

Tudományos Diákköri Dolgozat

A gallium(III)-1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraacetát komplex képződésének kinetikája etanol-víz elegyekben

Szabó Gergely

Kémia BSc.

III. évfolyam

Témavezetők:

Prof. Tóth Imre

egyetemi tanár

Dr. Baranyai Zsolt

tudományos munkatárs



Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Természettudományi és Technológiai Kar

Debreceni Egyetem

Debrecen

2014

Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés	3
II.	Irodalmi áttekintés	7
II.1	A gallium fizikai-kémiai tulajdonságai	7
II.2	A Ga³⁺ orvosi diagnosztikai és terápiás felhasználása	8
II.3	A NOTA és DOTA komplexek képződési reakciói	9
II.4	A ⁶⁸Ga(NOTA) és ⁶⁸Ga(DOTA) komplexek képződése nem vizes közegben	10
III.	Kísérleti rész	12
III.1	Törzsoldatok készítése és koncentrációjuk meghatározása	12
III.2	Oldategyensúlyi vizsgálatok	12
III.3	A Ga(DOTA) komplex képződésének ¹H- NMR spektroszkópiás vizsgálata	14
III.4	A Ga(DOTA) képződésének kinetikai vizsgálatai	14
IV.	Eredmények és értelmezésük	17
IV.1	A H₄DOTA ligandum protonálódási sajátosságai etanol-víz elegyekben	17
IV.2	A Ga(DOTA)-komplex képződésének kinetikai vizsgálata etanol-víz elegyekben	19
V.	Összefoglalás	28
VI.	Summary	29
VII.	Irodalomjegyzék	30

I. Bevezetés

A modern orvosi diagnosztikai képalkotó eljárások feladata nem invazív módon információt szolgáltatni az emberi testről és az élő szervezetben lejátszódó folyamatokról. Korunk leghatékonyabb diagnosztikai képalkotó módszerei a Computer Tomográfia (CT), a Mágneses Rezonanciás Képalkotás (MRI), a Pozitron Emissziós Tomográfia (PET) és az Single Photon Emissziós Computer Tomográfia (SPECT). Az említett módszerek alkalmazása során olyan anyagokra van szükség, amelyek vagy javítják a felvételek minőségét (pl. kontrasztanyagok a CT és az MRI vizsgálatok során), vagy magát a megfelelő jelet szolgáltatják a vizsgált sejt, szövet és szerv éloszervezetbeli elhelyezkedéséről, valamint a bejuttatott riporter közvetlen környezetének fiziológiai sajátosságairól, (Ilyenek pl. a ^{18}F izotópot tartalmazó 2-dezoxi-2- (^{18}F) fluoroglükóz – ^{18}F -FDG a PET és a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ izotópot tartalmazó Tc(DTPA) komplex a SPECT vizsgálatokban.)

A Pozitron Emissziós Tomográfia az egyik legérzékenyebb funkcionális képalkotó eljárás. A PET a hagyományos képalkotó eljárásokkal (pl. CT, MRI) szemben nem csak az anatómiai viszonyokat jeleníti meg, hanem a szervek és szövetek különböző funkcionális jellemzőit is.^[1] Ez a módszer olyan radiofarmakonokat alkalmaz, amelyek pozitront (β^+) emittáló izotópokat tartalmaznak. A pozitron az emissziója után annihilálódik és a keletkező két egymással ellentétes irányba haladó gamma ($E=511\text{ keV}$) fotont a 180° -os szögben elhelyezett detektorok egyidejűleg detektálják. Mivel mindkét foton szimultán érzékelése szükséges a jelhez, ezért a módszer sokkal nagyobb felbontással és érzékenységgel rendelkezik, mint a SPECT.^[2] A PET felbontó képességét az határozza meg, hogy a pozitron sugárzó izotóptól milyen távolságban következik be az annihiláció, ami függ a kilépő pozitron energiájától. A PET kép felbontása akkor lesz a legnagyobb, ha a kilépő pozitron energiája az 511 keV -hoz közeli érték.^[2] A PET vizsgálatok során leggyakrabban alkalmazott radiofarmakonok a 2-dezoxi-2- (^{18}F) fluoroglükóz (^{18}F -FDG), ^{11}C -metionin, ^{15}O -butanol és a ^{13}N -ammónia. A felsorolt β^+ sugárzó izotópokat (^{18}F : $^{18}\text{O}(\text{p,n})^{18}\text{F}$, $t_{1/2} = 109,8\text{ perc}$; ^{11}C : $^{14}\text{N}(\text{p,a})^{11}\text{C}$, $t_{1/2} = 20,39\text{ perc}$; ^{15}O : $^{14}\text{N}(\text{d,n})^{15}\text{O}$, $t_{1/2} = 2,05\text{ perc}$; ^{13}N : $^{16}\text{O}(\text{p,a})^{13}\text{N}$, $t_{1/2} = 9,96\text{ perc}$) ciklotronban állítják elő, és a megfelelő molekulák jelzése után történik PET vizsgálatokban való felhasználásuk. Mivel ezeknek a β^+ sugárzó izotópoknak az előállítása rendkívül költséges, így előnyös lenne olyan PET aktív izotópok alkalmazása, amelyek előállítása lényegesen olcsóbb és a jelzési folyamat nem igényel bonyolult szintetikus laboratóriumi felszereléseket és műveleteket. Az utóbbi évek során komoly érdeklődés mutatkozik a ^{68}Ga izotóp PET vizsgálatokban történő felhasználására, mivel a ^{68}Ga

egyszerűen előállítható $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor alkalmazásával és a jelzési folyamatok egyszerű komplexképzési reakciókban megvalósíthatók, ami a költségek és a szükséges idő csökkentésén túlmenően a kiszolgáló személyzet sugárterhelését is enyhíti.^[3,4] Az utóbbi években egyre népszerűbb a Ga^{3+} -ion különféle izotópjainak képalkotó vizsgálatokban történő felhasználása előnyös radiokémiai sajátosságai miatt. A radiológusok előszeretettel alkalmazzák a ^{66}Ga (β^+ , $t_{1/2} = 9,5$ óra), ^{67}Ga (β^+ , $t_{1/2} = 78,3$ óra) és ^{68}Ga (β^+ , $t_{1/2} = 67,71$ perc) izotópokat PET, a ^{67}Ga (γ , $t_{1/2} = 78,3$ óra) izotópot pedig SPECT vizsgálatoknál.

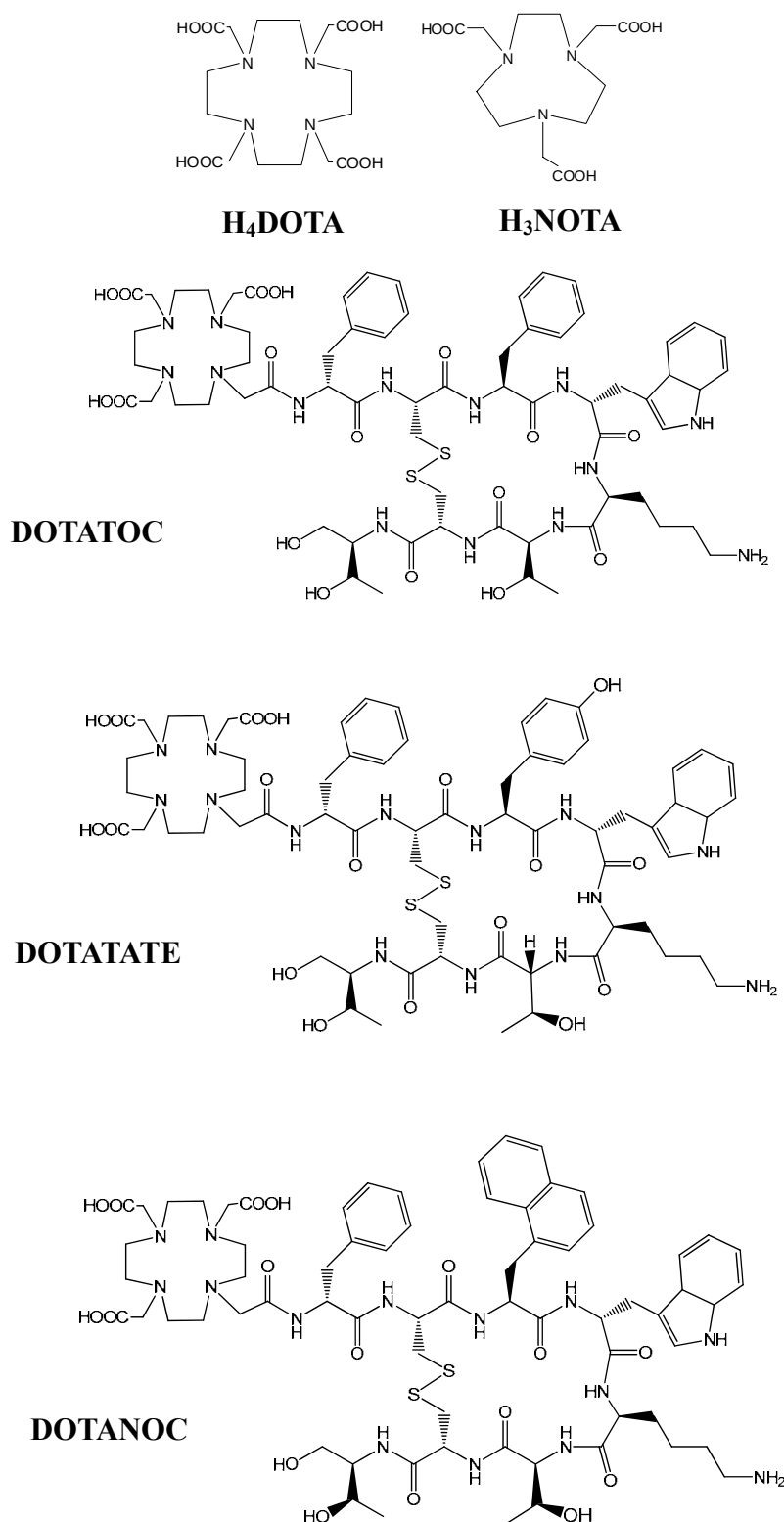
A Ga^{3+} -ion igen toxikus az élő szervezet számára főként hidrolitikus hajlama és a Fe^{3+} -ionhoz mutatott nagymértékű hasonlósága miatt.^[5,6] Így a Ga^{3+} -ion *in vivo* vizsgálatokban történő alkalmazása csak nagy termodinamikai stabilitással és kinetikai inertséggel jellemezhető komplexei formájában lehetséges. A ^{68}Ga izotóp komplexálására főként a makrociklusos amino-polikarboxilát ligandumokat (NOTA és DOTA) alkalmazzák, mivel csak ezekkel a ligandumokkal képzett komplexei elégítik ki az *in vivo* alkalmazhatóság fizikai-kémiai feltételeit ($\log K_{\text{Ga}(\text{NOTA})} = 31,0$; $\log K_{\text{Ga}(\text{DOTA})} = 26,05$).^[7,8] A ^{68}Ga izotóp NOTA és DOTA ligandumokkal történő komplexképzésének alapvető problémája a folyamatok lassúsága, amelyet speciális kapcsolt rendszerű reaktorokban magas hőmérsékleten (95°C) valósítanak meg a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorról nyert eluátum ^{68}Ge anyaelemtől való megtisztítását követően.^[9] A ^{68}Ga izotóp előállítására, tisztítására és a NOTA illetve a DOTA ligandumokkal történő komplexálására jelenleg alkalmazott módszerek jelentős aktivitásvesztést eredményeznek a jelzési folyamat végére, amelyet főleg a NOTA és DOTA ligandumokkal lejátszódó lassú komplexképződési reakciók eredményeznek. A közelmúltban Frank Rösch és munkatársai egy új módszert javasoltak $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -ion NOTA és DOTA ligandumokkal történő komplexképzésnek felgyorsítására.^[10] Az új módszer lényege, hogy a $^{68}\text{Ga}^{3+}$ izotópok és a NOTA, a DOTA és származékaik komplexképzési reakciói lényegesen gyorsabbak etanol-víz, izopropanol-víz és acetonitril-víz elegyekben, mint vizes közegben. Az új metanol-víz, valamint etanol-víz alapú módszer jelentősen lerövidíti a $^{68}\text{Ga}(\text{NOTA})$ és a $^{68}\text{Ga}(\text{DOTA})$ komplexek előállítását, ami lehetőséget nyújt a jelzési reakciók szobahőmérsékleten való megvalósításához oligopeptidekhez, fehérjékhez és monoklonális antitestekhez kapcsolt NOTA és DOTA ligandumokkal is a biológiailag aktív fragmensek denaturációja nélkül. A Ga^{3+} izotópokkal végzett vizsgálatok során a NOTA illetve DOTA ligandumokat az 1. ábrán látható oligopeptidekhez kapcsolják, amelyek elvben bizonyos receptorokhoz „szállítják” a radioaktív izotópot.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Tanszékén már régóta folynak kutatások

a Ga^{3+} -poliamino-polikarboxilát ligandumokkal képzett komplexeinek egyensúlyi, kinetikai és szerkezeti sajátságainak tanulmányozására. A vizsgálatok elsősorban a Ga(III)-komplexek *in vivo* vizsgálatokban való alkalmazhatóságának koordinációs kémiai feltételeire vonatkoznak. A közelmúltban a Ga^{3+} - és a lantanoida(III)-ionok (Ln^{3+}) NOTA és DOTA ligandumokkal metanol-víz és etanol-víz elegyekben lejátszódó komplexképzési reakcióinak felderítése érdekében olyan vizsgálatok kezdődtek, amelyekben részletesen tanulmányozták a Ga(DOTA) és Ln(DOTA) komplexek képződésének sebességét etanol jelenlétében és távollétében. A Ga(DOTA) és Ln(DOTA) komplexek etanol-víz elegyben való vizsgálatai a gyakorlati felhasználás lehetőségein túl számos új információt is szolgáltatnak a makrociklusos Ga^{3+} és Ln^{3+} komplexek képződésének mechanizmusára.

Munkám a fent említett területekhez kapcsolódik, amellyel kapcsolatban a következő célokat tűztük ki:

- A DOTA ligandum egyensúlyi sajátságainak tanulmányozása különböző összetételű etanol-víz elegyekben.
- A Ga(DOTA) képződésének kinetikai vizsgálata vízben, 10 és 40 V/V% etanol-víz elegyekben.
- Az etanol szerepének tanulmányozása a Gd(DOTA) képződésében.



1. ábra. A dolgozatban előforduló ligandumok képletei: **H₄DOTA**=1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav, **H₃NOTA**=1,4,7-triazaciklononán-1,4,7-triecetsav, **DOTATOC**=DOTA-d-Phe(1)-Tyr(3)-octreotid, **DOTATATE**=DOTA-Tyr(3)-octreotid, **DOTANOC**=DOTA-1-Nal(3)-octreotid

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A gallium fizikai és kémiai tulajdonságai

A gallium a periódusos rendszer III. főcsoportjának eleme. Elemi állapotban ezüstös színű, lágy, könnyen nyújtható fém, amely alacsony olvadási- ($29\text{ }^{\circ}\text{C}$) és forrásponttal ($2204\text{ }^{\circ}\text{C}$) rendelkezik, ezért egy nagyon széles hőmérsékleti tartományban folyékony halmazállapotú. A gallium olvadását kontrakció kíséri, a folyadék térfogata 3,4%-kal kisebb, mint a szilárd anyagé. Az alumíniummal és más fémekkel szobahőmérsékleten folyékony ötvözetet képez, ezért az elemi gallium tárolására fémből készült edények nem alkalmasak. Az alumíniumhoz hasonlóan a gallium felületét vékony oxidréteg védi a további oxidációtól. Levegőn passziválódik, a felületén képződő oldhatatlan gallium-oxid megóvjá a további reakcióktól.^[11]

Elemi állapotban (gallium-gallium kölcsönhatás kialakulása miatt) többféle allotróp módosulata ismert, amelyek közül négy légköri nyomáson (α , β , γ és δ), míg három magas nyomáson (Ga-II, Ga-III, Ga-IV) alakul ki. Szobahőmérsékleten az ortorombikus α -gallium a legstabilabb. Ebben a szerkezetben az atomok páronként összekapcsolódnak és minden atom hat, más dimerhez tartozó atommal szomszédos. A dimereket fémes kötések tartják össze, amelyek a folyékony galliumban is megmaradnak és még gázhalmazállapotban is kimutathatók.^[12]

A gallium elektronkonfigurációja $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^1$. Vegyületeiben az oxidációs száma +3, de létezik +1-es oxidációs állapotban is. Kis mérete és nagy töltése miatt a Ga^{3+} „hard” fémionnak tekinthető és vegyületeiben főként ionos kötést alakít ki. A Ga(III) sók az alumínium vegyületekhez hasonlóan amfoter jellegűek. A fém savakban Ga^{3+} -ion, lúgokban gallium-tetrahidroxid $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ képződése mellett oldódik.^[12] A Ga^{3+} -ion enyhén savas és bázikus körülmények között, $\text{pH}=3,5 - 7,5$ tartományban, hidrolizál ($\text{Ga}(\text{OH})_x$ $x=1$ $\log K_1=-2,41$; $x=2$ $\log K_2=-3,51$; $x=3$ $\log K_3=-4,71$; $x=4$ $\log K_4=-6,24$).^[5] Vizes oldatból az alacsony oldhatóságú $\text{Ga}(\text{OH})_3$ kolloid csapadékként is kiválhat.

A galliumot az alumíniumgyártás melléktermékeként, a Bayer-körfolyamat alumínát oldatából nyerik ki. Az oldat higanykatódos elektrolízise során a nátrium és a gallium a higanyba kerül, amelyből a galliumot anódos oxidációval, $\text{Na}[\text{Ga}(\text{OH})_4]$ formában vizes oldatba viszik, majd elektrolízissel, rozsdamentes acélkatódon kinyerik a fémét. A tisztítás során az elektrolízissel nyert galliumot savakkal és oxigénnel kezelik magas hőmérsékleten, majd kristályosítják. A gallium fő felhasználási területe a félvezető technológia. Alkalmazzák tranzisztorokban, egyes ötvözetekben, valamint felhasználják magas hőmérsékletű folyadékzárként és alacsony hőmérsékletű forrasztóanyagok készítésére.^[11,13]

II.2 A Ga^{3+} orvosdiagnosztikai és terápiás felhasználása

A Ga^{3+} vegyületek immunszuppresszív és gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek és bizonyos kórokozók ellen antimikrobiális hatásuk is van. A Ga^{3+} toxikus hatása miatt azonban ügyelni kell az alkalmazott gyógyszerek terápiás indexére a klinikai mérgezések elkerülésének érdekében.^[6] Napjainkban a Ga^{3+} különböző izotópjait elterjedten alkalmazzák az orvosi diagnosztikában és terápiában főként a rákos szövetek kimutatására, valamint a Ca^{2+} -ion metabolizmusának és a csontok felépülésének nyomkövetésére.^[6] A ^{68}Ga izotóppal (főként $\text{Ga}(\text{citrát})$ formában) végzett PET vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a tumorral rendelkező állatokba juttatott radioaktív ^{68}Ga a rosszindulatú sejtekben felhalmozódik, amit a $\text{Ga}(\text{citrát})$ disszociációjával és $\text{Ga}(\text{transzferrin})$ komplex képződésével, valamint a $\text{Ga}(\text{transferrin})$ rákos sejtbe való bejutásával értelmezték.^[6] A ^{68}Ga rákos sejtekbe való felhalmozódásának felfedezése vezetett a ^{67}Ga (γ , $t_{1/2} = 78,3$ óra) izotóp SPECT módszerben való felhasználásához rosszindulatú daganatok rutinszerű diagnosztizálásában. Az utóbbi években a ^{67}Ga izotópot leginkább *Hodgkin-* és *Non Hodgkin-limfómás* betegek SPECT vizsgálataiban alkalmazták, mind a kemoterápia mind a radioterápia hatékonyságának monitorozására, mind a műtétek után esetlegesen kiújult rákos megbetegedések felderítésére.^[6]

A ^{68}Ga (β^+ , $t_{1/2} = 67,71$ perc) izotópot a PET vizsgálatok során alkalmazzák daganatok korai stádiumban való diagnosztizálásához. A ^{68}Ga izotóp viszonylag rövid felezési idejének és könnyű előállításának ($^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor) köszönhetően kezd elterjedni a klinikai gyakorlatban. A ^{68}Ga izotóp *in vivo* vizsgálatokban történő felhasználása során bifunkciós NOTA és DOTA ligandumokkal képzett komplexeit alkalmazzák. A neuroendokrin daganatos sejtek felületén számos szomatosztatin receptor található. A neuroendokrin daganatos sejtek PET vizsgálata során olyan $^{68}\text{Ga}(\text{NOTA})$ vagy $^{68}\text{Ga}(\text{DOTA})$ komplexeket alkalmaznak, amelyek oldalláncában a szomatosztatin antagonistáinak tekinthető D-Phe¹-Tyr³-oktreotid (TOC), Tyr(3)-oktreotid (TATE) és 1-Nal(3)-oktreot (NOC) bifunkciós csoportok találhatóak, így ezek a daganatos sejtek felületéhez kapcsolódva lehetővé teszi a rákos sejtek nagy szelektivitással és érzékenységgel történő kimutatását, valamint az áttétképződés nyomkövetését (1. ábra).^[6]

II.3 A NOTA és DOTA komplexek képződési reakciói

Az orvosi diagnosztikában és terápiában a radioizotópok komplexálására leggyakrabban a NOTA és DOTA, valamint származékaikat alkalmazzák, mivel ezek a ligandumok és bifunkciós származékaik viszonylag egyszerűen előállíthatók és a komplexeik termodinamikai stabilitása és kinetikai inertsége is elegendően nagy az *in vivo* felhasználásukhoz.^[14] Az említett fizikai-kémiai sajátságok mellett különös jelentőséggel bír a NOTA és DOTA komplexek képződésének sebessége a viszonylag rövid felezési idejű radioaktív izotópok (⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho)^[15,16] komplexeinek híg oldatokban történő előállítása során. A NOTA és DOTA-komplexek kialakulása rendkívül lassú folyamat, az Ln(DOTA) komplexek esetében akár hónapokat (esetleg éveket) is igénybe vehet pH<3 esetén.^[17] A NOTA és DOTA komplexek képződésének kinetikai vizsgálata, a körülmények optimalálása során alapvető kérdés, hogy milyen folyamatokon keresztül megy végbe a komplexek képződése és ezek közül mely lépések a sebesség-meghatározóak.

A Ln(NOTA), Ga(NOTA) és Ln(DOTA)⁻-komplexek képződése során stabilis köztitermékek képződését tudták kimutatni NMR spektroszkópiás,^[18,19] lumineszcenciás^[20] és spektrofotometriás^[17,21] módszerekkel. A vizsgálatok eredményei alapján feltételezik, hogy a komplexképződés első lépésében monoprotonált *Ln(HNOTA)⁺ vagy *Ga(HNOTA)⁺, illetve kétszer protonált *Ln(H₂DOTA)⁺ köztitermékek képződnek, amelyekben csak a karboxilátsoportok vesznek részt a Ln³⁺-ionok koordinációjában, míg a 3 vagy 4 gyűrű amin-N-ek közül egy illetve két szembenlévő protonálva van.^[17,22] Az *Eu(H₂DOTA)⁺ köztitermék lumineszcenciás élettartam vizsgálatainak^[20] eredményei alapján 4–5 vízmolekula koordinálódik közvetlenül az Eu³⁺-ionhoz. Az Eu³⁺-ion koordinációs száma 9, míg az *Eu(H₂DOTA)⁺ köztitermékben található belső szférás vízmolekulák száma 4–5, melynek alapján megállapítható, hogy az *Eu(H₂DOTA)⁺ esetében valóban csak a 4 karboxilát oxigén vesz részt az Eu³⁺-ion koordinációjában és a köztitermék feltételezett szerkezete összhangban van a lumineszcenciás élettartam vizsgálatok eredményeivel.

A Ln(NOTA), Ga(NOTA) és Ln(DOTA)⁻-komplexek képződésének részletes kinetikai vizsgálatai szerint a reakciók sebessége lineárisan nő a [OH⁻] növekedésével a pH=3 – 6 tartományban.^[17-22] A Ln(NOTA), Ga(NOTA) és Ln(DOTA)⁻-komplexek képződésére Brücher,^[17,21] valamint Horrocks^[20] és munkatársai által javasolt reakciómechanizmus a legelfogadottabb, amely alapján az előegyensúlyi lépésben képződő protonált *Ln(HNOTA)⁺, *Ga(HNOTA)⁺ és *Ln(H₂DOTA)⁺ köztitermékek deprotonálódása és végtermékké történő átrendeződése a sebességmeghatározó lépés. A protonált köztitermékek

deprotonálódása lejátszódhat víz (mint *Brönsted* bázis), illetve OH^- katalizált úton, amelyet a végtermékké történő átrendeződés követ.^[23]

A NOTA és DOTA ligandumokkal képződő protonált $^*\text{Ln}(\text{HNOTA})^+$, $^*\text{Ga}(\text{HNOTA})^+$ és $^*\text{Ln}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztitermékek OH^- -ion által katalizált deprotonálódását jellemző sebességi állandókat (k_{OH} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) az 1. táblázatban tüntettük fel.

1. táblázat. A $\text{Ln}(\text{NOTA})$, $\text{Ga}(\text{NOTA})$ és $\text{Ln}(\text{DOTA})$ komplexek képződését jellemző k_{OH} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) sebességi állandók (25 °C)

Ligandumok	Ce^{3+}	Eu^{3+}	Gd^{3+}	Yb^{3+}	Ga^{3+}
NOTA ^[19,22]	$6,3 \times 10^7$	–	$7,1 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$ (Er^{3+})	$1,14 \times 10^5$
DOTA ^[24]	$3,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$ $7,2 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$ $9,3 \times 10^7$	–

Az $\text{Ln}(\text{NOTA})$ komplexek képződésére jellemző k_{OH} sebességi állandók maximumgörbe szerint változnak a lantanoidák rendszámának növekedésével és a maximum a Gd^{3+} -ionnál található.^[22] A $\text{Ln}(\text{NOTA})$ komplexek k_{OH} sebességi állandóinak maximum görbe szerinti változását a NOTA ligandumban található 6 donortom által kialakított koordinációs üreg és a Ln^{3+} -ionok méretviszonyai eredményezik. Ezzel szemben a $^*\text{Ln}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztitermékek OH^- katalizált deprotonálódását jellemző k_{OH} sebességi állandók monoton nőnek a Ln^{3+} -ionok méretének a csökkenésével.^[17] Az 1. táblázatban feltüntetett k_{OH} sebességi állandók alapján megállapítható, hogy az $\text{Ln}(\text{NOTA})$ komplexek képződése gyorsabban játszódik le, mint az analóg $\text{Ln}(\text{DOTA})$ komplexeké, ami feltételezhetően a képződő kétszer protonált $^*\text{Ln}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztitermékek nagyobb stabilitásával, lassabb OH^- katalizált deprotonálódásával és végtermékké történő átrendeződésével értelmezhető.

II.4. A $^{68}\text{Ga}(\text{NOTA})$ és $^{68}\text{Ga}(\text{DOTA})$ komplexek képződése nem vizes közegben

A radioaktív fémizotópot tartalmazó radiofarmakonok előállítása általában vizes közegben történik. A jelzési folyamatok hatékonyságát lényegesen befolyásolják a fémizotópok komplexálásakor alkalmazott kísérleti körülmények (pl. pH, hőmérséklet, ligandum felesleg, reakció idő). A $^{68}\text{Ga}(\text{NOTA})$ és $^{68}\text{Ga}(\text{DOTA})$ komplexek előállítását a reakció felgyorsítása érdekében általában magas hőmérsékleten végzik (95°C), ami az oligopeptidet, fehérjét és

monoklonális antitestet tartalmazó bifunkciós NOTA és DOTA származékok esetében a biológiailag aktív egységek denaturálódása miatt nem előnyös. *Frank Rösch* és munkatársai részletesen tanulmányozták a $^{68}\text{Ga}(\text{DOTANOC})$ komplex képződését különböző összetételű etanol-víz, izopropanol-víz és acetonitril-víz elegyekben.^[10] A $^{68}\text{Ga}(\text{DOTANOC})$ képződésének hatásfoka vízben 40%-os volt 70°C-on 10 perc elteltével. Azonos kísérleti körülmények mellett $^{68}\text{Ga}(\text{DOTANOC})$ képződésének hatásfoka 55, 75 és 90%-os volt 10, 30 és 40 V/V% etanol-víz, izopropanol-víz és acetonitril-víz elegyekben. *Frank Rösch* és munkatársai által elért eredmények alapján a $^{68}\text{Ga}(\text{DOTANOC})$, $^{44}\text{Sc}(\text{DOTANOC})$ és $^{177}\text{Lu}(\text{DOTANOC})$ komplexek képződése lényegesen gyorsabban (kétszer esetleg háromszor gyorsabban) játszódik le etanol-víz, izopropanol-víz és acetonitril-víz elegyekben, ami lehetővé teszi viszonylag rövid felezési idejű fémizotópok bifunkciós NOTA és DOTA komplexeinek jó hatásfokkal történő előállítását szobahőmérsékleten.^[10]

III. Kísérleti rész

III.1 Törzsoldatok készítése és koncentrációjuk meghatározása

A $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ törzsoldatot 99,9% tisztaságú Ga_2O_3 -ból (*Fluka*) készítettük 1:1 hígítású (~6 M) HNO_3 -ban való oldással. A savfelesleget vízfürdön végzett óvatos bepárlással távolítottuk el és a visszamaradó $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ -ot 0,1 M HNO_3 -al oldottuk vissza. A $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ törzsoldat koncentrációját komplexometriásan határoztuk meg. A titrált mintához feleslegben $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ mérőoldatot adtunk és a $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ felesleget standardizált ZnCl_2 oldattal határoztuk meg visszatitrálással *xilenolnarancs* indikátort alkalmazva. A titrálásokhoz használt $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ mérőoldatok koncentrációját 99,99%-os tisztaságú cinkből (*Merck*) készült standard oldattal határoztuk meg hexametilén-tetraamin puffer jelenlétében, *xilenolnarancs* indikátor alkalmazásával.^[25] A $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ törzsoldat H^+ koncentrációját $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ felesleg jelenlétében végzett pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. Az ionerősség beállításához használt NaCl oldatokat analitikai tisztaságú vegyszerből átkristályosítást követően, közvetlen beméréssel készítettük.

A H_4DOTA ligandumból (*Guerbet*) törzsoldatokat készítettünk (~0,0500M), majd a pontos koncentrációjukat pH-potenciometriás titrálással Ca^{2+} -ion (40-szeres) feleslege mellett, valamint annak távollétében felvett titrálási görbékből számítottuk, amelynek során figyelembe vettük a protonálódási lépcsőknek megfelelő ekvivalens lúgmennyiséget. A Ca^{2+} -ion felesleg jelenlétében végzett titrálások folyamán a komplex képződésével párhuzamosan leszorul a ligandumról az összes disszociálható proton, így meg tudjuk határozni a ligandumhoz tartozó összpoton-koncentrációt. A relatíve nagy Ca^{2+} -ion felesleg nem zavarja a meghatározást, mert a Ca^{2+} -ion hidrolízise csak magas pH-értékeknél következik be.

III.2 Oldategyensúlyi vizsgálatok

A DOTA ligandum protonálódási állandóit ($\log K_i^{\text{H}}$) pH-potenciometriás titrálások eredményeiből számítottuk ki. A pH-potenciometriás titrálások során *Metrohm-6.0233.100* kombinált üvegelektrodát és *Metrohm 785 DMP Titrino* automata titrátort használtunk. A titrálásokat 8 ml-es mintatérfogóban, állandó kevertetés, termosztálás ($25 \pm 0,1^\circ\text{C}$) és 0,15 M NaCl ionerősség mellett, standardizált 0,2 M NaOH -oldattal a pH=1,7 – 12,2 tartományban végeztük. A mérések előtt és alatt N_2 -gázt buborékolattunk át a rendszeren a karbonátosodás elkerülése érdekében. A pH-mérő kalibrálásához KH-ftalát (pH=4,002) és bórax (pH=9,177) puffereket használtunk. A különböző összetételű etanol-víz elegyekben végzett pH-potenciometriás titrálásokhoz 10 ml törzsoldatokat készítettünk ($[\text{DOTA}]=0,002$ M, 0,15 M

NaCl, $[HCl]=0,01\text{ M}$), amelyek etanol tartalmát tömegméréssel számított mennyiségű 96%-os etanol (*Molar*) adagolásával állítottuk a kívánt értékre, figyelembe véve az etanol-víz elegyek sűrűségét (ρ , g/ml), V/V% és m/m% összetételét, valamint a keveredésük során fellépő térfogat kontrakciót. A különböző etanol-víz elegyek sűrűségét, V/V% és m/m% összetételét az 2. táblázatban foglaltuk össze.

A pH-potenciometriás titrálások során a H^+ -ionok koncentrációját az *Irving* és munkatársai által kidolgozott módszerrel számítottuk, amelynek megfelelően egy 0,01 M HCl-oldatot 0,15 M NaCl ionerősség mellett 0,2 M NaOH oldattal titrálva meghatároztuk a mért (pH_{meas}) és a számított ($-\log[H^+]$) pH-k különbségét (pA) adott összetételű etanol-víz elegy $pH=1,8 - 2,5$ tartományban gyűjtött titrálási adataiból ($50 V_{NaOH} - pH_{meas}$ adatpár). Vizsgálataink során a leolvasott pH értékekből (pH_{meas}) az említett különbség (pA) felhasználásával történt a H^+ -ion koncentrációjának számítása.^[26] A számításokhoz szükségünk volt a sztöchiometriai vízionszorzat (pK_w) adott körülményekre vonatkozó értékére, amelyet a fent említett pH-potenciometriás titrálási görbe $pH=10,5 - 12,1$ tartományában gyűjtött titrálási adataiból ($30 V_{NaOH} \text{ (ml)} - pH_{meas}$ adatpár) számítottuk. A különböző etanol – víz elegyekre vonatkozó pA és pK_w értékeket a 2. táblázatban tüntettük fel.

A DOTA ligandum protonálódási állandóit ($\log K_i^H$) a különböző etanol – víz elegyekben végzett pH-potenciometriás titrálások eredményeiből ($200 V_{NaOH} \text{ (ml)} - pH_{meas}$ adatpár) számítottuk a PSEQUAD számítógépes program segítségével.^[27]

2. táblázat. Az etanol – víz elegyek sűrűsége (ρ , g/ml), V/V% és m/m% összetétele, valamint a számított pA és pK_w értékek (0,15 M NaCl, 25°C)

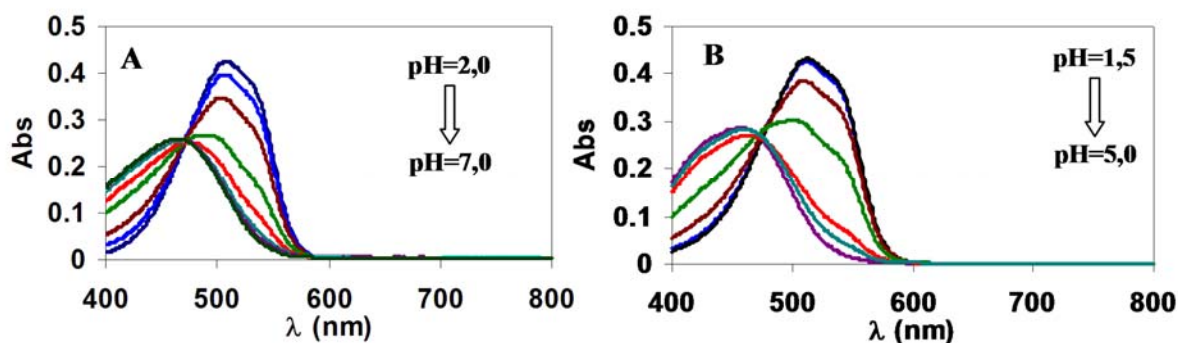
V/V%	m/m%	ρ (g/ml)	pA	pK_w
0	0	0,99708	0,014	13,834
10,6	7,83	0,98727	0,042	13,961
20,6	15,8	0,97537	0,056	14,106
31,4	25,0	0,95968	0,102	14,192
41,5	34,1	0,94247	0,189	14,271
52,4	44,7	0,92091	0,272	14,346
65,1	57,8	0,89185	0,336	14,511
73,4	66,8	0,87072	0,365	14,644

III.3 A Ga(DOTA) komplex képződésének ^1H -NMR spektroszkópiás vizsgálata

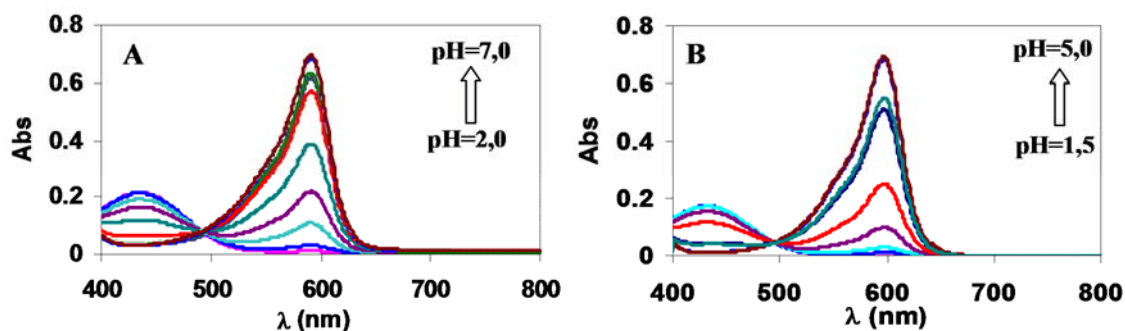
A Ga(DOTA) komplex képződését ^1H -NMR spektroszkópián Bruker DRX 400 spektrométerrel tanulmányoztuk. A minták hőmérsékletét Bruker VT-1000 hőmérsékletszabályozó egységgel tartottuk állandó értéken (298 K). A Ga^{3+} – DOTA rendszer vizsgálata során felvettük a DOTA ligandum és a Ga^{3+} - DOTA rendszer D_2O -s oldatainak ^1H -NMR spektrumait $t=5, 7, 27, 34, 50, 68, 86, 96, 113, 168, 218, 272$ és 1033 perccel a Ga^{3+} és DOTA oldatok összekeverése után ($[\text{Ga}^{3+}]=0,03$ M, $[\text{DOTA}]=0,015$ M, $\text{pH}=2,0$, $0,15$ M NaCl). A vizsgálatokhoz használt vizes oldatok pH értékét 2 M HCl-oldattal és szilárd NaOH-al állítottuk be 2,0-re, majd rotadeszt berendezéssel bepároltuk és D_2O -ban oldottuk. A vizes oldatok pH értékeinek mérése és a pH-mérő kalibrálása a III.2 fejezetben leírtak alapján történt. A spektrumok kiértékelését a Bruker Winnmr[®] szoftvercsomaggal végeztük.

III.4 A Ga(DOTA) képződésének kinetikai vizsgálatai

A Ga(DOTA) komplex képződését közvetve a komplex kialakulásával párhuzamosan a ligandumról felszabaduló protonok okozta pH csökkenést követve megfelelő pH indikátor alkalmazásával spektrofotometriásan tanulmányoztuk. A Ga(DOTA) képződését kísérő pH effektust metilnarancs, brómfenolkék és 2,4-dinitrofenol indikátorok (I) segítségével követtük. A metilnarancs és brómfenolkék indikátorok protonálódási állandóit és a kinetikai vizsgálatok során alkalmazott hullámhossz értékeket az indikátorok 0 és 40 V/V% etanos oldatainak $\text{pH}=1,5 - 7$ tartományban $\Delta\text{pH}=0,5$ egységenként 400-800 nm hullámhossz tartományban Cary 100Bio UV spektrofotométerrel 1 cm-es küvettában felvett abszorpciós spektrumaiból határoztuk meg. A metilnarancs és brómfenolkék indikátorok különböző pH értékeknél felvett abszorpciós spektrumai a 2. és 3. ábrákon láthatóak.



2. ábra. A metilnarancs különböző pH értékeknél felvett abszorpciós spektrumai vízben (A) és 40 V/V% etanol-víz elegyben (B). ($[\text{I}]=1\times 10^{-5}$ M, $0,15$ M NaCl, 25°C)



3. ábra. A brómfenolkék különböző pH értékeknél felvett abszorpciós spektrumai vízben (A) és 40 V/V% etanol-víz elegyben (B). ($[I]=1 \times 10^{-5}$ M, 0,15 M NaCl, 25°C)

A metilnarancs és brómfenolkék indikátorok adott hullámhosszon mért abszorbancia értéke a következő egyenlettel adható meg:

$$A = (\varepsilon_I [I] + \varepsilon_{HI} [HI]) \times l \quad (1)$$

ahol ε_I , ε_{HI} , $[I]$, $[HI]$ és l a deprotonált és a protonált indikátor adott hullámhosszra vonatkozó moláris abszorbanciáját és koncentrációját, valamint a fényúthosszat jelöli. Figyelembe véve az indikátor teljes koncentrációját ($[I]_t = [I] + [HI]$) és protonálódási állandóját ($K^H = [HI]/[H^+][I]$), az adott hullámhosszon mért abszorbancia értékek a következő egyenlettel fejezhetőek ki:

$$A = l \times \left[\frac{\varepsilon_I + \varepsilon_{HI} K^H [H^+]}{1 + K^H [H^+]} \right] [I]_t \quad (2)$$

A metilnarancs és brómfenolkék 508 és 592 nm-en különböző pH értékeknél meghatározott abszorbancia értékeit a (2) egyenletre illesztve számítottuk az indikátorok protonálódási állandóit a (K^H), amelyeket 3. táblázatban tüntettük fel. (A 2,4-dinitrofenol irodalomban fellelhető protonálódási állandója $\log K^H = 3,96$)^[28].

3. táblázat. A metilnarancs és brómfenolkék indikátorok protonálódási ($\log K^H$) állandói (0,15 M NaCl, 25°C)

EtOH V/V%	metilnarancs	brómfenolkék
0	3,32 (3)	3,79 (1)
40	2,30 (6)	4,07 (2)

A kinetikai vizsgálatokat Cary 100Bio UV spektrofotométerrel 0,874 cm-es tandem küvetában 25 °C-on termosztált küvetta tartó alkalmazásával 0, 10 és 40 V/V% etanol-víz elegyekben pH= 2,5 – 3,7 tartományban 0,15 M NaCl-os ionerősség mellett gyengén pufferelt oldatokban végeztük, ahol a pH változás 0,07 - 0,1 pH egység volt. A Ga(DOTA) komplex

képződésének kinetikai vizsgálatai során pszeudo-elsőrendű feltételeket biztosítottunk a DOTA ligandum nagy fölöslegének (5 - 30 szeres felesleg) alkalmazásával ($[Ga^{3+}]_t = 2,0 \times 10^{-4}$). Mivel a DOTA ligandum acetát csoportjainak protonálódása az általunk vizsgált pH tartományban (pH=2,5 – 3,7) játszódik le, így az alkalmazott DOTA feleslegek elegendőek voltak a pH állandó értéken tartásához más pufferek alkalmazása nélkül. A oldatok pH értékeinek mérése és a pH-mérő kalibrálása a III.2 fejezetben leírtak alapján történt. A kinetikai vizsgálatok során alkalmazott pH indikátorokat, a hullámhossz értékeket és a pH tartományokat a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat. A Ga(DOTA) képződésének kinetikai vizsgálatai során alkalmazott pH indikátorok, hullámhossz értékek és pH tartományok.

EtOH V/V%	Indikátor	[I] (mol/dm ³)	λ (nm)	pH
0	2,4-dinitrofenol	4×10^{-5}	410	2,5 – 2,7
	metilnarancs		508	2,9 – 3,5
	brómfenolkék		592	3,5 – 3,7
10	2,4-dinitrofenol	4×10^{-5}	410	2,5 – 2,7
	metilnarancs		508	2,9 – 3,5
	brómfenolkék		592	3,5 – 3,7
40	metilnarancs	4×10^{-5}	508	2,5 – 3,2
	brómfenolkék		592	3,2 – 3,7

A Ga(DOTA) képződésének vizsgálata során az általunk alkalmazott feltételek mellett a folyamatokat leíró sebességi egyenlet a következő módon adható meg:

$$\frac{d[GaL]_t}{dt} = k_{obs}[Ga^{3+}]_t \quad (3)$$

ahol k_{obs} pszeudo-elsőrendű sebességi állandót, a $[GaL]_t$ és a $[Ga^{3+}]_t$ a Ga(DOTA) komplex és Ga^{3+} -ion teljes koncentrációját jelöli. A k_{obs} pszeudo-elsőrendű sebességi állandó értékét az alábbi egyenlettel számítottuk:

$$A_t = (A_r - A_v)e^{(-k_{obs}t)} + A_v \quad (4)$$

ahol A_t a t időpillanatban mért abszorbancia, míg A_r a reaktánsok, A_v a végtermékek abszorbanciája. Az adott DOTA - és H^+ -koncentrációkhoz tartozó pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat 2 mérés átlagolásával kapott kinetikai görbék (300 idő-abszorbancia adatpár) a (4) egyenletre történő illesztésével SCIENTIST[®] program segítségével számítottuk.

IV. Eredmények és értelmezésük

A H₄DOTA ligandum nyolc donoratómmal (négy gyűrű amin nitrogén és négy karboxilát oxigén) rendelkezik. A vizsgálatok során alkalmazott etanol-víz elegyek befolyásolhatják a különböző donoratómok bázicitását, amely hatással lehet a DOTA protonálódási és donor atomok koordinációs sajátosságaira, valamint a komplexek képződési sebességére. Így a H₄DOTA ligandum részletes egyensúlyi és Ga(DOTA)-komplex képződésének kinetikai vizsgálata etanol-víz elegyben a gyakorlati alkalmazás lehetőségein túl koordinációs kémiai szempontból is érdekesnek tűnt.

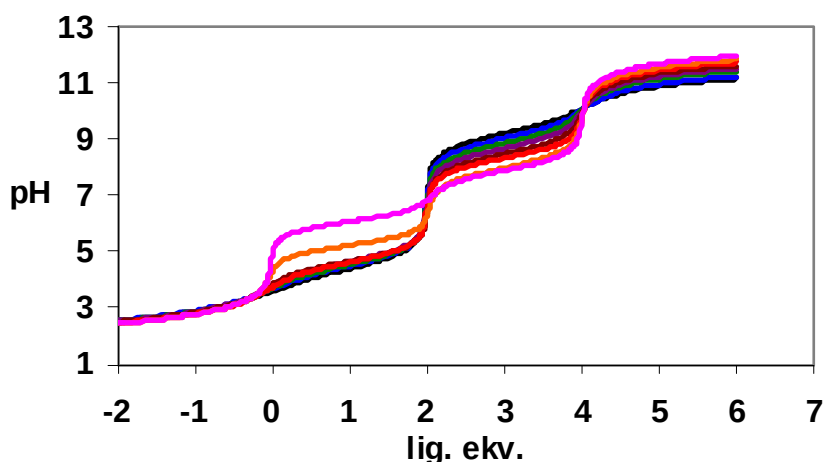
IV.1 A H₄DOTA ligandum protonálódási sajátosságai etanol-víz elegyben

A H₄DOTA ligandum protonálódási állandóit a ligandumok pH-potenciometriás titrálásának eredményeiből számítottuk. A protonálódási állandókat a következőképpen definiáljuk.



$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]}$$

ahol $i=0, 1, 2, 3, 4, 5$ és 6 . A H₄DOTA pH-potenciometriás titrálási görbét a 4. ábrán tüntettük fel. A DOTA ligandum különböző összetételű etanol-víz elegyben meghatározott protonálódási állandóit az 5. táblázatban foglaltuk össze, ahol zárójelben feltüntettük az egyes állandók standard deviációit.



4. ábra. A H₄DOTA ligandum titrálási görbéi különböző etanol-víz elegyekben

([H₄DOTA]=2,00 mM, [HCl]=4,00 mM, [EtOH]=0; 10,6; 20,6; 31,4; 41,3; 52,4; 65,1 és 73,4 V/V %, 0,15 M NaCl, 25 °C)

5. táblázat. A H₄DOTA ligandum protonálódási állandói különböző etanol-víz elegyekben (0,15 M NaCl, 25°C)

EtOH (V/V%)	0	10,6	20,6	31,4	41,3	52,4	65,1	73,4
$\log K_1^H$	9,23 (1)	9,03 (2)	8,85 (1)	8,66 (1)	8,42 (1)	8,08 (2)	7,90 (2)	7,67 (1)
$\log K_2^H$	9,21 (2)	9,07 (1)	8,88 (1)	8,73 (1)	8,53 (2)	8,47 (2)	8,09 (2)	8,13 (2)
$\log K_3^H$	4,51 (1)	4,54 (2)	4,53 (2)	4,52 (2)	4,36 (1)	4,16 (2)		
$\log K_4^H$	4,26 (3)	4,43 (2)	4,54 (2)	4,77 (1)	4,95 (2)	5,36 (2)		
$\log K_5^H$	2,36 (2)	2,46 (1)	2,25 (2)	2,24 (3)	1,98 (1)			
$\log K_6^H$	1,49 (1)	1,41 (3)	1,34 (3)	1,48 (3)	1,53 (3)			

A DOTA⁴⁻ ligandum protonálódási szekvenciáját ¹H- és ¹³C-NMR spektroszkópiás módszerekkel részletesen tanulmányozták.^[29] A teljesen deprotonált DOTA⁴⁻-ból kiindulva az első és a második protonálódási folyamat két szemben lévő gyűrű amin-nitrogénen játszódik le, míg a H₂DOTA²⁻ ligandumra belépő harmadik és a negyedik proton a nem protonált gyűrű nitrogénekhez kapcsolódó acetátcsoportokat protonálja.^[29] A H₄DOTA további protonálódása valószínűleg acetátcsoporton következik be.

A H₄DOTA ligandum különböző összetételű etanol-víz elegyekben meghatározott protonálódási állandóinak összehasonlítása alapján megállapítható, hogy a $\log K_1^H$ és $\log K_2^H$ értékek csökkennek, a $\log K_4^H$ értékek nőnek, míg a $\log K_3^H$ és $\log K_5^H$ értékek kismértékben csökkennek az etanol koncentrációjának a növekedésével. A makrociklusos ligandumok protonálódási folyamatai a különböző donoratomok között kialakuló kölcsönhatásoknak köszönhetően nem függetlenül játszódnak le. Így a DOTA ligandum különböző etanol-víz elegyben meghatározott protonálódási állandóinak értelmezése során figyelembe kell vennünk: i) a protonált donoratomok között kialakuló elektrosztatikus taszítást; ii) a nem protonált acetát csoportok és a protonált gyűrű nitrogén között kialakuló hidrogén-kötéseket; iii) az etanol lényegesen kisebb öndisszociációs állandóját; iv) a jelenlévő Na⁺-ion a DOTA ligandummal kialakított viszonylag stabil komplexét. A DOTA ligandum 0,15 M NaCl ionerősség mellett meghatározott első protonálódási állandója ($\log K_1^H = 9,23$; 0,15 M NaCl, 25°C) lényegesen kisebb, mint a 0,1 M Me₄NCl jelenlétében kapott $\log K_1^H$ érték ($\log K_1^H = 12,6$; 0,1 M Me₄NCl, 25°C)^[23], ami a viszonylag nagy stabilitású Na(DOTA) komplex képződésével értelmezhető ($\log K_{NaL} = 4,38$)^[30]. A DOTA $\log K_1^H$ és $\log K_2^H$ értékei csökkennek az etanol koncentrációjának növekedésével, ami az etanol kisebb öndisszociációs állandójával értelmezhető. Ezzel szemben a DOTA egyik acetát csoportjának protonálódásához rendelhető $\log K_4^H$ érték nő az etanol koncentrációjának a növekedésével.

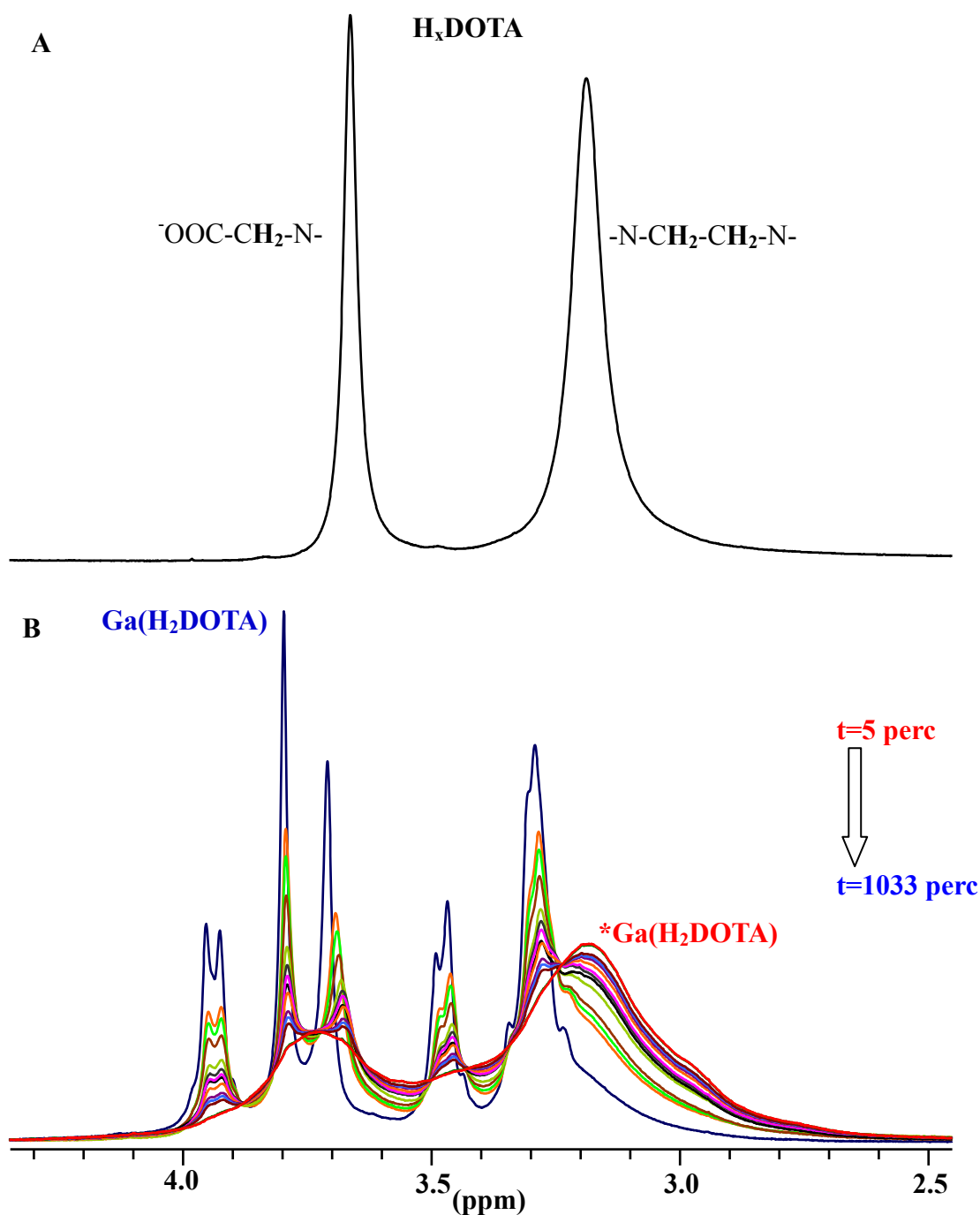
Az EDTA ligandum amino nitrogénjeinek protonálódási állandó metanol koncentrációjának növekedésével a DOTA-hoz hasonló módon csökkennek 80 – 90 V/V%-os összetételig, majd újra nőnek. Az EDTA acetát csoportjait jellemző protonálódási állandók az amino nitrogének $\log K^H$ értékeitől eltérő módon monoton nőnek a metanol koncentrációjának a növekedésével.^[31] A DOTA acetát csoportját jellemző protonálódási állandójának ($\log K_4^H$) az etanol koncentrációjának növekedésével bekövetkező növekedése a gyűrű nitrogének kisebb bázicitásával értelmezhető, aminek köszönhetően lényegesen gyengébb hidrogén-kötés alakul ki a deprotonált acetát csoport és a protonált gyűrű nitrogének között, így az acetát csoport protonálódása függetlenül játszódhat le.

A DOTA különböző etanol-víz elegyekben végzett egyensúlyi vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a donor atomok bázicitását, így a ligandum protonálódási állandóit lényegesen befolyásolja a rendszerek etanol koncentrációja, ami hatással van a komplexek egyensúlyi sajátságaira és feltehetően képződésük és disszociációjuk sebességére is.

IV.2 A Ga(DOTA)-komplex képződésének kinetikai vizsgálata

A Ga(DOTA) komplex egyensúlyi sajátságait, disszociációjának sebességét és szerkezeti tulajdonságait részletesen tanulmányozták.^[8] A Ga^{3+} -ion nagy stabilitási állandóval jellemezhető komplexet képez DOTA ligandummal ($\log K_{GaL}=26,05$; $\log K_{Ga(HL)}=3,64$; $\log K_{Ga(H_2L)}=2,43$; $\log K_{Ga(H_3L)}=1,84$), így a komplex képződése pH=2,0-n már közel 100%-os az 1:1 arányú Ga^{3+} - DOTA rendszerben ($[Ga^{3+}]=[DOTA]=4,0$ mM). A Ga(DOTA) disszociációja rendkívül lassú folyamat, amely H^+ és OH^- katalizált úton játszódhat le protonált és hidroxó-komplexek képződésén keresztül ($t_{1/2}=12,2$ nap, pH=0; $t_{1/2}=6,2$ óra, pH=10). A kétszeresen protonált $Ga(H_2DOTA)$ és $Cu(H_2DOTA)$ komplex szerkezete nagyon hasonló, mindkét komplexben a DOTA 6 donor atommal (két-két gyűrű nitrogén és acetát oxigén ekvatoriális, még két gyűrű nitrogén axiális pozícióban) koordinálódik a Ga(III)- illetve a Cu(II)-ionokhoz torzult oktaédes szerkezetet kialakítva, míg a két nem koordinálódó acetát csoport protonálva van.^[8,32]

A Ga(DOTA) képződése a $Ln(DOTA)$ komplexekhez hasonlóan lassan játszódik le, amelyeknél stabilis protonált $*Ln(H_2DOTA)$ közttermékek kialakulását mutatták ki spektrofotometriás,^[17,21] 1H -NMR^[18] és lumineszcencia spektroszkópiás^[20] módszerekkel. A Ga^{3+} -DOTA rendszer 1H -NMR spektroszkópiás vizsgálatait hasonló $*Ga(H_2DOTA)^{3+}$ közttermékek képződésének kimutatása céljából végeztük el. A Ga^{3+} -DOTA rendszer különböző időben felvett 1H -NMR spektrumai az 5. ábrán láthatóak.

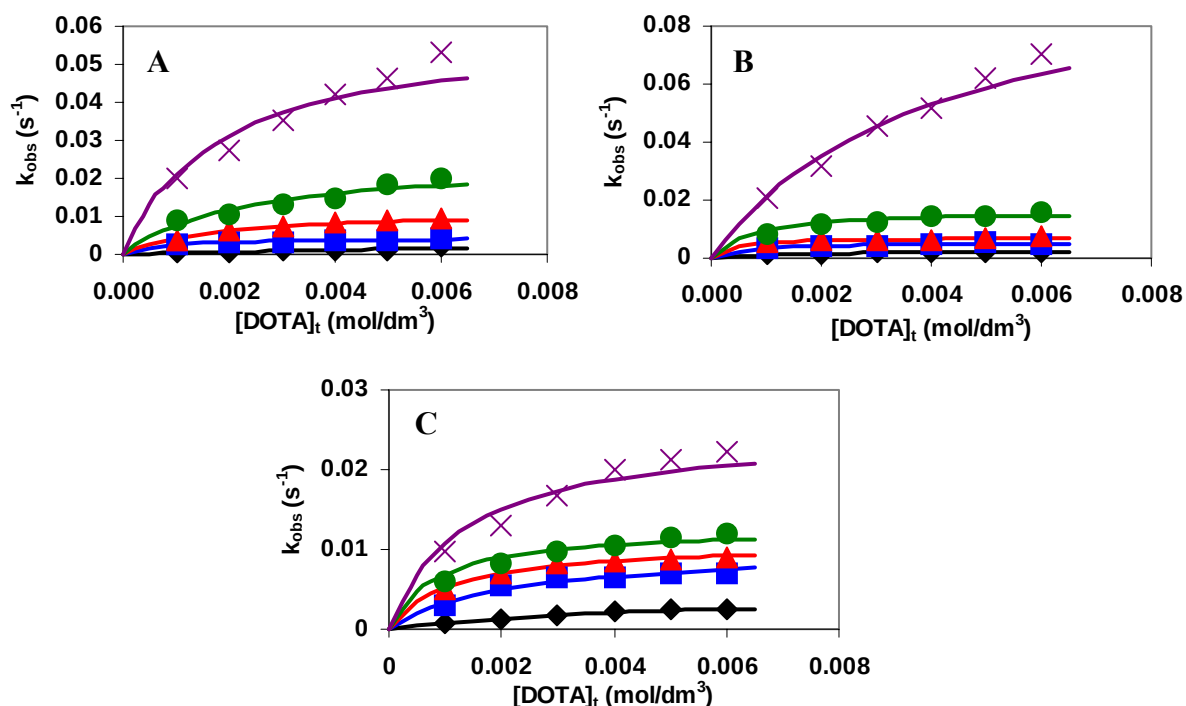


5. ábra. A H_xDOTA (A) és a Ga^{3+} - DOTA rendszer (B) 400 MHz ¹H-NMR spektrumai (A: $[H_xDOTA]=0,015$ M; B: $[Ga^{3+}]=0,03$ M, $[H_xDOTA]=0,015$ M, $x=5, 6$; pH=2,0; 0,15 M NaCl, 298 K)

A $Ga(H_2DOTA)$ -komplex kialakulása, (a vizsgálatok során alkalmazott kísérleti körülmények mellett protonált $Ga(H_2DOTA)$ -komplex képződik, amelyben két acetát csoport protonálva van), feltételezhetően a $Ln(DOTA)$ komplexekhez hasonlóan protonált köztitermék képződésén keresztül játszódik le. A Ga^{3+} és a DOTA oldatok összekeverését követően a

gyűrű és acetát metilén protonok $^1\text{H-NMR}$ jelei jelentősen kiszélesednek és intenzitásuk lecsökken (5. ábra), ami a Ga^{3+} és H_xDOTA ($x=5, 6$) között pillanatszerűen lejátszódó reakcióra utal. Az $^1\text{H-NMR}$ jelek kiszélesedése a reakció elején feltételezhetően a kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztitermék azonnali képződését és a jelenlévő szabad DOTA ligandummal kialakuló gyors cserefolyamatok eredményezik (a reakció valószínűleg a szabad Ga^{3+} és az öt esetleg hatszorosan protonált H_xDOTA ligandum között játszódik le $\text{pH}=2,0\text{-n}$). A kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztitermék szerkezete valószínűleg nagyon hasonló a kétszeresen protonált $^*\text{Ln}(\text{H}_2\text{DOTA})^{3+}$ köztitermék szerkezetéhez, amelyben a Ln^{3+} -ion az acetátcsoportok oxigénjeihez koordinálódik, miközben a makrociklusos gyűrű két szemben lévő nitrogénje protonált formában van.^[20] A Ga^{3+} -DOTA $^1\text{H-NMR}$ spektrumában (5. ábra) a 2,8 - 3,2 ppm közötti széles multipllett intenzitása csökken, míg a 3,3; 3,5; 3,7; 3,8 és 3,9 ppm-nél található multipllettek intenzitása nő az idő előrehaladásával, ami a kétszeresen protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztitermék deprotonálódásának és a $\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ végtermékké történő átrendeződésének a következménye. A 3,3; 3,5; 3,9; 3,7 és 3,8 ppm-nél található multipllettek rendre a $\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ -komplex a gyűrű, a koordinálódó és nem koordinálódó protonált acetát metilén protonokhoz rendelhetőek. A $\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ komplex oldatfázisú szerkezete valószínűleg nagyon hasonlít a $\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ egykristályának röntgendiffrakciós módszerrel meghatározott szerkezetéhez.^[8] A kétszer protonált $\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ komplex szerkezete feltételezhetően sokkal merevebb, mint a kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztiterméké, így (a viszonylag széles) multipllett jelenléte a $\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ képződésével értelmezhető. Fontos megjegyezni, hogy a Ga^{3+} - DOTA rendszer különböző időközönként felvett $^1\text{H-NMR}$ spektrumaiban 3,22; 3,35; 3,50; 3,65; 3,73; 3,82 és 3,89 ppm-nél található izobeszitikus pontok megjelenése egyértelműen mutatja a rendszerben jelen lévő két részecske (a $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ köztitermék és a $\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})^+$ komplex) egymásba történő átalakulását.

A $\text{Ga}(\text{DOTA})$ komplex képződési reakcióit a pszeudo-elsőrendű feltételek megteremtése érdekében 5-30-szeres ligandum felesleget alkalmazva, a komplex képződés során felszabaduló H^+ -ion okozta pH változáson keresztül indikátor módszerrel spektrofotometriásan tanulmányoztuk $\text{pH}=2,5 - 3,7$ tartományban. A $\text{Ga}(\text{DOTA})$ képződésének különböző pH-kon, különböző DOTA koncentrációknál és eltérő összetételű etanol-víz elegyekben meghatározott pszeudo-elsőrendű sebességi állandóit (k_{obs}) a 6. ábrán tüntettük fel.



6. ábra. A Ga(DOTA)-komplex képződése során kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók a $[DOTA]_t$ függvényében vízben (A), 10 V/V% (B) és 40 V/V% (C) etanol-víz elegyekben. ($[Ga^{3+}] = 2 \times 10^{-4}$ M, A: pH=2,67 (♦), 2,97 (■), 3,19 (▲), 3,49 (●) és 3,71 (×); B: pH=2,61 (♦), 2,88 (■), 3,13 (▲), 3,39 (●) és 3,64 (×); C: pH=2,70 (♦), 2,93 (■), 3,13 (▲), 3,35 (●) és 3,60 (×); 0,15 M NaCl, 25 °C)

A pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat (k_{obs}) a $[DOTA]_t$ függvényében ábrázolva a $Ln(DOTA)^-$ -komplexek képződéséhez hasonlóan telítési görbéket kaptunk, ami a köztitermék képződését jelzi. A kísérleti eredmények alapján gyakorlatilag teljesnek feltételeztük a köztitermék képződését ötszörösnél nagyobb fémion felesleg alkalmazásánál, így a Ga(DOTA)-komplexek képződési sebessége a kétszer protonált $*Ga(H_2DOTA)$ köztitermék átalakulásának sebességével jellemezhető:

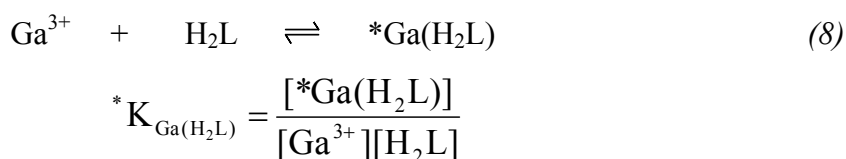
$$\frac{d[GaL]}{dt} = k_{obs} [Ga^{3+}]_t = k_f [*Ga(H_2L)]_t \quad (6)$$

, ahol a k_{obs} , $[Ga^{3+}]_t$, k_f , és $[*Ga(H_2L)]_t$ a pszeudo-első-rendű sebességi állandót, a Ga^{3+} teljes koncentrációját, a kétszer protonált $*Ga(H_2DOTA)^+$ adott pH-értékre vonatkozó átalakulását jellemző sebességi állandóját és teljes koncentrációját jelöli. A pszeudo-elsőrendű kinetikai feltételeket a DOTA ligandum nagy feleslegének alkalmazásával érték el. Mivel az általunk vizsgált pH tartományban a DOTA többszörösen protonált formában található (a teljesen deprotonált forma koncentrációja elhanyagolható), így a szabad DOTA ligandum

koncentrációja ($[DOTA]_{sz}$) a 5. táblázatban feltüntetett protonálódási állandók felhasználásával a következő egyenlettel adható meg:

$$[DOTA]_{sz} = [H_2DOTA](1 + K_3^H[H^+] + K_3^H K_4^H[H^+]^2 + K_3^H K_4^H K_5^H[H^+]^3) = \alpha [H_2DOTA] \quad (7)$$

, ahol $\alpha_H = 1 + K_3[H^+] + K_3 K_4[H^+]^2 + K_3^H K_4^H K_5^H[H^+]^3$. A kétszer protonált $*Ga(H_2DOTA)$ köztitermék stabilitási állandója a (8) egyenlettel fejezhető ki.



Figyelembe véve a Ga^{3+} teljes koncentrációját ($[Ga^{3+}] = [*Ga(H_2L)] + [Ga^{3+}]_{sz}$), a kétszer protonált $*Ga(H_2DOTA)$ köztitermék stabilitási állandóját ((8) egyenlet) és a (6) egyenletet, az adott pH értékeknél meghatározott pszeudo-elsőrendű sebességi állandóknak a DOTA teljes koncentrációjától ($[DOTA]_t$) való függése a következőképpen adható meg:

$$k_{obs} = \frac{k_f \times \left(\frac{*K_{Ga(H_2L)}}{\alpha} \right) \times [DOTA]_t}{1 + \left(\frac{*K_{Ga(H_2L)}}{\alpha} \right) \times [DOTA]_t} \quad (9)$$

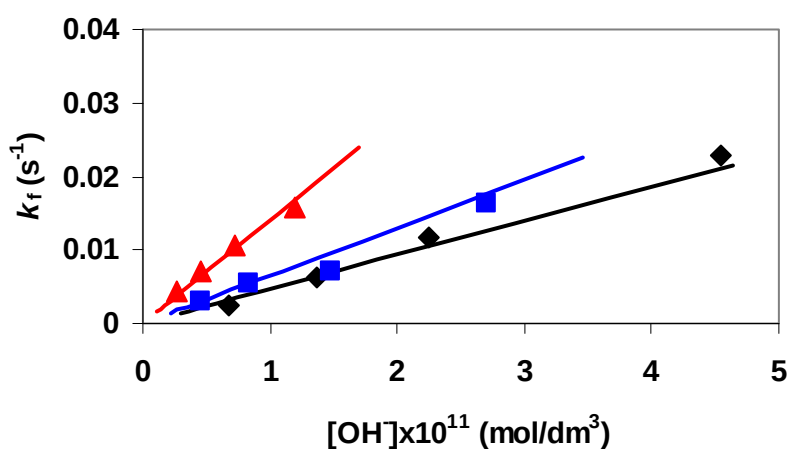
Az Ga^{3+} -DOTA⁻ rendszerekben adott pH-n és DOTA koncentráció mellett kísérletileg meghatározott k_{obs} pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat a (9) egyenlettel illesztve számítottuk ki a k_f sebességi állandókat és a kétszer protonált $*Ga(H_2DOTA)$ köztitermék stabilitási állandóját ($*K_{Ga(H_2L)}$). A kétszer protonált $*Ga(H_2DOTA)^+$ és a köztitermékek adott pH-ra vonatkozó $*K_{Ga(H_2L)}$ stabilitási állandóit és k_f sebességi állandóit a 6. táblázatban és a 7. ábrán tüntettük fel.

Az 5. táblázatban feltüntetett $*K_{Ga(H_2L)}$ értékek alapján elmondható, hogy a kétszer protonált $*Ga(H_2DOTA)$ köztitermék stabilitási állandója lényegesen nagyobb, mint az analóg $*Ce(H_2DOTA)$ és $*Eu(H_2DOTA)$ köztitermékek stabilitási állandói pH < 3,5 tartományban ($*K_{Ce(H_2L)} = 4,5$; $*K_{Eu(H_2L)} = 4,4$)^[17]. Azonban a $*K_{Ga(H_2L)}$ értékek csökkennek a pH növekedésével és pH = 3,6 - 3,7 tartományban már megegyeznek a $*Ce(H_2DOTA)$ és $*Eu(H_2DOTA)$ köztitermékek stabilitási állandóival. Figyelembe véve a Ga^{3+} -ion hidrolitikus

sajátosságait ($\text{Ga}(\text{OH})_x$ $x=1$ $\log K_1=-2.60$, $x=2$ $\log K_2=-3.51$, $x=3$ $\log K_3=-4.71$, $x=4$ $\log K_4=-6.24$),^[5] a a kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ köztitermék stabilitási állandójának a pH növekedésével bekövetkező csökkenése a vegyes $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})(\text{OH})^-$ köztitermék képződésével értelmezhető, ahol a OH^- -ion a $\text{Ga}(\text{III})$ -ionhoz közvetlenül koordinálódik lecsökkentve a központi fémion töltését és esetleg egy karboxilát csoportot kiszorítva.

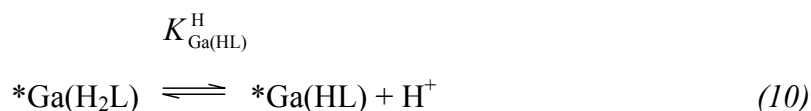
6. táblázat. A kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ köztitermék különböző pH-n és etanol-víz elegyekben meghatározott stabilitási állandója ($^*K_{\text{Ga}(\text{H}_2\text{L})}$)

EtOH:H ₂ O (V/V%)					
pH	0	pH	10	pH	40
2,67	6,18 (8)	2,61	6,28 (6)	2,70	6,32 (5)
2,97	6,08 (6)	2,88	6,15 (5)	2,93	6,17 (5)
3,19	5,25 (5)	3,13	5,94 (5)	3,13	6,07 (4)
3,49	4,52 (4)	3,39	5,44 (4)	3,35	5,69 (4)
3,71	4,22 (4)	3,64	4,17 (3)	3,60	5,00 (4)

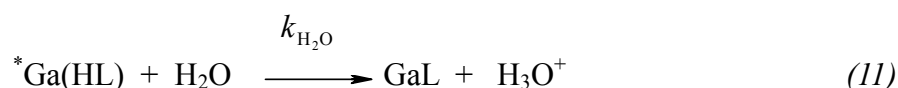


7. ábra A $\text{Ga}(\text{DOTA})$ képződésére jellemző sebességi állandók a $[\text{OH}^-]$ függvényében (EtOH V/V% = 0 (♦), 10 (■) és 40% (▲))

A $\text{Ga}(\text{DOTA})$ képződésére jellemző k_f sebességi állandók lineárisan nőnek a $[\text{OH}^-]$ növekedésével, amelynek magyarázatára a következő reakciómechanizmust tételeztük fel. A kétszer protonált ($^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$) és az egyszer protonált ($^*\text{Ga}(\text{HDOTA})$) köztitermékek között gyors protonálódási egyensúly van, amit a $\text{Ln}(\text{DOTA})$ komplexek képződése során is feltételeztük.^[23]



A monoprotonált $* \text{Ga}(\text{HDO} \text{TA})$ közttermék protonálódási állandóját ($K_{\text{Ga(HL)}}^{\text{H}}$) közvetlenül nem tudjuk mérni. Az analóg $* \text{Ln}(\text{HDO} \text{TA})$ közttermékek esetében a $K_{\text{Ln(HL)}}^{\text{H}}$ helyett a DOTA ligandum második protonálódási állandóját (K_2^{H} , 5. táblázat) adták meg, mint a lehetséges maximális értéket.^[20] A monoprotonált $* \text{Ga}(\text{HDO} \text{TA})$ közttermék protonvesztése, majd ezt követően a $\text{Ga}(\text{DOTA})$ terméké történő átrendeződése egy H_2O molekula, mint Brönsted bázis részvételével játszódhat le a $\text{pH}=2,6 - 3,7$ tartományban. Az etanol valószínűleg nem vesz részt a monoprotonált $* \text{Ga}(\text{HDO} \text{TA})$ közttermék protonvesztési folyamatában az alkoholos $-\text{OH}$ csoportjának kisebb H^+ -ion affinitása miatt.



Mivel az (10) egyenletnek megfelelően a monoprotonált közttermék koncentrációja az $1/[\text{H}^+]$ -val közvetlenül arányos, a k_f sebességi állandók lineáris növekedése a OH^- -ion koncentrációjának növekedésével csak a (10) egyenletben feltüntetett egyensúlyi folyamat eredménye. A lehetséges reakcióutakat figyelembevételével a (6) egyenlet a következő formában írható fel:

$$\frac{d[\text{GaL}]}{dt} = k_f[* \text{Ga}(\text{H}_2\text{L})]_t = k_{\text{H}_2\text{O}}[* \text{Ga}(\text{HL})][\text{H}_2\text{O}] \quad (12)$$

A kétszer protonált $* \text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ közttermék teljes koncentrációját ($[* \text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})]_t = [* \text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})] + [* \text{Ga}(\text{HDO} \text{TA})]$) a monoprotonált $* \text{Ga}(\text{HDO} \text{TA})$ közttermék protonálódási állandójával ($K_{\text{Ga(HL)}}^{\text{H}}$) kifejezve, a (12) egyenlet felhasználásával a $\text{Ga}(\text{DOTA})$ képződése a következő egyenlettel írható le:

$$k_f = \frac{k_{\text{H}_2\text{O}}[\text{H}_2\text{O}]}{1 + [\text{H}^+]/K_{\text{Ga(HL)}}^{\text{H}}} \quad (13)$$

A Ga^{3+} -DOTA rendszerek vizsgálata során kapott k_f sebességi állandókat (7. ábra) a (13) egyenletre illesztve számítottuk a $\text{Ga}(\text{DOTA})$ képződésére jellemző $k_{\text{H}_2\text{O}}$ sebességi és $K_{\text{Ga(HL)}}^{\text{H}}$ egyensúlyi állandókat. A számítások során figyelembe vettük a különböző etanol-víz elegyekben a H_2O koncentrációját. A $k_{\text{H}_2\text{O}}$ és $K_{\text{Ga(HL)}}^{\text{H}}$ állandókat a 7. táblázatban tüntettük fel.

7. táblázat. A Ga(DOTA), Ce(DOTA) és Yb(DOTA) képződésére jellemző sebességi és egyensúlyi állandók vízben, 10 és 40 V/V% etanol-víz elegyekben (0,15 M NaCl, 25°C)

EtOH V/V%	Ga(DOTA)			Ce(DOTA) ^[23]	Yb(DOTA) ^[23]
	0 % [H ₂ O]=55.5 M	10 % [H ₂ O]=50.1 M	40% [H ₂ O]=33.9 M	0%	0%
$k_{\text{H}_2\text{O}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)		0,9 ± 0,2		0,33	4,41
logK ^H _{Ln(HL)}	6,9 (4)	6,8 (3)	6,5 (4)	8,64	8,39

A 7. táblázatban feltüntetett $k_{\text{H}_2\text{O}}$ sebességi és $K_{\text{Ga(HL)}}^{\text{H}}$ egyensúlyi állandók alapján megállapítható, hogy a monoprotonált *Ga(HDOTA) köztitermék H₂O katalizált deprotonálódása gyorsabban játszódik le, mint a *Ce(HDOTA) köztiterméké, de lényegesen lassabban, mint a *Yb(HDOTA) esetében. Az Ln(DOTA) komplexek képződésére jellemző $k_{\text{H}_2\text{O}}$ sebességi állandók nőnek a Ln³⁺-ion méretének csökkenésével.^[17,23] Ezzel szemben a Ln(NOTA) komplexek képződési sebessége maximum görbe szerint változik a Ln³⁺-ionok rendszámának függvényében és a maximum a Gd³⁺-nál található. A Ln(DOTA) és Ln(NOTA) komplexek képződésének Ln³⁺-ionok növekvő rendszámának függvényében mutatott eltérő viselkedése a NOTA és DOTA ligandumok különböző üregméretével értelmezhető.^[17,22,3] Figyelembe véve a Ga³⁺ és a Ln³⁺-ionok sugarát (Ga³⁺: 0,62 Å; Ln³⁺: 0,97 – 1,16 Å), a *Ga(HDOTA) köztitermék lassabb H₂O katalizált deprotonálódását és Ga(DOTA) végtermékké történő átrendeződését a Ga³⁺ kis méretével magyarázhatjuk.

A vizsgálatok során a Ga(DOTA) képződése azonban lényegesen gyorsabban játszódott le, mint a Ln(DOTA) komplexek esetében az általunk vizsgált pH tartományban. A feltételezett reakciómechanizmus értelmében a reakció sebességmeghatározó lépése a monoprotonált *Ga(HDOTA) köztitermék víz katalizált deprotonálódása és végtermékké történő átrendeződése. Az (13) egyenlet alapján egyértelmű, hogy állandó $k_{\text{H}_2\text{O}}$ és [H₂O] értékeknél, valamint adott H⁺ koncentrációnál a $K_{\text{Ga(HL)}}^{\text{H}}$ értékének csökkenésével nő a k_{f} sebességi állandó értéke, mivel a kétszer protonált köztitermék protonálódási egyensúlya a reaktív monoprotonált köztitermék képződése irányában toldódik el. Így a Ga(DOTA) komplex azonos H⁺ koncentrációnál az Ln(DOTA) komplexekhez viszonyított gyorsabb képződése a monoprotonált *Ga(HDOTA) köztitermék kisebb protonálódási állandójával értelmezhető. Figyelembe véve a Ga³⁺-ion Ln³⁺-ionokhoz viszonyított kisebb ionméretét, a kétszer protonált *Ga(H₂DOTA) köztitermékben a Ga³⁺ közelebb kerülhet a protonált gyűrű nitrogénekhez és a fellépő elektrosztatikus taszítás következtében lecsökken a gyűrű nitrogének protonálódási állandója.

A Ga(DOTA) komplex képződése etanol-víz elegyben gyorsabban játszódik le, mint tiszta vizes közegben. Mivel a monoprotonált $^*\text{Ga}(\text{HDOTA})$ köztitermék víz katalizált deprotonálódása valószínűleg azonos sebességgel játszódik le vízben és különböző etanol-víz elegyekben, így a Ga(DOTA) etanol-víz elegyben tapasztalt gyorsabb képződését a kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ köztitermék deprotonálódását jellemző $K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$ egyensúlyi állandó etanol koncentráció növekedésével bekövetkező csökkenése eredményezi (7. táblázat). A $K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$ egyensúlyi állandó nagyobb etanol koncentrációknál tapasztalt csökkenéseit a gyűrű nitrogének csökkenő bázicitása eredményezi, amelyhez nagyon hasonló viselkedést tapasztaltunk a szabad DOTA ligandum protonálódási sajátságainak etanol-víz elegyekben történő tanulmányozása során.

A 6. táblázatban feltüntetett $k_{\text{H}_2\text{O}}$ sebességi és $K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$ egyensúlyi állandókat viszonylag nagy hibával tudtuk csak meghatározni. Mivel a kinetikai vizsgálatokat a $\text{pH}=2,6 - 3,7$ tartományban végeztük, így a $K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$ egyensúlyi állandókat ($\log K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}=6,9 - 6,5$) csak nagy bizonytalansággal tudtuk számítani, ami a (13) egyenlet értelmében $k_{\text{H}_2\text{O}}$ sebességi állandó számításakor is jelentkezett. A $k_{\text{H}_2\text{O}}$ sebességi és $K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$ egyensúlyi állandó értékének pontosabb meghatározása érdekében nagyobb pH értékeknél további kinetikai vizsgálatokat tervezünk „stopped-flow” módszerrel.

V. Összefoglalás

Munkám során a DOTA ligandum oldategyensúlyi sajátságait, illetve a GaDOTA komplex képződésének sebességét tanulmányoztam etanol-víz elegyekben pH-potenciometriás módszerrel illetve spektrofotometriásan indikátor módszer és ^1H NMR spektroszkópia alkalmazásával.

A H_4DOTA ligandum különböző összetételű etanol-víz elegyekben meghatározott protonálódási állandói alapján megállapítható, hogy az etanol koncentrációjának növelésével a $\log K_1^{\text{H}}$ és $\log K_2^{\text{H}}$ értékek csökkennek, a $\log K_4^{\text{H}}$ értékek nőnek, míg a $\log K_3^{\text{H}}$ és $\log K_5^{\text{H}}$ értékek kismértékben csökkennek. A gyűrű nitrogének protonálódásához rendelhető $\log K_1^{\text{H}}$ és $\log K_2^{\text{H}}$ értékek csökkenését az etanol kisebb öndisszociációs állandójával értelmezhető. A DOTA acetát csoportjának protonálódását jellemző $\log K_4^{\text{H}}$ érték növekvő etanol koncentrációval bekövetkező növekedése a gyűrű nitrogének csökkenő bázicitása eredményezi. A DOTA oldategyensúlyi vizsgálataiból egyértelműen kiderül, hogy az etanol koncentrációja befolyásolja a donoratomok bázicitását, a ligandum protonálódási sajátosságait, amelyek hatással vannak a DOTA egyensúlyi sajátságaira.

A Ga^{3+} -ion nagy stabilitási állandóval jellemezhető komplexet képez a DOTA ligandummal. A $\text{Ga}(\text{DOTA})$ képződése lassan, a $\text{Ln}(\text{DOTA})$ komplexekhez hasonlóan stabilis kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ köztitermék képződésén keresztül játszódik le. A $\text{Ga}(\text{DOTA})$ képződési reakcióinak sebességmeghatározó lépése a kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ köztitermék deprotonálódása és végtermékké történő átrendeződése. A kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ köztitermék deprotonálódására és végtermékké történő átrendeződésére jellemző k_f sebességi állandók lineárisan nőnek a $[\text{OH}^-]$ növekedésével a $\text{pH}=2,5 - 3,7$ tartományban. A $\text{Ga}(\text{DOTA})$ -komplex képződésére feltételezett reakció mechanizmus alapján a kétszer protonált $^*\text{Ga}(\text{H}_2\text{DOTA})$ köztitermék gyors protonálódási egyensúlyban ($K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$) átalakul monoprotonált $^*\text{Ga}(\text{HDOTA})$ köztitermékké, amely víz katalizált deprotonálódását követően rendeződik át végtermékké. A $^*\text{Ga}(\text{HDOTA})$ köztitermék $K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$ értéke lényegesen kisebb, mint a $^*\text{Ln}(\text{HDOTA})$ köztitermékek protonálódási állandója, ami magyarázatul szolgálhat a $\text{Ga}(\text{DOTA})$ gyorsabb képződésére. A $^*\text{Ga}(\text{HDOTA})$ köztitermék $K_{\text{Ga}(\text{HL})}^{\text{H}}$ értéke a DOTA ligandum $\log K_1^{\text{H}}$ és $\log K_2^{\text{H}}$ értékeihez hasonlóan csökken az etanol koncentrációjának növekedésével, ami adott H^+ koncentrációnál a $\text{Ga}(\text{DOTA})$ gyorsabb képződését eredményezi az etanol koncentrációjának növekedésével.

VI. Summary

In this work the equilibrium properties of the ligand DOTA and the formation rate of the GaDOTA complex were studied by pH-potentiometry, spectrophotometry and NMR spectroscopy in ethanol-water mixtures.

The protonation constants of H₄DOTA were determined by pH-potentiometry in ethanol-water mixtures. The protonation constants of DOTA reveal that the $\log K_1^H$ and $\log K_2^H$ values decrease, $\log K_4^H$ value increases while $\log K_3^H$ and $\log K_5^H$ values slightly decrease with the increasing ethanol concentration. The decrease of the protonation constants of the ring nitrogens ($\log K_1^H$ $\log K_2^H$) might be explained by the higher basicity of the ethylate ion. The increasing protonation constant of the acetate group of DOTA ($\log K_4^H$) might be caused by the decreasing basicity of the ring nitrogens which results in the independent protonation process of the carboxylate pendant arm. The equilibrium studies of the ligand DOTA indicate that the presence of ethanol affects the basicity of the donor atoms and consequently the equilibrium properties and the rate of the formation and dissociation reactions of DOTA complexes.

The Ga(DOTA) complex is characterized by a high stability constant. The formation rate of Ga(DOTA) is low, similarly to that of the Ln(DOTA) complexes. The relatively slow formation of Ga(DOTA) can be interpreted in terms of the formation of a stable diprotonated *Ga(H₂DOTA) intermediate, which can be deprotonated and transformed to the final Ga(DOTA) complex in a rate-determining step. The k_f rate constants characterizing the deprotonation and transformation of the diprotonated *Ga(H₂DOTA) intermediate to the Ga(DOTA) are directly proportional to the [OH⁻] in the pH range 2.5 – 3.7. According to the proposed reaction mechanism the diprotonated *Ga(H₂DOTA) intermediate is in protonation equilibrium with the monoprotonated *Ga(HDOTA) intermediate ($K_{Ga(HL)}^H$), which may deprotonate and transform to Ga(DOTA) in a H₂O assisted reactions. The $K_{Ga(HL)}^H$ value of *Ga(HDOTA) is lower than that of the *Ln(HDOTA) intermediates and it results in the faster formation of Ga(DOTA) in the pH range studied. The $K_{Ga(HL)}^H$ value of the *Ga(HDOTA) intermediate, similarly to the first ($\log K_1^H$) and second ($\log K_2^H$) protonation constants of DOTA, decreases with the increase of the ethanol concentration. The lower $K_{Ga(HL)}^H$ value of *Ga(HDOTA) intermediate results in the faster formation of Ga(DOTA) due to the shift of the equilibria from the diprotonated *Ga(H₂DOTA) intermediate to the formation of the reactive monoprotonated *Ga(HDOTA) intermediate.

VII. Irodalomjegyzék

- [1] Környei József: *A nukleáris medicina fizikai, kémiai alapjai*, Kossuth Egyetemi Kiadó, Debrecen, 1997.
- [2] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858-2902
- [3] a) M. Fani, J. P. André, H. R. Maecke, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2008**, *3*, 67-77.
b) K. Tanaka, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 815-825.
- [4] a) G. I. Gleason, *Int. J. Appl. Radiat. Isotop.* **1960**, *8*, 90-94. b) W. A. P. Breeman, A. M. Verbruggen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 978-981.
- [5] C. F. Baes, R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, **1976**.
- [6] C. R. Chitambar, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 2337-2361.
- [7] J. Notni, P. Hermann, J. Havlickova, J. Kotek, V. Kubicek, J. Plutnar, N. Loktinova, P. J. Riss, F. Rösch, I. Lukes, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 7174-7185
- [8] V. Kubicek, J. Havlickova, J. Kotek, Gy. Tircsó, P. Hermann, É. Tóth, I. Lukes, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 10960-10969
- [9] K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *J. Nucl. Med.*, **2007**, *48*, 1741-1748
- [10] F. Rösch, M. Malo-Cruz, *Efficient radiometal-labelling of drug delivery systems utilizing water/ethanol mixtures*, COST Action TD1004 Annual Meeting, **2013**, Athens, Greece
- [11] N. N. Greenwood, A. Earnshaw: *Elemek kémiája*, Nemzedékek Tudása Tankönyvkiadó, Budapest, **1998**, p.216 - 217.
- [12] J. F. Greber: *Gallium and Gallium Compounds*. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**
- [13] H. Sitzmann: *Gallium*. In: *Römpp Chemie Lexikon*. Thieme Verlag, Stand Dezember, **2006**.
- [14] K. D. Mjos, C. Orvig, *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 4540 – 4563.
- [15] J.-C. G. Bünzli, G. R. Choppin, eds., *Lanthanide Probes in Life*, Chemical and Earth Sciences: Theory and Practice. Elsevier, Amsterdam, **1989**.
- [16] R. B. Lauffer: *Chem. Rev.*, **1987**, *87*, 901.
- [17] É. Tóth, E. Brücher, I. Lázár, I. Tóth, *Inorg. Chem.*, **1994**, *33*, 4070.
- [18] X. Wang, T. Jin, V. Comblin, A. Lopez-Mut, E. Merciny, J. F. Desreux, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 1095.

- [19] J. F. Morfin, É. Tóth, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 10371 – 10378.
- [20] S. L. Wu, W. de W. Horrocks, Jr., *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 3724.
- [21] E. Brücher, G. Laurenczy, Zs. Makra, *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, 139, 141.
- [22] E. Brücher, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 1555-1559
- [23] L. Burai, I. Fábián, R. Király, E. Szilágyi, E. Brücher, *Dalton Trans.*, **1998**, 243 – 248.
- [24] E. Brücher, Zs. Baranyai, Gy. Tircsó Chapter 5.2 in RSC Drug Discovery Series No. 15, Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents, in “*The Future of Biomedical Imaging: Synthesis and Chemical Properties of the DTPA and DOTA Derivative Ligands and Their Complexes*” Ed. Martin Braddock, Royal Society of Chemistry, **2012**, p. 208-260.
- [25] I. Sajó, *Komplexometria*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, **1973**
- [26] H. M. Irving, M. G. Miles, L. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, **1967**, 38, 475.
- [27] L. Zékány, I. Nagypál, in *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, ed. D. J. Legett, Plenum, New York, **1985**, p.291.
- [28] A. K. Covington, *Acid-Base Indicators*, ed. E. Bishop, Pergamon, Oxford, **1972**.
- [29] J. F. Desreux, E. Merciny, M. F. Lincoln, *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 987.
- [30] É. Tóth, R. Király, J. Platzek, B. Radüchel, E. Rbücher, *Inorg. Chim. Acta*, **1996**, 249, 191.
- [31] D. B. Rorabacher, W. J. MacKellar, F. R. Shu and M. B. Sister, *Analytical Chemistry* **1971**, 43, 561-573.
- [32] A. Riesen, M. Zehnder, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*, **1986**, 69, 2067 – 2073.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Prof. Tóth Imrének és Dr. Baranyai Zsoltnak, témavezetőimnek, kísérleteim irányításáért, szakmai és elméleti támogatásukért, amellyel dolgozatom elkészítését lehetővé tették.

Kiemelt köszönet illeti Prof Brücher Ernő professzor emeritust szakmai tudásával való támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom Vágner Adrienn PhD hallgatónak és Takács Katalin tanszéki mérnöknek a mérések kivitelezésében nyújtott hasznos tanácsaikért.

Köszönöm a D519-es és D521-es labor dolgozóinak és hallgatóinak a vidám légkört, amit teremtettek.