



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**Iperpolarizzazione di risonanza magnetica nucleare
mediante paraidrogeno.**

**Trasferimento di polarizzazione nel[1-¹³C] piruvato
a bassi campi magnetici.**

Relatore: Prof. Gabriele Stevanato

Laureando: Pier Paolo Pravato

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE NMR.....	1
2. ORTHO-PARA IDROGENO	4
2.1 Iperpolarizzazione da paraidrogeno	8
2.2 Metodo SABRE.....	10
3. IPERPOLARIZZAZIONE [1- ¹³ C] PIRUVATO	12
3.1 MATERIALI E METODI.....	13
3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	15
CONCLUSIONI	23

Capitolo I

SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE NMR

La risonanza magnetica nucleare (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) è una tecnica spettroscopica non distruttiva e non invasiva ampiamente utilizzata per identificare la struttura molecolare e la composizione chimica di un campione.

L' NMR è stato sviluppato alla fine del 1940 da fisici con l'obiettivo di studiare le proprietà dei nuclei atomici. Successivamente nel 1951 i chimici intuirono che la spettroscopia NMR poteva anche essere utilizzata per determinare la struttura dei composti organici.

Questa tecnica ^[1] è descrivibile come l'assorbimento dell'energia (radiazione elettromagnetica) da parte di un nucleo che induce un'inversione dello spin quando la frequenza elettromagnetica della radiazione incidente è uguale alla frequenza di precessione (frequenza di Larmor). La spettroscopia NMR è basata sull'interazione tra un momento magnetico di spin nucleare e un campo magnetico. I nuclei di tutti gli atomi sono caratterizzati da un numero quantico di spin nucleare, I , che può essere maggiore o uguale a zero ed è sempre multiplo di $\frac{1}{2}$. I nuclei con $I = 0$ come ^{12}C o ^{16}O non possiedono spin nucleare e quindi non possono essere direttamente rilevati via NMR.

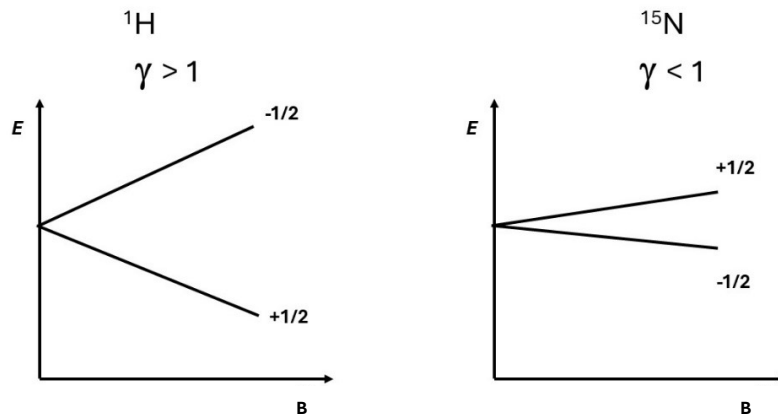
Mentre nuclei come ^{13}C , ^1H , ^{19}F ... possiedono un momento di spin nucleare e un corrispondente momento magnetico $\vec{\mu}$.

$$\vec{\mu} = \gamma \times \vec{I} \quad (1)$$

Quando questi nuclei vengono posti in un campo magnetico B_0 con direzione lungo l'asse z , i momenti magnetici nucleari si allineano al campo in un numero discreto $(2I+1)$ di orientazioni poiché gli stati energetici coinvolti sono quantizzati (*Zeeman splitting*). La differenza tra i livelli è

rappresentabile da una radiazione alle radiofrequenze(3kHz-300GHz). Ogni nucleo è caratterizzato da un preciso rapporto giromagnetico, γ , che è costante per un dato nucleo e può essere considerato come una misura di quanto "magnetico" è il nucleo. Se il rapporto giromagnetico è positivo il livello più basso di energia corrisponde allo stato di spin $+1/2$ e ad energia più alta si troverà lo stato di spin $-1/2$.

$$E_{m_I} = -\hbar\gamma B_0 m_I \quad (2)$$



La risonanza magnetica avviene quando il nucleo cambia la sua proiezione lungo z, M_z , assorbendo un quanto di energia. Questa energia viene applicata come radiazione elettromagnetica, la cui frequenza coincide con quella della precessione di Larmor:

$$\Delta E = E_{-1/2} - E_{+1/2} = \frac{1}{2} \hbar \gamma B_0 - \left(-\frac{1}{2} \hbar \gamma B_0 \right) = \hbar \gamma B_0 \quad (3)$$

$$E = h \nu_L = h \gamma B_0 / 2\pi \rightarrow \nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Infatti, solo energia fornita a tale frequenza, detta frequenza di risonanza, causa la transizione dallo stato di energia bassa ad alta dei nuclei atomici e viceversa. Dal punto di vista microscopico tutti gli spin iniziano il passaggio dal livello energetico basso a quello alto e la quantità di energia assorbita dal sistema è direttamente proporzionale al tempo d'applicazione della radiofrequenza. Se il tempo di applicazione della RF è tale da fornire sufficiente energia, tutti gli spin passeranno dal livello energetico basso a quello alto con effetto macroscopico che il vettore di magnetizzazione netta pur rimanendo parallelo all'asse Z cambierà verso, avendo compiuto una rotazione di 180° . Mediante un impulso di radiofrequenza coincidente con la frequenza di Larmor corrispondente al campo magnetico in esame e di opportuna ampiezza, il vettore di magnetizzazione può essere ruotato sul piano trasversale xy. Al termine dell'impulso, il vettore di magnetizzazione inizia a precessere attorno all'asse verticale alla frequenza di Larmor, inducendo una corrente oscillante nel circuito di ricezione del segnale. Questo produce un segnale oscillante che decade esponenzialmente nel tempo, noto come free induction decay (FID), a causa della perdita di coerenza dovuta

principalmente ai fenomeni di rilassamento del segnale stesso. L'oscillazione del segnale è legata alla differenza in frequenza fra la rotazione del campo magnetico B_1 e la frequenza di Larmor di precessione della Magnetizzazione ω_0 . La frequenza di oscillazione del segnale raccolto dal sistema di rivelazione può essere ottenuta attraverso la trasformata di Fourier.

La distribuzione sui livelli possibili è definita dalla statistica di Boltzmann:

$$\frac{N_b}{N_a} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (4)$$

se la differenza di energia tra i due livelli è molto piccola porta ad un popolamento dei livelli pressoché uguale. La sensibilità NMR è allora molto bassa: infatti se i nuclei nello stato α assorbono fotoni passando allo stato β , i nuclei nello stato β emettono fotoni per emissione stimolata e passano allo stato α . Approssimando $e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \cong 1 - \frac{\Delta E}{kT}$ e sostituendo ΔE con l'equazione 3 si ottiene:

$$\frac{N_a - N_b}{N_a} \cong \frac{\hbar\gamma B_0}{kT} \quad (5)$$

Questo significa che la sensibilità del segnale NMR può essere migliorata agendo sul campo magnetico che è direttamente proporzionale e sapendo che nuclei con rapporto giromagnetico maggiore portano maggiore sensibilità.

Questa introduzione ci permette di definire il campo di applicazione nel quale operiamo in particolare con un FT-NMR (NMR a trasformata di Fourier) applicato ai nuclei di ^{13}C . È possibile effettuare un confronto tra NMR ^1H e ^{13}C , in particolare la sensibilità del NMR ^{13}C è molto minore a causa della dell'abbondanza isotopica, infatti, il ^{13}C è solo 1.11% del C rispetto al $\sim 100\%$ di ^1H . Inoltre, il rapporto giromagnetico è circa $\frac{1}{4}$ rispetto a quello del protone. È necessario quindi andare ad operare sull'intensità del segnale.

L'iperpolarizzazione NMR è una tecnica che aumenta significativamente la popolazione degli stati di spin nucleare oltre i livelli raggiungibili con il campo magnetico standard (equilibrio di Boltzmann), migliorando così la sensibilità della spettroscopia NMR. In sostanza, si amplifica il segnale NMR rendendo più facile rilevare e studiare molecole in concentrazioni molto basse o in sistemi complessi.

Uno dei sistemi più usati per amplificare il segnale fu proposto da Bowers e Weitekamp ^[2] nel 1986. Attraverso degli esperimenti videro che il segnale NMR veniva amplificato grazie all'aggiunta di H_2 arricchito in forma para.

Capitolo 2

ORTHO-PARA IDROGENO

L'idrogeno è il primo elemento chimico della tavola periodica, ha come simbolo H e numero atomico $Z=1$. Allo stato elementare esiste sotto forma di molecola biatomica, H_2 , che a pressione atmosferica e a temperatura ambiente è un gas incolore, inodore, altamente infiammabile. La molecola di idrogeno presenta due isomeri definiti orto-idrogeno e para-idrogeno caratterizzati da spin nucleari dei due atomi, paralleli nel primo caso, antiparalleli nel secondo.

Heisenberg prende il premio Nobel nel 1932 anche grazie alla scoperta teorica del paraidrogeno che però verrà dimostrata sperimentalmente solo 40 anni dopo. Il paraidrogeno esiste perché si afferma che neutroni e protoni sono fermioni così come gli elettroni. Ovvero particelle con spin $\frac{1}{2}$ che rispondono alla stessa statistica di Fermi-Dirac. Affermando che i protoni sono fermioni significa che il momento di dipolo magnetico nucleare è $I = \frac{1}{2}$ e quindi implica che ho due stati $m_i = +\frac{1}{2}$, $-\frac{1}{2}$ ovvero spin up e spin down.

Considerando il principio di esclusione di Pauli che afferma: *“Scambiando le etichette di due fermioni identici, la funzione d'onda totale muta di segno; se lo stesso scambio di etichette riguarda due bosoni identici, il segno della funzione rimane lo stesso”* [3]. Quindi assumendo che protoni e neutroni sono fermioni significa che la funzione d'onda deve essere antisimmetrica anche verso lo scambio dei protoni. La funzione d'onda totale di una molecola H_2 può essere descritta attraverso questa funzione:

$$\Phi = \Psi^e \cdot \sigma^e \cdot \psi^n \cdot \sigma^n \cdot \psi_v^n$$

Ψ^e è la funzione d'onda elettronica orbitalica, σ^e spin elettronica, poi ψ^n , σ^n spin nucleare, ψ_v^n funzione d'onda vibrazionale, i due protoni interagiscono con un'interazione di Hooke, rappresentabile con la teoria dell'oscillatore armonico.

Si assume che la funzione d'onda totale Φ sia fattorizzata. Assumere che i protoni siano fermioni implica la presenza del paraidrogeno, è necessario che la funzione d'onda sia antisimmetrica sia rispetto allo scambio dei protoni sia allo scambio degli elettroni.

Analizzando le singole funzioni si osserva che la funzione d'onda elettronica orbitalica e di spin:

$$\Psi^e \cdot \sigma^e = \{k[\psi_a(1) \cdot \psi_b(2) + \psi_a(2) \cdot \psi_b(1)]\} \cdot \left\{\frac{1}{\sqrt{2}}[\alpha(1)\beta(2) - \beta(1)\alpha(2)]\right\}$$

deve necessariamente essere una combinazione lineare poiché non è possibile sapere quale elettrone appartiene al nucleo. La funzione è costruita seguendo il principio di esclusione di Pauli. È verificabile che nella prima parte invertendo le etichette degli elettroni la funzione rimane la stessa ciò significa che la funzione è simmetrica rispetto allo scambio degli elettroni, ma allo stesso tempo è simmetrica anche rispetto allo scambio dei protoni ovvero scambiare le etichette a e b al pedice. Per soddisfare il principio di esclusione di Pauli che afferma due fermioni non possono occupare simultaneamente lo stesso stato quantico, è necessario che la funzione di spin sia di singoletto e quindi antisimmetrica. Una funzione di singoletto è rappresentata da spin antiparalleli ovvero con momento angolare di spin complessivo nullo; in altri termini la funzione è antisimmetrica. Abbiamo considerato la funzione d'onda elettronica orbitalica come combinazione lineare con segno positivo della funzione d'onda di un elettrone su ciascuno dei due atomi H. Il segno positivo descrive un livello di energia minore e quindi rappresenta la funzione d'onda di legame, questo anche perché si ha un'interferenza costruttiva data da $\psi_a(1) \cdot \psi_b(2)$ e $\psi_a(2) \cdot \psi_b(1)$ che è rappresentabile come un aumento di densità elettronica nella regione internucleare. La combinazione lineare con segno negativo descrive quindi lo stato di non legame ed è rappresentata da una funzione antisimmetrica questo significa che la funzione di spin necessariamente deve essere simmetrica. Per il principio di esclusione di Pauli quindi ci saranno 3 stati di non legame e quindi la funzione di spin sarà di tripletto. Questo determina che in una collisione tra 2 atomi H la probabilità che avvenga la formazione di H₂ è di ¼.

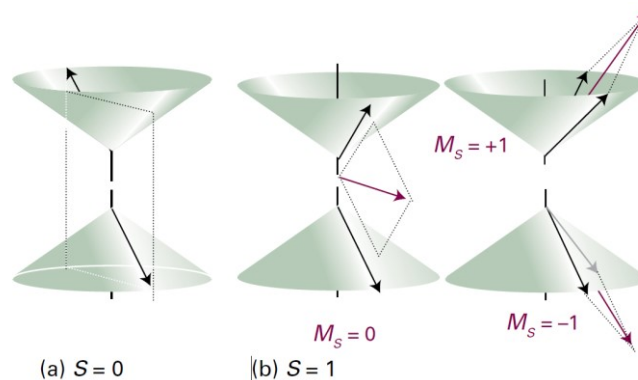


figura 1: (a) elettroni appaiati con momento angolare di spin risultate =0, stato di singoletto. (b) rappresentazione stato di tripletto momento angolare di spin totale =1. ^[3]

Proseguendo l'analisi si giunge a ciò che dimostra l'esistenza del paraidrogeno. Ragionando sulla funzione d'onda totale la parte orbitalica elettronica è simmetrica rispetto allo scambio dei nuclei così come quella di spin elettronico che è indipendente dai nuclei (infatti non sono presenti).

La parte rotazionale ψ^n è rappresentata dalle armoniche sferiche:

$$\psi^n = Y_{l, M_l}(\theta, \phi)$$

Queste possono essere sia simmetriche che antisimmetriche: se l è dispari la funzione sarà antisimmetrica se l è pari sarà simmetrica. Sapendo che parte vibrazionale è simmetrica perchè è indipendente dallo scambio dei nuclei, la funzione di spin nucleare può essere di tripletto o di singoletto quindi simmetrica o antisimmetrica. Quindi il fatto che la funzione totale debba essere antisimmetrica necessita del fatto che la parte rotazionale e la parte di spin nucleare siano una simmetrica e una antisimmetrica.

Se ψ^n è antisimmetrica ovvero l dispari necessariamente la funzione di spin σ^n è simmetrica e quindi di tripletto ovvero orto idrogeno. Mentre con l pari ψ^n è simmetrica e quella di spin è di singoletto (spin disaccoppiati $I=0$). Ciò dimostra l'esistenza del paraidrogeno.



Figura 2: o-idrogeno spin tripletto $I=1$

p-idrogeno spin singoletto $I=0$

Con lo stesso ragionamento effettuato per il legame della molecola H_2 , qui si può osservare come il rapporto tra orto e para idrogeno sia 3:1 ovvero 75% o- H_2 e 25% p- H_2 . Per poter ottenere para idrogeno bisogna avere l pari il che significa abbassare le energie rotazionali e arrivare a livello $l=0$ questo implica che abbassando la temperatura si popola il livello più basso e quindi abbassando la temperatura è possibile arricchire l'idrogeno nella sua forma para.

A temperatura ambiente avrò quindi l'energia necessaria per popolare sia il livello 0 ma anche il livello $l=1$, $E_l = l(l+1) \frac{h^2}{8\pi^2 I}$. È possibile dimostrare matematicamente il rapporto 3:1 di orto e para idrogeno grazie al fatto che ad ogni temperatura c'è un equilibrio termodinamico tra i due isomeri che rispondono alla statistica di Boltzmann.

$$\frac{N_l}{N_{tot}} = p_l \cdot e^{-\left(\frac{E_l}{kT}\right)} \text{ con } p_l \text{ la degenerazione}$$

$$\frac{[pH_2]}{[oH_2]} = \frac{\sum_{l=pari} N_l}{\sum_{l=dispari} N_l} = \frac{\sum_{l=pari} 1(2l+1)e^{-\left(\frac{E_l}{kT}\right)}}{\sum_{l=dispari} 3(2l+1)e^{-\left(\frac{E_l}{kT}\right)}}$$

A temperatura ambiente $kT \gg E_1$ e ciò porta alla dimostrazione matematica del rapporto $\frac{[pH_2]}{[oH_2]} = \frac{1}{3}$.

Mentre a temperature molto basse $kT \ll E_1$ e quindi $\frac{[pH_2]}{[oH_2]} = +\infty$. Ciò dimostra che l'arricchimento in paraidrogeno avviene a temperature prossime allo 0 K.

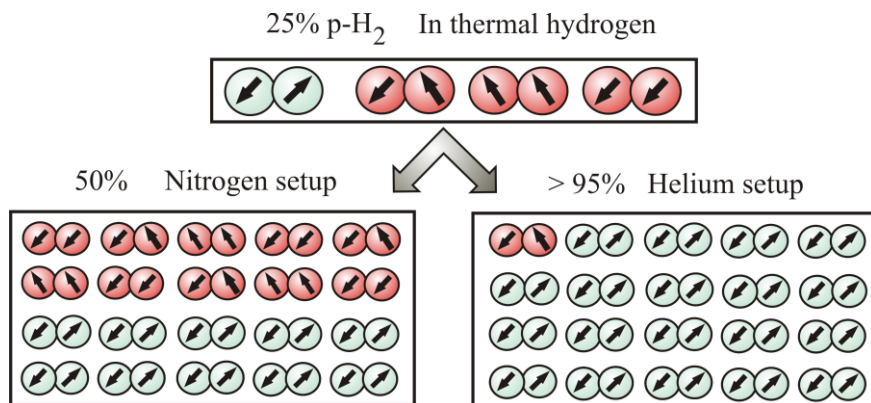


Figura 3: rappresentazione delle percentuali di paraidrogeno a T=298K, T=77K e T=4K

È possibile attraverso la distribuzione di Boltzmann descrivere tutto l'andamento della percentuale di paraidrogeno in funzione della temperatura.

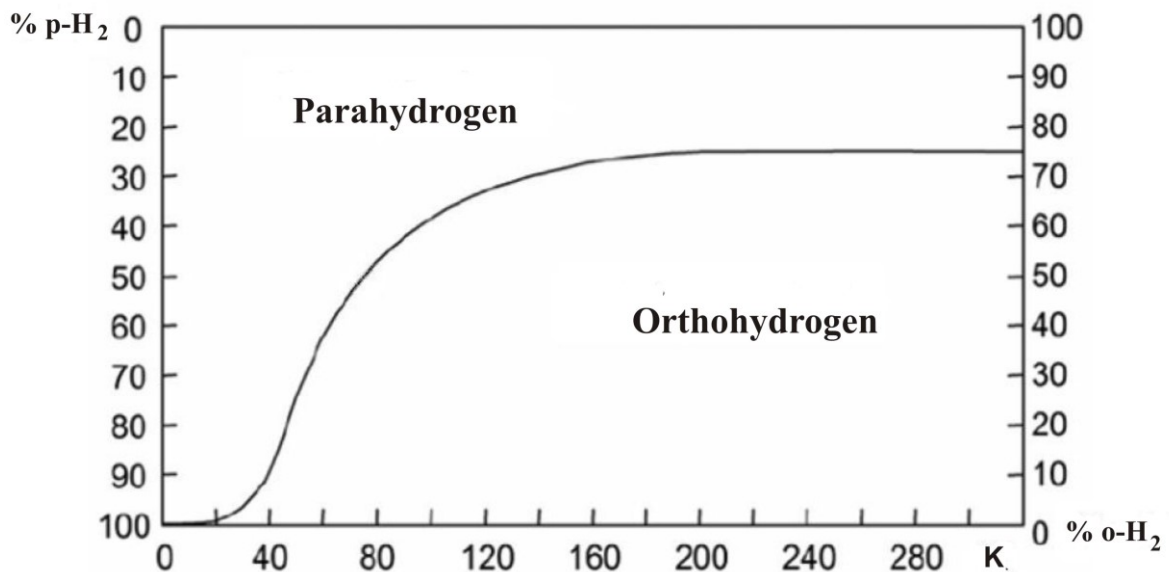


figura 4: andamento della percentuale di pH₂ in funzione della temperatura

Generalmente la conversione tra o-H₂ e p-H₂ non è spontanea e avviene molto lentamente. Durante questa reazione si ha una variazione nel momento angolare rotazionale che passa da $l=1$ a $l=0$ e dello stato di spin nucleare che da $I=1$ stato di tripletto forma uno stato di singoletto $I=0$. Questa transizione non conserva il momento angolare passando da $l=1$ a $l=0$ e quindi l'arricchimento in paraidrogeno è vietato dal punto di vista quanto-meccanico. Immergendo l'idrogeno in elio liquido a 4K ci vogliono settimane perché avvenga l'arricchimento in para, perché una volta inserito a 4K non è più all'equilibrio ma è fuori dall'equilibrio perché sta transendo. La transizione è una reazione esotermica^[4], il passaggio da $l=1$ a $l=0$ genera calore tanto da far evaporare l'elio liquido. Questo pone un problema anche per lo stoccaggio dell'idrogeno. Infatti, per stoccare l'idrogeno bisogna prima ottenere l'idrogeno in forma para e poi stoccarlo in questo modo non c'è più alcuna transizione esotermica. Al fine di rendere il processo più rapido è necessario quindi un catalizzatore senza il quale la reazione ha una costante cinetica pari a $k=0.019 \text{ h}^{-1}$. Siccome ciò che manca è il momento angolare è necessario un catalizzatore che fornisca spin ovvero sistemi paramagnetici elettronici o nucleari. Spesso si utilizzano metalli che sono paramagnetici e in questo modo la conversione viene accelerata portando a termine il processo in pochi secondi.

2.1 Iperpolarizzazione da paraidrogeno

Bowers e Weitekamp nel 1986 dimostrarono come il para-H₂ potesse aumentare la sensibilità del segnale NMR. Furono sviluppate molte modalità di amplificazione del segnale, il primo fu chiamato effetto PASADENA (“parahydrogen and synthesis allows dramatically enhanced nuclear alignment”). Questo meccanismo permette di trasferire la polarizzazione rotazionale ai livelli spin nucleari di un sistema. Con polarizzazione rotazionale si intende obbligare il sistema ad essere in uno stato rotazionale che non gli appartiene in quelle condizioni. Fluendo paraidrogeno in un tubo NMR, si trasferisce la polarizzazione rotazionale ai livelli spin nucleari della molecola da analizzare ciò amplifica il segnale dello strumento. La polarizzazione dei livelli spin nucleari è ciò che ci permette di visualizzare meglio e quindi amplificare il segnale NMR. L'intensità del segnale è direttamente proporzionale alla probabilità della transizione dallo stato iniziale allo stato finale per la differenza di popolamento; quindi, aumentando il ΔN (eq. 5) aumenta il segnale. Utilizzando il paraidrogeno che induce la polarizzazione e quindi un aumento di differenza di popolazione spin nucleare aumentiamo il segnale. Successivamente il metodo PASADENA è stato chiamato PHIP “*parahydrogen induced polarization*”.

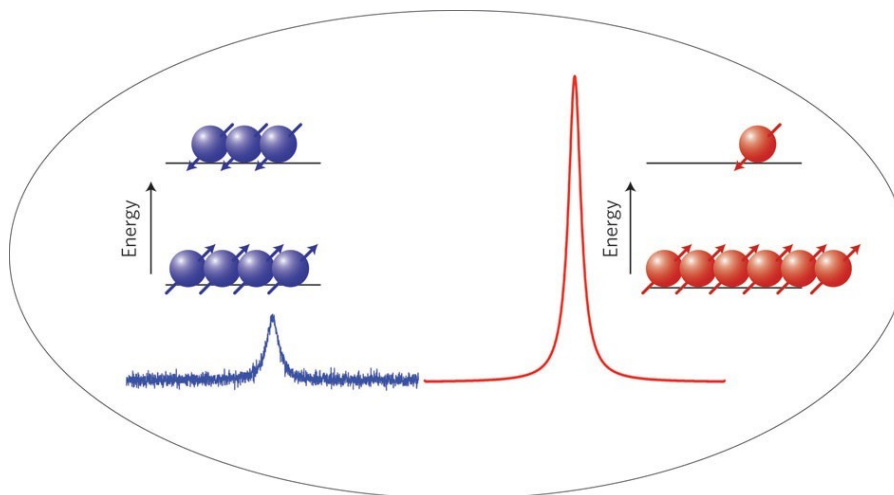


Figura 5: effetto differenza di popolazione

Il metodo PHIP è quindi utilizzato per iperpolarizzare nuclei attivi all’NMR come ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Il $p\text{-H}_2$ non possedendo momento magnetico non è visibile all’NMR e quindi tutto H_2 presente nel sistema è ortoidrogeno e abbassando la temperatura vedo la scomparsa della riga dell’orto idrogeno.

Riuscire a trasferire quindi la polarizzazione ad un eteronucleo come ^{13}C che ha un rapporto giromagnetico molto basso porta ad un notevole aumento della sensibilità dello strumento di oltre 20000 volte. Inoltre, ^{13}C presenta tempi di rilassamento spin-reticolo T_1 lunghi e possono essere utilizzati per prolungare la durata dell’iperpolarizzazione. La costante T_1 descrive la velocità di cessione dell’energia all’ambiente molecolare circostante da parte dei nuclei risonanti al termine dell’impulso. È uno scambio termodinamico che comporta una variazione di energia del sistema. La rapidità del ripristino è quindi funzione dell’efficienza degli scambi termodinamici spin-reticolo. Questo fenomeno è chiamato rilassamento longitudinale e descrive nel ritorno all’equilibrio le transizioni tra due stati di spin in modo tale da determinare le popolazioni all’equilibrio termodinamico. Solitamente l’andamento del rilassamento longitudinale è rappresentato da una curva esponenziale. Se la componente z della magnetizzazione all’istante t è $M_z(t)$ allora il ritorno all’equilibrio è:

$$M_z(t) - M_0 \propto e^{-\frac{t}{T_1}}$$

Il trasferimento di polarizzazione ad un eteronucleo deriva da un’idrogenazione ad un campo magnetico molto piccolo.

2.2 Metodo SABRE

Negli ultimi anni è stato sviluppato un ulteriore meccanismo di amplificazione del segnale con paraidrogeno chiamato “*signal amplification by reversible exchange*” (SABRE). SABRE genera un’iperpolarizzazione senza l’idrogenazione del substrato, ma forma un complesso insieme al catalizzatore che lega il substrato. Il metodo SABRE è descrivibile come un processo catalitico nel quale il centro metallico del catalizzatore attivato lega a sé il substrato e il p-H₂ nella forma di legante idruro; posto ad un campo magnetico ridotto (qualche μT) si ha un trasferimento spontaneo della polarizzazione al substrato. Questo metodo è stato individuato da S.B. Duckett nel 2009.

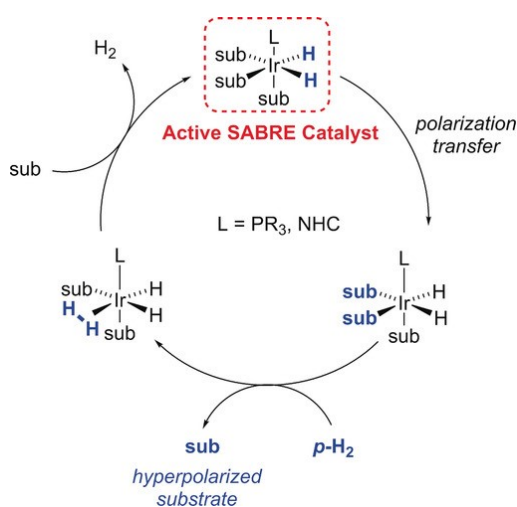


Figura 6: Schema generale del ciclo catalitico SABRE

L'idrogeno e il substrato polarizzato devono essere in grado di scambiarsi con il substrato libero e il nuovo p-H₂ dal complesso di trasferimento di polarizzazione. Questo richiede un complesso di stabilità adeguata.

Il trasferimento di polarizzazione si verifica a un campo magnetico dove due livelli energetici si incrocerebbero in assenza di accoppiamento spin-spin. In generale, la complessa dinamica di spin può essere descritta con il concetto di livelli anti-crossing (LACs), che può essere utilizzato per ottimizzare le prestazioni dei metodi di iperpolarizzazione. I LAC si verificano in campi magnetici dove due livelli energetici tendono ad avvicinarsi o a incrociarsi. Dal punto di vista computazionale l'analisi dei LAC viene effettuata diagonalizzando ^[6] l'Hamiltoniano del complesso SABRE. In particolare, per gli eteronuclei come ¹³C, ¹⁹F, ¹⁵N e altri il campo magnetico per ottenere un trasferimento ottimale è dell'ordine dei decimi di μT. Questo significa che si utilizza un campo magnetico minore di quello terrestre e necessariamente dobbiamo schermarci da questo con uno

schermo mu-metal e ridefinendo il processo SABRE come SABRE-SHEAT^[13] (*Signal Amplification by Reversible Exchange in SHield Enables Alignment Transfer to Heteronuclei*).

Il metodo SABRE è solitamente utilizzato per aumentare il segnale NMR di alcune molecole rilevanti dal punto di vista biologico. Non tutti i substrati sono compatibili con il metodo SABRE ma sono limitati a quei composti che si legano reversibilmente a catalizzatori organometallici a base di Iridio. Questo metodo è vantaggioso anche perché ci permette di rilevare anche basse concentrazioni di analita.

Tra le varie molecole di interesse biologico il [1-¹³C] Piruvato è stato quello studiato maggiormente poiché è all'intersezione di percorsi biologici importanti per il glucosio e l'omeostasi energetica e l'analisi del suo metabolismo fornisce informazioni cruciali riguardo a malattie come il cancro, l'insufficienza cardiaca e l'ictus. Poiché un aumento di conversione del piruvato in lattato determina una via per diagnosticare le anomalie cellulari.

Capitolo 3

IPERPOLARIZZAZIONE [1-¹³C] PIRUVATO

L'obiettivo della tesi è studiare l'andamento dell'iperpolarizzazione del [1-¹³C] Piruvato attraverso il metodo SABRE al variare di alcuni parametri sperimentali. Come anticipato precedentemente per il metodo SABRE è necessario l'uso di un catalizzatore a base di iridio in particolare è stato usato il [IrCl(COD)(IMes)] con IMes=1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)imidazol-2-ylidene e COD = cis,cis1,5-cicloottadiene. In particolare, questo è un pre-catalizzatore poiché la forma attiva che permette l'iperpolarizzazione deve essere prima attivata da un flusso di H₂; negli esperimenti è stato usato anche per la fase di attivazione il p-H₂. Questo catalizzatore deriva da una serie di ottimizzazioni e studi che hanno migliorato le proprietà legate al segnale iperpolarizzato. Se il processo di iperpolarizzazione SABRE è riuscito a divenire così efficace è dovuto anche al fatto che sono stati eseguiti molti numerosi studi su catalizzatori ^[7] dove sistematicamente venivano fatte variare alcune caratteristiche steriche ed elettroniche al fine di ottenere le migliori condizioni di iperpolarizzazione. Per esempio, alcune modifiche sono state effettuate nel cambio di posizione orto, meta o para di alcuni sostituenti nella parte arilica legata al sistema NHC. È stato osservato che aumentare l'ingombro sterico nel sito orto riduce il tempo di dissociazione del substrato, migliorando i livelli di polarizzazione^[7]. La stabilità del complesso catalitico è essenziale per mantenere un'alta efficienza di trasferimento di polarizzazione. Se il complesso si dissocia facilmente, la polarizzazione non sarà trasferita in maniera efficace. Modificando i ligandi del catalizzatore, è possibile adattare il metodo SABRE a diversi substrati. Ciò significa che, potenzialmente, molte altre molecole biologicamente rilevanti oltre al piruvato possono essere iperpolarizzate utilizzando questo metodo come molecole che si legano attraverso centri di ossigeno o azoto, ampliando così le potenziali applicazioni cliniche e di ricerca. Inoltre, per la stabilità del

complesso catalitico la temperatura gioca un ruolo cruciale. L'iperpolarizzazione ottimale del [1-¹³C] piruvato è stata ottenuta a temperature più basse rispetto a quelle utilizzate nei nostri esperimenti. Infatti, la fase di iperpolarizzazione avveniva in un bagno ad acqua ghiaccio con temperatura indicativa di 2-5°C. È stato ipotizzato che l'utilizzo di un co-ligando insieme a un catalizzatore di iridio e piruvato di sodio potrebbe portare alla formazione di un catalizzatore SABRE adatto. I co-ligandi erano stati precedentemente ampiamente utilizzati per migliorare i risultati di polarizzazione. I requisiti che devono soddisfare per essere utilizzati nel metodo SABRE è che non siano in grado di competere completamente con il legame del piruvato al centro metallico, fornendo contemporaneamente una stabilizzazione elettronica adeguata del catalizzatore. Si è scoperto che il co-ligando dimetilsolfossido (DMSO) soddisfa questo ruolo e fornisce uno spettro NMR altamente migliorato del piruvato.

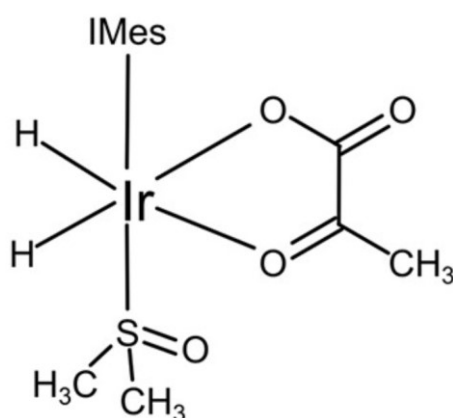


Figura 7: catalizzatore nella forma attivata utilizzato nell'esperimento, legato al piruvato

3.1 MATERIALI E METODI

La strumentazione utilizzata negli esperimenti di iperpolarizzazione era costituita da un generatore di idrogeno che sfrutta l'elettrolisi dell'acqua per appunto generare H₂ ad una pressione di 7 bar. La miscela di idrogeno prodotta contiene 75% o-H₂ e 25% p-H₂. Successivamente il flusso di gas attraverso un sistema di tubi viene portato alla temperatura dell'azoto liquido (77K) dove in presenza di ossidi di ferro che fungono da catalizzatori, come descritto nel capitolo 2, viene arricchito in p-H₂; ottenendo quindi una miscela al 50% o-H₂ e 50% p-H₂ come previsto dal grafico 4.

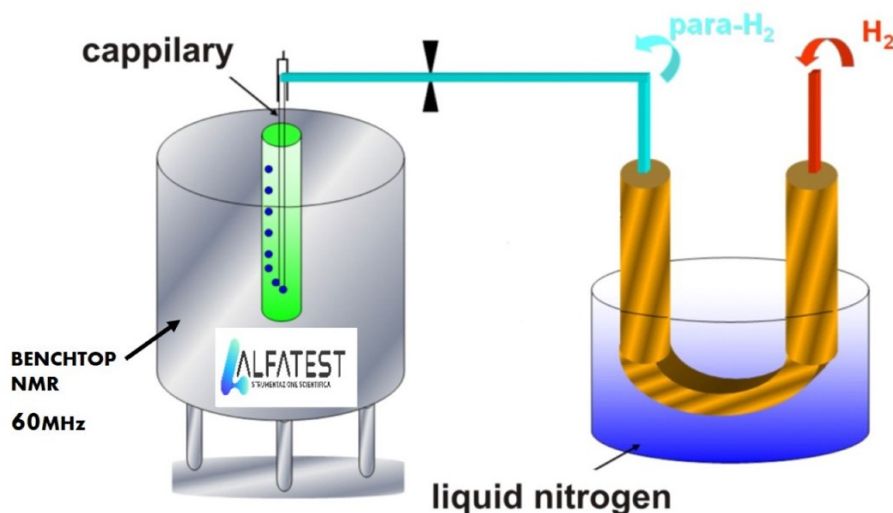


Figura 8: schema strumentazione utilizzata in laboratorio

Il p-H₂ così generato viene utilizzato come attivatore del catalizzatore contenuto in un tubo NMR con un bubbling di circa 10 minuti. La soluzione contenente il catalizzatore [IrCl(COD)(IMes)] è costituita da 27mg di catalizzatore sciolti in 350μL di metanolo deuterato (CD₃OD) con 1.24μL di DMSO. Successivamente ai 10 minuti di attivazione della soluzione contenente il catalizzatore viene introdotta la soluzione contenente il [1-¹³C] piruvato. La soluzione contenente il piruvato è costituita da 24mg di piruvato e 350μL di CD₃OD. Quindi sono state ottenute 2 soluzioni contenute in provette Eppendorf una con concentrazione di 12mM di catalizzatore e 36mM di DMSO e l'altra 60 mM in [1-¹³C] piruvato. A questo punto abbiamo tutti i componenti necessari per l'amplificazione del segnale mediante il metodo SABRE.

È necessario descrivere la strumentazione utilizzata per questi tipi di esperimenti. In figura 8 è presente uno schema che li descrive. In particolare, lo spettrometro da banco utilizzato è X-pulse della Oxford Instruments a 60MHz con un campo magnetico permanente a 1.4T, a differenza degli altri spettrometri NMR funziona in assenza di liquidi criogenici e ha una temperatura di utilizzo di 40°C. Questo strumento utilizza un magnete permanente da 60 MHz (1,4 T) e sfrutta una nuova tecnologia di shimming che consente di generare un campo estremamente omogeneo. Tutti gli spettri NMR sono stati analizzati con il Software MestReNova versione 15.0.1.

Affinché grazie al p-H₂ avvenga l'iperpolarizzazione ovvero che questo possa trasferire la polarizzazione rotazionale ai livelli spin nucleari, è necessario svolgere l'esperimento schermati dal campo magnetico terrestre attraverso un μ metal shield e generare all'interno di questa zona di schermatura un campo magnetico dell'ordine dei μT. Il campo magnetico al quale sono stati svolti gli esperimenti è stato generato da un solenoide con una resistenza interna di circa 1 Ω con in serie una resistenza aggiuntiva di 10 kΩ al quale è stato applicato un potenziale di 1.5V.

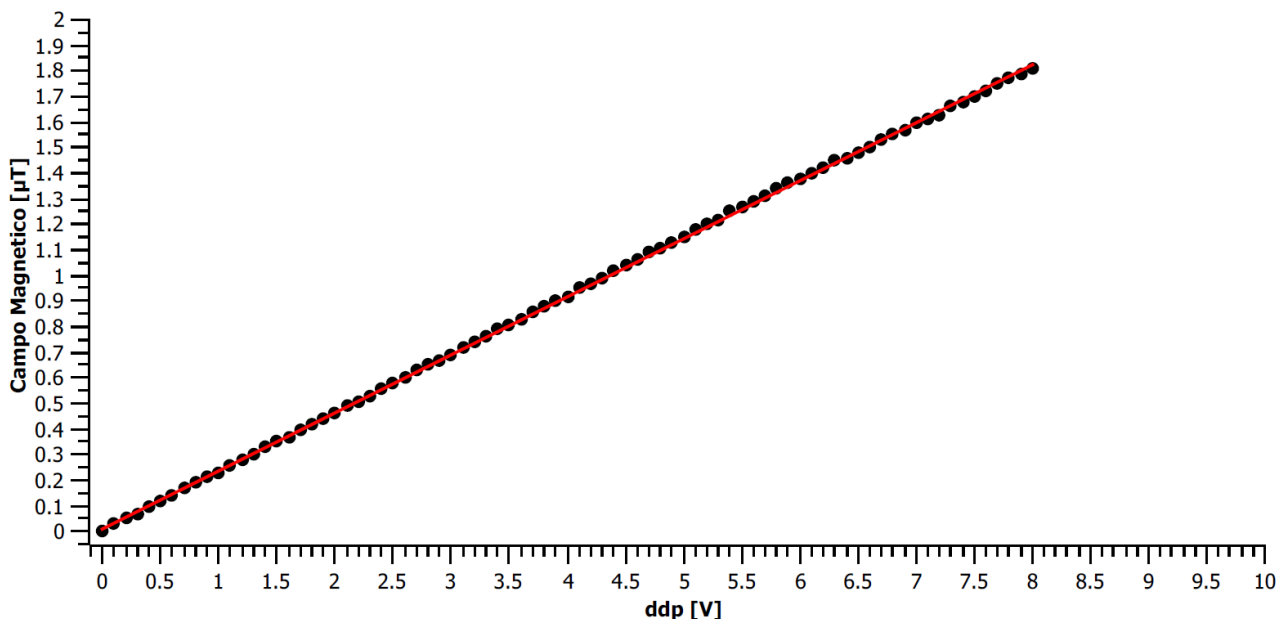


Figura 9: andamento del campo magnetico all'interno del μ metal shield; $B [\mu T] = 0.227V + 0.012$

Il grafico presente in figura 9 è stato determinato misurando il campo magnetico generato all'interno del μ metal shield variando il potenziale. Successivamente dopo aver preparato il primo campione sono stati effettuati ripetuti esperimenti di iperpolarizzazione applicando ogni volta un potenziale diverso e quindi facendo avvenire il bubbling di p-H₂ per 25s a campi magnetici diversi. Durante la fase di bubbling di p-H₂ il tubo NMR si trovava all'interno del μ metal shield dove veniva applicato un campo magnetico e in un bagno di acqua e ghiaccio ad una temperatura di circa 2-5°C.

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Analizzando i vari spettri NMR registrati e plottando le aree dei picchi in relazione con il campo magnetico generato è possibile vedere che abbiamo un massimo a $B=0.35\mu T$ che corrisponde ad un potenziale di 1.5V. Questo dato corrisponde ai dati presenti in letteratura che riportano il segnale massimo registrato tra 0.3 e 0.4 μT .

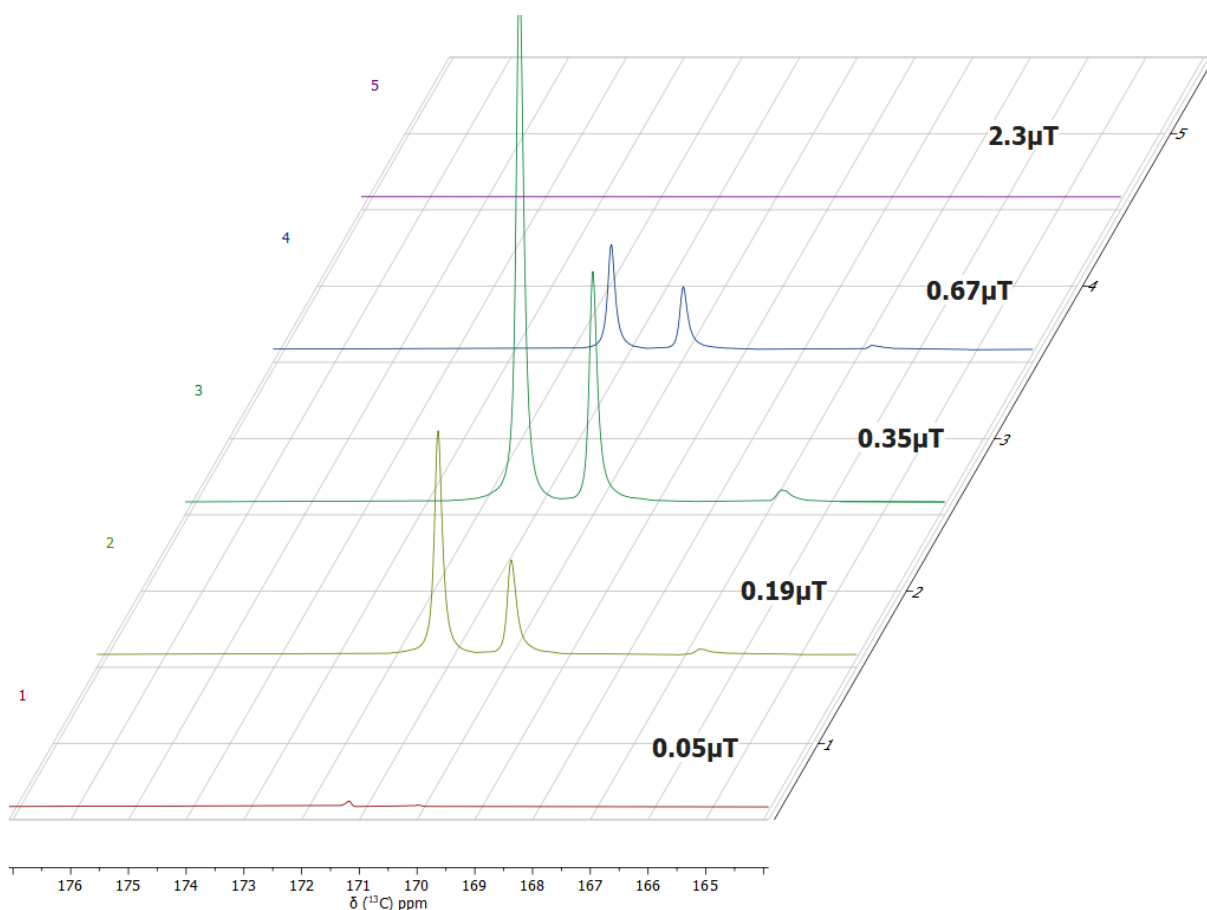


Figura 10: Spettri ^{13}C NMR: catalizzatore= 3.1 mg e 1.24 μL di DMSO in 350 μL di MeOD, [^{13}C] piruvato= 2.6 mg in 350 μL di MeOD, a diversi campi magnetici indicati in figura

Gli spettri come è possibile vedere in figura 10 presentano 3 picchi questi sono relativi a 3 forme del complesso iperpolarizzato ^{[8][9]}. Gli spettri NMR di ^{13}C riportati sono relativi ad 1 sola scansione quindi ad una misura di soli 3 secondi. È possibile notare come il primo spettro registrato senza polarizzazione è effettivamente non leggibile i possibili picchi sono pari al rumore dello strumento. Osservando la figura 10, il primo spettro in basso è stato acquisito effettuando la polarizzazione ad un campo magnetico di 0.05 μT ovvero applicando una differenza di potenziale di 0.2V; i picchi sono poco visibili rispetto allo spettro 3 dove siamo al massimo segnale che siamo riusciti ad ottenere. Il campo magnetico applicato è 0.35 μT al quale corrisponde una differenza di potenziale di 1.5V. Superati i 0.35 μT si ha una diminuzione del segnale come è possibile notare fino ad arrivare al segnale generato a 2.3 μT che è paragonabile al rumore dello strumento.

Nella figura 11 è possibile osservare gli andamenti degli integrali delle aree normalizzate in funzione del campo magnetico applicato. In particolare, ad ogni picco è possibile far corrispondere una precisa struttura chimica come evidenziato in figura 12.

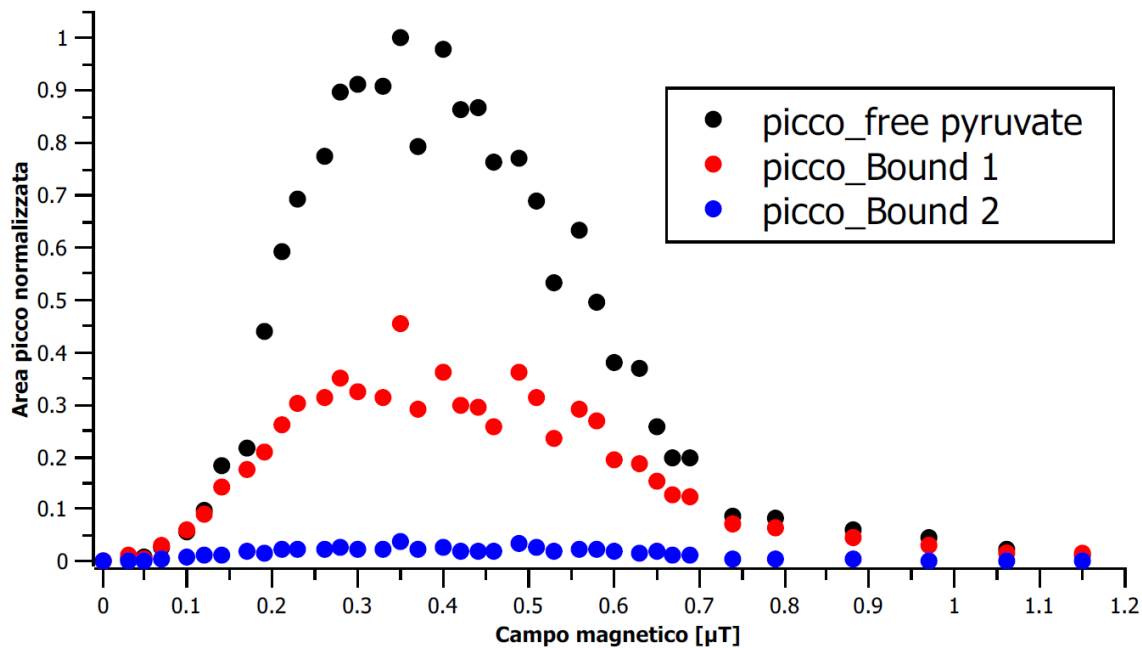


Figura 11: Andamento degli integrali delle aree dei picchi (free pyruvate, bound 1 e bound 2) normalizzate al picco di intensità massima del free pyruvate a 0.35 μT

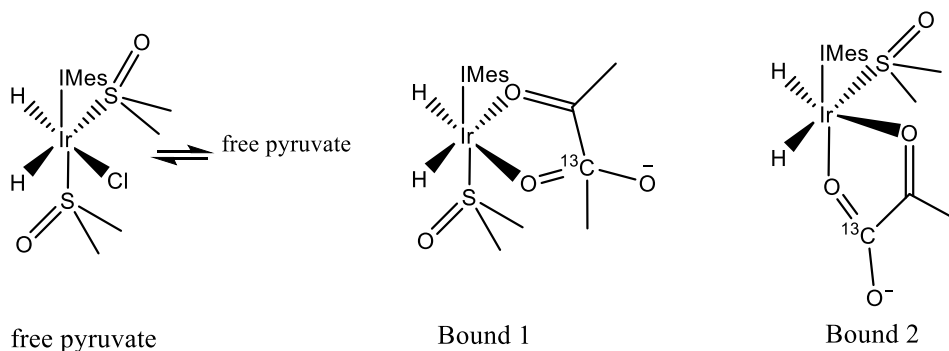


Figura 12: strutture chimiche relative ai picchi presenti nello spettro NMR

Il picco più intenso è quello legato al piruvato in forma libera.

Effettuando un confronto con lo spettro termico è possibile calcolare di quanto è stato amplificato il segnale:

$$\varepsilon \propto \frac{S_{\text{Hyperpolarised}}}{S_{\text{Thermal}}}$$

Definendo ε – fattore di amplificazione, S_{thermal} – integrale dell'area del picco legata allo spettro termico, $S_{\text{hyperpolarised}}$ – integrale dell'area del picco legata allo spettro iperpolarizzato. Lo spettro thermal acquisisce 512 scansione della soluzione non iperpolarizzata, mentre lo spettro iperpolarizzato con 1 sola scansione in meno di 3 secondi restituisce uno spettro definito.

Per calcolare P ovvero la polarizzazione si sfrutta il fatto che per i nuclei che hanno un numero quantico di spin $I = 1/2$, la differenza nella popolazione di spin dipende solo dalle popolazioni di

spin N_α e N_β dei due stati di spin $m = +1/2$ (α) e $m = -1/2$ (β). Questo ci permette di calcolare la polarizzazione come:

$$P = \frac{N_\alpha - N_\beta}{N_\alpha + N_\beta}$$

Sapendo che la popolazione di spin segue la legge di distribuzione di Boltzmann :

$$P = \frac{e^{-\frac{E_\alpha}{k_B T}} - e^{-\frac{E_\beta}{k_B T}}}{e^{-\frac{E_\alpha}{k_B T}} + e^{-\frac{E_\beta}{k_B T}}} = \frac{1 - e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}}}{1 + e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}}}$$

e poiché la tangente iperbolica è definita come:

$$\tanh(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}} = \frac{1 - e^{-2x}}{1 + e^{-2x}}$$

Otteniamo infine sfruttando anche l'equazione 3 :

$$P = \tanh\left(\frac{\Delta E}{2k_B T}\right) = \tanh\left(\frac{\gamma B_0 \hbar}{2k_B T}\right)$$

Una volta stabilito il campo magnetico in cui il fattore di amplificazione del segnale è massimo è stata valutata se la presenza di acqua o D_2O potesse andare ad interferire in maniera positiva o negativa l'intensità del segnale iperpolarizzato. In particolare, sono state preparate le medesime soluzioni presentate nella sezione materiali e metodi ma in questo caso è stata aggiunta H_2O o D_2O alla soluzione di piruvato ottenendo le seguenti concentrazioni nella soluzione totale analizzata: 0.5M ,1.0M ,1.5M ,2.0M.

Concentrazione H2O	m Catalizzatore	m piruvato	V H2O	Concentrazione D2O	m Catalizzatore	m piruvato	V D2O
0.5 M	2.7 mg	2.6 mg	6 μ L	0.5 M	2.8 mg	2.6 mg	6 μ L
1.0M	2.8mg	2.7 mg	12 μ L	1.0M	2.6mg	2.5 mg	12 μ L
1.5M	2.8 mg	2.5 mg	18 μ L	1.5M	2.6 mg	2.4 mg	18 μ L
2.0M	2.9 mg	2.9 mg	24 μ L	2.0M	2.8 mg	2.6 mg	24 μ L

Tabella 1: Composizione soluzione analizzate con diverse concentrazioni di H2O o D2O

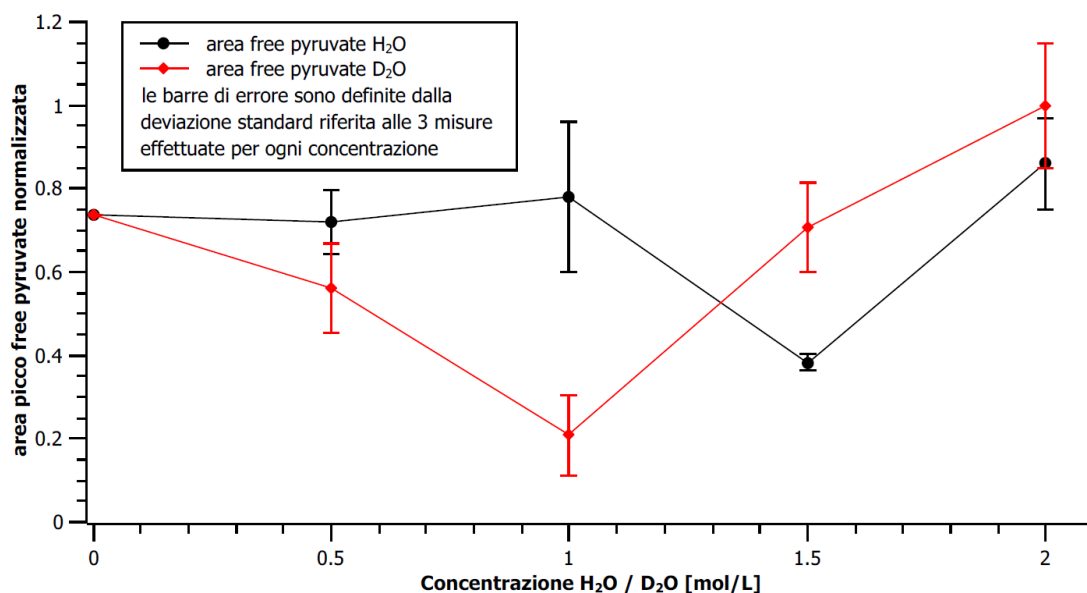


Figura 12: influenza dell'H₂O e D₂O negli spettri iperpolarizzati. Per ogni concentrazione sono state effettuate 3 misurazioni

Ciò che si osserva dall'analisi degli spettri alle varie concentrazioni di H₂O e D₂O è che si ha un massimo nell'amplificazione del segnale a 2M. Questi risultati sono stati ottenuti con solo 3 repliche, inoltre, le soluzioni analizzate presentano delle differenze anche se minime di concentrazione anche di catalizzatore e piruvato quindi la possibilità di errori sperimentali è maggiore. In letteratura, infatti, viene riportato un andamento che pone il massimo di amplificazione a 0.5M in H₂O^[8].

Il fatto che l'H₂O o D₂O influiscono sull'amplificazione del segnale può essere dovuto al fatto che possono facilitare lo scambio tra il p-H₂ e il substrato sul catalizzatore, migliorando l'efficienza del trasferimento di polarizzazione. Inoltre, la loro presenza può aiutare a mantenere una buona solubilità dei reagenti e del catalizzatore, garantendo che siano disponibili per il processo di scambio.

Ci si aspettava un andamento simile per H₂O e D₂O; una possibile motivazione di questo diverso andamento in particolare per le concentrazioni di 0.5 e 1 M può essere riferito al fatto che è stata utilizzata acqua deionizzata e non Milli-q a differenza delle concentrazioni di 1.5 e 2 M, quindi una maggiore seppur limitata quantità di ioni può aver influito sul segnale amplificato.

Il passaggio successivo è stato verificare un'altra condizione sperimentale che fino ad ora era rimasta costante ovvero la quantità di p-H₂.

Ogni esperimento utilizzava un bubbling di 25 secondi. In particolare, sono stati registrati gli spettri NMR della soluzione 1.5M in H₂O dopo un bubbling di p-H₂ di 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 secondi per osservare come la quantità di p-H₂ influenzi il segnale iperpolarizzato.

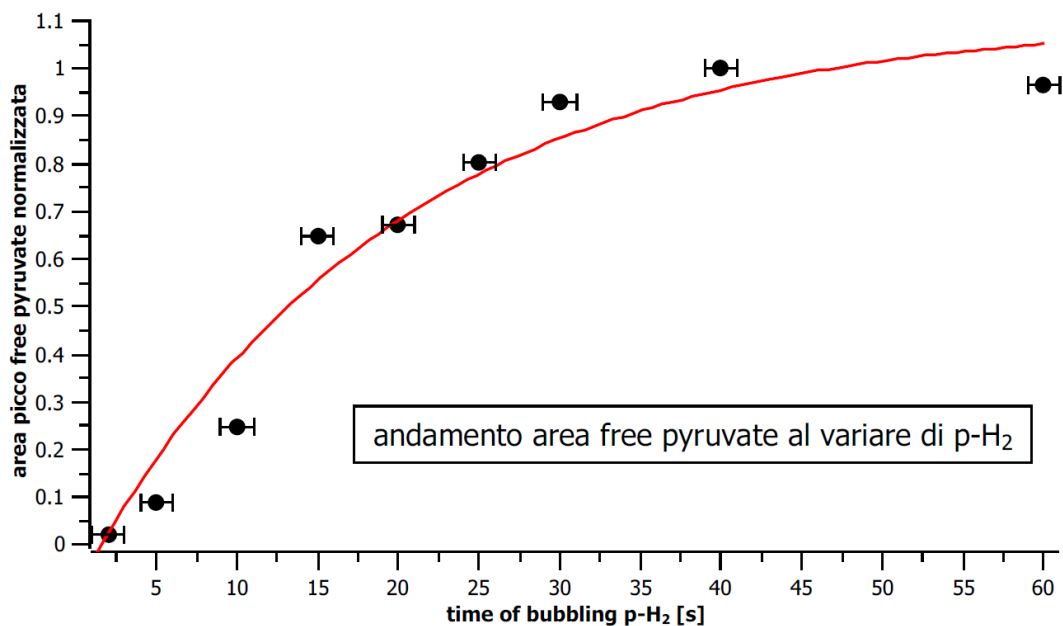


Figura 13: effetto della durata del bubbling di p-H₂

L'aumento del tempo di bubbling di p-H₂ porta ad un aumento del segnale fino a 40 secondi poi inizia una possibile fase di diminuzione del segnale dovuto al tempo di rilassamento T₁ del ¹³C che porta ad una diminuzione del segnale. È stato inserito nel grafico una barra di errore di 1 secondo relativa al possibile errore nella misurazione effettiva del tempo di bubbling. Da considerare anche il fatto che ogni misura è stata ripetuta solamente 1 volta.

È probabile che questo comportamento che abbiamo ottenuto visibile in figura 13 sia causato anche dalla dinamica delle bolle di gas nel tubo NMR generate dal bubbling a tempi prolungati che comporta una miscelazione inefficiente del gas para-H₂ e il suo trasferimento nella fase liquida. Tutti i nostri esperimenti precedenti sono stati effettuati con 25s di bubbling ottenendo quindi un segnale pari a circa 80% del segnale massimo che si può ottenere. È stato scelto 25s come bilanciamento tra il tempo di bubbling e una buona risoluzione dello spettro. L'andamento ottenuto è confermato anche in letteratura [8-13]

Negli esperimenti in cui abbiamo utilizzato impulsi a 20° che ruotano il vettore di magnetizzazione in senso orario di 20° attorno all'asse abbiamo potuto verificare il tempo di rilassamento longitudinale del ^{13}C (T_1).

Oltre ai 3 picchi legati al free pyruvate, Bound 1 e Bound 2 è presente un quarto picco che si posiziona a circa 177ppm. Questo picco nel corso dell'esperimento aumenta di intensità e poi decresce.

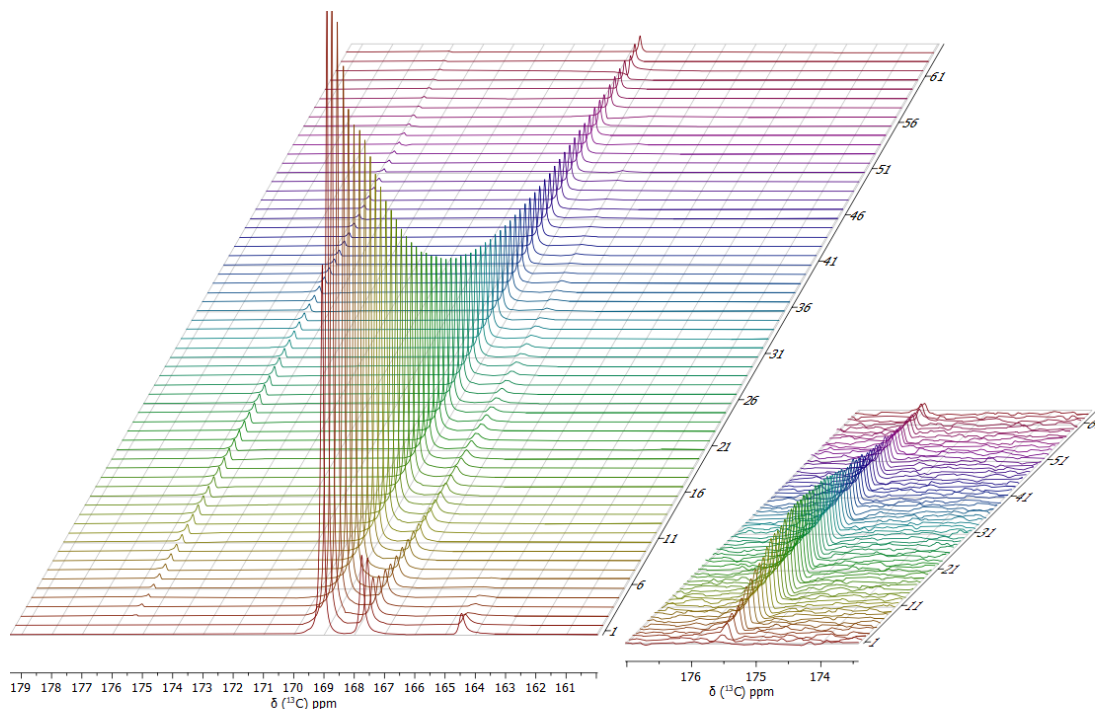


Figura 14: esperimento NMR con impulso a 20° , ogni spettro acquisito in 3 secondi con 2 secondi di tempo di rilassamento, focus a destra sull'andamento del segnale del suo dimero

Come accennato precedentemente si può notare un quarto picco che in base a ricerche condotte sulle reazioni del piruvato è possibile attribuire tentativamente al suo dimero (figura 14). Sarebbero necessarie ulteriori investigazioni per determinarne la certezza.

Il piruvato può dimerizzare attraverso un meccanismo di condensazione aldolica, che coinvolge due molecole di piruvato che reagiscono per formare il diidrossiacetato, coadiuvate dalla presenza di acqua. Dalla letteratura sappiamo che il dimero è stabile in ambiente basico, ma in base alle condizioni sperimentali utilizzate legate per esempio alla quantità di piruvato utilizzata è possibile ottenere il dimero all'interno della nostra soluzione. ^[11-12]

Visualizzando meglio il grafico ottenuto su MestReNova, plottando le aree dei picchi in funzione del tempo a cui sono stati acquisiti gli spettri otteniamo un andamento a campana che dimostra la formazione e la successiva scomparsa del dimero.

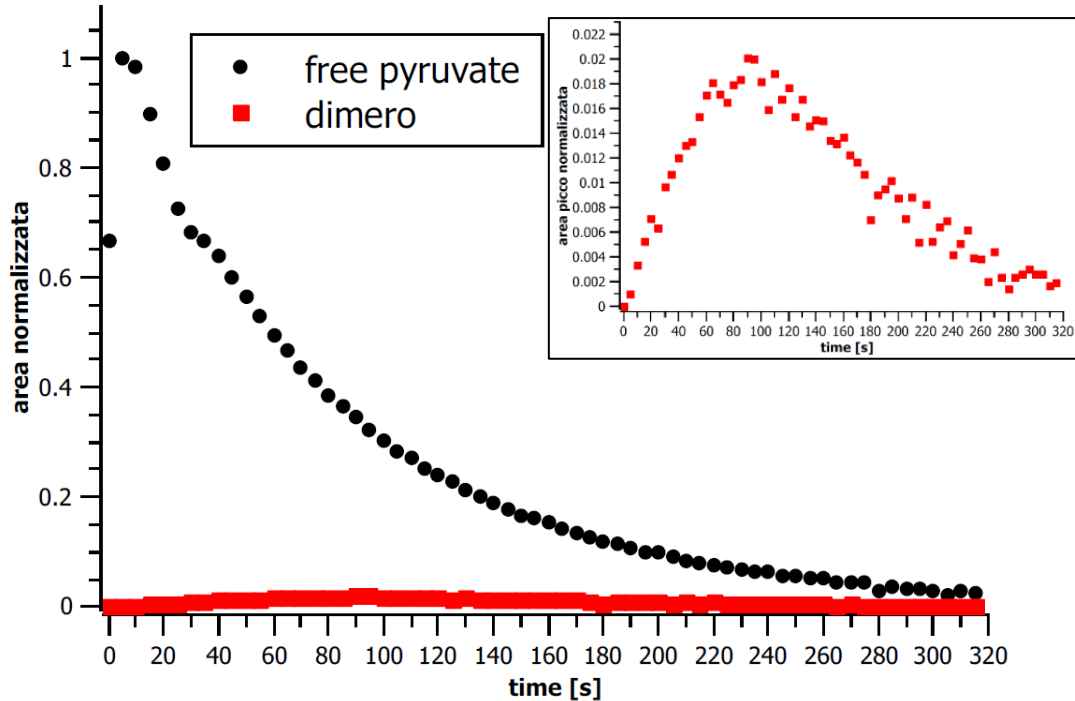


Figura 15: andamento del segnale del free pyruvate e del dimero su esperimenti t1, con impulso di 20°

Il segnale legato al dimero nel suo picco è pari al 2% del segnale del free pyruvate nei primi secondi dell'esperimento. Pur essendo una minima quantità riusciamo a valutarne la sua generazione e scomparsa in tempo reale nel corso delle varie acquisizioni degli spettri NMR.

CONCLUSIONI

Attraverso questo elaborato è stato possibile testare l'efficacia del metodo di iperpolarizzazione SABRE attraverso l'NMR, attuando alcune variazioni sulle condizioni sperimentali come il campo magnetico, la presenza di H₂O o D₂O, e il tempo di bubbling. Dopo aver evidenziato le tematiche riguardanti la produzione di p-H₂ da un punto di vista quantistico, è stato possibile affrontare l'iperpolarizzazione e i principali metodi utilizzati in ambito chimico-fisico. È stato possibile ottenere uno spettro NMR chiaro e leggibile riferito al ¹³C del [1-¹³C] piruvato in soli 2 secondi, con un fattore di amplificazione di circa $\epsilon=12800$ rispetto ad uno spettro thermal costituito da 512 scansioni in svariate ore. L'iperpolarizzazione del piruvato è stata condotta quindi ad un campo magnetico di 0.35 μ T con un bubbling di 25secondi. È stato possibile notare come H₂O e D₂O influenzino il segnale. Infine, nel corso degli esperimenti è stato possibile notare la presenza di una specie attribuita al dimero del piruvato che si forma nel corso degli esperimenti sul T1.

Il metodo SABRE per la sua semplicità e basso costo rispetto ad altri metodi di iperpolarizzazione è un'ottima frontiera per aiutare la diagnosi clinica di alcune malattie monitorando il metabolismo del piruvato.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Domenici V. ; Veracini C.A. , Risonanza Magnetica Nucleare: passato, presente e futuro di una tecnica spettroscopica che ha cambiato la chimica e non solo, Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli studi di Pisa
- [2] Bowers C. ; Weitekamp D. , Physical Review Letters, 1986, 57,2645–2648.
- [3] Atkins P. , De Paula J. , Keeler J. , Chimica Fisica, 6^a edizione , 2020
- [4] Riaz A. ; Qyyum M. A. ; Hussain A. ; Lee M. , Significance of ortho-para hydrogen conversion in the performance of hydrogen liquefaction process, International Journal of Hydrogen Energy, 2023
- [5] Turro N. J. ; Ruzzi M. ; Martì A.A ; Chen J. Y. C. ; Jockusch S. ; Lawler R.G. ; Sartori E. ; Chuang S. C. ; Komatsu K. ; Murata Y. , Demonstration of a Chemical Transformation Inside a Fullerene. The Reversible Conversion of the Allotropes of H₂@C₆₀ , J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 32, 10506–10507
- [6] Ivanov K. L. ; Pravdivtsev A. N. ; Yurkovskaya A. V. ; Vieth H. ; Kaptein R. , The role of level anti-crossings in nuclear spin hyperpolarization, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Volume 81, (2014)
- [7] Rayner, P.J., Norcott, P., Appleby, K.M. et al. Fine-tuning the efficiency of para-hydrogen-induced hyperpolarization by rational N-heterocyclic carbene design. Nat Commun 9, 4251 (2018)
- [8] Adelabu, I.; TomHon, P.; Kabir, M.S.H.; Nantogma, S.; Abdulmojeed, M.; Mandzhieva, I.; Etedgui, J.; Swenson, R.E.; Krishna, M.C.; Theis, T.; et al. Order-Unity ¹³C Nuclear Polarization of [1-¹³C]Pyruvate in Seconds and the Interplay of Water and SABRE Enhancement. ChemPhysChem 2022, 23.
- [9] Iali W. ; Roy S. S. ; Tickner B. J. ; Ahwal F. ; Kennerley A. J. ; and S. B. Duckett, Hyperpolarising pyruvate through signal amplification by reversible exchange (SABRE), Angew. Chem. Int. Ed. 58, 10271 (2019).
- [10] Khan M., HYPERPOLARIZATION USING PARAHYDROGEN, PhD thesis, 2013
- [11] C. Asmus, O. Mozziconacci, C. Schoineich, Low-Temperature NMR Characterization of Reaction of Sodium Pyruvate with Hydrogen Peroxide, *The Journal of Physical Chemistry A* 2015 119 (6), 966-977
- [12] S. A. Margolis and Bruce. Coxon, Identification and quantitation of the impurities in sodium pyruvate, Analytical Chemistry 1986 58 (12), 2504-2510
- [13] A. N. Pravdivtsev, K. Buckenmaier, N. Kempf, G. Stevanato, K. Scheffler, J. Engelmann, M. Plaumann, R. Koerber, J. Hövener, and T. Theis, LIGHT-SABRE Hyperpolarizes 1-¹³C-Pyruvate Continuously without Magnetic Field Cycling, *The Journal of Physical Chemistry C* 2023 127 (14), 6744-6753