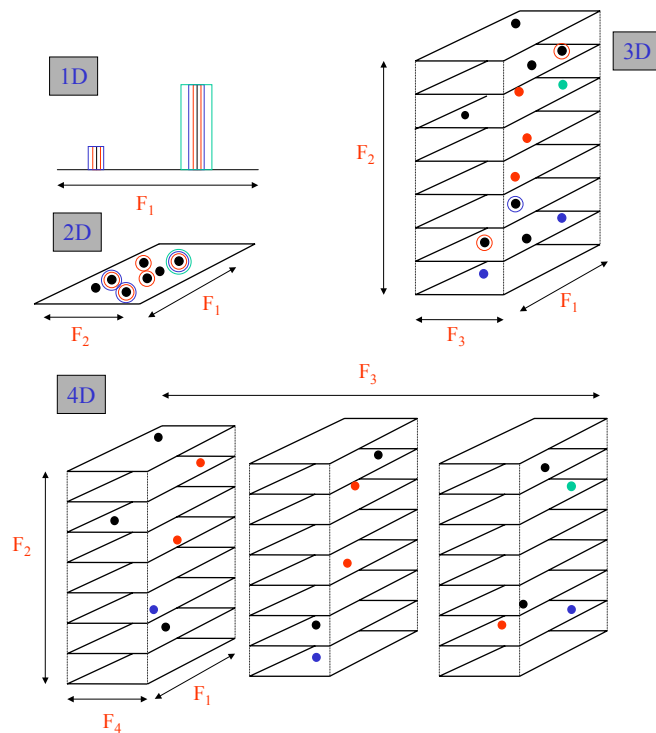


# Multidimensionální NMR spektroskopie

Móda nebo nutnost?

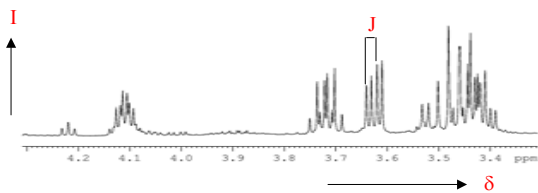


## Zjednodušení komplikovaných NMR spekter expanzí do více dimenzí.



## Dimensionalita NMR experimentů

- NMR parametry - chemický posun  $\delta$ 
  - interakční konstanta  $J$
  - počet signálů ve spektru
  - integrální intenzita  $I$

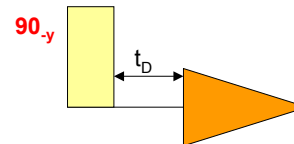


- Dimensionalita NMR experimentu je běžně určována počtem nezávislých časových domén  $t_i$ .

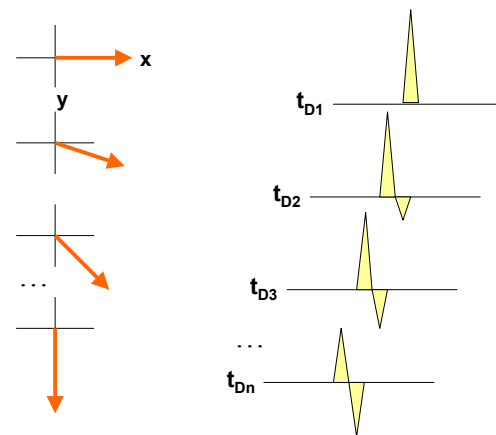


## 2D NMR spektroskopie

- **Jakékoliv 2D spektrum** zahrnuje opakování 1D sekvence za současného prodlužování proměnné periody  $t_D$ . Podívejme se nejprve na jednoduchý případ, kdy je tato perioda zařazena před začátkem snímání dat.



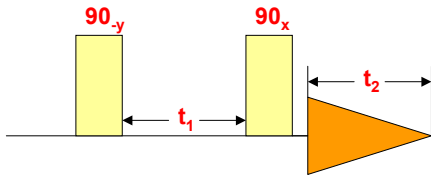
Po zpracování a výpisu spektra vypadají následovně:



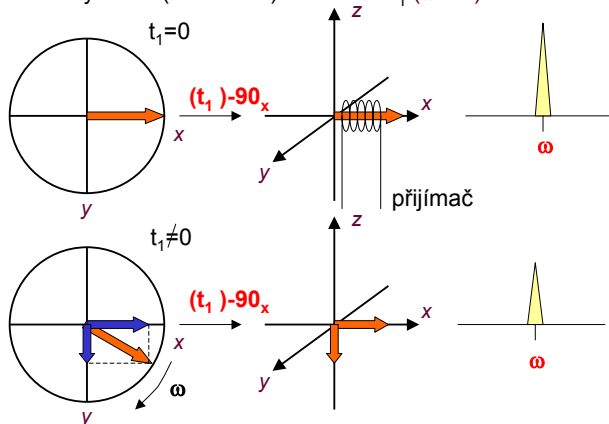
- Nyní máme **dvě časové domény**. První z nich je vytvářena podobně jako v 1D experimentu snímáním dat v přijímači spektrometru a druhá vzniká snímáním série těchto spekter s proměnnou periodou  $t_D$  (**variable delay**).

## 2D experiment

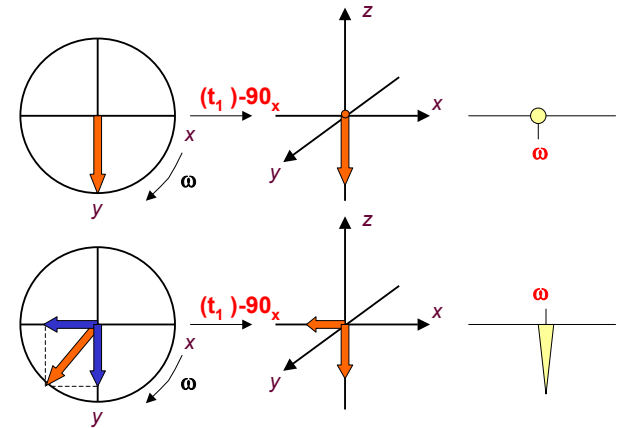
- Základní pulsní sekvence **COSY** experimentu obsahuje pouze dva pulsy oddělené proměnnou časovou periodou  $t_1$  (vývojová perioda):



- Nyní se pokusme analyzovat tuto sekvenci pro signál, který je tzv. **mimo rezonanci RF pole** pro různé hodnoty  $t_1$ . Jeho úhlová rychlost (frekvence) se liší od  $B_1$  ( $\omega \neq 0$ ).



## 2D experiment (pokračování)

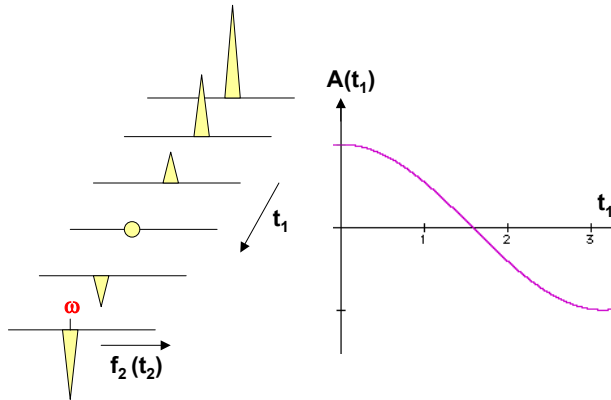


- Druhý  $\pi / 2$  puls působí pouze na komponentu magnetizace v ose **y**.
- Komponenta v ose **x** není nijak ovlivněna.

$$A(t_1) = A_0 \cdot \cos(\omega \cdot t_1)$$

## 2D experiment (pokračování)

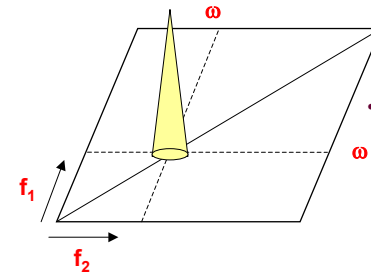
- Jestliže zaznameneáme sérii vzniklých spekter jako tzv. **“stacked plot”**, dostaneme následující obrázek:



- Nyní máme frekvenční doménu  $f_2$ , (vznikla z časové domény  $t_2$ ) a časovou doménu  $t_1$  (interferogram).
- Protože amplituda se v  $t_1$  doméně mění také periodicky, dostaneme **pseudo FID**, jestliže se na tato data podíváme ve směru kolmém k ose  $t_1$ .
- Pro zjednodušení je zanedbána relaxace signálu.

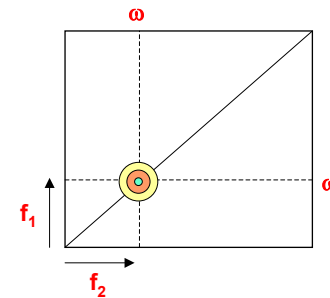
## 2D experiment (...)

- Existuje FID v  $t_1$ , takže můžeme provést **druhou Fourierovu transformaci v  $t_1$**  doméně (první byla provedena v  $t_2$  doméně). Tímto způsobem získáme **dvoudimenzionální spectrum**:

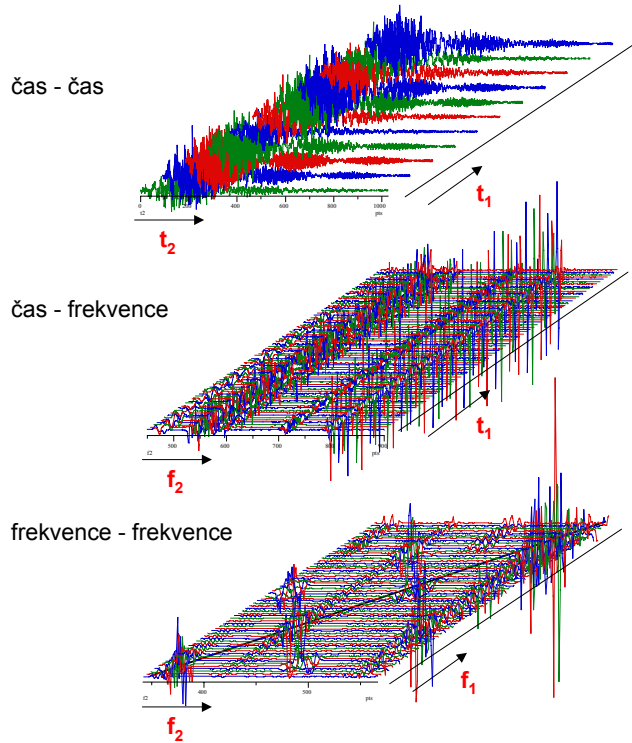


- Na průsečíku frekvenčních čar získáme tzv. **krospík**.  $\omega$  tomto případě **diagonální**.

- Mnohem přehlednější je tzv. **„contour plot“**, kdy jako bychom tyto krospíky sesekli a podívali se na ně shora.

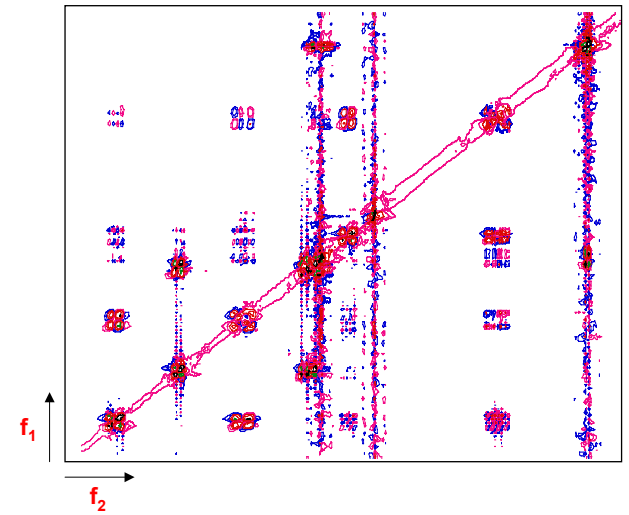


## 2D experiment - COSY (reálná data)



## 2D experiment - COSY (reálná data)

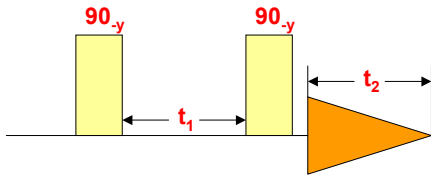
- *Contour-plot* se záznamem všech *krospíků*:



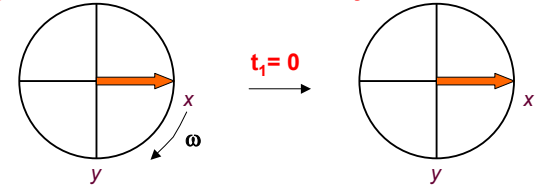
- Otázka nyní zní“ Odkud se vzaly všechny ty mimo-diagonální krospíky?

## Homonukleární korelace - COSY

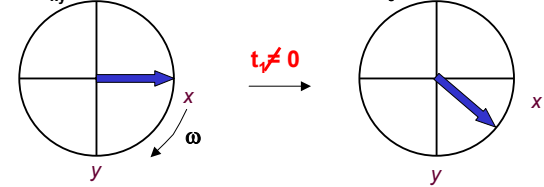
- **COSY** znamená **CORrelation SpectroscopY**, a protože pracujeme s homonukleárními interakčními konstantami, patří do **homonukleární korelační spektroskopie**.
- V předchozích úvahách jsme pracovali s izolovaným spinem bez jakékoliv interakce s ostatními, což je příliš velké zjednodušení.
- COSY experiment by nám měl říci, který spin je v interakci s nějakým dalším spinem. Toto právě poznáme z **mimo-diagonálních krospektrů**.
- Předpokládejme opět pulsní sekvenci pro COSY  $90_y - t_1 - 90_y - t_1$



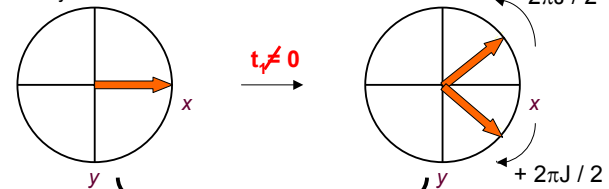
## Současný vývoj magnetizace podle chemického posunu a interakční konstanty



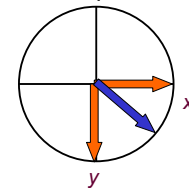
Vývoj  $M_{xy}$  podle chemického posunu  $\omega - \omega_0 < 0$



Vývoj  $M_{xy}$  podle interakční konstanty  $J$

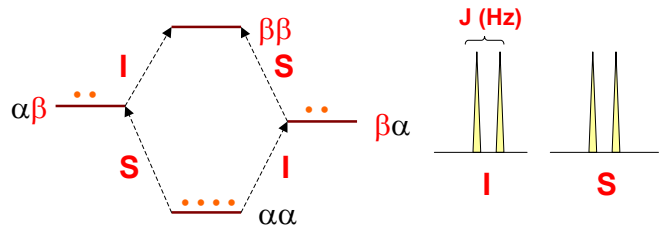


Společný vývoj  $M_{xy}$



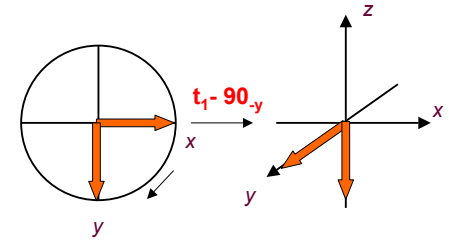
## Homonukleární korelace – COSY

- Diagram energetických hladin pro systém  $IS$ :

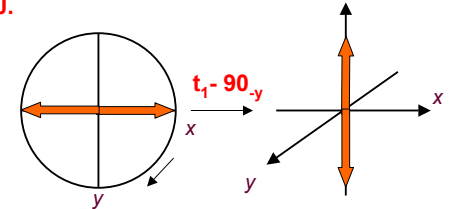


- Intenzita mimodiagonálních krospektrů závisí na míře přenosu polarizace (magnetizace) z jednoho jádra na druhé.
- Analyzujme situaci, kdy vybudíme spin  $I$  a přeneseme polarizaci na spin  $S$ .

## Homonukleární korelace (pokračování)



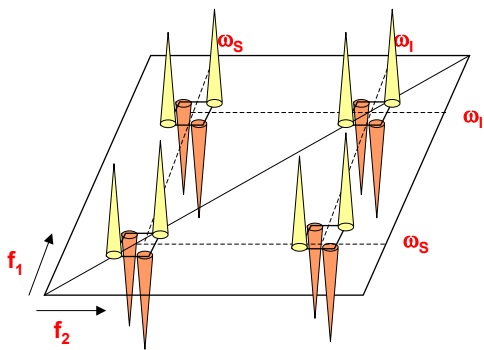
- Pro  $t_1 = 0$ , budeme mít kompletní inverzi spinu  $I$  (jedná se o pseudo  $\pi$  puls) a signál  $S$  se nezmění. Pro všechny ostatní časy se však intenzita spinu  $S$  bude měnit v důsledku rozdílné míry přenosu polarizace z jádra  $I$  na jádro  $S$ . Tato změna bude periodicky záviset na frekvenci spinu  $I$  a velikosti interakční konstanty  $J_{IS}$ . Nejvíce polarizace se přeneše nastavíme-li  $t_1 = 1/2J$ .



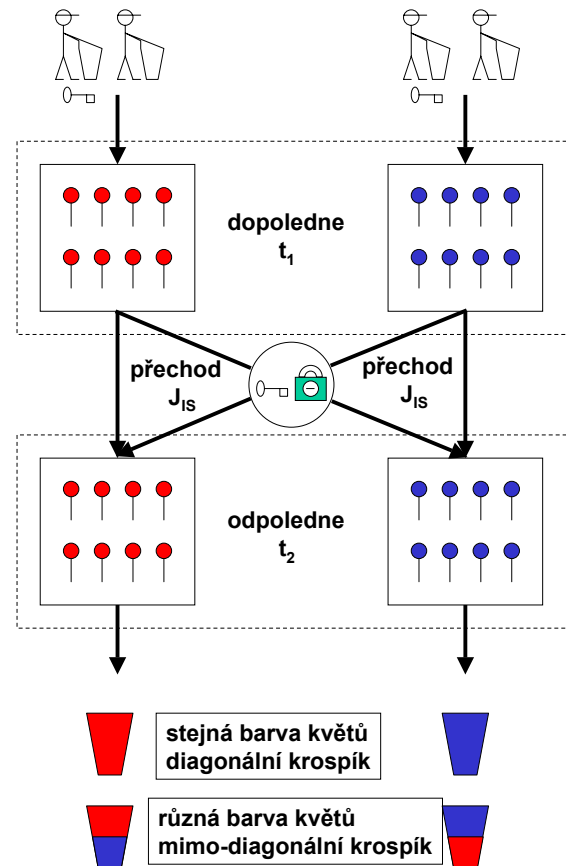
$$A_S(t_1, t_2) = A_I \cdot \text{trig}(\omega_I \cdot t_1) \cdot \sin(\pi J_{IS} \cdot t_1) \cdot \text{trig}(\omega_S \cdot t_2) \cdot \sin(\pi J_{IS} \cdot t_2)$$

## Homonukleární korelace (...)

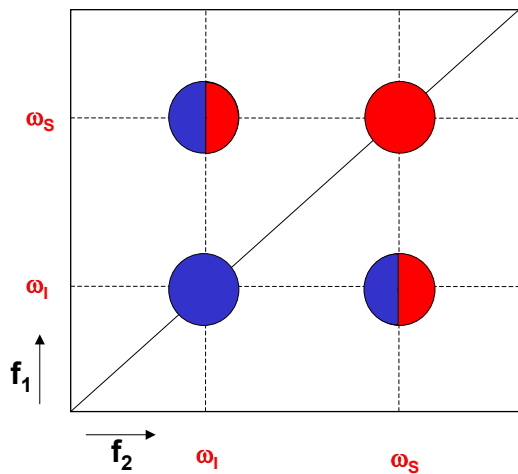
- Po Fourierově transformaci v  $t_1$  a  $t_2$ , a faktu, že stejný pochod přenosu polarizace probíhá i opačným směrem dostaneme následující obrázek:



- Toto je typický vzhled COSY spektra pro systém  $IS$ .

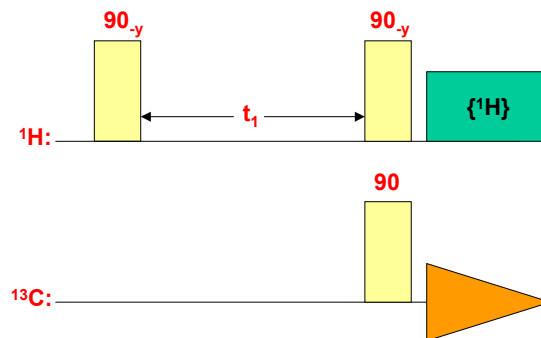






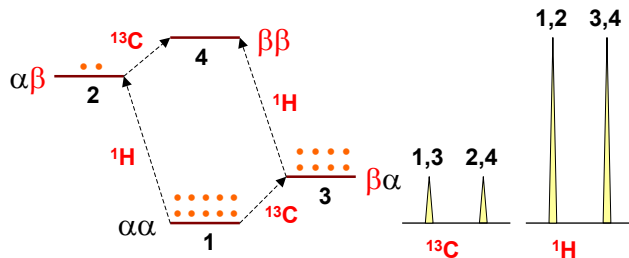
## Heteronukleární korelace - HETCOR

- Na podobném principu jako COSY funguje experiment, který nám poskytuje konektivitu mezi spiny  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  (obecně X). Nazývá se **HETCOR**, (**HET**eronuclear **COR**relation **spec**troscopy.)
- Pulsní sekvence obsahuje jak pulsy aplikované na  $^1\text{H}$ , tak i na  $^{13}\text{C}$  současně. Základní pulsni sekvence vypadá následovně:



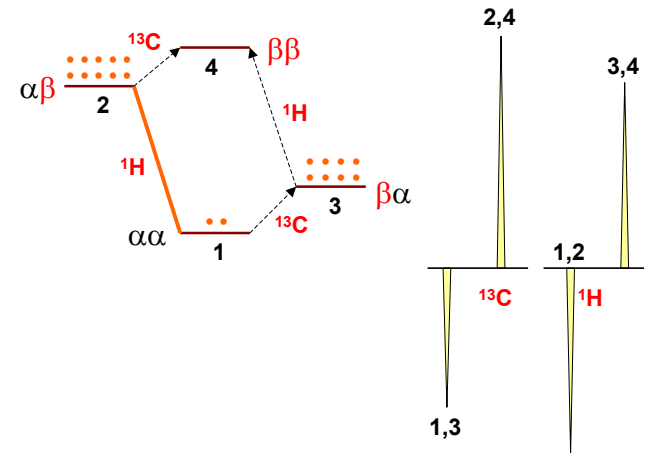
## HETCOR (...)

- Podobně jako v případě COSY, velikost inverze populace závisí na čase  $t_1$  a interakční konstantě  $J_{CH}$ .
- Takto to platí, je-li signál přesně v rezonanci, jsme-li mimo rezonanci, závisí též na  $^1\text{H}$  frekvenci ( $\delta$ ).
- Podobně jako v případě SPI a INEPTu, periodická změna inverze  $^1\text{H}$  populace bude mít obdobný periodický efekt na míru přenosu polarizace na  $^{13}\text{C}$ . Energetický diagram dvouspinového systému  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  potom vypadá následovně:



## HETCOR (...)

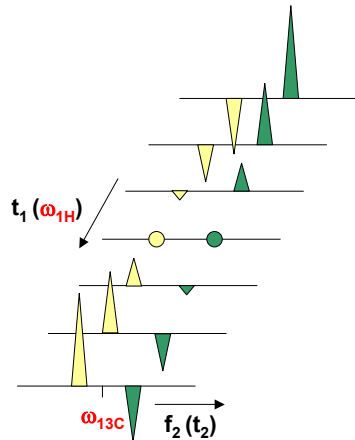
- A po přenosu polarizace následovně:



- Přenosem polarizace z  $^1\text{H}$  na  $^{13}\text{C}$  se může nejen zvýšit intenzita signálů  $^{13}\text{C}$ , ale je možné tímto způsobem přenést informaci o jádře  $^1\text{H}$  na jádro  $^{13}\text{C}$ .
- Protože signál  $^{13}\text{C}$ , který detekujeme během  $t_2$  periody, je modulován frekvencí protonu, který je s ním v interakci, **nese  $^{13}\text{C}$  FID informaci jak o  $^{13}\text{C}$ , tak o  $^1\text{H}$  frekvenci.**

## HETCOR (...)

- Intenzita  $^{13}\text{C}$  signálu bude záviset na míře inverze populace  $^1\text{H}$  spinů a tudíž na  $\omega_{1\text{H}}$  a velikosti  $J_{\text{CH}}$ . Záznam intenzity („stacked plot“) potom vypadá následovně pro různé  $t_1$  časy:

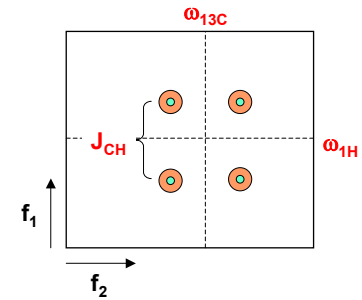


$$A_{13\text{C}}(t_1, t_2) \propto \text{trig}(\omega_{1\text{H}}t_1) * \text{trig}(\omega_{13\text{C}}t_2) * \sin(J_{\text{CH}}t_1) * \sin(J_{\text{CH}}t_2)$$

- Matematicky vyjádřeno, tzv. přenosová funkce bude záviset na frekvenci  $^1\text{H}$  spinu  $\omega_{1\text{H}}$  během periody  $t_1$  a frekvenci spinu  $^{13}\text{C}$  (v interakci s  $^1\text{H}$ )  $\omega_{13\text{C}}$  během periody  $t_2$  a velikosti interakční konstanty během obou period:

## HETCOR (...)

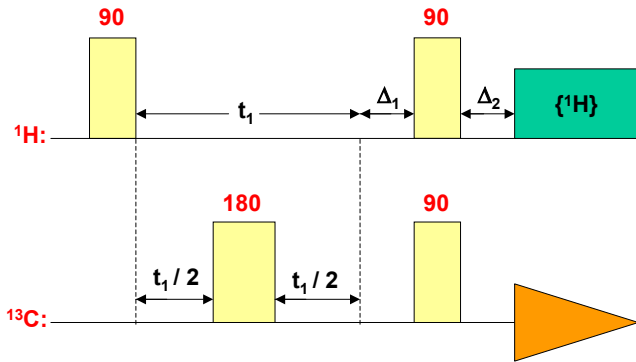
- Fourierova transformace v obou doménách nám poskytne 2D korelační spektrum:



- Hlavní rozdíl oproti COSY je v asymetričnosti spektra. Jedna osa nese  $^1\text{H}$  frekvence a druhá  $^{13}\text{C}$  frekvence.
- Problémem je rozštěpení signálu interakční konstantou  $J_{\text{CH}}$ , což jednak snižuje intenzitu spektra, ale zejména dochází k překryvům různých **CH** spinových systémů.

## HETCOR (odstranění rozštěpení signálu)

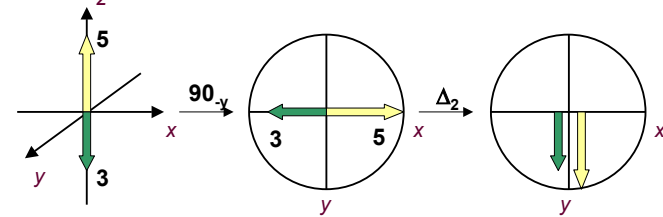
- Využijeme pro tento účel **heteronukleární spinové echo**.



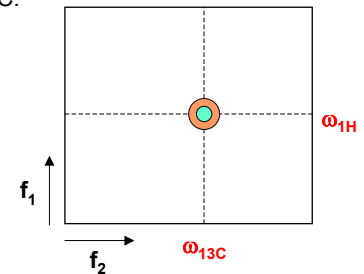
- Vložíme  $^{13}\text{C}$   $\pi$  puls doprostřed periody  $t_1$  a tím dojde k refokusaci  $^1\text{H}$  magnetizace během této periody, což má stejný efekt jako  $^1\text{H}$  dekapling. Časová prodleva  $\Delta_1$  potom slouží k uskutečnění přenosu polarizace z  $^1\text{H}$  na  $^{13}\text{C}$ .

## HETCOR (odstranění rozštěpení signálu)

- Nyní se podívejme na  $^{13}\text{C}$  magnetizaci. Po skončení přenosu polarizace (přenosu informace o  $^1\text{H}$ ) budeme mít dva  $^{13}\text{C}$  vektory s poměrem intenzit 5/3 v ose  $z$ . Vlivem  $^{13}\text{C}$   $\pi/2$  pulsu dojde k jejich sklopení do roviny  $\langle xy \rangle$  a po uplynutí času  $\Delta_2$  (nastaven též na hodnotu  $1/2J$ ) dojde k refokusaci obou vektorů:



- Se zahájením snímání dat (začátek  $t_2$  periody) začneme dekaplovat  $^1\text{H}$  (rušíme interakci  $J_{\text{CH}}$ . Spektrum nyní neobsahuje rozštěpení signálů vlivem  $J_{\text{CH}}$ . Na druhou stranu si však uchovává informaci o chemickém posunu obou interagujících jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ :



## Nepřímá (inverzní) detekce

Jedním z největších problémů v NMR spektroskopii je **citlivost !!!!**

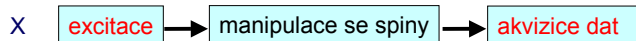
$$\frac{S}{N} \sim N \gamma_{exc} \gamma_{det}^{\frac{3}{2}} B_0^{\frac{3}{2}} (NS)^{\frac{1}{2}} \frac{T_2}{T}$$

Citlivost se v NMR spektroskopii vyjadřuje jako **poměr signálu k šumu S/N**.

Citlivost je možné zvýšit zejména zvýšením počtu aktivních jader (N), použitím většího externího magnetického pole  $B_0$  a zvýšením počtu akumulací (NS).

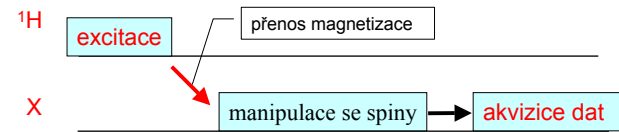
Další z možností jak dosáhnout vyšší citlivosti je vhodné uspořádání experimentu z hlediska excitovaného a detekovaného jádra ( $\gamma_{exc} \gamma_{det}$ ). Můžeme rozlišit tři případy:

A. Excitujeme a detekujeme stejné jádro.



## Nepřímá (inverzní) detekce (pokračování)

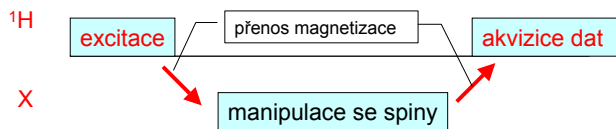
B. Excitujeme protony, přeneseme polarizaci a detekujeme X jádro.



Relativní citlivost	Zkrácení doby experimentu k dosažení stejného S/N
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ zvýšení 4x	16x
$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ zvýšení 10x	100x

## Nepřímá (inverzní) detekce (pokračování)

C. Excitujeme protony, přeneseme polarizaci na X jádro a zpět a detekujeme opět protony.



Relativní citlivost

Zkrácení doby experimentu k dosažení stejného S/N

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$  = zvýšení 32x

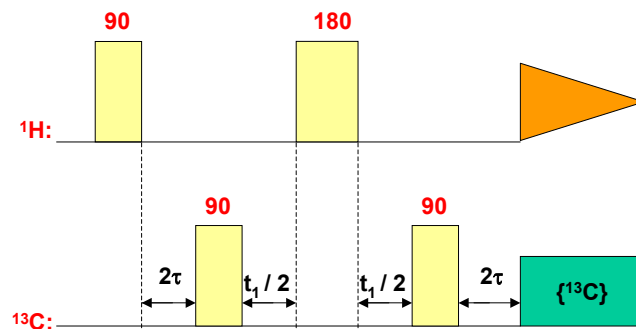
1024x

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$  = zvýšení 292x

85264x

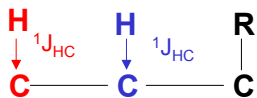
## Nepřímá (inverzní) detekce (pokračování)

- Nepřímá nebo-li inverzní detekce má význam pro zvýšení citlivosti jader s nízkým  $\gamma$ .

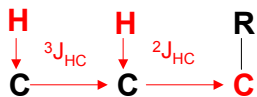


- Nejjednodušší pulsní sekvencí je **HMQC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence).
- Dalším hojně používaným experimentem je **HSQC** (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence).
- Inverzní analogií experimentu korelující  $^1\text{H}$  s  $^{13}\text{C}$  přes 2 a 3 vazby je **HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**oherence).

- Experimenty **HMQC** nebo **HSQC** poskytují korelace jader  $^1\text{H}$  s X jádru ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) přímo na ně vázanými, jinými slovy, přenos magnetizace se děje přes jednovazebnou interakční konstantu  $J_{\text{HX}}$ .



- Ve spektrech se objeví pouze X jádra, která mají přímo vázaný atom  $^1\text{H}$ . Nelze využít pro identifikaci kvarterních uhlíků!!!
- Experiment **HMBC** naproti tomu koreluje jádra  $^1\text{H}$  s jádru X ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) přes dvě nebo tři vazby (interakce dalekého dosahu).

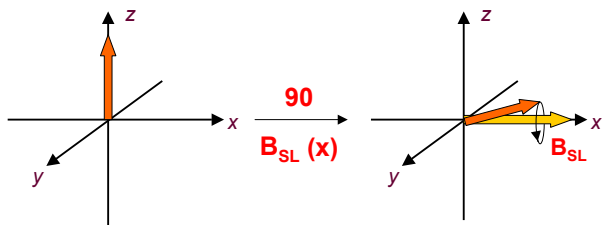


- Slouží téměř výhradně k identifikaci X jader, které nemají přímo vázaný atom  $^1\text{H}$ , např. kvarterních uhlíků. Ve spektru se objeví i interakce ostatních X jader s atomy  $^1\text{H}$  vzdálené o dvě/tři vazby.

## Spin-locking – práce při nízkých magnetických polích.

- **Čím vyšší pole, tím lepší rozlišení a citlivost.** Toto je hnací síla vývoje čím dál větších magnetů.
- Avšak existují případy, kdy je výhodnější pracovat naopak při velmi malém externím magnetickém poli  $B_0$ .
- Ideální by bylo dosáhnout rozlišení a citlivost vysokého magnetického pole  $B_0$  a některé ostatní pochody studovat při nižším poli např. přenos polarizace....
- Pro 2D experiment to znamená provádět přípravnou, vývojovou a akviziční periodu při  $B_0$  a směšovací periodu při nižším poli. Jak ale zařídit rychlý přechod mezi oběma poli?
- Technika, která se pro tento účel používá se nazývá **spin-locking**. Podstata spočívá v „odstranění“ vlivu externího magnetického pole  $B_0$  a donucení spinů precesovat okolo nového, nižšího magnetického pole.

## Spin-locking - princip

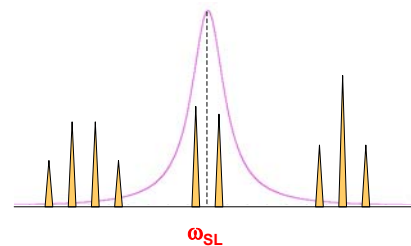


- Abychom odstranili vliv pole  $B_0$ , sklopíme vektor magnetizace z osy  $\langle z \rangle$  buď do osy  $\langle x \rangle$  nebo  $\langle y \rangle$  pomocí  $\pi / 2$  pulsu.
- Je-li magnetizace nyní v rovině  $\langle xy \rangle$ , je nutné ji tam po jistou dobu udržet. Toto je dosaženo tzv. uzamčením spinů v příslušném směru  $\langle x \rangle$  nebo  $\langle y \rangle$  novým magnetickým polem. Spiny potom začnou vykonávat precesní pohyb okolo směru působení nového magnetického pole.
- Magnetické pole  $B_{SL}$  je vytvářeno RF částí spektrometru buď jako kontinuální ozařování nebo (moderněji) sérií tzv. **kompozitních pulsů**, které mají stejný efekt.

před SL:  $\omega_0 = -\gamma B_0$  po SL:  $\omega_{SL} = -\gamma B_{SL}$

## Spin-locking – princip (pokračování)

- $B_{SL}$  je fluktující magnetické pole aplikované při nebo blízko rezonanční podmínky pro ta která jádra.
- V rotující soustavě souřadnic je statické a pracujeme pouze s jeho intenzitou. Toto je důvod, proč experimenty využívající „spin-locking nazýváme „**experimenty v rotující soustavě souřadnic**“.
- Důvod proč se používají kompozitní pulsy spíše než CW je ve větší spektrální šířce, kterou jsme tímto polem schopni pokrýt.



- Zvětšení spektrální šířky je možné dosáhnout buď větším výkonem RF vysílače (nebezpečí přehřátí vzorku) nebo kompozitními pulsy.



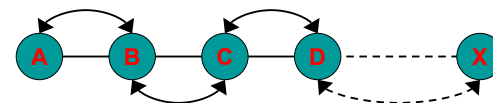
## TOCSY

- Délka a způsob vytváření spin-locku závisí na jeho dalším využití.
- Prvním experimentem využívajícím spin-lock je **TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)** nebo jinak nazývané **HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn experiment)**.
- Pracujeme-li při  $B_0$ , platí pro slabě interagující systémy  $\Delta\delta \text{ (Hz)} \gg J \text{ (Hz)}$ . Jinými slovy příspěvek k celkové energii systému pocházející z interakčních konstant je daleko menší než z rozdílu chemických posunů.

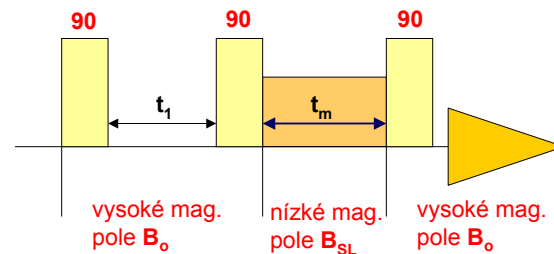
$$H = H_\delta + H_J + \dots \quad H_\delta \gg H_J + \dots$$

- Za podmínek spin-locku ( $B_{SL} \ll B_0$ ) se rozdíly v chemických posunech minimalizují (lze je zanedbat, čímž dojde k odstranění  $\Delta\delta$  a příspěvku  $H_\delta$ ). **Pro interakční konstanty to však neplatí** jejich velikost nezávisí na velikosti externího magnetického pole.
- Protože dojde k přiblížení energetických hladin jednotlivých spinů, magnetizace může volně přecházet z jednoho na druhý v rámci tzv. interakční sítě. Jinými slovy, spiny jsou vzájemně **zkorelovány**.

## TOCSY (pokračování)



- Maximum přenosu magnetizace mezi dvojicí spinů, které mají interakční konstantu  $J$  Hz je tehdy, nastavíme-li délku spin-locku na hodnotu  $t_m = 1 / 2J$ . Bude-li  $t_m$  delší, umožníme přechod magnetizace na další spiny.



- Pulsní sekvence 2D TOCSY experimentu obsahuje počáteční  $\pi / 2$  puls, kterým magnetizaci sklopíme do roviny  $\langle xy \rangle$ , kde dojde k jejímu „uzamčení“ některou ze sekvencí kompozitních pulsů (MLEV, DIPSI...). Tímto umožníme volný tok magnetizace po systému vzájemně interagujících spinů.

# TOCSY spektrum versus COSY

