

# JADERNÁ MAGNETICKÁ REZONANCE

## ÚVOD

Jaderná magnetická rezonance, nukleární magnetická rezonance, NMR - tři nejpoužívanější výrazy pro spektrální metodu využívající magnetických vlastností atomových jader některých izotopů. V roce 1945 byly poprvé pozorovány signály jader vodíku ve vodě a v parafínu, v padesátých letech se objevují první sériově vyráběné NMR spektrometry. Měřena byla sice většinou pouze jádra vodíku, protony, ale získané informace se ukázaly být nesmírně cennými při určování struktury sloučenin, především organických. Od té doby se NMR spektroskopie velmi rychle rozvíjela a stala se nezbytnou součástí strukturní analýzy. Zavedení supravodivých magnetů a jejich zdokonalování umožnilo postupné zvyšování intenzity magnetického pole a tím i citlivosti a rozlišení metody. Objev dvoudimenzionálních technik v 70.tých letech vedl k technikám schopným podat kompletní informaci o skeletu molekuly a prostorovém uspořádání atomů. Metody umožňující snímání spekter nebo alespoň získávání určitých informací o jádrech atomů v malých prostorových elementech uvnitř objektů daly vzniknout NMR zobrazování (NMR imaging, MR tomografie, MRT).

Dnes jsou tradiční metody NMR spektroskopie nepostradatelnou pomůckou syntetického chemika při sledování průběhu reakcí a ověřování struktury produktů. Speciální, časově náročnější techniky umožňují řešit struktury i velmi komplikovaných sloučenin, např. sekundární a terciární struktury biopolymerů, a studovat interakce mezi nimi. Obrovskou výhodou NMR spektroskopie biomolekul je, že můžeme zjišťovat jejich třídímenzionální strukturu za „fyziologických“ podmínek (v roztoku o určitém pH, teplotě, iontové síle) Pomocí MR tomografie jsou dnes již běžně studovány tkáně a orgány v lidském těle.

## TEORETICKÉ ZÁKLADY

Z hlediska NMR můžeme atomová jádra jednotlivých izotopů rozdělit na tři skupiny:

1. Jádra, která mají nulové spinové kvantové číslo  $I$  (výraz spinové kvantové číslo se často nahrazuje výrazem spin nebo jaderný spin). Jsou to jádra se sudým počtem protonů i neutronů, jako např.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ . Tato jádra nemají jaderný magnetický moment  $\mu$  a nejsou v NMR spektroskopii pozorovatelná.

2. Jádra se spinovým kvantovým číslem  $I = 1/2$ . Tato jádra mají jaderný magnetický moment a jsou snadno měřitelná. Příkladem je např. proton,  $^1\text{H}$ , který má vysoké přírodní

zastoupení mezi jádru vodíku a je nejběžnějším měřeným jádrem. Uhlík  $^{13}\text{C}$  představuje další často měřené jádro. Má nižší citlivost a zároveň nízké přírodní zastoupení (1.11%), takže jeho signály jsou zhruba 5700 x slabší než signály  $^1\text{H}$ . Další jádra se spinem 1/2 jsou například  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ .

3. Jádra se spinovým kvantovým číslem  $I > 1/2$ . Tato jádra mají vedle jaderného magnetického momentu i kvadrupolový moment a jsou velmi často obtížně měřitelná. Jádra s lichým nukleonovým číslem (součet protonů a neutronů) mají poločíselná spinová kvantová čísla (1/2, 3/2, 5/2 ...). Jádra se sudým nukleonovým číslem a lichým počtem protonů mají celočíselná spinová kvantová čísla (1, 2, 3 ...).

Atomová jádra s nenulovým spinem mají vlastní jaderný magnetický moment  $\mu$

$$\mu = \gamma \sqrt{I(I+1)} h / 2\pi$$

kde  $h$  je Planckova konstanta a  $\gamma$  je tzv. **gyromagnetický poměr**, konstanta charakteristická pro jádro každého izotopu. Pokud je jádro s nenulovým spinovým číslem mimo magnetické pole, jaderný spin se nijak neprojevuje. V magnetickém poli o intenzitě  $\mathbf{B}_0$  je výsledkem silového působení magnetického pole a magnetického momentu jádra precesní pohyb vektoru magnetického momentu jádra  $\mu$  kolem směru  $\mathbf{B}_0$  s frekvencí

$$\nu = \gamma \mathbf{B}_0 / 2\pi$$

označovanou jako Larmorova precesní frekvence. Z kvantové mechaniky plyne, že precedující vektor  $\mu$  může zaujmout celkem  $2I + 1$  orientací, lišících se úhlem  $\theta$  mezi  $\mu$  a  $\mathbf{B}_0$ . Jednotlivým orientacím odpovídají složky magnetického momentu ve směru pole

$$\mu_z = \mu \cos \theta = \gamma m h / 2\pi$$

kde  $m$  je magnetické kvantové číslo jádra (s hodnotami  $I, I - 1, \dots, -I$ , celkem  $2I + 1$  možných hodnot). Každé orientaci přísluší hodnota energie

$$E = -\mu_z \mathbf{B}_0 = -\gamma m h \mathbf{B}_0 / 2\pi.$$

Soustředíme-li se na nejčastěji měřená jádra se spinovým číslem  $I = 1/2$ , magnetické kvantové číslo může nabývat dvou hodnot  $m = -1/2$  a  $m = 1/2$ . Jaderný magnetický moment ve směru osy  $z$  může tedy nabývat hodnot  $\mu_z = -0,5 \gamma h / 2\pi$  nebo  $\mu_z = +0,5 \gamma h / 2\pi$  a v magnetickém poli o indukci  $\mathbf{B}_0$  pozorujeme vznik dvou energetických hladin označovaných  $\alpha$  a  $\beta$ :

$$E_\alpha = -0,5 \gamma h \mathbf{B}_0 / 2\pi$$

$$E_{\beta} = 0,5 \gamma \hbar \mathbf{B}_0 / 2\pi,$$

mezi nimiž je energetický rozdíl:

$$\Delta E = \gamma \hbar \mathbf{B}_0 / 2\pi$$

Tento energetický rozdíl odpovídá frekvenci přechodu  $\nu = \gamma B_0 / 2\pi$  (tzv. **rezonanční podmínka**). Tato frekvence leží u dnes dosahovaných magnetických polí v oblasti desítek až stovek MHz. Rozložení (populace) jader na obou hladinách je téměř stejné vzhledem k malému energetickému rozdílu; nadbytek na nižší hladině je v závislosti na intenzitě magnetického pole okolo  $10^{-5}$ , tedy na každých 100001 jader na nižší hladině připadá 100000 jader na hladině vyšší. Přesný poměr jader ve spinovém stavu  $\alpha$  a ve spinovém stavu  $\beta$  lze vypočítat pomocí Boltzmannova zákona:

$$N_{\alpha} / N_{\beta} = e^{\Delta E / k_b T},$$

kde  $k_b$  je Boltzmannova konstanta ( $= 1,3805 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ) a za  $\Delta E$  dosadíme rozdíl mezi energiemi spinů  $\alpha$  a  $\beta$ . Například v poli o indukci 11.74 T platí pro vodíky  $^1\text{H}$ :  $N_{\beta} \approx 0,99992 N_{\alpha}$ , to znamená, že na 100000 vodíkových jader se spinovým stavem alfa připadá 99992 jader ve stavu beta. Čím větší je indukce magnetického pole, tím větší je energetický rozdíl mezi stavy alfa a beta a tím větší je rozdíl v populacích jednotlivých spinových stavů. Větší rozdíl v populacích stavů způsobuje i větší citlivost NMR metody.

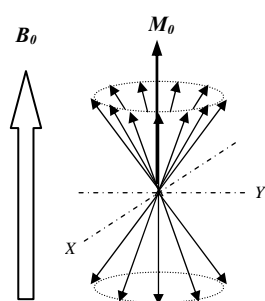
Tabulka 1.1 Magnetické vlastnosti izotopů nejdůležitějších prvků, které se vyskytují v organických látkách.

Jádro	Spin	Přirozený výskyt	$\gamma$ [ $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	NMR frekvence (11,74 T)	Citlivost
$^1\text{H}$	1/2	99,99	26,75	500,0 MHz	100
$^2\text{H}$	1	0,01	4,11	76,8 MHz	0,0001
$^3\text{H}$	1/2	-	28,54	533,3	0
$^{12}\text{C}$	0	98,93	-	-	-
$^{13}\text{C}$	1/2	1,07	6,73	125,7 MHz	0,02
$^{14}\text{N}$	1	99,63	1,93	36,1 MHz	0,1
$^{15}\text{N}$	1/2	0,37	-2,71	50,7 MHz	0,0004
$^{16}\text{O}$	0	99,96	-	-	-
$^{19}\text{F}$	1/2	100	25,18	470,4 MHz	83
$^{31}\text{P}$	1/2	100	10,84	202,4 MHz	6,6

V tabulce 1.1 jsou shrnuty důležité magnetické vlastnosti jader vybraných izotopů. Všimněte si, že gyromagnetický poměr  $\gamma$  má znaménko. V předposledním sloupci je uvedena rezonanční frekvence v magnetickém poli o indukci 11.74 T (Tesla,  $\text{V.s.m}^{-2}$ ). V NMR spektroskopii je zvykem udávat indukci  $B_0$  (či jí odpovídající intenzitu  $H_0$ ) magnetického pole

určitého přístroje jako frekvenci, při níž rezonují jádra  $^1\text{H}$ . Hovoříme tak často o 500 MHz NMR spektrometru, „intenzitě pole 500 MHz“ a pod. V posledním sloupci tabulky je uvedena relativní citlivost izotopů pro měření NMR spekter. Nejcitlivějším izotopem je  $^1\text{H}$ . Ostatní izotopy jsou méně citlivé, protože mají menší gyromagnetický poměr, tím pádem i nižší energetický rozdíl mezi spinovými stavy  $\alpha$  a  $\beta$  a nižší přebytek spinových stavů  $\alpha$  v rovnováze. K nízké citlivosti některých izotopů přispívá i jejich malý přirozený výskyt. Například izotop  $^{13}\text{C}$  má přirozený výskyt kolem 1% a zbytek (99%) jsou magneticky neaktivní jádra  $^{12}\text{C}$ , to znamená, že pouze jedna setina uhlíkových jader přispívá k NMR signálu.

Jak již bylo uvedeno, jádra s  $I = 1/2$  mohou nabývat dvou spinových stavů. V NMR se ustálilo používání souřadného systému tak, jak je uveden na obrázku 1.11. Kladný směr osy z



míří ve směru magnetického pole. V **rovnovážném stavu** vypadá systém následovně: Spiny jednotlivých jader vykonávají precesní pohyb a protože nemají stejnou fázi, jsou rozprostřeny po povrchu dvou kuželů. Malý přebytek jader na nižší energetické hladině (jsou to podle konvence spiny nad rovinou xy) způsobí, že **celková magnetizace  $M$**  vzorku (vektorový součet magnetických momentů jednotlivých jader) směřuje ve směru osy z. Na obrázku 1.11 je označena tučnou šipkou. Magnetizace  $M$  je na rozdíl od jaderných magnetických momentů makroskopická veličina, se kterou lze určitými způsoby manipulovat a poté ji detegovat.

## CHEMICKÝ POSUN

Z výše uvedeného vztahu pro energetický rozdíl mezi hladinami vyplývá, že všechna jádra jednoho izotopu vložená do téhož magnetického pole budou rezonovat při stejné frekvenci. Kdyby tomu tak bylo, nemělo by smyslu hovořit o NMR spektrech, protože tato spektra by obsahovala pouze jediný signál pro každý izotop obsažený ve vzorku.

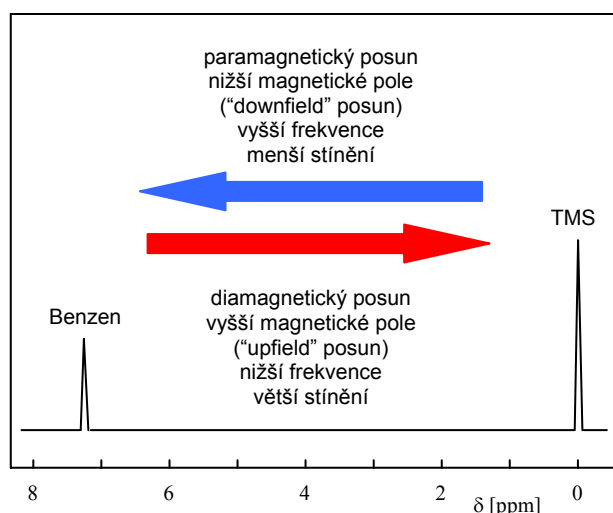
Pozorování NMR spekter je umožněno tím, že jádra atomů jsou od magnetického pole, v němž se nacházejí, **stíněna** elektrony. Elektrony svým pohybem vytvářejí magnetické pole, které má opačný směr než vnější magnetické pole  $B_0$ . Jádra stejného izotopu, která nemají stejné chemické okolí (tedy nejsou chemicky ekvivalentní) se liší rozložením elektronů ve svém okolí a tím sice velmi nepatrně, ale pozorovatelně, intenzitou stínění. Ta je úměrná vnějšímu magnetickému poli  $B_0$  a charakterizujeme ji stínící konstantou  $\sigma$ . Efektivní magnetické pole  $B_{\text{ef}}$ , které působí na jádro vyjadřuje vztah

$$B_{ef} = B_0 - \sigma B_0 = B_0 \cdot (1 - \sigma).$$

Jestliže na jádra působí různě velké efektivní magnetické pole, budou mít tato jádra i různou rezonanční frekvenci. Například pokud mají jádra  $^1\text{H}$  tetramethylsilanu (TMS) v poli 11.74 T rezonanční frekvenci přesně 500 MHz, vodíky  $\text{CH}_3$  skupiny methanolu jsou méně stíněné a budou mít rezonanční frekvenci 500001650 Hz a vodíky benzenu, které jsou ještě méně stíněné budou mít rezonanční frekvenci 500003635 Hz. V magnetickém poli o poloviční intenzitě, by vodíky TMS rezonovaly při 250 MHz, vodíky  $\text{CH}_3$  skupiny methanolu při 250000825 Hz a vodíky benzenu při 250001817,5 Hz. Proto se pro vyjadřování chemického posunu ujala stupnice  $\delta$  s jednotkou **ppm** (parts per milion) odpovídající miliontině vnějšího pole. Chemický posun je definován takto:

$$\delta_x = 10^6 * (v_x - v_{ref}) / v_{ref},$$

kde  $\delta_x$  je chemický posun atomu x,  $v_x$  je rezonanční frekvence atomu x a  $v_{ref}$  je rezonanční frekvence referenční sloučeniny. Budeme-li za referenční sloučeninu považovat



TMS a dosadíme-li rezonanční frekvence do vzorce, vyjde nám, že chemický posun vodíků methylové skupiny v methanolu je 3,3 ppm a chemický posun benzenových vodíků je 7.27 ppm. Hlavní výhodou chemického posunu  $\delta$  je to, že u různých přístrojů s různými induklemi magnetického pole poskytuje stejné hodnoty.

## SNÍMÁNÍ DAT

Předchozí výklad stačí k pochopení klasické, tzv. **CW** (continuous wave) NMR spektroskopie: Vzorek obsahující magneticky aktivní jádra vložíme do magnetického pole a do blízkosti vzorku umístíme cívku, kterou protéká střídavý proud o frekvenci v oblasti MHz. Potom měníme spojitě intenzitu magnetického pole  $B_0$  nebo frekvenci proudu v cívce. Při splnění výše uvedené rezonanční podmínky dojde k absorpci radiofrekvenčního záření, kterou můžeme měřit různými způsoby běžnými v elektrotechnice. CW NMR spektrometry se běžně vyráběly až do sedmdesátých let minulého století. Jejich elektronika byla poměrně jednoduchá a ke zpracování dat nebyl třeba počítač. Generátor frekvence byl řízen pozicí

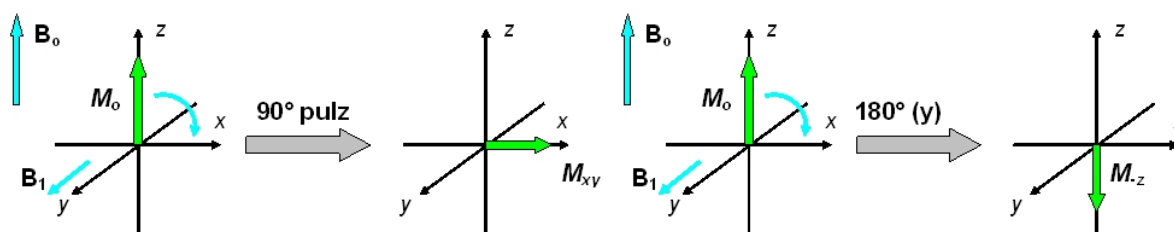
pisátka na ose X zapisovače nebo osciloskopu a v ose Y byl registrován zesílený signál z měřiče absorbce.

Většina současných spektrometrů pracuje v jiném, tzv. **FT** (Fourier transform) modu. Při něm jsou všechna jádra jednoho izotopu excitována velmi krátkým radiofrekvenčním **pulzem** o trvání řádově několik  $\mu\text{s}$ . Tak krátký puls má jistou neurčitost frekvence a pokryje obvykle frekvenční oblast všech jader jednoho izotopu. Návrat jader do rovnovážného stavu je možno sledovat jako tzv. FID (free induction decay, volné doznívání indukce). FID má tvar exponenciálně tlumené periodické funkce představující součet sinusoid s frekvencemi příslušejícími jednotlivým signálům a představuje **závislost intenzity proudu indukovaného ve snímací cívice na čase**. FID je v digitální formě uložen do paměti počítače a podroben Fourierově transformaci vedoucí k normálnímu spektru představujícímu **závislost intenzity na frekvenci**.

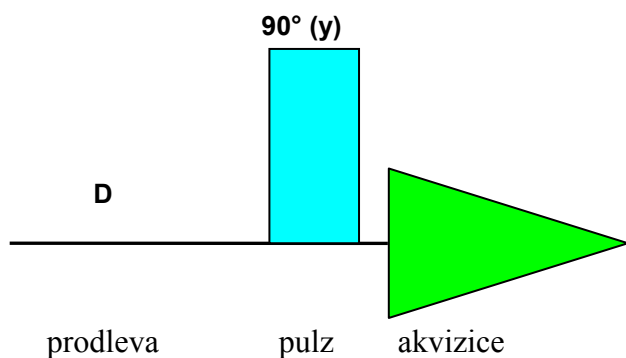
Výhodou FT NMR spektroskopie je především možnost opakovat rychle po sobě stejná měření a výsledné FIDy sčítat. Tím se zvyšuje citlivost měření a je možno měřit i zředěné vzorky nebo jádra s velmi malou citlivostí. Druhou výhodou FT NMR je možnost manipulovat se spinovými systémy či s populacemi na jednotlivých hladinách a tím získávat spektra obsahující další cenné informace.

## PULZY, PULZNÍ SEKVENCE

Radiofrekvenční pulz (pomocí oscilujícího magnetického pole  $B_1$  kolmého na směr pole  $B_0$ ) způsobuje otáčení vektoru magnetizace  $M$  kolem osy pole  $B_1$ . Takzvaný  $90^\circ$  pulz ( $\pi/2$  pulz) otočí magnetizaci o  $90^\circ$  do roviny  $xy$ .  $180^\circ$  pulz ( $\pi$  pulz) otočí magnetizaci do osy  $-z$ . V moderní NMR spektroskopii se se spinovými systémy často manipuluje celou řadou po sobě následujících pulzů, mezi nimiž jsou určité prodlevy, mluvíme pak o pulzních sekvencích, které se dají zapsat graficky.



Nejjednodušší pulsní sekvence, se kterou se seznámíme je vhodná pro měření libovolného jádra bez ozařování jiných jader. Je běžně používána při měření protonových spekter. Její grafické schéma obsahuje tři části. Popíšeme si zde podrobněji, co se během nich



odehrává. Při akumulaci spekter se tato pulsní sekvence stále opakuje a FIDy získané při každé akvizici (snímání dat) se sčítají. Jako konkrétní příklad si můžeme představit, že měříme  $^1\text{H}$  NMR spektrum směsi dvou látek (například  $\text{CHCl}_3$  a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). V každé z těchto látek mají

vodíková jádra jiné chemické okolí a tedy i jiné rezonanční frekvence, musíme tedy uvažovat dva různé vektory magnetizace.

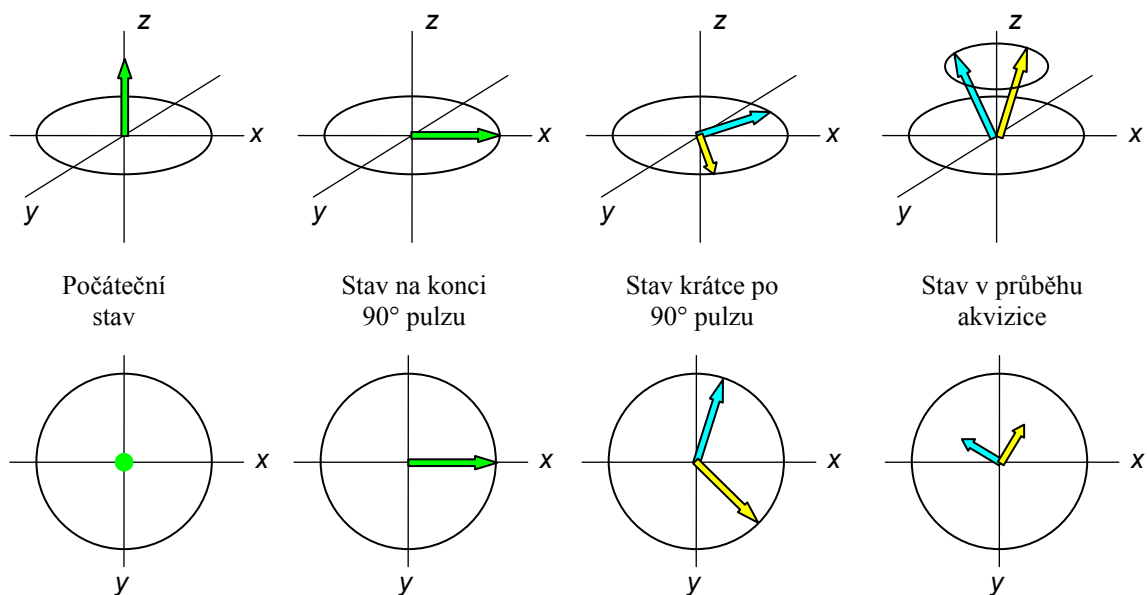
**1. Přípravná perioda D** trvá většinou několik sekund a během ní působí na vzorek pouze vnější magnetické pole. Ustaví se rovnováha v populacích spinů po pulsu nebo pulsech v předchozím průchodu sekvencí (proběhne relaxace) a magnetizace obou složek směsi míří ve směru osy z.

**2. Následuje  $90^\circ$  pulz** označený obdélníkem. Cívka obklopující vzorek je připojena na výstup vysokofrekvenčního zdroje (vysílače) a po dobu pulsu jí protéká proud s frekvencí, kterou nazýváme frekvence pulsu. Puls vytvoří po dobu svého trvání další magnetické pole, které osciluje právě s frekvencí pulsu. Frekvence pulsu bývá uprostřed oblasti rezonančních frekvencí sledovaného jádra. Fáze pulsu se uvádí ve schématu sekvence do závorky a v našem případě je taková, že pole  $B_1$  směřuje ve směru osy y. Celková magnetizace začne v rotujícím systému vlivem pole  $B_1$  rotovat okolo osy y.  $90^\circ$  Puls má právě takovou **intenzitu a délku**, aby jím vytvořené pole stihlo sklopit magnetizaci do směru osy x. Pulz je tak krátký, že se téměř neuplatní rozdíl frekvencí jednotlivých magnetizací. Všechny spiny a tedy i celková magnetizace  $M$  dále rotují kolem osy z se svojí Larmorovou frekvencí, proto se pro zjednodušení dalšího výkladu zavádí tzv. rotující soustava souřadná, která má s běžnou soustavou souřadnou společnou osu z, a která rotuje kolem této osy s frekvencí odpovídající Larmorově frekvenci sledovaných jader. V rotujícím systému směřují obě magnetizace ( $M_{\text{CHCl}_3}$  a  $M_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ ) po  $90^\circ$  pulzu ve směru osy x.

**3. Snímání dat (akvizice)**, které se graficky označuje trojúhelníkem. Jednotlivé tučné šipky představují magnetizace, na kterých se podílejí spiny, které rotují se stejnou frekvencí.

Tu mají spiny jader se stejným chemickým posunem. Tyto skupiny jader tedy mají různé precesní frekvence a znázorňujeme je jako dvě nezávislé magnetizace. Jednotlivé magnetizace ( $M_{\text{CHCl}_3}$  a  $M_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}$ ) nyní vlivem hlavního magnetického pole rotují okolo osy  $z$  se svými frekvencemi. Zároveň se spiny vracejí do rovnovážného stavu, tj. dochází k postupnému obnovování nadbytku spinů na nižší energetické hladině. V rotujícím modelu je tento děj vyjádřen tak, že šipky představující jednotlivé magnetizace opouštějí rovinu  $xy$  a po spirále se vracejí do směru osy  $z$ . V průmětu do roviny  $xy$  můžeme během akvizice pozorovat dva rotující vektory magnetizace, jejichž velikost postupně klesá.

Elektromagnetické pole vytvářené rotujícími magnetickými momenty jader indukuje v měřící cívice elektrický proud. Cívka je orientovaná tak, že zaznamenává složky vektorů magnetizace promítající se do roviny  $xy$ . Obvykle se pomocí tzv. kvadrurní detekce nezávisle detegují složky v osách  $x$  a  $y$ . Magnetizace, které jsme si zvolili a označili každou zvlášť, přispějí do FIDu sinusoidami s odpovídajícími frekvencemi. FID odpovídá součtu těchto sinusoid, má komplikovaný průběh a odráží časový průběh celkové magnetizace vzorku, tedy vektorového součtu všech dílčích magnetizací. S přibližováním vektorů rovnovážnému stavu intenzita FIDu klesá (zvětšuje se složka ve směru osy  $z$ , průmět do roviny  $xy$  se blíží k nule).

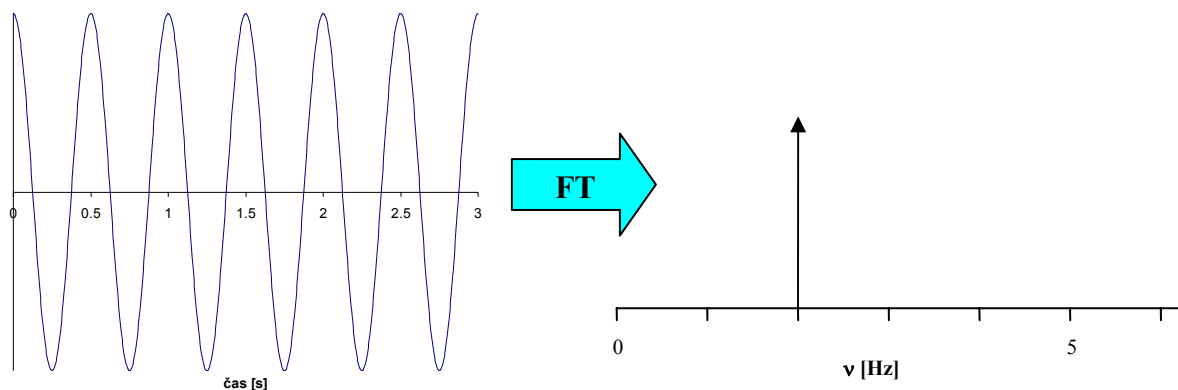


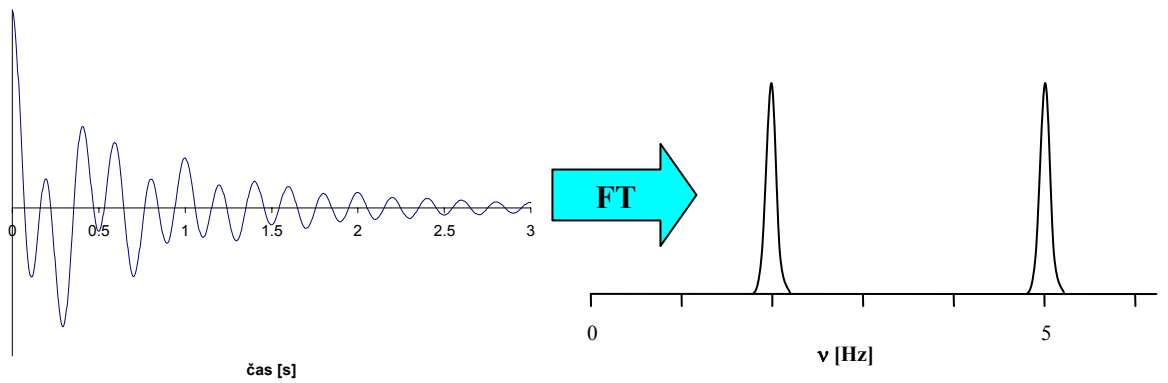
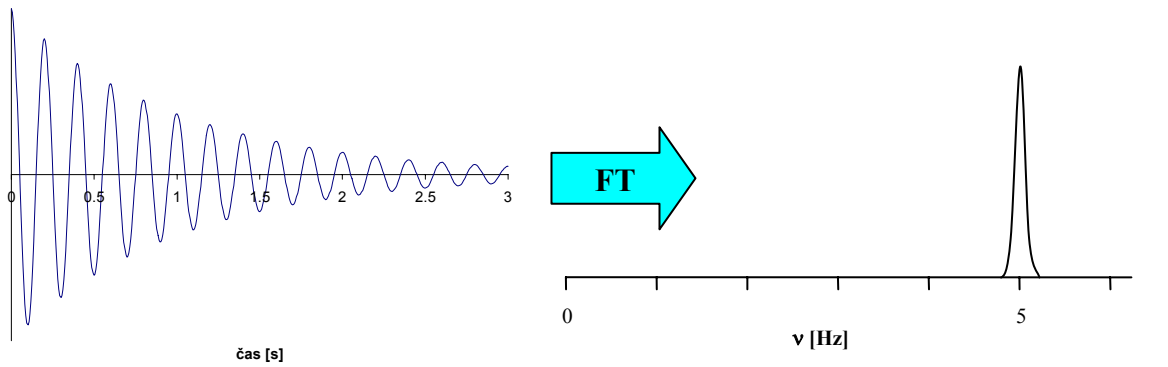
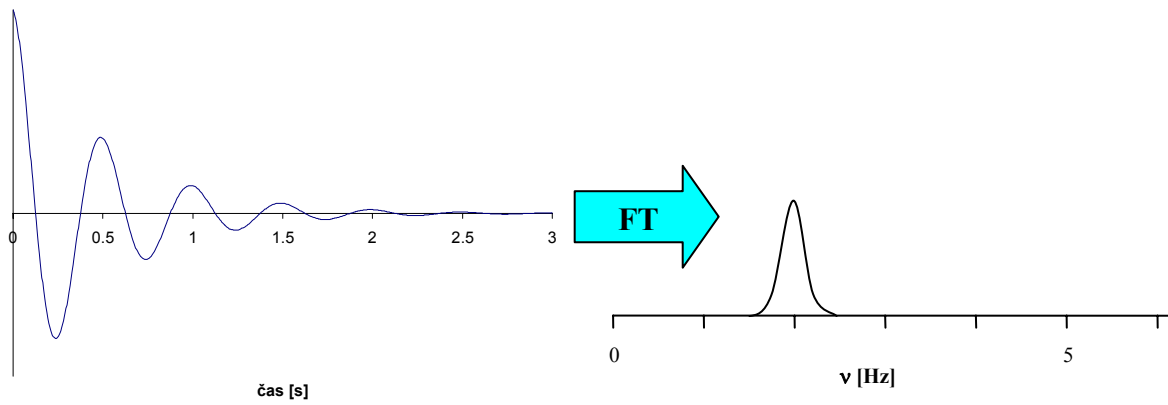
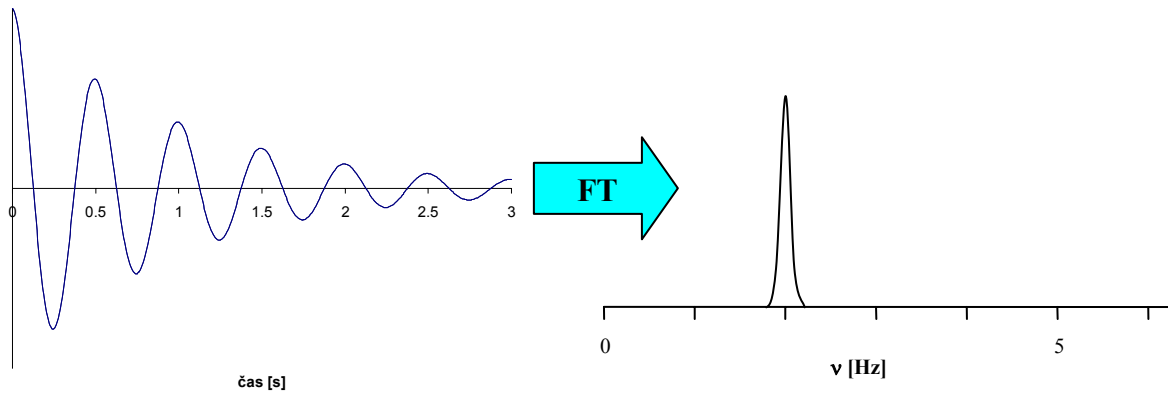
Obr. Chování magnetizací během jednopulzní sekvence. Nahoře je celkový stav a dole průmět do roviny  $xy$ .



## FOURIEROVA TRANSFORMACE

FID je časový záznam intenzity indukovaného proudu v měřící cívce (na ose  $x$  je čas) a spektrum je závislost spektrální intenzity na frekvenci (na ose  $x$  je frekvence). Fourierova transformace je matematický nástroj, který umožňuje z časového záznamu (FIDu) získat spektrum. Na obrázku xx je několik příkladů časových závislostí a spekter vzniklých po Fourierově transformaci. Obrázek xxa vlevo představuje neklesající periodickou funkci (cosinus), u které za jednu sekundu proběhnou dvě periody. Vpravo je pak spektrum vzniklé po Fourierově transformaci této funkce. Ve spektru vidíme polopřímku protínající osu  $x$  v bodě 2 Hz (2 periody za sekundu). Na obrázku xxb je klesající cosinová funkce se stejnou periodou jako na obrázku xxa. Podobně by vypadal FID změřený u vzorku s jedním signálem. Fourierovou transformací této klesající funkce vznikne signál u 2 Hz. Pološířka signálu (šířka signálu v polovině jeho výšky) souvisí s rychlostí klesání cosinové funkce. Čím rychleji klesá periodická funkce k nule, tím širší je výsledný signál. To je vidět na obrázku xxc, kde je zobrazena periodická funkce se stejnou periodou (dva cykly za sekundu), která ale rychleji klesá k nule. Ve výsledném spektru je širší signál u 2 Hz. Plocha signálu je stále stejná; když se zvětšila šířka signálu, snížila se jeho výška. Na dalším obrázku xxd je opět klesající cosinová funkce, tentokrát s periodou pět cyklů za sekundu. Spektrum vzniklé po Fourierově transformaci obsahuje jeden signál u 5 Hz. Na obrázku xxe je časová funkce, která vznikla součtem dvou klesajících cosinů s periodou dva a pět cyklů za sekundu. Ve výsledném spektru jsou pak dva signály u 2 Hz a 5 Hz. pro skutečnou Fourierovu transformaci používan

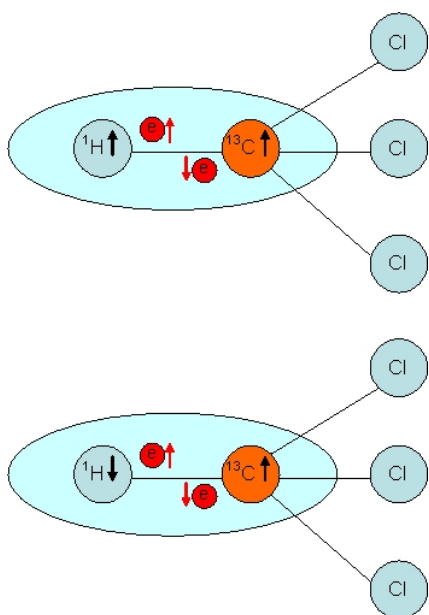




## MAGNETICKÉ INTERAKCE JADER

V NMR spektrech se mohou projevovat dva typy magnetických interakcí mezi jádry atomů v molekulách:

1) Přímé dipól-dipólové (dipolární) interakce jsou důsledkem vzájemného působení magnetických momentů jader prostorem. V izotropních prostředích (kapaliny, roztoky) jsou tyto interakce zprůměrovány k nule rychlými reorientacemi molekul v důsledku Brownova pohybu.

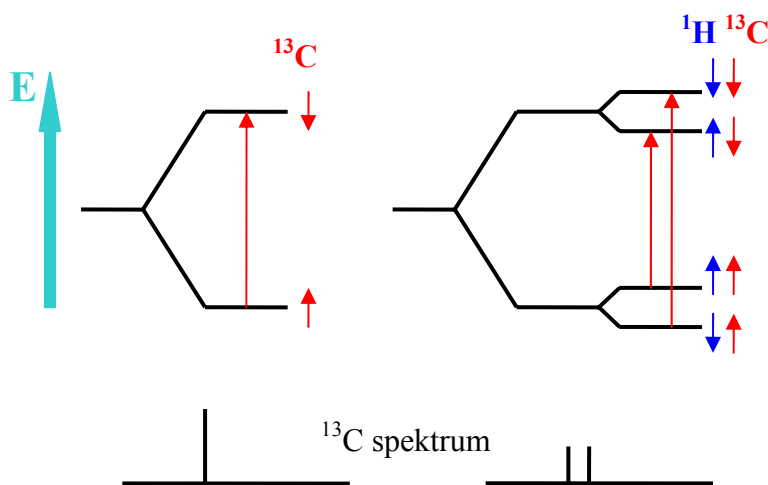


2) Nepřímé spin-spinové interakce (skalární) jsou zprostředkovány vazebnými elektrony (elektrony mají také svůj spin!) a způsobují štěpení (multiplicitu) signálů pozorovatelné v NMR spektrech měřených v izotropních prostředích.

Mechanismus nepřímé spin-spinové interakce si můžeme ukázat na jednoduchém příkladu heteronukleární interakce v molekule chloroformu  $^{13}\text{CHCl}_3$ . Magnetický moment vodíku způsobuje slabou magnetickou polarizaci vazebných elektronů (energeticky výhodnější je opačná orientace spinu jádra a elektronu). Spiny valenčních elektronů se řídí jednak Hundovým pravidlem, jednak

Pauliho principem. Podle Pauliho principu mají elektrony v jednom orbitalu vždy opačný spin. Interakce s jadernými spiny vede ke dvěma možným stavům - mají-li oba jaderné spiny ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ ) stejné znaménko, energie celého systému je poněkud vyšší než u systému s různými znaménky jaderných spinů, kde se znaménka jaderných a elektronových spinů střídají.

Na obrázku xx vlevo je zobrazen energetický diagram jádra uhlíku  $^{13}\text{C}$  v magnetickém poli bez spin-spinové interakce. Toto



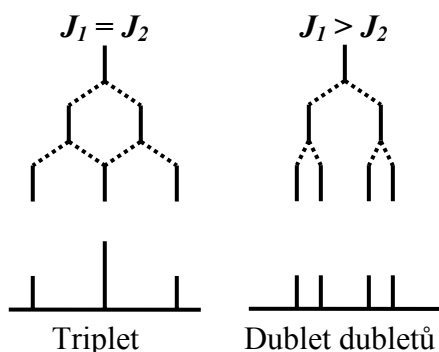
Heteronukleární spin-spinová interakce.

jádro má dva možné spinové stavy ( $\alpha$  a  $\beta$ ), mezi nimiž je energetický rozdíl  $\Delta E$  a ve spektru

Lze pozorovat jeden signál odpovídající tomuto přechodu ( $\alpha \rightarrow \beta$ ). Na obrázku vpravo je situace jádra uhlíku  $^{13}\text{C}$  s nepřímou spin-spinovou interakcí s jádrem vodíku. Oba spinové stavy uhlíku ( $\alpha$  i  $\beta$ ) jsou v důsledku interakce se spiny jádra vodíku štěpeny na dvě energetické hladiny. V tomto diagramu lze pozorovat dva různé přechody jádra  $^{13}\text{C}$   $\alpha \rightarrow \beta$ . Oba přechody mají různý energetický rozdíl  $\Delta E$ , to se projeví ve spektru tím, že pozorujeme dvě různé frekvence. Signál uhlíku  $^{13}\text{C}$  se nám tedy rozštěpil na dvě linie o stejné intenzitě. Stejně rozštěpení signálu můžeme zároveň pozorovat i v  $^1\text{H}$  spektru (energetické hladiny jádra  $^1\text{H}$  jsou rozštěpeny díky interakci s jádrem  $^{13}\text{C}$ ).

Velikost nepřímé spin-spinové interakce udává interakční konstanta  $J$  (jednotkou je Herz, Hz). Tato konstanta se označuje vlevo nahoře indexem udávajícím počet vazeb mezi interagujícími jádry. Podle počtu vazeb mezi interagujícími jádry jsou  $J$  označovány jako přímé ( $^1J$ ), geminální ( $^2J$ ), vicinální ( $^3J$ ) a interakce na velkou vzdálenost ( $^4J$ ,  $^5J$ , ...). V našem příkladu molekuly  $^{13}\text{CHCl}_3$  má přímá spin-spinová interakce  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  hodnotu  $^1J = 208$  Hz. Interakční konstanta  $J$  může být kladná nebo záporná, obojí se ale v jednoduchých NMR spektrech projeví stejně, ze spektra tedy lze odečíst absolutní hodnotu  $J$  ze vzdáleností čar v multipletech. Na rozdíl od chemického posunu interakční konstanty **nezávisí na indukci vnějšího magnetického pole**. Uvedenou interakci **nelze pozorovat mezi chemicky ekvivalentními jádry**.

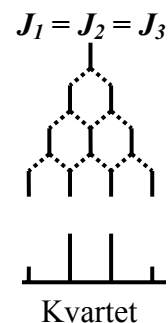
Pokud jádro interaguje s více magnetickými jádry, jejich vliv se ve spektru projevuje následovně: každá linie, která vznikne interakcí s jedním jádrem je dále štěpena na další linie interakcí s dalším jádrem. U běžných jader s  $I = 1/2$  dochází při každé interakci ke vzniku dvou linií z jedné původní. Signál se potom skládá z řady linií a jeho celkový vzhled nazýváme **multiplicita signálu**.



Tak například jádra štěpená interakcí se dvěma jádry se stejnými interakčními konstantami vytvoří **triplet** o poměru intenzit 1:2:1. Prostřední dvojnásobná linie zde vznikla splynutím dvou linií. Tato situace nastane obvykle při štěpení dvěma chemicky ekvivalentními jádry a tento tvar budou mít např. signály  $^{13}\text{C}$  označených v následujících

sloučeninách:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{Cl}_2\text{C}=\text{CH}_2$ .

Pokud nejsou interakční konstanty stejné, pozorujeme ve spektru čtyři linie o stejných intenzitách, tzv. **dublet dubletů**. Vzdálenosti 1. a 2. linie či

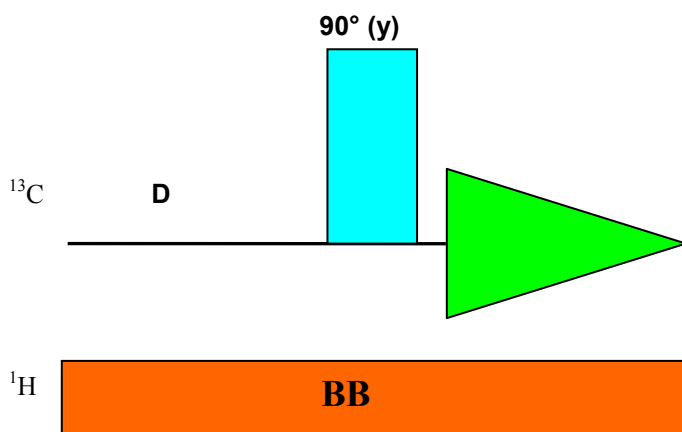


3. a 4. linie představují jednu interakční konstantu, vzdálenosti 1. - 3. a 2. - 4. konstantu druhou.

Pro štěpení třemi interagujícími jádry již existuje mnoho tvarů výsledného multipletu. Při štěpení se třemi stejnými interakčními konstantami vznikne *kvartet* (čtyři linie v poměru intenzit 1:3:3:1). Kvartetovou strukturu mají obvykle signály jader  $^{13}\text{C}$  methylové skupiny, která obsahuje tři ekvivalentní protony:  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{CH}_3\text{Cl}$ .

## DEKAPLINK

Štěpení signálů způsobené spin-spinovými interakcemi může ztěžovat interpretaci  $^{13}\text{C}$  NMR spekter (dochází k častějšímu překryvu signálů) a navíc zhoršuje poměr signálu k šumu (například signál rozštěpený na dublet má poloviční výšku než singlet) a tím snižuje citlivost měření  $^{13}\text{C}$  NMR spekter a zvyšuje se doba nutná pro naměření spekter. Heteronukleární ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) spin-spinové interakce lze odstranit pomocí takzvaného širokopásmového dekaplinku. Během celé doby měření  $^{13}\text{C}$  spekter jsou jádra vodíku ozařována dalším elektromagnetickým polem s frekvencí odpovídající rezonanční frekvenci jader vodíku. To způsobí rychlé



Pulzní sekvence pro měření  $^{13}\text{C}$  NMR spekter.

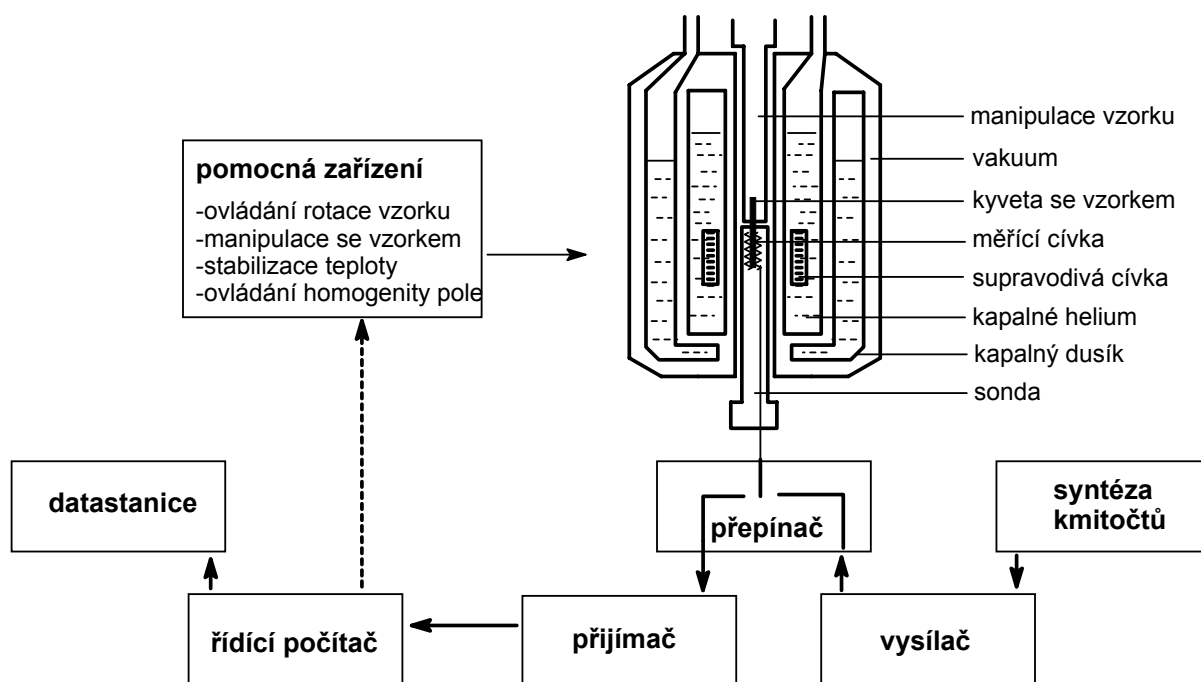
přechody mezi spinovými stavy  $\alpha$  a  $\beta$  a tím pádem vyrušení spin-spinové interakce jader vodíku s jádry uhlíku. V pulzní sekvenci je dekaplink označen obdélníkem ve vodíkovém kanále a označením BB (zkratka z Broad Bend decoupling – širokopásmový dekaplink).  $^{13}\text{C}$  NMR spektra se většinou měří s dekaplinkem.

## PŘÍSTROJE A TECHNIKA

U většiny současných NMR spektrometrů určených pro měření kapalných vzorků je magnetické pole vytvářeno supravodivými cívkami tvořenými několika tisíci závity ze speciálních slitin. Cívka je ponořena v kapalném heliu a teče jí proud okolo 100 A. Intenzita takto dosaženého magnetického pole je 4 - 18 T. Pole musí být vysoce stabilní, jeho kolísání vede k rozšíření linií ve spektru. Stejně tak vede k rozšíření linií nízká homogenita

magnetického pole - pokud se vyskytují jinak identická jádra z různých částí vzorku při různém poli, rezonují při různých frekvencích. Homogenita pole se upravuje speciální sadou prostorově různě orientovaných cívek, u nichž se intenzita proudu a tím i dodatkového pole upravují pro každý vzorek zvlášť. Část nehomogenit je možno eliminovat rotací kyvety se vzorkem, protože každé jádro prochází během otočky různými oblastmi magnetického pole.

U současných FT spektrometrů je obvykle stejná cívka použita pro vyslání pulzu i pro snímání odezvy. Další cívka nebo cívky slouží pro vysílání frekvencí jiného jádra, vytváření gradientů pole a pod. Při manipulaci se spinovými systémy je k cívce připojen syntezátor frekvencí opatřený zesilovačem (vysílačem) o výkonu obvykle 50-300 W, který musí být schopen produkovat krátké radiofrekvenční pulsy o přesné amplitudě, frekvenci a fázi. Vysílače bývají obvykle dva nebo více, protože často je ozařováno i jiné jádro než měřené. Kromě toho je další nezávislý kanál využit pro udržení stabilního pole (lock), ten obvykle využívá jader deuteria v použitém rozpouštědle. Při snímání odezvy systému je cívka přepnuta na přijímač, kde je signál zesílen, detekován a filtrován. Proces není jednoduchý, protože je výhodné zachytit nejen amplitudu signálu, ale i jeho fázi a dále je třeba rozlišit od sebe signály po obou stranách excitační frekvence. U různých přístrojů je tento proces do různé míry digitalizován. Další zpracování je vždy digitální. Část NMR spektrometru, kde jsou umístěny přijímací a vysílací cívky, korekční cívky pro dosažení maximální homogenity pole a zařízení ovládající přesné nastavení teploty vzorku se nazývá sonda. Sondy lze v případě potřeby měnit. Některé sondy jsou konstruovány tak, že umožňují měřit určitý typ experimentu s větší citlivostí. FID je uložen do paměti řídicího počítače, kde jsou FIDy z jednotlivých průchodů sčítány a poté je provedena Fourierova transformace a další zpracování spektra.



## ROZPOUŠTĚDLO, STANDARD

Vzorek je rozpuštěn v deuterovaném rozpouštědle a umístěn v kyvetě, která je přesunuta do středu magnetu na místo obklopené cívkami. Deuterovaná rozpouštědla se používají, protože rozpouštědlo je oproti měřené látce většinou v obrovském nadbytku a signál vodíku  $^1\text{H}$  rozpouštědla by tak byl v  $^1\text{H}$  NMR spektru mnohem intenzivnější a mohl by

Rozpouštědlo	Vzorec	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$
Chloroform	$\text{CDCl}_3$	7,26	77,0
Benzen	$\text{C}_6\text{D}_6$	7,27	128,0
Acetonitril	$\text{CD}_3\text{CN}$	1,94	1,3 118,2
Aceton	$\text{CD}_3\text{COCD}_3$	2,05	29,8 206,3
Dimethylsulfoxid	$\text{CD}_3\text{SOCD}_3$	2,50	39,5
Methanol	$\text{CD}_3\text{OD}$	3,31	49,0
Voda	$\text{D}_2\text{O}$	$\sim 4,8$	-

překrýt signály měřené látky. Deuterace rozpouštědel není nikdy stoprocentní a tak je v  $^1\text{H}$  NMR spektrech vidět i signál nedeuterovaného rozpouštědla. V  $^{13}\text{C}$  spektrech pak můžeme pozorovat i signály uhlíků rozpouštědla, které bývají kvůli spin-spinové interakci s deuteriem rozštěpeny na multiplety.

Tabulka xx. Chemické posuny běžně používaných deuterovaných rozpouštědel.

Počátek stupnice chemických posunů  $\delta$  se z technických důvodů stanovuje obtížně v absolutní hodnotě; ujal se používání vhodného standardu, který má ve spektru jedinou linii, kterou lze snadno najít mezi ostatními liniemi a přidává se buď přímo k měřené látce (interní standard) nebo v zatavené kapiláře do kyvety se vzorkem (externí standard). Pro  $^1\text{H}$  NMR

spektra to je nejčastěji tetramethylsilan (TMS),  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$  s dvanácti ekvivalentními vodíkovými atomy, ve spektrech je to singletový signál obvykle nejvíce vpravo. Pro  $^{13}\text{C}$  NMR spektra se u roztoků v  $\text{CDCl}_3$  nejčastěji používá prostřední linie jeho signálu s posunem  $\delta = 77$  ppm. Tetramethylsilan není rozpustný ve vodě, proto se při měření ve vodných roztocích používají jiné standardy (například 1,4-dioxan s chemickým posunem  $^1\text{H}$  3,75 ppm).

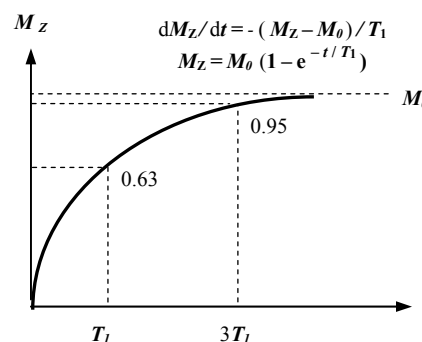
## RELAXACE

Magnetizace směřuje v rovnovážném stavu ve směru osy  $z$ . Aplikací elektromagnetických pulzů stáčíme magnetizaci z osy  $z$  a jaderný spinový systém je vyveden z rovnováhy. Systém se postupně vrací zpět do rovnovážného stavu a tomuto jevu říkáme relaxace. V NMR spektroskopii se rozlišují dva typy relaxačních dějů: **podélná relaxace** a **příčná relaxace**.

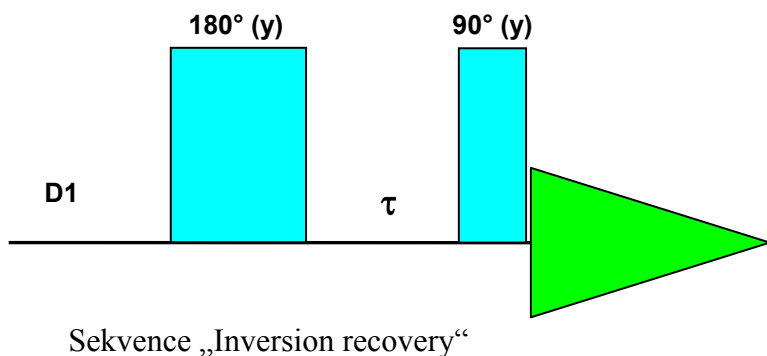
Během podélná relaxace (spin-mřížkové, longitudální) se znovu buduje rovnovážná magnetizace v ose  $z$ . Například v pulzní sekvenci pro měření vodíkových NMR spekter je  $90^\circ$  pulz, který sklopí magnetizaci z osy  $z$  do roviny  $xy$ . Bezprostředně po tomto pulzu je tedy magnetizace v ose  $z$  nulová. Díky podélné relaxaci se znovu vybuduje rovnovážná magnetizace v ose  $z$ . Nárůst magnetizace v ose  $z$  probíhá podle rovnice

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1}),$$

kde  $M_z$  je velikost magnetizace v ose  $z$ ,  $M_0$  je rovnovážná magnetizace,  $t$  je čas po  $90^\circ$  pulzu a  $T_1$  je spin mřížkový relaxační čas. Čím je  $T_1$  kratší, tím rychleji je znovu dosaženo



rovnovážného stavu.  $T_1$  bývá nejčastěji několik sekund, ale v některých případech může být i mnohem kratší nebo delší (až několik hodin).

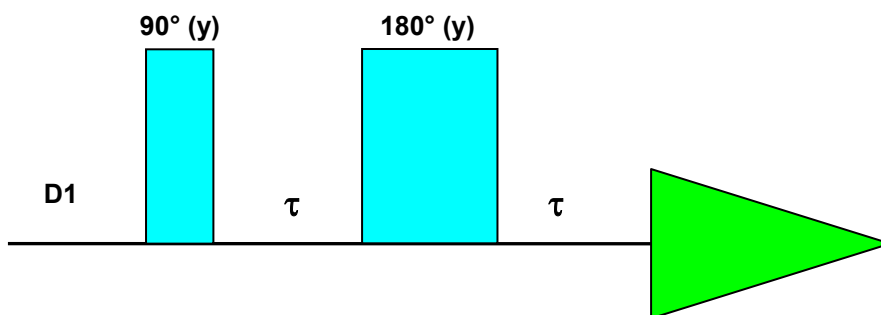
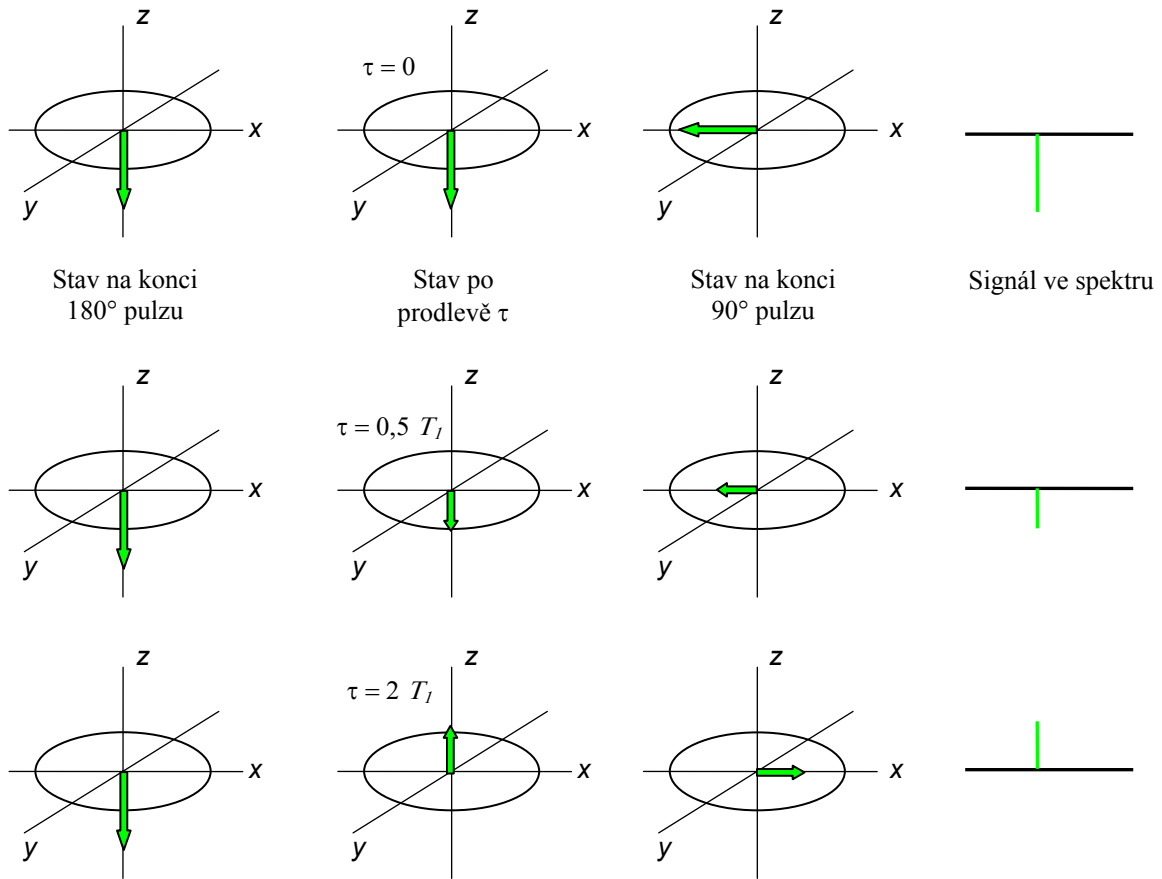


Pro měření relaxačních časů  $T_1$  se používá pulzní sekvence „inversion recovery“.

Tato sekvence obsahuje  $180^\circ$



pulz, který sklopí magnetizaci do osy  $-z$ , poté následuje prodleva  $\tau$ , kterou můžeme měnit. Během prodlevy  $\tau$  dochází k podélné relaxaci, magnetizace v  $-z$  se zmenšuje, prochází nulou a pak se znovu vytváří magnetizace v ose  $+z$ . Po prodlevě  $t$  následuje  $90^\circ$  pulz a detekce signálu.



Sekvence „Spinové echo“