

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Veronika Deckerová

Studium dynamického chování kalix[4]arenu pomocí NMR spektroskopie

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jan Lang, Ph.D.

Studijní program: Fyzika - Bc.

Studijní obor: Fyzika v medicíně

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Langovi, Ph.D. za cenné rady při psaní bakalářské práce, trpělivost a ochotu, Mgr. Jiřímu Czernekovi, Ph.D. za poskytnutí výsledků ab initio výpočtů a Doc. Ing. Pavlu Lhotákovi, CSc. za přípravu a poskytnutí vzorku kalix[4]arenu. Dále děkuji rodičům a svým blízkým za podporu při sepisování této práce.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 24.5.2004

Veronika Deckerová

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Teoretická část	6
2. 1. Základní pojmy	6
2. 2. Typy interakcí v magnetické rezonanci	7
2. 2. 1. Chemický posun	7
2. 2. 2. Nepřímá dipól-dipólová interakce	7
2. 2. 3. Přímá dipól-dipólová interakce.....	7
2. 3. Spinová relaxace	8
2. 3. 1. Spinová relaxace a relaxační časy	8
2. 3. 2. Autokorelační funkce, spektrální hustota – isotropní pohyb	8
2. 3. 3. Relaxace vlivem dipól-dipólové interakce	10
2. 3. 4. Relaxace vlivem anisotropie chemického posunu	12
2. 3. 5. Spektrální hustota pro isotropní rotační difúzi	12
2. 4. Nukleární Overhauserův efekt (NOE)	12
2. 5. Chemická výměna.....	13
2. 6. Molekula kalix[4]arenu.....	14
2. 6. 1. Struktura a konformační chování kalix[4]arenu	14
2. 6. 2. Pole vodíkových vazeb na dolním okraji kalix[4]arenu	16
2. 6. 3. Spinová relaxace a NOE v kalixarenu	17
3. NMR metodika	19
3.1. Měření podélné relaxační doby T_1	19
3. 2. Měření příčné relaxační doby T_2	20
3. 3. Měření nukleárního Overhauserova efektu.....	20
3. 4. Měření chemické výměny.....	22
4. Experimentální část.....	24
4. 1. Vzorek.....	24
4. 2. Nastavení experimentů	24
4. 2. 1. ^1H NMR spektra.....	24
4. 2. 2. ^1H EXSY	24
4. 2. 3. ^{13}C NMR spektra, měření T_1 , T_2 , <i>NOE</i>	25
5. Výsledky a diskuse	28
5. 1. ^{13}C a ^1H NMR spektrum kalix[4]arenu.....	28
5. 2. Relaxační doby T_1 a T_2 jader ^{13}C kalix[4]arenu.....	30
5. 3. Heteronukleární ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE v kalix[4]arenu	32
5. 4. Stanovení dynamického chování kalix[4]arenu v nano – pikosekundové časové škále	33
5. 5. Chemická výměna „cone – převrácený cone“	37
5. 6. Dynamika pole vodíkových vazeb.....	39
5. 6. 1. Výsledky měření chemické výměny pomocí sekvence CPMG s proměnným echo - časem.....	39
5. 6. 2. Výpočet parametrů chemické výměny	48
5. 7. Srovnání procesů chemické výměny v kalix[4]arenu.....	54
5. 8. Teplotní závislost a aktivační parametry překlopení pole vodíkových vazeb	54
6. Závěr	57
Použitá literatura	58

Název práce: Studium dynamického chování kalix[4]arenu pomocí NMR spektroskopie

Autor: Veronika Deckerová

Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jan Lang, Ph.D.

e-mail vedoucího: Jan.Lang@mff.cuni.cz

Abstrakt: Kalix[n]areny jsou pro své vynikající komplexační schopnosti a pro široké možnosti derivatizace často využívány v supramolekulární chemii. Nesubstituovaný kalix[4]aren zaujímá konickou konformaci stabilizovanou na spodním okraji polem čtyř vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami. Bylo prostudováno jeho dynamické chování v nepolárním rozpouštědle pomocí metod NMR spektroskopie zejména s využitím teplotně závislých měření ^{13}C spinové relaxace. Rychlostní konstanta změny směru pole vodíkových vazeb ($1,4 \times 10^{-4} - 4,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ v rozsahu teplot 221 – 304 K) byla stanovena proměřením závislosti příčné relaxační doby na echo-čase v pulzní sekvenci CPMG. Aktivační enthalpie této reakce je $36,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a aktivační entropie $-35 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, což vodíkové vazby charakterizuje jako velmi silné, s výrazným příspěvkem kooperativity. Bylo zjištěno, že chování pole vodíkových vazeb není korelováno s další konformační výměnou - přechodem mezi konickým a převráceným konickým konformerem, jehož rychlost byla metodou ^1H výměnné spektroskopie odhadnuta jako řádově 1 s^{-1} . Dále byl stanoven korelační čas rotačního pohybu molekuly (0,1 – 3 ns). Jeho teplotní závislost má arrheniovský tvar s aktivační energií $21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Celkem tak byly charakterizovány tři nezávislé druhy pohybu kalix[4]arenu probíhající ve třech různých časových škálách.

Klíčová slova: kalix[4]aren, NMR, spinová relaxace, vodíková vazba, dynamika

Title: Investigation of Dynamic Behavior of Calix[4]arene by NMR Spectroscopy

Author: Veronika Deckerová

Department: Department of Low Temperature Physics

Supervisor: RNDr. Jan Lang, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: Jan.Lang@mff.cuni.cz

Abstract: Calix[n]arenes and their derivatives are often used in supramolecular chemistry for their pronounced ability to form complexes. Unsubstituted calix[4]arene exists in a cone conformation, which is stabilized by an array of four hydrogen bonds between hydroxyl groups on the lower rim of the molecule. Its dynamic behavior in a non-polar solvent was studied by NMR spectroscopy methods based on the temperature dependence of ^{13}C spin relaxation. The rate constants of flip-flop motion of the hydrogen bond array ($1,4 \times 10^{-4} - 4,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ in the temperature range of 221 – 304 K) were determined using measurements of dependence of transverse relaxation time on echo-time in the CPMG pulse sequence. The activation enthalpy and entropy of this reaction are $36,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-35 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, respectively. This indicates that hydrogen bonds are unusually strong with a large contribution of cooperativity. Flip-flop of the hydrogen bond array was found uncorrelated with another conformational exchange present – the cone - inverted cone transition. The rate of this process was estimated about 1 s^{-1} by means of ^1H exchange spectroscopy. Next, the correlation time of molecular tumbling was determined 0,1 – 3 ns with the Arrhenius temperature dependence with the activation energy of $21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. The conclusion is that calix[4]arene molecule exhibits three independent kinds of motion observable by NMR occurring in three different time scales.

Keywords: Calix[n]arene, NMR, spin relaxation, hydrogen bonds, dynamics

1. Úvod

Kalix[n]areny přitahují v poslední době značnou pozornost v oblasti supramolekulární chemie vzhledem k jejich vynikajícím komplexačním schopnostem. Díky širokým možnostem jejich derivatizace je možné cíleně ovlivňovat afinitu k různým druhům ligandů - kationtům, neutrálním molekulám i aniontům. Zajímavou vlastností kalix[n]arenů je možnost syntézy různých konformerů s přesně definovanou prostorovou strukturou, což má zvláštní význam při návrhu látek s vhodnými komplexačními vlastnostmi. Kalix[n]areny jsou proto využívány k syntéze složitějších receptorů, senzorů, supramolekulárních struktur, modelů enzymů, kapalných krystalů apod.

Kalix[4]areny se obecně mohou nacházet ve čtyřech základních konformacích lišících se orientací fenolových jader. Nesubstituovaný kalix[4]aren, kterým se zabývá tato práce, zaujímá jen konickou konformaci s dutinou miskovitého tvaru, která je na spodním okraji stabilizována čtyřmi vodíkovými vazbami mezi hydroxylovými skupinami.

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) kalix[4]arenu v roztoku jsou ovlivněna třemi druhy pohybů vyskytujících se v rozmezí časových škál od pikosekund po sekundy. Patří mezi ně rotace molekuly, konformační přechod konického konformeru v převrácený konický konformer a přerušování a změna směru cirkulárního pole čtyř vodíkových vazeb. Zatímco první dva pohyby jsou v literatuře poměrně dobře popsány, o dynamice vodíkových vazeb informace téměř chybějí. Cirkulární pole čtyř vodíkových vazeb v kalix[4]arenu je přitom unikátní tím, že všechny čtyři jeho vazby jsou ekvivalentní. Jeho chování zřejmě dosud nebylo prozkoumáno proto, že běžně používané metody, zejména ^1H NMR spektroskopie, v takovém případě žádné údaje o kinetice vodíkových vazeb neposkytují.

Cílem této práce je charakterizace dynamického chování cirkulárního pole vodíkových vazeb na dolním okraji kalix[4]arenu. K tomu je nutné v potřebné míře stanovit i parametry ostatních dvou uvedených druhů molekulárního pohybu. Hlavní metodou je měření ^{13}C spinových relaxací.

Relaxační chování jaderných spinů je jev, který má velmi významné uplatnění magnetické rezonanční tomografii, která je dnes jednou z nejdůležitějších diagnostických metod v lékařství. U většiny měřených obrazů je jejich kvalita a zejména kontrast mezi jednotlivými typy tkání určena relaxačním chováním měřených jader (zpravidla jader ^1H molekul vody). Aplikace relaxačního chování jaderných magnetických momentů je tak typickým případem využití fyziky v medicíně. Hlavní metodikou použitou v této práci jsou pulzní sekvence založené na spinovém echu, které je též základem většiny klinických aplikací NMR.

2. Teoretická část

2. 1. Základní pojmy

Nukleární magnetická rezonance je jev, při kterém dochází k rezonančnímu chování atomových jader s nenulovým spinovým kvantovým číslem I , a tedy nenulovým magnetickým momentem μ , v magnetickém poli. Základní interakcí, která je zodpovědná za jev NMR je Zeemanova interakce (rovnice 1).

$$H = -\mu\mathbf{B}_0 \quad (1)$$

\mathbf{B}_0 je magnetická indukce externího magnetického pole. Mezi nejčastěji studovaná jádra patří ^1H a ^{13}C , která mají $I = 1/2$ a jejich magnetické kvantové číslo může proto nabývat dvou hodnot, $m = 1/2$ (stav α) a $m = -1/2$ (stav β). V externím magnetickém poli \mathbf{B}_0 dojde mezi těmito stavy k vytvoření energetického rozdílu daného vztahem 2, kde γ je gyromagnetická konstanta charakterizující dané jádro a h je Planckova konstanta.

$$\Delta E = \gamma h \mathbf{B}_0 / 2\pi \quad (2)$$

Rozdíl v populaci stavů ($N_\alpha - N_\beta$) se řídí Boltzmanovým rozdělením.

Z pohledu klasické mechaniky vykonává vektor magnetického momentu jádra v magnetickém poli precesní pohyb okolo osy z v laboratorní soustavě souřadnic s Larmorovou frekvencí ω_0 , pro kterou platí vztah 3.

$$\omega_0 = -\gamma \mathbf{B}_0 \quad (3)$$

Rezonanční frekvence daného jádra v látkovém prostředí je určena lokální hodnotou statického magnetického pole, neboť externí statické pole \mathbf{B}_0 je modifikováno interakcemi jádra s vlastním elektronovým obalem, popřípadě s okolními atomy. Kromě fixní laboratorní soustavy souřadnic se zavádí se také tzv. rotující soustava souřadnic, ve které osy x a y rotují rychlostí ω_0 okolo osy z .

K makroskopickému popisu chování soustavy všech jaderných magnetických momentů se používá celková jaderná magnetizace \mathbf{M} souboru jader, určená vektorovým součtem jaderných magnetických momentů μ obsažených v objemové jednotce vzorku. V přítomnosti statického magnetického pole vzniká nenulová magnetizace \mathbf{M} ve směru vnějšího magnetického pole \mathbf{B}_0 .

2. 2. Typy interakcí v magnetické rezonanci

Vedle nejvýznamnější Zeemanovy interakce působí na jaderný spin i další síly. V diamagnetických kapalinách to jsou zejména lokální magnetická pole buzená okolními elektrony, přímá dipól-dipólová a nepřímá dipól-dipólová (skalární) interakce mezi dvojicemi magnetických momentů. Interakce jaderného kvadrupólového momentu s elektrickým polem může být velmi silná, ale jádra se spinem $\frac{1}{2}$, kterými se tato práce zabývá, mají elektrický kvadrupólový moment nulový. Střední hodnota těchto interakcí v čase ovlivňuje rezonanční frekvenci sledovaného jádra nebo způsobuje štěpení čáry. Anisotropní části interakcí jsou rozhodující pro relaxační chování jaderného spinu.

2. 2. 1. Chemický posun

V důsledku stínění jádra okolními elektrony se liší efektivní magnetické pole v místě jádra od \mathbf{B}_0 . Mění se tedy rezonanční frekvence jádra a poloha čáry ve spektru. Při změně orientace molekuly v magnetickém poli se mění i stínění jádra okolními elektrony. Tento jev se označuje jako anisotropie chemického posunu (CSA) a přispívá k spinové relaxaci.

2. 2. 2. Nepřímá dipól-dipólová interakce

Nepřímá spin-spinová (skalární, J) interakce mezi dvojicí jaderných spinů je zprostředkována vazebnými elektrony. Je nezávislá na vnějším magnetickém poli \mathbf{B}_0 . Způsobuje štěpení čar na multiplet. V případě interakce dvou spinů $\frac{1}{2}$ se čáry štěpí na dublet.

2. 2. 3. Přímá dipól-dipólová interakce

Přímá dipól-dipólová interakce (DD) interakce mezi dvojicí spinů působí přes prostor, není ovlivněna chemickými vazbami. Její velikost je závislá na vzdálenosti obou dipólů \mathbf{r} a na orientaci jejich spojnice vůči magnetickému poli \mathbf{B}_0 . Dipól-dipólová interakční konstanta (DCC) je dána rovnicí 4, kde γ_C a γ_H jsou gyromagnetické konstanty jader ^{13}C a ^1H a μ_0 je permeabilita vakua. V případě kapalných roztoků je DD-interakce středována k nule molekulárním rotačním pohybem.

$$DCC = \left(\frac{\mu_0 \gamma_C \gamma_H \hbar}{8\pi^2} \right) r^{-3} \quad (4)$$

2. 3. Spinová relaxace

2. 3. 1. Spinová relaxace a relaxační časy

Ponecháme-li vzorek dostatečně dlouhou dobu v klidu v magnetickém poli, spinový systém dospěje do stavu termální rovnováhy, ve kterém je obsazení energetických hladin dáno Boltzmanovým rozdělením. Následná aplikace radiofrekvenčního pulzu poruší tuto rovnováhu. Proces navrácení spinového systému do rovnováhy se nazývá relaxace. Probíhá jednak v důsledku interakcí uvnitř spinového systému, jednak v důsledku interakcí s okolním molekulárním prostředím.

Rozeznáváme dva typy relaxačních procesů. Spin-mřížková (podélná) relaxace se týká složky M_z spinové magnetizace. Je to děj, při kterém je energie spinového systému předávána okolí (mřížce). Spin-spinová relaxace (příčná) způsobuje vymizení složek M_x a M_y . Kromě interakcí s okolím k této složce relaxace přispívá i rozfázování příčných složek spinu vlivem spin-spinových interakcí. K této relaxaci též přispívá nehomogenita magnetického pole. Relaxační proces může být charakterizován pomocí relaxačních časů (T_1 pro podélnou relaxaci, T_2 pro příčnou relaxaci) nebo pomocí jejich převrácených hodnot, relaxačních rychlostí R_1 , R_2 . T_2 je vždy menší nebo rovno $2T_1$. Pokud uvažujeme jen dipól-dipólovou interakci a anisotropii chemického posunu, platí $T_2 \leq T_1$. Relaxace určuje tvar čáry ve spektru, pro pološířku čáry ve spektru $\Delta\nu$ platí vztah 5.

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi T_2} \quad (5)$$

Příspěvek nehomogenity magnetického pole \mathbf{B}_0 k příčné relaxaci ($1/T_{2n}$) se nazývá nehomogenní rozšíření. Pro naměřenou hodnotu relaxační rychlosti T_2^* platí rovnice 6.

$$1/T_2^* = 1/T_2 + 1/T_{2n} \quad (6)$$

Pro charakterizaci spinového systému je užitečné jen homogenní rozšíření, nehomogenní část je minimalizována korekcemi magnetického pole \mathbf{B}_0 a volbou experimentální metodiky pro měření T_2 (metody založené na spinovém echu).

2. 3. 2. Autokorelační funkce, spektrální hustota – isotropní pohyb

Základní pojmy pro popis relaxace jaderného spinu je možné odvodit pro modelový případ, kdy jsou všechny spiny ve vzorku v magnetickém poli vystaveny působení silného statického magnetického pole \mathbf{B}_0 ve směru osy z a slabého magnetického pole $\mathbf{B}_x(t)$ ve směru osy x , které je pro každý spin jiné a mění se náhodně v čase.¹ Střední hodnota magnetické indukce fluktuujícího pole \mathbf{B}_x je nulová $\langle \mathbf{B}_x(t) \rangle = 0$, ale $\langle \mathbf{B}_x^2(t) \rangle \neq 0$. Rychlost fluktuace magnetického pole v časovém intervalu τ může být charakterizována pomocí autokorelační funkce $G(\tau)$ (rovnice 7).

$$G(\tau) = \langle \mathbf{B}_x^2 \rangle e^{-|\tau|/\tau_c} \quad (7)$$

τ_c je korelační čas fluktuace. Vysoká hodnota τ_c odpovídá pomalé fluktuaci, zatímco nízká odpovídá rychlé fluktuaci. Pro molekuly pohybující se v roztoku se velikost τ_c pohybuje od desítek pikosekund do několika nanosekund. Spektrální hustota je definována jako dvojnásobek Fourierovy transformace autokorelační funkce (rovnice 8).

$$\mathfrak{S}(\omega) = 2 \int_0^{\infty} G(\tau) \exp\{-i\omega\tau\} d\tau \quad (8)$$

Spektrální hustota pro magnetické pole fluktuující podél osy x s exponenciálně klesající autokorelační funkcí může být napsána také v jiném tvaru (rovnice 9). Zlomek na pravé straně rovnice 9 odpovídá normované spektrální hustotě $J(\omega)$ (rovnice 10).

$$\mathfrak{S}(\omega) = 2 \langle \mathbf{B}_x^2 \rangle \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (9)$$

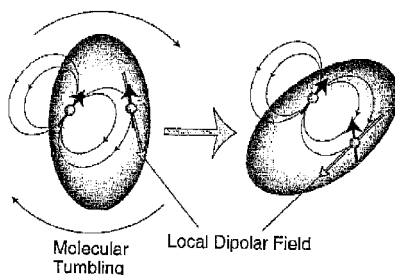
$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (10)$$

Uvažujeme-li spiny v molekule v roztoku, je fluktuace magnetického pole v místě spinu o velikosti $1/2$ je způsobena rotací molekuly. Vlivem pohybu molekuly se mění velikost dipól-dipólové interakce mezi dvěma spiny v molekule, a tedy i velikost a směr magnetického pole, kterým působí jeden spin na druhý. S rotací molekuly, tj. s měněním se lokálním magnetickým polem, se mění také elektronové proudy magnetickým polem indukované, což způsobuje anisotropii chemického posunu (CSA).

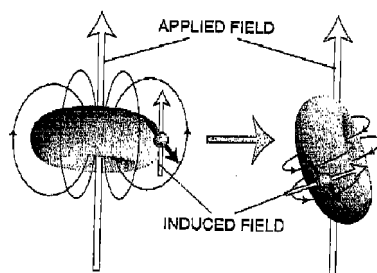
V kapalných roztocích proto odpovídá korelační čas fluktuace pole (τ_c) rotačnímu korelačnímu času molekuly (τ_M). Rotační korelační čas je také ovlivněn viskozitou kapaliny a teplotou. Pro spin o velikosti $1/2$ v kapalném roztoku je důležitost relaxačních mechanismů následující:

Dipól-dipólová interakce > CSA

V silných magnetických polích významně vzrůstá vliv CSA.



Obr. 1: Změna velikosti dipól-dipólové interakce vlivem rotace molekuly.¹



Obr. 2: Fluktuace anisotropního chemického posunu vlivem rotace molekuly.¹

Teplotní závislost rotačního korelačního času molekuly je zpravidla možné popsat Arrheniovou rovnicí 11.²

$$\tau_M = \tau_0 \exp\left(\frac{E_A}{RT}\right) \quad (11)$$

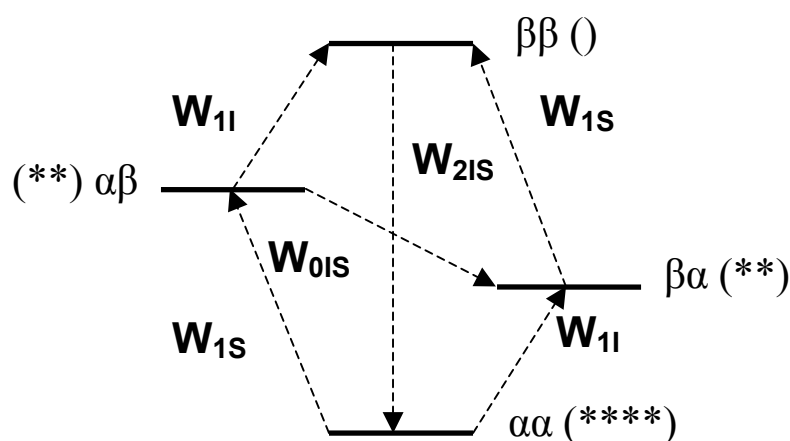
E_A je aktivační energie, R je molární plynová konstanta, T je termodynamická teplota a parametr τ_0 je předexponenciální faktor.

2. 3. 3. Relaxace vlivem dipól-dipólové interakce

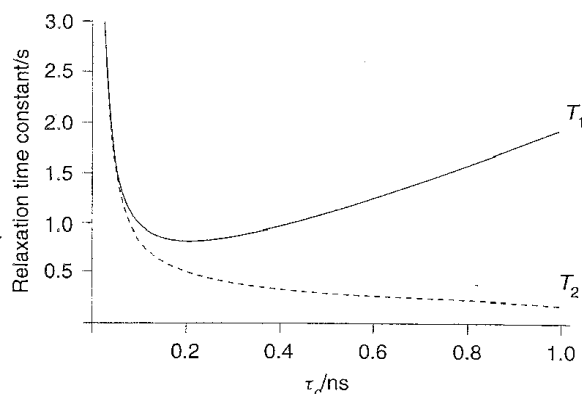
Magnetické pole fluktuující v příčné rovině indukuje přechody mezi energetickými hladinami spinů. Na obrázku 3 je znázorněn diagram energetických hladin s vyznačením pravděpodobností přechodů mezi nimi pro spiny I a S , mezi kterými existuje dipól-dipólová interakce. W_{II} a W_{IS} jsou pravděpodobnosti jednokvantových přechodů, W_2 je pravděpodobnost dvoukvantového přechodu, W_0 je pravděpodobnost nul kvantového přechodu.

Aby mohl nastat přechod W_{II} musí magnetické pole v okolí spinu fluktuovat s frekvencí blízkou rezonanční frekvenci spinů ω_{0I} , neboť pravděpodobnost přechodu závisí na spektrální hustotě $J(\omega_{0I})$. Totéž platí pro přechod W_{IS} spinu S a jeho rezonanční frekvenci ω_{0S} . Pro W_2 přechody jsou potřebné fluktuace o frekvenci $(\omega_{0I} + \omega_{0S})$, pro W_0 přechody o frekvenci $(\omega_{0I} - \omega_{0S})$.

W_1 , W_2 přechody přispívají k podélné relaxaci a jsou nejefektivnější, tedy R_1 je maximální, když $\omega_0 \tau_c \approx 1$, což znamená, že molekula rotuje s frekvencí blízkou ω_0 . W_0 přechody nezpůsobují relaxaci předáním energie mřížce, ale energie přechází od jednoho spinu k druhému. W_0 přechod přispívá k relaxaci příčné, spojuje energeticky blízké hladiny, vyžaduje nízké frekvence fluktuací pole, tedy pomalu se pohybující molekuly. U rychle se pohybujících molekul, kde $\omega_0 \tau_c < 1$, se W_0 přechod neuplatní a $R_1 = R_2$. Pohybuje-li se molekula pomalu, $\omega_0 \tau_c > 1$, jsou W_1 , W_2 neefektivní, proto je spin-mřížková relaxace pomalá, nejvíce se uplatní W_0 a $R_2 > R_1$ (obr. 4).¹ Oblast, kde $\omega_0 \tau_c \ll 1$, se nazývá režim extrémního zúžení a R_1 , R_2 zde nezávisí na velikosti magnetického pole B_0 . Naopak mimo režim extrémního zúžení R_1 a R_2 závisí na Larmorově frekvenci ω_0 , která je úměrná velikosti B_0 .



Obr. 3: Diagram energetických hladin dvou spinů I a S , mezi nimiž působí dipól-dipólová interakce. W_{1I} a W_{1S} jsou pravděpodobnosti jednokvantových přechodů, W_2 je pravděpodobnost dvoukvantového přechodu, W_0 je pravděpodobnost nul kvantového přechodu.



Obr. 4: Závislost podélné relaxační doby (T_1) a příčné relaxační doby (T_2) na korelačním čase (τ_c).¹

Pro relaxaci jader ^{13}C způsobenou dipól-dipólovou interakcí s jádru ^1H (která jsou během směřovacího času efektivně saturována) lze odvodit rovnice 12, 13,³ v nichž R^{DD} jsou příspěvky dipól-dipólové interakce k relaxačním rychlostem, N_H určuje počet protonů přímo navázaných na uhlík a výrazy typu $J(\omega)$ jsou normované spektrální hustoty.

$$R_1^{DD} = \frac{1}{4} N_H (DCC)^2 [J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H + \omega_C)] \quad (12)$$

$$R_2^{DD} = \frac{1}{4} N_H (DCC)^2 \left[2J(0) + \frac{1}{2} J(\omega_H - \omega_C) + \frac{3}{2} J(\omega_C) + 3J(\omega_H) + 3J(\omega_H + \omega_C) \right] \quad (13)$$

2. 3. 4. Relaxace vlivem anisotropie chemického posunu

Pro příspěvky CSA k relaxačním rychlostem R^{CSA} platí rovnice 14, 15.³ CSA_{eff} je amplituda interakce, která závisí na složkách tenzoru chemického posunu.

$$R_1^{CSA} = \frac{1}{3}(\gamma_C \mathbf{B}_0)^2 CSA_{eff}^2 J(\omega_C) \quad (14)$$

$$R_2^{CSA} = \frac{1}{3}(\gamma_C \mathbf{B}_0)^2 CSA_{eff}^2 \left[\frac{2J(0)}{3} + \frac{J(\omega_C)}{2} \right] \quad (15)$$

2. 3. 5. Spektrální hustota pro isotropní rotační difúzi

Uvažujeme-li isotropně rotující molekulu s korelačním časem τ_M , je možno spektrální hustotu $J(\omega)$ vyjádřit vztahem 16.³

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{\tau_M}{1 + \omega^2 \tau_M^2} \right] \quad (16)$$

2. 4. Nukleární Overhauserův efekt (NOE)

NOE je projevem dipól-dipólové interakce. Jde o přenos energie mezi dvěma spiny I (v našem případě se jedná o ^{13}C) a S (^1H), tzv. křížovou relaxaci.¹ Ozařujeme-li selektivně jeden spin, např. S , dostatečně dlouhou dobu, dojde k vyrovnání populací na hladinách spojených přechodem W_{IS} (obr. 3). Tím se změní populace hladin spinu I , což způsobí změnu intenzity signálu po aplikaci $\pi/2$ pulzu na spin I . V případě uhlíkového spektra získaného při ozařování jádra ^1H pro velikost NOE platí rovnice 17 a 18, kde σ^{DD} je rychlost heteronukleární křížové relaxace.³

$$NOE = 1 + \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_C} \right) \frac{N_H \sigma^{DD}}{R_I^{DD}} \quad (17)$$

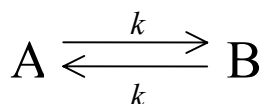
$$\sigma^{DD} = \frac{1}{4} (DCC)^2 [6J(\omega_H + \omega_C) - J(\omega_H - \omega_C)] \quad (18)$$

Pro maximální navýšení intenzity signálu ^{13}C vlivem NOE mezi ^1H a ^{13}C platí vztah 19.

$$NOE = 1 + \gamma_H / 2\gamma_C \cong 3 \quad (19)$$

2. 5. Chemická výměna

Chemická výměna je označení pro procesy, při kterých přecházejí jádra do jiného chemického okolí, čímž se mění jejich rezonanční frekvence z hodnoty ν_1 na ν_2 . Mezi tyto procesy patří např. chemické reakce nebo konformační změny. Uvažujme chemickou reakci prvního řádu s rychlostní konstantou k (obr. 5).



Obr. 5: Symetrická chemická výměna mezi stavem A a B , k je rychlostní konstanta chemické reakce.

Pro rychlost této symetrické chemické výměny k_{ex} potom platí vztah 20.

$$k_{ex} = 2k \quad (20)$$

Chemická výměna má vliv na šířku čar ve spektru. Je-li rychlost chemické výměny k_{ex} menší než rozdíl rezonančních frekvencí $\Delta\nu = \nu_1 - \nu_2$ v Hz při určité velikosti vnějšího magnetického pole, jedná se o tzv. pomalou výměnu můžeme a ve spektru pozorovat obě frekvence. Přechod spinů ze stavu s rezonanční frekvencí ν_1 do prostředí, kde mají frekvenci ν_2 , způsobuje jejich rychlejší rozfázování a rozšíření čáry ve spektru $\Delta\nu_{ex}$ (rovnice 21).

$$\Delta\nu_{ex} = R_2/\pi = 1/\pi\tau_A \quad (21)$$

Pokud je $k_{ex} > \Delta\nu$, objeví se ve spektru pouze jeden signál o frekvenci $(\nu_1 + \nu_2)/2$. Rychlost chemické výměny roste s rostoucí teplotou. Přechod mezi rychlou a pomalou výměnou nastává při tzv. koalescenční teplotě, při které platí vztah 22.

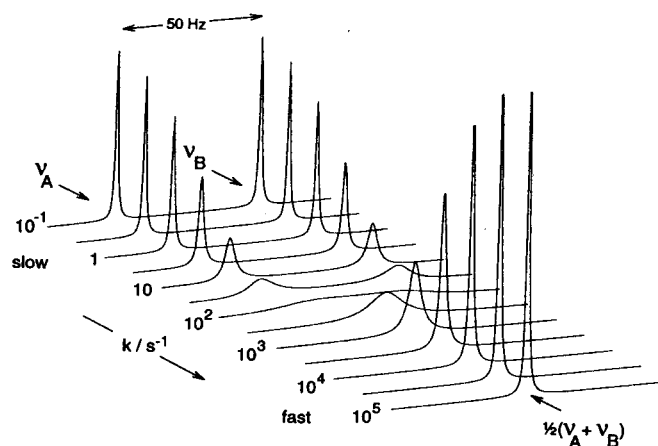
$$k_{ex} = \pi\Delta\nu/\sqrt{2} = 2,22\Delta\nu \quad (22)$$

S rostoucí k_{ex} roste příspěvek chemické výměny k rozšíření čáry, dokud není dosaženo koalescenční teploty. Další zvyšování k_{ex} vede k zmenšování rozšíření čáry (je úměrné $(\Delta\nu)^2$), až při velmi velké rychlosti chemické výměny není rozšíření čáry pozorovatelné (obr. 6).⁴

Pro rychlostní konstantu chemické reakce platí rovnice 23, kde ΔH je aktivační entalpie, ΔS je aktivační entropie.^{2;6} Aktivační volná energie reakce ΔG je dána vztahem 24.

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}} \quad (23)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (24)$$



Obr. 6: Symetrická chemická výměna mezi dvěma stavy - závislost NMR spekter na teplotě.⁵

2. 6. Molekula kalix[4]arenu

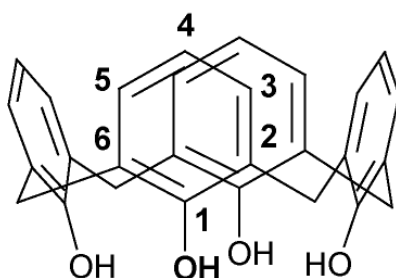
2. 6. 1. Struktura a konformační chování kalix[4]arenu

Kalix[4]aren je sloučenina patřící do rodiny fenolických oligomerů. Skládá se ze čtyř aromatických jader spojených methylenovými můstky (obr. 7). Na dolním okraji nese čtyři hydroxylové skupiny. Tato molekula má miskovitý tvar a vzhledem k vysokému obsahu π -elektronů je schopna nekovalentně vázat menší neutrální a kladně nabitě molekuly. Brzy bylo rozpoznáno, že kalixaren je velmi vhodným stavebním blokem pro samoorganizující se supramolekulární struktury.^{7;8}

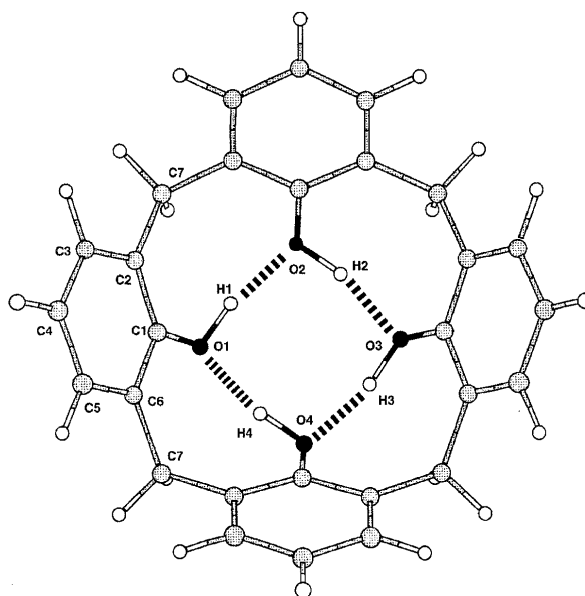
Od objevu struktury kalix[4]arenu v roce 1978⁹ byla připravena celá řada derivátů majících atraktivní vlastnosti. Základními místy pro substituci jsou hydroxylové skupiny (tzv. dolní okraj), pozice 4 aromatických kruhů (tzv. horní okraj) nebo substituce na methylenových spojkách, případně nahrazení celého methyleny jinou skupinou, např. sírou (thiakalixaren). Vhodnou substitucí je možné modifikovat elektrostatický náboj v jednotlivých částech molekuly, velikost a tvar kavity, flexibilitu makrocyclu a další vlastnosti. Tak je možné připravit látky schopné působit jako specifické receptory pro různé druhy substrátů, založené na nekovalentních interakcích.

Předmětem této práce je nesubstituovaný kalix[4]aren, který představuje strukturální základ všech odvozených látek. Jeho molekula má konický tvar se čtyřčetnou osou symetrie procházející středem dutiny. Tato konformace je stabilizována polem cirkulárních vodíkových vazeb mezi sousedními OH skupinami na dolním okraji (obr. 8). Tato geometrie však není zcela rigidní, jak dokazuje rozšíření čar CH_2 skupiny v ^1H NMR spektrech. Methylenové protony nejsou ekvivalentní a rozšíření jejich rezonancí je způsobeno jejich vzájemnou chemickou výměnou – přechodem mezi konickým a převráceným konickým konformerem, při kterém dochází k převrácení

kalix[4]arenu „naruby“ za vzniku geometricky totožného produktu (obr. 9). Tento přechod probíhá přes meziprodukty, které existují příliš krátce, aby byly pozorovatelné pomocí NMR spektroskopie.^{10;11}

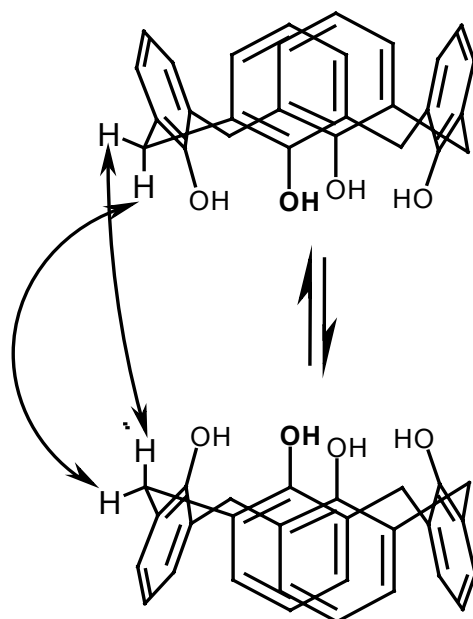


Obr. 7: Molekula kalix[4]arenu se znázorněním číslování uhlíků.

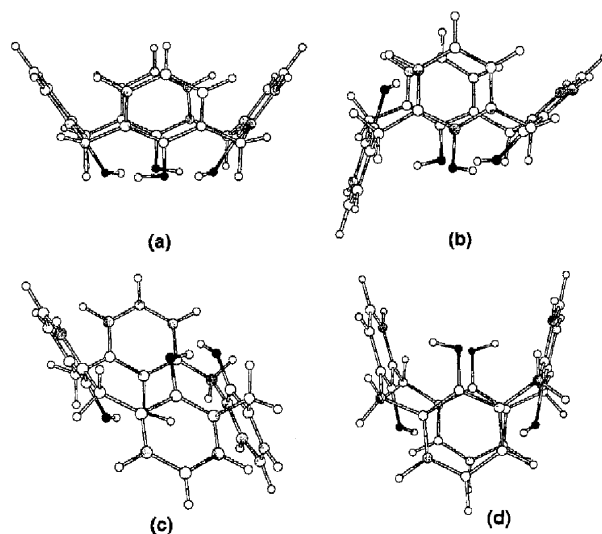


Obr. 8: Vodíkové můstky mezi OH skupinami v konickém konformeru kalix[4]arenu.¹²

Kalix[4]areny substituované na dolním okraji nepolárními skupinami (např. tetramethoxykalix[4]aren), které nejsou schopné tvořit vodíkové můstky, mají vedle konického relativně stabilní i další základní konformery - částečně konický, 1,2-střídavý a 1,3-střídavý (obr. 10). Mezi konformery dochází k přechodům rotací jednotlivých aromatických kruhů kolem osy procházející spojovacími methylenovými skupinami, přičemž dolní okraj prochází vnitřkem molekuly. Konformační mobilita závisí na přítomných substituentech, na druhu rozpouštědla a na teplotě.



Obr. 9: Převrácení molekuly kalix[4]arenu. Konický konformer se mění na převrácený konický konformer, mezi vodíky CH₂ skupiny dochází k chemické výměně.



Obr. 10: Konformace substituovaných kalix[4]arenů: (a) konická, (b) částečně konická, (c) 1,2- střídavá, (d) 1,3- střídavá.¹²

2. 6. 2. Pole vodíkových vazeb na dolním okraji kalix[4]arenu

Pole cirkulárních vodíkových vazeb do jinak symetrické molekuly vnáší chiralitu – OH skupiny mohou směřovat buď proti nebo po směru pohybu hodinových ručiček. Kalix[4]aren tak existuje ve formě dvou stereoizomerů. O síle jednotlivých vodíkových vazeb i o míře jejich kooperativity je dosud známo velmi málo. Jejich charakterizace se omezila na měření chemického posunu hydroxylového vodíku v ¹H NMR spektru a na

měření frekvence OH valenční vibrace v infračerveném absorpčním spektru. Chemický posun OH skupiny v ^1H spektru byl nalezen 10,2 ppm v *p-tert*-butylkalix[4]arenu, což je velmi vysoká hodnota.⁷

Nicméně, jak frekvence OH valenční vibrace, tak velikost ^1H chemického posunu OH skupiny jsou významně ovlivněny i dalšími parametry (např. vazebný úhel)⁷, takže neposkytují jednoznačné parametry vodíkové vazby. Síla vodíkových vazeb na dolním okraji kalixarenu je určující pro jeho strukturní i dynamické vlastnosti. Bez možnosti tvorby vodíkových vazeb konický konformer zaujímá tzv. zploštělou geometrii (pinched cone), symetrie kavity se redukuje z C_4 na C_2 . Síla vodíkových vazeb určuje odklonění aromatických kruhů od osy symetrie a otevřenost kavity.

Kalix[4]aren poskytuje unikátní kruhové pole vodíkových vazeb, které není přerušeno atomem, který se přímo vodíkové vazby neúčastní. Na druhou stranu vysoká symetrie pole znesnadňuje studium a charakterizaci, protože většina spektrálních parametrů nezávisí na směru pole vodíkových vazeb. Chování systému vodíkových vazeb bylo dosud studováno především při nízkých teplotách (do 80 K), kdy se systém chová podle zákonů kvantové mechaniky a kdy protony mohou „tunelovat“ skrz potenciál vodíkové vazby k sousednímu kyslíku. Přestože výsledky experimentálních¹³⁻¹⁵ a teoretických¹⁶ studií zatím vyčerpávajícím způsobem všechny podstatné aspekty nevysvětlily, indikují přítomnost koordinovaného přenosu všech protonů k sousedním kyslíkům. Při zvyšování teploty dochází k přechodu ke klasickému chování, kdy k přechodu přes bariéru pak dochází po náhodné tepelné excitaci, která má mnohem vyšší pravděpodobnost. Rychlost přechodu přes bariéru je potom dána Eyringovým vztahem (rovnice 23).

Systémy cirkulárních vodíkových vazeb a změny jejich směru („flip-flop“ procesy) byly pozorovány na některých derivátech kalixarenu, např. na derivátech *p-tert*-butylkalix[6]arenu fosforylovaných na dolním okraji. Pole vodíkových vazeb je u těchto derivátů necyklické, je přerušeno fosfátovou skupinou.¹⁷ Pomocí EXSY byla u monofosfátů určena volná aktivační energie na jednu vazbu $9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, což je hodnota odpovídající středně silné vazbě.¹⁸ V difosfátech připadá na jednu vazbu $7,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, přičemž míra kooperativity je nižší, neboť se jedná o dvě pole o dvou vazbách. Kalix[6]areny jsou flexibilnější než kalix[4]areny, prokazatelně u nich dochází k zásadní optimalizaci vnitřní energie tvorbou „pinched“ konformace, která též patrně optimalizuje geometrii vodíkových vazeb.

Síla vodíkových vazeb byla zkoumána i na *p-tert*-butylkalix[4]arenu a na jeho částečně methylovaných derivátech.¹⁹ Frekvence OH valenční vibrace byla naměřena 3190 a 3140 cm^{-1} v roztoku CS_2 resp. CCl_4 a 3150 cm^{-1} v pevné fázi při laboratorní teplotě. Tři kooperativní vodíkové vazby byly detekovány i v monomethyl derivátu podle IR frekvencí. Posuny a amplitudy signálů v ^1H spektru (10,13 ppm 1H a 9.54 ppm 2H) indikují flip-flop proces, kdy silnější rezonance odpovídá vystředovanému posunu obou krajních vazeb a slabší rezonance u 10,13 ppm přísluší prostřední vodíkové vazbě, u které se kooperativita projevuje nezávisle na směru celého pole vodíkových vazeb. Frekvence valenčních OH vibrací je výrazně vyšší u dimethylovaného derivátu, což odpovídá faktu, že zde zcela chybí příspěvek kooperativity.

2. 6. 3. Spinová relaxace a NOE v kalixarenu

Uhlíky v molekule kalix[4]arenu můžeme rozdělit do dvou skupin. Uhlíky C3, C5, C4, CH₂ (obr. 7) mají na sebe přímo vázané vodíky a relaxují proto zejména vlivem dipól-dipólové interakce s těmito vodíky. Uhlíky vázané v aromatických kruzích pak

dále relaxují vlivem CSA. Uhlíky C1, C2, C6, které nemají navázaný vodík, relaxují převážně vlivem CSA. K jejich relaxaci přispívá také dipól-dipólová interakce s vodíky v okolí. Interference relaxačních mechanismů jsou potlačeny vhodnou pulzní sekvencí (viz kapitola 3). Pro výsledné relaxační rychlosti a NOE lze potom s použitím rovnic 12-17 odvodit vztahy 25, 26 a 27.³

$$R_1 = R_1^{DD} + R_1^{CSA} \quad (25)$$

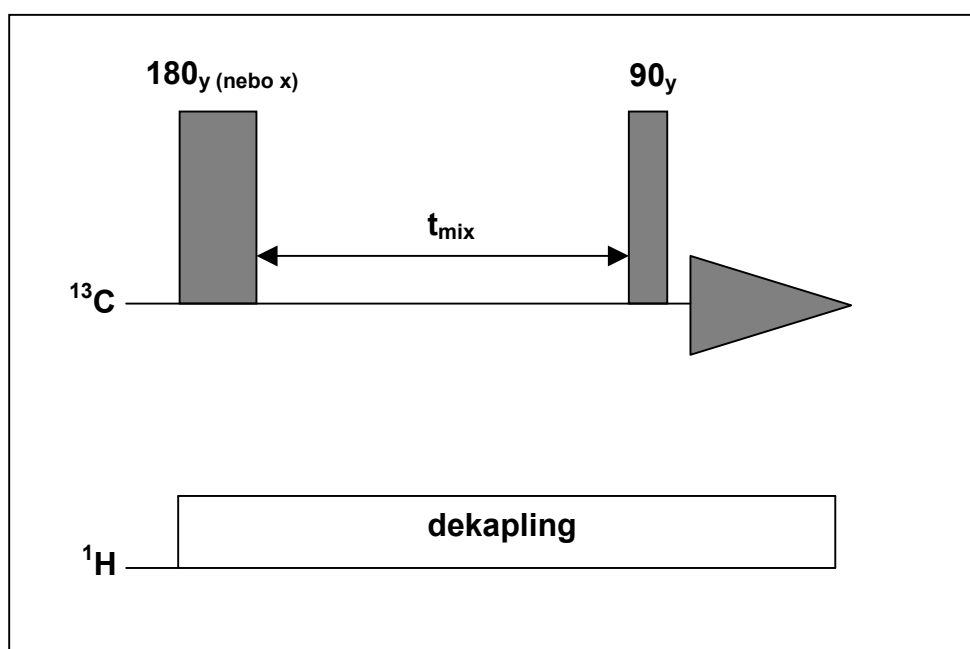
$$R_2 = R_2^{DD} + R_2^{CSA} \quad (26)$$

$$NOE = 1 + \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_C} \right) \frac{N_H \sigma^{DD}}{R_1^{DD} + R_1^{CSA}} \quad (27)$$

3. NMR metodika

3.1. Měření podélné relaxační doby T_1

K měření podélné relaxační doby se používá sekvence nazývaná inversion recovery (obr. 11).²⁰



Obr. 11: Sekvence inversion recovery²⁰ použitá k měření podélné relaxační doby T_1 .

Tato sekvence se skládá ze dvou pulsů. Nejdříve je aplikován π -puls, jehož délka je právě taková, aby došlo k otočení magnetizace M_0 o 180° , tedy do směru osy $-z$. Velikost magnetizace je pak $-M_0$. Procesem spin-mřížkové relaxace se magnetizace začne navracet k rovnovážné hodnotě M_0 , v průběhu časového intervalu t_{mix} (tzv. směšovací čas) se tak mění velikost z -složky magnetizace. Aby bylo možné tuto velikost sledovat, je třeba magnetizaci otočit do roviny xy . To je provedeno pomocí $\pi/2$ -pulsu. Intenzita výsledného signálu je pak úměrná velikosti z -složky magnetizace v čase t_{mix} od aplikace π -pulsu. Měníme-li interval t_{mix} , získáme časovou závislost velikosti z -složky magnetizace. Relaxační dobu T_1 lze pak určit ze vztahu 28, kde I_t je intenzita signálu v čase t od π -pulsu, I_∞ je amplituda signálu v době, kdy jsou měřené spiny zrelaxovány a magnetizace je navracena k rovnovážné hodnotě M_0 .

$$I(t) = I_{\infty} \left(1 - 2 \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right) \quad (28)$$

Po celou dobu sekvence jsou ozařována jádra ^1H (tzv. dekapling), čímž dojde k vyrovnání populací jejich hladin a odstranění vlivu J-interakce na spektra ^{13}C , tj. vymizení multiplerní struktury, a k odstranění vlivů křížové relaxace a interferenci relaxačních mechanismů DD a CSA.

3. 2. Měření příčné relaxační doby T_2

Základní sekvencí k měření příčné relaxační doby je spinové echo. Magnetizace je pomocí $\pi/2$ -pulzu otočena do roviny x,y . Následně pak dochází procesem relaxace k poklesu příčné složky magnetizace. Tento pokles je ale také způsoben rozfázováním spinů vlivem nehomogenity magnetického pole. Je-li za čas $t_{echo}/2$ po $\pi/2$ -pulzu aplikován π -pulz, dojde k otočení rozfázovaných spinů v rovině x,y o 180° . Koná-li vektor magnetizace i nadále precesní pohyb ve stejném směru, dojde po identickém časovém intervalu $t_{echo}/2$ po π -pulzu znovu ke zřazování spinů. Intenzita I následně získaného signálu tak závisí jen na relaxační době a není ovlivněna nehomogenitou magnetického pole (rovnice 29).

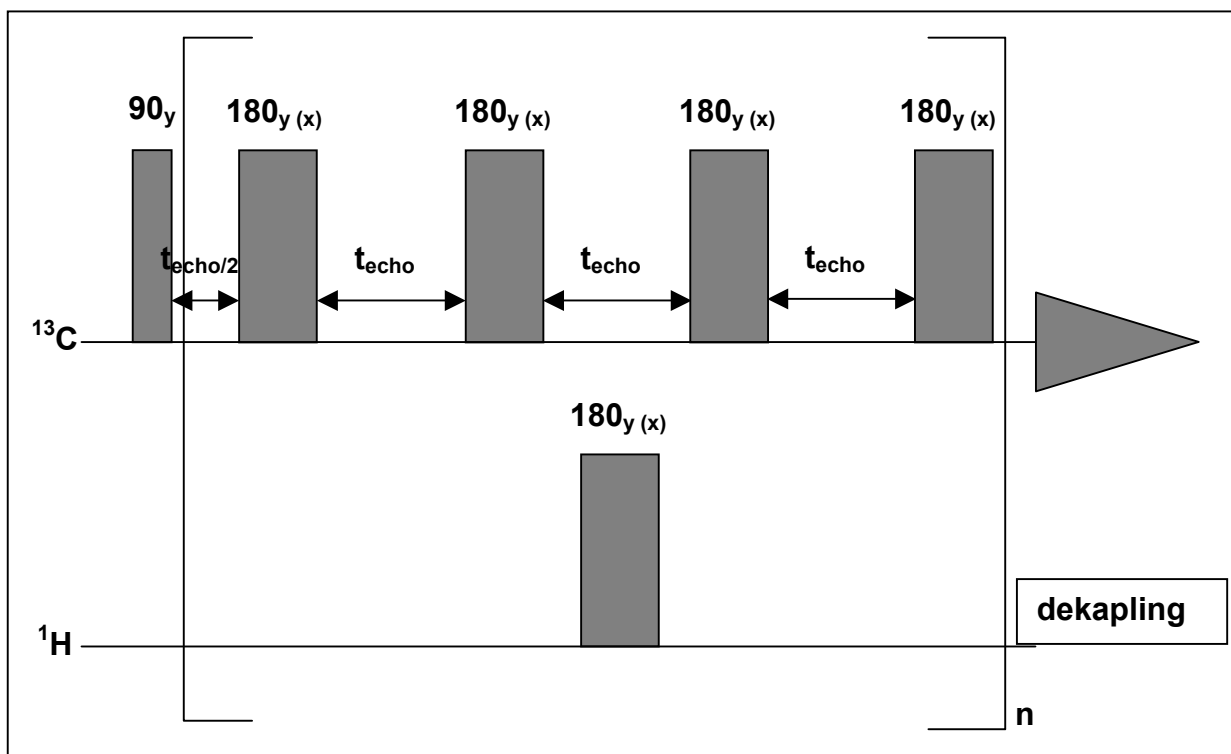
$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (29)$$

I_0 je intenzita signálu v čase nula po aplikaci $\pi/2$ -pulzu.

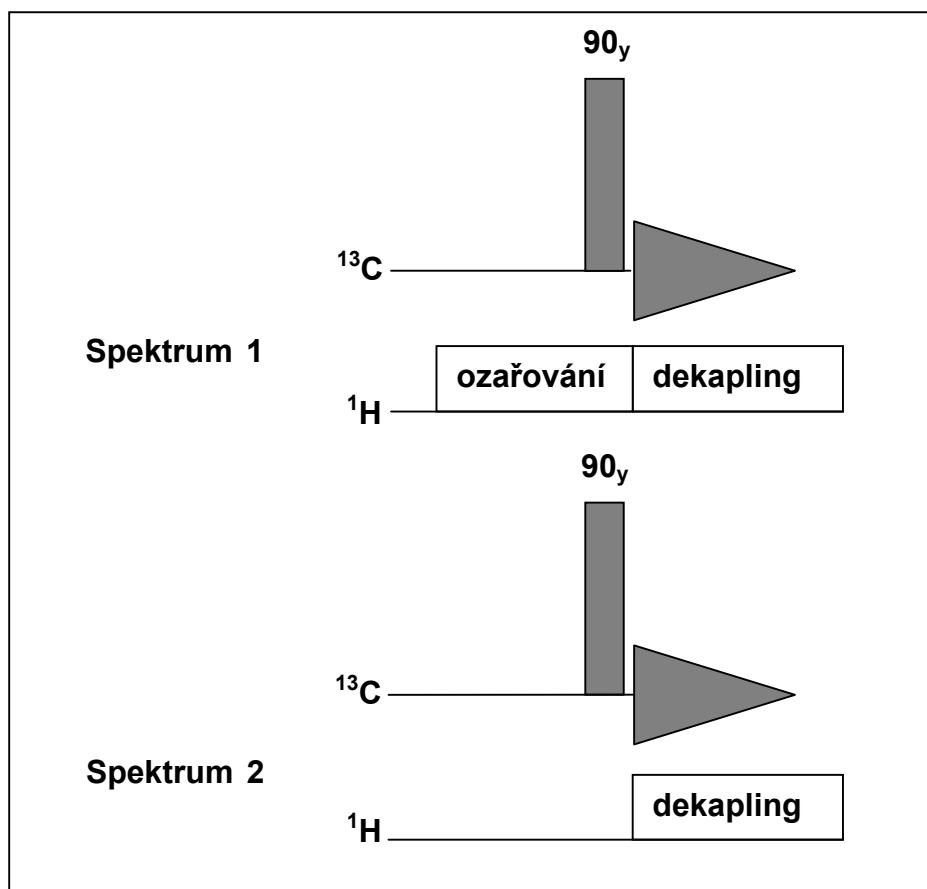
K měření příčné relaxační doby se používá sekvence CPMG (Carr, Purcell, Meiboom, Gill), což je mnohonásobné spinové echo s konstantním echočasem a proměnným počtem cyklů n . (obr. 12).²¹ Protonový π -pulz zajišťuje efektivní dekapling a odstranění interference relaxačních mechanismů DD a CSA.

3. 3. Měření nukleárního Overhauserova efektu

K měření heteronukleárního stacionárního NOE mezi ^{13}C a ^1H se používá sekvence znázorněná na obrázku 13.²² Během doby, kdy je selektivně ozařován ^1H , dochází vlivem NOE k přenosu magnetizace na ^{13}C , jehož signál následně měříme. Dále je změřen signál ^{13}C bez předchozího ozařování ^1H . NOE se získá jako podíl intenzit signálů spektra 1 a spektra 2.



Obr. 12: Sekvence CPMG²¹ použitá k měření příčné relaxační doby T_2 .



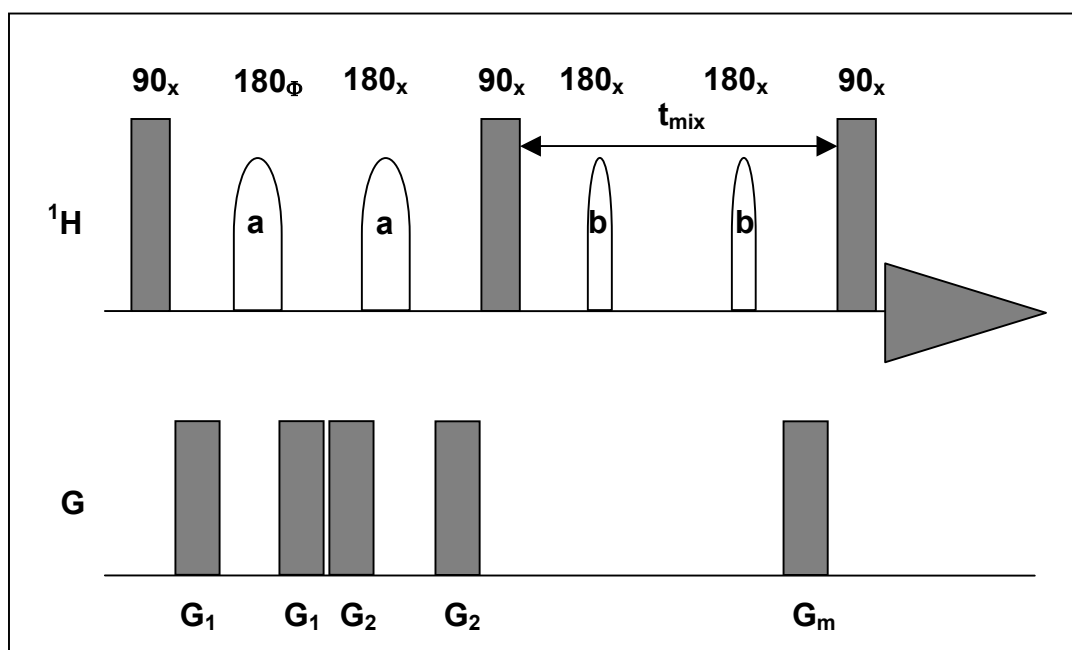
Obr. 13: Sekvence použitá k měření heteronukleárního NOE.²²

3. 4. Měření chemické výměny

K měření pomalé chemické výměny mezi dvěma stavy A a B lze použít výměnnou spektroskopii EXSY (obr. 14).²³ Princip této metody je následující. Nejdříve je selektivně převrácen jeden signál A . Probíhá-li mezi signálem A a signálem B chemická výměna, dochází během směřovacího času t_{mix} po ozáření k přenosu magnetizace na signál B ($I(A-B)$). Měříme-li spektrum pro několik hodnot směřovacího času t_{mix} , můžeme z naměřené závislosti intenzit signálů na směřovacím čase určit rychlostní konstantu chemické výměny podle vztahu 30.

$$k_{ex} = \frac{I(A-B)/I(A)}{t_{mix}} \quad (30)$$

Tento vzorec platí jen pro počáteční nárůst závislosti, který je přibližně lineární. Odchylka od linearity je způsobena členy s vyššími mocninami t_{mix} (t_{mix}^2 , t_{mix}^3 , atd.), které jsou pro dostatečně malé směřovací časy zanedbatelné. EXSY lze použít pouze k měření pomalé výměny, která příliš nerozšiřuje čáry ve spektru.



Obr. 14: Sekvence DPFGE NOE používaná k měření EXSY. G jsou pulzní gradienty magnetického pole, a jsou selektivní pulzy tvaru q3-gaussovská kaskáda, b jsou neselektivní pulzy tvaru hyperbolický secans, Nastavení fází: $\Phi = \{x,y,-x,-y\}$, přijímač $\{x,-x,x,-x\}$.²³

Rychlost rychlejší chemické výměny lze určit z pološířky signálu $\Delta\nu$ ve spektru podle rovnice 31.

$$\Delta\nu = k_{ex}/\pi \quad (31)$$

Měření pološířek je nejpřesnější v oblasti koalescence, kde chemická výměna rozšiřuje čáru maximálně.

K měření rychlých chemických výměn lze použít sekvenci CPMG (obr. 12) s proměnnou délkou echa. Z naměřené závislosti relaxační rychlosti na $t_{echo/2}$ lze určit rychlost chemické výměny použitím vztahů 32 a 33.²⁴

$$R_2 = p_A p_B (\Delta\omega)^2 t_{echo/2} \left(1 - \frac{\tau_{ex}}{t_{echo/2}} \tanh\left(\frac{t_{echo/2}}{\tau_{ex}}\right) \right) + R^{DD+CSA} \quad (32)$$

$$\tau_{ex} = \frac{1}{k_{ex}} \quad (33)$$

p_A, p_B jsou populace stavu A a B , $\Delta\omega$ rozdíl jejich chemických posunů, τ_{ex} je korelační čas chemické výměny. R^{DD+CSA} je relaxační rychlost, kterou by spiny relaxovaly pouze vlivem dipól-dipólové interakce a CSA, tedy kdyby mezi nimi neexistovala chemická výměna. První člen na pravé straně rovnice 32 odpovídá relaxační rychlosti vlivem chemické výměny R_{ex} .

4. Experimentální část

4. 1. Vzorek

Vzorek kalix[4]arenu (Pavel Lhoták, VŠCHT Praha) o hmotnosti 0,02122 g byl rozpuštěn v 1,35884 g 1,1,2,2-tetrachloroethanu- d_2 (Chemotrade, 99.8% d), vzniklý roztok o koncentraci 0,06 mol/dm³ byl odplyněn pomocí několika cyklů zmražení, odčerpání plynu, rozmražení a zataven v 5 mm kyvetě.

K získání ¹³C a ¹H spekter byl použit NMR spektrometr Bruker Avance 500 pracující při magnetickém poli 11,8 T. Experimenty byly prováděny při teplotách od 200,6 K do 303,7 K. Teplota byla kalibrována pomocí methanolového standardu. Přesnost kalibrace teploty je 0,2 K a stabilita teploty byla přibližně 0,1 K.

4. 2. Nastavení experimentů

Délka ¹³C $\pi/2$ pulzu se pohybovala v rozmezí 6,5-7,7 μ s, délka ¹H $\pi/2$ pulzu se pohybovala od 12,7 μ s do 13,9 μ s.

Následující kapitoly obsahují výčet parametrů jednotlivých experimentů.

4. 2. 1. ¹H NMR spektra

šířka spektra: 6,0 kHz
velikost: 32768 datových bodů
počet scanů (průchodů): 8
doba akvizice: 2,7263s

4. 2. 2. ¹H EXSY

sekvence DPGFSE NOE (obr. 14)

šířka spektra: 2,0 kHz
velikost: 4096 datových bodů
počet scanů (průchodů): 32
doba akvizice: 1,0224 s

selektivní π -pulzy a: tvar - q3-gaussovská kaskáda o délce 54 ms
neselektivní tvarované π -pulzy b ve směšovacím času: hyperbolický secans 0,4 ms.

Měření přenosu magnetizace byla prováděna mezi diastereotopickými vodíky skupiny CH₂ a pro srovnání též mezi jádry H4 a H3, H5, a to tak, že byly postupně selektivně invertovány oba signály interagujících párů. Další parametry použité při měření jsou v závislosti na teplotě uvedeny v tabulkách 1 a 2.

T [K]	221.2	232.6	242.9	252.1	262.5
t_{mix_min} [ms]	6	6	6	6	6
t_{mix_max} [ms]	50	58	78	90	58
N	10	10	10	10	10

Tabulka 1: Nastavení parametrů pro měření EXSY mezi vodíky CH₂ skupiny pro jednotlivé teploty. N je počet použitých směřovacích časů (počet měření), t_{mix_min} je nejmenší hodnota směšovacího času, t_{mix_max} je největší hodnota směšovacího času.

T [K]	221.2	232.6	242.9	252.1	262.5
t_{mix_min} [ms]	6	6	6	6	6
t_{mix_max} [ms]	100	900	1000	1000	1000
N	11	10	11	11	11

Tabulka 2: Nastavení parametrů pro měření EXSY mezi vodíky aromatického jádra pro jednotlivé teploty. N je počet použitých směšovacích časů (počet měření), t_{mix_min} je nejmenší hodnota směšovacího času, t_{mix_max} je největší hodnota směšovacího času.

4. 2. 3. ¹³C NMR spektra, měření T_1 , T_2 , NOE

spektra byla ¹H-dekaplována sekvencí waltz-16
šířka spektra: 22,7 kHz
velikost: 65536 datových bodů
počet scanů (průchodů): 128
doba akvizice: 1,4418s

- **Měření podélné relaxační doby T_1**

Pulzní sekvence: inversion recovery (obr. 11)

Na začátek měření s každým směšovacím časem bylo vloženo alespoň 6 scanů bez nabírání dat kvůli ustavení stacionárního stavu spinového systému před začátkem pulzní sekvence (tzv. dummy scany). Další parametry jsou v závislosti na teplotě zaznamenány v tabulce 3. Hodnoty relaxačních časů T_1 byly z intenzit naměřených signálů získány naitováním podle rovnice 28.

- **Měření příčné relaxační doby T_2**

Pulzní sekvence: CPMG (obr. 12)

Nastavené parametry jsou v závislosti na teplotě uvedeny v tabulce 4. Hodnoty relaxačních časů T_2 byly z intenzit naměřených signálů získány naitováním podle rovnice 29.

T [K]	200.6	210.9	221.2	232.6	242.9	252.1	262.5	272.8	283.1	293.4	303.7
DI [s]	5	3	2	6	2	2	2	3	3.5	7.5	6.5
LB	5	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2
N	12	12	12	13	12	12	12	13	13	13	13
t_{mix_min} [ms]	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
t_{mix_max} [s]	10	4	4	10	4	4	4	8	9	14	14

Tabulka 3: Nastavení parametrů pro měření uhlíkových relaxačních dob T_1 pro jednotlivé teploty. DI je doba před každým scanem, v průběhu které dochází k návratu spinového systému do rovnováhy nebo stacionárního stavu ($DI+AQ \geq 3T_1$), LB je rozšíření čáry exponenciální apodizací, N počet různých směšovacích časů, t_{mix_min} je nejmenší hodnota směšovacího času a t_{mix_max} je největší hodnota směšovacího času (jeho hodnota byla pro měření T_1 přibližně rovna $5T_1$).

T [K]	200.6	210.9	221.2	232.6	242.9	252.1	262.5	272.8	283.1	293.4	303.7
DI [s]	8.5	3	3	3	3	3	3	7	9	13.5	12
LB	20	5	2	2	10	2	2	2	2	2	2
$D20$ [ms]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
N	10	10	12	10	11	12	11	13	13	13	13
t_{mix_min} [ms]	4	4	4	4	4	4	4	3.2	3.2	3.2	3.2
t_{mix_max} [s]	0.24	0.24	2	4	1	2	1	6	6	9.6	11.2

Tabulka 4: Nastavení parametrů pro měření uhlíkových relaxačních dob T_2 pro jednotlivé teploty. DI je doba před každým scanem, v průběhu které dochází k návratu spinového systému do rovnováhy nebo stacionárního stavu ($DI+AQ \geq 5T_1$), LB je rozšíření čáry exponenciální apodizací, $D20$ je doba trvání jedné poloviny echa, N počet různých směšovacích časů, t_{mix_min} je nejmenší hodnota směšovacího času a t_{mix_max} je největší hodnota směšovacího času (jeho hodnota byla pro měření T_2 přibližně rovna $4T_2$).

- **Měření rychlé chemické výměny pomocí sekvence CPMG**

šířka spektra: 5,3 kHz
velikost: 16384 datových bodů

Další nastavené parametry jsou pro jednotlivé teploty uvedeny v tabulce 5.

- **Měření heteronukleárního ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE**

Pulzní sekvence: dynamic NOE sequence (obr. 13).

Nastavené parametry jsou pro jednotlivé teploty uvedeny v tabulce 6. Při měření $\{^1\text{H}\}$ - ^{13}C NOE byly protony ozařovány nejprve velmi krátkou dobu t_{mix_min} (10 μs) a

potom po dobu delší než $5T_1$ (t_{mix_max}). Hodnota *NOE* byla získána jako poměr intenzit signálů takto změřených dvou spekter.

<i>T</i> [K]	221.2	232.6	242.9	252.1	262.5	272.8	283.1	293.4	303.7
<i>DI</i> [s]	4	2.5	3	3.5	5	7	9	13.5	12
<i>LB</i>	10	10	10	2	2	2	2	2	2
<i>N(D20)</i>	10	8	9	9	8	13	11	7	9
<i>N</i>	10-11	8-11	10-11	10-12	10-12	10-12	10-11	13	13-14
<i>D20_{min}</i> [ms]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>D20_{max}</i> [ms]	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	5.0	5.0	0.4	0.4

Tabulka 5: Nastavení parametrů pro měření chemické výměny pomocí sekvence CPMG pro jednotlivé teploty. *DI* je doba před každým scanem, v průběhu které dochází k návratu spinového systému do rovnováhy nebo stacionárního stavu ($DI + AQ \geq 5T_1$), *LB* je rozšíření čáry exponenciální apodizací, *D20* je doba trvání jedné poloviny echa, *N(D20)* počet časů *D20*, při kterých byly pro jednotlivé teploty měřeny relaxační doby T_2 , *N* počet různých směšovacích časů, *D20_{min}* je nejmenší použitá hodnota *D20*, *D20_{max}* je největší použitá hodnota *D20*, hodnoty směšovacích časů t_{mix} závisí na konkrétní hodnotě *D20*, jejich rozmezí bylo od $8 \times D20$ do $4T_2$).

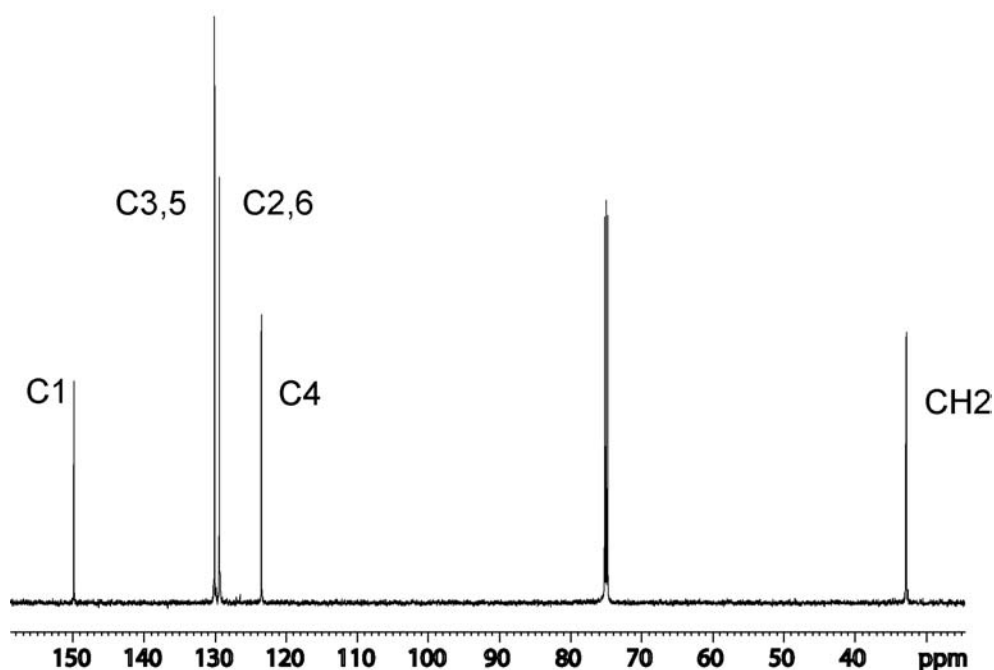
<i>T</i> [K]	200.6	210.9	221.2	232.6	242.9	252.1	262.5	272.8	283.1	293.4	303.7
<i>DI</i> [s]	18	15	10	20	10	10	10	15	15	30	35
<i>LB</i>	10	5	2	10	10	2	2	2	2	2	2
t_{mix_min} [ms]	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
t_{mix_max} [s]	10	10	7	10	5	7	7	9	9	15	18

Tabulka 6: Nastavení parametrů pro měření *NOE* pro jednotlivé teploty. *DI* je doba před každým scanem, v průběhu které dochází k návratu spinového systému do rovnováhy nebo stacionárního stavu ($DI + AQ \geq 10T_1$), *LB* je rozšíření čáry exponenciální apodizací, t_{mix_min} je kratší doba ozařování vodíků, t_{mix_max} je dlouhá doba ozařování vodíků (delší než $5T_1$).

5. Výsledky a diskuse

5. 1. ^{13}C a ^1H NMR spektrum kalix[4]arenu

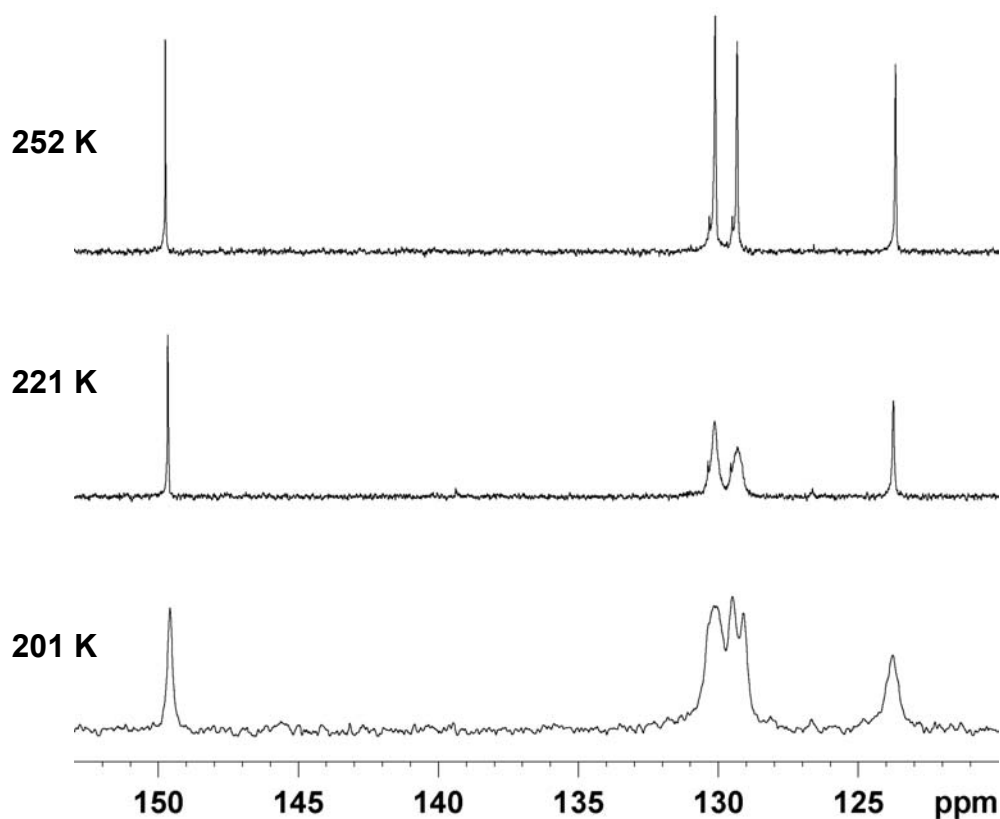
^{13}C spektrum kalix[4]arenu v $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$ obsahuje 5 signálů. Jejich přiřazení je uvedeno v obrázku 15. Atomy C2, C6, respektive C3, C5 jsou při teplotě 303,7 K chemicky ekvivalentní. Při snižování teploty (obr. 16) však dochází u jejich signálů k rozšiřování (221 K) a štěpení (201 K). Z toho vyplývá, že ekvivalence při vyšší teplotě je způsobena dynamickým procesem, který střeďuje jejich chemické posuny. Protože se tento proces neprojevuje u C1 a C4, musí být symetrický podle spojnice C1 – C4. Jediný takový proces připadající v úvahu je změna natočení vodíkové vazby na dolním okraji molekuly. Protože k otočení vodíkové vazby může dojít jen za současného otočení vedlejší vodíkové vazby, je štěpení rezonancí C2, C6 a C3, C5 důsledkem změny směru celého pole vodíkových vazeb na dolním okraji kalix[4]arenu.



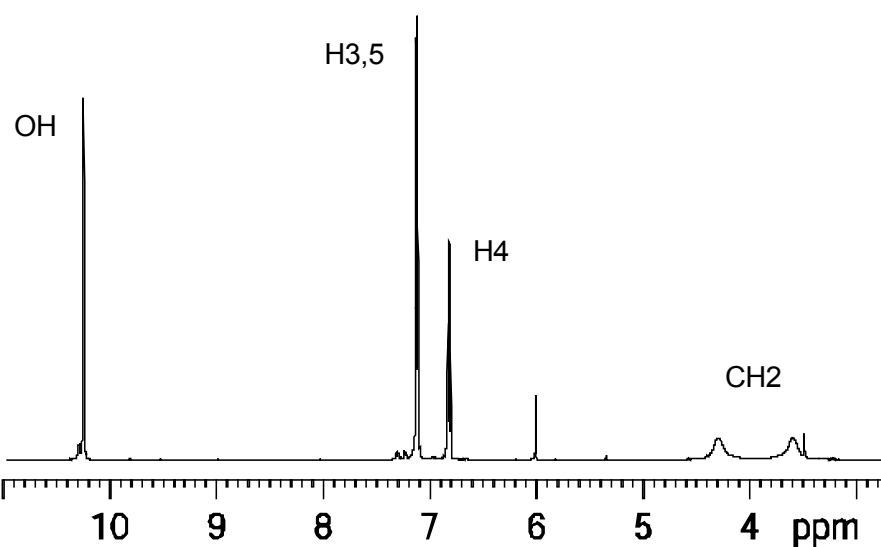
Obr. 15: ^{13}C NMR spektrum kalix[4]arenu v tetrachloroethanu- d_2 při teplotě 303,7 K.

^1H spektrum obsahuje 5 signálů, jejich přiřazení je uvedeno v obrázku 17. Ve spektru je patrné rozšíření signálů jader CH_2 skupiny. Je to důsledkem chemické výměny - převracením kalixarenové molekuly z konického konformeru

v převrácený konický konformer, při kterém si diastereotopické protony si vymění místo (obr. 9). Signál H3, H5 je dublet a signál H4 je triplet v důsledku vzájemné J-interakce. Signál OH skupiny je posunut k 10,2 ppm, což ukazuje na přítomnost silné vodíkové vazby.



Obr. 16: Teplotní závislost ^{13}C NMR spekter kalix[4]arenu v tetrachloroethanu- d_2 .



Obr. 17: ^1H NMR spektrum kalix[4]arenu v tetrachloroethanu- d_2 při teplotě 303,7 K.

5. 2. Relaxační doby T_1 a T_2 jader ^{13}C kalix[4]arenu

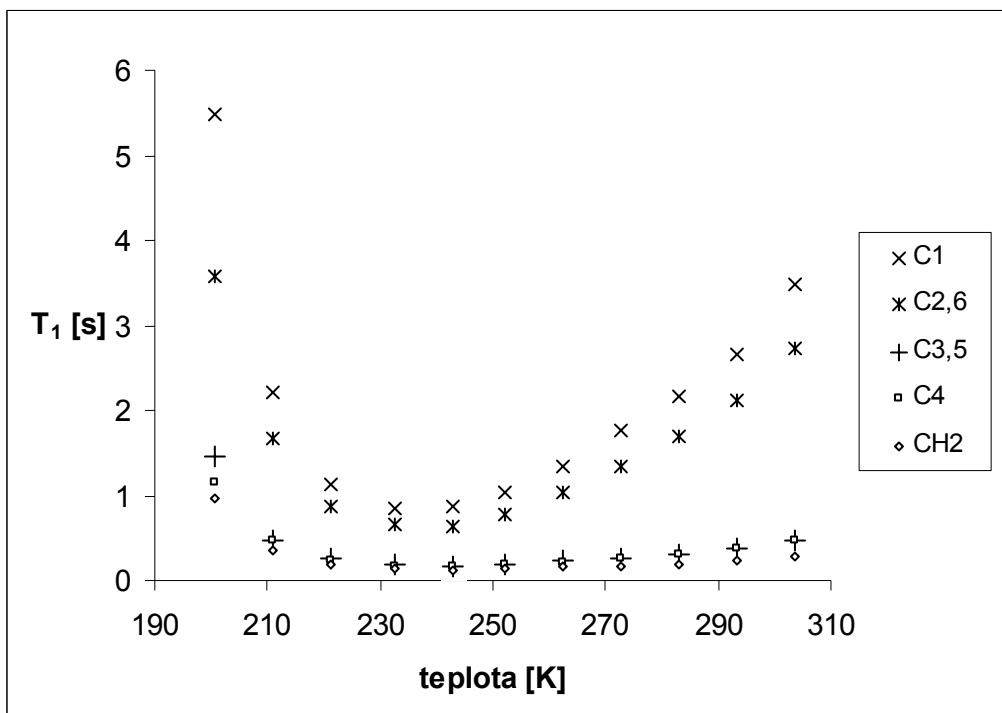
Podélné relaxační doby T_1 byly měřeny pomocí sekvence inversion recovery (obr. 11), příčné relaxační doby T_2 pomocí sekvence CPMG s konstantním echo časem (obr. 12). Naměřené hodnoty relaxačních časů v závislosti na teplotě jsou uvedeny v tabulkách 7, 8 a v grafech 1, 2. Chyba určení T_1 u jader C3, C5, C4 a CH_2 je 2,5%, u jader C1 a C2, C6 5%. Chyba určení relaxačních dob T_2 je 5%. Statistické chyby fitu při výpočtu T_1 a T_2 jsou menší, uvedené chyby jsou odhadnuté systematické chyby měření.

T [K]	T_1 [s]				
	C1	C2, C6	C3, C5	C4	CH_2
200.6	5.48	3.58	1.45	1.15	0.961
210.9	2.21	1.67	0.479	0.470	0.356
221.2	1.14	0.880	0.249	0.235	0.184
232.6	0.838	0.651	0.182	0.171	0.135
242.9	0.872	0.642	0.174	0.168	0.126
252.1	1.03	0.784	0.194	0.191	0.137
262.5	1.33	1.04	0.226	0.223	0.155
272.8	1.76	1.34	0.268	0.263	0.173
283.1	2.16	1.69	0.316	0.311	0.200
293.4	2.66	2.11	0.377	0.369	0.236
303.7	3.47	2.74	0.472	0.465	0.284

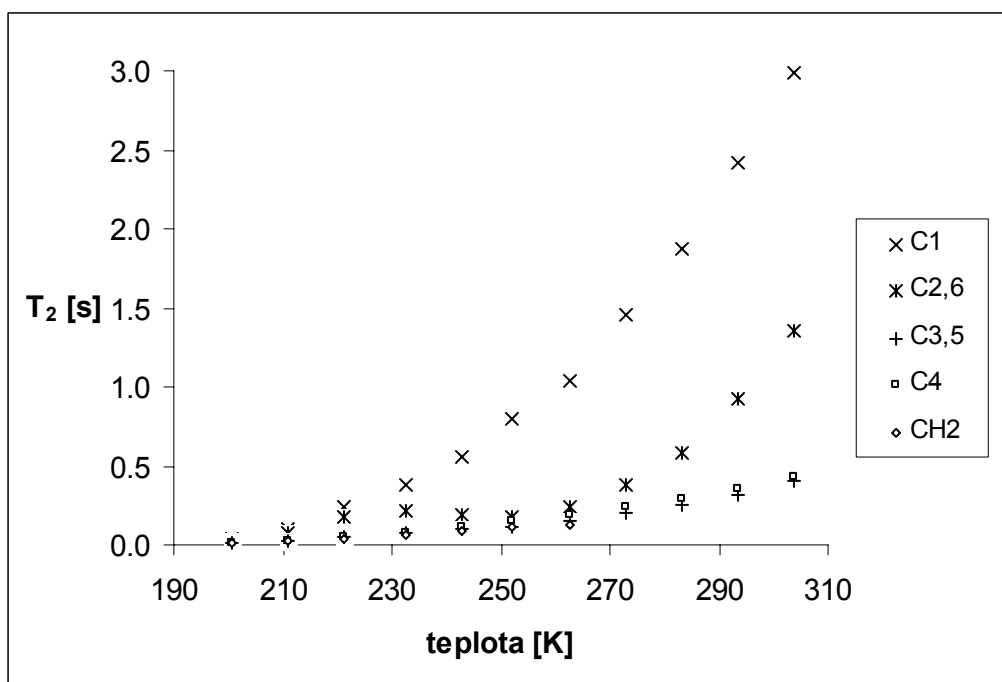
Tabulka 7: Závislost relaxačního času T_1 [s] na teplotě pro jednotlivá jádra ^{13}C .

T [K]	T_2 [s]				
	C1	C2, C6	C3, C5	C4	CH_2
200.6	0.0352	0.0227	0.00980	0.00886	0.00810
210.9	0.104	0.0779	0.0253	0.0268	0.0205
221.2	0.237	0.178	0.0547	0.0535	0.0404
232.6	0.382	0.210	0.0810	0.0800	0.0670
242.9	0.563	0.194	0.101	0.111	0.0860
252.1	0.793	0.182	0.116	0.147	0.109
262.5	1.04	0.238	0.146	0.186	0.129
272.8	1.46	0.386	0.198	0.239	
283.1	1.88	0.586	0.250	0.290	
293.4	2.42	0.921	0.322	0.357	
303.7	2.99	1.35	0.405	0.432	

Tabulka 8: Závislost relaxačního času T_2 [s] na teplotě pro jednotlivá jádra ^{13}C .



Graf 1: Závislost relaxačního času T_1 [s] na teplotě pro jednotlivá jádra ^{13}C .



Graf 2: Závislost relaxačního času T_2 [s] na teplotě pro jednotlivá jádra ^{13}C .

Jádra ^{13}C je možné rozdělit podle délky relaxačního času T_1 . Nejrychleji relaxuje uhlík skupiny CH_2 , neboť má na sebe přímo navázány dva protony a relaxuje v důsledku dipól-dipólové interakce s nimi. Uhlíky C3, C5 a C4 mají přímo vázaný pouze jeden vodík, a proto relaxují pomaleji než uhlík CH_2 . K jejich relaxaci též

z menší části přispívá CSA. Nejpomaleji relaxují uhlíky C2, C6 a C1, které nemají vodík a relaxují zejména vlivem CSA a částečně též vlivem DD interakce s ostatními protony v molekule.

Rozdělení do skupin podle délky relaxačních dob T_2 odpovídá rozdělení podle T_1 . Velikosti relaxačních časů T_2 uhlíků C2, C6 a C1 by měly být přibližně stejné, neboť tyto uhlíky relaxují stejným mechanismem. Z tabulky 8 a grafu 2 je však patrné, že uhlíky C2, C6 mají výrazně kratší T_2 než C1. Tento výsledek nasvědčuje tomu, že relaxace uhlíků C2, C6 je kromě CSA způsobena ještě jiným relaxačním mechanismem. Stejně tak uhlíky C3, C5 relaxují poněkud rychleji ve srovnání s uhlíkem C4. Procesem, který selektivně ovlivní příčnou relaxaci (T_2) a neprojeví se na podélné relaxaci (T_1 , NOE) je chemická výměna. Souvisí to s faktem, že příčná relaxační doba je zkracována i relativně pomalými pohyby a tedy i chemickou výměnou, která existuje mezi páry C2, C6 a C3, C5.

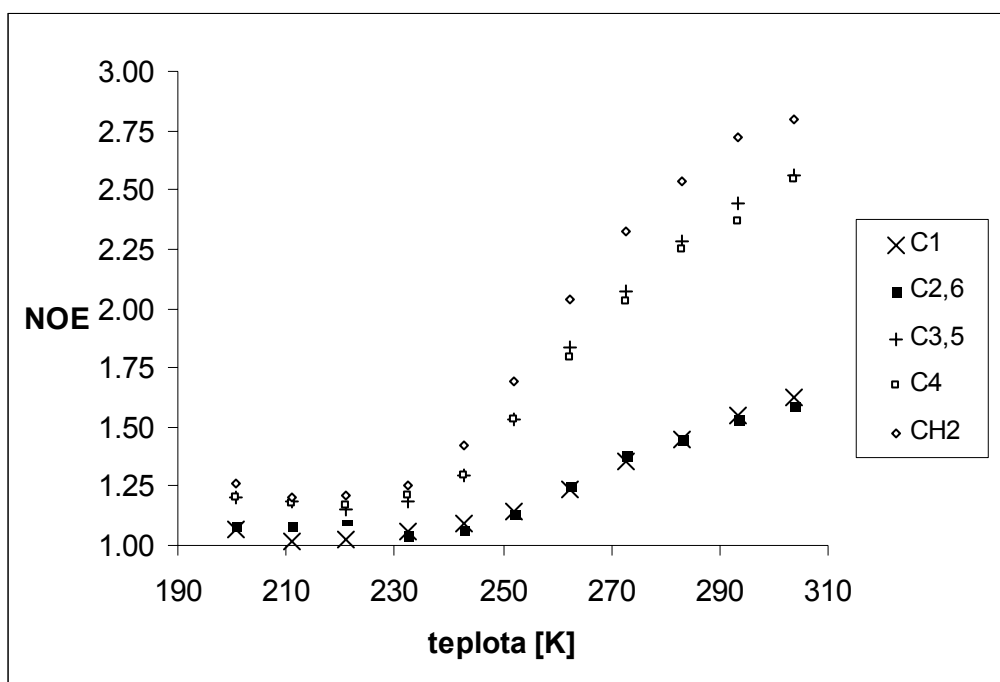
Z grafů 1 a 2 je vidět, že naměřené příčné relaxační doby (T_2) se s klesající teplotou zkracují, zatímco podélné relaxační doby (T_1) dosahují při určité teplotě minima a pak opět rostou. Tento výsledek je ve shodě s teorií a odpovídá opuštění režimu extrémního zúžení při snižování teploty.

5. 3. Heteronukleární ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE v kalix[4]arenu

Pomocí sekvence pro dynamické NOE, znázorněné na obrázku 13 byl měřen přenos magnetizace z ^1H na ^{13}C vlivem DD interakce, tedy velikost stacionárního heteronukleárního Overhauserova efektu. Výsledné hodnoty NOE jsou v závislosti na teplotě uvedeny v tabulce 9 a grafu 3. Měření bylo provedeno pro stejné teploty jako měření relaxačních dob. Chyba určení NOE byla odhadnuta na 5%.

T [K]	NOE				
	C1	C2, C6	C3, C5	C4	CH_2
200.6	1.07	1.08	1.20	1.20	1.26
210.9	1.02	1.08	1.19	1.18	1.20
221.2	1.03	1.11	1.15	1.17	1.21
232.6	1.06	1.04	1.19	1.21	1.26
242.9	1.09	1.07	1.30	1.30	1.42
252.1	1.15	1.14	1.53	1.53	1.69
262.5	1.23	1.26	1.83	1.79	2.04
272.8	1.36	1.38	2.07	2.03	2.33
283.1	1.45	1.44	2.28	2.25	2.53
293.4	1.55	1.53	2.45	2.37	2.72
303.7	1.62	1.59	2.56	2.55	2.79

Tabulka 9: Závislost NOE na teplotě pro jednotlivá jádra ^{13}C .



Graf 3: Závislost *NOE* na teplotě pro jednotlivá jádra ^{13}C .

Z tabulky 9 a grafu 3 je vidět, že největší hodnoty *NOE* byly naměřeny u uhlíku CH_2 skupiny, menší hodnoty u uhlíků C3, C5 a C4 a nejmenší u uhlíků C2, C6 a C1. Tento výsledek odpovídá rozdílnému příspěvku DD a CSA interakcí k podélné relaxační rychlosti ve jmenovateli rovnice 27. Tensor chemického posunu ^{13}C methylenové skupiny je prakticky isotropaní, takže *NOE* je nejvyšší. V případě C3, C5 a C4 je příspěvek CSA vzhledem k DD interakci malý ale nikoli zanedbatelný, a tudíž *NOE* je poněkud menší. V případě C2, C6 a C1, které nemají přímo vázaný vodík, je *NOE* velmi malé, protože DD interakce se vzdálenějšími protony je slabá vzhledem k CSA. Teplotní závislost *NOE* dosahuje minima v okolí 210 K, na druhou stranu se jeho hodnota pro CH_2 skupinu blíží 2,99, což je teoretické maximum.

5. 4. Stanovení dynamického chování kalix[4]arenu v nano – pikosekundové časové škále

Naměřené relaxační parametry při jednotlivých teplotách byly použity ke stanovení parametrů rotační difúze kalix[4]arenu s využitím rovnic 25, 26 a 27. Pro konstrukci spektrálních hustot byl použit model isotropaní rotace tuhé koule (rovnice 16), který obsahuje jediný nezávislý parametr, a to globální korelační čas τ_M . Použití tohoto nejjednoduššího modelu je odůvodněno výsledky studie Shultese a kol., kteří nezjistili žádné vnitřní pohyby v kalixarenu v časové škále nano – pikosekund.²⁵ Obdobně ve studii tetrasulfonové kyseliny kalix[4]arenu²⁶ nebyly nalezeny signifikantní interní pohyby. Navíc vnější rozměry kalix[4]arenu v kartézských osách jsou si blízké²⁷ a tudíž není třeba předpokládat žádnou výnamnou anisotropii v molekulární rotaci.

Pro tento výpočet samozřejmě není možné použít naměřené hodnoty T_2 pro jádra C2, C6, C3, C5, protože obsahují i příspěvek chemické výměny, která není zahrnuta

ve vztazích 25, 26 a 27. Pro konstantu DD interakce mezi přímo vázanými atomy C, H byla použita hodnota 21,5 kHz pro aromatické uhlíky a 20,7 kHz pro methylenovou spojku. Tyto konstanty odpovídají CH vzdálenostem 112 pm, respektive 113,4 pm. Tyto vzdálenosti jsou delší než jsou příslušné hodnoty získané difrakčními metodami v krystalech, ale jsou vhodné jako efektivní hodnoty pro interpretaci magnetické dipól-dipólové interakce,^{28;29} patrně vzhledem k vibračnímu středování meziatomové vzdálenosti (přesněji její třetí mocniny). Pro jádra C1 a C2, C6, která nenesou přímo vázaný proton, byla též aplikována korekce na DD interakci se vzdálenými protony, a to tím způsobem, že byly pomocí *ab initio* vypočítané geometrie²⁷ odhadnuty vzdálenosti a z nich vypočítané DD interakční konstanty byly sečteny. Pro stanovení vlivu CSA relaxačního mechanismu je nutné znát „amplitudu interakce“, veličinu CSA_{eff} , získanou ze složek tenzoru chemického posunu. Pro jednotlivé uhlíky byly použity hodnoty podle tabulky 10, získané *ab initio* výpočtem.²⁷

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	průměr C2, C6	průměr C3, C5
CSA_{eff} [ppm]	132	157	171	183	171	158	157	171

Tabulka 10: Hodnoty CSA_{eff} použité při výpočtu parametrů rotační difúze kalix[4]arenu získané *ab initio* výpočtem.²⁷

Výpočet rotačního korelačního času molekuly τ_M (tabulka 11 a graf 4) byl proveden pro všechna jádra a všechny použité relaxační parametry současně. Chyby korelačních časů byly získány Monte Carlo simulací – bylo vygenerováno 200 nových souborů relaxačních dat tak, že nové hodnoty byly generovány náhodně z normálního rozdělení se středem v experimentální hodnotě a se šířkou danou chybou příslušného experimentálního bodu (2,5%, resp. 5%). Pro každý vygenerovaný soubor relaxačních dat byl vypočítán korelační čas. Standardní odchylka takto vypočítaných hodnot je uváděna jako chyba ve stanovení korelačního času τ_M .

Z výsledků uvedených v tabulce 11 lze vidět, že velikosti rotačních korelačních časů molekuly kalixarenu jsou řádově v nanosekundách. Fitem Arrheniovy rovnice 11 byly z naměřené závislosti rotačního korelačního času na teplotě určeny aktivační parametry rotace molekuly kalix[4]arenu:

$$\tau_0 = 26 \text{ fs } (\pm 10 \text{ fs})$$

$$E_A = 21 \text{ kJ.mol}^{-1} (\pm 1 \text{ kJ.mol}^{-1}).$$

Chyby byly stanoveny obdobně jako v případě korelačního času τ_M . „Nové“ soubory hodnot korelačních časů byly generovány v rámci standardní odchylky fitu „skutečných“ τ_M .

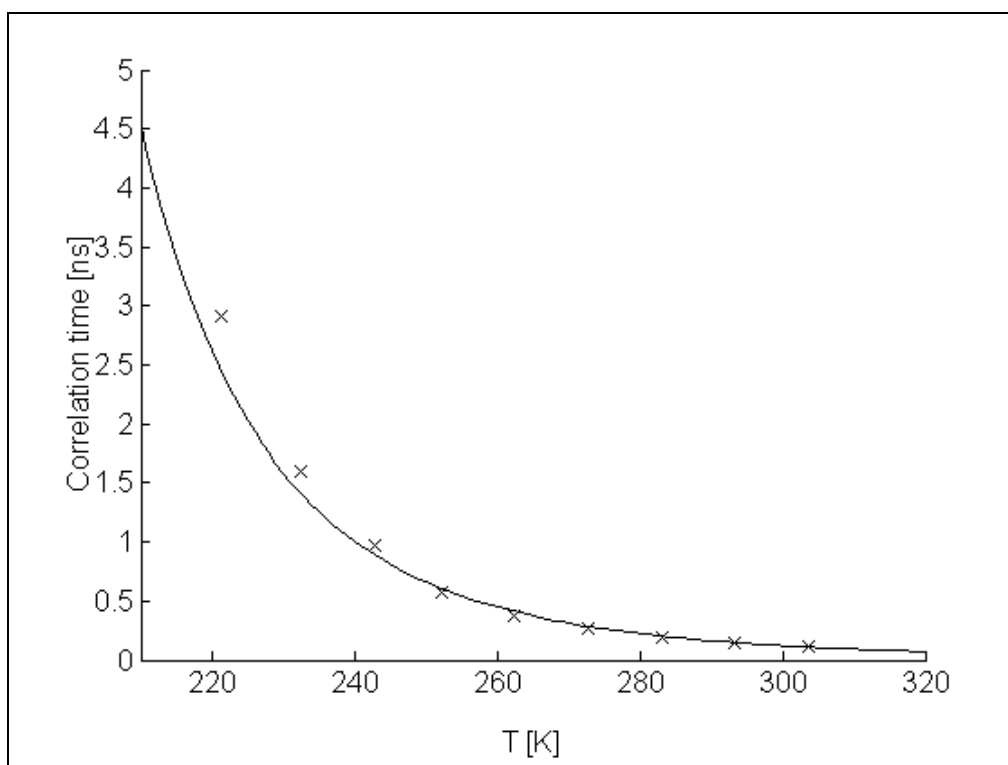
Získané aktivační parametry pro rotační difúzi molekuly kalix[4]arenu jsou ve velmi dobrém souhlasu s dříve publikovanými výsledky pro kalix[4]aren-*p*-sulfonovou kyselinu v D₂O ($\tau_0 = 17,4 \text{ fs}$, $E_A = 25.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$), pentasodnou sůl kalix[4]aren-*p*-sulfonové kyseliny v D₂O ($\tau_0 = 80 \text{ fs}$, $E_A = 20.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$)²⁶ (publikované τ_0 je vynásobeno příslušným parametrem uspořádanosti S^2 kvůli porovnání s isotropním modelem, použitým v našem případě).

Shultes a kol. měřili pohyblivost kalix[4]arenu v CDCl₃ a DMSO-*d*₆ při jediné teplotě 303 K a získali τ_M 38,5 ps respektive 159 ps (při předpokládané vzdálenosti CH

113 ps).²⁵ Naše hodnota 114 ps při 303,7 K je v rozmezí určeném publikovanými hodnotami, což kvalitativně odpovídá viskozitám použitých rozpouštědel.

T [K]	τ_M [ns]	chyba τ_M [%]
221.2	2.91	2
232.6	1.60	4
242.9	0.969	3
252.1	0.566	4
262.5	0.377	3
272.8	0.263	3
283.1	0.197	3
293.4	0.152	2
303.7	0.114	2

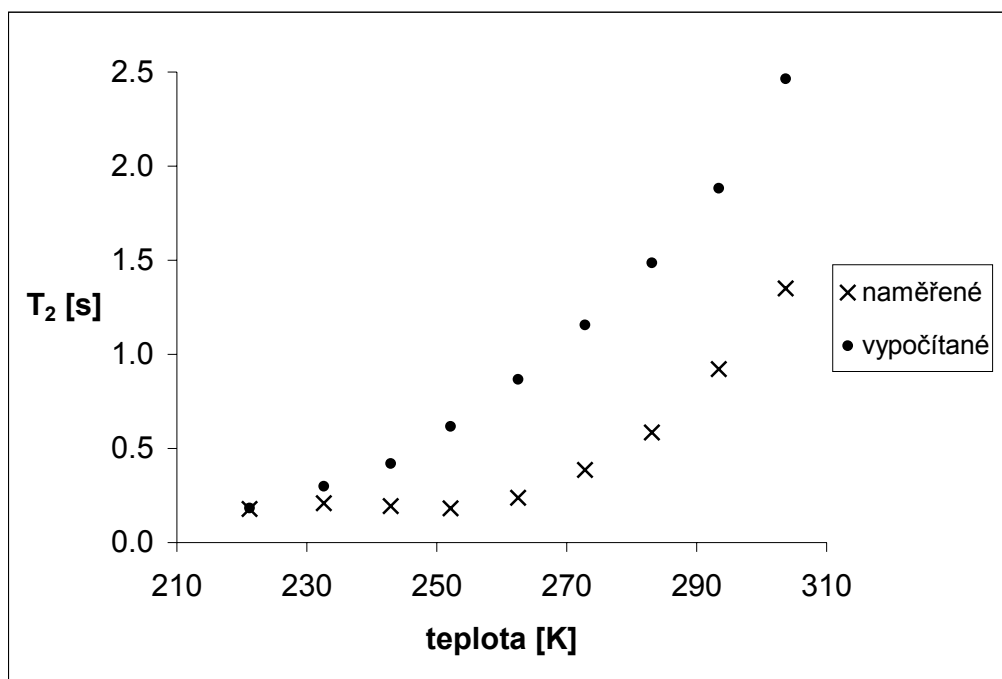
Tabulka 11: Rotační korelační časy molekuly kalix[4]arenu v závislosti na teplotě.



Graf 4: Rotační korelační časy molekuly kalix[4]arenu v závislosti na teplotě s naitovanou Arrheniovou závislostí (rovnice 11).

T [K]	T_{2teor} [s]	
	C2, C6	C3, C5
221.2	0.184	0.055
232.6	0.300	0.088
242.9	0.420	0.119
252.1	0.617	0.159
262.5	0.868	0.197
272.8	1.156	0.242
283.1	1.487	0.293
293.4	1.882	0.356
303.7	2.464	0.452

Tabulka 12: Vypočítané hodnoty teoretických relaxačních časů T_{2teor} [s] pro jádra C2, C6 a C3, C5 bez vlivu chemické výměny v závislosti na teplotě.



Graf 5: Porovnání vypočítaných hodnot T_{2teor} příčných relaxačních časů pro jádra C2, C6 s naměřenými hodnotami T_2 v závislosti na teplotě.

Součástí fitu rovnic 25, 26, 27 je výpočet teoretických hodnot relaxačních parametrů, a tedy stanovení příčných relaxačních dob T_{2teor} jader C2, C6 a C3, C5 očištěných o vliv chemické výměny. Jsou uvedeny v tabulce 12 a jejich porovnání s naměřenými hodnotami pro uhlíky C2, C6 je znázorněno v grafu 5. Pro stanovení těchto relaxačních dob byl do čitatele výrazu pro spektrální hustoty $J(\omega)$ (rovnice 16) ke korelačnímu času přidán faktor F , specifický pro každé jádro. Důvodem bylo, že vzájemné naškálování DD konstant a CSA_{eff} pro jednotlivé skupiny uhlíků, relaxujících odlišnými mechanismy, není snadné, protože absolutní výše obou konstant závisí na metodě jejich stanovení. Korekční faktor pak vyjadřuje míru nekonsistence modelu pro jednotlivé skupiny jader. V našem případě se jeho hodnoty pohybovaly v rozmezí

$1 \pm 0,13$. Korekční faktor F tak slouží ke stanovení teoretických hodnot $T_{2\text{teor}}$ atomů C2, C6 a C3, C5 očištěných o systematickou chybu ve velikostech použitých DD konstant a CSA_{eff} .

Výsledky uvedené v tabulce 12 a v grafu 5 jednoznačně potvrzují, že jádra C2, C6 (a C3, C5) skutečně relaxují rychleji, než by odpovídalo relaxaci vlivem dipól-dipólové interakce a CSA. K jejich relaxaci tedy přispívá chemická výměna, kterou je změna orientace vodíkových vazeb mezi OH skupinami na dolním okraji molekuly. Jádra C2 se tak dostávají do chemického okolí, ve kterém se dříve nacházely jádra C6, a naopak. To v menší míře platí i pro C3 a C5. Tento proces způsobuje urychlení příčné relaxace jader C2, C6 a C3, C5. Je pozorovatelný i v uhlíkovém spektru jako rozšíření a štěpení čar C2, C6 a C3, C5 při teplotách 221 K a méně (obr. 16), při vyšších teplotách může být sledován pomocí sekvence CPMG s proměnnou délkou echo-času (viz níže).

Směr pole vodíkových vazeb by se mohl změnit při přechodu konického konformeru v převrácený konický konformer (obr. 9), při kterém musí dojít k přerušení alespoň některých vodíkových vazeb na dolním okraji. Tento proces může být pozorován na ^1H rezonancích CH_2 skupiny, kde způsobuje rozšíření čar (obr. 17), při nižší teplotě pak může být pomalá chemická výměna monitorována pomocí metody EXSY. Další náplní této práce bylo zjistit, jaký je vztah mezi těmito dvěma ději, zda-li přerušování a změna směru vodíkových vazeb souvisí s procesem převrácení molekuly.

5. 5. Chemická výměna „cone – převrácený cone“

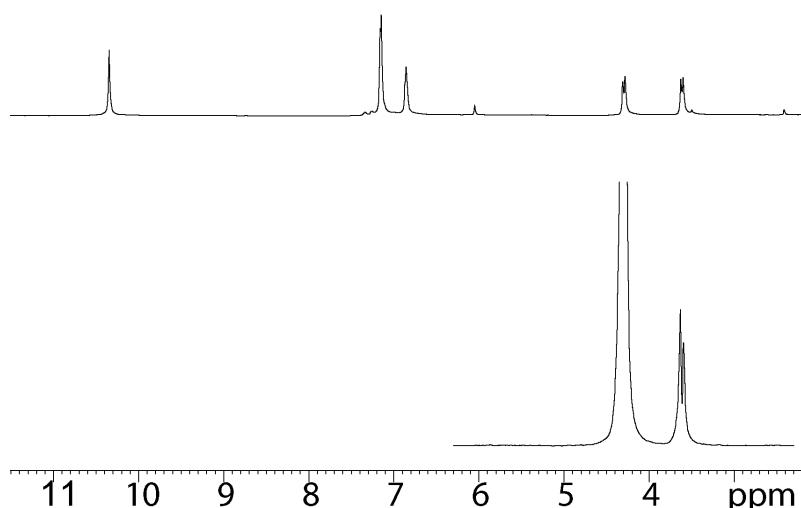
K měření rychlosti chemické výměny byla použita metoda 1D-EXSY (obr. 14), při níž byl sledován přenos magnetizace mezi vodíky CH_2 skupiny. Během směšovacího času dochází mezi těmito vodíky k přenosu magnetizace vlivem chemické výměny, ale navíc také vlivem NOE. Aby bylo možné zjistit velikost chemické výměny, byl příspěvek NOE odhadnut na základě měření přenosu magnetizace mezi dvěma *ortho*-vodíky aromatického kruhu, mezi nimiž neprobíhá chemická výměna.

Při teplotách od 221,2 K do 262,5 K byla měřena spektra pro několik hodnot směšovacího času t_{mix} při selektivním ozařování jednoho z vodíků, a poté při selektivním ozařování druhého vodíku interagujícího páru. Příklad naměřené závislosti (relativní) intenzity signálů obou vodíků na směšovacím čase je uveden v grafu 6. Naměřenými závislostmi intenzity signálů neozařovaných vodíků na t_{mix} byly proloženy polynomy 2. řádu. Faktor lineárního členu udává rychlost přenosu magnetizace $k_{(\text{noe}+\text{ex_CH}_2)}$. Stejným postupem byla z naměřených závislostí intenzit signálů vodíků aromatického kruhu na t_{mix} zjištěna rychlost $k_{(\text{noe_H}_{3,4})}$ přenosu magnetizace vlivem NOE. Vzdálenost vodíků v aromatickém kruhu je 0,248 nm, vzdálenost vodíku v CH_2 skupině je 0,175 nm.²⁷ Protože velikost NOE klesá se šestou mocninou vzdálenosti mezi interagujícími spiny, je NOE mezi vodíky v CH_2 skupině přibližně 11 krát větší než mezi vodíky aromatického kruhu. Výsledná hodnota rychlosti chemické výměny $k_{\text{ex_CH}_2}$ byla určena odečtením odhadnutého příspěvku NOE $k_{(\text{noe_CH}_2)}$ od naměřené hodnoty rychlosti přenosu magnetizace (tabulka 13).

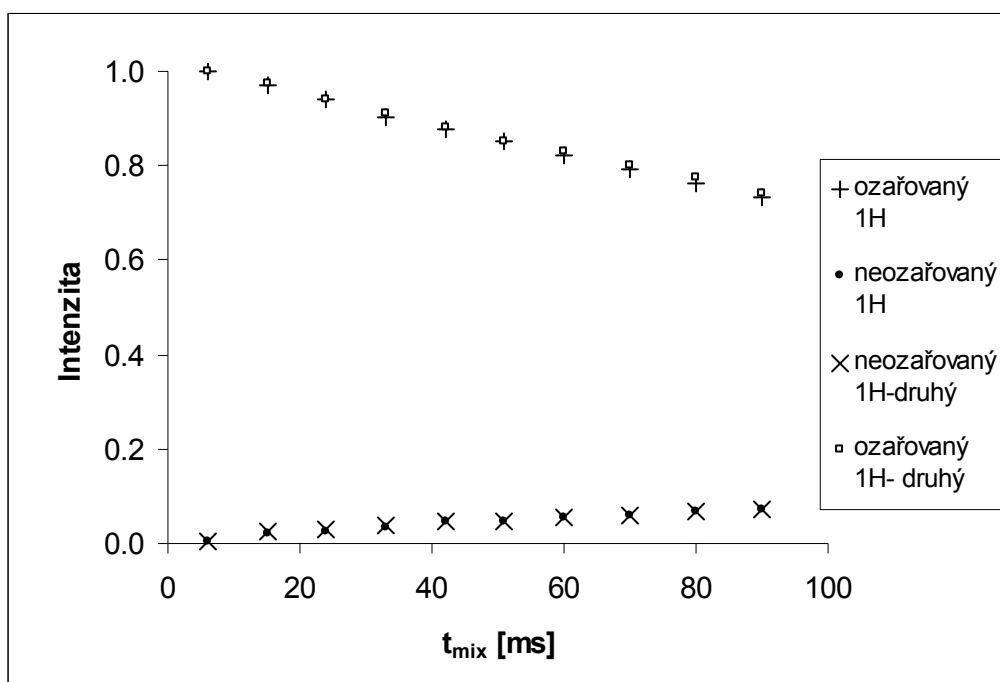
$T[\text{K}]$	$k_{1(\text{noe+ex_CH}_2)}$ [s ⁻¹]	$k_{2(\text{noe+ex_CH}_2)}$ [s ⁻¹]	$k_{(\text{noe+ex})}$ průměr(k_1, k_2) [s ⁻¹]	$k_{(\text{noe_H}_{3,4})}$ [s ⁻¹]	$k_{(\text{noe_CH}_2)}$ [s ⁻¹]	$k_{\text{ex_CH}_2}$ [s ⁻¹]
262.5	1.99	1.94	1.97	0	0	1.97
252.1	1.20	1.13	1.17	0.0148	0.12	1.05
242.9	1.58	1.65	1.61	0.0951	0.77	0.85
232.6	3.03	2.83	2.93	0.268	2.16	0.77
221.2	5.60	5.19	5.40	0.505	4.07	1.32

Tabulka 13: Určení rychlosti chemické výměny mezi vodíky CH₂ skupiny $k_{\text{ex_CH}_2}$ pomocí EXSY. $k_{1(\text{noe+ex_CH}_2)}$ a $k_{2(\text{noe+ex_CH}_2)}$ jsou rychlosti přenosu magnetizace vlivem chemické výměny a NOE při excitaci prvního resp. druhého vodíku CH₂ skupiny, $k_{(\text{noe+ex})}$ je průměr($k_{1(\text{noe+ex_CH}_2)}$, $k_{2(\text{noe+ex_CH}_2)}$), $k_{(\text{noe_H}_{3,4})}$ je rychlost přenosu magnetizace mezi vodíky aromatického kruhu vlivem NOE, $k_{(\text{noe_CH}_2)}$ je odhadnutý příspěvek NOE ke $k_{(\text{noe+ex_CH}_2)}$.

Z výsledků vyplývá, že rychlost chemické výměny mezi vodíky CH₂ skupiny, a tedy rychlost převrácení kalixarenového kruhu mezi konickým a převráceným konickým konformerem se řádově pohybuje okolo 1 s⁻¹. Rychlost chemické výměny je poměrně dobře určená pro teploty 243 – 263 K. Při nižších teplotách, kdy se chemická výměna zpomaluje, je příspěvek NOE k celkovému přenosu magnetizace mezi methylenovými vodíky dominantní a získané rychlosti chemické výměny mají jen orientační význam. Rychlost převrácení konického konformeru je známa z literatury – volná aktivační energie procesu je udávána 59 – 63 kJ.mol⁻¹ (odpovídá zhruba rychlosti výměny 1 s⁻¹)³⁰ a naše měření byla provedena jen pro řádové ověření publikovaných hodnot. Protože se ukázalo (viz níže), že chování pole vodíkových vazeb není korelované s převrácením konického konformeru, nebylo potřebné tento pohyb zkoumat podrobněji.



Obr. 18: Měření EXSY. V horní části obrázku je pro srovnání uvedeno ¹H NMR spektrum kalix[4]arenu při teplotě 252,1 K. Ve spodní části obrázku je vidět navýšení signálu jednoho vodíku CH₂ skupiny vlivem přenosu magnetizace z ozařovaného druhého vodíku CH₂ skupiny při téže teplotě.



Graf 6: Příklad naměřené závislosti (relativní) intenzity signálů obou vodíků na směšovacím čase t_{mix} při měření chemické výměny pomocí EXSY při teplotě 252,1 K.

5. 6. Dynamika pole vodíkových vazeb

5. 6. 1. Výsledky měření chemické výměny pomocí sekvence CPMG s proměnným echo - časem

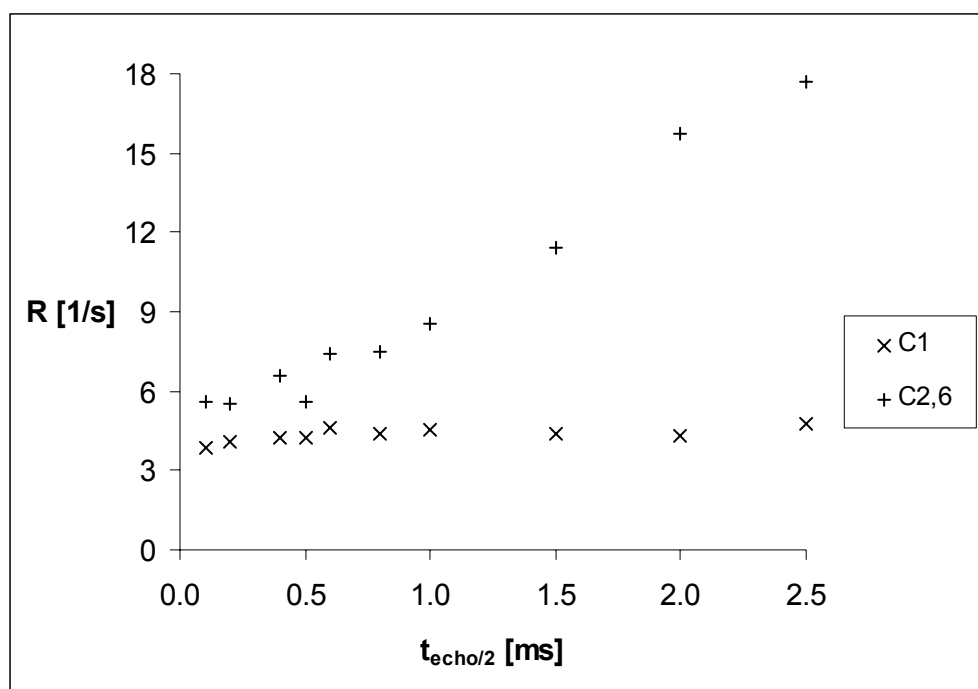
K příčné relaxaci jader C2, C6 přispívají tři složky, relaxace vlivem CSA, relaxace vlivem DD interakce a relaxace vlivem chemické výměny. Velikost relaxační rychlosti bez chemické výměny R^{DD+CSA} , tedy jen vlivem CSA a DD interakce, byla určena výše jako R_{2teor} (viz kap. 5. 4). Z této hodnoty a ze skutečně naměřené relaxační rychlosti (R_2) lze určit příspěvek k relaxační rychlosti způsobený chemickou výměnou R_{ex} . Rychlost chemické výměny k_{ex} lze určit ze vztahu pro závislost R_2 na $t_{echo/2}$ v sekvenci CPMG (rovnice 32). Tato závislost byla změřena pro devět různých teplot v rozmezí od 221,2 K do 303,7 K při hodnotách $t_{echo/2}$ v rozmezí 100 μ s – 5 ms. Naměřené závislosti relaxačních rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ jsou uvedeny v tabulkách 14- 22 a grafech 7- 15. Pro srovnání jsou v grafech uvedeny i relaxační rychlosti R_2 pro C1, které nezávisí na velikosti $t_{echo/2}$, a tedy neobsahují příspěvek chemické výměny.

Změřené příčné relaxační rychlosti C3, C5 též závisí na délce echočasu $t_{echo/2}$ obdobně jako C2, C6, nicméně tato závislost je méně zřetelná a navíc pro delší echočasy je příčná relaxace významně modulována $^1J_{CH}$ interakcí, která není dostatečně dekaplována 1H π -pulzy mezi spinovými echy v CPMG sekvenci (viz obr. 12). Proto

byla rychlost chemické výměny vyhodnocována jen ze signálu C2, C6. Pro úplnost dodáváme, že R_2 pro C4 nezávisí na délce echo-času.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.1	3.84	5.62
0.2	4.10	5.48
0.4	4.27	6.58
0.5	4.21	5.62
0.6	4.63	7.43
0.8	4.36	7.47
1.0	4.51	8.55
1.5	4.42	11.4
2.0	4.28	15.7
2.5	4.78	17.7

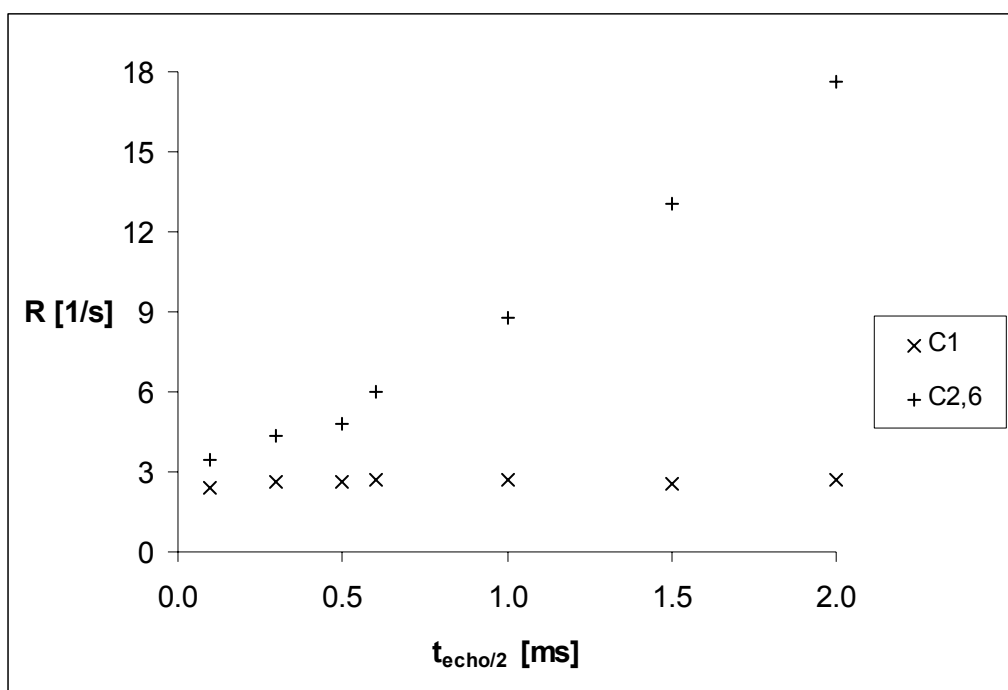
Tabulka 14: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 221,2 K.



Graf 7: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 221,2 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.1	2.38	3.45
0.3	2.59	4.32
0.5	2.60	4.74
0.5	2.64	4.79
0.6	2.72	5.99
1.0	2.71	8.76
1.5	2.55	13.0
2.0	2.69	17.6

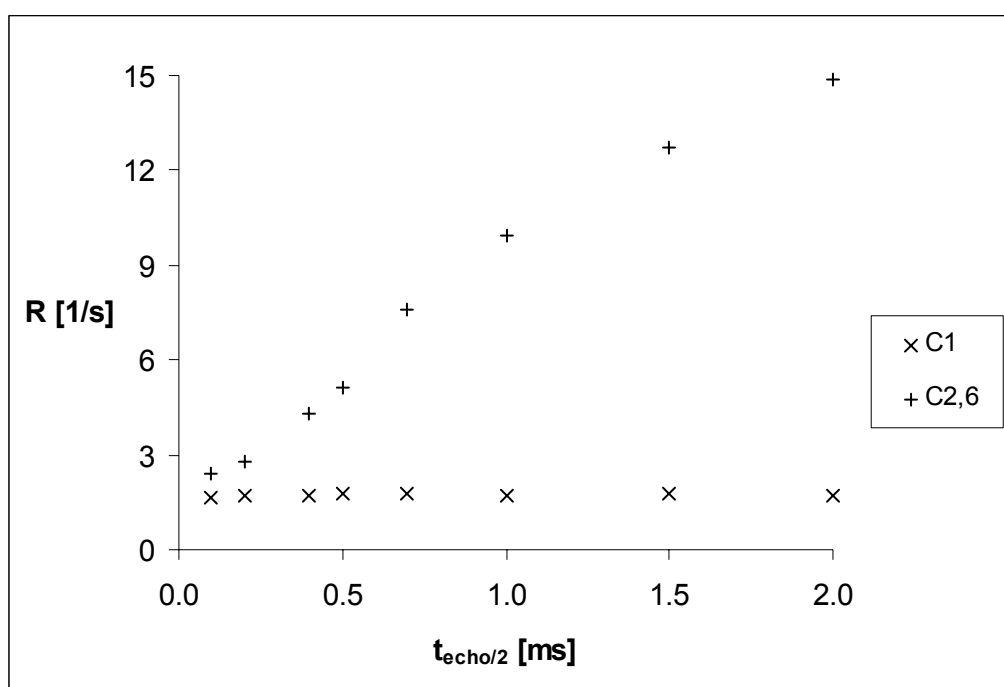
Tabulka 15: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 232,6 K.



Graf 8: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 232,6 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.1	1.63	2.42
0.2	1.73	2.78
0.4	1.70	4.31
0.5	1.77	5.15
0.5	1.78	5.15
0.7	1.78	7.62
1.0	1.73	9.92
1.5	1.76	12.7
2.0	1.70	14.9

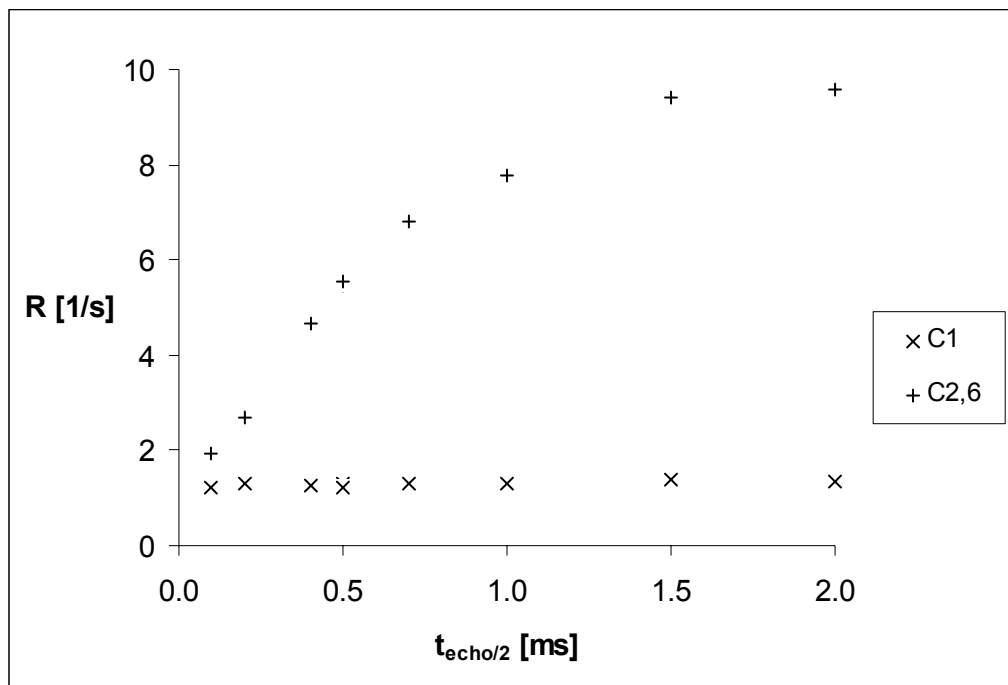
Tabulka 16: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 242,9 K.



Graf 9: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 242,9 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.1	1.21	1.94
0.2	1.29	2.69
0.4	1.27	4.66
0.5	1.28	5.46
0.5	1.24	5.55
0.7	1.32	6.81
1.0	1.31	7.78
1.5	1.41	9.40
2.0	1.36	9.56

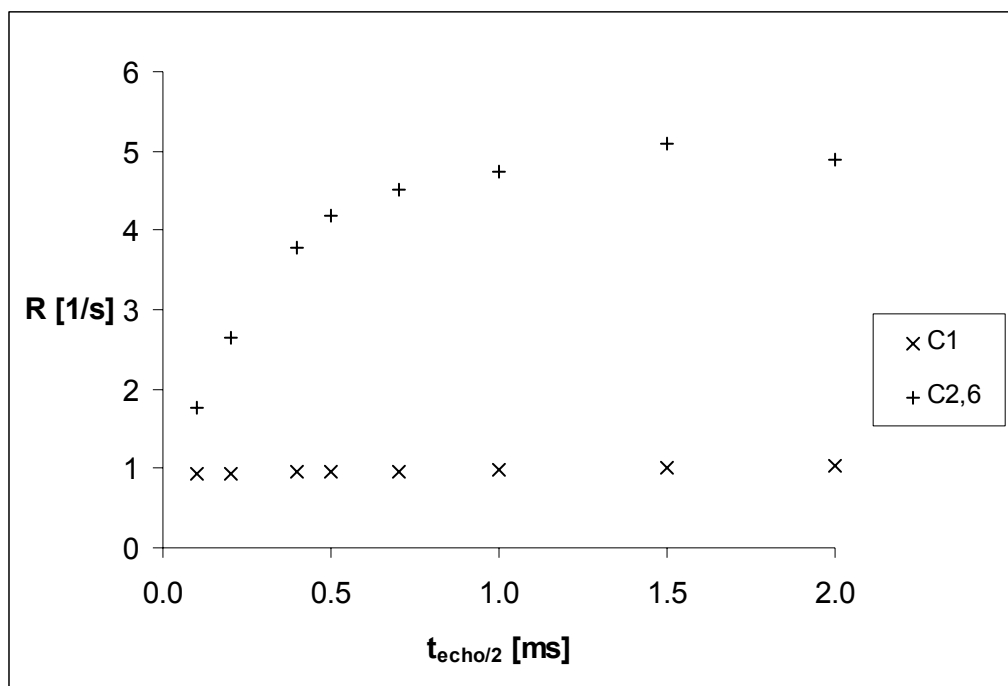
Tabulka 17: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 252,1 K.



Graf 10: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 252,1 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.1	0.924	1.77
0.2	0.926	2.65
0.4	0.952	3.78
0.5	0.959	4.19
0.7	0.955	4.52
1.0	0.974	4.73
1.5	1.01	5.10
2.0	1.04	4.90

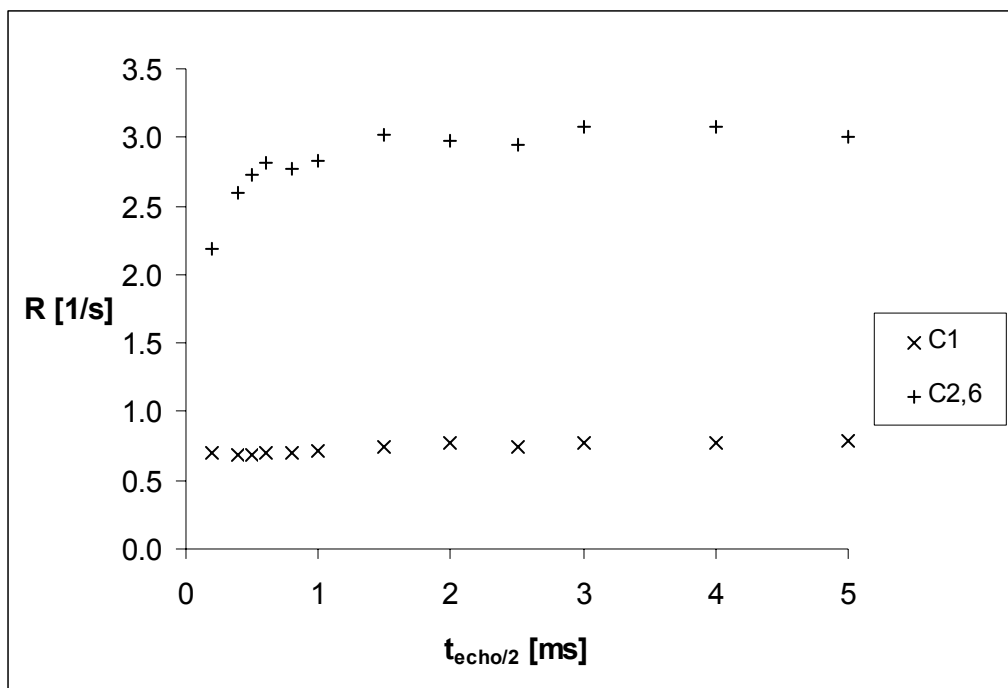
Tabulka 18: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 262,5 K.



Graf 11: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 262,5 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.2	0.694	2.18
0.4	0.685	2.59
0.5	0.685	2.72
0.6	0.699	2.82
0.8	0.702	2.77
1.0	0.714	2.83
1.5	0.739	3.02
2.0	0.767	2.97
2.5	0.739	2.94
3.0	0.741	3.07
3.0	0.776	3.08
4.0	0.770	3.07
5.0	0.792	3.00

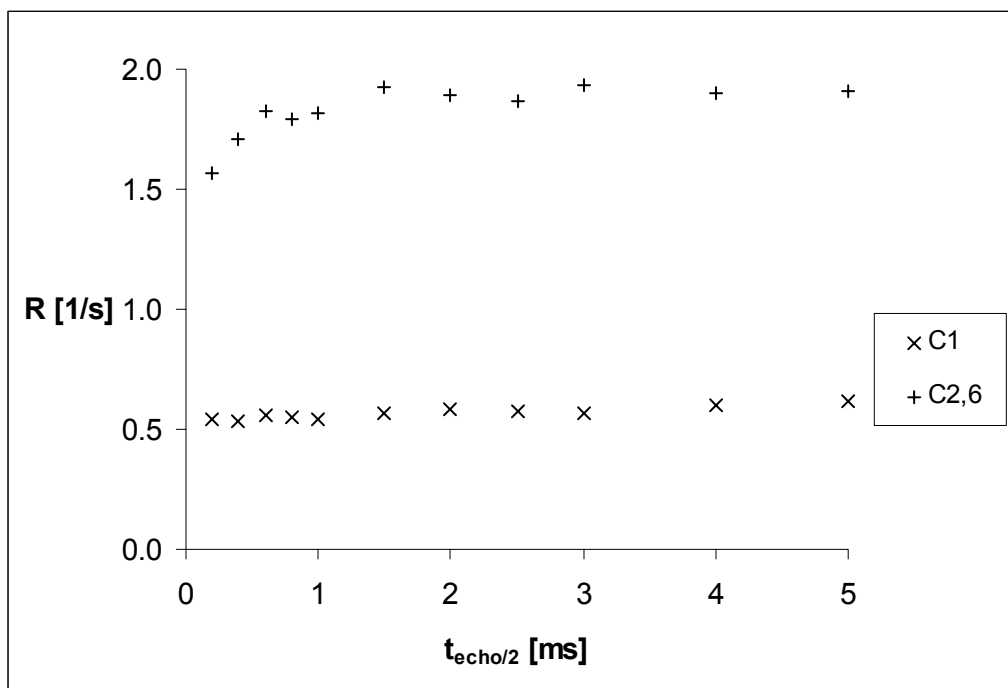
Tabulka 19: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 272,8 K.



Graf 12: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 272,8 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.2	0.546	1.57
0.4	0.532	1.71
0.6	0.557	1.83
0.8	0.552	1.79
1.0	0.542	1.82
1.5	0.563	1.92
2.0	0.587	1.89
2.5	0.571	1.87
3.0	0.565	1.93
4.0	0.596	1.90
5.0	0.614	1.91

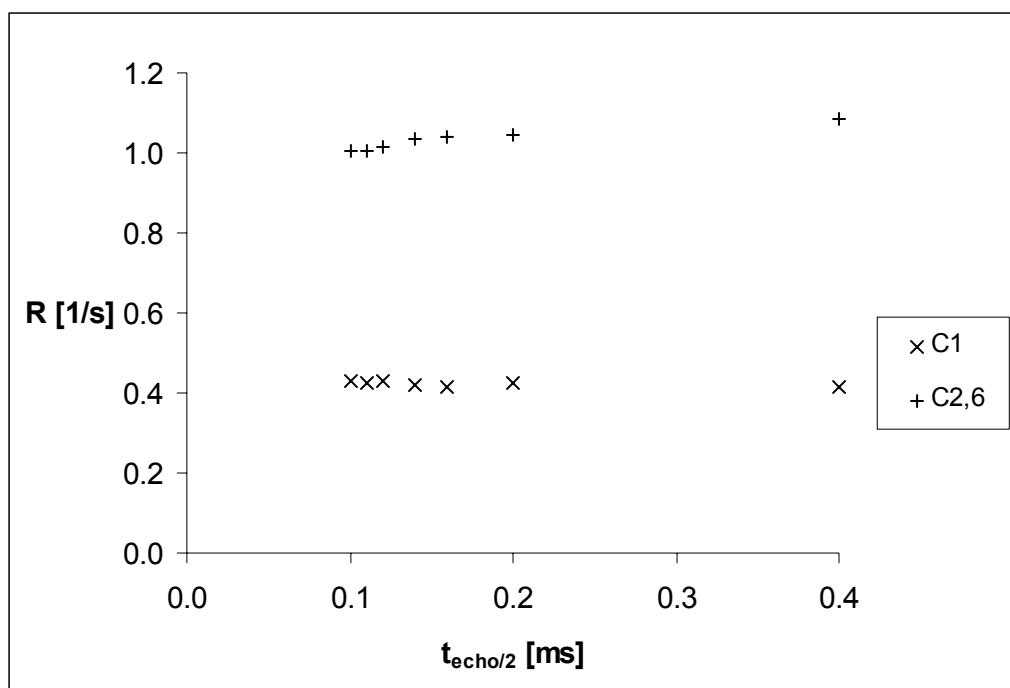
Tabulka 20: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 283,1 K.



Graf 13: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 283,1 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.10	0.431	1.00
0.11	0.424	1.00
0.12	0.430	1.01
0.14	0.420	1.03
0.16	0.417	1.04
0.20	0.425	1.04
0.40	0.413	1.09

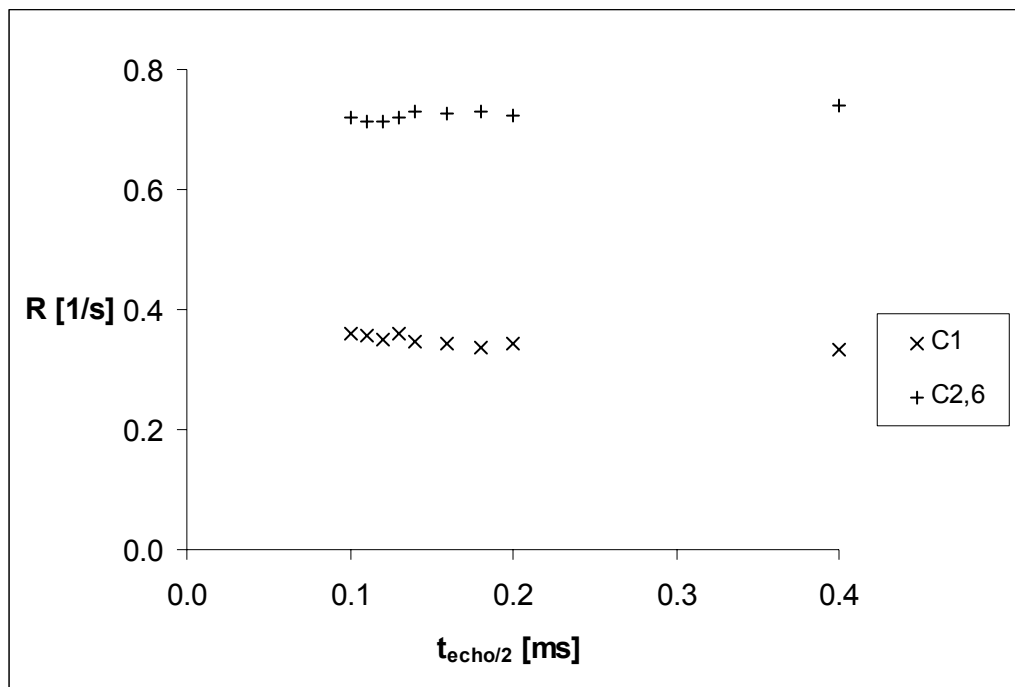
Tabulka 21: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 293,4 K.



Graf 14: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 293,4 K.

$t_{echo/2}$ [ms]	$R_2(C1)$ [s^{-1}]	$R_2(C2,6)$ [s^{-1}]
0.10	0.359	0.719
0.11	0.357	0.712
0.12	0.351	0.713
0.13	0.361	0.720
0.14	0.346	0.731
0.16	0.343	0.726
0.18	0.335	0.729
0.20	0.343	0.725
0.40	0.334	0.740

Tabulka 22: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 303,7 K.

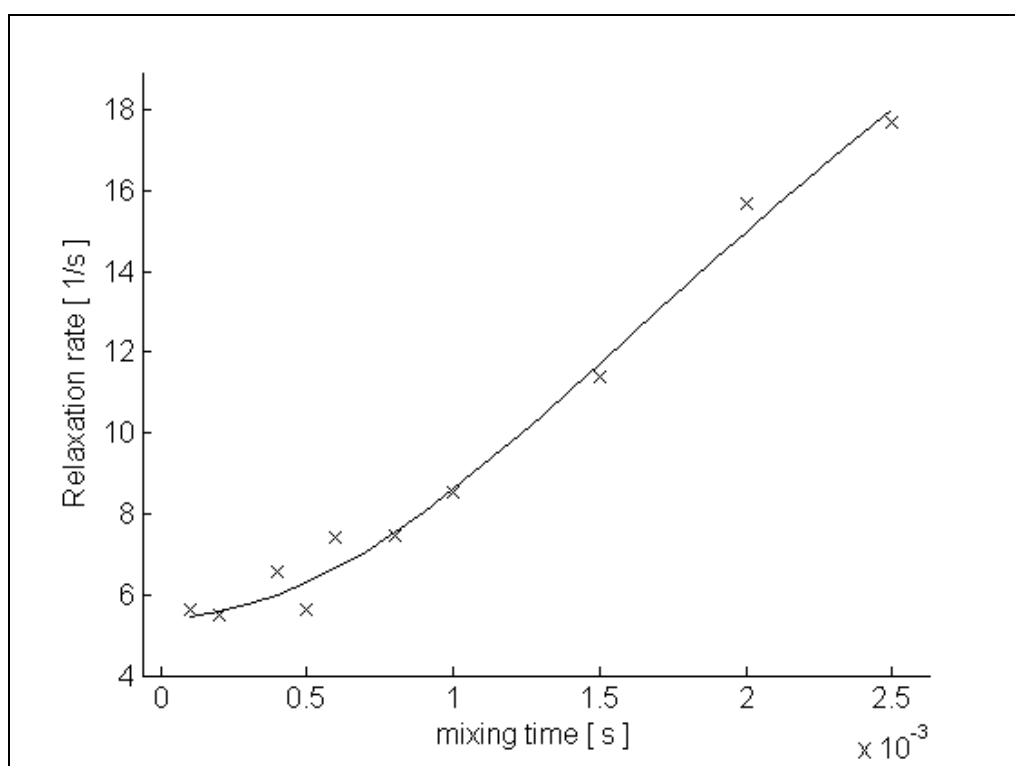


Graf 15: Naměřená závislost relaxační rychlostí R_2 na $t_{echo/2}$ pro C1 a C2, C6 při teplotě 303,7 K.

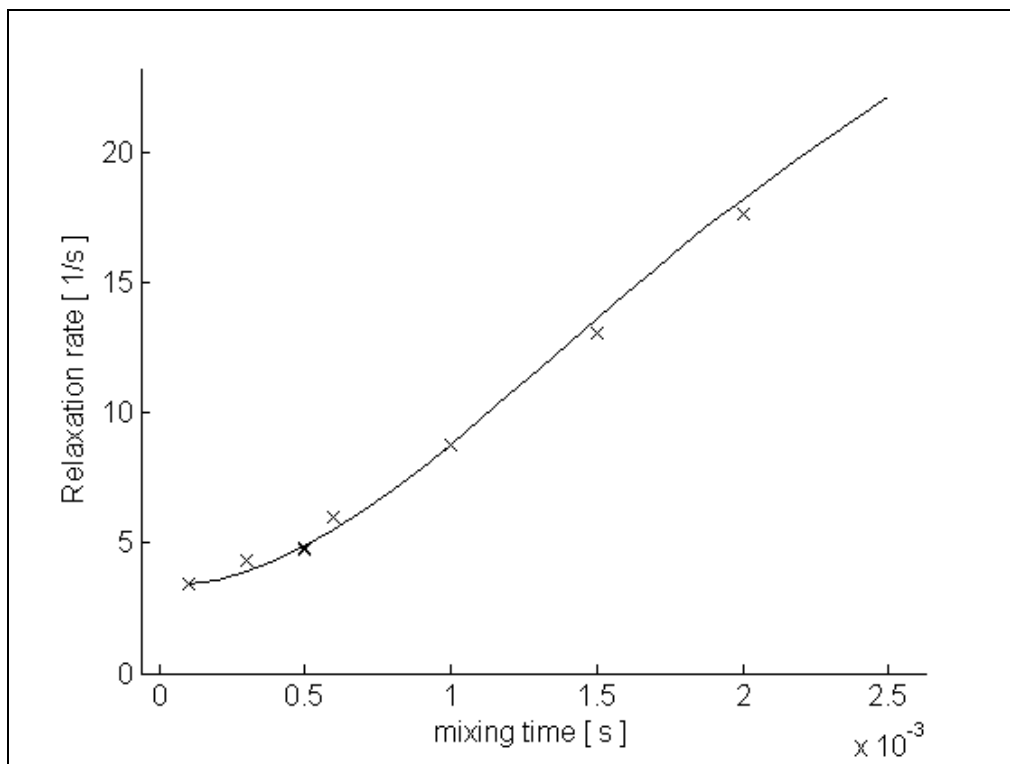
5. 6. 2. Výpočet parametrů chemické výměny

Parametry obsažené v rovnici 32 byly určeny z naměřené závislosti relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo/2}$ pro uhlíky C2, C6 pomocí programu MATLAB 6.5. Protože se jedná o symetrickou chemickou výměnu, jsou populace obou stavů stejné ($p_A = p_B = 0,5$). Pro relaxační rychlost bez chemické výměny byla použita převrácená hodnota relaxační doby T_{2teor} vypočítaná v kapitole 5. 4. (tab. 12). Další dva parametry, rozdíl chemických posunů ($\Delta\omega$) a korelační čas chemické výměny (τ_{ex}), byly určeny fitováním naměřené závislosti pro teploty od 232,6 K do 262,5 K. Při vyšších teplotách je již

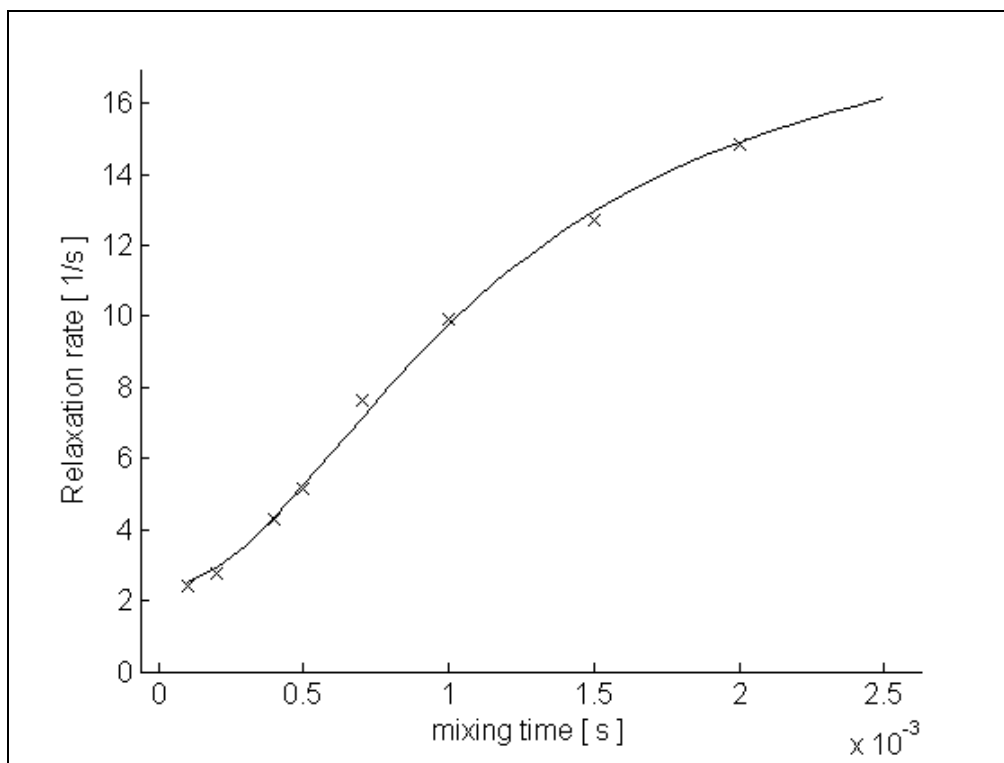
chemická výměna příliš rychlá a při měření nemohl být zachycen počáteční nárůst relaxační rychlosti při dostatečně malém $t_{echo/2}$. Naměřené hodnoty R_2 leží zejména v oblasti, kde je již závislost na $t_{echo/2}$ prakticky konstantní (graf 21 - 24), a proto nelze nezávisle stanovit oba parametry $\Delta\omega$ a τ_{ex} . Pro výpočet byla použita hodnota $\Delta\omega = 54,1$ Hz odhadnutá jako průměr výsledků při nižších teplotách. Rovněž při teplotě 221,2 K bylo použito $\Delta\omega = 54,1$ Hz, neboť při měření byl zachycen pouze počátek nárůstu R_2 v závislosti na $t_{echo/2}$. Rychlostní konstanty chemické výměny k_{ex} byly určeny z τ_{ex} podle vztahu 33. Nafitované závislosti relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo/2}$ jsou znázorněny v grafech 16 - 24. Výsledné parametry $\Delta\omega$ a τ_{ex} a k ($k = k_{ex}/2$) jsou uvedeny v tabulce 23. Při některých teplotách byla závislost fitována jen pro $t_{echo/2} \leq 2,5$ ms. Pro delší časy byla relaxační rychlost určena s nedostatečnou přesností, protože kvůli dlouhému echo-času bylo k dispozici málo bodů pro charakterizaci exponenciálního poklesu magnetizace.



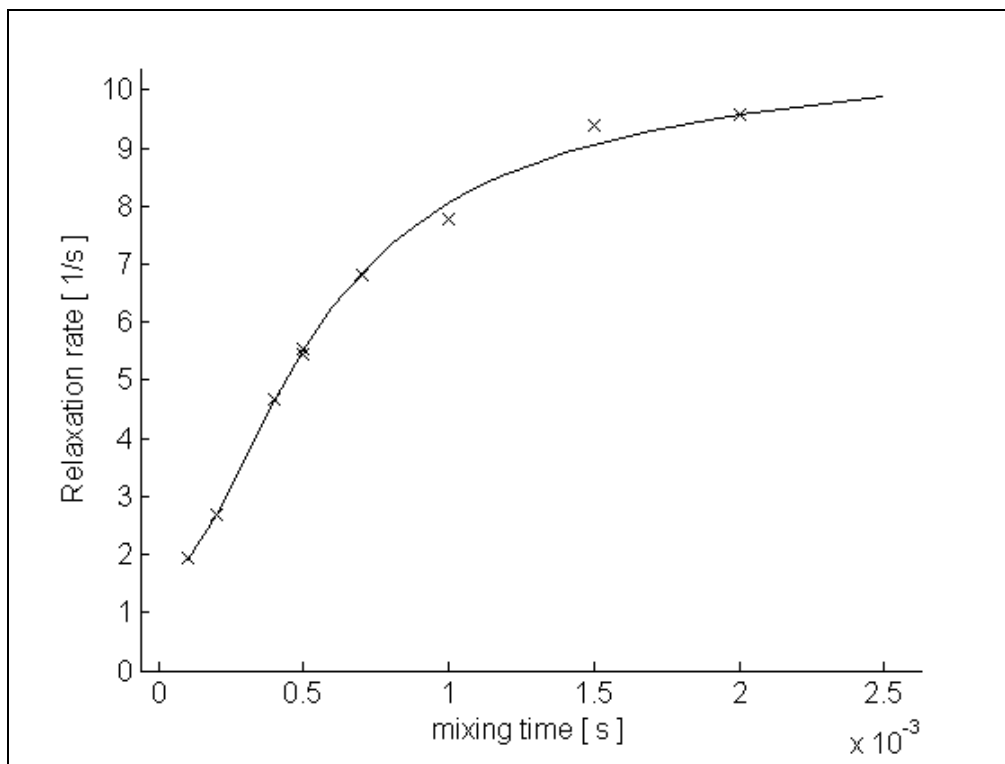
Graf 16: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo/2}$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 221,2 K.



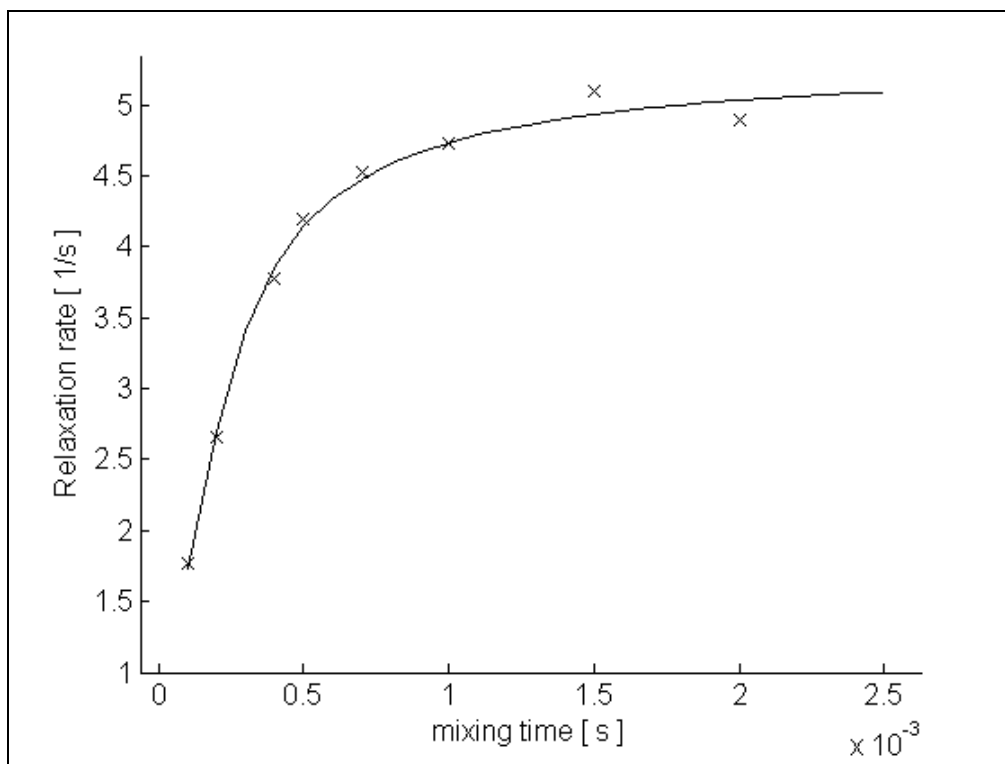
Graf 17: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo}/2$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 232,6 K.



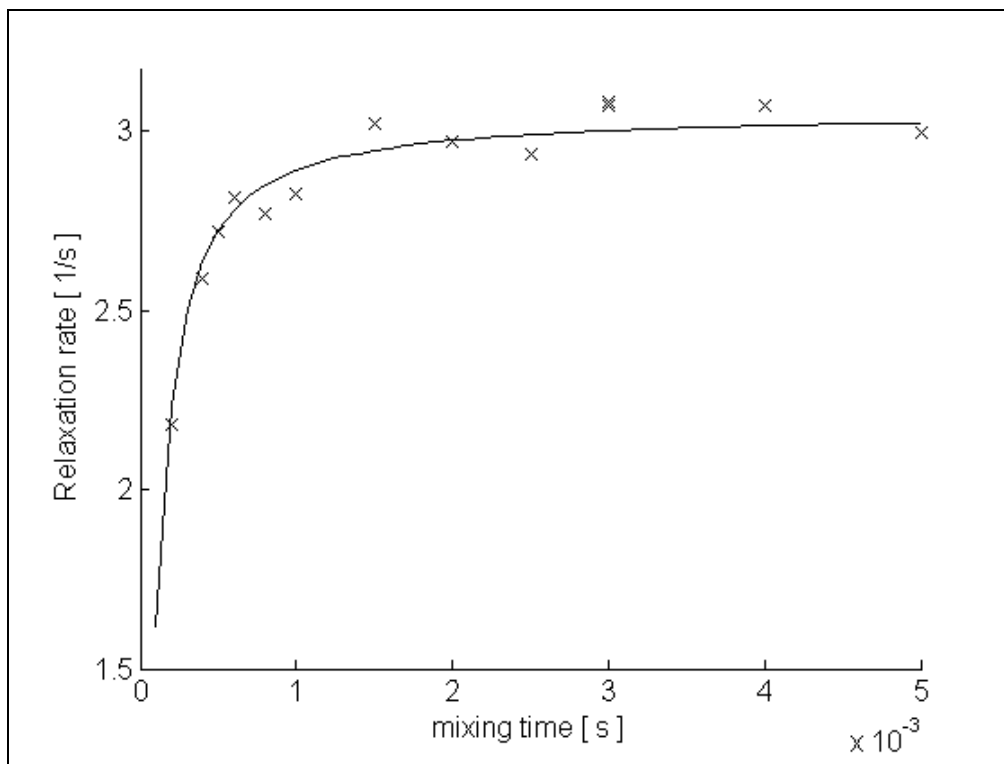
Graf 18: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo}/2$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 242,9 K.



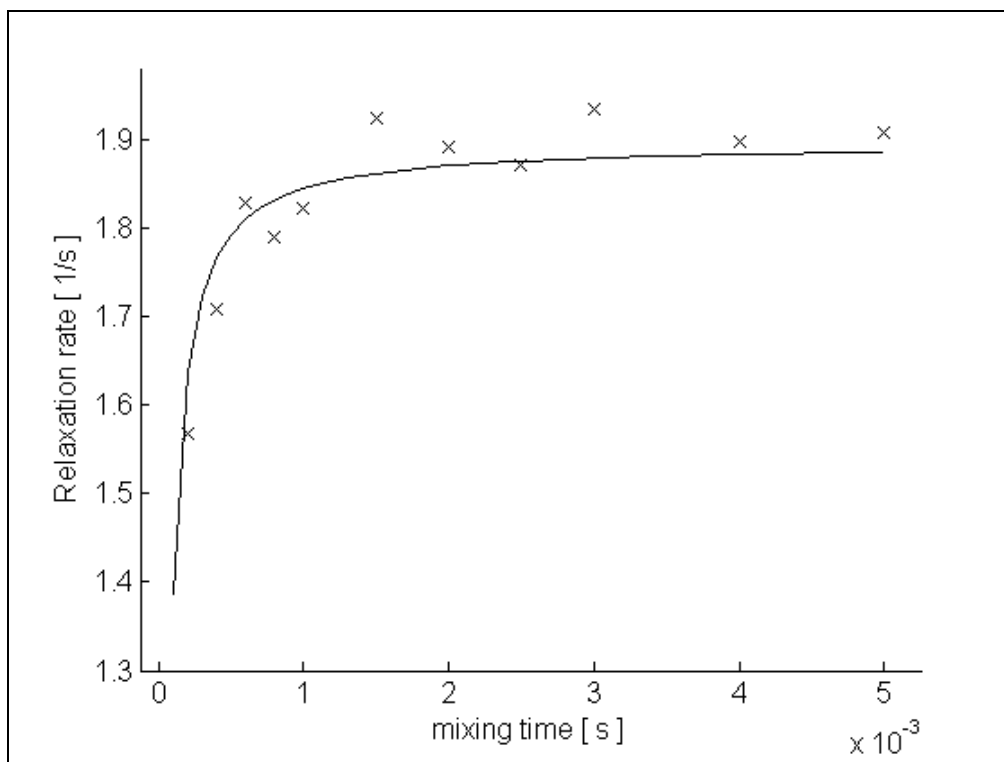
Graf 19: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo}/2$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 252,1 K.



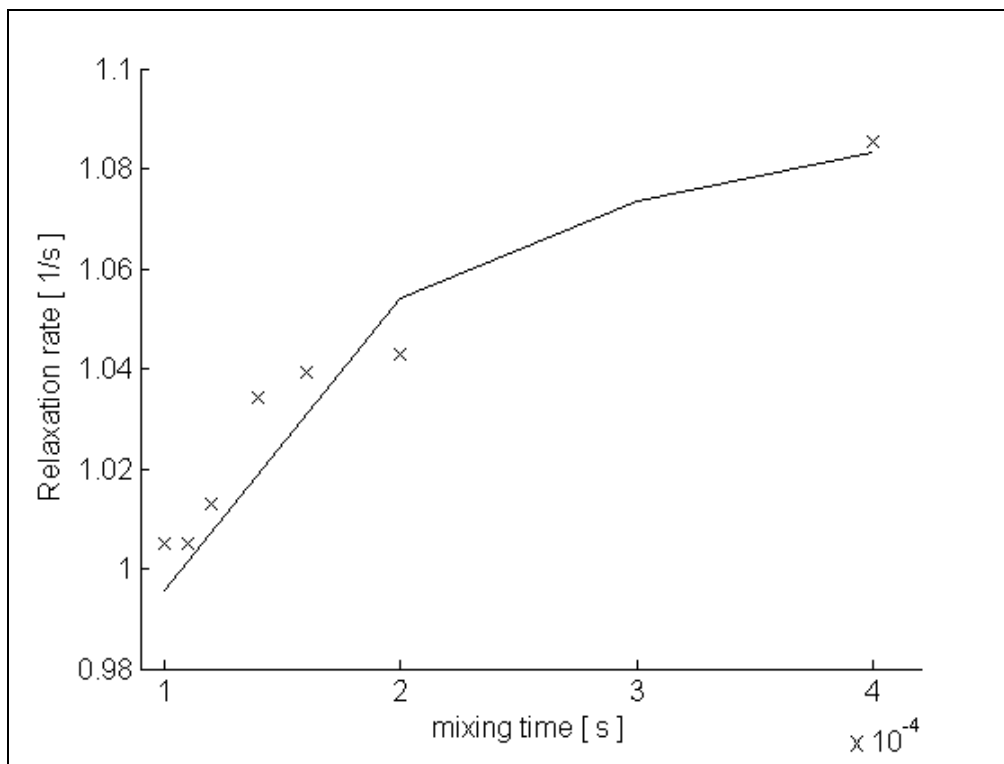
Graf 20: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo}/2$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 262,5 K.



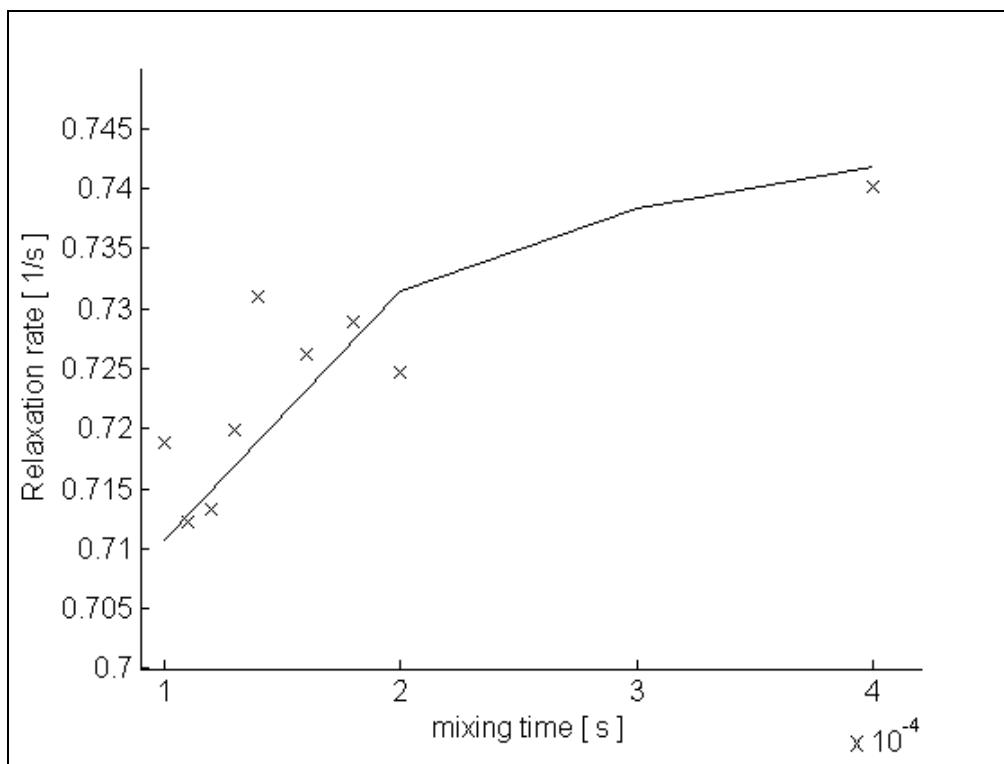
Graf 21: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo}/2$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 272,8 K.



Graf 22: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo}/2$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 283,1 K.



Graf 23: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo/2}$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 293,4 K.



Graf 24: Nafitovaná závislost relaxační rychlosti R_2 na $t_{echo/2}$ („mixing time“) pro C2, C6 při teplotě 303,7 K.

T [K]	$\Delta\omega$ [Hz]	relativní chyba $\Delta\omega$ [%]	τ_{ex} [ms]	relativní chyba τ_{ex} [%]	k [$s^{-1} \times 10^3$]
221.2	54.1 ^a		3.49	7	0.143
232.6	53.7	3	1.46	19	0.342
242.9	53.3	1	0.671	4	0.745
252.1	54.6	1	0.322	5	1.55
262.5	54.5	1	0.144	4	3.46
272.8	54.1 ^a		0.0759	1	6.59
283.1	54.1 ^a		0.0423	1	11.8
293.4	54.1 ^a		0.0201	1	24.8
303.7	54.1 ^a		0.0120	1	41.6

Tabulka 23: Vypočítané parametry chemické výměny $\Delta\omega$, τ_{ex} a rychlostní konstanta chemické reakce k . ^a zafixovaná hodnota $\Delta\omega$.

5. 7. Srovnání procesů chemické výměny v kalix[4]arenu

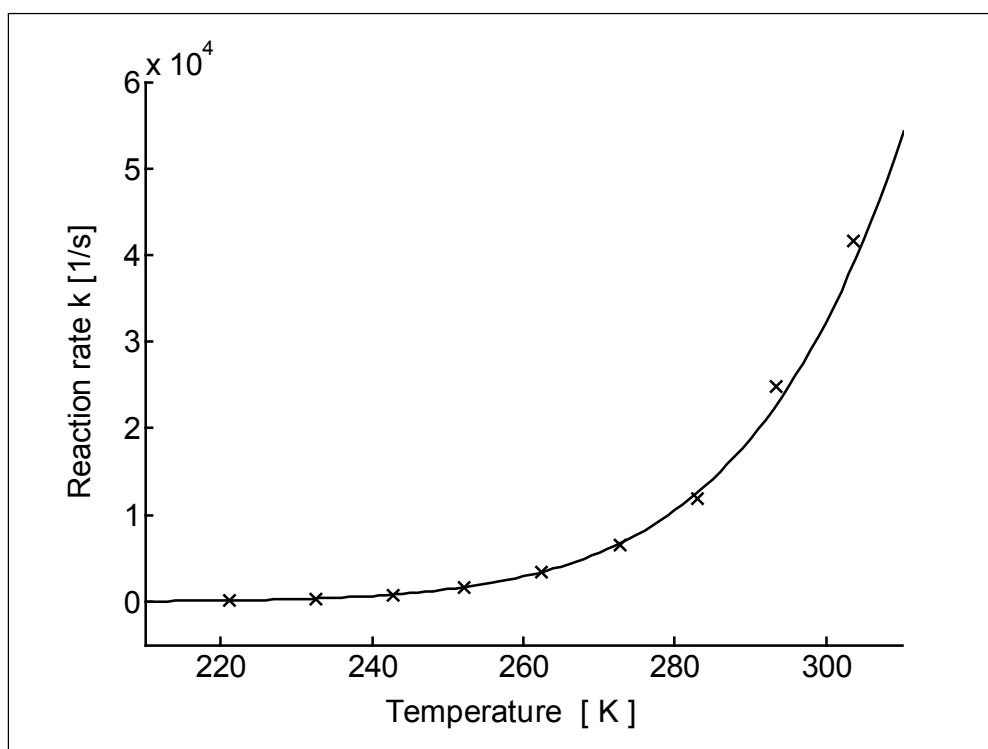
Porovnáme-li rychlostní konstanty chemické výměny mezi jádry C2, C6 zjištěné pomocí metody CPMG (tab. 23) s rychlostními konstantami chemické výměny mezi vodíky CH₂ skupiny určenými pomocí EXSY (tab. 13), zjistíme, že se liší o několik řádů. Například při teplotě 252 K je rychlost převrácení kalixarenu (EXSY) přibližně 1 s⁻¹, zatímco rychlost procesu, který urychluje příčnou relaxaci jader C2, C6 je 1,6×10³ s⁻¹. Z toho vyplývá, že přerušování a změna směru orientace vodíkových vazeb mezi OH skupinami je přibližně tisíckrát rychlejší než převrácení kalixarenového kruhu, a tedy tyto dva procesy nejsou korelované.

5. 8. Teplotní závislost a aktivační parametry překlopení pole vodíkových vazeb

V grafu 25 je znázorněna naměřená závislost rychlostní konstanty chemické reakce k na teplotě. Z rovnic 23, 24 byly pomocí programu MATLAB určeny aktivační parametry chemické výměny způsobené změnou orientace vodíkových vazeb na spodním okraji molekuly. Výsledné hodnoty volné aktivační energie ΔG jsou v závislosti na teplotě uvedeny v tabulce 24. Hodnoty aktivační entropie ΔS a aktivační entalpie ΔH jsou:

$$\Delta S = -35 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1} (\pm 3 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1})$$

$$\Delta H = 36,8 \text{ kJ.mol}^{-1} (\pm 0,8 \text{ kJ.mol}^{-1}).$$



Graf 25: Závislost rychlostní konstanty k převracení směru pole vodíkových vazeb na teplotě.

T [K]	ΔG [kJ.mol ⁻¹]	relativní chyba ΔG [%]
221.2	44.8	0.3
232.6	45.2	0.2
242.9	45.5	0.2
252.1	45.9	0.2
262.5	46.2	0.2
272.8	46.6	0.2
283.1	47.0	0.2
293.4	47.4	0.3
303.7	47.7	0.4

Tabulka 24: Výsledky určení volné aktivační energie ΔG chemické výměny způsobené změnou orientace vodíkových vazeb na spodním okraji molekuly v závislosti na teplotě.

Získané volné aktivační energie – 44,8 – 47,7 kJ.mol⁻¹ pro překlacení pole vodíkových vazeb jsou velmi vysoké, což kvalitativně odpovídá i vysokému chemickému posunu ¹H rezonance OH skupiny (10,2 ppm). Příspěvek kooperativity je možné odhadnout z hodnoty volné aktivační energie připadající na jednu vazbu pole – 11,2 – 11,9 kJ.mol⁻¹. Tyto hodnoty jsou vyšší o zhruba o 2 – 3 kJ.mol⁻¹ než hodnoty získané pro fosfáty a thiofosfáty thiakalix[6]arenu.¹⁷

Vypočítaná aktivační enthalpie 36,8 kJ/mol ($\pm 0,8$ kJ/mol) a aktivační entropie $-35 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ($\pm 3 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) popisují enthalpicky řízenou reakci. Entropický příspěvek k volné aktivační energii je však poměrně významný (zhruba 1/4 při laboratorní teplotě) a je možné jej vysvětlit vyšší symetrií tranzitního stavu, pro který si lze představit geometrii, ve které je vodík stejně vzdálený od obou atomů kyslíku účastnících se vodíkové vazby.

6. Závěr

Bylo prostudováno dynamické chování molekuly kalix[4]arenu v nepolárním rozpouštědle metodami spektroskopie NMR, zejména s využitím teplotně závislých měření spinové relaxace. Byly změřeny relaxační parametry jader ^{13}C , podélné relaxační doby (T_1), příčné relaxační doby (T_2) a zesílení NMR signálu vlivem nukleárního Overhauserova efektu (*NOE*) při ozařování jader ^1H .

Za předpokladu isotropní rotační difúze byl stanoven korelační čas molekulárního rotačního pohybu v rozmezí 0,1 – 3 ns. Jeho teplotní závislost má arrheniovský tvar s aktivační energií 21 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Bylo zjištěno, že příčná relaxace jader C3, C5 a zejména C2, C6 je signifikantně urychlena příspěvkem chemické výměny. Zdrojem této výměny je změna směru cirkulárního pole čtyř vodíkových vazeb na dolním okraji kalix[4]arenové molekuly. Měření závislosti příčné relaxační doby signálu C2, C6 na echo-času v pulzní sekvenci CPMG byly získány rychlostní konstanty této konformační výměny $1,4 \times 10^{-4} - 4,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ v rozsahu teplot 221 – 304 K. Byly stanoveny aktivační parametry reakce – aktivační enthalpie (36,8 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) a aktivační entropie (-35 $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). Podle vysoké hodnoty volné aktivační energie (45,5 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ při 243 K) je možné vodíkové vazby v kalix[4]arenu charakterizovat jako velmi silné, zřejmě s výrazným příspěvkem kooperativity.

Metodou ^1H výměnné spektroskopie byla odhadnuta rychlost dalšího dynamického procesu – přechodu mezi konickým konformerem a převráceným konickým konformerem. V soulase s literaturou³⁰ byla zjištěna rychlost řádově 1 s^{-1} . Zcela odlišné hodnoty rychlostních konstant dokazují, že převrácení směru cirkulárního pole vodíkových vazeb není korelováno s převrácením celé kalix[4]arenové molekuly (s přechodem konický konformer – převrácený konický konformer).

Metodami NMR spektroskopie tak byly charakterizovány tři druhy molekulárního pohybu kalix[4]arenu, probíhající nezávisle ve třech různých časových škálách.

Použitá literatura

- [1] Levitt, M. H. *Spin Dynamics: Basic of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley and Sons, 2001.
- [2] McQuarrie, D. A.; Simon, J. D. *Physical Chemistry: A Molecular Approach*, University Science Books: Sausalito, CA, 1997.
- [3] Canet, D. *Nuclear Magnetic Resonance: Concepts and Methods*, John Wiley and Sons: Chichester, 1996.
- [4] Sanders, J. K. M.; Hunter, K. B. *Modern NMR spectroscopy*, Oxford University Press: Oxford 1994.
- [5] Hore, P. J. *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press: Oxford, 1995.
- [6] Eyring, H.; Henderson, D.; Jones S. B.; Eyring, E. M. *Statistical mechanics and dynamics*; John Willey and Sons: New York, 1982.
- [7] Gutsche, C. D. *Calixarenes. Monographs in Supramolecular Chemistry*. Stoddart, J. F. (ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
- [8] Gutsche, C. David. *Calixarenes Revisited. Monographs in Supramolecular Chemistry*. Stoddart, J. F. (ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998.
- [9] Gutsche, C. D.; Muthukrishnan R., *J. Org.Chem.* 1978, *43*, 4905-4906.
- [10] Fischer, S.; Grootenhuis, P. D. J.; Groenen, L. C.; Hoorn, W, P.; Veggel, F. C. J. M.; Reinhoudt, D.; Karplus, M. *J.Am.Chem.Soc.* 1995, *117*, 1611-1620.
- [11] Thondorf, I. *J.Chem.Soc., Perkin Trans.2* 1999, 1791-1796.
- [12] Bernardino, R. J.; Costa Cabral, B. J. *J.Phys.Chem.A* 2000, *103*, 9080-9085.
- [13] Brougham, D. F.; Caciuffo, R.; Horsewill, A. J. *Nature* 1999, *397*, 241-243.
- [14] Horsewill, A. J.; Jones, N. H.; Caciuffo, R. *Science* 2001, *291*, 100-103.
- [15] Horsewill, A. J.; Jones, N. H.; Caciuffo, R. *Science* 2002, *298*, 1171.
- [16] Fernandez-Ramos, A.; Smedarchina, Z.; Pichierri, F. *Chem. Phys. Let.* 2001, *343*, 627-632.
- [17] Janssen, R. G.; van Duynhoven, J. P. M.; Verboom, W.; van Hummel, G. J.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, *118*, 3666-3675.

- [18] Jeffrey, G. A.; Saenger, W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer: Berlin, 1991.
- [19] Groenen, L. C.; Seinwender, E.; Lutz, B. T. G.; van der Maas, J. H.; Reinhoudt, D. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1998, 1893-1898.
- [20] Canet, D.; Levy, G. C.; Peat, I. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, *18*, 199-204.
- [21] Kay, L. E.; Nicholson, L. K.; Delaglio, F.; Bax, A.; Torchia, D. A. *J. Magn. Reson.* 1992, *97*, 359.
- [22] Kowalewski, J., Ericsson, A., and Vestin, R. *J. Magn. Reson.* 1978, *31*, 165.
- [23] Stott, K.; Stonehouse, J.; Keeler, J.; Hwang, T.; Shaka, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, *117*, 4199.
- [24] Luz, Z.; Meiboom, S. *J. Chem. Phys.* 1964, *39*, 366.
- [25] Shultes, M.; Eisenhauer, R.; Dechter, J. J.; Johansson, M.; Kumar, P.; Kowalewski, J. *J. Magn. Reson. Chem.* 1999, *37*, 799-804.
- [26] Antony, J. H.; Dölle, A.; Fliege, T.; Geiger, A. *J. Phys. Chem. A* 1997, *101*, 4517-4522.
- [27] Czernek, J. *nepublikované výsledky*, 2004.
- [28] Kowalewski, J.; Effemey, M.; Jokisaari, J. *J. Magn. Reson.* 2002, *157*, 171-177.
- [29] Lang, J.; Tošner, Z.; Lhoták, P.; Kowalewski, J. *J. Magn. Reson. Chem.* 2003, *41*, 819-827.
- [30] Gutsche, C. D.; Bauer, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, *107*, 6052-6059.