



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2023 00144

(22) Data de depozit: 29/03/2023

(41) Data publicării cererii:
29/12/2023 BOPI nr. 12/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI"(IFIN-HH), STR.REACTORULUI,
NR.30, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• VASOS PAUL ROMEO,
STR.GRIGORE ALEXANDRESCU NR.5,
PLOIEȘTI, PH, RO;
• VODĂ MIHAI ADRIAN,
STR.1 DECEMBRIE, NR.161, VILA 15,
TUNARI, IF, RO;
• TOPOR ALEXANDRU, STR.MĂRĂȘTI,
NR.2, FOCȘANI, VN, RO

(54) METODĂ DE DETERMINARE CANTITATIVĂ A RADICALILOR
DINTR-O PROBĂ LICHIDĂ FOLOSIND RELAXOMETRIE DE
REZONANȚĂ MAGNETICĂ NUCLEARĂ ÎN CÂMP MAGNETIC
TERESTRU

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare cantitativă a compușilor paramagnetici generați în apă prin iradiere sau reacții chimice folosind relaxometrie de rezonanță magnetică nucleară în câmp magnetic terestru. Metoda conform invenției constă în:

-prepararea unor probe standard cu concentrații cunoscute de specie paramagnetică în apă distilată și a unei referințe de apă distilată,

- înregistrarea unui semnal RMN în câmp terestru folosind secvențe de puls de tipul cu recuperare de magnetizare pentru determinarea timpului de relaxare longitudinală (T_1) și CPMG pentru determinarea timpului de relaxare transversală (T_2),

- determinarea constantelor de relaxare $R_1=1/T_1$ și $R_2=1/T_2$ și a dependenței lor liniare cu concentrația de specie paramagnetică și obținerea unei curbe de calibrare R_1 , R_2 vs. concentrație, pentru speciile de interes, și

- obținerea concentrației din curba de calibrare prin prelucrarea unei probe cu o concentrație necunoscută de specie paramagnetică și interpolarea datelor obținute.

Revendicări: 5

Figuri: 5

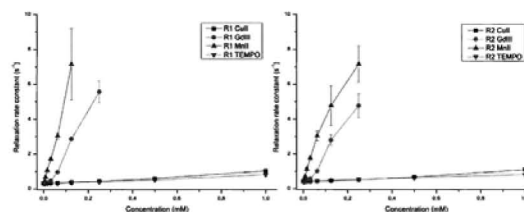


Fig. 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU BREVETE DE INVENȚII	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2023 00144
Data depozit	29-03-2023

27

METODĂ DE DETERMINARE CANTITATIVĂ A COMPUȘILOR PARAMAGNETICI GENERAȚI ÎN APĂ PRIN IRADIERE SAU REACȚII CHIMICE FOLOSIND RELAXOMETRIE DE REZONANȚĂ MAGNETICĂ NUCLEARĂ ÎN CÂMP MAGNETIC TERESTRU

DESCRIERE

Invenția se referă la o metodă de rezonanță magnetică nucleară în câmp magnetic terestru („Earth-field NMR”) pentru a detecta și a determina concentrația radicalilor liberi prezenți sau generați printr-o reacție chimică într-o soluție apoasă. Această metodă are potențialul de a oferi o cale mult mai ieftină de dozare a radicalilor liberi din probe biologice (J. Magn. Reson., 2020, 319, 106800).

Principiul general al observațiilor RMN constă în introducerea într-un câmp magnetic static a unei probe care conține nuclee atomice cu spin nuclear diferit de zero. Aceste nuclee vor rezona, adică vor fi capabile să execute tranziții între orientările cuantificate în acest câmp static, atunci când un puls de radiofrecvență este aplicat la frecvența Larmor caracteristică. Un set de parametri importanți în comportamentul magnetizării colective generate de aceste nuclee îl constituie constantele de timp de relaxare spre echilibru. Constanta de timp de relaxare a magnetizării în planul transvers pe câmpul magnetic principal, denumită T_2 (constanta de timp de relaxare „spin-spin”) reprezintă durata de viață a semnalului RMN. Constanta de timp de relaxare caracteristică regenerării magnetizării la echilibru (constanta de timp de relaxare „spin-rețea”) este notată T_1 . Aceste constante de timp de relaxare depind atât de natura nucleelor dar și de configurația moleculară în imediata apropiere, i.e. prezența altor nuclee magnetice, de mișcarea acestora, și cu precădere de prezența unor specii purtătoare de spin electronic neîmperechiat. Prezența acestor spini electronici și mișcările relative ale centrilor paramagnetici față de nucleul studiat modifică valoarea constantelor de timp de relaxare, T_1 și T_2 .

Rezonanța magnetică nucleară în câmp magnetic terestru este o metodă recentă care beneficiază de omogenitatea naturală foarte ridicată a câmpului magnetic terestru (Magn. Reson. Med., 1990, 15, 386–391), eliminând prin aceasta costul aferent producerii câmpului magnetic static și beneficiind de un instrument portabil cu operabilitate ridicată. Spectrometrele în câmp terestru s-au dovedit a fi versatile în multiple domenii de cercetare fundamentală și industrială, oferind inclusiv capabilități de imagistică (J. Chem. Educ., 2019, 96(10), 2326–2332; Instrum. Sci. Technol., 2006, 32(6), 655–667).

Principiul relaxometriei RMN ^1H pentru detecția și determinarea cantitativă a radicalilor constă în a măsura constantele de timp de relaxare (longitudinală sau spin-spin, T_1 și transversală sau „spin-rețea”, T_2) a protonilor din moleculele de apă, într-o soluție în care sunt prezenți radicali liberi. Prezența acestor radicali, care reprezintă specii paramagnetice, duce la o intensificare a proceselor de relaxare a protonilor, acest efect fiind cunoscut sub numele de PRE (paramagnetic relaxation enhancement, Phys. Rev., 1955, 99, 559). Atât constantele de timp de relaxare longitudinale (T_1) cât și cele transversale (T_2) sunt afectate în sensul scăderii valorilor, prin măsurarea acestor timpi de relaxare aferenți unor concentrații de specie paramagnetică, se pot obține constantele de relaxare aferente $R_1 = 1/T_1$ și $R_2 =$

Paul R. Vasos¹

Mihai A. Vodă¹

Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania

$1/T_2$. În cazul observării unei variații liniare cu concentrația speciilor radicalice respective, se poate defini relaxivitatea ca fiind panta curbei R vs concentrație.

Obiectivele, caracteristicile și avantajele prezentei invenții

Principala revendicare a metodei propuse este măsurarea dependenței liniare între parametrii R_1 , R_2 și concentrația de specie paramagnetică prezentă sau obținută prin generarea radicalilor liberi prin reacții chimice.

Pentru a demonstra principiul metodei, am selectat o serie de compuși paramagnetici stabili în mediu apos: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și un radical organic stabil, TEMPO ((2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl). Speciile chimice prezente în soluție apoasă în urma dizolvării reactivilor sunt în fapt combinații complexe de tipul: $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, $[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$ iar în cazul TEMPO sunt molecule solvate prin legături de hidrogen cu molecule de apă.

Experimentele de relaxivitate sunt efectuate utilizând un spectrometru Magritek TerraNova, folosind două secvențe de puls: Polarization Recovery pentru T_1 și Carr-Purcell Meiboom-Gill (Phys. Rev., 1954, 94, 630; Sci. Inst., 1958, 29, 688–691) CPMG pentru T_2 (Fig 1). Probele sunt soluții apoase ai compușilor menționați anterior, folosind apa distilată ca referință.

Figura 1. Prezintă cele două secvențe de pulsuri folosite, Polarization Recovery presupune repetarea întregii secvențe cu creșterea timpului caracteristic τ_{rec} . CPMG presupune o singură secvență cu repetarea segmentului dintre paranteze pentru n puncte experimentale, timpul caracteristic τ_E fiind specific experimentului.

Figura 2. Prezintă dependența parametrilor T_1 și T_2 vs concentrația de specie paramagnetică din soluție, și inset-uri pentru zonele de concentrații mici. Timpii de relaxare T_1 au fost determinați prin secvențe de puls de recuperare a polarizării, timpii de relaxare T_2 au fost determinați prin secvențe de tip CPMG.

Figura 3. Prezintă dependența parametrilor R_1 și R_2 vs concentrația de specie paramagnetică, parametrii se obțin prin relațiile $R_1 = 1/T_1$, $R_2 = 1/T_2$.

Figura 4. Prezintă dependența valorilor T_2 vs durata reacției chimice în probele de H_2O_2 de concentrație variabilă, folosind Csl la concentrație constantă de 10 mM.

Figura 5. Prezintă dependența valorilor T_2 vs durata reacției chimice în probele de H_2O_2 de concentrație constantă de 100 mM, folosind Csl la concentrații variabile.

Paul R. Vasos¹

Mihai A. Vodă¹

Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania

Tabel 1. Prezintă relaxivitățile longitudinale r_1 și transversale r_2 ale compușilor paramagnetici studiați.

I. Determinarea relaxometrică și relaxivitatea speciilor paramagnetice stabile

Metoda de lucru constă în prepararea unor soluții într-un vas de 315 mL, cu concentrația speciilor paramagnetice având valori de la 1 mM la 3.9 μ M, lucru realizat prin diluții succesive 1:2. După prepararea fiecărei soluții se folosește o secvență de puls specifică determinării timpului de relaxare T_1 și/sau T_2 .

În condițiile noastre de lucru, proba de apă pură are parametrii $T_1 = 3200 \pm 100$ ms, și $T_2 = 2400 \pm 100$ ms, iar probele de Cu(II), Mn(II), Gd(III) și TEMPO prezintă valori diferite în funcție de concentrația acestora, conform Fig 2.

Dependența liniară a constantelor de relaxare $R_1 = 1/T_1$ și $R_2 = 1/T_2$, sunt prezentate în Fig 3.

Un parametru specific agenților paramagnetici (în cazul acesta pot fi numiți și agenți de relaxare) este relaxivitatea, longitudinală r_1 și transversală r_2 . Relaxivitatea este definită ca măsura în care creșterea concentrației unui agent de relaxare cu o unitate afectează constanta de relaxare a protonilor din apa soluției respective, astfel că relaxivitatea poate fi determinată din panta aferentă dependențelor liniare din graficele din Fig 3. Este importantă cunoașterea acestui parametru determinat experimental pentru a fi comparat cu valorile din literatură, deoarece este independent de concentrație dar este dependent atât de câmpul static local cât și de natura chimică a agentului de relaxare.

În cazul speciilor Cu(II) și Mn(II) în mediu apos, relaxivități experimentale au mai fost determinate conform Mann et al (J. Chem. Educ., 2019, 96(10), 2326-2332).

Relaxivitățile r_1 și r_2 a agenților de relaxare determinate experimental pentru Gd(III) și TEMPO alături de Cu(II) și Mn(II) reproduse de către noi sunt indicate în Tabelul 1.

II. Identificarea prin relaxometrie a speciilor radicalice generate chimic

Metoda de lucru constă în prepararea unor soluții de H_2O_2 de concentrație cunoscută și observarea descompunerii acesteia. În urma reacției de descompunere se produc radicali instabili: $\cdot OH$ (hidroxil), cu timp de viață mediu de ordinul nanosecundelor, recombinația rapidă a radicalilor $\cdot OH$ conduce la obținerea de O_2 , care în condițiile de lucru este o specie paramagnetică stabilă cu spin electronic $S = 1$ (triplet).

Ecuatiile chimice relevante proceselor descrise sunt Eq 1. și Eq 2.

Paul R. Vasos¹

Mihai A. Vodă¹

Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania



Descompunerea H_2O_2 poate fi realizata termic, în conditii normale la 25°C aceasta fiind stabilă pe intervale de timp de zile/săptămâni, reacția poate insa fi accelerată catalitic, prin adaugarea de Csl, specia activă catalitic fiind anionul iodură. Astfel, au fost preparate soluții la concentrații multiple de H_2O_2 cu menținerea de Csl la concentrație constantă, dar și soluții de Csl la concentrații multiple cu menținerea de H_2O_2 la concentrație constantă.

În urma preparării fiecărei soluții de H_2O_2 și Csl, s-a înregistrat timpul de relaxare T_2 folosind o secvență de pulsuri CPMG. Parametrul T_2 a fost înregistrat la momente diferite în fereastra de timp a reacției chimice, de regulă de ordinul minutelor în domeniul de concentrații folosit.

Variațiile parametrilor T_2 cu evoluția reacției chimice de descompunere de H_2O_2 sunt indicate în Fig 4, în situația menținerii concentrației de Csl la 10mM, și folosind 3 concentrații diferite de H_2O_2 la 1 mM, 10 mM respectiv 100 mM. În experimentul din Fig 5. s-a menținut concentrația de H_2O_2 constantă la 100 mM și s-au folosit 4 concentrații diferite de Csl, 0 mM (necatalizat), 0.1 mM, 1 mM, 5 mM și 10 mM. Cazul necatalizat reprezintă de fapt simpla descompunere termică a H_2O_2 în mediu apos.

În toate situațiile observate în Fig 4. și Fig 5. se observă un semnal inițial (măsurat imediat după adăugarea de catalizator), apropiat de valoarea standard a protonilor din apa pură, $T_2 = 2400 \pm 100$ ms, care scade relativ rapid către valori mai mici pe măsură ce reacția evoluează. Scăderea T_2 este datorată efectului PRE al speciilor O_2 , și nu a speciilor $\cdot\text{OH}$ (cu timp de viața extrem de scurt comparativ cu durata pulsurilor). Astfel, viteza de reacție va depinde de concentrația inițială de H_2O_2 dar și de Csl, în toate situațiile se poate observa o curbă de descompunere atenuată, semn ca reacția încetinește în timp pe măsură ce concentrația de reactant scade de la valoarea inițială, fapt conform cineticii reacțiilor de descompunere.

Determinarea speciilor radicalice O_2 conform acestei metode este una pur calitativă.

Paul R. Vasos¹

Mihai A. Vodă¹

Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania

REVENDICĂRI

1. Metodă de determinare cantitativă a speciilor radicalice stabile într-o probă apoasă folosind rezonanța magnetică nucleară în câmp terestru, prin metoda de relaxometrie:
 - În urma preparării probelor standard cu concentrații cunoscute de specie paramagnetică în apă distilată și a unei referințe de apă distilată, înregistrarea unui semnal RMN în câmp terestru folosind secvențe de puls de tipul: recuperare de magnetizare pentru determinarea timpului de relaxare longitudinală T_1 și CPMG pentru determinarea timpului de relaxare transversală T_2 .
 - Folosind parametri derivați, constantele de relaxare R_1 și R_2 , și dependența lor liniară cu concentrația de specie paramagnetică, se pot obține curbe de calibrare R_1 , R_2 vs concentrație, pentru speciile de interes.
 - Obținerea concentrației din curba de calibrare prin prelucrarea unei probe cu o concentrație necunoscută de specie paramagnetică și interpolarea datelor obținute.
2. Metodă de obținere a relaxivității unui compus paramagnetic de interes, conform revendicării 1., caracterizată prin aceea că se poate extrage panta unui grafic al valorilor R_1 și R_2 vs concentrație, dacă se pot prepara probe de concentrație cunoscută a agentului paramagnetic.
3. Metodă de identificare a prezenței de O_2 în soluții apoase în urma descompunerii unui agent chimic, în caz particular a descompunerii de H_2O_2 pe cale catalitică.
4. Identificarea cantității de H_2O_2 în prezența unei cantități de catalizator Csl în concentrație cunoscută, utilizat pentru a iniția descompunerea chimică rapidă și măsurarea imediată a parametrului T_2 la timpi diferiți pe măsura ce reacția evoluează.
5. Identificarea cantității de catalizator de tip iodură solubilă în apă în probe de concentrație cunoscută de H_2O_2 prin obținerea graficelor T_2 vs timp de reacție și compararea datelor cu curbe cinetice experimentale care pot fi determinate prin alte metode fizico-chimice de caracterizare in-situ.

Paul R. Vasos¹

Mihai A. Vodă¹

Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania

22

DESENE

FIGURA 1

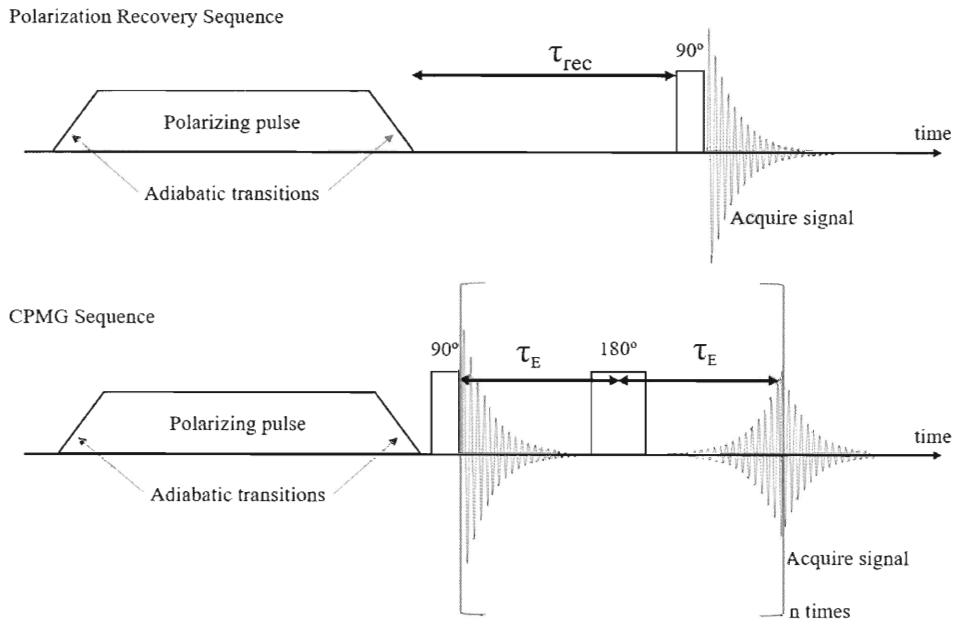
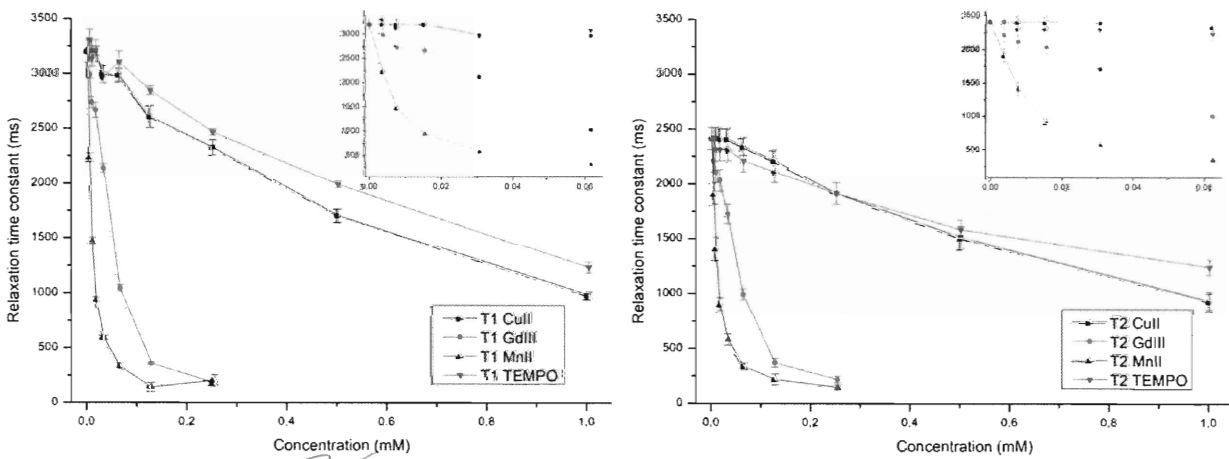


FIGURA 2



Paul R. Vasos¹
 Mihai A. Vodă¹
 Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania

21

FIGURA 3

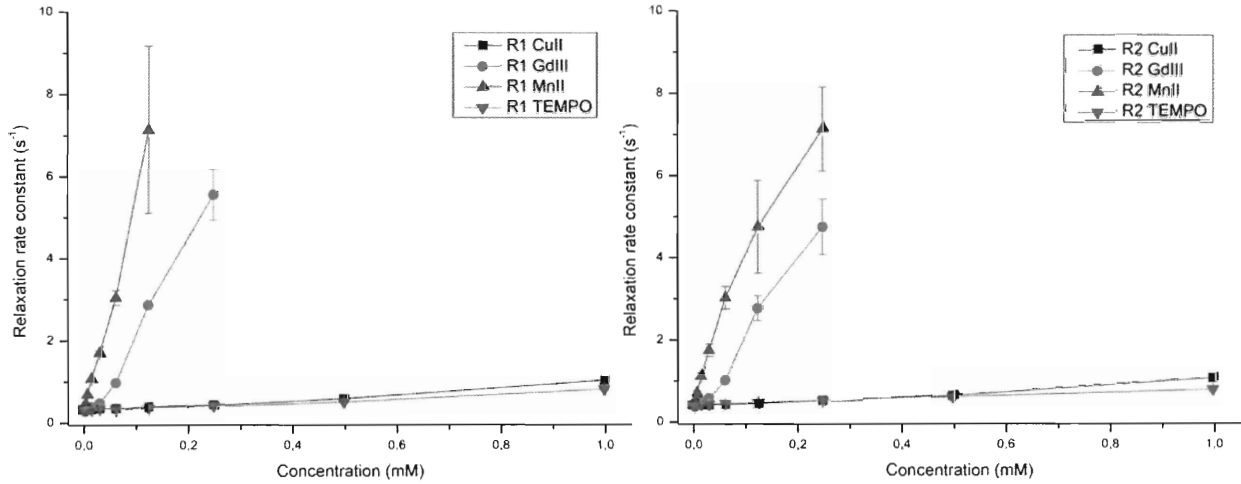
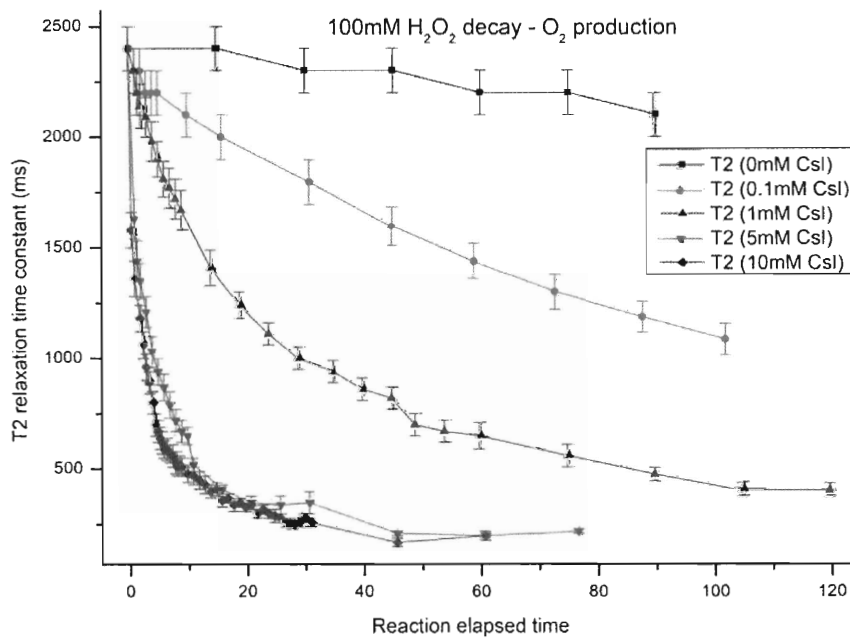


FIGURA 4



Paul R. Vasos¹

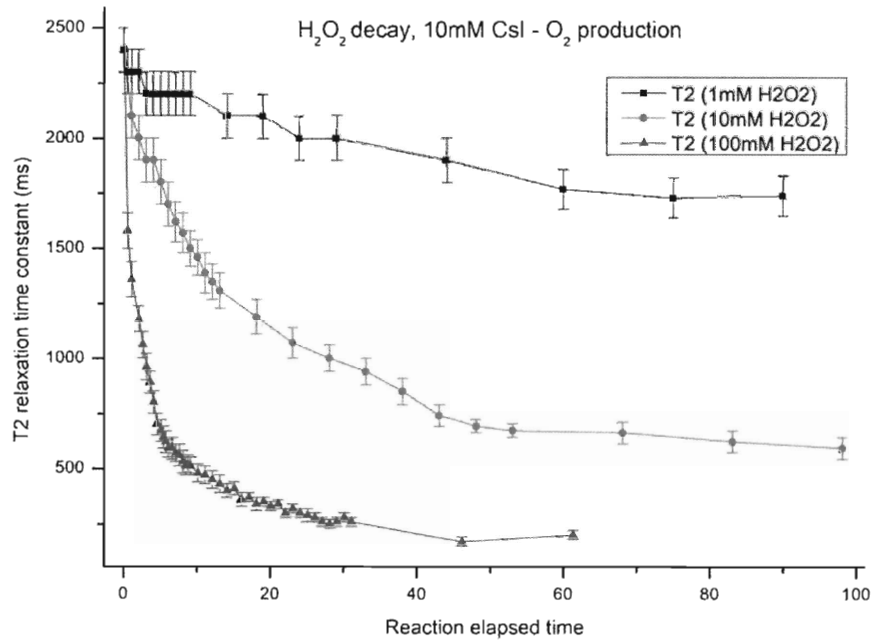
Mihai A. Vodă¹

Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania

20

FIGURA 5



TABELUL 1

Species	r_1 (s ⁻¹ mM ⁻¹)	r_2 (s ⁻¹ mM ⁻¹)
TEMPO	0.40 ± 0.02	0.40 ± 0.01
Cu ^{II}	0.73 ± 0.02	0.54 ± 0.04
Gd ^{III}	8.66 ± 2.36	9.13 ± 1.77
Mn ^{II}	46.56 ± 2.37	37.38 ± 3.19

Paul R. Vasos¹Mihai A. Vodă¹Alexandru Topor¹

¹ Biophysics and Biomedical Applications Group, ELI-NP, Extreme Light Infrastructure - Nuclear Physics, IFIN-HH, Str. Reactorului 30, Bucharest-Magurele, RO-077125, Romania