

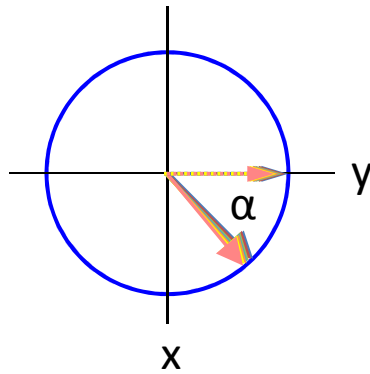
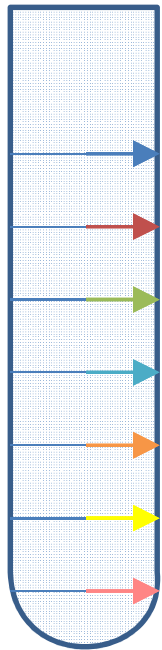
# **Nukleární magnetická rezonance**

Gradientní NMR spektroskopie

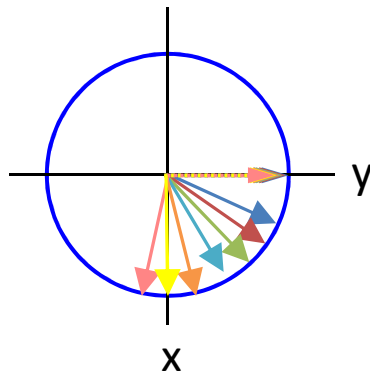
# Selekce signálů

- homogenita magnetického pole
  - kdyby nebylo magnetické pole homogenní, vykazovala by jádra stejného typu v různých pozicích vzorku rozdílné precesní frekvence a tím i rozdílné chemické posuny (rozšíření signálu)
- homogenita je nastavena cívkami kolem vzorku – upravují pole v osách x, y, z a jejich kombinacích
- magnetické pole může v čase fluktuovat => je potřeba ho zastabilizovat – lokování “locking” např. na signál deuteria, které je přítomné v nějakém množství v rozpouštědle (např. D<sub>2</sub>O)
- řízená a přesně definovaná nehomogenita může být využita k selekci signálu

# Gradients

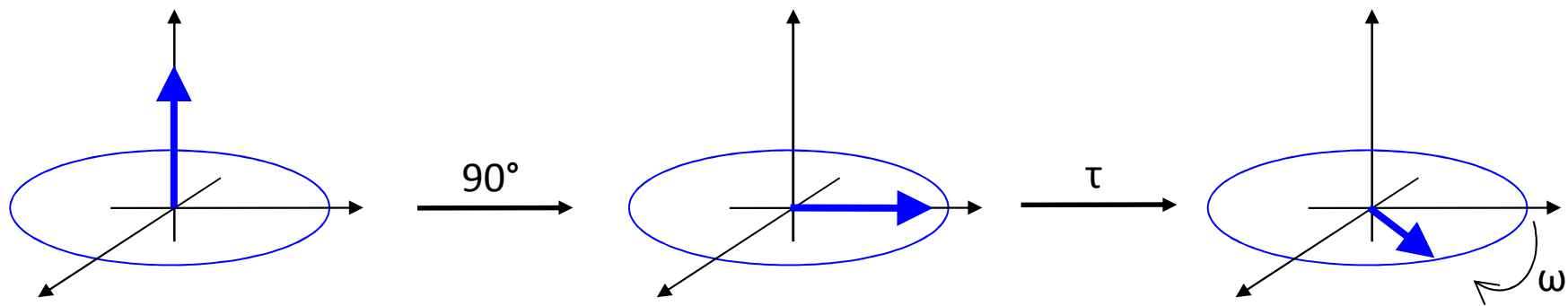
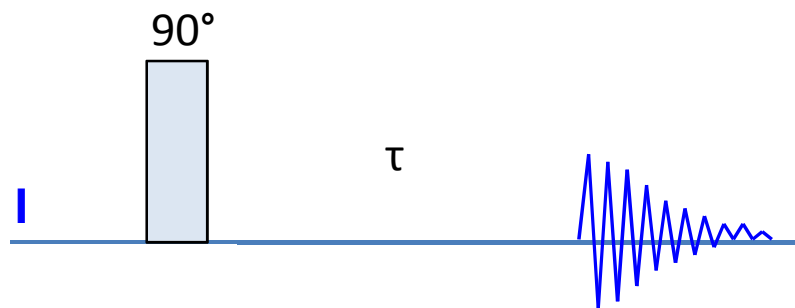


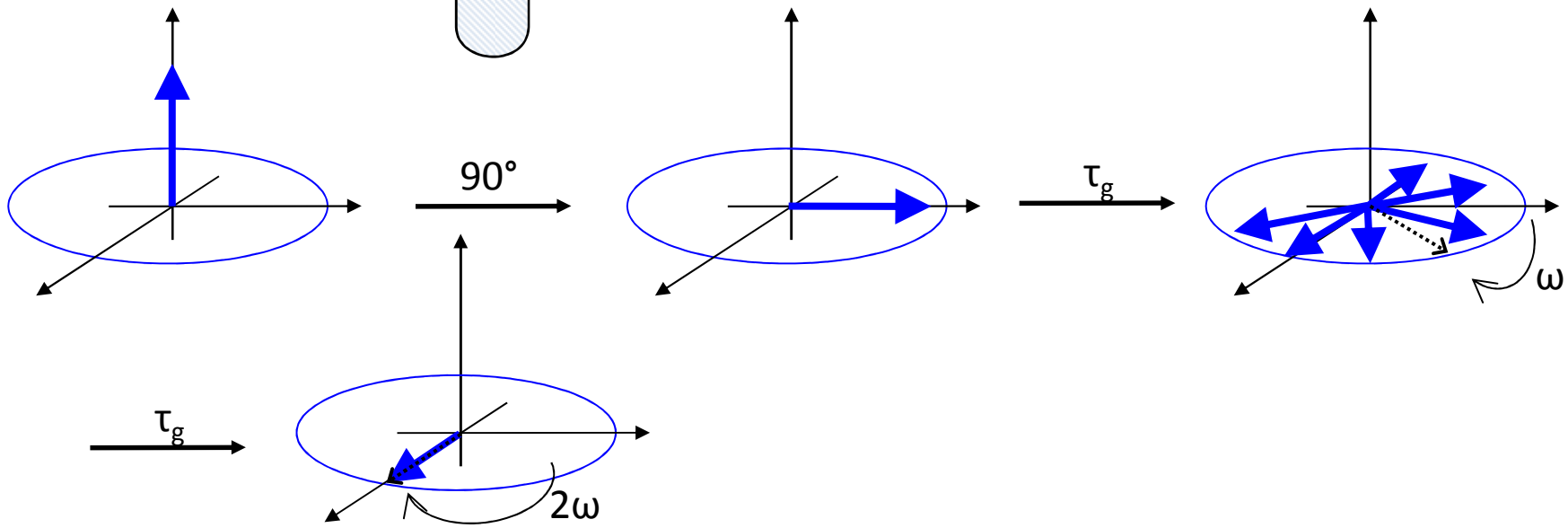
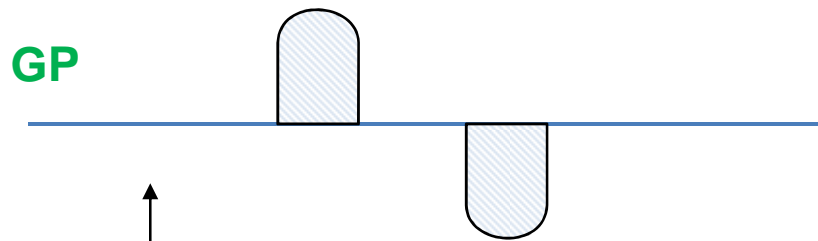
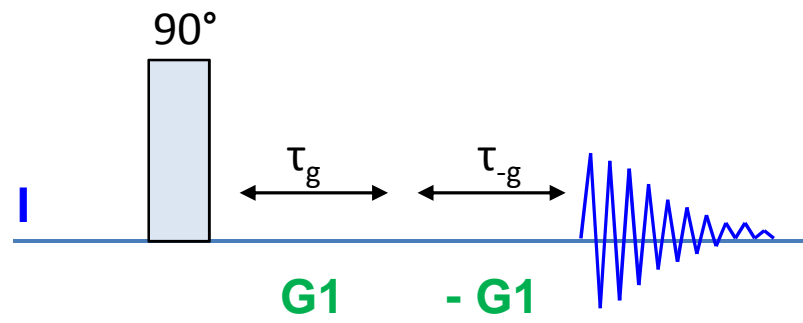
- v případě homogenního magnetického pole se vektory reprezentující různé pozice v kyvetě posunou za čas  $\tau$  o stejný úhel  $\alpha$  (stejná frekvence)

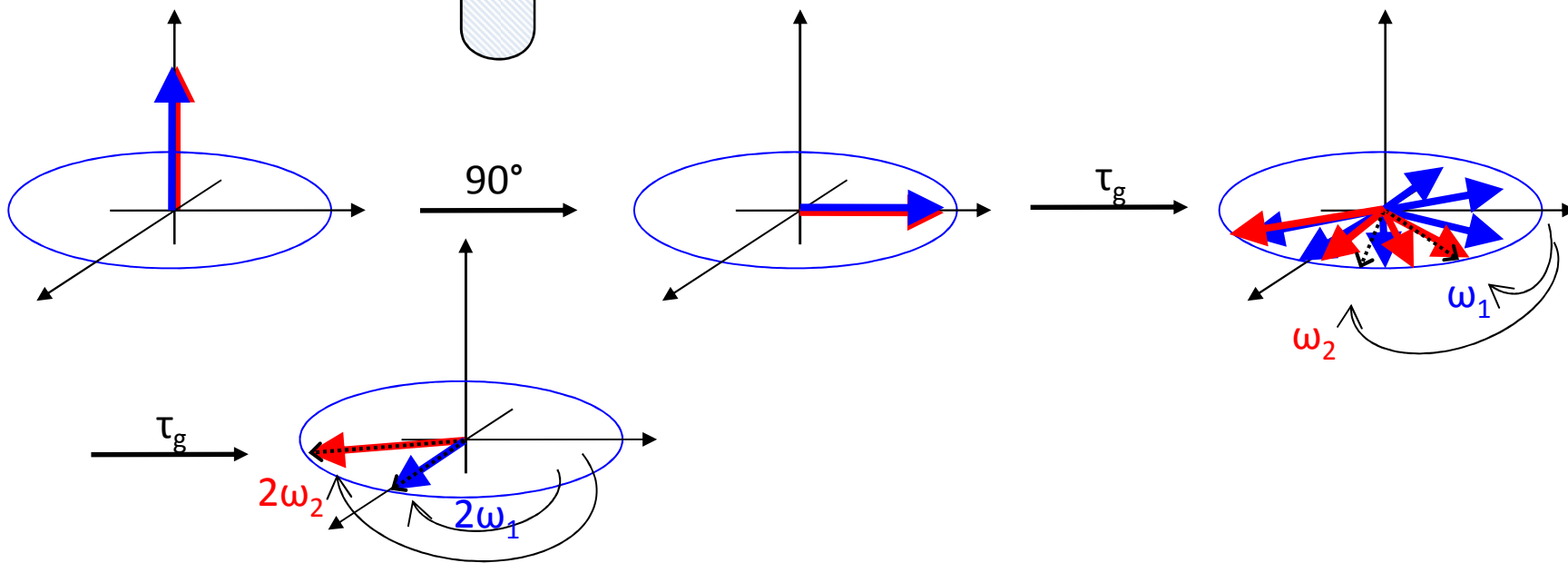
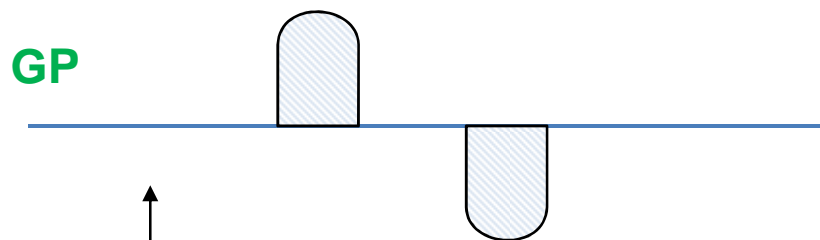
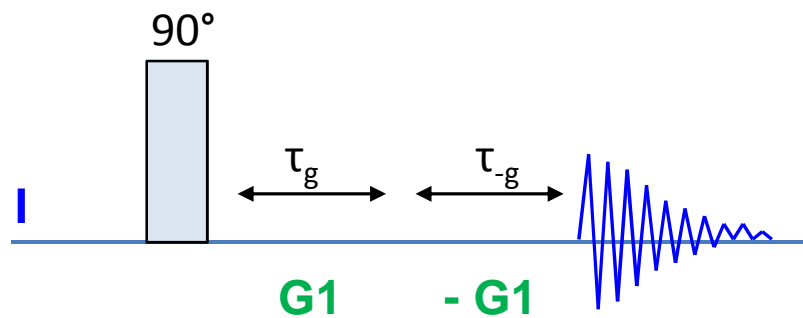


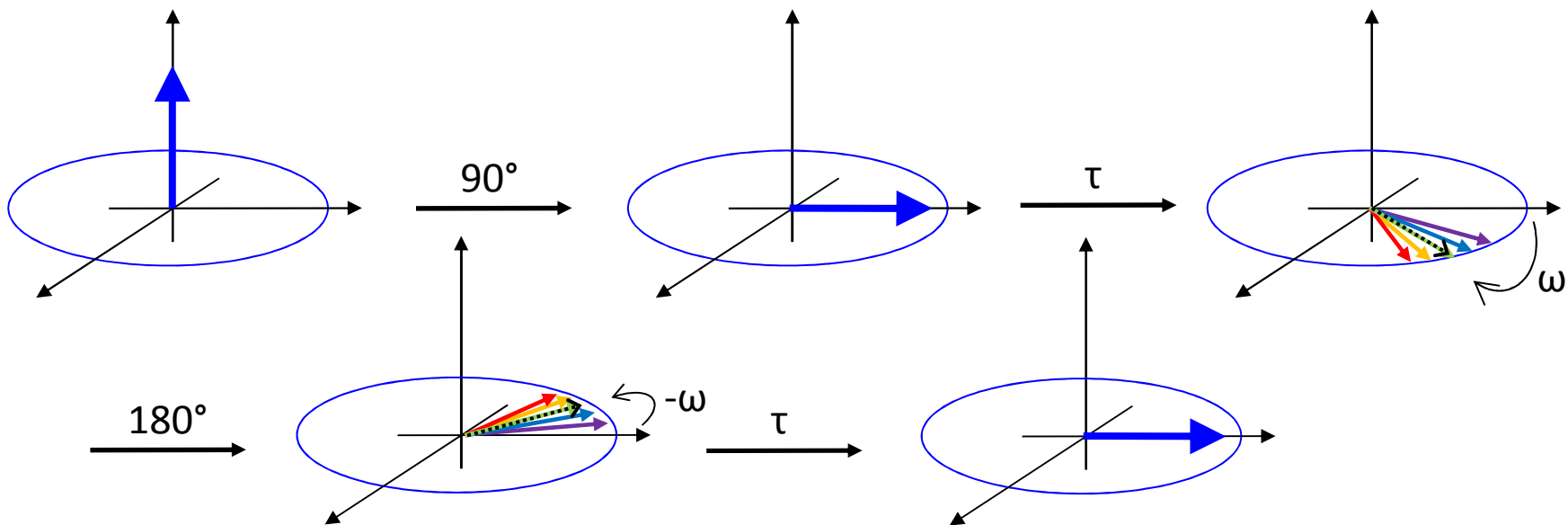
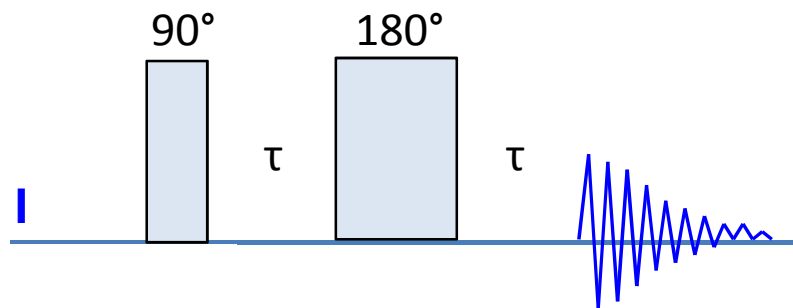
- v případě nehomogenního mag. pole se vektory posunou o různé úhly (různá frekvence)

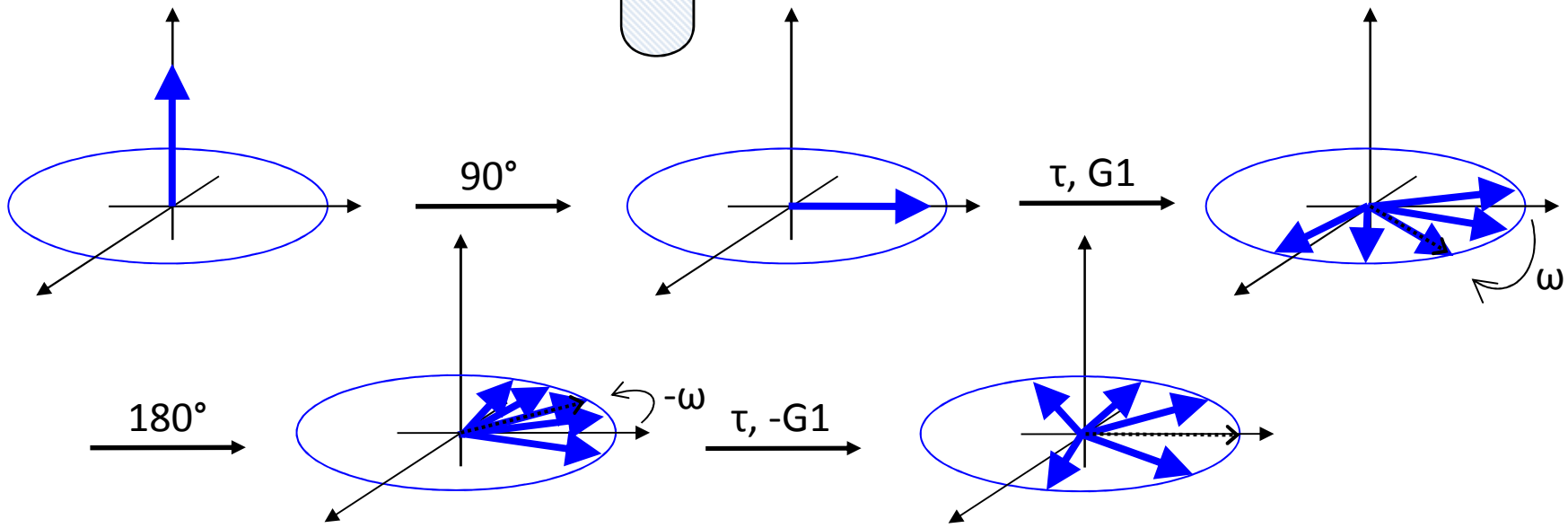
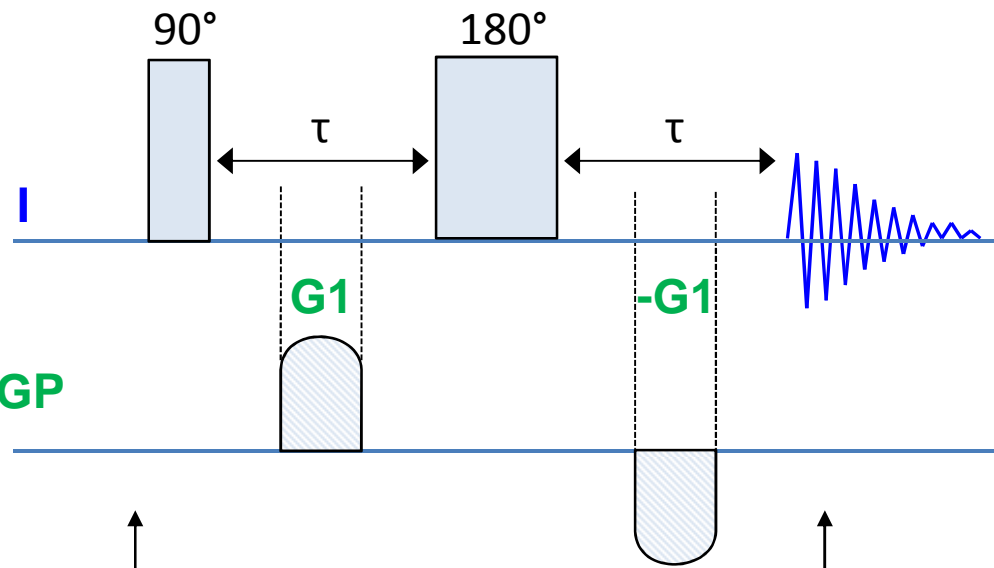




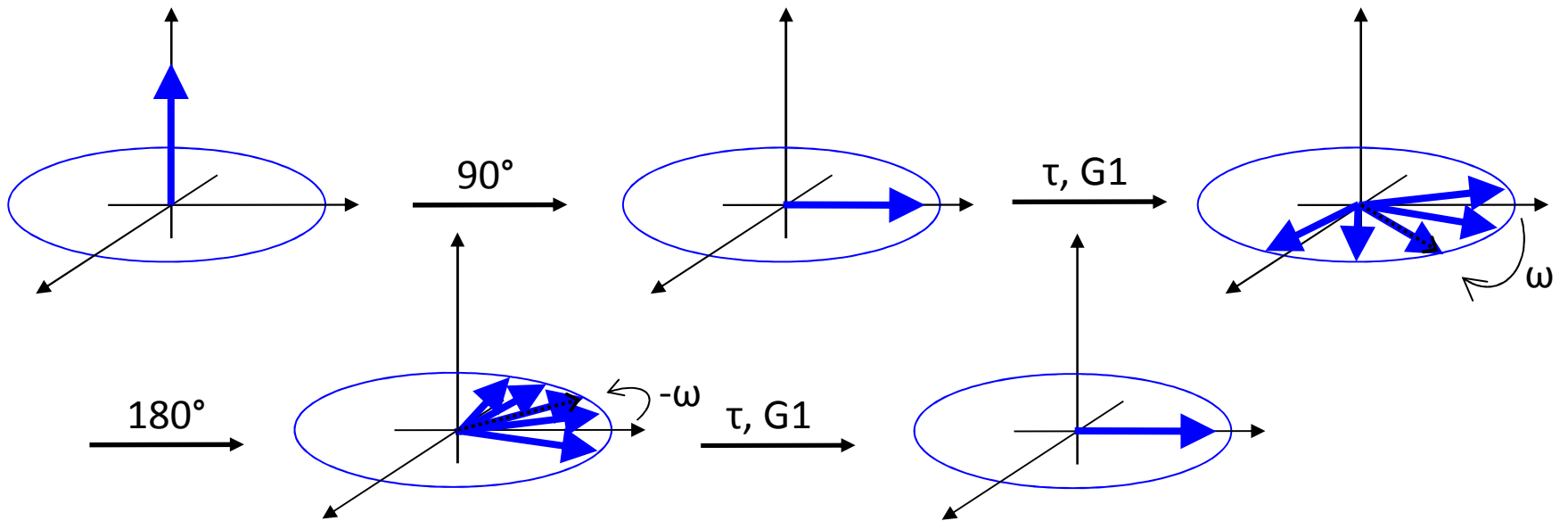
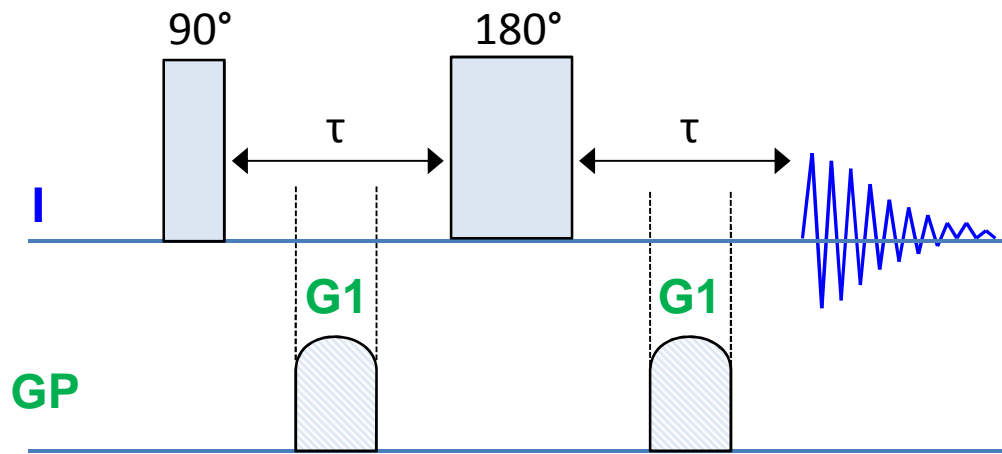








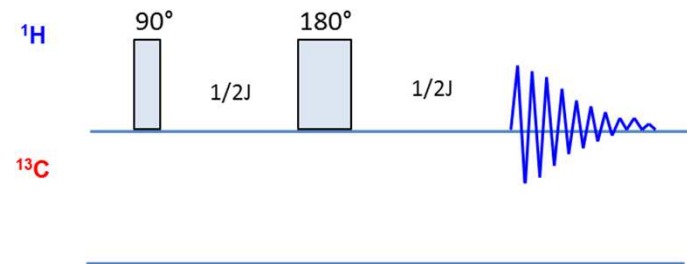
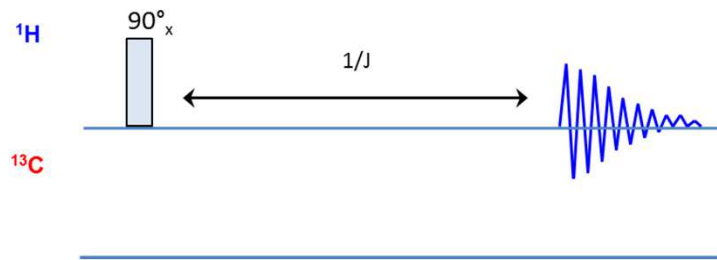




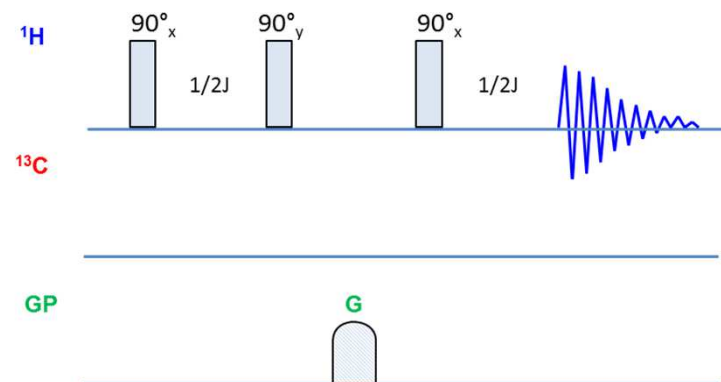
# Selekce signálů

- výběr signálu páru  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a eliminace nebo rozfázování  $^1\text{H} - ^{12}\text{C}$  :

– fázové cykly



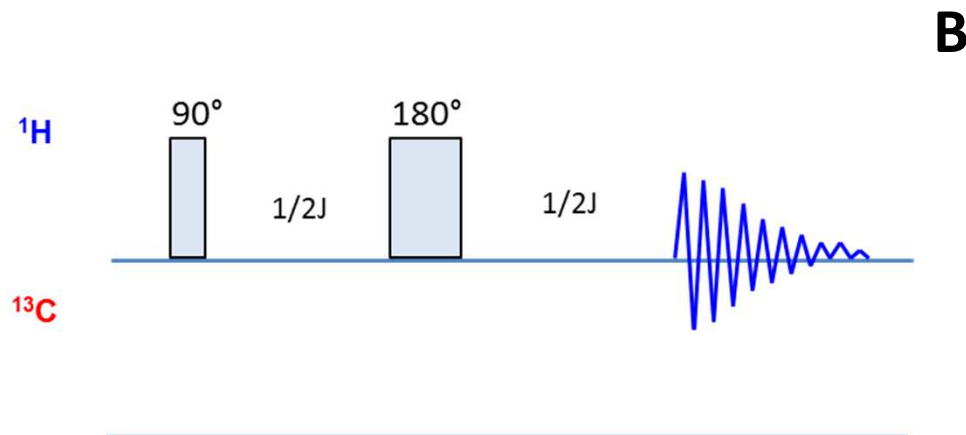
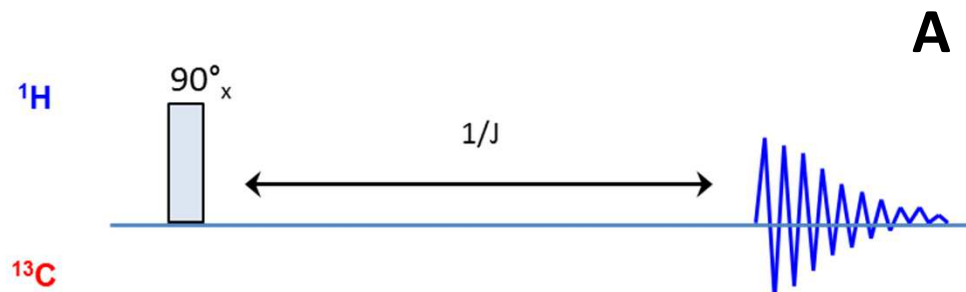
– pulzní gradient magnetického pole



# Selekce signálů

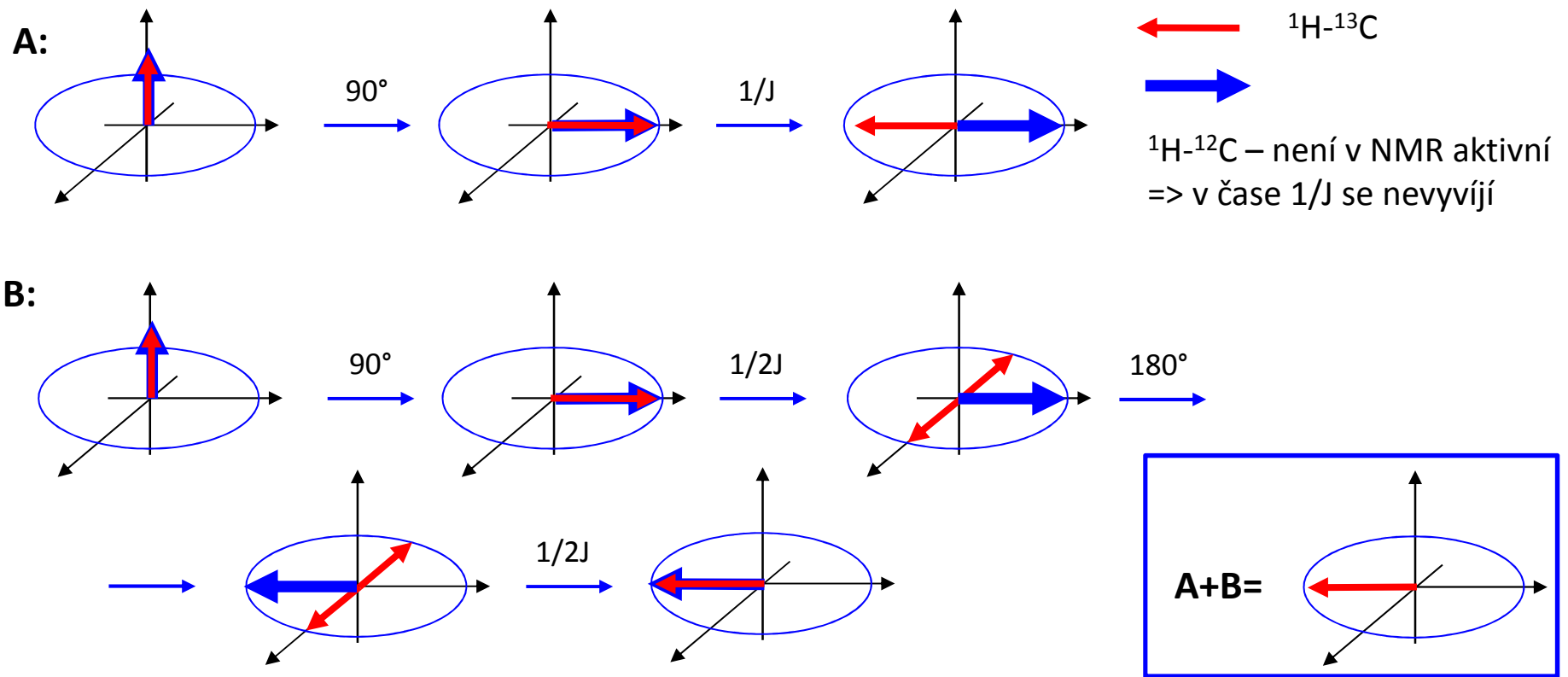
- výběr signálu páru  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a eliminace nebo rozfázování  $^1\text{H} - ^{12}\text{C}$  :

– fázové cykly



# Selekce signálů

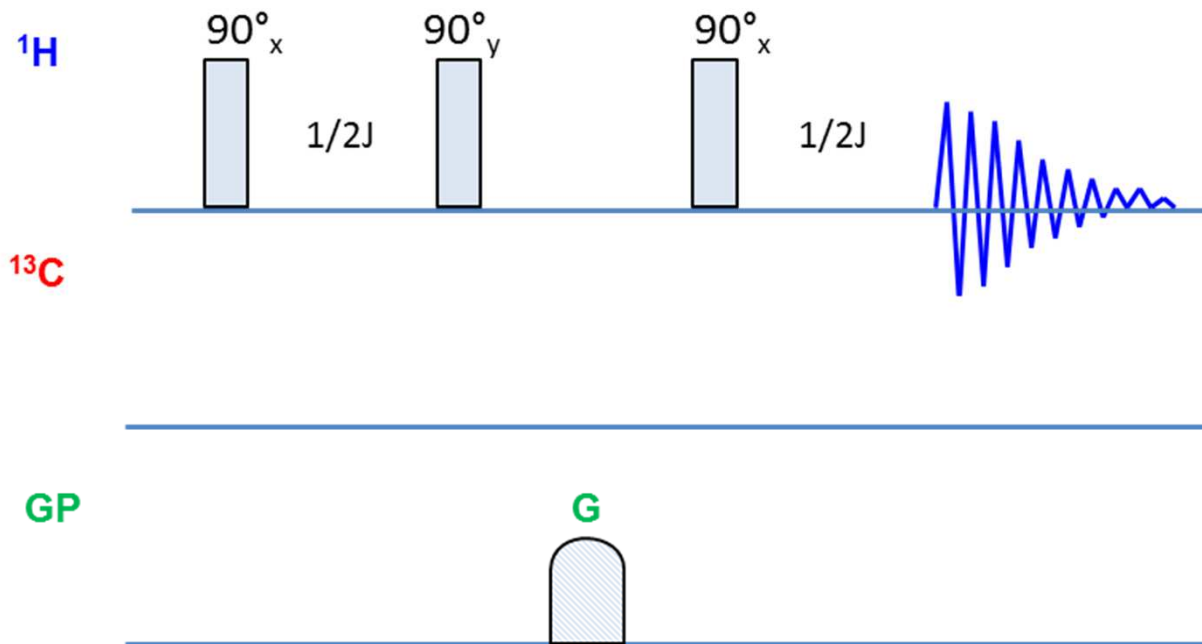
## Vyběr signálů pomocí fázových cyklů



- k vývoji kaplingu dochází jen pro pár <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C (ne pro <sup>1</sup>H – <sup>12</sup>C)
- měření dvou spekter (**A** a **B**), sečtení/odečtení není perfektní kvůli experimentálním nepřesnostem - zbytkové signály <sup>1</sup>H – <sup>12</sup>C

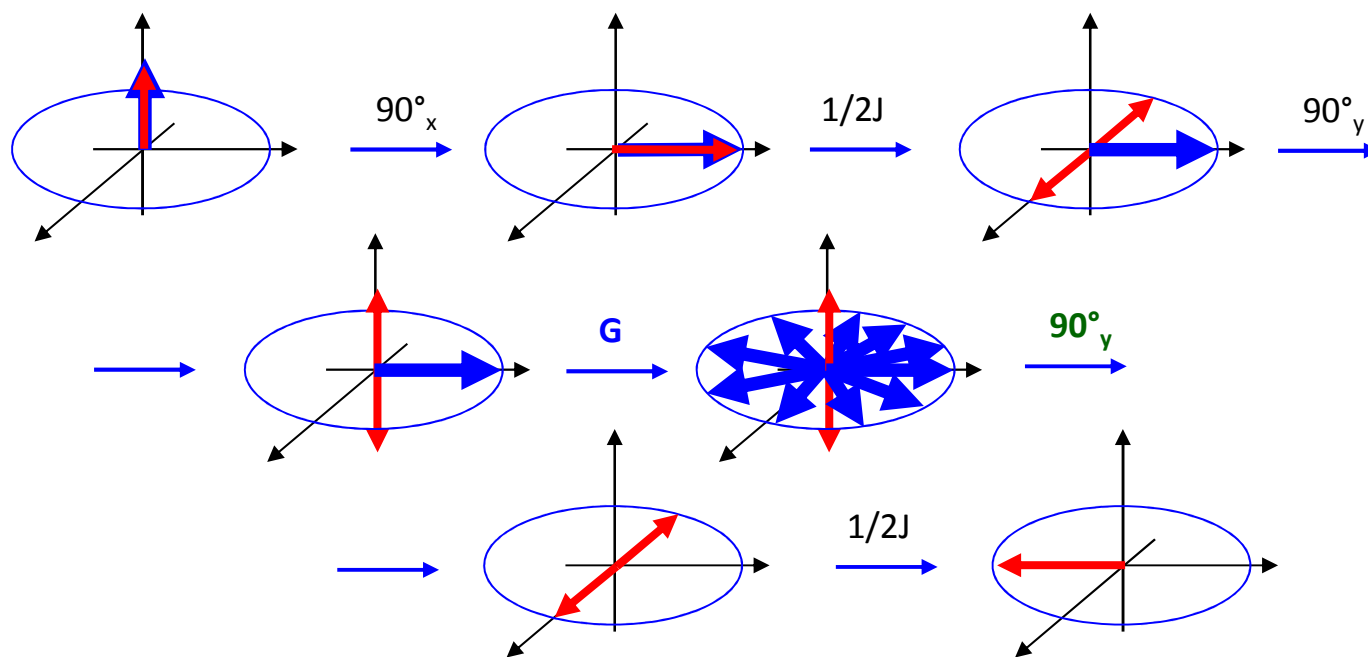
# Selekce signálů

- výběr signálu páru  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a eliminace nebo rozfázování  $^1\text{H} - ^{12}\text{C}$  :
  - pulzní gradient magnetického pole



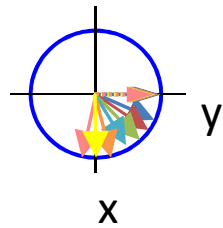
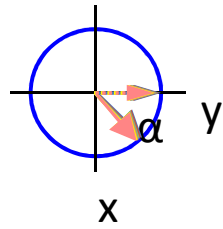
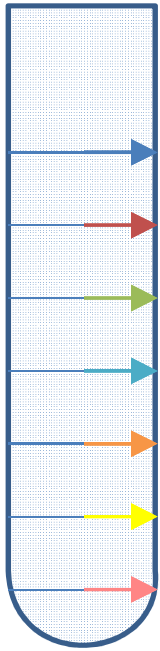
# Selekce signálů

## Vyběr signálů pomocí gradientů

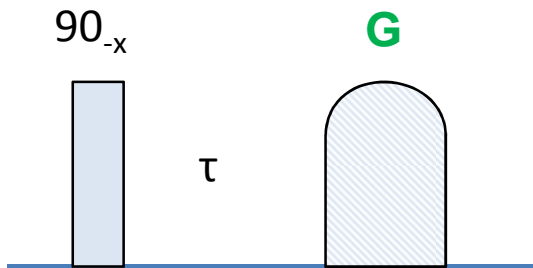


- signály  $^1\text{H} - ^{12}\text{C}$  se rozfázují v rovině pomocí gradientu **G**
- $90^\circ_y$  sklopí  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  signály do osy x – během  $1/2J$  zrefokusují
- výhody – žádné artefakty vznikající odečtem spekter (viz. předchozí obr.)
- měření jednoho spektra – rychlejší akumulace signálu

# Gradienty



- v případě homogenního magnetického pole se vektory na všech pozicích v kyvetě posunou za čas  $\tau$  o stejný úhel  $\alpha$
- gradientem o intenzitě  $G$  uměle vygenerujeme nehomogenní magnetické pole a dojde k různému vývoji v jednotlivých částech vzorku po dobu trvání  $G$



# Gradienty

$$\Phi_z = P\gamma\tau_g B_g$$

$\Phi_z$  – fázový posun

$P$  – řád koherence (SQ, DQ)

$\gamma$  – magnetogyrická konstanta

$\tau_g$  – doba trvání gradientu

$B_g$  – intenzita gradientu

$\sum \Phi = 0$  - suma fází musí být nulová  
pro refokusaci signálu



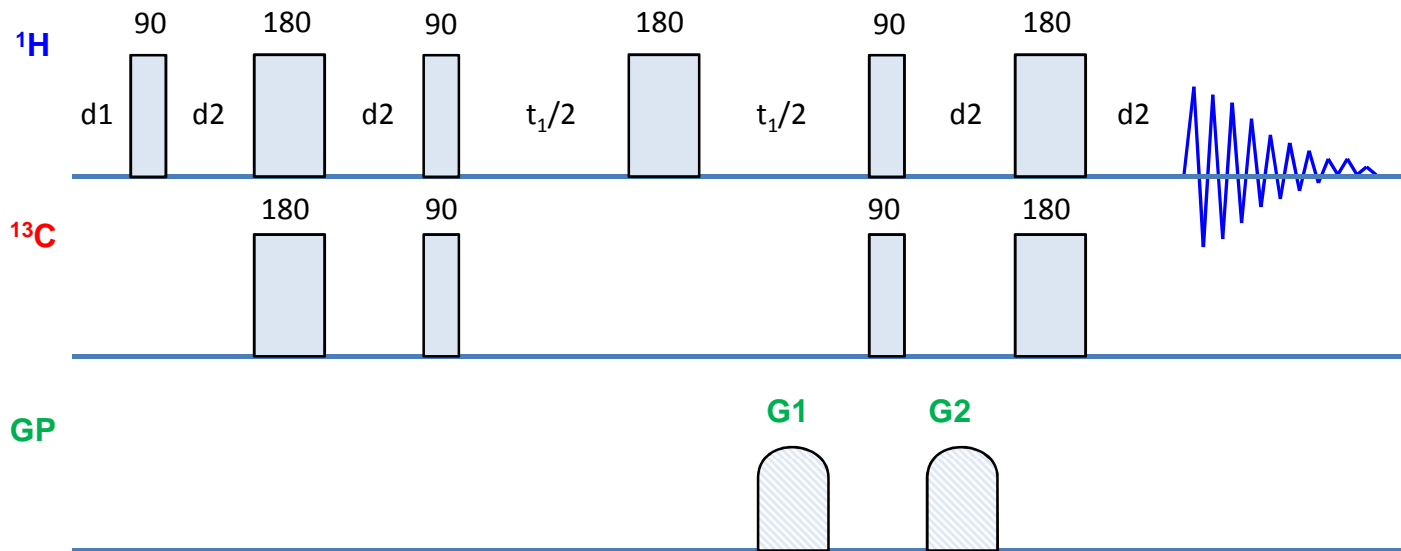
# HSQC s gradienty (gs-HSQC)

nastavení gradientů : splnění podmínky  $\sum \Phi = 0$ :

HSQC:  $P_1 = P_2$  (SQ),  $\tau_1 = \tau_2$ ,  $B_1 = B_2$

$\Rightarrow$  poměr gradientů se řídí poměrem  $\gamma$

$\Rightarrow$  (pro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  G1:G2 4:1)



# Gradients

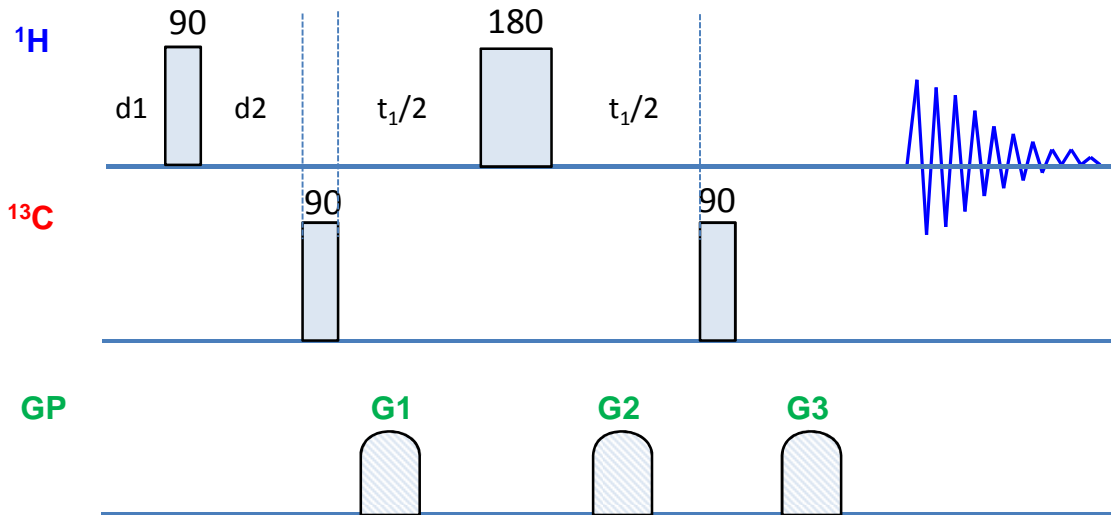
- HMQC:

G1 – DQ, G2 – ZQ, G3 – SQ

$$\tau_1 = \tau_2 = \tau_3$$

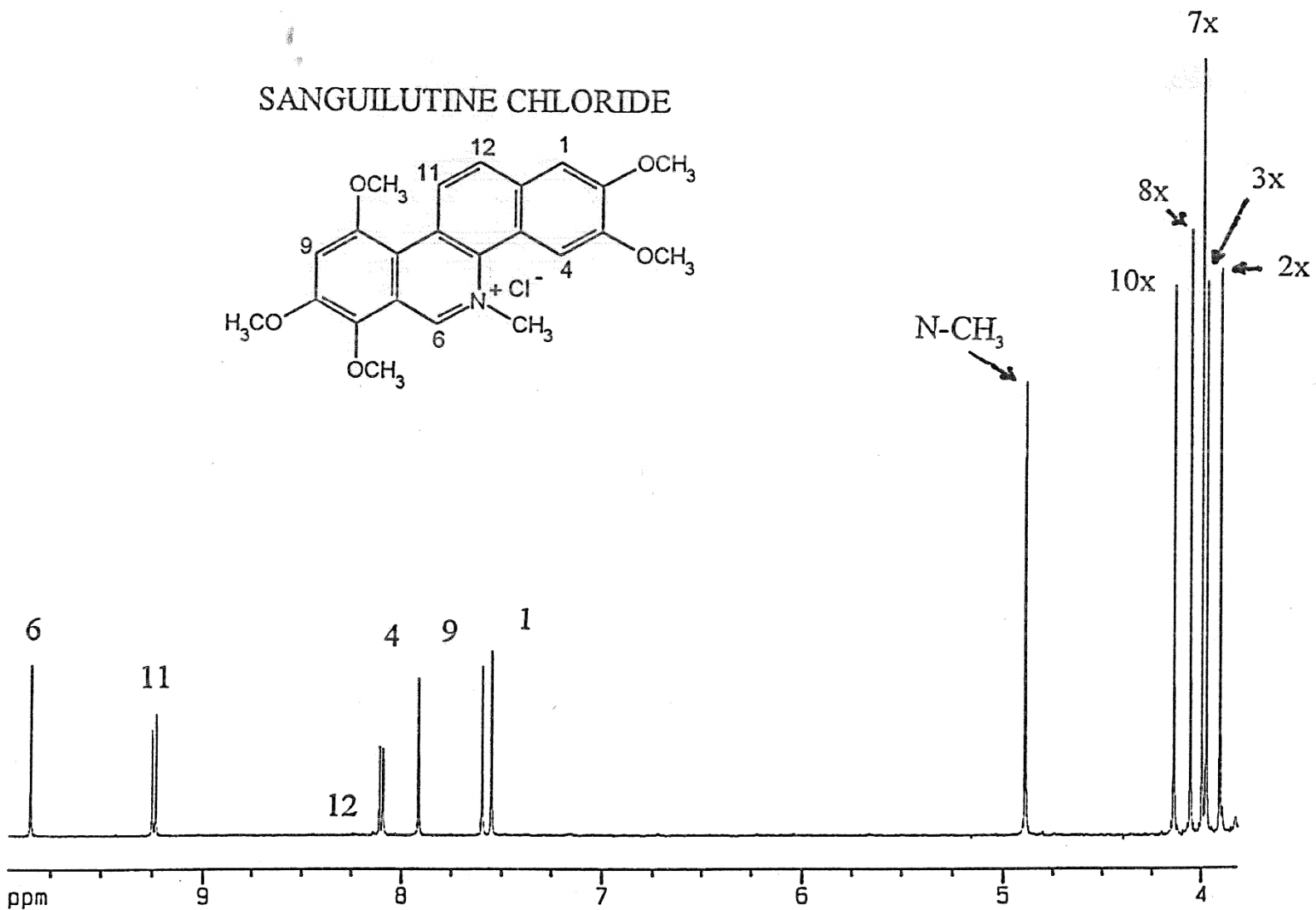
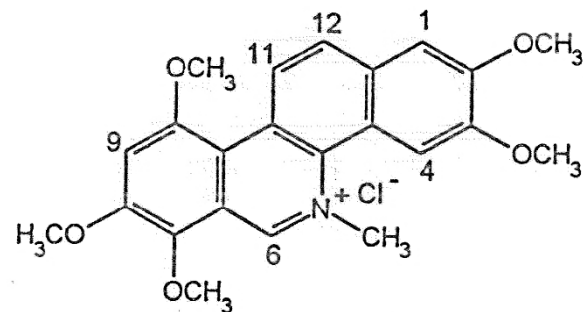
$$\Phi = 0 = (\gamma_C + \gamma_H)G1 + (\gamma_C - \gamma_H)G2 + (-\gamma_H)G3 \quad \text{pro } ^1\text{H-}^{13}\text{C, např: } G1:G2:G3 = 5:3:4$$

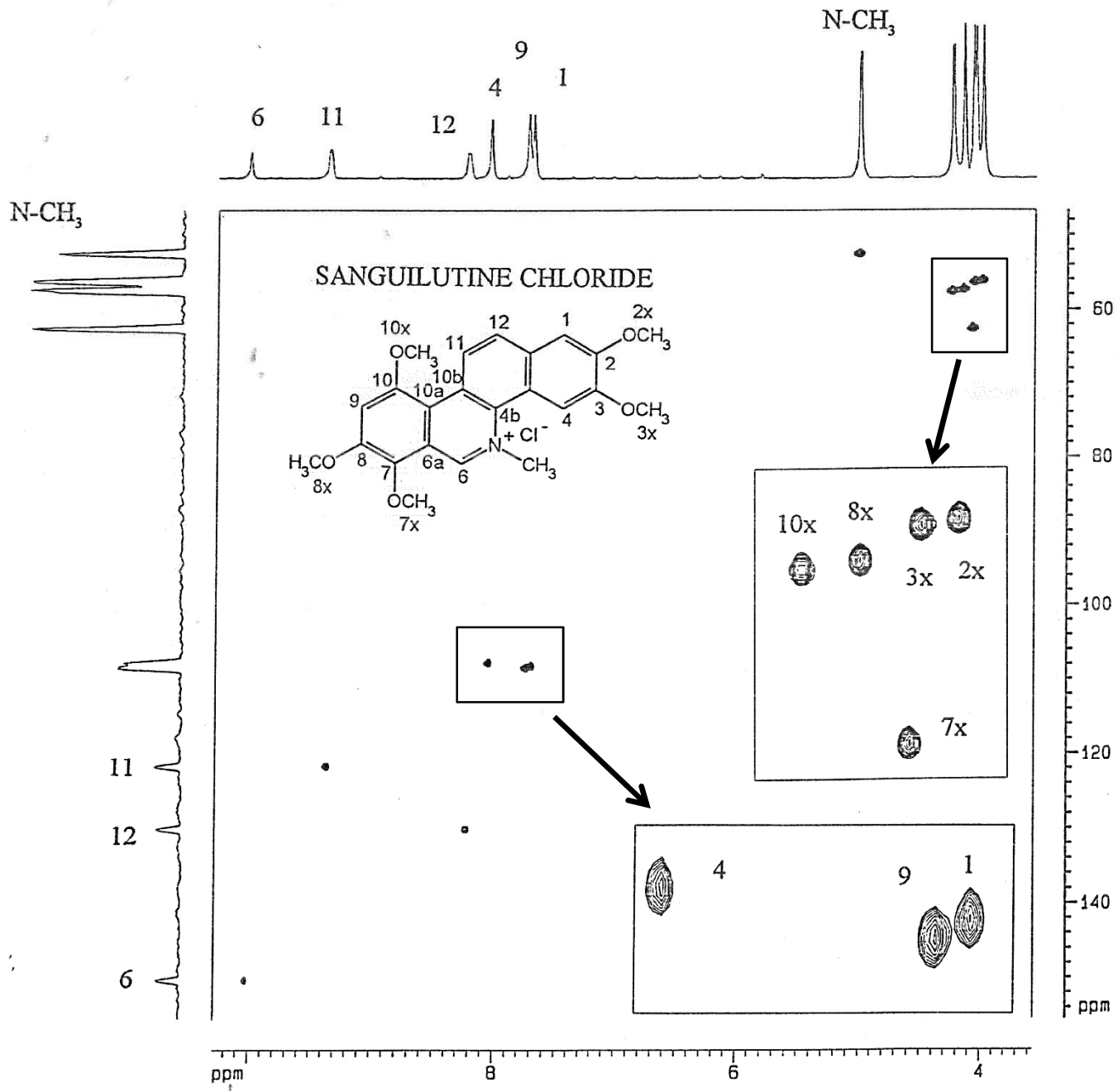
$$(1+4)*5 + (1-4)*3 + (-4)*4 = 0$$



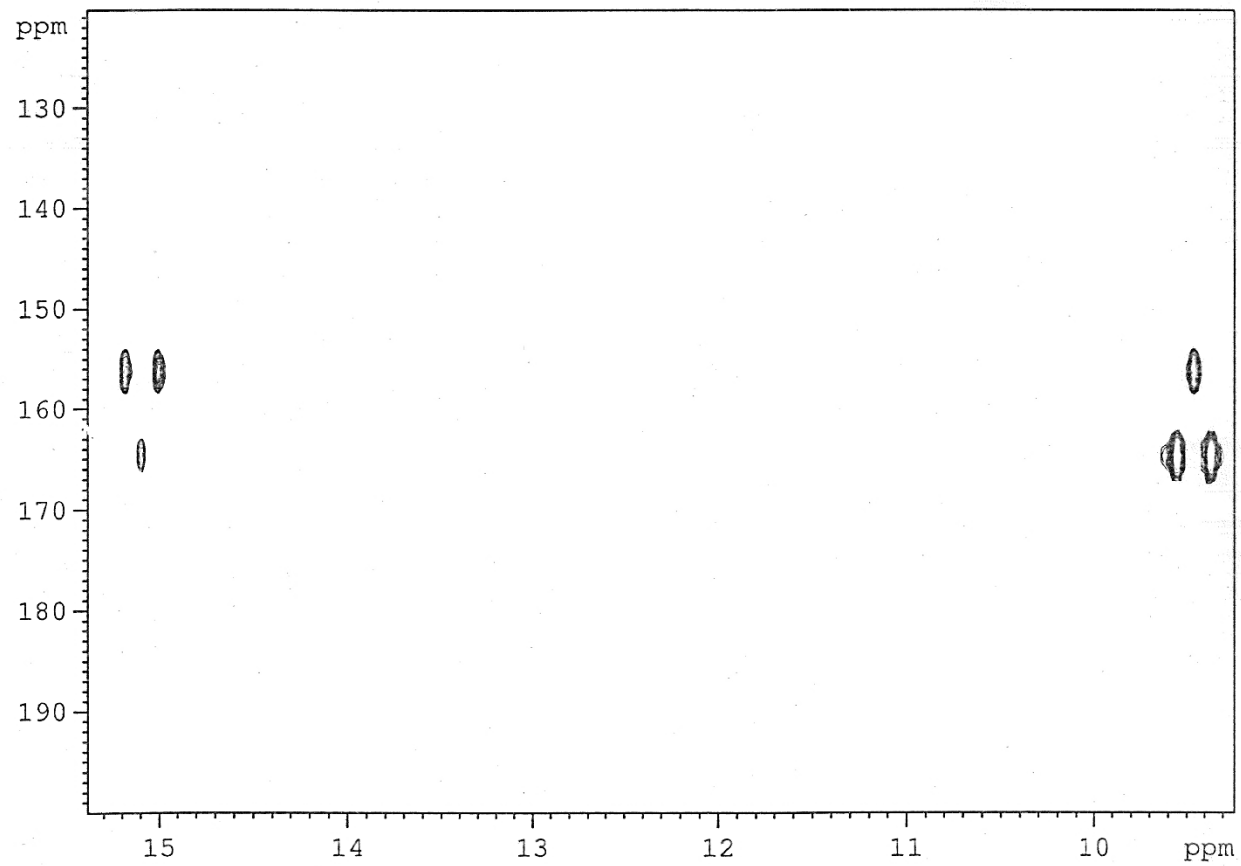
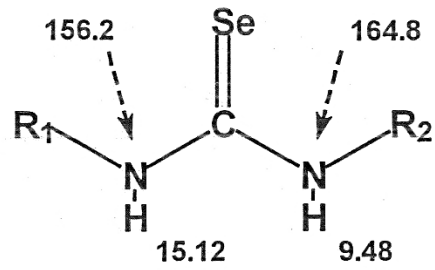
- použití gradientů je velmi významné pro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC v přirozeném zastoupení, kde se jinak při fáz. cyklech odečítá kolem 97-98 % signálu → t1 šum
- nezbytné pro  $^{15}\text{N}$  - v přirozeném zastoupení 3x méně než  $^{13}\text{C}$  (0.37 % vs. 1.11 %)

# SANGUILUTINE CHLORIDE

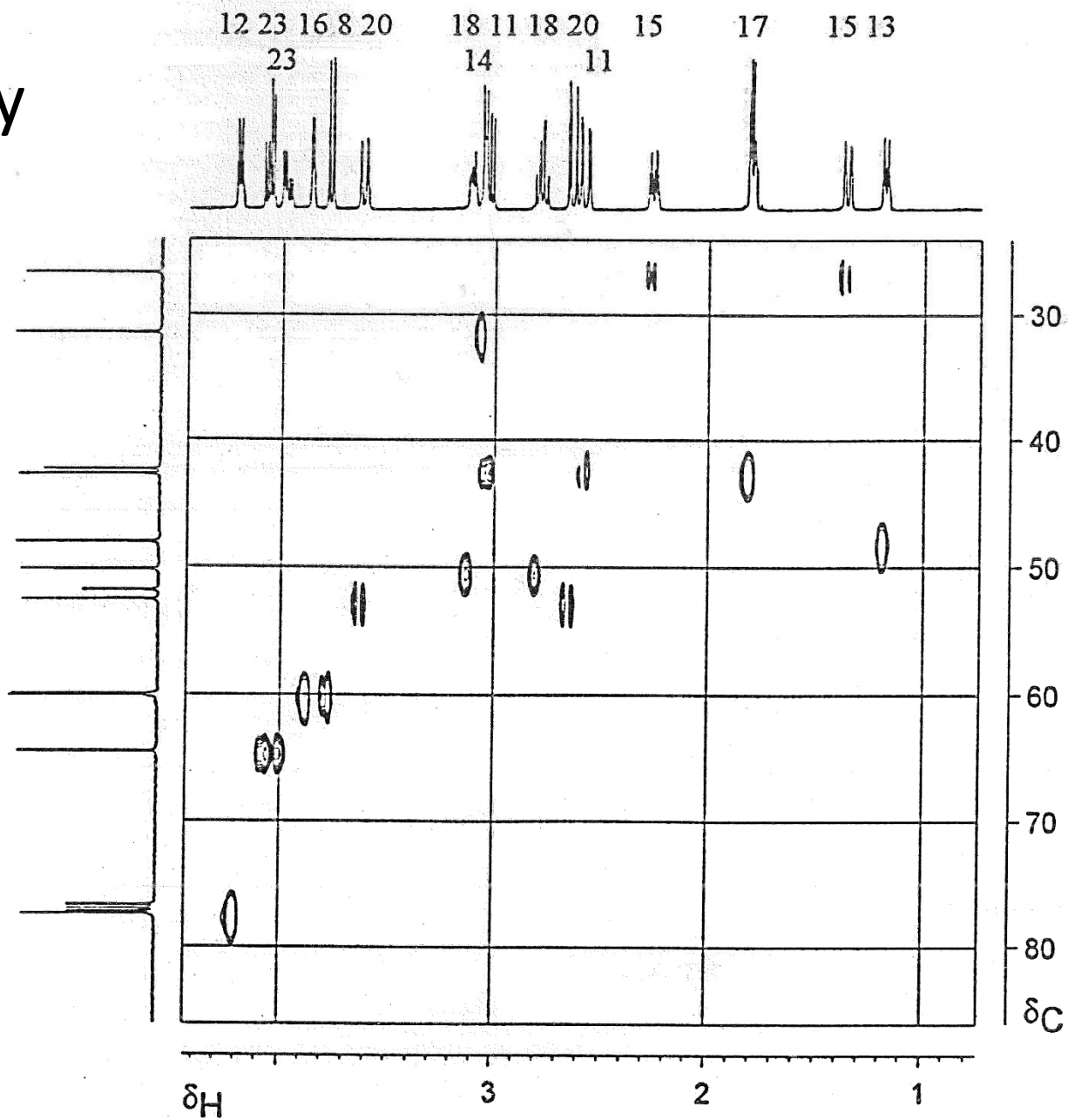
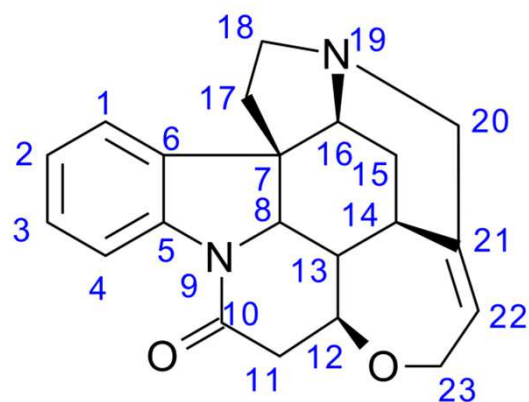




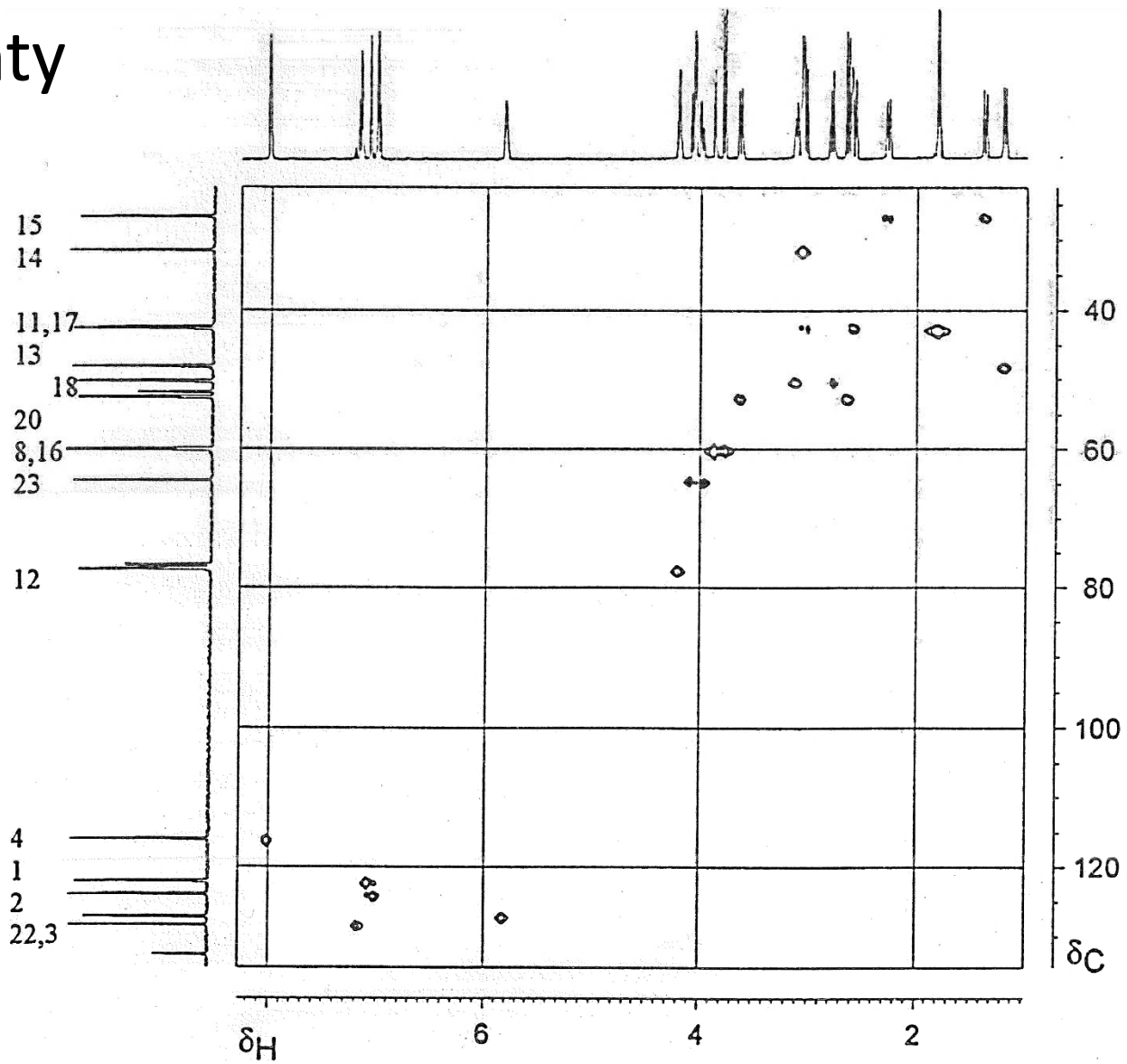
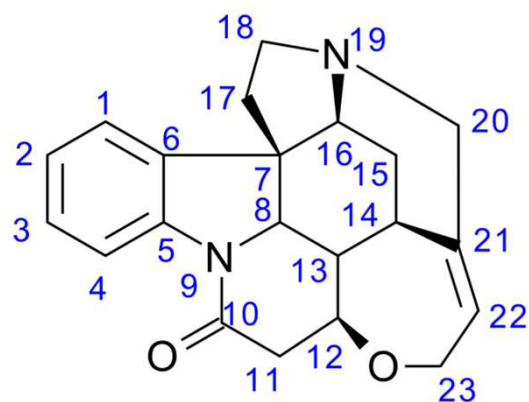
# Gradient-Enhanced $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HMBC



# HSQC s gradienty

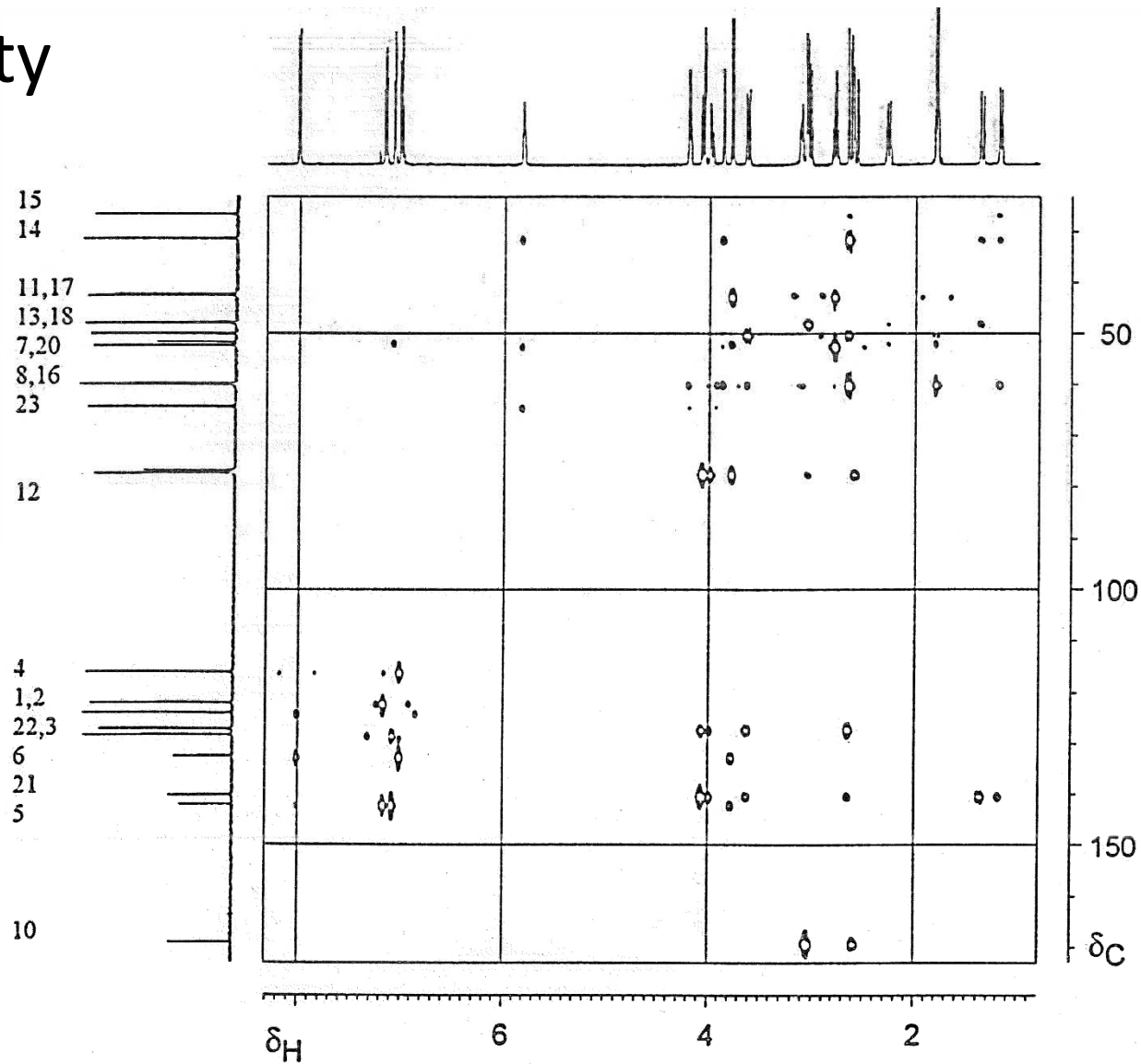
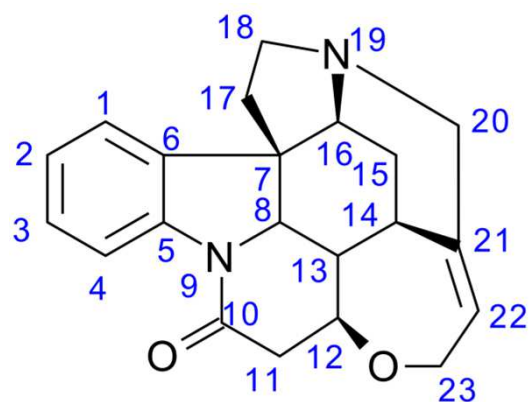


# HMQC s gradienty





# HMBC s gradienty



# 3D spektra

## 2D

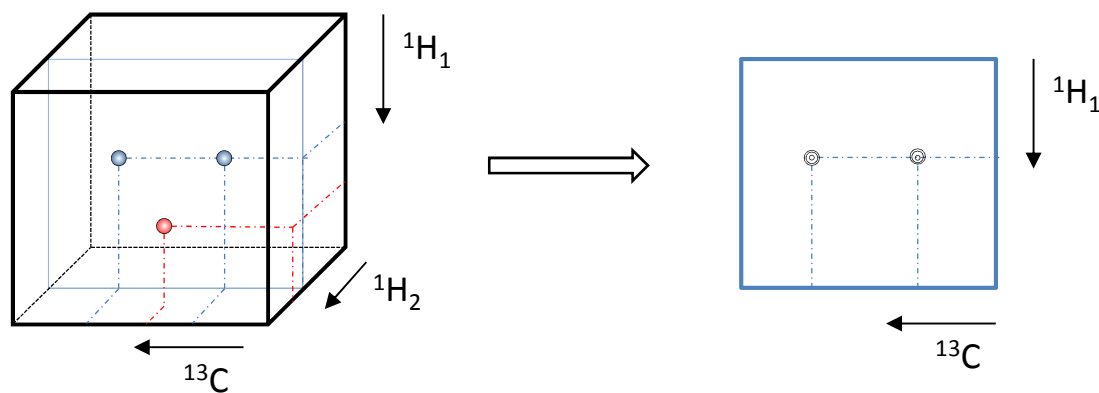
- 2D experimenty – dvě dimenze → FT dvou časových proměnných – FID ( $t_2$ ) a inkrementační čas  $t_1$
- 2D spektrum – rovina, kde je interakce dvou jader zobrazena jako vrstevnice

## 3D

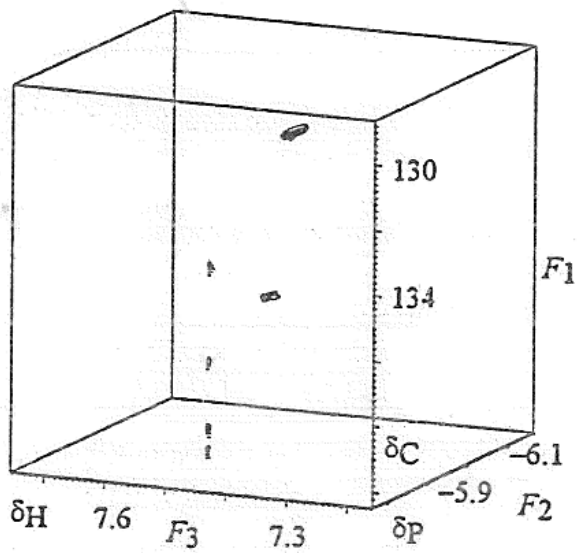
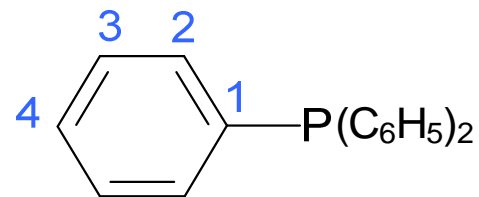
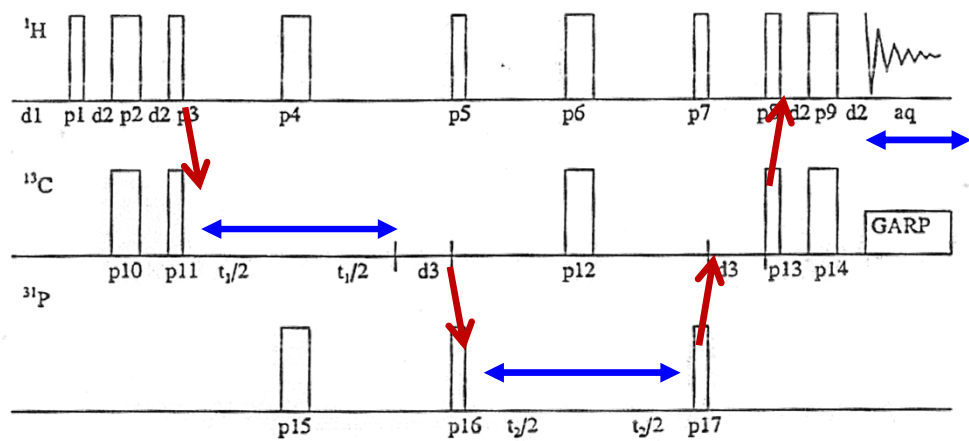
- 3D experimenty – přidán třetí časový vývoj (druhá inkrementační perioda) FID ( $t_3$ ) a inkrementační čas  $t_1$  a  $t_2$
- 3D spektrum – kostka, kde je interakce jader zobrazena jako bod uvnitř kostky

# 3D spektra

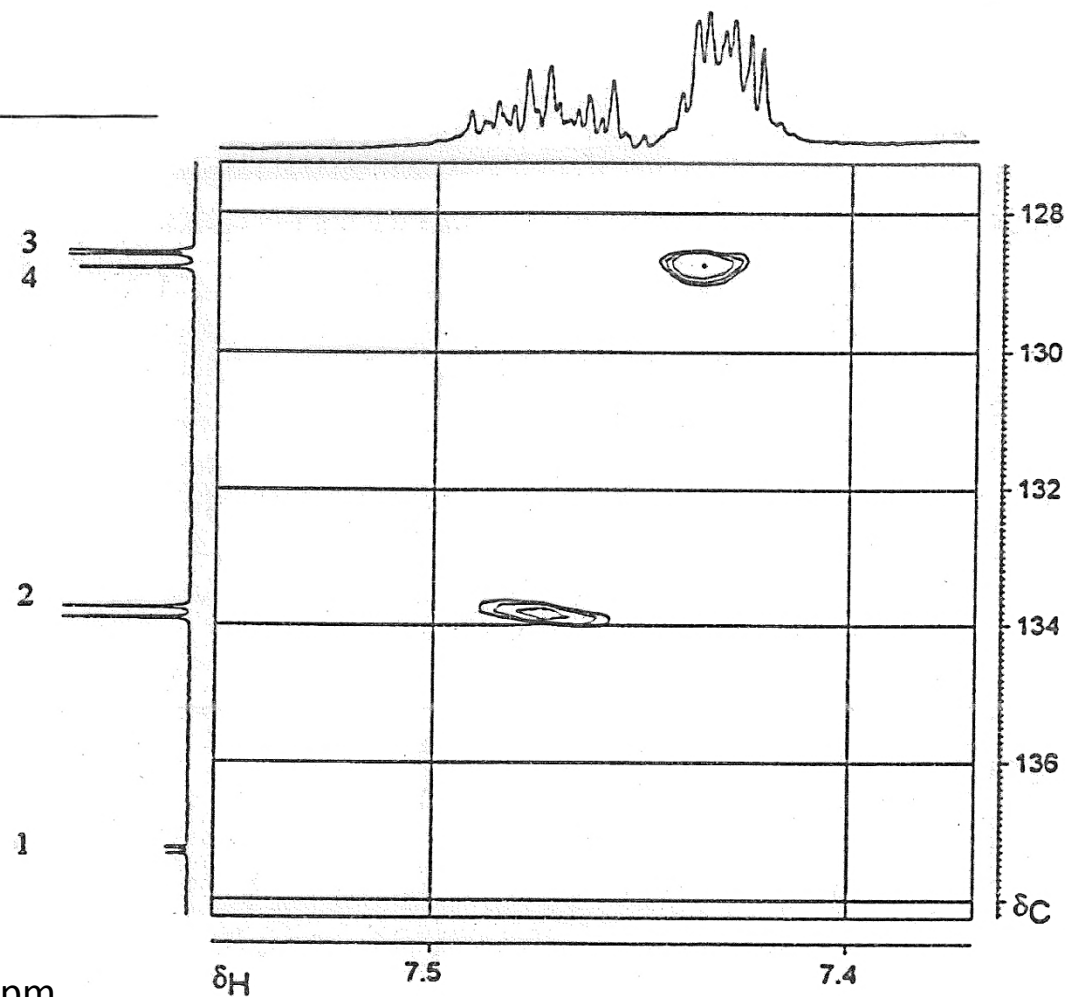
- 3D spektrum – kostka, kde je interkace jader zobrazena jako bod uvnitř kostky
- každý rozměr kostky představuje jednu frekvenční (časovou) proměnnou
- vhodné pro velké molekuly, biomolekuly
- kombinované experimenty HMQC-COSY, HMQC-TOCSY



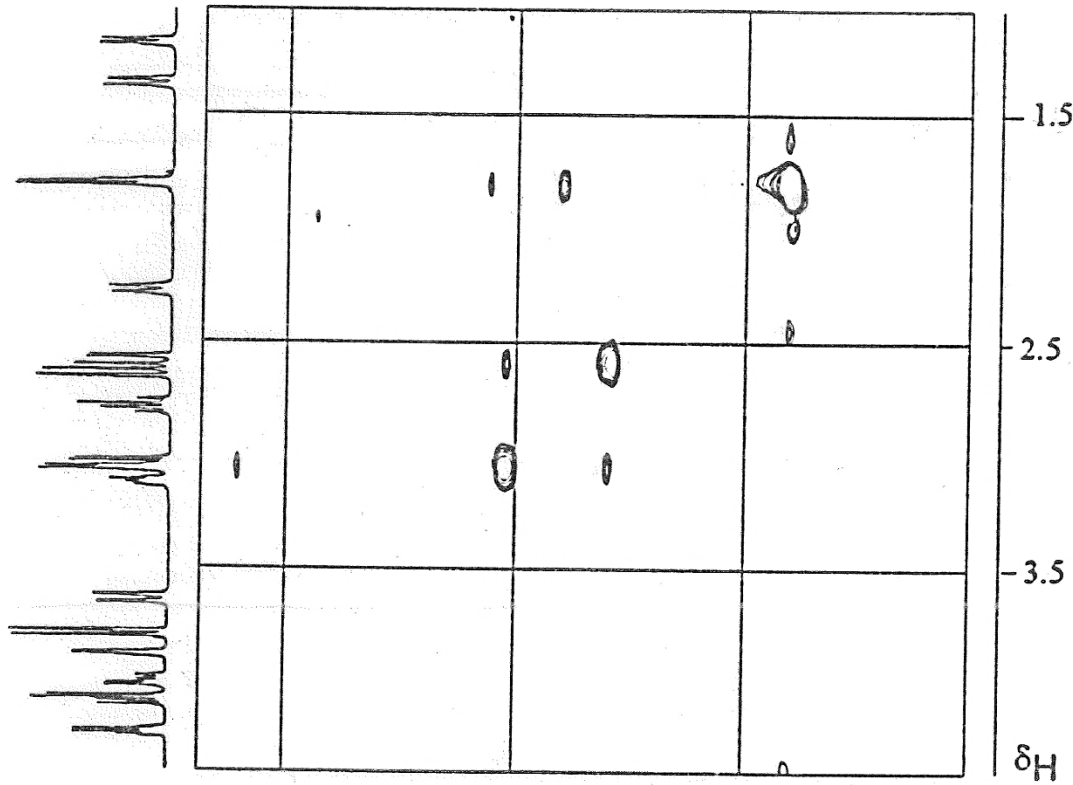
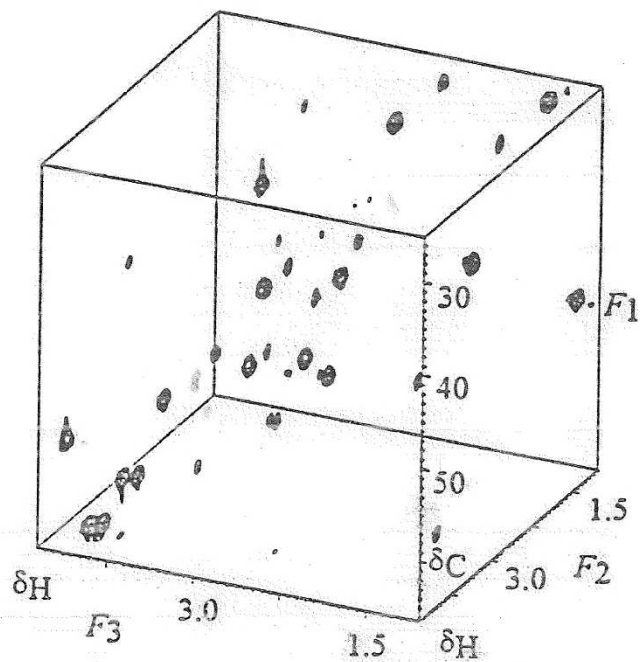
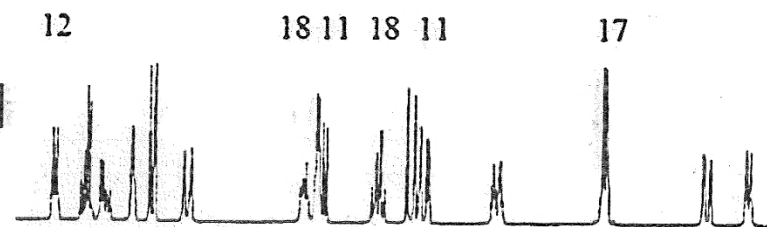
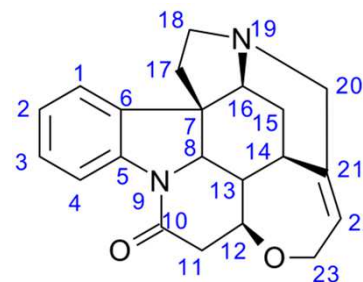
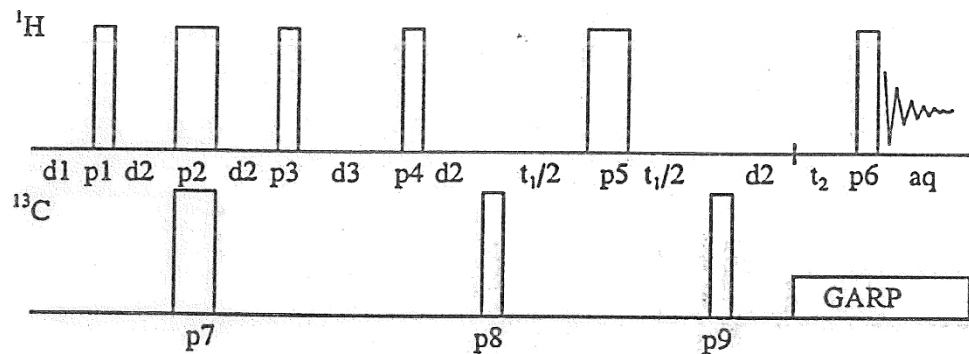
### 3D H,C,P-Correlation



rovina C,H pri  $\delta P = -6$  ppm



# 3D HMQC-COSY



rovina H,H pri  $\delta C = 42,5$  ppm





# Gradient-Selected HMQC-TOCSY

