

A mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) alkalmazása a kolloidok fizikai kémiai jellemzésére

KÉRI Mónika, NAGY Zoltán, NOVÁK Levente, NYUL Dávid és BÁNYAI István*

Debreceni Egyetem, Fizikai Kémiai Tanszék, Egyetem tér 1. Debrecen, Magyarország

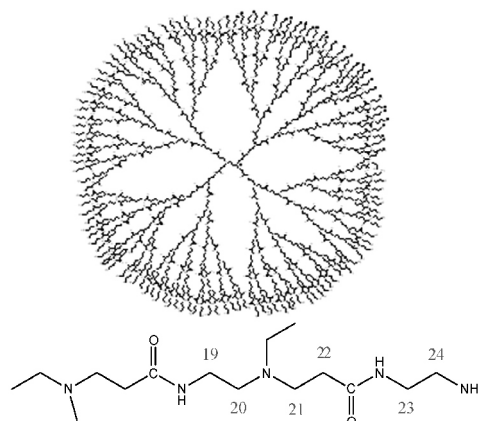
1. Bevezetés

A kolloidok fizikai kémiája nem csak önmagában érdekes, hanem a fizikai kémia általános fejlődéséhez is nagymértékben hozzájárult¹. A nagyműszeres szerkezetvizsgáló módszerek, mint például a mágneses magrezonancia (NMR), a nanotechnológia viharos gyorsaságú megjelenésével a kolloidok fizikai-kémiájában is gyorsan teret hódítottak². A nagyfelbontású NMR alkalmazásával elsősorban a különböző fehérjék szerkezetvizsgálatában értek el alapvető eredményeket. E területen hazánkban több műhely is a nemzetközi élvonalhoz tartozik.³⁻⁶ A klasszikus diszperziós kolloidok és nanorészecskék vizsgálatában az NMR alkalmazások még csak az utóbbi évtizedekben kezdődtek.⁷⁻⁹ A Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszékén, illetve az előd Kolloid- és Környezetkémiai Tanszéken mintegy tíz éve indultak meg az ilyen irányú kutatások.¹⁰ Ezek sem elsősorban a nagyfelbontású korrelációs ¹H, ¹³C egy- és kétdimenziós NMR vizsgálatok voltak, bár ezek sem hiányoznak az eszköztárunkból^{11,12}, hanem a kevésbé alkalmazott dinamikus NMR mérések, úgymint diffúziometria és relaxometria, valamint a reneszánszát élő NMR-krioporozimetria.

E dolgozatban az utóbbi tíz év néhány eredményét mutatjuk be, elsősorban az NMR alkalmazása szempontjából. Ennek oka az, hogy a módszer még kevésbé terjedt el az egyébként világszínvonalú magyar kolloidikában, nanotechnológiában és a kapcsolódó anyagtudományi kutatásokban. Célunk az, hogy az ezen a területen dolgozó tudományos közösség számára megmutassuk a módszer teljesítményét, illetve a hazai NMR spektroszkópikusok számára ízelítőt adjunk, hogy milyen lehetőségek vannak számukra a nanotudományokban.^{2,13}

Bemutató modellrendszerként döntően a poli-amido-amin dendrimereket választottuk, leggyakrabban azok ötödik generációját. (G5_PAMAM.NH₂). Ezek szimmetrikus, közel gömb alakú, monodiszperz makromolekulák, a G5_PAMAM.NH₂ ötödik generációs alapmolekula moláris tömege 28 kDa. Az 1. ábrán ennek egyszerűsített szerkezeti képlete, és kiterített vázlata látható. Fontos tulajdonsága, hogy a reaktív NH₂ végcsoportok könnyen funkcionálizálhatók, például karboxil csoportokkal, ami nanoméretű kelátképzők előállítását teszi lehetővé. Amennyiben a nem funkcionálizált amino végcsoportokat szubsztituálják, például metilezik, akkor a dendrimerek toxikus hatása megszüntethető.¹⁴ Hátrányuk a

viszonylagos drágaságuk és - elsősorban a nagyobb generációknál - a reprodukálható előállításuk nehézsége.¹⁵



1. ábra Egy PAMAM dendrimer síkban kiterített vázlatos szerkezeti képlete (felső ábra). A G5_PAMAM.NH₂ dendrimer végcsoportja az etilén-diamin maghoz kapcsolódó ötször ismétlődő egységekkel (alsó ábra).

2. Kísérleti rész: az NMR módszerek rövid ismertetése

2.1. Az NMR diffúziometria

Az NMR diffúziometria (PGSE-NMR vagy kétdimenziós változata, a DOSY) a molekulák vagy részecskék hőmozgásának sebességét méri.¹⁶ A z-irányú mágneses gradiens impulzusok kiadására képes NMR-készülékek és mérőfejek megjelenésével, valamint a vonatkozó mérőprogramok kifejlesztésével ez a módszer a diffúziós együtthatók meghatározásának egyik alapvető módszerévé vált¹⁷. Ahhoz, hogy egy molekula vagy részecske diffúzióját tanulmányozhassuk, a részecskének egy jól mérhető NMR-aktív magot kell tartalmaznia. A diffúziósebesség méréshez fontos a viszonylag nagy érzékenység és a hosszú relaxációs idő.

A módszer elve röviden a következő. Az NMR-cső hossz tengelye mentén (z-irány) rövid ideig (néhány ms) létrehozunk egy viszonylag nagy mágneses tér gradienst (a szokásos maximum érték 50 Gauss/cm). Ennek a következménye az, hogy az azonos részecskék kémiai eltolódása (mágneses momentumának precessziós frekvenciája) attól fog függeni, hogy éppen hol tartózkodnak az NMR cső hossz tengelye mentén. A gerjesztő impulzussorozat megszűnése után a relaxáció sebessége pedig két tényezőtől adódik össze: a valódi relaxációból és a csere folyamatokból származó sebességtöbbletből. Itt a

* Bányai István. Tel.: +36 52 512900/ 22384, e-mail: banyai.istvan@science.unideb.hu

cserefolyamat pedig nem más, mint a részecskék Brown-mozgásából származó z -tengely menti helycsere. Az így kialakult megnövekedett relaxációsebességet a mért jel intenzitásának csökkenéséből számolhatjuk ki a következő egyenlet segítségével:

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{\tau_1}{\tau_2} - \frac{\tau_2}{\tau_1}\right) \exp\left[-\gamma^2 g^2 D \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \quad (1)$$

Ahol τ_1 az idő, amely alatt csak transzverzális relaxáció történik, τ_2 amely során longitudinális relaxáció és a cserefolyamat (Brown-mozgás) következik be míg Δ a z -irányú gradiens impulzus időtartama. $\Delta = 2\tau_1 + \tau_2$, azaz az ún. diffúzió idő, amely alatt a cserefolyamat, azaz a Brown-mozgás történik és befolyásolja a jelintenzitást. A mérés során a g gradiens térerősséget fokozatosan növelve mérjük a jelintenzitást, majd a γ giromágneses együttható értékét ismerve a D diffúziós együttható a legkisebb négyzetek módszerével kiszámítható¹⁶. Az angol nyelvű szakirodalom gyakran „self-diffusion”-nak nevezi a folyamatot, a magyar szaknyelvben a saját diffúzió használatos. A mi javaslatunk a Brown-mozgás megtartása, vagy reverzibilis diffúzió kifejezés használata, mivel a rendszerben kémiai potenciálkülönbség nincsen.

2.2. NMR relaxometria

Az NMR relaxometria a relaxációs idő mérésén alapul. Az NMR relaxációs mechanizmusok sokfélék, de ezek közül a legtöbb esetben, nem kvadrupólus magok esetén, az ún. dipoláris relaxáció határozza meg a gerjesztett állapot megszűnésének sebességét. Ebben szerepet játszanak a környezet mágneses és dielektromos tulajdonságai, a környezeti mágneses fluktuáció frekvenciája és annak viszonya a gerjesztett magot tartalmazó molekula nem transzlációs mozgásának frekvenciájához. Ez utóbbit a rotációs korrelációs idővel jellemezzük, ami egy radiánnyi fordulat ideje. Ez kapcsolatos a molekula mozgási szabadsági fokaiival, illetve méretével. Minél lassabb a molekula mozgása annál gyorsabb mind a transzverzális, mind a longitudinális relaxáció. Ezt a tényt mi elsősorban a porózus szilárd testek vizsgálatára használjuk ki. Az alkalmazás igen jól működik kislebontású NMR készülékeken is¹⁸. Ezek a viszonylag olcsó relaxométerek igen hatékonyan alkalmazhatóak például pórusméret meghatározására. E munkánkban jelentős szakmai és szoftvertámogatást kaptunk Ioan Ardelean professzortól a kolozsvári Műszaki Egyetemről, aki a kisterű NMR nemzetközileg elismert szakértője, és az alkalmazásáról számos közleményt publikált¹⁹⁻²¹. A relaxáció sebességét hagyományosan a T_1 és T_2 longitudinális és transzverzális relaxációs időállandókkal jellemzik, amelyek a relaxáció elsőrendű sebességi koefficienseinek reciprok értékei.

2.3. NMR kriporozimetria

A kriporozimetria elve régóta ismert a fizikai kémiában. Az ún. Gibbs-Thomson egyenlet írja le azt, hogy zárt térben folyadékok fázisátmeneti hőmérséklete hogyan függ a tér méretétől. Például olvadás esetében:

$$\Delta T = (T_e - T_0) = -\frac{V_M \gamma_{sl} T_0 A_s}{\Delta H V_s} = -K_c \frac{A_s}{V_s} \quad (2)$$

A (2) egyenletben bal oldalon az olvadáspont-csökkenés szerepel. A jobb oldalon a folyadék moláris térfogata (V_M), a folyadék-szilárd határfelületi feszültség (γ_{sl}), az olvadáspont nagy térben (T_0), az olvadáshő (ΔH) és a felület-térfogat arány szerepel (A_s/V_s). Látható, hogy ez utóbbi mikor kicsi, azaz a zárt tér nagy, akkor az olvadáspont-csökkenés zérushoz tart. Az említett fizikai-kémiai paramétereket a K_c kriporozimetriás állandóban gyűjtötték össze, majd kísérleti adatok alapján módosították adott rendszerekre.

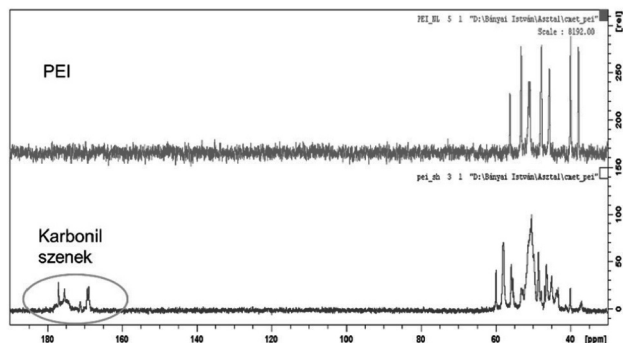
Az NMR spektroszkópia ennek a régi módszernek a reneszánszát hozta, ugyanis a szilárd (megfagyott) fázis megfelelő mérési módszerrel (spin-ekho) nem ad jelet^{22,23}. Ha tehát egy porózus anyagot tartalmazó, oldószerrel telített mintát megfagyasztunk, akkor az oldószer NMR-jele a gyors relaxációja miatt nem látható. Ha részben megolvad, akkor viszont kvantitatívan mérhető az olvadt rész mennyisége. Ez azt jelenti, hogy lépésenként emelve a fagyott minta hőmérsékletét észlelni tudjuk először a kisebb pórusokban megjelenő olvadt folyadék mennyiségét, a hőmérsékletből pedig az A_s/V_s arányt számíthatjuk ki, ami például gömb esetében $3/r$ azaz a pórus sugarával van összefüggésben ((2) egyenlet). A módszer érdekessége, értéke még az, hogy a fagyás- és az olvadásgörbéken bizonyos esetekben hiszterézis észlelhető, amiből a pórus geometriájára tudunk következtetni. A számítások szerint a ΔT_f fagyáspont-csökkenés viszonya ΔT_m olvadáspont-csökkenéshez a geometriára utal. Ha az arányuk $3/2$, akkor a pórus gömb ha 2 , akkor hengeres, ha nincs olvadáspont-csökkenés de van fagyáspontcsökkenés, akkor rés alakú a pórus²².

3. Példák az NMR alkalmazásokra a kolloidok vizsgálatában

3.1. Nagyfelbontású NMR

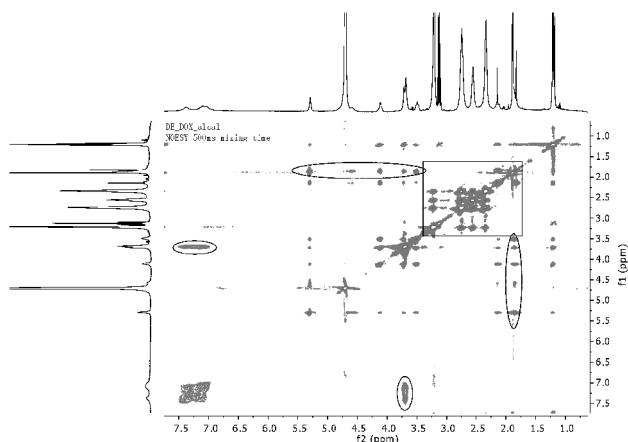
Mivel a PAMAM dendrimerek elég drágák, gyakran felmerül az igény, hogy hasonló tulajdonságú olcsóbb polimerekkel helyettesítsük őket. A nagyfelbontású 1D és 2D NMR spektroszkópiát elsősorban a szerves makromolekulás kolloidok módosítása sikerességének megállapítására alkalmaztuk. Példánkban elágazó polietilén-imin (PEI) funkcionálisítását végeztük monoklór-ecetsavval makromolekulás dendrimerszerű kelátképző nanorészecskék előállításának céljából (CM-PEI). A szintézis hatékonyságát több módszerrel, így pH-potenciometriával és kromatográfiásan is ellenőriztük, de leghatékonyabbnak a kvantitatív ^{13}C -NMR bizonyult. Azt használtuk ki, hogy a különböző kötési állapotú szerek kémiai eltolódása nagymértékben különbözik, így a karbonil csoportok jelei jól elkülönülten tűnnek fel a spektrumban. A 2. ábrán a kiindulási anyag és a termék ^{13}C -NMR spektrumát mutatjuk, amiből kiderül, hogy a bevitt COOH csoportok száma (és a vele együtt bevitt CH_2 csoportoké is) egyszerű integrálással nyerhető. Természetesen a módszernek további előnye, hogy a kapott vegyület tisztasága, és amint arra a 3.2. alfejezetben kitérünk, a molekula mérete is gyorsan meghatározható a diffúziós együtthatójának mérése alapján.

A CM-PEI ígéretes ligandumnak látszik például a lantanoidák vagy mangán(II)-ionok koordinációjára, így MRI kontrasztanyagok fejlesztésére. Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy átmeneti fémekkel is nagy stabilitású komplexet képez.



2. ábra. A funkcionizált (alsó, CM-PEI) és a nem funkcionizált PEI ^{13}C -NMR spektrumai.

A kétdimenziós NMR technikák is hasznosak, az alkalmazásuk hasonló a szerves kémiai rutin alkalmazásokhoz, azonban mindig figyelembe kell venni a makromolekulákra, nagy részecskékre jellemző rövid relaxációs időket. Érdekes példát mutat a 3. ábra, amikor doxorubicin lép kölcsönhatásba ötödik generációs poli-amidoamin dendrimerrel (G5_PAMAM). Egyértelműnek látszott, hogy a gyógyszer sikeres becsomagolását úgy igazolhatjuk, hogy korrelációt mutatunk ki a doxorubicin és a G5_PAMAM NMR jelei között. A kétdimenziós (2D) nukleáris Overhauser-hatás spektrumban (NOESY), amely térbeli közelséget mutatja, nem láthatunk ugyanakkor keresztcsúcsot a doxorubicin és a dendrimer jelei között, csak a doxorubicin saját protonjai között. (3. ábra) A keresztcsúcsok fázisa a doxorubicin saját jelei között azonban megegyezik a diagonális csúcsok fázisával, ami a nagymolekulák sajátja. Így tudtuk igazolni a hatóanyag kapszulázását, azaz, hogy részévé vált a makromolekulának, de azt nem, hogy mely dendrimer részekhez kapcsolódik másodlagos kötésekkal a hatóanyag kismolekulája²⁴.



3. ábra. A doxorubicin és G5_PAMAM dendrimer ^1H 2D-NOESY spektruma. Négyzettel jelölve a dendrimer korrelációs területe, ellipszisszel pedig a doxorubicin aromás jelei közötti keresztcsúcs.

A 3. ábrán érdekességként szaggatott ellipszisszel olyan keresztcsúcsokat jelöltünk, amelyek a dendrimer és a doxorubicin protonjai közötti korrelációt mutatnak első látásra. Részletesebb vizsgálataink azt mutatták, hogy ezek kizárólagosan a doxorubicinhez tartoznak, csak a dendrimer jelei átfedték a doxorubicin jeleit. Ez egyúttal arra inti a felhasználót, hogy a 2D NMR spektrumok elemzését nagy óvatossággal kell végezni.

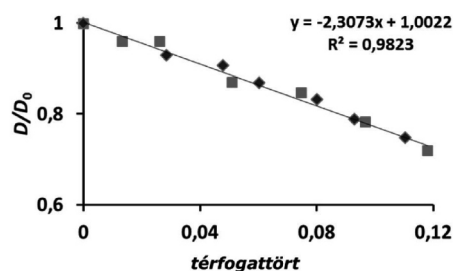
^{13}C -NMR technikával sikerült a cellulóz különböző elkülönített frakcióit is azonosítani, amelyeket izotópos kormeghatározáshoz alkalmaznak²⁵.

3.2. NMR diffúziometria alkalmazásai

Az NMR diffúziometria rendkívüli előnye, hogy gyakorlatilag minden mérhető NMR-magot tartalmazó részecske vagy molekula diffúziós együtthatója meghatározható. Például a nátrium-dodecil-szulfát oldatában, ^1H -NMR segítségével az oldószer és a micella, míg ^{23}Na -NMR mérésekkel a Na^+ ellenion diffúzió együtthatója is mérhető. Ezeknek az adatoknak az összevetéséből a rendszer fizikai-kémiai tulajdonságairól érdekes információk nyerhetők. Ebben a rendszerben mérve a dodecil-szulfát anion és a víz diffúziósebességét, meg tudtuk határozni a micella körüli vízréteg vastagságát¹⁰. A diffúzió NMR-technikával megadott értékek összhangban voltak más adatokkal és más technikák, például a kisszögű neutronsórás eredményeivel²⁶.

3.2.1. PAMAM dendrimerek mérete, asszociációja és hidratációja

A diffúziós együttható az Einstein-Stokes egyenlet értelmében egyértelmű kapcsolatban van a diffundáló részecskék méretével, amennyiben a részecskék gömb alakúak, és egymás mozgását ütközés vagy egyéb kölcsönhatás révén nem befolyásolják. A poli-amido-amin (PAMAM) dendrimerek az irodalom szerint az első feltételt teljesítik, a második feltételt pedig úgy érhetjük el, hogy meghatározzuk a diffúziós együtthatókat a koncentráció függvényében és zérus koncentrációra extrapoláljuk. Természetesen vizes oldatban a dendrimerek hidratálódnak, aminek természetére pedig a víz (D_2O) diffúziósebességének koncentrációfüggéséből következtethetünk, mert ^1H -NMR-rel mindkét molekula diffúziója követhető. A D_2O diffúziója a HOD maradék jelen mérhető. A 4. ábra mutatja az NH_2 végcsoportú G5_PAMAM.NH₂ és a karboxilezett G5_PAMAM.NHCO (CH_2COOH) dendrimerek diffúziós együtthatóinak koncentrációfüggését²⁷.



4. ábra A G5_PAMAM.NH₂ (négyzet) és karboxil csoporttal módosított változata (rombusz) relatív diffúziós együtthatóinak függése a dendrimer térfogattörtjétől.

A zérus koncentrációra extrapolált diffúziós együtthatóból a G5_PAMAM.NH₂ dendrimer átmérője 6,1 nm-nek adódott, lényegesen nagyobbak, mint amit más módszerrel becsültek. A térfogattört függvényében ábrázolva a dendrimer diffúziós együtthatóit a kapott egyenes meredeksége -2,3 volt, aminek a merev, gömb alakú kolloidokra elméleti alapon -2,2 kell lennie (4. ábra).²⁸ Azaz meglepő módon saját pH-jukon (pH 10) a G5_PAMAM.NH₂ dendrimer molekulák alap és karboxilátal funkcionált változatai egymással gyakorlatilag más kölcsönhatást, mint a rugalmas ütközést nem mutatnak, tehát az ideális diszperziós (liofo) kolloidokhoz hasonlóan viselkednek. Ennek okát a nagymértékű hidratációban láttuk²⁷. A víz diffúziós együtthatójának koncentrációfüggését pedig úgy értelmeztük, hogy vannak víz (D₂O) molekulák, amelyek a dendrimerrel együtt diffundálnak, mások pedig szabadon mozognak. Mivel csak egy vízjelünk volt az NMR spektrumban, így a modellben azt is feltettük, hogy a cserefolyamat a dendrimerben lévő víz és a szabad víz között gyors az NMR kémiai eltolódás időskálán. Ebből az egyszerű modellből a dendrimer víztartalma 3600 mol/mol-nak adódott, méghozzá úgy, hogy megokoltuk, hogy a dendrimer a vízre nézve tökéletesen átjárható. Az ilyen módon meghatározott hidratációs szám pontos definíciója: *azoknak a vízmolekuláknak a száma, amelyek a makromolekulával egy dinamikai egységet képviselnek, de a diffúzió időskáláján gyorsan cserélődnek a tömbfázissal.* Ennek a számnak a realitását más módon, NMR krioprozimetriával is bizonyítottuk¹². Szintén diffúziometriai segítségével bizonyítottuk, hogy a foszfát puffer alkalmazása megváltoztatja a makromolekulás kolloidok viselkedését specifikus kölcsönhatások révén²⁹.

3.3. Kisterű NMR-relaxometria

Az NMR relaxometria a relaxációs idő mérése alapján következtet a rendszerben molekulák részecskék méretére, szerkezetére és a közeggel való kölcsönhatásra. Mind a nagyfelbontású és kislebontású változata alkalmas a kolloid rendszerek vizsgálatára. Mi elsősorban a porózus rendszerek tanulmányozására alkalmazzuk. A nagyterű, vagy nagyfelbontású NMR-rel szemben előny az olcsósága és olcsóbb üzemeltetése. Természetesen hátránya a kisebb érzékenység, így elsősorban az oldószer sajátosságait lehet vele követni. A kiértékelés komplikáltabb, de megjegyzendő, hogy az NMR hőskorában a matematikai alapokat már kidolgozták. Intézetünkben két Bruker MQ20 MiniSpec relaxométer üzemel, amelyek a rezonancia frekvenciája mindössze 20 MHz. Az egyik gradiens mérőfejjel és egységgel van felszerelve, így az oldószer relaxációsebessége mellett még a diffúzió mérésére is alkalmas.

A transzverzális relaxációs időt az ún. CPMG (*Carr, Purcell, Meiboom és Gill*) impulzus szekvenciával mértük. Ekkor ún. spin ekho jeleket generálunk, és mérjük azoknak az intenzitáscsökkenését az ekhoidó függvényében. A szokásos eljárás az, hogy multi-exponenciális függvényt illesztünk a csökkenő görbére, annyi elemből állót, amennyi relaxációs idejű részecske van a rendszerben:

$$I(t) = I_{\infty} + \left(\sum_{i=1}^n I_i e^{-t/T_{2i}} \right) \quad (3)$$

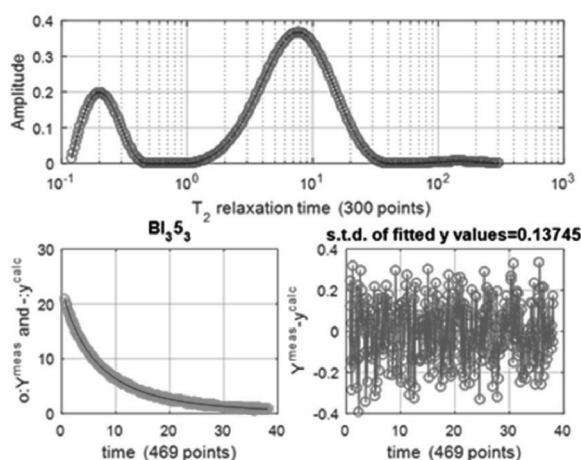
A szilikagél esetében a víz lehet a határfelületen, ahhoz közel, attól távolabb, és kis pórusokba zárva. Ha a diffúzió elég gyors ahhoz, hogy a diffúzió ideje alatt a felületi, a felület közeli és a megtelt pórusokban lévő vízmolekulák átkerüljenek egyik pozícióból a másikba, akkor egy átlagos relaxációs időt mérünk, azaz a (3) egyenletben $n=1$. A leggyakrabban a két helyi modellel írják le a rendszereket, amelyet a (4) egyenlet fejez ki^{18,30}:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{V_s}{V} \frac{1}{T_{2s}} + \frac{V_b}{V} \frac{1}{T_{2b}} \quad (4)$$

A mért relaxációs idő a felületi (s) és a tömbfázisbeli relaxációs idők (b) térfogattört szerinti átlaga. Ha a pórusok között az oldószer csere lassú, akkor több átlagos relaxációs időpárt (s és b) mérhetünk, amelyek aránya a pórusmérettel kapcsolatba hozható ((5) egyenlet). A kiértékelés során nehézséget okoz, hogy a multiexponenciális illesztés nagyon gyengén kondicionált feladat³¹. Ennek alternatívája a kifejezetten erre a rendszerekre kifejlesztett Laplace-inverziónál módszere, amely esetében nem kell előre megadni az illesztendő exponenciális tagok számát³². Lényege, hogy először a mért intenzitást relaxációs időre, mint független változóra skálazzuk át:

$$I(t) = I_{\infty} + \int_0^{\infty} T_2 I(T_2) e^{-\frac{1}{T_2} t} dT_2 \quad (5)$$

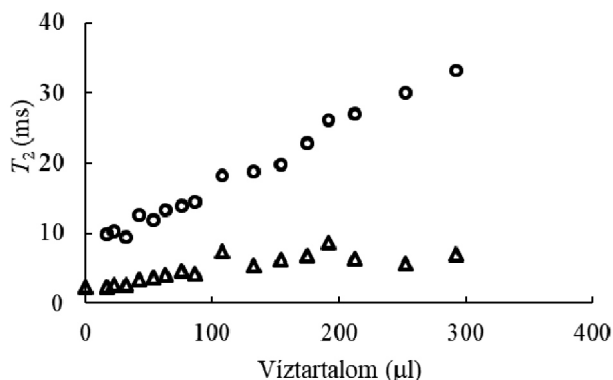
Ezt követően megadjuk a relaxációs idő racionális minimumát és maximumát és több száz pontra osztjuk ezt az intervallumot, mindegyikhez egy-egy relaxációs időállandót rendelve. Ezekhez kiszámítjuk az exponenciális függvény értékét, majd pedig a legkisebb négyzetek módszerével megkeressük az $I(T_2)$ eloszlásfüggvényt, azaz a pre-exponenciális tényezőket. Tipikus számítási eredményt mutat az 5. ábra. Látható, hogy a mutatott aránynál kétféle relaxációsebességű vízmolekula található a szilikában.



5. ábra Tipikus illesztési eredmény a multi-exponenciális relaxáció esetében, a MERA program kimeneti képe. Felül a kétféle relaxáció-eloszlást láthatjuk, alul a bal oldali képen az illeszkedés jóságát, a jobboldali képen pedig a százalékos eltéréseket pontonként.

(32 l víz/ 344 mg szilika)

A 6. ábrán mutatjuk be a víz transzverzális relaxációs idejének változását a koncentráció függvényében egy Kieszelgel 60 jelzésű szilikagél rendszerben a vízmennyiség függvényében. Az 6. ábrából a következő információkhoz juthatunk. A szilikagél pórusaiban a víz kezdetben adszorbeálódik a felületen. A formálisan nulla hozzáadott víztartalom esetén a levegőből adszorbeált víz relaxációs idejét mértük (2,4 ms).



6. ábra A 344 mg Kieszelgel 60-ba juttatott víz relaxációs idejének változása a hozzáadott vízmennyiség függvényében. A két pontsorozat kétféle víz jelenlétét jelzi.

A rövidebb relaxációs idő 25 l víz adagolásáig állandó, azaz adszorpció történik, majd enyhén növekszik, ami többretegű adszorpcióra utal, ezután 100 l-től nem változik. Ez a víz nincs kapcsolatban a pórusvízzel, és aránya gyakorlatilag lecsökken a kezdeti 80-90 %-ról 2-5 %-ra a növekvő vízmennyiséggel. A hosszabb relaxációs idejű víz először csak néhány %-ban jelenik meg. A víz relaxációs idejének növekedése 100 l-ig arra utal, hogy a pórusok sarkaiban ún. „tócsákat” képez. E tócsák növekednek, ami a relaxációs idő növekedésével jár, mert több lesz a vele kapcsolatban lévő tömbfázishoz hasonlós víz. Az állandósult relaxációs idő 100 és 180 l között arra utal, hogy megtelnek a jól definiált pórusok, és csak azok száma gyarapszik. Ezt követően a Kieszelgel 60 szemcséi közötti vizet mérjük. A pórusméret kiszámítása Allen és munkatársai szerint a következő módon történhet^{18,30}:

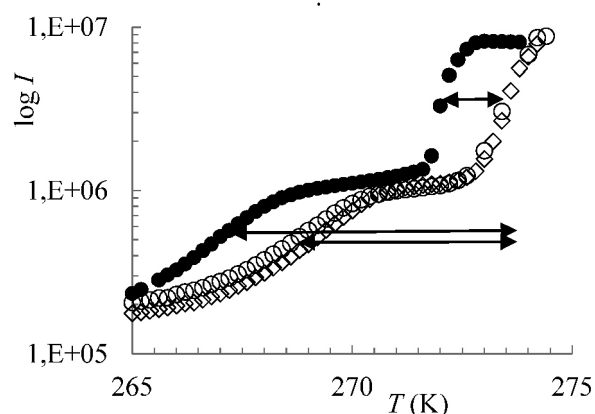
$$\rho = \left\{ 1 - \left[\frac{\left(\frac{T_{2s}}{T_2} - 1 \right)}{\left(\frac{T_{2s}}{T_{2b}} - 1 \right)} \right]^{1/3} \right\}^{-1} \quad (5)$$

Ahol a $\rho = r/l$ a dimenziómentes méret, ami azt adja meg, hogy az r pórusugár hányszorosa az l adszorbeált, azaz felületi vírzéteg vastagságának. T_2 a mért transzverzális relaxációs idő, T_{2s} a felületi rétegben lévő víz, T_{2b} a pórus belsejében lévő víz relaxációs ideje. Az (5) egyenlet érvényességének feltétele az, hogy gömbi pórusok vannak, amelyeken belül kétfajta víz található: felületi és nem felületi, amely utóbbinak a relaxációs ideje azonos a tömbfázisbelivel. A kétfajta vízmolekula helycseréje gyors a relaxáció időskáláján, azaz kiátlagolódik a relaxáció-sebességük. A pórusméret meghatározhatósága két állandó értékének, T_{2s} és l pontos ismeretétől függ. Az előbbi becsülhető a zérus víztartalomra extrapolált T_2 -ből, míg az

utóbbi pontos pórusméretű rendszer vizsgálatából egy bizonyos anyagfajtára meghatározható. A Kieszelgel 60 gyártó szerinti legvalószínűbb pórusugara 3 nm, míg a T_{2s} 2,5 ms-nak becsülhető (6. ábra). Ebből az l értékét becsülhetjük elve azzal a feltevéssel, hogy 100 és 200 l vízmennyiség között telnek meg a pórusok. A számítások azt mutatták, hogy a felületi vírzéteg vastagsága 0,2 nm-nek adódik, ami megegyezik az irodalomban adott értékekkel^{18,30}. Ez a két érték valószínűleg jól használható a szilikaféleségek pórusméretének relaxometriás meghatározásához. E mérőszorozatnak éppenséggel az is volt a célja, hogy ehhez az adathoz hozzájussunk³³. Megjegyezzük, hogy a két állandó kismértékű változása nagyobb eltéréseket okozhat a pórusméretben, ezért óvatosan kell eljárni a módszer alkalmazásakor. Jelentősége elsősorban a geokémiában, a kőzetek jellemzésénél és az olajiparban a viaszok olajtartalmának meghatározásánál van³⁴⁻³⁶. Léteznek olyan mérőfejek, amelyekkel a minta felületén lehet mérni, ezek elsősorban, amelyek a környezettudományokban alkalmazhatóak³⁷.

3.4. NMR krioporozimetria alkalmazása

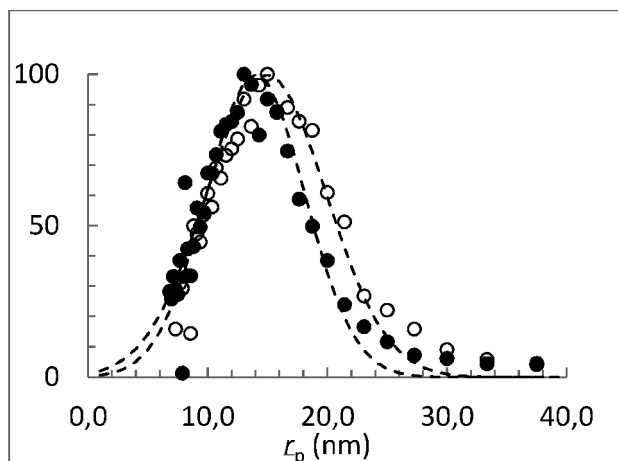
A pórusméret, illetve annak eloszlásának ismerete igen fontos. Meghatározására számos módszer ismeretes, azonban ezek többnyire más körülmények között történnek, mint ahogyan az alkalmazás. Az NMR krioporozimetria nem invazív, általában nem változtatja meg a mérés a pórusméret-eloszlást. Példánkban a rezorcin-formaldehid szerves aerogél pórusméret-eloszlásának meghatározását mutatjuk be NMR krioporozimetrián. A módszerrel nem csak a méreteloszlást, hanem a pórusalakot is meg tudtuk határozni. A rezorcin és a formaldehid polikondenzációjával egy olyan hidrogél jön létre, amelyből szuperkritikus extrakcióval aerogélt lehet készíteni. Ebből megfelelő karbonizálással szén aerogél nyerhető. Ennek széleskörű alkalmazási lehetőségét mutatták ki. Az NMR krioporozimetria vizes közegben képes megadni a pórusméret-eloszlást. A 7. ábra mutatja a vízzel feltöltött RF aerogél tipikus olvadási- és fagyási görbéit.



7. ábra A rezorcin-formaldehid aerogél NMR krioporozimetriás görbéje. A a fagyási görbe, a és o jelek két olvasztási periódus eredményét, és annak reprodukálhatóságát mutatják.

Látható az olvadási görbe reprodukálhatósága is, valamint az olvadás és a fagyás folyamatának histerézise. Az első effektus esetén nem történt olvadáspont-csökkenés, de közelítőleg 1 K fagyáspontcsökkenés észlelhető (273,2-ről

272,3-ra). Ez résalakú pórusra utal, és feltehetőleg a részecskék közötti vízréteg átlagos vastagságára jellemző, az értéke mintegy 30 nm ((2) egyenlet). A kisebb hőmérsékleten a két inflexiós pont távolságának aránya mintegy 1,5, ami gömb alakú pórusokra utal. A 8. ábra mutatja a fagyás- és az olvadásgörbéből számítható pórusméret-eloszlást, az olvadás- és fagyásgörbék grafikus differenciálásával előállítva. A legvalószínűbb pórusugár 15 nm-nek adódott és az eloszlás a 8. ábrán láthatóan közel Gauss-görbe jellegű.



8. ábra A 7. ábrán látható, fagyás- és olvadásgörbék deriváltja látható, a vízszintes tengelyen a (2) egyenletből számítható méret van feltüntetve a hőmérséklet helyett.

Hivatkozások

- Helmholtz, R. v.; *Annal. Phys.* **1886**, 263, 508. <https://doi.org/10.1002/andp.18862630403>
- Fraissard, J.; Lapina, O.; *Magnetic Resonance in Colloid and Interface Science*, Eds. Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, Boston, London, 2002 Vol. 76.
- Palfy, G.; Kiss, B.; Nyitray, L.; Bodor, A. *Chembiochem* **2016**, 17, 1829-1838. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600280>
- Kardos, J.; Kiss, B.; Micsonai, A.; Rovo, P.; Menyhard, D. K.; Kovacs, J.; Varadi, G.; Toth, G. K.; Perczel, A. *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 2946-2955. <https://doi.org/10.1021/jp5124234>
- Hetenyi, A.; Hegedus, Z.; Fajka-Boja, R.; Monostori, E.; Kover, K. E.; Martinek, T. A.; *J. Biomol. Nmr* **2016**, 66, 227-232. <https://doi.org/10.1007/s10858-016-0076-3>
- Kovacs, T.; Batta, G.; Zakany, F.; Szollosi, J.; Nagy, P.; *J. Lipid Res.* **2017**, 58, 1681-1691. <https://doi.org/10.1194/jlr.M077339>
- Nyden, M.; Holmberg, K.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, 14, 169-170. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.02.002>
- Schonhoff, M.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, 18, 201-213. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.004>
- Mariette, F.; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, 14, 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.10.006>
- Vass, S.; Grimm, H.; Banyai, I.; Meier, G.; Gilanyi, T.; *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 11870-11874. <https://doi.org/10.1021/jp051716p>
- Novak, L.; Banyai, I.; Fleischer-Radu, J. E.; Borbely, J.; *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1624-1632. <https://doi.org/10.1021/bm0612182>

Az így meghatározott pórusméret jól egyezik a nitrogén adszorpciós mérésekből becsült értékkel³⁸. Az NMR krioporozimetria értékes alternatívája lehet az egyéb módszereknek, mert abban a közegben határozható meg a pórusméret-eloszlás, ahol alkalmazzuk a szilárd fázist, illetve tanulmányozhatjuk a folyadékok hatását a száraz állapotban mért pórusméretre. A módszert sikeresen alkalmaztuk lágy anyagok esetében is, meg tudtuk határozni a dendrimerek üregeinek lehetséges méretét is¹².

Köszönetnyilvánítás

A kutatás a GINOP-2.3.2.-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával, valamint az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-2 Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával valósult meg. A szerzők egyike (B.I) köszönettel tartozik prof. Dr. Ioan Ardeleannek (Kolozsvári Műszaki Egyetem, Románia) a relaxometriában nyújtott önzetlen segítségéért.

- Keri, M.; Peng, C.; Shi, X. Y.; Banyai, I.; *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 3312-3319. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00272>
- Gunko, V. M. Turov, V. V. *NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDIES OF INTERFACIAL PHENOMENA* CRC Press: Boca Raton,, 2010.
- He, X. D.; Alves, C. S.; Oliveira, N.; Rodrigues, J.; Zhu, J. Y.; Banyai, I.; Tomas, H.; Shi, X. Y.; *Colloids Surf. B-Biointerfaces* **2015**, 125, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.004>
- Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N. *Dendrimer Chemistry: Concepts, Syntheses, Properties, Applications* Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2009. <https://doi.org/10.1002/9783527626953>
- Johnson, C. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, 34, 203-256. [https://doi.org/10.1016/S0079-6565\(99\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6565(99)00003-5)
- Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 520-554. <https://doi.org/10.1002/anie.200300637>
- Allen, S. G.; Stephenson, P. C. L.; Strange, J. H. *J. Chem. Phys.* **1998**, 108, 8195-8198. <https://doi.org/10.1063/1.476175>
- Bede, A.; Scurtu, A.; Ardelean, I. *Cem. Conc. Res.* **2016**, 89, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2016.07.012>
- Farrher, G.; Ardelean, I.; Kimmich, R.; *J. Magn. Reson.* **2006**, 182, 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2006.06.032>
- Farrher, G.; Ardelean, I.; Kimmich, R. *Appl. Magn. Reson.* **2008**, 34, 85-99. <https://doi.org/10.1007/s00723-008-0096-6>
- Petrov, O. V.; Furo, I. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, 54, 97-122. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2008.06.001>

23. Strange, J. H.; Rahman, M.; Smith, E. G. *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 3589-3591.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.71.3589>
24. Zhang, M. G.; Guo, R.; Keri, M.; Banyai, I.; Zheng, Y.; Cao, M.; Cao, X. Y.; Shi, X. Y. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1696-1706. <https://doi.org/10.1021/jp411669k>
25. Keri, M.; Palsu, L.; Turi, M.; Heim, E.; Czebely, A.; Novak, L.; Banyai, I. *Cellulose* **2015**, *22*, 2211-2220.
<https://doi.org/10.1007/s10570-015-0642-y>
26. Banyai, I.; Lakatos, I.; Meier, G.; Nagy, Z.; Vass, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2017**, *90*, 854-862.
<https://doi.org/10.1246/bcsj.20170050>
27. Banyai, I.; Keri, M.; Nagy, Z.; Berka, M.; Balogh, L. P. *Soft Matter* **2013**, *9*, 1645-1655.
<https://doi.org/10.1039/C2SM26726H>
28. Dhont, J. K. G. *An Introduction to the Dynamics of Colloids* Elsevier: Amsterdam, 1998.
29. Keri, M.; Nagy, Z.; Novak, L.; Szarvas, E.; Balogh, L. P.; Banyai, I.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 11540-11548.
30. Allen, S. G.; Stephenson, P. C. L.; Strange, J. H. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 7802-7809.
<https://doi.org/10.1063/1.473780>
31. Tikhonov, A. N.; Arsenin, V. Y. *Solutions of ill posed problems* W. H. Winston and Sons, (distributed by Wiley.): New York, 1977.
32. Does, M. D. http://www.vuivs.vanderbilt.edu/~doesmd/MERA/MERA_Toolbox.html
33. Kalmar, J.; Keri, M.; Erdei, Z.; Banyai, I.; Lazar, I.; Lente, G.; Fabian, I. *Rsc Advances* **2015**, *5*, 107237-107246.
<https://doi.org/10.1039/C5RA21353C>
34. Ayalur-Karunakaran, S.; Blumich, B.; Stapf, S. *Eur. Phys. J. E* **2008**, *26*, 43-53.
<https://doi.org/10.1140/epje/i2007-10341-x>
35. Presciutti, F.; Perlo, J.; Casanova, F.; Glogler, S.; Miliani, C.; Blumich, B.; Brunetti, B.; G. Sgamellotti, A. *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *93*. DOI: 10.1063/1.2963026
<https://doi.org/10.1063/1.2963026>
36. Song, Y. Q. *J. Magn. Reson.* **2013**, *229*, 12-24.
<https://doi.org/10.1016/j.jmr.2012.11.010>
37. Blumich, B.; Perlo, J.; Casanova, F. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2008**, *52*, 197-269.
<https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2007.10.002>
38. Nagy, B.; Czakkel, O.; Laszlo, K. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2014**, *185*, 66-71.
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.11.004>

Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) for Physico-Chemical Characterization of Colloid Systems

Physical chemistry, in general, gained a lot from studying colloids. These studies contributed to clarifying the exact definitions of surfaces, particles, phases *etc.* Nowadays the physical chemistry of colloids becomes extremely important because the high rate of progress in molecular biology requires this knowledge. Furthermore, the “nano age” is our present. We witness an explosion in nanoscience and nanotechnology. The key feature of this branch of physical chemistry is self-assembly. In practice we cannot produce nanoparticles but let them form as directed by the laws of stability, formation, structure, and particle dynamics. When the nanoparticles are “ready” the characterization is a vital point for their application in the industry or pharmacy.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy since the 1950s has become one of the most important tools for characterizing the equilibrium, dynamics and structure of materials. However, this method became an indispensable technique for characterizing nanometer-sized particles only in the last two decades, mainly for structural analysis of bio-macromolecules. In this paper, we show that beyond the classical 1D chemical shift and 2D correlation NMR spectroscopy other types of NMR methods can very often be used to characterize not only organic macromolecules but dispersion colloids or micellar systems as well. Moreover, for the solid porous materials, liquid NMR spectroscopy is a very powerful method to determine the pore size distribution. This paper does not deal with solid state NMR because it is very different from liquid state NMR either in theory or in practice. We rather deal in details with three methods: relaxometry, diffusometry and NMR-cryoporometry besides the usual NMR applications. In order to make these tools attractive, we shortly summarize the basic theory concerning them and show a few examples from our own research made during the last decade.

First, we show that ^{13}C -NMR can easily be used to determine the degree of functionalization of a macromolecular chelating agent (Figure 2). In this case the high chemical shift range of ^{13}C -NMR helped us to determine the degree of decoration of the well-known polyethylene-imine platform with chelating groups. This macromolecule is a very promising nano-sized chelating agent for transition metal ions.

The interaction of poly-amido-amine dendrimers of generation 5 (G5_PAMAM.NH₂) with a small organic molecule, the drug doxorubicin, is discussed with 1H-1H 2D NOESY spectrum (Figure 3). NOESY is very useful to detect secondary interactions because cross-relaxation, the reason of the appearance of cross peaks, is determined by the spatial vicinity of groups even if there is a primary chemical bond between them. We could not find cross peaks between the drug and the dendrimer platform, however the phase of cross peaks between protons within the drug were in identical phase compared to the diagonal peaks. It is a clear indication from the long rotational correlation time that is the drug molecule is inside of a large particle.

NMR diffusometry is used to determine the hydrodynamic size of particles containing NMR active nuclei. However it is usually forgotten that one should measure the diffusion coefficient as a function of the concentration and extrapolate the *D* value to zero, otherwise the obstruction effect causes false results in size. Furthermore the concentration dependence gives information on the association properties. The highly hydrated dendrimers behave like hard spheres, ideal lyophobic colloids, nonetheless that G5_PAMAM.NH₂ was expected to be highly associated. The concentration dependence of their apparent diffusion coefficient proved that there is no specific interaction between their NH₂ end groups. (Figure 4) The most probable reason is that water hydrates the end groups and prevents the interaction between

them. By measuring the diffusion rate of water in the presence of G5_PAMAM dendrimers we found that the hydration number can also be calculated and is as high as 3600 mol/mol macromolecule.

Low field NMR relaxometry is widely used in geochemistry and in the oil industry. It does not provide high resolution NMR spectra but it can measure relaxation rates and diffusion coefficients very effectively. The main advantage of these relaxometers is the low price and low maintenance requirement. The basic method used is the titration of porous materials with a solvent and measurement of the change in relaxation time. According to our experiences this method can provide information about the wettability of surfaces of porous materials and about the mechanism of wetting. In certain cases it is even applicable for pore size determination. However it suffers from the lack of the knowledge about the surface relaxivity and that of the thickness of the surface layer. Kieselgel-60 silicagel with known pore size provided information about the thickness of the adsorbed layer of water molecules on silica species in general. Therefore measurement of the relaxation time distribution of Kieselgel 60 makes possible to determine the mechanism of wetting and the size of pores of other newly prepared silica based materials. (Figure 6) We are on the way to extend this method for other types of aerogels with the combination of NMR cryoporometry. Low field NMR diffusometry can also be used for pore size determination of macropores by using the concept of hindered diffusion, however the application requires high computational care because the full process cannot be described by analytical equations, only some approximate formulas are available.

NMR cryoporometry is based on the famous Gibbs-Thomson equation introduced to describe the phase transfer

temperature for liquids confined in small volumes of solids, typically porous materials. NMR brought a breakthrough in this classical method because it is able to detect quantitatively the molten solvent as a function of temperature. Therefore we are able to construct melting-freezing curves (Figure 7). From these experiments the pore size distribution can be calculated for solids, like aerogels in solution (Figure 8). This method looks very promising because it is non-invasive and contrary to mercury porometry it can be used for soft material, like gels. We successfully used this method for dendrimers and aerogels. This method has a possibility to determine the pore shape as well. Disadvantage of the NMR cryoporometry is that the constants in the Gibbs-Thomson equation should be determined experimentally using known pore size material. It depends on the solvent used but also on the interface tensions which are determined by the solid as well. The limits of pore size which can be determined vary from 2-5 nm to 100 nm.

This paper summarizes NMR-related activity of the colloid group of the Department of Physical Chemistry, the former Department of Colloid and Environmental Chemistry, of the University of Debrecen. We have published about 30 papers in the last decade on this subject in collaboration with Hungarian and international partners. The goal of this paper is to encourage colloid chemists to use NMR spectroscopy and to enlighten for them the gain which can be obtained from NMR. Normally the NMR labs are accessible through specially trained operators who are, as a matter of fact, professional in high resolution multidimensional methods for organic chemistry. This communication hopefully helps to bring closer colloid chemistry to the operators and facilitate the communication between colloid chemists and NMR experts.