



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Martin Plšek

Studium vlastností nových kontrastních látek pro zobrazování magnetickou rezonancí

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Václav Římal, Ph. D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2023

Děkuji Mgr. Adamovi Svítokovi a prof. RNDr. Hermannovi, Dr. za přípravu použitých vzorků. Dále děkuji RNDr. Marii Šoltésové, Ph. D. za zprostředkování tématu bakalářské práce. Mé hlavní poděkování patří Mgr. Václavu Římalovi, Ph. D. za jeho konzultace, rady, vedení práce a především za jeho trpělivost.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne.....

podpis

Název práce: Studium vlastností nových kontrastních látek pro zobrazování magnetickou rezonancí

Autor: Martin Plšek

Katedra / Ústav: Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Václav Římal, Ph. D., Katedra fyziky nízkých teplot

Abstrakt: Kontrastní látky pro zobrazování magnetickou rezonancí využívají organické komplexy paramagnetických iontů. Tato práce se zabývá studiem rotace fosfonátové skupiny komplexů Ln^{III} s monoetylosterem-P kyseliny 1,4,7,10-tetraza-cyklo-dodekán-4,7,10-tris(karboxymetyl)-1-metyfosfonové ($\text{Lndo3ap}^{\text{OEt}}$), a to konkrétně $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ a $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$. Byla změřena ^1H a ^{31}P NMR spektra obou komplexů v závislosti na teplotě. Byly odhadnuty příčné relaxační doby a chemické posuvy dvou spektrálních čar ^{31}P , mezi kterými probíhá chemické výměna. Spektra ^{31}P byla následně fitována analytickou funkcí popisující tvar spektra s dvoustavovou chemickou výměnou, čímž byly získány závislosti rychlosti výměny a relativních populací obou diastereoizomerů na teplotě. Z těchto závislostí byly určeny termodynamické veličiny charakterizující fosfonátovou rotaci. Byly diskutovány nejistoty získaných veličin a bylo provedeno porovnání rotace fosfonátu s podobnými komplexy. Provedená charakterizace může být následně využita k vývoji nových efektivních kontrastních látek.

Klíčová slova: jaderná magnetická rezonance, kontrastní látka pro MRI, kinetika konformační výměny

Title: Investigation of the Properties of Novel Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging

Author: Martin Plšek

Department: Department of Low-Temperature Physics

Supervisor: Mgr. Václav Římal, Ph. D., Department of Low-Temperature Physics

Abstract: Contrast agents for magnetic resonance imaging frequently employ organic complexes of paramagnetic ions. The present work studies rotation of phosphonate group in Ln^{III} complexes of monoethylester-P of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-4,7,10-tris(karboxymethyl)-1-methylphosphonic acid ($\text{Lndo3ap}^{\text{OEt}}$), specifically $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ and $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$. ^{31}P and ^1H NMR spectra were measured in a wide temperature range. Transverse relaxation times and chemical shifts of the two ^{31}P spectral lines which undergo mutual chemical exchange were estimated. The phosphorus spectra were then subjected to line-shape analysis, thus characterizing the chemical exchange connected to phosphonate rotation. This process yielded temperature dependence of both rate coefficients and relative populations between the two diastereoisomers for both studied molecules. The thermodynamic parameters were obtained and compared with similar complexes with phosphonate rotation. The knowledge of the detailed kinetics can later lead to improvements of the efficiency of the contrast agents.

Keywords: nuclear magnetic resonance, MRI contrast agent, kinetics of conformational exchange

Obsah

Úvod.....	1
1 Jaderná magnetická rezonance.....	2
1.1 Jaderný spin.....	2
1.2 Energetické hladiny.....	2
1.3 Obsazení hladin.....	3
1.4 Blochovy rovnice (popis magnetizace).....	3
1.5 Relaxační procesy.....	4
1.6 Příčná relaxační doba T_2	4
1.7 Chemická výměna.....	5
1.8 Výpočet teploty ze spektra methanolu.....	7
1.9 Princip zobrazování magnetickou rezonancí.....	7
1.10 Kontrastní látky.....	7
2 Postup měření a použité vzorky.....	9
2.1 Použité vzorky.....	9
2.2 Balík Asymexfit.....	10
2.3 Výpočet chyb.....	10
2.4 Nastavení experimentů.....	11
2.5 Kalibrace teploty.....	12
2.6 Dynamická viskozita roztoku.....	13
3 Výsledky měření.....	15
3.1 Lado3ap ^{OEt}	15
3.1.1 Vodíková a fosforová spektra (Lado3ap ^{OEt}).....	15
3.1.2 Výpočet kA a pA	16
3.2 Cedo3ap ^{OEt}	21
3.2.1 Vodíková a fosforová spektra (Cedo3ap ^{OEt}).....	21
3.2.2 Výpočet kA a pA	22
4 Diskuze.....	26
4.1 Lado3ap ^{OEt}	26
4.2 Cedo3ap ^{OEt}	27
4.3 Porovnání s dalšími pracemi.....	28
Závěr.....	30
Seznam použité literatury.....	31
Seznam tabulek.....	32
Seznam obrázků.....	33

Úvod

Zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging, MRI) je nenahraditelná technika v medicínské radiologii. Poskytuje přesný obraz měkkých tkání, orgánů a pomáhá při odhalování patologických nálezů. Pro lepší charakterizaci patologií je nutné zvýšit kontrast mezi tkáněmi, k čemuž se používají nitrozilně podávané kontrastní látky. Jejich účinnost je charakterizovaná relaxivitami r_1 a r_2 (nárůstem převrácených hodnot podélné a příčné relaxační doby T_1 a T_2 normovaným na koncentraci kontrastní látky). V současné době jsou kontrastní látky ještě daleko od svých teoretických maxim relaxivity.

Většinu používaných kontrastních látek tvoří sloučeniny na bázi gadolinia (Gd). To zvyšuje kontrast díky elektronovému paramagnetismu. Samo o sobě je ale toxické pro lidský organismus, proto musí být součástí stabilních ligandů; jeden z nejčastěji používaných ligandů je komplex $H_4\text{dota}$. Ani v této formě se ale nemůže podávat například pacientům s chronickým onemocněním ledvin. Navíc i u zdravých jedinců byly v nedávné době pozorovány jeho pozůstatky v mozkové, srdeční nebo jaterní tkáni [1]. Z toho důvodu se vyvíjí kontrastní látky na bázi různých dalších prvků. Slibné jsou například některé sloučeniny s ostatními lanthanoidy jako je Eu nebo Dy [2].

Kromě paramagnetismu je pro dobrou kontrastní látku důležitá také její dynamika a interakce s molekulami vody (signál zpracováváný v MRI k získání obrazu obvykle pochází od jader vodíku v molekulách vody). Klíčové atributy jsou počet koordinovaných molekul vody na iontu, jejich relaxační doba a střední doba, po kterou zůstává voda koordinovaná [3]. Významný vliv má i dynamika ligandu a molekul vody v jeho blízkém okolí (tj. molekuly vody, které nejsou koordinované). Dynamika molekul v okolí je charakterizována korelačním časem, dlouhý korelační čas znamená pomalý pohyb molekul a naopak. Ve velkých magnetických polích (3 T a výš) je relaxivita větší při delším korelačním čase. Toho se využívá navázáním kontrastní látky na větší molekuly, čímž se korelační čas prodlužuje. Pokud tato vazba není rigidní, k prodloužení korelačního času nedochází.

Tato práce se zabývá komplexy Ln^{III} s monoesterem-P kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-tris(karboxymetyl)-1-metylfosfonové, krátce $\text{Lndo3ap}^{\text{OEt}}$, konkrétně diamagnetickým komplexem $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ a potenciální kontrastní látkou $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$ obsahující paramagnetický cer. Cílem práce je vyhodnocení chemické výměny mezi diastereoizomery $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$, resp. $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$. K vypočtení rychlostních konstant byla naměřena fosforová spektra v závislosti na teplotě. V těchto spektrech jsou při nízkých teplotách dva signály, každý od jednoho diastereoizomeru. Tvar spektrálních čar je ovlivněn rychlostí chemické výměny, která se mění s teplotou. Pro vyhodnocení rychlostních konstant byla spektra fitována funkcí modelující tvar spektrální křivky pro jádra, které se účastní chemické výměny, v našem případě jsou to ^{31}P . Úspěšné fitování je podmíněno vhodným odhadem příčné relaxační doby ^{31}P v obou diastereoizomerech při všech teplotách. Po splnutí obou signálů vlivem chemické výměny je navíc potřeba získat i jejich chemické posuvy. Ze závislosti rychlostních konstant na teplotě byly dalším fitem určeny aktivační entropie, entalpie a Gibbsova energie příslušející probíhající chemické výměně.

1 Jaderná magnetická rezonance

1.1 Jaderný spin

Jaderný spin závisí na počtu protonů i neutronů, ze kterých se dané jádro skládá. Ve spektroskopii jaderné magnetické rezonance (nuclear magnetic resonance, NMR) se proto rozlišuje mezi různými izotopy. Pro popis spinu se zavádějí operátor kvadrátu velikosti celkového spinu \hat{S}^2 a průmětu spinu do osy z \hat{S}_z následujícím způsobem (v jednotkách \hbar):

$$\hat{S}^2|s, m_s\rangle = s(s+1)|s, m_s\rangle, \quad s = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$$

$$\hat{S}_z|s, m_s\rangle = m_s|s, m_s\rangle, \quad m_s = -s, -s+1, \dots, s \quad (1)$$

kde $|s, m_s\rangle$ značí vlastní stav s kvantovými čísly velikosti spinu (s) a průmět spinu do osy z (m). Pro $s=1/2$ může m_s nabývat hodnot $+1/2$ a $-1/2$ a označíme $|\frac{1}{2}, \frac{1}{2}\rangle \equiv |\alpha\rangle$ a $|\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}\rangle \equiv |\beta\rangle$.

Se spinem také souvisí spinový magnetický moment $\hat{\mu}$:

$$\hat{\mu} = g \frac{e}{2m} \hat{S} = \gamma \hat{S}, \quad (2)$$

kde g je bezrozměrné číslo nazývané g faktor, m je hmotnost částice, e je elementární náboj a γ je gyromagnetický poměr (Tabulka 1)

Tabulka 1 Spinová čísla a gyromagnetické poměry vybraných izotopů [4]

Izotop	s	γ ($10^6 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$)
^1H	1/2	267,522
^2H	1	42,066
^{13}C	1/2	67,283
^{31}P	1/2	108,394
^{17}O	5/2	-36,281

1.2 Energetické hladiny

Spinový hamiltonián \hat{H} magnetického pole ve směru osy z nabývá tvaru:

$$\hat{H} = -\hat{\mu} \cdot \mathbf{B} = -\gamma B_z (1 + \delta) \hat{S}_z, \quad (3)$$

kde B_z je velikost vnějšího magnetického pole a δ je chemický posuv, který reprezentuje magnetické pole indukované prostředím (elektronovým). Rovnice (3) platí pro izotropní kapalinu, pokud by prostředí nebylo izotropní měl by δ tenzorový charakter. Pro spin $1/2$ v magnetickém poli dostáváme energetické hladiny:

$$\hat{H}|\alpha\rangle = \omega_0 \hat{S}_z |\alpha\rangle = \frac{1}{2} \omega_0 |\alpha\rangle, \quad (4)$$

$$\hat{H}|\beta\rangle = \omega_0 \hat{S}_z |\beta\rangle = -\frac{1}{2} \omega_0 |\beta\rangle. \quad (5)$$

Kde ω_0 je Larmorova frekvence.

Rozdíl energetických hladin je tedy rovný Larmorově frekvenci ω_0 .

1.3 Obsazení hladin

Pro soubor mnoha spinů (pro jednoduchost uvažujme jen spin 1/2) se pravděpodobnost nalezení spinu v energetických stavech řídí Boltzmannovým rozdělením. Poměr mezi populacemi energetických hladin je

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(\frac{-\Delta E}{k_B T}\right) = \exp\left(\frac{-\omega_0}{k_B T}\right), \quad (6)$$

kde N_α , resp. N_β , jsou populace stavů $|\alpha\rangle$, resp. $|\beta\rangle$, energetické hladiny. Rozdílem populací obou hladin vzniká makroskopická jaderná magnetizace, která je v rovnovážném stavu ve směru indukce magnetického pole.

1.4 Blochovy rovnice (popis magnetizace)

Blochovy rovnice pro popis vývoje magnetizace \mathbf{M} v čase, které vycházejí z fenomenologického popisu chování gyromagnetické částice doplněného o relaxační děje, mají následující tvar [5]:

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma(\mathbf{M}(t) \times \mathbf{B}(t))_x - \frac{M_x(t)}{T_2}, \quad (7)$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma(\mathbf{M}(t) \times \mathbf{B}(t))_y - \frac{M_y(t)}{T_2}, \quad (8)$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma(\mathbf{M}(t) \times \mathbf{B}(t))_z - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1}, \quad (9)$$

kde T_1 je podélná relaxační doba, T_2 je příčná relaxační doba a M_0 je velikost rovnovážné magnetizace.

Tvar NMR spektrální křivky lze získat Fourierovou transformací funkce $M(t) = M_x(t) + iM_y(t)$, kde $M_x(t)$ a $M_y(t)$ jsou řešení rovnic (7) a (8) pro $\mathbf{B}(t) = (0, 0, B_z)$ s počátečními podmínkami $M_x(0) = 0$ a $M_y(0) = M_0$. Takto získaný předpis spektrální křivka má tvar:

$$S_L(\omega) = \frac{T_2 M_0}{1 + iT_2(\omega - \omega_0)}, \quad (10)$$

kde ω_0 je Larmorova frekvence příslušného jádra.

$S_L(\omega)$ je Lorentzova křivka jejíž reálná část je

$$L(\omega) = \frac{T_2 M_0}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2}. \quad (11)$$

Pološířka (FWHM) funkce $L(\omega)$ je rovna $\frac{2}{T_2}$.

V reálném experimentu NMR je však pološířka spektrální čáry navýšena také v důsledku nehomogenního magnetického pole B_0 a také např. vlivem chemické výměny. Pro pološířku experimentálních rezonančních čar proto používáme označení T_2^* . Platí, že T_2^* je kratší než T_2 .

1.5 Relaxační procesy

Fluktuující lokální magnetická indukce \mathbf{b} , která vzniká v důsledku pohybů molekul, způsobuje přechod jaderné magnetizace do rovnovážného stavu.

Náhodné procesy můžeme popsat stochastickou funkcí $Y(t)$. S její pomocí dále definujeme autokorelační funkci $G(\tau)$ [6]:

$$G(\tau) = \langle Y(t)Y^*(t + \tau) \rangle,$$

která koreluje náhodné procesy v různých časech.

Pokud předpokládáme, že je $\langle Y(t) \rangle = 0$ a že jsou stochastické funkce pro velké τ nekorelované (tedy $\lim_{\tau \rightarrow \infty} G(\tau) = 0$) je nejjednodušší tvar funkce:

$$G(\tau) = G(0) \exp\left(\frac{-|\tau|}{\tau_c}\right), \quad (12)$$

kde τ_c je rotační korelační čas.

Fourierovou transformací korelační funkce dostaneme spektrální hustotu $J(\omega)$ [6]:

$$J(\omega) = G(0) \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}, \quad (13)$$

která souvisí se závislostí příčných (T_2) a podélných (T_1) relaxačních dob.

1.6 Příčná relaxační doba T_2

Pro účely vyhodnocení spekter je potřeba znát závislost na teplotě. Pokud předpokládáme, že jsou relaxační mechanismy způsobené lokálním magnetickým polem \mathbf{b} , které mění svůj směr náhodně vůči vnějšímu magnetickému poli \mathbf{B}_0 a které má konstantní velikost b , platí pro závislost T_2 na teplotě následující vztah [6]:

$$\frac{1}{T_2} = 2\gamma^2 b^2 (J(\omega_0) + J(0)), \quad (14)$$

kde γ je gyromagnetický poměr jádra, o jehož relaxační dobu se zajímáme a $J(\omega)$ je z rovnice (13) pro $G(0) = 1$.

Rotační korelační čas τ_c závisí na teplotě následujícím způsobem [6]:

$$\tau_c(T) = \frac{4\pi\eta(T)a^3}{k_B T}, \quad (15)$$

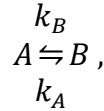
kde a je poloměr molekuly (za předpokladu, že je molekula přibližně sférická), jejíž součástí je jádro s relaxační dobou T_2 , k_B je Boltzmannova konstanta a $\eta(T)$ je dynamická viskozita roztoku, ve kterém se molekula se studovaným jádrem nachází. Závislost $\eta(T)$ může být popsána fenomenologickým vztahem [6]:

$$\eta(T) = \eta_0 \exp\left(\frac{E_a^\eta}{k_B T}\right), \quad (16)$$

Kde η_0 je konstanta a E_a^η je aktivační energie pro viskózní proudění.

1.7 Chemická výměna

Chemická výměna je proces, při němž dochází ke změně rezonanční frekvence jader. Může být způsobena např. chemickou reakcí nebo změnou konformace molekuly. Schematicky se dvoustavová chemická výměna, kdy jádro přechází mezi dvěma stavy A a B s různými Larmorovými frekvencemi ω_A a ω_B , značí:



kde k_A a k_B jsou rychlosti chemické výměny (tedy převrácené hodnoty $\tau_{A,B}$, což je střední doba, za kterou dojde k výměně pozic atomu).

K získání funkcí, popisujících tvar spektrálních čar nesymetrické výměny, je potřeba vyřešit tzv. Bloch-McConnellovu rovnice (modifikované Blochovy rovnice pro případ chemické výměny) [7]:

$$\frac{dM_x^A}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B}^A)_x - \frac{M_x^A}{T_2^A} - k_A M_x^A + k_B M_x^B, \quad (17)$$

$$\frac{dM_y^A}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B}^A)_y - \frac{M_y^A}{T_2^A} - k_A M_y^A + k_B M_y^B, \quad (18)$$

$$\frac{dM_x^B}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B}^B)_x - \frac{M_x^B}{T_2^B} + k_A M_x^A - k_B M_x^B, \quad (19)$$

$$\frac{dM_y^B}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B}^B)_y - \frac{M_y^B}{T_2^B} + k_A M_y^A - k_B M_y^B, \quad (20)$$

kde \mathbf{M}^A , \mathbf{M}^B jsou vektory jaderné magnetizace od stavu A resp. B, \mathbf{B}^A a \mathbf{B}^B jsou vektory magnetické indukce v místě A resp. B, γ je gyromagnetický poměr studovaného izotopu a T_2^A , T_2^B jsou příčné relaxační doby. Tuto soustavu lineárních diferenciálních rovnic lze vyřešit podle [7]. Fourierova transformace řešení soustavy rovnic dává komplexní tvar spektrální čáry:

$$S(\omega) = M_0 \frac{k_A + k_B + p_A \alpha_B + p_B \alpha_A}{\alpha_A \alpha_B + k_A \alpha_B + k_B \alpha_A}, \quad (21)$$

kde

$$\alpha_{A,B} = \frac{1}{T_{A,B}^2} - i(\omega_{A,B} - \omega), \quad (22)$$

$p_{A,B}$ jsou relativní populace v místech A a B, pro něž platí

$$p_A + p_B = 1. \quad (23)$$

Pokud je systém v termodynamické rovnováze, rychlostní konstanty a populace nejsou nezávislé veličiny, ale platí:

$$p_A k_A = p_B k_B. \quad (24)$$

Pouze dvě veličiny z předchozích čtyř jsou na sobě nezávislé.

Pokud chemická výměna probíhá pouze mezi dvěma stavy, dochází při nárůstu rychlosti výměny nejdříve k rozšíření a přibližování obou maxim. Následně dojde k jejich splynutí (tzv. koalescenci). Při dalším zvyšování teploty (resp. s růstem hodnoty zlomku $k_A/\Delta\omega$) se sjednocený pík zužuje (Obrázek 7, Obrázek 13).

Podle Eyringovy rovnice [7] k_A závisí na teplotě T jako:

$$k_A = \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{-\Delta H^\ddagger + T \Delta S^\ddagger}{RT}\right), \quad (25)$$

kde ΔH^\ddagger je změna aktivační entalpie, ΔS^\ddagger je změna aktivační entropie, h je Planckova konstanta a R je molární plynová konstanta.

Dále se také zavádí změna Gibbsovy aktivační energie ΔG_T^\ddagger při teplotě $T(K)$ jako:

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad (26)$$

Změna Gibbsovy energie ΔG_T je zcela analogická ΔG_T^\ddagger .

Populace p_A je přímo spojena s rovnovážnou konstantou K :

$$K = \frac{p_B}{p_A}, \quad (27)$$

Teplotní závislost rovnovážné konstanty K je popsána van't Hoffovou rovnicí:

$$K = \exp\left(\frac{-\Delta H + \Delta ST}{RT}\right). \quad (28)$$

Kde ΔS je změna entropie, ΔH je změna entalpie. Pro získání ΔS a ΔH z teplotní závislosti p_A je potřeba rovnici (27) s využitím (23) přepsat na:

$$p_A = \frac{1}{K + 1}. \quad (29)$$

1.8 Výpočet teploty ze spektra methanolu

Pro přesnější určení teploty měřeného vzorku je potřeba zjistit vztah mezi skutečnou teplotou T_{REAL} ve vzorku a teplotou měřenou na čidle teploměru T_{SET} . K tomu lze využít závislost vzdálenosti chemických posuvů jader ^1H v methanolu, δ_{CH_3} a δ_{OH} v ppm podle vzorce [8]:

$$T(K) = 403 - 29,46 \cdot |\delta_{OH} - \delta_{CH_3}| - 23,832 \cdot |\delta_{OH} - \delta_{CH_3}|^2 \quad (30)$$

1.9 Princip zobrazování magnetickou rezonancí

Zobrazování magnetickou rezonancí (MRI, magnetic resonance imaging) využívá závislost Larmorovy frekvence na velikosti vnějšího magnetického pole \mathbf{B} . Aplikací gradientu magnetického pole podél osy z a použitím vhodného radiofrekvenčního signálu se excitují spiny pouze ve vybrané vrstvě kolmé k ose z [4].

K přiřazení souřadnic v této rovině slouží tzv. kódování fáze a frekvence. Které, pomocí dalších gradientů v osách x a y mění Larmorovu frekvenci a fázi přijímaného signálu. Ten po zpracování Fourierovou transformací vede k vytvoření obrazu.

Takto získaný kontrast je tvořen pouze různou hustotou měřených jader (nejčastěji vodíku ^1H ve vodě nebo tucích). Jelikož je hustota vody v tkáních velmi podobná, není tento kontrast ideální pro jejich zobrazení. Proto se zvyšuje kontrast na základě rozdílných relaxačních dob T_2 a T_1 , jejichž velikost je napříč tkáněmi různorodější než hustota vody.

1.10 Kontrastní látky

Klíčovou schopností kontrastních látek je ovlivnění relaxační doby okolních protonů v molekulách vody, tato vlastnost je charakterizovaná relaxivitami r_2 a r_1 (převrácenými hodnotami T_2 a T_1), které jsou normované na koncentraci kontrastní látky.

U lanthanoidů (tedy i gadolinia) je zvýšená relaxivita způsobená lokálním fluktuujícím magnetickým polem od elektronu [3]. Celkový příspěvek k pozorované relaxivitě $1/T_{i,obs}$ [3] se dá rozdělit na:

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

kde $T_{i,d}$ je diamagnetická relaxační doba a $T_{i,p}$ je paramagnetická relaxační doba.

Jelikož je relaxivita závislá na velikosti magnetického pole od elektronu, které se liší dle vzdálenosti ovlivněných jader (^1H z vody) od paramagnetického prvku, dělí se dále i příspěvek od $1/T_{i,p}$ [3] na:

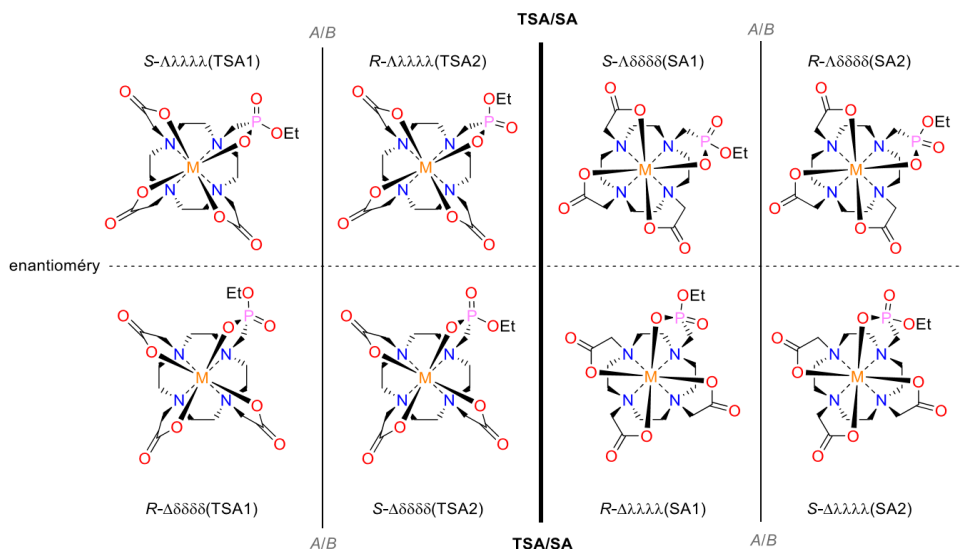
$$\frac{1}{T_{i,p}} = \frac{1}{T_{i,p}^{OS}} + \frac{1}{T_{i,p}^{IS}},$$

kde $T_{i,p}^{OS}$ je příspěvek od molekul vody z vnější sféry (outer sphere), z blízkého okolí paramagnetického prvku. $T_{i,p}^{IS}$ je od molekul vody z vnitřní sféry (inner sphere), což znamená od molekul vody, které jsou koordinované na paramagnetickém prvku.

$T_{i,p}^{IS}$ závisí na pohyblivosti molekuly kontrastní látky, počtu koordinovaných molekul vody na paramagnetickém iontu, na relaxační době vázané vody a na střední době po kterou je voda vázána k iontu. $T_{i,p}^{OS}$ záleží na dynamice molekul vody, které se nachází v blízkosti iontu, ale nejsou na něm koordinované.

2 Postup měření a použité vzorky

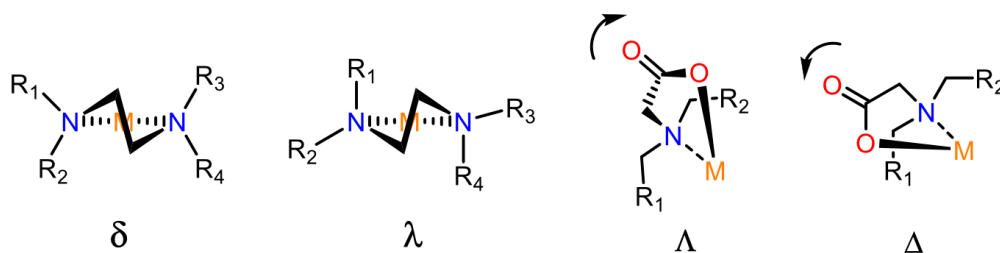
2.1 Použité vzorky



Obrázek 1 Stereoizomery komplexů $M(\text{do3ap}^{\text{OEt}})$, v této práci $M = \text{La}, \text{Ce}$. Vlevo stereoizomery TSA (twisted square antiprism), vpravo SA (square antiprims) [9]

Použité komplexy jsou deriváty ligandu H_4dota s etylfosfonátovou skupinou. Tato skupina se po koordinaci stává chirální a proto má komplex čtyři enantiomery (Obrázek 1), což jsou dvě látky, které mají stejný sumární i strukturální vzorec, ale jejich molekuly jsou zrcadlové obrazy a nelze je ztotožnit. V případě La a Ce vznikají pouze stereoizomery TSA. Tyto komplexy se liší natočením pendantních ramen (Δ a Λ) a konformací kruhů vytvořených koordinací makrocyklu ($\delta\delta\delta\delta$ a $\lambda\lambda\lambda\lambda$) (Obrázek 2) a pozicí etylové skupiny (R a S izomery).

Pozn. v dalších kapitolách užívám označení veličin $T_2^{A,B}$ a $\delta_{A,B}$, ale to není stejné označení jako na obrázku výše (Obrázek 1).



Obrázek 2 Rozdílné konformace pětičlenných kruhů v komplexu $M(\text{do3ap}^{\text{OEt}})$ [10]

Detailnější popis stereoizomerie těchto derivátů je v [9] a [10]. Vzorky pro NMR spektroskopii byly roztoky $\text{La}(\text{do3ap})^{\text{OEt}}$ a $\text{Ce}(\text{do3ap})^{\text{OEt}}$ ve směsi deuterovaného methanolu a těžké vody v objemovém poměru 1:1 (připravili Mgr. Adam Svítok a prof. RNDr. Hermann, Dr. z Přírodovědné fakulty UK). Do obou roztoků bylo dodatečně

přidáno 0,4 mg standardu TMSP, sodné soli kyseliny 3-(trimethylsilyl)propionové, jako reference chemického posuvu.

2.2 Balík Asymexfit

Všechna spektra byla zpracována v programu Matlab pomocí balíku Asymexfit [7]. Tento balík je volně dostupný ke stažení a je určen pro fitování experimentálních spekter s asymetrickou chemickou výměnou. K fitování se používá modifikace funkce $S(\omega)$, kde je přidána fázová korekce nultého řádu (první řád korekce je zanedbatelný vzhledem k fitování úzkého spektrálního rozsahu):

$$S(\omega, \varphi) = \cos(\varphi) \operatorname{Re}[S(\omega)] + \sin(\varphi) \operatorname{Im}[S(\omega)] \quad (31)$$

Plná formule k fitování spektra s N výměnnými singlety a K multiplety je

$$S_{fit}(\omega) = \sum_{n=1}^N S_n(\omega, \varphi) + \sum_{k=1}^K S_k(\omega, \varphi, J) + b_0 + b_1 \omega, \quad (32)$$

kde b_0 a b_1 jsou „baseline“ korekce, J je skalární konstanta nepřímé spin-spinové interakce.

Tvar funkce $S(\omega)$ je platný pro obecnou chemickou výměnu atomů ve dvou polohách, nezávisle na hodnotě populací a příčných relaxačních dob $T_2^{A,B}$. Z počtu parametrů v rovnicích (21) a (22) plyne, že k úspěšnému fitování experimentálních spekter NMR je potřeba snížit počet volných parametrů. Kromě závislostí z (24) a (23) je potřeba ještě určit parametry $T_2^{A,B}$.

Pro spektrum, kde jsou ještě rozlišená dvě maxima, je možné nechat parametry $\omega_{A,B}$ volné. Tato varianta fitu je v asymexfitu k dispozici, dále ji nazývám fit pomalé výměny (nebo značím fit funkcí $S_p(\omega)$).

Po koalescenci (sjednocení obou maxim) je pro získání výsledků nezatížených vysokou korelací fitovaných veličin potřeba zadat i chemické posuvy $\omega_{A,B}$ jako pevné parametry, tuto variantu dále nazývám fitování rychlé výměny (nebo fit funkcí $S_r(\omega)$).

Součástí balíku jsou i další nástroje k fitování Lorentzovou křivkou (11), určení termodynamických konstant nebo odhadu chyb nafitovaných parametrů.

2.3 Výpočet chyb

Celkové nejistoty hodnot k_A a p_A byly pro oba vzorky vypočteny součtem čtverců odchylek způsobených $\delta_{A,B}$ a $T_2^{A,B}$.

Chyby způsobené $\delta_{A,B}$ byly vypočteny pomocí metody *estimateerrors*, která je k dispozici v Balík Asymexfit a která opakuje fitování spektra s různými hodnotami $\delta_{A,B}$ měněnými v rozsahu jejich konfidenčních intervalů. Nejistoty způsobené hodnotami $T_2^{A,B}$ byly určeny tak, že byly fity spekter opakovány s $T_2^{A,B}$ odhadnutými dle Obrázek 9, resp. Obrázek 16, pro teploty o 2 K nižší a vyšší. Jako chybu nafitovaných parametrů způsobenou nejistotou odhadu $T_2^{A,B}$ jsem použil směrodatnou odchylku takto získaných hodnot.

U fitů funkcí $S_p(\omega)$ byly určeny pouze chyby způsobené $T_2^{A,B}$ výše uvedeným postupem.

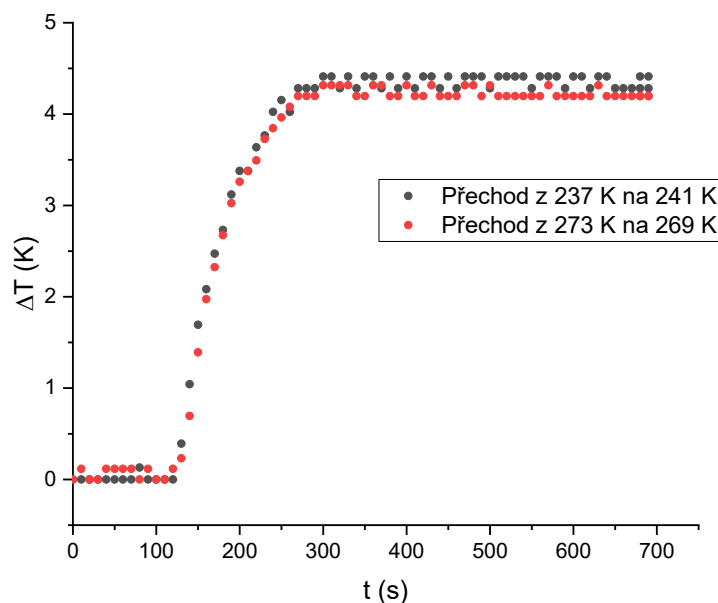
2.4 Nastavení experimentů

Všechna spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance III HD. pomocí dvoukanálové sondy BBFO obsahující ^2H lock. Ke zpracování měření byl použit program TopSpin, fitování spekter následně probíhalo v programu Matlab za použití balíku určeného k analýze nesymetrické chemické výměny (viz Balík Asymexfit). Při všech experimentech bylo použito stejné nastavení teplotní jednotky:

Chlazení BCU: síla chlazení – strong, průtok plynného dusíku – 600 l/h; flush gas flow mode – medium (300 l/h), shim gas flow mode – medium (1200 l/h)

Chemický posuv ^1H byl kalibrován pomocí interního standardu TMSP a reference chemického posuvu ^{31}P byla získána přepočtem vynásobením rezonanční frekvence ^1H faktorem $\Xi = 0,40480742$ odpovídajícím kyselině fosforečné [11].

U všech experimentů byl krok mezi teplotami 2 K. Doba čekání mezi nastavením nové teploty a dalším měřením byla ve všech experimentech minimálně 5 minut (při automatickém měření, při manuálním měření byla delší), což bylo ověřeno jako dostatečné podle časového vývoje spekter methanolu po změně teploty (Obrázek 3).



Obrázek 3 Porovnání změn vypočtených teplot při změně teploty o 4 K při různých počátečních teplotách

Obrázek 3 ukazuje rozdíly počáteční teploty a teploty v čase t , teploty jsou vypočtené pomocí (30). Vypočtené teploty jsou limitovány rozlišením osy chemického posuvu, proto jsou skoky v hodnotách konečné teploty.

Rozsah teplot při měření vzorku s methanolem byl 310 – 232,8 K (Tabulka 2).

Tabulka 2 Měření ^1H spekter methanolu

Pulzní program	zg
Počet skenů	1
AQ	3,27 s

Rozsah teplot při měření vzorku s lanthanem byl 310 – 236 K (Tabulka 3). Rozsah teplot při měření vzorku s cerem byl 310 – 234 K (Tabulka 3). Opakovací doba D1 u ^{31}P spekter byla nastavena tak, aby AQ+D1 bylo alespoň $1,27 T_1$, přičemž T_1 byla změřena metodou inversion recovery.

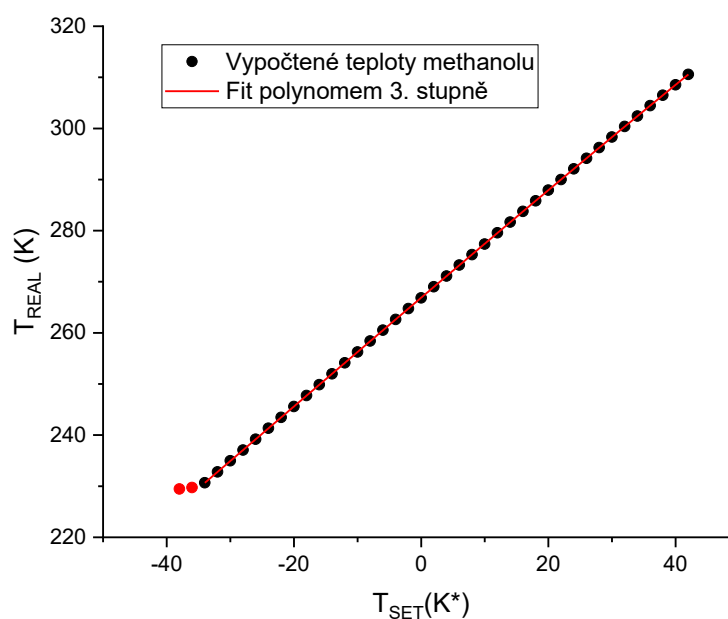
Tabulka 3 Měření spekter $Lado3ap^{OEI}$ (La) a $Cedo3ap^{OEI}$ (Ce)

	La ^1H	La ^{31}P	Ce ^1H	Ce ^{31}P
Pulzní program	zg	zgdc	zg	zgdc
Počet skenů	16	136	16	500
AQ	3,27 s	0,81 s	1,10 s	0,20 s
D1	1,00 s	0,81 s	1,00 s	0,01 s

2.5 Kalibrace teploty

Pro vypočtení T_{REAL} byl použit vzorec (30)(Obrázek 4). Data byla proložena polynomem třetího stupně (Tabulka 5).

Kvůli zmenšení chyby u absolutního členu byla T_{SET} při fitování posunuta o 268 K.



Obrázek 4 Fit závislosti T_{REAL} na T_{SET} proložené polynomem 3. stupně, červené hodnoty nebyly do fitu započteny K^* značí kelvin posunutý o -268 K

Tabulka 4 Tvar fitované funkce a vypočtené parametry z Obrázek 4

Fitovaná závislost:	$T_{REAL} = B_0 + B_1(T_{SET} - 268) + B_2(T_{SET} - 268)^2 + B_3(T_{SET} - 268)^3$			
	B_0	B_1	B_2	B_3
	$266,883 \pm 0,005$	$1,0600 \pm 0,0004$	$(-2,94 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$(-4,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$

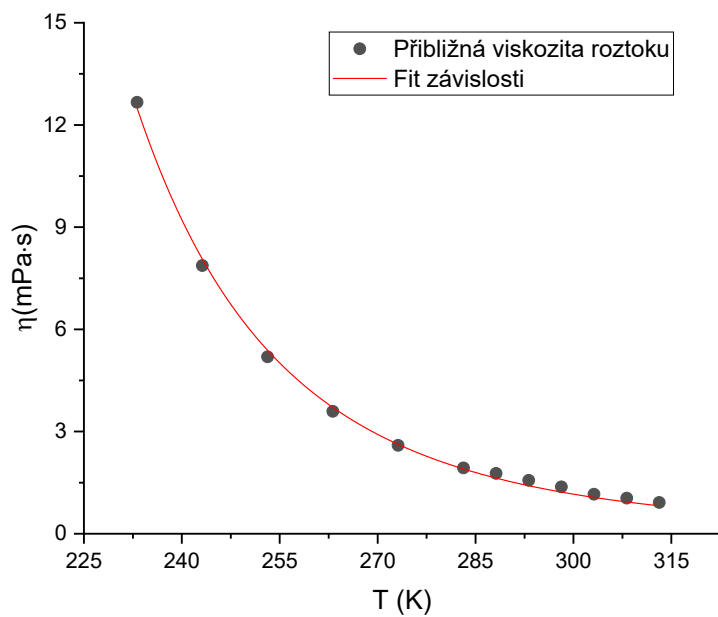
Při teplotách kolem 230 K dochází k zakřivení závislosti. Pro tyto teploty není čekací doba 5 minut při chlazení BCU dostatečná.

2.6 Dynamická viskozita roztoku

Pro vyhodnocení závislosti $T_2^{A,B*}$ na teplotě je potřeba znát i konstanty z rovnice (16) pro dynamickou viskozitu. Byl proveden fit hodnot dynamické viskozity (Obrázek 5) získaných pro směsi vody a methanolu blízké použitému rozpouštědлу (50:50 voda:methanol) z různých zdrojů v širokém teplotním rozsahu (Tabulka 5). V případě, že se koncentrace lišily o více než 2 %, jsem vypočítal aritmetický průměr dvou nejbližších hodnot viskozity η_1 a η_2 . Data byla proložena funkcí (16). Výsledek je na Obrázek 5 a v Tabulka 5.

Tabulka 5 Dynamické viskozity, u hodnoty v {} jsou koncentrace vody v procentech, kterým odpovídá viskozita před závorkou, η_p je zprůměrovaná hodnota z předchozích dvou sloupců

Teplota(K)	η_1 (mPa·s) {c}	η_2 (mPa·s) {c}	η_p (mPa·s)	Zdroj
313,15	0,9438 {58}	0,8887 {43}	0,9	[12]
308,15	1,0987 {58}	0,9867 {43}	1,0	[12]
303,15	1,2317 {58}	1,0845 {44}	1,2	[12]
298,15	1,3737 {52}		1,4	[13]
293,15	1,5656 {52}		1,6	[13]
288,15	1,7712 {52}		1,8	[13]
283,15	1,76 {57}	2,103 {46}	1,9	[14]
273,15	2,32 {57}	2,865 {46}	2,6	[14]
263,15	3,144 {57}	4,043 {46}	3,6	[14]
253,15	4,42 {57}	5,961 {46}	5,2	[14]
243,15	6,478 {57}	9,261 {46}	7,9	[14]
233,15	9,991 {57}	15,34 {46}	13	[14]
223,15	16,46 {57}	27,55 {46}	22	[14]
213,15	29,56 {57}	54,43 {46}	42	[14]
203,15	58,96 {57}	121,8 {46}	90	[14]



Obrázek 5 Fit závislosti dynamické viskozity na teplotě podle (16)

Tabulka 6 Vypočtené parametry závislosti dynamické viskozity (Obrázek 4)

Fitovaná závislost:	$\eta(T) = M \exp\left(\frac{N}{T}\right)$
M (Pa·s)	N (K)
$(2,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$	2480 ± 40

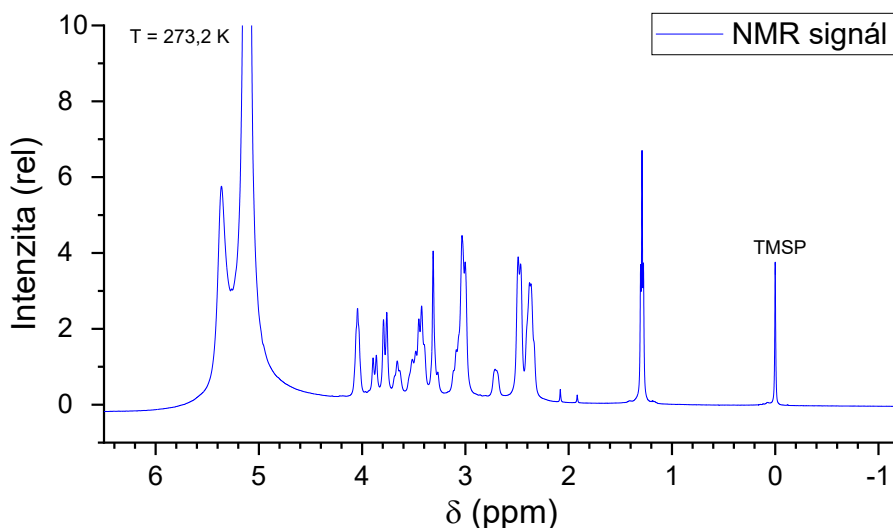
3 Výsledky měření

3.1 Lado3ap^{OEt}

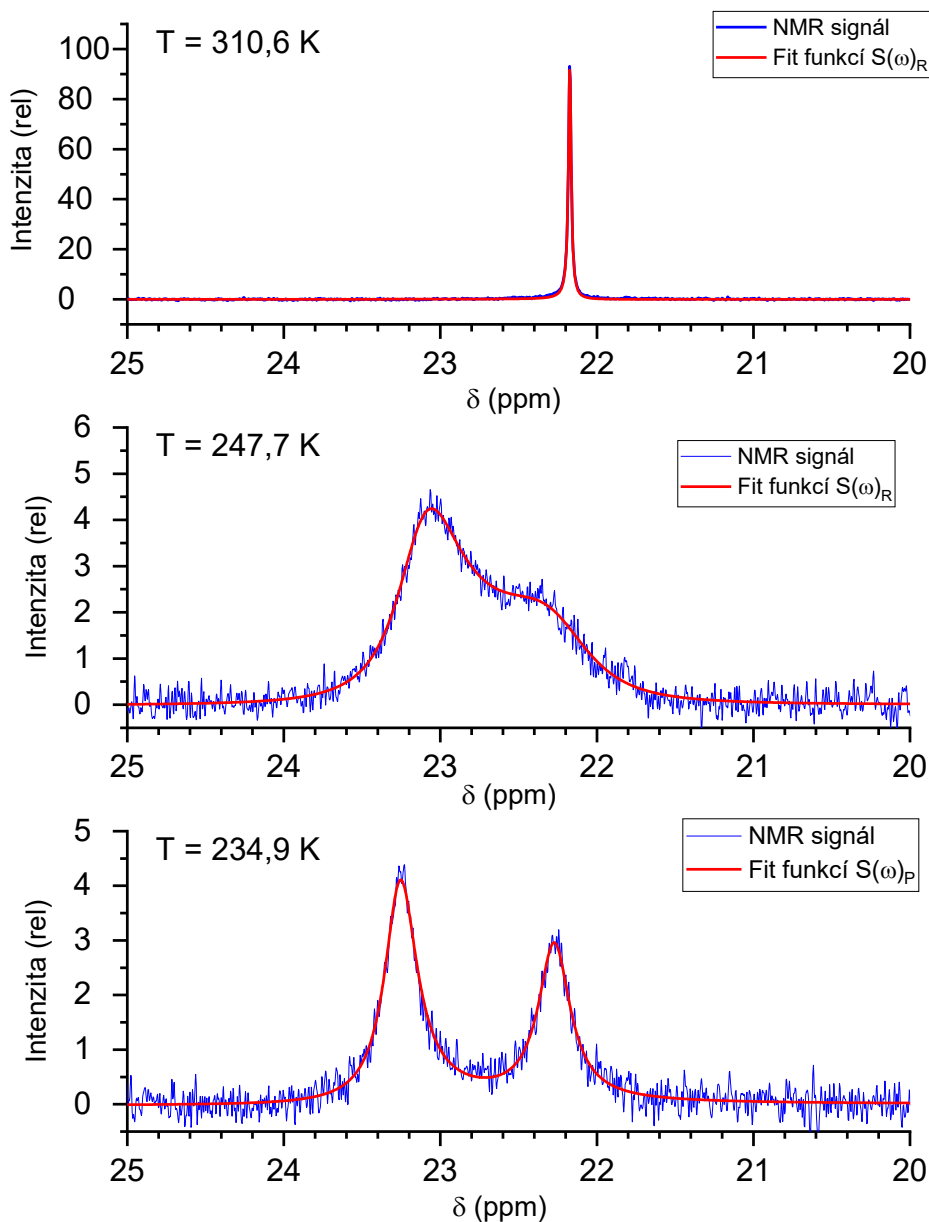
3.1.1 Vodíková a fosforová spektra (Lado3ap^{OEt})

Molekula Lado3ap^{OEt} obsahuje jediný atom fosforu. V NMR spektru ³¹P se však projevuje chemická výměna mezi R a S izomery etylfosfonátu. Charakteristický tvar fosforových spekter se mění v závislosti na teplotě, resp. rychlosti chemické výměny. Při malých hodnotách $k/\Delta\omega$ pozorujeme dobře rozlišená maxima (Obrázek 7, T = 234,9 K), u Lado3ap^{OEt} už jsou spektra rozšířená vlivem chemické výměny. Poté dochází k přibližování obou spektrálních čar a k jejich splnutí (Obrázek 7, T = 247,9 K). Při dalším zvyšování $k/\Delta\omega$ dochází k zužování tohoto maxima (Obrázek 7, T = 310,6 K).

Většina vodíkového spektra (Obrázek 6) nebyla pro naše účely relevantní, proto nebyla provedena identifikace jednotlivých spektrálních čar, jediný potřebný signál byl od TMSP. Ten byl získán porovnáním spekter před a po přidání standardu. Vodíková spektra sloužila k přepočtu chemického posuvu ³¹P pomocí reference na standard TMSP, také se pomocí šířky spektrální čáry TMSP porovnávala homogenita magnetického pole při navazujících měřeních. Chemická výměna z ¹H spekter vyhodnocována nebyla z důvodu četných překrytí rezonančních čar, které neumožňují detailní rozbor.



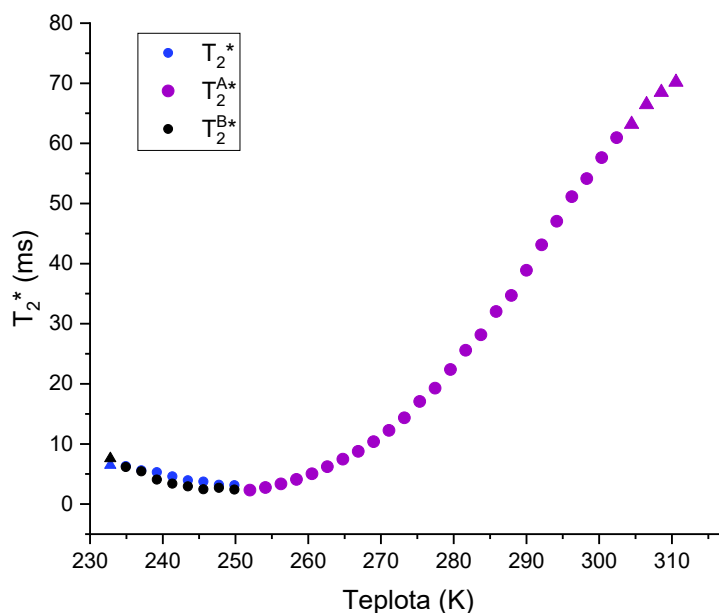
Obrázek 6 Vodíkové spektrum vzorku s lanthanem



Obrázek 7 Fosforová spektra vzorku s lanthanem

3.1.2 Výpočet k_A a p_A

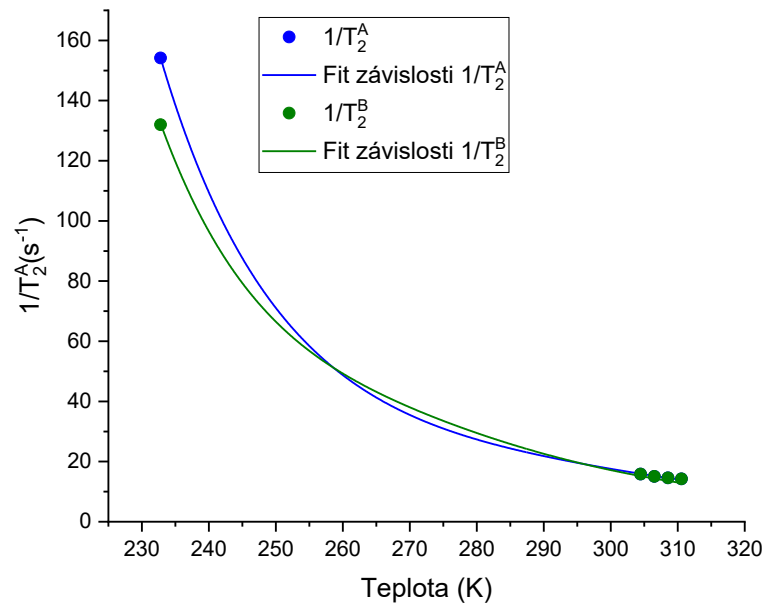
Abychom mohli provést fit spekter pomocí funkce $S_R(\omega)$, bylo potřeba získat závislosti $T_2^{A,B}$ a $\omega_{A,B}$, resp. $\delta_{A,B}$, na teplotě. Spektra ^{31}P byla nejdříve fitována Lorentzovými křivkami (11), z čehož byly získány hodnoty $T_2^{A,B*}$ (Obrázek 8) a chemických posuvů spektrální čáry při rychlé chemické výměně (Obrázek 10).



Obrázek 8 T_2^* v závislosti na teplotě (T_2^* je parametr získaný z fitování spektra Lorenzovou křivkou S_L při dané teplotě), trojúhelníkem jsou označené body použité pro fit

Závislost $T_2^{A,B}$ na teplotě získáme složením rovnic (14), (15) a (16). Volné parametry pro fitování byly a a b (resp. byla použita substituce $4\pi a^3 = 3V$).

Nejdříve bylo potřeba zjistit (nebo alespoň odhadnout) krajní hodnoty $T_2^{A,B}$. Závislost $T_2^{A,B*}$ je ovlivněna chemickou výměnou. Navíc po splnutí obou maxim nemáme možnost určit jednotlivé pološířky. Pro fit $T_2^{A,B}$ byly proto použity odhady ze závislosti pološířky. Jako spodní odhad (při nejnižších teplotách) byly pro $T_2^{A,B}$ použity hodnoty $T_2^{A,B*}$. Jako horní odhad hodnot při nejvyšších naměřených teplotách byly pro obě relaxační doby $T_2^{A,B}$ použity stejné hodnoty, a to T_2^* při nejvyšších čtyřech teplotách. Tyto body byly za použití viskozity rozpouštědla (Tabulka 5) proloženy funkcí (14) popisující teplotní závislost příčné relaxační doby (Obrázek 9, Tabulka 7). Získané parametry byly dále použity pro výpočet $T_2^{A,B}$ při fitování ^{31}P spekter tvarem čáry při chemické výměně.

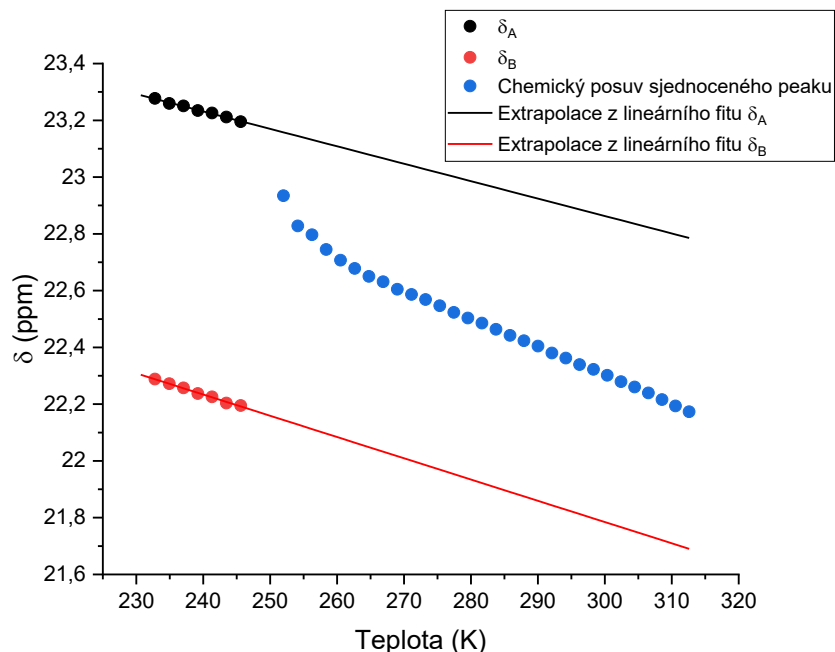


Obrázek 9 Fit závislosti $T_2^{A,B}$ funkcí získanou složením rovnic (14), (15) a (16). Předpis pro dynamickou viskozitu je z předcházejícího grafu (Obrázek 5)

Tabulka 7 Vypočtené parametry z fitů závislosti $T_2^{A,B}(T)$ (Obrázek 9)

V_A (m ³)	b_A (T)
$(4,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-27}$	$(3,43 \pm 0,06) \cdot 10^{-4}$
V_B (m ³)	b_B (T)
$(2,2 \pm 9) \cdot 10^{-27}$	$(4,7 \pm 9) \cdot 10^{-4}$

Následně byl proveden fit spekter funkcí pro pomalou výměnu $S_p(\omega)$ (Balík Asymexfit). Pro výpočet $T_2^{A,B}$ byla použita závislost s parametry z předchozího fitu (Tabulka 7). Takto byla zpracována spektra až do teploty 245,6 K, která je poslední s rozlišitelnými maximy. Získaná závislost $\omega_{A,B}$, resp. $\delta_{A,B}$, je na Obrázek 10.



Obrázek 10 δ_A a δ_B získané z fitu funkcí $S_P(\omega)$ a jejich lineární extrapolace

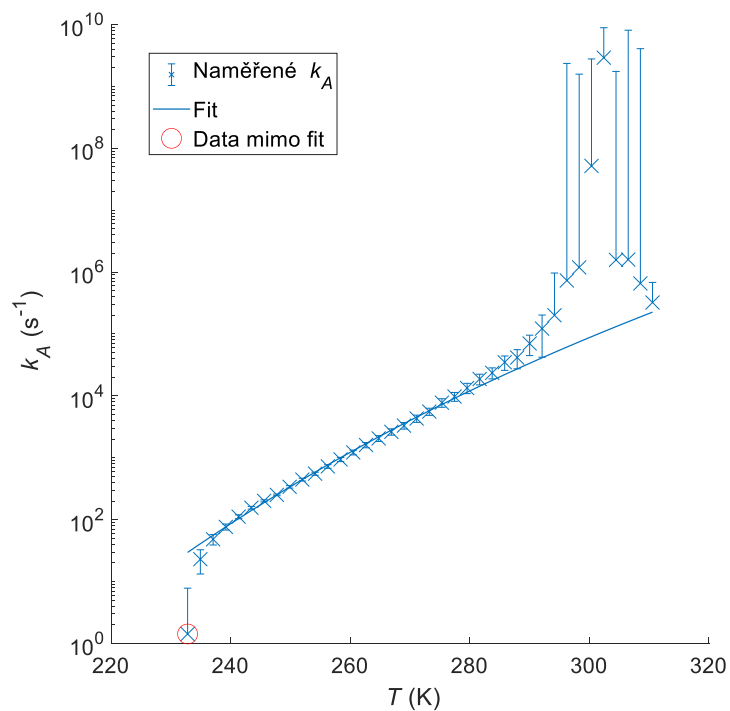
Dále byl proveden fit ostatních spekter pomocí funkce pro rychlou výměnu $S_R(\omega)$ (Balík Asymexfit). Pro $T_2^{A,B}$ byly použity stejné závislosti jako u $S_P(\omega)$. Hodnoty $\delta_{A,B}$ byly vypočteny extrapolací lineárního fitu (Obrázek 10), jejich hodnoty při nejvyšších teplotách nelze experimentálně zjistit, tudíž nemáme k dispozici ani žádný jejich odhad.

Takto byly získány hodnoty k_A a p_A pro všechna spektra po koalescenci obou maxim.

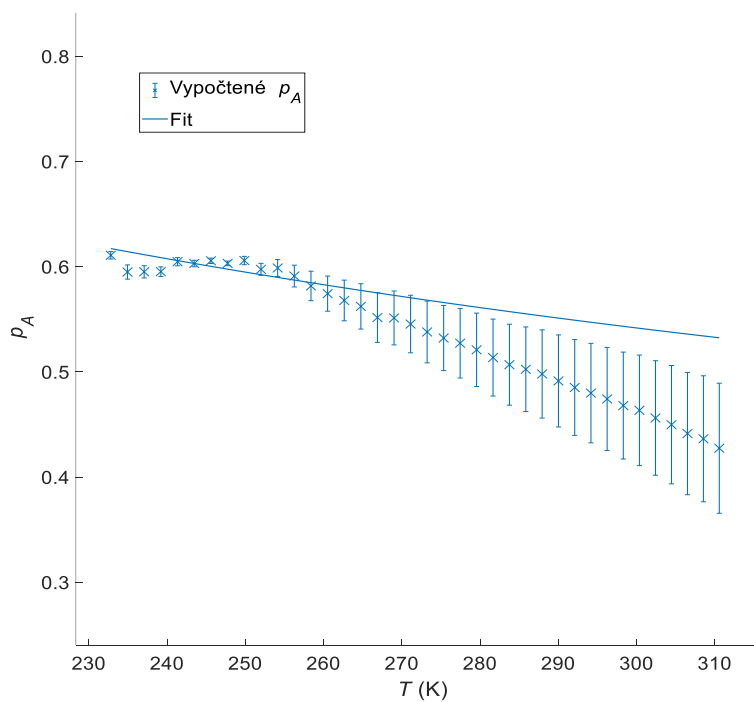
Tabulka 8 Aktivační entropie a entalpie vypočtené z fitu k_A (Obrázek 11) a p_A (Obrázek 12)

Hodnoty z fitu k_A		
ΔS^\ddagger (J/mol/K)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔG_{310}^\ddagger (J/mol)
72 ± 4	$66,8 \pm 0,9$	$(4,4 \pm 0,2)10^4$
Hodnoty z fitu p_A		
ΔS (J/mol/K)	ΔH (kJ/mol)	ΔG_{310} (J/mol)
-7 ± 1	$-2,6 \pm 0,3$	$(-3,6 \pm 0,8)10^3$

Rychlostní konstanty k_A a populace p_A získané ze všech spekter (i z obou funkcí $S_{P,R}(\omega)$) byly nakonec vykresleny v závislosti na teplotě (Obrázek 12, Obrázek 11) a proloženy v Matlabu fity z (25)-(29), které jsou také k dispozici v balíku Asymexfit. Tabulka 8 obsahuje aktivační entropie, entalpie a Gibbsovy energie.



Obrázek 11 Vypočtené k_A a jejich fit podle (25)

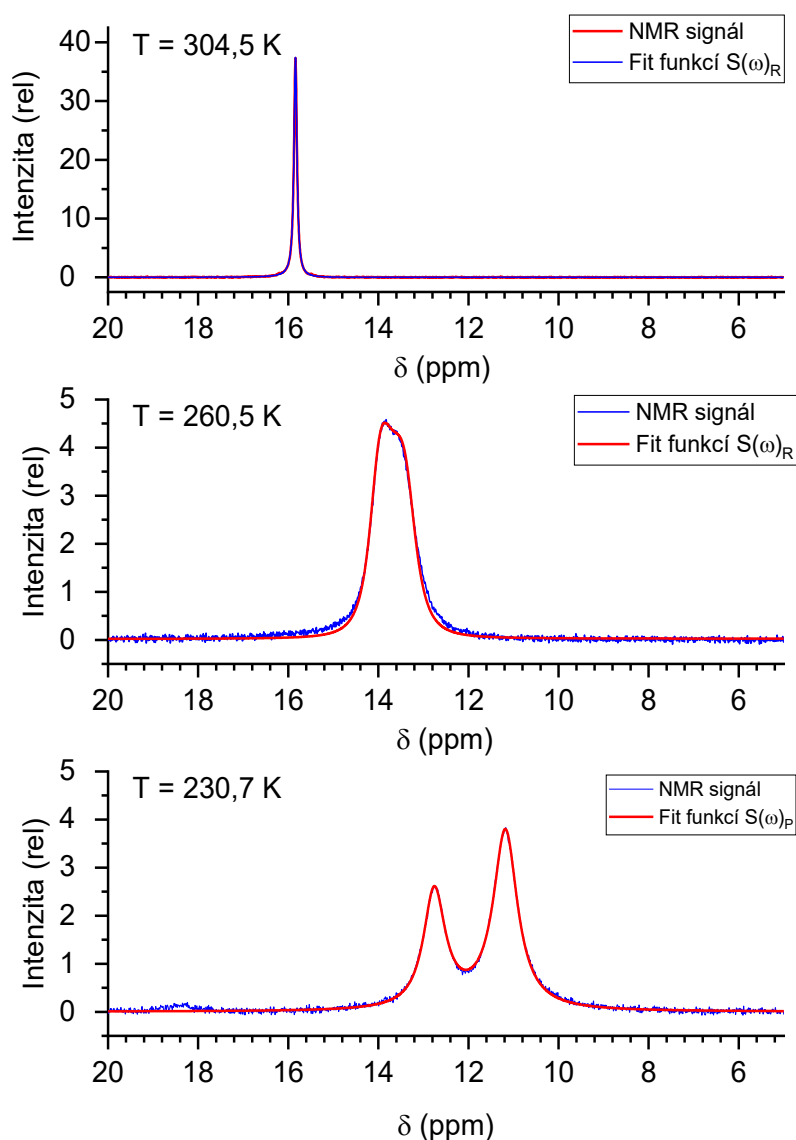


Obrázek 12 Populace p_A a její fit podle (29) a(28)

3.2 Cedo3ap^{OEt}

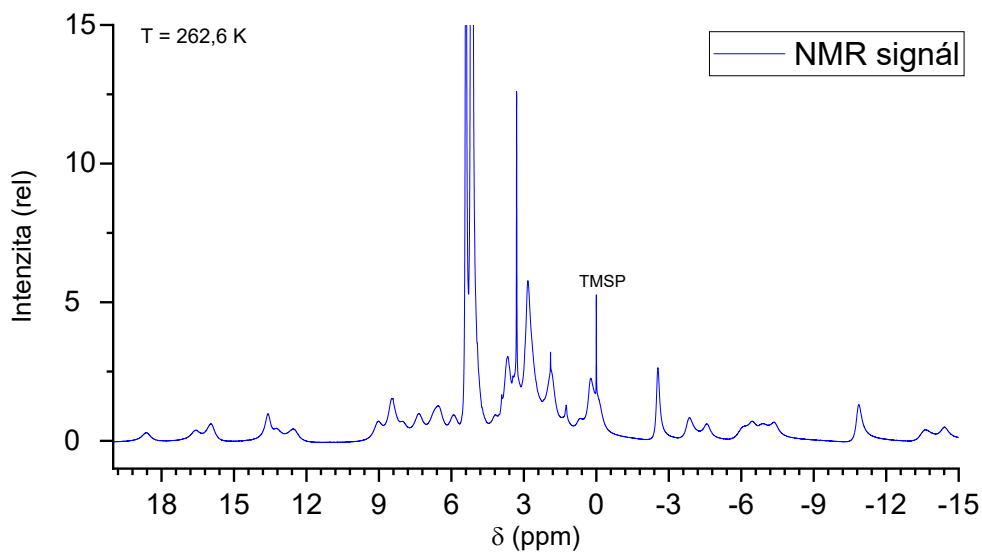
3.2.1 Vodíková a fosforová spektra (Cedo3ap^{OEt})

Fosforová spektra vzorku s cerem mají velmi podobný průběh jako ta s lanthanem. Pouze chemická výměna začíná probíhat až při vyšších teplotách, což je dobře vidět z porovnání závislosti T_2^* obou vzorků (Obrázek 8, Obrázek 16). Z porovnání spekter vzorku s lanthanem (Obrázek 7) a s cerem (Obrázek 13) je zřejmá nižší úroveň šumu u vzorku s cerem, což je způsobeno vyšším počtem skenů. Doba měření jednoho spektra byla u obou vzorků velmi podobná, ale paramagnetický cer zkracuje podélné relaxační doby jader (proto je potenciální kontrastní látkou), což umožnilo kratší opakovací čas D1 (Tabulka 3).



Obrázek 13 Fosforové spektrum vzorku s cerem

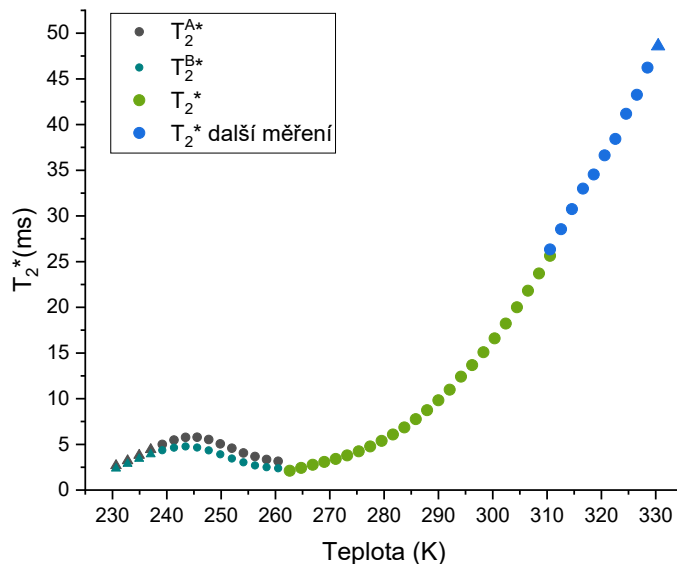
Vodíkové spektrum (Obrázek 14) opět sloužilo hlavně k přepočtu chemického posuvu ^{31}P pomocí reference na standard TMS^P. Díky paramagnetismu ceru je vodíkové spektrum širší a složitější.



Obrázek 14 Vodíkové spektrum vzorku s cerem

3.2.2 Výpočet k_A a p_A

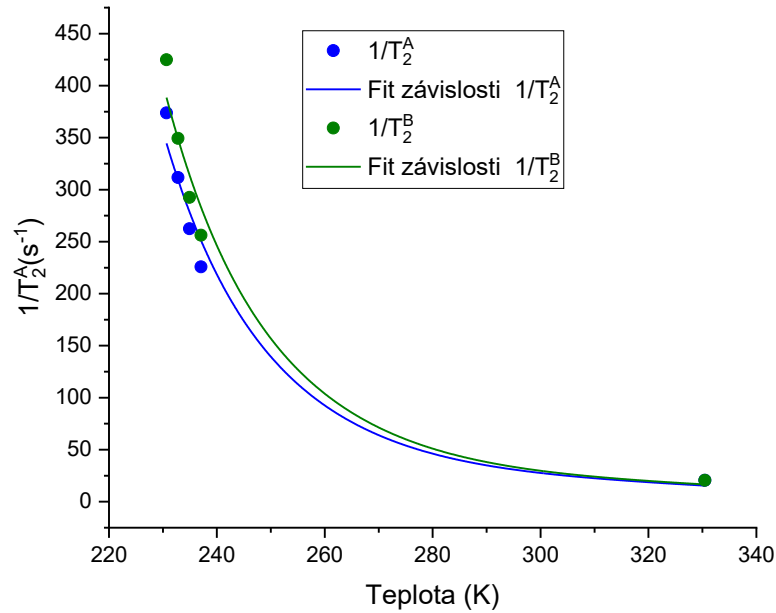
Všechna spektra byla opět nejdříve zpracovaná fitem Lorenzovou křivkou (11), ze kterých byl získán průběh $T_2^{A,B*}$ (Obrázek 15) a chemických posuvů spektrální čáry při rychlé chemické výměně (Obrázek 17).



Obrázek 15 Závislost T_2^* na teplotě pro vzorek s koordinovaným cerem, trojúhelníky jsou označeny hodnoty použité pro odhad T_2^A

U $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$ máme při nízkých teplotách (kolem 230 K) k dispozici lepší spodní odhad $T_2^{A,B}$. Spektra nejsou tolik rozšířená působením chemické výměny, tudíž

jsou T_2^A a T_2^{A*} téměř stejné, proto bylo při fitování $T_2^{A,B}$ (Obrázek 16) použito více hodnot u nízkých teplot. Pro horní odhad $T_2^{A,B}$ byla použita T_2^* získaná při nejvyšší teplotě.

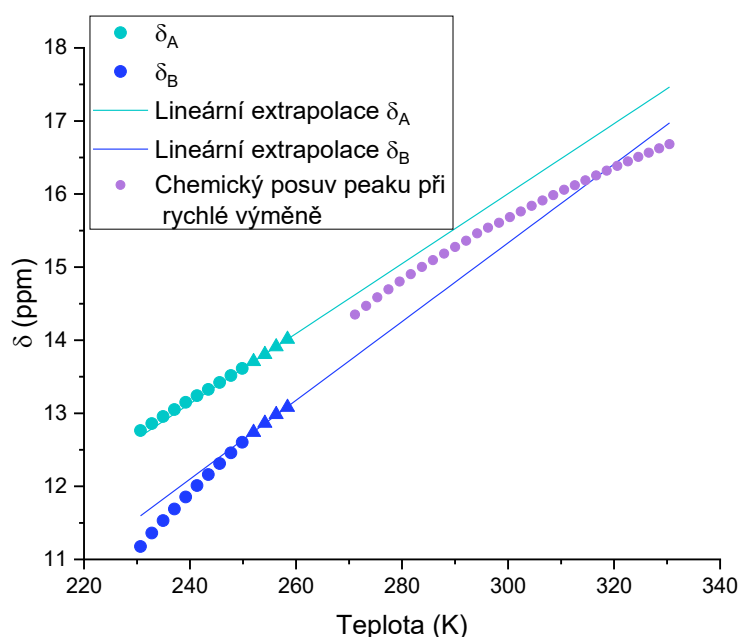


Obrázek 16 Fit závislosti T_2^{A*} funkcí získanou složením rovnic (14), (15), (16). Konstanty pro výpočet dynamické viskozity jsou z Tabulka 6

Tabulka 9 Vypočtené parametry závislosti $T_2^{A,B}(T)$

V_A (m ³)	b_A (T)
$(1,0 \pm 6) \cdot 10^{-27}$	$(3,3 \pm 10) \cdot 10^{-4}$
V_B (m ³)	b_B (T)
$(1,2 \pm 7) \cdot 10^{-27}$	$(3,3 \pm 9) \cdot 10^{-4}$

Analogicky jako u předchozího vzorku byly naitována spektra funkcí $S_p(\omega)$, abychom mohli extrapolovat δ_A a δ_B .



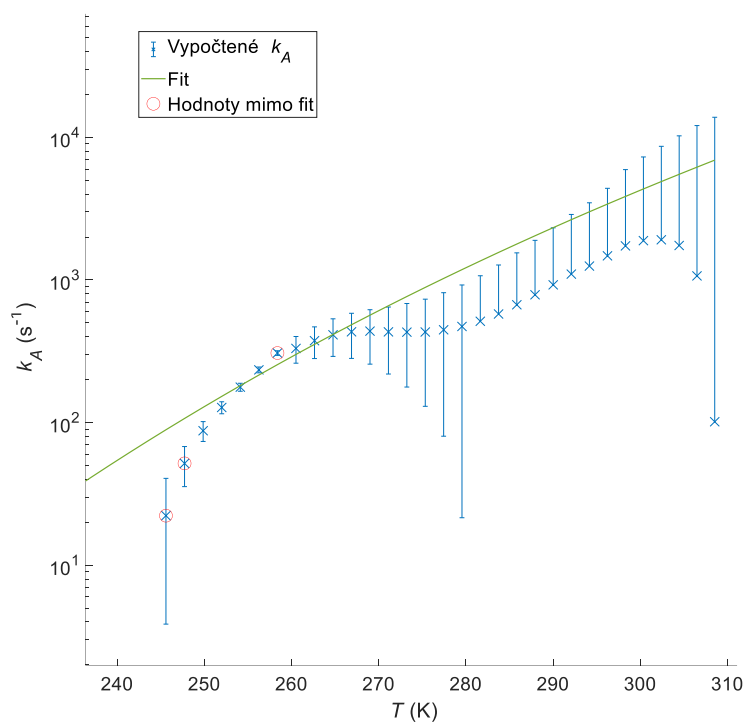
Obrázek 17 δ_A a δ_B získané z fitu spekter funkcí S_p , jejich lineární fit a následná extrapolace jsou pouze z posledních 4 bodů (trojúhelníků)

Získané závislosti $T_2^{A,B}$ (Obrázek 16, Tabulka 9) a $\delta_{A,B}$ (Obrázek 17) byly použity při zpracování spekter pro teploty vyšší než 260,5 K pomocí $S_R(\omega)$. Tím byly získány hodnoty k_A a p_A . Chyby byly vypočteny stejně jako u předchozího vzorku (Výpočet chyb).

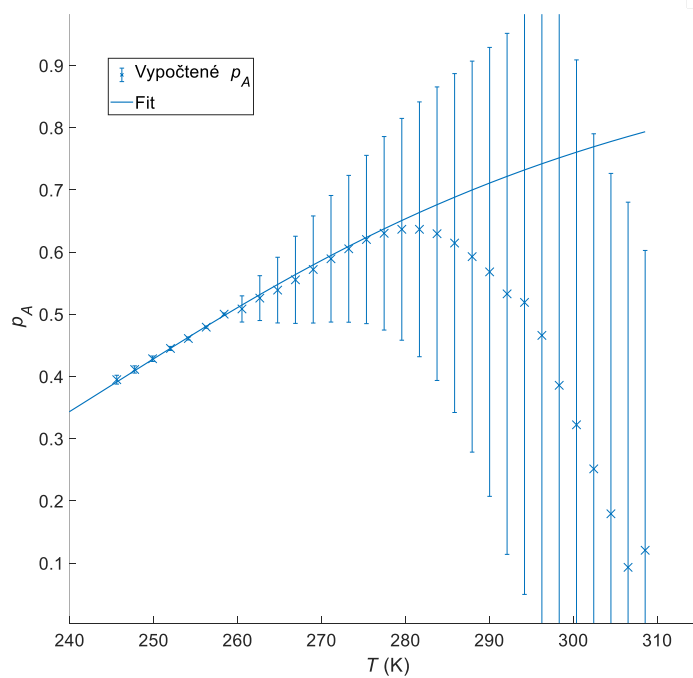
Tabulka 10 Vypočtené konstanty z fitů k_A (viz Obrázek 18) a p_A (viz Obrázek 19)

Hodnoty z fitu k_A		
ΔS^\ddagger (J/mol/K)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔG_{310}^\ddagger (J/mol)
-38 ± 9	41 ± 2	$(5,3 \pm 0,5)10^4$
Hodnoty z fitu p_A		
ΔS (J/mol/K)	ΔH (kJ/mol)	ΔG_{310} (J/mol)
69 ± 3	$17,9 \pm 0,7$	$(-3,5 \pm 1,5)10^3$

Rychlostní konstanty k_A (Obrázek 18) a populace p_A (Obrázek 19) získané ze všech spekter (i z obou funkcí $S_{P,R}(\omega)$) byly zpracovány stejně jako u vzorku Lado3ap^{OEt}. Tabulka 10 obsahuje vypočtené aktivační entropie, entalpie a Gibbsovy energie z fitu k_A . Rozdíly entropií, entapií a Gibbsovy energií jsou z fitu p_A .



Obrázek 18 Závislost k_A na teplotě a její fit podle (25)



Obrázek 19 Vypočtené hodnoty p_A a fit podle (29) a(28)

4 Diskuze

U obou vzorků vnášejí do výsledných k_A a p_A chyby závislostí $T_2^{A,B}$ a extrapolace $\delta_{A,B}$. Pravděpodobně větší chyby se dopouštíme lineární extrapolací $\delta_{A,B}$. Při nejvyšších teplotách nelze experimentálně ověřit jejich hodnoty, tudíž nezbyvá jiná možnost, než je extrapolovat. Možný způsob jejich ověření by bylo provedení kvantově chemických výpočtů, ze kterých bychom získali populace obou diastereoizomerů.

4.1 *Lado3ap*^{OEt}

Pološířka spektrálních čar, ze které se určuje $T_2^{A,B}$, je i při nejnižších naměřených teplotách ovlivněná chemickou výměnou. To by se dalo vyřešit naměřením spekter při nižších teplotách, což by vyžadovalo chlazení na nižší teplotu (např. pomocí kapalného dusíku). Hrozí však zamrznutí roztoku, čímž je teplotní rozsah omezen.

Odhad $T_2^{A,B}$ při nejvyšších teplotách byl nezbytný, protože jeho závislost na teplotě není lineární, tudíž by extrapolace rovnice (14) bez něj byla velmi nepřesná. I s hrubým odhadem však dostáváme parametry z fitu (Obrázek 9) s velkými chybami (Tabulka 7, malá odchylka V_A je čistě náhodná), jelikož jsou tyto parametry korelované. I přesto velikost a i b řádově odpovídá očekávaným hodnotám (velikost a z V_B vychází 2,1 nm).

Odůvodnění toho, že by T_2^* při nejvyšších naměřených teplotách měla sloužit jako přibližný odhad, je následující. Jelikož jsou obě $T_2^{A,B}$ relaxační doby pro jeden prvek v jedné molekule pouze v různých konformacích, tak by měly být přibližně stejné, takže pro zjednodušení předpokládáme jejich rovnost při nejvyšších naměřených teplotách. Dále v limitě $k \rightarrow \infty$ dostaneme z (21), že šířka spektra závisí už jen na $T_2^{A,B}$ a to vztahem:

$$\frac{2}{T_2^*} = \frac{2(p_A T_2^B + p_B T_2^A)}{T_2^B T_2^A}, \quad (33)$$

z čehož plyne po dosazení $T_2^A = T_2^B$, rovnost $T_2^* = T_2^A$ nezávisle na populacích $p_{A,B}$. Tedy nejlepší horní odhad pro T_2^A je T_2^* při nejvyšší naměřené teplotě.

U vzorku s lanthanem (Obrázek 8) pozorujeme změnu derivace T_2^* kolem 305 K, což by mohlo být způsobeno saturací vlivu chemické výměny na pološířku. Pro obě zkoumané molekuly byla provedena dodatečná měření pro teploty větší než 310 K (viz Obrázek 15). Kvůli velkému vlivu nastavení homogenity magnetického pole na pološířku se však již nedaly hodnoty z těchto dodatečných měření použít pro doplnění závislosti na Obrázek 8. Chyba u určení populací je způsobena téměř výhradně extrapolací $\delta_{A,B}$. Největší příspěvek od $T_2^{A,B}$ je u výpočtu $\delta_{A,B}$ z $S_P(\omega)$ (i tato nejistota je ale zanedbatelná), vliv $T_2^{A,B}$ na populace při fitování funkcí $S_R(\omega)$ je ještě menší.

Při výpočtu odchylek k_A musíme počítat oba příspěvky. Pro teploty 240 – 290 K převažuje vliv nejistoty $\delta_{A,B}$. Pro teploty vyšší než 290 K rychle roste chyba způsobená $T_2^{A,B}$. Když se totiž pološířka spektrální křivky blíží hornímu odhadu z T_2^* , roste k_A nade všechny meze.

Fit závislosti k_A na teplotě (Obrázek 11) odpovídá naměřeným hodnotám poměrně dobře. U teplot přes 300 K dochází k odklonu naměřených dat, tyto hodnoty ale kvůli velkým nejistotám téměř fit neovlivňují. Jediný bod ležící mimo fit (mimo rámeček

odchylek) je při nejmenší teplotě, protože chyba způsobená $T_2^{A,B}$ je zde nejspíš podhodnocená (čím blíže k teplotám, při kterých jsme použili $T_2^{A,B*}$ jako odhad, tím větší je chyba).

Fit závislosti p_A (Obrázek 12) nevystihuje teoretický model a není tak věrně dobrý jako pro k_A . To jsme očekávali vzhledem k dlouhé obtížné extrapolaci chemických posuvů, na kterých jsou obě populace závislé.

4.2 Cedo3ap^{OEt}

Výsledky měření vzorku s cerem jsou daleko více ovlivněné výpočtem $\delta_{A,B}$ z fitu spekter funkcí $S_p(\omega)$. Pokud bychom provedli lineární extrapolaci ze všech získaných $\delta_{A,B}$ došlo by k jejich zkřížení. Pokud by opravdu docházelo k překřížení museli bychom ale pozorovat výrazné zúžení (zvětšení T_2^*) při teplotě křížení $\delta_{A,B}$ a to se neděje (Obrázek 15). Pološířka totiž závisí na zlomku $k/\Delta\omega$, který pro $\delta_A = \delta_B$ diverguje, což by mělo za následek zúžení spektrální křivky. Z toho lze usoudit, že u ceru nejspíš není závislost $\delta_{A,B}$ zcela lineární. Lineární závislost chemických posuvů je čistě empirická (žádný teoretický předpis zatím není) a nemáme k dispozici žádné odhady $\delta_{A,B}$ při nejvyšších teplotách, proto nezbyvá lepší varianta než lineární fit. Musíme použít jenom body blíže k teplotě, při které dochází ke koalescenci (260,5 K), abychom se vyhnuli tomu, že se chemický posuv píku při vysokých teplotách dostává mimo výseč extrapolovaných bodů (Obrázek 17). Proto byly k extrapolaci použity jenom poslední 4 body před úplným splynutím spektrálních čar. Toto je také příčinou velké chyby, která je vidět v grafech k_A i p_A pro cer (Obrázek 18, Obrázek 19).

Odhady $T_2^{A,B}$ u spodních teplot jsou přesnější než u lanthanu, proto byly použity 4 hodnoty $T_2^{A,B*}$. U nejvyšších teplot nepozorujeme podobnou změnu závislosti jako u lanthanu (Obrázek 8, Obrázek 15), proto byla jako odhad $T_2^{A,B}$ použita jen poslední hodnota T_2^* (předpoklady pro tento odhad jsou stejné jako u vzorku s lanthanem). Pro zpřesnění závislosti $T_2^{A,B}$ na teplotě by bylo potřeba naměřit ještě větší rozsah teplot v obou směrech. Navíc by bylo potřeba použít přesnější vzorec než (14), protože je cer paramagnetický.

Jak už bylo zmíněno, závislost $T_2^{A,B}$ ale nezpůsobuje u toto vzorku takovou chybu v porovnání s lineární extrapolací $\delta_{A,B}$.

Hodnoty vypočtené pomocí fitů závislostí k_A i p_A (Tabulka 10, Obrázek 18, Obrázek 19) se odvíjí hlavně z k_A , resp. p_A , získaných z $S_p(\omega)$, kde se ještě chyba způsobená extrapolací $\delta_{A,B}$ není.

Závislost k_A má netypický charakter. Mezi teplotami 265 – 275 K dochází ke zpomalení růstu k_A a její stagnaci. Při těchto teplotách ještě chyba způsobená extrapolací $\delta_{A,B}$ není tak velká. Tento průběh nejspíš souvisí s příliš velkým zjednodušením závislosti $T_2^{A,B}$ pro paramagnetický cer.

Pro přesnější určení k_A i p_A by bylo potřeba získat informaci o populacích při vyšších teplotách, tím by se snížila nejistota způsobená lineární extrapolací chemických posuvů. Pro další zpřesnění by bylo potřeba naměřit spektra v ještě větším rozsahu teplot (pro získání lepších odhadů $T_2^{A,B}$ z pološířky spekter) a použití přesnější závislosti (14). Rychlostní konstanty v případě pomalé výměny by se rovněž daly získat pomocí EXSY experimentů. U rychlé výměny by se dalo uvažovat o vyhodnocení disperze T_2 v závislosti na echočase v CPMG experimentu. To jsou však měření nad rámec této bakalářské práce.

4.3 Porovnání s dalšími pracemi

V diplomové práci Mgr. Adama Svítoka [10] byly určeny rychlostní konstanty fosfo(i)natových rotací u komplexů podobných tomu studovanému v této práci (Tabulka 11). Data pro $[\text{Eu}(\text{do3ap}^{\text{OEt}})(\text{H}_2\text{O})]^-$ (fosfonát) jsou získaná ze spekter 2D $^1\text{H} - \text{H}$ EXSY a pro $[\text{Eu}(\text{do3ap}^{\text{Me}})(\text{H}_2\text{O})]^-$ (fosfinát) ze spekter 1D ^1H EXSY. Porovnáním vidíme, že rychlostní konstanta u komplexů Eu je o 2 – 3 řády menší než u všech molekul v Tabulka 12 při stejné teplotě. Pro komplexy s iontem Eu totiž existují i izomery SA (Obrázek 1) a jsou pro ně energeticky dostupnější chemické výměny mezi izomery TSA a SA. Také byla pozorována tendence ke zpomalování rychlosti výměny se zmenšujícím se iontem koordinovaným v komplexu [10].

Tabulka 11 Rychlostní konstanty z [10] v s^{-1} měřené při teplotě 278 K

Izomerace	$[\text{Eu}(\text{do3ap}^{\text{OEt}})(\text{H}_2\text{O})]^-$	$[\text{Eu}(\text{do3ap}^{\text{Me}})(\text{H}_2\text{O})]^-$
TSA-A→TSA-B	$1,6 \pm 0,2$	13 ± 1
TSA-B→TSA-A	$2,2 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$

V SFG projektu A. Suché [15] byly vypočteny rychlostní konstanty už ve větším teplotním rozsahu pro komplex $\text{Lado3ap}^{\text{ABn}}$ (Tabulka 12, k porovnání jsem vzal pouze teploty, u kterých je přiměřená chyba), analýza chemické výměny byla v projektu provedena pomocí balíku Asymexfit a fitu ^{31}P spekter. V této tabulce jsou uvedeny hodnoty k_B , které jsme my nedopočítávali, odlišné od k_A v důsledku vyššího rozdílu populací obou stavů v [15] než u vzorků v této práci. Při uvážení rovnice (24) a námi vypočtených populací p_A (Obrázek 12), které jsou blízké hodnotě 1/2, jsou $k_{A,B}$ u $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ řádově stejné, u $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$ jsou v oblasti s rozumnými chybami p_A také řádově stejné. Z porovnání vidíme, že rotace fosfonátu je u vzorku $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ rychlejší než u $\text{Lado3ap}^{\text{ABn}}$ a opět pozorujeme menší rychlostní konstanty u komplexu $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$ s menším iontem.

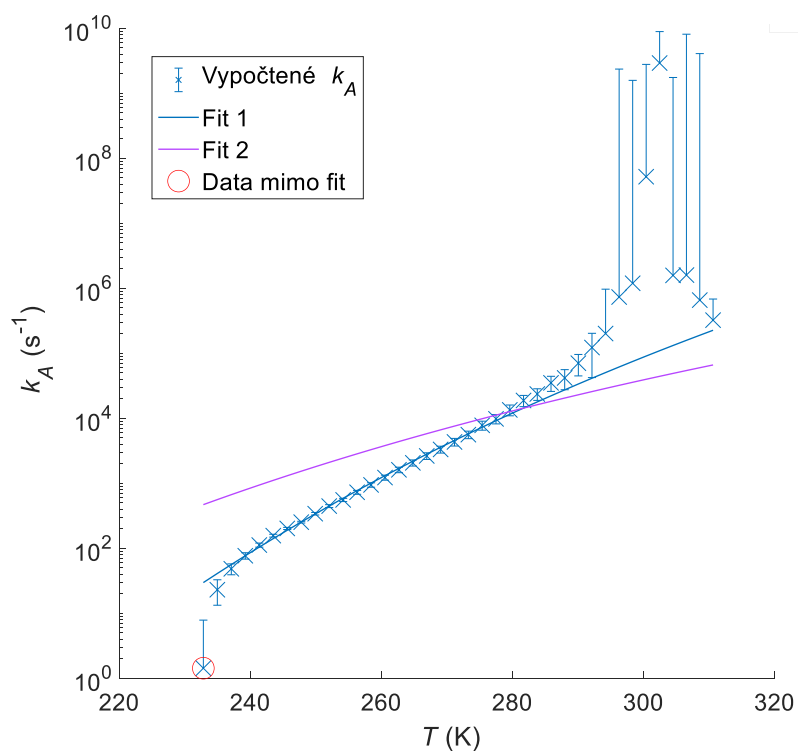
Tabulka 12 Porovnání rychlostních konstant z [15] a této práce (hodnoty označené ## byly příliš malé pro výpočet naší metodou)

T (K)	$\text{Lado3ap}^{\text{ABn}}$		T (K)	$\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$	$\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$
	k_A (s^{-1})	k_B (s^{-1})		k_A (s^{-1})	k_A (s^{-1})
238	4,5	18	239,2	85 ± 9	##
248	39	180	247,7	258 ± 8	52 ± 16
258	330	2000	258,4	$(9,4 \pm 0,7) 10^2$	$(3,1 \pm 0,1) 10^2$
268	540	6000	269,0	$(3,3 \pm 0,2) 10^3$	$(4 \pm 2) 10^2$
278	800	7400	277,4	$(9,7 \pm 1,5) 10^3$	$(4 \pm 4) 10^2$
288	2100	9400	287,9	$(41 \pm 14) 10^4$	$(8 \pm 11) 10^2$

V diplomové práci Mgr. Adama Svítoka byly také vypočteny pro $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ i $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$ termochemické konstanty fosfonátové rotace (Tabulka 13) stejnou metodou jako v této práci, ale ze spekter ^{17}O . U $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$ se hodnoty v rámci chyb shodují. Naopak u $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ jsou velké rozdíly v ΔS^\ddagger a ΔH^\ddagger (Tabulka 13, Obrázek 20), ΔG_{298}^\ddagger se v rámci chyb shodují. Rozdíly mohou být způsobené příliš velkým odhadem $T_2^{A,B}$ při vysokých teplotách, nebo vysokou vzájemnou korelací entalpie a entropie při fitování. Pokud by ale byla kladná aktivační entropie skutečně kladná, mohlo by to znamenat, že při výměně dochází k dekoordinaci molekuly vody koordinované na iontu La [10].

Tabulka 13 Porovnání termochemických veličin

	Adam Svítok [10]		Tato práce	
	Lado3ap ^{OEt}	Cedo3ap ^{OEt}	Lado3ap ^{OEt}	Cedo3ap ^{OEt}
ΔS^\ddagger (J/mol/K)	-37 ± 6	-33 ± 4	72 ± 4	-38 ± 9
ΔH^\ddagger (kJ/mol)	36 ± 2	40 ± 2	$66,8 \pm 0,9$	41 ± 2
ΔG_{298}^\ddagger (kJ/mol)	48 ± 4	50 ± 3	45 ± 2	52 ± 5



Obrázek 20 Porovnání Fitu 1 z této práce a Fitu 2, který byl zakreslen dosazením termochemických konstant z [10]

Závěr

Byla naměřena vodíková a fosforová spektra Lado3ap^{OEt} a Cedo3ap^{OEt} v rozsahu teplot 232–310 K, resp. 230–330 K. Pro přesné určení teploty byla provedena kalibrace methanolem. Analýzou spektrálních čar ³¹P NMR byla vyhodnocena chemická výměna mezi dvěma konformacemi Lado3ap^{OEt}, resp. Cedo3ap^{OEt}, což vedlo k získání hodnot rychlostí výměny k_A a relativních populací obou diastereoizomerů p_A .

Pro vypočtení k_A a p_A bylo nutné odhadnout $T_2^{A,B}$ při všech teplotách a také chemické posuvy obou stavů $\delta_{A,B}$. Extrapolaci z experimentálně dostupných hodnot byla věnována zvláštní pozornost za využití teoretického modelu pro relaxační doby, neboť na ní silně závisí výsledné hodnoty k_A a p_A . Ze závislosti k_A a p_A na teplotě byly dalším fitováním v Matlabu získány termodynamické veličiny charakterizující fosfonátovou rotaci.

Seznam použité literatury

- [1] A. L. Stanescu *et al.*, „Brain tissue gadolinium retention in pediatric patients after contrast-enhanced magnetic resonance exams: pathological confirmation", *Pediatr. Radiol.*, roč. 50, č. 3, s. 388–396, bře. 2020, doi: 10.1007/s00247-019-04535-w.
- [2] M. Bottrill, L. Kwok, a N. J. Long, „Lanthanides in magnetic resonance imaging", *Chem Soc Rev*, roč. 35, č. 6, s. 557–571, 2006, doi: 10.1039/B516376P.
- [3] V. C. Pierre a M. J. Allen, Ed., „Gadolinium-based Contrast Agents", in *Contrast Agents for MRI: Experimental Methods*, The Royal Society of Chemistry, 2017. doi: 10.1039/9781788010146-FP007.
- [4] M. H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, 2. vyd., roč. 2008. John Wiley & Sons, Ltd.
- [5] F. Bloch, „Nuclear Induction", *Phys Rev*, roč. 70, č. 7–8, s. 460–474, říj. 1946, doi: 10.1103/PhysRev.70.460.
- [6] J. Kowalewski a L. Mäler, *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments, and Applications*, roč. 2006. Taylor & Francis.
- [7] V. Římal, H. Štěpánková, a J. Štěpánek, „Analysis of NMR spectra in case of temperature-dependent chemical exchange between two unequally populated sites", *Concepts Magn. Reson. Part A*, roč. 38A, č. 3, s. 117–127, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/cmr.a.20214>.
- [8] H. Günther, *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, roč. 2. John Wiley and Sons, 1995.
- [9] A. Svítok, „Štúdium komplexov Ln^{III} s ligandom H₄so₃ap^{OEt} metódou ¹⁷O NMR.", Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Praha, 2019. [Online]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/108643/130260514.pdf?sequence=1&isAllo>
- [10] A. Svítok, „Roztoková dynamika komplexov Ln^{III} s monofosforovými deriváty H₄dota sledovaná metódou NMR", Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Praha, 2021. [Online]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/108643/130260514.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [11] R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. C. de Menezes, R. Goodfellow, a P. Granger, „NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts(IUPAC Recommendations 2001)", *Pure Appl. Chem.*, roč. 73, č. 11, s. 1795–1818, 2001, doi: doi:10.1351/pac200173111795.
- [12] M. A. Motin, M. H. Kabir, a M. E. Huque, „Viscosities and Excess Viscosities of Methanol, Ethanol and n-Propanol in Pure Water and in Water + Surf Excel Solutions at Different Temperatures", *Phys.Chem.Liq.*, roč. 43, č. 2, s. 123–137, 2005.
- [13] D. Jannakoudakis, G. Papanastasiou, a P. G. Mavridis, „Allure viscosimétrique et diélectrique de mélanges d'alcool méthylique-eau à diverses températures", *Epistém. Epeteris*, roč. 15, s. 101–117, 1975.
- [14] Fred. Kurata, T. W. Yergovich, a G. W. Swift, „Density and viscosity of aqueous solutions of methanol and acetone from the freezing point to 10.deg.", *J. Chem. Eng. Data*, roč. 16, č. 2, s. 222–226, 1971, doi: 10.1021/je60049a004.
- [15] A. Suchá, „Charakterizace nových kontrastních látek pro zobrazování magnetickou rezonancí", SFG projekt, Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, Praha.

Seznam tabulek

Tabulka 1 Spinová čísla a gyromagnetické poměry vybraných izotopů [4]	2
Tabulka 2 Měření ^1H spekter methanolu	11
Tabulka 3 Měření spekter $\text{Lado3ap}^{\text{OEt}}$ (La) a $\text{Cedo3ap}^{\text{OEt}}$ (Ce)	12
Tabulka 4 Tvar fitované funkce a vypočtené parametry z Obrázek 4	12
Tabulka 5 Dynamické viskozity, u hodnoty v {} jsou koncentrace vody v procentech, kterým odpovídá viskozita před závorkou, η_p je zprůměrovaná hodnota z předchozích dvou sloupců	13
Tabulka 6 Vypočtené parametry závislosti dynamické viskozity (Obrázek 4).....	14
Tabulka 7 Vypočtené parametry z fitů závislostí $T2A, B(T)$ (Obrázek 9).....	18
Tabulka 8 Aktivační entropie a entalpie vypočtené z fitu kA (Obrázek 12) a pA (Obrázek 11)	19
Tabulka 9 Vypočtené parametry závislosti $T2A, B(T)$	23
Tabulka 10 Vypočtené konstanty z fitů kA (viz Obrázek 18) a pA (viz Obrázek 19).....	24
Tabulka 11 Rychlostní konstanty z [10]	28
Tabulka 12 Porovnání rychlostních konstant z [15] a této práce	28
Tabulka 13 Porovnání termochemických veličin.....	29

Seznam obrázků

Obrázek 1 Stereoizomery komplexů $M(\text{do3ap}^{\text{OEt}})$, v této práci $M = \text{La, Ce}$. Vlevo stereoizomery TSA (twisted square antiprism), vpravo SA (square antiprims) [9]	9
Obrázek 2 Rozdílné konformace pětičlenných kruhů v komplexu $M(\text{do3ap}^{\text{OEt}})$ [10].	9
Obrázek 3 Porovnání změn vypočtených teplot při změně teploty o 4 K při různých počátečních teplotách	11
Obrázek 4 Fit závislosti $TREAL$ na $TSET$ polynomem 3. stupně (v programu Origin2020b), červené hodnoty nebyly do fitu započteny K^* značí kelvin posunutý o -268 K	12
Obrázek 5 Fit závislosti dynamické viskozity na teplotě podle (16)	14
Obrázek 6 Vodíkové spektrum vzorku s lanthanem	15
Obrázek 7 Fosforová spektra vzorku s lanthanem	16
Obrázek 8 $T2^*$ v závislosti na teplotě ($T2^*$ je parametr získaný z fitování spektra Lorenzovou křivkou S_L při dané teplotě), trojúhelníkem jsou označené hodnoty použité pro fit	17
Obrázek 9 Fit závislosti $T2A$ funkcí získanou složením rovnic (14), (15) a (16). Předpis pro dynamickou viskozitu je z předcházejícího grafu (Obrázek 5)	18
Obrázek 10 δA a δB získané z fitu funkcí $SP\omega$ a jejich lineární extrapolace	19
Obrázek 11 Vypočtené kA a jejich fit podle (25)	20
Obrázek 12 Populace pA a její fit podle (29) a (28)	20
Obrázek 13 Fosforové spektrum vzorku s cerem	21
Obrázek 14 Vodíkové spektrum vzorku s cerem	22
Obrázek 15 Závislost $T2^*$ na teplotě pro vzorek s koordinovaným cerem, trojúhelníky jsou označené hodnoty použité pro odhad $T2A$	22
Obrázek 16 Fit závislosti $T2A^*$ funkcí získanou složením rovnic (14), (15), (16). Konstanty pro výpočet dynamické viskozity jsou z Tabulka 6	23
Obrázek 17 δA a δB získané z fitu spekter funkcí SP , jejich lineární fit a následná extrapolace jsou pouze z posledních 4 bodů (trojúhelníků)	24
Obrázek 18 Závislost kA na teplotě a její fit podle (25)	25
Obrázek 19 Vypočtené hodnoty pA a fit podle (29) a (28)	25
Obrázek 20 Porovnání Fitu 1 z této práce a Fitu 2, který byl zakreslen dosazením termochemických konstant z [10]	29