



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

NMR diffuusiomittauksissa

Atte Piisi

Kemia (Fysikaalinen kemia)

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

30.6.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Atte Piisi

Otsikko: NMR diffuusiomittauksissa

Ohjaaja(t): Jukka Lukkari, Henri Kivelä

Sivumäärä: 22 sivua

Päivämäärä: 30.6.2025

Avainsanat: NMR, itsediffuusio

NMR (ydinmagneettinen resonanssi, engl *nuclear magnetic resonance*) -spektroskopia on nykytieteen tehokas työkalu. Sen avulla voidaan karakterisoida erilaisia molekyyliä kemiallisen siirtymän avulla. Vuonna 1945 F. Blochin ja E. M. Purcellin johtamat tutkimusryhmät havaitsivat ensimmäisenä NMR-ilmion. NMR-spektroskopiaa käytetään usein molekyylien rakenteen tutkimiseen, mutta sitä voidaan myös käyttää diffuusiomittauksissa.

Lämpöliikkeestä tapahtuvaa molekyylien satunnaisliikettä kutsutaan itsediffuusioksi. Itsediffuusion mittausta varten kuitenkin pelkkä NMR-mittaus ei riitä. Molekyylien siirtymien mittausta varten täytyy tietää molekyylien lähtöpaikka, jotta voidaan määrittää niiden liike.

Kenttägradienttien avulla voidaan molekyylin magnetisaatioon sisällyttää tietoa sen alkuperäisestä paikasta. Pulssitettujen kenttägradienttien (engl. *PFG, pulsed field gradient*) käyttö tasaisten kenttägradienttien tilalla parantaa spinkaikudiffuusiomittausten tuloksia huomattavasti.[6] PFG:ja käytetään lähes jokaisessa nykyaikaisessa diffuusiomittauksessa.

Yksiulotteisissa mittauksissa PFG:lla indusoidaan magnetisaation muutos ytimille riippuen niiden sijainnista näytteessä. Mittaukseen kuuluu diffuusioaika, jonka aikana molekyylit liikkuvat satunnaisesti näytteessä. Gradienttipulssien indusoimien magneettikenttien summa tietyllä paikalla on nolla, mutta diffuusion takia ytimien spintilasta johtuvat magneettiset momentit eivät käänny takaisin alkuperäiseen suuntaan ja NMR-signaalin intensiteetti pienenee.[8]

Diffuusiomittausten avulla voidaan selvittää esimerkiksi molekyylin koko, muoto, liuotinkyky ja järjestää nämä diffuusiokerroimen avulla eri kemiallisille siirtymille.[6] Näin voidaan molekyylin jokaiselle eri kemiallisen siirtymän arvon saaneelle ytimelle määrittää oma diffuusiokerroimensa.

Kun oletetaan gradientin intensiteetin vaimenevan eksponentiaalisesti ja intensiteetin vaimenema gradientin voimakkuuden funktiona noudattavan Gaussin jakaumaa, diffuusiokerroimen määrittäminen signaalin intensiteetistä onnistuu yhtälön (1) avulla.

$$I = I_0 \cdot e^{-D\gamma^2 G^2 \tau_G^2 \tau_D} \quad (1)$$

missä I on NMR-piikin intensiteetti, D diffuusiokerroin, γ ytimen magnetogyriininen suhde, G kenttägradientin voimakkuus, τ_D diffuusioaika ja τ_G gradienttipulssin kesto.

Diffuusiokerroimet voidaan määrittää jokaiselle NMR-piikille. Näin voidaan tutkia jokaisen ytimen, joka muodostaa piikin NMR-spektriin, diffuusiokerrointa erikseen.

Sisällys

1	Johdanto	4
2	NMR spektroskopia	5
2.1	Ydinmagneettinen resonanssi.....	5
2.2	Toimintaperiaate	6
2.3	Rakenneanalyysit.....	7
2.4	Kenttägradientti.....	9
3	Diffuusiokertoimen määrittäminen	12
3.1	Diffuusion määrittäminen.....	12
3.2	PFG-NMR menetelmät.....	12
3.2.1	Spinkaiku (SE).....	12
3.2.2	Stimuloitu kaiku (STE).....	14
3.3	Longitudinal Eddy-current Delay (LED).....	15
3.4	Bi-polar LED (BPP-LED)	15
3.5	DOSY.....	16
3.6	Diffuusiokertoimen lasku.....	18
4	Tiivistelmä	20
5	Lähteet	21

1 Johdanto

Ydinmagneettinen resonanssi (*engl. Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) havaittiin ilmiönä ensimmäisen kerran F. Blochin ja E.M. Purcellin tutkimusryhmien toimesta jo 1940-luvun puolivälissä.[1], [2], [3]. Ydinmagneettinen resonanssi perustuu NMR-aktiivisiin ytimiin, joilla spinquanttiluku $I \neq 0$. Näitä ytimiä voidaan häiritä vahvassa magneettikentässä ytimien ominaistajuudella radiopulssin avulla, minkä vuoksi niiden spintilassa tapahtuu muutos. Virittävän pulssin jälkeen magneettisen momentin odotusarvolla on magneettikenttää vastainen kohtisuora komponentti, joka prekessoi ytimelle ominaisella Larmor-taajuudella sen palautuessa tasapainotilaansa. NMR-spektroskopiassa havaitaan tämä prekessioliike, mikä mahdollistaa molekyylien rakenteiden ja ominaisuuksien tutkimisen. Voimakkaan ulkoisen magneettikentän ympäristössä, kaikkien ytimien spintilat ovat samassa lähtötilassa. Näytteen ympärille asetetun kelan avulla voidaan hallita, millä taajuuksilla radiopulssia lähetetään tutkittavaan ytimeen ja voidaan tutkia erilaisia NMR-aktiivisiä ytimiä.

Lämpöenergia on molekyylien ja sidosten värähtelyä tai liikettä. Vaikka ulkoista voimaa ei kohdistettaisi nesteeseen molekyylit liikkuvat. Kun molekyylit liikkuvat satunnaisesti, tapahtuu niiden välillä törmäyksiä. Itsediffuusiolla tarkoitetaan molekyylien satunnaisista törmäyksistä johtuvaa kulkeutumista nesteessä. Sille voidaan määrittää diffuusiokerroin, minkä avulla voidaan esimerkiksi mallintaa molekyylien mikroskooppista liikettä, määrittää aineiden liukoisuutta sekä laskea molekyylin hydrodynaaminen säde. NMR-spektroskopian avulla voidaan tutkia diffuusiota ilman systeemin häirintää.

Tutkielman matemaattinen käsittely on rajattu klassisen mekaniikan käsittelyyn, eikä malleja ole esitetty kvanttimekaanisen fysiikan mukaan.

Tutkielmassa luvussa 2 käsitellään NMR-spektroskopian perusteet ja sen yleisempi käyttökohde, rakenneanalyysit, sekä käsitellään kenttägradientit. Luvussa 3 käsitellään diffuusiomittauksiin liittyviä pulssisarjoja, DOSY-mittaukset sekä diffuusiokertoimen lasku.

2 NMR-spektroskopia

Ydinmagneettisen resonanssin (NMR, engl. nuclear magnetic resonance) avulla voidaan karakterisoida ainetta kemiallisen siirtymän avulla. Spinimpulssimomentti J , magneettinen dipolimomentti μ ja ytimen magnetogyriininen suhde γ ovat olennaisimmat suureet NMR-spektroskopiassa[4]

Useimmilla atomien ytimillä on ominaisuus, jota kutsutaan ydinspiniksi. Varauksellisella ytimellä on magneettinen momentti μ , jolla on suuruus ja suunta. Spiniä kuvataan spinkvanttiluvulla I . Mikäli spinkvanttiluku $I \neq 0$, on ydin NMR-aktiivinen. Atomien yleisimmät isotoopit ovat harvoin hyödyllisiä NMR-spektroskopiassa. Poikkeuksena ^1H -ydin eli protoni, jonka spinkvanttiluku $I = \frac{1}{2}$ ja sen luontainen esiintymä on 99,98 %, joten se on äärimmäisen käyttökelpoinen ydin NMR-spektroskopiassa. [4] Suuren luontaisen esiintymän vuoksi lähes kaikkia vetyä sisältäviä molekyyliä voidaan tutkia NMR-spektroskopian avulla. Muita NMR-aktiivisia ytimiä voidaan käyttää NMR-spektroskopiassa. Esimerkiksi ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F ja ^{35}Cl ovat kaikki NMR-aktiivisia, mutta mikään ei ole orgaanisessa kemiassa yhtä yleinen ydin kuin vety. Jatkossa keskitymme ^1H -NMR spektroskopian tutkimuksiin.

2.1 Ydinmagneettinen resonanssi

Ilman ulkoista magneettikenttää atomiytimien momentit suuntautuvat satunnaisesti. Kun ytimet altistetaan ulkoiselle magneettikentälle, ytimien spinit suuntautuvat kentän suuntaiseksi tai vastaiseksi[4]. Ydinmagneettinen resonanssi tapahtuu, kun magneettikentän mukaisesti suuntautuneet ytimet absorboivat energiaa ja muuttavat niiden spinin suuntaa magneettikenttään nähden[4]. Absorboituvan energian täytyy olla yhtä suurta kuin energiatilojen erotus.

$$E_{abs} = \left(E_{-\frac{1}{2}} - E_{+\frac{1}{2}} \right) = h\nu \quad (1)$$

Spinenergiatilojen erotus on magneettikentän voimakkuuden funktio. Magneettikentässä oleva ydin alkaa prekessoimaan oman spinakselinsa ympäri kulmataajuudella ω , jota kutsutaan ytimen Larmor-taajuudeksi[4]. Absorptio tapahtuu, kun $\nu = \omega$

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} \mathbf{B}_0 = h\nu \quad (2)$$

Missä γ on magnetogyriininen suhde eli magneettisen momentin ja kulmamomentin suhde. Vedyille $\gamma = 2,675 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}\text{T}^{-1}$. Magnetogyriininen suhde on jokaiselle ytimelle ominainen vakio. Kun Larmor-taajuudella tuleva säteily osuu ytimeen, sen spintila muuttuu. Tätä kutsutaan resonanssiksi.

Ytimiä ympäröivät elektronit suojaavat sitä ulkoiselta magneettikentältä, koska niiden liike magneettikentässä tuottaa oman magneettikentän, mikä vastustaa ulkoista magneettikenttää \mathbf{B}_0 . Tätä ilmiötä kutsutaan diamagneettiseksi varjostus (engl. *diamagnetic shielding*)[4]. Varjostus aiheuttaa hyvin pieniä muutoksia resonanssitaajuudessa, jotka riippuvat myös magneettikentän voimakkuudesta. Koska kemiallisen siirtymän muutokset ovat hyvin pieniä, helpointa on asettaa liuokseen standardi,

minkä resonanssitaajuuteen verrataan muiden ytimien tuottamia piikkejä. Yleisimmin käytetty standardi on tetrametyylisilaani (TMS, $(CH_3)_4Si$). TMS:a käytetään, koska sen protoneilla on hyvin suuri varjostus ja poolittoman TMS:n 1H -piikin paikka ei riipu voimakkaasti liuottimesta tai sen koostumuksesta. Mittauksessa siis ilmoitetaan, kuinka paljon ytimen resonanssitaajuus on siirtynyt TMS:sta[4].

Koska magneettikentän voimakuus vaikuttaa resonanssitaajuuteen, on helpompaa käyttää asteikkona jotain, mikä on vertailukelpoinen kaikkien mittauslaitteiden välillä. Siksi mittauksen asteikkona ei toimi Hz vaan kemiallinen siirtymä (δ , ppm). δ saadaan[5]

$$\delta \text{ (ppm)} = \frac{\nu_{\text{ydin}} - \nu_{\text{refrenssi}}}{\nu_{\text{refrenssi}}} \quad (3)$$

2.2 Toimintaperiaate

NMR-laite tuottaa z-akselin suuntaisen magneettikentän B_0 . Ytimien magneettisten momenttien odotusarvot järjestäytyvät samansuuntaisesti ulkoista magneettikenttää B_0 kohden ja muodostuu nettomagnetisaatio M_0 . Näytteen ympärillä olevaan satulakelaan lähetetään ytimen ominaisella resonanssitaajuudella pulssi, joka kääntää ytimen magnetisaatiovektorin pois z-akselilta[4].

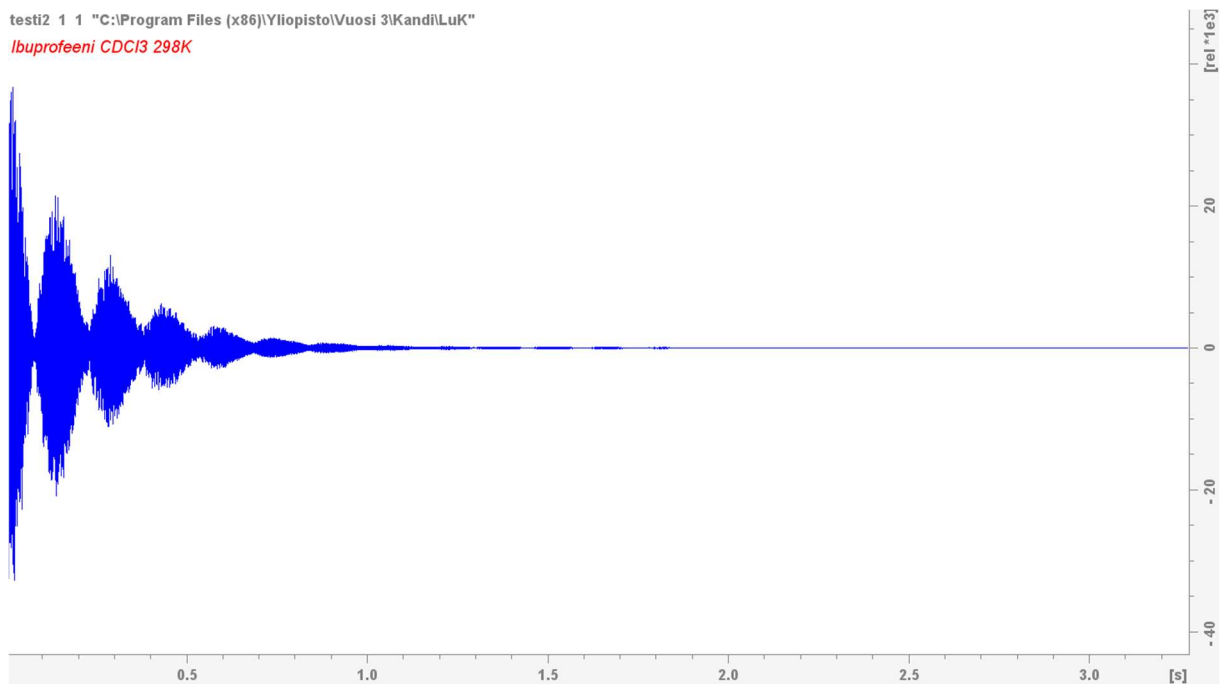
Moderneissa laitteissa pulssina käytetään hyvin lyhyttä radiopulssia. RF-lähetintä voidaan kuvata matemaattisesti harmonisena oskillaattorina. Fourier-epätarkkuusperiaatteen mukaan tarkan aallonpituuden havaitsemiseksi, signaalin keston täytyy olla pitkä. RF-lähettimen lähettämä radiopulssi sisältää muitakin taajuuksia, koska radiopulssin kesto on liian lyhyt tarkan aallonpituuden syntymiseen. Taajuusväli on tarpeeksi suuri, että voidaan virittää näytteen koko 1H -taajuusalue ja niiden spintila muuttuu[4]. Tämä on suuri etu moderneille NMR-laitteille, sillä mittausaika lyhenee huomattavasti, kun kaikki tutkittavat ytimet saadaan virittymään samanaikaisesti.

Pulssin jälkeen ytimet prekessoivat Larmor-taajuudella takaisin magneettikentän B_0 suuntaiseksi. Relaksaation aikana molekyylistä vapautuu sähkömagneettista säteilyä ytimelle ominaisella Larmor-taajuudella. Prekessioliikkeen pyörivä magnetisaatiovektori indusoi laitteen satulakelaan sähkövirtaa, mikä voidaan havaita. Ennen signaalin keräystä täytyy odottaa lyhyt aika, minkä jälkeen resonanssi saavuttaa suurimman arvonsa.

Molekyylissä on erilaisia ytimiä, jotka vapauttavat sähkömagneettista säteilyä samanaikaisesti. Säteily indusoi sähkövirtaa satulakelaan, mikä vahvistetaan ja digitoidaan. Havaitaan FID (*Free Induction Decay*) -signaali. FID-signaali on muodoltaan vaimeneva siniaalto, sillä ytimet emittoivat vähemmän sähkömagneettista säteilyä, kun niiden prekessio lähenee alkutilaa.

FID-signaali on hyvin kompleksi, sillä siinä on kaikki molekyyllissä olevien ytimien emittoimat sähkömagneettiset signaalit. Signaalille voidaan tehdä Fourier-muunnos, josta saadaan NMR-spektri.

[4]



Kuva 1. ^1H -FID-signaali ibuprofeenista.

FID-signaali on kelaan indusoituneen jännitesignaalin intensiteetti ajan funktiona. FID-signaalille voidaan tehdä Fourier-muunnos, millä saadaan x-akselille kemiallinen siirtymä ja y-akselille piikin intensiteetti. Fourier muunnoksen jälkeen voidaan lukea NMR-spektri.

2.3 Rakenneanalyysit

Yleisin ja tutuin käyttökohte NMR-spektroskopiaalle on rakenneanalyysit. Rakenneanalyysien tekeminen NMR-spektroskopian avulla on helppoa, nopeaa ja tarkkaa. ^1H - ja ^{13}C -spektrit ovat tärkeimpiä työkaluja orgaanisten yhdisteiden rakenteiden tunnistamisessa. Kemiallisten siirtymien avulla pystytään päättelemään paljon molekyylin rakenteesta.

Protonien kemialliseen siirtymään vaikuttaa niiden kemiallinen ympäristö. Eri kemiallisissa ympäristöissä ytimien varjostus muuttuu, joka vaikuttaa niiden ominaistaajuuteen. Suurin vaikutus tulee elektronegatiivisista substituenteista. Molekyylien tai funktionaalisten ryhmien tunnistamisessa jo esitelty diamagneettinen varjostus on tärkeässä roolissa. Elektronegatiiviset substituentit vähentävät diamagneettista varjostusta ytimeltä, mikä kasvattaa sen kemiallisen siirtymän arvoa spektrissä.[4] Esimerkiksi happi on hyvin elektronegatiivinen atomi ja se vähentää diamagneettista suojausta vedyltä huomattavasti ja siksi RCOOH vety havaitaan spektrissä 11–12 ppm alueella. Elektronegatiivisuuden vaikutus vähenee huomattavasti, kun etäisyys tutkittavaan ytimeen kasvaa.

Elektronegatiivisuus ei ole ainoa kemialliseen siirtymään vaikuttava tekijä. Hiilen hybridisaation muodostamat π -sidokset vähentävät protonien suojausta. sp^3 hiileen sitoutunut protoni saa enemmän

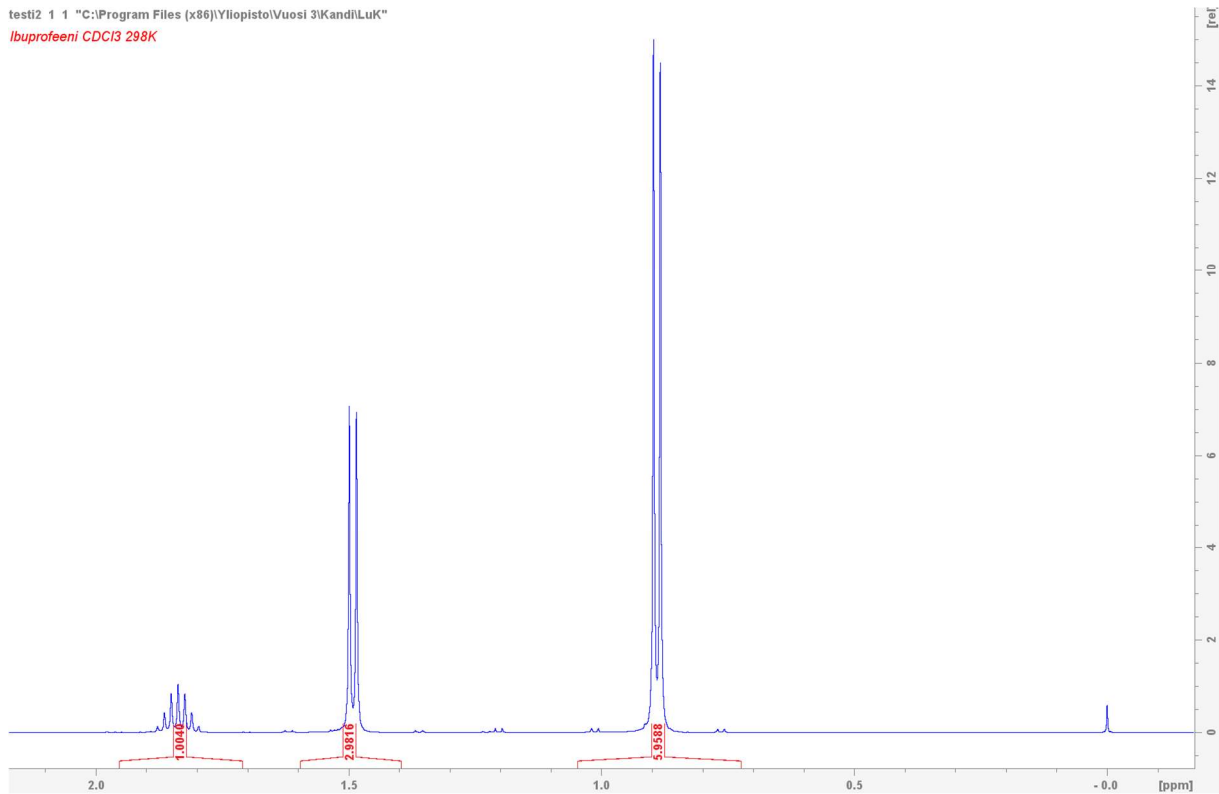
suojausta kuin sp^2 hiileen sitoutunut protoni. Hiilen p-orbitaali on kauempana hiiliytimestä kuin s-orbitaali, joten vetyprotonilla on vähemmän varjostusta. Poikkeuksena näihin sääntöihin ovat esimerkiksi aromaattiset yhdisteet. Kun bentseeni asetetaan magneettikenttään, vapaasti kulkevat π -elektronit kiertävät aromaattista rengasta ympäri. Elektronien kiertoa kutsutaan rengasvirraksi (*engl. ring current*).[4] Kiertävät elektronit muodostavat magneettikentän, mikä vaikuttaa kiinnittyneiden protonien absorptiotaajuuteen.

Nykyään on taulukoitu lähes kaikki funktionaaliset ryhmät ja niiden kemialliset siirtymät.[4] Näiden avulla voidaan liuksesta tutkia molekyylien funktionaalisia ryhmiä tarkasti.

Kemiallisesta siirtymästä saadaan tietoa funktionaalisesta ryhmästä, johon protoni on kiinnittynyt, mutta ei niiden määrästä. Protonien määrää voidaan tutkia integroimalla spektriin piirtyneen piikin pinta-ala. Pinta-ala ei anna absoluuttista protonien määrää yhdisteessä, vaan niiden suhdeluvun muiden protonien määrään.[4] Pinta-alan määrittäminen helpottaa rakenneanalyysiä huomattavasti, sillä kahden funktionaalisen ryhmän kemiallinen siirtymä yhdisteessä voi olla hyvin lähellä toisiaan, mutta protonien määrä on eri.

Kolmas tärkeä asia rakenneanalyseissa on spin-spin-jakautuminen (*engl. spin-spin splitting*). Spektriin muodostuva piikki ei ole aina vain yksi piikki, vaan usein se on jakautunut. Ydin resonoi useammalla resonanssitaajuudella riippuen sen kytkentänaapureista. Jos protoni on yhden kytkennän päässä toisesta protonista, jakautuu spektriin muodostuva piikki kahteen. Spin-spin-jakautuminen tapahtuu, jos yhden kytkennän päässä olevassa kemiallisesti identtisessä vedyssä on eri spin. Jos kytkennän päässä olevalla protonilla on spin $+\frac{1}{2}$ ja toisella kemiallisesti identtisellä vedyllä on spin $-\frac{1}{2}$, tapahtuu spin-spin jakautuminen spektrissä. Protonin kemiallinen siirtymä on riippuvainen toisen protonin spinistä, joten ne ovat kytkeytyneet (*engl. coupled*). Kun spinit ovat erilaiset, protonin suojaus vähenee ja sen ppm arvo kasvaa. Kytkeytyneiden spinien määrä vaikuttaa NMR-piikkien määrään seuraamalla kaavaa $n+1$, missä n on kytkentänaapureiden määrä. Kytkentää kutsutaan nimellä J -kytkentä.[4]

Kytkenät tapahtuvat kahden NMR-aktiivisen ytimen välillä. J -kytkennät voivat olla homo- tai heteroytimisiä ja ne voivat kulkeutua myös useamman sidoksen yli. 1J -kytkentöillä tarkoitetaan yhden sidoksen yli kulkeutuvia kytkentöjä esimerkiksi $^1J(^{13}C - ^1H) = 156 \text{ Hz}$. [4] 3J -kytkennät kulkeutuvat kolmen sidoksen yli, esimerkiksi H-C-C-H molekyyliosassa vedyt ovat kytkeytyneet $^3J(^1H - ^1H) = 8 \text{ Hz}$. J :n arvo saadaan helposti mittaamalla spektristä multipliettien piikkien väli. Sen arvo ei riipu laitteen tuottaman magneettikentän voimakkuudesta. J on siis kytkentävakio



Kuva 2. Ibuprofeenin ¹H-spektri 0–2,3 ppm alueella.

Ibuprofeenin spektrissä 1,85 ppm alueella havaittu piikki on jakautunut yhdeksään osaan. Sillä on siis kahdeksan kemiallisesti ekvivalenttia kytkentänaapurua. Ibuprofeenin rakenteesta voidaan tunnistaa tämä ydin etsimällä protoni, jolla on yhden ³J kytkennän päässä kahdeksan kemiallisesti ekvivalenttia vetyä.

2.4 Kenttägradientti

Kenttägradientti on näytteen alueelle luotu magneettikenttä, jolla muutetaan magneettikentän z-komponenttia paikkaan verrannollisesti. Kenttägradientit indusoidaan ulkoisten kelojen avulla näytteen alueen päälle. Niitä voidaan käyttää päämagneettikentän **B**₀ homogenisoimiseksi tai homogenisuuden poistamiseksi. Kenttägradientin avulla voidaan asettaa magnetisaatioille eri suunta riippuen ytimen sijainnista näytteessä. [6]

Kuvassa 3 havainnollistetaan kenttägradientin vaikutusta näytteen ytimien magnetisaatiovektorin vaiheeseen. 90° RF-pulssin jälkeen magnetisaatiot ovat y-akselin suuntaisia, mutta kenttägradienttipulssin jälkeen ytimen magnetisaatiovektori saa vaihekulman z-akselin sijainnin mukaan.[7]

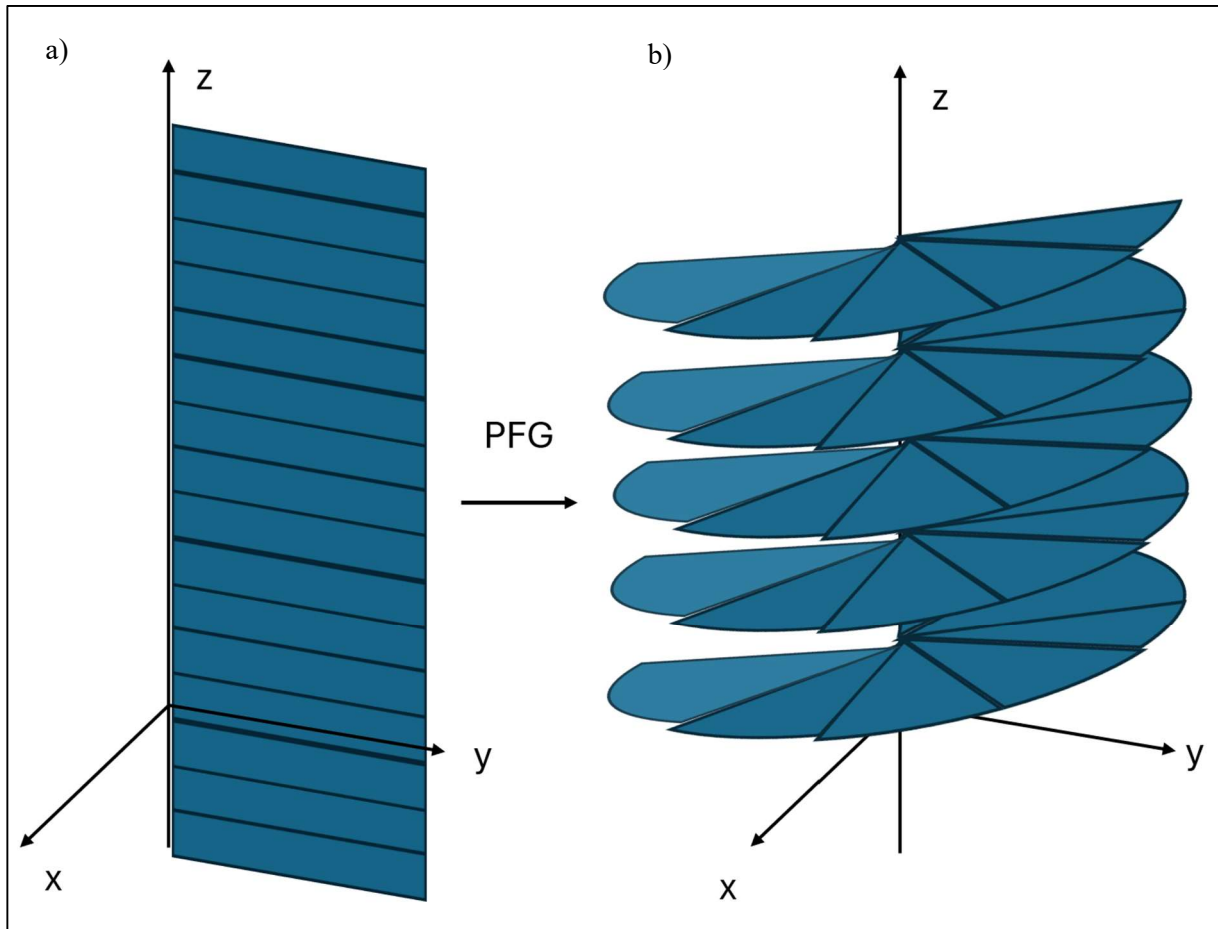
Kenttägradientin **g** kanssa ulkoinen magneettikenttä paikassa **r** on [7]

$$B_z(r) = B_0 + \mathbf{g} \cdot \mathbf{r} \quad (5)$$

Yllä oletamme vain z-suuntaisen gradientin vaikuttavan ytimen spiniin. Koska spinit prekessoivat kulmataajuudella $\omega(\mathbf{r}) = -\gamma B(\mathbf{r})$ ja saatu vaihe riippuu magneettikentästä $B(\mathbf{r})$ ja gradientin kestosta. Kestoltaan δ oleva z-gradienttipulssi tuottaa z-koordinaatista riippuvan vaihekulman[7]

$$\phi(z) = -\gamma B(z)\delta = -\gamma(\mathbf{B}_0 + gz)\delta \quad (6)$$

Vaihekulman muutosta voidaan ajatella ruuvikierteen muodostumisena magnetisaatioille kuvan 3 mukaan. Ruuvikierteen muodostuminen määräytyy vaihekulman muutoksen mukaan $\Delta\phi(z) = -(\gamma g \delta)z$. Ruuvikierteen nousua $\Lambda = \frac{2\pi}{q}$, missä $q = \gamma g \delta$ kuvaa gradienttipulssin pinta-alaa, jonka yksikkö on m^{-1} . [7]



Kuva 3. a) Näytteen magnetisaatiovektoreiden suunat 90° RF-pulssin jälkeen, sekä **b)** kenttägradienttipulssin jälkeen.[7]

Tätä magnetisaatiovektorin vaiheen muutosta voidaan hyödyntää esimerkiksi magneettikuvauksissa ja diffuusiomittauksissa. Niissä magnetisaation avulla voidaan tehdä mittauksia esimerkiksi kudoksien koosta ilman invaasiota. Magneettikuvauksissa kelojen avulla luodaan gradientteja jokaiseen kolmeen ulottuvuuteen.

Z-suuntaisella kenttägradientilla halutaan tuottaa tietty vaihekulma magnetisaatiovektoreille, mikä riippuu niiden sijainnista z-akselilla. Kenttägradienttien kytkeminen päälle ja pois muuttaa magneettivuon tiheyttä, mikä indusoi pyörrevirtauksia (engl. *Eddy current*). Pyörrevirtaukset tuottavat

magneettikenttiä, mitkä häiritsevät ytimen magnetisaatiovektorin vaihekulman muutosta, jolloin vaihekulma ei ole enää suoraan verrannollinen ytimen sijaintiin z-akselilla. Pyörrevirtaukset katoavat pienen ajan kuluttua, joten niiden vaikutusta voidaan pienentää lisäämällä viive gradienttipulssinannon jälkeen ennen keräysaikaa.[8]

3 Diffuusiokertoimen määrittäminen

3.1 Diffuusion määrittäminen

Tässä tutkielmassa puhutaan itsediffuusiosta sekä itsediffuusiokertoimista. Itsediffuusio ei johdu aineen konsentraatioeroista, vaan liuotinmolekyylien ja tutkittavan molekyylin satunnaisiin törmäyksiin, mitä kutsutaan Brownin liikkeeksi. Brownin liike on täysin satunnaista molekyylien liikettä, mitä voidaan mallintaa todennäköisyyksien avulla. Liuotinkyvyn ja molekyylin molekulaarisen liikkeen tutkiminen perustuu tähän satunnaisprosessiin.

Kun NMR-mittauksiin esiteltiin kaksi taajuusulottuvuutta, voitiin alkaa tutkia molekyyliä ja niiden vuorovaikutuksia tarkemmin DOSY-menetelmällä, minkä keskiössä itsediffuusiokerroin on. Diffuusiokerroin (D) riippuu kitkakertoimista eli lämpötilasta ja väliaineen vastuksesta.[7] Debye-Einstein teorian mukaan:

$$D = \frac{k_B T}{f_T} \quad (7)$$

missä k_B on Boltzmanin vakio, T on lämpötila ja f_T on kitkatekijä. Ympyränmuotoiselle partikkelille, millä on hydrodynaaminen säde r_H , liuotimessa, jonka viskositeetti on η , kitkatekijät $f_T = 6\pi\eta r_H$. [7] Elektroforeesin liikkuvuus määritellään $\mu = v/E_{ac}$, missä E_{ac} on sähkökentän voimakkuus ja v on varatun hiukkasen rajanopeus (*engl. terminal velocity*). Ei ole yksinkertaista kaavaa kuvaamaan molekulaaristen ominaisuuksien suhdetta elektroforeesiseen liikkuvuuteen, mutta pienillä ioneilla μ on verrannollinen kokonaisvaraukseen ja kääntäen verrannollinen kitkatekijöihin.[7]

Pulssitettujen kenttägradienttien hyödyntäminen diffuusiomittauksissa on helposti ymmärrettävää, koska niiden avulla voidaan leimata ytimien magnetisaatiovektoreiden vaihekulmia z-akselin sijainnin mukaan. Ennen diffuusiomittausten käsittelyä, tulee tutustua mittauksen menetelmiin, millä voidaan tutkia diffuusiota.

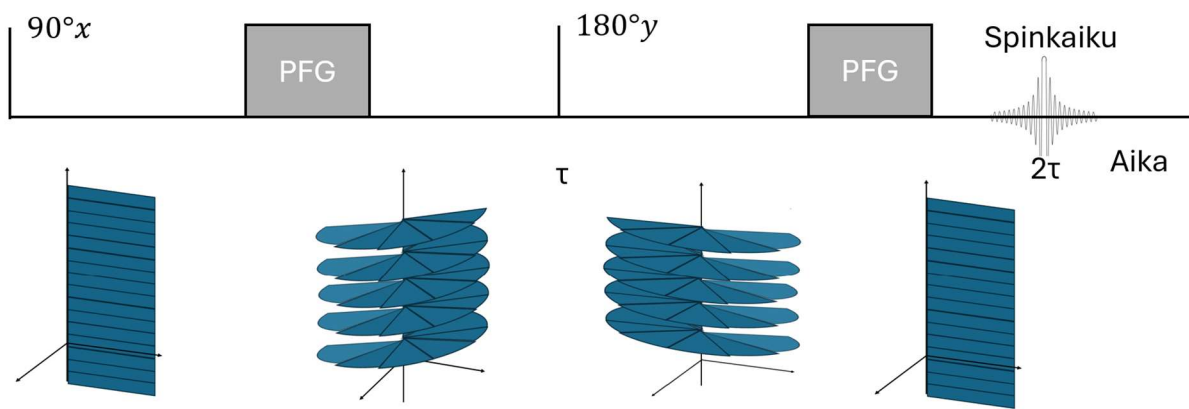
3.2 PFG-NMR menetelmät

Ennen diffuusiokertoimien määrittäystä täytyy tutustua erilaisiin menetelmiin, joilla voidaan havaita diffuusiota nesteessä. Itsediffuusion mittaaminen on ollut hankalaa ennen PFG-NMR menetelmiä. PFG-NMR luo täydelliset mahdollisuudet tutkia aineen diffuusiota lisäämättä aineeseen itsessään mitään. Seuraavaksi käydään läpi, minkälaisia mittaustekniikoita voidaan käyttää hyödyksi diffuusiokertoimien määrittäystä varten.

3.2.1 Spinkaiku (SE)

Spinkaiku (*engl. spin echo, SE*) -mittauksessa gradienttipulssin avulla ytimien magnetisaatiovektorin vaihekulman muutokseen lisätään tietoa ytimien sijainnista z-akselilla. Tavallisessa NMR-mittauksessa heti 90° pulssin jälkeen havaittava FID-signaali syntyy ydinmagnetisaatioiden prekessiosta samalla, kun

se palaa takaisin alkuperäiseen asentoon. Rakentamalla sopiva pulssisarja RF- ja z-gradienttipulssista (esim. Kuva 4), voidaan poikittainen nettomagnetisaatio ensin hävittää ja sitten palauttaa takaisin myöhemmällä ajanhetkellä. Uudelleen fokuoitetun eli palautunutta magnetisaatiota kutsutaan spinkaiuksi tai Hahn-kaiuksi. Gradienttipulssin tuottama magnetisaatiovektoreiden vaihekulma hävittää nettomagnetisaation ja signaalia ei havaita, ellei magnetisaatiovektoreita palauteta takaisin samanvaiheisiksi, missä ne olivat ennen gradienttipulssia. Tarvitaan siis kaksi gradienttipulssia, joista toinen muodostaa kierrerruuvin ja toinen magnetisaatiovektoreiden vaihekulmien palautukseen. Gradienttipulssien pinta-ala täytyy olla sama, jotta magnetisaatiovektorien vaihekulmat palautuvat takaisin samoiksi. Magnetisaatioiden refokusointi tuottaa spinkaiun. Magnetisaatiovektorien prekessioliikkeen indusoima sähkövirta tallennetaan FID-signaalina. [6], [7]



Kuva 4. Yksinkertainen Stejskal-Tanner spinikaikupulssisarja. [6]

Stejskal-Tanner PFG-SE-diffuusiomittaus on yksinkertaisin spinikaikumittaus. Siinä tuotetaan ensin 90° radiopulssi. 90° radiopulssin jälkeen, kuten tavallisessa NMR-mittauksessa, muodostuu FID-signaali. PFG-SE-mittauksessa sitä ei kerätä. Ensimmäisen radiopulssin jälkeen kenttägradientin avulla annetaan gradienttipulssi PFG. PFG muuttaa magnetisaatiovektorin vaihekulmaa riippuen molekyylin sijainnista z-akselilla. Seuraavaksi ajassa τ annettavan 180° RF-pulssin tarkoitus on kääntää magnetisaation ruuvikierre peilikuvaksi y-akselille, silloin seuraavaksi annettavana gradienttipulssina voidaan käyttää samaa gradienttipulssia kuin aluksi. [7] Jälkimmäinen gradienttipulssi, yhdessä 180°_y RF-pulssin kanssa, palauttavat magnetisaatiovektorit takaisin samanvaiheisiksi. Hyvin homogeenisessä magneettikentässä, missä gradienttipulssien pinta-alat ovat yhtä suuret, havaitaan spinikaiku ajassa 2τ , jonka amplitudi saadaan yhtälöstä

$$\psi(2\tau) = \frac{S(2\tau)}{S_0(2\tau)} = \frac{M_0 \cdot e^{-\frac{2\tau}{T_2}} \cdot e^{-Dq^2(\Delta-\frac{\delta}{3})}}{S_0(2\tau)} \quad (8)$$

missä M_0 on ytimien nettomagnetisaatio, $q = \gamma g \delta$ on gradienttipulssin pinta-ala, Δ on ensimmäisen ja jälkimmäisen gradienttipulssin välinen aika eli diffuusioaika, D on diffuusiokerroin ja S_0 on kaiun amplitudi ilman gradientteja.

Mikäli diffuusiota ei tapahdu, intensiteetti pysyy täysin samana, sillä gradientit ovat kumonnet toistensa vaikutuksen. Mikäli molekyylit liikkuvat eri paikkaan z-akselilla, jälkimmäinen gradienttipulssi ei kumoa magnetisaatiovektoreiden vaiheleimaa täydellisesti, jolloin nettomagnetisaatio vähenee ja intensiteetti vaimenee. Intensiteetin vaimenemasta voidaan laskea diffuusiokerroin.

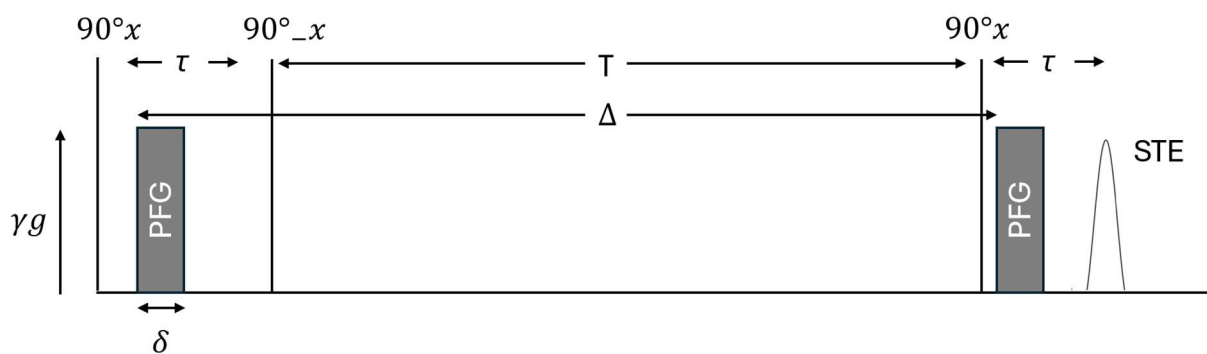
Spinkaikumittaus on hyvin herkkä mittaus. Sen heikkoudet johtuvat pitkästä ajasta, kun magnetisaatiovektorit ovat xy-tasolla, missä niihin vaikuttavat J -modulaatiot sekä spin-spin relaksaatiot. Spin-spin relaksaatioaika eli T_2 voi olla lyhyt joillakin suurilla molekyyyleillä, mikä voi johtaa signaalin menettämiseen. J -modulaatioilla tarkoitetaan signaalien muutoksia, mitkä johtuvat ytimen spin-spin-kytkennöistä, mikä myös heikentää signaalia. Näiden yhteisvaikutus tuottaa ongelmia vahvasti kytkeytyneille spintiloille. [7] Nykyään on kehitetty pulssisarjoja, mitkä eivät perustu spinkaikuun ja ovat paljon tarkempia mittauksia myös suurille molekyyyleille, joilla T_2 relaksaatioaika on lyhyempi.

3.2.2 Stimuloitu kaiku (STE)

Stimuloitujen kaiden diffuusiomittaukset ovat periaatteiltaan täysin samaa. Käytetty gradienttipulssisarja on monimutkaisempi. Erwin Hahn tutki pulssisarjoja, missä oli kaksi tai kolme 90° RF-pulssia.

Kolmen pulssin sarjalla hän pystyi tuottamaan tasaisella gradientilla jopa viisi kaikuja. Ensimmäinen kaiku kolmannen RF-pulssin jälkeen on stimuloitu kaiku (*engl. stimulated echo*). [6], [7]

Stimuloitujen kaiden gradienttina voidaan käyttää jatkuvaa gradienttia tai gradienttipulssia. Molemmilla pulssisarjoilla on hyötyjä, mutta tässä keskitytään pulssitettujen gradienttien stimuloitujen kaiden mittauksiin (PFG-STE).



Kuva 5. Yksinkertainen stimuloitujen kaiden pulssisarja. [7]

Stimuloitujen kaiden kolme 90° RF-pulssia vähentää aikaa, minkä magnetisaatiovektorit ovat xy-tasolla. Ensimmäiset vaiheet ovat täysin samat kuin SE-mittauksessa. Mittaus aloitetaan 90°_x RF-pulssilla, missä magnetisaatiovektorit kääntyvät xy-tasoon. RF-pulssin jälkeen annetaan PFG, mikä antaa magnetisaatiovektoreille vaihekulman riippuen niiden sijainnista z-akselilla. Magnetisaatiovektorit käännetään 90°_{-x} pulssilla xz-tasoon, missä magnetisaation z-komponentti ei altistu translationaaliselle spin-spin relaksaatiolle tai J -modulaatioille. Diffuusiosta johtuva molekyylien liike z-suunnassa voi tapahtua silti. [6], [7]

Ilman voimakasta taustagradienttia voidaan stimuloitua kaiun amplitudi laskea yhtälöllä

$$S(T + 2\tau) = \frac{M_0}{2} e^{-\left(\frac{2\tau}{T_2} + \frac{\tau}{T_1}\right)} e^{-Dq^2\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)} \quad (9)$$

Stimuloitua kaiun heikkouden voi havaita yhtälöstä (9). STE:n amplitudi on puolet pienempi kuin SE:n amplitudin, jos T_1 ja T_2 ovat yhtä suuret. Amplitudin puoliintuminen johtuu toisesta RF-pulssista ja jälkimmäisestä gradienttipulssista. RF-pulssilla voidaan varastoida vain y-komponentti ja jälkimmäinen gradienttipulssi vain osittain palauttaa magnetisaatiovektorit y-suuntaisiksi. Kuitenkin molekyyleille, joiden ytimillä $T_1 \gg T_2$, STE-mittaukset tuottavat paljon suurempia amplitudeja kaiuille kuin SE-mittaukset. STE-mittauksissa voidaan vähentää huomattavasti T_2 ajasta johtuvia translationaalisia relaksaatioita. Asettamalla $2\tau \ll T$, ytimien relaksaatio painottuu huomattavasti enemmän T_1 relaksaation aikaan. Kun $\tau \ll \frac{1}{J}$, J -modulaatiot eivät ole merkittäviä. Nykyään lähes kaikki mittaukset suoritetaan stimuloitua kaikua hyödyntäen. [6], [7]

3.3 Longitudinal Eddy-current Delay (LED)

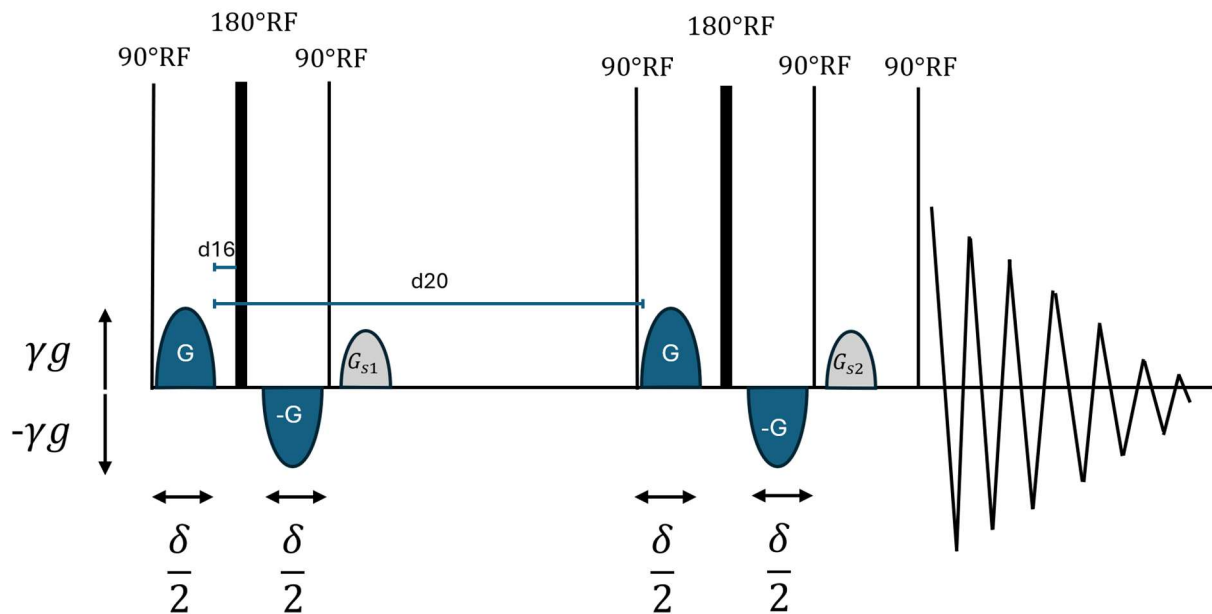
Kenttägradienttien yhteydessä käsitellyt pyörrevirtaukset ovat ongelmia SE- tai STE-PFG-NMR-mittauksissa. pyörrevirtaukset ovat varsin suuri ongelma mittauksissa, missä käytetään laajaa gradienttipulssien skaalaa. STE-mittauksissa, missä τ pidetään lyhyenä poikittaisrelaksaation ja J -modulaation minimoimiseksi, pyörrevirtauksien tuottamat ongelmat kasvavat.

LED (*engl. longitudinal Eddy-current Delay tai Longitudinal Encode-Decode*) on muokattu STE-pulssisarja, missä STE-pulssisarjaan lisätään 90° RF-pulssi jälkimmäisen gradientin jälkeen ja palauttava 90°_{-x} RF-pulssi, kun pyörrevirtaukset ovat hävinneet. Lisätyllä 90° RF-pulssilla voidaan tallentaa STE ja lisätyllä 90°_{-x} pulssilla voidaan lukea magnetisaatio pyörrevirtausten kadottua. [6], [7] LED-pulssisarja on hyvä tapa optimoida STE-mittausarjan tuloksia. Myöhemmin on kuitenkin pystytty parantamaan Eddy-virtausten vaikutusta vielä enemmän.

3.4 Bi-polar LED (BPP-LED)

Parhaimpiin tapoihin poistaa pyörrevirtausten vaikutus lyhyen gradienttipulssin mittauksissa on havaittu olevan gradienttipulssin jako kahteen vastakkaissuuntaiseen yhtä suureen osaan ja erottamalla nämä 180° RF-pulssilla. Bi-polaarisen pulssiparin (*engl. Bi-polar Pulse Pair, BPP*) yhteisvaikutus on sama kuin ennenkin, mutta niiden tuottamat Eddy-virtaukset kumoavat toisensa. Koska gradienttipulssit ovat vastakkaissuuntaiset, niiden tuottamat Eddy-virtaukset ovat myös vastakkaissuuntaiset, joten ne kumoavat toisensa lähes kokonaan.[6]

Fordham et al. muuttivat ensimmäisinä kaikki LED- pulssisarjan gradienttipulssit pulssipareiksi.[9] BPP-LED-sarjan avulla voidaan tehdä tarkkoja diffuusiomittauksia suurien taustagradianttien läsnäollessa.



Kuva 6. Bruker NMR-spektrometrin BPP-LED-STE-pulssisarja.[10]

Bipolaarisien pulssiparien lisäksi kuvan 6 pulssisarjassa on käytetty ”spoil” gradienttipulssseja, mitkä vähentävät toissijaisia kaikuja. Gradienttipulssien muotoa on myös muokattu, jotta pyörrevirtauksia syntyisi vähemmän.

3.5 DOSY

Edellä on esitelty pulssisarjoja ja mittaustekniikoita, joilla voidaan suorittaa diffuusiokertoimen määrittämiä. Vielä on selvittämättä, mitä saadulle signaalille voidaan tehdä, jotta saadaan diffuusiokertoimet laskettua ja diffuusiospektri muodostettua.

Diffuusiokerroin pystytään laskemaan spin kaiun tai stimuloitun kaiun avulla. Kaiun vaimenemasta voidaan laskea diffuusiokerroin, jos tunnetaan käytetyn gradientin voimakkuus sekä kaiun amplitudi. DOSY (engl. Diffusion Ordered Spectroscopy) -menetelmä tuottaa tarkkoja diffuusiomittauksia erilaisissa näytteissä. DOSY-mittauksen spektrissä kemiallinen siirtymä on yhdellä akselilla ja diffuusiokerroin toisella akselilla. [7] DOSY-mittauksilla toistetaan diffuusiomittauksia useilla gradienttipulssin pinta-alan q arvoilla. Taajuusspektrit saadaan Fourier-muunnoksilla ja datasetit jokaiselle kemiallisen siirtymän arvolle saadaan käänteisellä Laplace-muunnoksella q^2 :n suhteen.[6] Laplace-muunnoksessa reaali-funktio muutetaan kompleksimuuttujan funktioksi. Koska FID-signaali on kompleksimuuttujan funktio, voidaan se käänteisellä Laplace-muunnoksella kääntää takaisin

reaalimuuttujan funktioksi. Näin saadaan 2D-spektri diffuusiolle, missä toisella akselilla on diffuusiokerroin ja toisella akselilla on kemiallinen siirtymä.

Diffuusiomittaus suoritetaan mittaussarjana. Kenttägradientin voimakkuutta säädellään lineaarisesti mittausten välillä. Gradienttipulssin voimakkuus vaikuttaa magnetisaation vaiheenmuutokseen. Mitä suurempi gradienttipulssin voimakkuus, sitä enemmän magnetisaation vaihe riippuu z-koordinaatista. Signaalin intensiteetti vaimenee tällöin diffuusion vaikutuksesta enemmän. Matemaattisesti on helppoa huomata tämä gradienttipulssin muodostaman ruuvikierteen jyrkkyydestä. Kappaleessa 2.3 magnetisaatiovektorien ruuvikierteen jyrkkyyttä kuvattiin yhtälöllä $\Lambda = \frac{2\pi}{q}$, missä $q = \gamma g \delta$ eli gradienttipulssin pinta-ala. Ruuvikierteen jyrkkyys määritellään ulkokehän kulkemana matkana z-akselin suunnassa yhden kokonaisen kierroksen aikana. Gradienttipulssin pinta-ala on kääntäen verrannollinen ruuvikierteen jyrkkyyteen, joten suurella gradienttipulssin pinta-alalla saadaan loiva ruuvikierte magnetisaatiovektoreista. Loivassa ruuvikierteessä diffuusion vaikutus intensiteetin vaimenemiseen kasvaa, sillä jo pieni muutos tutkittavan ytimen z-koordinaatissa lisää magnetisaatiovektorin vaihekulman vaihevirhettä huomattavasti. Vaihevirheiden kasvaessa magnetisaatioiden vektorisumma pienenee, jolloin ruuvikierteen palautuessa tasoksi se kapenee ja signaalin intensiteetti vähenee.

DOSY-mittauksissa oletetaan NMR-piikkien intensiteetin vaimenevan eksponentiaalisesti gradienttipulssien voimakkuuden kasvaessa, mitä voidaan kuvata yhtälöllä, joka on muotoa

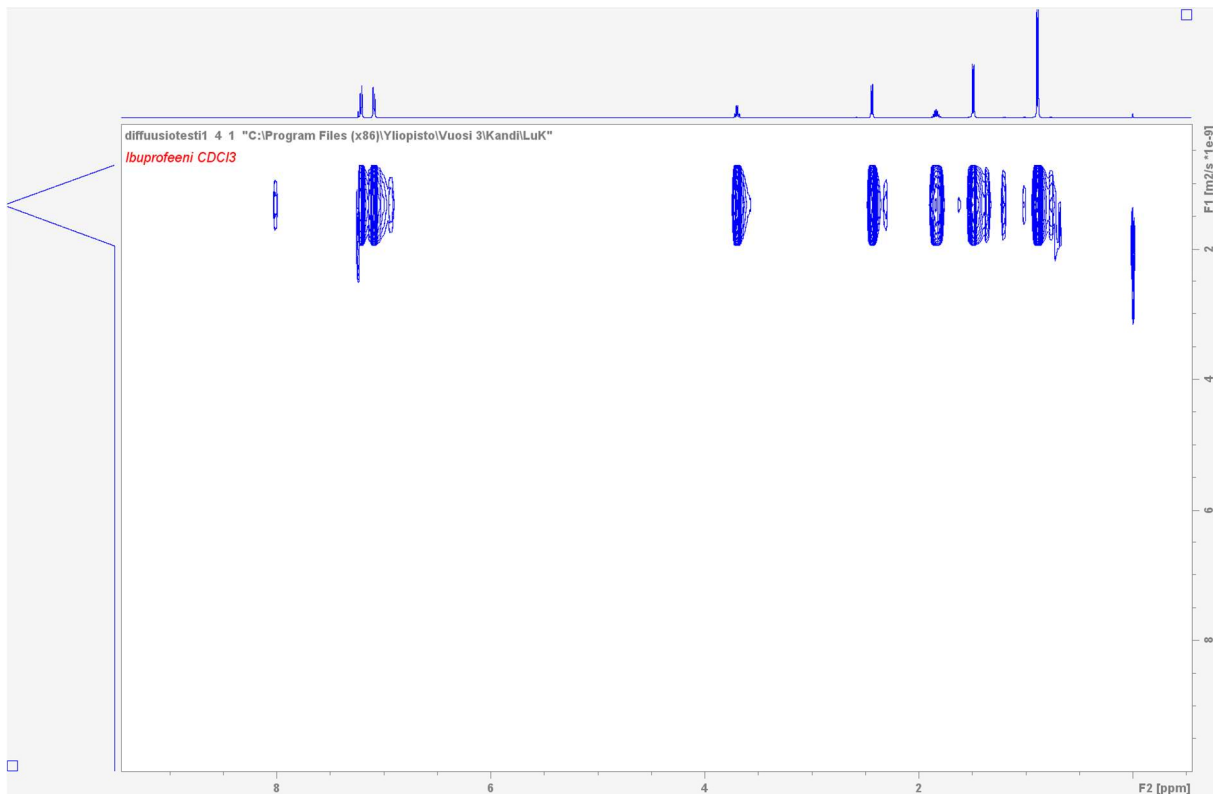
$$S(x) = Ae^{-Dq^2\Delta'} \quad (10)$$

missä Δ' on diffuusioajan ja gradientin kestoajan parametri. [6]

DOSY-mittauksissa FIDit kerätään 20–50 q :n arvolla, jotka kasvavat eksponentiaalisesti. FIDit Fourier muutetaan, jotta saadaan taajuusspektrit. DOSY-spektri muodostetaan normalisoitujen Gaussin käyrien avulla. Saadaan 2D-dataa, mitä voidaan mallintaa funktiolla

$$F(D, \nu) = \sum_{j=1}^{N_\lambda} A_j(\nu) \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_j^2}} e^{-\left(\frac{D-D_j}{2\sigma_j^2}\right)^2} \quad (11)$$

missä σ_j voidaan asettaa keskihajonnaksi tai joksikin muuksi vakioksi, jonka avulla otetaan huomioon virhearviot mittauksesta. [6] Funktiossa $D_j = p_j D_j^{mic} + (1 - p_j) D_j^{free}$, missä p_j on liuenneisuuden aste ja D_j^{mic} ja D_j^{free} ovat diffundoituvan alkion j diffuusiokertoimet sitoutuneille ja vapaille molekyyleille. [7] Gaussin käyrien käyttö on yleisin nykyaikainen menetelmä DOSYn mallintamiseen.



Kuva 7. Ibuprofeenin DOSY-spektri.

Kuvassa 7 näkyy ibuprofeenin DOSY-spektrissä selvä erotus TMS:n ja ibuprofeenin diffuusiokertoimissa. DOSY on siis hyvä menetelmä liuosten tutkimiseen, missä on useita yhdisteitä. Sillä voidaan erottaa NMR-spektrissä olevat piikit diffuusiokertoimien mukaan, mistä voidaan päätellä mikä funktionaalinen ryhmä kuuluu millekin molekyyliin.

3.6 Diffuusiokerroimen lasku

DOSY-mittauksilla voidaan myös tutkia diffuusiokerrointa intensiteetin vaimenemana gradientin voimakkuuden funktiona. Käytettäessä mittaussarjana lineaarisesti kasvavia gradienttipulssien voimakkuuksia, intensiteetin vaimenema noudattaa Gaussin jakaumaa. Kun oletetaan intensiteetille pätevän yhtälön (10) mukainen vaimeneminen gradientin voimakkuuden funktiona, voidaan diffuusiokerroin määrittää yhtälöllä

$$I = I_0 \cdot e^{-D\gamma^2 G^2 \tau_G^2 \tau_D} \quad (12)$$

missä I on NMR-piikin intensiteetti, D diffuusiokerroin, γ ytimen magnetogyriininen suhde, G kenttägradientin voimakkuus, τ_D diffuusioaika ja τ_G gradienttipulssin kesto.

Kun käytetään kuvan 6 mukaista pulssisarjaa, diffuusioaika $\tau_D = d20 - \frac{d16}{2} - \frac{\delta}{3}$, missä $d16$ on gradienttien toipumisaika ja gradienttipulssin kesto $\tau_G = \delta$.

Mittaussarjassa otetaan havaintopisteitä lineaarisesti gradientin kasvaessa. Gradientin maksimiarvo on tunnettu ja yhtälössä gradientin voimakkuus G on käytetyn gradientin voimakkuuden suhde gradientin

maksimiarvoon. Datapisteisiin I vs. G sovitetään Gaussin käyrä, jonka leveyden avulla voidaan laskea diffuusiokerroin.

4 Tiivistelmä

Tutkielman toisessa luvussa perehdyttiin NMR-spektroskopiaan kemistin työvälineenä. NMR-spektrometrin taustalla oleva fysikaalinen kemia sekä toimintaperiaate. Tarkastelun alla oli klassinen esitystapa ydinmagneettisen resonanssin ilmiölle ja sen ominaisuuksien hyödyntäminen NMR-spektroskopiassa. NMR-mittauksen järjestelyjä sekä laitteen ominaisuuksia tutkittiin. Tutustuttiin kenttägradienttien vaikutukseen ytimen magnetisaatiossa ja esiteltiin niiden matemaattinen mallinnus. Kolmannessa luvussa keskityttiin diffuusioon ilmiönä ja sen tutkimiseen. Tutustuttiin erilaisiin pulssisarjoihin, millä voidaan mitata nesteen diffuusiota ja niiden matemaattisiin malleihin. Erilaisten pulssisarjojen vahvuuksia ja heikkouksia esiteltiin. Tutustuttiin DOSY:n matemaattiseen taustaan ja miten sitä voidaan hyödyntää heterogeenisten nesteiden tutkimisessa ja diffuusiokertoimen määrittämisessä.

5 Lähteet

- [1] F. Bloch, W. L. Hanses, and A. M. Packard, "The Nuclear Induction Experiment," California, Jun. 1946.
- [2] E. M. Purcell, H. C. Torrey, and R. V. Pound, "Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid," Cambridge, Dec. 1945.
- [3] F. Bloch, "Nuclear Induction," California, 1946.
- [4] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, and J. R. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*, 5th ed. Cengage Learning, 2014.
- [5] R. Harris, E. Becker, S. Cabral de Menezes, P. Granger, R. Hoffman, and K. Zilm, "Further conventions for NMR shielding and chemical shifts (IUPAC Recommendations 2008)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 80, no. 1, pp. 59–84, 2008.
- [6] C. Johnson, "Diffusion Measurements by Magnetic Field Gradient Methods," Chapel Hill, NC, USA, May 2007.
- [7] C. S. Johnson Jr, "Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications," Chapel Hill, NC, USA, Aug. 1999.
- [8] G. H. Sørland and D. Aksnes, "Artefacts and pitfalls in diffusion measurements by NMR," *Magnetic Resonance in Chemistry*, vol. 40, no. SPEC. ISS., Dec. 2002, doi: 10.1002/mrc.1112.
- [9] E. J. Fordham, S. J. Gibbs, and L. D. Hall, "Partially restricted diffusion in a permeable sandstone: Observations by stimulated echo PFG NMR," *Magn. Reson. Imaging* 12, p. 297, 1993.
- [10] "TopSpin - advanced NMR Experiments User manual," no. 005, Nov. 2020.

