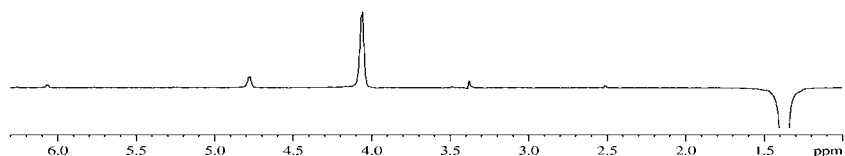
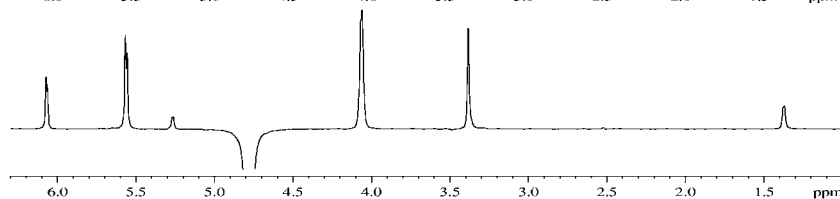
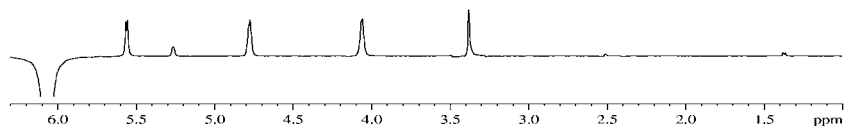
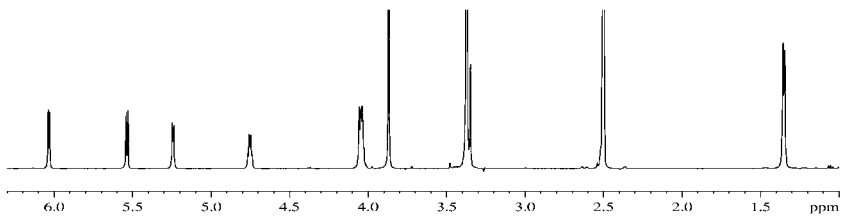


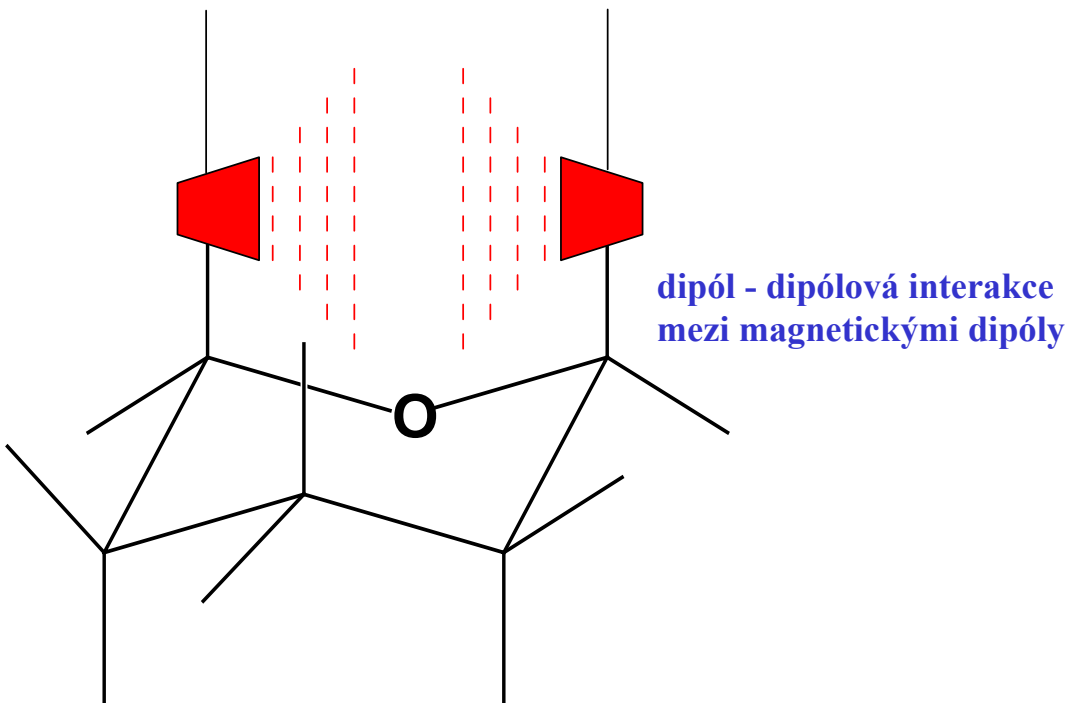
LEKCE 8

- Nukleární Overhauserův efekt - princip měření a jeho využití (diferenční NOE, NOESY, ROESY).
- TOCSY.



Nukleární Overhauserův efekt (NOE)

- Důsledek dipolární interakce mezi dvěma jadernými spiny, které jsou blízko u sebe (interakce přes prostor, do 5 Å)
- Saturací jader A dochází ke změně populací jader B a tudíž ke změnám jejich intenzit (dodání energie - navýšení signálů protonů)



NOE

- rychle pohybující se molekuly (malé molekuly)

$$\omega_o * \tau_c \ll 1 \quad \text{pozitivní NOE} \\ \text{(extreme narrowing limit)}$$

- pomalu pohybující se molekuly (makromolekuly nebo malé molekuly ve viskozních rozpouštědlech)

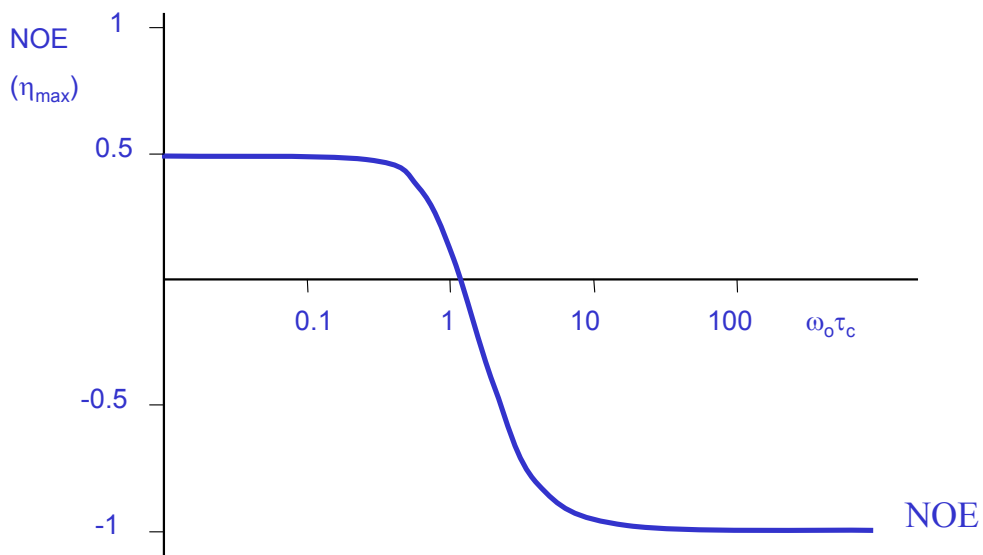
$$\omega_o * \tau_c \gg 1 \quad \text{negativní NOE}$$

- středně velké molekuly

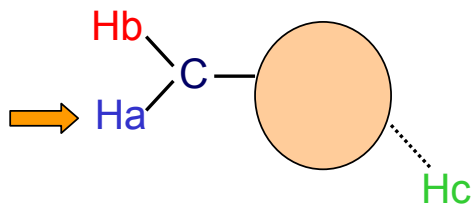
$$\omega_o * \tau_c \approx 1 \quad \text{NOE} \approx 0$$

τ_c - korelační čas; doba, za níž se molekula otočí o 1 rad
 ω_o - rezonanční frekvence

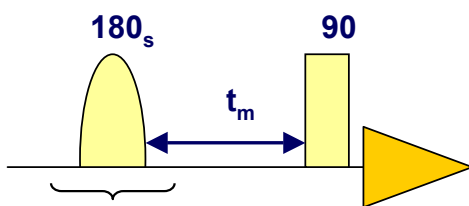
Závislost homonukleárního NOE na $\omega_o * \tau_c$



Princip měření NOE

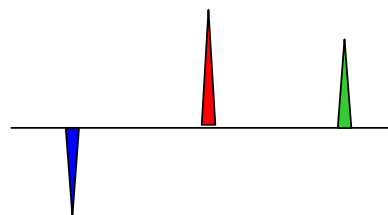


experiment I

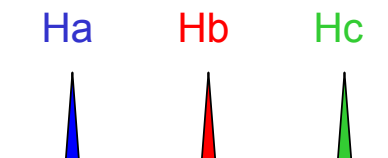
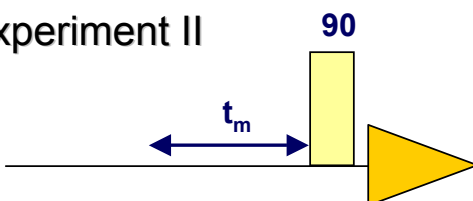


selektivní inverze

t_m směšovací čas - čas, ve kterém se
bude NOE

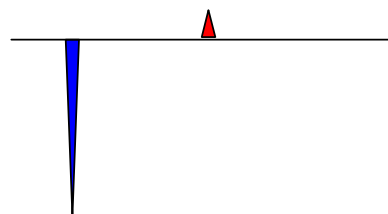


experiment II



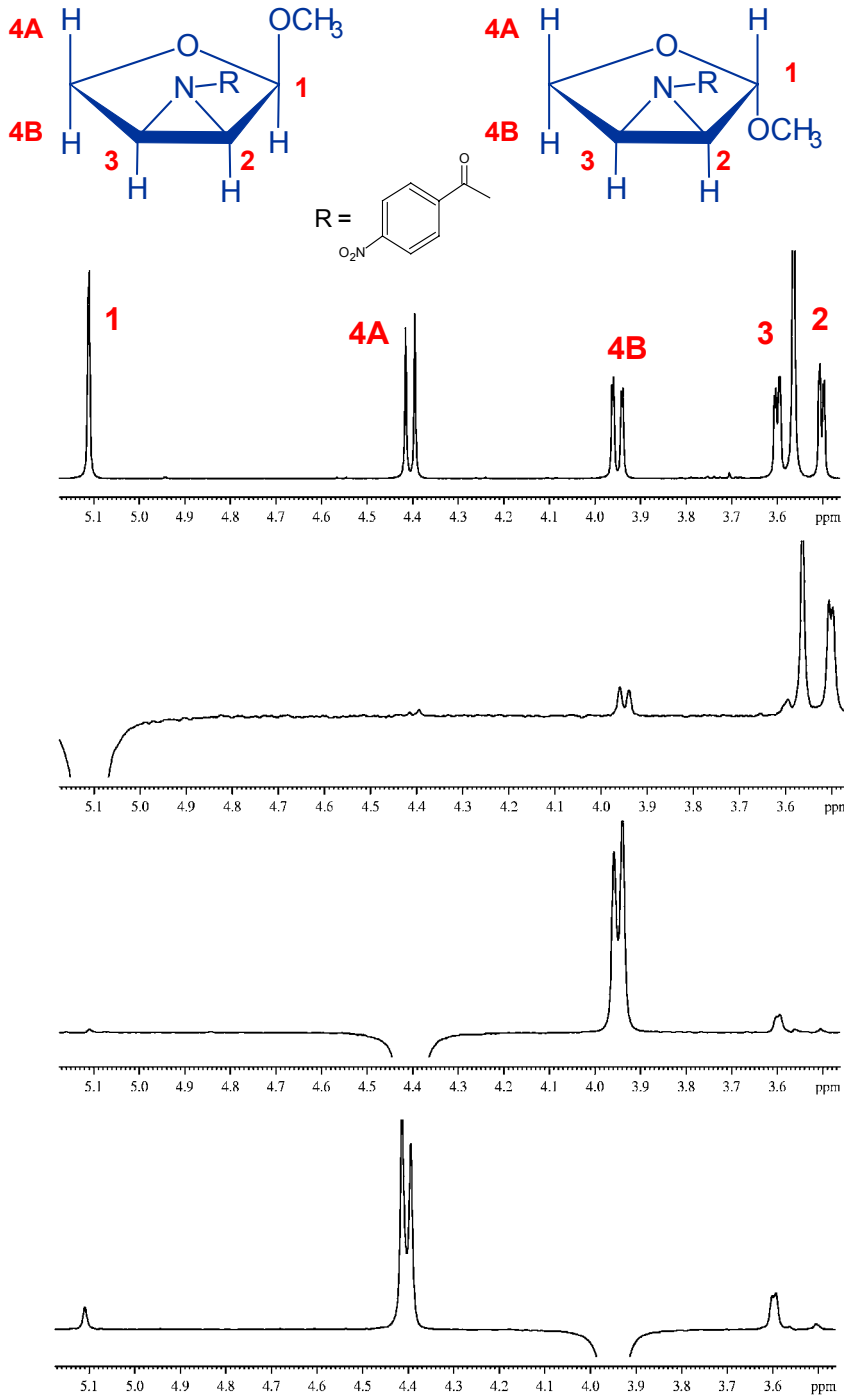
experiment I — experiment II

diferenční spektrum: odečtení
2 fidů (spekter)



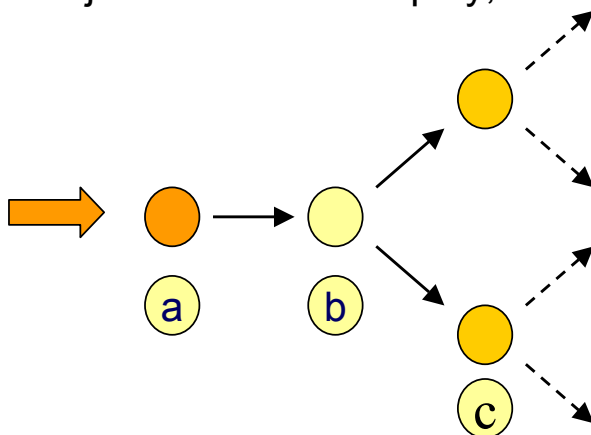
- Intenzita **červeného** signálu odpovídá navýšení v důsledku NOE.

α nebo β anomer ?

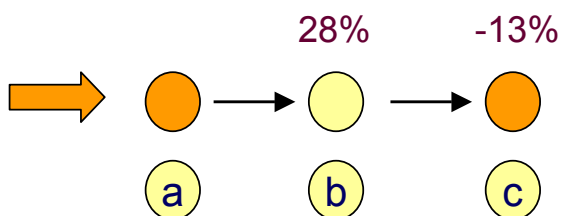


Spinová difuze

- V molekule nejsou 2 izolované spiny, ale množství různých susedů.



- V důsledku křížové relaxace mezi jádry **b** a **c** se sníží NOE navýšení jádra **b** a dojde k negativnímu navýšení jádra **c**. (Platí pouze pro extreme narrowing limit)



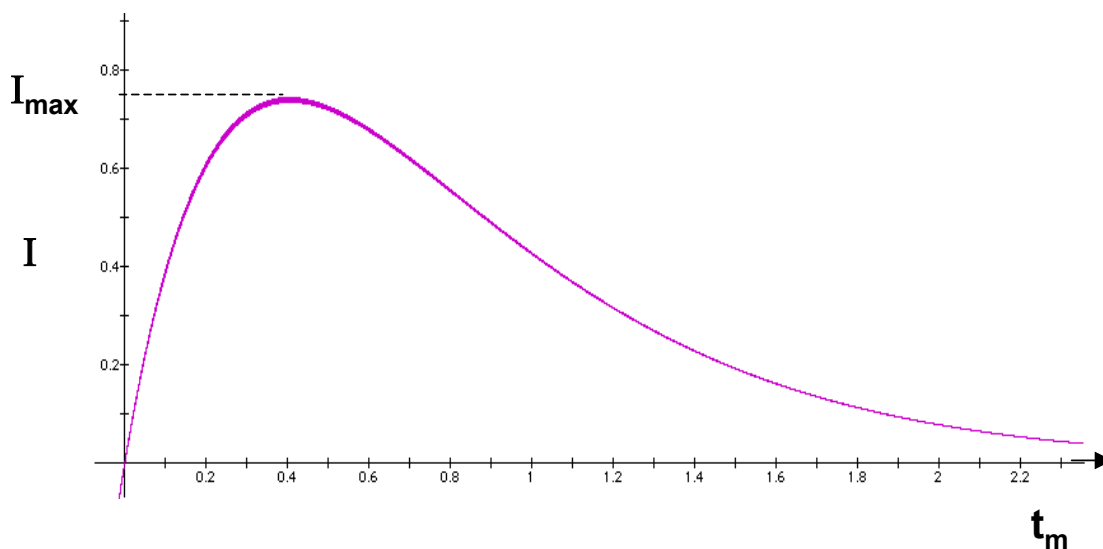
- Velké molekuly - nepřímé NOE navýšení je vždy záporné

nepřímé navýšení = spinová difuze

- Čím delší je směšovací čas t_m , tím větší je spinová difuze.

Intenzita NOE závisí na směšovací čas, t_m

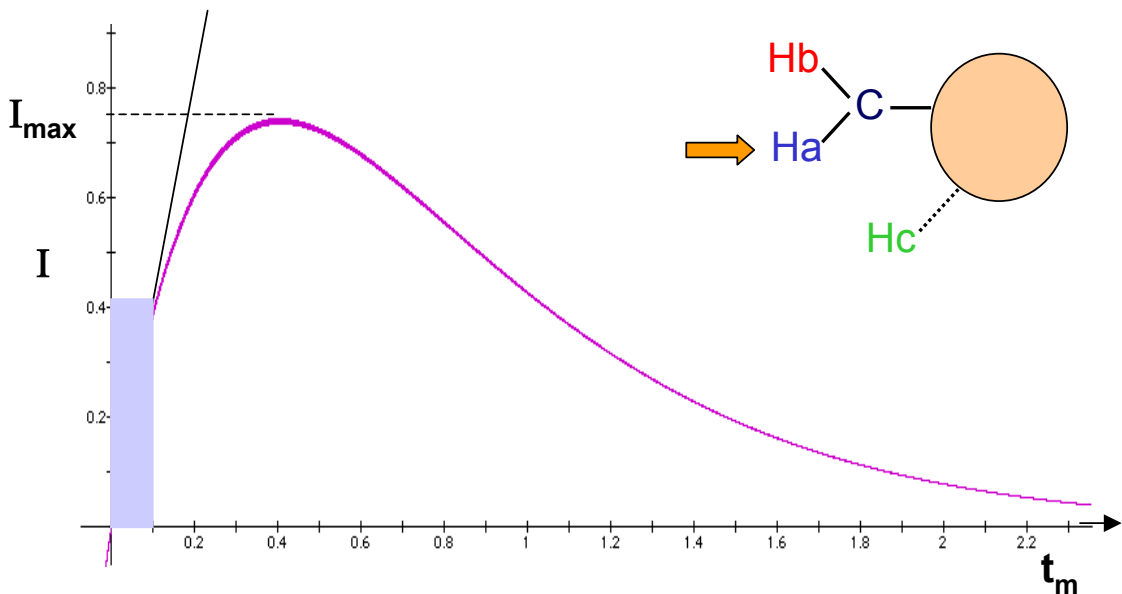
- Jestliže měříme při různých hodnotách směšovacího času t_m , získáme NOE výstavbovou křivku.
- Při delším směšovacím čase, t_m NOE klesne k nule (magnetizace se vrátí do osy $\langle z \rangle$) v důsledku podélné relaxace T_1 a spinové difuze.



I - intenzita signálu v NOE spektru

Výpočet vzdáleností - měření výstavbové křivky

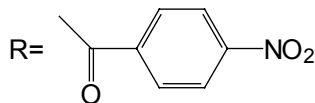
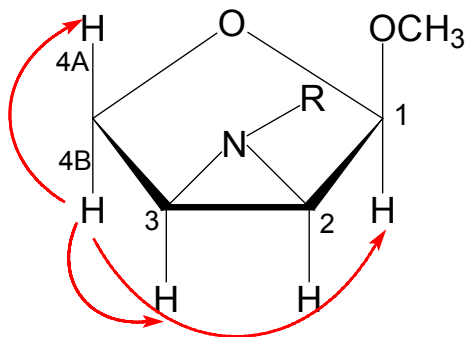
- Lineární část výstavbové křivky - rozhodující pro rychlost budování NOE
- Směrnice křivky v bodě 0 - rychlostní konstanta křížové relaxace σ .
- Nutno zvolit vhodné směšovací časy t_m , aby ještě nedocházelo ke spinové difuzi



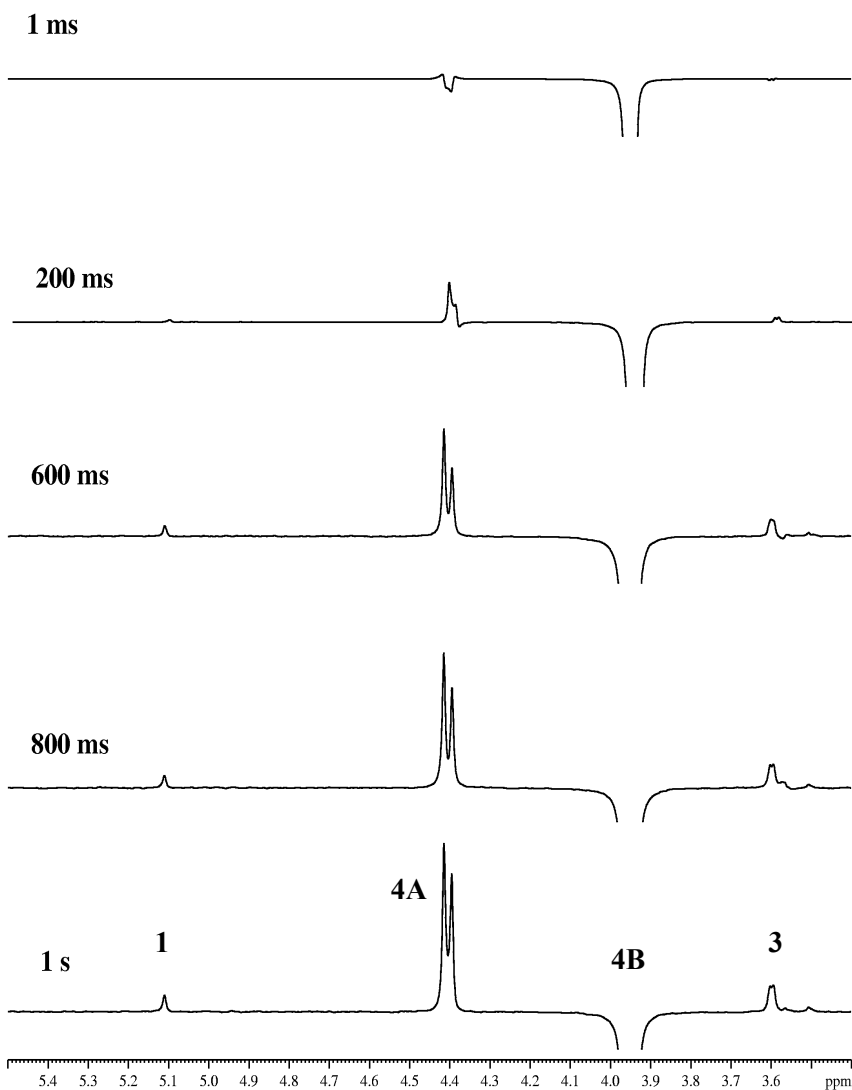
$$\left. \begin{array}{l} \sigma_{ab} \propto r_{ab}^{-6} \\ \sigma_{ac} \propto r_{ac}^{-6} \end{array} \right\} r_{ac} = r_{ab} * (\sigma_{ab} / \sigma_{ac})^{1/6}$$

- σ - rychlost nárůstu NOE,
rychlostní konstanta křížové relaxace
- r_{ab} - meziatomová vzdálenost (známá)
- r_{ac} - meziatomová vzdálenost (měřená)

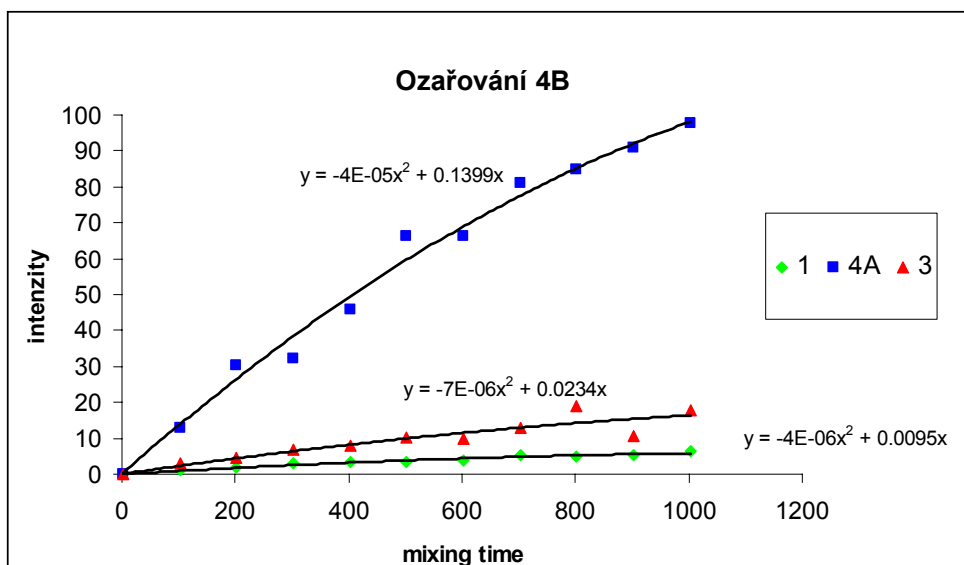
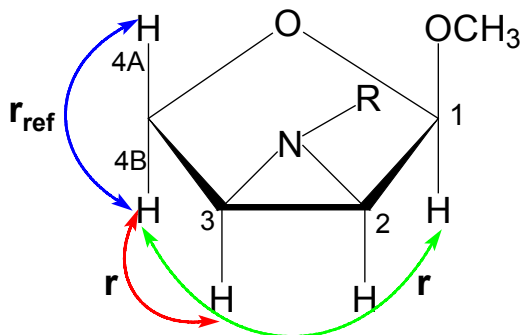
Výpočet vzdáleností - měření výstavbové křivky



$t_m = 1, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 \text{ ms}$

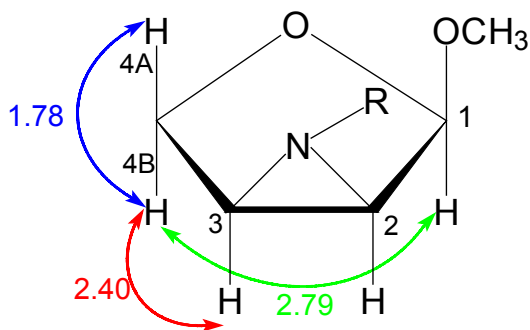


Výpočet vzdáleností - měření výstavbové křivky

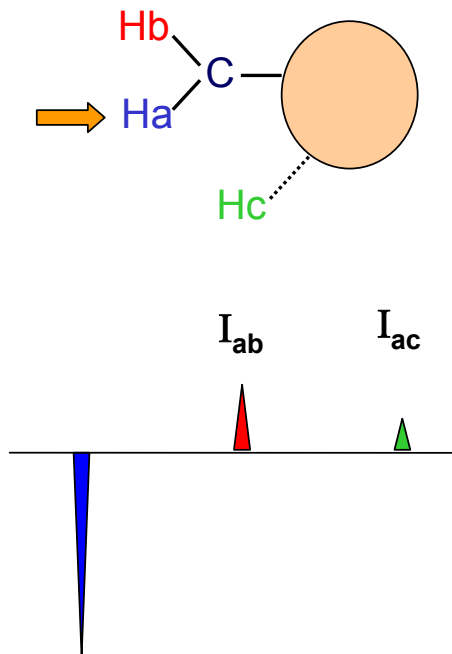


$$\left. \begin{array}{l} \sigma_{\text{ref}} \propto r_{\text{ref}}^{-6} \\ \sigma \propto r^{-6} \end{array} \right\} r = r_{\text{ref}} * (\sigma_{\text{ref}} / \sigma)^{1/6}$$

σ - rychlost nárůstu NOE
 r - měřená vzdálenost
 r_{ref} - referenční vzdálenost
 ($r_{\text{ref}} = 1.78 \text{ \AA}$)



Rychlý odhad vzdáleností (zjednodušení předchozí metody)



Vzdálenost protonů **Ha** a **Hb** - referenční

- Výpočet vzdálenosti mezi protony **Ha** a **Hc**:

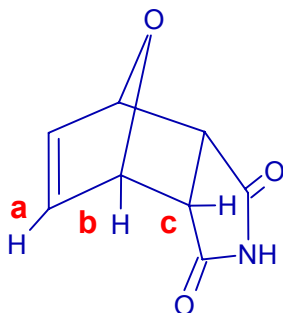
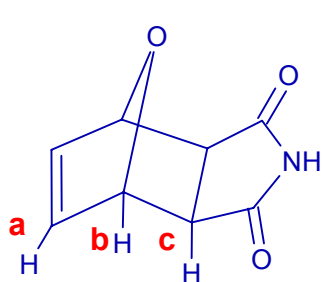
$$\left. \begin{array}{l} I_{ab} \propto r_{ab}^{-6} \\ I_{ac} \propto r_{ac}^{-6} \end{array} \right\} r_{ac} = r_{ab} * (I_{ab} / I_{ac})^{1/6}$$

I ... intenzita signálu

r ... vzdálenost mezi jádry

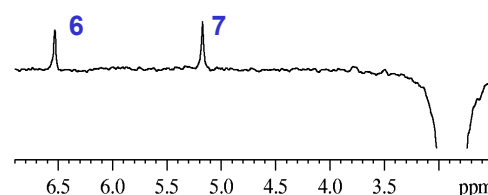
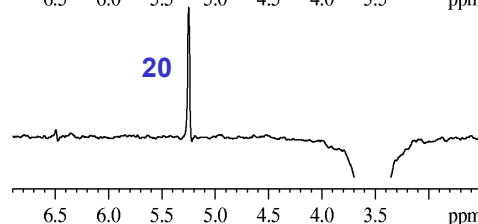
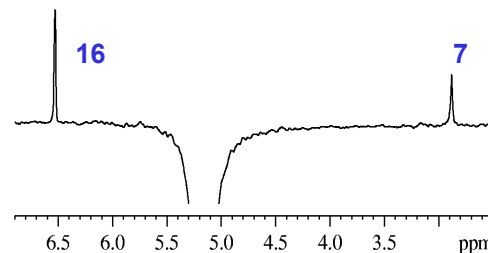
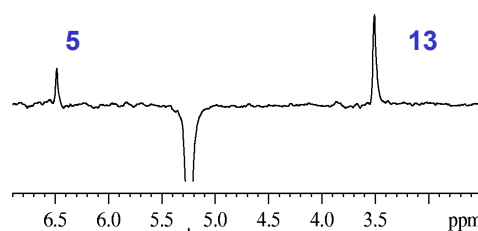
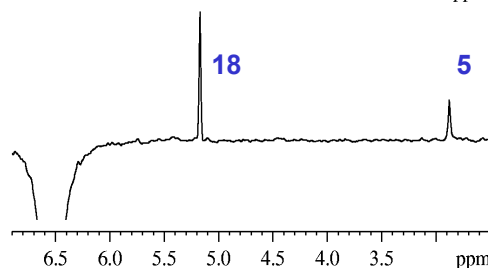
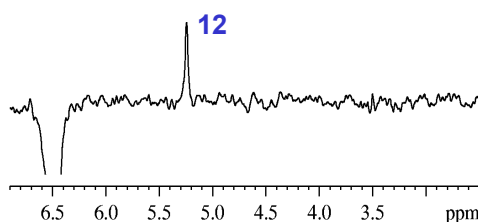
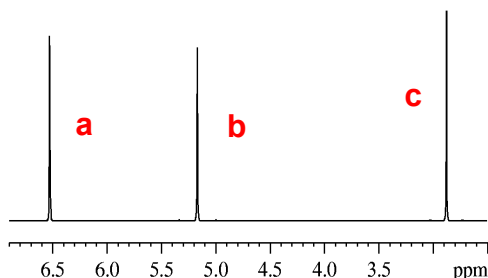
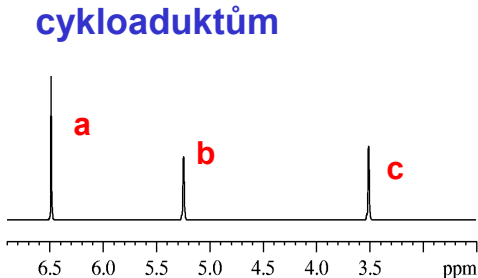
- Zjištění intenzity NOE:
integrace
změření výšky signálu (stejně pološířky)

Odhad vzdáleností u *exo*- a *endo*-cykloaduktů



$r_{ab} = 2.8 \text{ \AA}$ (X ray)

Na základě odhadu vzdáleností přiřadte spektra příslušným cykloaduktům



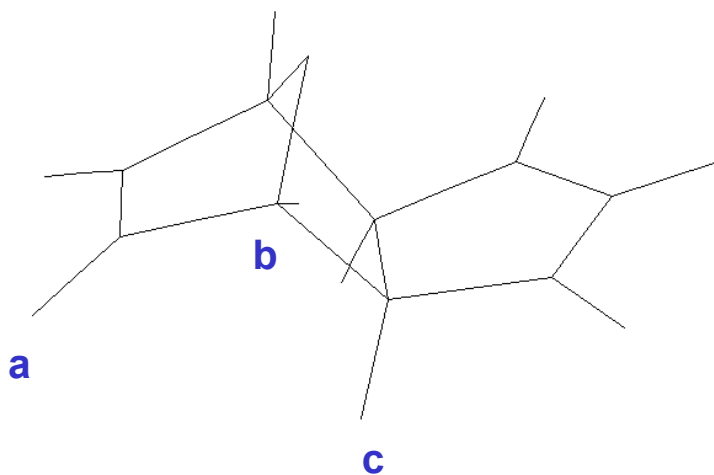
$r_{ac} =$

$r_{bc} =$

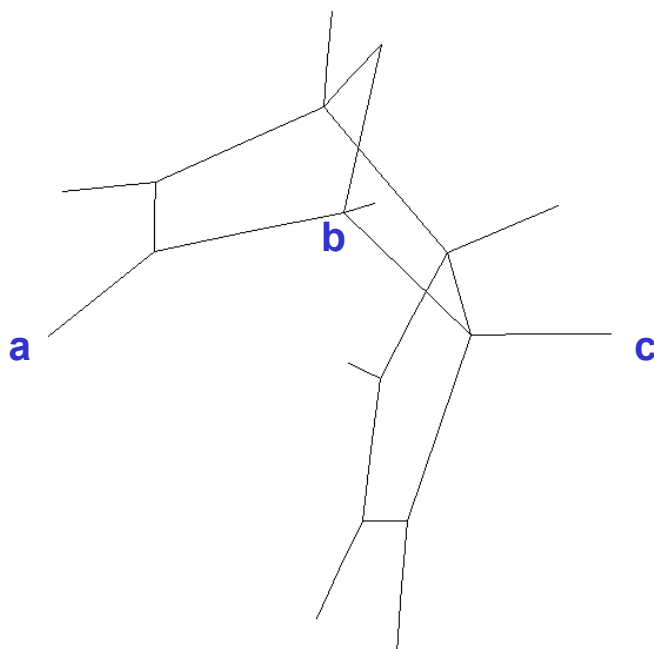
$r_{ac} =$

$r_{bc} =$

exo

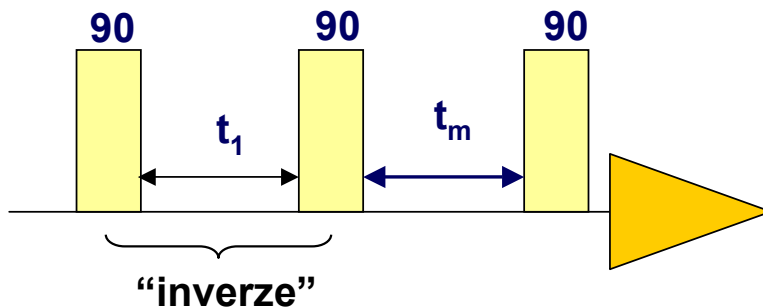


endo

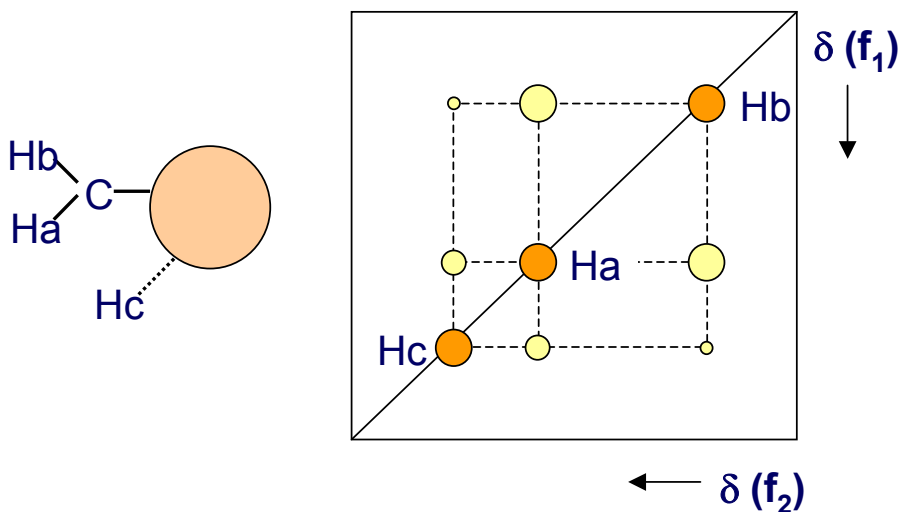


NOESY

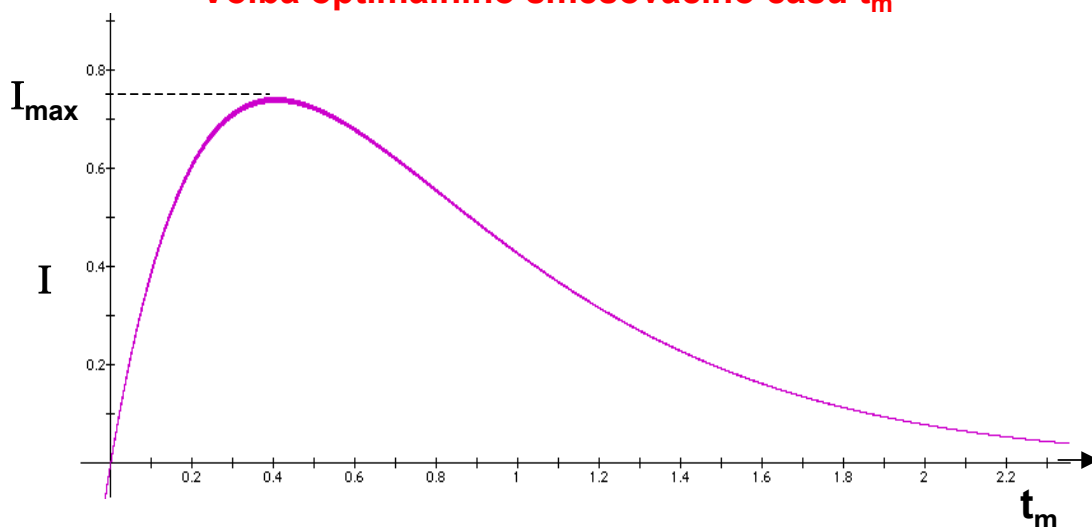
Selektivní inverze každého protonu zvláště je zdlouhavá, v **NOESY** (**NOE Spectroscopy**), 2D experiment, lze studovat všechny protony najednou.



- Během času t_1 se vytváří 2. dimenze
- Během směšovacího času t_m dochází ke **křížové relaxaci** mezi spiny, které interagují přes prostor.
- V 2D spektru jsou chemické posuny v obou dimenzích, mezi interagujícími spiny jsou krosníčky.
- Velikost krosníků závisí na velikosti NOE a tedy na vzdálenosti mezi jádry.



Volba optimálního směšovacího času t_m



Srovnání 1D a 2D metod NOESY

1D

- získáme výběrovou informaci (pokud víme, co chceme)
- rychlejší (selektivně převrátíme jen vybraná jádra)
- vyšší rozlišení
- větší citlivost

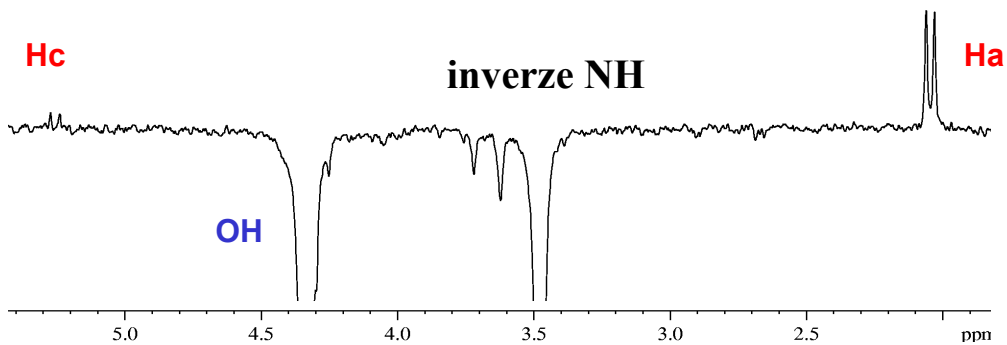
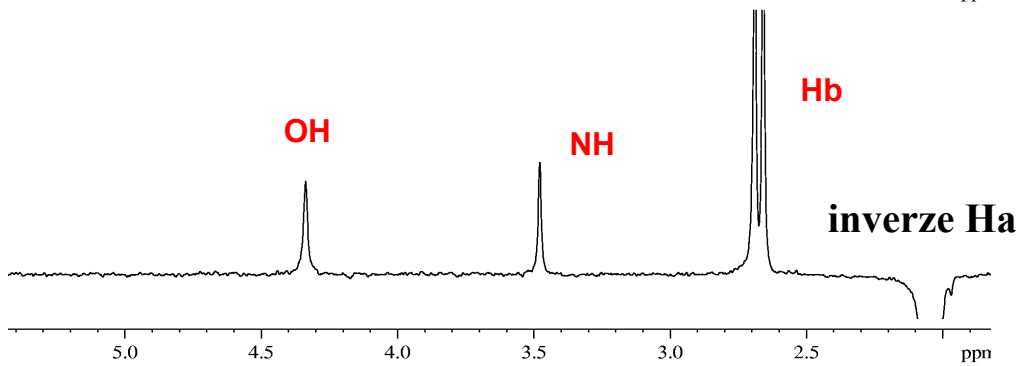
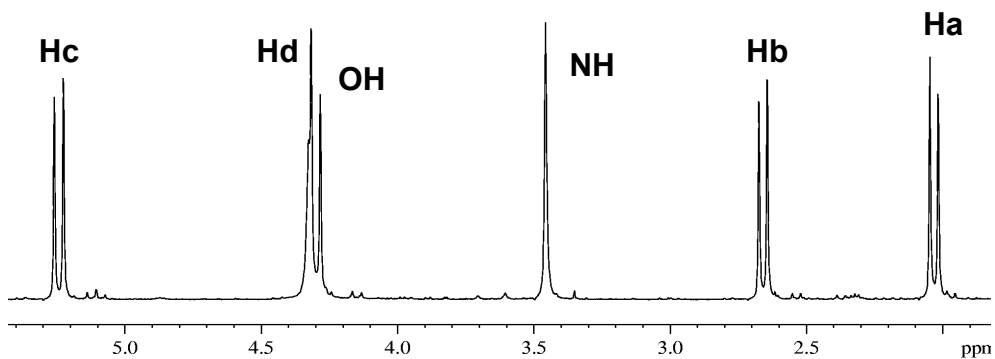
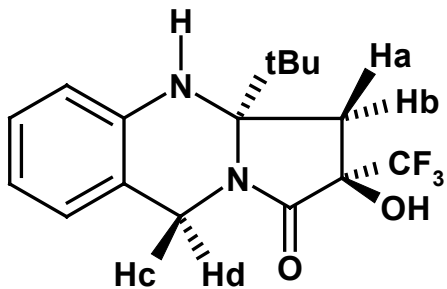
2D

- výhodné, pokud chceme získat celkovou informaci
- náročnější na čas (≈ 12 h)

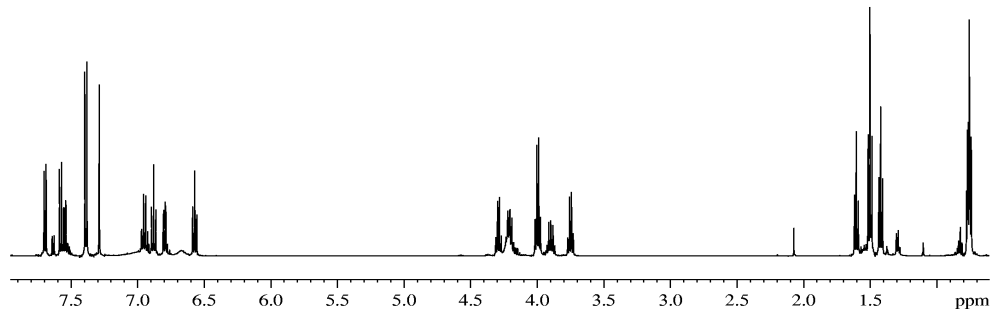
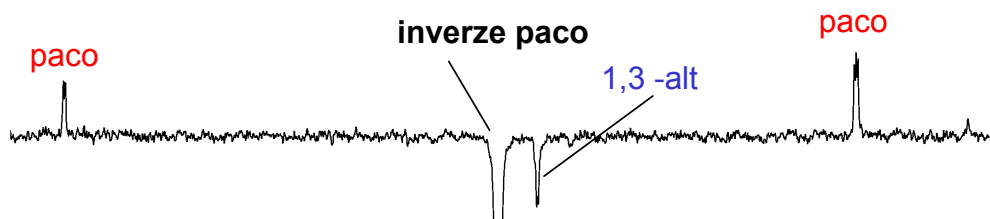
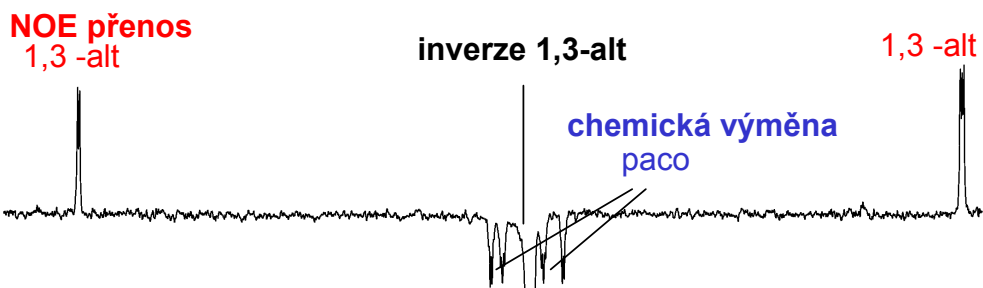
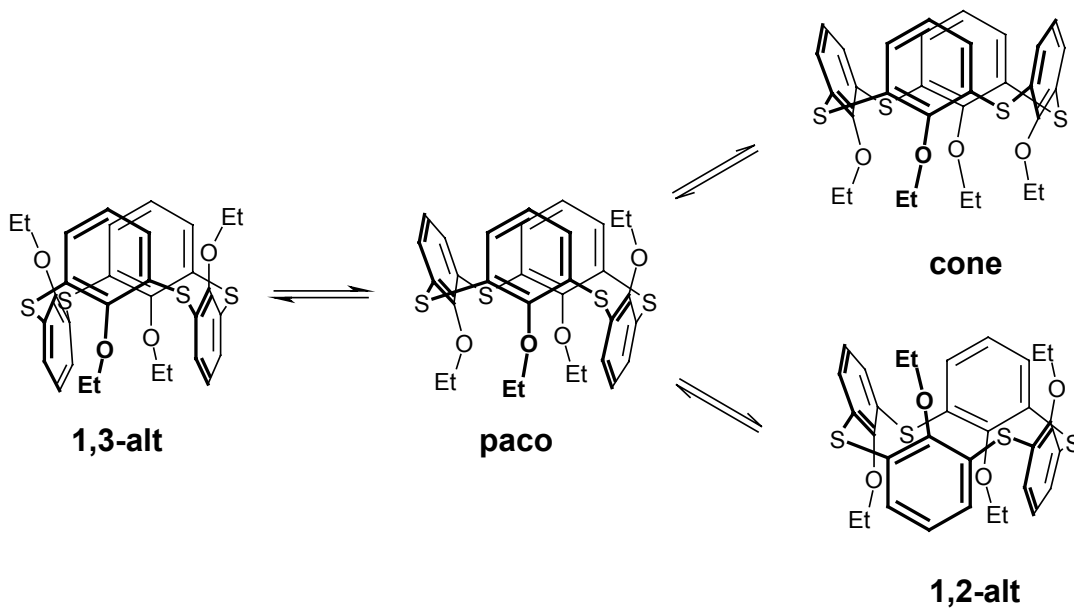
NOE × chemická výměna

- pomalá chemická výměna je způsobena přenosem magnetizace podobným NOE
- v mnoha systémech se uplatňují oba mechanismy - jsou pozorovatelné v jednom experimentu
- přenos magnetizace vlivem **chemické výměny je vždy negativní**
- **malé molekuly (pozitivní NOE)** - není problém s rozlišením těchto jevů
- **velké molekuly (negativní NOE)** - není vždy jednoduché rozlišit píky (krospíky), které jsou výsledkem NOE a které chemické výměny

NOE \times **chemická výměna**



NOE \times chemická výměna



- rychle pohybující se molekuly (malé molekuly)

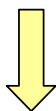
$$\omega_o * \tau_c \ll 1 \quad \text{pozitivní NOE} \\ \text{(extreme narrowing limit)}$$

- pomalu pohybující se molekuly (makromolekuly nebo malé molekuly ve viskozních rozpouštědlech)

$$\omega_o * \tau_c \gg 1 \quad \text{negativní NOE}$$

- středně velké molekuly

$$\omega_o * \tau_c \approx 1 \quad \text{NOE} \approx 0$$



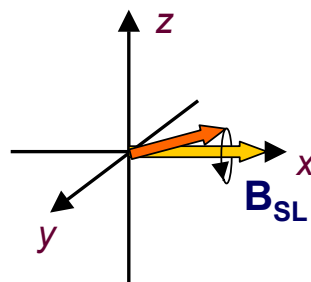
Není možné měřit středně velké molekuly ???

ROESY (ROTating framE SpectroscopY)

Studium dipolární interakce v polích, které jsou mnohem menší než B_o , (B_{SL}), **Spin-locking - práce v nižších polích**

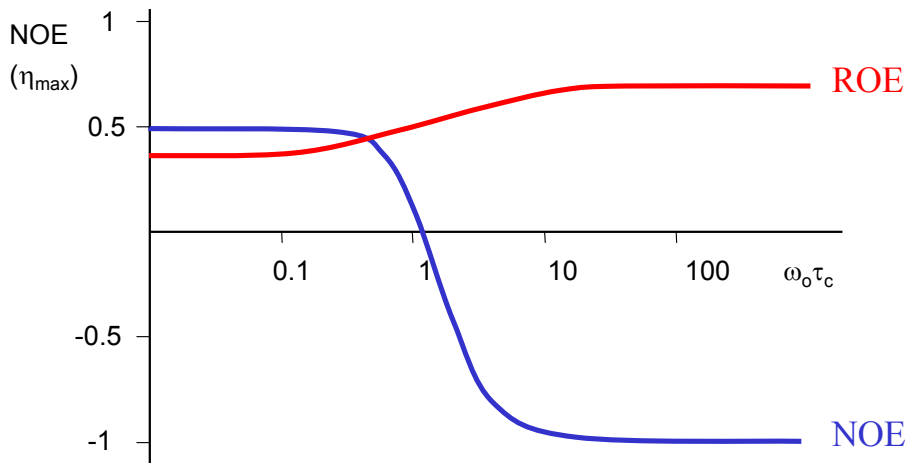
- sklopení magnetizace do osy $\langle x \rangle$,
- uzamčení (**locking**) magnetizace v ose $\langle x \rangle$,
- precese kolem nového magnetického B_{SL}

B_o 100 až 800 MHz	$\omega_{SL} \ll \omega_o$
B_{SL} 2 až 5 kHz	$\omega_{SL} * \tau_c \ll 1$

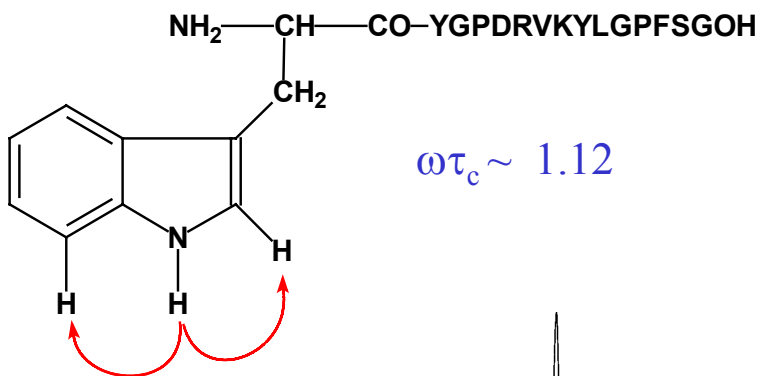


- rezonanční frekvence ω_{SL} bude velmi malá,
- vždy splněna podmínka pro extreme narrowing limit,
- všechny NOE signály jsou **pozitivní**

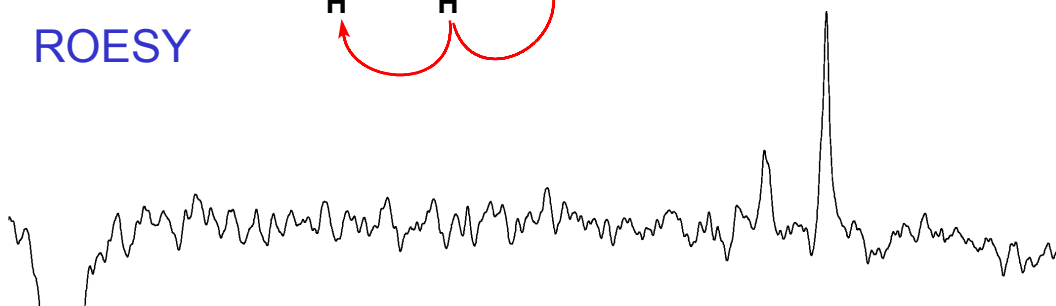
Závislost homonukleárního NOE na $\omega_o * \tau_c$



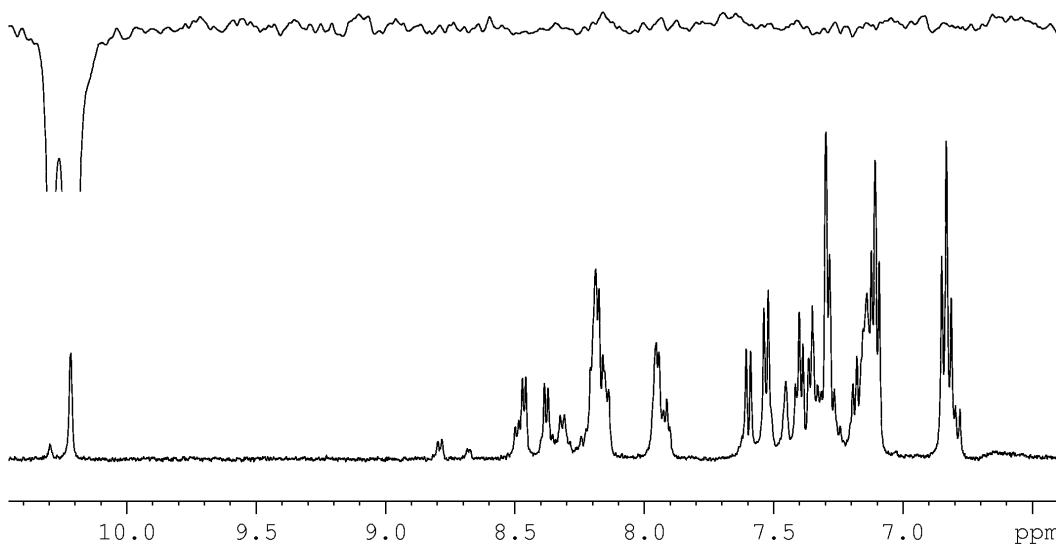
NOESY a ROESY “středně velké” molekuly



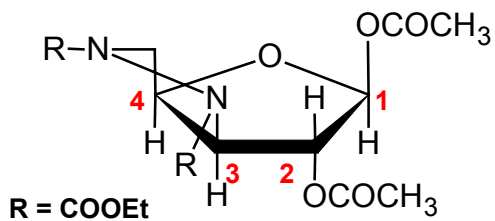
ROESY



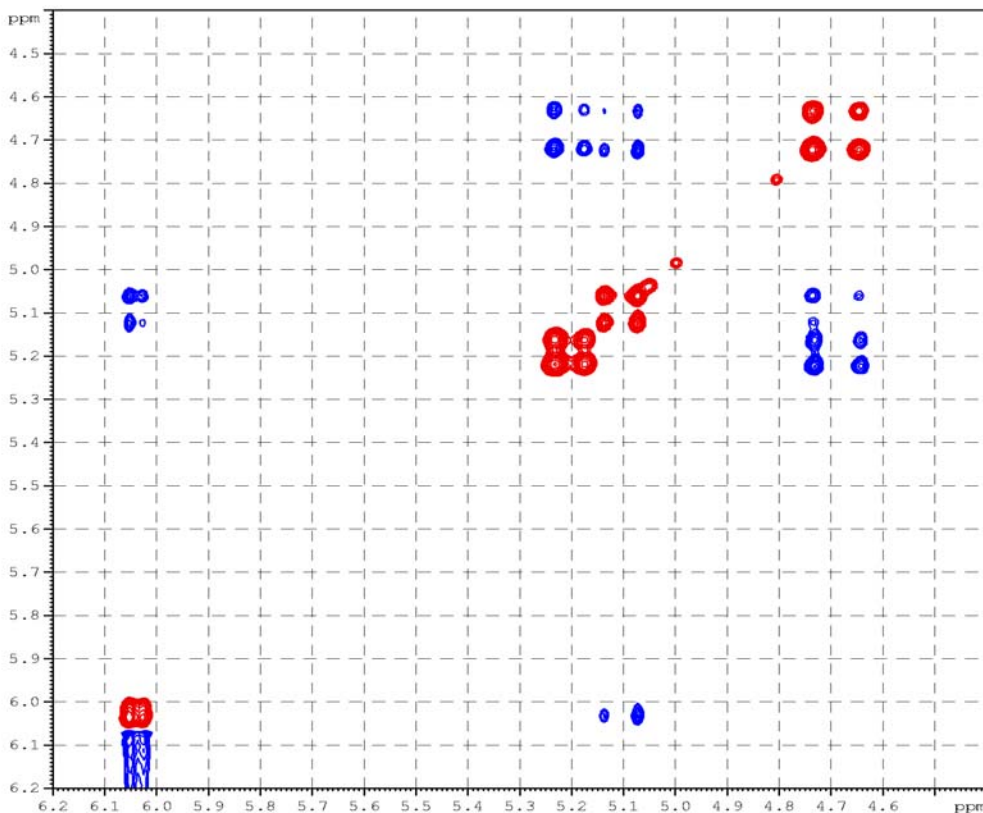
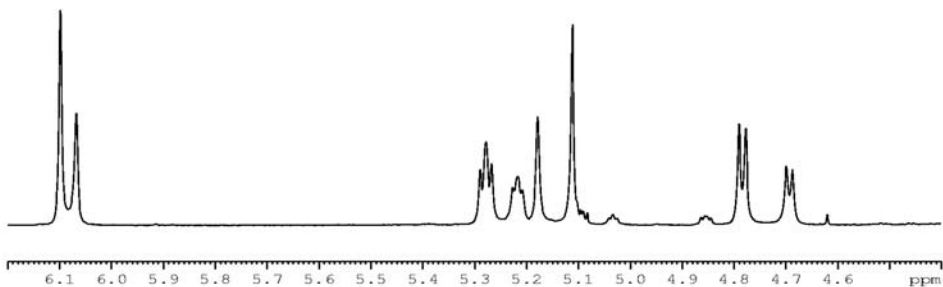
NOESY



Využití ROESY pro rozlišení NOE od chemické výměny



ROE - **pozitivní**
chemická výměna - **negativní**



Souhrn

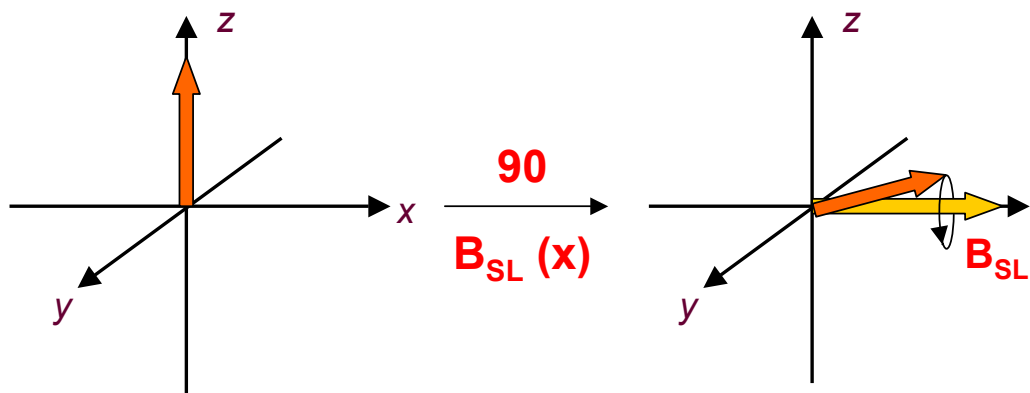
- NOE navýšení je úměrné vzdálenosti jader (r^{-6}), to umožňuje zjišťovat:
 - stereochemii a konformace
 - mezijaderné vzdálenosti
- V závislosti na velikosti/pohyblivosti (τ_c) molekuly, využíváme různé experimenty.
 - Malé organické molekuly: *diferenční NOE, NOESY*.
 - Proteiny, nukleové kyseliny, sacharidy: *NOESY (ROESY - k rozlišení NOE od chemické výměny)*.
 - Středně velké molekuly: *ROESY*

Experimentální podmínky

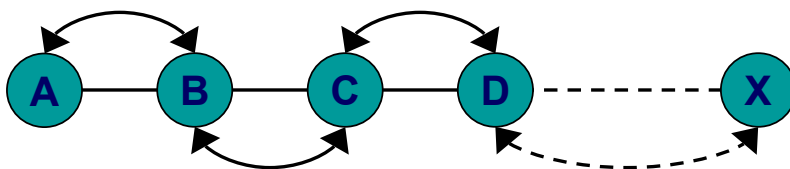
- kvalitativní aplikace (NOE je nebo není?):
 - není potřeba žádná speciální úprava vzorku
- kvantitativní aplikace (i odhad vzdáleností):
 - vzorek nesmí obsahovat paramagnetické nečistoty, kyslík musí být odstraněn odplyněním (“freeze -pump -thaw” postup nebo probublání inertem přes septum)
 - vhodně zvolené směšovací časy (pozor na spinovou difuzi)

TOCSY (*T*OTAL *C*ORRELATION *S*PECTROSCOPY)

využití koherentního přenosu magnetizace zprostředkovaného interakční konstantou

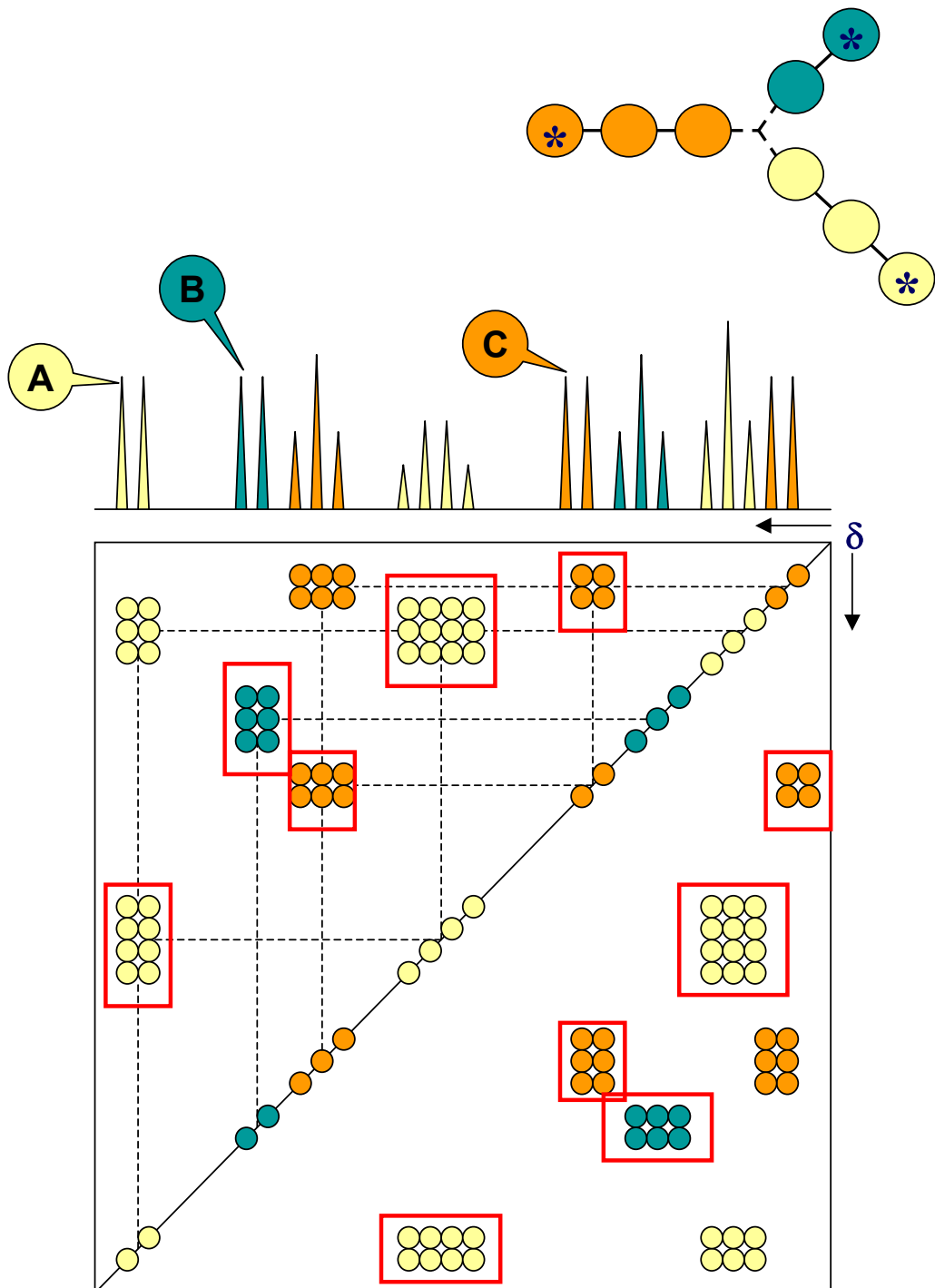


Volný tok magnetizace po systému vzájemně interagujících spinů:

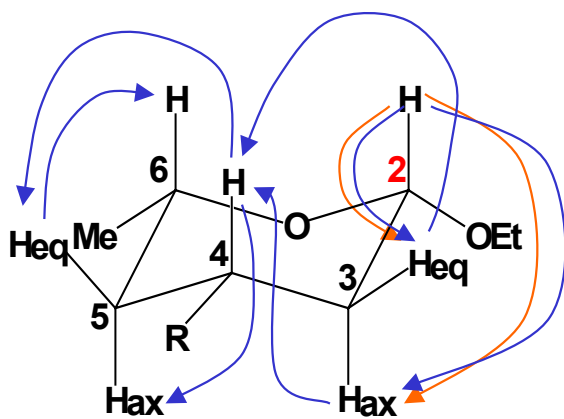
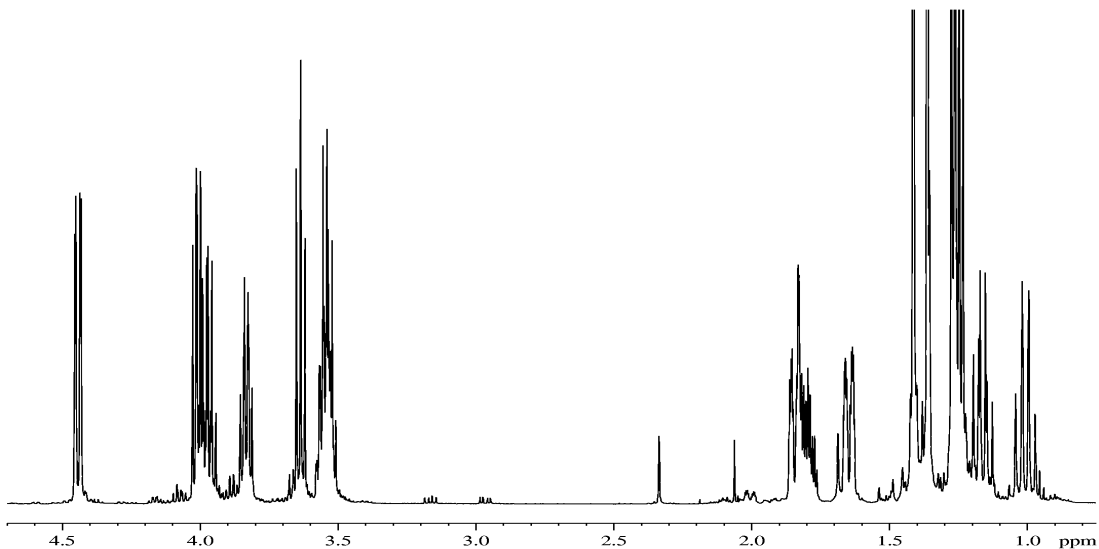


- využití spin-locku, práce při nižších polích, $B_{SL} \ll B_0$
- minimalizace rozdílu v chemických posunech, odstranění $\Delta\delta$, velikost J nezávisí na externím poli
- magnetizace volně přechází z 1 na 2. spin v rámci tzv. interakční sítě - koherence určitého spinu v zaplivaném systému se přenáší ke všem ostatním spinům v tomto systému

TOCSY spektrum versus COSY

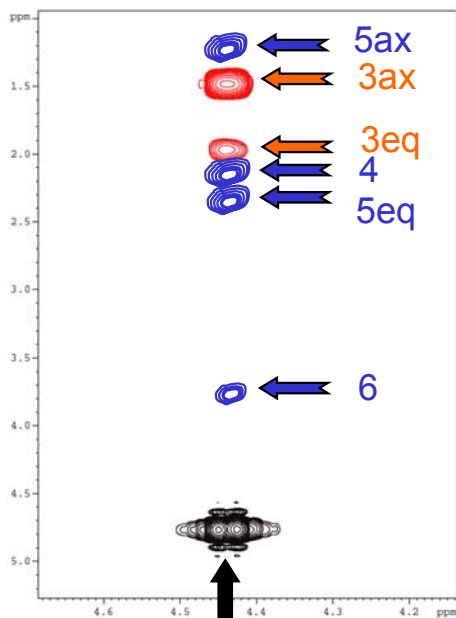


Využití TOCSY k přiřazení ¹H signálů pyranosy



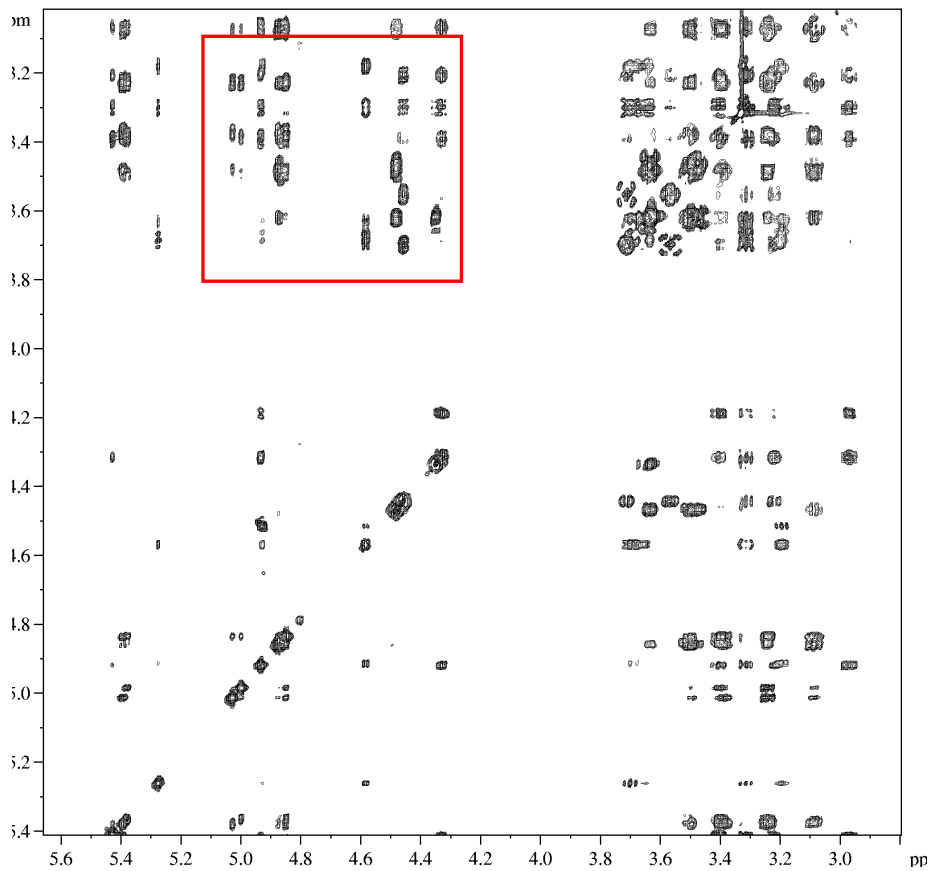
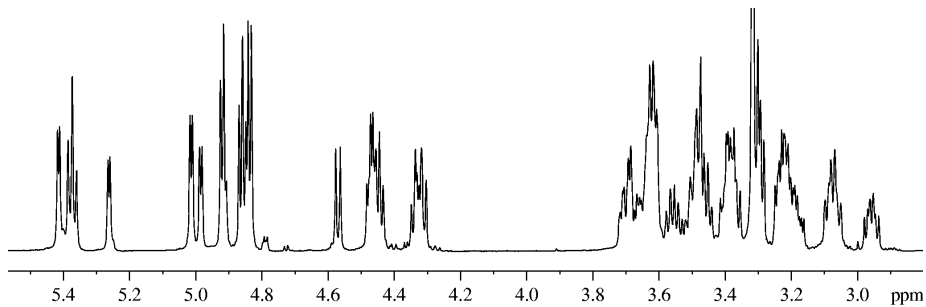
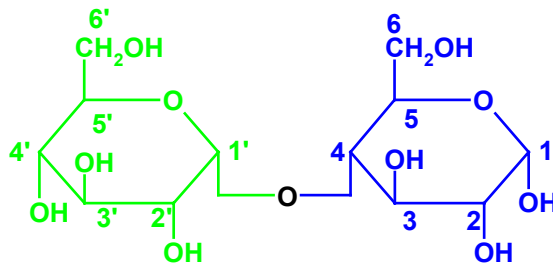
→ COSY přenos

→ TOCSY přenos



2

Využití TOCSY k přiřazení ^1H signálů maltosy



Využití TOCSY k přiřazení ^1H signálů maltosy

