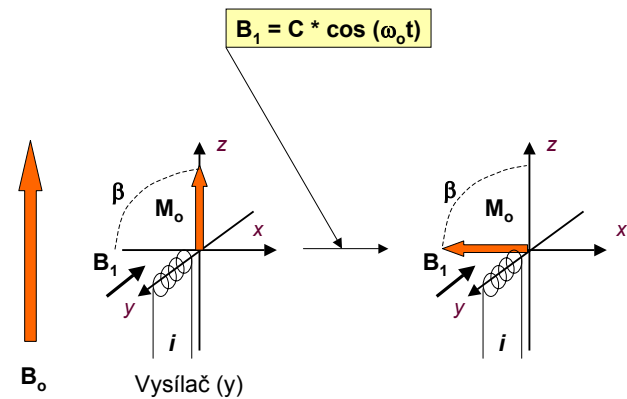


Vznik NMR signálu a jeho další osud.



NMR excitace

- Zdrojem energie pro excitaci jader je oscilující elektromagnetické záření s frekvencí ω_0 generované střídavým proudem :



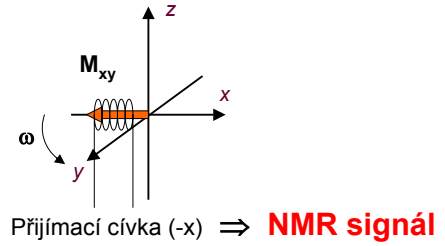
- Je-li frekvence RF pole B_1 a precesního pohybu magnetizace M_0 stejná, je dosaženo tzv. **rezonanční podmínky** a systém absorbuje energii.
- Vzájemnou interakcí RF pole B_1 a magnetizace M_0 dojde k jejímu překlopení kolem tohoto pole B_1 o úhel β , který odpovídá velikosti dodané energie a době jejího působení.

Návrat magnetizace M_0 zpět do rovnováhy (detekce NMR signálu)

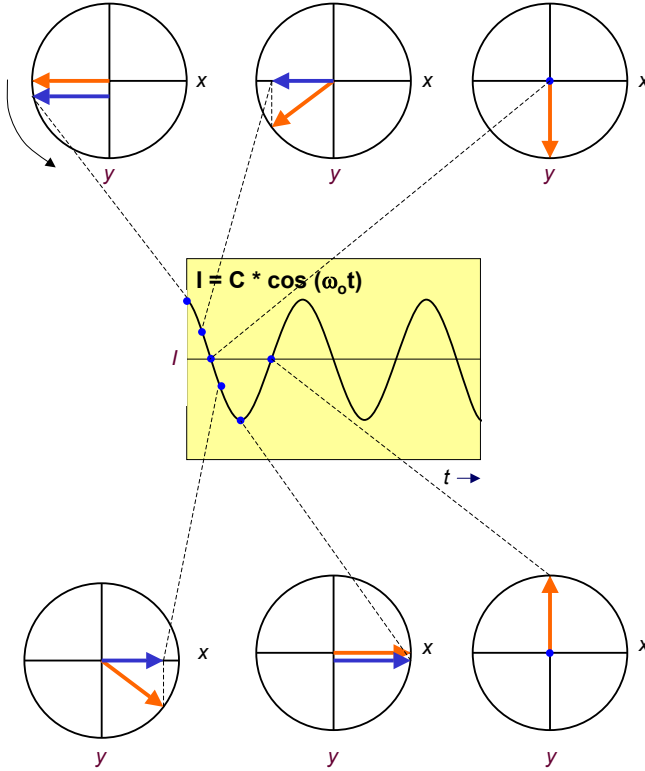
- Při absenci externího mag. pole B_1 se M_{xy} bude snažit přejít zpět na M_0 (rovnováha) obnovením původní distribuce populací N_α / N_β . Tento jev se nazývá **relaxace**.



- Oscilace vektoru M_{xy} vytváří fluktuující magnetické pole, které generuje elektrický proud v přijímací cívce:

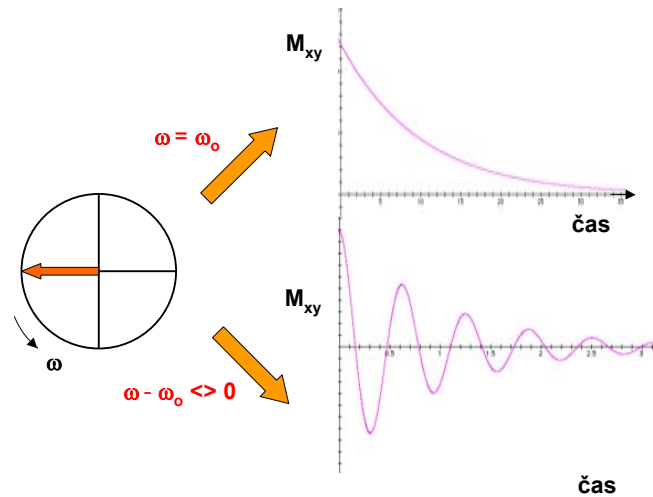


Průběh signálu v přijímací cívce (-x):



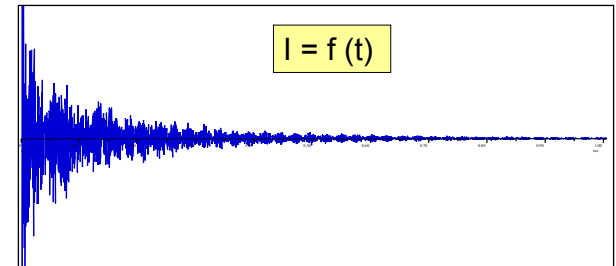
Free Induction Decay (FID)

- Z důvodu relaxace NMR odezvy jednotlivých jader zanikají. Tento zánik probíhá exponenciálně a získáme tak signál, který je superpozicí kosinové a exponenciální funkce.

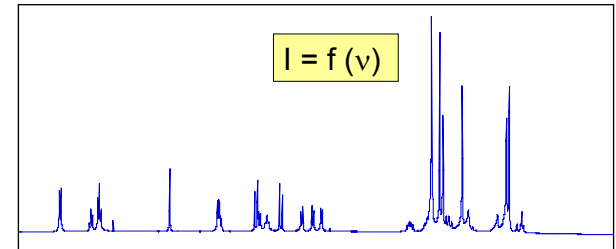


FID (pokračování)

- V reálném vzorku existuje mnoho spinových systémů o různých frekvencích, většinou rozdílných od nosné frekvence B_1 . Z tohoto důvodu získáme mnoho odezev, které mají různou periodu a rozdílnou rychlost zániku. Takováto kombinace signálů vzorku se nazývá **Free Induction Decay (FID)**:



- Abychom získali NMR spektrum, musíme provést tzv. **Fourierovu transformaci**:

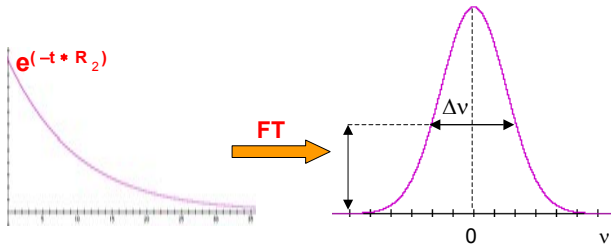


Fourierova transformace a tvar signálu

- Matematická operace pomocí níž lze převést informaci ze závislosti na čase na závislost na frekvenci.

$$f(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i2\pi\nu t} dt$$

$$f(\nu) = \int_0^{\infty} e^{-\pi R_2} e^{-i2\pi\nu t} dt = \frac{1}{(\pi R_2 + i2\pi\nu)}$$

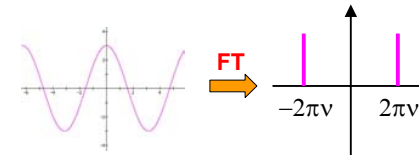


- Tvar signálu je charakterizován tzv. Lorentzovou křivkou, kde $\Delta\nu$ je šířka signálu v polovině jeho maximální intenzity a nazývá se **pološířka signálu**.

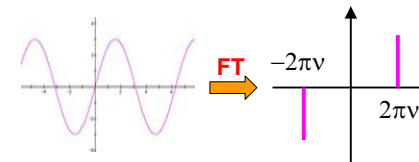
$$\Delta\nu = \frac{R_2}{\pi} = \frac{1}{\pi T_2}$$

Další příklady FT některých funkcí.

cos(2πν * t)

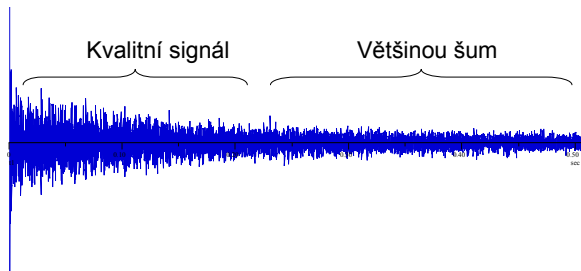


sin(2πν * t)

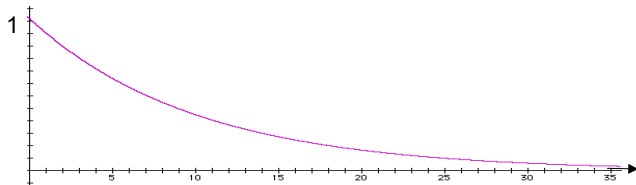


Zpracování dat – digitální filtrování

- Nyní máme signál v počítači. První operací při zpracování je tzv. digitální filtrování, nebo-li násobení FIDu vhodnou matematickou funkcí. Jak M_{xy} zaniká, obsahuje čím dál více šumu:



- Jednoduše vynásobíme FID funkcí, která potlačí šum:

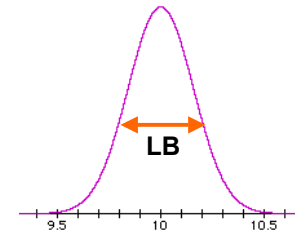


Digitální filtrování (pokračování)

- V takovémto případě se jedná o *exponenciální funkci*:

$$F(t) = 1 * e^{-(LB * t)} \text{ nebo } F(t) = 1 * e^{-(t/\tau)}$$

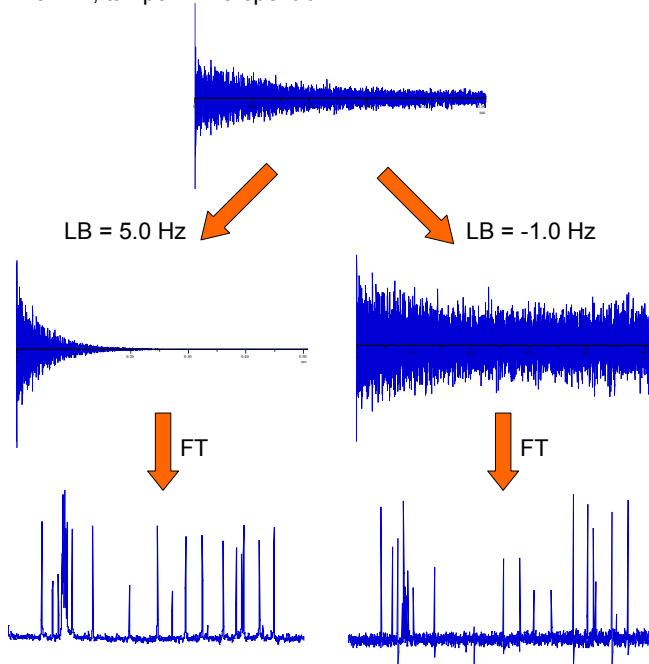
- Parametr LB se nazývá umělé rozšíření čáry (*line broadening*).



- Použijeme-li parametr LB s opačným znaménkem, exponenciála roste, šum je zvýrazněn a dojde k zúžení signálu (zlepší se rozlišení).
- Existuje celá řada dalších funkcí pro různé účely.

Zlepšení citlivosti nebo rozlišení

- Na následující FID byla aplikována exponenciální funkce s LB kladným a potom záporným a byl sledován efekt jak na FID, tak po FT na spektrum:



Velikost dat a doplnění FIDu nulami

- Důležitý parametr je velikost dat (v datových bodech). Platí jednoduchý vztah, čím více datových bodů, tím je umožněno lepší **digitální rozlišení** (pokud to umožňuje povaha vzorku).
- Digitální rozlišení je definováno jako počet Hz na jeden datový bod:

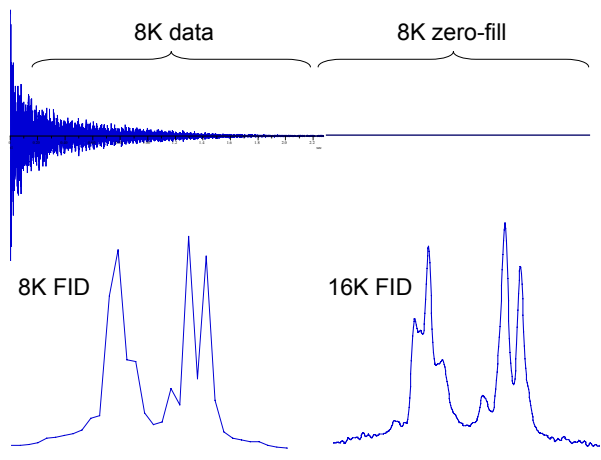
$$DR = SW / SI$$

SW – šířka spektra (Hz)
SI – velikost dat (bodech)

- Takže pro šířku spektra 5 KHz a FID snímáný do 16K, máme digitální rozlišení 0.305 Hz/bod.
- Pokud je spektrální šířka (SW) velká a počet bodů paměti (SI) malý, digitální rozlišení bude také malé a dojde ke ztrátě informace.
- Jedním z řešení je zvětšit SI, což znamená větší objem dat a delší experimentální čas.
- Druhým řešením je doplnění experimentálních bodů nulami, tzv. „**zero filling**“ na konci FIDu.

Zero-filling (pokračování)

- Touto operací zvýšíme počet bodů paměti a tím i digitální rozlišení výsledného spektra. **Nelze použít pokud máme špatně vzorkovaná data na začátku!**

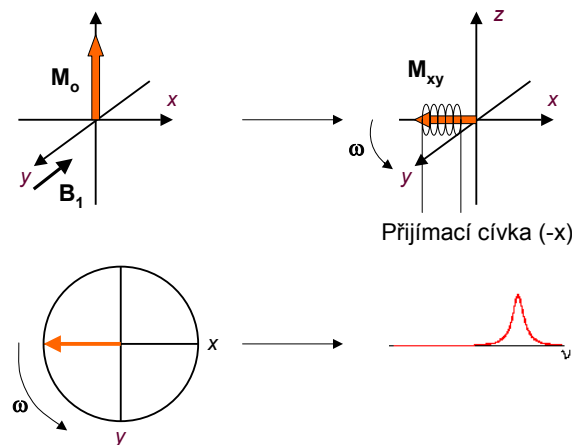


Fázování NMR spekter

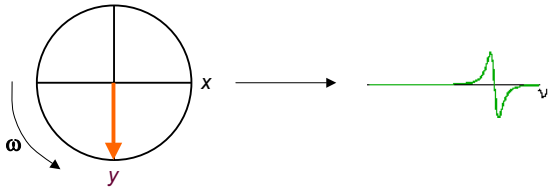
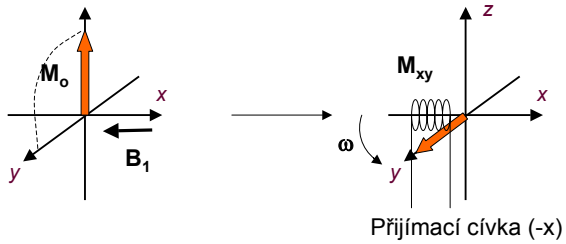
- Jedna z velmi důležitých operací při zpracování NMR spekter je nastavit správné fáze všech signálů.
- Co je příčinou toho, že různé odezvy v jednom spektru mají tzv. rozdílnou fázi?

Fázový posun 0. řádu:

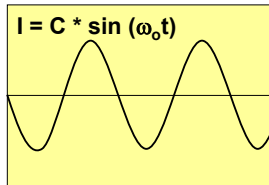
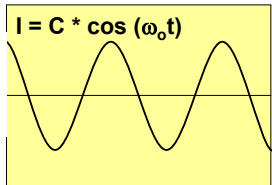
- Je způsoben rozdílnou fází mezi vysílačem a přijímačem.



Fázování NMR spekter



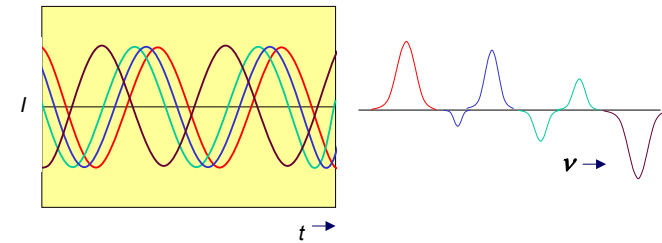
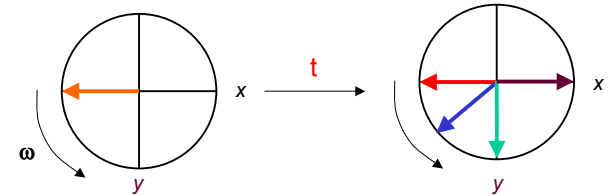
- Fáze signálu je směs **reálné** (cosinové) a **imaginární** složky.



Fázování NMR spekter

Fázový posun 1. řádu:

- K tomuto fázovému posunu dochází vlivem tzv. mrtvého času měřící sondy, kdy různé signály mají různou úhlovou rychlost (frekvenci), čímž dojde k různému posunu snímání jejich odezvy. Jejich cosinové signály jsou navzájem **fázově posunuté**.



Fázování NMR spekter

- Rozdíl mezi fázovým posunem 0. a 1. řádu je v jejich závislosti na frekvenci příslušného signálu. Zatímco fázový posun **0. řádu** je stejný pro všechny body ve spektru, **(nezávisí na frekvenci signálu)**, fázový posun **1. řádu** lineárně vzrůstá se vzdáleností od nosné frekvence **(závisí na frekvenci signálu)**.
- Chceme, aby výsledek bylo spektrum se signály v čistě absorpčním tvaru.
- Provedeme fázovou korekci 0. řádu (stejnou pro všechny body spektra) a poté korekci 1. řádu (korekce lineárně roste se vzdáleností od nosné frekvence).

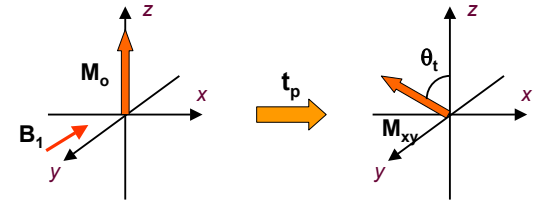
$$S(\omega) = S(\omega)_x + [\phi_0 + \phi_1(\omega)] * S(\omega)_y$$

ϕ_0 – fázová korekce 0. řádu

ϕ_1 – fázová korekce 1. řádu

Délka pulsu a sklápěcí úhel

- Sklápěcí úhel θ_t je úhel vychýlení makroskopické magnetizace z rovnovážného stavu do roviny **<xy>**. Závisí na velikosti RF pole B_1 , době jeho působení t_p a gyromagnetické konstantě γ měřeného jádra.



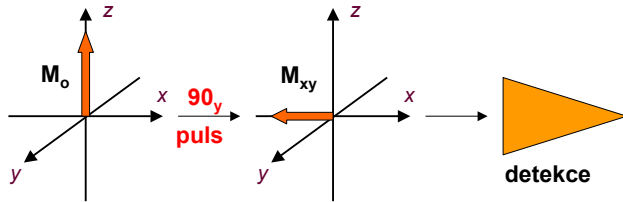
$$\theta_t = \gamma * t_p * B_1$$

- Takto definujeme tzv. **šířku (délku) pulsu**, což je doba, za kterou dosáhneme otočení vektoru magnetizace o $\pi / 4, \pi / 2, \pi \dots$

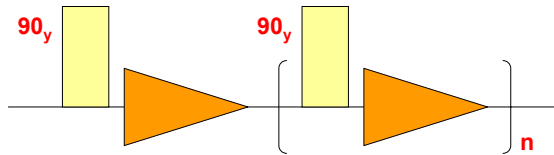
1D Pulsní sekvence

- Nejjednodušší pulsni sekvence, kterou se měří běžné ^1H spektrum, obecněji jakékoliv jádro.

Vektorově:



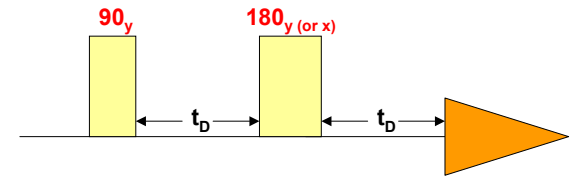
Schématicky:



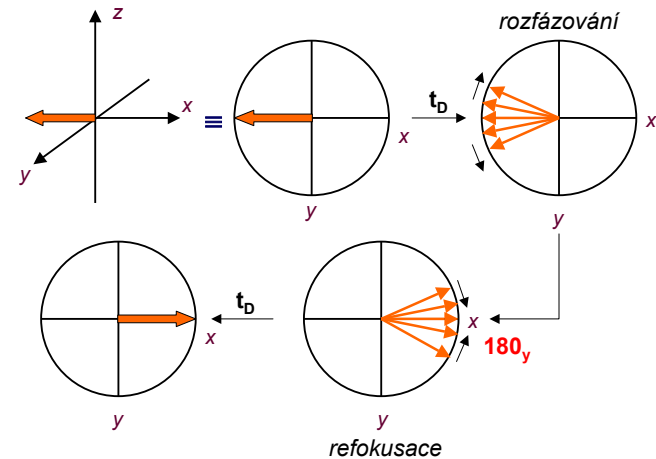
- Tzv. **fáze pulsu** udává směr odkud je aplikováno RF pole. Vektor makroskopické magnetizace se okolo této osy otáčí. Pulsy se označují 90_x nebo 90_y , což znamená 90° z osy x (y) v rotující soustavě souřadnic.

Spinové echo

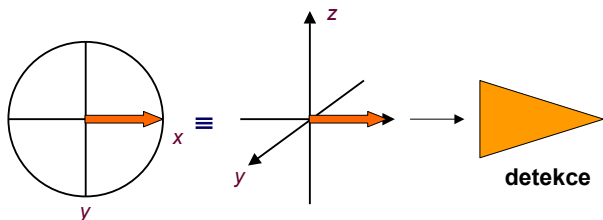
- Mějme následující pulsni sekvenci:



- Analýzu začneme po 90_y pulsu:



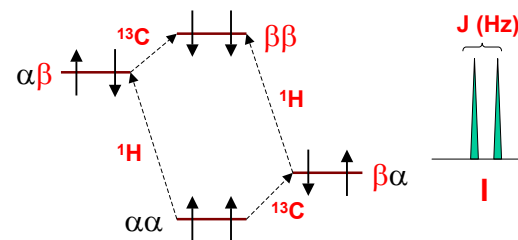
Spinové echo (pokračování)



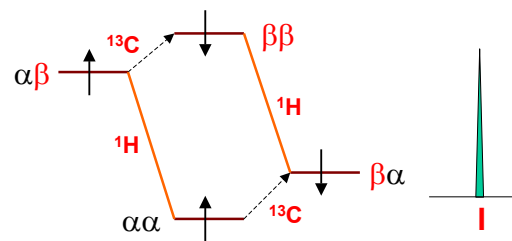
- Zanedbáme-li vliv T_2 relaxace dostaneme na konci stejný signál (pouze s opačným znaménkem) jako na začátku. Protože dojde k sfázování všech signálů ve spektru, tato sekvence umožňuje získat signály v absorpčním tvaru bez nutnosti je fázovat.

Spinové echo a heteronukleární interakce

- Uvažujme ^{13}C spin v interakci s ^1H :

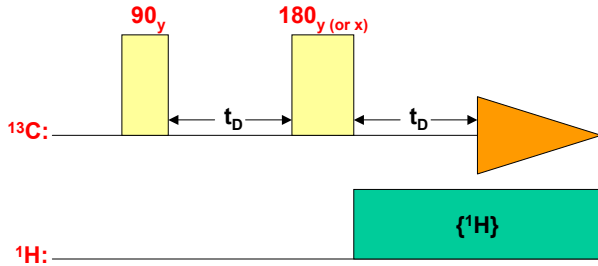


- V ^{13}C spektru uvidíme signály rozštěpené interakcí s ^1H . Velikost těchto interakčních konstant je 120 - 170 Hz a komplikují spektrum. Většinou se proto ^{13}C spektrum měří s dekaplingem ^1H , kdy dojde k saturaci ^1H přechodů a zrušení ^{13}C - ^1H interakcí. ^{13}C multiplety se objeví jako jednoduché čáry:

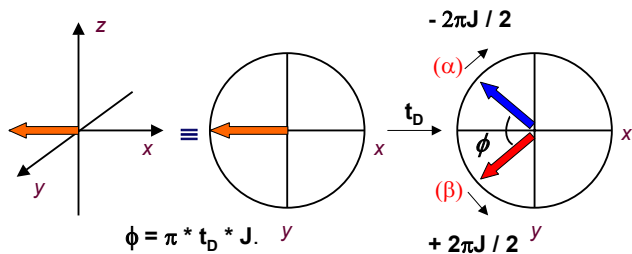


Spinové echo a heteronukleární interakce

- Nyní modifikujeme trochu naši pulsní sekvenci pro měření spinového echa tak, že obsahuje ^1H dekapling:

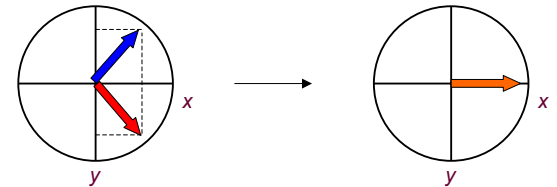


- Uvažujme nejprve CH systém. Po $\pi/2$ pulsu se bude ^{13}C M_{xy} vyvíjet pod vlivem J -interakce. Jinými slovy, každý vektor bude označen jedním ze stavů ^1H , a to α a β :

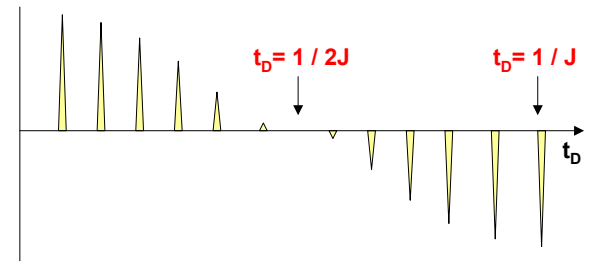


Spinové echo a heteronukleární interakce

- π pulz z osy y převrátí jednotlivé vektory a ihned poté začneme dekaplovat ^1H . Dojde k jejich zastavení (nevyvíjejí se) a ke kolapsu v jeden:



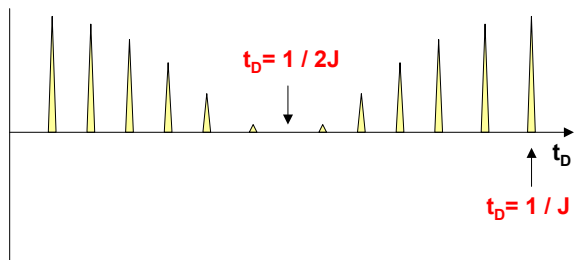
- Pro různé hodnoty t_D bude signál vypadat následovně:



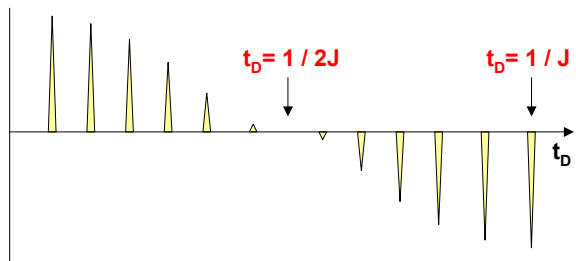
Spinové echo a heteronukleární interakce

- Signál se mění s cosinem t_D , je nulový pro $1/2J$ násobky t_D a maximální/minimální pro $1/J$ násobky t_D .

- Pro skupinu CH_2 je to následovně:

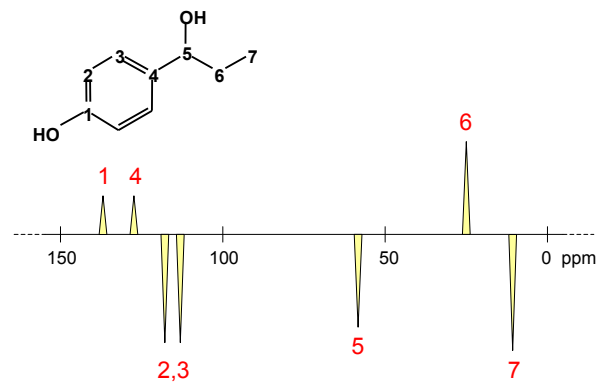


- Analogicky pro CH_3 :



Attached Proton Test (APT)

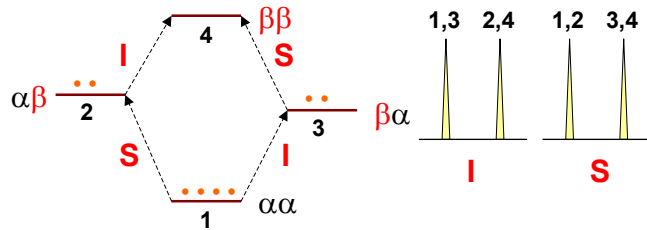
- Za předpokladu, že CH interakční konstanty jsou podobné a hodnota t_D je nastavena na $1/J$, získáme následující výsledek:



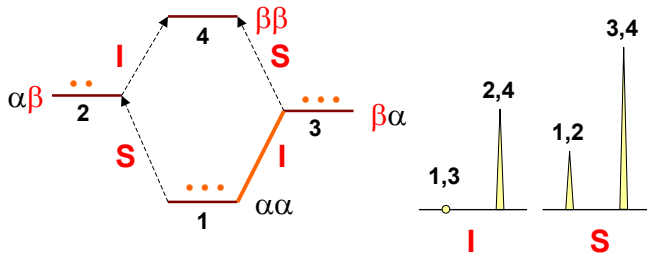
- Experiment se jmenuje **attached proton test (APT)** a lze jej využít pro rozlišení C, CH, CH_2 , a CH_3 .

Přenos polarizace

- Uvažujme dva protony, které jsou v interakci a mají velmi rozdílný chemický posun δ . Označíme je **I** a **S**, abychom dodrželi konvenci a \bullet označíme přebytek populace jednoho stavu nad druhým:



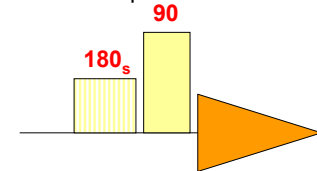
- Nyní ozáříme **selektivně** (měkký puls...) jen jednu čáru (jeden přechod). Dojde k vyrovnání populací obou stavů a příslušná čára zmizí ze spektra.



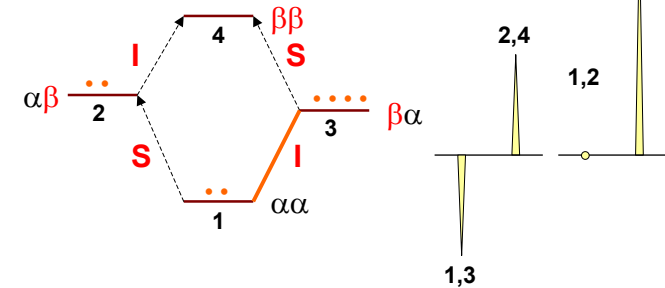
Přenos polarizace. SPT and SPI

- Protože jsme změnili populace jednotlivých spinových stavů, dojde ke změně intenzity příslušných čar ve spektru. Přenesli jsme polarizaci (magnetizaci) z jednoho spinu na druhý. Toto se nazývá selektivní přenos polarizace (**selective polarization transfer, SPT**).

- Existuje varianta tohoto experimentu:



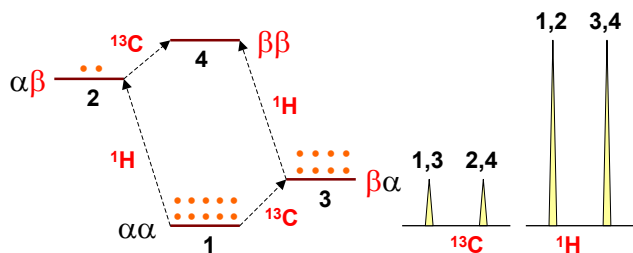
- První puls je selektivní π puls. Invertuje populace pouze jednoho spinu:



- Takovýto experiment se nazývá selektivní inverze populace (**selective population inversion, SPI**).

Heteronukleární přenos polarizace

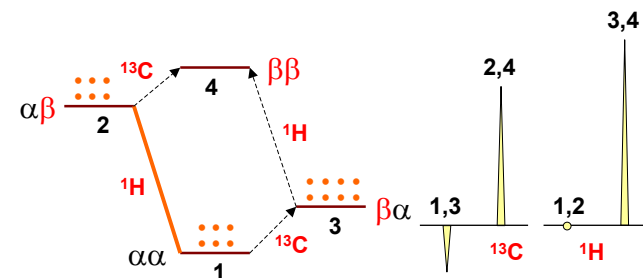
- Z praktického hlediska má heteronukleární přenos polarizace mnohem větší význam než homonukleární varianta.
- **Využití pro navýšení intenzity málo citlivých jader!**



- Pracujeme-li s kombinací jader ^{13}C a ^1H , musíme brát v úvahu jejich vzájemný **poměr gyromagnetických konstant γ 1 ku 4**.

Heteronukleární přenos polarizace - SPT

- Nyní ozáříme selektivně přechod **1,2** a získáme následující rozdělení populací:

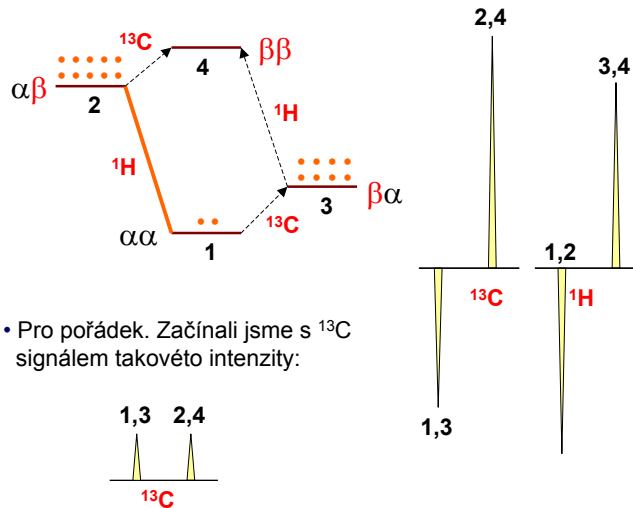


- Došlo k trojnásobnému navýšení intenzity jednoho z ^{13}C přechodů.
- V absolutní hodnotě (sečteme-li příspěvky obou čar) se jedná o **dvojnásobné** navýšení intenzity ^{13}C signálu.

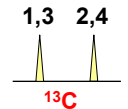
$$\text{celkové navýšení} = \frac{|-1| + |+3|}{2}$$

Heteronukleární přenos polarizace - SPI

- Nyní provedme stejnou analýzu pro SPI. Jestliže selektivně vyměníme (obrátime) populace stavů 1 a 2, dostaneme:



- Pro pořádek. Začínali jsme s ^{13}C signálem takovéto intenzity:

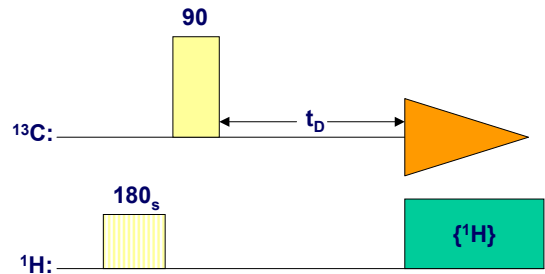


- Manipulací polarizace protonů jsme dospěli k **čtyřnásobnému** navýšení ^{13}C signálu. Pochopitelně uvažujeme opět obě čáry jak kladnou, tak i zápornou:

$$\text{celkové navýšení} = \frac{|-3| + |+5|}{2}$$

Heteronukleární přenos polarizace

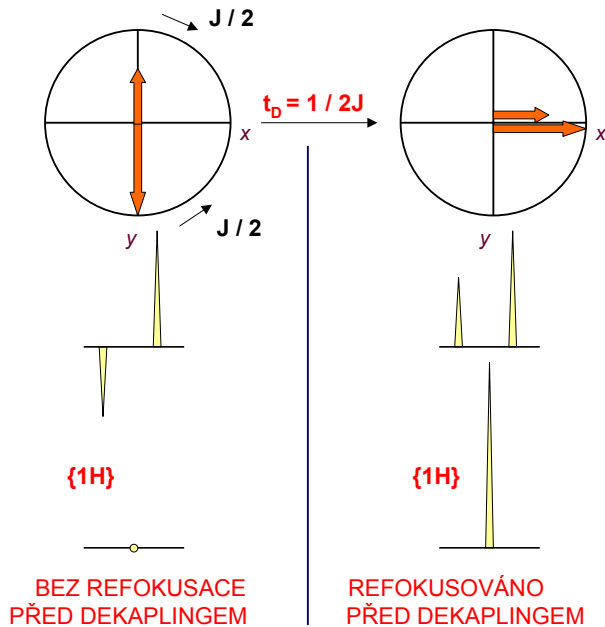
- Nyní máme ^{13}C signály kladné a záporné a spektrum je zkaplované s ^1H . **Není tedy možné začít s protonovým dekaplingem!!!**
- Provedeme tzv. **J-modulaci**:



- Nastavíme t_D na hodnotu $1 / 2J$. To znamená, že po $\pi / 2$ pulsu na a periodě t_D dojde k tzv. **refokusaci** obou signálů ^{13}C .

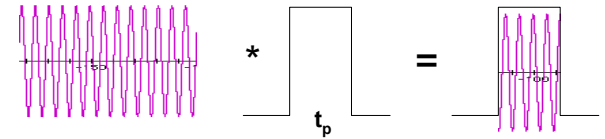
Heteronukleární přenos polarizace (...)

- Budeme uvažovat pouze ^{13}C magnetizaci, protože pro ^1H dojde pouze k převrácení populací na jednotlivých hladinách. Po $\pi/2$ pulsu na ^{13}C máme +5 and -3 komponenty magnetizace v rovině $\langle xy \rangle$:

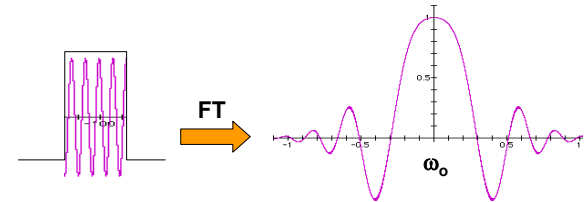


Radiofrekvenční puls.

- Radiofrekvenční puls je kombinací cosinové (frekvence ω_0) a krokové funkce.



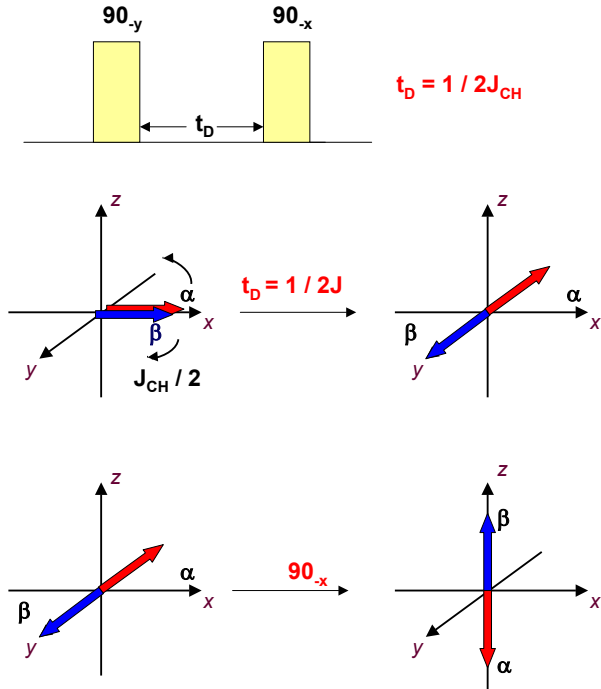
- Toto je časový průběh. Chceme-li vidět, jaké frekvence puls pokrývá provedeme FT:



- Výsledkem je signál se středem ω_0 , který pokrývá široký rozsah frekvencí oběma směry, tzv. **šířku pásma (band width)**. Šířka pásma je nepřímo úměrná délce pulsu $f \propto 1/t$.

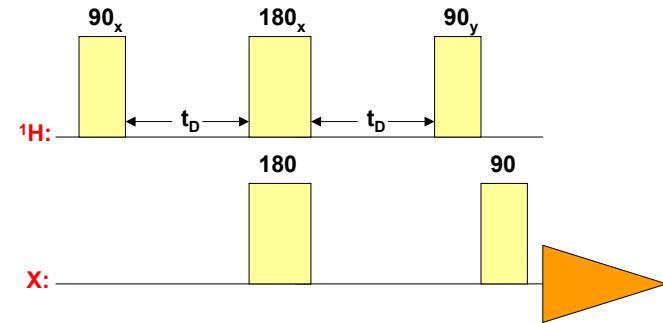
Přenos polarizace s neselektivními pulsy

- Použijeme-li dva $\pi/2$ pulsy vzájemně fázově posunuté o 90° a oddělené periodou $t_D = 1/2J_{CH}$, dosáhneme převrácení vektoru α .



Neselektivní přenos polarizace - INEPT

- Pokud rozšíříme sekvenci o heteronukleární spinové echo (odstranění rozdílů chemických posunů jednotlivých 1H) dostaneme pulsní sekvenci, která se nazývá **INEPT** (*In*ensitive *Nu*clei *E*nhancement by *P*olarization *T*ransfer). Je to důležitý stavební blok mnoha pulsních sekvencí.
- Je používána pro navýšení citlivosti jader **s nízkým γ** jako např. ^{13}C a ^{15}N . Vypadá následovně:



- Velikost zvýšení citlivosti je úměrná poměru gyromagnetických konstant spinu excitovaného a spinu snímaného γ_E/γ_A .
Pro $^{13}C \sim 4$, pro $^{15}N \sim 10$.