.12 Syntéza 1,8-dibenzyl-4,11-bis(*N*-trifluorethyl-3-aminopropyl)cyklamů (5b)



Do 500ml 3-hrdlé baňky bylo naváženo 5,43 g NaBH_4 (15 ekv.). Baňka byla opatřena zpětným chladičem s bublačkou, přikapávačkou se septem, míchadlem a přívodem argonu. Aparatura byla 3x sekurována argonem. V 50 ml bezvodého diglymu bylo rozpuštěno 3,35 g látky **4b**. Roztok byl přes septum převeden do aparatury. Poté bylo přes septum přidáno dalších 120 ml diglymu. Do přikapávačky byla připravena směs tvořená 60 ml diglymu a 5,5 ml $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (4,5 ekv.). Za bublačku byla připojena promývačka s 200 ml 5% $\text{NaOH}:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1). Pod stálým proudem argonu byla do baňky pomalu přikapána směs z přikapávačky (zhruba 1 kapka/s). Po přikapání byla aparatura ponořena do olejové lázně a zahřáta na $100\text{ }^\circ\text{C}$. Reakční směs byla míchána po dobu 24 hodin. Poté byla směs ponechána vytemperovat na laboratorní teplotu. Přes septum bylo opatrně přikapána $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) dokud směs nepřestala silně pění po přidavku kyseliny. Vyloučená sůl byla odfiltrována a filtrát byl odpařen pod vysokým vakuem tvořeným dvěma sériově zapojenými membránovými pumpami při $80\text{ }^\circ\text{C}$. Odparek a dříve odfiltrovaná sůl byly rozpuštěny v 500 ml 5% NaOH a extrahovány CH_2Cl_2 (10x20 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 a odpařena na RVO. Bylo získáno 2,15 g produktu ve formě čirého oleje (67 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

2.2.13 Syntéza ligandu L2



Ve 250ml baňce bylo rozpuštěno 2,05 g látky **5b** ve 220 ml 80% AcOH. Roztok byl převeden do autoklávu s míchadlem. Poté bylo do roztoku naváženo 210 mg Pd/C jako katalyzátoru. Autokláv byl následně uzavřen a evakuován. Do aparatury byl zaveden plynný H_2 pod tlakem přibližně 7 atmosfér. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 4 dní. Poté byl katalyzátor odfiltrován na fritě S4 a promyt destilovanou vodou. Jímaný filtrát byl odpařen na RVO do sucha a následně ještě 2x s $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Bylo získáno 1,6 g hydrochloridu **L1** ve formě bílého prášku (74 %). Charakterizační spektra byla shodná s publikovanými daty.²⁴

NMR charakterizace:

^1H (300 MHz, D_2O , pD = 1,03): δ 2,12 (8H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3,11; 3,17; 3,29; 3,39; 3,50 (28H, m, CH_2); 4,00 (4H, q, $^3J = 8,7$ Hz, CH_2CF_3)

^{19}F (282 MHz, D_2O , pD = 1,03): δ -67,47 (6F, t, $^3J = 8,7$ Hz, CF_3)

^{13}C (100 MHz, D_2O , pD = 1,03): δ 19,54; 21,24 (4C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 39,14; 43,03; 46,06; 46,33; 49,18; 51,76 (14C, CH_2); 48,07 (2C; q, $^3J = 35,1$ Hz CH_2CF_3); 122,84 (2C; q, $^3J = 277,3$ Hz CH_2CF_3)

2.3 Příprava komplexů a měření

2.3.1 Roztoky ke krystalizaci

Do vialky bylo naváženo přibližně 10 mg příslušného hydrochloridu ligandu, který byl následně rozpuštěn ve 100 μl H_2O . Do roztoku byl přidán 1M roztok chloridu příslušného

kovu (0,95 ekv.) a pH výsledného roztoku bylo upraveno pomocí 1M LiOH. Přesné hodnoty uvádí Tabulka 2.

Tabulka 2: Příprava roztoků ke krystalizaci

	Cu(L1)	Ni(L1)	Co(L1)	Cu(L2)	Ni(L2)	Co(L2)
m [mg]	10,5	9,9	10,2	9,8	10,8	10,1
V_{kov} [μl]	15,7	14,8	15,2	14	15,5	14,5
pH	5,62	6,35	5,87	5,16	6,10	5,26

Připravené roztoky byly ponechány stát ke krystalizaci s volnou difúzí isopropanolu přes plynnou fázi. Jelikož nedošlo ke krystalizaci, byly po 3 týdnech do roztoků přidány zhruba 2 kapky nasyceného roztoku NaClO₄. Avšak ani poté nedošlo ke krystalizaci produktů.

2.3.2 Potenciometrické titrace

Do titrační nádoby, vytemperované na 25 °C, bylo pipetou s mikrometrickým šroubem odměřeno 2,506 ml 0,03M roztoku HCl v 0,02M (Me₄N)Cl a 2,512 ml deionizované vody. V titrační nádobě byla proudem argonu vytvořena inertní atmosféra, aby se zabránilo rozpouštění vzdušného CO₂. Roztok byl titrován 0,2M roztokem (Me₄N)OH. Takto byla získána kalibrační titrační křivka, ze které byly vypočteny parametry elektrody. Kalibrace byla provedena vždy před a po titraci roztoku ligandu, resp. komplexu. Elektroda totiž vykazuje při konstantní iontové síle lineární závislost potenciálu E na logaritmu koncentrace, resp. aktivity, $[\text{H}^+]$ iontů. V krajních hodnotách pH ($\text{pH} < 2$ a $\text{pH} > 12$) je však linearita porušena a projevuje se tzv. kyselá a bazická chyba měření. Vztah pro potenciál elektrody pak nabývá tvar

$$E = E_0 + S \log[\text{H}^+] + J_A [\text{H}^+] + J_B \frac{K_w}{[\text{H}^+]}, \quad (14)$$

kde J_A je koeficient popisující kyselou chybu, J_B je koeficient popisující bazickou chybu, S je Nernstovská směrnice a K_w je iontový součin vody.

Pro potenciometrická měření byly připraveny zásobní roztoky ligandů o koncentraci přibližně 0,02M.

Při stanovení protonizačních konstant ligandu bylo do titrační nádoby odměřeno 2,506 ml roztoku kyseliny a takové množství roztoku ligandu, aby po závěrečném zředění

deionizovanou vodou na přibližně 5 ml byla jeho koncentrace zhruba 0,004M. Roztok byl následně titrován za stejných podmínek, za kterých byla prováděna kalibrace.

Při stanovení koordinačních vlastností ligandů byl navíc do titrační nádoby převeden roztok kovu spolu s roztokem ligandu tak, aby ligand byl zhruba v 2% nadbytku oproti kovu. Jelikož se kinetiky komplexací ukázaly být příliš pomalé téměř u všech měřených iontů kovů, tj. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} a Zn^{2+} , musely být připraveny roztoky do skleněných zkumavek pro každý potřebný bod titrační křivky, které byly ponechány komplexovat po dobu 3 týdnů v případě nikelnatých iontů a po dobu alespoň jednoho týdne v případě ostatních iontů kovů. Pro body v bazické oblasti byly roztoky připraveny do skleněných ampulí, které byly následně zataveny, aby nedocházelo k neutralizaci vzdušným CO_2 . Rozsahy pH, které byly v jednotlivých případech měřeny uvádí Tabulka 3. U titrace systému Zn^{2+} -L1 se při srovnání standardní a “out-of-cell” titrace ukázala být komplexace rychlá i v kyselé oblasti oproti ostatním případům. Při titraci Co(L1) pravděpodobně docházelo k oxidaci na Co^{3+} , a proto data nebyla zpracována dále.

Tabulka 3: Měřené rozsahy pH

	Cu(L1)	Ni(L1)	Co(L1)	Zn(L1)	Cu(L2)	Ni(L2)	Co(L2)	Zn(L2)
pH(rozsah)	~2-6	~2-6	-	2-12	~2-6	2-9	~2-8	~2-12

2.3.3 NMR titrace

Pro titraci ligandu L1 bylo naváženo 10,0 mg hydrochloridu ligandu do skleněné vialky, kde byl rozpuštěn v 0,5 ml D_2O . Roztok byl převeden do NMR kyvety. Úprava pH byla prováděna přidavkem 1M NaOH v D_2O (1 přidavek = 3,75 μl). Titrace probíhala až do pH 12,46.

Pro titraci ligandu L2 bylo naváženo 10,4 mg hydrochloridu ligandu do skleněné vialky, kde byl rozpuštěn v 0,5 ml D_2O s příměsí tBuOH a 2,2,2-trifluoroethanolu (1 kapka). Roztok byl převeden do NMR kyvety. Úprava pH byla prováděna přidavkem 1M NaOH v D_2O (1 přidavek = 3,75 μl). Titrace probíhala pouze do pH 11,46, protože v měřící kyvetě při vyšším pH docházelo ke vzniku zákalu.

2.3.4 NMR studium komplexace a měření relaxačního času T_1

Do vialky bylo naváženo přibližně 10 mg příslušného hydrochloridu ligandu, který byl následně rozpuštěn v 0,5 ml 0,1M CH_3COONa pufru. Pomocí 5% NaOH bylo pH upraveno

na hodnotu zhruba 5,8. Do roztoku byl přidán 0,95 ekv. 1M roztoku chloridu příslušného kovu (Tabulka 4). Pomocí ^{19}F -NMR byla sledována změna složení roztoku hned po přidavku kovu, a pak vždy po 2–3 hodinách. Pro měření byl použit insert s D_2O + 2,2,2-trifluorethanol. Poté, co se složení roztoků již neměnilo, bylo ve všech vzorcích upraveno pH zpět na hodnotu zhruba 5,8 a květy s roztoky byly zahřívány na 60 °C do druhého dne. Po změření bylo u všech vzorků zvednuto pH na hodnotu zhruba 7,4 a vzorky, u kterých se stále projevovala změna složení, byly zahřívány na 90 °C do druhého dne pro dosažení rovnovážného stavu. Poté byly u všech vzorků naměřeny ^{19}F relaxační časy T_1 metodou inversion recovery. U vzorků, kde bylo i v rovnovážném stavu pozorováno více signálů, bylo změřeno ^{19}F NMR spektrum při 90 °C, což by ukázalo, zda jednotlivé formy komplexů jsou mezi sebou v chemické výměně, která by se projevila koalescencí signálů. Vzdálenost signálů ani jejich pološířka se však nezměnily, a tedy nedochází k žádné chemické výměně v časové škále NMR.

Tabulka 4: Příprava roztoků pro komplexaci a konečné pH roztoků

	m [mg]	V_{kov} [μl]	pH_{final}
Zn(L1)	9,8	13,9	7,76
Zn(L2)	10,8	14,7	7,27
Cu(L1)	9,1	12,9	7,65
Cu(L2)	10,8	14,7	7,33
Ni(L1)	9,8	13,9	7,36
Ni(L2)	11,0	15,0	7,37
Co(L1)	10,5	14,9	7,29
Co(L2)	10,6	14,4	7,08

2.3.5 CEST

Od roztoků komplexů připravených výše byla naměřena ^1H NMR spektra s presaturací signálu vody. Na základě spekter byly připraveny koncentrovanější roztoky komplexů v 0,5 ml D_2O (Tabulka 5). Úprava pH byla provedena 1M NaOH v D_2O a roztoky byly zahřívány na 90 °C do druhého dne.

Tabulka 5: Příprava koncentrovaných roztoků

	m [mg]	V_{kov} [μl]	pH_{final}
Ni(L1)	35,7	50,6	8,55
Ni(L2)	41,3	56,3	5,25
Co(L2)	43,1	58,5	7,58

Po srovnání ^1H NMR spekter v D_2O a H_2O s presaturací byl k dalšímu studiu zvolen roztok Co(L2), v jehož spektru byl pozorován pík s chemickým posunem ~ -120 ppm s potenciálem pro CEST efekt (Příloha 16–17). Vzorek v D_2O byl odpařen do sucha a rozpuštěn v 0,5 ml destilované H_2O . Naměřené pH roztoku bylo 7,31. Pro měření byl použit insert s $\text{D}_2\text{O} + 2,2,2$ -trifluorethanol. Nejprve bylo změřeno ^1H spektrum bez presaturace signálu vody a poté s presaturací s různě silnými presaturačními pulzy (satpwr = 1, 8, 16, 23 a 30; satdly = 4) a byla sledována změna intenzity ostatních píků ve spektru (Příloha 1–4). Poté byl stejný experiment opakován při pH 5,73; 4,80 a 3,62.

3 Výsledky a diskuze

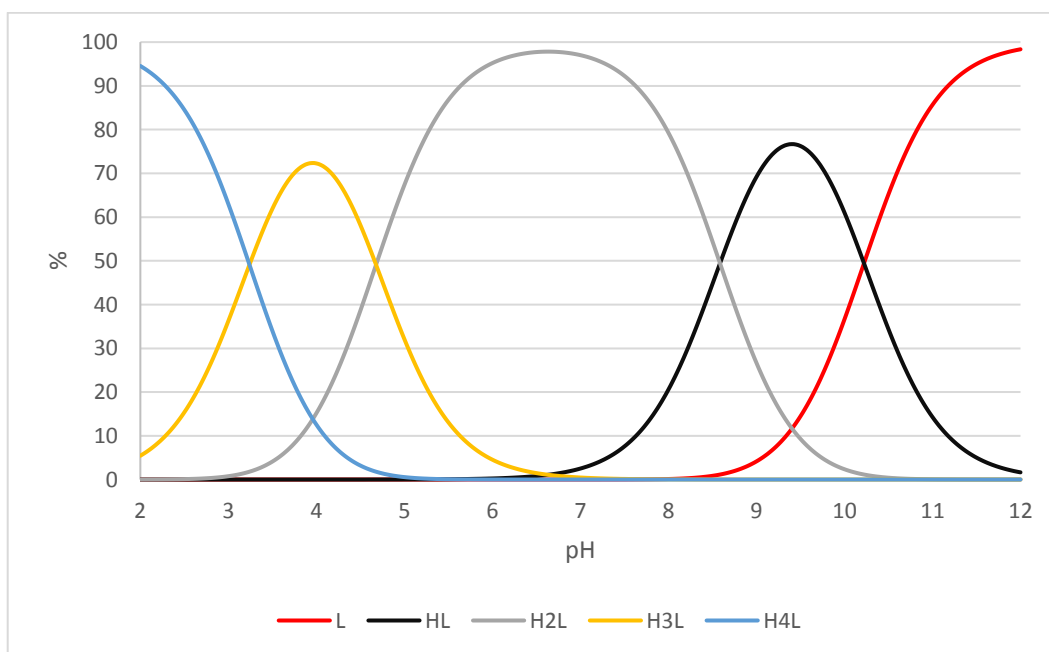
3.1 Acidobazické vlastnosti ligandů L1 a L2

Pomocí potenciometrických a NMR titrací byly stanoveny protonizační konstanty ligandů L1 a L2. Získané hodnoty ukazuje Tabulka 6.

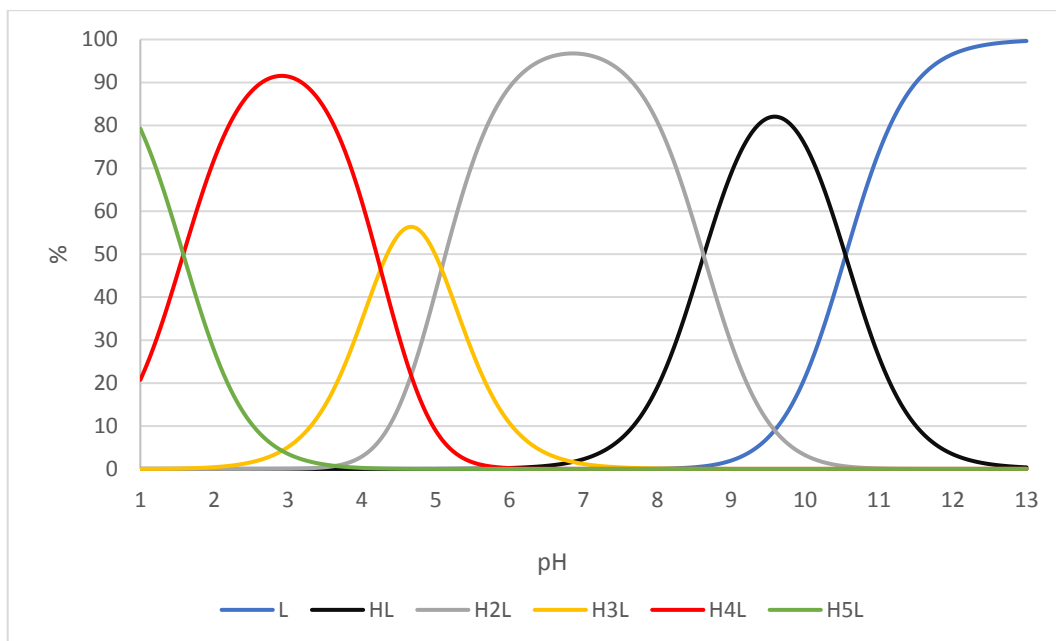
Tabulka 6: Stanovené protonizační konstanty ligandů L1 a L2

	L1		L2	
	Potenciometrie	NMR	Potenciometrie	NMR
pK_1	10,22(3)	10,69(4)	10,55(1)	10,6(1)
pK_2	8,58(4)	8,67(7)	8,62(2)	8,6(2)
pK_3	4,67(6)	4,3(1)	5,07(2)	5,0(2)
pK_4	3,24(7)	3,3(4)	4,25(3)	4,5(3)
pK_5	-	-	1,58(4)	1,2(3)

Pomocí získaných protonizačních konstant byly vypočítány distribuční diagramy jednotlivých forem ligandů v závislosti na pH (Obrázek 15 – L1, Obrázek 16 – L2).



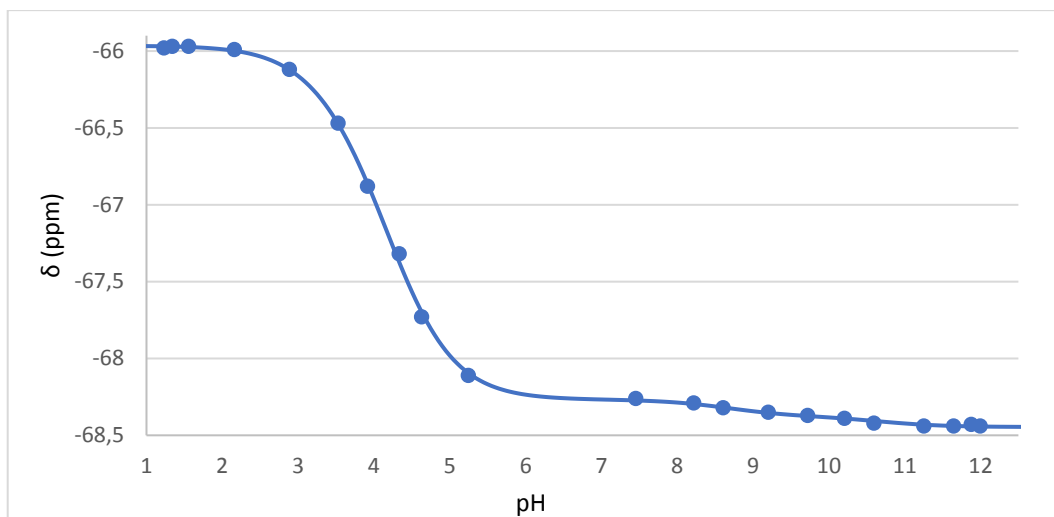
Obrázek 15: Distribuční diagram ligandu L1



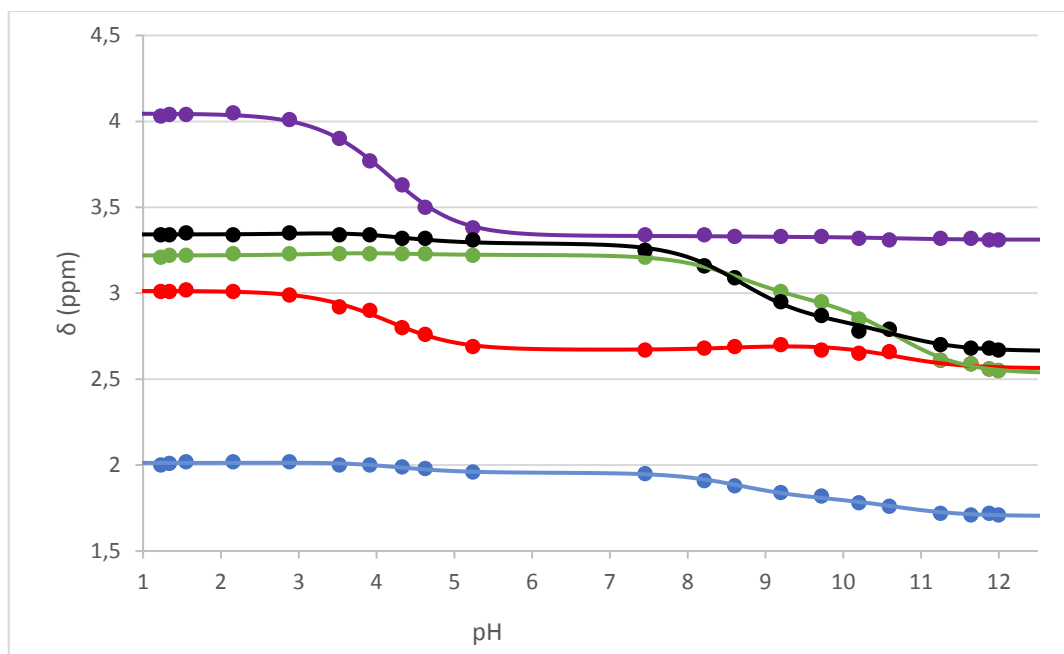
Obrázek 16: Distribuční diagram ligandu L2

U obou ligandů pozorujeme v kyselé oblasti dominantní zastoupení formy H₄L, tedy formy s protonizovanými pendantními rameny a nesubstituovanými atomy dusíku na makrocyklu. V neutrální oblasti se pak stává dominantní formou H₂L, která je protonizovaná na nesubstituovaných aminoskupinách na makrocyklu. Zároveň můžeme pozorovat vyšší bazicitu pendantní aminoskupiny z důvodu větší vzdálenosti od elektronegativního atomu dusíku makrocyklu.

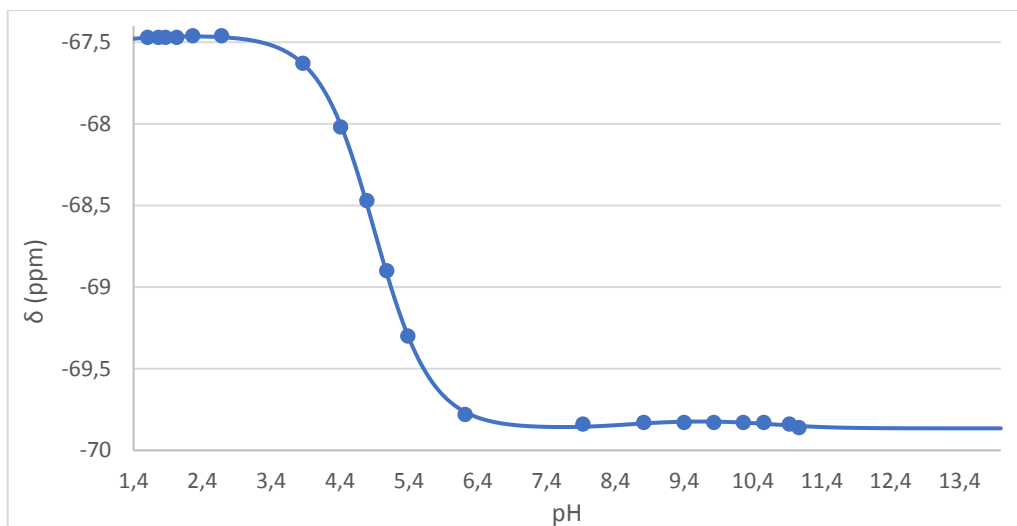
Teoretické distribuce byly zároveň použity k fitování naměřených závislostí chemických posunů na pH pro jádra ¹⁹F a ¹H (Obrázek 17,18 – L1; Obrázek 19,20 – L2). Přestože jsou konstanty vypočítané z NMR měření zatížené větší chybou z důvodu pohybu signálů přes sebe v průběhu titrace, jsou konstanty získané oběma metodami (potenciometrie i NMR) konzistentní (Příloha 5–8).



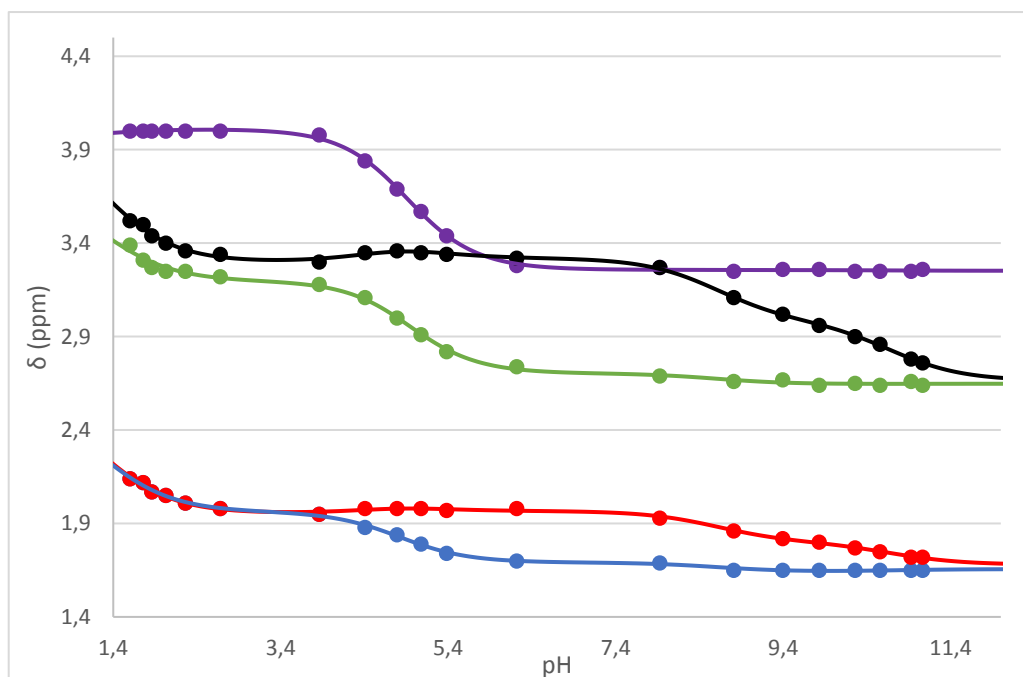
Obrázek 17: Závislost chemického posunu jádra ^{19}F na pH pro L1



Obrázek 18: Závislost chemického posunu jádra ^1H na pH pro L1: fialová – CF_3CH_2 ; černá/zelená – CH_2 makrocyklu; červená – CH_2 pendantu; modrá – CH_2 propylen na makrocyklu



Obrázek 19: Závislost chemického posunu jádra ^{19}F na pH pro L2



Obrázek 20: Závislost chemického posunu jádra ^1H na pH pro L2: fialová – CF_3CH_2 ; černá – CH_2 makrocyklu; zelená – CH_2 pendantu; modrá – CH_2 propylen pendantu; červená – CH_2 propylen na makrocyklu

3.2 Koordinační vlastnosti ligandů L1 a L2

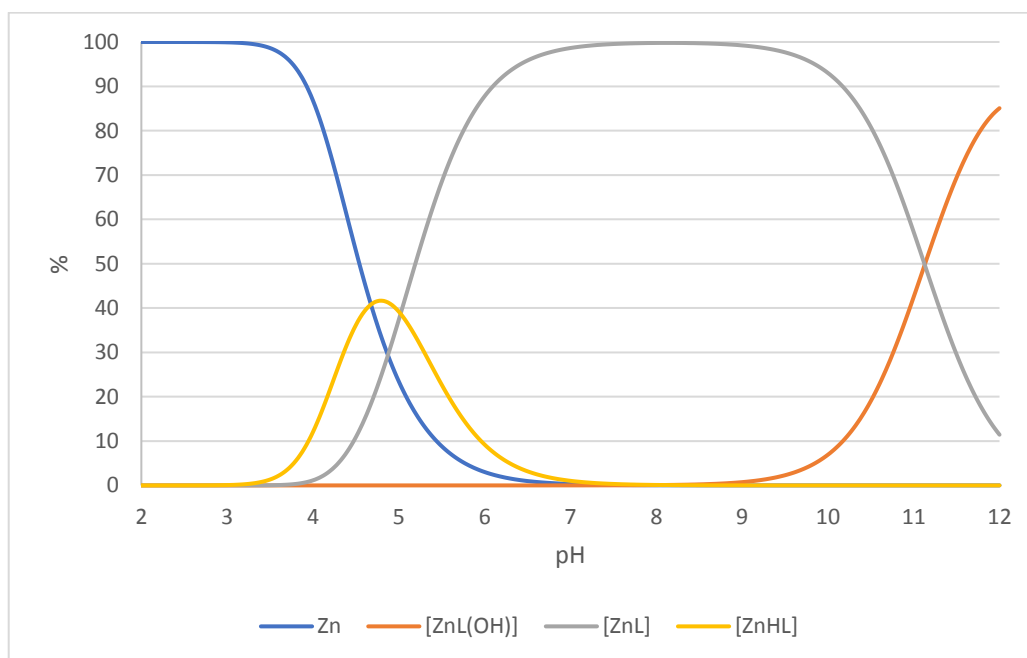
Pomocí potenciometrických titrací byly stanoveny konstanty stability ($\log \beta$) komplexů ligandů L1 a L2 se čtyřmi ionty přechodných kovů (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} a Zn^{2+}). Získané hodnoty ukazuje Tabulka 7.

$$\beta = \frac{[\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l]}{[\text{M}]^m[\text{H}]^h[\text{L}]^l} \quad (15)$$

Tabulka 7: Stanovené konstanty stability ($\log \beta$) komplexů s ligandy L1 a L2

	L1				L2			
	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Co^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Co^{2+}	Zn^{2+}
[ML]	21,52(8)	14,03(3)	-	12,21(5)	20,34(8)	12,75(5)	10,31(2)	10,53(5)
[MHL]	24,91(6)	18,41(4)	-	17,23(6)	25,1(1)	18,01(4)	15,85(7)	16,33(9)
[MH ₂ L]	27,43(7)	-	-	-	29,54(6)	22,2(2)	-	-
[ML(OH)]	-	-	-	1,08(5)	-	3,2(2)	2,35(5)	1,29(5)

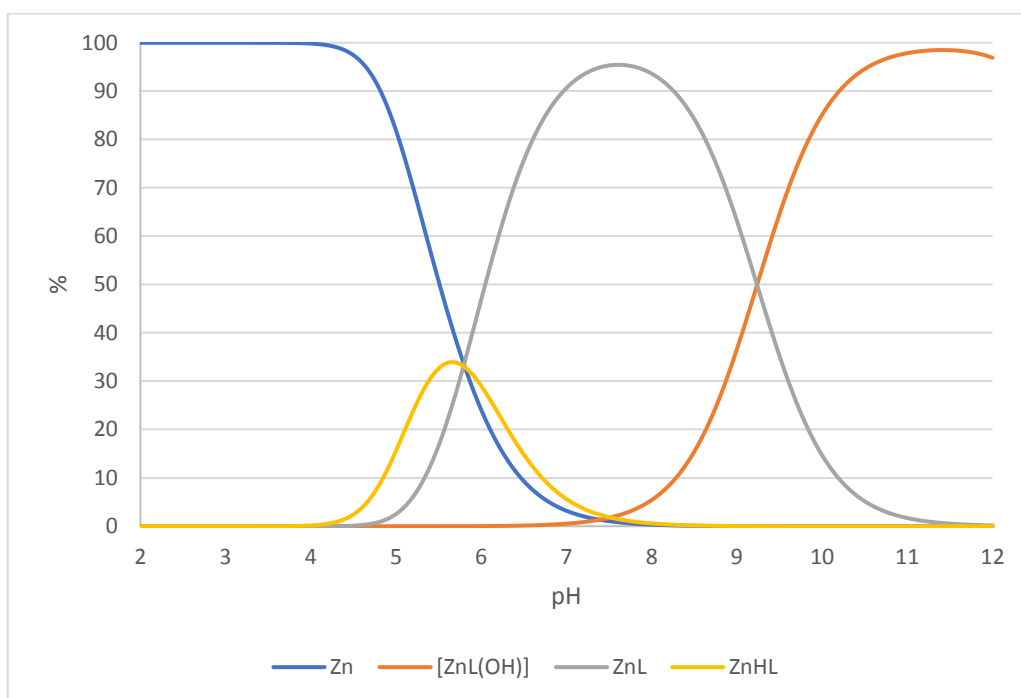
Ze získaných konstant stability byly vypočítány distribuční diagramy pro jednotlivé systémy (Obrázek 21–27).



Obrázek 21: Distribuční diagram pro systém Zn^{2+} -L1

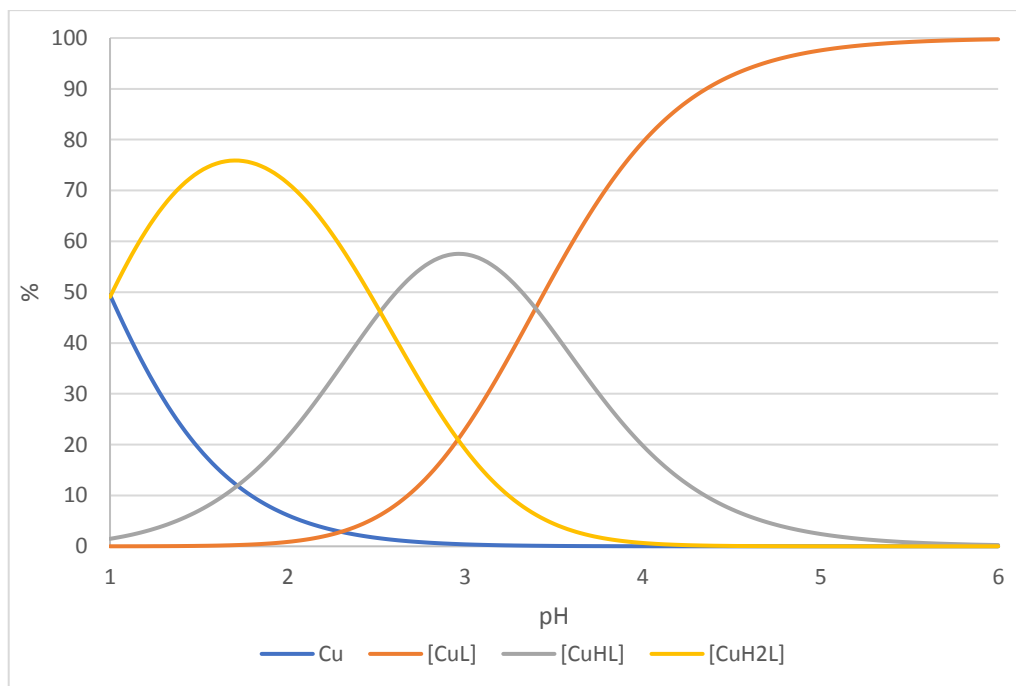
Z distribučního diagramu pro Zn^{2+} -L1 na Obrázku 21 je zřejmé, že majoritní složkou v rozsahu pH 5,5–10,5 je částice [ZnL]. Samotná komplexace pak začíná při $\text{pH} > 3$. Při

pH > 7 je pak Zn^{2+} zcela zakomplexován.



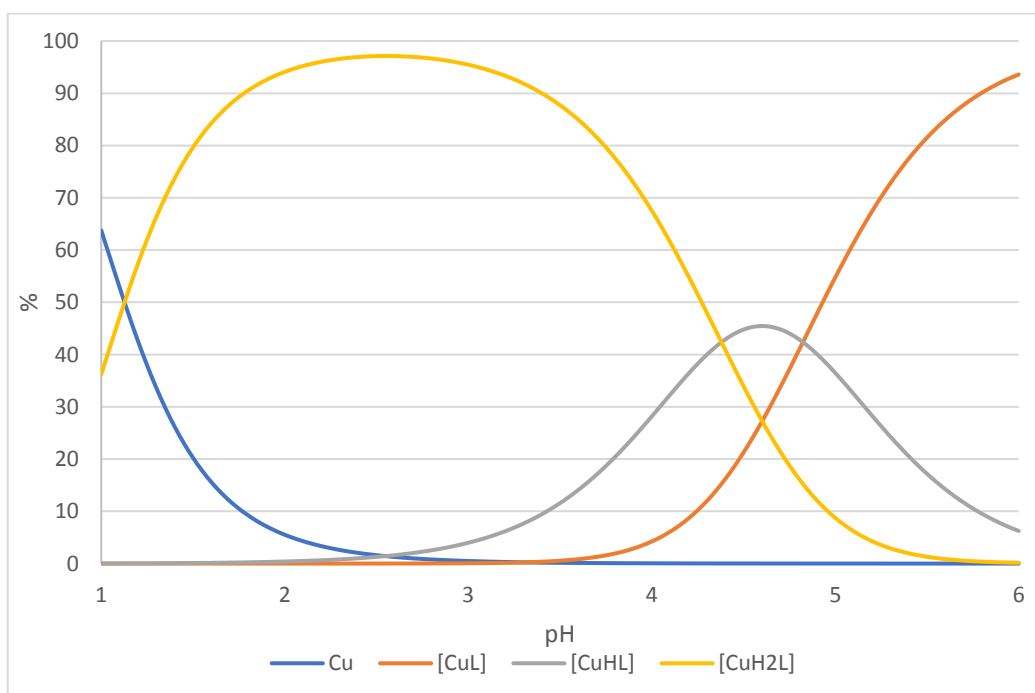
Obrázek 22: Distribuční diagram pro systém Zn^{2+} -L2

U distribučního diagramu pro Zn^{2+} -L2 na Obrázku 22 vidíme velmi podobnou distribuci jako u Zn^{2+} -L1 s tím rozdílem, že ke komplexaci dochází až při $\text{pH} > 4$ a k úplné komplexaci až při $\text{pH} > 8$. Zároveň můžeme pozorovat posun vzniku částice $[\text{ZnL}(\text{OH})]$ k nižšímu pH . Hydroxidokomplex zde začíná vznikat již při $\text{pH} \sim 7$, zatímco v případě Zn^{2+} -L1 ke vzniku dochází až při $\text{pH} \sim 9$. Pokud se podíváme na systém Zn^{2+} -cyklam, tak uvidíme, že pK_a hydroxidokomplexu je zhruba stejné jako v případě systému Zn^{2+} -L2 (Zn^{2+} -L2 $\sim 9,3$ a Zn^{2+} -cyklam $\sim 9,77$).³¹ Z tohoto srovnání vidíme, že bazičtější aminoskupiny ligandu L2 jsou s iontem Zn^{2+} vázány pouze velmi slabě nebo dokonce vůbec. Toto je dále podpořeno pomocí ^{19}F NMR spektra (Příloha 12).



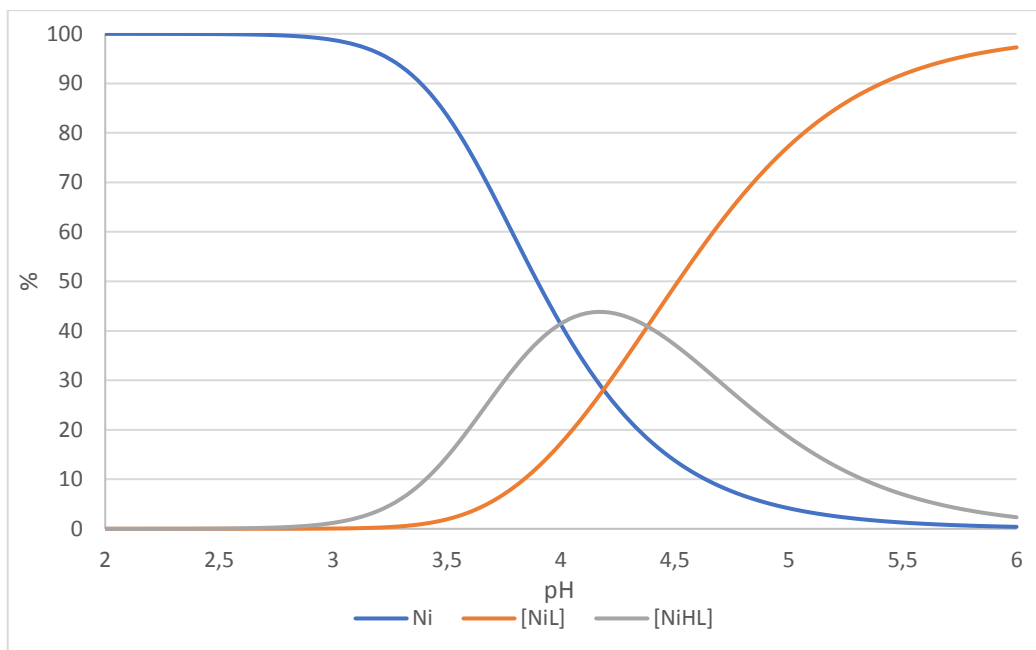
Obrázek 23: Distribuční diagram pro systém Cu^{2+} -L1

Z distribučního diagramu pro Cu^{2+} -L1 vidíme, že již při $\text{pH} = 1$ je zhruba polovina iontů Cu^{2+} zakomplexována a forma $[\text{CuL}]$ se stává majoritní složkou již při $\text{pH} \sim 3,5$.



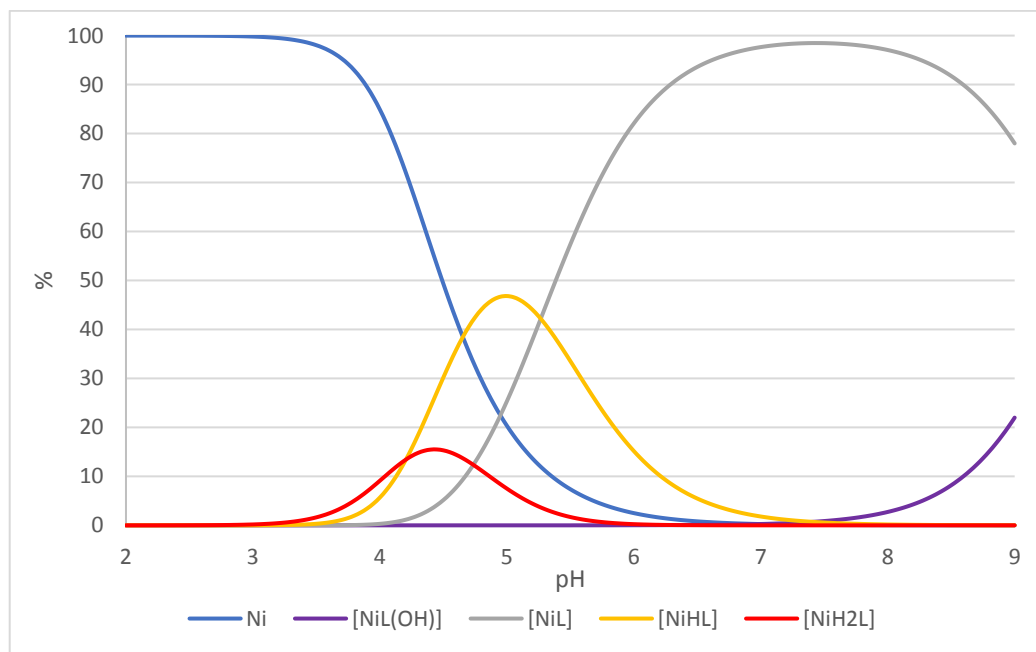
Obrázek 24: Distribuční diagram pro systém Cu^{2+} -L2

Porovnáním Obrázku 23 a 24 vidíme, že ke komplexaci dochází také již ve velmi kyselé oblasti. Avšak obdobně jako v případě Zn^{2+} můžeme pozorovat posun vzniku částice $[\text{CuL}]$ k vyššímu pH zhruba o jednotku z důvodu vyšší bazicity pendantního ramene ligandu.



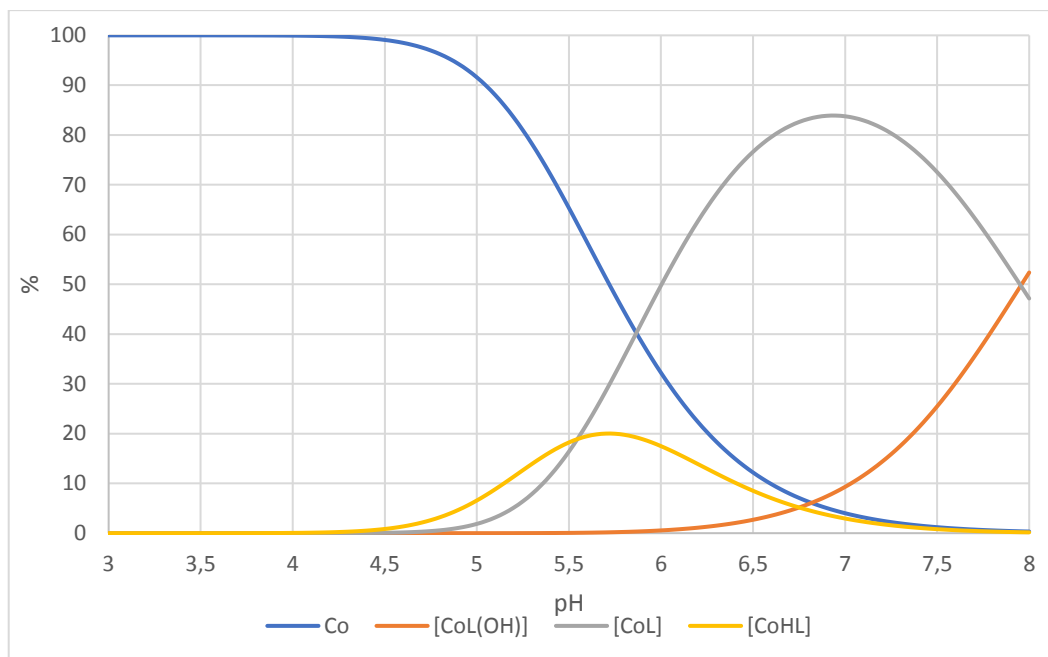
Obrázek 25: Distribuční diagram pro systém Ni^{2+} -L1

Z distribučního diagramu pro Ni^{2+} -L1 vidíme, že ke komplexaci dochází při $pH \sim 3$ a částice $[NiL]$ se stává majoritní složkou při $pH \sim 4,5$. K úplnému zakomplexování pak dochází až při $pH > 6$.



Obrázek 26: Distribuční diagram pro Ni^{2+} -L2

Z distribučního diagramu pro Ni^{2+} -L2 vidíme, že na rozdíl od Ni^{2+} -L1 vzniká i částice $[NiH_2L]$, i když jen ve velmi malém zasoupení. Stejně jako v předchozích případech dochází i zde k posunu vzniku částice $[NiL]$ k vyššímu pH z důvodu vyšší bazicity pendantu.



Obrázek 27: Distribuční diagram pro systém Co^{2+} -L2

Na Obrázku 27 vidíme, že ke komplexaci iontů Co^{2+} dochází při $\text{pH} \sim 4,5$. Ovšem již při $\text{pH} \sim 6$ dochází ke vzniku částice $[\text{CoL}(\text{OH})]$, což je velmi podobné chování jako v případě Zn^{2+} -L2.

3.3 Relaxace T_1

Metodou inversion recovery byly změřeny relaxační časy T_1 pro ^{19}F signály volných ligandů a jejich komplexů. Měření bylo provedeno v poli 7,04 T. Získané hodnoty ukazuje Tabulka 8. Spektra komplexů ukazují Přílohy 9–15.

Tabulka 8: Naměřené relaxační časy T_1

ligand	L1 – T_1 [ms]		L2 – T_1 [ms]	
	Zn^{2+}	$1,20(3) \cdot 10^3$	$0,87(3) \cdot 10^3$	$1,31(2) \cdot 10^3$
Cu^{2+}	7,5(1)		26,4(3)	
Ni^{2+}	20,6(5)	13,4(9)	$0,75(2) \cdot 10^3$	19,5(4)
Co^{2+}	-		$0,35(2) \cdot 10^3$	$0,86(4) \cdot 10^3$

Z naměřených hodnot můžeme vidět, že zinečnaté ionty dle očekávání tvoří diamagnetické komplexy, u kterých nepozorujeme výrazné zkrácení relaxačního času T_1 .

U iontů měďnatých vidíme 160-ti násobné zkrácení relaxačního času v případě L1 a 50-ti násobné zkrácení v případě L2. Tento rozdíl ukazuje na větší vzdálenost atomů fluoru od paramagnetického iontu kovu u L2, a tedy i prodloužení koordinační vazby pendantních ramen.

U nikelnatých iontů pozorujeme ve spektrech 2 signály v případě obou ligandů. V případě L1 pozorujeme 2 paramagnetické izomery. Předpokládaný oktaedrický komplex může mít pendantní ramena koordinována v poloze *trans* s makrocyklem uspořádaným v geometrii *trans*(III) nebo v poloze *cis* s geometrií s makrocyklem v geometrii *cis*(V).³² Koordinace v poloze *trans* může vést ke vzniku opticky aktivních izomerů, kde by se pak mohly vyskytovat diastereoizomery s konfigurací RR/SS nebo RS na atomu dosíku pendantní skupiny. Při měření ¹⁹F NMR spekter při 90 °C se objeví třetí velmi široký signál, který je obtížně fázovatelný a při měření za laboratorní teploty okamžitě opět mizí. Z poměru signálů je však patrné, že nemá vliv na složení roztoku, a tedy je v roztoku přítomen i za nižší teploty. Vyšší teplota však způsobuje zpomalení relaxačních časů T_1 a T_2 , což by mohlo být vysvětlení existence signálu při vyšší teplotě (Příloha 19).

V případě ligandu L2 pozorujeme jeden minoritní paramagnetický izomer a jeden majoritní diamagnetický, který má zřejmě čtvercové uspořádání s nekoordinovanými pendantními rameny. Tato domněnka je dále podpořena žluto-oranžovým zabarvením roztoku, které je typické pro čtvercové komplexy niklu. Příloha 18 ukazuje srovnání ¹⁹F NMR spekter volného ligandu a komplexu Ni²⁺-L2 při srovnatelném pH.

V případě iontů kobaltnatých vidíme u L2 vznik komplexů bez výrazného paramagnetického zkrácení relaxačního času T_1 . Jelikož má Co²⁺ konfiguraci d^7 , očekávali bychom paramagnetický komplex, který potvrzuje spektrum ¹H (Příloha 16). Jelikož však v ¹⁹F spektru paramagnetismus nepozorujeme, můžeme se domnívat, že jsou atomy fluoru příliš vzdáleny od paramagnetického jádra, nebo dokonce nedochází ke koordinaci pendantní aminoskupiny. V případě L1 bylo naměřeno obtížně zfázovatelné spektrum s mnoha signály a vypočtené relaxační časy byly zatížené příliš velkou chybou, a proto nebyly zahrnuty do výsledků.

3.4 CEST

V žádném měření s různou silou presaturačního pulzu nebyla pozorována přítomnost CEST efektu při žádné hodnotě pH (Příloha 1–4). Nicméně se ukázalo, že komplex

$[\text{Co}(\text{L}_2)]^{2+}$ je kineticky inertní, jelikož při snížení pH pod hodnotu 7 by mělo docházet k dekomplexaci, která byla pozorována v malé míře až po několika hodinách při $\text{pH} = 3,62$.

4 Závěr

Byly připraveny ligandy L1 a L2 ve větší škále. Pomocí potenciometrických titrací a NMR byly studovány jejich acidobazické a koordinační vlastnosti. U zinečnatých komplexů pozorujeme částice $[ZnL]$, $[ZnHL]$ a $[ZnL(OH)]$. K úplné komplexaci dochází při $pH \sim 7$ u ligandu L1 a při $pH \sim 8$ u ligandu L2. V případě L2 je také pozorována slabší koordinace bazičtějších pendantních aminoskupin, kde vzniku hydroxidokomplexu dochází přibližně stejně snadno jako v případě Zn^{2+} komplexu s nesubstituovaným cyklamem. Měďnaté komplexy v obou případech vykazují úplnou komplexaci už při $pH \sim 3$. Avšak vznik částice $[CuL]$ je v případě L2 posunut do vyšší hodnoty pH zhruba o jednotku v důsledku vyšší bazicity pendantních aminoskupin. Stejný posun pozorujeme i u nikelnatých komplexů, kde se v případě L2 objevuje v malém zastoupení i forma $[NiH_2L]$. Také k úplné komplexaci dochází až při $pH \sim 7$, což je opět o jednotku výše než v případě L1. Komplex kobaltnatý byl studován pouze v případě L2, jelikož u L1 docházelo k oxidaci, což znemožnilo spolehlivé měření. K úplné komplexaci ligandem L2 dochází až při $pH \sim 8$ a ke vzniku hydroxido komplexu dochází již při $pH \sim 6$. Naměřené koordinační vlastnosti velmi podobné iontům zinečnatým.

Dále byly studovány též relaxační časy T_1 jader ^{19}F jak u volných ligandů, tak u komplexních sloučenin, a byl nalezen potenciál pro využití jako MRI kontrastní látky. Především pak u měďnatých komplexů, které projevily zhruba 160-ti násobné zkrácení T_1 oproti volnému ligandu v případě L1 a zhruba 50-ti násobné zkrácení v případě L2. Konkrétní relaxační čas pro Cu^{2+} -L1 byl 7,5(1) ms a pro Cu^{2+} -L2 byl 26,4(3) ms.

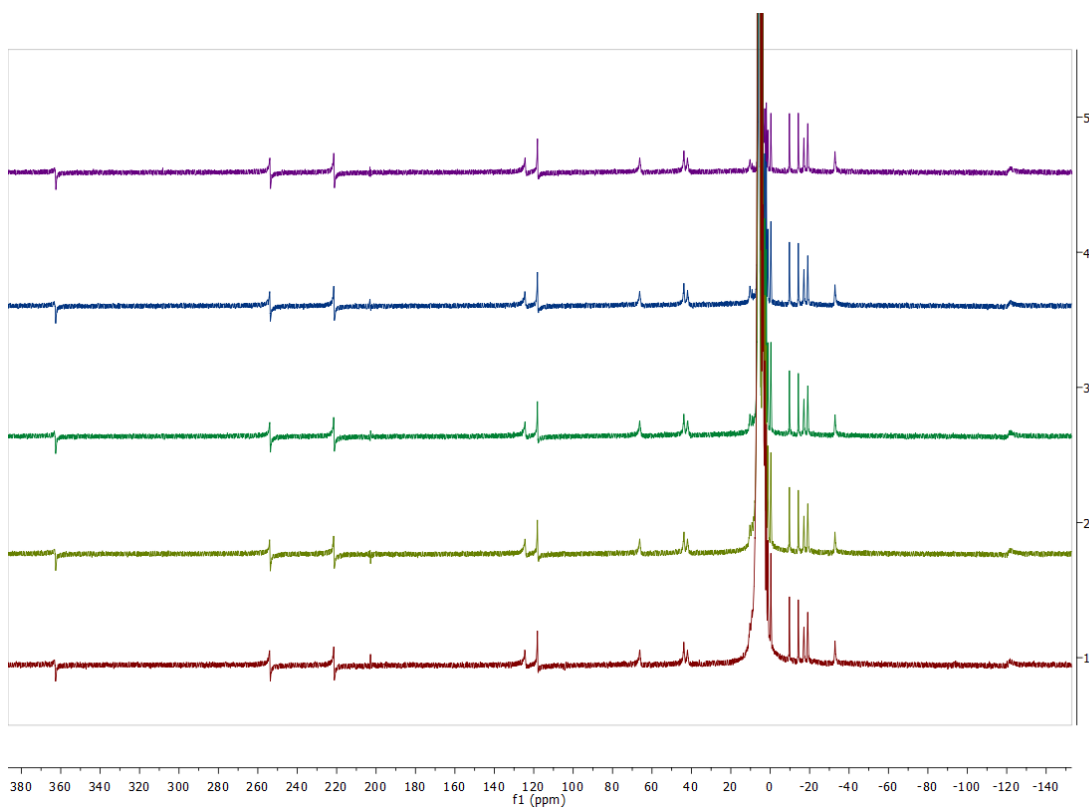
Nikelnatý komplex ligandu L1 také projevily výrazné zkrácení času T_1 , nicméně se v roztoku ustaluje rovnováha mezi dvěma izomery. Jeden z izomerů vykázal relaxační čas 20,6(5) ms, druhý pak 13,4(9) ms. Při měření za zvýšené teploty se ve spektru objeví velmi široký signál třetí složky, která je zřejmě v roztoku přítomna i za laboratorní teploty, ale má příliš rychlé relaxační časy T_1 a T_2 , aby za této teploty byla ve spektru vidět. Ligand L2 vykázal preferenci čtvercového uspořádání komplexu s nekoordinovanými pendantními rameny, takže nedochází k výraznému zkrácení relaxačního času T_1 . Naměřená hodnota u majoritní diamagnetické formy byla 0,75(2) s, u minoritně zastoupené formy pak 19,5(4) ms, což naznačuje její paramagnetismus.

U komplexů kobaltnatých dochází v případě L1 pravděpodobně ke směsi produktů a v závislosti na pH též k oxidaci na ionty kobaltité, což vedlo ke komplikacím při měření,

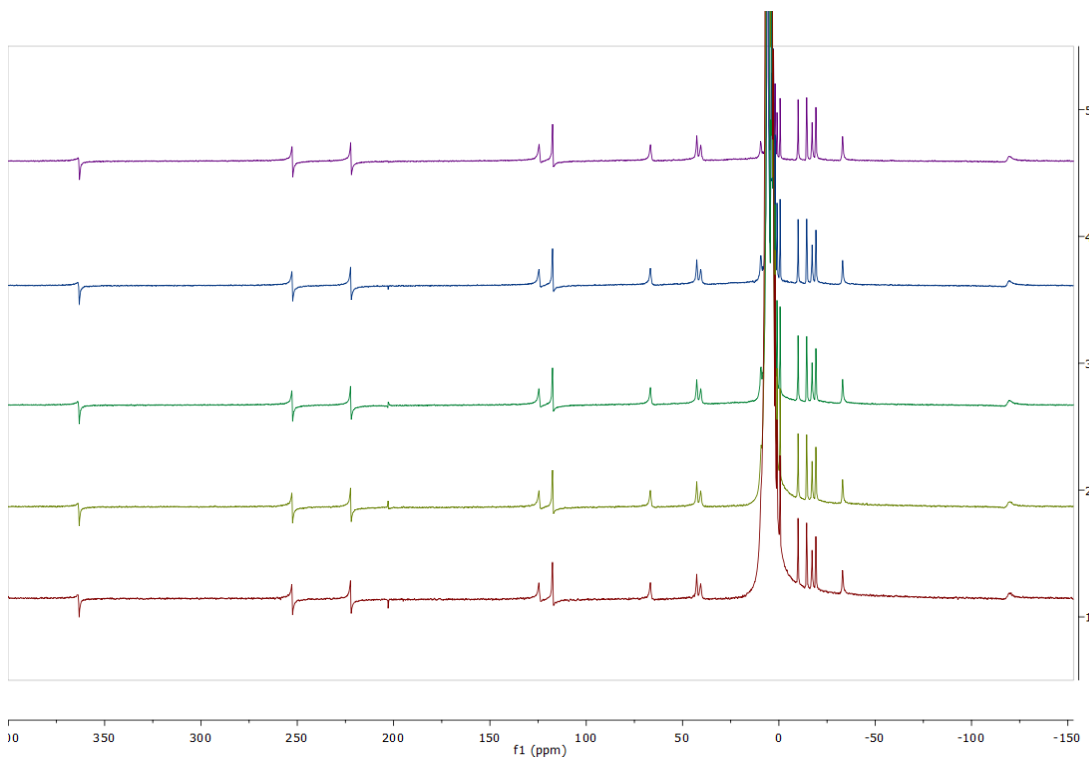
a tak nebyl dále studován. U L2 byly naměřené relaxační časy 0,35(2) s a 0,86(4) s, což vedlo k závěru, že pendantní ramena nejspíš nejsou koordinována, a proto nevidíme vliv paramagnetického iontu Co^{2+} na relaxační čas T_1 .

Pomocí NMR byla studována potenciální přítomnost CEST efektu. Jako nejvhodnější kandidát se ukázal být kobaltnatý komplex s ligandem L2. Avšak další měření ukázala, že CEST efekt přítomný není, a že vzniklý komplex je patrně kineticky inertní (vzhledem k přetrvávající komplexaci cyklamové části ligandu i v mírně kyselém prostředí).

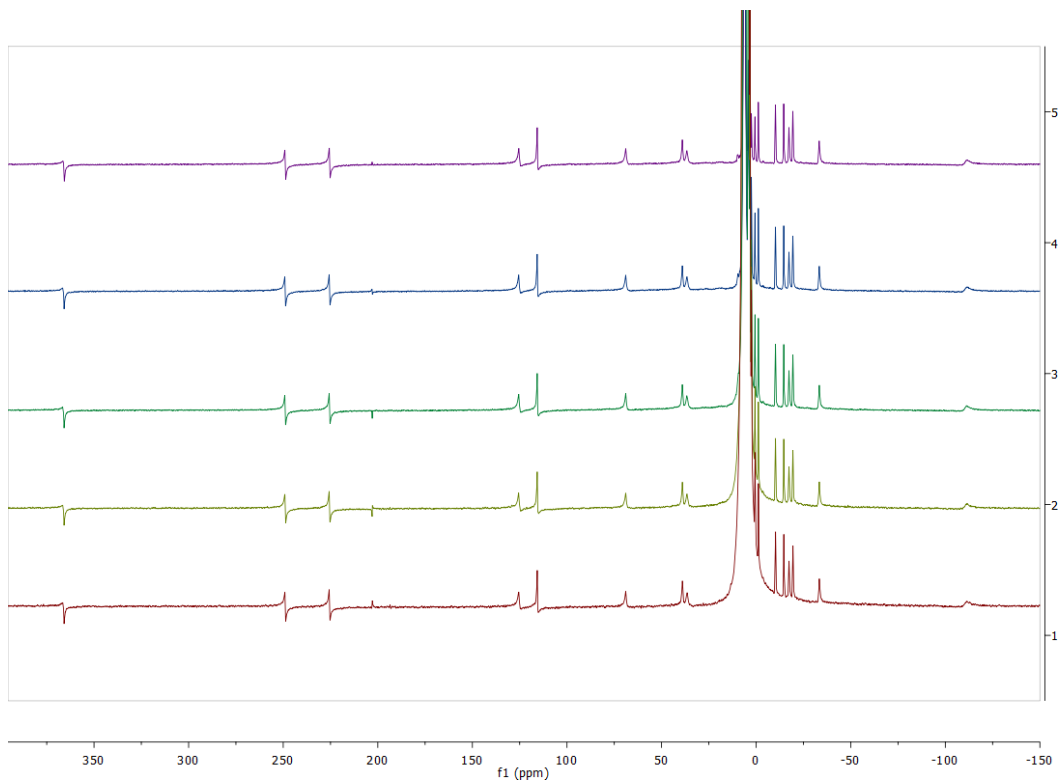
5 Přílohy



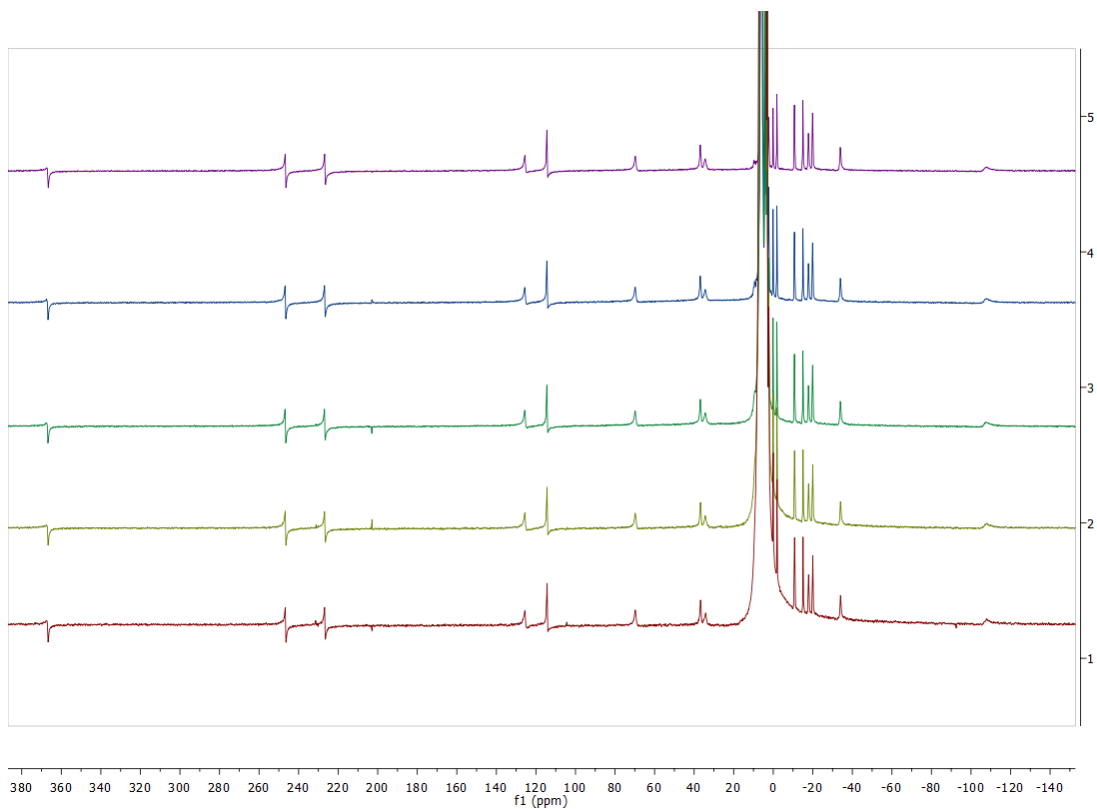
Příloha 1: Měření přítomnosti CEST efektu u Co^{2+} -L2 s různou silou presaturačního pulzu $-^1\text{H}$, měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,31$, $\text{satpwr} = 1; 2: 8; 3: 16; 4: 23; 5: 30$, $\text{satdly} = 4$



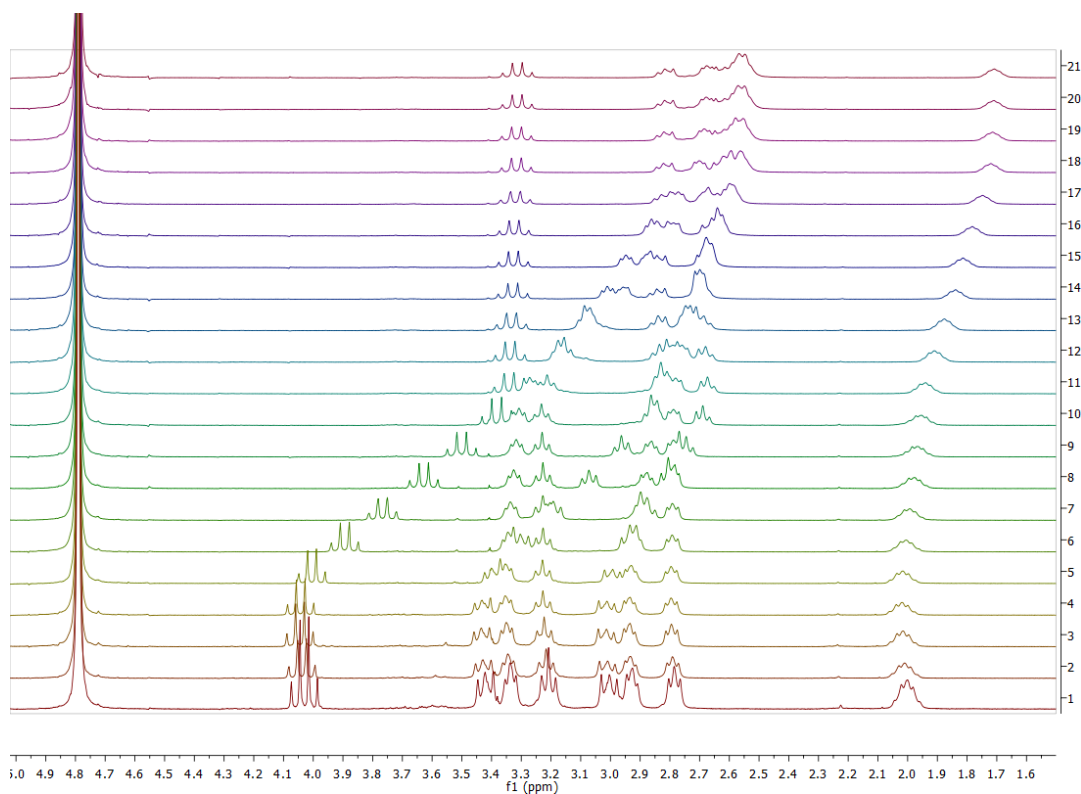
Příloha 2: Měření přítomnosti CEST efektu u Co^{2+} -L2 s různou silou presaturačního pulzu $-^1\text{H}$, měřeno v H_2O , $\text{pH} = 5,73$, $\text{satpwr} = 1; 2: 8; 3: 16; 4: 23; 5: 30$, $\text{satdly} = 4$



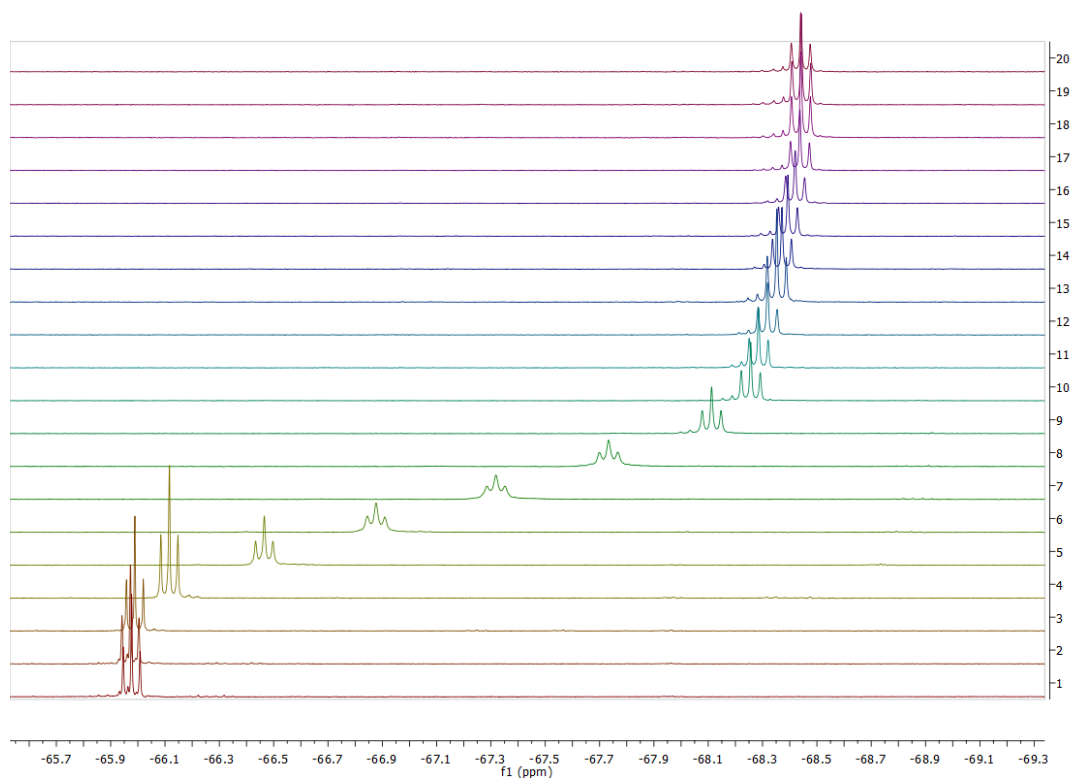
Příloha 3: Měření přítomnosti CEST efektu u Co^{2+} -L2 s různou silou presaturačního pulzu $-^1\text{H}$, měřeno v H_2O , $\text{pH} = 4,80$, $\text{satpwr} = 1: 1; 2: 8; 3: 16; 4: 23; 5: 30$, $\text{satdly} = 4$



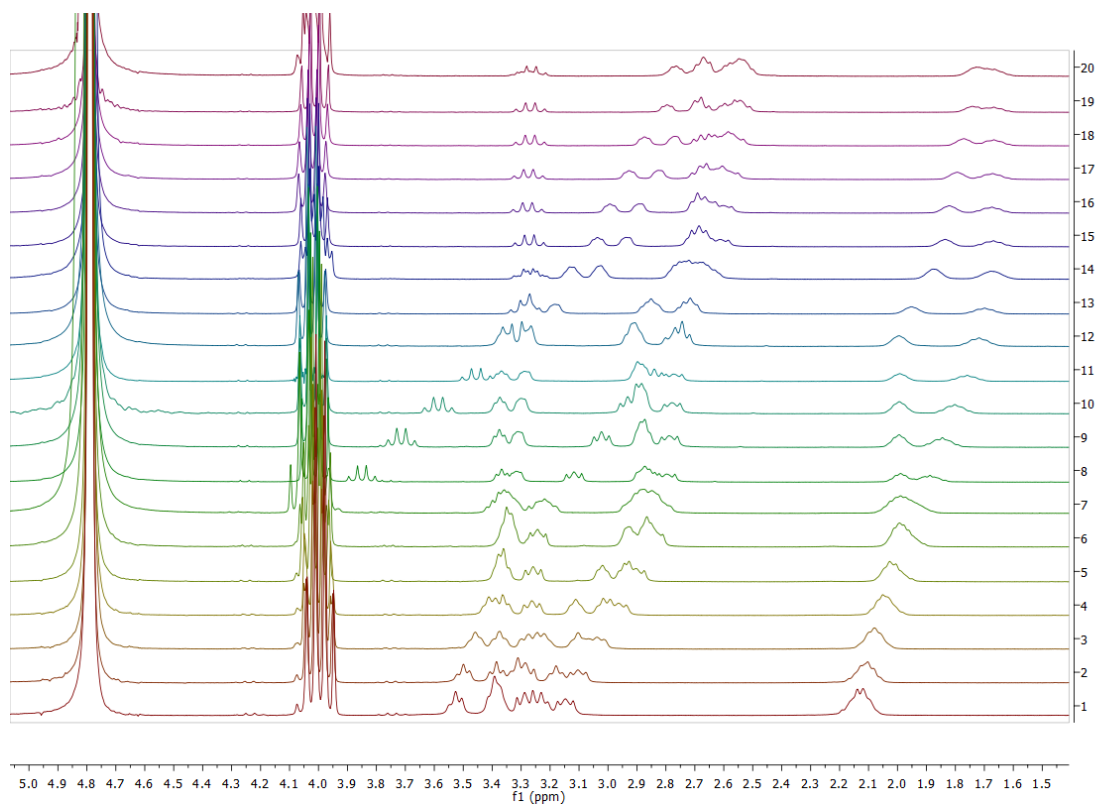
Příloha 4: Měření přítomnosti CEST efektu u Co^{2+} -L2 s různou silou presaturačního pulzu $-^1\text{H}$, měřeno v H_2O , $\text{pH} = 3,62$, $\text{satpwr} = 1: 1; 2: 8; 3: 16; 4: 23; 5: 30$, $\text{satdly} = 4$



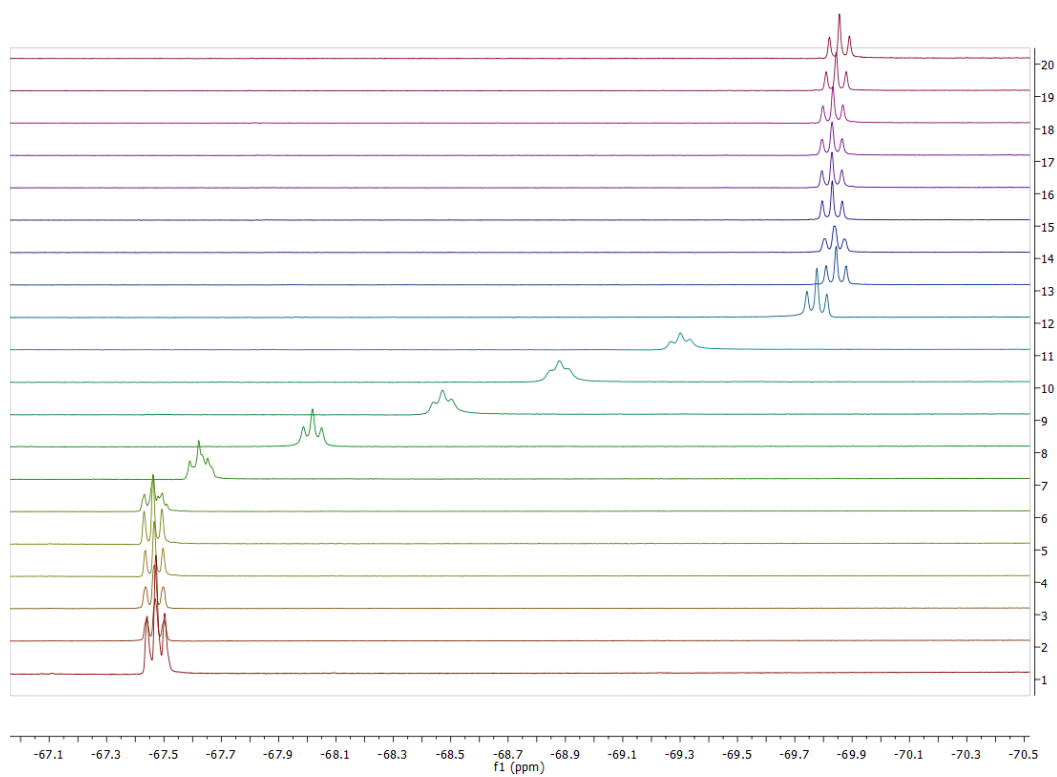
Příloha 5: NMR titrace ligandu L1 – ^1H , měřeno v D_2O , pD spekter: 1: 0,87, 2: 0,99, 3: 1,22, 4: 1,87, 5: 2,65, 6: 3,34, 7: 3,76, 8: 4,21, 9: 4,53, 10: 5,19, 11: 7,57, 12: 8,39, 13: 8,81, 14: 9,45, 15: 10,01, 16: 10,53, 17: 10,95, 18: 11,66, 19: 12,08, 20: 12,33, 21: 12,46



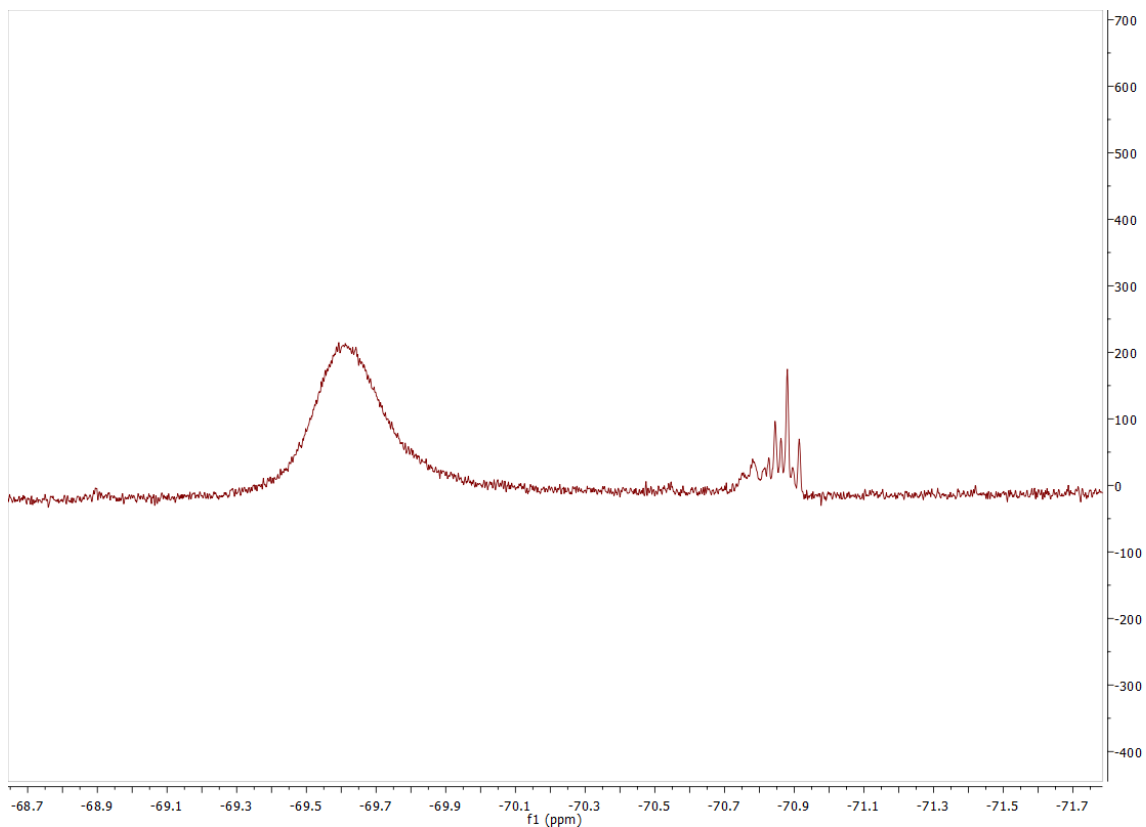
Příloha 6: NMR titrace ligandu L1 – ^{19}F , měřeno v D_2O , pD spekter: 1: 0,87, 2: 0,99, 3: 1,22, 4: 1,87, 5: 2,65, 6: 3,34, 7: 3,76, 8: 4,21, 9: 4,53, 10: 5,19, 11: 7,57, 12: 8,39, 13: 8,81, 14: 9,45, 15: 10,01, 16: 10,53, 17: 10,95, 18: 11,66, 19: 12,08, 20: 12,33



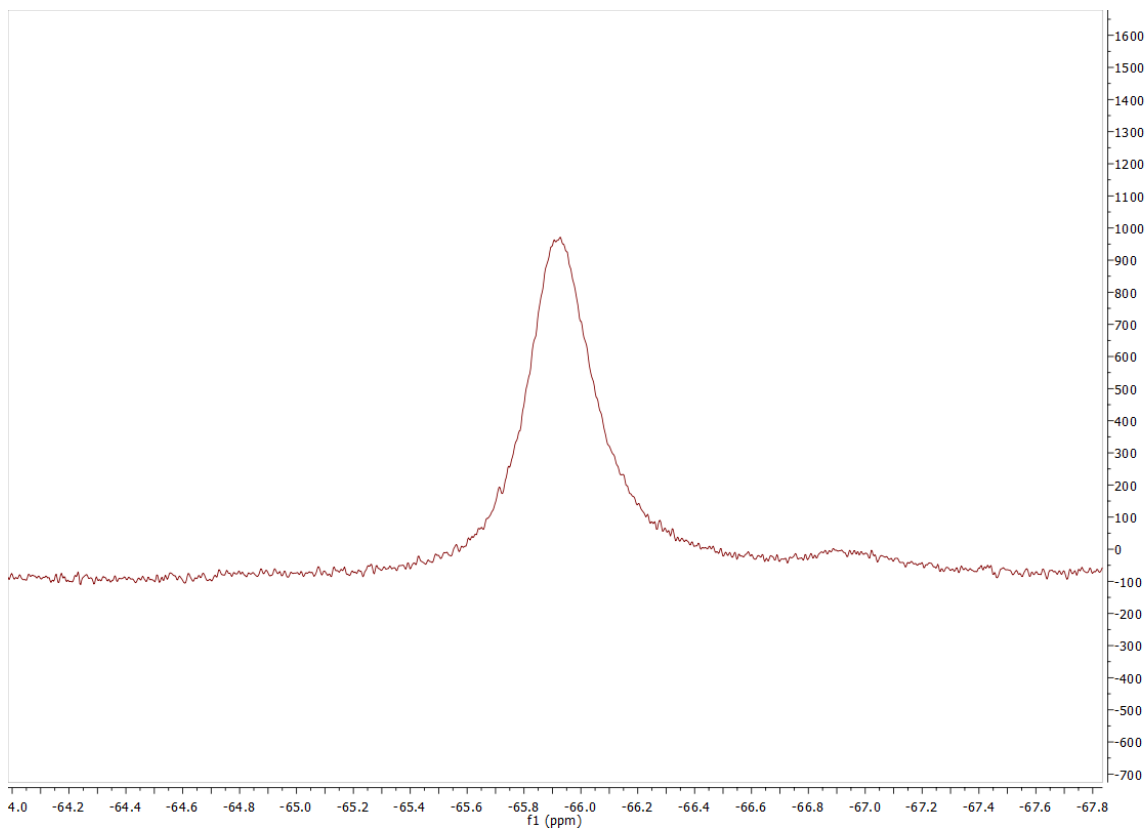
Příloha 7: NMR titrace ligandu L2 – ^1H , měřeno v D_2O , pD spekter: 1: 1,27, 2: 1,44, 3: 1,55, 4: 1,73, 5: 1,98, 6: 2,43, 7: 3,70, 8: 4,29, 9: 4,70, 10: 5,01, 11: 5,34, 12: 6,24, 13: 8,08, 14: 9,03, 15: 9,66, 16: 10,13, 17: 10,59, 18: 10,91, 19: 11,31, 20: 11,46



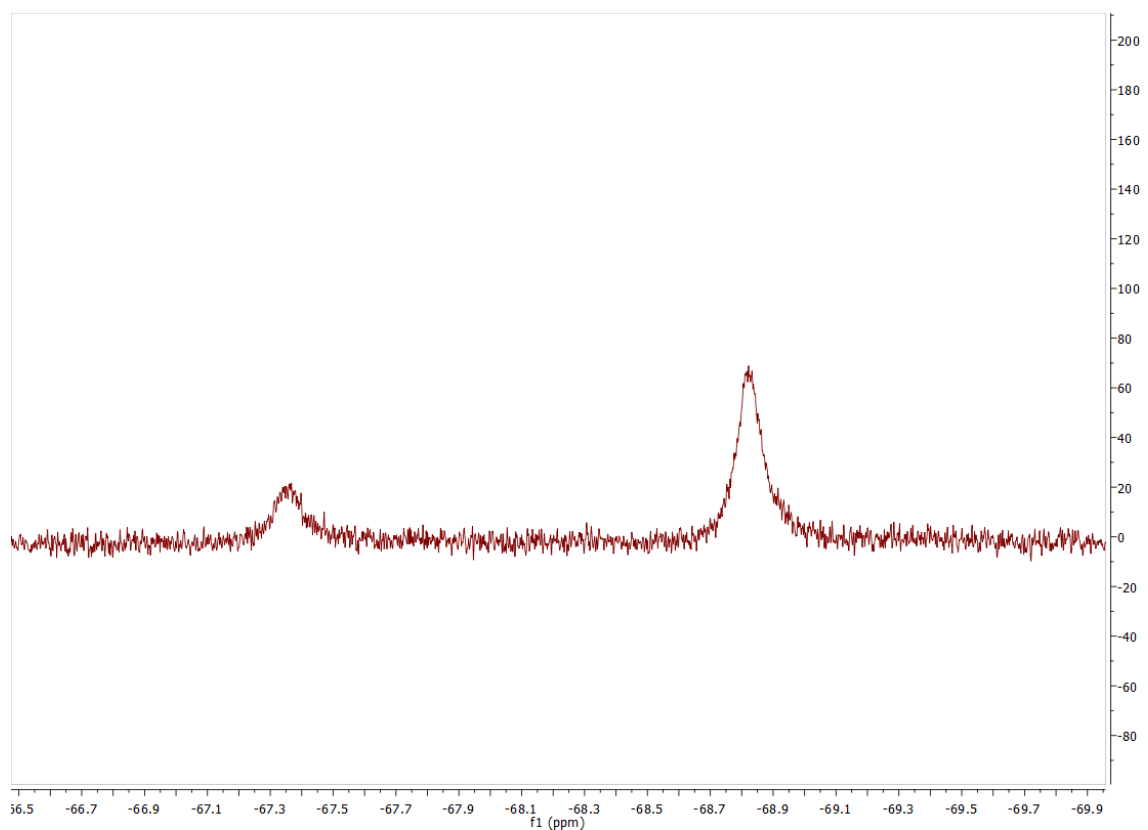
Příloha 8: NMR titrace ligandu L2 – ^{19}F , měřeno v D_2O , pD spekter: 1: 1,27, 2: 1,44, 3: 1,55, 4: 1,73, 5: 1,98, 6: 2,43, 7: 3,70, 8: 4,29, 9: 4,70, 10: 5,01, 11: 5,34, 12: 6,24, 13: 8,08, 14: 9,03, 15: 9,66, 16: 10,13, 17: 10,59, 18: 10,91, 19: 11,31, 20: 11,46



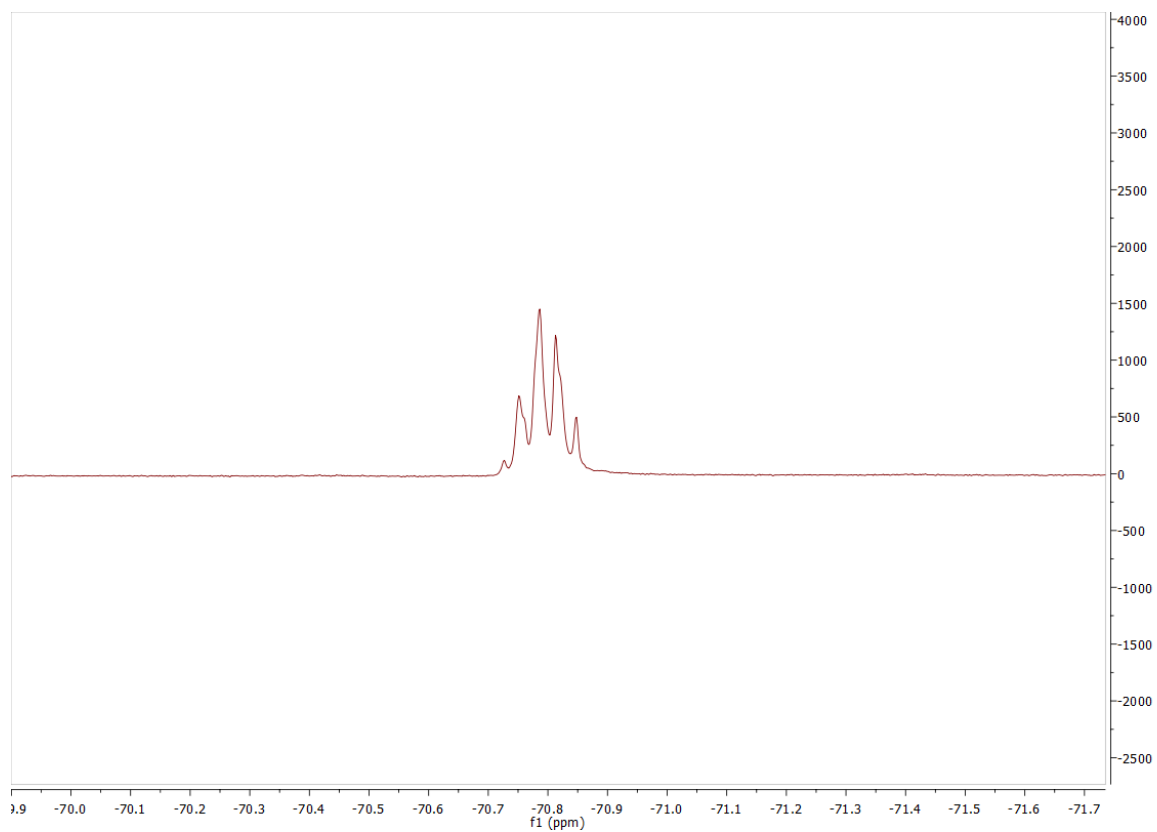
Příloha 9: Komplex Zn^{2+} -L1 – ^{19}F , měřeno v H_2O , pH = 7,76



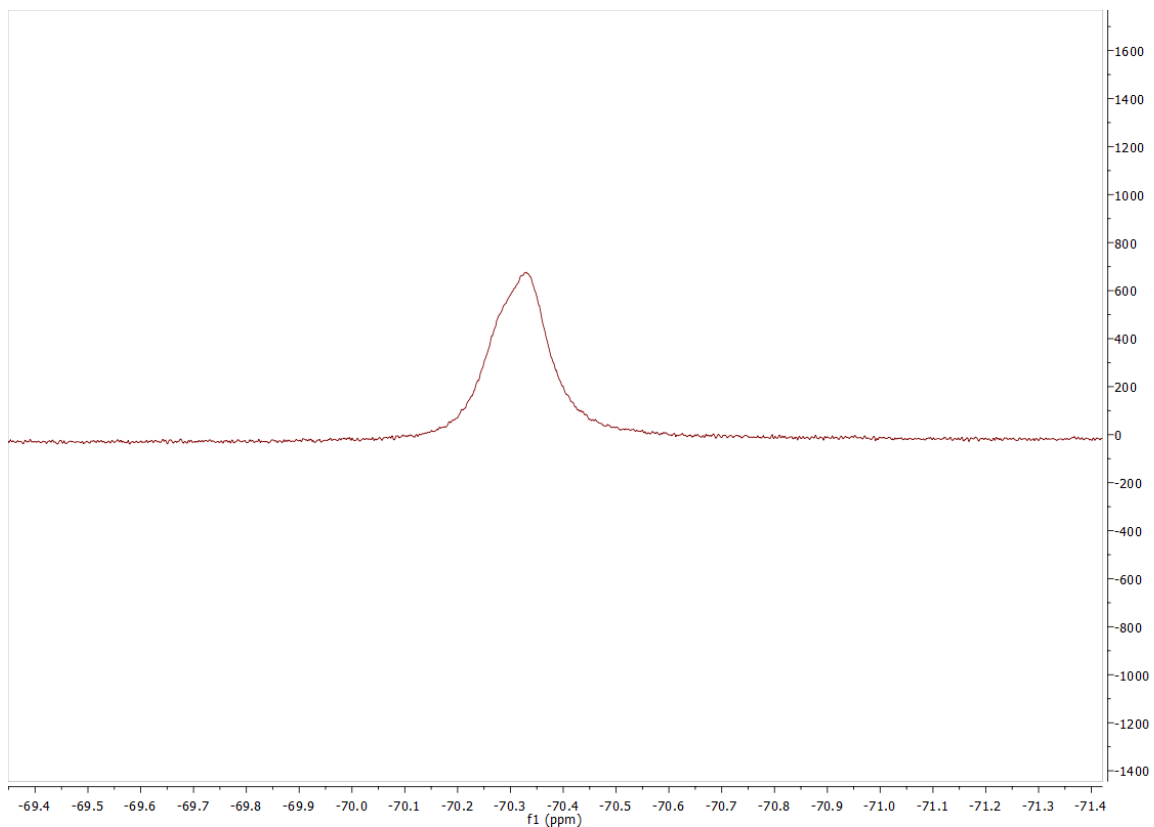
Příloha 10: Komplex Cu^{2+} -L1 – ^{19}F , měřeno v H_2O , pH = 7,65



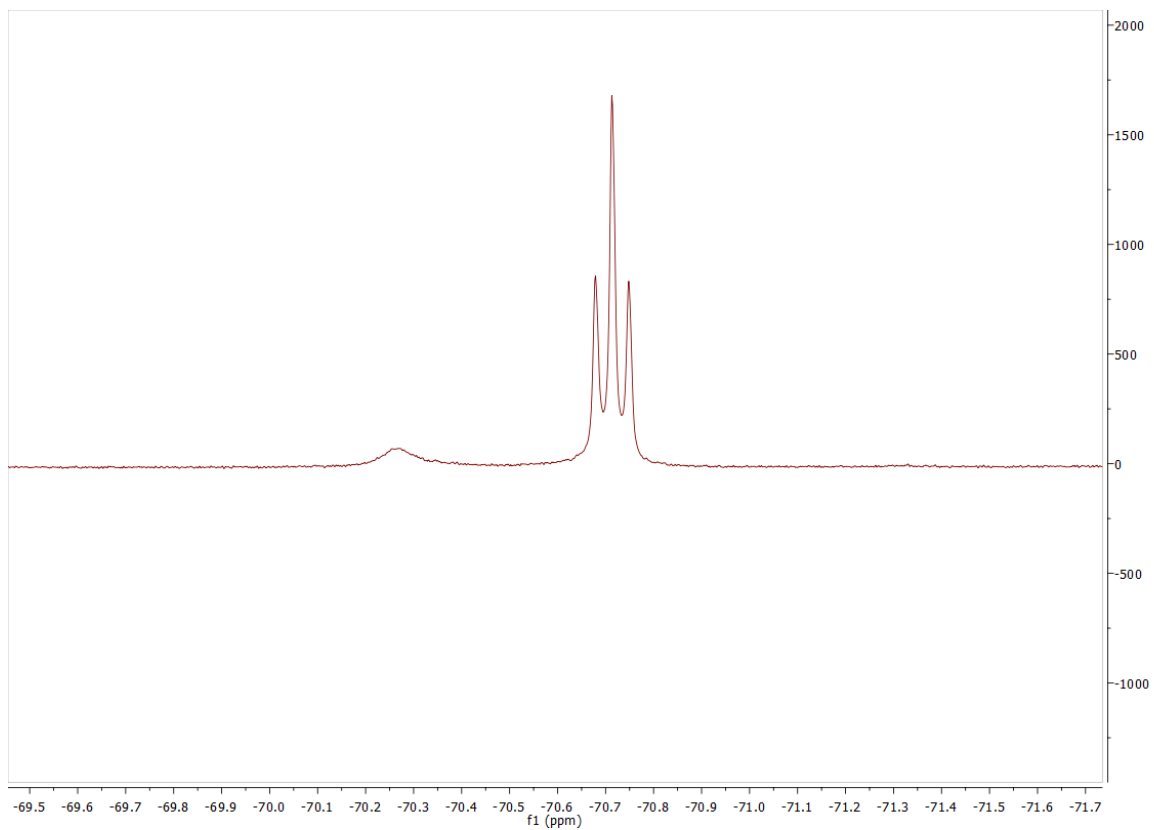
Příloha 11: Komplex Ni^{2+} -L1 – ^{19}F , měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,36$



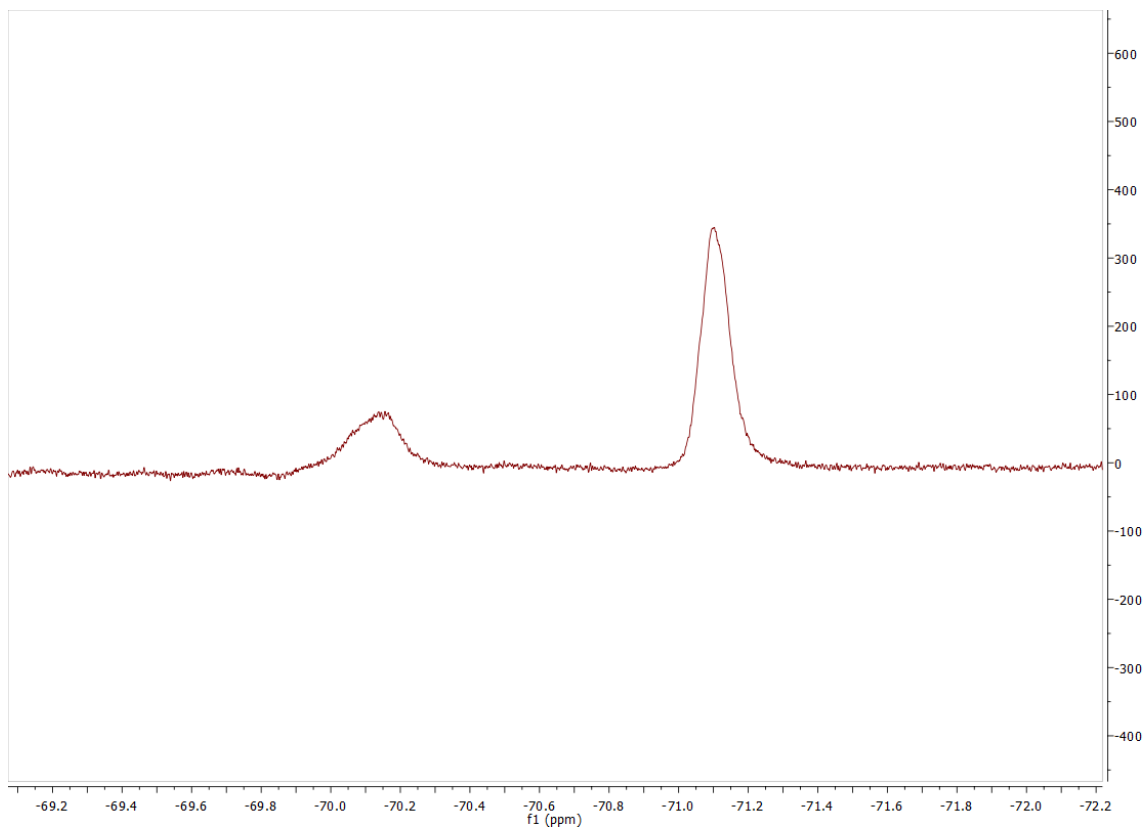
Příloha 12: Komplex Zn^{2+} -L2 – ^{19}F , měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,27$



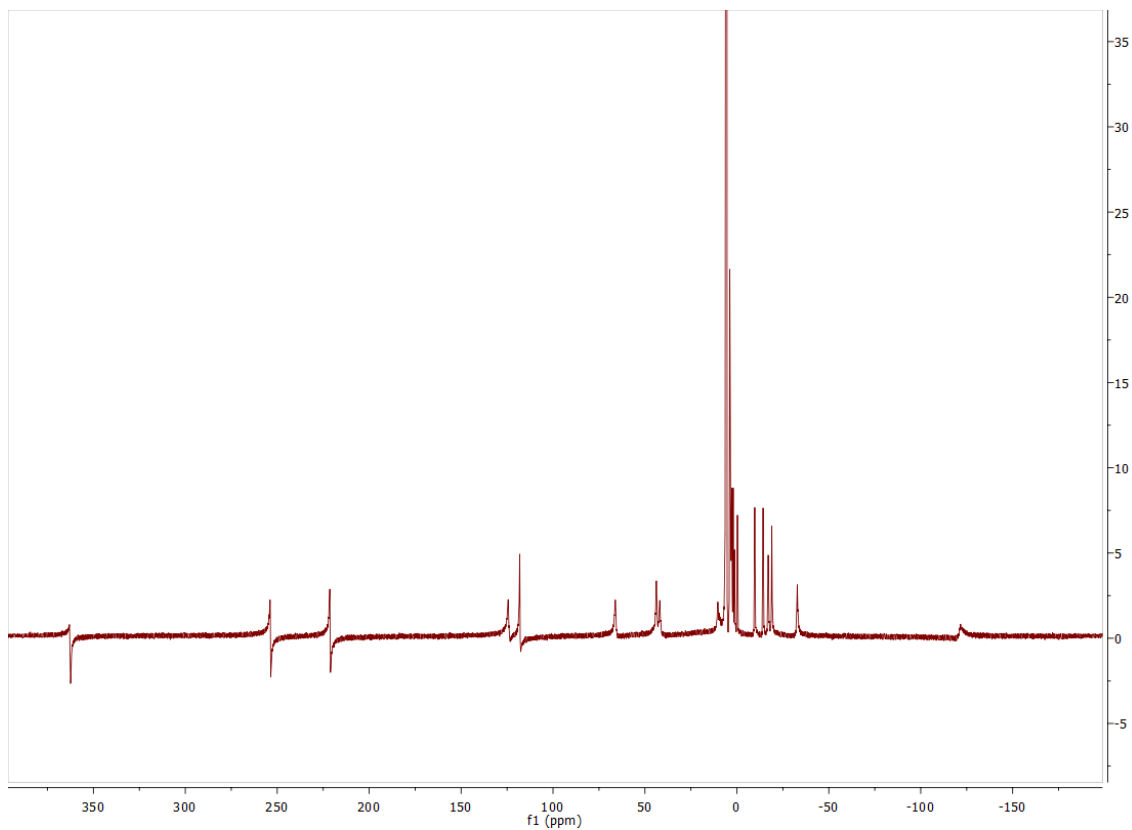
Příloha 13: Komplex Cu^{2+} -L2 – ^{19}F , měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,33$



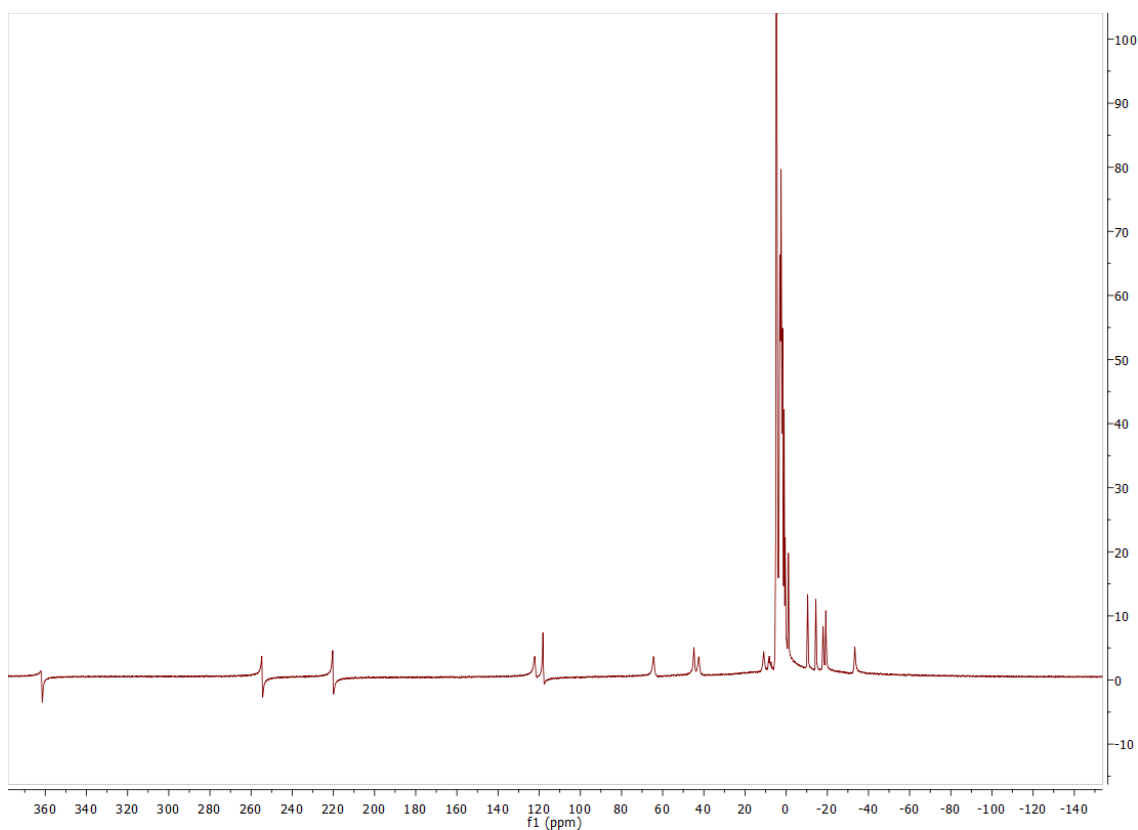
Příloha 14: Komplex Ni^{2+} -L2 – ^{19}F , měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,37$



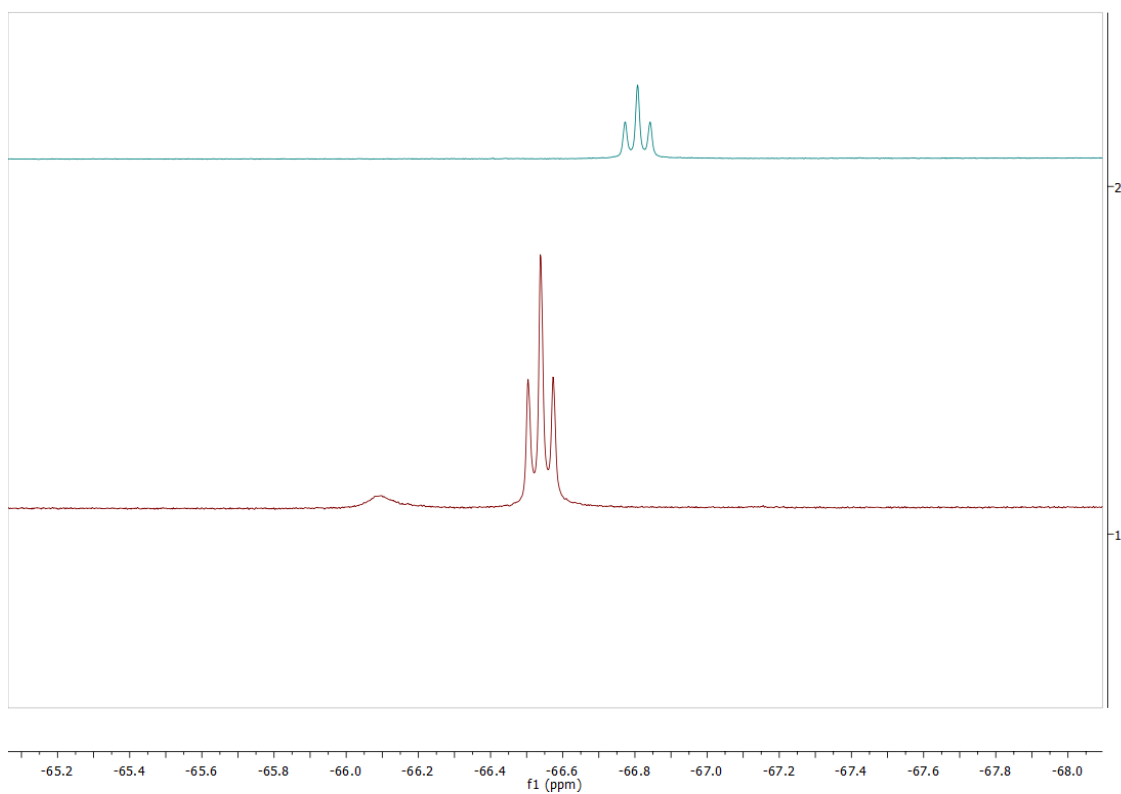
Příloha 15: Komplex Co^{2+} -L2 – ^{19}F , měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,08$



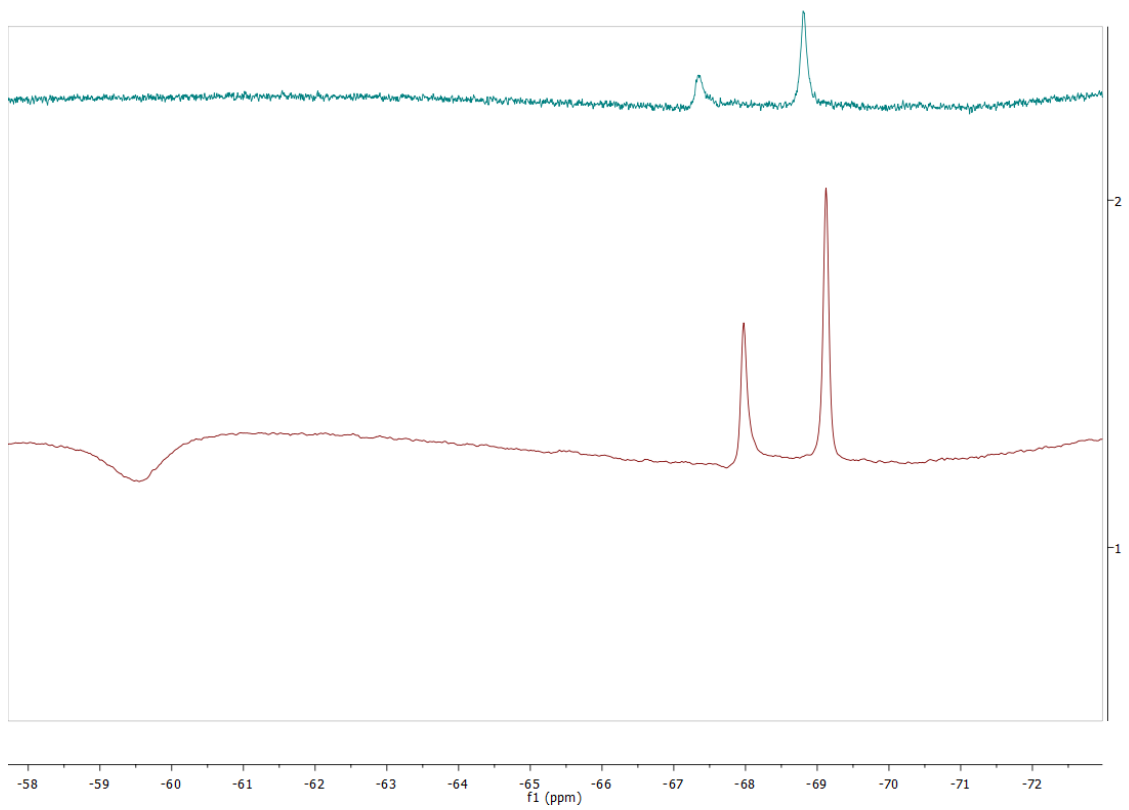
Příloha 16: Komplex Co^{2+} -L2 – ^1H , měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,31$



Příloha 17: Komplex Co^{2+} -L2 – ^1H , měřeno v D_2O , $\text{pD} = 7,58$



Příloha 18: Srovnání spekter volného ligandu L2 a komplexu Ni^{2+} -L2 – 19F, měřeno v H_2O ; horní spektrum – L2, $\text{pH} = 6,24$, dolní spektrum – Ni^{2+} -L2, $\text{pH} = 7,37$



Příloha 19: Srovnání spekter Ni^{2+} -L2: 1: teplotě 90 °C, 2: za laboratorní teploty – ^{19}F , měřeno v H_2O , $\text{pH} = 7,37$

Použité zkratky

AcOH	– kyselina octová
BnBr	– benzylbromid
CEST	– chemical exchange saturation transfer (přenos saturace chemickou výměnou)
CF ₃ COOEt	– ethyltrifluoroacetát
Cyklam	– 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan
Cyklen	– 1,4,7,10-tetraazacyklododekan
Diglym	– diethylenglykol dimethylether
DMF	– dimethylformamid
DTPA	– diethylenetriaminpentaoctová kyselina
EtOH	– ethanol
FID	– free induction decay
FT	– Fourierova transformace
ACN	– acetonitril
MRI	– magnetic resonance imaging (zobrazování magnetickou rozonací)
NMR	– nukleární magnetická rezonance
PARACEST	– paramagnetic chemical exchange saturation transfer (paramagnetický přenos saturace chemickou výměnou)
Pd/C	– palladium na uhlí
ppm	– parts per million
RF	– radiofrekvenční
RVO	– rotační vakuová odparka
TACN	– 1,4,7-triazacyklononan
TEAB	– tetraethylamonium bromid
satpwr	– saturation power (síla saturačního pulzu)
satdly	– saturation delay (délka saturačního pulzu)

Seznam zdrojů

1. Dračínský, M. NMR spektroskopie pro chemiky 1. Dostupné z: http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/747.pdf. (2.6.2018)
2. Becker, E. D. *High Resolution NMR. Theory and Chemical Applications*. Elsevier (1999).
3. Atkins, P. & Paula, J. D. E. *Fyzikální chemie (9th Edition)*. (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013).
4. Hendee, W. R. & Ritenour, E. R. *Medical Imaging Physics (4th Edition)*. (Wiley-Liss, 2002).
5. Kumar, A. History of MRI. *J. Indian Inst. Sci.* **94**, 363–370 (2014).
6. Hermann, P., Kotek, J., Kubiček, V. & Lukeš, I. Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the Complexes. *Dalton Trans.* **23**, 3027–3124 (2008).
7. Hingorani, D. V., Bernstein, A. S. & Pagel, M. D. A Review of Responsive MRI Contrast Agents: 2005–2014. *Contrast Media Mol. Imaging* **10**, 245–265 (2015).
8. Geraldes, C. F. G. C. & Laurent, S. Classification and Basic Properties of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 1–23 (2009).
9. Tirotta, I., Dichiarante, V., Pigliacelli, C., Terraneo, G., Bombelli, F. B., Metrangolo, P., Resnati, G. & Cavallo, G. ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications. *Chem. Rev.* **115**, 1106–1129 (2015).
10. Harvey, P., Kuprov, I. & Parker, D. Lanthanide Complexes as Paramagnetic Probes for ¹⁹F Magnetic Resonance. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2015–2022 (2012).
11. Chalmers, K. H., Kenwright, A. M., Parker, D. & Blamire, A. M. ¹⁹F-Lanthanide Complexes With Increased Sensitivity for ¹⁹F-MRI: Optimization of the MR Acquisition. *Magn. Reson. Med.* **66**, 931–936 (2011).
12. Chalmers, K. H., De Luca, E., Hogg, N. H. M., Kuprov, I., Parker, D., Botta, M., Wilson, J. I., Blamire, A. M. & Kenwright, A. M. Design Principles and Theory of Paramagnetic Fluorine-Labelled Lanthanide Complexes as Probes for ¹⁹F Magnetic Resonance: A Proof-of-Concept Study. *Chem. - Eur. J.* **16**, 134–148 (2010).
13. Srivastava, K., Weitz, E. A., Peterson, K. L., Marjańska, M. & Pierre, V. C. Fe- and

- Ln-DOTAm-F12 Are Effective Paramagnetic Fluorine Contrast Agents for MRI in Water and Blood. *Inorg. Chem.* **56**, 1546–1557 (2017).
14. Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M. & Kikuchi, K. Dual-Function Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and ^{19}F MRI. *Angew. Chem - Int. Ed.* **48**, 3641–3643 (2009).
 15. Senanayake, P. K., Kenwright, A. M., Parker, D. & Van Der Hoorn, S. K. Responsive Fluorinated Lanthanide Probes for ^{19}F Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chem. Commun.* **28**, 2923–2925 (2007).
 16. Van Zijl, P. C. M. & Yadav, N. N. Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST): What is in a Name and What Isn't? *Magn. Reson. Med.* **65**, 927–948 (2011).
 17. Dorazio, S. J. & Morrow, J. R. The Development of Iron(II) Complexes as ParaCEST MRI Contrast Agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **12**, 2006–2014 (2012).
 18. Woods, M., Woessner, D. E. & Sherry, A. D. Paramagnetic Lanthanide Complexes as PARACEST Agents for Medical Imaging. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 500 (2006).
 19. Ali, M. M., Liu, G., Shah, T., Flask, C. A. & Pagel, M. D. Using Two Chemical Exchange Saturation Transfer Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Molecular Imaging Studies. *Acc. Chem. Res.* **42**, 915–924 (2009).
 20. Dorazio, S. J., Olatunde, A. O., Tsitovich, P. B. & Morrow, J. R. Comparison of Divalent Transition Metal Ion ParaCEST MRI Contrast Agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 191–205 (2014).
 21. Soesbe, T. C., Wu, Y. & Sherry, A. D. Advantages of paramagnetic chemical exchange saturation transfer (CEST) complexes having slow to intermediate water exchange properties as responsive MRI agents. *NMR Biomed.* **26**, 829–838 (2013).
 22. Zhang, S., Trokowski, R. & Sherry, A. D. A Paramagnetic CEST Agent for Imaging Glucose by MRI. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 15288–15289 (2003).
 23. Krchová, T., Gálisová, A., Jiráček, D., Hermann, P. & Kotek, J. Ln(III)-Complexes of a DOTA Analogue with an Ethylenediamine Pendant Arm as pH-Responsive PARACEST Contrast Agents. *Dalton Trans.* **45**, 3486–3496 (2016).
 24. Špánek, J. Bakalářská práce. Kontrastní látky pro ^{19}F -MRI. (Univerzita Karlova v Praze, 2016).
 25. Blahut, J., Hermann, P., Gálisová, A., Herynek, V., Císařová, I., Tošner, Z. & Kotek, J. Nickel(II) Complexes of N- CH_2CF_3 Cyclam Derivatives as Contrast Agents

- for ^{19}F Magnetic Resonance Imaging. *Dalton Trans.* **45**, 474–478 (2016).
26. Blahut, J., Bernášek, K., Gálisová, A., Herynek, V., Císařová, I., Kotek, J., Lang, J., Matějková, S. & Hermann, P. Paramagnetic ^{19}F Relaxation Enhancement in Nickel(II) Complexes of *N*-Trifluoroethyl Cyclam Derivatives and Cell Labeling for ^{19}F MRI. *Inorg. Chem.* **56**, 13337–13348 (2017).
 27. Olatunde, A. O., Dorazio, S. J., Sperryak, J. A. & Morrow, J. R. The NiCEST Approach: Nickel(II) ParaCEST MRI Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18503–18505 (2012).
 28. Kývala, M. & Lukeš, I. CHEMOMETRICS'95. Pardubice, Česká republika. Book of Abstracts p. 63 (1995).
 29. Krchová, T., Kotek, J., Jiráček, D., Havlíčková, J., Císařová, I. & Hermann, P. Lanthanide(III) Complexes of Aminoethyl-DO3A as PARACEST Contrast Agents Based on Decoordination of the Weakly Bound Amino Group. *Dalton Trans.* **42**, 15735–15747 (2013).
 30. Royal, G., Dahaoui-Gindrey, V., Dahaoui, S., Tabard, A., Guillard, R., Pullumbi, P. & Lecomte, C. New Synthesis of Trans-disubstituted Cyclam Macrocycles - Elucidation of the Disubstitution Mechanism on the Basis of X-ray Data and Molecular Modeling. *Eur. J. Org. Chem.* 1971–1975 (1998).
 31. Martell, A. E., Smith, R. M. & Motekaitis, R. J. NIST Standard Reference Database 46 (Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes), Version 7.0. (2003).
 32. Bosnich, B., Tobe, M. L. & Webb, G. A. Complexes of Nickel(II) with a Cyclic Tetradentate Secondary Amine. *Inorg. Chem.* **4**, 1109–1112 (1965).
 33. MRI Scan in Fayetteville, NC | Valley Radiology. Available at: <https://www.valleyradiologync.com/services/mri-scan>. (6.7.2018)
 34. Magnetic Resonance at the Department of Molecular Cardiology. Available at: <http://www.nmr.uni-duesseldorf.de/sets/fluorine.html>. (6.7.2018)