

# **Nukleární magnetická rezonance**

Lekce 1 – Úvod do NMR

# Nuclear Magnetic Resonance

## In vivo NMR spectroscopy ( $^1\text{H}$ , $^{31}\text{P}$ )

- magnetic resonance tomography - MRT (from Greek *tomos* = section or slice) or magnetic resonance imaging - MRI (and fMRI)

## NMR spectroscopy

- **solids**
- **liquids** (solutions)
  - **biology, biochemistry** (macromolecules - proteins, nucleic acids, enrichment -  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )
  - **chemistry and pharmacy** (M.W.  $\sim < 2000$  D, natural abundance of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ )

# NMR strukturní analýza

- 1) Úvod, vznik signálu, chemický posun, interpretace  $^1\text{H}$  NMR spektra
- 2) Elektronické a strukturní vlivy na chemický posun, nepřímá spin spinová interakce, vektorový model, spinové systémy
- 3) Interakce jaderného spinu, pulzní sekvence, relaxace ( $T_1$  a  $T_2$ ), nukleární Overhauserův jev (NOE)
- 4) Kalibrace RF pulzu, chemická výměna, spinové echo, APT, DEPT
- 5) 2D NMR spektroskopie, COSY, interpretace
- 6) Přenos polarizace, heteronukleární korelace, HETCOR
- 7) Inverzní experimenty, HSQC, HMQC, HMBC
- 8) Vícekvantová spektroskopie, DQF-COSY, INADEQUATE
- 9) Spin lock, TOCSY, NOESY
- 10) Gradientní NMR spektroskopie, 3D NMR
- 11) DOSY, NMR spektrometry, sondy, logická struktura analýzy
- 12) NMR spektroskopie pevného stavu

# Historie NMR

- 1945 – první detekce NMR signálu v kondenzované fázi (Bloch, Purcell)
- 1949 – 1950 – objev chemického posunu a spin-spinové interakce
- 1952 – Felix Bloch a Edward M. Purcell – Nobelova cena za fyziku
- 1953 – nukleární Overhauserův jev
- 1957 – Fourierova transformace (FT) – vztah mezi frekvenční (NMR spektrum) a časovou závislostí (FID)
- 1970 – 1975 –  $^{13}\text{C}$  NMR je běžná metoda
- 1971 – koncept 2D NMR (J. Jeener)
- 1974 – vývoj a realizace 2D NMR experimentů (R. Ernst)
- 1991 – Richard Ernst – Nobelova cena za rozvoj NMR spektroskopie
- 2002 – Kurt Wüthrich – Nobelova cena za rozvoj 3D NMR u biomakromolekul
- 2003 – Paul C. Lauterbur, Sir Peter Mansfield - Nobelova cena za MRI

# Proč studovat NMR spektroskopii ?

## **Významná metoda strukturní chemie a biologie**

- Chemie přírodních látek
- Organická chemie – analytický nástroj pro organickou syntézu
- Supramolekulární chemie – studium nekovalentních interakcí
- Anorganická chemie – komplexy, Materiálová chemie - CNT
- Biochemie, molekulární biologie – NK, proteiny, komplexy

## **Studie dynamických procesů**

- Reakční kinetika
- Studium chemických výměn (nebo strukturních)

## **Konformační studie**

- Proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy, komplexy

## **Návrh nových typů léčiv**

- Vztah struktura-aktivita (SAR)

# Úvodní poznámky

- **Absorpční (emisní) spektroskopie, podobně jako IČ nebo UV**, detekce absorpce radiofrekvenčního záření jádru atomů v molekulách
- Aktivní jsou pouze jádra se spinovým kvantovým číslem ( $I$ )  **$\neq 0$**
- Sudé hmotové číslo + sudé atomové číslo
  - $I = 0$  ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ )
- Sudé hmotové číslo + liché atomové číslo
  - $I = \text{celočíslný}$  ( $^{14}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ )
- Liché hmotové číslo
  - $I = \text{polovinový}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ )

- **Spinové stavy jsou kvantovány – změně stavu odpovídá absorpce (emise) RF záření**

$$m = l, (l-1), (l-2), \dots, -l$$

m je magnetické kvantové číslo

- Pro  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  platí

$$l = \frac{1}{2} \quad m = \frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$$

# Jaderný spin

- **spinový moment hybnosti jádra I** ... superpozice spinů nukleonů v atomovém jádře daného izotopu

0	<sup>12</sup> C (98.9%)	<sup>16</sup> O(99.9%)			
$\frac{1}{2}$	<sup>1</sup> H (99.98%)	<sup>13</sup> C (1.1%)	<sup>15</sup> N(0.37%)	<sup>31</sup> P(100%)	<sup>19</sup> F(100%)
1	<sup>2</sup> H (0.02%)	<sup>14</sup> N(99.63%)			

- **magnetický moment  $\mu$**

$$\mu = \gamma I \quad \mu_z = \gamma I_z$$

$\gamma$  ... magnetogyrická konstanta charakteristická pro dané jádro





# Izolovaný jaderný spin v magnetickém poli

energie spinového dipólového momentu  $\mu_z$  v magnetickém poli:

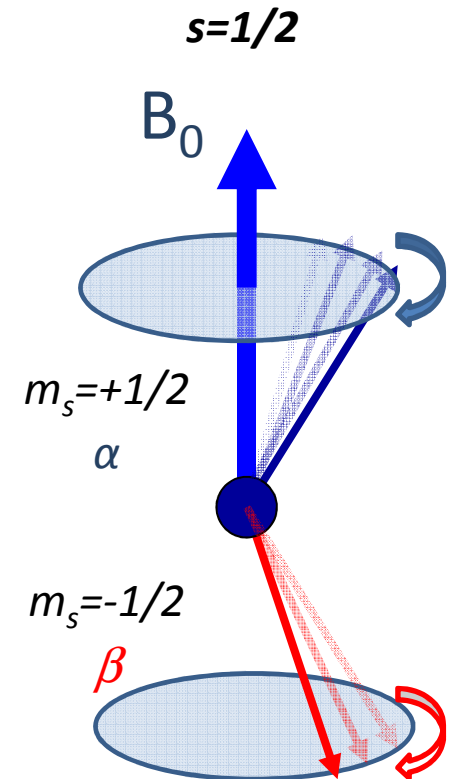
$$E = -\mu_z B_0$$

- ztráta degenerace spinových stavů  $m_s$
- Boltzmannova statistická distribuce pro jádro  $s=1/2$ :

$$N_{+1/2} / N_{-1/2} = e^{-2\mu_z B_0 / kT}$$

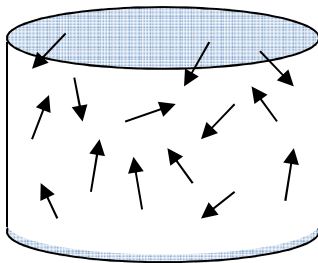
precesní pohyb spinu kolem vektoru  $B_0$  s Larmorovou frekvencí  $\omega$

$$\omega = -\gamma B_0$$

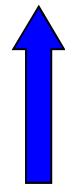
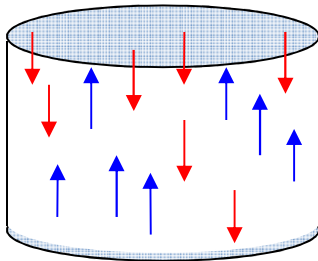


# Makroskopická magnetizace $M_z$

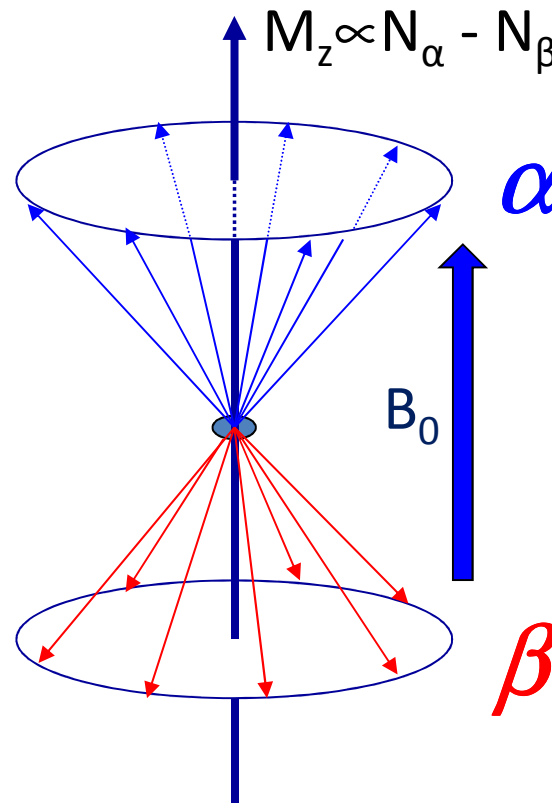
spinové dipólové momenty se ve vnějším magnetickém poli zorientují podél vektoru magnetické indukce, výsledný vektor magnetizace představuje superpozici populací obou stavů  $m_s$



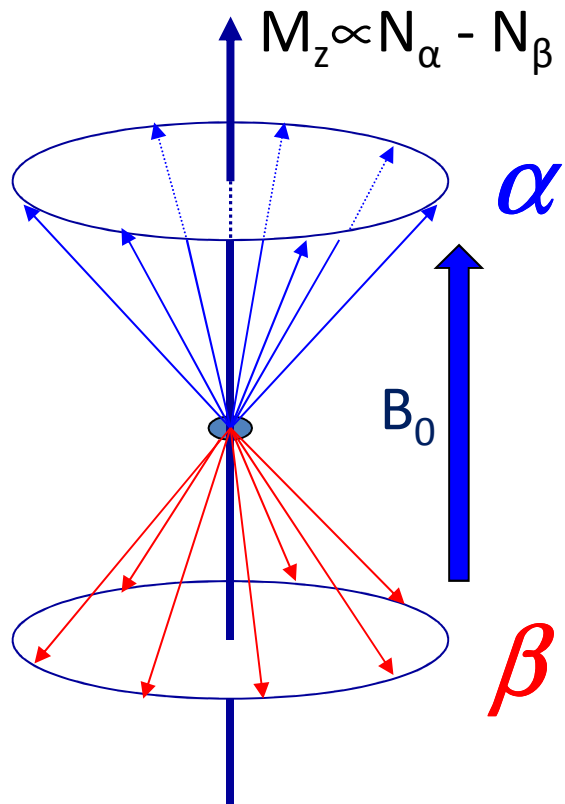
$B_0 = 0$



$B_0$



# Makroskopická magnetizace



$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{2\mu_z B_0}{kT}} = e^{\frac{\hbar\gamma B_0}{kT}} = e^{\frac{\hbar\omega}{kT}}$$

Pro  $B_0=7,05$  T:

$\gamma(^1\text{H}) = 267,5 \cdot 10^6 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$   $\nu(^1\text{H}) = \omega / 2\pi = 300$  MHz :

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \frac{1\,000\,048}{1\,000\,000}$$

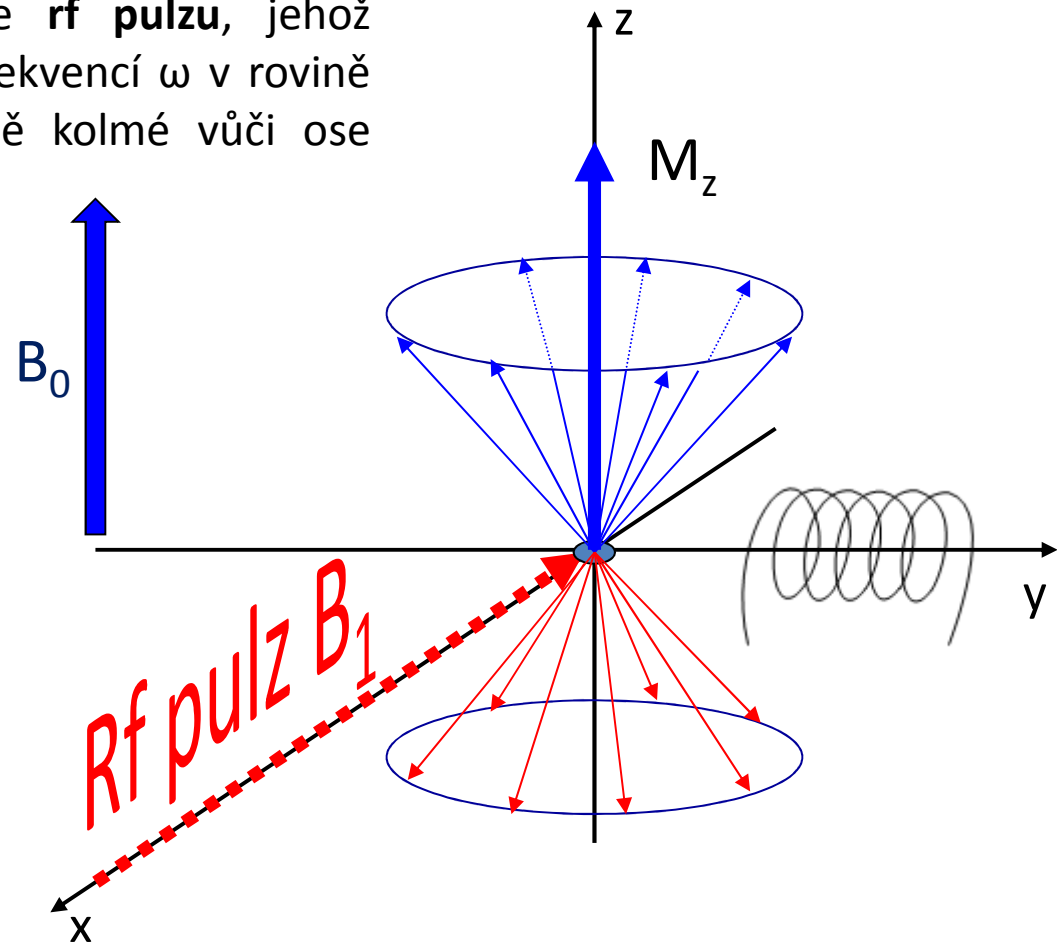
$\gamma(^{13}\text{C}) = 67,3 \cdot 10^6 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$   $\nu(^{13}\text{C}) = 75$  MHz :

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \frac{1\,000\,012}{1\,000\,000}$$

# Radiofrekvenční pulz

Působením magnetického pole **rf pulzu**, jehož vektor  $\mathbf{B}_1$  rotuje s rezonanční frekvencí  $\omega$  v rovině  $xy$ , dojde k rotaci  $M_z$  v rovině kolmé vůči ose otáčení  $B_1$ .

**Transverzální rovina  $xy$ :**  
detekován signál oscilujícího pole jaderných spinů



# Pulzní NMR techniky

**Excitace** – ozařováním spinu **rf pulzem** dojde k přechodu z rovnovážné stavu ve směru osy z do roviny detekce (xy)

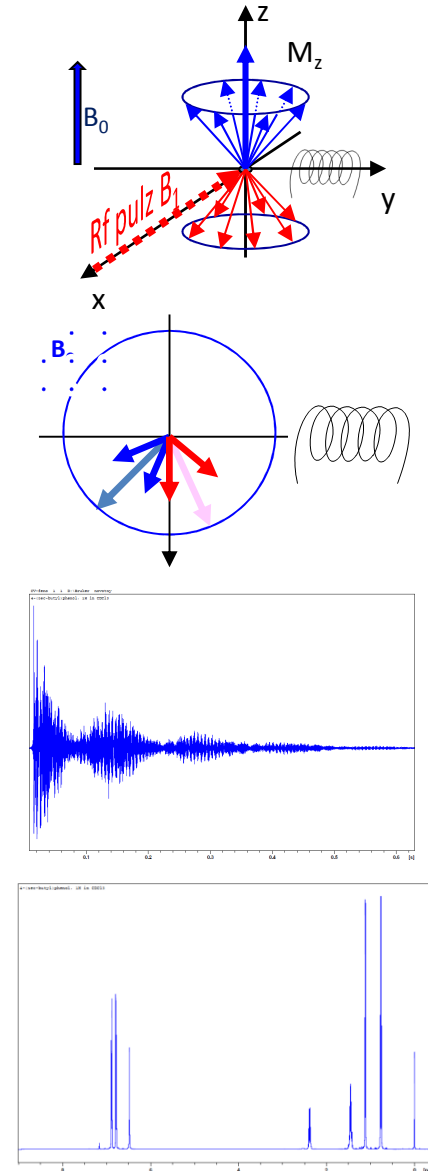
**Vývoj** – jednotlivé excitované systémy dle vektorového modelu vykonávají rotační pohyb v xy o charakteristických frekvencích v důsledku interakce s lokálním magnetickým polem

**Detekce signálu** – vznikající oscilující pole excitovaných spinů je snímáno cívkou v podobě časové závislosti indukovaného proudového signálu (**FID**)

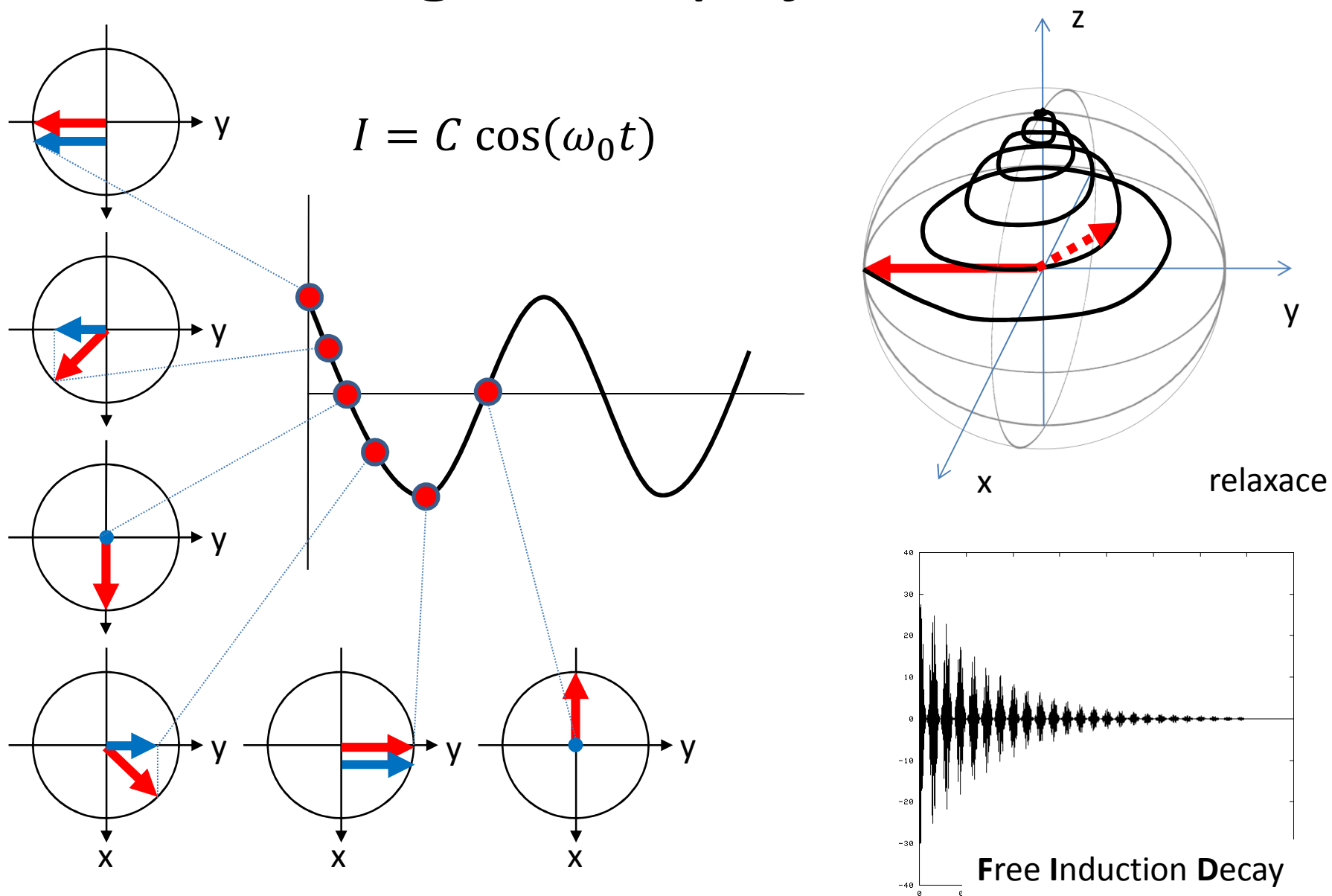
**Akvizice** – uložení FIDu do paměti, relaxační prodleva před zahájením dalšího skenu.

**Furierova transformace** – převedení akumulovaných FIDu do závislosti intezity signálů na frekvenci – **NMR spektra**.

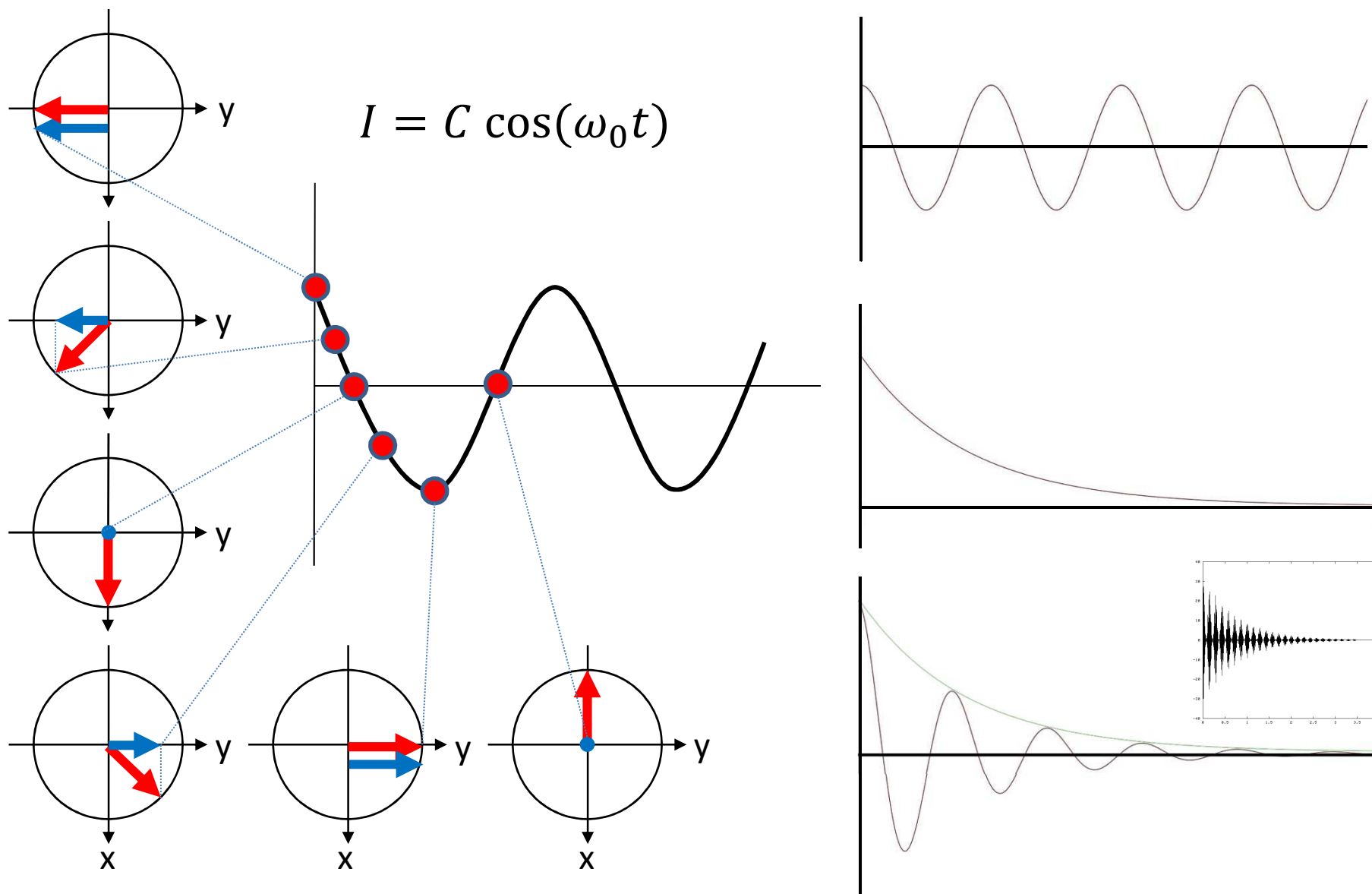
**Relaxace** – návrat do rovnovážného stavu v ose z, rozfázování koherentního vývoje spinů v rovině xy



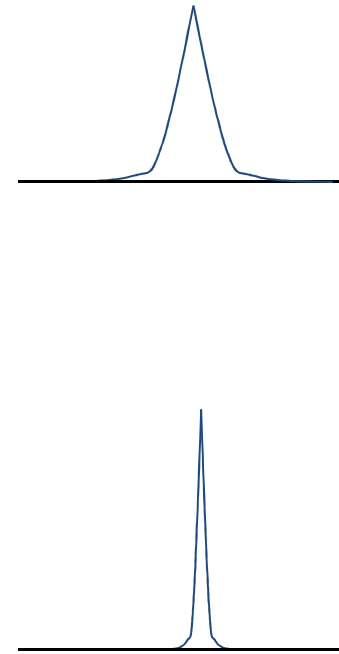
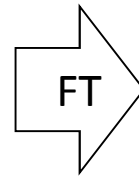
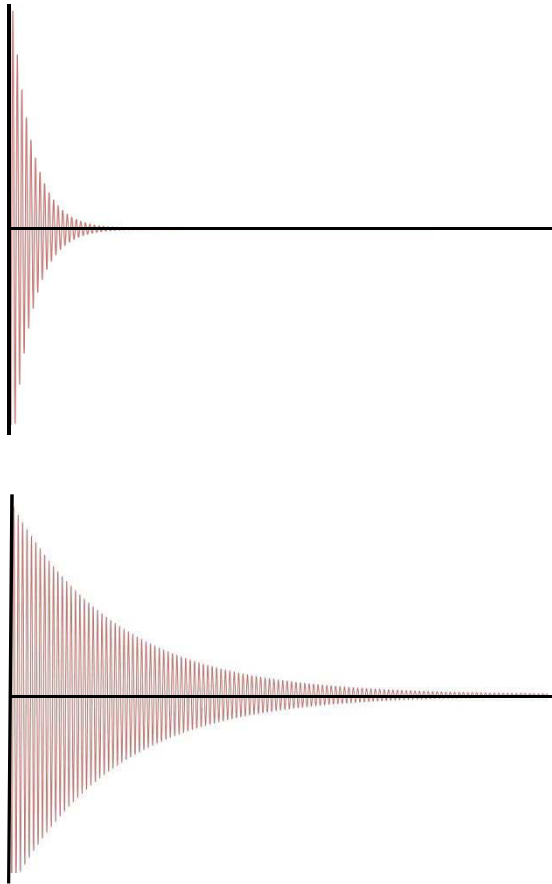
# Průběh signálu v přijímací cívce



# Průběh signálu v přijímací cívce



# Průběh signálu v přijímací cívce



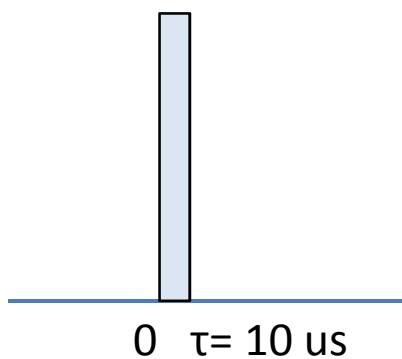


# Rádiofrekvenční pulzy

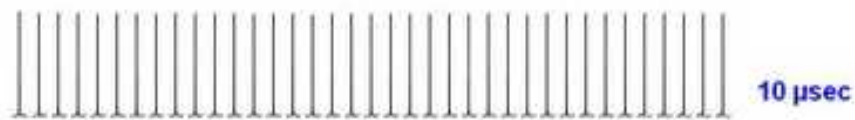
Šířka excitačního profilu je nepřímo úměrná délce trvání pulzu.

Střed excitačního profilu spektra odpovídá nastavení vysílače  $\Omega_0$  spektrometru.

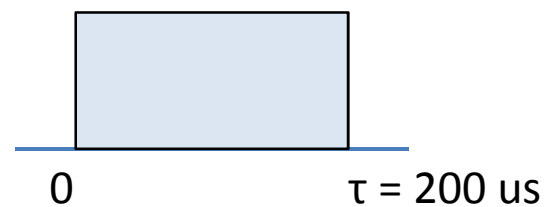
**TVRDÝ (pravoúhlý) neselektivní pulz**



FT



**MĚKKÝ (pravoúhlý) selektivní pulz**



FT

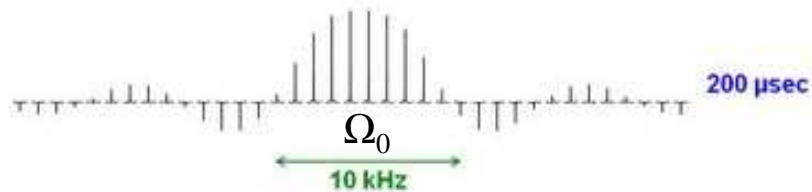
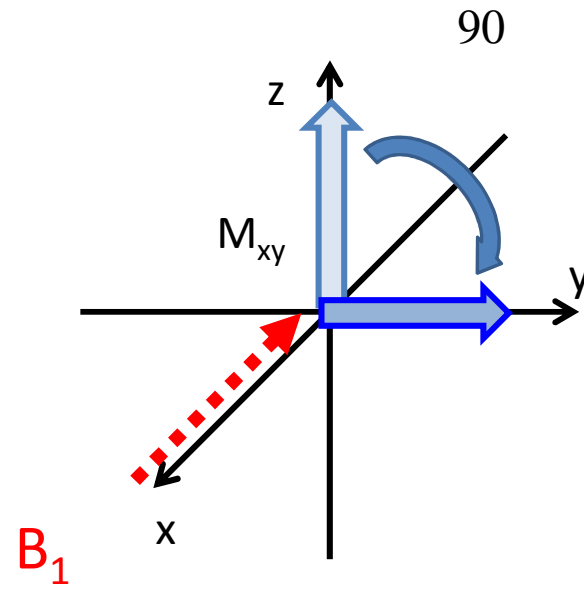
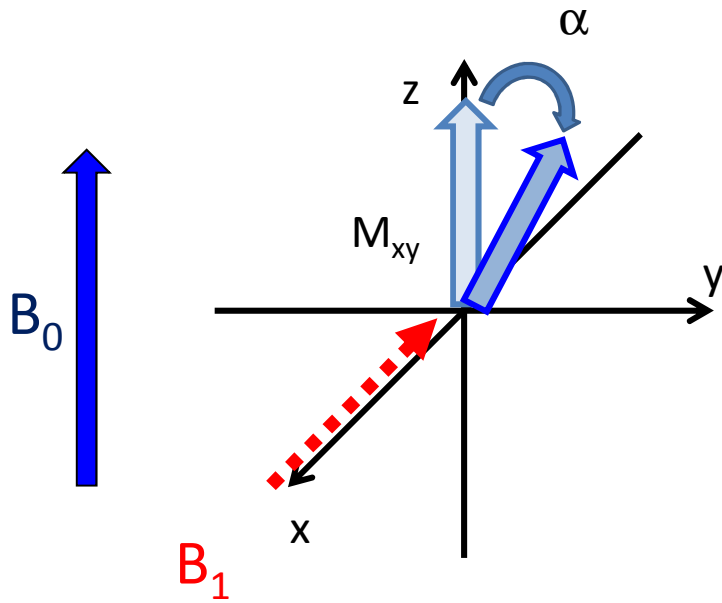
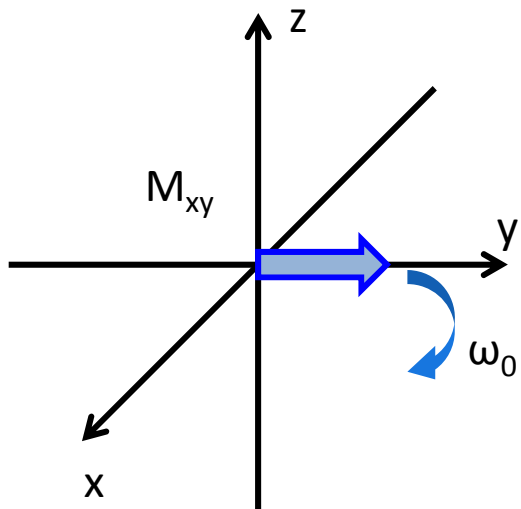
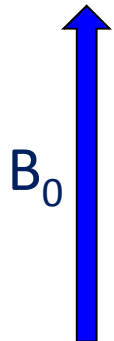


Schéma excitačních profilů

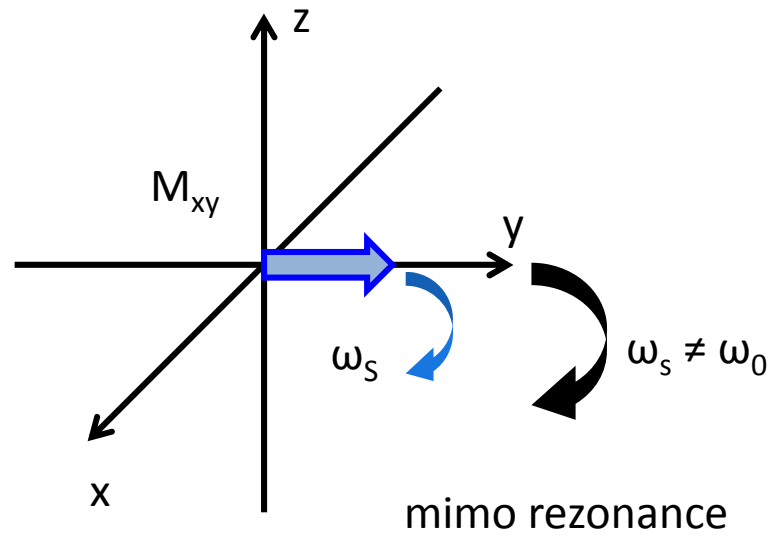
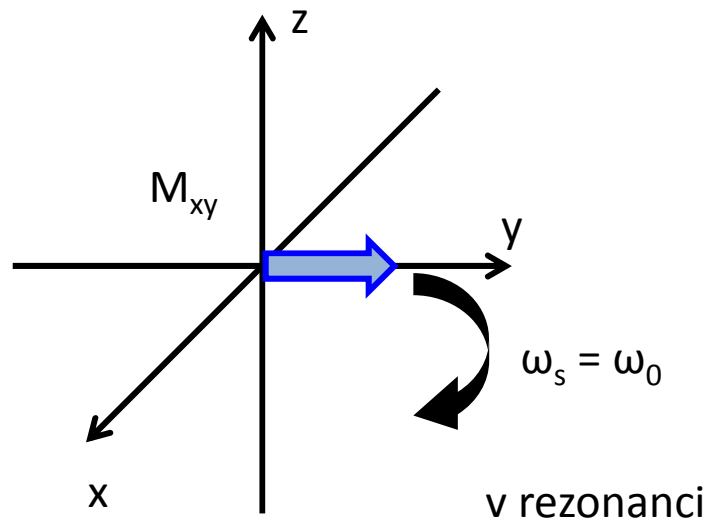
Sklápěcí úhel  $\alpha$  pro signál v rezonanci  $\Omega_0$ :

$$\alpha = \gamma B_1 \tau$$



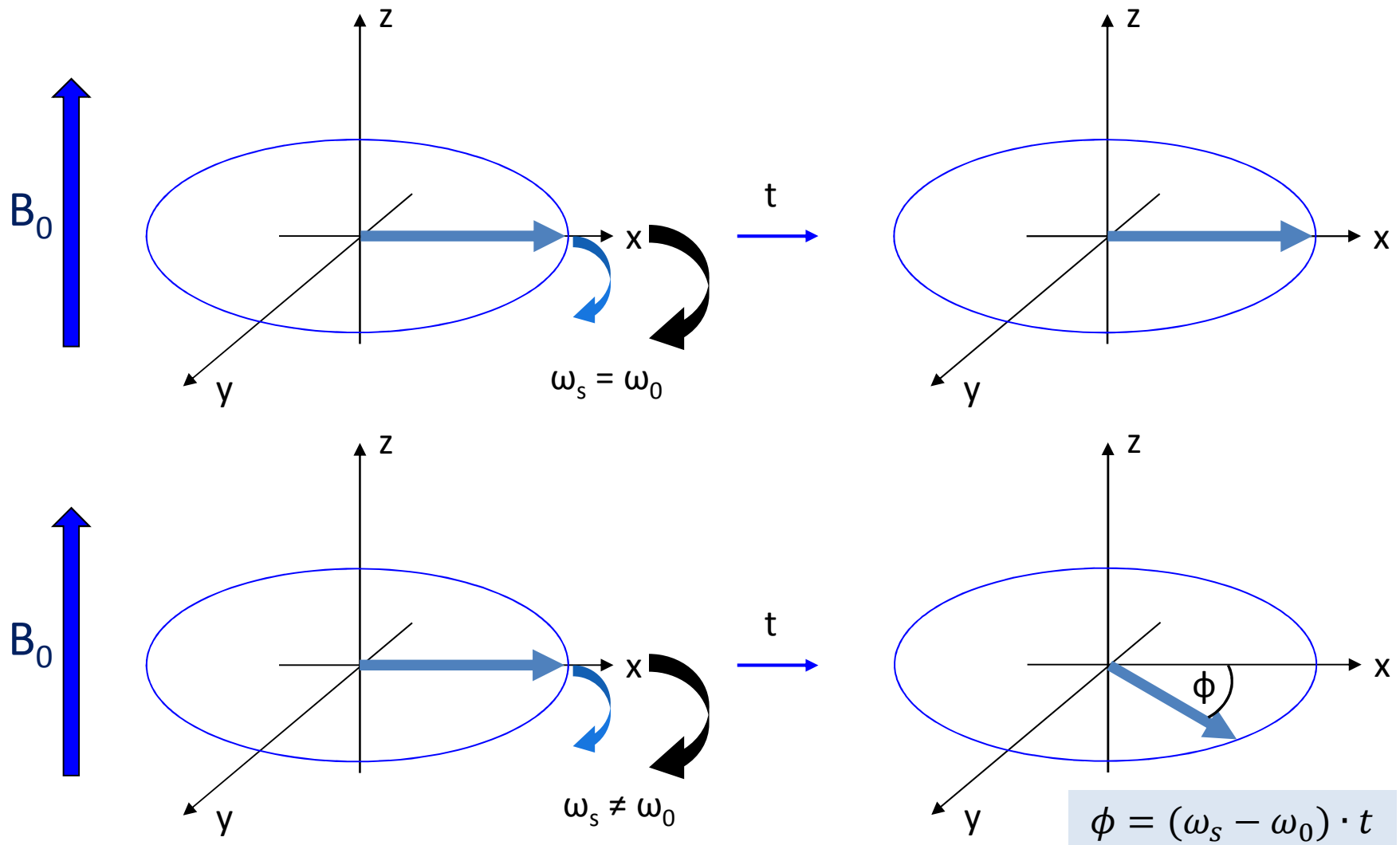


laboratorní soustava souřadnic



rotující soustava souřadnic

# Chemický posun v rotující soustavě



$$s(t) \xrightarrow{FT} S(\Omega)$$

# FT NMR

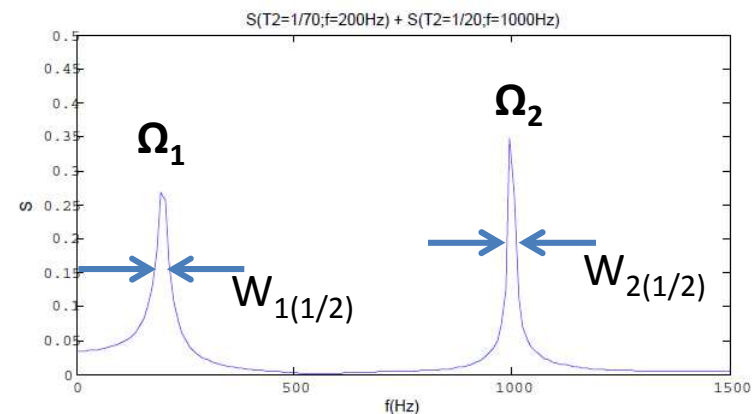
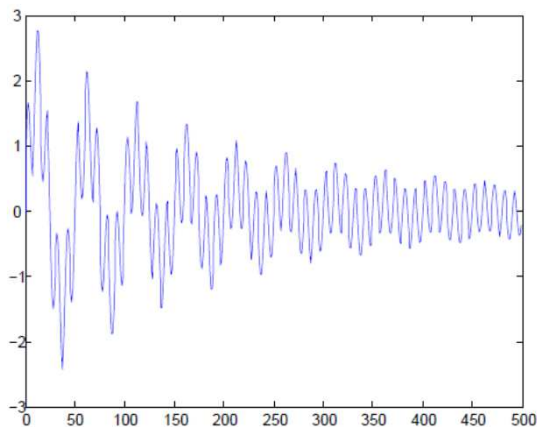
Fourierova transformace FT představuje lineární proces, umožňující analyzovat spektrální složení časově závislého FIDu (Fourierův obraz  $s$ ) na základě komplexního integrálu:

$$S(\Omega) = \int_0^{+\infty} s(t) e^{-i\Omega t} dt$$



Pro případ signálu složeného pouze ze dvou různých oscilací dostáváme pro reálnou část součet dvou absorpčních křivek s maximy odpovídajícími frekvencím  $\Omega_1$  a  $\Omega_2$  o velikostech úměrných váhovému zastoupení  $s_i^{(0)}$  a **pološířkám signálu** závislým na relaxačním čase  $T_2^{(i)}$ :

$$\text{Re } S(\Omega) = \text{Re} \int_0^{+\infty} \left( s_1^0 e^{i\Omega_1 t - \frac{t}{T_2^{(1)}}} + s_2^0 e^{i\Omega_2 t - \frac{t}{T_2^{(2)}}} \right) e^{-i\Omega t} dt = s_1^0 \frac{T_2^{(1)}}{(\Omega - \Omega_1)^2 T_2^{(1)2} + 1} + s_2^0 \frac{T_2^{(2)}}{(\Omega - \Omega_2)^2 T_2^{(2)2} + 1}$$



# Jaderné stínění

vnější pole generuje indukované **lokální magnetické pole elektronové hustoty  $B_{loc}$  (izotropní aproximace):**

$$B_{loc} = \sigma \cdot B_0$$

Hamiltonián stínění:

$$\hat{H}_{CS} = -\gamma \sigma B_0 \hat{I}_z$$

Precesní frekvence ovlivněná stíněním jádra

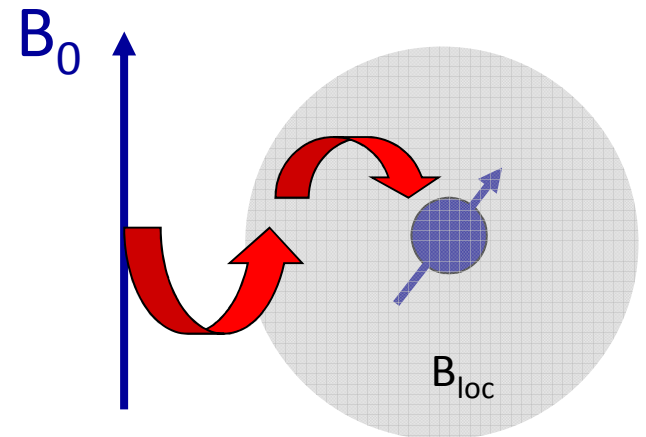
$$\omega = -\gamma(1 + \sigma)B_0$$

**Chemický posun:**

$$\delta = \omega - \omega_{ref}$$

**Definice relativní škály chemického posunu:**

$$\delta = (\omega - \omega_{ref}) / \omega_{ref} \cdot 10^6 \text{ ppm}$$



# Chemický posun vs. stínící konstanta

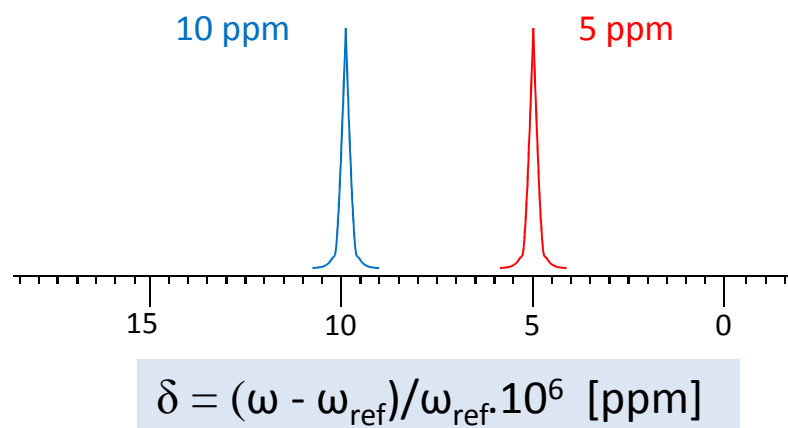
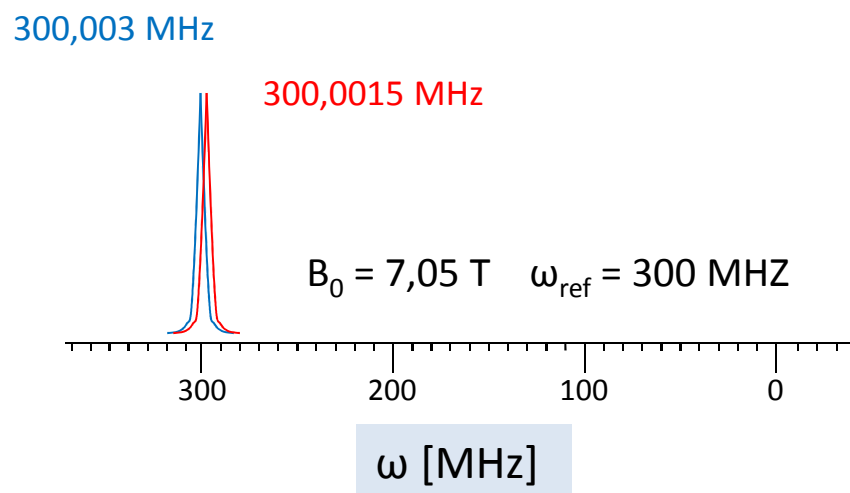
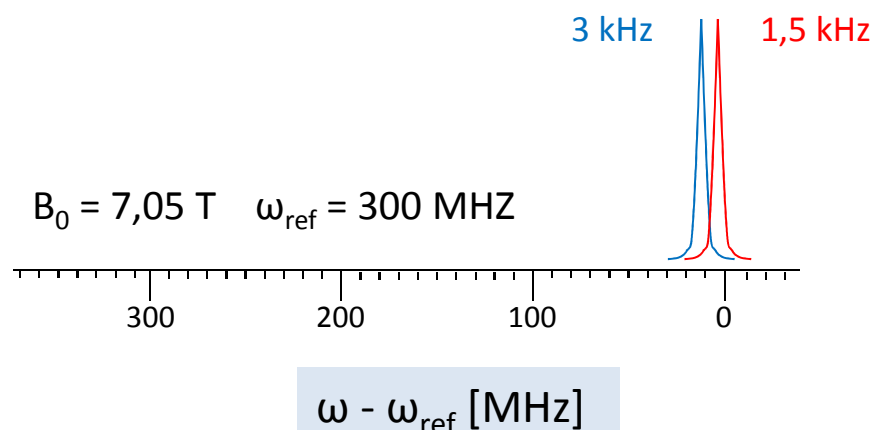
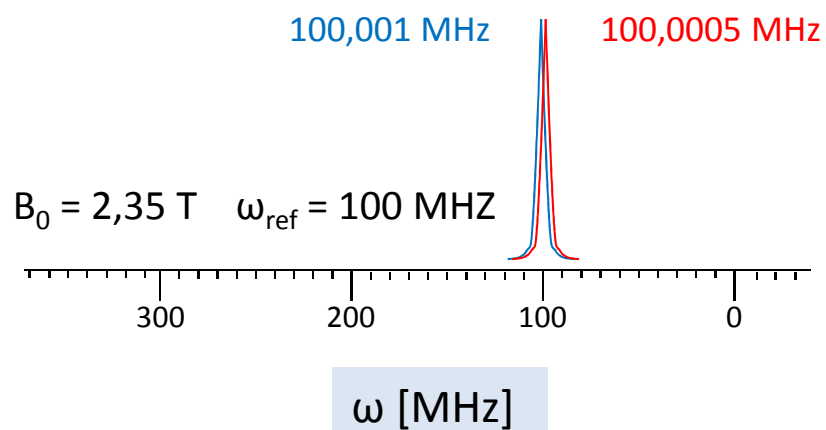
Zavedení referenční hodnoty stínící konstanty  $\sigma_{\text{ref}}$  standartu v referenčním vnějším poli  $B_{0 \text{ ref}}$  splňující tutéž rezonanční podmínku:

$$(1 - \sigma)B_0 = (1 - \sigma_{\text{ref}})B_{0 \text{ ref}}$$
$$\sigma - \sigma_{\text{ref}} \approx (B_0 - B_{0 \text{ ref}}) / B_{0 \text{ ref}} = (\omega - \omega_{\text{ref}}) / \omega_{\text{ref}}$$

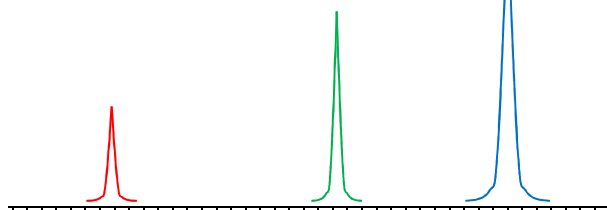
Chemický posun jako rozdíl stínících konstant:  $\delta = \sigma - \sigma_{\text{ref}}$

**Definice relativní škály chemického posunu:**  $\delta = (\omega - \omega_{\text{ref}}) / \omega_{\text{ref}} \cdot 10^6 \text{ ppm}$

# Definice škály chemického posunu

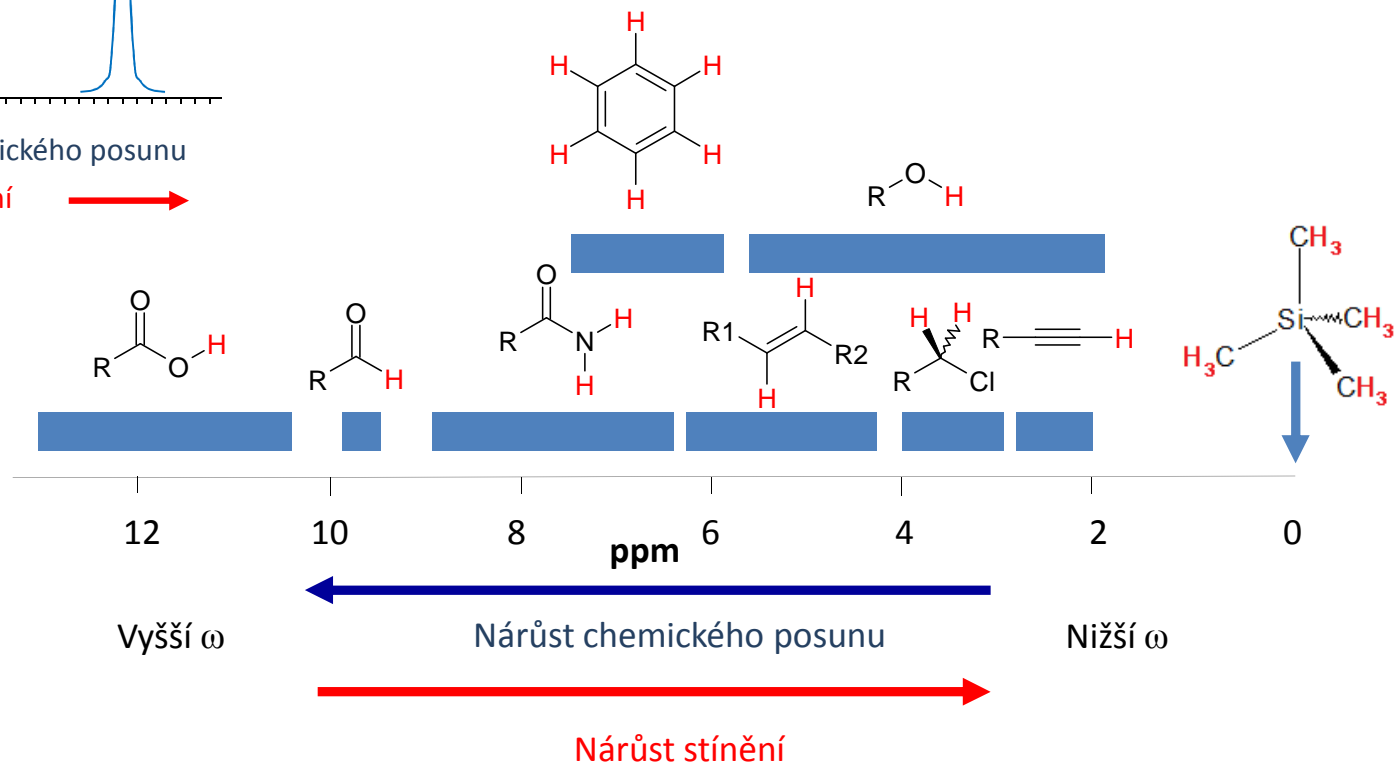






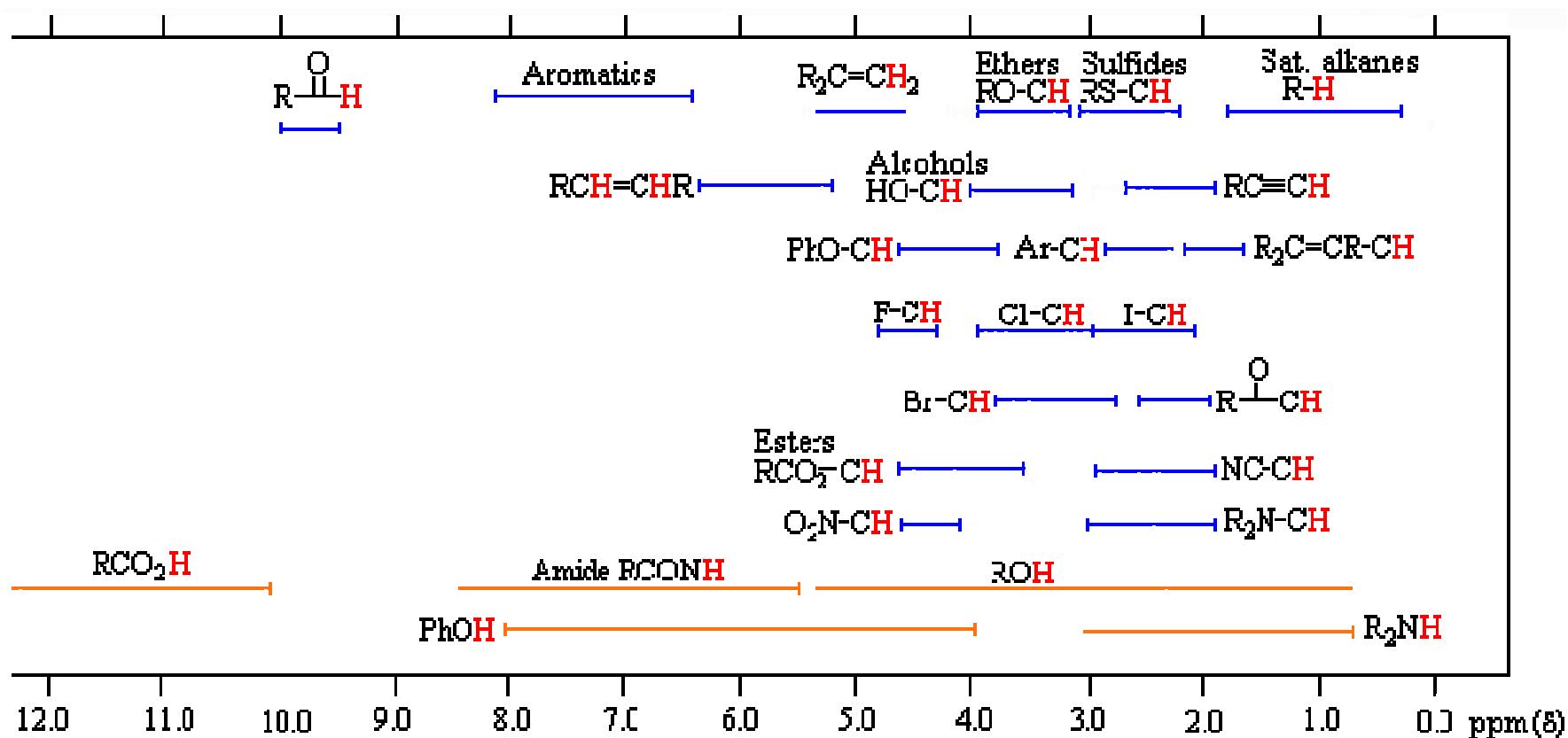
← Nárůst chemického posunu  
Nárůst stínění →

# 1D <sup>1</sup>H NMR spektrum

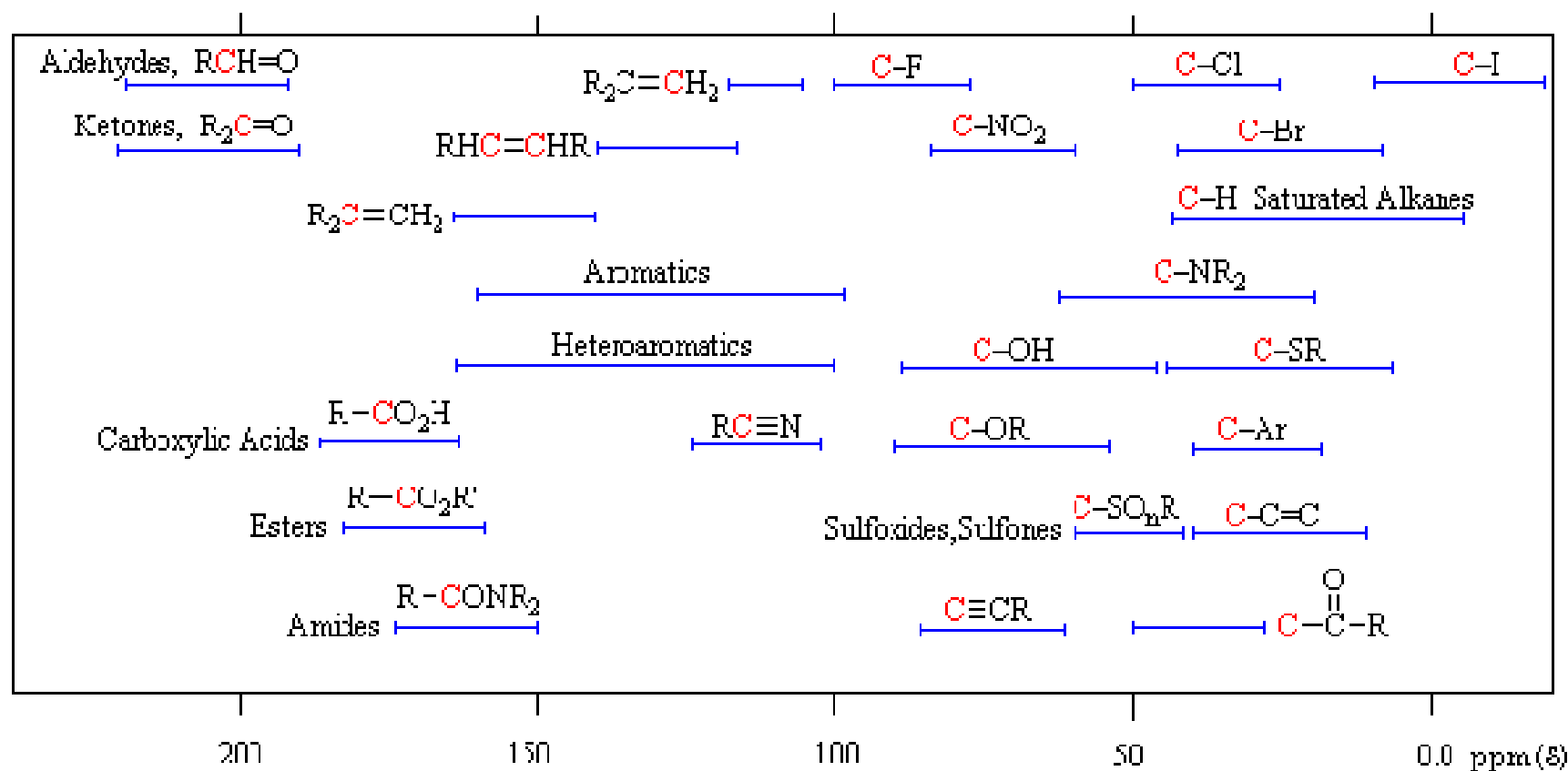


- Závislost intenzity signálu na jeho rezonanční frekvenci, resp. chemickém posunu.
- Položírka signálu - relaxace, chemická výměna
- Kvantifikace signálů - integrace

# $^1\text{H}$ NMR chemické posuny



# $^{13}\text{C}$ NMR chemické posuny



# 1H PENICILLINE G

