UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Kateřina Šetková

STUDIUM DYNAMIKY MAKROCYKLICKÝCH INKLUZNÍCH KOMPLEXŮ POMOCÍ NMR SPEKTROSKOPIE

Katedra fyziky nízkých teplot

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

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu své diplomové práce RNDr. Janu Langovi, Ph.D. za cenné rady při psaní 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 thiakalix[4]arenu. Ráda bych poděkovala také rodičům a svým blízkým za podporu při sepisování této práce.

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

V Praze dne 2.4.2005

Kateřina Šetková

OBSAH

ÚVOD	
TEORETICKÁ ČÁST	5
1. ZÁKLADNÍ POJMY	5
2. TYPY INTERAKCÍ V MAGNETICKÉM POLI	
3. SPINOVÁ RELAXACE	
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.	16
4. CHEMICKÁ VÝMĚNA	
5. NMR METODIKA	
6. KALIXARENY	
7. NASTAVENÍ EXPERIMENTU	
8. výsledky měření	
9. STANOVENÍ DYNAMICKÉHO CHOVÁNÍ THIAKALIX[4]ARENU	
10. CHEMICKÁ VÝMĚNA	
11. srovnání s kalix[4]arenem	
ZÁVĚR	61
LITERATURA	62

Název práce: Studium dynamiky makrocyklických inkluzních komplexů pomocí NMR spektroskopie
Autor: Kateřina Šetková
Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot
Vedoucí diplomové 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. Thiakalix[4]aren vznikl nahrazením methylenové spojky mezi fenolickými jádry sírou, což v důsledku způsobilo větší kavitu v molekule a odlišné konformační chování. Thiakalix[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 ¹³C spinové relaxace. Rychlostní konstanta změny směru pole vodíkových vazeb byla stanovena měřením závislosti spektrálních intenzit na proměnném echo-čase v pulzní sekvenci CPMG. Byly stanoveny aktivační parametry této reakce. Dále byl stanoven korelační čas rotačního pohybu molekuly a jeho teplotní závislost s arrheniovským tvarem. Měření bylo porovnáno s podobným na "mateřském" kalix[4]arenu.

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

Title: Investigation of Dynamics of Macrocyclic Inclusion Complexes by NMR Spectroscopy

Author: Kateřina Šetková

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. Thiacalix[4]arene is derived from the classical calix[4]arene by replacement of the methylene bridges between the phenol rings by sulfur atoms, which results in a slightly larger cavity and altered conformational behavior. Thiacalix[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 ¹³C spin relaxation. The rate constants of flip-flop motion of the hydrogen bond array were determined by measurements of dependence of spectral intensities on echo-time in the CPMG NMR pulse sequence. The activation enthalpy and entropy of this reaction were determined. Next, the correlation times of molecular tumbling were determined and found to follow the Arrhenius temperature dependence. The measurements were compared to those of the "classical" calix[4]arene.

Keywords: Thiacalix [4] arene, NMR, spin relaxation, hydrogen bonds, and dynamics

ÚVOD

Kalix[n]areny jsou cyklické fenolické oligomery, které se staly jednou ze základních strukturních jednotek v supramolekulární chemii. Mají vynikající komplexační schopnosti, které lze modifikovat substitucí základního skeletu. Jejich zajímavou vlastností 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. Thiakalix[4]aren, kterým se zabývá tato diplomová 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) thiakalix[4]arenu v roztoku jsou ovlivněna několika druhy pohybů vyskytujících se v rozmezí časových škál od pikosekund po sekundy. Patří mezi ně mimo jiné i přerušování a změna směru cirkulárního pole čtyř vodíkových vazeb. Dynamika tohoto pole nebyla dosud popsána. Cirkulární pole čtyř vodíkových vazeb v thiakalix[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.

Tato práce navazuje na měření dynamiky chování cirkulárního pole vodíkových vazeb na dolním okraji nesubstituovaného kalix[4]arenu. Tím, že byla nahrazena CH₂ spojka mezi fenolovými jádry sírou, mírně zvětšil se celý objem kavity a tedy i geometrie kavity. Cílem práce je prozkoumat vliv této substituce na stabilitu pole vodíkových vazeb. Detailní porozumění chování molekuly thiakalix[4]arenu je důležité pro pochopení chování supramolekulárních struktur včetně inkluzních komplexů, které jsou na jeho základě vytvořeny.

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, jejíž hamiltonián *H* je popsán rovnicí 1.

$$H = -\boldsymbol{\mu}\boldsymbol{B}_{\boldsymbol{\theta}} \tag{1}$$

Bo je magnetická indukce externího magnetického pole.

Mezi nejčastěji studovaná jádra patří ¹H a ¹³C, která mají $I = \frac{1}{2}$ a jejich magnetické kvantové číslo může proto nabývat dvou hodnot, $m = \frac{1}{2}$ (stav α) a $m = -\frac{1}{2}$ (stav β). V externím magnetickém poli **B**o dojde mezi těmito stavy k vytvoření energetického rozdílu daného vztahem (2). Nižší hladina odpovídá situaci, kdy je z-složka magnetického momentu jádra orientována ve směru vnějšího magnetického pole. Vyšší hladina odpovídá stavu, kdy je orientována proti směru vnějšího pole.

$$\Delta E = \gamma h \boldsymbol{B}_{\boldsymbol{a}} / 2\pi \tag{2}$$

 γ je gyromagnetická konstanta charakterizující dané jádro (např.: $\gamma_{_{1}_{H}} = 2,68 \cdot 10^8 \, \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$, $\gamma_{_{^{13}\text{C}}} = 0,67 \cdot 10^8 \, \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$) a *h* je Planckova konstanta.

Při klasickém popisu můžeme soubor spinů popsat vektorem celkové magnetizace M, který je dán vektorovým součtem magnetických momentů jednotlivých spinů. V rovnováze bude celková magnetizace M ve směru vnějšího magnetického pole B_0 . Toto pole konvenčně označuje kladný směr osy z. Přechody mezi energetickými hladinami lze indukovat střídavým polem B_{rf} , kolmým k ose z o vhodné frekvenci splňující rezonanční podmínku [1]:

$$\boldsymbol{\omega}_{\boldsymbol{\theta}} = -\gamma \boldsymbol{B}_{\boldsymbol{\theta}}, \tag{3}$$

kde ω_0 je kruhová rychlost Larmorovy precese, zvaná Larmorova frekvence, která je

pro běžně používaná pole B_0 v radiové oblasti.

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. Radiofrekvenčním pulsem příslušné délky lze totiž sklápět vektor magnetizace M o libovolný úhel od směru osy z (viz obr. 1). Po této proceduře bude vektor magnetizace konat precesi kolem osy z s Larmorovou frekvencí ω_0 . Dojde tedy ke snížení z-ové komponenty magnetizace a vzniku magnetizace v rovině x;y.



obr. 1: sklopení magnetizace do roviny x,y

2. TYPY INTERAKCÍ V MAGNETICKÉM POLI

Elektrické a magnetické pole ovlivňující jaderný spin může pocházet z vnější aparatury nebo také ze samotného vzorku. V prvním případě označujeme spinové interakce za *externí*, ve druhém případě pak za *interní*.

Externí spinové interakce jsou čistě magnetické. V drtivé většině případů je magnetické pole využito k manipulaci s magnetickými spiny. Spektrometr vytváří dva typy externího pole: velmi silné statické magnetické pole B_0 a mnohem slabší oscilující pole kolmé ke statickému B_{rf} .

Interní interakce jsou čistě magnetické jen pro spiny $\frac{1}{2}$. Při vyšších spinových momentech se projevuje také elektrická kvadrupolární interakce. Tou se ale nebudeme dále zabývat, neboť rezonance jader se spinem I >1/2 se v této práci neměří.

2.1. CHEMICKÝ POSUN

Reprezentuje nepřímou interakci vnějšího magnetického pole a jaderných spinů zahrnutím elektronů.

Rezonanční frekvence daného jádra v látkovém prostředí je určena lokální hodnotou statického magnetického pole, neboť externí statické pole B_0 je modifikováno interakcemi jádra s vlastním elektronovým obalem, popřípadě s okolními atomy. Tím se také mění poloha čáry ve spektru. Tento jev – posun rezonanční frekvence ovlivněný strukturou molekuly - lze popsat tenzorem chemického posunu δ , který lze vyjádřit maticí o rozměrech 3x3 . Tento tenzor je v systému hlavních os diagonální a je reprezentován složkami δ_{xx} , δ_{yy} a δ_{zx} . Pro případ molekuly rychle rotující v izotropní kapalině se složky tenzoru středují a tenzor chemického stínění může být reprezentován skalární hodnotou, která je dána jeho stopou δ .

Efekt stínění způsobuje, že lokální pole B_{local} v místě jádra je menší o hodnotu σB_0 , kde σ je *konstanta stínění*, a platí [2] vztah:

$$\boldsymbol{B_{local}} = (1 - \sigma) \boldsymbol{B_0}. \tag{4}$$

Z výše uvedeného plyne, že rezonanční frekvence jádra bude posunuta na hodnotu:

$$\boldsymbol{\omega} = -\gamma(1-\sigma)\boldsymbol{B}\boldsymbol{\omega} \tag{5}$$

Pozici píku o daném chemickém posunu lze uvádět v jednotkách frekvence

(Hz), potažmo v jednotkách kruhové frekvence ($rad \cdot s^{-1}$), ale tato hodnota je závislá na velikosti externího pole B_0 , jak je vidět ve vztahu (5). Vzhledem k tomu, že měřicí aparatury mají různé hodnoty polí (např. 4,7 T, 9,4 T, 11,7 T, 21,1T), je nutné zavést pro chemický posun jednotku nezávislou na velikosti externího pole. Velikost chemického posunu se tedy udává vzhledem ke zvolenému standardu pro daný izotop.

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{standard}}{\omega_{standard}} \cdot 10^6 , \tag{6}$$

kde δ je velikost chemického posunu v jednotkách ppm (parts per million), ω je Larmorova frekvence měřené látky (resp. konkrétního píku) a $\omega_{standard}$ je Larmorova frekvence standardu pro daný izotop.

2.2. PŘÍMÁ DIPÓL-DIPÓLOVÁ INTERAKCE

Representuje přímou interakci jaderných spinů mezi sebou. Každý jaderný spin produkuje ve svém okolí magnetické pole. Každý další spin v okolí reaguje na toto pole a jejich interakce je vzájemná. Přímá dipól-dipólová (DD) interakce je často označována jako působení "přes prostor" neboť pole mezi jadernými spiny působí v prostoru mezi spiny bez započtení elektronového obalu. Dosah dipól-dipólové interakce může být jednak intramolekulární, ale také intermolekulární.

Velikost je závislá na vzdálenosti obou dipólů r a na orientaci jejich spojnice vůči magnetickému poli B_0 . Dipól-dipolární interakční konstanta (*DCC*) je dána rovnicí 7, kde γ_C a γ_H jsou gyromagnetické konstanty jader ¹³C a ¹H a μ_0 je permeabilita vakua.

$$DCC = \left(\frac{\mu_0 \gamma_C \gamma_H h}{8\pi^2}\right) \mathbf{r}^{-3}$$
⁽⁷⁾

Přímá dipól – dipólová interakce se často využívá ke strukturním studiím, jelikož závisí jen na známých fyzikálních konstantách a na vzdálenosti mezi spiny a tedy na geometrickému tvaru molekuly [3].

V případě kapalných roztoků (aproximace isotropní tekutiny) je DD-interakce středována k nule molekulárním rotačním pohybem.

2.3. J-INTERAKCE

Reprezentuje nepřímou magnetickou interakci jaderných spinů přes vazebné elektrony. Zatímco přímá spin - spinová interakce (DD) je v isotropních tekutinách středována k nule, jsou i v těchto vzorcích viditelně spojeny jaderné spiny přítomností vazebných elektronů, které mění orientační závislost mezispinové interakce v magnetickém poli probíhajícím mezi danými spiny. Dva spiny mají měřitelnou J-interakci jen pokud jsou spojeny malým počtem chemických vazeb zahrnujících i vodíkové vazby. Z toho také vyplývá, že J-interakce je většinou intramolekulární. Případ intermolekulární J-interakce mohou tvořit vodíkové můstky. J-interakce je v tomto případě mnohem slabší.

J-interakce je dalším nástrojem přímé spektroskopické metody určování chemické struktury vzorku, neboť nám poskytuje informace o vzájemných vazbách mezi atomy. Ve spektru se projevuje štěpením čar na multiplety. V případě interakce dvou spinů ¹/₂ se čára štěpí na dublet.

2.4. SPIN-ROTAČNÍ INTERAKCE

Representuje interakce jaderných spinů s magnetickým polem generovaným rotačním pohybem molekuly. Každá molekula se sestává z kladných a záporných elektrických nábojů (jádra a elektrony). Pokud molekula rotuje, náboje cirkulují a vyvolávají elektrický proud, který indukuje lokální magnetické pole interagující s magnetickým momentem jádra. Tyto interakce jsou však důležité pouze v mikrovlnné spektroskopii plynů, v NMR mají význam pouze pro plynné vzorky a v případě kapalin jen pro velmi malé molekuly. V izotropních kapalinách jsou středovány náhodnými fluktuacemi pohybu molekuly k nule.

2.5. SHRNUTÍ INTERAKČNÍCH MECHANISMŮ RŮZNÉ FÁZE

Největší část interakcí ve vzorku tvoří přizpůsobení se vnějšímu magnetickému poli a interakce s radiofrekvenční poruchou. Tyto interakce jsou označovány jako vnější, neboli externí a probíhají v každé fázi.

Mezi interními interakcemi má největší váhu kvadrupolární interakce, následují DD interakce, chemický posun a J-interakce, první dvě však vymizí u izotropních kapalin. Spin-

rotační interakce nemají vliv ani u kapalin, ani u pevných látek.

Důležitým faktem je, že anisotropní části jednotlivých interakcí zodpovídají za spinovou relaxaci, a to i když se interakce neprojeví na poloze a multiplicitě čar ve spektru.

3. SPINOVÁ RELAXACE

Relaxací se nazývá jev, kdy se excitovaný systém spinů vrací zpět do rovnovážného (případně stacionárního) stavu a energie systému je disipována do okolí v podobě tepelné energie. Rychlost relaxace je charakterizována relaxačními časy.

Molekula v roztoku vykonává náhodný termální pohyb, při kterém dochází k interakcím s okolními molekulami, což vede ke vzniku lokálního fluktuujícího pole [3]. Tyto okolní molekuly se nazývají *mřížka*. Pro systém spinů s hodnotou ½ je fluktuace magnetického pole hlavní příčinou relaxace. U spinů >1/2 se přidává také elektrická kvadrupólová interakce.

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). Časový vývoj z-ové složky makroskopické magnetizace je dán obyčejnou diferenciální rovnicí:

$$\frac{dM_{z}}{dt} = \frac{M_{0} - M_{z}}{T_{1}}$$
(8)

 $1/T_1$ je tedy rychlostní konstanta přechodu z nerovnovážného stavu to rovnováhy a označuje se R_1 . Řešení rovnice (8) má tvar jednoexponenciálního nárůstu magnetizace v ose $\tilde{:}$

$$M_{z}(t) = M_{0} \left(1 - 2 \exp(-t/T_{1}) \right)$$
(9)

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.

V souvislosti s příčnou relaxací pro pološířku čáry ve spektru Δv platí následující vztah:

$$\Delta v = \frac{1}{\pi T_2} \tag{10}$$

Příspěvek nehomogenity magnetického pole B_0 k příčné relaxaci $(1/T_{2n})$ se nazývá nehomogenní rozšíření. Pro naměřenou hodnotu relaxační rychlosti T_2 * platí rovnice 11.

$$1/T_2^* = 1/T_2 + 1/T_{2n} \tag{11}$$

Pro charakterizaci spinového systému je užitečné jen homogenní rozšíření, nehomogenní část je minimalizována korekcemi magnetického pole B_0 a volbou experimentální metodiky pro měření T_2 (metody založené na spinovém echu). Časový průběh intenzity (velikosti magnetizace) má tvar:

$$M(t) = M_0 \exp(-t/T_2).$$
(12)

Vysvětlit relaxaci jako důsledek fluktuace lokálních magnetických polí působících na studovaná jádra je možné pomocí odvození pro nejjednodušší případ - náhodně fluktuující magnetické pole: Časový průběh x-ové složky lokálního náhodně fluktuujícího pole B_x má následující vlastnosti:

- (i) Fluktuace pole má nulovou střední hodnotu: $\langle B_x(t) \rangle = 0$, což lze chápat jak pro jeden spin v dlouhém časovém intervalu, tak pro velký soubor spinů v jednom okamžiku (v korespondenci s ergodickou hypotézou).
- (ii) Střední kvadratická odchylka fluktuujícího pole je ⟨B²_x(t)⟩ ≠ 0 a tato hodnota je stejná pro každý spin.
- (iii) Zavedeme korelační funkci $G(\tau)$, která udává intenzitu fluktuací, jako:

$$G(\tau) = \left\langle B_x(t)B_x(t+\tau) \right\rangle \neq 0.$$
(13)

Obecně má korelační funkce velkou hodnotu pro malé τ a naopak se blíží k nule pro $\tau \to \infty$. Pro takto definované fluktuující pole se jedná o monoexponenciální pokles s parametrem τ_c a pak má korelační funkce tvar:

$$G(\tau) = \left\langle B_x^2 \right\rangle \exp\left(-\frac{|\tau|}{\tau_c}\right),\tag{14}$$

kde $\langle B_x^2 \rangle$ je střední kvadratické odchylka korelační funkce pro parametr $\tau = 0$, viz vztah 11. τ_c se nazývá korelační čas, který udává rychlost fluktuace. Exponenciálně klesající korelační funkce charakterizovaná korelačním časem nebo součet několika takových korelačních funkcí se často používá k popisu fluktuace interakcí jaderného spinu i v složitějších reálných případech.

Důležitou roli v teorii NMR relaxací hraje *spektrální hustota J(\omega)*. Spektrální hustota je dána jako Fourierova transformace korelační funkce:

$$J(\omega) = 2 \int_{0}^{+\infty} G(\tau) \exp(-i\omega\tau) d\tau.$$
(15)

Vycházíme-li ze vztahu 14 pro korelační funkci, dostáváme spektrální hustotu ve tvaru absorpční Lorenzovy křivky:

$$J(\omega) = 2\left\langle B_x^2 \right\rangle \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}.$$
 (16)

Zlomek na pravé straně rovnice 16 odpovídá normované spektrální hustotě $\Im(\omega)$:

$$\Im(\omega) = \mathcal{A}(\omega; 0, \tau_c^{-1}) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}.$$
(17)

V případě, že je fluktuace pole rychlá, pak korelační funkce klesá rychle (korelační čas je krátký) a spektrální hustota je široká (viz obrázek 2). V opačném případě je pokles korelační funkce pomalý (dlouhý korelační čas) a spektrální hustota je úzká (obrázek 3).



Obr. 3: Rychlá fluktuace magnetického pole v x-ovém směru transverzální roviny (a) odpovídá rychlému poklesu korelační funkce (b). Spektrální hustota má široký tvar (c).



Obr. 4: Pomalá fluktuace magnetického pole v x-ovém směru transverzální roviny (a) způsobuje pomalý pokles korelační funkce (b), spektrální hustota má pak úzký tvar (c).

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 měnícím se lokálním magnetickým polem, se mění také elektronové proudy magnetickým polem indukované, což způsobuje anisotropii chemického posunu (CSA). Důležitost relaxačních mechanismů pro spiny ½ je následující:

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. Teplotní závislost rotačního korelačního času molekuly je zpravidla možné popsat Arrheniovou rovnicí 18 [5].

$$\tau_{M} = \tau_{0} exp\left(\frac{E_{A}}{RT}\right)$$
(18)

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

3.1. DIPÓL-DIPÓLOVÁ RELAXACE

Magnetické pole fluktuující v příčné rovině indukuje přechody mezi energetickými hladinami spinů. Na obrázku 5 je znázorněn diagram energetických hladin s vyznačením pravděpodobností přechodů mezi nimi pro spiny *I* a *S*, mezi kterými existuje dipóldipólová interakce. W_{II} a W_{IS} jsou pravděpodobnosti jednokvantových přechodů, W_2 je pravděpodobnost dvoukvantového přechodu, W_0 je pravděpodobnost nulkvantového 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, a 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. 6).[3] Oblast, kde $\omega_0 \tau_c << 1$, 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. 5: Diagram energetických hladin dvou spinů I a S, mezi nimiž působí dipól-dipólová interakce. W_{11} a W_{15} jsou pravděpodobnosti jednokvantových přechodů, W_2 je pravděpodobnost dvoukvantového přechodu, W_0 je pravděpodobnost nulkvantového přechodu.



Obr. 6: Závislost podélné relaxační doby (T_1) a příčné relaxační doby (T_2) na korelačním čase (τ_1) .[3]

Pro relaxaci jader ¹³C způsobenou dipól-dipólovou interakcí s jádry ¹H (která jsou během směšovacího času efektivně saturována) lze odvodit rovnice 19, 20 [6] 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.

$$R_{I}^{DD} = \frac{1}{4} N_{H} (DCC)^{2} \left[J(\omega_{H} - \omega_{C}) + 3J(\omega_{C}) + 6J(\omega_{H} + \omega_{C}) \right]$$
(19)

$$R_{2}^{DD} = \frac{1}{4} N_{H} (DCC)^{2} \left[2J(0) + \frac{1}{2} J(\omega_{H} - \omega_{C}) + \frac{3}{2} J(\omega_{C}) + 3J(\omega_{H}) + 3J(\omega_{H} + \omega_{C}) \right]$$
(20)

3.2. RELAXACE VLIVEM CSA

Pro příspěvky CSA k relaxačním rychlostem R^{CSA} platí rovnice 20, 22 [3] CSA_{eff} je amplituda interakce, která závisí na složkách tenzoru chemického posunu.

$$R_{I}^{CSA} = \frac{1}{3} (\gamma_{C} \boldsymbol{B}_{\boldsymbol{\theta}})^{2} CSA_{eff}^{2} J(\omega_{C})$$
⁽²¹⁾

$$R_{2}^{CSA} = \frac{1}{3} (\gamma_{C} \boldsymbol{B}_{\theta})^{2} CSA_{eff}^{2} \left[\frac{2J(0)}{3} + \frac{J(\omega_{C})}{2} \right]$$
(22)

3.3. SPEKTRÁLNÍ HUSTOTA PRO ISOTROPNÍ ROTACI

Uvažujeme-li isotropně rotující molekulu s korelačním časem τ_M , je možno spektrální hustotu $J(\omega)$ vyjádřit vztahem 23. [3]

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{\tau_M}{1 + \omega^2 \tau_M^2} \right]$$
(23)

Pro komplikovanější systémy, které jako celek rotují isotropně (s korelačním časem

 τ_{M}), avšak obsahují i části s mnohem rychlejšími anisotropními lokálními pohyby (s korelačním časem τ_{e}), je možno použít Lipari-Szabo přístup [12]. Tento model obsahuje dva korelační časy: globální τ_{M} , lokální τ_{e} a parametr uspořádání S^{2} , který určuje, jak se podílí globální a lokální složka korelačního času na celkovém korelačním čase. Redukovaná spektrální hustota v tomto modelu má tvar váženého součtu (s vahou S^{2}) dvou Lorenzových absorpčních křivek.

3.4. NUKLEÁRNÍ OVERHAUSERŮV EFEKT (NOE)

NOE je projevem dipól-dipolové interakce. Jde o přenos energie mezi dvěma spiny (v našem případě se jedná o jádra ¹³C a ¹H), tzv. křížovou relaxaci [3]. Ozařujeme-li selektivně jeden spin, např. jádro ¹H, dostatečně dlouhou dobu, dojde v důsledku přenosu energie k navýšení magnetizace na jádře ¹³C, které se projeví navýšením intenzity signálu ve spektru. V případě uhlíkového spektra získaného při ozařování jádra ¹H pro velikost NOE platí rovnice (24) a (25), kde σ^{DD} je rychlost heteronukleární křížové relaxace [6].

$$NOE = 1 + \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\right) \frac{N_H \sigma^{DD}}{R_1^{DD}}$$
(24)

$$\sigma^{DD} = \frac{1}{4} (DCC)^2 \left(6\Im(\omega_H + \omega_C) - \Im(\omega_H - \omega_C) \right)$$
(25)

Pro maximální navýšení intenzity signálu ¹³C vlivem NOE mezi ¹H a ¹³C platí:

$$NOE = 1 + \gamma_H / 2\gamma_C \cong 3. \tag{26}$$

4. CHEMICKÁ VÝMĚNA

Chemická výměna je označení pro procesy, při kterých přecházejí jádra do jiného chemického okolí, čímž se mění jejich rezonanční frekvence z hodnoty v_1 na v_2 . Chemická výměna má zejména na příčnou složku magnetizace a můžeme ji rozdělit na dva typy: intramolekulární (konformační přechody) a intermolekulární(např. tvorba komplexů).

Uvažujme symetrickou chemickou reakci prvního řádu s rychlostní konstantou *k* (obr. 7).

$$A \xrightarrow{k} B$$

Obr. 7: 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 27.

$$k_{ex} = 2k \tag{27}$$

Chemická výměna má vliv na šířku čar ve spektru. Je-li rychlost chemické výměny k_{ex} menší než rozdíl rezonančních frekvencí $\Delta v = v_1 - v_2$ v Hz při určité velikosti vnějšího magnetického pole, jedná se o tzv. pomalou výměnu, a ve spektru můžeme pozorovat obě frekvence. Přechod spinů ze stavu s rezonanční frekvencí v_1 do prostředí, kde mají frekvenci v_2 , způsobuje jejich rychlejší rozfázování a rozšíření čáry ve spektru Δv_{ex} (rovnice 28).

$$\Delta v_{ex} = R_2 / \pi = 1 / \pi \tau_A \tag{28}$$

Pokud je $k_{ex} > \Delta v$, objeví se ve spektru pouze jeden signál o frekvenci $(v_1 + v_2)/2$. Rychlost chemické výměny roste s rostoucí teplotou. Přechod mezi rychlou a pomalou výměnou nastává při tzv. koalescenční teplotě, při které platí vztah 29.

$$k_{ex} = \pi \Delta v / \sqrt{2} = 2,22\Delta v \tag{29}$$

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 $(\Delta v)^2$), až při velmi velké rychlosti chemické výměny není rozšíření čáry pozorovatelné (obr. 8) [7].



Obr. 6: Symetrická chemická výměna mezi dvěma stavy - závislost NMR spekter na teplotě. [9]

Dosud byly popsány režimy chemické výměny, které mají vliv na tvar spektra a tedy se dají přímo ze spektra kvantifikovat. Režimy mimo tuto oblast je možné studovat jinými metodami. Pomalou výměnu, která znatelně nerozšiřuje spektrální čáry je možné měřit pomocí metod založenými na přenosu magnetizace.

Naopak výměnu, která je příliš rychlá, aby významně rozšířila průměrný signál společný pro oba stavy, je možné měřit pomocí závislosti příčné relaxace na echo-času v pulsních sekvencích založených na spinovém echu. Tato metoda je uplatněna v této práci a je podrobněji popsána v kapitole 5.3.

Eyringova rovnice (30) popisuje závislost rychlostní konstanty chemické reakce na termodynamických parametrech tranzitního stavu – volné Gibbsově energii ΔG , která souvisí s aktivační entalpií ΔH a s aktivační entropií ΔS podle vztahu 31.[5], [8]

$$k = k_{\rm B}T/h \exp(-\Delta G/RT) \tag{30}$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{31}$$

5. NMR METODIKA

5.1. MĚŘENÍ PODÉLNÉ RELAXAČNÍ DOBY T₁

K měření podélné relaxační doby T_t se standardně používá sekvence "inversion recovery" (obr. 7). [10] Aplikací 180° tvrdého pulsu (krátký puls, který excituje celé spektrum) na vzorek v rovnováze ve vnějším magnetickém poli dojde k překlopení magnetizace M_0 do záporného směru osy z. Po uplynutí doby, kterou nazývám směšovací čas t_{mix} , kdy se magnetizace vyvíjí (relaxuje ke své rovnovážné hodnotě), aplikujeme 90° tvrdý puls, který obrátí magnetizaci do roviny x,y, kde detekujeme signál volné precese (FID). Opakováním této procedury pro sérii různých časů t_{mix} určíme časový nárůst magnetizace M_z . Hodnotu relaxační doby T_1 určíme fitem experimentálních dat do vztahu (32).

$$I(t) = I_{\infty} \left(1 - 2 \exp\left(-\frac{t}{T_I}\right) \right)$$
(32)

I(t) rozumíme intenzitu signálu v čase t od 180°-pulzu, I_{∞} je amplituda signálu v době, kdy jsou měřené spiny zrelaxovány a magnetizace je navrácena k rovnovážné hodnotě M_0 .



Obr. 7: schématické znázornění sekvence inversion recovery použité k měření podélné relaxační doby T_{t} .

Po celou dobu sekvence jsou ozařována jádra ¹H (tzv. dekapling), čímž dojde

k vyrovnání populací jejich hladin a odstranění vlivu J-interakce na spektra ¹³C, tj. vymizení multipletní struktury, a k odstranění vlivů křížové relaxace a interferencí relaxačních mechanismů DD a CSA.

5.2. MĚŘENÍ NUKLEÁRNÍHO OVERHAUSEROVA EFEKTU NOE

K měření heteronukleárního stacionárního NOE mezi ¹³C a ¹H se používá sekvence znázorněná na obrázku 9 [12]. Během doby, kdy je selektivně ozařován ¹H, dochází vlivem NOE k přenosu magnetizace na ¹³C, jehož signál následně měříme. Dále je změřen signál ¹³C bez předchozího ozařování ¹H. NOE se získá jako podíl intenzit signálů spektra 1 a spektra 2.



Obr. 9: schématické znázornění sekvence pro měření NOE.

5.3. MĚŘENÍ PŘÍČNÉ RELAXAČNÍ DOBY T₂

Základem sekvence k měření příčné relaxační doby je spinové echo. Magnetizace je pomocí 90°-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_{ecbo} po 90°-pulzu aplikován 180°-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_{ecbo} po 180°-pulzu znovu ke zfázování spinů. Intenzita *I* následně získaného signálu tak závisí jen na homogenní relaxaci a není ovlivněna nehomogenitou magnetického pole (rovnice 33).

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right)$$
(33)

 I_0 je intenzita signálu v čase nula po aplikaci 90°-pulzu.

K měření příčné relaxační doby se používá sekvence CPMG (Carr, Purcell, Meiboom, Gill – podle autorů sekvence), což je mnohonásobné spinové echo s konstantním echočasem a proměnným počtem cyklů *n*. (obr. 8) [11]. Protonový 180°-pulz zajišťuje odstranění interference relaxačních mechanismů DD a CSA.

K měření rychlých chemických výměn (viz. kap. 4) lze použít sekvenci CPMG s proměnnou délkou echa. Z naměřené závislosti relaxační rychlosti na t_{ecbo} lze určit rychlost chemické výměny použitím vztahů 34 a 35.[27]

$$R_{2} = p_{A} p_{B} \left(\Delta \omega\right)^{2} t_{echo} \left[1 - \frac{\tau_{ex}}{t_{echo}} \tanh\left(\frac{t_{echo}}{\tau_{ex}}\right) \right] + R^{DD+CSA}$$
(34)

$$\tau_{ex} = \frac{1}{k_{ex}} \tag{35}$$

Kde 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, jakou by spiny relaxovaly pouze vlivem dipól-dipólové interakce a CSA, tedy kdyby mezi nimi neexistovala chemická výměna. První člen na pravé straně rovnice 34 odpovídá relaxační rychlosti vlivem





Obr. 8: schématické znázornění sekvence CPMG použité k měření příčné relaxační doby.

6. KALIXARENY

Kalixareny jsou deriváty [1*n*] metacyklofanů, přičemž je lze rozdělit na sloučeniny odvozené od fenolu – běžně nazývané kalixareny – a na sloučeniny odvozené od resorcinolu – kalixresorcareny.

Kalixareny patří dnes k jedné ze základních stavebních jednotek v supramolekulární chemii. Je to díky jejich syntetické dostupnosti, snadné derivatizaci a definované a volitelné prostorové struktuře. Používají se především k přípravě molekul schopných komplexace s biomolekulami a to jak ionty nebo neutrálními molekulami, tak i kationy. Dále jako molekulární senzory, složitější receptory, modely enzymů a kapalné krystaly. Za zmínku stojí i jejich využití při stabilizaci reaktivních radikálů. Ze strany průmyslu je zájem o kalixareny jako hostitele těžkých kovů, lanthanoidů a aktinoidů.

Sirné deriváty těchto látek, thiakalixareny, se ukázaly být zajímavou skupinou látek. Ve srovnání s klasickými kalixareny nabízejí nové komplexační možnosti díky mírně větší velikosti kavity a jiným chemickým vlastnostem sirného můstku.

6.1. NÁZVOSLOVÍ KALIXARENŮ

Základní kostra těchto látek se nazývá kalix[n]aren, kde n značí počet kruhů makrocyklu. Tento název již předpokládá přítomnost fenolických hydroxylů, pro zdůraznění je však možno je zvlášť vyjmenovat. Přítomné substituenty se pojmenují podle zásad chemického názvosloví. Při prostorovém znázornění se molekula zobrazuje tak, aby většina methylenových (nebo jim odpovídajících) můstků směřovala dolů. Z toho vyplývají široce používané termíny "spodní okraj" (lower rim) pro oblast, kde jsou v nesubstituovaném stavu vázány fenolické kyslíkové atomy, a "horní okraj" (upper rim) pro oblast m- a p-substituentů. Tato práce se zabývá thiakalix[4]arenem, jež je znázorněn na obrázku 10.

6.2. KONFORMAČNÍ CHOVÁNÍ THIAKALIX[4]ARENU

Předmětem studia této diplomové práce je thiakalix[4]aren, který je na spodním okraji stabilizován vodíkovými můstky. Toto cirkulární pole vazeb vnáší do jinak symetrické molekuly chiralitu – OH skupiny mohou směřovat buď proti nebo po směru hodinových ručiček. Ve skutečnosti se orientace těchto vazeb v čase mění, thiakalix[4]aren tak existuje ve dvou stereoizomerech. Nutno říci, že síla vodíkových vazeb na spodním okraji kalixarenu je určující pro jeho strukturní i dynamické vlastnosti. Bez možnosti tvorby H-můstků zaujímá kalixaren tzv. zploštělou geometrii – viz. obrázek 11, na kterém jsou hydroxyly substituovány methylovými zbytky. Síla vodíkových vazeb totiž ovlivňuje odklonění aromatických kruhů od osy symetrie a tvar kavity.



Obr. 10: thiakalix[4]aren a) se znázorněním očíslování uhlíků; b) vypočtená prostorová struktura.¹



Obr. 11: zploštělý thiakalix [4] aren – bez vodíkových vazeb na spodním okraj i^2

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

¹ Jiří Czernek; ab initio výpočet; 2004

² Michal Čajan; ab initio výpočet; 2000

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. [13]

Nicméně, jak frekvence OH valenční vibrace, tak velikost ¹H chemického posunu OH skupiny jsou významně ovlivněny i dalšími parametry (např. vazebný úhel) [13], takže neposkytují jednoznačné parametry vodíkové vazby.

Kalix[4]aren a thiakalix[4]aren poskytují 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 experimentálních [14], [15], [16] a teoretických [17] 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 30).

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 [18]. Pomocí EXSY³ byla u monofosfátů určena volná aktivační energie na jednu vazbu 9 kJ.mol⁻¹, což je hodnota odpovídající středně silné vazbě [19]. V difosfátech připadá na jednu vazbu 7,8 kJ.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.

Tři kooperativní vodíkové vazby byly detekovány i v monomethyl derivátu kalix[4]arenu 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

³ EXSY = experiment výměnné spektroskopie NMR založený na přenosu magnetizace. Lze ji použít pouze k měření pomalé výměny, která příliš nerozšiřuje čáry ve spektru. Více viz [20].

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 patně chybí příspěvek kooperativity, neboť obsahuje dvě oddělené vodíkové vazby. Určitá míra kooperativity by v tomto případě byla možná jen pokud by jeden kyslíkový methoxy skupiny byl současně akceptorem vodíkových vazeb od obou sousedních hydroxylových skupin.

Thiakalix[4]areny stejně jako kalix[4]areny substituované na dolním okraji nepolárními skupinami, 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. 12). Mezi konformery dochází k přechodům rotací jednotlivých aromatických kruhů kolem osy procházející spojovacími atomy či skupinami, přičemž dolní okraj prochází vnitřkem molekuly. Konformační mobilita je závislá na přítomných substituentech, na druhu rozpouštědla a na teplotě. V případě nesubstituovaného thiakalix[4]arenu jsou tyto konformační přechody též možné, ale konformery jiné než konický jsou energeticky nevýhodné a tudíž jejich populace není pozorovatelná. Vedou však k tomu, že dochází k převracení konického konformeru na převrácený konický konformer, který je geometricky totožný, pouze jakoby převrácený "naruby". Tento proces by též vedl k převrácení pole vodíkových vazeb, ale, jak bylo zjištěno pro kalix[4]aren, při jejich studiu jej není nutné uvažovat, protože je o několik řádů pomalejší než pozorovaná rychlost převrácení pole vodíkových vazeb, a tedy oba procesy nejsou korelované.



Obr. 12: konformace substituovaného kalixarenu – tetramethoxykalix[4]arenu a) konická b) částečně kónická c) 1,2 střídavá d) 1,3 střídavá

6.3. SPINOVÁ RELAXACE A NOE VE VZORKU Thiakalix[4]arenu

Uhlíky v molekule thiakalix[4]arenu můžeme rozdělit do dvou skupin. Uhlíky C3, C4, C5 (obr. 10) mají na sebe přímo vázané vodíky a relaxují proto zejména vlivem dipóldipólové interakce s těmito vodíky, slaběji též vlivem CSA. Uhlíky C1, C2, C6, které nemají navázaný vodík, relaxují převážně vlivem CSA. K jejich relaxaci přispívá také dipóldipólová interakce s vodíky v okolí. Uvedené DD a CSA příspěvky k relaxacím nejsou obecně aditivní, k relaxaci přispívá i jejich interference, ta je však u relaxačních mechanismů potlačena vhodnou pulzní sekvencí. Pro výsledné relaxační rychlosti a NOE lze potom s použitím rovnic 19 - 24 odvodit vztahy 36, 37 a 38 [6].

$$R_I = R_I^{DD} + R_I^{CSA} \tag{36}$$

$$R_2 = R_2^{DD} + R_2^{CSA}$$
(37)

$$NOE = 1 + \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_C}\right) \frac{N_H \sigma^{DD}}{R_I^{DD} + R_I^{CSA}}$$
(38)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7. NASTAVENÍ EXPERIMENTU

Pro získání ¹H a ¹³C spekter byl použit spektrometr Avance 500, od firmy Bruker, jehož pracovní frekvence je 500,13 MHz pro jádra ¹H a 125,76 MHz pro jádra ¹³C. K ozařování a detekci signálu byla použita sonda TBO, která je vhodná k detekci signálu ¹³C jader a k současnému ozařování ¹H i ¹³C jader. K regulaci teploty byla použita teplotní jednotka BVT 3000. Stabilita v nastavení teploty je lepší než ± 0,1 K. Teplota byla kalibrována pomocí methanolového standardu. Celková přesnost nastavené teploty je lepší než ± 0,2 K. Vzorek byl před každým měřením temperován na dané teplotě nejméně 15 minut.

Délka ¹³C $\pi/2$ pulsu se pohybovala v rozmezí 6,6-7,1 µs, délka ¹H $\pi/2$ pulsu se pohybovala od 13,1 µs do 14,3 µs.

Následuje výčet parametrů jednotlivých experimentů.

7.1.¹H NMR SPEKTRA

šířka spektra: 6 kHz velikost: 32 k datových bodů počet scanů (průchodů): 8 doba akvizice: 3,5 s doba před každým scanem (*D1*): 7,0 s

7.2.¹³C NMR SPEKTRA

spektra byla ¹H–dekaplována sekvencí waltz–16 šířka spektra: 10 kHz velikost: 32 k datových bodů doba akvizice: 1,6 s

Měření podélné relaxační doby T₁:

Pulzní sekvence: inversion recovery (obr. 7).

Na začátek měření s každým směšovacím časem bylo vloženo 6 scanů bez nabírání dat (tzv. dummy scany) kvůli ustavení stacionárního stavu spinového systému před začátkem pulzní sekvence. Další parametry jsou v závislosti na teplotě zaznamenány v tabulce 1. *D1* je doba před každým scanem, v průběhu které dochází k návratu spinového systému do rovnováhy nebo stacionárního stavu a byla nastavena tak, aby splňovala podmínku: $D1+AQ \ge 3xT_1$, kde AQ je doba nabírání dat označována jako akvizice AQ. Pro měření bylo pro každou teplotu použito 12 různých směšovacích časů t_{mix} . Nejmenší hodnota směšovacího času byla vždy 10µs, t_{mix_max} je největší hodnota směšovacího času (jeho hodnota byla pro měření *T1* přibližně rovna $5T_1$). Všechny experimenty byly měřeny na 512 scanů (průchodů).

T [K]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
D1 + AQ [s]	6,0	6,5	4,5	5,4	6,9	9,0	11,4	15,0	10,6	20,4
t _{mix_max} [s]	10	10	7,5	9	11,5	14	19	25	14	34
									-	

Tabulka 1: Nastavení parametrů pro měření uhlíkových relaxačních dob T₁ pro jednotlivé teploty.

První data byla měřena při teplotě 303 K, proto bylo také nastavení D1 vzhledem k ostatním experimentům kratší. Tato hodnota byla odhadnuta podle relaxační doby T_1 pro 303 K v podobném vzorku – kalix[4]arenu (viz. [21]). Tímto měřením bylo zjištěno,že relaxační doby v thiakalix[4]arenu jsou delší a pro další experimenty již bylo nastavení upraveno.

Měření příčné relaxační doby T_2 a rychlé chemické výměny:

K měření této relaxační doby byla použita pulzní sekvence CPMG s t_{echo} = 0,8ms a proměnnou délkou opakování n (obr. 8). Pro chemickou výměnu bylo použito měření relaxační doby T₂ sekvencí CPMG s proměnnou délkou echo-času. To znamená, že v následných experimentech zvyšujeme délku echo-času t_{echo} (200 µs – 5,0 ms) a pro dané t_{echo} se mění počet cyklů *n* v sekvenci. Protonový puls zajišťuje odstranění vlivu interference relaxačních mechanismů. Nevýhodou tohoto měření je poměrně velká časová náročnost a tak byla z části k měření chemických výměn použita i její upravená verze, ve které místo počtu cyklů při neměnném echo-času zvyšujeme délku t_{echo} a pro daný echo-čas je nastaven počet cyklů v sekvenci tak, aby směšovací čas t_{mix} určený ve skutečnosti jejich součinem zůstal konstantní (20, 30 a 100 ms). Tím byla snížena časová náročnost těchto experimentů asi na polovinu. Jaké experimenty CPMG byly změřeny pro kterou teplotu uvádí následující výčet: 313 K ... CPMG a $t_{echo} = 0,8$ ms a CPMG a $t_{mix} = 100$ ms 303 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,2$ a 0,8 ms 293 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms 283 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms 273 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,2$; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0 ms 263 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms a CPMG s $t_{mix} = 20$ ms 253 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms a CPMG s $t_{mix} = 20$ ms 253 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms a CPMG s $t_{mix} = 20$ ms 243 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms a CPMG s $t_{mix} = 20$ ms 233 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms a CPMG s $t_{mix} = 20$ ms 233 K ... CPMG s $t_{echo} = 0,8$ ms a CPMG s $t_{mix} = 20$ ms

Následující tabulky shrnují nastavení parametrů pro měření uhlíkových relaxačních dob T_2 pro jednotlivé teploty. *D1* byla nastavena vždy tak, aby splňovala podmínku *D1* >5 T_1 . *N* je počet použitých různých směšovacích časů, t_{mix_max} je největší hodnota směšovacího času (jeho hodnota byla pro měření T_2 přibližně rovna $4T_2$), nejmenší hodnota směšovacího času byla v klasické sekvenci CPMG vždy použita podle možností nastavení co nejnižší. V sekvenci CPMG s konstantním směšovacím časem je v tabulce uvedena vždy hodnota počtu různých echo-časů *N* a jejich nejnižší t_{echo_min} a nejvyšší hodnota t_{scho_max} .

т [К]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
D1 [s]	4,4	4,9	4,9	7,4	9,9	13,4	17,4	20,6	26	32,4
N	12	12	12	12	12	12	12	9	12	9
t _{mix_max} [s]	1,6	1,6	3,2	3,2	4,8	6,4	7,5	4,5	6,4	6,3

Tabulka	2: N	astavení	parametrŭ	pro	měření	uhlik	ových	relaxai	čních	dob	T_2	metodou	CPM	1G.
---------	------	----------	-----------	-----	--------	-------	-------	---------	-------	-----	-------	---------	-----	-----

τ[κ]	233		243	253		263	313
t _{mix} [ms]	20 30		20	20 30		20	100
N	9	12	10	10	12	5	6
t _{echo_min} [ms]	0,1052	0,1052	0,1047	0,1051	0,1051	0,105	0,1045
T _{echo_max} [ms]	2,48	0,92	2,48	2,48	3,73	0,4	0,81

Tabulka 3: Nastavení parametrů pro měření chemických výměn metodou CPMG a konstantním směšovacím časem a proměnným echo-časem.

7.3. MĚŘENÍ HETERONUKLEÁRNÍHO {¹H}-¹³C NOE

Pulzní sekvence: sekvence pro dynamické NOE (obr. 9).

Nastavené parametry jsou pro jednotlivé teploty uvedeny v tabulce 4. Při měření

{¹H}-¹³C NOE byly protony ozařovány nejprve po velmi krátkou dobu 10µs a potom po dobu delší než $5T_t$ (t_{mix_max}). Hodnota *NOE* byla získána jako poměr intenzit signálů takto změřených dvou spekter. *D1* byla nastavena vždy tak, aby splnila podmínku *D1* > $8T_t$.

т [К]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
D1 [s]	12	13	15	18	23	30	38	50	30	68
t _{mix_max} [s]	6	6,5	7,5	9	11,5	15	11,5	25	17	34

Tabulka 4: Nastavení parametrů pro měření NOE.

Pro teploty 213 K, 203 K a 193 K bylo naměřeno jen ${}^{1}H$ – spektrum a ${}^{13}C$ – spektrum na 2266 scanů. Kvůli rozšíření signálů zejména pro uhlíky C2, C6 došlo ke snížení poměru signál/šum, což znemožnilo měření ${}^{13}C$ relaxací.

7.4. VZOREK

Vzorek thiakalix[4]arenu (Pavel Lhoták, VŠCHT Praha) o byl rozpuštěn 1,1,2,2tetrachlorethanu-d₂ (Chemotrade, 99.8% d), vzniklý nasycený roztok o koncentraci přibližně 0,03 mol/dm³ byl odplyněn pomocí několika cyklů zmražení, odčerpání plynu, rozmražení a zataven v 5 mm kyvetě.

8. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

8.1. ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Tabulka 5 ukazuje parametr *LB* zpracování naměřených dat pro jednotlivé teploty. Jedná se o exponenciální apodizaci signálu volné precese. Tento parametr byl použit stejný pro všechna měření relaxační doby T_2 při dané teplotě.

т [К]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
LB {T1}	2	15	15	15	5	2	5	5	2	5
LB {T2}	20	20	20	20	15	5	10	10	5	5
LB {NOE}	2	5	5	5	5	2	5	5	2	5

Tabulka 5: Parametr LB použitý pro zpracování experimentů.

8.2. ¹³C A ¹H SPEKTRA THIAKALIX[4]ARENU

¹³C spektrum thiakalix[4]arenu v 1,1,2,2-tetrachloroethanu-d₂ obsahuje 4 signály. Jejich přiřazení je uvedeno v obrázku 13. Atomy C2, C6, respektive C3, C5 jsou při teplotě vyšší než 223K chemicky ekvivalentní. Při snižování teploty však dochází u jejich signálů k rozšiřování (213 K) a štěpení (203 K). Z toho vyplývá, že ekvivalence při vyšší teplotě je způsobena dynamickým procesem, který středuje 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 thiakalix[4]arenu.

¹H spektrum obsahuje 3 signály, jejich přiřazení je uvedeno v obrázku 14. Signál H3, H5 je dublet a signál H4 je triplet v důsledku vzájemné J-interakce. Signál OH skupiny je posunut k 9,5 ppm.



Obrázek 13: ¹³C spektrum thiakalix[4]arenu při 263K, 213K a 203K (shora). U spektra při 203K byla odečtena hodnota štěpení píku: 1,02ppm, což znamená rozdíl frekvencí 128,3Hz.



Obrázek 14: ¹H spektrum thiakalix[4] arenu při 313K.

8.3. RELAXAČNÍ DOBY THIAKALIX[4]ARENU

Podélné relaxační doby T_1 byly měřeny pomocí sekvence "inversion recovery" (obr. 7), příčné relaxační doby T_2 pomocí sekvence CPMG s konstantním echo-časem t_{echo} = 0,8 ms kvůli splnění podmínky ¹³C pulz << t_{echo} << 1/¹J_{CH} (obr. 8). Hodnoty relaxačních časů T_1 byly z intenzit naměřených signálů získány nafitováním podle rovnice 32. Hodnoty relaxačních časů T_2 byly z intenzit naměřených signálů získány nafitováním podle rovnice 33. Chyba určení T_1 byla stanovena u jader C3, C5 a C4 na 2,5%, u jader C1 a C2, C6 na 5%. Chyba určení relaxačních dob T_2 je 5%. Statistické chyby fitu při výpočtu T_1 a T_2 jsou menší, uvedené chyby by měly zahrnovat i možné systematické chyby měření.

 $R_1(T)[s^{-1}]$

Teplota [K]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
C1	1,28	1,32	1,00	0,831	0,628	0,511	0,382	0,319	0,255	0,198
C2,C6	0,903	0,942	0,775	0,577	0,443	0,353	0,272	0,225	0,180	0,159
C3,C5	5,39	5,73	5,13	4,41	3,79	3,05	2,64	2,17	1,76	1,42
C4	5,30	5,37	4,97	4,59	3,85	3,10	2,76	2,25	1,87	1,49



Tabulka 6: závislost relaxační rychlosti podélné relaxace R1 na teplotě pro jednotlivá jádra.

Graf 1: závislost relaxační rychlosti podélné relaxace pro jednotlivá jádra na teplotě.

Z naměřených relaxačních rychlostí spin-mřížkové relaxace (tabulka 6 a graf 1) vidíme, že uhlíky v molekule thiakalix[4]arenu můžeme rozdělit do dvou skupin. Uhlíky C3, C4, C5 mají na sebe přímo vázané vodíky a relaxují proto zejména vlivem dipól-dipólové interakce s těmito vodíky, slaběji též 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. Dále vidíme, že relaxační rychlosti mají své maximum v 233K. Při zvyšování teploty se totiž systém dostává do režimu extrémního zúžení (viz. kap. 3.1.) a podélná relaxační rychlost se snižuje, neboť se obecně rotační difúze s rostoucí teplotou zrychluje.

 $R_2(T)[s^{-1}]$

Teplota [K]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
C1	3,12	2,00	1,58	0,98	0,73	0,56	0,55	0,41	0,29	0,23
C2,C6	15,06	20,09	16,17	9,11	4,85	2,53	1,59	0,93	0,57	0,39
C3,C5	13,61	11,02	8,29	6,15	4,56	3,79	3,01	2,33	1,92	1,68
C4	12,99	9,70	6,96	4,90	4,39	3,33	3,09	2,34	1,83	1,76

Tabulka 7: závislost příčné relaxační rychlosti R2 na teplotě pro jednotlivá jádra.



Graf 2: závislost relaxační rychlosti příčné relaxace na teplotě pro jednotlivá jádra.

Rozdělení do skupin podle délky relaxačních relaxačních rychlostí R_2 odpovídá rozdělení podle R_1 . Velikosti relaxačních rychlostí R_2 by měly podle teorie monotónně klesat se zvyšující se teplotou. Zase vidíme (tab. 7 a graf 2), že uhlíky s vodíky (C3, C5 a C4) relaxují velmi podobně, rychleji než C1 kvůli dipól-dipólové interakci. C2, C6 by měly relaxovat podobně jako C1, neboť také nemají vodík, ale můžeme si všimnout výrazného navýšení relaxační rychlosti, dokonce i oproti uhlíkům nesoucím vodík. Tento výsledek odpovídá tomu, že příčná relaxační doba je zkracována i relativně pomalými pohyby a tedy i chemickou výměnou, která existuje mezi páry C2, C6 díky konformační změně směru vodíkových vazeb. Zkrácení R_2 C3, C5 je mnohem méně patrné.

8.4. HETERONUKLEÁRNÍ {¹H}- ¹³C NOE V THIAKALIX[4]ARENU

Pomocí sekvence pro dynamické NOE, znázorněné na obrázku 9 byl měřen přenos magnetizace z ¹H na ¹³C vlivem DD interakce, tedy velikost stacionárního heteronuklárního Overhauserova efektu. Výsledné hodnoty NOE jsou v závislosti na teplotě uvedeny v tabulce 8 a grafu 3. Měření bylo provedeno pro stejné teploty jako měření relaxačních dob. Chyba určení NOE byla odhadnuta na 5%.

NOE	(T)
	~ /

teplota [K]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
C1	0,97	1,04	1,10	1,14	1,28	1,38	1,45	1,53	1,47	1,53
C2,C6	1,09	1,03	1,10	1,15	1,23	1,31	1,38	1,39	1,42	1,45
C3,C5	1,20	1,31	1,53	1,85	2,12	2,33	2,50	2,51	2,60	2,64
C4	1,12	1,30	1,48	1,73	2,13	2,21	2,44	2,53	2,77	2,55

Tabulka 8: závislost NOE na teplotě pro jednotlivá jádra ¹³C.



Graf 3: závislost NOE na teplotě pro jednotlivá uhlíková jádra.

Z tabulky 5 a grafu 3 vidíme, že uhlíky s přímo vázaným vodíkem (C3, C5 a C4) relaxují převážně vlivem DD interakce, zvláště při vyšších teplotách, ale NOE pro ně nedosahuje teoretického maxima 3,0 při čisté DD interakci. Poměr příspěvku CSA a DD je u uhlíků bez vodíku (C1, C2, C6) ještě větší, což se projeví poklesem hodnoty NOE.

9. STANOVENÍ DYNAMICKÉHO CHOVÁNÍ THIAKALIX[4]ARENU

Naměřené relaxační rychlosti při jednotlivých teplotách byly použity ke stanovení parametrů rotační difúze thiakalix[4]arenu s využitím rovnic 34, 35 a 36. Pro konstrukci spektrálních hustot byl použit model izotropní rotace tuhé koule (rovnice 23), 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 [22]. Obdobně ve studii tetrasulfonové kyseliny kalix[4]arenu [23] nebyly nalezeny signifikantní interní pohyby. Navíc vnější rozměry thikalix[4]arenu v kartézských osách jsou si blízké [24] a tudíž není třeba předpokládat žádnou významnou anisotropii v molekulární rotaci.

9.1. URČENÍ KONSTANT DCC A CSA_{eff}

Pro konstantu DD interakce mezi přímo vázanými atomy C - H byla použita hodnota 21,5 kHz. Tato konstanty odpovídá C-H vzdálenosti 112 pm. Tato vzdálenost je delší než je příslušná hodnota získaná difrakčními metodami v krystalech, ale je vhodná jako efektivní hodnota pro interpretaci magnetické dipól-dipólové interakce [25], [26] patrně vzhledem k vibračnímu středování meziatomové vzdálenosti (přesněji její třetí mocniny). Zejména pro uhlíky, které nenesou přímo vázaný vodík je nezbytné započítat i interakci se vzdálenějšími vodíky. To bylo provedeno tak, že byly pomocí ab initio vypočítané geometrie [24] odhadnuty vzdálenosti a z nich vypočítané DD interakční konstanty byly sečteny. Tato korekce byla provedena pro všechny uhlíky a výsledné DD konstanty jsou uvedeny v tabulce 10. Protože pro dvojice C2, C6 a C3, C5 se získané konstanty poněkud liší, ale ve spektru poskytují jediný signál, byla pro ně použita hodnota průměru příslušných čísel.

Na rozdíl od vzdálenosti nepřímo vázaných atomů C-H jsme se nepokoušeli zahrnout vibrační středování, protože předpokládáme, že delší vzdálenosti jím budou ovlivněny méně a jejich započtení vyžaduje komplikované a časově velmi náročné kvantově-chemické výpočty.

C1	8,33E+08
C2, C6	5,47E+08
C3, C5	1,87E+10
C4	1,90E+10

Tabulka 10: používané hodnoty DD konstanty (DCC).

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 11, získané ab initio výpočtem [24].

CSA _{eff}	(ppm)	Průměr
C1	159,4	
C2	135,5	134,0
C3	181,4	181,1
C4	185,6	
C5	180,8	
C6	132,6	

Tabulka 11: hodnoty CSA_{eff} získané ab initio výpočtem. Pro jádra C2, C6 respektive C3,C5 byla použita průměrná hodnota ze stanovených hodnot pro C2 a C6 respektive C3 a C5.

9.2. VÝPOČET ROTAČNÍHO KORELAČNÍHO ČASU $\tau_{\rm m}$ Molekuly

Výpočet rotačního korelačního času molekuly τ_M (tabulka 12 a graf 5) byl proveden pro všechna jádra a všechny relaxační parametry současně pro každou teplotu zvlášť. Důležitým výsledkem analýzy pohybu molekuly je stanovení velikosti relaxační rychlosti R_2 bez příspěvku chemické výměny, které jsme obdrželi jako součást fritovací rutiny při určování τ_M . Tyto hodnoty ale závisí na velikosti interakčních konstant (DCC a CSA_{eff}) pro každé jednotlivé jádro. Jelikož se relativní velikosti obou konstant liší pro každé jádro, mohou mít také odlišný vliv na celkový výpočet. Proto byl do rovnice 34 vložen opravný faktor jako druhý nezávislý parametr, který mohl být pro každé jádro různý, ale jeho průměrná hodnota byla zafixována na 1. Tento faktor kompensuje možnou chybu interakčních konstant a zajišťuje konsistenci naměřených T_p NOE a spočtených T_2 pro všechna jádra. Chyby korelačních časů byly získány Monte Carlo simulací – bylo vygenerováno 100 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 (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

teplota [K]	223	233	243	253	263	273	283	293	303	313
C1	3,12	2,00	1,58	0,98	0,73	0,56	0,55	0,41	0,29	0,23
C2,C6	15,06	20,09	16,17	9,11	4,85	2,53	1,59	0,93	0,57	0,39
C3,C5	13,61	11,02	8,29	6,15	4,56	3,79	3,01	2,33	1,92	1,68
C4	12,99	9,70	6,96	4,90	4,39	3,33	3,09	2,34	1,83	1,76
C1 num	3,53	1,93	1,35	0,99	0,73	0,58	0,46	0,37	0,29	0,22
C2,C6 num	2,65	1,36	0,99	0,70	0,52	0,41	0,31	0,26	0,20	0,18
C3,C5 num	15,14	7,90	6,26	5,05	4,17	3,28	2,79	2,28	1,83	1,47
C4 num	14,18	7,83	6,29	5,14	4,29	3,33	2,97	2,35	1,90	1,60
τ _M (ns)	1,914	0,763	0,501	0,344	0,246	0,183	0,145	0,114	0,089	0,072
chyba %	6,38	9,02	4,82	3,74	3,26	3,05	2,99	2,57	2,79	2,68

Tabulka 12: výpočet R₂ relaxační rychlosti bez chemické výměny a rotačního korelačního času τ_M . Hodnoty typu C1 jsou skutečně naměřené relaxační rychlosti, zatímco hodnoty typu C1 num jsou spočtené relaxační rychlosti bez příspěvku chemické výměny.



Graf 4: porovnání vypočtených a naměřených hodnot relaxační rychlosti R₂ příčné relaxace.



Graf 5: vypočtený rotační korelační čas molekuly thiakalix [4] arenu.

Z výsledků uvedených v tabulce 14 lze vidět, že velikosti rotačních korelačních časů molekuly thiakalix[4]arenu jsou řádově v nanosekundách. Fitem Arrheniovy rovnice (18) byly z naměřené závislosti rotačního korelačního času na teplotě určeny aktivační parametry rotace molekuly thiakalix[4]arenu:

$$\tau_0 = 79 \pm 8 \text{ fs}$$

 $E_A = 17,68 \pm 0,17 \text{ kJ.mol}^{-1}$

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 thiakalix[4]arenu jsou ve velmi dobrém souhlasu s dříve publikovanými výsledky pro pentasodnou sůl kalix[4]aren-*p*-sulfonové kyseliny v D₂O ($\tau_0 = 80$ fs, $E_A = 20.5$ kJ.mol⁻¹)[23].

10. CHEMICKÁ VÝMĚNA

10.1. VÝSLEDKY MĚŘENÍ CHEMICKÉ VÝMĚNY Pomocí sekvence cpmg s proměnným Echočasem

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, tedy jen vlivem CSA a DD interakce, R_2^{DD+CSA} byla určena výše viz. tabulka 12 jako R_{2num} . Z této hodnoty a ze skutečně naměřených spektrálních intensit lze určit příspěvek způsobený chemickou výměnou R_{ex} (spojení rovnic 34 a 33: rovnice 39). Naměřené závislosti spektrálních intenzit na t_{ecbo} a počtu ech n pro jádra C2, C6 jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech.

$$I(t) = I_0 \exp[-(R_2^{DD+CSA})n t_{ecba}] \exp(-R_{ex}n t_{ecba})$$
(39)

Změřené příčné relaxační rychlosti C3, C5 též závisejí na délce echo-času t_{echo} obdobně jako C2, C6, nicméně tato závislost je méně zřetelná a navíc pro delší echo-časy je příčná relaxace významně modulována ${}^{1}J_{CH}$ interakcí, protože pro delší echočasy již není splněna podmínka $t_{echo} << 1/{}^{1}J_{CH}$ (viz obr. 8). Proto byla rychlost chemické výměny vyhodnocována jen ze signálu C2, C6.

Pro ilustraci uvádím změnu relaxační doby R_2 v závislosti na echo-času v pulzní sekvenci CPMG při dvou teplotách: 223K a 273K. Je vidět, že pro delší echo-časy se relaxační rychlost zvyšuje až není zachytitelná ve spektru. Pro vyhodnocení chemických výměn byla však použita spektrální intenzita jako u ostatních teplot.

t _{echo} [ms]	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	3,0	4,0	5,0
C1	2,6	2,9	3,1	3,5	2,9	2,9	3,1	3,2	3,4
C2,C6	2,7	5,7	15,1	31,2	37,6	45,2	61,4		
C3,C5	11,7	12,4	13,6	15,3	17,6	17,7	20,4	20,9	22,0
C4	12,7	12,8	13,0	13,8	14,0	12,7	12,0	13,4	13,6

Tabulka 13: závislost relaxační rychlosti R_2 na proměnlivém echo-čase při 223K pro všechna jádra thiakalix [4] arenu. Prázdné kolonky pro C2,C6 při 4,0 a 5,0 ms echo-času znamenají, že v tomto případě již nebyl ve spektru viditelný peak pro tato jádra.

t _{echo} [ms]	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,6	2,4	3,2	4,0
C1	0,63	0,61	0,56	0,56	0,62	0,61	0,59	0,60	0,48	0,50
C2,C6	2,48	2,68	2,60	2,53	2,65	2,76	2,77	2,86	2,74	2,70
C3,C5	3,55	3,62	3,67	3,80	3,66	3,69	3,74	3,56	3,41	3,67
C4	3,60	3,52	3,67	3,32	3,55	4,15	3,55	3,60	3,33	3,42

Tabulka 14: závislost relaxační rychlosti R_2 na proměnlivém echo-čase pro všechna jádra thiakalix/4/arenu při teplotě 273K.



Graf 6: závislost relaxačních dob R_2 na délce echo-času v sekvenci CPMG při teplotě 223K. R_2 pro jádra C1 a C4 nezávisí na délce echo-času, zatímco u jader C2,C6 a C3, C5 je závislost zřejmá.



Graf 7: závislost R_2 na echo-času v sekvenci CPMG při teplotě 273K. Z grafu je patrné, že při této teplotě již není žádná závislost.



Graf 8: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při různých echo-časech při teplotě 223K. Fit rovnicí 34.

<u>Teplota 233K:</u>

$$T_{mix} = 20ms$$

t _{echo} [ms]	I C2,C6
0,2	1,53
0,4	1,30
0,6	1,20
0,8	1,09
1,0	0,96
1,2	0,90
1,6	0,81
2,5	0,82
5,0	0,57

 $T_{mix} = 30ms$

I C2,C6
2,45
2,45
2,20
1,84
1,59
1,30
1,18
1,06
0,93

Tabulka 15: závislost spektrálních intenzit píku C2, C6 na proměnném echo-čase při dvou hodnotách směšovacího času.



Graf 9: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při různých echo-časech při teplotě 233K. Fit rovnicí 34. Čára diagonální na fity intenzit v tabulce 16 vznikla nafitováním intenzit při neměnném echo-čase 0,8 ms z měření R_2 sekvencí CPMG (viz. kap. 5.3 a 8.3).

Teplota 243K:

$$T_{mix} = 20ms$$

I C2,C6
2,29
2,10
1,97
1,83
1,44
1,08
0,45
0,09

Tabulka 16: závislost spektrálních intenzit píku C2, C6 na proměnném echo-čase při jedné hodnotě směšovacího času.



Graf 10: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při různých echo-časech při teplotě 243K. Fit rovnicí 34. Další čára vznikla nafitováním intenzit při neměnném echo-čase 0,8 ms z měření \mathbb{R}_2 sekvencí CPMG (viz. kap. 5.3 a 8.3).

<u>Teplota 253K:</u>

$$T_{mix} = 20ms$$

-	
t _{echo} [ms]	I C2,C6
0,2	2,10
0,3	2,13
0,4	2,11
0,6	1,92
0,8	2,06
1,0	1,96
1,2	2,04
1,6	2,06
2,5	2,03
5,0	1,99

 $T_{mix} = 30ms$

t _{echo} [ms]	I C2,C6
0,2	1,95
0,3	1,88
0,4	1,81
0,6	1,74
0,8	1,85
1,0	1,74
1,2	1,83
1,5	1,73
1,8	1,67
2,5	1,81
3,7	1,78
7,5	1,76

Tabulka 17: závislosť spektrálních intenzit píku C2, C6 na proměnném echo-čase při dvou hodnotách směšovacího času.

<u>Teplota 263K:</u>

$$T_{mix} = 20ms$$

t _{echo} [ms]	I C2,C6
0,2	2,88
0,4	2,83
0,6	2,85
1,2	2,57
2,4	2,42
4,8	1,99
9,4	1,37
18,8	0,67
37,6	0,14
75	0,05

 $T_{mix} = 30 \text{ ms}$

t _{echo} [ms]	I C2,C6
0,2	2,49
0,3	2,57
0,4	2,63
0,6	2,47
0,8	2,59

Tabulka 18: závislost spektrálních intenzit píku C2, C6 na proměnném echo-čase při dvou hodnotách směšovacího času.



Graf 11: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při různých echo-časech při teplotě 253K. Fit rovnicí 34.



Graf 12: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při různých echo-časech při teplotě 263K. Fit rovnicí 34.



Graf 13: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při různých echo-časech při teplotě 273K. Fit rovnicí 34.

Teplota 283K:

Chemická výměna byla vyhodnocena z měření relaxační rychlosti R_2 sekvencí CPMG při neměnné hodnotě echo-času $t_{acho} = 0,8$ ms.



Graf 14: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při jedné hodnotě echo-času při teplotě 283K. Fit rovnicí 34.

Teplota 293K:

Chemická výměna byla vyhodnocena z měření relaxační rychlosti R_2 sekvencí CPMG při neměnné hodnotě echo-času $t_{acho} = 0,8$ ms.



Graf 15: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při jedné hodnotě echo-času při teplotě 293K. Fit rovnicí 34.

Teplota 303K:

t _{echo} [ms]	0,2	0,8
C1	3,358	3,497
C2,C6	1,629	1,763
C3,C5	0,512	0,522
C4	0,499	0,548

Tabulka 19: závislost relaxační rychlosti R_2 na dvou hodnotách echo-času pro všechna jádra thiakalix [4] arenu.



Graf 16: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při 2 různých echo-časech při teplotě 303K. Fit rovnicí 34.

Teplota 313K:

 $T_{mix} = 100ms$

techo [ms]	I C2,C6	
0,2	1,98	
0,4	2,07	
0,6	1,91	
0,8	2,06	
1,2	2,02	
1,6	2,01	

Tabulka 20: závislost spektrálních intenzit píku C2, C6 na proměnném echo-čase při jedné hodnotě směšovacího času.



Graf 17: závislost spektrálních intenzit uhlíků C2,C6 na počtu ech při různých echo-časech při teplotě 313K. Fit rovnicí 34. Další čára vznikla nafitováním intenzit při neměnném echo-čase 0,8 ms z měření R_2 sekvencí CPMG (viz. kap. 5.3 a 8.3).

10.2. STANOVENÍ PARAMETRŮ CHEMICKÉ VÝMĚNY

Parametry obsažené v rovnici 34 byly určeny 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 R^{DD+CSA} byla použita převrácená hodnota relaxační doby T_{2mm} vypočítaná v kapitole 9.2. (tab. 14). Další dva parametry, rozdíl chemických posunů ($\Box \omega$) a korelační čas chemické výměny (τ_{ex}), byly určeny fitováním naměřené závislosti pro teploty od 223 K do 243 K. Při vyšších teplotách je již chemická výměna příliš rychlá a při měření nemohl být zachycen počáteční nárůst spektrálních intenzit při dostatečně malém t_{echo} . Naměřené hodnoty R_2 leží zejména v oblasti, kde je již závislost na t_{echo} prakticky konstantní a proto nelze nezávisle stanovit oba parametry $\Box \omega$ a τ_{ex} . Pro výpočet byla použita hodnota $\Box \omega = 134,41$ Hz odhadnutá jako průměr výsledků při teplotách 223 – 243K. Rychlostní konstanty chemické výměny k_{ex} byly určeny z τ_{ex} podle vztahu 35. Nafitované závislosti spektrální intenzity na celkovém směšovacím času t_{mix} jsou znázorněny v grafech 8 - 17. Výsledné parametry $\Box \omega$ a τ_{ex} a k ($k = k_{ex}/2$) jsou uvedeny v tabulce 21.

		relativní chyba Δω		relativní chyba τ _{ex}	
<i>T</i> [K]	⊿ω [Hz]	[%]	<i>τ_{ex}</i> [μS]	[%]	<i>k</i> [s⁻¹]
223	131,0	1,6	688	8,9	727
233	133,9	0,6	293	8,7	1706
243	138,3	1,7	112	6,8	4464
253	134,4 ^a		48	12,3	10417
263	134,4 ^a		27,3	4,5	18315
273	134,4 ^a		13,39	2,4	37341
283	134,4 ^a		7,304	2,9	68456
293	134,4 ^a		3,916	5,3	127681
303	134,4 ^a		1,9799	4,8	252538
313	134,4 ^a		1,0626	7,1	470544

Tabulka 21: Vypočítané parametry chemické výměny $\Delta \omega$, τ_{ex} a rychlostní konstanta chemické reakce k. ^a zafixovaná hodnota $\Delta \omega$.

Porovnáním změřeného štěpení píku C2,C6, tedy hodnoty rozdílu chemických posunů pro jádra C2 a C6 odečtené přímo ze spektra, s vypočtenou hodnotou $\Delta \omega$ se přesvědčíme o shodě vypočtených a skutečných hodnot. Hodnota odečtená ze spektra pro teplotu 203K i 193K je 128,3Hz.

10.3. TEPLOTNÍ ZÁVISLOST A AKTIVAČNÍ Parametry překlopení pole vodíkových vazeb

V grafu 18 je znázorněna naměřená závislost rychlostní konstanty chemické reakce k na teplotě. Z rovnic 30, 31 byly pomocí programu MATLAB 6 určeny aktivační parametry chemické výměny způsobené změnou orientace vodíkových vazeb na spodním okraji molekuly. Výsledné hodnoty volné aktivační energie $\bigtriangleup G$ jsou v závislosti na teplotě uvedeny v tabulce 24. Přesnost jejich určení je ±0,1 kJ/mol. Hodnoty aktivační entropie $\bigtriangleup S$ a aktivační entalpie $\bigtriangleup H$ jsou:

 $\Delta S = -13.8 \pm 2.4 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ $\Delta H = 38.9 \pm 0.7 \text{ kJ.mol}^{-1}.$



Graf 18: Závislost rychlostní konstanty k převracení směru pole vodíkových vazeb na teplotě.

	ΔG	
T [K]	[kJ/mol]	
223	42,0	
233	42,2	
243	42,3	
253	42,5	
263	42,6	
273	42,8	
283	42,9	
293	43,1	
303	43,2	
313	43,4	

Tabulka 22: Výsledky určení volné aktivační energie ⊿G chemické výměny způsobené změnou orientace vodíkových vazeb na spodním okraji molekuly v závislosti na teplotě.

Aktivační energie a entropie jsou parametry tranzitního stavu mezi reaktanty a produkty. Je to potenciálové maximum mezi stavy reaktantu a produktu. Rychlost přechodu je dána velikostí bariéry.

Získané volné aktivační energie 42,0 - 43,4 kJ.mol⁻¹ pro překlopení pole vodíkových vazeb jsou poměrně vysoké, což kvalitativně odpovídá i vysokému chemickému posunu ¹H rezonance OH skupiny (9,6 ppm). Příspěvek kooperativity je možné odhadnout z hodnoty volné aktivační energie připadající na jednu vazbu pole – 10,5 - 10,9 kJ.mol⁻¹.

Vypočítaná aktivační entalpie 38,9 kJ/mol a aktivační entropie - 13,8 J.mol⁻¹.K⁻¹ popisují entalpicky řízenou reakci.

11. SROVNÁNÍ S KALIX[4]ARENEM

¹H spektra thiakalix[4]arenu a kalix[4]arenu ukazují, že vodíkové můstky v thiakalix[4]arenu jsou slabší (čára OH skupiny má menší chemický posun).



Obrázek 15: 'H spektrum thiakalix[4] arenu (nahoře) v porovnání s ¹H spektrem kalix[4] arenu při 293K.

Relaxační časy thiakalix[4]arenu pro jednotlivá jádra jsou ve srovnání s relaxačními časy kalix[4]arenu při stejných teplotách (viz. [21]) delší a to jak u podélné, tak u příčné relaxace. Jinými slovy thiakalix[4]aren relaxuje pomaleji, tedy navracení spinů jednotlivých jader do stacionárního stavu je pomalejší. Zároveň ve srovnání NOE v kalix[4]arenu a thiakalix[4]arenu si můžeme všimnout, že příspěvek DD interakce pro jádra bez přímo vázaných vodíků je téměř stejná, pouze pro jádra s přímo vázaným vodíkem je podíl DD interakce a CSA thiakalix[4]arenu větší.

Rotační korelační čas kalix[4]arenu [21] je ve srovnání s thiakalix[4]arenem menší, jak je vidět z grafu 19. Znamená to, že se molekula kalixarenu celkově hýbe (anizotropně rotuje) rychleji a více. Tento fakt je jistě podpořen tím, že molekula kalixarenu je menší a lehčí (viz. obrázek 16 a tabulka 23).



Graf 19: porovnání rotačních korelačních časů molekul thiakalix[4] arenu (označeno -S-) a kalix[4] arenu (označeno $-CH_2$ -).



Obrázek 16: srovnání prostorové struktury kalix[4] arenu a thiakalix[4] arenu.

	O – O vzdálenost	O-H-O vazebný úhel	¹ H chemický posun
Thiakalix[4]aren	274,9 pm	152,1 °	9,6 ppm
Kalix[4]aren	264,7 pm	164,5 °	10 , 2 ppm

Tabulka 23: srovnání strukturních parametrů thiakalixarenu a kalixarenu.

Aktivační parametry kalix[4] arenu byly stanoveny následovně [21]:

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

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

Je vidět, že předexponenciální faktor je podle očekávání také kratší ve srovnání s thiakalixarenem, ale aktivační energie pohybu je vyšší. Otevřenou otázkou zůstává důvod. Je tento rozdíl způsoben vnitřním pohybem molekul či případnou komplexací nebo odlišnou interakcí kalix[4]arenu s rozpouštědlem, která způsobí zpomalení jeho pohybu?

Je třeba uvážit, že model isotropní rotační difúze, který byl pro chování molekuly v této diplomové práci aplikován, uvažuje jen jeden druh isotropního pohybu. Pokud by však v molekule docházelo k dalšímu nezávislému pohybu, použití tohoto modelu by ukázalo jen jakési střední hodnoty všech pohybů dohromady. O tom, jestli je v molekule nějaký vnitřní pohyb bychom se mohli přesvědčit měřením relaxací při různých hodnotách magnetických polích, tedy v odlišných přístrojích.

Pro kalix[4]aren byly určeny volné aktivační energie 44,8 – 47,7 kJ/mol pro překlopení pole vodíkových vazeb v teplotním rozsahu 221,2 – 303,7 K. Jsou o 2 – 4 kJ/mol vyšší než v thiakalix[4]arenu. Tento fakt může souviset s poněkud odlišnou geometrií – v kalix[4]arenu jsou vodíkové vazby asi o 10 pm kratší a vazebný úhel asi o 12° větší. V kalix[4]arenu jsou tedy vodíkové vazby silnější a na jejich rozbití je třeba větší energie než v thiakalix[4]arenu.

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

 $\Delta H = 36.8 \text{ kJ.mol}^{-1} (\pm 0.8 \text{ kJ.mol}^{-1}).$

Vidíme, že zatímco rozdíl entalpie je pro kalix[4]aren vůči thiakalix[4]arenu velmi podobný, rozdíl entropie překlopení směru vodíkových vazeb je u thiakalix[4]arenu podstatně nižší (-13,8 J.K⁻¹.mol⁻¹).

Do současné doby byla kooperativa vodíkových vazeb v thiakalixarenech zkoumána pouze pro fosfáty a thiofosfáty thiakalix[6]arenu [18]. Ve srovnání s touto prací je příspěvek kooperativity jednotlivých vodíkových vazeb v thiakalix[4]arenu vyšší o zhruba o 1 - 2 kJ/mol.

ZÁVĚR

Bylo prostudováno dynamické chování molekuly thiakalix[4]arenu v nepolárním rozpouštědle metodami spektroskopie NMR, zejména s využitím teplotně závislých měření spinové relaxace. Byly změřeny relaxační parametry jader ¹³C, 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 0,07 – 1,9 ns. Jeho teplotní závislost má arrheniovský tvar s aktivační energií 17,7 kJ.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 thiakalix[4]arenové molekuly. Měřením závislosti spektrální hustoty signálu C2, C6 na proměnném echo-času v pulzní sekvenci CPMG byly získány rychlostní konstanty této konformační výměny 727 – 470,5 x 10³ s⁻¹ v rozsahu teplot 223 – 313 K. Charakteristický korelační čas tohoto přechodu je 1 – 688 µs. Byly stanoveny aktivační parametry reakce – aktivační entalpie (38,9 kJ.mol⁻¹) a aktivační entropie (-13,8 J.mol⁻¹.K⁻¹).

Metodami NMR spektroskopie tak byly charakterizovány dva druhy molekulárního pohybu thiakalix[4]arenu.

Získané výsledky byly porovnány s příbuznými molekulárními systémy, zejména s molekulou kalix[4]arenu. Bylo zjištěno, že stabilita pole vodíkových vazeb v thiakalix[4]arenu je zhruba o 2-4 kJ/mol na jednu vazbu nižší.

LITERATURA

[1] Bloch, F.: "Nuclear Induction", Phys. Rev. 70, 460-474 (1946).

[2] Günter, H.: NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry, John Wiley and Sons, Chichester (1995).

[3] Levitt, Malcolm H.: "spin dynamics", John Wiley and Sons, Chichester (2001).

[4] Luz, Z.; Meiboom, S. J.: Chem. Phys. 1964, 39, 366.

[5] McQuarrie, D. A.; Simon, J. D.: Physical Chemistry: A Molecular Approach, University Science Books: Sausalito, CA (1997).

[6] Canet, D.: Nuclear Magnetic Resonance: Concepts and Methods, John Wiley and Sons, Chichester (1996).

[7] Sanders, J. K. M.; Hunter, K. B. Modern NMR spectroscopy, Oxford University Press: Oxford (1994).

[8] Eyring, H.; Henderson, D.; Jones S. B.; Eyring, E. M. Statistical mechanics and dynamics; John Willey and Sons: New York (1982).

[9] Hore, P. J. Nuclear Magnetic Resonance, Oxford University Press: Oxford (1995).

[10] Canet, D.; Levy, G. C.; Peat, I. R. J. Am. Chem. Soc. 1975, 18, 199-204.

[11] Kay, L. E.; Nicholson, L. K.; Delaglio, F.; Bax, A.; Torchia, D. A. J. Magn. Reson.1992, 97, 359.

[12] Lipari, G.; Szabo, A.: "Model–Free Approach to the Interpretation of Nuclear
 Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity", J.
 Am. Chem. Soc. 104, 4546-4559 (1982).

[13] Gutsche, C. D.: Calixarenes. Monographs in Supramolecular Chemistry. Stoddart, J.F. (ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1989).

[14] Brougham, D. F.; Caciuffo, R.; Horsewill, A. J.: Nature 1999, 397, 241-243.

[15] Horsewill, A. J.; Jones, N. H.; Caciuffo, R.: Science 2001, 291, 100-103.

[16] Horsewill, A. J.; Jones, N. H.; Caciuffo, R.: Science 2002, 298, 1171.

[17] Fernandez-Ramos, A.; Smedarchina, Z.; Pichierri, F.: Chem. Phys. Let. 2001, 343, 627-632.

[18] 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.

[19] Jeffrey, G. A.; Saenger, W.: Hydrogen Bonding in Biological Structures, Springer: Berlin (1991). [20] Stott, K.; Stonehouse, J.; Keeler, J.; Hwang, T.; Shaka, A. J. J.: Am. Chem. Soc. 1995, 117, 4199.

[21] Deckerová, Veronika: Bakalářská práce, Praha (2004).

[22] Shultes, M.; Eisenhauer, R.; Dechter, J. J.; Johansson, M.; Kumar, P.; Kowalewski,J.: Magn.Reson.Chem. 1999, 37, 799-804.

[23] Antony, J. H.; Dölle, A.; Fliege, T.; Geiger, A. J.: Phys. Chem. A 1997, 101, 4517-4522.

[24] Czernek, J.: nepublikované výsledky, 2004.

[25] Kowalewski, J.; Effemey, M.; Jokisaari, J. J.: Magn. Reson. 2002, 157, 171-177.

[26] Lang, J.; Tošner, Z.; Lhoták, P.; Kowalewski, J.: Magn. Reson. Chem. 2003, 41, 819-827.