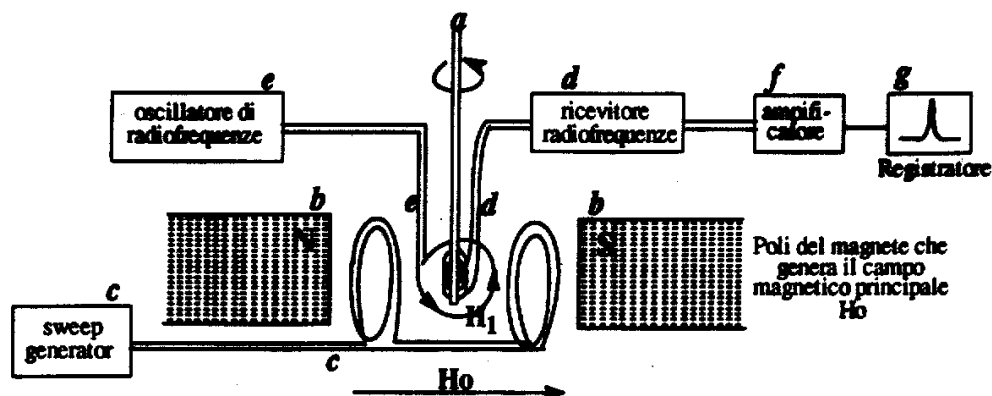


## CAPITOLO 2 NMR

**Esperimenti NMR****1 STRUMENTAZIONE**

Anche se attualmente tutti gli strumenti in funzione sono strumenti ad impulsi (detti anche pulse-FT-NMR) vale la pena iniziare questo capitolo da quelli che sono stati, da un punto di vista storico, i primi strumenti ad essere utilizzati, gli spettrometri in onda continua o CW-NMR.

Uno strumento in onda continua può essere schematizzato nella maniera seguente.

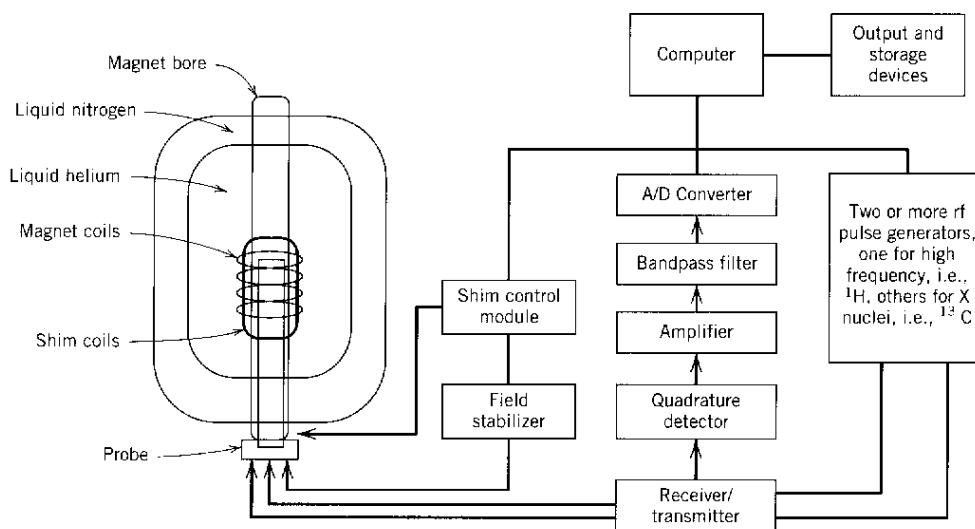


Esso è costituito da un **magnete (b)** un **oscillatore di radiofrequenze (e)** ed un **ricevitore di radiofrequenze (d)**. Esistono due differenti modi per raggiungere le condizioni di risonanza

1. variare l'intensità del campo magnetico tenendo fissa la frequenza  $\nu_1$  del trasmettitore. In questo caso è necessario un accessorio chiamato "**sweep generator**" che crea un campo magnetico aggiuntivo che si somma o si sottrae a quello prodotto dal magnete.
2. variando la frequenza  $\nu_1$  tenendo costante  $H_0$ .

Entrambi le tecniche (*field sweep* e *frequency sweep*) erano un tempo utilizzate nella pratica costruttiva degli strumenti NMR, e lo spettro in onda continua veniva registrato punto per punto variando la grandezza ( $H_0$  o  $\nu_1$ ) in maniera continua e costante. Una volta raggiunte le condizioni di risonanza il segnale prodotto e raccolto dal ricevitore viene amplificato in **f** e registrato (**g**).

Di poco più complessa è invece la struttura degli spettrometri più moderni che utilizzano la tecnica di acquisizione pulsata. Inizieremo ora un'analisi più dettagliata di quella che è la parte più importante di uno spettrometro NMR, **il magnete**. Proseguendo la discussione poi verranno via via prese in considerazione anche altre parti dello strumento che serviranno a spiegare la tecnica di registrazione di uno spettro FT-NMR.



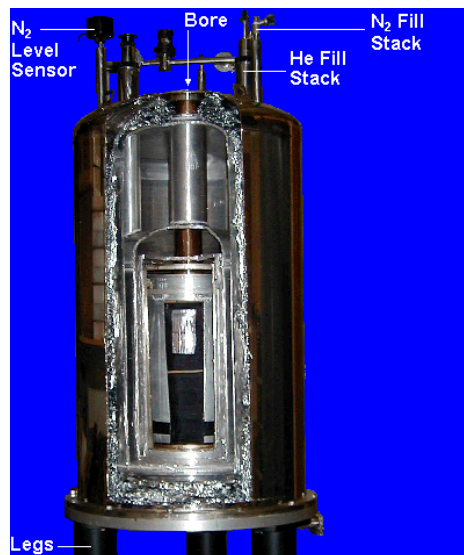
## Il Magnete

Abbiamo visto come il fenomeno della risonanza magnetica nucleare sia possibile solo in presenza di un forte campo magnetico che consente la distribuzione degli spin su livelli energetici differenti. Il magnete è quindi una delle parti fondamentali dello strumento. Nel corso degli anni la ricerca tecnologica ha portato allo sviluppo di sistemi sempre più efficaci per la produzione di campi magnetici e quindi a flussi di campo sempre più elevati. I primi magneti utilizzati erano dei **magneti permanenti**, in pratica delle enormi calamite tra i cui poli veniva posizionato il sistema di eccitazione e ricezione. Da un punto di vista costruttivo sono estremamente semplici da realizzare, non richiedono particolari manutenzioni. Il problema nell'utilizzo di questi magneti è sostanzialmente legato al fatto che non permettono di realizzare flussi di campo superiori ai 2.11 tesla. Campi leggermente superiori (2,35 T) vengono invece prodotti dagli **elettromagneti**, che producono il campo magnetico utilizzando spire metalliche percorse da correnti elettriche ad elevato voltaggio. Tali sistemi producono un forte effetto Joule (dissipazione di energia sotto forma di calore) e per questo motivo richiedono l'utilizzo di complessi sistemi di raffreddamento ad acqua.

La ricerca nel campo dei materiali, ed in particolar modo nel campo dei superconduttori, ha reso possibile lo sviluppo dei **criomagneti** che

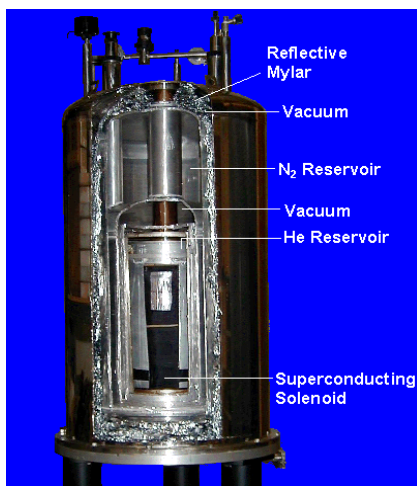


rappresentano oggi il metodo più moderno ed efficace di produrre campi magnetici. Il campo viene prodotto da una bobina (solenoid) di migliaia di metri di un sottile filamento costituito da una lega niobio-titanio. Tale lega, a basse temperature è un superconduttore, equivale a dire che a temperature



prossime allo zero assoluto ( $-273^{\circ}\text{C}$ ) è in grado di condurre energia elettrica a resistenza zero e quindi senza nessun effetto joule. Una volta posto il solenoide in un bagno di elio liquido ( $-269^{\circ}\text{C}$ ) è possibile intrappolare nella spirale metallica una corrente di 10.000 volts che percorre teoricamente all'infinito il solenoide producendo il campo magnetico desiderato. Per cercare di minimizzare l'evaporazione dell'elio, il tutto viene

circondato da una camicia refrigerante (un Dewar) ripiena di azoto liquido ( $-200^{\circ}\text{C}$ ).



Questi gas liquidi vanno periodicamente aggiunti poiché se il solenoide dovesse venirsi a trovare ad una temperatura più alta perderebbe la sua caratteristica di superconduttore e si brucerebbe. Il magnete appare quindi come un grosso cilindro la maggior parte del volume di tale cilindro è in realtà occupata dai recipienti per i gas liquidi. Il centro del campo magnetico e quindi il sistema di eccitazione-ricezione è posto quasi in fondo al sistema di dewars ed il campione viene calato all'interno del magnete da un'apertura posta sulla parte

superiore attraverso un flusso d'aria che fa galleggiare un opportuno campionatore chiamato spinner.

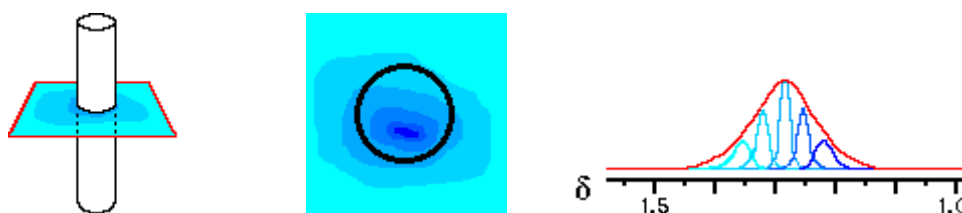
Le unità di misura che indicano il flusso di un campo magnetico sono i Gauss ed i Tesla, in maniera forse impropria, nella terminologia NMR, è entrato in

uso indicare la grandezza di un magnete, e quindi del campo magnetico da esso prodotto, facendo riferimento alla frequenza di risonanza del protone. Pertanto se si parla di un magnete da 90 MHz si vuole indicare un campo magnetico da 2,11 Tesla nel quale il protone risuona appunto a 90MHz. Per renderci meglio conto dei progressi ottenuti in termine di costruzione di magneti siamo passati dai 90 MHz di un magnete permanente, ai 100 MHz di un elettromagnete e ai 900 MHz – 1 GHz di un criomagnete.

### **Omogeneità del campo: rotazione e shimatura**

Al fine di ottenere dei segnali stretti, che assomiglino il più possibile a righe, è necessario che il campo magnetico attorno al campione sia il più possibile omogeneo.

Il campione viene inserito (sottoforma di soluzione diluita) in un tubicino del diametro di 5mm e lungo circa 20cm. L'altezza del liquido introdotto è in genere di circa 1 cm. Se il flusso di campo che investe la porzione di liquido analizzato non è omogeneo, succede che nuclei posti in posizioni diverse del campione sperimenteranno un diverso campo  $H_0$  e quindi daranno risonanza a frequenze diverse. La somma di tutte le diverse risonanze darà origine ad una banda allargata.



Quando invece il campo è omogeneo, tutti i nuclei sperimentano lo stesso flusso di campo, risuoneranno quindi alla stessa frequenza producendo un segnale stretto.



L'omogeneità del campo si può ottenere in due modi che in genere agiscono simultaneamente,

1. **rotazione del campione:** permette di mediare le posizioni dei vari nuclei per mescolamento della soluzione
2. **shimming coils:** un complesso sistema di spirali poste intorno al sistema di analisi che producono piccoli campi magnetici di intensità e

direzione regolabile. L'operazione di aggiustamento di questi campi è un'operazione che deve essere ripetuta per ogni campione e viene indicata con il termine *shimmatura* (orrendo inglesismo che purtroppo non trova un analogo termine italiano)

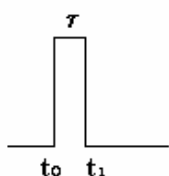
## 2 IL METODO DI ACQUISIZIONE PULSATA (PULSE-NMR)

### L'impulso

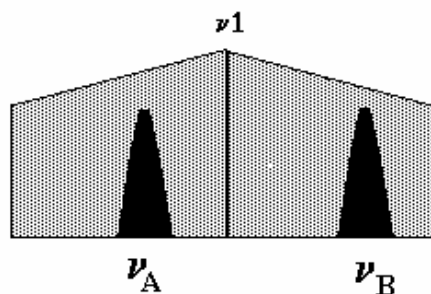
Nella tecnica pulsata, contrariamente all'onda continua, tutti i nuclei di una specie (es protoni o carboni 13) vengono eccitati simultaneamente da un impulso di radiofrequenze. Vediamo che cosa è di fatto un impulso, come viene generato ed in che cosa differisce da una singola radiofrequenza.

Generalmente un generatore di radiofrequenze opera ad una frequenza fissa ben definita. Negli spettrometri CW frequency sweep tale frequenza poteva essere fatta variare ma rimaneva sempre e comunque una frequenza sostanzialmente monocromatica.

Se teniamo acceso il generatore per un certo intervallo di tempo, fisso sulla stessa frequenza, si ottiene una banda continua di radiofrequenze, simmetrica rispetto alla frequenza generatrice  $\nu_1$  formata da tutte le componenti spurie della frequenza principale che nel tempo  $\tau_p$  diventano via via più intense. Tale banda di radiofrequenze viene definita **impulso**.



Rappresentazione schematica di un impulso



Tutti i segnali vengono eccitati dal set di radiofrequenze prodotto da un impulso

In un esperimento NMR la durata dell'impulso è di pochi  $\mu\text{sec}$  (7-8  $\mu\text{sec}$ ). La scelta della frequenza principale viene fatta in base all'intensità del flusso di campo ed in base al nucleo che si vuole osservare.

Es. dato un campo di 1.41 T servirà una frequenza di 60 MHz per eccitare il protone e di 15 MHz per far risuonare il carbonio 13.

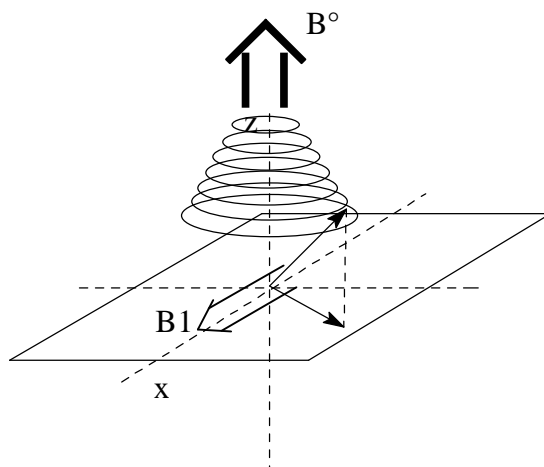
La scelta della durata dell'impulso viene invece fatta in base all'ampiezza spettrale che si desidera analizzare. Per essere certi che tutti i nuclei dello spettro siano stati eccitati completamente e nella stessa maniera si usano i cosiddetti **impulsi hard**: impulsi di breve durata e di elevata potenza.

### Angolo dell'impulso e generazione del segnale

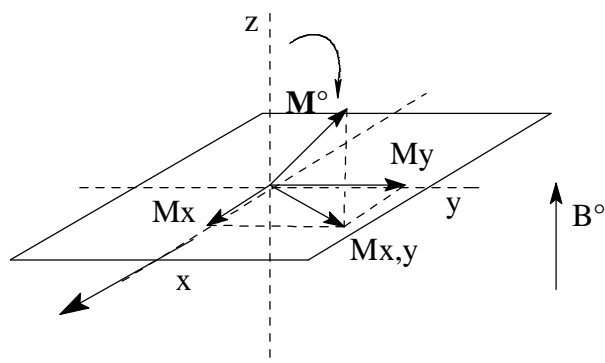
Prendiamo ora in considerazione un esempio pratico per vedere come si origina un segnale. Immaginiamo di analizzare lo spettro di risonanza di un campione contenente  $\text{CHCl}_3$ . Abbiamo visto, nel primo capitolo, che il sistema di spin può essere riassunto e descritto dal vettore magnetizzazione, ovvero il vettore somma dei singoli spin nucleari. Il vettore magnetizzazione ci permette di trattare il sistema senza tener conto delle singole precessioni nucleari che tuttavia continuano ed essere ovviamente presenti.

Nel set di frequenze dell'impulso con il quale colpisco il campione è sicuramente contenuta anche la frequenza che soddisfa le condizioni di risonanza per il  $\text{CHCl}_3$ .

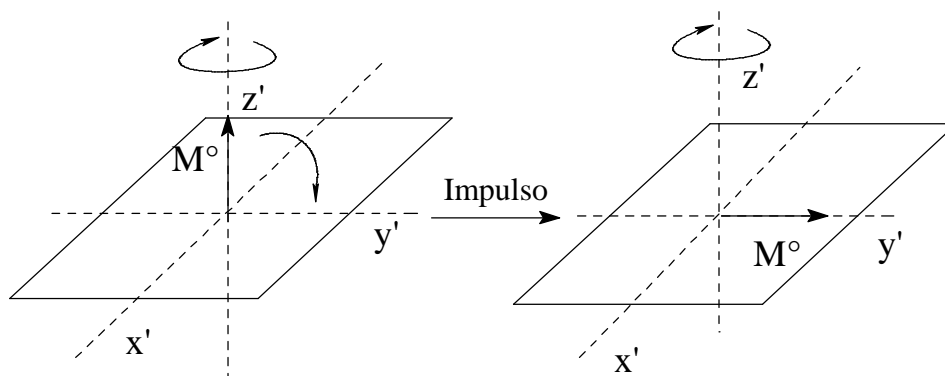
A questo punto è come se il vettore  $\mathbf{M}_0$  iniziasse a risentire di un campo magnetico aggiuntivo  $B_1$  perpendicolare al campo  $B_0$  applicato. Il campo  $B_1$ , associato alla frequenza incidente sposta il vettore magnetizzazione dall'asse  $z$  del sistema cartesiano di riferimento (Laboratory frame). Appena abbandonato l'asse  $z$  il vettore inizia a risentire di due moti precessionali che si sommano, uno attorno all'asse  $B_0$  (forte) ed uno attorno all'asse  $B_1$  (debole). Il risultato delle due forze applicate al vettore è un moto a spirale che progressivamente sposta  $M_0$  dall'asse  $z$  verso il piano  $x,y$ .



Un movimento come quello appena proposto non è semplice da descrivere poiché in ogni momento la posizione del vettore deve essere descritta da tre coordinate rappresentate dalle relative proiezioni sui tre assi cartesiani.



Dato che la precessione attorno a  $B_0$  avviene alla frequenza di Larmor, se immaginiamo un sistema di riferimento (Rotating frame) in rotazione rispetto all'asse  $z$  ad una velocità angolare coincidente con quella di precessione semplificheremo il movimento di  $M_0$  confinandolo sul piano  $z'y'$ .



Facendo quindi riferimento al vettore magnetizzazione  $M_0$  descritto in un sistema di riferimento rotante ( $x'y'z'$ ) si definisce l'angolo di impulso  $\alpha$  il valore angolare che misura lo spostamento di  $M_0$  rispetto all'asse  $z'$ . L'angolo sarà funzione della potenza del trasmettitore e della durata dell'impulso in base alla equazione:

$$\alpha = \gamma B_1 \tau_p$$

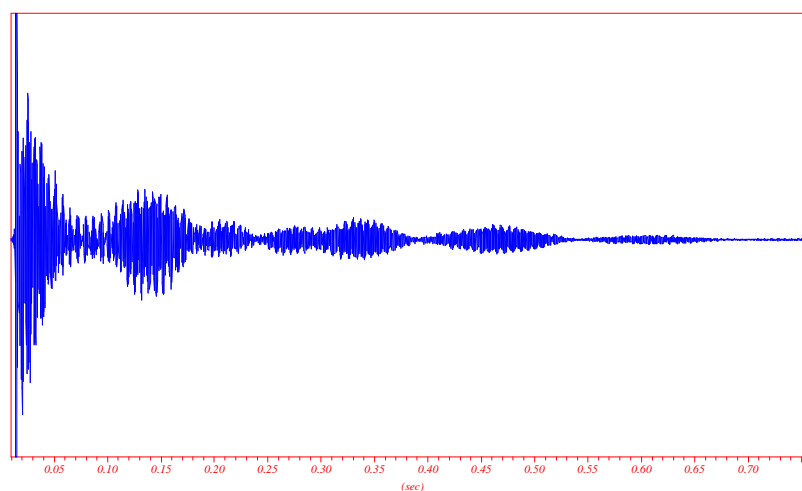
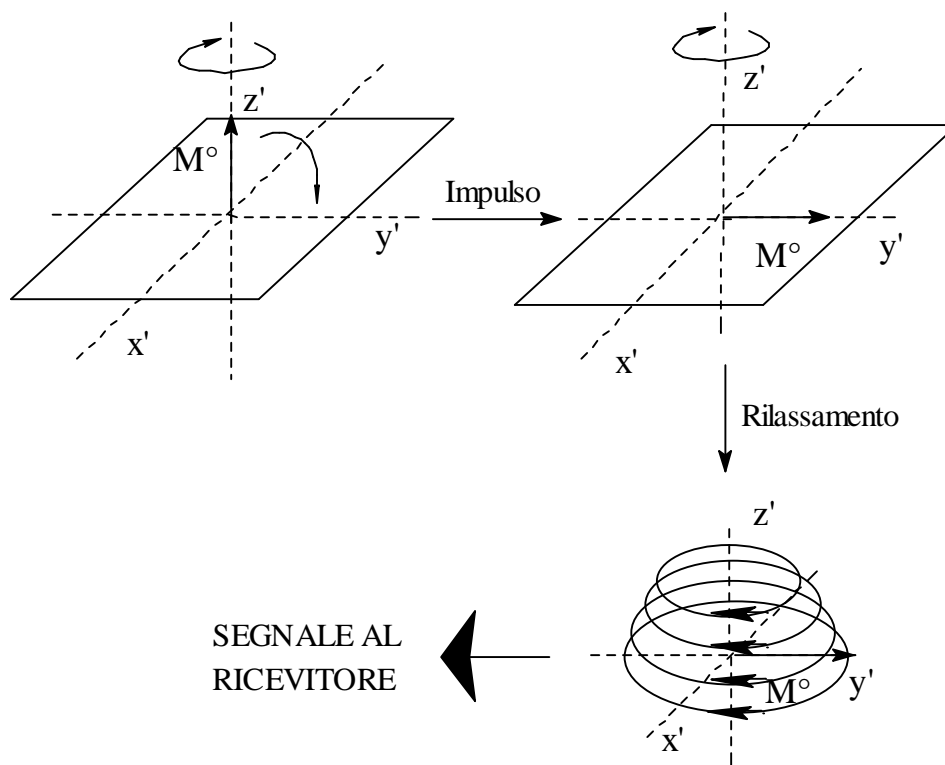
dove:

$\gamma B_1$  = potenza dell'impulso (potenza del trasmettitore)

$\tau_p$  = durata dell'impulso

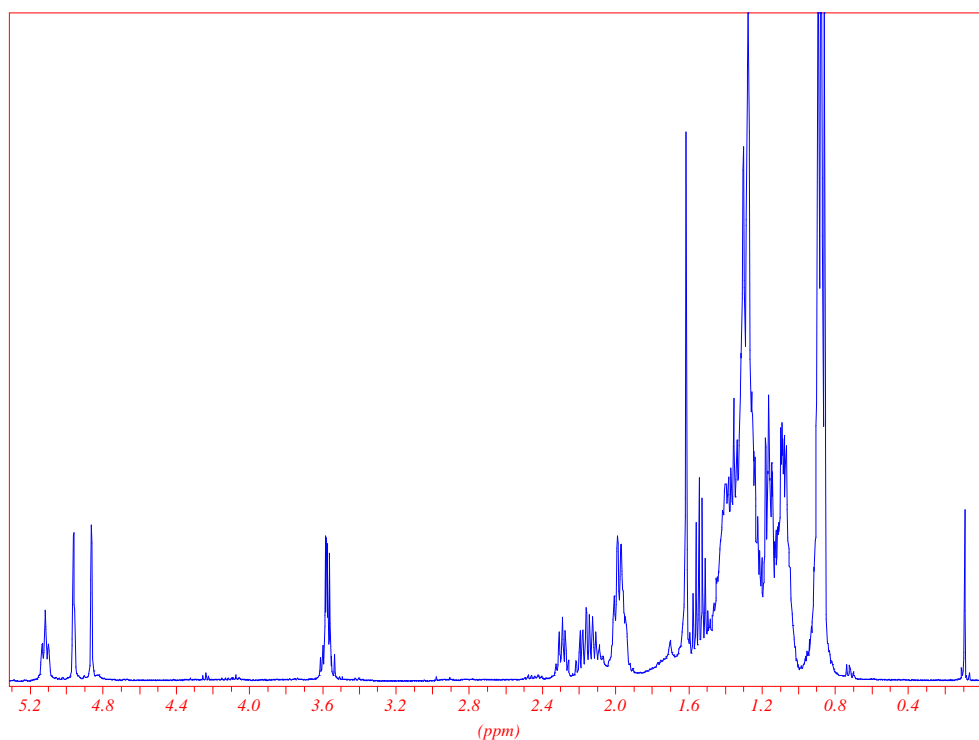
Lo spostamento del vettore  $M_0$  dal punto di equilibrio produce una magnetizzazione macroscopica sull'asse  $Y'$  del sistema di riferimento

rotante. Tale magnetizzazione è una grandezza tempo dipendente poiché, una volta rimossa la sorgente di eccitazione, il sistema tende all'equilibrio attraverso processi di rilassamento che permettono la perdita di energia e la redistribuzione degli spin sulla base dell'equazione di Boltzman. Il ritorno all'equilibrio produce, sulla spirale ricevente, un segnale armonico smorzato chiamato FID (Free Induction Decay). Il FID è di fatto il vero segnale che si ottiene da un esperimento NMR in tecnica pulsata.



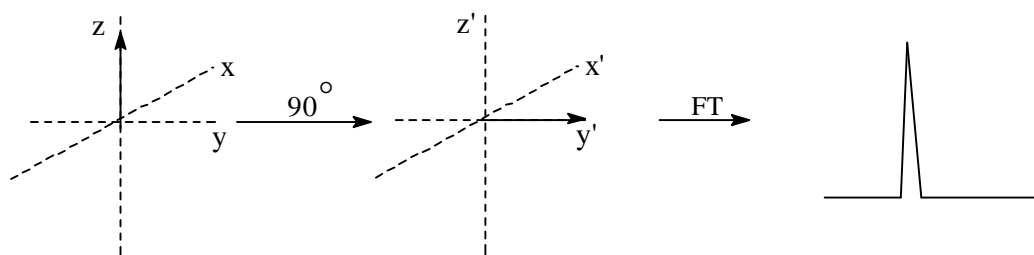
Il FID è una funzione che esprime la variazione di intensità del segnale in funzione del tempo. Il segnale prodotto sulla spirale è un segnale di tipo elettrico. Per essere registrato ed elaborato deve essere digitalizzato, cioè trasformato in una serie di dati binari leggibili da un computer. Questa operazione viene effettuata dall'**ADC** (Convertitore Analogico Digitale). Il segnale digitalizzato viene quindi elaborato matematicamente operando sulla funzione FID una trasformata di Fourier, un calcolo abbastanza complesso, che serve a cambiare il dominio alla funzione: passando da quello dei tempi a quello delle frequenze.

Questa operazione conduce ad uno spettro che esprime le variazioni di intensità del segnale in funzione delle frequenze, quindi uno spettro fatto di righe e bande come quelli già visti in altri tipi di spettroscopia.

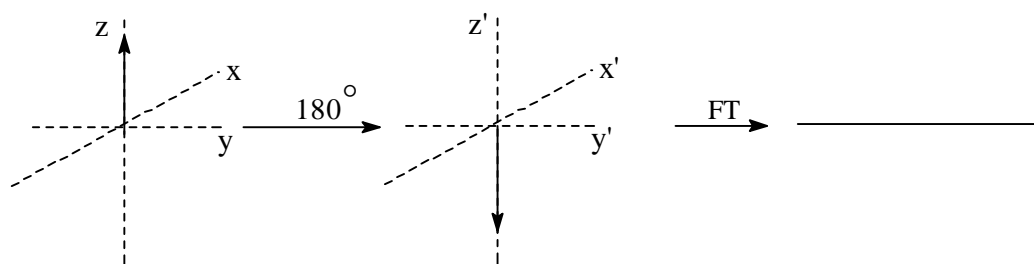


Gli impulsi che generano il segnale NMR abbiamo detto vengono classificati in base all'angolo di spostamento del vettore magnetizzazione rispetto all'asse z. Sulla base all'intensità del segnale prodotto si possono definire:

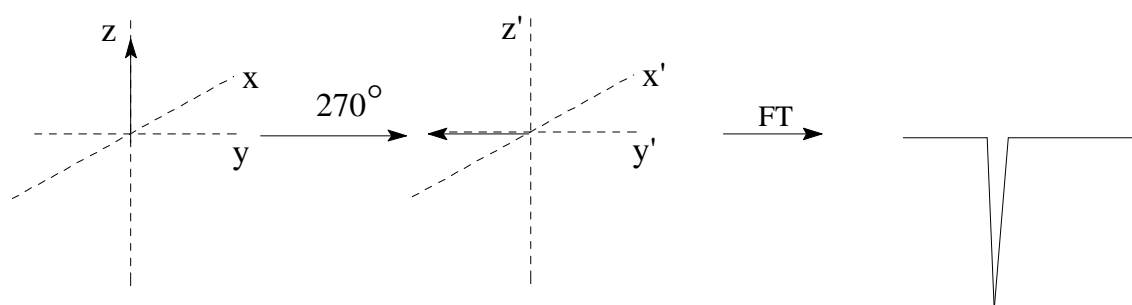
1. **impulso a 90°** : massima intensità positiva



**impulso a 180° : segnale nullo**



**impulso a 270° : massima intensità negativo**

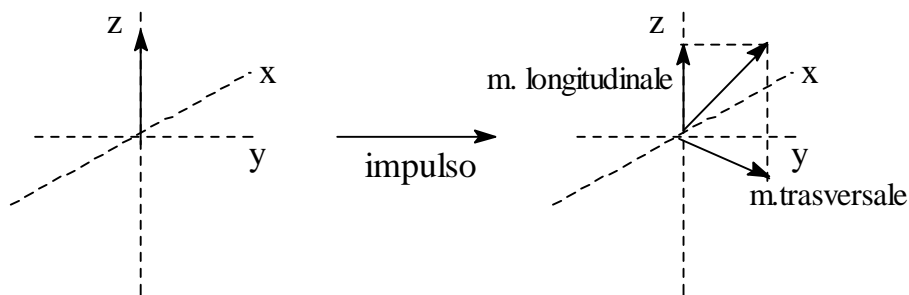


### 3 IL RILASSAMENTO

In un esperimento di risonanza magnetica nucleare dopo l'applicazione di un impulso si distinguono due differenti componenti della magnetizzazione macroscopica:

- *Magnetizzazione longitudinale* lungo l'asse z
- *Magnetizzazione trasversale* sul piano x,y.

Entrambe sono entità soggette a fenomeni di rilassamento e per questo motivo la loro intensità è tempo-dipendente. Ovviamente vi saranno due differenti processi di rilassamento per le due componenti .



#### Rilassamento longitudinale $T_1$

Immediatamente dopo l'applicazione di un impulso gli spin di un campione si trovano in uno stato di non equilibrio poiché i livelli energetici del sistema sono ancora ugualmente popolati. Si avrà una certa magnetizzazione longitudinale  $M_z$  che, dopo un impulso a  $90^\circ$  è nulla.. La crescita della magnetizzazione verso l'equilibrio termico e la variazione della sua componente z richiede un certo tempo  $T_1$  e segue l'equazione differenziale di 1° ordine:

$$dM_z/dt = (M_0 - M_z)/T_1$$

dove  $1/T_1$  è la costante di velocità per il passaggio dallo stato perturbato del sistema allo stato di equilibrio. Durante il tempo  $T_1$  l'energia è trasferita dagli spin al lattice; tale processo viene detto **RILASSAMENTO**

**LONGITUDINALE** ed il tempo  $T_1$  **TEMPO DI RILASSAMENTO LONGITUDINALE** (o **RILASSAMENTO SPIN-LATTICE**).**Rilassamento trasversale  $T_2$** 

Come abbiamo già detto esiste una componente della magnetizzazione sul piano x,y che prende il nome di **magnetizzazione trasversale**. Appare pertanto logico introdurre un altro tempo di rilassamento ( $T_2$ ) riferito a tale componente.

$T_2$  è conosciuto come **tempo di rilassamento spin-spin** a causa del meccanismo implicato nel processo, che prevede il trasferimento di energia tra gli spin individuali. Il meccanismo per il rilassamento trasversale è pertanto basato principalmente sul trasferimento di energia attraverso il sistema di spin.

**Ogni transizione di un nucleo attraverso i suoi stati di spin modifica il campo locale di alcuni nuclei che si trovano nelle vicinanze; il tempo di vita degli stati di spin viene accorciato da tale processo, che contribuisce anche all'allargamento di riga andando di fatto a creare delle zone di in omogeneità magnetica.**

In definitiva, però, il livello totale di energia non cambia ed il **rilassamento trasversale** può essere considerato essenzialmente un *processo di tipo entropico*, contrariamente a quello **longitudinale** che è prettamente *entalpico*.

Nei liquidi la disomogeneità del campo magnetico è il fattore più importante per la dipendenza della magnetizzazione dal tempo.

Immaginiamo di suddividere il campione in piccole regioni, piccole a sufficienza da garantire una omogeneità locale del campo magnetico.  $M_{x,y}$  è data dalla somma della magnetizzazione di ciascuna regione. Assumendo che non può esservi perfetta omogeneità tra diverse regioni, ciascuna regione contribuirà alla magnetizzazione con una riga (isometrica) ad una precisa frequenza, differente da regione a regione.

