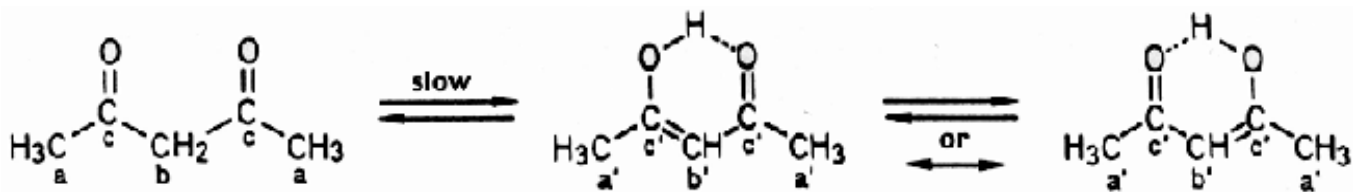
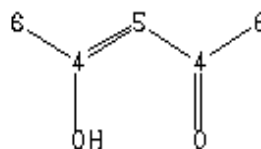
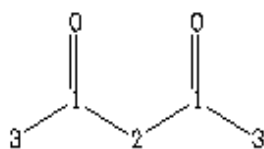
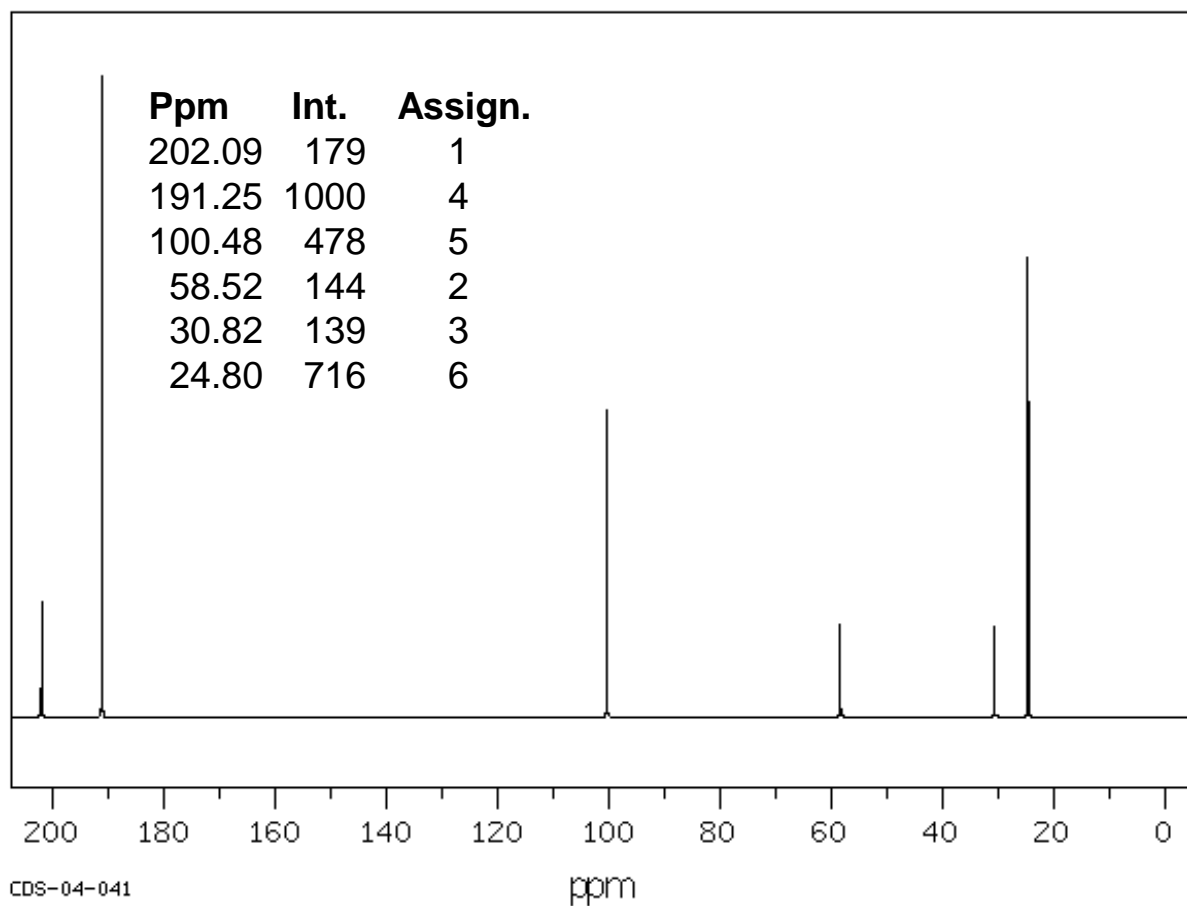


Az NMR spektrum hőmérsékletfüggése

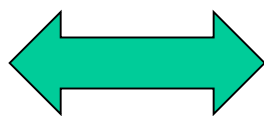




技有（半勝）

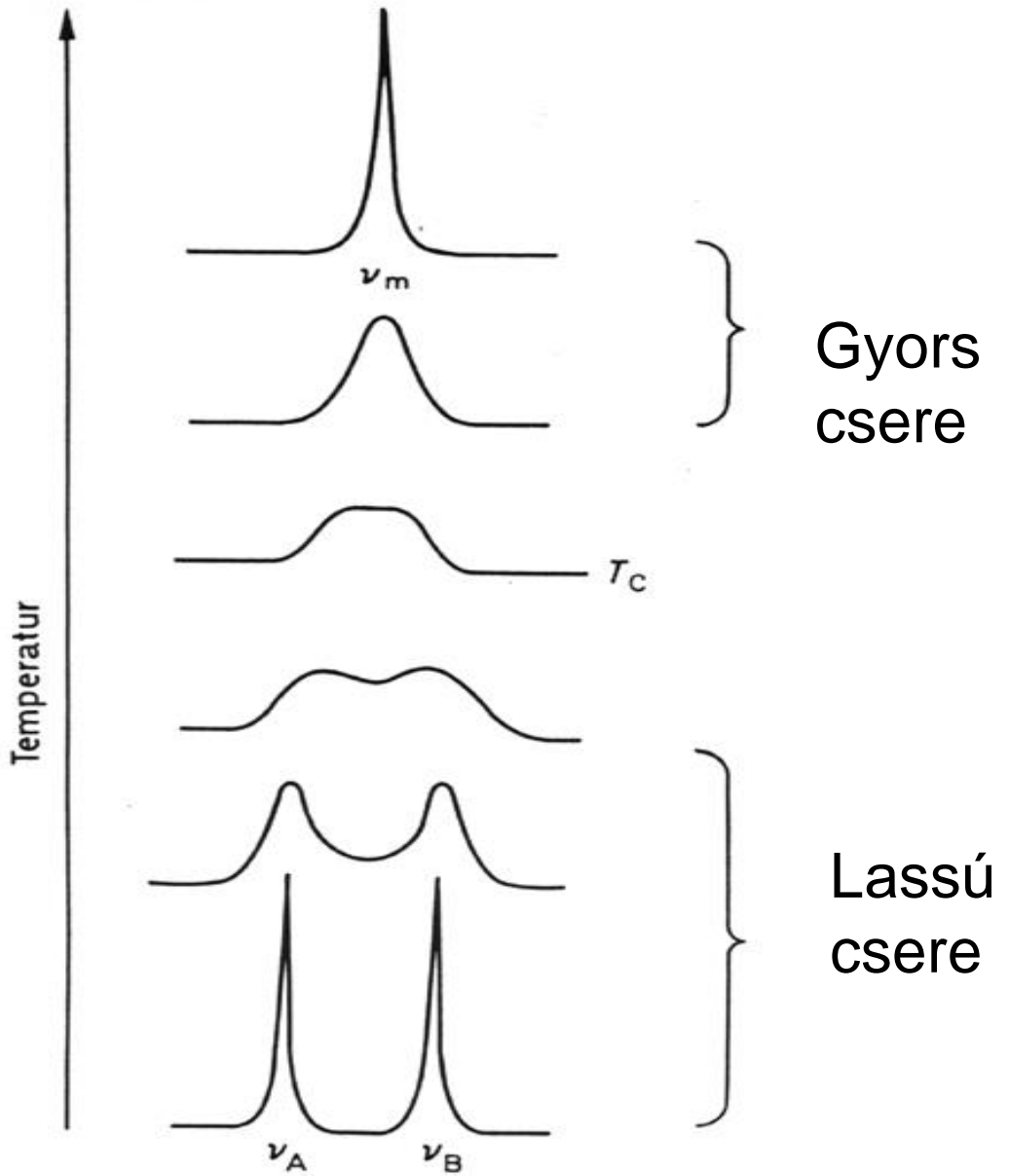


一本勝



有効

T ?



A cserefolyamatok típusai:

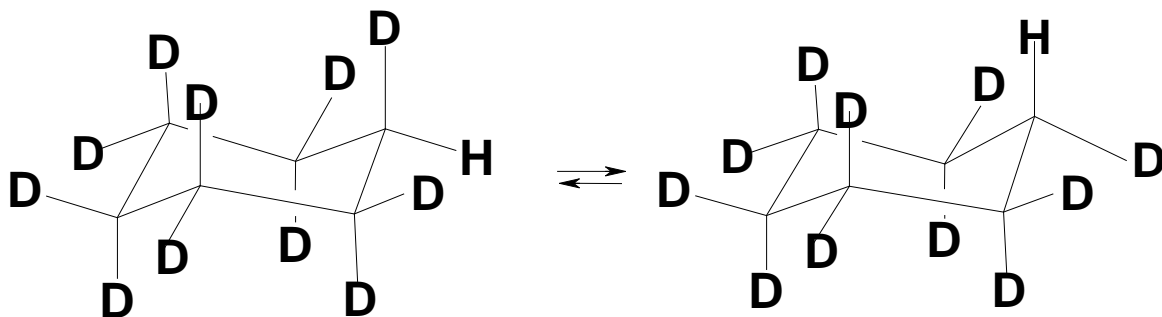
konformációs egyensúly

(gyűrűinverzió, gátolt rotáció)

tautomer egyensúly

komplex egyensúly

Kéthely-csere



Kéthely-csere leírása : Eyring egyenlet

Az Eyring egyenlet levezetése

$$k = \frac{RT}{N \cdot h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

$$v_m = \frac{v_A + v_B}{2}$$

Az aktiválási szabadentalpia:

$$\Delta G^\ddagger = RT_c \cdot \ln \frac{RT_c \sqrt{2}}{\pi \cdot N \cdot h |v_A - v_B|}$$

A hőmérsékletfüggő mérés adataiból:

$$\Delta G^\ddagger = 19 \cdot 10^{-3} \cdot T_c (9,97 + \log T_c - \log |v_A - v_B|)$$

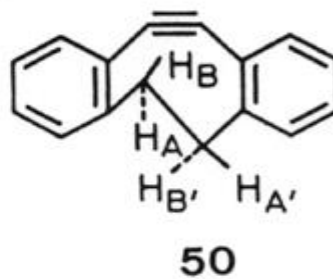
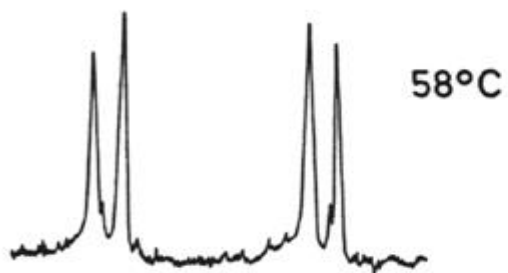
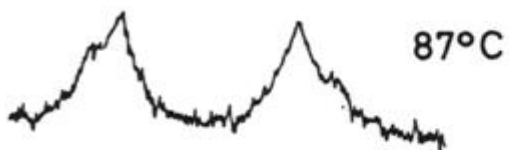
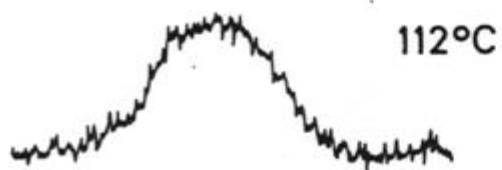
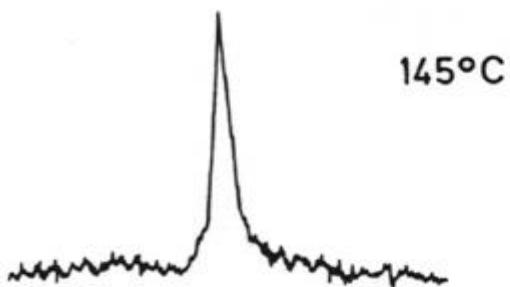
v_A és v_B a végtelen lassú csere esetén mért individuális kémiai eltolódások

T_c a hőmérsékletfüggő kísérletsorozatból meghatározható koaleszcenciahőmérséklet

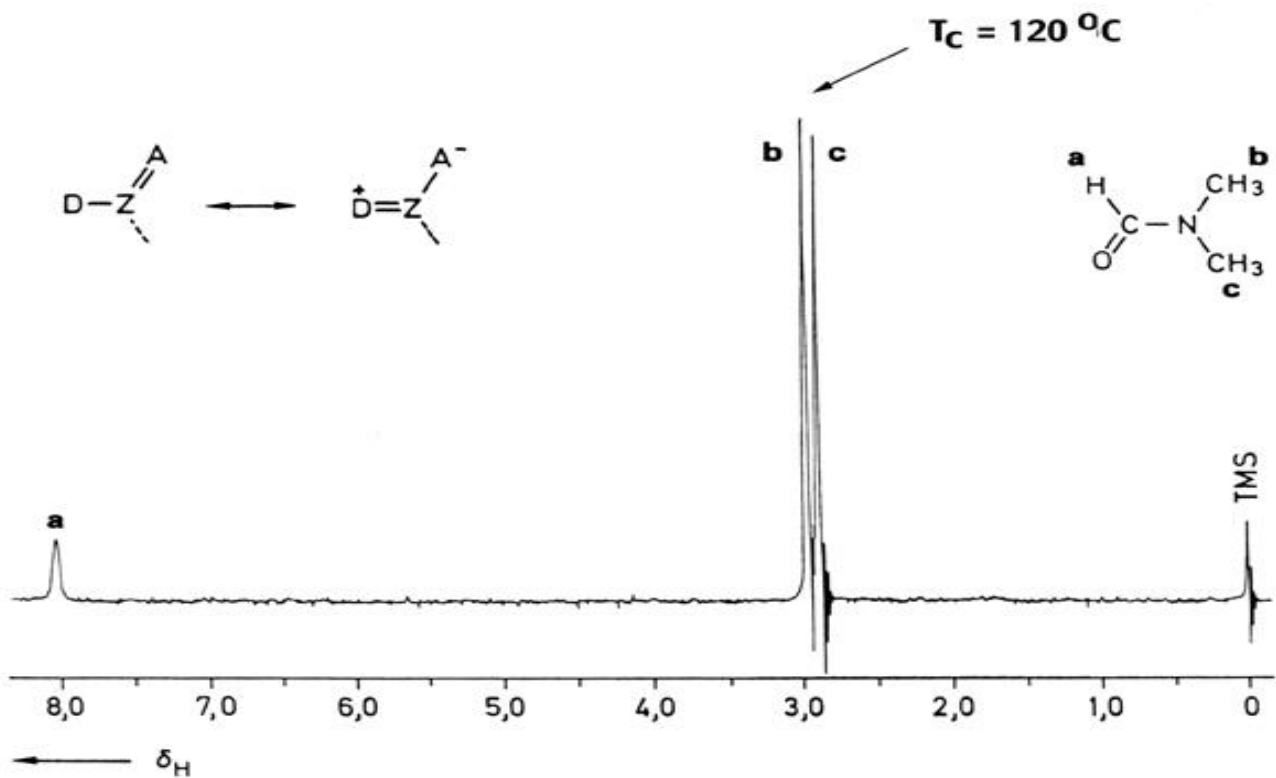
Meghatározható a ΔG aktiválási szabadentalpia

Elválasztható-e a két species ?

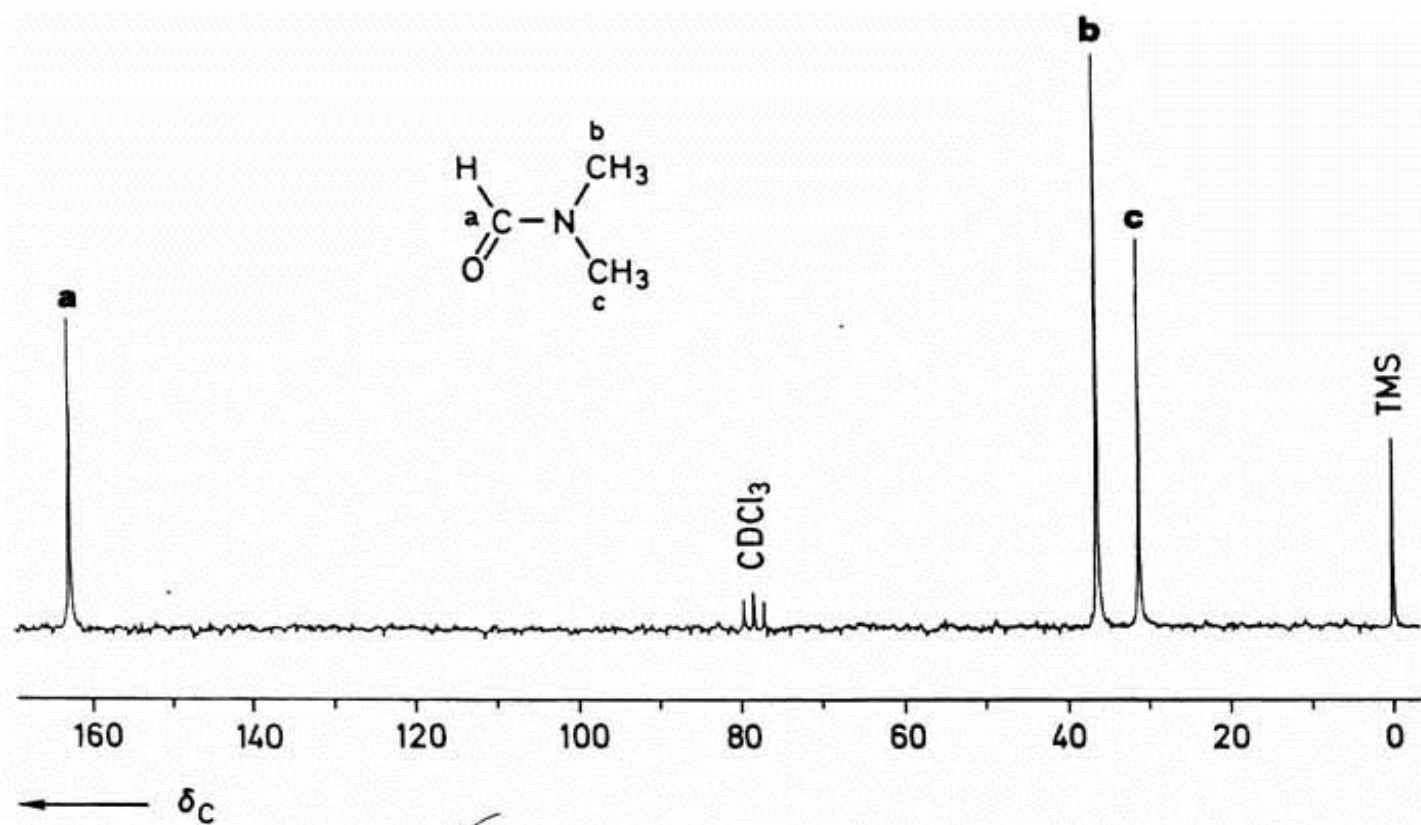
Példa:Konformációs egyensúly



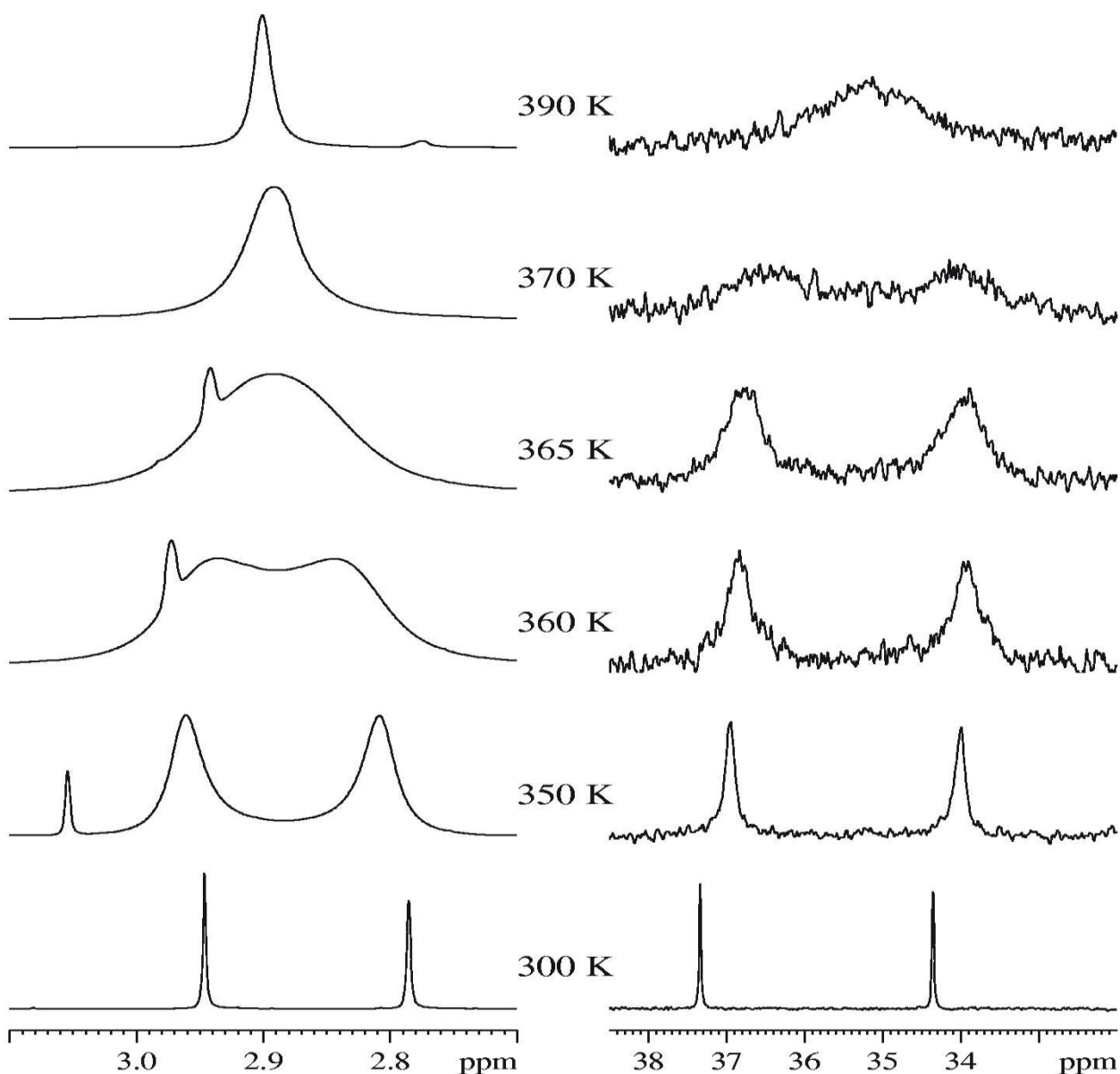
Gátolt rotáció észlelése $^1\text{H-NMR}$ spektrumban: DMF



Gátolt rotáció észlelése ^{13}C -NMR spektrumban: DMF



Gátolt rotáció : Koaleszcencia mérése DMA ^1H és ^{13}C -NMR spektrumaiban



A kétdimenziós (2D) NMR spektroszkópia

Mérföldkövek az NMR történetében

- 1D-FT

R.R. Ernst, W.A. Anderson, *Rev. Sci. Instr.*, **37**, 93 (1966)

- 2D-FT

a) J. Jeener: AMPERE International Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, 1971

b) A. Kumar, D. Welti, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson* **18**, 69 (1975)



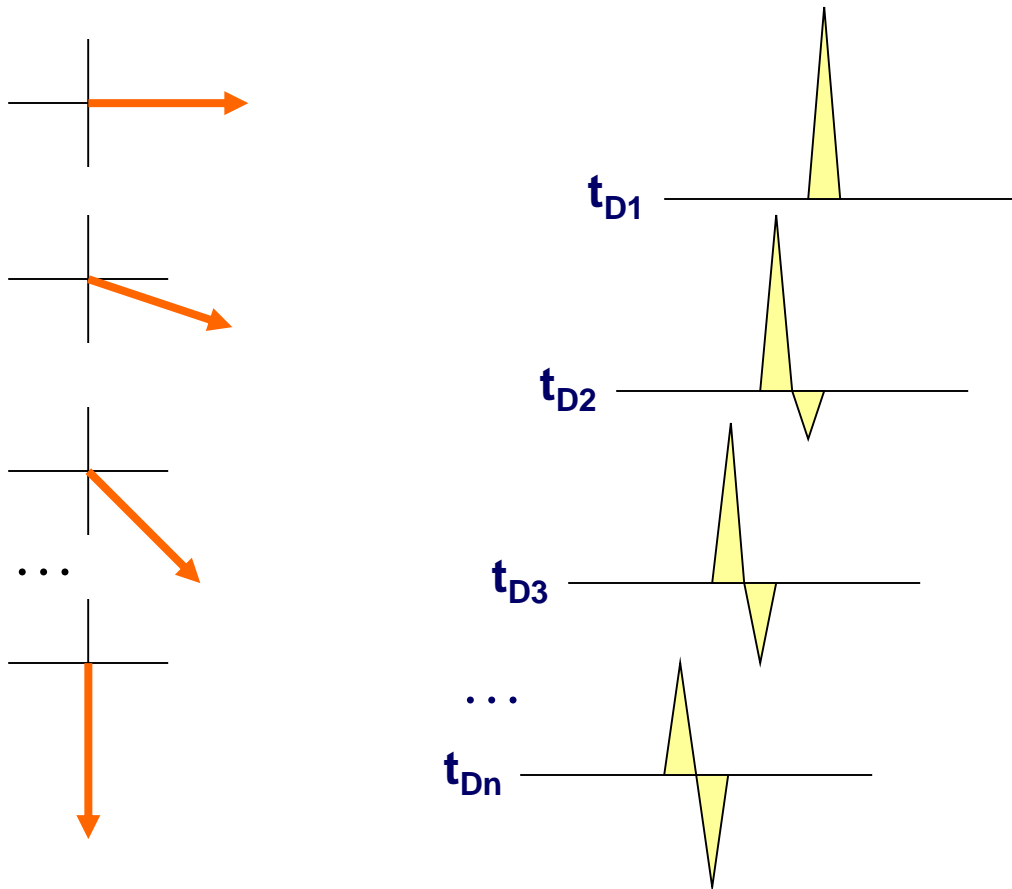
J. Jeener



R. Ernst

A 2D NMR spektroszkópia

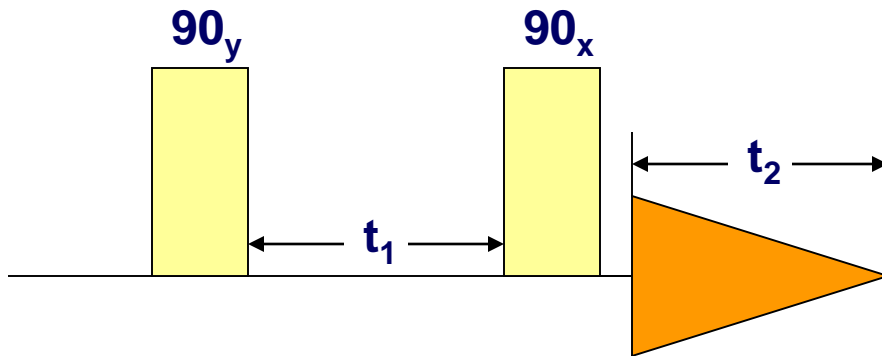
Bár már az eddigiekben is megismerkedtünk olyan NMR kísérletekkel, ahol több pulzust alkalmaztak, ezek egydimenziós kísérletek voltak. Láttuk azonban, hogy ezek a kísérletek egymástól eltérő eredményt hozhatnak, attól függően, hogy a kísérlet egy szakaszában a várakozási idő eltérő. A 2D spektroszkópia kiinduló gondolata az, hogy egy pulzus-szekvencián belül a várakozási időt szisztematikusan, egy időfüggvény alapján változtatjuk és a spektrumsorozatot ezen időfüggvény szerint másodszor is Fourier-transzformáljuk.



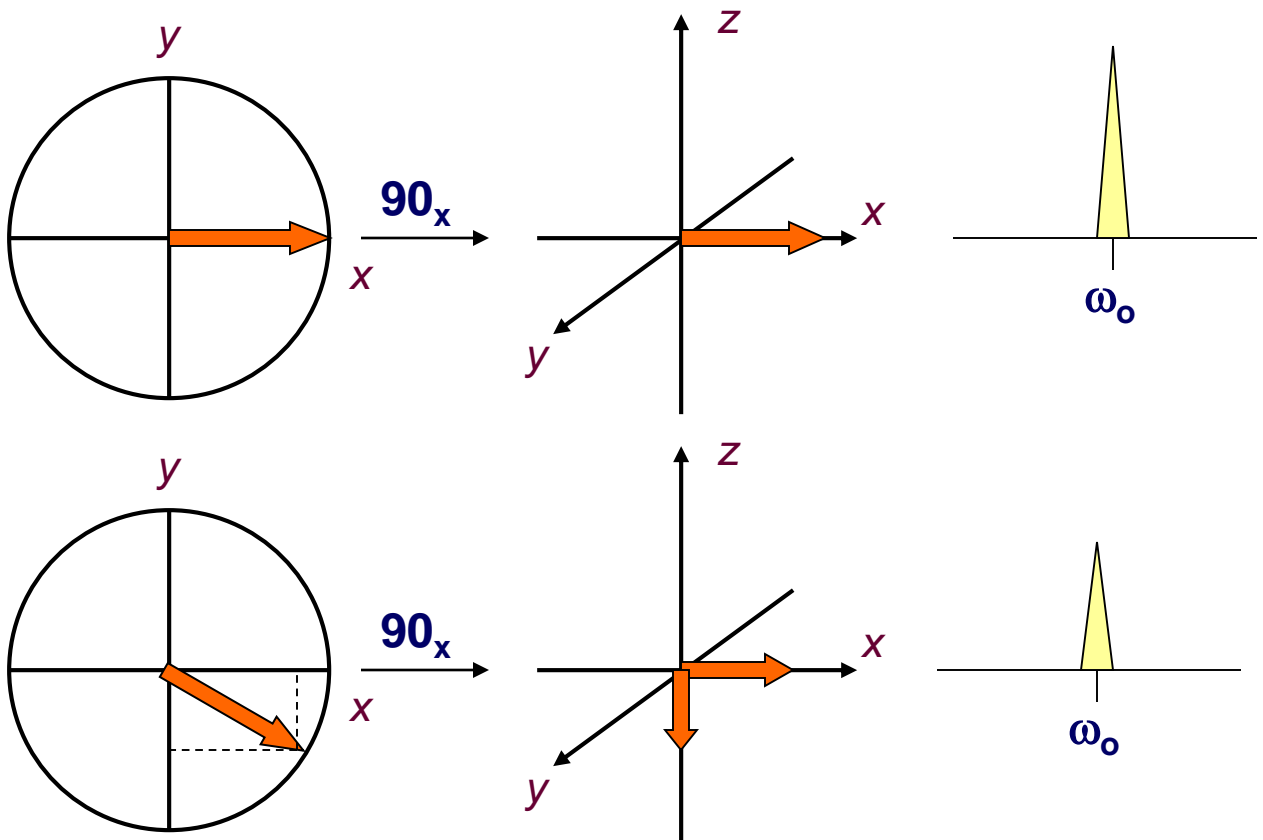
A fenti kísérletben az ún. pre-akvizíciós várakozási idő változik, ennek hatását az előző órán ismertettük. Az így kapott spektrumsorozat is időfüggő ($t_d = DE$)

A legegyszerűbb 2D kísérlet : COSY

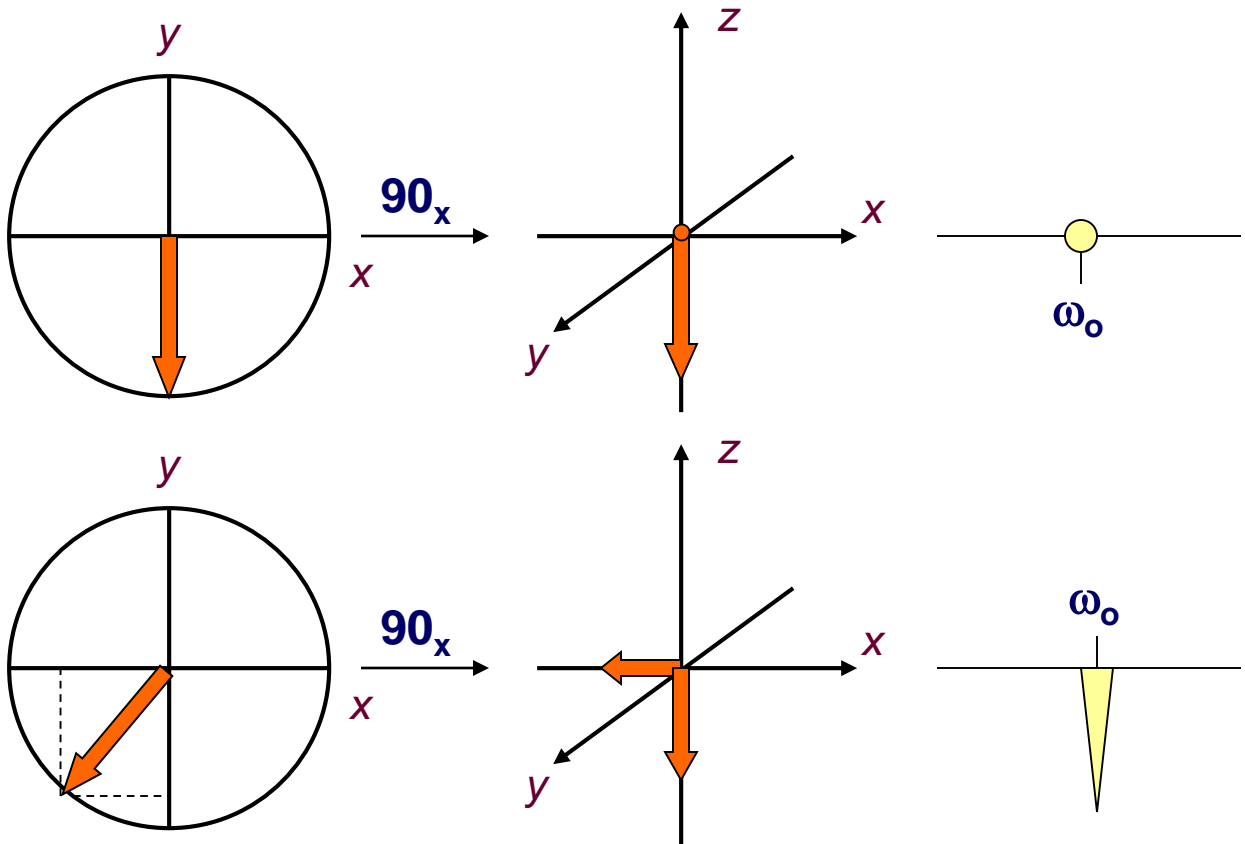
Ebben, az ún. **Jeener**-kísérletben két $\pi/2$ pulzus követi egymást, a köztük eltelt t_1 idő növekszik szisztematikusan a sorozaton belül.



Nézzük, hogyan viselkedik egy adott kémiai eltolódású szingulett az ω_0 körfrekvenciával forgó koordinátarendszerben különböző t_1 idők után. Az első $\pi/2$ pulzus hatása:



A legegyszerűbb 2D kísérlet : COSY



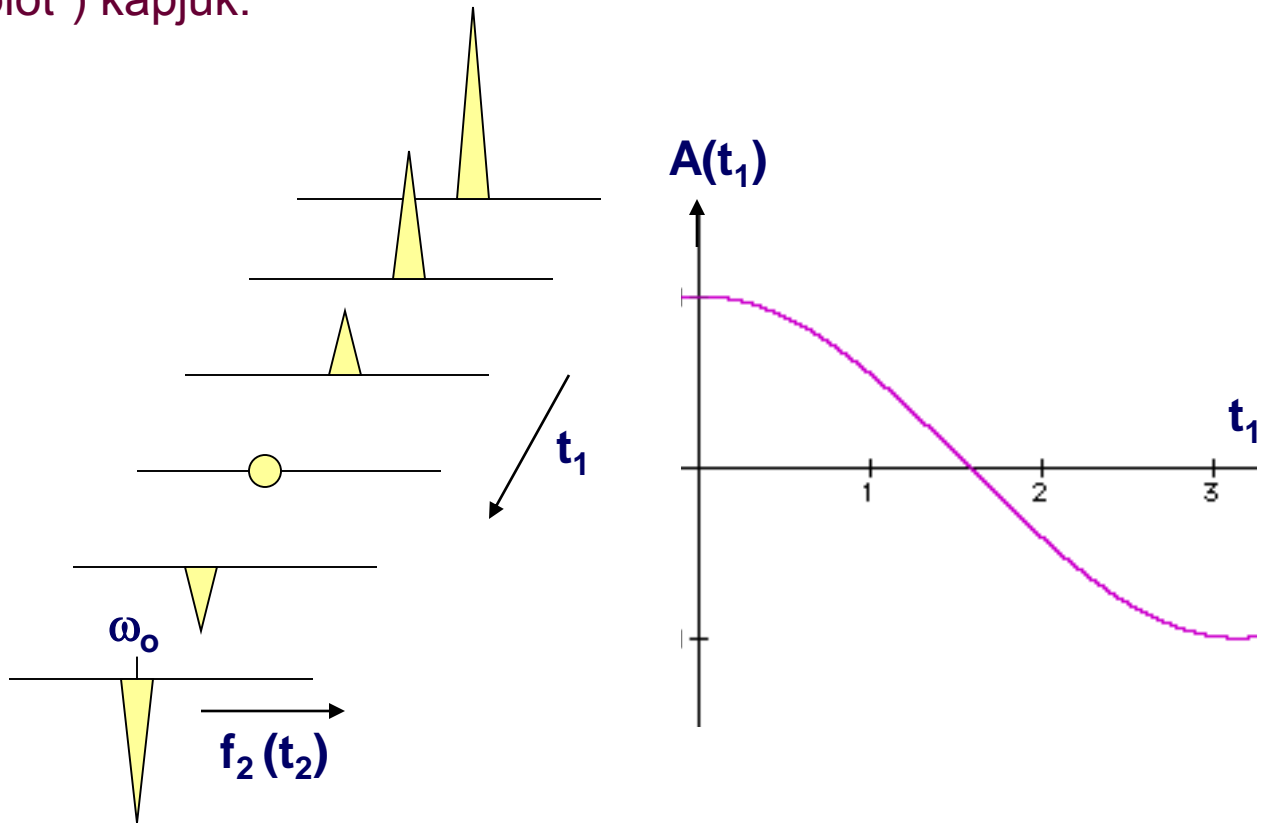
A második $\pi/2$ pulzus csak a mágneszettségi vektor y irányú komponensére hat az $\langle xy \rangle$ síkban.

- Az x irányú komponensre nincs hatással, de annak nagysága (amplitudója) függ a jel frekvenciájától.

$$A(t_1) = A_0 * \cos(\omega_0 * t_1)$$

A legegyszerűbb 2D kísérlet : COSY

Ha a spektrumokat sorban, egymás fölé kirajzoljuk, („stacked plot”) kapjuk:



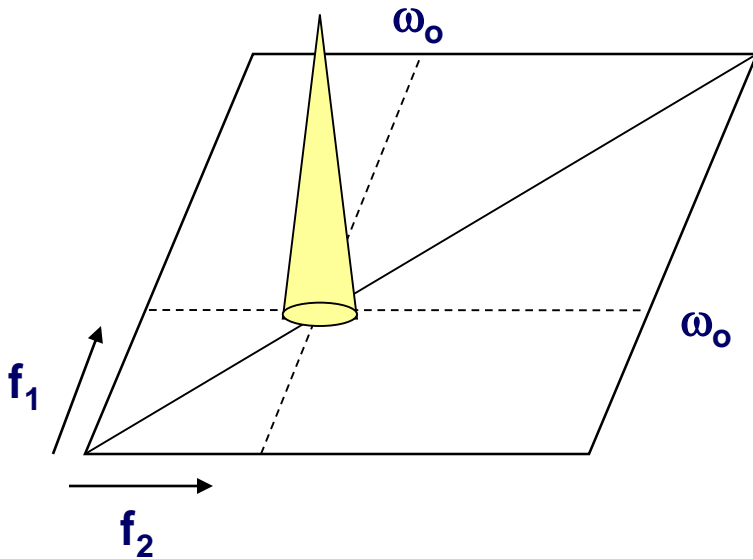
Ekkor az egyik tengelyen (f_2), frekvencia-függő adatokat, a másik tengelyen (t_1) egy időfüggvényt kapunk.

Miután az amplitudó moduláció a t_1 tengelyen szintén egy periodikus függvényt eredményez, ezt egy pseudo FID-nek tekintve, újra Fourier-transzformálhatunk és így kapjuk az f_1 tengelyt.

A jelintenzitást természetesen a T_1 és T_2 relaxáció is befolyásolja, de hatása általában nem meghatározó, mivel a t_1 idők több nagyságrenddel kisebbek a relaxációs időknél (μs - ms ill. s nagyságrend!)

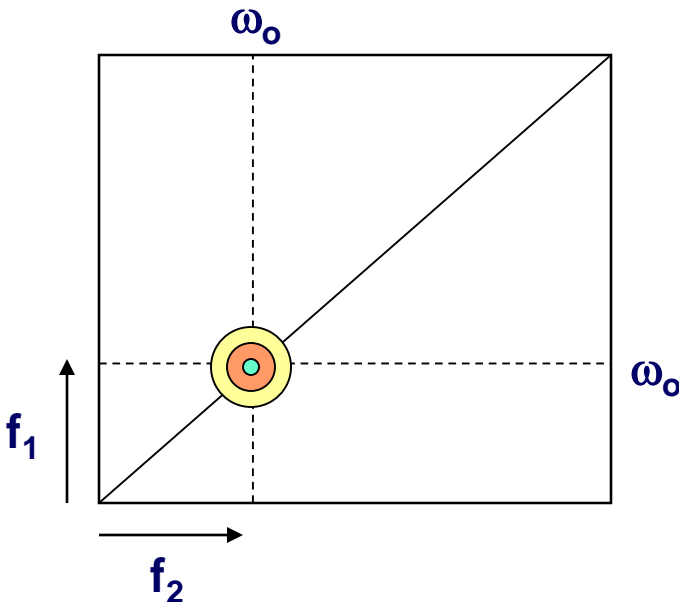
A legegyszerűbb 2D kísérlet : COSY

A kétszeres Fourier-transzformáció eredménye a kapott **kétdimenziós NMR spektrum**:



A két vonal találkozásánál kapjuk a maximális intenzitású jelet, az ún. **diagonálist**, melyet a tengelyekre vetíthetünk.

A 2D-NMR spektrumok másik, gyakoribb ábrázolási módja az ún. **contour plot**.

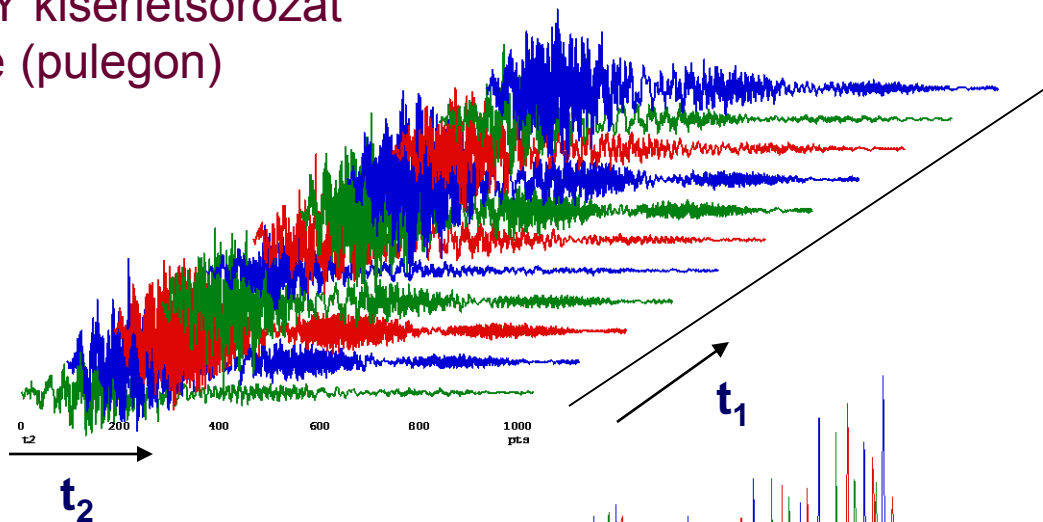


A különböző színű vonalak a különböző intenzitásokat jelölik, mint a térképek szintvonalai.

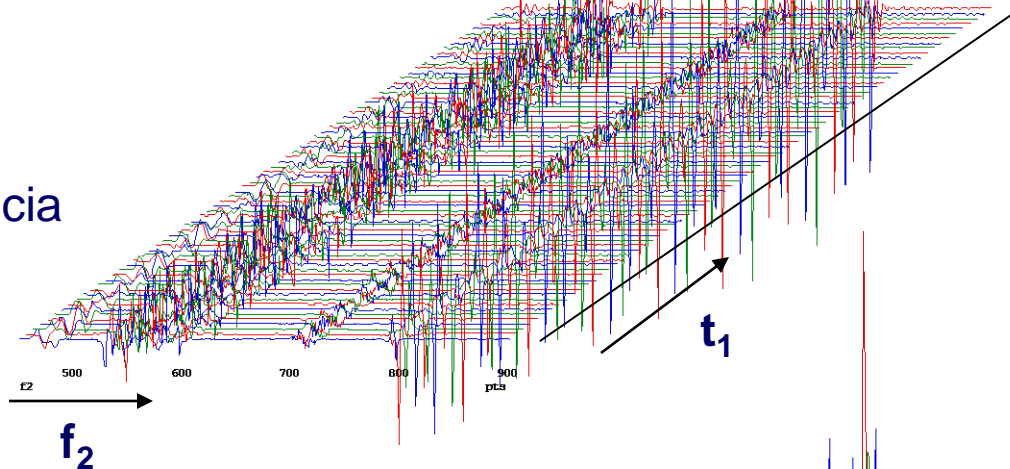
Hogy néz ki egy valós minta esetében?

- A 2D COSY kísérletsorozat eredménye (pulegon)

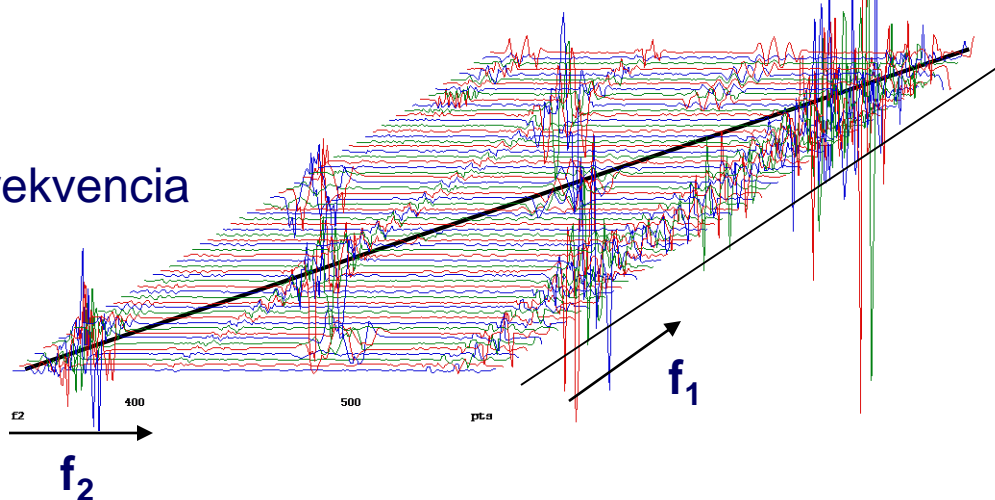
idő-idő



idő - frekvencia

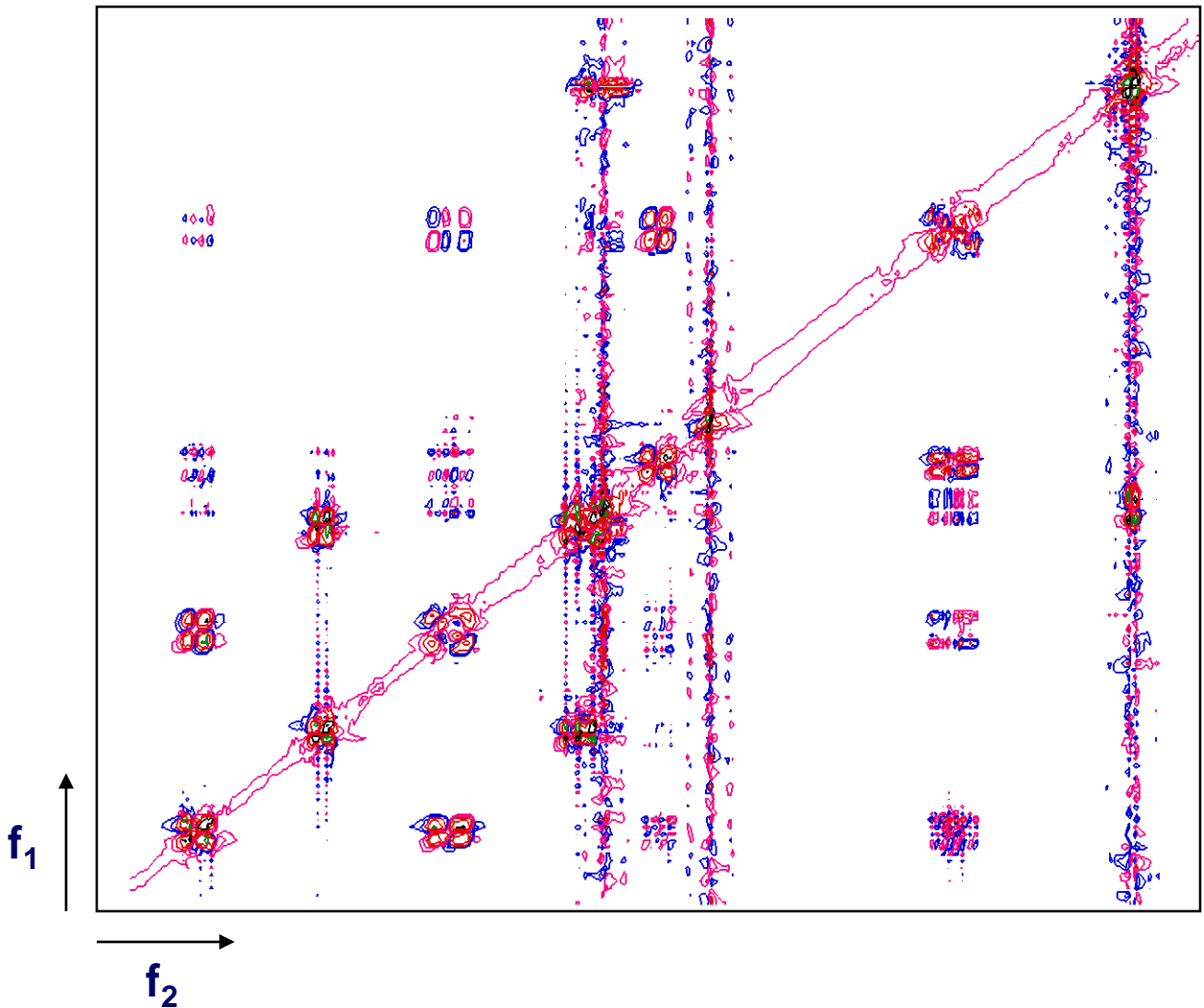


frekvencia-frekvencia



Hogy néz ki egy valós minta esetében?

Az előző spektrum **contour-plot** formában (a továbbiakban 2D-térképnek nevezzük)



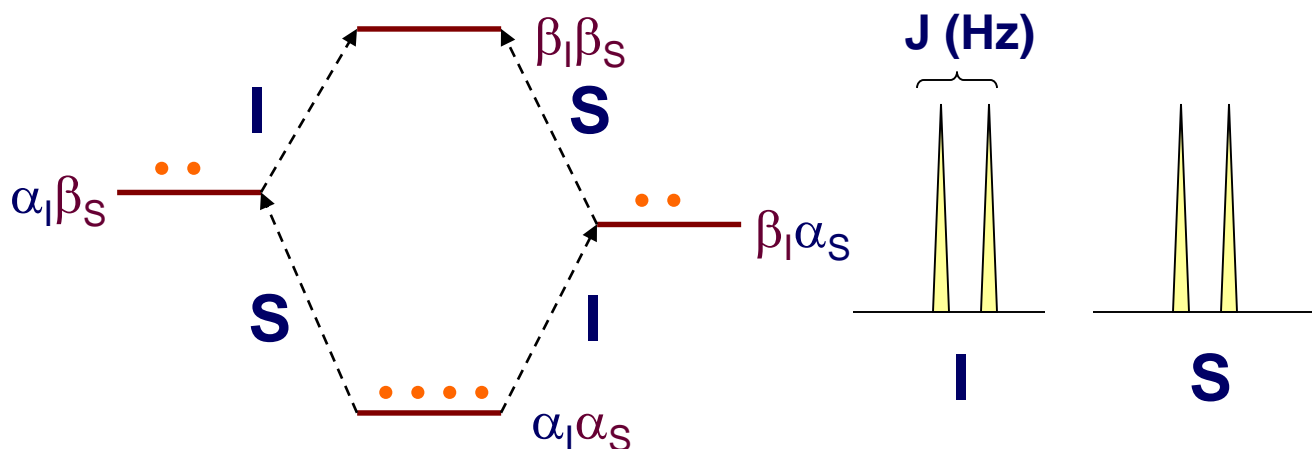
Kérdés: mit keresnek itt az **off-diagonális** csúcsok (továbbiakban: keresztcsúcsok), honnan erednek, mit jelentenek? A COSY kísérlet elemzését a következőkben csak néhány egyszerűbb szempont figyelembevételével tesszük meg. Nem végezzük el (a mi szempontunkból nem is szükséges) a részletes matematikai leírást

COSY – homonukleáris korreláció

A **COSY** kifejezés a **CORrelation SpectroscopY** szóösszetételből ered, pontosabban **homonukleáris korrelációs spektroszkópia** lehetne a neve, ui. a homonukleáris csatolás az alapvető jelenség, amin alapszik. A bevezetőben bemutatott 2D spektrum egyetlen izolált spint tartalmazó rendszer spektruma, melyben nincs csatolási kapcsolat más spinekkel.

Ami a COSY spektrum legfőbb haszna, hogy megmutatja, hogy az adott spin mely más spinekkel van csatolási kapcsolatban. A keresztcsúcsok mutatják meg, hogy a diagonális adott jele milyen más jelekkel csatol.

Nézzük meg a $90_y - t_1 - 90_y$ pulzusszekvencia hatását egy csatolt spin páron. Emlékeztetőül egy homonukleáris két-spin rendszer energiadiagramja:



Ami a két $\pi/2$ pulzus (ez egy „pseudeo” π pulzus) hatását illeti: könnyen belátható, hogy ezzel invertáljuk az **S** spin populációját, amely az **I** spinen polarizáció transzfert eredményez.

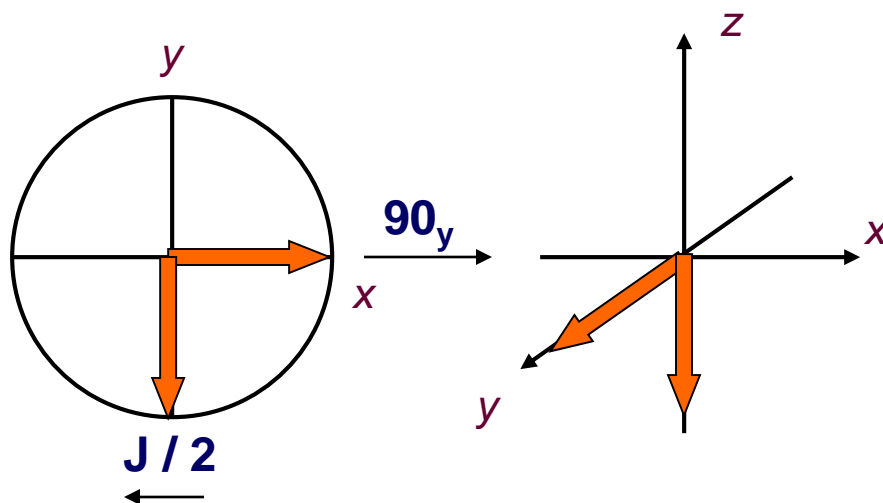
COSY- homonukleáris korreláció

A feltétel felcserélhető, hiszen az **I**-ről **S**-re történő polarizáció transzfer ugyanaz, mint **S**-ről **I**-re. Vizsgáljuk meg azt az esetet, amikor az **I** spint gerjesztjük és nézzük, mi történik az **S** spinnel.

Az első $\pi/2$ pulzus után két **I** vektorunk van az **x** tengelyen, az egyik $\omega_1 + J/2$, a másik $\omega_1 - J/2$ szögsebességgel forog. A második $\pi/2$ pulzus a mágnesezettségi vektor **y** irányú komponensét a **-z** tengelyre kényszeríti, amely az **I** spin populációjának részleges inverzióját eredményezi.

A $t_1=0$, esetben az **I** spinek teljes inverziója következik be, (mivel ez végeredményben egy π pulzus) és ekkor az **S** spin intenzitása nem változik. Minden egyéb esetben az **S** spin intenzitása változni fog és ez a változás periodikusan függ az **I** spin rezonanciafrekvenciájától.

Az **I** spinek populációs inverziója rezonanciafrekvenciájuk trigonometrikus függvénye. Amennyiben a jelek egyikének frekvenciáján vagyunk és $t_1=1/4 J$:

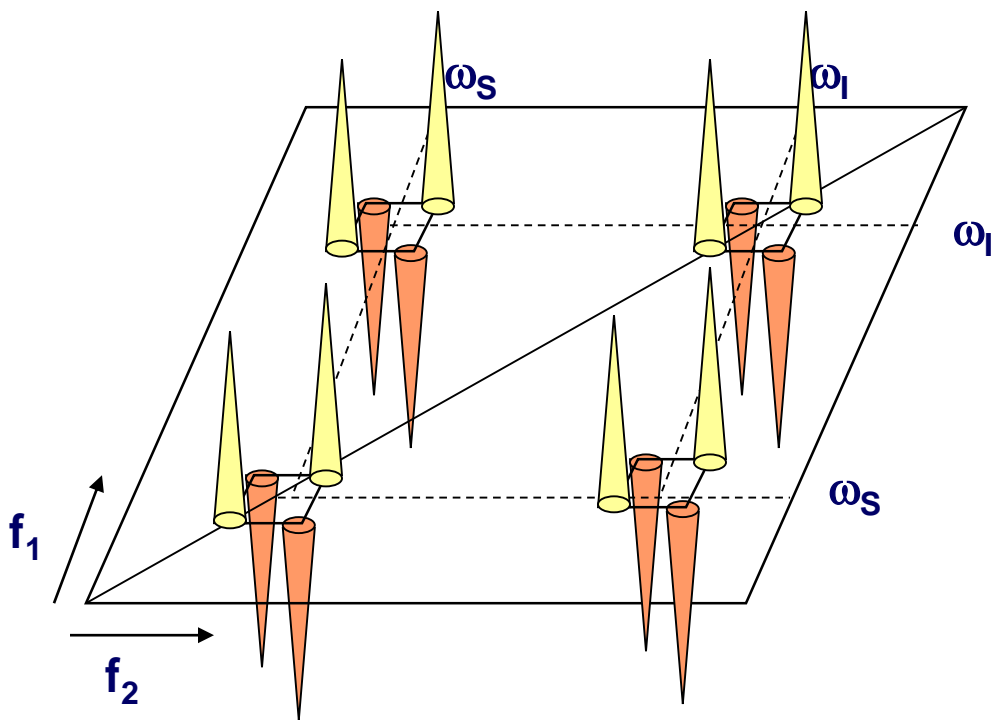


COSY – Homonukleáris korreláció

Általános esetben az **S** spin jelének intenzitását a $\pi/2$ pulzus után egy trigonometrikus függvény írja le, ahol a t_1 és t_2 változók mellett az **I** spin rezonanciafrekvenciája és a J_{IS} csatolási állandó szerepel:

$$A_S(t_1, t_2) = A_0 * \sin(\omega_I * t_1) * \sin(J_{IS} * t_1) * \sin(\omega_S * t_2) * \sin(J_{IS} * t_2)$$

A t_2 majd t_1 szerinti Fourier transzformáció után az **I** spint is figyelembe véve, kapjuk a következőt eredményt:



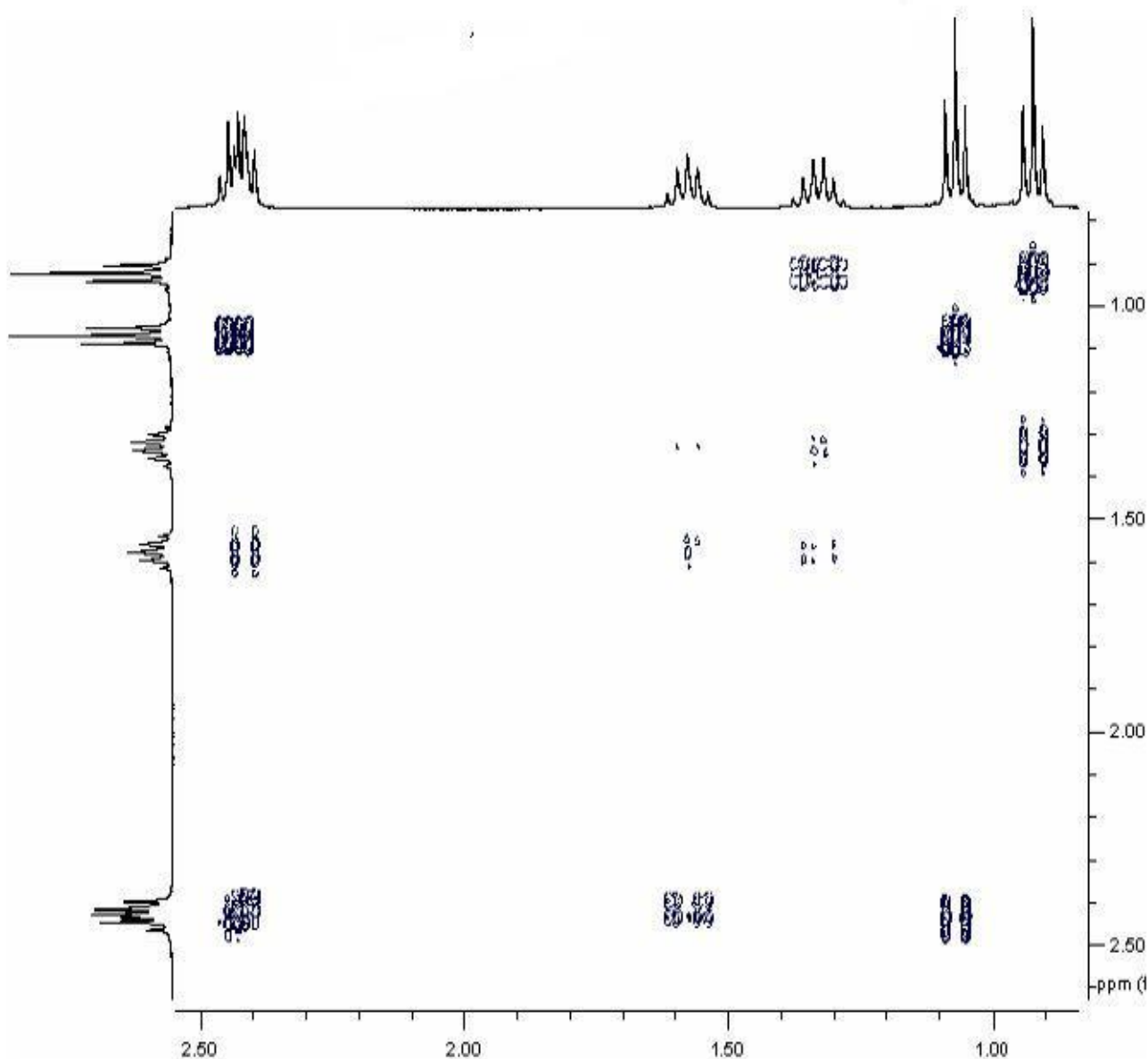
Ez egy dublett-dublett szerkezetű két-spinrendszer **COSY** spektruma. A szinuszfüggvény diszperziós jeleket eredményez f_1 és f_2 dimenzióban. A keresztcsúcsok fázisa „negatív”.

COSY alkalmazása szerkezetfelderítésben

Diagonális (és a vetületek) : a teljes 1D spektrum.

Keresztcsúcsok : a diagonális jel csatoló partnerei (J)

A keresztcsúcsok szimmetrikusan jelennek meg (sorok és oszlopok).

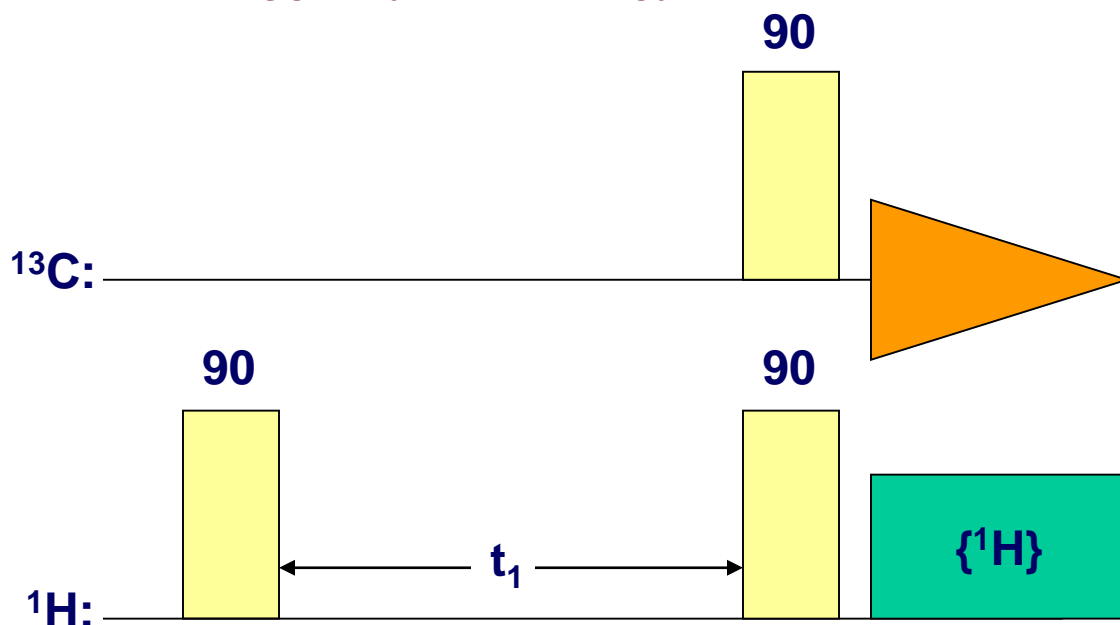


COSY spectrum of 3-heptanone



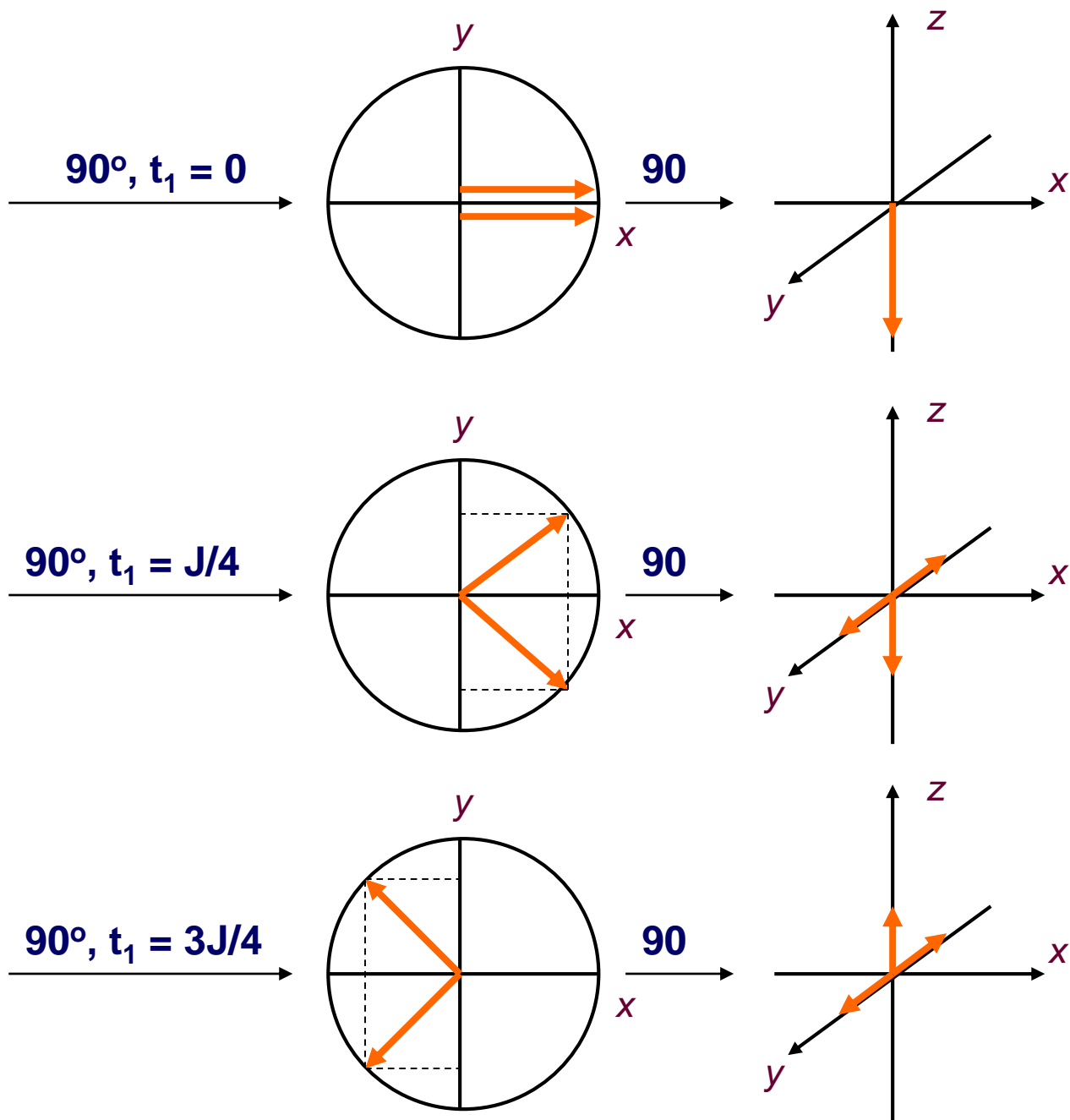
Heteronukleáris korrelációk

A COSY (**CO**rrelation **S**pectroscop**Y**) kísérlet volt az első a 2D NMR módszerek között. Egyike a leghatékonyabb szerkezetfelderítő módszereknek. Segítségével megmutathatjuk, hogy a szerkezet mely elemeihez tartozó jelek csatolnak egymással ($^3J_{\text{HH}}$ - tehát szomszédosak!) – a kereszt-csúcsok jelzik a „konnektivitást”. A kísérletnek több variációja és továbbfejlesztése ismeretes (**DQF-COSY**, **E-COSY** stb). Hasonló módon végezhetünk egy további kísérletet, ahol a heteronukleáris konnektivitást vizsgálunk, (praktikusan az ^1H és a ^{13}C jelek közötti kapcsolatot). (**HET**eronuclear **COR**relation spectroscopy). A pulzusszekvencia ebben az esetben mind a ^{13}C , mind az ^1H csatornát érinti, hiszen a ^{13}C jelek intenzitását „jelölnék” az ^1H populációk időbeli változásának függvényében. Pl. így:



Heteronukleáris korrelációk

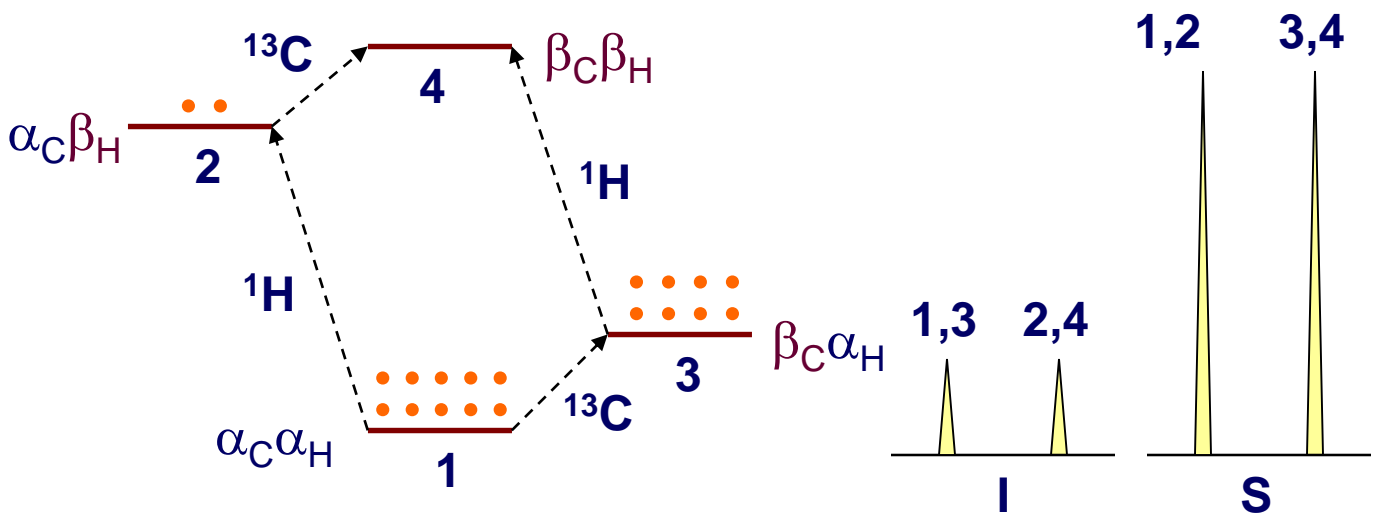
- Először azt vizsgáljuk, mi történik az ^1H mágneszettségi vektorral különböző értékű t_1 idők alatt



Heteronukleáris korrelációk

Ugyanúgy, ahogy a COSY esetében láttuk, az aktuális t_1 függvényében a proton populációs inverziójának különböző állapotai fejlődnek ki. Látható, hogy az inverzió aktuális fázisa a J_{CH} csatolástól függ.

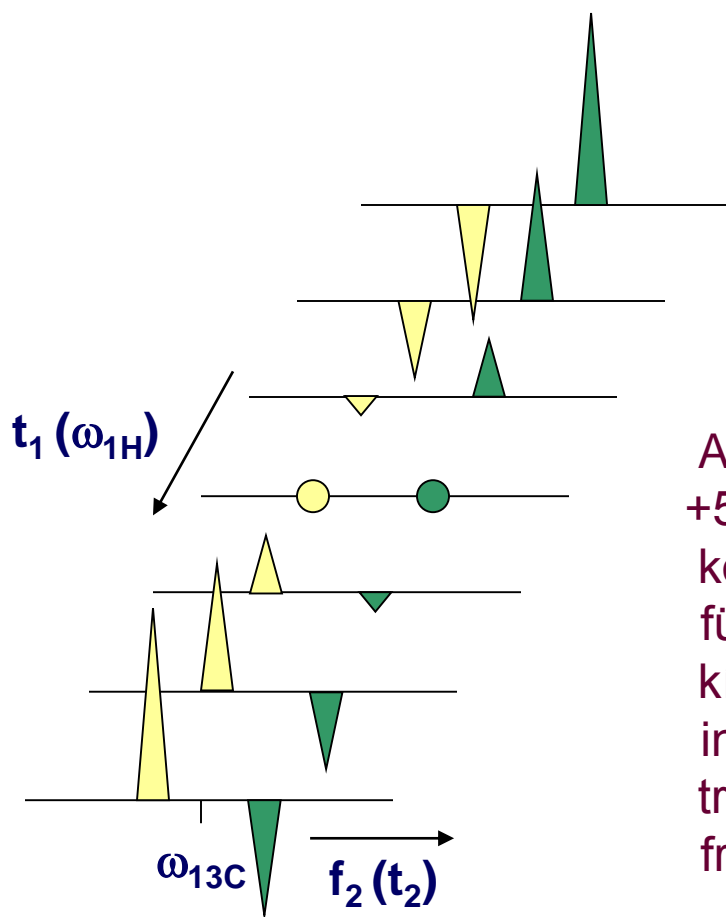
Bár a levezetést a forgó koordinátarendszerben egy Larmor-frekvenciával forgó dubletten mutattuk be, belátható, hogy a jelenséget az 1H kémiai eltolódás (δ) is befolyásolja. Mint azt az SPI és INEPT kísérleteknél is láttuk, az 1H szintekről történő populációs inverzió a ^{13}C szintekre periodikus. Emlékeztetőül a heteronukleáris két-spin rendszer energia-diagramja:



Miután a ^{13}C jel intenzitása, amelyet a t_2 függvényében detektáltunk, a hozzá kapcsolódó proton frekvenciájával modulált, a ^{13}C csatornán mért FID a ^{13}C és az 1H frekvenciák tekintetében egyaránt hordoz információt.

Heteronukleáris korrelációk

A ^{13}C vonalak intenzitása az ^1H jelektől eredő populációs inverzió függvénye, függenek ω_{H} -tól. Amennyiben a ^{13}C jelek intenzitását a COSY kísérletnél látott módon egymás fölé kirajzoljuk:

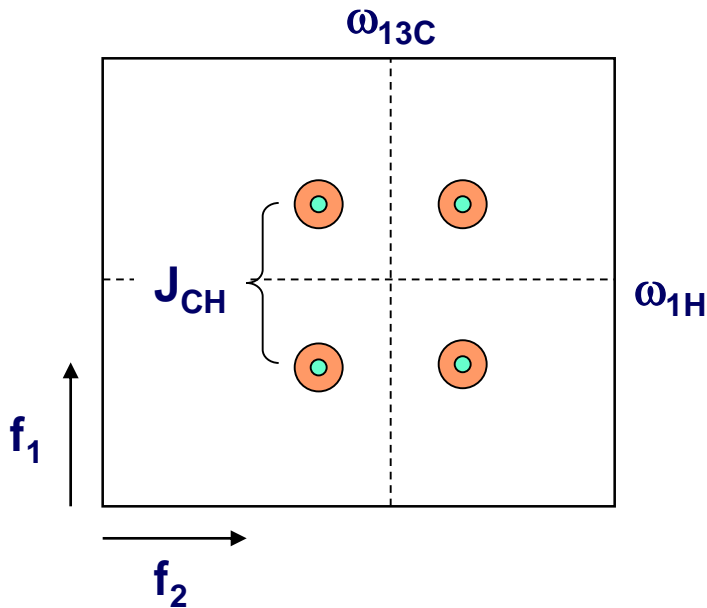


A ^{13}C vonalak intenzitása +5 és -3 között fog változni, $\omega_{1\text{H}}$ és J_{CH} értékétől függően, mint azt az INEPT kísérletnél is láttuk. Maximális intenzitásokat a polarizáció transzferéhez optimális ^1H frekvenciákon észlelünk.

Matematikai egyenlettel kifejezve egy multipliett ^{13}C jel intenzitása függ $\omega_{13\text{C}}$ -tól a t_2 dimenzióban, $\omega_{1\text{H}}$ -tól a t_1 dimenzióban, valamint J_{CH} -tól mindkét dimenzióban. (Nem írjuk fel a képletet).

Heteronukleáris korrelációk

A kétszeres Fourier transzformáció után az így mért 2D spektrum a következő szintvonalas 2D térképet adja:



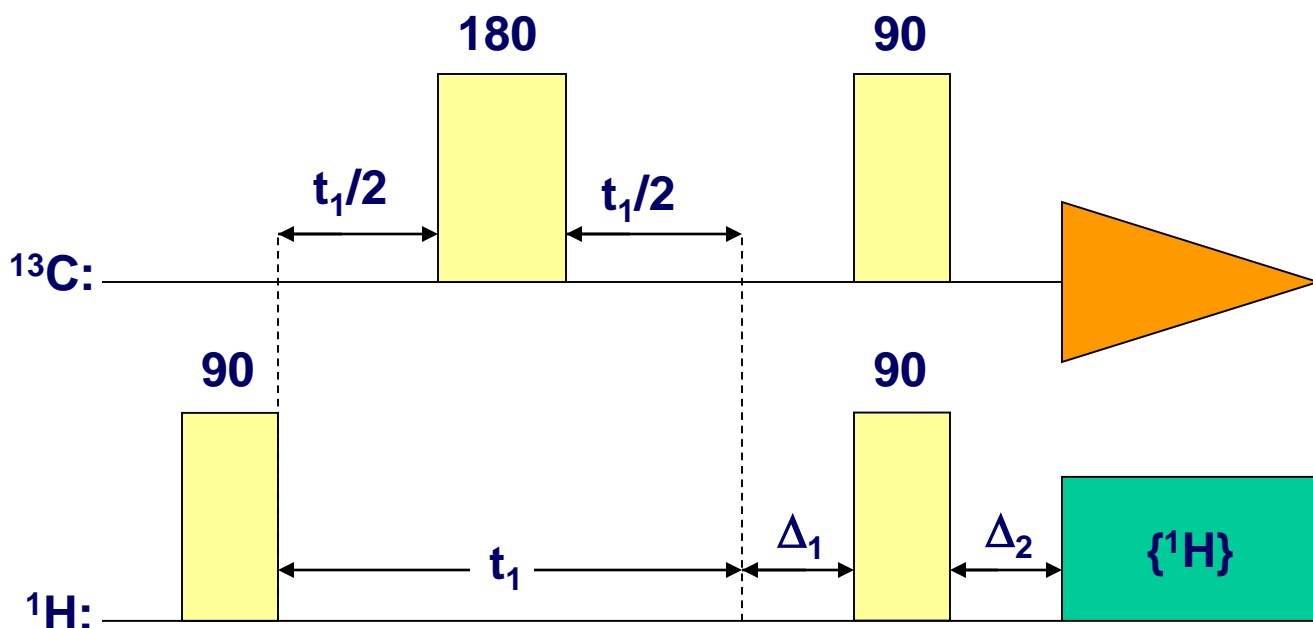
Az elsőnek ismertetett COSY spektrummal ellentétben, ez a 2D spektrum nem szimmetrikus, miután az egyik tengely ^{13}C frekvenciákat, a másik ^1H frekvenciákat tartalmaz.

A jelek felhasadnak a J_{CH} csatolási állandóknak megfelelően. Tudjuk, hogy az $^1J_{\text{CH}}$ értéke 50 - 250 Hz tartományban változhat, tehát hasonlóan az 1D spektrumokhoz, reális minták esetén bonyolult, egymást átfedő jelcsoportokra számíthatunk.

A csatolásoktól most sem tudunk egyszerűen szélessávú protonlecsatolással megszabadulni, hiszen lecsatolás esetén nem jönne létre polarizáció transzfer.

Heteronukleáris korreláció J_{CH} csatolás nélkül

Az alkalmazott ötlet hasonló, mint a refókuszált INEPT kísérlet során alkalmazott trükk.



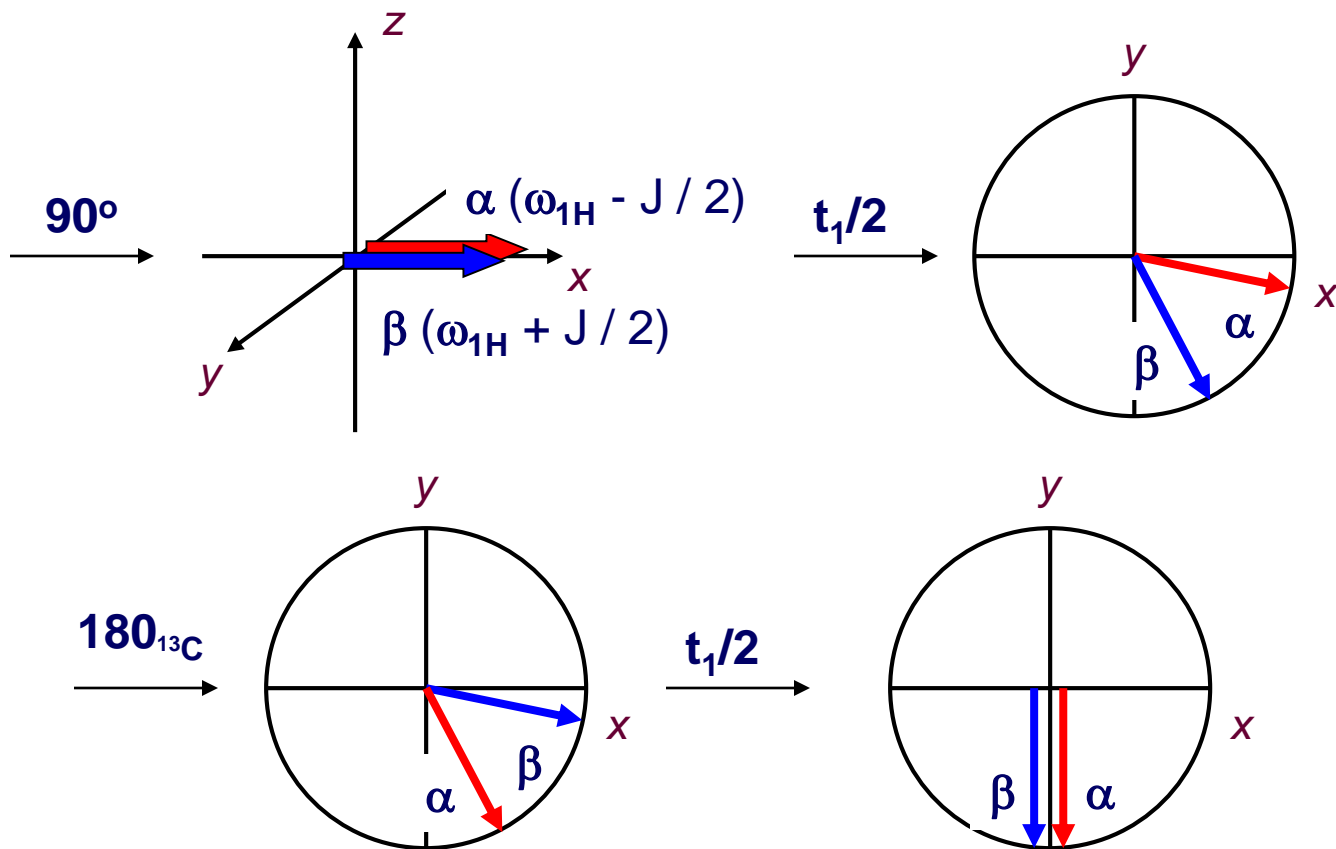
A ^{13}C csatornán adott π pulzussal újrafókuszáljuk az ^1H mágneszettségi vektort, a két várakozási idővel maximalizáljuk a az ^1H polarizáció átvitelt a ^{13}C jelekre, ugyanakkor elérjük a ^{13}C mágneszettségi vektorok lecsatolás előtti újrafókuszálódását.

A polarizáció transzfer hatékonysága a Δ időtől és a szénatom multiplicitásától függ, mint az INEPT kísérletnél, hasonlóan itt is egy „átlagos” (Δ) érték alkalmazása javasolt.

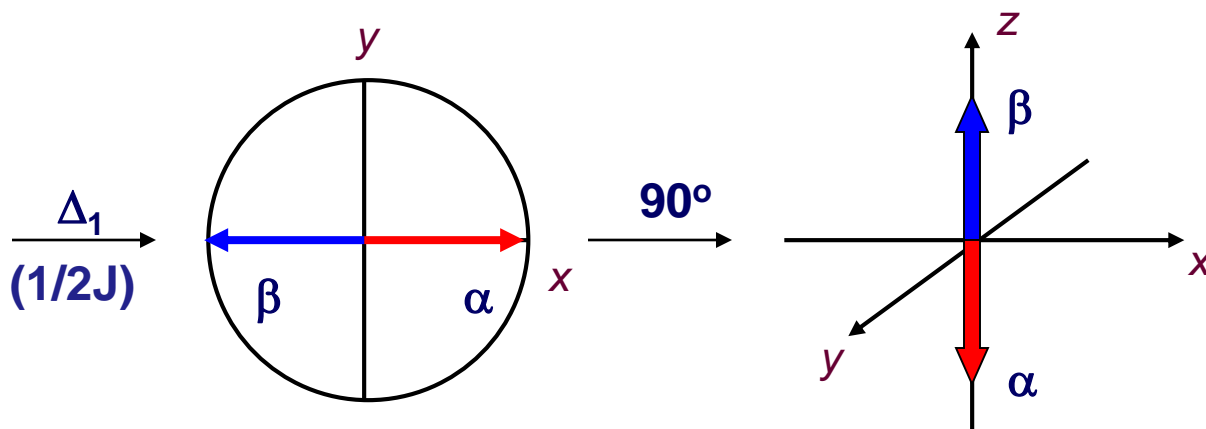
A következő vektorábra egy CH szénatom (dublett jel) esetét mutatja.

Heteronukleáris korreláció J_{CH} csatolás nélkül

Egy adott t_1 érték után az 1H mágnesezettségi vektor:

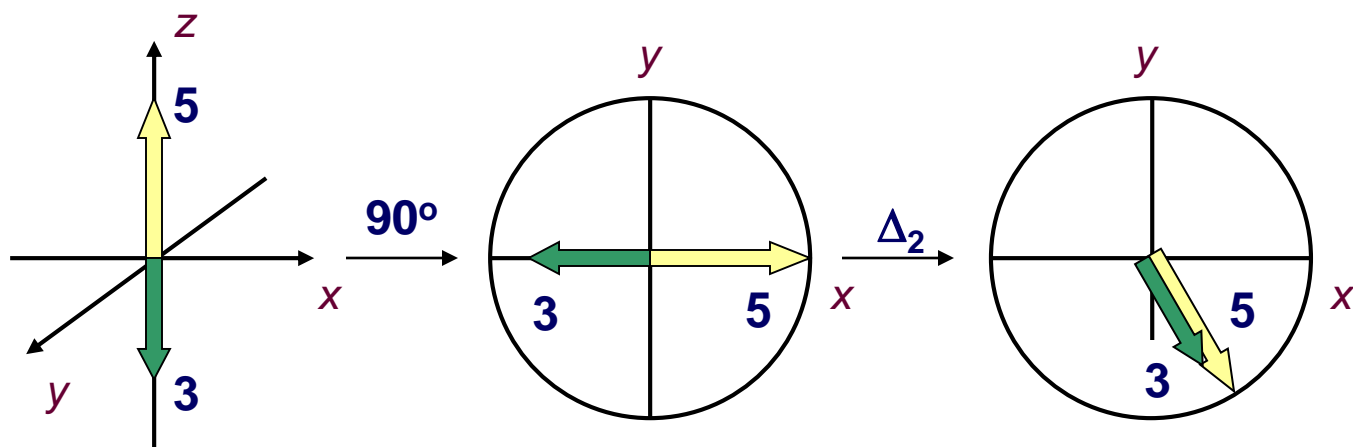


Amennyiben a Δ_1 időt $1/2J$ értékre választjuk, a két 1H vektor fáziseltérése pontosan 180° lesz. Ezen t_1 idő alatt jön létre a maximális populációs inverzió, J_{CH} effektus nélkül:

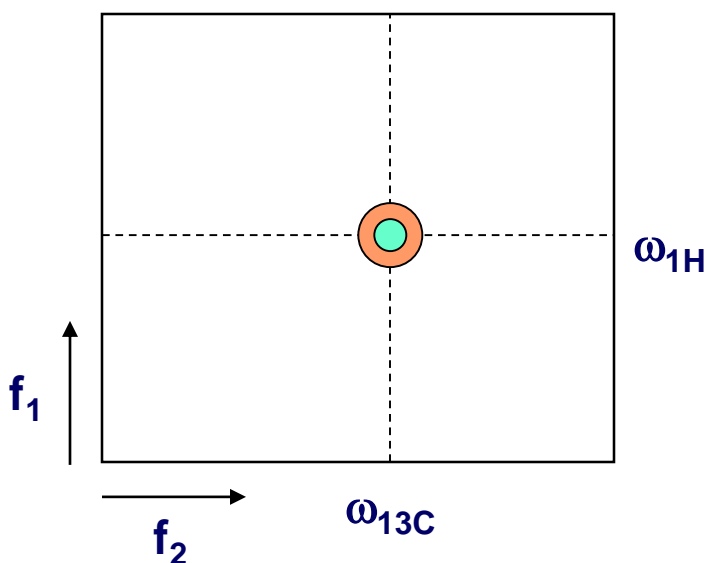


Heteronukleáris korreláció J_{CH} csatolás nélkül

Nézzük most a ^{13}C mágneszettségi vektor mozgását! A $\pi/2$ ^1H pulzus után a ^{13}C vektorok szétválnak 5:3 arányban a $\langle z \rangle$ tengelyen. A második Δ_2 ($1/2J$ értékű) várakozási idő után újra találkoznak (refókuszálódnak):



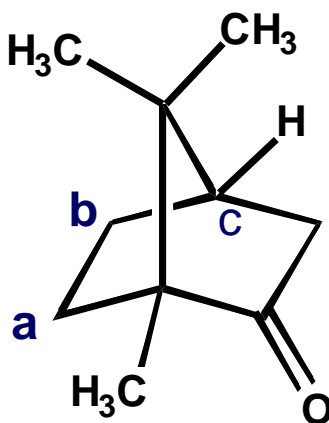
Miután a ^{13}C mágneszettségi vektorok refókuszálódtak, alkalmazhatjuk a szélessávú ^1H lecsatolást. A 2D spektrum most már nem mutat J_{CH} csatolást (de továbbra is tartalmazza a kémiai eltolódás-információt). A kétszeres FT után egy keresztcsúcsot kapunk, ahol ezek az eltolódások összetartoznak.



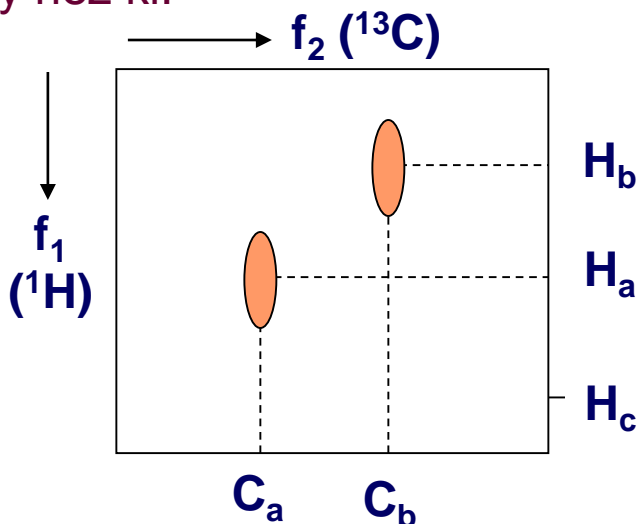
Távol-ható heteronukleáris korreláció

A Δ_1 és Δ_2 várakozási idők szolgálják azt a célt, hogy maximális értékű ^{13}C mágnesettségi vektorokat kapjunk az anti-fázisú $^1\text{J}_{\text{CH}}$ csatolt multiplettek. Δ_1 és Δ_2 értéke így általában 2- 5 ms lehet, mivel a $^1\text{J}_{\text{CH}}$ átlagértéke 150 Hz.

Valóban előnyösen alkalmazható a 2D –heterokorrelációs NMR spektrum az egymás melletti C és H atomok jeleinek azonosítására, megkönnyítve a teljes jelhozzárendelést. Azonban egyrészt a kvaterner ^{13}C jelek ebből kimaradnak, másrészt egyéb nehézség is adódhat, pl. a kámfor esetén:



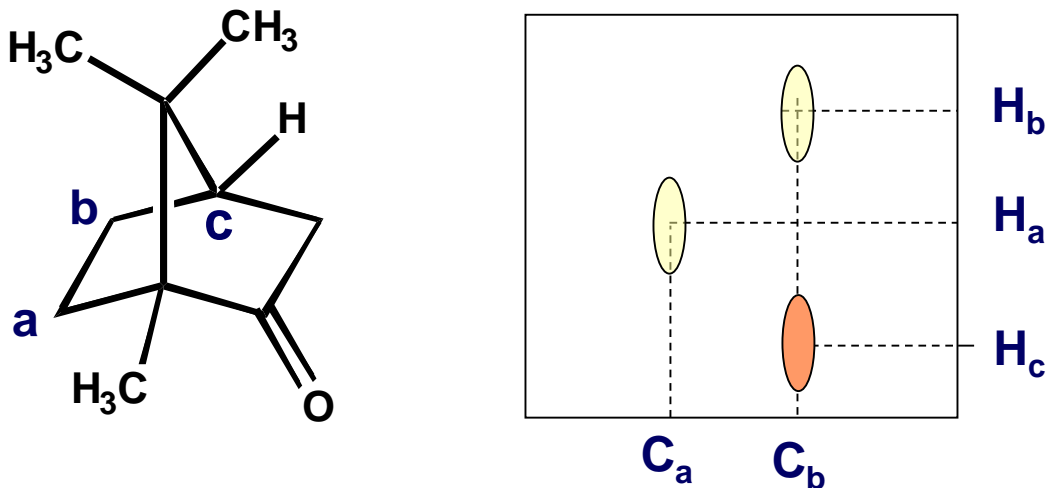
Az **a** és **b** szénatomok jele egy széthúzott ^{13}C - ^1H korrelált spektrumban így néz ki:



Távol-ható heteronukleáris korreláció

Azonban az **a** és **b** szénatomok, és a hozzájuk tartozó protonok is kémiaailag és mágnesesen nagyon hasonló környezetben vannak. Önmagában a heterokorreláció nem segíti jeleik hozzárendelését, a köztük való döntést.

A kérdést eldönthetné, ha meg tudnánk mondani, hogy a két jel közül melyik van közelebb a **C_c** szénatomhoz kapcsolódó metin-protonhoz, melynek jelét az ¹H spektrumban nagy biztonsággal tudjuk azonosítani.



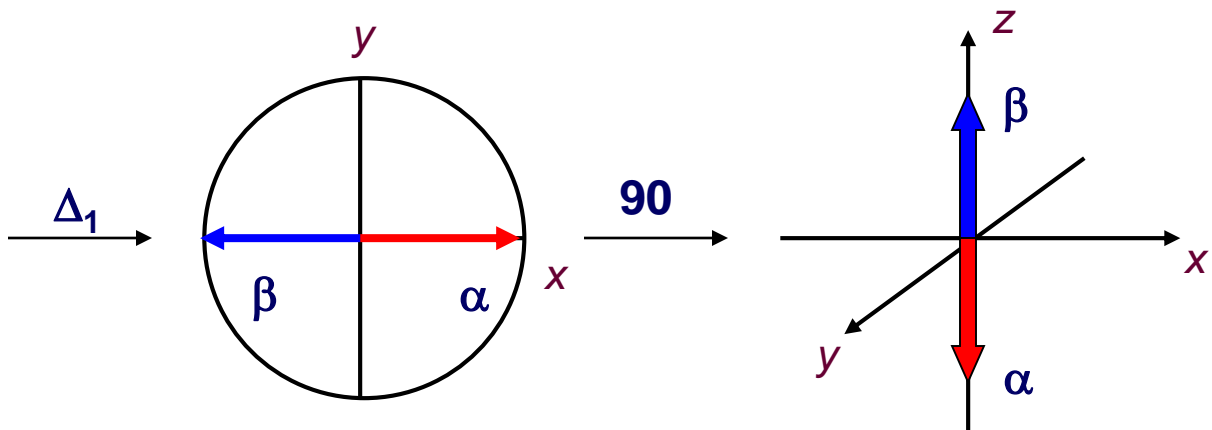
Hogyan lehetne ezt megcsinálni? Elviekben egy egyszerű heteronukleáris korreláció segítségével, melyet most a távol-ható CH csatolásokra optimalizálunk.

A ¹J_{CH} csatoláson kívül a szénatomok jelei a távolabbi protonokkal is csatolnak, legtöbbször a ²J_{CH} és ³J_{CH} csatolásokat észlelhetjük, melyek ca. egy nagyságrenddel kisebbek, abszolút értékük jellemzően 5-20 Hz.

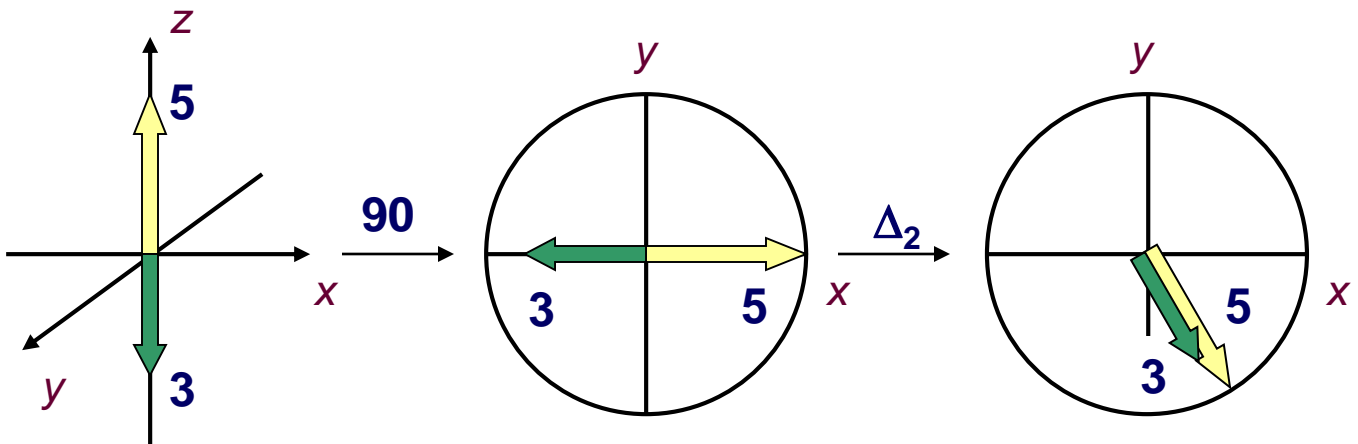
A gyakorlatban azonban számos nehézség lép fel, ha a várakozási időket csak mechanikusan „hozzáigazítjuk” ezekhez a csatolási állandókhöz.

Távol-ható heteronukleáris korreláció

Fontos, hogy belássuk, miért is építettük be a Δ_1 és Δ_2 várakozási időket a pulzusszekvenciába. Emlékezzünk, a cél az anti-fázisú ^{13}C mágneszettségi vektor újrafókuszálása volt. A pulzusszekvencia részlete az ^1H csatornán:



Ugyanakkor a ^{13}C csatornán:

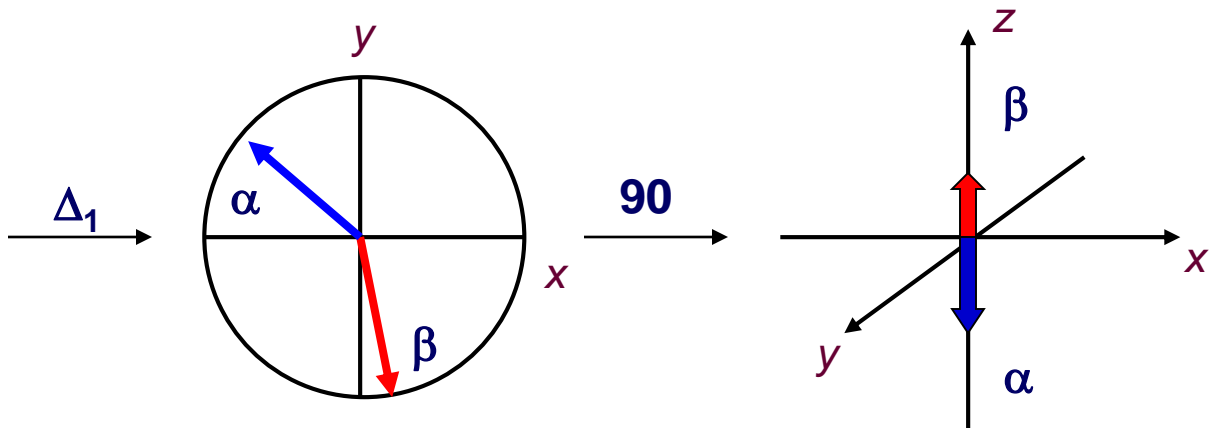


Tehát ahhoz, hogy egy CH (metin) dublett '-3' és '+5' intenzitású vektorai újra találkozassanak, a Δ_1 és Δ_2 várakozási időket $1/2 * ^1J_{\text{CH}}$ értékűre kell választani. Mi van akkor, ha ezeket az időket most $1/2 * ^2J_{\text{CH}}$ értékűnek állítjuk be?

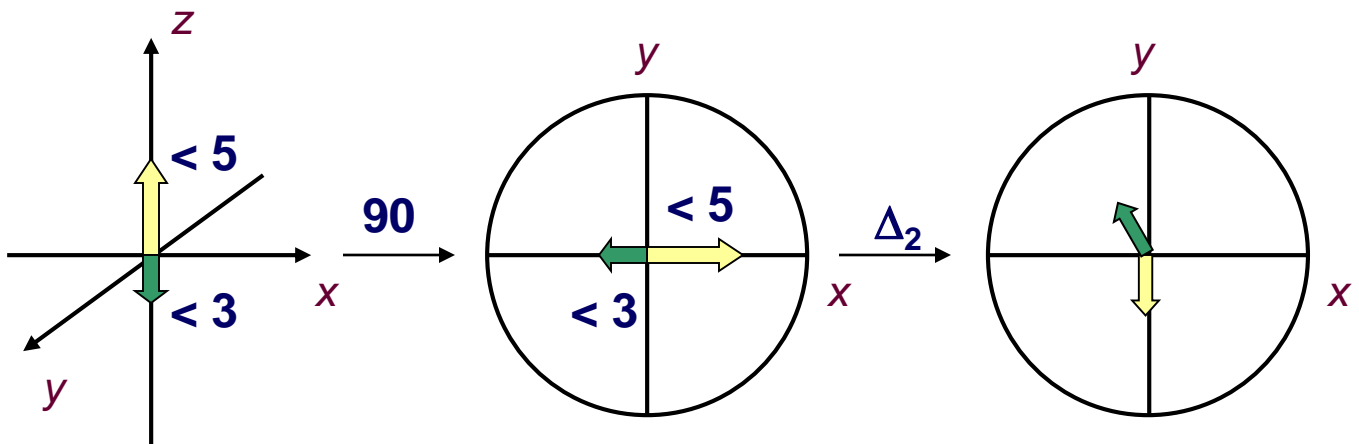
Távol-ható heteronukleáris korreláció

A Δ_1 és Δ_2 várakozási idők jellemző értéke 50 ms lesz, a korábbi 5 ms helyett. Tehát, az anti-fázisú ^{13}C mágneszettségi vektor nem fog az $^1\text{J}_{\text{CH}}$ csatolás hatására újrafókuszálódni, inkább csökkenni kezd.

A refókuszálás ideje alatt az ^1H csatornán ez történik:



A várakozási idők azonban most nem kedvezőek a J-moduláció szempontjából, így nem érjük el az ^1H populációk teljes inverzióját. Ugyanakkor a ^{13}C csatornán:

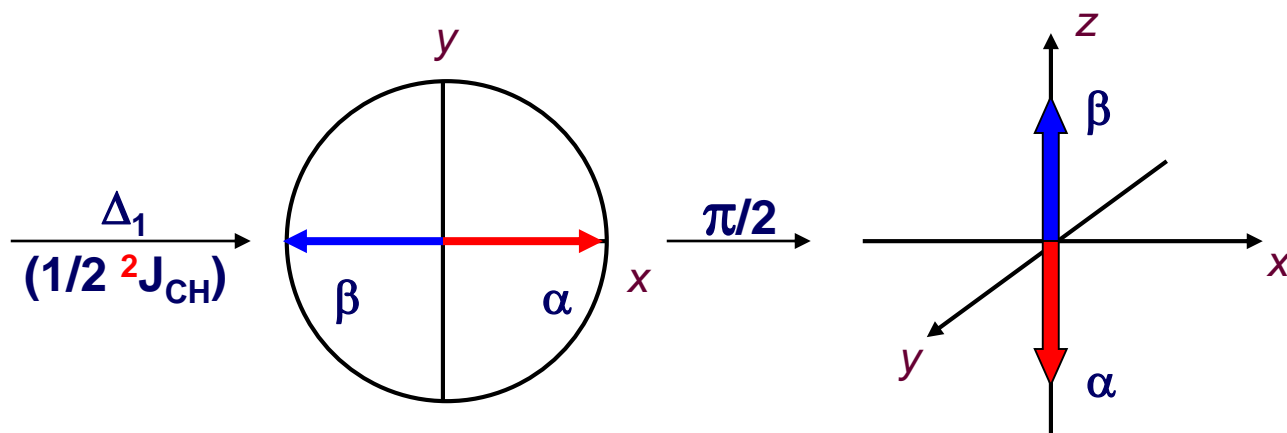


Ezután megtörténik az ^1H csatornán a lecsatolás, azaz azok a ^{13}C vektorok, melyek az $^1\text{J}_{\text{CH}}$ hatása alatt eddig kifejlődtek, eltűnnek.

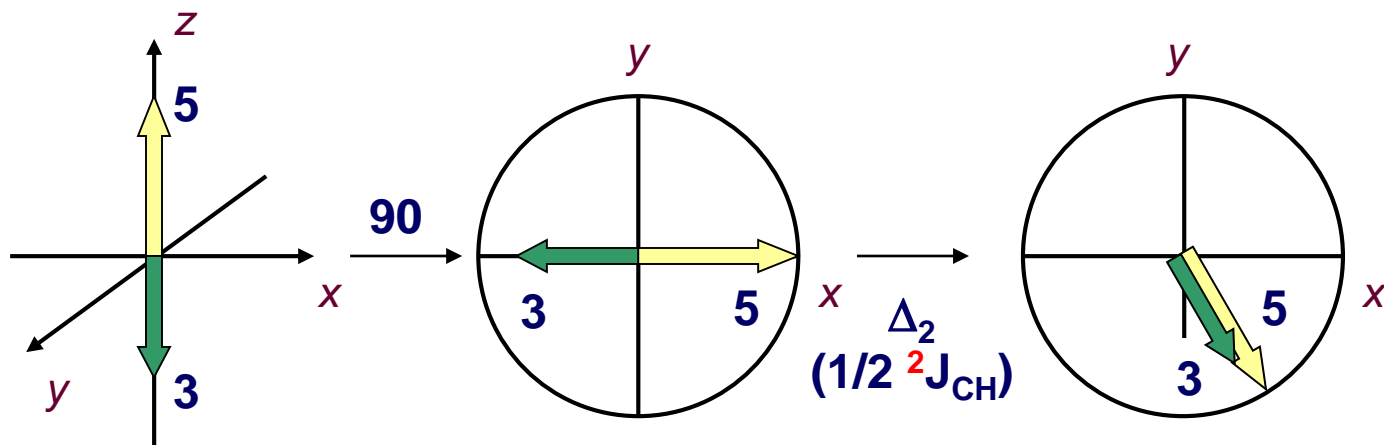
Távol-ható heteronukleáris korreláció

Íly módon, mondhatni, „elnyomtuk” azokat a keresztcsúcsokat, melyek az egy-kötéses ${}^1J_{CH}$ csatolásoktól erednek. Másfelől, azok az anti-fázisú ${}^{13}C$ mágnesszettségi vektorok, melyek a ${}^2J_{CH}$ csatolási állandóknak megfelelő Δ_1 és Δ_2 várakozási idők alatt fejlődtek ki, megjelentek

Az 1H csatornán:



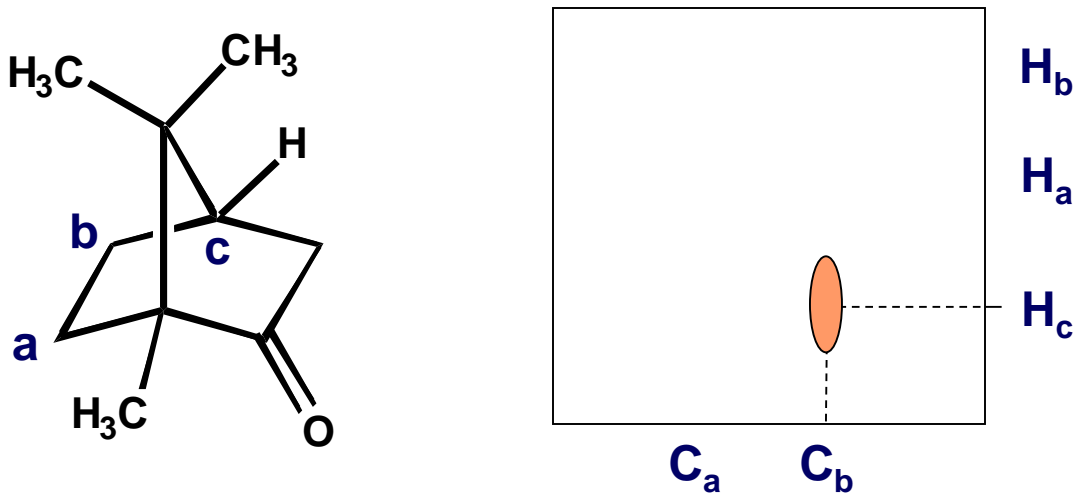
A ${}^{13}C$ csatornán:



Végül is, azok a ${}^{13}C$ jelek, melyek csatolásai a beállított ${}^2J_{CH}$ csatolásnak többé-kevésbé megfelelnek, fognak heterokorrelációt mutatni egy 2D spektrumban, elértük a kítűzött célt.

Távol-ható heteronukleáris korreláció

Amennyiben ezután processzáljuk az adott Δ_1 és Δ_2 értékek mellett felvett heterokorrelációs spektrumot, az eredmény:



Elvileg ez az a kép, amit el szerettünk volna érni, a kérdéses jelhozzárendelés elvégezhető. Azonban néhány további szempontot is figyelembe kell veyünk. Először is, nem tudunk különbséget tenni a ${}^2J_{CH}$ és ${}^3J_{CH}$ csatolások között, mert ezek várható értéke nagyjából ugyanakkora.

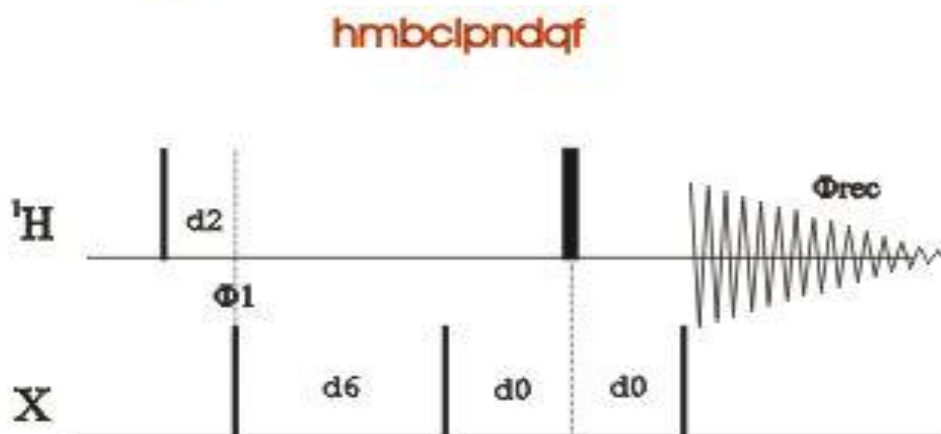
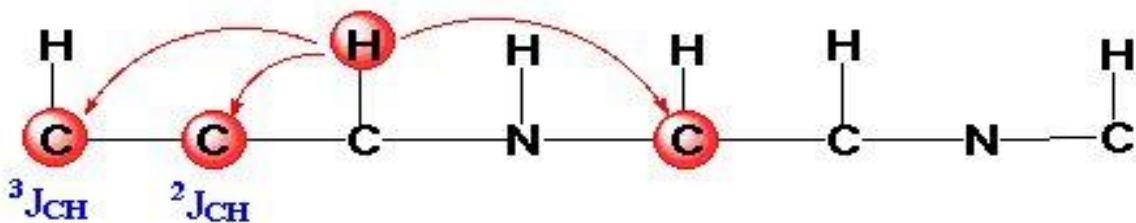
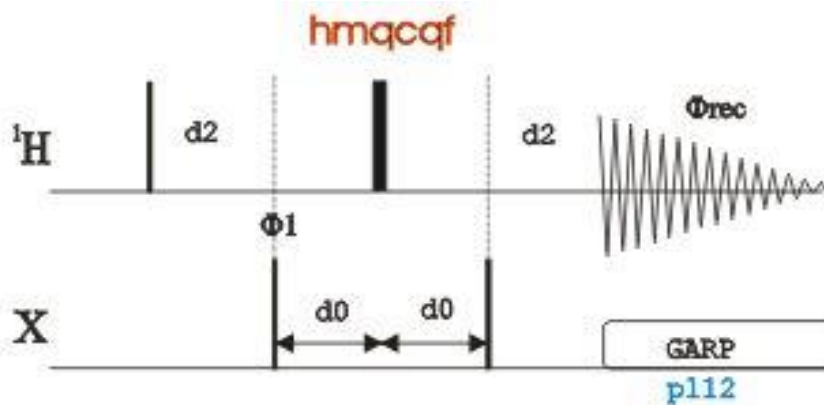
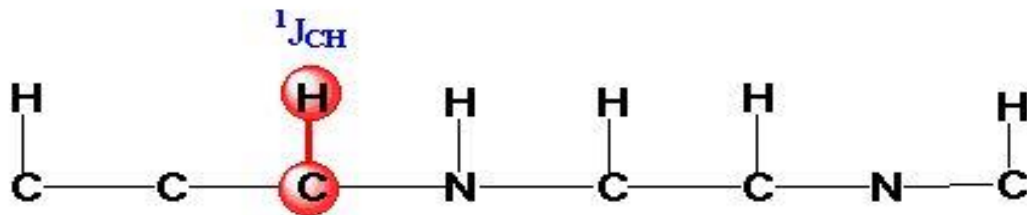
A megfelelő értékű Δ_1 és Δ_2 idők megválasztása egyébként is kritikus, mivel becslésük nagyobb hibával történhet csak meg mint az ${}^1J_{CH}$ csatolások esetén. Másodszor, a beállított hosszú várakozási idők (20-50 ms) alatt az 1H és ${}^{13}C$ spinek relaxációja már nem elhanyagolható, így a spektrum jeleinek intenzitása kicsi lesz, de az 1H relaxáció az inverzió hatékonyságát is csökkenti, ez pedig a korrelációk gyengeségét eredményezi. A nehézségek leküzdésére számos módszert dolgoztak ki, a legtöbb eredményt a protondetektálás (a két csatorna funkciójának cseréje) hozta. A két- és három-kötéses csatolás megkülönböztetésének hiánya azonban a módszernél továbbra is fennáll.

Heteronukleáris 2D NMR korrelációk

Az elmúlt időben egyeduralgokóv váltak a protondetektlt (inverz detektált) módszerek – ehhez meg kellett vlstani az X-mag szélessávú lecsatolstt.

Kisérlet célja	Megvalósítás	F ₂ (FT és detektálás)	F ₁ (FT és lecsatolás)
Egy-kötés korreláció	Hetero-COSY, HETCOR	X (¹³ C, ²⁹ Si, ¹⁵ N...)	¹ H
Több-kötés korreláció	COLOC	X (¹³ C, ²⁹ Si, ¹⁵ N...)	¹ H
Egy-kötés korreláció	HSQC	¹ H	X (¹³ C, ²⁹ Si, ¹⁵ N...)
Egy--kötés korreláció	HMQC	¹ H	X (¹³ C, ²⁹ Si, ¹⁵ N...)
Több-kötés korreláció	HMBC	¹ H	X (¹³ C, ²⁹ Si, ¹⁵ N...)
Kt-kötés korreláció	H2BC	¹ H	X (¹³ C, ²⁹ Si, ¹⁵ N...)

Leggyakoribb heteronukleáris 2D kísérletek napjainkban



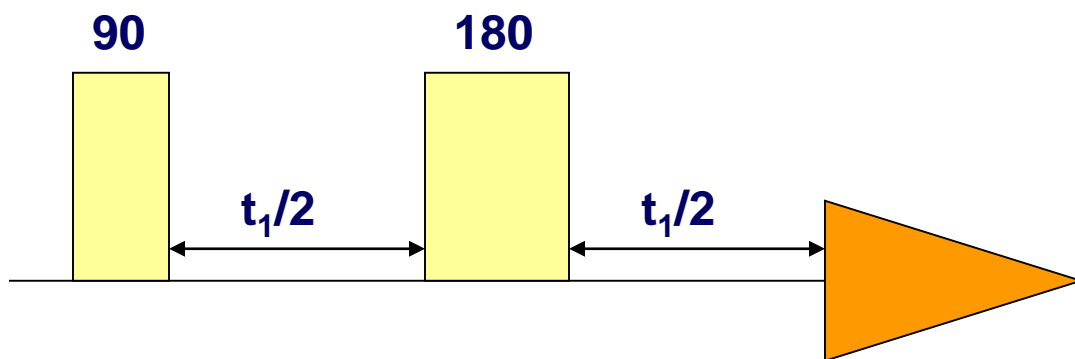
Homonukleáris 2D J - spektroszkópia

Az eddig megismert kétdimenziós módszerek spinrendszerek közötti kapcsolatokat (korrelációkat) mutattak ki. Azonban a 2D NMR kísérletek számos egyéb információ megszerzésére is képesek lehetőséget nyújtani.

A spektrumok (elsősorban az ^1H -NMR spektrumok) értékelésének legnagyobb nehézsége, hogy a spektrumban rengeteg jel fellépése várható, ezek bonyolult csatolási képet mutathatnak, ráadásul egymást is átfedik.

A többdimenziós kísérletek során lehetőség nyílik arra, hogy a kémiai eltolódás és a csatolás külön dimenzióban jelenjen meg, ezáltal a spektrum egyszerűsödik.

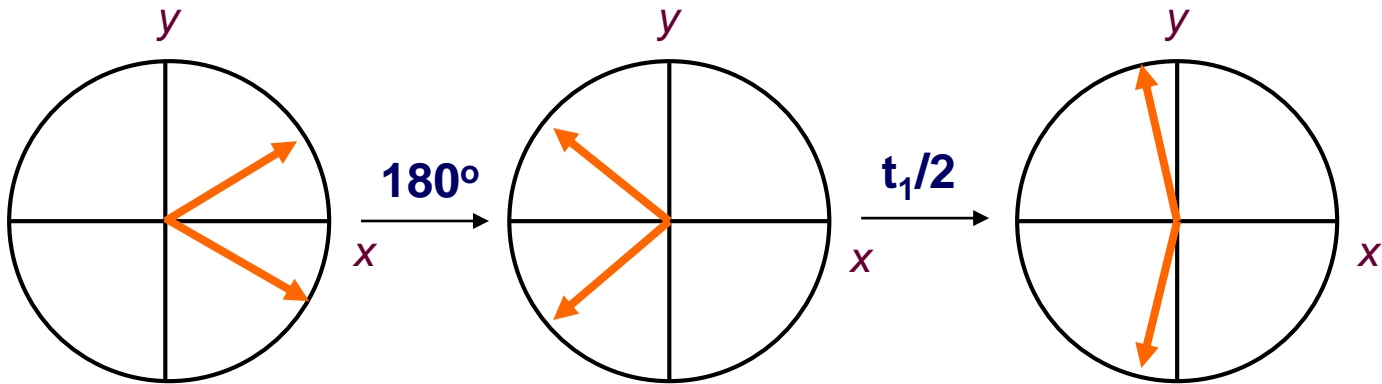
Ennek egyik lehetősége a **2D-J** spektroszkópia, mely homonukleáris és heteronukleáris változatban is ismert. A homonukleáris **J**-spektrum előállításának alapja a spin-visszhang kísérlet.



A szisztematikusan változó t_1 várakozási időt a $\pi/2$ és π pulzus, illetve a π pulzus és a begyűjtési idő közé iktatjuk. A pulzusszekvencia hatását először egy dublett, majd egy triplett jelen vizsgáljuk meg.

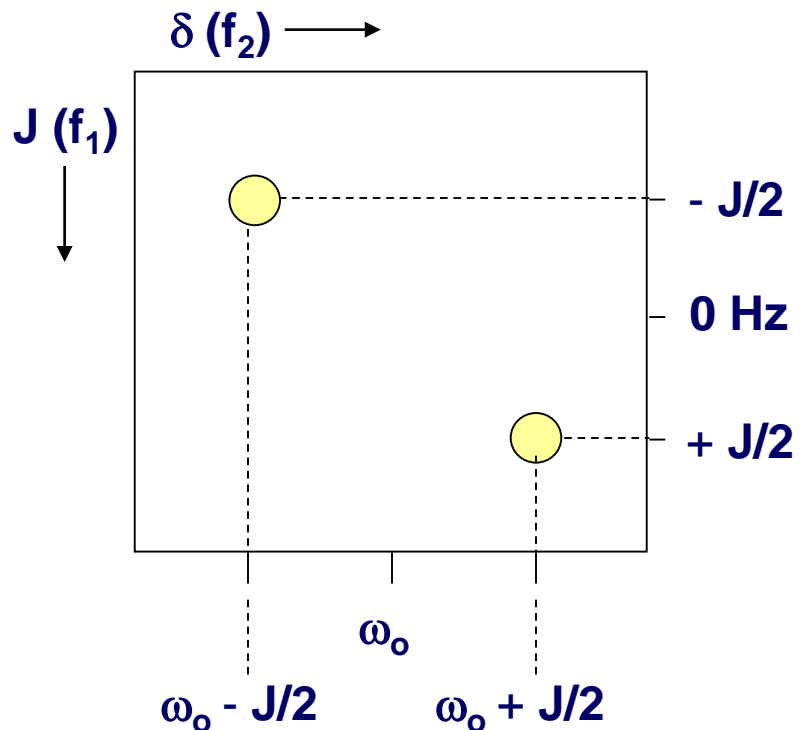
Homonukleáris 2D J - spektroszkópia

A $\pi/2$ pulzus és bizonyos t_1 idő után a két mágnesezettségi vektor fáziseltolódása következik be, a fáziskülönbség $+ J/2 * t_1$ és $- J/2 * t_1$. Egy $t_1 < 1/4J$ idő után



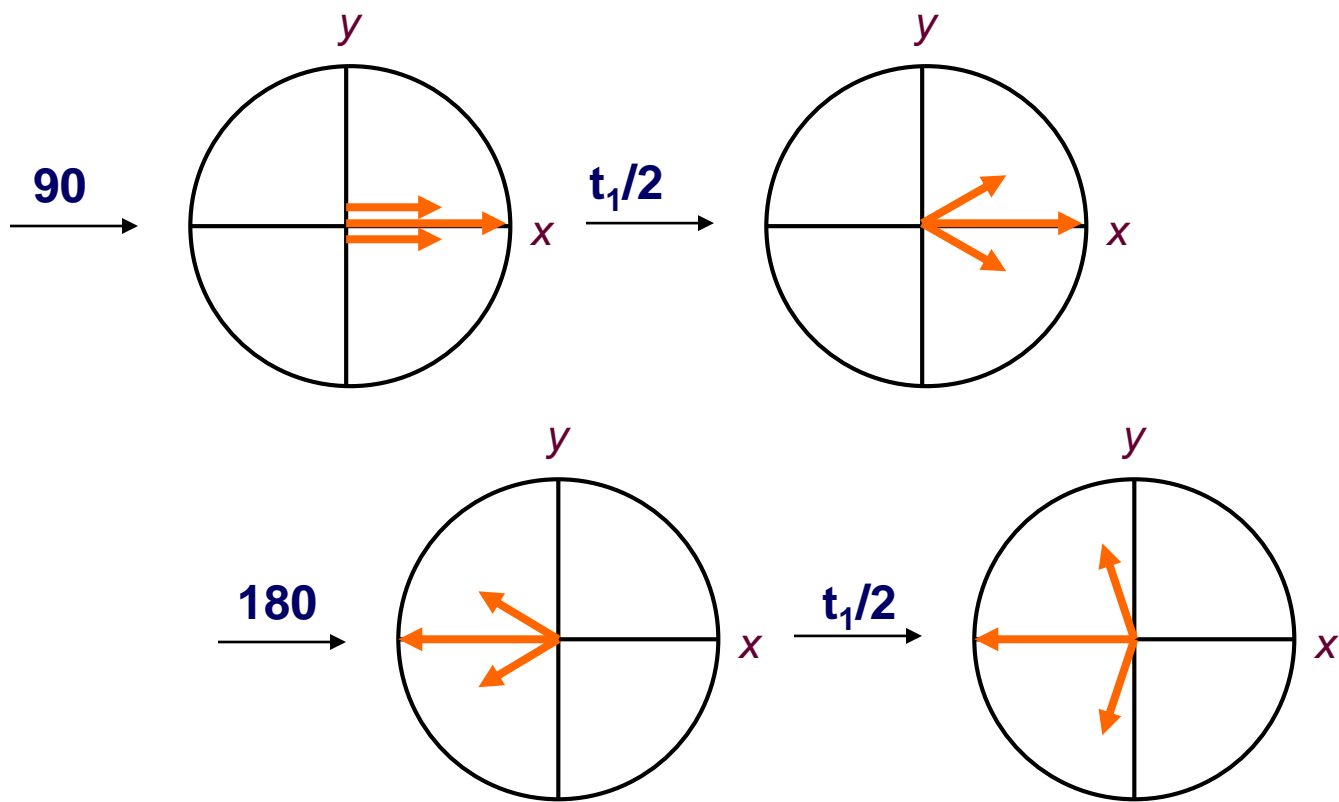
Különböző t_1 értékek után a két vektor (és összegük) a $\cos (J/2 * t_1)$ függvény szerint változik

A kétszeres Fourier transzformáció után így fog kinézni a 2D térkép:

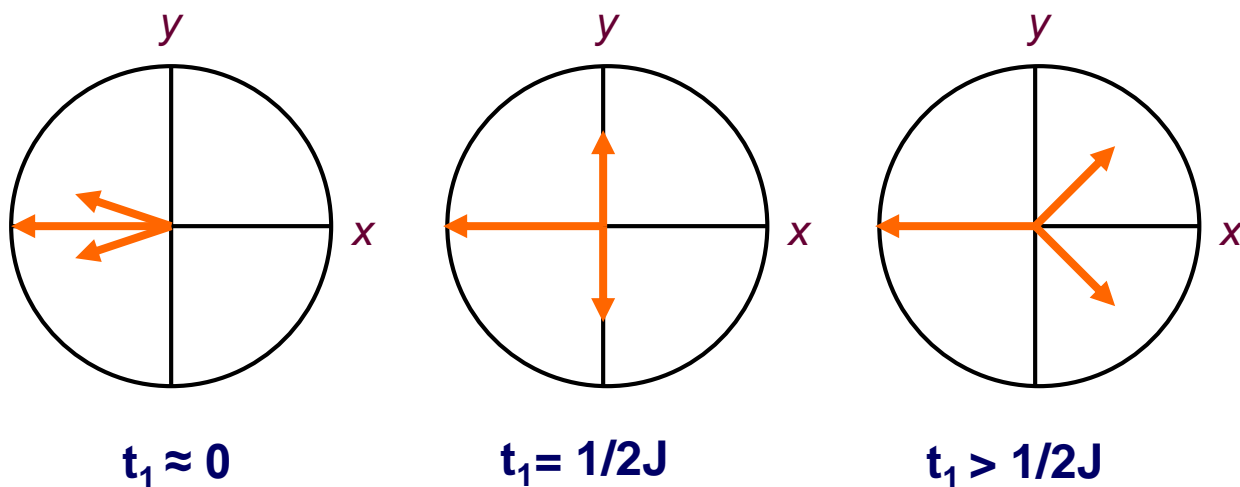


Homonukleáris 2D J - spektroszkópia

Miután a pulzus-szekvencia alapvetően egy homonukleáris spin - visszhang, a kísérletben a kémiai eltolódásokat t_1 időtől függetlenül újrafókuszáljuk. Egy ω_0 Larmor-frekvenciájú, J csatolási állandójú triplett esetén:



Különböző t_1 értékeknél az alábbi képeket kaphatjuk:

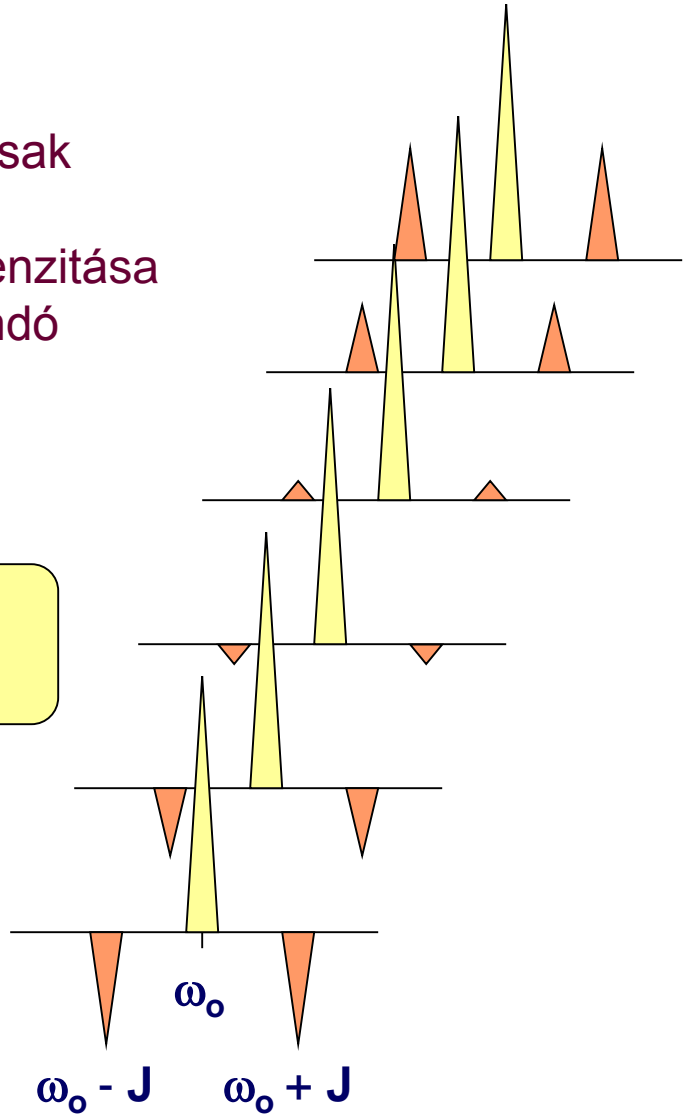


Homonukleáris 2D J - spektroszkópia

A központi vonal intenzitása gyakorlatilag nem változik, csak a relaxáció (T_2) befolyásolja.
A triplett két oldalágának intenzitása a t_1 idő és a J csatolási állandó periodikus függvénye lesz

$$A(t_1) = A_0 * \cos(J * t_1)$$

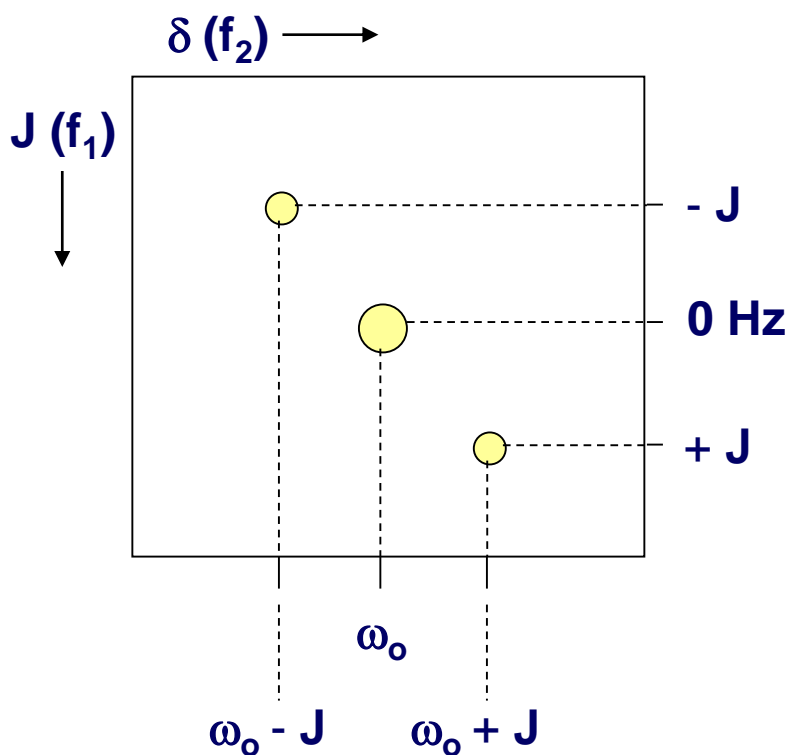
A központi ág esetén $\omega_0 = 0$, mivel pont a Larmor-frekvenciával forog



A t_2 (f_2) dimenzióban (amelyhez a valóságosan mért FID tartozik) megmarad a frekvencia információ, azaz a multiplett közepének kémiai eltolódása.

Homonukleáris 2D J - spektroszkópia

Ha az előző ábrán felrajzolt spektrumokat most másodszer is Fourier transzformáljuk (látható, hogy az amplitudó függvény periodikus) a következő 2D térképet nyerhetjük: Mivel a kémiai eltolódásokat a második t_1 idő után újrafókuszáljuk, az f_1 tengelyen a jelek közepe 0 Hz lesz:

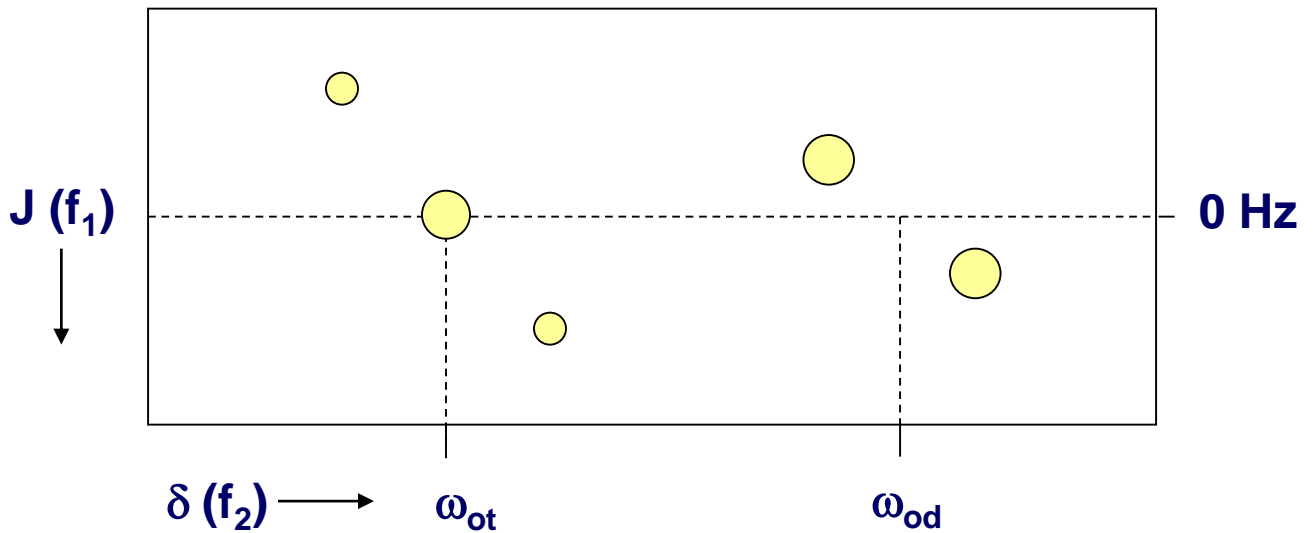


Miután az f_1 és f_2 dimenzióban eltérő információkat nyerünk, ez a 2D térkép sem lesz szimmetrikus.

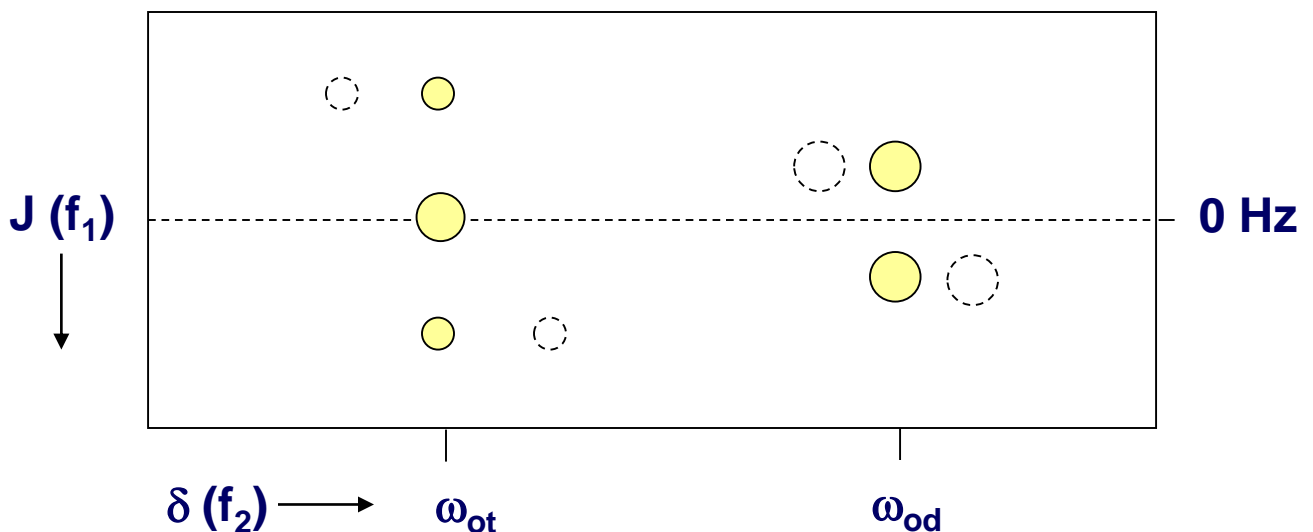
Amennyiben a dublett és a triplett analízise során kapott eredményeket egy 2D térképen egyesítjük a következő ábrát kapjuk (függetlenül attól, hogy csatolnak, avagy nem csatolnak egymással):

2D -J spektroszkópia – elforgatás

A multipliett jelek közepe mutatja a kémiai eltolódást, a J csatolási állandó az f_1 dimenzióban jelentkezik, de a tengelyvetületek értelmezhetetlenek.

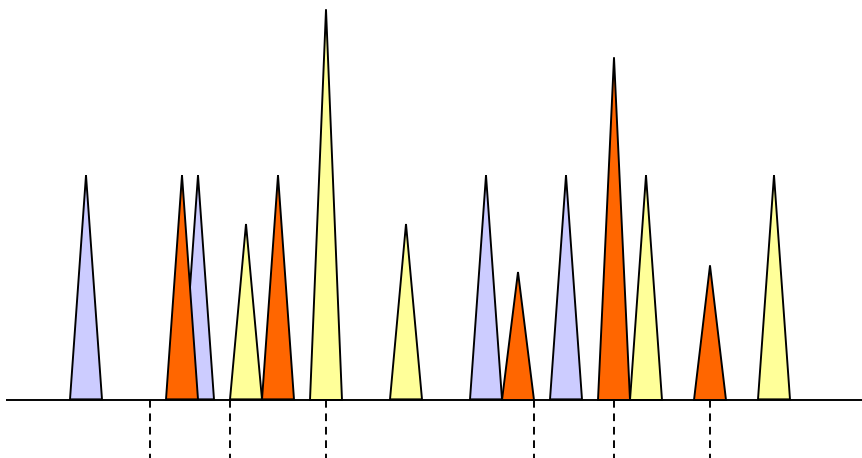


A multiplettek ágai 45° -al vannak elforgatva, a középpontjukon fektetett egyenes mentén, így a csatolás leolvasása sem egyszerű. Matematikailag elvégezhető egy olyan művelet, melylyel a multipletteket elforgatják a tengelyek mentén (*"tilting"*).

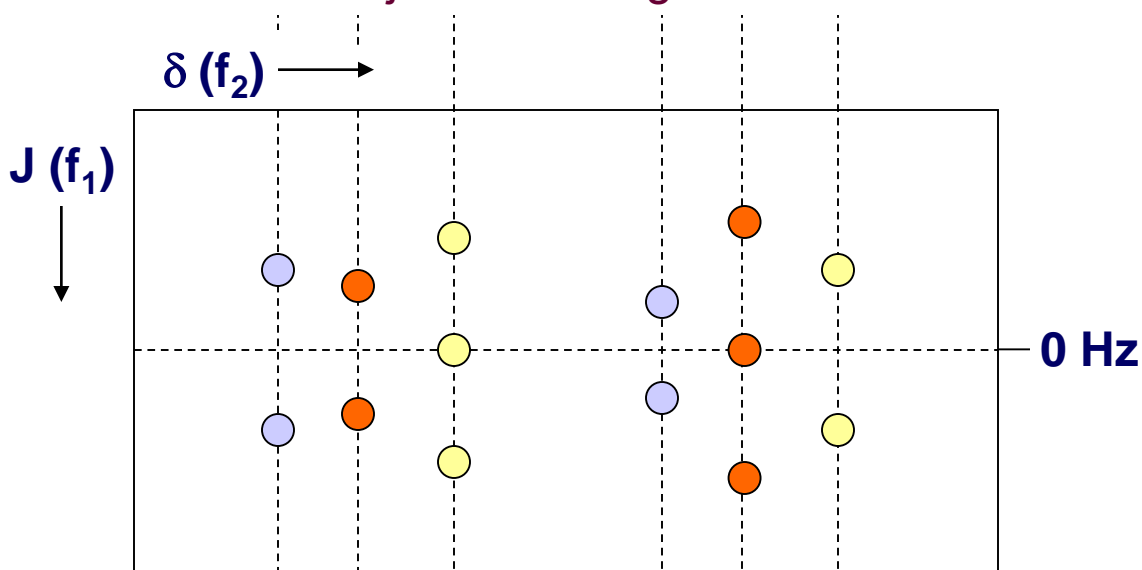


A 2D J – spektroszkópia hasznosítása

A technika előnyei könnyen beláthatóak. Egy nagyon bonyolult, átfedő jeleket tartalmazó 1D ^{-1}H spektrum esetén:



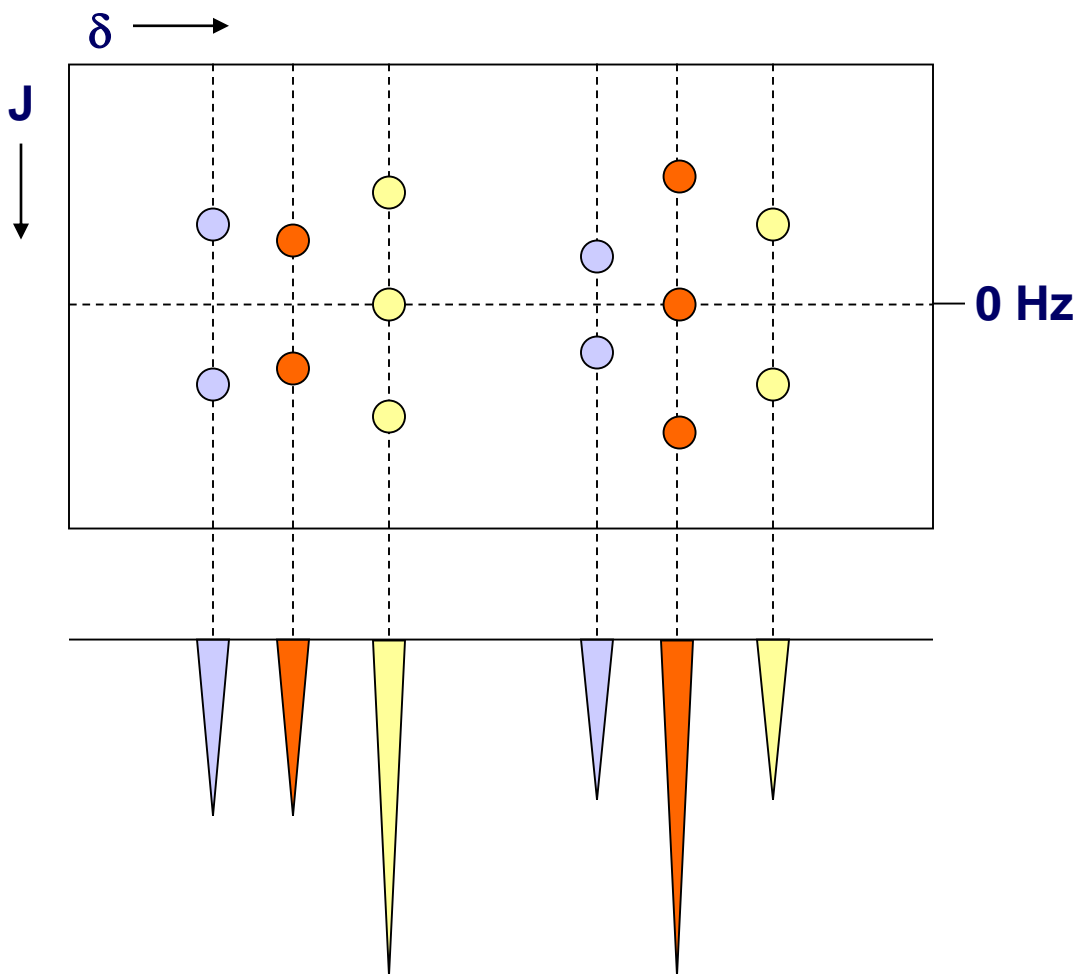
A **2D-J** spektrumban mind a δ kémiai eltolódások, mind a **J** csatolások felbontva jelennek meg:



A δ kémiai eltolódást az f_2 tengely, a **J** csatolási állandó adatokat az f_1 tengely mutatja. Meg kell azonban jegyezni, hogy ez a módszer nem minden bonyolult spektrumra orvosság, hanem csak azokra, ahol a spinrendszerek elsőrendűnek tekinthetők.

A 2D J – spektroszkópia hasznosítása

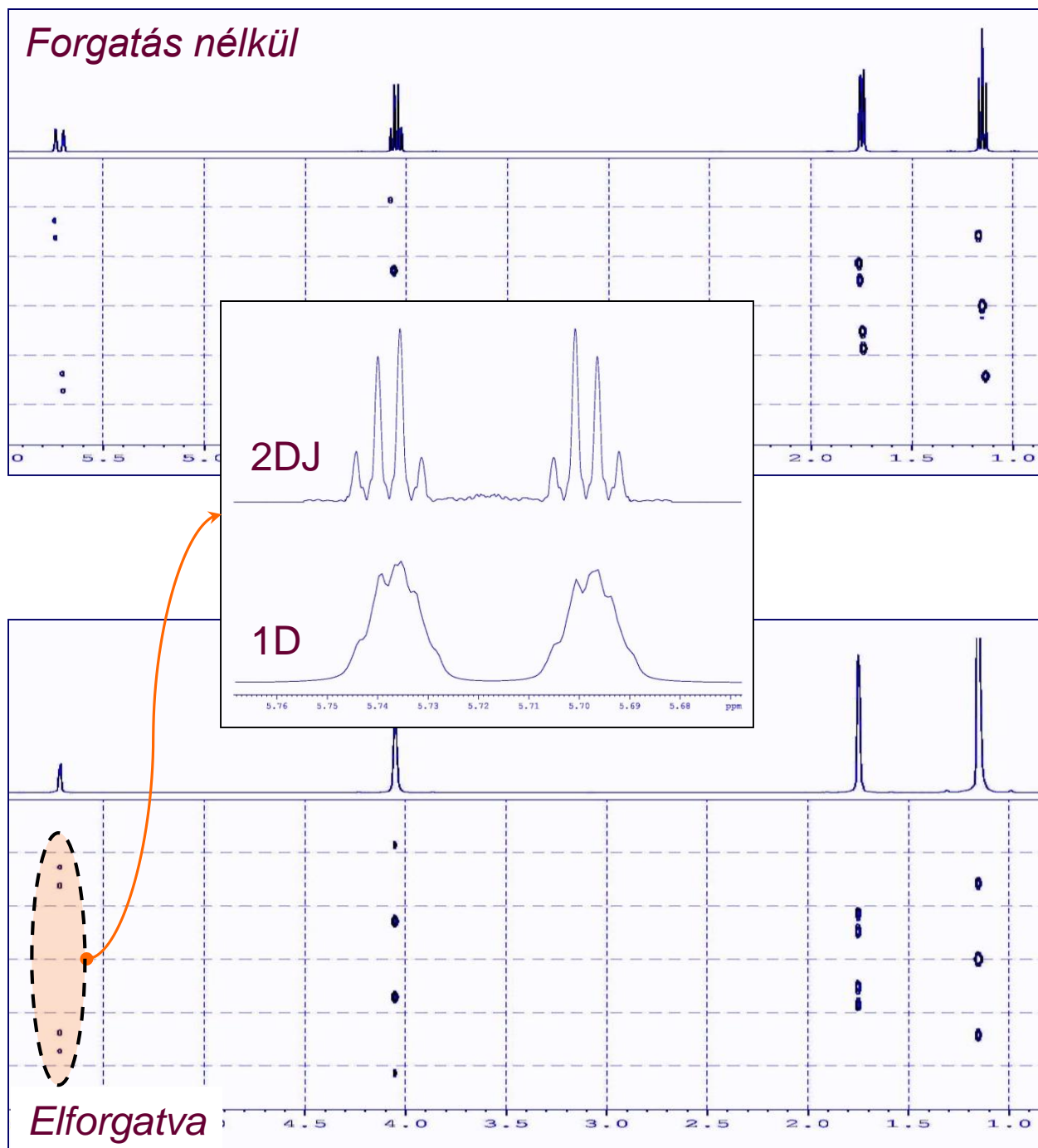
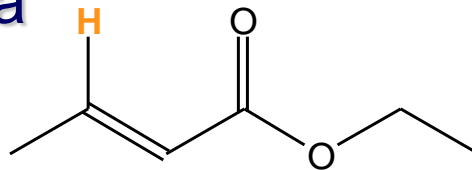
A 2D spektrum kémiai eltolódás tengelyének vetülete tkp. egy teljesen lecsatolt ^1H spektrum, azaz minden ^1H jel szingulettként jelenik meg:



Másrészt, amennyiben 256 vagy 512 t_1 kísérletet végzünk, a kb. 20-30 Hz szélességű csatolási állandó dimenzióban lesz ennyi pontunk. Ez olyan extrém nagy értékű digitális felbontást biztosít, melyet egy hagyományos 1D kísérletben rendszerint nem érünk el. Ezáltal lehetőség nyílik a csatolási állandók értékének nagyon pontos meghatározására

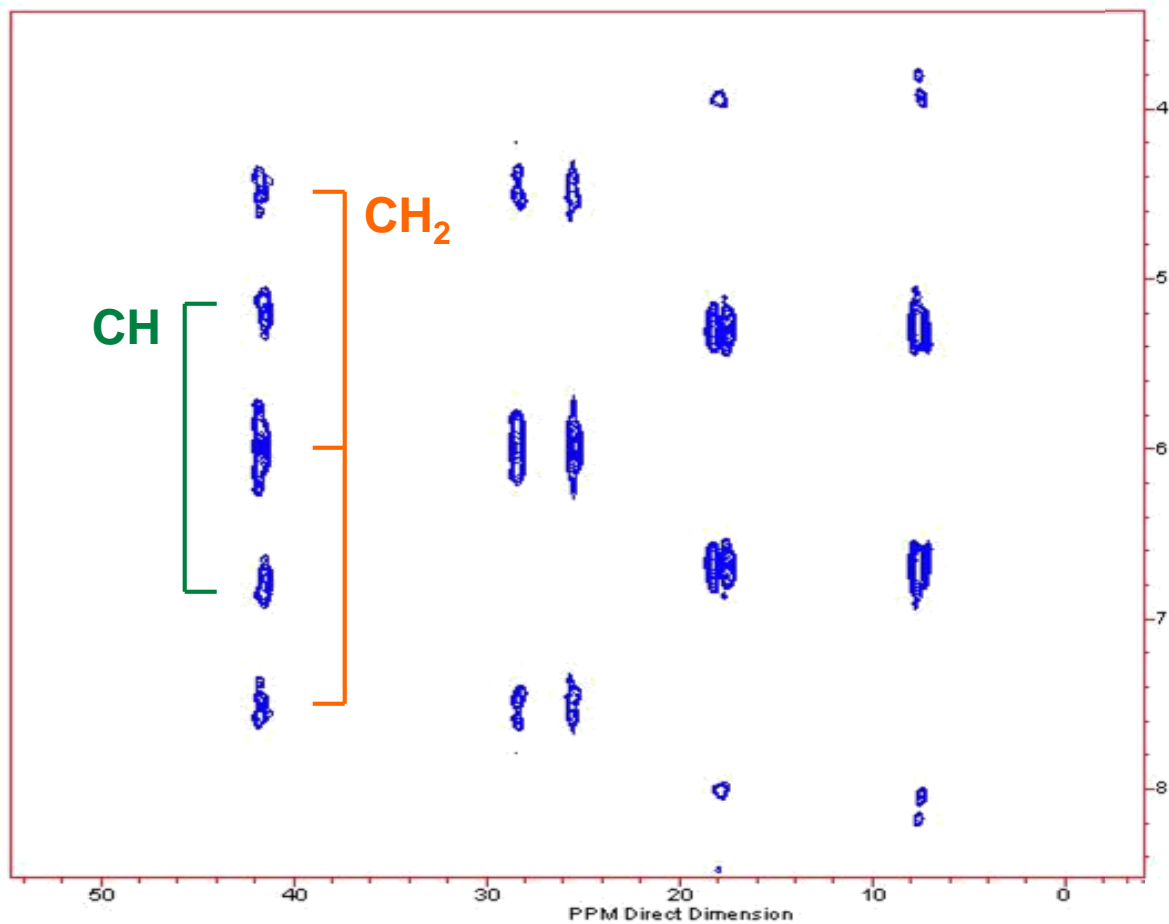
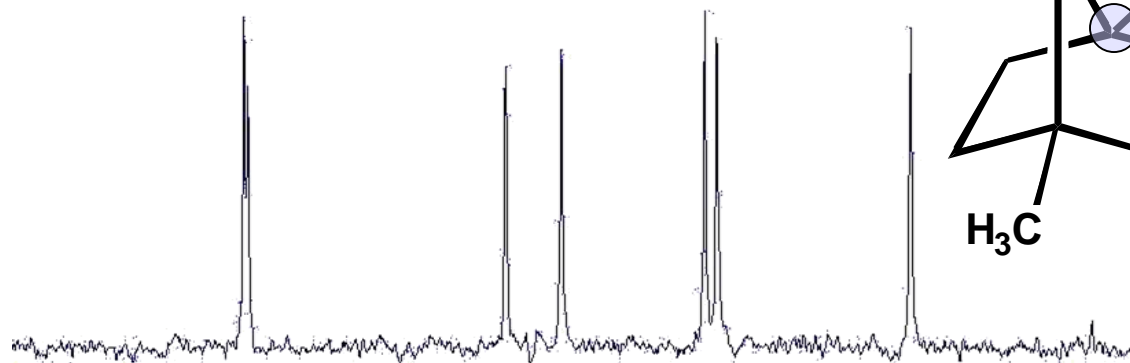
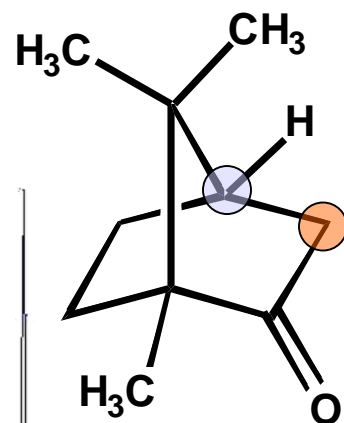
2D -J : egy gyakorlati példa

- Etil-krotonát (400 MHz)



- Jelentős felbontás javulás az **5.7** ppm-es jelen!

Heteronukleáris 2D-J - spektroszkópia

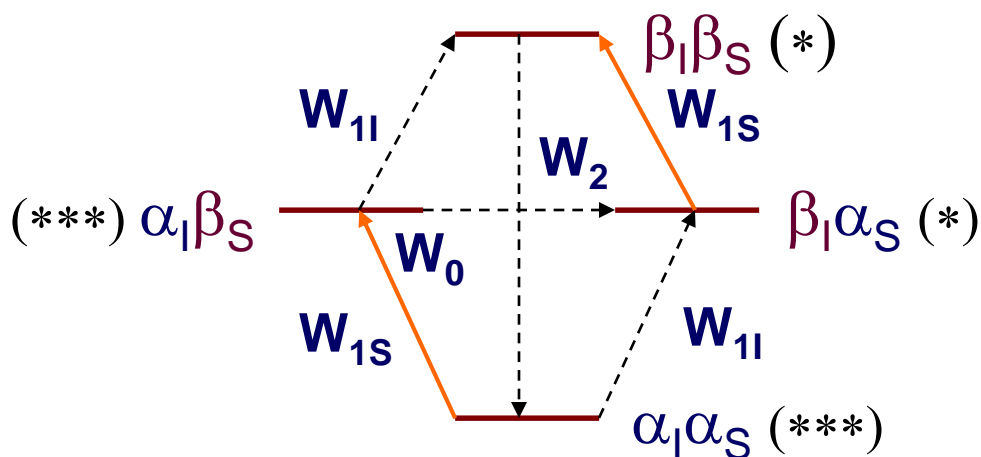


Nukleáris Overhauser Effektus (NOE)

A W_{1I} és W_{1S} átmeneteket befolyásolja a spin-rács vagy longitudinális relaxáció. (alapvetően dipól-dipól kölcsönhatáson keresztül jön létre!)

Belátható, hogy a dipoláris kölcsönhatás okozta relaxáció olyan frekvenciákon jöhet létre, amelyek közeliek az $\omega = \gamma * B_0$, egyenlet által meghatározott frekvenciákhoz. Ezek lehetnek molekuláris mozgások (pl. forgás) és ütközések..

Ha most **telítjük** az **S** spin átmeneteit, akkor energianívói egyenlőek lesznek és így a nívók betöltöttsége is azonos lesz



Ezek után nem jöhetnek létre a W_{1S} átmenetek, hiszen a a nívók között nincs energiakülönbség. Az **S** spinek relaxációjára csak a W_0 és W_2 átmenetek közötti energiacsere biztosít lehetőséget.

Az **S** spin ezen relaxációs folyamatai az **I** spin átmeneteit is befolyásolják. A W_2 átmenet az **I** spin átmeneteihez tartozó jelen intenzitás növekedést, míg a W_0 intenzitás csökkenést idéz elő.

Nukleáris Overhauser Effektus (NOE)

A W_{2IS} or W_{0IS} átmeneteket közvetlenül detektálni nem tudjuk, azonban befolyásolják a spinrendszer relaxációjának lehetőségeit. Az egyik lehetőség akkor lép fel, ha az átmenet gyakorisága kétszerese az ω frekvenciának, a másik akkor, ha ez a gyakoriság közel áll a zérushoz. Az egyik akkor áll fenn, ha a molekulánk mozgékony, a másik ha nagyon lassan mozog. A jelintenzitás változását az ún. **Solomon egyenlet** írja le,

$$\eta = \gamma_I / \gamma_S * \frac{W_2 - W_0}{2 * W_{1S} + W_2 + W_0}$$

- 1) Ha a molekulánk gyorsan mozog (a legtöbb szerves vegyület ilyen) akkor az egyik spin telítése következtében a kettős kvantum átmenetek dominálnak, és ekkor a másik spin jelen mért maximális növekedés γ_I / γ_S . Pl.: az ^1H jelek telítése során (szélessávú protonlecsatolás) a ^{13}C jeleken mért maximális növekedés elvileg ~ 2 szerez
- 2) Ha a molekula mozgása lomha (pl egy fehérje esetében), akkor a W_0 átmenet dominál, a maximális NOE értékek nagysága $-\gamma_I / \gamma_S$. Amennyiben $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NOE effektusokat szeretnénk mérni, az elméleti növekedés $\sim -1!$

Nukleáris Overhauser Effektus (NOE)

Mitől függenek a kvantumátmenetek valószínűségi faktorai?

$$W_1 = \frac{3 \tau_c}{r^6 (1 + \omega_I^2 \tau_c^2)}$$

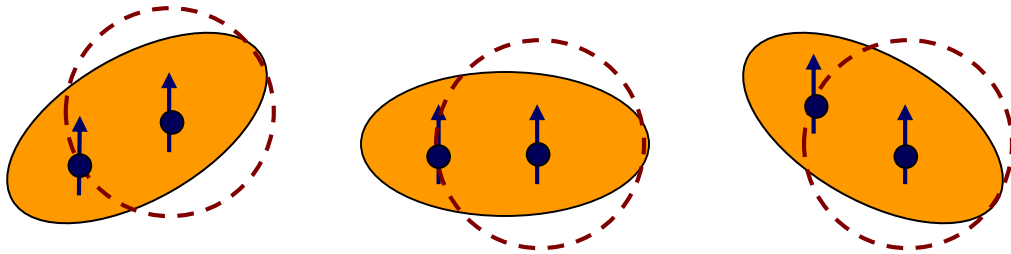
$$W_0 = \frac{2 \tau_c}{r^6 (1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2)}$$

$$W_2 = \frac{12 \tau_c}{r^6 (1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2)}$$

Korrelációs függvények és a spektrális sűrűség

A spinrendszerek energialeadása a környezet (szilárd fázisban: rács) felé attól függ, hogy milyen frekvenciájú kölcsönhatásokban vesznek részt.

Oldatban legmeghatározóbb jelenség a molekula forgása. A spinek a külső \mathbf{B}_0 tér által orientáltak, a forgás a hozzá tartozó frekvenciával mozgó dipólusokat generál. Ez fluktuáló mágneses tereket jelent és ilyen módon nyújt lehetőséget a spineknek az energialeadásra (dipól-dipól relaxáció).



A helyzet leírásához szükségünk van egy, a molekula oldatbeli mozgását leíró függvényre. Definiálhatunk egy ún. **korrelációs függvényt**, mely jellemzi a molekula helyzetét egy adott (t) időpillanatban és egy, azt követő infinitézimális idő ($t + \tau$) elteltével

$$g(\tau) = R(t) * R(t + \tau)$$

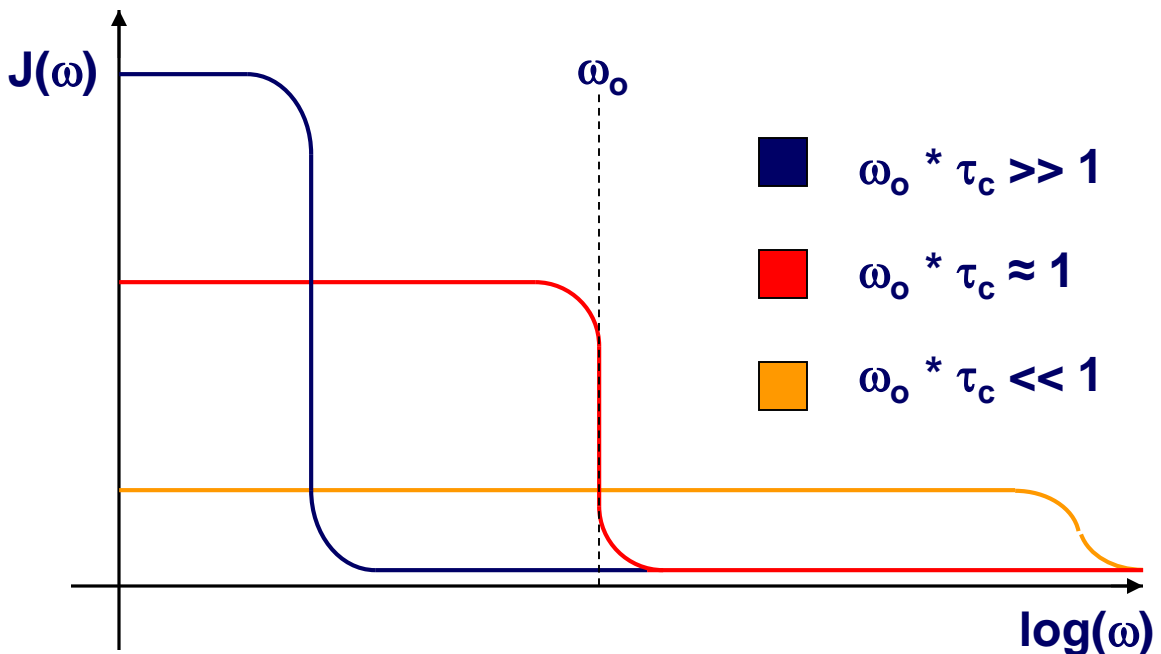
A függvény kapcsolatot teremt a molekula két, különböző időpillanatbeli orientációja között. $g(0) = 1$, és $g(\tau)$ a τ/τ_c aránytól függően exponenciálisan csökken, ahol τ_c a molekula méretét és mozgékonyágát jellemző korrelációs idő.

A spektrális sűrűség-függvény

Általánosan is elmondható, hogy amennyiben ismerünk egy időfüggő jelenséget, a hozzá tartozó frekvenciát meghatározhatjuk a Fourier-transzformáció segítségével. A $g(\tau)$ függvény Fourier transzformáltját **spektrális sűrűség-függvénynek** nevezik ($J(\omega)$). Mivel a $g(\tau)$ időfüggvény exponenciális, a $J(\omega)$ függvény alakja **Lorentz** típusú lesz:

$$J(\omega) = \frac{2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

A τ_c korrelációs idő jellemzi a molekula mozgékonyását, megmutatja, hogy a molekuláris mozgás sebessége milyen komponensekből tevődik össze. Ezek lehetnek a spinrendszer ω_0 Larmor-frekvenciájánál gyorsabb, lassabb, esetleg avval összemérhető frekvenciájúak.



Nukleáris Overhauser Effektus (NOE)

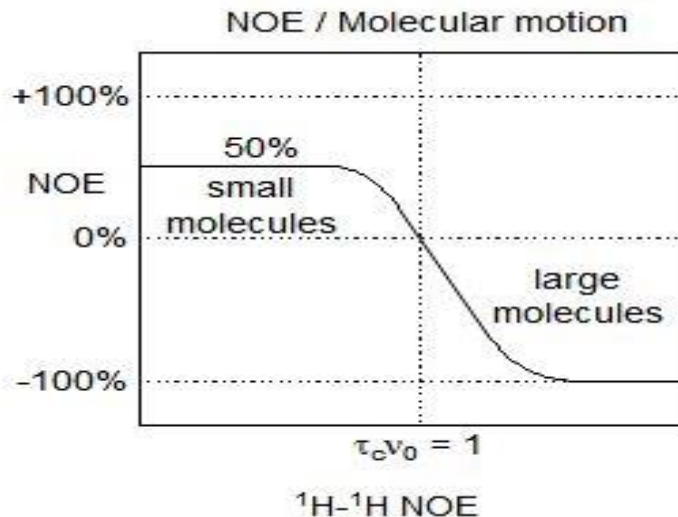
- Mekkora lehet a **NOE** értéke?
- $\omega * \tau_c \ll 1$ – A molekula gyorsan mozog és pozitív intenzitásváltozásokat észlelünk.
extrém keskenyedési tartomány
(kis molekulák, alacsony viszkozitású oldatok)
 $W_2 : W_1 : W_0 \quad 12 : 3 : 2$

Ekkor $\eta = \gamma_I / 2 \gamma_S$
vagyis homonukleáris esetben 0.5
heteronukleáris esetben (pl ^{13}C 1.99)
- $\omega * \tau_c \gg 1$ - A molekula lomha mozgású, negatív jelintenzitásváltozásokat észlelhetünk
diffúziós határ
(fehérjék, viszkózus oldatok)
Ekkor $\eta = - \gamma_I / \gamma_S$
vagyis homonukleáris esetben -1
azaz nincs jel!

Az előbbi elméleti okfejtést részben gyengíti az a tény, hogy a relaxáció nemcsak dipól-dipól kölcsönhatási mechanizmus szerint játszódhat le.

Nukleáris Overhauser Effektus (NOE)

- Mi történik a középmezőnyben?
- A lehetőségek számbavételhez két paraméter együttes hatását célszerű figyelembe venni, egyik a spinrendszer rezonanciafrekvenciája, másik a molekula mozgékonyága, az un. **korrelációs idő** τ_c .
- $\omega * \tau_c \ll 1$ – A molekula gyorsan mozog és pozitív intenzitásváltozásokat észlelünk.
extrém keskenyedési tartomány
(kis molekulák, alacsony viszkozitású oldatok)
- $\omega * \tau_c \gg 1$ - A molekula lomha mozgású, negatív jelintenzitásváltozásokat észlelhetünk
diffúziós határ
(fehérjék, viszkózus oldatok)
- $\omega * \tau_c \approx 1$ - Középtartomány, lehetnek olyan helyzetek, hogy a mért NOE közelít a zérushoz. Közepes molekulák esetén az alkalmazott térerő „okos” megválasztása nagyon lényeges lehet. Most nem biztos, hogy a B_0 növelése a jó megoldás!



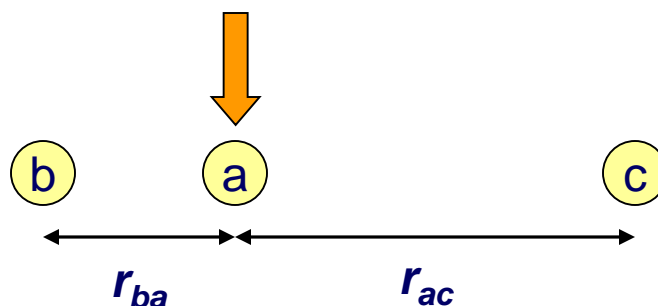
Állandósult állapotú (steady-state) NOE

Kisméretű, merev molekulákra igazak a következő feltételek:

$$\begin{aligned}(\omega_I - \omega_S) * \tau_c &\ll 1 \\ \omega_I * \tau_c &\ll 1 \\ \omega_S * \tau_c &\ll 1 \\ (\omega_I + \omega_S) * \tau_c &\ll 1\end{aligned}$$

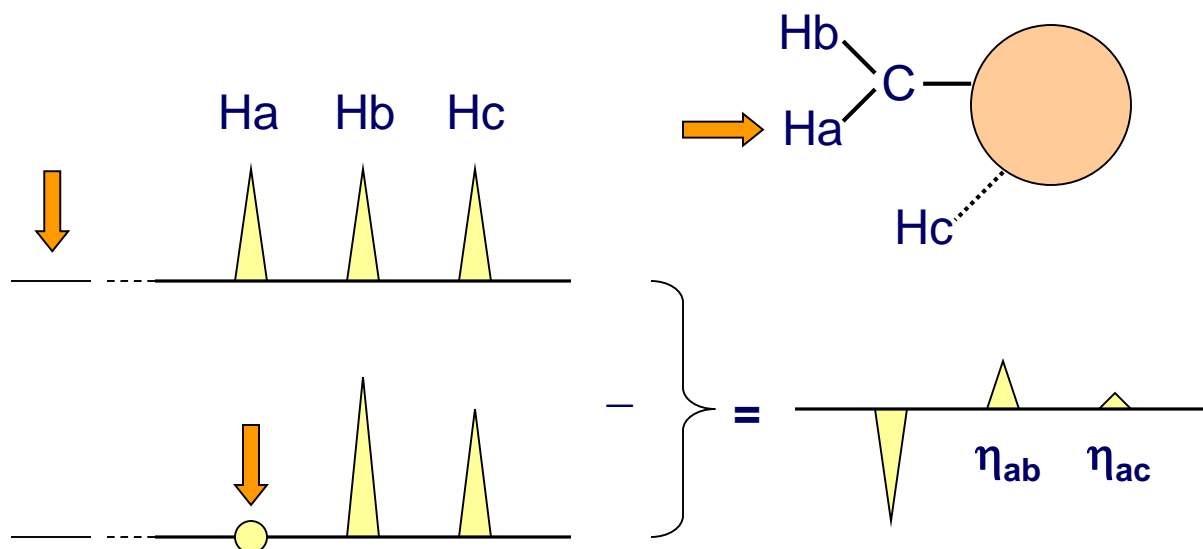
Ezek a molekulák viszonylag gyorsan mozognak. A fenti feltételek teljesülése esetén a kvantumátmenetek valószínűségi egyenleteiben (a **W** értékekben) egyszerűsítéseket hajthatunk végre, és így pl. az ^1H - ^1H NOE értékének maximális értéke $\eta_I = 0.5$ – nek adódik

Azonban, ha csak egy kétszín-rendszerünk van nincs sok értelme „geometriáról” beszélni. A NOE effektus r_{IS}^{-6} távolságfüggését akkor tudjuk szerkezeti információvá alakítani, ha az effektusokat egy molekula egészében értelmezzük. Amennyiben egy proton jelét szelektíven besugározzuk, ez a proton a molekula több más protonjával is - ezzel egyidőben - **dipoláris kölcsönhatásba** kerül.



NOE differencia spektroszkópia

Ha már van egy molekulában három proton, melyek közül kettőnek a távolsága rögzített (pl. egy CH₂ csoport elemei):

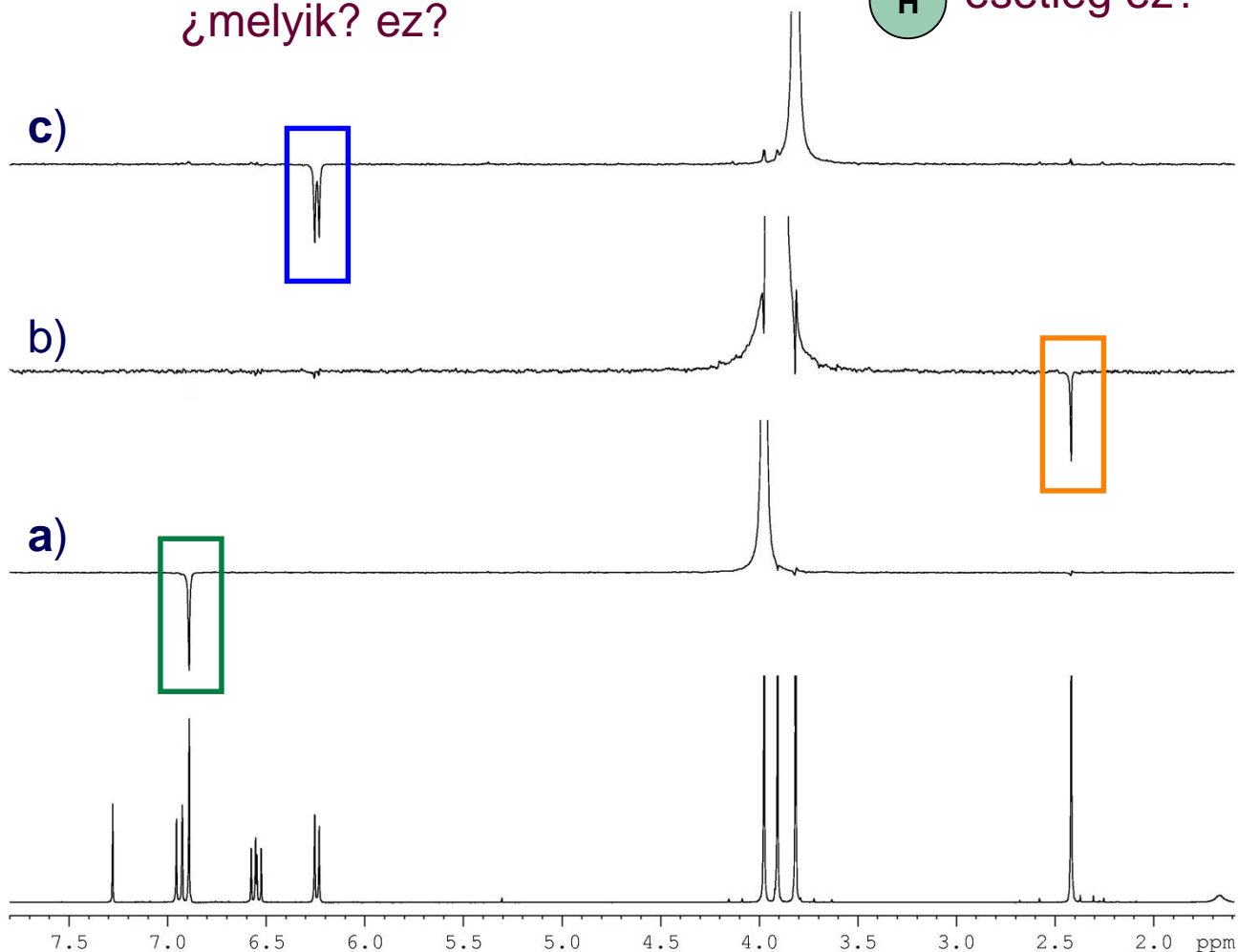
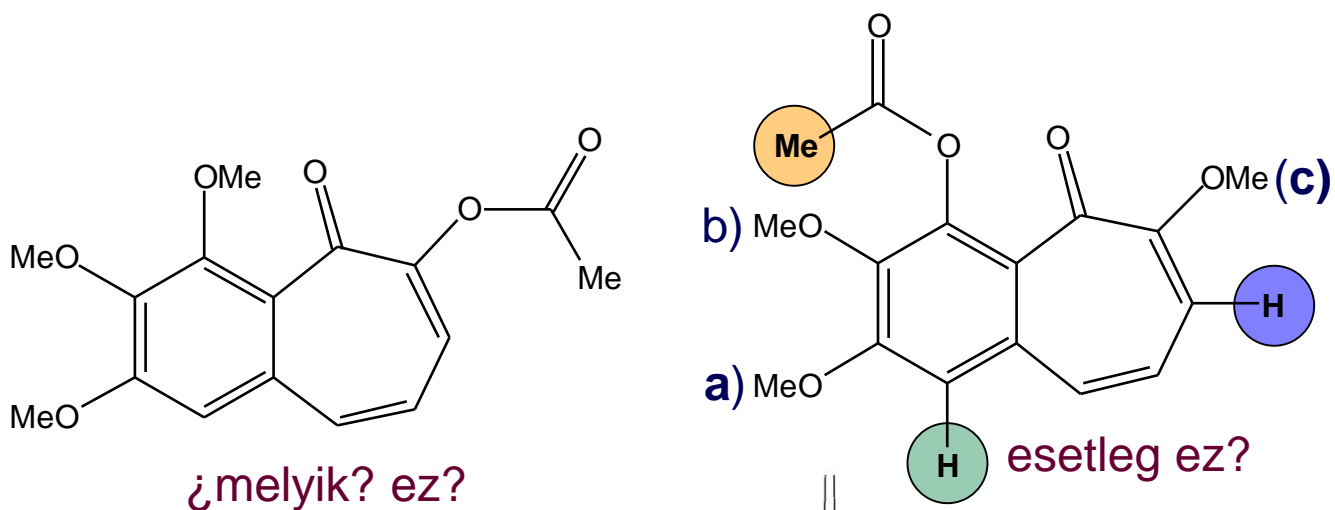


Miután van egy referenciának tekinthető protonpárunk (**H_a** és **H_b**) melynek távolságát ismerjük, van egy kiindulópontunk, amely alapján ki tudjuk számítani a másik (többi) protonoktól való távolságukat. (pl. a **H_a** és a **H_c** hidrogénatomok távolságát):

$$\left. \begin{array}{l} \eta_{ab} \propto r_{ab}^{-6} \\ \eta_{ac} \propto r_{ac}^{-6} \end{array} \right\} r_{ac} = r_{ab} * (\eta_{ab} / \eta_{ac})^{-1/6}$$

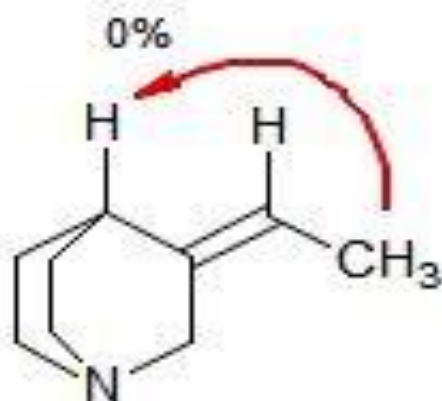
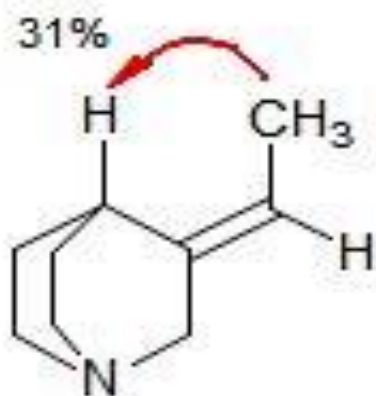
A csúcsok területei a különbségi spektrum jeleinek integrálása során kapott értékek (a besugárzott jel intenzitása: -100%). A NOE effektus nem szimmetrikus, tehát az **I** → **S** növekmény nem azonos az **S** → **I** növekedéssel.

NOE - differencia spektrum: egy példa

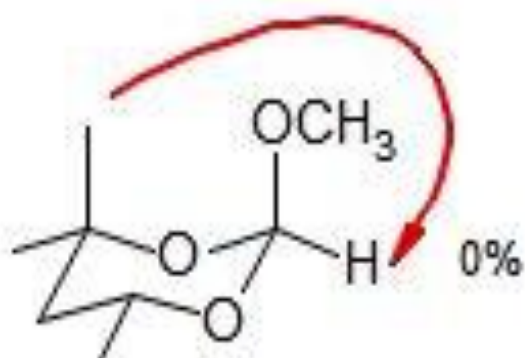
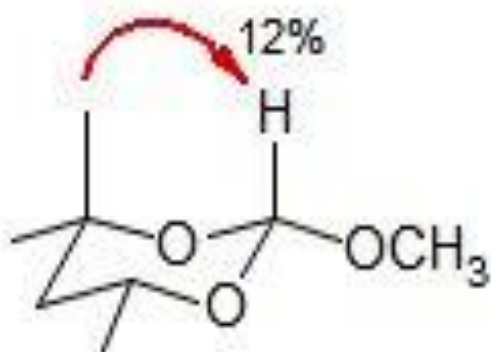


Trimetilpurpurogalin acetát szerkezetének bizonyítása: az izomer szerkezetek közti döntés alapja az 1D-NOE differencia spektrum

NOE: további példák

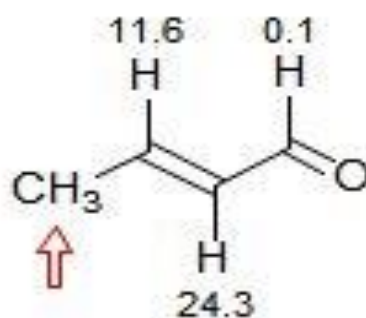
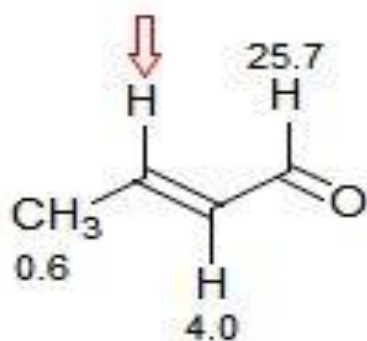
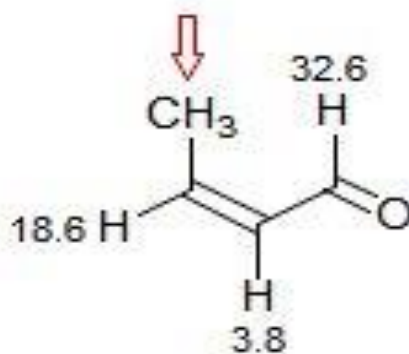
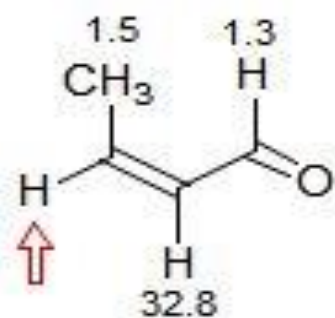
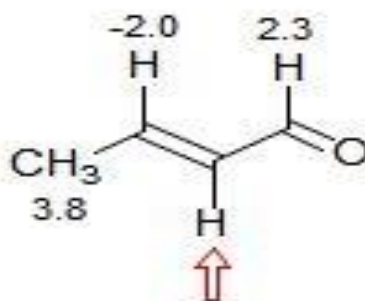
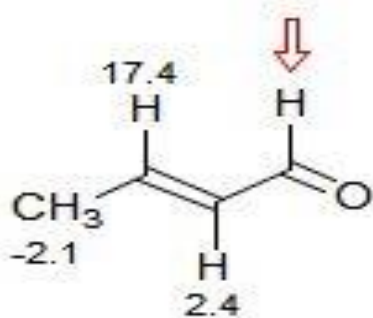
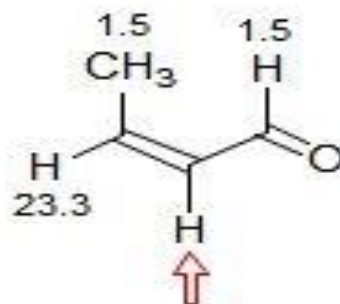
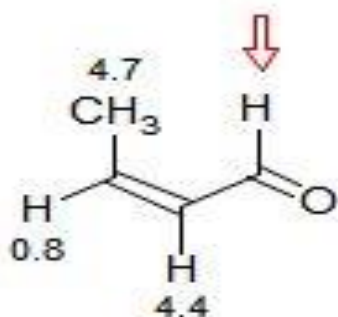


Assignment of E/Z stereochemistry
Tet. Lett. **1967**, 4065



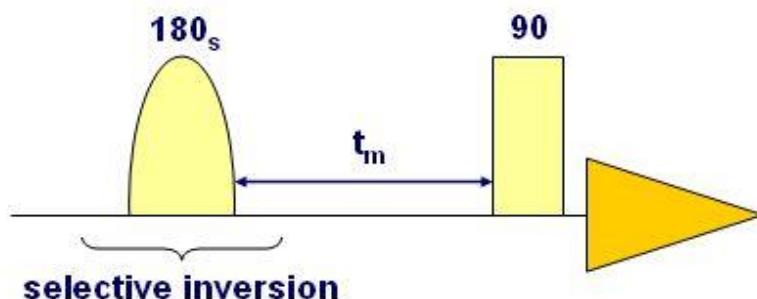
Assignment of stereochemistry

NOE: még további példák



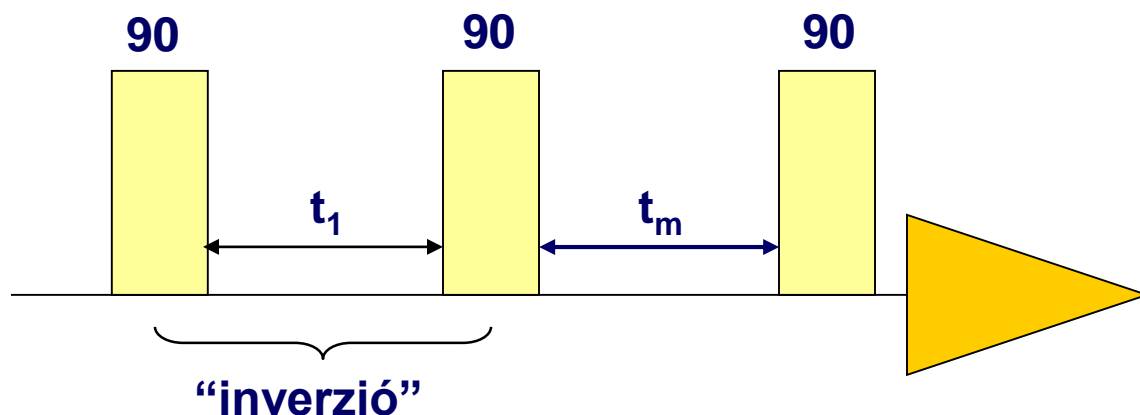
1-D NOE és NOESY

Az 1D méréshez szükséges egy szelektív inverzió (általánosan besugárzással valósítják meg), majd a keverési idő után egy ún. „kiolvasó” $\pi/2$ pulzus



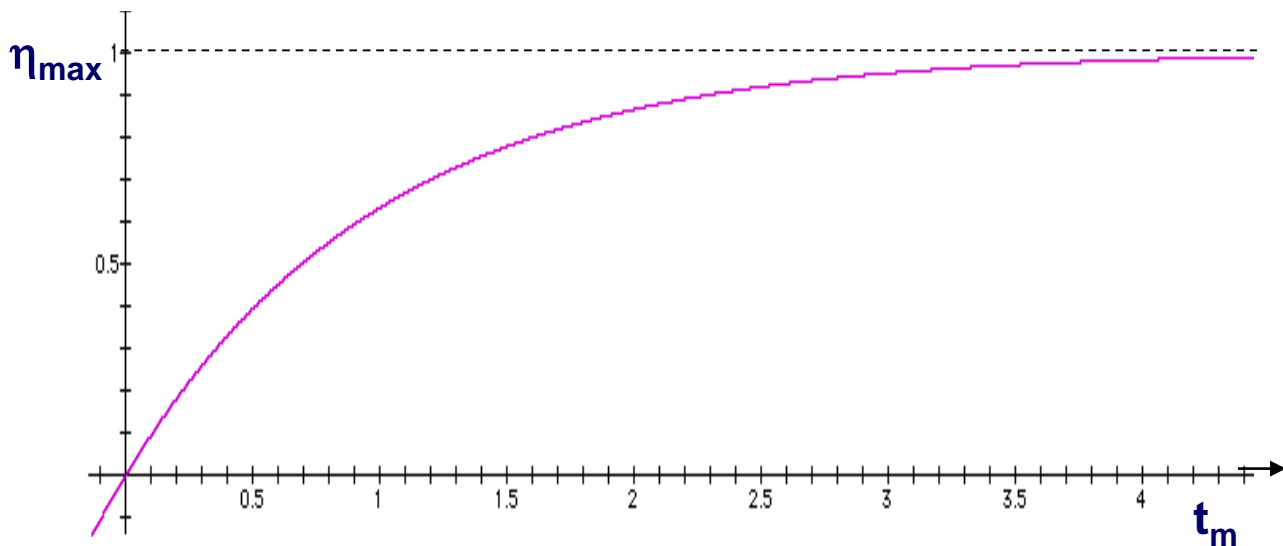
A t_m keverési idő optimumának helyes megállapítása a kísérlet sikeres kivitelezésének fontos alapja.

Emlékezzünk most az INEPT kísérletnél tanultakra! Ott a szelektív pulzust egy alkalmas fázisú $\pi/2$ - $\pi/2$ pulzuspárral helyettesítettük. Ha kétdimenziós kísérletet szeretnénk végezni, akkor egy, a kísérletben alkalmazott várakozási időt (t_1) inkrementálni kell. Az alábbi pulzusszekvencia a kétdimenziós NOE kísérlet, a **NOESY** (**NOE Spectroscop Y**). Eredményében abban különbözik a COSY spektrumtól, hogy itt nem a **J** csatolás által, hanem a **dipoláris kölcsönhatás** által kapcsolatban levő (tehát térközeli!) protonok jelei fognak keresztcsúcsot mutatni.

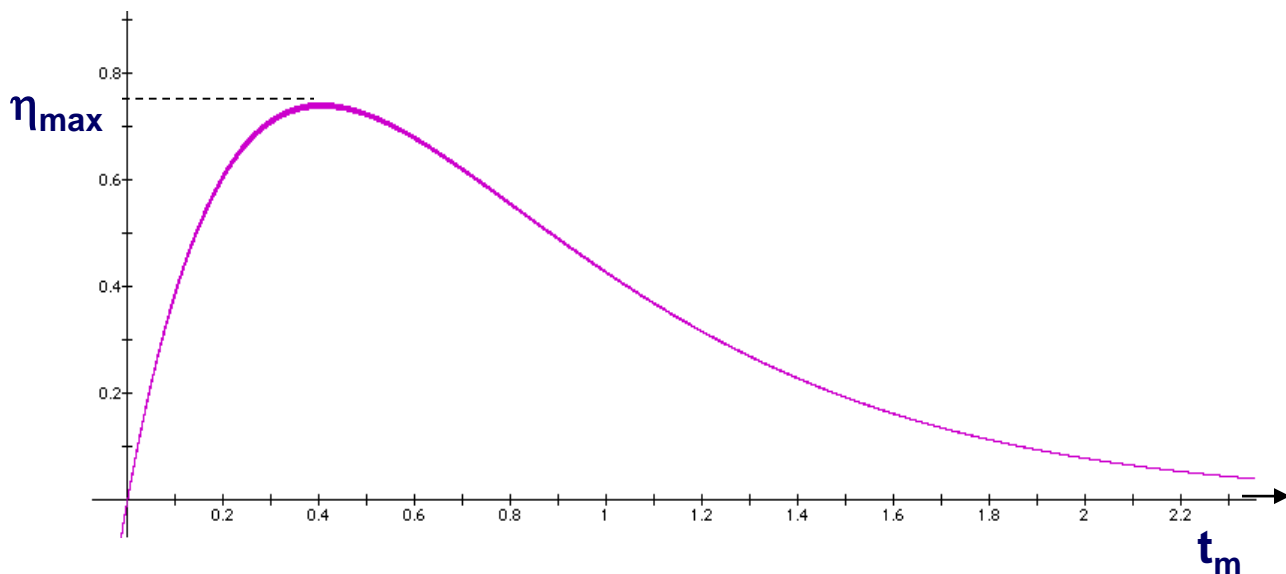


Állandósult állapotú és tranziens NOE

Különböző t_m keverési idő mellett végzett kísérletek megmutatják a **NOE** felépülés sebességét, mely két izolált proton és megfelelő kísérleti körülmények mellett egy exponenciális függvény szerint megy végbe, η_{\max} -értékének eléréséig

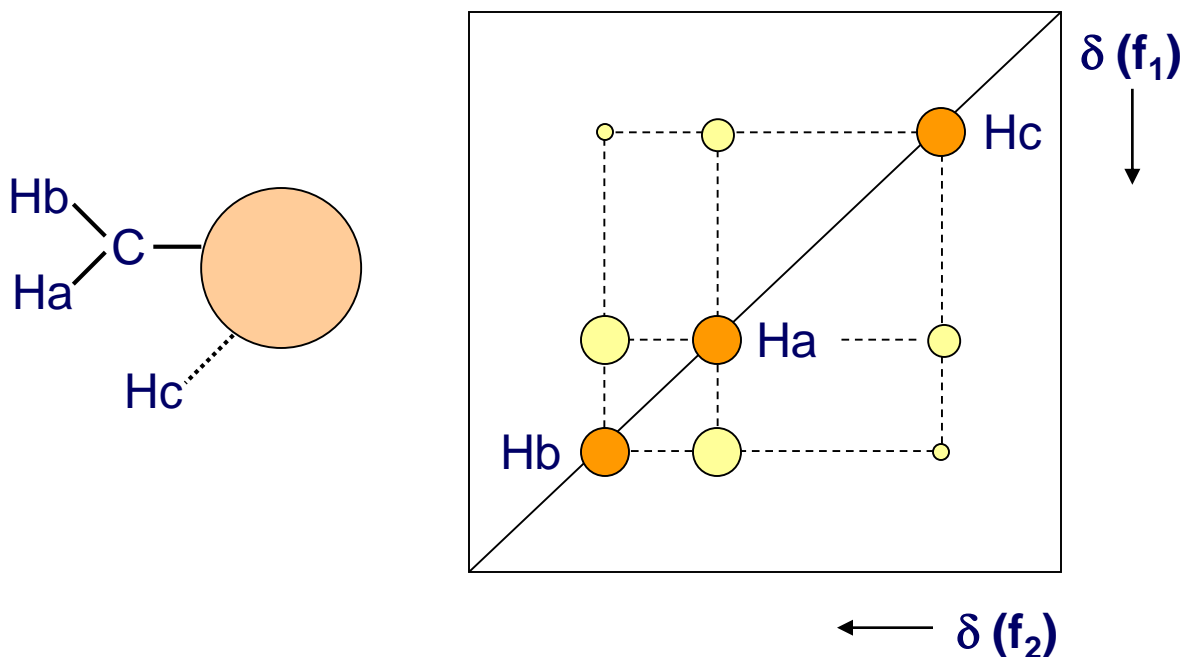


Amennyiben a T_1 és T_2 relaxációt is figyelembe vesszük, az észlelt NOE egy ideig növekszik, azután zérus értékre csökken, minden mágneszettségi vektor a z tengely irányába áll vissza.



NOESY

Az első két $\pi/2$ pulzus (az inkrementált t_1 idővel) az összes protonjel inverzióját szolgálja, ahol minden kémiai eltolódás és csatolás információ megmarad – nem történik refókuszálás. A kétszeres Fourier transzformáció után a kapott szimmetrikus 2D térkép tartalmazza a kémiai eltolódás és csatolás információkat (a diagonális tkp. az 1D ^1H spektrum), a keresztcsúcsok pedig a keresztrelaxációban részt vevő, dipolárisan csatolt spinekhez tartozó jelek között jelennek meg. A NOESY mérés és az adatok feldolgozása mindig ún. fázisérzékeny módban történik, azaz a 2D térképen a szintvonalak magasságot és mélységet egyaránt jeleznek. (mint a térképen a hegyek magassága és a tavak, tengerek mélysége)



A keresztcsúcsok nagysága a magok közti távolság függvénye. Térfogati integrálokat kell mérnünk, és hasonlóan az 1D módszerhez, szükséges egy ismert magtávolság a többi távolság számításához.

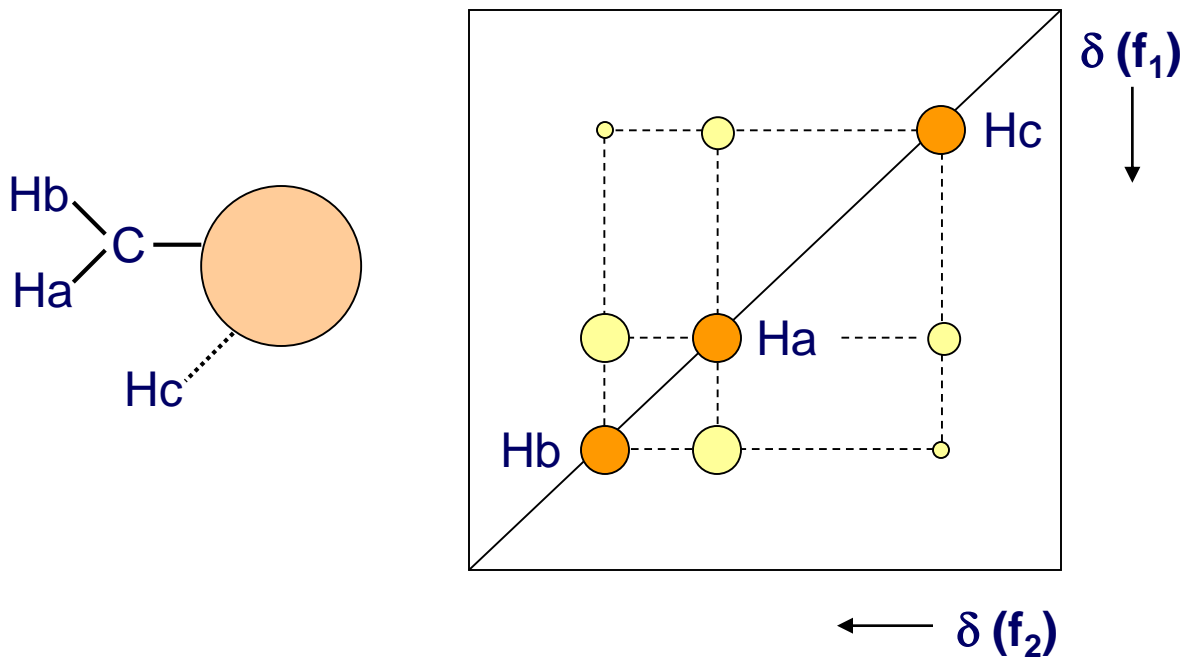
NOESY

A NOESY spektrum értékelése:

ha a diagonális csúcsok pozitív fázisúak (a spektrum fázisát így állítjuk be - konvenció)

- (+) NOE csúcsok negatív irányba mutatnak
- kémiai csere csúcsok pozitív irányba mutatnak
- de! (-) NOE csúcsok is negatív irányba mutatnak

- Erősen csatolt rendszerek esetén mesterséges COSY csúcsok is megjelenhetnek



A mért NOE effektusok lehetnek intramolekulárisak (híg oldat) de bizonyos esetekben intermolekulárisak is. (pl. oligomerek, asszociátumok fennállása esetén)

A NOE mérése (NOESY vagy differencia spektrum?)

Mintaelőkészítés és mérés

- Lényeges a megfelelő térerő gondos megválasztása ($\eta \neq 0$)
- Oldat : oldószer gondos megválasztás, paramágneses szennyezők (oxigén!) eltávolítás
- Mérés során nem ajánlott a minta forgatása

1D differencia spektroszkópia

- Előzetes meggondolás szükséges (mely protonok érintettek?)
- Gondos kísérlettervezés (multiplettek lecsatolása)
- Kvantitatív eredményt kapunk (nem kölcsönös!)

NOESY

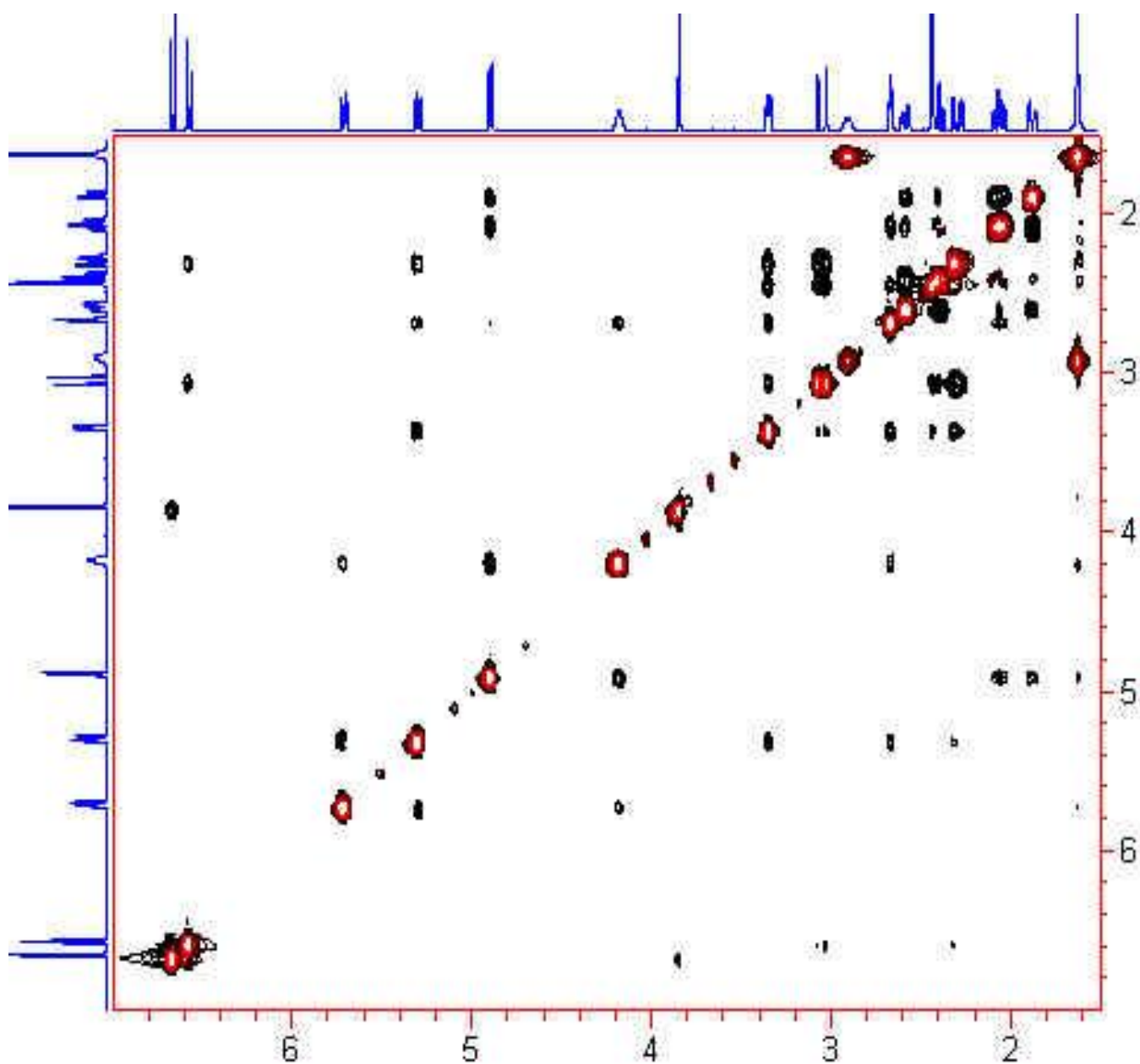
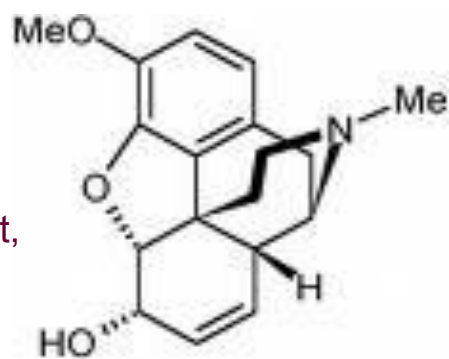
- Minden korreláció látszik
- Átfedések megszűnhetnek
- Fázisérzékeny változatban, (+) és (-) NOE is látszik
- Kvantitatív értékelés nehézségekbe ütközik
- A keverési idő megválasztása döntő lehet

Eredmények kritikus kezelése ($\eta \neq 0$) ??

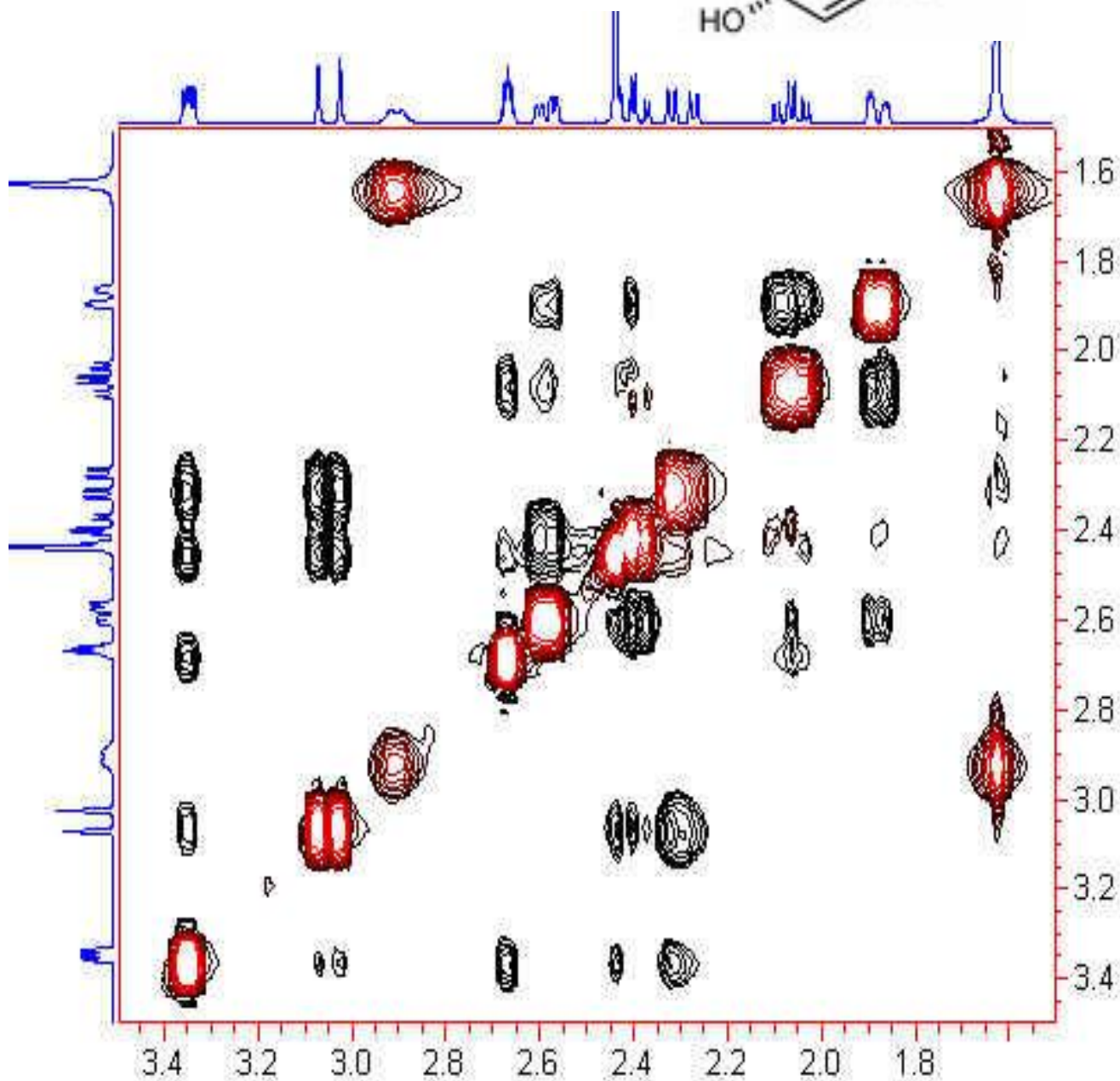
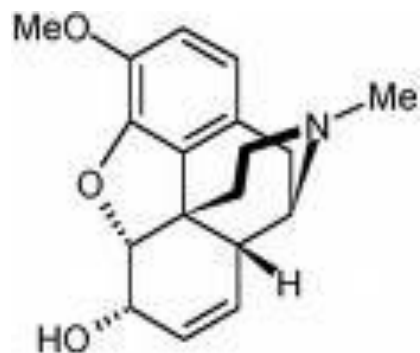
Mire jó?

NOESY – egy valós példa

A fekete szintvonalak a negatív (vetítés síkja alatti) csúcsokat jelzik – ezek jeleznek NOE kölcsönhatást, azaz térközelséget



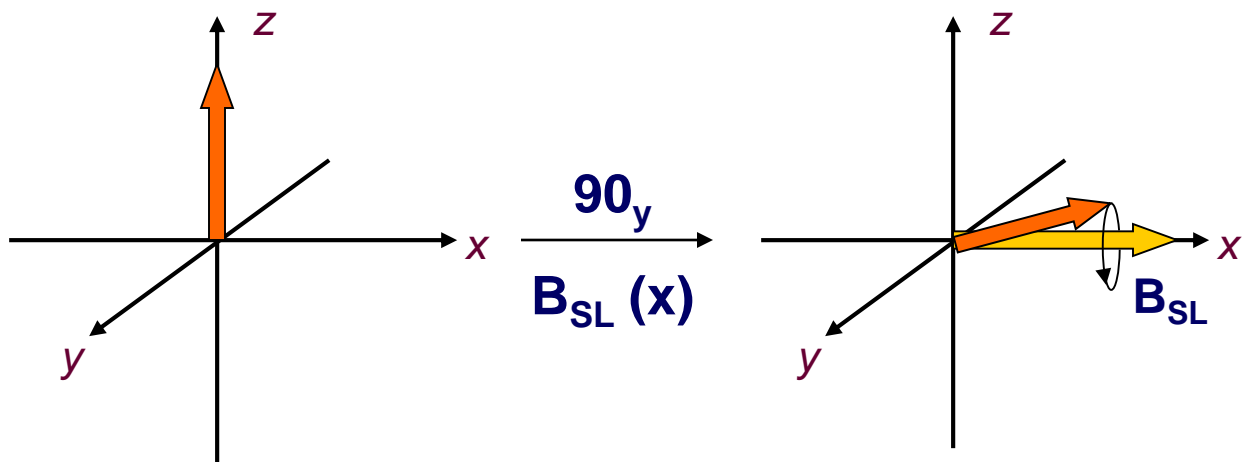
NOESY – egy valós példa



A spin-lock (rögzítés)

Maga a módszer azt jelenti, hogy a mágnesezettségi vektorunkat a \mathbf{B}_0 tér által kikényszerített z irány helyett tartósan az xy síkban tartjuk. Ehhez először a vektort egy $\pi/2$ pulzussal az x vagy y tengely irányába kell kibillenteni.

Ezután következik a rögzítés (*locking*), azaz, ha a vektor már az xy síkban van, az új mágneses tér ezt a vektort a továbbiakban az x vagy y tengely körüli precesszióra kényszeríti. Ezt rendszerint egy folytonos térrel történő besugárzással (CW), vagy újabban alkalmasan kidolgozott, sok komponensből álló pulzusvonalatokkal, ún. összetett (composite) pulzusokkal tudják elérni.



Amennyiben ezt a feltételt elértük, (ez az ún. *Hartmann-Hahn condition*), rendszerünkben az átmenetek frekvenciái a továbbiakban a \mathbf{B}_{SL} térrel lesznek arányosak.

$$\text{SL előtt: } \omega_0 = \gamma \mathbf{B}_0 \quad \text{SL után: } \omega_{SL} = \gamma \mathbf{B}_{SL}$$

TOCSY

A spin-rögzítés elvileg alkalmazható az **xy** sík tetszőleges tengelyén, tetszőleges ideig, a kívánt effektus elérésére. Az egyik legfontosabb módszer, mely a spin-lock alkalmazására épül, az ún. **HOmonukleáris HArtmann-HAhn** kísérlet, viccesnek tűnő nevén **HOHAHA**, másnéven **TOCSY (Total Correlation SpectroscopY)**. Célja a csatolt spinrendszerek **teljes** hálózatát felderíteni. (Emlékezzünk, a COSY csak a szomszédot mutatja!). A szokásos 1D körülmények között, vagy éppen a COSY módszer segítségével a csatolásokat a külső (polarizáló) **B₀** mágneses térben figyeljük meg, tehát fennáll a

$$\Delta\delta \text{ (Hz)} \gg J \text{ (Hz)} \text{ feltétel.}$$

Azaz, a rendszer energiaviszonyaiban a kémiai eltolódások szerepe lesz a meghatározó a csatolásokkal szemben. Az előző évi tananyagban ezt úgy említettük, hogy az ilyen spinrendszer ún. **elsőrendű spinrendszer**. Kvantummechanikai megközelítésben:

$$H = H_{\delta} + H_J + \dots \quad \text{úgy, hogy } H_{\delta} \gg H_J$$

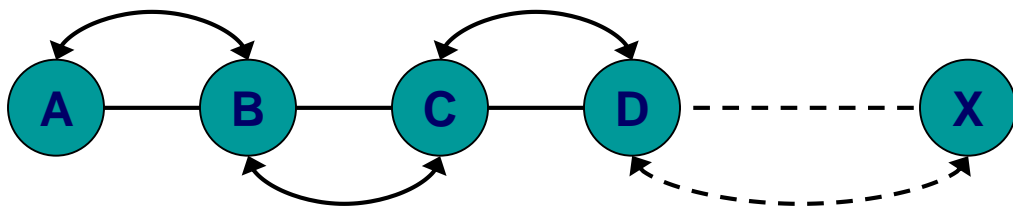
Ahol **H** a rendszerre jellemző, a rendszer energiáját jellemző, ún. **Hamilton-operátor**.

A spin-lock körülmények között azonban lényeges változás történik. A kémiai eltolódás különbségek (*Hertzben!*) csökkennek, mivel $\Delta\delta$ (**B₁** << **B₀**), a csatolások azonban nem, (**J** a vizsgált molekula tulajdonsága!), ezért **H_J** >> **H_δ**, azaz az energiaviszonyokban a csatolásoknak meghatározó szerep jut.

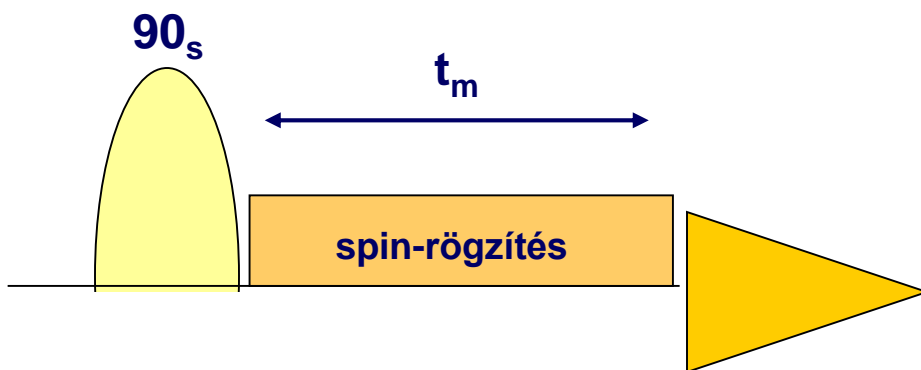
TOCSY

Esetünkben tehát a csatolási term lesz a meghatározó a rendszer energiaállapotában. A skaláris csatolás eredményeképpen ún. koherencia átvitel jön létre.

A részleteket nem érintve, a módszer lényege az, hogy amennyiben a „keverés” megfelelően hatékony, egy spinrendszer valamely elemét kiválasztva, a koherencia a spinrendszer minden további elemét érinti, azaz korreláció mutatható a spinrendszer összes többi elemével.



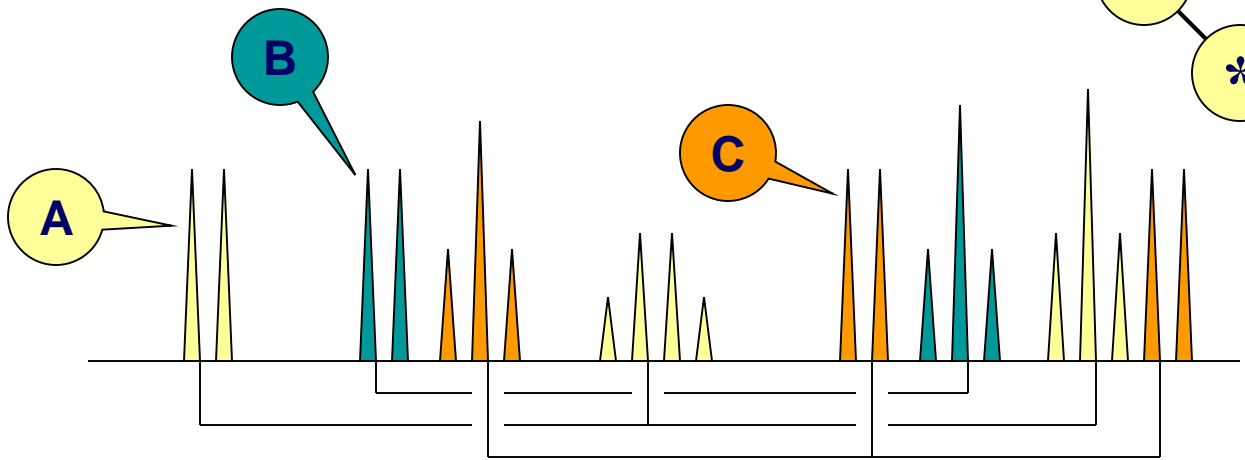
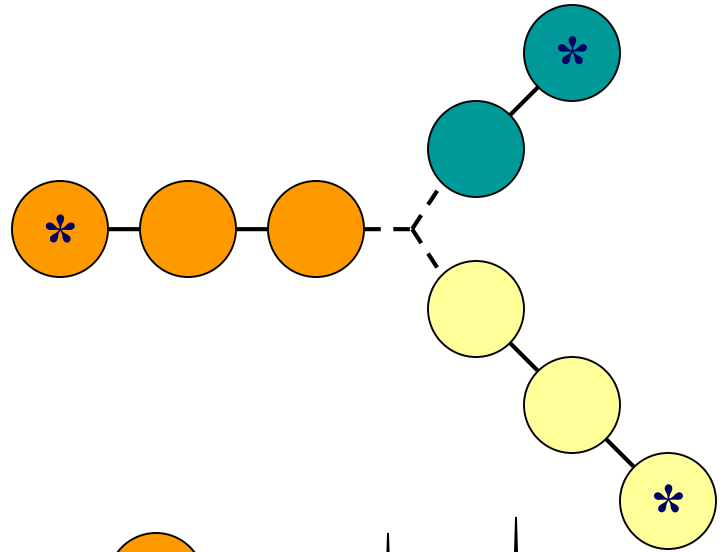
Két spin közötti maximális koherencia átvitel J csatolási állandó fennállása esetén akkor jön létre, ha $t_m = 1/2J$. Hosszabb t_m értékek esetén a gyengébben csatoló spinek is részt vesznek a koherencia átvitelben, azaz egy kiválasztott spintől távolabb is detektálható kölcsönhatás. Az 1D-TOCSY kísérletet egy, a kiválasztott spinre szelektív $\pi/2$ pulzussal kezdjük:



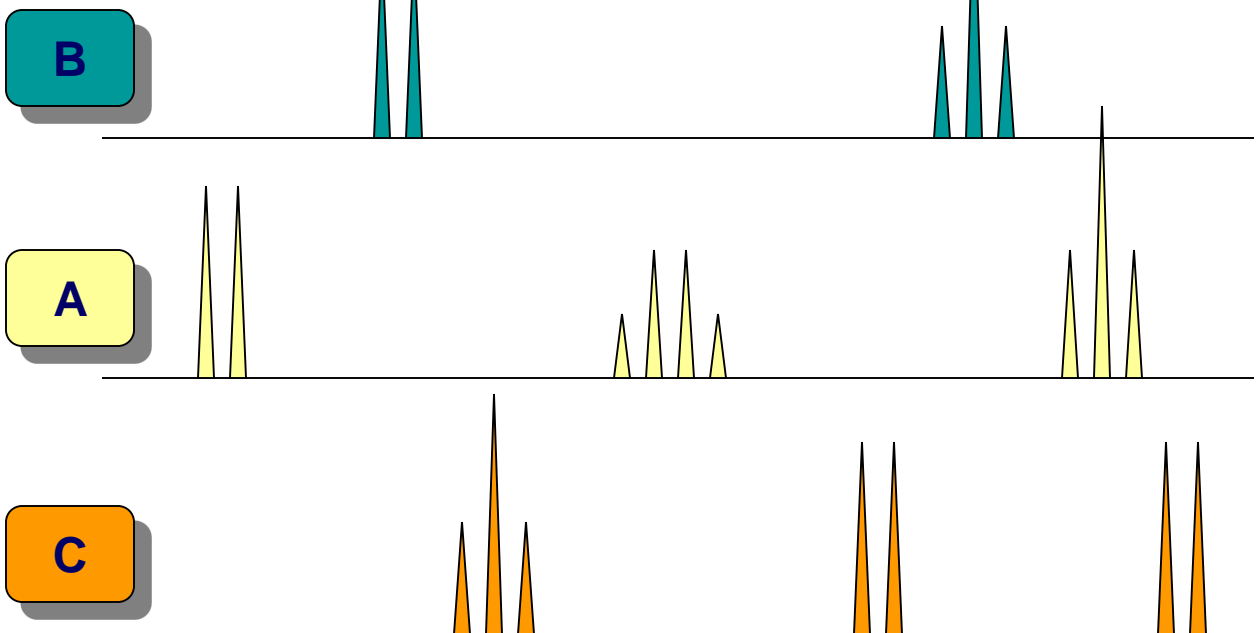
A t_m keverési idő alatt a kiválasztott, rögzített spinről a koherencia a vele csatolásban levő összes spinre továbbterjed.

1D –TOCSY

Ha rögzítéssel a spinszisztémából egy spint kijelölünk, megismerhetjük a rendszer **összes** többi elemét

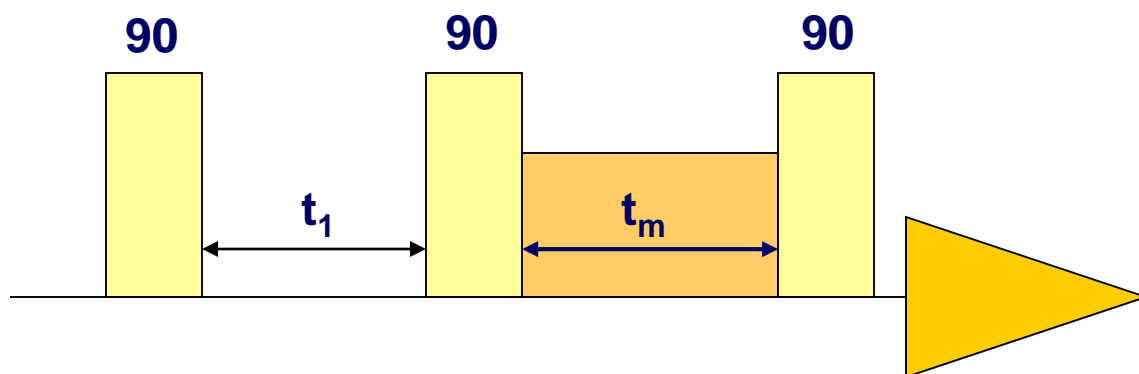


Rögzített (locked) spin:



2D-TOCSY

A szekvencia alkalmazásának legfőbb nehézsége a szelektív pulzus, mely sohasem annyira szelektív, mint szeretnénk. Ezért, mint eddig is általában a 2D módszerek esetén, a szelektív pulzus helyett kemény $\pi/2$ pulzuskombinációt alkalmazunk. A keverési idő (azaz a spin-lock) előtti és utáni két pulzust az irodalom mint „*trimmelő*” pulzusokat emlegeti. A pulzus-szekvencia a következő:

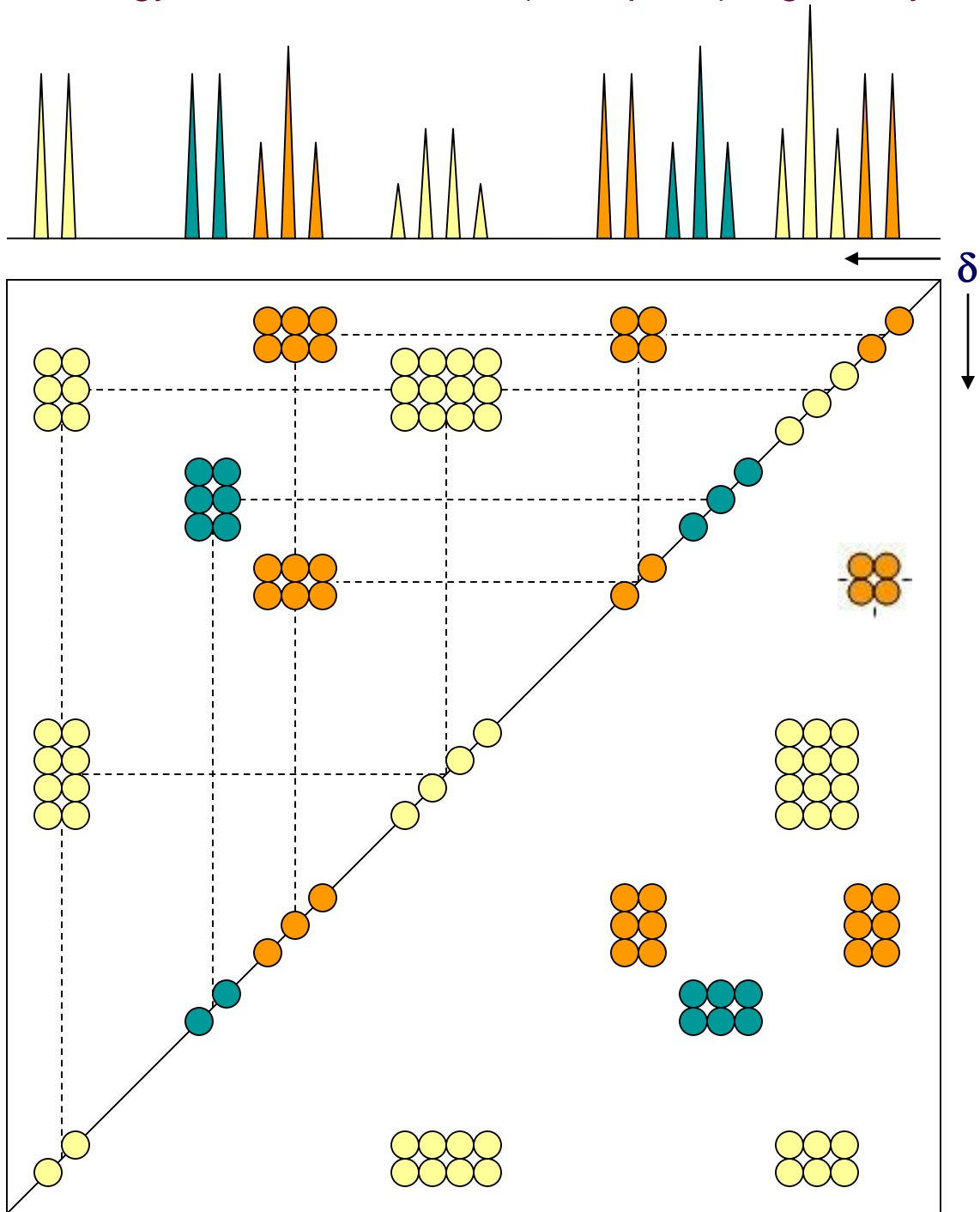


A spin-rögzítést (spin-lock) ma már olyan összetett pulzuskombinációkkal érjük el, mint a Malcolm Lewitt által kidolgozott ún. **MLEV** pulzusvonat (különböző változatai léteznek), vagy a hasonló funkciót ellátó **DIPSI**.

A t_m keverési idő alatt a molekula minden egyes, azonos spin-rendszerén belül megvalósul a koherencia-transzfer, így a kétszeres FT után ezek között korrelációt kapunk. (keresztcsúcs detektálható). A **TOCSY** tehát egy olyan homonukleáris 2D módszer, mellyel nemcsak a szomszédos, de a további csatoló partnerek is azonosíthatóak. (pl. egy megszakítás nélküli szénlánc v. egy gyűrű összes hidrogénje. Ilymódon a COSY spektrumhoz hasonló (azt kiegészítő, esetleg helyettesítő) információkat szolgáltat.

TOCSY

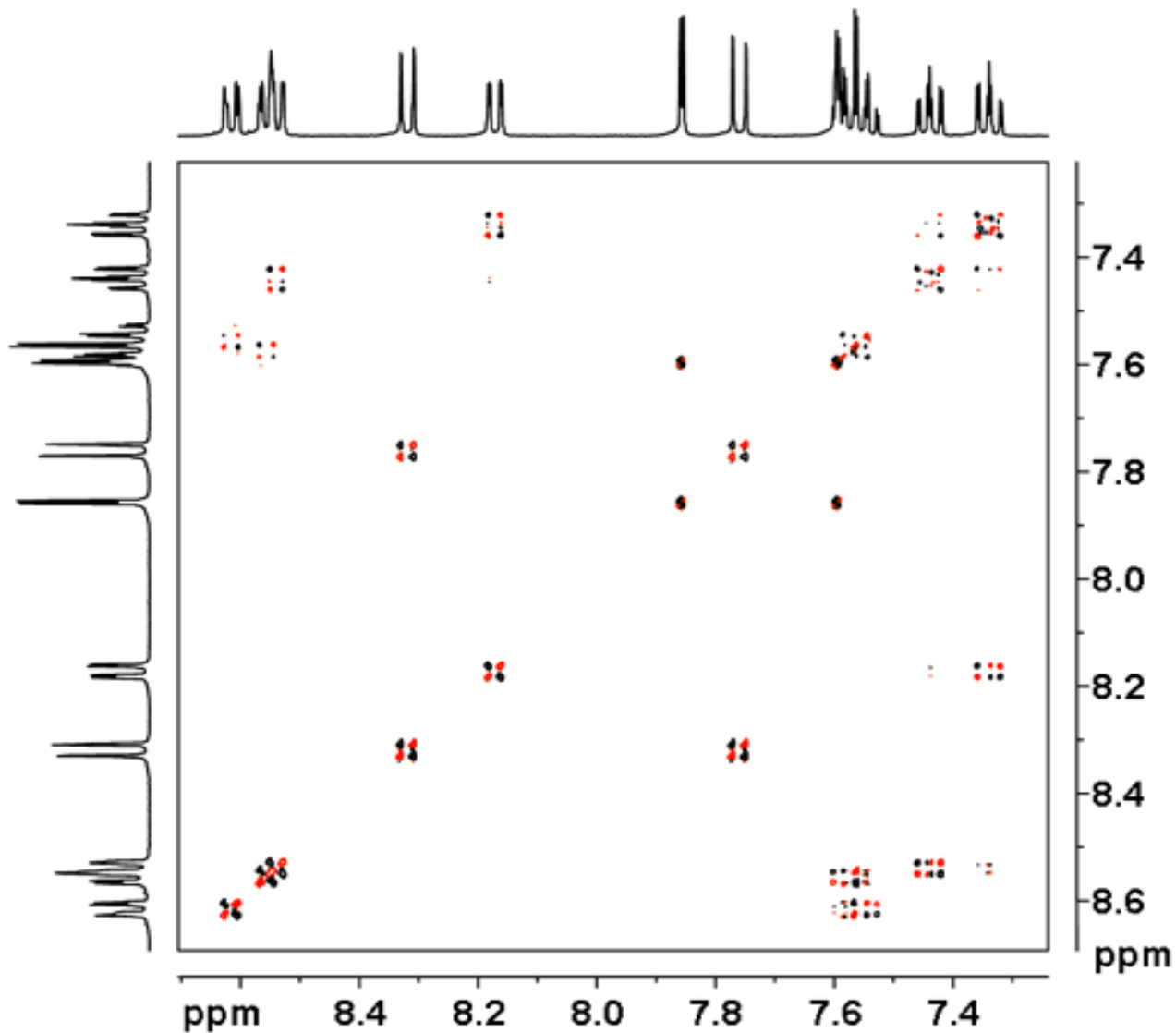
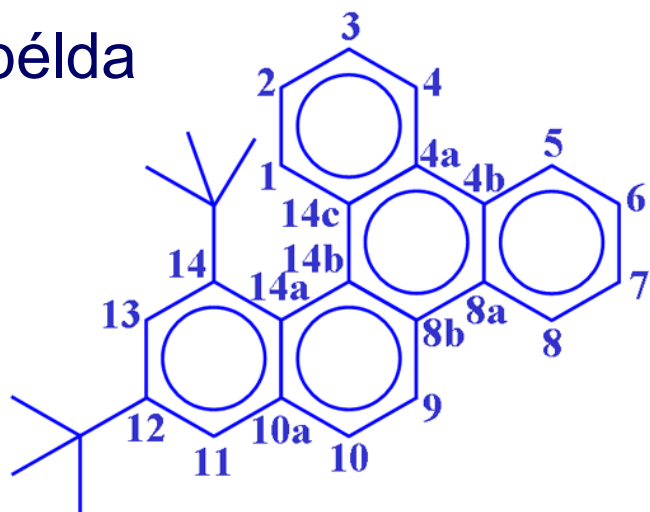
- A 2D térképen minden különálló, a másikkal nem csatoló spin-rendszer ugyanabban a sorban (oszlopban) foglal helyet:



Az ilyen TOCSY spektrumok sikeresen alkalmazhatók peptidek, poliszaharidok egységeinek szerkezetfelderítésére.

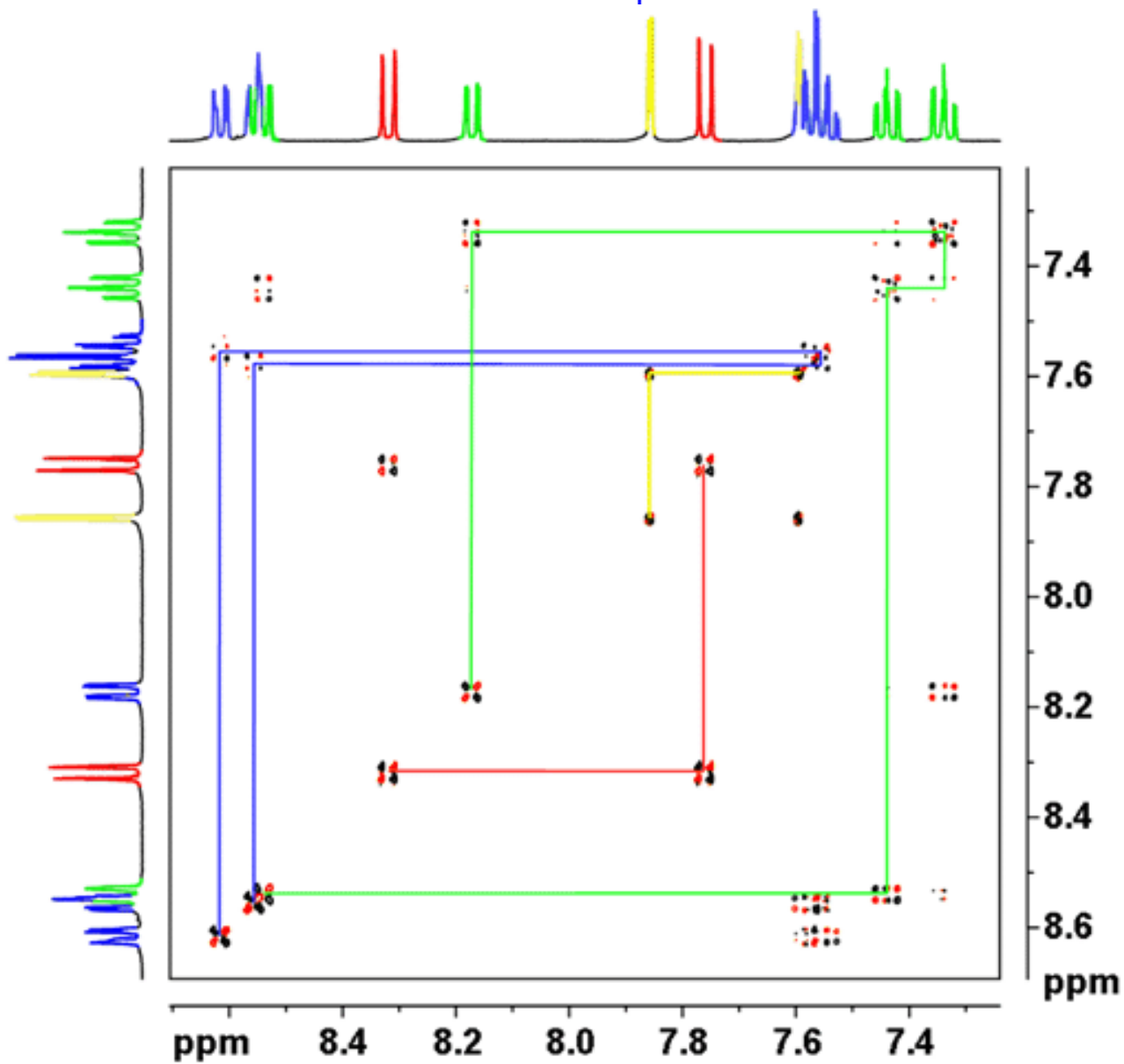
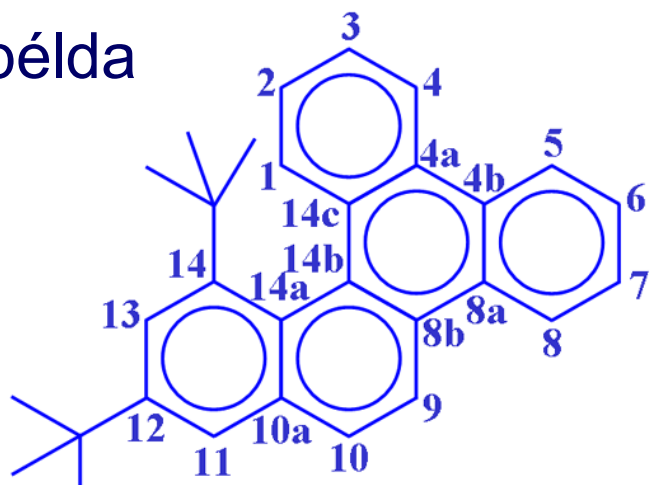
TOCSY – egy valós példa

COSY



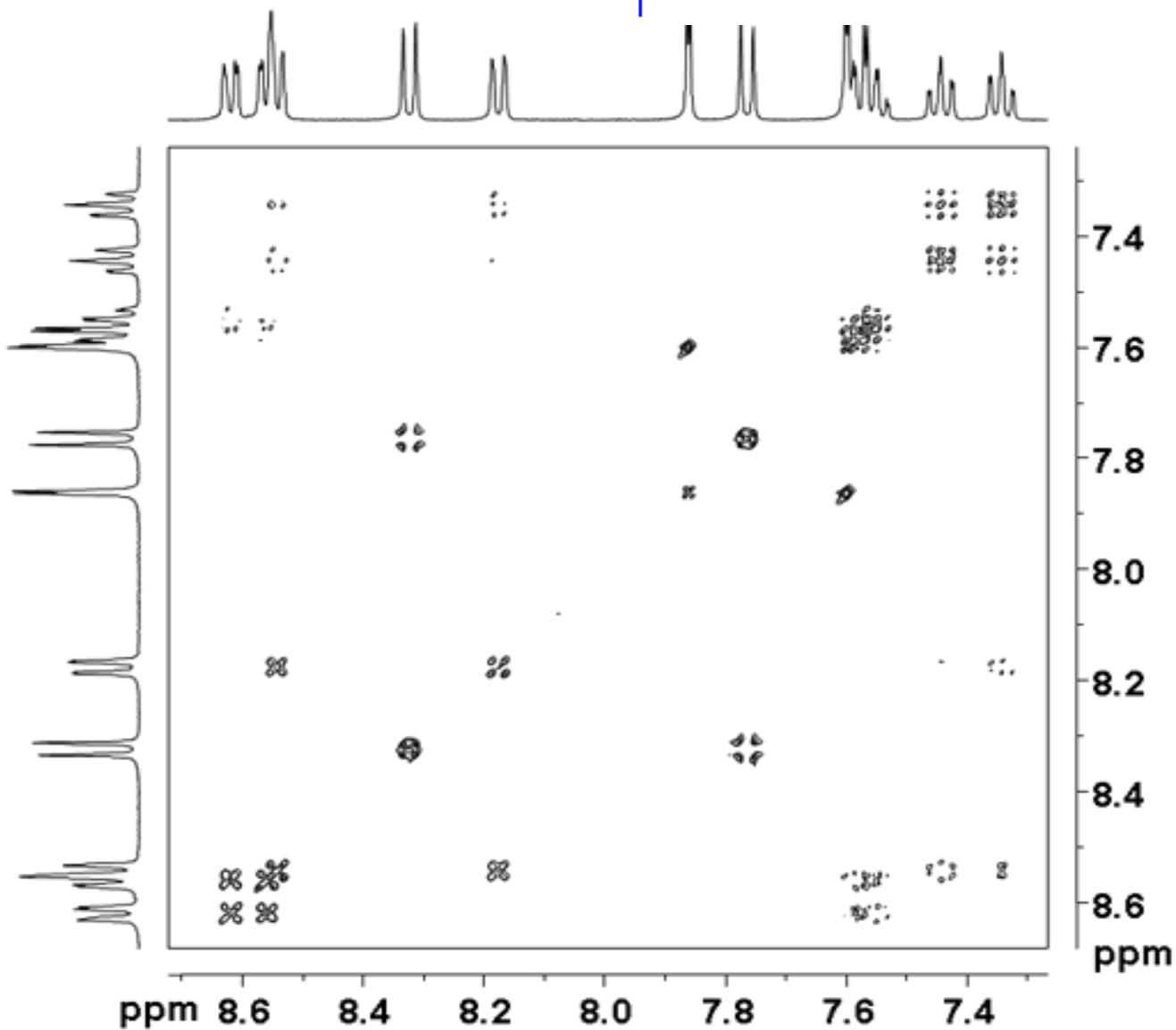
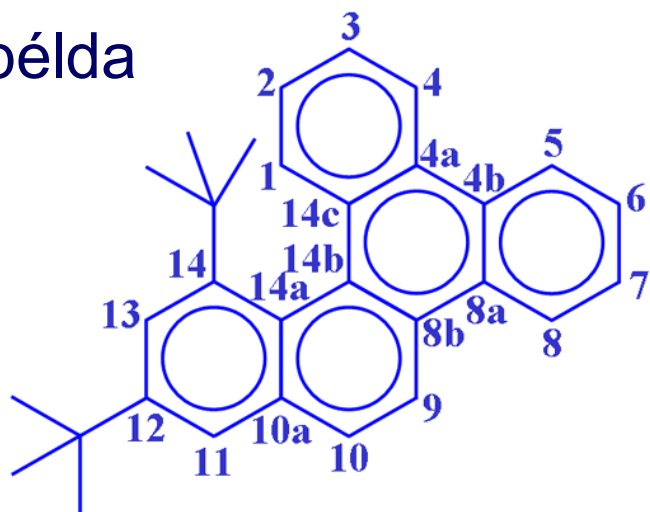
TOCSY – egy valós példa

COSY



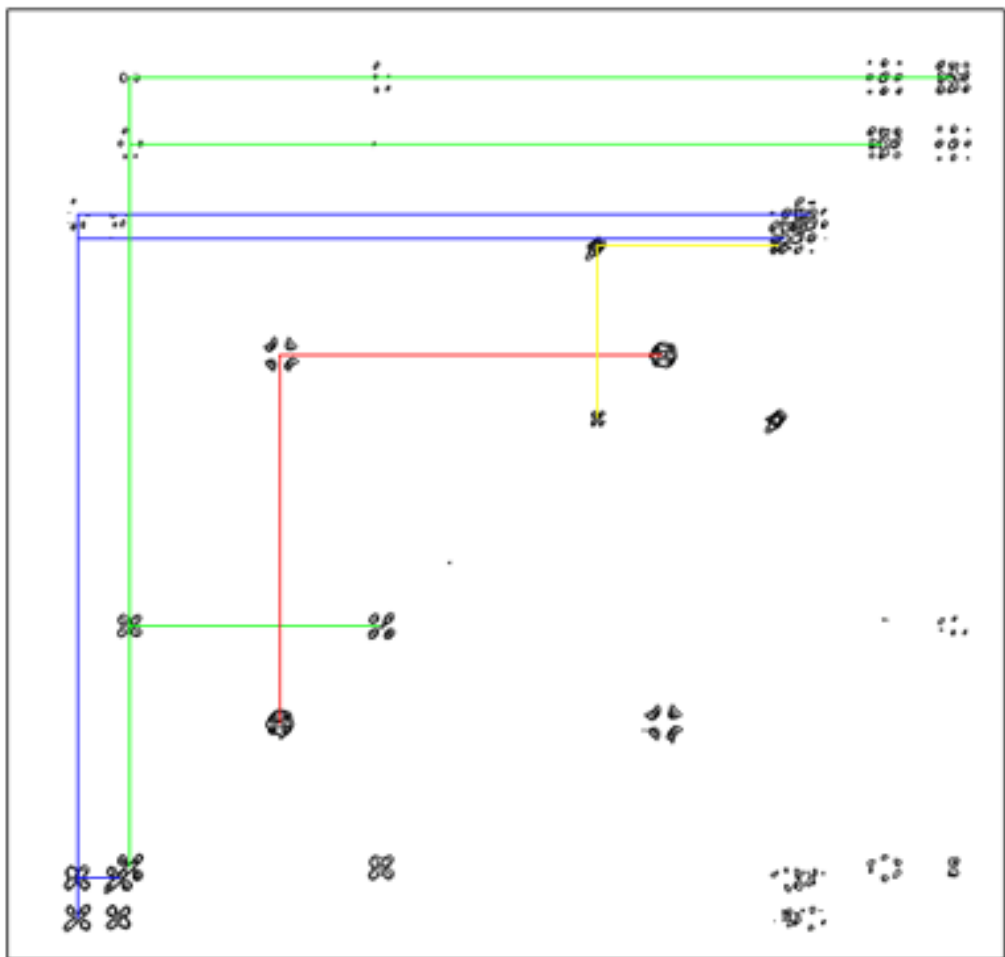
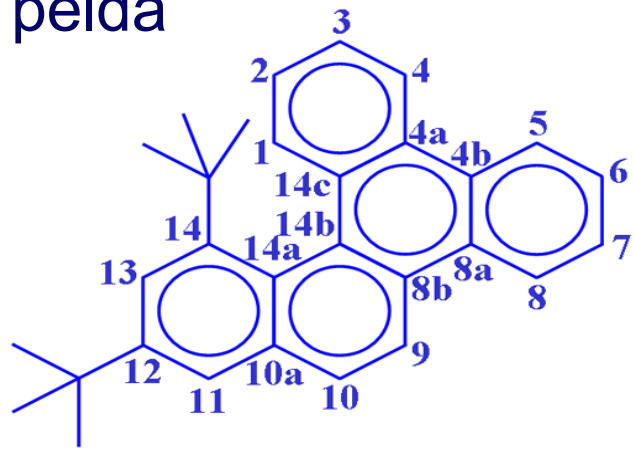
TOCSY – egy valós példa

TOCSY



TOCSY – egy valós példa

TOCSY



ppm 8.6 8.4 8.2 8.0 7.8 7.6 7.4

ROESY

A spin-lock technikát alkalmazó másik fontos NMR kísérlet a **ROESY (ROTating frame SpectroscopY)**. Ez a módszer a NOESY változata spin-lock körülmények mellett..

Mint láttuk, a NOESY spektrumoknál a mért NOE növekedés a $\omega * \tau_c$ függvénye, homonukleáris esetben a Solomon egyenletekből következően $\omega * \tau_c = 1.12$ értéknél válik zérussá.

Nem kell szembenézni az említett problémával a dipoláris csatolások tanulmányozása során, ha ezeket a B_0 térnél lényegesen kisebb térben végezzük.

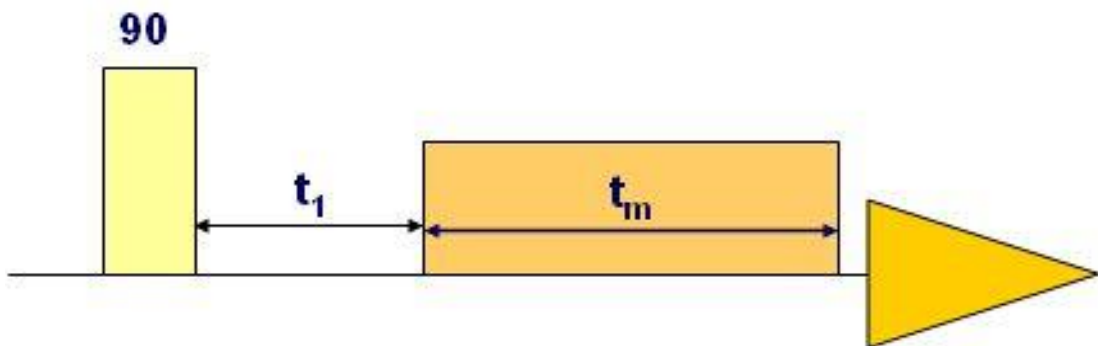
Ekkor mindig az „extrém keskenyedési tartományban” dolgozunk és minden dipoláris kölcsönhatás pozitív lesz

B_0 - 100 to 1000 MHz

B_{SL} - 2 to 5 KHz

$$\omega_{SL} \ll \omega_0 \longrightarrow \omega * \tau_c \ll 1$$

A pulzusszekvenciát egy nem-szelektív, kemény $\pi/2$ pulzussal indítjuk és a spin-lock előtti t_1 időt inkrementáljuk, így kapjuk a második dimenziót.

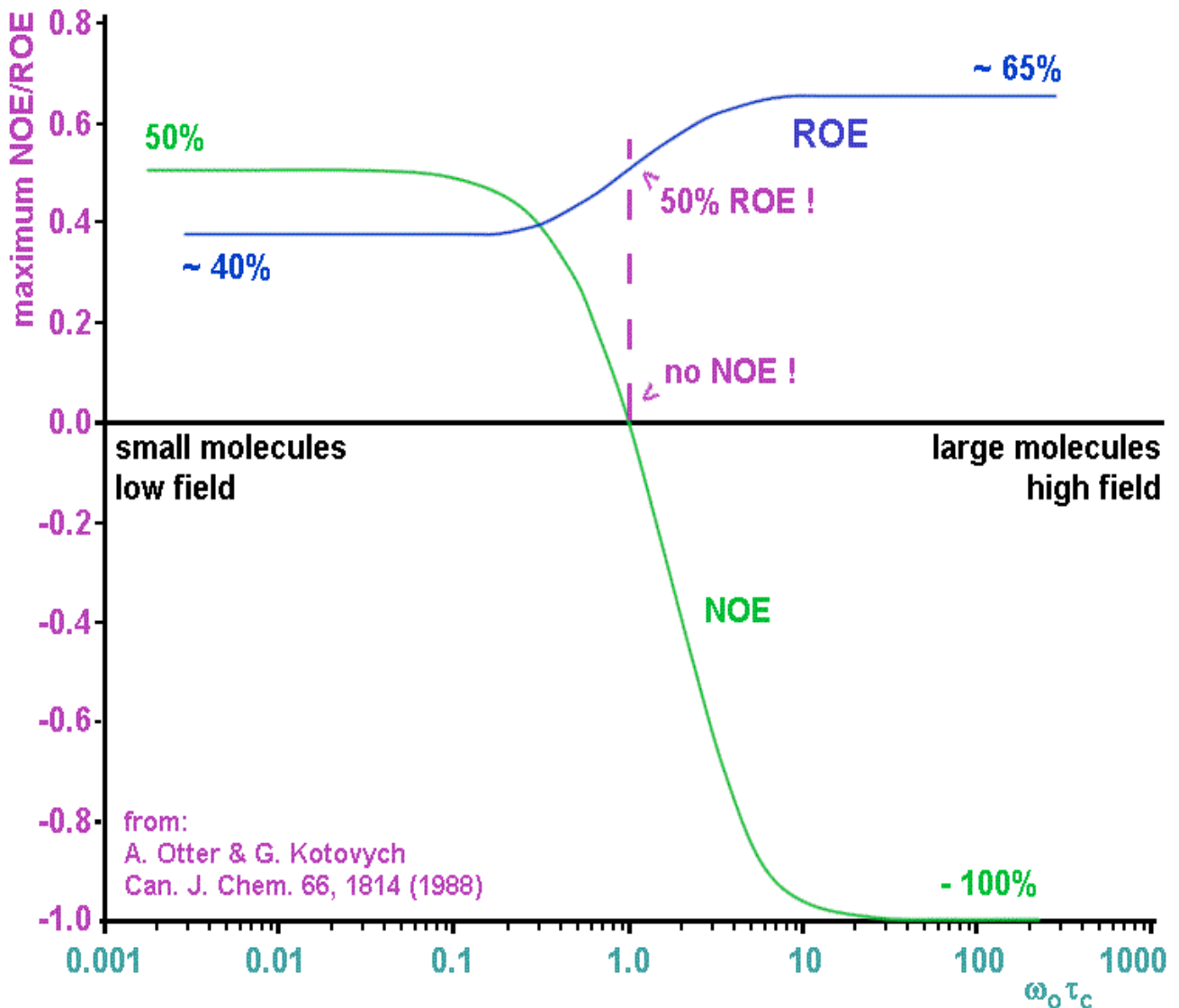


ROESY

A kétszeres FT után kapott szimmetrikus 2D térkép közel azonosan értékelhető, mint a NOESY. Ha a diagonális csúcsokat pozitív (felfelé mutatnak) fázisúra állítjuk:

- A ROE csúcsok negatív fázisúak
- a kémiai cseréből eredő csúcsok pozitív fázisúak
- a ROE csúcsok abszolút értéke általában kisebb, mint a NOE csúcsok általában (ha megjelennek?!)
- előfordulhatnak mesterséges (pozitív) HOHAHA csúcsok

ROESY vagy NOESY ?



2D NMR spektrumok típusai

I. Kémiai eltolódás korrelációk($f_1=\delta$, $f_2=\delta$)

Homonukleáris

- a) Csatoláskorrelált (COSY, TOCSY)
- b) Dipól-dipól kölcsönhatás korrelált (NOESY, ROESY)

Heteronukleáris

Csatolás-korrelált

- a) Egy-kötés korreláció (HSQC, HMQC)
- b) Több-kötés korreláció (HMBC, H2BC)

II. J-spektroszkópia ($f_1=J$, $f_2=\delta$)

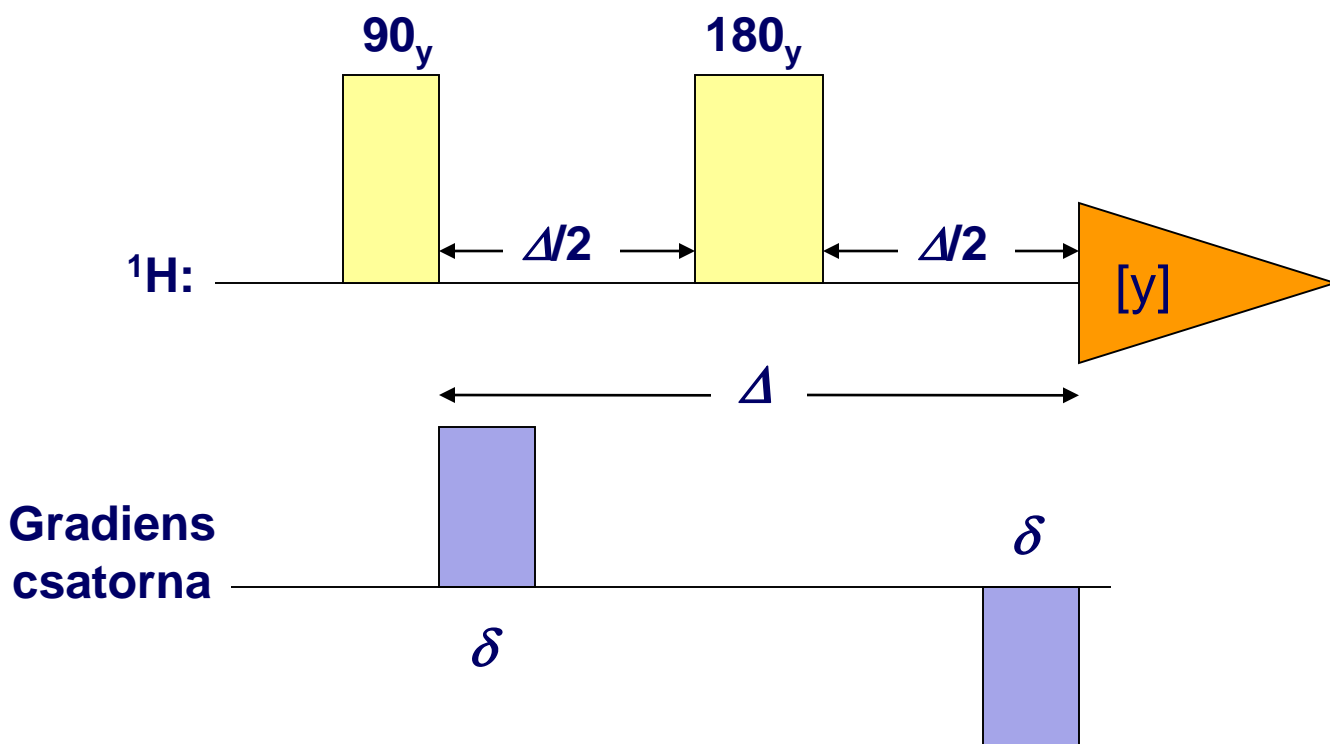
- a) Homonukleáris
- b) Heteronukleáris

III. Diffúzió korrelált ($f_1=D$, $f_2=\delta$)

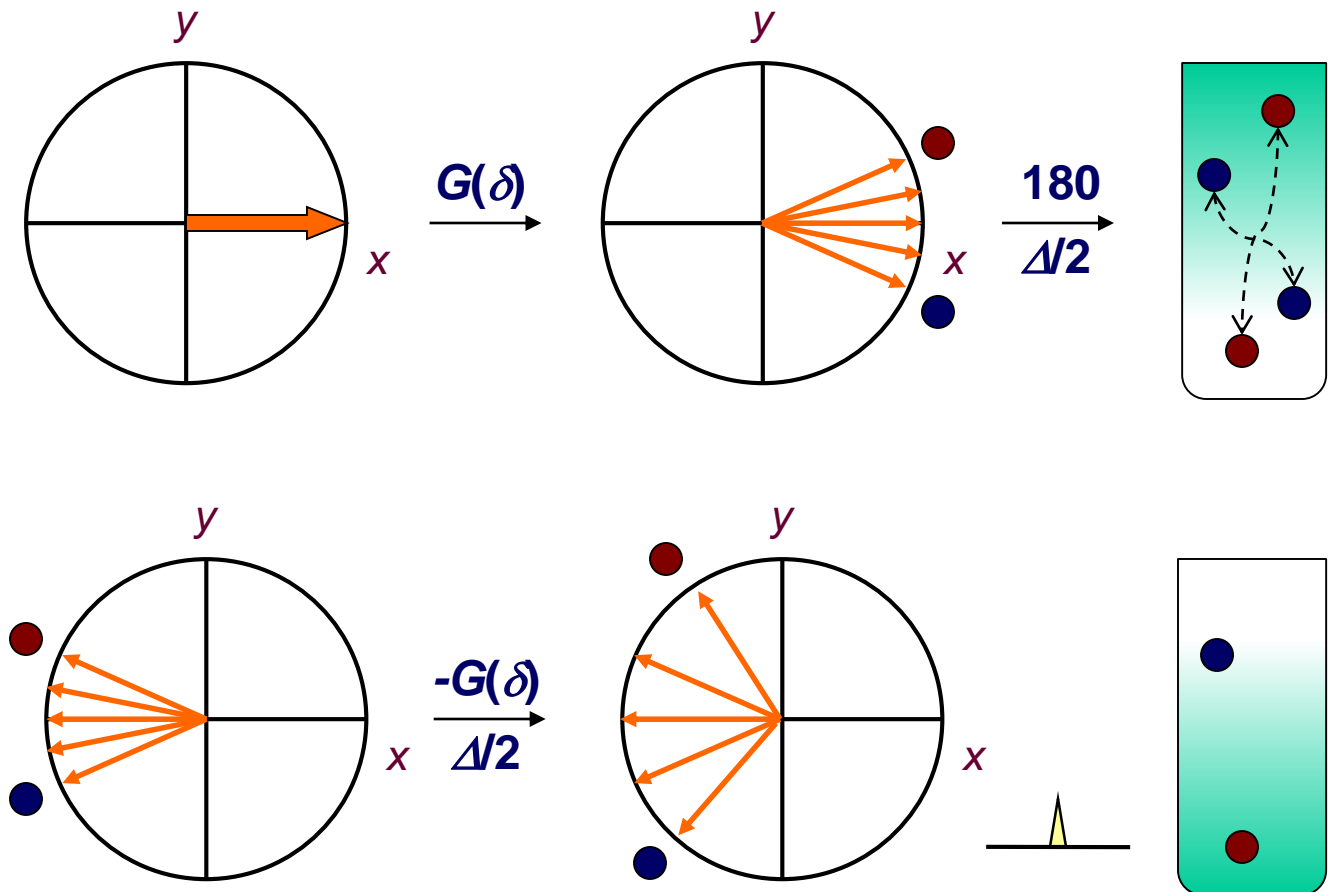
Térgradiens módosított spin visszhang

Feltételek: nincs hőgradiens, nincs koncentrációkülönbség indukált diffúzió, csak Brown hőmozgás

Lépések : a) magspin térbeli helyzetének megjelölése (1. gradiens pulzus) b) vizsgáljuk a kijelölt spinek elmozdulását (2. gradiens pulzus)

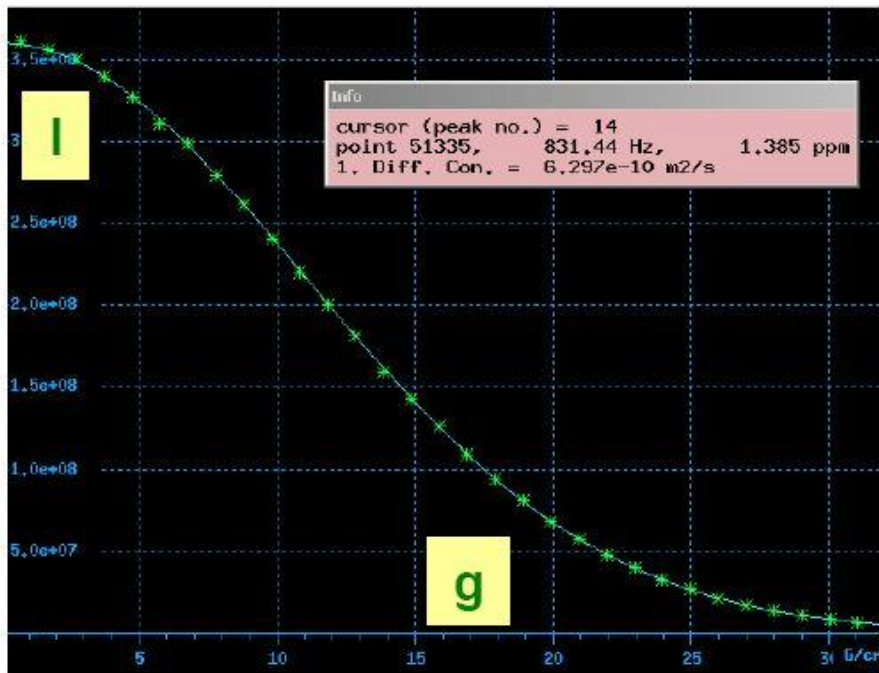
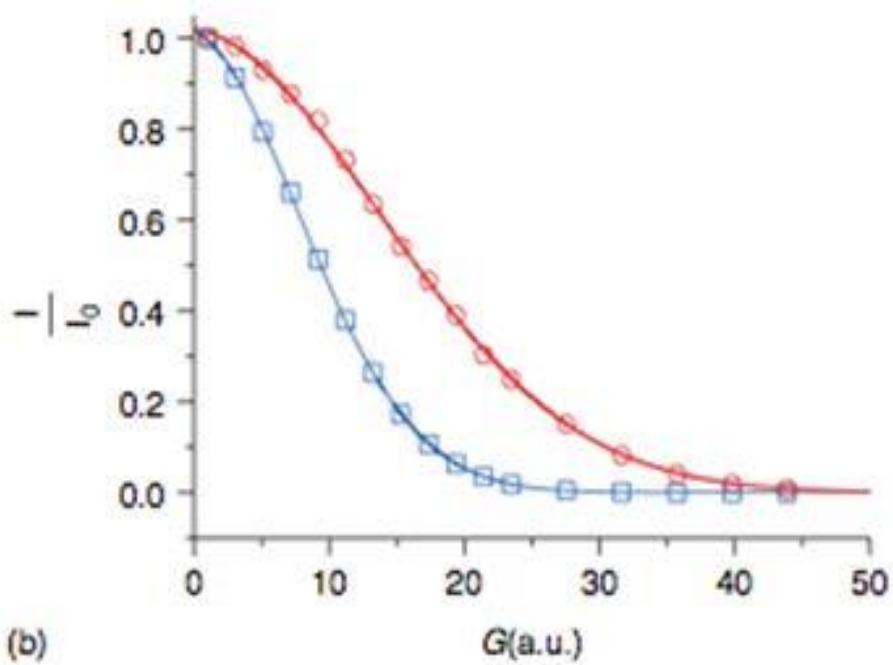


Térgradiensek és a diffúzió



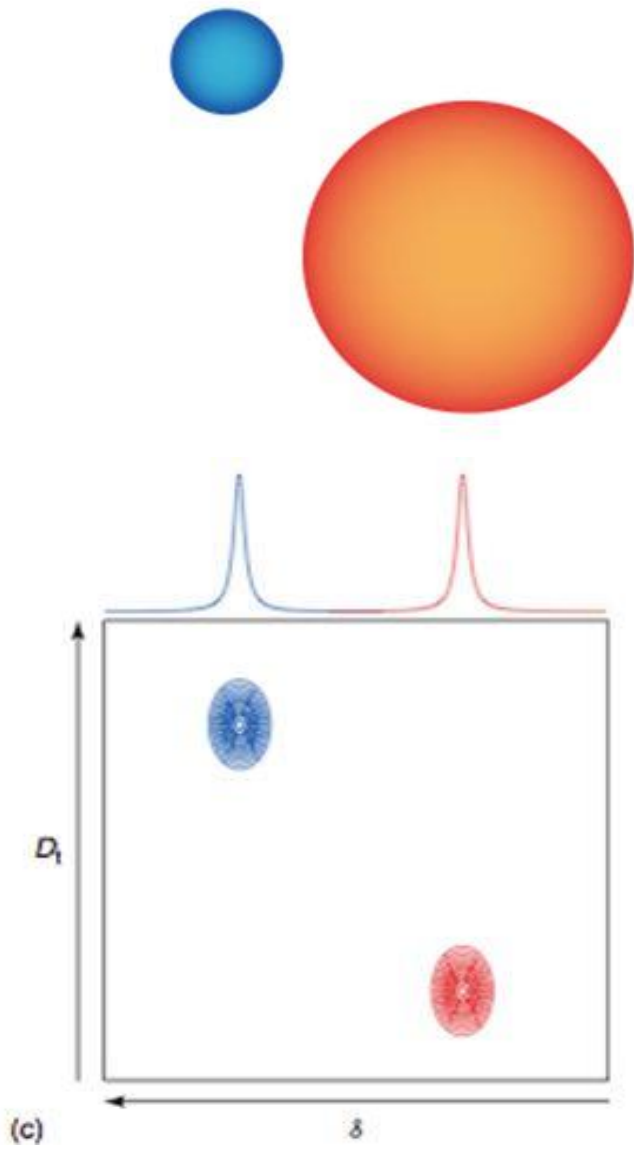
Az első gradiens pulzus hatására fázisvesztés jön létre (dephasing), a második ellentétes gradiens pulzus hatására létrejöhet az „újrafókuszálás (refocussing)”. Amennyiben a Δ idő alatt nincs elmozdulás, a jelet visszanyerjük, amennyiben elmozdult a spin, az újrafókuszálás csak részleges lesz, (jelintenzitás csökkenés), de a jel akár el is tűnhet.

Diffúziós állandó meghatározás



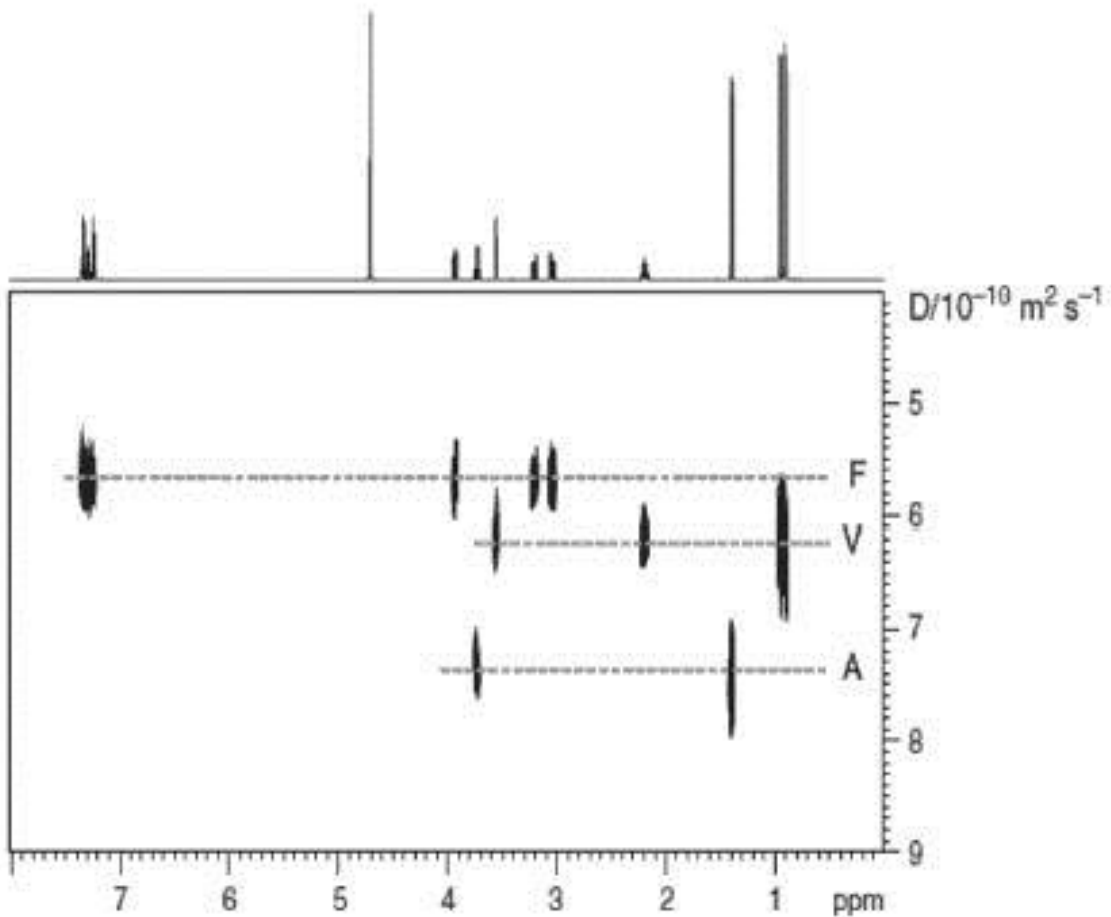
2D-DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

Alapfogalom:



2D-DOSY

valós példa: aminosavak elegye



Alkalmazási lehetőségek:

elegyek analízise

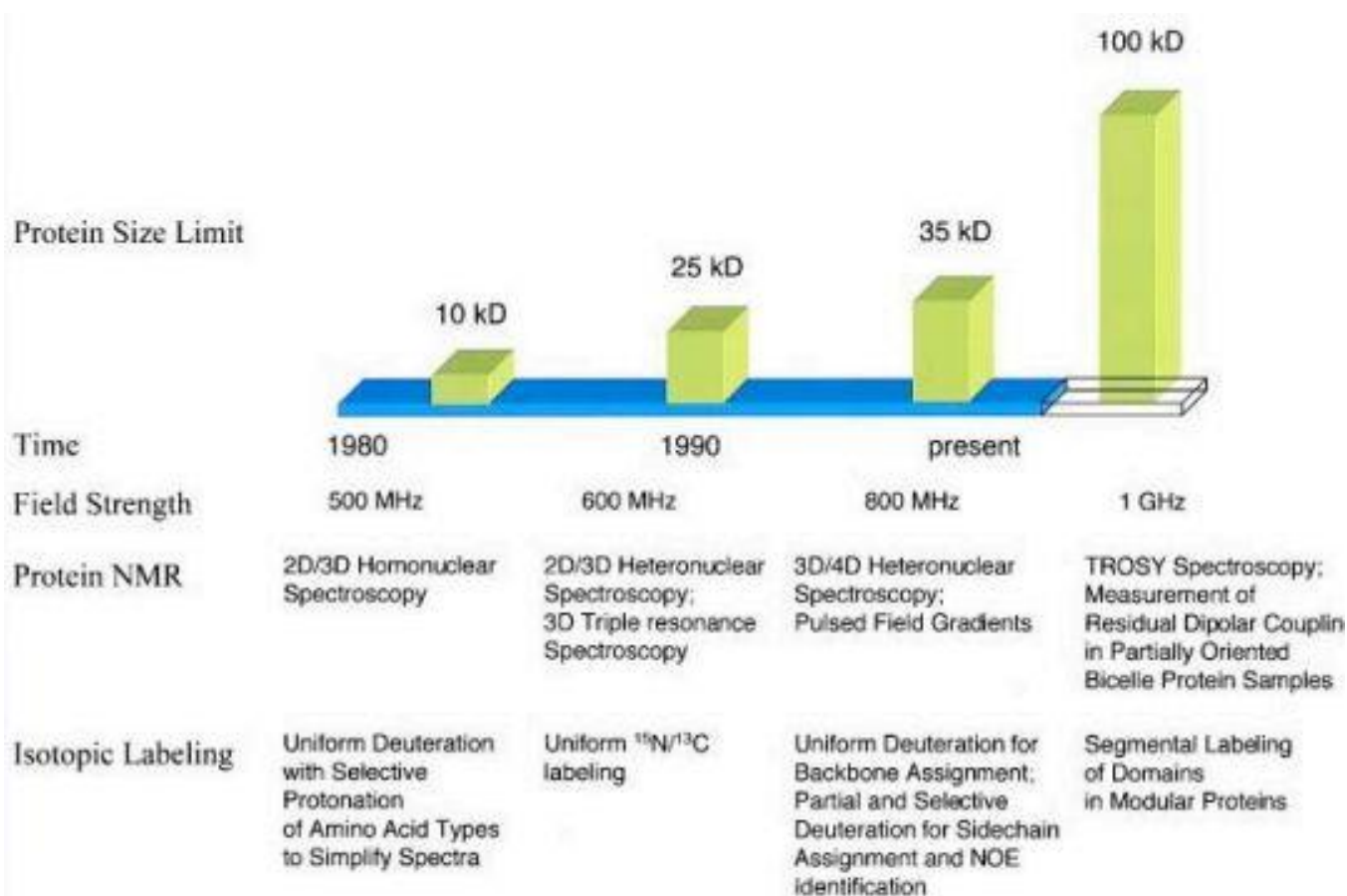
molekulák közti kölcsönhatások vizsgálata (gazdavendég kölcsönhatás, dimerizáció, oligomerizáció)

cserefolyamatok vizsgálata (egyensúlyi állandó meghatározása)

NMR a fehérjék szerkezetkutatásában

Az időbeli fejlődés üteme -

lehetőségek és hatékonyság



NMR a fehérjék szerkezetkutatásában



Kurt Wütrich

