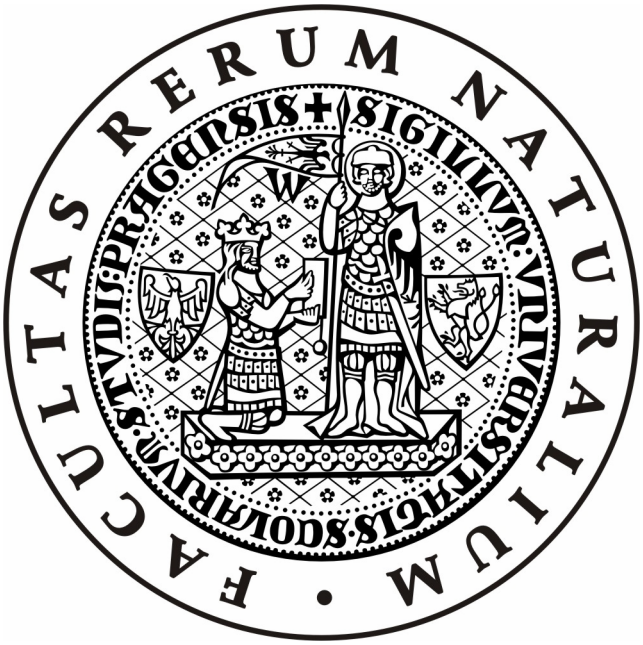
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra anorganické chemie



Jiří Bárta

Nové ligandy pro nukleární magnetickou tomografii; vliv postranního substituentu na rychlost výměny vody gadolinitých komplexů

Bakalářská práce

Praha 2008

Poděkování

Děkuji svému školiteli Dr. Janu Kotkovi za výborné vedení mé práce po spletité chemické cestě, za trpělivost s mojí občasnou zbrklostí a nešikovností, za pomoc při interpretaci spekter a za všechny konzultace, rady a čas, který mi věnoval.

Děkuji Ing. Miroslavu Lorencovi za ochotu moji práci oponovat.

Dále bych chtěl poděkovat Dr. Janu Plutnarovi, Mgr. Bohuslavu Drahošovi a Mgr. Zuzaně Kotkové za změření NMR spekter, Dr. Tomáši Vithovi za změření MS spekter a také všem dalším kolegům z laboratoře za rady a pomoc při mojí práci.

Díky si zaslouží i moji kamarádi, kteří byli ochotní přečíst si tuto práci a opravit mnou napáchané chyby.

Největší dík patří mé rodině a přítelkyni za podporu, trpělivost a vytvoření ideálních podmínek pro moje studium a vypracování této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že předloženou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pod odborným vedením svého školitele a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Praha, září 2008

.....

Jiří Bárta

Obsah

1. Úvod 6

1.1 Nukleární magnetická rezonance a MRI 6

1.2 MRI kontrastní látky 7

1.3 Relaxivita 8

1.3.1 Relaxivita protonu vnitřní sféry 10

1.3.2 Ladění parametrů relaxivity protonu vnitřní sféry 10

1.4 Ovlivnění rychlosti výměny vody 11

1.5 Cíl práce 13

2. Návrh syntézy 14

2.1 *cis*-1,4 chránění cyklenu 14

2.2 1,4-bis(*terc*-butoxykarbonylmethyl)cyklen 15

2.3 Zavedení fosfonátové a karboxylové skupiny, odchránění 15

3. Experimentální část 18

3.1 Seznam použitých chemikálií 18

3.2 Metody charakterizace 19

3.3 Syntetická část 20

3.3.1 1,4-oxalylcyklen (**2**) 20

3.3.2 7,10-dibenzyl-1,4-oxalylcyklen (**3**) 20

3.3.3 1,4-dibenzylcyklen (**4**) 21

3.3.4 7,10-dibenzyl-1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (**5**) 21

3.3.5 7,10-dibenzyl-1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (**6**) 22

3.3.6 1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (**7a**) 22

3.3.7 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (**7b**) 23

3.3.8 7,8-bis(karboxymethyl)-1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (**9c**) 24

3.3.9 7,8-bis(karbonylmethyl)-1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (**8**) 24

3.3.10 7,8-bis(*terc*-butoxykarbonylmethyl)-1,4-bis(diethylfosfono-methyl)cyklen (**9b**) 25

3.3.11 7,8-bis(karboxymethyl)-1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (**11**) 26

3.3.12 7,8-bis(karboxymethyl)-1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (**8**) 26

4. Výsledky a diskuze 28

4.1 Syntéza 1,4 chráněného cyklenu 28

4.2 Cesta přes 1,4 chráněný cyklen 28
4.3 Cesta přes 1,4-bis(*terc*-butoxykarbonylmethyl)cyklen 30
5. Závěr 31
6. Seznam zkratek 32
7. Seznam použité literatury 33

1. Úvod

1.1 Nukleární magnetická rezonance a MRI

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je široce rozšířenou analytickou technikou používanou v mnoha odvětvích. Základním principem této metody je interakce magnetického pole se spinem atomových jader. Využívá se k zjišťování fyzikálních, chemických, elektronických a strukturních vlastností molekul a také poskytuje detailní informace o jejich 3D struktuře. Poprvé byla tato metoda popsána v roce 1946 Felixem Blochem a Edwardem Millsem Purcellem, kteří nezávisle na sobě objevili, že konkrétní atomová jádra jsou schopna absorbovat elektromagnetické záření o určité frekvenci, pokud jsou vložena do vnějšího magnetického pole, a tato frekvence je různá pro každý atom v molekule. V roce 1952 jim byla za tento objev udělena Nobelova cena za fyziku. Dnes patří NMR mezi nejvyužívanější metody analýzy nově připravených látek.

Při vložení objektu do magnetického pole se spiny jader atomů s nenulovým spinovým číslem zorientují vzhledem k vektoru intenzity magnetického pole a rozdělí se přitom na dvě energetické hladiny. Rozdíl v populaci jednotlivých hladin (už jeden z milionu) vytvoří detekovatelnou změnu. Magnetické dipólové momenty jader rotují okolo axiálního vektoru statického magnetického pole s tzv. Larmorovou frekvencí. Pozorovaný objekt je vystaven pulsům elektromagnetického záření ve směru kolmém na vektor statického magnetického pole, což způsobuje dočasnou rezonanci energetických hladin magnetických dipólů, a díky tomu dochází k vyrovnání populací. Frekvence potřebná k rezonanci konkrétního jádra je definovaná rovnicí [1]:

$$\nu = \frac{\gamma_I B_0}{2\pi} \qquad [1]$$

kde B_0 je velikost magnetického pole a γ_I je gyromagnetický jaderný poměr.

Po ukončení pulsu elektromagnetického záření nastává tzv. *populační relaxace*. Během tohoto procesu se jádra vracejí do svého termodynamicky výhodnějšího stavu v magnetickém poli a požadovaný signál vyzářený jádry během relaxace je zaznamenáván vysokofrekvenčními cívkami. Jádra relaxují dvěma způsoby, první se nazývá longitudinální (T_1) a druhý transverzální (T_2). Po zrelaxování systému se může měření opakovat, neboť se objekt nachází v původním stavu.

Objev NMR vedl k vývoji velice výkonné diagnostické metody nazývané nukleární magnetická tomografie, často zkracované jako MRI (z anglického magnetic resonance imaging). Dříve se i v anglickém názvu vyskytovalo slovo „nukleární“ (nuclear), ale v 70. letech nabylo negativního významu evokujícího vystavení radioaktivnímu záření a bylo tedy vypuštěno. V novodobém lékařství se MRI stala hojně využívanou technikou k vytváření přesných obrazů měkkých tkání a orgánů. Touto metodou se dají získat 2D a 3D obrazy různých orgánů v živých organismech a demonstrovat tak patologické nebo fyziologické změny tkáně. Pro MRI využívanou v lékařství je základem NMR studium jader atomů vodíku vázaných v molekule vody.

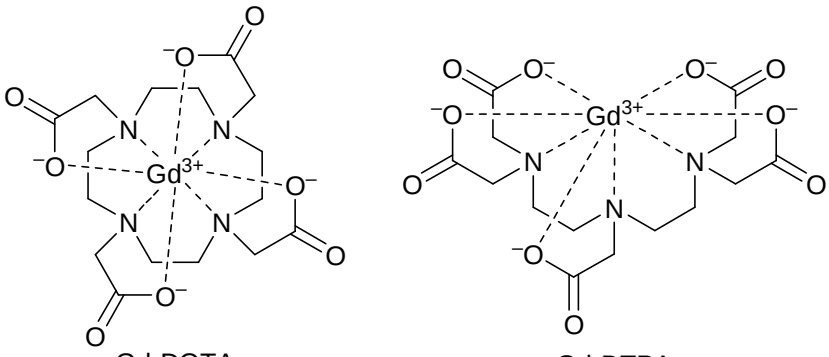
Pro získání MRI obrazu je však nutné s informací o relaxaci tkáně zaznamenat i prostorovou informaci, a proto se aplikují tři ortogonální magnetické gradienty. Typické rozlišení MRI je okolo 1 mm^3.[1] V klinické praxi se často MRI využívá k rozlišení patologických tkání (jako je např. nádor) od zdravých. Největší výhodou je, že se nejedná o invazivní metodu, narozdíl od tradičního rentgenologického vyšetření, které může při několikanásobné aplikaci dokonce zvýšit zhoubnost nádoru. Magnetické pole využívané v MRI se pohybuje v rozmezí od 0,5 do 3 T, což odpovídá rozpětí Larmorovy frekvence od 20 do 120 Hz.[2] Existuje několik specializací MRI, např. angiografie[3] (slouží k monitorování cév), difúzní MRI[4] (měří difúzi vody v tkáni) nebo funkční MRI[5] (měří změny signálu tkáně v důsledku změny aktivity tkáně).

1.2 MRI kontrastní látky

MRI obraz se vytváří z rozdílu v koncentracích protonu a rozdílu relaxačních časů (T_1, T_2) v různých tkáních. Bylo zjištěno, že s přídavkem MRI kontrastní látky se v mnoha případech zvyšuje senzitivita nebo specificita zobrazení. Při použití paramagnetické kontrastní látky se výrazně zvyšuje rozlišovací schopnost tkání v MRI, jak demonstroval Paul C. Lauterbur (Nobelova cena v roce 2003). Zvýšení se dosáhne tehdy, má-li některá tkáň větší afinitu nebo vaskularitu než ostatní. Většina nádorů má vyšší vyživovací nároky než zdravá tkáň a díky tomu vstřebá větší množství kontrastní látky, což vede k viditelnému kontrastu v MRI obrazu.

Vodné aqua ionty kovů jsou většinou značně toxické,[6] proto se v klinické praxi často využívají jejich komplexy s ligandy typu polyaminokarboxylátů. Chovají se buď jako T_1 kontrastní látky, které zvyšují signál a vytváří „pozitivní“ kontrast, nebo T_2

kontrastní látky, které snižují signál a vytváří „negativní“ kontrast. Přítomnost pozitivní kontrastní látky se projeví zesvětlením na MRI obrazu. Jedná se obvykle o nízkomolekulární sloučeniny obsahující ionty Gd^{III} nebo Mn^{II}, které mají nespárované elektrony ve valenční vrstvě a dlouhé elektronové relaxační časy. Příkladem pozitivních kontrastních látek jsou komerčně dostupné cheláty Gd^{III} s ligandy 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou kyselinou (DOTA) a diethylentriaminpentaoctovou kyselinou (DTPA) – Dotarem® a Magnevist® (*Obrázek 1*), nejčastěji používané jako nespecifické kontrastní látky pro zobrazování lebeční a páteřní oblasti, nebo Manganofodipir trisodium® využívaný k zobrazování jater.[1] Přítomnost negativní kontrastní látky se projeví ztmavnutím na MRI obrazu. Jejich reprezentanty jsou většinou malé agregáty nazývané „superparamagnetic iron oxides“ (SPIO), jejímž představitelem je nanokrystalický Fe_2O_3. Tato práce se bude věnovat pozitivním kontrastním látkám a především komplexům Gd^{III} s fosfonátovými deriváty ligandu DOTA a jejich syntéze.



Obrázek 1

(Koordinované molekuly vody byly pro přehlednost vynechány)

1.3 Relaxivita

Nejčastějšími T_1 kontrastními látkami jsou cheláty Gd^{III}. Kation Gd^{III} má sedm nespárovaných elektronů a díky tomu značný paramagnetický příspěvek. Další jeho výhodou je **S** symetrie základního elektronového stavu, která způsobuje pomalou elektronovou relaxaci, což je velmi důležité pro efektivnost kontrastní látky. V principu mají cheláty Gd^{III} jedno koordinační místo obsazené molekulou vody (tzv. voda

vnitřní sféry). Paramagnetické centrum v blízkosti molekuly vody zkracuje její longitudiální a transverzální relaxační časy (T_1, T_2). Pozorované relaxační časy ($T_{1,poz}$, $T_{2,poz}$) roztoku se potom skládají z diamagnetického (T_{1d}, T_{2d} – relaxační časy roztoku bez paramagnetické látky) a paramagnetického (T_{1p}, T_{2p} – způsobeny přítomností komplexu Gd^{III}) příspěvku. Solomon, Bloembergen a Morgan vytvořili teorii (SBM teorie) popisující relaxaci jader rozpouštědla v přítomnosti paramagnetické látky. Podle této teorie je pozorovaná rychlost relaxace ve zředěných roztocích popsána rovnicí [2]:

$$\frac{1}{T_{i,\mathrm{poz}}} = \frac{1}{T_{i,\mathrm{d}}} + \frac{1}{T_{i,\mathrm{p}}}\text{; kde } i = 1,2 \qquad [2]$$

Protože paramagnetický člen je přímo úměrný koncentraci Gd^{III}, rovnice [2] se dá přepsat jako rovnice [3]:

$$\frac{1}{T_{i,\mathrm{poz}}} = \frac{1}{T_{i,\mathrm{d}}} + r_i[\mathrm{Gd}]\text{; } i = 1,2 \qquad [3]$$

Člen r_i se nazývá relaxivita. Jedná se o měřitelnou veličinu přímo odpovídající efektivnosti kontrastní látky. V MRI jsou měřena vodíková jádra vody, rovnice [3] tedy nejčastěji popisuje jejich relaxaci a člen r_i je pak nazýván „relaxivitou protonu.“ Relaxivita se skládá z příspěvků vnitřní sféry (inner sphere), vnější sféry (outer sphere) a druhé sféry (second sphere), což popisuje rovnice [4]:

$$r_i = r_i^{\mathrm{IS}} + r_i^{\mathrm{SS}} + r_i^{\mathrm{OS}}\text{; } i = 1,2 \qquad [4]$$

Molekula vody koordinovaná přímo k iontu Gd^{III} v paramagnetickém komplexu se vyměňuje s molekulami vody v roztoku a přenáší tak do roztoku paramagnetickou informaci. Tento proces je tzv. „příspěvkem vnitřní sféry“ (r_i^{IS}). Molekuly roztoku mohou být také ovlivněny paramagnetickým iontem během difúze, kdy se dostanou dostatečně blízko k iontu kovu, což je tzv. „příspěvek vnější sféry“ (r_i^{OS}). Speciálním případem příspěvku vnější sféry je tzv. „příspěvek druhé sféry“ (r_i^{SS}), který se vyskytuje u určitých typů chelátů, kde se kromě vody přímo koordinované na ion kovu vyskytují také další molekuly vody vázané v blízkosti paramagnetického centra jinými interakcemi, např. vodíkovou vazbou.[7] Tato interakce poskytuje molekule vody dostatek času, aby na ni byla přenesena paramagnetická informace a ta byla takto dále rozšířena do roztoku. Avšak oproti přímo koordinované molekule vody je čas molekuly v druhé sféře strávený u paramagnetického iontu znatelně kratší a i vzdálenost od centra je větší, díky čemuž je příspěvek k celkové relaxivitě

znatelně menší. Příspěvky vnější a druhé sféry ovlivňují celkovou relaxivitu přibližně stejně, každý asi z 20 %. Zatímco příspěvek vnější sféry se nedá ovlivnit, protože závisí převážně na difúzi, příspěvky vnitřní a druhé sféry závisí na povaze chelátu, a proto je design nových ligandů velice důležitý.

1.3.1 Relaxivita protonu vnitřní sféry

Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím relaxivitu vnitřní sféry je počet molekul vody koordinovaných k jednomu chelátu s Gd^{III} (q). Relaxivita je přímo úměrná počtu koordinovaných molekul vody, což znamená, že pokud zvýšíme q dvojnásobně, zdvojnásobí se i relaxivita. Bohužel tento nárůst je možný pouze do určité meze. Důvodem, proč se v současně používaných kontrastních látkách nevyskytují vyšší hydratační čísla než jedna, je pokles termodynamické a hlavně kinetické stability komplexu a pokles *in vivo* relaxivity při záměně molekul vody za bifunkční chelatant vyskytující se přirozeně v lidském těle (fosfát, karbonát, aminokyseliny).

Další neméně důležité parametry, které ovlivňují relaxivitu vnitřní sféry, jsou rychlost výměny molekuly vody mezi vnitřní sférou a roztokem (popisovaná rychlostní konstantou k_{ex}, nebo její reciprokou hodnotou nazývanou „rezidenčním časem vody“ označovaným jako τ_M), rotační korelační čas (τ_R) popisující přeorientování vektoru kov–proton a časy relaxace elektronových spinů (T_{1e},T_{2e}). Jelikož je tato práce zaměřena pouze na pozitivní kontrastní látky, bude od tohoto místa termínu „relaxivita“ používáno ve smyslu longitudinální relaxivity protonu r_1, rovnici [4] můžeme tedy psát ve tvaru rovnice [5]:

$$r_1 = r_1^{IS} + r_1^{SS} + r_1^{OS} \qquad [5]$$

1.3.2 Ladění parametrů relaxivity protonu vnitřní sféry

Jedním z odvozených parametrů ovlivňujících relaxivitu je také relaxační čas protonu koordinované molekuly vody (T_{1M}), který je závislý na rotačním korelačním čase (τ_R), časech elektronové relaxace (T_{1e} a T_{2e}) a rychlosti výměny vody k_{ex}. Při rozpouštění kontrastní látky v roztoku mohou nastat dvě limitní situace. V případě, že se koordinovaná voda vyměňuje velice pomalu s molekulami roztoku ($\tau_M >> T_{1M}$), rychlost výměny vody se stává limitujícím faktorem relaxivity. V opačném případě ($T_{1M} >> \tau_M$) je limitujícím faktorem relaxační čas protonů koordinované

molekuly vody. Výše zmíněné parametry společně s počtem koordinovaných molekul vody (q) jsou klíčovými parametry ovlivňujícími relaxivitu. Při správném ladění těchto parametrů lze získat kontrastní látku s vysokou efektivitou.

Jelikož je jen velice málo známo o souvislosti mezi molekulární strukturou a relaxací elektronových spinů, design nových kontrastních látek je převážně zaměřen na optimalizaci tří klíčových parametrů: q, k_{ex} a τ_R. Podle simulací vycházejících ze SBM teorie by mělo být možné dosáhnout optimální relaxivity zpomalením rotace komplexu a současnou optimalizací rychlosti výměny vody (příliš rychlá nebo pomalá výměna vody má negativní vliv na celkovou relaxivitu).[8]

Narozdíl od vnitřní sféry počet molekul v druhé sféře nijak neovlivňuje stabilitu komplexu, což vybízí k syntéze ligandů nesoucích skupiny umožňující vodíkovou vazbu, jakými jsou např. fosfonáty, a tím zvýšit celkovou relaxivitu.

Relaxivita nízkomolekulárních chelátů používaných jako kontrastních látek v MRI je prakticky zcela limitována rychlou rotací komplexu. Rotace komplexu může být zpomalena zvýšením molekulárního objemu při zachování rigidní interní struktury. Toho se dá dosáhnout vlastním shlukováním malých chelátů, např. tvorbou micel,[9] nebo konjugací s makromolekulami jakou jsou peptidy,[10] polysacharidy[11] nebo dendrimery.[12]

O ladění rychlosti výměny vody bude pojednáno v další části.

1.4 Ovlivnění rychlosti výměny vody

Rychlost výměny vody hraje klíčovou roli v konečné relaxivitě a zároveň je limitujícím faktorem pro vysokomolekulární komplexy. Ze simulací podle SBM teorie vyplývá, že optimální rychlost výměny vody leží v poměrně úzkém intervalu 10–40 ns.[8] Obecně má většina dnes používaných kontrastních látek pomalou výměnu vody, a proto se novodobý výzkum zaměřuje na látky s vysokou rychlostí výměny vody.[7]

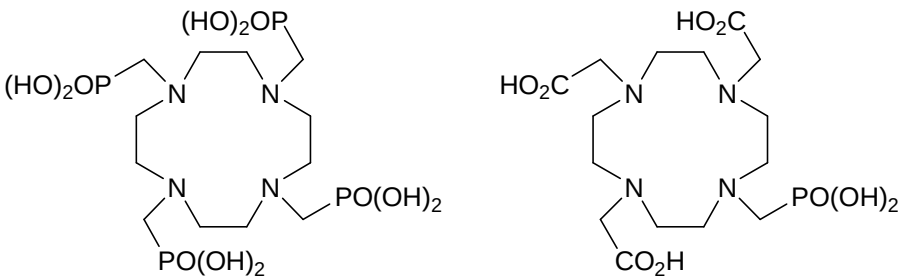
K výměně může dojít dvojím způsobem, za neutrálního pH se vymění celá molekula vody, zatímco v kyselém nebo bazickém prostředí probíhá mnohem rychlejší prototropní výměna pouhého protonu nezávisle od výměny celé molekuly vody.

Výměna vody se dá urychlit také pečlivým navržením nového ligandu, ve kterém se zvýší sterické nároky v blízkosti paramagnetického centra. Toho se dá

dosáhnout např. nahrazením karboxylové skupiny ligandu DOTA fosfonátovou skupinou. Zvýšení sterického bránění a negativní náboj nesený fosforovou skupinou nutí molekulu vody k rychlejšímu odstoupení od centrálního atomu.[13]

Komplex Gd^{III} s ligandem DOTA se vyskytuje ve dvou izomerech – SA (z anglického square antiprismatic, nebo-li čtvercově antiprismatickém) a TSA (z anglického twisted square antiprismatic, nebo-li zkříženě čtvercově antiprismatickém). Tyto izomery vykazují značně rozdílnou rychlost výměny vody.[14] Izomer TSA vyměňuje vodu 10krát až 100krát rychleji než SA. Při zavedení fosfonátové skupiny se ze sterických důvodů zvětší zastoupení TSA izomeru a díky tomu i celková relaxivita.

Zastoupení TSA izomeru se také mění v řadě lanthanoidů, ve které stoupá s rostoucí velikostí Ln^{III} iontů. U Yb^{III} a Lu^{III} se vyskytuje pouze SA izomer, u komplexu Gd^{III} je TSA izomer zastoupen jen asi z 20 %,[15] kdežto u La^{III} a Ce^{III} byl nalezen pouze TSA izomer. Proto se nové ligandy navrhují tak, aby měly co největší zastoupení TSA izomeru v Gd^{III} komplexech. Stericky náročnější skupinou než karboxylová je i fosfonát. Jedním z příkladů zavedení fosfonátu na kruh cyklenu je 1,4,7,10-tetrakis(fosfonomethyl)cyklen (DOTP – *Obrázek 2*), který se sice v chelátu vyskytuje pouze ve formě TSA izomeru, ale je natolik kompaktní, že neumožňuje koordinaci vody, která je nutná k funkci MRI kontrastní látky. Proto se syntetizují deriváty ligandu DOTA s menším počtem fosfonátových skupin, např. 4,7,10-tris(karboxymethyl)-1-fosfonomethylcyklen (DO3AP – *Obrázek 2*), který je již schopný v chelátu vázat vodu. Další možností je zavedení monoesteru fosfonátu, který také podporuje vyšší zastoupení TSA izomeru v chelátu.



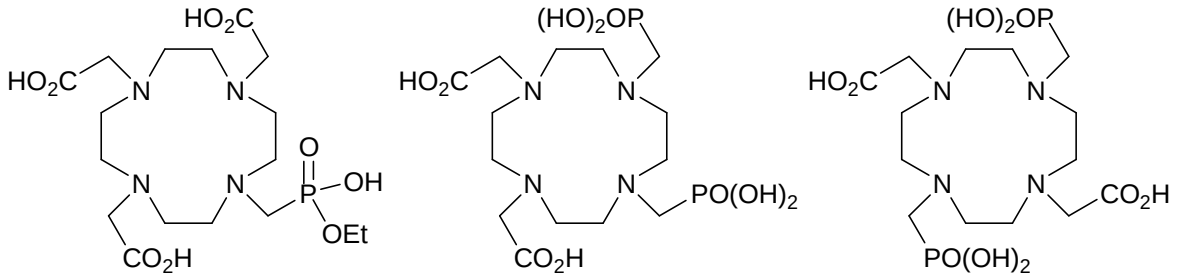
DOTP DO3AP

Obrázek 2

1.5 Cíl práce

Jak bylo mnohokrát zmíněno výše, zavedení fosfonátové skupiny místo karboxylové v molekule ligandu DOTA by mělo vést ke zvýšení rychlosti výměny vody v důsledku zvýšení zastoupení TSA izomeru. Rovněž by se měla zvýšit celková relaxivita chelátu případným příspěvkem vodíkovými vazbami vázaných vod druhé sféry. Tento motiv byl již několikrát vyzkoušen, např. u již uvedené DOTP nebo DO3AP a jejího esteru 4,7,10-tris(karboxymethyl)-1-ethylfosfonomethylcyklenu (DO3AP(OEt) – *Obrázek 3*). Komplexy s DOTP nejsou schopné vázat vodu, proto se připravovaly chelatanty s menším počtem fosfonátových skupin jako je DO3AP a DO3AP(OEt), které již v chelátech koordinují molekulu vody, a jejich vlastnosti byly rozsáhle zkoumány.[16,17] V jejich případě došlo k výraznému zvýšení rychlosti výměny vody, dokonce 5 až 10 násobně oproti komplexu ligandu DOTA, ale optimální hodnoty stále nedosáhly. Nabízí se tedy logický krok syntézy difosfonátového derivátu liagandu DOTA v poloze *cis*-1,4-cyklenu, který by mohl narozdíl od *trans*-difosfonátového analogu[18] (*trans*-DO2AP – *Obrázek 3*) v chelátu koordinovat molekulu vody.

Cílem této práce je syntéza 7,8-bis(karboxymethyl)-1,4-bis(fosfonomethyl) cyklenu (*cis*-DO2AP – *Obrázek 3*).



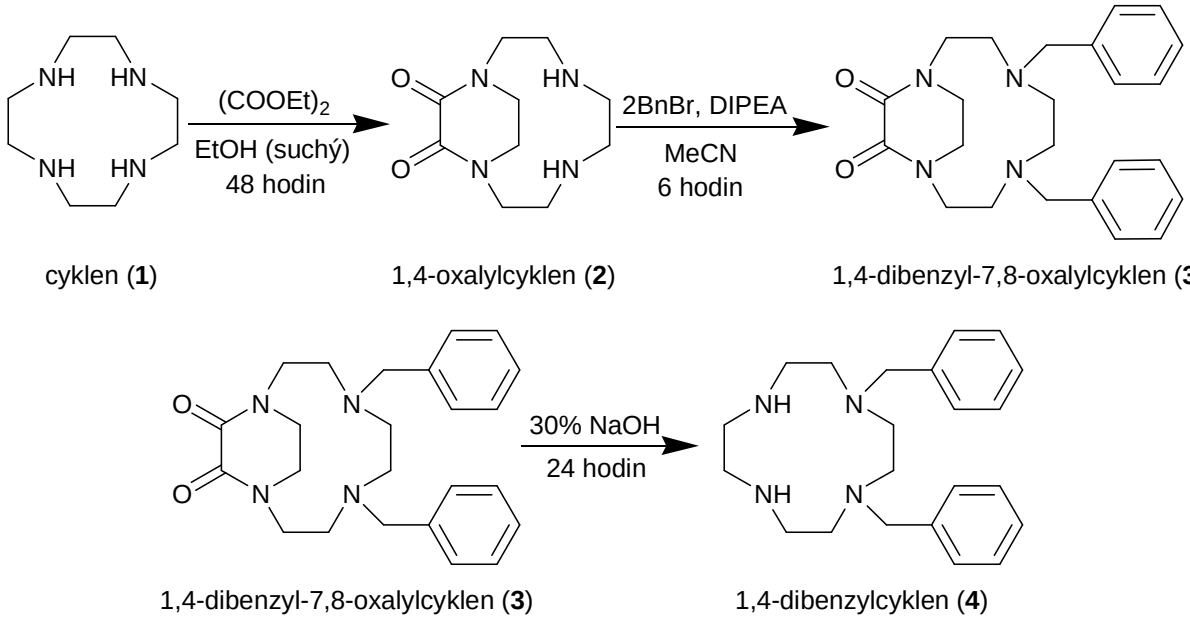
DO3AP(OEt) *cis*-DO2AP *trans*-DO2AP

Obrázek 3

2. Návrh syntézy

2.1 *cis*-1,4 chránění cyklenu

Poměrně snadno se dá připravit DO3A nebo 1-monokarboxymethylcyklen,[19] jejichž vznik je mírně preferován, avšak regioselektivní disubstituce v polohách 1,4 a 7,10 neprobíhá snadno. Proto zavedení dvou karboxylových a dvou fosfonátových skupin v poloze *cis*-1,4 a *cis*-7,10 na kruh cyklenu **1** naráží na značné syntetické problémy. Jednou z možných cest je použití vhodného chránění, které zabrání vzniku nechtěných vedlejších produktů. Jako ideální řešení se jeví navázání oxalylu,[20] jenž spojí dva atomy dusíku v poloze 1,4. Toto chránění však samo o sobě není vhodné pro následné syntézy. Při jeho úplném odstranění by mohlo dojít i k odbourání navázaných fosfonátových nebo karboxylových skupin, proto byly na takto chráněný kruh cyklenu následně zavedeny dvě benzylové skupiny,[20] jejichž odstranění by nemělo ovlivnit další navázané skupiny. Po bazické hydrolýze 1,4-dibenzyl-7,8-oxalylcyklenu **3**, kde se odstraní oxalylový můstek, vznikne *cis*-1,4-dibenzylcyklen **4**,[20] který je *cis*-1,4 chráněnou výchozí látkou pro další syntézu a je na ni možné zavést jak karboxylové, tak i fosfonátové skupiny. Reakce jsou přehledně zobrazeny ve *Schématu 1*.



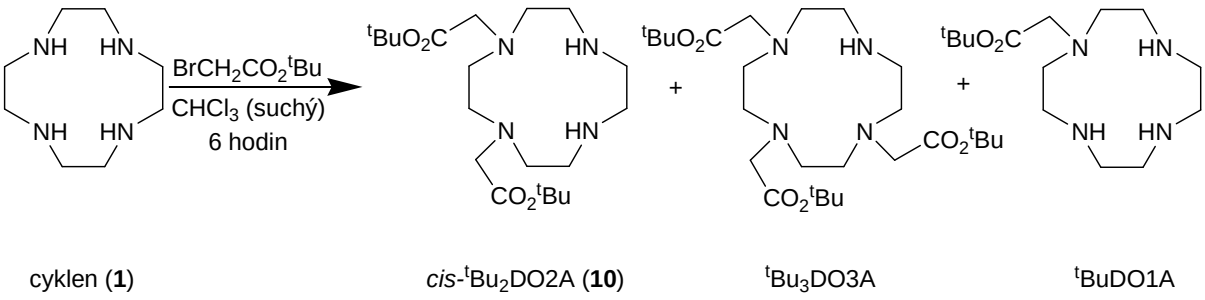
cyklen (**1**) 1,4-oxalylcyklen (**2**) 1,4-dibenzyl-7,8-oxalylcyklen (**3**)

1,4-dibenzyl-7,8-oxalylcyklen (**3**) 1,4-dibenzylcyklen (**4**)

Schéma 1

2.2 1,4-bis(*terc*-butoxykarbonylmethyl)cyklen

Přímější cesta ke kýžené látce vede přes reakci cyklenu s *terc*-butylbromacetátem v bezvodém chloroformu,[21] kterou se zavede na kruh cyklenu chráněná karboxylová skupina. Její velkou nevýhodou je vznik vedlejších produktů a z toho plynoucí oddělování požadovaného produktu 1,4-bis(*terc*-butoxy-karbonylmethyl)cyklenu **10** (*cis*-$^{t}Bu_2$DO2A – *Schéma 2*). Dělení se provádí chromatograficky na silikagelu s isokratickou elucí mobilní fází amoniak:ethanol 1:10. Vedlejšími produkty jsou velice dobře vznikající $^{t}Bu_3$DO3A (*Schéma 2*) a také ^{t}BuDO1A (*Schéma 2*).[19] Kvůli dobře vznikajícím vedlejším produktům se rovněž snižuje výtěžek celé reakce, což významně hovoří v neprospěch této varianty. Reakci i s vedlejšími produkty zobrazuje *Schéma 2*.



cyklen (**1**) *cis*-$^{t}Bu_2$DO2A (**10**) $^{t}Bu_3$DO3A ^{t}BuDO1A

Schéma 2

2.3 Zavedení fosfonátové a karboxylové skupiny, odchránění

Navázání fosfonomethylové skupiny na kruh cyklenu se provádí Mannichovou reakcí, při které reaguje cyklen s nadbytkem paraformaldehydu v triethylfosfitu (ethylesteru kyseliny fosforité) jako rozpouštědle. Výsledný produkt je v esterové formě, která se dále hydrolyzuje, nejčastěji kysele (reflux v koncetrované HCl). Při bazické hydrolýze dochází k selektivní deesterifikaci na monoester.[17]

Karboxylovou skupinu je možné na kruh cyklenu navázat analogicky jako v případě syntézy *cis*-$^{t}Bu_2$DO2A, v tomto případě tedy reakcí chráněného cyklenu s *terc*-butylbromacetátem v nepolárním prostředí za přítomnosti báze. Opět je potřeba získat deesterifikovanou formu, čehož se docílí kyselou hydrolýzou (reflux v CF_3COOH). Prakticky stejným způsobem se dá zavést karboxylová skupina za pomocí ethylbromacetátu. Výhoda tohoto postupu spočívá ve stejných esterových skupinách jako má fosfonát, díky čemuž by se mohla hydrolýza všech esterů provést

pouze v jednom kroku.

Při využití *cis*-1,4-dibenzylového chránění je vhodné nejprve zavést na kruh cyklenu fosfonátové skupiny před karboxylovými, které by mohly po debenzylaci vytvořit laktam a značně tak znepříjemnit, nebo dokonce znemožnit, následné kroky syntézy.

Odstranění chránících benzylových skupin se provádí reduktivní debenzylací vodíkem za přítomnosti palladia jako katalyzátoru sorbovaném na aktivním uhlí. Obecně debenzylace probíhají lépe v roztocích kyselin.

Možné cesty syntézy cílové látky jsou přehledně zobrazeny ve *Schématech 3* a *4*.

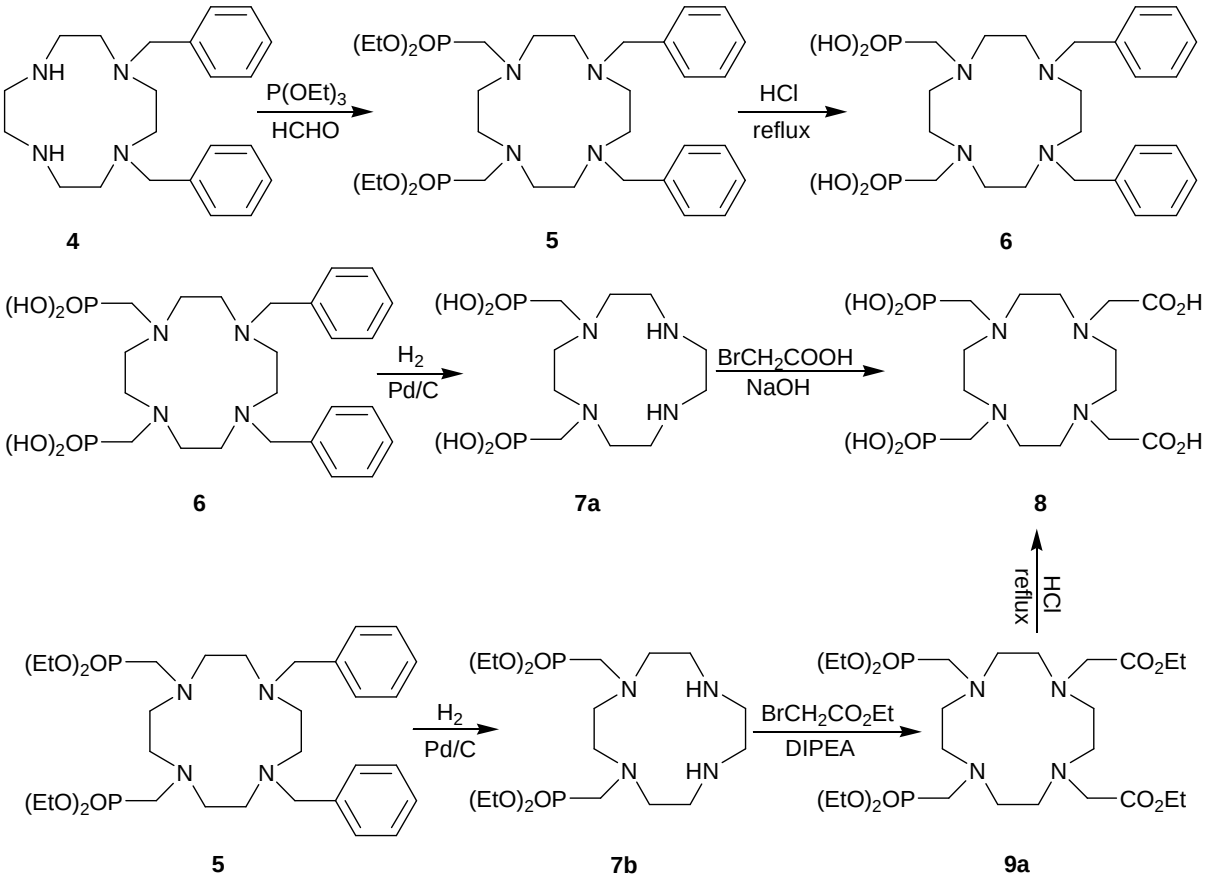
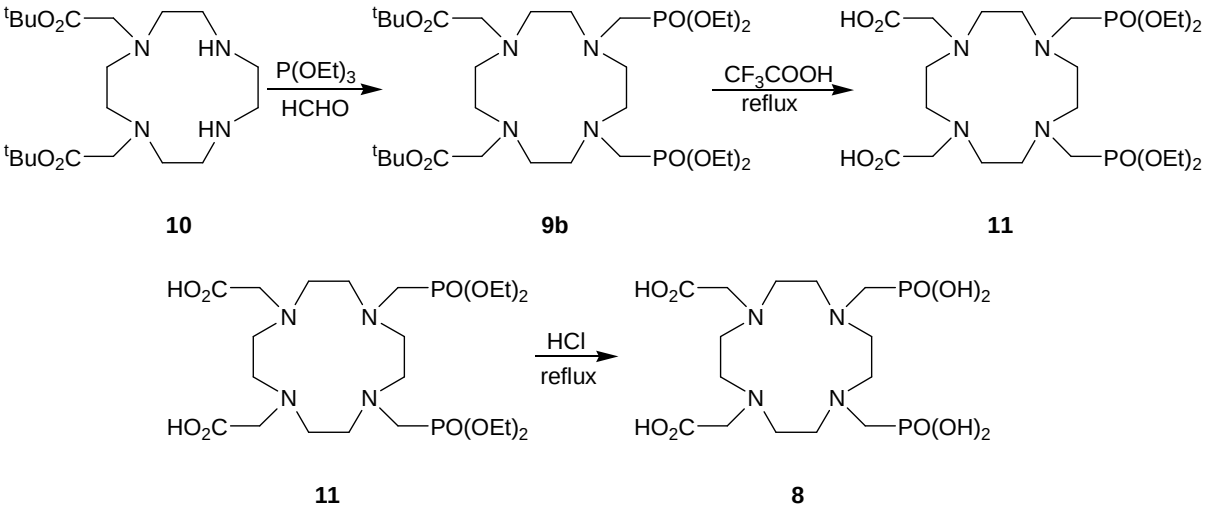


Schéma 3



10 **9b** **11**

11 **8**

Schéma 4

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Reagencie

1,4-bis(*terc*-butoxykarbonylmethyl)cyklen	dar spolupracujícího pracoviště na KOCh
benzylbromid, 96%	Acros Organics
cyklen, čistý	CheMatech
diethyloxalát, 99%	Fluka
ethyldiisopropylamin, 98%	Fluka
hydroxid sodný, čistý	Lach-Ner
kyselina chlorovodíková (36% vodný roztok)	Penta
kyselina octová, 99%	Penta
kyselina trifluoroctová, 99%	Acros Organics
ninhydrin, 0,5% ethanolický roztok	Lachema
palladium (10% na aktivním uhlí)	Sigma-Aldrich
paraformaldehyd, 96%	Fluka
triethylfosfit, 95%	Fluka
vodík, 3.0	Linde

Rozpouštědla

acetonitril, *p. a.*	Penta
amoniak (25% vodný roztok)	Penta
chloroform, *p. a.*	Penta
dichlormethan, *p. a.*	Penta
diethylamin, *p. a.*	Loba
ethanol, denaturovaný	Lihovar Kolín
ethanol, bezvodý, *p. a.*	Penta
methanol, *p. a.*	Penta
toluen, *p. a.*	Penta
voda, deionizovaná	PřF UK

Deuterovaná rozpouštědla

D_2O (99,8% D)	Chemotrade
$CDCl_3$ (99,8% D)	Sigma-Aldrich

Iontoměniče a sorbenty

silikagel, chromatografický (60-230 mesh)	Fluka
silný aniontový iontoměnič (Dowex 1, 100/200 mesh)	Fluka
silný kationtový iontoměnič (Dowex 50, 100/200 mesh)	Fluka
slabý kationtový iontoměnič (Amberlite CG 50, 200/400)	Fluka

3.2 Metody charakterizace

Spektroskopie NMR

^{1}H, ^{13}C a ^{31}P NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian VNMRS 300 a Varian ^{UNITY}*INOVA* 400 na PřF UK. Pro měření byly použity 5 mm NMR kyvety. Teplota při měření byla 25 ℃. Rezonan ční frekvence a standardy pro referenci uvádí **Tabulka 1**. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v ppm u ^{1}H s přesností na dvě desetinná místa, u ^{13}C a ^{31}P s přesností na jedno desetinné místo. Při měření většiny ^{31}P a ^{13}C NMR spekter byl použit decoupling jader ^{1}H. Spektra byla většinou měřena v čistých deuterovaných rozpouštědlech ($CDCl_3$, D_2O), údaje pro konkrétní měření jsou uvedeny v návodech u příslušných látek v syntetické části.

Tabulka 1. Měřená jádra, jejich rezonanční frekvence a standardy v NMR spektroskopii. (i) – interní, (e) – externí

Měřené jádro	Rezonanční frekvence (MHz)		Standardy
	Varian VNMRS 300	Varian ^{UNITY}*INOVA* 400	
^{1}H	299,94	399,94	^{t}BuOH (i) δ_H = 1,25 ppm
^{13}C	75,4	100,6	^{t}BuOH (i) δ_C = 32,0 ppm a 72,2 ppm
^{31}P	121,4	161,9	H_3PO_4 (e) δ_P = 0,0 ppm

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 s ESI („Electron Spray Ionization“) jako zdrojem iontů a IT („Ion Trap“) detektorem.

Získána byla spektra kladných (**+**) i záporných (**–**) iontů. Uvedeny jsou intenzivní signály, jež se podařilo interpretovat.

Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

K tenkovrstvé chromatografii byly použity destičky typu *Silufol*® (*Kavalier*) se sorbentem Silpearl (širokoporézní silikagel), naneseným na hliníkové fólii, se škrobem jako pojivem. Příslušné mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých látek individuálně, stejně jako činidla, kterými byly vyvolávány.

3.3 Syntetická část

3.3.1 1,4-oxalylcyklen (2)

1,4-oxalylcyklen **2** byl připraven modifikací syntézy popsané v literatuře.[20]

V baňce bylo rozpuštěno 3,80 g (22,0 mmol) cyklenu **1** ve 150 ml bezvodého EtOH. K roztoku bylo přidáno 3,55 g (24 mmol; 3,3 ml) diethyloxalátu. Reakční směs byla míchána 48 h za RT. Průběh reakce byl kontrolován TLC (Et_2NH:MeOH 1:5, detekce ninhydrin, cyklen – výrazná skvrna na startu, produkt **2** – postupně narůstající skvrna s R_f = 0,5). Poté byla reakční směs odpařena na RVO do sucha. Produkt **2** byl přečištěn sloupcovou chromatografií (silikagel, 150 cm^3, Et_2NH:MeOH 1:5, R_f = 0,5). Frakce byly jímány po 70 ml. Celkem bylo použito přibližně 500 ml mobilní fáze. Průběh chromatografie byl kontrolován TLC (viz výše). Frakce obsahující produkt byly odpařeny a po rozpuštění v EtOH spojeny. Produkt byl lyofilizován z H_2O přes noc. Lyofilizovaný produkt **2** ve formě bílého prášku byl zvážen a byly z něj odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 4,90 g (98%)

Charakterizace produktu odpovídá publikovaným datům.

3.3.2 7,10-dibenzyl-1,4-oxalylcyklen (3)

7,10-dibenzyl-1,4-oxalylcyklen **3** byl připraven modifikací syntézy popsané v literatuře.[20]

V baňce bylo rozpuštěno 0,20 g (0,88 mmol) látky **2** v 10 ml CH_3CN. K roztoku bylo přidáno 1,14 g (8,8 mmol; 1,5 ml) DIPEA a 0,33 g (1,9 mmol; 0,23 ml) benzyl

bromidu. Reakční směs byla míchána za RT. Průběh reakce byl kontrolován TLC (Et_2NH:MeOH 1:15, detekce ninhydrin, **2** – skvrna s R_f = 0,4; produkt **3** – postupně narůstající skvrna s R_f = 0,8). Po vymizení skvrny výchozí látky **2** (cca 8 hodin) byla reakční směs odpařena na RVO a vytřepávána mezi CH_2Cl_2 a H_2O. Dichlormethanová fáze, obsahující produkt **3,** byla odpařena. Odparek byl bílý prášek. Získaný produkt **3** byl nechán krystalizovat z toluenu. Po týdenním stání vykrystalizovaly bílé krystaly. Po odpaření na rotační vakuové odparce byl produkt **3** sušen v exsikátoru nad P_2O_5. Produkt **3** byl zvážen a byly z něj odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,34 g (97%)

Charakterizace produktu odpovídá publikovaným datům.

3.3.3 1,4-dibenzylcyklen (4)

1,4-dibenzylcyklen **4** byl připraven podle syntézy popsané v literatuře.[20]

V baňce bylo rozpuštěno 0,30g látky **3** v 10 ml H_2O za malého přídavku EtOH. Poté bylo přidáno 10 ml 30% NaOH a směs byla nechána míchat 24 hodin při 90 ℃. Po odpaření do sucha na RVO byl odparek vytřepáván mezi $CHCl_3$ a H_2O. Chloroformová fáze byla odpařena na RVO. Z produktu ve formě bezbarvého oleje byly odebrány vzorky na charakterizaci. Produkt **4** byl srážen jako hydrochlorid z koncetrované HCl přídavkem EtOH. Sraženina hydrochloridu látky **4** byla odfiltrována na S4 fritě, sušena ve vakuu a poté zvážena.

Výtěžek: 0,20 g (54%)

Charakterizace produktu odpovídá publikovaným datům.

3.3.4 7,10-dibenzyl-1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (5)

Hydrochlorid látky **4** byl vytřepáván mezi 10% KOH a $CHCl_3$. Chloroformová fáze byla odpařena a zvážena. V baňce bylo rozpuštěno 0,13 g (0,4 mmol) látky **4** v 0,6 ml triethylfosfitu (0,60 g; 4,0 mmol). Poté bylo přidáno 0,05 g (1,6 mmol) paraformaldehydu. Reakční směs byla zahřáta na 50 ℃. Pr ůběh reakce byl sledován TLC (NH_3:EtOH 1:5, detekce ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **4** – skvrna s R_f = 0,2; produkt **5** – postupně narůstající skvrna s R_f = 0,4). Po vymizení skvrny výchozí látky (cca 3 hodiny) byla reakční směs rozpuštěna v EtOH a nanesena

na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (150 cm^3) promytý EtOH. Iontoměnič byl promyt EtOH, EtOH:H_2O 1:1, NH_3:EtOH 1:5 a 1:1 a nakonec regenerován HCl:H_2O 1:1. Z frakcí byly odebrány vzorky na TLC (NH_3:EtOH 1:5, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **5** – skvrna s R_f = 0,4). Produkt se nacházel ve frakcích s amoniakální fází, které byly spojeny a odpařeny na RVO. Z produktu **5** ve formě bílého prášku byly po zvážení odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,20 g (80%)

Charakterizace:

NMR ($CDCl_3$): **^{1}H** δ 1,25 (CH_3, 12H, m); 2,60-3,30 (N-CH_2-CH_2-N, N-CH_2-Ph, 18H, br); 4,01 (O-CH_2-CH_3, N-CH_2-P, 10H, m); 7,26 (Arom, 10H, m)

^{31}P {^{1}H} δ 53,0 (s)

MS: (**+**) $[M+H]^+$ 653,4; $[M+Na]^+$ 675,4; $[M–CH_2PO(OEt)_2+H]^+$ 515,3

3.3.5 7,10-dibenzyl-1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (6)

V baňce bylo rozpuštěno 0,20 g látky **5** v 50 ml HCl:H_2O 1:1 a refluxováno přes noc. Poté byla směs odpařena na RVO do sucha a byl odebrán vzorek na NMR a MS. Směs byla dále nanesena na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (50 cm^3), který byl promyt H_2O, látka **6** byla eluována 5% vodným roztokem NH_3, což bylo kontrolováno TLC (IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **6** – skvrna s R_f = 0,6). Po odpaření a zvážení byly z produktu **6** ve formě žlutého oleje odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,10 g (60%)

Charakterizace:

NMR (D_2O): **^{1}H** δ 2,60-3,40 (24H, br) 3,66 (2H, s); 4,01 (3H,s); 7,37 (Arom., 10H, m)

^{31}P {^{1}H} δ 8,9 (14P, s); 10,5 (6P, m); 12-15 (39P, br); 15,6 (6P, s); 17,2 (7P; m); 19,3 (12P, s); 20,7 (10P, s)

MS: (**+**) $[M+H]^+$ 537,2

3.3.6 1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (7a)

V baňce bylo rozpuštěno 0,10 g látky **6** v 25 ml CH_3COOH. K roztoku bylo přidáno 0,05 g Pd na aktivním uhlí. K baňce byl připojen balónek s asi 1 dm^3 H_2. Směs byla nechána míchat za RT přes noc. Poté byla přefiltrována přes filtrační

papír a odpařena na RVO do sucha. Z odparku byly odebrány vzorky na charakterizaci. Dále byla látka **7a** přečištěna na silném kationtovém iontoměniči v H^+ cyklu (50 cm^3), který byl po nanesení produktu promyt H_2O. Látka **7a** z něj byla eluována 5% vodným roztokem NH_3, což bylo kontrolováno TLC (IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **7a** – skvrna s R_f = 0,1). Po odpaření byla látka **7a** přečištěna na slabém kationtovém iontoměniči, z kterého byla eluována H_2O. Látka **7a** byla detekována TLC (viz výše). Frakce obsahující látku **7a** byly spojeny a odpařeny do sucha. Po zvážení byly z produktu **7a** ve formě žlutého oleje odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,044 g (66%)

Charakterizace:

NMR (D_2O): **^{1}H** δ 2,99 (N-CH_2-P , d, $^2J_{PH}$ = 10,50 Hz); 3,33 (N-CH_2-CH_2-N, m)

^{13}C 42,5 (N-*C*-*C*-N, d, $^3J_{PC}$ = 146,0 Hz), 51,6 (N-*C*-P, d, $^1J_{PC}$ = 90,4 Hz)

^{31}P {^{1}H} δ 16,3 (s)

MS: (**–**) $[M–H]^–$ 359,0; $[M+Na–H]^–$ 381,0

(**+**) $[M+H]^+$ 361,0; $[M+Na]^+$ 383,0

3.3.7 1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (7b)

V baňce bylo rozpuštěno 0,62 g (1 mmol) látky **5** v 25 ml EtOH. K roztoku bylo přidáno 0,06 g Pd adsorbovaného na aktivním uhlím. K baňce byl připojen balónek s asi 2 dm^3 H_2. Po 24 hodinách míchání za RT byla směs přefiltrována přes filtrační papír a odpařena. Po zvážení byly z produktu odebrány vzorky na charakterizaci, která určila, že benzyly jsou stále navázány na kruh cyklenu. Dále byla směs rozpuštěna v CH_3COOH a bylo k ní přidáno 0,1 g Pd adsorbovaného na aktivním uhlím. K baňce byl připojen balónek s asi 2 dm^3 H_2. Směs byla nechána míchat 48 hodin. Poté byla reakční směs přefiltrována přes filtrační papír a odpařena. Po zvážení byly z produktu odebrány vzorky na charakterizaci a TLC, podle kterých byl produkt dále dělen sloupcovou chromatografií (silikagel, 100 ml, NH_3:EtOH 1:20, NH_3:EtOH 1:5). Analýzou vybraných frakcí bylo zjištěno, že reakční směs sestávala z bis-monoesteru **7c** a bis-diesteru látky **7b** (a tj. pravděpodobně i ze smíšeného monoesteru-diesteru, který se však nepodařilo izolovat v dostatečně čisté podobě pro jeho charakterizaci). Proto bylo s touto směsí produktů přikročeno k další reakci.

Charakterizace:

7b (frakce 2): R_f = 0,7; NH_3:EtOH 1:5; NMR (D_2O): **^{1}H** δ 1,31 (CH_3, 12H, m); 2,86 (N-CH_2-CH_2-N, 4H, br); 2,94 (N-CH_2-CH_2-N, 4H, br); 3,12 (N-CH_2-CH_2-N, 4H br); 3,22 (N-CH_2-P, 4H, d, $^2J_{PH}$ = 9,20 Hz); 4,15 (O-CH_2-CH_3, 8H, p, $^3J_{HH}$ = 7,20 Hz, $^3J_{PH}$ = 8,00 Hz)

^{31}P {^{1}H} δ 30,4 (s); 30,6 (s); 31,1 (s); 31,2 (s)

7c (frakce 5+6, 1,4-bis(ethylfosfonomethyl)cyklen) R_f = 0,4; NH_3:EtOH 1:5; NMR ($CDCl_3$) **^{1}H** δ 1,25 (CH_3, 6H, dt, $^3J_{HH}$ = 6,00 Hz, $^4J_{PH}$ = 1,20 Hz); 2,50 (P-C-N-CH_2-CH_2-N, t, $^3J_{HH}$ = 5,20 Hz); 2,59 (P-C-N-CH_2-CH_2-N, t, $^3J_{HH}$ = 5,20 Hz); 2,70 (N-CH_2-CH_2-N, d, $^4J_{PH}$ = 5,20 Hz); 2,88 (N-CH_2-P, 4H, d, $^2J_{PH}$ = 5,20 Hz); 4,05 (O-CH_2-CH_3, 4H, m)

^{13}C {^{1}H} δ 16,4 (*C*H_3, d, $^3J_{PC}$ = 5,7 Hz); 45,1 (N-*C*H_2-*C*H_2-N, s); 46,2 (N-*C*H_2-*C*H_2-N, s); 47,0 (N-*C*H_2-*C*H_2-N, s); 50,1 (N-*C*H_2-P, d, $^1J_{PC}$ = 154,5 Hz); 52,3 (N-*C*H_2-*C*H_2-N, d, $^3J_{PC}$ = 6,1 Hz); 61,6 (O-*C*H_2-CH_3, d, $^2J_{PC}$ = 6,9 Hz)

^{31}P {^{1}H} δ 26,3 (s); 26,7 (s)

3.3.8 7,8-bis(karboxymethyl)-1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (9c)

V baňce bylo rozpuštěno 0,27 g (0,57 mmol) látky **7b** v H_2O. Bylo přidáno 0,24 g bromoctové kyseliny a na špičku špachtle fenolftaleinu. Směs byla zahřáta na 80 ℃. Ke směsi byl v průběhu reakce přikapáván 10% roztok NaOH do slabého růžového zabarvení. Po 24 hodinách byl odebrán vzorek na MS a reakční směs byla nanesena na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (150 cm^3), který byl promyt H_2O. Látka **9c** z něj byla eluována 5% vodným roztokem NH_3, což bylo kontrolováno TLC (IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **9c** – skvrna s R_f = 0,9). Produkt **9c** byl získán ve formě nažloutlého oleje.

Výtěžek: 0,18 g (54%)

Charakterizace:

MS: (**+**) $[M+H]^+$ 533,2

3.3.9 7,8-bis(karbonylmethyl)-1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (8)

V baňce bylo rozpuštěno 0,18 g (0,3 mmol) látky **9c** v 50 ml HCl:H_2O 1:1. Po 24 hodinách míchání za RT byla reakční směs odpařena do sucha a nanesena

na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (150 cm^3), který byl promyt H_2O. Látka **8** z něj byla eluována 5% vodným roztokem NH_3, což bylo kontrolováno TLC (IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **8** – skvrna s R_f = 0,1). Produkt byl dále přečištěn na slabém kationtovém iontoměniči v H^+ cyklu (150 cm^3), z kterého byl eluován H_2O, což bylo kontrolováno TLC (viz výše). Frakce s produktem **8** ve formě nažloutlého oleje byly spojeny a odpařeny. Poté z nich byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Výtěžek: 0,10 g (63%)

Charakterizace:

NMR (D_2O+NaOH): **^{31}P {^{1}H}** δ 12,3 (s)

MS: (**–**) 496,1 $[M+Na–H]^-$

3.3.10 7,8-bis(*terc*-butoxykarbonylmethyl)-1,4-bis(diethylfosfonomethyl) cyklen (9b)

V baňce bylo rozpuštěno 1,00 g (2,5 mmol) látky **10** v 4,4 ml triethylfosfitu (4,19 g; 26 mmol). Poté bylo přidáno 0,30 g (10 mmol) paraformaldehydu. Reakční směs byla zahřáta na 50 °C. Průběh reakce byl sledován TLC (NH_3:EtOH 1:5, detekce ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **10** – skvrna s R_f = 0,4; produkt **9b** – skvrna s R_f = 0,9), NMR a MS. Po vymizení skvrny výchozí látky, neobjevení se peaku výchozí látky a nalezení peaku produktu v MS spektru a posunu integrálů v ^{31}P NMR spektru ve prospěch produktu od triethylfosfitu (17 hodin) byla reakční směs rozpuštěna v EtOH a nanesena na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu promytý EtOH. Iontoměnič byl promyt EtOH, EtOH:H_2O 1:1, NH_3:EtOH 1:5 a 1:1 a nakonec regenerován HCl:H_2O 1:1. Z frakcí byly odebrány vzorky na TLC (viz výše). Produkt **9b** ve formě bílého prášku se nacházel ve frakcích s amoniakální fází, které byly spojeny a odpařeny na RVO. Po té byly odebrány vzorky na charakterizaci.

Charakterizace:

Výtěžek: 1,60 g (91%)

NMR ($CDCl_3$): **^{1}H** δ 1,25 (C*H*$_3$-CH_2, t, $^3J_{HH}$ = 7,20 Hz); 1,38 (C*H*$_3$-C, s); 2,72 (N-C*H*$_2$-C*H*$_2$-N, s); 2,77 (N-C*H*$_2$-C*H*$_2$-N, s); 2,80 (N-C*H*$_2$-C*H*$_2$-N, s); 2,87 (N-C*H*$_2$-P, 4H, d, $^2J_{PH}$ = 9,30 Hz); 3,24 (C-C*H*$_2$-N, s); 4,06 (O-C*H*$_2$-CH_3, 8H, t, $^3J_{HH}$ = 7,20 Hz)

^{31}P {^{1}H} δ 27,1 (s)

MS: (**+**) $[M+H]^+$ 701,3; $[M+Na]^+$ 723,3

3.3.11 7,8-bis(karboxymethyl)-1,4-bis(diethylfosfonomethyl)cyklen (11)

V baňce byla rozpuštěna látka **9b** v CF_3COOH a refluxována přes noc. Poté byla reakční směs odpařena a z odparku ve formě žlutého oleje byly odebrány vzorky na TLC (NH_3:EtOH 1:5, detekce ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **9b** – skvrna s R_f = 0,9; produkt **11** – skvrna s R_f = 0,3). Po odpaření měla látka **11** hmotnost 1,4 g.

3.3.12 7,8-bis(karboxymethyl)-1,4-bis(fosfonomethyl)cyklen (8)

V baňce byla rozpuštěna látka **11** v HCl a refluxována přes noc. Poté byla reakční směs odpařena a byly z ní odebrány vzorky na TLC (NH_3:EtOH 1:5, detekce ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **11** – skvrna s R_f = 0,3; produkt **8** – skvrna s R_f = 0,0; IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin a roztok octanu měďnatého, **11** – skvrna s R_f = 0,8; **8** – skvrna s R_f = 0,2). Dále byla látka **8** přečištěna na silném kationtovém iontoměniči v H^+ cyklu, který byl promyt H_2O. Látka **8** z něj byla eluována 5% vodným roztokem NH_3, což bylo kontrolováno TLC (IPAV 7:3:3, detekce ninhydrin, roztok octanu měďnatého, **8** – skvrna s R_f = 0,2). Látka **8** byla znovu nanesena na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (300 cm^3) a byl učiněn pokus ji eluovat pyridinem, což se podle TLC (viz předchozí) nezdařilo. Byla vymyta až HCl, ale v nadbytku chloridu pyridinia, od kterého byla oddělována na silném aniontovém iontoměniči v OH^- cyklu (300 cm^3). H_2O byl eluován pyridin a produkt **8** HCl, kontrola TLC (viz výše). Látka **8** byla dále nanesena na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (150 cm^3), který byl promyt H_2O. Látka **8** z něj byla eluována 5% vodným roztokem NH_3, což bylo kontrolováno TLC (viz výše). Produkt **8** byl přečištěn na slabém kationtovém iontoměniči v H^+ cyklu, z kterého byl eluován H_2O, což bylo kontrolováno TLC (viz výše). Produkt byl zvážen a byly z něj odebrány vzorky na charakterizaci. Charakterizace neukázala čistou látku. Produkt byl tedy znovu nanesen na silný kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (150 cm^3), který byl promyt H_2O. Látka **8** z něj byla eluována 5% vodným roztokem NH_3, což bylo kontrolováno TLC (viz výše). Produkt byl znovu nanesen na slabý kationtový iontoměnič v H^+ cyklu (150 cm^3), z kterého byl eluován H_2O, což bylo kontrolováno TLC (viz výše). Z frakcí byly odebrány vzorky na charakterizaci. Frakce obsahující produkt **8** byla ve formě nažloutlého oleje.

Výtěžek: 0,060 g (4%)

Charakterizace:

NMR (D_2O+NaOH): **^{1}H** *δ* 2,78 (N-C*H*$_2$-C*H*$_2$-N, s); 2,83 (N-C*H*$_2$-P, s); 2,86 (N-C*H*$_2$-P, s); 3,10 (N-C*H*$_2$-C*H*$_2$-N, s); 3,16 (N-C*H*$_2$-C*H*$_2$-N, s); 3,18 (N-C*H*$_2$-C*H*$_2$-N, s); 3,26 (N-C*H*$_2$-CO, s)

^{31}P {^{1}H} *δ* 12,3 (s)

MS: (**–**) 496,1 $[M+Na–H]^-$

4. Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza 1,4 chráněného cyklenu

Po několika pokusech reprodukce publikované syntézy látky **2** s následným neúspěšným chromatografickým dělením na sloupci silikagelu v mobilní fázi NH_3:EtOH 1:5 byla provedena změna mobilní fáze na Et_2NH:MeOH 1:5. Původní mobilní fáze sice na TLC jevila velice dobré možnosti dělení látky **2** od výchozí látky **1**, ale po provedení sloupcové chromatografie se ve frakcích místo separovaných látek nacházela směs pravděpodobně z důvodu částečné hydrolýzy nebo transamidace v průběhu chromatografie. Látka **2** byla izolována i ve formě hydrochloridu (srážela se z roztoku EtOH zaváděním plynného HCl). Bohužel, při vytřepávání mezi 10% NaOH a $CHCl_3$ se v chloroformové fázi nenacházela čistá látka **2**, ale opět směs látek **1** a **2**, zřejmě kvůli basické hydrolýze látky **2**. Látka **2** byla tedy úspěšně izolována chromatograficky na sloupci silikagelu s mobilní fází Et_2NH:MeOH 1:5 a následně lyofilizována pro odstranění zbytků mobilní fáze, hlavně Et_2NH.

Klíčovým krokem chránění je následná benzylace látky **2** benzylbromidem. Je u ní zapotřebí dodržet molární poměry reaktantů a také reakční dobu. V nadbytku benzylbromidu dochází k přereagování a kromě látky **3** vznikají vedlejší produkty, které se musí od látky **3** dělit chromatograficky. Bohužel, není dobře detekovatelné na TLC, zda došlo již k úplné konverzi látky **2** na látku **3**. Mnohokrát se jevilo, že k úplné konverzi ještě nedošlo, na TLC se stále vyskytovala skvrna výchozí látky kromě produktu, ale další přídavek benzylbromidu vedl k přereagování. Toto byl hlavní problém při škálování reakce, a proto se nepodařilo připravit látku **3** a tudíž ani látku **4** ve větším množství.

4.2 Cesta přes 1,4 chráněný cyklen

Mannichova syntéza z 1,4-dibenzylcyklenu **4** proběhla nad očekávání snadno a hned na první pokus. Izolace difosfonátového produktu **5** na silném kationtovém iontoměniči se osvědčila jako dobrá nepáchnoucí metoda, neboť na iontoměniči dochází ke konverzi nadbytečného triethylfosfitu (značně zapáchající sloučeniny) na nepáchnoucí diethylfosfit. Už po izolaci látky **5** se na TLC objevovala skvrna

s R_f = 0,8, která by se mohla přisoudit monofosfonátu látky **4**, jejíž peak se objevil na MS spektru, ale také jako fragment na fragmentačním spektru látky **5**. V ^{31}P NMR spektru se však nacházel pouze jediný signál, což vede k závěru, že pokud byla monofosfonátová látka izolována společně s látkou **5**, jednalo se pouze o minoritní množství.

Látka **5** navzdory esterové a benzylové formě projevovala značnou rozpustnost v H_2O, proto byla místo odchránění dalším krokem syntézy kyselá hydrolýza, jejímž výsledkem nebyla podle MS spekter plně deesterifikovaná látka **6**, i když NMR spektra žadný signál CH_3 skupin ethylesterů neprokázala. TLC se ani po přečištění na silném kationtovém iontoměniči nejevilo jako průkazné. Proto bylo přistoupeno k odchránění, které proběhlo v kyselém prostředí velice dobře, neboť po 24 hodinách nebyl po odpaření vzorku reakční směsi v ^{1}H NMR spektru již žádný aromatický signál nalezen. Po přečištění na silném a slabém kationtovém iontoměniči byla látka **7a** charakterizovaná NMR spektroskopií a MS spektrometrií, které potvrdily, že se skutečně jedná o difosfonátový produkt. Ovšem v ^{13}C NMR spektru byl nalezen počet signálů odpovídající spíše *trans*-izomernímu produktu než *cis*, a proto bude látka dále zkoumána pro zjištění přesné struktury. Bohužel, izolované množství nedostačovalo k pokusům o další syntézu.

Při provedení odchránění po zavedení fosfonátové skupiny, tedy bez hydrolýzy, nastal problém v nevodném prostředí, kde nedošlo k úplné debenzylaci. Proto byla debenzylace provedena znovu v kyselině octové, kde byla již vyzkoušena. Po této redukci vodíkem se již benzyly na kruhu cyklenu nenacházely. Po odchránění byla z reakční směsi chromatograficky izolována látka **7b** a její částečně deesterifikované formy, což svědčí o částečné kyselé hydrolýze během debenzylace.

Vzhledem k tomu, že látka **7b** a její částečně hydrolyzované formy (všechny použitelné pro další syntézu) byly rozpustné v H_2O, bylo k navázání karboxylové skupiny využito kyseliny bromoctové a vodného prostředí, namísto v návrhu syntézy zmíněného ethylesteru bromoctové kyseliny, který vyžaduje nevodné prostředí a v neposlední řadě je také dražší. Po této reakci byla látka **9c** charakterizována pouze TLC, následně kysele hydrolyzována a až poté charakterizována i NMR a MS. Po této charakterizaci byla přečištěna na silném a slabém kationtovém iontoměniči, což vedlo k mírným ztrátám ve výtěžku, ale velice čisté cílové látce **8**.

4.3 Cesta přes 1,4-bis(*terc*-butoxykarbonylmethyl)cyklen

Po téměř kvantitativní Mannichově reakci a izolaci produktu **9b** proběhly hydrolýzy esterů. Přečištění konečného produktu neprobíhalo snadno, navzdory očekáváním. Až několikanásobné opakování standardní procedury vedlo k čistým látkám. Nízký výtěžek po hydrolýze lze připsat opakování přečištění na iontoměničích, kde dochází ke ztrátám v každém kroku. Nicméně cílovou látku se podařilo izolovat v množství potřebném na NMR charakterizaci a tedy také pro MS a jako standard pro TLC.

5. Závěr

Byly objeveny a částečně vyřešeny problémy při škálování syntézy chráněné výchozí látky 1,4-dibenzylcyklenu. Pro přípravu většího množství cílové látky bude ještě nutné vyškálovat syntézu 1,4-dibenzyl-7,8-oxalylcyklenu.

Byly vyzkoušeny možné cesty přípravy cílové látky. Výsledky jednotlivých příprav předběžně ukázaly, která cesta by mohla vést k nejvyššímu výtěžku a byla by tedy vhodná pro přípravu většího množství cílové látky. Cílovou látku se podařilo připravit alespoň v malém množství jako standard na TLC, NMR a MS.

Zjištění, zda komplex ligandu *cis*-DO2AP s Ln^{III} je schopný koordinovat molekulu vody, bude předmětem dalšího zkoumání.

6. Seznam zkratek

2D	dvou dimenzionální
3D	tří dimenzionální
Ac	acetyl
AcOH	kyselina octová
Bn	benzyl
cyklen	1,4,7,10-tetraazacyklododekan
δ	chemický posun
DIPEA	ethyldiisopropylamin
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
Et	ethyl
EtOH	ethanol
IPAV	směs isopropylalkoholu, amoniaku a vody
Me	methyl
MeOH	methanol
MRI	„Magnetic Resonance Imaging“
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ph	fenyl
R_f	retenční faktor
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SBM	Solomon, Bloembergen, Morgan
^{t}Bu	*terc*--butyl
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)

7. Seznam použité literatury

[1] J. P. Hornak, http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/, **2008**

[2] V. Kuperman, *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Applications*, Academic Press, San Diego, CA., **2000**

[3] S. Mori, P. B. Barker, *The Anatomical Record (New Anat.)*, **1999**, *257*, 102

[4] C. Wu, M. W. Brechbiel, R. W. Kozak, O. Gansow, *Bioor. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 449

[5] http://www.fmri.org/fmri.htm, **2008**

[6] W. P. Cacheris, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Magn. Reson. Imag.*, **1990**, *8*, 467

[7] A. E. Merbach, É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester (Anglie), **2001**

[8] P. Fousková-Lebdušková, *PhD. Thesis*, Univerzita Karlova, Praha, **2006**

[9] G. M. Nicolle, É. Tóth, K. P. Eisenwiener, H. R. Mäcke, A. E. Merbach, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**, *7*, 757

[10] P. Caravan, N. J. Cloutier, M. T. Greenfield, S. A. McDermid, S. U. Dunham, J. W. M. Bulte, J. C. Amedio ml., R. J. Looby, R. M. Supkowski, W. DeW Horrocks ml., T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002***, 124*, 3152

[11] D. M. Corsi, L. Vander Elst, R. N. Muller, H. van Bekkum, J. A. Peters, *Chem Eur. J.*, **2001**, *7*, 64

[12] E. Tóth, D. Pubanz, S. Vauthey, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.*, **1996**, *2*, 1607

[13] S. Aime, M. Botta, M. Fasano, M. P. M. Marques, C. F. G. C. Geraldes, D. Pubanz, A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, **1997**, *3*, 2059

[14] J. Rudovský, P. Cígler, J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtíšek, I. Lukeš, J. A. Peters, L. Vander Elst, R. N. Muller, *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 2373

[15] F. A. Dunand, S. Aime, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 1506

[16] J. Rudovský, *PhD. Thesis*, Univerzita Karlova, Praha, **2006**

[17] P. Lebdušková, P. Hermann, L. Helm, *Dalton Trans.*, **2007**, *4*, 493

[18] P. Hermann, osobní sdělení

[19] A. Dadabhoy, S. Faulkner, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans. 2*, **2002**, 348

[20] F. Bellouard, F. Chuburu, N. Kervarec, L. Toupet, S. Triki, Y. Le Mest, H. Handel, *J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans. 1*, **1999**, 3499

[21] C. Li, W. Wong, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 2956