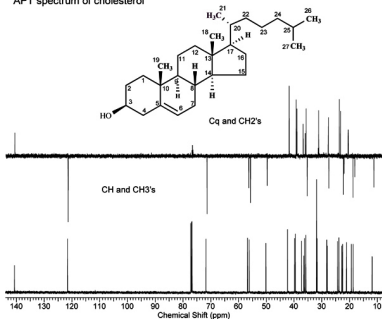


NMR

Nukleární Magnetická Rezonance

APT spectrum of cholesterol



Nukleární Magnetická Rezonance

Stručná historie

- **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.
- **2003** Nobelova cena za vývoj MRI - Paul C. Lauterbur.

Nukleární Magnetická Rezonance

Princip

- Sledujeme absorpci radiofrekvenčního záření vzorkem, který je umístěn v magnetickém poli.
- Vzorek je nejčastěji kapalný, ale lze měřit i pevné látky a plyny.
- Jde o důležitou metodu v chemické a strukturní analýze.
- Vyžaduje silné magnetické pole, proto se nejčastěji využívá supravodivých magnetů.

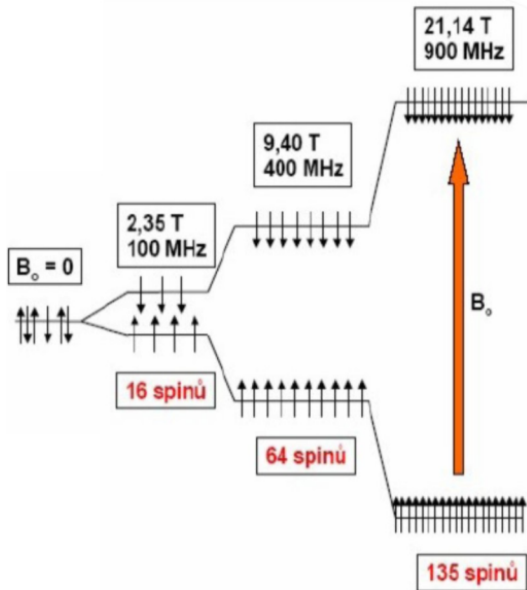
Nukleární Magnetická Rezonance

Jaderný spin

- Atomové jádro se skládá z protonů a neutronů.
- Obě částice mají spin $\pm\frac{1}{2}$.
- Jaderný spin je roven součtu spinů všech nukleonů.
- V NMR jsou aktivní pouze jádra s *nenulovým jaderným spinem*.
- Nejčastěji se využívají jádra se spinem $\frac{1}{2}$, např. ^1H , ^{13}C , ^{19}F nebo ^{31}P .
- Bez vlivu vnějšího magnetického pole mají všechny orientace jaderného spinu stejnou energii.
- Pokud ale vložíme jádro do magnetického pole, získáme systém hladin o různých energiích.
- Pokud na tento systém působíme radiofrekvenčním zářením, může dojít k absorpci energie a excitaci spinu na vyšší energetickou hladinu.
- Poté pozorujeme návrat spinu a původní hladinu a emisi absorbované energie, kterou následně snímáme.

Nukleární Magnetická Rezonance

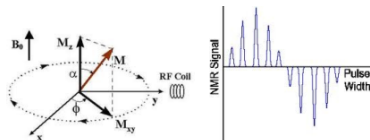
Jaderný spin



Nukleární Magnetická Rezonance

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.



Nukleární Magnetická Rezonance

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:

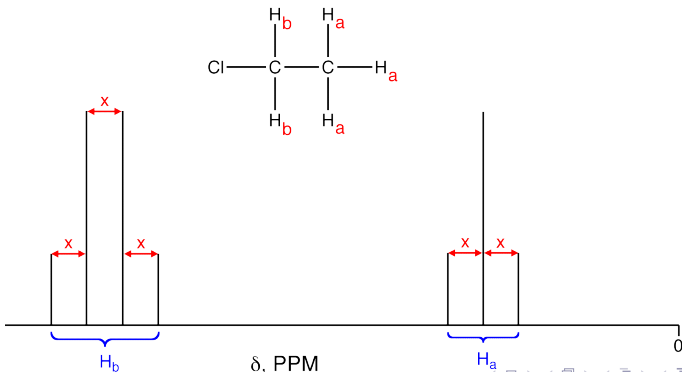
$$\delta = \frac{\nu - \nu_{TMS}}{\nu}$$

- 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.

Nukleární Magnetická Rezonance

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.



Nukleární Magnetická Rezonance

Interakční konstanta

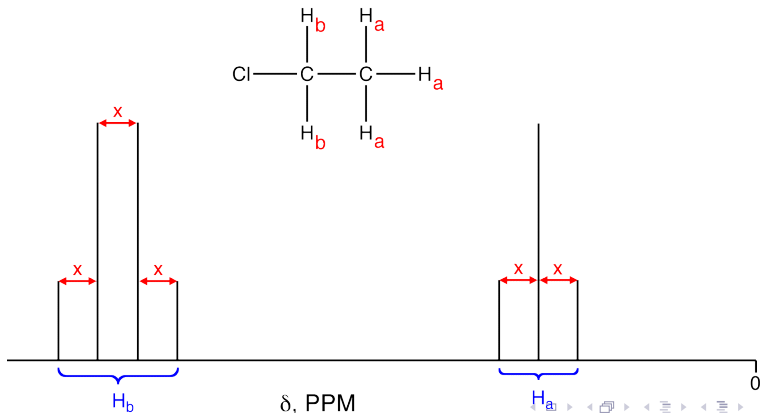
- Způsob štěpení je dán počtem interagujících spinů.
- Pro jádra se spinem $\frac{1}{2}$ je velikost multipletu, tzn. počet signálů po štěpení a jejich vzájemná intenzita dán Pascalovým trojúhelníkem.

$n = 0$					1										
$n = 1$				1		1									
$n = 2$			1		2		1								
$n = 3$			1		3		3		1						
$n = 4$			1		4		6		4		1				
$n = 5$			1		5		10		10		5		1		
$n = 6$			1		6		15		20		15		6		1

Nukleární Magnetická Rezonance

Interakční konstanta

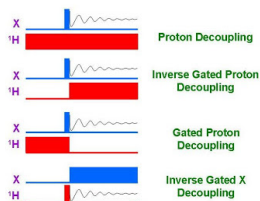
- Velikost interakce se vyjadřuje pomocí interakční konstanty, která se označuje písmenem J . Pro přesnější popis interakce se využívá indexů, např. interakci mezi atomy vodíku v ethanolu (přes tři vazby H-C-C-H) vyjádříme ${}^3J_{HH}$. Její velikost se udává v Hz.



Nukleární Magnetická Rezonance

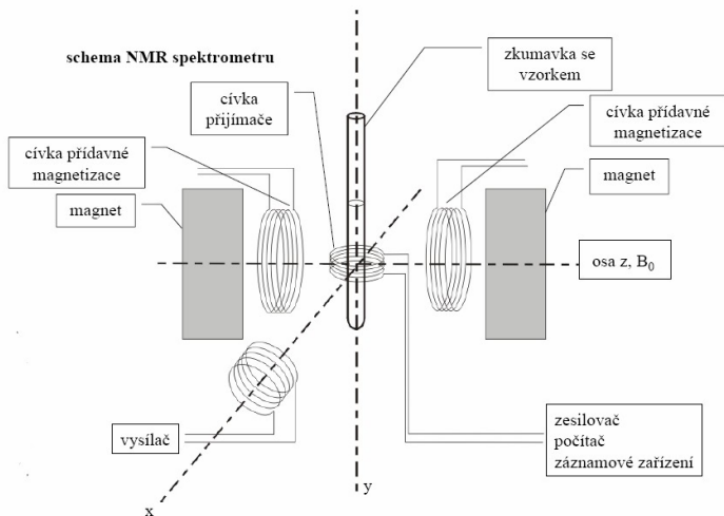
Decoupling (dekaplink)

- 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 – neozářujeme během akvizice, nedojde k potlačení NOE.
- Inverse-gated decoupling – ozařujeme pouze během akvizice, vhodné pro jádra se záporným gyromagnetickým poměrem – ^{15}N , ^{29}Si .



Nukleární Magnetická Rezonance

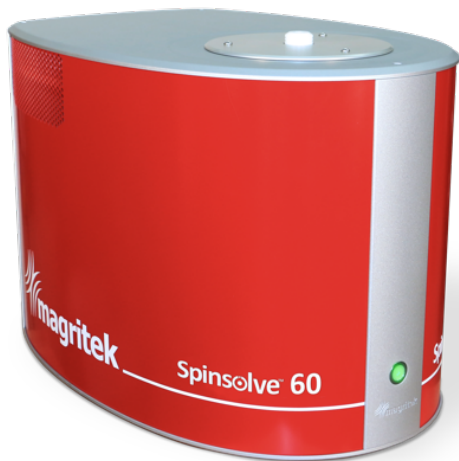
Schéma NMR spektrometru



Nukleární Magnetická Rezonance

NMR magnety

- Permanentní - do 100 MHz



Nukleární Magnetická Rezonance

NMR magnety

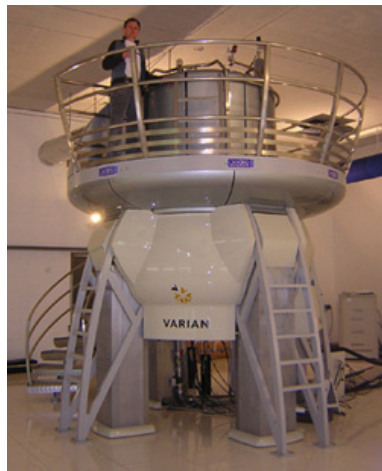
- Cryogen-free - 100-300 MHz - levný provoz



Nukleární Magnetická Rezonance

NMR magnety

- Supravodivé magnety - nejběžnější v NMR
 - Chlazené kapalným heliem (4-2,2 K)
 - Magnetické pole až 23,5 T (1000 MHz)



Nukleární Magnetická Rezonance

Závislost rezonanční frekvence na síle magnetického pole

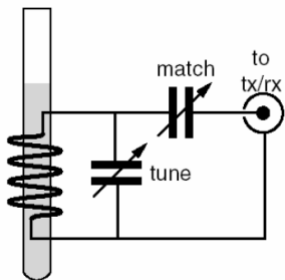
B_0 [T]	1H [MHz]	^{13}C [MHz]
1,41	60	15,1
2,35	100	25,15
7,05	300	75,4
11,74	500	125,7
14,09	600	150,9
16,44	700	176,05
19,97	850	213,78
22,32	950	238,94



Nukleární Magnetická Rezonance

NMR sondy

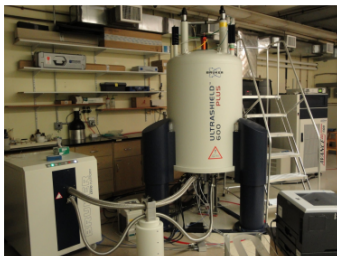
- Hlavní funkcí je excitace spinového systému a snímání odezvy.
- Obsahují lockovací kanál.
- Udržují stabilní teplotu vzorku.
- Často obsahují také gradientovou cívku(y) pro experimenty využívající pulsní gradienty magnetického pole.
- Podle konstrukce se dělí:
 - Teplé sondy
 - Kryosondy
 - Průtočné sondy
 - Nanosondy



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

Nukleární Magnetická Rezonance

NMR sondy



Nukleární Magnetická Rezonance

Vzorky pro NMR spektroskopii

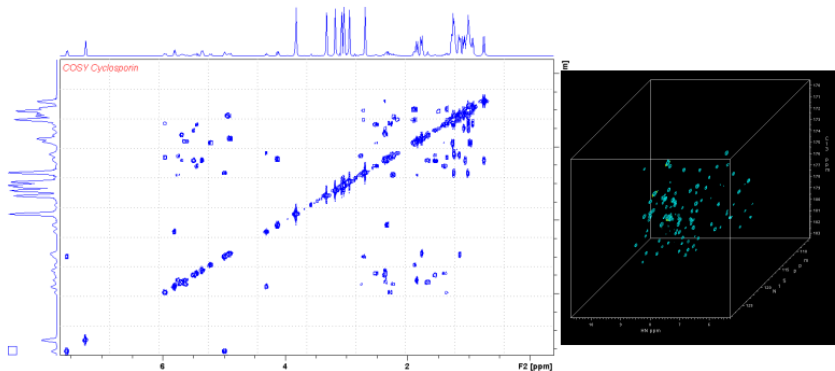
- Využívají se tenkostěnné skleněné kyvety, které se umísťují do plastových nebo keramických rotorků. Průměr kyvet je nejčastěji 3, 5 nebo 10 mm.
- Pro měření je nutné připravit roztok měřené látky v deuterovaném rozpouštědle. Signál ^2H (D) se používá k lockování vzorku.
- Vzorky reakčních směsí se 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.



Nukleární Magnetická Rezonance

2D NMR

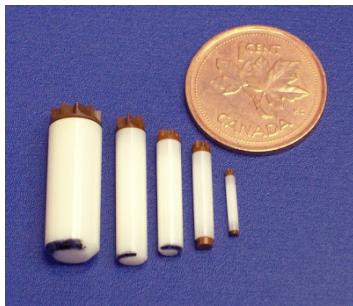
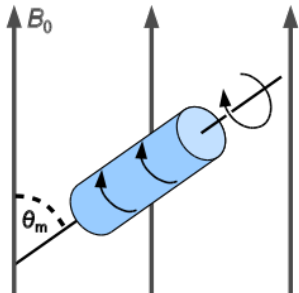
- Pro složitější molekuly už nemusí být 1D NMR spektrum čitelné.
- Rozlišení se dá zvýšit silnějším magnetickým polem.
- Lepší cestou je přechod na NMR experimenty ve dvou a více dimenzích.
- V dnešní době se rutinně využívá 2D a 3D NMR.



Nukleární Magnetická Rezonance

NMR v pevné fázi

- MAS NMR - Magic Angle Spinning.
- Vzorek je napěchován do keramického rotoru a rotuje pod úhlem $54,7^\circ$ ($\cos^2 \theta_m = \frac{1}{3}$, magický úhel).
- Rotace při rychlostech 0-130 kHz.
- Pro měření málo citlivých jader se využívá cross-polarizace.



Nukleární Magnetická Rezonance

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.

- Rutinní kvalitativní a kvantativní chemická analýza.
- Strukturní analýza.
- Strukturní analýza biomolekul.
- Studium degradačních procesů a stupně degradace, např. barviv, polymerů, atd.
- Studium stupně hydratace v nástěnných malbách pomocí bezkontaktní sondy.

- 1 <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/>
- 2 H. Günther (2013). NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry, ISBN 978-3527330003
- 3 J. Keeler (2005). Understanding NMR Spectroscopy. ISBN 978-0-470-01786-9.