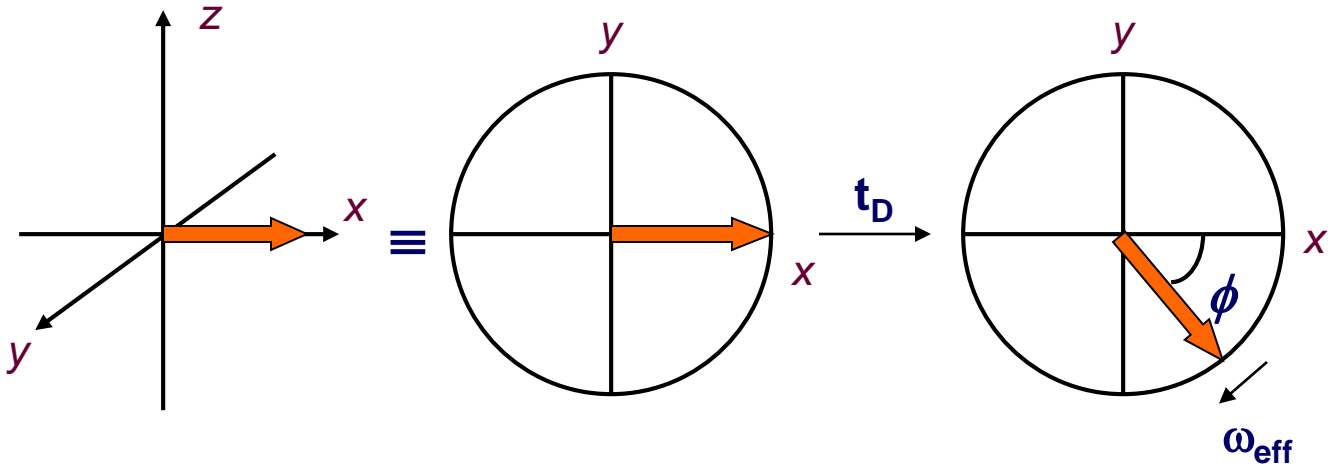
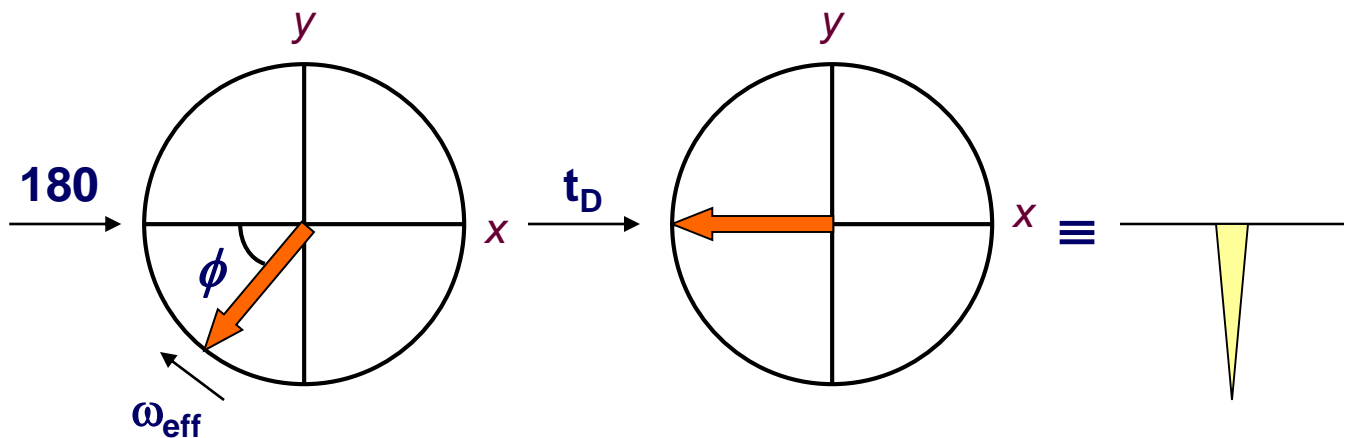


# Spin-visszhang hatása egy szingulett jelen

- Az  $\mathbf{M}_{xy}$  mágnesezettségi vektor változása a  $\pi/2$  pulzus után :



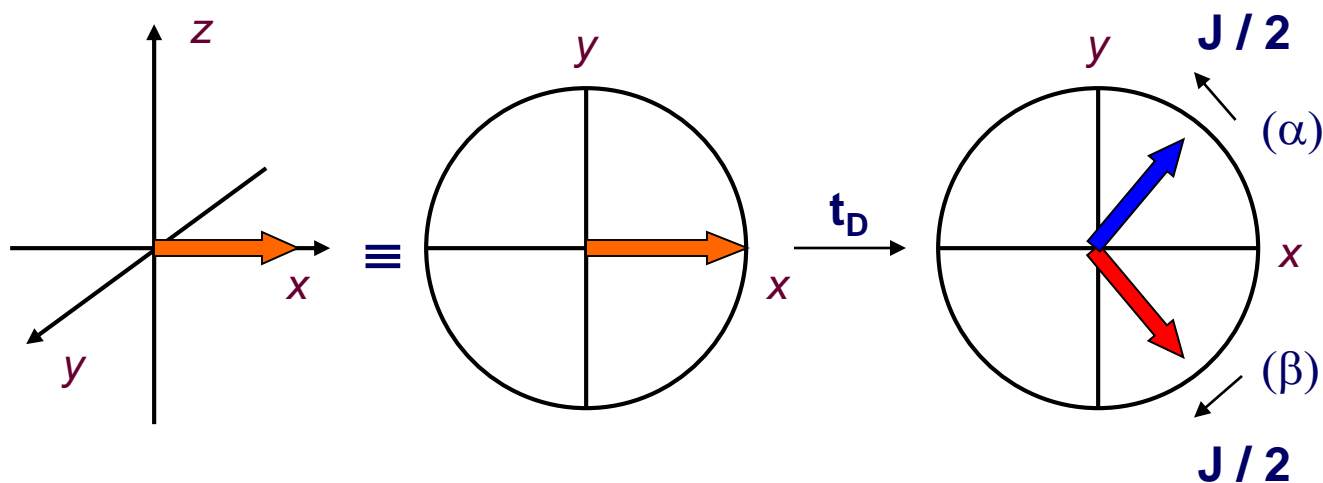
$t_D$  idő eltelte után a mágnesezettségi vektor eltérül az  $\langle xy \rangle$  síkban egy bizonyos szöggel,  $\omega_{\text{eff}} * t_D (\phi)$ , ahol  $\omega_{\text{eff}} = \omega - \omega_0$ . A  $\pi$  ( $180^\circ$ ) pulzus és a második  $t_D$ , periódus után visszatér az  $x$  tengely irányába és nagysága azonos!



Nem lesz fázisvesztés, (fáziseltódás okozta intenzitás-csökkenés), ha a második  $t_D$  idő után azonnal detektálunk. „Tiszta” abszorpciós jelet kapunk!

# Spin visszhang és homonukleáris csatolás

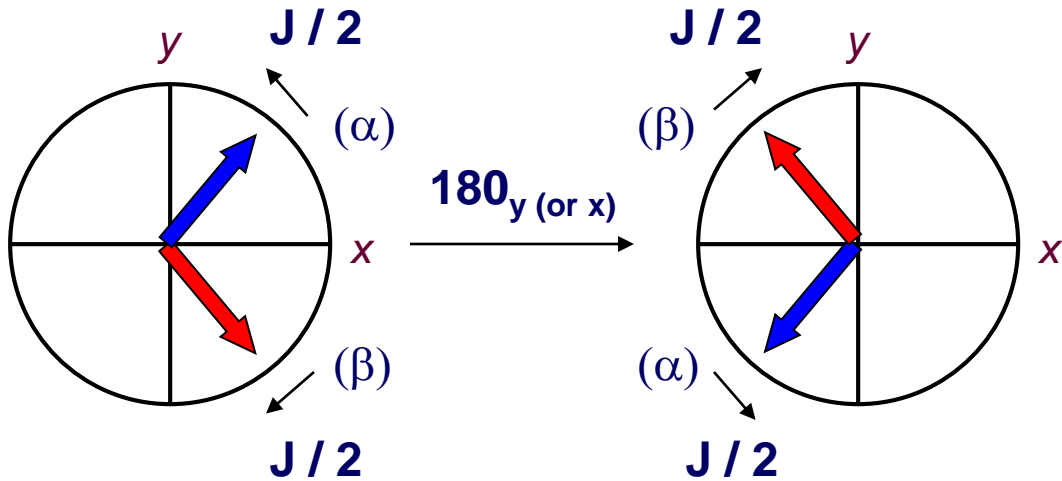
- A spin visszhang gyakorlati mérése során azonban nehézségek léphetnek fel, ha a spektrumot tökéletes fázisban szeretnénk látni. Lássuk be, eddig csak olyan modelleket vizsgáltunk, melyek spektruma szingulett jelekből épültek fel. (Nem volt homonukleáris csatolás)
- Vegyünk egy  $^1\text{H}$  jelet, mely csatol egy másik kémiai eltolódású  $^1\text{H}$  jellel és figyeljük a forgó koordinátarendszertől. A  $\pi/2$  pulzus után a csatolás következtében  $t_D$  idő alatt kifejlődik a mágneszettségi vektor két komponense



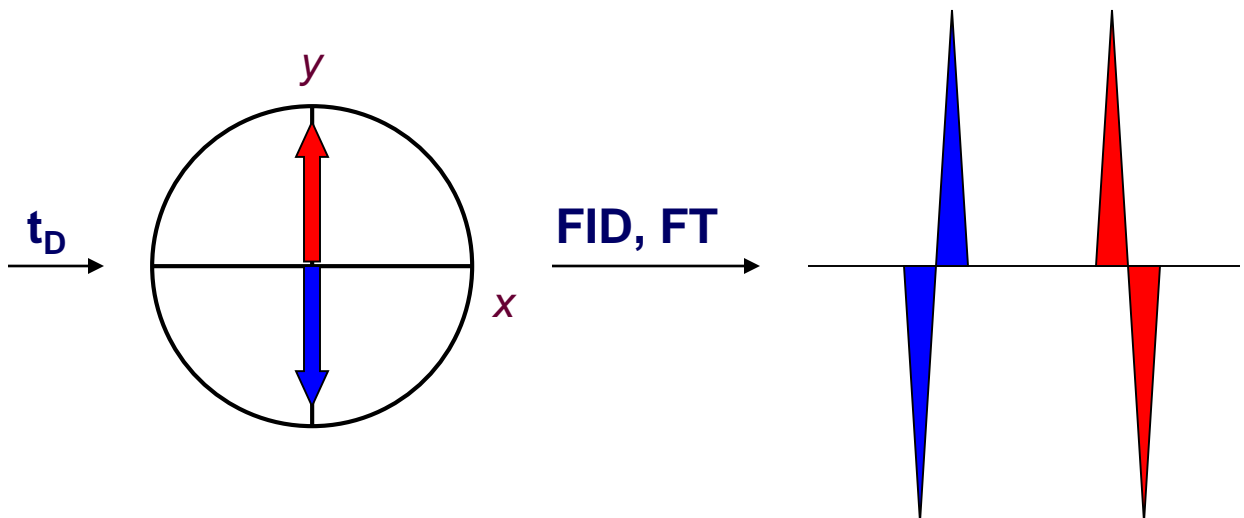
- A vektor két ága megfelel a csatoló partner két spinállapotának (jelölés).  
Következő  $\pi$  pulzus azonban invertálja a populációkat !

# Spin visszhang és homonukleáris csatolás

A  $\pi$  pulzus hatása: tükrözi a vektorokat és megváltoztatja a forgásirányokat

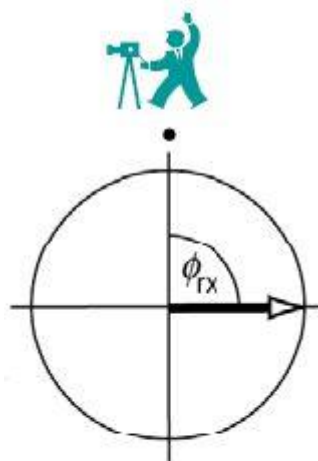
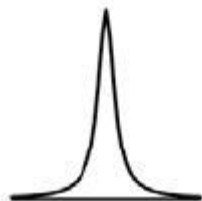
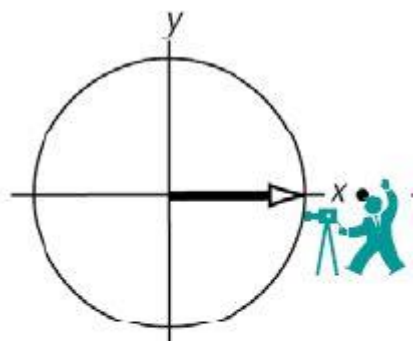


- Igy ahelyett, hogy újrafókuszálná a jel két ágát, az ellenkező forgásirány következtében a dublett (multiplett) ágai a második periódus alatt még inkább szeparálódnak. Amennyiben ekkor detektálunk, tiszta diszperziós jelet kapunk. ( Bár ezt  $t_D$  idő hossza is befolyásolja)

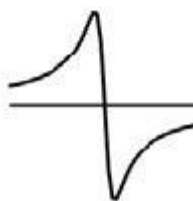


# Pulzus és detektor fáziseltérés

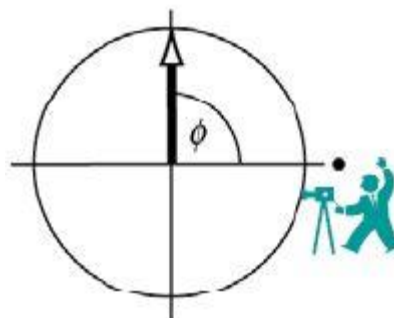
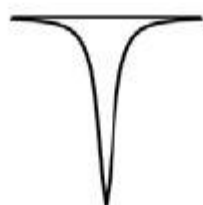
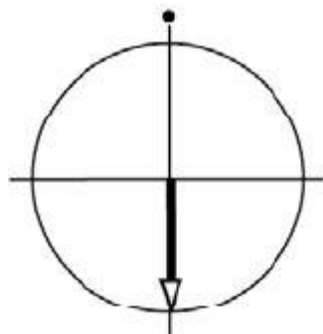
$0^\circ$



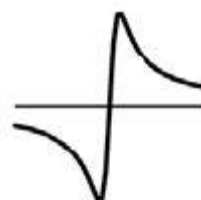
$90^\circ$



$180^\circ$



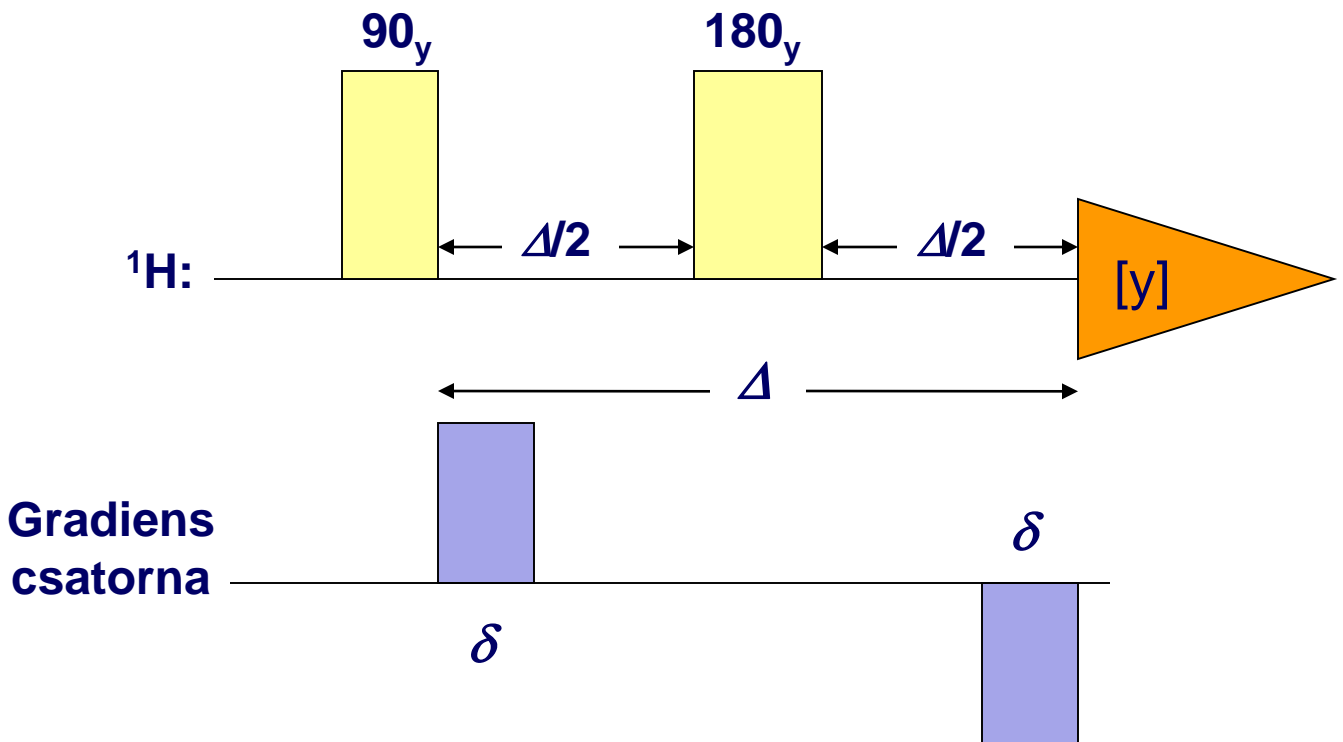
$270^\circ$



# Spin visszhang kísérlet térgradiensekkel

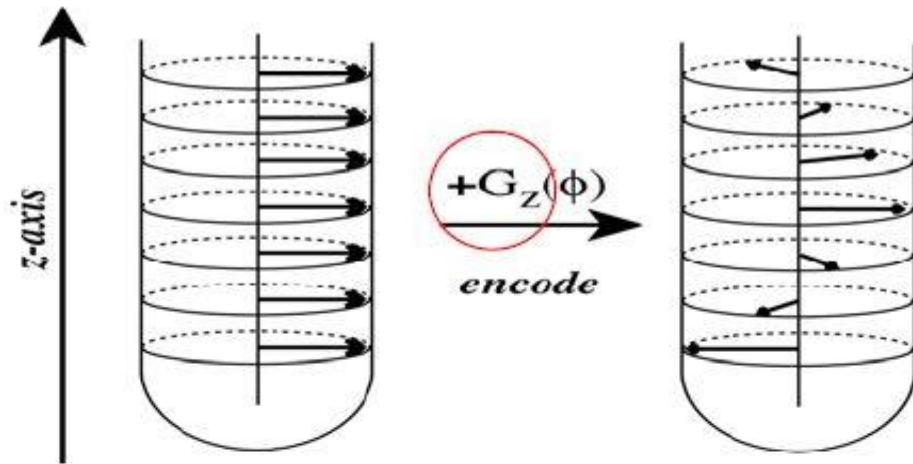
Diffúziós (öndiffúziós) állandó : Ismerete a kémia és biológia területén alapvető jelentőségű a molekuláris mozgások és kölcsönhatások megismerése szempontjából.

A gradiens- NMR spektroszkópia kiváló lehetőség NMR-aktív magokat tartalmazó részecskék diffúziójának tanulmányozására. A legegyszerűbb ilyen kísérlet a spin-visszhang kísérlet kombinációja két gradiens-pulzussal. A két gradiens pulzus nagysága pontosan ugyanakkora, de előjelük ellentétes, így az adatgyűjtés alatti térhomogenitás biztosított.

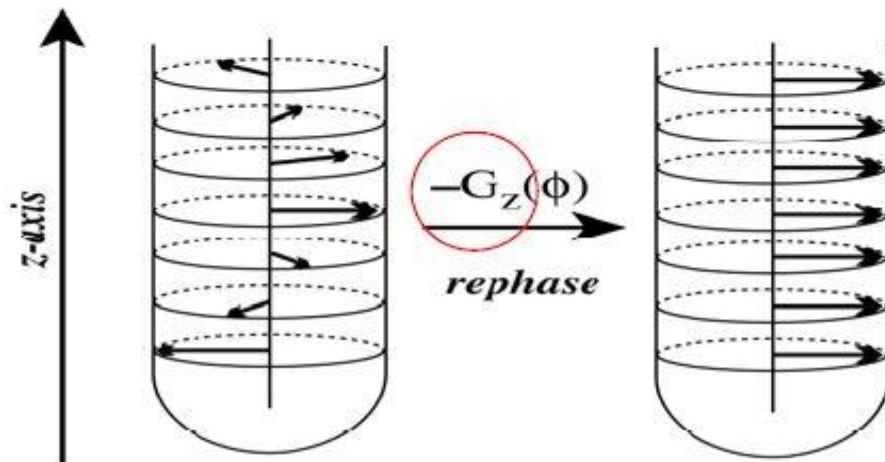


Vizsgáljuk meg, hogy a „kódoló” és „dekódoló” gradiensok milyen hatást fejtenek ki a különböző sebességgel mozgó (diffundáló) spinek esetén. A gradiens hatására egyes spinek gyorsabban, mások lassabban változnak a forgó koordinátarendszerben.

# Gradiens pulzusok hatása



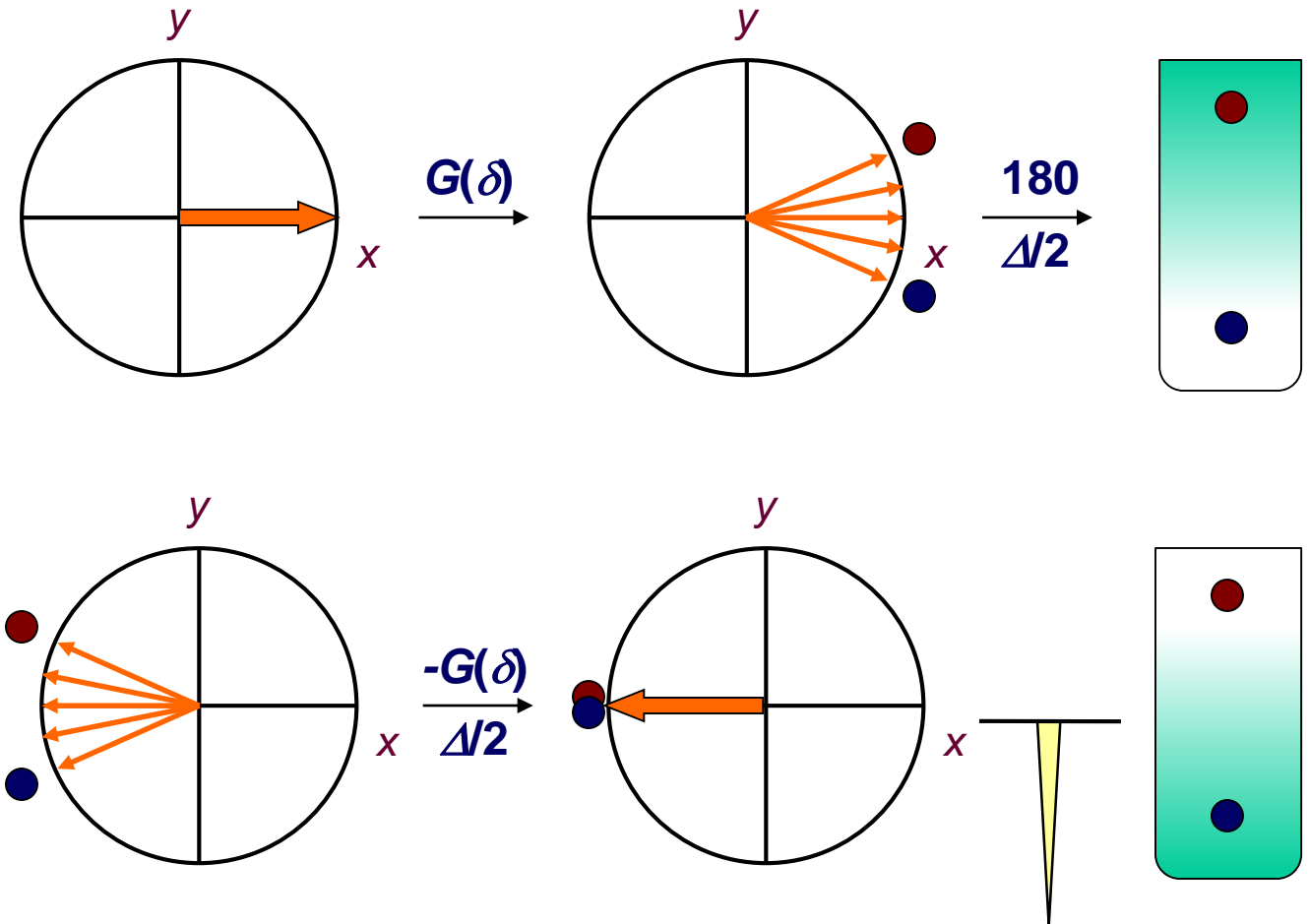
fázisvesztés



újráfókuszálás

# Spin visszhang kísérlet térgradiensekkel

Abban az esetben, ha nincs számottevő diffúzió :

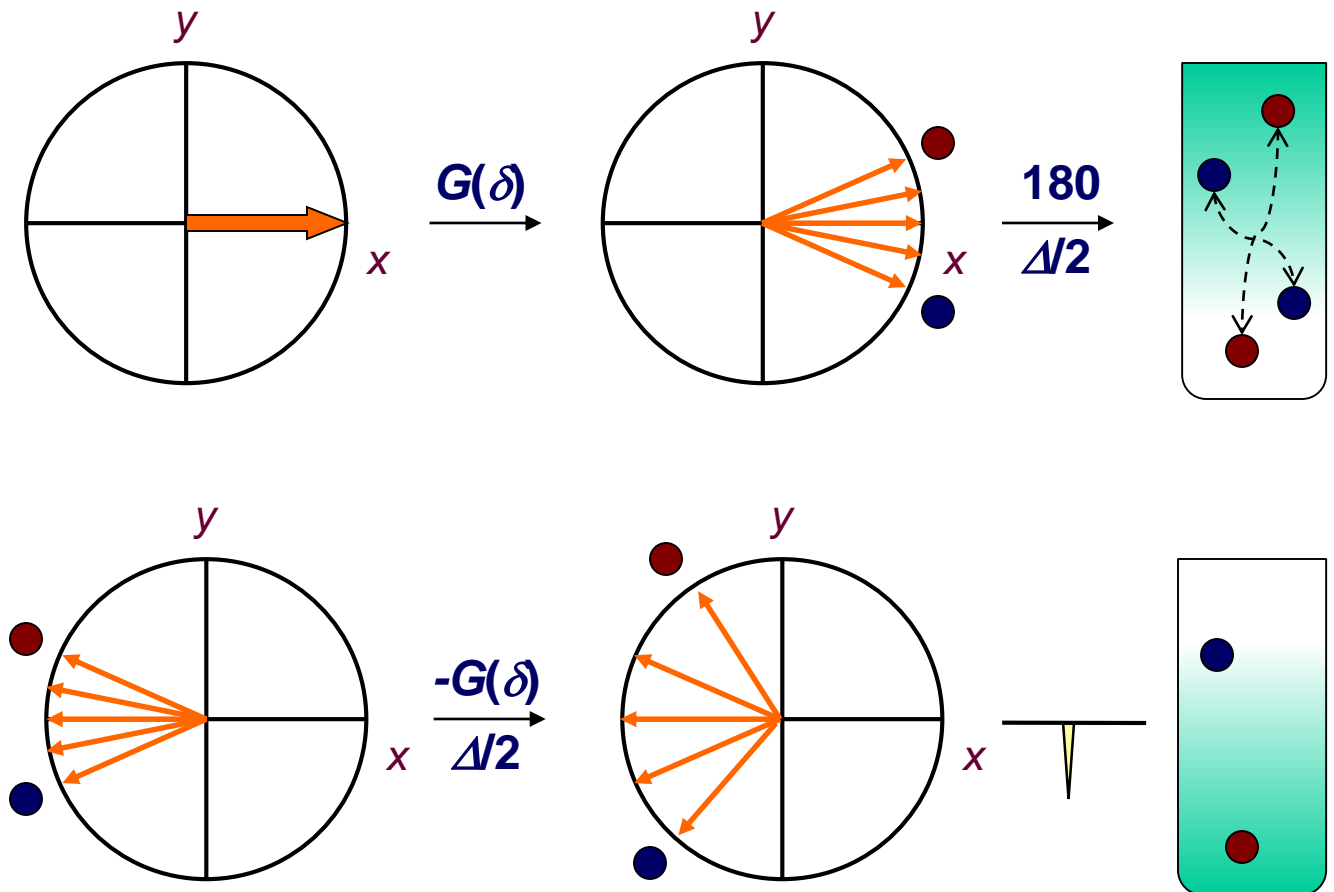


A kék/piros gombócok a tér különböző helyeit elfoglaló azonos típusú spineket jelentik.

Amennyiben a spin nem mozdul el a térben a kísérlet folyamán, a gradiens hatása nem észlelhető, a „dekódoló” gradiens visszaállítja azt az állapotot, melyet a „kódoló” gradiens „elrontott”. A spin-visszhang jelének intenzitása nem változik.

Amennyiben azonban a spin gyorsan mozog (eldiffundál az eredeti helyéről...

# Térgradiensek és a diffúzió



Mivel a kísérlet közben a magok elmozdulhatnak arról a helyről, ahol előzőleg voltak, a „dekódoló” gradiens hatása az lesz, hogy a gyorsabb (eldiffundáló) spinek fázisvesztése is gyorsabb lesz – azaz a jelük intenzitása csökken. Végeredményben, minél a gyorsabban megy végbe a diffúzió, annál kisebb lesz a jelintenzitás.

A jelintenzitást ezenfelül a  $G$ ,  $\delta$  és  $\Delta$  paraméterek megváltoztatásával tudjuk befolyásolni.

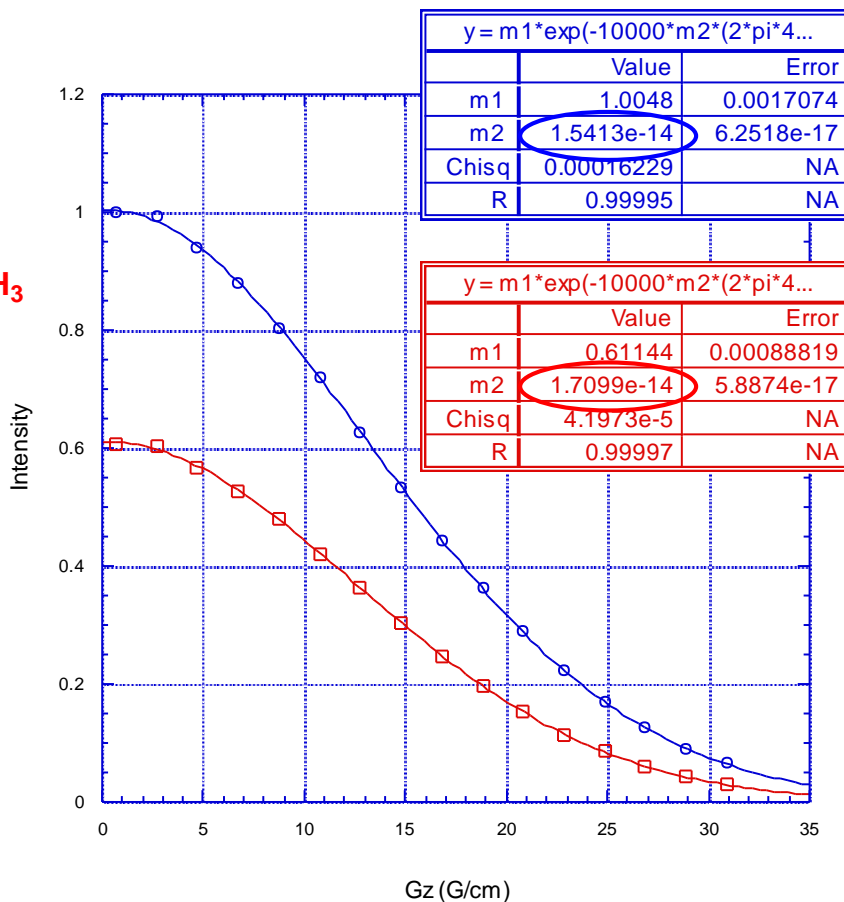
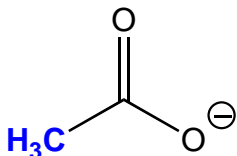
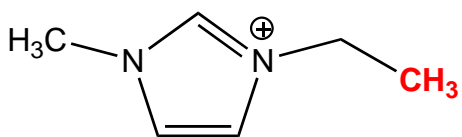


# Térgradiensek és a diffúziós állandó

A  $D$  diffúziós állandó méréséhez a kísérlet különböző  $G$  értékeknél történő megismétlése szükséges, más mérési paraméterek változatlanul tartása mellett. A mért jel-intenzitások és a diffúziós állandó közti összefüggés: (Stokes, Einstein)

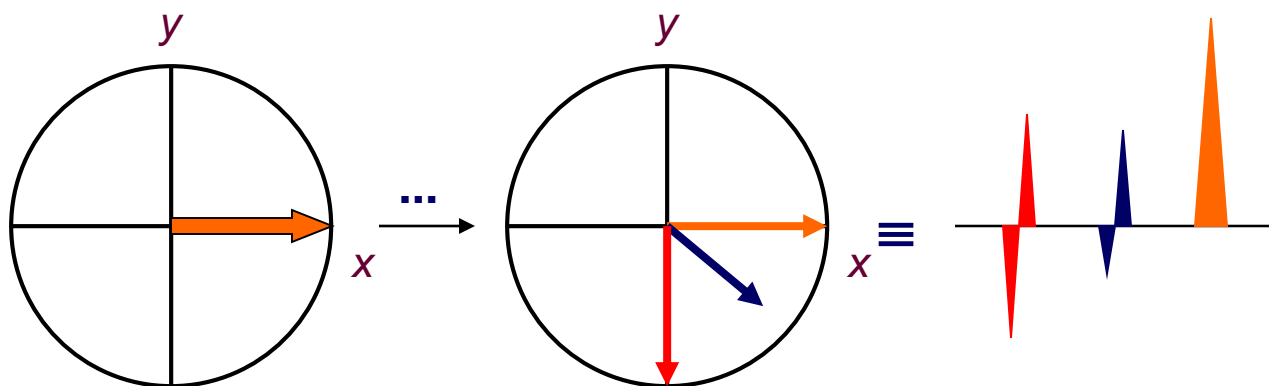
$$I(G) = I_0 \times e \left[ -\gamma^2 G^2 \delta^2 D \times (\Delta - \delta / 3) \right]$$

irodalmi példa egy ilyen kísérletre  $40\text{ }^\circ\text{C}$ -on :



# Spin visszhang alkalmazások

- Ha jobban meggondoljuk azonban, egy egyszerű NMR mérés során ( $90^\circ$ -os, vagy ennél kisebb pulzus alkalmazása) sem nyerhetünk tiszta abszorpciós jelet.
- Nem mérhetünk közvetlenül a nagy energiájú impulzus után, mert ekkor a vevőtekercsben mesterséges jelek keletkeznének, a tekercs „leégne”. Kell egy minimális várakozási idő, az un. **‘pre-akvizíciós várakozási idő’** (*DE*).  
Azonban ez alatt az idő alatt a kissé különböző mágnesezettségi vektorokon a kémiai eltolódás különbség következtében különböző mértékű fáziseltódást észlelünk.



- Miután ez a fáziskülönbség létrejön a különböző kémiai eltolódású jeleken, a jelek fázisa is eltérő lesz, minden jel abszorpciós és diszperziós fázisú jelek keverékéből fog összeállni.

# Spektrum fázis

- Más elnevezés szerint ezeket a komponenseket a FID **reális**, illetve **imaginárius (diszperzív)** komponenseinek nevezzük. Matematikailag koszinusz, illetve szinuszfüggvénnyel írhatók le. (Emlékezzünk az Euler formulára!)

$$S(\omega)_x = \sum \cos(\omega) - \text{reális rész}$$

$$S(\omega)_y = \sum \sin(\omega) - \text{imaginárius rész}$$

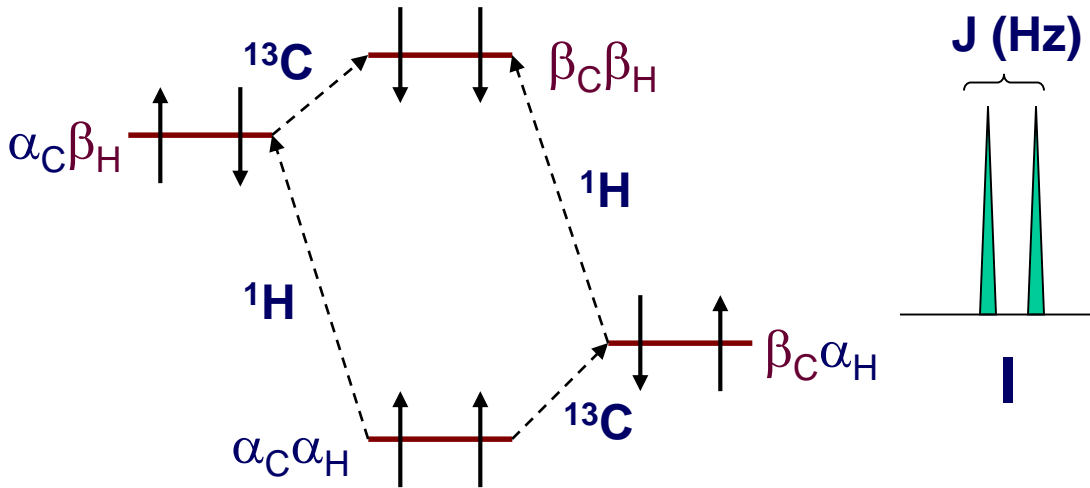
- Számunkra a tiszta abszorpciós fázisú spektrum a kívánatos, ezért a detektor jeléből ezt a **reális** (koszinusz) és az **imaginárius** (szinusz) rész kombinációjából nyerjük. A kombinációs együtthatók a spektrum frekvenciájától függenek.

$$S(\omega) = S(\omega)_x + [ \phi_0 + \phi_1(\omega) ] * S(\omega)_y$$

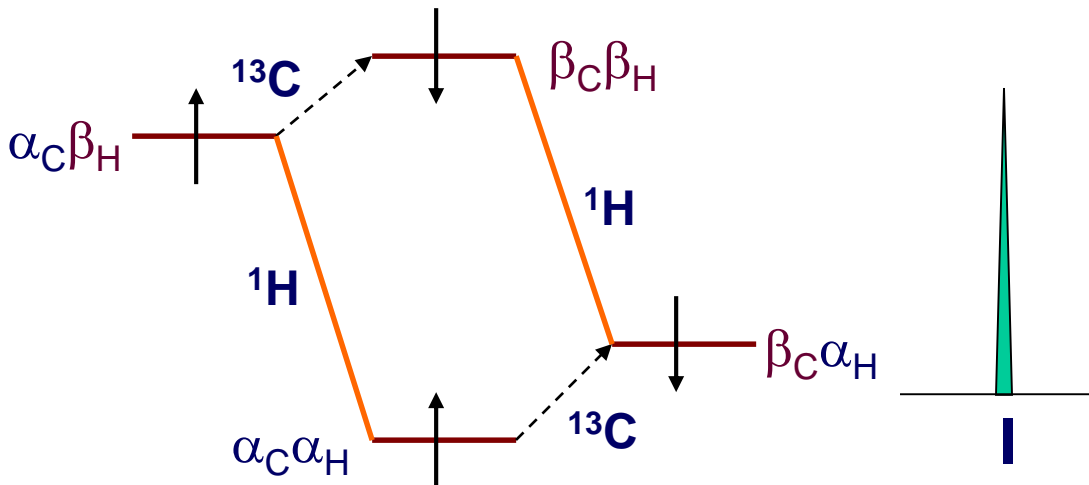
- az egyenletben  $\phi_0$  az úgynevezett **zérusrendű** fázis, és  $\phi_1$  az un. **elsőrendű** fázis faktora. Számértéküket rendszerint nem kell meghatározni, a spektrométer programja általában lehetővé teszi manuális beállításukat, illetve automatikus fáziskorrektíós szoftverek is rendelkezésre állnak. Alacsony  $\gamma$  érték esetén lehetnek nehézségek.

# Heteronukleáris csatolás

Hogyan jelentkezik a  $^{13}\text{C}$  –NMR spektrumokban?

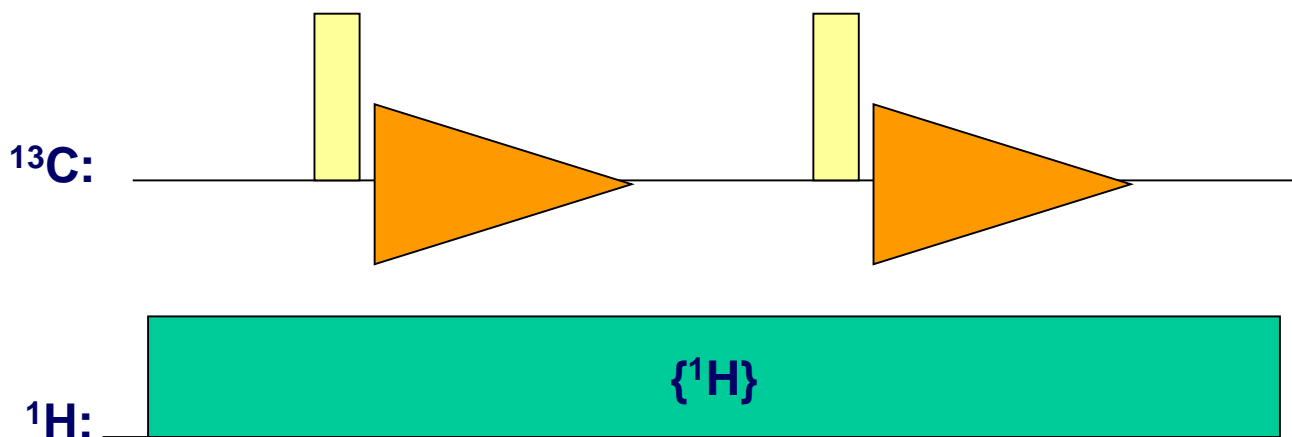


- A  $^{13}\text{C}$  spektrum jelei felhasadnak az  $^1\text{H}$  magokkal való csatolás következményeképpen. Az  $^1J_{\text{CH}}$  csatolási állandók értéke 50 és 250 Hz között változhat. A további csatolások a spektrumokat bonyolulttá és áttekinthetetlenné teszik. Az  $^1\text{H}$  átmeneteket telítve (**lecsatolva**) ezek az átmenetek megszűnnek, a  $^{13}\text{C}$  multiplettek egy vonalként jelentkeznek.:



# Szélessávú protonlecsatolás

•A szélessávú protonlecsatolás kísérleti módszere a következő:



Jellemzők:

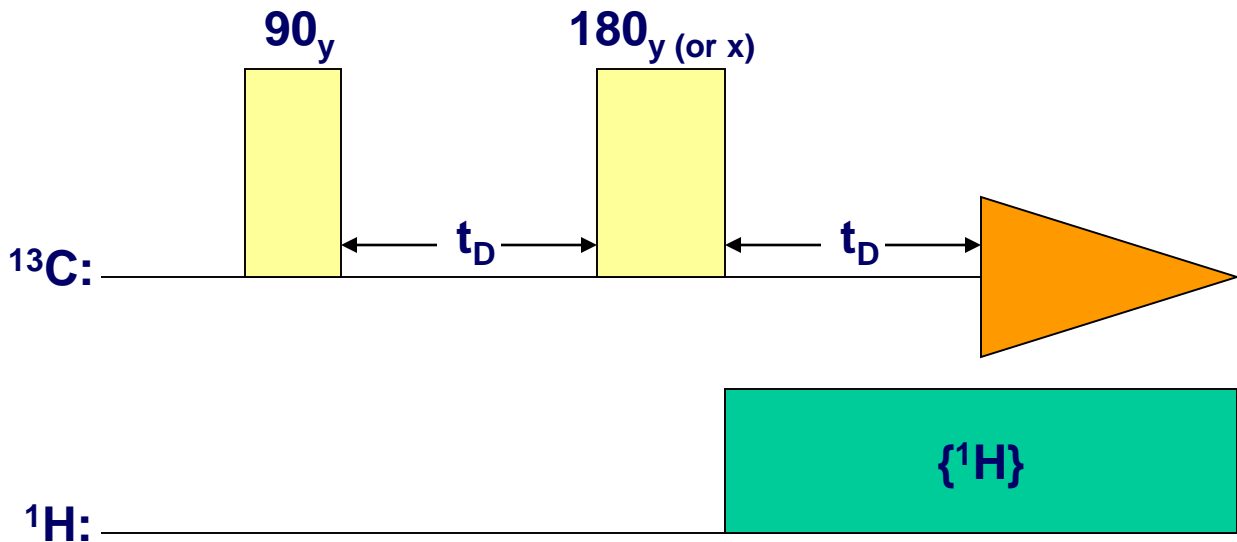
Egyszerű, egy-pulzus, majd adatgyűjtéses pulzusprogram  
Kétcsatornás mérés technika : egy mérő- és egy lecsatoló csatorna alkalmazása. A lecsatolás a teljes mérési idő alatt be van kapcsolva.

Következmény:

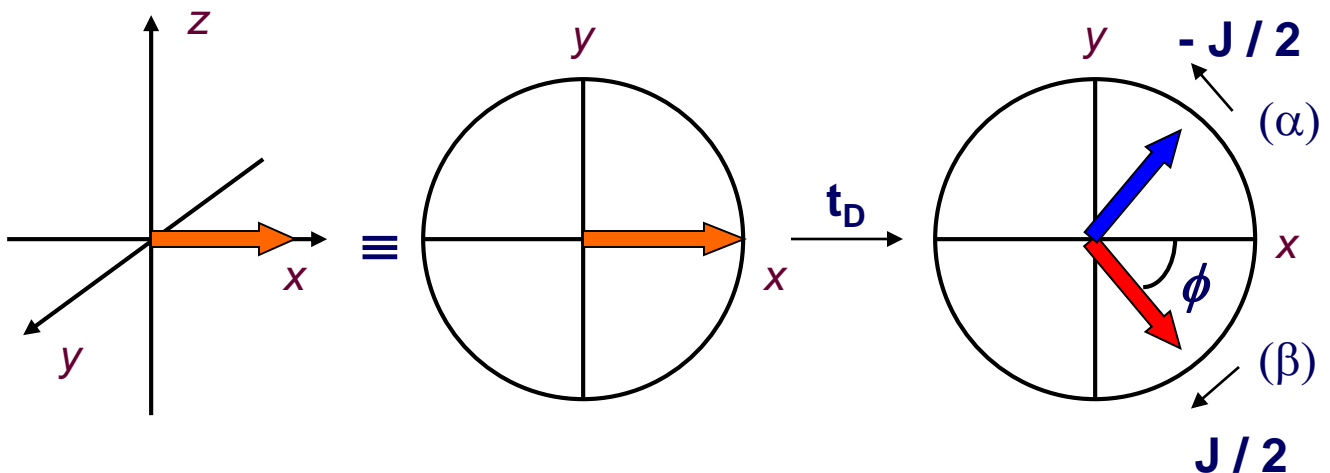
Egyszerű, szingulett jeleket tartalmazó  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum  
A kettősrezonancia folytán szükségszerűen fellépő heteronukleáris Overhauser effektus fellépése. Ez  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  magpár esetén pozitív, intenzitás-növekedés jelentkezik (max 2,5-szörös), tehát javul a jel/zaj viszony.

# Spin-visszhang és a heteronukleáris csatolás

- Kombináljuk a spin-visszhang pulzusszekvenciát egy kapuzott lecsatolással:



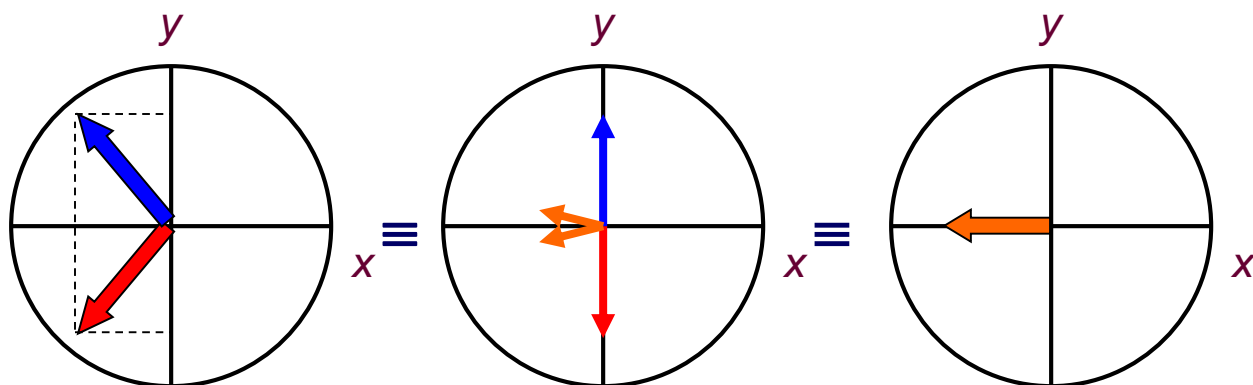
- Vizsgáljuk meg a  $^{13}\text{C}$  mágneszettségi vektor viselkedését az adott pulzusszekvencia során! Tekintsük először egy CH (metin) szénatom esetét. A  $\pi/2$  pulzus után az  $\mathbf{M}_{xy}$  vektor a  $\mathbf{J}$  csatolás hatására „szétválik” a proton spinállapotoknak megfelelő  $\alpha$  and  $\beta$  komponensekre



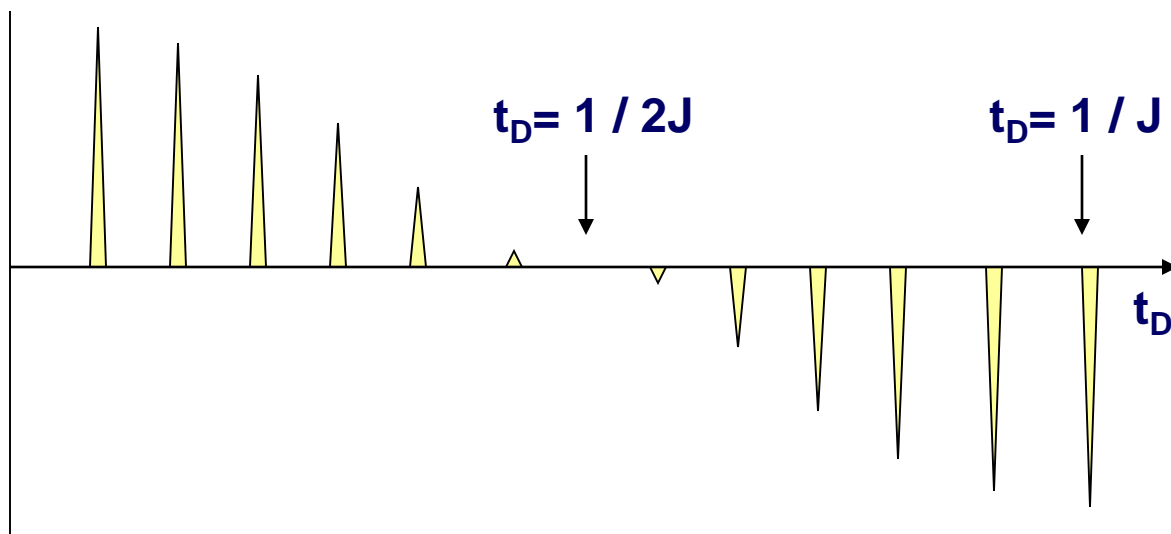
A kitérés szöge leírható:  $\phi = \pi * t_D * J$ .

# Spin visszhang és a heteronukleáris csatolás

A  $t_D$  idő alatt a két vektor „szétnyílik”, az eredő mágneszettség csökken (egy pillanatig zérusig, hiszen a két vektor eredője is 0), majd újból nő, de az eredő  $-x$  irányba mutat. A 180 fokos,  $\pi$  pulzus invertálja a mágneszettségi vektorokat (tükrözi az  $yz$  síkban)



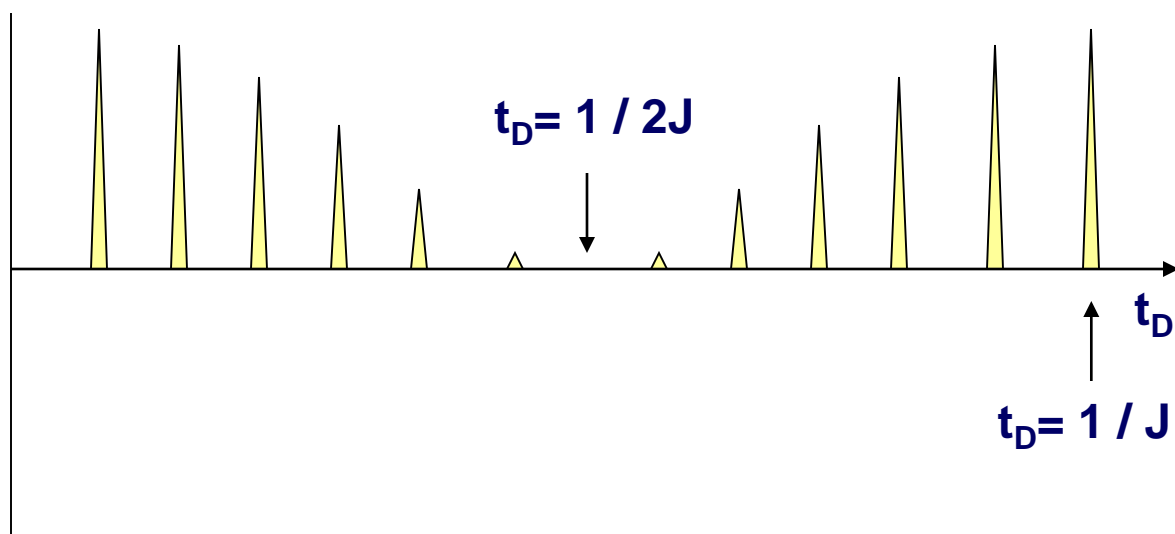
- Egy további  $t_D$  idő múlva (most már az  $^1\text{H}$  lecsatolást bekapcsolva) a két komponens „találkozik”.
- A jelintenzitást a  $t_D$  függvényében ábrázolva:



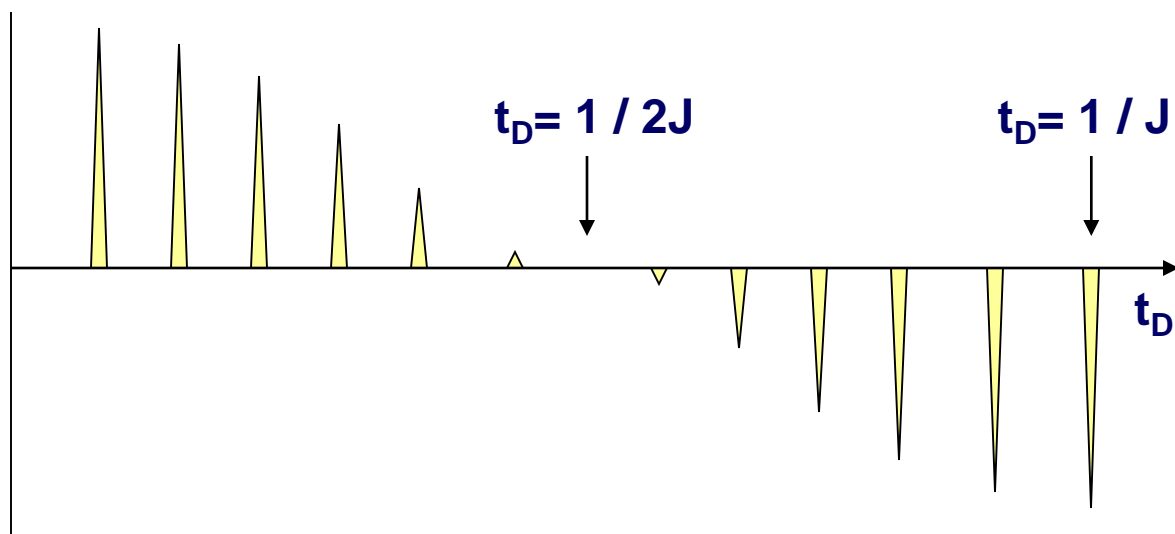
# Spin-visszhang és a heteronukleáris csatolás

- A jelintenzitás egy koszinuszfüggvény szerint változik  $t_D$ , függvényében  $1 / 2J$  helyen minimumot (zérus),  $1 / J$  helyen maximumot ér el.

Egy  $\text{CH}_2$  (metilén) szénatom jelére hasonló analízist végezve a jelintenzitás – várakozási idő függvényre a következő eredményt kapjuk:

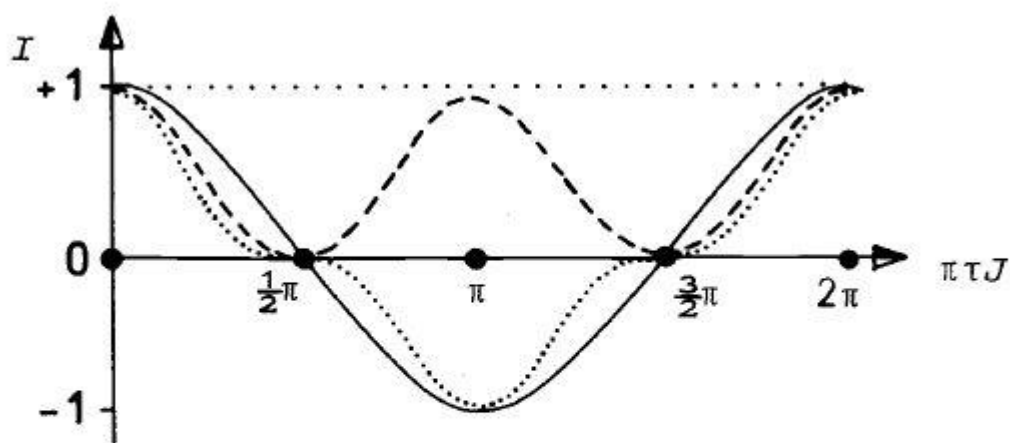
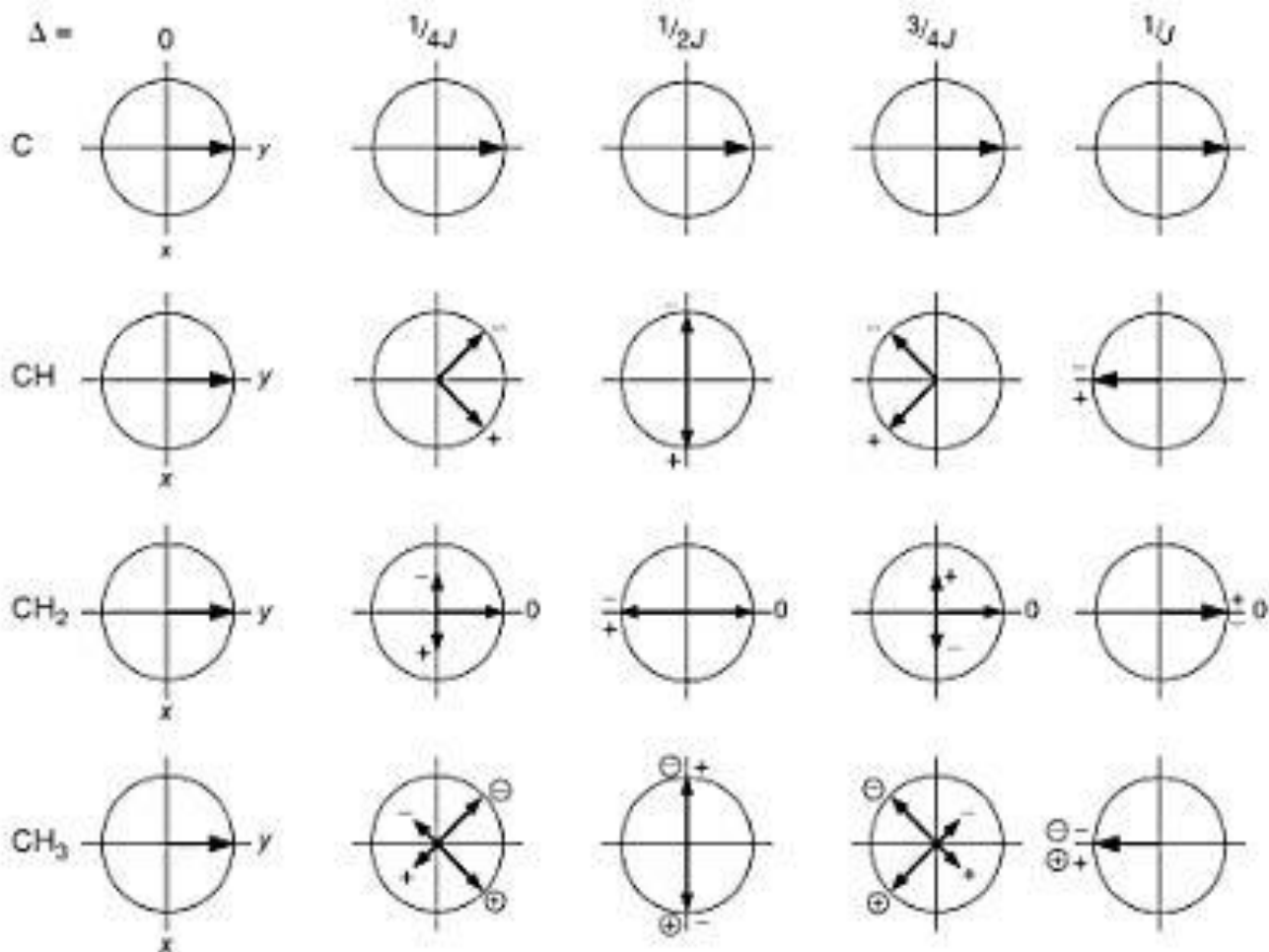


- Analóg módon, egy  $\text{CH}_3$  (metil), szénatomra:





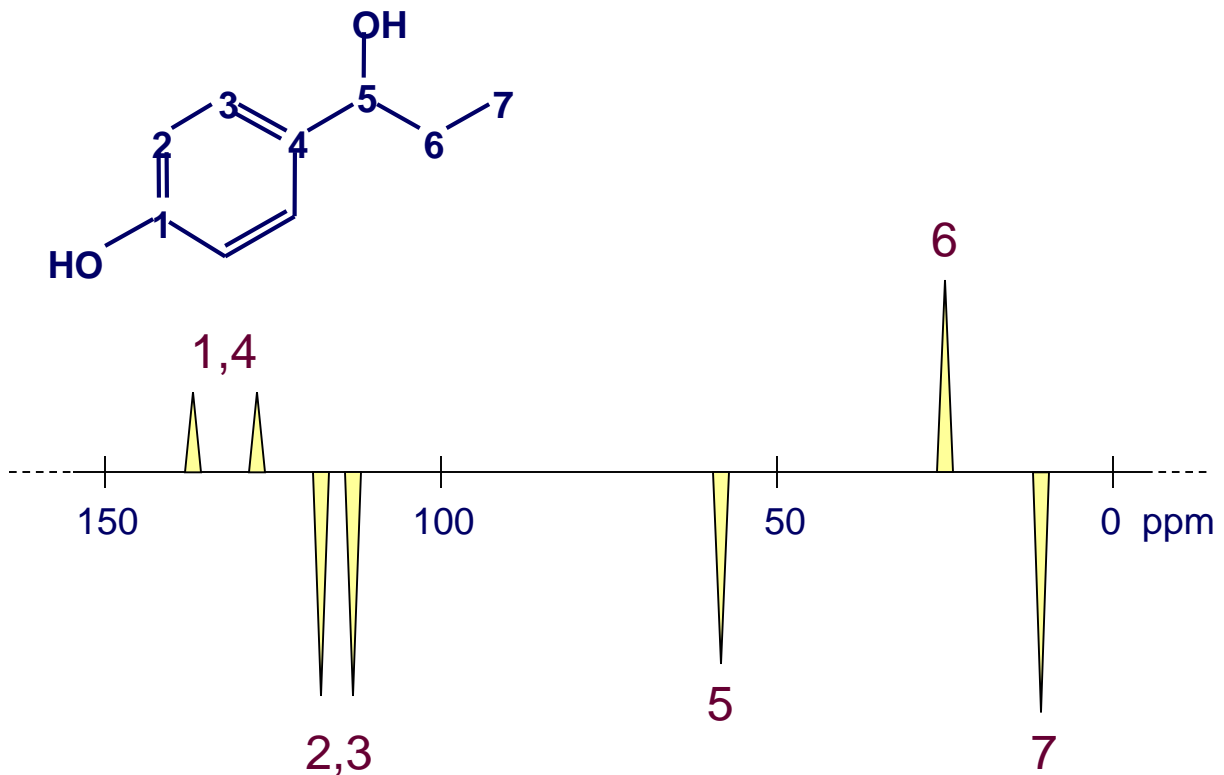
# Intenzitásváltozás az összes jelre:



- .....  $I_C = I_0$
- $I_{CH} = I_0 \cos(\pi \tau J)$
- $I_{CH_2} = I_0 [1 + \cos(2\pi \tau J)]$
- .....  $I_{CH_3} = I_0 [3 \cos(\pi \tau J) + \cos(3\pi \tau J)]$

# Spin visszhang és a heteronukleáris csatolás

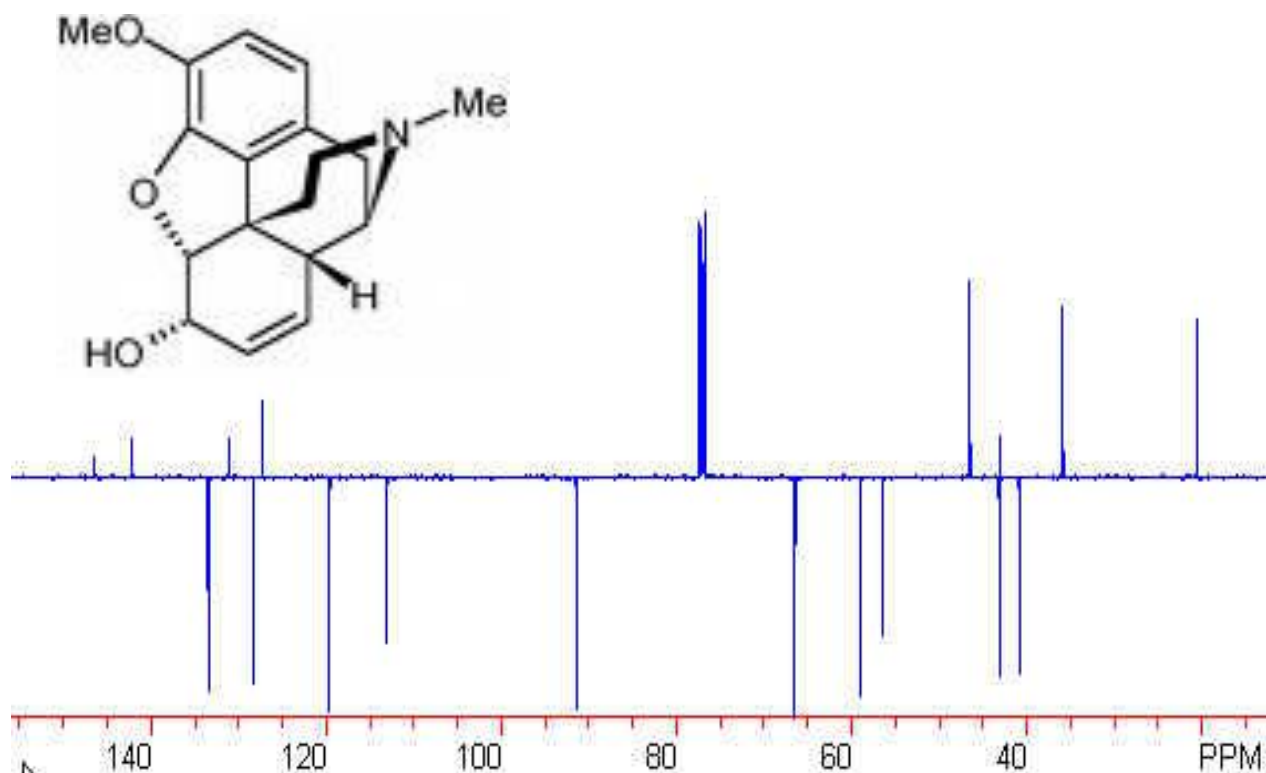
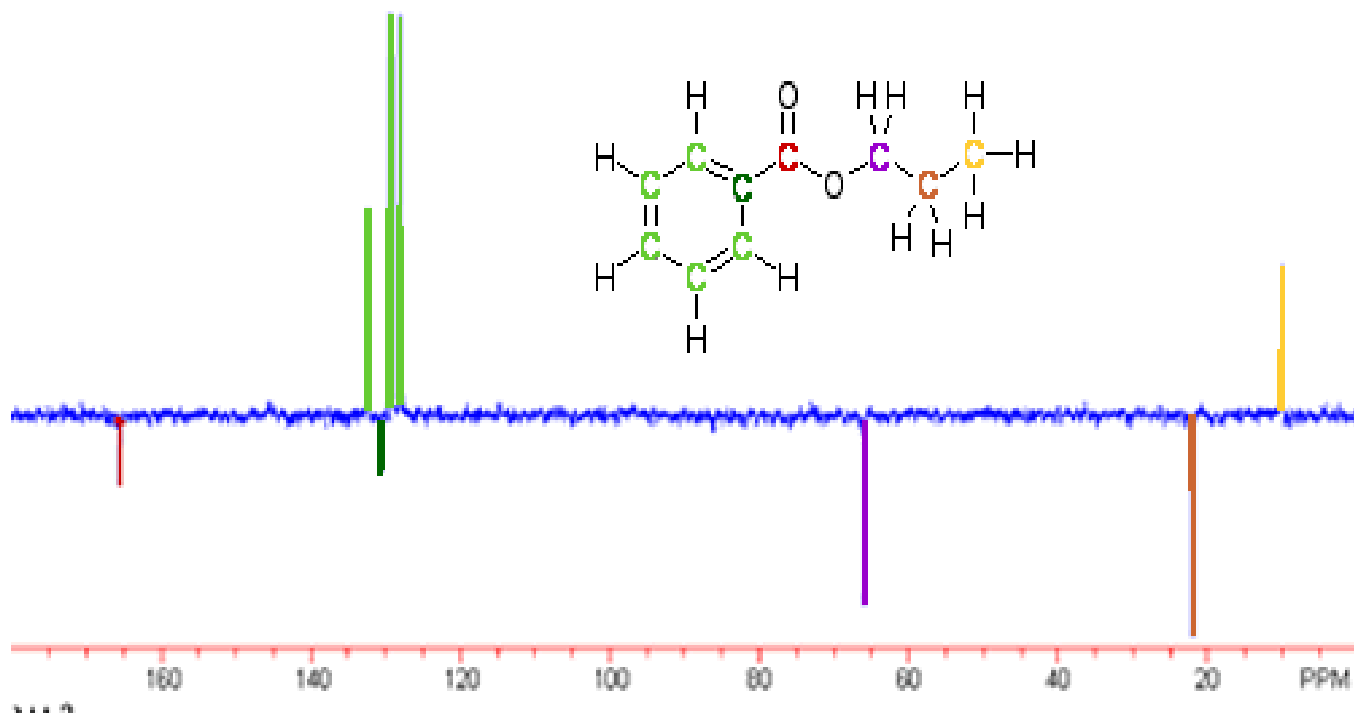
Feltételezve, hogy a  $^1J_{CH}$  csatolási állandók nem változnak nagyon, a  $t_D$  értékét  $1/J$ -nek (1/120-140 Hz) választva, a páros és páratlan multiplicitású jeleket a lecsatolás után ellentétes fázisban kapjuk meg.



- A kvaterner C jelek a fenti kísérletben mindig fázisban maradnak, hiszen ők nem mutatnak  $^1J$  protoncsatolást. Fázisuk előjele alapján tehát meg tudjuk különböztetni a C, CH, CH<sub>2</sub> és CH<sub>3</sub>, atomokhoz tartozó  $^{13}C$  jeleket. Ezt a kísérletet (ami tulajdonképpen egy kapuzott spin-visszhang), az irodalomban leggyakrabban csatolt proton tesztnek nevezik (**attached proton test, APT**).

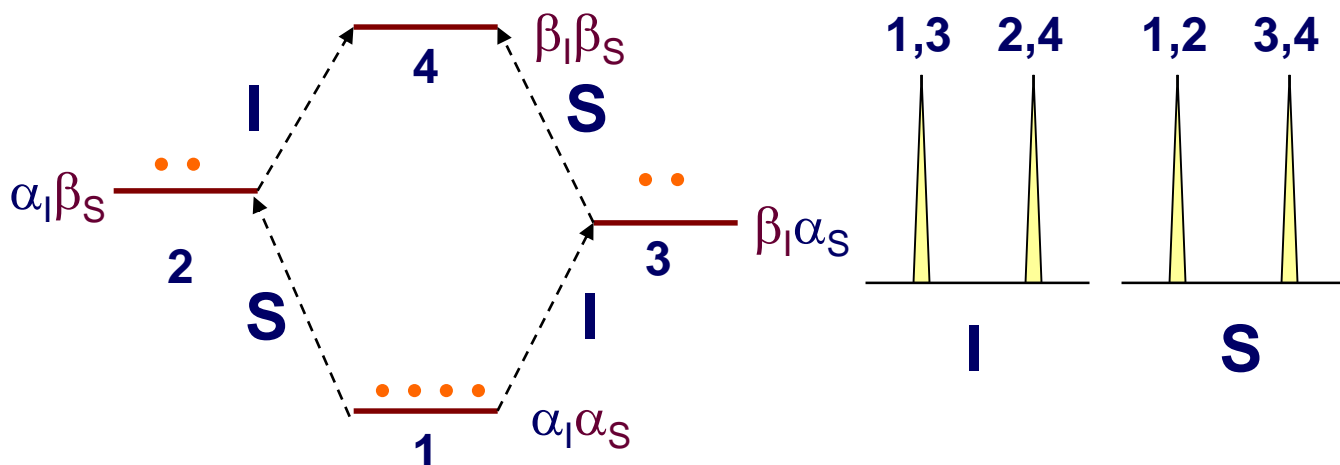
Ugyanezen célból fejlesztették ki a **DEPT** pulzusszekvenciát is.

# APT (attached proton test)

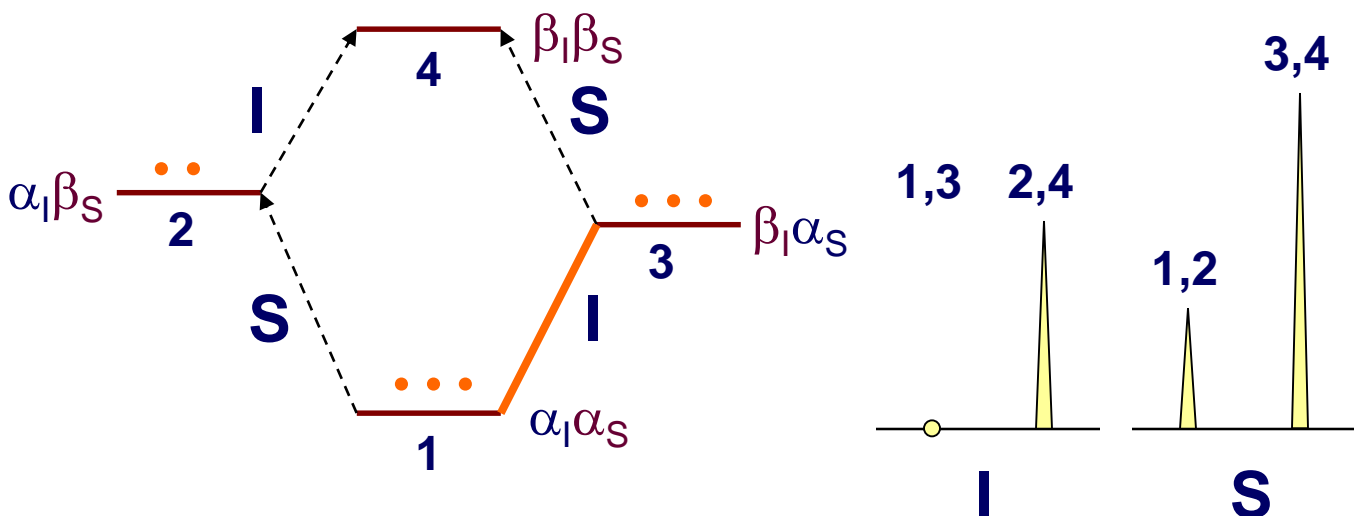


# Polarizáció átvitel

- A jelenséget először egy homonukleáris ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) esetben próbáljuk vázolni. Az **I** és **S** spinek gyengén csatolnak egymással, kémiai eltolódáskülönbségük nagy. A „gombóc” a nívók betöltöttségének különbségét jelzi.

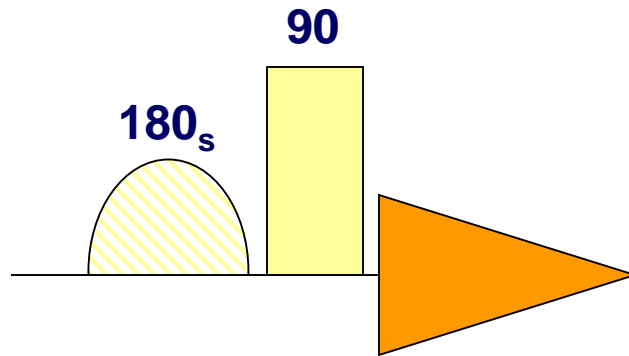


- Amennyiben az egyik spin egyik átmenetét pl. : ( $\alpha_I\alpha_S - \beta_I\alpha_S$ ) szelektíven besugározzuk (telítjük) a két nívó betöltöttsége azonossá válik (ugyanannyi gombóc az 1. és 3. szinten !)

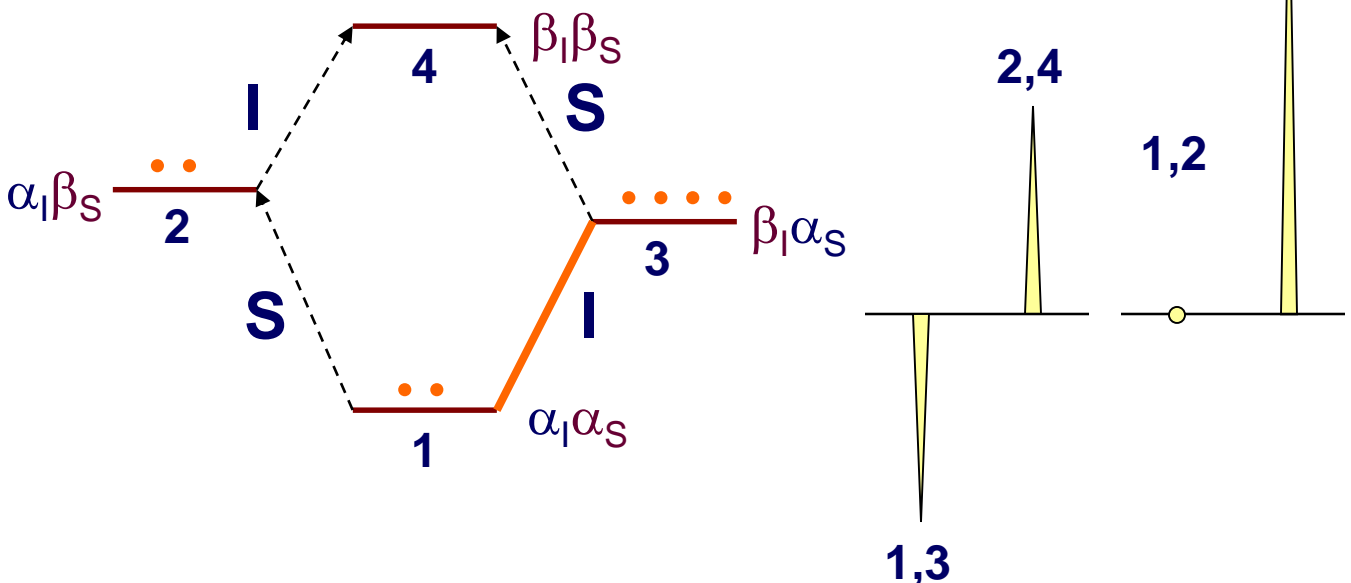


# Homonukleáris polarizáció átvitel és inverzió

- Miután megváltoztattuk a nívók benépesítettségét, ennek megfelelően a spektrum vonalainak intenzitása is változni fog! A polarizációt egyik magról a másik magra vittük át, ezért a módszer neve szelektív polarizáció átvitel, angolul **selective polarization transfer**, rövidítve **SPT**. Ennek a módszernek egy további variációja is lehetséges: Alkalmazzuk a következő pulzusszekvenciát:

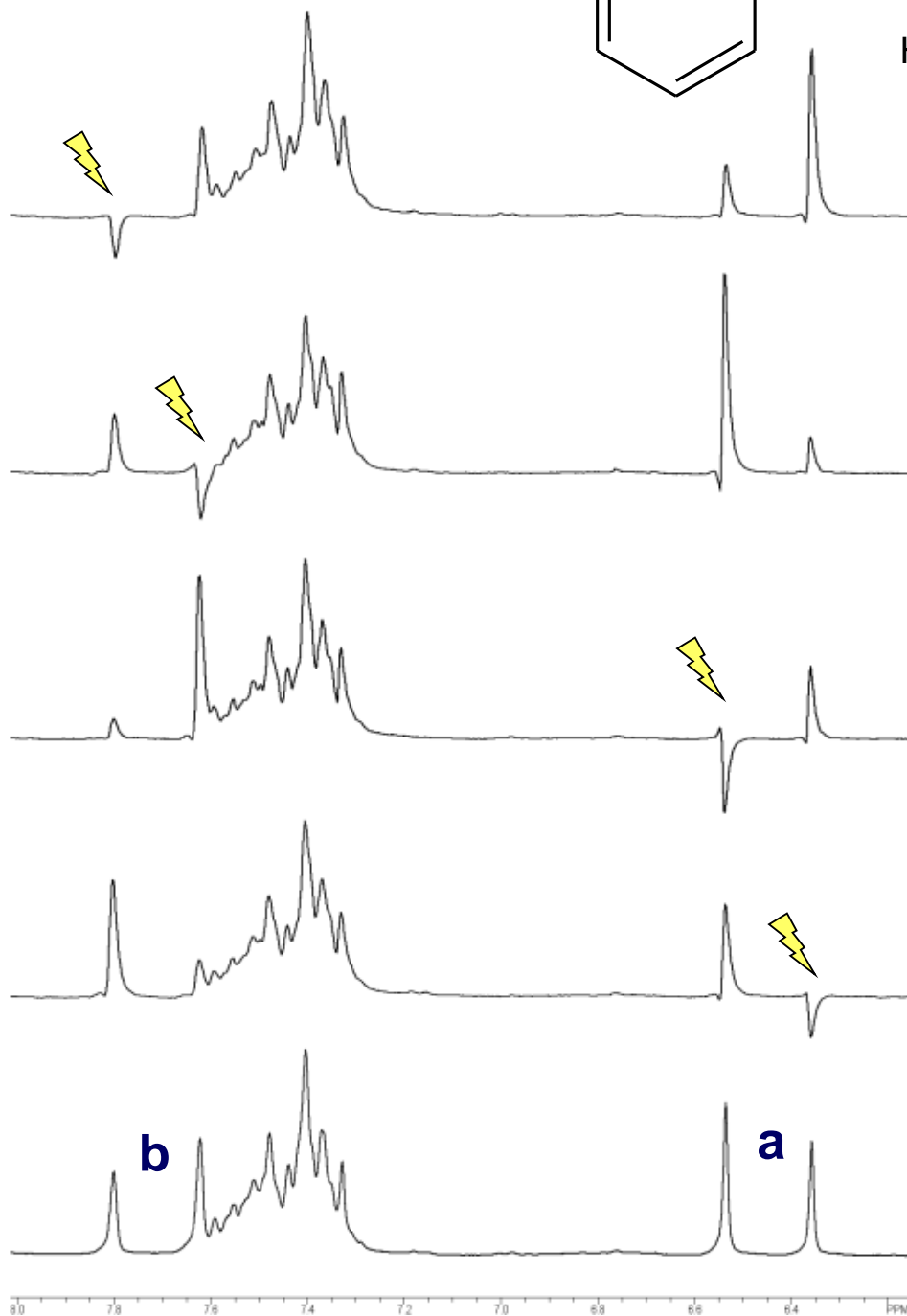
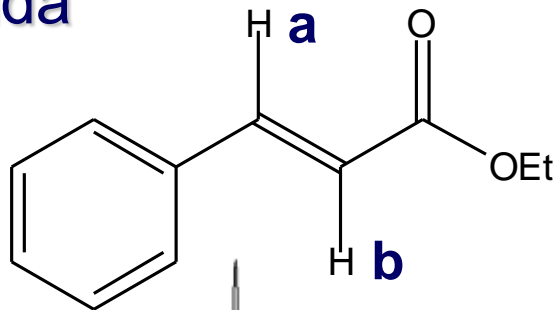


Az első pulzus egy kis energiájú, és ezért szelektív  $\pi$  pulzus. Mint tudjuk, a  $\pi$  pulzusok invertálják a populációkat. Esetünkben csak az 1,3 átmenet populációját.



# SPI : egy alkalmazási példa

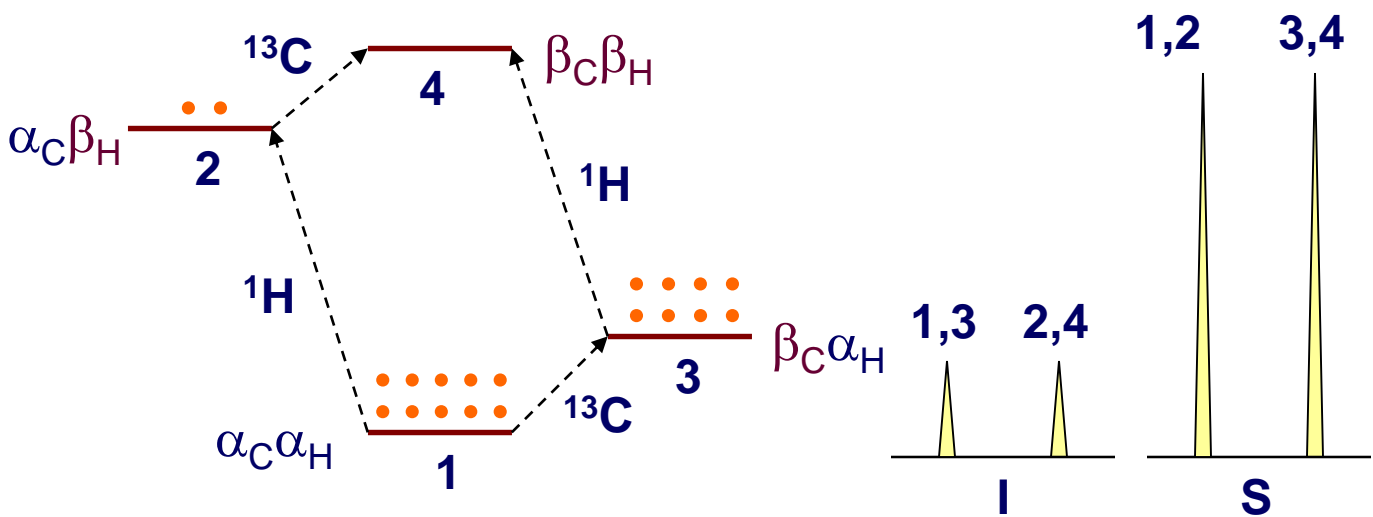
- Egy gyakorlati példa:  
fahéjsav-etilészter



- Az **a** és **b** olefin protonjeleket szelektíven invertáljuk, jól megfigyelhetők a jelcsoporton belüli intenzitásváltozások

# Heteronukleáris polarizáció átvitel

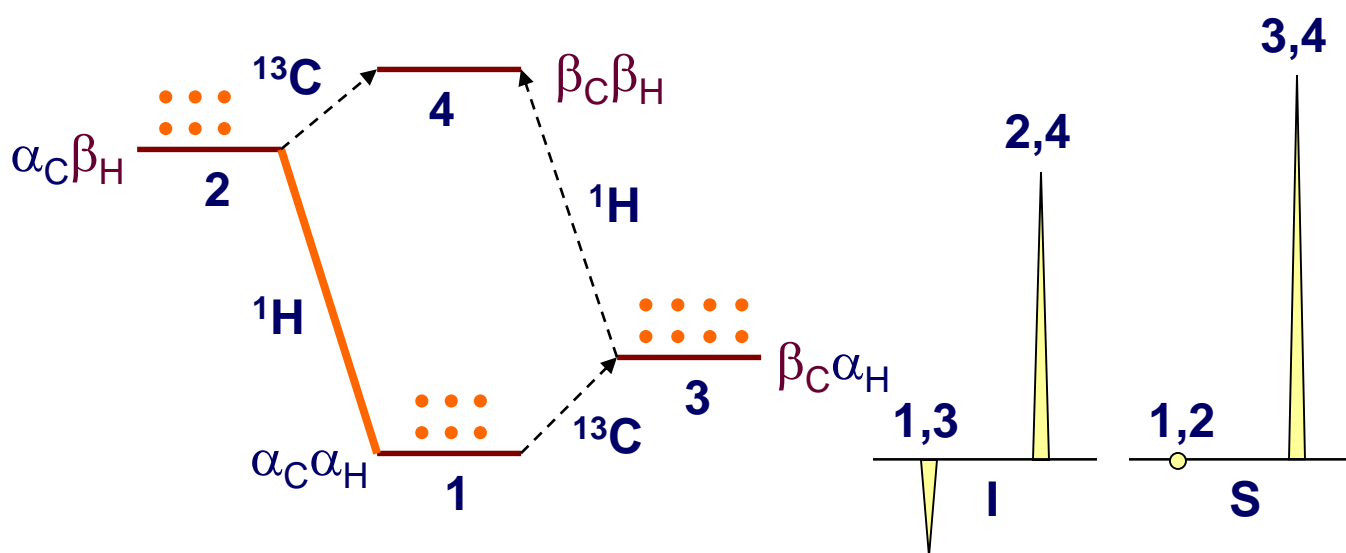
Mivel itt nemcsak polarizáció átvitel, hanem inverzió is létrejön, a módszert szelektív polarizácó(s) inverzióának (**selective population inversion, SPI**) nevezzük. Az SPT és az SPI átfedett spinrendszerek elemeinek azonosítására alkalmas technika (ld. példa: fahéjsav etilészter). Heteronukleáris változatuk azonban ennél is sokkal hasznosabb és elterjedtebb. Nézzük meg, hogyan változnak itt az energianívók:



A  $^{13}\text{C}$  és  $^1\text{H}$  nívók benépesítettségi aránya a giromágneses tényezők arányának (1: 4) felel meg. Ezekkel arányos a spinátmenetekhez tartozó jelek intenzitása is. Bár a természetes előfordulás következtében fellépő hátrányt nem tudjuk kiküszöbölni, felmerül a kérdés, hogy az  $^1\text{H}$  mag kedvezőbb érzékenységet hogyan tudnánk a vele csatoló, de kevésbé érzékeny  $^{13}\text{C}$  mag rezonanciájának mérése során hasznosítani. A módszer lehetőséget teremt más, ún. "ritka"-spinű heteromag (pl  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$ , stb) javított érzékenységű mérésére is...

# Heteronukleáris polarizáció átvitel - SPT

- Nézzük, hogy viselkedik egy heteronukleáris AX spinrendszer az SPT kísérlet során. Miután telítettük az **1,2** vonalhoz tartozó átmenetet, (ez egy proton-proton átmenet!) vizsgáljuk meg a nívók benépesítettségét:



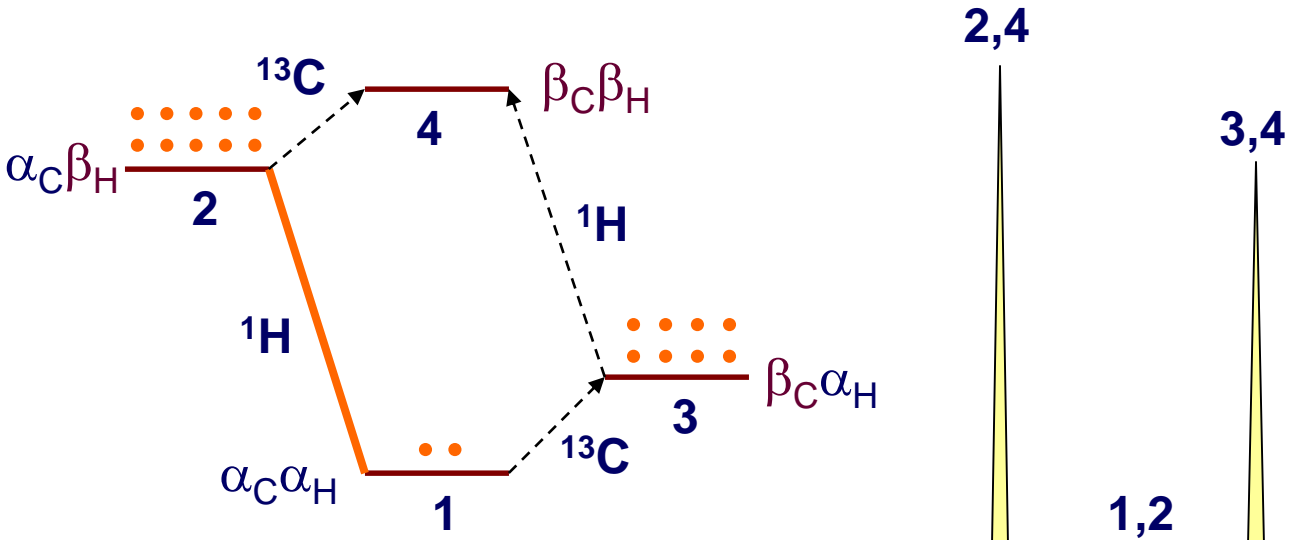
- A jelintenzitás a betöltöttség-különbséggel arányos módon fog változni, kétszeres növekedés lesz a másik  $^1\text{H}$  átmeneten és háromszoros növekedés az egyik  $^{13}\text{C}$  átmeneten (**3,4**).

Összegezve: nőtt a  $^{13}\text{C}$  intenzitás az eredeti spektrumhoz viszonyítva (ami a célunk volt), abszolút értékben pedig a nyereség kétszeres!

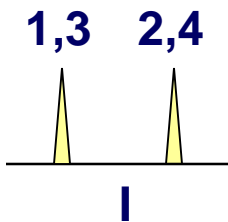


# Heteronukleáris polarizáció átvitel – SPI

- Végezzünk most egy hasonló SPI kísérletet! Ekkor is az **1,2** átmenet benépesítettségét változtatjuk, de most hajtsunk végre egy szelektív inverziót! (4X több gombóc a felső nívón)



- Nézzük még egyszer az alsó ábrán az eredeti  $^{13}\text{C}$  intenzitásviszonyokat:

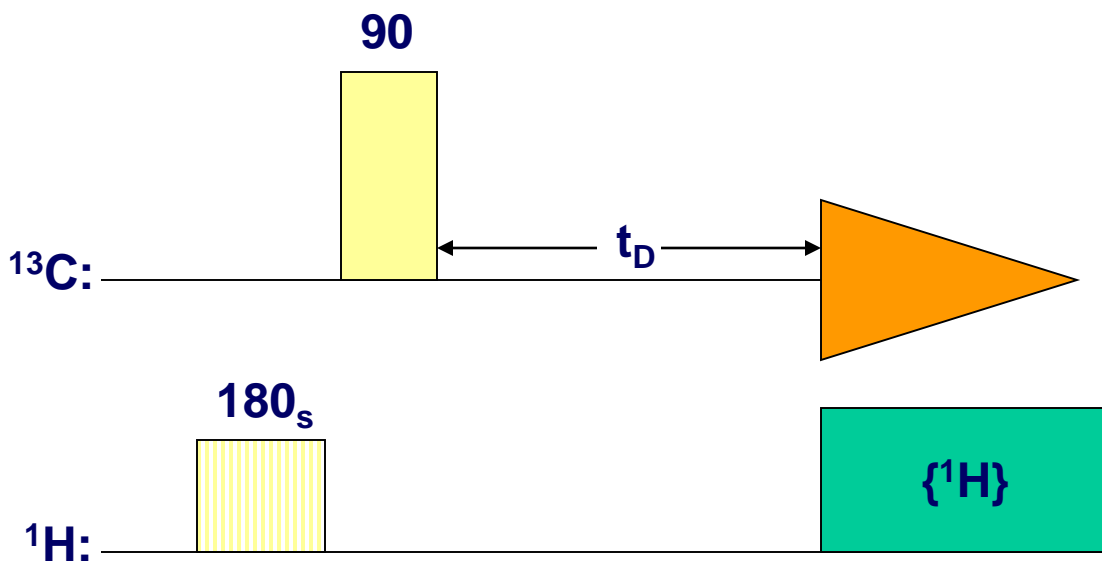


- A heteronukleáris SPI eredménye egy -3, +5 intenzitású dublett lesz, amely abszolút értékben négyszeres intenzitásnövekedést jelent. (jobb ábra)

# J-moduláció és polarizáció átvitel

A  $^{13}\text{C}$  intenzitás növekedés nyereség, de az eddigi módon felvett spektrumok mindig protoncsatoltak, tehát eredendően multiplettek, ráadásul torz (fel-le mutató) jelek. Felmerül a szélessávú protonlecsatolás igénye. Ezt nem tudjuk egyszerűen megtenni, hiszen az intenzitás növekedésének eredete az  $^1\text{H}$  nívók különbsége. Ez azonban eltűnne, ha az  $^1\text{H}$ -csatornán szélessávú protonlecsatolást alkalmaznánk.

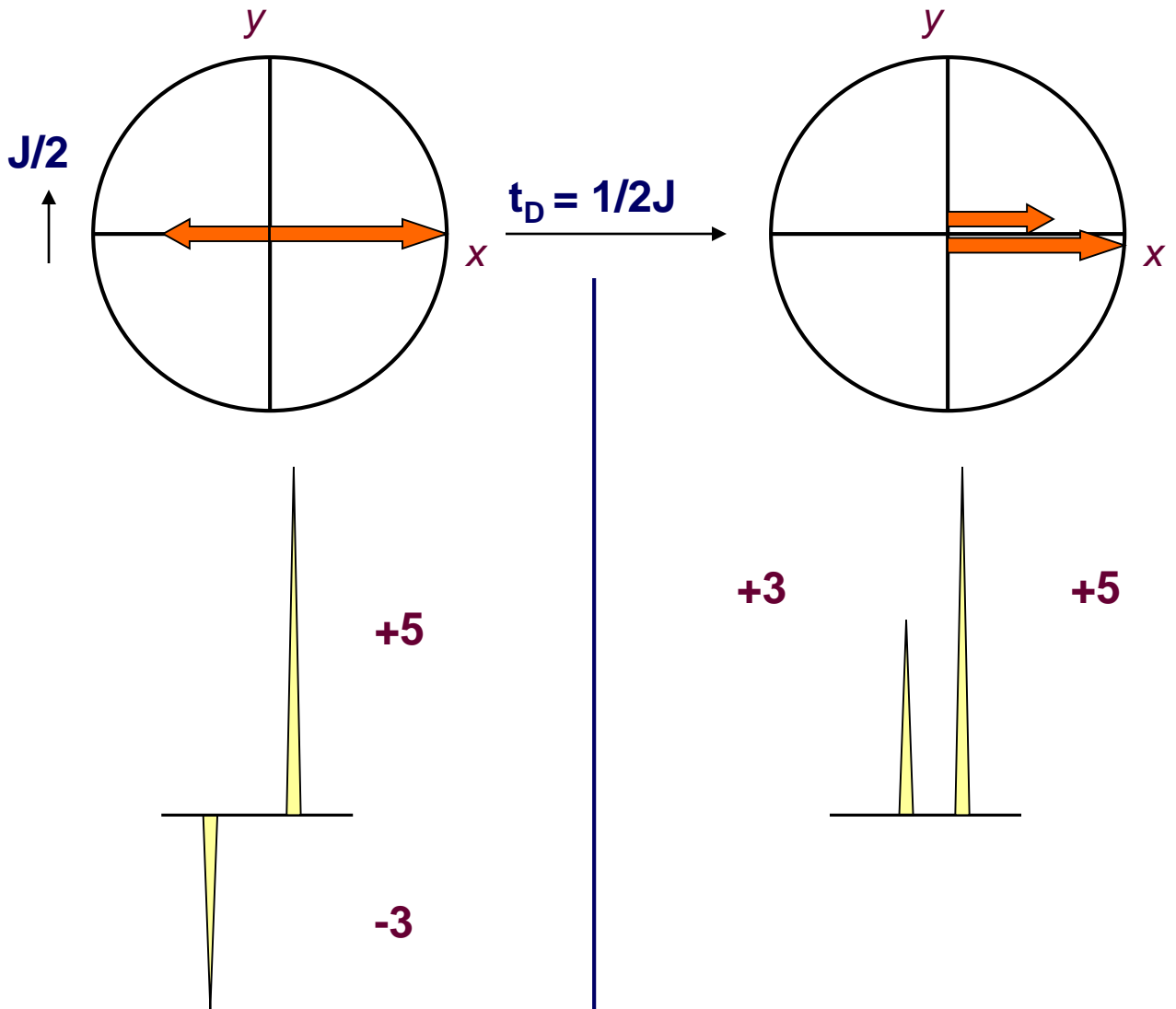
A megoldást az ún. csatolás-moduláció alkalmazása jelenti.



Válasszuk  $t_D$  értékét  $1/2J$  -nek! Ekkor a  $\pi/2$  pulzus és  $t_D$ , idő után a  $^{13}\text{C}$  mágneszettségi vektor az eddig tanultak alapján újrafókuszálódik. A következő vektorábrán látjuk ezt.

# J-moduláció és polarizáció átvitel

Most csak a  $^{13}\text{C}$  mágneszettségét vizsgáljuk, hiszen az  $^1\text{H}$  csatornán mindössze az történt, hogy a  $\pi$  pulzussal egyetlen átmenetet szelektíven invertáltunk. A  $\pi/2$   $^{13}\text{C}$  pulzus után **+5** and **-3** arányú két komponens jelenik meg az  $\langle xy \rangle$  síkban:

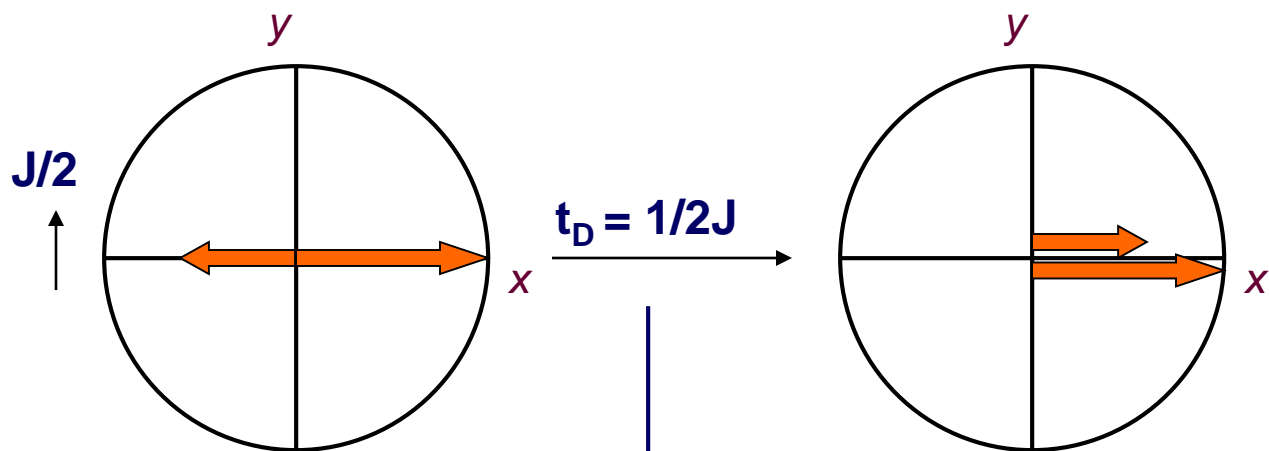


Nincs újrafókuszálás  
a lecsatolás előtt

A lecsatolás előtt  
újrafókuszálás történt

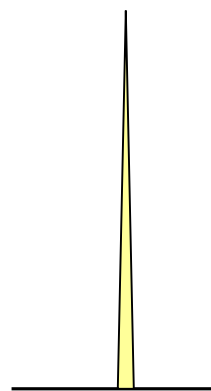
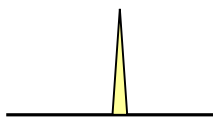
# J-moduláció és polarizáció átvitel

Ugyanezen viszonyok a lecsatolás után :



**{<sup>1</sup>H lecsatolás}**

**{<sup>1</sup>H lecsatolás}**

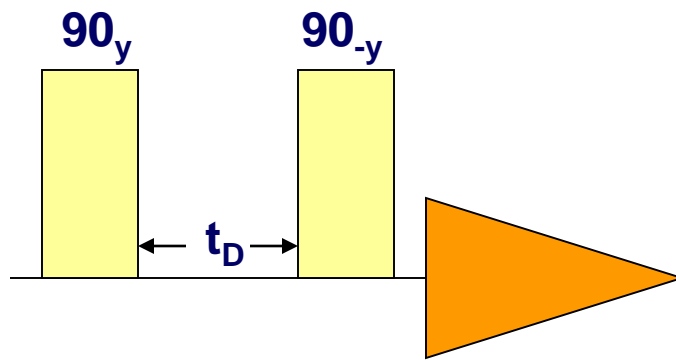


Nincs újrafókuszálás  
a lecsatolás előtt

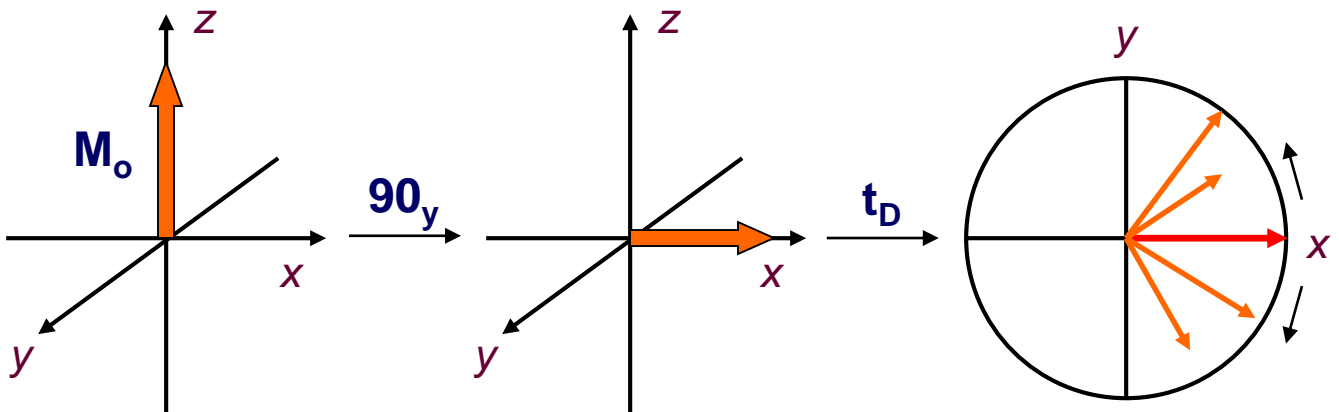
A lecsatolás előtt  
újrafókuszálás történt

# Binomiális pulzusok

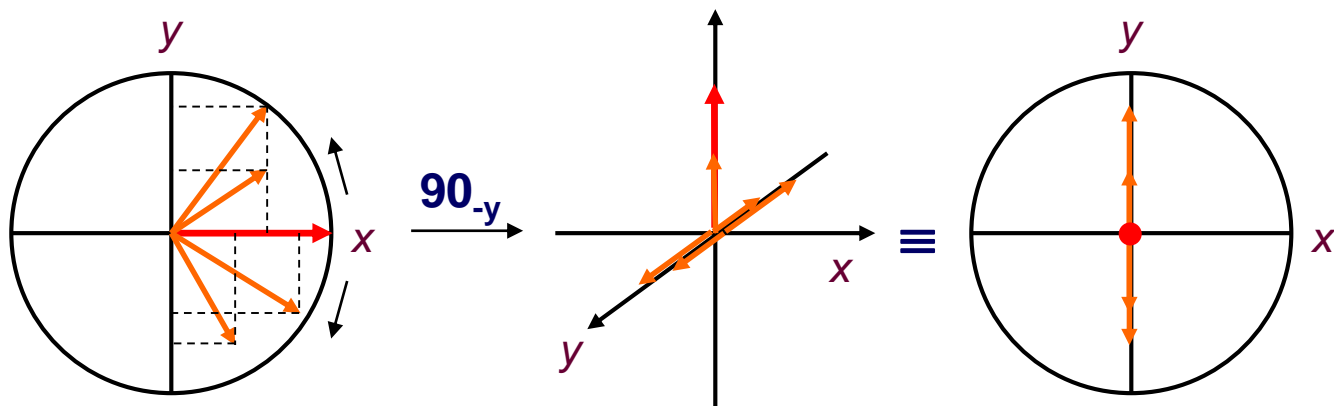
Valójában pulzusszekvenciák v. másnéven **pulzusvonatok**. Alkalmazási lehetőségeik között szerepel a gerjesztési profil módosítása, azaz bizonyos kémiai eltolódású jelek kívánt megjelenése v. meg nem jelenése. Hatásukat jól lehet vektorokkal szemléltetni. A legegyszerűbb binomiális pulzus az **1:1**, ahol két,  $t_d$  intervallummal elválasztott, eltérő fázisú  $\pi/2$  pulzust alkalmazunk. Az  $\omega_0$  frekvenciát válasszuk most egy adott jel kémiai eltolódásával egyenlőnek:



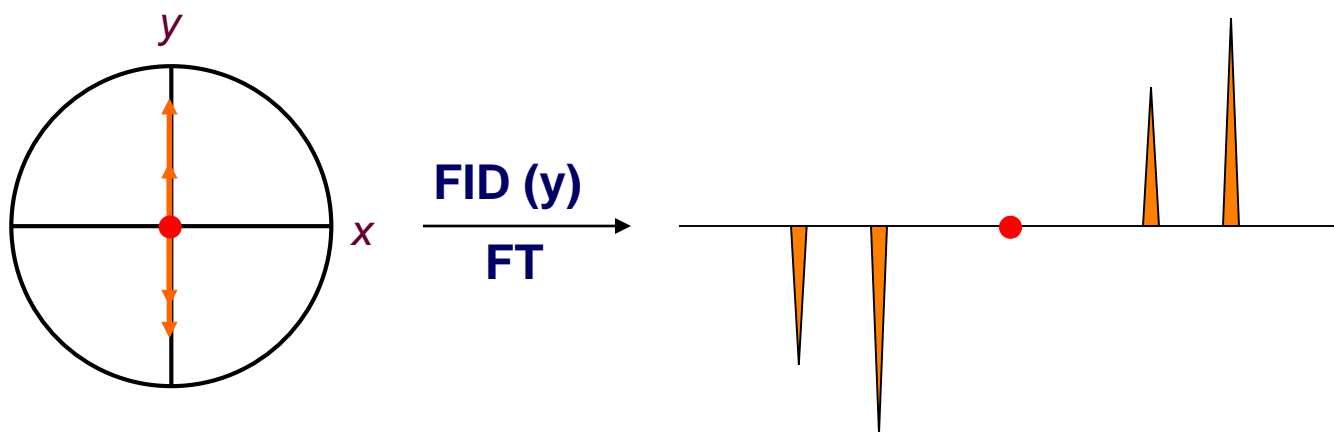
Az első  $\pi/2$  pulzus lehajtja a mágnesezettségi vektort az  $\langle xy \rangle$  síkba. A  $t_d$  idő eltelte után a jelek/spinek az  $\langle xy \rangle$  síkban precesszálnak, kivéve az  $\omega_0$  frekvenciájú jelet, mely az  $x$  tengellyel együtt forog továbbra is.



A következő  $\pi/2$  pulzus minden  $x$  komponenst visszatérít a  $z$  tengely irányába, az  $\omega_0$  frekvenciájú teljes jelet, valamint az összes többi jel aktuális  $x$  komponensét

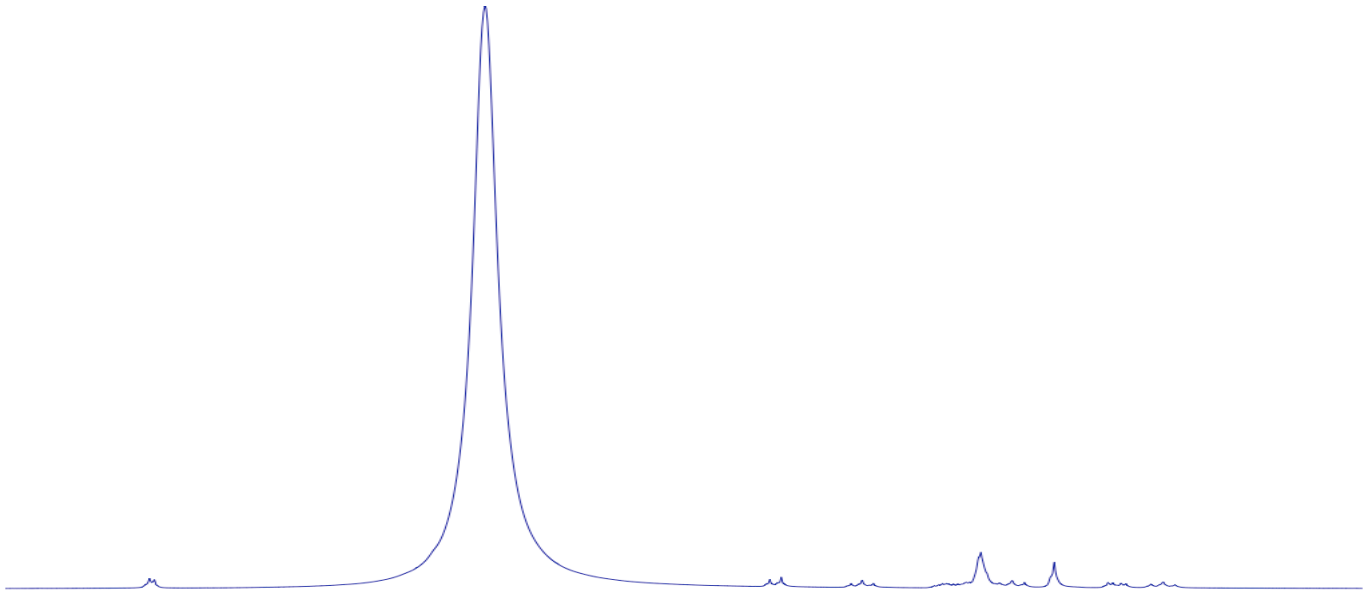


Az eredményül kapott FID csak olyan komponenseket tartalmaz, melyek a vivőfrekvenciától eltérő frekvenciával rezonálnak. Ezek a vevőtekerics szempontjából fázisban maradnak, de ellentétes előjelűek lesznek attól függően, hogy a vivőfrekvenciánál nagyobb, vagy kisebb frekvenciájú helyen rezonálnak.

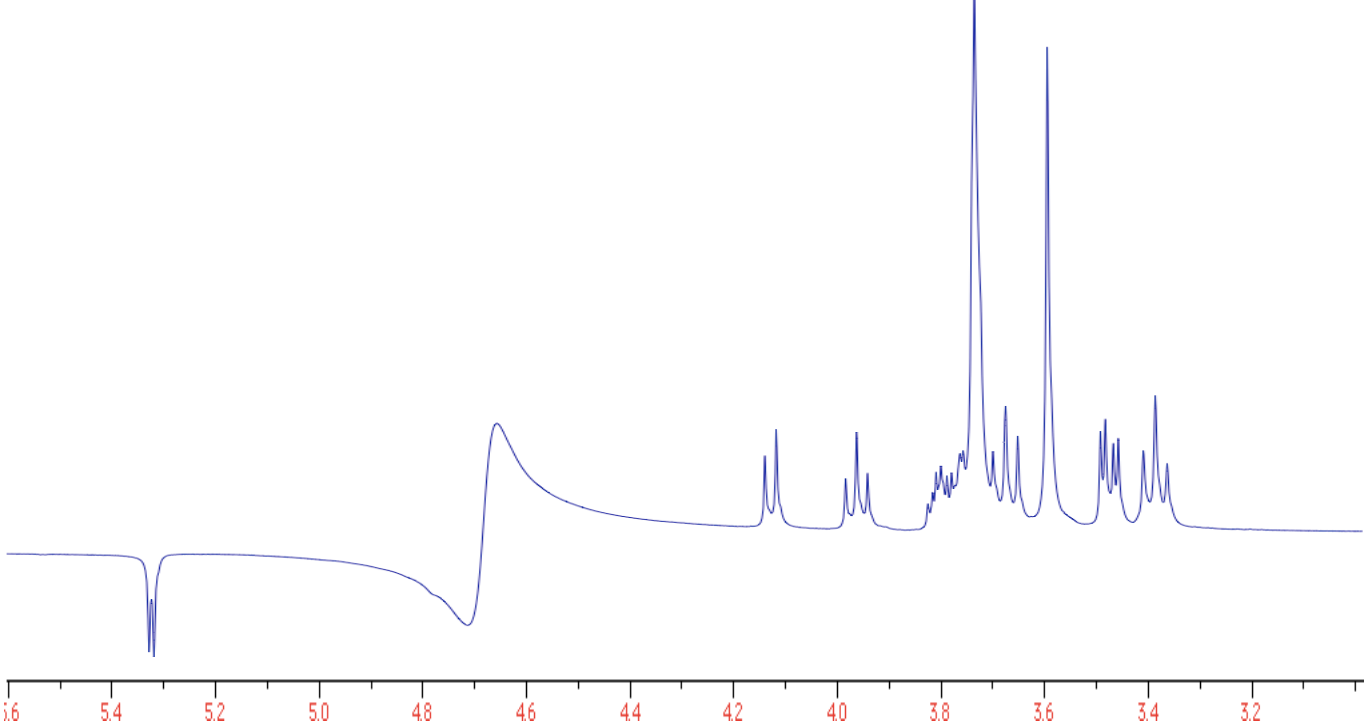


A  $t_d$ , időpont megválasztásától függően továbbá „kinullázódnak” azok a jelek is, melyek  $1/(2 \cdot t_d)$  Hz frekvenciánál jelentkeznek. Megfelelő  $t_d$  kiválasztásnál ez nem zavaró.

Az 1:1 pulzust sikeresen alkalmazni lehet nem kívánt nagy jelek, (különösen) vízjel elnyomására. Nem kell mást tenni, mint a vivőfrekvenciát azonosnak választani a nem kívánt jel kémiai eltolódásával és a  $t_d$  idő megválasztani. Figyeljünk a gerjesztési profilra! (a spektrum integrálása viszont nem célravezető)  
 $^1\text{H}$  spektrum (50mM cukoroldat 9:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  oldószerben)

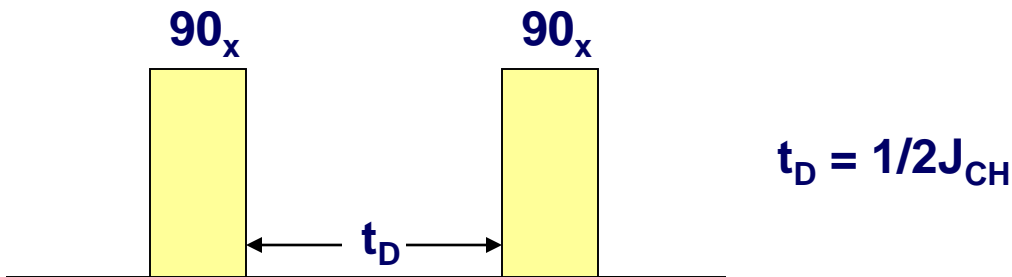


$^1\text{H}$  spektrum 1:1 pulzus alkalmazásával ( $t_d = 200 \mu\text{s}$ ):

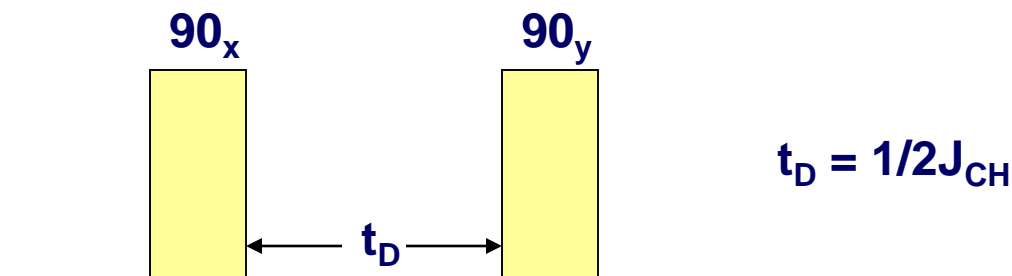


# SPT nagyenergiájú (kemény) pulzusokkal

- A megismert SPI és SPT módszerek hátránya, hogy a protongerjesztés kisenergiájú (és speciális alakú!) pulzusokkal jön létre, melyeket a gyakorlatban nem egyszerű megvalósítani. Előnyösebb lenne helyettük a szokásos „kemény” pulzusok használata. Ilyen célra pulzuskombinációkat alkalmaznak. Az első szelektív azokra az  $^1\text{H}$  jelekre, melyek frekvenciája azonos mindkét  $\pi/2$  pulzus vivőfrekvenciájával.



Ez a változat annak a jelnek a populációját invertálja, amely kémiai eltolódása (pl. egy dublett jel közepe) azonos a pulzusok vivőfrekvenciájával.

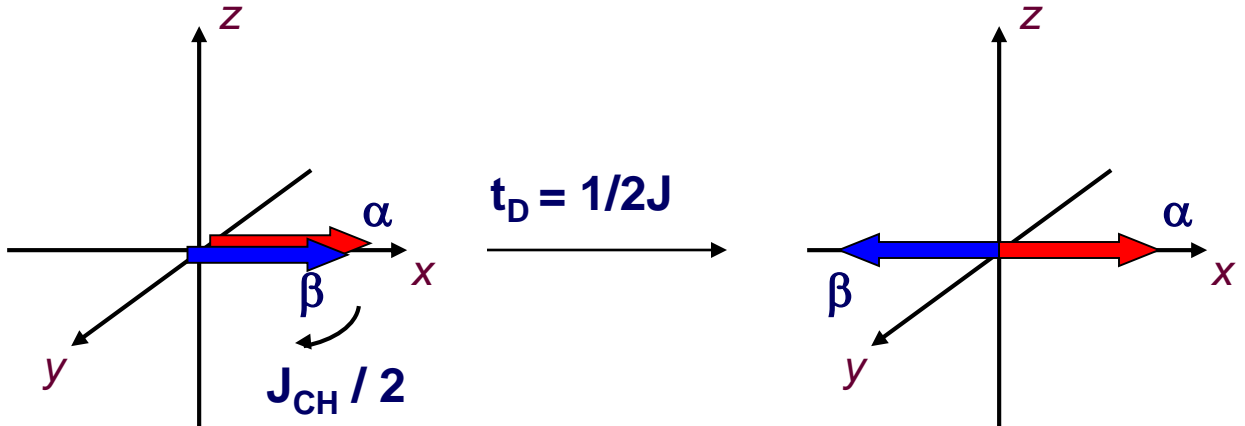


Mindkét esetben  $t_D = 1/2J_{CH}$ . Vizsgáljuk meg az első pulzus-szekvencia hatását egy vektorábrán

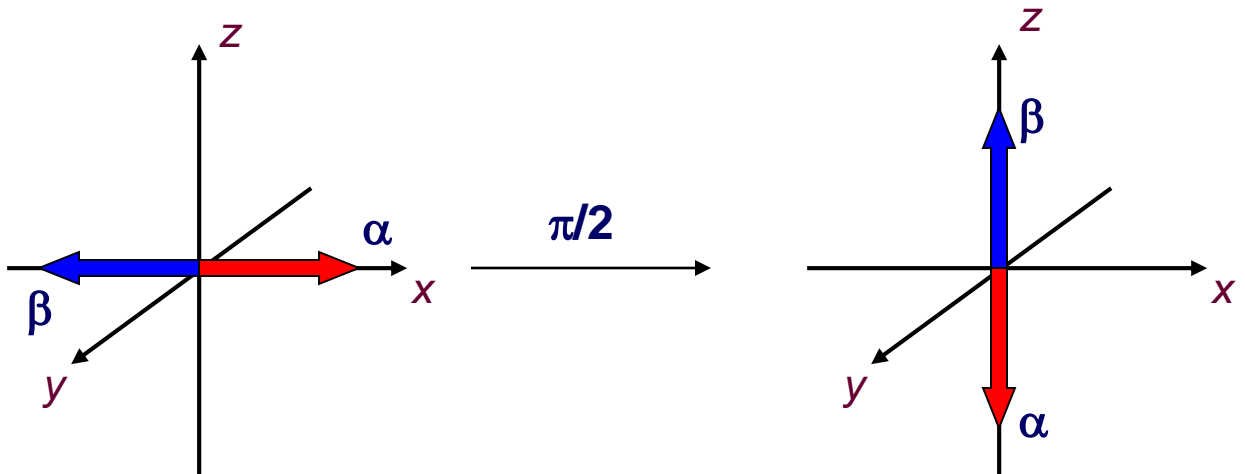


# SPT nagyenergiájú (kemény) pulzusokkal

- A  $\pi/2$  pulzus után mind az  $\alpha$  mind a  $\beta$  vektor a  $+x$  tengely mentén helyezkedik el :



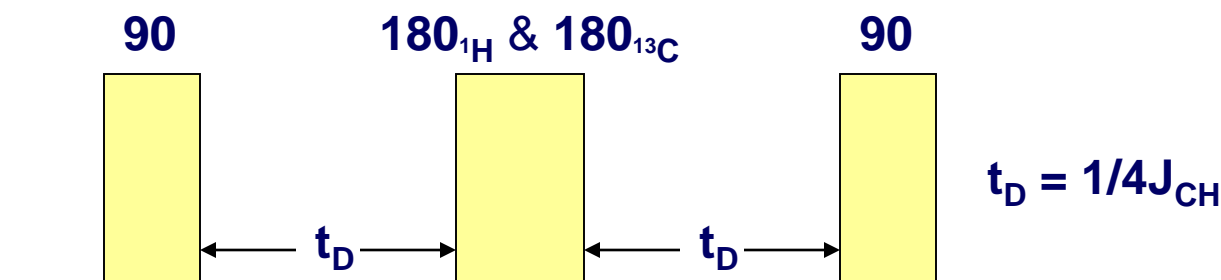
- Az  $1/2J_{CH}$  idejű várakozás után a gyorsabb ( $\alpha$ ) a vektor megelőzi a lassabb ( $\beta$ ) vektort éppen  $\pi$  radián értékkel. Ekkor alkalmazva a második  $\pi/2$  pulzust,  $\alpha$  és  $\beta$  vektorok a  $z$  tengelyre kényszerülnek



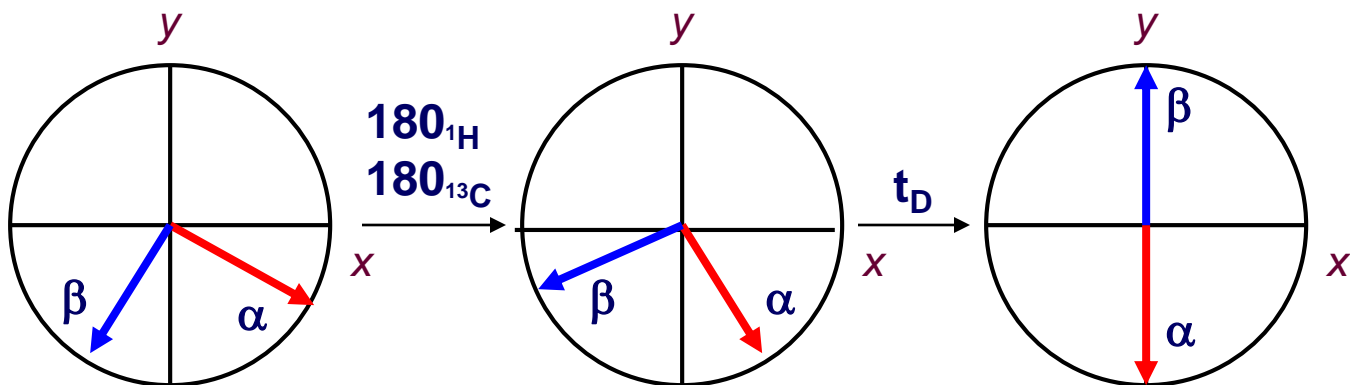
- Ez a pulzusszekvencia a  $^{13}\text{C}$  gerjesztéssel együtt alkalmazva intenzitásnövekedést okoz azon a  $^{13}\text{C}$  jelen, melyhez az adott proton kapcsolódik.

# Nem-szelektív polarizáció átvitel

- Az eddig ismertett SPT és SPI szelektív módszerek, egy-egy proton jel gerjesztésével/inverziójával valósulnak meg. Előnyös lenne, ha az érzékenységjavulást széles sávban élvezhetnénk, ehhez az összes heteroatomhoz csatoló protonjelről kellene a polarizáció transzfernek létrejönnie. Egy lehetőség az utóbb ismertett pulzusszekvenciát kombinálni egy spin-visszhanggal, ahol  $t_D = 1/4J_{CH}$



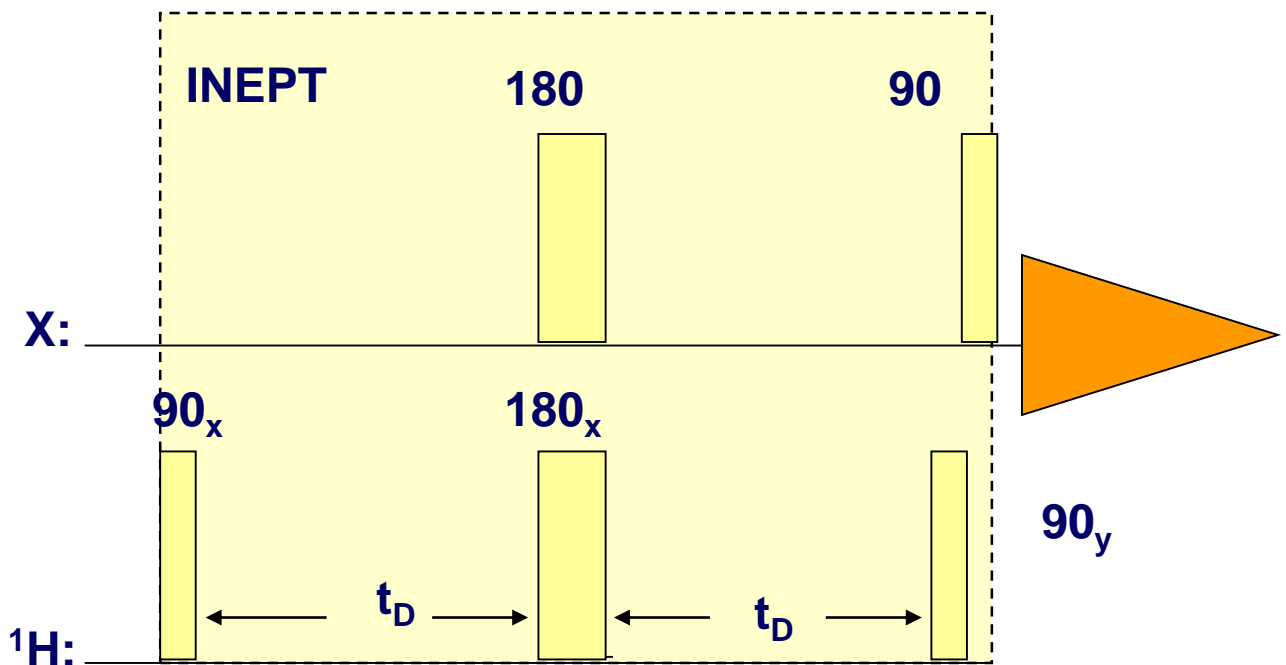
- A  $\pi$  pulzus és a  $2 t_D$  idő alatt újrafókuszálódik a mágnesezettségi vektor, minden kémiai eltolódású proton populációja megfordul (invertálódik). A  $\pi$  pulzus az **X** csatornán felcseréli az  $\alpha$  és  $\beta$  vektorokat:



Ezután a második  $\pi/2$  pulzus az  $\alpha$  és  $\beta$  vektorokat a **z** tengely irányába kényszeríti.

# Nem-szelektív polarizáció átvitel - INEPT

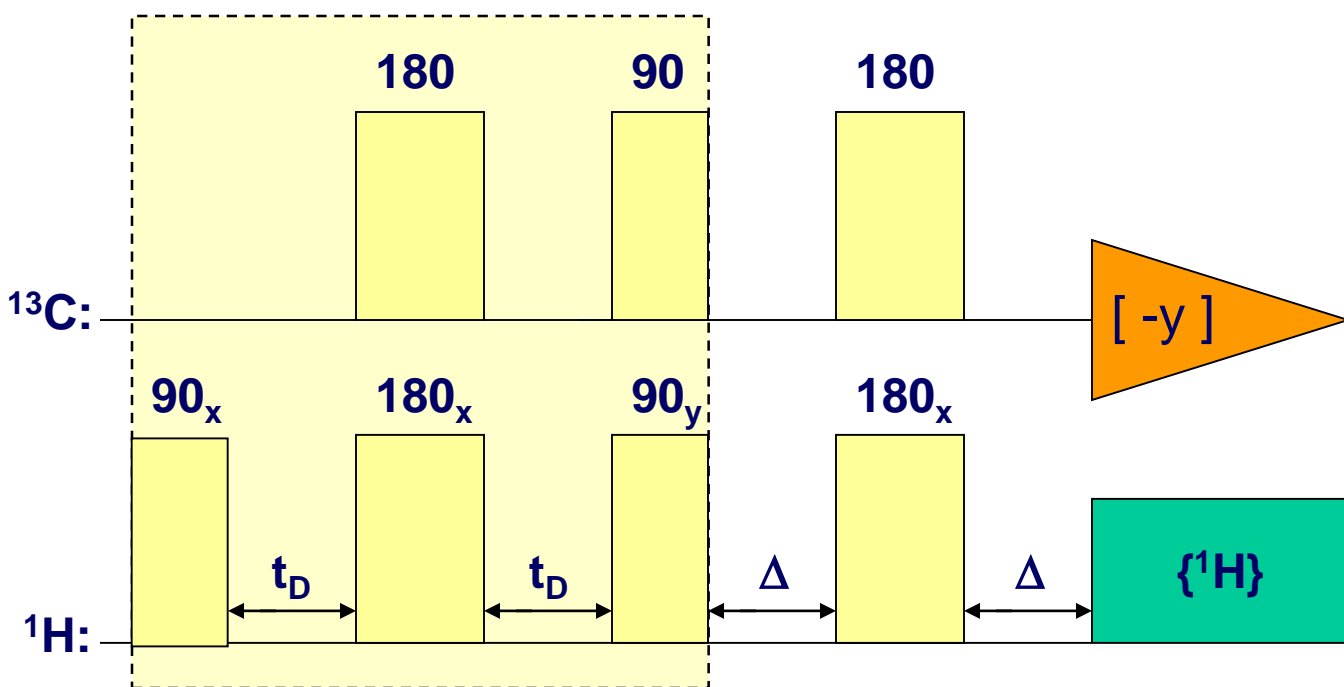
- Az ismertetés elején bemutatott pulzusszekvencia kis módosításával született meg az ún. **INEPT** (*In*ensitive *Nuclei* *Enhancement* by *Polarization* *Transfer*) kísérlet, mely egy gyakran használt hatékony módszer az NMR spektroszkópiában önmagában és más módszerek építőelemeként is.



- Az **X** mag legtöbbször egy „ritka spin”, (pl. <sup>13</sup>C vagy <sup>15</sup>N) melyen szeretnénk elérni az intenzitásnövekedést. Az eddigiekhez képest fontos változtatás a „kiolvasó”  $\pi/2$  pulzus az **X** csatornán, a célból, hogy detektálható transzverzális mágnesezettséget hozzon létre. Lényeges, hogy nem egyidejűleg, hanem az <sup>1</sup>H csatornán adott  $\pi/2$  pulzus után alkalmazzuk.

# Refókuszált INEPT

- A „hagyományos” INEPT kísérletnél **+5** és **-3** (fel- és lefelé mutató) jelek problémájával találkozunk. Jó lenne a jel két ágát egy szingulett jellé alakítani, de szokásos szélessávú  $^1\text{H}$  lecsatolás ez esetekben nem mindig sikeres. Ekkor a legjobb megoldás az, ha az INEPT pulzusszekvenciát kiegészítjük egy újrafókuszáló pulzuskombinációval a végén és a **-y** tengely mentén detektálunk:



- A szénatom rendűségétől függően a  $\Delta$  várakozási időt optimalizálhatjuk, azaz választhatjuk a következő értékeket:

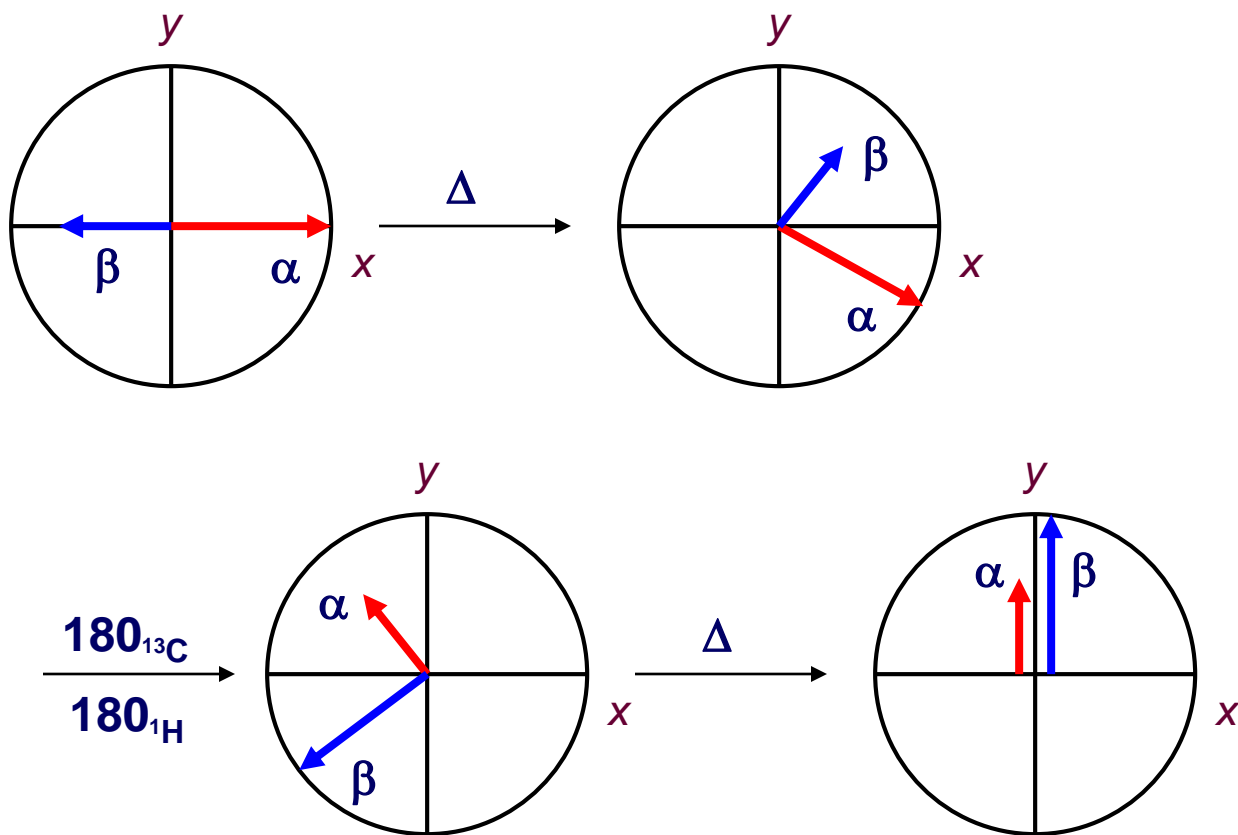
$$\text{CH} : \Delta = 1/4J$$

$$\text{CH}_2 : \Delta = 1/8J$$

- Hogy minden rendű szénatomon (kivéve a kvaternereket!) legyen polarizáció transzfer, a gyakorlatban  $\Delta \approx 1/7J$  értéket szoktak alkalmazni.

# Refókuszált INEPT

- A  $\pi/2$   $^{13}\text{C}$  puzus után megnövekedett értékű (+5 & -3)  $^{13}\text{C}$  mágneszettséget észlelünk az  $\langle xy \rangle$  síkban.



Az INEPT (és még kedvezőbben, a refókuszált INEPT) kísérlet többféle mérési lehetőséget kínál, elsősorban kis érzékenységű magok (pl.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ) rezonanciájának vizsgálata során.

- általánosságban javul az érzékenység
- „szerkeszthetjük” a spektrumot, mint az APT-nél
- kedvezően mérhetjük a heteronukleáris csatolási állandót
- optimalizálható több-kötéses csatolási állandóra is

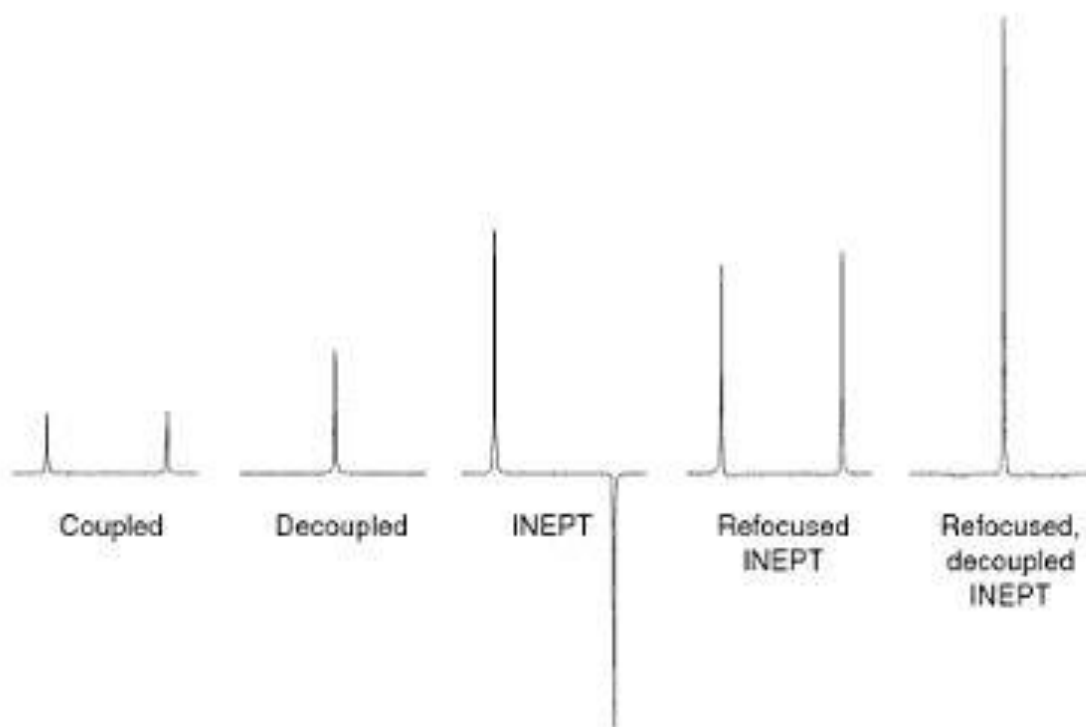
A sikeres kísérlethez azonban jól kell előzetesen megbecsülni a csatolás-függő várakozási időket, különben torz fázisok léphetnek fel, amelyek nem korrigálhatók a FT után sem.



# INEPT: jelintenzitás növekedés heteromagok („ritka spinek”) mérése esetén:

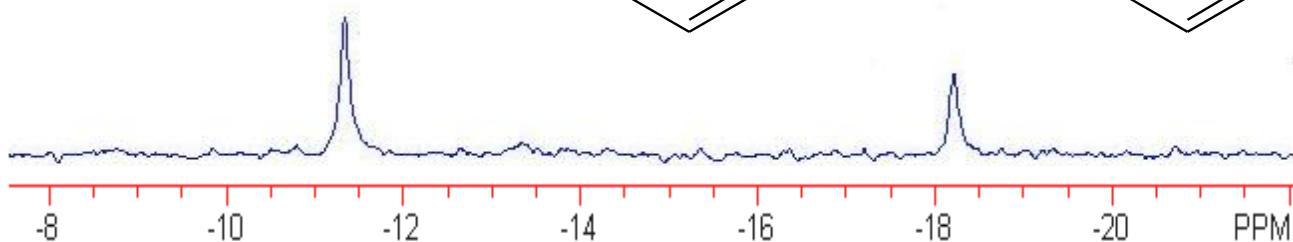
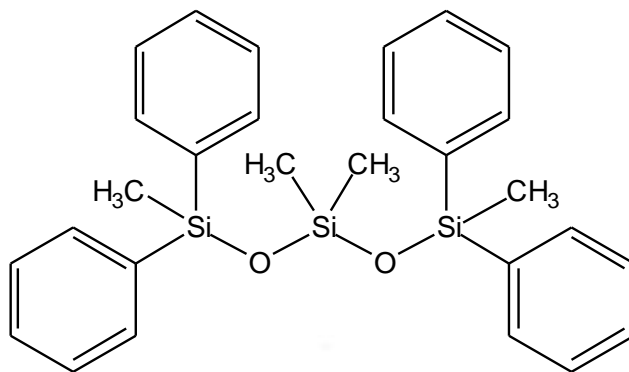
$^{31}\text{P}$	$^{13}\text{C}$	$^{29}\text{Si}$	$^{15}\text{N}$	$^{109}\text{Rh}$
2.47	3.98	5.03	9.87	31.8

Az eredmény egy gyakorlati példán (dublett jel)

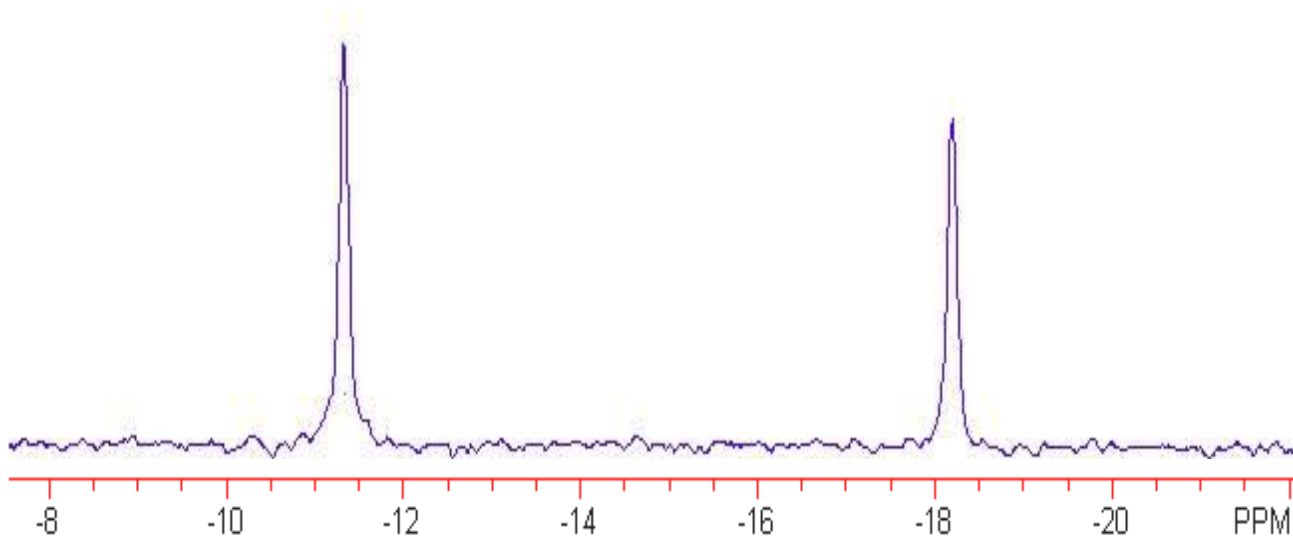


# INEPT : egy gyakorlati példa

”normál”  $^{29}\text{Si}$  1D spektrum:



refókuszált  $^{29}\text{Si}$  INEPT spektrum:

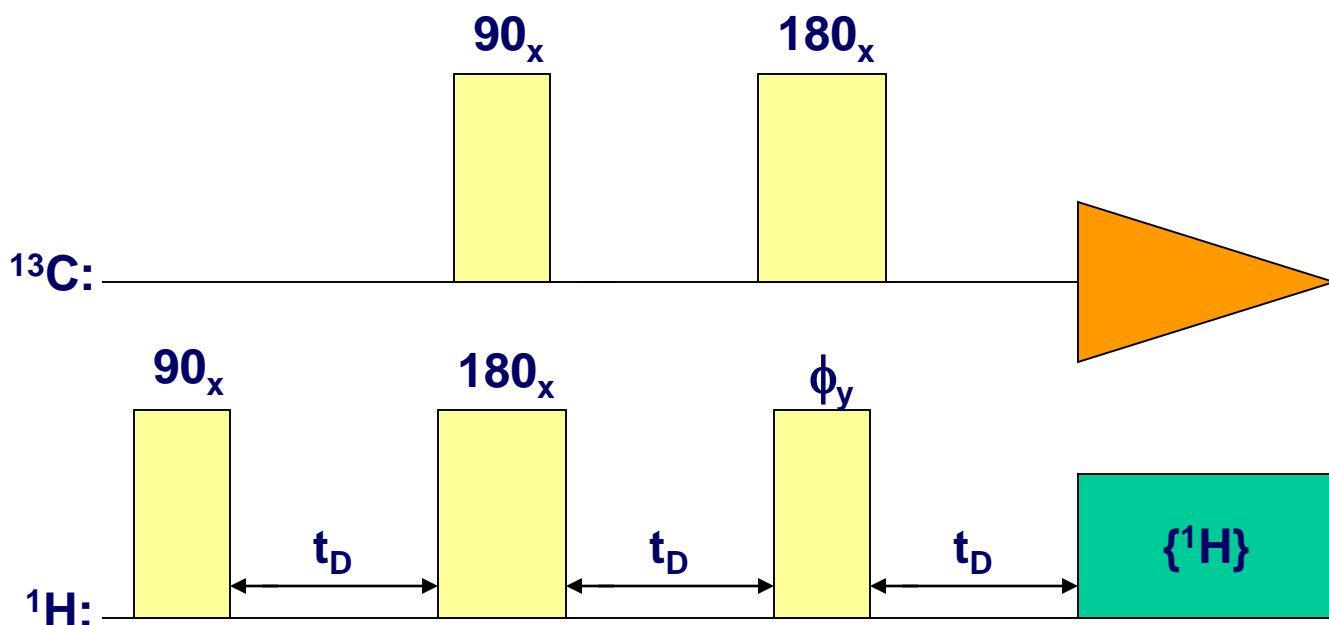


- A  $^2J_{1\text{H}-^{29}\text{Si}}$  csatolási állandó kb.  $\sim 7$  Hz, a  $\gamma_{1\text{H}}/\gamma_{^{29}\text{Si}}$  arány 5.



# DEPT

A **DEPT** (**D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer) pulzusszekvencia előnye azonfelül, hogy lehetőséget teremt az eltérő multiplicitású (CH, CH<sub>2</sub> és CH<sub>3</sub>) <sup>13</sup>C jelek megkülönböztetésére, a protonok kedvezőbb mágnesszettségi viszonyait is közvetíti a <sup>13</sup>C spektrumra.

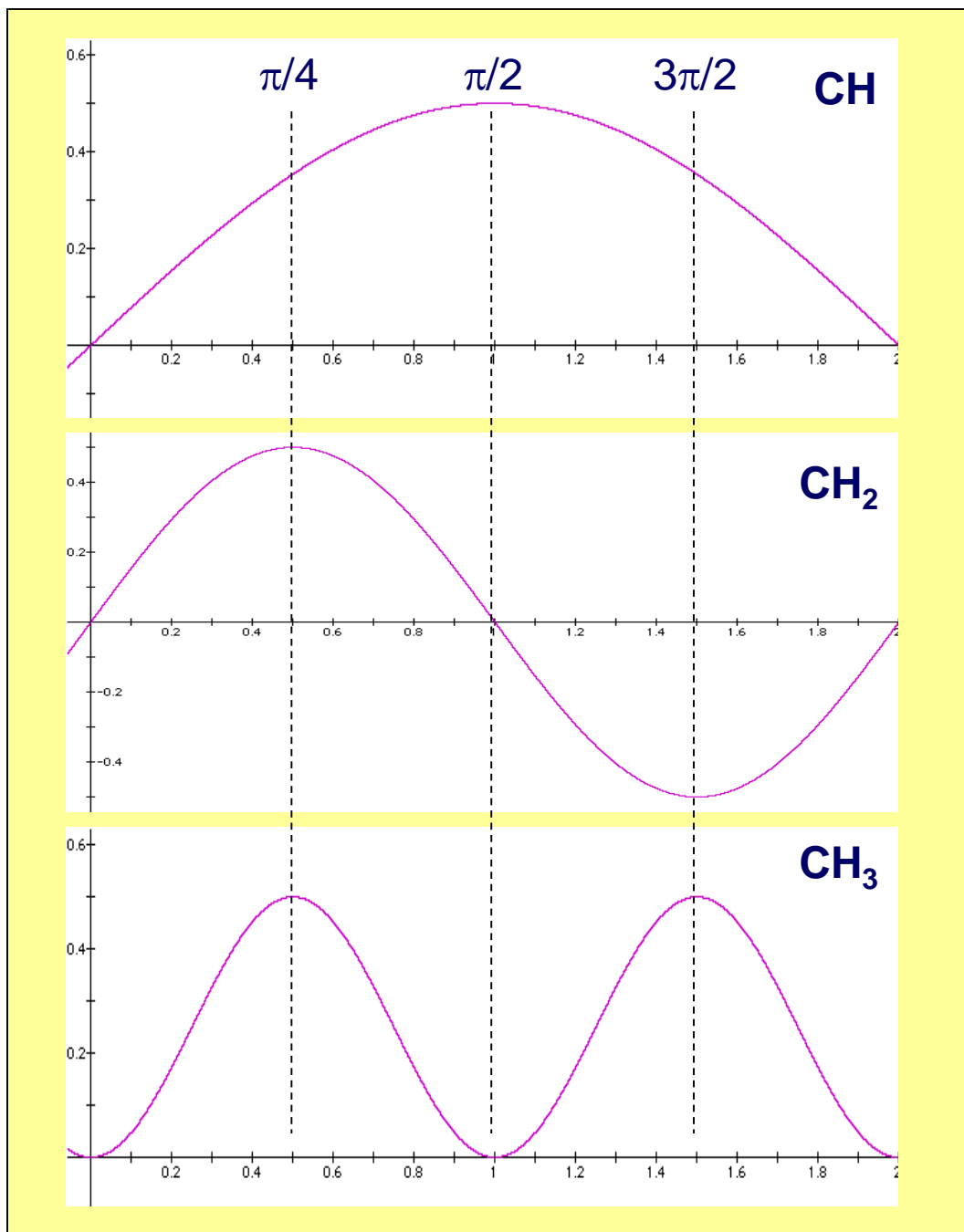


A pulzusszekvencia alkalmazása során fellépő ún. **többszörös kvantumátmenetek** nem teszik lehetővé működésének az eddig alkalmazott mágnesszettségi vektorábrákkal történő magyarázatát.

A DEPT kísérlet különböző változatainak összeadásával/kivonásával olyan független, mesterséges spektrumokat szerkeszthetünk, melyekben a C, CH, CH<sub>2</sub>, és CH<sub>3</sub> jelek külön-külön spektrumban jelennek meg

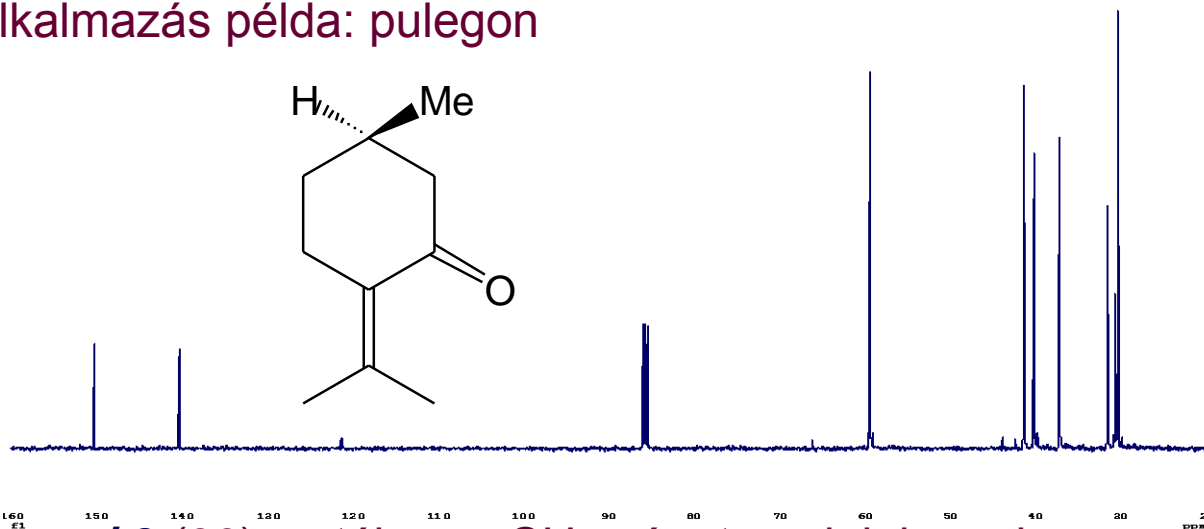
# DEPT

- Amennyiben a különböző multiplicitású C jelek intenzitását a  $\phi$  pulzusszög függvényében ábrázoljuk:

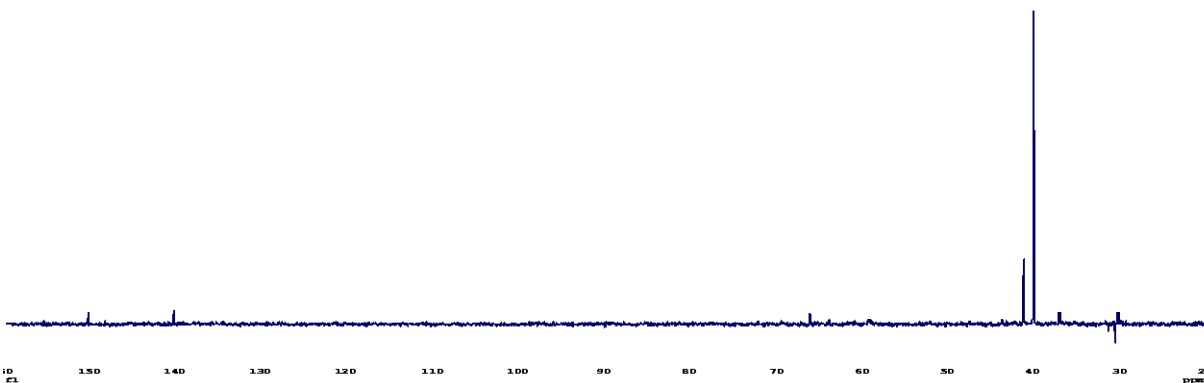


# DEPT kísérlet különböző $\phi$ szögekkel

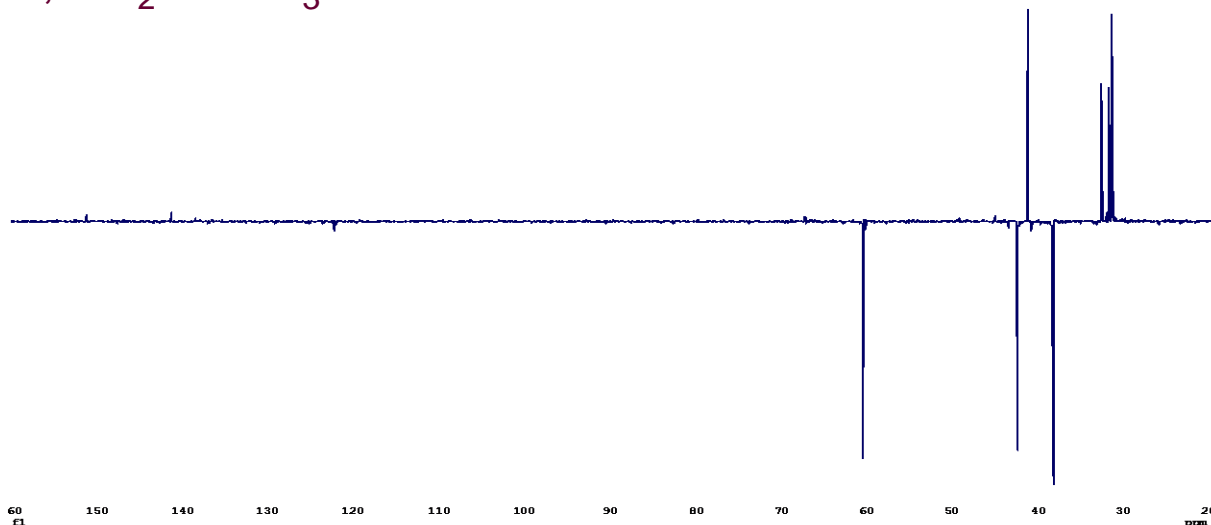
- Alkalmazás példa: pulegon



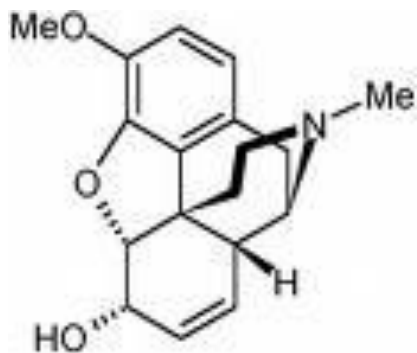
- $\phi = \pi / 2$  (90) esetében a CH szénatomok jelennek meg



- $\phi = 3\pi / 4$  (135) CH, esetében megkülönböztethetjük CH, CH<sub>2</sub> és CH<sub>3</sub> szénatomokat.



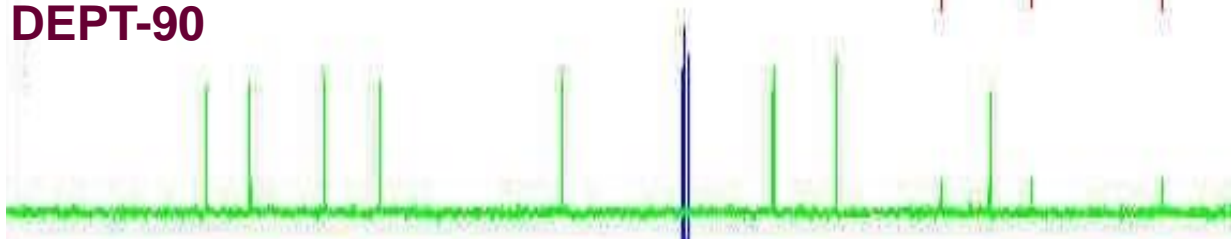
# A DEPT módszer változatai



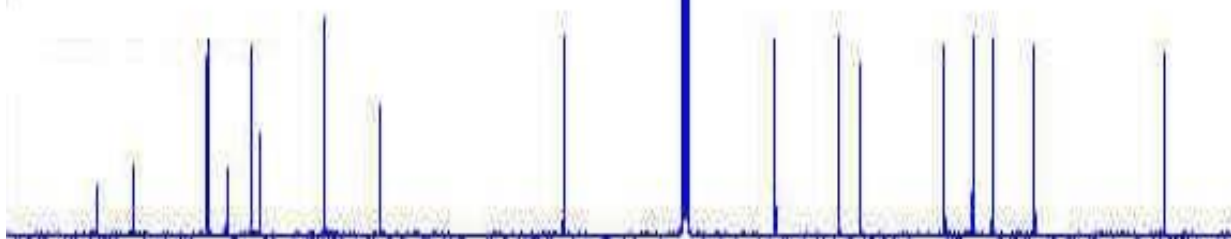
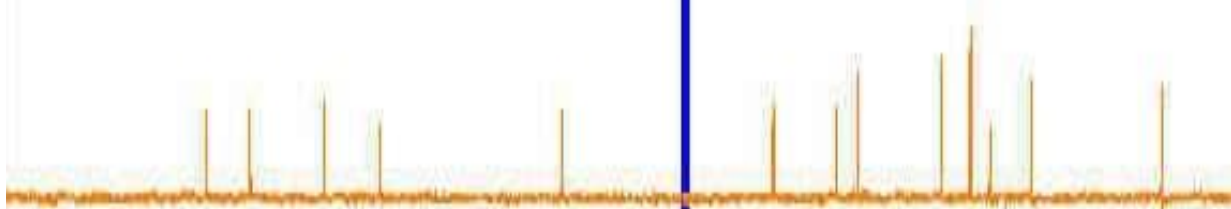
**DEPT-135**



**DEPT-90**



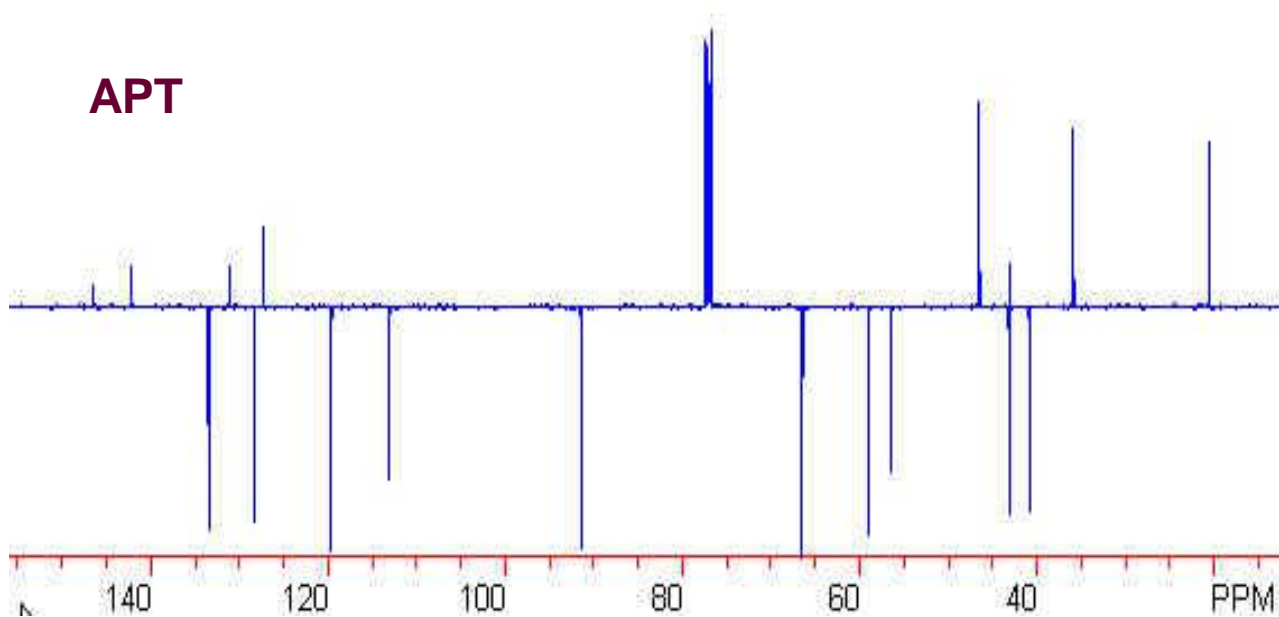
**DEPT-45**



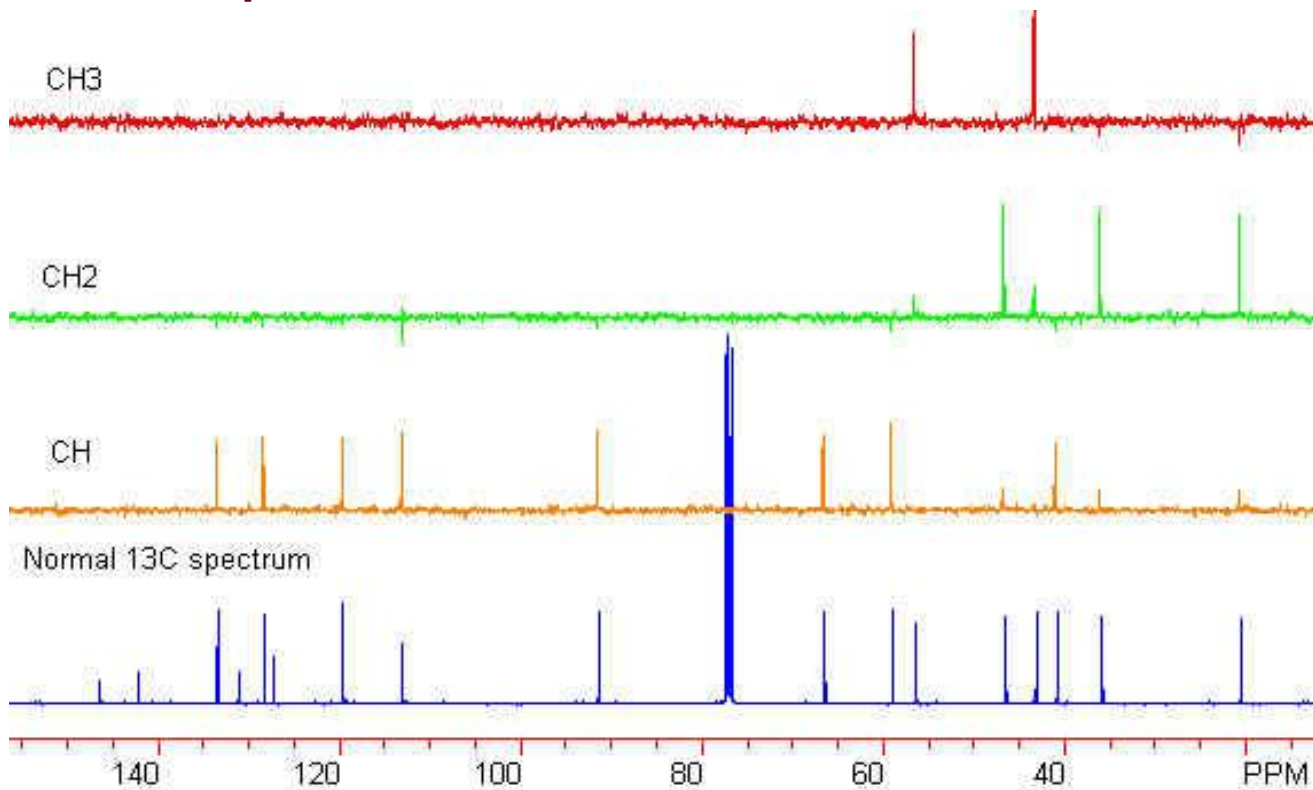
140 120 100 80 60 40 PPM

# APT és DEPT összehasonlítása

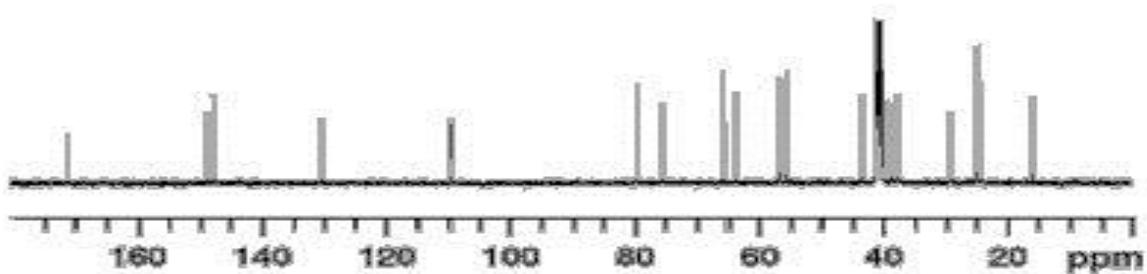
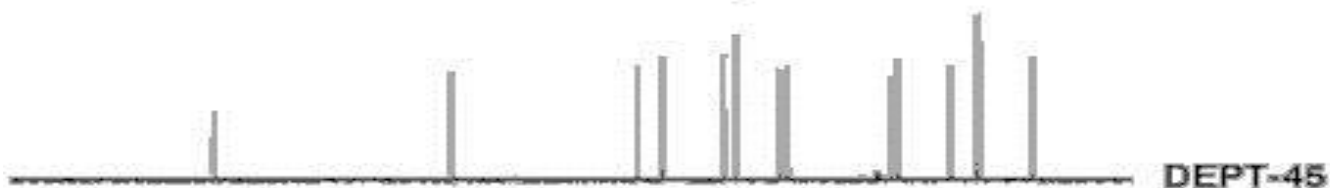
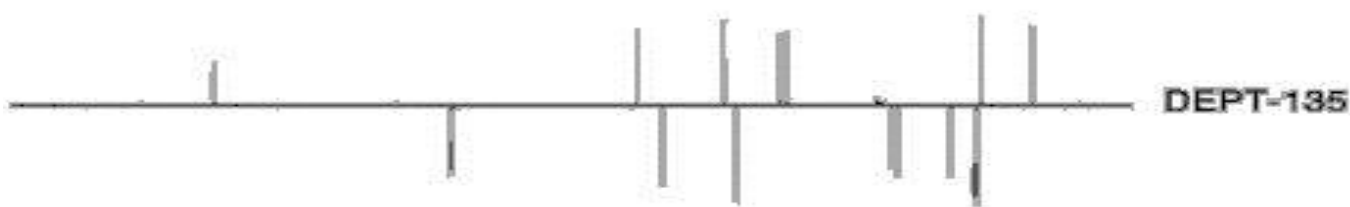
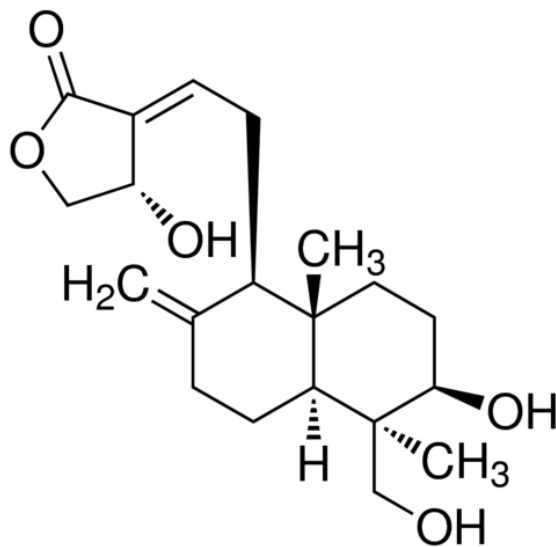
## APT



## DEPT spektrumszerkesztés



# A DEPT módszer változatai



# A DEPT módszer tökéletesítése

Szeretnénk látni a kvaterner jeleket is!

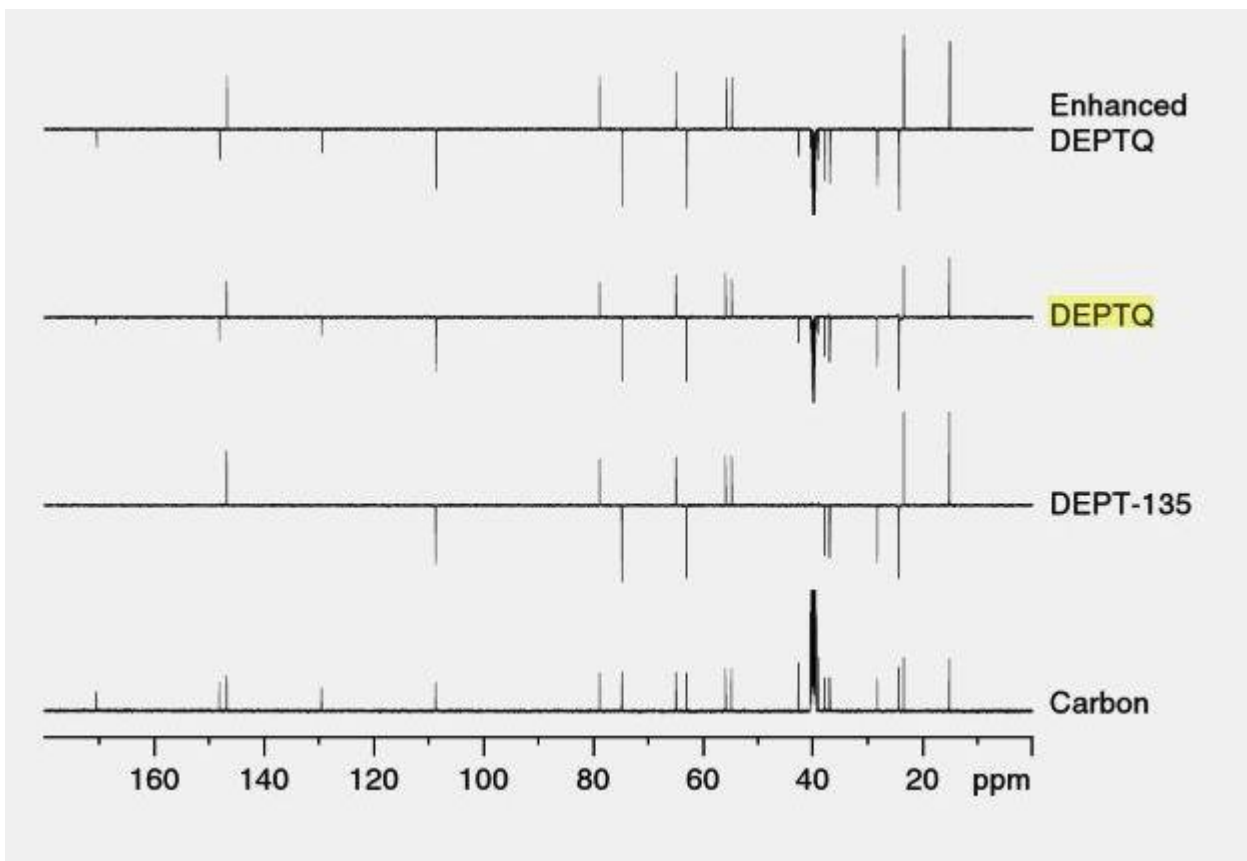
Nehézségek: nincs, vagy nagyon kicsi NOE

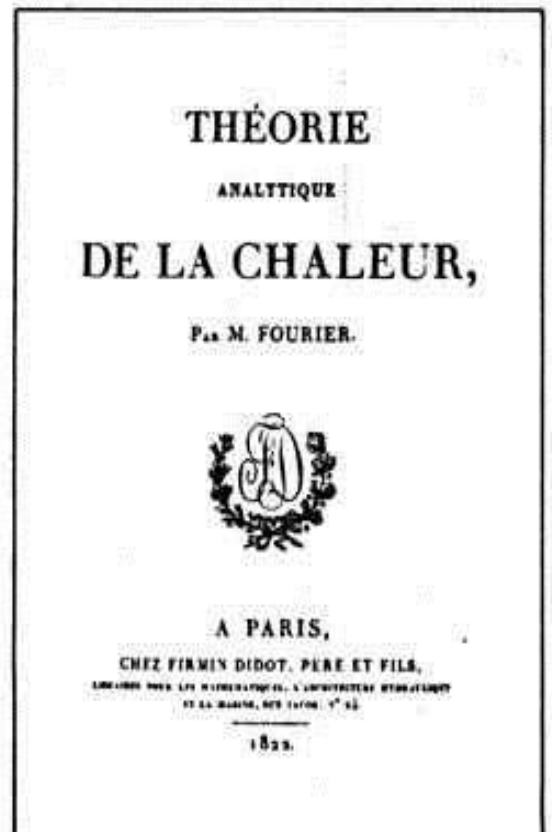
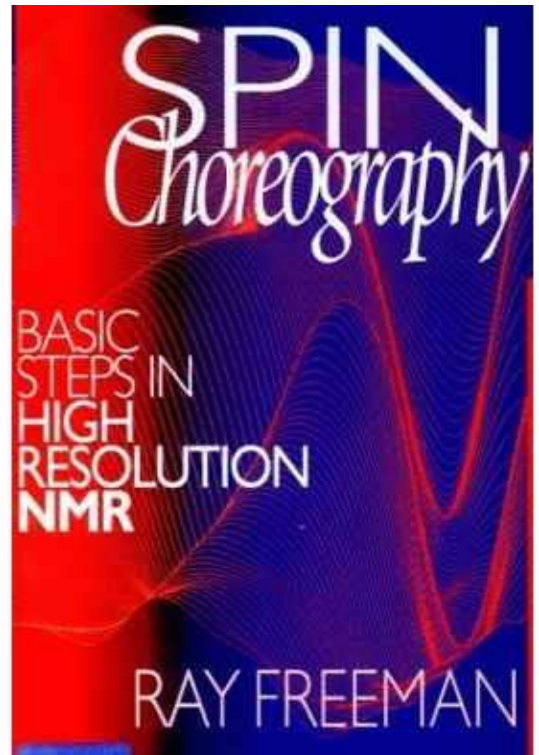
90°-os  $^{13}\text{C}$  pulzus: fázisproblémák

180°-os  $^{13}\text{C}$  pulzus pontatlansága

**DEPTQ** : széles-frekvenciájú (adiabatikus)  $^{13}\text{C}$  pulzusok alkalmazása

Javított **DEPTQ**: a nemkívánatos fázisú mágnesezettség-komponensek kiszűrése gradiens-pulzusokkal.







## Néhány fontos NMR- aktív mag

Név	Spin	Természetes előfordulás (%)	Relatív érzékenység	Larmor frekvencia 11.7 T térerő esetén (MHz)
<sup>1</sup> H	1/2	99.98	1	500.13
<sup>13</sup> C	1/2	1.07	1.76*10 <sup>-4</sup>	125.75
<sup>2</sup> H	1	0.015	1.45*10 <sup>-6</sup>	76.77
<sup>31</sup> P	1/2	100	6.6*10 <sup>-2</sup>	161.97
<sup>23</sup> Na	3/2	100	9.25*10 <sup>-2</sup>	132.29
<sup>19</sup> F	1/2	100	8.22*10 <sup>-1</sup>	470.59
<sup>10</sup> B	3	19.58	3.89*10 <sup>-3</sup>	53.73
<sup>11</sup> B	3/2	8.42	1.33*10 <sup>-1</sup>	160.46
<sup>14</sup> N	1	99.63	1.00*10 <sup>-3</sup>	36.14
<sup>15</sup> N	1/2	0.37	3.85*10 <sup>-6</sup>	50,69
<sup>17</sup> O	5/2	0.037	1.08*10 <sup>-5</sup>	67.80
<sup>29</sup> Si	1/2	4.7	3.68*10 <sup>-4</sup>	99.36
<sup>195</sup> Pt	1/2	33.8	3.36*10 <sup>-3</sup>	107,51

# Heteromagok NMR spektroszkópiája: $^2\text{H}$

Property	Value
Spin	1
Natural abundance	0.0155%
Chemical shift range	13 ppm, from -1 to 12
Frequency ratio ( $\Xi$ )	15.350609%
Reference compound	TMS- $d_{12}$ neat = 0 ppm
Linewidth of reference	1.7 Hz
$T_1$ of reference	1 s
Receptivity rel. to $^1\text{H}$ at natural abundance	$1.50 \times 10^{-8}$
Receptivity rel. to $^1\text{H}$ when enriched	$9.65 \times 10^{-3}$
Receptivity rel. to $^{13}\text{C}$ at natural abundance	$8.78 \times 10^{-3}$
Receptivity rel. to $^{13}\text{C}$ when enriched	56.7
Linewidth parameter	$0.41 \text{ fm}^4$

Kémiai eltolódástartomány: azonos, mint az  $^1\text{H}$

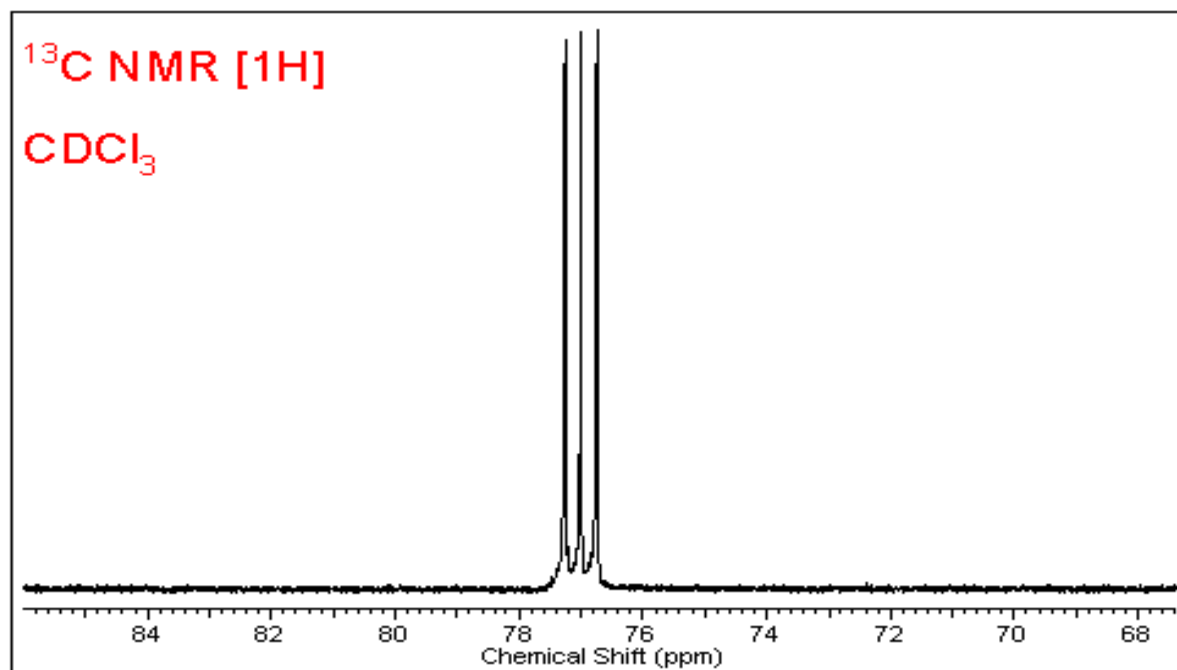
Csatolás:  $J_{\text{HD}} / J_{\text{HH}} = \gamma_{\text{D}} / \gamma_{\text{H}}$

Mérés: szélessávú protonlecsatolás mellett (esetleg a lecsatolás „kapuzott”)

Mérési nehézségek: műszer stabilizálás – külső lock (pl  $^{19}\text{F}$ )

# Heteromagok NMR spektroszkópiája: $^2\text{H}$

A deutérium csatolásainak megjelenése



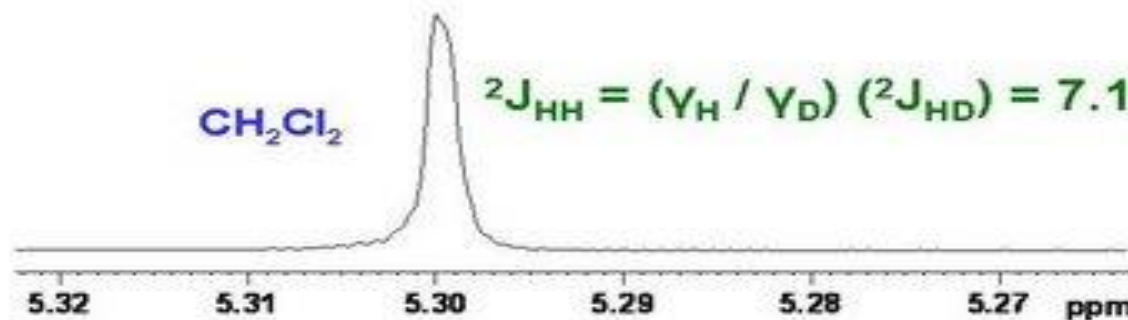
$^2\text{J}_{\text{HH}}$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

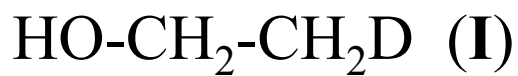
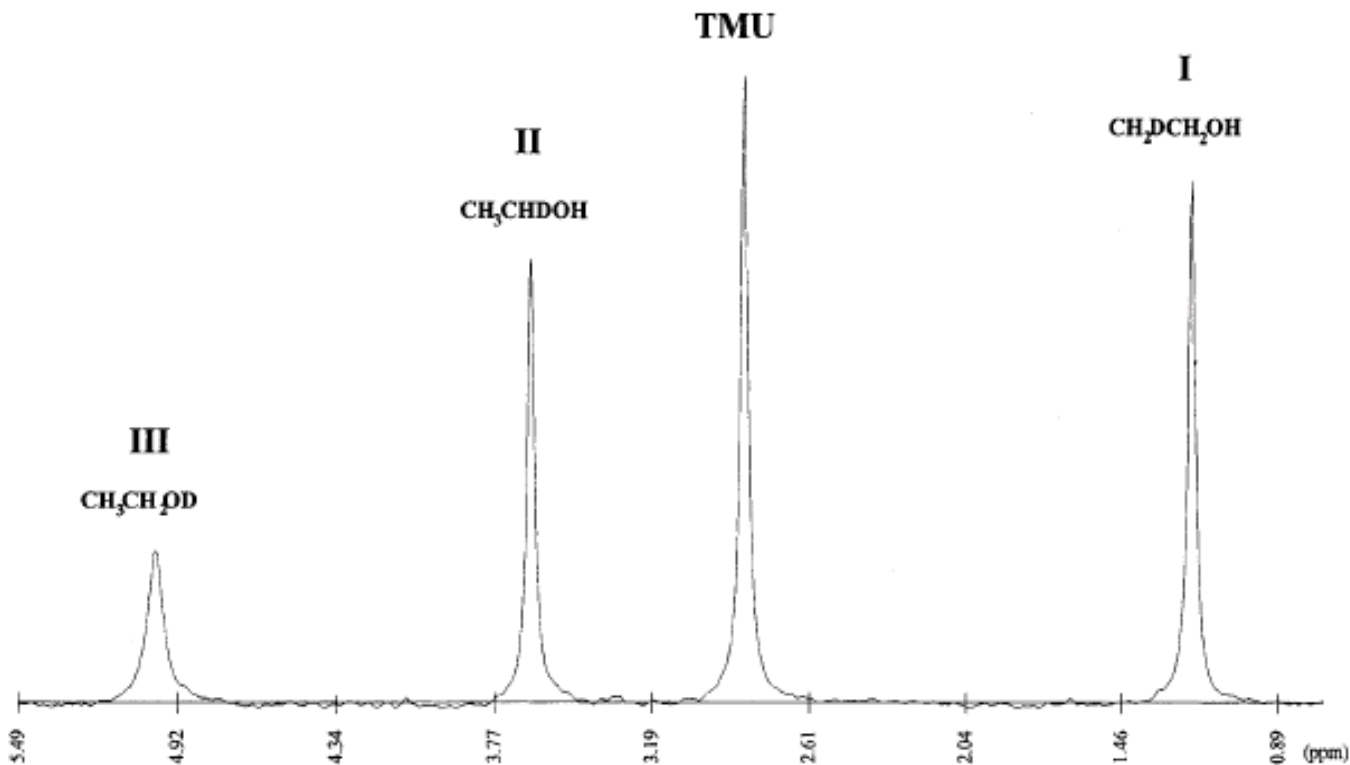
$$^2\text{J}_{\text{HD}} = 1.104 \text{ Hz}$$



$\text{CH}_2\text{Cl}_2$

$$^2\text{J}_{\text{HH}} = (\gamma_{\text{H}} / \gamma_{\text{D}}) (^2\text{J}_{\text{HD}}) = 7.192 \text{ Hz}$$



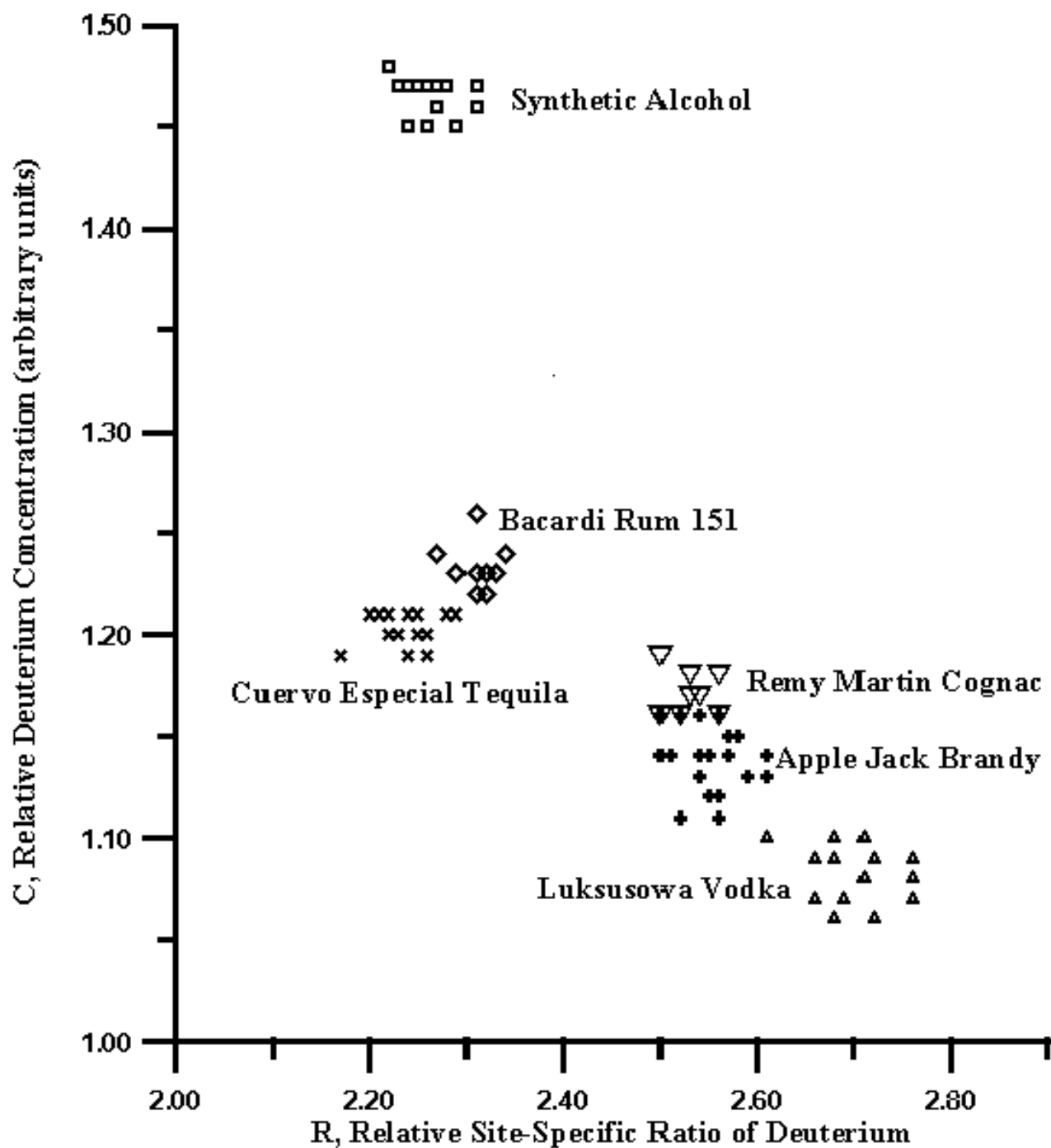


$$R = 3 * \text{II} / \text{I}$$



$$C = (\text{I} + \text{II}) / (\text{S} * \kappa)$$

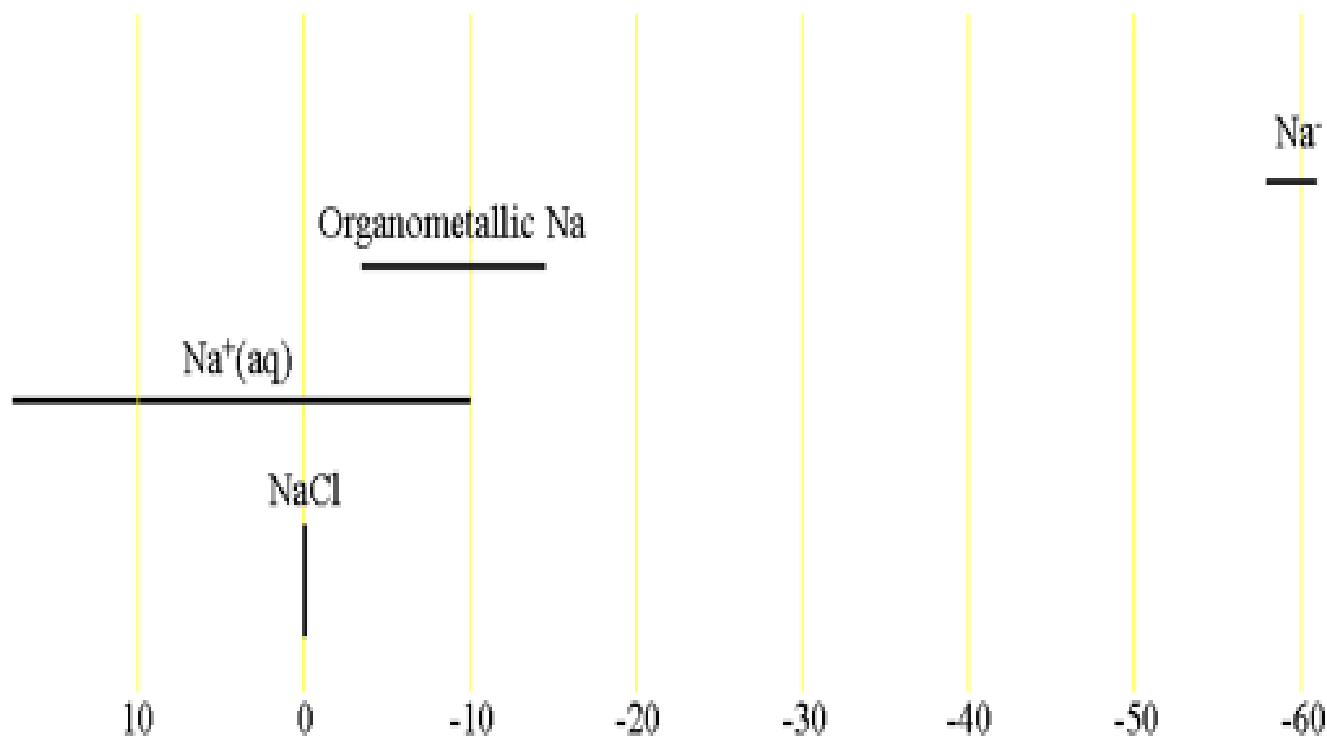




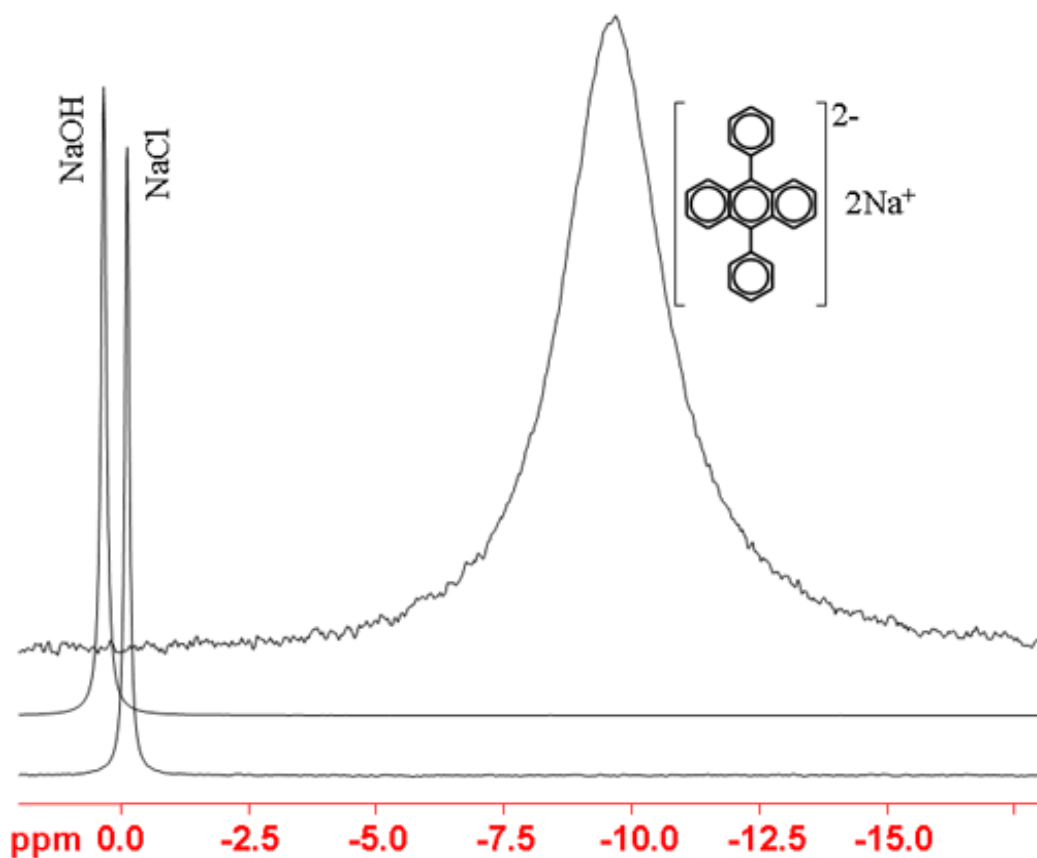
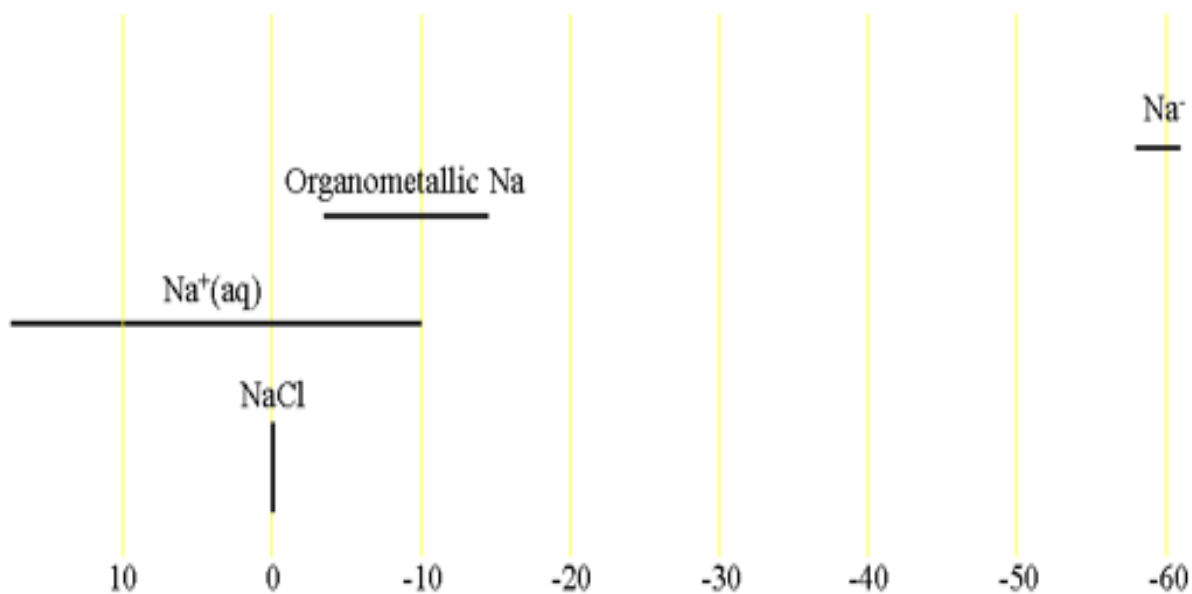


# Heteromagok NMR spektroszkópiája: $^{23}\text{Na}$

Property	Value
Spin	3/2
Natural abundance	100%
Chemical shift range	72 ppm, from -62 to 10
Frequency ratio ( $\Xi$ )	26.451900%
Reference compound	0.1 M NaCl in $\text{D}_2\text{O}$
Linewidth of reference	8.2 Hz
$T_1$ of reference	0.1 s
Receptivity rel. to $^1\text{H}$ at natural abundance	0.0927
Receptivity rel. to $^1\text{H}$ when enriched	0.0927
Receptivity rel. to $^{13}\text{C}$ at natural abundance	545
Receptivity rel. to $^{13}\text{C}$ when enriched	545
Linewidth parameter	140 fm <sup>4</sup>

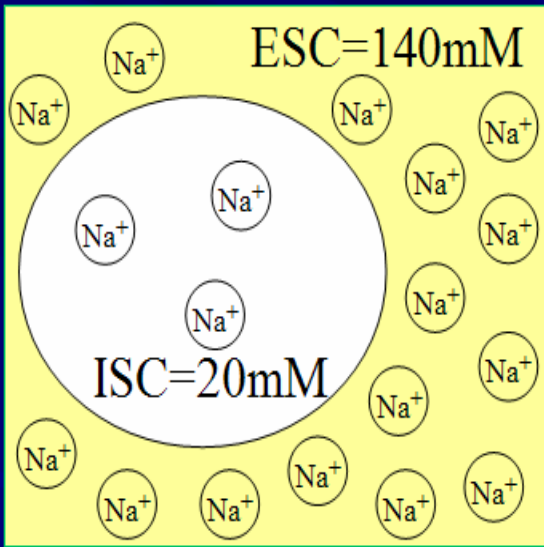


# Heteromagok NMR spektroszkópiája: $^{23}\text{Na}$

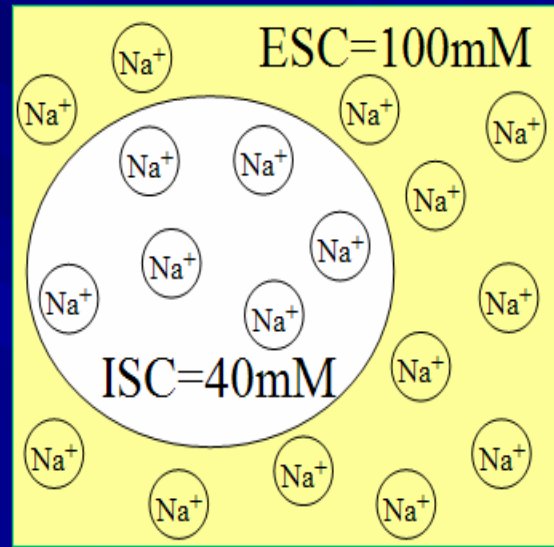




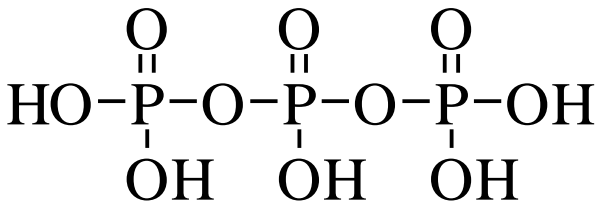
# Normal



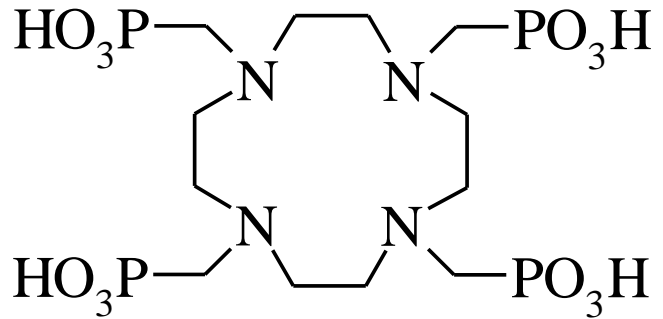
# Ischemia



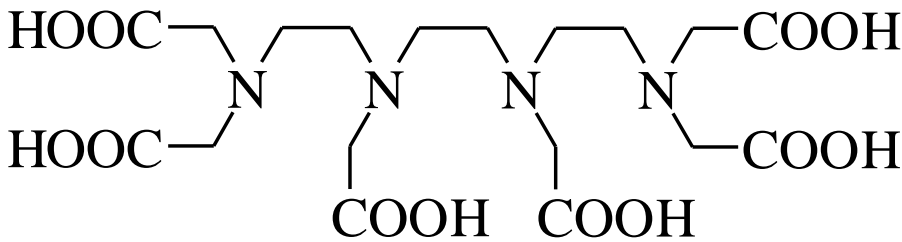
Nátrium koncentráció viszonyok változása sejtekben és környezetükben



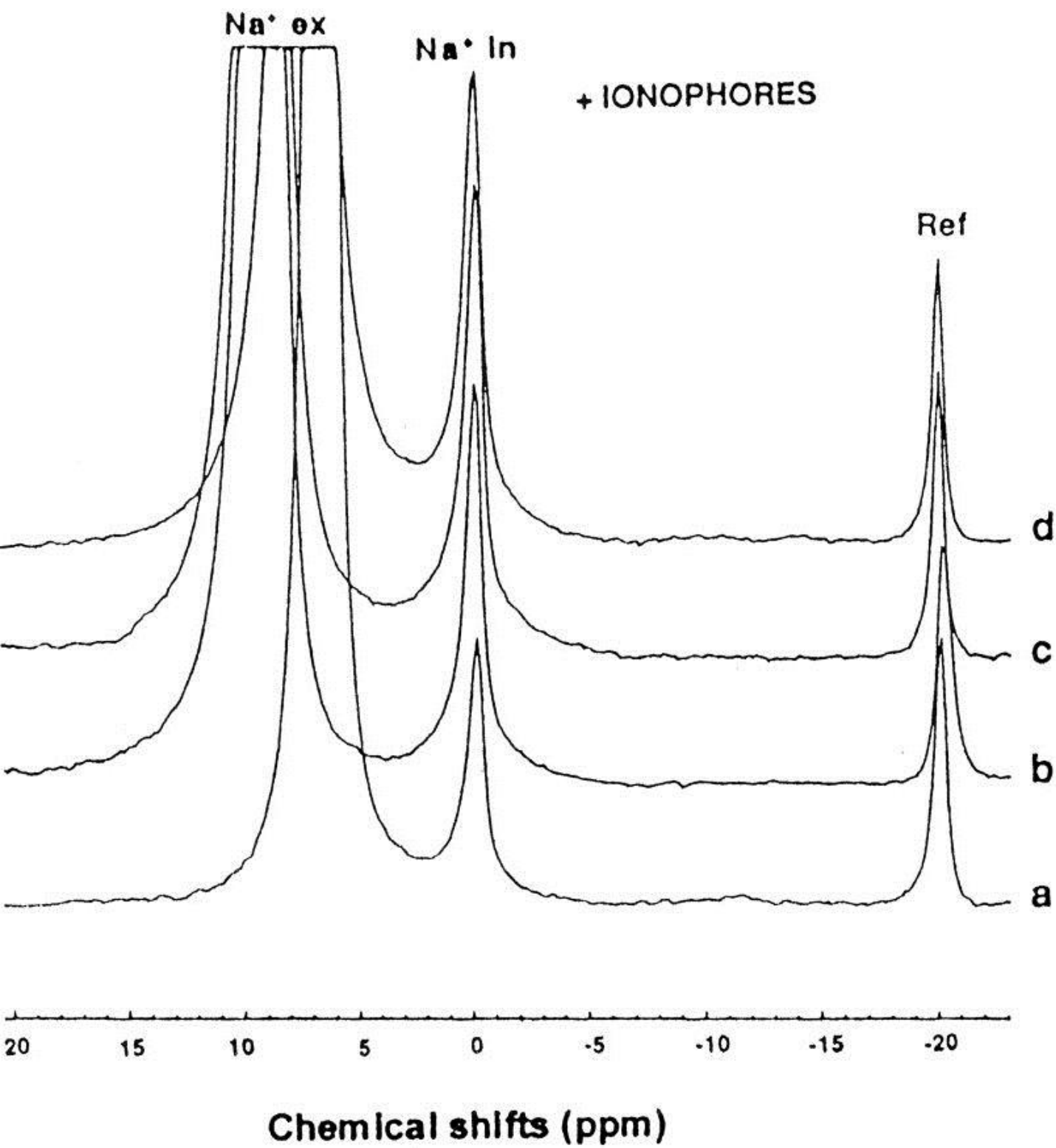
PPP



DOTP

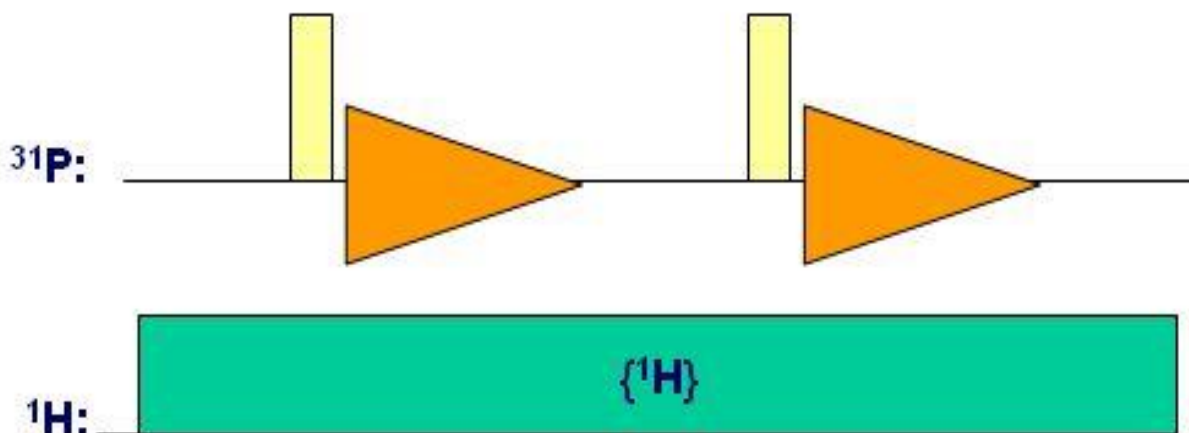


TTHA





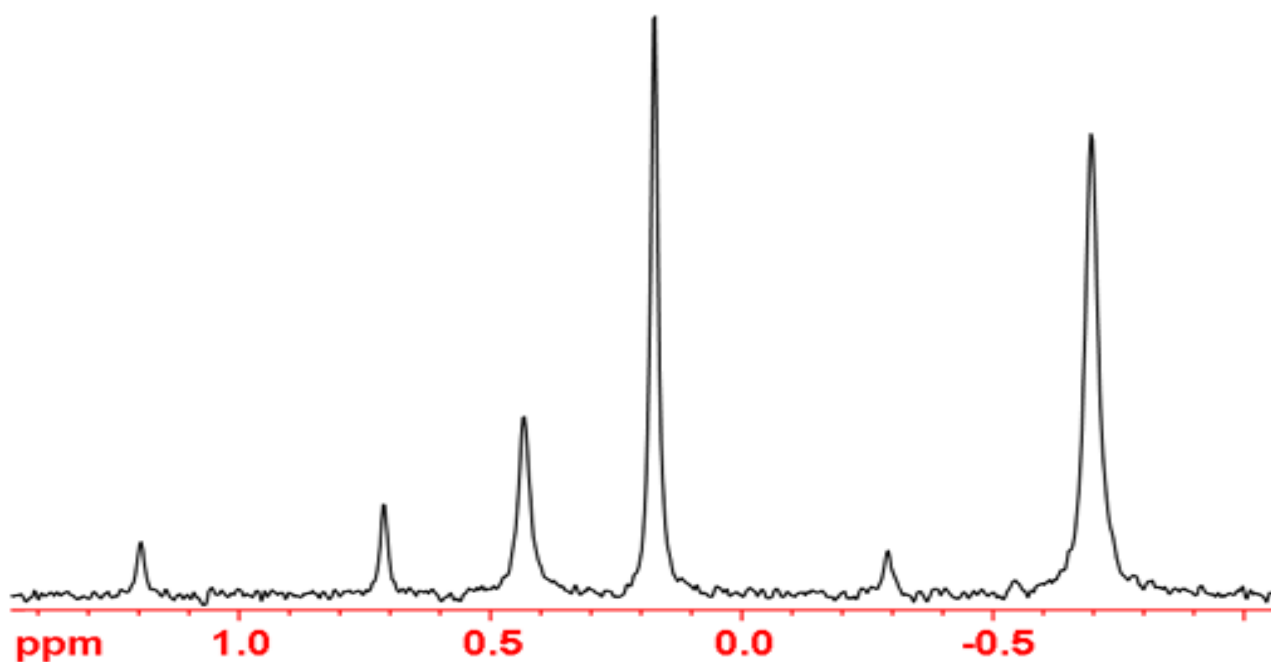
# Heteronukleáris NMR: $^{31}\text{P}$



$^{31}\text{P}$  spektrum mérése: szélessávú protonlecsatolás mellett.

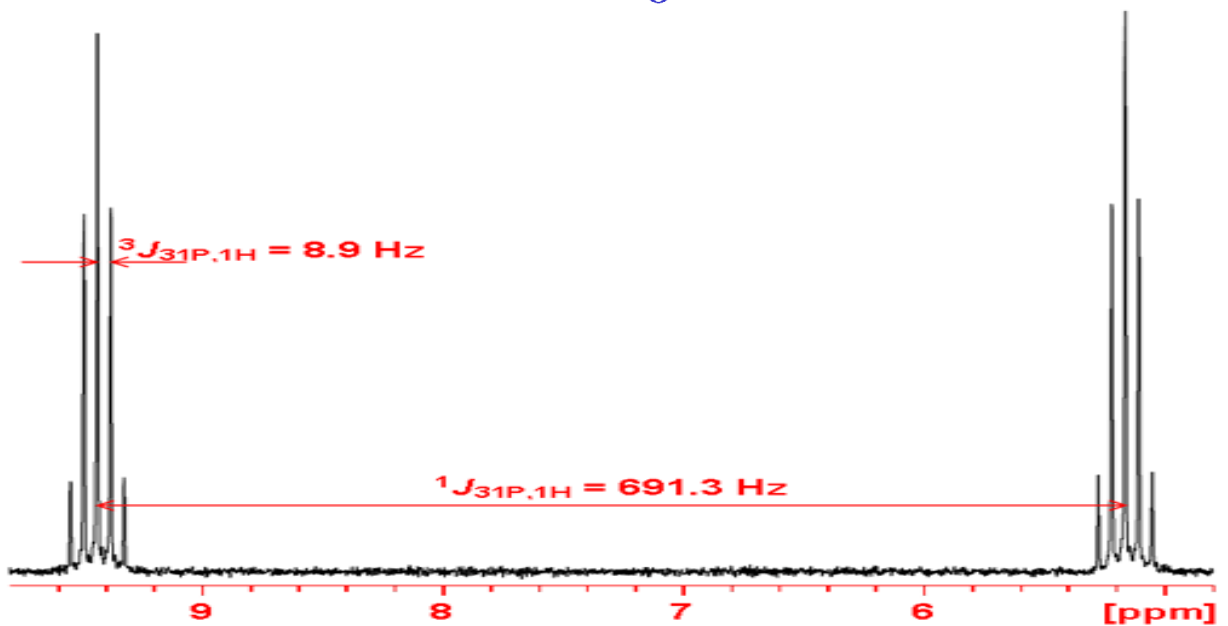
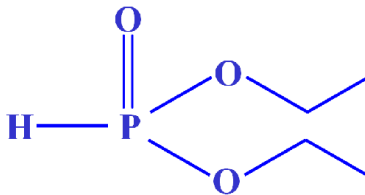
Nehézségek:

- a  $^{31}\text{P}$ - $^1\text{H}$  csatolási állandó jóval nagyobb lehet, mint a  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolási állandó (ca. 600 Hz)

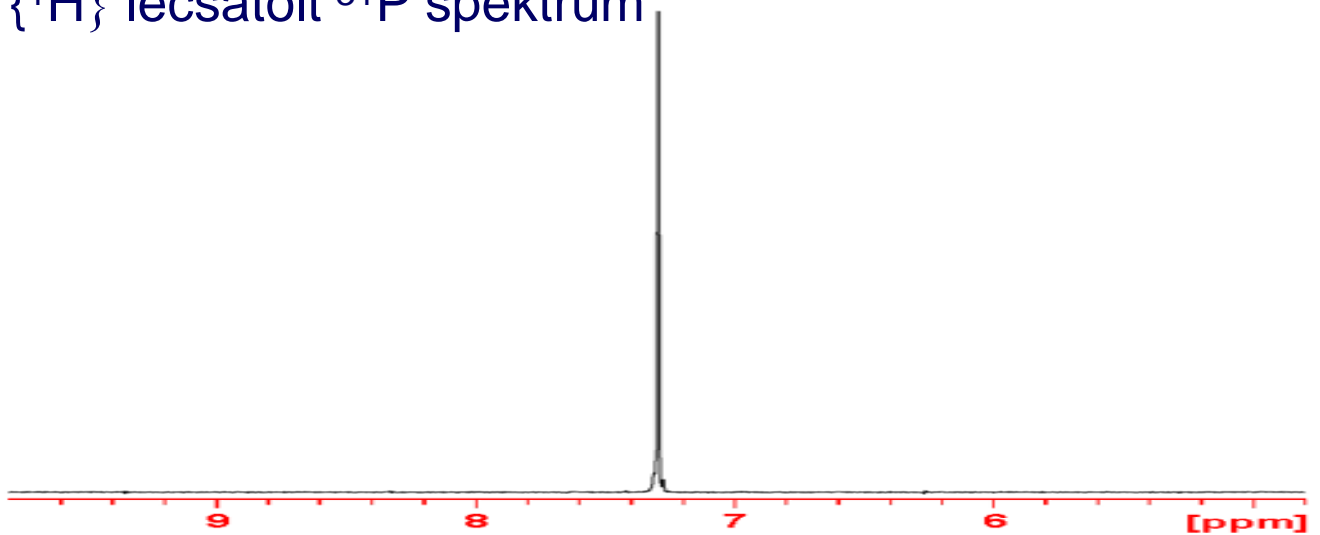


# Heteronukleáris NMR: $^{31}\text{P}$

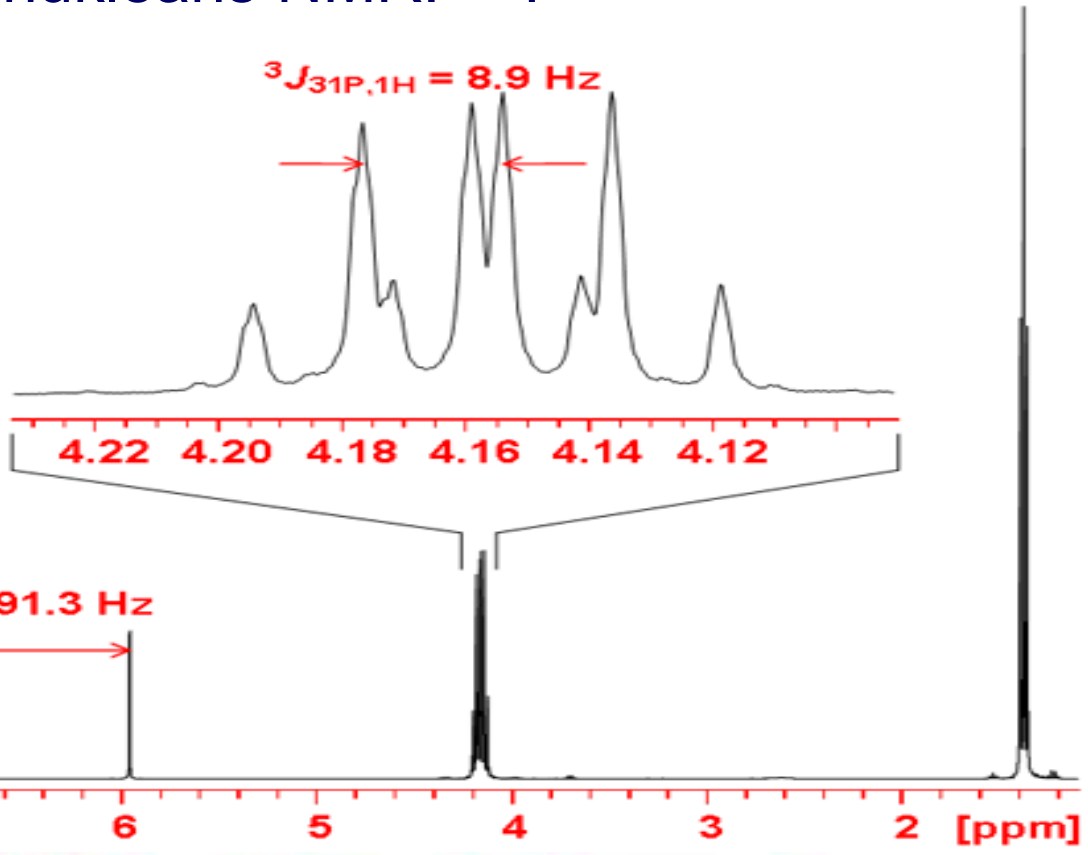
$^1\text{H}$  csatolt  $^{31}\text{P}$  spektrum



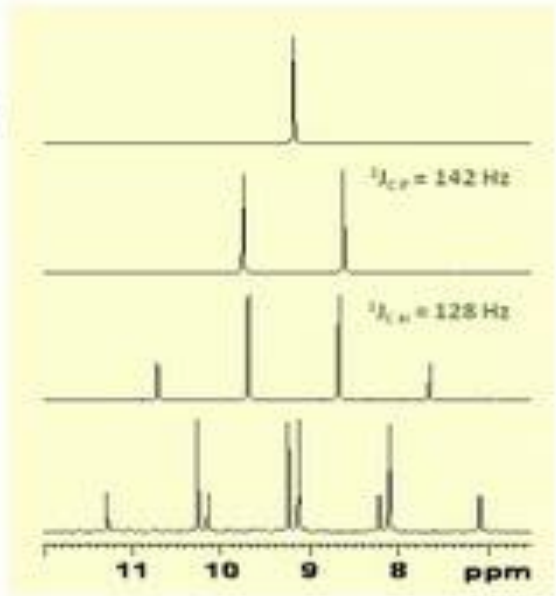
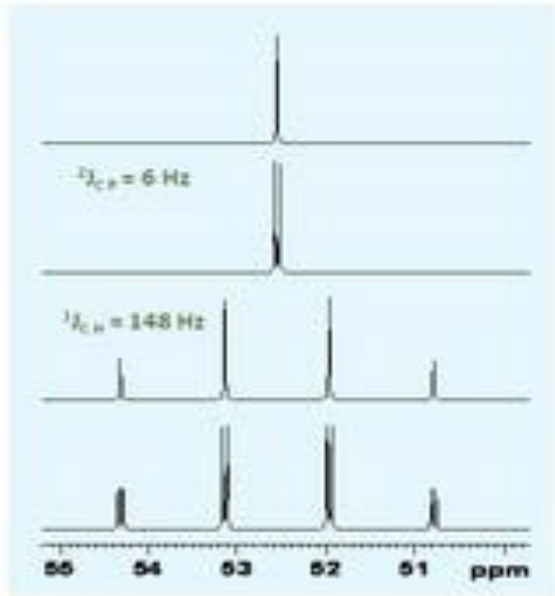
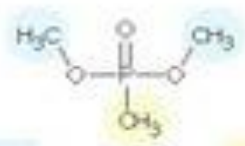
{ $^1\text{H}$ } lecsatolt  $^{31}\text{P}$  spektrum



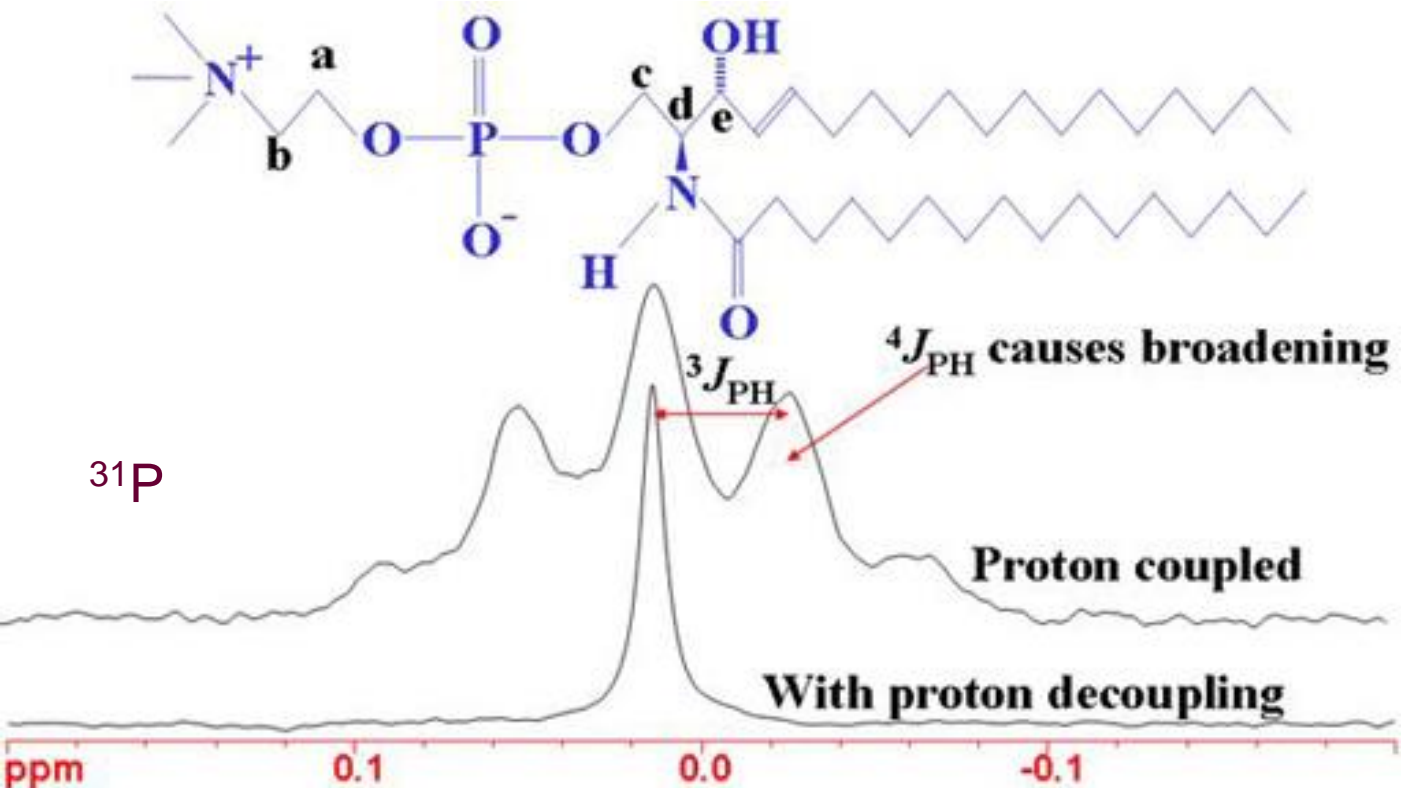
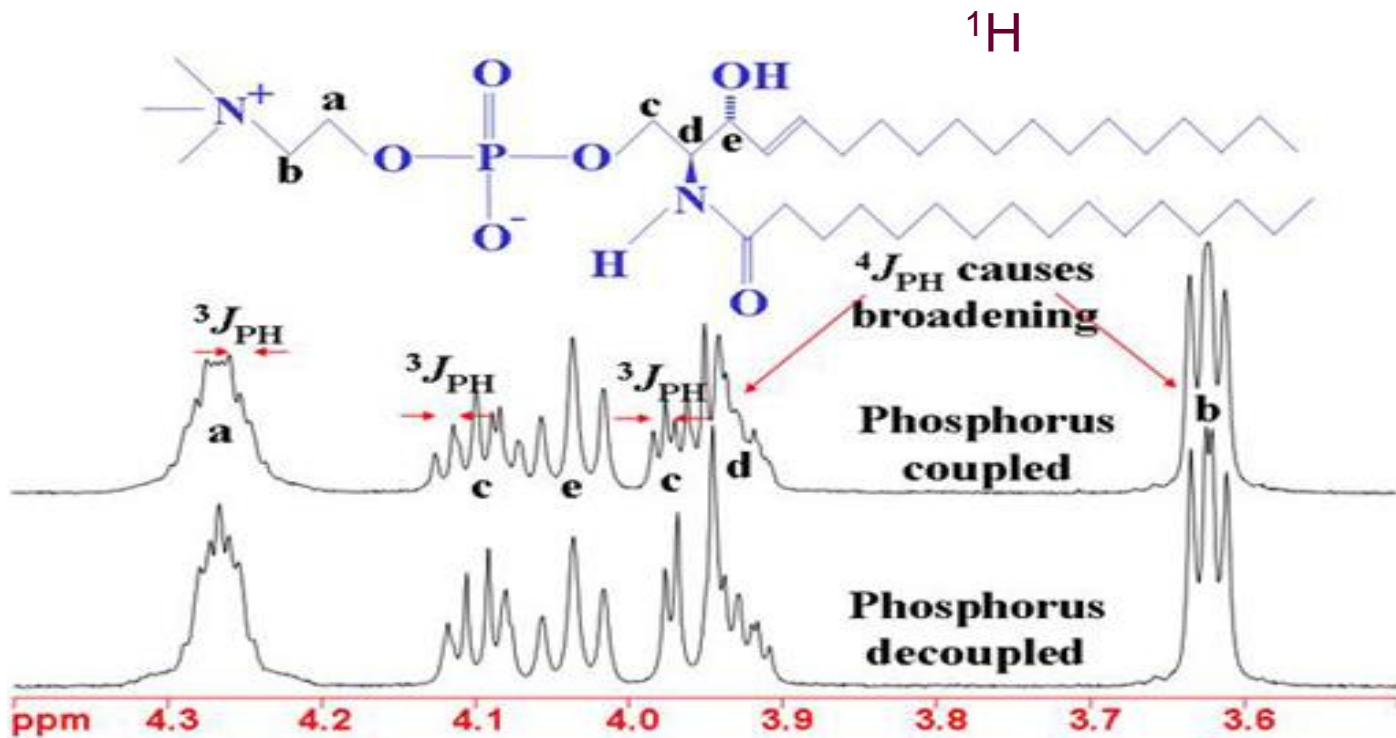
# Heteronukleáris NMR: $^{31}\text{P}$



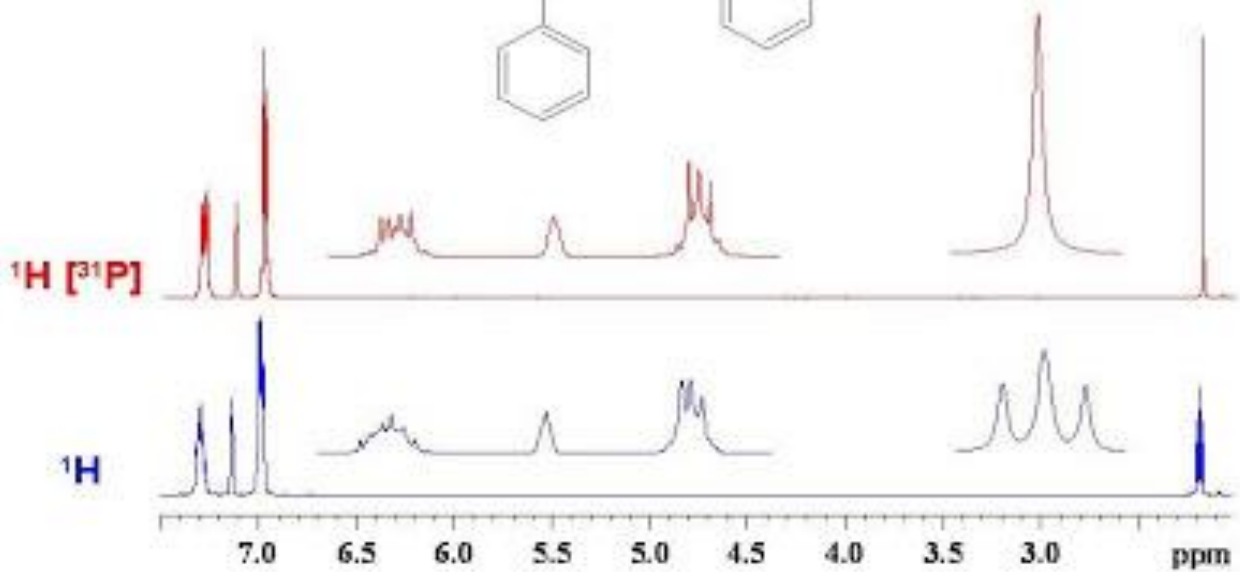
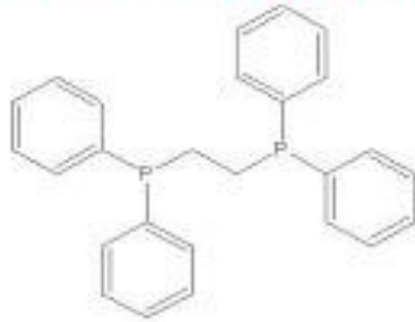
## $^{13}\text{C}$ NMR with $^1\text{H}$ and $^{31}\text{P}$ Decoupling



# Heteronukleáris NMR: $^{31}\text{P}$

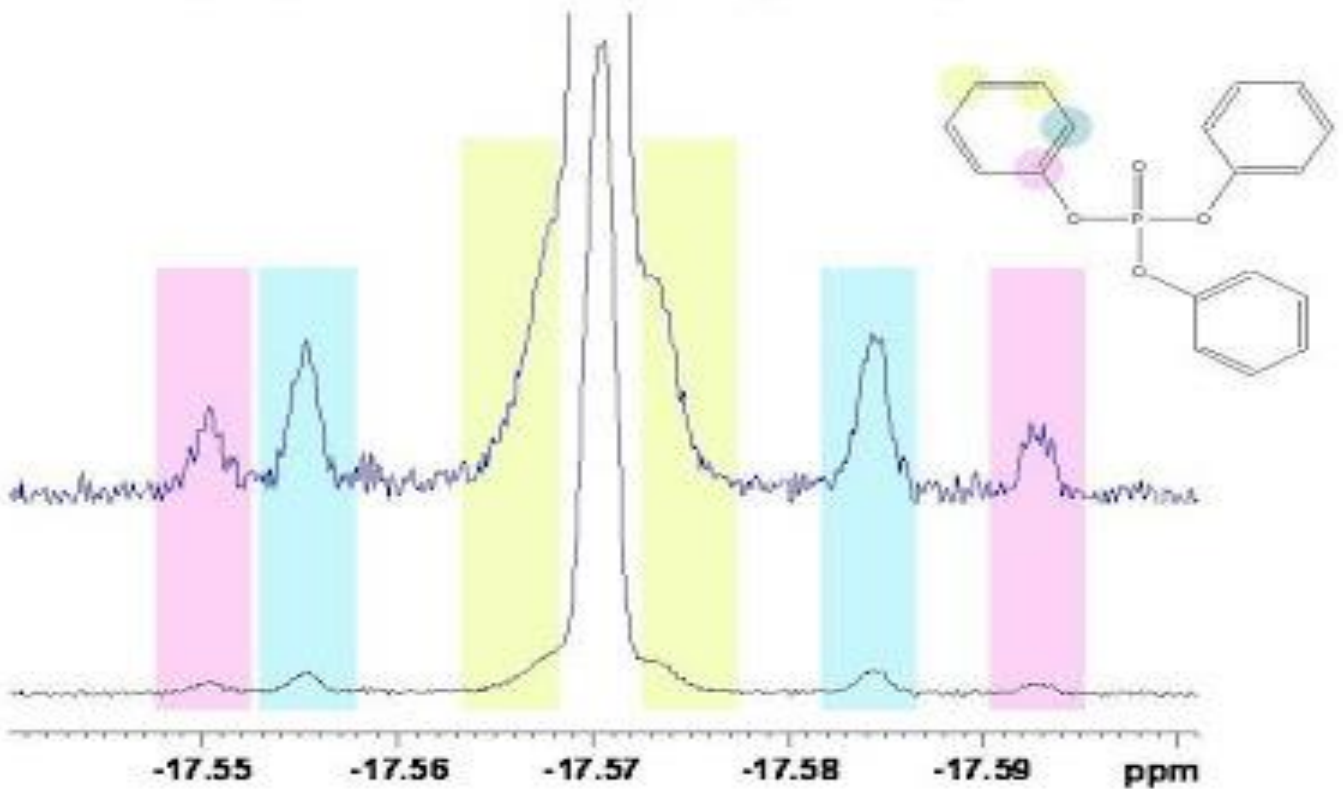


## $^1\text{H}$ NMR with $^{31}\text{P}$ Decoupling



$^{31}\text{P}$  lecsatolás nehézségei : nagy csatolási állandó, több P esetén nagy sáv szélesség

## $^{31}\text{P}$ [ $^1\text{H}$ ] NMR of Triphenyl Phosphate





# „Kvázi” in vivo $^{31}\text{P}$ -NMR

egyidejű  $^{23}\text{Na}$  mérés

