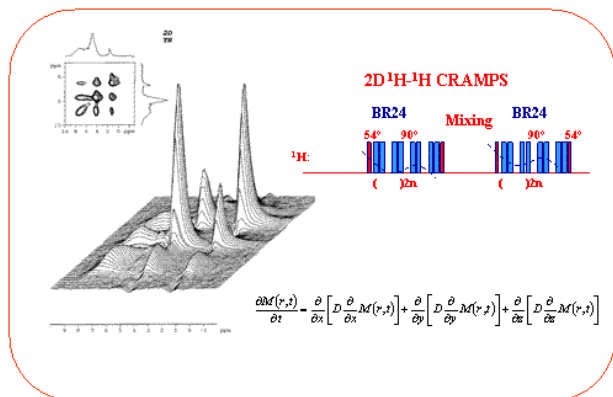


(7) 2D homonukleární ^1H - ^1H korelační experimenty

Joint Laboratory of Solid-State NMR
IMC AS CR and JRPIC AS 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

Vícerozměrná NMR spektroskopie – 1971

Joint Laboratory of Solid-State NMR
IMC AS CR and JRPIC AS CR

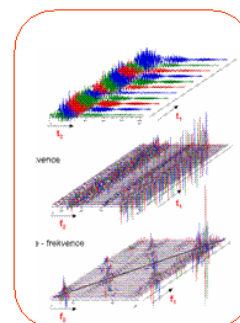


Přednáška na letní škole v Basko Polje, Jugoslávie, 1971

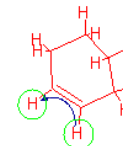
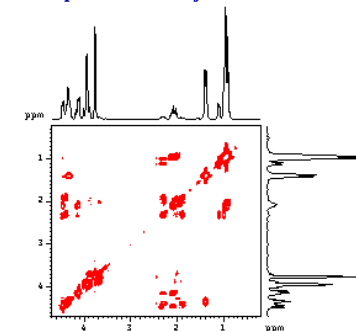
Dvoudimenzionální NMR, COSY

Aut: W.P., Bartholdi E., Ernst R.R.
2D Spectroscopy. Application to NMR, *J. Chem. Phys.* (1976); 64: 229.

Jean Luis Charles Jeener
*1931



Magnetizace se přes vazebné elektrony
přenáší na sousední jádra



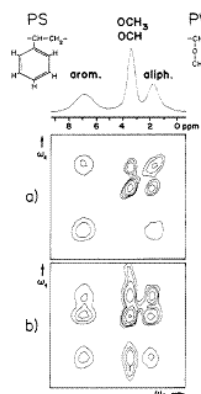
2D COSY NMR

Vodík-vodíkový korelační dvou-dimenzionální experiment byl prvně navržen Jeanem Jeenerem na letní škole v Basko Polje už v roce 1971. Po pěti letech byl realizován lidmi kolem R. Ernsta a tak bylo získáno vodík-vodíkové korelační spektrum v roztoku. Tento typ korelačních experimentů je založený na existenci a působení spin-spinových J interakcí o velikosti jednotek až desítek Hz. Jde tedy o přenos polarizace prostřednictvím vazebných elektronů a slouží ke sledování proton-protonové konektivity a posouzení topologie v molekule.

2D korelační NMR v pevné fázi – 1985

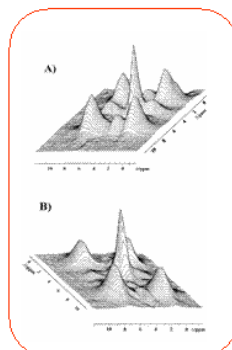
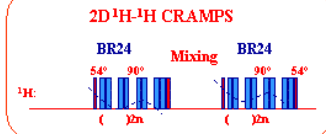
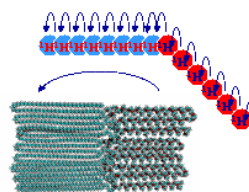
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

Caravatti P., Neuenschwander P., Ernst R.R.
Characterization of Heterogeneous Polymer Blends by 2D ^1H Spin
Diffusion Spectroscopy, *Macromolecules*. (1985); 18: 119.



Morfologie
polymerních směsí

Štafetový přenos polarizace
Korelace ^1H - ^1H chemických posunů

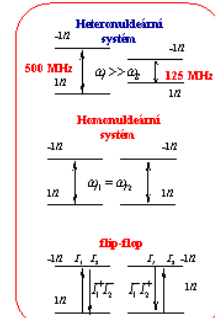
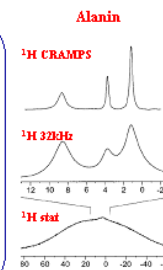
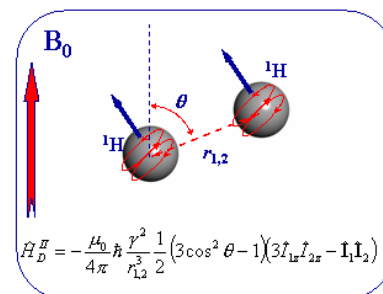


Analogický experiment v pevné fázi byl realizován téměř o deset let později. Tento vodík-vodíkový korelační experiment ale původně nesloužil k posouzení konektivity a topologie skeletu molekuly, ale spíše k posouzení mísitelnosti heterogenních polymerních systémů. Přenos polarizace je založen na přímých dipol-dipolových interakcích a tedy na spinové difuzi. Magnetizace se může šířit i přes velké vzdálenosti a vznik korelačních signálů tak indikuje prostorovou blízkost/vzdálenost různých složek a strukturních jednotek. Konkrétně v tomto případě polymerní směsi PVME a PS se jedná o systém fázově separovaný – není patrný korelační signál mezi oběma složkami (a), zatímco v druhém případě (b) vzniklý korelační signál indikuje intimní promíchání obou složek až na molekulární úrovni.

Přenos polarizace v homonukleárním systému

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

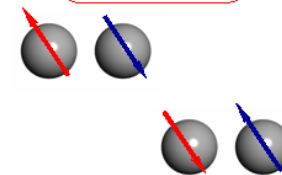
Flip-flop přechody – celková energie systému je konzervována



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

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

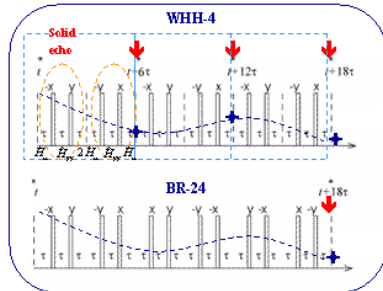
$$H_D^H = -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma^2}{r_{1,2}^3} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) (2 I_{1z} I_{2z} - 1/2 (I_1^+ I_2^- + I_1^- I_2^+))$$



Štafetový přenos polarizace – tedy spinová difuze – je možná pouze proto, že v homonukleárním systému dochází k flip-flop přechodům. Pokud spolu jádra dipolárně interagují a tedy nejsou dále než 5Å, pak při změně orientace jednoho jaderného magnetického momentu dojde současně i ke změně orientace sousedního. To je samozřejmě možné pouze proto, že celková energie systému tím 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. Dochází k výměně magnetizace mezi jednotlivými strukturními jednotkami, což lze využít k získání cenných strukturních informací. Na druhou stranu ale tyto velmi silné dipolární interakce vedou ke ztrátě spektrálního rozlišení. Z toho plyne, že tyto interakce na jedné straně chceme využít a téměř zároveň je musíme potlačit, aby bylo dosaženo vysokého rozlišení protonových spekter.

Multipulsní homodekaplink – 1968

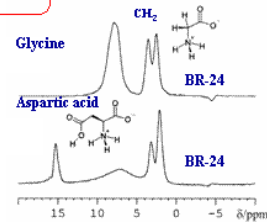
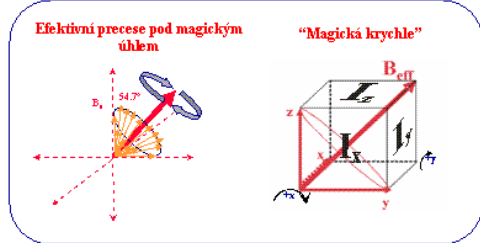
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR



$$\hat{H}_D^H = \hat{H}_{xx} + \hat{H}_{yy} + \hat{H}_{zz}$$

$$\left. \begin{aligned} \hat{H}_{xx} &= \dots (3I_{1x}I_{2x} - I_1I_2) \\ \hat{H}_{yy} &= \dots (3I_{1y}I_{2y} - I_1I_2) \\ \hat{H}_{zz} &= \dots (3I_{1z}I_{2z} - I_1I_2) \end{aligned} \right\} = 0$$

$$\begin{aligned} \hat{H}_{CS} &\approx \hat{I}_z \\ \hat{H}_{CS} &\approx (\hat{I}_x + \hat{I}_y + \hat{I}_z)/3 \end{aligned}$$



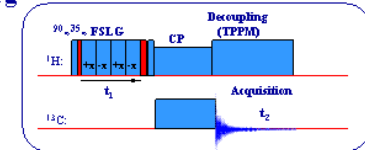
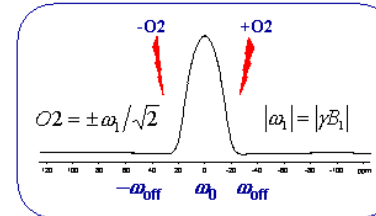
Odstraňování dipolárních interakcí je založeno na multipulsním ozařování spinového systému a podstatou klasické multipulsní sekvenční (1968) je nekonečná řada cyklů 90° pulsů. Díky ní začínou spiny vykonávat precesi kolem efektivního pole, které svírá s vektorem statického magnetického pole magickým úhlem 54,7°. Po ukončení celého jednoho cyklu (4 pulsy) je efektivní dipolární Hamiltonián roven nule, spinový systém se vyvíjí pouze podle chemického posunu a v tento okamžik tedy lze detekovat jeden bod FID. Výsledkem této stroboskopické detekce jsou relativně dobře rozlišená spektra. Nevýhodou těchto technik je, že dobře pracují pouze při frekvencích rotace do 3kHz. Pak začne MAS rušit účinky dipolárního dekaplinku a rozlišení prudce klesá.

Kontinuální homodekaplink

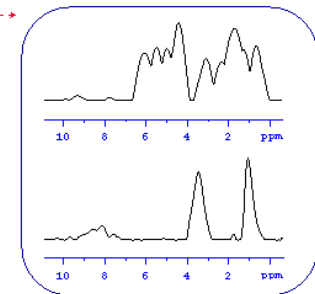
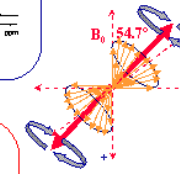
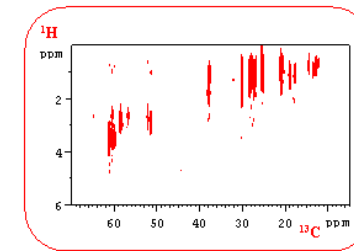
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JHPC AS CR

Mimorezonanční ozařování - FSLG

Lee-Goldburg



Lee M. et al., *Phys Rev A* 140, 1261 (1965)
Bielecki A. et al., *Chem Phys Lett* 155, 341 (1989).



Řešení poskytuje kontinuální verze této techniky a tím je „frekvenčně přepínaný“ Lee-Goldburgův dekaplink (FSLG), který se začal intenzivně používat v posledních pěti letech, i když vlastní princip byl popsán již v roce 1965. Frekvence rotace, při kterých může být tento dekaplink použit, je až 16kHz. Protony jsou střídavě ozařovány ze dvou frekvencí symetricky umístěných od rezonanční frekvence ¹H. Rezonanční offset musí splnit „mimorezonanční“ podmínku a je tedy svázaný s intenzitou ozařovacího pole. Tímto způsobem, stejně jako v předchozím případě, donutíme spiny efektivně vykonávat precesi kolem směru efektivního magnetického pole, které svírá úhel 54,7° s vnějším magnetickým polem B₀. Protože se jedná o dekaplink kontinuální, musíme pro detekci vodíkového spektra využít 2D experiment.

Kontinuální homodekaplink

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

Fázově modulovaný Lee-Goldburgův experiment

Fázová modulace

$$\phi(t) = \omega_{PMLG} t$$

$$|\omega_{PMLG}| = \omega_1 / \sqrt{2}$$

Doba trvání LG cyklu

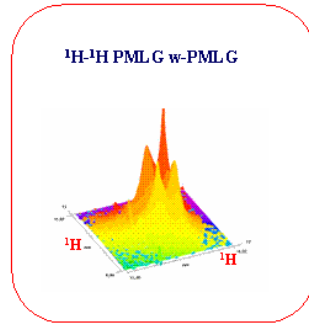
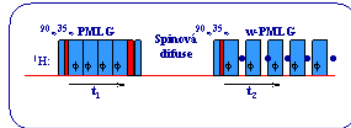
$$t_{LG} = \sqrt{(2/3)} (2\pi / \omega_1)$$

Celková fázová změna během jednoho LG cyklu

$$\alpha_{LG} = |\omega_{PMLG}| t_{LG} = 207.8^\circ$$

„On-resonance“ experiment

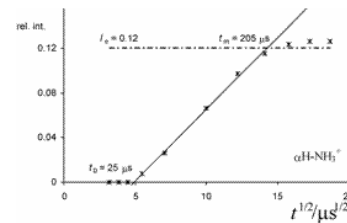
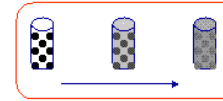
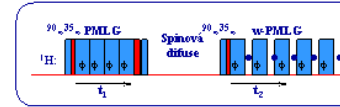
Trajektorie rf pole během cyklu PMLG-9



Podobný přístup reprezentuje fázově modulovaný experiment (PMLG – phase modulated *Lee-Goldburg*), kdy se postupně mění fáze pole B_1 , zatímco ozařovací frekvence zůstává konstantní a je přesně v resonanci. Dipolární interakce je potlačena pokud fázová modulace pulsu splňuje výše uvedenou podmínku. Doba trvání jedné LG ozařovací jednotky odpovídá rotaci ^1H magnetizace kolem efektivního pole o 2π a z toho plyne změna fáze rf pole během jednoho LG cyklu je 208° . Stejně jako v případě FSLG je nutná symetrizace experimentu a to tak, že směr fázové modulace je otočen (invertován) vždy během následujícího LG cyklu. 2D experiment je tedy navržen tak, že po první detekční periodě vrátíme magnetizaci do směru osy z . Pak následuje směšovací perioda. Po té následuje další detekční perioda, která je rozdělena okny.

^1H - ^1H Spinová výměna (difuze)

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



Rychlost spinové výměny: $\frac{\partial M(\gamma, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \left[D_{\frac{\partial}{\partial x}} M(\gamma, t) \right] + \frac{\partial}{\partial y} \left[D_{\frac{\partial}{\partial y}} M(\gamma, t) \right] + \frac{\partial}{\partial z} \left[D_{\frac{\partial}{\partial z}} M(\gamma, t) \right]$

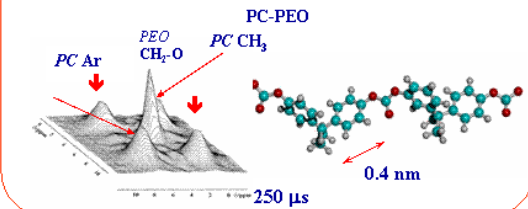
Velikost domény dispergované složky A : $d_A = 2 \frac{\varepsilon}{f_B} \left(\frac{1}{\pi} D_m^s \right)^{1/2}$

Stanovení spin-difusního koeficientu z pološířky:

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

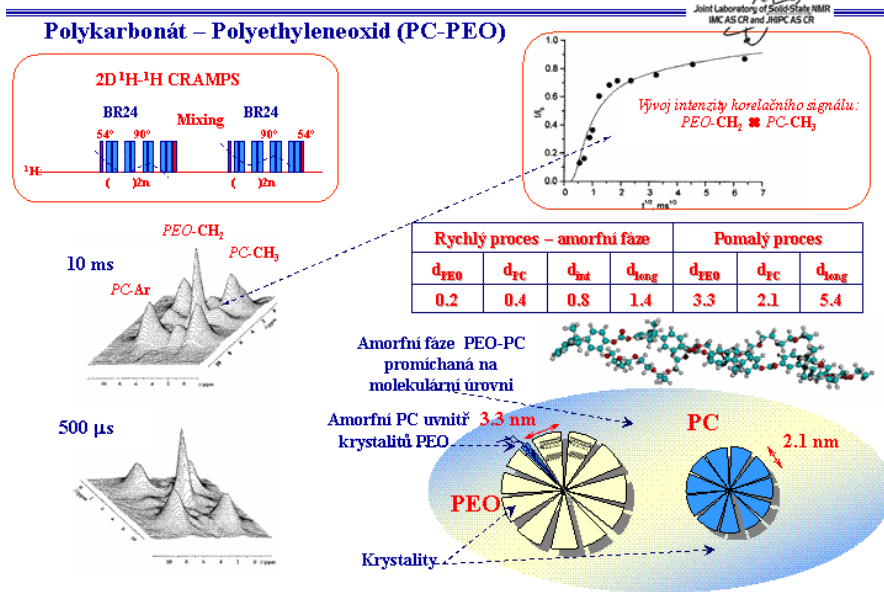
$$D_{mob} = 8.2 \times 10^{-6} T_2^{-1} + 0.007 \quad D_{mob} = 4.4 \times 10^{-5} T_2^{-1} + 0.26$$

Vnitřní kalibrace D : 2D ^1H - ^1H CRAMPS



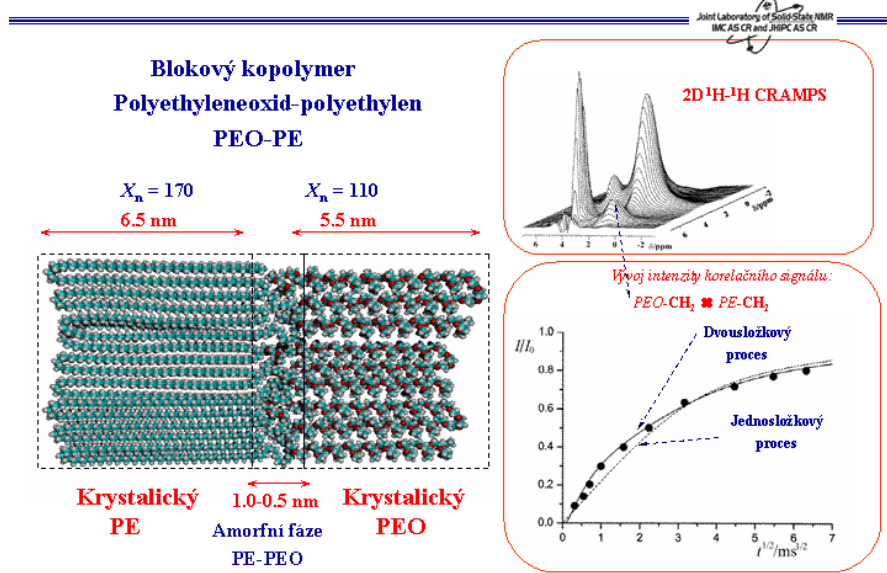
Vznik a přítomnost mimodiagonálních signálů v 2D spektru indikuje prostorovou blízkost funkčních skupin. Z rychlosti výstavby intenzity mimodiagonálního signálu lze získat informace o meziatomové vzdálenosti a také o velikosti jednotlivých složek v heterogenním systému. Při měření meziatomových vzdáleností dojde k ukončení procesu během několika stovek mikrosekund, zatímco při popisu heterogenních systémů trvá celý proces i několik desítek milisekund. Základem pro popis je druhý Fickův zákon a z tohoto důvodu je nutné znát spin-difusní koeficient, odhadnout dimenzionalitu procesu a znát objemový zlomek dispergované složky. Pro určení spin difusního koeficientu byla navržena řada vztahů, které buď využívají pološířky protonového signálu nebo T_2 relaxace. Nejlepší ale je vnitřní kalibrace. To znamená sledovat přenos polarizace mezi strukturálními jednotkami jejichž vzdálenost je známa.

Velikosti domén v polymerních blendech



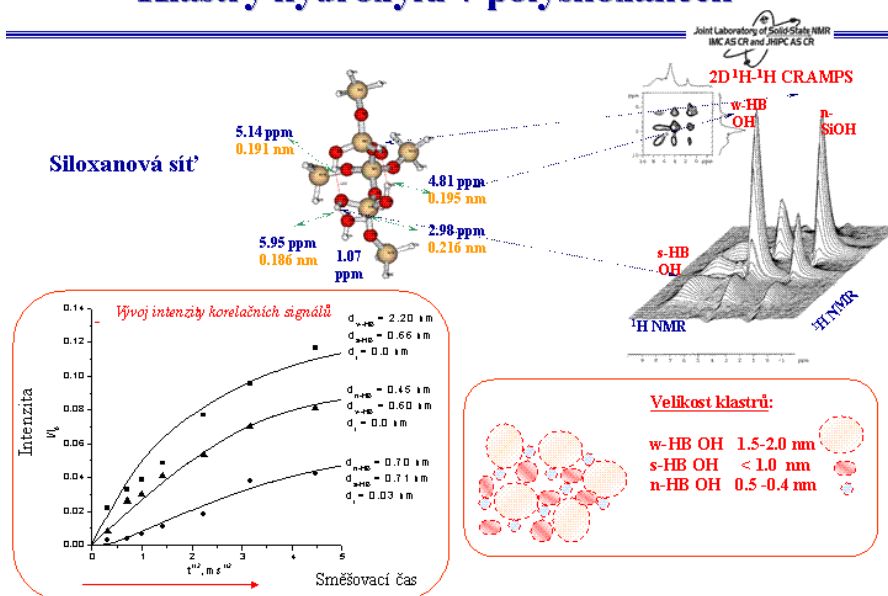
Vhodným příkladem pro aplikaci tohoto 2D experimentu je směs polykarbonát polyethylenoxid (PC-PEO), ve které jsou obě složky semikrystalické. Přítomnost mimodiagonálních signálů potom prozrazuje spinovou difuzi mezi PEO a PC. Systém není zcela fázově separovaný, navíc je díky částečné krystalinitě poněkud komplikovaný. Díky tomu je komplikovaná i interpretace dat. Nejprve je patrný rychlý růst intenzity signálů, který se později zpomalí. To naznačuje složitou morfologii: v amorfni oblasti jsou molekuly obou polymerů téměř intimně promíchány zatímco krystality jsou větší a jsou separovány. Výstavbová křivka pak odráží dva spin-difuzní procesy. První proces je rychlý a reprezentuje spinovou výměnu mezi intimně promíchanými molekulami v amorfni fázi, zatímco pomalý proces souvisí s přenosem magnetizace mezi krystality. Simulací výstavbové křivky pak lze stanovit velikost jednotlivých domén.

Velikost domén v kopolymerech



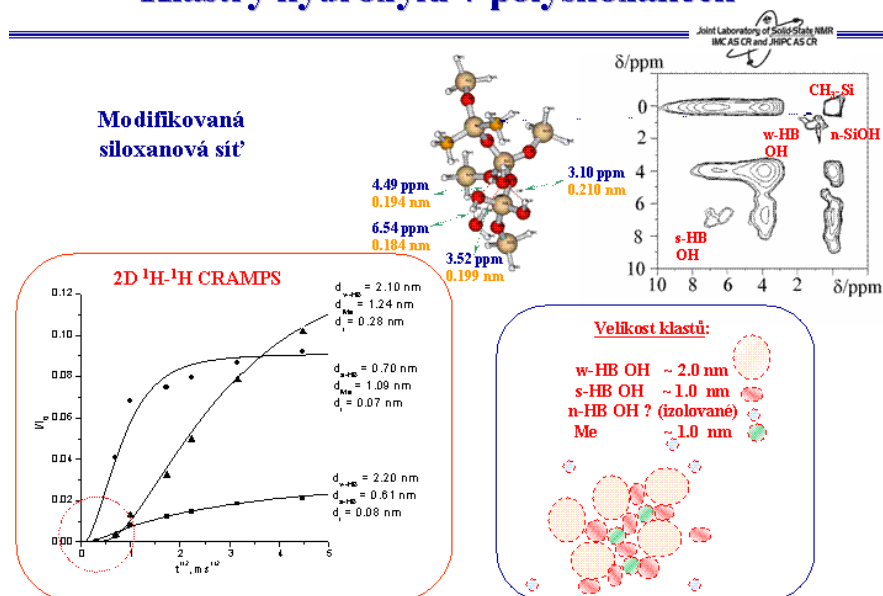
Dalším vhodným příkladem mohou být kopolymery. V tomto případě je to kopolymer PEO a PE. Při detailnějším pohledu na získaná data lze nalézt odchylky od ideálního modelu pro dvě složky a mezifázi. Z odchylek vývoje spinové difuze od ideálního modelu lze odhadovat komplikovanou morfologii mezifázové oblasti na rozhraní polymerních bloků PE a PEO v blokových kopolymerech. Přechod není skokový ani zcela plynulý, ale v amorfni rozhraní dochází ke vzniku malých oblastí 0,5 - 1 nm, kde jsou oba polymerní řetězce propleteny. Mimo to lze určit velikost lamel a z početně průměrného polymeračního stupně i odhadnou počet skladů polymerního řetězce.

Klastry hydroxylů v polysiloxanech



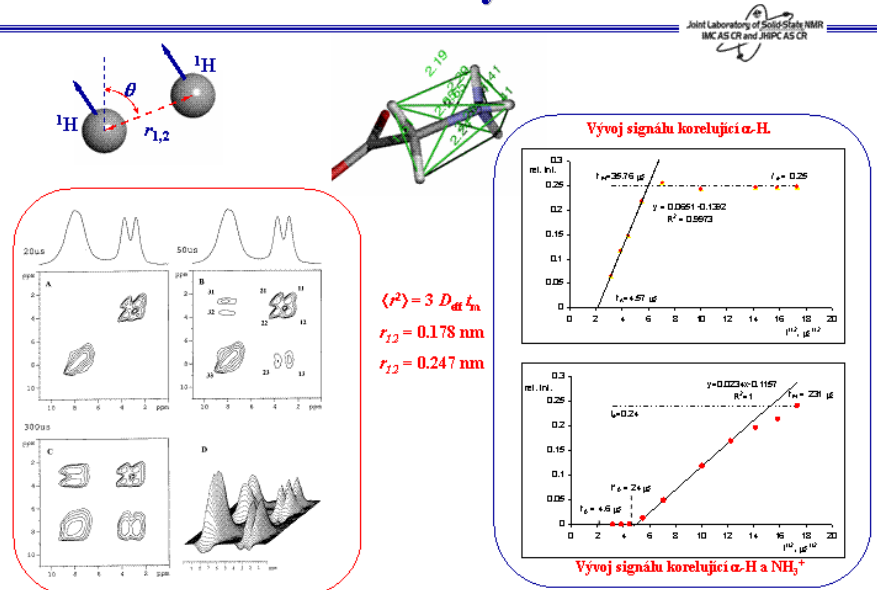
Spin-difuzní procesy a jejich analýzu lze rozšířit a aplikovat i na jiné systémy, nejenom na heterogenní polymerní látky. Tímto způsobem lze také popsat vícesložkové systémy, např. lze stanovit velikost klastrů hydroxylových skupin a sorbované vody na povrchu polysiloxanových sítí. Přítomné klastry se liší průměrnou silou vodíkových vazeb a díky tomu je lze spektrálně rozlišit. Tak lze sledovat jejich útvary o velikosti 0,5-1 nm a dále je možné posoudit i jejich distribuci na povrchu. Vzhledem k tomu, že není indikována přítomnost žádné významné mezifáze, pak je pravděpodobné, že všechny typy hydroxylových skupin jsou spolu ve vzájemném dipolárním kontaktu.

Klastry hydroxylů v polysiloxanech



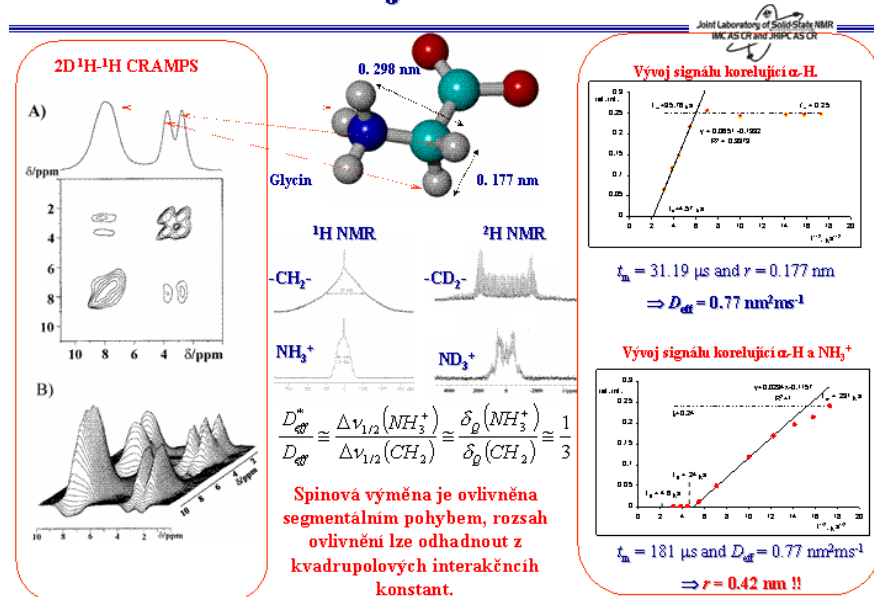
Obdobně lze sledovat a posoudit velikost hydroxylových a methylových útvarů na povrchu modifikovaných siloxanových sítí. Zde je však jasně patrný „sigmoidní tvar“ spin-difuzní závislosti a to naznačuje přítomnost mezifáze nebo „nenáhodnou“ distribuci jednotlivých klastrů. Zdá se rozumné tvrdit, že methylové skupiny jsou obklopeny hydroxylovými klastry se slabší vodíkovou vazbou, za kterými pak následují klastry se silnými vodíkovými vazbami. Na rozdíl od předchozího systému v této siloxanové síti jsou některé SiOH zcela izolované. Opět lze odhadnout velikost jednotlivých útvarů, ovšem pro přesný a rigorózní popis uspořádání je dosažené rozlišení stále příliš hrubé.

Měření meziatomových vzdáleností



Relevantní jsou vzdálenosti 0,1 - 0,5 nm. V tom případě je nutné sledovat velice rychlé procesy, které probíhají v desítkách až stovkách mikrosekund. V předchozích případech to byly jednotky až desítky milisekund. Získaná data pak lze interpretovat jako mezijaderné vzdálenosti. Pokud lze dosáhnout kvalitního spektrálního rozlišení a při znalosti spin-difuzního koeficientu pak z výstavbových křivek by mělo být velmi snadné určit meziatomovou vzdálenost. Navíc doba akvizice jednoho spektra je obvykle méně jak 1-2 hodiny.

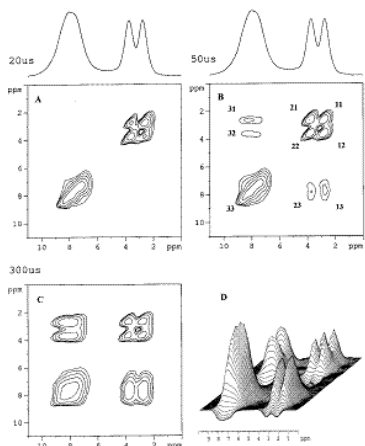
^1H - ^1H mezijaderná vzdálenost



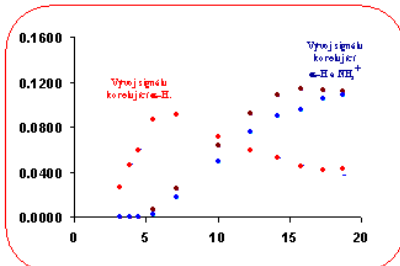
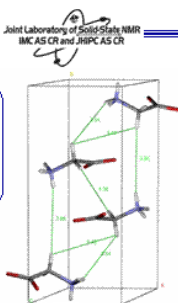
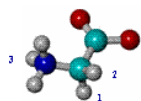
Ale pozor. V těchto případech měření meziatomových vzdáleností se molekula „rozpadá“ na jednotlivé segmenty někdy s rozdílným dynamickým chování. V tomto případě NH_3^+ skupina rotuje zatímco CH_2 je zcela rigidní. To se promítne do velikostí dipolárních interakcí a tedy i do efektivního spin-difuzního koeficientu. Rychlost výměny magnetizace v rigidní skupině mezi neekvivalentními CH_2 vodíky je mnohem rychlejší než v té pohyblivé části. Proto je potřeba tento problém mít na paměti a výpočetně kompenzovat. Určení struktury je tak podmíněno znalostí dynamiky systému. Bohužel ale nedokonalé spektrální rozlišení těchto technik neumožňuje studovat detailní strukturu komplikovanějších systémů. Otvírá se ale jiná možnost využití těchto spin-difuzních experimentů.

Parametry krystalové buňky

Měření ^1H - ^1H meziatomových vzdáleností.



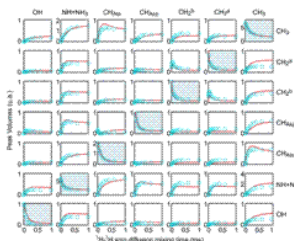
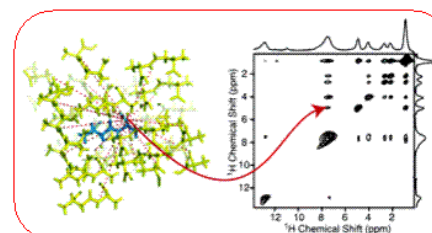
Mezimolekulární vzdálenosti mohou být teoreticky získány z vývoje spinové difuze.



Pro určování meziatomových vzdáleností uvnitř molekuly, tedy pro popis lokální geometrie, se obvykle interpretuje pouze počáteční část spin-difuzní závislosti. Pro delší směšovací doby lze ale někdy pozorovat jisté odchylky ve výstavbě korelačních signálů. Např. tyto korelační signály odrážejí přenos polarizace mezi α -H a NH_3^+ . V ideálním případě by jejich intenzita měla být stejná, jak plyne z neutronových difrakčních dat. To tedy znamená, že sledovaná odchylka musí souviset s uspořádáním molekul v krystalu a s jejich pakování a souvisí tak s mezimolekulárním přenosem polarizace. Teoreticky by tedy bylo možné tuto mezimolekulární vzdálenost vyextrahovat a získat. Bohužel takto získaná vzdálenost je ale nespecifická, je průměrná přes všechny sousední molekuly a orientace.

Parametry krystalové buňky

Elena B. et al.
Solid-state ^1H NMR crystallography, *J. Am. Chem. Soc.* (2005);
127(25):9140.

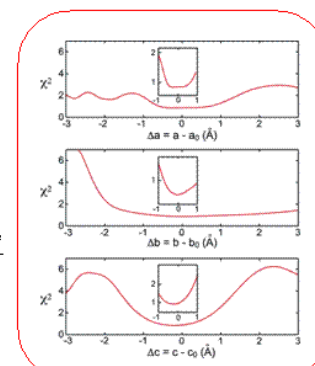


$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{calc}_i - t_i)^2}{\sigma_i^2}$$

$$\frac{dM}{dt} = -K(M - M_0) \quad k_0 = \sum_i \left(\frac{A_i \gamma^2 \hbar^2}{4\pi} \right) \frac{A}{(r_{ij}^3)^4} \quad k_n = -\sum_i k_i$$

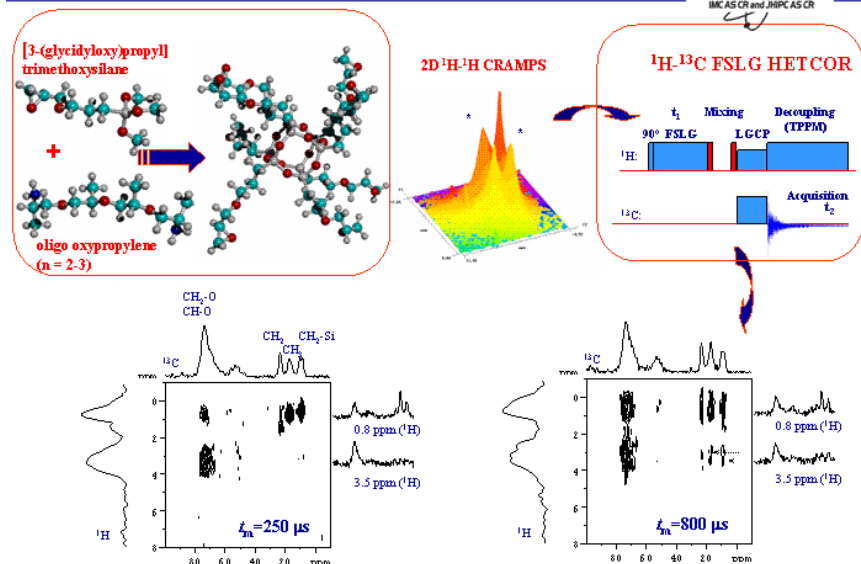
$$M(t, \tau_{SD}) = \exp(-K\tau_{SD})M_i(t, 0) \quad P(\tau_{SD}) = \exp(-K\tau_{SD})M_i^2$$

n ... Functional dependence on internuclear distance



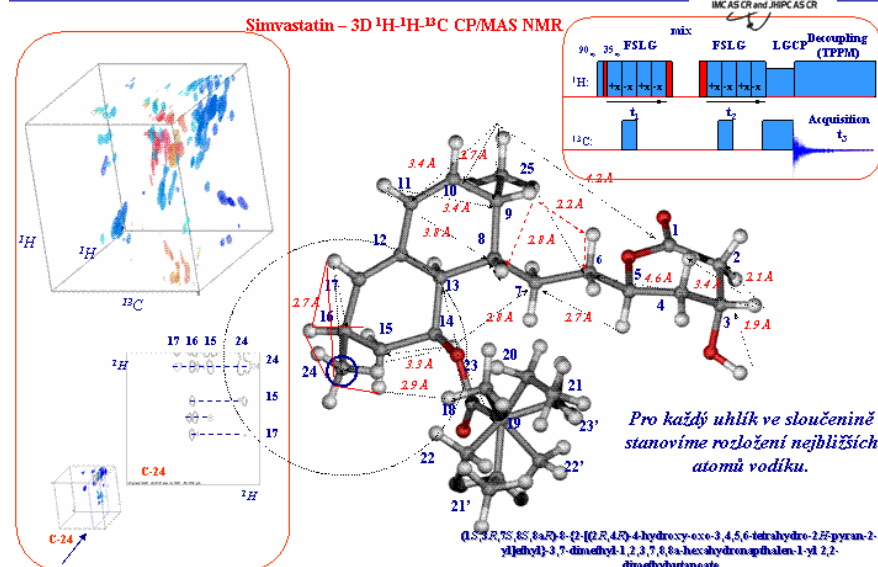
Nicméně, nedávno byl tento přístup rozšířen a zobecněn a bylo ukázáno, tento typ experimentu, pokud se podaří dosáhnout dobrého spektrálního rozlišení, může být s úspěchem použit i k posouzení parametrů krystalové buňky. Výstavbové závislosti totiž skutečně obsahují informace o velikosti krystalové buňky. Vyhodnocení experimentálních dat vychází z řešení klasické kinetické matice pro vývoj intenzity magnetizace. Na jedné straně tuto matici mohou získat experimentálně, ale na straně druhé mohou vývoj magnetizace simulovat na základě navrženého pakování molekul v krystalu. Pro tento účel musím vzít do úvahy všechny vodík-vodíkové vzdálenosti pro centrální molekuly a deset sousedních. Pak lze tuto matici – průběh výstavby matice zkonstruovat a na základě porovnání simulace a experimentálních dat, posoudit kvalitu parametrů krystalové buňky.

Uspořádání polymerních sítí



Jak jsem se již zmínil, slabé spektrální rozlišení limituje využití těchto technik na relativně malé systémy s vysokým stupněm uspořádání. Pro komplikované polymerní systémy je informace velmi rychle ztracena. Např. v případě složitější polymerní sítě dokážeme rozlišit pouze dva signály a to pro nějaké detailní studie je nedostatečné. Pak se musíme pokusit spektrální rozlišení zvýšit. Jednou z možností je zakódování informace o ^1H - ^1H spinové difuzi do uhlíkových chemických posunů. Tato technika byla diskutována v předchozí kapitole. Díky velké disperzi chemických posunů je dosažené spektrální rozlišení již dostatečné k získání hledaných informací.

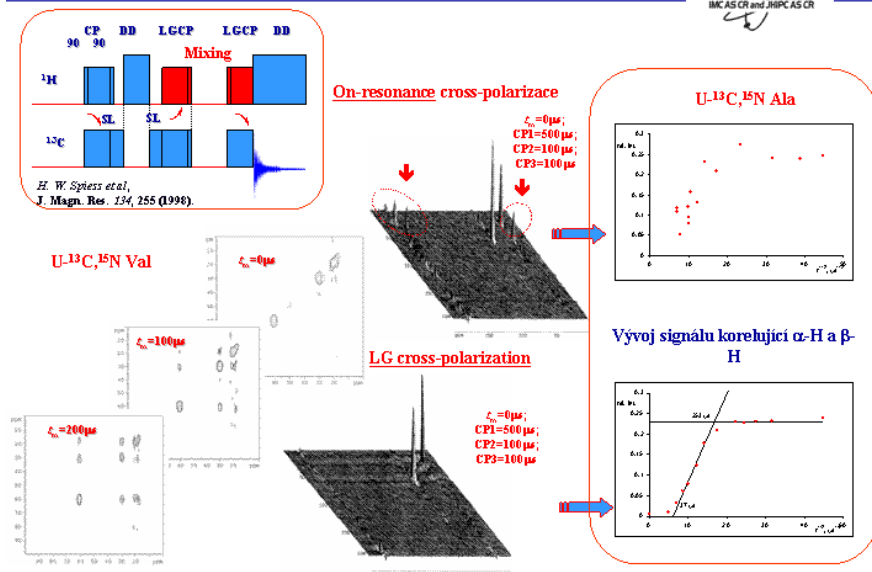
Stanovení struktury – ^1H - ^1H vzdálenost



Chceme-li jít ještě dále pak lze zkombinovat vodík-vodíkový korelační experiment s předchozím vodík-uhlíkovým korelačním experimentem. Problém malého spektrálního rozlišení tím obojím vyřešíme využitím třetího rozměru. Ve dvou rozměrech jsou hodnoty chemických posunů vodíku a ve třetím jsou uhlíkové chemické posuny. To znamená, že kolem každého vybraného atomu uhlíku lze selektivně určit lokální rozložení a geometrii atomů vodíku a to až do vzdálenosti 4 Å. Změřené 3D experimenty ve vhodném směru (v ose uhlíkových chemických posunů) rozřežeme. Podle chemického posunu pro jakoukoli rozlišenou funkční skupinu tak lze získat 2D vodík-vodíkové spektrum. Pro získání potřebných dat je ale nutné provést sérii 3D experimentů. To je již dost časově náročné a vlastně se jedná o 4D experiment. Doba akvizice jednoho 3D spektra je tak 24 hodin.

2D ^{13}C - ^{13}C korelace – ^1H - ^1H spinová difuze

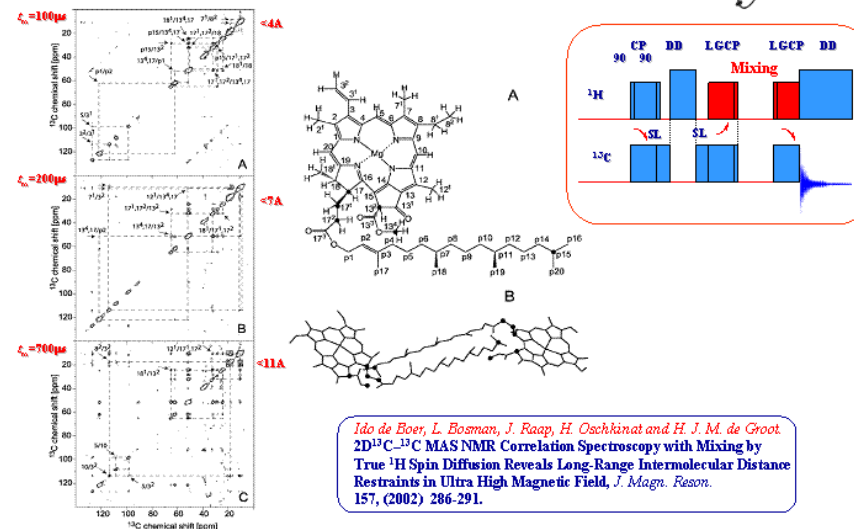
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMC AS CR and JRPSC AS CR



Ale i přes toto vylepšení je spektrální rozlišení ve vodíkové dimenzi kritickým faktorem. Proto se nabízí detekce ^{13}C chemických posunů v obou dimenzích a tak navrhnout a aplikovat experiment, ve kterém je ^{13}C - ^{13}C korelace zprostředkována ^1H - ^1H spinovou výměnou. Samozřejmě v tomto případě je nutné izotopické obohacení vzorku, ale provedením tohoto experimentu s třemi CP bloky lze dosáhnout velmi kvalitních dat. První CP vytvoří transverzální ^{13}C magnetizaci, která se následně vyvíjí podle chemického posunu, pak následuje zpětná LGCP do protonového spinového systému a uložení ^1H magnetizace od osy z. Během směšovací periody dojde ke spinové výměně a nakonec je magnetizace poslední LGCP periodou převedena zpět do ^{13}C systému. Díky tomu je intenzita korelačních signálů závislá pouze na ^1H - ^1H spinové výměně.

2D ^{13}C - ^{13}C korelace – ^1H - ^1H spinová difuze

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



Ido de Boer, L. Bosman, J. Raap, H. Oschkinat and H. J. M. de Groot.
2D ^{13}C - ^{13}C MAS NMR Correlation Spectroscopy with Mixing by
True ^1H Spin Diffusion Reveals Long-Range Intermolecular Distance
Restrains in Ultra High Magnetic Field, *J. Magn. Reson.*
157, (2002) 286-291.

Příkladem využití tohoto experimentu je popis uspořádání komplexu Chlorofilu a/ H_2O . Pro krátké směšovací doby do 100 μs , odpovídají korelační signály pouze intramolekulárním kontaktům. Pro delší časy spinové difuze se objevují další signály, jež indikují mezimolekulární přenos polarizace, a které tak mohou být využity k určení vzájemné orientace molekul. V tomto konkrétním případě byl sledován vznik korelačního signálu mezi koncem řetězce a polycyklickou částí. A to indikuje „back-to-back“ uspořádání, kdy jednotlivé řetězce jsou zcela natažené. Překvapivá je rychlost šíření magnetizace. Během 100 μs dojde k přenosu až do vzdálenosti 4A a po 700 μs je tato vzdálenost dokonce 11A. Nicméně pro kratší směšovací doby, lze tímto způsobem velmi dobře posoudit právě mezimolekulární kontakty a uspořádání molekul v agregátech.