

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie

**Tetraazamakrocycly na kalix[4]arenovém skeletu
a jejich komplexy s lanthanoidy**

Tetraazamacrocycles on calix[4]arene scaffold and their lanthanide complexes

Diplomová práce

studijního oboru klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Marta Mádlová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Pavla Vojtíška, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze, květen 2009

ÚVOD	5
1.1 MRI	5
1.2 Kontrastní látky	6
1.3 Chemická povaha kontrastních látek pro MRI	7
1.4 Metody studia kontrastních látek	9
1.4.1 Relaxivita	9
1.4.2 Počet koordinovaných molekul vody a jejich vzdálenost od Gd ³⁺ centra	10
1.4.3 Rotační korelační čas a elektronová relaxace	11
1.4.4 Rychlost výměny vody	11
1.4.5 Stanovení koncentrace lanthanoidů ve vzorku	12
1.4.6 Izomerie komplexů v roztocích	13
1.5 Kalix[4]areny jako modifikovatelné „nosiče“	16
2 CÍL PRÁCE	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Seznam použitých chemikálií a rozpouštědel	21
3.2 Metody charakterizace a čistící metody	21
3.2.1 Elementární analýza	21
3.2.2 HPLC	21
3.2.3 Hmotnostní spektrometrie	22
3.2.4 Infračervená spektroskopie	22
3.2.5 NMR spektroskopie	22
3.2.6 Ramanova spektroskopie	23
3.2.7 Spektroskopie UV/VIS	23
3.2.8 Tenkovrstevná chromatografie	23
3.2.9 Teplota tání	24
3.2.10 Ultrafiltrace	24
4 SYNTETICKÁ ČÁST	25
4.1 Příprava kalix[4]arenové části cílové sloučeniny	25
4.1.1 Příprava 5,11,17,23-tetrakis(1,1-dimethylethyl)-25,26,27,28-tetrahydroxykalix[4]arenu, (p-terc.butylkalix[4]arenu), ^t BuOHC4A, (I)	26
4.1.2 Příprava cone-5,11,17,23-tetrakis(1,1-dimethylethyl)-25,26,27,28-tetrakis(ethoxykarbonylmethoxy)kalix[4]arenu, ^t BuAcC4A, (II)	27
4.1.3 Příprava cone-5,11,17,23-tetranitro-25,26,27,28-(ethoxykarbonylmethoxy)kalix[4]arenu, NO ₂ AcC4A, (III)	28
4.1.4 Příprava cone-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(ethoxykarbonylmethoxy)kalix[4]arenu, NH ₂ AcC4A, (IV)	29
4.1.5 Příprava cone-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(karboxylmethoxy)kalix[4]arenu, NH ₂ KC4A, (V) ⁴⁸	29

4.2	Příprava makrocyclické části cílové sloučeniny	31
4.2.1	Příprava kyseliny 4-nitrobenzylfosfinové, NBnPIN, (VI)	32
4.2.2	Příprava tris(<i>t</i> -butyl)esteru 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,4,7-trioctové kyseliny, ^t Bu ₃ do3a·HBr, (VII)	33
4.2.3	Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1- {methyl-[(4-nitrofenyl)methyl]fosfinové}, H ₄ do3ap ^{NBn} ·2,5HCl·3H ₂ O, (VIII) ⁴⁹	34
4.2.4	Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1- {methyl-[(4-aminofenyl)methyl]fosfinové}, H ₄ do3ap ^{ABn} ·3HCl·2H ₂ O, (IX) ⁴⁹	35
4.3	Příprava cílové sloučeniny	36
4.3.1	Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1- {methyl-[(4-isothiokyanatanofenyl)methyl]fosfinové}, H ₄ do3ap ^{IBn} ·4HCl, (X) ⁴⁴	36
4.3.2	Příprava L ₄ -C, (XI)	37
4.4	Příprava komplexů	39
4.4.1	Příprava komplexů ligandu	39
4.4.2	Zjištění přítomnosti volného kovu v roztoku	40
4.4.3	Příprava vzorků na relaxometrická měření	40
4.4.4	Příprava vzorku komplexu pro studium izomerie v roztocích	40
5	DISKUZE	41
5.1	Příprava ligandu L₄-C	41
5.1.1	Příprava kalix[4]arenu	41
5.1.2	Příprava makrocyclu	41
5.1.3	Příprava cílové látky L ₄ -C	43
5.2	Charakterizace cílové sloučeniny L₄-C	44
5.2.1	DRIFTS spektroskopie	44
5.2.2	HPLC	50
5.2.3	NMR	51
5.3	Relaxometrická studie	53
5.3.1	Příprava komplexů	53
5.3.2	Určení parametrů τ_R , τ_M , T_{1e} a r_1 u (GdL) ₄ -C	53
5.3.3	Určení izomerie komplexu v roztoku	58
6	ZÁVĚR	59
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	60
8	POUŽITÁ LITERATURA	63
9	PŘÍLOHA	

Úvod

1.1 MRI

Tomografie magnetické rezonance, též MRI¹ („Magnetic Resonance Imaging“), je dnes běžnou, široce používanou, diagnostickou technikou v medicíně. S pomocí této metody je možné získat „řezy“ určité oblasti těla ze změřených NMR signálů, ty dále zpracovávat a spojovat až k výslednému třídimenziálnímu obrazu požadovaného orgánu. Tato metoda je vhodná pro zobrazování měkkých tkání, zatímco CT („Computer Tomography“), který užívá RTG-zářením, zobrazuje hlavně tvrdé tkáně. Díky rozsahu nastavení vyšetření je možné dosáhnout rozlišení, které dalece přesahuje možnosti rentgenu či CT. První MRI experimenty (P.C. Lauterbur 1973)² na jednoduchých objektech ukázaly, že relaxační rychlost protonů vody je překvapivě citlivá na její okolí a liší se nejen podle typu tkáně, ty s vyšším obsahem tuku relaxují rychleji, ale i v rámci jednoho typu tkáně odliší zdravou tkáň od nemocné. Sleduje se obvykle signál ¹H molekul vody, která tvoří v závislosti na pohlaví a stáří kolem 65 % lidské tkáně.

MRI technika má hned několik výhod. Velmi dobré rozlišení a naprostá neinvazivnost vyšetření, jež nevystavuje pacienta vlivům škodlivého záření, jsou jednou z nich. Kvalitu zobrazení je možné zvýšit použitím látek, které selektivně urychlují relaxaci, tzv. kontrastní látky. Přirozený kontrast v MRI obrazu je výsledkem souhry řady faktorů, jako je longitudinální (podélný, T_1) a transversální (příčný, T_2) relaxační čas, hustota protonů v zobrazované oblasti a instrumentální parametry. Dodání kontrastní látky do organismu může uměle zkracovat relaxační čas protonů vody v místech, kde je daný typ kontrastu potřeba. Další technikou je použití kontrastních látek s cílem ovlivnit jejich biodistribuci, tak aby se dostaly do určitých tkání (tzv. „Targeted Contrast Agents“).

1.2 Kontrastní látky

Komplexní soli gadolinia jsou v poslední době nejpoužívanějšími kontrastními látkami, protože jsou silně paramagnetické a urychlují relaxaci T_1 . Gadolinité ionty mají sedm nespárovaných elektronů v základním stavu a vysoký efektivní magnetický moment $\mu_{\text{eff}} = 7,94 \text{ B.M.}$ Další výhodou iontů Gd^{3+} je jeho spinový stav $^8\text{S}_{7/2}$, díky kterému má zhruba 10^5 -krát delší elektronové relaxační časy T_{1e} a T_{2e} než ostatní lanthanoidy³. Tato vlastnost má zásadní vliv na schopnost sloučenin Gd^{3+} urychlovat relaxaci okolních jader, především ^1H .

Kvůli vysoké toxicitě volných Ln^{3+} iontů v organismu (LD_{50} pro Gd^{3+} je $0,1\text{--}0,5 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$)⁴, která se vysvětluje u Gd^{3+} nízkou rozpustností solí s biogenními anionty (zejména fosforečnany), musí být tyto použity ve formě komplexů s polydentátními organickými ligandy a na tyto komplexy jsou kladeny zvlášť přísné nároky. K disociaci komplexu v organismu nesmí docházet, protože kov i ligand jsou ve volném stavu vysoce toxické.

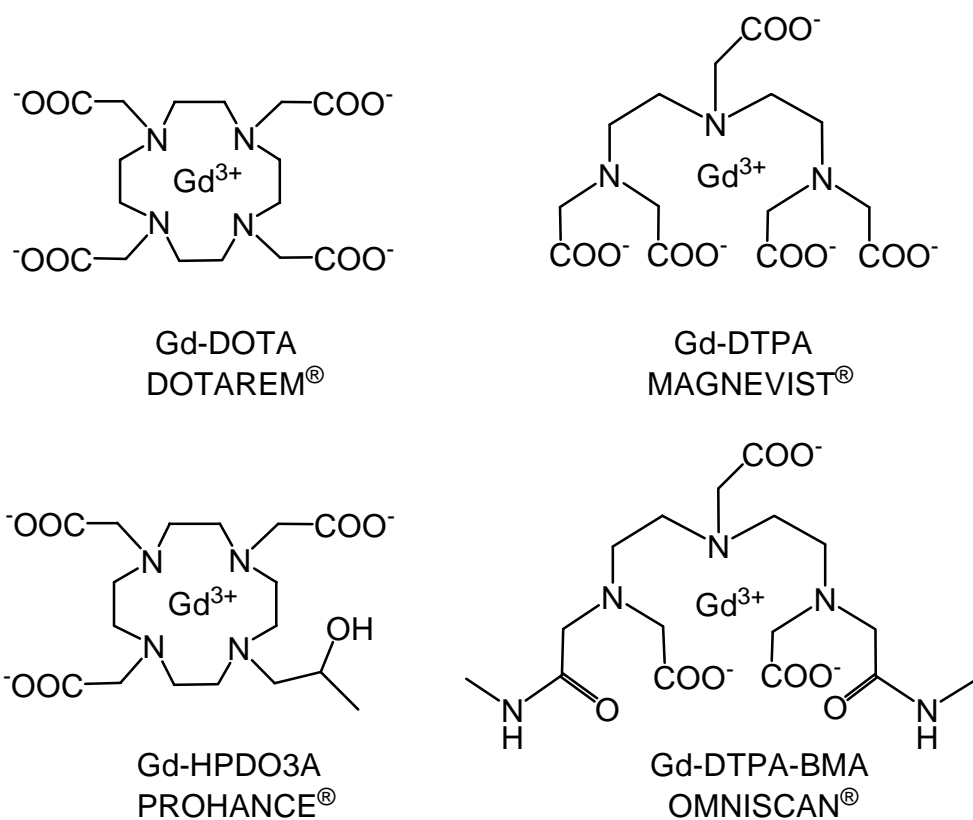
Na komplexy gadolinité používané v MRI jsou kladeny požadavky jako termodynamická stabilita, kinetická inertnost, musí být dostatečně rozpustné a musí mít nízký celkový náboj, ale také musí mít paramagnetické centrum dostatečně přístupné molekulám vody z okolí, aby se magnetická informace z komplexu přenesla na protony tkáňové vody. Malá citlivost MRI je nevýhodou, která je provázána potřebou vysoké dávky koncentrovaných roztoků komplexů (kolem $0,5 \text{ M}$), které by proto měly mít maximální možnou rozpustnost. Toho lze docílit dodáním vhodné hydrofilní skupiny pro zvýšení rozpustnosti. Komplex ale nesmí být moc nabitý, jinak hrozí buněčným strukturám osmotický šok.

Povahou kontrastních látek, které se nejčastěji podávají nitrožilně a krevním řečištěm se distribuují dále, je dána i jejich metabolická cesta. Hydrofilní komplexy jsou filtrovány přes ledviny a poté vyloučeny močí, zatímco hydrofobní nebo neutrální komplexy jsou metabolizovány v játrech.

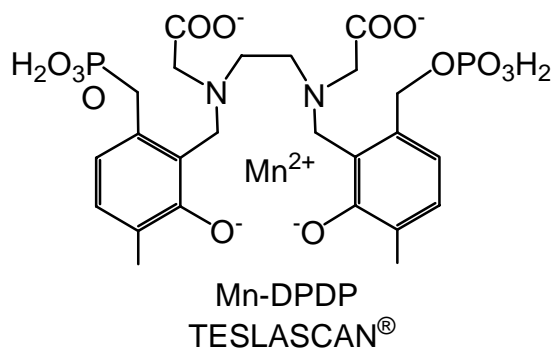
1.3 Chemická povaha kontrastních látek pro MRI

Podle chemické povahy se kontrastní látky dělí na dva základní typy⁵. Prvním z nich jsou pevné, nerozpustné mikročástice anorganických solí (např. oxidy trojmocného železa ve formě koloidních roztoků, lišící se hlavně velikostí částic – tzv. SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxides))⁶, ovlivňující především T_2 relaxační časy.

Druhým typem jsou rozpustné komplexy paramagnetických iontů d- a f- prvků (nejčastěji s Gd^{3+} , *obrázek 1*, nebo s Mn^{2+} , *obrázek 2*)⁷, které ovlivňují především T_1 relaxační časy⁶.



Obrázek 1: Komerčně používané komplexy Gd^{3+} .⁶



Obrázek 2: Komerčně používaná kontrastní látka Mn-dpdp.⁸

Další skupinou kontrastních látek se intenzivně zabývá výzkum a měly by umožnit zacílení („targeting“) na určitý typ tkáně či buněk a sloužit pro jejich označení.

Komplexy klinicky používané jako kontrastní látky jsou např. Teslascan[®], Dotarem[®], ProHance[®], Magnevist[®], Omniscan[®], MultiHance[®], viz. *obrázek 1 a 2*.

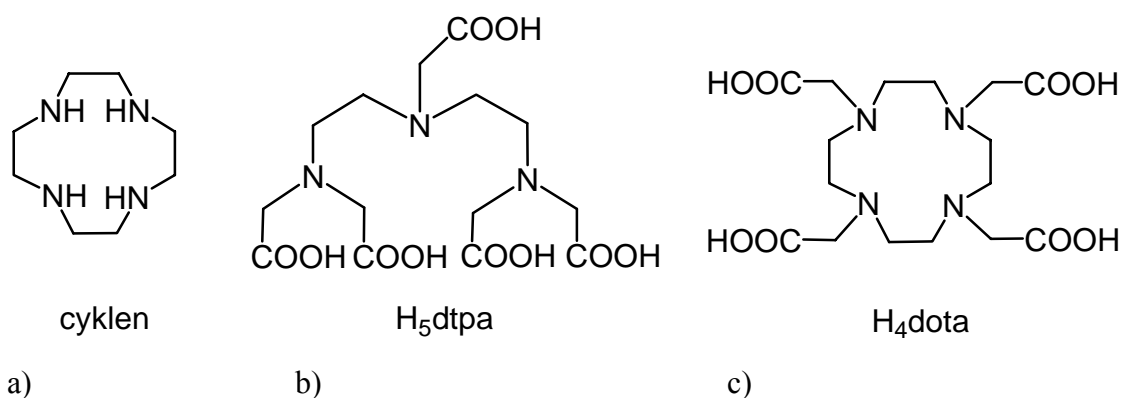
Ligandy, které se používají pro MRI, jsou odvozeny od lineárních (acyklická H₅dtpa, *obrázek 3b*) a cyklických polyaminů (makrocyclická látka H₄dota, *obrázek 3c*), které nesou zpravidla acetátové, fosfonátové^a, fosfinátové^b nebo alkoholové pendanty (pendant = přívěsek). Makrocyclické ligandy jsou polydentátními ligandy obsahující donorové atomy začleněné buď do cyklu nebo připojené k základnímu skeletu cyklu. V těch se na rozdíl od komplexů ligandů s lineárním řetězcem uplatňuje tzv. makrocyclický efekt, který napomáhá významnému zvýšení stability komplexů. V aqua-komplexech lanthanoidů je třeba pro dostatečnou stabilitu komplexu obsadit alespoň sedm koordinačních míst ligandu. Ionty Ln³⁺ zde mají koordinační číslo 8 až 9 v závislosti na iontovém poloměru (1,02–0,86 Å) a na typu ligandu.

Pro komplexaci makrocycly je důležitá i velikost dutiny, kde pro Ln³⁺ jsou optimální 12-člené tetraazacyklické ligandy odvozené od cyklu (*obrázek 3a*). Vlastnosti komplexu lze poměrně citlivě pozměňovat také povahou pendantních skupin

^a Fosfonové kyseliny jsou odvozeny od kyseliny fosforečné nahrazením jedné hydroxylové skupiny organickým substituentem, jejich obecný vzorec je R–PO₃H₂.

^b Fosfinové kyseliny jsou odvozeny od kyseliny fosforečné nahrazením jedné hydroxylové skupiny organickým substituentem a druhé buď atomem vodíku – monosubstituované mající vzorec R–PO₂H₂, nebo druhým organickým substituentem – disubstituované kyseliny o vzorci R¹R²–PO₂H.

na makrocyklu při zachování stejných komplexačních vlastností (např. výsledný náboj nebo polarita).



Obrázek 3: a) Struktura cyklenu, 1,4,7,10-tetraazacyklododekan, b) H₅dtpa, c) H₄dota.

1.4 Metody studia kontrastních látek

Většina metod studia kontrastních látek je spojena s NMR spektroskopií³⁹. Efektivitu a vlastnosti sloučeniny potenciálně sloužící jako kontrastní látka můžeme předpovědět z řady parametrů, které plynou ze Solomonovy-Bloembergenovy-Morganovy (SBM) teorie popisující mechanismy magnetické relaxace ve vodných roztocích paramagnetických látek. Na základě výsledků fyzikálně-chemických měření (NMR relaxace, luminiscence, EPR, struktura komplexů) je možné pomocí SBM teorie získat sadu parametrů popisující mikroskopické vlastnosti kontrastních látek, přičemž spolehlivost těchto látek závisí na množství vstupních informací⁹. V následujících kapitolách jsou společně s významem parametrů uvedeny i metody, kterými lze tyto parametry stanovit.

1.4.1 Relaxivita

Efektivita kontrastní látky, neboli její schopnost urychlovat relaxaci protonů, se numericky vyjadřuje veličinou zvanou relaxivita r_1 . Je definována vztahem:

$$\frac{1}{T_{\text{lobs}}} = \frac{1}{T_{\text{1d}}} + r_1 [\text{Gd}^{3+}] \quad (1)$$

T_{obs}	vyjadřuje celkovou měřitelnou rychlost relaxace protonů
T_{id}	diamagnetický příspěvek k relaxaci
$[\text{Gd}^{3+}]$	koncentrace gadolinitých iontů v roztoku

V gadolinitém komplexu se vyskytují tři typy molekul vody, které jsou ovlivňovány přítomností paramagnetické látky a tudíž přispívají ke zvýšení hodnoty relaxivity¹⁰. Jsou to molekuly vnitřní sféry, které je tvořena molekulami vody přímo koordinovanými ke Gd^{3+} , vnější sféry, která zahrnují všechny molekuly rozpouštědla v blízkosti komplexu, a druhé sféry, kterou tvoří molekuly vody vázané vodíkovými můstky k ligandu.

Celkové navýšení relaxivity oproti čistému rozpouštědлу je pak dáno součtem příspěvků molekul vnitřní (r_{1p}^{IS}), vnější (r_{1p}^{OS}) a druhé (r_{1p}^{SS}) sféry:

$$r_1^{\text{obs}} = r_{1p}^{\text{IS}} + r_{1p}^{\text{OS}} + r_{1p}^{\text{SS}} + r_{1w} \quad (2)$$

r_1^{obs}	měřená relaxivita
r_w	relaxivita čistého rozpouštědla v nepřítomnosti paramagnetika

Mezi parametry nejvíce ovlivňující relaxivitu patří hlavně vzdálenost mezi protonem vody a paramagnetickým iontem R_{GdH} , počet koordinovaných molekul vody q , rotační korelační čas molekuly τ_R , residenční čas koordinované molekuly vody τ_M a elektronový relaxační čas T_{1e} .

1.4.2 Počet koordinovaných molekul vody a jejich vzdálenost od Gd^{3+} centra

Obecně platí, že s klesající vzdáleností koordinovaných molekul vody ke Gd^{3+} iontu a s jejich rostoucím počtem roste výrazně i relaxivita. Na druhou stranu s každou další přímo koordinovanou molekulou vody klesá i stabilita těchto komplexů. V současné době tedy převládají kontrastní látky, které koordinují ve vnitřní sféře pouze jednu molekulu vody.

1.4.3 Rotační korelační čas a elektronová relaxace

Rotační korelační čas představuje rychlost, kterou se komplex v roztoku otáčí kolem své osy. Jak již bylo zmíněno má rotační korelační čas velký vliv na samotnou relaxivitu kontrastní látky, je-li rotace molekuly příliš rychlá (krátký τ_R), nejsou vodíky molekul vody schopny získat dostatečnou informaci o magnetickém momentu nepárových elektronů Gd^{3+} , což se projeví jejich pomalejší relaxací. Naopak pomalejší rotace (delší τ_R) zefektivní relaxační mechanismus a relaxivita látky se zvýší, proto nejčastějším způsobem zvýšení relaxivity kontrastní látky je její připojení k pomalu rotující makromolekule¹¹. Makromolekula musí být ovšem zároveň i sama dostatečně rigidní, jinak se spolu s lokálním pohybem v molekule samozřejmě stírají veškeré výhody dlouhého celkového rotačního korelačního času.

Elektronový relaxační čas lze optimalizovat výběrem vhodného paramagnetického kationtu. Gd^{3+} , Mn^{2+} a Fe^{2+} se zdají být v tomto bodě ideální pro jejich dlouhý T_{1e} a velký magnetický moment.

Hodnoty τ_R a T_{1e} se projevují zejména při měření relaxivity při proměnné síle magnetického pole, neboli nukleární magnetické relaxační disperzi (1H NMRD = Nuclear Magnetic Relaxation Disperzion). Při tomto experimentu jsou tyto dva vlivy (τ_R a T_{1e}) odděleny, poněvadž zatímco τ_R není závislý na magnetické indukci, T_{1e} tuto závislost vykazuje. Parametr T_{1e} tak ovlivňuje relaxivitu v oblasti slabších polí, zatímco τ_R v oblasti polí vyšších než 0,2 T. Podle průběhu 1H NMRD profilu lze rotační korelační čas odhadnout, přičemž obecně platí, že látky s dlouhým rotačním korelačním časem, např. makromolekuly, vykazují výrazné zvýšení relaxivity v oblasti silnějších magnetických polí (kolem 0,5 T).

1.4.4 Rychlost výměny vody

S ohledem na poslední parametr, tedy residenční čas koordinované molekuly vody, je vyšší relaxivity dosahováno u molekul, které mají rychlou výměnu vody, protože v důsledku tohoto je více molekul vody v roztoku ovlivněno přítomností paramagnetického iontu. Příliš rychlá výměna však také není vhodná, protože nestačí dojít k efektivnímu přenosu magnetické informace z centrálního atomu. Rychlost výměny vody má tedy své optimální rozmezí hodnot, které závisí na síle magnetického pole, při kterém měření provádíme. Spolu se silnějšími magnetickými poli, která jsou

v současné době používána, se posouvá i optimum residenčních časů k nižším hodnotám a můžeme tedy říci, že je stále třeba τ_M zkracovat, neboť je u většiny kontrastních látek příliš dlouhý a optimálních rozmezí se nedaří dosáhnout.

Ke zjištění rychlostní konstanty výměny vody k_{ex} ($k_{ex} = 1/\tau_M$) ve vnitřní koordinační sféře lze použít měření teplotní závislosti T_2 relaxačního času ^{17}O signálu molekul vody v roztoku gadolinitého komplexu¹². Místo skutečné transverzální relaxační rychlosti $1/T_2$ se zavádí tzv. redukovaná relaxační rychlost $1/T_{2r}$ daná vztahem¹³:

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2,\text{dia}}} \right) = \frac{1}{T_{2M} - \tau_M} \quad (3)$$

P_m	molární frakce přímo koordinovaných molekul vody
T_2	transverzální relaxační čas paramagnetického vzorku
$T_{2,\text{dia}}$	transverzální relaxační čas referentního diamagnetického vzorku

Hodnoty relaxivity u nízkomolekulárních kontrastních látek používaných v praxi se pohybují při magnetickém poli 0,5 T kolem $5 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, přestože teoreticky dosažitelná relaxivita má hodnotu přes $100 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Hlavní příčinou nízké relaxivity u používaných kontrastních látek je pomalá výměna molekul vody a příliš krátký rotační korelační čas τ_R .

1.4.5 Stanovení koncentrace lanthanoidů ve vzorku

Rozpustíme-li paramagnetickou látku v diamagnetickém roztoku, změní se celková magnetická susceptibilita roztoku. Tím se také změní efektivní magnetické pole uvnitř vzorku, což vyvolá změnu rezonanční frekvence měřených jader¹⁴. Takto indukovaný chemický posun Δ_χ tzv. BMS („Bulk Magnetic Susceptibility Shift“) lze použít ke stanovení koncentrace Ln^{3+} ve vzorku, a to tak, že se z rovnice (4) vyjádří koncentrace c a za Δ_χ se dosadí absolutní hodnota rozdílu posunů $^1\text{BuOH}$ ve vzorku a v insertu (referenční květa ve vzorku). Jedná se o tzv. Evansovu metodu¹⁴.

$$\Delta_{\chi} = \frac{4\pi c s}{T} \left(\frac{\mu_{\text{eff}}}{2,84} \right)^2 \times 10^3 \quad (4)$$

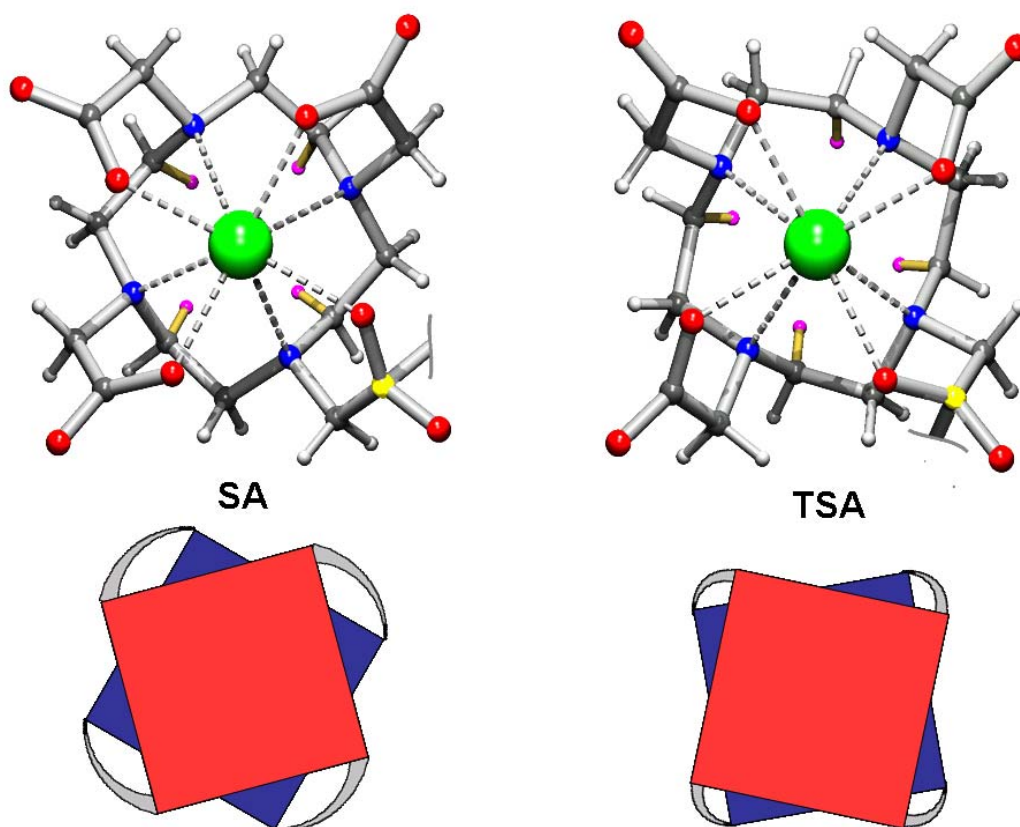
- Δ_{χ} indukovaný chemický posun (v ppm)
 c koncentrace paramagnetického Ln³⁺ komplexu v roztoku vyjádřená v mol·dm⁻³
 s geometrický faktor (např. pro sférický tvar $S = 0$, pro paralelní cylindrický – např. NMR kyveta – $s = 1/3$, a pro antiparalelní cylindrický $s = -1/6$)
 T termodynamická teplota
 μ_{eff} efektivní magnetický moment pro daný Ln³⁺ ion v B.M. (pro ion Gd³⁺ 7,94 B.M., pro ion Yb³⁺ 4,5 B.M.)

Předpokladem je nezávislost efektivního magnetického pole μ_{eff} na chemickém okolí. Přesnost takto stanovených koncentrací je srovnatelná s metodou AAS¹⁵.

1.4.6 Izomerie komplexů v roztocích

O komplexech typu dota s ionty lanthanoidů je známo, že mohou existovat v několika izomerních formách (Ln³⁺ ion leží mezi dvěma koplanárními rovinami tvořenými atomy dusíku ve spodní rovině a atomy kyslíku v rovině horní)¹². Příčinami izomerie jsou dvě možnosti konformace makrocyclu, označované jako δ a λ , a dvě možnosti natočení pendantních, u ligandu H₄dota acetátových, skupin, označované jako Δ a Λ ¹⁶. V roztoku se tedy můžeme setkat se čtyřmi možnými izomery, dvěma diastereomerními páry enantiomerů, které mezi sebou bývají v roztoku v dynamické rovnováze umožněné inverzí kruhu a překlápěním pendantních ramen¹⁷. Protože jednotlivé enantiomery nejsou v rámci NMR spektroskopie rozlišitelné, jsou z těchto čtyř izomerů pozorovány pouze dvě sady signálů odpovídající dvěma diastereomerům, které vždy reprezentují jeden enantiomerní pár. Enantiomerní pár $\Lambda(\delta\delta\delta\delta)$ a $\Delta(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ se souhrnně označuje jako izomer **SA** (Square Antiprism) a pár enantiomerů $\Lambda(\lambda\lambda\lambda\lambda)$ a $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$ se označuje jako **TSA** (Twist Square Antiprism), viz. *obrázek 7*. Izomery **SA** a **TSA** jsou také nazývány jako **M** (odpovídá izomeru **SA**) a **m** (odpovídá izomeru **TSA**), což původně značilo jejich relativní zastoupení v komplexu [(Gd(dota)(H₂O)]⁻ (**M** = majority, **m** = minority). Poměr zastoupení těchto izomerů v roztoku souvisí s iontovým poloměrem centrálního atomu a v průběhu lanthanoidové řady se proto

mění¹⁸. Dutina izomeru **TSA** je prostornější, je tedy preferována lanthanoidy s větším poloměrem, a převažuje na začátku lanthanoidové řady, zatímco izomer **SA**, který je preferován menšími ionty, převažuje na jejím konci. Ve struktuře izomerů je další odlišnost a to vzájemná vzdálenost koordinovaných kyslíkových atomů pendantních ramen. V komplexu **TSA** jsou kyslíkové atomy blíže u sebe, což vede k většímu sterickému pnutí v místě koordinované molekuly vody, které destabilizuje její vazbu ke Gd^{3+} . Komplexy v izomerii **TSA** tak vykazují až 50× vyšší rychlost výměny vody než v izomerii **SA**^{19,20}. Studium relaxivity u komplexu $[(Gd(dota)(H_2O))]^-$ bylo zjištěno, že ačkoliv je izomer **TSA** v roztoku minoritní složkou je zodpovědný přibližně za 90 % celkové relaxivity²¹. Jeden ze současných přístupů vedoucích ke zvýšení relaxivity kontrastních látek se tedy zakládá i na snaze připravit takový ligand, který v případě gadolinitých komplexů preferuje uspořádání v izomeru **TSA**²². Těmi jsou i tetrasubstituované deriváty cyklenu s jednou fosfinovou pendantní skupinou.



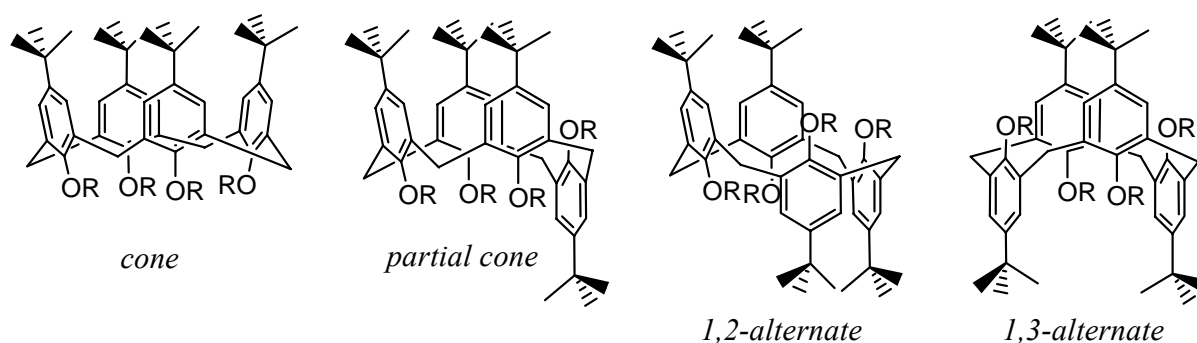
Obrázek 7: Konformace diastereomerů **SA** a **TSA** v komplexech ligandu typu dota s ionty lanthanoidů. V dolní části je schematicky znázorněná vzájemná orientace rovin dusíkových a kyslíkových donorových atomů.

U těchto komplexů existuje ovšem ještě optická izomerie na atomu fosforu (který se po koordinaci stává chirálním), což zdvojnásobuje počet diastereomerů v roztoku a tím i počet signálů v ^{31}P NMR spektrech z původních dvou, **SA** a **TSA**, na čtyři, **R-SA**, **S-SA**, **R-TSA** a **S-TSA**.

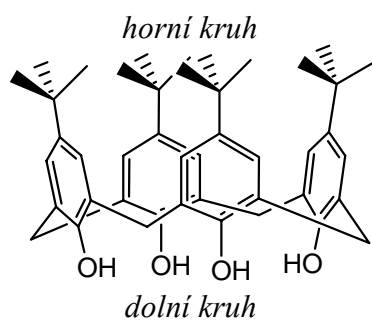
1.5 Kalix[4]areny jako modifikovatelné „nosiče”

Jednou z metod jak zvýšit relaxivitu je připojení nízkomolekulárního komplexu Gd^{3+} k nějakému makromolekulárnímu nosiči, což zvyšuje rotační korelační čas^{1,23}. Nejčastěji jsou jako nosiče používány polymery nebo dendrimery²⁴. Flexibilita jejich řetězců však působí nižší nárůst relaxivity, než by odpovídalo rychlosti rotace celé molekuly. Lepším řešením jsou rigidnější a strukturně lépe popsatelné látky jako cyklo-dextriny nebo kalix[4]areny^{25, 26, 27, 28, 29}.

Látky s kalixarenovým skeletem jsou oblíbené stavební jednotky v supramolekulární chemii³⁰, především proto, že se jedná o molekuly synteticky poměrně snadno dostupné a přitom poskytující zajímavé a široké možnosti konstrukce supramolekulárních systémů^{31,32}. Kalix[4]areny mohou zaujmout čtyři stabilní konformace viz. *obrázek 4*, které se od sebe odlišují vzájemnou polohou aromatických jader³³. Tyto molekuly představují vlastně substituované aromatické systémy a lze na ně aplikovat většinu běžných organických reakcí na benzenovém jádře. To umožňuje základní kalixarenový systém dále dobře derivatizovat na horním i dolním kruhu viz. *obrázek 5* a vytvářet molekuly s dalšími funkcemi v postranních řetězcích^{34,35}. Komplexace kationtů samotnými kalix[4]areny může probíhat s vysokou selektivitou, díky dobře definovatelnému uspořádání vazebných míst v molekule ligandu³⁶, proto kalix[4]areny často fungují jako selektivní receptory pro dané kationty nebo jako selektivní nosiče přes různá fázová rozhraní (fosfolipidová membrána).

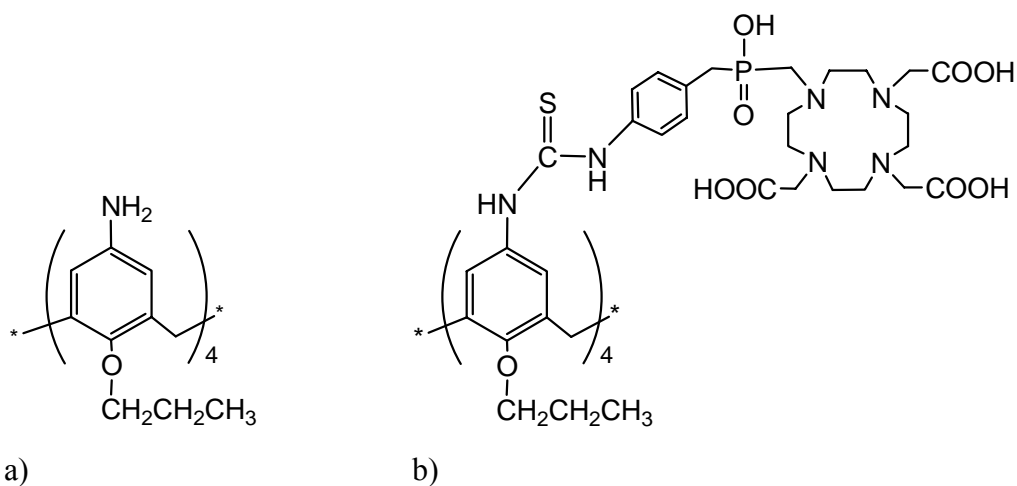


Obrázek 4: Čtyři základní konformery kalix[4]arenu.



Obrázek 5: Označení „horní“ a „dolní“ kruh kalix[4]arenu.

Využití kalixarenu jako nosiče pro kontrastní látky v MRI není novou myšlenkou. Na pracovišti TU Delft byl použit *cone*-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(1-propoxy)kalix[4]aren, viz. **obrázek 6a**), konjugovaný s tetraazamakrocylem, viz. **obrázek 6b**). Tato látka je ve však vodě málo rozpustná a vytváří již ve zředěných roztocích micely³⁷, což je zásadním problémem pro MRI aplikaci.



Obrázek 6: *a*) Molekula *cone*-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(1-propoxy)kalix[4]arenu, *b*) molekula potenciálního konjugátu s tímto kalix[4]arenem.

Zavedení zbytků kyseliny octové na dolní kruh kalix[4]arenu je jedním z možných řešení problému rozpustnosti těchto látek ve vodě. Chemie kalix[4]arenů poskytuje synteticky schůdnou možnost zavedení požadovaného substituentu do předem zvoleného místa, a převedení tak, jinak hydrofobního, kalix[4]arenu na látku ve vodě rozpustnou. Acetátové skupiny zvýší polaritu a tedy rozpustnost a dále chemicky nezasahují do možné konjugace na horním kruhu a jsou dostatečně velké, aby bylo možné substituci využít k zablokování základního skeletu v požadované stabilní *cone* konformaci³⁸. Kalix[4]arenový skelet určuje pomocí konformace definovanou strukturu ligandu a dále

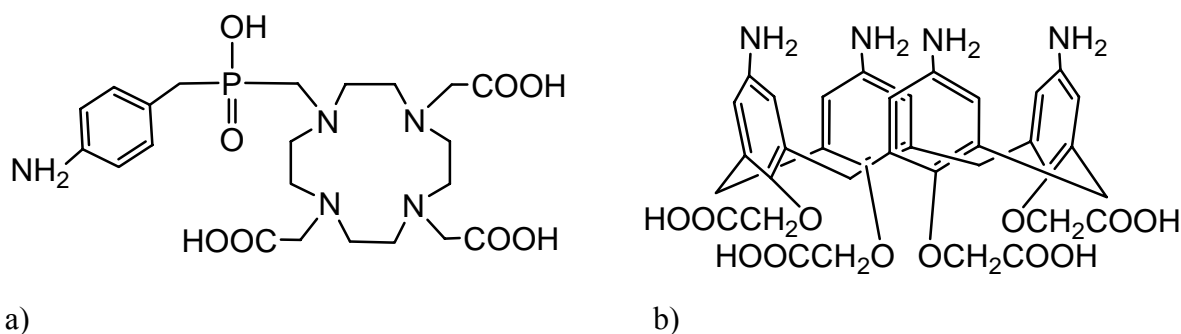
významně ovlivňuje molekulovou hmotnost ligandu, tudíž zpomaluje jeho rotaci a tím zvyšuje rotačně korelační čas τ_r ^{1,39}.

Přítomnost aminoskupin na horním kruhu kalix[4]arenu umožňuje vazbu na makrocyclický tetraamin s pendantními rameny schopný koordinovat gadolinité ionty. Aminoskupina na benzylovém jádře na pendantním ramenu makrocycly je snadno převaditelná pomocí thiofosgeny na isothiokyanát, tato skupina je pak schopna za mírných podmínek reagovat s aminovými skupinami kalix[4]arenu za vzniku N,N'-disubstituované thiomocoviny, ta pak vykazuje optimální *in vivo* hydrolytickou stabilitu⁴⁰. Tento způsob kovalentní vazby patří vedle reakce s aktivními estery karboxylových skupin k nejpoužívanějším konjugačním metodám pro aminové skupiny. Konjugace přes thiomocovinu má hned několik výhod, vzhledem k dobrým výtěžkům isothiokyanátu, jeho dostatečné aktivitě a zároveň selektivitě.

2 Cíl práce

Jednou z cest jak zvýšit relaxivitu kontrastní látky je zpomalení rotace molekuly v roztoku, tedy zvýší hodnoty τ_R . Cílem této diplomové práce je proto syntéza ligandu navrženého tak, aby se připojením molekuly makrocyklu s fosfinátovým pendantem k makromolekule kalix[4]arenu zvýšila molekulová váha potenciální kontrastní látky. Práce se zabývá charakterizací tohoto konjugátu, dále přípravou komplexů tohoto ligandu s ionty lanthanoidů a studiem jejich vlastností z hlediska požadavků kladených na kontrastní látky pro tomografii magnetické rezonance.

Cílový ligand sestává z dvou částí, z molekuly H_4do3ap^{ABn} fungující jako dobrý chelátor, viz. *obrázek 8a*), a molekuly kalix[4]arenu NH_2KC4A , viz. *obrázek 8b*), jako nosiče s rigidní a velmi dobře definovanou strukturou.



a)

b)

Obrázek 8: a) 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-[(4-aminofenyl)methyl]fosfinová kyselina}, H_4do3ap^{ABn} ,

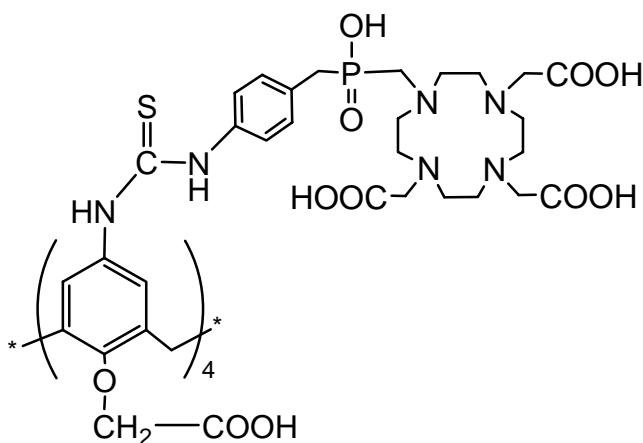
b) cone-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(karboxyl-methoxy)kalix[4]arenu, NH_2KC4A .

Makrocyclická část vykazuje podobné vlastnosti jako H_3do3a , ale je schopna tvořit ještě pevnější, termodynamicky i kineticky stabilnější, komplexy, protože se koordinuje osmi donorovými skupinami. Dále je známo, že fosfinátové pendantní skupiny znatelně urychlují výměnu vázaných molekul vody s okolím^{41,42} a svoji aciditou (vyšší než u karboxylátových skupin) jsou schopny urychlit komplexaci lanthanoidů⁴³.

V postranním řetězci nese tato molekula aminoskupinu. Po převedení aminoskupiny na isothiokyanát je tato skupina schopná kovalentní vazby na molekuly

obsahující volné primární aminové skupiny⁴⁴. Takovou molekulou je v našem případě kalix[4]aren, který díky definované geometrii *cone* konformace určuje strukturu ligandu. Výhodou je také možnost vazby hned čtyř makrocyclů s fosfinovou kyselinou na jednu molekulu ligandu.

Výsledný konjugát, viz. **obrázek 9**, bude v následujícím textu označována jako L₄C.



Obrázek 9: Struktura ligandu L₄-C.

Z pohledu anorganické a koordinační chemie je tento ligand schopen koordinovat čtyři ionty Ln³⁺ do makrocyclických pendantních ramen.

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií a rozpouštědel

Pro syntézu ligandů a komplexů (reagencie, rozpouštědla, roztoky na úpravu pH, sušidla) byly použity komerčně dostupné chemikálie (Acros Organics, Aldrich, Fluka, Lachner, Penta, Strem) o běžné čistotě, které nebyly dále přečišťovány. Při reakcích byl použit paraformaldehyd, který byl odfiltrován ze starých vodných roztoků formaldehydu (Lachema). Při přípravě ^tBuOHC4A byl použit NaOH firmy Riedel-de-Haën, extra pure. Argon byl použit plynný z tlakové láhve (9,996%, Linde Technoplyn) a vodík plynný z tlakové láhve (99,9%, Linde Technoplyn). Použitá deuterovaná rozpouštědla byla dodána firmami Chemotrade, Deutero GmbH a Aldrich.

3.2 Metody charakterizace a čisticí metody

Pokud u metody není uvedeno jinak, je přístroj na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

3.2.1 Elementární analýza

Elementární analýza (stanovení C, H, N, P, Cl, Br) byla zajištěna pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze na automatickém analyzátoru PerkinElmer 2400. Výsledky elementární analýzy jsou uváděny v hmotnostních procentech. Hodnota na prvním místě je zjištěná hodnota jako průměr ze dvou měření a hodnota v závorkách je vypočítána podle teoretického vzorce. Hmotnostní obsahy jsou uváděny na dvě desetinná místa.

3.2.2 HPLC

Reverzní HPLC

Experimenty byly prováděny na kolonách Waters XTerra RP8 (150×4,60 mm 5 μm), Luna 5μ Phenyl-Hexyl (150×4,60 mm 5 micron) a Luna 5μ C8 (2) 100A (150×4,60 mm 5 micron). Pro přípravu mobilních fází byla následující rozpouštědla: acetonitril (A), 0,1 % (objemová) kyselina trifluoroctová v destilované vodě (B) a

deionizovaná voda (C). Průtok mobilní fáze kolonou byl $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. K detekci byl použit UV-VIS detektor při $\lambda = 210 \text{ nm}$ a při $\lambda = 289 \text{ nm}$.

Size Exclusion chromatografie

Byla použita kolona TOSOH Bioscience TSKgel G2000SW ($7,5 \text{ mm} \times 30,0 \text{ cm}$, $10 \mu\text{m}$). Jako mobilní fáze byl použit $0,1 \text{ M}$ roztok octanu sodného ($\text{pH} = 6,5$, upraveno pomocí kyseliny octové). Průtok mobilní fáze kolonou byl $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. K detekci byl použit UV-VIS detektor při $\lambda = 230 \text{ nm}$ a při $\lambda = 289 \text{ nm}$.

Na vyhodnocení dat byl v obou případech použit program Clarity.

3.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji ESQUIRE 3000 firmy Bruker využívajícím ionizaci elektrosprejem a iontovou past jako analyzátor. Uspořádání: m/z hodnota (charakter iontu).

3.2.4 Infračervená spektroskopie

K měření infračervených spekter byl použit jednopaprskový FTIR spektrometr Magna 760 firmy Nicolet. Spektra byla měřena metodou difúzní reflexe (DRIFTS).

3.2.5 NMR spektroskopie

Pro měření NMR spekter u připravovaných látek a meziproductů byly použity přístroje firmy Varian-Unity INOVA 400 a NMRS 300. Při měření na přístroji Varian 400 byly rezonanční frekvence měřených jader $399,95 \text{ MHz}$ pro ^1H , $100,58 \text{ MHz}$, pro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ a $161,92 \text{ MHz}$ pro ^{31}P . Měření na NMRS 300 probíhalo při rezonančních frekvencích $299,94 \text{ MHz}$ pro ^1H , $75,42 \text{ MHz}$ pro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ a $121,42 \text{ MHz}$ pro ^{31}P . Pro měření jader ^{13}C byl použit decoupling jader ^1H . Chemické posuny v ^1H a ^{13}C NMR spektrech byly referencovány na signál vnitřního standardu TMS ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, $\delta_{\text{H}} = 0,000 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}} = 0,000 \text{ ppm}$), $^t\text{BuOH}$ ($\delta_{\text{H}} = 1,250 \text{ ppm}$) nebo na signál rozpouštědla CH_3OH ($\delta_{\text{H}} = 3,310 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}} = 49,000 \text{ ppm}$) a CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7,250 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}} = 77,000 \text{ ppm}$). Chemické posuny ^{31}P byly referencovány na vnější standard 85% vodný roztok H_3PO_4

($\delta_p = 0,000$ ppm). Hodnoty chemických posunů δ jsou uváděny ve škále ppm. Pro přehlednost je ve výčtu posunů (dle anglické literatury) namísto desetinné čárky psána tečka. Hodnoty interakčních konstant jsou uváděny v jednotkách Hz a zaokrouhleny na jedno desetinné místo.

Pro relaxometrické měření byl použit přístroj Varian-Unity INOVA 400.

3.2.6 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektra práškových vzorků byla měřena na spektrometru Magna 760 firmy Nicolet, vybaveným modulem Nexus FT Raman .

3.2.7 Spektroskopie UV/VIS

UV-VIS spektra byla měřena na přístroji UNICAM UV 300 firmy ChromSpec. Jedná se o dvoupaprskový přístroj s wolframovou lampou a deuteriovou výbojkou, který umožňuje měření v rozsahu 190–900 nm. K měření byla použita křemenná kyveta o objemu 3 ml s optickou dráhou 1,0 cm.

3.2.8 Tenkovrstevná chromatografie

Pro tenkovrstevnou chromatografii byly použity destičky SiO₂ (silikagel 60 F₂₅₄) firmy Merck a SiO₂ (Silufol, SiO₂ 60 F₂₅₄) firmy Kavalier Votice. Chromatogramy byly sušeny proudem horkého vzduchu z horkovzdušné pistole. Detekce látek byla prováděna pomocí UV lampy Konrad Benda NU-8 KL při vlnové délce 254 nm, parami jodu a u aminosloučenin postříkem 0,5% roztokem ninhydrinu v ethanolu s následným zahřátím horkovzdušnou pistolí. Hodnoty R_f jsou uváděny na dvě desetinná místa.

Zkratky mobilních fází:

dichlormethan–ethanol – DE

hexan–ethylacetát – HE

isopropanol–amoniak–voda – IPAV

isopropanol–kyselina octová–voda – IPOV

methanol–dichlormethan–triethylamin – MDT

dichlormethan–methanol–amoniak – DMA

– v závorce jsou pak uváděny objemové poměry jednotlivých rozpouštědel.

3.2.9 Teplota tání

Body tání byly stanoveny na mikrovýhřevném stolku Boëtius firmy VEB Kombinat Nagema, DDR, a na bodotávku firmy Büchi B-540. Uvedené hodnoty teplot tání jsou nekorigované.

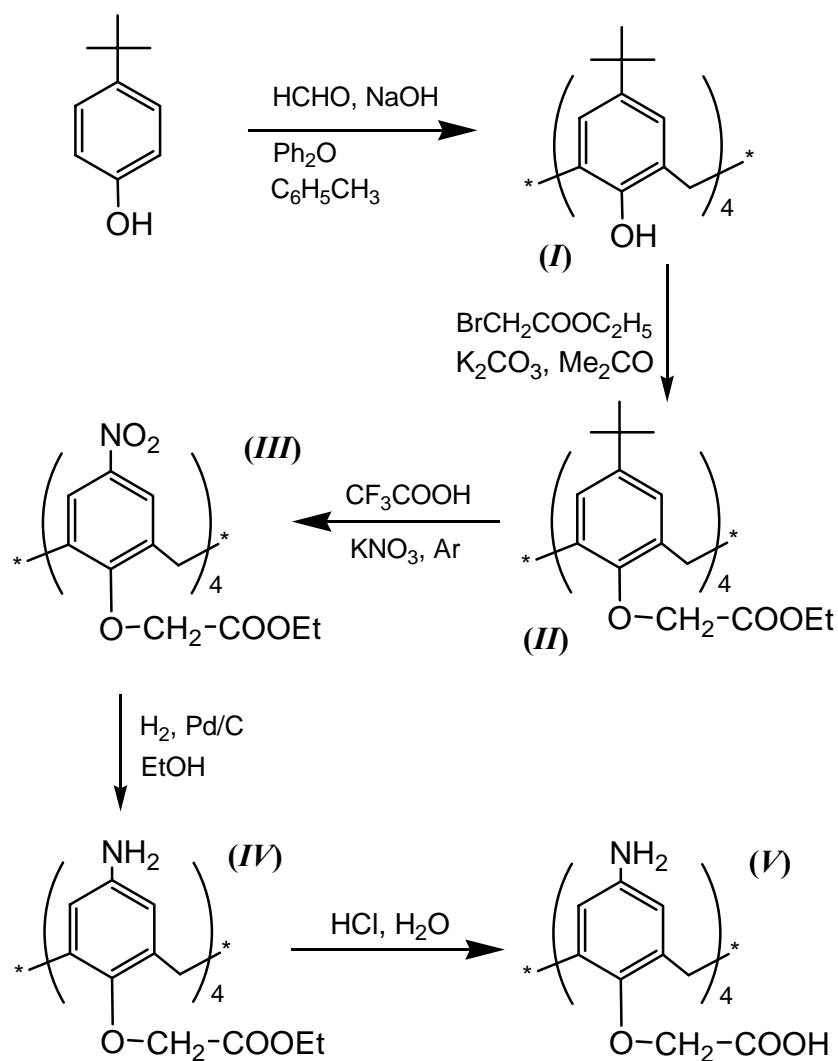
3.2.10 Ultrafiltrace

Ultrafiltrací byly separovány makromolekulární látky od látek s nižší molekulovou hmotností, v ultrafiltrační cele Milipore za použití membrány Milipore, zadržující molekuly s molekulovou hmotností nad $3000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

4 Syntetická část

4.1 Příprava kalix[4]arenové části cílové sloučeniny

Syntéza kalix[4]arenové části cílové látky je shrnuta na *obrázku 10*.



Obrázek 10: Reakční schéma přípravy

cone-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(karboxyl-methoxy)kalix[4]arenu.

4.1.1 Příprava 5,11,17,23-tetrakis(1,1-dimethylethyl)-25,26,27,28-tetrahydroxykalix[4]arenu, (*p*-terc.butylkalix[4]arenu), ¹BuOHC4A, (I) ⁴⁵

Trojhrdlá 2 l baňka byla vybavena teploměrem (rozsah minimálně do 260 °C), mechanickým míchadlem, přívodem inertního plynu a odvodem plynu do lázně s vodou. Do baňky bylo v mírném proudu argonu vloženo 125 g (0,832 mol) jemně rozetřeného *p*-terc.butylfenolu ^c, 80 ml 40% vodného roztoku formaldehydu (1,07 mol) a roztok 0,60 g (15 mmol) NaOH ^d, v 1,5 ml destilované vody. Za mírného proudu argonu byla aparatura vyhřáta na 120 °C ^e, tato teplota byla udržována do napěnění a ztuhnutí béžové viskózní reakční směsi (asi 90 minut), poté byl vypnut ohřev a míchadlo. Poté byl přidán 1 l roztaveného difenyletheru ^f, 50 ml toluenu a reakční směs byla zahřívána na 180 °C po dobu 60 minut (oddestilování azeotropu vody a toluenu). Po oddestilování veškeré vody byl odvod plynu nahrazen zpětným chladičem a vzniklá suspenze byla refluxována 4 hodiny do vyčeření a vzniku temně hnědého roztoku ^g. Poté byl vypnut ohřev, aparatura nechána vychladnout a bylo přidáno 750 ml ethylacetátu. Vzniklá suspenze byla ponechána stát za laboratorní teploty do druhého dne. Vyloučený produkt byl odsát na fritě S2, promyt 150 ml kyseliny octové, 50 ml ethylacetátu a vysušen na vzduchu. Výtěžek po rekrystalizaci z toluenu (z 1 l) je 62,6 g bezbarvé krystalické látky, tj. cca 45 % vzhledem k *p*-terc.butylfenolu (vzniká klatrát s toluenem v poměru 1:1 ve formě bezbarvých lesklých šupinek, $M_r = 741$ g).

^c Práce s *p*-terc.butylfenolem je obtížná, látka získává třením elektrostatický náboj, veškerá manipulace s touto látkou byla prováděna v rukavicích a ochranných brýlích v dobře táhnoucí digestoři.

^d Použit NaOH firmy Riedel-de-Haën, extra pure.

^e Teplota 120 °C v počáteční fázi reakce se musí přesně dodržet, je nutno udržovat jen mírný proud argonu kvůli těkavosti formaldehydu.

^f S difenyletherem (b.t. 28 °C, b.v. 258 °C) je nutno pracovat v táhnoucí digestoři a v rukavicích.

^g Při refluxu v difenyletheru hrozí nebezpečí utajeného varu při nedokonalém odstranění vody v předchozím kroku; na konci refluxu má být roztok čirý a temně hnědý; pokud nedojde po 4 hodinách k vyčeření roztoku, je nutno prodloužit dobu refluxu, jinak dochází ke kontaminaci vzniklého produktu *p*-terc.butylkalix[8]arenem.

¹H NMR (v CDCl₃, 25 °C): 1.22 (s, 36H, -C(CH₃)₃); 1.54 (s, -CH₃ z toluenu); 4.25, 3.50 (2×d, 8H, A-CH₂-B); 7.05 (s, 8H, aromatický H); 7.14, 7.26 (m, aromatické H z toluenu); 10.34 (s, 4H, -OH)

¹³C {¹H} NMR (v CDCl₃, 25 °C): 31.40 (-C(CH₃)₃); 32.61 (A-CH₂-B); 34.00 (-CH₃ z toluenu); 125.92 (aromatický -CH); 127.68 (aromatický -C-CH₂); 128.22 (-C(CH₃)₃); 129.03 (aromatický -C-OH)

MS (ESI): pozitivní mod *m/z* 672,7 (M + Na⁺), negativní mod *m/z* 647,4 (M⁻)

IR: 3180 cm⁻¹ (ν(OH)), 3050 cm⁻¹ (ν(C-H aromatická)), 2950 cm⁻¹ a 2910 cm⁻¹ (ν(CH₂)), 2870 cm⁻¹ (ν(CH₃)), 1610 cm⁻¹ (δ(aromatické jádro)), 1480 cm⁻¹ a 1460 cm⁻¹ (δ(CH₂)), 1390 cm⁻¹ (δ(CH₃)), 1200 cm⁻¹ (ν(C-O))

b.t.: rozklad nad 320 °C

4.1.2 Příprava cone-5,11,17,23-tetrakis(1,1-dimethylethyl-25,26,27,28-tetrakis(ethoxykarbonylmethoxy)kalix[4]arenu, ^tBuAcC4A, (II) ⁴⁶

Do dvouhrdlé destilační baňky (500 ml) s magnetickým míchadlem bylo naváženo 10 g (0,01 mol) látky *I*, poté bylo přidáno 21,2 g K₂CO₃, 25,6 g (17,0 ml) ethylesteru kyseliny bromoctové^h a 200 ml suchého acetonuⁱ. Obsah baňky se zpětným chladičem a sušící trubičkou (bezvodý CaCl₂) byl dán refluxovat na olejovou lázeň při 80 °C po dobu 7 dní. Reakční směs byla ponechána zchladnout, nažloutlá suspenze byla přefiltrována na fritě S4 a filtrát odpařen na RVO. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. K odparku byl přidán dichlormethan do rozpuštění, pak ethanol (asi 50 ml) do vzniku zákalu, který se po chvíli rozpouští, a ponecháno krystalizovat v lednici. Po odsátí na fritě S3 byl filtrát zahuštěn pro krystalizaci další frakce. Produkt byl získán jako bílá krystalická látka *M_r* = 993 g. Výtěžek byl 10,9 g (11 mmol) tj. cca 84 % (všechny podíly).

¹H NMR (v CDCl₃, 25 °C, reference TMS): 1.08 (s, 36H, -C(CH₃)₃); 1.29 (t, 12H, *J* = 7.2 Hz, -CH₂CH₃); 3.19 (d, 4H, *J* = 12.8 Hz, A-CH₂-B); 4.21 (q, 8H, *J* = 7.2 Hz, -CH₂CH₃); 4.80 (s, 8H, -OCH₂-); 4.86 (d, 4H, *J* = 13.2 Hz, A-CH₂-B); 6.78 (s, 8H, aromatický H)

^h S ethylesterem kyseliny bromoctové je nutno pracovat v dobře táhnoucí digestoři a v rukavicích.

ⁱ Aceton sušený stáním nad bezvodým K₂CO₃ a odfiltrováním od sušidla.

^{13}C { ^1H } NMR (v CDCl_3 , 25 °C): 14.18 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 31.34 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 31.86 ($\text{A}-\text{CH}_2-\text{B}$); 33.79 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 60.27 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 71.30 ($-\text{OCH}_2$); 125.31 (aromatický $-\text{CH}$); 133.42 (aromatický $-\text{C}-\text{CH}_2$); 145.12 (aromatický $-\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 152.95 (aromatický $-\text{C}-\text{O}$); 170.50 ($\text{C}=\text{O}$)

MS (ESI): pozitivní mod: m/z 1015,9 ($\text{M} + \text{Na}^+$)

TLC: (silikagel – Merck, HE 1:1, detekce UV a I_2), $R_f = 0,45$

4.1.3 Příprava cone-5,11,17,23-tetranitro-25,26,27,28-(ethoxykarbonyl-methoxy)kalix[4]arenu, $\text{NO}_2\text{AcC4A}$, (III)⁴⁷

Do vyžíhané a vychladlé dvouhrdlé baňky (50 ml) bylo naváženo 5 g (5 mmol) látky **II**, 20,2 g KNO_3 a 16 ml CF_3COOH ^j. Do baňky byl zaváděn argon přes zaváděcí trubičku, průchod byl upraven na 1 bublinu za 2 vteřiny a necháno míchat při RT asi šest hodin. Barva reakční směsi byla ihned po smíchání výchozích látek temně fialová a na konci nitrace se změnila na žlutooranžovou, změna barvy byla použita jako kontrola průběhu reakce. Poté byl obsah baňky převeden do 500 ml destilované vody a bylo přidáno 100 ml CH_2Cl_2 . Obě fáze byly odděleny v dělicí nálevce (1000 ml) a vodná část byla extrahována 3×50 ml CH_2Cl_2 . Organické frakce byly spojeny a protřepány v dělicí nálevce s 5% roztokem K_2CO_3 (~100 ml), poté 4×100 ml destilované vody do bezbarvé vodné fáze. Pro lepší dělení separovaných fází byla přidána při každém vytřepávání malá lžička KCl do dělicí nálevky. Organická fáze byla vysušena bezvodým MgSO_4 (1 lžička na cca 250 ml), ten byl odfiltrován na fritě S3 a filtrát byl odpařen na RVO dosucha. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství dichlormethanu, poté byl přidáván cyklohexan do vzniku zákalu, který se po chvíli rozpouští, a celé bylo ponecháno krystalizovat v lednici 3 dny. Poté byla směs odsáta na fritě S3 a ponechána na vzduchu doschnout. Produkt byl získán rekrystalizací z acetonitrilu za horka jako světle žlutá krystalická látka $M_r = 949$ g. Výtěžek 1,87 g (2 mmol) tj. cca 40 % (všechny podíly).

^1H NMR (v CDCl_3 , 25 °C): 1.30 (t, 12H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3.47 (d, 4H, $J = 14.8$ Hz, $\text{A}-\text{CH}_2-\text{B}$); 4.22 (q, 8H, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4.77 (s, 8H, $-\text{OCH}_2$); 5.04 (d, $J = 14.4$ Hz, 4H, $\text{A}-\text{CH}_2-\text{B}$); 7.59 (s, 8H, aromatický H)

^j S kyselinou trifluoroctovou je nutno pracovat v dobře táhnoucí digestoři a v rukavicích.

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (v CDCl_3 , 25 °C): 14.08 (CH_2CH_3); 31.51 (A- CH_2 -B); 61.29 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 71.52 ($-\text{OCH}_2$), 124.26 (aromatický $-\text{CH}$); 135.15 (aromatický $-\text{C}-\text{CH}_2$); 143.37 (aromatický $-\text{C}-\text{NO}_2$); 160.79 (aromatický $-\text{C}-\text{O}$); 168.86 ($-\text{C}=\text{O}$)

MS (ESI): pozitivní mod: m/z 971,5 ($\text{M} + \text{Na}^+$)

TLC: (silikagel – Merck, DE 10:1, detekce UV a I_2), $R_f = 0,85$

4.1.4 Příprava cone-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(ethoxykarbonyl-methoxy)kalix[4]arenu, $\text{NH}_2\text{AcC4A}$, (IV) ⁴⁸

Do 50 ml dvouhrdlé baňky opatřené magnetickým míchadlem, zaváděcí trubičkou a bublačkou bylo naváženo 500 mg látky **III** (0,5 mmol) a 150 mg Pd/C. K této směsi bylo přilito takové množství bezvodého lihu, aby zaváděcí trubička byla ponořená (20–25 ml), byl napojen přívod vodíku a směs se míchala přibližně 1 hodinu. Po této době byl napojen balónek s vodíkem, baňka byla uzavřena a směs byla míchána při RT 3 dny. Poté bylo přidáno aktivní uhlí, směs byla přefiltrována přes filtrační papír do 100 ml baňky a filtrát odpařen na RVO dosucha. Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstevné kapalinové chromatografie. Výtěžek byl 0,43 g (0,51 mmol), tj. cca 96 %.

^1H NMR (v CD_3OD , 25 °C): 1.28 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 12H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2.99 (d, $J = 13.6$ Hz, 4H, A- CH_2 -B); 4.19 (q, $^4J = 6.8$ Hz, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 4.61 (s, 8H, $-\text{OCH}_2$); 4.72 (d, $^2J = 13.6$ Hz, 4H, A- CH_2 -B); 6.14 (s, 8H, aromatický H)

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (v CD_3OD , 25 °C): 14.60 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 32.57 (A- CH_2 -B); 61.55 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 72.60 ($-\text{OCH}_2$); 117.66 (aromatický $-\text{CH}$); 136.47 (aromatický $-\text{C}-\text{CH}_2$); 142.28 (aromatický $-\text{C}-\text{NH}_2$); 150.79 (aromatický $-\text{C}-\text{O}$); 171.97 ($\text{C}=\text{O}$)

TLC: (silikagel – Merck, MDT 3:3:1, detekce UV a I_2), $R_f = 0,25$

4.1.5 Příprava cone-5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(karboxyl-methoxy)kalix[4]arenu, $\text{NH}_2\text{KC4A}$, (V) ⁴⁸

Do 100 ml baňky s odpařenou látkou **IV** (0,43 g), zabalené v alobalu a opatřené magnetickým míchadlem bylo přilito 12 ml destilované vody a 2 ml koncentrované HCl. Baňka byla uzavřena septem a injekční jehlou naplněna argonem a reakční směs byla míchána 4 dny. Poté bylo přidáno aktivní uhlí a směs byla přefiltrována přes fritu S4. Filtrát byl odpařen dosucha a produkt čištěn na silném katexu (Dowex 50×W4,

100 mesh, 3×8 cm, v H⁺ cyklu). Nečistoty byly eluovány vodou, produkt eluován 5% vodným roztokem NH₃. Eluát byl odpařen dosucha, rozpuštěn v minimálním množství vody a opět odpařen dosucha. Odparek byl znovu rozpuštěn v minimálním množství vody a vysrážen acetonem. Poté byl produkt odsát na fritě S4 a vysušen v exsikatoru nad P₂O₅. Produkt byl získán jako světlý prášek s hnědorůžovým nádechem s výtěžkem 0,29 g (0,41 mmol), tj. cca 80 %.

¹H NMR (v D₂O, 25 °C, reference ^tBuOH): 3.24 (d, ²J = 13.2 Hz, 4H, A-CH₂-B); 4.45 (s, 8H, -OCH₂); 4.69 (d, ²J = 13.6 Hz, 4H, A-CH₂-B); 6.56 (s, 8H, aromatický H).

¹³C {¹H} NMR (v D₂O, 25 °C, reference ^tBuOH): 32.34 (A-CH₂-B); 77.101 (OCH₂); 118.80 (aromatický -CH); 138.81 (aromatický -C-CH₂); 142.15 (aromatický -C-NH₂); 151.41 (aromatický -C-O); 179.74 (C=O)

Elementární analýza: C: 54,48 % (54,33 %); H: 5,94 % (5,95 %); N: 10,40 % (10,56 %)

teoretický vzorec: NH₂KC₄A·2NH₃·2,5H₂O; (pro C₃₆H₄₇N₆O_{14,5})

MS (ESI): negativní mod: 715,3 (M⁻)

pozitivní mod: 717,4 (M⁺)

M_r = 795,3 (2×NH₃, 2,5×H₂O)

FTIR (DRIFTS): 2700 cm⁻¹ (ν(NH₃⁺)), 1600 cm⁻¹ (ν_{as}(COO⁻)), 1330 cm⁻¹ (ν_s(COO⁻)), 1050 cm⁻¹ (ν(C_{ar}-N))

FT Raman: 2600 cm⁻¹ (ν(NH₃⁺)), 1610 cm⁻¹ (ν_{as}(COO⁻)), 1330 cm⁻¹ (ν_s(COO⁻)), 1050 cm⁻¹ (ν(C_{ar}-N))

TLC: (silikagel – Merck, MDT 3:3:1, detekce UV a I₂), R_f = 0,20

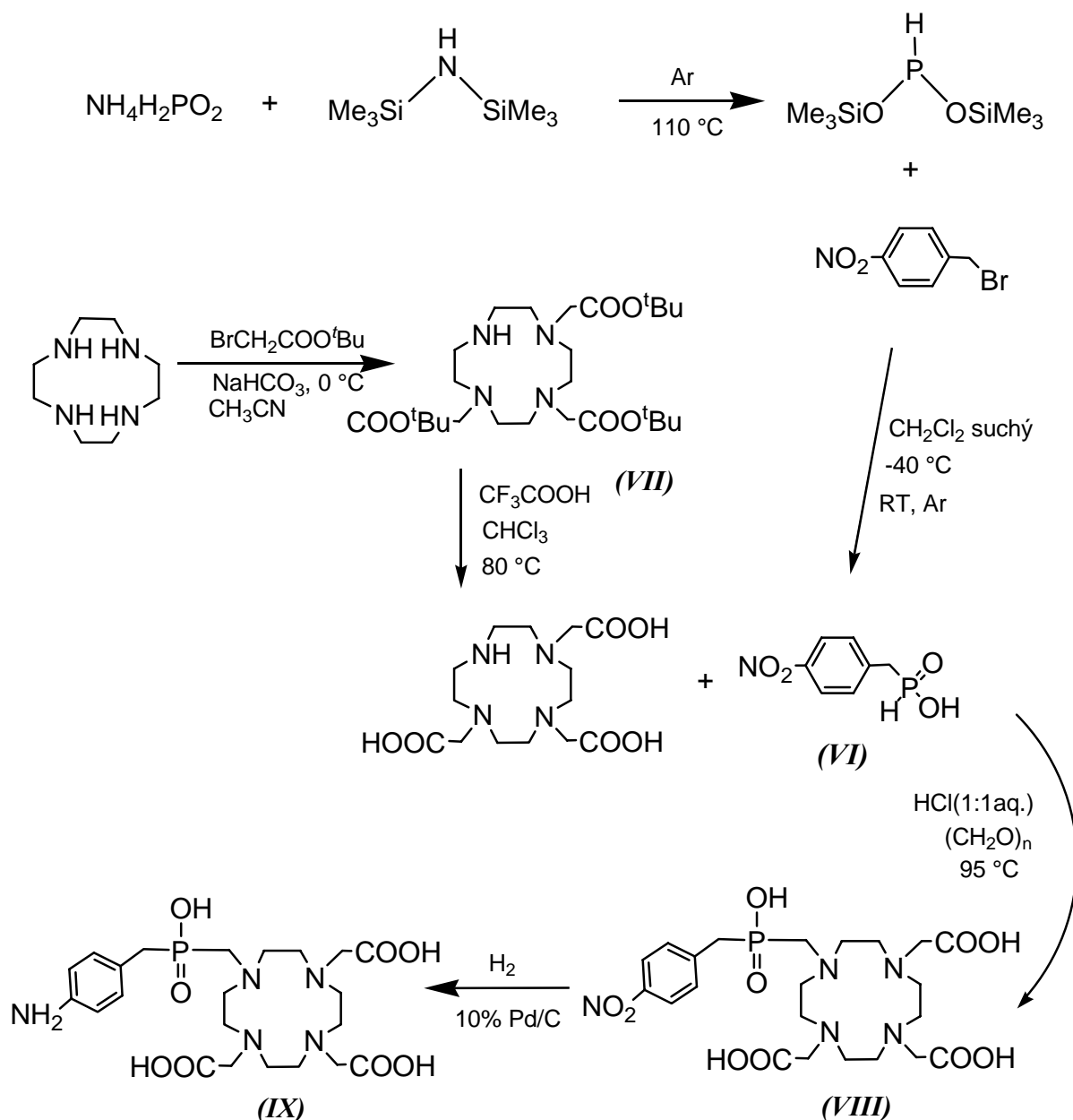
HLPC: (LunaC8) – gradient 05/50/45–50/50/0, 10 minut, MeCN/H₂O + 0,1% TFA/H₂O, t_R = 4,9 min, λ₁ = 210 nm, λ₂ = 289 nm.

b.t.: rozklad nad 375 °C

4.2 Příprava makrocyclické části cílové sloučeniny

Příprava tetraazacyklu sestává z přípravy dvou dílčích prekurzorů, NBnPIN a H₃do3a. Mannichovou kondenzací poté získáme makrocyklus s fosforovým pendantním ramenem.

Syntéza makrocyclické části je shrnuta na *obrázku 11*.



Obrázek 11: Reakční schéma přípravy kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-aminofenyl)methyl]fosfinové}.

4.2.1 Příprava kyseliny 4-nitrobenzylfosfinové, NBnPIN, (VI)⁴⁹

20,0 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (241 mmol) bylo dáno do trojhrdlé baňky (1 l) s míchadlem, opatřené septem, chladičem, bublačkou a zaváděcí trubičkou s kohoutem pro přívod argonu. Baňka byla dobře promyta argonem a přes septum bylo pomalu přidáno 100 ml hexamethyldisilazanu injekční stříkačkou. Proud argonu byl upraven tak, aby přes bublačku procházely 2–3 bublinky za 5 sekund. Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni 12 hodin při teplotě 100–110 °C. Po dosažení 80 °C začal unikat amoniak (zrychlení proudu v bublačce).

K reakční směsi bylo přidáno přes septum 150 ml suchého dichlormethanu^k. Baňka byla vychlazena v lázni pevný CO_2 /ethanol na –40 °C. Za stálého míchání byl přidán přes septum roztok 23,6 g 4-nitrobenzylbromidu (109 mmol) ve 150 ml suchého dichlormethanu^l během cca 20 minut. Necháno 16 hodin míchat pod mírným proudem argonu, poté byl proud argonu zesílen a reakční směs přečerpána kanylou do 500 ml ethanolu v Erlenmeyerově baňce (2 l) s míchadlem. Zakalený hnědý roztok byl odpařen na RVO a rozpuštěn ve směsi 300 ml 6M HCl a 300 ml dichlormethanu. Tato směs byla nechána míchat 1 hodinu, přičemž došlo ke krystalizaci části produktu. Pevná fáze byla odfiltrována na fritě S4 a obě kapalně fáze filtrátu poté odděleny v dělicí nálevce. Vodná fáze byla promyta 5×200 ml dichlormethanu. Organické frakce byly spojeny spolu s odfiltrovanou pevnou částí a odpařeny do sucha na RVO. Odparek byl znovu odpařen malým množstvím ethanolu, rozpuštěn v 150 ml vroucí vody a za horka přefiltrován na fritě S3. NBnPIN vykrystalizovala z horkého filtrátu přes noc při RT, byla zfiltrována na fritě S3 a dosušena ve vakuovém exsikátoru nad P_2O_5 . NBnPIN byla získána jako oranžovožlutá krystalická látka (výtěžek této frakce 3,35 g).

Nerozpuštěná látka po filtraci za horka spolu s odpařeným matečným roztokem znovu extrahována ve 100 ml vroucí vody a zfiltrována za horka (S3). Výše popsaná krystalizace byla opakována s výtěžkem 2,9 g v této frakci. Další krystalizace byla provedena stejným způsobem a získáno bylo 5,2 g NBnPIN.

Celkový výtěžek 11,5 g (65 mmol) tj. cca 60 % ($M_r = 177$ g). Čistota produktu byla hodnocena ^{31}P NMR spektry.

^k Čerstvě předestilovaného při 40 °C s čerstvým P_2O_5 po předchozím sušením s P_2O_5 přes noc.

^l Práce s 4-nitrobenzylbromidem prováděna v rukavicích a ochranných brýlích v dobře táhnoucí digestoři.

³¹P NMR (v NH₃: EtOH 1:5, 25 °C) 23.58 (dt, 1P, ¹J_{PH} = 511.4 Hz, ²J_{PH} = 18.3 Hz, NBnPIN)

¹H NMR (v DMSO-d₆, 25 °C) 3.22 (d, 2H, ²J_{PH} = 19.2 Hz, -CH₂-); 6.98 (d, 1H, ¹J_{PH} = 541.2 Hz, P-H); 7.59 (dd, 2H, ¹J_{HH} = 8.4 Hz, ²J_{HH} = 2.4 Hz, aromatika); 8.19 (d, 2H, ¹J_{HH} = 8.4 Hz, aromatika)

4.2.2 Příprava tris(*t*-butyl)esteru 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,4,7-trioctové kyseliny, ^tBu₃do3a·HBr, (VII)⁵⁰

Do 1000 ml baňky s magnetickým míchadlem bylo dáno 15,0 g cyklenu, 30,1 g NaHCO₃ a 500 ml acetonitrilu. Baňka byla uzavřena, dána do lázně voda/led a vychlazena na 0 °C. Během další hodiny a půl bylo přidáváno 52,7 g ethylesteru kyseliny bromoctové^m po kapkách pomocí přikapávací nálevky. Reakční směs byla znovu ochlazena na 0 °C a nechána 24 hodin míchat při laboratorní teplotě.

Pevná fáze byla odfiltrována a filtrát odpařen na RVO. Poté byl rozpuštěn v 500 ml toluenu a dán míchat přes noc. Pevná fáze byla odfiltrována na fritě S3, promyta 3×50 ml toluenu a prosušena vzduchem. Poté byl tento bílý prášek rozpuštěn v 1000 ml baňce ve 400 ml dichlormethanu a bylo přidáno 400 ml vody. Směs byla intenzivně míchána 20 hodin při laboratorní teplotě. Obě fáze byly odděleny v dělicí nálevce a vodná frakce byla extrahována 2×50 ml. Organické frakce byly spojeny a zahuštěny na odparce na cca 50 ml. K tomuto koncentrovanému roztoku byl pomalu a za míchání přidáván hexan do vzniku bílého zakalení. Směs byla dána na hodinu do lednice pro urychlení krystalizace. Vzniklá bílá krystalická látka byla odfiltrována na fritě S3, promyta směsí hexanu a dichlormethanu (ve stejném poměru jako v matečném roztoku) a vysušena vzduchem. Postupně byly zfiltrovány i 2., 3. a 4. podíl krystalizace (čistota se snižovala). ^tBu₃do3a byla získána jako bílý lehký prášek ve formě mono-hydrobromidu *M_r* = 596 g. Výtěžek byl 21,11 g (35 mmol), tj. cca 40 % (všechny podíly). Čistota produktu byla hodnocena pomocí ¹H a ¹³C NMR spekter.

^m S ethylesterem kyseliny bromoctové je nutno pracovat v dobře táhnoucí digestoři a v rukavicích.

$^1\text{H NMR}$ (v CDCl_3 , 25 °C) 1.42 (s, 18H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.43 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2.85 (br, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 2.90 (br, 8H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 3.07 (br, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 3.26 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{CO}-$); 3.35 (s, 4H, $-\text{CH}_2\text{CO}-$)

$^{13}\text{C } \{^1\text{H}\}$ NMR (v CDCl_3 , 25 °C) 28.13 (s, 2C, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 28.17 (s, 1C, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 47.46, 49.15, 51.30, 58.15 (s, 8C, cyklové $-\text{CH}_2-$); 81.62 (s, 2C, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 81.78 (s, 1C, $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-$); 169.57 (s, 1C, $-\text{CO}-$); 170.45 (s, 2C, $-\text{CO}-$)

MS (ESI): pozitivní mod: m/z 515,3 (M^+)

4.2.3 Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1- $\{methyl-[(4\text{-nitrofenyl)methyl}]\text{fosfinové}\}$, $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{NBn}} \cdot 2,5\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, (VIII)

5,0 g $^t\text{Bu}_3\text{do3a} \cdot \text{HBr}$ (látka VII) byla hydrolyzována kyselinou trifluoroctovouⁿ (25 ml) v chloroformu (25 ml) při 80 °C přes noc. Rozpouštědla byla odpařena na RVO. K odparku bylo přidáno 5,0 g NBnPIN (látka VI), 20 ml koncentrované HCl, 20 ml H_2O a směs byla refluxována na olejové lázni při 100 °C. Během 4 hodin byl přisypáván 1,0 g paraformaldehydu v 40-ti minutových intervalech. Druhý den bylo přidáno dalších 0,5 g paraformaldehydu ve dvou dávkách. Směs byla refluxována přes noc, poté odpařena na RVO a několikrát doodpařena s H_2O . Odparek byl rozpuštěn ve vodě a nerozpustná část byla odfiltrována. Filtrát byl zahuštěn a nanesen na silný katex (Dowex 50 \times W4, 100 mesh, 3 \times 25 cm, v H^+ cyklu), ten byl poté promyt 300 ml vody, 2 l EtOH (1:1 s H_2O). Produkt byl eluován 5% vodným roztokem NH_3 . Eluát s látkou VIII, ve formě amonné soli, byl odpařen na RVO a poté ještě jednou s vodou. Tento odparek rozpuštěný ve vodě byl nanesen na silný anex (Amberlite IRA 402 typ1, 4 \times 25 cm, v AcO^- cyklu). Nečistoty eluovány H_2O (500 ml), poté 5% roztokem AcOH (600 ml) a produkt pak 3% roztokem HCl (700 ml). Eluát s látkou VIII byl odpařen a poté znovu několikrát doodpařen s H_2O . Získaný odparek byl triturován v THF (cca 50 ml) po dobu jednoho týdne. Produkt byl získán filtrací na fritě S3 a dosušen v exsikátoru nad P_2O_5 . Výtěžek byl 3,3 g (4,7 mmol), tj. cca 56 %.

$^{31}\text{P } \{^1\text{H}\}$ NMR (v H_2O , 25 °C, reference H_3PO_4 externí standard) 30.1, bs.

ⁿ S kyselinou trifluoroctovou je nutno pracovat v dobře táhnoucí digestoři a v rukavicích.

Elementární analýza: C: 37,45 % (37,49 %); H: 6,16 % (6,08 %); N: 9,48 % (9,94 %); Cl: 12,42 % (12,58 %)

teoretický vzorec: $H_4do3ap^{NBn} \cdot 2,5HCl \cdot 3H_2O$; (pro $C_{22}H_{42,5}N_5O_{13}P_{12,5}Cl_{2,5}$)

TLC: (silufol, IPA V 7:3:3, detekce ninhydrinem), $R_f = 0,70$, zelenošedá skvrna

4.2.4 Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1- {methyl-[(4-aminofenyl)methyl]fosfinové}, $H_4do3ap^{ABn} \cdot 3HCl \cdot 2H_2O$, (IX)

Odparek z předchozího reakčního kroku, látka **VIII**, byl ve 100 ml baňce rozpuštěn ve 40 ml vody. Pod hladinu byl zaveden argon a roztok jím byl probubláván cca 5 minut. Po vypláchnutí celé baňky argonem bylo přidáno 0,35 g 10% Pd/C a baňka byla opět vypláchnuta argonem a poté dvakrát vodíkem. Poté byl na baňku napojen balónek s vodíkem a směs nechána míchat při RT. Po třech dnech (detekce konce reakce byla provedena pomocí TLC) byla reakční směs zfiltrována přes tři vrstvy filtračního papíru a filtrát byl odpařen na RVO dosucha. Odparek byl znovu odpařen s malým množstvím vody a poté dvakrát s 6M HCl dosucha. Získaný odparek byl triturován v THF (cca 50 ml) dva dny. Produkt byl získán filtrací přes fritu S3, prosušen vzduchem na fritě a dosušen v exsikátoru (P_2O_5 pod vakuem). Výtěžek byl 1,6 g (2,3 mmol), tj. cca 50 %.

Elementární analýza: C: 39,47 % (39,15 %); H: 6,16 % (6,42 %); N: 10,98 % (10,38 %); P: 4,49 % (4,59 %)

teoretický vzorec: $H_4do3ap^{ABn} \cdot 3HCl \cdot 2H_2O$; ($C_{22}H_{43}Cl_3N_5O_{10}P$)

1H NMR (v D_2O , 25 °C, reference tBuOH) 2.95 (d, 2H, $J_{PH} = 16.0$ Hz, P- \underline{CH}_2 -benzyl); 3.01 (d, 2H, $J_{PH} = 3.6$ Hz, N- \underline{CH}_2 -P); 3.05–3.28 (m, 16H, cyklové \underline{HH}); 3.45 (s, 2H, N- \underline{CH}_2 -COOH); 3.65 (s, 4H, N- \underline{CH}_2 -COOH); 7.28 (m, 2H, aromatika); 7.34 (m, 2H, $J_{PH} = 2.0$ Hz, aromatika).

^{31}P { 1H } NMR (v D_2O , 25 °C, reference H_3PO_4 externí standard): 34.9, bs

MS (ESI): pozitivní mod: 552,2 ($M + Na^+$), 568,1 ($M + K^+$), 361,4 ($do3aCH_2^+$)

negativní mod: 528,0 (M^-), 566,0 ($(M - 2H + K)^-$)

$M_r = 673,2$ g ($3 \times HCl$, $2 \times H_2O$)

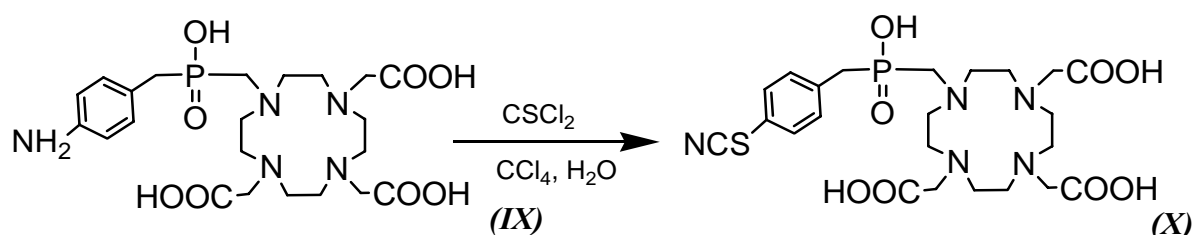
TLC: (silufol, IPA V 7:3:3, detekce ninhydrinem), $R_f = 0,65$, růžovofialová skvrna

b.t.: rozklad nad 250 °C

4.3 Příprava cílové sloučeniny

Pro vlastní reakci s aminoskupinami na kalix[4]arenu je nutné převést aminoskupinu na benzylovém jádře na pendantním ramenu makrocyklu pomocí thiofosgenu na isothiokyanoskupinu. Tato aktivní skupina je schopna za mírných podmínek reagovat s aminoskupinami na kalix[4]arenu za vzniku N,N'-disustituované thiomocoviny.

Převedení aminoskupiny na aktivní isothiokyanoskupinu je znázorněno na *obrázku 12*.



Obrázek 12: Reakční schéma přípravy kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-isothiokyanatanofenyl)methyl]fosfinové}

4.3.1 Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-isothiokyanatanofenyl)methyl]fosfinové}, $H_4do3ap^{IBn} \cdot 4HCl$, (X) ⁴⁴

0,5 g látky *IX* (0,342 mmol) bylo rozpuštěno v 5 ml vody v 25 ml hruškovité baňce. pH bylo upraveno 15% kyselinou chlorovodíkovou na 2 (kontrola univerzálním pH papírkem). 88 μ l 90% thiofosgenu (0,41 mmol)^o bylo smícháno s 5 ml CCl_4 a bylo přidáno k vodnému roztoku látky *IX*. Do reakční směsi bylo dáno menší míchadlo, poté byla baňka několikrát propláchnuta argonem, utěsněna (teflonová páska a parafilm) a obalena alobalem. Dvoufázová reakční směs byla poté 12 hodin intenzivně míchána na magnetické míchačce, baňka byla nakloněna a zároveň umístěna nesymetricky k míchačce. Reakce byla kontrolována pomocí TLC. Obě fáze pak byly odděleny pomocí injekční stříkačky. Vodná fáze obsahující produkt byla odpařena na RVO.

^o CSCI_2 je dýmavá velmi toxická kapalina, při zacházení s ní byly použity ochranné pomůcky a pracovalo se v dobře táhnoucí digestoři. Nádobí a samotná organická fáze byly likvidovány amoniakem.

Výtěžek byl 550 mg (0,77 mmol), tj. 90 %. Pro delší skladování je třeba produkt uchovávat v mrazáku v suchém stavu.

$^1\text{H NMR}$ (v D_2O , 25 °C, reference $^1\text{BuOH}$) 2.87–3.90 (m, 26H, kruh + CH_2 pendantní – nerozlišeno); 7.20 (m, 2H, aromatika); 7.23 (m, 2H, aromatika)

$^{31}\text{P NMR}$ (v D_2O , 25 °C, reference H_3PO_4 externí standard) 29.8, s

Elementární analýza: C: 38,01 % (38,51 %), H: 5,93 % (5,34 %), N: 10,10 % (9,76 %), S: 4,54 % (4,47 %)

teoretický vzorec: $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{IBn}} \cdot 4\text{HCl}$; $(\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{SO}_8\text{Cl}_4\text{P})$

MS (ESI): pozitivní mod: 572 (M^+), 361 (do3aCH_2^+)

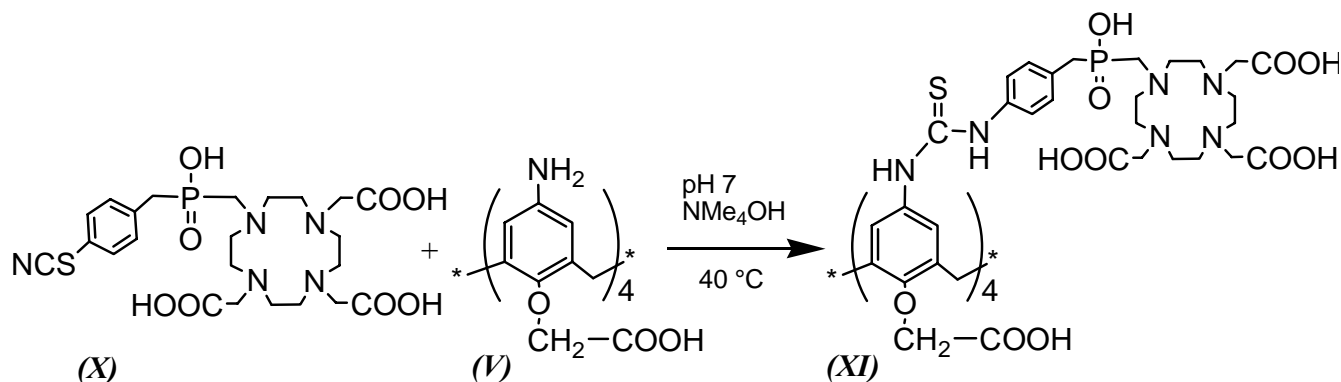
$M_r = 717,4$ ($4 \times \text{HCl}$)

IR: 2100 cm^{-1} (ν , $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ valenční antisymetrická vibrace)

UV: 273 nm, 284 nm (aromatika, NCS)

TLC: (Merck, IPOV 6:1:8, det. ninhydrinem) růžovohnědá nevýrazná skvrna – spíše mizí, $R_f = 0,5$

Reakce aktivní skupiny isothiokyanátu s aminovými skupinami kalix[4]arenu za vzniku N,N'-disubstituované thiomocoviny je znázorněna na *obrázku 13*.



Obrázek 13: Příprava látky $\text{L}_4\text{-C}$.

4.3.2 Příprava $\text{L}_4\text{-C}$, (XI)

Do 25 ml baňky slzovitého tvaru byla dána látka *V* 0,061 g ($8,3 \cdot 10^{-5}$ mol) a baňka byla umístěna na olejovou lázeň ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). Látka *X* byla rozpuštěna ve vodě (3 ml) a přidávána ve třech částech do baňky k látce *V*, po čtyřech a po dvanácti hodinách.

Po každém přidavku bylo upraveno pH na 7–8 pomocí 10% roztoku NMe₄OH. Dimer látky **IX** a soli byly odstraněny ultrafiltrací na membráně 3000 g·mol⁻¹. Látka byla získána ve formě [N(CH₃)₄⁺]₁₁L₄C·19H₂O, M_r = 4158,3 g a výtěžek byl 0,24 g (8·10⁻⁵ mol), tj. 96 %.

¹H NMR (v D₂O, 80 °C, reference ^tBuOH) 2.93–3.47 (m, 92H, kruh + CH₂ pendantní + A–CH₂–B kalixu, 132H, N(CH₃)₄⁺ – nerozlišeno); 3.65 (s, 16H, –NCH₂COOH); 4.61 (s, 8H, –OCH₂COO– kalixu); 4.82 (d, 4H, J = 13,6 Hz, A–CH₂–B kalixu); 7.11 (s, 8H, aromatika kalixu); 7.24 (m, 8H, aromatika makrocyklu); 7.39 (m, 8H, aromatika makrocyklu)

³¹P {¹H} NMR (v D₂O, 80 °C, reference H₃PO₄ externí standard) 32.40, s

¹³C {¹H} NMR (v D₂O, 80 °C, reference ^tBuOH) 48.18 (44×N(CH₃)₄⁺); 68.34 (d, J_{CP} = 17.1 Hz, 4×P–CH₂–benzyl); 69.91 (d, J_{CP} = 13.8 Hz, 4×N–CH₂–P); 73.95, 74.00, 74.06 (36×CH₂–cyklové); 74.69 (4×N–CH₂–COOH); 75.39 (4×O–CH₂–COOH); 75.48 (8×N–CH₂–COOH); 87.94 (s, 4×A–CH₂–B kalixu); 135.24 (d, J_{CP} = 2.3 Hz, 4×aromatický –C–CH₂–P); 143.83 (8×aromatický –C–CH₂– kalixu); 145.05 (8×aromatický –CH– kalixu); 149.07 (8×aromatický –CH– makrocyklu); 149.12 (8×aromatický –CH– makrocyklu); 152.33 (4×aromatický –C–NH– makrocyklu); 152.43 (4×aromatický –C–NH– kalixu); 153.28 (4×aromatický –C–O kalixu); 190.28 (8×COOH makrocyklu); 190.58 (4×COOH makrocyklu); 193.91 (4×COOH kalixu); 195.23 (4×N–C(S)–N).

Elementární analýza: C: 49,70 % (49,66 %), H: 8,3 % (8,26 %), N: 11,79 % (11,78 %)

teoretický vzorec: [N(CH₃)₄⁺]₁₁HL₄–C·19H₂O; (C₁₇₂H₃₃₁O₆₃N₃₅S₄P₄)

M_r = 4159,3 (19×H₂O)

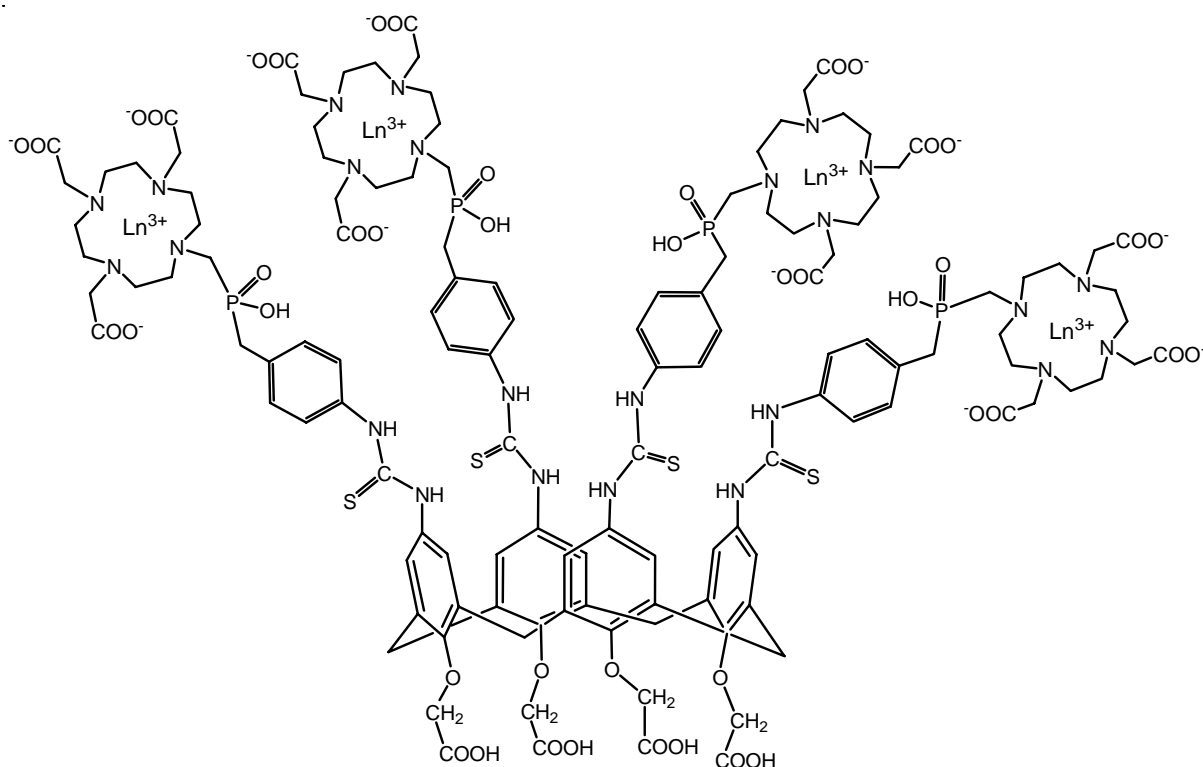
IR: 1600 cm⁻¹ (ν, –NCSN– valenční antisymetrická vibrace)

UV: 273 nm, 284 nm (aromatika, NCSN)

HLPC: (SEC) – pH 6,5 (Acetátový pufr 0,1M), t_R = 21 min, λ₁ = 230 nm, λ₂ = 289 nm.

(LunaC8) – gradient 05/50/45–50/50/0, 10 minut, MeCN/H₂O + 0,1% TFA/H₂O, t_R = 3,8 min, λ₁ = 210 nm, λ₂ = 289 nm.

4.4 Příprava komplexů



Obrázek 14: Komplex s lanthanoidy ligandu L₄C.

4.4.1 Příprava komplexů ligandu

Do 25 ml baňky bylo naváženo 0,2 g ligandu $[\text{N}(\text{CH}_3)_4]^+_{11}\text{L}_4\text{C} \cdot 19\text{H}_2\text{O}$ (0,025M roztok konjugátu), rozpuštěno ve 3 ml vody a poté bylo přidáno 8 ekvivalentů chloridu příslušného lanthanoidu. pH bylo upraveno 2% vodným roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 7–8, k určení hodnoty pH byla použita jedna kapka bromthymolové modři a požadována byla zelená až zelenomodrá barva indikátoru. Reakční směs byla míchána hodinu při 40 °C a poté bylo přidáno 2,5 ml 0,12M roztoku H₄edta (12 ekv.) pro chelataci volného lanthanoidu a bylo znovu upraveno pH na hodnotu 7–8. Poté byla použita ultrafiltrace na membráně 3000 g·mol⁻¹ k oddělení solí a H₄edta. Takto připravený roztok (GdL)₄-C a (YbL)₄-C byl použit pro přípravu vzorků pro další měření.

4.4.2 Zjištění přítomnosti volného kovu v roztoku

Vzorek komplexu v roztoku (kapka roztoku po ultrafiltraci) ve vialce zředěn 1 ml vody a byly přidány tři kapky pufru urotropin/HCl 0,1M pH 5,5. Poté byla přidána xylenolová oranž a pokud byl výsledný roztok žlutý, vzorek neobsahoval volný kov. Pokud byla výsledná barva fialová, kov se v roztoku nacházel ve volném stavu.

4.4.3 Příprava vzorků na relaxometrická měření

K měření byl použit 50 mM roztok komplexu gadolinitého (GdL)₄-C v 0,6 ml vody a pH bylo upraveno roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 7. Roztok byl obohacen 10% roztokem H₂¹⁷O (na koncentraci H₂¹⁷O 0,5 %) a ^tBuOH (na koncentraci ^tBuOH 0,5 %).

Jako reference bylo použito 0,6 ml destilované vody s přidavkem 10% roztoku H₂¹⁷O (na koncentraci H₂¹⁷O 0,5 %) a ^tBuOH (na koncentraci ^tBuOH 0,5 %). pH bylo upraveno roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 7.

4.4.4 Příprava vzorku komplexu pro studium izomerie v roztocích

Pro toto měření bylo použito 50mM roztoku (YbL)₄-C v 0,6 ml D₂O. Izomerie komplexu byla zkoumána měřením ¹H a ³¹P {¹H} NMR spekter.

5 Diskuze

5.1 Příprava ligandu L₄-C

5.1.1 Příprava kalix[4]arenu

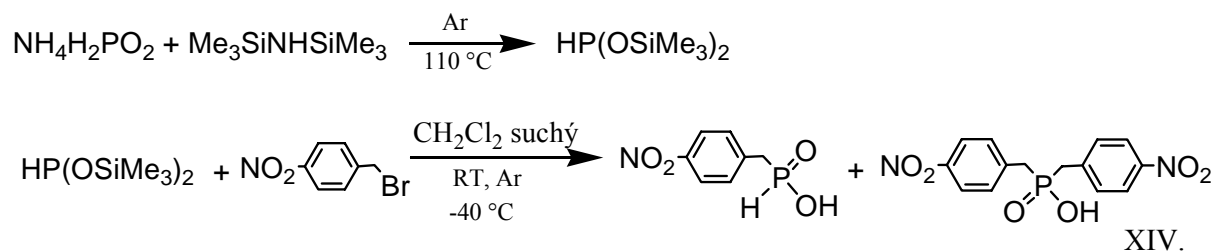
První krok syntézy, příprava ^tBuOHC₄A, byl proveden podle literatury⁴⁵. Při této reakci musela být přesně dodržena reakční teplota, protože při vyšší teplotě než je 120 °C *p*-terc.butylfenol sublimuje, což vede ke znatelnému snížení výtěžku. Je také nutností použít NaOH o čistotě extra pure, v našem případě od firmy Riedel-de-Haën, protože jinak dochází opět k velkému snížení výtěžku (až o polovinu). Výtěžek po rekrystalizaci byl cca 45 % vzhledem k *p*-terc.butylfenolu s vysokou čistotou.

Následující dva kroky syntézy, tj. navázání ethoxykarbonylmethoxy skupiny na „dolní“ kruh a *ipso*-nitrace „horního“ kruhu^{51, 52} byly převzaty z literatury^{46, 47} a byly plně reprodukovatelné. Výtěžky byly cca 84 % a 40 %.

Redukce nitroskupiny na „horním“ kruhu a následná hydrolyza esteru na „dolním“ kruhu probíhala bez potíží podle diplomové práce Petry Němečkové. Výtěžky obou reakcí byly cca 96 % a 80 % a produkt *V* neobsahoval podle ¹H NMR žádné významné nečistoty. Kvůli možné oxidaci aminoskupin na „horním“ kruhu, byla látka *V* připravována většinou až v případě potřeby ze stabilní a dobře skladovatelné látky *III*, protože u vzorků skladovaného delší dobu se čistota látky *V* (podle HPLC) zhoršovala (docházelo k rozkladu). Pokud nebyla ihned spotřebována, byla látka *V* skladována v atmosféře argonu bez přístupu světla. Infračervená spektra budou diskutována v kapitole 5.2.1.

5.1.2 Příprava makrocyklu

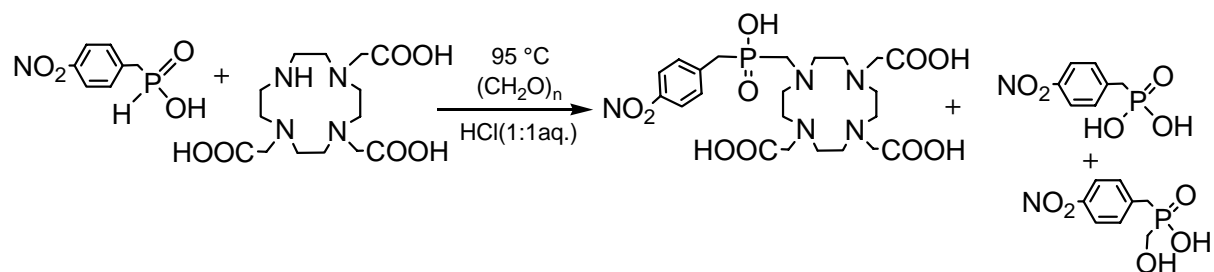
NBnPIN byla připravena podle návodu, který byl optimalizován a nyní je rutinně používán v naší laboratoři⁴⁹. Při syntéze vzniká vedlejší disubstituovaný produkt kyseliny bis(nitrobenzyl)fosfinové *Obrázek 15* (dle ³¹P {¹H} NMR v EtOH:NH₃ 1:1), avšak jeho vznik se podařilo vhodnými reakčními podmínkami omezit. Reaktanty a vedlejší produkty lze odstranit extrakcí a krystalizací a produkt není nutné již dále přečišťovat (podle ³¹P NMR). Výtěžek byl cca 60 % vzhledem k *p*-nitrobenzylbromidu.



Obrázek 15: Vznik vedlejšího produktu při přípravě NBnPIN bis(nitrobenzyl)fosfinové kyseliny.

^tBu₃do3a·HBr byl připraven alkylací cyklu (1,4,7,10-tetraazacyklododekan) *t*-butylbromacetátem. Při této reakci je nutno použít nadbytek alkylačního činidla, aby nevznikal disubstituovaný vedlejší produkt ^tBu₂do2a, který se od trisubstituovaného obtížně odstraňuje. Bohužel tím dochází ke vzniku tetrasubstituovaného vedlejšího produktu ^tBu₄dota, který znatelně snižuje výtěžek reakce (na cca 40 % vzhledem k H₃do3a). ^tBu₄dota lze od produktu snadno odstranit extrakcí do toluenu.

Hydrolyza ^tBu₃do3a·HBr proběhla kvantitativně. Látka **VIII** byla připravena Mannichovou kondenzací (modifikací publikovaného postupu⁴⁹). Tato reakce spočívá v adici nukleofilu, kyseliny 4-nitrobenzylfosfinové, na iminiovou částici, která se generuje ze sekundárního aminu, H₃do3a, paraformaldehydem. Směs byla refluxována přes noc v azeotropické kyselině chlorovodíkové za míchání při 100 °C. Paraformaldehyd byl přidáván v několika dávkách, aby bylo dosaženo plné substituce. Silný katex v H⁺ cyklu byl použit k oddělení dusíkatých látek od nedusíkatých látek. Silný anex v acetátovém cyklu byl použit k oddělení silných kyselin od slabých (látky obsahující P–OH a látky mající pouze –COOH). Látka byla izolována ve formě H₄do3ap^{NBn}·2,5HCl·3H₂O s výtěžkem cca 56 % vzhledem k ^tBu₃do3a·HBr.



Obrázek 16: Příprava H₄do3ap^{NBn}.

Látka **IX** byla připravena podle literatury⁴⁹ a to katalytickou redukcí na Pd/C výchozího nitroderivátu **VIII**. Výtěžek látky **IX** ve formě H₄do3ap^{ABn}·3HCl·2H₂O byl cca 50 % vzhledem k H₄do3ap^{NBn}. Infračervená spektra budou diskutována v kapitole 5.2.1.

5.1.3 Příprava cílové látky L_4-C

Příprava $H_4do3ap^{IBn} \cdot 4HCl$ byla provedena modifikací publikovaného postupu⁴⁵. V dvoufázové reakční směsi je jednou z fází vodný roztok kyseliny H_4do3ap^{ABn} , druhou fází je roztok thiofosgeny v chloridu uhličitém. Úprava pH na hodnotu 2 u vodné části je nutná pro omezení rozkladu kyseliny H_4do3ap^{ABn} a k optimalizování reakčních podmínek. Roztok thiofosgeny v chloridu uhličitém byl přidán naráz a důležité bylo obě fáze, vodnou i organickou, co možná intenzivně a efektivně promíchat. Toho bylo dosaženo tím, že baňka s reakcí byla nakloněna a zároveň umístěna nesymetricky k míchačce. Doba reakce je řádově desítky minut a závisí hlavně na intenzitě promíchávání reakční směsi. Isothiokyanáty tohoto typu jsou však hydrolyticky nestálé ve vodném prostředí, proto byla látka X připravována vždy bezprostředně před konjugací s kalix[4]arenem.

Roztok H_4do3ap^{IBn} ve vodě byl v nadbytku pomalu přidáván v několika částech k roztoku NH_2KC4A , aby bylo při výsledné konjugaci dosaženo co možná plné substituce kalix[4]arenu. Po každém přidavku bylo upraveno 10% roztokem NMe_4OH na pH 7–8, což je pH optimum této reakce. Při úpravě pH se mezi hodnotou 4–5 vytvoří sraženina, která se další úpravou rozpustí. Reakce probíhala za mírně zvýšené teploty (40 °C). Ultrafiltrace byla použita jako separační technika k odstranění solí a dimeru látky IX , který vzniká v nezanedbatelném množství z aktivní molekuly X , nejprve hydrolyzou –NCS skupiny na –NH₂ skupinu a následně reakcí tohoto aminu s další ještě nezhydrolyzovanou molekulou aktivní látky X .

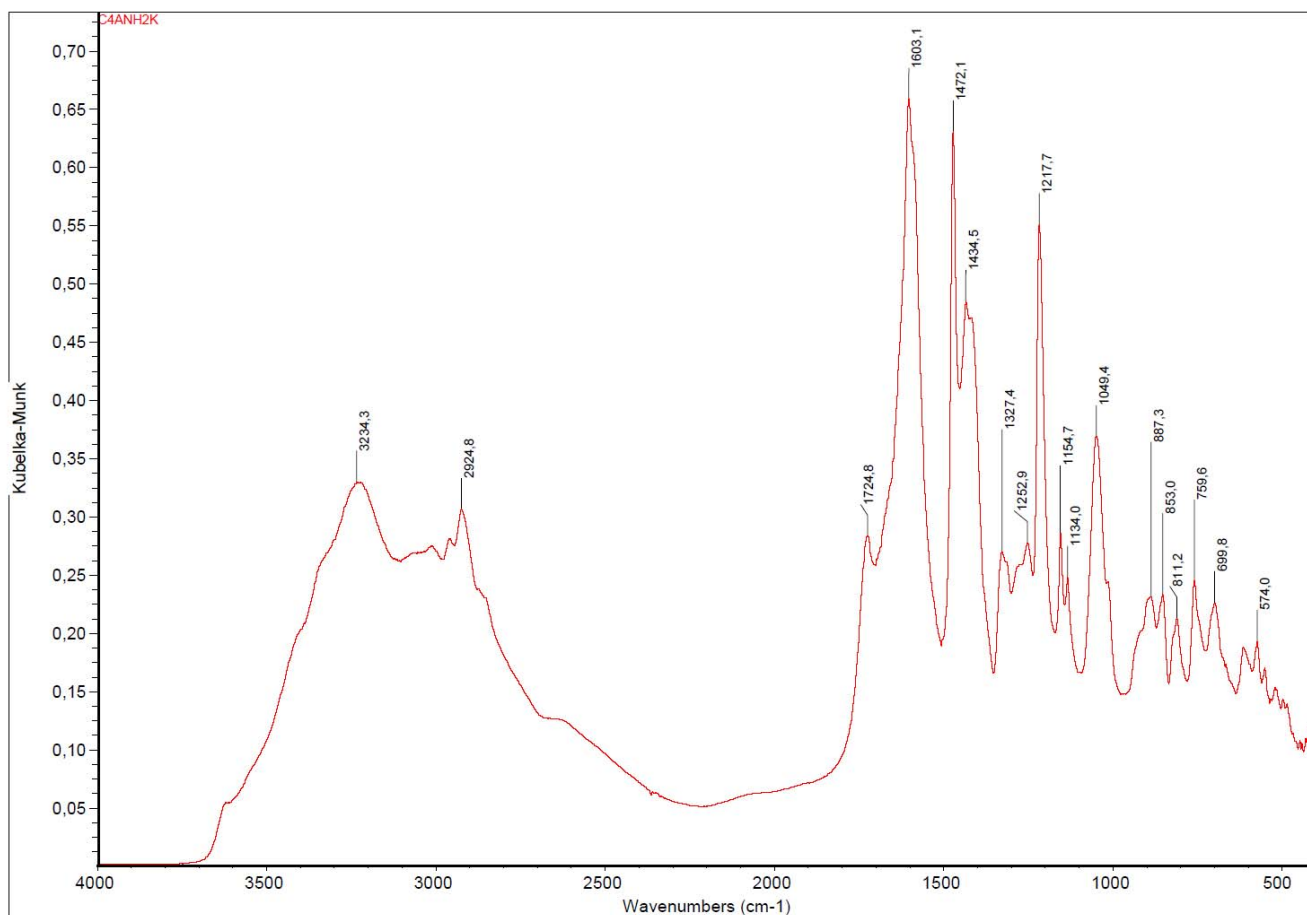
V posledním reakčním kroku přípravy ligandu L_4C bylo pH upravováno 10% roztokem NMe_4OH na pH 7–8 a molekula tedy s velkou pravděpodobností obsahuje několik tetramethylamoniových kationtů a molekul vody, což potvrzuje elementární analýza látky L_4C .

5.2 Charakterizace cílové sloučeniny L₄-C

5.2.1 DRIFTS spektroskopie

Spektroskopie v infračervené oblasti byla použita k charakterizaci látek NH₂KC4A a H₄do3ap^{ABn}. U látky NH₂KC4A pomohla vyřešit, zda se látka v pevném stavu nachází ve formě kationtu, aniontu, případně „zwitter-iontu”. Důležité bylo přiřazení signálů především aminových a acetátových skupin.

Infračervené spektrum látky NH₂KC4A·2NH₃·2,5H₂O měřené metodou DRIFTS je na *obrázku 17*.



Obrázek 17: IR DRIFTS spektrum látky NH₂KC4A. (Wavenumbers = vlnčet v jednotkách cm⁻¹).

V případě přítomnosti deprotonované formy aminových skupin u NH₂KC4A, by měla být antisymetrická valenční vibrace –NH₂ v oblasti 3550–3330 cm⁻¹ a symetrická valenční vibrace v oblasti 3450–3250 cm⁻¹. V případě protonované formy by se měla

valenční vibrace $-\text{NH}_3^+$ projeviti difúzní absorpcí v širokém rozmezí mezi $3200\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ s mnoha submaximami jako důsledek existence vodíkových vazeb mezi skupinami $-\text{NH}_3^+$ a COO^- . V oblasti kolem 2150 cm^{-1} by se měl nacházet středně silný pás kombinační frekvence (antisymetrická deformační a torsní vibrace $-\text{NH}_3^+$) typický pro spektra iontů se skupinami $-\text{NH}_3^+$, který se nazývá indikátorový⁵³. Podle výše uvedeného je pravděpodobná spíše přítomnost protonizované formy $-\text{NH}_3^+$, viz. *tabulka 1*.

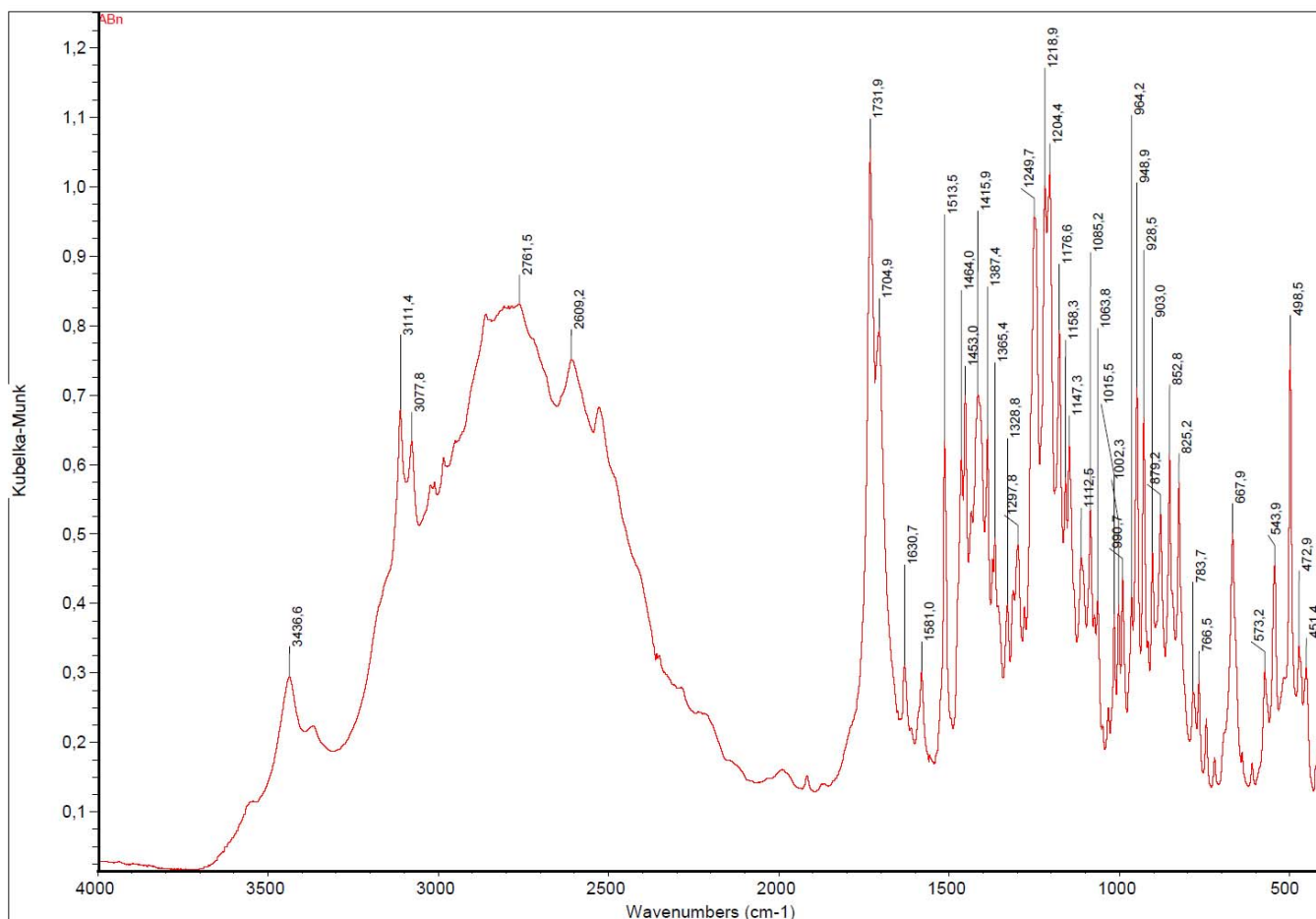
Dále byl očekáván pás vazby $-\text{COOH}$ s vlnočtem přibližně 1750 cm^{-1} . V této oblasti se však ve spektru žádný pás nevyskytoval. Kalix[4]aren se tedy v pevném stavu musí nacházet v deprotonované formě $-\text{COO}^-$. Vlnočti antisymetrické valenční vibrace $1610\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ této vazby je v porovnání s protonovanou formou výrazně nižší⁵³. Vibrace s vlnočtem 1730 cm^{-1} může patřit $\nu(\text{C}=\text{O})$ karbonylu. Přehled frekvencí jednotlivých skupin nalezených ve spektru odpovídajících vibračním pásům podle literatury je uveden v *tabulce 1*.

Tabulka 1: Hodnoty teoretických pásů valenčních vibrací a odpovídajících frekvencí nalezených ve spektru látky $\text{NH}_2\text{KC4A}$ na *obrázku 17*.

	valenční vibrace [cm^{-1}] ⁵³		odpovídající frekvence ve spektru [cm^{-1}]
	antisymetrické	symetrické	
$-\text{NH}_2$	3550–3330	3450–3250	
$-\text{NH}_3^+$	3200–2400		3235–2925
$-\text{COOH}$	1750		
$-\text{COO}^-$	1610–1550		1605

Látka $\text{NH}_2\text{KC4A}$ v pevném stavu se tedy zřejmě vyskytuje ve formě „zwitteriontu”⁴⁸.

Infračervené spektrum látky $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{ABn}} \cdot 3\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ měřené metodou DRIFTS, které je na *obrázku 18*, mělo objasnit zda se látka vyskytuje ve formě kationtu, aniontu nebo „zwitter-iontu” a také zda se ve spektru vyskytují signály P=O vazeb.



Obrázek 18: IR DRIFTS spektrum látky $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{ABn}} \cdot 3\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. (Wavenumbers = vlnočety v jednotkách cm^{-1}).

U látky $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{ABn}} \cdot 3\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ je zřejmě naopak ve spektru protonizovaná forma $-\text{COOH}$ podle vibrace s vlnočtem přibližně 1750 cm^{-1} , protože antisymetrické valenční vibrace deprotonované formy $-\text{COO}^-$ $1610\text{--}1550 \text{ cm}^{-1}$ se ve spektru nevyskytují.

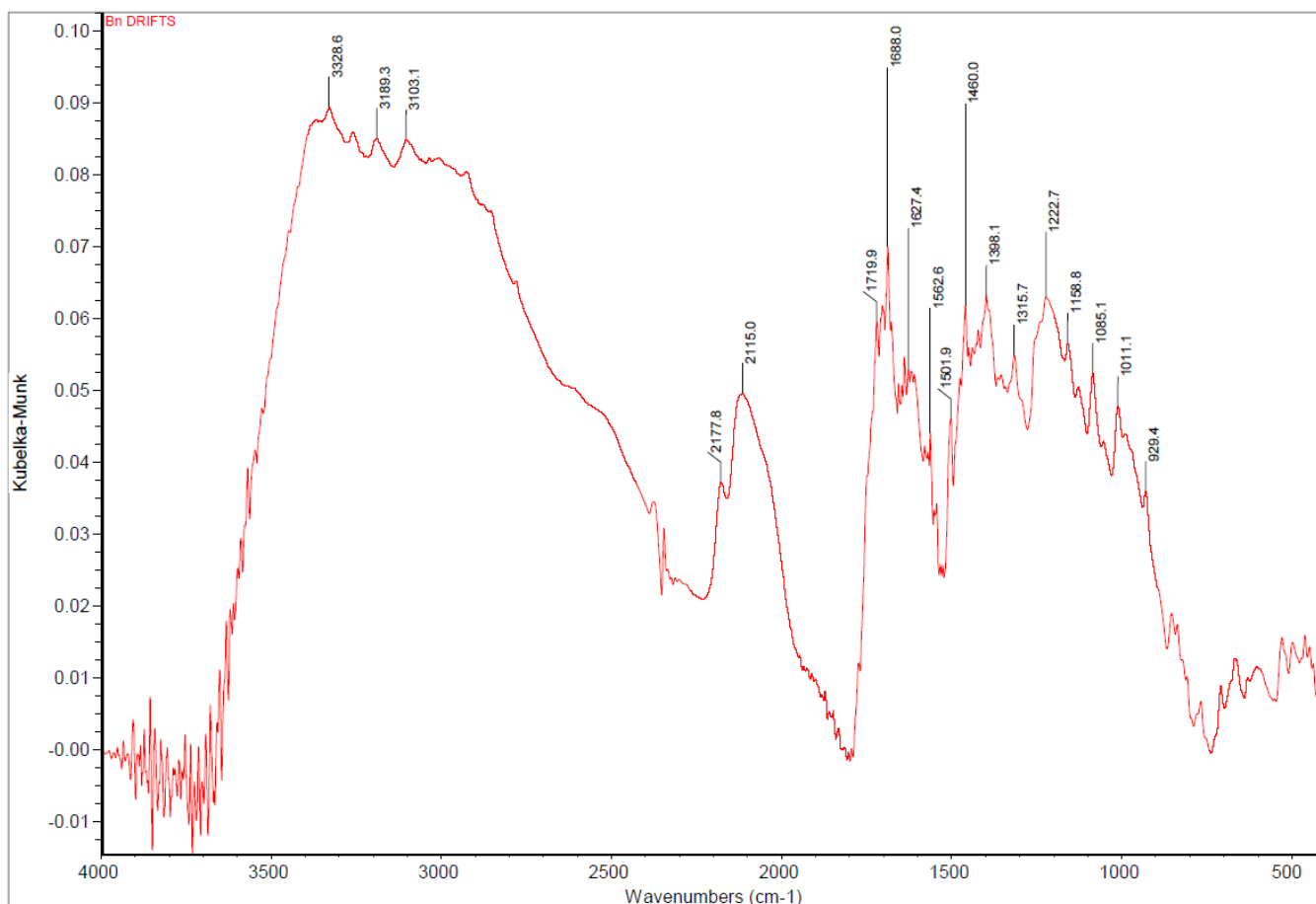
Z hodnot antisymetrické valenční vibrace deprotonované formy $-\text{NH}_2$ v oblasti $3550\text{--}3330 \text{ cm}^{-1}$ a symetrické valenční vibrace v oblasti $3450\text{--}3250 \text{ cm}^{-1}$ nebo z hodnot valenční vibrace protonované formy $-\text{NH}_3^+$, která by se měla projevit absorpcí v rozsahu mezi $3200\text{--}2400 \text{ cm}^{-1}$ s mnoha submaximami, které jsou důsledkem vodíkových vazeb mezi skupinou $-\text{NH}_3^+$ a skupinami COO^- , nelze jednoznačně určit v jaké formě se v této látce $-\text{NH}_2$ nachází, ale lze očekávat, že je celá molekula protonizovaná.

Valenční vibrace vazby $\nu(\text{P}=\text{O})$ ve fosfinové kyselině ev. aniontu by měla být $1190\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$, zde je možné, že vibrace 1205 cm^{-1} by ještě mohla spadat do tohoto pásu. Vibrace s vlnočtem 1730 cm^{-1} může patřit valenční vibraci $\nu(\text{C}=\text{O})$ karbonylu⁵³. Přehled nalezených frekvencí ve spektru je shrnut v *tabulce 2*.

Tabulka 2: Hodnoty teoretických pásů valenčních vibrací a odpovídajících frekvencí nalezených ve spektru látky $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{ABn}}$ na *obrázku 18*.

	valenční vibrace [cm^{-1}] ⁵³		odpovídající frekvence ve spektru [cm^{-1}]
	antisymetrické	symetrické	
$-\text{NH}_2$	3550–3330	3450–3250	3440
$-\text{NH}_3^+$	3200–2400		3110–2550
$-\text{COOH}$	1750		1730
$-\text{COO}^-$	1610–1550		
$\text{P}=\text{O}$	1190–1140		1175–1145 (1205)
$\text{C}=\text{O}$	1730		1730

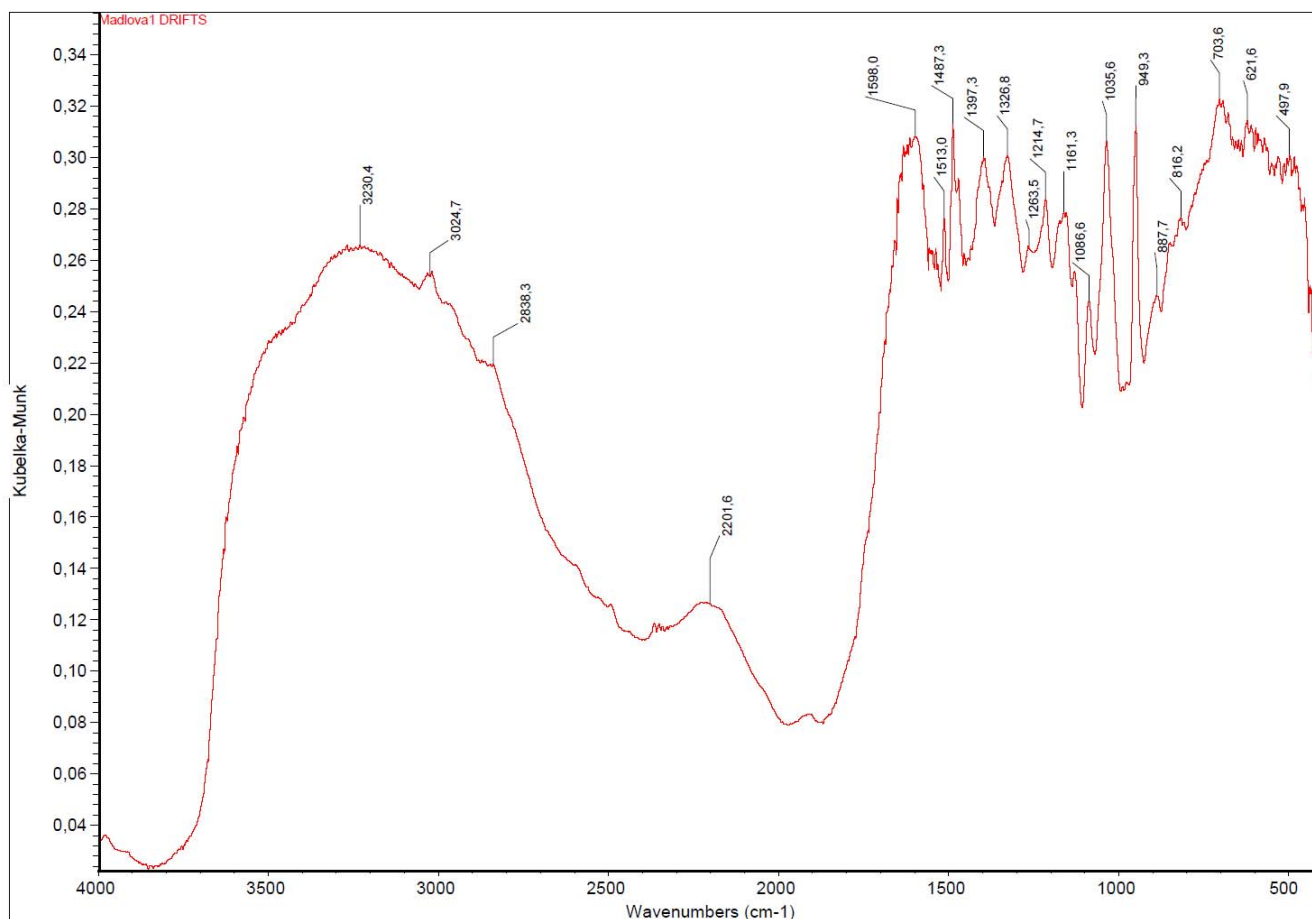
Infračervené spektrum látky $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{IBn}} \cdot 4\text{HCl}$ měřené metodou DRIFTS, které je na *obrázku 19*, mělo hlavně potvrdit výskyt $-\text{NCS}$ skupiny.



Obrázek 19: IR DRIFTS spektrum látky $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{IBn}}$. (vlnočet v jednotkách cm^{-1}).

Isothiokyanáty jsou lineární molekuly a proto se podle jejich symetrie objeví ve spektru volného iontu absorpční pásy valenční asymetrické vibrace přibližně kolem 2100 cm^{-1} . Výrazná vibrace ve spektru při 2115 cm^{-1} přítomnost $-\text{NCS}$ skupiny potvrzuje.

Na infračerveném spektru konjugátu $[N(CH_3)_4]^+_{11}HL_4C \cdot 19H_2O$ měřené metodou DRIFTS, viz. *obrázek 20*, mělo být zjištěno zda se tu vyskytuje tzv. „thioureidový” pás a také přítomnost signálů P–O vazeb jako u předchozích spekter.



Obrázek 20: IR DRIFTS spektrum látky L_4C . (Wavenumbers = vlnočet v jednotkách cm^{-1}).

Tzv. „thioureidový” pás má hodnoty frekvencí deformačních vibrací v rozmezí $1600–1500\text{ cm}^{-1}$, což odpovídá ve spektru pásu frekvencí $\nu(-N(CS)N-)$ okolo 1600 cm^{-1} .

Oblast výskytu vibrace C=S vazby ve spektrech není možné pro její necharakterističnost určit. U látky L_4C ze spektra můžeme usuzovat, že se látka v pevném stavu vyskytuje s deprotonizovanými $-COO^-$ skupinami. Valenční vibrace vazby $\nu(P=O)$ se u látky L_4C samozřejmě vyskytují také a měly být v oblasti $1190–1140\text{ cm}^{-1}$.

Vzhledem ke komplikovanosti spektra nebylo možné jednotlivé pásy jednoznačně přiřadit a *tabulka 3* je pouze orientační.

Tabulka 3: Hodnoty teoretických pásů valenčních vibrací a odpovídajících frekvencí nalezených ve spektru látky L₄C na *Obrázku 20*.

	valenční vibrace [cm ⁻¹] ⁵³		odpovídající frekvence ve spektru [cm ⁻¹]
	antisymetrické	symetrické	
-NH ₂	3550–3330	3450–3250	okolo 3230
-NH ₃ ⁺	3200–2400		3230–2840
-COOH	1750		
-COO ⁻	1610–1550		okolo 1600
P=O	1190–1140		1160
C=O	1730		
-N(CS)N-	1600–1500		okolo 1600

Z elementární analýzy byla předpokládána přítomnost tetramethylamoných kationtů nasorbovaných na molekule konjugátu. V methylamoniových iontech se pásy valenčních vibrací skeletů C₄N⁺ vyskytují v oblasti 1000 a 750 cm⁻¹ a deformační v oblasti pod 460 cm⁻¹. Methylskupiny vázané na tento atom dusíku mají neobvykle velkou hodnotu frekvencí valenčních vibrací vazeb C–H, které se nacházejí mezi 3020 a 2920 cm⁻¹. Pásy deformační vibrace skupin CH₃N⁺ jsou lokalizovány v oblasti mezi 1485 až 1395 cm⁻¹ a pás symetrické deformační vibrace leží v oblasti mezi 1400 cm⁻¹ a je významně charakteristický. Pásy rocking vibrací skupin CH₃N⁺ se nacházejí v oblasti 1260–900 cm⁻¹.

V případě tak velké molekuly jako je L₄C jsou malé šance na přesnější přiřazení vibračních pásů a tak je měření spíše orientační. Porovnáním spekter měřených látek jsou zde však dobře pozorovatelné hlavní strukturní změny v molekule.

5.2.2 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla použita pro určení toho, zda se cílová látka L₄C vyskytuje v roztoku po ultrafiltraci jako jeden typ molekuly.

Při „Size Exclusion” chromatografii byl použit jako mobilní fáze acetátový pufr o pH 6,5, které bylo zvoleno s ohledem na nestabilitu cílové sloučeniny v kyselém prostředí. Na chromatogramu byl pozorován jeden symetrický pík, který nám potvrzuje že jde o konjugát, který neobsahuje ani jednu z výchozích látek.

Dalším experimentem byla optimalizace metody pro stanovení konjugátu L₄C na koloně s reverzní fází Luna C8, Luna Phenyl/Hexyl nebo XTerra RP8. Nejlepší retenční časy byly dosaženy na koloně Luna C8 a u té byla jako vhodná zvolena gradientová eluce při gradientu 05/50/45–50/50/0 (MeCN/0,1% TFA v H₂O/H₂O). Na chromatogramu při retenčním čase $t_R = 3,8$ minut je jeden majoritní pík odpovídající molekule L₄C, jejíž identita byla určena pomocí MS odebráním vzorku. Frakce obsahující tento pík byla jímána a následná hmotnostní analýza potvrdila, že se jedná o látku L₄C. V chromatogramu byly patrné také minoritní nepolární nečistoty, které nebyly identifikovány.

Detekce byla prováděna při dvou vlnových délkách: při $\lambda = 210$ nm, kde absorbuje velká většina látek včetně aromatického jádra, kde ovšem absorbuje i kyselina octová z acetátového pufru a proto byla u experimentu na SEC použita $\lambda = 230$ nm, a při $\lambda = 289$ nm kde absorbují kalix[4]areny a konjugáty.

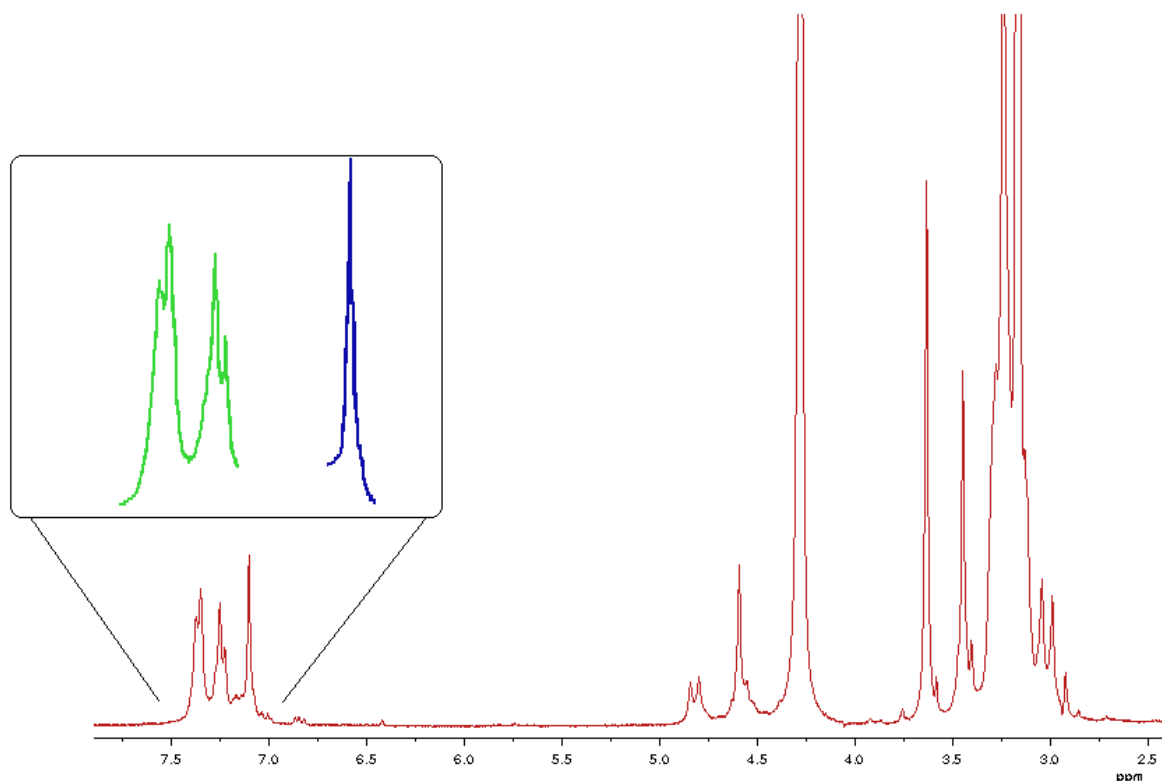
5.2.3 NMR

NMR zůstává pro látku L₄C hlavní charakterizační metodou.

V ¹H NMR spektru kalix[4]arenové části, tedy látky **V**, byly pozorovány tři signály. Dva signály odpovídající skeletu kalix[4]arenu, a to dublet dubletů můstkových methylenových skupin, jejichž vodíkové atomy nejsou ekvivalentní a singlet aromatických atomů vodíků, které ekvivalentní jsou. Třetím signálem by měl být singlet skupiny –OCH₂COOH na „dolním“ kruhu. Ve spektru se vyskytuje i druhá sada signálů, jež odpovídá komplexu NH₂KC₄A s kationty sodíku, které jsou přítomné v destilované vodě nebo ve skle, což bylo potvrzeno pomocí ¹H NMR spektroskopie v diplomové práci P. Němečkové⁴⁸. Kalix[4]areny jsou tedy velmi dobrými ligandy pro komplexaci sodných iontů¹⁷.

V ¹H NMR spektru makrocyclické části, tedy látky **IX**, byly pozorovány signály odpovídající skeletu makrocycly, kde by měly být dva široké multiplety zahrnující vodíky na skeletu makrocycly a dva „singlety“ skupin –NCH₂COOH mající intenzitu 1:2 a téměř stejný chemický posun. Další čtyři signály odpovídají pendantnímu ramenu s aromatickým kruhem. Dva multiplety v oblasti aromatických vodíků, které patří čtyřem neekvivalentním vodíkům, a signály vodíků na methylenových skupinách sousedících s atomem fosforu, které jím jsou štěpené na dublet.

V ^1H NMR spektru L_4C , viz. *obrázek 22*, jsou hlavními charakterizačními signály ty v aromatické části spektra, které náležejí čtyřem atomům vodíku na každém makrocyclickém pendantu (celkem 16H-multiplet) a osmi ekvivalentním atomům vodíku na kalix[4]arenovém skeletu, které dávají jeden singlet. Poměr těchto aromatických signálů je dva ku jedné, což značí plnou substituci kalix[4]arenu. ^1H NMR spektrum bylo měřeno při 80 °C, aby signál vody nepřekrýval signál $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ „dolního“ kruhu kalix[4]arenu, a celkově aby se zlepšilo rozlišení piků ve spektru.



Obrázek 22: ^1H NMR spektrum látky $\text{L}_4\text{-C}$, měřené při 80 °C (signály označené zeleně patří makrocyklu, signál označený modře kalix[4]arenu).

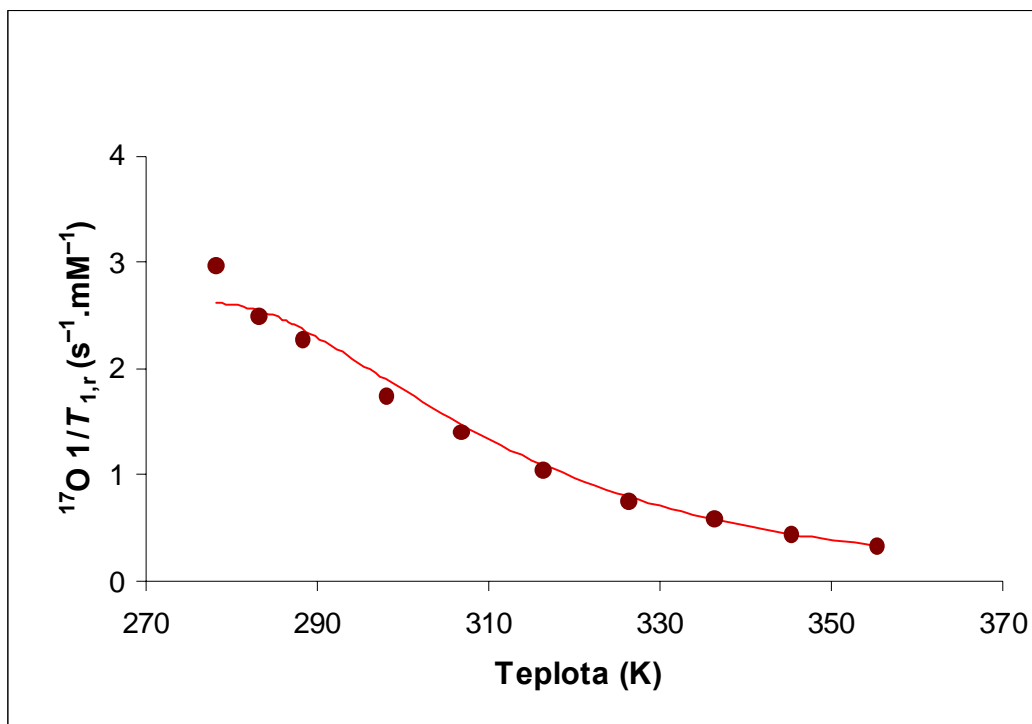
5.3 Relaxometrická studie

5.3.1 Příprava komplexů

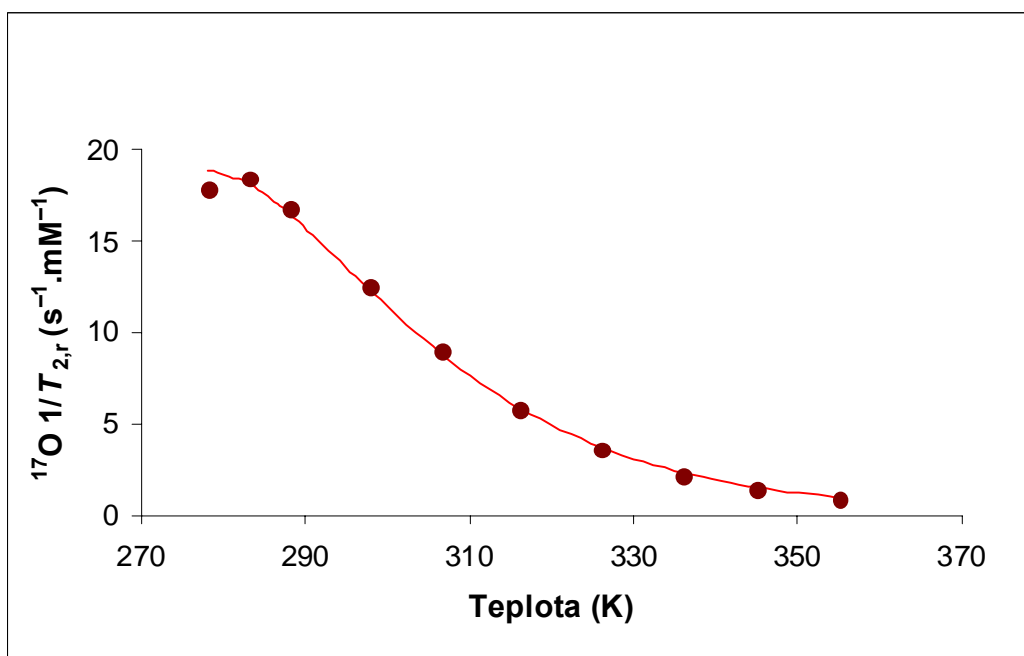
K ligandu L_4C ve vodném roztoku bylo přidáno ekvivalentní množství chloridu lanthanoidu (poměr 1:4). Vzhledem k předchozím výsledkům M. Sklenářové⁵⁴ je zapojení dolního kruhu kalix[4]arenového skeletu do komplexace ve vodném roztoku nepravděpodobné. pH bylo upraveno na hodnotu 7, což je pH optimum pro zakomplexování kovu lanthanoidu. Vzhledem k přítomnosti zbytku kyseliny fosfinové v molekule, který komplexaci urychluje je rychlost komplexace poměrně vysoká a celý proces je při teplotě 40 °C ukončen během hodiny. Pro zamaskování volného lanthanoidu byla přidána disodná sůl H_4edta a pH bylo znovu upraveno na 7, aby se vzniklé komplexy změnou pH nerozpadly. Přítomnost volného kovu byla zkontrolována pomocí xylenolové oranže. K odstranění solí, volné H_4edta a zamaskovaného lanthanoidu byla použita ultrafiltrace.

5.3.2 Určení parametrů τ_R , τ_M , T_{1e} a r_l u $(GdL)_4-C$

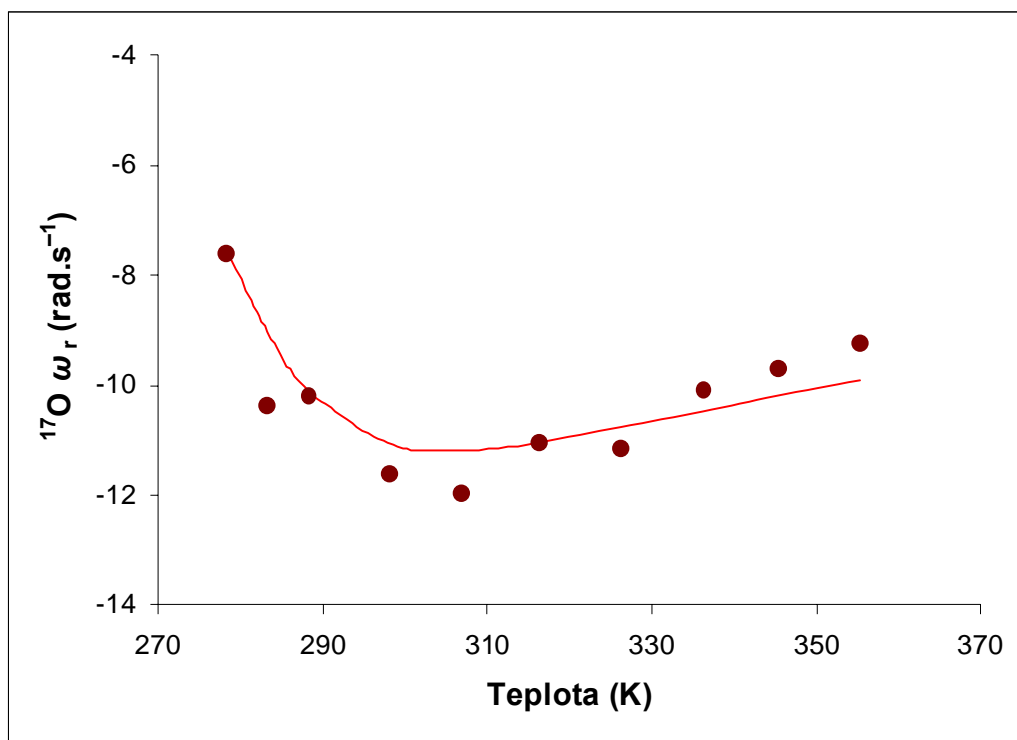
Na studovaném komplexu L_4C s Gd^{3+} byl naměřen set ^{17}O NMR dat v závislosti na teplotě (^{17}O T_1 a ^{17}O T_2 relaxační časy a ^{17}O angulární frekvence ω). Příprava komplexu a referentního vzorku jsou uvedeny v kapitole 4.4.3. Chemické posuny ^{17}O (54.22 MHz) byly měřeny standardní pulzní sekvencí s 90° pulzem. Závislosti redukovaných relaxačních časů $T_{1,r}$ a $T_{2,r}$ a angulárních frekvencí ω_r na teplotě jsou uvedeny v grafech níže **Obrázek 23–25**. Faktor P_m byl spočten z extrapolací poměru $Ln:H_2O$ 1:1 a je nezbytný pro redukci T_1 a T_2 relaxačních časů. Vynesené experimentální body byly získány po odečtení odpovídajících hodnot pro vodu jako referenci.



Obrázek 23: Závislost $^{17}\text{O } 1/T_{1,r}$ relaxační rychlosti na teplotě pro komplex $(\text{GdL})_4\text{-C}$. (400 MHz, pH 7)



Obrázek 24: Závislost $^{17}\text{O } 1/T_{2,r}$ relaxační rychlosti na teplotě pro komplex $(\text{GdL})_4\text{-C}$. (400 MHz, pH 7)



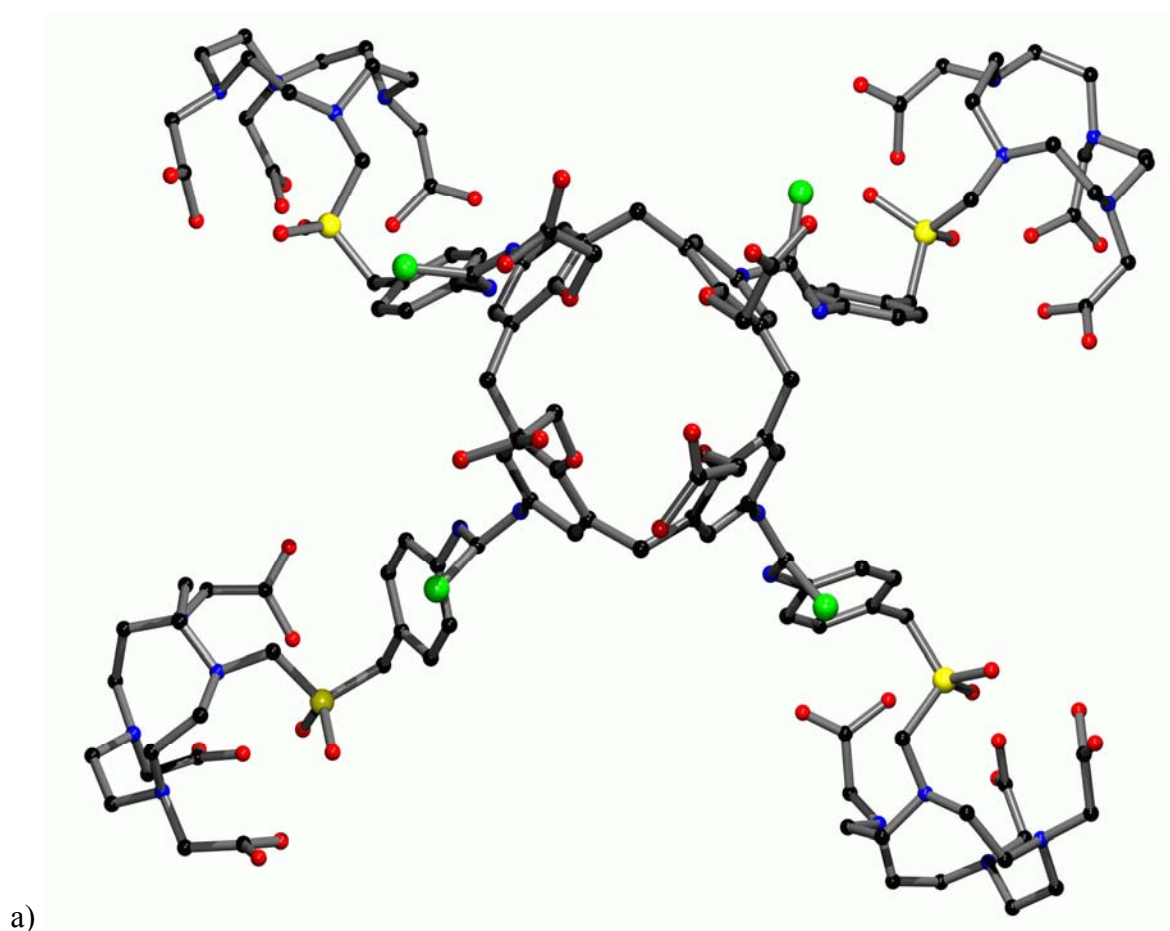
Obrázek 25: Závislost $^{17}\text{O } \omega_r$ na teplotě pro komplex $(\text{GdL})_4\text{-C}$. (400 MHz, pH 7)

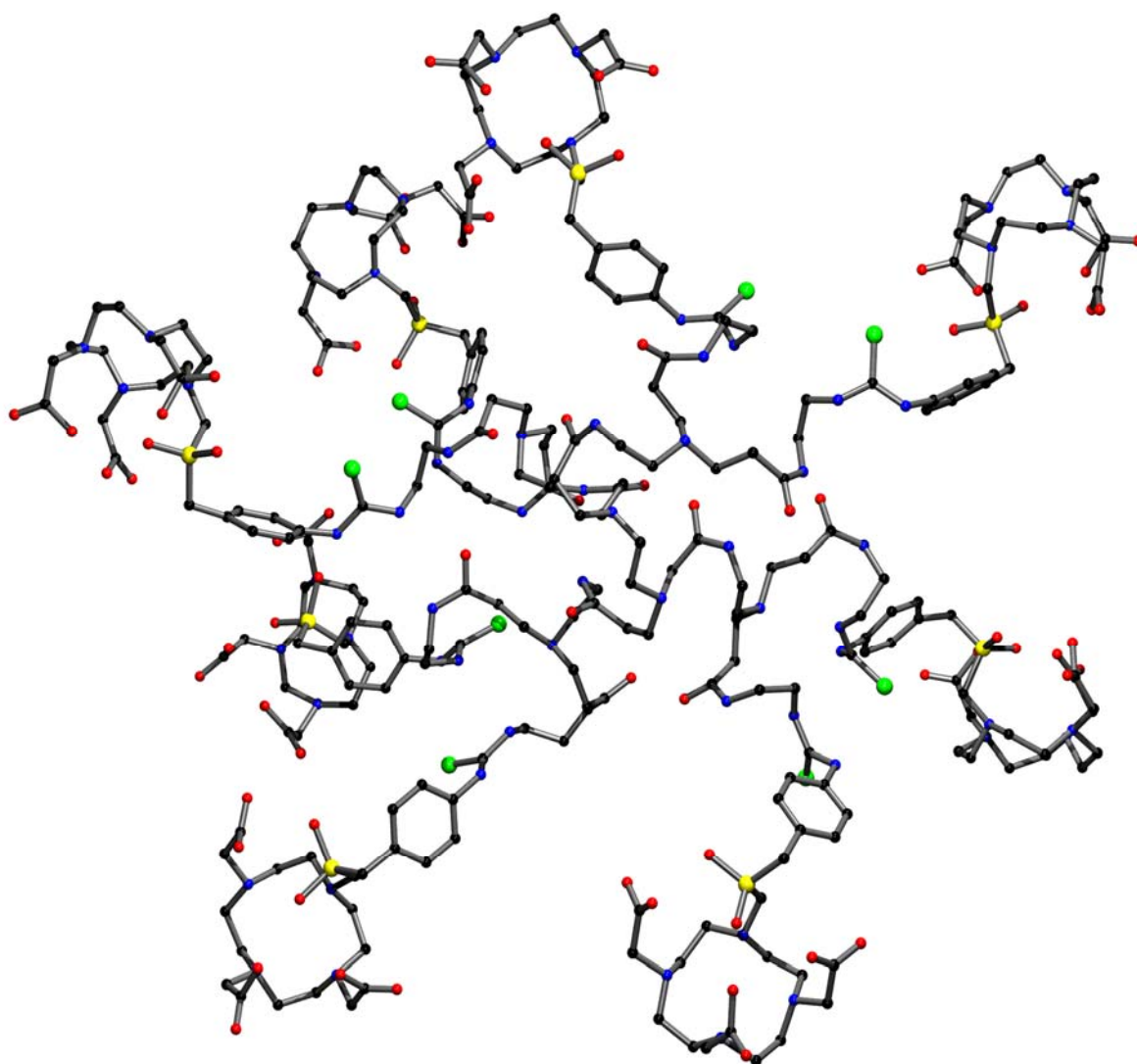
Zpracování naměřených hodnot bylo provedeno pomocí modelu Lipari-Szabo (uvedený v **Příloze**), protože v tomto případě nelze použít model SBM, který se používá běžně pro nízkomolekulární komplexy. Na rozdíl od SBM modelu rozlišuje teorie Lipari-Szabo rotační korelační čas celé molekuly (zde označovaný jako globální) a lokální rotační korelační čas, který charakterizuje vnitřní pohyb a je typický pro ne zcela rigidní sloučeniny, jakými jsou například větší konjugáty. V modelu byla fixována řada parametrů na hodnoty určené pro molekuly podobné struktury, neboť je nelze z dostupných dat přesně stanovit. Hodnoty významných parametrů komplexu $(\text{GdL})_4\text{-C}$ určené matematickým zpracováním dat dle modelu Lipari-Szabo jsou uvedeny v **tabulce 4** a jsou porovnány s parametry konjugátu na bázi PAMAM dendrimeru 1. generace s osmi navázanými makrocyclickými ligandy, $(\text{GdL})_8\text{-G1}$. Celkový set parametrů komplexu $(\text{GdL})_4\text{-C}$ je poté uveden v **tabulce 5** v příloze.

Tabulka 4: Výsledky simultánního matematického zpracování ^{17}O NMR dat pomocí modelu Lipari-Szabo. (400 MHz, pH 7)

Parametr	Název parametru	Hodnota pro (GdL) ₄ -C	Hodnota pro (GdL) ₈ -G1
τ_M [ns]	<i>rezidenční čas molekuly vody</i>	54	48
τ_{R1} [ns]	<i>lokální rotační korelační čas</i>	0.337	0.115
τ_{Rg} [ns]	<i>globální rotační korelační čas</i>	1.1	1.56
RLS	<i>faktor rigidity</i> <small>rozsah 0-1, 1 = zcela rigidní</small>	0.58	0.25
r_1 [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	<i>relaxivita</i>	16.4	14.8

Rezidenční čas koordinované molekuly vody je u studovaného komplexu srovnatelný s komplexem dendrimera a stále se pohybuje v optimálním rozsahu hodnot. Globální rotační korelační čas je výrazně kratší, což je v souladu s menší velikostí komplexu (GdL)₄-C, jak je patrné ze simulace velikostí ligandů uvedené na **Obrázku 26**.





b)

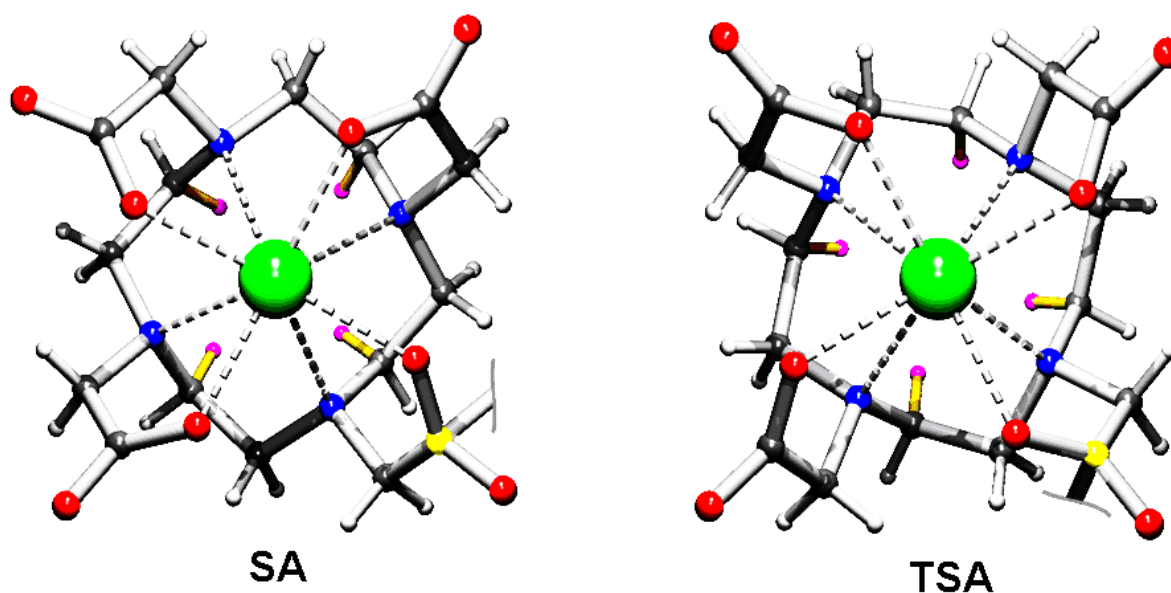
Obrázek 26: Srovnání velikostí ligandů *a)* $(L)_4-C$ a *b)* $(L)_8-G1$.

Struktura byla optimalizována pomocí programu HyperChem®.

Lokální korelační čas je naopak v našem případě delší a potvrzuje tak mnohem větší rigiditu konjugátu $(GdL)_4-C$, která je důsledkem malé flexibility kalix[4]arenu oproti PAMAM dendrimeru. Spočtený faktor rigidity *RLS*, který udává míru zakázanosti lokálního pohybu, poté tuto malou flexibilitu potvrzuje, neboť jeho hodnota je výrazně vyšší než u konjugátu $(GdL)_8-G1$. Výsledkem takto optimálně nastavených parametrů je uvedená vysoká hodnota relaxivity, neboli účinnosti studovaného konjugátu jako potenciální kontrastní látky.

5.3.3 Určení izomerie komplexu v roztoku

Informace o struktuře komplexu $(YbL)_4-C$ v roztoku poskytla 1H NMR spektra. Ve spektrech těchto komplexů dochází díky přítomnosti paramagnetického iontu k výraznému zvětšení hodnot chemických posunů jednotlivých jader. Tento jev se nazývá lanthanoidem indukovaný posun. Díky němuž lze rozlišit jednotlivé signály a přiřadit je k příslušným izomerům. Stejně jako u komplexu $Yb-dota^{55}$, nalézáme v 1H NMR spektru $(YbL)_4-C$ komplexu signály příslušející SA a TSA izomerům. Integrací signálů příslušejících atomům vodíku, které se nachází nejbliže k lanthanoidu, viz. *obrázek 27*, bylo možno odhadnout poměr zastoupení SA a TSA v roztoku. Stejně jako u komplexu $Yb-H_4do3ap^{ABn}$ je poměr SA : TSA u látky $(YbL)_4-C$ 4 : 3. Z tohoto plyne, že poměr izomerů se po konjugaci nemění.



Obrázek 27: Izomery SA a TSA v komplexech ligandu typu dota s ionty lanthanoidů.

6 Závěr

V této diplomové práci byla popsána příprava nového konjugátu kalix[4]arenu s makrocyclickým ligandem a jeho komplexů s ionty gadolinia a yterbia. Jednotlivé syntetické kroky byly optimalizovány. Meziprodukty a cílová látka L₄-C byly charakterizovány řadou metod. Komplexy byly studovány pomocí relaxometrické studie, podle které je látka (GdL)₄-C vhodná pro použití v MRI. Model Lipari-Szabo byl použit pro zpracování ¹⁷O NMR dat namísto modelu SBM, protože rozlišuje rotační korelační čas celé molekuly a lokální rotační korelační čas charakterizující její vnitřní pohyb. Tento model je vhodnější pro látky typu konjugátu L₄-C. Z porovnání hodnot významných parametrů komplexu (GdL)₄-C s parametry konjugátu na bázi PAMAM dendrimera (GdL)₈-G1 byl u komplexu (GdL)₄-C zjištěn vysoký stupeň rigidity molekuly a vysoká hodnota milimolární relaxivity. To vše jednoznačně řadí tuto látku do skupiny potenciálních kontrastních látek pro MRI.

7 Seznam použitých zkratek a symbolů

AAS	atomová absorpční spektroskopie
B.M.	Bohrův magneton
BMS	Bulk Magnetic Susceptibility Shift
bs	široký singlet (tvar multipletu v NMR spektru)
b.t.	bod tání
CT	Computerized Tomography
δ_x	chemický posun signálu (NMR spektrum); bezrozměrná veličina udávána v jednotkách ppm
δ	deformační vibrace (infračervené spektrum), [cm^{-1}]
d	dublet (tvar multipletu v NMR spektru)
dd	dublet dubletů (tvar multipletu v NMR spektru)
DE	dichlormethan : ethanol
DMSO	dimethylsulfoxid
DRIFT	difúzní reflexe (metoda měření infračervených spekter)
ekv.	ekvivalent
ESI MS	hmotnostní spektrum získané pomocí ionizace elektrosprejem
Et ₃ do3a	triethylester-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,4,7-trioctové kyseliny
FTIR	Fourier transform infrared (spectroscopy)
(GdL) ₄ -C	komplex cílového ligandu s gadoliniem
H ₄ do3a	1,4,7-tris(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
H ₄ dota	1,4,7,10-tetrakis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
H ₄ do3ap ^{ABn}	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-aminofenyl) methyl] fosfinová}
H ₄ do3ap ^{IBn}	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-isothiokyanatanofenyl) methyl] fosfinová}
H ₄ do3ap ^{NBn}	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-nitrofenyl) methyl] fosfinová}
H ₅ dtpa	kyselina diethylentriamin pentaoctová
H ₄ edta	kyselina ethylendiamintetraoctová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HE	hexan : ethylacetát
IPAV	isopropanol : amoniak : voda
IPOV	isopropanol : kyselina octová : voda
IR	infračervené (spektrum)
IS	vnitřní sféra
<i>J</i>	interakční konstanta
L ₄ -C	označení cílového ligandu
LD ₅₀	letal dose; dávka, po které 50 % zvířat zahyne
m	multiplet (tvar multipletu v NMR spektru)
MDT	methanol : dichlormethan : triethylamin
MeCN	acetonitril
<i>M_r</i>	relativní molekulová hmotnost
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MS	Mass spectroscopy
<i>m/z</i>	hmotnost částice dělená jejím nábojem (hmotnostní spektrum)
NBnPIN	kyselina 4-nitrobenzylfosfinová
NH ₂ AcC4A	<i>cone</i> -5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(ethoxykarbonyl-methoxy)kalix[4]arenu
NH ₂ KC4A	<i>cone</i> -5,11,17,23-tetraamino-25,26,27,28-tetrakis(karboxyl-methoxy)kalix[4]arenu
NMR	jaderná magnetická rezonance
NMRD	Nuclear Magnetic Relaxation Disperzion
NO ₂ AcC4A	<i>cone</i> -5,11,17,23-tetranitro-25,26,27,28-(ethoxykarbonyl-methoxy)kalix[4]arenu
OS	vnější sféra
PAMAM	poly(amidoamin)
pH	vodíkový exponent
q	kvartet (tvar multipletu v NMR spektru)
RT	laboratorní teplota
RTG	rentgenové záření
RVO	rotační vakuová odparka
s	singlet (tvar signálu v NMR spektru)
SA	Square Antiprism
SEC	Size Exclusion Chromatography

SS	druhá sféra
SPIO	Super Paramagnetic Iron Oxides
t	triplet (tvar multipletu v NMR spektru)
t_R	retenční čas [min.]
terc	terciární
$^t\text{Bu}_2\text{do}2\text{a}$	bis(<i>t</i> -butyl)ester- <i>cis</i> -1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,4-dioctové kyseliny nebo bis(<i>t</i> -butyl)ester- <i>trans</i> -1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,7-dioctové kyseliny
$^t\text{Bu}_3\text{do}3\text{a}$	tris(<i>t</i> -butyl)ester-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,4,7-trioctové kyseliny
$^t\text{Bu}_4\text{dota}$	tetrakis(<i>t</i> -butyl)ester-1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny
$^t\text{BuOHC}4\text{A}$	5,11,17,23-tetrakis(1',1'-dimethylethyl)-25,26,27,28-tetra- hydroxykalix[4]arenu
$^t\text{BuAcC}4\text{A}$	<i>cone</i> -5,11,17,23-tetrakis(1,1-dimethylethyl)-25,26,27,28- tetrakis(ethoxykarbonylmethoxy)kalix[4]arenu
TFA	kyselina trifluorooctová
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná kapalinová chromatografie, Thin Layer Chromatography
TMS	tetramethylsilan
TSA	Twist Square Antiprism
UV/VIS	záření v ultrafialové a viditelné oblasti, Ultraviolet-Visible Spectroscopy
ν	valenční vibrace (infračervené spektrum), [cm^{-1}]
$(\text{YbL})_4\text{-C}$	komplex cílového ligandu s yterbiem

8 Příloha

Hodnoty parametrů v modelu Lipari-Szabo

Tabulka 5: Hodnoty parametrů v modelu Lipari-Szabo, které byly fixovány (podtržené) a ty co byly vypočítány.

Název parametru	Hodnota
<u>TVO</u>	$1,11 \cdot 10^{-11}$
<u>DELTA</u>	$1,60 \cdot 10^{19}$
HM	50887,7036 (51(2)·10 ³)
TMO	$5,37 \cdot 10^{-8}$
ERL	12153,4501 (12(1)·10 ³)
ERG	31676,3363 (32(5)·10 ³³)
TROL	$3,38 \cdot 10^{-10}$
TROG	$1,12 \cdot 10^{-9}$
ACC	-2685342,086 (-2,69(2)·10 ⁶)
<u>RO</u>	$2,50 \cdot 10^{-10}$
<u>RH</u>	$3,10 \cdot 10^{-10}$
<u>N</u>	1
ACC	$3,50 \cdot 10^{-10}$
RLS	0,578329581
<u>KHI</u>	7580000
<u>COUT</u>	0,1
<u>HMSS</u>	20000
<u>TMOSS</u>	$1,00 \cdot 10^{-9}$

Fitování údajů ¹H NMRD profilů a ¹⁷O T₁, T₂ relaxačních časů a chemických posunů
– Lipari-Szabo

// Fit of NMRD and 17O T₁, T₂ and wr data - Lipari-Szabo
// Equations from prof. Aime and prof. Peters modified by Zuzana Kotkova

IndVars: T,B
DepVars:R2O,R1O,dwr
//R1H
Params:
tv0,delta,Hm,tm0,Erl,Erg,tr0l,tr0g,acc,ro,rh,n,a,RLS,khi,Cout,Hmss,tm0ss

// Parameters and variables used

// T - temperature at K
// B - used field at MHz
// R2O - 17O transversal relaxivity at ms⁻¹mM⁻¹
// R1O - 17O longitudinal relaxivity at ms⁻¹mM⁻¹
// dwr - 17O reduced radial frequency difference of bonded and free water at rads⁻¹
// R1H - 1H longitudinal relaxivity at ms⁻¹mM⁻¹
// tv0 - correlation time for instantaneous distortion of the metal coordination polyhedron at 298 K
// delta - D₂ mean squared fluctuation of ZFS
// tm0 - water residence time at 298 K
// Erl - rotation free energy (local motion)
// Erg - rotation free energy (global motion)
// Hm - water exchange free energy
// tr0l - local rotation correlation time at 298 K
// tr0g - global rotation correlation time at 298 K
// acc - hyperfine Gd-O coupling constant A/hbar
// ro - Gd-O distance at m
// rh - Gh-H distance at m
// n - number of water molecules coordinated at Gd
// a - shortest distance from outer sphere to gadolinium - for os contribution
// RLS - degree of spatial restriction of the local motion
// D - diffusion coefficient at 298 K
// khi - term with quadrupolar coupling constant and asymmetry parameter = $c \cdot (1 + (h^2)/3)^{0.5}$
// Cout - outer sphere constant
// nss - number of water molecules at second sphere
// rss - Gd-ss distance
// trss - rotation correlation time of second sphere
// Hmss - water exchange free energy for second sphere contribution
// tm0ss - water residence time at 298 K for second sphere

// Physical constants implicitly used

// p - Ludolf's number ($p = 3.14159265$)
// S - multiplicity of Gd ($S = 3.5$)
// Sz - spin z projection ($Sz = 2*S*(S+1) = 31.5$)
// univ - universal gas constant ($R = 8.31441$)
// mB - Bohr magneton ($mB = 9.274E-24$)
// m0 - vacuum magnetic susceptibility ($m0 = 4\pi E-7$)
// h - Planck constant ($h = 6.626071E-34$)
// hbar - reduced Planck constant ($h/(2\pi) = 1.0546E-34$)
// NA - Avogadro constant ($NA = 6.023E23$)
// k - Boltzman constant ($kB = 1.38066E-23$)
// go - gyromagnetic ratio of ^{17}O ($go = -3.626E7$)
// gh - gyromagnetic ratio of 1H ($gh = 2.675E8$)
// gs - electronic gyromagnetic ratio ($gs = 1.75977E11$)
// ws - Larmor frequency of the Gd^{3+} electron spin
// dg - deviation from the free electron gL value
// g - electron g-factor ($g = 2.0023193043622$)
// C1 = $(1/25)*(4*S*(S+1)-3)$
// C2 = $(1/50)*(4*S*(S+1)-3)$
// C3 = $(1/3)*S*(S+1)$
// C8 = $((3*p^2)/10)*((2l+3)/(l^2(2l-1)))$; $l=5/2$
// C9 = $(2/15)*((gh^2*g^2*mB^2)*S*(S+1)*(m0/(4*p))^2)$
// C10 = $((32*NA*p)/405)*(m0/(4*p))^2*hbar^2*gs^2*gh^2*S(S+1)$

// Notes

// magnetic field is in Larmor frequencies

// Definitions of constants

p=3.14159265
univ=8.31441
gs=1.75977E11
gh=2.675E8
go=-3.626E7
C1=2.4
C2=1.2
C3=5.25
C4=4.7604E-45
C5=3.4274E-59
C6=0.1657
C7=9.5209E-45
C8=0.9475
C9=5.181644E-43
C10=5.796E-19

// Definition of omegas; Larmor frequencies of 1H (wh), ^{17}O (wo) and electron (ws)

wh= $2\pi*1E6*B$
ws= $2\pi*1E6*B*(gs/gh)$
wo= $2\pi*1E6*B*(go/gh)$

// Eyring equations

$$tm = ((tm0 \wedge (-1)) * T / 298.15) * \exp((Hm / univ) * ((1 / 298.15) - (1 / T))) \wedge (-1)$$

$$tmss = ((tm0ss \wedge (-1)) * T / 298.15) * \exp((Hmss / univ) * ((1 / 298.15) - (1 / T))) \wedge (-1)$$

$$trl = ((tr0 \wedge (-1)) * \exp((Erl / univ) * ((1 / 298.15) - (1 / T)))) \wedge (-1)$$

$$trg = ((tr0g \wedge (-1)) * \exp((Erg / univ) * ((1 / 298.15) - (1 / T)))) \wedge (-1)$$

$$tv = ((tv0 \wedge (-1)) * \exp((Ev / univ) * ((1 / 298.15) - (1 / T)))) \wedge (-1)$$

// Electronic relaxation times T1e, T2e - Zero field splitting (ZFS) + spin rotation (SR) term

$$T1e = (C1 * \delta * tv * ((1 / (1 + ws^2 * tv^2)) + (4 / (1 + 4 * ws^2 * tv^2)))) + (dg / (9 * trt)) \wedge (-1)$$

$$T2e = (C2 * \delta * tv * (3 + (5 / (1 + ws^2 * tv^2)) + (2 / (1 + 4 * ws^2 * tv^2)))) + (dg / (9 * trt)) \wedge (-1)$$

// Total correlation times (t - total, l - local, g - global, e - electronic)

$$trt = (trl \wedge (-1) + trg \wedge (-1)) \wedge (-1)$$

$$tc1l = (T1e \wedge (-1) + trt \wedge (-1) + tm \wedge (-1)) \wedge (-1)$$

$$tc2l = (T2e \wedge (-1) + trt \wedge (-1) + tm \wedge (-1)) \wedge (-1)$$

$$tc1g = (T1e \wedge (-1) + trg \wedge (-1) + tm \wedge (-1)) \wedge (-1)$$

$$tc2g = (T2e \wedge (-1) + trg \wedge (-1) + tm \wedge (-1)) \wedge (-1)$$

$$te1 = (T1e \wedge (-1) + tm \wedge (-1)) \wedge (-1)$$

$$te2 = (T2e \wedge (-1) + tm \wedge (-1)) \wedge (-1)$$

// R2 scalar - contact contribution for 17O (R2sO)

$$R2sO = C3 * acc^2 * (te1 + (te2 / (1 + ws^2 * te2^2)))$$

// R2 dipolar - pseudocontact contribution for 17O - Lipari-Szabo (R2dO)

$$d1O = (RLS * tc1g / (1 + wo^2 * tc1g^2)) + ((1 - RLS) * tc1l / (1 + wo^2 * tc1l^2))$$

$$d2O = (RLS * tc2g / (1 + ws^2 * tc2g^2)) + ((1 - RLS) * tc2l / (1 + ws^2 * tc2l^2))$$

$$R2dO = (C4 / (ro^6)) * (7 * d1O + 13 * d2O)$$

// R2 dipolar Curie contribution for 17O (R2cO)

$$R2cO = (C5 * wo^2 / (T^2 * ro^6)) * (4 * trg + 3 * trg / (1 + wo^2 * trg^2))$$

// Total dipolar contribution to R2 of 17O (R2dtO)

$$R2dtO = R2dO + R2cO$$

$$R2dtO = R2dO$$

// Total T2 relaxation time (T2mO)

$$T2mO = (R2sO + R2dtO) \wedge (-1)$$

$$T2mO = (R2sO) \wedge (-1)$$

// Radial frequency difference of bound and free water at rad/s (dwm)

$$dwm = (C6 / T) * acc * B$$

// Overall reduced T2 relaxation of 17O (R2O)

$$// T2r = \ln(\text{fract} / tm)$$

$$// R2O = pm * \text{fract} / tm$$

// Overall reduced T1 relaxation of 17O - Lipari-Szabo (R1O; consists of dipolar, R1dO, and quarupolar, R1qO, terms)

$$// R1dO = (C7 / (ro^6)) * (3 * d1O + 7 * d2O)$$

$$// q1O = (RLS * trg / (1 + wo^2 * trg^2)) + ((1 - RLS) * trt / (1 + wo^2 * trt^2))$$

$$// q2O = (RLS * trg / (1 + 4 * wo^2 * trg^2)) + ((1 - RLS) * trt / (1 + 4 * wo^2 * trt^2))$$

$$// R1qO = C8 * khi^2 * (0.2 * q1O + 0.8 * q2O)$$

$$// T1mO = (R1dO + R1qO) \wedge (-1)$$

$$// R1O = pm / (T1mO + tm)$$

// Radial frequency difference of bond and free water - total reduced (dwr), contribution of os (dwos)

$$// dwos = Cout * dwm$$

$$// dwr = pm * (dwm / ((tm / T2mO + 1)^2 + (tm * dwm)^2) + dwos)$$

// R1 dipolar - pseudocontact contribution for 1H - Lipari-Szabo (R1dH)

$$d1H = (RLS * tc1g / (1 + wh^2 * tc1g^2)) + ((1 - RLS) * tc1l / (1 + wh^2 * tc1l^2))$$

```

d2H=(RLS*tc2g/(1+ws^2*tc2g^2))+((1-RLS)*tc2l/(1+ws^2*tc2l^2))
R1dH=(C9/(rh^6))*(3*d1H+7*d2H)
// Total inner sphere milimolar contribution to 1H relaxivity (R1Hin)
T1mH=(R1dH)^(-1)
R1Hin=pm/(T1mH+tm)
// Calculus for difusion coefficient according to J.C.Hindman (D)
B1=3.118150E-04
B2=5.062560E+03
B3=1.547920E+02
B4=1.629310E+03
D=(1E-4)/((B1*EXP(B2/T))+(B3*EXP(B4/T)))
// Outer sphere contribution to 1H relaxivity according to Freeds model
(R1Hos); i - proton spins, s - Gd electron states
tau=a^2/D
z2i=(tau/T1e)+([0,1]*wh*tau)
z2s=(tau/T2e)+([0,1]*ws*tau)
os1=Re((1+0.25*(z2i^0.5))/(1+z2i^0.5+(4/9)*z2i+(1/9)*(z2i^1.5)))
os2=Re((1+0.25*(z2s^0.5))/(1+z2s^0.5+(4/9)*z2s+(1/9)*(z2s^1.5)))
R1Hos=(C10/(A*D))*(3*os1+7*os2)
// Aime's and Bota's second sphere dipolar contribution to 1H R1 relaxivity
(R1Hss)
//tc1ss=(T1e^(-1)+trss^(-1))^(-1)
//tc2ss=(T2e^(-1)+trss^(-1))^(-1)
//R1dHss=(C9/(rss^6))*((7*tc2ss/(1+ws^2*tc2ss^2))+(3*tc1ss/(1+wh^2*tc1ss^2)))
//T1mss=R1dHss^(-1)
//pmss=nss*1E-3/55.55
//R1Hss=pmss/(T1mss+tmss)
// Overall R1 proton relaxivity (R1H)
//R1H=R1Hin+R1Hos+R1Hss
R1H=R1Hin+R1Hos
// Estimation of parameters - combination of prof. Merbach DOTA
parameters and estimation
// for second sphere
n=1
delta=0.16E20
tm0=243E-9
Hm=49.8e3
tr0l=77E-12
tr0g=500e-12
Erl=40E3
Erg=20e3
tv0=11.1E-12
Ev=1000
acc=-3.7E6
ro=2.5E-10
rh=3.1E-10
n=1
a=3.5E-10
rss=3.5E-10
trss=2E-10

```

nss=1
dg=0.08
RLS=1

9 Použitá literatura

- ¹ Chakeres D. W.; Schmalbrock P., *Fundamentals of magnetic resonance Imaging*, Williams & Wilkins, Baltimore, **1992**
- ² Lautebur, P.C., Image Formation by Induced Local Interactions, *Nature*, **1973**, 252, 190
- ³ Peters, J. A.; Huskens, J.; Raber, D. J., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1996**, 28, 283–350.
- ⁴ Weinman, R.J., *Physiol. Chem. Phys. Med. Nucl. Magn. Reson.*, **1984**
- ⁵ Merbach, A. E.; Toth, E., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, JOHN WILEY & SONS, Chichester **2001**
- ⁶ Muller, N.M., *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, **1995**
- ⁷ Schwert, D. D.; Davies, J. A.; Richardson, N., *Topics Curr. Chem.* **2002**, 221, 165–199.
- ⁸ Aime, S.; Crich, S. G. et al., *Coord. Chem. Rev.*, **2006**, 250, 1562–1579
- ⁹ Polášek, M., *Diplomová práce*, NMR studie komplexů pyridin-*N*-oxidového analogu DOTA s lanthanoidy, **2004**
- ¹⁰ Botta, M., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 399
- ¹¹ Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Crich, S. G.; Terreno, E., *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 186, 321–333
- ¹² Swift, T. J.; Connick, R. E., *J. Chem. Phys.*, **1962**, 37, 307–320
- ¹³ Aime, S.; Botta, M.; Ermondi, G., *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 4291–4299
- ¹⁴ Evans, D. F., *J. Chem. Soc.* **1959**, 2003
- ¹⁵ Corsi, D. M.; Platas-Iglesias, C.; van Bekkum, H.; Peters, J. A., *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, 39, 723–726
- ¹⁶ Šedinová, M., *Bakalářská práce*, Použití multinukleární NMR spektroskopie při charakterizaci potenciálních kontrastních látek pro MRI tomografii, **2005**
- ¹⁷ Hoefl, S.; Roth, K. *Chem. Ber.*, **1993**, 126, 869–873
- ¹⁸ Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Marques, M. P. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Pubanz, D.; Merbach, A. E., *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 2059–2068
- ¹⁹ Aime, S.; Barge, A.; Bruce, J. I.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Moloney, J. M.; Parker, D.; de Sousa, A. S.; Woods, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 5762–5771

-
- ²⁰ Zhang, S. R.; Kovacs, Z.; Burgess, S.; Aime, S.; Terreno, E.; Sherry, A. D., *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 288–296
- ²¹ Merbach, A. E.; Toth, E., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging.*, JOHN WILEY & SONS, Chichester **2001**
- ²² Dunand, F. A.; Aime, S.; Merbach, A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 1506–1512
- ²³ Buděšínský M.; Pelnař J., *Nukleární magnetická rezonance*, 25- svazek cyklu Organická chemie, ÚOCHB AV ČR, Praha **2000**
- ²⁴ Newkome G.R.; Moorefield C.N.; Vögtle F.: *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Synthesis, Applications*; Wiley-VCH, Weinheim, **2001**
- ²⁵ Easton Ch. J.; Lincoln S. F.: *Modified Cyclodextrins – Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry*, Imperial College Press, London **1999**
- ²⁶ Hermann, P.; Kotek, J.; Kubiček, V.; Lukeš, I., *Dalton Trans.*, 3027, **2008**
- ²⁷ Lebdušková, P.; Hermann, P.; Helm, L.; Tóth, E.; Kotek, J.; Binnemans, K.; Rudovský, J.; Lukeš, I.; Merbach, A.E., *Dalton Trans.*, 493, **2007**
- ²⁸ Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Mainero, V.; Aime, S., *Org. Biomol. Chem.*, 3, 112, **2005**
- ²⁹ Lebdušková, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vander Elst, L.; Muller, R.N.; Lukeš, I.; Peters, J.A., *Bioconjugate Chem.*, 15, 881, **2004**
- ³⁰ Lhoták P., *Struktura a konformace kalix[n]arenů*. Dostupné online na [http://uoch.vscht.cz/Skupiny/Lhotak/my_webs/Struktura a konformace.htm](http://uoch.vscht.cz/Skupiny/Lhotak/my_webs/Struktura_a_konformace.htm)
- ³¹ Gutsche C.D.: *Calixarenes*; Monographs in Supramolecular Chemistry Vol 1.; Stodart J.F., Ed.; Cambridge: The Royal Society Of Chemistry, **1989**
- ³² Gutsche C.D.; Dhawan B.; Leonin M.; Stewart D., *Org. Synth.*, 68, 238–242, **1990**
- ³³ Neri P.; Bottino A.; Cunsolo F.; Piattelli M.; Gavuzzo E., *Angew. Chem.*, Int. Ed. Engl., 37, 166, **1998**
- ³⁴ Lhoták P.; Stibor I., *Calix[n]areny a příbuzné molekuly: in Molekulární design*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, **1997**
- ³⁵ Martz J.; Graf E.; Hosseini M.W.; De Cian A.; Fischer J., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3791, **2000**
- ³⁶ Palatinusová L., *Bakalářská práce*, Stereochemie komplexů kovů se substituovanými kalix[n]areny, **2005**

-
- ³⁷ Schühle, D.T.; Schatz, J.; Laurent, S.; Elst, L.V.; Muller, R.N.; Stuart, M.C.A.; Peters, J.A., *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 3290–3296
- ³⁸ Gutsche C., *Calixarenes in Monographs in Supramolecular Chemistry*, Cambridge: the Royal Society of Chemistry, **1989**
- ³⁹ Tóth, E.; Ni Dhubhghaill, O.M.; Besson, G.; Helm, L.; Merbach, A.E., *Magn. Reson. Chem.*, **1999**, 37, 701–708
- ⁴⁰ Niemi, P.; Reisto, P., *Invest. Radiol.*, **1991**, 26, 820–824
- ⁴¹ Aime, S.; Merbach, A. E.; Toth, E., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging.*, JOHN WILEY & SONS, Chichester **2001**
- ⁴² Aime, S.; Botta, M.; Frullano, L.; Crich, S.G.; Giovenzana, G.; Pagliarin, R.; Palsamino, G.; Sirtori, F.R.; Sisti, M., *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 4017–4024
- ⁴³ Wang, X.; Jin, T.; Comblin, V., *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 1095–1099
- ⁴⁴ Rudovský, J., *Diplomová práce*, Příprava a NMR studium bifunkčních chelátů odvozených od DO3A, **2002**
- ⁴⁵ Macrocyclic Synthesis, editor Parker D., *Oxford University Press*, New York **1996**
- ⁴⁶ Arnaud-Neu, F.; Collins, E.M.; Deasy, M.; Ferguson, G.; Harris, S.J.; Kaitner, B.; Lough, A.J.; McKervey M.A.; Marques E.; et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8681
- ⁴⁷ Verboom W.; Durie A.; Egberink R.J.M.; Asfari Z.; Reinhoudt D.N., *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 1313
- ⁴⁸ Němečková, P., *Diplomová práce*, Koordinace substituovaných nitro- a minokalix[4]arenů, **2008**
- ⁴⁹ Kačenka, M., *Bakalářská práce*, Bimodal macromolecular MRI contrast agents with possibility of luminescence detection, **2007**
- ⁵⁰ Dadabhoy, A.; Faulkner, S.; Sammes, P. G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2002**, 348–357
- ⁵¹ Klimentová, J.; Vojtíšek, P.; Sklenářová, M., *J. Mol. Struct.*, **2007**, 871(1-3), 33–41
- ⁵² Reinhoudt D. N. *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **1998**, 4, 1225
- ⁵³ Horák M.; Papoušek D., *Infračervená spektra a struktura molekul*, Academia Praha **1976**
- ⁵⁴ Sklenářová, M., *Diplomová práce*, Substituované kalix[4]areny jako potenciální ligandy pro koordinaci lanthanoidů, **2008**
- ⁵⁵ Zhang, S.; Michaudet, L.; Burgess, S.; Sherry, D.A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 11