

Dr. Tóth Gábor



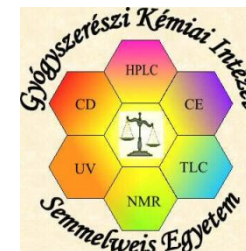
Új irányzatok és távlatok a gyakorlati NMR spektroszkópiában

Lehetőségek és korlátok

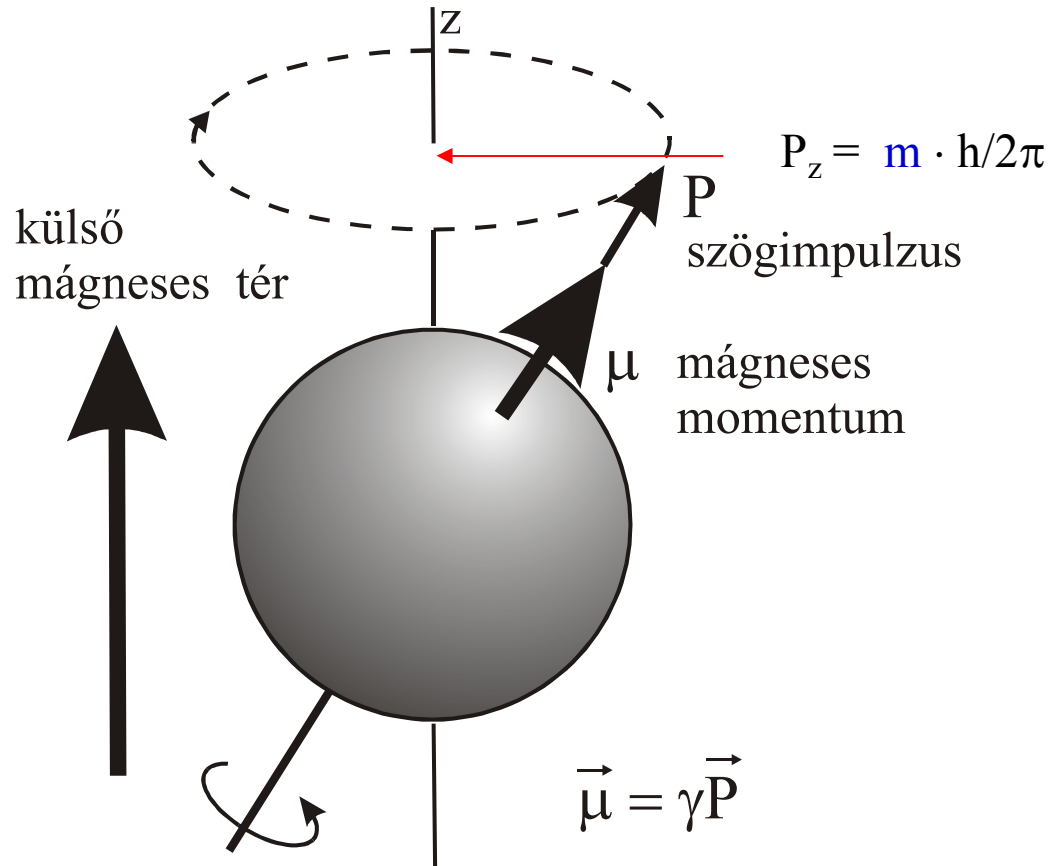
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék



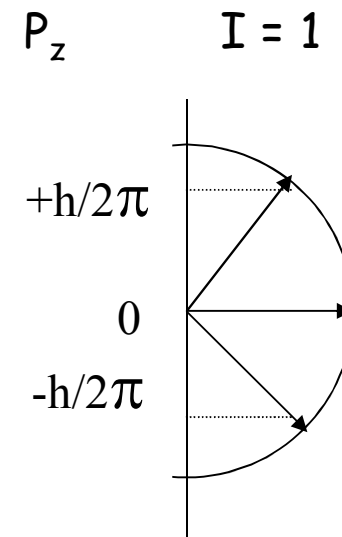
NMR spektroszkópia a
tudományok szolgálatában
2017. BMGE



Az atommagok mágneses sajátságai



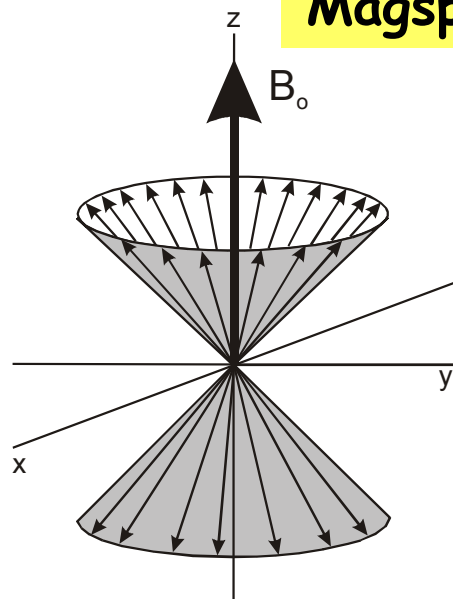
mágneses kvantumszám
 $m = I, I-1, \dots, -I+1, -I$
 $2I + 1$ lehetséges beállítás!



Larmor
 preszesszió

γ : giromágneses hányados
 $\gamma_H/\gamma_C = 4/1$

Magspin energiaszintek felhasadása mágneses térben



$$m = -1/2 \quad E \text{ (alsó)} = -\frac{1}{2} \gamma \frac{h}{2\pi} B$$

$$m = +1/2 \quad E \text{ (felső)} = +\frac{1}{2} \gamma \frac{h}{2\pi} B$$

$$\Delta E = \frac{\gamma \cdot h \cdot B}{2\pi}$$

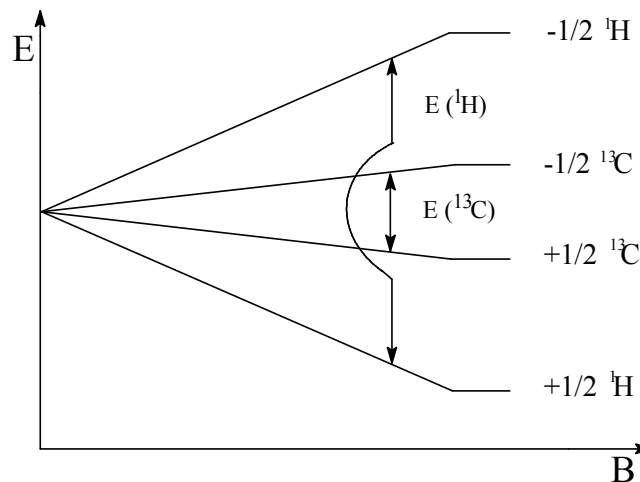
$$\omega = \gamma \cdot B; \quad \nu = 1/2\pi \cdot \gamma B$$

$$h\nu = \Delta E$$

$$\frac{N(\text{felső})}{N(\text{alsó})} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \approx 1 - \Delta E / kT = 1 - \frac{h}{2\pi} \cdot \frac{\gamma B}{kT} \quad (\text{Boltzmann})$$

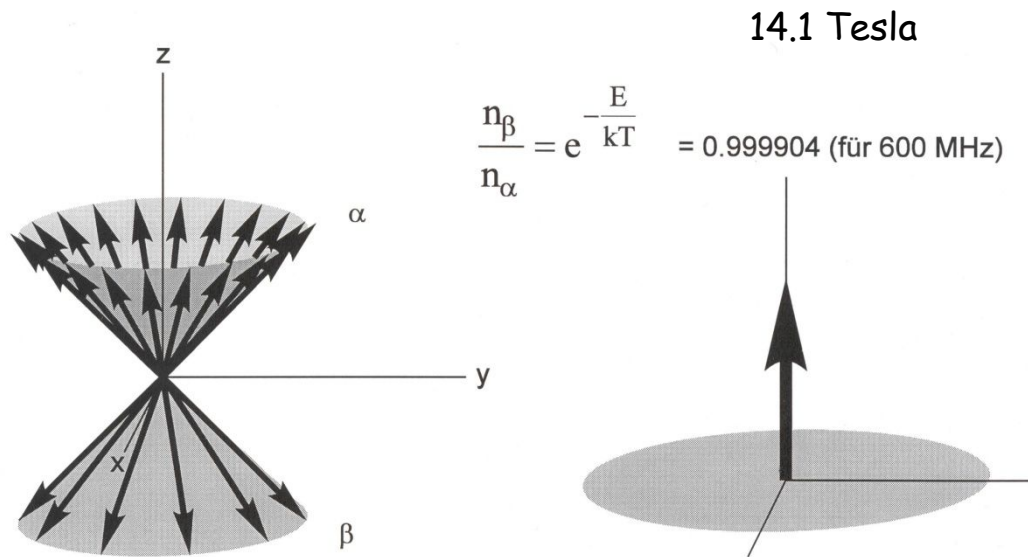
^1H , 2.3 Tesla, 100 MHz
 $\Delta E = 0.04 \text{ Joule/mol}$

Közelítés
(sorfejtés)



γ : giromágneses hányados

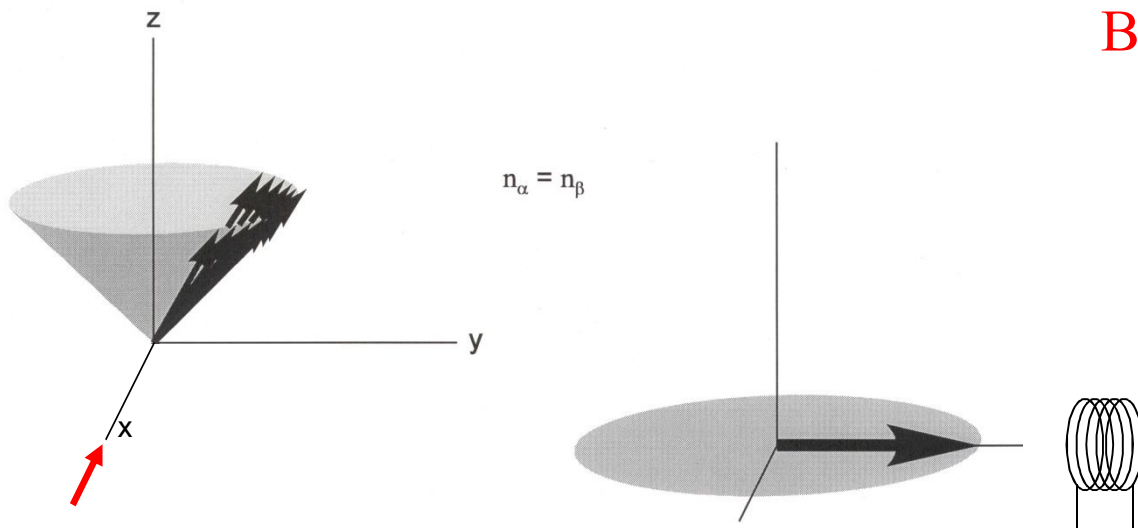
$$\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}} = 4/1$$



A mágnesvektorok mozgása,
irányultsága és megoszlása az
alap- és gerjesztett állapotok közt

$$\omega = \gamma B$$

$$\Delta E = h\nu = \gamma B \cdot h\omega/2\pi,$$



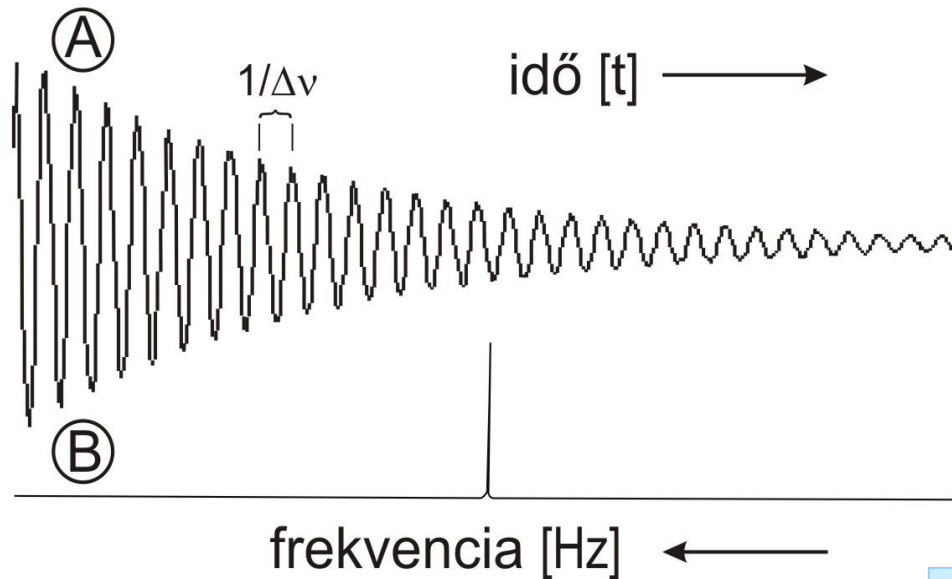
B_1 x-irányú RF-impulzus hatása

Vevőtekerics (detektor)

RF impulzus



Jean Baptiste
Fourier
(1769 - 1830)



FID (Free Induction Decay)

reális + imaginárius
rész

(abszorpció + diszperzió)

(A) **Fourier transzformáció** (B)

Inverz Fourier transzformáció

$$f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(\nu) \exp(-i2\pi\nu t) d\nu$$

$$F(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \exp(+i2\pi\nu t) dt$$

$i = \sqrt{-1}$

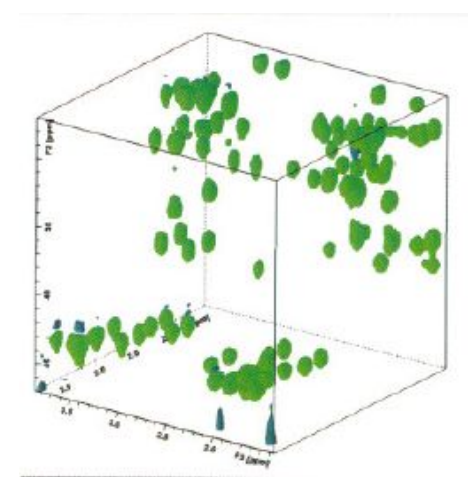
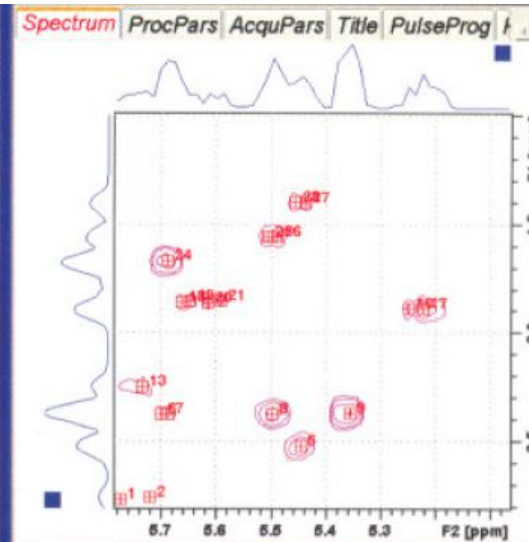
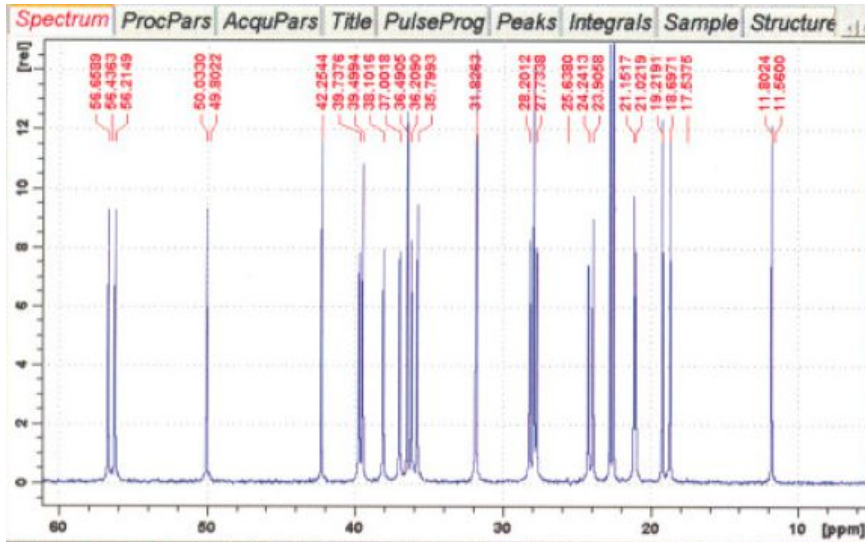
1D egydimenziós

2D kétdimenziós
spektrum

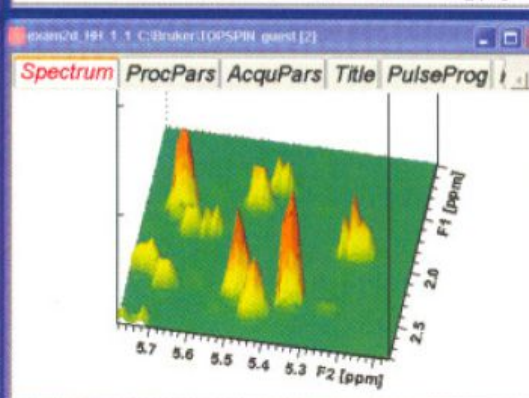
3D háromdimenziós

contour plot

szintvonalas kép



Peak	Index (F1)	ν (F1) [ppm]	Intensity	Annotation
1	6782.3	169.8368	7.75	
2	10952.9	139.5043	8.01	
3	12199.5	130.4373	0.16	
4	12926.7	125.1485	0.19	
5	13295.7	122.4645	8.05	
6	19470.8	77.5532	3.48	
7	19529.3	77.1279	3.64	
8	19587.7	76.7032	3.57	



panoráma kép

NMR Spektrális paraméterek

1. Relaxációs idő [sec]

spin - rács (T_1), spin - spin (T_2)

molekuláris mozgás, (mikrodinamika), NMR-Tomográfia

2. Jelintenzitás

^1H -NMR kvantitatív, protonok számával arányos

^{13}C -NMR nem kvantitatív, NOE (nukleáris Overhauser effektus)

3. Kémiai eltolódás

$$\Delta E = h\nu = h/2\pi \cdot \gamma \cdot B = h/2\pi \cdot \gamma \cdot (B_o + B_{\text{helyi}})$$

kémiai szerkezet, elektroneloszlás, térszerkezet

4. Spin - spin csatolódás

Indirekt (skaláris) spin - spin csatolódás [Hz]

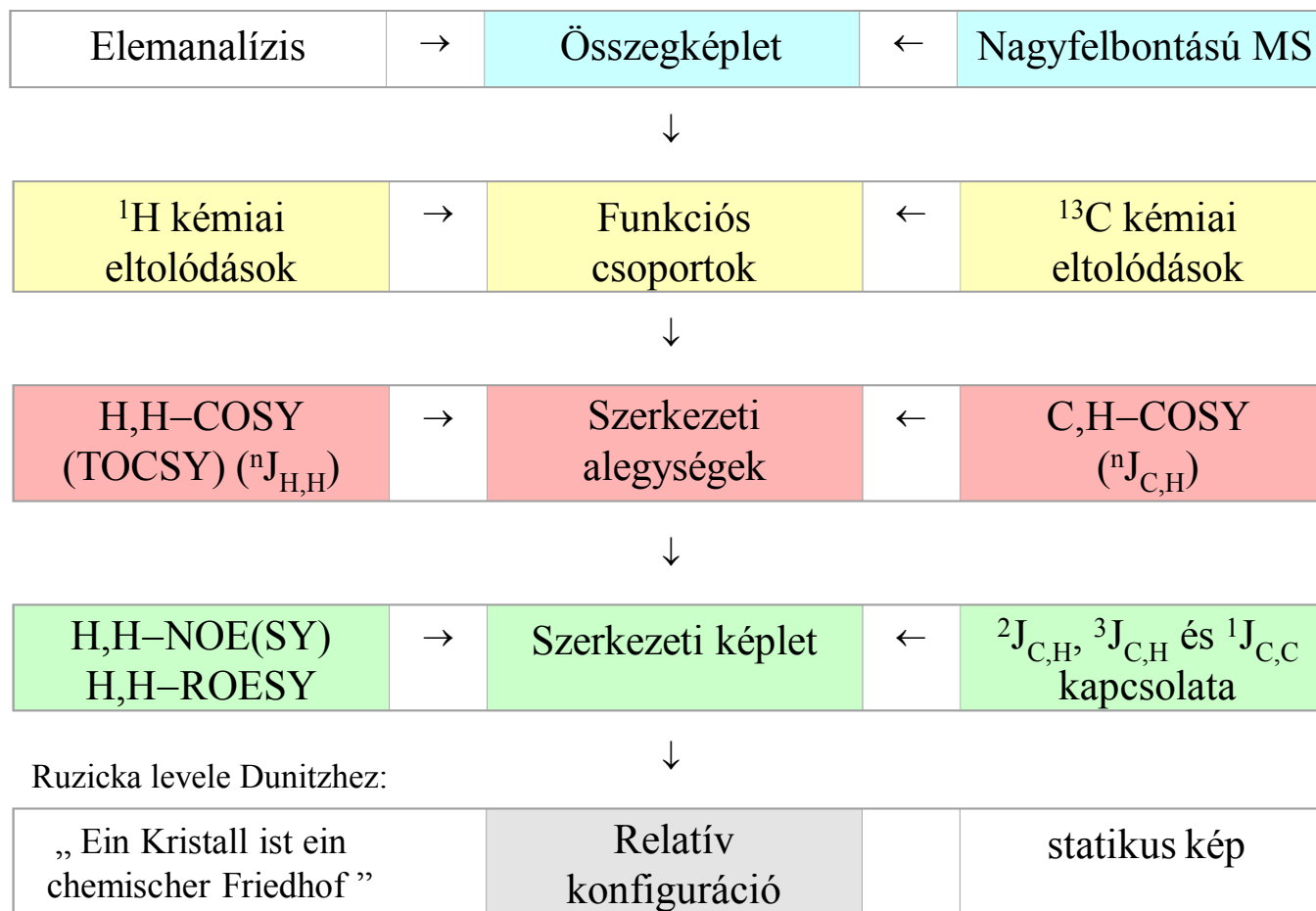
elektronok közvetítik, jelfelhasadást eredményez, multiplicitási szabályok

konnektivitás (magok kapcsolódási sorrendje), elektronsűrűség, térszerkezet

Direkt spin-spin csatolódás: folyadékfázisban kiátlagolódik

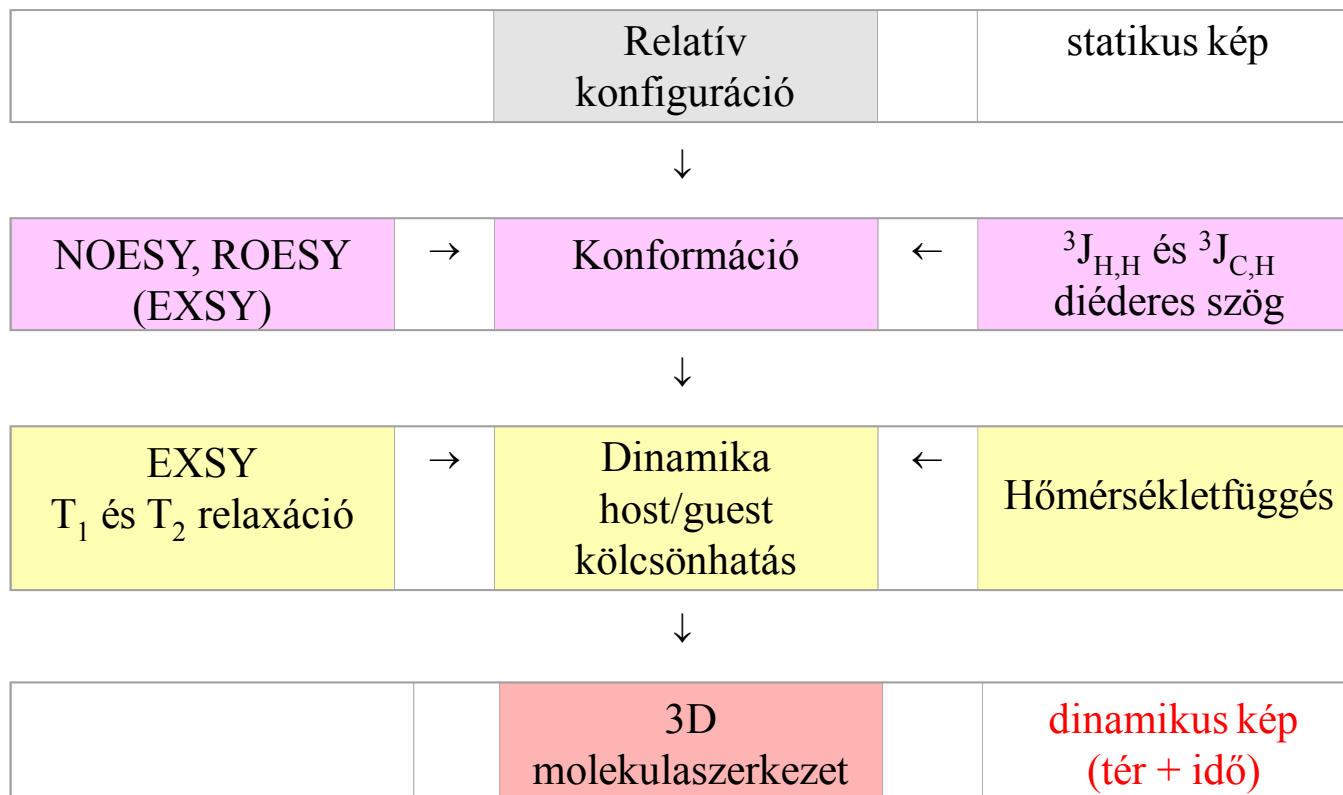
A szerkezetfelderítés stratégiája

NMR módszerekkel



A szerkezetfelderítés stratégiája

NMR módszerekkel (folyt.)

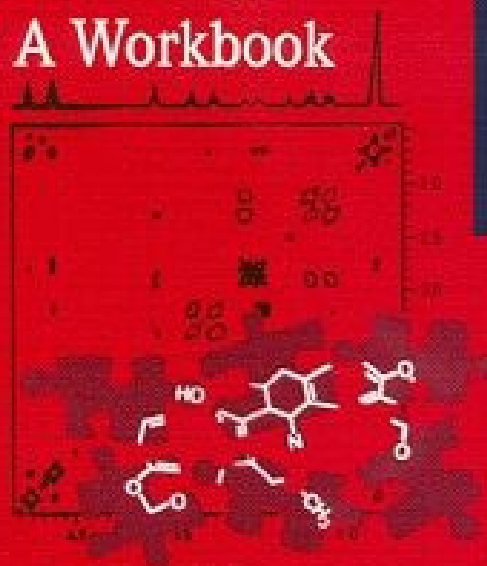


H. Duddleck · W. Dietrich · G. Tóth

1998

Structure Elucidation by Modern NMR

A Workbook



Third, Revised and Updated Edition



STEINKOPFF
DARMSTADT

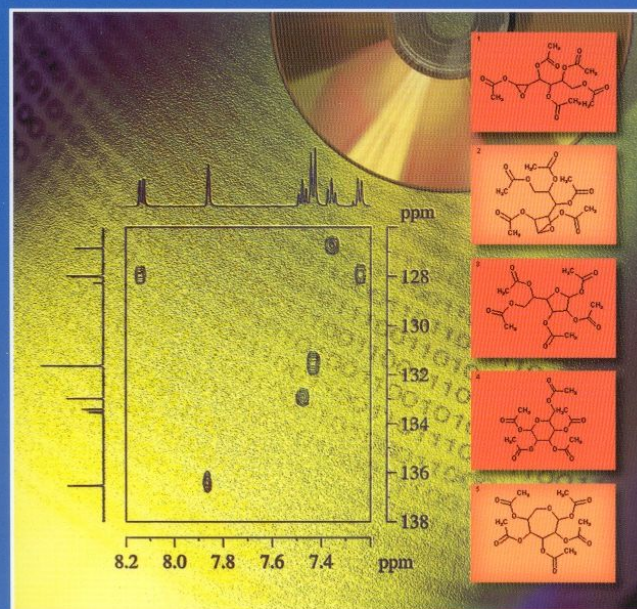


Springer

E. Pretsch, G. Tóth, M. E. Munk, M. Badertscher

Computer-Aided Structure Elucidation

Spectra Interpretation and Structure Generation



Textbook

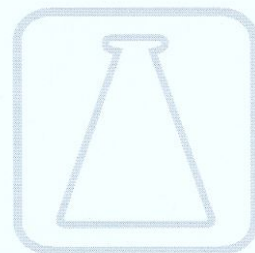


2005

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRŐK KARRA

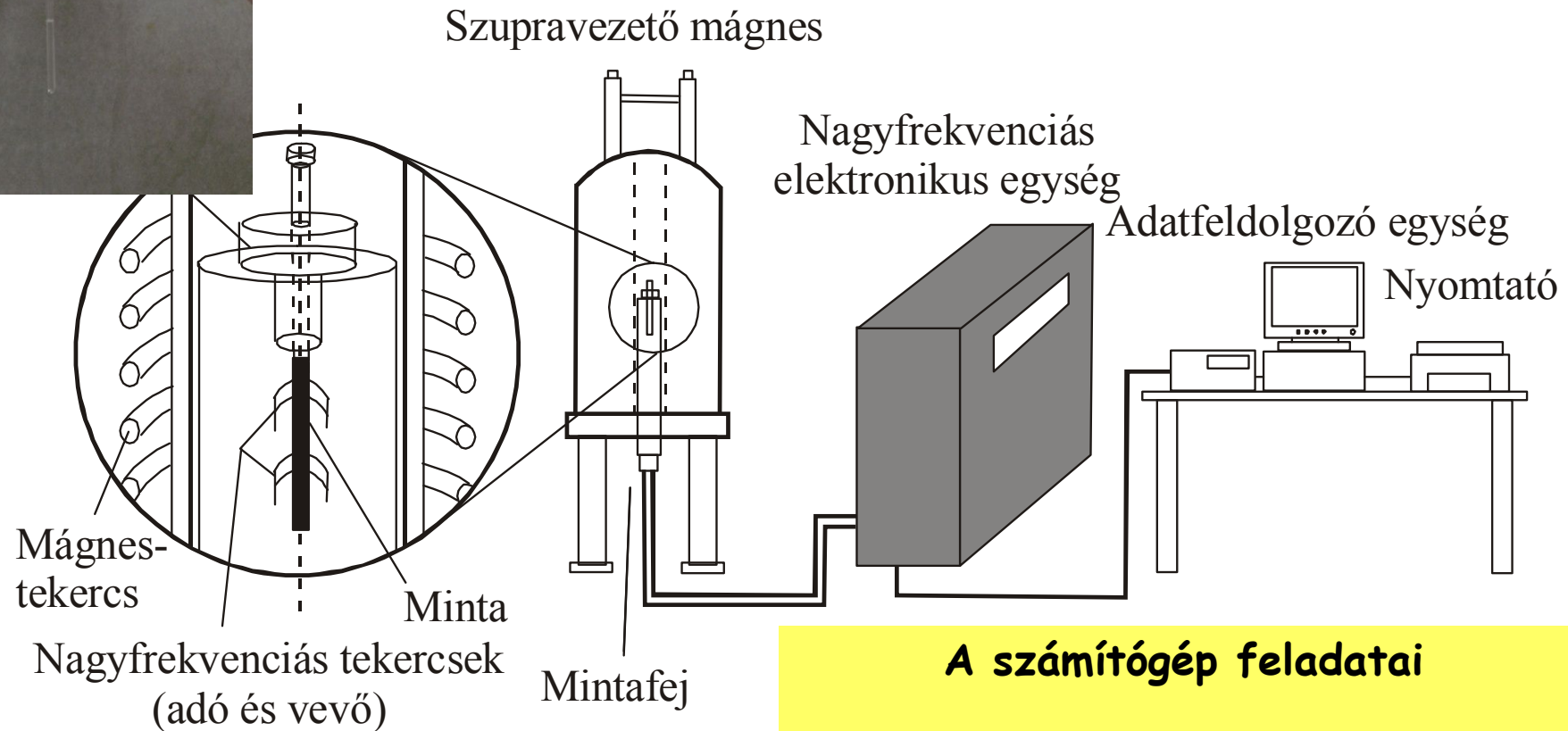
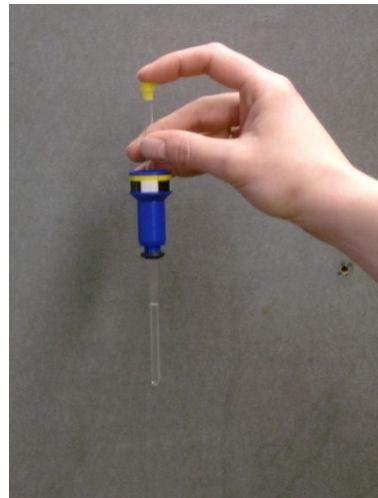
Tóth Gábor – Balázs Barbara

SZERVES VEGYÜLETEK SZERKEZETFELDERÍTÉSE



Műegyetemi Kiadó

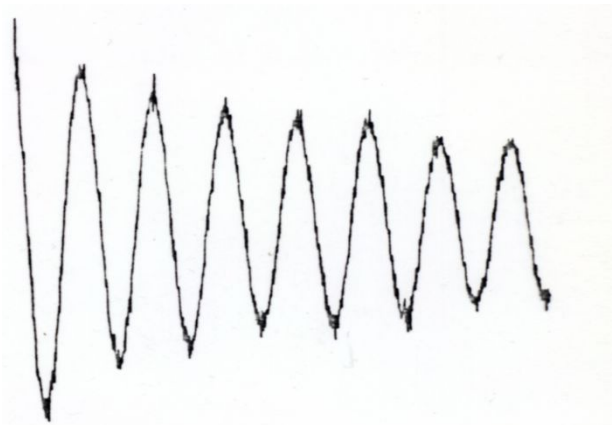
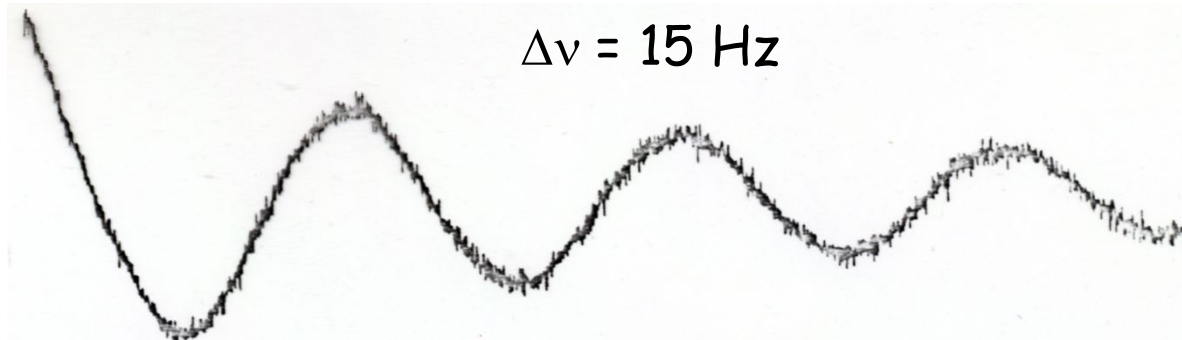
Az NMR spektrométer felépítése



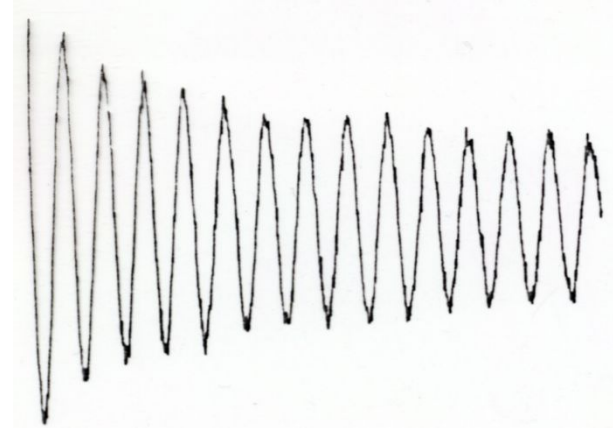
A számítógép feladatai

1. vezérlés, szabályzás (pulzus, vevő)
2. akkumuláció
3. Fourier transzformáció
4. analóg \Leftrightarrow digital konverzió
5. spektrum kiírás, adattárolás, -formálás

FID a $\Delta\nu$ függvényében



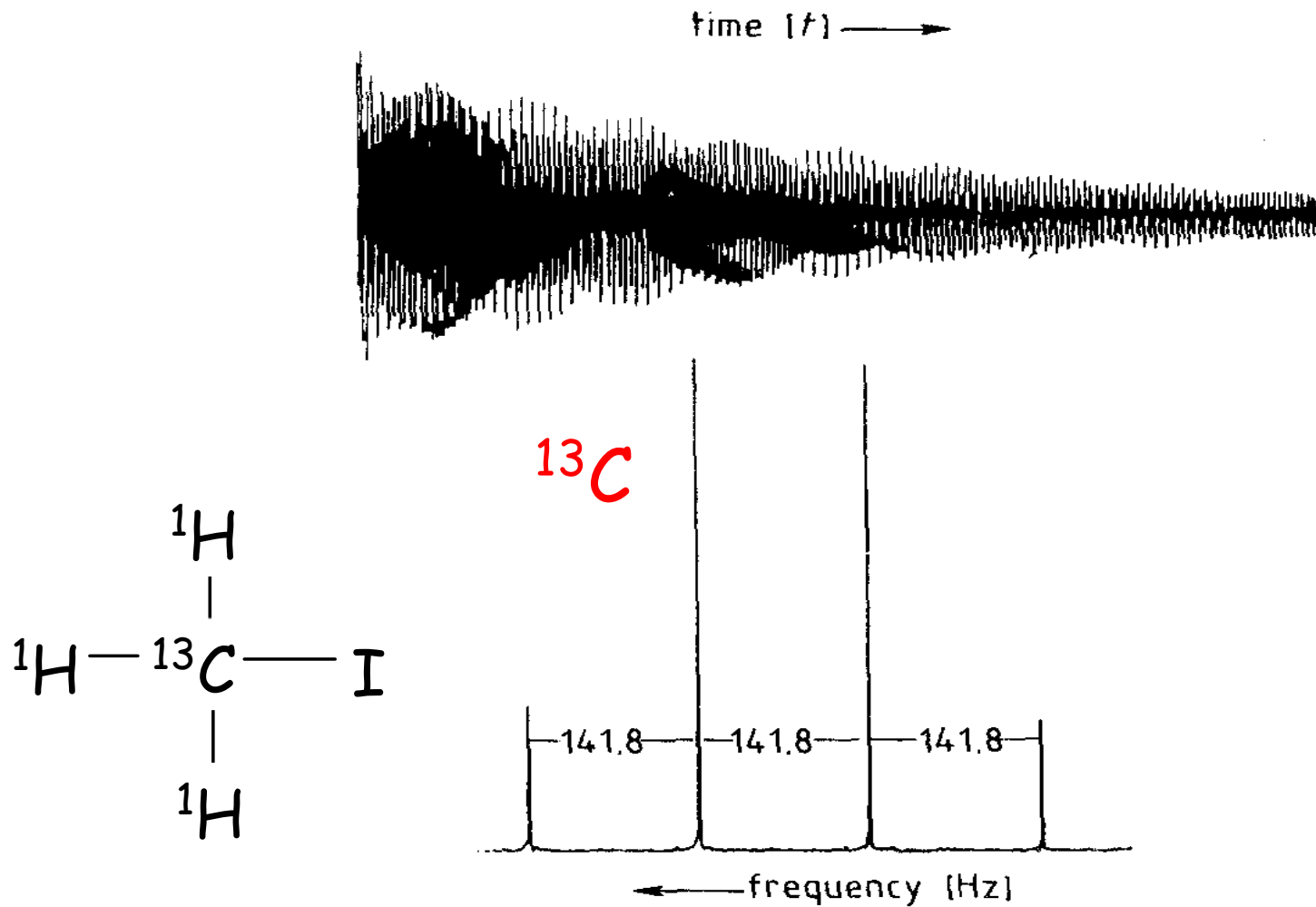
$\Delta\nu = 65 \text{ Hz}$



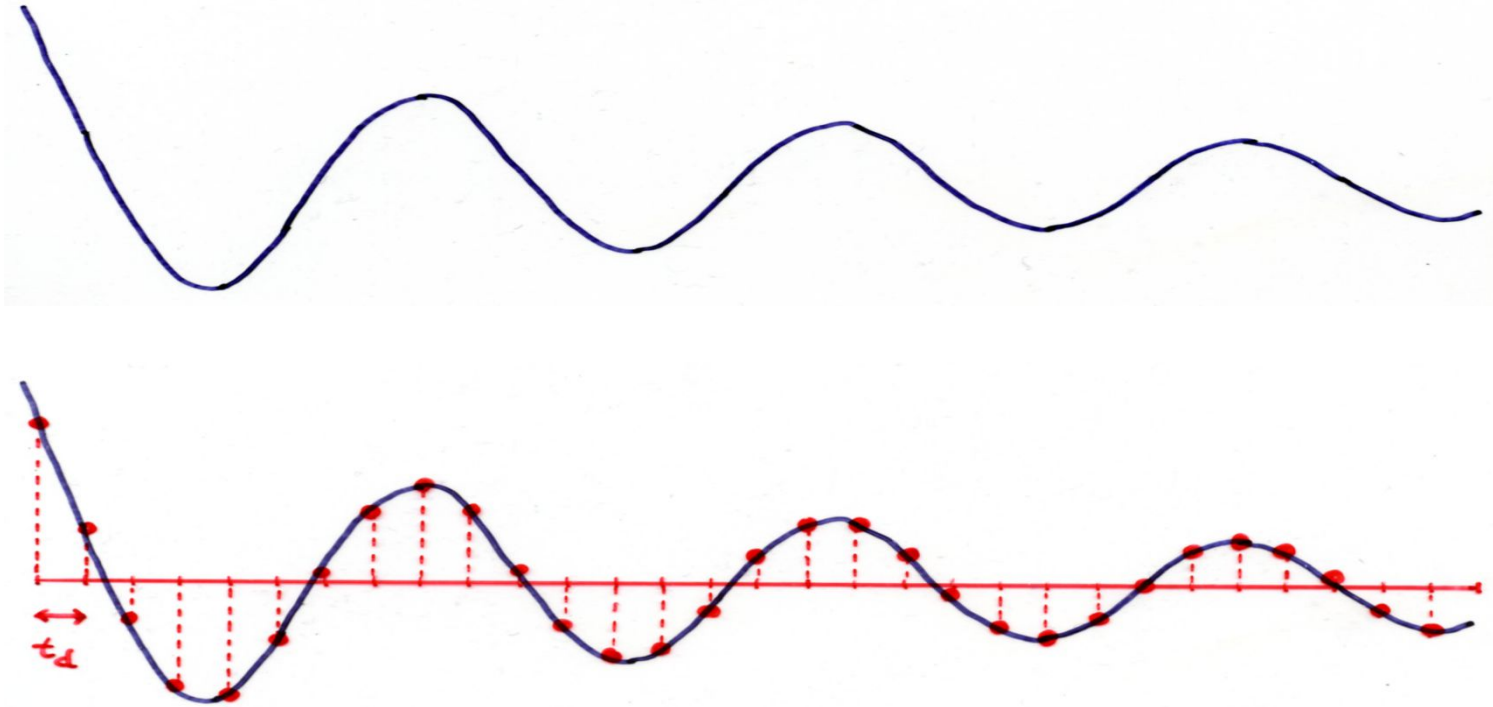
$\Delta\nu = 114 \text{ Hz}$

$\Delta\nu$: a jel és a hordozó frekvencia különbsége

FID Szuperpozíció → Fourier analízis



Analóg ↔ digital átalakítás

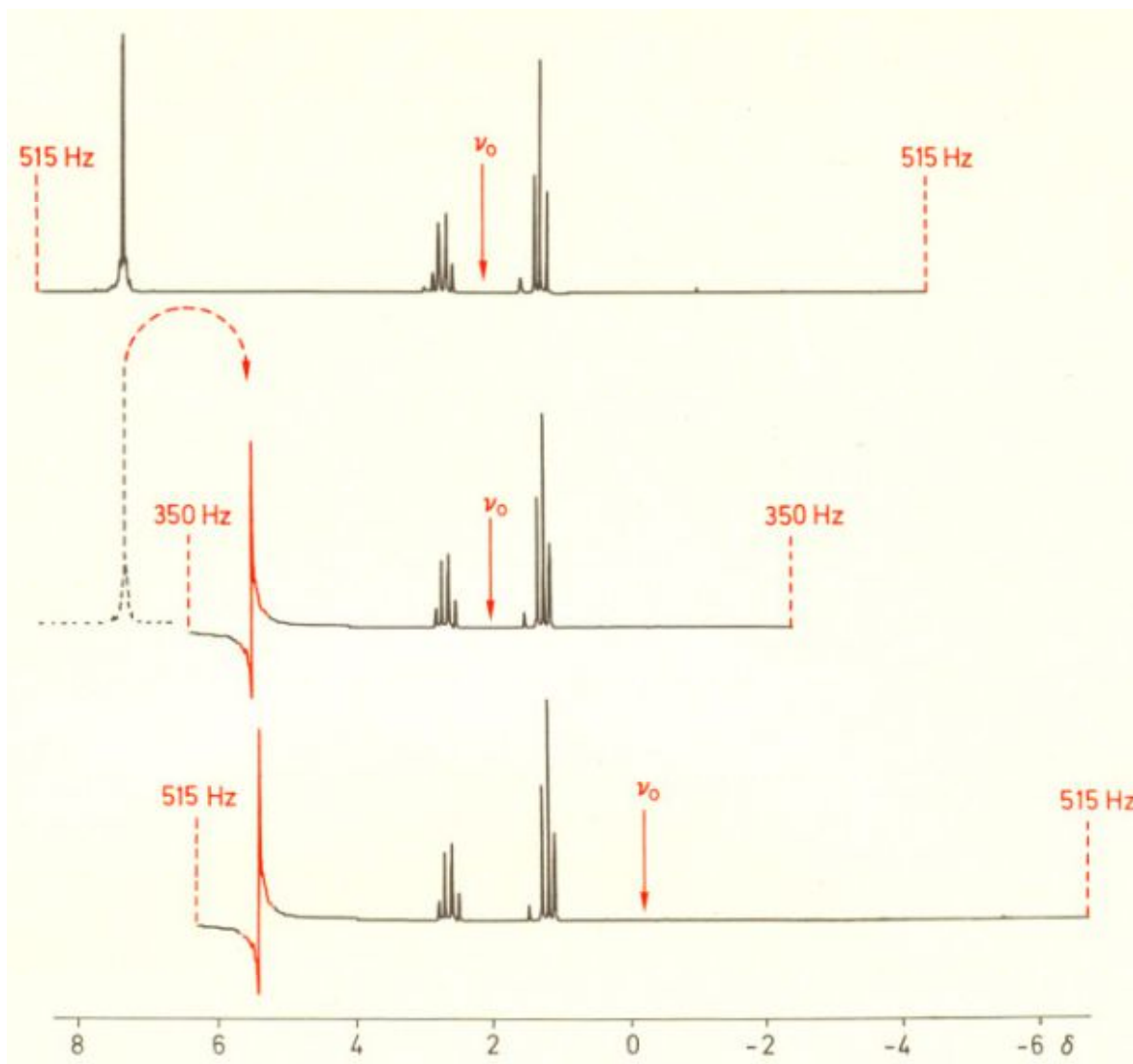


dwell time t_d egy pont mérési ideje

Az adatpontok száma általában 1 - 128 k (kilo) = 2^{10} = 1024 (ca. 1000)

A jel frekvenciájának pontos meghatározásához periódusonként legalább 2 pont kell (Nyquist frekvencia)

Jel visszahajtás (folding), spektrális ablak, hordozó frekvencia (ν_0)



spektrális ablak 1030 Hz



hordozó frekvencia ν_0



spektrális ablak 700 Hz



hordozó frekvencia ν_0



spektrális ablak 1030 Hz

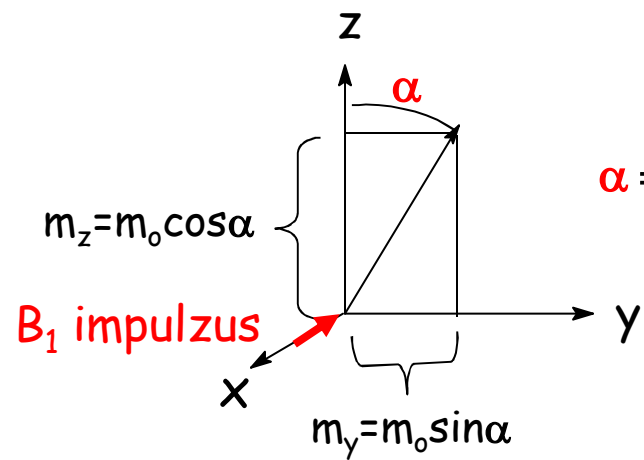


hordozó frekvencia ν_0

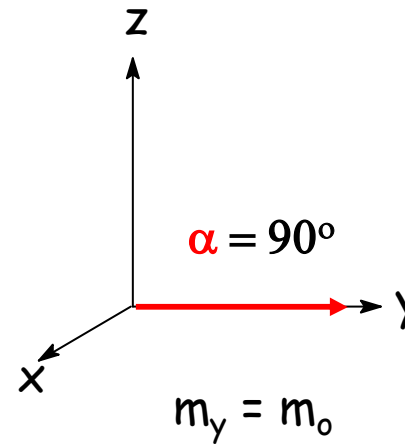


A visszahajtott jel fázisa nem korrigálható, de a jel digitális szűrővel eltávolítható!

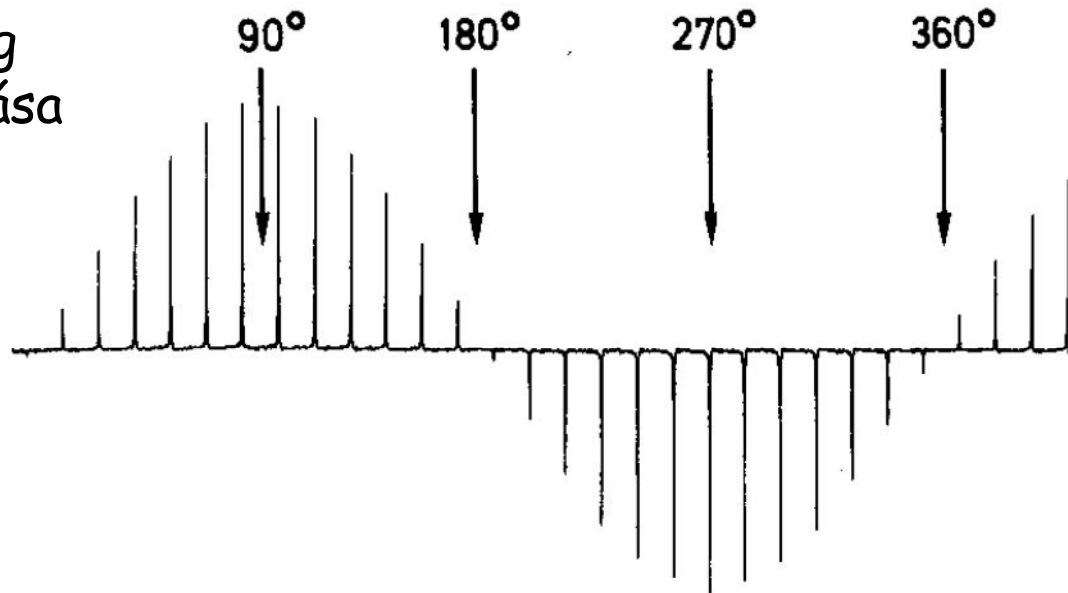
Pulzus szög: α



$$\alpha = \gamma \cdot B_1 \cdot \text{időtartam}$$

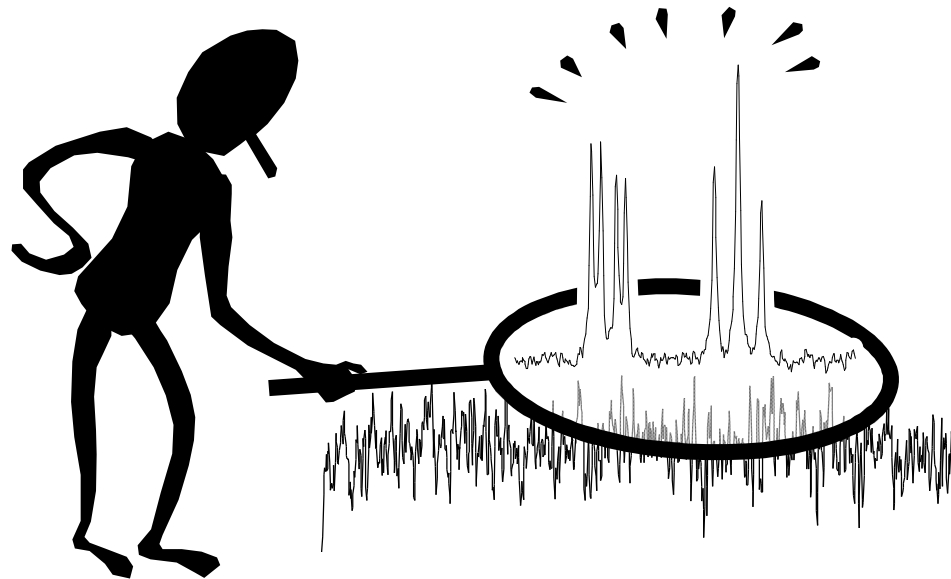


pulzus szög meghatározása



Egy impulzus estén a maximális nagyságú jelet a 90° -os pulzus eredményezi

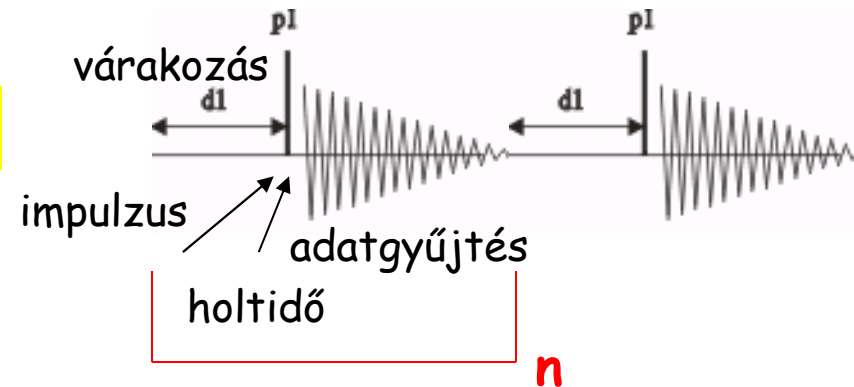
NMR, hol van a felső határ?



Dr. Tóth Gábor: Az NMR-mérések
érzékenység-növelésének távlatai

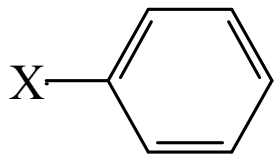
Spektrum akkumulálás

^1H mérés pulzus szekvenciája

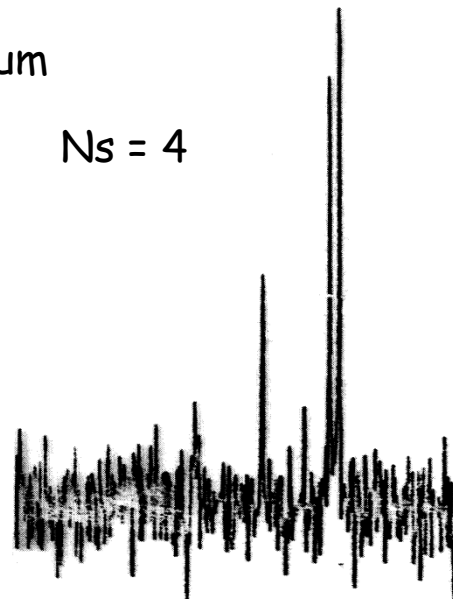


Jel/zaj növekedése : $S/N = n / \sqrt{n} = \sqrt{n}$

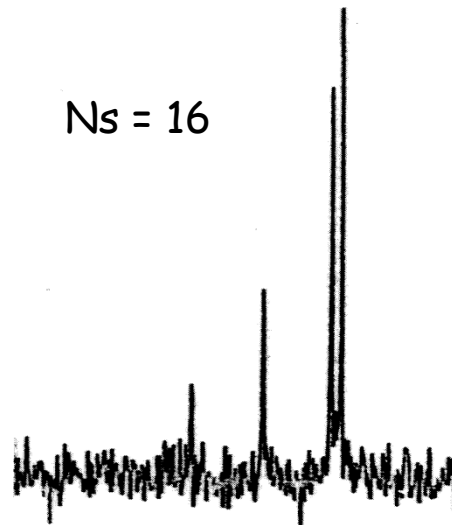
^{13}C NMR spektrum



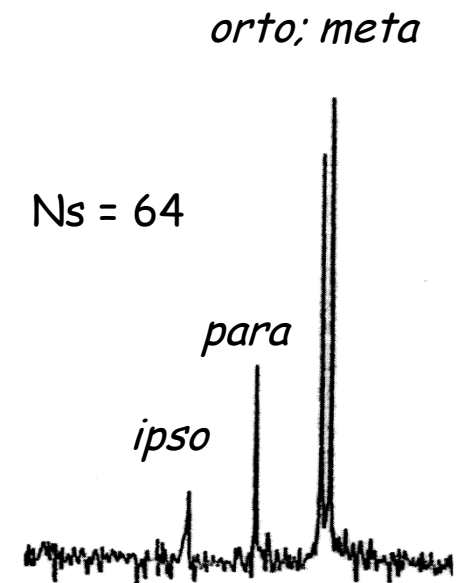
Ns = 4



Ns = 16



Ns = 64



Adat feldolgozás (apodizáció)

A FID szorzása exponenciális függvénnyel

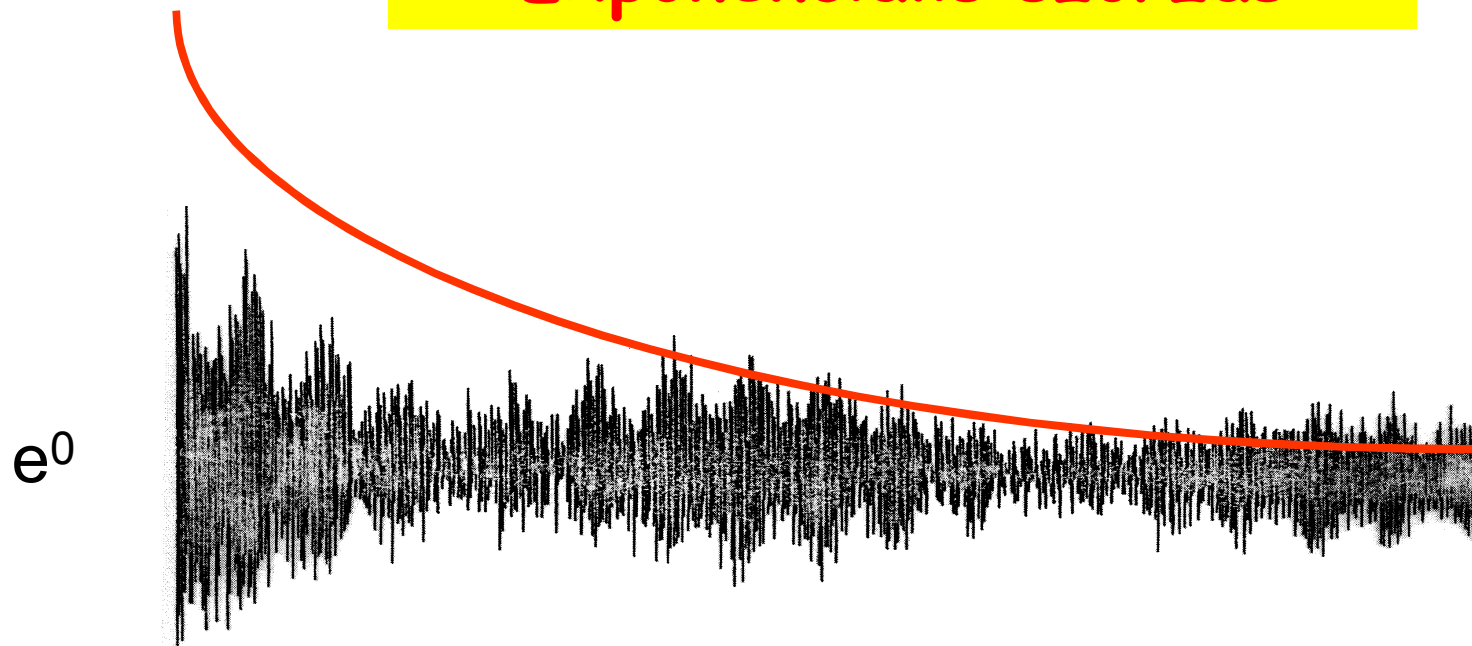
FID:

$$M_{y'} = M_{y'}^0 \cdot \cos(2\pi\Delta\nu t) \cdot e^{-t/T_2^*}$$

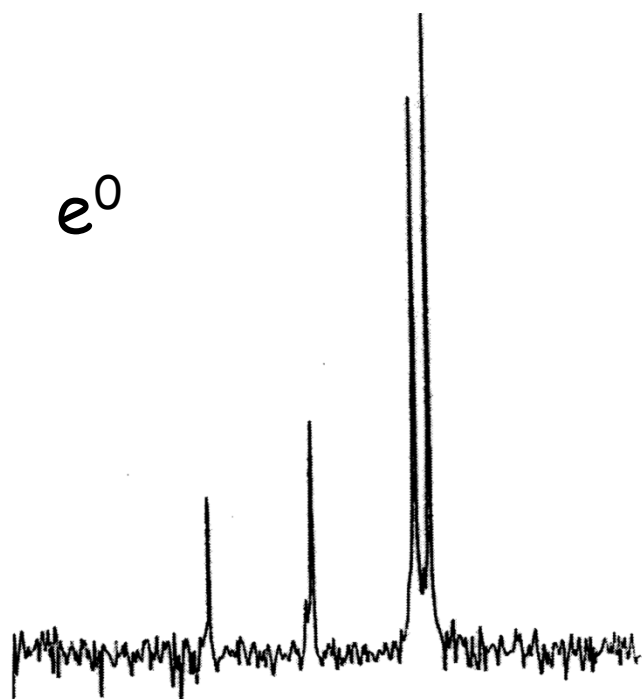
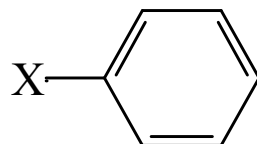
FID + exponential multiplication:

$$M_{y'} = M_{y'}^0 \cdot \cos(2\pi\Delta\nu t) \cdot e^{-t/T_2^*} \cdot \boxed{e^{-x}}$$

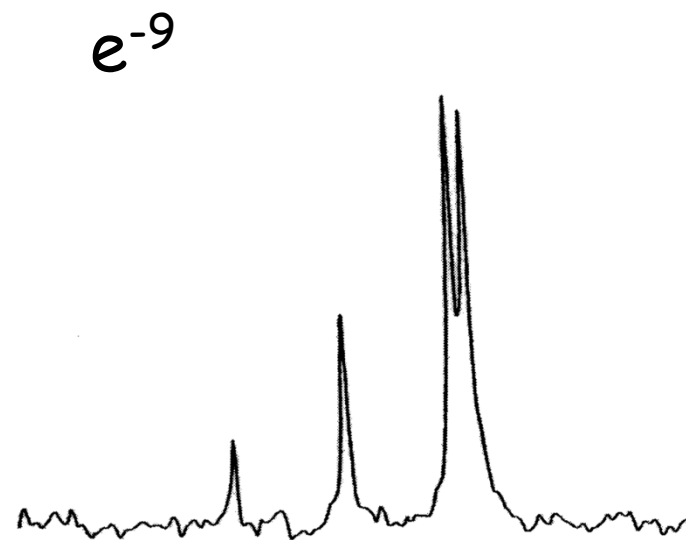
Exponenciális szorzás



Az exponenciális szorzás hatása a spektrumra

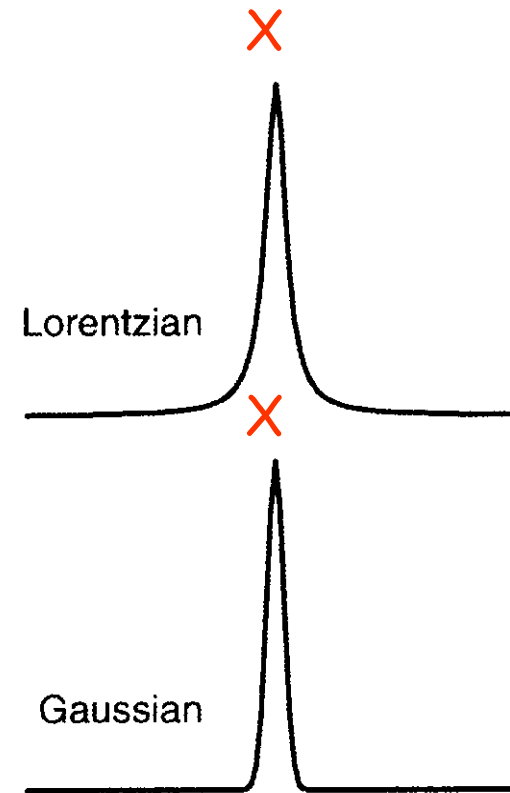


Érzékenység növelés a felbontás rovására!



Szorzás Gauss/Lorentz függvénnnyel

szorzás centruma

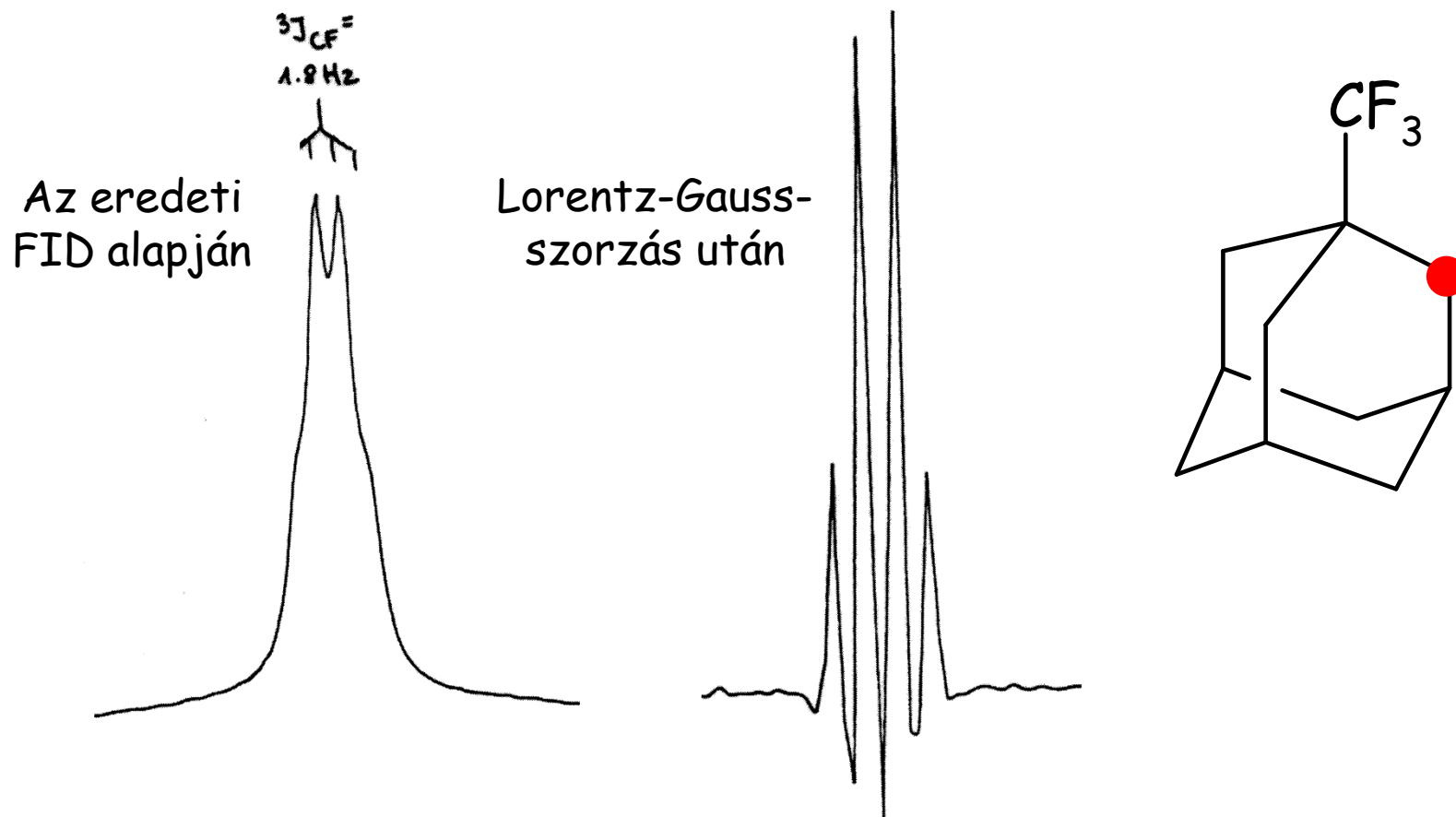


FID és spektrum a Lorentz/Gauss szorzás előtt és után

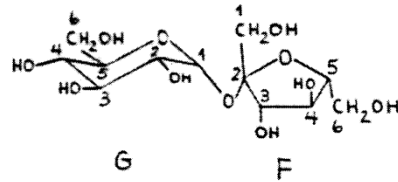
A Gauss/Lorentz szorzás hatása a spektrumra

Felbontás növelés az érzékenység rovására

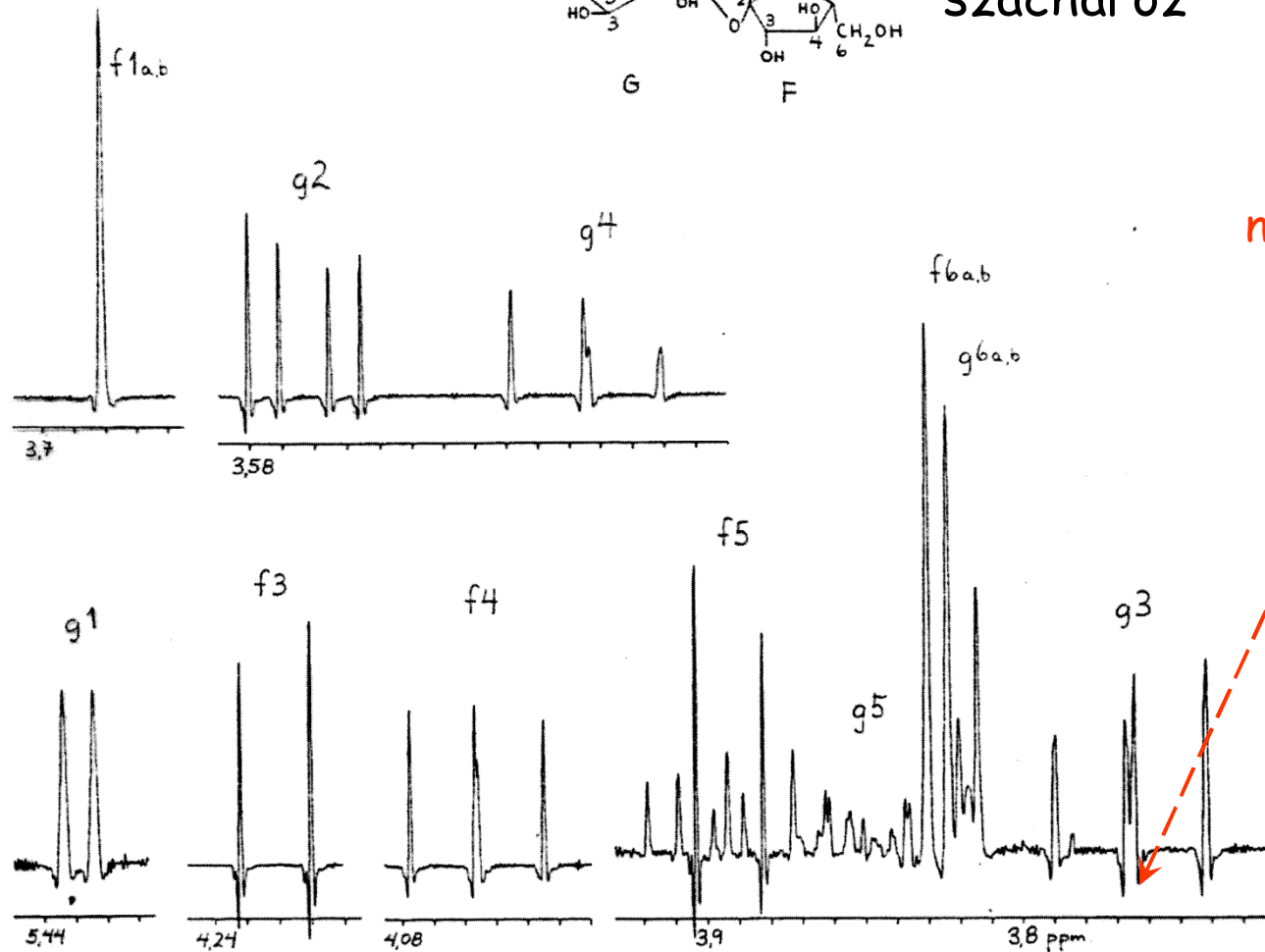
példa: az 1-trifluormetiladamantán (●) ^{13}C -jele



Túlzott mértékű felbontás növelés jeltorzulást okoz!

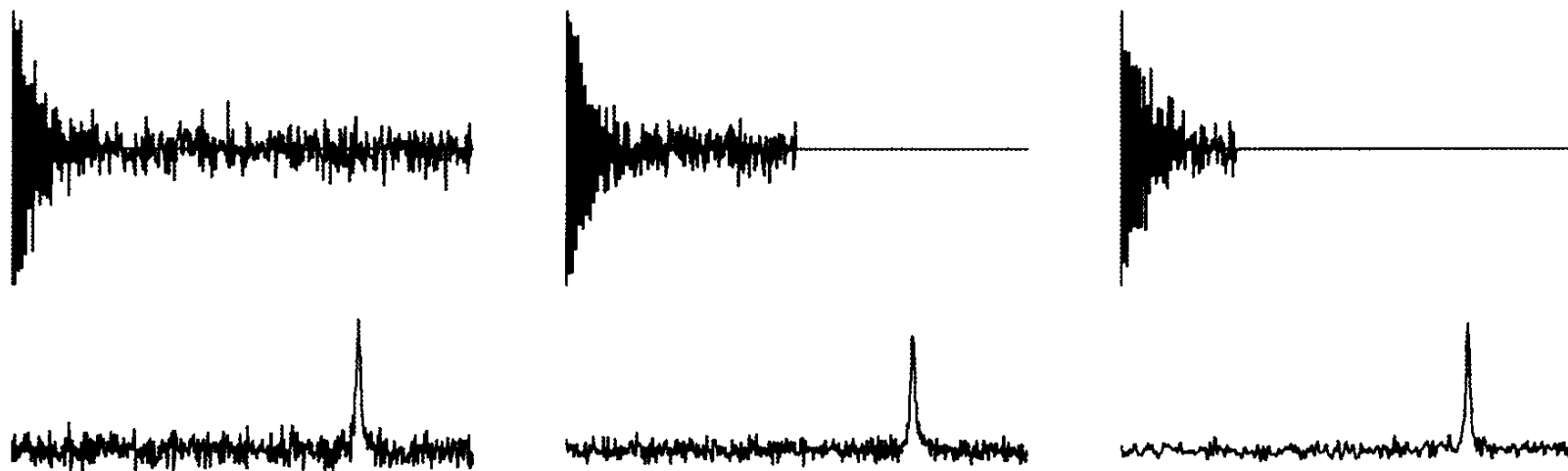


szacharóz



„Truncation”

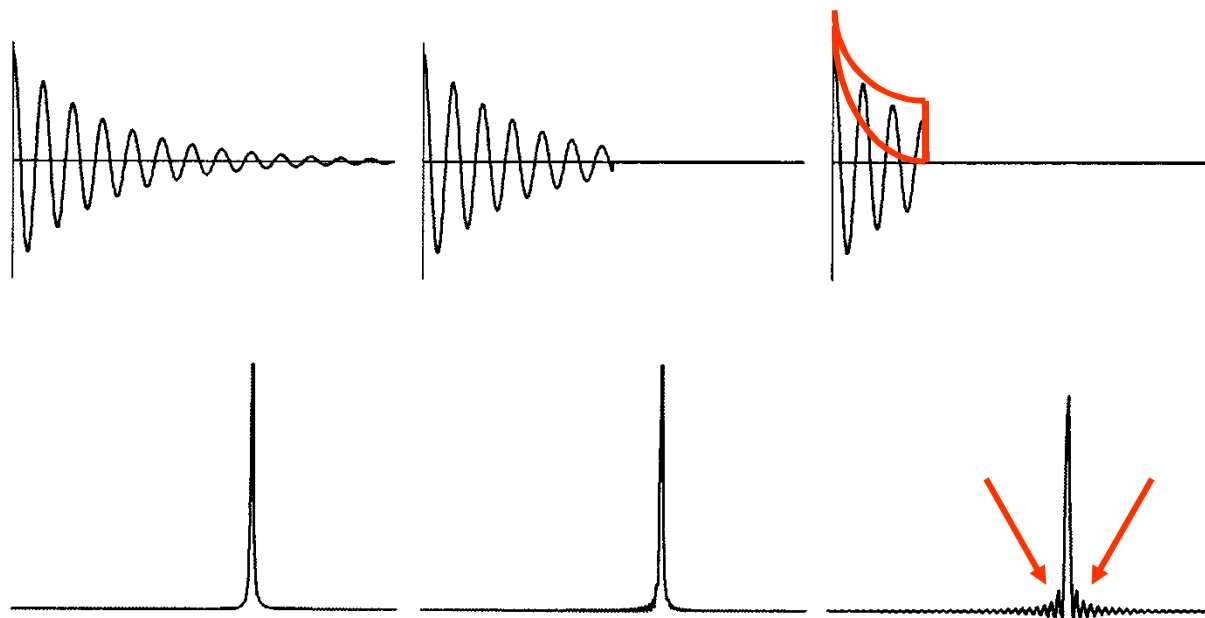
Ez a jelenség akkor lép fel ha az adatgyűjtés a FID teljes lecsengése előtt jóval korábban abbamarad



A jel frekvenciáját ez nem befolyásolja, de a mérésidőt megrövidítheti.

„Truncation”

Ez a jelenség akkor lép fel ha az adatgyűjtés a FID teljes lecsengése előtt jóval korábban abbamarad

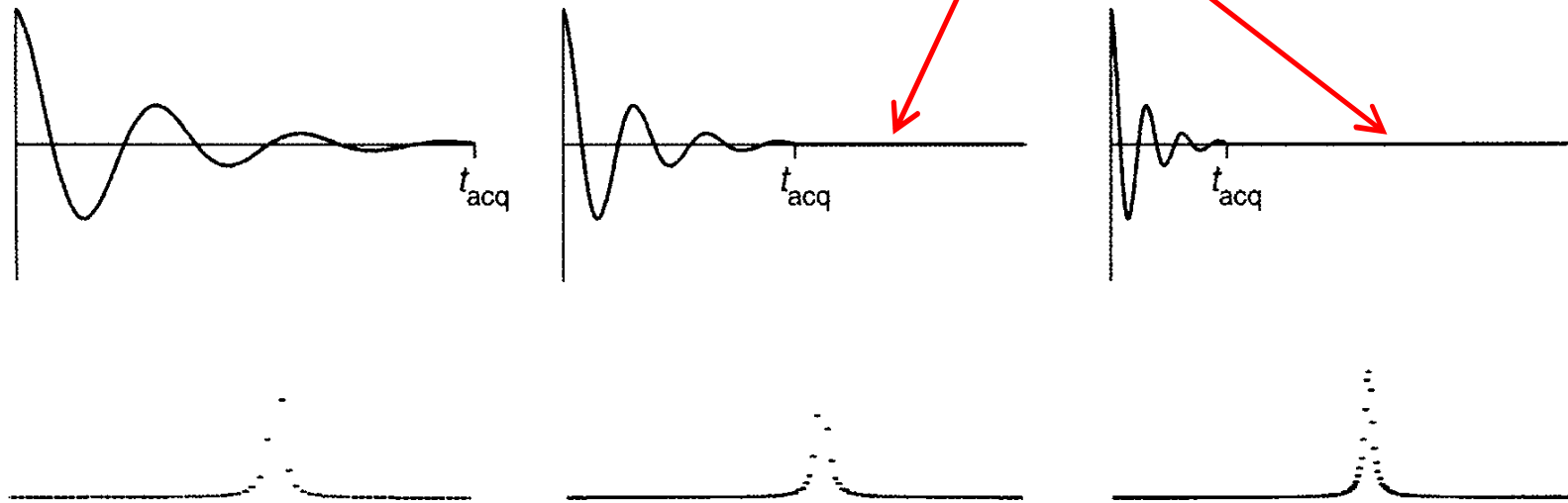


A jelalak torzul, a jelhez balról és jobbról is csillapított szinusz rezgés kapcsolódik. Megoldás: exponenciális szorzás, zéruspont feltöltés vagy lineáris predikció. A lineáris predikció során a számítógép kiszámítja és csatolja a FID hiányzó részét!

Zéruspont feltöltés

„Zero Filling”

A teljes FID után **zéruspontokat csatolunk**
(adatpontok zéro információval?)



Jobb digitális felbontás, tökéletesebb jelalak.

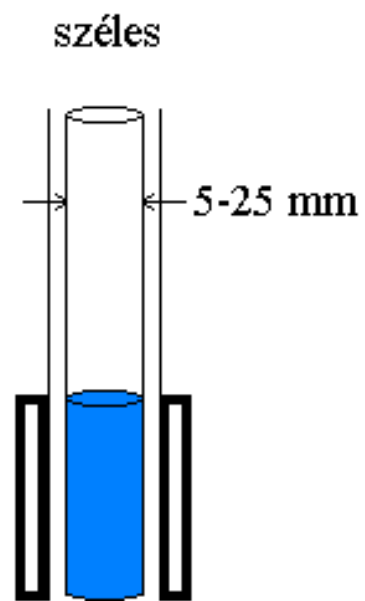
Minimum egyszeres zéruspont feltöltés feltétlenül ajánlott,
hisz az eredeti adatpontok fele a FID imaginárius részére
használódik el!

Érzékenység

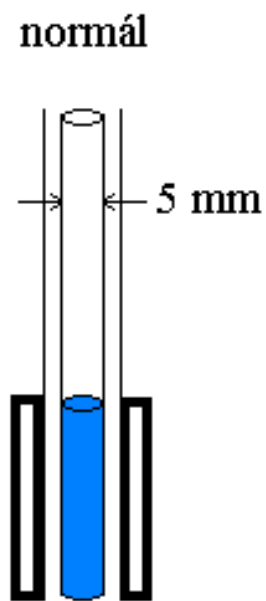
$$S/N = n \cdot \gamma_{\text{gerj}} \cdot \gamma_{\text{det}}^{3/2} \cdot NS^{1/2} \cdot T^{-1} \cdot T_2^{-1} B^{3/2} \left(\frac{G \cdot Q}{c_2 \cdot T_c} \right)$$

S/N:	jel/zaj viszony
n:	molekulák száma (koncentráció)
γ_{gerj}:	gerjesztett atom giromágneses tényezője
γ_{det}:	detektált atom giromágneses tényezője
NS:	mérések száma
T:	abszolút hőmérséklet
T_2:	spin-spin relaxációs idő
B:	térerő
G:	mérőfejre jellemző állandó
Q:	jósági tényező
c_2:	előerősítő zajfaktora
T_c:	rádiófrekvenciás adó- és vevőtekercecsek aktuális hőmérséklete

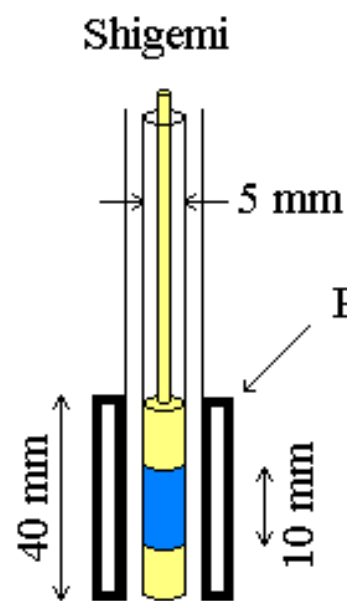
NMR mérőcsövek



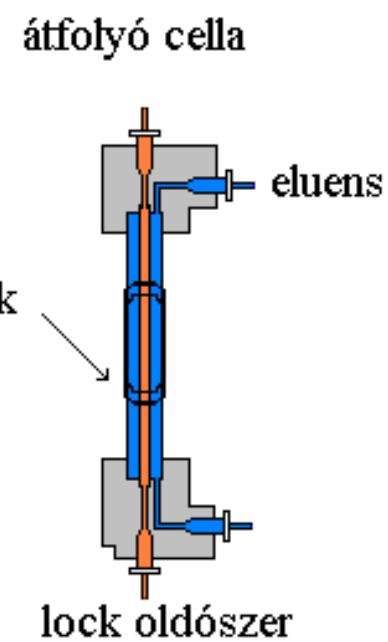
2,4 ml (10 mm)



0,6 ml



0,18 ml



0,16 ml

MATCH tubes (mérőcsővek)

Átmérő: 1, 1.7, 2.0, 2.5, 3.0, 4.25 and 5mm

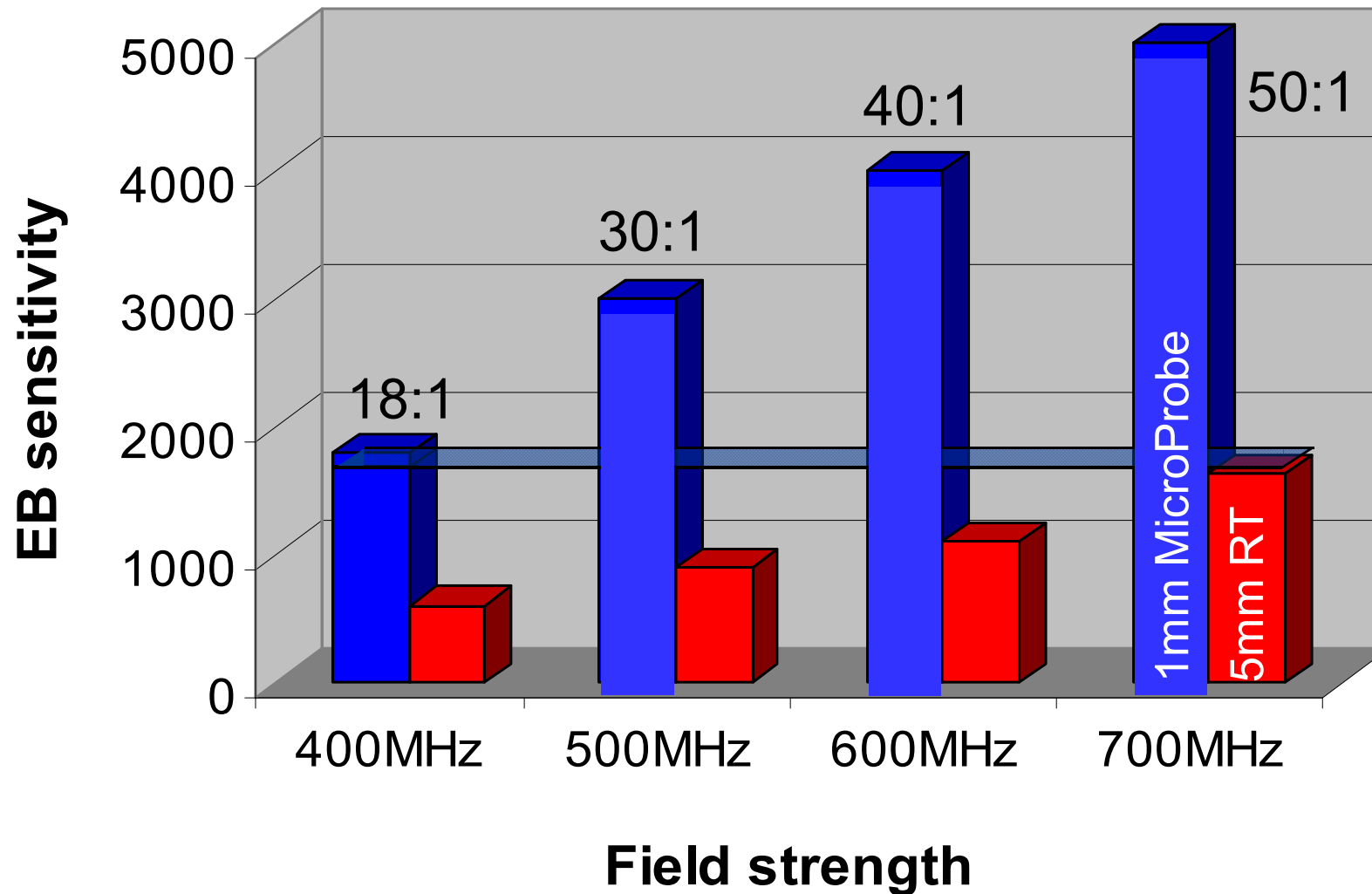
LC-SPE-NMR méréshez optimális: 2.0-3.0mm



1mm MicroProbe: kiemelkedő érzékenység

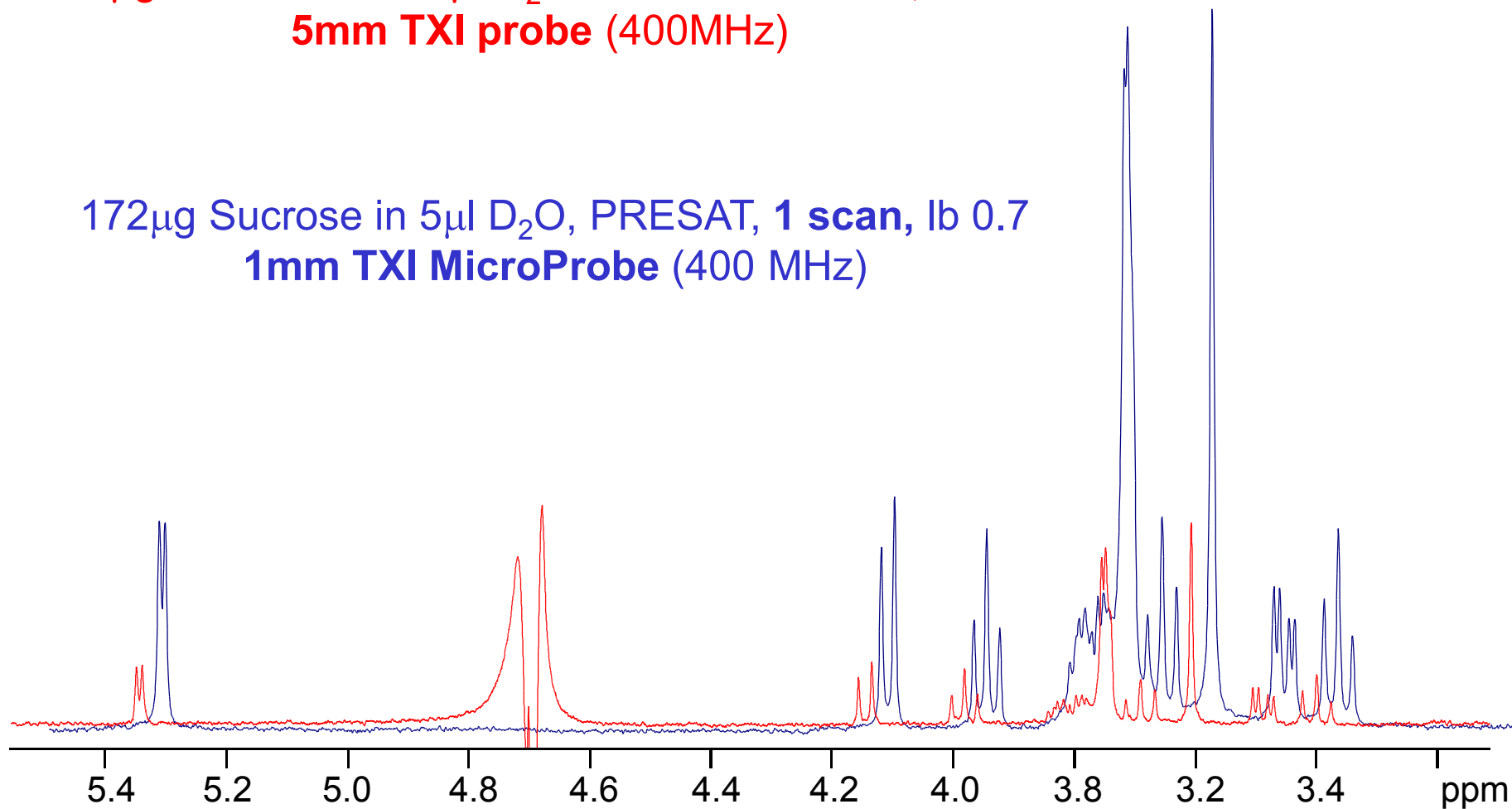
1mm MicroProbe és a **standard 5mm fej** érzékenysége

(0.1 % EB sensitivity)



172 μ g Sucrose in 500 μ l D₂O, PRESAT, 1 scan, lb 0.7
5mm TXI probe (400MHz)

172 μ g Sucrose in 5 μ l D₂O, PRESAT, 1 scan, lb 0.7
1mm TXI MicroProbe (400 MHz)



1mm MicroProbe (172 μ g Sucrose in 5 μ l D₂O)

S/N = 110 : 1

5mm standard (172 μ g Sucrose in 550 μ l D₂O)

S/N = 35 : 1

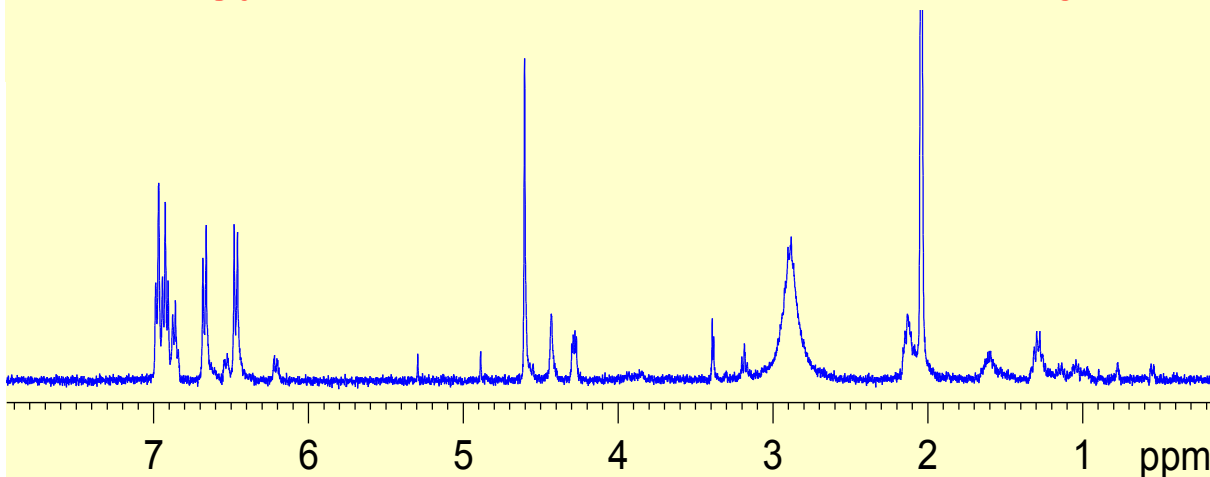


HPLC + SPE



**Solid
Phase
Extraction**

16 NS, 9 μ l eluátum az 1mm-es cartridge-ből:
9-16 x gyorsabb mint 5mm-es normal fej



Jens C. Madsen and Henrik Pedersen, Lundbeck, Copenhagen

HPLC

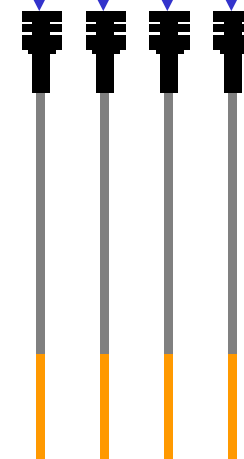
elválasztás

**SPE
cartridges**

gyűjtés

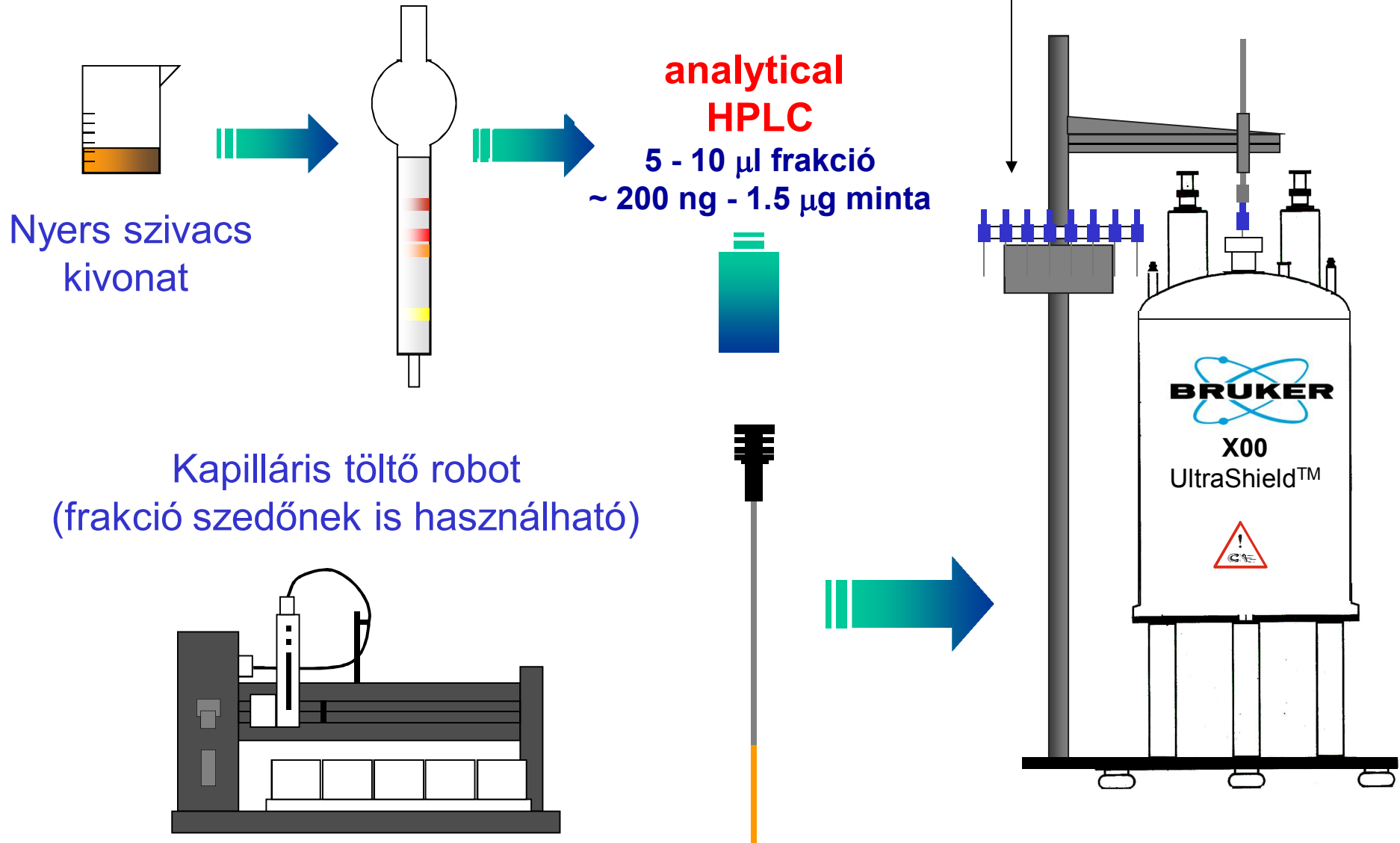
**SPE
cartridges**

beoldás
1mm-es
mérőcsőbe



zárható,
többször
használatos
mérőcsövek

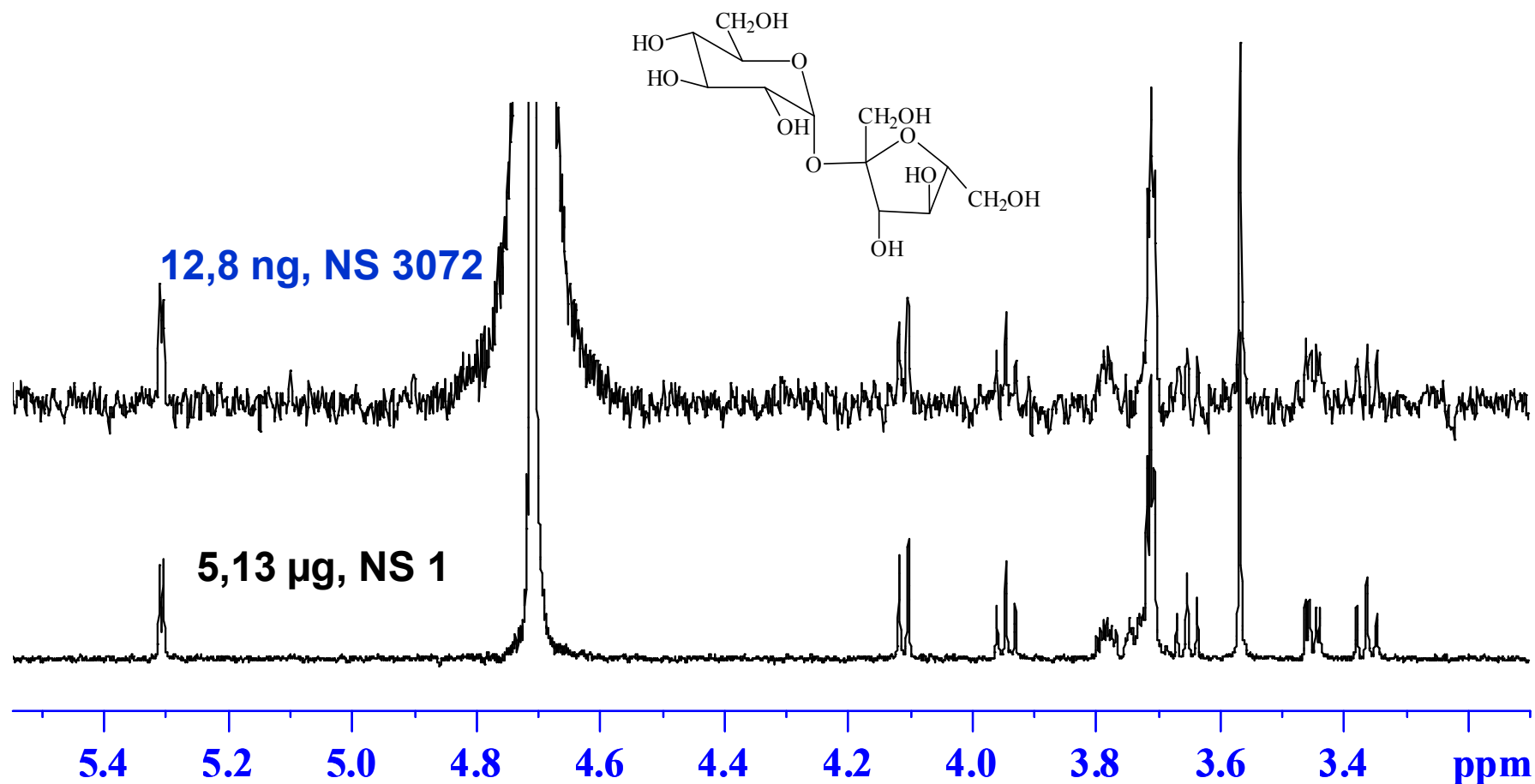
Természetes eredetű anyagok



Kapilláris-átfolyó-mérőfej - érzékenység

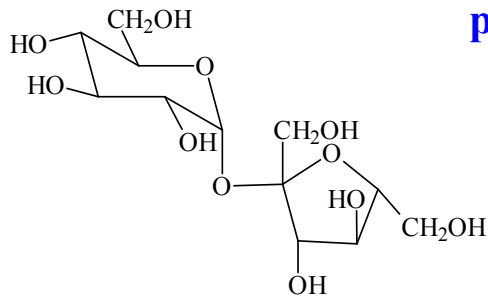
Minta: 25 μM szacharóz, Térfogat: 1,5 μl \Rightarrow mennyiség **12,8 nanogram**

NS 3072, mérési idő \sim 3 h, S/N: 5,5:1

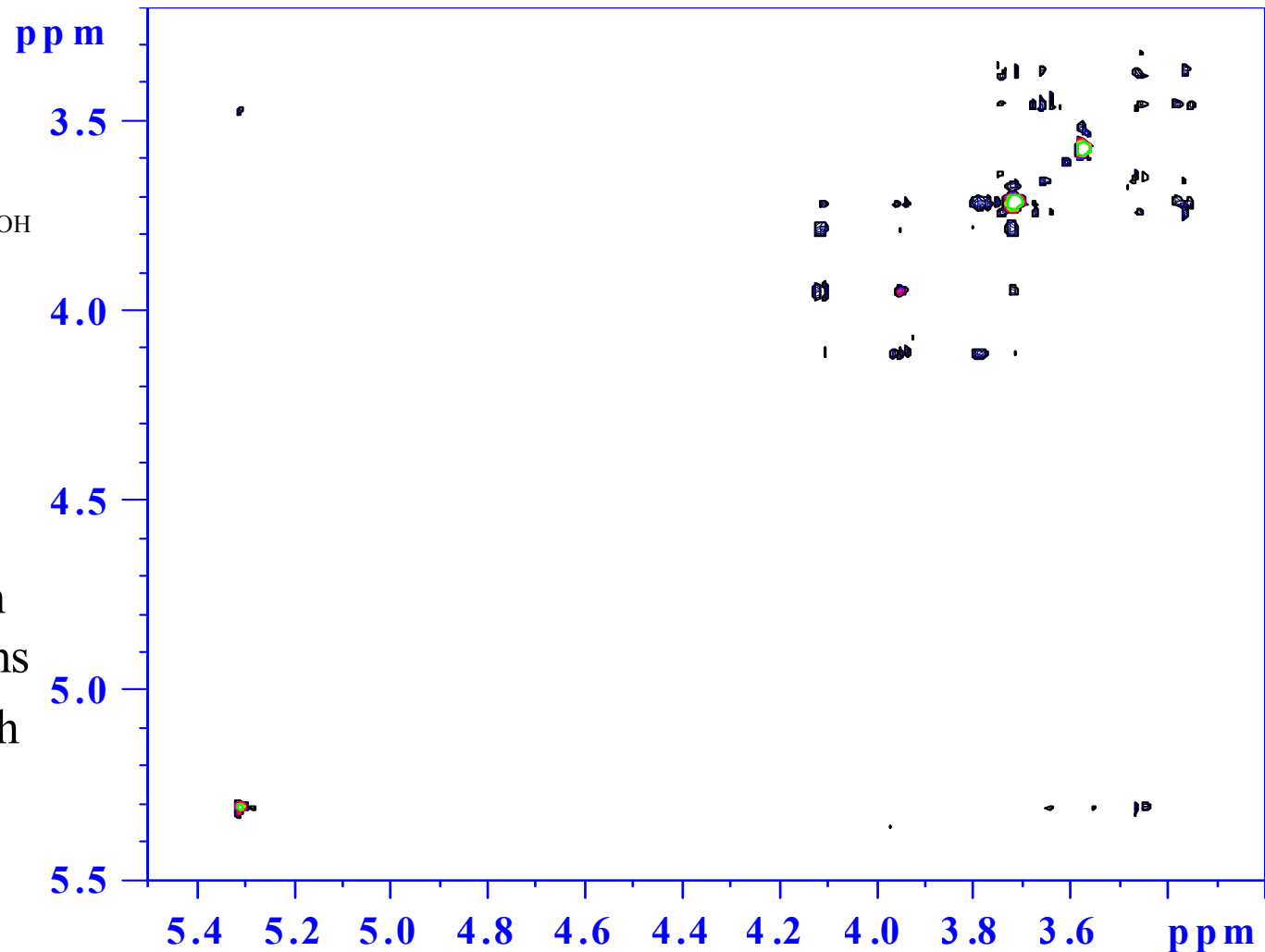


Kapilláris-átfolyó-mérőfej

51,3 ng szacharóz $^1\text{H}/^1\text{H}$ TOCSY



- Oldószer: D_2O
- NS 80
280 inkrementum
keverési idő: 45ms
- Mérési idő: 14.5 h



Automatizált mérési módszerek és teljesítményük

NMR mintaváltó **átfolyócellás NMR**

• 1D-spektrum	7 perc	2 perc
• minta/nap	~200	~720
• minta/hét	~1000	~3500
• mintahely	120	960

Az **érzékenység** összehasonlítása ^1H és ^{13}C méréseknél (direkt/inverz detektálás)

Kísérlet	gerj./det. mag	rel. érzékenység	idő
1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NOE nélkül	$^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$	1	1024
1D ^{13}C -DEPT	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	4	64
2D C,H-COSY	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	4	64
2D H,C-COSY (HMQC)	$^1\text{H}/^1\text{H}$	32	1

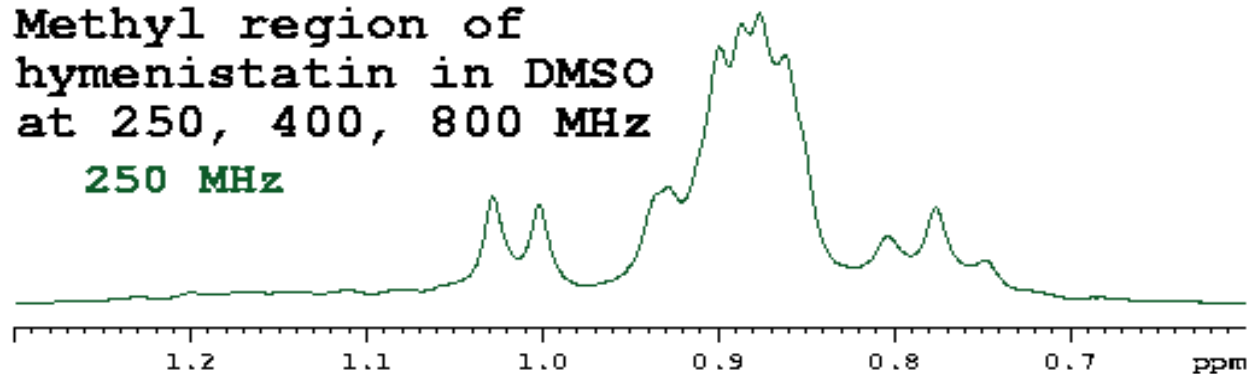
$$S/N = n \cdot \gamma_{\text{gerj}} \cdot \gamma_{\text{det}}^{3/2} \cdot N S^{1/2} \cdot T^{-1} \cdot T_2^{-1} B^{3/2} \left(\frac{G \cdot Q}{c_2 \cdot T_c} \right)$$

Kaptein **CIDNP**; Griffin, Dorn: Dinamikus magpolarizáció
DNP → **ELDOR**, ^1H : 660, ^{13}C : 2400. Pines, Goodson: Optikai
 pumpa (Xe, He), **SPINOE** (Spin Polarisation Induced NOE)

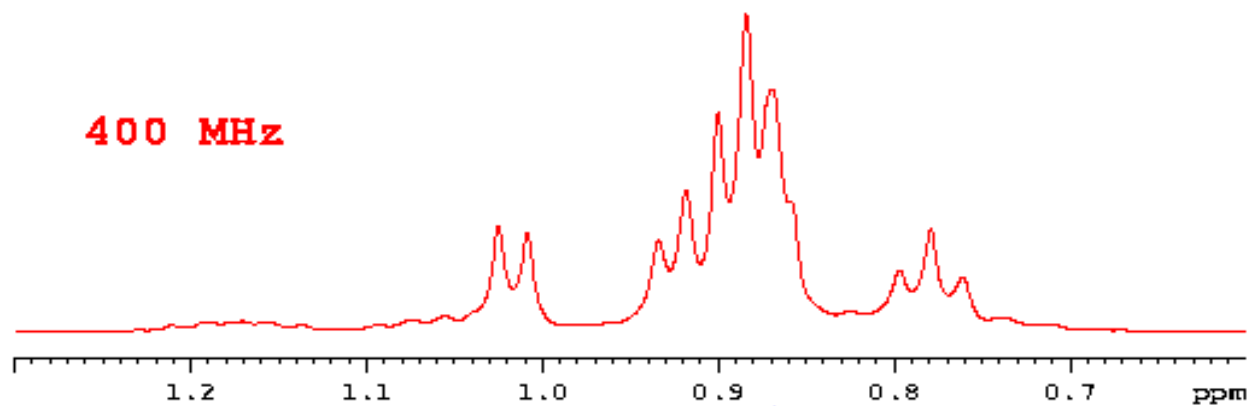
A mágneses térerő növelésének hatása

Methyl region of
hymenistatin in DMSO
at 250, 400, 800 MHz

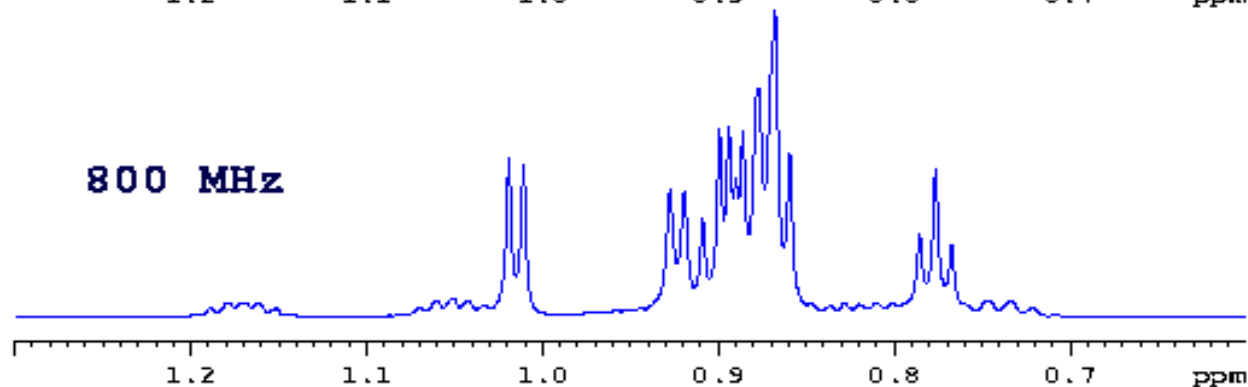
250 MHz



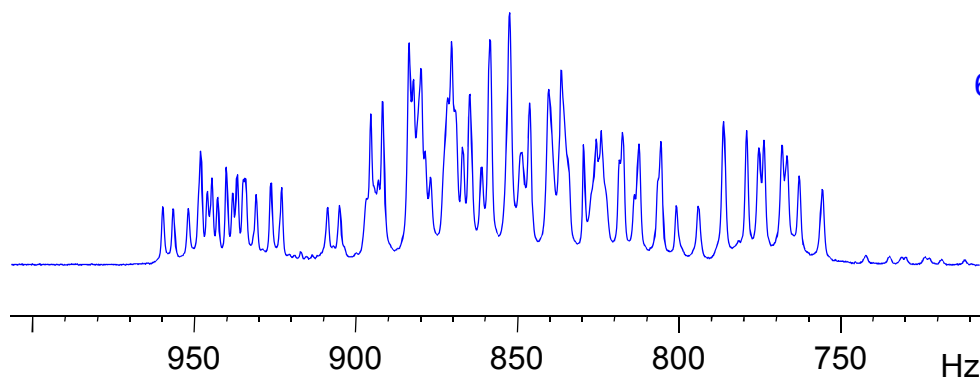
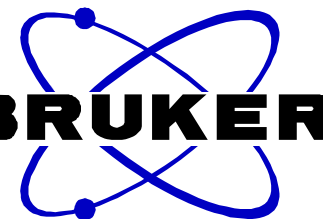
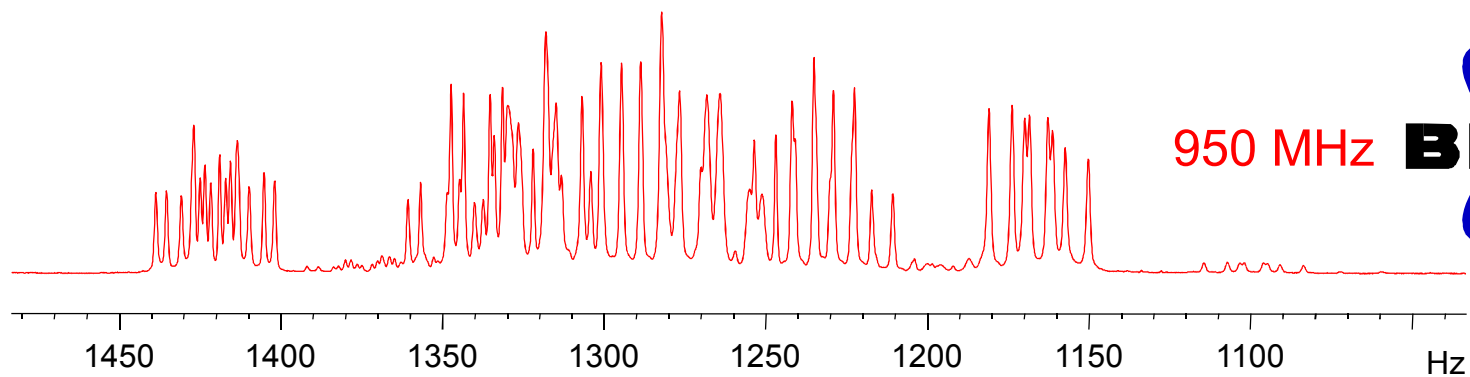
400 MHz



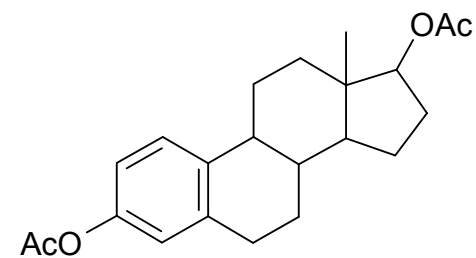
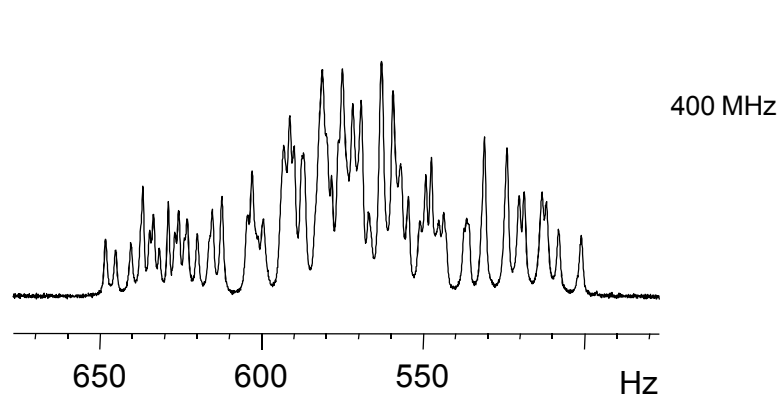
800 MHz



Az
érzékenység
mellett a
spektrális
diszperzió,
azaz a jelek
elkülönülése
is nagyban
növekszik



Ösztradiol-acetát



Az NMR mágnesyártás fejlődése



1965
90 MHz



1970
270 MHz



1979
400 MHz



1983
500 MHz

UltraStabilized™

1992
750 MHz / 54 mm



1995
800 MHz
UltraStabilized

1992
750 MHz SB

950
MHz

2006



2004
900 MHz US²



2003
UltraShield Plus
400-600 SB



2000-2001
900 MHz
800 MHz US²



1998
700 MHz
UltraShield

1996
UltraShield™

1 GHz 2009

→ 1.2 GHz fejlesztés alatt (Bruker)



1000 MHz NMR Magnet

Magnetic field strength 23.5 Tesla

NMR proton frequency 1000 MHz

Standard bore size 54 mm

2 K UltraStabilized™ sub-cooling technology

Persistent superconducting magnet

Advanced joint technology enables high-current and high field joints of smallest electrical resistance



installation in Lyon

AVANCE III 1000 MHz NMR spectrometer

Patented Direct Digital Synthesis

Timing Resolution 12.5 ns

Minimum event time 25 ns

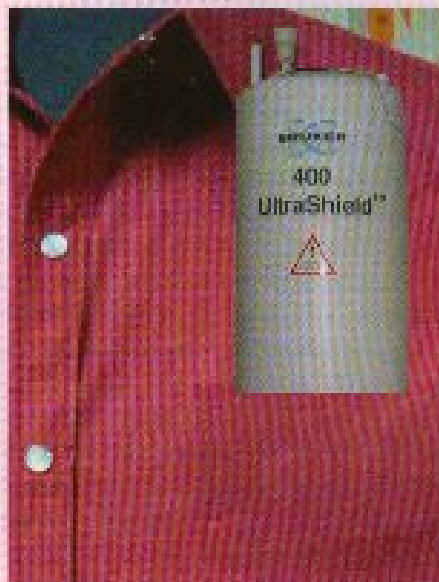
Single Chip RF generation

Highest Phase resolution (0.0055°)

Highest Frequency resolution (0.005 Hz)

Zseb-NMR

Az NMR-készülékeket a közeljövőben jelentős fogyókúrára lehet majd fogni. Eddig viszonylag nagy térrészben homogén mágneses tere: csak azupravezető mágnesekkel sikerült létrehozni, amelyek folyamatos hűtést (folyékony héliumot és folyékony nitrogént), valamint nagyméretű hőszigetelő köpenyt igényelnek. Német tudósok nemrégiben szamárium-kobalt ötvözetből készítenek állandó, erős mágneseket. Ha ezeknek a mágneseknek változtatják az egymáshoz viszonyított helyzetét, az NMR-készülékek „shim”-meléséhez hasonló módon javítani lehet a tér homogenitását. A prototípusként készített, Halbach-elrendezésű mágnes mindössze 500 g tömegű, 35 mm külső átmérőjű és 80 mm hosszú. Segítségével 0,7 T erősségű tereket lehet előállítani, a furatába normál 5 mm-es NMR-cső helyezhető. A technológia további finomításával és a méret csekély növelésével 75 mm átmérőjű, 1,5 T erősségű mágnes is készíthető, amely már egy 60 MHz-es, nagy NMR-készülékkel azonos felbontású spektrumokat képes felvenni.



Az NMR-készülékeket a közeljövőben jelentős fogyókúrára lehet majd fogni. Eddig viszonylag nagy térrészben homogén mágneses tere: csak azupravezető mágnesekkel sikerült létrehozni, amelyek folyamatos hűtést (folyékony héliumot és folyékony nitrogént), valamint nagyméretű hőszigetelő köpenyt igényelnek. Német tudósok nemrégiben szamárium-kobalt ötvözetből készítenek állandó, erős mágneseket. Ha ezeknek a mágneseknek változtatják az egymáshoz viszonyított helyzetét, az NMR-készülékek „shim”-meléséhez hasonló módon javítani lehet a tér homogenitását. A prototípusként készített, Halbach-elrendezésű mágnes mindössze 500 g tömegű, 35 mm külső átmérőjű és 80 mm hosszú. Segítségével 0,7 T erősségű tereket lehet előállítani, a furatába normál 5 mm-es NMR-cső helyezhető. A technológia további finomításával és a méret csekély növelésével 75 mm átmérőjű, 1,5 T erősségű mágnes is készíthető, amely már egy 60 MHz-es, nagy NMR-készülékkel azonos felbontású spektrumokat képes felvenni.

Angew. Chem. Int. Ed. 49, 4133. (2010)

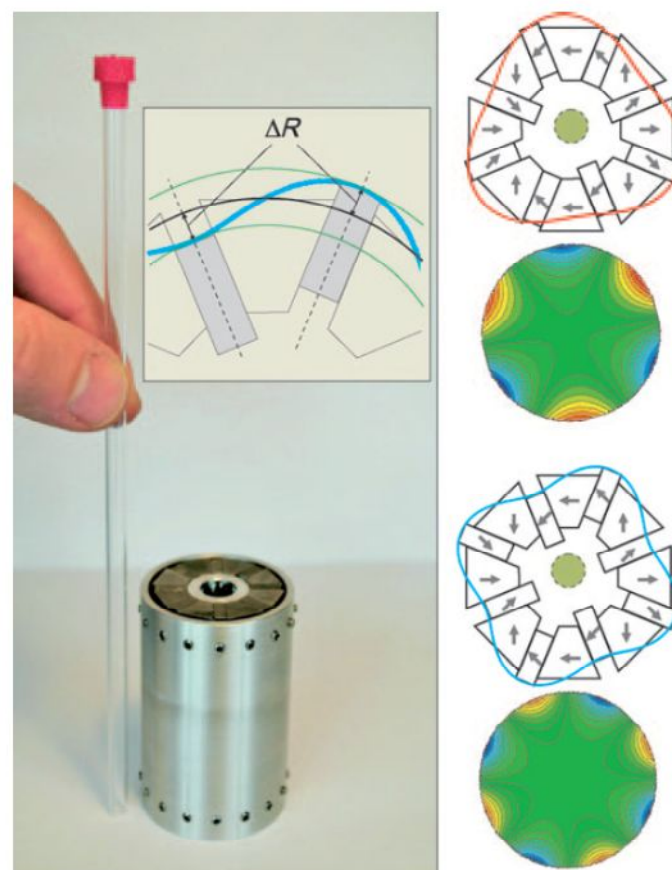


Figure 2. Photograph of the Halbach magnet composed of rectangular and trapezoidal pieces of SmCo which generate a field of 0.7 T. It is 80 mm long and has inner and outer diameters of 15 and 35 mm, respectively. By displacing the rectangular magnets following the modulations shown in the sketches on the right, corrections of third (red) and fourth (blue) order can be generated as illustrated by the two-dimensional field maps underneath. The inset shows the amplitude of the movements ΔR of the rectangular magnets, which are the control variable for the mechanical shimming.

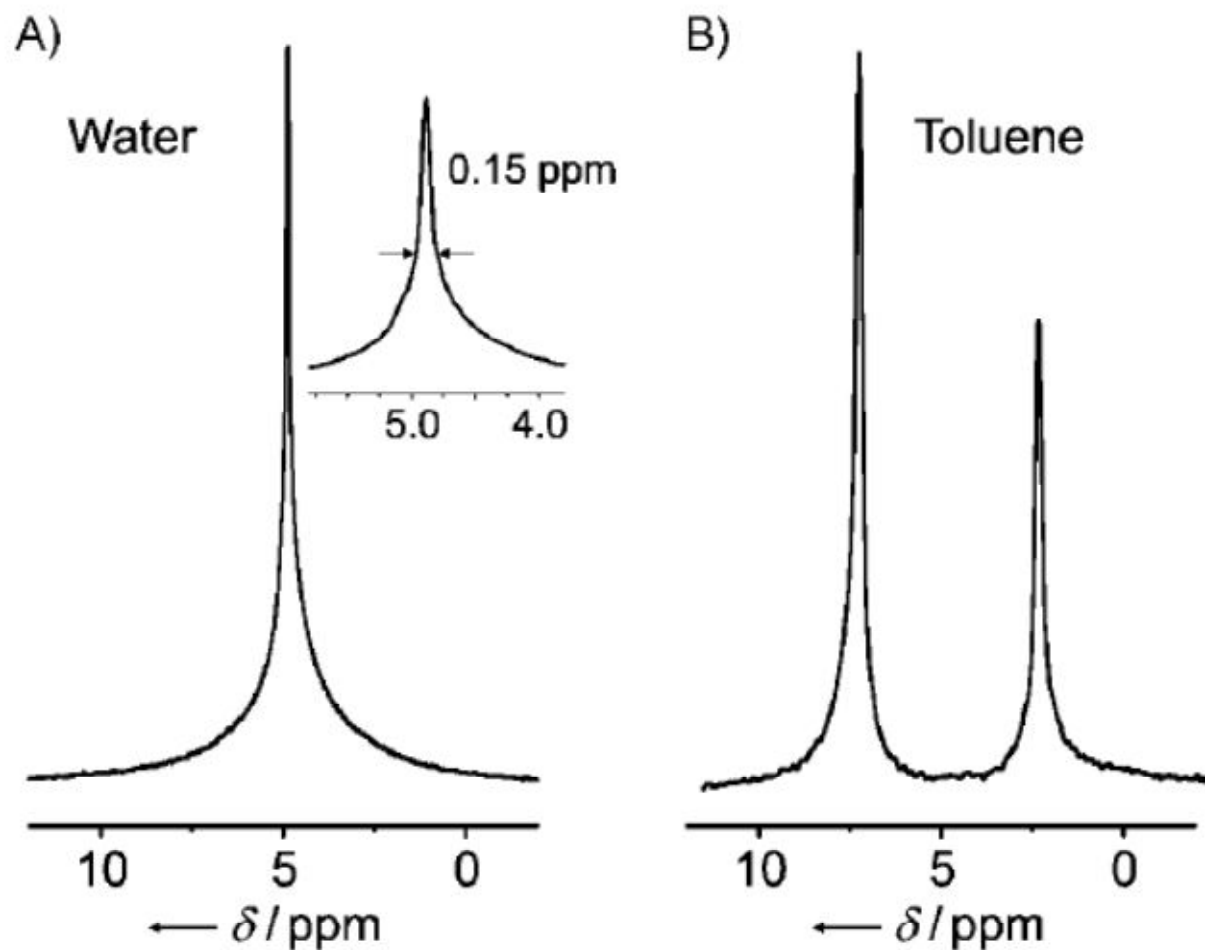
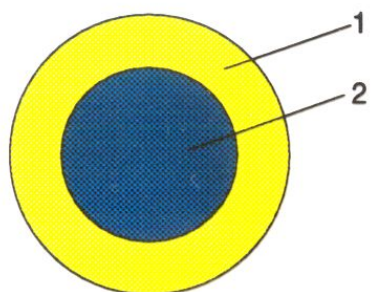


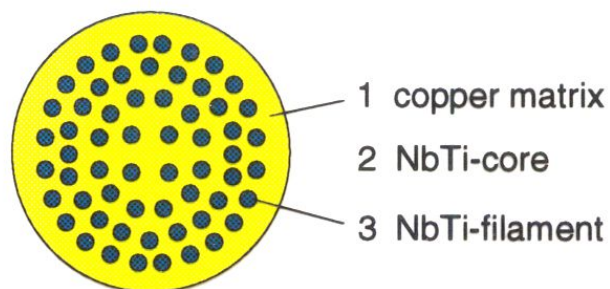
Figure 4. A) Spectrum of water in a conventional 5 mm NMR tube. The spectrum is the Fourier transform of the free induction decay of 16 scans acquired during an acquisition time of 536 ms with a recycle delay of 10 s. B) Spectrum of toluene obtained after Fourier transformation of the free induction decay of 64 scans.

Szupravezető mágnesek

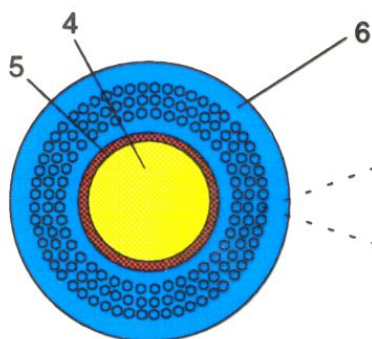
Az NMR mágnes tekercséhez használt drót keresztmetszete



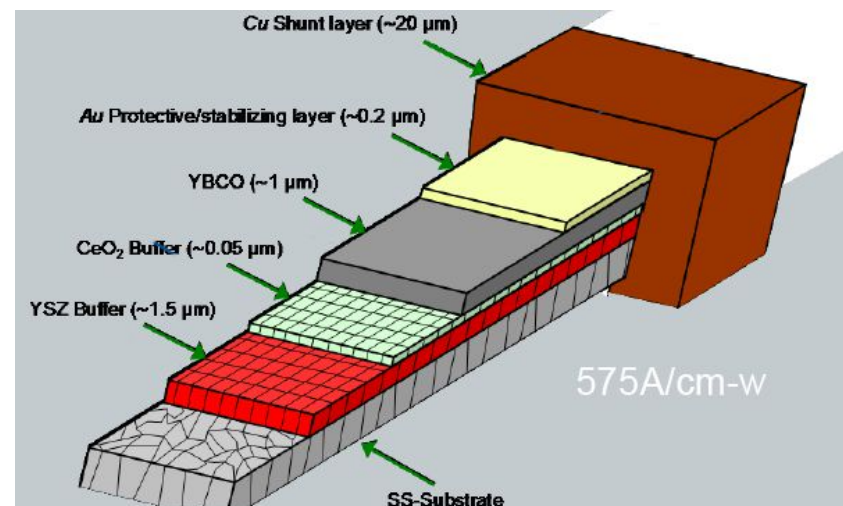
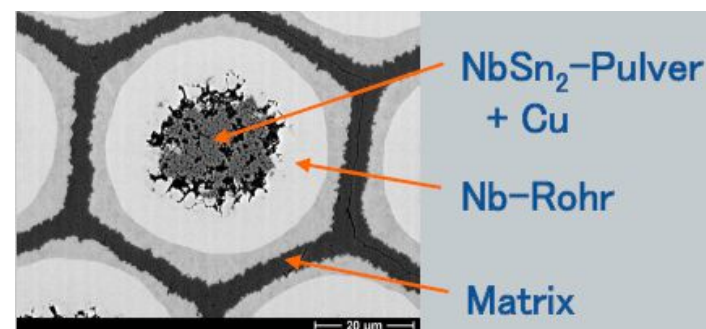
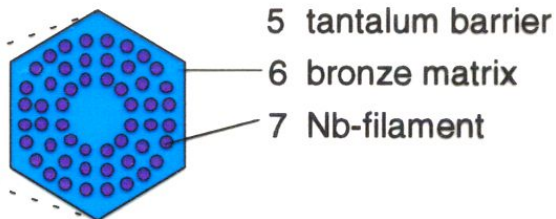
NbTi - single filament



NbTi - multi filament
(about 60 NbTi-filaments)

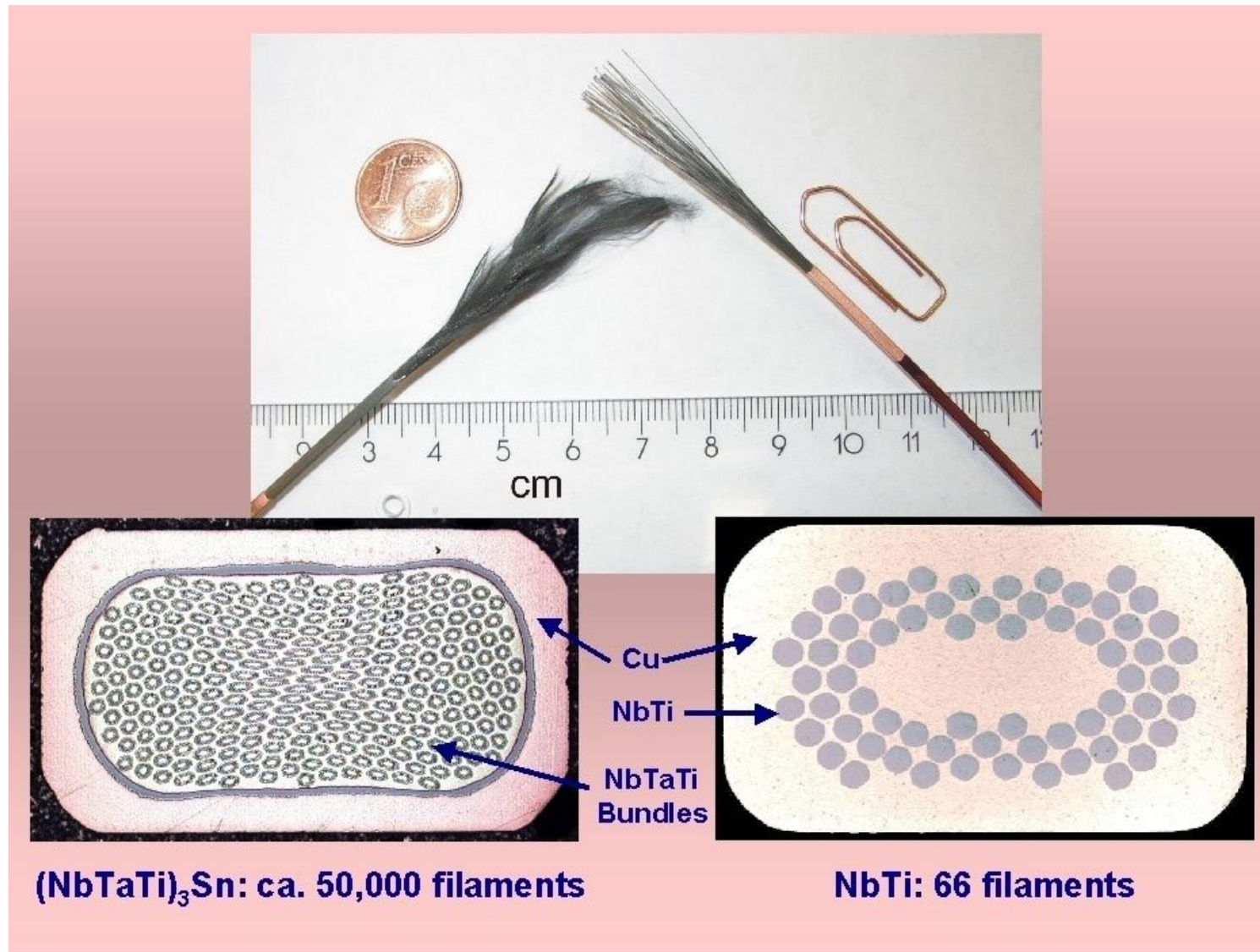


Nb₃Sn - superconductor (non reacted)
(total of 4000 to 10 000 Nb-filaments)



YBCO vezeték

A legújabb szögletesre formázott NbSn and NbTi NMR drót

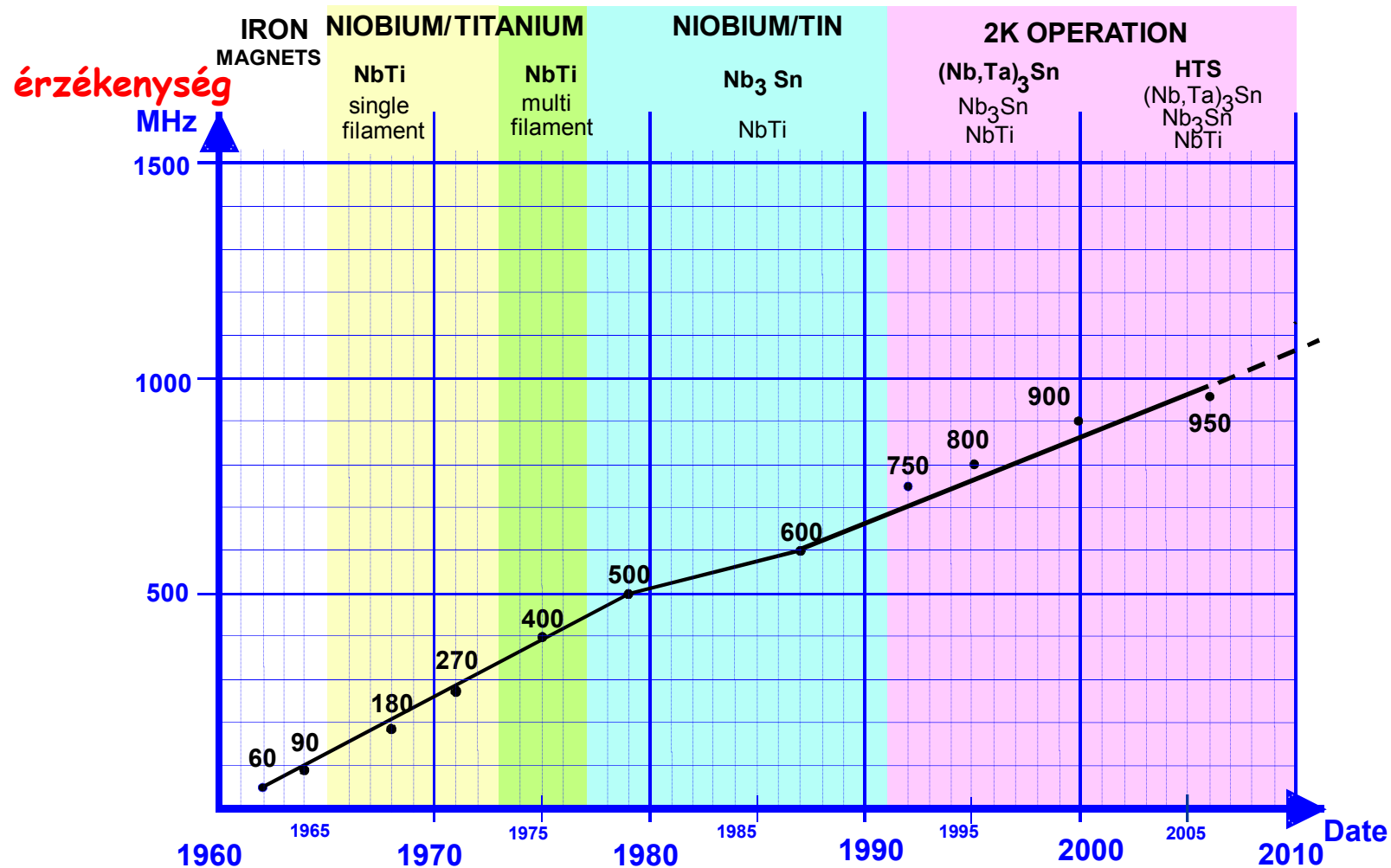


hőkezelés



nagyobb flexibilitás

Az NMR mágnes szupravezető anyaga és a érzékenység



Tökéletes NMR sajátosságú mágnesek „állandó üzemmód”

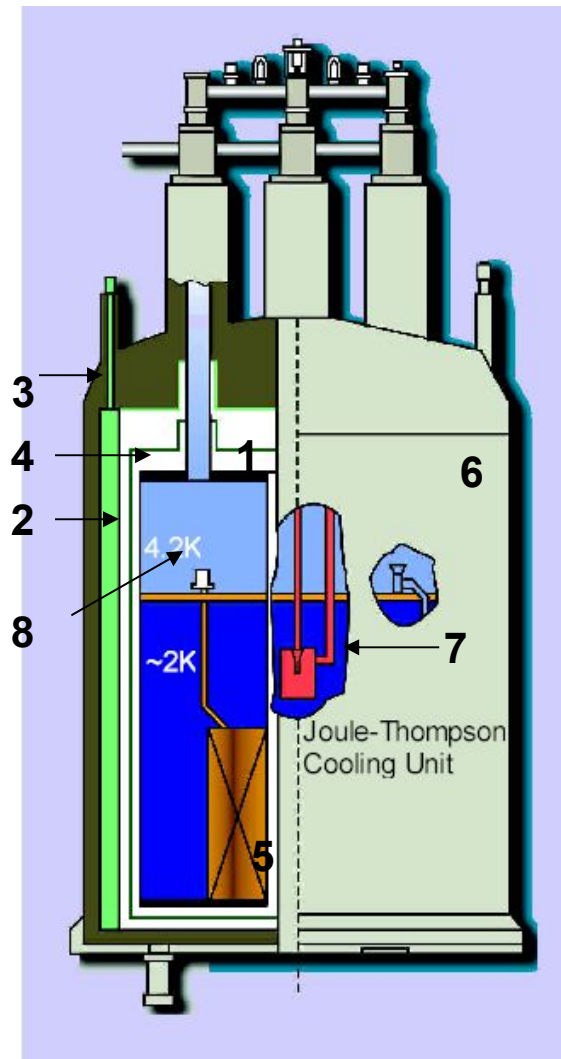
magasság
átmérő
tömeg

5300 mm
1688 mm
7000 kg

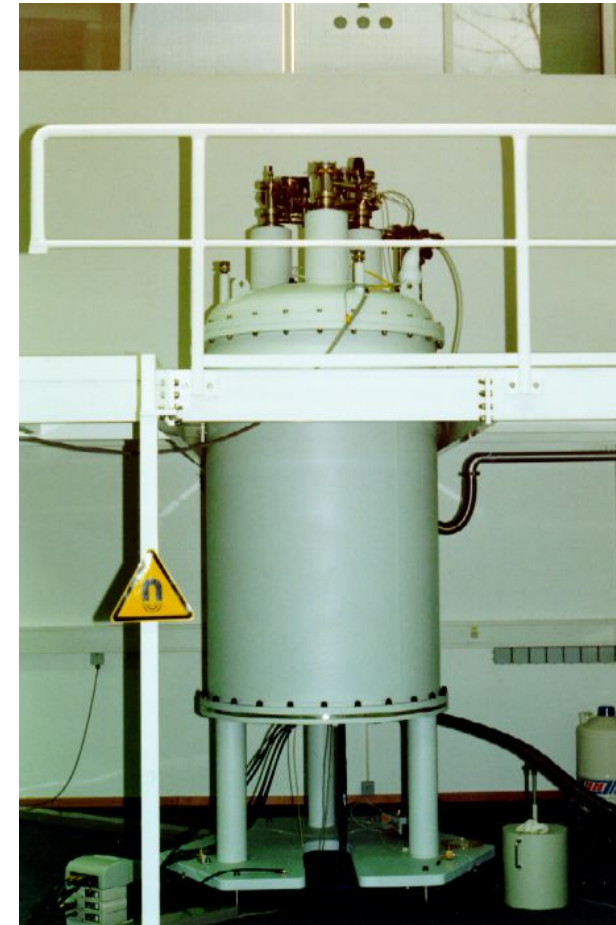




Az ultrastabilizált mágnes technológia

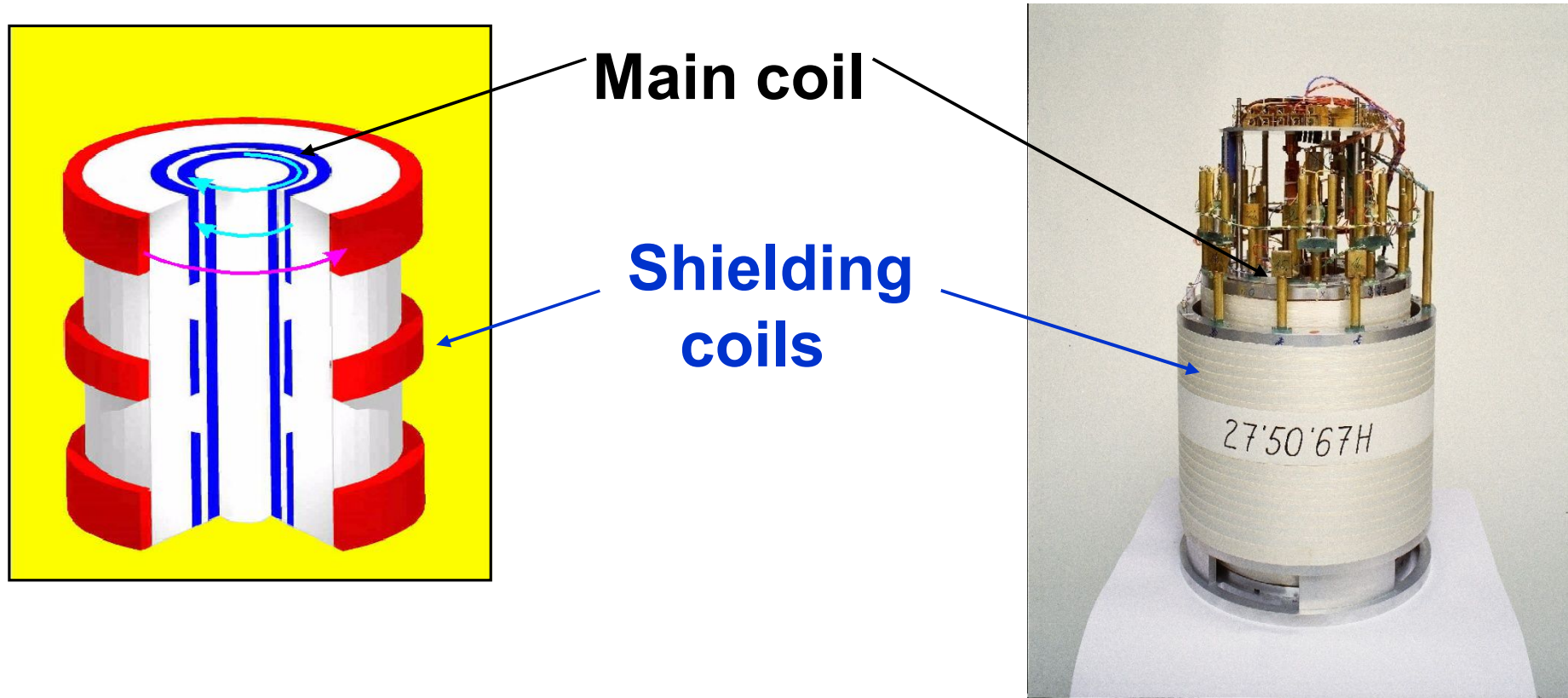


- 1 Helium vessel
- 2 Nitrogen vessel
- 3 Vacuum chamber
- 4 Radiation shield
- 5 SC-coil
- 6 Siphon entry port
- 7 J-T cooling unit
- 8 Thermal barrier



750 - 900 MHz ultrastabilized technology

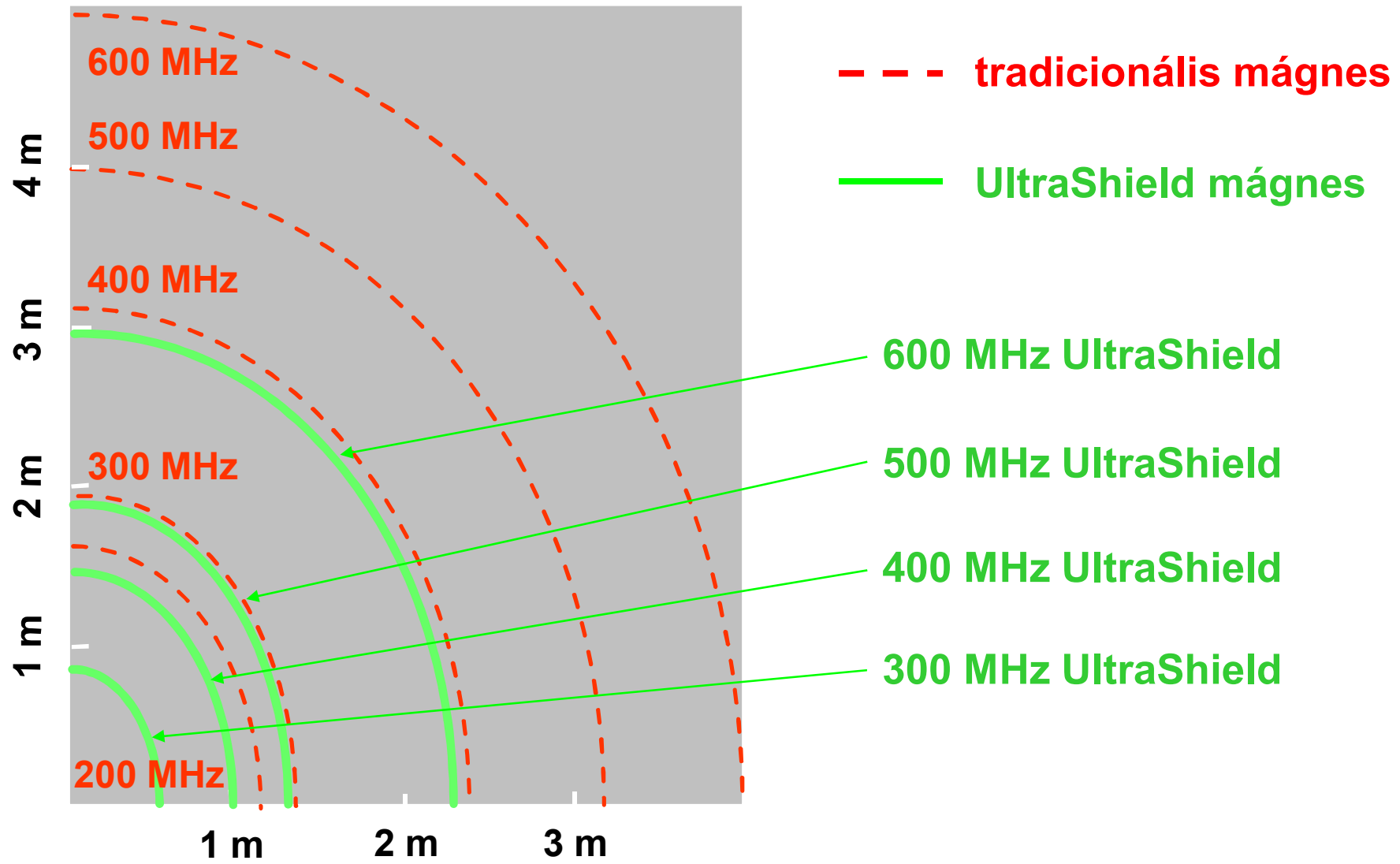
UltraShield technológia



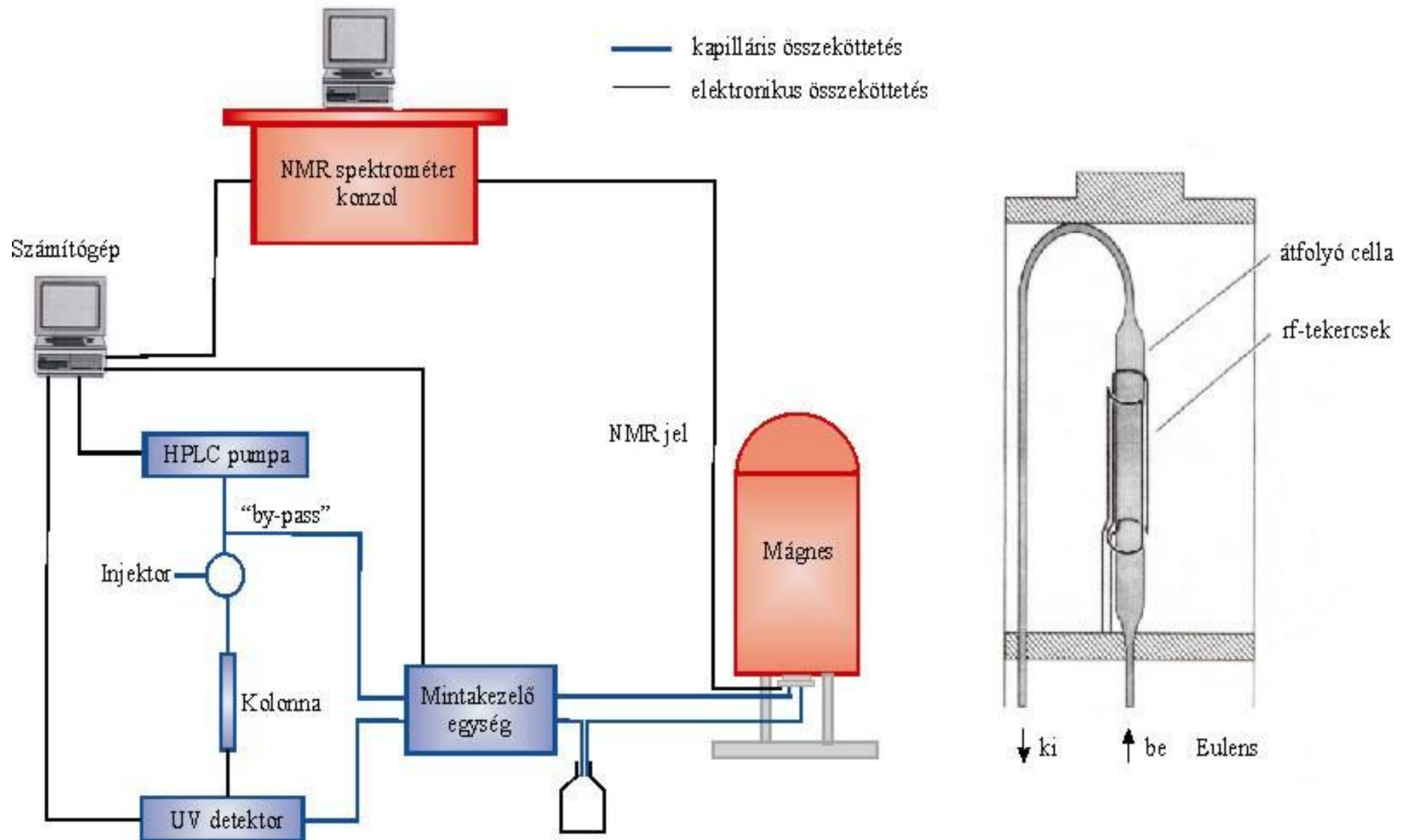
500 MHz UltraShield

Az UltraShield technológia teszi lehetővé az LC, MS és egyéb integrált rendszerek elhelyezését közvetlenül a mágnes közelében

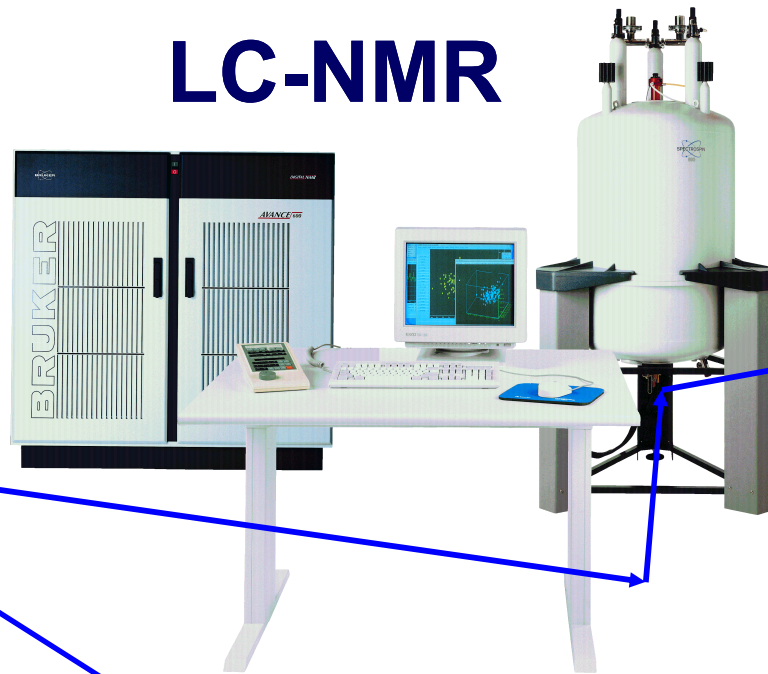
UltraShield technológia



HPLC-NMR kapcsolás sematikus képe

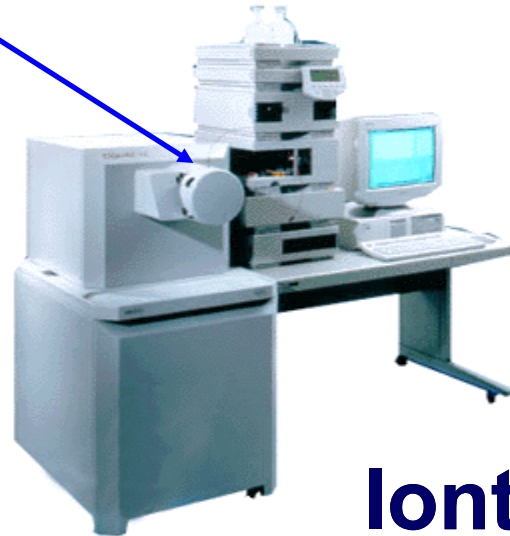


LC-NMR



Fraction Collector

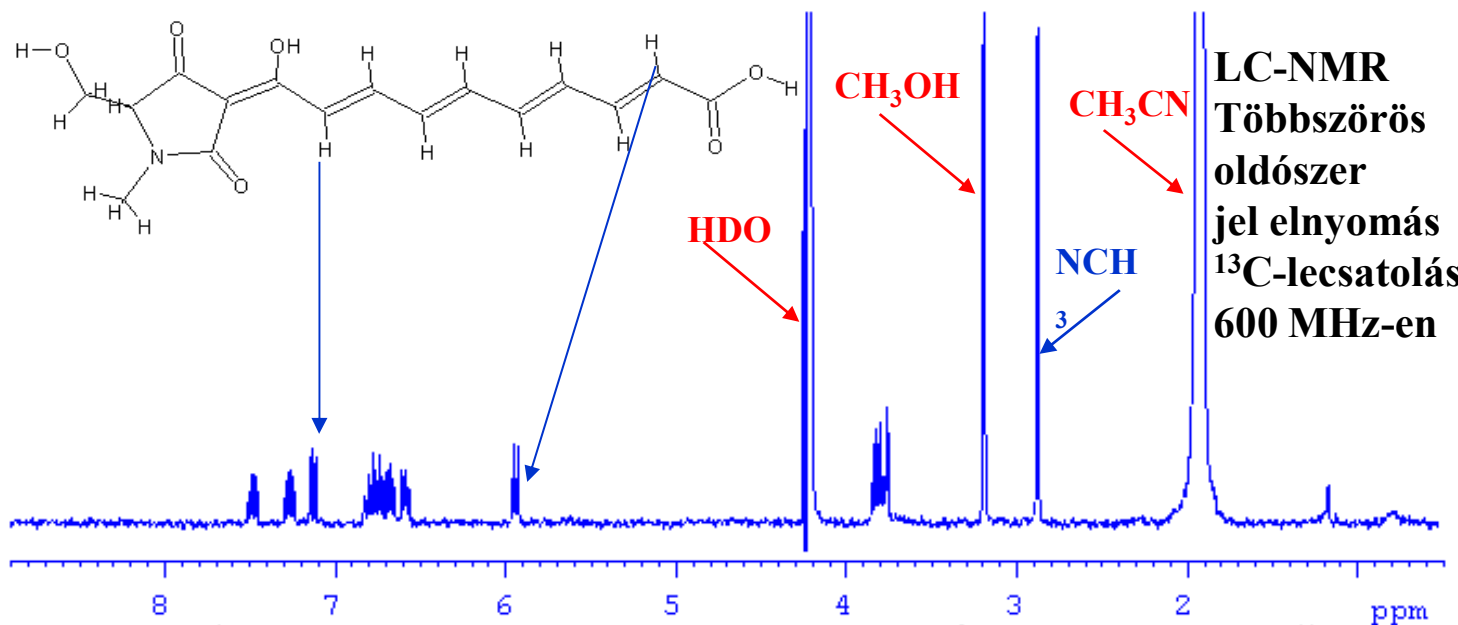
LC-NMR-MS interface



Iontrap MS

LC-NMR a természetes anyagok analízisében

LC-NMR

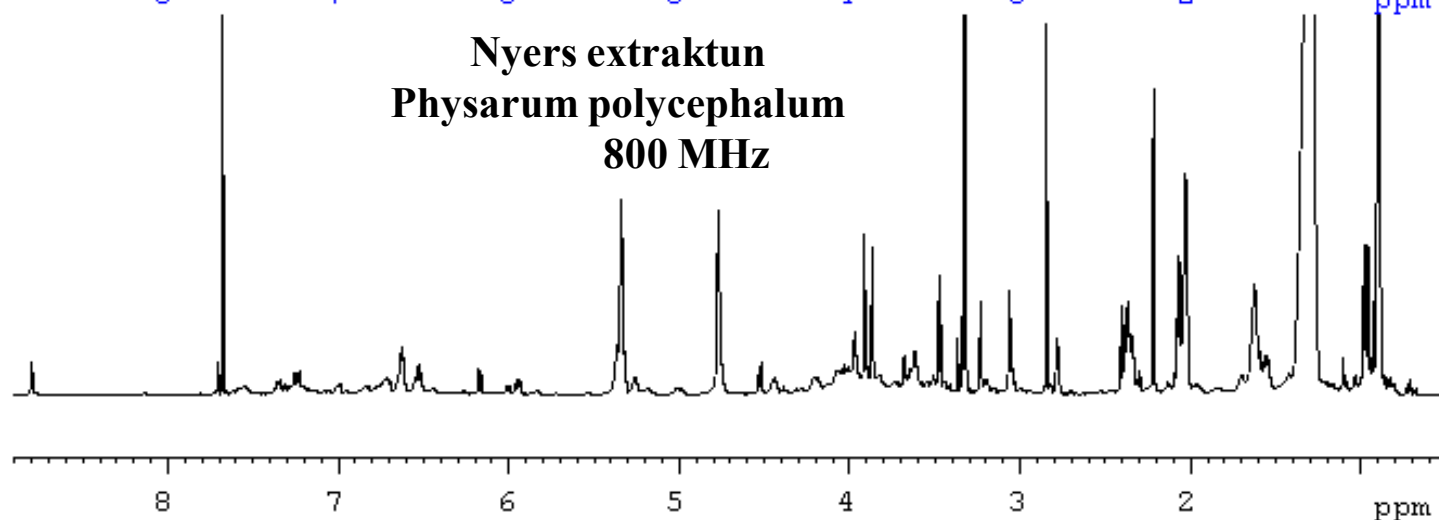


LC-NMR
Többszörös
oldószer
jel elnyomás
¹³C-lecsatolás
600 MHz-en

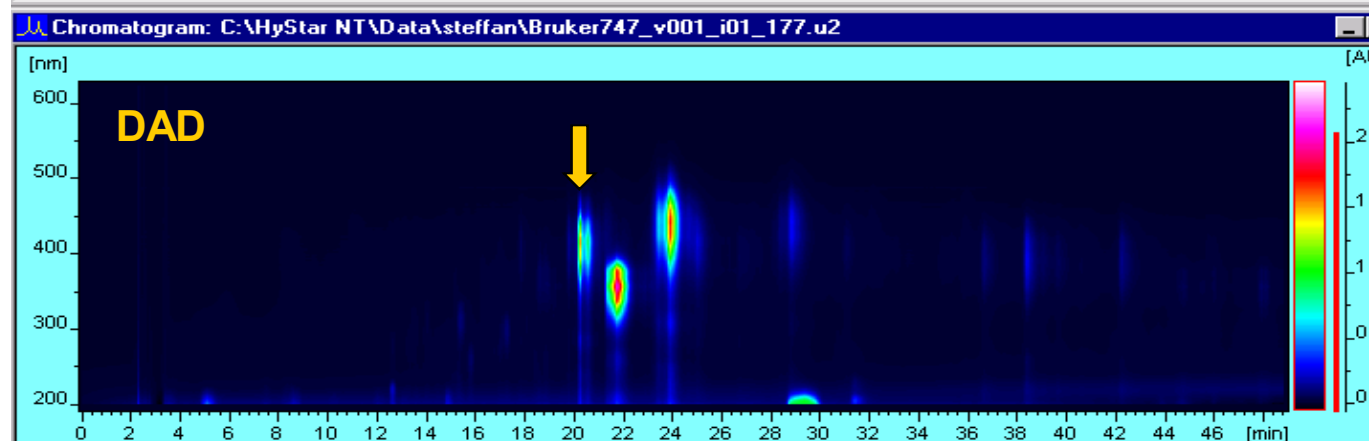
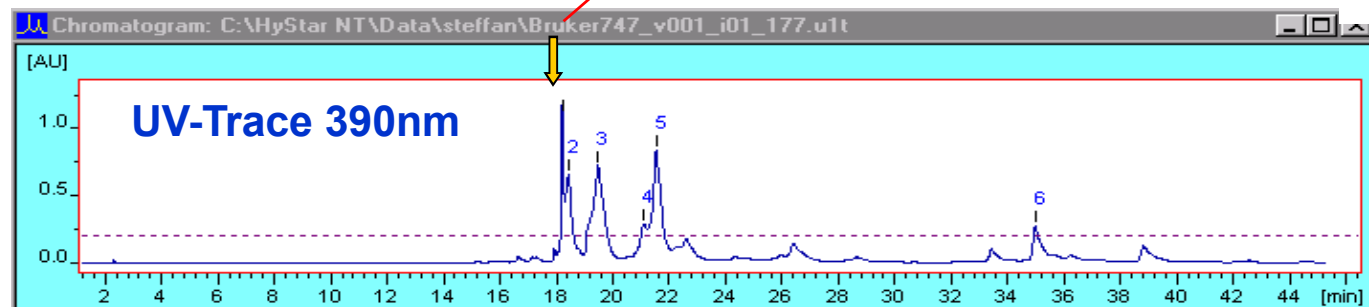
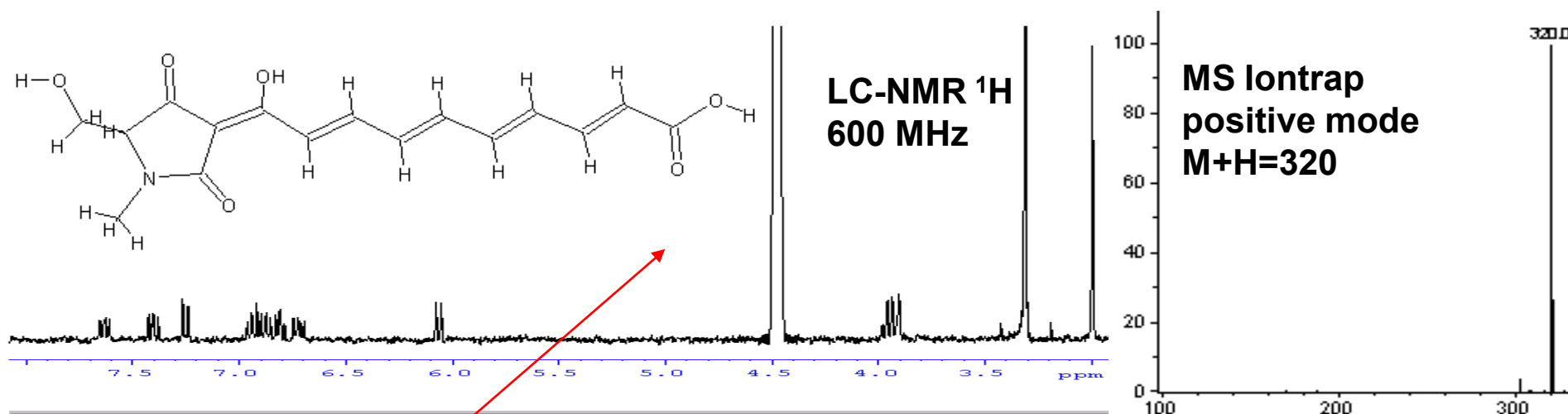
Az LC-NMR előnye :

- 1) feleslegessé válik a már ismert, s így érdektelen anyagok időigényes izolálása
- 2) lehetővé válik a korábbi MS adatok szerkezeti információkkal történő kiegészítése

Nyers extraktum
Physarum polycephalum
800 MHz



NMR in Natural Products Analysis



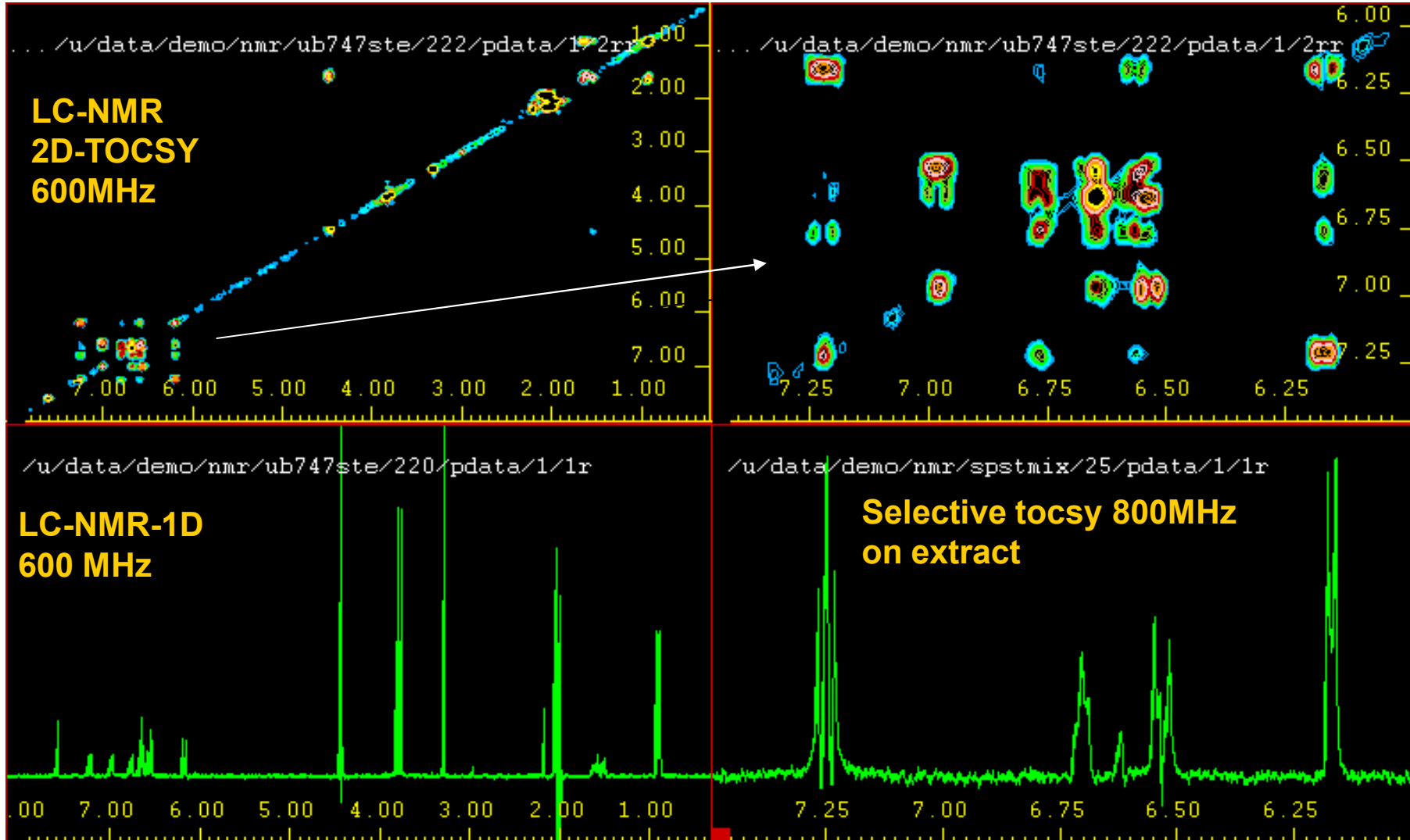
The power of
LC-NMR-MS

3 different
analytical tools in
one measurement

MS- MS/MS
1D and 2D-NMR
UV and DAD

NMR in Natural Products Analysis

Information gathered by LC-NMR and 800 MHz spectroscopy
LC-NMR peak 3 at 18.8 minutes



$$S/N = n \cdot \gamma_{\text{gerj}} \cdot \gamma_{\text{det}}^{3/2} \cdot N S^{1/2} \cdot T^{-1} \cdot T_2^{-1} B^{3/2} \left(\frac{G \cdot Q}{c_2 \cdot T_c} \right)$$

a) Érzékenység **standard** TXI 5mm mérőfejre,
0.1% etilbenzol:

500MHz: 900:1

b) Érzékenység **CryoProbe™** TXI 5mm mérőfejre,
0.1% etilbenzol :

500MHz: 3000:1

600MHz: 4000:1

800MHz 6000:1

c) Mérési idő és érzékenység összefüggése:

$$\text{mérésidő}_{\text{Cryo}} = \text{mérésidő}_{\text{standard}} \cdot \left(\frac{SN_{\text{standard}}}{SN_{\text{Cryo}}} \right)^2$$

Bruker's CryoProbe™ TXI 600 MHz System

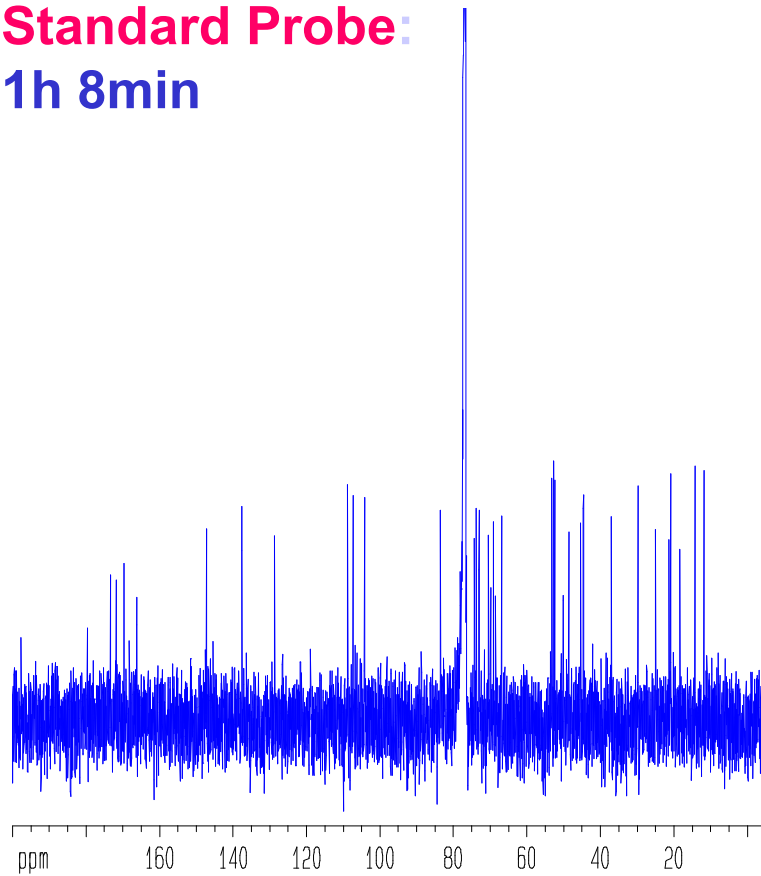


Cryoprobe: 500MHz $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ Z-gradient

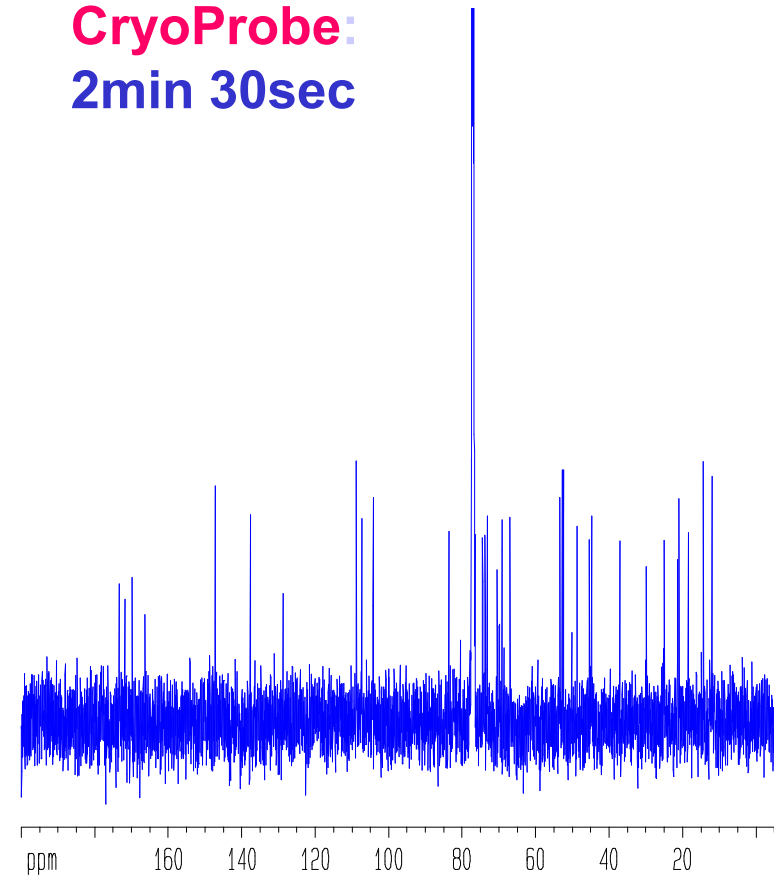
5.5mg Azadirachtin 650 μl kloroformban (10mM)

$\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{O}_{16}$ MW: 720.72

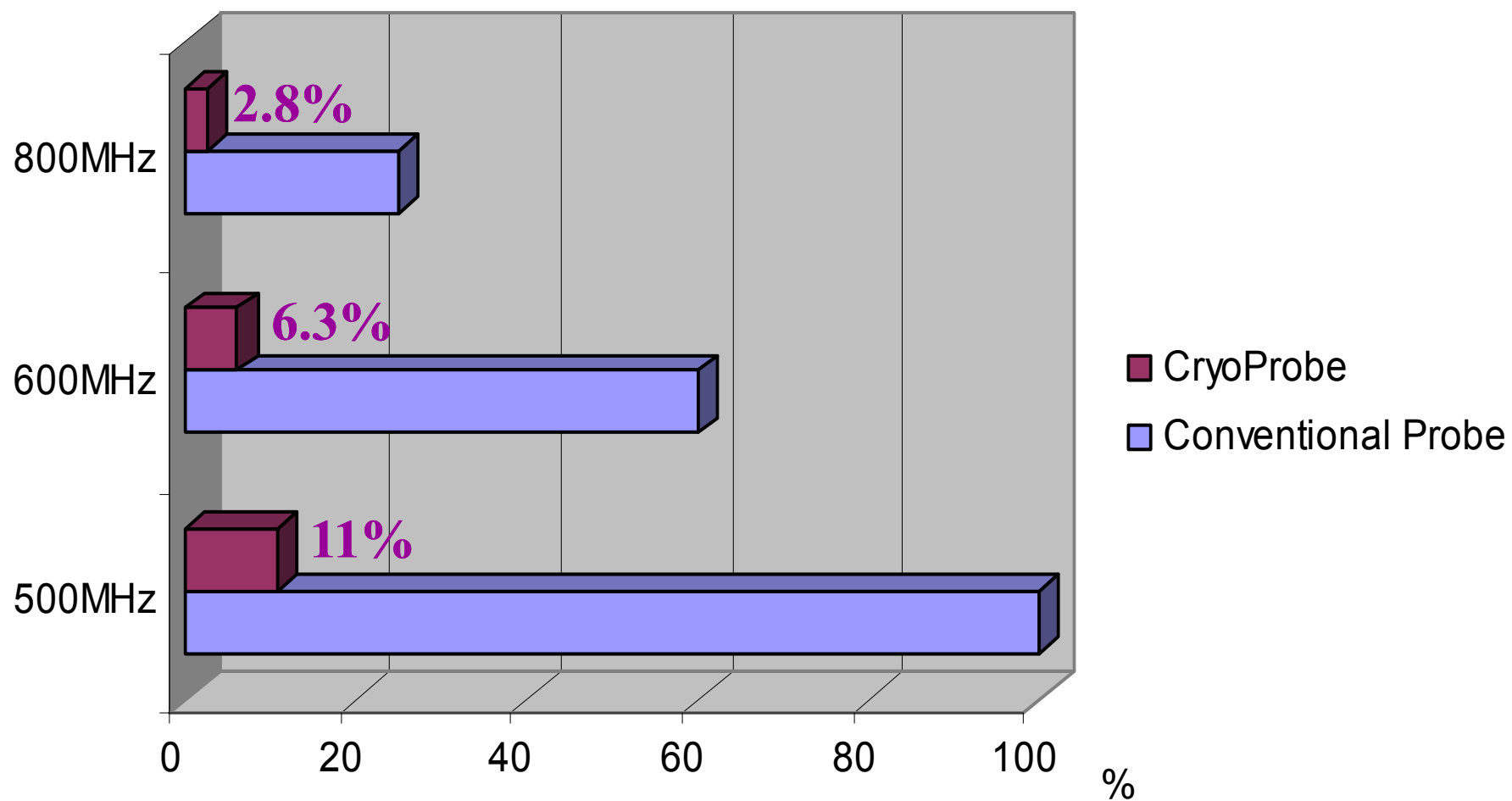
Standard Probe:
1h 8min



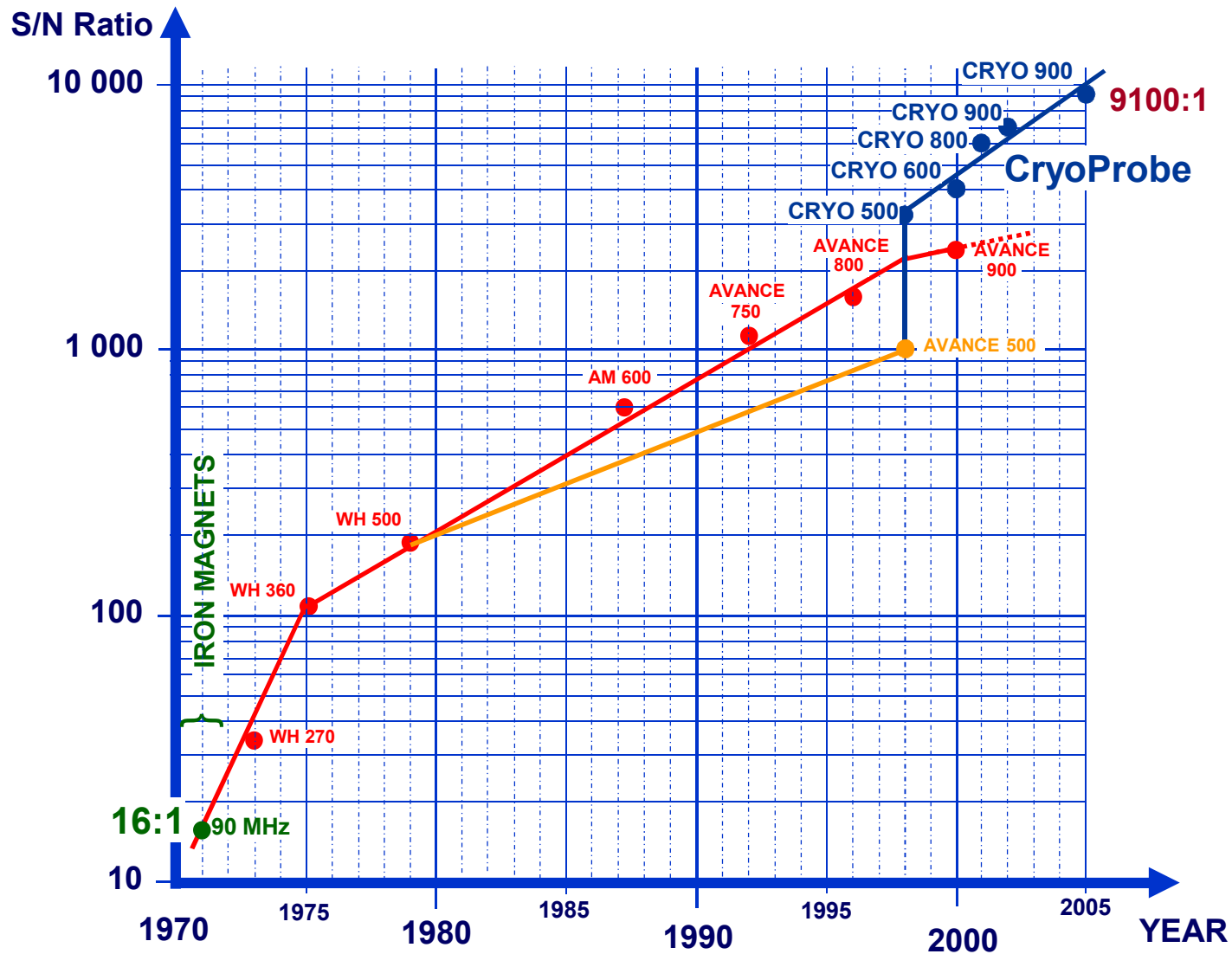
CryoProbe:
2min 30sec



Mérési idők összehasonlítása



NMR érzékenység 0.1% EB



CryoProbe™ Prodigy 400-600MHz (Bruker)

A 2011. év egyik legfontosabb NMR műszeres újítása !

- RF tekercsek és előerősítő >77K
az **érzékenység növekedése** a normál (RT) fejhez képest faktor
 - **2-3x az X-magokra (pl. ^{13}C)**
 - **ca. 2x az $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ magokra**
- **Ekvivalens '+300 MHz érzékenységgel' !**
- **Broadband** szélessávú konfiguráció
- Alkalmazható az új 400-600 MHz Avance III™ NMR spektrométereknél
- Használható automatikus hangolásnál is (ATM)



CryoProbe™ Prodigy

Kiemelkedő teljesítmény mérsékelt áron



Heteronukleáris NMR 10x gyorsabb

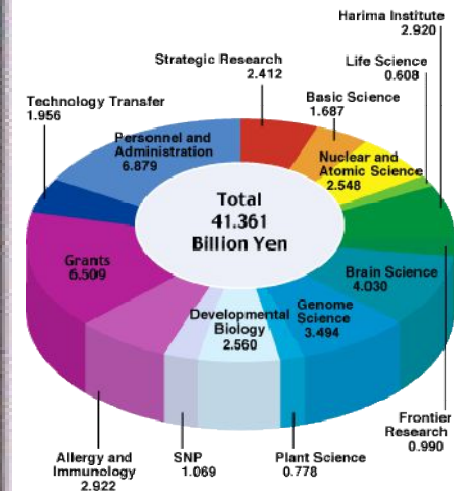
Az új folyékony Nitrogen CryoProbe
átírja a 'medium field' NMR-t

- Nagy teljesítmény növekedés alacsony működtetési és karbantartási költségek
- Lényegesen olcsóbb mint a hagyományos He CryoProbe
- Szerviz gyakoriság a 2 évet is meghaladja / 20'000 óra
- Prodigy fejhez csak a vezérlő egység és liquid N₂ tartály kell
- Könnyen telepíthető nincs szükség infrastruktúra bővítésre

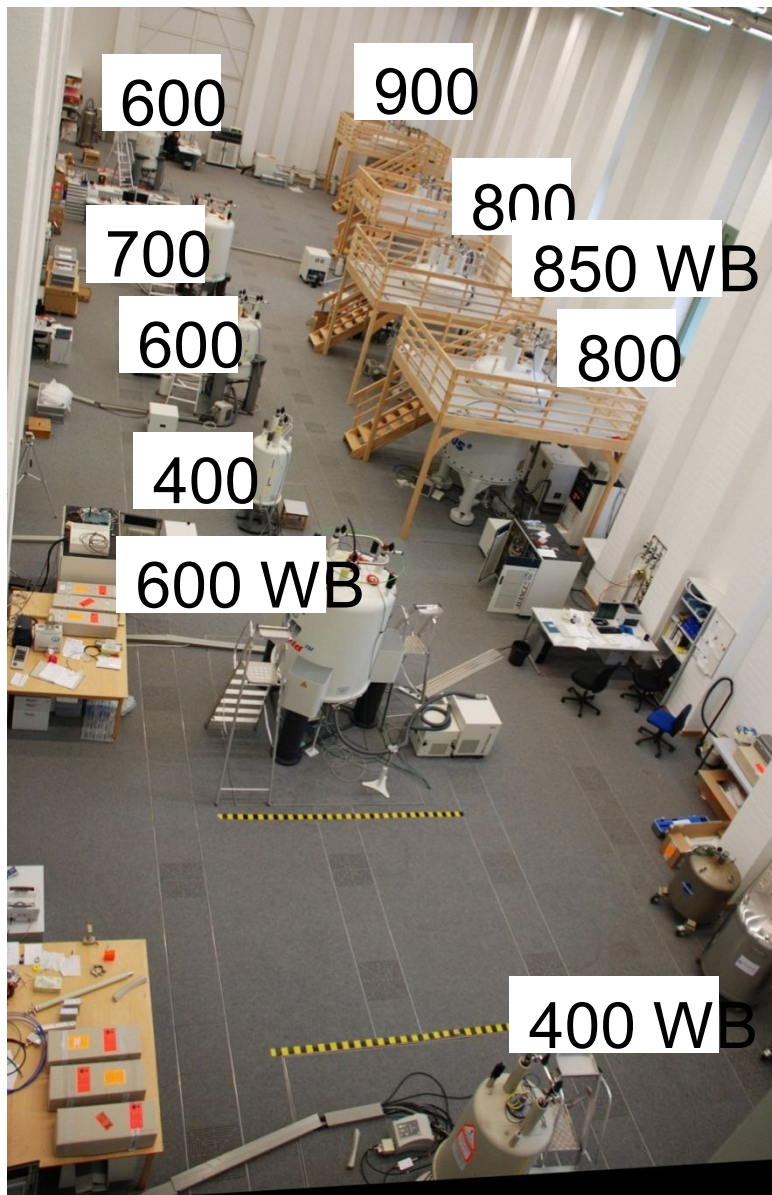
*„Rich man solution”
The Institute of Physical
and Chemical Research*



▲ Yokohama Institute



„Applications of NMR in structural and dynamic biology, chemistry and neurobiology“



MPI for Biophysical Chemistry
Göttingen, Germany
Prof. C. Griesinger 2013.

NMR as Black box

Analysis Laboratory at LipoScience (USA)



NMR-investigations on blood plasma at 48 °C

↳ **Risc of coronary heart disease**

Gyors mérési technikák

Hadamard spektroszkópia
Rétegszelektív gerjesztés

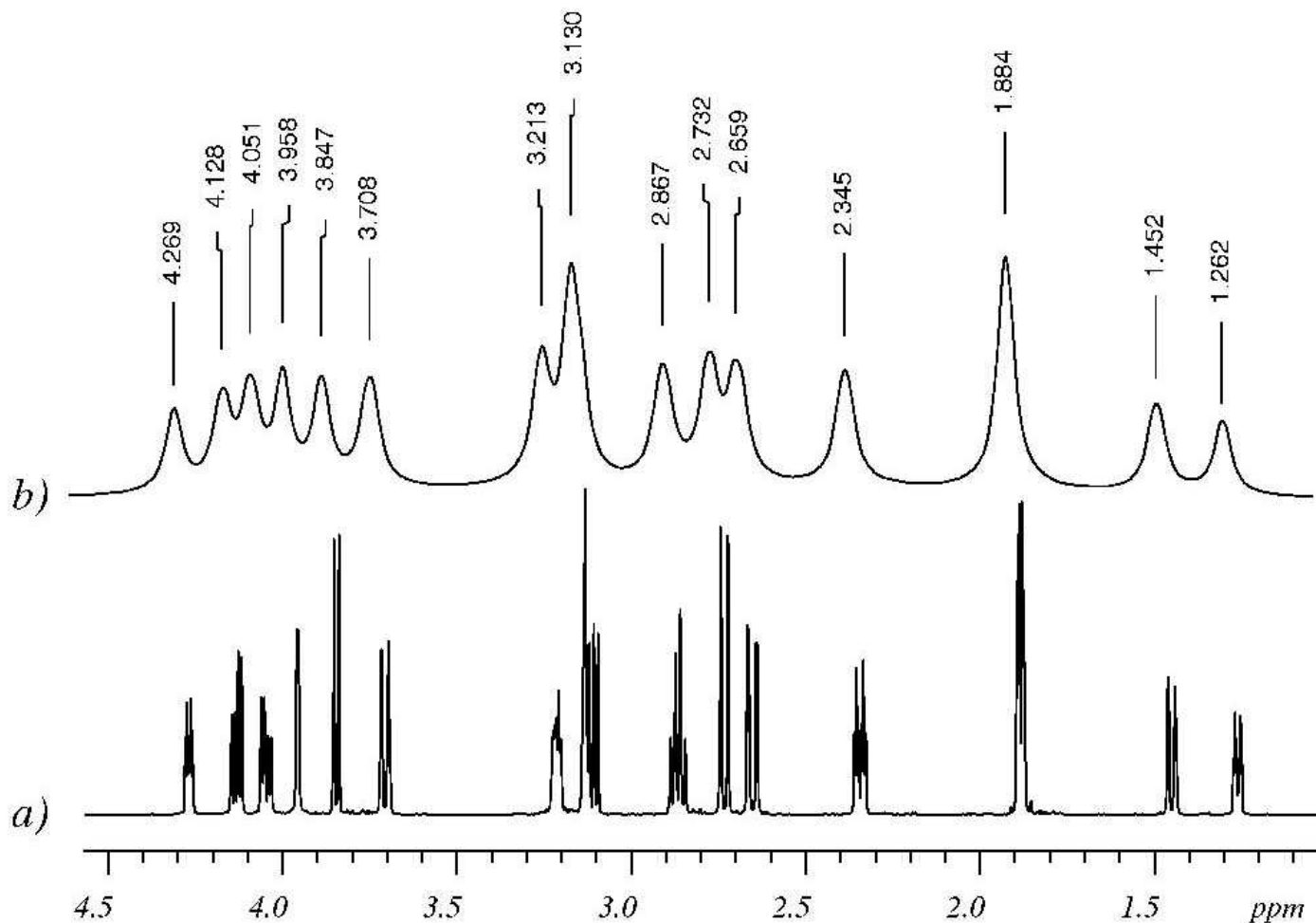
UF NMR, SOFAST, SPEED, ASAP
Projection reconstruction
APSY / GFT / MWD

FDM - Filter Diagonalization Method

NUS - Non-Uniform Sampling

Covariance NMR
Spectrum folding
Sharc NMR
Rapid Pulsing - BEST NMR

E. Kupce, R. Freeman: **HADAMARD** fast NMR spectroscopy
Frequency Lists for Hadamard Encoded Experiments
1D Spectrum of Strychnine



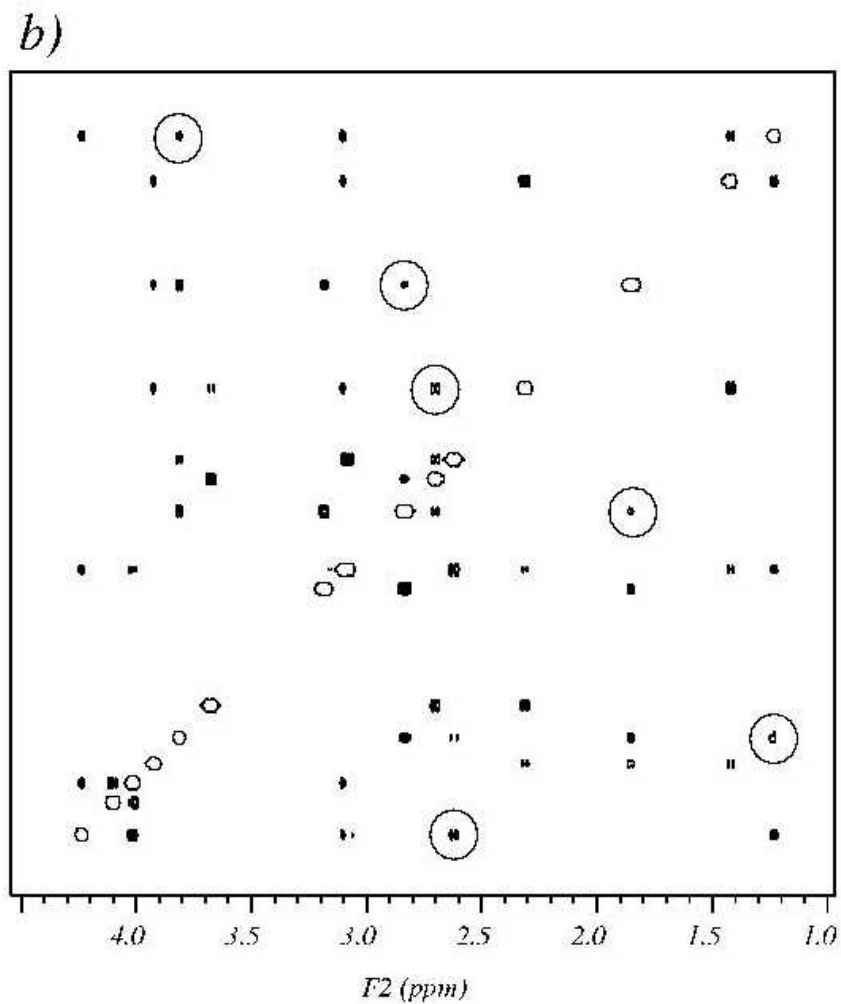
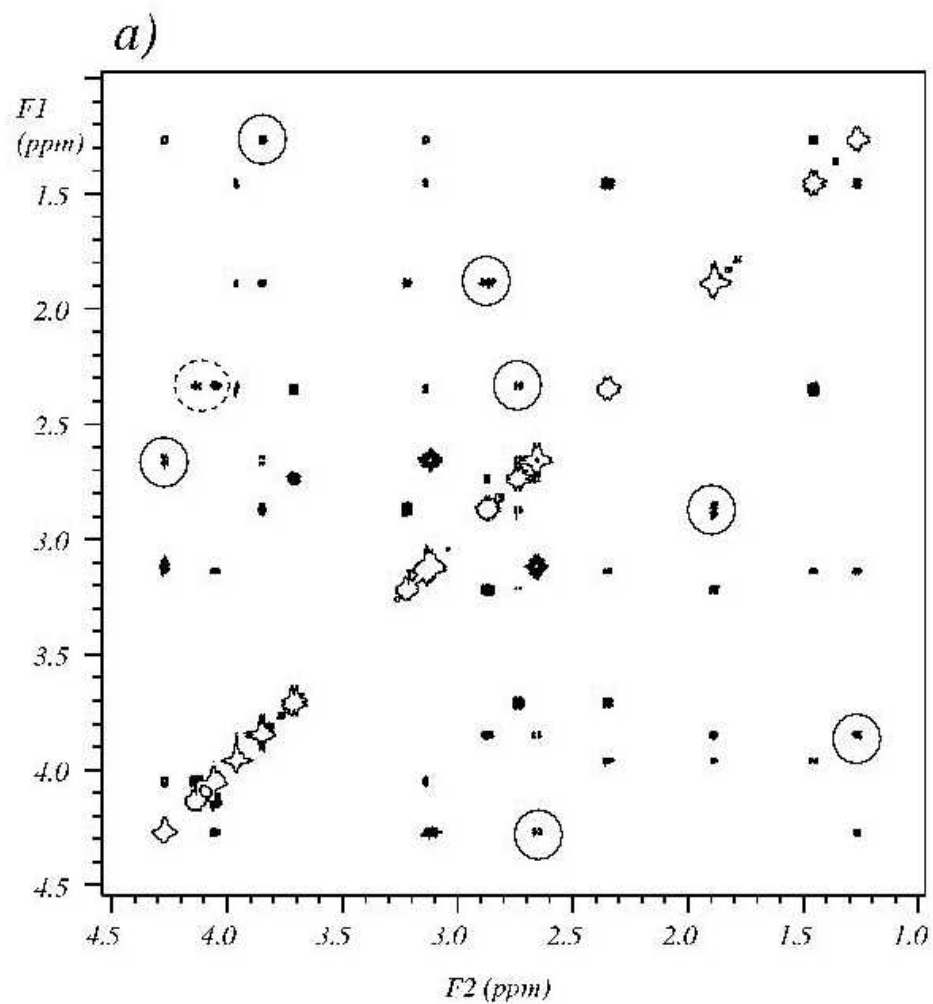
2D NOESY of Strychnine:

a) Conventional

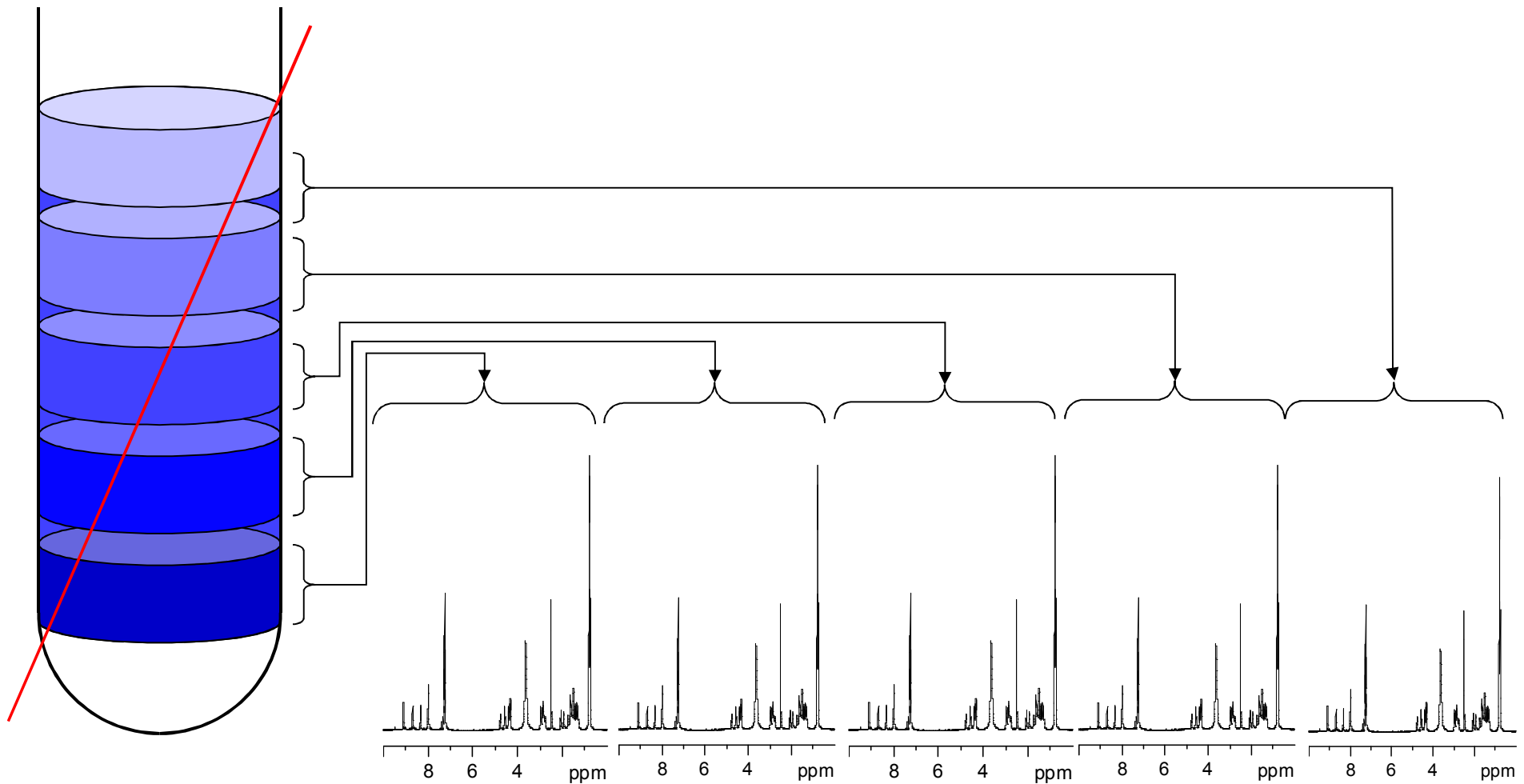
3h 13 min

b) Hadamard

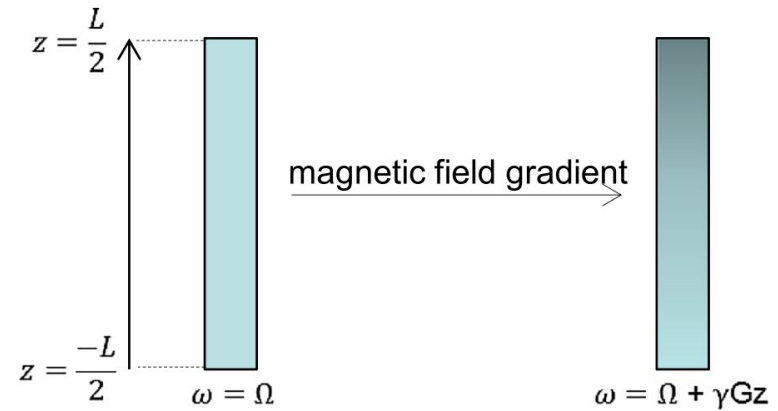
49 sec



„Frydmann Experiment” : rétegszelektív gerjesztés

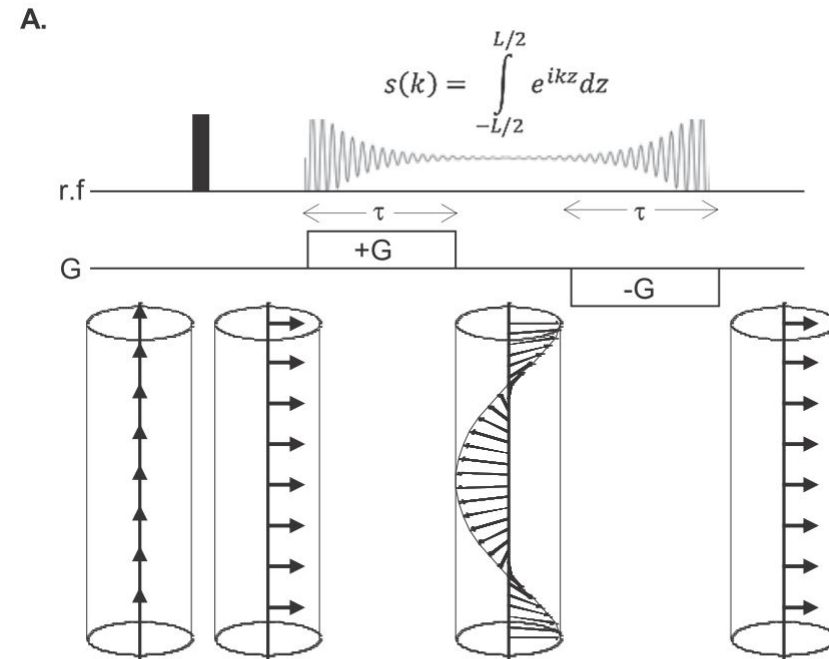


A mágneses tér-gradiens hatása a magspinek precessziós frekvenciájára

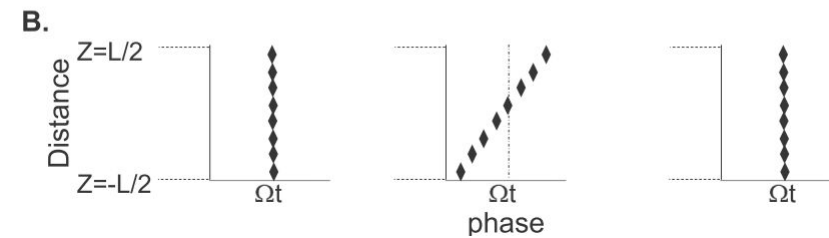


A **+G** és **-G** mágneses tér-gradiensek echo hatása a magspinek frekvenciájára

A. Pulzus szekvencia



B. A magspinek fázisának függése térbeli helyzetüktől



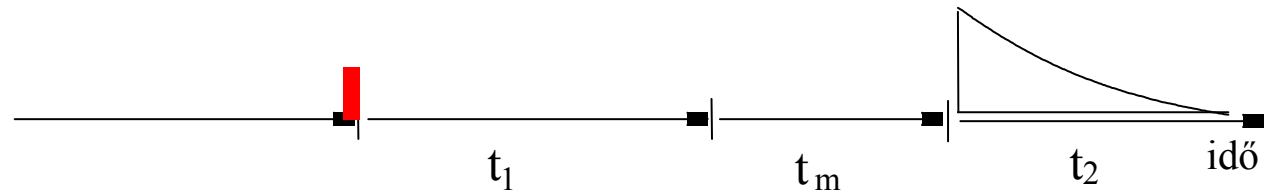
Kétdimenziós (2D) NMR spektroszkópia

előkészítés
(preparation)

kifejlődés
(evolution)

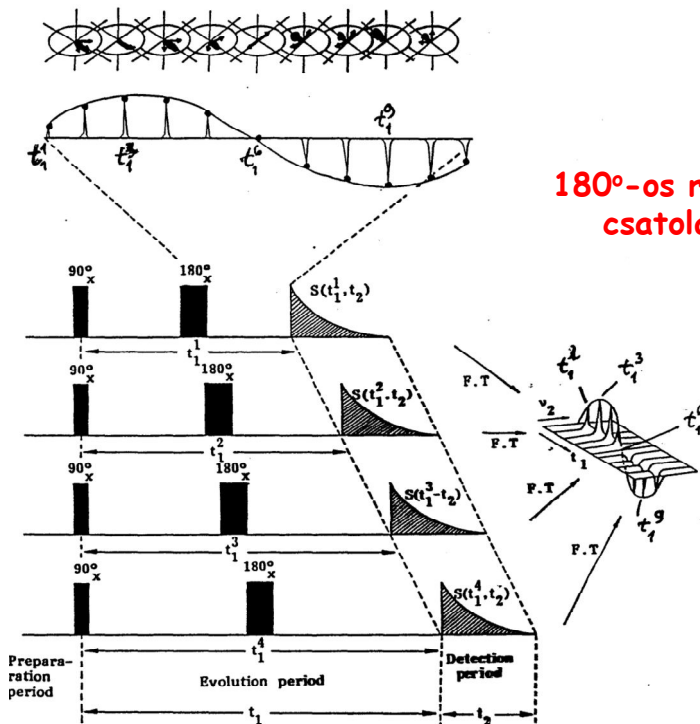
keverés
(mixing)

detektálás
(detection)

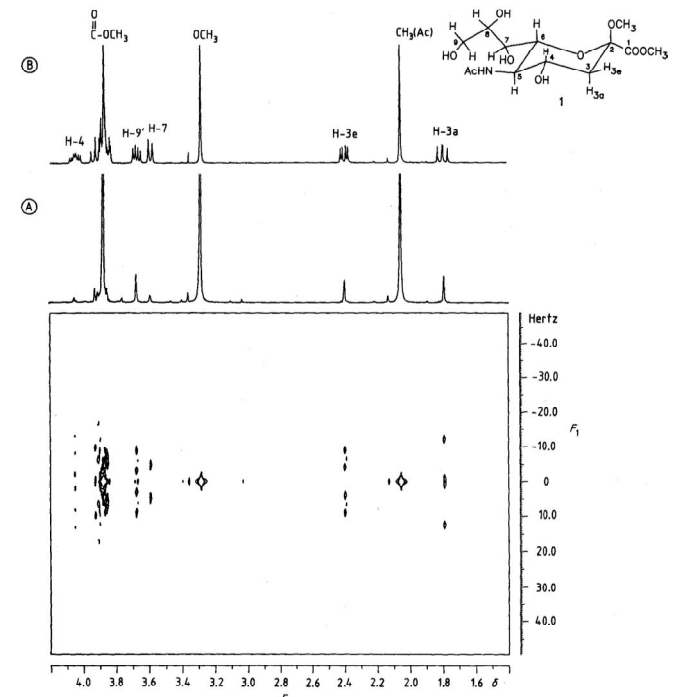


2D $S(t_1, t_2) \xrightarrow{Ft} S(t_1, F_2) \xrightarrow{Ft} S(F_1, F_2)$

3D $S(t_1, t_2, t_3) \xrightarrow{Ft} S(t_1, t_2, F_3) \xrightarrow{Ft} S(t_1, F_2, F_3) \xrightarrow{Ft} S(F_1, F_2, F_3)$



180°-os refokuszáló pulzussal javított csatolás felbontott 2D ¹H NMR



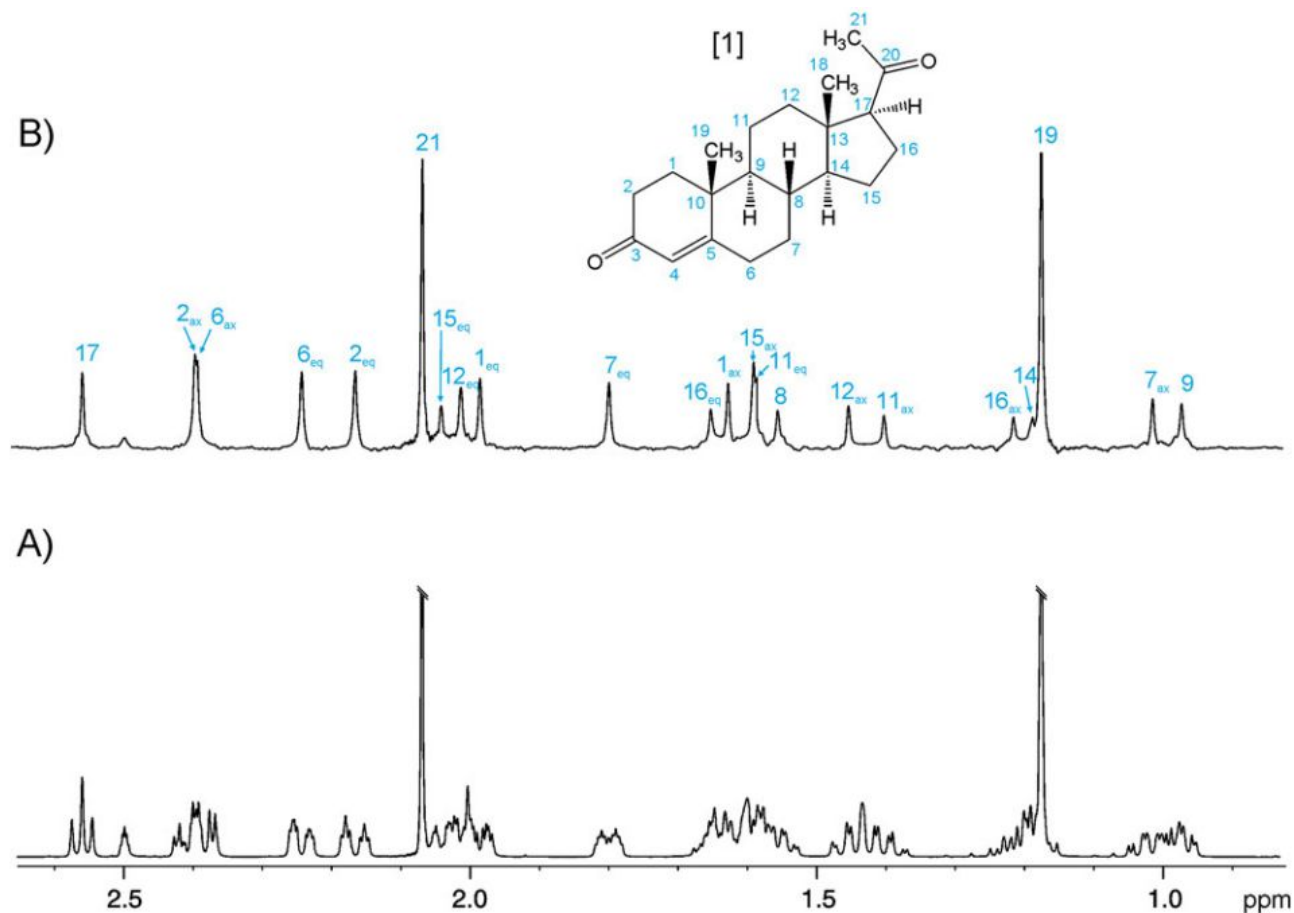
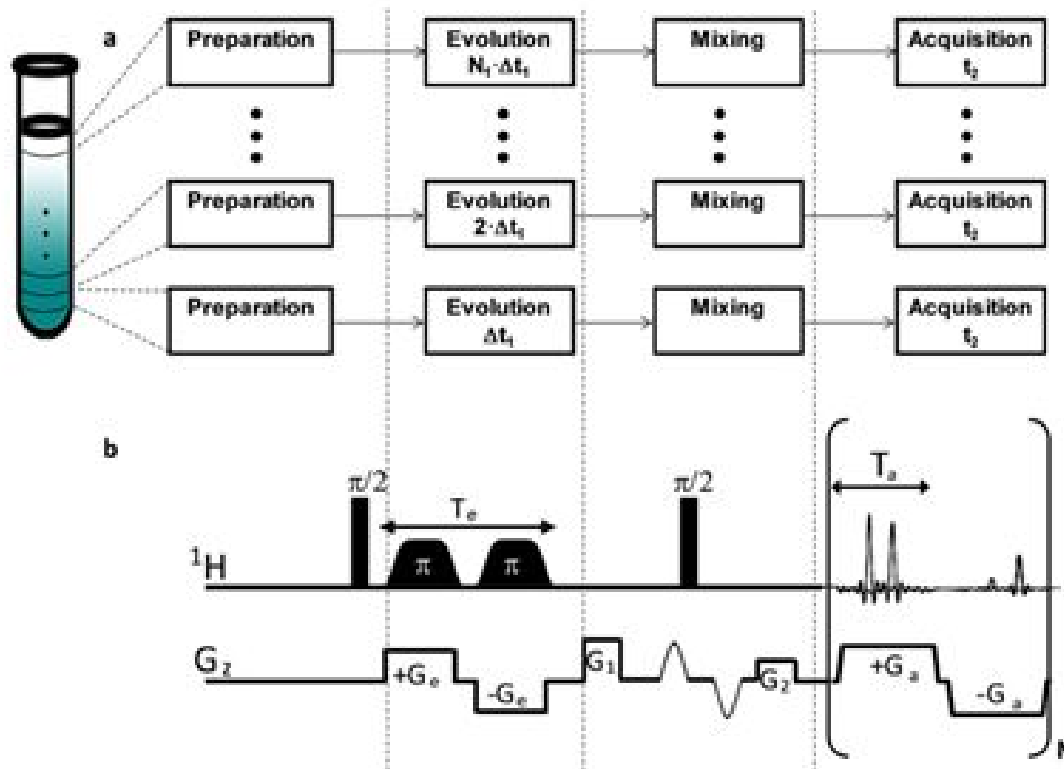


Figure 1. (A) 600-MHz conventional and (B) broadband homodecoupled 1D ^1H NMR spectra of the steroid progesterone [1] in dimethyl sulfoxide- d_6 . Note how all simplified singlet resonances at their chemical shift frequencies can be distinguished in the pure shift spectrum, which was acquired in about 5 min using the PSYCHE experiment.

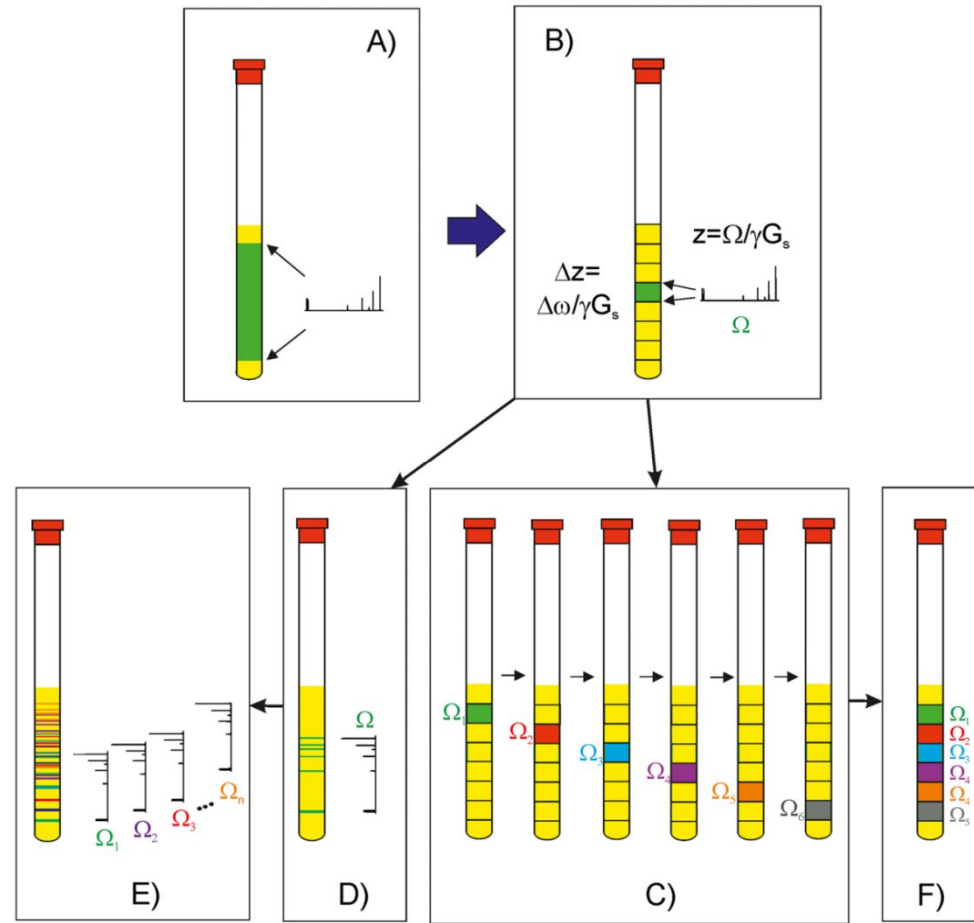
Fast hybrid multidimensional NMR methods based on ultrafast 2D NMR.
 Serge Akoka, Patrick Giaudeau MRC 53. 986-94 2015

2D UF NMR

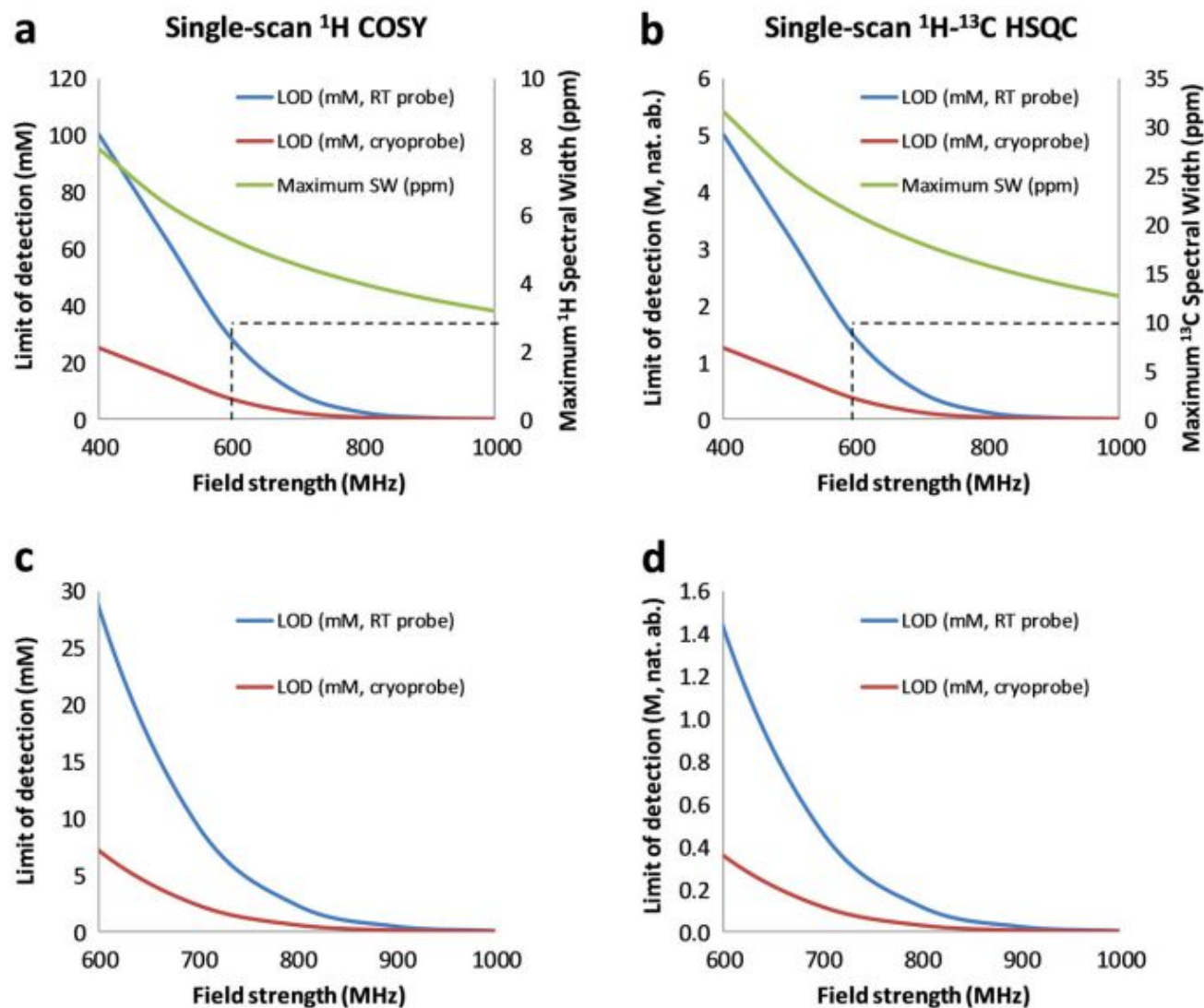


a) az UF akvizíció sémája. A mintát diszkrét rétegekre bontjuk melyekben egy adott időpontban eltérő az inkrementált t_1 idők száma. A „Preparation/Evolution/Mixing/Acquisition” egységek a hagyományos mérésben levőknek felelnek meg, de itt nem idő, hanem térbeli pozíció szerint történik a kódolás.

b) példa: az UF single-scan $^1\text{H}^1\text{H}$ COSY pulzus szekvenciája. A detektálási blokk lényegében echo-planar spectroscopic imaging (EPSI) típusú és bipoláris gradienseket használ. T_e : a térbeli kódolási gradiens ideje; G_e : a kodoló gradiens amplitudója; T_a : a detektálási gradiens ideje; G_a : a detektálási gradiens amplitudója; N: az akvizíciók (loop) száma.



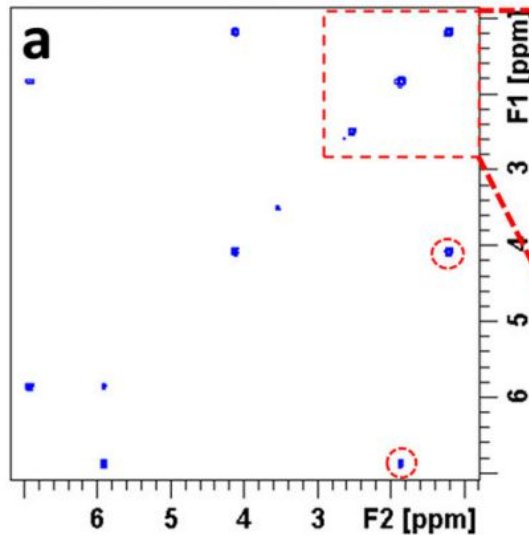
Single-scan UF $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY és $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC lehetséges mérési tartományai (LOD)



A spektrális szélesség (SW) számításánál $T_e=30$ ms időt (térbeli kódolás) vettek alapul, ami egy ésszerű kompromisszum a felbontás és SW közt, továbbá a detektálási gradiens amplitudója 30 G cm^{-1} .

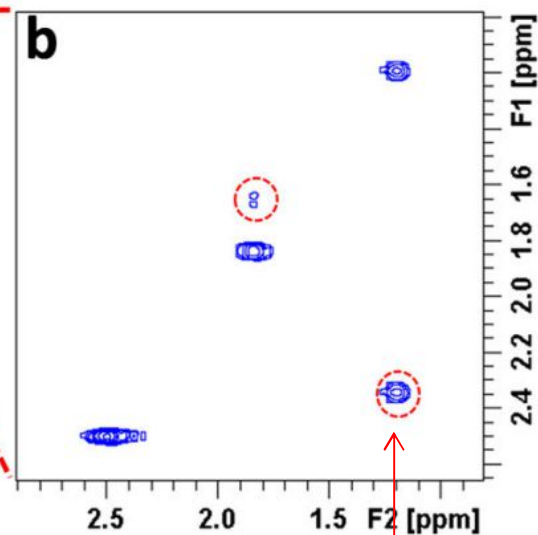
$^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY mérés spektrális ablakja (SW) növelése a speciális hibrid UF „interleaved” technikával

8 interleaved scans, 30 s



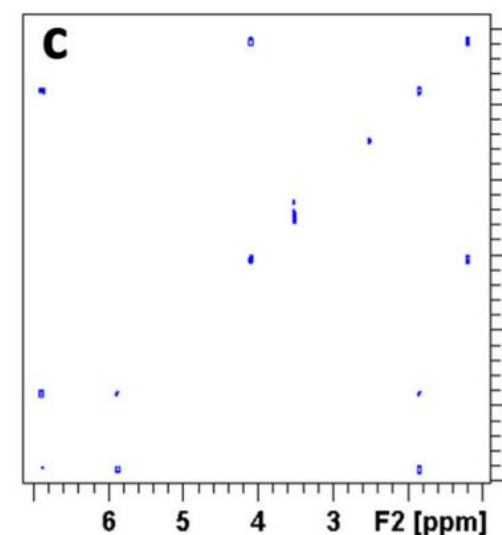
teljes SW, gyors eredmény

Single-scan, 100 ms



részleges SW, visszahajtott jel

Conventional, 35 min



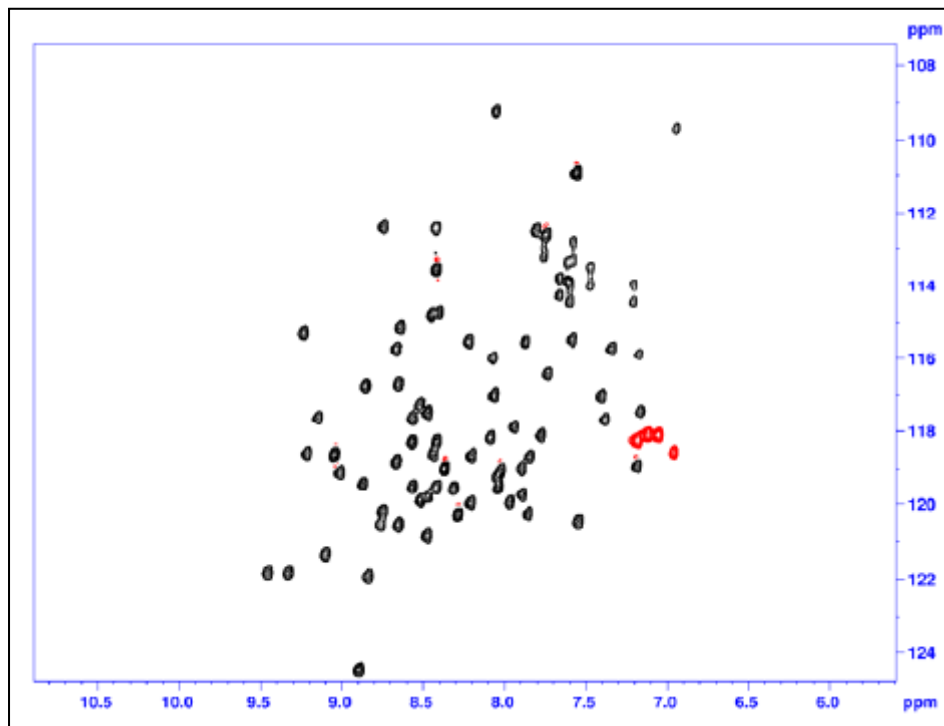
teljes SW, lassú mérés

Minta: 100-mMol etil krotonát, 700 MHz, DMSO- d_6 , $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY mérés

SOFAST-HMQC

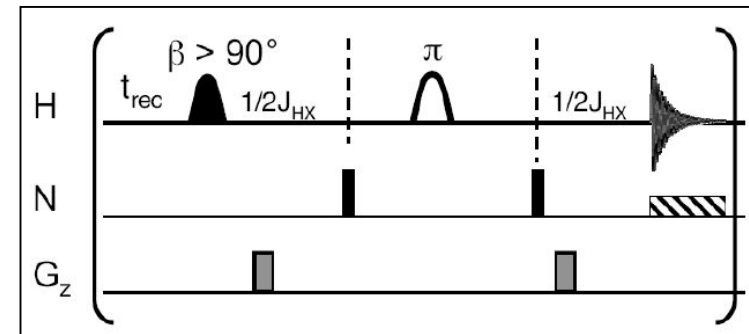
Band-Selective Optimized-Flip-Angle Short-Transient

1 mM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ jelzett ubiquitin / $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$

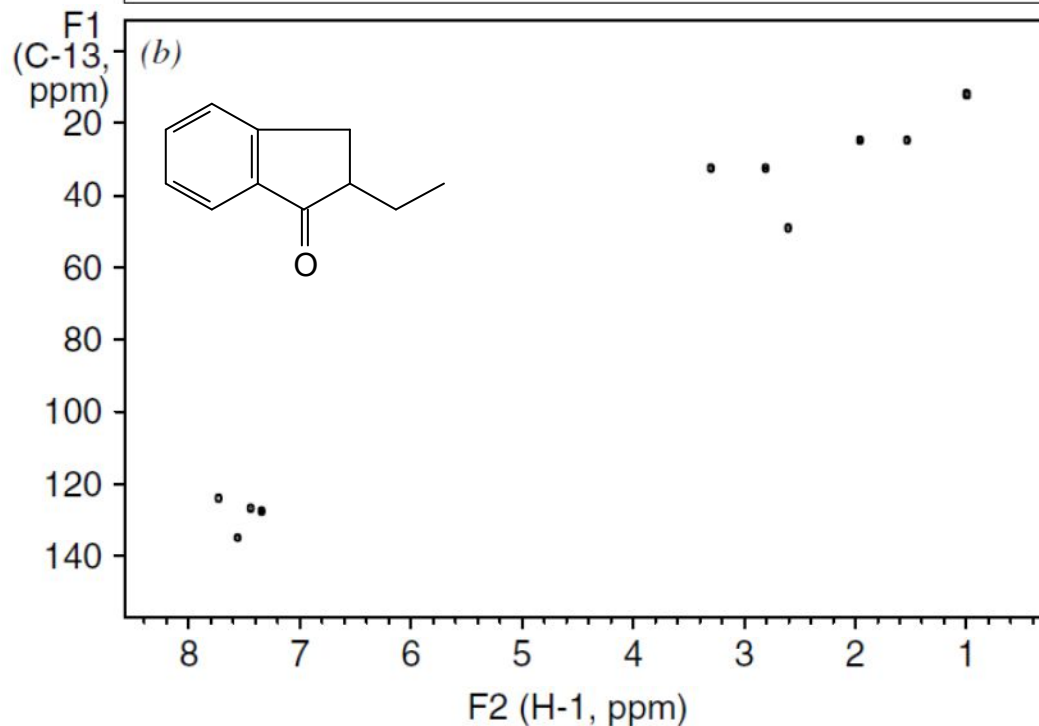
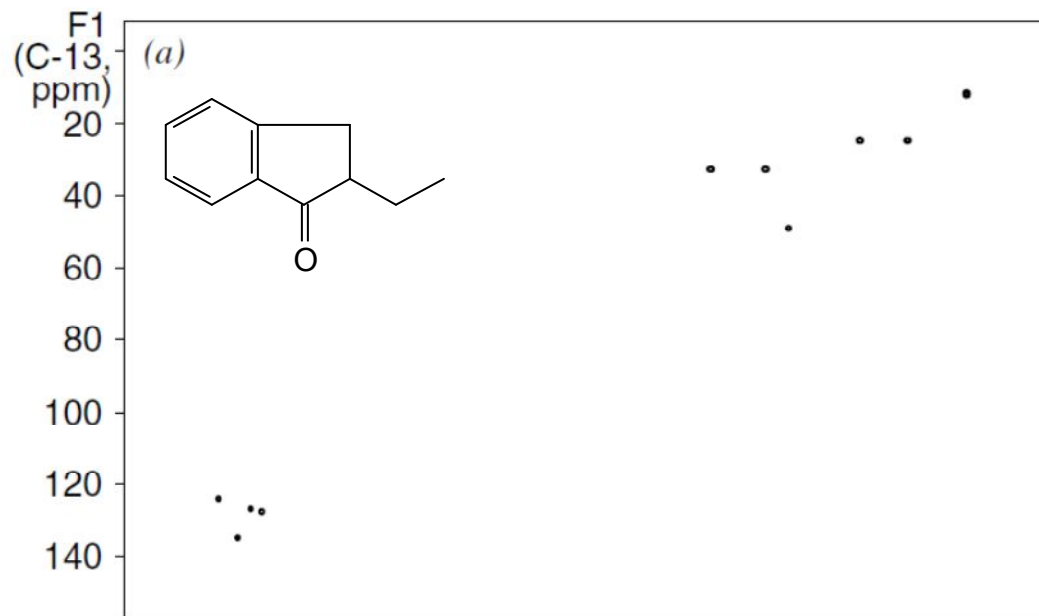


mérés idő 28 sec

aq = 40 ms
d1 = 40 ms
ns = 2, 64 complex points



;p39: f1 channel - 120 degree shaped pulse for excitation
; Pc9_4_120.1000 (120o) (3.0ms at 600.13 MHz)
; (or Q5.1000 (90o) (2.0ms at 600.13 MHz))
;p40: f1 channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
; Rsnob.1000 (1.0ms at 600.13 MHz)



SPEED: single-point evaluation of the evaluation of dimension

Eriks Kupce, Ray Freeman: MRC 45,711-713 (2007)

a) Hagymányos $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC
 $T_1 = 128$ (inkrementum), $ns=1$
 Mérés idő: ca. 10 perc

b) „SPEED” $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC
 $T_1 = 1!$ (inkrementum), $t_1^* = 80 \mu\text{s}$ $ns=1$
 Mérés idő: 5 sec.

Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance

David Schulze-Sünninghausen, Johanna Becker and Burkhard Luy*

Karlsruher Institut für Technologie
JACS 2014, **136**, 1242-5.

ABSTRACT: A novel NMR experiment, the so-called ASAP-HSQC, is introduced that allows the detection of heteronuclear one-bond correlations in less than 30 s on small molecules at natural abundance without compromises in sweep width, resolution or spectral quality. Equally, the experiment allows a significant increase in digital resolution or a moderate sensitivity enhancement in the same overall experiment time compared to a conventional HSQC. The gain is a consequence of keeping all unused proton magnetization along z during acquisition, so that the previously reported ASAP and ALSOFAST approaches can be transferred from HMQC to HSQC-type experiments. Next to basic and broadband pulse sequences, a characterization of the sequence with respect to minimum measurement time, sensitivity gain, and advantages in resolution compared to state-of-the-art experiments is given.

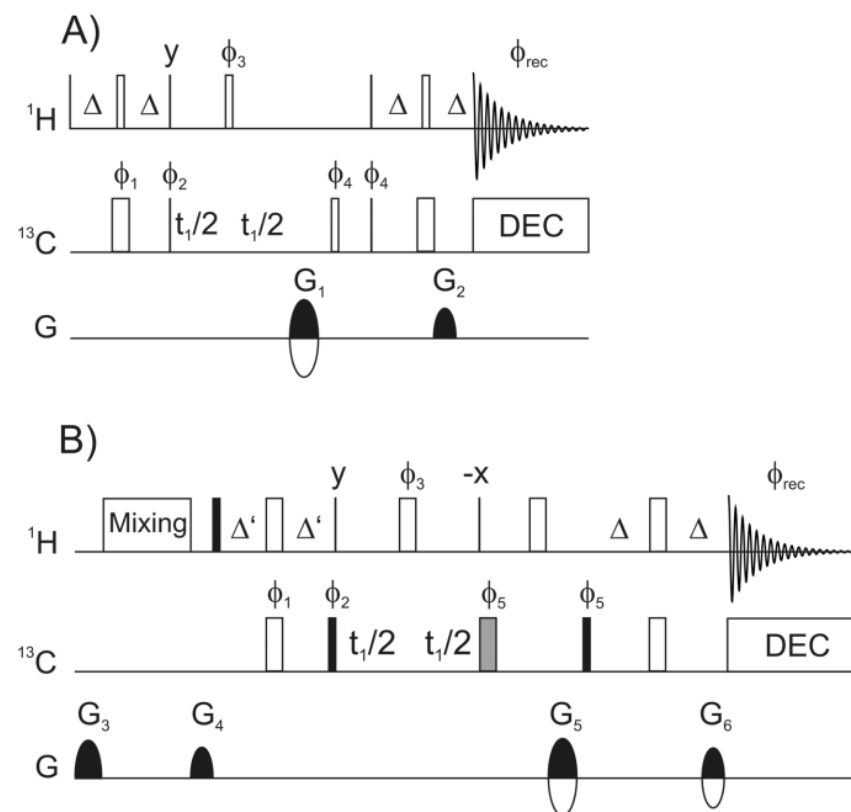


Figure 1. Pulse sequences for a conventional HSQC (A) and the ASAP-HSQC (B). Pulse phases are x unless indicated otherwise. Vertical lines represent 90° hard pulses, thin open boxes 180° hard pulses. In (A) wider open boxes indicate CHIRP inversion pulses¹¹ of $500 \mu\text{s}$ duration. In (B) the filled box on ^1H marks a BEBOP (10 kHz, 20 kHz, $550 \mu\text{s}$, $\pm 20\%$, 1100)¹² pulse using the nomenclature introduced in,¹³ the pairs of $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ open boxes during INEPT transfer steps represent $600 \mu\text{s}$ BUBI pulse sandwiches,¹⁴ where the proton pulse is also used as a BURBOP-180_x (10 kHz, 20 kHz, $600 \mu\text{s}$, $\pm 20\%$, 1200)^{13,15} refocusing pulse for the other open boxes. The gray shaded ^{13}C refocusing pulse after t_1 evolution is a BURBOP-180_y (37.5 kHz, 10 kHz, 1.1 ms, $\pm 5\%$, 2200). All proton shaped pulses are applied with an rf-amplitude of 20 kHz, while it is 10 kHz for carbon shapes. Although only a subset has been used for the experiments shown, full phase cycling is given by $\phi_1 = x$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_4 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_5 = 4(-x), 4(x)$; $\phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, -x, x, -x, x$. The delay $\Delta = 1/(2 J_{\text{CH}})$ is typically set to an average coupling

constant of 145 Hz, while Δ' is optimized individually for every sample. $\Delta' = 1.2$ ms and $\Delta' = 1.3$ ms, respectively, was used for menthol and maltose spectra shown in this article. Heteronuclear decoupling was achieved using GARP.¹⁶ Isotropic mixing in between scans in (B) was performed using the DIPSI-2 sequence.¹⁷ Purge gradients were set to $G_3 = 43\%$ and $G_4 = 33\%$ of the maximum gradient strength of 50.7 G/cm, while echo/antiecho and coherence order selection was achieved by switching gradients according to $G_1 = (80\%, -80\%)$, $G_2 = (20.1\%, 20.1\%)$ or $G_5 = (63.9\%, 80\%)$, $G_6 = (80\%, 59.9\%)$ every other increment. TPPI-like incrementation¹⁸ with the echo/antiecho recording scheme was achieved by simultaneous inversion of phases ϕ_1 and ϕ_2 .

ASAP-HSQC: Rapid Heteronuclear Single Quantum Correlation NMR Spectra at Natural Abundance (Acceleration by Sharing Adjacent Polarization)

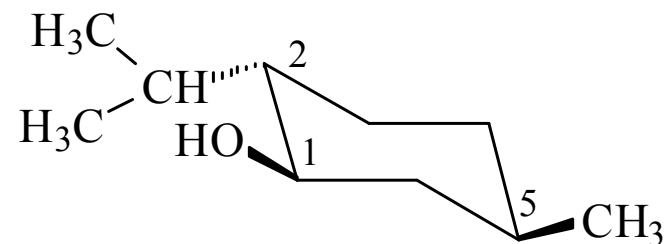
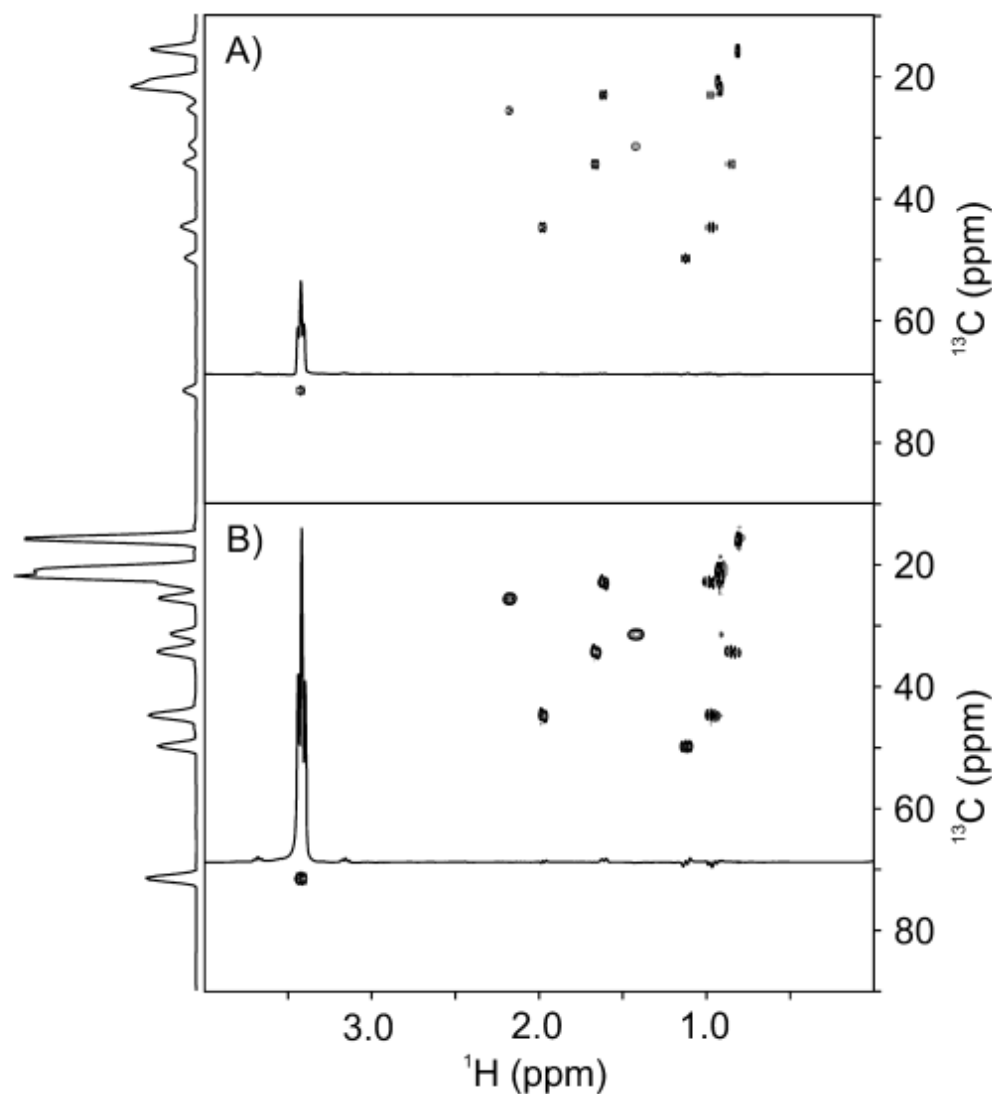
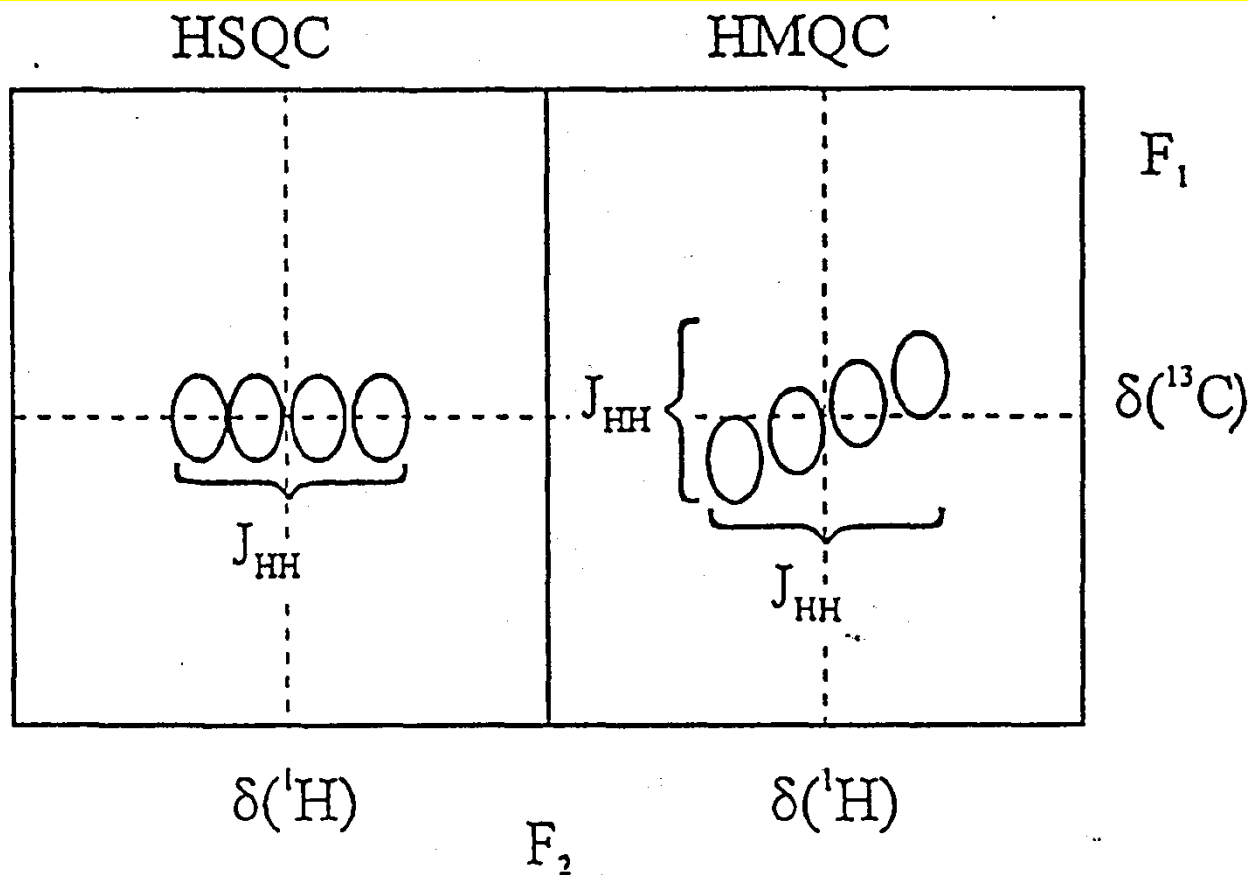


Figure 3. Comparison of a conventional HSQC and an ASAP-HSQC of menthol in CDCl_3 with equivalent overall measurement time. Both spectra were recorded with 1024×128 complex data points, corresponding to acquisition times of 213.5 and 5.3 ms for the two dimensions. For the conventional HSQC, 2 scans per t_1 increment and four dummy scans with a recovery delay of 2 s close to the average T_1 times were applied, which results in a measurement time of 9 min and 34 s (A). The ASAP HSQC was acquired using 14 scans per t_1 increment and 16 dummy scans in 9 min and 17 s (B). While spectral quality is identical, a relative increase in intensity of 3–4 is observed for the ASAP-HSQC with an simultaneous increase in noise of only $\sqrt{7}$.

Heteronuclear Single Quantum Correlation Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
keresztcsúcs szerkezete

Itt a lineáris predikcióval jelentősen javítható a jel/zaj viszony



A HMQC (HMBC) keresztcsúcsok az $^1\text{H}, ^1\text{H}$ csatolások folytán kiszélesedve jelennek meg az F_1 (^{13}C) dimenzióban, ahogy azt a bemutatott kvartett jelen láthatjuk. Mindez lecsökkenti a felbontást és az érzékenységet ebben a dimenzióban

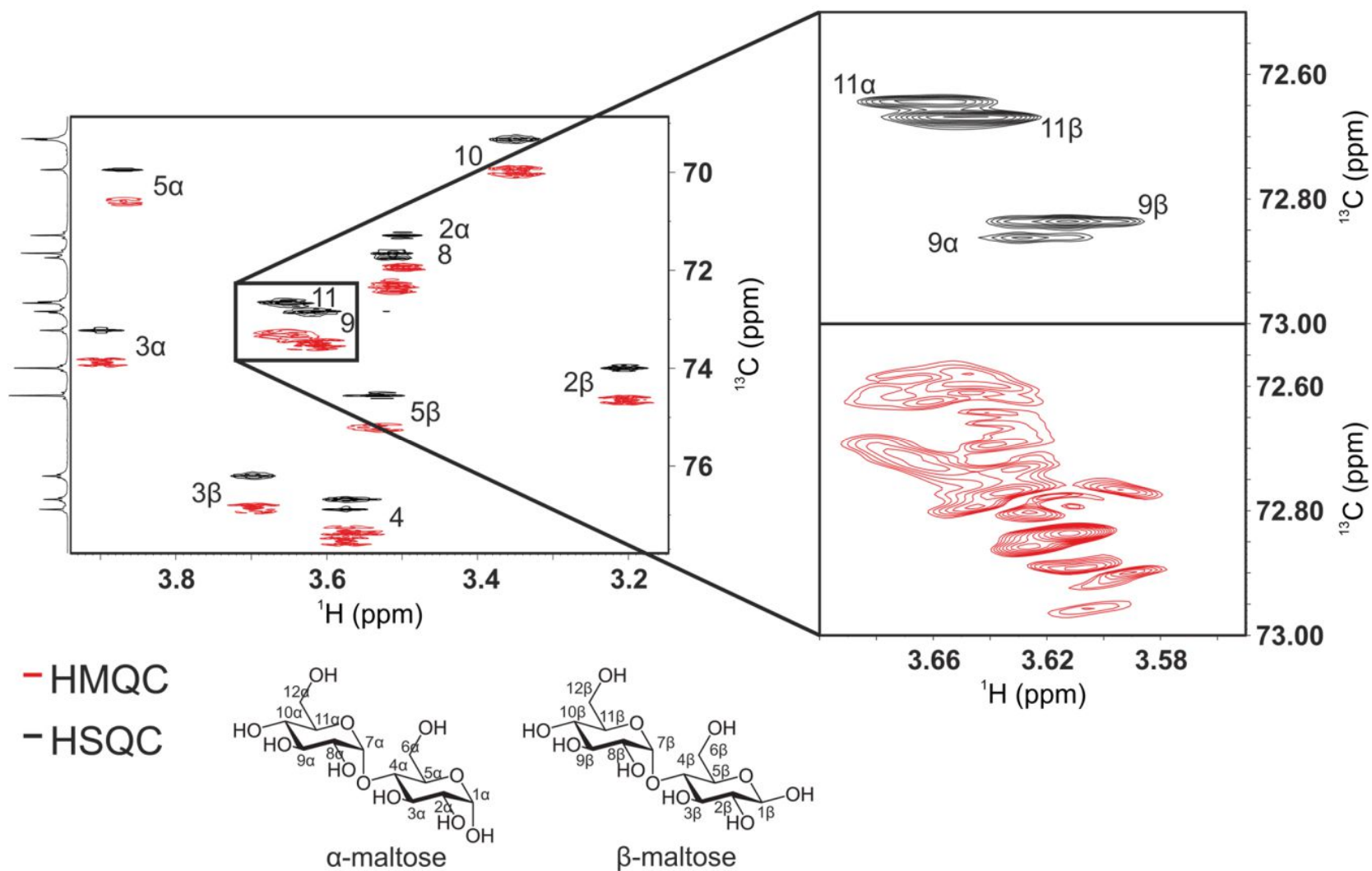
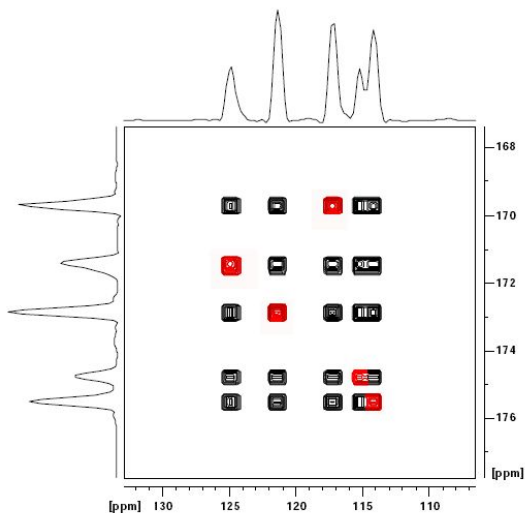


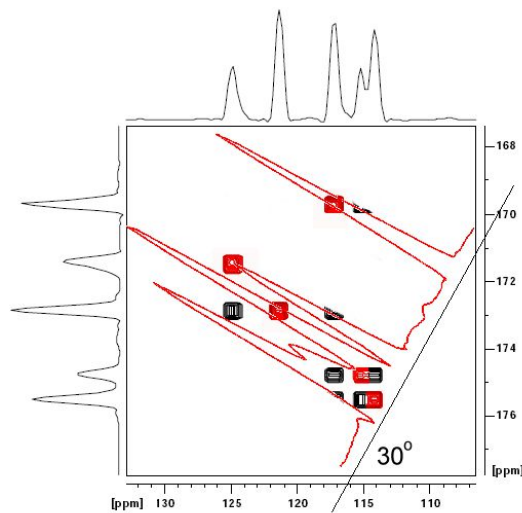
Figure 4. Comparison of ASAP-HSQC and ASAP-HMQC spectra acquired on maltose in D_2O . Both spectra were recorded with a large number of t_1 increments, i.e. $512 (^1H) \times 16384 (^{13}C)$ complex data points and acquisition times of 142.3 and 905.4 ms. This corresponds to a digital resolution of 0.55 Hz in the carbon dimension after zero filling to 32768 points. One scan per t_1 increment and 16 dummy scans were acquired in 3 h, 6 min, and 37 s for the ASAP-HSQC, and in 3 h, 7 min, and 10 s for the ASAP-HMQC. Clearly the advantage in resolution can be seen, which even allows the distinction of $9\alpha/\beta$ and $11\alpha/\beta$ of maltose, which are each approximately 3 Hz apart.

Gyors nD mérési technikák

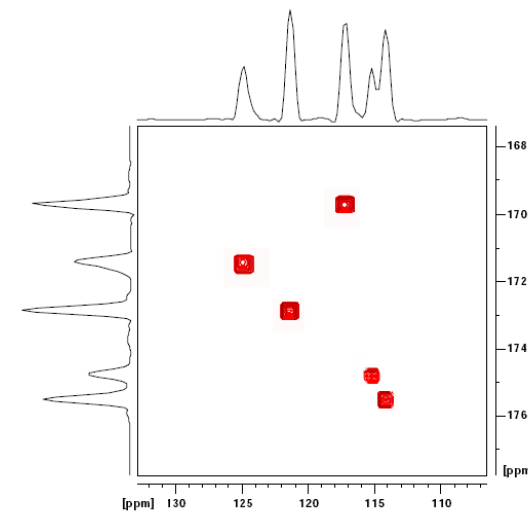
Csökkentett dimenziójú mérések – Kupce, Freeman, Wüthrich
Projekció rekonstrukció, APSY **A**utomated **p**rojection **s**pectroscopy



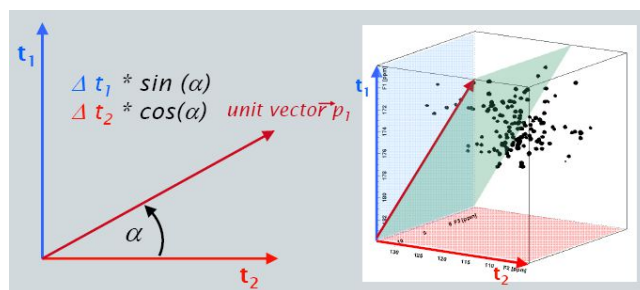
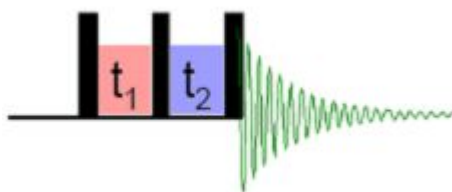
0°, 90°



0°, 90°, 30°



0°, 90°, 30°, -30°, 60°, -60°



3D HNCO

- t1 2D H,C sík (alfa=90 fok)
- t2 2D H,N sík (alfa=0 fok)
- t1 és t2: 2D H,NC sík (alfa=n fok)

APSY

APSY as rapid acquisition method

Conventional

48 and 128 increments
for dimensions t_1 and t_2
32 increments for t_3
16 for t_4 , t_5 and t_6

APSY

96 increments for
all projection angles

Time saving

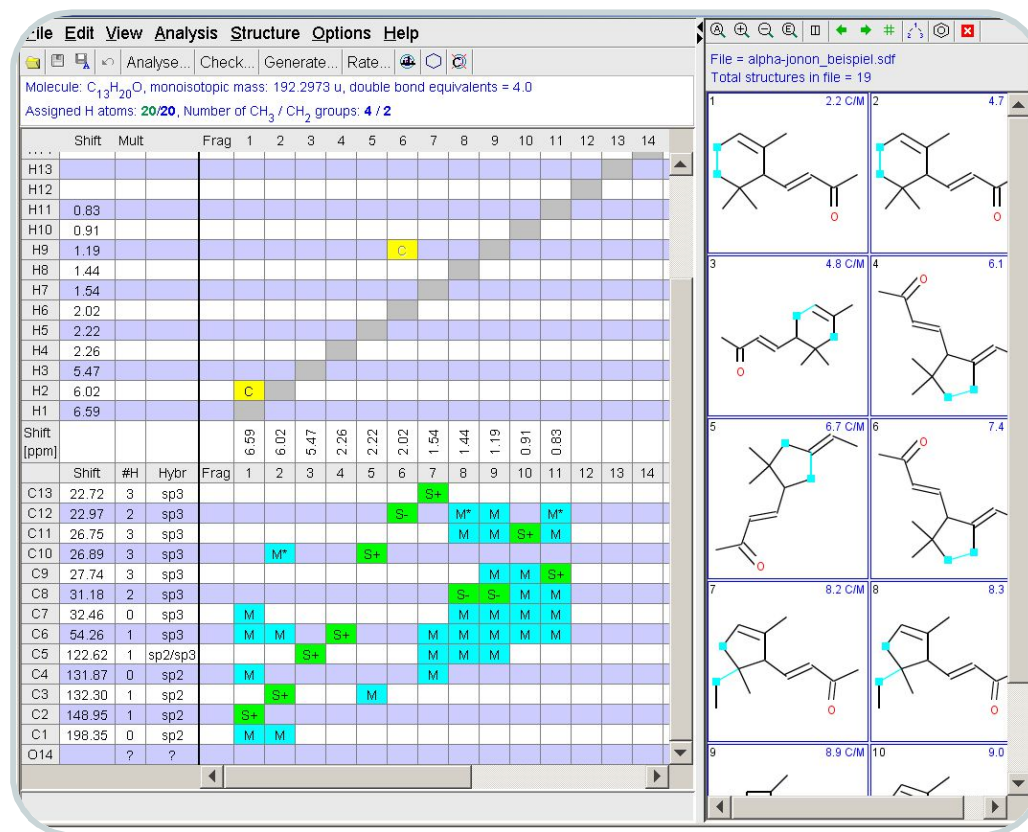
Dimensionality	exp. time [h]	#projections	exp. time [h]	factor conventional : APSY
3D	2	20	0.5	4
4D	54	40	1.0	54
5D	864	60	1.5	576
6D	13824	80	2.0	6912
7D	221184	100	2.5	88474

D1 + AQ = 1sec, number of scans = 1, sensitivity of different experiments not considered

Automatizált Bruker Szerkezetfelderítő szoftver

Automation Assisted Structure Elucidation **CMC-se™**

- Felgyorsítja a spektroszkópus munkáját
- Automatizálja a legtöbb szükséges proceszálási és interpretációs lépést
- Az NMR akvizíció és a szofisztikált szoftver analízis zökkenőmentes integrálása
- Kis molekulák egyszerű és gyors szerkezetfelderítése



High Res. MS, Elemental Analysis

(MW and DBE)



^1H NMR

(integrals, ^1H info: some functional groups)



^{13}C NMR, DEPTQ

(^{13}C info: some functional groups and features)



(DQF)COSY + (ed)HSQC

(fragments, ^{13}C multiplicity)



HMBC + TOCSY (+ HSQC-TOCSY)

(connecting the dots, ^{13}C info)



ROESY / NOESY

(stereochemistry)

The background of the slide features a blurred NMR spectrum with several peaks of varying heights and widths, set against a blue gradient. The text is centered over a lighter blue horizontal band.

NMR mérések optimalizálása a hatékony szerkezetfelderítéshez

Áttekintés

- **Adiabatikus pulzusok**
- „Rapid scanning artifact” -ok elnyomása
- Paraméterek optimalizációja a heteronukleáris lecsatoláshoz
- Mérések:
 - ^{13}C 1D mérések (DEPT, DEPT-Q, UDEFT)
 - homonukleáris 2D (COSY, ROESY, NOESY, TOCSY)
 - heteronukleáris 2D (HSQC, HMBC, H2BC)
- Optimalizált mérések automatizálásának előkészítése
- Optimalizált SW-vel történő composite mérések előkészítése
- Quantitatív NMR
 - ERETIC, PULCON, ARTSI, SICCO stb.

Adiabatikus pulzusok

Mit jelent, hogy adiabatikus pulzus?

= változó frekvenciájú (sweep) pulzus
(a konstans frekvenciájú pulzus helyett)

Mi az előnye?

= nagyobb gerjesztési sávszélesség= nagyobb S/N
= kevésbé érzékeny a pontatlan beállításra

Hol alkalmazható?

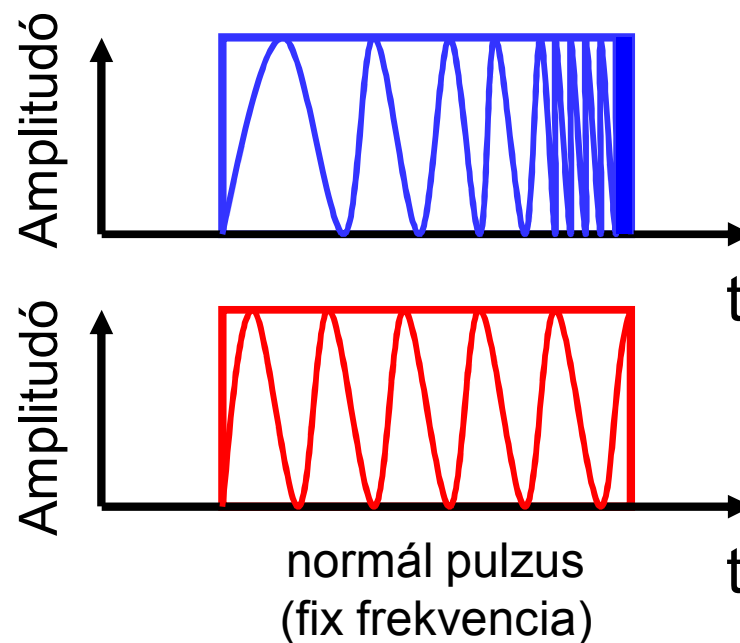
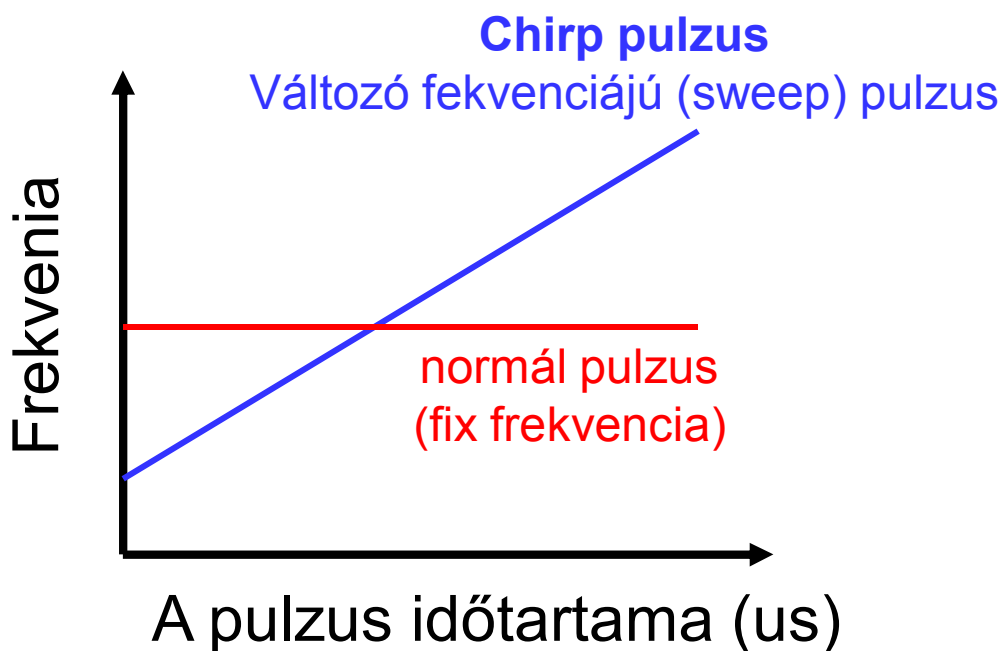
= 180° ^{13}C pulzusként a HSQC típusú mérésekhez
= lecsatoló pulzusként az adiabatikus lecsatoláshoz

Hogyan kell beépíteni ezeket?

= a TopSpin és XWinNMR már használja
= pre-definiált paraméter szettek

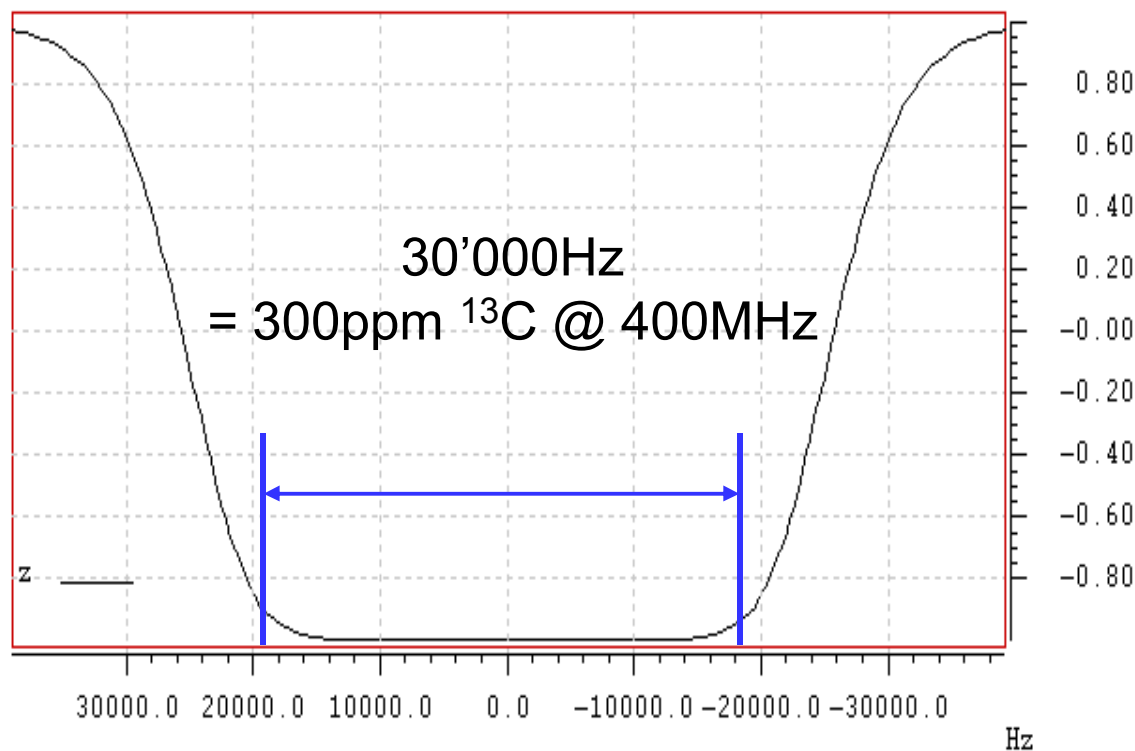
Mi is az adiabatikus pulzus?

= változó frekvenciájú (sweep) pulzus
(a konstans frekvenciájú (sweep) pulzus helyett)



Mi az előnye az adiabatikus pulzusoknak?

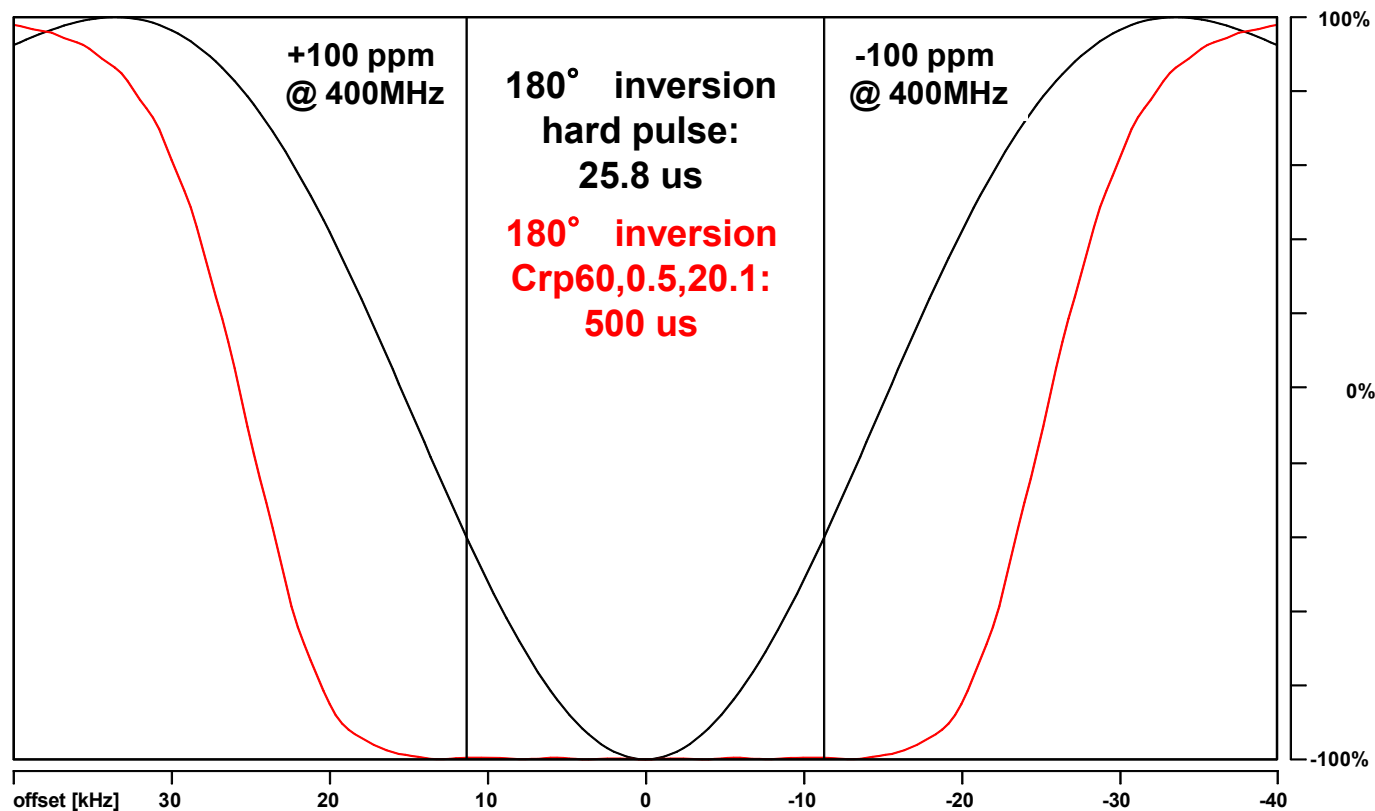
- = nagyobb gerjesztési sáv szélesség
- = jobb jel/zaj a centrumtól távol is (offset)



Simulation of a
500us adiabatic
inversion pulse:
Crp60,0.5,20.1
(stdisp)

Mi az előnye az adiabatikus pulzusoknak?

Az adiabatikus „smoothed chirp”
és normal 180° „hard” pulzus összevetése



Hol és hogyan alkalmazzuk az adiabatikus pulzusokat?

- Egyszerű adiabatikus pulzusokat csak **INVERZIÓ** esetén!
- **REFOKUSZÁLÁSRA**: composite adiabatikus pulzusokat
- 300 - 600 MHz:
 - 500ms Crp60,0.5,20.1 for inversion
 - 2000ms Crp60comp.4 for refocussing
- 700 - 950 MHz:
 - 500ms Crp80,0.5,20.1 for inversion
 - 2000ms Crp80comp.4 for refocussing

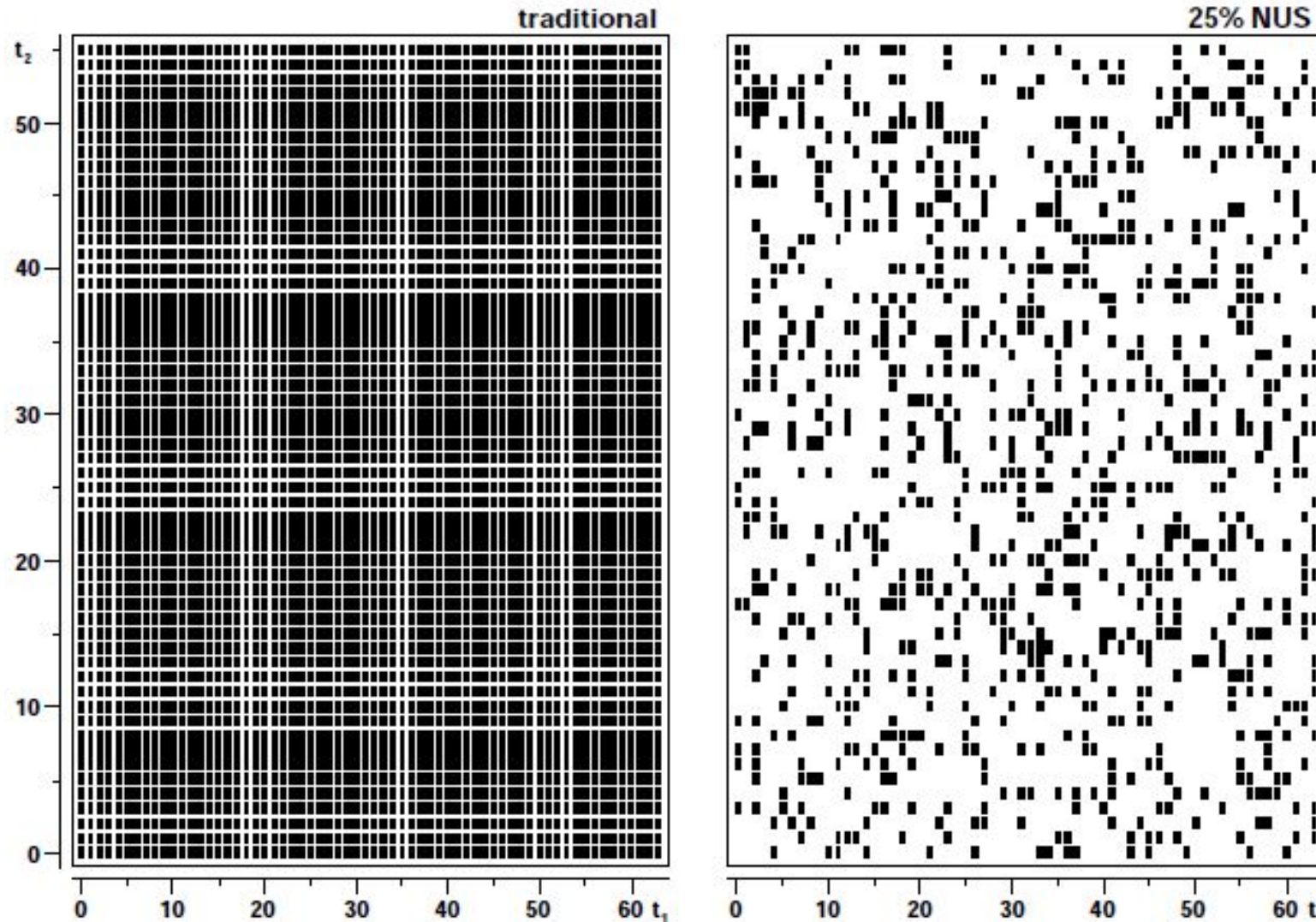
- Miért előnyös fentieknél az adiabatikus pulzus:
 - Szignifikánsan nagyobb a sáv szélesség
 - Nem érzékeny a power level pontatlan beállítására (mis-setting)
 - Nem érzékeny az esetleges B_1 inhomogenitásra
- Lehet az adiabatikus pulzust kalibrálni? **NEM**, nem közvetlenül.
 - Ha a berendezés „cortab”-val felszerelt: calculate level.
 - Ha nem:
 - power level of Crp60's = 25.5ms rectangular 90°
 - power level of Crp80's = 22.2ms rectangular 90°
- „prosol” használata / automation compatibility?
- Adiabatikus pulzusokat a HSQC és a DEPT típusu méréseknél használunk
 - inverzióra és/vagy refokuszálásra
 - pulzusprogramok: ...sp... ill. ...sp... **.2**

Non Uniform Sampling (NUS, 2010 Bruker, TopSpin 3.0)

Multidimenziós spektrumok mérési idejének drasztikus lerövidítése

3D ($t_1 t_2$ plane)

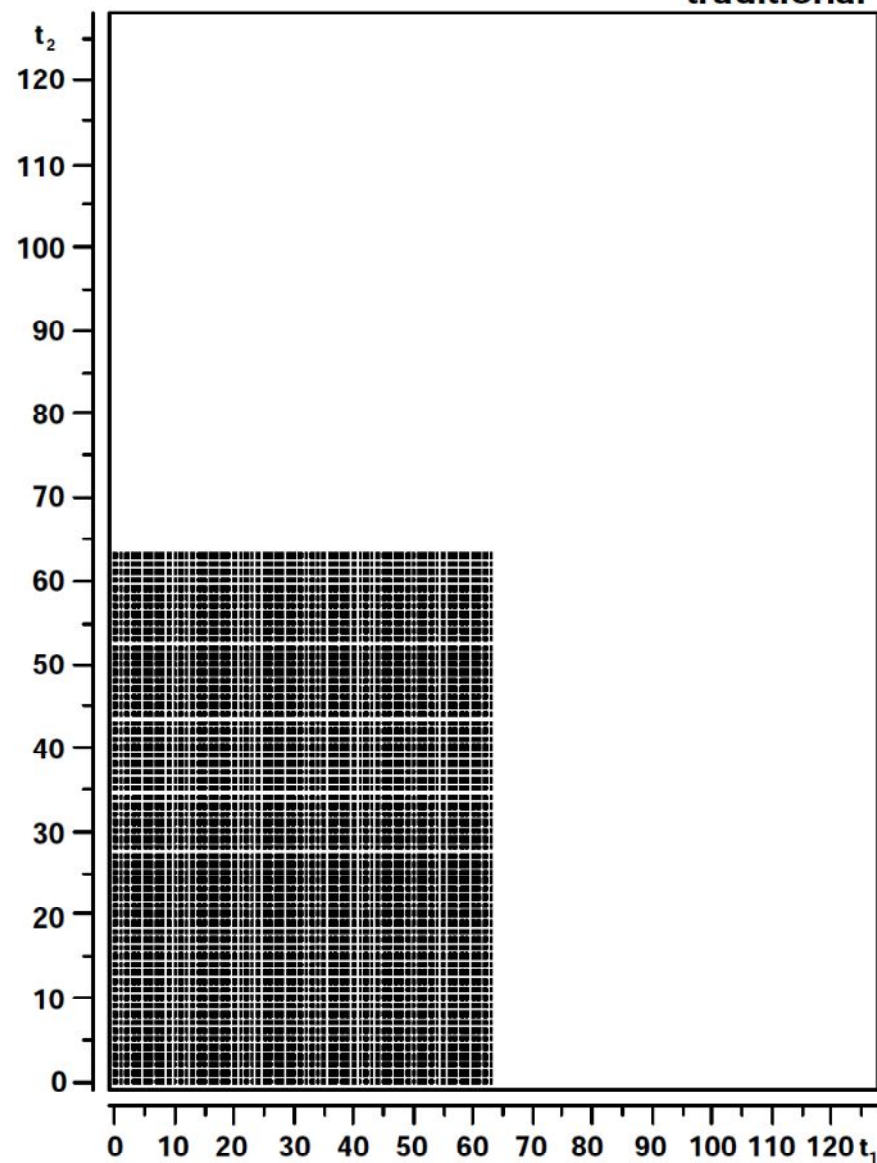
complex points



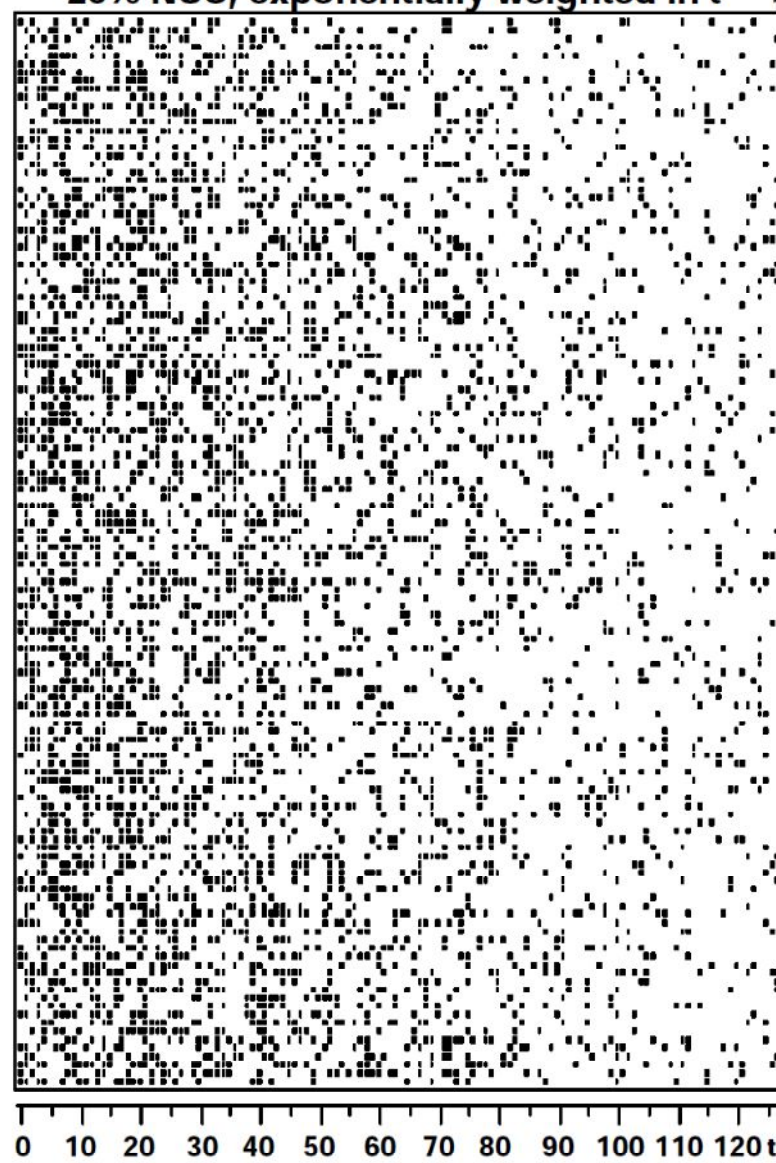
3D (t_1, t_2 plane)

4096 complex points

traditional



25% NUS, exponentially weighted in t

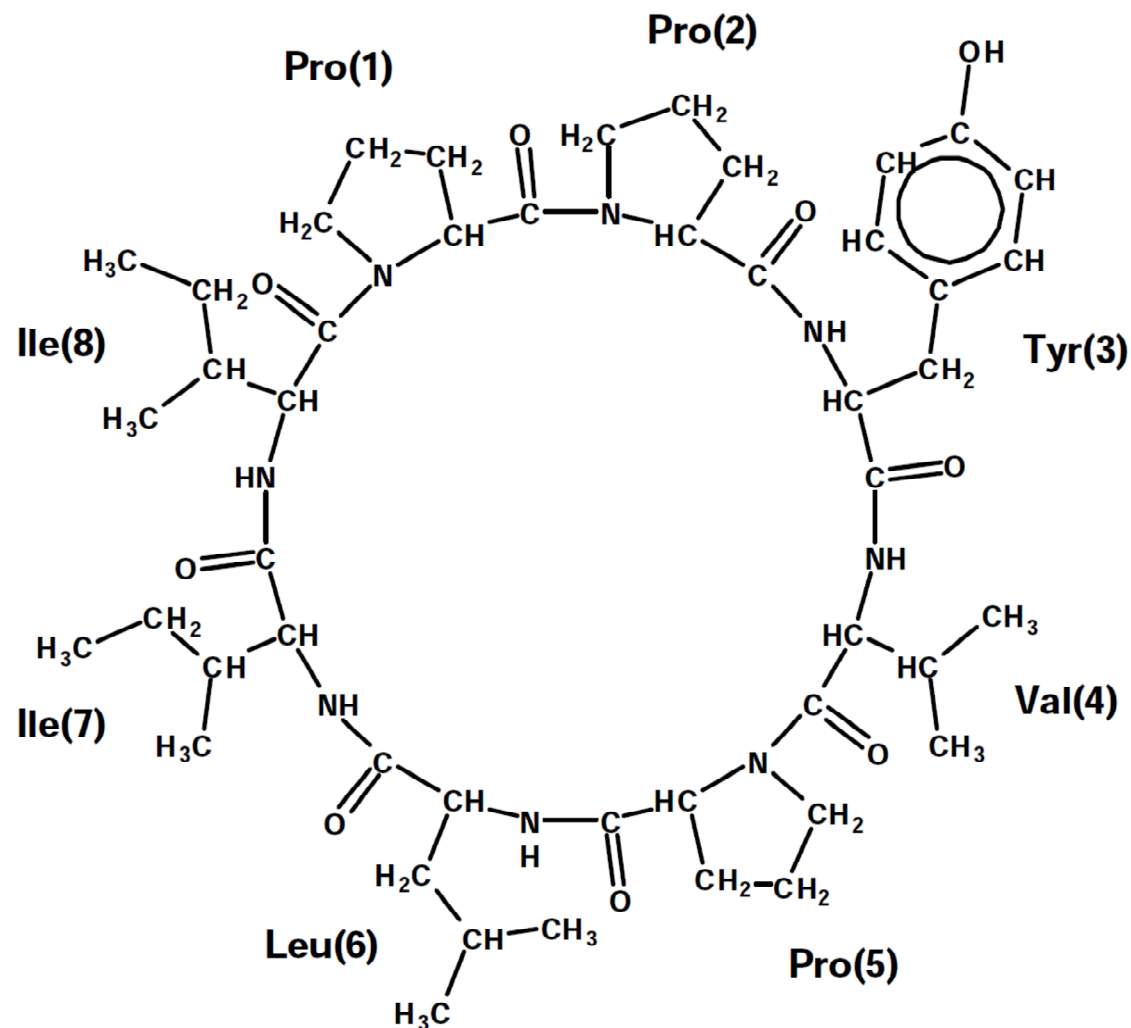


NUS

Hymenistatin

number of cross peaks
(estimated maximum):

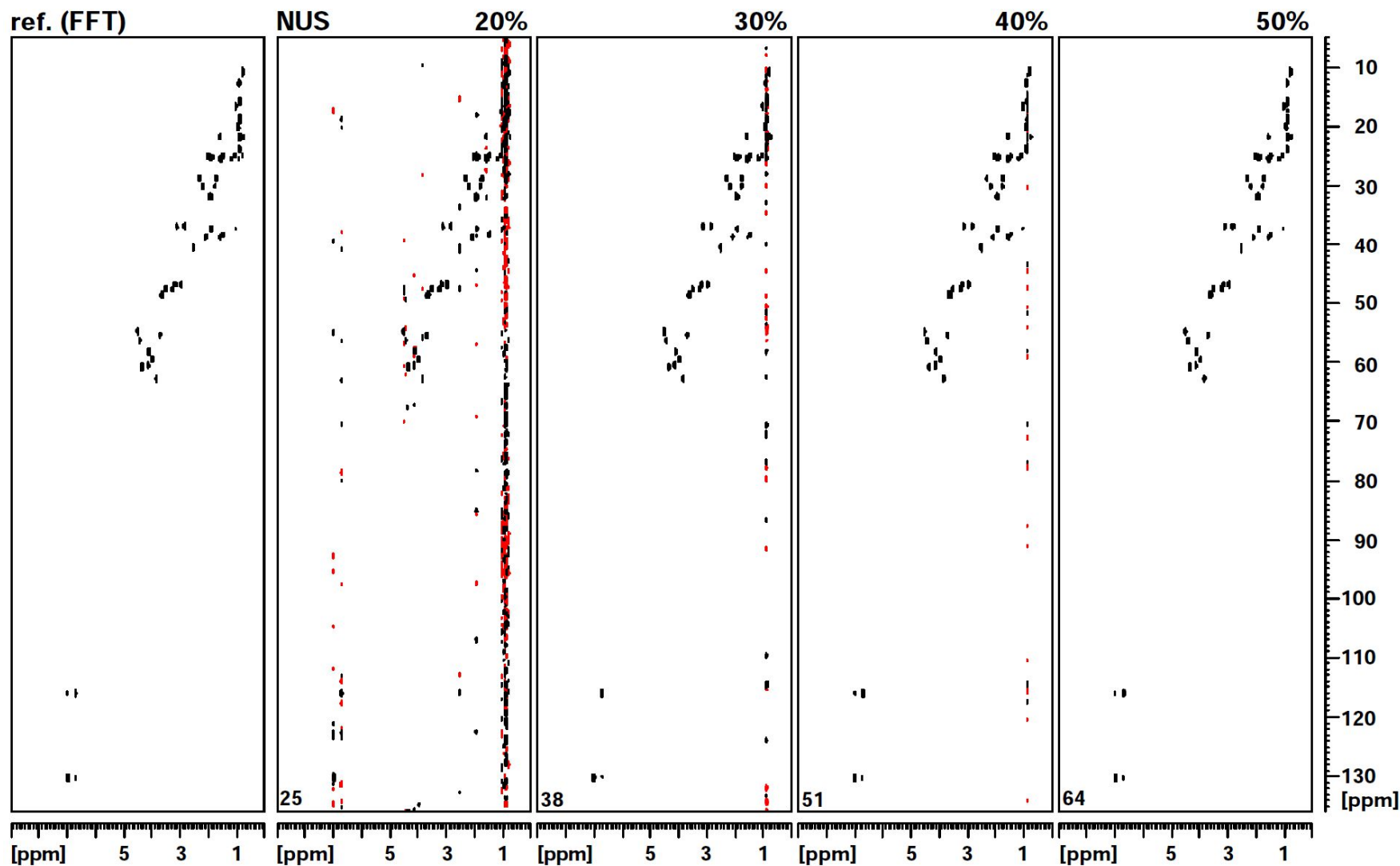
HSQC (^{13}C)	48
HMBC (^{13}C)	199
COSY	187
TOCSY	339



R.K. Konat, D.F. Mierke, H.Kessler, B. Kutscher, M. Bernd
& R. Voegeli, *Helv. Chim. Acta* **76**, 1649 (1993)

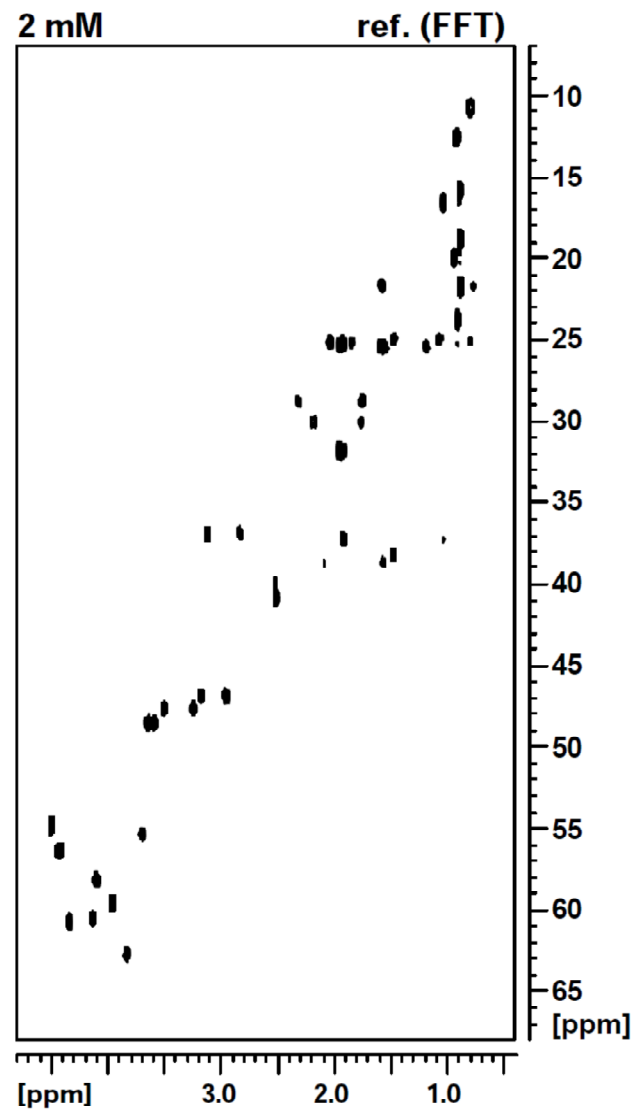
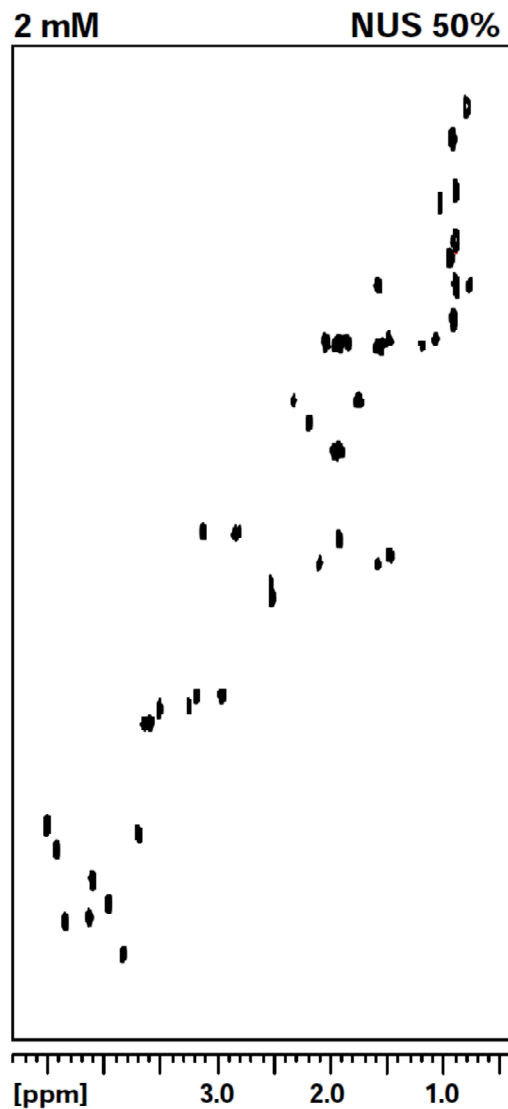
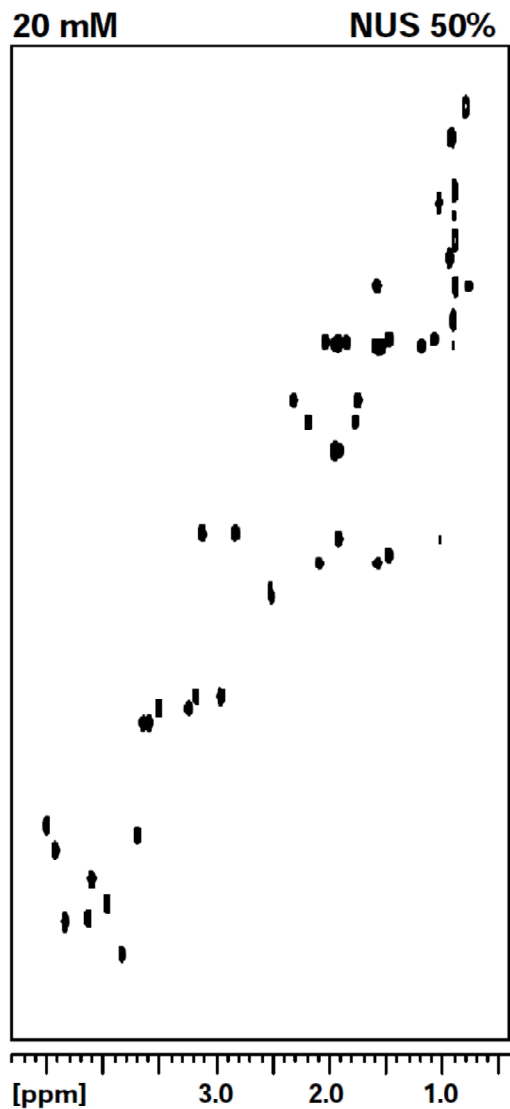
20mM (8.94mg) Hymenistatin (komplexpontok száma)

HSQC: td = 256



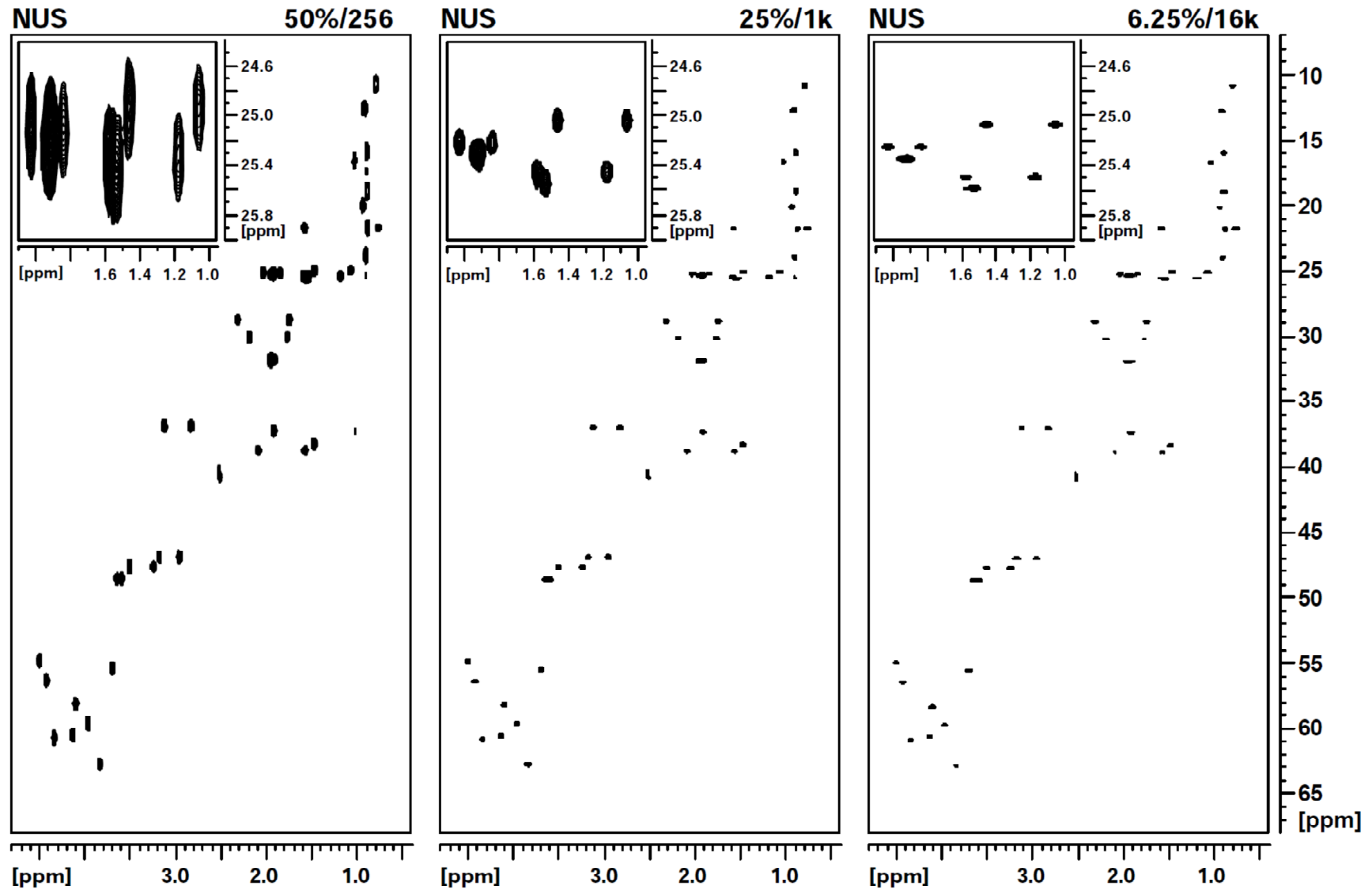
HSQC: td = 256

2mM = 0.894mg



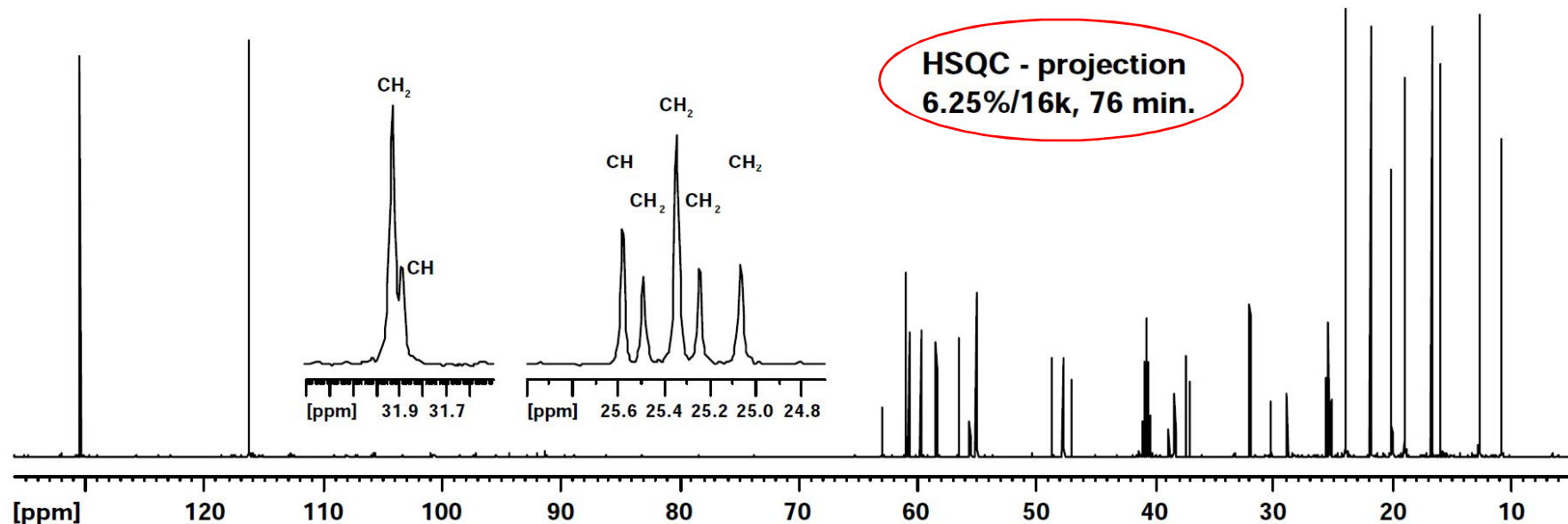
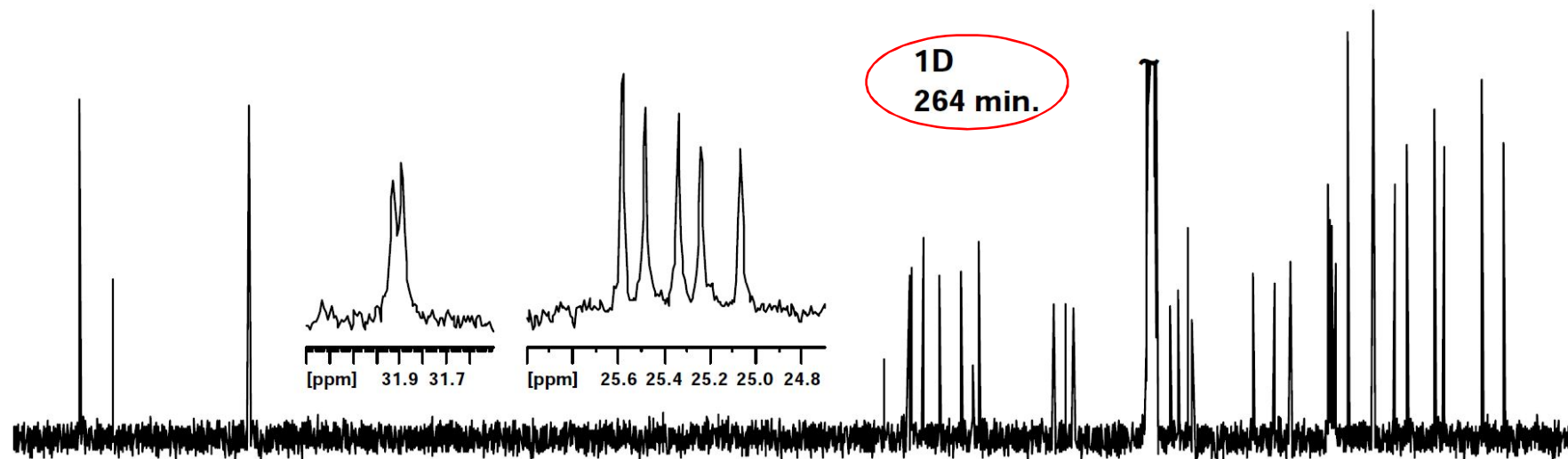
HSQC

A ^{13}C felbontás/mérésidő optimalizálása



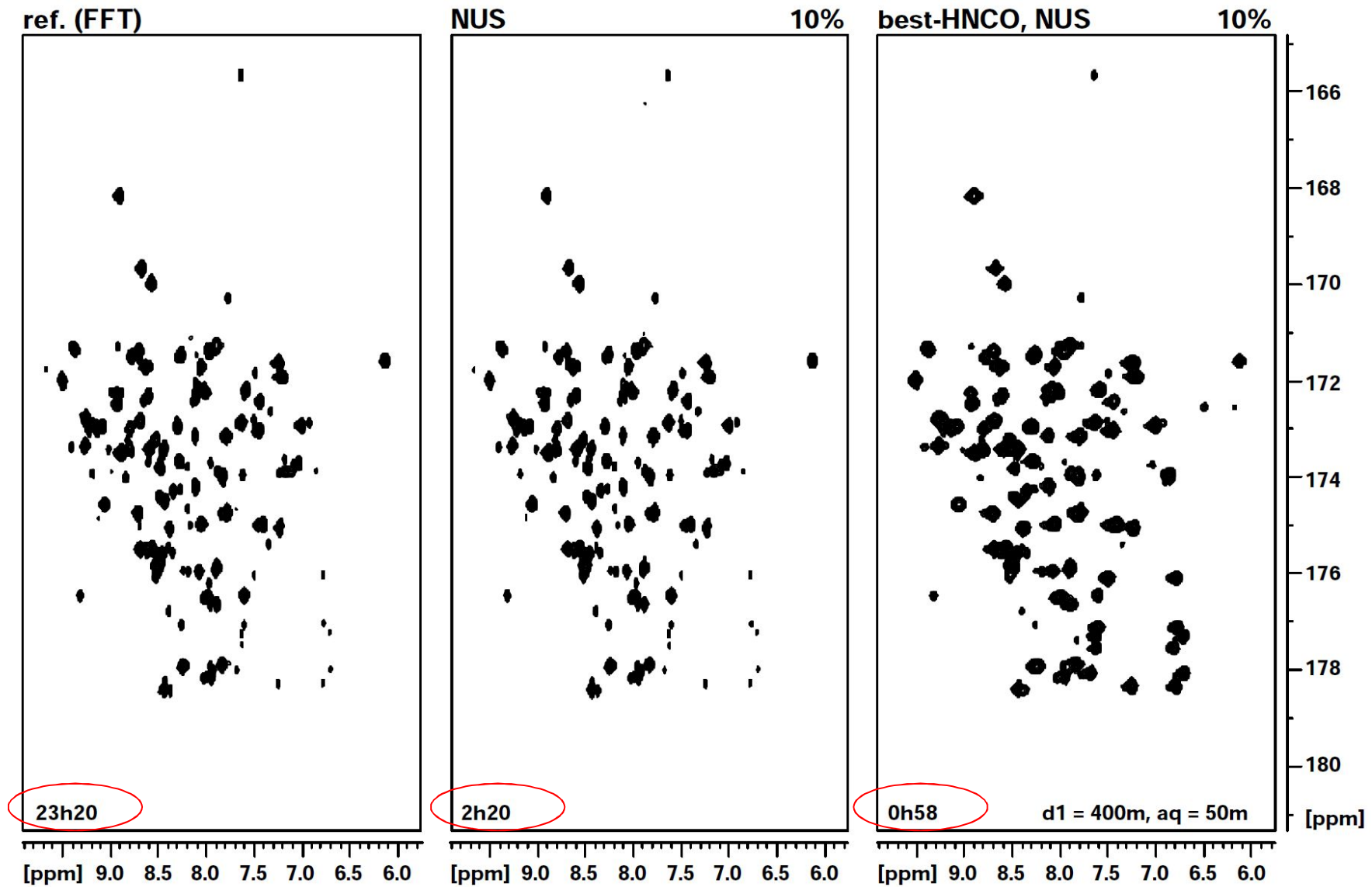
HSQC

20mM (8.94mg) Hymenistatin



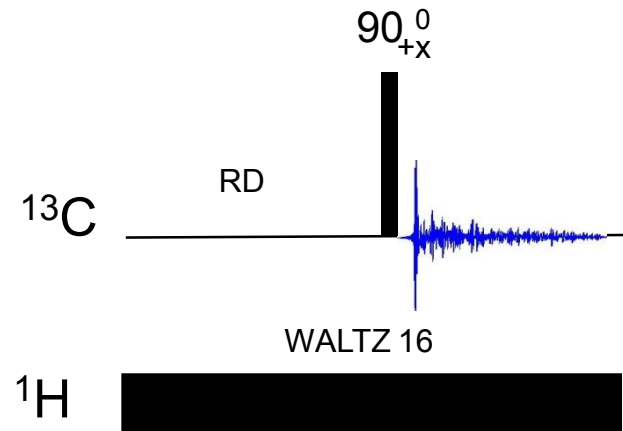
Ubiquitin 3D spektrumának $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ projekciója

HNCO: F1F3 projection



A klasszikus ^{13}C mérés

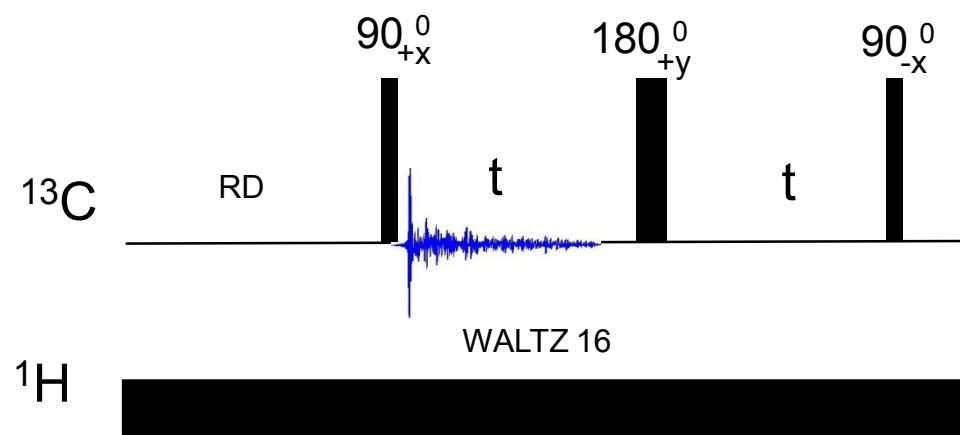
Hosszú akvizíciós idő



- A legtöbb idő arra kell, hogy beálljon (T_1) relaxációs egyensúly
- Általában a 90° pulzust 30° pulzussal helyettesítjük, hogy növelhessük a pulzus ismétlés sebességét (zgpg30)

DEFT: Driven Equilibrium Fourier Transform

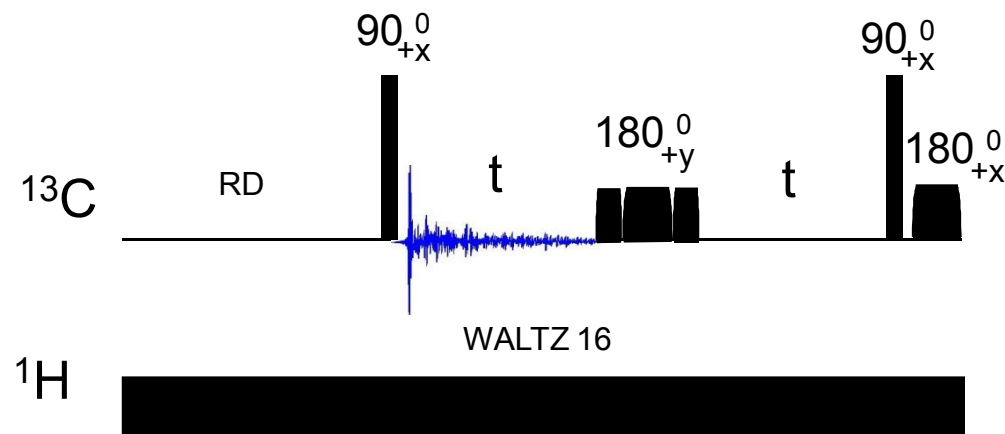
(sajnos a maga idejében nem vált be)



- Különösen alkalmas **kis, jelzetlen molekulákra** (T_2 közeli T_1 -hez)
- Nagyon érzékeny az offset effektusra, B1 inhomogenitásra, pulzus kalibrációra
- Akvizíció után a mágnesezettséget visszabillentjük a z tengely irányába

Becker E. D., Ferretti J. A., Farrar T. C. J. Am. Chem. Soc., 1969,
91, 7784-7785

UDEFT: Uniform DEFT



- A 180° refokuszáló pulzust adiabatikus pulzusra cseréljük
 - Cseréljük a 90° pulzust egy „mimicked mixed composite” pulzusra
- ⇒ Kompenzáljuk így az offset effektust, B1 inhomogenitást és a pulzus kalibrálás hibáját

M. Piotto, M. Bourdonneau, K. Elbayed, J.-M. Wieruszkeski, G. Lippens,
Magn. Reson. Chem., 2006, 44, 943

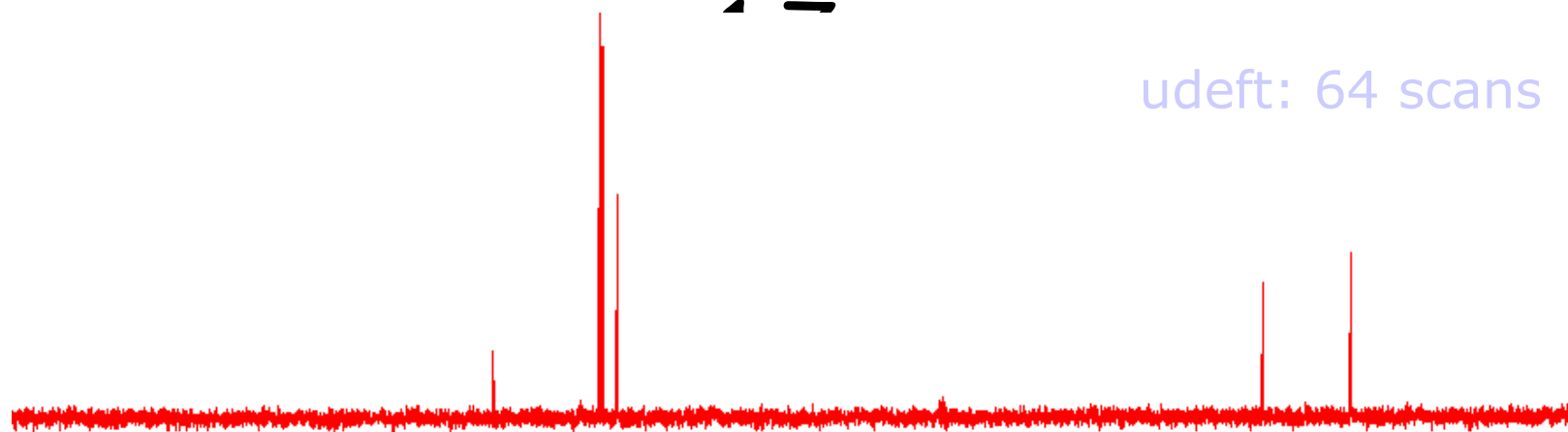
UDEFT a gyakorlatban

- Minden szerves molekulára használható, akkor is ha $T_2 < T_1$ (nincs nyereség, de veszteség sem)
- Jelentős S/N növekedés hosszú relaxációs idejű ^{13}C atomok esetén (quaternary carbons)
- CH_3 , CH_2 és CH szénatomok esetén azonos S/N növekedés
- (Relaxation delay + acquisition time) ca. 4 sec. körüli minden molekulára
- Acquisition Time ca. 360 ms - röviden kell tartani, hogy a T_2 relaxáció ne okozzon gondot
- LB = 2 és lineáris predikció:
 - ME_mod: LPfc
 - NCOEF=4096
 - LPBIN= 128k (vagy 256k)

10% ethyl benzene @ 400MHz

1 -

udeft: 64 scans



zgpg: 64 scans



200

150

100

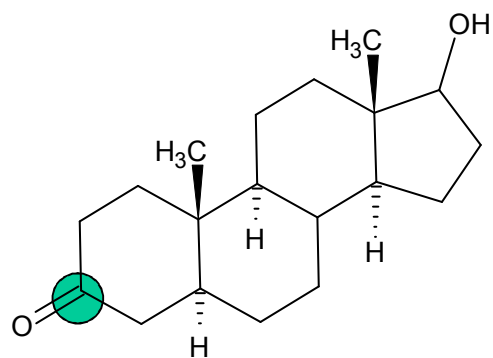
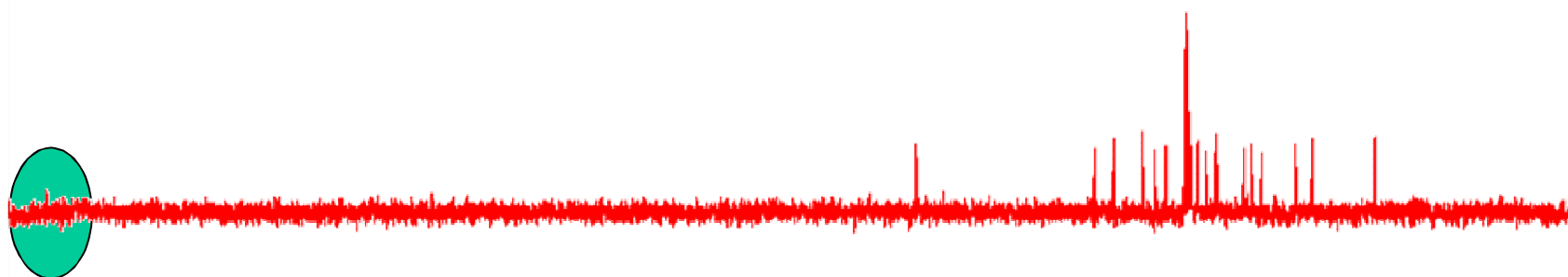
50

0

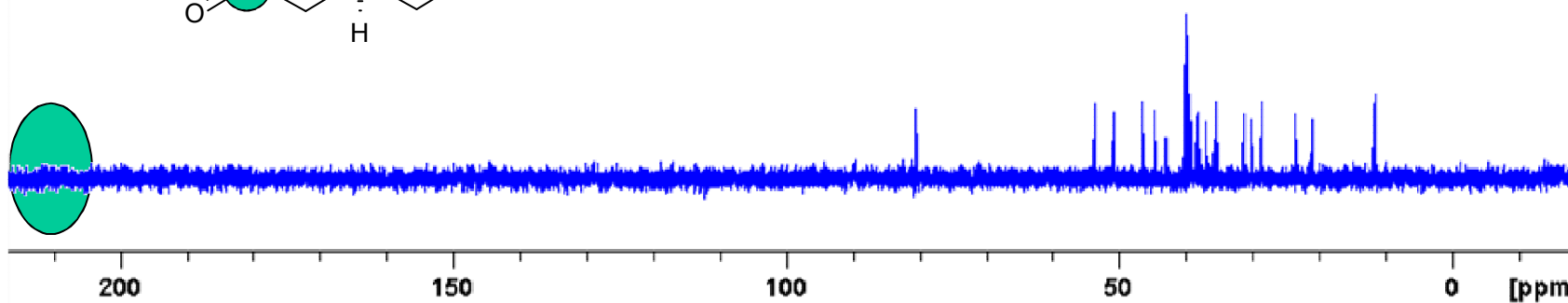
[ppm]

Real life: close to limit of detection

udeft: 1k scans



zgpg: 1k scans



Az NMR mérés technika hatékonyságának nagymértékű magnövekedéséhez vezetett:

Optimalizált 1D, 2D és 3D inverz (^1H) detektálású mérések, gradiens pulzusok, adiabatikus pulzusok felhasználása

Extrém nagy térerejű, ultra-stabilizált és aktív árnyékolású mágnesek bevezetése

Cryoprobe, ún. „hideg” mérőfejek alkalmazása az érzékenységet ca. négyszeresére növeli

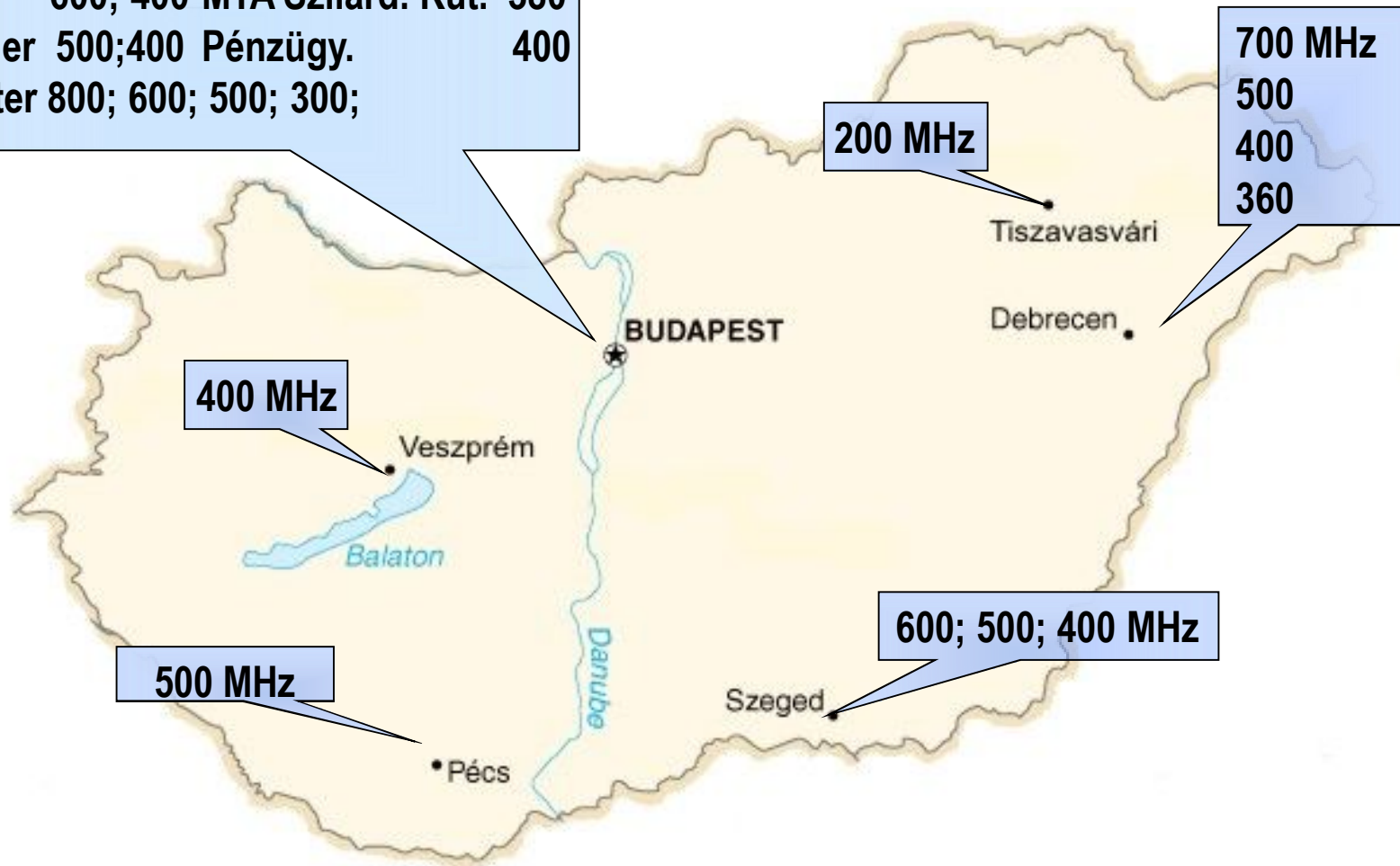
Átfolyó mérőfejek kifejlesztése, mintavétel és a mérések automatizálása

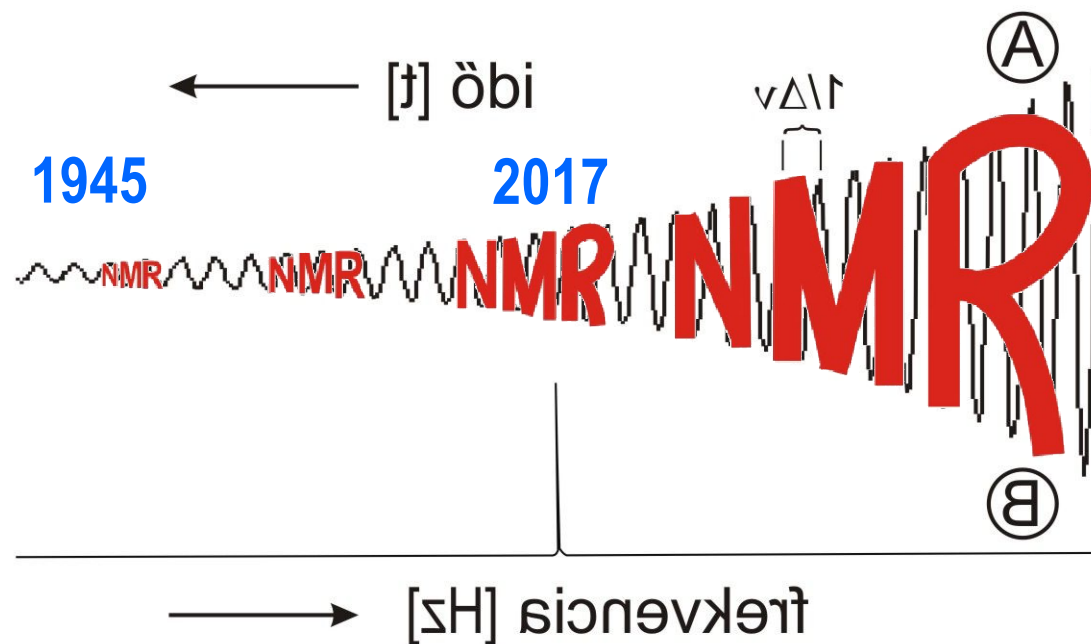
HPLC-NMR, HPLC-MS-NMR és HPLC-MS-DAD-NMR integrált analitikai rendszerek kialakítása mikromennyiségű minták mérésére

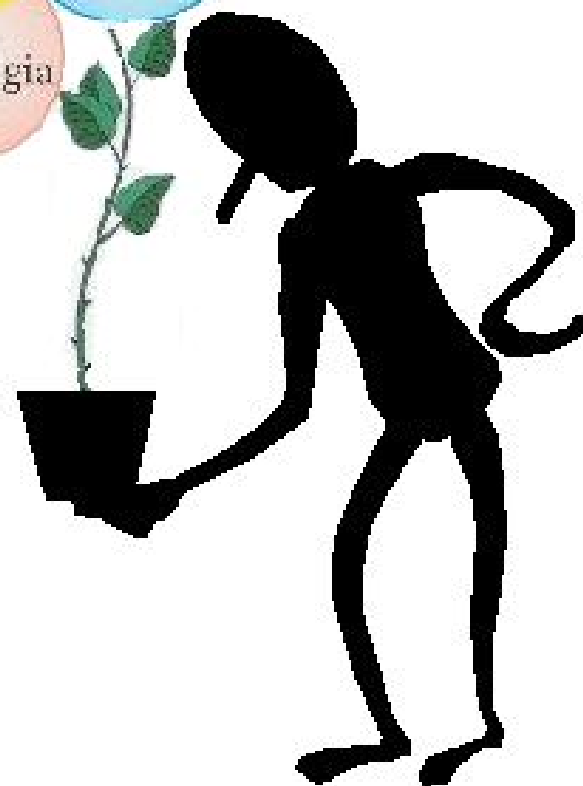
Új szoftverek „Ultrafast n-Dimensional NMR spectroscopy”: Frydman-Experiment, Hadamard spektroszkópia, G-mátrix FT NMR (Szyperski), NUS,

Hazai NMR körkép

BME	500; 300	SONEAS	500
ELTE	700; 500; 250	OBI	400
SOTE	600; 400	ViChem Chemie	300
KKKI	600; 500	Sanofi	500
EGIS	600; 400	MTA Szilárd. Kut.	380
Servier	500; 400	Pénzügy.	400
Richter	800; 600; 500; 300;		







*Köszönöm a megtisztelő
figyelmüket!*

