

Μεταφορά μαγνήτισης

Ένας άλλος τρόπος αύξησης της ευαισθησίας ενός πειράματος NMR είναι η λεγόμενη **μεταφορά μαγνήτισης** από έναν ευαίσθητο πυρήνα (^1H) προς λιγότερο ευαίσθητους πυρήνες (^{13}C , ^{15}N). Η μέθοδος ονομάζεται και **μεταφορά πληθυσμών** ή **πώλωσης** επειδή η μεταβολή των πληθυσμών των ενεργειακών σταθμών των πρωτονίων μετά από κάποια διαταραχή (παλμό) προκαλεί έμμεσα εννοϊκές για την αύξηση της ευαισθησίας μεταβολές στους πληθυσμούς των λιγότερο ευαίσθητων πυρήνων.

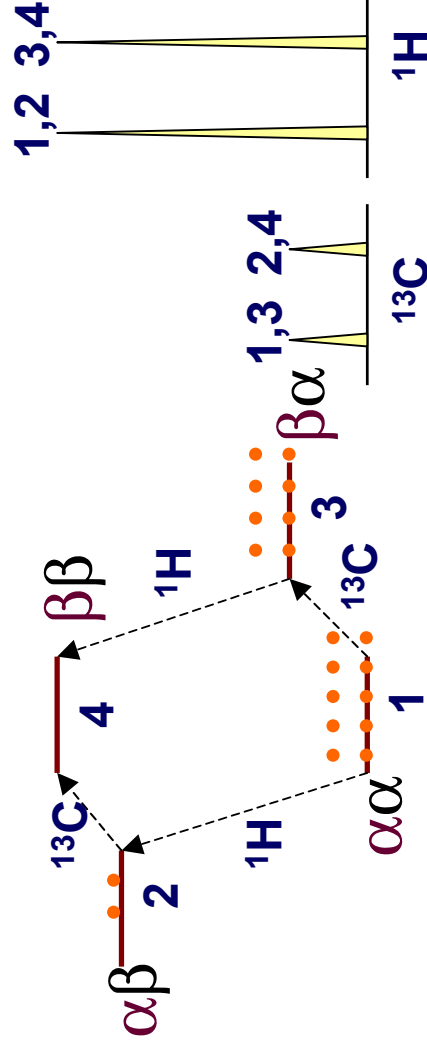
Η μεταφορά της μαγνήτισης μπορεί να γίνει, είτε μεταξύ ομοίων πυρήνων, π.χ. μεταξύ πρωτονίων (ομοπυρηνική μεταφορά μαγνήτισης), είτε μεταξύ ανόμοιων πυρήνων, π.χ. μεταξύ πρωτονίων και πυρήνων άνθρακα-13 (ετεροπυρηνική μεταφορά μαγνήτισης). Περισσότερο αποτελεσματική και χρήσιμη είναι η ετεροπυρηνική μεταφορά μεταφορά μαγνήτισης, το μηχανισμό της οποίας και τα πειράματα που τη συνοδεύουν θα εξετάσουμε στη συνέχεια.

Διαφορά πληθυσμών

$$^{13}\text{C}: \alpha\beta - \beta\beta = \alpha\alpha - \beta\alpha = 2$$

$$^1\text{H}: \beta\alpha - \beta\beta = \alpha\alpha - \alpha\beta = 8$$

Η διαφορά πληθυσμών μεταξύ των ενεργειακών σταθμών αντανakλά την αναλογία **1** προς **4** του γυρομαγνητικού λόγου των πυρήνων ^{13}C και ^1H .

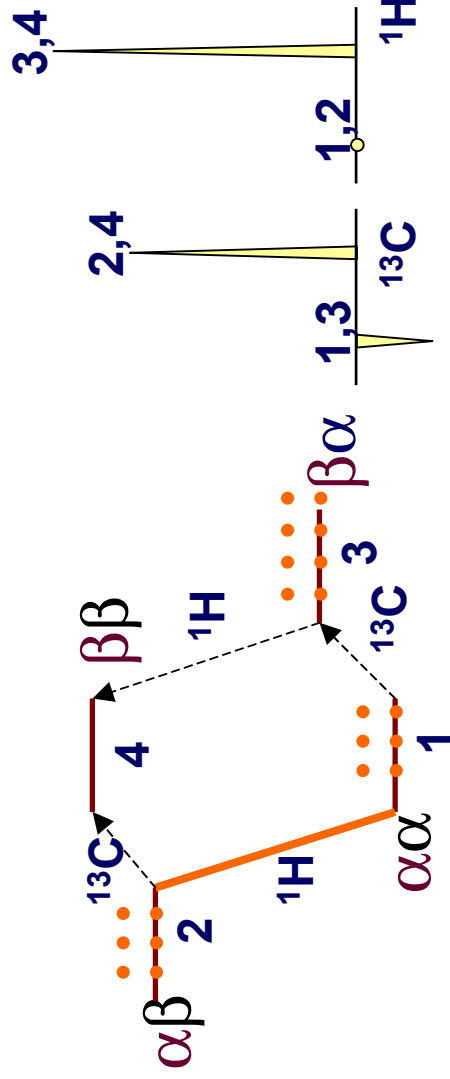


Μεταφορά μαγνήτισης (...)

Μεταφορά μαγνήτισης από το ^1H στον ^{13}C μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, χρησιμοποιώντας επιλεκτικούς ή μαλακούς παλμούς:

- Επιλεκτικός κορεσμός μιας μετάπτωσης του ^1H .
- Επιλεκτική αναστροφή των πληθυσμών μιας μετάπτωσης του ^1H .

Επιλεκτικός κορεσμός μιας μετάπτωσης (1,2) του ^1H



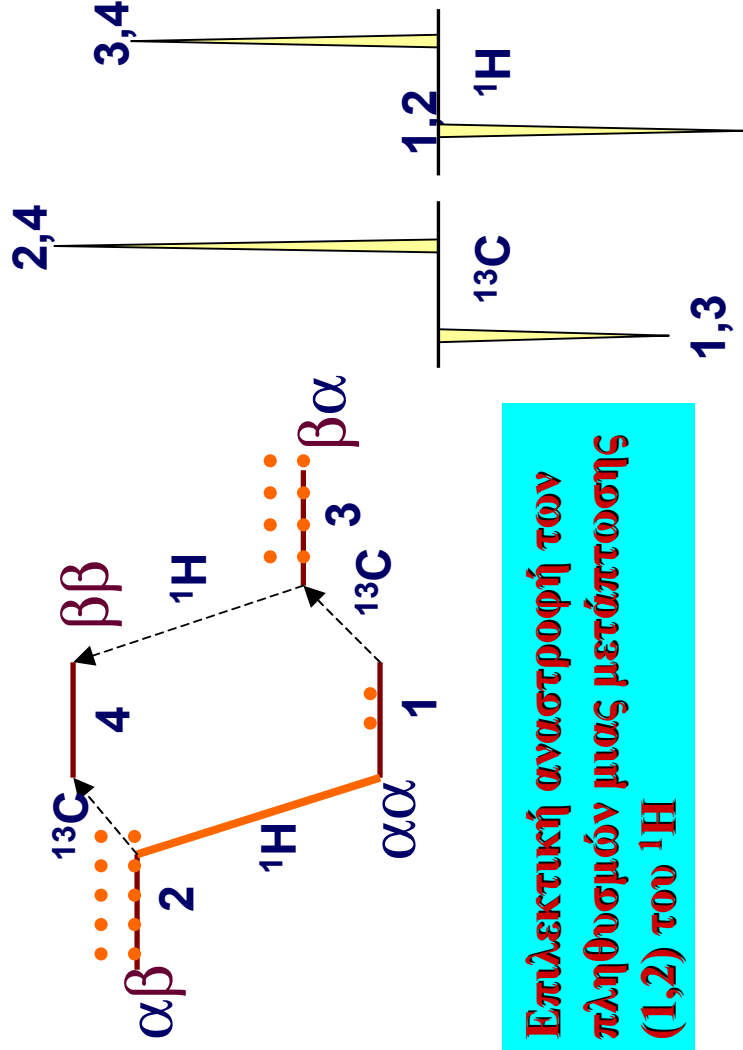
Για τον ^{13}C παρατηρούμε αναστροφή του σήματος από τη μετάπτωση (1,3) με την ίδια αρχική ένταση και τριπλασιασμό της έντασης του σήματος από τη μετάπτωση (2,4) δηλαδή διπλασιασμό της έντασης σε σχέση με την αρχική τιμή.

Διαφορά πληθυσμών

$$^{13}\text{C}: \alpha\beta - \beta\beta = 6 \quad \alpha\alpha - \beta\alpha = -2$$

$$^1\text{H}: \beta\alpha - \beta\beta = 8 \quad \alpha\alpha - \alpha\beta = 0$$

Μεταφορά μαγνήτισης (...)



Επιλεκτική αναστροφή των πληθυσμών μιας μετάπτωσης (1,2) του ^1H

Για τον ^{13}C παρατηρούμε αναστροφή του σήματος από τη μετάπτωση (1,3) με τριπλάσια ένταση (-3) από την αρχική και πενταπλασιασμό (+5) της έντασης του σήματος από τη μετάπτωση (2,4).

Αν και η καθαρή αύξηση της έντασης των δύο σημάτων (5-3=2) δεν διαφέρει από την αρχική, χειριζόμενοι κατάλληλα την πόλωση των πρωτονίων, μπορούμε να πετύχουμε αύξηση της έντασης του σήματος του ^{13}C κατά 4 περίπου φορές (θεωρώντας θετικά και αρνητικά σήματα).

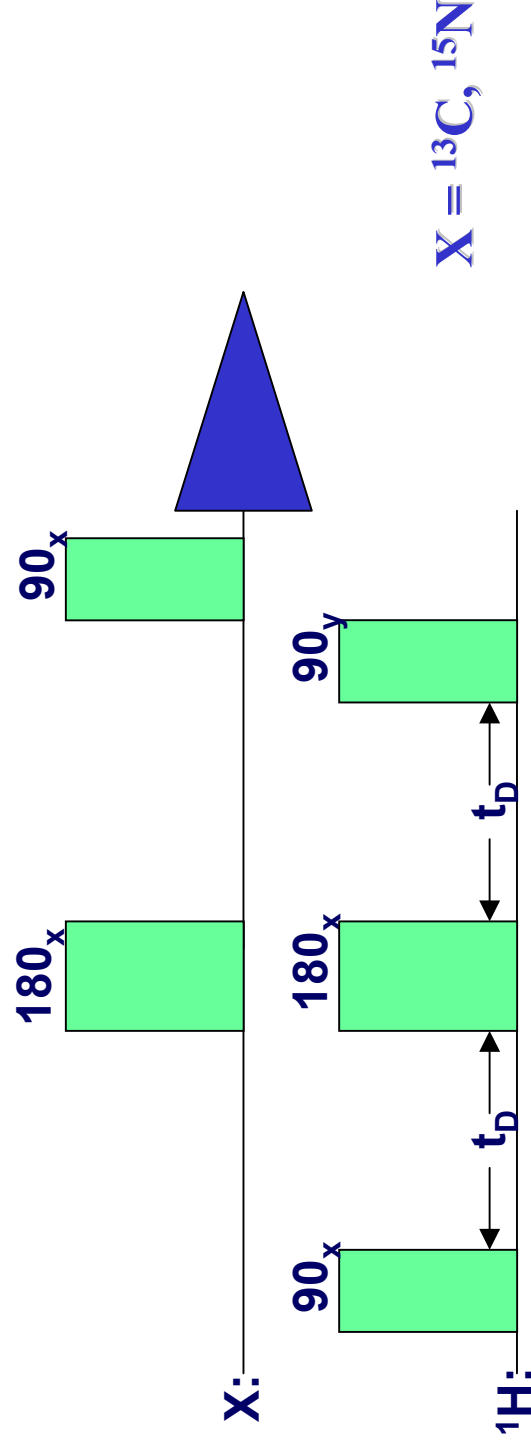
Διαφορά πληθυσμών

$$^{13}\text{C}: \alpha\beta - \beta\beta = 10 \quad \alpha\alpha - \beta\alpha = -6$$

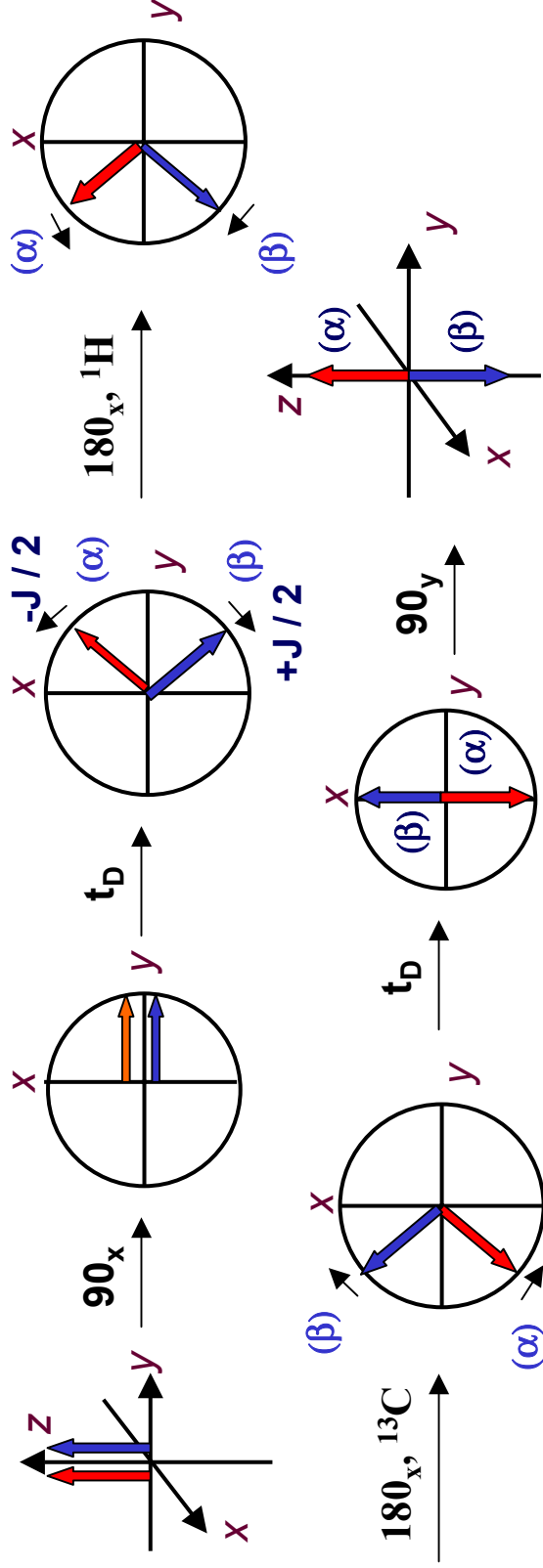
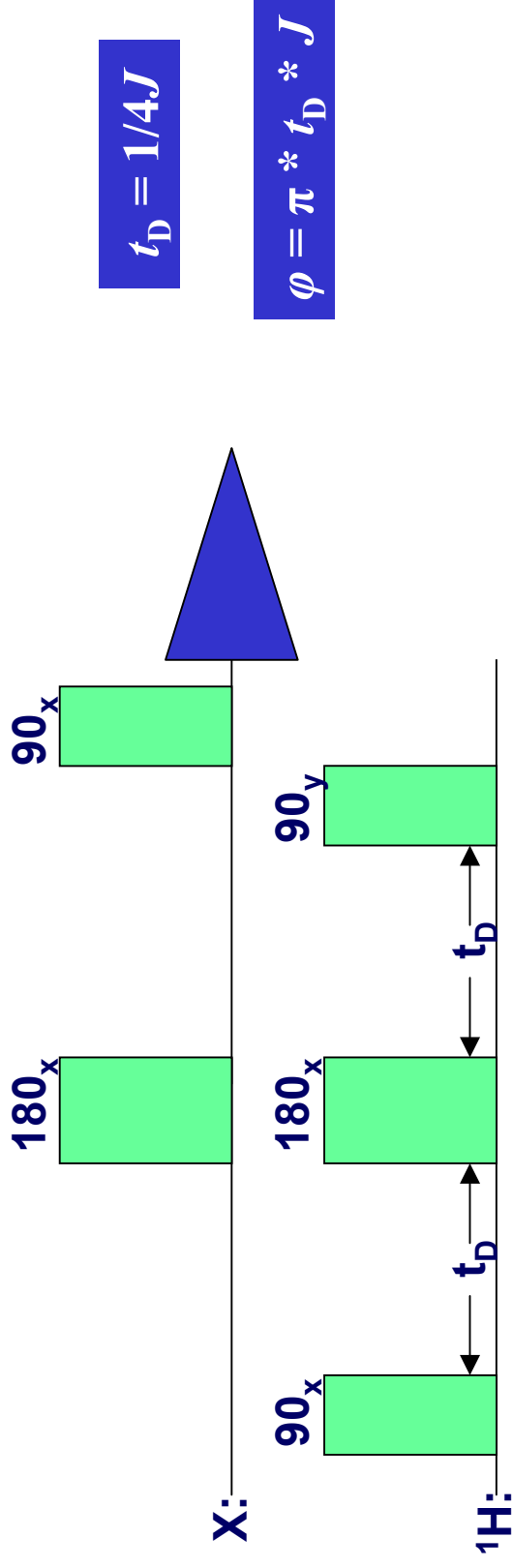
$$^1\text{H}: \beta\alpha - \beta\beta = 8 \quad \alpha\alpha - \alpha\beta = 0$$

Ακολουθία INEPT

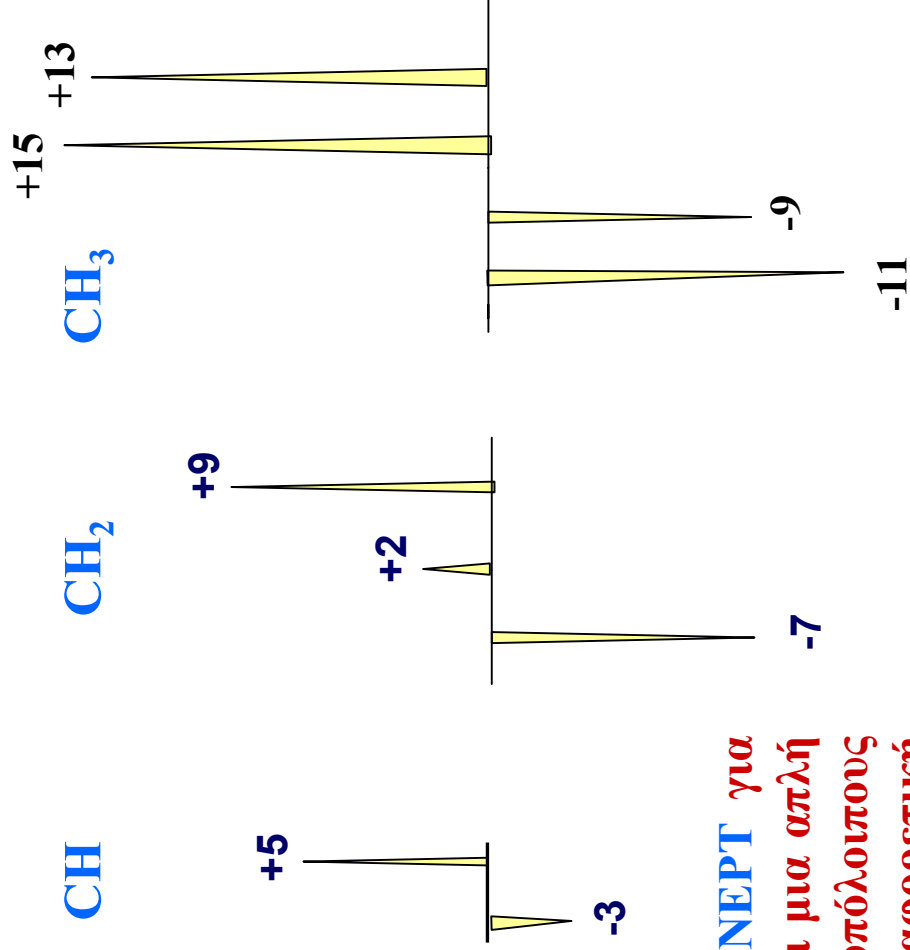
Η ακολουθία παλμών με την οποία μπορούμε να πετύχουμε μεταφορά μαγνήτισης με επιλεκτική αναστροφή μιας μετάπτωσης του ^1H έχει το ακρονύμιο **SPT** ή **SPI** (**Selective Population Inversion**), αλλά δεν είναι χρήσιμη για πολλούς λόγους: Χρησιμοποιεί επιλεκτικούς παλμούς, εφαρμόζεται για κάθε πρωτόνιο χωριστά στο φάσμα, επιμηκύνοντας έτσι τη διάρκεια του πειράματος, δεν μπορεί να γίνει αποσύζευξη των ^1H και τέλος δεν οδηγεί σε καθαρή αύξηση της έντασης των κορυφών. Στην πράξη χρησιμοποιούμε μια πιο προχωρημένη ακολουθία, η οποία χρησιμοποιεί μη επιλεκτικούς παλμούς. Ονομάζεται **INEPT** (**In**ensitive **N**uclei **E**nanced by **P**olarization **T**ransfer) και συνδυάζει τη μεταφορά μαγνήτισης με τη διαμόρφωση- J ή διαμόρφωση φάσης.



Ακολουθία INEPT (...)



Ακολουθία INEPT (...)

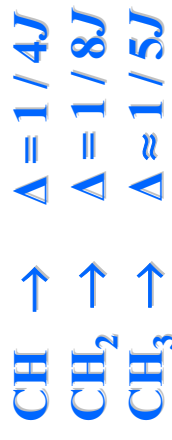


Η εφαρμογή της ακολουθίας INEPT για τον τεταρτοταγή άνθρακα δίνει μια απλή κορυφή με ένταση 1. Για τους υπόλοιπους τύπους ανθράκων με διαφορετική πολλαπλότητα δίνει σήματα με αρνητικές και θετικές σχετικές εντάσεις των συνιστωσών κορυφών.

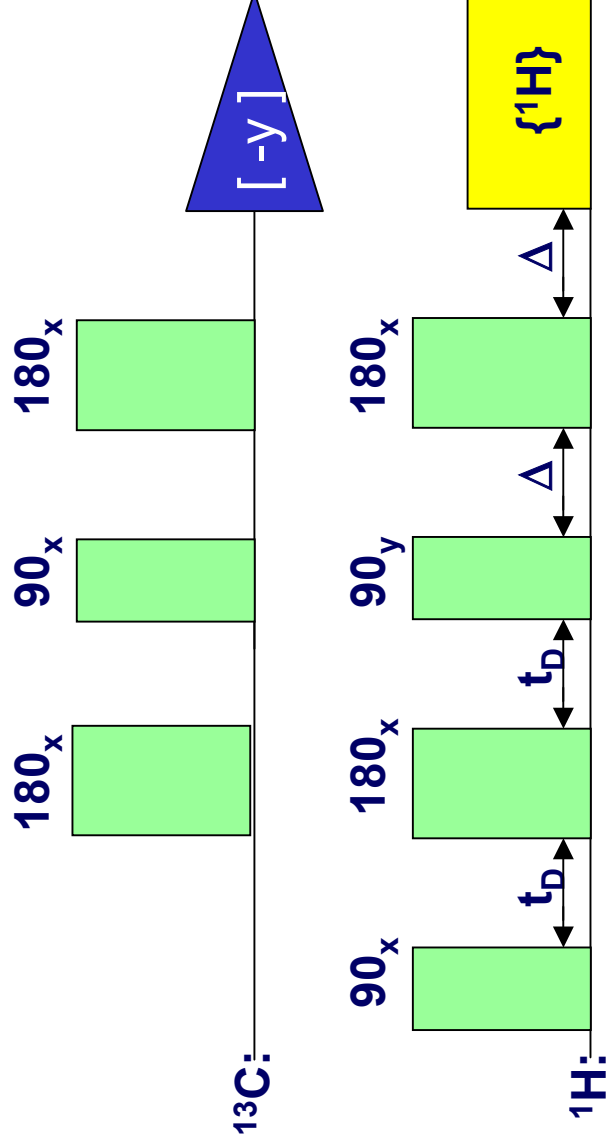
Επανεστιαζόμενη (Refocused) INEPT

- Με την κανονική INEPT συνεχίζουμε να έχουμε το πρόβλημα των σχετικών εντάσεων, π.χ. +5 πάνω και -3 κάτω για μια διπλή κορυφή. Θέλουμε να έχουμε μία μόνο κορυφή για κάθε τύπο άνθρακα. Αυτό βέβαια δεν μπορούμε να το επιτύχουμε με αποσύζευξη (οι συνιστώσες με αντίθετη φάση ακυρώνονται).
- Συνδυάζουμε την INEPT με μια πρόσθετη ακολουθία *spin-echo*, η οποία προκαλεί επανεστίαση της μαγνήτισης στον άξονα $-y$. Επίσης, η επανεστιαζόμενη INEPT επιτρέπει την ανιχνεύση της μαγνήτισης με αποσύζευξη.

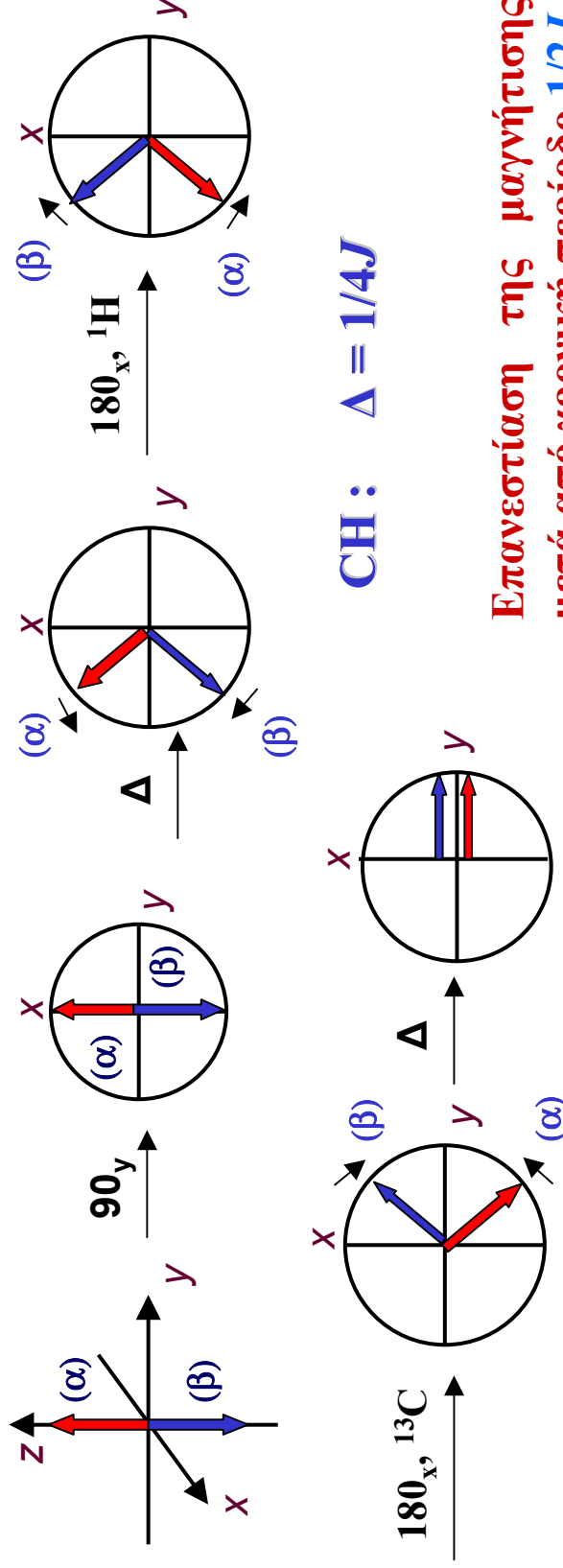
Ανάλογα με τον τύπο του άνθρακα, εφαρμόζουμε διαφορετικούς χρόνους Δ :



Για να έχουμε για όλους τους τύπους του άνθρακα περίπου την ίδια αύξηση της ευαισθησίας, χρησιμοποιούμε $\Delta \approx 1 / 7J$.



Επανεστιαζόμενη (Refocused) INEPT (...)

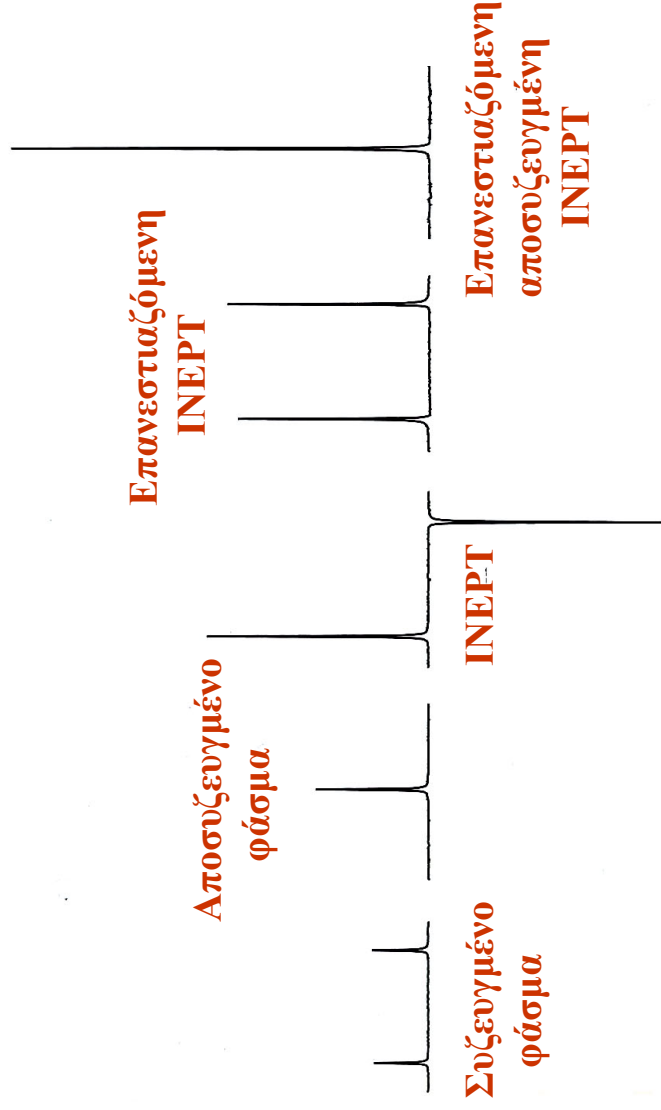


Επανεστίαση της μαγνήτισης
μετά από χρονική περίοδο $1/2J$.

Η επανεστιαζόμενη INEPT δίνει φάσματα με πολλαπλές, αλλά ορθές κορυφές για κάθε τύπο πρωτονιομένου άνθρακα, αρκεί να εφαρμοσθεί ο κατάλληλος χρόνος Δ . Οι εντάσεις των πολλαπλών κορυφών παρουσιάζουν κάποια παραμόρφωση σε σχέση με αυτές του απλού συζυγμένου φάσματος. Η αποσύζευξη κατά την ανίχνευση της FID άρει την παραμόρφωση των εντάσεων και δίνει φάσματα με απλές ορθές κορυφές.

Εναισθησία της INEPT

Πυρήνας	INEPT	NOE
^{13}C	3,98	2,87
^{15}N	9,87	-3,94
^{31}P	2,47	2,24
^{29}Si	5,03	-1,52
^{57}Fe	30,95	16,48
^{109}Ag	21,50	-9,85



Εμφάνιση πολλαπλότητας με την ακολουθία INEPT

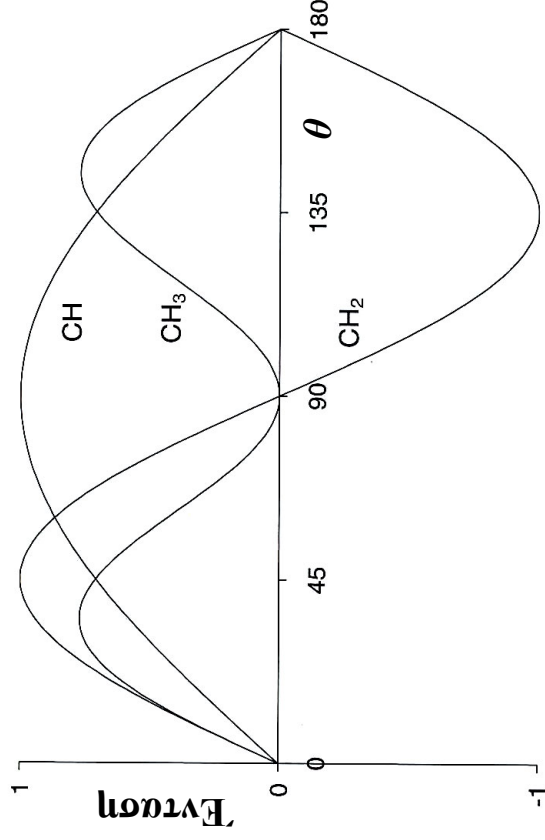
Στην επανεστιαζόμενη INEPT, η επιλογή $\Delta = 1/4J$ επανεστιάζει πλήρως τη διπλή κορυφή του μεθινικού άνθρακα, οι τριπλές και τετραπλές κορυφές παραμένουν με αντίθετη φάση και κατά την αποσύζευξη ακυρώνονται. Χρησιμοποιώντας λοιπόν $\Delta = 1/4J$ μπορούμε να πάρουμε ένα φάσμα, όπου εμφανίζονται μόνον οι μεθινικοί άνθρακες.

$$\theta = \pi * \Delta * J$$

$$\text{CH: } I = I_0 * \sin\theta$$

$$\text{CH}_2: I = I_0 * 2\sin\theta \cos\theta$$

$$\text{CH}_3: I = I_0 * 3\sin\theta \cos^2\theta$$



θ	CH	CH ₂	CH ₃
45°	$3/2\sqrt{2}$	1	$1/\sqrt{2}$
90°	0	0	1
135°	$3/2\sqrt{2}$	-1	$1/\sqrt{2}$

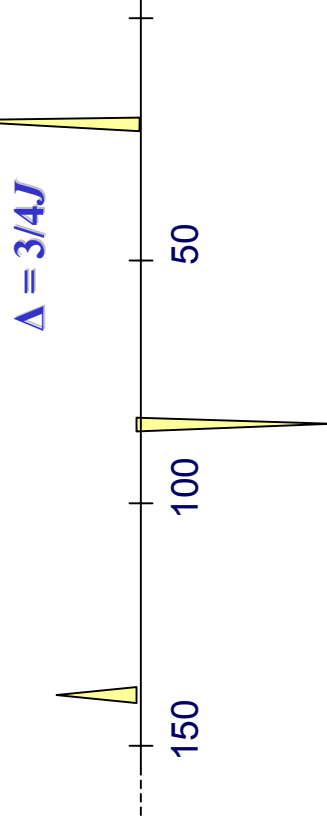
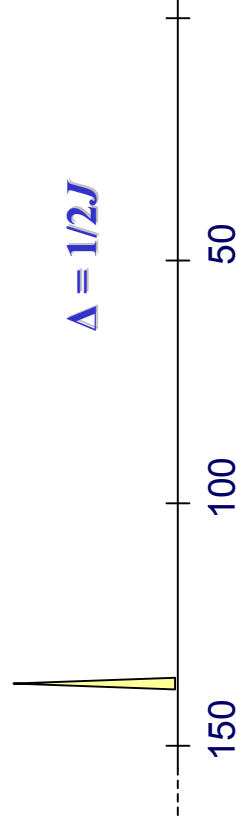
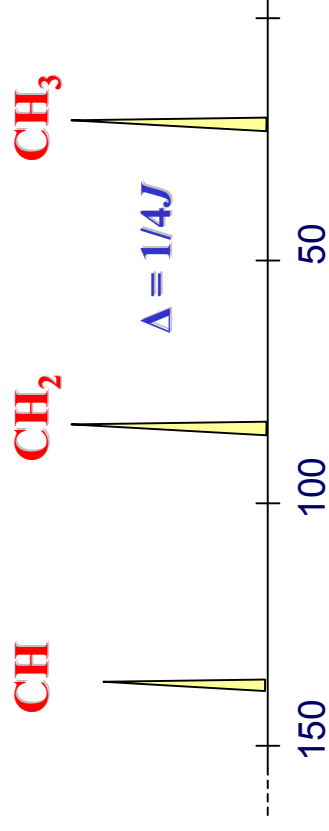
Εμφάνιση πολλαπλότητας με την ακολουθία INEPT (...)

Για να διαφοροποιήσουμε όλους τους πρωτονιομένους άνθρακες, κάνουμε τρία πειράματα ρυθμίζοντας κατάλληλα τους χρόνους Δ , ώστε να ισοδυναμούν με γωνίες $\theta = 45^\circ$, 90° και 135° .

$\theta = 45^\circ$ → CH (+), CH₂ (+) CH₃ (+)

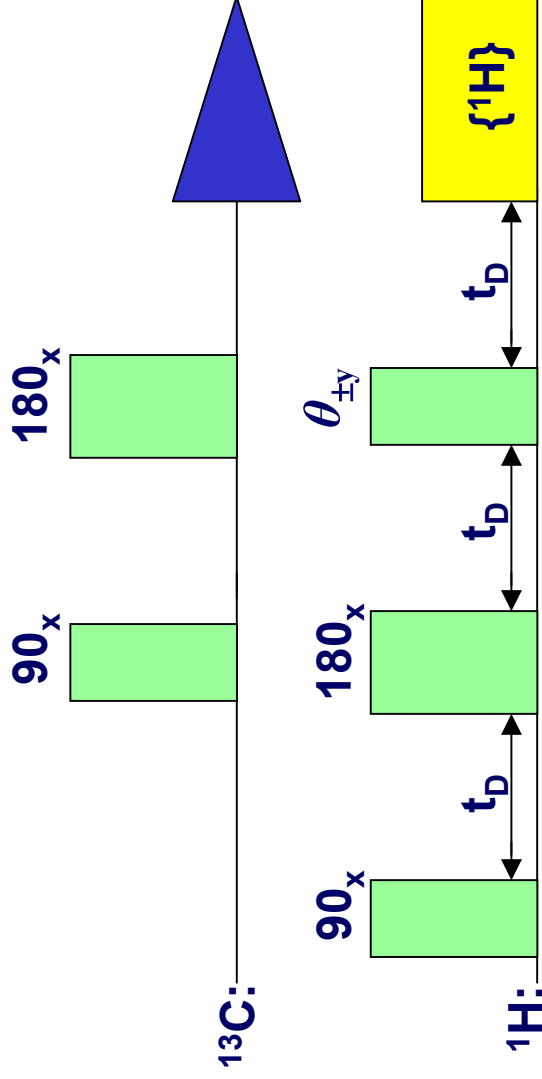
$\theta = 90^\circ$ → CH (+)

$\theta = 135^\circ$ → CH (+), CH₂ (-), CH₃ (+)



Η εμφάνιση των φασμάτων με την ακολουθία INEPT είναι ανώτερη από την αντίστοιχη εμφάνιση με τη βασική ακολουθία spin-echo.

Ακολουθία DEPT

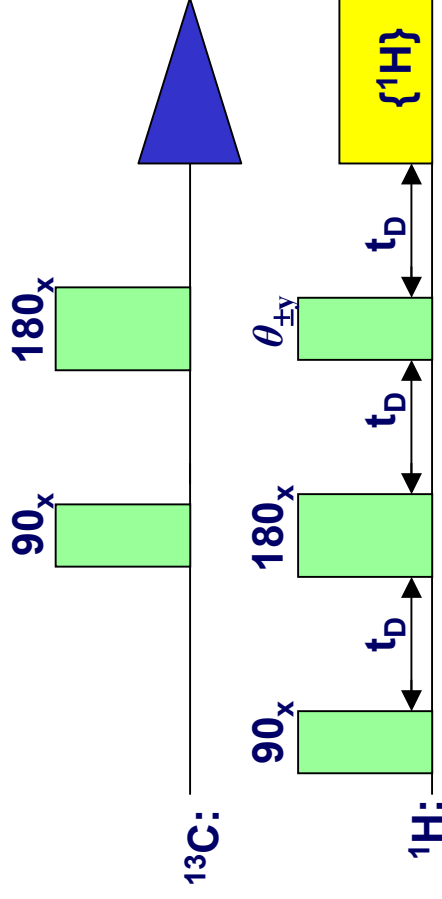


Άλλα σοβαρά πλεονεκτήματα της DEPT είναι ότι μπορούμε να πάρουμε συζευγμένα φάσματα, τα οποία διατηρούν τη σωστή φάση των σημάτων (απορρόφησης), και τη γνωστή σχετική ένταση των κορυφών (1:1 για διπλές, 1:2:1 για τριπλές και 1:3:3:1 για τετραπλές). Τέλος, το πείραμα DEPT δεν απαιτεί ακρίβεια στα χρονικά διαστήματα μεταξύ των παλμών, όπως η INEPT.

Η μέθοδος DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) είναι η πιο δημοφιλής ακολουθία για τον προσδιορισμό της πολλαπλότητας των πρωτονιόμενων ατόμων άνθρακα και έχει πλέον αντικαταστήσει κλασικές μεθόδους, όπως η λήψη συζευγμένων φασμάτων.

Το πείραμα DEPT δημιουργεί παρόμοια μεταφορά μαγνήτισης, όπως η INEPT, παρουσιάζει όμως το πλεονέκτημα ότι όλα τα σήματα είναι σε φάση στην αρχή της ανίχνευσης και έτσι δεν χρειάζεται το επιπλέον χρονικό διάστημα Δ για την επανεστίαση της μαγνήτισης.

Ακολουθία DEPT (...)



θ° (H) : Περιστροφή των δύο συνιστωσών του ^1H με αντίθετη φάση στον άξονα $+z$ και $-z$. Γίνεται μεταφορά της HMQC στις δύο συνιστώσες της μαγνήτισης του ^{13}C , οι οποίες βρίσκονται με αντίθετη φάση στο επίπεδο $\langle xy \rangle$.

180° (C) : Καταργεί την ανομοιογένεια του πεδίου.

$t_D = 1/2J$: Επανεστιάζει τη χημική μετατόπιση του ^{13}C . Η μαγνήτιση του εξελίσσεται όμως υπό την επίδραση της σύζευξης $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$.

90° (H) : Μαγνήτιση ^1H στο επίπεδο $\langle xy \rangle$.

$t_D = 1/2J$: Οι δύο συνιστώσες της μαγνήτισης του ^1H (λόγω σύζευξης $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) βρίσκονται σε αντίθετη φάση στον άξονα x .

180° (H) : Καταργεί την ανομοιογένεια του πεδίου.

90° (C) : Τοποθετεί τον άνθρακα στο επίπεδο $\langle xy \rangle$ μαζί με το πρωτόνιο, όπου η μαγνήτιση του ενός πυρήνα εξελίσσεται σε συνοχή με τη μαγνήτιση του άλλου πυρήνα. Η νέα κατάσταση ονομάζεται **ετεροπυρηνική συνοχή** **πολλαπλών κβάντων** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC) και δεν μπορεί να περιγραφεί με το διανυσματικό μοντέλο.

$t_D = 1/2J$: (α) Επανεστιάζει τη χημική μετατόπιση του ^1H . (β) Εξελίσσεται η HMQC υπό την επίδραση της χημικής μετατόπισης του ^{13}C .

Εμφάνιση πολλαπλότητας με την ακολουθία DEPT

Το κλειδί για την εμφάνιση της πολλαπλότητας των κορυφών του άνθρακα με την ακολουθία **DEPT** είναι η τιμή της γωνίας θ . Οι μεθινικοί, μεθυλενικοί και μεθυλικοί άνθρακες ανταποκρίνονται διαφορετικά σ' αυτόν το παλμό και αυτό παρέχει τη βάση της εμφάνισης της πολλαπλότητας με την ακολουθία **DEPT**. Η μεταβολή της έντασης των κορυφών για διαφορετικές τιμές της θ είναι ανάλογη με αυτήν της **INEPT** για διαφορετικές τιμές του διαστήματος $\Delta = \pi^* t_D^* J$, που είδαμε προηγουμένως.

θ	45°	90°	135°
CH	+	+	+
CH ₂	+	0	-
CH ₃	+	0	+

