

NMR



Osnova

- Úvod, základní princip
- Instrumentace – magnety, měřící sondy, elektronika
- Chemický posun, spin-spinová interakce, decoupling
- Základní 1D experimenty
- Interpretace 1D NMR spekter
- Více-dimenzionální NMR spektroskopie
- NMR v pevné fázi
- NMR experimenty ve slabém magnetickém poli

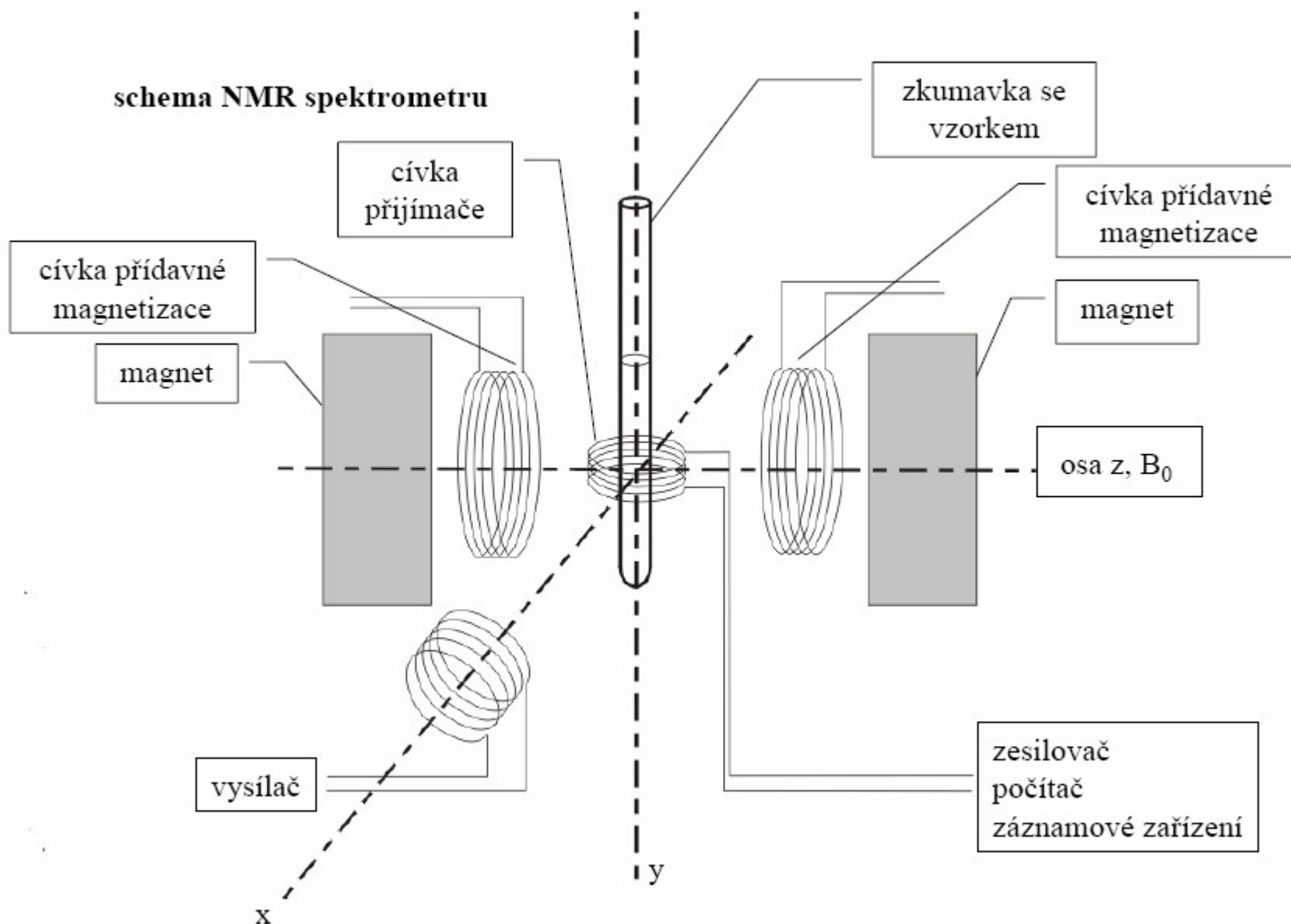
Historie NMR

- 1943 – Nobelova cena za objev magnetického momentu protonu – Otto Stern.
- 1944 – Nobelova cena za rezonanční metodu pro zjištění magnetických vlastností atomových jader – Isidor Isaac Rabi.
- 1945 – první ^1H NMR spektrum vody.
- 1952 – Nobelova cena za rozvoj metod pro přesná měření jaderného magnetismu a první NMR signál – Felix Bloch a Edward Mills Purcell.
- 1965 – širokopásmový ^1H decoupling.
- 1991 – Nobelova cena za HR-NMR, vývoj nových pulsních technik, rozvoj FT-NMR a zavedení 2D NMR technik – Richard R. Ernst.
- 2002 – Nobelova cena za vývoj NMR technik umožňujících určení 3D struktury biomolekul – Kurt Wüthrich.

Nukleární Magnetická Rezonance

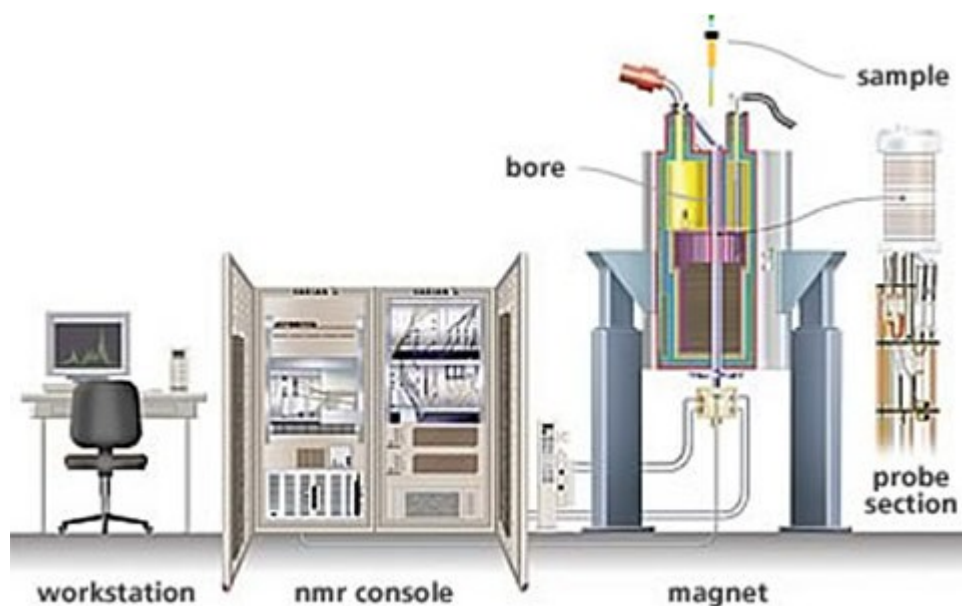
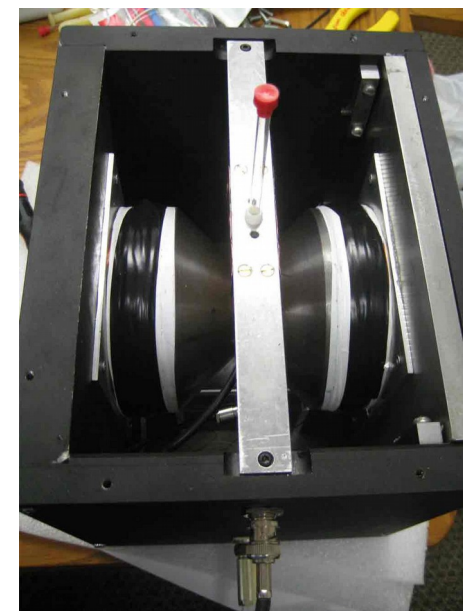
- Sledujeme absorpci radiofrekvenčního záření vzorkem, který je umístěn v magnetickém poli.
- Vzorek může být v plynném, kapalném i pevném stavu.
- Důležitá metoda pro strukturní analýzu.
- Vyžaduje silné magnetické pole, nejčastěji se využívá supravodivých magnetů.

Schéma NMR spektrometru



NMR magnety

- Permanentní – do 100 MHz
- Cryogen-free – levný provoz, 100 – 300 MHz.
- Supravodivé magnety – nejčastěji využívané v NMR
 - Chlazené kapalným heliem (4 – 2,2 K)
 - Magnetické pole až 23,5 T (1000 MHz)



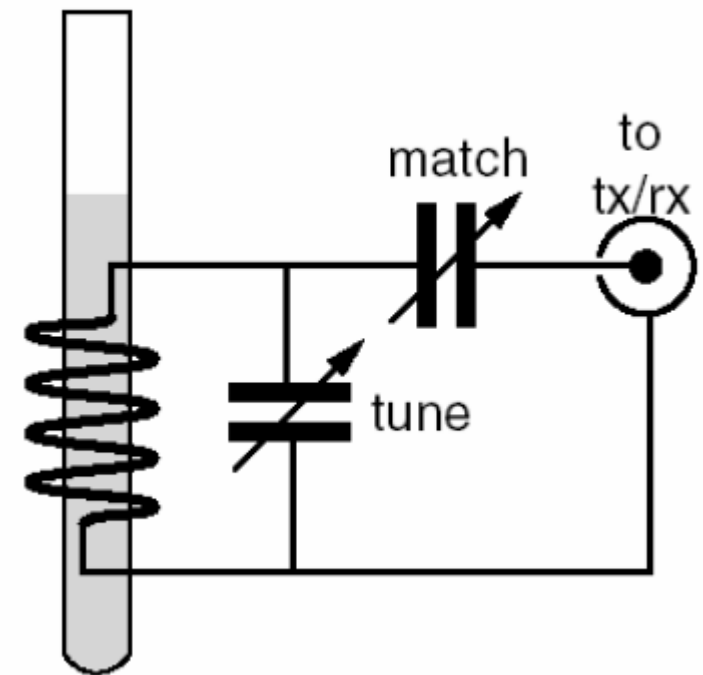


Rezonanční frekvence ^1H a ^{13}C jader v závislosti na síle magnetického pole

B_0 [T]	^1H [MHz]	^{13}C [MHz]
1,41	60	15,1
2,35	100	25,15
7,05	300	75,4
11,74	500	125,7
14,09	600	150,9
16,44	700	176,05
19,97	850	213,78
22,32	950	238,94

NMR sondy

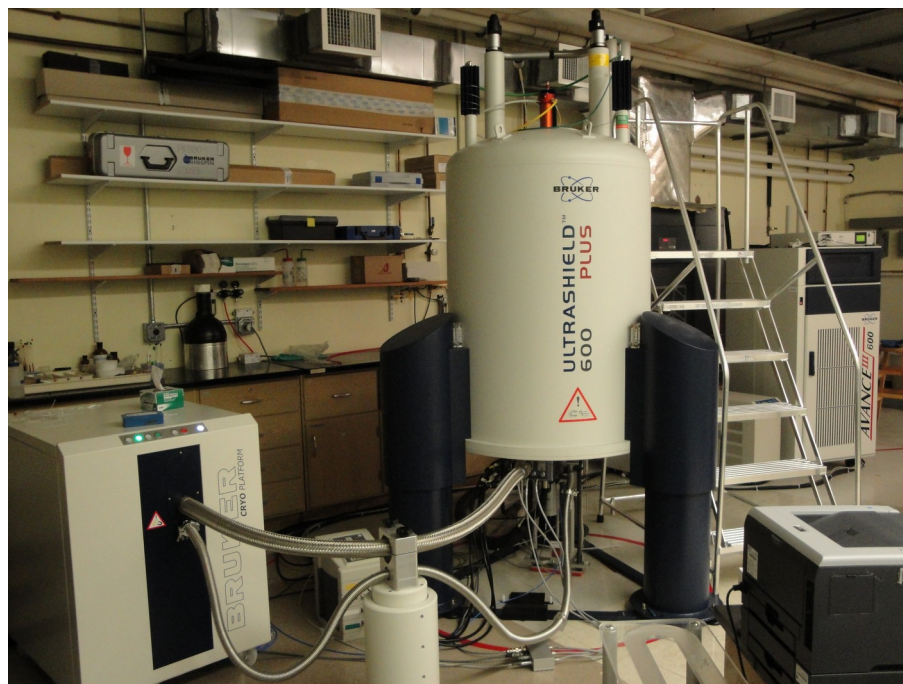
- Hlavní funkcí je excitace spinového systému a snímání odezvy.
- Lockovací kanál.
- Udržuje stabilní teplotu vzorku.
- Často obsahuje také gradientovou cívku (cívky) pro experimenty využívající pulsní gradienty magnetického pole.
- Podle konstrukce se dělí
 - Teplé sondy
 - Kryosondy – zvýšená citlivost, náročná údržba
 - Průtočné sondy
 - Nanosondy – pro extrémně malé množství vzorku



NMR sondy

- Sondy se dále dělí podle počtu cívek. Citlivost cívek klesá se vzdáleností od vzorku.
 - Dvoukanálové – dvě cívky
 - Tříkanálové (triple resonance)
- BB sondy mají vnitřní cívku určenou pro měření jader X a vnější pro měření ^1H nebo pro ^1H decoupling. Inverzní sondy mají uspořádání opačné a jsou vhodné pro snímání ^1H jader, např. 2D experimenty – ^1H - ^{13}C HSQC.
- Dále rozlišujeme sondy podle velikosti NMR kyvety, pro kterou jsou konstruovány – 5 a 10 mm.

NMR sondy



Vzorek pro NMR spektroskopii

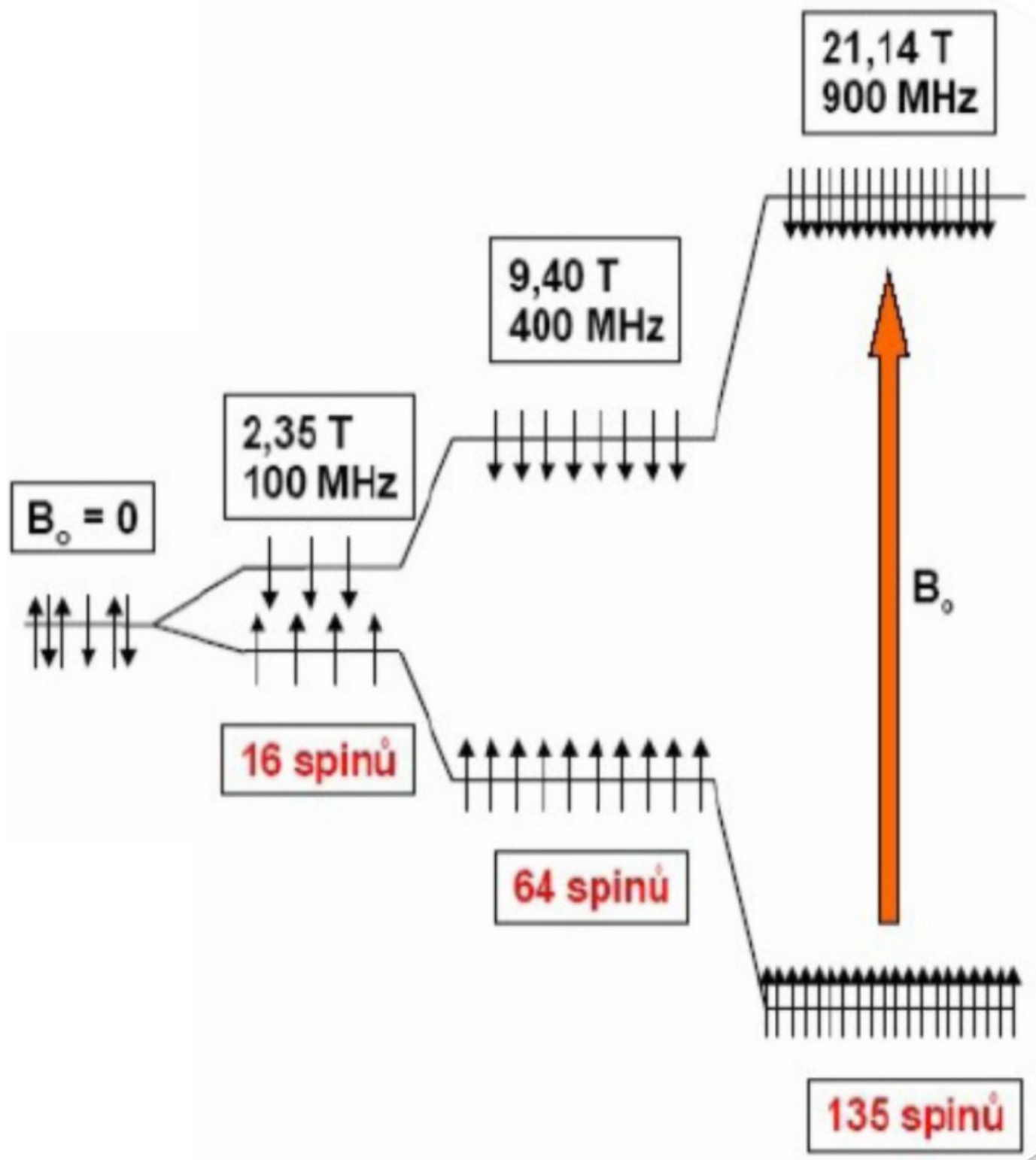
- Využívají se tenkostěnné skleněné kyvety, které se umisťují do plastových nebo keramických rotorků. Průměr kyvet je nejčastěji 3, 5 nebo 10 mm.
- Pro měření je nutné připravit roztok měřené látky v deuterovaném rozpouštědle. Signál ^2H (D) se používá k lockování vzorku.
- Vzorky reakčních směsí se často měří v koaxiálním uspořádání, kdy se kyveta se vzorkem vloží do kyvety s deuterovaným rozpouštědlem.
- Signál deuterovaného rozpouštědla lze využít i jako standard ke kalibraci spektra.

Rozpouštědla pro NMR

Rozpouštědlo	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$
C_6D_6	7,16	128,4
CDCl_3	7,24	77,23
CD_2Cl_2	5,32	54,0
D_2O	4,8	-
DMSO	2,50	39,5
CD_3OD	3,31; 4,78	49,2
Toluen- d_8	2,09; 6,98; 7,00; 7,09	20,4; 125,5; 128,3; 129,4; 137,9
CD_3CN	1,94	1,4; 118,7

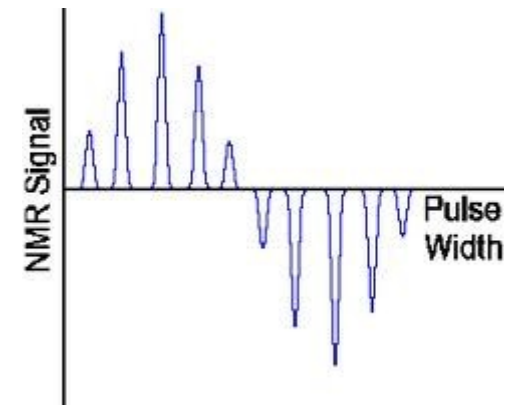
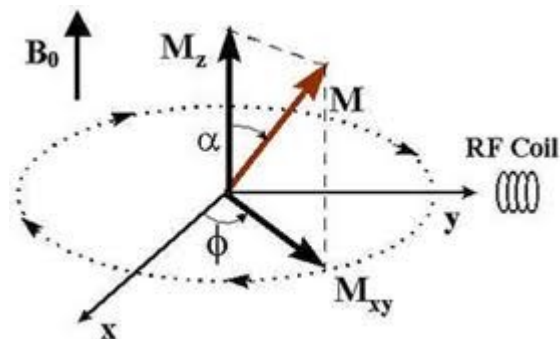
Jaderný spin

- Atomové jádro se skládá z protonů a neutronů.
- Obě částice mají spin $\pm\frac{1}{2}$.
- Jaderný spin je dán součtem spinů všech nukleonů.
- V NMR jsou aktivní pouze jádra, která mají spin různý od nuly.
- Nejčastěji se měří jádra se spinem $\frac{1}{2}$, např. ^1H , ^{13}C , ^{19}F a ^{31}P .
- Za normálních podmínek mají obě orientace spinu stejnou energii.
- Pokud ale vložíme jádro do magnetického pole, získáme dvě rozdílné energetické hladiny.
- Pokud na tento systém působíme radiofrekvenčním zářením, může dojít k absorpci a přeskoku spinu na vyšší energetickou hladinu.
- Poté pozorujeme návrat spinu na původní hladinu a vyzáření absorbované energie, kterou snímáme.



Radiofrekvenční pulsy

- FT-NMR využívá k excitaci jaderných spinů radiofrekvenční pulsy.
- Ty excitují všechna měřená jádra, např. protony, najednou.
- Pulsy sklápí vektor magnetizace a způsobují jeho *precesi*.
- Délka pulsů se pohybuje v řádu μs .
- Čím je puls delší, tím je větší i sklápěcí úhel.



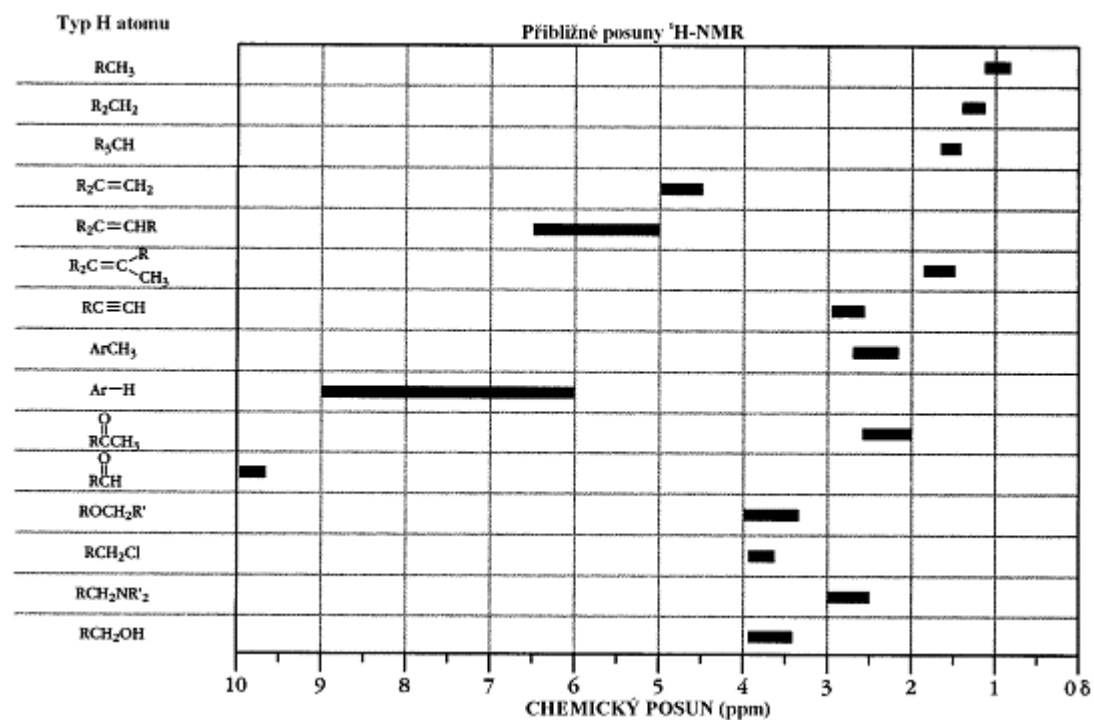
Chemický posun

- Izolovaná jádra stejného izotopu budou v magnetickém poli rezonovat při stejné frekvenci.
- Pokud uvažujeme molekuly, je každé jádro ovlivněno také lokálními magnetickými poli, které jsou generovány vazebnými elektrony. Tím dochází ke změně rezonanční frekvence daného jádra.
- Změna je dána tzv. chemickým okolím pozorovaného jádra a nazývá se *chemický posun*. Označuje se δ a je dán vztahem:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{TMS}}{\nu}$$

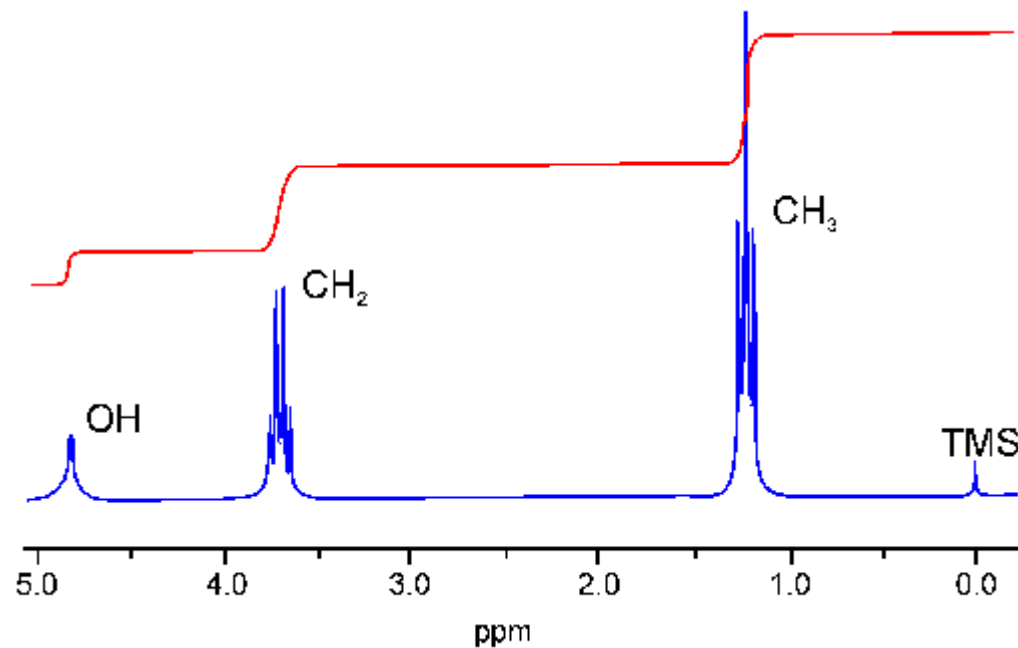
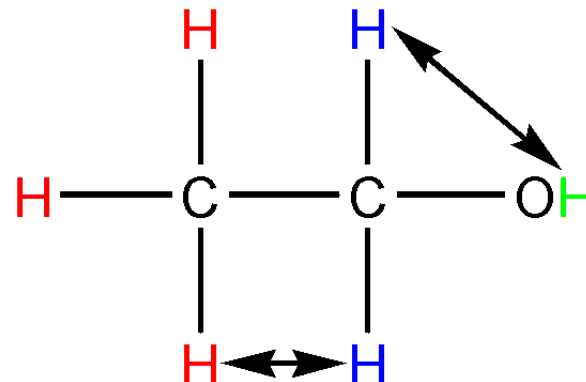
- ν_{TMS} je rezonanční frekvence standardu, ν je rezonanční frekvence signálu
- chemický posun je bezrozměrný, jelikož se jedná o velmi malé hodnoty, udává se v ppm.
- Chemický posun je, na rozdíl od rezonanční frekvence, nezávislý na hodnotě vnějšího magnetického pole.

^1H NMR chemické posuny



Interakční konstanta

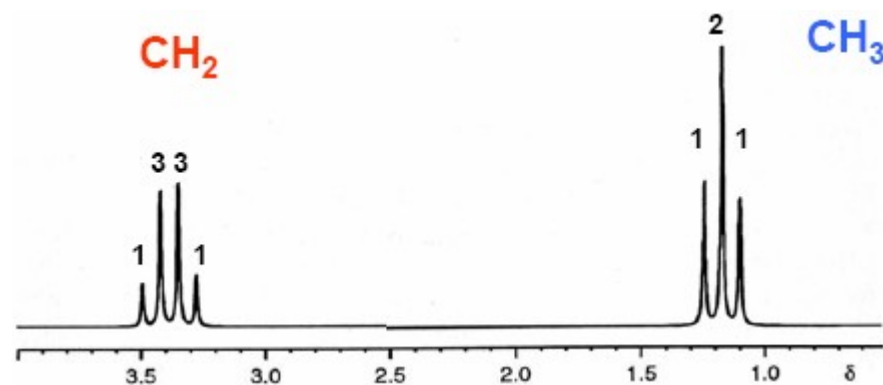
- Pokud je v molekule více NMR aktivních jader, může docházet k jejich vzájemné interakci. Síla této interakce je dána hlavně počtem vazeb, které jádra oddělují.
- Velikost interakční konstanty je nezávislá na intenzitě magnetického pole.



Interakční konstanta

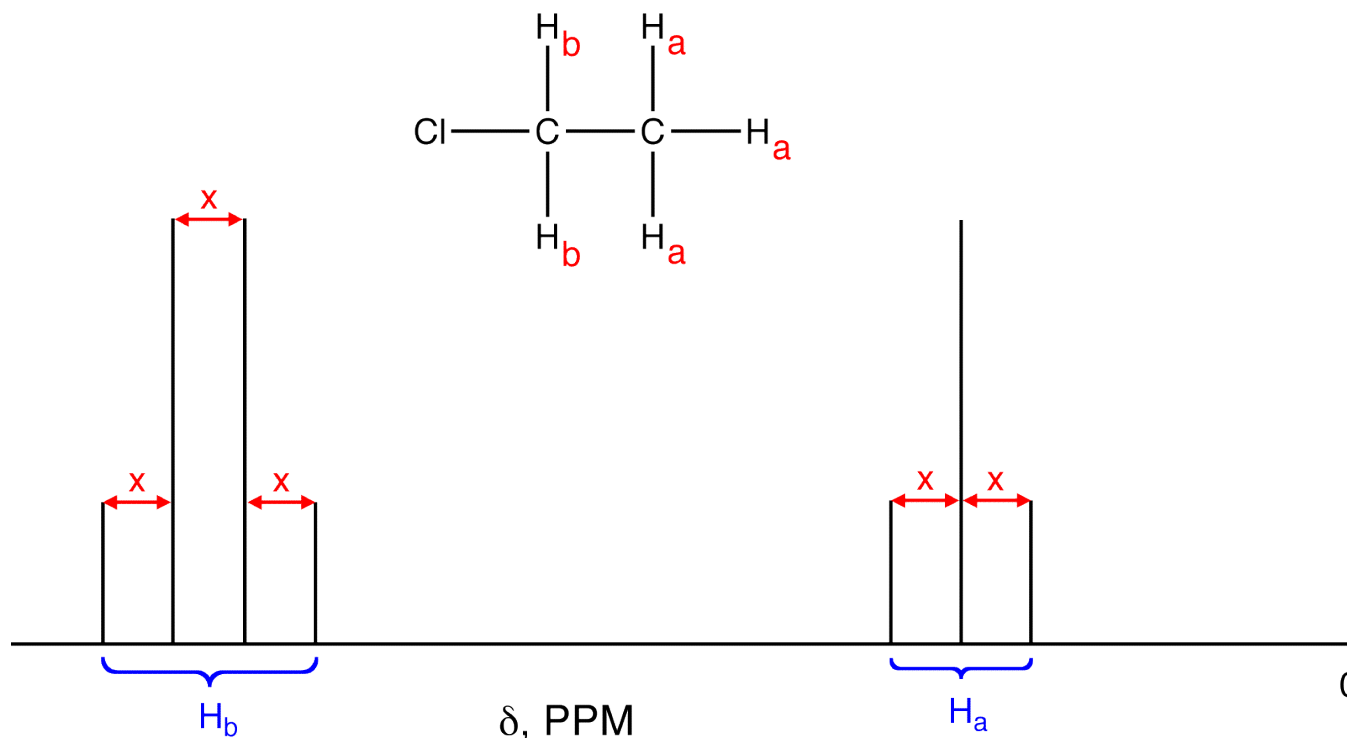
- Způsob štěpení je dán počtem interagujících spinů.
- Pro jádra se spinem $\frac{1}{2}$ je velikost multipletu, tzn. počet signálů po štěpení a jejich vzájemná intenzita dán Pascalovým trojúhelníkem.

			1			
		1	1			
	1	2	1			
1	3	3	1			
1	4	6	4	1		
1	5	10	10	5	1	
1	6	15	20	15	6	1



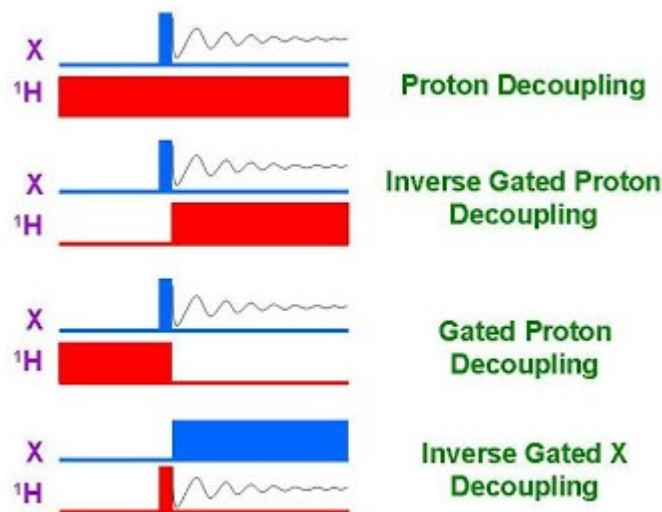
Interakční konstanta

- Velikost interakce se vyjadřuje pomocí interakční konstanty, která se označuje písmenem J . Pro přesnější popis interakce se využívá indexů, např. interakci mezi atomy vodíku v ethanolu (přes tři vazby H-C-C-H) vyjádříme ${}^3J_{\text{HH}}$. Její velikost se udává v Hz.



Decoupling (dekaplink)

- Štěpením signálů spektra je důležitou informací pro strukturní analýzu, zároveň ale zhoršuje poměr signál/šum.
- Pro potlačení štěpení se používá tzv. decoupling, kdy kontinuálně ozařujeme dekaplovaná jádra. Tím dojde k potlačení štěpení.
- Ztratíme ale informaci o kvantitativním složení vzorku, protože intenzita signálu v dekaplovaném spektru není úměrná koncentraci.
- Gated decoupling – neozařujeme během akvizice, nedojde k potlačení NOE.
- Inverse-gated decoupling – ozařujeme pouze během akvizice, vhodné pro jádra se záporným gyromagnetickým poměrem – ^{15}N , ^{29}Si .



^1H NMR

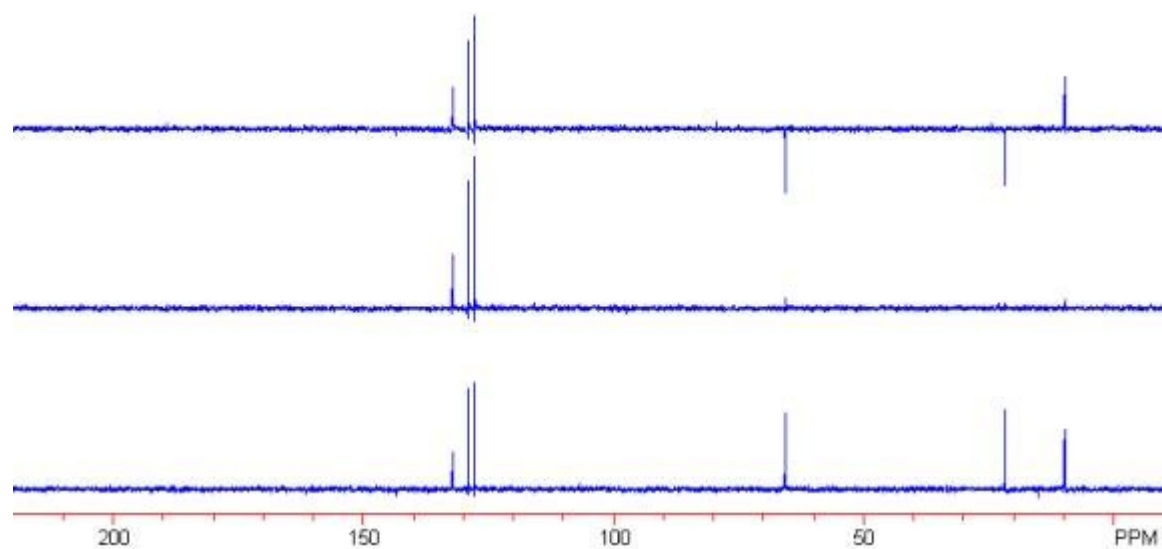
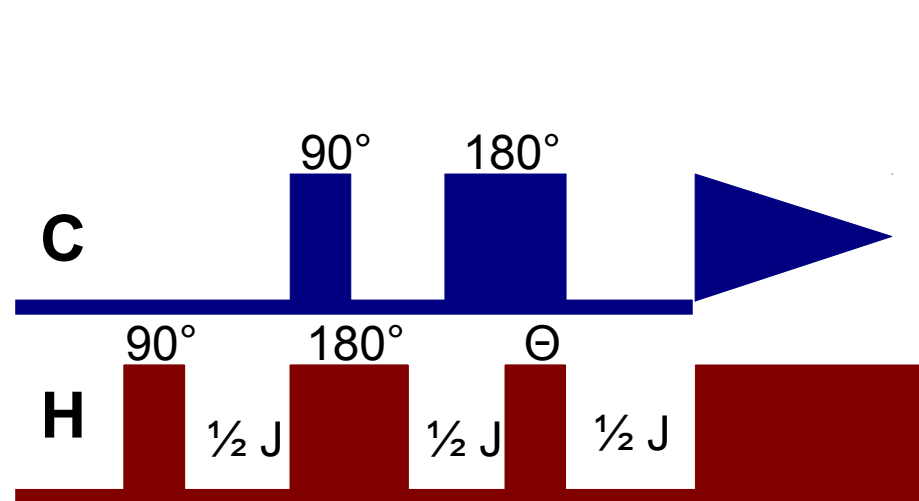
- ^1H je velmi citlivé jádro s přírodním zastoupením téměř 100 %.
- Běžný rozsah chemických posunů 14 až -4 ppm.
- Používá se jednopulsní experiment (zg) s 90° pulsem, příp. 30° pulsem (zg30).
- Lze využít i homonukleární nebo heteronukleární decoupling.
- Složitější molekuly poskytují komplikovaná spektra, obsahující multiplety vyšších řádů.
- Pro větší molekuly je výhodné měřit 2D NMR experimenty – COSY, NOESY.
- Ve spektru lze pozorovat tzv. uhlíkové satelity vzniklé interakcí ^1H - ^{13}C .
- <http://users.wfu.edu/ylwong/chem/nmr/h1/>
- <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/handouts/nmr-h/hdata.htm>

^{13}C NMR

- V přírodě je obsah izotopu ^{13}C pouze 0,01 %, zbytek tvoří NMR neaktivní izotop ^{12}C .
- ^{13}C NMR nejčastěji měříme s ^1H decouplingem.
- Rozsah chemických posunů je od 220 do -20 ppm.
- Často se využívají složitější experimenty – APT, DEPT, INEPT, ...
- Příp. 2D experimenty – HSQC, HMBC.
- Stanovení interakční konstanty ^{13}C - ^{13}C vyžaduje velmi koncentrované vzorky a dlouhý měřicí čas – INADEQUATE.
- <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/handouts/nmr-c13/cdata.htm>
- <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/handouts/nmr-c13/c-coupling.htm>

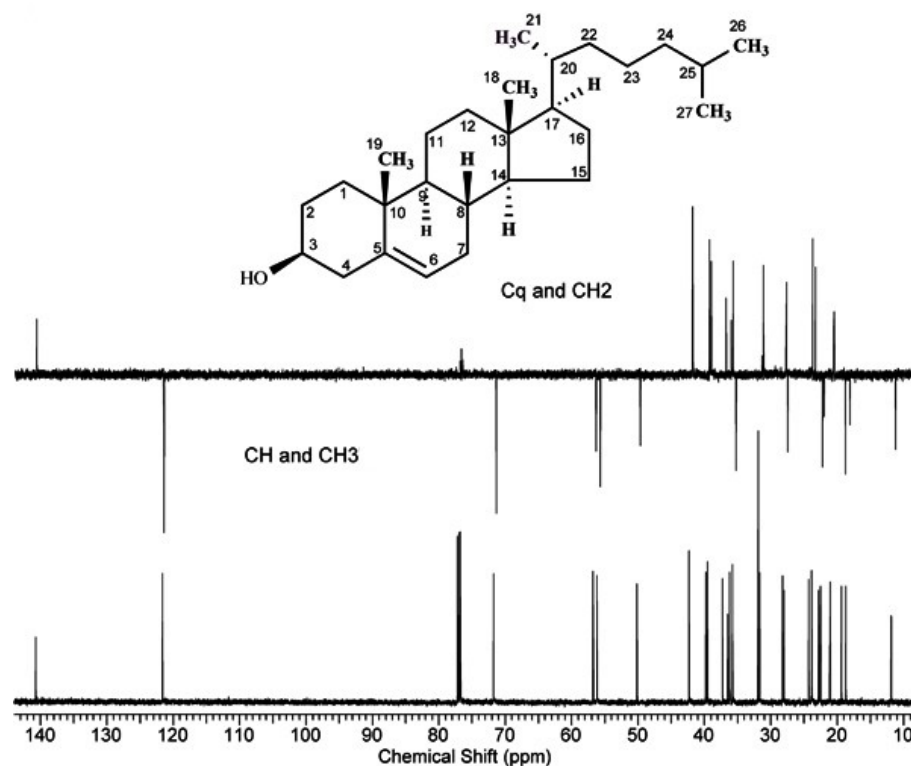
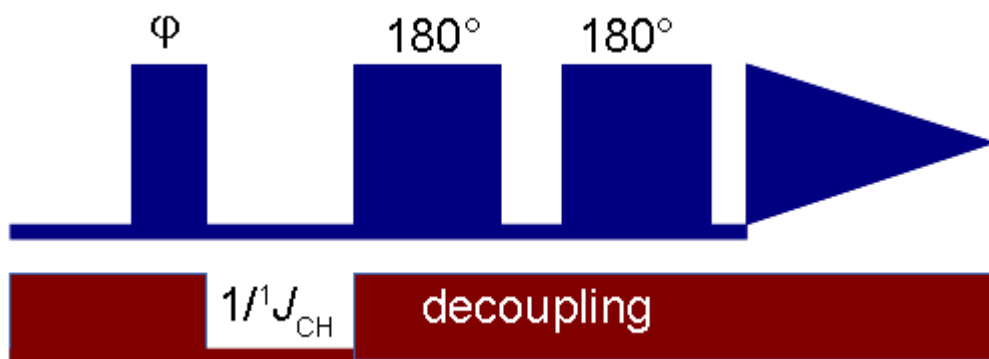
DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

- Poskytuje informaci o počtu protonů vázaných k uhlíku, tzn. Umožňuje rozlišit skupiny CH, CH₂, CH₃ a kvartérní uhlíky.
- DEPT45 – signály od všech uhlíku s vazbou C-H ve stejné fázi
- DEPT90 – pouze signály skupin CH, ostatní jsou potlačeny
- DEPT135 – signály CH a CH₃ ve fázi, CH₂ v antifázi



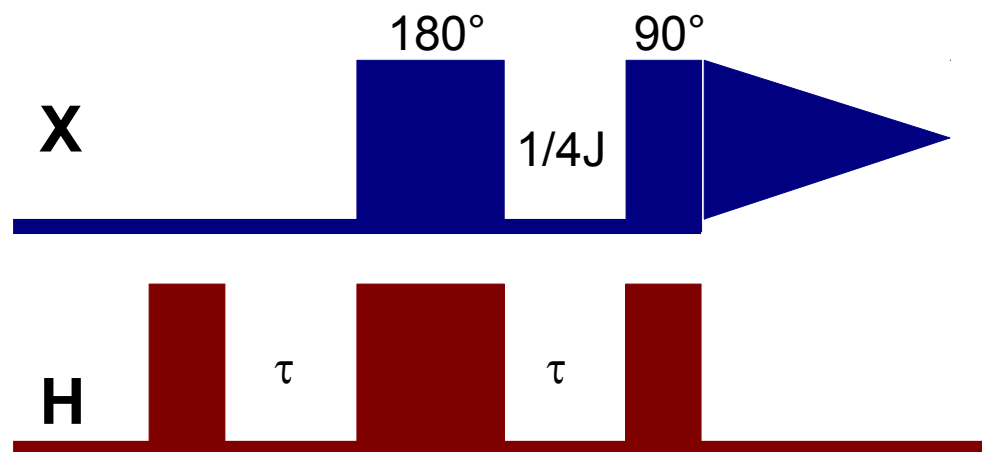
APT – Attached Proton Test

- Podobně jako DEPT umožňuje určit počet protonů vázaných na atom uhlíku.
- Kvartérní uhlíky a skupiny CH₂ poskytují pozitivní píky.
- Skupiny CH a CH₃ poskytují negativní píky.
- Nižší citlivost než DEPT, ale místo tří spekter stačí naměřit jedno.



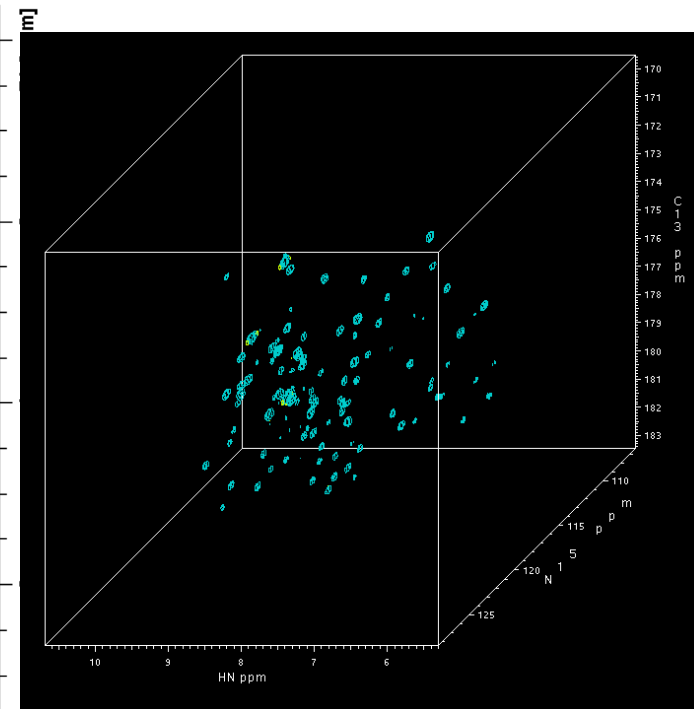
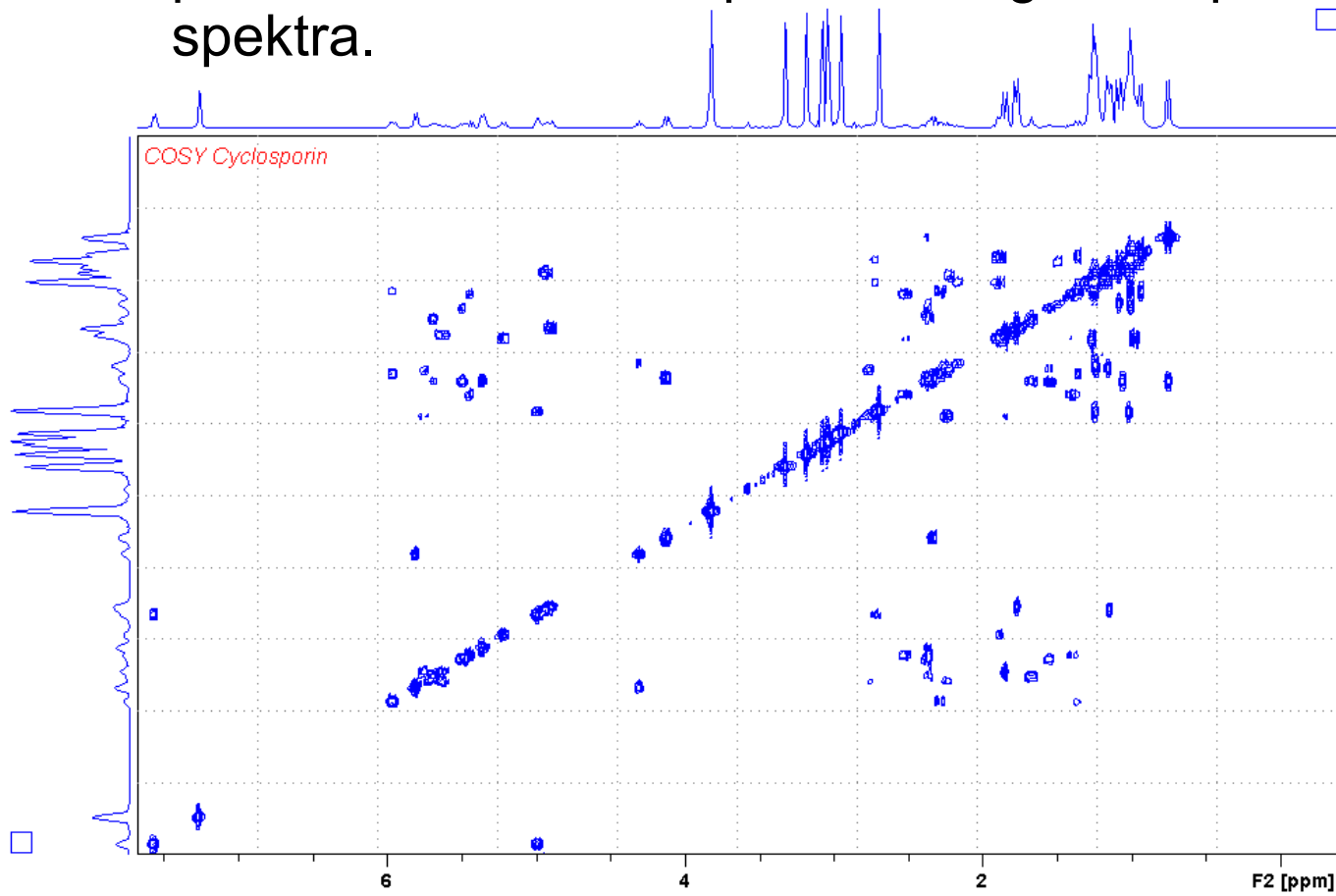
INEPT – Inensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer

- Důležitý prvek mnoha pulsních sekvencí, využívajících přenos polarizace.
- Využívá se pro zvýšení citlivosti jader s nízkým gyromagnetickým poměrem.
- Zvýšení citlivosti je úměrné poměru gyromagnetických konstant ^1H a měřeného jádra – pro ^{13}C je to asi 4x, pro ^{15}N cca 10x.



2D ... XD NMR experimenty

- Pro složitější molekuly není 1D NMR spektrum čitelné.
- Rozlišení se dá zvýšit silnějším magnetickým polem.
- Lepší cestou je přechod na NMR experimenty ve více dimenzích.
- V dnešní době se rutinně využívají 2D a 3D experimenty.
- Rozlišení je podstatně vyšší než u 1D spekter protože dochází k rozprostření signálů v ploše spektra.

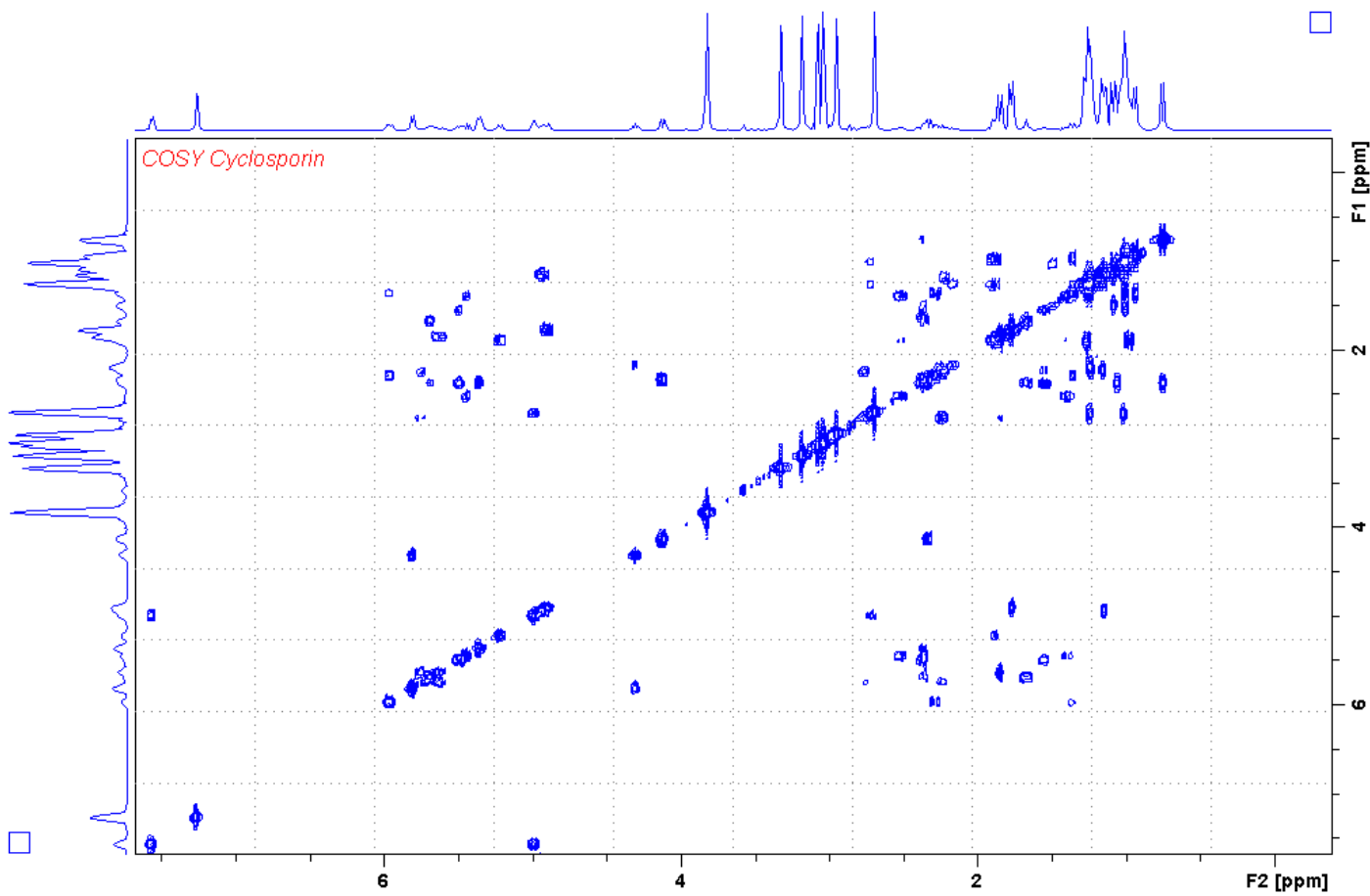


2D ... XD NMR experiments

- 2D experiments se skládají ze čtyř kroků:
 - Příprava (preparation) – excitace spinového systému.
 - Vývoj (evolution) – necháme systém volně vyvíjet.
 - Mixing time – dochází k přenosu magnetizace mezi spiny.
 - Detekce – akvizice dat.
- 2D spektra se nejčastěji znázorňují jako plošné řezy, lze je ale zobrazit i jako 3D mapy.
- Rozlišená 2D NMR spektra (resolved) - rozlišená podle interakčních konstant. Na jedné ose je chemický posun, na druhé interakční konstanta.
- Korelovaná 2D NMR spektra (correlated) - na obou osách jsou chemické posuny.
- U vícedimensionálních experimentů se opakuje vývoj a mixing time v příslušných dimensích.

Homonukleární 2D experimenty

- Přenos magnetizace mezi stejnými jádry, nejčastěji ^1H - ^1H , ale může být i ^{31}P - ^{31}P , ^{19}F - ^{19}F , atd. U koncentrovaných vzorků lze i ^{13}C - ^{13}C (INADEQUATE).
- Pokud mezi jádry dochází k přenosu magnetizace, pozorujeme tzv. *cross-peaks*. V opačném případě získáme *diagonální peaky*.



COSY

- **C**ORrelated **S**pectroscop**Y**
- Jeden z nejběžnějších 2D experimentů.
- Umožňuje zjistit interakce mezi jádry a odečíst interakční konstanty.
- Protony, které jsou dál než tři vazby neposkytují cross-peaky, protože hodnota ${}^4J_{\text{HH}}$ je blízká nule.
- V současnosti se používá DQF-COSY - (Double Quantum Filtered COSY) - která poskytuje stejné informace, ale spektra jsou čistější.

TOCSY

- **T**Otal **C**orrelated **S**pectroscop**Y**
- **HOHAHA** - HOmonuclear HArtmann HAhn
- Umožňuje rozdělit protony do skupin podle vzájemných interakcí.
- Lze např. rozlišit protony jednotlivých cyklů v disacharidech.

NOESY

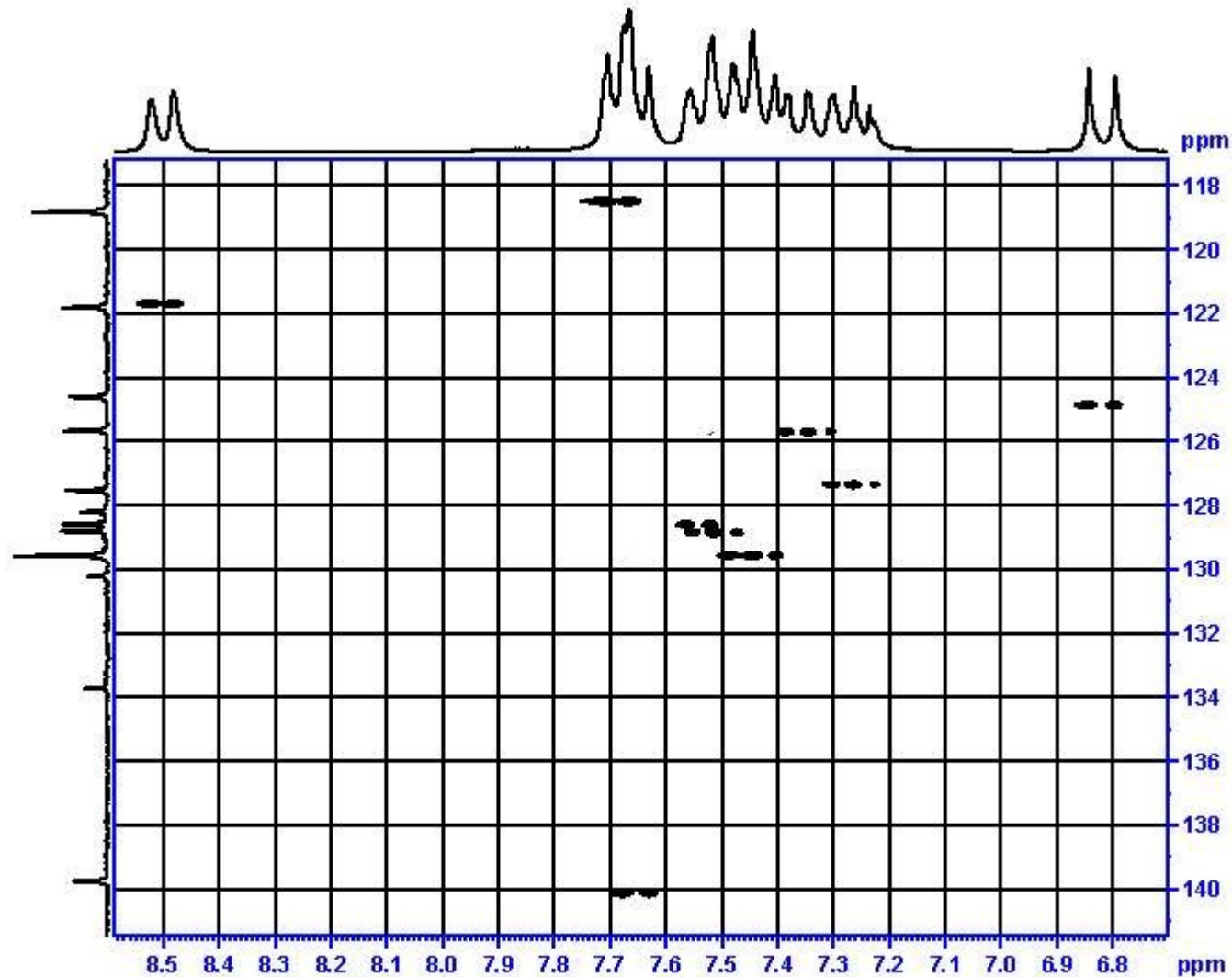
- **Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy**
- Velmi důležitá metoda pro určování terciární struktury biomolekul.
- Přenos magnetizace probíhá mezi jádry, mezi kterými je skalární interakce.
- Maximální vzdálenost jader 5-6 Å.
- Pro větší vzdálenosti - ROESY - **RO**tating frame **O**verhauser **E**nhancement **S**pectroscopy.

Heteronukleární 2D experimenty

- Dochází k přenosu magnetizace mezi různými jádry, např. ^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N , atd.
- Díky přenosu magnetizace lze pohodlně měřit i málo citlivá jádra.
- Na osách jsou chemické posuny jednotlivých jader.
- Pokud mezi jádry dojde k přenosu magnetizace, pozorujeme peak na průsečíkům chemických posunů obou jader.
- Pokud k přenosu magnetizace nedojde, nezískáme žádný peak.

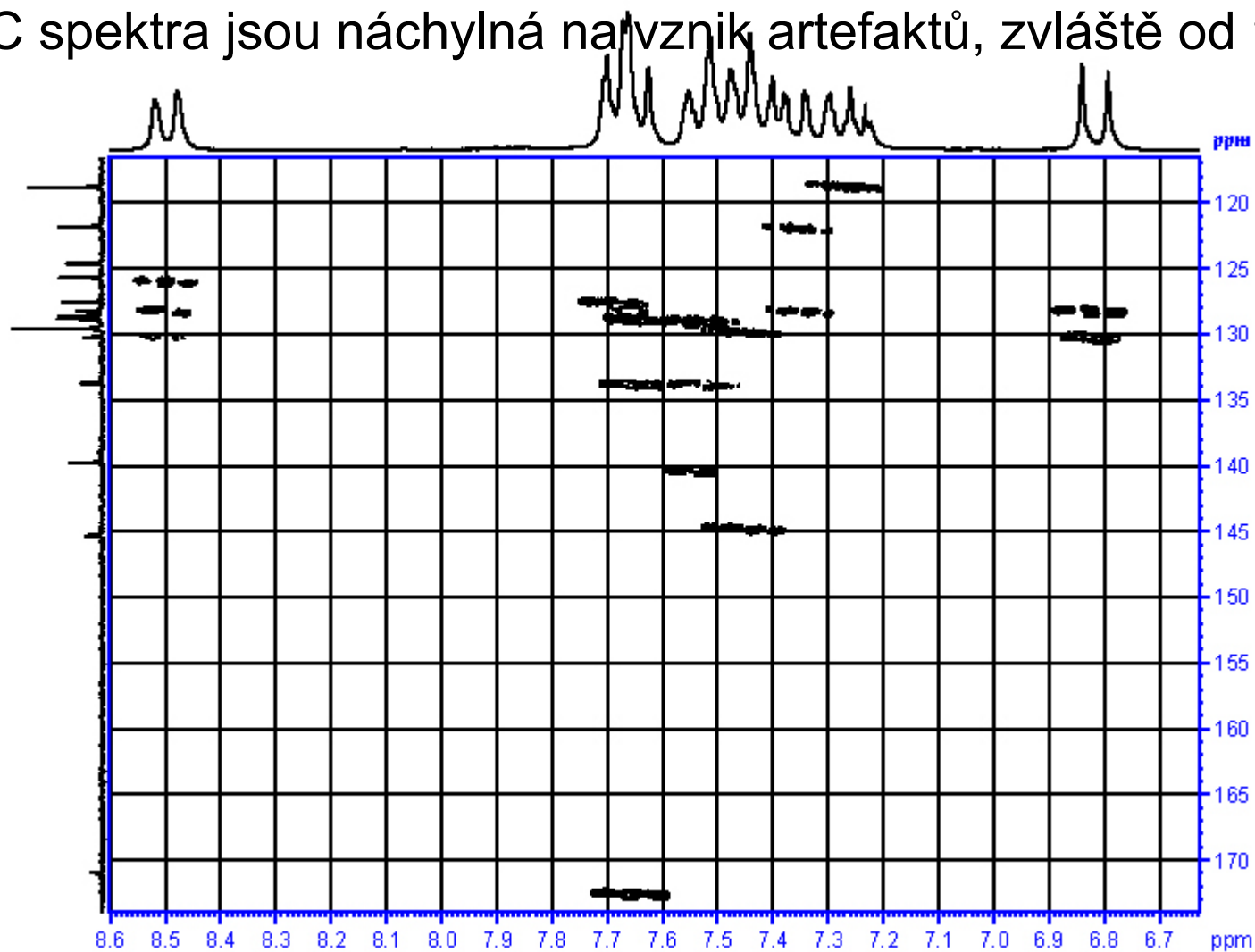
HSQC

- **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence
- Patří mezi tzv. inverzní experimenty - snímáme ^1H .
- Signály ve spektru patří ^1H jádrům vázaným přímo na ^{13}C nebo ^{15}N .
- Spektrum není symetrické podle diagonály.



HMBC

- **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation
- Pozorujeme signály protonů, které interagují s jádrem X přes více než jednu vazbu.
- Metoda umožňuje pozorování kvartérních uhlíků.
- HMBC spektra jsou náchylná na vznik artefaktů, zvláště od ${}^1J_{\text{XH}}$.



Solid-state NMR

- MAS NMR - **M**agic **A**ngle **S**pinning
- Anizotropie chemického posunu.
- Vzorek je napěchován do keramického rotoru a rotuje pod úhlem $54,7^\circ$ (magický úhel).
- Rotace při rychlostech 0-50 kHz.
- Pro měření málo citlivých jader se využívá *cross-polarizace*.

NMR ve slabém magnetickém poli

- Earth's-Field NMR
 - využívá magnetické pole Země
 - lze měřit velké vzorky
 - pro zlepšení S/N se využívá pre-polarizace v elektromagnetu
- Low-Field NMR
- Systémy využívající permanentní magnety nebo elektromagnety - PicoSpin, ...

Odkazy

- <http://nmrlab.chemi.muni.cz/>
- <http://qa.nmrwiki.org/>
- <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/index.html>
- http://sdbs.riodb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi