

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie

NOVÉ LIGANDY PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE

New ligands for applications in medicine

Bakalářská práce
studijního oboru Chemie v přírodních vědách

Praha 2010

Kateřina Holá

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru: Nové molekulární systémy pro pokročilé aplikace prospěšné pro zdraví a šetrné k životnímu prostředí (MSM0021620857).

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D. 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.

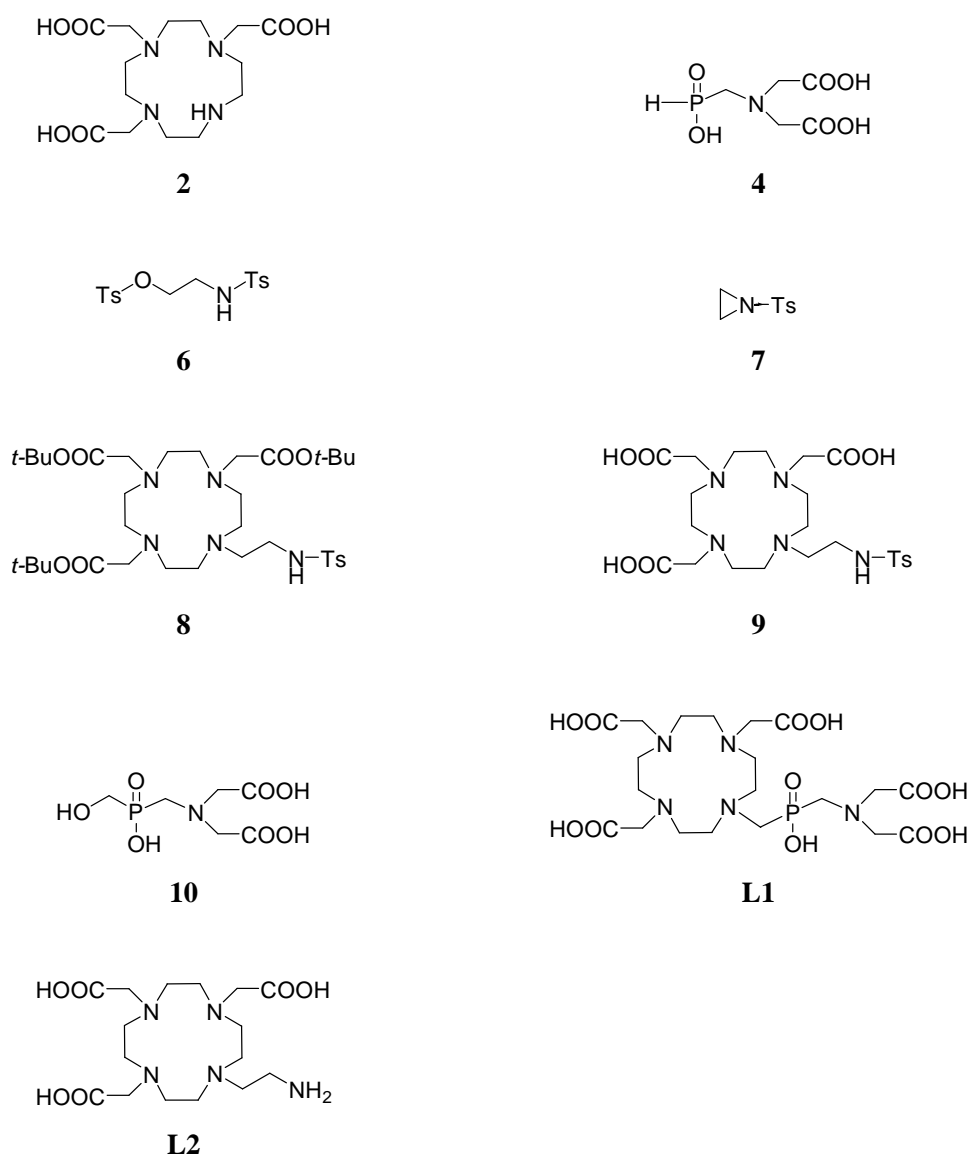
V Praze, červen 2010

1 Obsah

2	Teoretický úvod	5
2.1	Makrocyclické ligandy pro medicínské aplikace	5
2.2	Nukleární medicína	5
2.2.1	Radiodiagnostické metody	6
2.2.2	Radioterapie	7
2.2.3	Výběr radionuklidů	7
2.3	Magnetická rezonance	10
2.3.1	Fyzikální princip MRI	11
2.3.2	MRI kontrastní látky	13
2.3.3	CEST	15
3	Cíl a motivace práce	17
4	Experimentální část	18
4.1	Použité chemikálie	18
4.2	Přístroje a metody charakterizace	18
4.2.1	Tenkovrstvá chromatografie	18
4.2.2	HPLC	18
4.2.3	Hmotnostní spektrometrie	18
4.2.4	NMR spektroskopie	18
4.2.5	Elementární analýza	19
4.2.6	Stanovení teploty tání	19
4.2.7	Rentgenostrukturní analýza	19
4.3	Syntetická část	19
4.3.1	Příprava látky 2	20
4.3.2	Příprava látky 4	21
4.3.3	Příprava ligandu L1	22
4.3.4	Příprava látky 6	24
4.3.5	Příprava látky 7	25
4.3.6	Příprava látky 8	25
4.3.7	Příprava látky 9	26
4.3.8	Příprava ligandu L2	27
4.4	Kinetické studie ligandu L1	27
4.4.1	Formační kinetika komplexu Ce- L1	28
4.4.2	Disociační kinetika komplexu Ce- L1	28
5	Výsledky a diskuze	29
5.1	Syntéza prekurzorů a ligandů	29
5.1.1	Příprava látky 2	29
5.1.2	Příprava látky 4	29
5.1.3	Příprava ligandu L1	29
5.1.4	Příprava látky 6	30
5.1.5	Příprava látky 7	31
5.1.6	Příprava látky 8	31
5.1.7	Příprava látky 9	32
5.1.8	Příprava ligandu L2	32
5.2	Kinetické studie ligandu L1	33
5.2.1	Formační kinetika komplexu Ce- L1	33

	5.2.2 Disociační kinetika komplexu Ce-L1	36
6	Závěr	40
7	Seznam použitých zkratk	41
8	Použitá literatura	43
9	Poděkování.....	45

Obrázek 1.1: Značení připravovaných látek použité v textu.



2 Teoretický úvod

2.1 Makrocyclické ligandy pro medicínské aplikace

Komplexy makrocyclických ligandů jsou nedílnou součástí mnoha biologických procesů, např. transportu kyslíku u živočichů nebo fotosyntézy. Velký rozvoj syntézy makrocyclických ligandů přišel v šedesátých letech 20. století^[1] a s tím i jejich využití v medicíně. Komplexy kovů byly v minulém století použity k léčbě mnoha typů chorob od syfilidy přes rakovinu až k artritidě^[2]. Největší rozvoj v dnešní době zaznamenává využití makrocyclických komplexů kovů v diagnostice a radioterapii.

Radiodiagnostika a radioterapie jsou často založeny na radioizotopech kovů. V diagnostice MRI jsou užívány paramagnetické ionty kovů (nejčastěji Gd^{3+} a Mn^{2+}). Užívané kovy jsou ve volné formě pro lidský organismus značně toxické (LD_{50}^{\dagger} volného trojmocného gadolinia je $0,1-0,5 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[3] a jsou metabolizovány různými orgány. Proto je nezbytné, aby byly vázány v komplexech kineticky i termodynamicky stálých i v *in vivo* prostředí.

Velmi vhodné vlastnosti pro komplexaci kovů mají právě makrocyclické ligandy, tj. cyklické sloučeniny s devíti nebo více atomy, z nichž jsou alespoň tři donorové^[1]. Při koordinaci s iontem kovu vznikají nejčastěji pětičlenné nebo šestičlenné chelátové kruhy. Jejich značná rigidita má za následek vysokou kinetickou inertnost vzniklého komplexu^[1].

2.2 Nukleární medicína

Nukleární medicína je obor zabývající se diagnostikou a terapií pomocí radioaktivních izotopů.

V radiodiagnostice se používá především radionuklidy vyzařující γ -záření, β^+ -emitory, popřípadě smíšené β - γ radionuklidy. Tyto radioaktivní látky, radiofarmaka, se aplikují do těla pacienta nejčastěji orálně nebo intravenózně. Každý typ radiofarmaka má v těle odlišný metabolismus a distribuci, proto je volen podle typu vyšetření, např. sloučeniny ^{123}I při vyšetření poruch štítné žlázy, ^{32}P pro diagnostiku chorob kostí, nebo metastabilní technecium ^{99m}Tc , které našlo široké uplatnění při zobrazování jater, ledvin, plic a dalších orgánů^[4]. Z míst výskytu příslušného γ -emitoru poté vychází γ -záření, které prochází organismem a je nejčastěji zachycováno citlivými scintilačními kamerami, které vytvářejí příčné řezy a pomocí počítačové grafiky poskytnou 3D-obraz, tzv. tomogram, rozložení radiofarmaka v těle. Na základě tohoto obrazu lze získat informace o anatomii vyšetřované tkáně nebo orgánu, o metabolismu orgánů a o jiných orgánových funkcích. Nejčastěji používané metody pro diagnostiku chorob pomocí

[†] myš, intravenózně

radiofarmak jsou jednofotonová emisní počítačová tomografie **SPECT** (Single Photon Emission Computed Tomography) a pozitronová emisní tomografie **PET** (Pozitron Emission Tomography).

Při radioterapii se využívá biologických účinků ionizujícího záření. Ve velké většině se jedná o terapii nádorových onemocnění. Cílem radioterapie je selektivní likvidace nádorového ložiska při co nejmenším poškození okolních zdravých tkání.

2.2.1 Radiodiagnostické metody

2.2.1.1 Planární scintigrafie

Scintigrafie či gamagrafie je fyzikálně-elektronická metoda zobrazení distribuce radiofarmaka v organismu na základě zevní detekce vycházejícího γ -záření^[4]. Fotony γ -záření jsou z objektu snímány tzv. scintilačními kamerami, které převádějí tok těchto fotonů na elektrické impulzy a pomocí nich pak vytváří scintigrafický obraz distribuce radiofarmaka ze snímaného objektu. Vzhledem k tomu, že γ -záření je emitováno všemi směry, musí se při snímání scintigrafického obrazu provést kolimační projekce, tj. fotonům γ -záření se do cesty postaví olověná deska s drobnými rovnoběžnými otvory (kolimátor). Při kolimační projekci projdou pouze ty fotony, které jsou rovnoběžné s otvory kolimátoru^[4].

Planární scintigrafie je základní a nejčastěji užívaná zobrazovací scintilační metoda. Jejím výsledkem je dvojrozměrné zobrazení trojrozměrné distribuce radiofarmaka v orgánu, části těla či v celém těle. Při pořízení více snímků ve velmi krátkém časovém úseku můžeme získat dynamickou distribuci^[5].

2.2.1.2 Tomografická scintigrafie

Planární scintigrafický obraz není vždy zcela postačující. Pro odstranění nevýhod planární scintigrafie a pro získání komplexního zobrazení struktur v různých hloubkách byla vyvinuta tomografická scintigrafie. Můžeme ji rozdělit na jednofotonovou emisní tomografii (SPECT) a pozitronovou emisní tomografii (PET).

Při vyšetření tomografickou metodou SPECT je zkoumané místo snímáno scintilační kamerou pod různými úhly. Detektor rotuje okolo pacienta. Během jedné rotace sejme 32–64 obrazů, které jsou počítačově rekonstruovány do trojrozměrné struktury^[4].

Při metodě PET je zobrazována distribuce β^+ radionuklidů. Tyto radionuklidy v místě distribuce emitují pozitrony e^+ , které následně anihilují s okolními elektrony. Při anihilaci vznikají dva fotony anihilačního γ -záření o energii 511 keV, které vylétají z místa vzniku v protilehlém směru rychlostí světla po přímkových drahách, což umožňuje koincidenční detekci^[4]. Pozitronový zářič je umístěn mezi dva dostatečně malé protilehlé detektory, které jsou

zapojeny do tzv. koincidenčního obvodu. Tímto obvodem projdou do další elektronické aparatury jen impulzy odpovídající současné detekci fotonů v obou protilehlých detektorech – kolimace je realizována elektronicky^[4]. Registrace signálu tedy znamená, že na spojnici obou detektorů došlo k anihilaci. K rekonstrukci trojrozměrného obrazu distribuce radiofarmaka se sestaví a vyhodnotí množina koincidenčních přímků z většího počtu protilehlých detektorů^[4].

2.2.2 Radioterapie

Radioterapie nádorových onemocnění je založena na účincích ionizujícího záření na buňky tkání, které jsou vlivem záření usmrčovány, nebo inaktivovány poškozením jejich DNA. V nádorové tkáni je potřeba eliminovat především kmenové klonogenní buňky^[4], jejichž neomezené dělení způsobuje nádorové onemocnění.

Pro dosažení co nejlepších terapeutických účinků na nádorovou tkáň se musí zvážit druh nádoru a vlastnosti okolní zdravé tkáně. Pro radioterapii je velmi důležitá radiosenzitivita konkrétního druhu nádoru, jakož i rozdíl v citlivosti vůči záření mezi nádorovou a zdravou tkání. Poškození zdravé tkáně je největší limitující faktor pro dopravení dostatečně vysoké dávky do nádorového ložiska, proto je důležité zvážit i vhodnou ozařovací techniku.

Existují tři základní radioterapeutické metody^[4]: *teleterapie* – svazky záření jsou aplikovány z vnějšího ozařovače; *brachyterapie*, která je často označována jako ozařování „na blízko“, je aplikace uzavřených radionuklidových zářičů (radionuklid v inertním chemickém pouzdru) do cílové tkáně nebo do její těsné blízkosti; a *radioizotopová terapie* – aplikace radionuklidů ve vhodné chemické formě přímo do organismu, nejčastěji metabolickou cestou.

2.2.3 Výběr radionuklidů

2.2.3.1 Radionuklidy pro diagnostiku

V jednofotonové emisní počítačové tomografii se využívá radiofarmak založených na γ -emitech^[4]. V klinické praxi je nejužívanější ^{99m}Tc. Neméně významné jsou i ⁶⁷Ga, ¹¹¹In, ¹²³I a ²⁰¹Tl. Nespornou výhodou těchto γ -emitorů je jejich schopnost emitovat Augerovy elektrony a tím i možnost jejich použití při radioterapii.

Tabulka 2.1^[2]: Poločasy a způsoby rozpadu radionuklidů přechodných kovů užívaných v diagnostice SPECT.

Izotop	Poločas rozpadu $T_{1/2}$	Způsob rozpadu [%]	Izotop	Poločas rozpadu $T_{1/2}$	Způsob rozpadu [%]
⁶⁷ Cu	2,58 d	β^- (100)	^{99m} Tc	6,0 h	IT(100)
⁶⁷ Ga	3,26 d	EC(100)	¹¹¹ In	2,83 d	EC(100)
⁹⁰ Y	2,66 d	β^- (72)	¹⁸⁶ Re	3,78 d	β^- (92), EC(8)

EC – elektronový záchyt; IT – izomerický přechod

Nejčastěji užívaná radiofarmaka v pozitronové emisní tomografii jsou založena na ^{18}F , především ve formě 2-fluor-2-deoxyglukosy^[6]. Méně časté jsou radionuklidy přechodných kovů. Z nich jsou nejužívanější izotopy ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga nebo ^{86}Y .

Většina radionuklidů používaných v PET je produkována v cyklotronech, které vzhledem k relativně krátkému poločasů života některých izotopů (tabulka 2.2)^[7,8] musí být v blízkosti radiodiagnostického pracoviště.

Tabulka 2.2: Poločasy a způsoby rozpadu radionuklidů přechodných kovů užívaných v diagnostice PET.

Izotop	Poločas rozpadu $T_{1/2}$	Způsob rozpadu [%]	Izotop	Poločas rozpadu $T_{1/2}$	Způsob rozpadu [%]
^{18}F	1,83 h	β^+ (97), EC(3)	^{64}Cu	12,8 h	β^+ (19), EC(41), β^- (40)
^{38}K	7,71 min	β^+ (100)	^{66}Ga	9,45 h	β^+ (57), EC(43)
^{45}Ti	3,09 h	β^+ (86), EC(14)	^{68}Ga	1,1 h	β^+ (90), EC(10)
^{51}Mn	46,2 min	β^+ (97), EC(3)	^{72}As	26 h	β^+ (77), EC(23)
^{52}Fe	8,2 h	β^+ (57), EC(43)	$^{82\text{m}}\text{Rb}$	6,3 h	β^+ (26), EC(74)
^{52}Mn	5,6 d	β^+ (28), EC(72)	^{83}Sr	32,4 h	β^+ (24), EC(76)
^{55}Co	17,5 h	β^+ (77), EC(23)	^{86}Y	14,74 h	β^+ (34), EC(66)
^{60}Cu	23,4 min	β^+ (93), EC(7)	^{89}Zr	78,4 h	β^+ (22), EC(78)
^{61}Cu	3,3 h	β^+ (62), EC(38)	$^{94\text{m}}\text{Tc}$	53 min	β^+ (72), EC(28)
^{63}Cu	3,32 h	β^+ (62), EC(38)	$^{110\text{m}}\text{In}$	1,15 h	β^+ (62), EC(38)

EC – elektronový záchyt

2.2.3.2 Radionuklidy v radioterapii

Při výběru radiofarmaka k terapii nádorových onemocnění je důležité, aby aplikovaná látka byla specifická, tj. aby se vážala a byla kumulována pouze v nádorové tkáni. Měla by mít vysokou cytotoxicitu a krátký dosah emitovaného záření, aby okolní zdravé tkáně byly co nejméně poškozeny. Pro splnění poslední podmínky je vhodné volit emitory α nebo β^- . Vzhledem k nevhodnému chemickému chování většiny α emitorů (často se jedná o prvky, které vytvářejí nestálé komplexy) se v klinické praxi nejvíce uplatňují β^- zářiče. Tyto emitory jsou často smíšené β - γ zářiče. Tato skutečnost se často využívá i k monitorování distribuce a metabolismu radiofarmaka v těle pomocí SPECT. Užívané radioizotopy jsou uvedeny v tabulce 2.3^[9,10].

Tabulka 2.3: Poločasy rozpadu, způsob rozpadu a dosah v tkáních β^- emitorů přechodných kovů užívaných při radioterapii.

Izotop	Poločas rozpadu $T_{1/2}$	Způsob rozpadu [%]	Dosah v tkáni [mm]
^{67}Cu	2,58 d	β^- (100)	1,8
^{90}Y	2,66 d	β^- (100)	12,0
^{109}Pd	0,56 d	β^- (100)	5,0
^{111}Ag	7,47 d	β^- (100)	4,8
^{149}Pm	2,21 d	β^- (100)	5,0
^{153}Sm	1,95 d	β^- (100)	3,0
^{166}Ho	1,1 d	β^- (100)	8,0
^{177}Lu	6,7 d	β^- (100)	1,5
^{186}Re	3,7 d	β^- (92), EC(8)	5,0

EC – elektronový záchyt

Poločas života použitého radionuklidu by měl být takový, aby minimální vyzářená dávka byla $0,4 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ref.^[9]). Celková dávka by ovšem neměla překročit $50 \text{ J}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ref.^[9]). β^- emitory můžeme rozdělit podle vyzářené energie na nízkoenergetické emitory (^{177}Lu), se střední hodnotou vyzářené energie (^{149}Pm a ^{153}Sm) a vysokoenergetické emitory (^{166}Ho a ^{90}Y). Poměrně velká výhoda uvedených β^- zářičů, yttria a uvedených lanthanoidů, je jejich podobná koordinační chemie^[9]. Volba příslušného β^- emitoru poté závisí především na velikosti a lokalizaci tumoru. Pro malé metastázy je lepší volit nízkoenergetické emitory, pro rozsáhlejší tumory je výhodnější volit vysokoenergetické emitory.

Radioizotop ^{90}Y ($T_{1/2} = 2,66 \text{ d}$) je jako čistý β^- emitor široce používán pro cílenou radioterapii. Radioizotop ^{86}Y ($T_{1/2} = 14,74 \text{ h}$) je používán v pozitronové emisní tomografii nejčastěji právě u pacientů, kteří podstoupili terapii s radiofarmaky založenými na ^{90}Y . Největší výhoda dvojice $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ je možnost jejich současné aplikace při sledování cílené terapie čistého β^- emitoru pomocí PET^[9,11].

Podobná dvojice radionuklidů, radionuklid $^{110\text{m}}\text{In}$ ($T_{1/2} = 1,15 \text{ h}$) emitující pozitrony a ^{111}In ($T_{1/2} = 2,8 \text{ d}$) jako radionuklid emitující γ -záření, byla použita pro srovnání zobrazovacích metod SPECT a PET. Byly pořízeny snímky jak pomocí metody SPECT po aplikaci radiofarmaka s ^{111}In , tak snímky pomocí PET po aplikaci $^{110\text{m}}\text{In}$. Srovnání jasně prokázalo nesporné výhody pozitronové emisní tomografie při detekci malých tumorů^[11].

V radioterapii nejsou využívány pouze β^- emitory. S velkou výhodou mohou být používány emitory Augerových elektronů díky velké cytotoxicitě a krátkému dosahu ve tkáních. Díky těmto vlastnostem je dosaženo selektivní likvidace nádorového ložiska při co nejmenším poškození okolních zdravých tkání.

Jako Augerovy elektrony jsou označovány elektrony, které se uvolní při tzv. vnitřní konverzi Roentgenova záření. K Augerovy emisi nejčastěji dochází následkem elektronového záchyty (**EC** – **E**lectron **C**apture) nebo při vnitřní konverzi γ -záření.

Při elektronovém záchytu proton zachytí elektron z nejbližší elektronové slupky a vznikne neutron za současného uvolnění neutrina. Uvolněná energie z této jaderné reakce je rozdělena mezi neutrino a vazebnou energii zachyceného elektronu^[4].

Vnitřní konverze γ -záření je proces, při kterém je foton γ , emitovaný při deexcitaci vzbuzené jaderné hladiny, pohlcen obalovým elektronem vlastního atomu, který přebere veškerou jeho energii^[4]. Foton zanikne a elektron se díky přijaté energii uvolní z elektronové slupky a vylétne ven z atomu. Tento elektron je označován jako konverzní elektron^[4].

Následkem obou výše popsaných jevů je volné místo po uvolněním elektronu ve vnitřní slupce elektronového obalu (nejčastěji slupka K). Toto volné místo je okamžitě zaplněno elektrony z vyšších hladin. Důsledkem těchto přeskoků je charakteristické vyzáření kvanta Roentgenova záření. Roentgenovo záření může být, stejně jako při vnitřní konverzi záření γ , pohlceno obalovým elektronem vlastního atomu. Tento elektron se uvolní z atomu. Takto emitovaný konverzní elektron se označuje jako Augerův elektron^[4,11]. Z jednoho volného místa ve vnitřní slupce elektronového obalu, která má nižší energetickou hladinu než výše ležící slupky, se tak může uvolnit několik Augerových elektronů.

Energie emitovaného Augerova elektronu má hodnotu v rozmezí od několika elektronvoltů do desítek kiloelectronvoltů^[12]. Dosah Augerových emitů o energii menší než 500 eV ve tkáni odpovídá řádově několika nanometrům, proto je nutné dané radiofarmakum dopravit do jader buněk. Díky vzniku velkého množství Augerových elektronů na jeden rozpad může absorbovaná dávka být vyšší než 1 MJ·kg⁻¹ na rozpad^[12].

Nejčastěji užívané radionuklidy emitující Augerovy elektrony^[12] jsou ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹²³I a ²⁰¹Tl. Tyto radionuklidy se současně používají při radiodiagnostice v jednofotonové emisní počítačové tomografii. Při radioterapii těmito radionuklidy je tedy možné sledovat jejich distribuci v těle.

2.3 Magnetická rezonance

V dnešní době se do popředí dostává tomografická zobrazovací metoda **MRI** (**M**agnetic **R**esonance **I**maging). Při této metodě, která je založena na detekci změn magnetických momentů atomových jader, není pacient vystaven ionizujícímu záření, jak je tomu u výše uvedených, ač neinvazivních metod.

Magnetický moment jádra vytváří nespárovaný nukleon, proto mohou být pozorována pouze jádra s lichým počtem protonů nebo neutronů, nejčastěji ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ²³Na a ³¹P. Lidský organismus obsahuje cca 70 % vody, proto se jako aktivní jádro používá ¹H. Intenzita

pozorovaného signálu odpovídá distribuci vody v zobrazované tkáni. Chování molekul vody ve zdravé a nemocné tkáni je značně odlišné. Rozdíl je především v pohyblivosti molekul vody, která souvisí s teplotou, koncentrací solí v tkáních a s pH, což ovlivňuje relaxační vlastnosti protonů vody.

Pro zvýšení kontrastu mezi nemocnou a zdravou tkání nebo pro zobrazení orgánů či krevního řečiště se do těla pacienta aplikuje tzv. MRI kontrastní látka. Tyto látky zvyšují rychlost relaxace protonů vody v okolní tkáni díky jejich paramagnetismu^[13]. V dnešní době jsou nejčastěji užívané kontrastní látky založené na iontech gadolinitých, železitých nebo manganatých^[2].

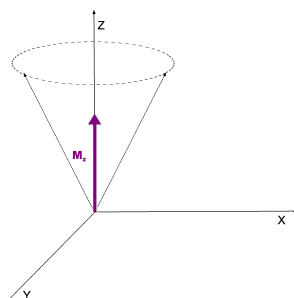
2.3.1 Fyzikální princip MRI

Jádra atomů mající nenulový jaderný spin se chovají jako magnetické dipóly (mají svůj magnetický moment μ), proto interagují s vnějším magnetickým polem^[14]. V závislosti na orientaci jaderného spinu těchto jader v magnetickém poli můžeme rozdělit jejich stavy na vysokoenergetické (celkový jaderný spin je orientován antiparalelně k vnějšímu magnetickému poli) a nízkoenergetické (paralelní orientace). Makroskopická veličina vzniklá vektorovým součtem těchto příspěvků se označuje jako magnetizace M a je orientována stejně jako vnější magnetické pole^[14].

Magnetický moment jader vystavených vnějšímu magnetickému poli vykonává tzv. precesní pohyb, který si lze představit jako pohyb po plášti pomyslného kužele (obr. 2.1)^[15]. Tento pohyb můžeme charakterizovat Larmorovou frekvencí f_0 :

$$f_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}, \quad (1)$$

kde γ je gyromagnetický poměr jádra a B_0 magnetická indukce vnějšího magnetického pole.



Obrázek 2.1: Směr magnetického momentu jader ve vnějším magnetickém poli se v čase mění (vektor magnetického momentu opisuje plášť kužele). Celkový vektor magnetizace má směr osy z , tedy směr vnějšího magnetického pole.

Abychom mohli pozorovat signál, musíme vychýlit celkový vektor magnetizace do roviny xy a sledovat jeho navrácení do původní polohy. Tohoto sklopení lze dosáhnout dodáním energie

o Larmorově frekvenci (např. elektromagnetickými pulzy). Dodáme-li systému energii, při které bude právě jedna polovina magnetických momentů orientována paralelně a druhá antiparalelně, bude celková magnetizace pouze v rovině xy a systém bude satureován. V této rovině je umístěna přijímací cívka, v které se indukuje napětí^[14].

2.3.1.1 Relaxace

Pokud přestane elektromagnetický pulz působit, dojde k relaxaci. Magnetizace se z excitovaného stavu navrátí do stavu původního^[14]. Relaxační čas můžeme rozdělit na podélný T_1 a příčný T_2 . Podélný čas T_1 je definován jako čas, za který se obnoví M_z (tj. magnetizace v ose z) na 63 % své původní velikosti – jedná se o spin-mřížkovou relaxaci. Příčný čas je čas T_2 , za který klesne magnetizace v rovině xy (M_{xy}) na 37 % svého maxima – spin-spinová relaxace.

2.3.1.2 Relaxivita

Přítomnost paramagnetického kovu v blízkosti molekul vody zvyšuje rychlost relaxace atomů vodíku, což má za následek lepší rozlišení tkání v dané oblasti. Rychlost relaxace R je definována jako reciproká hodnota relaxačního času T . Pozorovanou relaxaci $R_{i,obs}$ rozpouštědla (tj. vody) v přítomnosti paramagnetik můžeme popsat Solomon-Bloembergen-Morganovou teorií^[13]:

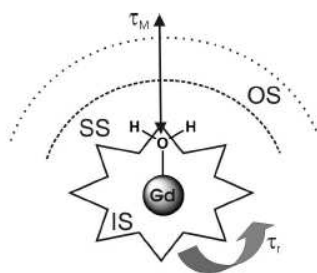
$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}}, \quad i = 1, 2, \quad (2)$$

$$R_{i,obs} = R_{i,d} + R_{i,p} = R_{i,d} + r_i[\text{Gd}], \quad i = 1, 2, \quad (3)$$

kde $T_{i,obs}$ je pozorovaný relaxační čas, $T_{i,d}$ diamagnetický příspěvek, $T_{i,p}$ je paramagnetický příspěvek, r_i je relaxivita a $[\text{Gd}]$ je koncentrace gadolinia, tj. nejčastěji užívaného paramagnetického kovu v MRI.

Z rovnice 3 plyne, že relaxivita je schopnost paramagnetika zvýšit rychlost relaxace protonů. Hodnota relaxivity je dána celkovým součtem příspěvků od sfér vody v okolí paramagnetického kovu (4)^[13]. Jednotlivé sféry jsou zobrazeny na obrázku 2.2.

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{SS} + r_i^{OS}, \quad i = 1, 2 \quad (4)$$

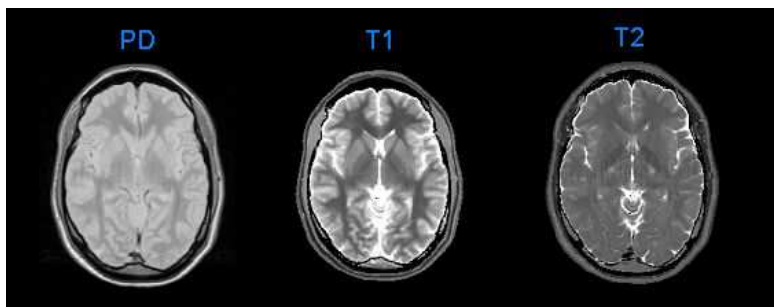


Obrázek 2.2: Zobrazení jednotlivých sfér v okolí kontrastní látky; IS – vnitřní koordinační sféra, SS – druhá sféra, OS – vnější sféra, τ_M – residenční čas molekuly vody ve vnitřní sféře, τ_R – rotační korelační čas

Příspěvek vnitřní koordinační sféry r_i^{IS} k celkové relaxivitě je dán molekulou vody koordinovanou k paramagnetickému kovu, příspěvek r_i^{SS} je způsoben molekulami vody v blízkosti paramagnetického kovu (tj. v druhé koordinační sféře) a r_i^{OS} molekulami vody z vnější koordinační sféry. Celková hodnota relaxivity je závislá na koncentraci gadolinitého komplexu, počtu molekul koordinované vody q , na residenčním čase molekuly vody ve vnitřní sféře (τ_M) a na rotačním korelačním čase (τ_R). Poslední tři zmíněné faktory lze ovlivnit vhodnou volbou ligandu.

2.3.2 MRI kontrastní látky

MRI kontrastní látky můžeme obecně rozdělit na pozitivní, tzv. T_1 kontrastní látky, a negativní, tzv. T_2 kontrastní látky^[16]. T_1 kontrastní látky významně zkracují hlavně T_1 relaxační čas. Volba vhodné sekvence zvýší intenzitu signál v místě, kde je kontrastní látka. Snímek bude mít pozitivní kontrast. Do této skupiny látek patří například kontrastní látky založené na iontech gadolinitých nebo manganatých^[2]. Mezi T_2 kontrastní látky, které lokálně snižují signál protonů vody, patří tzv. superparamagnetické látky, které jsou nejčastěji založeny na nanočásticích oxidů trojmocného železa aplikovaného ve formě koloidních roztoků^[17]. Rozdíly v zobrazení pomocí T_1 a T_2 kontrastních látek a bez použití kontrastní látky jsou zobrazeny na obrázku 2.3.



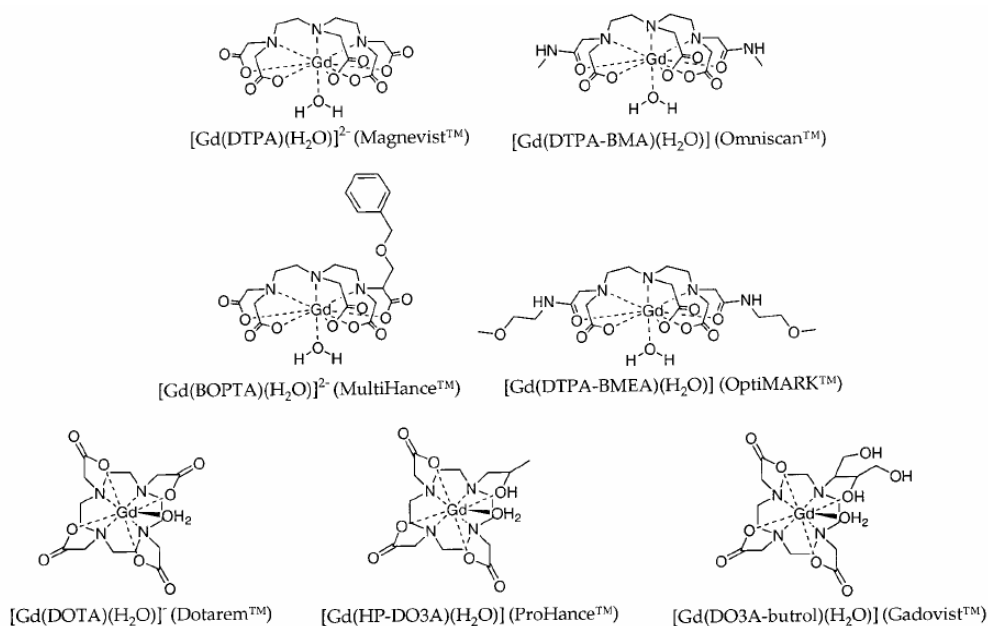
Obrázek 2.3^[14]: Zobrazení mozku pomocí MRI. PD – snímek zobrazující protonovou hustotu bez podání kontrastní látky, T_1 -vážený snímek a T_2 -vážený snímek po podání kontrastní látky.

2.3.2.1 MRI kontrastní látky založené na gadoliniu

V současné době je většina používaných MRI kontrastních látek založena na chelátech trojmocného gadolinia. Tento ion má nejvyšší možný počet nespárovaných elektronů – sedm^[18]. Trojmocné gadolinium je tedy velmi paramagnetické. Další výhodou je i jeho poměrně dlouhý relaxační čas oproti ostatním lanthanoidům^[13], který ovlivňuje rychlost relaxace jader v jeho okolí.

V klinické praxi se v současné době nejčastěji používají oktadentátní ligandy^[18]. Vzhledem k faktu, že koordinační číslo trojmocného gadolinia je zpravidla 8–9, zbývá jedno místo pro koordinaci vody.

Cheláty trojmocného gadolinia můžeme obecně rozdělit na acyklické a makrocyclické. Jednou z prvních acyklických kontrastních látek používaných v klinické praxi byl komplex gadolinitého iontu s DTPA – MagnevistTM, (obr. 2.4), první užívaná makrocyclická kontrastní látka byl komplex gadolinia s DOTA – DotaremTM, (obr. 2.4)^[18].



Obrázek 2.4: Některé kontrastní látky užívané v medicínské praxi^[19].

Komplex gadolinia s DTPA (Gd–DTPA) má více než desetkrát^[18] menší toxicitu než samotný ion gadolinia, naštěstí relaxivita chelatovaného gadolinia zůstává dostatečně vysoká k dobrému kontrastu v zobrazované tkáni. S velkou výhodou se Gd–DTPA používá k zobrazování centrálního nervového systému, k zobrazování funkce ledvin nebo nádorů^[18].

Tabulka 2.4^[18,19]: LD₅₀ a konstanta stability Gd–DTPA, Gd–DOTA, Gd–DTPA-BMA a Gd–HP-DO3A.

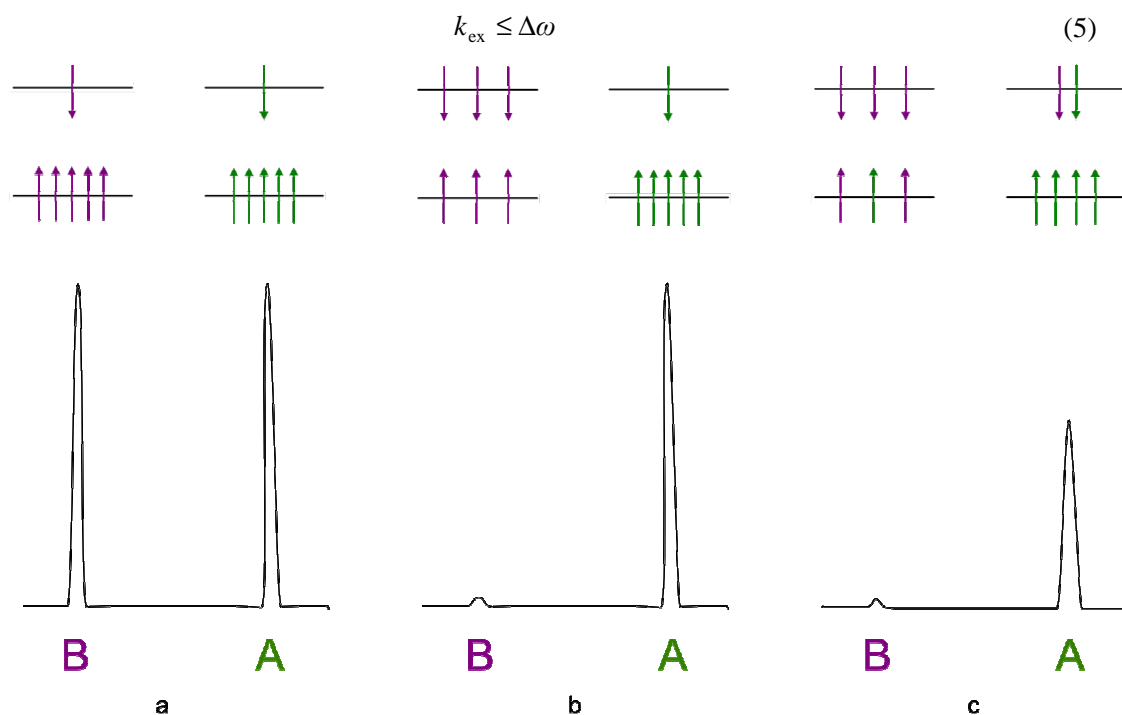
Látka	LD ₅₀ (myš, intravenózně) [mmol·kg ⁻¹]	log <i>K</i>
Gd–DTPA	5,6	22,2
Gd–DTPA-BMA	14,8	16,85
Gd–DOTA	11	24,7
Gd–HP-DO3A	12	23,8

Nespornou výhodou makrocyclických ligandů je kinetická stabilita jejich komplexů^[18,20] oproti komplexům s acyklickými ligandy (viz tabulka 2.4). Kinetická stabilita úzce souvisí i s toxicitou dané látky. Dalšími důležitými parametry komplexů jsou lipofilita komplexu a biodistribuce. Gadolinité komplexy jsou aplikovány intravenózně a vylučují se v nezměněné formě pasivní glomerulární filtrací močí. Poločas eliminace se u člověka pohybuje okolo 1,5 hodiny^[20]. Další neméně důležitý faktor je specifita ligandu pro ion gadolinia, aby nemohlo docházet k transmetalaci kovy vyskytujícími se v lidském organismu^[20], především Ca²⁺ a Zn²⁺.

2.3.3 CEST

CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) je jedna ze speciálních aplikací MRI, která je založena na snížení intenzity signálu vody^[21]. MRI kontrastní látky založené na CEST nabízí nové možnosti v zobrazování tkání, protože intenzita jejich kontrastu je ovlivněna biologickými podmínkami nebo jinými biochemickými parametry, např. pH, koncentrací kyslíku v krvi nebo enzymatickou aktivitou^[22]. Pro tyto kontrastní látky se někdy užívá anglický pojem Responsive Agents^[21].

Fyzikální princip snížení intenzity signálu vody v případě aplikace MRI kontrastní látky je zobrazen na obrázku 2.6^[21]. Vystavíme-li kontrastní látku vnějšímu magnetickému poli, jsou jaderné spiny protonů volné vody (A) i protony vody koordinované k paramagnetickému kovu nebo „vyměnitelné“ protony v blízkosti paramagnetického kovu (B) v základním stavu. Pozorujeme dva signály (obr. 2.6a). Po dodání elektromagnetického pulzu o dané rezonanční frekvenci se saturují protony v blízkosti paramagnetického kovu, jejich výsledná magnetizace bude nulová, signál ze spektra zmizí (obr. 2.6b). Po této saturaci může dojít ke dvěma procesům, buď se systém navrátí do původního stavu, nebo v mezičase dojde k chemické výměně protonů (obr. 2.6c). Druhý proces může nastat jen v případě, že rozdíl rezonančních frekvencí protonů, tj. protonů v blízkosti paramagnetického kovu a protonů „volné“ vody, je větší než rychlost chemické výměny (5)^[23]. V takovém případě dojde k snížení intenzity signálu protonů „volné“ vody.



Obrázek 2.6^[21]: protony v blízkosti paramagnetického kovu – B, „volná“ voda – A; a) základní stav A i B; b) saturace B; c) snížení signálu A chemickou výměnou.

Běžně používané kontrastní látky založené na gadolinium jsou nevhodné pro CEST, protože gadolinium extrémně rozšiřuje NMR signál. Tento problém lze překonat použitím komplexů jiných lanthanoidů (např. trojmocného europia), které pomalu vyměňují koordinovanou vodu nebo komplexy europia s ligandy, které obsahují protony ve formě koordinující se alkoholové, amidové nebo aminové skupiny či nekoordinující se amidové skupiny. Nejčastěji používané komplexy pro CEST jsou založeny na ligandech s amidovými skupinami^[21]. Výměna protonu na těchto skupinách je ovlivněna teplotou nebo pH. Díky této skutečnosti je možné získat více informací při jednom vyšetření.

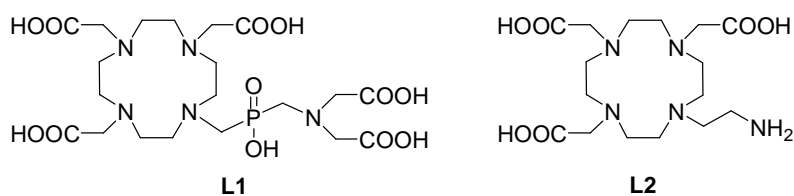
3 Cíl a motivace práce

Tato bakalářská práce má za cíl přípravu potenciálně vhodných makrocyclických ligandů (obrázek 3.1) pro komplexaci trojmocných iontů lanthanoidů.

Ligand **L1** byl navržen pro urychlení komplexace pomocí slabě koordinujícího se pendantního ramene. Jako slabě koordinující rameno byla zvolena iminodioctová kyselina (IDA) ($\log K_{\text{CuIDA}} = 10,6^{[24]}$, pro srovnání $\log K_{\text{CuDOTA}} = 22,6^{[25]}$), která byla použita jako prekurzor k syntéze ligandu **L1**. IDA je tridentátní ligand, který tvoří s ionty kovu komplex s dvěma pětičlennými kruhy. Patří do skupiny tzv. aminopolykarboxylových kyselin. Do této skupiny patří např. ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), která má četné použití v analytické chemii pro odměrná stanovení iontů kovů.

Dalším cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda rychlost komplexace je díky slabě se koordinujícímu pendantnímu rameni opravdu urychlena. Rychlosti komplexace pro ligand **L1** byly studovány spektrofotometricky na iontu trojmocného ceru.

Ligand **L2** obsahuje aminovou skupinu, jejíž protonizace/koordinace by mohla být značně ovlivněna pH nebo teplotou, proto by ligand **L2** mohl být vhodný pro CEST experiment. Tato látka již byla připravena způsoby uvedenými v literatuře^[26,27,28], nebyla však studována z hlediska použitelnosti pro CEST experiment. Byl zvolen jiný postup přípravy, než je uvedeno v literatuře.



Obrázek 3.1: Ligandy, které byly připravovány v rámci bakalářské práce

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, byly použita rozpouštědla a chemikálie od firem Sigma-Aldrich, Fluka a Penta. Jako rozpouštědla pro NMR byla použita D₂O (99,8 %, CHEMOTRADE) a CDCl₃ (99,95 %, ALDRICH).

t-Bu₃DO3A·HBr..... Interpharma
IDA..... SAS Scientific chemicals ltd.
paraformaldehydodfiltrován ze starých roztoků formaldehydu (Lachema)

4.2 Přístroje a metody charakterizace

4.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

Při tenkovrstvé chromatografii byly používány chromatografické destičky typu *Silufol*[®] (*Kavalier*) se sorbentem Silpearl (širokopórový silikagel) na hliníkové. Mobilní fáze a detekční činidla jsou uvedeny u jednotlivých látek.

Detekční činidla:

0,5% ethanolický roztoku ninhydrinu

jód

5% vodný roztok CuSO₄

4.2.2 HPLC

Látka **9** a ligand **L2** byly analyzovány na koloně Luna phenyl-hexyl 150×4,6 mm (Phenomenex), průtoková rychlost 1 ml·min⁻¹, detekce při 254 nm, mobilní fáze pro jednotlivé látky jsou uvedeny níže.

4.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla naměřena na přístroji Bruker ESQUIRE 3000 ES-ion trap (ionizace elektrosprejem) Bc. Miroslavem Pniokem nebo RNDr. Vojtěchem Kubíčkem, Ph.D. v pozitivním i negativním módu. Dále jsou uváděny jen ty signály, které se podařilo interpretovat.

4.2.4 NMR spektroskopie

NMR spektra byla měřena na přístrojích VNMR300, Varian ^{UNITY} INOVA 400 a Bruker Advance (III) 600. Není-li uvedeno jinak, byla měření prováděna při 25 °C. Signály jsou popsány následujícími zkratkami: s (singlet), bs (broad singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet).

Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v ppm (zaokrouhlení na dvě desetinná místa pro ^1H , v případě ^{13}C a ^{31}P na jedno), interakční konstanty v Hz. Jako interní standard byl použit *t*-BuOH ($\delta_{\text{H}} = 1,25$ ppm). Spektra byla měřena RNDr. Zuzanou Kotkovou a RNDr. Janem Plutnarem, Ph.D.

4.2.5 Elementární analýza

Procentuální zastoupení C, H, N a P byla stanovena Ivanou Strašlipkovou z Ústavu makromolekulární chemie AVČR v Praze na automatickém analyzátoru Perkin Elmer 2400. Hmotnostní procenta jsou uvedena na dvě desetinná místa a jsou určena jako průměr ze dvou prováděných měření. Na prvním místě je uváděna naměřená hodnota, v závorce hodnota spočtená. Ligand **L1** tvoří podle rentgenostrukturní analýzy stechiometrický adukt s vodou (hydrát), ale „větrá“, proto je uvedena teoretická hodnota nejlépe vyhovující stechiometrickému aduktu.

4.2.6 Stanovení teploty tání

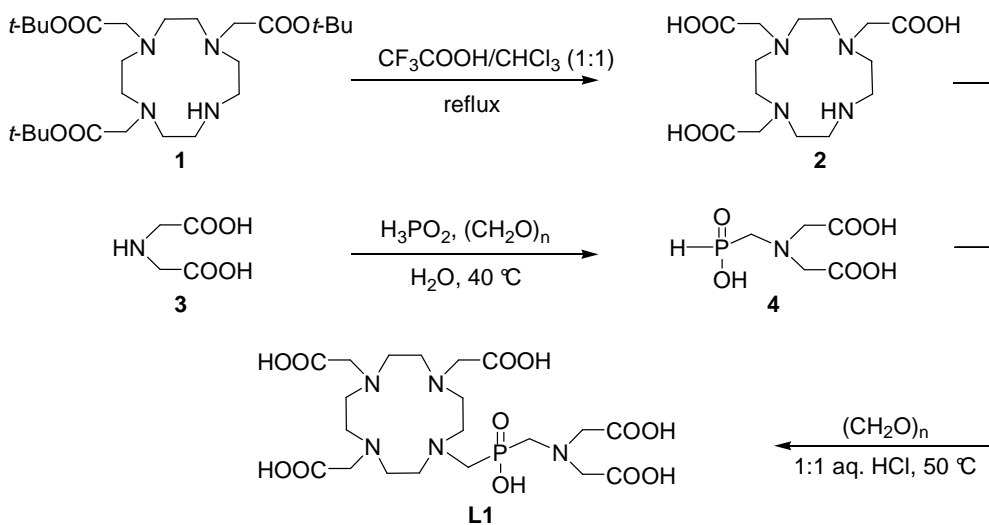
U některých látek byla stanovována teplota tání na bodotávku Bücher B-540.

4.2.7 Rentgenostrukturní analýza

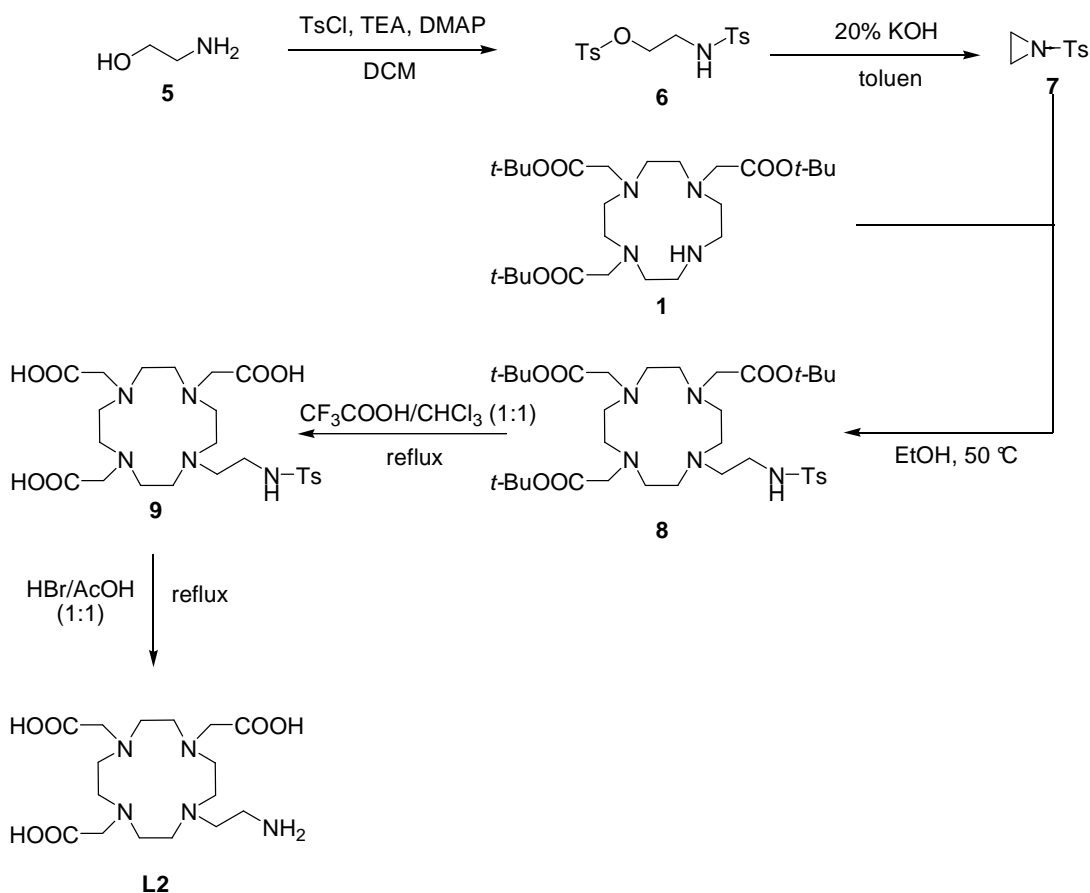
Měření bylo provedeno RNDr. Ivanou Císařovou, CSc. na difraktometru NONIUS KAPPA CCD se zářením Mo-K α , která též strukturu vyřešila pomocí programu SIR92. Vypřesnění bylo provedeno doc. RNDr. Janem Kotkem, Ph.D. pomocí programu SHELXL97, vizualizace byla provedena pomocí programu PLATON.

4.3 Syntetická část

Schémata přípravy ligandů **L1** a **L2** jsou uvedeny na obrázku 4.1 a 4.2.



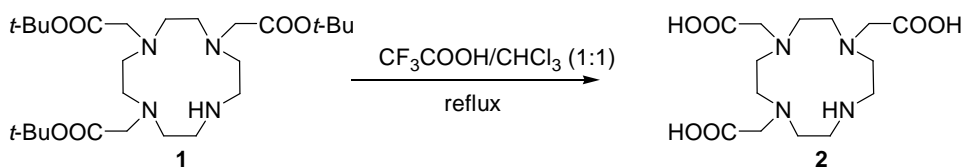
Obrázek 4.1: Příprava ligandu L1.



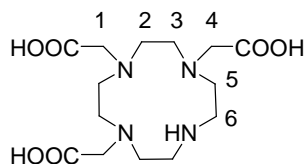
Obrázek 4.2: Příprava ligandu L2.

4.3.1 Příprava látky 2

1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina, DO3A

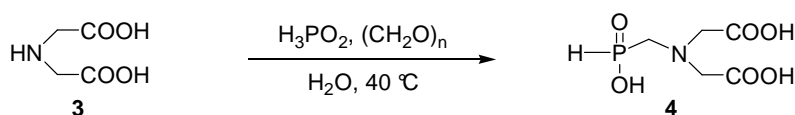


K 3,86 g látky **1·HBr** (6,5 mmol) ve 250ml baňce bylo přidáno 40 ml CF₃COOH a 40 ml CHCl₃. Vzniklá směs byla refluxována na olejové lázni při 80 °C po dobu 24 hodin. Následně byla reakční směs odpařena do sucha na rotační vakuové odparce. Po odpaření byla do baňky přidána destilovaná voda a vzniklá směs byla opět odpařena do sucha. Tento postup byl ještě dvakrát zopakován. Látka **2** nebyla izolována, ale ponechána ve formě vodného roztoku (20 ml H₂O) pro následnou reakci – vodné prostředí zabraňovalo případné laktamizaci látky **2**; pozorováno v laboratoři dříve^[29].

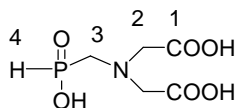
Charakterizace látky 2:

MS: (+) 346,9 [M+H]⁺.

¹H NMR: (399,95 MHz, D₂O): 2,53-2,98 (H-2,3,5, m, 12H), 3,12-3,29 (H-4, 6, m, 8H), 3,88 (H-1, s, 2H).

4.3.2 Příprava látky 4***N,N*-bis(karboxymethyl)aminomethylfosfinová kyselina**

Do 250ml baňky bylo naváženo 5,02 g látky **3** (37,7 mmol). Za laboratorní teploty bylo do baňky přilito 50 ml vody. Tato směs byla míchána a zahřívána na 40 °C. Během 10 minut bylo do směsi postupně přidáno 24,82 g 50% roztoku H₃PO₂ (188,1 mmol, 5 ekv.). V průběhu přidávání H₃PO₂ se látka **3** začala částečně rozpouštět. V průběhu následující hodiny bylo postupně přidáváno 1,25 g (CH₂O)_n (41,7 mmol, 1,1 ekv.). Do vzniklé reakční směsi bylo ještě přidáno 20 kapek konc. kyseliny chlorovodíkové. Reakce byla ponechána míchat při 40 °C po dobu 24 hodin. Látka **4** se vyloučila ve formě bílého prášku nerozpustného v reakční směsi. Vzniklá suspenze byla zfiltrována na fritě S3. Produkt byl za horka rozpuštěn v destilované vodě a rekrystalizován po přidavku 20 kapek HCl. Vyloučené bílé krystalky byly zfiltrovány. Výtěžek reakce byl 2,8 g, tj. 35 %.

Charakterizace látky 4:

MS: (-) 209,5 [M-H]⁻.

¹H NMR: (399,95 MHz, D₂O/NaOD): 3,47 (H-3, d, 2H, ²J_{HP} = 10,4), 4,19 (H-2, s, 4H), 7,26 (H-6, d, 1H, ¹J_{HP} = 553,1).

¹³C NMR: (150,93 MHz, D₂O/NaOD): 53,7 (C-3, d, 1C, ¹J_{CP} = 83,0), 57,5 (C-2, s, 2C), 169,2 (C-1, s, 2C).

³¹P NMR: (161,91 MHz, D₂O/NaOD): 10,2 (s).

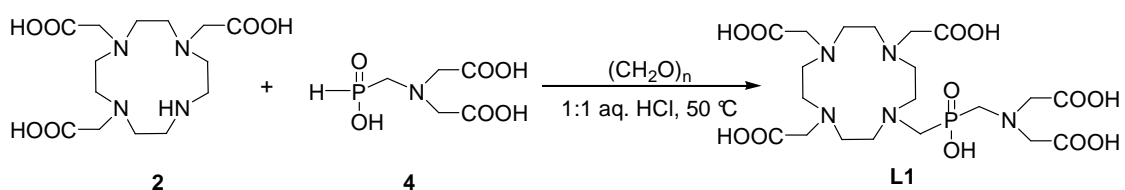
$^{31}\text{P NMR}\{^1\text{H}\}$: (161,91 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$): 11,9 (d, $^1J_{\text{HP}} = 553,1$).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_6\text{P}$, $M_r = 211,02$) C: 28,44 (28,45), H: 4,60 (4,77), N: 6,54 (6,63), P: 14,48 (14,67).

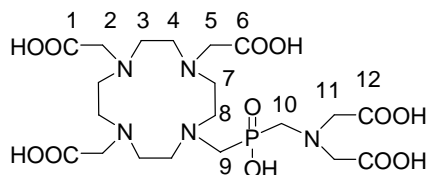
t_f : látka se rozkládá nad 200 °C.

4.3.3 Příprava ligandu L1

10-{Hydroxy[*N,N*-bis(karboxymethyl)aminomethyl]fosforyl]methyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina



K vodnému roztoku látky **2**, připraveném podle postupu 4.3.1, bylo přidáno do 100ml baňky 20 ml konc. kyseliny chlorovodíkové a 2,73 g látky **4** (12,9 mmol, 2,0 ekv.). Vzniklá směs byla zahřána na 50 °C. V průběhu 1,5 hodiny bylo do reakční směsi přidáno 0,58 g $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (19,3 mmol, 3,0 ekv.). Reakční směs byla míchána při této teplotě přes noc. Vznik produktu byl potvrzen hmotnostní spektrometrií. Vzniklý žlutý roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce. Po odpaření byla do baňky přidána destilovaná voda a vzniklá směs byla opět odpařena do sucha. Tento postup byl ještě dvakrát zopakován. Odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50 – 100 mesh, H^+ -cyklus). Kolona byla důkladně vypláchnuta vodou. Vodou byl eluován vedlejší produkt výše uvedené reakce – (hydroxymethyl)-*N,N*-bis(karboxymethyl)aminomethylfosfinová kyselina (**10**). Eluát této látky byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce a rekrystalizován z horké vody. Charakterizace látky **10** je uvedena níže. Produkt **L1** byl eluován 5% roztokem NH_3 . Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Po odpaření byla do baňky přidána destilovaná voda a vzniklá směs byla opět odpařena do sucha. Tento postup byl ještě dvakrát zopakován. Odparek, nažloutlý olej látky **L1**, byl dále rozpuštěn v malém množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném aniontovém iontoměniči (Dowex 1, CH_3COO^- -cyklus). Nečistoty (především DO3A) byly eluovány vodou a 2% AcOH. Produkt reakce **L1** byl eluován 20% roztokem AcOH. Eluát byl několikrát odpařen na rotační vakuové odparce, poté byl rozpuštěn v malém množství vody a byl převrstven 3 ml EtOH. Produkt **L1** se vyloučil v podobě bílého prášku, který byl následně odfiltrován na fritě S3. Výtěžek reakce byl 2,32 g (63 %).

Charakterizace produktu L1:

MS: (-) 568,0 [M-H]⁻.

¹H NMR: (399,95 MHz, D₂O, 80 °C): 3,25 (H-7,8, m, 8H, ³J_{HH} = 12,8 MHz), 3,42 (H-9,10, bs, 4H), 3,54 (H-3,4, m, 8H, ³J_{HH} = 16,8), 3,83 (H-5, s, 4H), 4,01 (H-2, s, 2H), 4,24 (H-11, s, 4H).

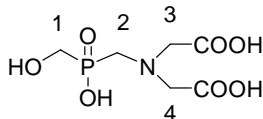
¹³C NMR: (150,93 MHz, D₂O): 48,3 a 49,1 (C-3,8, 4C), 50,9 a 51,5 (C-4,7, 4C), 51,2 (C-9[†], d, 1C, ¹J_{CP} = 89,0), 53,6 (C-10[†], d, 1C, ¹J_{CP} = 81,5), 55,8 (C-2, 1C), 56,7 (C-11, 2C), 58,8 (C-5, 2C).

³¹P-NMR: (121,42 MHz, D₂O): 25,0 (s).

³¹P NMR{¹H }: (121,42 MHz, D₂O): 25,0 (s).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro C₂₀H₃₆N₅O₁₂P·3,5H₂O, M_r = 632,20) C: 37,93 (37,98), H: 6,50 (6,85), N: 10,8 (11,07), P: 4,78 (4,90).

t_i: látka se rozkládá při 192 °C.

Charakterizace látky 10:

MS: (-) 239,5 [M-H]⁻.

¹H NMR: (299,94 MHz, D₂O): 3,37 (H-2, d, 2H, ²J_{HP} = 8,7), 3,50 (H-1, d, 2H, ²J_{HP} = 6,3), 4,11 (H-3,4, s, 4H).

³¹P NMR: (121,42 MHz, D₂O): 27,9 (s).

³¹P NMR{¹H }: (121,42 MHz, D₂O): 27,9 (s).

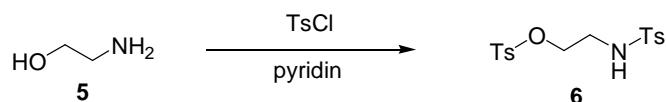
Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro C₆H₁₂NO₇P, M_r = 241,04) C: 29,71 (29,89), H: 4,88 (5,02), N: 5,70 (5,81).

t_i: látka se rozkládá při 203 °C.

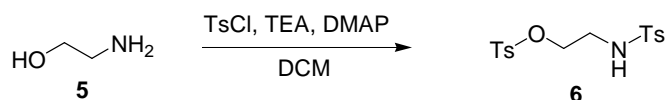
[†] signály mohly být zaměněny

4.3.4 Příprava látky 6

O,N-Di-(*p*-toluensulfonyl)ethanolamin

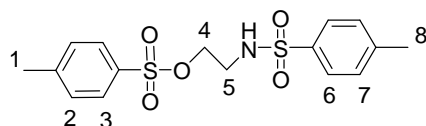


Reakce byla provedena podle postupu uvedeného v literatuře^[30]. Bylo naváženo 12 g ethanolaminu (196,6 mmol). Navážka byla rozpuštěna v 15 ml pyridinu. Vzniklý roztok byl převeden do 250ml baňky a chlazen směsí vody s ledem. V 50 ml pyridinu bylo rozpuštěno 80 g *p*-toluensulfonyl chloridu (TsCl) (419,6 mmol, 2,1 ekv.). Vzniklý roztok byl v průběhu 30 minut postupně přidáván k roztoku ethanolaminu za stálého chlazení a míchání. Vzniklá směs byla ponechána míchat přes noc. Následně byly do reakční směsi přidány 2 ml vody pro odstranění nadbytku TsCl. Reakční směs byla nalita na 500 g rozdrčeného ledu, okyselena 20 ml kyseliny chlorovodíkové a triturována. Vzniklý bílý prášek byl zfiltrován a promyt vodou. Rekrystalizace byla provedena ze směsi toluen/hexan. Připravený bílý prášek obsahoval na základě NMR spekter směs sloučeniny **6** a *N*-(*p*-toluensulfonyl)ethanolaminu. Proto byl zvolen jiný postup přípravy látky **6**.



Návážka 10 g ethanolaminu (163,8 mmol) byla rozpuštěna v 50 ml dichlormethanu. Roztok byl převeden do 250 ml baňky. Do reakční směsi bylo přidáno 68,7 g TsCl (360,3 mmol, 2,2 ekv.), 33,1 g triethylaminu (327,3 mmol, 2 ekv.) a 0,2 g DMAP (1,6 mmol, 0,01 ekv.). Reakční směs byla míchána a chlazena směsí ledu a vody po dobu 12 hodin. Vyloučená bílá látka byla zfiltrována a rekrystalizována ze směsi toluen/hexan. Z NMR spektra bylo patrné, že je ve směsi nezregovaný TsCl, proto byla provedena rekrystalizace z horkého EtOH. Bylo získáno 36,2 g (60 %).

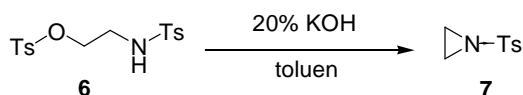
Charakterizace látky 6:



¹H NMR: (299,94 MHz, CDCl₃): 2,41 (H-1,8, s, 6H), 3,19 (H-5, t, 2H), 4,03 (H-4, t, 2H), 7,25–7,70 (H-2,3,6,7, m, 8H).

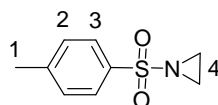
4.3.5 Příprava látky 7

N-(*p*-toluensulfonyl)aziridin



Reakce byla provedena pole postupu uvedeného v literatuře^[31]. Bylo naváženo 27,2 g (74,5 mmol) látky **6**. Navážka byla přenesena do 1l baňky a rozpuštěna v 580 ml toluenu. Vzniklý roztok byl intenzivně míchán na magnetické míchačce. Do reakční směsi bylo najednou přilito 110 ml 20% roztoku KOH. Takto vzniklá reakční směs byla intenzivně míchána pod dobu 1 hodiny, poté byla přelita do dělicí nálevky. Reakční směs byla protřepána s 500 ml vody. Byla oddělena toluenová fáze, která byla usušena síranem sodným a následně byla odpařena na rotační vakuové odparce. Zbylá bílá olejovitá látka byla dána na 5 minut do lednice za vyloučení bílého sypkého prášku. Bylo získáno 13,5 g látky **7** (93 %).

Charakterizace látky 7:



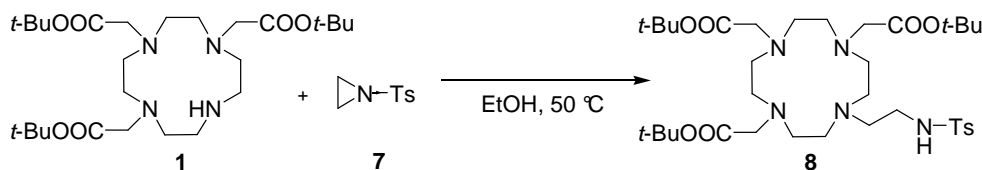
TLC: Silufol[®] (Kavalier), EtOH/aq. NH₃ 2:1, detekce I₂, $R_f = 0,87$; Silufol[®] (Kavalier), CHCl₃, detekce I₂, $R_f = 0,57$.

¹H NMR: (299,94 MHz, CDCl₃): 2,32 (H-1, s, 3H), 2,40 (H-4, s, 4H), 7,31 (H-2, d, 2H, ³J_{HH} = 8,2), 7,78 (H-3, d, 2H, ³J_{HH} = 8,4)

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro C₉H₁₁NO₂S, $M_r = 197,25$) C: 54,60 (54,80), H: 5,39 (5,62), N: 6,32 (7,10), S: 16,67 (16,26).

4.3.6 Příprava látky 8

1-[2-(*N*-*p*-toluensulfonyl)amino-ethyl]-4,7,10-tris(*t*-butylcarboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan



V 5 ml EtOH bylo rozpuštěno 1,02 g látky **1**·HBr (1,7 mmol). Roztok byl nanesen na silný aniontový iontoměnič (Dowex 1, OH⁻- cyklus) a eluován EtOH. Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn ve 20 ml bezvodého EtOH. Vzniklý roztok byl zahříván na termostatované lázni na 50 °C. V průběhu 10 minut bylo do reakční směsi přidáno 0,326 g látky **7** (1,7 mmol, 1 ekv.). Reakce byla míchána při 50 °C po dobu 2 dnů a její průběh byl kontrolován pomocí TLC a MS. V průběhu reakce začala v reakční směsi vznikat nerozpustná bílá látka (patrně polymerizací látky **7**). Tato látka byla odfiltrována a do reakční směsi bylo přidáno 0,163 g látky **7** (0,8 mmol, 0,5 ekv.). Vzniklá nerozpustná látka byla opět odfiltrována. Reakční směs byla odpařena do sucha a byl odebrán vzorek na NMR. Kvantitativní průběh reakce byl ověřen poměrem intenzit signálů tercbutylových a aromatických vodíků. Bylo získáno 1,08 g žlutého oleje látky **8** (89 %).

Charakterizace látky **8**:

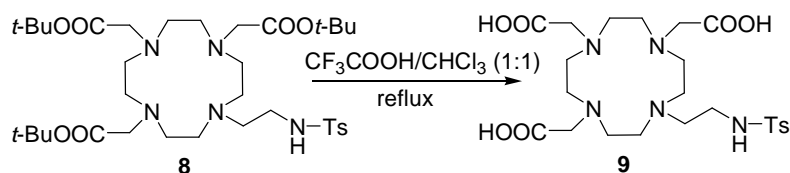
MS: (+) 712,4 [M+H]⁺.

TLC: Silufol[®] (Kavalier), CHCl₃/CH₃OH 10:1, detekce I₂, CuSO₄, ninhydrin, R_f = 0,15-0,35.

¹H NMR: (399,95 MHz, CDCl₃): 1,43 (*t*-Bu, s, 27H), 2,39 (CH₃-arom., s, 3H), 2,46-3,02 (cyklus, N-CH₂-CH₂-NHTs, m, 20H), 3,27 (CH₂CO, s, 2H), 3,14 (CH₂CO, s, 4H), 7,28 (arom., d, 2H, ³J_{HH} = 8,4), 7,73 (arom., d, 2H, ³J_{HH} = 8,2).

4.3.7 Příprava látky **9**

1-[2-(*N*-*p*-toluensulfonyl)amino-ethy]-4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan



Do 50ml baňky bylo naváženo 0,87 g (1,2 mmol) oleje látky **8** a bylo přidáno 10 ml CF₃COOH a 10 ml CHCl₃. Reakční směs byla pod refluxem zahřívána na 80 °C pod dobu 24 hodin. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 0,64 g nepřečištěného žlutého oleje látky **9**. Pro účely charakterizace byla látka **9** přečištěna na HPLC.

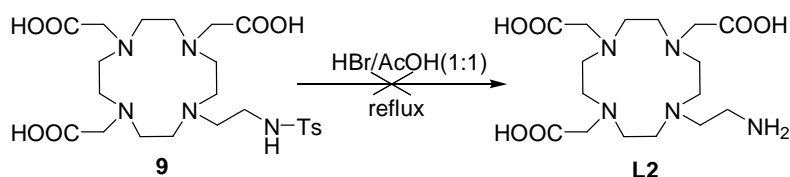
Charakterizace látky **9**:

MS: (+) 544,2 [M+H]⁺.

$^1\text{H NMR}$: (600,17 MHz, D_2O): 2,45 (CH_3 -arom., s, 3H), 3,15-3,37 (cyklus, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHTs}$, m, 18H), 3,63-3,85 (CH_2CO , $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHTs}$, m, 8H), 7,50 (arom., d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$), 7,79 (arom., d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$).

4.3.8 Příprava ligandu L2

1-[2-amino-ethyl]-4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan



Do 50ml baňky bylo naváženo 0,525 g nepřečištěného žlutého oleje látky **9**, který byl následně rozpuštěn v 5 ml AcOH a v 5 ml HBr. Reakční směs byla na olejové lázni refluxována při 130 °C po dobu 20 hodin. Poté byla reakční směs odpařena do sucha a přečištěna na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ -cyklus). Kyselé nečistoty byly eluovány H_2O . Produkt reakce **L2** s dalšími nečistotami byl eluován 5% roztokem NH_3 . Eluát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 420 mg žlutého oleje, z kterého byl odebrán vzorek pro MS. Hmotnostní spektrometrií byla prokázána přítomnost nezregovované DO3A (+) 345,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ a neznámé látky (+) 313,9. Proto byl získaný olej látky **L2** s nečistotami dále přečišťován na slabém kationtovém iontoměniči (Amberlite 50, 160–200 mesh, H^+ -cyklus, 150 ml). Nezreagovaná DO3A byla eluována v prvních dvou objemech kolony vodou. Produkt byl eluován vodou společně s nečistotou v následujících čtyřech objemech kolony a poté také 0,5–20% kyselinou octovou. Tyto dvě látky, tj. ligand **L2** a neznámá nečistota, se posléze nepodařilo rozseparovat ani na koloně SiO_2 (25 ml) – mobilní fáze IPAV 5:1:1, při jímání frakcí po 2 ml i přes rozdíl v retenčních faktorech ($\Delta R_f = 0,1$). Úspěšná nebyla ani separace na SiO_2 , kdy jako mobilní fáze byl použit IPAV (7:3:3).

Charakterizace látky L2:

MS: (+) 390,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

TLC: Silufof[®] (Kavalier), IPAV (7:3:3), detekce ninhydrin, $R_f = 0,65$; IPAV (5:1:1), detekce ninhydrin, $R_f = 0,18$.

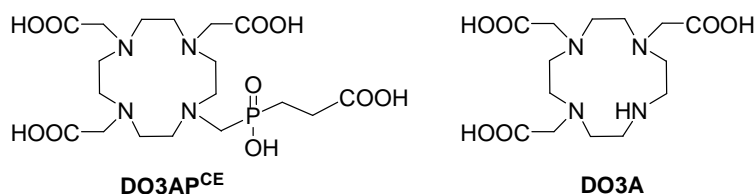
4.4 Kinetické studie ligandu L1

Jako ion kovu pro studium formační a disociační kinetiky komplexu ligandu **L1** byl zvolen ion trojmocného ceru. Rychlost komplexace a dekomplexace byly studovány spektrofotometricky na UV-VIS-spektrofotometru Hewlett Packard HP 8453A (jednopaprskový „diode-array“

spektrofotometr s mikroprocesorovou kontrolou, vlnový rozsah 190–1100 nm s přesností $\pm 0,005$ nm při 400 nm, wolframová a deuteriová lampa). Kinetická měření byla provedena v 1,000 cm termostatované křemenné kyvetě. Matematické vyhodnocení rychlostních konstant bylo provedeno v programu Pro-K II.

4.4.1 Formační kinetika komplexu Ce–L1

Rychlost vzniku komplexu ligandu **L1** s Ce^{3+} byla studována v závislosti na pH a srovnána s rychlostí komplexace ligandů **DO3A** a **DO3AP^{CE}** (obrázek 4.3). Koncentrace ligandu byla při všech měřeních $1 \cdot 10^{-3}$ M. Různé hodnoty pH byly nastavovány acetátovým nebo MES pufrům, koncentrace pufrů byla vždy 0,1 M. Konstantní iontová síla (0,1 M) byla nastavována 2M roztokem KCl. Teplota byla termostatem udržována na hodnotě $25,0 \pm 0,1$ °C.



Obrázek 4.3: Ligandy, se kterými byla srovnána formační kinetika ligandu **L1**.

4.4.2 Disociační kinetika komplexu Ce–L1

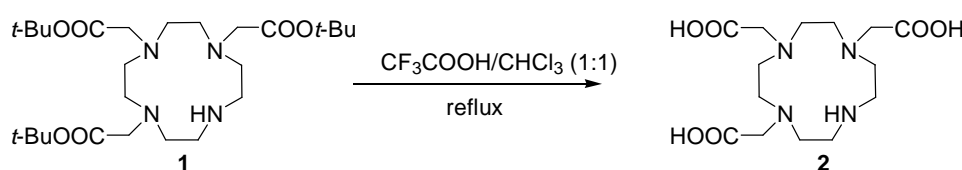
Studium disociační kinetiky komplexu Ce–**L1** bylo prováděno při extrémních podmínkách, tj. koncentrace H^+ iontů v rozsahu 1–3 M, konstantní iontová síla $I = 3$ M nastavovaná HClO_4 a NaClO_4 (koncentrace NaClO_4 byla v rozmezí 0–2 M podle koncentrace H^+ iontů z HClO_4). Disociace komplexu byla prováděna při různých teplotách 25–50 °C. Roztok komplexu byl připraven smícháním 1 ekvivalentu Ce^{3+} s 1,2 ekvivalenty ligandu **L1** tak, aby výsledná koncentrace komplexu Ce–**L1** v celkovém objemu zásobního roztoku byla $1 \cdot 10^{-3}$ M. Pro rychlou komplexaci Ce^{3+} bylo do roztoku postupně přidáváno 9 ekvivalentů NaOH. Během přidávání začala v roztoku vznikat žlutá sraženina, kterou se nepodařilo za horka rozpustit, proto byla odfiltrována. Zásobní roztok byl následně doplněn redestilovanou vodou na rysku.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Syntéza prekurzorů a ligandů

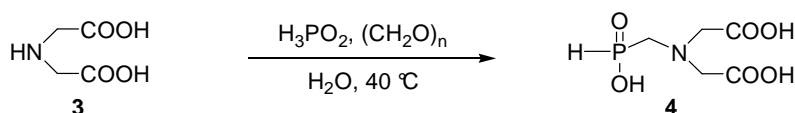
Všechny látky, které byly připravovány v rámci této bakalářské práce, jsou uvedeny na schématech na obrázcích 4.1 a 4.2 (str. 19–20).

5.1.1 Příprava látky 2



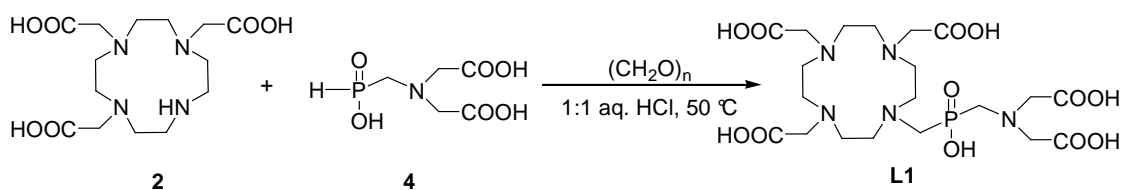
Příprava látky 2 byla provedena za typických podmínek pro odstranění *tert*-butylových skupin, tj. var v CHCl_3 a CF_3COOH (1:1). Po zreagování byla reakční směs několikrát odpařena s vodou pro odstranění nadbytku CF_3COOH . Pro zabránění laktamizace látky 2 (pozorováno v laboratoři dříve^[29]) nebyla tato látka ponechána stát ve formě odparů, ale byla naředěna a uschována ve formě vodného roztoku.

5.1.2 Příprava látky 4

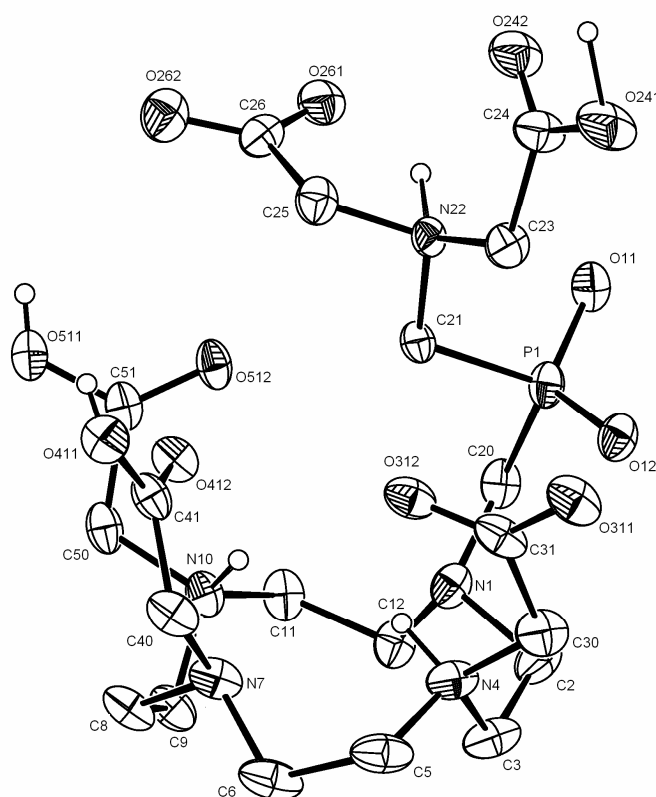


Reakce byla provedena podle postupu již dříve vyzkoušeném na našem pracovišti^[32]. Pro přípravu bylo využito Mannichovy reakce. Bylo vyzkoušeno více reakčních podmínek (např. více zředěná reakční směs nebo různé koncentrace přidané HCl), avšak výše uvedené reakční podmínky poskytovaly nejvyšší výtěžky.

5.1.3 Příprava ligandu L1



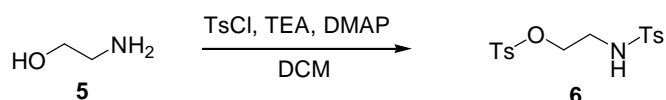
Při přípravě ligandu **L1** bylo také využito Mannichovy reakce. Reakce proběhla kvantitativně. Nečistoty byly odstraněny na silném kationtovém a aniontovém iontoměničči. Jako vedlejší produkt reakce byla izolována látka **10**, která byla plně charakterizována. Získaný bílý olej látky **L1** byl rozpuštěn v malém množství vody a vysrážen přidávkem bezvodým EtOH. Malé množství takto získaného bílého prášku bylo rozpuštěno ve 0,5 ml destilované vody v malé úzké vialce, která byla dána do větší vialky, na jejímž dně bylo malé množství 96% EtOH. Po uzavření byl za laboratorní teploty ponechán EtOH difunovat do vodného roztoku ligandu **L1** v malé vialce. Během tří týdnů se podařilo vypěstovat monokrystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu (obrázek 5.1).



Obrázek 5.1: Molekulární struktura **L1** ze struktury **L1·4H₂O**. Teplotní elipsoidy jsou vykresleny s 50% pravděpodobností. Pro přehlednost nejsou zobrazeny vodíky vázané na uhlících.

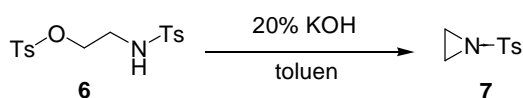
Krystalografická data: **L1·4H₂O**, C₂₀H₃₆N₅O₁₂·4H₂O, $M_r = 641$, triklinická, $a = 9,5462(4) \text{ \AA}$, $b = 10,7017(7) \text{ \AA}$, $c = 16,051(1) \text{ \AA}$, $\alpha = 100,877(2)^\circ$, $\beta = 95,356(4)^\circ$, $\gamma = 112,760(3)^\circ$, $U = 1459,66(15) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, prostorová grupa $P-1$, $R_1(\text{int}) = 0,0731$, $wR_2(\text{all}) = 0,2419$.

5.1.4 Příprava látky **6**



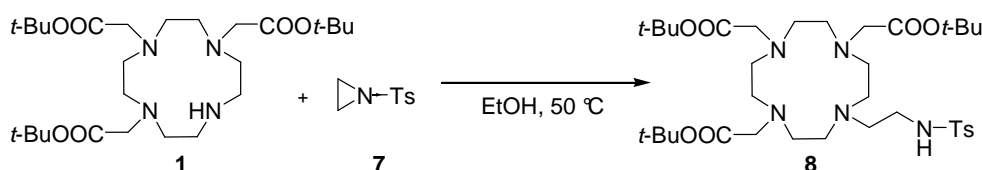
Při přípravě látky **6** bylo nejdříve postupováno podle literatury^[30], nepodařilo se ovšem připravit čistý produkt, ale pouze směs látky **6** a *N*-(*p*-toluensulfonyl)ethanolaminu. Ethanolamin zcela nezreagoval nejspíše vlivem špatného teplotního režimu nebo vlivem nekvalitního pyridinu. Proto byly zvoleny jiné reakční podmínky (tj. přítomnost báze ve formě triethylaminu, dichlormethan jako rozpouštědlo) a bylo přidáno 0,01 ekv. DMAP jako katalyzátoru.

5.1.5 Příprava látky **7**



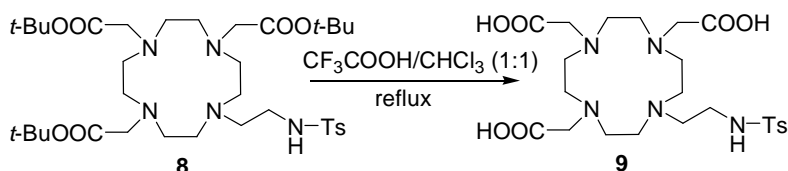
Látka **7** byla připravena podle literatury^[31]. Reakce proběhla kvantitativně během 1 hodiny.

5.1.6 Příprava látky **8**



Bylo prokázáno, že látka **8** vzniká v menším množství při reakci z *t*-Bu₃do3a·HBr (**1**·HBr) než při reakci z *t*-Bu₃do3a volné (**1**). Bromid zde mohl působit jako nukleofilní činidlo a reagovat s TsAz (látkou **7**). Proto byla *t*-Bu₃do3a·HBr převedena na volnou *t*-Bu₃do3a na silném aniontovém iontoměniči. Reakce byla prováděna za různých reakčních podmínek, tj. různé teploty a různá rozpouštědla (bezvodý EtOH, toluen a chloroform). Největší poměr látky **8** k nezreagované látce **1** byl dosáhnout v bezvodém EtOH při 50 °C. Za těchto reakčních podmínek nezreagovaný TsAz (látkou **7**) degraduje (nejspíše polymeruje) za vzniku nerozpustného produktu. Této skutečnosti bylo využito pro odstranění nezreagovaného TsAz (**7**). Jeho nepřítomnost v reakční směsi byla kontrolována pomocí TLC. Reakce se ukázala jako stericly náročná, proto po přidání **1** ekv. TsAz k látce **1** nevznikla látka **8** kvantitativně a nezreagovaný TsAz nejspíše zpolymeroval. Jako vhodné sekvenční uspořádání se prokázalo být míchání při 50 °C po dobu 2 dnů s **1** ekv. TsAz a po odfiltrování nezreagovaného TsAz přidání 0,5 ekv. TsAz a míchání reakční směsi za stejných reakčních podmínek po dobu následujícího dne. Pokusy o oddělení vzniklé látky **8** od malého množství nezreagované látky **1** ztroskotaly na rozkladu látky **8** na látku **1** na kyselém silikagelu (mobilní fáze CHCl₃/CH₃OH 10:1). Stejný problém nastával i v amoniakálních soustavách. Z tohoto důvodu nebylo malé množství výchozí látky **1** od látky **8** separováno.

5.1.7 Příprava látky 9

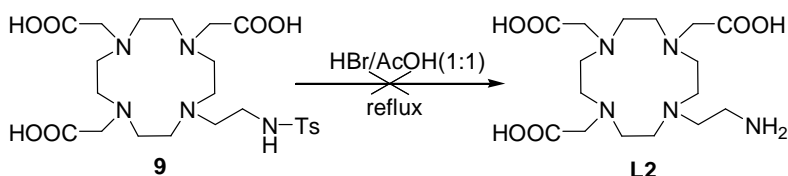


Reakce byla provedena za typických podmínek pro odstranění *tert*-butylových skupin, tj. var v CHCl_3 a CF_3COOH (1:1). Po zreagování byla reakční směs několikrát odpařena s vodou pro odstranění nadbytku CF_3COOH . Při přidávání vody se látka **9** vysrážela jako bílý olejovitý materiál, po úplném odpaření vody byla látka **9** ve formě žlutého oleje. Separace od nečistoty (DO3A), která byla v reakční směsi přítomna z předchozího reakčního kroku, nebyla provedena z časových důvodů. Pro účely NMR charakterizace byla látka **9** přečištěna na HPLC za podmínek gradientové eluce 1. Vyzkoušené gradientové eluce a retenční časy látky **9** a nečistoty (DO3A) jsou uvedeny v tabulce 5.1. Po zintegrování chromatogramů byl obsah nečistoty (DO3A) v oleji látky **9** určen přibližně na 4 %.

Tabulka 5.1: Podmínky použitých gradientových elucí pro charakterizaci a separaci látky **9**; složka A = MeCN, složka B = 0,1% roztok TFA (hodnota obsahu složky B v mobilní fázi byla po celou dobu separace konstantní) a C = H_2O (vždy dopočet do 100 %).

gradientová eluce	složka A	složka B	DO3A t_R [min]	látka 9 t_R [min]
1	0–15 min: z 15 na 35 %	40 %	3,7	6,9
2	0–15 min: z 15 na 60 %	20 %	2,0	4,0

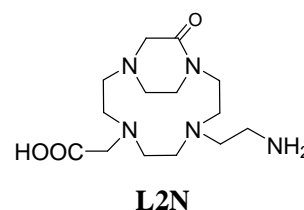
5.1.8 Příprava ligandu L2



Odstranění chránící tosylové skupiny bylo provedeno varem ve směsi HBr a AcOH. Kyselé nečistoty byly odstraněny na silném kationtovém iontoměničce. Z intenzit signálů na HPLC (tabulka 5.2) bylo zjištěno, že při této reakci vzniká ligand **L2** pouze v malém množství. Ve velké míře byla přítomna v reakční směsi DO3A (více jak 40 %) a neznámá nečistota **L2N**, která by podle MS mohla odpovídat laktamu látky **L2** bez jedné acetylové skupiny (tato nečistota se ovšem zdá velmi nepravděpodobná). Z dané směsi se podařilo na slabém kationtovém

iontoměníči odseparovat DO3A. Neznámá nečistota se nepodařila od ligandu **L2** odseparovat ani na SiO₂.

Látka **9** při této hydrolyze nejspíše podléhá β -eliminaci. Proto se nejví vhodně připravovat ligand **L2** pomocí výše uvedeného reakčního schématu. Tosylová skupina nejspíše snižuje elektronovou hustotu na aminoethylenové skupině natolik, že toto pendantní rameno za vysoké teploty v přítomnosti HBr a AcOH také odstupuje, o čemž svědčí i vysoký obsah DO3A v reakční směsi.



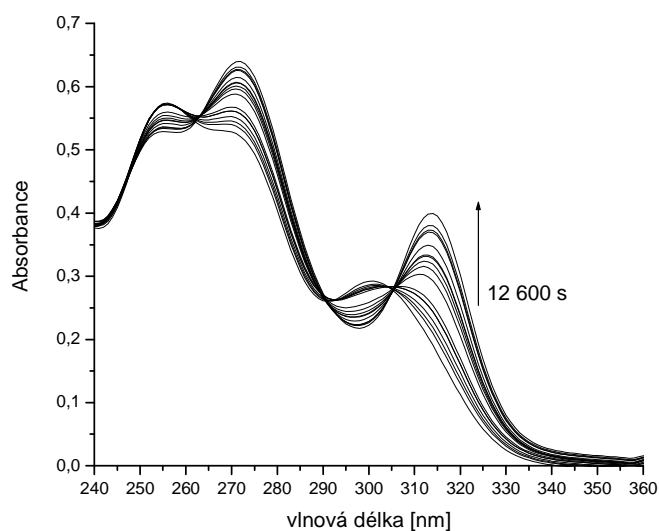
Tabulka 5.2: Podmínky gradientové eluce použité pro charakterizaci a určení zastoupení ligandu **L2** a nečistot v reakční směsi; složka A = MeCN, složka B = 0,1% roztok CH₃COONH₄ (hodnota obsahu složky B v mobilní fázi byla vždy konstantní) a C = H₂O (vždy dopočet do 100 %).

gradientová eluce	složka A	složka B	L2	DO3A	Nečistota; MS:[313,9] ⁺
			<i>t_R</i> [min]	<i>t_R</i> [min]	<i>t_R</i> [min]
3	0–20 min: z 0 na 20 %	40 %	1,7	3,0	6,3

5.2 Kinetické studie ligandu L1

5.2.1 Formační kinetika komplexu Ce–L1

Typický set spekter naměřených při komplexaci ligandu **L1** s iontem trojmocného ceru je zobrazen na obrázku 5.2. Charakteristická absorpční maximum pro koordinaci trojmocného ceru do dutiny makrocyclického ligandu typu DOTA je 315 nm.



Obrázek 5.2: Závislost absorbance na vlnové délce komplexace ligandu **L1** s Ce³⁺; $c_{L1} = 1 \cdot 10^{-3}$ M, $c_{Ce} = 1 \cdot 10^{-3}$ M (tj. poměr 1:1), pH = 6,0, $I = 0,1$ M KCl, $t = 25$ °C.

Při typických kinetických měřeních komplexací makrocyclických ligandů se často užívá metoda pseudoprvního řádu. Tato metoda se nejčastěji používá pro zjednodušení interpretace výsledků reakcí vyšších řádů^[33]. Bude-li například reakce látek A a B druhého řádu, lze její rychlost formulovat vztahem 6,

$$v = k_2[A] \cdot [B] \quad (6)$$

kde k_2 je rychlostní konstanta druhého řádu, $[A]$ a $[B]$ jsou rovnovážné koncentrace látek A a B.

Bude-li zvolena počáteční koncentrace látky B mnohem vyšší než koncentrace látky A ($[B]_0 > 10[A]_0$), můžeme říci, že koncentrace látky B se během reakce téměř nemění (tj. je konstantní). Můžeme ji tedy zahrnout do rychlostní konstanty, do tzv. rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{obs} .

$$v = k_2[A] \cdot [B]_0 = k_{\text{obs}}[A] \quad (7)$$

Rychlost koordinace iontu kovu do dutiny dusíkatého makrocyclu je ovlivněna protonací na dusíkových atomech. Tyto protony odstupují v přítomnosti OH^- iontů. Můžeme tedy říct, že OH^- ionty „katalyzují“ komplexaci do dutiny ligandu. Závislost rychlostní konstanty pseudoprvního řádu na koncentraci OH^- iontů proto lze vyjádřit vztahem^[34]:

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{OH}^-} \cdot [\text{OH}^-] + k_{\text{H}_2\text{O}}, \quad (8)$$

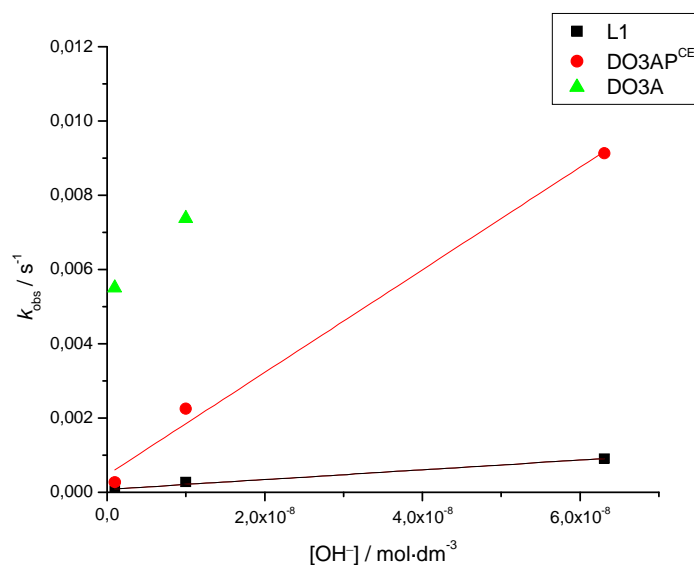
kde k_{OH^-} je rychlostní konstanta reakce, kterou katalyzují OH^- ionty, $k_{\text{H}_2\text{O}}$ je rychlostní konstanta, která charakterizuje rychlost reakce bez přítomnosti OH^- iontů. Její hodnota je obvykle velmi nízká, proto v mnoha případech ani nelze z naměřených dat věrohodně určit.

Rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{obs} pro formaci komplexů CeL, kde L je ligand **L1**, **DO3A** nebo **DO3AP^{CE}**, byly určeny pro dvacetinásobný nadbytek Ce^{3+} iontů a jsou uvedeny v tabulce 5.3.

Tabulka 5.3: Rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{obs} pro komplexaci ligandů **L1**, **DO3AP^{CE}** a **DO3A** pro různé hodnoty pH; $c_{\text{L}} = 1 \cdot 10^{-3}$ M, $c_{\text{Ce}} = 2 \cdot 10^{-2}$ M, $I = 0,1$ M KCl, $t = 25$ °C; při pH = 6,8 probíhá komplexace Ce^{3+} ligandem **DO3A** velmi rychle, proto nemůže být pozorována na použitém spektrofotometru, z tohoto důvodu není uvedena.

pH	$k_{\text{obs}} \times 10^3 [\text{s}^{-1}]$		
	L1	DO3AP^{CE}	DO3A
6,8	0,90	9,1	–
6,0	0,27	2,2	7,4
5,0	0,037	0,26	5,5

Vyneseme-li závislost rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{obs} na koncentraci hydroxidových iontů získáme, dle vztahu 8, kinetický parametr k_{OH^-} pro formaci katalyzovanou OH^- ionty. Tato závislost je pro studované ligandy zobrazena na obrázku 5.3.



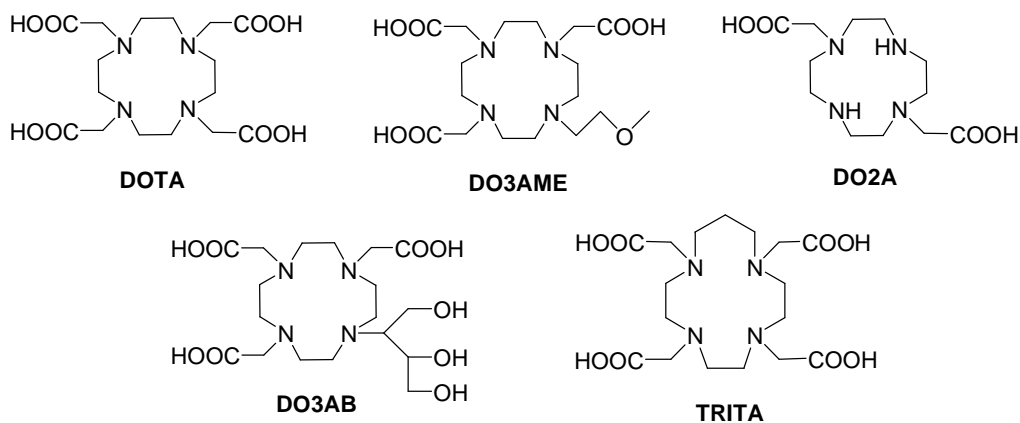
Obrázek 5.3: Závislost rychlostních konstant pseudoprvního řádu na koncentraci OH⁻ iontů pro ligandy **L1**, **DO3AP^{CE}** a **DO3A**; $c_L = 1 \cdot 10^{-3}$ M, $c_{Ce} = 2 \cdot 10^{-2}$ M, $I = 0,1$ M KCl, $t = 25$ °C; při pH = 6,8 probíhá komplexace Ce³⁺ ligandem **DO3A** velmi rychle, proto nemohla být sledována na použitém spektrofotometru, z tohoto důvodu není vynesena v grafu.

Kinetický parametr k_{OH} pro formaci katalyzovanou OH⁻ ionty, tj. směrnice ze závislosti na obrázku 5.3, je pro ligandy **L1** a **DO3AP^{CE}** uvedena v tabulce 5.2. Absolutní člen této závislosti je téměř nulový, tzn. bez přítomnosti OH⁻ iontů komplex téměř nevzniká, proto není dále uváděn ani uvažován. Pro **DO3A** tato hodnota nebyla určena z důvodu nedostatku dat. Z obrázku 5.3 je však patrné, že tato hodnota bude vyšší než pro **L1** a **DO3AP^{CE}**. Pro srovnání jsou v tabulce 5.4 uvedeny také hodnoty rychlostních konstant k_{OH} pro strukturálně příbuzné ligandy, které jsou uvedeny na obrázku 5.4. Tyto hodnoty byly převzaty z lit. [35,36].

Tabulka 5.4: Hodnoty rychlostních konstant k_{OH} pro formaci komplexu katalyzovanou OH⁻ ionty pro ligandy **L1** a **DO3AP^{CE}**; $c_L = 1 \cdot 10^{-3}$ M, $c_{Ce} = 2 \cdot 10^{-2}$ M, $I = 0,1$ M KCl, $t = 25$ °C. Pro srovnání jsou uvedeny i k_{OH} pro ligandy z obrázku 5.3, tyto hodnoty byly převzaty z lit. [35,36].

	L1	DO3AP^{CE}	DOTA[†]	DO3AME[#]	DO2A[#]	DO3AB[#]	TRITA[†]
$k_{OH} \times 10^{-5}$ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]	0,13	1,4	35	67	2,8	21	69

[†]25 °C 0,1 M KCl; [#]25 °C, 1,0 M KCl.



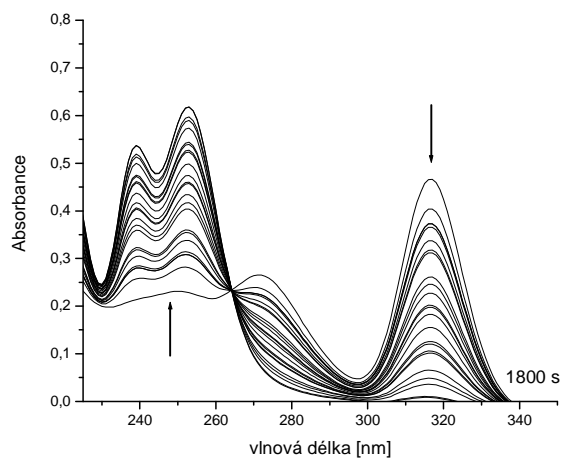
Obrázek 5.4: Ligandy, se známou hodnotou^[35,36] k_{OH} pro komplexaci Ce^{3+} .

Porovnáme-li hodnoty v tabulce 5.4, je patrné, že rychlost komplexace v případě ligandu **L1** (tj. ligandu, který má jako jednu pendantní skupinu slabě koordinující se ligand) je výrazně zpomalena oproti ostatním.

Porovnání s hodnotami v literatuře^[35,36] je jen ilustrativní, protože tyto hodnoty byly změřeny za jiných podmínek (např. rozdílné poměry koncentrací ligandů a Ce^{3+} iontů). Rozdíly naměřených hodnot rychlostních konstant od hodnot skutečných jsou také ovlivněny faktem, že při měření byl použit zásobní roztok Ce^{3+} v 1mM HCl. Tento fakt mohl způsobit výkyv v koncentraci H^+ iontů, neboť měření bylo prováděno ve velmi málo kyselých roztocích. Hodnoty pH nebyly kontrolovány pH-metrem. Avšak komplexace ligandů **L1**, **DO3AP^{CE}** a **DO3A** byly provedeny za stejných podmínek, z čehož lze jednoznačně říci, že komplexace ligandu **L1** vlivem jeho slabě se koordinujícího pendantního ramena není urychlena oproti původním spekulacím, které vedly k jeho přípravě, ale naopak výrazně zpomalena.

5.2.2 Disociační kinetika komplexu Ce–L1

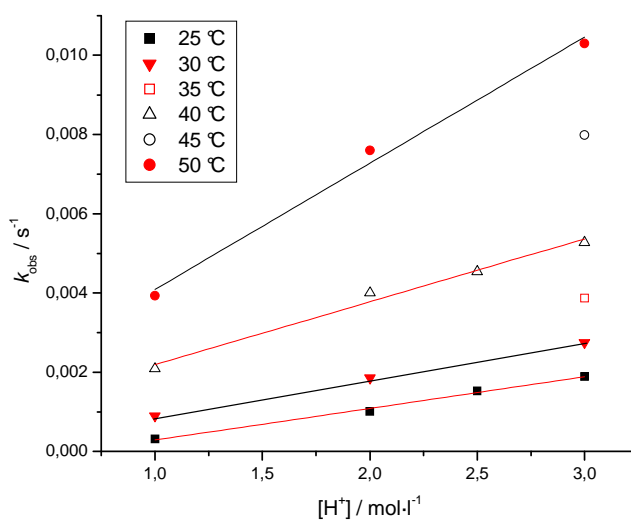
Typická časová změna závislosti absorbance na vlnové délce pro dekomplexaci Ce–**L1** je zobrazena na obrázku 5.5. Největší změna absorbance nastala při 315 nm, tj. charakteristické vlnové délce pro ion Ce^{3+} vázaný v dutině makrocyklu. Pro vlnovou délku 315 nm byly vyhodnoceny rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{obs} pro různé koncentrace H^+ iontů a teploty. Naměřené hodnoty rychlostních konstant jsou uvedeny v tabulce 5.5. Závislost těchto rychlostních konstant na koncentraci H^+ pro různé teploty je pak vynesena na obrázku 5.6.



Obrázek 5.5: Časová závislost absorbance na vlnové délce pro dekomplexaci komplexu Ce-L1; $c_{\text{Ce-L1}} = 1 \cdot 10^{-3}$ M, $[\text{H}^+] = 3$ M, $I = 3$ M Na(H)ClO₄, $t = 25$ °C.

Tabulka 5.5: Hodnoty rychlostních konstant pseudoprvního řádu k_{obs} pro disociaci komplexu Ce-L1 pro různé teploty a různé koncentrace H^+ iontů; $c_{\text{CeL1}} = 1 \cdot 10^{-3}$ M, $I = 3$ M Na(H)ClO₄.

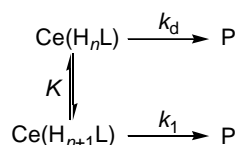
$[\text{H}^+]$ [mol·l ⁻¹]	$k_{\text{obs}} \times 10^3$ [s ⁻¹] teplota [°C]					
	25	30	35	40	45	50
3	1,9	2,8	3,9	5,3	8,0	10,2
2,5	1,5	–	–	4,5	–	–
2	1,0	1,9	–	4,0	–	7,6
1	3,2	9,0	–	2,1	–	3,9



Obrázek 5.6: Závislost rychlostní konstanty disociace Ce-L1 k_{obs} na koncentraci H^+ iontů pro různé teploty, tato závislost byla proložena rovnicí 12; $c_{\text{CeL1}} = 1 \cdot 10^{-3}$ M, $I = 3$ M Na(H)ClO₄.

Závislost rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{obs} na koncentraci protonů pro dekomplexaci komplexů kovů s makrocyclickými ligandy má obvykle saturační nebo lineární průběh. Saturační kinetika dekomplexace je charakteristická lineárním růstem při nižších koncentracích H^+ iontů. Při vysokých hodnotách koncentrací H^+ iontů se stává rychlostní konstanta nezávislá na koncentraci, tj. má téměř nulovou směrnici.

Tyto dva typy závislostí (tj. saturační a lineární) jsou spojeny s mechanismem dekomplexace. Dále budeme uvažovat následující mechanismus dekomplexace, který je typický právě pro makrocyclické komplexy ceru^[37].



Pro jednoduchost nejsou v tomto mechanismu uváděny náboje jednotlivých sloučenin. Rychlost disociace lze vyjádřit vztahem:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{CeH}_x\text{L}]_{\text{tot}} = k_d \cdot [\text{CeH}_n\text{L}] + k_1 \cdot [\text{CeH}_{n+1}\text{L}], \quad (9)$$

kde $[\text{CeH}_x\text{L}]_{\text{tot}}$ je celková koncentrace komplexu, která se dá vyjádřit vztahem 10.

$$[\text{CeH}_x\text{L}]_{\text{tot}} = [\text{CeH}_n\text{L}] + [\text{CeH}_{n+1}\text{L}] = [\text{CeH}_n\text{L}] \cdot (1 + K \cdot [\text{H}^+]) \quad (10)$$

Po dosazení vztahu 10 do rovnice 9, dostaneme:

$$\begin{aligned} v &= k_{\text{obs}} \cdot [\text{CeH}_n\text{L}] \cdot (1 + K \cdot [\text{H}^+]) = [\text{CeH}_n\text{L}] \cdot (k_d + k_1 \cdot K \cdot [\text{H}^+]) \\ k_{\text{obs}} &= \frac{k_d + k_1 \cdot K \cdot [\text{H}^+]}{1 + K \cdot [\text{H}^+]} \end{aligned} \quad (11)$$

Závislost rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{obs} na koncentraci H^+ iontů je zobrazena na obrázku 5.6. Z této závislosti (i při vyšších teplotách) je patrné, že pro studovaný komplex Ce-L1 má lineární průběh, tzn. že částice CeH_{n+1}L při disociaci téměř nevzniká a člen $K \cdot [\text{H}^+]$ v rovnici 11 můžeme oproti 1 zanedbat ($1 \gg K \cdot [\text{H}^+]$). Na základě této aproximace můžeme vztah 11 vyjádřit ve tvaru:

$$k_{\text{obs}} = k_d + k_1 \cdot K \cdot [\text{H}^+]. \quad (12)$$

Hodnoty rychlostní konstanty k_d a členu k_1K , který vyjadřuje disociaci urychlenou H^+ ionty, byly určeny pro 25 °C ze závislostí na obrázku 5.6 a jsou uvedeny v tabulce 5.6 společně s hodnotami, které byly určeny pro dekomplexaci komplexů příbuzných ligandů^[37].

Tabulka 5.6 Hodnoty rychlostní konstanty k_d a členu k_1K pro disociaci komplexu Ce–**L1** při 25 °C a některých vybraných komplexů; hodnoty pro tyto komplexy byly převzaty (ref.^[37]).

Komplex	Ce– L1	Ce– DOTA [*]	Ce– DO3A [*]	Ce– NOTA [*]
k_d [s ⁻¹]	$5,1 \cdot 10^{-4}$	– [#]	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
k_1K [dm ³ ·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]	$8,0 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$	$1,12 \cdot 10^{-1}$	$4,3 \cdot 10^{-2}$

[#]nebylo pozorováno, ^{*}pro 25 °C, $I = 1$ M NaCl.

Z tabulky 5.6 je patrné, že stabilita komplexu Ce–**L1** vůči kyselé hydrolyze odpovídá stabilitě komplexu ligandu **DOTA** a je mnohem vyšší než stabilita komplexu ligandu **DO3A** (derivát s menším počtem pendantních skupin) nebo **NOTA** (derivát malého pro lanthanoidy nevhodného makrocyclického ligandu triazacyklononanu). Porovnání stability těchto komplexů je však pouze ilustrativní, protože hodnoty rychlostních konstant jejich dekomplexace byly studovány za jiných podmínek ($[H^+] = 0,005$ – $0,500$ M, $I = 1$ M NaCl).

6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byl připraven a plně charakterizován ligand **L1**. Pomocí spektrofotometrických kinetických studií bylo zjištěno, že tento ligand, který byl navržen pro urychlení komplexace díky jednomu slabě se koordinujícímu pendantnímu rameni (IDA), komplexaci neurychluje, ale naopak výrazně zpomaluje. Je nasnadě, že toto výrazné zpomalení je způsobeno koordinací tohoto ramene za současného zpomalení koordinace kovu do kavity makrocyclu. Tato teorie kompetice by mohla být v budoucnu potvrzena sledováním komplexace iontu trojmocného europia s ligandem **L1** pomocí fluorescenční spektroskopie, díky které lze určit počet koordinovaných molekul vody k iontu europia.

Ligand **L2** se nepodařilo připravit v dostatečně čisté formě pro charakterizaci. Při reakci, která měla vést ke vzniku tohoto ligandu, vznikaly vedlejší produkty v mnohem větší míře než samotný produkt, který se nepodařilo z reakční směsi izolovat. Látka **9** při této reakci patrně podléhá β -eliminaci, proto se zdá nevhodné pro přípravu ligandu **L2** používat jako chránicí skupinu *p*-toluensulfonylovou. Jako alternativní možnost by mohlo být použití reakce *t*-Bu₃do3a·HBr (**1**·HBr) s Z-aziridinem, kde chránicí Z-skupina by v posledním reakčním kroku mohla odstoupit bez toho, že by odstoupila celá aminoethylenová skupina. Z-aziridin se ale zatím v naší laboratoři nepodařilo připravit^[32].

7 Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová
CEST	chemical exchange saturation transfer
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DO2A	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,7-dioctová kyselina
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
DO3AB	10-[2,3-dihydroxy-(1-hydroxymethyl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
DO3AME	2-methoxyethyl-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová kyselina
DO3AP ^{CE}	10-[[hydroxy(2-karboxyethyl)fosforyl]methyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
DTPA-BMA	bis(methylamid) diethylentriaminpentaoctové kyseliny
EC	elektronový záchyt
ekv.	ekvivalent
EtOH	ethanol
eV	elektronvolt ($1 \text{ eV} = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$)
HP-DO3A	10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
IDA	iminodioctová kyselina
IPAV	mobilní fáze o složení: propan-2-ol, hydroxid amonný a voda
IS	vnitřní sféra
IT	izomerický přechod
LD ₅₀	dosis letalis media (poloviční smrtná dávka)
M	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
MeCN	acetonitril
MES	kyselina 2-morfolinethansulfonová
MRI	tomografie magnetické rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance

NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
OS	vnější hydratační sféra
PET	positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie)
SPECT	single photon emission computed tomography (jednofotonová emisní počítačová tomografie)
SS	druhá hydratační sféra
$T_{1/2}$	poločas rozpadu
<i>t</i> -BuOH	<i>tert</i> -butanol
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
TFA	trifluorooctová kyselina
TLC	thin layer chromatography (chromatografie na tenké vrstvě)
TRITA	1,4,7,10-tetraazacyklotridekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
Ts; tosyl	<i>p</i> -toluensulfonyl
TsAz	<i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)aziridin
TsCl	<i>p</i> -toluensulfonylchlorid
Z	benzyloxykarbonyl

8 Použitá literatura

- [1] Lindoy, L. F. *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, Cambridge University Press, **1989**.
- [2] Reichert, D. E.; Lewis, J. S.; Anderson, C. J. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 3-66.
- [3] Weinmann, H. J.; Laniado, M.; Mützel, W. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* **1984**, *16*, 167-172.
- [4] Ulmann, V. AstroNuklFyzika, <http://astronuklfyzika.sweb.cz/>, cit. 29.12.2009.
- [5] Šantora, J.; Křížová, H.; Buncová, M. <http://www.cls.cz/>, Reg. č. a/028/014, cit. 29.12.2009.
- [6] Pacák, J.; Černý M. *Chem. Listy* **2002**, *707*, 704-707.
- [7] Valk, P. E.; Bailey, D. L.; Townsend, D. W.; Maisey, M. N. *Positron Emission Tomography: Basic Science and Clinical Practice*, London, **2003**.
- [8] Li, W. P.; Meyer, L. A.; Anderson, C. J. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *252*, 179-192.
- [9] Liu, S.; Robinson, S. P.; Edwards, D. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *252*, 193-216.
- [10] Nuclear Science Division, <http://ie.lbl.gov/>, cit. 13.2.2010.
- [11] Lubberink, M.; Tolmachev, V.; Widstroem, C.; Bruskin, A.; Lundqvist, H.; Westlin, J. J. *Nucl. Med.* **2002**, 1391-1397.
- [12] O'Donoghue, J. A.; Wheldon, T. E. *Phys. Med. Biol.* **1996**, *41*, 1973-1992.
- [13] Helm, L.; Tóth, É.; Merbach, A. E. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *221*, 62-100.
- [14] <http://fmri.mchmi.com/>, cit. 9.3.2010.
- [15] http://en.wikibooks.org/wiki/Basic_Physics_of_Nuclear_Medicine, cit 9.3.2010.
- [16] Jacques, V.; Desreux, J. F. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *221*, 123-163.
- [17] Merbach, A. E.; Tóth, É. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester, **2001**.
- [18] Gries, H. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *221*, 1-24.
- [19] Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, 2293-2352.
- [20] Port, M.; Raynal, I.; Schaefer, M.; Ide, J.; Greneur, S. L.; Corot, C. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2006**, *20*, 563-576.
- [21] Sherry, D.; Woods, M. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2008**, *10*, 391-413.
- [22] Aime, S.; Barge, A.; Castelli, D. D.; Fedeli, F.; Mortillaro, A.; Nielsen, F. U.; Terreno, E. *Magn. Reson. Med.* **2002**, *648*, 639-648.
- [23] Zhou, J.; van Zijl, P. C. M. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spect.* **2006**, *48*, 109-136.
- [24] Anderegg, G.; Arnaud, F.; Delgado, R.; Felcman, J.; Popov, K. *Pure. Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1445-1495.

-
- [25] Port M., Idée J., Medina C., Port M., Robic J. I., Sabatou M., Corot C., *Biometals* **2008**, *21*, 469-490.
- [26] Li, C.; Li, Y. X.; Law, G. L.; Man, K.; Wong, W. T.; Lei, H. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 571-574.
- [27] Li, C.; Wong, W. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6055-6058.
- [28] Duimstra, J. A.; Femia, F. J.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12847–12855.
- [29] Kotek, J. ústní sdělení.
- [30] Hope, D. B.; Horncastle, K. C. *J. Chem. Soc. C* **1966**, *66*, 1098-1099.
- [31] Martin, A. E.; Ford, T. M.; Bulkowski, J. E. *J. Org. Chem. C* **1982**, *47*, 412-415.
- [32] Krchová, T. *Bakalářská práce*, PřF UK v Praze, Praha **2010**.
- [33] Mudrová, M. *Diplomová práce*, PřF MU v Brně, Brno **2005**.
- [34] Försterová, M.; Svobodová, I.; Lubal, P.; Táborský, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. *Dalton Trans.* **2007**, 535-549.
- [35] Szila, E.; Platzeck, J.; Radu, B. *Inorg. Chim. Acta.* **2000**, *298*, 226-234.
- [36] Balogh, E.; Tripier, R.; Ruloff, R.; Tóth, É. *Dalton Trans.* **2005**, 1058-1065.
- [37] Kuman, K.; Chang, C. A.; Tweedle, M. F. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 587-593.

9 Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Honzovi Kotkovi za nekonečnou trpělivost, bezmeznou zásobu rad a podnětů a za jeho osobitý přístup. Také bych mu chtěla poděkovat za rozšíření svých nejen chemických obzorů, ale i hudebních, mineralogických a typografických. Bylo mi ctí mu dělat „bubáka“.

Dále bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Přemysl Lubalovi, Ph.D. za poskytnutí zázemí při kinetických měřeních a celému tamnímu brněnskému tandemu.

Děkuji Zuzce a Plutovi za měření NMR spekter.

Děkuji panu Mírovi za všechny své oblíbené MS píky, jmenovitě 712,4 a 390,0. Děkuji mu za ochotu, s jakou se o ně staral a pomáhal je separovat na HPLC. Děkuji mu za cenné rady, odborné i jiné.

Děkuji Terce za lidskou stránku věci a celému kolektivu laboratoře „19“ (malému i velkému) za přátelské prostředí.

Děkuji všem svým recenzentům.

Děkuji dvěma úžasným kočičkám z Brna, které se o mě staraly v dobách nejhorších.

Děkuji panu doktoru Uhličitanovi za to, že vůbec je, protože výčet všeho, za co bych mu měla poděkovat, se sem nemá šanci vejít.

Mé velké díky patří mé rodině.

Závěrem děkuji všem, na které jsem zapomněla.