

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Jan Kubinec

Komplexy derivátů 1,4,7-triazacyklononanu

Complexes of 1,4,7-triazacyclononane derivatives

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
doc. RNDr. Vojtěch Kubíček

Praha 2019

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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne

.....

Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na přípravu monoamidu makrocyklu H₃NOTA, který byl připraven několika krokovou syntézou. Ligand byl charakterizován pomocí NMR, MS a rentgenové difrakční analýzy. Potenciometricky bylo studováno acidobazické chování ligandu. Byly stanoveny čtyři protonizační konstanty pK_a , které jsou nižší než hodnoty protonizačních konstant ligandu H₃NOTA. Potenciometricky byly zkoumány i koordinační vlastnosti s ionty vybraných přechodných kovů, ionty biologického zájmu a lithnými ionty. Konstanty stability komplexů ukazují, že monoethyl amidický derivát H₃NOTA tvoří méně stabilní komplexy než diethylamidický derivát. Konstanty stability pro komplexy s derivatizovanými ligandy jsou nižší než pro komplexy s H₃NOTA. Pomocí ⁷¹Ga NMR byla zkoumána kinetika komplexace Ga³⁺ při různých pH a byly stanoveny rychlostní konstanty a poločasy komplexace. Poločasy komplexace jsou při pH = 1 pro oba ligandy nižší než pro ligand H₃NOTA.

Klíčová slova: makrocyclické komplexy, termodynamická stabilita, formační kinetika, radiofarmaka

Abstract

The aim of this thesis was to prepare monoamide of macrocycle H₃NOTA, which was prepared by multiple step synthesis. Ligand was characterized by NMR, MS and X-ray diffraction analysis. Acid-base properties were studied by potentiometric titrations. Four protonation constants pK_a 's were found and these protonation constants are lower than pK_a 's of H₃NOTA. Coordination properties with selected metal ions from the first row of transition metal, metal ions of biological interest and with lithium ions were investigated by potentiometric titration. Stability constants show that monoethylamide derivative of macrocycle H₃NOTA forms complexes with lower stability than diethylamide derivative of macrocycle H₃NOTA. Stability constants for complexes which contains amide group are lower than for H₃NOTA complexes. Kinetics of Ga³⁺ complexation was investigated at different pH by ⁷¹Ga NMR. The rate constants of and half-lives of complexation were determined at pH = 1. The rate constant was higher and the half-life of complexation was shorter than for H₃NOTA ligand.

Key words: macrocyclic complexes, thermodynamic stability, formation kinetics, radiopharmaceutical

1 Obsah

1	OBSAH	- 3 -
2	ÚVOD	- 7 -
2.1	ZOBRAZOVACÍ TECHNIKY	- 7 -
2.2	RADIOCHEMICKÉ METODY – PET	- 7 -
2.3	TARGETING NEBOLI CÍLENÁ AKUMULACE RADIOFARMAKA	- 9 -
2.4	TERANOSTIKA	- 10 -
2.4.1	TERANOSTICKÉ PÁRY KOVŮ	- 12 -
2.5	VÝZKUM NA LIGANDU H₃NOTA	- 13 -
2.5.1	KONJUGÁTY LIGANDU SE ZACHOVÁNÍM SKELETU H ₃ NOTA	- 16 -
2.5.2	AMIDICKÉ KONJUGÁTY H ₃ NOTA	- 18 -
3	HLAVNÍ MOTIVACE A CÍLE PRÁCE	- 23 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 25 -
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	- 25 -
4.2	METODY CHARAKTERIZACE	- 25 -
4.2.1	NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE (NMR)	- 25 -
4.2.2	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)	- 25 -
4.2.3	CHROMATOGRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ (TLC)	- 25 -
4.2.4	ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA	- 26 -
4.2.5	POTENCIOMETRICKÉ TITRACE ⁴⁷	- 26 -
4.2.6	¹ H NMR TITRACE A UV/VIS TITRACE	- 27 -
4.2.7	RENTGENOVÁ STRUKTURNÍ ANALÝZA (RTG)	- 28 -
4.3	SYNTÉZA	- 29 -
4.3.1	SYNTÉZA NO ₂ A- <i>t</i> Bu PŘÍMOU CESTOU (1) ⁵³	- 29 -
4.3.2	2-CHLORO- <i>N</i> -ETHYLACETAMID (2)	- 29 -
4.3.3	DI- <i>TERT</i> -BUTYL 7-(2-(ETHYLAMINO)-2-OXOETHYL)-1,4,7-TRIAZONAN-1,4-DIACETÁT (3)	- 30 -

4.3.4	KYSELINA 7-(2-(ETHYLAMINO)-2-OXOETHYL)-1,4,7-TRIAZONAN-1,4-DIOCTOVÁ (4)	- 31 -
5	DISKUZE	- 32 -
5.1	SYNTÉZA	- 32 -
5.2	STRUKTURA LIGANDŮ V PEVNÉ FÁZI	- 34 -
5.3	POTENCIOMETRICKÉ TITRACE	- 37 -
5.3.1	ACIDOBAZICKÉ VLASTNOSTI	- 37 -
5.3.2	KOORDINAČNÍ VLASTNOSTI	- 38 -
5.4	⁷¹ Ga NMR SPEKTROSKOPIE	- 49 -
6	ZÁVĚR	- 52 -
7	LITERATURA	- 53 -

Seznam použitých zkratek

MRI	Magnetic Resonance Imaging (tomografie magnetické rezonance)
CT	Computed Tomography (počítačová tomografie)
PET	Positron Emission Tomography (pozitronová emisní tomografie)
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography (jednofotonová emisní tomografie)
NMR	Nukleární Magnetická Resonance
TACN	1,4,7-triazacyklononan
H ₃ NOTA	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová
[18F]-FDG	2-deoxy-2-[¹⁸ F]fluoroglukóza
RVO	rotační vakuová odparka
BnTACN	1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan
BrAcOtBu	<i>tert</i> -butylbromoacetát
AcONa	octan sodný
MeCN	acetonitril (methylkyanid)
H ₄ DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
H ₄ TETA	kyselina 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,8,11-tetraoctová
H ₅ NODAGA	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1-glutamová-4,7-dioctová
H ₅ NODASA	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1-jantarová-4,7-dioctová
H ₃ TRAP	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-tris-(methylfosfinová)
H ₃ TRAP-Pr	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-tris-[methyl(2-carboxyethyl) fosfinová]
H ₆ TRAP-OH	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-tris-[methylene-(hydroxymethyl) fosfinová]
TFA	trifluoroacetic acid (kyselina trifluoroctová)
LT	laboratorní teplota
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
DIC	diisopropylcarbodiimid
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát

H ₂ NO ₂ A-DEA	kyselina 7-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-dioctová
H ₂ NO ₂ A-MEA	kyselina 7-(2-(ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-dioctová
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
AMPSO	kyselina <i>N</i> -(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropansulfonová

2 Úvod

2.1 Zobrazovací techniky

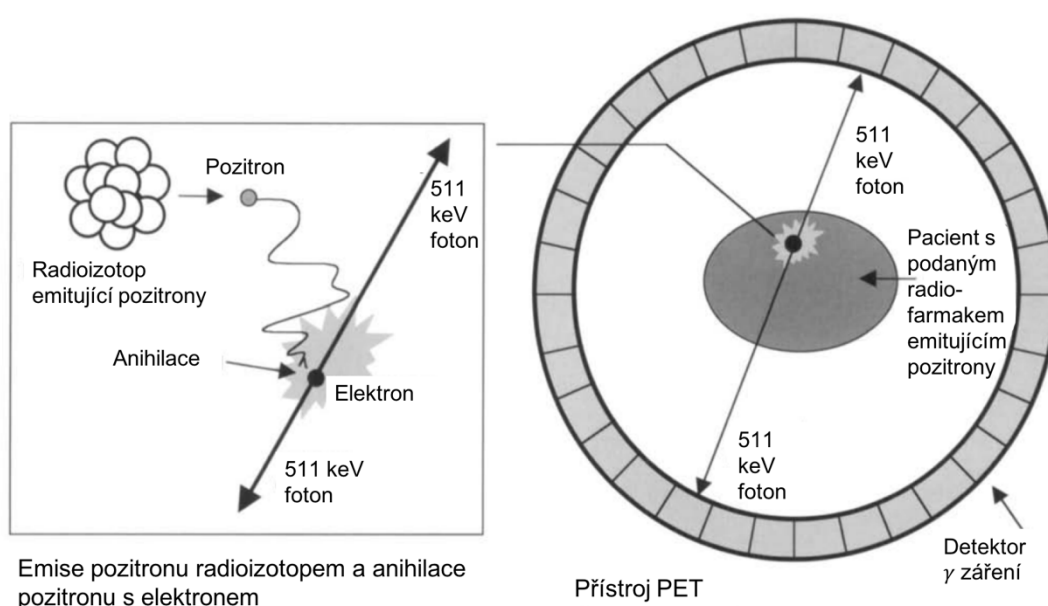
Molekulární zobrazovací techniky hrají v dnešní době klíčovou roli v diagnostickém procesu. Molekulární zobrazování je soubor technik s různým základem, ale se stejným cílem; neinvazivně vizualizovat vnitřní struktury organismů a buněčné procesy v nich. Interakce vodíkových atomů s magnetickým polem využívá technika magnetické rezonance – MRI. Interakci se světlem, kde zdrojem kontrastu je fluorescence nebo absorpce, využívají optické metody, které mají hlavní nevýhodu v nízké penetraci elektromagnetického záření do tkání. Poslední skupina zobrazovacích metod využívá detekce ionizujícího záření.

První úspěšný pokus v oboru molekulárního zobrazování zaznamenal na konci 19. století Wilhelm Conrad Röntgen, který využil γ záření o vlnové délce 0,1–10 nm s následnou fotografickou detekcí. Záření vyslané směrem k vyšetřovanému objektu je různou měrou absorbované, což závisí na charakteristice tkáně. Tvrdé tkáně absorbují toto záření mnohonásobně více než tkáně měkké. Základním uspořádáním této techniky, kde rentgenová výbojka je statická, lze získat dvoudimensionální obraz. Výraznou modernizaci znamenal pro tento typ vyšetření pohybující se zdroj ionizujícího záření a scintilační detektor. V tomto CT (Computed Tomography) vyšetření počítač pomocí algoritmů vypočítává z několika set planárních řezů trojrozměrný obraz vyšetřovaného objektu. Dávka ionizačního záření při tomto vyšetření je však mnohonásobně vyšší než při běžném rentgenovém vyšetření.

2.2 Radiochemické metody – PET

Zobrazovací techniky využívající radiofarmaka jsou důležité zejména svou citlivostí. Mezi tyto metody se řadí zejména dvě významné zobrazovací metody. PET z anglického Positron Emission Tomography a SPECT což znamená Single Photon Emission Computed Tomography. Rozdíl mezi nimi je především v rozdílném zdroji ionizujícího záření. Od výše zmíněného rentgenového nebo CT vyšetření se liší tím, že zářič, který je navázán na vhodné radiofarmakum, je vpraven do krevního oběhu. Následuje distribuce v organismu podle povahy použitého radiofarmaka. Různé chemické vlastnosti (např. lipofilita, velikost molekuly nebo navázaná bioaktivní látka) radiofarmaka mohou významně ovlivnit distribuci. Toto mají obě metody společné. SPECT vyšetření používá

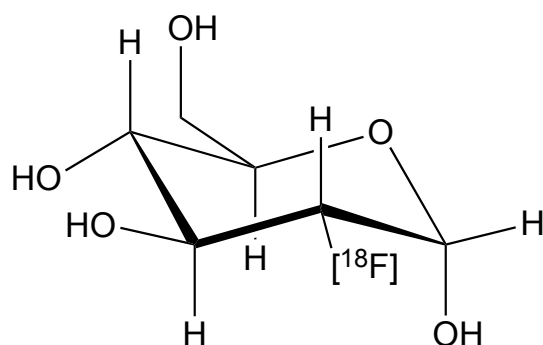
jako zdroj kontrastu γ zářiče a metoda PET používá jako zdroje záření v radiofarmakách β^+ zářiče. β^+ emitorů je mnoho, ale ne každý je vhodný pro tyto klinické účely. Vhodnost nuklidu se určuje podle několika parametrů: poločasu rozpadu, energie emitované β^+ částice a nároků na přípravu. β^+ zářič se rozpadá za uvolnění jednoho pozitronu, který proniká tkáněmi do vzdálenosti dané svou počáteční energií a poté anihiluje s elektronem. Anihilací vzniknou dva vzájemně antiparalelní γ fotony s energií 511 keV, které jsou zachyceny scintilačním detektorem. Vyloučeny z detekce jsou páry fotonů, které nedopadnou ve stejný čas a ve správném úhlu. Princip této metody je schematicky ukázán na Obrázku 1. Poměrně vysoká citlivost a nízký šum dělají z PET jeden z nejmocnějších molekulárně zobrazovacích nástrojů.



Obrázek 1: Schéma vyšetření pomocí pozitronové emisní tomografie.¹

Nejčastěji používané radiofarmakum jako kontrastní látka v PET je [18F]-FDG (Obrázek 2), které je cílené díky Warburgovu efektu na rychle rostoucí rakovinné buňky využívající ve svém metabolismu prakticky jen glykolýzu a také na buňky využívající nadměrné množství glukózy (např. buňky mozku).² Klíčovými vlastnostmi ^{18}F jsou vhodná doba poločasu rozpadu ($t_{1/2} = 110$ minut) a nízká energie vyzářeného pozitronu (640 keV).³ Poločas rozpadu je dostatečně dlouhý na to, aby se ^{18}F stihl inkorporovat do molekuly radiofarmaka, vpravit do těla pacienta a jeho následnou distribuci v pacientovi. Nízká výchozí energie emitovaného fotonu má za následek nízkou penetraci tkáněmi a

anihilaci s elektronem po uražení vzdálenosti okolo 2 mm. Vhodnými pozitronovými zářiči jsou také kovy, které nabízí mnoho izotopů rozpadajících se β^+ rozpadem (Tabulka 1).



Obrázek 2: Struktura molekuly $[^{18}\text{F}]$ -FDG.

Kvůli toxicitě volných iontů kovů a jejich nesespecifickému ukládání v organismu se zpravidla vážou do termodynamicky stabilních a zároveň kineticky inertních komplexů. Vhodnými ligandy jsou pro tyto účely makrocyclické polyaminy, které jsou výbornými ligandy pro řadu iontů přechodných kovů.

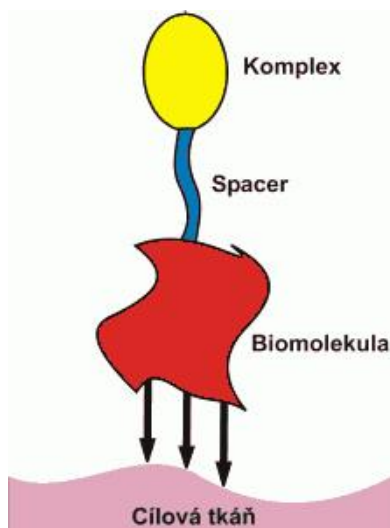
Tabulka 1: Vybrané izotopy kovů využívané v PET vztahující se k tematice práce.⁴

Izotop	$t_{1/2}$ [hod]	Příprava	β^+ [%]
^{60}Cu	0,4	$^{60}\text{Ni}(p,n)^{60}\text{Cu}$, cyklotron	93
^{61}Cu	3,3	$^{61}\text{Ni}(p,n)^{61}\text{Cu}$, generátor	62
^{62}Cu	0,16	$^{62}\text{Zn}(\beta^-)^{62}\text{Cu}$, generátor	98
^{64}Cu	12,7	$^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$, cyklotron	19
^{68}Ga	1,1	$^{68}\text{Ge}(\beta^-)^{68}\text{Ga}$, generátor	90

2.3 Targeting neboli cílená akumulace radiofarmaka

Molekula radiofarmaka musí být akumulována v cílové tkáni. Některá radiofarmaka sama od sebe cílí na tumorové buňky. Jedním z případů je výše zmíněná $[^{18}\text{F}]$ -FDG. Ostatním radiofarmakům musí pomoci na dané místo nějaká část molekuly, kterou je nejčastěji nějaká biologicky aktivní látka mající vysokou a specifickou afinitu ke zkoumané tkáni. Biologicky aktivní látka bývá připojen spojku (linkerem) s částí molekuly, kde je navázán vhodný radioizotop. Distribuci na specifické místo mají za úkol

především biomolekuly a jejich syntetické analogy.⁵ Velkou skupinou jsou peptidy, kde se zkoumají například cyklické RGD deriváty jako agonisty $\alpha\beta_3$ integrinů, které se nacházejí ve velké míře na povrchu tumorových buněk. Pro zobrazování neuroendokrinních nádorů se ukázaly jako úspěšné kontrastní látky nesoucí biomolekulu založenou na analogu somatostatinu, protože tyto nádory vytvářejí vysokou koncentraci receptorů pro tento hormon.⁶ Další možností jsou protilátky proti určitým proteinům vyskytujícím se hlavně v tumorových buňkách. Cílení na tumorové buňky pomocí protilátek s sebou nese několik nevýhod, které souvisí s charakteristikami molekuly.⁷ Celé protilátky mají velmi pomalé vylučování z těla, čímž se prodlužuje jejich čas strávený v organismu, což zvyšuje dávku radiace, kterou organismus přijme. Toto odstraňují enzymatické štěpy (tzv. „minibodies“) z velkých protilátek, které se rychleji vylučují a jejich použití je jednodušší.

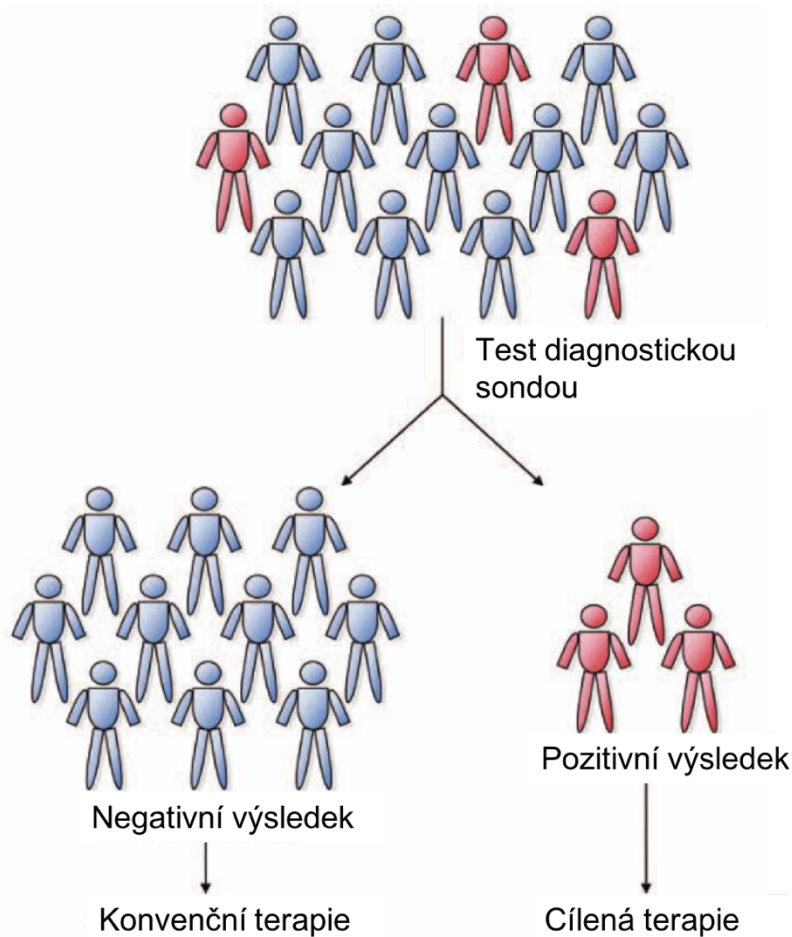


Obrázek 3: Obecné schéma cílení („targetingu“) radiofarmak.⁸

2.4 Teranostika

Tento termín, jehož název vznikl sloučením anglických slov „therapy“ a „diagnostics“, byl poprvé použit v roce 2002. Teranostika se zabývá diagnózou a léčbou onemocnění. Teranosticky využitelná farmaka by měla umět zároveň diagnostikovat specifické onemocnění a zároveň dané onemocnění léčit. Za diagnostické vlastnosti molekuly farmaka je zodpovědná část, která funguje jako kontrastní látka. Farmaka obsahující kov se dají detekovat v těle například pomocí MRI pro kovy zkracující T_1 relaxační čas vody a metody SPECT nebo PET pro kovy, které jsou β^+ či γ zářiči.

Terapeutická část teranostické molekuly by měla léčit dané onemocnění. Toto specifické farmakum je zacílené na dané onemocnění pomocí biologicky aktivní molekuly.⁹ Jiný přístup v teranostice využívá jednoho farmaka s ligandovým místem, kam se váže ion kovu, který emituje ionizující záření. Podle navázaného kovu a jeho charakteru se mění využití léčiva. Je-li ve struktuře radioizotop kovu rozpadající se β^+ či γ zářením, tak se dá tímto farmakem diagnostikovat onemocnění. Výměnou za radioizotop rozpadající se β^- nebo α zářením se změní se léčivo z diagnostického na terapeutické.



Obrázek 4: Výběr pacientů k léčbě specificky cíleným farmakem.¹⁰

Před nasazením léčiva obsahujícího terapeuticky aktivní část se musí zjistit, zda je pacient vůbec pro takovou léčbu vhodný. Může tomu napovídat druh nádoru, histologické vyšetření nebo vyšetření s diagnostickým typem farmaka.¹¹ Pokud pacient vykazuje pozitivní reakci na diagnostický typ farmaka nebo je histologie pozitivní na buňky mající specifický receptor na látku navázanou na farmaku, tak může pacient podstoupit cílenou terapii pomocí farmaka specificky modifikovaného pro terapeutické využití. Ostatní

pacienti nevhodní pro specificky cílenou léčbu jsou léčeni standardním procesem (Obrázek 4). Tímto postupem se dostáváme od farmak typu „jedna léčba pro všechny“ k více „personalizované“ medicíně.¹² Typický příklad a zároveň první teranostická léčba spadá do 40. let, kde byl použit ^{123}I jako γ zářič pro zobrazování štítné žlázy, protože buňky štítné žlázy jako jediné jsou schopné přijímat a zpracovávat jod, čímž je zaručena specifická distribuce. Izotop ^{131}I , který produkuje jak β^- tak γ záření, byl použit pro léčbu rakoviny štítné žlázy.^{13,14}

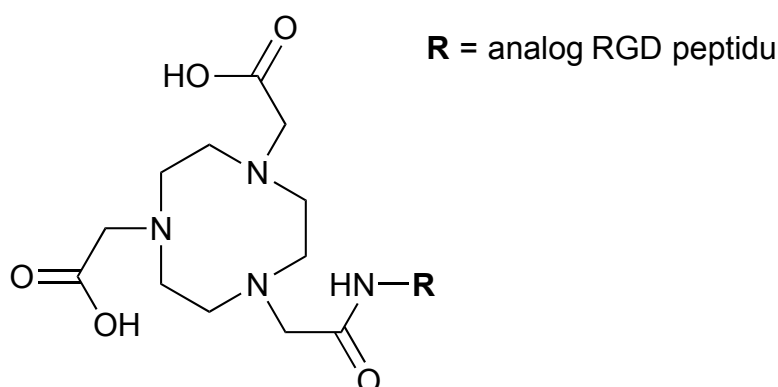
2.4.1 Teranostické páry kovů

Kovy nabízejí širokou paletu izotopů, které se už v praxi využívají nebo mají potenciál pro klinickou aplikaci. V radiofarmaku je komplex radioizotopu, který je konjugovaný s látkou zaručující specifickou distribuci. Modifikace účinků radiofarmaka se docílí výměnou kovu v komplexu za jiný rozpadající se jiným druhem radioaktivní přeměny. V ideálním případě se diagnostický izotop kovu je vyměněn za jiný terapeuticky použitelný izotop, čímž je zaručeno stejné chemické chování radiofarmaka. Některé vhodné páry izotopů kovů s menším atomovým poloměrem jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Vybrané páry izotopů kovů využitelných pro diagnostiku a terapii.^{4,15-17}

Izotop	$t_{1/2}$ [hod]	Příprava	Rozpad [%]
^{44}Sc	3,97	$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$, generátor	β^+ 94
^{47}Sc	80,4	$^{46}\text{Ca}(n,\gamma)\rightarrow ^{47}\text{Ca}(t_{1/2} = 4,54\text{d})(\beta^-)$ $\rightarrow ^{47}\text{Sc}$, cyklotron	β^- 100
^{64}Cu	12,7	$^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$, cyklotron	β^+ 19 β^- 40
^{67}Cu	62,4	$^{\text{nat}}\text{Zn}(p, 2p)$, cyklotron	β^- 100
^{86}Y	14,7	$^{86}\text{Sr}(p, n)^{86}\text{Y}$, cyklotron	β^+ 33
^{90}Y	64,1	$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, generátor	β^- 100

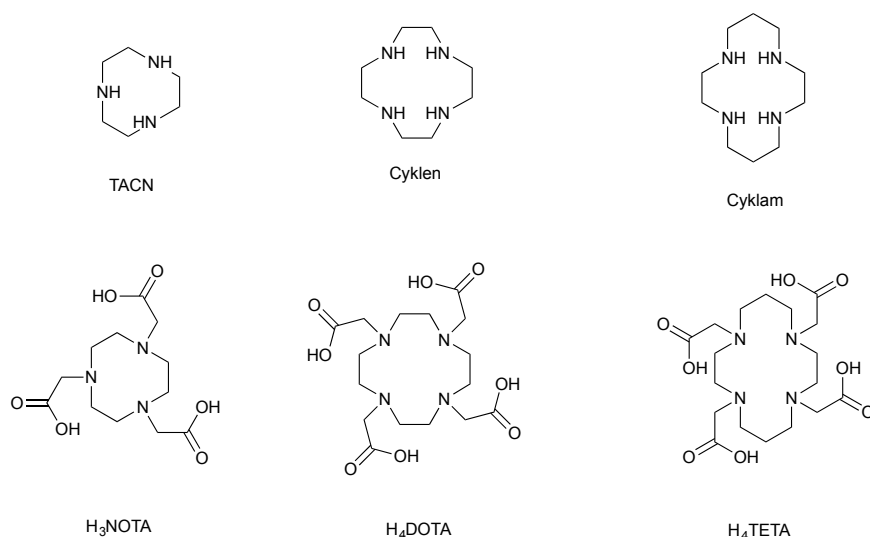
Skandité ionty byly úspěšně použity jako terapeutické farmakum na myších v komplexu s monoamidem makrocyklu H₄DOTA (Obrázek 6) s kyselinou listovou, kdy se akumulovalo v kreatin tvořících karcinogenních buňkách, tvořících nádory v ústech a ledvinách.¹⁵ Yttritíe ionty skýtají problém v tom, že se rozpadají pouze ze 33 % β^+ rozpadem a doprovázející γ záření narušuje čistý PET záznam, což snižuje kontrast.¹⁸ Měďnaté ionty byly použité jako experimentální kontrastní látka v komplexu s ligandem H₂NO₂A-RGD, na který byl amidickou vazbou připojen analog agonisty RGD-bombesin (Obrázek 5).¹⁹ Pro terapeutické účely byl využit konjugát protilátky anti-CD99 s ligandem p-NH₂-Bn-H₃NOTA (Tabulka 4), který prokázal účinnost léčby na mikrometastáze.²⁰



Obrázek 5: Struktura ligandu H₂NO₂A-RGD zmíněného výše.

2.5 Výzkum na ligandu H₃NOTA

Intenzivní vývoj ligandů vhodných pro komplexaci měďnatých iontů probíhal zejména kvůli několika slibným izotopům potenciálně využitelných v radiofarmacii. První volba padla na cyklam (Obrázek 6), jelikož jeho kavita je natolik velká, že se měďnatý kation vejde do kavity makrocyklu mezi atomy dusíku. Výzkum ale ukázal, že pro měďnaté kationty není cyklam příliš vhodný, jelikož se měďnaté ionty redukovaly z Cu²⁺ na Cu⁺ a následně se dekoordinovaly. Proto byly zkoumány vylepšené ligandy na bázi cyklamu s různými pendantními rameny,^{21–23} ale i makrocyclické ligandy jiné velikosti. Menšími analogy cyklamu jsou cyklen (Obrázek 6), který má čtyři atomy dusíku spojené ethylenovými můstky a TACN, který obsahuje pouze tři stejně propojené atomy dusíku.



Obrázek 6: Struktury některých makrocyclických ligandů vztahujících se k tématu.

Díky nevýhodám cyklamu a jeho derivátů byly zkoumány další podobné ligandy a H₃NOTA (Obrázek 6) se ukázal nejlepší volbou pro malé přechodné kovy, hlavně kvůli svému výhodnému uspořádání. Je vhodný, zejména díky velikosti své kavity, pro kovy z první řady přechodných prvků.²⁴ Nabízí šest donorových atomů, které jsou vhodné pro tvrdé lewisovské kyseliny preferující oktaedrickou koordinační sféru. Zwitterionická forma tohoto ligandu v pevné fázi má ve středu makrocyclické kavity vázaný proton, který je v kontaktu přes vodíkovou vazbu se zbylými atomy dusíku.²⁵ Jedna karboxylová skupina se podílí na intermolekulární vazbě a zbylé dva karboxyly jsou protonované. Protonizační konstanty byly v minulosti několikrát stanoveny většinou v přítomnosti alkalických kovů.^{26,27} Koordinující kation, pocházející z hydroxidu použitého jako titrační činidlo a nebo ze základního elektrolytu, se může slabě koordinovat na polyazamakrocycly a tím snižovat protonizační konstantu v nejbazičtější části měření.^{28,29} Při použití nekoordinujícího titračního činidla se projevilo zvýšení hodnoty nejvyšší protonizační konstanty. Ligand H₃NOTA má pět protonizačních konstant 13,17, 5,74, 3,22, 1,96 a 0,70.²⁵

Měďnaté ionty jsou komplexovány ligandem H₃NOTA velmi dobře a už při pH < 1,5 je komplex kvantitativně vytvořen.²⁵ Spektrofotometrie zároveň prokázala přítomnost mono a diprotonovaného komplexu, který vzniká díky Jahn-Tellerovu efektu, který oslabuje koordinaci axiálních ligandů. Komplex měďnatých kationtů s ligandem H₃NOTA ($\log K = 23,33$), v porovnání s ligandy H₄DOTA a H₄TETA (Obrázek 6), které

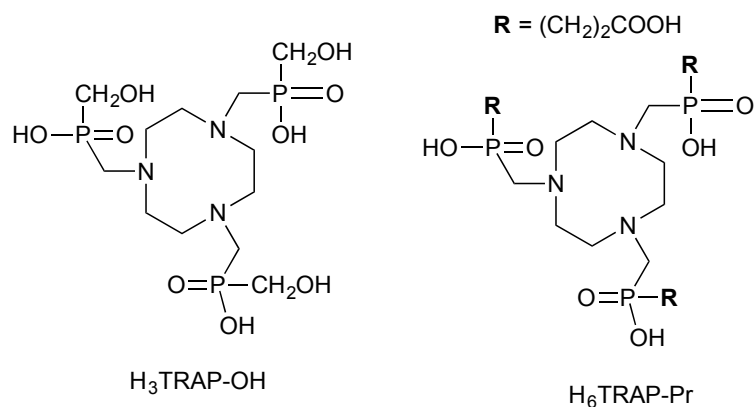
taktéž tvoří komplexy s měďnatými kationty, vykazuje o řád až dva vyšší konstantu stability.

V pevném stavu byl pozorován a popsán výše zmíněný monoprotizovaný komplex [Cu(HNOTA)], který je pouze pentakoordinovaný a proton je lokalizován na karboxylátu. Deformovaná equatoriální rovina je tvořena N₂O₂, zbylý atom dusíku je v axiální poloze a protonizovaný karboxylát je ve větší vzdálenosti od kovu.³⁰ V kyselějším prostředí je komplex [Cu(Cl)(H₂NOTA)] také pentakoordinován, kde je ekvatoriální rovina tvořena N₂OCl atomy, jeden axiální vrchol je tvořen posledním atomem dusíku z makrocyclu a druhý je tvořen koordinovaným protonizovaným karboxylátem. Poslední protonované pendantní rameno je nekoordinované, jak bylo popsáno na základě krystalové struktury.³¹ Pro měďnaté ionty byl izolován v pevném stavu komplex jak v oktaedrické konformaci, tak i ve formě deformovaného trigonálního antiprismatu.^{30,31}

Zinečnatý komplex s H₃NOTA je o řád a nikelnatý komplex dokonce o čtyři řády méně stabilní než měďnatý komplex. [Zn(NOTA)]⁻ vzniká též už ve velmi kyselém prostředí, což bylo dokázáno pomocí ¹H NMR titrace.²⁵ Termodynamicky selektivní je ligand více pro měďnaté ionty než pro nikelnaté a zinečnaté ionty, což jsou produkty rozpadu nuklidů mědi a zároveň nečistoty původem z přípravy izotopů mědi. Kineticky selektivní je ligand pro měďnaté kationty, kde kinetika komplexace je o jeden až dva řády rychlejší než pro zinečnaté ionty, a dokonce o pět až šest řádů rychlejší než pro nikelnaté ionty. Při pH 4 a desetinasobném nadbytku iontů mědi váže do komplexu z 99 % v čase okolo půl milisekundy, zinečnaté ionty za třináct milisekund a nikelnaté ionty jsou plně komplexovány za více než minutu. V přítomnosti nadbytku zinečnatých kationtů rychlost komplexace měďnatých kationtů nebyla nijak ovlivněna.²⁵

Gallium, další z řady slibných kovů využitelných jako zdroj diagnostického kontrastu, tvoří též velmi stabilní komplex s H₃NOTA, který je o několik řádů stabilnější než měďnatý komplex. Komplex zaujímá v prostoru lehce deformovaný oktaedrický tvar.³² Tento komplex byl charakterizován pomocí ⁷¹Ga NMR spektroskopie vůči standardu [Ga(H₂O)₆]³⁺ a poskytoval charakteristický úzký a ostrý signál (171 ppm; *w*_{1/2} = 210 Hz).³³ Komplex vykazuje vysokou stabilitu ve velmi kyselém prostředí (6M HNO₃), kdy i po 60 dnech zůstal nezměněn. Okolo pH = 9 se gallité ionty začínají dekomplexovat za vzniku [Ga(OH)₄]⁻.³⁴ Rychlost vzniku komplexu byla zkoumána při různých pH. Při pH 2,8 byl komplex rychle a kvantitativně vytvořen do pěti minut.

Snížení pH na 1 znamenalo prodloužení kvantitativního vzniku komplexu na šest dní a při pH = 0 nebyla pozorována žádná komplexace. V tomto ohledu se lépe jeví deriváty obsahující fosfinové skupiny na pendantech (Obrázek 7). Při pH = 1 se kvantitativně vytvoří komplex $H_3TRAP-Pr$ s Ga^{3+} za 12 minut a $H_6TRAP-OH$ za 60 minut.^{34,35}



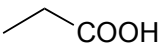
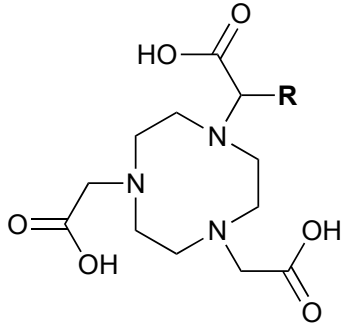
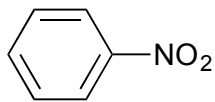
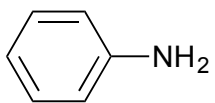
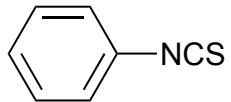
Obrázek 7: Struktura ligandů z rodiny H_3TRAP vhodných pro komplexaci gallitých iontů.

2.5.1 Konjugáty ligandu se zachováním skeletu H_3NOTA

Komplexy kovů se k bioaktivním látkám připojují několika základními způsoby. Základní rozdělení je podle toho, zda je zachován skelet ligandu H_3NOTA nebo je derivatizován na některém z acetátů. Tato derivatizace může být nejčastěji ve formě esteru nebo amidu. Pokud je skelet H_3NOTA zachován, tak připojení je na α uhlík pendantního ramene nebo na uhlíkový skelet základního makrocyklu TACN.

Elegantní řešení, při současném zachování koordinačních schopností ligandu H_3NOTA , se jeví jako náhrada jedné či více čistě acetátových pendantů za derivát mající v α pozici linker spojující makrocyklus a látku zodpovědnou za biodistribuci. Jeden ze tří aminových atomů dusíku makrocyklu je alkylován místo halogenacetátu pomocí α -halogenglutamové kyseliny. Vznikne, komerčně dostupná molekula, $H_4NODAGA$ (Tabulka 3).³⁶ Dalším komerčně dostupným derivátem je $H_4NODASA$, která má linker ke karboxylové funkční skupině kratší.³⁷ Karboxylová skupina poté nabízí různé možnosti připojení bioaktivní molekuly např. amidovou nebo esterovou vazbou k protilátkám, bioaktivním peptidům apod.

Tabulka 3: Struktura derivátů ligandu H₃NOTA zmíněných v textu.

	R =	Zkratka
	H	H ₃ NOTA
		H ₄ NODAGA
	-COOH	H ₄ NODASA
		H ₃ NO ₂ A1A-Ph-NO ₂
		H ₃ NO ₂ A1A-Ph-NH ₂
		H ₃ NO ₂ A1A-Ph-SCN

Dalším používaným linkerem je fenyl (Tabulka 3), který je navázaný na acetát na α uhlíku. Fenyl je obvykle derivatizován v para poloze skupinou, která je schopná konjugace s aminy nebo karboxylovými skupinami. Těmito funkčními skupinami jsou nitroskupina (H₃NO₂A1A-Ph-NO₂), která je schopná po redukci na primární amin (H₃NO₂A1A-Ph-NH₂) reagovat s karboxylovými kyselinami. Tento amin lze dále reakcí s thiofosgenem přeměnit na isothiokyanatan (H₃NO₂A1A-Ph-SCN) schopný konjugace s *N*-terminálním aminem peptidu či proteinu za vzniku thiomocovinové funkční skupiny. Hydroxylovou skupinu v para poloze lze využít jako esterovou spojku.

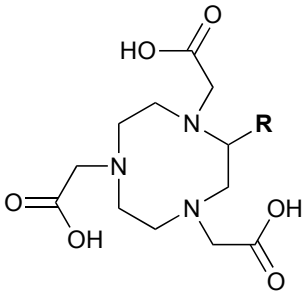
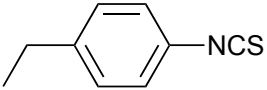
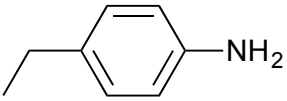
Je-li na konci pendentního ramene volná karboxylová funkční skupina, tak je možné konjugovat biologicky aktivní látku pomocí esterové nebo amidické vazby. Je výhodné, když linker s karboxylovou funkční skupinou je ještě před konjugací modifikován do formy aktivovaného esteru usnadňující následnou esterifikaci nebo i tvorbu amidů, což zajistí např. derivatizace karboxylové funkce *N*-hydroxysukcinimidem.³⁸

Druhý způsob navazování linkeru na makrocycklus je k uhlíkovému skeletu polyazamakrocyklu TACN. Použity byly velmi podobné přístupy jako byly zmíněné výše. Linker je nejčastěji benzyl, který má v para poloze aminovou nebo

isothyokyanátovou funkční skupinu (p-SCN-Bn-H₃NOTA) (Tabulka 4), které jsou schopny konjugace s jinými molekulami.^{39,40}

Derivatizované ligandy typu H₄NODAGA chelatují gallité kationty srovnatelně dobře jako H₃NOTA a jejich komplexy jsou podobně stabilní, což potvrzuje premisu o zachování koordinačních schopností a zachování stability komplexů.⁴¹ Publikací o chemickém chování a vlastnostech ligandu H₃NOTA je mnoho. Dat o chemických vlastnostech konjugátů je málo. Zaměření literatury v oblasti těchto ligandů je především na syntetickou část, kdy se vyvíjejí konjugáty s bioaktivními molekulami. Do kavity se inkorporuje pozitronový zářič, nejčastěji měďnaté nebo gallité kationty a poté se aplikuje do malého modelového organismu, čímž se dokumentuje funkčnost.

Tabulka 4: Struktura derivátů ligandu H₃NOTA zmíněných v textu.

	R =	Zkratka
		p-SCN-Bn-H ₃ NOTA
		p-NH ₂ -Bn-H ₃ NOTA

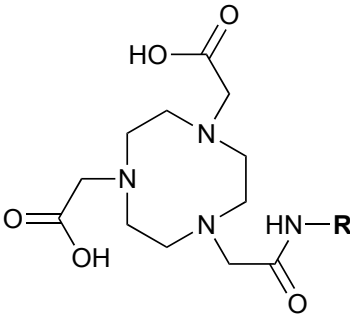
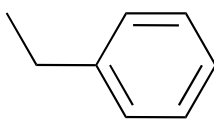
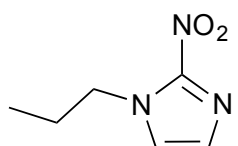
2.5.2 Amidické konjugáty H₃NOTA

Velmi frekventované je použití amidové vazby v molekule, která má za úkol spojit makrocycly, který nese radioizotop s bioaktivní částí radiofarmaka. Formace amidu přímo z karboxylové skupiny pendantu makrocycly je preferovanou reakcí při tvorbě experimentálních kontrastních látek.^{36,39,42,43} Používá se makrocycly, jehož acetáty, až na jeden, jsou ochráněné nejčastěji ve formě *tert*-butylesteru. Reakce probíhá jak v bezvodých rozpouštědlech, kterými jsou např. bezvodý *N,N*-dimethylformamid, tak ve vodě nebo ve směsi vody s organickým rozpouštědlem. Reakce aminu a karboxylové skupiny je zprostředkována činidlem, které usnadní tvorbu amidové vazby (např. HOBt, DIC, HBTU).

Chemické vlastnosti připravených experimentálních kontrastních látek ani amidických konjugátů nebývají mnoho zkoumány. Některé studie jsou rozebrány dále.

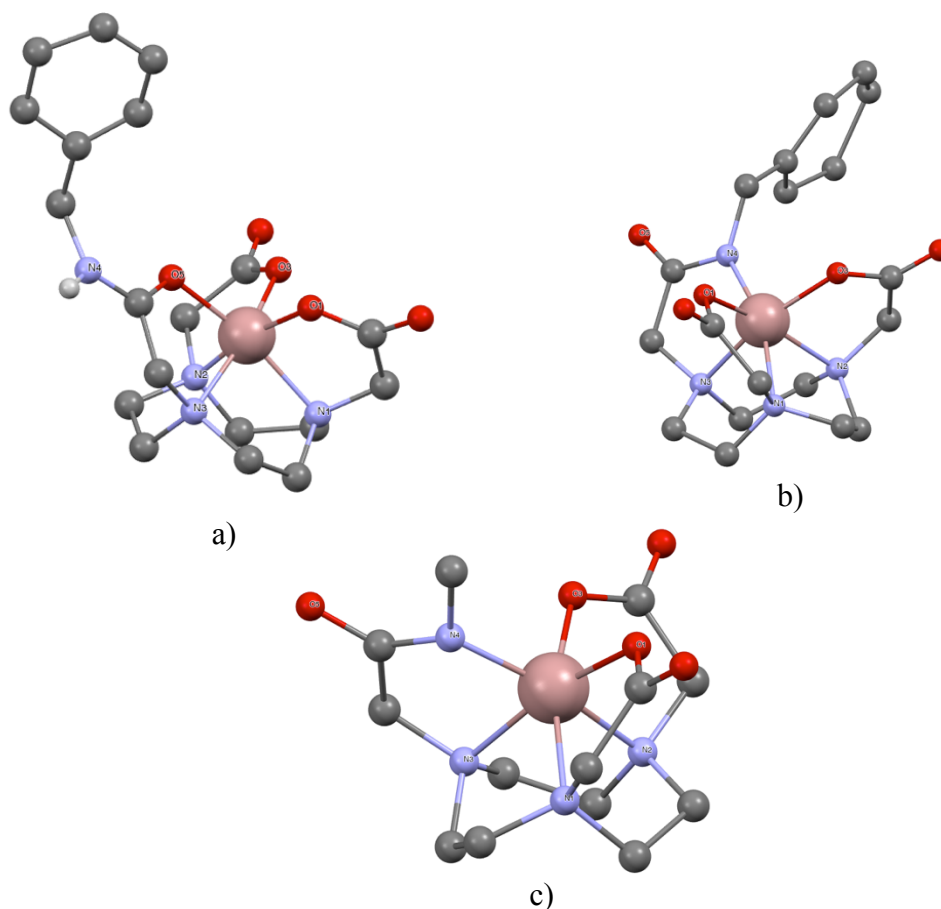
Koordinační vlastnosti monoamidu ligandu H₃NOTA byly studovány s gallitými kationty, kvůli velmi perspektivním vlastnostem svého izotopu ⁶⁸Ga. Modelovými sloučeninami posloužily dva monoamidy: methylamid (H₂NO₂A-ME) a benzylamid (H₂NO₂A-BE) (Tabulka 5), které měly dokázat, zda takto derivatizované ligandy dovedou tvořit stabilní komplexy s gallitými kationty.⁴⁴ Byly připraveny komplexy obou ligandů při pH = 3 a 5, které ukazovaly jiný druh koordinace potvrzený rentgenovou strukturní analýzou. Při pH = 3 byla pro benzylamidový pendant (H₂NO₂A-BE) pozorována N₃O₃ koordinace ve formě deformovaného oktaedru, kde gallitý kation je koordinován makrocyclickými atomy dusíku a atomy kyslíku z acetátových ramen. Pro pH = 5 bylo koordinační okolí popsáno jako N₄O₂, kdy místo atomu kyslíku je koordinován atom amidického dusíku.

Tabulka 5: Struktura studovaných ligandů obsahující monoamidy pro koordinaci gallitých kationtů.^{44,45}

	R =	Zkratka
	—CH ₃	H ₂ NO ₂ A-ME
		H ₂ NO ₂ A-BE
		H ₂ NO ₂ A-NI

Derivát s methylamidovou skupinou (H₂NO₂A-ME) vykazoval při obou výše zmíněných pH koordinaci N₄O₂. Koordinace N₄O₂ při nižších pH je zde vysvětlena z důvodu protonizace kyslíkového atomu a díky následné izomerizaci tvorby imidové vazby. Zároveň je ale zdůrazněno, že při koordinaci gallitých kationtů s monoamidem, kde jedno pendantní rameno je derivatizováno [(nitroimidazolyl)ethyl]aminem (H₂NO₂A-NI), tak tento ligand koordinuje výlučně s koordinačním okolím N₃O₃.⁴⁵ Pomocí ⁷¹Ga NMR bylo sledováno koordinační chování navržených ligandů v prostředí o různé hodnotě pH. Pro methylamidový derivát byly sledovány dva druhy signálů s měnícím se zastoupením. Při nízkém pH byl pozorován široký signál (δ = 175,2 ppm;

$w_{1/2} = 9000$ Hz) z něhož vystupoval malý ostřejší singlet (171,1 ppm; $w_{1/2} = 283$ Hz). Široký signál byl přisouzen koordinačnímu okolí N_4O_2 a úzký signál se zvyšující se intenzitou při zvyšujícím se pH, kdy při neutrálním pH zůstal jako jediný signál, byl přiřazen k N_3O_3 koordinaci. Při pH okolo 9 se koordinovaný gallitý kation dekomplexoval za vzniku $[Ga(OH)_4]^-$. Stejné chování bylo sledováno i u benzylamidového derivátu (H_2NO_2A-BE) s jinými charakteristikami signálů ($\delta = 173,8$ ppm; $w_{1/2} = 4000$ Hz a $\delta = 170,1$; ppm $w_{1/2} = 279,1$ Hz).

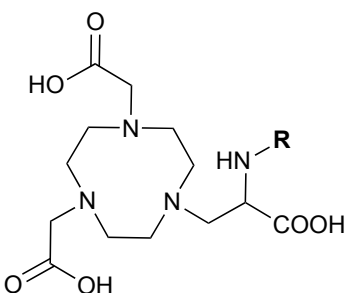
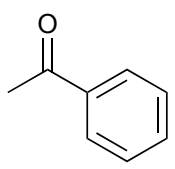
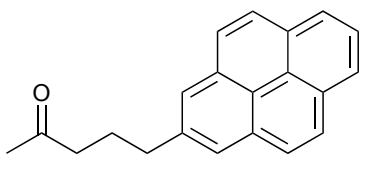


Obrázek 8: Krystalové struktury komplexů Ga^{3+} s monoamidy H_3NOTA .⁴⁴ a) N_3O_3 koordinace ligandu H_2NO_2A-BE b) N_4O_2 koordinace ligandu H_2NO_2A-BE a c) N_4O_2 koordinace ligandu H_2NO_2A-ME .

Podobná studie byla realizována s analogem H_3NOTA , kde místo jednoho z acetátových ramen byly α -deriváty propionátu (Tabulka 6).⁴⁶ Sledována byla změna koordinačního okolí gallia z N_4O_2 na N_3O_3 a naopak mezi pH 3–11, kde se měla měnit

karboxylová skupina za aminovou nebo amidovou z α pozice. Signál komplexu obsahující $\text{H}_3\text{NO}_2\text{A1P-AB}$ byl natolik široký, že zaniknul v základní linii. Změna koordinačního okolí byla sledována pouze u α -aminopropionátového derivátu $\text{H}_3\text{NO}_2\text{A1P-AM}$, u kterého byl v kyselé oblasti ($\text{pH} = 3,3$) koordinovaný karboxyl ($\delta = 141$ ppm; $w_{1/2} = 900$ Hz), který už při $\text{pH} = 4$ začal ustupovat a vznikal nový užší signál ($\delta = 186$ ppm; $w_{1/2} = 550$ Hz), který až do $\text{pH} 11,2$ byl jedinou částicí obsahující gallium. Užší signál s vyšším chemickým posunem na ^{71}Ga NMR spektru byl s pomocí ^1H NMR spekter přiřazen k N_4O_2 koordinaci. Signál ($\delta = 140$ ppm; $w_{1/2} = 900$ Hz) sloučeniny mající rameno (α -benzoyl-amido)propionátu $\text{H}_3\text{NO}_2\text{A1P-BA}$ v ^{71}Ga NMR spektru nevykazoval žádné změny se zvyšujícím se pH . Tímto byla potvrzena koordinace pouze karboxylovými skupinami, a ne amidickou skupinou. Jediná odlišnost mezi gallitými komplexy je vyšší náchylnost k bazicky katalyzované dekomplexaci pro komplex obsahující amidický derivát, protože při $\text{pH} = 10,2$ byl komplex kvantitativně rozložen. Rozdíly mezi různými druhy koordinace zde byly zejména v chemickém posunu, ale pološířky signálů se nelišily signifikantně mezi koordinačními stavy N_4O_2 a N_3O_3 .⁴⁶ Tyto závěry jsou přesně opačné tomu, co bylo shledáno ve studii dřívější, která uvádí velké rozdíly v pološířkách signálů a malé rozdíly v posunech na škále ppm.⁴⁴ Úzký signál s vysokou intenzitou, který se objevoval na širokém signálu může být s velkou pravděpodobností produkt hydrolytické degradace amidické vazby. Hydrolýzou ligandu obsahující monoamid NOTA vznikne H_3NOTA . Tato hydrolýza je po koordinaci gallitého kationtu značně urychlena. Signál komplexu $[\text{Ga}(\text{NOTA})]$ ($\delta = 171$ ppm; $w_{1/2} = 210$ Hz)³³ je velmi podobný signálu sledovanému v ^{71}Ga NMR spektrech objevujících se v uvedené studii s acetamidy. Závěry o koordinaci či dekoordinaci amidického dusíku věrohodněji vyplývají ze studie s ligandem majícím jedno acetátové rameno nahrazené derivatizovaným propionátem na α pozici.

Tabulka 6: Struktura derivátů ligandu H₃NO₂A1P zmíněných v textu.

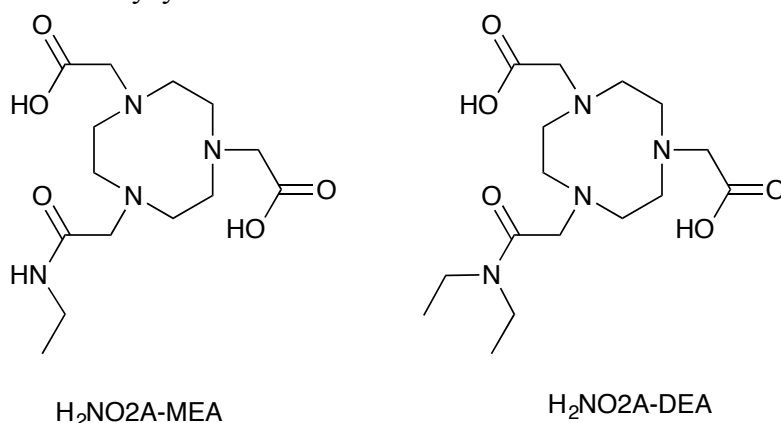
	R =	Zkratka
	H	H ₃ NO ₂ A1P-AM
		H ₃ NO ₂ A1P-BA
		H ₃ NO ₂ A1P-AB

3 Hlavní motivace a cíle práce

Z teoretického úvodu práce vyplývá, že makrocyclické ligandy a sloučeniny je obsahující jsou velmi zkoumaným odvětvím anorganické chemie vzhledem ke slibnému použití v radiofarmacii. Probíhá vývoj nových experimentálních kontrastních látek pro diagnostické účely jako PET a MRI. Vhodnou výměnou centrálního atomu komplexu je možné s pomocí teranostického přístupu změnit účel daného radiofarmaka z diagnostického na terapeutický. Specifická distribuce v organismu je zajištěna pomocí bioaktivní látky, která bývá ve většině případů spojená s komplexem nesoucí radioizotop pomocí amidické vazby. Syntéza amidu z *N*-terminálního aminu biologicky aktivních látek je jednoduchá a probíhá jak ve vodném, tak bezvodém prostředí.

Výzkum v oblasti experimentálních kontrastních látek využívající jako zdroj kontrastu ionizující záření pocházející z kovů se zaměřuje z velké části na syntézu nových sloučenin. Druhou velkou částí, kterou se zabývá literatura, je jejich aplikaci do modelového organismu, nejčastěji myši, čímž je dokumentována funkčnost syntetizované kontrastní látky. Publikace, které se zaměřují na popis chemických vlastností syntetizovaných ligandů a komplexů je minimum.

Cílem této diplomové práce bylo syntetizovat modelovou sloučeninu H₂NO₂A-MEA (Obrázek 9) navazující na látku z bakalářské práce H₂NO₂A-DEA (Obrázek 9), které obsahují monoamid makrocyclu H₃NOTA. Velikost kavity ligandu H₃NOTA je vhodná zejména pro prvky z první řady přechodných kovů a jiné s obdobným atomovým poloměrem. Připravené ligandy byly charakterizovány pomocí analytických metod nukleární magnetické rezonance, hmotnostní spektrometrie a v pevné fázi pomocí rentgenové difrakční analýzy.



Obrázek 9: Struktury zkoumaných modelových monoamidů ligandu H₃NOTA.

Dalším cílem bylo zkoumat acidobazické vlastnosti syntetizovaných ligandů pomocí potenciometrické titrace. Následně byly zkoumány koordinační vlastnosti stejnou metodou s vybranými ionty přechodných kovů, protože jsou vstupní surovinou pro přípravu radioizotopů pro diagnostiku či terapii anebo jejich produktem rozpadu. Koordinační vlastnosti s gallitými kationty byly zkoumány pomocí NMR. Vybrány byly kvůli slibným vlastnostem izotopu ^{68}Ga a cenové dostupnosti generátoru tohoto izotopu. Dále byly zkoumány koordinační vlastnosti ligandů s ionty kovů biologického zájmu a s lithnými ionty, které dle literatury tvoří neobvykle stabilní komplexy s ligandem H_3NOTA .

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Všechny chemikálie a rozpouštědla použité při syntéze a měření byly získány z komerčních zdrojů (Sigma–Aldrich, Lach–ner, Fluka, Penta, Chematech).

4.2 Metody charakterizace

4.2.1 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Všechna NMR spektra byla naměřena na přístrojích přístupných na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy. Spektra ^1H , ^{13}C , ^{71}Ga byla měřena na spektrometrech Varian VNMRS 300, Varian UNITY Inova 400, Bruker Ascend 400 a Bruker Avance (III) 600. Všechna měření probíhala při teplotě 25°C ve standardních kyvetách pro NMR s průměrem 5 mm. Pro měření byla použita čistá deuterovaná rozpouštědla (DMSO- d_6 , CDCl_3 a D_2O). Naměřené hodnoty chemických posunů byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa pro ^1H jádra a pro nevodíková jádra (^{13}C , ^{71}Ga) na jedno desetinné místo.

4.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra připravených látek byla měřena a získána na ze spektrometru Bruker Esquire 3000 s ESI (electrospray) s IT detekcí (ion trap) fragmentů. Uvedeny jsou signály, které se jednoznačně podařilo interpretovat a přiřadit.

4.2.3 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Tenkovrstevná chromatografie byla prováděna na hliníkových foliích pokrytých vrstvou stacionární fáze (SiO_2 nebo Al_2O_3) impregnovanou fluorescenčním barvivem. Tyto TLC jsou komerčně dostupné pod názvem Merck silica 60 F₂₅₄ a Merck aluminium oxide 60 F₂₅₄.

Detekce probíhala pomocí UV záření při vlnových délkách 254 nm a 366 nm, jodem nebo detekčními činidly.

Použitá detekční činidla:

Dragendorffovo činidlo

- roztok A: 1,7 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml směsi $\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (80:20)
- roztok B: 40,0 g KI ve 100 ml H_2O

- smíseno 5 ml roztoku A, 5 ml roztoku B, 20 ml koncentrované AcOH, 70 ml H₂O)

AMC

- (0,5 g Ce(SO₄)₂, 12,0 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O
- 250 ml 10% H₂SO₄

4.2.4 Elementární analýza

Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie v Praze na automatickém analyzátoru PERKIN ELMER 2400 II.

4.2.5 Potenciometrické titrace⁴⁷

Potenciometrické titrace byly prováděny v termostatované cele (25,0±0,1°C) při konstantní iontové síle $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ M}$. Měření probíhalo v rozmezí pH přibližně 1,4 – 12 pod inertní atmosférou v proudu Ar přiváděného nad roztok. Objem na počátku byl ~5 ml, koncentrace titrovaného ligandu ~0,004 M a když byl přítomen kov v roztoku, tak v poměru kov:ligand 1:1. Použité titrační činidlo byl NMe₄OH o koncentraci ~0,3M přesně. Měření potenciálu probíhalo za pomoci skleněné kombinované argentchloridové elektrody GK 240B na pH metru PHM 240. Roztok NMe₄OH byl přidáván pomocí automatické byrety ABU 900 o objemu 2 ml. Každý set měření obsahoval 3 shodné titrace. Počet bodů v průběhu titračního měření byl 40–60 v závislosti na nastavení jednotlivých titrací. Naměřené hodnoty posloužily jako zdrojová data pro program OPIUM⁴⁸, díky kterému byly získány protonizační konstanty ligandu a konstanty stability studovaných systémů kov:ligand. Program prokládá experimentální body funkcí nelineární regrese s matematicko-statistickou metodou nejmenších čtverců. Jelikož jsou kalibrační parametry časově proměnné, tak před každou titrací a po ní byly zjišťovány experimentálně parametry elektrody použitím kalibrační titrace, které byly zjištěny pomocí funkce:

$$E = E_0 + S \cdot \log[H^+] + J_A \cdot [H^+] + J_B \cdot K_w / [H^+],$$

kde E_0 je standardní elektrodový potenciál, S je Nernstova směrnice, J_A a J_B jsou koeficienty popisující kyselou a bazickou chybu měřící elektrody a K_w je iontový součin vody.

Z titrací byly pomocí programu OPIUM⁴⁸ vypočteny celkové rovnovážné konstanty stability β . Protonizační konstanta zkoumaných ligandů je dána vztahem

$$\beta_{hl} = [H_h L_l] / [H]_h \cdot [L]_l$$

a konstanta stability systému kov:ligand vztahem

$$\beta_{mhl} = [M_m H_h L_l] / [M]_m \cdot [H]_h \cdot [L]_l$$

(pro názornost nejsou uvedena nábojová čísla jednotlivých částic vystupujících ve vzorcích). Mezi celkovou konstantou β a konsektivní konstantou pK_a je pak definován obecným vztahem

$$pK_n = \log \beta_n - \log \beta_{(n-1)}.$$

Hodnota iontového součinu vody ($pK_w = 13,81$ pro $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ M}$ při 25°C) a hodnoty konstant stability systémů $M^{2+}-\text{OH}^-$ byly převzaty z literatury.⁴⁹

Metoda stanovení konstant stability pro nikelnaté komplexy s pomalou kinetikou vzniku pomocí metody „out-of-cell“ byla prováděna podle literatury.⁵⁰ Bylo připraveno ~20 vzorků reprezentujících titraci v rozmezí pH 1,7–4,0 ve dvou paralelních sériích. Vzorky byly míchány z roztoků ligandu, nikelnatých iontů, HCl/(NMe₄)Cl použitých i při klasické potenciometrické titraci. Počáteční objem každého vzorku byl 1 ml a poměr M:L 1:1 při koncentraci $c_{\text{lig}} = c_M = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Následně bylo pH každého vzorku upraveno pomocí definovaného přídatku vodného roztoku (NMe₄)OH pod inertní atmosférou Ar, vzorky byly uzavřeny a nechány jeden týden stát při laboratorní teplotě. Poté byl odečten potenciál pomocí stejného příslušenství jako při klasické potenciometrické titraci.

4.2.6 ¹H NMR titrace a UV/VIS titrace

Bylo připraveno 10 vzorků v rozmezí pH 0–2, každý o celkovém objemu 1 ml a poměru M:L 1:1 při koncentraci $c_{\text{lig}} = c_M = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Vzorky byly připravovány ze zásobního roztoku ligandu, zinečnatých iontů pro ¹H NMR titraci titraci a cílového pH bylo dosaženo pomocí zásobního roztoku HCl o koncentraci ~0,2 M, 1,0 M a 2,0 M přesně bez kontroly iontové síly. Jako standard byla použita směs *t*BuOH v D₂O v tenké kapiláře vložené do standardní 5 mm kyvety. Spektra byla měřena na stroji Bruker Avance (III) 600 dostupném na PřF UK.

V případě měďnatých iontů, příprava vzorků probíhala analogicky jako pro výše zmíněné ¹H NMR měření. Bylo připraveno i několik vzorků s formálním pH nižším než

0 a jeden vzorek bez přídavku ligandu. Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru Specord 50 Plus system (Analytic Jena) v kyvetách s optickou dráhou 10 mm při teplotě 25°C v rozmezí vlnových délek 500–950 nm. Konstanty stability a zastoupení jednotlivých částic bylo vyhodnoceno spolu s daty z potenciometrických titrací pomocí programu OPIUM⁴⁸.

4.2.7 Rentgenová strukturní analýza (RTG)

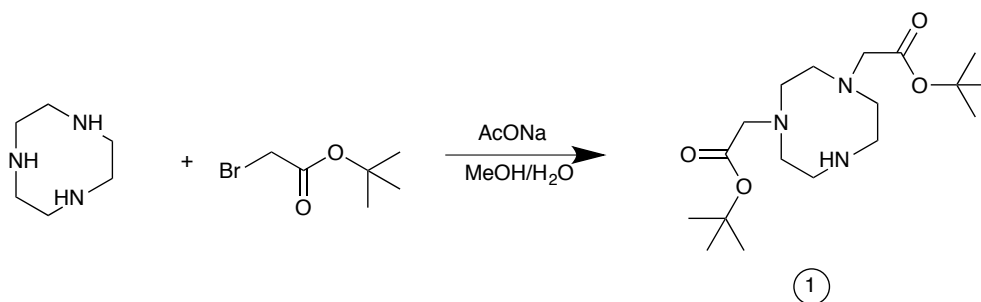
Difrakční data byla pro ligand H₂NO₂A-MEA získána přístrojem Nonius KAPPACCD vybaveným detektorem Bruker APEX-II CCD se zdrojem záření Mo-K_α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) za teploty 150 K, které bylo dosaženo pomocí chlazení Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem. Difrakční data byla pro ligand H₂NO₂A-DEA získána difraktometrem Bruker D8 VENTURE Kappa Duo PHOTON100 využívající Cu-K_α ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) záření za teploty 150 K, které bylo dosaženo pomocí chlazení Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem.

Data byla analyzována pomocí softwaru SAINT (Bruker AXS Inc.) a korekce na absorpci byla provedena programem SADABS pomocí multi-scan metody. Struktury byly řešeny přímými metodami programem SHELXT2014⁵¹ a vypřesněny pomocí programu SHELXL2014⁵². Obecně, všechny nevodíkové atomy byly vypřesněny anizotropně. Vodíkové atomy byly zafixovány v teoretických pozicích (C–H) pomocí $U_{eq}(H) = 1.2 U_{eq}(C)$, tak aby zůstaly nízké hodnoty parametrů nebo v původní pozici z mapy zbytkové elektronové hustoty. Pouze atomy vodíku vázané na heteroatom (N, O) byly plně vypřesněny.

Data naměřila na Univerzitě Karlově RNDr. Ivana Císařová, CSc. a vypřesnění struktur provedl doc. RNDr. Jan Kotek, PhD.

4.3 Syntéza

4.3.1 Syntéza NO2A-tBu přímou cestou (1)⁵³



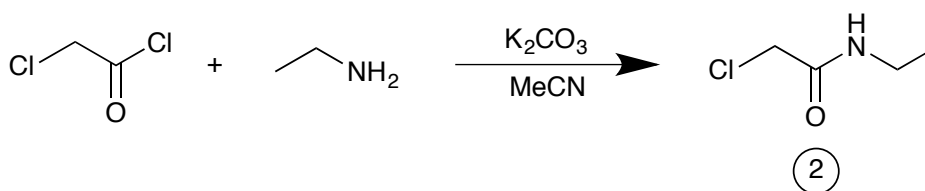
TACN (5,0 g; 38,7 mmol) byl rozpuštěn v 50 ml směsi MeOH/H₂O 9:1, byl přidán AcONa (26,3 g; 0,193 mol) a směs byla chlazena ledovou lázní se solí. Alkylační činidlo, BrAcOtBu (15,8 g; 81,2 mmol) bylo přidáno do 100 ml směsi MeOH/H₂O 9:1 a vzniklý roztok byl v průběhu jedné hodiny přikapán do reakční směsi. Reakční směs byla míchána 24 hodin při LT a následně byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v malém množství CHCl₃, pevný podíl byl odfiltrován přes fritu S4 a filtrát byl odpařen. Odparek byl rozpuštěn v minimu CHCl₃, dělen pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, 200 ml, eluce pomocí CHCl₃:MeOH:Et₃N 25:8:7). Frakce obsahující produkt byly zkombinovány a odpařeny na RVO. Produkt byl získán ve formě žlutého oleje (8,85 g, 64 %).

Charakterizace:

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3,33 (s, N-CH₂-COOtBu, 4H), 2,89 (bs, Ac-N-CH₂-CH₂-NH, 8H), 2,76 (s, Ac-N-CH₂-CH₂-N-Ac, 4H), 1,45 (s, C-(CH₃)₃, 18H).

TLC: (SiO₂; M_f: CHCl₃:MeOH:Et₃N 25:8:7) R_f = 0,75

4.3.2 2-chloro-N-ethylacetamid (2)



Chloroacetylchlorid (2,28 g; 20 mmol) byl rozpuštěn v suchém MeCN (75 ml) a přisypán suchý K₂CO₃ (3,50 g; 25 mmol). Tato směs byla chlazena pomocí EtOH a suchého ledu. Ochlazená směs byla míchána a pomalu byl přikapán roztok ethylaminu (0,67 g; 7,5 ml 2M v THF, 15 mmol) v roztoku MeCN (125 ml). Reakční směs byla míchána přes noc při LT a poté zfiltrována a filtrát odpařen na RVO. Odparek byl

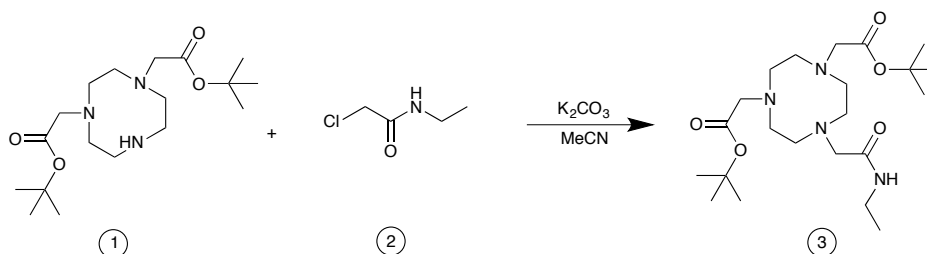
rozpuštěn v nasyceném roztoku NaHCO₃ (40 ml) a extrahován CH₂Cl₂ (3x40 ml). Organické fáze byly zkombinovány, sušeny pomocí Na₂SO₄, poté zfiltrováno sušidlo a organická frakce odpařena do formy bezbarvého oleje (1,82 g; 90 %).

Charakterizace:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,74 (CO–NH–Et, s, 1H), 3,95 (Cl–CH₂–CO, s, 2H), 3,26 (NH–CH₂–CH₃, qd, ³J_{HH} = 7,3, 5,7 Hz, 2H), 1,10 (NH–CH₂–CH₃, t, ³J_{HH} = 7,3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 165,31 (CO–NH, s, 1C) 42,06 (Cl–CH₂–COO, s, 1C) 34,19 (NH–CH₂–CH₃, s, 1C), 13,95 (NH–CH₂–CH₃, s, 1C).

4.3.3 Di-*tert*-butyl 7-(2-(ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-diacetát (3)



Do baňky byl rozpuštěn NO2A-*t*BU (1) (2,0 g; 5,6 mmol) v bezvodém MeCN (60 ml) a přisypán K₂CO₃ (0,70 g; 10 mmol). Pomalu bylo přikapán roztok alkylačního činidla (2) (0,75 g; 6,2 mmol; 1,1 ekv.) v bezvodém MeCN (60 ml). Reakce byla míchána 2 dny při LT, poté byla reakční směs zfiltrována přes fritu S4 a filtrát odpařen do žlutého oleje. Odparek byl rozpuštěn v malém množství CH₂Cl₂ a dělen sloupcovou chromatografií (Al₂O₃, 200 ml, eluce pomocí CH₂Cl₂ ⇒ CH₂Cl₂:MeOH 50:1). Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na RVO do formy žlutého oleje (2,18 g; 88 %).

Charakterizace:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,64 (CO–NH–Et, t, ³J_{HH} = 5,8 Hz, 1H), 3,32 (N–CH₂–CONH, s, 2H), 3,30 (N–CH₂–COO, s, 4H), 3,11 (NH–CH₂–CH₃, q, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 4H), 2,78 (Ac–N–CH₂–CH₂–N–Ac, bs, 4H), 2,75 (Ac–N–CH₂–CH₂–N–Amid, bt, 4H), 2,61 (Ac–N–CH₂–CH₂–N–Amid, bt, 4H), 1,41 (COO–C(CH₃)₃, s, 18H), 1,01 (NH–CH₂–CH₃, t, ³J_{HH} = 7,2 Hz, 3H).

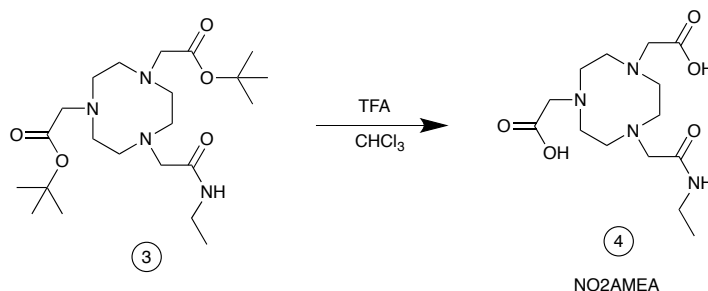
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170,84 (COO, 3C), 80,05 (COO–C(CH₃)₃, 2C), 58,59 (N–CH₂–COO, 3C) 55,45 ((Ac–N–CH₂–CH₂–N–Ac, s, 2C), 55,34 (Ac–N–CH₂–

CH₂-N-Amid, s, 2C), 54,40 (Ac-N-CH₂-CH₂-N-Amid, s, 2C), 33,05 (COO-C(CH₃)₃, 6C), 27,85 (NH-CH₂-CH₃, 1C), 15,04 (NH-CH₂-CH₃, 1C).

MS: 443 [M+H], 387 [(M-*t*Bu)+H]

TLC: (Al₂O₃; M_f: CH₂Cl₂:MeOH 50:1) *R_f* = 0,6

4.3.4 Kyselina 7-(2-(ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-dioctová (**4**)



Látka **3** (2,18 g; 4,93 mmol) byla rozpuštěna ve směsi rozpouštědel CHCl₃ a TFA (1:1; 120 ml) a vzniklá směs míchána 30 hodin při LT. Poté byla reakční směs odpařena do žlutého oleje a odparek několikrát znovu odpařován s H₂O. Odparek byl rozpuštěn v malém množství H₂O a dělen na silném kationtovém iontoměnič (Dowex 50; H⁺ cyklus; 100 ml; 10% pyridin). Pyridinová frakce byla odpařena do žlutého oleje a odparek byl několikrát odpařen s H₂O. Žlutý olej byl rozpuštěn ve 40 ml H₂O, povařen s aktivním uhlím a zfiltrován přes 0,22 μm mikrofiltr. Filtrát byl odpařen dosucha s MeOH, čímž se vyloučila pevná látka (1,38 g; 85 %).

Charakterizace:

¹H NMR: (400 MHz, D₂O) δ 3,86 (N-CH₂-COO, s, 4H), 3,60 (N-CH₂-CONH, s, 4H), 3,34 (Ac-N-CH₂-CH₂-N-Ac, s, 4H), 3,24 (NH-CH₂-CH₃, q, ³*J_{HH}* = 7,3 Hz, 2H), 3,23 (Ac-N-CH₂-CH₂-N-Amid, bt, ³*J_{HH}* = 5,7 Hz, 2H), 3,09 – 2,95 (Ac-N-CH₂-CH₂-N-Amid, t, ³*J_{HH}* = 5,7 Hz, 4H), 1,11 (NH-CH₂-CH₃, t, ³*J_{HH}* = 7,3 Hz, 3H).

¹³C NMR: (101 MHz, D₂O) δ 173,16 (COO, 2C), 172,66 (C=O-NH, 1C), 59,63 (N-CH₂-COO, 2C), 57,34 (N-CH₂-CONH, 1C), 51,39 (Ac-N-CH₂-CH₂-N-Amid, 2C), 50,16 (Ac-N-CH₂-CH₂-N-Ac, 2C), 49,66 (Ac-N-CH₂-CH₂-N-Amid, 2C), 35,21 (NH-CH₂-CH₃, 1C), 14,19 (NH-CH₂-CH₃, 1C).

EA: (C₁₄H₂₆N₄O₅·2H₂O *M_r* = 366,42) C 45,95 (45,89) H 7,77 (8,25) N 14,96 (15,29) O 31,32 (30,56)

MS: 329,2 [M-H], 331,2 [M+H]

TLC: (Al₂O₃; M_f: *i*PrOH:konc.NH₃:H₂O 10:1:2) *R_f* = 0,3

5 Diskuze

5.1 Syntéza

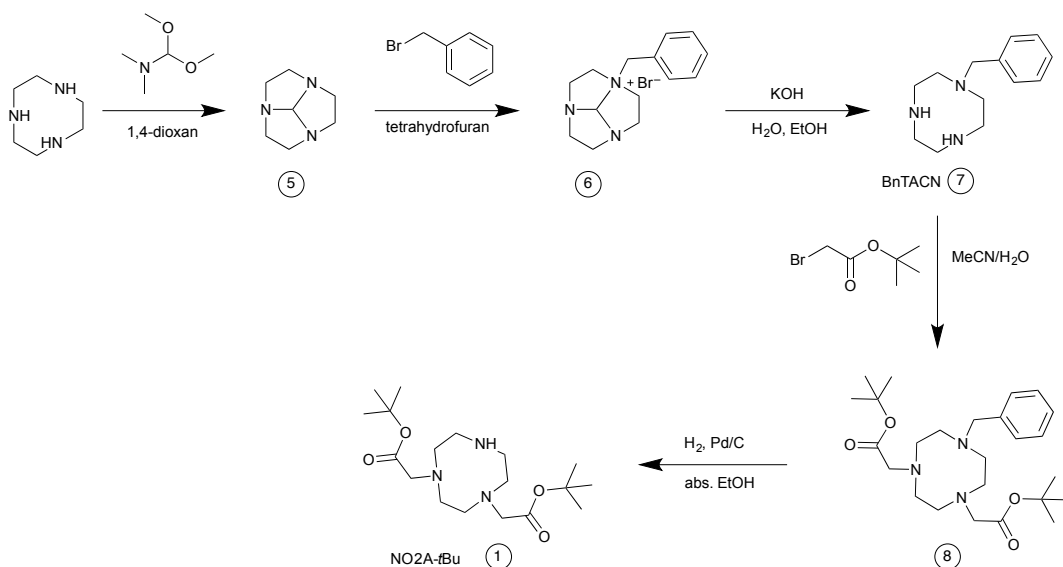


Schéma 1: Schéma syntézy NO2A-*t*Bu přes benzylové chránění.

Pro syntézu makrocyklu (1) NO2A-*t*Bu, kde jsou dva makrocyklické atomy dusíku substituovány *tert*-butyl esterem kyseliny octové byly zkoumány dva přístupy. První syntetický postup byla vícezkroková syntéza (Schéma 1) vycházející ze základního makrocyklu – TACN, která byla už mnohokrát úspěšně použita.^{54–56} Druhou cestou je přímá alkylace makrocyklu *tert*-butylbromoacetátem.⁵³

Při několikakrokové syntéze BnTACN (7), kde byl izolován až konečný produkt nejprve reaguje TACN s *N,N*-dimethylformamiddimethylacetalem za vzniku přemostěného TACN (5), což zajistí následnou selektivní monoalkylaci benzylbromidem. Nerozpustná amoniová sůl (6) vyloučená z roztoku byla odfiltrována a rozpuštěna do směsi obsahující vodu a hydroxid draselný, ve kterém probíhala hydrolýza můstku mezi makrocyklickými atomy dusíku. Produkt byl rekrystalizován ve formě hydrochloridu (7) s výtěžkem 47 %.

Pro získání volné báze byl BnTACN (7) míchán s vodným roztokem NaOH a poté extrahován CH₂Cl₂ a organická fáze odpařena. Odparek byl poté rozpuštěn do směsi acetonitril/voda, alkylován *tert*-butylbromoacetátem a výsledná směs dělena sloupcovou chromatografií se 70% výtěžkem. Produkt (8), byl katalyticky hydrogenován vodíkem za

přítomnosti 10% Pd/C a po dělení sloupcovou chromatografií se získá NO2A-*t*Bu (**1**) ve výtěžku 73 %.

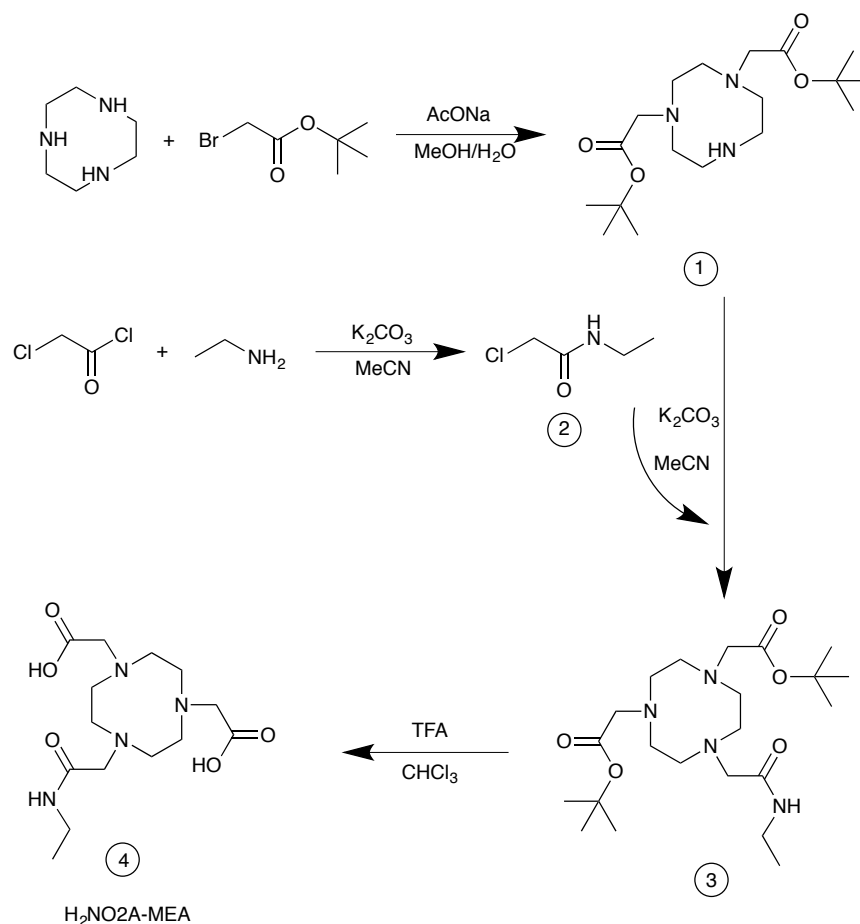


Schéma 2: Schéma syntézy ligandu H₂NO₂A-MEA.

Celkově nízký výtěžek a reakční schéma s řadou kroků byla motivace pro alternativní přístup při přípravě NO₂A-*t*Bu (**1**). Přímá alkylace TACN pomocí *tert*-butylbromoacetátu probíhala ve směsi MeOH/H₂O 9:1, zejména kvůli rozpustnosti výchozího makrocyklu, s octanem sodným, který sloužil jako báze. Počáteční chlazení reakce bylo kvůli zpomalení rychlosti reakce a zamezení vzniku trisubstituovaného produktu. Po ukončení reakce byly vysráženy acetáty a bromidy vzniklé odštěpením z alkylačního činidla. Dělení reakční směsi probíhalo na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie. V mobilní fázi byl vedle chloroformu a methanolu použit triethylamin, který neutralizuje kyselé skupiny silikagelu. Disubstituovaný produkt reakce byl získán s výtěžkem 64 %. Vyšší celkový výtěžek reakce, kratší doba přípravy a pouze jeden reakční krok byly hlavní motivací k použití jednokrokové syntézy.

Příprava alkylačního činidla (**2**) probíhala mechanismem nukleofilní substituce v bezvodém MeCN, kde byl rozpuštěn mírný nadbytek chloroacetylchloridu vůči ethylaminu a suspendován uhličitán draselný jako báze. Bazickou extrakcí bylo zajištěno, aby se přebytečný chlorid kyseliny chloroctové zhydrolyzoval a přešel do vodné fáze, kdežto do organické fáze byl extrahován pouze produkt s vysokým výtěžkem 90 %.

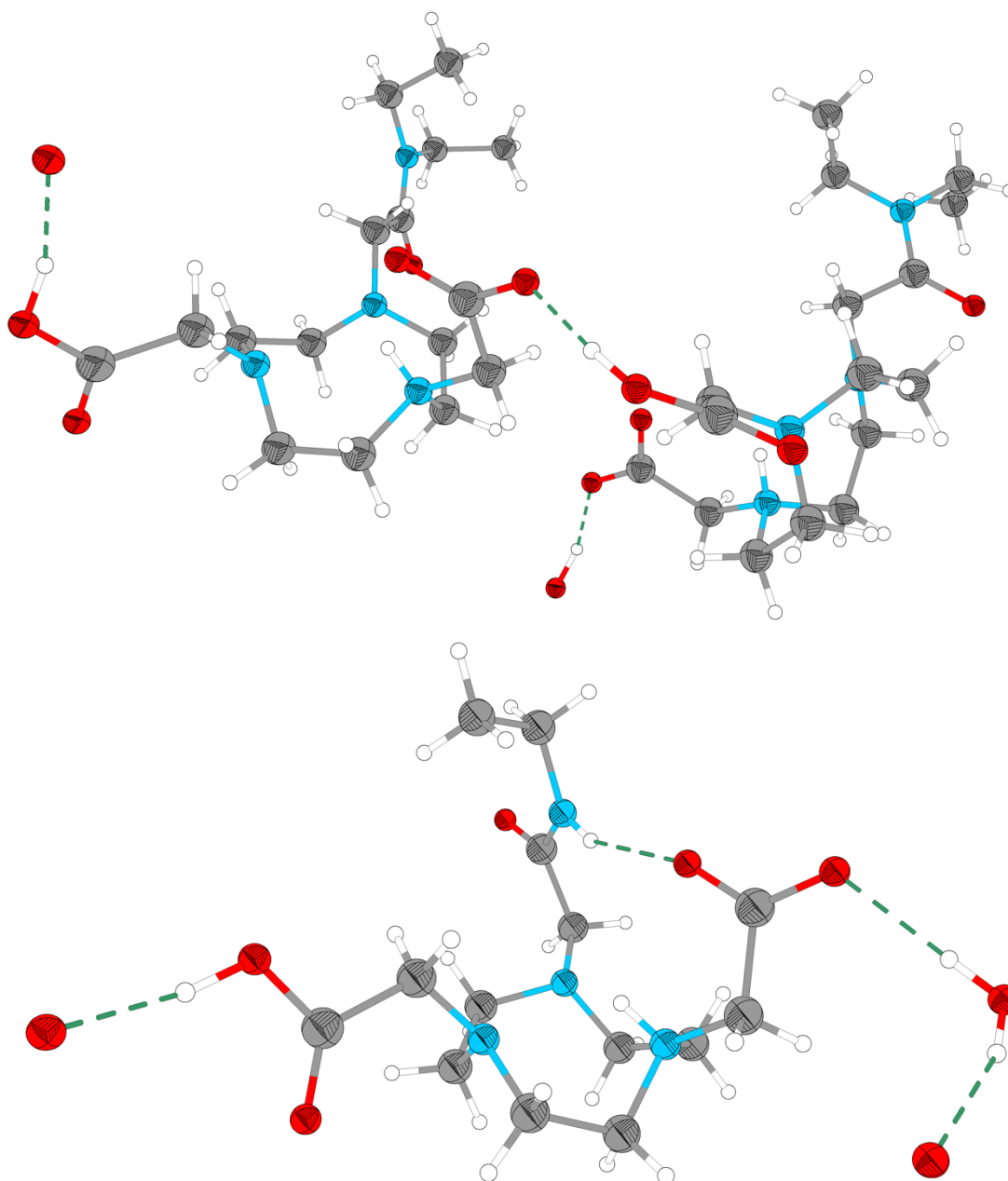
Alkylace NO₂A-tBu (**1**) pomocí výše zmíněného alkylačního činidla (**2**) probíhala v bezvodém MeCN. Reakční směs byla dělena na oxidu hlinitém místo na silikagelu, protože alumina poskytovala užší nechvostující skvrny na TLC už při použití mobilní fáze bez použití amoniaku. Produkt byl izolován ve formě oleje s výtěžkem 88 %.

Posledním krokem v reakční sekvenci byla deesterifikace acetátů. To se provádělo ve směsi CHCl₃ a TFA, která protonizuje esterový atom kyslíku. Z esteru se odštěpí isobuten. Čištění probíhalo na silném kationtovém iontoměniči Dowex 50 v H⁺ cyklu. Po nanesení látky elektrostaticky interagují sulfonové skupiny iontoměniče s protonizovanými makrocyclickými atomy dusíku, čímž se oddělí nemakrocyclické nečistoty. Eluce pomocí vodného 10% pyridinu zvýší pH na iontoměniči a změní celkový náboj sloučeniny z kladného na záporný a látka ztratí retenci. Eluát byl několikrát odpařen s vodou kvůli odpaření zbytků pyridinu a čištěn ještě dále pomocí aktivního uhlí. Produkt byl získán ve formě pevné látky po odpaření s methanolem. Po odpaření s vodou produkt zůstal ve formě oleje a nepodařilo se ho dostat do pevné formy. Na minoritní frakci produktu byla úspěšně zkoušená možnost rekrystalizace probíhající ze soustavy voda/acetón, která ale poskytovala nízké výtěžky.

Ligand H₂NO₂A-DEA byl syntetizován analogickým způsobem popsaným v bakalářské práci.⁵⁴

5.2 Struktura ligandů v pevné fázi

Monokrystaly ligandů byly získány elucí látky ze silného kationtového iontoměniče Dowex 50 10% vodným roztokem pyridinu. Eluát byl několikrát odpařen na RVO a po třech dnech stání z oleje vykrytalizoval bezbarvý monokrystal látky H₂NO₂A-MEA. Stejným procesem byla získána i struktura látky H₂NO₂A-DEA, kde monokrystal vykrytalizoval z oleje stáním v lednici. Experimentální krystalografická data získaných krystalových struktur jsou shrnuta v Tabulce 7.



Obrázek 10: Krystalové struktury ligandů $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (nahore) $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (dole) v pevném stavu. Zeleně jsou znázorněny intermolekulární vodíkové vazby ligandu. Černě jsou zobrazeny uhlíkové atomy, bíle vodíkové atomy, červeně kyslíkové atomy a modře dusíkové atomy.

Ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$) (Obrázek 10) vykrytalizoval v kosočtverečné soustavě ve tvaru prismatu. Makrocyclus tvoří rovinu a nad ní vystupují všechny pendanty. Struktura není stabilizována žádnou intramolekulární vazbou. Stabilizace probíhá pouze skrz intermolekulární vodíkovou vazbu obou acetátů (Obrázek 10).

Ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Obrázek 10) vykrytalizoval v monoklinické soustavě ve tvaru prismatu. Makrocyclický skelet tvoří rovinu, nad kterou směřují pendantní ramena. Molekula je stabilizována intramolekulárně díky vodíkové vazbě mezi amidickou a karboxylovou skupinou. Intermolekulární stabilizace vodíkovou vazbou je mezi acetátovými rameny, které interagují jedním atomem kyslíku s molekulou vody a druhým atomem kyslíku s další strukturální jednotkou ligandu.

Tabulka 7: Experimentální krystalografická data studovaných ligandů.

Sloučenina	$\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$	$\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$
Vzorec	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$
M_r	348,40	358,44
Barva	Bezbarvý	Bezbarvý
Tvar	Prisma	Prisma
Krystalová soustava	monoklinická	kosočtverečná
Prostorová grupa	$P12_1/c_1$	$P2_12_12_1$
a [Å]	14,5673(5)	10,2549(3)
b [Å]	8,3125(3)	11,1906(3)
c [Å]	14,2549(6)	31,0907(8)
α [°]	90	90
β [°]	96,0930(10)	90
γ [°]	90	90
V [Å ³]	1716,38(11)	3567,92(17)
Z	4	8
ρ [g·cm ⁻³]	1,348	1,335
μ [mm ⁻¹]	0,105	0,823
Difrakcí celkem	3956	7016
Intenz. difrakcí [$I > 2\sigma(I)$]	3470	6971
R	0,0349	0,0251
R' [$I > 2\sigma(I)$]	0,0404	0,0252
wR	0,0875	0,0688
wR' [$I > 2\sigma(I)$]	0,0910	0,0689

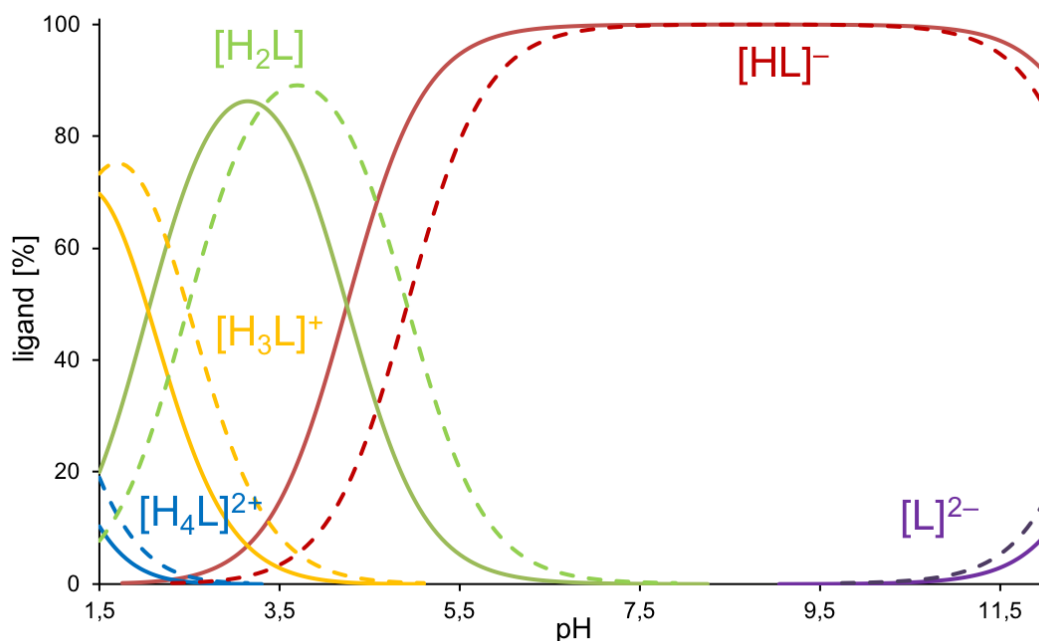
5.3 Potenciometrické titrace

Pomocí metody potenciometrické titrace byly stanoveny protonizační konstanty ligandu H₂NO₂A-MEA a konstanty stability komplexů s Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ a Zn²⁺. Pro ligand H₂NO₂A-DEA byly stanoveny konstanty stability s Li⁺, Mg²⁺ a Ca²⁺. Pro srovnání jsou uváděny protonizační konstanty a konstanty stability komplexů ligandu H₂NO₂A-DEA z bakalářské práce.⁵⁴

5.3.1 Acidobazické vlastnosti

Experimentálně byly stanoveny čtyři protonizační konstanty ligandu H₂NO₂A-MEA shrnuté v Tabulce 8. Dvě konstanty s nejnižším p*K_a* odpovídají protonizaci karboxylových skupin acetátů, zbylé dvě protonizační konstanty náležejí protonizaci dvou makrocyclických atomů dusíku. Potenciometrické měření bylo prováděno v rozmezí pH 1,4–12 (Obrázek 11). V počátečním bodě titrace byly přítomny tři formy ligandu. Na počátku titrace byly přítomny dvě kladně nabitě částice ligandu. Plně protonizovaný ligand [H₄L]²⁺ a mono protonizovaný [H₃L]⁺, jejichž maximální zastoupení bylo v počátečním bodě titrace a postupně klesalo do jejich úplného vymizení u pH 3,5 respektive 4,5. Neutrální forma ligandu [H₂L]⁰ se také objevuje na začátku titrace s maximálním zastoupením pH~3. V rozmezí pH 6–10 je majoritní částicí v roztoku mono protonizovaná forma ligandu [HL]⁻ a od pH 10 se začíná objevovat i plně deprotonizovaná částice ligandu [L]²⁻ v maximálním zastoupení na konci titrace ~10%.

Porovnání protonizačních konstant ligandu H₂NO₂A-MEA a H₂NO₂A-DEA⁵⁴ ukazuje, že monoethyl derivát má celkově nižší bazicitu než ligand obsahující diethyl derivát. Srovnání obou připravených ligandů s H₃NOTA²⁵ ukazuje trend, že derivatizace jednoho acetátového ramene snižuje konsektivní protonizační konstanty ligandu o jeden řád (Tabulka 8).



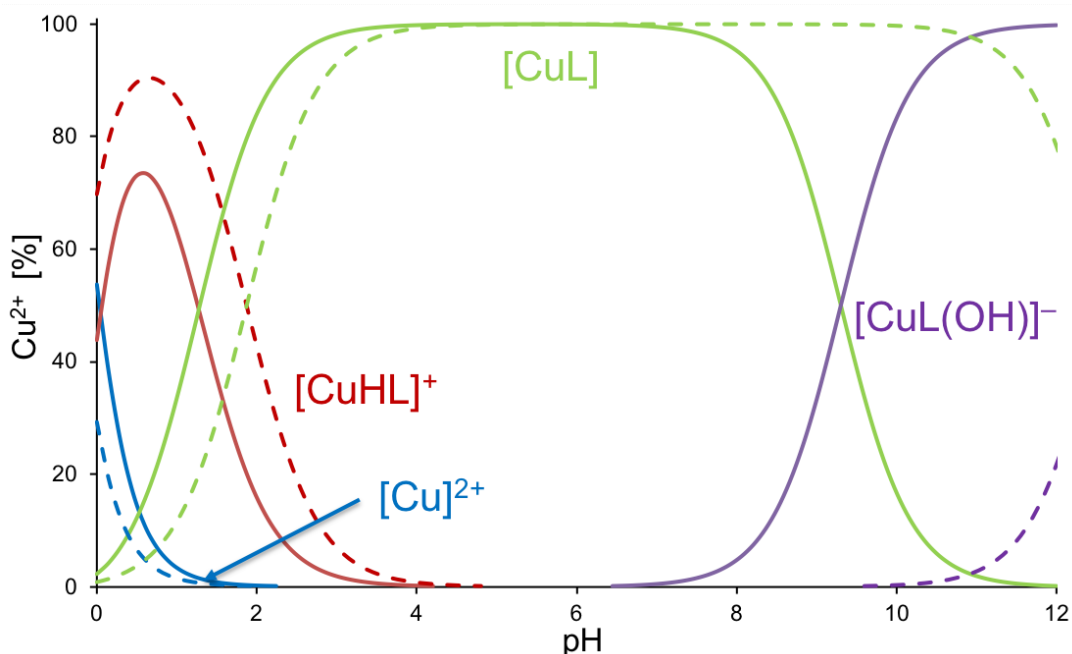
Obrázek 11: Distribuční diagram ligandu H₂NO₂A-MEA, který je zobrazen plnou čarou ($c_{\text{lig}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, 25 °C). Přerušovanou čarou je naznačena distribuce ligandu H₂NO₂A-DEA⁵⁴ za stejných podmínek.

Tabulka 8: Protonizační konstanty ligandů H₂NO₂A-MEA, H₂NO₂A-DEA a H₃NOTA ($c_{\text{lig}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, 25 °C).

	H ₂ NO ₂ A-MEA		H ₂ NO ₂ A-DEA ⁵⁴		H ₃ NOTA ²⁵	
	$\log\beta$	$\text{p}K_a$	$\log\beta$	$\text{p}K_a$	$\log\beta$	$\text{p}K_a$
H + L ↔ [HL]	13,03(2)	13,03	12,75(1)	12,75	13,17	13,17
H + HL ↔ [H ₂ L]	17,27(2)	4,24	17,67(2)	4,92	18,91	5,74
H + H ₂ L ↔ [H ₃ L]	19,31(2)	2,04	20,15(2)	2,48	22,13	3,22
H + H ₃ L ↔ [H ₄ L]	19,98(5)	0,67	21,07(3)	0,92	24,09	1,96
H + H ₄ L ↔ [H ₅ L]	–	–	–	–	24,79	0,70

5.3.2 Koordinační vlastnosti

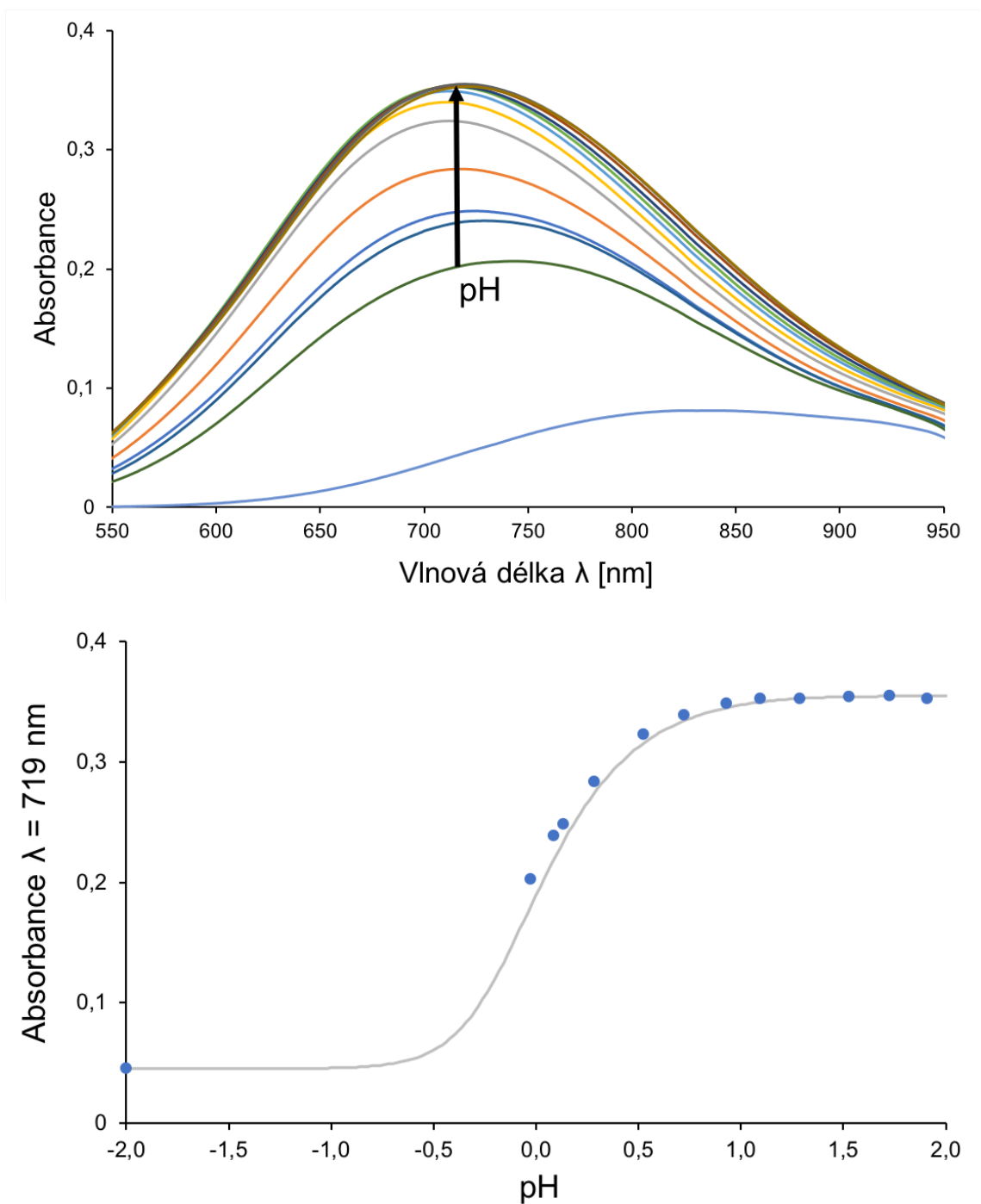
Systém Cu²⁺:H₂NO₂A-MEA byl studován potenciometrickou titrací v poměru 1:1 v rozmezí pH 1,4–12,1 (Obrázek 12). Vyhodnocením titrací vyšlo najevo, že zastoupení volných měďnatých iontů na počátku titrace je méně než 10 %. Potenciometrické měření ve velmi kyselém prostředí je neprůkazné, takže bylo nutné měření UV/VIS spektrofotometrie v oblasti pH 0–2 (Obrázek 13).



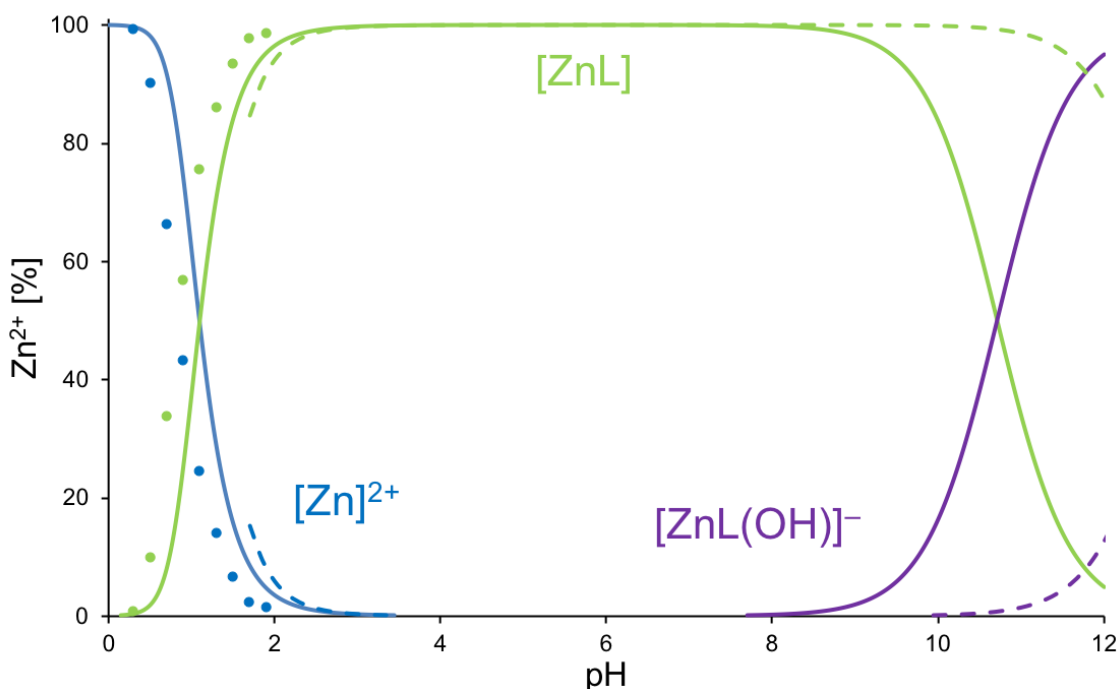
Obrázek 12: Distribuční diagram systému $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Prerušovanou čarou je naznačena distribuce ligandu $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}^{54}$ za stejných podmínek.

Při $\text{pH} = 0$ je přítomno $\sim 55\%$ volných měďnatých iontů Cu^{2+} , které jsou kvantitativně komplexovány ligandem od $\text{pH} \sim 2$. Vedle volných měďnatých iontů je při $\text{pH} = 0$ přítomen i protonizovaný komplex $[\text{CuHL}]^+$ v zastoupení $\sim 45\%$ s maximálním výskytem při $\text{pH} \sim 0,5$ a jeho výskyt lze sledovat do $\text{pH} 4$. Nenabitý komplex $[\text{CuL}]$ je v minimální míře zastoupen i při $\text{pH} = 0$ a v rozmezí $\text{pH} 4\text{--}7$ je jedinou částicí komplexu v roztoku. Od $\text{pH} \sim 8$ začíná nabývat na důležitosti hydroxo komplex $[\text{CuL(OH)}]^-$, který je na konci titrace v téměř 100% zastoupení.

Při porovnání chování ligandu $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ a $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}^{54}$ lze pozorovat, že ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ při $\text{pH} = 0$ zakomplexoval o $\sim 25\%$ méně měďnatých iontů než derivát $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$. Zároveň nenabitý komplex $[\text{CuL}]$ tvoří hydroxo komplex o $\sim 2,5$ jednotky pH dříve než $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$. Na rozdíl od $\text{H}_3\text{NOTA}^{25}$ ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ ani $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ netvoří diprotonizovaný komplex kvůli absenci protonizovatelného karboxylu v axiální poloze komplexů.

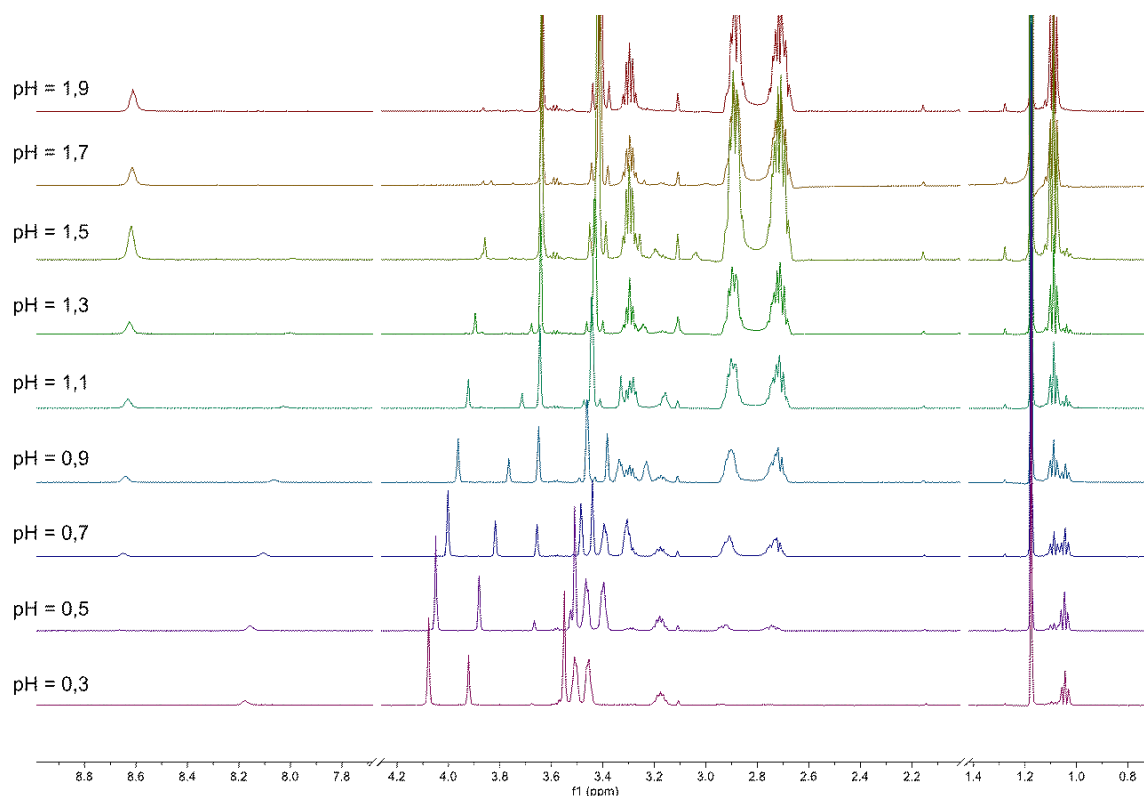


Obrázek 13: Závislost absorbance na vlnové délce systému Cu²⁺:H₂NO₂A-MEA při různých pH v poměru 1:1 (nahore). Nejnižší světle modrá křivka je absorpční spektrum volných měďnatých iontů. Závislost absorbance v absorpčním maximu λ = 719 nm na pH částice. [CuHL]⁺ (dole). Šedá křivka je teoretické proložení dle programu OPIUM.⁴⁸



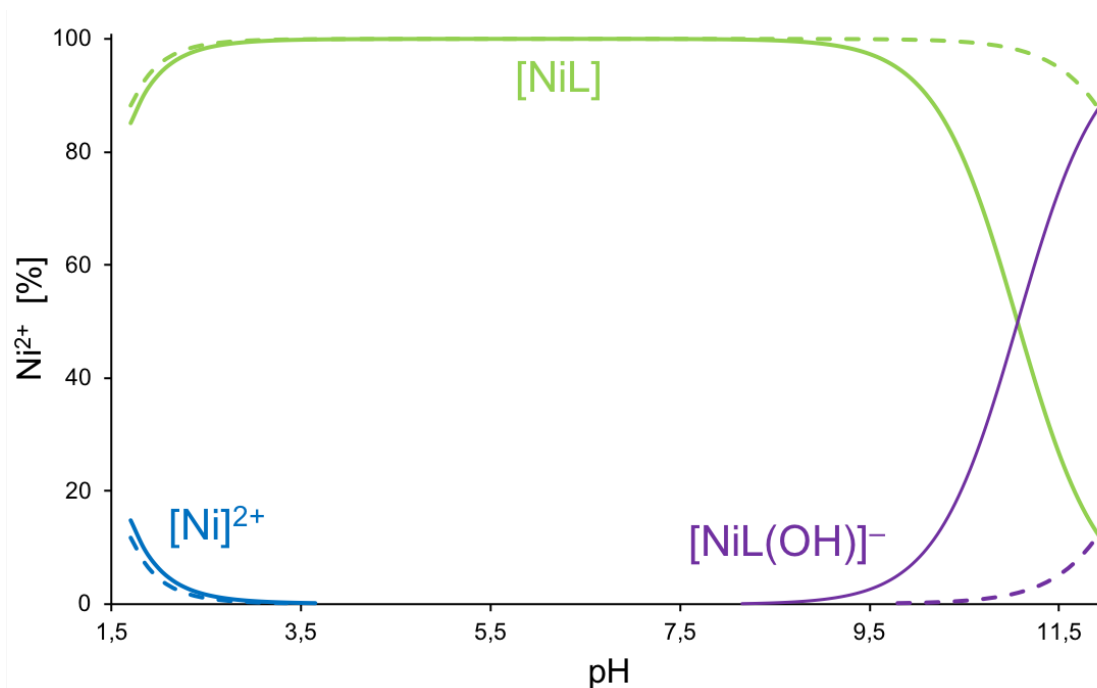
Obrázek 14: Distribuční diagram systému $\text{Zn}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$, zobrazen plnou čarou, v poměru 1:1 ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Zelené body znamenají zastoupení komplexu $[\text{ZnL}]$ zjištěné pomocí ^1H NMR titrace a modré body zastoupení volného Zn^{2+} vypočtené z NMR titrace. Přerušovanou čarou je naznačena distribuce ligandu $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}^{54}$ za stejných podmínek.

Systém $\text{Zn}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (Obrázek 14) byl titrován v poměru 1:1 v rozmezí pH 1,4–12,1. Na počátku měření se v roztoku nacházelo ~40 % volných zinečnatých iontů, které jsou kvantitativně zakomplexovány od pH ~3,5, a zbytek byl vázán do komplexu $[\text{ZnL}]$. V rozmezí pH 3,5–8,0 se nachází v roztoku pouze částice $[\text{ZnL}]$, její zastoupení od pH 8 do konce titrace klesá na úkor hydroxo komplexu $[\text{ZnL}(\text{OH})]^-$. V kyselé oblasti pH 0,3–2,0 byl tento systém pro ověření platnosti navrženého modelu zkoumán ještě pomocí NMR titrace (Obrázek 15). NMR titrace potvrdila, že nevzniká žádná protonizovaná forma komplexu a navržený chemický model je správný.



Obrázek 15: ¹H NMR spektra systému Zn²⁺:H₂NO₂A-MEA v poměru 1:1 a rozmezí pH 0,3–1,9 ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, bez kontroly iontové síly, 25°C).

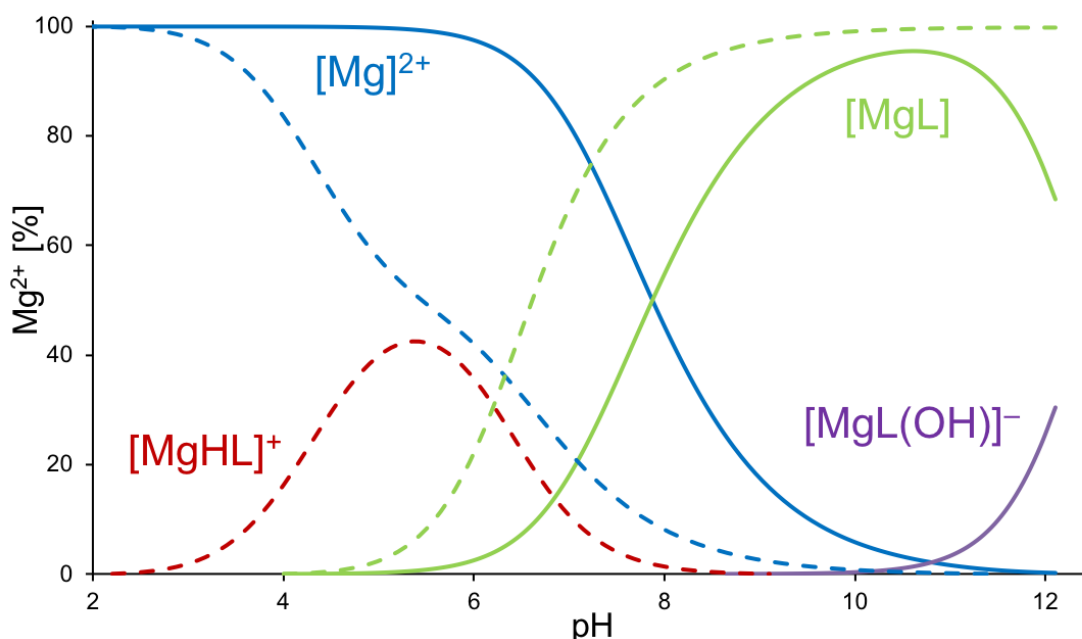
Ligand H₂NO₂A-MEA koordinuje obdobně dobře zinečnaté ionty do komplexu [ZnL] jako H₂NO₂A-DEA. Výraznější rozdíl je pozorován v bazické oblasti, obdobně jako v případě měďnatého komplexu, kde tvorba hydroxo komplexu [ZnL(OH)]⁻ probíhá o ~2 jednotky pH dříve pro komplex s ligandem H₂NO₂A-MEA než s ligandem H₂NO₂A-DEA.⁵⁴



Obrázek 16: Distribuční diagram systému $\text{Ni}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (zobrazeno plnou čarou) a $\text{Ni}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ v poměru 1:1 ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NMe_4Cl , 25°C). Prerušovanou čarou je naznačena distribuce ligandu $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$.

Stejný průběh měla titrace systému $\text{Ni}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (Obrázek 16), který byl titrován v poměru 1:1 v rozmezí pH 1,7–12,0. V kyselé oblasti titrace (pH 1,7–4,0) probíhala metodou „out-of-cell“ kvůli pomalé kinetice komplexace, která je dána elektronovou konfigurací nikelnatých iontů $[\text{Ar}] 3d^8$. Nikelnaté ionty mají počáteční zastoupení ~15 %. Od pH ~3,5 jsou zakomplexovány ze 100 % do komplexu $[\text{NiL}]$, který byl v roztoku jako jediná částice komplexu do pH ~8. Od tohoto pH se začíná objevovat hydroxo komplex, který je na konci titrace zastoupen ~90 %.

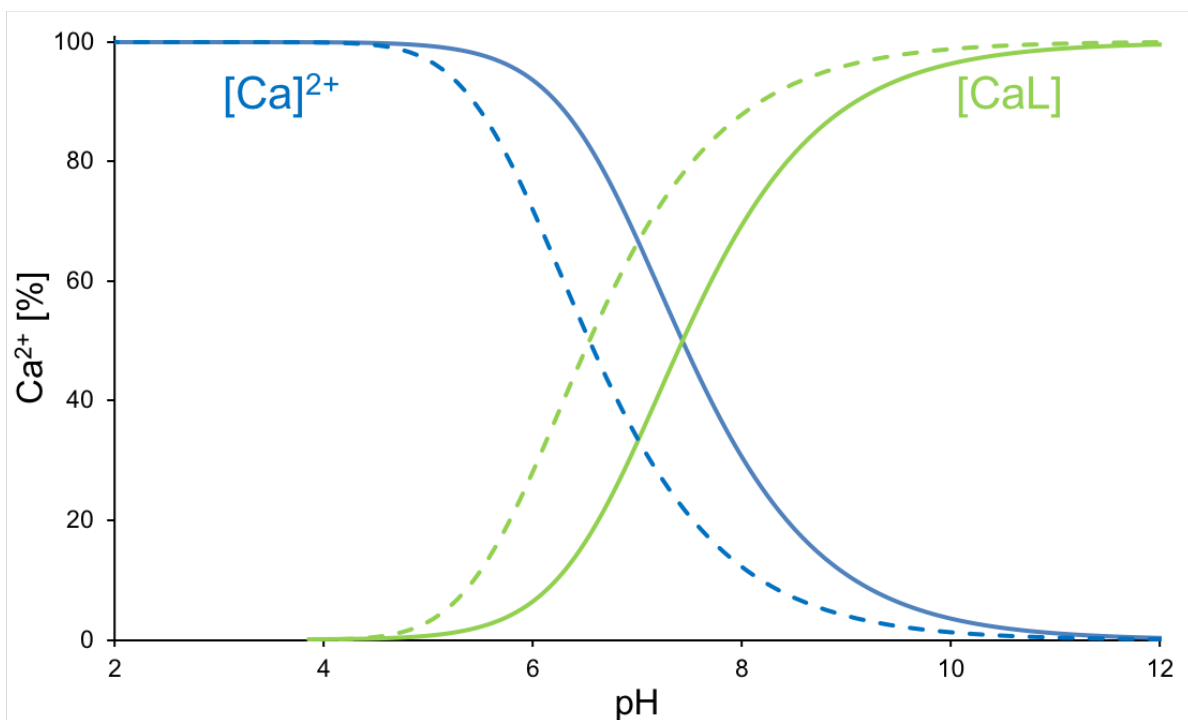
Systémy $\text{Mg}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ a $\text{Mg}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ byly titrovány v poměru 1:1 v rozmezí pH 1,9–12,1 (Obrázek 17). Volné hořečnaté kationty začínají být ligandem $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ komplexovány až při pH ~4 do komplexu $[\text{MgL}]$. Tento komplex se od pH ~9 pomalu přeměňuje na částici $[\text{MgL}(\text{OH})]^-$. Na druhou stranu ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ nejprve s hořečnatými ionty tvoří protonizovaný komplex $[\text{MgHL}]^+$ s maximálním zastoupením při pH ~5,5. Už od pH 4 se začíná objevovat nenabitý komplex $[\text{MgL}]$ jehož zastoupení stoupá až do konce titrace.



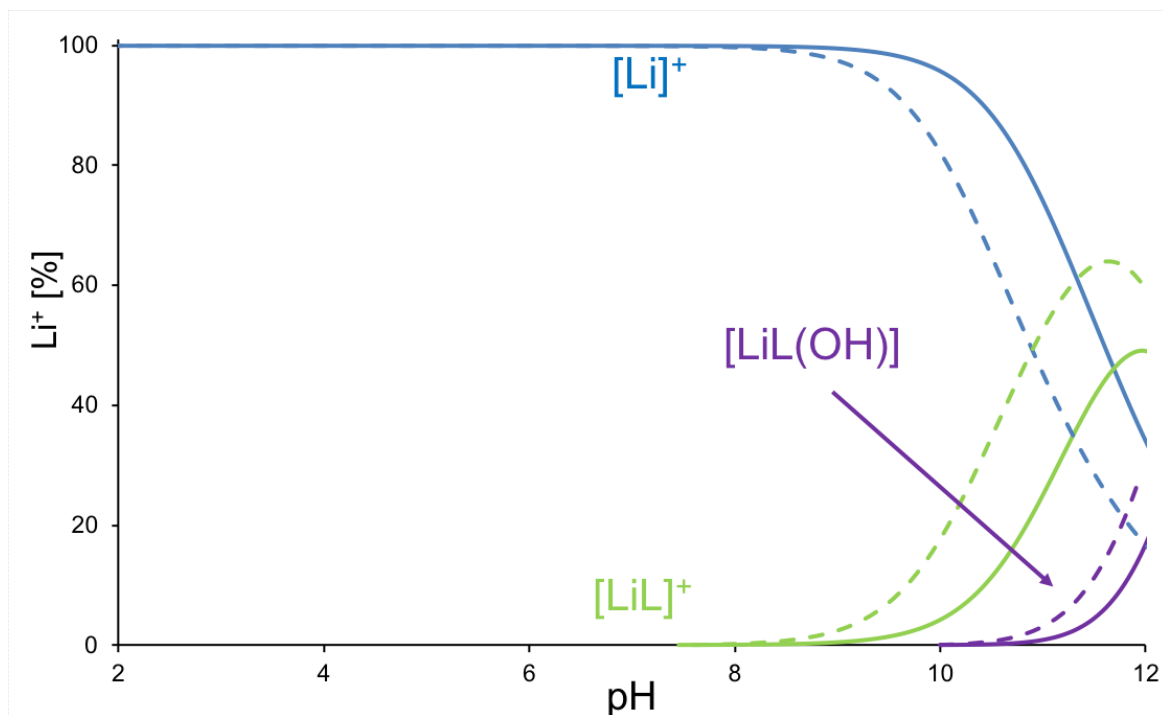
Obrázek 17: Distribuční diagram systémů $\text{Mg}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (zobrazeno plnou čarou) a $\text{Mg}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ v poměru 1:1 ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NMe_4Cl , 25°C). Přerušovanou čarou je naznačena distribuce ligandu $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$.

Systémy $\text{Ca}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ a $\text{Ca}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ (Obrázek 18) byly titrovány v poměru 1:1 v rozmezí pH 1,9–12,1. Vazba volných iontů do komplexu $[\text{CaL}]$ začíná při pH $\sim 4,5$ pro ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ a pro $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ okolo pH $\sim 5,5$. Komplexace probíhala po celou dobu titrace až do konečného bodu, kdy byl téměř všechn kov vázán do komplexu $[\text{CaL}]$.

Titrace systémů $\text{Li}^+:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ a $\text{Li}^+:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ byla prováděna v rozmezí pH 1,9–12,0 (Obrázek 19). Na rozdíl od všech předešlých systémů je lithium vázáno do komplexů až v bazickém prostředí. $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ začíná komplexovat lithné ionty do komplexu $[\text{LiL}]^+$ při pH ~ 8 a ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ až při pH ~ 9 . Komplex $[\text{LiL}]^+$ je nejvíce zastoupen těsně před koncem titrace a současně vedle něj se při pH > 10 začíná objevovat hydroxo komplex $[\text{LiL}(\text{OH})]$ jehož množství stoupá až do konce měření.



Obrázek 18: Distribuční diagramy systémů $\text{Ca}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (zobrazeno plnou čarou) a $\text{Ca}^{2+}:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ (zobrazeno přerušovanou čarou) v poměru 1:1 ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, 25°C).



Obrázek 19: Distribuční diagramy systémů $\text{Li}^+:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (zobrazeno plnou čarou) a $\text{Li}^+:\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ (zobrazeno přerušovanou čarou) v poměru 1:1 ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, 25°C).

Porovnáním všech distribučních diagramů je vidět, že ligand H₂NO₂A-DEA koordinuje kovy v kyselějším prostředí lépe než ligand H₂NO₂A-MEA. Toto platí pro většinu analyzovaných komplexů. Vzniklé komplexy ligandu H₂NO₂A-MEA s přechodnými kovy ukázaly vznik hydroxo komplexů, které se tvoří už ve slabě bazickém prostředí, zatímco hydroxo komplexy s ligandem H₂NO₂A-DEA se tvoří o ~2 jednotky pH později.

Vypočtené hodnoty konstant stability jednotlivých systémů kov ligand (Tabulka 9) pro měďnaté, zinečnaté a nikelnaté ionty jsou v souladu s Irving-Williamsovou řadou. Tato teorie říká, že ligand tvoří nejstabilnější komplexy s měďnatými ionty, komplex zinečnatý bude méně stabilní než měďnatý a nejméně stabilní bude komplex s nikelnatými kationty. Stabilita jednotlivých komplexů ukázala, že nejméně stabilní komplexy se studovanými kovy tvoří ligand H₂NO₂A-MEA, pak H₂NO₂A-DEA a nejstabilnější komplexy s vybranými kovy z první řady přechodných kovů tvoří ligand H₃NOTA (Tabulka 10). Konstanty stability pro studované kovy jsou se zkoumanými ligandy o řád a v případě zinečnatých iontů o tři řády nižší než konstanty stability pro H₃NOTA.

Vypočtené konstanty stability pro komplexy ligandů H₂NO₂A-MEA a H₂NO₂A-DEA se studovanými nepřechodnými kovy, kovy biologického zájmu a lithiem kopírují stabilitní trend, který byl pozorovaný u komplexů H₃NOTA (Tabulka 10). Mezi studovanými ligandy a porovnávaným ligandem H₃NOTA tvoří nejstabilnější komplexy ligand H₃NOTA a nejméně stabilní H₂NO₂A-MEA. Významné rozdíly byly sledovány mezi studovanými ligandy a ligandem H₃NOTA v hodnotách konstant stability komplexů zejména u zinečnatého a hořečnatého komplexu.

Spektrofotometrické měření systému Cu²⁺:H₂NO₂A-MEA prokázalo, stejně jako u systému Cu²⁺:H₂NO₂A-DEA⁵⁴, výbornou schopnost komplexace měďnatých iontů. Ligand H₂NO₂A-MEA tvoří při pH = 0 přibližně se 45 % měďnatých iontů mono protonizovaný komplex [CuHL]⁺. Tato protonizace je lokalizována na jednom z acetátových pendantních ramen a je umožněna elektronovou konfigurací iontů Cu²⁺. Měďnaté ionty, mající elektronovou konfiguraci [Ar] 3d⁹, obsahují v orbitalu dz², který je zodpovědný za vazbu v axiálním prostoru pouze jeden elektron. Tato specifita v elektronové konfiguraci centrálního atomu způsobuje silnou Jahn-Tellerovu distorzi. Donorové atomy v axiální poloze jsou vázány mnohem slaběji než donorové atomy

v ekvatoriální poloze. V axiální pozici dochází v kyselé oblasti k ataku ligandu protonem. Nejslaběji je koordinované derivatizované rameno, které ale nemůže být protonizované, takže na rozdíl od H₃NOTA připravené ligandy tvoří pouze mono protonizovaný komplex. Toto chování není sledováno u zinečnatých a nikelnatých iontů, které tvoří se zmíněnými ligandy pravidelné oktaedrické komplexy.

Tabulka 9: Konstanty stability komplexů s vybranými kovy a ligandy H₂NO₂A-MEA a H₂NO₂A-DEA (*I* = 0,1 mol·dm⁻³ NMe₄Cl, 25 °C).

	Cu ²⁺		Zn ²⁺		Ni ²⁺	
	logβ		logβ		logβ	
	MEA	DEA ⁵⁴	MEA	DEA ⁵⁴	MEA	DEA
[ML]	21,37(3)	22,55(2)	18,89(3)	19,13(3)	18,38(5)	19,3(1)
[MHL] ⁺	22,64(3)	24,42(1)	–	–	–	–
[ML(OH)] ⁻	12,06(4)	10,00(4)	8,18(3)	6,29(4)	7,32(5)	6,6(1)
	Ca ²⁺		Mg ²⁺		Li ⁺	
	logβ		logβ		logβ	
	MEA	DEA	MEA	DEA	MEA	DEA
[ML]	8,30(2)	8,80(2)	7,86(1)	9,16(2)	4,09(1)	4,45(1)
[MHL] ⁺	–	–	–	15,37(3)	–	–
[ML(OH)] ⁻	–	–	-4,59(2)	–	-8,38(1)	-7,95(1)

Konstanty stability jednotlivých komplexů ukazují, že zavedením amidické skupiny do molekuly snižuje stabilitu vzniklých komplexů. Ligand s amidickou skupinou obsahující jen jeden alkyl tvoří nejméně stabilní komplexy ze zkoumaných ligandů. Tyto komplexy mají o necelý řád nižší konstantu stability než ligand mající ve struktuře dialkyl amidovou skupinu. Porovnáním konstant stability s ligandem H₃NOTA ukazuje propad konstant stability jednotlivých systémů o jeden, respektive dva řády v závislosti na porovnávaném ligandu. Zinečnaté ionty v tomto ohledu vybočují z řady a tvoří o tři řády méně stabilní komplexy s ligandy obsahující amidovou skupinu než s ligandem H₃NOTA.

Zinečnaté ionty jsou tvrdší lewisovskou kyselinou než měďnaté ionty a preferují ve svém koordinačním okolí tvrdší záporně nabitě donorové atomy. Zároveň zinečnaté kationty si daleko více než měďnaté ionty vynucují oktaedrické koordinační okolí, což daleko lépe splňuje ligand H₃NOTA než studované ligandy, protože pendant obsahující amidický derivát bude koordinován nejslaběji. Hořečnaté, vápenaté a lithné ionty zapadají do již pozorované série hodnot konstant stability. Hořečnaté komplexy studovaných ligandů vykují rozdílné chování vůči protonu a hydroxidu. Ve většině případů ligand H₂NO₂A-DEA koordinuje ionty kovů lépe v kyselějším prostředí, a proto je možná tvorba protonizovaného komplexu. Ligand H₂NO₂A-MEA tvoří méně stálé komplexy a vyšší sklon k vzniku hydroxo komplexů což se projevuje i u hořečnatých iontů. Komplex hořečnatých iontů s ligandem H₂NO₂A-MEA se tvoří mnohem později než s ligandem H₂NO₂A-DEA a jeho významné zastoupení je až v oblasti pH kde se protonizované komplexy netvoří.

Tabulka 10: Porovnání konstant stability komplexů s vybranými kovy a studovanými ligandy H₂NO₂A-MEA, H₂NO₂A-DEA a s acetátovaným analogem H₃NOTA²⁵ (*I* = 0,1 mol·dm⁻³ NMe₄Cl, 25 °C).

	logK		
	M + L ↔ [ML]		
	H ₂ NO ₂ A-MEA	H ₂ NO ₂ A-DEA	H ₃ NOTA ²⁵
Cu ²⁺	21,37	22,55 ⁵⁴	23,33
Zn ²⁺	18,89	19,13 ⁵⁴	22,32
Ni ²⁺	18,38	19,37	19,24
Mg ²⁺	7,86	9,16	10,97
Ca ²⁺	8,30	8,80	10,32
Li ⁺	4,09	4,45	5,24

Vliv zavedení amidické skupiny do molekuly byl dříve zkoumán i na větším analogu makrocyklu TACN, cyclenu (1,4,7,10-tetraazacyclododekan) a jeho plně acetátovaném derivátu H₄DOTA (Obrázek 6).^{50,57} Zavedení monobutylamidické skupin na jedno pendantní rameno sníží celkovou bazicitu ligandu. Výsledky ukazují, že zavedení amidické vazby do ligandu sníží konstantu stability komplexu o jeden a půl řádu. Podobné

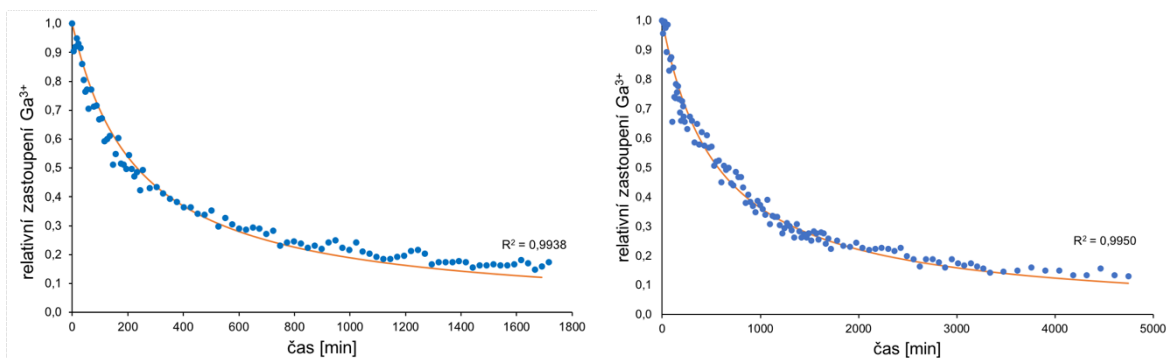
výsledky ukázala i koordinace gadolinitých kationtů, které jsou asi o třetinu větší než gallitý nebo měďnatý kation.⁵⁷ Zavedení propylamidické skupiny na jedno pendantní rameno významně sníží bazicitu cyklu i stabilitu komplexů. Gadolinitý komplex obsahující monoamid ligandu H₄DOTA jeví o tři řády nižší konstantu stability než tvoří ligand H₄DOTA.

5.4 ⁷¹Ga NMR spektroskopie

Rychlost komplexace a stabilita komplexu v bazickém prostředí byly sledovány pomocí ⁷¹Ga NMR spektroskopie, což už bylo několikrát použito a je to jedna z mála možností jak efektivně sledovat rychlost komplexace a stálost Ga³⁺ komplexů.^{34,44,50}

Všechna měření byla prováděna při koncentraci 0,01M, vůči standardu a v poměru M:L 1,05:1. Pro kinetiky komplexace byl využit standard [Ga(OH)₄]⁻ mající chemický posun v ⁷¹Ga NMR 224 ppm a měření stability bylo prováděno vůči standardu obsahující [Ga(H₂O)₆]³⁺ s chemickým posunem 0 ppm. Komplexy [GaNO₂A-MEA]⁺ a [GaNO₂A-DEA]⁺ při pH 1 na ⁷¹Ga NMR vykazují signály ve tvaru širokého singletu ([GaNO₂A-MEA]⁺ – 175,2 ppm; *w*_{1/2} ~ 1470 Hz a [GaNO₂A-DEA]⁺ – 174,8 ppm; *w*_{1/2} ~ 1250 Hz), což jsou signály mnohem širší než signál komplexu [GaNOTA] (171 ppm; *w*_{1/2} = 210 Hz).

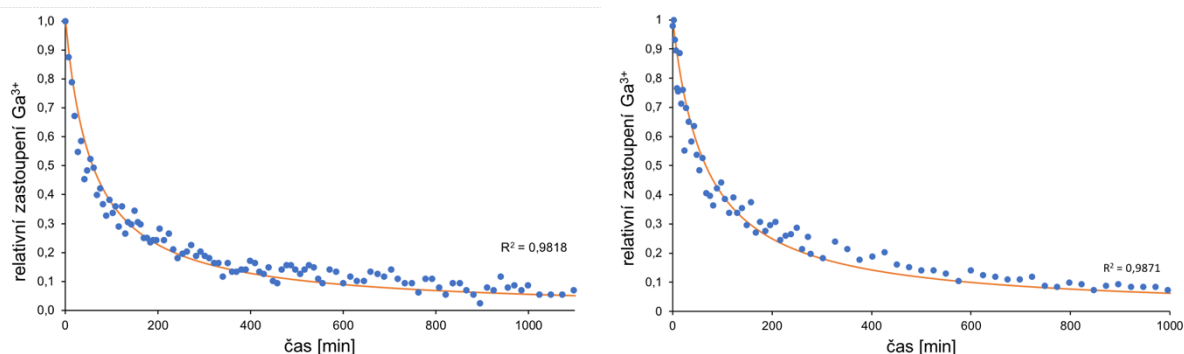
Kinetika komplexace ligandu H₂NO₂A-MEA a H₂NO₂A-DEA byla zkoumána při pH 1; 2 a 2,8 způsobem porovnávání integrálů ploch nekoordinovaných gallitých iontů oproti standardu. Komplexace byla při nejvyšším pH pro oba studované ligandy natolik rychlá, že doba od smíchání roztoků k naměření prvního NMR spektra (2 minuty) byla dostatečně dlouhá k plné komplexaci volného [Ga(H₂O)₆]³⁺. Kinetika komplexace volného kovu ligandem podléhá podle pravidel kinetiky druhého řádu, kterou experimentální hodnoty velmi dobře kopírují (Obrázek 20). Při pH = 1 jsou gallité ionty koordinovány nejpomaleji. Poločas komplexace (*t*_{1/2}) gallitých iontů jsou pro ligand H₂NO₂A-MEA téměř čtyři hodiny (233 minut) a ligand H₂NO₂A-DEA je poločas komplexace delší (571 minut) (Tabulka 11).



Obrázek 20: Kinetika komplexace Ga^{3+} ligandy $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (vlevo) a $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ (vpravo) při $\text{pH} = 1$ (25°C , $0,01\text{M}$, poměr M:L 1,05:1). Modré body jsou experimentální hodnoty zastoupení $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ a oranžová křivka teoretické proložení kinetikou druhého řádu spočítanou programem MicroMath Scientist.⁵⁸

Rychlost komplexace gallitých iontů zkoumanými ligandy je nepatrně rychlejší než pro ligand H_3NOTA , což může být důsledkem nižší hustoty náboje na pendantech, a tudíž snížením stability reakčních intermediátů. Zároveň makrocyclické atomy dusíku mají nižší bazicitu a díky tomu je usnadněn vznik komplexu.

Stejný trend je pozorovatelný i při zvýšení pH na 2, kde se poločas komplexace čtyřikrát zkrátí oproti pH o řád nižšímu (Obrázek 21). Kinetika komplexace taktéž kopíruje závislost kinetiky druhého řádu. Vypočtené poločasy komplexace ($t_{1/2}$) (Tabulka 11) pro jednotlivé ligandy se výrazně neliší. Ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ koordinuje gallité ionty s poločasem 58 minut a ligand $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ s poločasem 66 minut.



Obrázek 21: Kinetika komplexace Ga^{3+} ligandy $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-MEA}$ (vlevo) a $\text{H}_2\text{NO}_2\text{A-DEA}$ (vpravo) při $\text{pH} = 2$ (25°C , $0,01\text{M}$, poměr M:L 1,05:1). Modré body jsou experimentální hodnoty zastoupení $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ a oranžová křivka teoretické proložení kinetikou druhého řádu spočítanou programem MicroMath Scientist.⁵⁸

Tabulka 11: Parametry rychlosti komplexace ligandů H₂NO₂A-MEA, H₂NO₂A-DEA a H₃NOTA³⁴ (25°C, 0,01M, standard [Ga(OH)₄]⁻ v D₂O).

pH	H ₂ NO ₂ A-MEA		H ₂ NO ₂ A-DEA		H ₃ NOTA ³⁴
	<i>k</i>	<i>t</i> _{1/2}	<i>k</i>	<i>t</i> _{1/2}	<i>t</i> _{1/2}
	[M ⁻¹ s ⁻¹]	[min]	[M ⁻¹ s ⁻¹]	[min]	[min]
2,8	–	a)	–	a)	a)
2	2,85(7)·10 ⁻⁴	58±2	2,51(9)·10 ⁻⁴	66±3	–
1	7,14(20)·10 ⁻⁵	233±5	2,92(5)·10 ⁻⁵	571±10	270

a) Nebylo měřitelné kvůli příliš rychlé komplexaci gallitých iontů.

Stabilita komplexů s gallitými ionty byla sledována v 1M pufrch a v 0,01M koncentraci ligandu. Pufry využitě při měření byly následující: pH = 7,5 HEPES, pH = 8,5 AMPSO a pH = 9,4 AMPSO. Vzorky byly připraveny smísením v poměru 1:1 20mM vodného roztoku gallitého komplexu a 1M vodného roztoku pufru.

Gallitý komplex ligandu H₂NO₂A-DEA je při pH 7,5 stabilní při laboratorní teplotě a nebyla pozorována žádná hydrolyza po dobu čtyřech dní. První náznaky hydrolyzy amidické vazby byly sledovány při pH 8,5. Ze širokého singletu vyrůstal úzký signál komplexu [GaNOTA] po dvou dnech při laboratorní teplotě. Při pH 9,4 je tato hydrolyza ještě rychlejší a většina komplexu [GaNO₂A-DEA]⁺ je rozložena na komplex [GaNOTA] bez zjevné dekomplexace gallitého iontu.

Gallitý komplex [GaNO₂A-MEA]⁺ při pH 7,5 vykazoval široký signál komplexu na ⁷¹Ga NMR ihned po přípravě vzorku. Po uplynutí 22 hodin signál vymizel. Signál komplexu nebyl přítomný vůbec při pH 8,5 a 9,4. Dle nepřímých důkazů je možno usoudit, že gallité ionty jsou koordinovány amidickým atomem dusíku místo atomu kyslíku z karboxylu. To je zejména z toho důvodu, že při pH 7,5 se gallité ionty nemůžou vyskytovat ve formě [Ga(H₂O)₆]³⁺. Dekomplexace gallitých iontů také neproběhla, jelikož nebyl pozorován signál [Ga(OH)₄]⁻. Zároveň nebyl sledován produkt hydrolyzy amidické vazby, úzký intenzivní signál komplexu [GaNOTA]. Díky těmto nepřímým důkazům je možné usoudit, že gallitý ion je koordinován amidickým atomem dusíkem a koordinační okolí gallitého ionu je tak N₄O₂. To vysvětluje i absenci signálu gallitých iontů, protože se naruší symetrie natolik, že se signál gallitých iontů zanikne v základní linii. Tuto hypotézu potvrzují i odlišná ¹³C NMR spektra volného ligandu a komplexu [GaNO₂A-MEA]⁺ při pH 7,5.

6 Závěr

Několikakrokovou syntézou byl připraven ligand, který obsahuje amidovou skupinu na jednom acetátovém rameni, H₂NO₂A-MEA navazující na sloučeninu z bakalářské práce H₂NO₂A-DEA. V pevném stavu byla u ligandů sledována různá stabilizace struktury pomocí intermolekulární a u ligandu H₂NO₂A-MEA i intramolekulární vodíkové vazby. Potenciometricky byly stanoveny čtyři protonizační konstanty, které jsou nižší, než mají ligandy H₂NO₂A-DEA a H₃NOTA²⁵. Byly studovány koordinační vlastnosti ligandu H₂NO₂A-MEA s Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ a Li⁺. Koordinační vlastnosti ligandu H₂NO₂A-DEA byly studovány s Ca²⁺, Mg²⁺ a Li⁺. Byl pozorován trend ve stabilitě komplexů, kde nejméně stabilní komplexy tvořil se zkoumanými ionty kovů ligand H₂NO₂A-MEA. Stabilnější komplexy tvořil ligand H₂NO₂A-DEA, přičemž ani tento ligand netvořil stabilnější komplexy než makrocycklus H₃NOTA.

Pomocí ⁷¹Ga NMR byla zkoumána kinetika komplexace Ga³⁺ iontů při pH 1 a 2 a 2,8 ligandy H₂NO₂A-MEA a H₂NO₂A-DEA. Při pH 2,8 probíhala komplexace tak rychle, že její poločas nebylo možné změřit. Při pH 2 je poločas komplexace obou ligandů okolo jedné hodiny. Při pH 1 jsou gallité ionty vázány do komplexu ligandem H₂NO₂A-MEA rychleji než ligandem H₃NOTA³⁴ a mnohem rychleji než ligandem H₂NO₂A-DEA. Hydrolyza amidické vazby gallitého komplexu [GaNO₂A-DEA]⁺ byla pozorována při pH 8,5 a při pH 9,4. Dle nepřímých důkazů při pH 7,5 se mění koordinace z N₃O₃ na N₄O₂, kde karboxylový atom kyslíku je nahrazen amidickým atomem dusíku.

7 Literatura

- (1) Cherry, S. R.; Gambhir, S. S. *ILAR J.* **2001**, *42* (3), 219–232.
- (2) Heiden, M. G. Vander; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. *Science.* **2009**, 1029–1033.
- (3) Basu, S.; Kwee, T. C.; Surti, S.; Akin, E. A.; Yoo, D.; Alavi, A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1228*, 1–18.
- (4) Anderson, C. J.; Welch, M. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2219–2234.
- (5) Tanaka, K.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (5), 815–828.
- (6) Valkema, R.; Krenning, E. P.; Visser, T. J.; Breeman, W. A.; Bakker, W. H.; Kwekkeboom, D. J.; Kooij, P. P.; de Jong, M. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28* (9), 1421–1429.
- (7) Schubiger, P. A.; Alberto, R.; Smith, A. *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7* (2), 165–179.
- (8) <http://web.natur.cuni.cz/anorchem/koordchem/vyzkum>; přístup dne 25.3.2019.
- (9) Funkhouser, J. *Curr. Drug Discov.* **2002**, *2*, 17–19.
- (10) Lee, D. Y.; Li, K. C. P. *Am. J. Roentgenol.* **2011**, *197* (2), 318–324.
- (11) McCarthy, J. R. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (11), 1023–1030.
- (12) Warenus, H. M. *Expert Opin. Med. Diagn.* **2009**, *3* (4), 381–393.
- (13) Hertz, S.; Roberts, A. *J. Am. Med. Assoc.* **1946**, *131*(2), 81–86.
- (14) Chapman, E. M.; Evans, R. D. *J. Am. Med. Assoc.* **1946**, *131*(2), 86–91.
- (15) Koster, U.; van der Meulen, N.; Bernhardt, P.; Muller, C.; Schibli, R.; Groehn, V.; Turler, A.; Bunka, M.; Haller, S. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55* (10), 1658–1664.
- (16) Roesch, F. *Curr. Radiopharm.* **2012**, *5* (3), 187–201.
- (17) Novak-Hofer, I.; Schubiger, P. A. *Eur. J. Nucl. Med.* **2002**, *29* (6), 821–830.
- (18) Herzog, H.; Tellmann, L.; Scholten, B.; Coenen, H. H.; Qaim, S. M. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *52* (2), 159–165.
- (19) Jackson, A. B.; Nanda, P. K.; Rold, T. L.; Sieckman, G. L.; Szczodroski, A. F.; Hoffman, T. J.; Chen, X.; Smith, C. J. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39* (3), 377–387.
- (20) O'Neill, A. F.; Dearling, J. L. J.; Wang, Y.; Tupper, T.; Sun, Y.; Aster, J. C.; Calicchio, M. L.; Perez-Atayde, A. R.; Packard, A. B.; Kung, A. L. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20* (3), 678–687.
- (21) Stigers, D. J.; Ferdani, R.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Anderson, C. J.; Golen, J. A.; Moore, C.; Rheingold, A. L. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (7), 1699–1701.

- (22) Pandya, D. N.; Kim, J. Y.; Park, J. C.; Lee, H.; Phapale, P. B.; Kwak, W.; Choi, T. H.; Cheon, G. J.; Yoon, Y. R.; Yoo, J. *Chem. Commun.* **2010**, 46 (20), 3517–3519.
- (23) Füzarová, S.; Kotek, J.; Císařová, I.; Hermann, P.; Binnemans, K.; Lukeš, I. *Dalton Trans.* **2005**, 17, 2908–2915.
- (24) Chaudhuri, P.; Wieghardt, K. *Prog. Inorg. Chem.* **2007**, 35, 329–436.
- (25) Kubíček, V.; Böhmová, Z.; Ševčíková, R.; Vaněk, J.; Lubal, P.; Poláková, Z.; Michalíková, R.; Kotek, J.; Hermann, P. *Inorg. Chem.* **2018**, 57 (6), 3061–3072.
- (26) Geraldes, C. F. G. C.; Alpoim, M. C.; Marques, M. P. M.; Sherry, A. D.; Singh, M. *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 3876–3881.
- (27) Clarke, E. T.; Martell, A. E. *Inorganica Chim. Acta* **1991**, 181 (2), 273–280.
- (28) Anderegg, G.; Delgado, R.; Arnaud-Neu, F.; Felcman, J.; Popov, K. *Pure Appl. Chem.* **2005**, 77 (8), 1445–1495.
- (29) Försterová, M.; Svobodová, I.; Lubal, P.; Táborský, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2006**, No. 5, 535–549.
- (30) Kotek, J.; Kubíček, V.; Císařová, I.; Benyei, A. C.; Hermann, P. *Nepublikované výsledky*.
- (31) Van Der Merwe, M. J.; Boeyens, J. C. A.; Hancock, R. D. *Inorg. Chem.* **1985**, 16 (24), 1208–1213.
- (32) Craig, A. S.; Parker, D.; Adams, H.; Bailey, N. A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 0 (23), 1793–1794.
- (33) Kataký, R.; Ferguson, G.; Harrison, A.; Craig, A. S.; Broan, C. J.; Randall, A. M.; Parker, D.; Cox, J. P. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1991**, 87–99.
- (34) Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (1), 577–590.
- (35) Notni, J.; Hermann, P.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Plutnar, J.; Loktionova, N.; Riss, P. J.; Rösch, F.; Lukeš, I. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16 (24), 7174–7185.
- (36) Eisenwiener, K. P.; Prata, M. I. M.; Buschmann, I.; Zhang, H. W.; Santos, A. C.; Wenger, S.; Reubi, J. C.; Mäcke, H. R. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13 (3), 530–541.
- (37) Andre, J. P.; Maecke, H. R.; Macko, L.; Kaspar, A. *67 Ga(NODASA): A new potential bifunctional radioligand for coupling to peptides*; 1998.

- (38) Verel, I.; Visser, G. W. M.; Boellaard, R.; Stigter-van Walsum, M.; Snow, G. B.; van Dongen, G. A. M. S. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44* (8), 1271–1281.
- (39) Pulido, J.; de Cabrera, M.; Sobczak, A. J.; Amor-Coarasa, A.; McGoron, A. J.; Wnuk, S. F. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (21), 5624–5630.
- (40) Förster, C.; Schubert, M.; Pietzsch, H. J.; Steinbach, J. *Molecules* **2011**, *16* (6), 5228–5240.
- (41) Riss, P. J.; Kroll, C.; Nagel, V.; Rösch, F. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (20), 5364–5367.
- (42) Shetty, D.; Jeong, J. M.; Ju, C. H.; Kim, Y. J.; Lee, J. Y.; Lee, Y. S.; Lee, D. S.; Chung, J. K.; Lee, M. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (21), 7338–7347.
- (43) De Sá, A.; Matias, Á. A.; Prata, M. I. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Ferreira, P. M. T.; André, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7345–7348.
- (44) Shetty, D.; Choi, S. Y.; Jeong, J. M.; Hoigebazar, L.; Lee, Y. S.; Lee, D. S.; Chung, J. K.; Lee, M. C.; Chung, Y. K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *34*, 5432–5438.
- (45) Hoigebazar, L.; Jeong, J. M.; Choi, S. Y.; Choi, J. Y.; Shetty, D.; Lee, Y. S.; Lee, D. S.; Chung, J. K.; Lee, M. C.; Chung, Y. K. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (17), 6378–6385.
- (46) Ferreira, M. F.; Pereira, G.; André, J. P.; Prata, M. I. M.; Ferreira, P. M. T.; Martins, J. A.; Geraldes, C. F. G. C. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2014**, *43* (21), 8037–8047.
- (47) Hlinová, V.; Jaroš, A.; David, T.; Císařová, I.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Hermann, P. *New J. Chem.* **2018**, *42* (10), 7713–7722.
- (48) Kývala, M.; Lubal, P.; Lukeš, I. *OPIUM software package, IX. Spanish-Italian, and Mediterranean Congress on Thermodynamics of Metal Complexes (SIMEC 98), Girona, Spain;* 1998.
- (49) Jurinak, J. J. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1976**, *40* (3).
- (50) Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, É.; Lukeš, I. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (23), 10960–10969.
- (51) Sheldrick, G. M. *SHELXT-2014. Program for Crystal Structure Solution from Diffraction Data. University of Göttingen, Göttingen;* 2014.
- (52) Sheldrick, G. M. *SHELXL-2014. Program for Crystal Structure Refinement from Diffraction Data. University of Göttingen: Göttingen;* 2014.
- (53) Gai, Y.; Hu, Z.; Rong, Z.; Ma, X.; Xiang, G. *Molecules* **2015**, *20* (10), 19393–

19405.

- (54) Kubinec, J. Koordinační vlastnosti monoamidu NOTA; Bakalářská práce, Univerzita Karlova, 2016.
- (55) Holub, J. Komplexy gallia pro molekulární zobrazování kostní tkáně; Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze: Praha, 2011.
- (56) Regueiro-Figueroa, M.; Gündüz, S.; Patinec, V.; Logothetis, N. K.; Esteban-Gómez, D.; Tripier, R.; Angelovski, G.; Platas-Iglesias, C. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (21), 10342–10350.
- (57) Sherry, A. D.; Brown, R. D.; Geraldès, C. F. G. C.; Spiller, M.; Kuan, K.-T.; Koenig, S. H. *Inorg. Chem.* **1989**, *28* (3), 620–622.
- (58) *Scientists for Windows, Version 2.01, Micromath Inc., Salt Lake City; 1995.*

Poděkování

Největší poděkování ze všech náleží mému bezvadnému školiteli Vojtovi za trpělivé vedení mé práce, za konzultace a čas strávený nad výsledky. Cením si Tvého přátelského přístupu k nám studentům, otevřenosti a všeho vědění, které ses mi snažil předat.

Poděkování si zaslouží osazenstvo velkého labu „19“, které mi poskytlo přátelské prostředí, i když mě po jednání „o nás bez nás“ na poslední rok poslalo do „vyhnanství“. Nebojte se, budiž Vám odpuštěno! Jmenovitě bych chtěl poděkovat Ondrovi Zemkovi za měření MS spekter a hlavně panu Mgr. S.t. Udělá za pomoc a neutuchající nadšení při měření všemožných i nemožných NMR spekter.

Velký dík si zaslouží Jana Havlíčková, která mi byla nápomocna při měření potenciometrických titrací, kterých bylo více než dost lemovaných všemožnými překážkami, ale i tak jsi byla vždy přívětivá a nápomocná, jak jsi jen mohla. Zároveň bych chtěl poděkovat i panu prof. Petru Hermannovi za užitečné připomínky a přínosné chemické konzultace.

Velmi bych chtěl poděkovat i všem členům „malého labu“, kteří mě skvěle přijali a pomohli mi díky skvělé atmosféře a Petrovým nesčetným konzultacím úspěšně dokončit můj diplomový projekt. Co víc, zapálili ve mně zvědavost, kterou s trochou štěstí budu rozvíjet dále...

Závěrem bych rád vyjádřil svou nejhlubší vděčnost své přítelkyni, přátelům, a především rodině za bezmeznou podporu a náklonost, kterou mi vyjadřovali v každé chvíli mého studia a pomohli mi to dotáhnout až sem...

Tak končí naše komédie,

zlo prohrává a dobro žije.

Vám, paní, vidím, se slza v oku blyští,

že chodí to tak pouze na jevišti.

V životě našem opáčně to bývá.

Tam dobrák úpí, vrch má duše křivá.

Jak ale říkám na každičké štaci:

svět bude lepší, dáme-li si práci.

Je marné vzlykat, modliti se zdrávas,

vše záleží jen na vás, na nás... a hlavně teda na VÁS!

Jára da Cimrman