

Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Az OPDMA ligandum előállítása és Gd(III)-komplexének koordinációs kémiai vizsgálata

Kun Emese

Vegyésszmérnök BSc hallgató III. évfolyam



Témavezetők:

Dr. Bunda Szilvia

tudományos munkatárs

Dr. Kálmán Ferenc Krisztián

egyetemi docens

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológia Kar

Fizikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2024

TARTALOMJEGYZÉK

1.	Bevezetés és célkitűzés.....	1
2.	Irodalmi előzmények	3
2.1	Az MRI és kontrasztanyagai	3
2.2	A Gd(III)-komplexek általános jellemzése	5
2.3	Az O-piklén vegyületcsalád jellemzése	7
3.	Az alkalmazott kísérleti módszerek	8
3.1	Felhasznált anyagok és általános eljárások.....	8
3.2	Ligandumok előállítása	9
3.2.1	OPDMA-tetraetil-észter ligandum előállítása.....	9
3.2.2	Az OPDMA ligandum előállítása	10
3.3	pH-potenciometria.....	11
3.4	Relaxometria	12
3.5	NMR spektroszkópia	13
4.	Elért eredmények és értékelésük.....	15
4.1	Egyensúlyi vizsgálatok	15
4.2	Kinetikai vizsgálatok	18
4.3	Relaxációs vizsgálatok.....	20
5.	Összefoglalás	23
6.	Summary	24
	Köszönetnyilvánítás.....	25
	Irodalomjegyzék	26

A dolgozatban szereplő rövidítések

AAZTA:	2,2'-((1,4-bisz(karboximetil)-6-(9-karboxinonil)-1,4-diazepán-6-il)azanediil)diécetsav
DFT:	sűrűség funkcionál-elmélet
DOTA:	1,4,7,10-tetraaza-ciklododekán-tetraecetsav
DTPA:	dietilén-triamin-pentaacetát
EMA:	Európai Gyógyszerügynökség
FDA:	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hivatal
MRI:	Mágneses Rezonanciás Képalkotás
NMR:	Mágneses Magrezonancia
NSF:	Nefrogén Szisztémás Fibrózis
OPDMA:	O-piklén-di-malonát származék
O-piklén:	oxatria-za-biciklopentadeka-trién alapvázú makrociklus
OPMMA:	O-piklén-mono-malonát származék
PCTA:	3,6,9,15-tetraazabiciklo[9.3.]pentadeka-1(15),11,13-trién-3,6,9-triécetsav
T_1:	longitudinális relaxációs idő
T_2:	transzverzális relaxációs idő

1. Bevezetés és célkitűzés

Az orvosi képalkotás során számos módszert és eszközt alkalmaznak, hogy minél pontosabb diagnózist állítsanak fel. Az egyik legnagyobb jelentőséggel bíró eljárás a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI), melynek előnye a többi módszerrel szemben a jó felbontóképesség. Az MRI egy non-invazív módszer, mely során erős mágneses tér hatására a szervezetben lévő, leginkább vízprotonok gerjesztődnek megfelelő rádiófrekvenciás impulzus hatására és jelet képeznek. Az így kapott jel arányos a szövetekben jelen lévő protonok számával és mivel az egészséges és kóros szövetekben a víz mennyisége eltérő, így a relaxációs idejük is különböző lesz. Ezek a tényezők együttesen hozzák létre az MRI képet.

Az eljárás során a kontrasztosság növelése érdekében gyakran alkalmaznak úgynevezett kontrasztanyagokat, melyekkel csökkenthető a protonok relaxációs ideje és ezzel együtt a vizsgálati idő is. Erre a célra használhatók a paramágneses fémionok, amelyek toxicitásuk miatt csak kelátképző ligandumokkal alkotott komplexeik formájában alkalmazhatók. A gyakorlatban többnyire a hét párosítatlan elektront tartalmazó Gd(III)-ion komplexeit használják.

Napjainkban a Gd(III)-ion alapú kontrasztanyagok használata csökkenő tendenciát mutat, mivel disszociációjuk során a felszabaduló szabad Gd(III)-ionok felhalmozódhatnak a szervezetben és a veseelégtelenségben szenvedők esetében komoly betegséget, nefrogén szisztémás fibrózist (NSF) okoznak. Továbbá az ilyen típusú vegyületeket alkalmazó egészségügyi intézmények környezetében a szennyvízben is kimutathatóvá vált a Gd(III)-ionok jelenléte, amely toxicitása miatt szintén gondot okoz. Ezen problémák hatására egyre fontosabbá válnak a szervezet számára jobban tolerálható biokompatibilis kontrasztanyagok is.

Az NSF kialakulása, a Gd(III)-komplexeik *in vivo* disszociációja azonban megakadályozható, ha a Gd(III)-iont olyan ligandumhoz kötjük, amely nagyobb inertséget mutat az eddig használtakkal szemben.

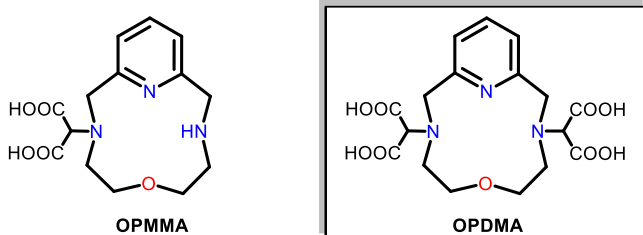
Munkám során fő célom az volt, hogy olyan a Gd(III)-iont megkötni képes makrociklusos ligandumot állítsak elő, amely kellően inert, nagy termodinamikai stabilitású és jó relaxációs tulajdonságokkal rendelkező komplexet képez.

Az utóbbi években jelentősen fellendült a Mn(II)-iont tartalmazó komplexek fejlesztése is, hiszen ezek jobban tolerálhatók *in vivo*. A Mn(II) megkötésére alkalmas ligandumok fejlesztését elsősorban a Gd(III)-ionnál már bevált alapvázak módosításával valósítják meg, így jutottak el Csupász és munkatársai az O-piklén alapvázú, két acetátcsoporthoz tartozó OPC2A

ligandumhoz, amely Mn(II)-komplexének fiziko-kémiai sajátosságai akár *in vivo* alkalmazását is lehetővé tennék.[1]

Tulajdonképpen ennek a munkának a továbbgondolásaként fogható fel a kutatócsoportunkban már korábban Bakos Dóra által előállított és vizsgált OPMMA ligandum, amely az O-piklén alapvázon a két acetátcsoport helyett egy malonátcsoportot tartalmaz, megőrizve ezzel a Mn(II)-ion számára a hatos koordinációs környezetet (lásd **1. ábra**).[2] Természetesen adódott az ötlet, hogy mi lenne, ha nemcsak egy, hanem két malonátcsoportot építenénk rá az O-piklén alapvázra, így előállítva egy a Gd(III)-ion komplexálására is alkalmas ligandumot.

Ezért tehát, céлом volt az OPMMA ligandum továbbfejlesztésével egy új ligandum előállítása, amely (legalább is ebben reménykedtünk) stabilan képes kötni a Gd(III)-iont, megfelelően nagy relaxációs hatás mellett. Az általam tervezett OPDMA ligandumban az O-piklén alapvázú makrociklus már két malonátcsoportot tartalmaz (**1. ábra**). Célul tűztem ki továbbá az általam előállított OPDMA ligandumnak és Gd(III)-komplexének koordinációs kémiai vizsgálatát.



1. ábra Az O-piklén-mono-malonát[2] és az O-piklén-di-malonát ligandum szerkezete

2. Irodalmi előzmények

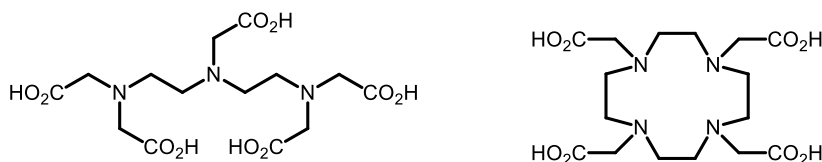
2.1 Az MRI és kontrasztanyagai

A mágneses rezonancia képalkotás (MRI) egy kifinomult képalkotói technika, amely klinikai módszerként sokat fejlődött az elmúlt évtizedekben.[3]

Az MRI a test belső szerveinek feltérképezésére szolgáló eszköz. Nem ionizáló elektromágneses sugárzást használ és eddigi tanulmányok szerint nincs expozícióval kapcsolatos veszélye sem. A kiváló minőségű keresztmetszeti képek készítése a testről gondosan kialakított mágneses mező jelenlétében történik. A kép úgy készül, hogy a páciens körülvevő nagy mágnes külső mágneses mezőt indukál, mely arra készíti a testben lévő hidrogén atommagokat, hogy igazodjanak a mágneses mezőhöz. Később rádiófrekvenciás jel alkalmazásának hatására a hidrogének spinjei kifordulnak, majd az alapállapotba történő visszatérés során energia szabadul fel, amelyet a detektorokon keresztül a számítógép észlel és felhasználja a MR kép elkészítéséhez.[4,5]

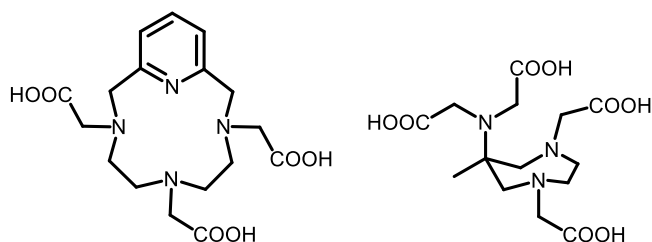
A paramágneses fémkomplexeknek a mai napig nagy jelentőségük van az orvosi diagnosztikában.[3] Az egészséges és a kóros szövetek közötti gyenge kontraszt oka a relaxációs idők túl kicsi eltérése, ezen kontraszt növelésére alkalmazhatnak kontrasztanyagot.[6]

Az elmúlt évtizedekben vizsgáltak Gd(III)-tól eltérő fémionokon (Mn(II), Mn(III), Fe(III), Cu(II)) alapuló kontrasztanyagokat, melyek alapjai lehetnek nyíltláncú és makrociklikus ligandumok is. Ugyanakkor ezidáig úgy tűnik, hogy a Gd(III)-komplexek mutatják a legjelentősebb hatást a T_1 longitudinális relaxációs időre, bár már előállítottak egy-két olyan átmenetifém komplexet is, ami felveszi a versenyt a gyakorlatban alkalmazott kontrasztanyagokkal. A leggyakrabban alkalmazott gadolínium tartalmú kontrasztanyagok alap ligandumai a DTPA és DOTA (2. ábra).[7]



2. ábra DTPA és DOTA ligandum

Potenciális kontrasztanyag jelöltek lehetnek még a PCTA és a nyíltláncú AAZTA ligandumok Gd(III)-komplexei a nagy termodinamikai stabilitásuknak és kinetikai inertségüknek köszönhetően (3. ábra). [8,9]



3. ábra PCTA és AAZTA ligandum

A gadolínium toxicitása miatt a napjainkban használt kontrasztanyagokban a fémion kelátképző ligandummal van megkötve, melynek célja, hogy a szervezetből megtörténő kiürülésig a kontrasztanyag intakt maradjon, ezzel megakadályozva a szabad Gd(III)-ionok akkumulálódását az egyes szövetekben.[10]

A kontrasztanyagoknak számos szempontnak kell megfelelniük, hogy alkalmazhatóak legyenek: jó vízoldhatóságúnak kell lenniük, nagy kinetikai inertséggel kell rendelkezniük, ugyanakkor, legyen kicsi az ozmotikus koncentrációjuk, és nagy a termodinamikai stabilitásuk, továbbá, ha lehet legyenek szervspecifikusak és minimális dózis mellett is maximálisan növeljék a kontrasztosságot.[11]

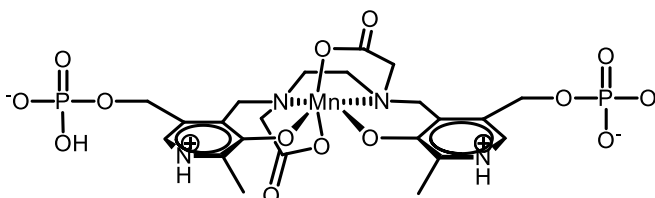
A kontraszt alapján kétféle MRI kontrasztanyagot különböztetünk meg: T_1 -kontrasztanyagot, mely pozitív kontrasztot eredményez a jelintenzitás növekedése miatt és a T_2 -kontrasztanyagot, ami negatív kontrasztot eredményez a jelintenzitás csökkenése miatt, attól függően, hogy a T_1 vagy a T_2 relaxációs időket csökkentik.[12]

Az NSF betegségben szenvedő páciensek esetében nagy mennyiségű gadolíniumot találtak a bőrbiopszia során, mely vizsgálatának következtében arra a megállapításra jutottak, hogy az NSF kialakulása és a gadolínium alapú kontrasztanyagok alkalmazása között összefüggés van. A szervezetbe jutott Gd(III)-ion feldúsulhat a komplexek és az endogén ligandumok és/vagy fémionok között lejátszódó kicserélődési reakciók miatt, így a szabaddá váló Gd(III) nem tud kiürülni. (4. ábra)[13]



4. ábra Gadolínium okozta szisztémás fibrózis súlyos veseelégtelenségben

Az előbb említettek miatt az FDA és az EMA korlátozza klinikai használatukat (elsősorban a nyíltláncú DTPA származékokét), ezért a kutatók nagy hangsúlyt fektetnek az alternatív megközelítésekre, amelyeknek alapjául szolgálnak, ahogy már említettük, a nem lantanoida fémek. Korábban már volt Mn(II)-ion alapú szer a klinikai alkalmazásban, a májspecifikus Mn(II)-DPDP, de azt mára kivonták a forgalomból a kis számú vizsgálati igény miatt (5. ábra).[14]



5. ábra Mn(II)-DPDP komplex

2.2 A Gd(III)-komplexek általános jellemzése

A gadolínium, a ritka(föld)fémek közé tartozik, nem létezik a természetben elemi formában. Hat stabil és egy radioaktív (^{152}Gd) izotópja létezik, a legelterjedtebb a ^{158}Gd (24,8%). Vegyületeiben az oxidációs száma +3-as, de ritka esetekben +1-es és +2-es oxidációs állapotban is jelen lehet.[15]

A gadolínium toxicitását a +3-as oxidatív állapota okozza, melynek atomsugara majdnem azonos a kalciuméval, így a két fém számos biológiai folyamatban versenyezhet. Az esetlegesen bekerülő Gd(III) blokkolhatja a kalcium csatornákat és számos egyéb fiziológiai folyamatot, ami akár az idegimpulzusok továbbításának gátlásához is vezethet, valamint elősegítheti a citokinek fejlődését, ami oxidatív stresszt idézhet elő.[16]

A hard-soft sav-bázis elmélet alapján a Gd(III) a hard karakterű fémionok közé tartozik, azaz kis méretű, nagy töltésű és kis polarizálhatóságú. Hasonlóan hard karakterű donoratomokhoz koordinál.

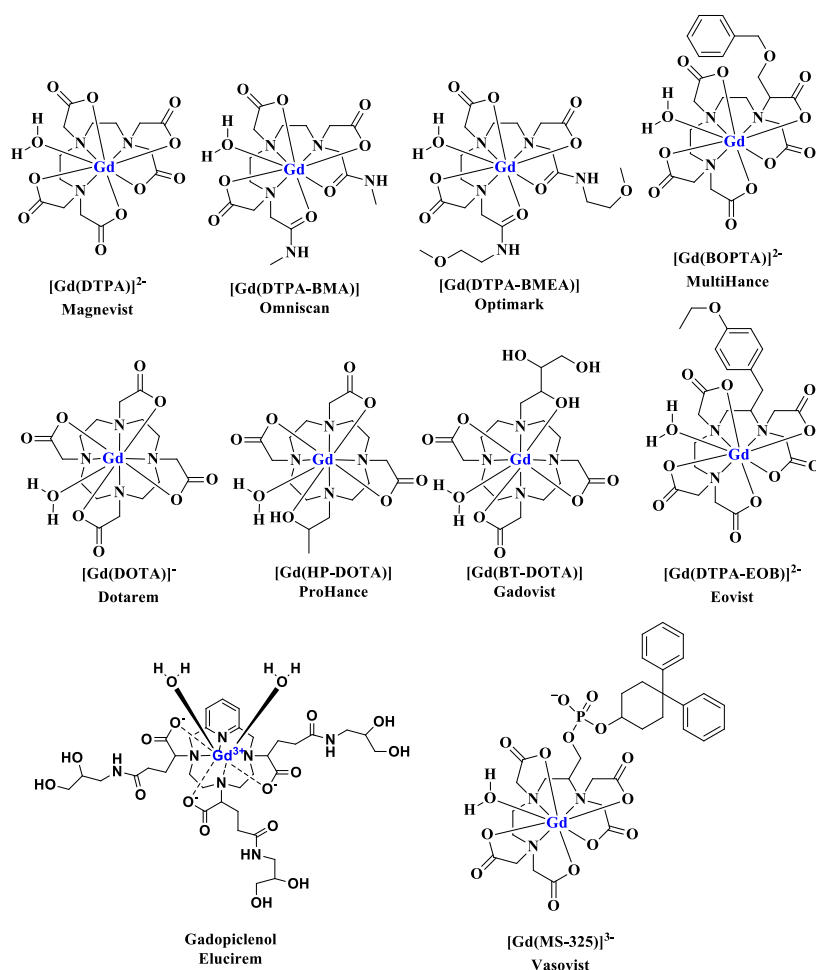
Kelátok formájában viszont nem mérgező, és MRI kontrasztanyagként alkalmazható. Szobahőmérsékleten a gadolínium paramágneses, így lecsökkenti a szövetekben a vízprotonok relaxációs idejét, ezzel növelve az MR kép kontrasztosságát. Az elektron relaxációs ideje pedig nagyságrendekkel nagyobb, mint a többi lantanoida +3-as ioné, aminek következtében a proton rezonancia jelek sokkal szélesebbek. A Gd(III) hét párosítatlan elektront tartalmaz, nagy a mágneses momentuma és kellően hosszú 10^{-9} s az elektron relaxációs ideje.[15]

Szerkezetileg a gadolínium alapú kontrasztanyagok lineáris és nem lineáris, valamint ionos és nem ionos csoportokba tartozhatnak. A makrociklusos és ionos szerkezetek nagyobb stabilitással rendelkeznek a nyílt láncú és nem ionos formákkal szemben.

A makrociklusos ligandumok alapja a tetraaza-ciklododekán gyűrű, ami merev szerkezetet ad a ligandumnak. A nyíltláncú ligandumok, mint a DTPA és származékai, ezzel szemben flexibilisebb komplexet alkotnak.

A Gd(III)-komplexek kinetikai sajátságai nagymértékben függenek a koordináló ligandum sajátságaitól, de az általánosan elmondható, hogy a makrociklusos komplexek inertsége nagyobb.[17]

Az elmúlt évtizedben kilenc Gd(III)-tartalmú kontrasztanyag volt forgalomban a világon (6. ábra),[18] azonban mostanában került piacra egy újabb komplex a Gadopixelenol, amelynek az alkalmazását az FDA és az EMA is jóváhagyta ELUCIREM néven.[19]

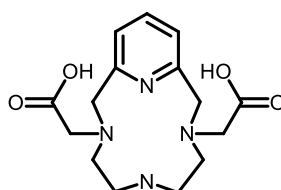


6. ábra Forgalomban lévő Gd(III)-alapú kontrasztanyagok

2.3 Az O-piklén vegyületcsalád jellemzése

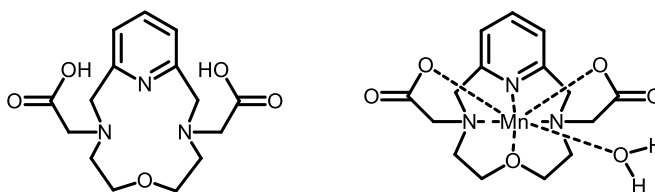
Tóth és munkatársai javasolták az eddigi legjobb jelöltet a Mn(II)-kelátok reaktivitását illetően, amely a $[\text{Mn}(\text{DOTA})]^{2-}$ -hoz hasonló kinetikai inertséggel rendelkezik. Az erre használt ligandum egy merev biszpidin platformon alapuló komplex.[1]

Olyan merev alapvázú MRI kontrasztanyagként használható ligandumok is lettek már szintetizálva, amelyeknek alapja piklén származék. Az alapvegyület a $\text{H}_2(3,9)\text{-PC2A}$, ami stabil komplexet képez Mn(II)-vel egy vízmolekulát koordinálva a komplex belső szférájában (7. ábra). A képződött komplex ugyanakkor inertségét tekintve nem megfelelő az orvosi alkalmazásra.



7. ábra A $\text{H}_2(3,9)\text{-PC2A}$ ligandum

A piklén-alapú makrociklusok egyedi protonálódási szekvenciát mutatnak, mivel az első protonálódás a piridinggyűrűhöz *transz* pozícióban elhelyezkedő nitrogénatomon történik, míg a második protonálódási lépés során az első proton átlép a cisz N-re, a jobb töltésszétválás érdekében. Ebből a ligandumból jutunk el az $\text{H}_2\text{OPC2A}$ ligandumhoz, ha a *transz*-nitrogén donoratomt egy éteres -O- atommal helyettesítjük, ami természetesen jelentős hatással van mind a protonálódási állandók értékeire, mind a protonálódási sorrendre. A mangánnal képződő komplexének stabilitása némileg meghaladja a $\text{H}_23,9\text{-OPC2A}$ komplexét (8. ábra).[1]



8. ábra $\text{H}_23,9\text{-OPC2A}$ ligandum és $[\text{Mn}(3,9\text{-OPC2A})]$ -komplexe

3. Az alkalmazott kísérleti módszerek

3.1 Felhasznált anyagok és általános eljárások

A szintézisekhez felhasznált reagenseket, illetve oldószereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) valamint a Tokyo Chemical Industry cégektől szereztük be.

Az analitikai és preparatív HPLC mérések során használt oldószerek a VWR HiPerSolv CHROMANORM®-tól lettek beszerezve.

Az O-piklén ligandum szintéziséhez szükséges mikrohullámú roncsolásokat CEM Microwave Synthesis System (Discover-S #908860) mikrohullámú reaktorról végeztük.

A reakciók előrehaladtát és a termékek tisztaságának ellenőrzését Waters 996 PDA detektorral működő Waters Alliance 2690 típusú analitikai HPLC készülékkel követtük nyomon. A használt kolonna 3 mikronos Phenomenex C18(2) 150×4,6 mm volt. A folyamat során gradiens elúciót, 1 mL/perc áramlási sebességgel alkalmaztuk.

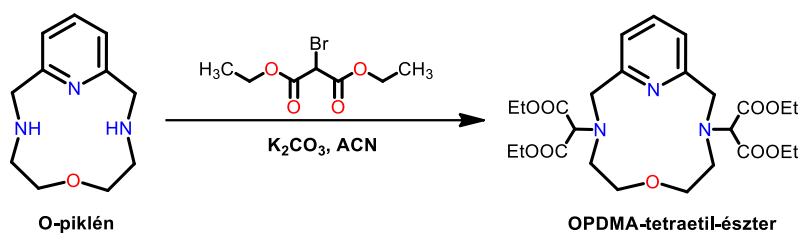
A preparatív HPLC-n végzett tisztítási műveleteket YL9110S Quaternary Pump, YL9101S Vacuum Degasser, YL9120 UV/Vis Detector egységekből álló nagynyomású folyadékkromatográfiás műszerrel végeztük. Az alkalmazott kolonna Phenomenex Luna 5 µm C18(2) 100 Å 250×21.2 mm (S/No. H18-268346) volt.

A nagyfelbontású tömegspektrumok felvételét Szabó Dávid Ruben végezte a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékének Műszerelemzési Laboratóriumában egy maXis II UHR ESI-QTOF MS Bruker műszerrel.

Az NMR spektroszkópiás méréseket Bruker Avance II 500 MHz-es spektrométerrel végeztük el. A ligandumok szerkezetének igazolásához végzett ¹H- és ¹³C-NMR mérésekhez 99,9%-os tisztaságú deuterált oldószereket (Acetonitril-d₃, D₂O,) alkalmaztunk, melyeket a Cambridge Isotope Laboratories Inc cégektől rendeltünk. Az ¹⁷O-NMR mérésekhez 10 %-ban ¹⁷O-el dúsított vizet használtunk, amit a Nukem Isotopes GmbH cégtől szereztünk be.

3.2 Ligandumok előállítása

3.2.1 OPDMA-tetraetil-észter ligandum előállítása

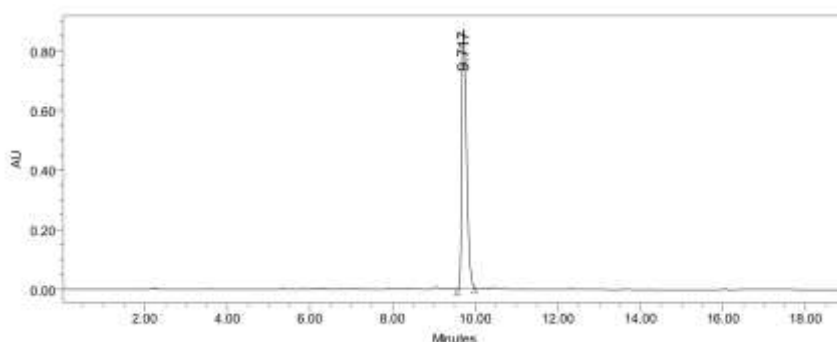


9. ábra Az OPDMA-tetraetil-észter ligandum előállítása

Az OPDMA ligandumok szintéziséhez felhasznált O-piklén ligandum előállítása az irodalomban megtalálható leírás szerint történt.[1]

Egyszerű alkilezést végeztünk az O-piklén makrociklus (200 mg, 0,97 mmol) és dietil-bromomalonát (330 μl , 1,93 mmol) reakciójával (9. ábra). A malonát oldalláncot kis részletekben csepegtettük a makrociklus lúgos oldatához (670 mg, 4,85 mmol K_2CO_3). Minden újabb részlet hozzáadása előtt analitikai HPLC-vel ellenőriztük az alkilezés mértékét. A keletkezett termékeket preparatív HPLC-s technikával elválogattuk (10. ábra).

Az előállított és megtisztított (legalább >95%) vegyületek szerkezeti jellemzését ^1H - és ^{13}C -NMR, ESI-HRMS és analitikai HPLC mérések segítségével valósítottuk meg.



10. ábra Az OPDMA-tetraetil-észter tisztítása után kapott analitikai HPLC-s kromatogram ($t_R = 9,717$ perc)

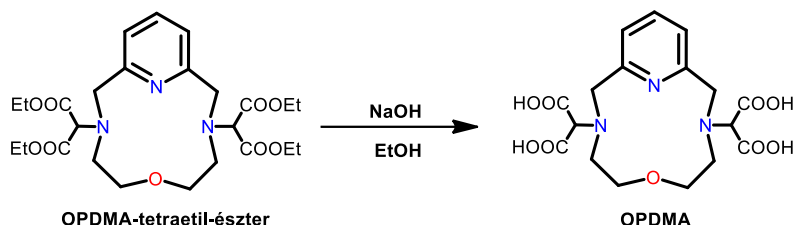
Kitermelés: 275 mg, 0,52 mmol.

ESI-MS (m/z , pozitív mód): $[\text{M}^+\text{H}]^+$ számított: 523,5822; $[\text{M}^+\text{H}]^+$ mért: 523,5817.

^1H -NMR (500 MHz, ACN-d_3) δ (ppm): 8,32 (1H, t , $J_1=7,8$ Hz, $J_2=7,8$ Hz, aromás), 7,65 (2H, d , $J=7,7$ Hz, aromás), 4,54 (4H, m , $-\text{CH}_2-$), 4,47 (2H, m , $-\text{CH}-$), 4,18 (8H, t , $J_1=6,9$ Hz, $J_2=6,8$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3,42 (4H, m , $-\text{CH}_2-$), 3,06 (4H, m , $-\text{CH}_2-$), 1,20 (12H, t , $J=7,0$ Hz, $-\text{CH}_3$).

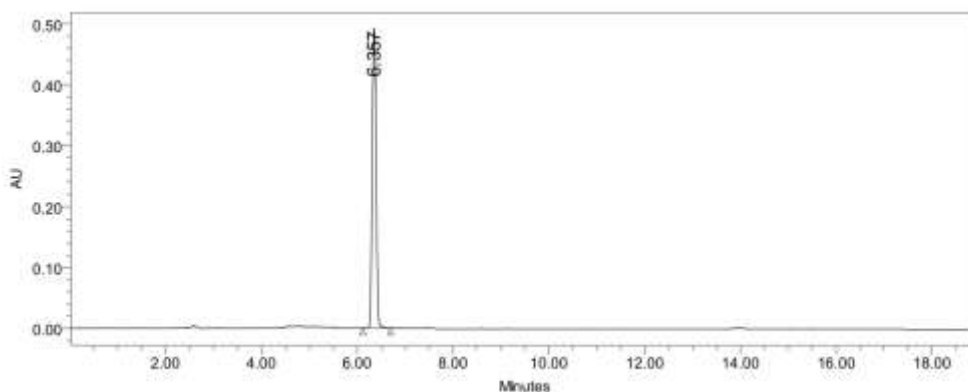
^{13}C -NMR (125 MHz, ACN-d_3) δ (ppm): 168,4 ($4 \times 1\text{C}$, C=O), 155,7 ($2 \times 1\text{C}$, aromás), 146,3 ($1 \times 1\text{C}$, aromás), 123,9 ($2 \times 1\text{C}$, aromás), 68,8 ($2 \times 1\text{C}$, $-\text{CH}_2-$), 68,5 ($2 \times 1\text{C}$, $-\text{CH}-$), 62,8; 57,2; 55,1 ($8 \times 1\text{C}$, $-\text{CH}_2-$), 14,25 ($1 \times 1\text{C} + 6 \times 2\text{C}$, $-\text{CH}_3$).

3.2.2 Az OPDMA ligandum előállítása



11. ábra Az etil-észter védőcsoport eltávolítása: az OPDMA ligandum előállítása

Az elválogatott termékeken található etil-észter védőcsoportokat lúgos közegben (5 ekv. NaOH) távolítottuk el (11. ábra). A reakció teljes lejátszódását analitikai HPLC-vel valamint tömegspektrometriásan is ellenőriztük. Az előállított új makrociklusról az oldószert liofilizálással eltávolítottuk, és az így kapott szilárd anyagot visszaoldottuk víz/acetonitril elegyében majd preparatív HPLC-n ismét megtisztítottuk (12. ábra).



12. ábra Az OPDMA tisztítása után kapott analitikai HPLC-s kromatogram
($t_R = 6,357$ perc)

Kitermelés: 128 mg, 0,31 mmol.

ESI-MS (m/z , pozitív mód): $[\text{M}+\text{H}]^+$ +számított: 412,1351; $[\text{M}+\text{H}]^+$ +mért: 412,1350.

^1H -NMR (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 7,69 (1H, t , $J_1=7,8$ Hz, $J_2=7,5$ Hz, aromás), 7,20 (2H, d , $J=7,5$ Hz, aromás), 4,17 (2H, bs , $-\text{CH}_2-$), 3,97 (2H, bs , $-\text{CH}-$), 3,70 (2H, s , $-\text{CH}_2-$), 3,32 (2H, bs , $-\text{CH}_2-$), 2,94 (2H, bs , $-\text{CH}_2-$), 2,58 (2H, bs , $-\text{CH}_2-$), 2,29 (2H, bs , $-\text{CH}_2-$).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 176,9 ($4 \times 1\text{C}$, C=O), 160,1 ($2 \times 1\text{C}$, aromás), 137,8 ($1 \times 1\text{C}$, aromás), 120,2 ($2 \times 1\text{C}$, aromás), 78,8 ($2 \times 1\text{C}$, $-\text{CH}_2-$), 68,1 ($2 \times 1\text{C}$, $-\text{CH}-$), 59,1 ($2 \times 1\text{C}$, $-\text{CH}_2-$), 54,0 ($2 \times 1\text{C}$, $-\text{CH}_2-$).

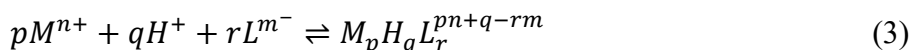
3.3 pH-potenciometria

A pH-potenciometria egy elektroanalitikai eljárás, amely a ligandumok és komplexeik egyensúlyi vizsgálatának egyik legmeghatározóbb módszere. A módszer lényege, hogy a ligandum protonálódási folyamataira hatással van a komplexképződés, ami savasabb tartományba tolja a deprotonálódási folyamatokat. Tehát az oldat H^+ -koncentrációját a fémionok és a különböző mértékben protonált ligandumok közötti versengési reakciók, valamint a szabad ligandumok különböző bázicitású donorcsoportjai befolyásolják. A ligandum protonálódási folyamatait és állandóit az alábbi egyenletekkel írhatjuk le:



$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H^+][H_{i-1}L]}, i=1,2,\dots \quad (2)$$

A különböző komplexek általános képződési reakcióját és a stabilitási szorzatát a következőképpen adhatjuk meg:



$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pH_qL_r^{pn+q-rm}]}{[M^{n+}]^p[H^+]^q[L^{m-}]^r} \quad (4)$$

Az általunk vizsgált egyensúlyi rendszerben, ahol a fémion és a ligandum 1:1 arányban volt jelen, ML , MH_iL és $ML(OH)$ részecskék képződését feltételezhetjük, amelyek egyensúlyi állandóit az alábbi egyenletekkel jellemezhetjük:

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (5)$$

$$K_{MH_iL} = \frac{[MH_iL]}{[MH_{i-1}L][H^+]}, i=1,2,\dots \quad (6)$$

$$K_{MLOH} = \frac{[ML]}{[MLOH][H^+]} \quad (7)$$

A pH-potenciometria legmegbízhatóbban a pH=2-12 között alkalmazható, ugyanakkor előfordulhat, hogy a komplexképződés nem esik ebbe a tartományba, így ilyenkor a pH-metriás titrálást kiegészítő fotometriás vagy relaxometriás méréseket lehet végezni és a kapott primer adatokat együtt illesztve kapjuk a megfelelő állandókat.

A pH-potenciometriás mérések kivitelezése Metrohm 6.00234.100 kombinált üvegelektóddal és Metrohm 702SM típusú Titrino automata titrátorral történt. A méréseket 0,15 M-os NaCl ionerősség mellett végeztük, állandó $25,0 \pm 0,1$ °C hőmérséklet mellett, valamint a titrálás során inert atmoszférát (N_2) alkalmaztunk a CO_2 zavaró hatásának

kiküszöbölésére. A savas mintát 0,2 M-os NaOH oldattal titráltuk, melyben a komponensek koncentrációja $c_L=c_M=2$ mM volt. A titrálás során 100–150 mL-pH adatpárt gyűjtöttünk 1,7–12,0 pH-tartományban. Az Irving-faktor és a víziionszorzat (K_v) kiszámításához egy a sósavat 0,01 M koncentrációban tartalmazó mintát titráltunk NaOH-oldattal. A vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek mindegyike analitikai tisztaságú volt.

A kapott pH-V(ml) adatpárokat a PSEQUAD számítógépes program segítségével illesztettük.[20]

3.4 Relaxometria

Az eljárás alapja a szabad Mn(II)- és Gd(III)-ion és a kialakuló komplex relaxivitásában mutatkozó különbség. A komplex képződése során a fémion belső szférájában található vízmolekuláknak a száma csökkenni kezd, ami növekedést eredményez a vízprotonok relaxációs idejében melynek hatására a relaxációs sebesség csökkenni fog. Disszociációs reakció esetében az előbb említett folyamatnak az ellenkezője figyelhető meg, ugyanis ahogy az ionok szabadabbá válnak a relaxivitásban növekedés érzékelhető.

Az egyensúlyi vizsgálatok eredményeinek alátámasztására úgynevezett pH-relax titrálást végeztünk, ahol a pH-függvényében mértük az egyes minták relaxivitását ($1/T_1$). A komplex relaxitás értékeinek meghatározása során (pH = 7,4, HEPES puffer) koncentrációja minden esetben 1 mM-os volt, a mérések 20 és 60 MHz térerősségnél történtek 25 és 37 °C-on ($I=0,15$ M NaCl).

Relaxometriás módszerrel történt a komplexek inertségének vizsgálata is. A kinetikai vizsgálatok során a minták T_2 relaxációs idejét mértük az idő függvényében különböző pH-értékeken 25-szörös Eu(III)-ion jelenlétében, hogy biztosítsuk a reakciók elsőrendűségét, így a kapott sebességi állandók, k_{obs} , pseudo-elsőrendű sebességi állandók. A primer idő-relaxitás adatokat a Scientist program segítségével, az alábbi egyenlettel illesztve kaptuk a k_{obs} értékeket.

$$R_t = (R_0 - R_e)e^{-k_{obs}t} + R_e \quad (8)$$

, ahol az R_0 , R_t , és R_e a kezdeti, a t időpillanatban mért és az egyensúlyi $1/T_2$ értékeket reprezentálja.

A $[Gd(OPDMA)]^-$ kinetikai vizsgálata esetén az alkalmazott pH-tartomány 2-4 volt. A pH beállításához 50 mM-os MKE (monoklórecetsav) DMP (dimetil-piperazin) és NMP (N-metil-piperazin) puffereket alkalmaztunk. A komplex koncentrációja 1 mM, a hőmérséklet 37 °C volt.

A mérések során a vízprotonok T_1 relaxációs idejét inverzió átviteli kísérlettel, míg T_2 relaxációs idejét CPMG módszerrel határoztuk meg. Az előbbi lényege, hogy a makroszkópikus mágnesezettségi vektort először egy 180° -os rádiófrekvenciás impulzussal sugározzuk be, majd τ idő után egy második, 90° -os impulzust követően detektáljuk a jelet, míg a második módszerrel úgynevezett spin ekhó jeleket állítunk elő, majd mérjük az intenzitáscsökkenését az ekhó idő függvényében.

A T_1 - és T_2 -adatainak mérését Bruker Minispec MQ20 és MQ60 relaxométereken végeztem.

3.5 NMR spektroszkópia

Az NMR, azaz mágneses magrezonancia spektroszkópia egy olyan modern kémiai szerkezetvizsgálat, amely képes információt adni az anyag szerkezetéről. Az NMR mágneses teret használva vizsgálja az egyes anyagokat a különböző magok eltérő spin tulajdonságait kihasználva.

Az NMR lényege a nukleáris árnyékolás koncepcióján alapul. Ez azt jelenti, hogy minden atommagot elektronok vesznek körül, melyek mágneses mezőt hoznak létre. Ezt a mezőt az atommag érzékeli és az azt körülvevő elektronkörnyezetet kissé megváltoztatja, amely az energiaszintek enyhe változását is okozza. Az így kapott energiaszintek gerjesztése más-más frekvenciát igényel, mely új csúcsokat hoz létre az NMR-spektrumban, így lehetővé téve a molekulák szerkezeti meghatározását.

A ligandum tisztaságának ellenőrzésére ^1H -NMR és ^{13}C -NMR eljárást alkalmaztunk, melynek segítségével meghatároztuk a protonok és szénatomok számát és elhelyezkedését a molekulán belül.

A paramágneses fémion tartalmú komplexek relaxivitását számottevő tényező befolyásolja, amelyek között szerepel a fémionhoz közvetlenül kötődő vízmolekula cseresebessége (k_{ex}^{298}). A k_{ex} érték meghatározására ^{17}O -NMR módszert alkalmaztunk, ahol a ^{17}O mag relaxációs sebességét és kémiai eltolódását vizsgáltuk H_2^{17}O víz segítségével. A paramágneses fémionhoz koordinálódó ^{17}O mag relaxációs ideje jelentősen csökken, amelynek változását a hőmérséklet függvényében meghatározva lehetőség nyílik a belsőszférás vízmolekula cseresebességének meghatározására. A Gd(III)-komplexek vízcseresebességének kinetikai és aktiválási paramétereit a ^{17}O longitudinális és transzverzális relaxációs sebességéből ($1/T_1$, $1/T_2$) és a jelek kémiai eltolódásából határozhatjuk meg.

A paramágneses komplexre, valamint egy diamágneses mintára mért adatokból a Swift-Connick elmélet alapján lehet meghatározni a redukált relaxációs sebességeket ($1/T_{1r}$, $1/T_{2r}$) és

a redukált kémiai eltolódást ($\Delta\omega_r$). Diamágneses standardnak általában 3-as pH-jú ^{17}O -ben dúsított perklórsav oldatot alkalmazunk. A redukált relaxációs sebességet és a kémiai eltolódást az alábbi egyenletekkel számíthatjuk ki:

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{1}{P_m} \left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_{2A}} \right] = \frac{1}{\tau_m} \frac{T_{2m}^{-2} + \tau_m^{-1} T_{2m}^{-1} + \Delta\omega_m^2}{(\tau_m^{-1} + T_{2m}^{-1})^2 + \Delta\omega_m^2} \quad (9)$$

$$\Delta\omega_m = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B}{3k_B T} \frac{A_O}{\hbar} \quad (10)$$

ahol P_m a belső vízmolekula(ák) móltörtje, τ_m a koordinált vízmolekula átlagos élettartama, $1/T_{2m}$ a belső szféra vízmolekula transzverzális relaxációs sebessége és $\Delta\omega_m$ a kémiai eltolódás különbsége, melyet befolyásol az $A_O/\hbar$ érték, a g_L izotóp Landé g-faktor, a μ_B Bohr magneton, az S elektron spin és a B térerő.

A transzverzális relaxációsebességet a skaláris hozzájárulás ($1/T_{2sc}$) határozza meg:

$$\frac{1}{T_{2m}} \cong \frac{1}{T_{2sc}} = \frac{S(S+1)}{3} \left(\frac{A_O}{\hbar} \right)^2 \tau_s \quad (11)$$

ahol $1/\tau_s$ a vízcseresebesség ($k_{ex}=1/\tau_m$) és az elektron-spin relaxációsebesség ($1/T_{1e}$) összege:

$$\frac{1}{\tau_s} = \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{T_{1e}} \quad (12)$$

A k_{ex} hőmérsékletfüggését az Eyring egyenlet írja le:

$$\frac{1}{\tau_m} = k_{ex} = \frac{k_B T}{h} \exp \left\{ \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \right\} = \frac{k_{ex}^{298} T}{298.15} \exp \left\{ \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T} \right) \right\} \quad (13)$$

ahol k_{ex}^{298} a vízcseresebesség 298,15K hőmérsékleten, és $\Delta S^\ddagger$ valamint $\Delta H^\ddagger$ a cserefolyamat aktiválási entrópiája és entalpiája. Az illesztés során az elektron-spin relaxációsebességre exponenciális hőmérsékletfüggést feltételeztünk:

$$\frac{1}{T_{1e}} = \frac{1}{T_{1e}^{298}} \exp \left\{ \frac{E_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298,15} \right) \right\} \quad (14)$$

Számításaink során a q értékét 1-nek vettük a ligandumban jelenlevő donoratomok száma, valamint a komplex relaxivitása miatt.

Az OPDMA ligandum Gd(III)-komplexének vizsgálata során 3 mM-os koncentrációt alkalmaztunk, és a minta H_2^{17}O tartalmát 2%-ra dúsítottuk.

4. Elért eredmények és értékelésük

4.1 Egyensúlyi vizsgálatok

A Gd(III)-ionnal képződő komplexek termodinamikai stabilitása az egyik legfontosabb fizikai-kémiai paraméter, hiszen az *in vivo* alkalmazáshoz nélkülözhetetlen, hogy a komplex stabilitása nagyobb legyen, mint a szervezetben fellelhető ligandumokkal kialakuló kelátoké. Továbbá, az endogén Cu(II)-ion is nagy stabilitású komplexek kialakítására képes a nitrogén donoratomokat tartalmazó ligandumokkal, amelyek $\log K$ értékei megközelítik, sőt számos esetben meg is haladják a megfelelő Gd(III)-komplexekéit. A termodinamikai jellemzés mindemellett azért is szükséges, hogy információt kapjunk a rendszer részecskeeloszlásáról elsősorban a fiziológiás tartományt illetően. Biztosnak kell benne lennünk, hogy a Gd(III)-komplex az alkalmazás körülményei között 100%-ban képződik, valamint tudnunk kell, hogy a protonált vagy esetlegesen kialakuló hidroxó-komplexek hogyan befolyásolják az anyagunk egyéb tulajdonságait, mint például a relaxivitás.

Az egyensúlyi viszonyok tanulmányozását mindig a ligandum protonálódási állandóinak meghatározásával kezdjük, egyrészt azért, mert pH-potenciometriás módszerrel így a ligandum koncentrációja is meghatározható, másrészt a komplexek egyensúlyi állandójának számításához a bázicitás ismerete elengedhetetlen.

Ezért, első lépésként az OPDMA ligandum protonálódási állandóit határoztuk meg, majd azok ismeretében kísérletet tettünk a kialakuló Gd(III)-komplex stabilitási állandójának meghatározására is. A kapott V(ml)–pH adatpárokat a PSEQUAD program segítségével illesztettük.[21] A kapott pK ($\log K$) értékeket, valamint az összehasonlítási alapul szolgáló H_5DTPA , H_5AAZTA , H_4PCTA és H_4DOTA ligandumok pK értékeit, továbbá a Gd(III)-komplexek stabilitási állandóit és pGd értékeit az 1. táblázat tüntettük fel.

A képződő komplexek stabilitását a ligandum bázicitása ($\Sigma \log K_1^H$), a donoratomok minősége és elhelyezkedése határozza meg elsősorban. A ligandum bázicitásának mértéke ezért információt ad annak fémkötő képességéről, lehetőséget biztosítva a komplexek stabilitási állandóinak becslésére. A leginkább célravezető módszer, ha a ligandumok gerincében elhelyezkedő donoratomok protonálódási állandóit ($\Sigma \log K_2^H$) vesszük figyelembe, összegezzük és hasonlítjuk össze, hiszen az úgynevezett belsősférás (in cage) komplex kialakulására ezek vannak a legnagyobb hatással, amikor is a fémion már képes az alapváz és a kar(ok) donoratomjai által kialakított koordinációs kalitkába belépni.

1. táblázat Az OPDMA és az összehasonlító ligandumok és komplexeik egyensúlyi paraméterei
(25 °C, 0,15 M NaCl)

	OPDMA	DTPA^a	AAZTA^b	PCTA^c	DOTA^d
logK₁	7,14(5)	9,93	11,23	11,36	11,08
logK₂	6,99(2)	8,37	6,52	7,35	9,23
logK₃	3,17(4)	4,18	3,78	3,83	4,24
logK₄	2,23(4)	2,71	2,24	2,12	4,18
logK₅	2,02(5)	2,00	1,56	1,29	1,88
ΣlogK₂^H ^e	14,13	18,30	17,75	18,71	20,31
logK_{GdL}	>20	22,03	20,24	20,39	24,7 ^f
logK_{GdL}^H	2,01(2)	1,96	1,89	–	–
pGd^g	17,7	16,5	14,4	14,2	12,7

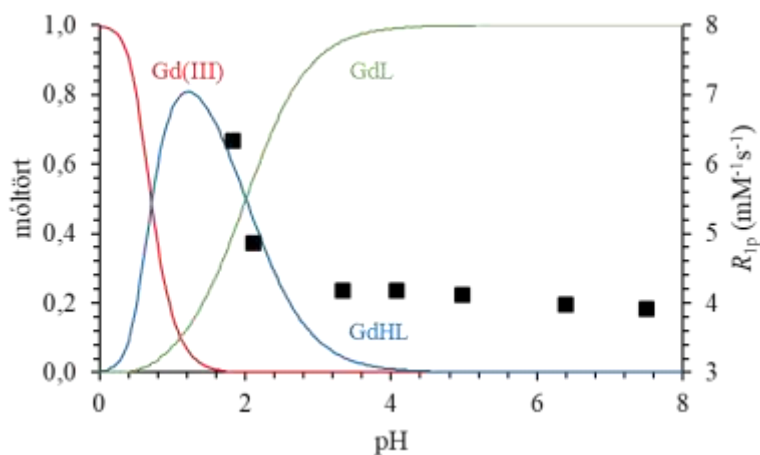
^a Ref.[22]; ^b Ref. [23] 0,1 M KCl; ^c Ref. [24] 1 M KCl; ^d Ref.[25], logK₆^H=1.71 (1.0 M NaCl); ^e logK₁ + logK₂; ^f Ref. [26] 0,1 M NaCl; ^g pH=7,4; c_L=c_M=0,01 mmol/dm³

Az 1. táblázatban látható bázicitás értékeket összevetve jól látszik, hogy az OPDMA ligandum rendelkezik a legkisebb bázicitással, ami nem meglepő, hiszen a makrociklus egyik N-atomját O-atommal helyettesítettük, míg a transz-helyzetben elhelyezkedő N egy aromás rendszerbe van foglalva. Míg az OPDMA ligandum logK₁ értéke körülbelül 7, addig az összehasonlító ligandumok értéke 10 vagy ennél nagyobb, ami sokkal erősebb H-hidak kialakulására utal a N és karboxilát-O donoratomok között. A logK₂ értékek már nem mutatnak ilyen jelentős eltérés, sőt ahogy az látszik is, az az AAZTA esetében mutatja a legkisebb bázicitást. Bár ¹H-NMR méréseket nem végeztünk a protonálódási szekvencia felderítésére, de nyugodtan kijelenthetjük, hogy eltérően a PCTA származékoktól, ahol a ligandum protonálódása a piridin egységgel szemben elhelyezkedő *transz*-N-en kezdődik, itt erre nincs lehetőség a N – O csere miatt, tehát a proton belépése mindenképpen a *cisz*-N-ekre történik.[27] A 3-5 protonálódási folyamatok, a kapott pK értékek alapján is, a malonátcsoporthoz rendelhetők.

Bár próbáltuk a [Gd(OPDMA)]⁻-komplex stabilitási állandóját pH-potenciometriás módszerrel meghatározni, a kísérletek nem vezettek eredményre, mivel az illesztések során azt tapasztaltuk, hogy a komplexképződés pH = 2-re befejeződik, így csak egy protonálódási állandó meghatározására volt lehetőségünk. Annak ellenére, hogy pontos adatunk nincs a komplex termodinamikai stabilitására vonatkozóan, a kísérletekben tapasztaltak alapján jó becsléssel azt mondhatjuk, hogy a komplexünk logK_[Gd(OPDMA)] értéke legalább 20 vagy annál

is nagyobb. Ekkora érték kell ugyanis ahhoz, hogy a komplexképződés befejeződjön pH = 2-re. Természetesen fölmerül a kérdés, hogy miért nem vizsgáltuk a rendszert erősen savas tartományban különmintásan, amire az az egyszerű válasz, hogy nem akartuk, hogy a malonát esetleges dekarboxileződése (ami nagy sav és lúg koncentrációknál bekövetkezhet) téves következtetésre adjon lehetőséget. Meg kell még jegyeznünk ugyanakkor azt is, hogy az 1,5-ös pH-n összeállított minta MS spektruma sem mutatja szabad ligandum jelenlétét, továbbá a komplex dekarboxileződésére sem találtunk bizonyítékot.

A kapott protonálódási állandók és a becsült stabilitás érték felhasználásával szerkesztettünk egy eloszlási diagramot, amin a komplexre különböző pH-kon mért relaxivitás értékeket is feltüntettük, (15. ábra).



15. ábra A Gd(III)-OPDMA⁴⁻ rendszerre számolt részecskeeloszlási diagram és a különmintás mérések során kapott $1/T_{1p}$ relaxivitás értékek (■) a pH-függvényében.

($C_{\text{komplex}} = 1,0 \text{ mM}$, $I = 0,15 \text{ M NaCl}$, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1.41 T)

Az 15. ábrán jól látszik, hogy a komplex oldatának relaxivitása 4-es pH fölött nem változik jelentősen, ami azt jelenti, hogy ebben a tartományban az GdL komplex van csak jelen a rendszerben. Míg 4-es pH alatt a relaxitás jelentős növekedését figyelhetjük meg, ami a komplex protonálódása során az egyik karboxilát dekoordinációjával párhuzamosan, egy második vízmolekula belsősférás koordinációjára utal, egy $q = 2$ -es komplex képződését eredményezve.

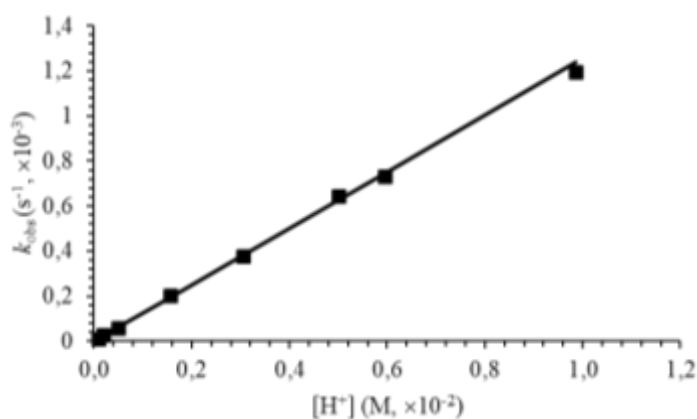
A Gd(III)-komplexek stabilitásának jobb összehasonlítása érdekében kiszámítottuk a komplexek úgynevezett pGd-értékeit ($\text{pGd} = -\log[\text{Gd(III)}]_{\text{szabad}}$, $\text{pH}=7,4$, $c = 0,01 \text{ mM}$) is, amely egy látszólagos stabilitáshoz hasonló állandónak is tekinthető, de minden bizonnyal alkalmas a különböző ligandumokkal kialakuló Gd(III)-komplexek stabilitásának összehasonlítására. Ha megnézzük az 1. táblázatban bemutatott adatokat azt látjuk, hogy a $[\text{Gd(OPDMA)}]^-$ -komplex pGd-értéke minimum egy, maximum 5 nagyságrenddel nagyobb, mint a többi komplexé, ami kiemelkedő termodinamikai stabilitásra utal.

4.2 Kinetikai vizsgálatok

A Gd(III)-komplexek nagy stabilitása mellett azok inertsége is fontos tényező, hiszen a disszociációval szemben mutatott érzékenység nagyban befolyásolja az *in vivo* alkalmazott komplexek szerkezetbeni sorsát. Éppen ezért részletesen tanulmányoztuk a $[Gd(OPDMA)]^-$ -komplex disszociációs reakcióját 2–4 pH-tartományban 37 °C-on, 1H -relaxometriás módszerrel, a P. Caravan és munkatársai által javasolt körülmények módosításával.[28]

Mi is a T_2 relaxációs idők (transzverzális relaxáció) mérésével követtük egy 1 mM-os koncentrációjú komplex oldatban a fémcseré reakciókat (a T_2 mérések gyorsabban kivitelezhetőek mint a T_1 meghatározása), ugyanakkor 25 mM-os Zn(II) kicserélő fémion helyett, ugyanilyen koncentrációjú Eu(III)-at alkalmaztunk. A kicserélő fém cseréjére azért volt szükség, mert a komplex nagy stabilitása Zn(II)-ion alkalmazása esetén gyaníthatóan egyensúlyi folyamatra vezetett volna, míg a Gd(III) és Eu(III) nagy hasonlósága miatt, a cserereakciók teljesen lejátszódtak.

Az Eu(III)-ion nagy feleslege biztosította a pszeudo-elsőrendű körülményeket, így az $1/T_2-t$ adatpárokból meghatározott k_{obs} értékek elsőrendű sebességi állandónak tekinthetők. A kapott primer adatokból a Scientist® (Micromath) program alkalmazásával ($R_t = R_e + (R_0 - R_e) \times e^{-kt}$, ahol R_t a t időben mért, R_0 a kezdeti, míg R_e az egyensúlyi $1/T_2$ értékeket jelöli) számítottuk ki az egyes pH-kon lejátszódó reakciók k_{obs} , értékeit. A kapott sebességi állandókat és illesztésüket a 16. ábrán mutatjuk be.



16. ábra A $[Gd(OPDMA)]^-$ -komplex disszociációjának k_{obs} értékei a H^+ -koncentráció függvényében ($\times 25$ Eu(III)-felesleg, 37 °C, 0,15 M NaCl)

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a komplex disszociációjának sebessége lineárisan növekszik a H^+ -ion koncentráció növekedésével. A Gd(III)-komplexek disszociációja a protonkatalizált utak mellett lejátszódhat még az úgynevezett spontán disszociációval is, valamint a kicserélő fémionnak is lehet szerepe.

Makrociklusos komplexről lévén szó, a kicserélő fémion közvetlen támadásával lejátszódó reakciót nem vizsgáltuk, hiszen saját tapasztalataink, valamint irodalmi előzmények alapján is azt mondhatjuk, hogy ennek az útnak itt nincs szerepe.[29] Továbbá az illesztések során az egyenletet tovább tudtuk egyszerűsíteni, mivel sem spontán disszociációt, sem négyzetes H^+ -ion függést nem találtunk, így végül a 15. egyenletet használtuk az illesztéshez.

$$k_{obs} = k_1 \times [H^+] \quad (15)$$

, ahol a k_1 , a $[Gd(OPDMA)]^-$ -komplex protonkatalizált disszociációs útját jellemző sebességi állandó

A $[Gd(OPDMA)]^-$ -ra kapott k_1 , valamint az összehasonlításhoz használt komplexek megfelelő értékeit a 2. táblázatban mutatjuk be, ahol a fiziológiás pH-ra számolt felezési időket is feltüntettük. Bár 37 °C végeztük a méréseket a 2. táblázatban feltüntettük a 25 °C-ra vonatkozó adatot is, amire az adott lehetőséget, hogy tapasztalataink szerint a hőmérséklet emelkedése 25-ről 37 °C-ra körülbelül 2,5-szeres gyorsulást jelent a reakciók sebességében, amit a táblázatban feltüntetett $[Gd(DOTA)]^-$ -komplexre vonatkozó adatok is alátámasztanak.

2. táblázat Az OPDMA⁴⁻, DTPA⁵⁻, AAZTA⁴⁻, PCTA³⁻ és DOTA⁴⁻ ligandumok Gd(III)-komplexeinek disszociációját jellemző sebességi állandók, valamint a fiziológiás pH-ra (7,4) számolt felezési idők (25 és 37 °C)

	OPDMA ⁴⁻	DTPA ⁵⁻ ^a	AAZTA ⁴⁻ ^b	PCTA ³⁻ ^c	DOTA ⁴⁻ ^d
k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	$\sim 5 \times 10^{-2}$ / $1,26(3) \times 10^{-1}$ ^e /	$5,8 \times 10^{-1}$	1,05	$5,1 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-6}$ / $2,0 \times 10^{-5}$ ^e
$t_{1/2}$ (év) ^f	~ 11 / 4,4^e	$1,5 \times 10^{-2}$	0,50	$1,1 \times 10^3$	$6,6 \times 10^4$ / 2,7 $\times 10^4$^e

^a Ref[30]; ^b Ref[23]; ^c Ref[24]; ^d Ref[31], az adat az $[Eu(PCTA)]$ komplexre vonatkozik;

^e 37 °C; ^f $t_{1/2} = \ln 2 / k_{calc}$, pH=7,4

A 2. táblázat adatainak összehasonlításából látszik, hogy az általunk előállított ligandum Gd(III)-komplexe jobb inertséggel rendelkezik, mint a gyakorlatban is alkalmazott nyíltláncú $[Gd(DTPA)]^{2-}$ -komplex (egyébként ez igaz a többi DTPA-származék komplexre is) vagy a $[Gd(AAZTA)]^-$. Ugyanakkor, 2-3 nagyságrenddel kisebb inertséggel rendelkezik, mint a PCTA vagy DOTA komplex. Ennek magyarázata az lehet, hogy a makrociklusban végrehajtott N–O csere következtében a kialakuló kötések valamivel gyengébbek, ráadásul a komplex koordinációs kalitkája is flexibilisebb, kevésbé zárt, mint a $[Gd(PCTA)]$ vagy $[Gd(DOTA)]^-$ esetében. Következésképpen a fémion disszociációja is gyorsabban lejátszódik.

4.3 Relaxációs vizsgálatok

Kétség sem férhet hozzá, hogy az MRI szempontjából egy kontrasztanyag legfontosabb tulajdonsága annak relaxivitása ($r_{1,2p}$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)), azaz a relaxáció sebességét növelő hatása. A kontrasztanyagnak szánt komplexeknél azért fontos a nagy relaxitás, hogy az esetleges későbbi alkalmazás során minél kisebb dózis mellett, minél nagyobb kontrasztnövelő hatást érjünk el.

Így tehát, meghatároztuk az OPDMA ligandum Gd(III)-komplexének relaxációs tulajdonságait is, melyet a komplex relaxitásának mérésével valósítottunk meg. Különböző térerőkön (20 (0,47 T) és 60 MHz (1,4 T)), valamint különböző hőmérsékleteken (25 és 37 °C) végeztük vizsgálatainkat. A mérés során kapott adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A vizsgált OPDMA⁴⁻ és a DTPA⁵⁻, AAZTA⁴⁻, PCTA³⁻, valamint DOTA⁴⁻ ligandumok Gd(III)-komplexeinek r_{1p} értékei (0,15 M NaCl, pH=7,4, 25/37 °C)

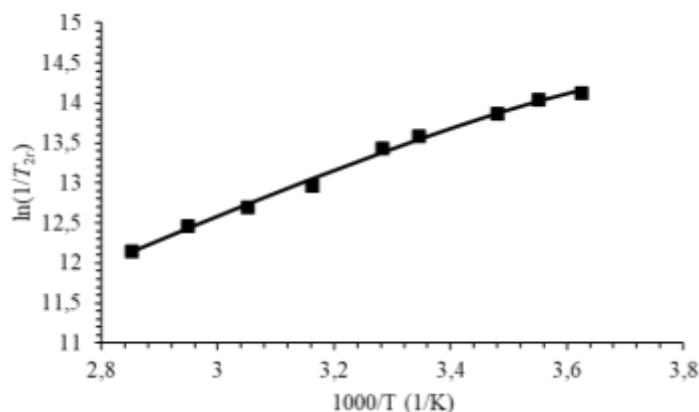
25/37 °C	OPDMA ⁴⁻ ($q=1$)	DTPA ⁵⁻ ($q=1$)	AAZTA ⁴⁻ ($q=2$)	PCTA ³⁻ ($q=2$)	DOTA ⁴⁻ ($q=1$)
0,47 T	4,5/3,7	4,7 ^a /3,8 ^b	7,1 ^d /5,2 ^d	6,9 ^f /5,2 ^f	4,7 ^a /3,5 ^b
1,4 T	4,3/3,4	4,2 ^c /3,4 ^b	6,7 ^e /4,8 ^e	6,3 ^g /4,8 ^g	4,3 ^c /3,1 ^b

^a Ref.[32]; ^b Ref.[33]; ^c 50 MHz = 1.17 T; ^d Ref.[34], ^e Ref.[35]; ^f Ref.[36]; ^g Ref.[37]

A mért r_{1p} adatok alapján elmondható, hogy a $[\text{Gd}(\text{OPDMA})]^-$ relaxitásának értékei megegyeznek az egyvizes ($q = 1$) $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ és $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ komplexek értékeivel, azokat csak a belső szférájukban két vízmolekulát tartalmazó AAZTA és PCTA kelátok értékei haladják meg.

Ez alapján elmondhatjuk, hogy komplexünk belső koordinációs szférájában található egy vízmolekula, ami közvetlenül a fémionhoz koordinálódik, valamint a hőmérséklet emelésével csökkenő relaxitásból az is látszik, hogy a molekula rotációja sebességének (τ) meghatározó szerepe van a komplex relaxitásának kialakításában, hiszen a lassuló rotáció jelentősebb relaxitás növekedést idézne elő.[29]

Vizsgáltuk továbbá a $[\text{Gd}(\text{OPDMA})]^-$ komplex belsőszférájában elhelyezkedő vízmolekula cseresebességét is ¹⁷O-NMR technika segítségével (17. ábra).



17. ábra A $[Gd(OPDMA)]$ -komplex redukált ^{17}O transzverzális relaxáció sebességének hőmérsékletfüggése. A folytonos vonal a mért értékek illesztését mutatja.

Az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy az $\ln(1/T_{2r})$ értékek a gyors csere tartományába esnek. Az illesztés során kapott állandókat a 4. táblázatban tüntettük fel a Gd(III)-ion DTPA⁴⁻, AAZTA⁴⁻, PCTA³⁻, valamint DOTA⁴⁻ ligandumokkal alkotott komplexeire vonatkozó adatokkal együtt.

4. táblázat Az OPDMA⁴⁻ és a DTPA⁴⁻, AAZTA⁴⁻, PCTA³⁻, valamint DOTA⁴⁻ ligandumok Gd(III)-komplexe ^{17}O -NMR méréseinek illesztése során kapott paraméterek

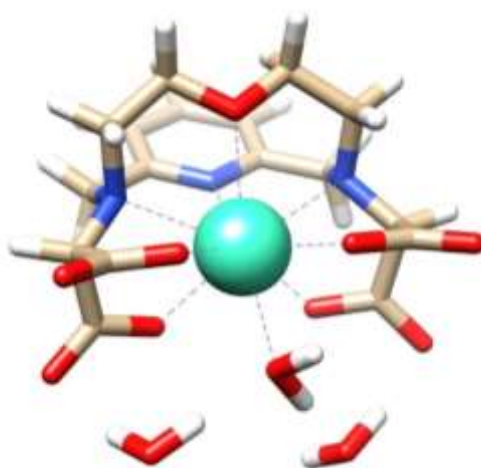
	$k_{ex}^{298} (\times 10^6 \text{ s}^{-1})$	$\Delta H^\ddagger (\text{kJ mol}^{-1})$	$A/h (\times 10^6 \text{ rad s}^{-1})^a$	$1/T_{1e} (\times 10^7 \text{ s}^{-1})$
$[Gd(OPDMA)]^-$ ($q = 1$)	81(9)	24(3)	-3,8	1,8(8)
$[Gd(DTPA)]^{2-b}$ ($q = 1$)	3,3	52	-3,8	–
$[Gd(AAZTA)]^{-c}$ ($q = 2$)	11,1	20	-3,8	–
$[Gd(PCTA)]^d$ ($q = 2$)	14	45	-3,8	–
$[Gd(DOTA)]^{-b}$ ($q = 1$)	4,1	50	-3,7	0,25

^a rögzítve a számolás során; ^b Ref. [32]; ^c Ref. [34], [35]; ^d Ref. [36]

Az 5 és 70 °C között gyűjtött mérési adatokból megállapítható, hogy magasabb hőmérsékleten már egyértelműen a vízcseresebesség dominál (70 °C-on 95%-os hozzájárulás) az elektronspin relaxációval szemben, így annak meghatározása kis hibával lehetséges. Ahogy az a 4. táblázat adataiból is kitűnik a $[Gd(OPDMA)]$ -komplexe kapott k_{ex}^{298} a legnagyobb a felsorolt komplexek között, ami figyelembe véve a komplexek szerkezetbeli különbségét, a $[Gd(OPDMA)]$ -komplex esetén nagyobb szterikus zsúfoltságot jelent (amely gyorsítja a koordinált vízmolekula cseréjét). A malonát karok merevebb szerkezete nem teszi lehetővé a

karboxilátcsoportok egyenletesebb elhelyezkedését a Gd(III)-ion körül, így a vízmolekula kötődése sem lehet olyan erős, amit a kisebb aktiválási entalpia ($\Delta H^\ddagger = 24$ kJ/mol) is tükröz.

Habár a relaxivitás értékek alapján valószínű, hogy a [Gd(OPDMA)]-komplex belső koordinációs szférájában egy vízmolekula található, ennek megerősítésére, valamint a komplex szerkezetének jobb megismerése érdekében DFT számításokat is végeztünk együttműködésben Dr. Lihi Norbert egyetemi docenssel (**18. ábra**). A számított szerkezetet a 18. ábrán mutatjuk be, ahol jól látszik a koordinált vízmolekula jelenléte, amit a kapott Gd-O távolság 2,6 Å értéke is megerősít.



18. ábra. A [Gd(OPDMA)]-komplex DFT optimált szerkezete

5. Összefoglalás

Kutatómunkám során egy O-piklén-alapú malonát oldalláncokat tartalmazó ligandum, a H₄OPDMA, előállítását és Gd(III)-ionnal kialakuló komplexének koordinációs kémiai jellemzését végeztem el.

Meghatároztuk a ligandum protonálódási állandóit és azt tapasztaltuk, hogy annak bázicitása a legkisebb összevetésben a H₅DTPA, H₅AAZTA, H₄PCTA és H₄DOTA ligandumokéval. A kisebb bázicitás miatt, számítani lehetett arra, hogy a kialakuló Gd(III)-komplex stabilitási állandója is kisebb lesz, hiszen poliamino-polikarboxilátok esetén a nagyobb bázicitás általában nagyobb stabilitási állandót jelent.

Meglepetésünkre, a [Gd(OPDMA)]⁻-komplex termodinamikai stabilitását nem tudtuk pH-potenciometriás módszerrel meghatározni, mert az pH = 2-re teljesen kialakult. MS vizsgálatok azt is igazolták, hogy már 1,5-ös pH-n sincs jelen szabad ligandum a rendszerben, így a meghatározáshoz ennél jóval savasabb körülményeket kellett volna alkalmazni. Ezeket a vizsgálatokat viszont nem tudtuk elvégezni, hiszen irodalmi előzmények azt mutatták, hogy a malonátcsoport a hőmérséklet emelése mellett, az erősen savas és lúgos környezetre is érzékeny és dekarboxileződésen esik át, miközben acetátcsoporttá alakul. Így csak becsülni tudtuk a stabilitási állandót, ami biztosan nagyobb, mint $\log K_{ML} = 20$. Ezt az állandót figyelembe véve a pGd-értékek számításánál azt kaptuk, hogy a [Gd(OPDMA)]⁻-komplexnek a legnagyobb a látszólagos stabilitási állandója fiziológiás körülmények között.

Összehasonlítva az [Gd(OPDMA)]⁻ relaxivitását a többi komplexével azt mondhatjuk, hogy az megegyezik a $q = 1$ típusú komplexekével, azt csak a $q = 2$ komplexek értéke múlja fölül. A vizsgálatokból az is kiderült, hogy a hőmérséklet emelésével a relaxitás értékek csökkennek, ami jellemző a kis molekula tömegű, gyorsan rotáló komplexekre. Az ¹⁷O-NMR mérések alapján a komplex vízcseresebessége meglehetősen gyors, jelentősen meghaladja az összehasonlító komplexekét.

A [Gd(OPDMA)]⁻-komplex inertebb, mint a gyakorlatban alkalmazott lineáris DTPA-származék komplexek, viszont disszociációja 2-3 nagyságrenddel gyorsabb, mint a makrociklusos DOTA-típusú komplexeké.

Összességében elmondható, hogy [Gd(OPDMA)]⁻-komplex jó tulajdonságokkal rendelkezik akár az *in vivo* alkalmazáshoz is.

6. Summary

In this work, we present the results of the synthesis of a new O-pyclene based ligand containing malonate pendants and the coordination chemical characterization of its Gd(III) complex.

We have determined the protonation constants of the ligand and based on the results the basicity of that was also calculated. Comparing the basicity of the H₄OPDMA with those of the H₅DTPA, H₅AAZTA, H₄PCTA and H₄DOTA ligands, one can conclude that, the H₄OPDMA possesses the lowest basicity among the chelators compared.

Surprisingly, we were not able to determine the thermodynamic stability of [Gd(OPDMA)]⁻ by pH-potentiometric method, since the complex formation was complete by pH 2. Furthermore, MS measurements performed on samples at even lower pH values, indicating that uncomplexed ligand is not present in the solution at pH 1.5. Based on these experiences we can assume that the logK_{ML} value for the [Gd(OPDMA)]⁻ chelate, must be higher than 20. The question is raised, why we did not investigate the thermodynamic stability even more acidic conditions, for example, by using out-of cell technique. The answer is simple, since based on literature evidences, beside the elevated temperature the malonate is also sensitive to the highly acidic and basic conditions going through decarboxylation reaction, when acetate forms from the malonate moiety. Thus, we used the estimated stability constant for the calculation of the pGd value, which was found to be the highest, consequently, the [Gd(OPDMA)]⁻ is the most stable among the mentioned complexes at physiological pH.

The [Gd(OPDMA)]⁻ complex displays ¹H relaxivity (with one inner sphere water molecule) similar than those were observed for the H₅DTPA and H₄DOTA complexes, only the *q* = 2 complexes show higher relaxation enhancing effects. The inner sphere coordinated water molecule of [Gd(OPDMA)]⁻ is involved in a rather fast exchange with bulk water, its *k*_{ex} value is higher than those were found for the comparative chelates.

The [Gd(OPDMA)]⁻ dissociates slower than the DTPA-based complexes used in the clinical practice, but 2-3 orders of magnitudes faster than that was observed for the DOTA-like chelates.

Overall, we can conclude that the [Gd(OPDMA)]⁻ possesses excellent physico-chemical properties, which make it suitable for *in vivo* applications.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni szívből jövő köszönetemet mindazoknak, akik hozzájárultak a szakdolgozatom elkészüléséhez:

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kálmán Ferenc Krisztiánnak, aki biztosította számomra a lehetőséget, hogy a kutatócsoport tagja lehessenek, és szakmai iránymutatásával, valamint türelmével segítette szakmai fejlődésemet.

Hálás vagyok Dr. Bunda Szilvia társtémavezetőmnek a szakmai segítségéért, a folyamatos támogatásáért és a lelki támaszáért, amit az elmúlt időszakban nyújtott.

Köszönöm továbbá Prof. Dr. Tircsó Gyula tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy a Fizikai Kémia Tanszéken végezhettem el a szakdolgozathoz szükséges kutatómunkát.

Köszönettel tartozom Dr. Lihi Norbertnek a DFT számításokhoz való hozzájárulásáért, valamint Dr. Csupász Tibornak, aki az O-pilkén alapváz szintézisében nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom Bakos Dórának, Czuna Aleaxandrának, Szaniszló Zsófiának és a D622-es laborban kutatóknak, a segítségért, támogatásért, türelemért és a kellemes laboratóriumi környezetért.

Nagy köszönettel tartozom a szüleimnek, a nővéremnek és a barátaimnak, akik az évek során mellettem álltak és lelkiileg támogattak. Nélkülük a megtett út, jóval nehezebb lett volna.

Irodalomjegyzék

- [1] T. Csupász, D. Szücs, F. K. Kálmán, O. Hollóczki, A. Fekete, D. Szikra, É. Tóth, I. Tóth, G. Tircsó, A New Oxygen Containing Pycen-Type Ligand as a Manganese(II) Binder for MRI and ^{52}Mn PET Applications: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Structural and Radiochemical Studies, *Mol.* **2022**, 27, 371.
doi: 10.3390/molecules27020371
- [2] Bakos Dóra Tudományos Diákköri Konferencia: Az OPMMA ligandum Mn(II)-komplexének koordinációs kémiai vizsgálata (2023)
- [3] T. Geva, Magnetic Resonance Imaging: Historical Perspective, *J Cardiovasc Magn Reson*, **2006**, 8(4), 573–580.
doi: 10.1080/10976640600755302
- [4] K. Revett, An Introduction to Magnetic Resonance Imaging: From Image Acquisition to Clinical Diagnosis, *Stud. Comp. Int. Dev.*, **2011**, 127–161.
doi: 10.1007/978-3-642-17934-1_7
- [5] J. J. Pekar, A brief introduction to functional MRI, *IEEE Eng. Med. and Bio. Mag.* **2006**, 25(2), 24–26.
doi: 10.1109/memb.2006.1607665
- [6] V. Jacques, J. F. Desreux, New Classes of MRI Contrast Agents, *Contrast Agents I.* **2002**, 123–164.
doi: 10.1007/3-540-45733-x_5
- [7] H. Gries, Extracellular MRI Contrast Agent Based on Gadolinium, *Contrast Agents I.* **2002**, 1-24.
doi: 10.1007/3-540-45733-X_1
- [8] F. Rojas-Quijano, E. T. Benyó, G. Tircsó, F. K. Kálmán, Z. Baranyai, S. Aime, A. D. Sherry, Z. Kovács, Lanthanide(III) Complexes of Tris(amide) PCTA Derivatives as Potential Bimodal Magnetic Resonance and Optical Imaging Agents, *Chemistry - A Euro. J.*, **2009**, 15(47), 13188–13200.
doi: 10.1002/chem.200901095
- [9] S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, G. Palmisano, M. Sisti, [Gd-AAZTA]: A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43(24), 7588–7590.
doi: 10.1021/ic0489692

- [10] T. J. Fraum, D. R. Ludwig, M. R. Bashir, K. J. Fowler, Gadolinium-based contrast agents: A comprehensive risk assessment. *JMRI*. **2017**, 46(2), 338–353. doi: 10.1002/jmri.25625.
- [11] A. S. Merbach, L. Helm, E. Tóth, The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, *John Wiley & Sons*. **2013**. doi: 10.1002/9781118503652.
- [12] R. B. Lauffer, Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design, *Chem. Rev.* **1987**, 87(5), 901–927. doi: 10.1021/cr00081a003.
- [13] A. J. Gauden, P. M. Phal, K. J. Drummond, MRI safety; nephrogenic systemic fibrosis and other risks, *J. Clin. Neurosci.* **2010**, 17(9), 1097–1104. doi: 10.1016/j.jocn.2010.01.016.
- [14] D. Pan, A. H. Schmieder, S. A. Wickline, G. M. Lanza, Manganese-based MRI contrast agents: past, present, and future, *Tetrahedron*. **2011**, 67(44), 8431–8444. doi: 10.1016/j.tet.2011.07.076
- [15] E. Nieboer, The lanthanide ions as structural probes in biological and model systems, *Rare Earths*. **1975**, 1–47. doi: 10.1007/bfb0116554
- [16] L. Pasquini, A. Napolitano, E. Visconti, D. Longo, A. Romano, P. Tomà, M. C. R. Espagnet, Gadolinium-Based Contrast Agent-Related Toxicities, *CNS Drugs*, **2018**, 32(3), 229–240. doi: 10.1007/s40263-018-0500-1
- [17] R. B. Lauffer, Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design, *Chem. Rev.* **1987**, 87(5), 901–927. doi: 10.1021/cr00081a003
- [18] Y.-D. Xiao, R. Paudel, J. Liu, C. Ma, Z.-S. Zhang, S.-K. Zhou, MRI contrast agents: Classification and application, *Int. J. Mol. Med.* **2016**, 38(5), 1319–1326. doi: 10.3892/ijmm.2016.2744
- [19] C. Gendron, P. Bourrinet, A. Dencausse, N. Fretellier, Preclinical Safety Assessment of Gadopiclenol: A High-Relaxivity Macrocyclic Gadolinium-Based MRI Contrast Agent, *Inv. Rad.*, **2024**, 59(2), 108-123. doi: 10.1097/RLI.0000000000001038
- [20] F. Shikata, H. Tokumitsu, H. Ichikawa, Y. Fukumori, In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2002**, 53(1), 57–63.

doi: 10.1016/s0939-6411(01)00198-9

- [21] L. Zékány, I. Nagypál, Computational Methods for the Determination of Formation Constants, *PSEQUAD*, **1985**, 291–353.
doi: 10.1007/978-1-4684-4934-1_8
- [22] Z. Baranyai, Z. Pálinkás, F. Uggeri, E. Brücher, Equilibrium Studies on the Gd^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} Complexes of BOPTA, DTPA and DTPA-BMA Ligands: Kinetics of Metal-Exchange Reactions of $[\text{Gd}(\text{BOPTA})]^{2-}$, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 13, 1948–1956.
doi: 10.1002/ejic.200901261
- [23] Z. Baranyai, F. Uggeri, G. B. Giovenzana, A. Bényei, E. Brücher, S. Aime, Equilibrium and Kinetic Properties of the Lanthanoids(III) and Various Divalent Metal Complexes of the Heptadentate Ligand AAZTA, *Chem. - A Eur. J.*, **2009**, 15(7), 1696–1705.
doi: 10.1002/chem.200801803
- [24] Gy. Tircsó, Z. Kovács, A. D. Sherry, Equilibrium and Formation/Dissociation Kinetics of Some Ln(III)PCTA Complexes, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45(23), 9269–9280.
doi: 10.1021/ic0608750
- [25] J. F. Desreux, E. Merciny, M. F. Loncin, Nuclear magnetic resonance and potentiometric studies of the protonation scheme of two tetraaza tetraacetic macrocycles, *Inorg. Chem.*, **1981**, 20(4), 987–991.
doi: 10.1021/ic50218a008
- [26] W. P. Cacheris, S. K. Nickle, A. D. Sherry, Thermodynamic study of lanthanide complexes of 1,4,7-triazacyclononane- $\text{N},\text{N}',\text{N}''$ -triacetic acid and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -tetraacetic acid, *Inorg. Chem.* **1987** 26(6), 958–960.
doi: 10.1021/ic00253a038
- [27] S. Aime, M. Botta, S. Geninatti Crich, G. B. Giovenzana, G. Jommi, R. Pagliarin, M. Sisti, Synthesis and NMR Studies of Three Pyridine-Containing Triaza Macrocyclic Triacetate Ligands and Their Complexes with Lanthanide Ions, *Inorg. Chem.* **1997**, 36(14), 2992–3000.
doi: 10.1021/ic960794b
- [28] E. M. Gale, I. P. Atanasova, F. Blasi, I. Ay, P. Caravan, A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast, *JACS*, **2015**, 137(49), 15548–15557.
doi: 10.1021/jacs.5b10748
- [29] A. S. Merbach, L. Helm, É. Tóth, The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging, Wiley, **2013**

doi: 10.1002/9781118503652

- [30] L. Sarka, L. Burai, E. Brücher, The Rates of the Exchange Reactions between $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$ and the Endogenous Ions Cu^{2+} and Zn^{2+} : A Kinetic Model for the Prediction of the In Vivo Stability of $[\text{Gd}(\text{DTPA})]^{2-}$, Used as a Contrast Agent in Magnetic Resonance Imaging, *Chem. - A Eur. J.*, **2000**, 6(4), 719–724.
doi: 10.1002/(SICI)1521-3765(20000218)6:4<719::AID-CHEM719>3.0.CO;2-2
- [31] E. Toth, E. Brucher, I. Lazar, I. Toth, Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide(III)-DOTA Complexes, *Inorg. Chem.* **1994**, 33(18), 4070–4076.
doi: 10.1021/ic00096a036
- [32] D. H. Powell, O. M. N. Dhuhghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer, A. E. Merbach, Structural and Dynamic Parameters Obtained from ^{17}O NMR, EPR, and NMRD Studies of Monomeric and Dimeric Gd^{3+} Complexes of Interest in Magnetic Resonance Imaging: An Integrated and Theoretically Self-Consistent Approach¹, *JACS*, **1996**, 118(39), 9333–9346.
doi: 10.1021/ja961743g
- [33] S. Laurent, L. V. Elst, R. N. Muller, Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents, *CMMI*, **2006**, 1(3), 128–137.
doi: 10.1002/cmmi.100
- [34] S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano, M. Sisti, $[\text{Gd-AAZTA}]^-$: A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43(24), 7588–7590.
doi: 10.1021/ic0489692
- [35] D. Lalli, F. Carniato, L. Tei, C. Platas-Iglesias, M. Botta, Surprising Complexity of the $[\text{Gd}(\text{AAZTA})(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ Chelate Revealed by NMR in the Frequency and Time Domains, *Inorg. Chem.* **2022**, 61(1), 496–506
doi: 10.1021/acs.inorgchem.1c03194
- [36] S. Aime, M. Botta, S. G. Crich, G. Giovenzana, R. Pagliarin, M. Sisti, E. Terreno, NMR relaxometric studies of Gd(III) complexes with heptadentate macrocyclic ligands, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36(S1), 200–S208.
doi: 10.1002/(SICI)1097-458X(199806)36:13<S200::AID-OMR324>3.0.CO;2-H
- [37] L. Leone, L. Guarnieri, J. Martinelli, M. Sisti, A. Penoni, M. Botta, L. Tei, Rigid and Compact Binuclear Bis-hydrated Gd-complexes as High Relaxivity MRI Agents, *Chem. Eur. J.* **2021**, 27(46), 11811–11817. doi: 10.1002/chem.202101701