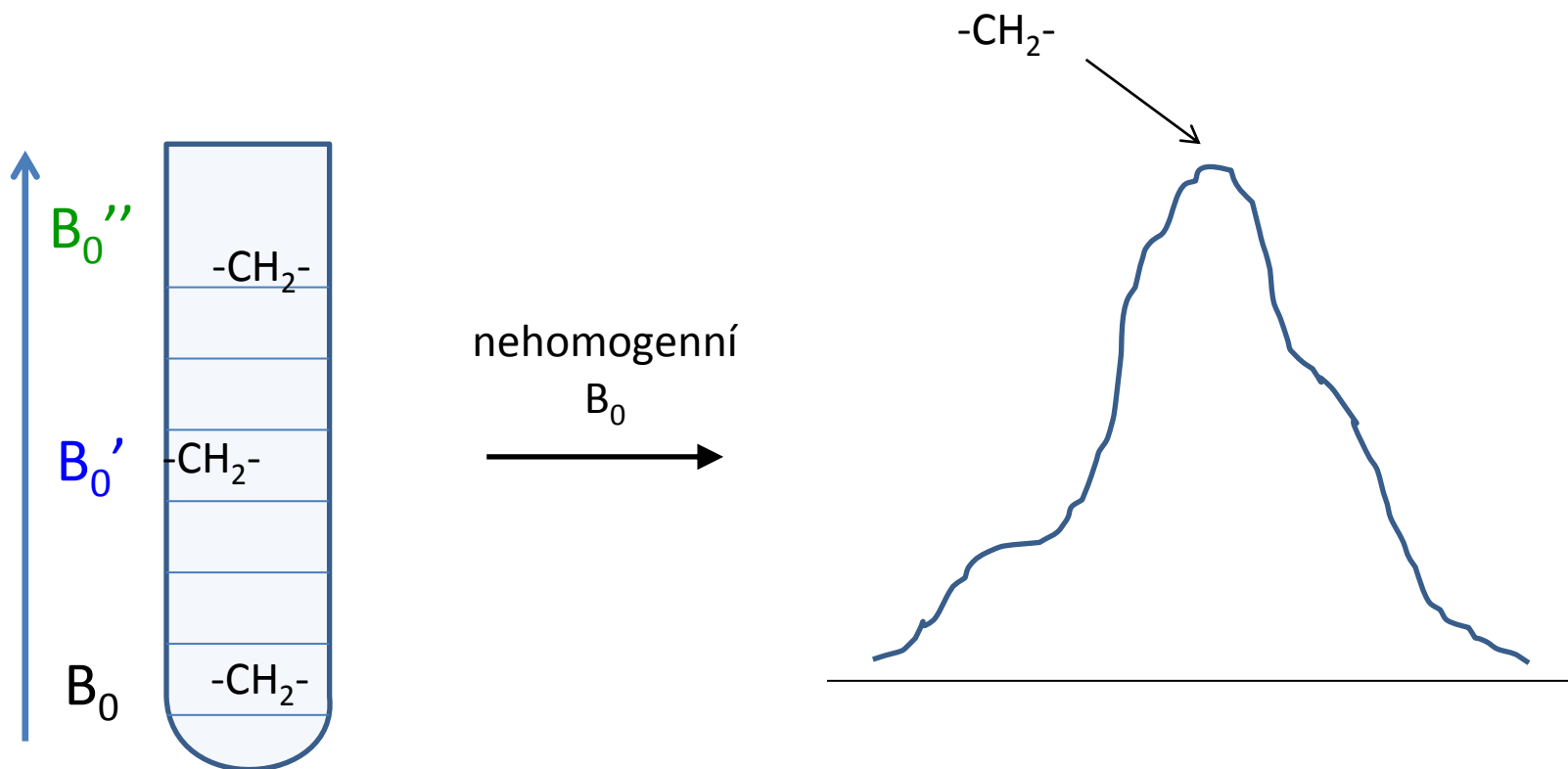


Nukleární magnetická rezonance

Řešení prostorové struktury molekul

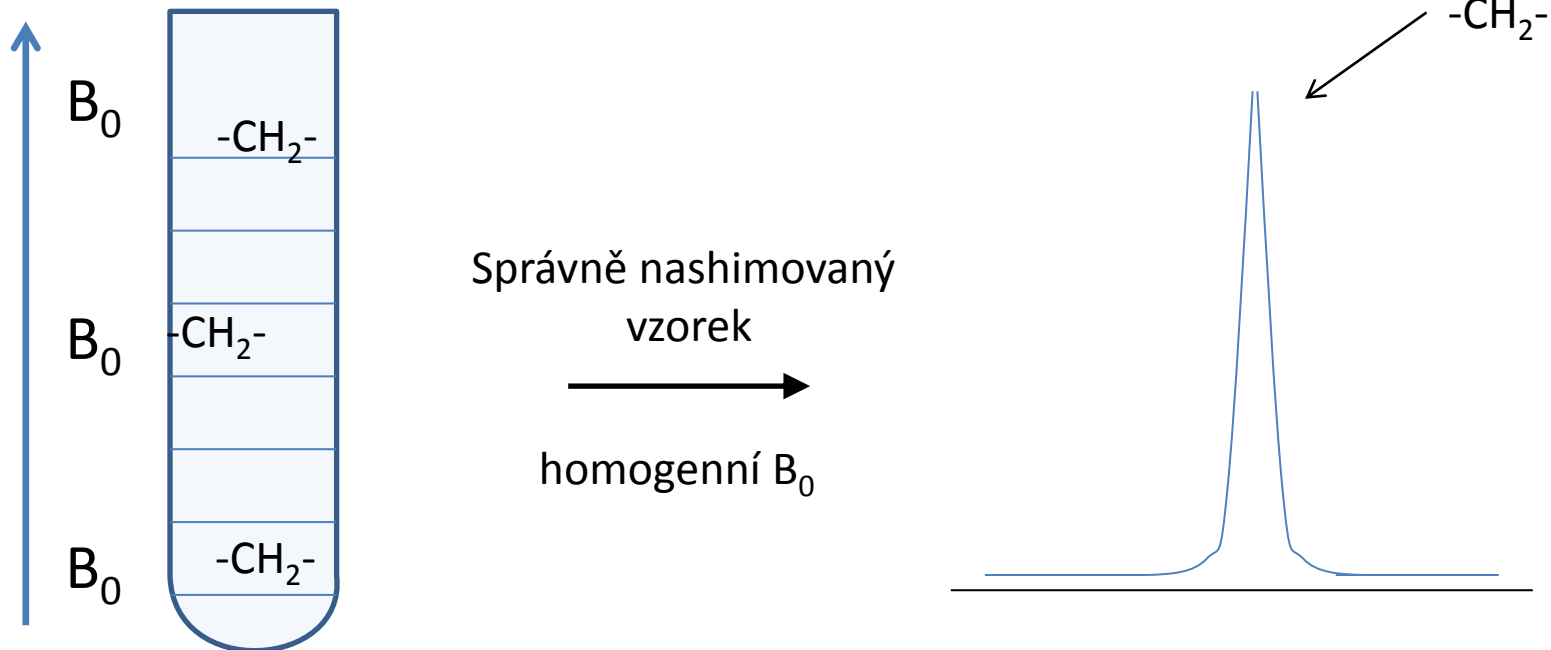
Homogenizace magnetického pole - shimování

- vliv okolí a nehomogenního vzorku - B_0 různé v jednotlivých částech vzorku – různé rezonanční frekv.



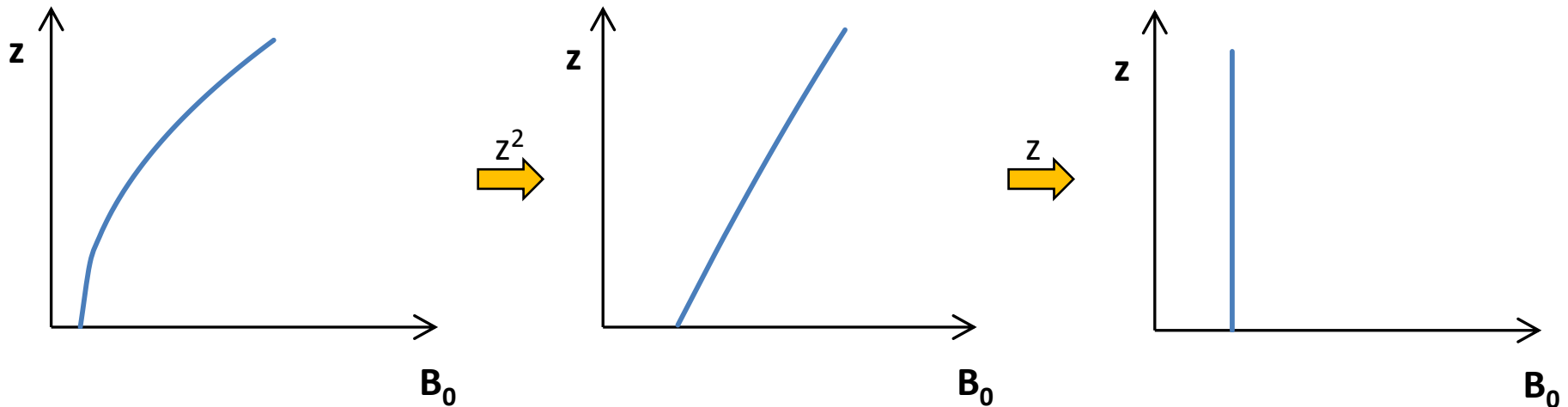
Homogenizace magnetického pole - shimování

- homogenní B_0 – shodné rezonanční frekvence pro stejné atomy, např. CH_2 skupina v EtOH.

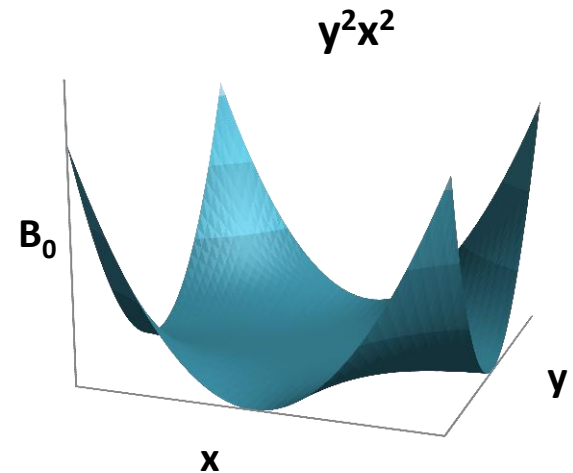
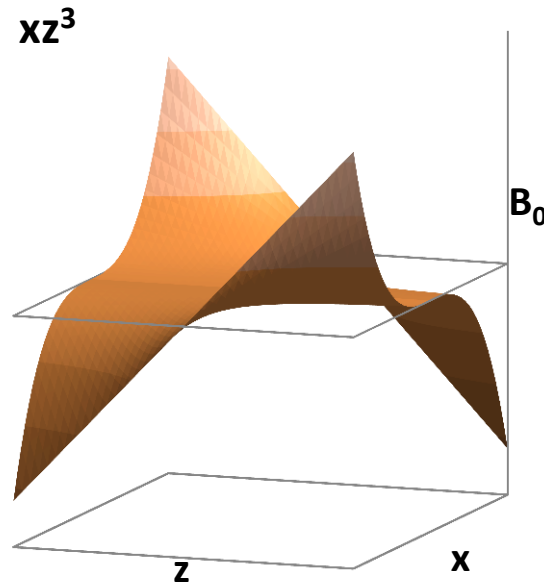
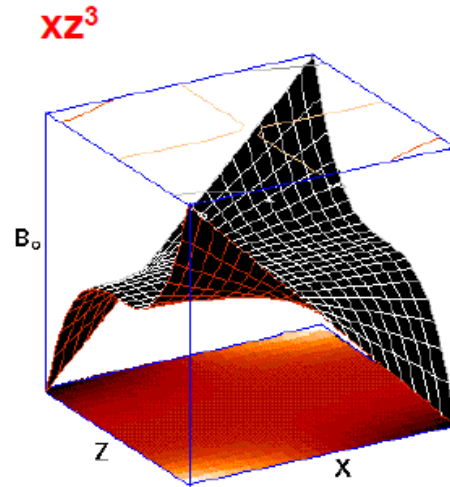
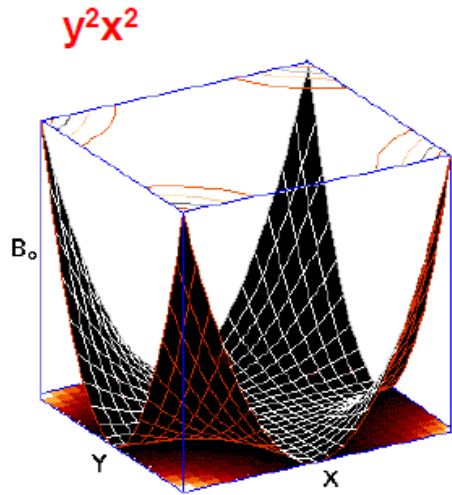


Homogenizace magnetického pole - shimování

- homogenita se docílí korekčními, tzv. shimovacími cívkami
- korekční cívky jsou umístěny kolem vzorku v různých směrech



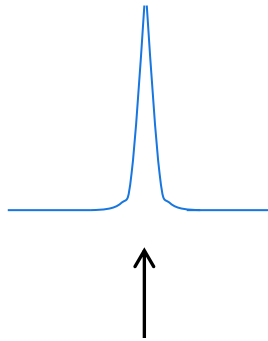
Homogenizace magnetického pole - shimování



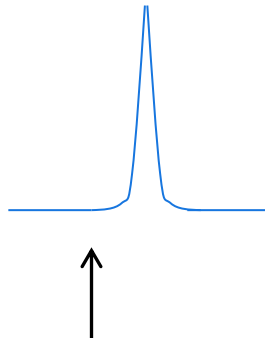
Stabilizace magnetického pole – lockování (“locking”)

- B_0 se mění v čase
- pro stabilizaci B_0 se používá tzv. field lock
- korekce B_0 podle změny polohy signálu ^2H

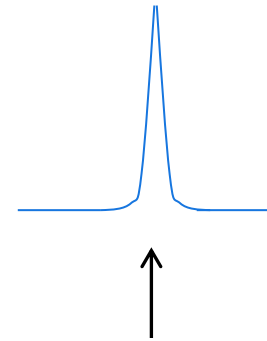
Stabilizace magnetického pole - lockování



rezonanční
pozice
deuteria



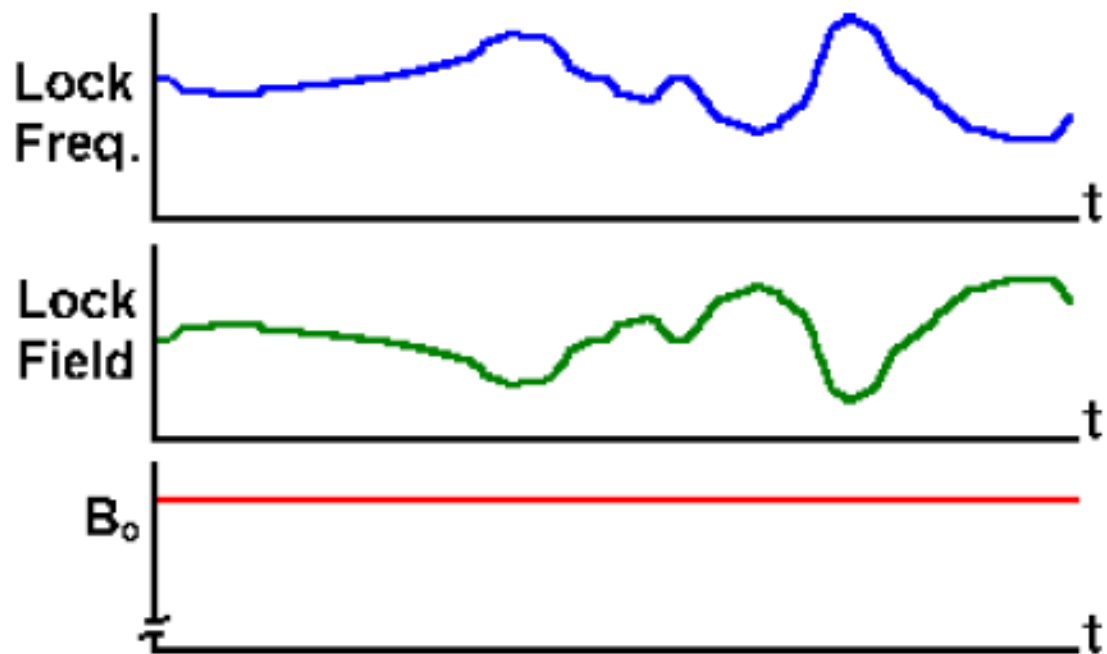
při změně
mag. pole
- změna
rezonanční
frekvence



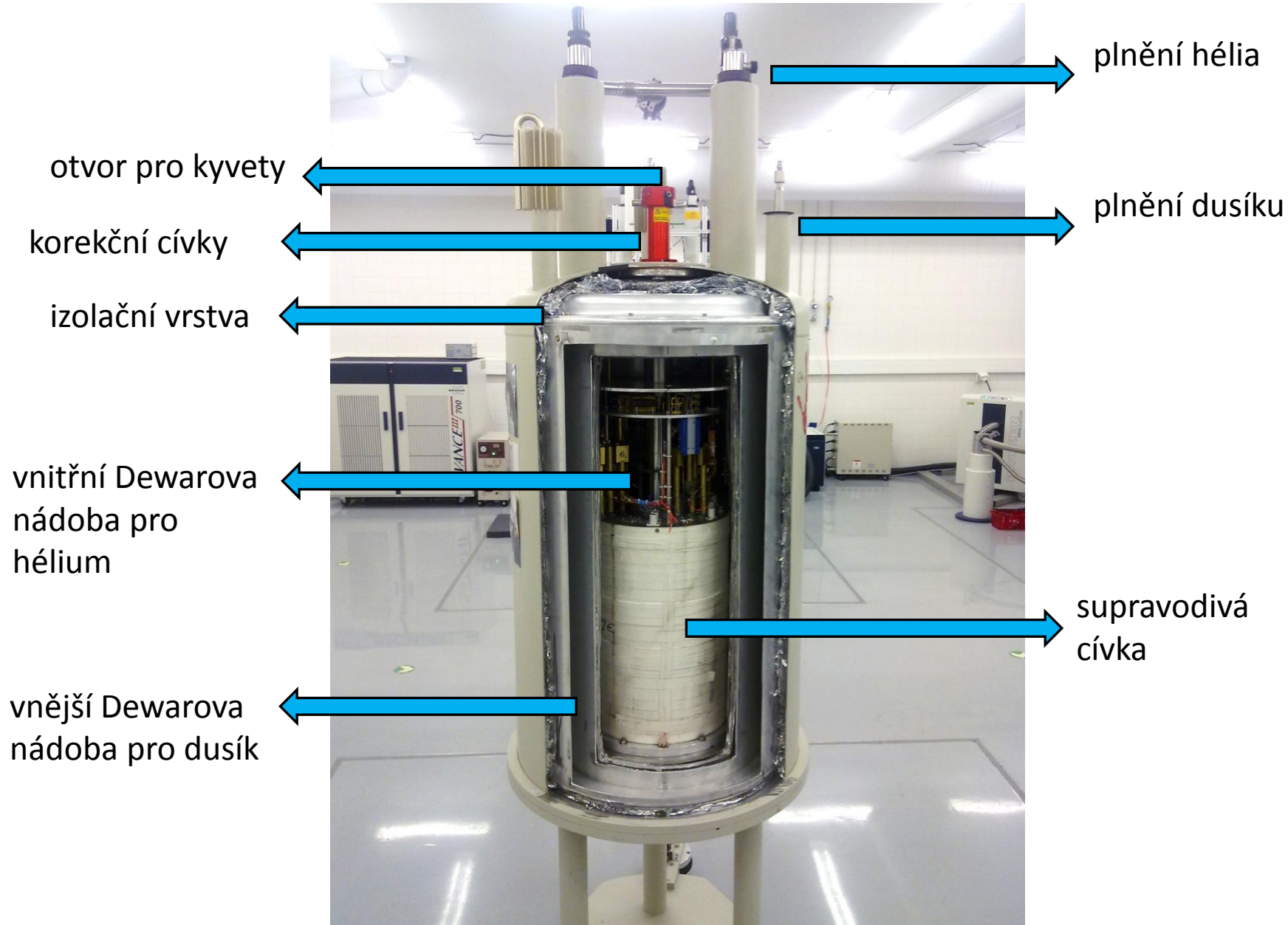
přístroj indukuje
přídavné pole v
opačném směru
a vrátí rezonanční
frekvenci na
původní hodnotu

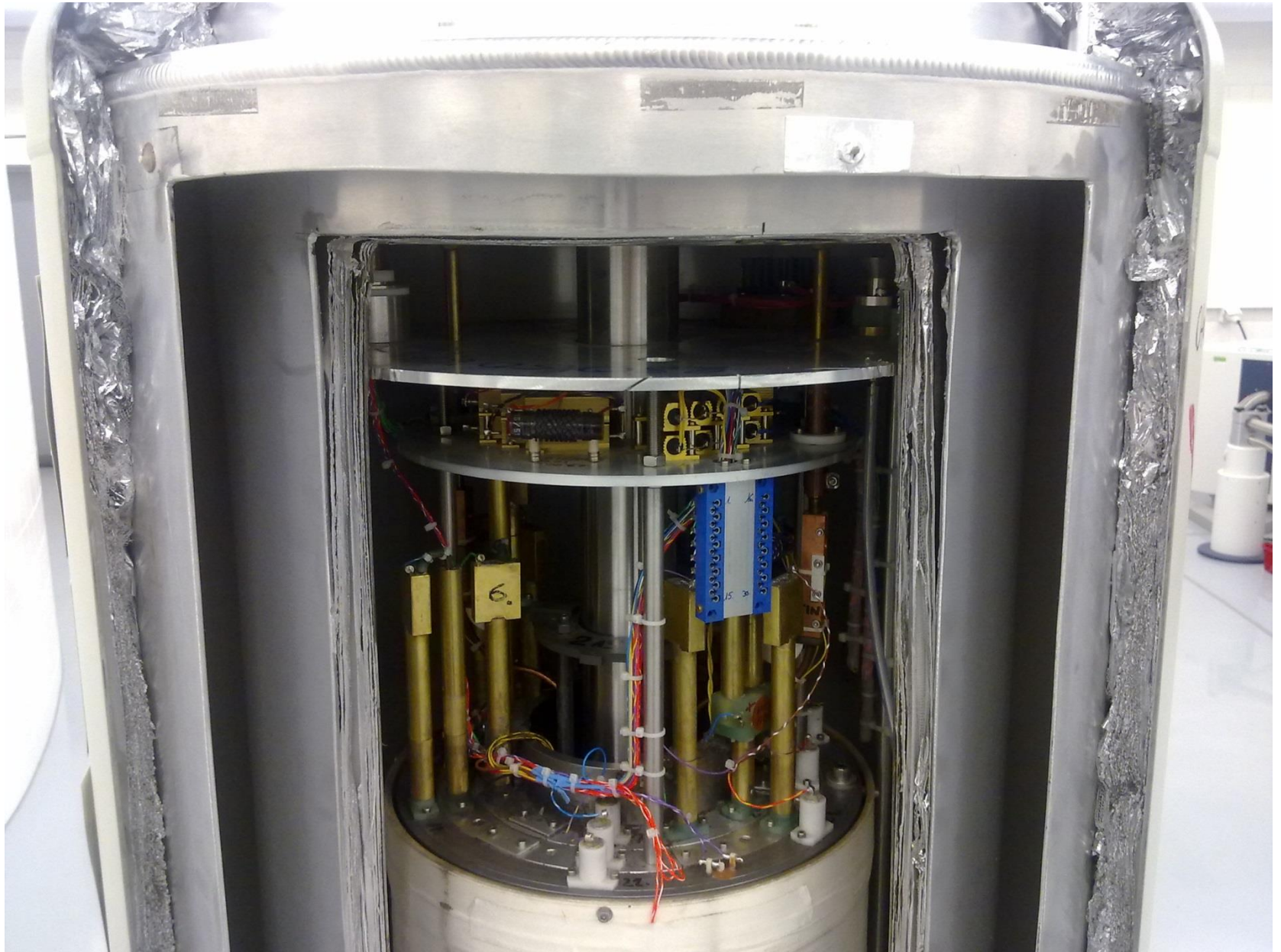
- pro měření ^2H , lockování na ^{19}F

Stabilizace magnetického pole – lockování (“locking”)



Průřez NMR spektrometrem





NMR kyvety

Klasické kyvety

- průměr: 1, 3, 5, 10 mm
- délka: ~ 20 cm
- objem vzorku pro 5 mm kyvetu 500-600 μl
- vyrobeny z borosilikátového skla

Klasické kyvety



Shigemi

- velikosti stejné jako klasické kyvety
- ~ poloviční objemy – 200-300 μl pro 5 mm
- vysoké dno, do kyvety se zasouvá pístek
- vyrobeny jsou z materiálu s podobnou magn. susceptibilitou jakou má roztok



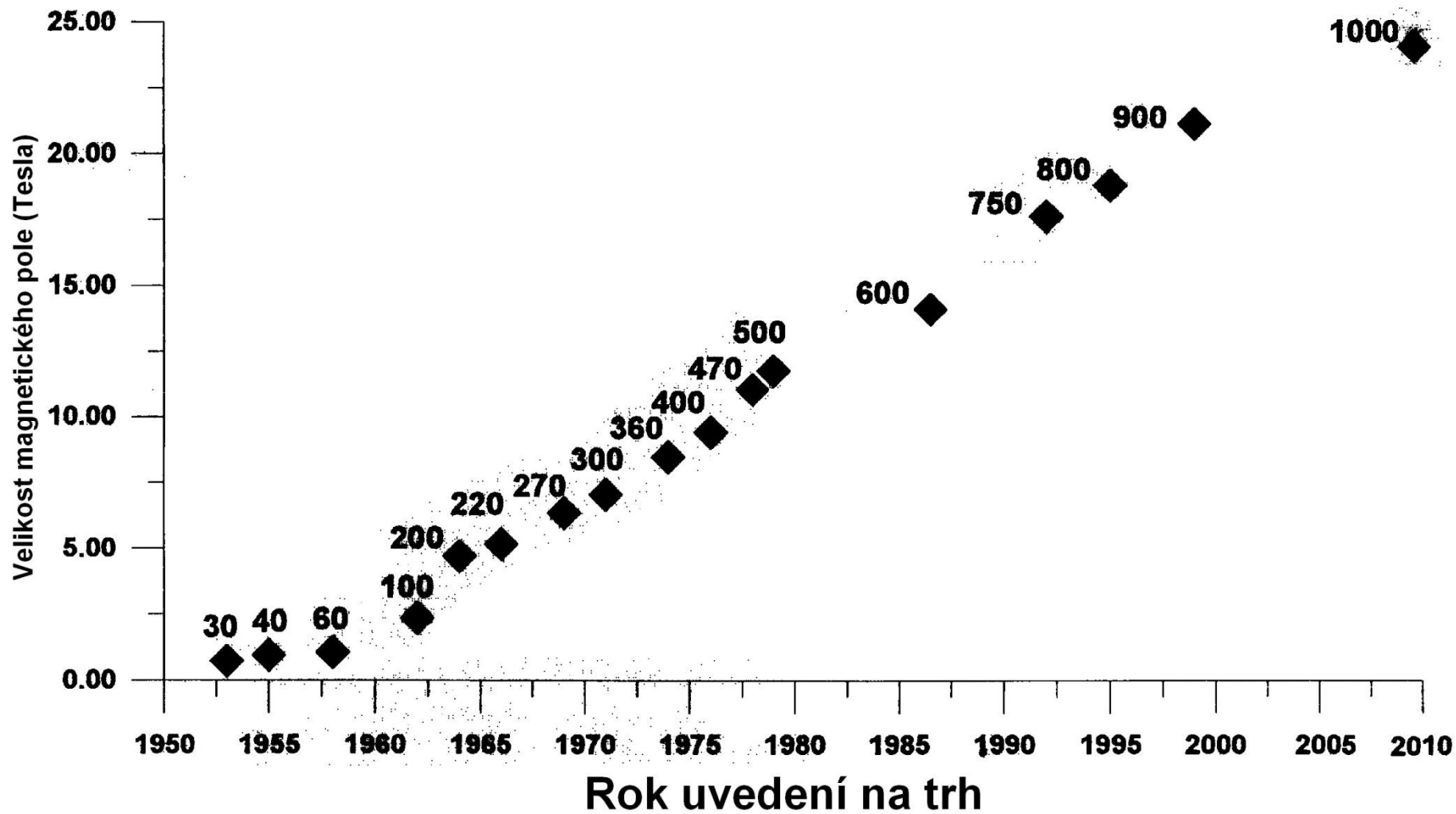
Shigemi kyveta

NMR sondy

- kyveta se vzorkem se pouští do sondy
- obsahuje cívky laděné na frekvenci jednoho nebo více jader při daném magnetickém poli
- další cívka zabezpečuje gradientní pulzy
- jsou konstruovány pro různou velikost NMR kyvet
- kryosondy – prostor cívek je chlazen asi na 20K → zvýšena citlivost cívky díky snížené úrovni tepelného šumu



Vývoj NMR spektrometrů



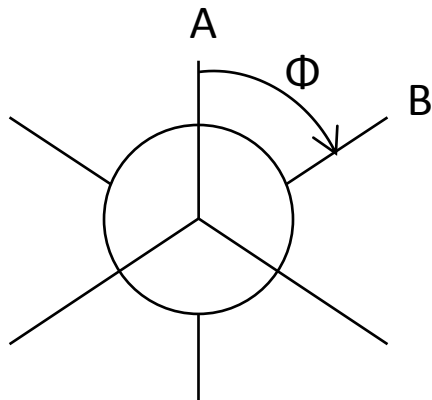
Řešení struktury

- Konstituce
 - vzájemné vázání atomů
 - H-H interakce přes 2-4 vazby – COSY, TOCSY
 - H-C jednovazebné interakce – HETCOR, HSQC, HMQC
 - H-C interakce přes 2-4 vazby – LR-HETCOR, HMBC
 - C-C jednovazebné interakce – INADEQUATE
- Konfigurace, konformace
 - konfigurace na dvojných vazbách
 - určení dihedrálních úhlů
 - H-X-Y-H interakční konstanty – dihedrální úhly
 - NOE – meziatomové vzdálenosti
 - chemický posun

Řešení struktury

Dihedrální úhly

- Karplusova rovnice: ${}^3J_{IS} = A \cdot \cos^2 \Phi + B \cdot \cos \Phi + C$
- velikost J -interakční konstanty závisí m.j. na torzním úhlu mezi interagujícími atomy
- konstanty A, B, C závisí na typu interagujících atomů

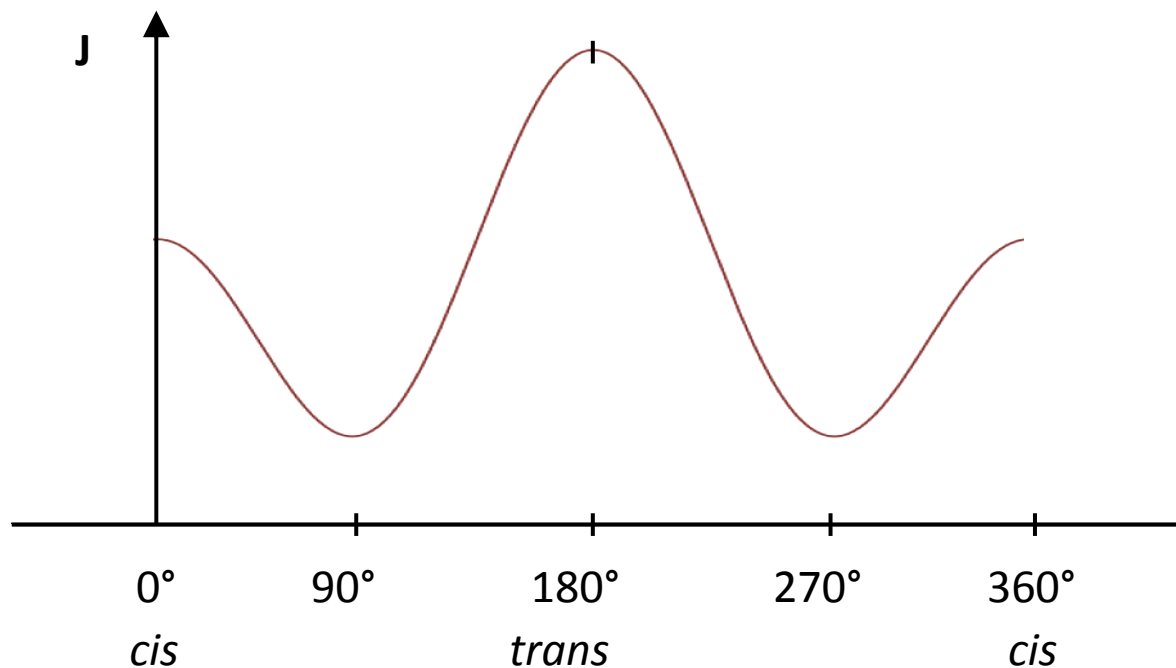


J-konstanta	rozsah hodnot (Hz)
${}^1J({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C})$	125-250
${}^1J({}^{13}\text{C}, {}^{13}\text{C})$	30-80
${}^1J({}^{15}\text{N}, {}^1\text{H})$	70-110
${}^1J({}^{15}\text{N}, {}^{13}\text{C})$	2-20
${}^2J({}^1\text{H}, {}^1\text{H})$	-20-5
${}^2J({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C})$	-10-15
${}^3J({}^1\text{H}, {}^1\text{H})$	0-18
${}^3J({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C})$	1-10

Studium konformací

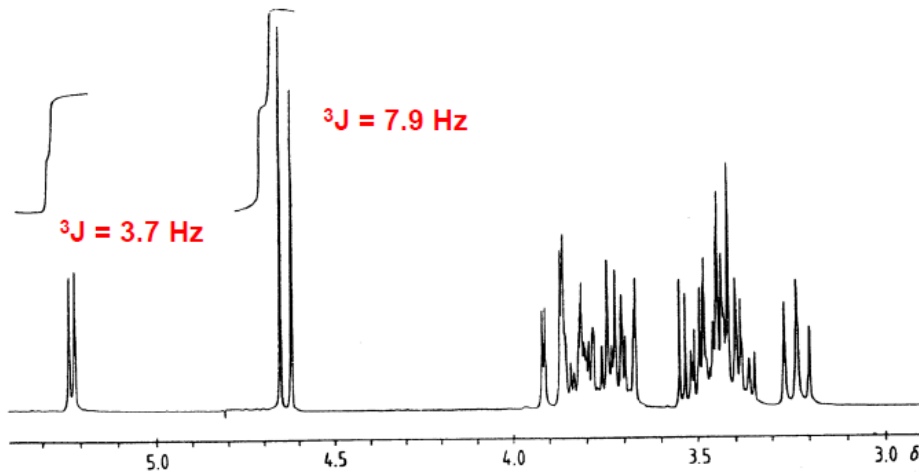
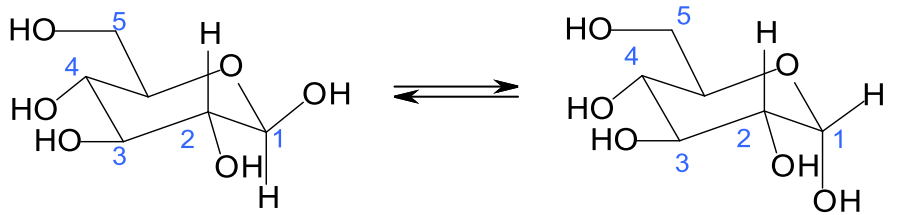
- Karplusova rovnice
 - pro popis konformace molekuly
 - umožňuje získat hodnoty dihedrálních úhlů

$${}^3J_{IS} = A \cdot \cos^2 \Phi + B \cdot \cos \Phi + C$$

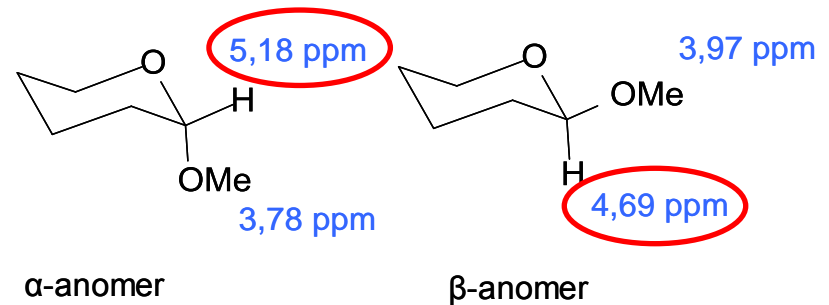


Studium konformací

relativní zastoupení α a β anomeru
D-glukopyranosy v roztoku



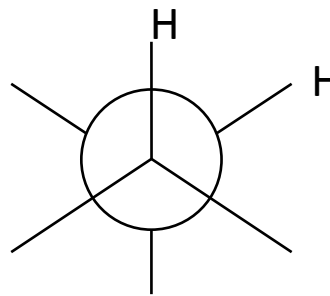
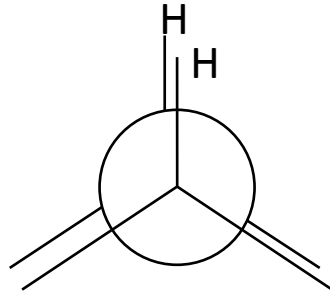
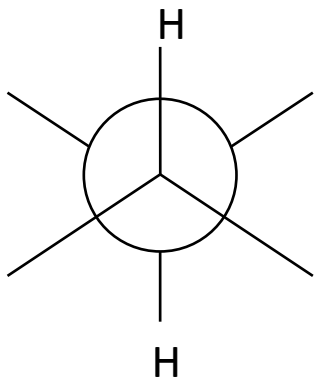
anisotropní efekt anomerních
protonů



Dihedrání úhly

1,2-disubstituované ethany:

$$J(\textit{trans}) > J(\textit{cis}) > J(\textit{gauche}) > J(90^\circ) \approx 0$$

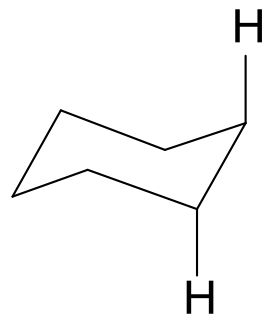
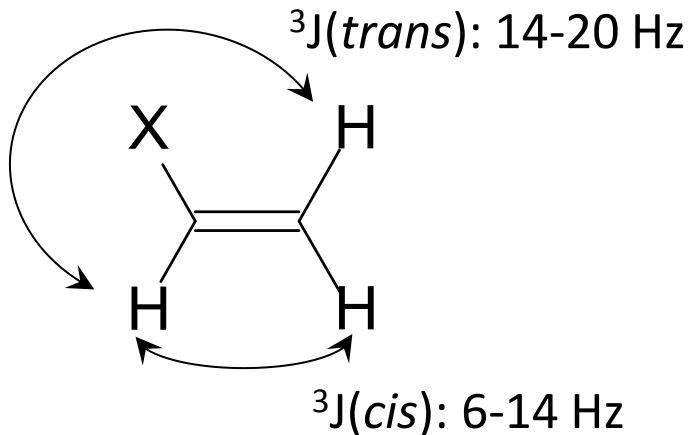


alkeny:

$$J(\textit{trans}) > J(\textit{cis})$$

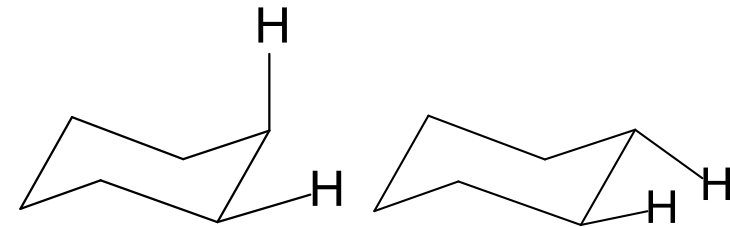
cyklohexan v židličkové konformaci:

$$J(\textit{aa}) > J(\textit{ae}) \approx J(\textit{ee})$$



$$J(\textit{aa}): 10-16 \text{ Hz}$$

$$\Phi \approx 180^\circ$$

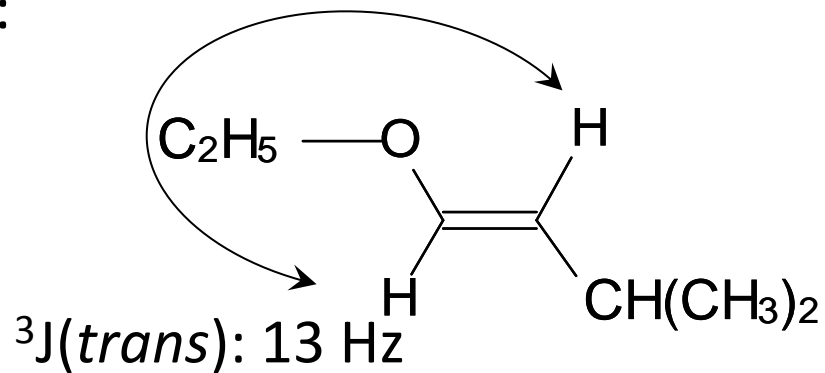
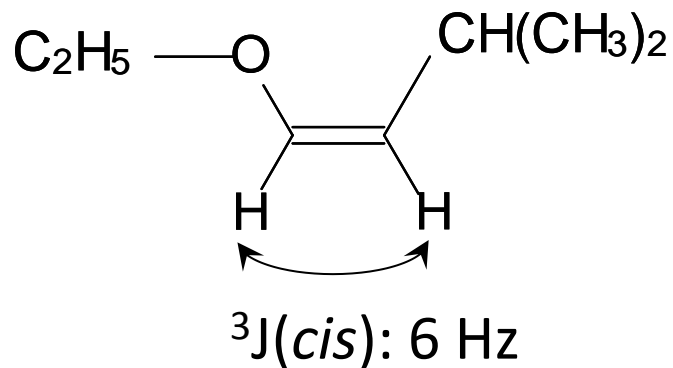


$$J(\textit{ae}) \approx J(\textit{ee}): 3-5 \text{ Hz}$$

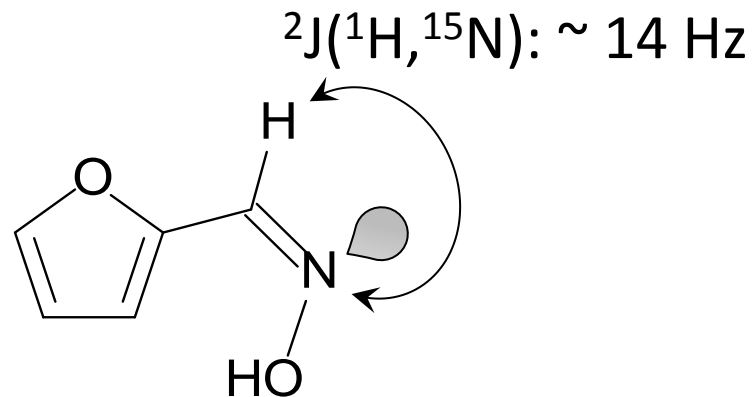
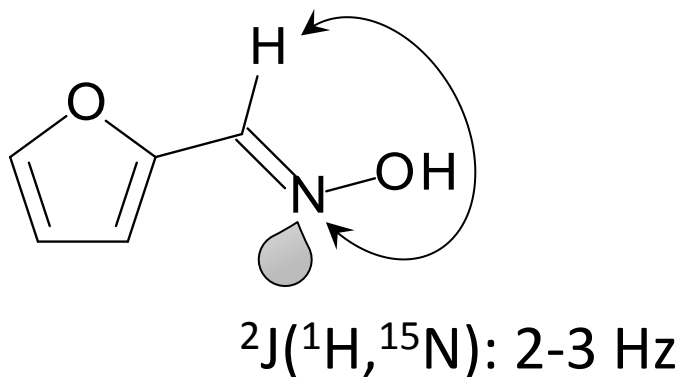
$$\Phi \approx 60^\circ$$

Dihedrání úhly

konfigurace na dvojn  vazb :

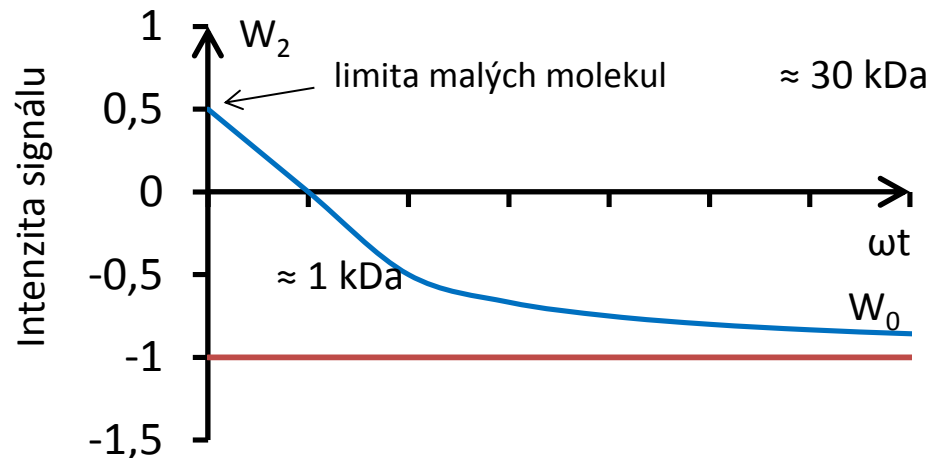


konfigurace na dus ku s voln m elektronov m p rem:

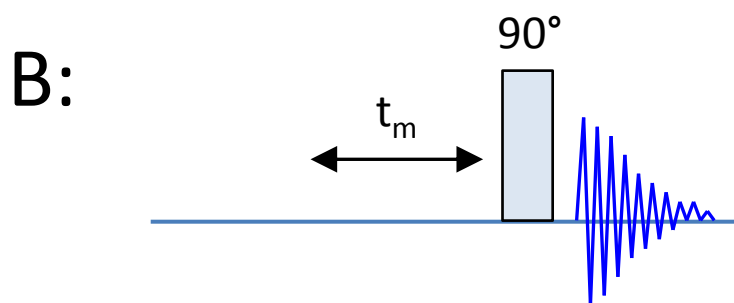
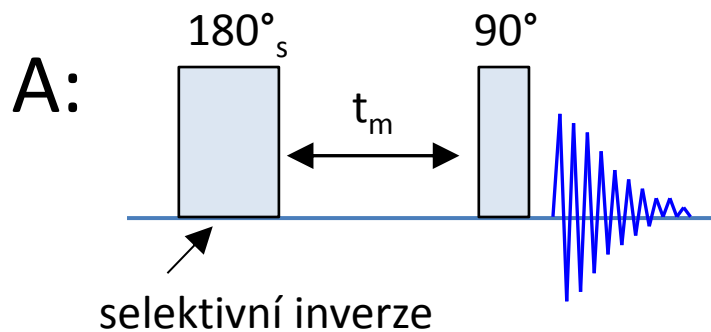
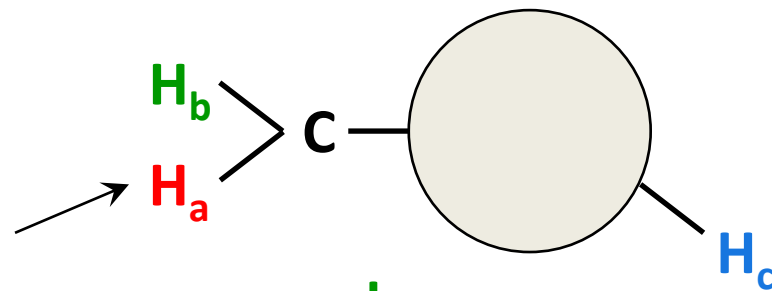


Meziatomové vzdálenosti

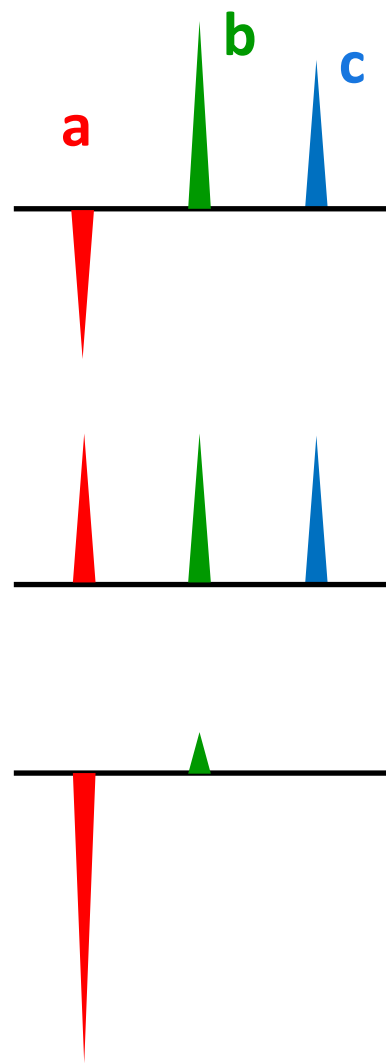
- využití NOE interakcí
- NOE klesá se šestou mocninou meziatomových vzdáleností ($\text{NOE} \sim 1/r^6$)
- pro malé, rychle rotující molekuly: $\text{NOE} > 1$
- pro velké, pomalé molekuly, ve viskózních rozpouštědlech: $\text{NOE} < 1$



Měření NOE

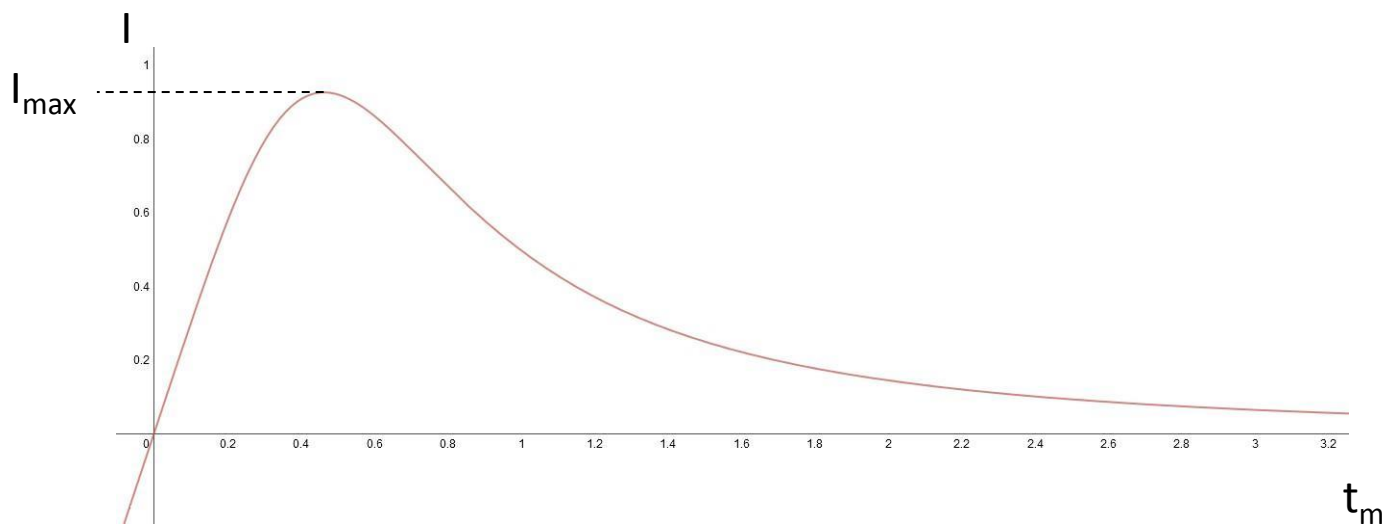


diferenční spektrum A-B:



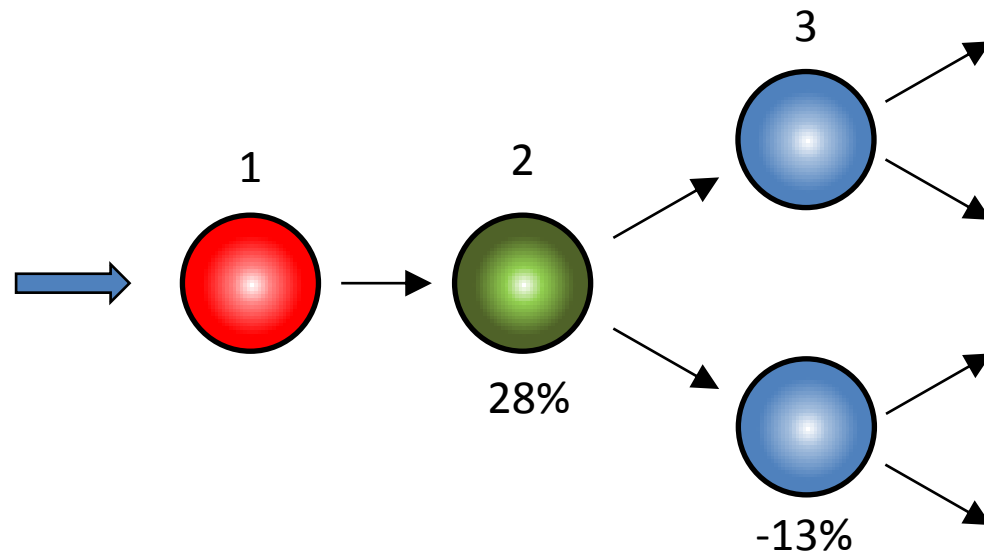
NOE výstavbová křivka

- intenzita NOE závisí na směřovacím čase t_m
- měřením NOE při různých časech t_m získáme výstavbovou křivku
- čím delší je t_m , tím je NOE menší v důsledku podélné relaxace a spinové difuze



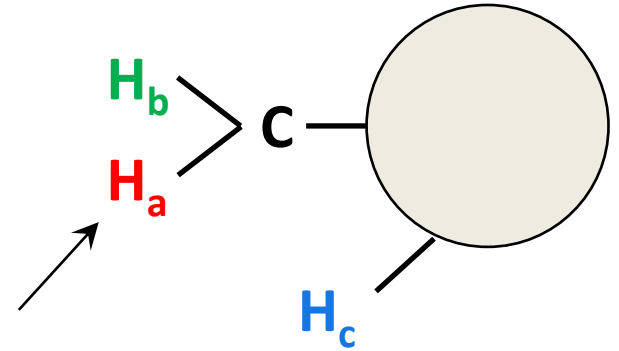
Spinová difuze

- u sousedících spinů ve vzorku dochází ke křížové relaxaci
- ozáření jádra 1 indukuje pozitivní NOE na jádru 2 a dále negativní NOE u jádra 3



Výpočet vzdálenosti

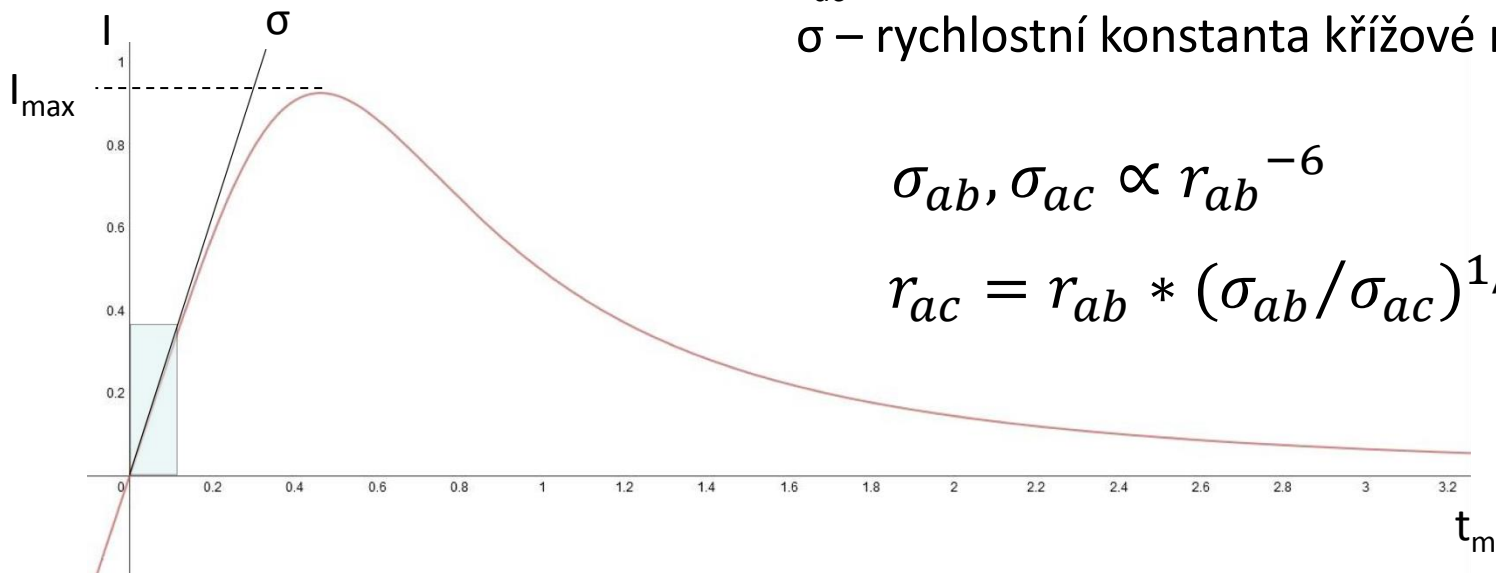
- směrnice σ výstavbové křivky v bodě 0 – rychlostní konstanta křížové relaxace
- nutné zvolit vhodné t_m , aby ještě nedocházelo ke spinové difuzi



r_{ab} – známa, referenční vzdálenost

r_{ac} – měřená neznámá vzdálenost

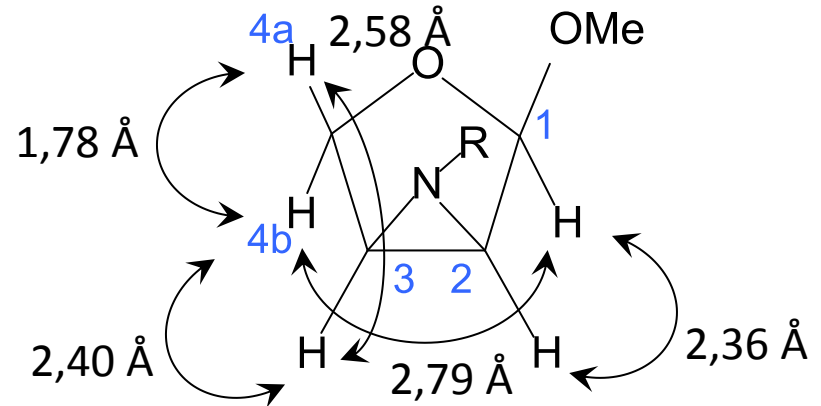
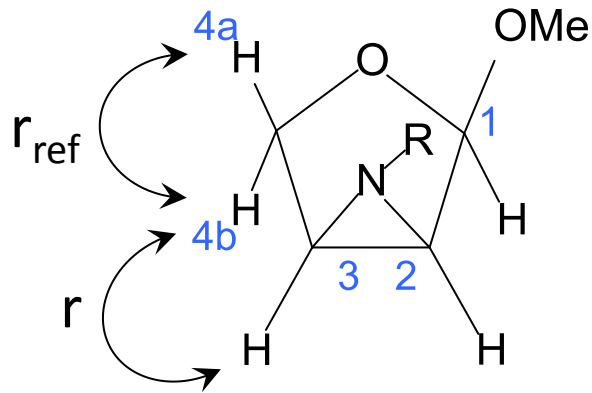
σ – rychlostní konstanta křížové relaxace



$$\sigma_{ab}, \sigma_{ac} \propto r_{ab}^{-6}$$

$$r_{ac} = r_{ab} * (\sigma_{ab} / \sigma_{ac})^{1/6}$$

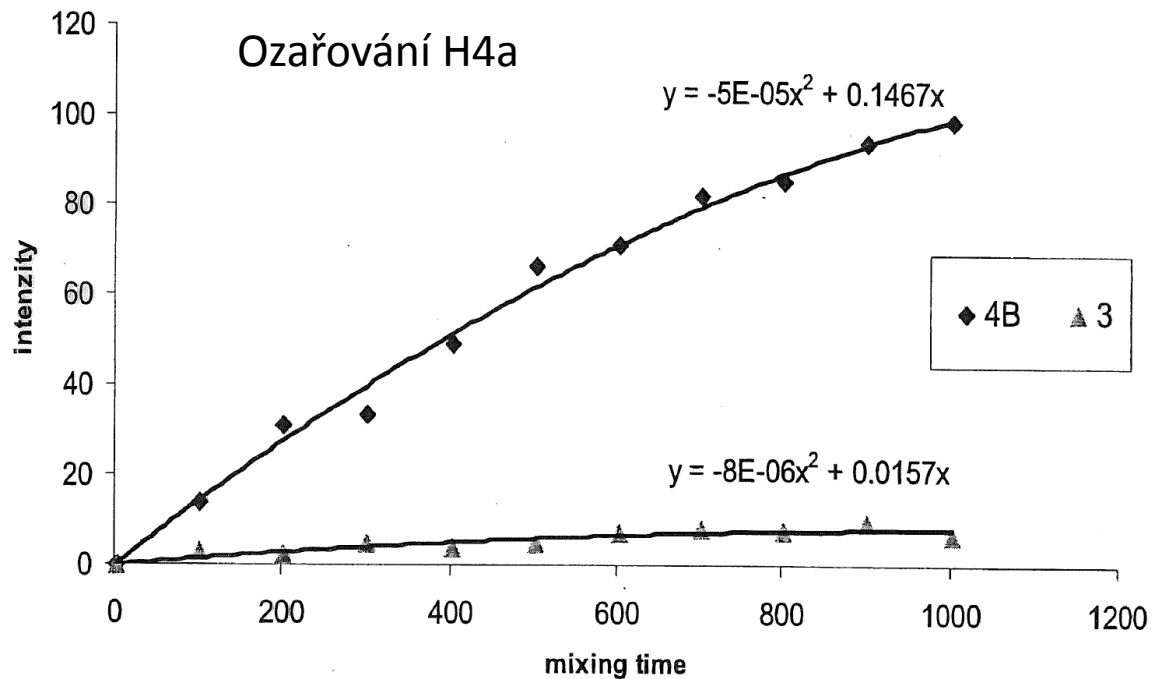
Výpočet vzdálenosti



$$\sigma \propto r^{-6}$$

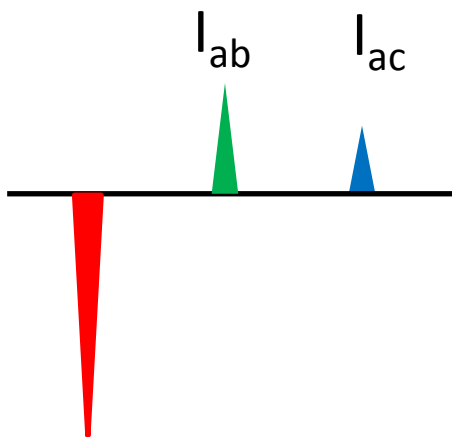
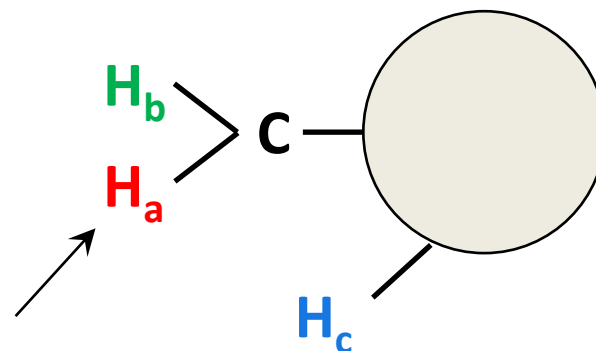
$$\sigma_{ref} \propto r_{ref}^{-6}$$

$$r = r_{ref} * (\sigma_{ref}/\sigma)^{1/6}$$



Výpočet vzdálenosti

- zjednodušený přístup na základě intenzit signálů
- zjištění intenzity NOE
 - integrace
 - výška signálu (při stejné pološířce)
- $r_{ab} = r_{ref}$



$$I_{ab} \propto r_{ab}^{-6}$$
$$I_{ac} \propto r_{ac}^{-6}$$

$$r_{ac} = r_{ref} * (I_{ac}/I_{ref})^{1/6}$$

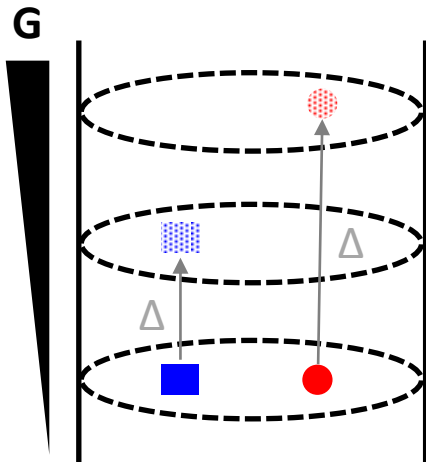
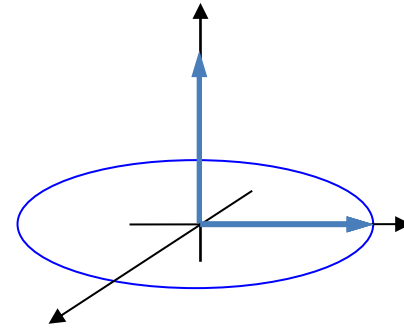
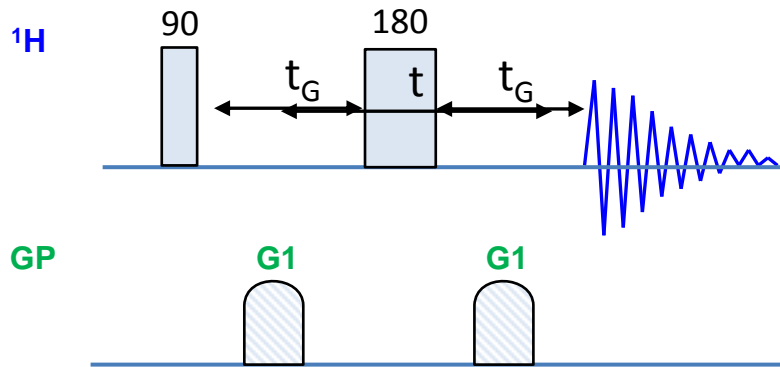
Relativní citlivost NMR experimentů

1D experimenty	Množství vzorku (mg)	2D experimenty	Množství vzorku (mg)
^1H	0,004	^1H - ^1H COSY	0,5
^{13}C { ^1H }	4	delayed COSY	1
^{13}C DEPT	5	phase-sensitive COSY	1
1D ^{13}C - ^{13}C INADEQUATE	75	HETCOR	10
		long-range HETCOR	20
		HSQC, HMQC	2
		HMBC	4
		NOESY	8
		homonuclear 2D <i>J</i> -resolved	1
		heteronuclear 2D <i>J</i> -resolved	40
		2D ^{13}C - ^{13}C INADEQUATE	300

Přibližně pro 12ti hodinové měření na 400 MHz spektrometru

DOSY

Diffusion-Ordered Spectroscopy



$$I = I_0 \exp\left(\frac{-2\tau}{T_2} - (\gamma\delta G)^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right)$$

