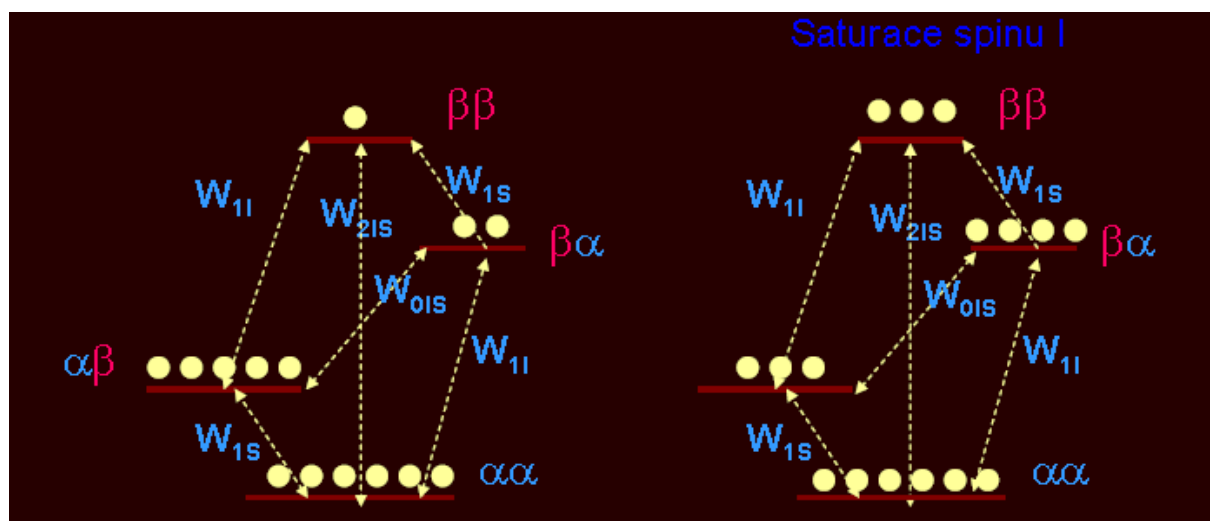


Nukleární Overhauserův efekt (NOE)

NOE je důsledek dipolární interakce mezi dvěma jádry. Vzniká přímou interakcí volně přes prostor, tudíž není ovlivněn chemickými vazbami jako nepřímá spin-spinová interakce. V případě NOE selhává představa monoexponenciální podélné relaxace, jedná se o tzv. relaxaci křížovou, kdy změna stavu jednoho spinu ovlivňuje stav spinu druhého. Jedná se o skutečný přenos z -magnetizace, tedy energie. V důsledku toho potom ve spektru vidíme změněné intenzity. NOE je nedílnou součástí podélné relaxace.

Nejjednodušším systémem, kde lze NOE pozorovat, je systém dvou spinů I a S, které mezi sebou nemají skalární interakční konstantu ($J_{IS} = 0$). I a S mohou být například protony, ale i jiná jádra, potom rozlišujeme homonukleární NOE (obě jádra jsou stejná), nebo heteronukleární NOE (jádra jsou rozdílná). Intenzita signálu je dána rozdílem populací spinů v různých energetických stavech (viz obr. 1).

Obr. 1: energetický diagram dvouspinového systému IS



- W je pravděpodobnost přechodu mezi hladinami. Pro systém v rovnováze máme W_{11} a W_{1S} přechody, které jsou jednokvantové.
- W_{0IS} a W_{2IS} jsou **nul-** a **dvou kvantové** přechody.
- Intenzita pozorovaného signálu spinů **I, S** je dána rozdílem populací jejich stavů α , β .

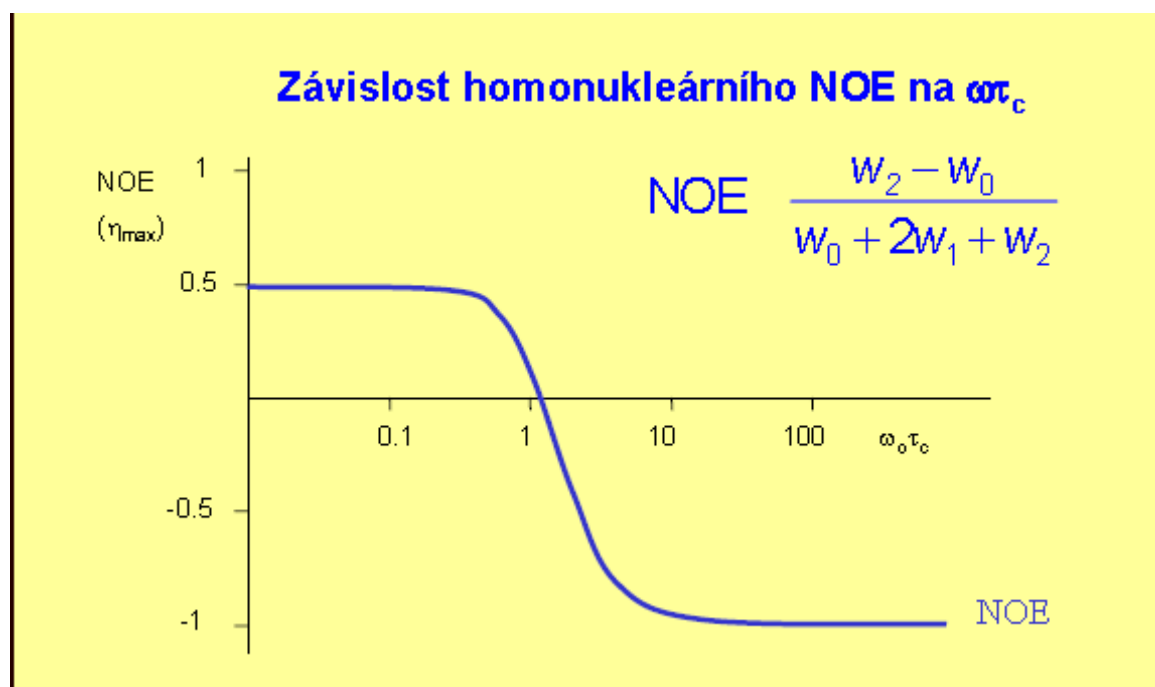
V rovnováze jsou dovolené jednokvantové přechody W_{11} a W_{1S} . V NOE experimentu, který zahrnuje saturaci jednoho jádra, dojde ke změně populací stavů, mohou nastat i přechody tzv. nulkvantové (W_{0IS}) a dvoukvantové (W_{2IS}), které jsou však spektroskopicky zakázané a ve

spektru se neprojeví. Provedeme-li saturaci spinu I, dojde ke změnám populací stavů a ke křížové relaxaci, kdy změna stavu jednoho spinu ovlivňuje stav spinu druhého.

Pravděpodobnosti nul- a dvoukvantových přechodů souvisí s rychlostí pohybu molekul a s velikostí magnetického pole. Dvoukvantové přechody jsou nejpravděpodobnější, pokud je rychlost reorientace molekul blízká dvojnásobku rezonanční frekvence (např. 1 GHz pro ^1H na 500 MHz přístroji). Nulkvantové přechody jsou nejpravděpodobnější, jestliže je rychlost reorientace molekul blízká rozdílu rezonančních frekvencí mezi sledovanými jádry (např. pozorujeme-li NOE mezi vodíky s chemickými posuny 3.0 a 4.0 ppm na 500 MHz přístroji, rozdíl rezonančních frekvencí je $(4.0 - 3.0) \times 500 = 500$ Hz).

Malé molekuly mají krátký korelační čas τ_c , což je doba, za kterou se molekula otočí o jeden radián. U těchto molekul při relaxaci převládá W_2 nad W_0 , NOE bude pozitivní. Naopak, u molekul s velkým korelačním časem (např. makromolekul) se více uplatňují nulkvantové přechody a NOE je negativní. Středně velké molekuly tudíž mohou mít NOE přibližně nulový a tedy nepozorovatelný (viz obr. 2)

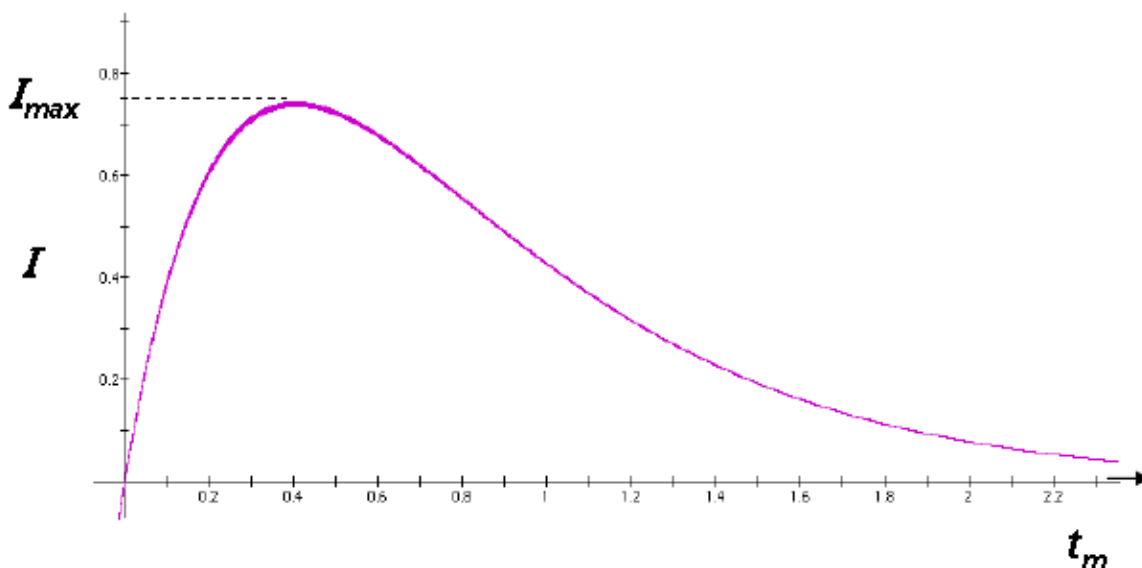
Obr. 2: Závislost homonukleárního NOE na $\omega \cdot \tau_c$



ω_0 ...rezonanční frekvence, τ_c ...korelační čas

Intenzita NOE signálu také závisí na směřovací době τ_m . Měřeními při různých hodnotách τ_m získáme tzv. NOE výstavbovou křivku. Po delším čase NOE klesne k nule v důsledku podélné relaxace a spinové difuze (obr. 3).

Obr. 3: Závislost intenzity signálu na směšovací době τ_m



I ...intenzita signálu v NOE spektru

τ_m ...směšovací čas

Kvantitativně lze efekt NOE popsat pomocí koeficientu η (částečné navýšení signálu), který udává, o kolik se zvýší intenzita signálu vlivem NOE, pokud jádra mají krátký korelační čas a jejich relaxace probíhá pouze dipolárním mechanismem. η lze vypočítat pomocí gyromagnetických poměrů obou jader (I a S):

$$\eta = \frac{\gamma_I}{2\gamma_S} \quad S \dots \text{pozorované jádro}, I \dots \text{saturované}$$

Výsledná intenzita pozorovaného signálu I je dána vztahem:

$$I = (1 + \eta) \cdot I_0$$

Pomocí těchto vzorců lze vypočítat, že zvýšení ^{13}C signálu může být maximálně trojnásobné (saturujeme-li ^1H), při obráceném postupu (saturace ^{13}C , pozorování ^1H) je navýšení pouze 12,5 %. V homonukleárním experimentu je maximální možné navýšení signálu o 50 %.

Proto v heteronukleárním NOE experimentu saturujeme nejcitlivější jádro (s nejvyšším γ) a pozorujeme méně citlivé jádro. V případě jader ^{15}N může být faktor η až -5, signál je pak

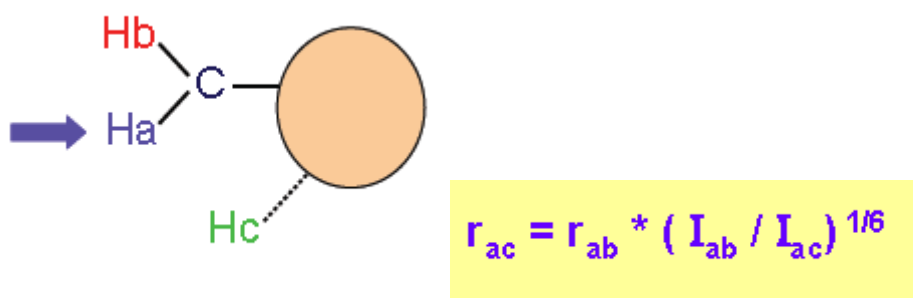
negativní. To může způsobit komplikace v případě, že výsledné η bude vlivem molekulárních a experimentálních faktorů blízké -1, signál ze spektra vymizí.

Multi-spinový systém

V multi-spinovém systému může být NOE negativní i z jiných příčin, než je nul kvantový přechod. Ve tří-spinovém systému A-B-C mají sousední jádra mezi sebou dipolární interakci, mezi jádry A a C však k dipolární interakci nedochází. Saturujeme-li jádro A, budou změněny populace jádra B a intenzita jeho signálu vzroste. Dipolární interakce B-C je však ovlivněna novou populací spinů B, která se liší od rovnovážného stavu. Tímto způsobem dojde k nepřímému ovlivnění jádra C a ke změně intenzity jeho signálu, tzv. nepřímý NOE nebo také spinová difúze. Nepřímý NOE je vždy negativní.

NOE lze využít k měření intramolekulárních vzdáleností pomocí η . Je však nutné mít v molekule standard vzdálenosti, např. CH₂ skupinu (obr. 4)

Obr. 4: vzorec pro výpočet vzdálenosti jader z NOE experimentu



I – intenzita signálu (integrace nebo měření výšky signálů o stejné pološířce)

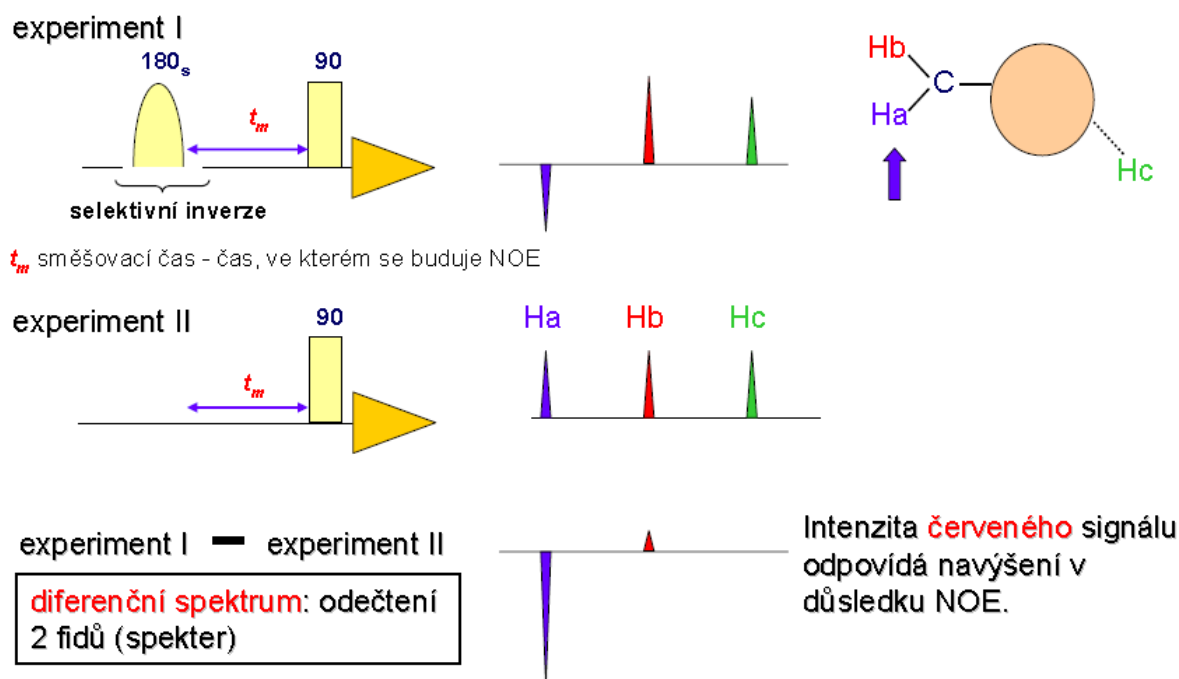
r_{ab} – meziatomová vzdálenost (známá)

r_{ac} - meziatomová vzdálenost (měřená)

Experimentální aspekty:

Jednodimenzionální NOE experimenty umožňují měřit změny intenzit signálů. Většinou však postačuje kvalitativní zjištění, že ke změně intenzity signálu vůbec došlo. Nejprve změříme klasické spektrum, potom spektrum s NOE a získaná spektra navzájem odečteme. Rozdílové spektrum obsahuje pouze ty signály, u kterých dochází ke změně intenzity v důsledku NOE. Negativní signály se vždy objeví na pozici saturovaného jádra, protože v NOE spektru saturovaný signál vymizí. Při měření je potřeba snímat mnoho FIDů, abychom získali dobrý poměr signál/šum.

Obr. 5: 1D NOE experiment (diferenční spektrum)



NOE závisí na dipól-dipól relaxaci, ostatní intra- nebo intermolekulární relaxační procesy redukují částečný přírůstek vlivem NOE, někdy až na nulu. Proto je v praxi nutné dodržovat určitá pravidla:

- Vzorek nesmí obsahovat žádná paramagnetická aditiva a nečistoty, kyslík musí být odstraněn
- Rozpouštědlo by nemělo obsahovat žádné protony (vysoce deuterované)
- Vzorek musí být dokonale rozpuštěn a mít malou viskozitu
- Při rozhodování, jestli měřit NOE methyly nebo jednotlivého protonu, vždy saturujeme signál CH₃ a měříme intenzitu samotného protonu, protože relaxace protonů v methyly je způsobená hlavně interakcí mezi sebou navzájem, NOE efekt je tedy malý (jen několik %) nebo vymizí úplně.

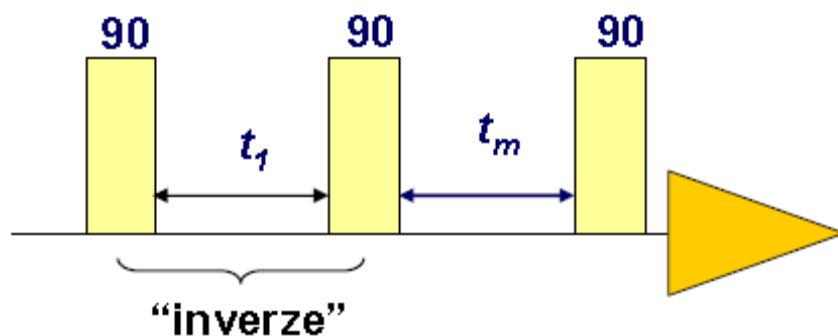
Hranicí pro pozorování NOE je 5 Å, v ideálním případě je lepší, je-li vzdálenost méně než 3Å. Nesmíme zapomenout, že zvýšení signálu v 1D NOE závisí nejen na mezijaderné vzdálenosti, ale také na tom, zda se před snímáním FIDu stačila ustanovit rovnováha.

NOESY (Nuclear Overhauser spectroscopy)

NOESY patří mezi 2D NMR techniky. Změna magnetizace v průběhu směšovací doby je založena na NOE. V NOESY spektru je na diagonále klasické 1D spektrum, krosníky indikují

interakce přes prostor. Využití NOESY spekter je dnes rozšířené zejména v konformační analýze biomolekul, kdy můžeme zjistit vzdálenost jader v prostoru a získat tak 3D obraz molekul. Analýza dat NOE experimentů pro velké molekuly (M_r nad 20 000), které mají ve spektru několik set krosníků, vyžaduje výkonné programy a počítače na zpracování.

Obr. 6: pulzní sekvence NOESY

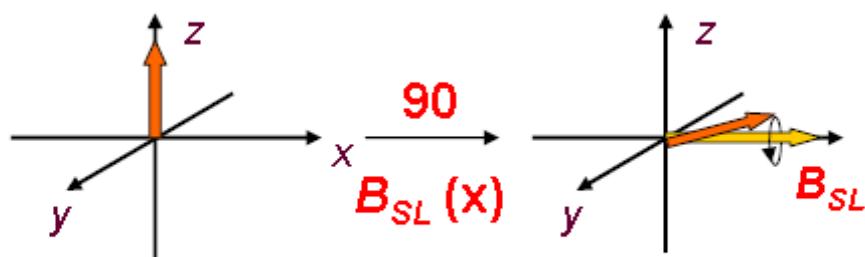


Selektivní inverze každého protonu zvlášť je zdlouhavá, v NOESY lze studovat všechny protony najednou. Během času t_1 se vytváří 2. dimenze. Během směšovacího času t_m dochází ke **křížové relaxaci** mezi spiny, které interagují přes prostor. V 2D spektru jsou chemické posuny v obou dimenzích, mezi interagujícími spiny jsou krosníky. Velikost krosníků závisí na velikosti NOE a tedy na vzdálenosti mezi jádry.

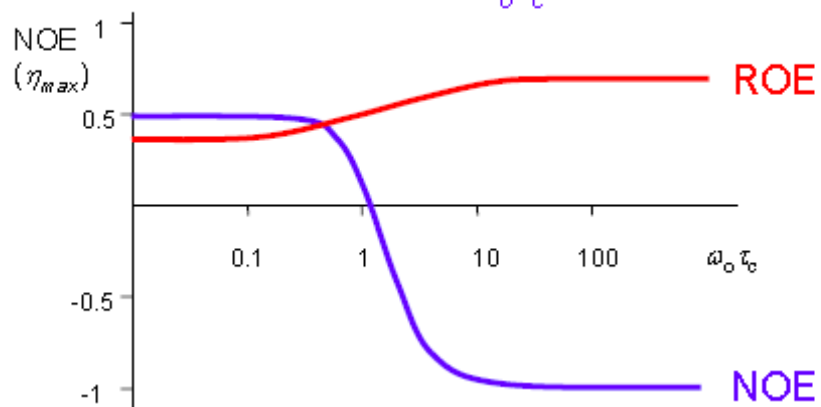
U středně velkých molekul může být NOE přibližně nulové a měřit NOESY spektrum pak nemá smysl. Navíc v některých případech může NOE konkurovat chemická výměna, která je způsobena přenosem magnetizace podobným NOE. V mnoha systémech se uplatňují oba mechanismy zároveň a jsou tedy pozorovatelné zároveň. Protože přenos magnetizace vlivem chemické výměny je vždy negativní, lze ji v případě malých molekul od NOE snadno odlišit. Pro velké molekuly, které mají NOE záporný, je to však složitější. V těchto případech je výhodné změřit ROESY spektrum (**ROTATING FRAME SPECTROSCOPY**). Princip spočívá ve sklopení magnetizace do osy x, jejím uzamčení v ose x, nastane precese kolem nového B_{SL} . Rezonanční frekvence ω_{SL} bude velmi malá, tím bude $\omega_{SL} \tau c \ll 1$ a všechny NOE signály tedy budou pozitivní (viz obr. 7)

Obr. 7: ROESY

Spin-locking - práce v nižších polích



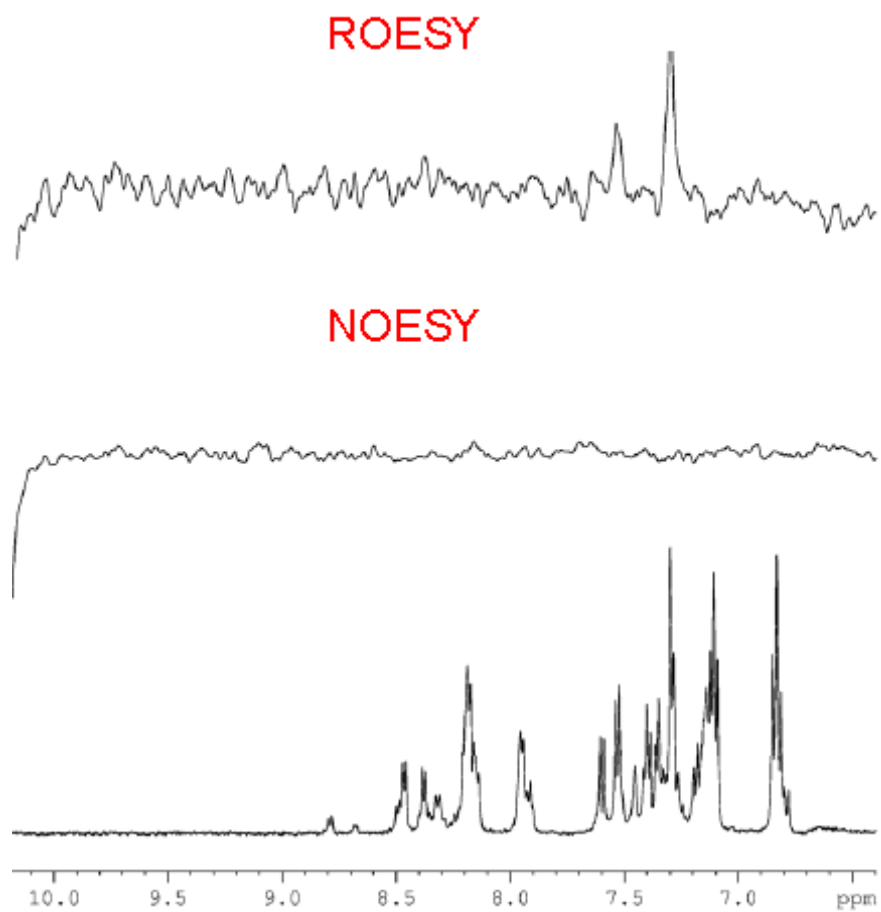
Závislost homonukleárního NOE na $\omega_0 \tau_c$



B_0 100 až 800 MHz $\omega_{SL} \ll \omega_0$

B_{SL} 2 až 5 kHz $\omega_{SL} \tau_c \ll 1$

Obr. 8: NOESY a ROESY spektrum středně velké molekuly

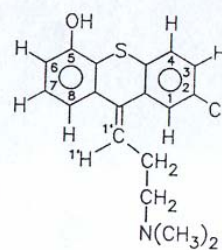


Příklady NOESY spekter:

Na obr. 9 je příklad využití NOE experimentu při určení struktury, popis experimentu je pod spektrem. Na obr.10 je příklad reálného NOESY spektra α -methyl-3-*O*-methylcellobiosidu.

Example 1:

- The psychiatric drug chlorprothixene (4) metabolizes in humans and animals. Chemical and mass spectrometric studies [3] have shown that in the principal metabolite a hydrogen atom in one of the two benzene rings has been replaced by a hydroxyl group. The analysis of the 300 MHz ^1H NMR spectrum (Fig. 10-4) indicates that this OH group must be attached at either the 5- or the 8-position. An NOE experiment showed that the correct position is on C-5. Saturating the resonances of H-1' ($\delta = 5.84$), which is one of the protons in the side-chain, produced a positive NOE for the doublet of doublets at $\delta \approx 7.02$, which had previously been assigned to



4

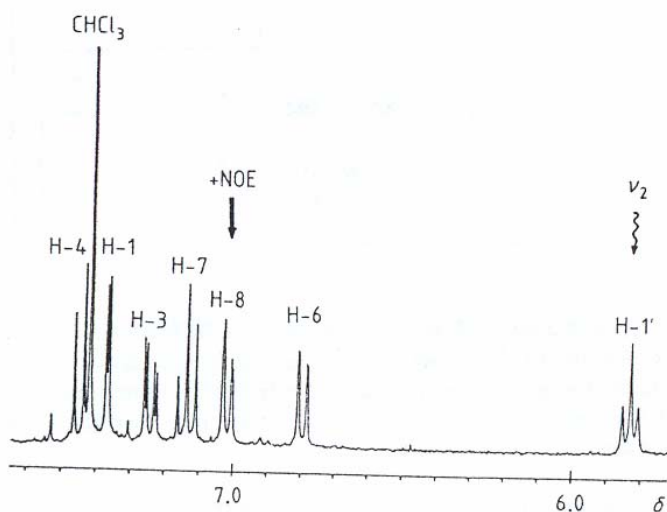


Figure 10-4.

Portion of the 300 MHz ^1H NMR spectrum of chlorprothixene (4) in CDCl_3 with assignments. When the H-1' resonances ($\delta = 5.84$) are saturated the intensity of the doublet of doublets at $\delta = 7.02$ is increased due to the NOE.

Obr. 10: NOESY spektrum α -methyl-3-*O*-methylcellobiosidu

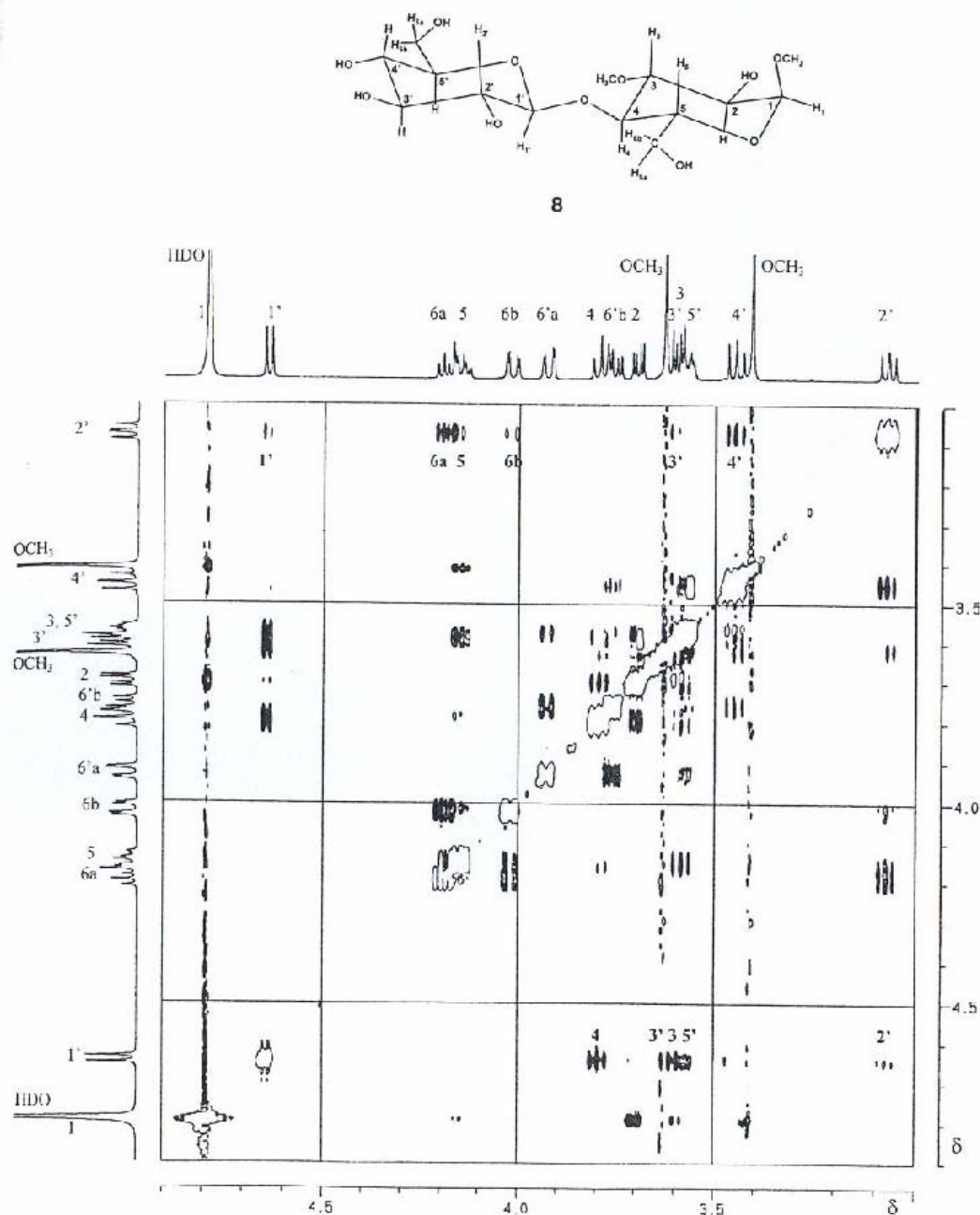


Figure 10-6.

NOESY spectrum of α -methyl-3-*O*-methylcellobioside (3) in D_2O . The 500 MHz 1H NMR spectrum is shown at the top and left-hand edges, with assignments. The H-1 resonance is hidden under the HDO resonance of the solvent. Only the cross-peaks on the horizontal lines starting from H-1' and H-2', the two protons adjacent to the glycosidic bond in ring I, are labeled. The correlation peaks between protons of rings I and II give clear and reliable information about the relative orientation of the two rings.

(Experimental conditions:

approx. 20 mg in 0.5 ml D_2O ; 5 mm sample tube; 128 measurements with t_1 altered in 400 μs increments; mixing time $\Delta t = 2$ s; each measurement with 16 FIDs and 1 K data points; total time approx. 2 h.)

Shrnutí:

Navýšení signálu v důsledku NOE je úměrné vzdálenosti jader, což umožňuje zjišťovat kromě mezijaderných vzdáleností také stereochemii a konformace. V závislosti na velikosti molekuly a její pohyblivosti využíváme různé experimenty, malé organické molekuly měříme diferenční NOE metodou nebo NOESY, proteiny, nukleové kyseliny, sacharidy a jiné velké molekuly NOESY, pro odlišení chemické výměny od NOE používáme ROESY. Středně velké molekuly měříme vždy ROESY.

Výhody 1D NOE experimentu jsou větší rychlost, větší citlivost i rozlišení, navíc získáme výběrovou informaci, pokud ovšem víme, co chceme. 2D NOESY je zdlouhavější, avšak poskytne nám komplexní informaci.