

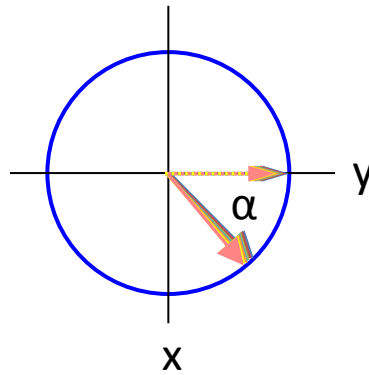
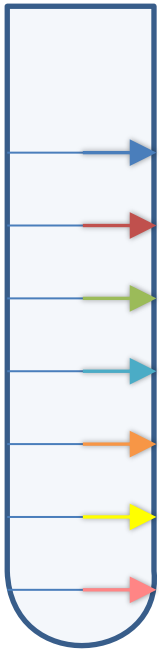
Nukleární magnetická rezonance

Gradientní NMR spektroskopie

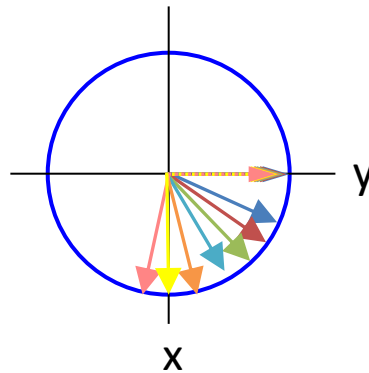
Selekce signálů

- homogenita magnetického pole
 - kdyby nebylo magnetické pole homogenní, vykazovala by jádra stejného typu v různých pozicích vzorku rozdílné precesní frekvence a tím i rozdílné chemické posuny (rozšíření signálu)
- homogenita je nastavena cívkami kolem vzorku – upravují pole v osách x, y, z a jejich kombinacích (viz. lekce 10)
- magnetické pole může v čase fluktuovat => je potřeba ho zastabilizovat – lokování “locking” např. na signál deuteria, které je přítomné v nějakém množství v rozpouštědle (např. D₂O)
- řízená a přesně definovaná nehomogenita může být využita k selekci signálu

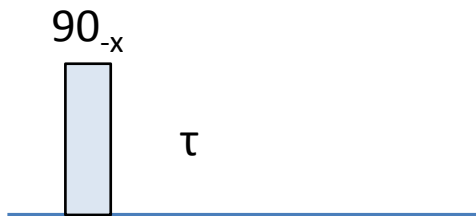
Gradients

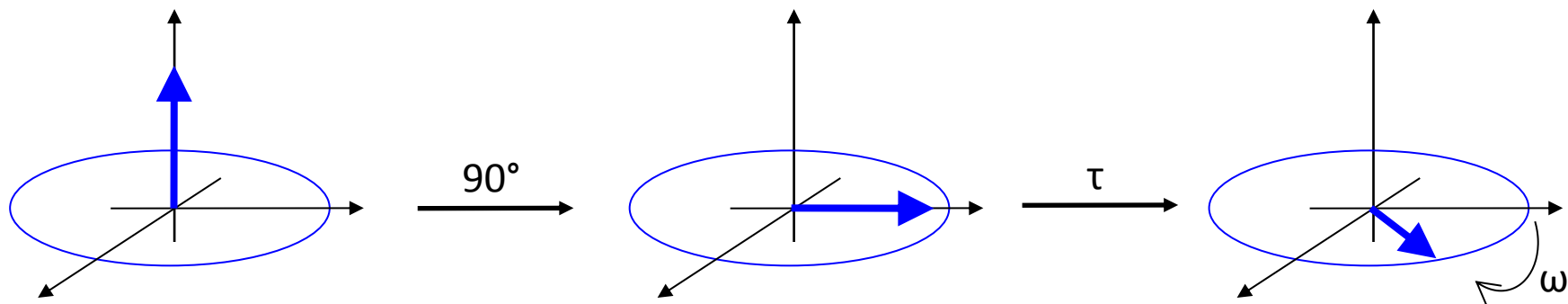
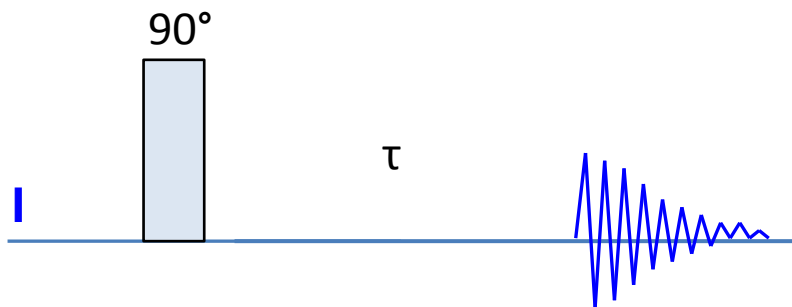


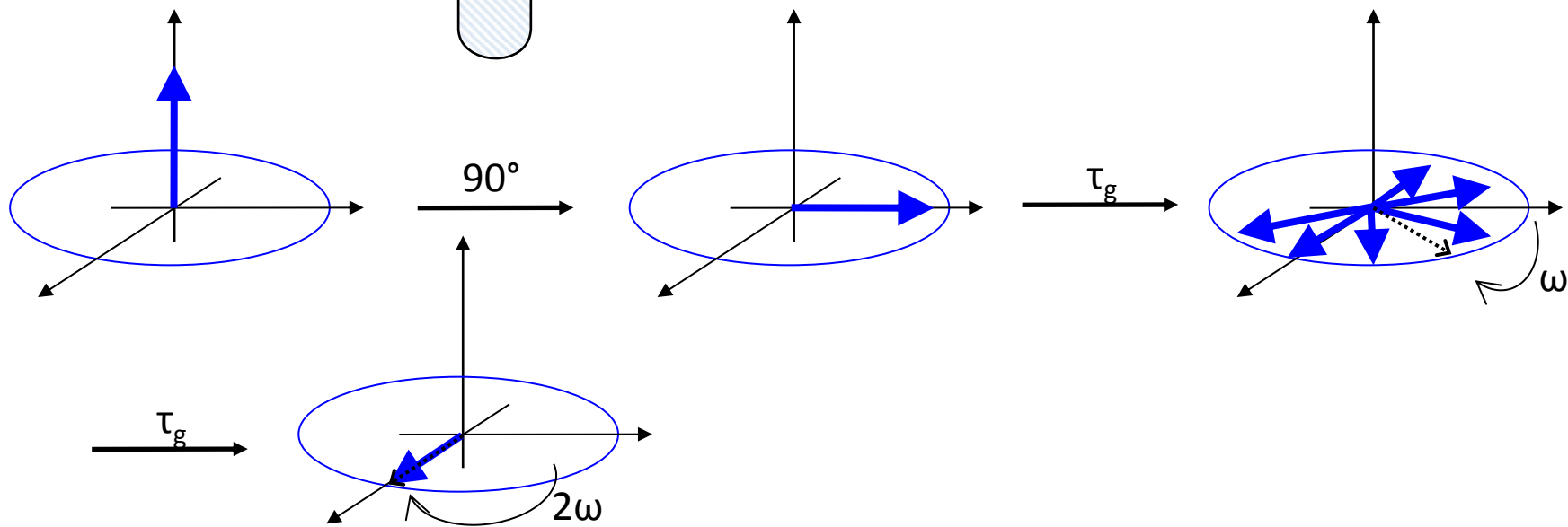
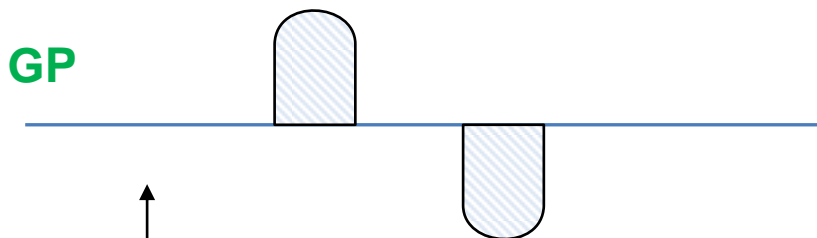
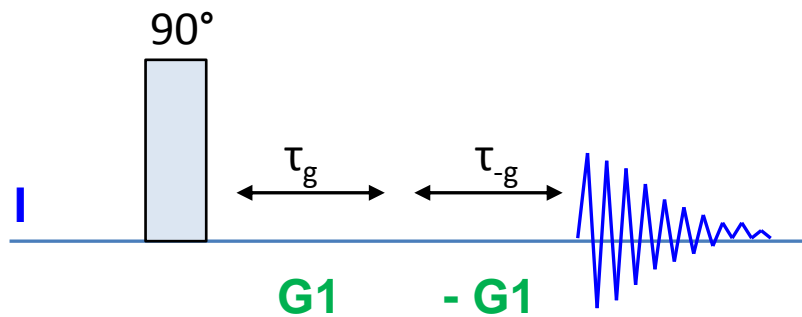
- v případě homogenního magnetického pole se vektory reprezentující různé pozice v kyvetě posunou za čas τ o stejný úhel α (stejná frekvence)

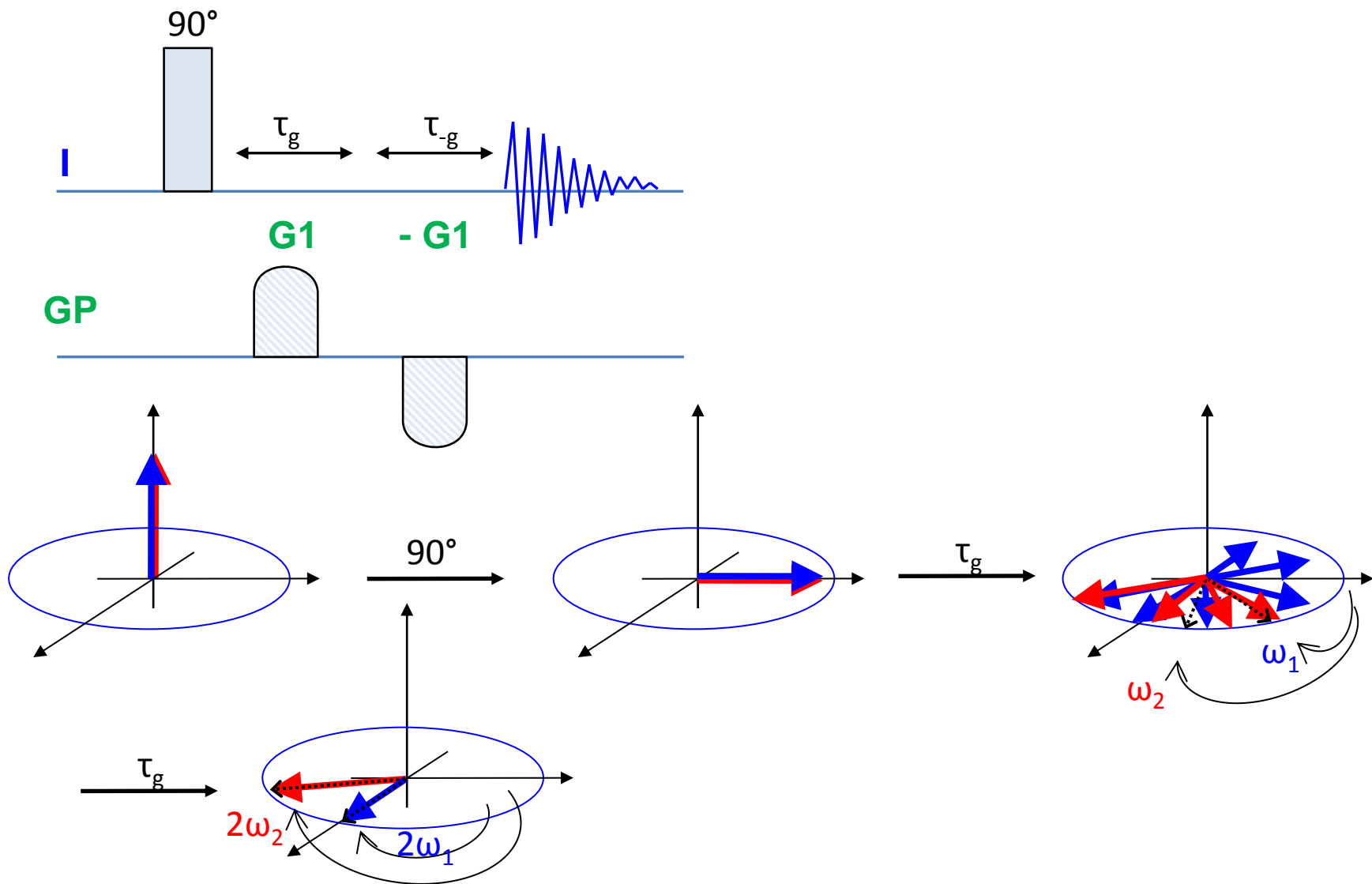


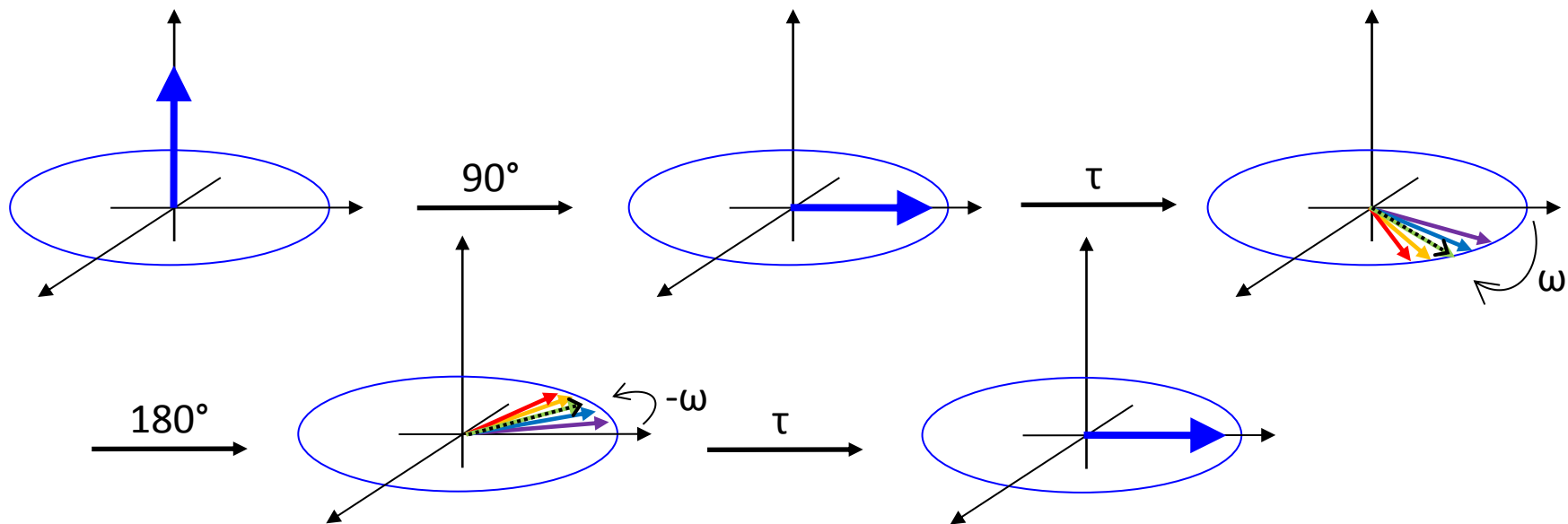
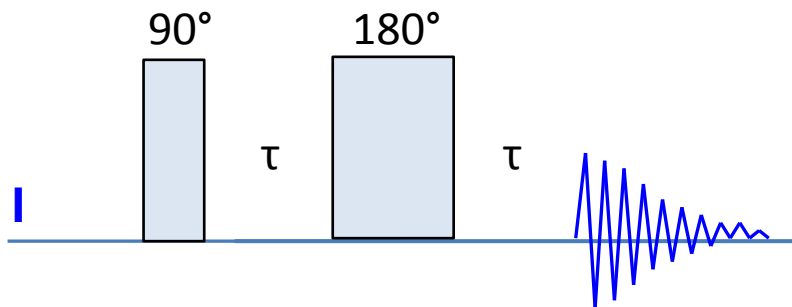
- v případě nehomogenního mag. pole se vektory posunou o různé úhly (různá frekvence)

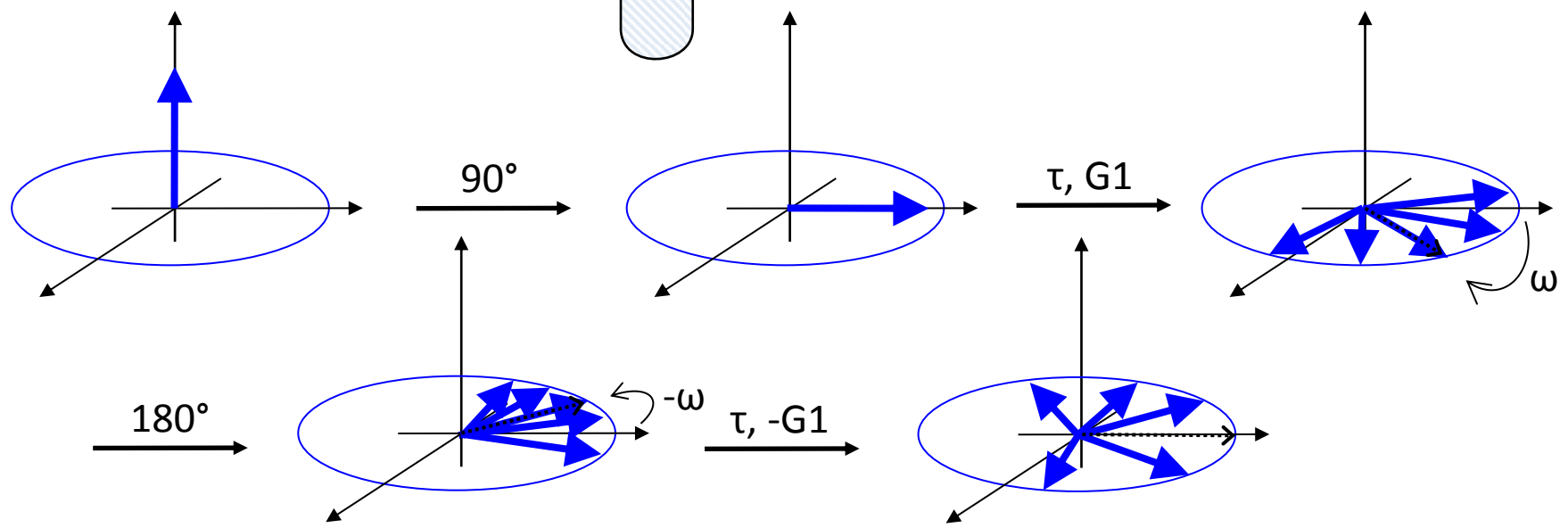
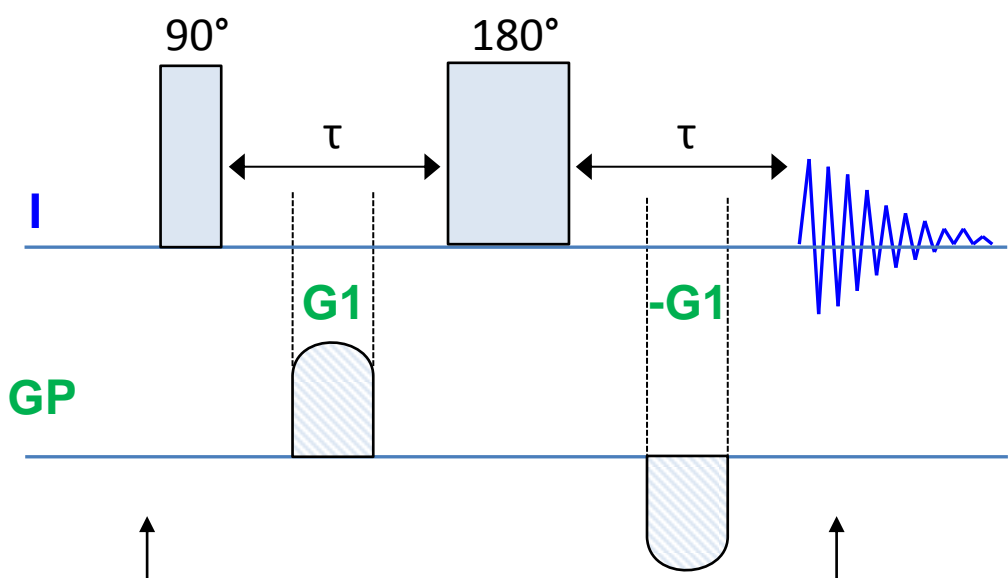


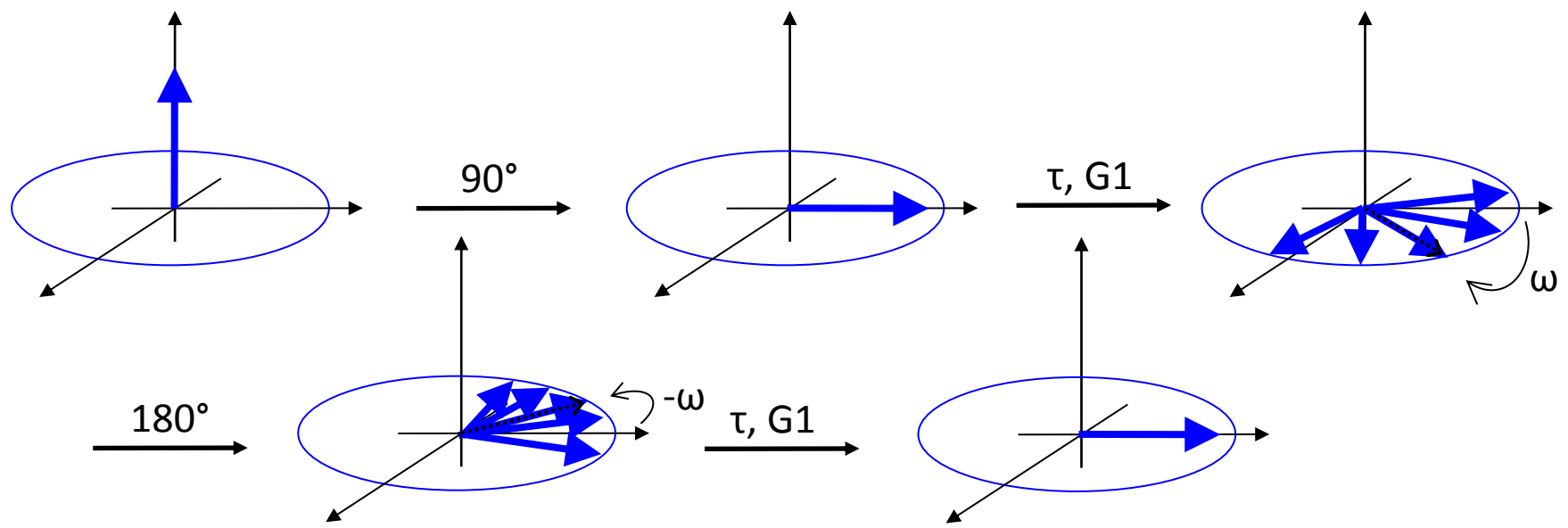
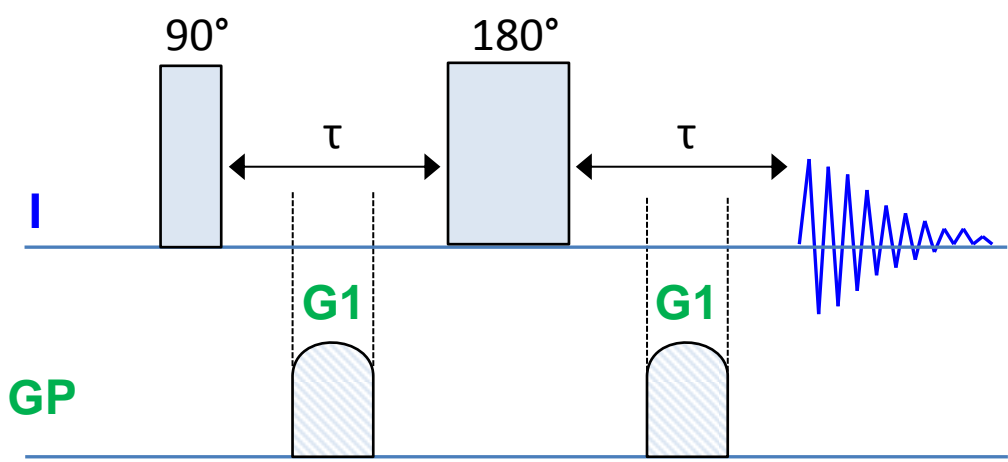








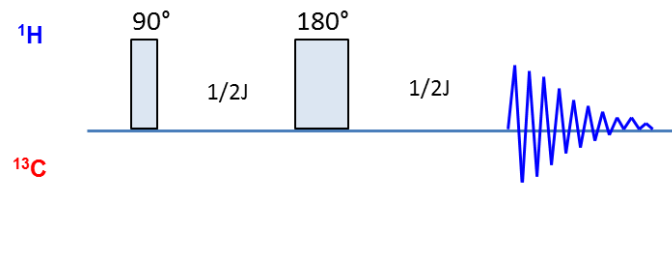
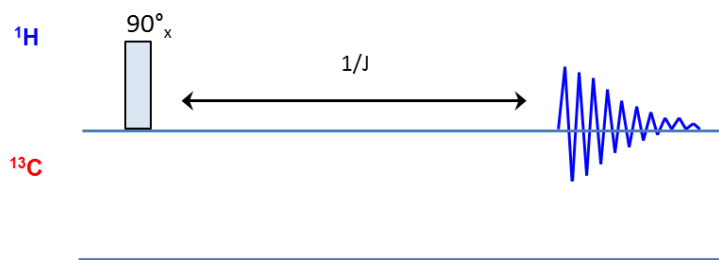




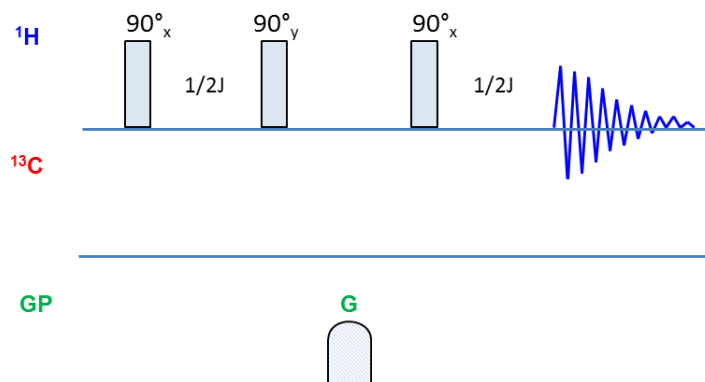
Selekce signálů

- výběr signálu páru ^1H – ^{13}C a eliminace nebo rozfázování ^1H – ^{12}C :

– fázové cykly



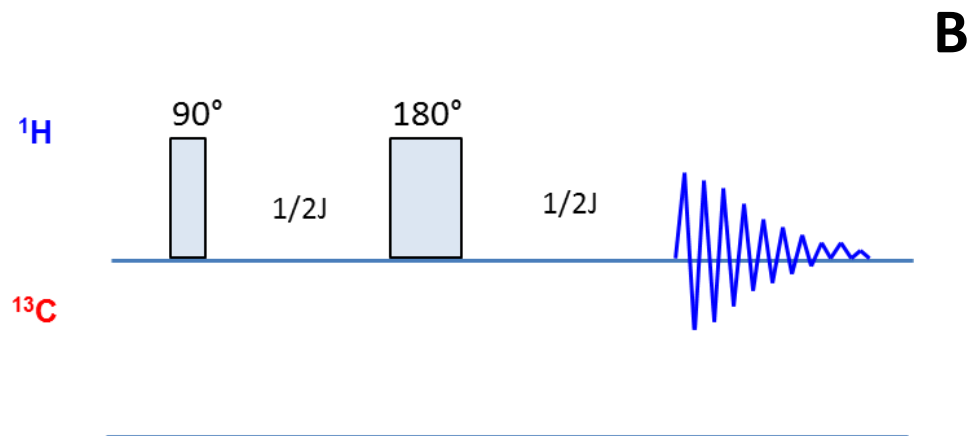
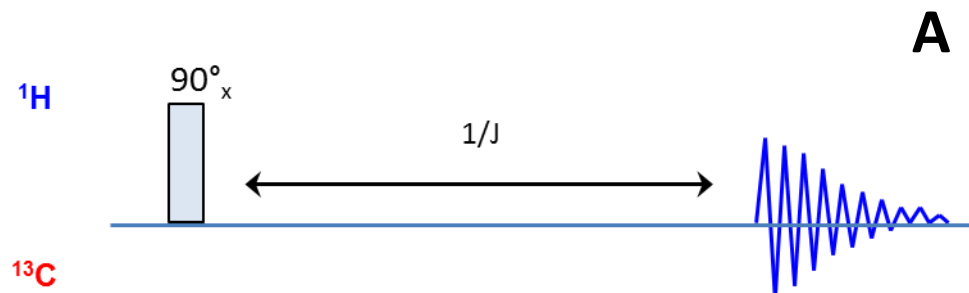
– pulzní gradient magnetického pole



Selekce signálů

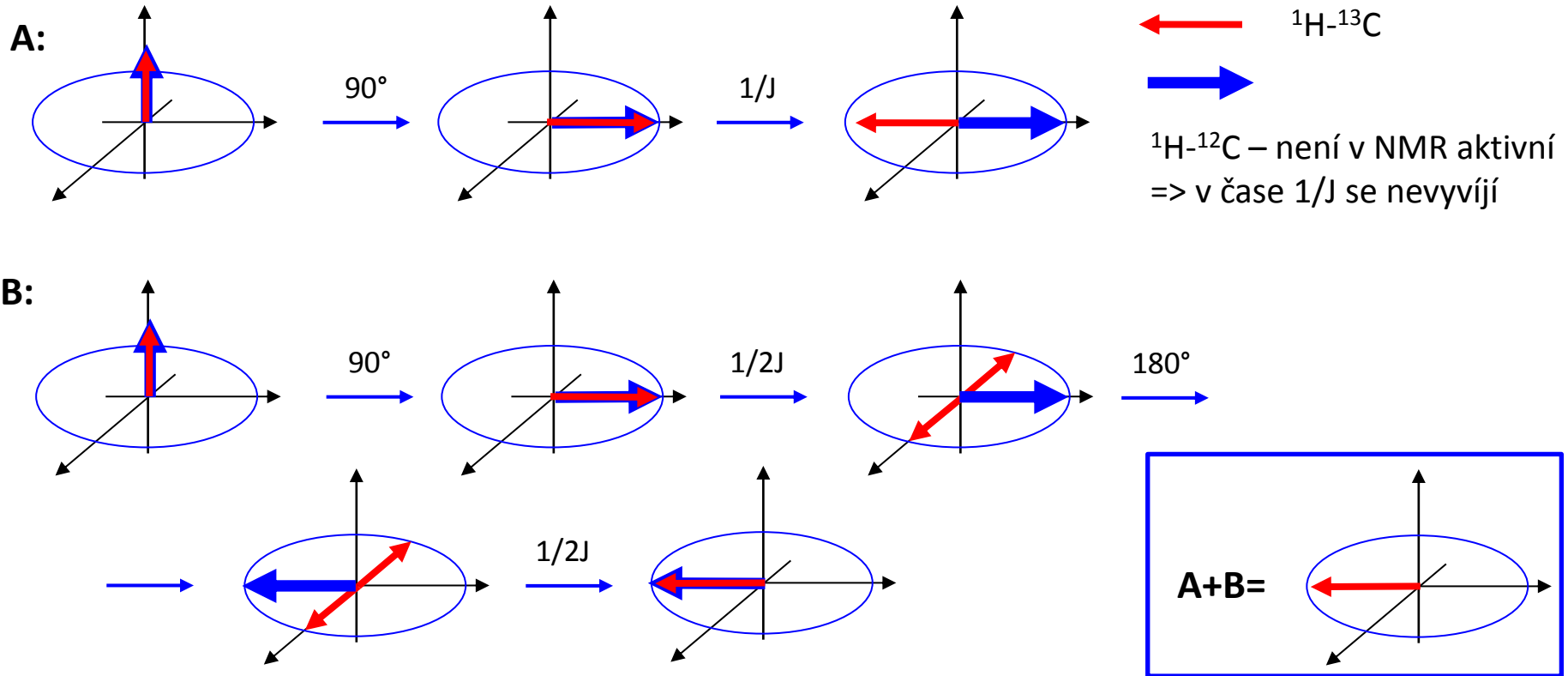
- výběr signálu páru ^1H – ^{13}C a eliminace nebo rozfázování ^1H – ^{12}C :

– fázové cykly



Selekce signálů

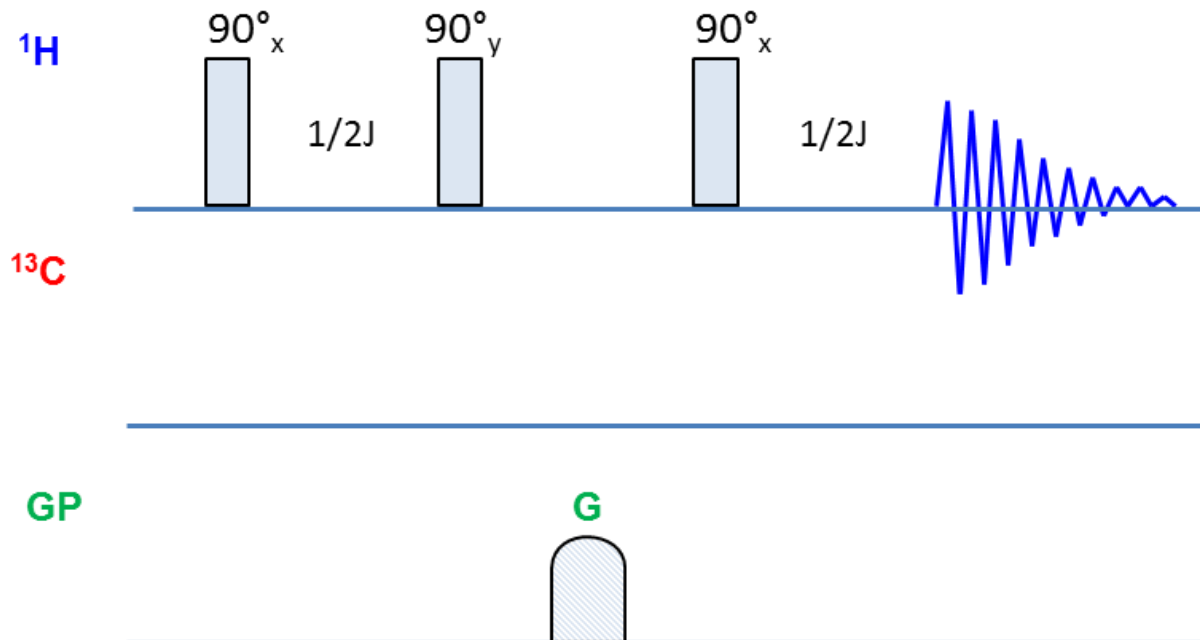
Vyběr signálů pomocí fázových cyklů



- k vývoji kaplingu dochází jen pro pár ¹H – ¹³C (ne pro ¹H – ¹²C)
- měření dvou spekter (**A** a **B**), sečtení/odečtení není perfektní kvůli experimentálním nepřesnostem - zbytkové signály ¹H – ¹²C

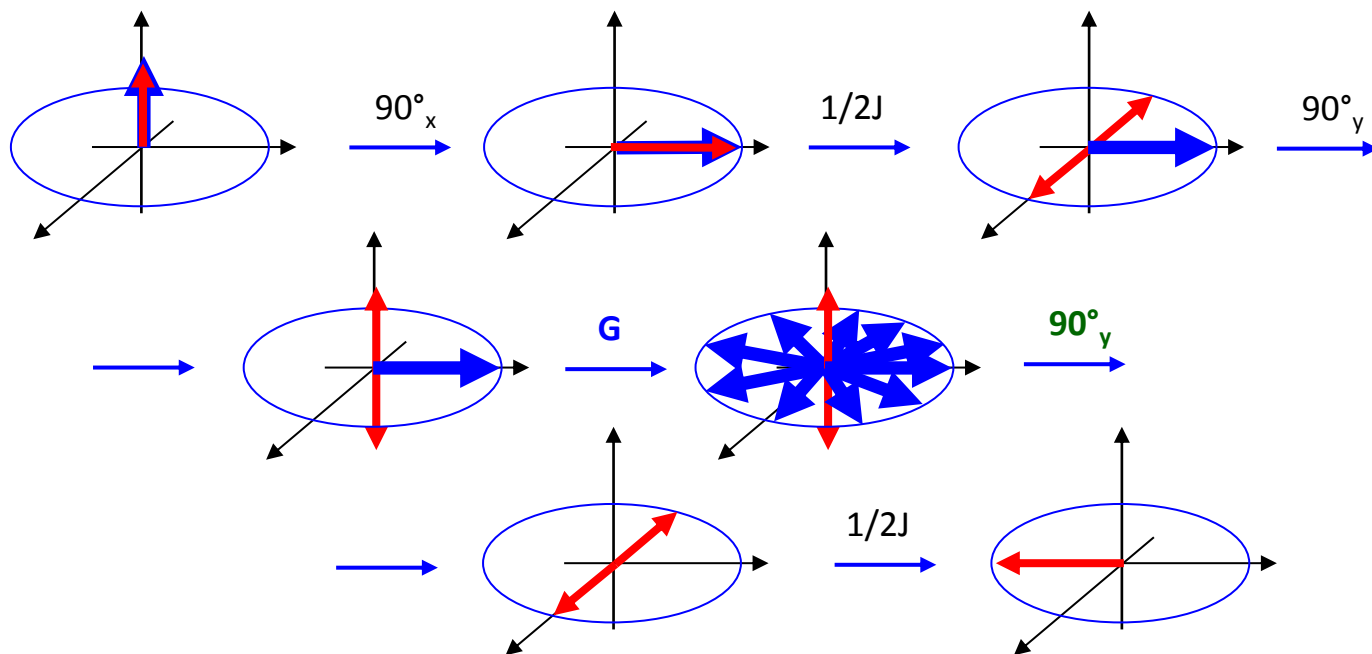
Selekce signálů

- výběr signálu páru ^1H – ^{13}C a eliminace nebo rozfázování ^1H – ^{12}C :
 - pulzní gradient magnetického pole



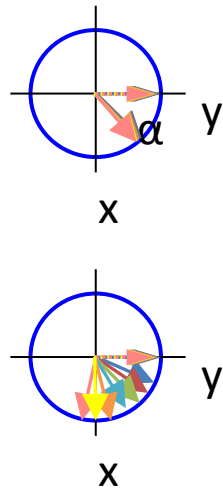
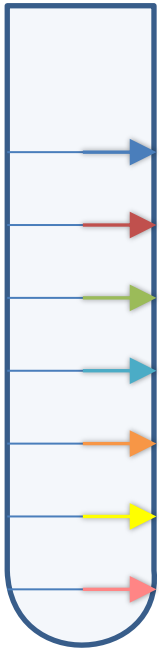
Selekce signálů

Vyběr signálů pomocí gradientů

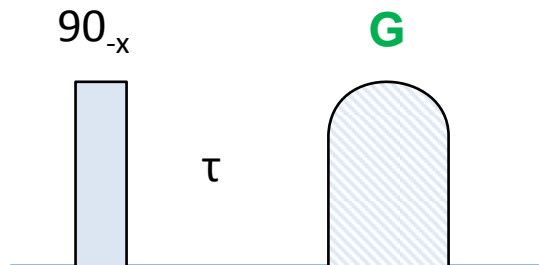


- signály ^1H – ^{12}C se rozfázují v rovině pomocí gradientu **G**
- 90_y sklopí ^1H – ^{13}C signály do osy x – během $1/2J$ zrefokusují
- výhody – žádné artefakty vznikající odečtem spekter (viz. předchozí obr.)
- měření jednoho spektra – rychlejší akumulace signálu

Gradienty



- v případě homogenního magnetického pole se vektory na všech pozicích v kyvetě posunou za čas τ o stejný úhel α
- gradientem o intenzitě G uměle vygenerujeme nehomogenní magnetické pole a dojde k různému vývoji v jednotlivých částech vzorku po dobu trvání G



Gradienty

$$\Phi_z = p\gamma\tau_g B_g$$

Φ_z – fázový posun

p – řád koherence (SQ, DQ)

γ – magnetogyrická konstanta

τ_g – doba trvání gradientu

B_g – intenzita gradientu

$\sum \Phi = 0$ - suma fází musí být nulová
pro refokusaci signálu

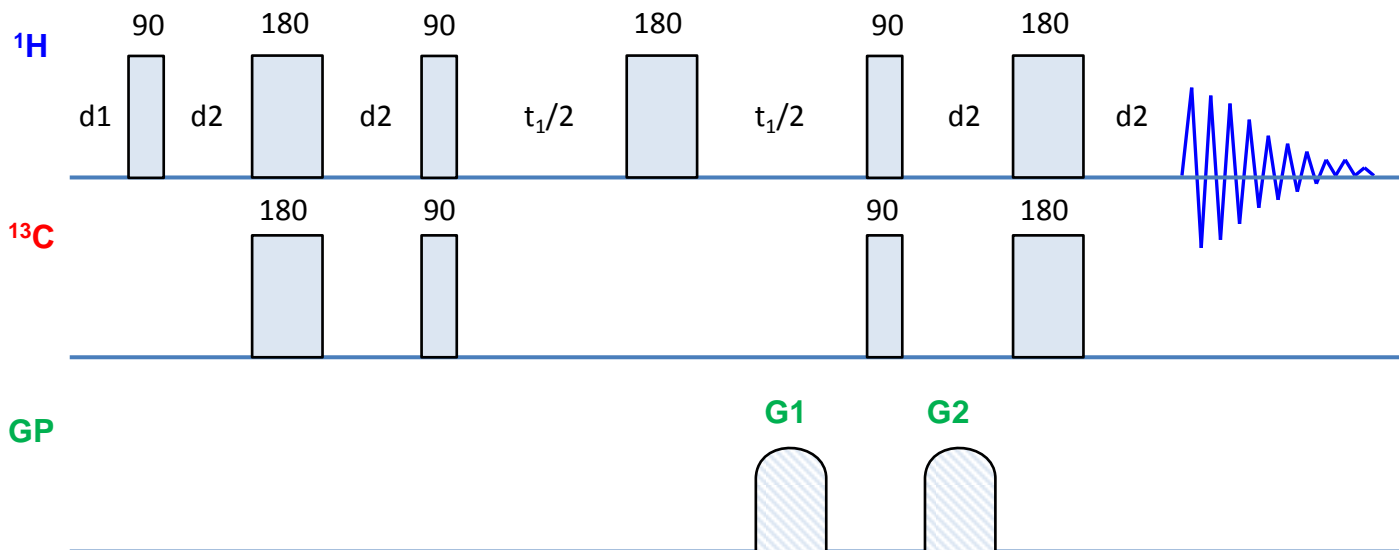
HSQC s gradienty (gs-HSQC)

nastavení gradientů : splnění podmínky $\sum \Phi = 0$:

HSQC: $p_1 = p_2$ (SQ), $\tau_1 = \tau_2$, $B_1 = B_2$

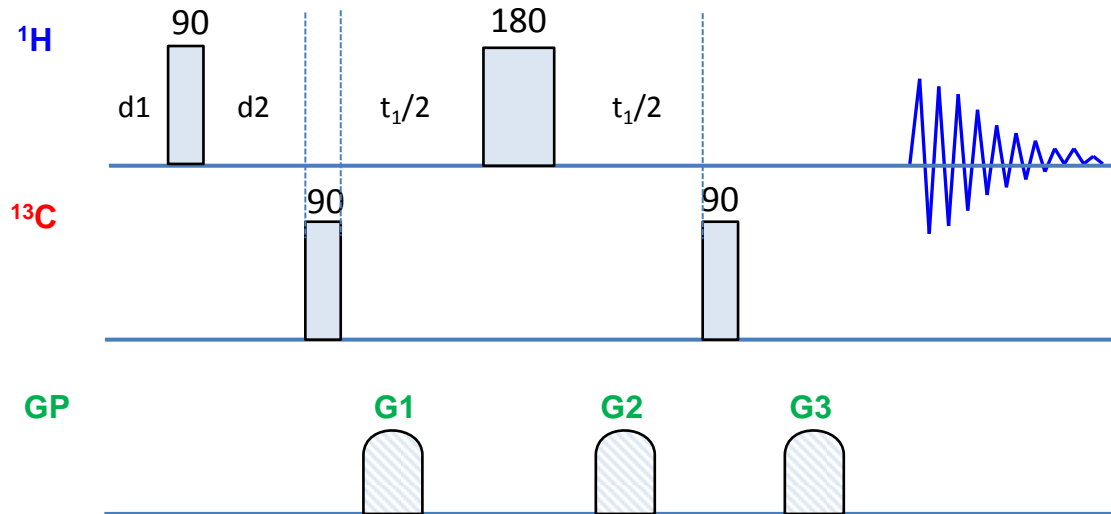
\Rightarrow poměr gradientů se řídí poměrem γ

\Rightarrow (pro ^1H - ^{13}C G1:G2 4:1)



Gradienty

- HMQC:



G1 – DQ, G2 – ZQ, G3 – SQ

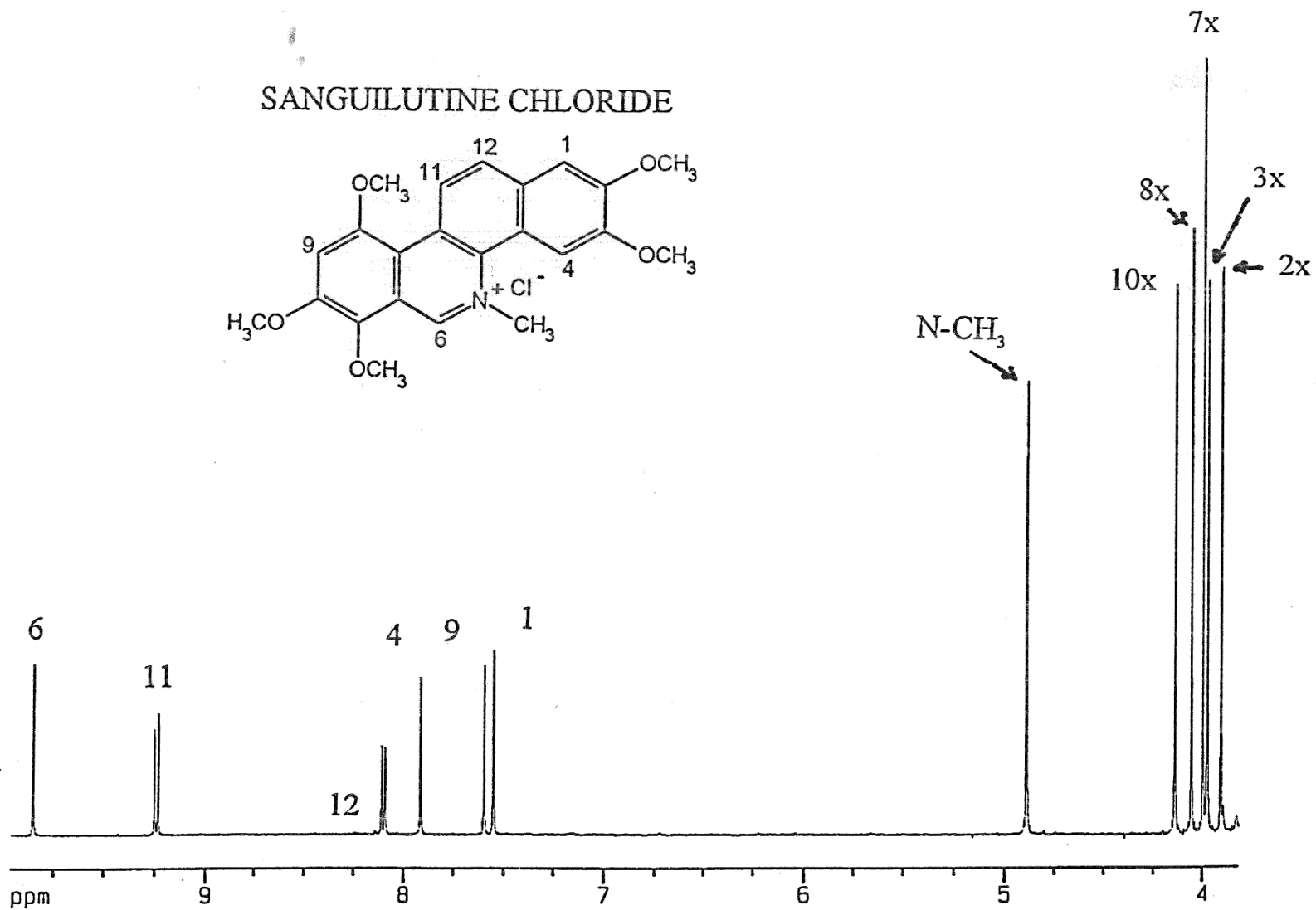
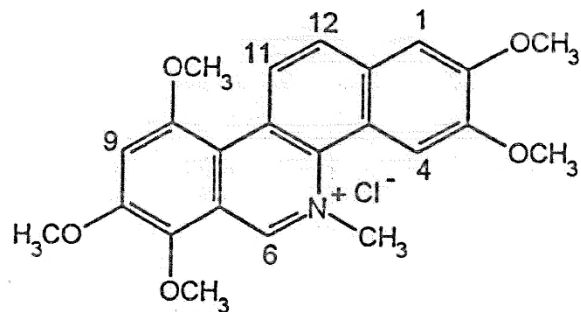
$$\tau_1 = \tau_2 = \tau_3$$

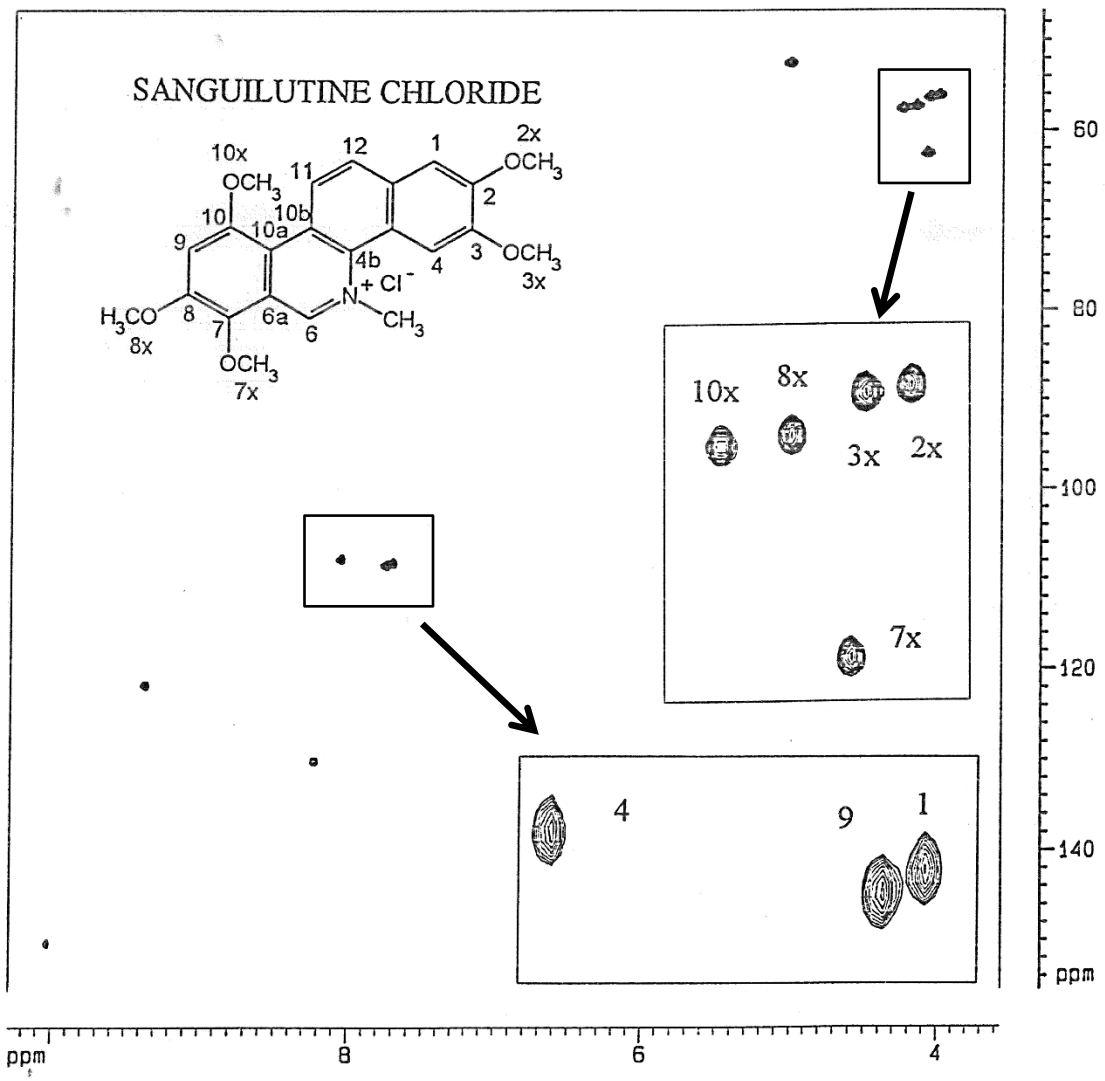
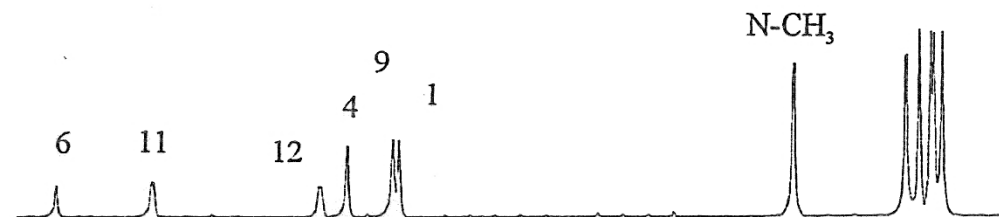
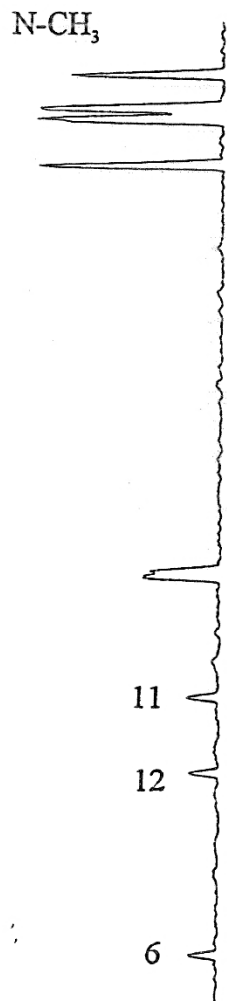
$$\Phi = 0 = (\gamma_C + \gamma_H)G1 + (\gamma_C - \gamma_H)G2 + (-\gamma_H)G3 \quad \text{pro } ^1\text{H-}^{13}\text{C, např: } G1:G2:G3 = 5:3:4$$

$$(1+4)*5 + (1-4)*3 + (-4)*4 = 0$$

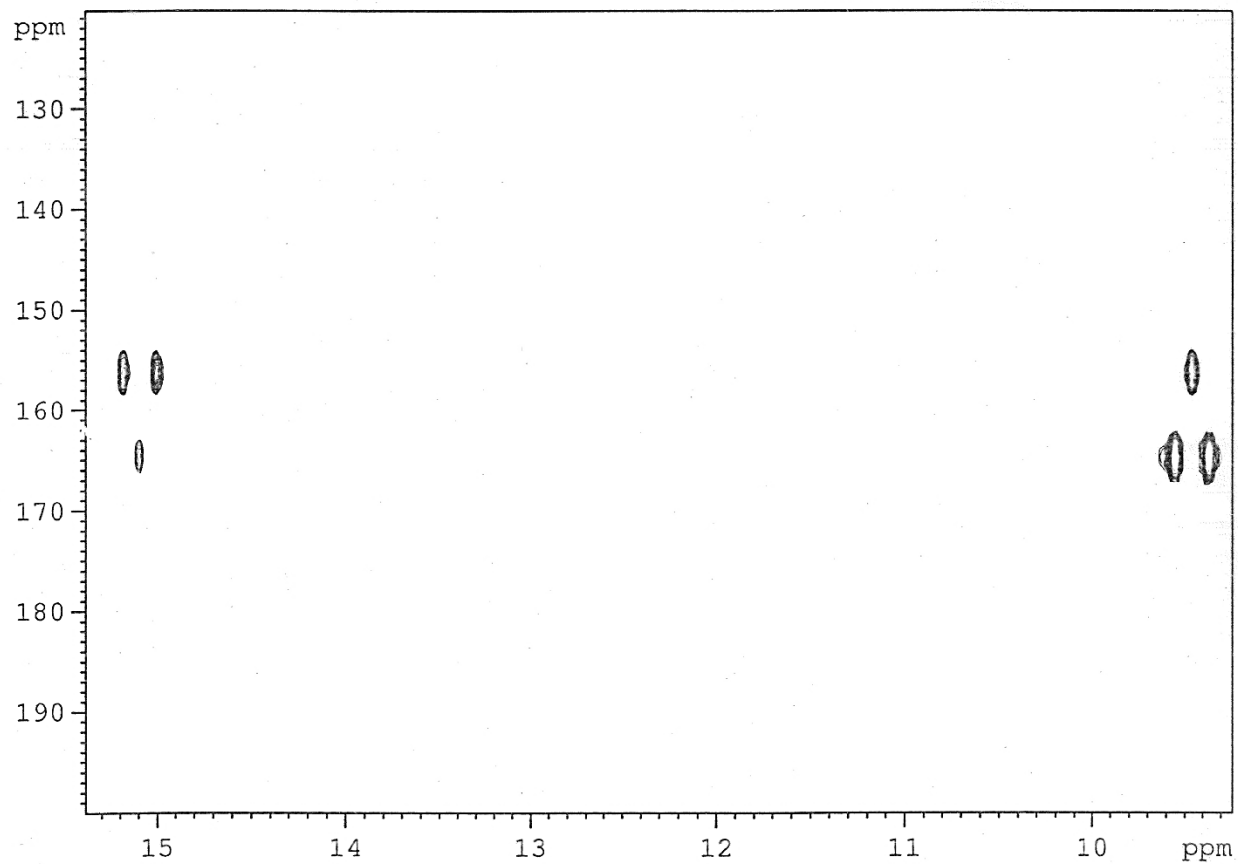
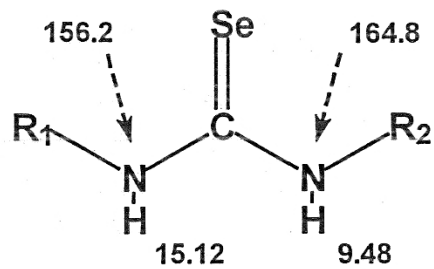
- použití gradientů je velmi významné pro ^1H - ^{13}C HMBC v přirozeném zastoupení, kde se jinak při fáz. cyklech odečítá kolem 97-98 % signálu \rightarrow t1 šum
- nezbytné pro ^{15}N - v přirozeném zastoupení 3x méně než ^{13}C (0.37 % vs. 1.11 %)

SANGUILUTINE CHLORIDE

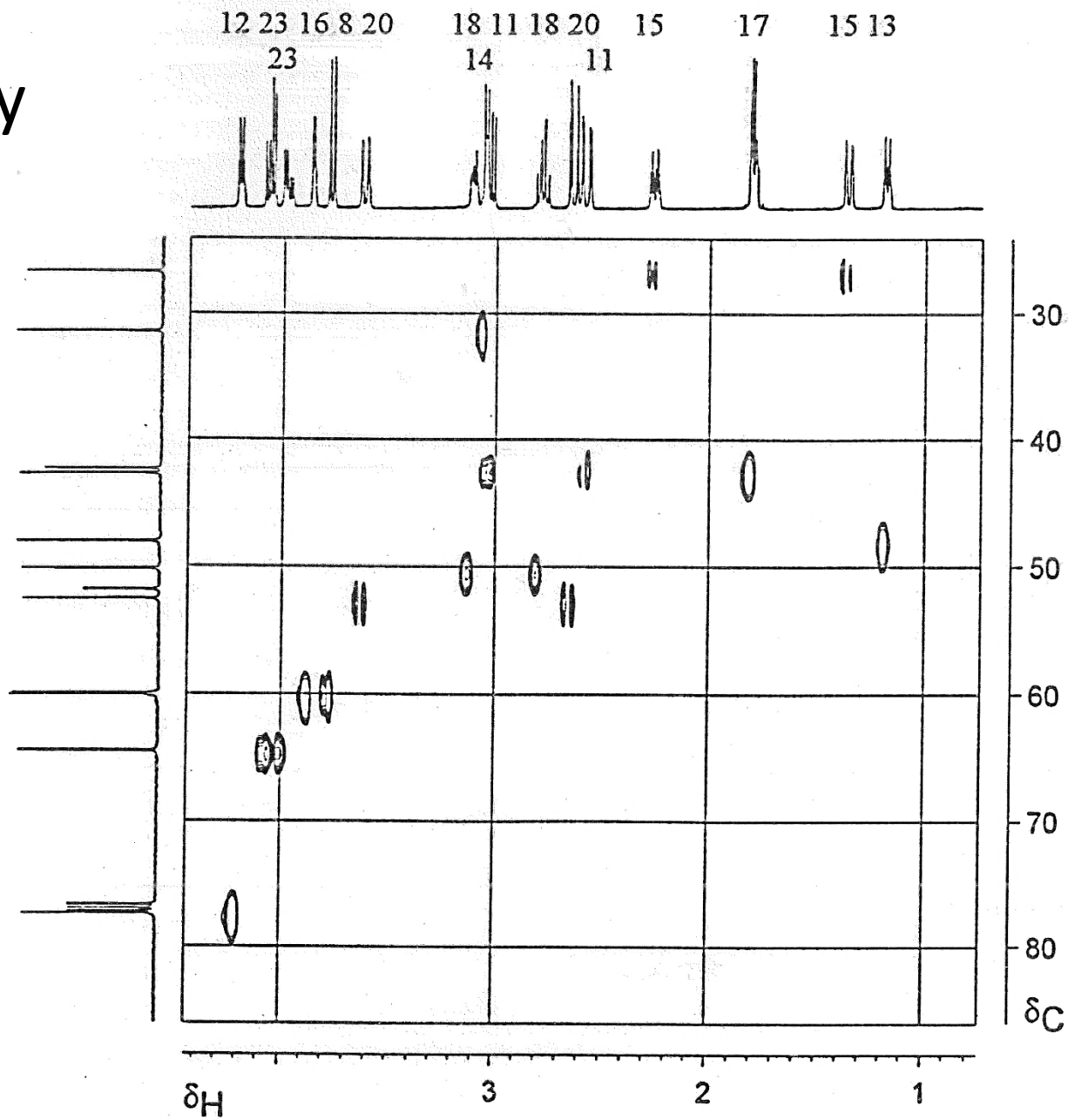
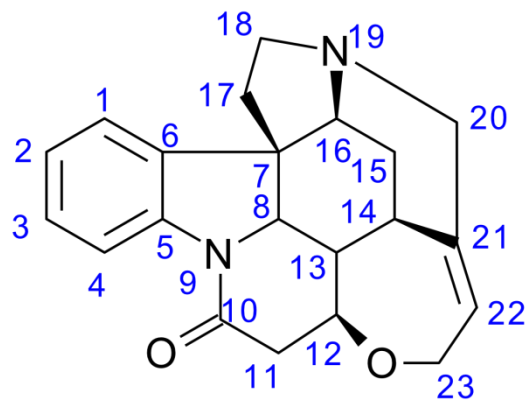




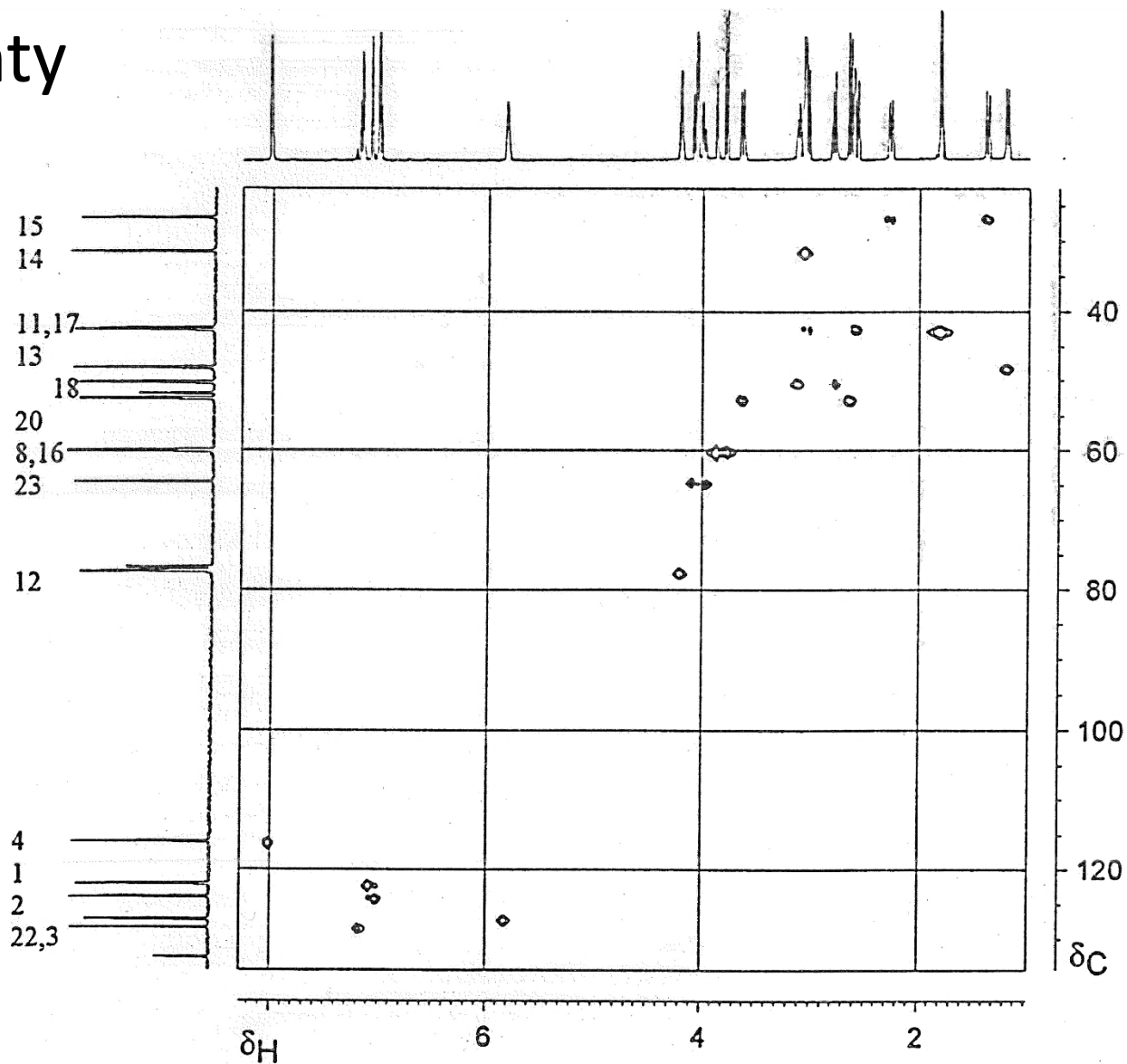
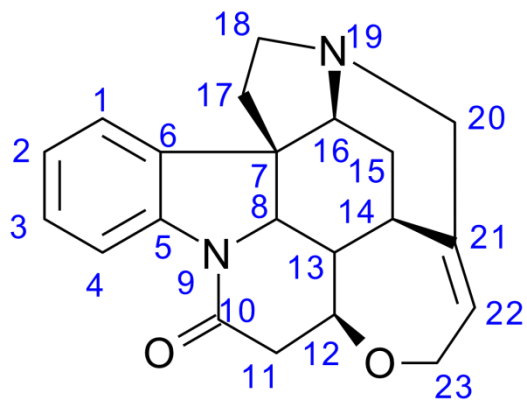
Gradient-Enhanced ^1H - ^{15}N HMBC



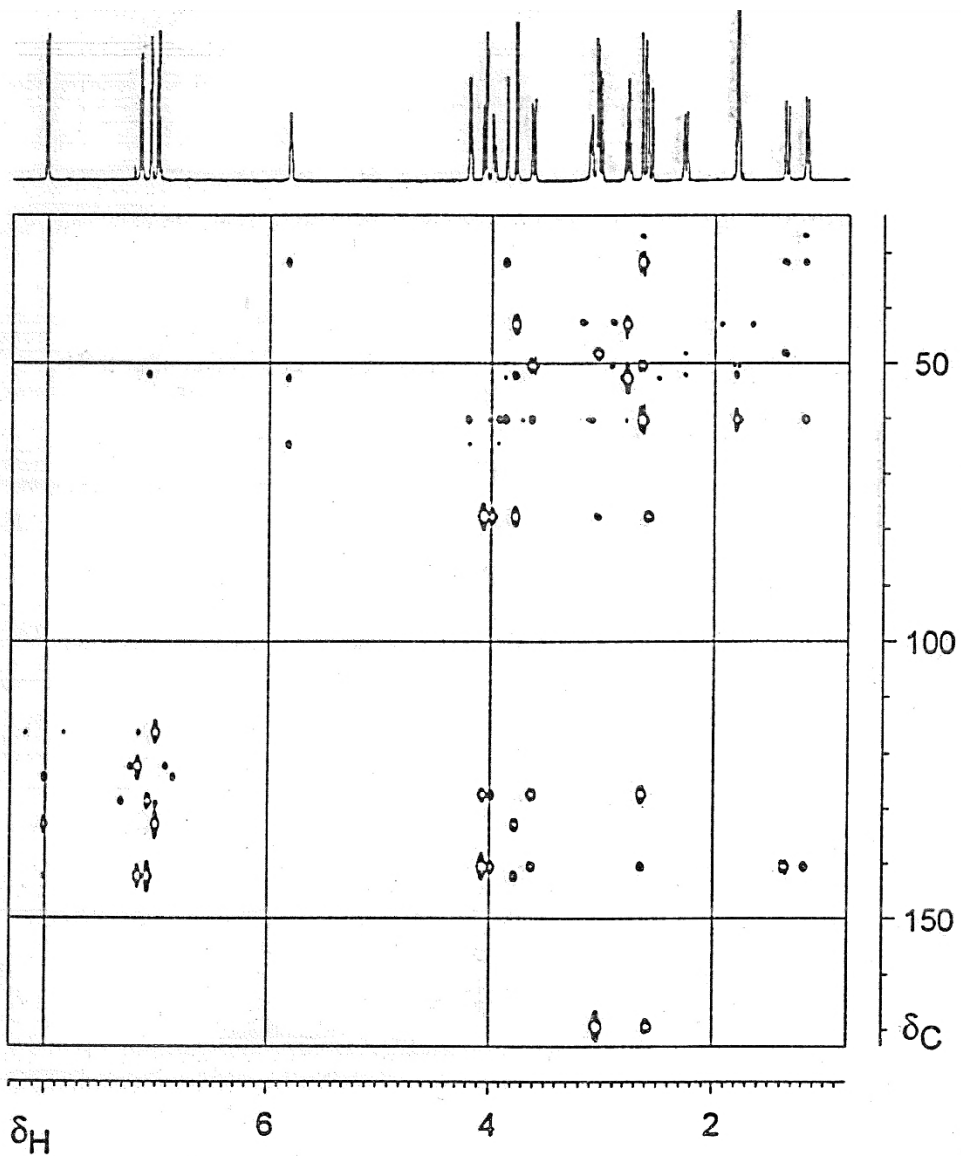
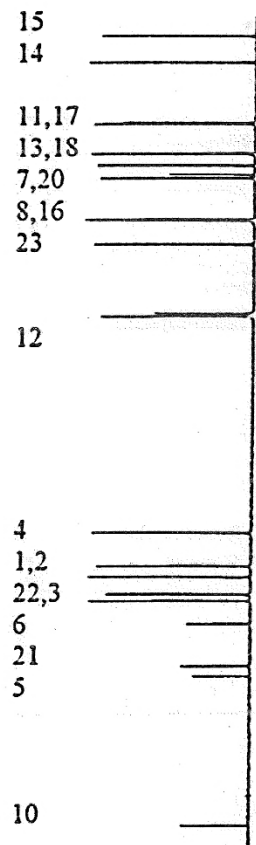
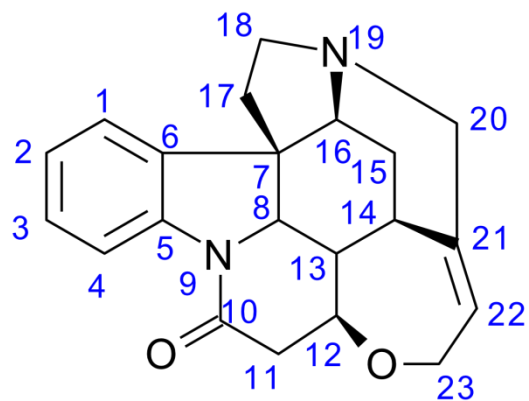
HSQC s gradienty



HMQC s gradienty



HMBC s gradienty



3D spektra

2D

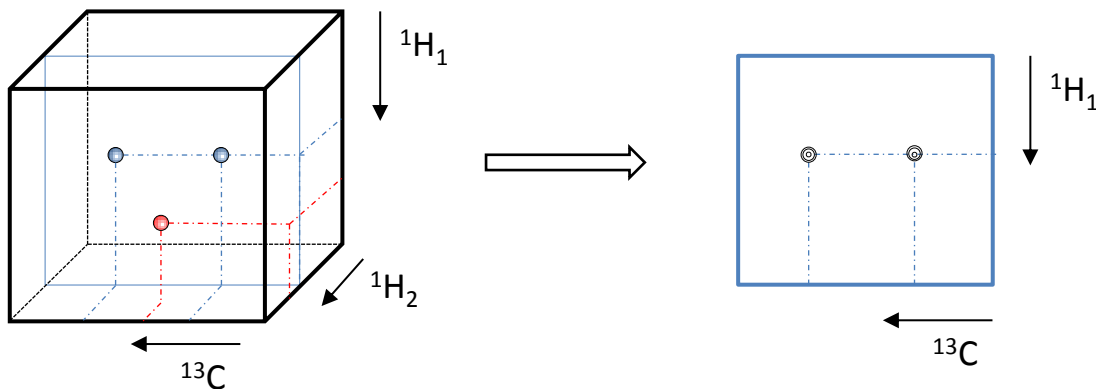
- 2D experimenty – dvě dimenze → FT dvou časových proměnných – FID (t_2) a inkrementační čas t_1
- 2D spektrum – rovina, kde je interakce dvou jader zobrazena jako vrstevnice

3D

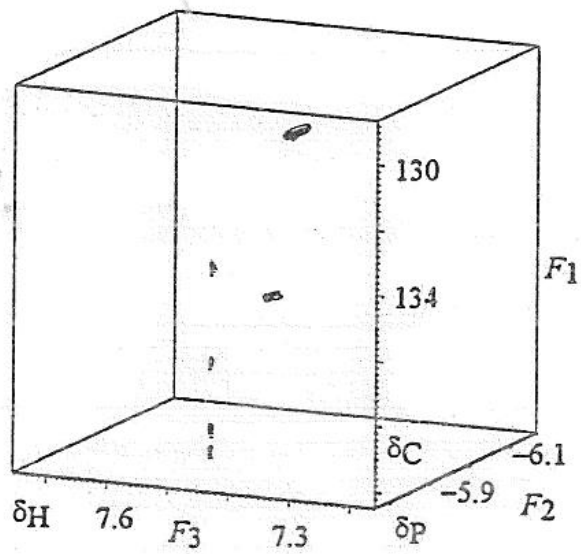
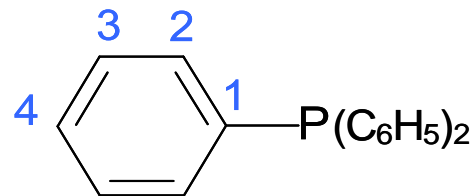
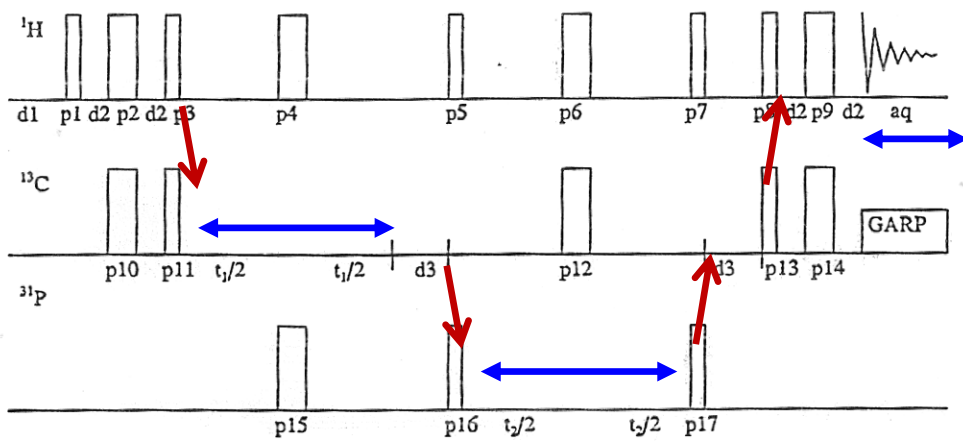
- 3D experimenty – přidán třetí časový vývoj (druhá inkrementační perioda) FID (t_3) a inkrementační čas t_1 a t_2
- 3D spektrum – kostka, kde je interakce jader zobrazena jako bod uvnitř kostky

3D spektra

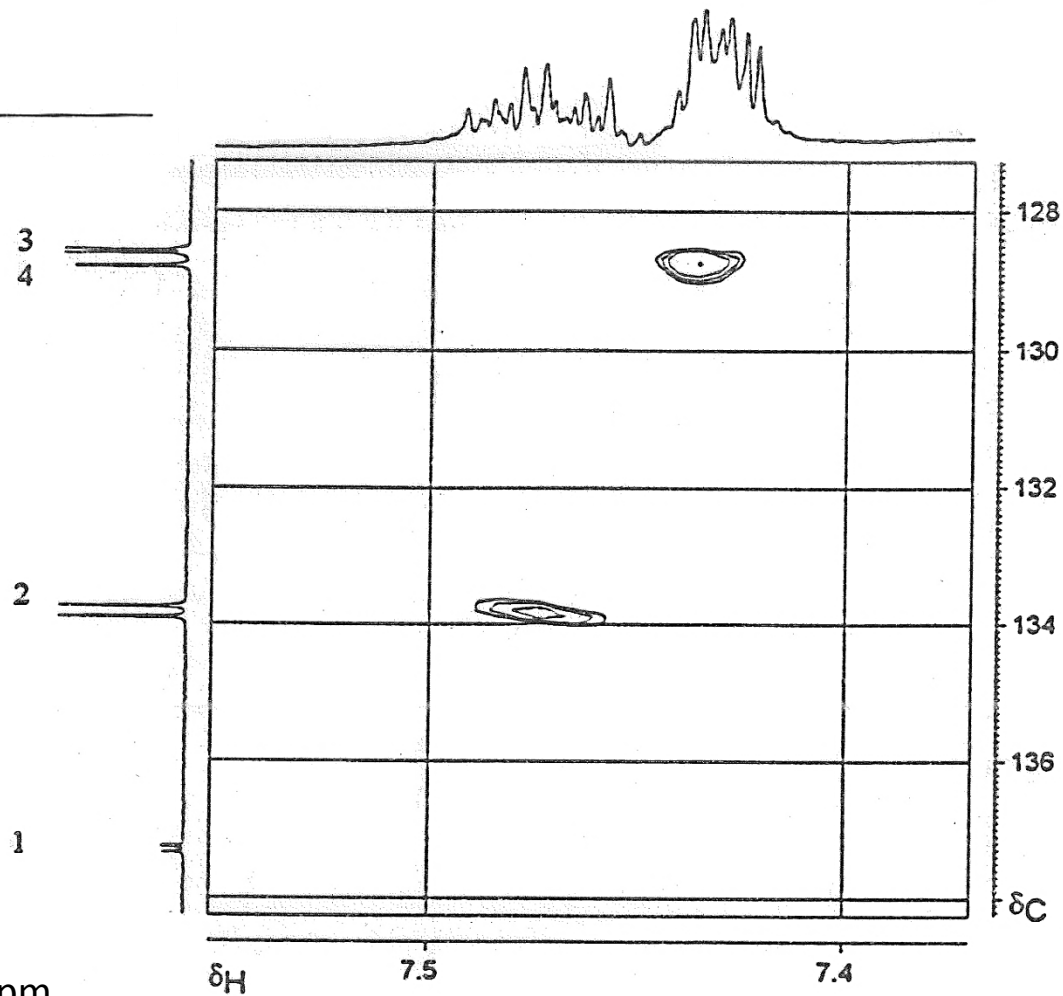
- 3D spektrum – kostka, kde je interkace jader zobrazena jako bod uvnitř kostky
- každý rozměr kostky představuje jednu frekvenční (časovou) proměnnou
- vhodné pro velké molekuly, biomolekuly
- kombinované experimenty HMQC-COSY, HMQC-TOCSY



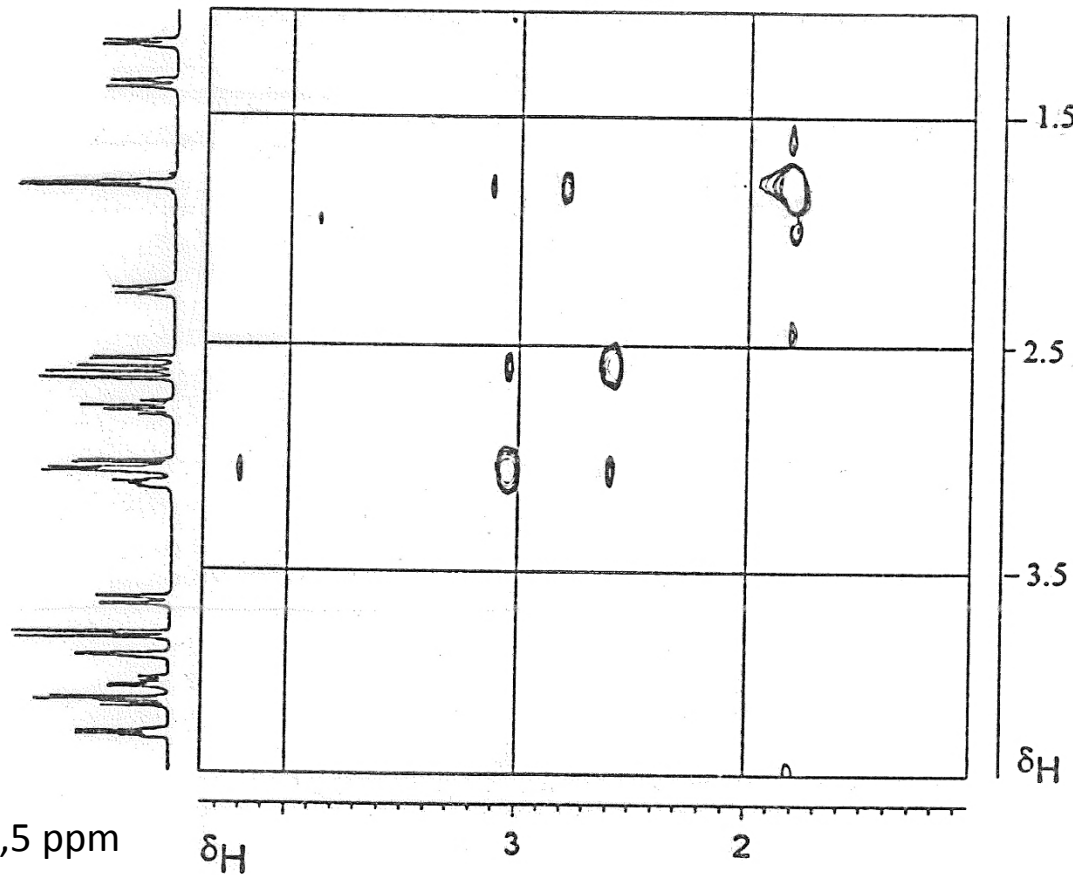
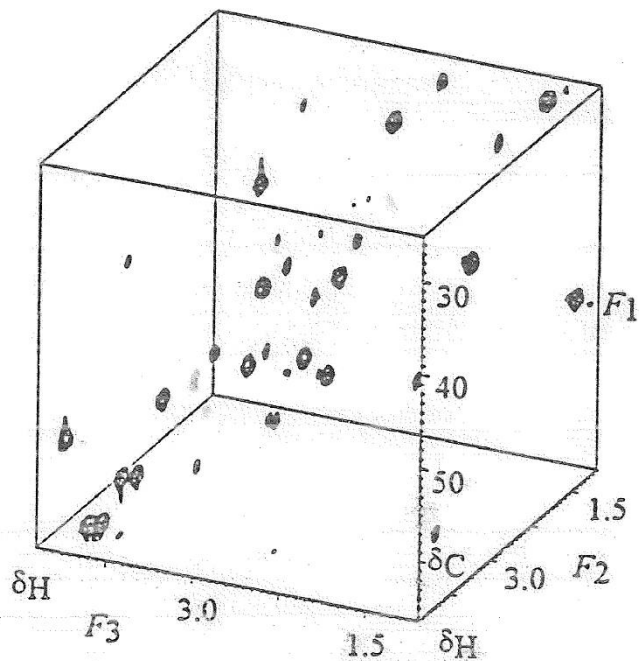
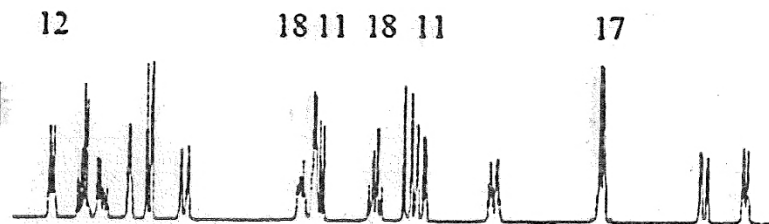
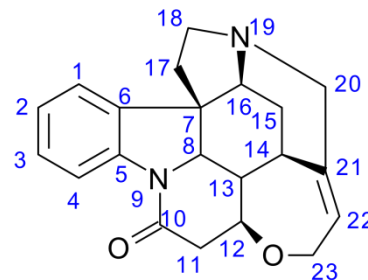
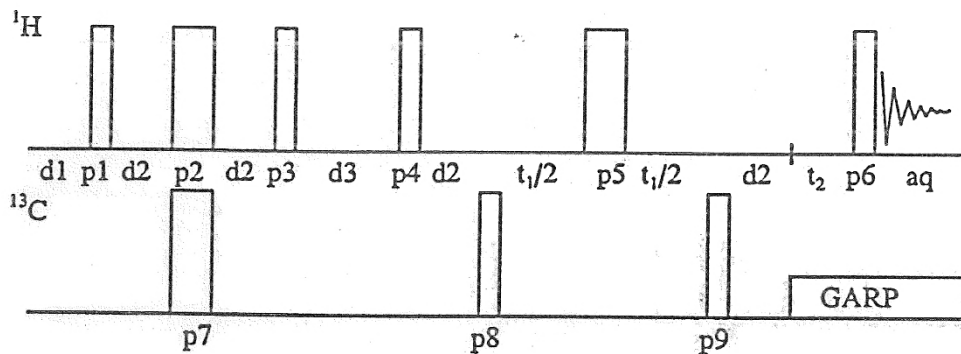
3D H,C,P-Correlation



rovina C,H pri $\delta P = -6$ ppm

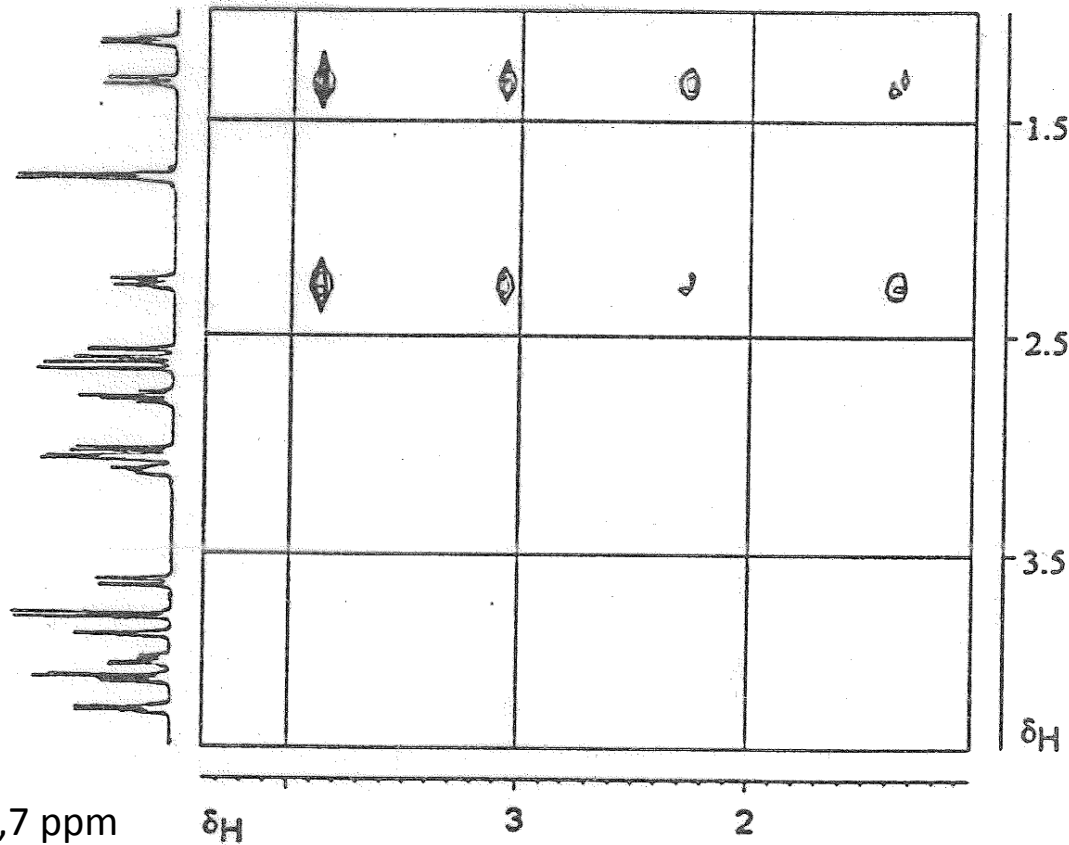
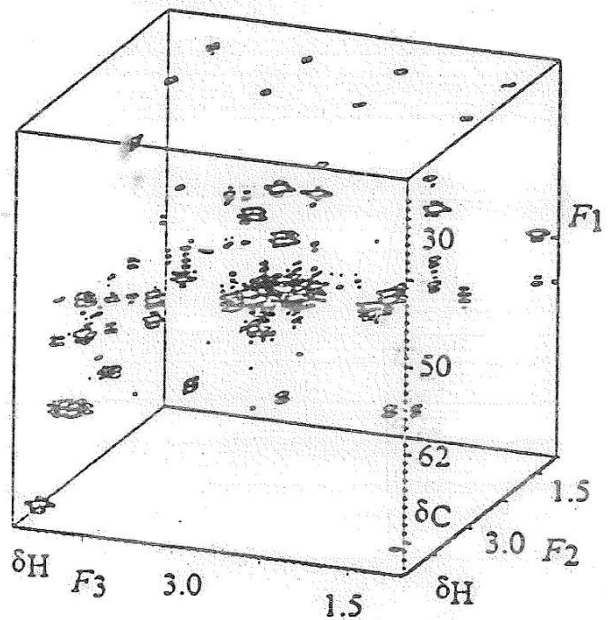
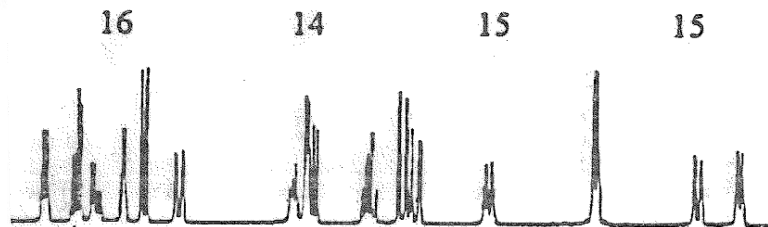
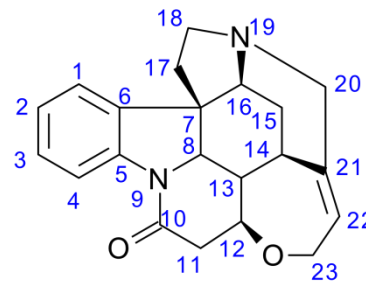
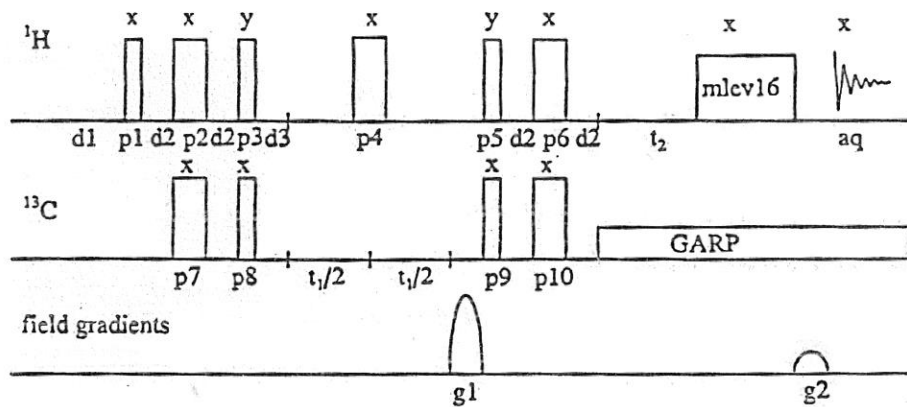


3D HMQC-COSY



rovina H,H pri $\delta C=42,5$ ppm

3D Gradient-Selected HSQC-TOCSY



rovina H,H pri $\delta C = 26,7$ ppm

Gradient-Selected HMQC-TOCSY

