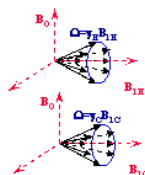
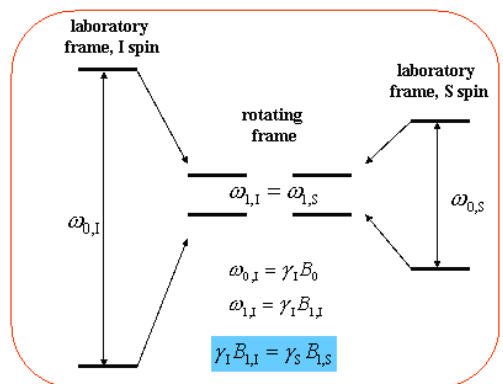


(3) Techniky přenosu polarizace – „cross“-polarizace a spinová difuze

Joint Laboratory of Solid-State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



Jiří Brus

(Verze 1.0.1-2005)
(neupravená a neúplná)

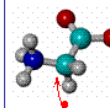
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, Praha 6 -
Petřiny 162 06
e-mail: brus@imc.cas.cz

Zvýšení citlivosti NMR experimentu

Joint Laboratory of Solid-State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

Problém relaxace

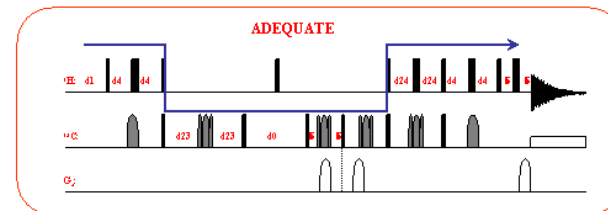
- 1) Absorpce γ záření není doprovázena spontánní emisí.
- 2) Disipace je vynucena fluktuacemi lokálních magnetických polí.
- 3) Vnitřní molekulární pohyb je u krystalických systémů velmi omezený.
- 4) Relaxační časy izotopicky řídkých jader v řádech minut a hodin.



Problém malé polarizovatelnosti

γ_I
 γ_S

nucleus	natural abundance	max. enhancement factor
^{13}C	1.11 %	4
^{15}N	0.37 %	10
^{29}Si	4.70 %	5
^31P	100 %	2.5



I v roztoku probíhá řada experimentů tak že, je magnetizace nejprve přenesena ze sousedních protonů, pak nepřímo sledována magnetizace jádra X (Y) a nakonec je přenesena zpět do ^1H a detekována přímo. Důvodem je zvýšení citlivosti experimentu. To plyne z přenosu velké polarizace z vodíkových jader, z velkého magnetického momentu, který indukuje odpovídající silné napětí v detekční cívce a rychlé relaxace vodíkových spinů. V pevném stavu je situace komplikovaná tím, že měření ^1H NMR spekter s dobrým rozlišením je velmi složité. Díky tomu nemůžeme využít zvýšení citlivosti přímou detekcí ^1H magnetizace. Proto se musíme soustředit na techniky s přímou detekcí jader s nízkým izotopickým zastoupením, a nízkým γ , které ale využijí vysoké polarizace vodíkového spinového systému. V postatě se soustředíme na techniku, která je analogická INEPT experimentům. Zásadní rozdíl je v tom, že v pevné fázi není hnací silou přenosu polarizace spin-spinová J -interakce, ale interakce přímá dipol-dipolová.

„Cross“-polarizace – 1972

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



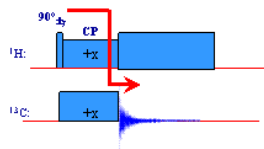
Alex Pines
*1945

Podstatné zvýšení citlivosti NMR experimentu provedené na izotopicky řídkých jádrech, odstraněno dipolární rozšíření, ale CSA stále dominuje spektru.

Pines A., Gibby M.G., Waugh J.S.

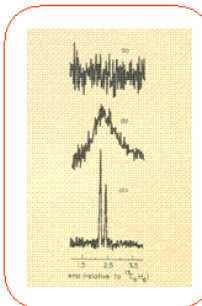
Proton-Enhanced Nuclear Induction Spectroscopy. A Method for High Resolution NMR of Dilute Spins in Solids, *J. Chem. Phys.* (1972); 56: 1776.

Adamantan při 303K - vzorek je statický - nerotuje



$$(\Delta = \omega_I - \omega_S = 0)$$

$$\gamma_H B_{1H} = \gamma_C B_{1C}$$



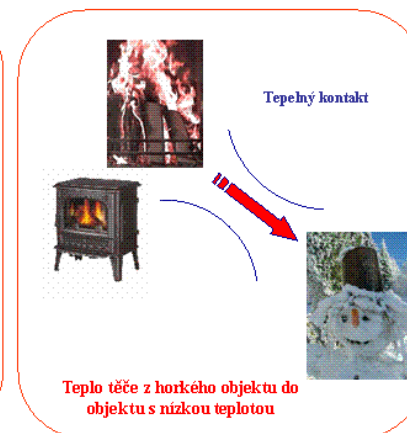
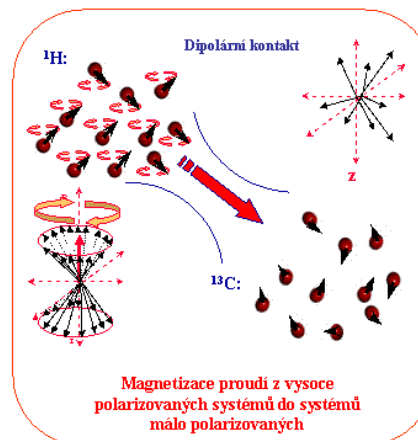
Zvýšení citlivosti až 1000-krát

- 1) Polarizace izotopicky hojných jader I .
- 2) Snížení spinové teploty jader I v rotující soustavě souřadné.
- 3) Ustavení kontaktu mezi I a S – spin-lock a HH kontakt.
- 4) Detekce magnetizace S při současném dekaplinku I .

Pro zvýšení intezity signálu jader s nízkým gyromagnetickým poměrem a řídkým izotopickým zastoupením se dnes používá zcela rutinně technika zvaná křížová polarizace nebo „cross“-polarizace. echnika byla navržena Alexem Pinesem v roce 1972 a vychází z Hartmann-Hahnova experimentu navrženého v roce 1962. Ukázalo se, že díky přenosu polarizace jader z protonového systému do systému uhlíkových spinů a díky možnosti podstatně rychlejší akumulaci spekter, které plyne z kratší relaxační doby protonů dojde ke zvýšení citlivosti experimentů za jednotku času až 1000-krát.

Tepelný tok a tepelný kontakt

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

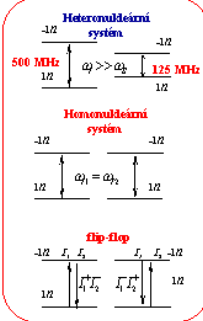
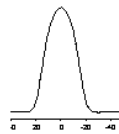
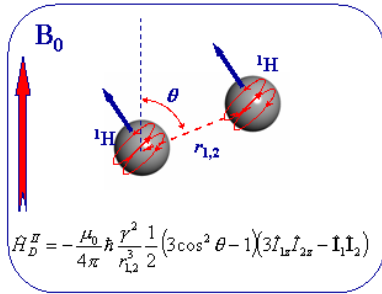


Technika „cross“-polarizace využívá tendence magnetizace proudit z vysoce polarizovaných systémů do systémů s nízkou polarizovaností. Podmínkou je aby se oba systémy nacházeli v kontaktu. Je to zcela obdobné, jako když se teplo šíří z horkého objektu do studeného. To je také možné pouze tehdy, pokud se oba systémy dostanou do tepelného kontaktu. Pokud budou oba systémy izolovány, teplo se samozřejmě nepřenesou. Proto i během NMR experimentu musím nejprve odstranit všechny možné překážky a izolace mezi různými spinovými systémy, aby došlo k přenosu magnetizace.

Přenos polarizace v homonukleárním systému

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

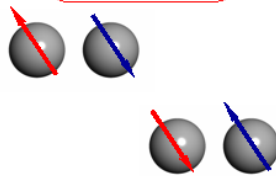
Flip-flop přechody – celková energie systému je konzervována



$$I_1 I_2 = (I_{1x} I_{2x} + I_{1y} I_{2y} + I_{1z} I_{2z})$$

$$I^+ = I_x + iI_y, I^- = I_x - iI_y$$

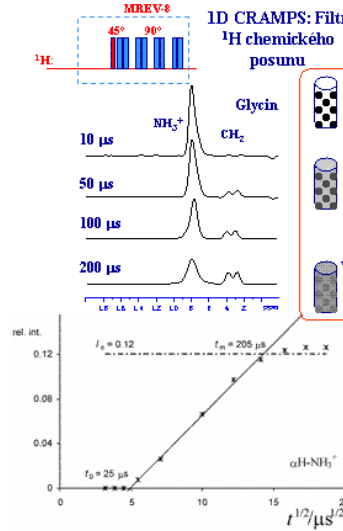
$$\hat{H}_D^H = -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2}{r_{12}^3} \frac{1}{2} (3\cos^2\theta - 1) (2I_{1x}I_{2x} - 1/2(I_1^+ I_2^- + I_1^- I_2^+))$$



V homonukleárním systému jsou rezonanční frekvence jader prakticky identické a to vede k tomu, že mezi jednotlivými jádry dochází k *flip-flop* přechodům. Pokud spolu jádra dipolárně interagují a tedy nejsou dále než 5Å, pak změna orientace jaderného magnetického momentu jednoho jádra si vynutí změnu orientace sousedního jaderného momentu. To je samozřejmě možné jen proto, že celková energie systému zůstane konzervována a celkový rozdíl v populacích na obou energetických hladinách zůstane konstantní. *Flip-flop* procesy mezi protony jsou v organických látkách velmi rychlé a šíří se v celém vzorku. Je to přirozený a velmi rychlý proces, kterému se říká někdy spinová difuze. Je to ale proces plně koherentní, který může být refoksován nebo i zastaven. To je rozdíl od spinové difuze se kterou se setkáváme při měření NOE – zde se jedná o procesy vynucené relaxací (o procesy nekoherentní).

¹H-¹H Spinová výměna (difuze)

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



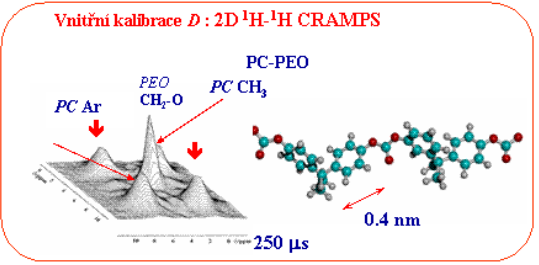
Rychlost spinové výměny: $\frac{\partial M(\gamma, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} [D_{\text{ex}}^{\text{H}} M(\gamma, t)] + \frac{\partial}{\partial t} [D_{\text{ex}}^{\text{H}} M(\gamma, t)] + \frac{\partial}{\partial t} [D_{\text{ex}}^{\text{H}} M(\gamma, t)]$

Velikost domény dispergované složky A: $d_A = 2 \frac{\epsilon}{f_B} \left(\frac{1}{\pi} D_{\text{ex}}^{\text{H}} \right)^{1/2}$

Stanovení spin-difusního koeficientu z pološířky:

$$D_{\text{rig}} = \frac{1}{12} \sqrt{\frac{\pi}{2 \ln 2}} \langle r^2 \rangle \Delta \nu_{1/2} \quad D_{\text{mob}} = \frac{1}{6} \langle r^2 \rangle [\alpha \Delta \nu_{1/2}]^{1/2}$$

$$D_{\text{mob}} = 8.2 \times 10^{-6} T_2^{-1} + 0.007 \quad D_{\text{mob}} = 4.4 \times 10^{-5} T_2^{-1} + 0.26$$

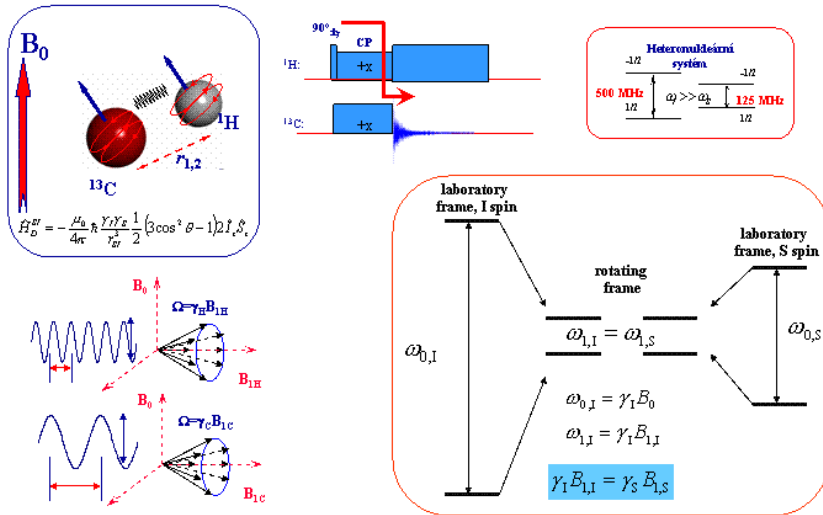


Vzhledem k tomu, že magnetizace šíří přes prostor nikoli pomocí valenčních elektronů, je možné rychlost šíření magnetizace využít k získání zajímavých strukturních informací. Ve stejný okamžik se změni orientace jaderných magnetických dipólů v páru interagujících jader a tato změna, informace o polarizaci se postupně nese prostorem a jako štafeta hopká od jednoho vodíku ke druhému. Např. selektivní excitací vytvoříme gradient vodíkové magnetizace. Jsou excitované pouze NH₃⁺ vodíky v glycinu zatímco CH₂ nejsou vybudeny. Tuto vzniklou polarizaci uložíme do směru osy z a necháme postupně šířit přes prostor. S prodlužující se dobou spinové difuze intenzita signálu CH₂ roste zatímco NH₃⁺ klesá. Ve vzorku dochází k vyrovnávání gradientu magnetizace. Nakonec je systém v rovnováze. Tento proces lze popsat druhým Fickovým zákonem a lze jej využít pro měření vzdálenosti mezi funkčním jednotkami. Nebo pro jednoduchý dvousložkový systém pak lze stanovit velikost dispergovaných částic v matici.

Přenos polarizace v heteronukleárním systému

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

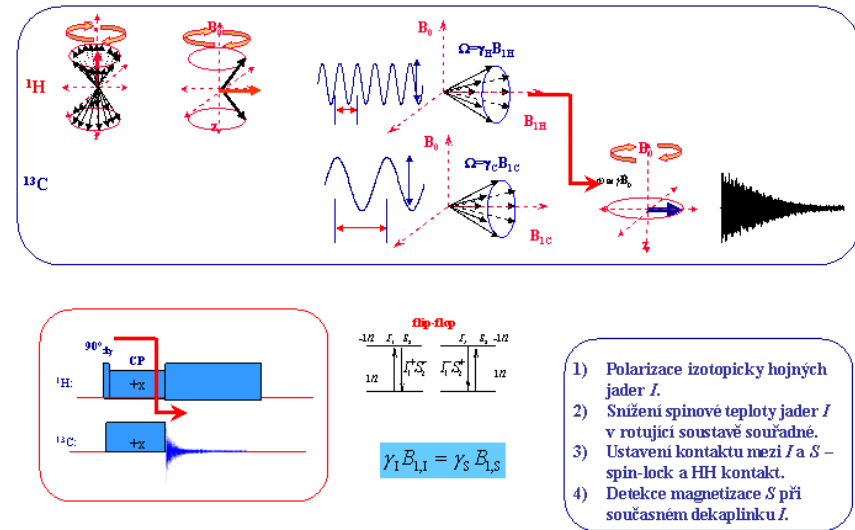
Flip-flop přechody – celková energie systému je konzervována



Jak dosáhnout šíření magnetizace mezi různými jádry? V heteronukleárním systému totiž *flip-flop* přechody nejsou možné, protože celková energie při nich není zachována. Tady je jasné, že tento přenos si musíme vynutit působením *rf* polí. To je zařízeno Hartman-Hahnovým experimentem, který je založen na současně aplikaci dvou *rf* polí, jejichž rezonanční frekvence odpovídají např. ^1H a ^{13}C tedy 500 a 125 MHz. Výsledkem působení těchto polí je rotace jaderných spinů kolem směru aplikovaného *rf* pole. Frekvence rotace spinů kolem tohoto směru je úměrná amplitudě použitého *rf* pole. Pokud amplitudy obou použitých polí budou takové, že frekvence nutace spinů budou shodné, dojde k ustavení tzv. dipolárního kontaktu. V nově vzniklé soustavě souřadné se rozdíl v mezi energetickými hladinami vyrovnají a může dojít k *flip-flop* přechodům. Magnetizace se může začít přelévat. Podmínkou existence heteronukleární interakce mezi jadernými spiny, tedy vzdálenost menší než 5 Å.

„Cross“-polarizace – experimentální uspořádání

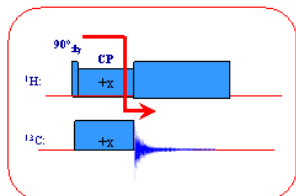
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



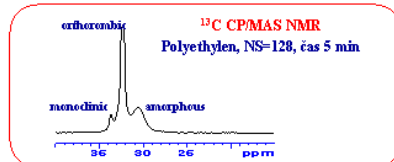
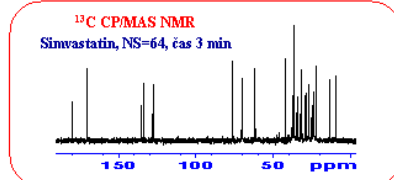
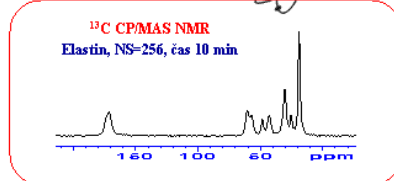
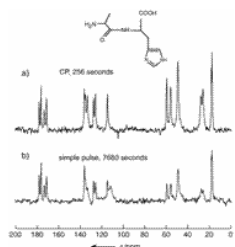
Vlastní experiment probíhá následovně. Nejprve 90° pulsem převedeme vodíkovou magnetizaci do roviny x-y. Vodíkový systém je nyní vysoce polarizovaný s daným rozdílem populací na obou energetických hladinách. Fáze posunutě pole potom tuto magnetizaci uzavře do spin-locku. Magnetizace je držena v daném směru a nedochází k vývoji chemického posunu. Současně zapojíme i druhé *rf* pole se správně nastavenou amplitudou a tím ustavíme dipolární kontakt. Polarizace se začne přesouvat z vodíkového systému do spinového systému uhlíků a nakonec snímáme magnetizaci uhlíků. Celkově zůstává rozdíl v populacích zachován. Tedy celková polarizace systému je konstantní to znamená že protonová magnetizace se sníží.

„Cross“-polarizace – vysoká citlivost

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



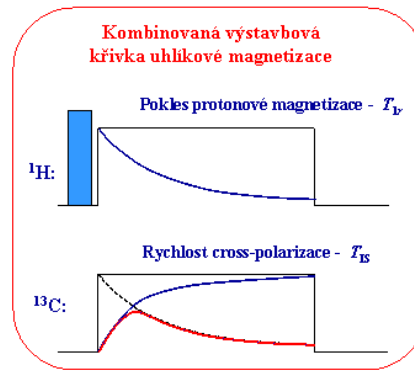
¹³C CP/MAS NMR
Porovnání CP a SP/MAS NMR
experimentu



Tento dvou rezonanční experiment spolu s rotací vzorku pod magickým úhlem a dipolárním dekaplinkem se stal základem pro velkou většinu experimentů prováděných v pevném stavu. Díky tomu je možné významně zkrátit experimentální čas měření uhlíkových či dusíkových NMR spekter látek v přirozeném izotopickém zastoupení. Měření vysoce rozlišených spekter je tak otázkou několika desítek minut a díky tomu se NMR spektroskopie pevného stavu stala metodou, která je snadno použitelná v řadě aplikací, například pro charakterizaci složení nerozpustných látek a to jak přírodních tak syntetických, nebo pro snadné rozlišení krystalových forem. Různé krystalové formy mají díky rozdílnému pakování a konformaci, různá NMR spektra. Povšimněme si dále zde rozdílu ve vzhledu spekter amorfního polymeru a mikrokryalického produktu. Obecně platí, že rostoucí stupeň neuspořádanosti vede k rozšiřování signálu.

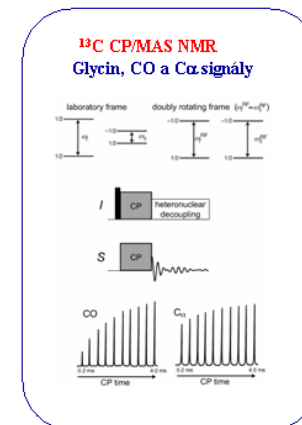
Dynamika „cross“-polarizace

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



Typické hodnoty CP = 100 μs až 10 ms

Delší doba CP vyžaduje snížení výkonů obou νf poli - pozor na poškození sondy

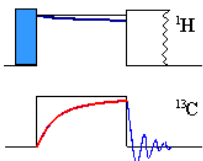


Pro úspěšné provedení NMR experimentu s „cross“-polarizací (CP) a vyhodnocení získaných dat je dobré ale něco vědět o dynamice tohoto procesu. Rychlost přenosu polarizace z vodíkového spinového systému do uhlíkového je závislá na velikosti dipolárních interakcí. Efektivní přenos polarizace na neprotonovaný kvartérní uhlík vyžaduje poněkud delší čas než v případě rychle polarizovaných uhlíků s přímo vázanými atomy vodíku. Obecně je typická směšovací doba mezi 100 μs a 10 ms. Vzestup intenzity uhlíkového signálu ale není nekonečný, a v určitý okamžik začíná pokles. Tento pokles je důsledkem relaxačních procesů tedy $T_{1\rho}$ relaxace ¹H magnetizace. Z toho plyne, že integrální intenzity signálů nemusí přesně odpovídat stechiometrii systému. Použitím ale dostatečně dlouhé doby přenosu polarizace (2-3 ms) je odchylka od správných hodnot menší jak 5 %.

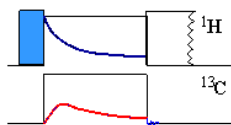
Dynamika „cross“-polarizace

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

Vhodné okolnosti pro
provedení CP experimentu:
 $T_{1\rho} \gg T_{1S}$



Nevhodné okolnosti pro
provedení CP experimentu:
 $T_{1\rho} \ll T_{1S}$



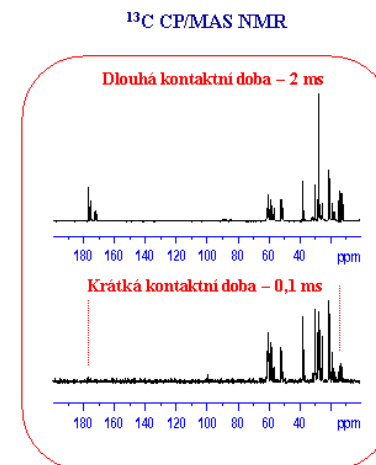
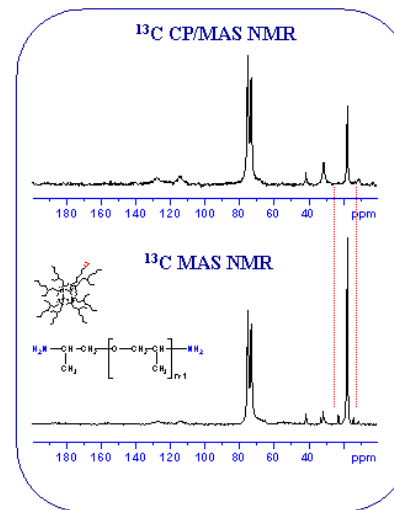
Kontaktní doba - praktické aspekty ¹³C CP/MAS NMR

- Krátká kontaktní doba T_{1S} (~500 μs): detekce především jednotek s přímo vázanými protony, (-CH₃, -CH₂-, >CH-)
- Dlouhá kontaktní doba T_{1S} (>1 - 2 ms): kvartérní uhlíky (>C<, -COO-, substituované aromáty, ...)
- Dlouhá kontaktní doba T_{1S} (>1 - 2 ms): systémy s vysokou vnitřní pohyblivostí
- krátké $T_{1\rho}$: systémy s paramagnetickými příměsí, vysoká pohyblivost

V zásadě existují dvě typy okolností a uspořádání, které ovlivňují provedení NMR experimentu s cross-polarizací, a které determinují délku kontaktní doby, a které mají zásadní vliv na citlivost experimentu. V ideálním případě je rychlost protonové relaxace v rotující soustavě souřadné velmi pomalá – $T_{1\rho}$ je delší než 10 ms. V tom případě máme dobrou šanci dosáhnout maximálního zesílení uhlíkového signálu. V opačném případě kdy je $T_{1\rho}$ relaxace velmi rychlá, pod jednu milisekundu, pak je nemožné dosáhnout maximálního zesílení signálu, ale pouze jisté optimální hodnoty. To je případ systémů s velkou vnitřní pohyblivostí, případně látek, které obsahují paramagnetické nečistoty.

Dynamika „cross“-polarizace

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

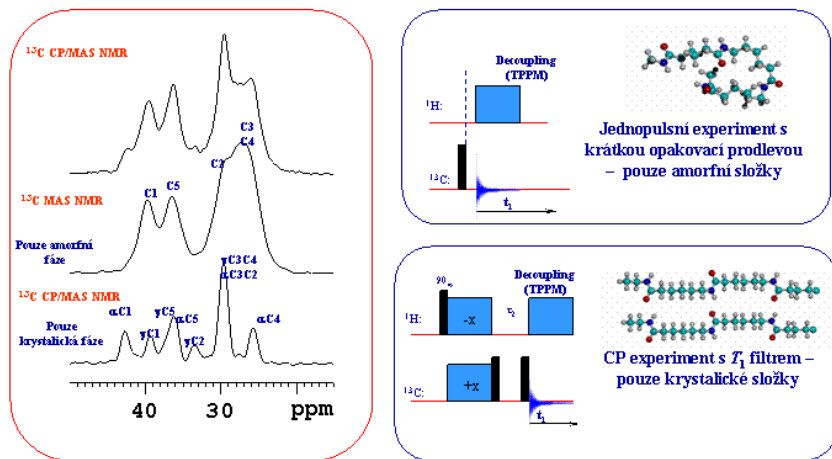


Takže je zřejmé, že při použití krátké kontaktní doby se signály kvartérních uhlíků neobjeví a navíc signály methylových skupin budou podstatně potlačeny. To se samozřejmě dá vyřešit tím, že se prodlouží kontaktní doba (CT) na 2-10 ms, ale v některých případech, většinou když se jedná o heterogenní systémy, jako jsou polymerní směsi sítě atp. CP zcela selže a signály některých složek nelze vůbec detekovat. To je případ hybridní polymerních směsí, kde siloxanové jednotky nejsou vůbec ukotvené v polymerní matici, vytváří mikrodomény tvořené gelovitou hmotou, kde je izotropní pohyb natolik rychlý, že dipolární interakce jsou prakticky odstraněny. Nicméně i toto je velice zajímavá strukturální informace, kterou lze využít k popisu systému a tak je tedy zřejmé, že někdy je potřeba klasický jedno-pulsní experiment použít. Někdy navíc můžeme d pomalé relaxace uhlíkových atomů v tuhé fázi využít.

Dynamika CP – selektivní experimenty

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

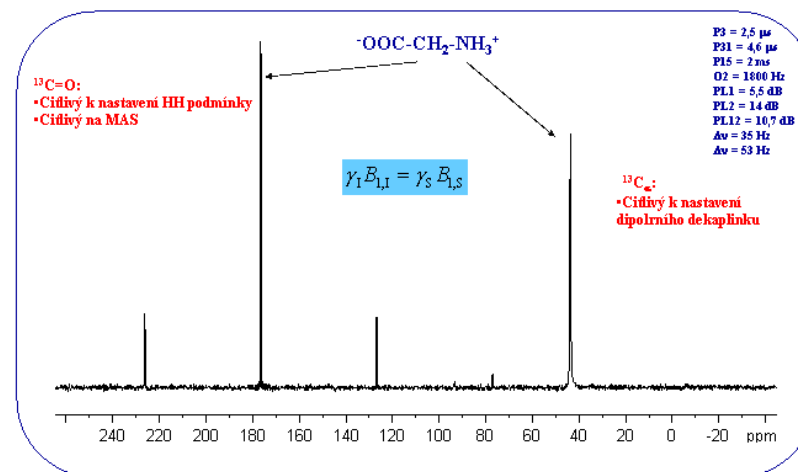
Čistý polyamid-6



Existuje řada heterogenní systémů, zvláště polymerních které jsou semikrystalické a obsahují vedle sebe amorfni a krystalickou fázi. Standardní CP experiment poskytne celkové spektrum ve kterém budou všechny složky systému, jak amorf tak krystalita. Amorfni složka je však většinou relativně pohyblivá s krátkou dobou uhlíkové relaxace a to znamená, že ji lze detekovat experimentem s přímou excitací a krátkou opakovací periodou (D1). Naproti tomu uhlíková magnetizace s dlouhou dobou relaxace je potlačena protože spinový systém je nasycen. Takže tímto způsobem dostanu selektivní spektrum amorfni fáze. Na druhou stranu, ale zavedení T_1 uhlíkového filtru za CP periodu nechám zrelaxovat magnetizaci amorfni fáze, zatímco magnetizace krystalické složky je neovlivněna a tak mohu nerušeně detekovat selektivní spektrum krystalitů. To je docela užitečná technika pro heterogenní systémy.

Optimalizace „cross“-polarizace

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

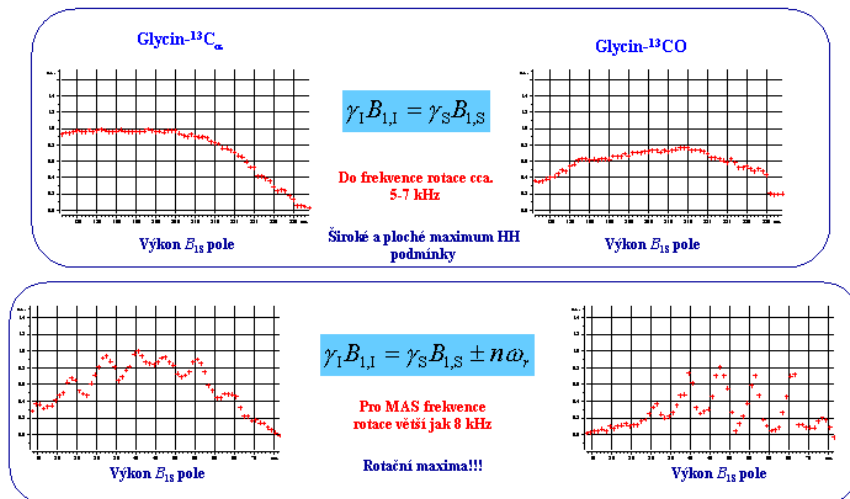


Nicméně CP experiment je potřeba optimalizovat. Obvykle stačí provést optimalizaci na standard kterým je glycin, ale mnohdy musíme optimalizovat přímo na daný vzorek. Glycin je vůbec vhodný systém pro optimalizaci řady parametrů NMR experimentů v pevném stavu. Karbonylový signál je velmi citlivý na správné nastavení HH podmínky a přesnému nastavení MA, zatímco signál alfa uhlíku citlivě reaguje na špatně zoptimalizovaný dekaplink. V každém případě glycin je asi nejčastěji měřeným systémem. Uvedené parametry je nutno optimalizovat a kontrolovat minimálně každý týden.

Optimalizace „cross“-polarizace



Profil HH podmínky

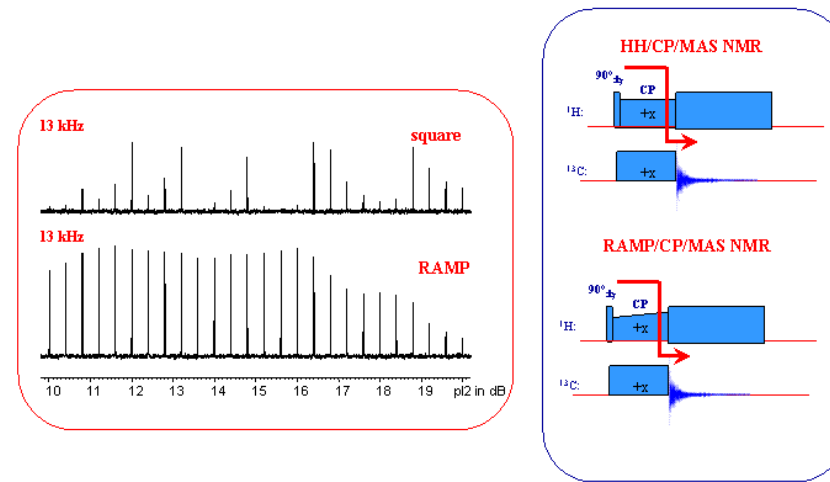


Při optimalizaci HH podmínky se postupuje tak, že výkon jednoho pole se drží konstantní zatímco druhé se plynule mění do té doby než se nastane maximální zesílení detekovaného signálu. Zde je vidět, že v případě protonizovaných uhlíků je dosaženo HH podmínky poměrně v širokém rozsahu, tedy že HH podmínka je široká. Na druhou stranu u neprotonizovaného karbonylu snadno najdeme maximum a právě proto se tento signál užívá k optimalizaci CP. Toto ovšem platí pokud frekvence rotace vzorku pod magickým úhlem nepřesáhne 7 kHz. Pak se HH profil rozpadne na centrální signál a sérii rotačních pásů. HH podmínka je tak modulována frekvencí rotace a je jasné, že CP se musí optimalizovat na danou frekvenci rotace. Navíc ta lokální maxima jsou poměrně úzká a tak se velmi lehce může stát, že parametry vhodné pro glycin zcela selžou pro neznámý vzorek.

Optimalizace „cross“-polarizace



Profil HH podmínky



Navíc s rostoucí frekvencí rotace se problém dále prohlubuje a je velmi obtížné vůbec nějaké maximum vůbec nalézt. Proto bylo potřeba nalézt takovou techniku, která by opět rozšířila HH podmínku a redukovala vznik rotačních signálů. Kupodivu se jedná o velmi jednoduchou modifikaci stávajícího CP experimentu. Došlo pouze k jedné změně. V původním provedení byla intenzita rf pole během doby dipolárního kontaktu udržována konstantní. V nové verzi se amplituda rf pole kontinuálně mění tím je splněna HH podmínka v mnohem širším rozsahu a problém složitého hledání lokálních maxim je opět odstraněn. Tato amplitudová modulace je dnes univerzálně rozšířena, pouze ve speciálních případech se nyní používá původního uspořádání.

Shrnutí

- a. Velice dlouhá relaxace jader v tuhé fazi - nízká citlivost NMR experimentu.
- b. Přenos polarizace z vodíkového spinového systému.
- c. Spinová difuze v homonukleárním systému – flip-flop přechody.
- d. Heteronukleární systém – Hartmann-Hahnův dvourezonanční experiment.
- e. Ustavení dipolárního kontaktu.
- f. Flip-flop přechody jsou povoleny v heteronukleárním spinovém systému.
- g. Konzervace energie a polarizace.
- h. Dynamika CP
- i. Optimalizace doby přenosu polarizace – rigidní vs. mobilní systémy.
- j. Optimalizovat výkony excitačních poli.
- k. Pozor na vysoké frekvence rotace pod magickým úhlem.
- l. Úzký profil HH podmínky.
- m. Amplitudová modulace pro velké frekvence MAS.

