

Nukleární magnetická rezonance

Lekce 1 – Úvod do NMR

Nuclear Magnetic Resonance

In vivo NMR spectroscopy (^1H , ^{31}P)

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

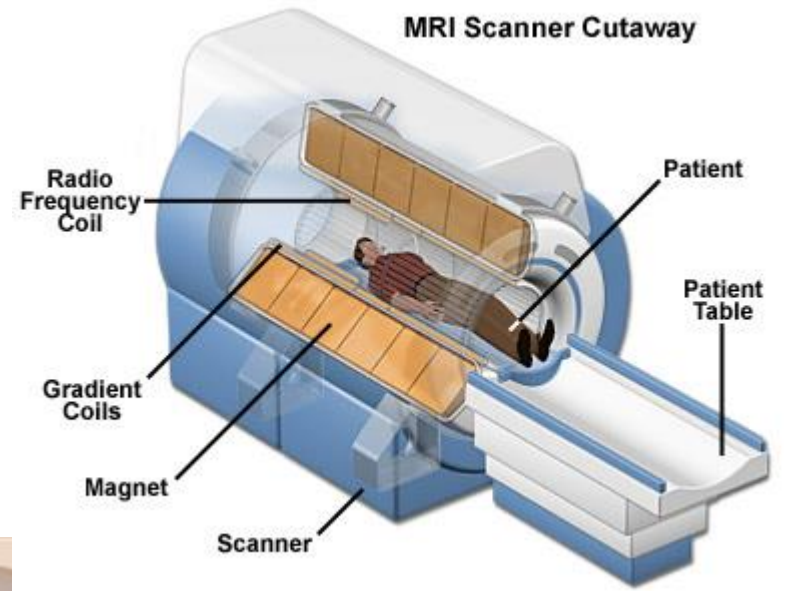
NMR spectroscopy

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

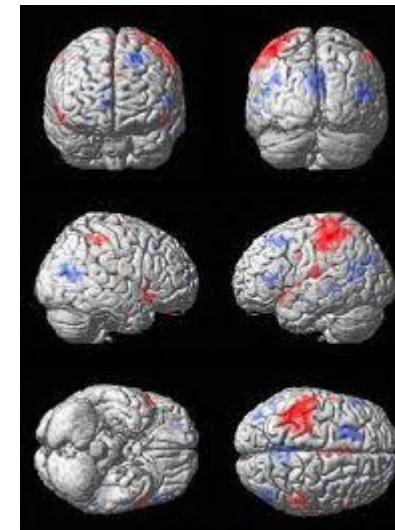
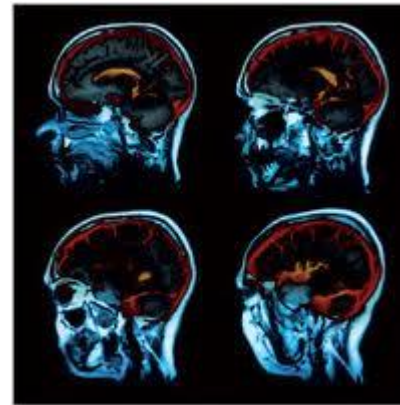
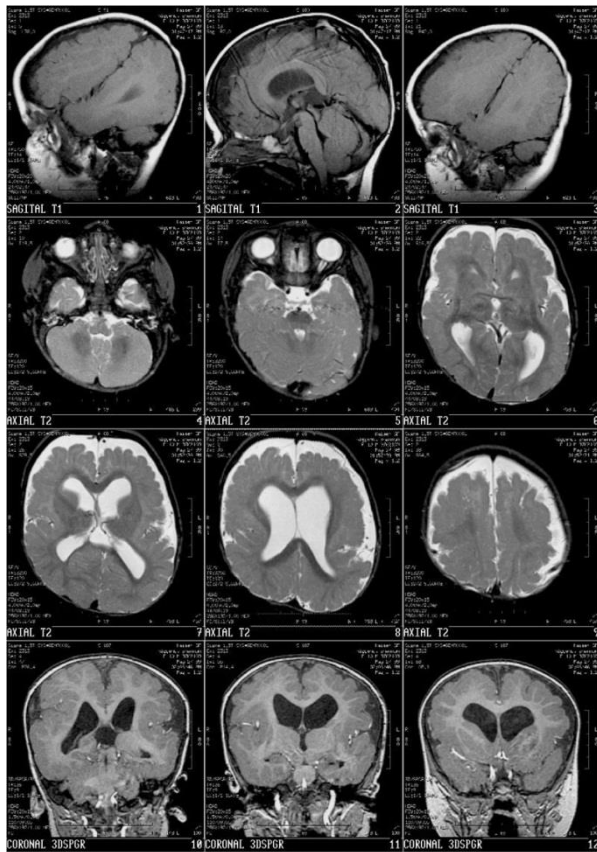
MRI



MRI



MRI - fMRI



NMR strukturní analýza

- 1) Úvod, vznik signálu, chemický posun, interpretace ^1H 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}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

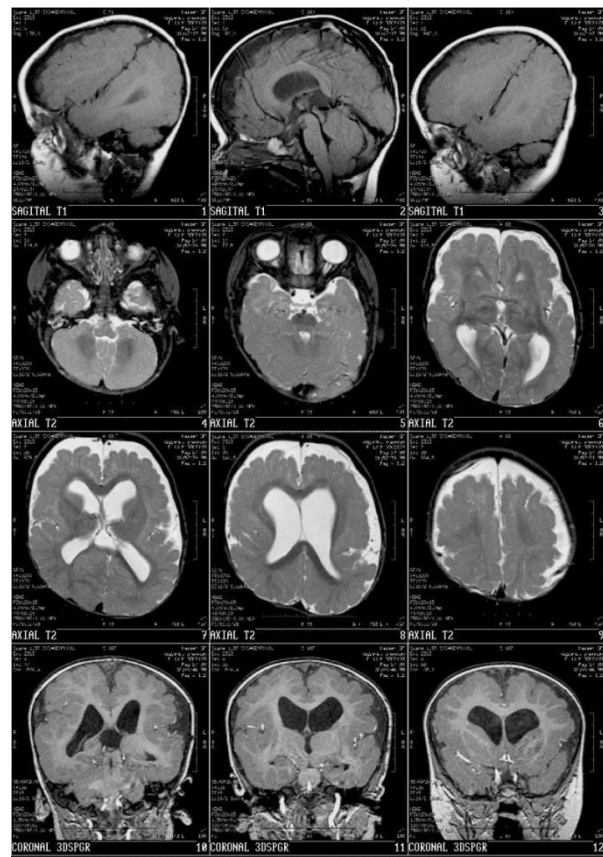
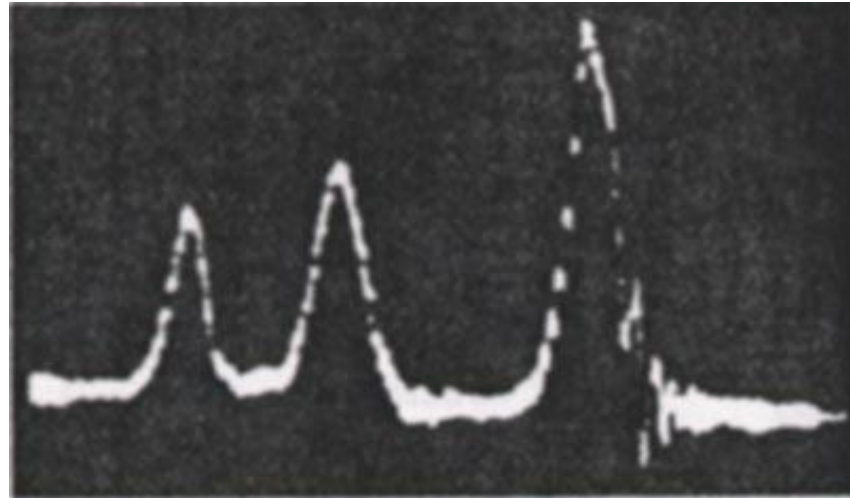
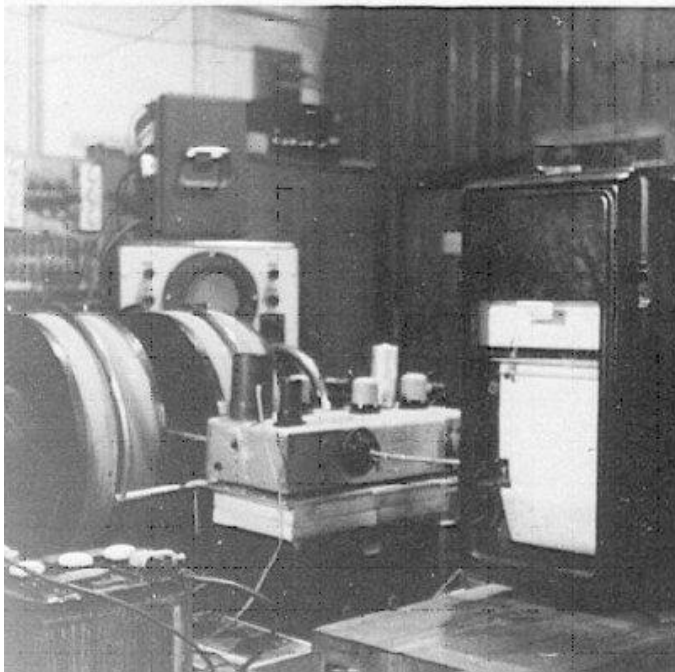
- Reakční kinetika
- Studium chemických výměn (nebo strukturních)

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}C , ^{16}O)
- Sudé hmotové číslo + liché atomové číslo
 - $I = \text{celočíslný}$ (^{14}N , ^2H)
- Liché hmotové číslo
 - $I = \text{polovinový}$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}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 ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}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 ¹²C (98.9%) ¹⁶O(99.9%)

½ ¹H (99.98%) ¹³C (1.1%) ¹⁵N(0.37%) ³¹P(100%) ¹⁹F(100%)

1 ²H (0.02%) ¹⁴N(99.63%)

- **magnetický moment μ**

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

γ ... magnetogyrická konstanta charakteristická pro dané jádro



Izolovaný jaderný spin v magnetickém poli

energie spinového dipólového momentu μ_z v magnetickém poli:

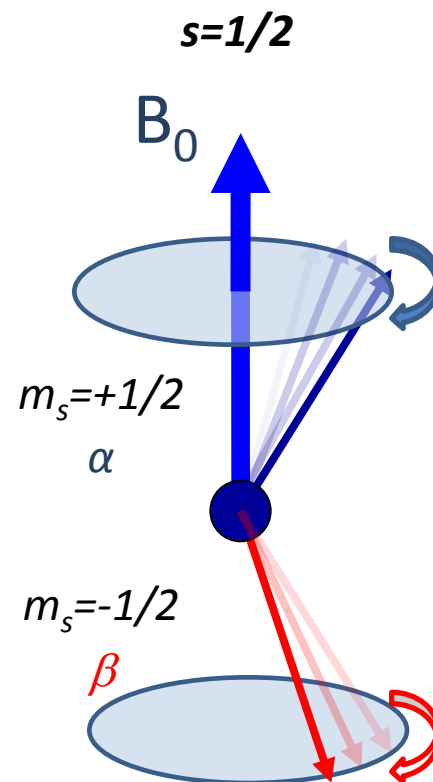
$$E = -\mu_z B_0$$

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

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

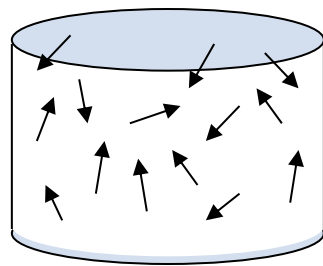
precesní pohyb spinu kolem vektoru B_0 s Larmorovou frekvencí ω

$$\omega = -\gamma B_0$$

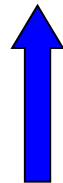
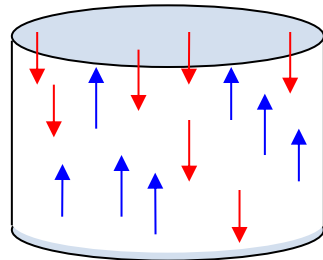


Makroskopická magnetizace M_z

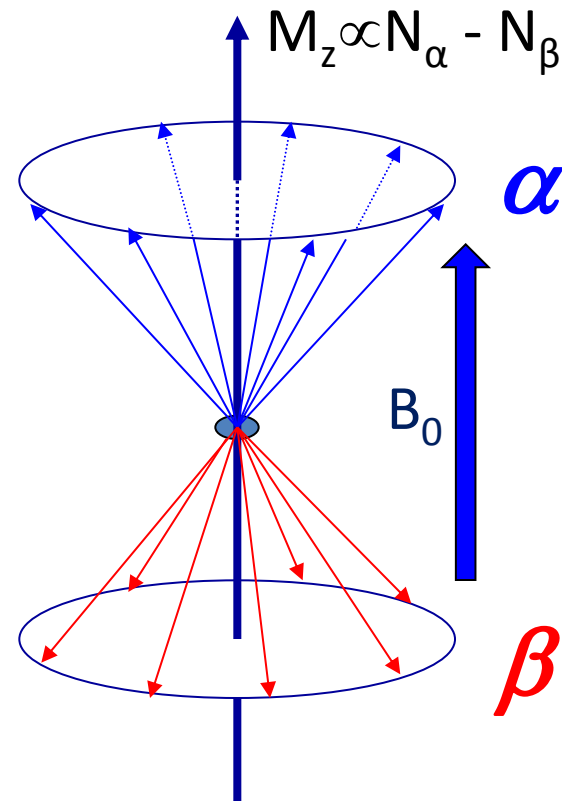
spinové dipólové momenty se ve vnějším magnetickém poli zorientují podél vektoru magnetické indukce, výsledný vektor magnetizace představuje superpozici populací obou stavů m_s



$B_0 = 0$

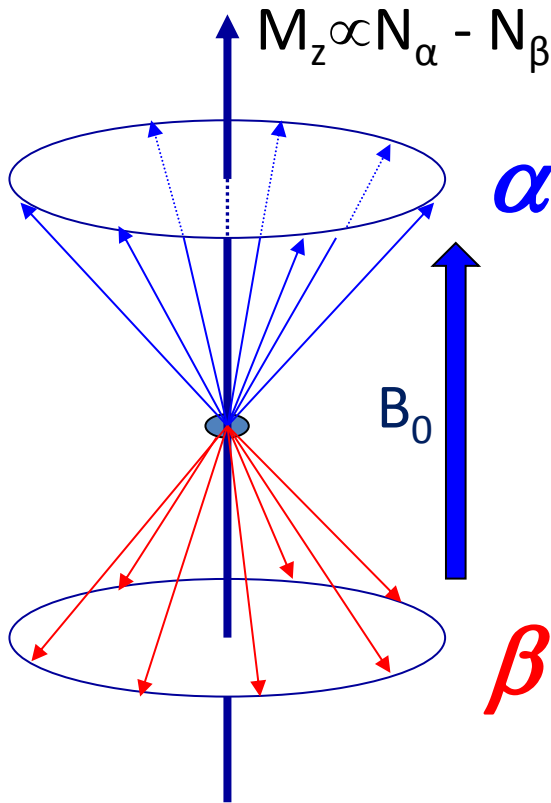


B_0



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 :

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

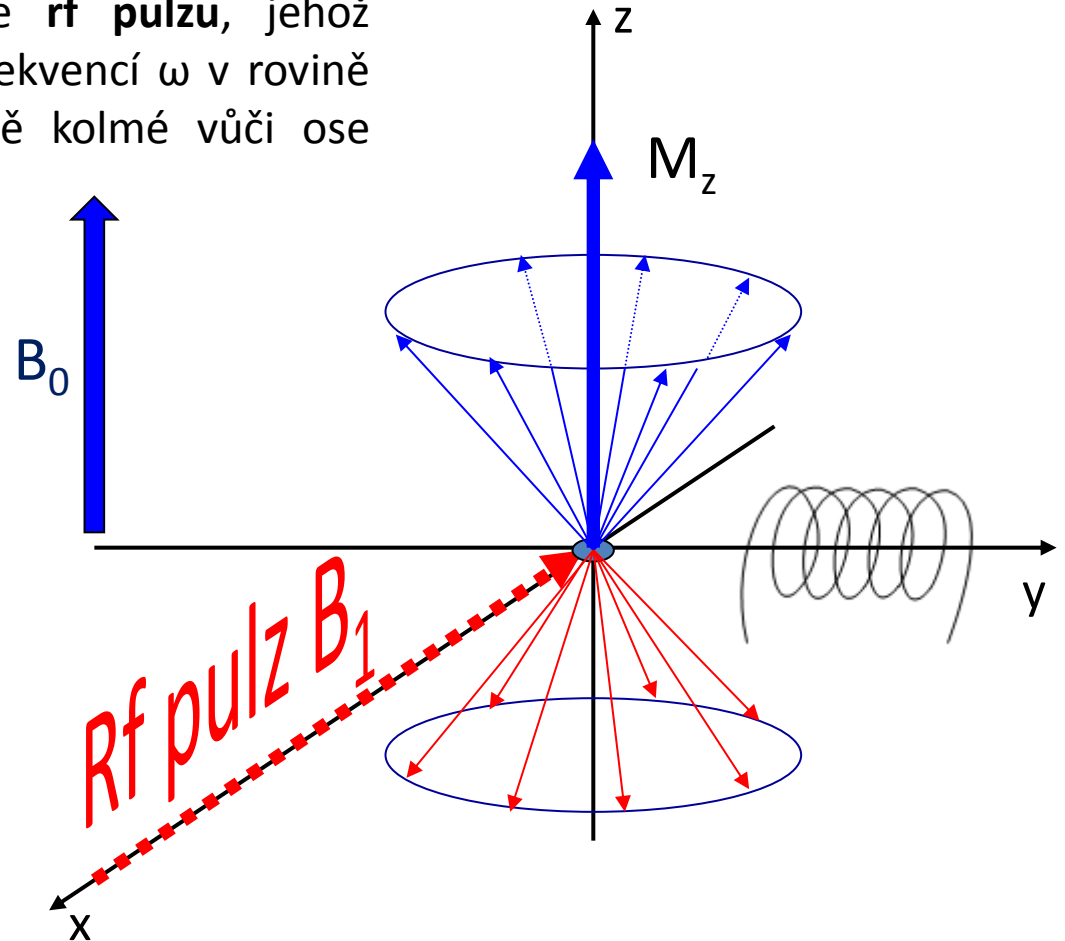
$\gamma(^{13}\text{C})= 67,3 \cdot 10^6 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$ $\nu(^{13}\text{C})=75$ MHz :

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

Radiofrekvenční pulz

Působením magnetického pole **rf pulzu**, jehož vektor \mathbf{B}_1 rotuje s rezonanční frekvencí ω 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)

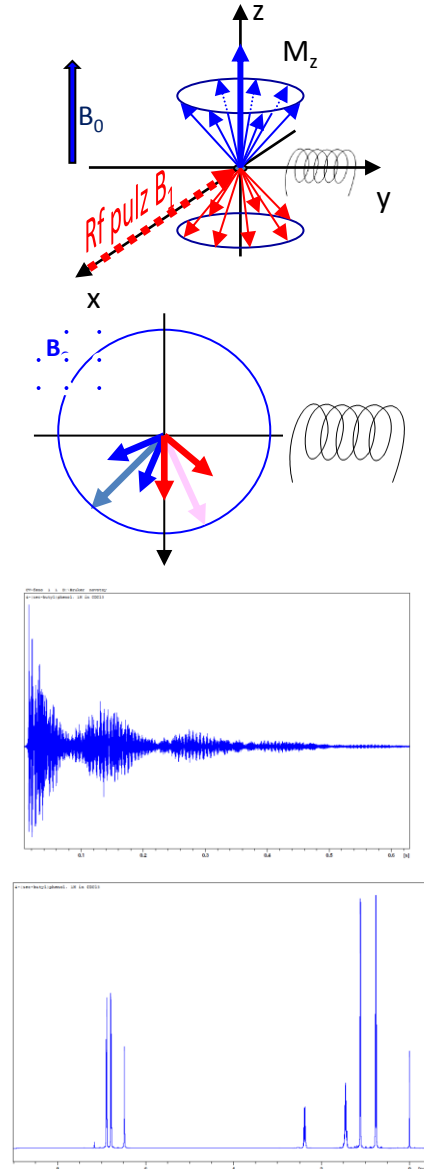
Vývoj – jednotlivé excitované systémy dle vektorového modelu vykonávají rotační pohyb v xy o charakteristických frekvencích v důsledku interakce s lokálním magnetickým polem

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

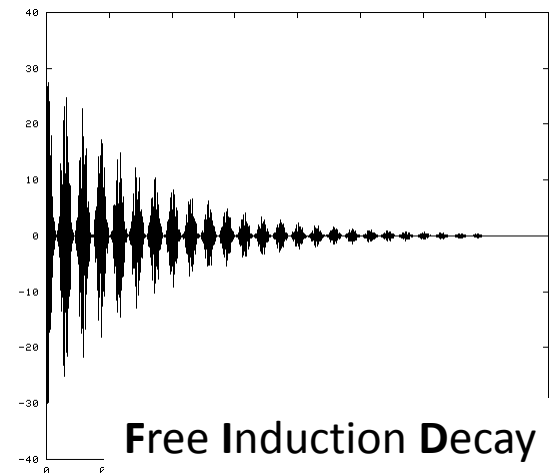
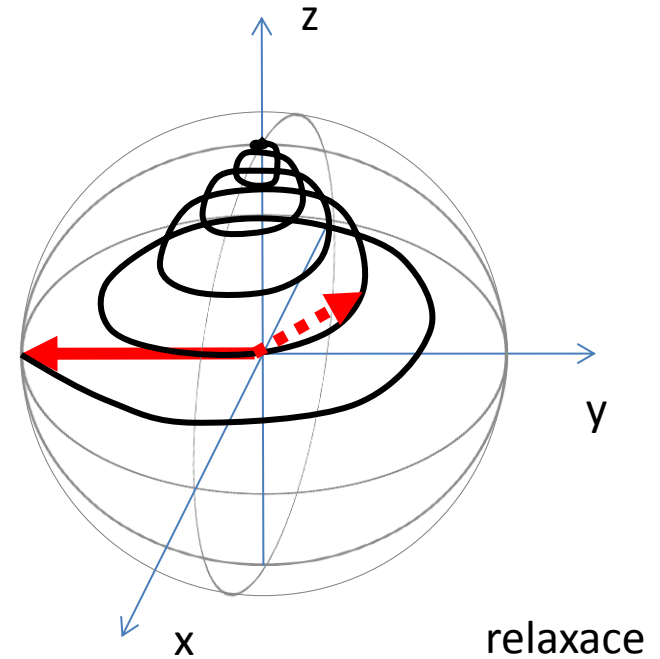
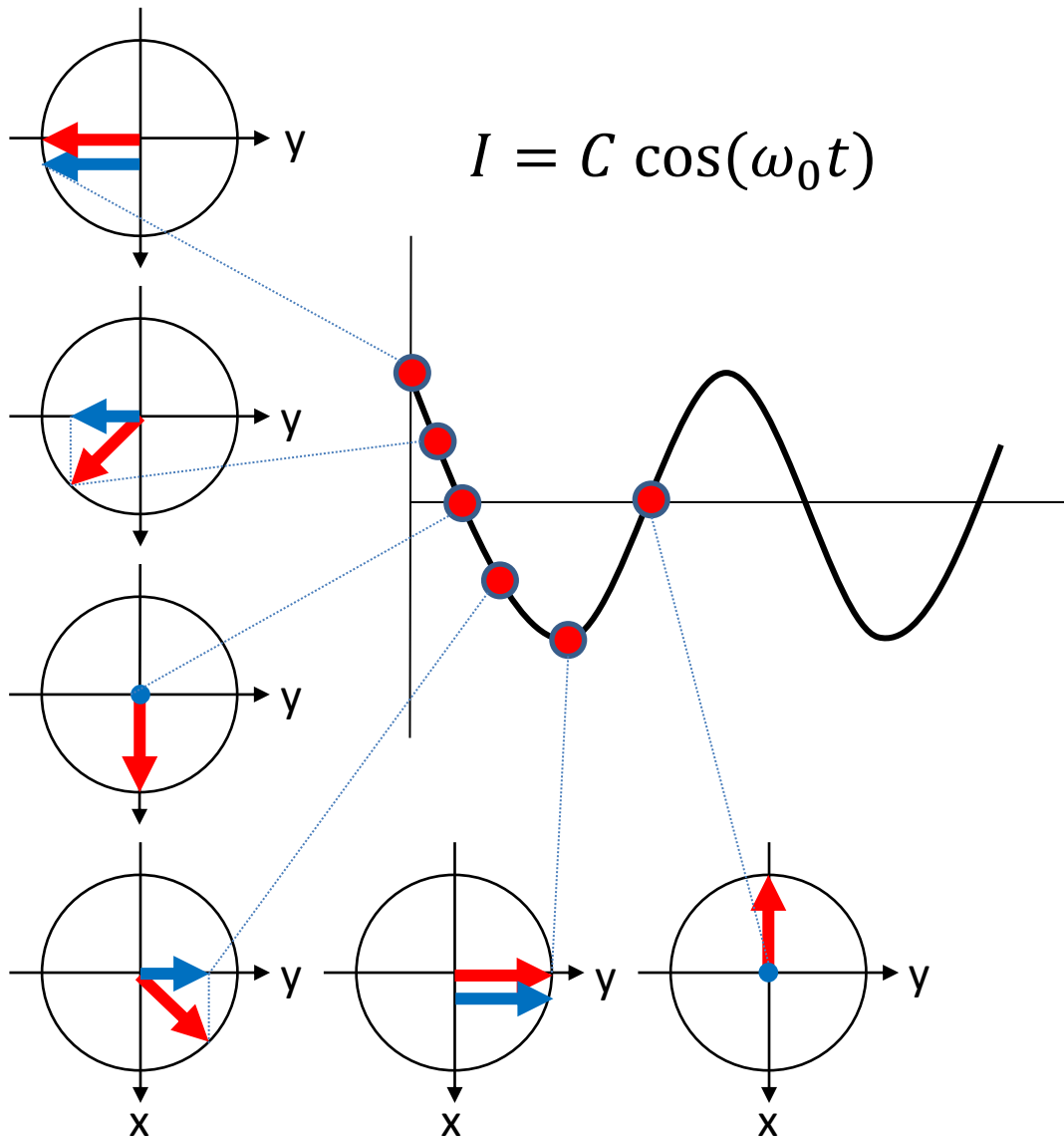
Akvizice – uložení FIDu do paměti, relaxační prodleva před zahájením dalšího skenu.

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

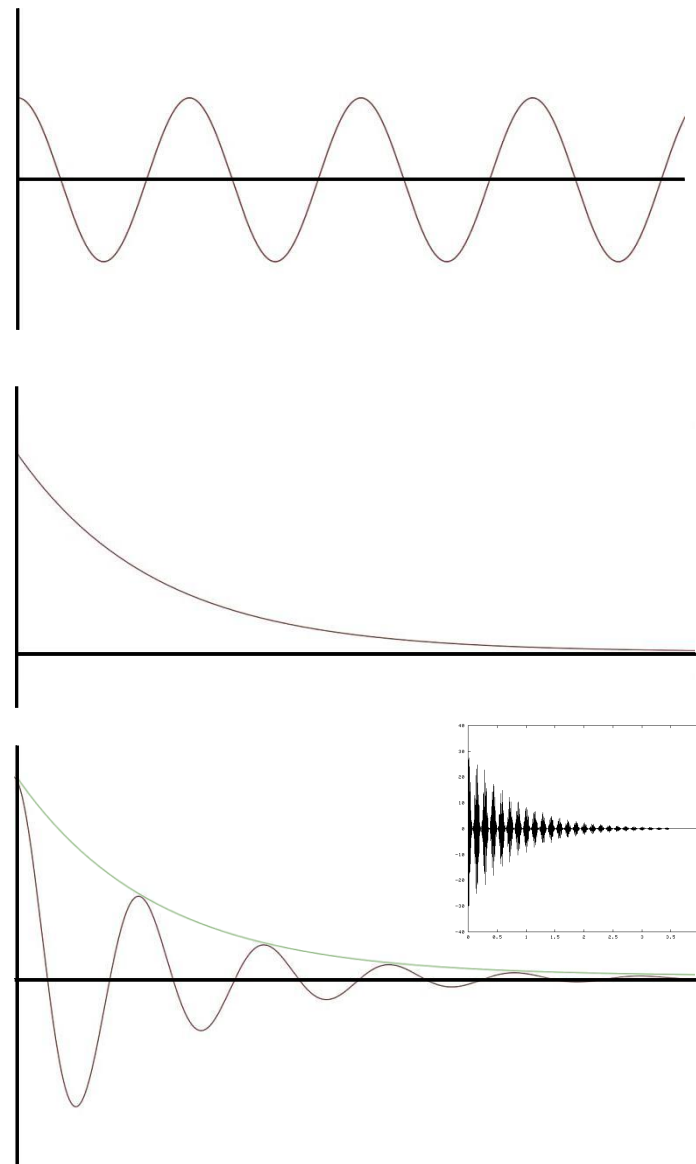
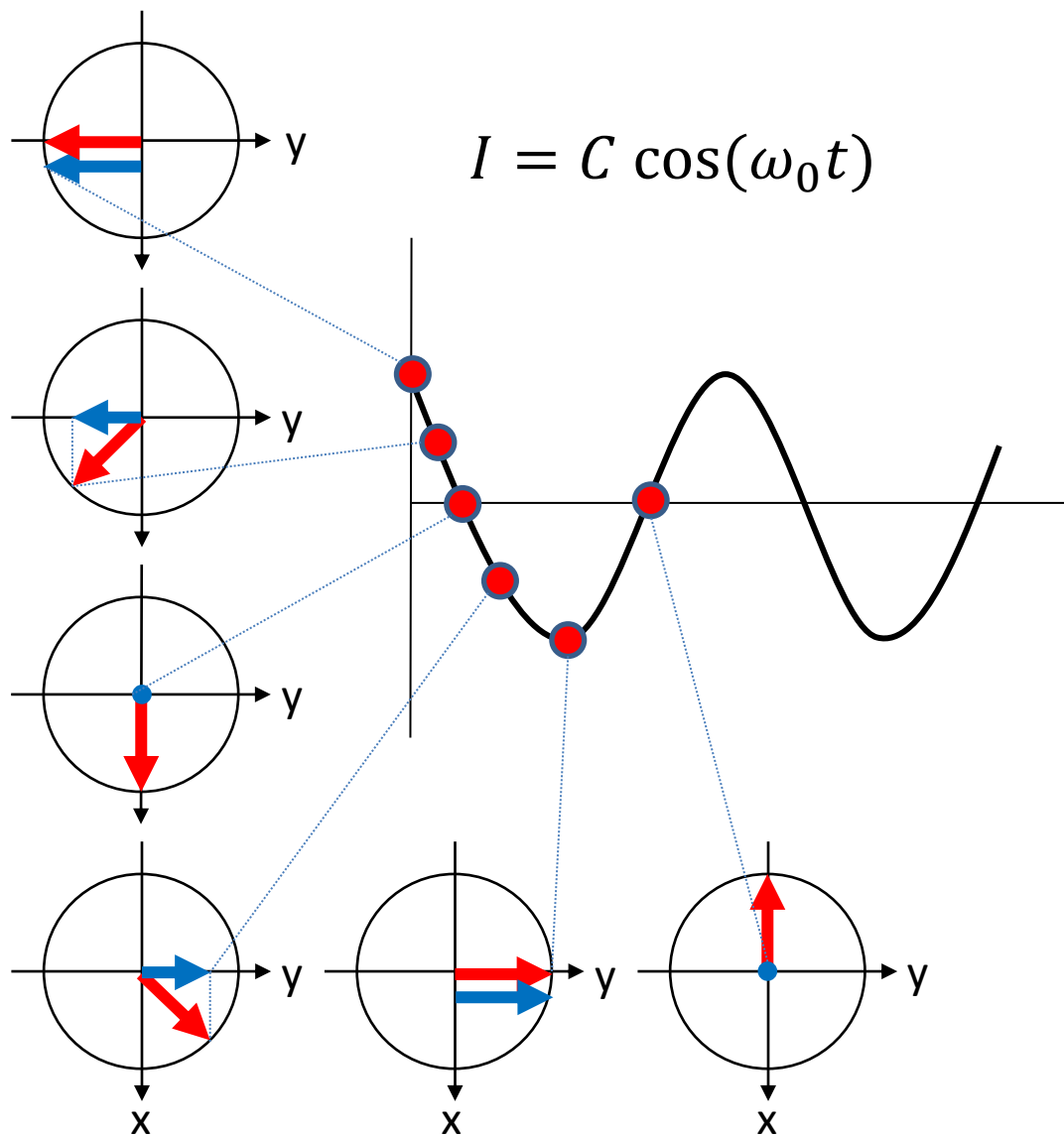
Relaxace – návrat do rovnovážného stavu v ose z , rozfázování koherentního vývoje spinů v rovině xy



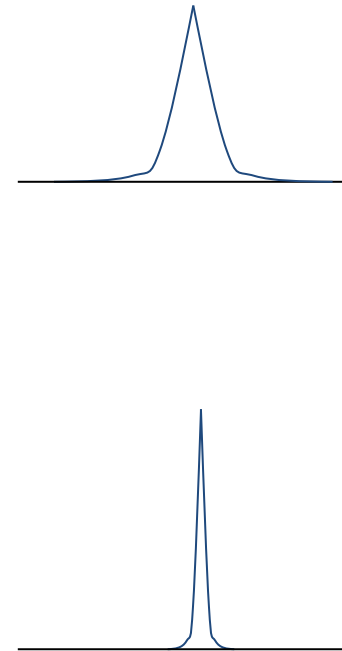
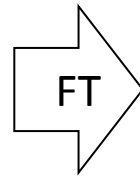
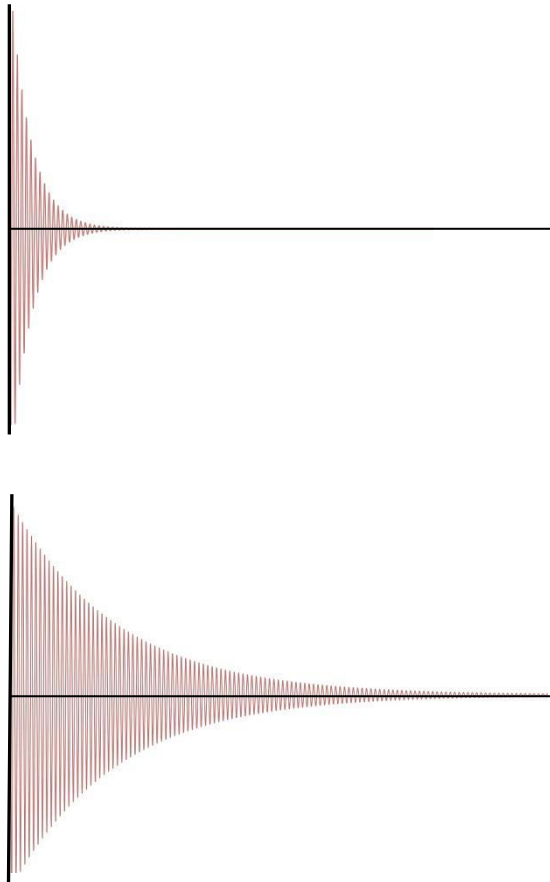
Průběh signálu v přijímací cívce



Průběh signálu v přijímací cívce



Průběh signálu v přijímací cívce

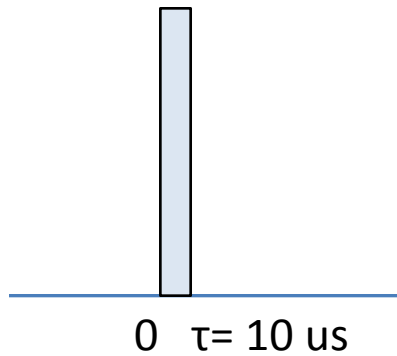


Radiofrekvenční pulzy

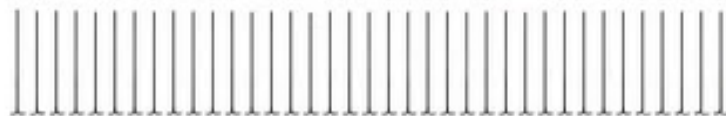
Šířka excitačního profilu je nepřímo úměrná délce trvání pulzu.

Střed excitačního profilu spektra odpovídá nastavení vysílače Ω_0 spektrometru.

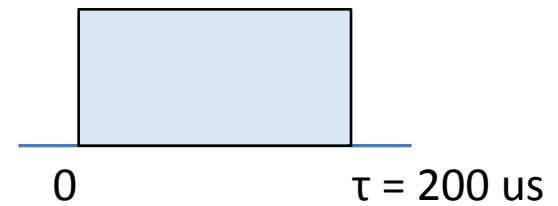
TVRDÝ (pravoúhlý) neselektivní pulz



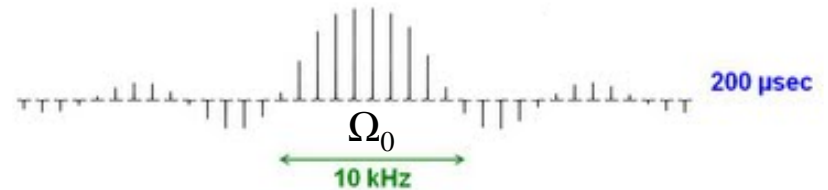
FT



MĚKKÝ (pravoúhlý) selektivní pulz

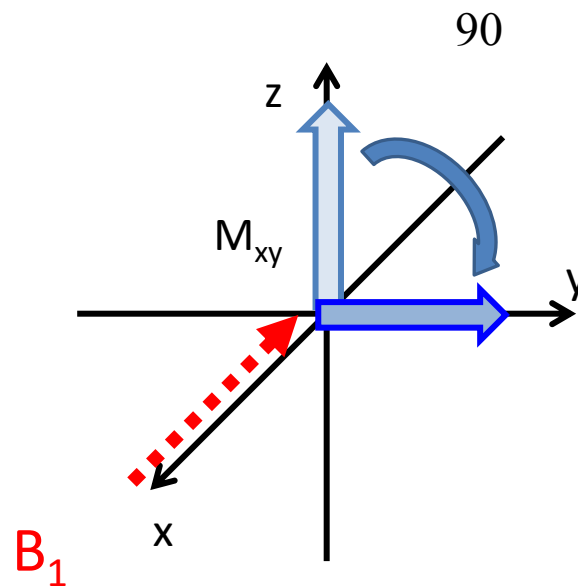
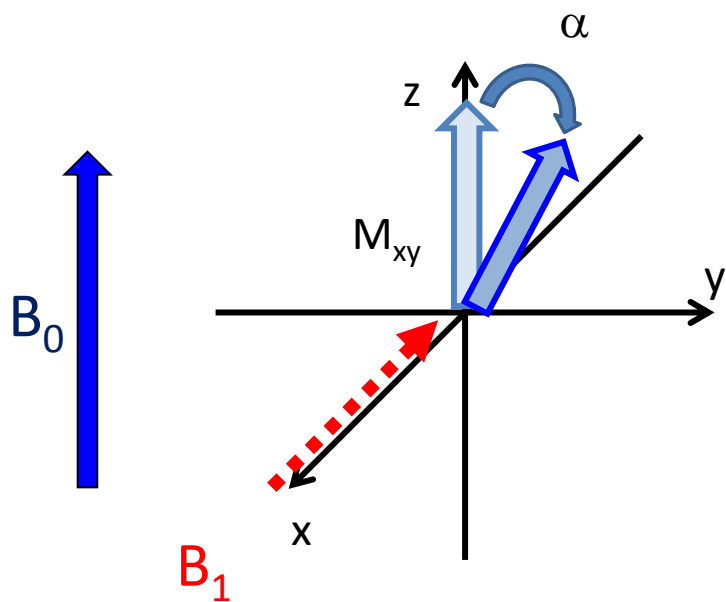


FT

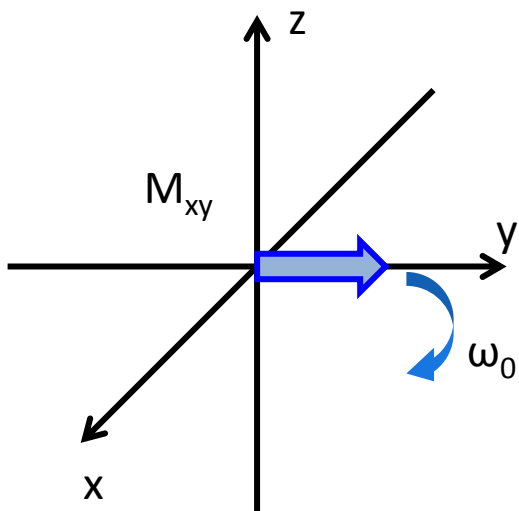


Sklápěcí úhel α pro signál v rezonanci Ω_0 :

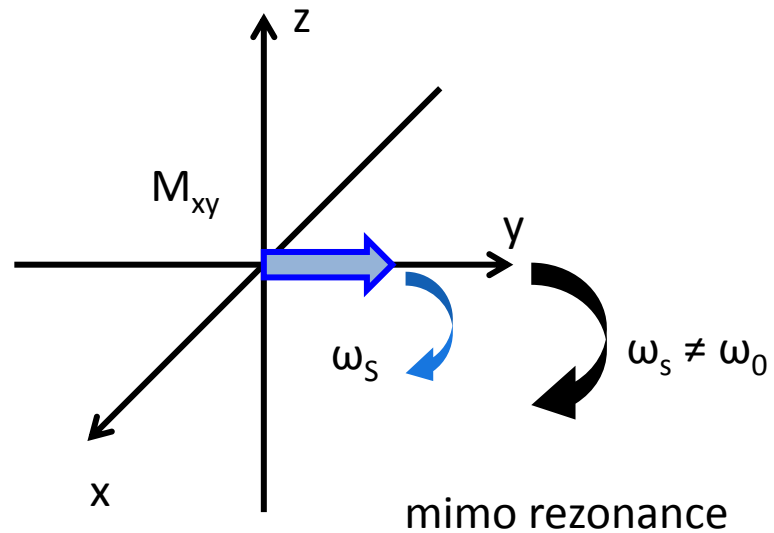
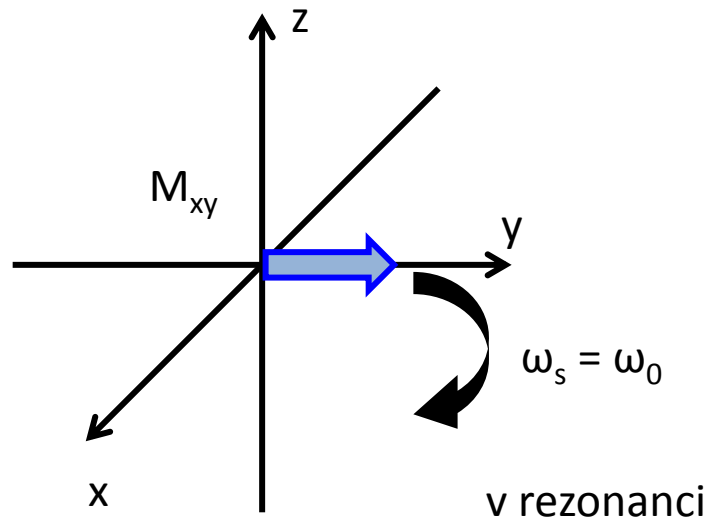
$$\alpha = \gamma B_1 \tau$$



B_0

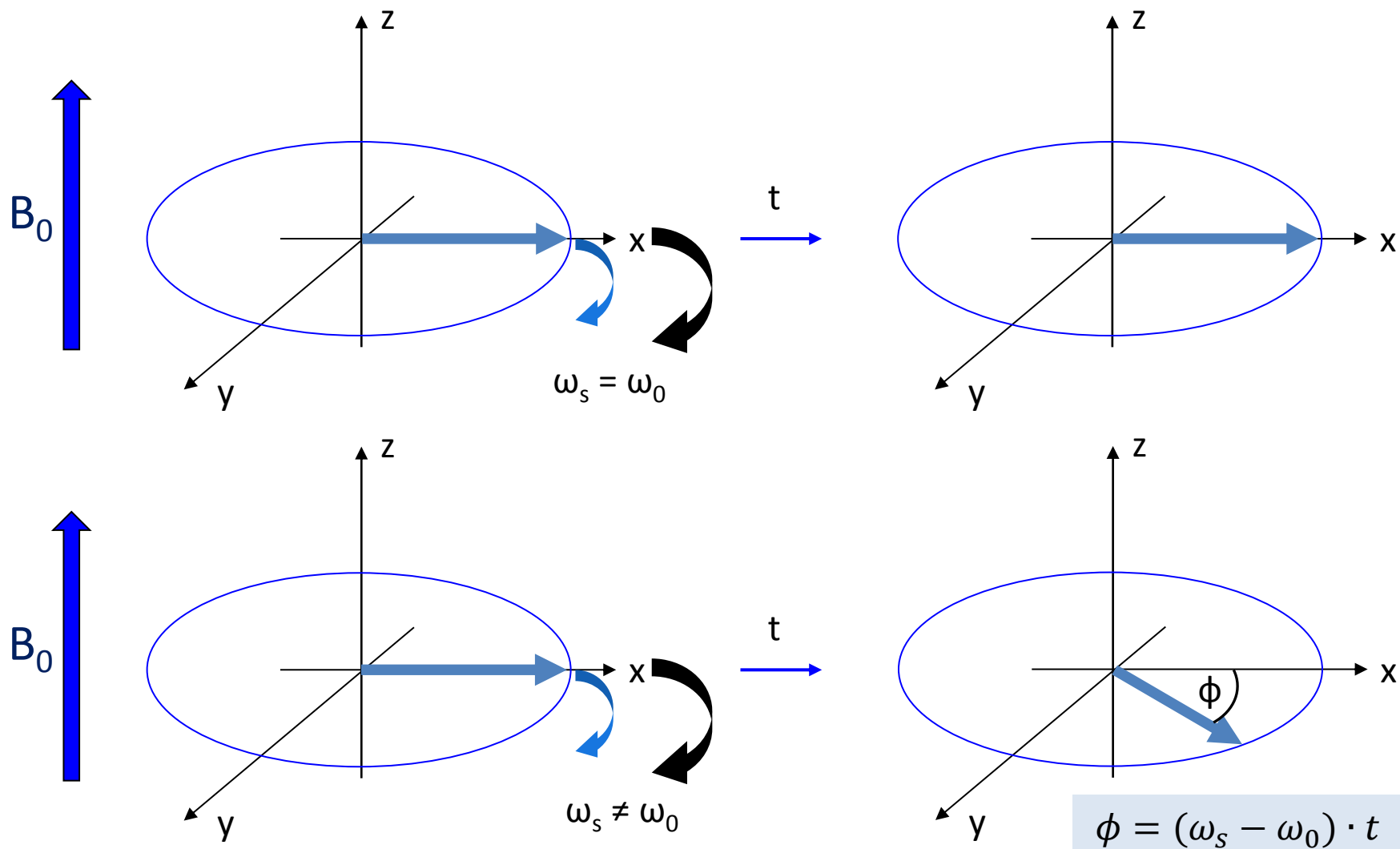


laboratorní soustava souřadnic



rotující soustava souřadnic

Chemický posun v rotující soustavě



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

FT NMR

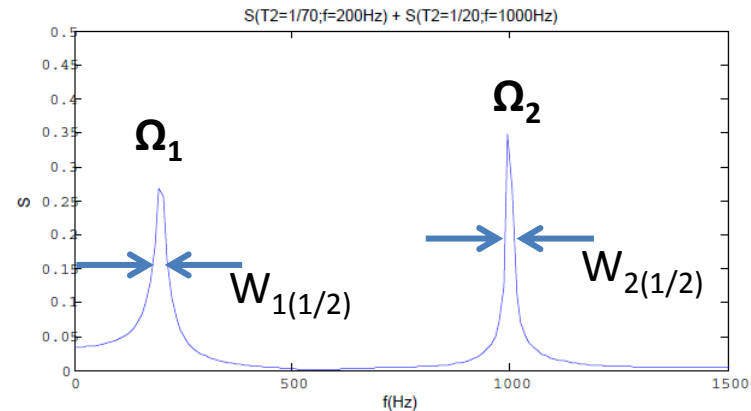
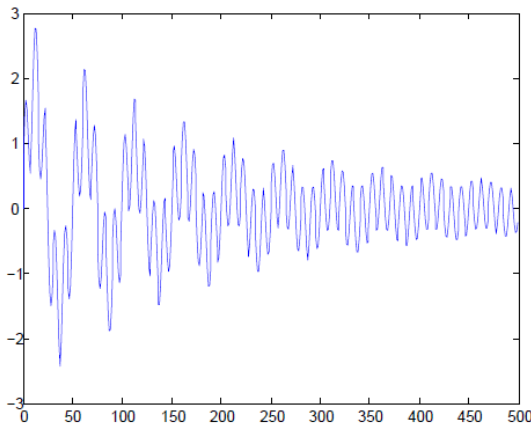
Fourierova transformace FT představuje lineární proces, umožňující analyzovat spektrální složení časově závislého FIDu (Fourierův obraz s) na základě komplexního integrálu:

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



Pro případ signálu složeného pouze ze dvou různých oscilací dostáváme pro reálnou část součet dvou absorpčních křivek s maximy odpovídajícími frekvencím Ω_1 a Ω_2 o velikostech úměrných váhovému zastoupení $s_i^{(0)}$ a **pološírkám 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:

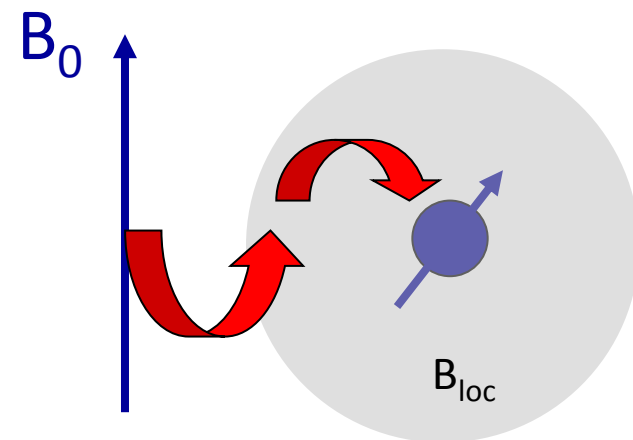
$$\hat{H}_{CS} = -\gamma \sigma B_0 \hat{I}_z$$

Precesní frekvence ovlivněná stíněním jádra

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

Chemický posun:

Definice relativní škály chemického posunu:



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

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

Chemický posun vs. stínící konstanta

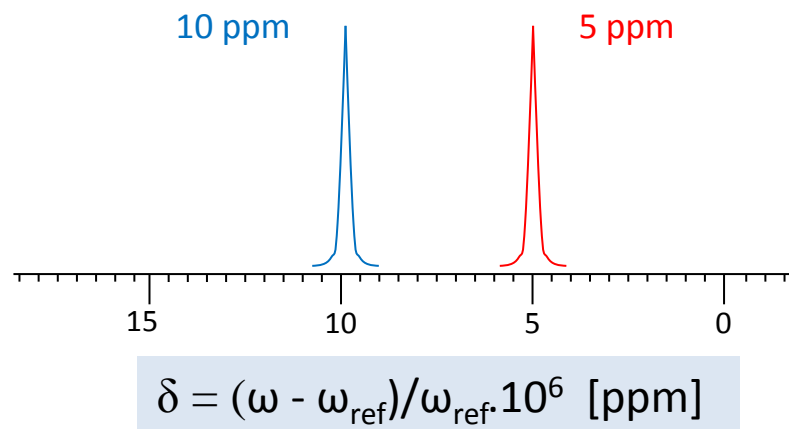
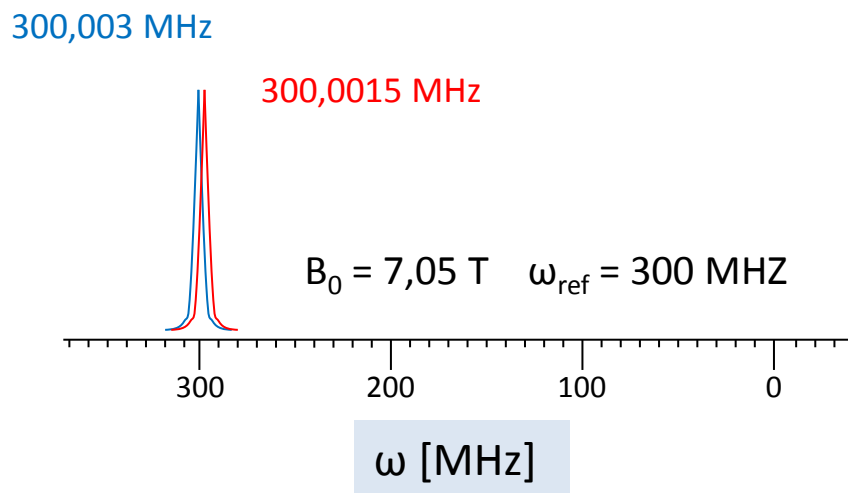
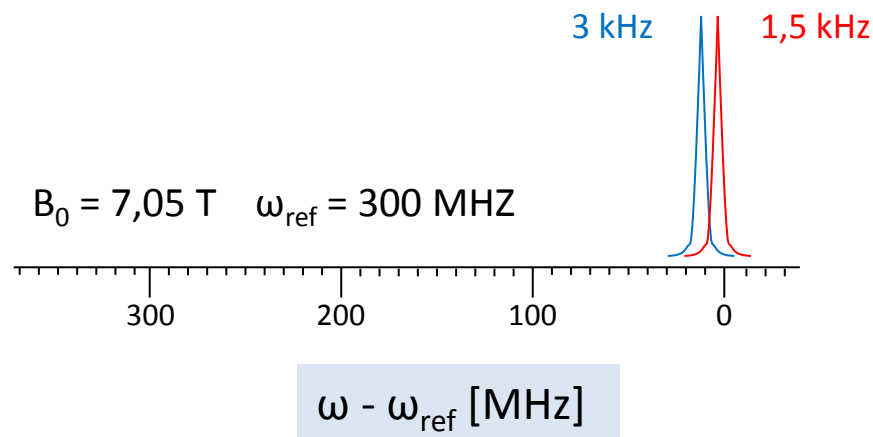
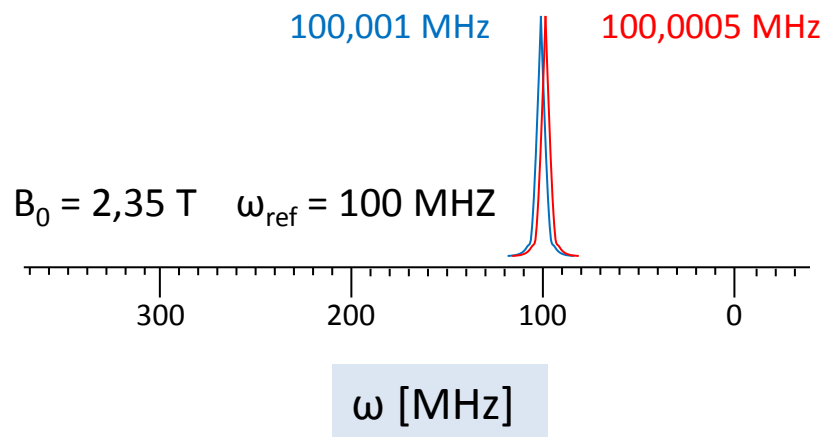
Zavedení referenční hodnoty stínící konstanty σ_{ref} standartu v referenčním vnějším poli $B_{0 \text{ ref}}$ splňující tutéž rezonanční podmínku:

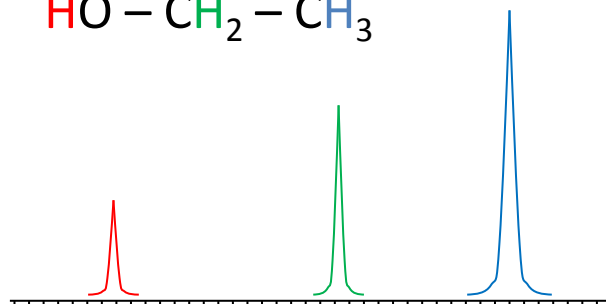
$$(1 - \sigma)B_0 = (1 - \sigma_{\text{ref}})B_{0 \text{ ref}}$$
$$\sigma - \sigma_{\text{ref}} \approx (B_0 - B_{0 \text{ ref}}) / B_{0 \text{ ref}} = (\omega - \omega_{\text{ref}}) / \omega_{\text{ref}}$$

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

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

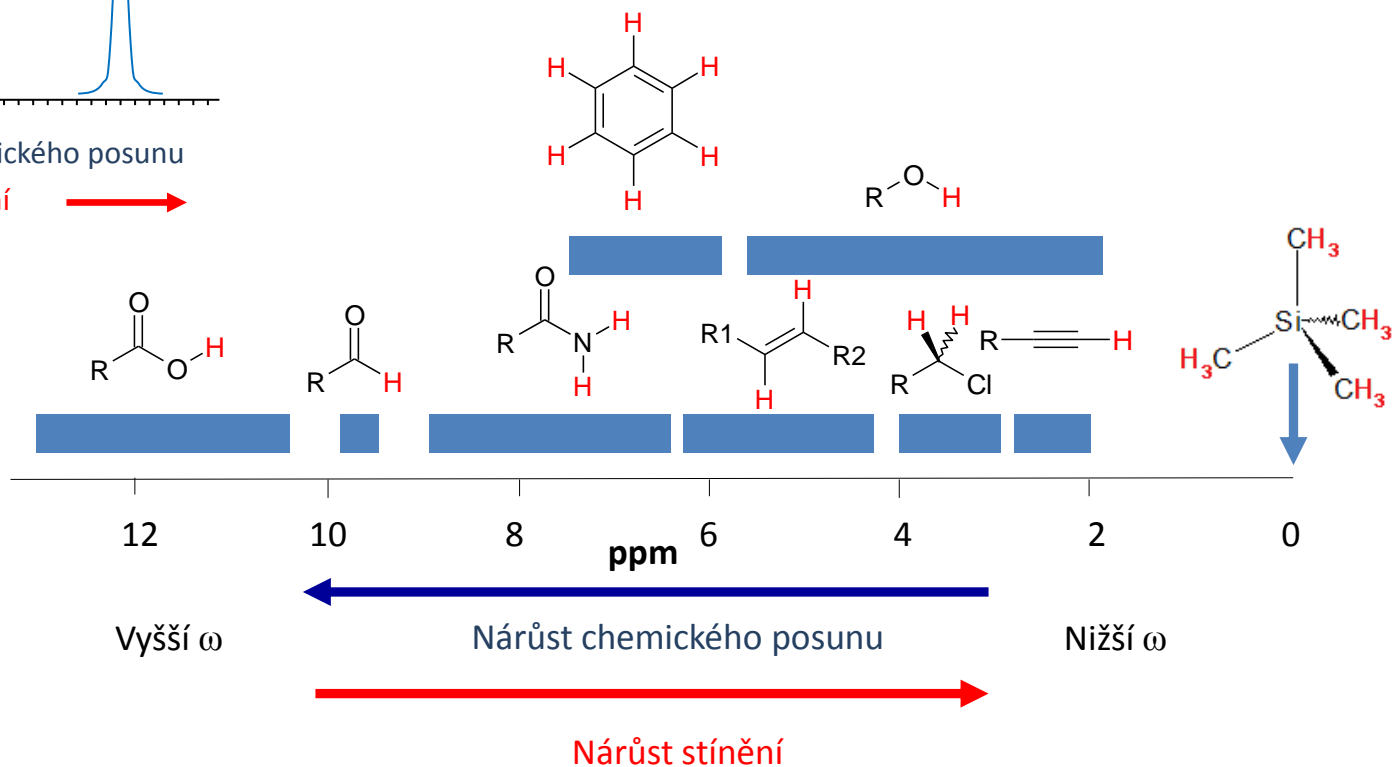
Definice škály chemického posunu





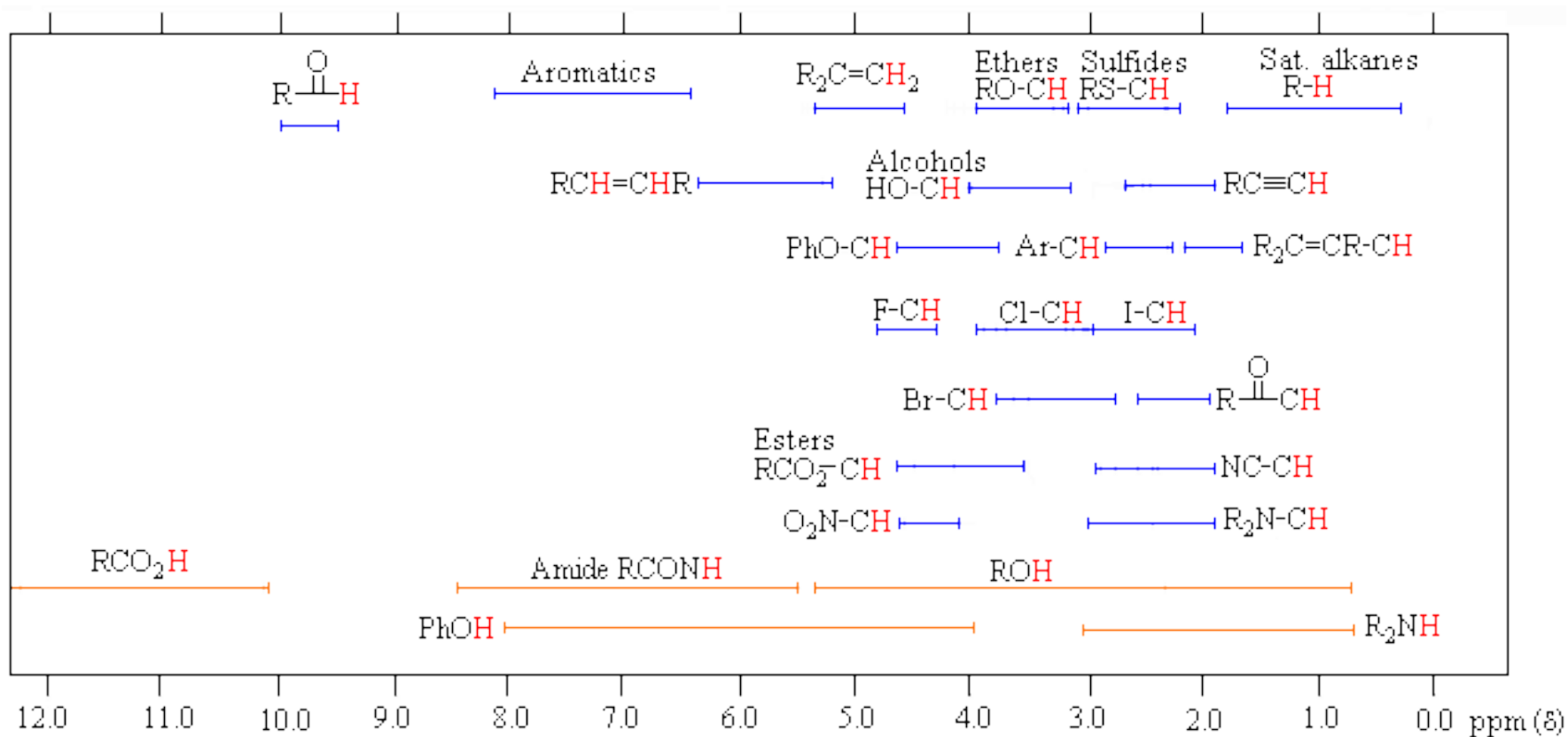
← Nárůst chemického posunu
Nárůst stínění →

1D ^1H NMR spektrum

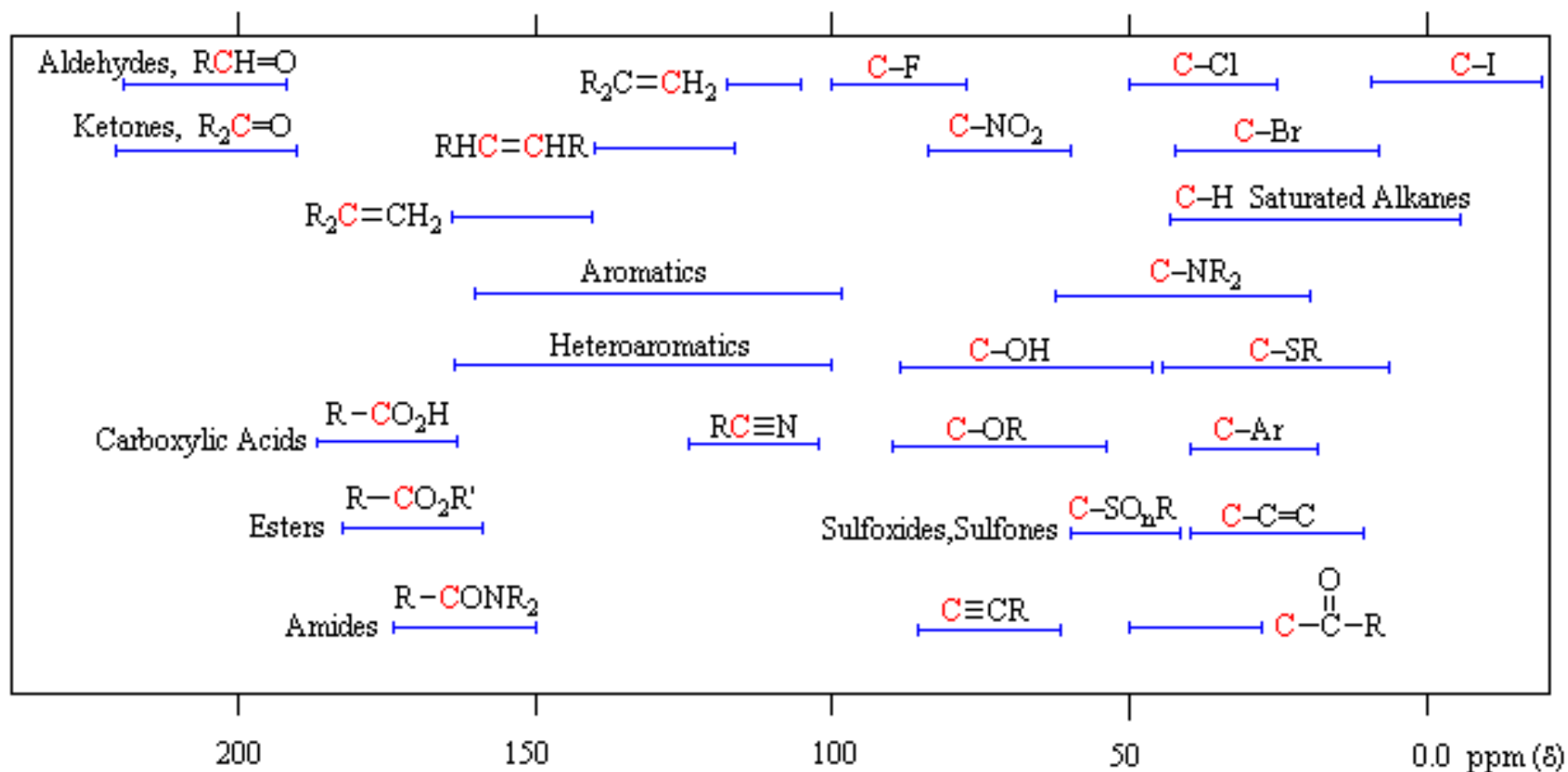


- Závislost intenzity signálu na jeho rezonanční frekvenci, resp. chemickém posunu.
- Pološířka signálu - relaxace, chemická výměna
- Kvantifikace signálů - integrace

^1H NMR chemické posuny



^{13}C NMR chemické posuny



1H PENICILLINE G

