

NMR spektroskopia

Tibor Liptaj, Michal Kaliňák, Jana Nováčiková

NMR spektroskopia je metóda molekulovej spektroskopie, ktorá je založená na jave nukleárnej magnetickej rezonancie. NMR spektroskopia umožňuje rozlíšiť a sledovať atómy určitých izotopov (napr. ^1H , ^{13}C ,...) viazaných v chemicky rozdielnych polohách molekuly. Vďaka tomu je NMR spektroskopia v súčasnosti považovaná za jednu z najefektívnejších metód identifikácie látok a určovania ich štruktúry od malých molekúl až po veľké prírodné a syntetické makromolekuly. Okrem toho NMR umožňuje efektívne skúmanie interakcií molekúl na molekulovej úrovni. NMR spektroskopia je zároveň absolútna kvantifikačná metóda a hoci nie je tak citlivá, ako iné analytické metódy, umožňuje stanovenie zložiek v zmesi bez potreby kalibračných meraní. NMR vyžaduje minimálnu resp. žiadnu úpravu vzorky. Štruktúra, interakcie a kvantitatívna analýza vzoriek sa dajú vykonať aj pre vzorky v pôvodnom stave bez nutnosti ich úpravy. Zároveň je to nedeštruktívna metóda, ktorá umožňuje sledovať aj živé bunky či organizmy. Po NMR analýze môže byť vzorka použitá na inú analýzu, či iné účely. Nedeštruktívnosť umožňuje tiež sledovať časový vývoj študovaného systému na jednej a tej istej vzorke.

Tento text Vám umožní ponoriť sa do fungovania NMR. Učte sa postupne alebo si zvolte tému, ktorá Vás zaujíma. Ak chcete jednoduchý rýchlokurz, prečítajte si kapitolu “[[Nukleárna magnetická rezonancia – jadrá atómov v službách chémie a medicíny](#)]” z knihy “Odhalené tajomstvá chémie”.

Obsah

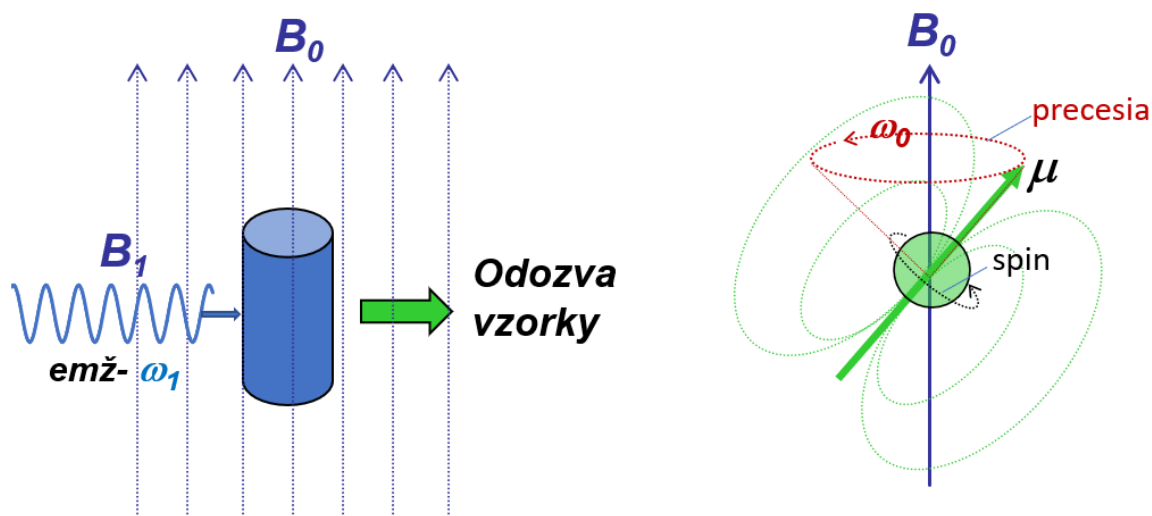
1	Fyzikálny princíp NMR spektroskopie	5
1.1	Spin atómových jadier	6
1.2	Magnetický moment atómových jadier	8
1.2.1	Spin v magnetickom poli	9
1.3	Magnetizácia vzorky	12
1.3.1	Vzorka v nulovom magnetickom poli	13
1.3.2	Vzorka v nenulovom magnetickom poli	14
1.3.3	Rovnovážna magnetizácia	14
1.4	Účinok rádiofrekvenčného poľa B_1	16
1.4.1	Charakter poľa B_1	16
1.4.2	Rotujúca súradnicová sústava	17
1.5	Relaxácia vzorky	21
1.5.1	Mechanizmus NMR relaxácie	22
1.5.2	Charakteristika náhodných magnetických polí	22
1.5.3	Relaxácia M_z zložky magnetizácie	25
1.5.4	Relaxácia M_{xy} zložky magnetizácie	27
1.5.5	Zdroje náhodných polí a relaxačné mechanizmy	29
1.5.6	Kvantovo-mechanický popis relaxácie	30
1.6	Základný NMR experiment	30
1.7	Základná schéma NMR spektrometra	34
2	NMR – metóda molekulovej spektroskopie	36
2.1	Historický úvod	36
2.2	Charakteristiky NMR spektroskopie	37
2.2.1	Výnimočnosť NMR	37

2.2.2	Rôzne typy NMR experimentov a spektier.....	37
2.3	NMR v kvapalnej a tuhej fáze	38
3	NMR spektrá a štruktúrne informácie.....	40
3.1	Princíp „kódovania štruktúry“ v NMR spektrách.....	40
3.2	Interakcie spinov a NMR spektrálne parametre	41
3.2.1	Počet signálov – vplyv symetrie a dynamických procesov	41
3.2.1.1	Pomalý dynamický proces	43
3.2.1.2	Stredne rýchly dynamický proces.....	44
3.2.1.3	Rýchly dynamický proces.....	45
3.2.2	Chemický posun	47
3.2.2.1	Stupnica NMR chemického posunu	48
3.2.2.2	Vznik chemického posunu.....	49
3.2.2.3	Empirické dáta	51
3.2.2.4	Efekt substituentu	56
3.2.2.5	Vodíkové väzby	61
3.2.2.6	Efekt elektrónov na susedných väzbách – magnetická anizotropia... 62	
3.2.3	J-interakcie, spinové systémy a multipletová štruktúra signálov	66
3.2.3.1	Spinové systémy	67
3.2.3.2	Veľkosť interakčných konštánt.....	76
3.2.3.2.1	Jednoväzbové interakčné konštanty.....	76
3.2.3.2.2	Dvojväzbové interakčné konštanty.	77
3.2.3.2.3	Trojväzbové interakčné konštanty.	77
3.2.3.2.4	Interakcie ďalekého dosahu	79
3.2.4	Dipól-dipólové interakcie	80
3.2.4.1	Veľkosť a vlastnosti dipól-dipólovej interakcií.....	80

3.2.4.2	Dipól-dipólové interakcie v tuhej fáze.....	82
3.2.4.3	Dipól-dipólové interakcie v orientovanej kvapalnej fáze	84
3.2.4.4	Dipól-dipólová relaxácia.....	87

1 Fyzikálny princíp NMR spektroskopie

NMR spektroskopia je založená na jave nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR). NMR je fyzikálny jav, pri ktorom atómové jadrá vzorky umiestnenej v silnom statickom magnetickom poli B_0 interagujú so slabým periodicky oscilujúcim magnetickým poľom B_1 (tzv. koherentné elektromagnetické žiarenie s frekvenciou ω_1). Pole B_0 indukuje periodický precesný pohyb magnetických momentov jadier okolo smeru B_0 s frekvenciou ω_0 , úmernou sile poľa B_0 (indukcii). Jav NMR je pozorovateľný, ak frekvencia $\omega_1 \cong \omega_0$, čiže ak frekvencia precesie jadier je v rezonancii s frekvenciou B_1 . NMR jav sa využíva v mnohých oblastiach prírodných vied a vo výrobnej praxi. Jeho dve najdôležitejšie aplikácie sú: NMR spektroskopia a NMR zobrazovanie využívané v medicíne (angl. skratka MRI; Magnetic Resonance Imaging).



Obr. 1 Vľavo: Symbolická schéma pozorovania NMR javu; vpravo: precesný pohyb magnetického momentu atómového jadra okolo smeru magnetického poľa B_0 .

Z vyššie uvedenej definície vyplýva, že NMR jav súvisí s vlastnosťami atómových jadier. Z fyziky vieme, že atómové jadrá sú útvary zložené a protónov a neutrónov. Ich stav popisuje teória jadrovej a časticovej fyziky. Pre NMR jav sú však podstatné iba 2 vlastnosti atómových jadier, ktoré jadrá prejavujú navonok a to ich spin a ich magnetický moment. Pre niektoré jadrá je NMR jav ešte ovplyvňovaný ich elektrickým kvadrupólovým momentom.

Pri NMR jave sa nemení vnútorný stav jadier ani ich vnútorná energia, čiže nie je spojený s jadrovými reakciami a rádioaktivitou. Pri NMR experimentoch sa mení iba potenciálna energia jadier (orientácia ich magnetických momentov vo vonkajšom magnetickom poli) s čím sú spojené iba veľmi malé zmeny energie vzorky a preto sú NMR metodiky bezpečne a neinvazívne.

Pretože každý izotop má v jadre iné zloženie nukleónov (iný počet protónov a neutrónov), každý izotop bude mať iné NMR vlastnosti. Znamená to, že rozdielne izotopy toho istého prvku, ktoré síce majú takmer rovnaké chemické vlastnosti budú mať rozdielne NMR vlastnosti. Z praktického hľadiska je preto zaujímavé aké je prirodzené zastúpenie izotopov s dobrými NMR vlastnosťami.

Pretože, pri NMR sa nepozoruje individuálne správanie jednotlivých jadier ale celkový makroskopický prejav jadier obsiahnutých vo vzorke, dôležité parametre pre popis NMR sú magnetizácia vzorky (celkový výsledný magnetický moment vzorky, ktorý predstavuje merateľný prejav vzorky) a relaxácia vzorky (spontánne procesy vedúce k rovnovážnemu usporiadaniu magnetických momentov jadier vo vzorke).

V ďalšom texte budú jednotlivé vyššie uvedené NMR vlastnosti jadier stručne charakterizované.

1.1 Spin atómových jadier

Atómové jadra sú objekty mikrosвета, ktorý sa riadi pravidlami kvantovej teórie. Pod pojmom „spin“ je v kvantovej teórii označovaný vnútorný rotačný moment objektov mikrosвета. Je to čisto kvantovomechanický efekt, ktorý nemá obdobu v klasickej mechanike. Jeho čiastočnou analógiou je rotačný moment telies rotujúcich okolo vlastnej osi rotácie.

Spin je podobne ako klasický rotačný moment telies vektorová veličina (označenie I) s rovnakým rozmerom základnej jednotky ($J.s$). Pre praktické dôvody sa však veľkosť spinu atómových a subatómových objektov vyjadruje v jednotkách \hbar (redukovaná Planckova konštanta, $\hbar = 1,054571817 \cdot 10^{-34} J.s$). Podľa kvantovej teórie je veľkosť spinu kvantovaná a je charakterizovaná spinovým kvantovým číslom I . I môže nadobúdať iba celé alebo poloceločíselné hodnoty: $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$. Veľkosť vektora spinu je potom podľa kvantovej teórie daná výrazom:

$$I = \hbar \sqrt{I \cdot (I + 1)}$$

Spin atómových jadier je odvodený od spinu neutrónov a protónov. Ich spin je zase odvodený od spinu kvarkov, z ktorých sa tieto nukleóny skladajú. K celkovému spinu nukleónov prispieva okrem vlastného spinu kvarkov aj ich orbitálny moment hybnosti. Presný mechanizmus vzniku výsledného spinu nukleónov je zložitý a zatiaľ nie je jednoznačne potvrdený (resp. teória je veľmi komplikovaná [[Proton spin crisis – Wikipedia](#)]). Empiricky však bolo potvrdené, že oba nukleóny protón i neutrón majú spin $I = \frac{1}{2}$.

Mechanizmus skladania spinov nukleónov v atómových jadrách je taktiež zložitý, no pre celkový spin jadier sú známe tieto jednoduché pravidla:

1. Jadrá s párnym počtom protónov i neutrónov majú nulový spin ($I = 0$). Patria sem napr. jadrá izotopov ^{12}C , ^{16}O . Tieto jadrá nevykazujú NMR jav.
2. Jadrá s nepárnym počtom nukleónov (suma protónov a neutrónov v jadre) majú poloceločíselný spin ($I = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots$).
3. Jadrá s nepárnym počtom protónov i nepárnym neutrónov majú spin celočíselný ($I = 1, 2, 3, \dots$).

Jadrá s nenulovým spinom, teda jadrá ktoré sú NMR aktívne je v NMR terminológii zvykom označovať zjednodušene ako „spiny“.

Kvantová teória ako aj Stern-Gerlachov experiment [[Stern–Gerlach experiment – Wikipedia](#)] postulujú, že nie iba celková veľkosť spinu ale aj veľkosť jeho zložiek (I_x , I_y a I_z) je kvantovaná, pričom veľkosť zložiek vektora spinu sa dá vyjadriť ako súčin redukovanej

Planckovej konštanty \hbar a kvantového čísla m (napr. $I_x = m\hbar$). Číslo m sa nazýva magnetické kvantové číslo. V závislosti od veľkosti I magnetické kvantové číslo m môže nadobúdať iba $2I+1$ diskretných hodnôt:

$$m \in \{-I, -(I-1), -(I-2) \dots \dots + (I-2), +(I-1), +I \}.$$

Pre organickú chémiu a biochémiu sú najdôležitejšie jadrá so spinom $I = 1/2$ (patria sem napr. jadrá izotopov ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P). Pre tieto jadrá m môže nadobúdať iba 2 hodnoty: $+1/2$ a $-1/2$. Dôsledkom tohto kvantovania je, že všetky merateľné veličiny, ktoré charakterizujú stav spinov $I = 1/2$ (energia, zložky vektora spinu) môžu nadobúdať iba 2 dovolené hodnoty. Vo všeobecnosti nie je determinované ktorú hodnotu z 2 možných pri meraní skutočne určíme. Známa je iba štatistická pravdepodobnosť s akou jednotlivé hodnoty nameriame.

Čo sa týka energie pre spiny $I = 1/2$ existujú iba 2 stavy, v ktorých je dobre definovaná. Tieto stavy je zvykom formálne označovať ako $|\alpha\rangle$ a $|\beta\rangle$. V stave $|\alpha\rangle$ je energia spinu rovná $E_\alpha = -1/2 \gamma B_0$ a v stave $|\beta\rangle$ rovná $E_\beta = +1/2 \gamma B_0$. Vyjadruje sa v jednotkách rad/s.

Vo všeobecnosti sú spiny $I = 1/2$ v zmiešanom stave $|\psi\rangle$ danom ako superpozícia stavov $|\alpha\rangle$ a $|\beta\rangle$: $|\psi\rangle = c_\alpha|\alpha\rangle + c_\beta|\beta\rangle$. Koeficienty c_α a c_β sú komplexné čísla a určujú podiel stavov $|\alpha\rangle$ a $|\beta\rangle$ v zmiešanom stave a zároveň umožňujú určiť pravdepodobnosť namerania jednotlivých dovolených hodnôt energie. Pravdepodobnosť, že nameriame hodnotu E_α alebo E_β je rovná $p(E_\alpha) = c_\alpha^2$, resp. $p(E_\beta) = c_\beta^2$. Platí pritom, že vždy nameriame jednu z týchto 2 možností, čiže: $p(E_\alpha) + p(E_\beta) = c_\alpha^2 + c_\beta^2 = 1$

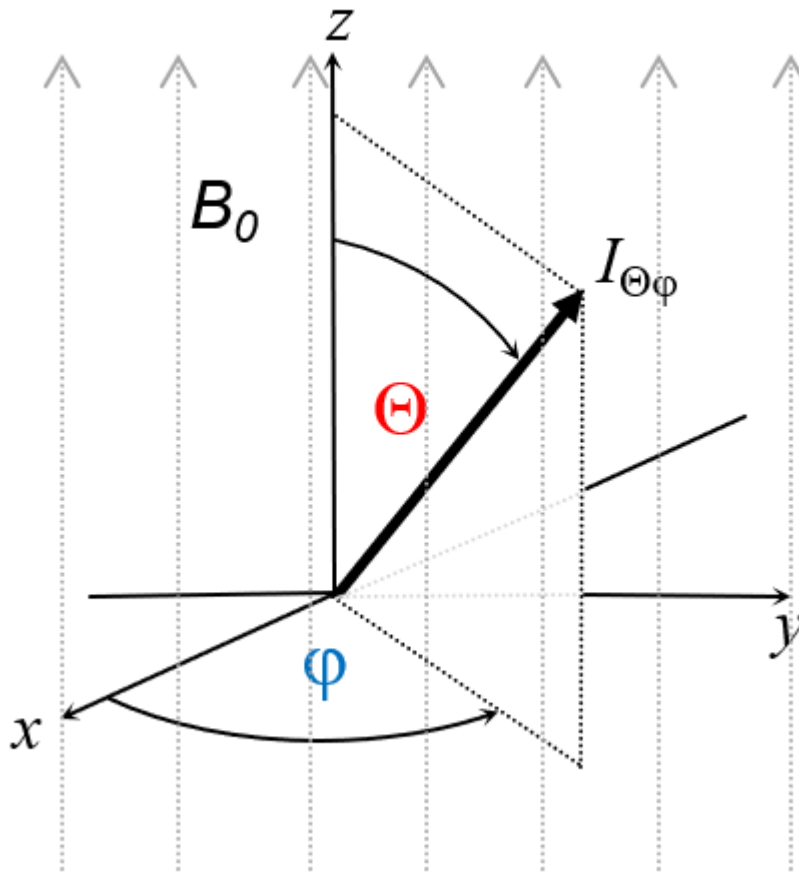
Keďže (ako uvidíme neskôr) energia spinu súvisí s hodnotou I_z zložky spinu, v stave s dobre definovanou energiou spinu sú dobre definované aj z -zložky vektora spinu: $I_z(\alpha) = +1/2\hbar$ a $I_z(\beta) = -1/2\hbar$.

Z kvantovania veľkosti zložiek vektora spinu vyplýva, že vektor spinu má veľmi zvláštne vlastnosti. Na rozdiel od vektora klasického momentu hybnosti vektor spinu nemá dobre definovanú orientáciu v priestore: miesto 3 ortogonálnych (nezávislých) zložiek potrebných na jej jednoznačne určenie (napr. zložiek I_x , I_y a I_z), má dobre definovanú iba jednu z nich. V závislosti od stavu spinu má táto dobre definovaná zložka rôznu orientáciu v priestore. Táto dobre definovaná zložka sa zvykne označovať ako „Blochov vektor“ [[Bloch Sphere – Wikipedia, the free encyclopedia](#)]. Smer, v ktorom je Blochov vektor orientovaný sa obvykle vyjadruje v polárnych súradniciach Θ a φ (pozri Obr. 2). Pri tomto vyjadrení súradníc stav Blochovho vektora $|\psi\rangle$ možno vyjadriť ako superpozíciu stavov $|\alpha\rangle$ a $|\beta\rangle$, pričom koeficienty c_α a c_β sú určené súradnicami Θ a φ :

$$|\psi\rangle = c_\alpha|\alpha\rangle + c_\beta|\beta\rangle = \cos(\Theta/2)|\alpha\rangle + \sin(\Theta/2)e^{i\varphi}|\beta\rangle$$

Zložka spinu v smere danom súradnicami Θ a φ má vždy hodnotu $I_{\Theta,\varphi} = +\hbar/2$. I_x , I_y a I_z zložky vektora spinu pritom nie sú dobre definované. Pri ich opakovanom meraní sa náhodne namerajú hodnoty $+\hbar/2$ alebo $-\hbar/2$. Spriemerované hodnoty veľkého počtu týchto meraní (alebo spriemerované hodnoty veľkého súboru spinov, ktoré boli pred meraním v rovnakom stave) sú však dobre definované a dajú sa vyjadriť ako priemet Blochovho vektora do smeru osi x , y a z : $\langle I_x \rangle = 1/2\hbar \cdot \sin\Theta \cos\varphi$, $\langle I_y \rangle = 1/2\hbar \cdot \sin\Theta \sin\varphi$ a $\langle I_z \rangle = 1/2\hbar \cdot \cos\Theta$, kde $\langle I_i \rangle$ označuje kvantovo-mechanickú spriemerovanú hodnotu zložky spinu I_i .

Vidíme, že spriemerované hodnoty zložiek Blochovho vektora sú definované podobným spôsobom ako zložky klasických vektorov. Pri NMR meriame vždy veľký súbor spinov a získavame informácie iba o spriemerovanom správaní spinov. V ďalšom (pokiaľ explicitne neuvedieme ináč) budeme preto za vektor spinu považovať Blochov vektor, ktorý má správanie podobne správaniu klasického vektora momentu hybnosti. Tento prístup nám zjednoduší popis mnohých NMR javov.



Obr. 2 Polárne súradnice znázorňujúce orientáciu Blochovho vektora (orientáciu dobre definovanej zložky spinu). Θ určuje orientáciu $I_{\Theta\phi}$ vzhľadom k B_0 a ϕ jeho orientáciu (fázu) v rovine xy . Podrobnejšia (kvantovo-mechanická) diskusia týkajúca sa stavu a orientácie spinu jadier ako aj validácia vyššie uvedeného zjednodušeného opisu NMR javu pre jadrá s $I = 1/2$ bude uvedená v samostatnej kapitole.

1.2 Magnetický moment atómových jadier

Existencia vlastného rotačného momentu jadier I spolu s existenciou kladného náboja atómových jadier podľa klasickej mechaniky naznačuje súčasnú existenciu ich magnetického momentu. Jadrá s nenulovým spinom sa skutočne prejavujú ako mikroskopické magnety s magnetickým momentom μ , pričom μ je vektor, ktorý je kolíneárny s vektorom spinu I

$$\mu = \gamma \cdot I,$$

kde konštanta úmernosti γ sa nazýva gyromagnetický pomer. V SI sústave sa μ vyjadruje v jednotkách $[A \cdot m^2]$ resp. v jednotkách $[J/T]$; rozmer γ je $[\text{rad}/(\text{s} \cdot T)]$.

Magnetický moment atómových jadier a subatómových častíc je veľmi malý a preto je zvykom vyjadrovať jeho veľkosť aj v jednotkách tzv. jadrového magnetónu μ_N ($\mu_N = 5,05078 \cdot 10^{-27}$ J/T). Jadrový magnetón μ_N je definovaný ako fiktívny magnetický moment prúdovej slučky kladného náboja na povrchu jadra vytvorenej otáčavým pohybom (spinom) jadra. Výpočet je urobený podľa klasickej teórie analogickým spôsobom ako pri elektrónovom (Bohrovom) magnetóne [[Bohr magneton – Wikipedia](#)]:

$$\mu_N = \frac{e\hbar}{2m_p}$$

kde e je jednotkový náboj, m_p je pokojová hmotnosť protónu a $\hbar/2$ rotačný moment protónu. Jediným praktickým významom jadrového magnetónu je, že je vhodnou jednotkou na vyjadrenie veľkosti skutočného magnetického momentu atómových jadier, nukleónov a elementárnych častíc. V týchto jednotkách veľkosť magnetického momentu i -tého jadra (nukleónu) určuje bezrozmerná konštanta g_i , ktorá sa nazýva g-faktor: $\mu_i = g_i \mu_N$. Magnetický moment protónu a neutrónu vyjadrený v týchto jednotkách je $\mu_p = 2,793\mu_N$, resp. $\mu_n = -1,913\mu_N$.

Skutočnosť, že neutrón má nenulový magnetický moment jednoznačne poukazuje na to, že magnetický moment nukleónov a atómových jadier nie je prejavom rotácie elektrického náboja (vznik prúdovej slučky) ale je to čisto kvantovo-mechanický efekt. Spin a magnetický moment protónu a neutrónu sú odvodené od spinu a magnetického momentu kvarkov, z ktorých sa tieto nukleóny skladajú.

Spin a magnetický moment atómových jadier je odvodený od magnetického momentu neutrónov a protónov z ktorých sa jadro skladá. V atómových jadrách dvojice protónov a neutrónov vytvárajú zjednotené páry, ktoré majú nulový spin a nulový magnetický moment. Výsledný spin i magnetický moment jadra preto určujú nespárené nukleóny. Ak v jadre prevládajú nespárené neutróny, tak výsledný magnetický moment je záporný (jeho vektor je orientovaný opačne ako vektor spinu) a naopak ak v jadre prevládajú nespárené protóny jeho magnetický moment je kladný. Veľkosť celkového magnetického momentu jadier (hodnota g alebo γ) však závisia nielen od celkového momentu nespárených nukleónov ale aj od detailov štruktúry jadra a zatiaľ neexistuje jednoznačná teória vysvetľujúca detaily skladania magnetického momentu nukleónov v atómových jadrách.

1.2.1 Spin v magnetickom poli

Magnetický moment je prostriedkom pomocou ktorého spiny interagujú s okolím. Magnetický moment interaguje s magnetickými poľami, v ktorých sa nachádza. Môžu to byť polia externé ale aj polia interné pochádzajúce zo vzorky.

Najskôr vyšetříme správanie spinov vo vonkajšom statickom magnetickom poli v akom sa NMR experiment vždy vykonáva. Označme toto pole symbolom \mathbf{B}_0 a smer jeho siločiar za smer z -osi laboratórnej súradnicovej sústavy (LSS).

Na spiny mimo magnetického poľa nepôsobí žiadna sila, a preto spiny zostávajú v rovnakom stave a nemení sa ich poloha ani orientácia. Orientačná (polohová) energia pre všetky spiny v nulovom poli nezávisle od ich orientácie je rovnaká – nulová: $E_{\theta, \varphi} = 0$ pre všetky hodnoty θ a φ ak $B_0 = 0$.

Naopak, v nenulovom magnetickom poli B_0 potenciálna energia závisí od vzájomnej orientácie vektorov magnetickej indukcie a magnetického momentu spinu. Je daná skalárnym súčinom vektorov $\boldsymbol{\mu}$ a \mathbf{B}_0 . Závaší od uhla Θ medzi nimi :

$$E_{\Theta,\varphi} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 = -\mu_z \cdot B_0 = -\mu \cdot B_0 \cdot \cos(\Theta) = -\frac{1}{2} \hbar \cdot \gamma \cdot B_0 \cdot \cos(\Theta) = -\frac{1}{2} \hbar \cdot \omega_0 \cdot \cos(\Theta),$$

kde $\omega_0 = \gamma \cdot B_0$ má rozmer frekvencie [rad/s]. Najmenšiu hodnotu potenciálnej energie má magnetický moment ak je orientovaný v smere \mathbf{B}_0 ($\Theta = 0^\circ$). Najväčšiu energiu má spin, ak je orientovaný proti smeru \mathbf{B}_0 ($\Theta = 180^\circ$). Dôležité je, že energia spinov nezávisí od uhla φ , t. j. od ich orientácie v rovine xy .

Ak by spin jadra bol nulový a napriek tomu by jadro malo nenulový magnetický moment $\boldsymbol{\mu}$, potom by sila úmerná gradientu potenciálnej energie ($\mathbf{F}_\Theta = -dE_\Theta / d\Theta$) pôsobila na $\boldsymbol{\mu}$ momentom sily $\mathbf{T} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0$ a spôsobila by zmenu jeho orientácie do smeru \mathbf{B}_0 , tak ako je to v prípade magnetky kompasu. Existencia spinu však spôsobí, že spin začne precesovať okolo smeru magnetického poľa. Precesia je výsledkom točivého momentu sily \mathbf{T} , ktorým \mathbf{B}_0 pôsobí na $\boldsymbol{\mu}$. Výsledkom je zmena orientácie \mathbf{I} , a teda aj $\boldsymbol{\mu}$. Podľa klasickej mechaniky opis pohybu \mathbf{I} (účinnok točivého momentu \mathbf{T}) vyjadruje vektorová diferenciálna rovnica:

$$\frac{d(\gamma \mathbf{I})}{dt} = \frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma(\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0) = \boldsymbol{\mu} \times \gamma \mathbf{B}_0 = \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{\omega}_0 \quad (1)$$

kde $\boldsymbol{\mu}$ je magnetický moment odvodený od Blochovho vektora \mathbf{I} . Na riešenie tejto vektorovej rovnice je vhodné oba vektory vyjadriť pomocou ich x , y a z zložiek: $\boldsymbol{\mu} \equiv \frac{1}{2}\hbar\gamma(\sin\Theta\cos\varphi; \sin\Theta\sin\varphi; \cos\Theta)$ a podobne $\mathbf{B}_0 \equiv (0; 0; B_0)$. Rozpísaním vyššie uvedenej vektorovej rovnice na jej zložky dostaneme 3 skalárne rovnice:

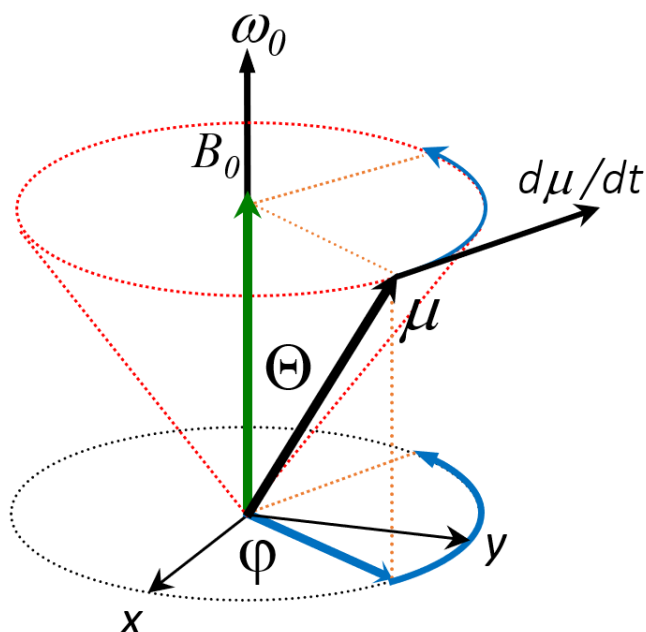
$$\frac{d\mu_x}{dt} = \mu_y \cdot \omega_0; \quad \frac{d\mu_y}{dt} = -\mu_x \cdot \omega_0; \quad \frac{d\mu_z}{dt} = 0 \quad (2)$$

Ak urobíme 2.deriváciu týchto zložiek dostaneme diferenciálne rovnice 2.stupňa (napr. $d^2\mu_x/dt^2 = -(\omega_0)^2 \cdot \mu_x$), ktorých riešením (pri konštantnom ω_0) sú 3 integrálne rovnice pre jednotlivé zložky vektora $\boldsymbol{\mu}$:

$$\mu_x(t) = \frac{1}{2}\hbar\gamma\sin(\Theta)\cdot\cos(\varphi+\omega_0 t); \quad \mu_y(t) = \frac{1}{2}\hbar\gamma\cdot\sin(\Theta)\cdot\sin(\varphi+\omega_0 t); \quad \mu_z(t) = \frac{1}{2}\hbar\gamma\cdot\cos(\Theta),$$

kde φ je počiatočná fáza $\boldsymbol{\mu}$. Vidíme, že spin (jeho dobre definovaná zložka, Blochov vektor) vykonáva precesný pohyb okolo vonkajšieho poľa, ktoré na spin pôsobí. V polárnej súradnicovej sústave sa dá pohyb jednoducho popísať:

1. Pri precesii sa polárny uhol Θ (odchýlka $\boldsymbol{\mu}$ od smeru \mathbf{B}_0) nemení, nemení sa preto ani polohová energia spinu a ani hodnota jeho zložky μ_z .
2. Fáza (orientácia $\boldsymbol{\mu}$ v rovine xy) sa rovnomerne mení s časom s uhlovou rýchlosťou ω_0 [rad.s⁻¹] úmernou indukciou \mathbf{B}_0 .
3. Z predchádzajúceho vyplýva, že vzájomná orientácia rôznych spinov toho istého druhu a ich celková energia sa pri precesii taktiež nemenia.



Obr. 3 Pri precesii magnetického momentu spinu (Blochovho vektora) sa súradnica Θ nemení, no fáza φ s časom lineárne rastie s uhlovou rýchlosťou ω_0 .

Frekvencia precesie spinov ω_0 sa označuje sa ako Larmorova frekvencia. Často sa vyjadruje aj v Hz: $\nu_0 = \omega_0/2\pi$ [$\text{Hz} \equiv \text{s}^{-1}$]. V závislosti od indukcie magnetického poľa, ktoré sú v súčasnosti pre pozorovanie NMR javu dostupné (do 25 T) je hodnota Larmorovej frekvencie z oblasti rádiových frekvencií (kHz až ~ 1 GHz). Znamená to, že NMR prístroje sú rádiových frekvencií aparatury.

Okrem poľa B_0 na spiny pôsobia aj interné (vnútro vzorkové) magnetické polia a môžu pôsobiť tiež ďalšie vonkajšie polia. Pohyb spinu v takomto prípade určuje výsledné (časovo premenlivé) magnetické pole $B(t)$, ktoré je vektorovým súčtom všetkých poli pôsobiacich v danom okamžiku na spin. Okamžitá zmena stavu spinu sa dá potom naďalej vyjadriť vo forme rovnice (1), treba len zameniť B_0 za $B(t)$ a ω_0 za $\omega(t)$.

Pohybové rovnice zložiek spinu uvedené vyššie boli odvodené metódami klasickej teórie. Ako bolo uvedené v kapitole kvantová teória poskytuje pre pohyb spinov identické výsledky.

1.3 Magnetizácia vzorky

Sledovanie NMR vlastností individuálnych atómových jadier, ktoré boli diskutované vyššie je možné len pri experimentoch s atómovými lúčmi. Sú to experimenty Stern-Gerlachovho typu [[Stern-Gerlach experiment – Wikipedia](#)]. Pre praktické aplikácie NMR javu sú však tieto experimenty nevyužiteľné. Rozvoj aplikácií založených na NMR jave začal až po objavení spôsobu ako tento jav sledovať v štandardných laboratórnych podmienkach na štandardných (makroskopických) vzorkách. Pri tomto novom spôsobe sa miesto správania individuálnych spinov sleduje správanie celej vzorky. Sleduje sa magnetizácia vzorky M , čo je jej výsledný magnetický moment vzorky. M je daná vektorovým súčtom magnetických momentov všetkých sledovaných spinov vo vzorke:

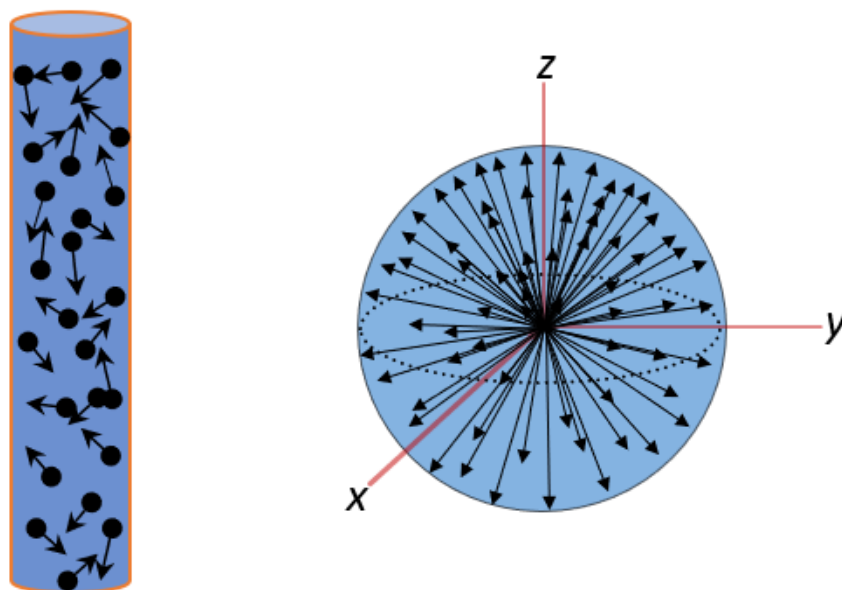
$$M = \sum_i \mu_i$$

Ak je vo vzorke viac typov spinov, napr. rôzneho druhu (^1H , ^{13}C , alebo napr. ^1H v rôznych polohách v molekule) možno celkovú magnetizáciu rozdeliť na jej zložky: $M = \sum^k M^k$ kde k -tá zložka je súčtom magnetického momentu všetkých spinov k -tého typu: $M^k = \sum_i \mu_i^k$.

Typické NMR vzorky (objem 0,5 ml; milimólové koncentrácie zložiek) obsahujú obrovský počet spinov ($\sim 10^{18}$ - 10^{21}). Niektoré parametre takého veľkého súboru možno určiť pomocou termodynamických zákonov. Medzi takéto parametre patrí aj hodnota M vo vzorke, ktorá je v termodynamickej rovnováhe. Rovnovážna magnetizácia sa dá M určiť na základe Boltzmanovho zákona, podľa ktorého je rozdelenie populácie rôznych stavov elementov súboru dané ich energiou [[Boltzmann distribution – Wikipedia](#)].

1.3.1 Vzorka v nulovom magnetickom poli

Ak vzorka sa nachádza mimo magnetického poľa ($B_0 = 0$) potenciálna energia ($E_{\Theta\phi} = -\mu_z \cdot B_0$) všetkých spinov, nezávisle od ich orientácie je rovnaká – nulová. Z Boltzmanovho zákona potom vyplýva, že všetky orientácie spinov v priestore sú rovnako zastúpené. Pri nulovom poli je aj frekvencia precesie ($\omega_0 = \gamma \cdot B_0$) nulová. Mimo magnetického poľa sú teda spiny statické objekty, ktoré si zachovávajú svoju orientáciu v priestore. Ak by sme počiatky vektorov magnetického momentu jednotlivých spinov presunuli do počiatku súradnicovej sústavy potom by konce vektorov boli vytvárali povrch (Blochovej) gule, pričom hustota koncov vektorov vo všetkých orientáciách by bola rovnaká. Situácia je symbolicky znázornená na nasledujúcom obrázku.



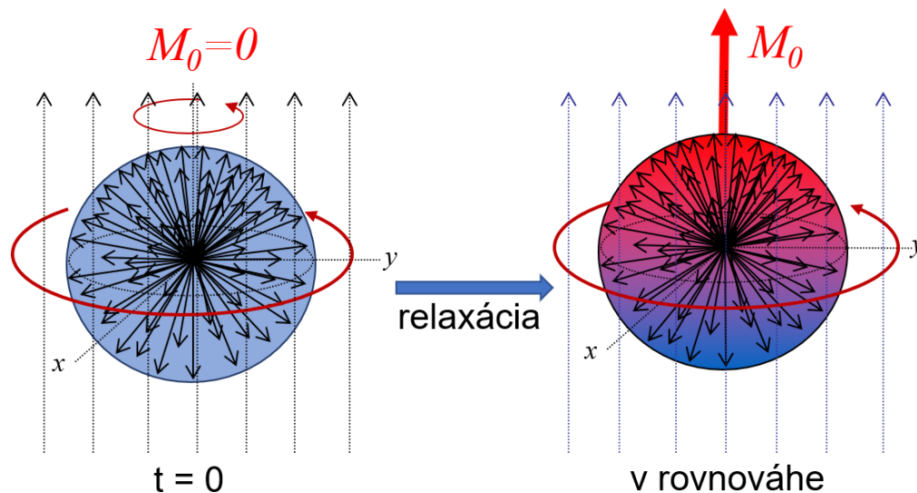
Obr. 4 Orientácia magnetických momentov vo vzorke mimo magnetického poľa. Vľavo – znázornenie spinov vo vzorke; vpravo – usporiadanie spinov presunutím začiatku každého vektora spinu do počiatku súradnicovej sústavy. Konce vektorov vytvárajú povrch “Blochovej” gule.

Keďže všetky orientácie sú rovnako pravdepodobné, ku každému magnetickému vektoru existuje aj opačne orientovaný vektor, ich súborový súčet (rovnovážna magnetizácia M_0) je preto nulový: $M_0 (B_0=0) = \sum_i \mu_i = 0$. Podobne ako celková rovnovážna magnetizácia

vzorky aj magnetizácie jej zložiek sú pri nulovom vonkajšom magnetickom poli nulové: $\mathbf{M}_0^k(\mathbf{B}_0 = 0) = 0$, pre všetky zložky k .

1.3.2 Vzorka v nenulovom magnetickom poli

Ak vložíme vzorku do magnetického poľa začnú prebiehať 2 procesy: precesia spinov a ustanovovanie novej termodynamickej rovnováhy. Precesia spinov sa ustanoví okamžite, no keďže pri precesii sa nemení vzájomná orientácia spinov rovnakého druhu magnetizácia všetkých zložiek vzorky zostáva v prvých okamžikoch nulová. V grafickom zobrazení sa v prvých momentoch statická „vektorová guľa“ zmení iba na guľu rotujúcu okolo \mathbf{B}_0 ako je to ukázané na nasledujúcom obrázku vľavo.



Obr. 5 Vľavo – stav spinového systému v okamžiku vloženia vzorky do magnetu (rovnomerná hustota spinov); vpravo – stav po ustálení termodynamickej rovnováhy. Vyšší podiel červenej farby znamená vyššiu hustotu spinov s danou orientáciou. Všetky spiny precesujú rovnakou rýchlosťou okolo B_0 .

Druhý proces, ustanovovanie novej termodynamickej rovnováhy – relaxácia vzorky, trvá relatívne dlho ($\sim 0.01-100s$). Hnacou silou je odchýlka stavu vzorky od rovnovážneho jej stavu. Mechanizmom procesu sú interakcie medzi rôznymi časťami vzorky, ktoré je zvykom označovať ako “mriežka” (patria sem iné jadrami, elektrónmi,.. a iné stupne voľnosti) indukované tepelným pohybom vo vzorke. O mechanizme relaxácie budeme diskutovať v nasledujúcom odstavci. Teraz sa zameriame na stanovenie rovnovážnej hodnoty magnetizácie v nenulovom poli. Vychádza sa z Boltzmanovho zákona aplikovaného na súbor spinov. Podľa tohto zákona by orientácie spinov s menším uhlom odklonu od \mathbf{B}_0 (menším uhlom Θ a teda menšou energiou) mali byť zastúpené v rovnovážnej vzorke častejšie ako orientácie s väčším uhlom Θ a teda aj väčšou polohovou energiou. Graficky je to znázornené na obrázku vpravo.

1.3.3 Rovnovážna magnetizácia

Energia spinov nezávisí od ich orientácie v rovine kolmej na \mathbf{B}_0 (v rovine x,y) a preto distribúcia orientácii spinov v xy rovine je rovnomerná. Znamená to, že \mathbf{M}_0 je orientovaná v smere osi z a jej zložky smere x a y sú nulové, čiže $\mathbf{M}_0^0 \equiv (0, 0, M_0)$.

Pri vyčíslení hodnoty M_0 je výhodné reprezentovať stav spinov pomocou stavov, v ktorých je dobre definovaná energia spinu. Ako sme uviedli vyššie Blochov vektor $\mu_{\theta,\varphi}$ je možné vyjadriť ako kombináciu dvoch Blochových vektorov $\alpha = \mu_{\theta=0, \varphi=0}$ a $\beta = \mu_{\theta=180^\circ, \varphi=0}$ s dobre definovanou energiou, orientovaných v smere (vektor α) a proti smeru (vektor β) B_0 .

$$\mu_{\theta,\varphi} = \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \alpha + \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \exp(+i\varphi) \beta$$

Pri aplikácii Boltzmanovho zákona na výpočet potom možno uvažovať že spiny sa nachádzajú iba v stave α alebo β a pomer početnosti týchto stavov (N_α a N_β) vyjadriť rovnicou:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(-\frac{E_\alpha - E_\beta}{kT}\right) = \left(1 + \frac{E_\alpha - E_\beta}{kT}\right) = \left(1 + \frac{\gamma B_0 \hbar}{kT}\right)$$

kde k ($1,380\,649 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) je Boltzmanova konštanta a T je teplota v kelvinoch. Pretože argument exponenciálnej funkcie je veľmi malý, je možné túto funkciu aproximovať prvými 2 členmi jej rozvoja do Taylorovho radu. Pre výpočet M_0 potrebujeme určiť rozdiel ($N_\alpha - N_\beta$). Z vyššie uvedenej rovnice vyplýva:

$$\Delta N = N_\alpha - N_\beta = N_\beta \left(1 + \frac{\gamma B_0 \hbar}{kT}\right) - N_\beta \cong \frac{N \gamma B_0 \hbar}{2 kT}$$

kde v poslednom vzťahu sme N_β nahradili polovičnou hodnotou súčtu $N = (N_\alpha + N_\beta)$, pretože relatívny rozdiel medzi N_α a N_β je zanedbateľný. Napríklad tento prebytok pre NMR najcitlivejšie jadrá (^1H spiny, $\gamma = 42.576\,255 \text{ MHz/T}$) umiestnené v silnom magnetickom poli $B_0 = 14 \text{ Tesla}$ je iba 48 na každý milión spinov vo vzorke. Rovnovážnu magnetizáciu určíme ako súčin prebytku spinov v stave α oproti stavu β vynásobený magnetickým momentom jedného spinu v stave α (jeho zložkou v smere osi z):

$$M_0 = \Delta N \cdot \alpha_z = \Delta N \cdot \frac{\gamma \hbar}{2} = N \frac{(\gamma \hbar)^2 B_0}{4kT}$$

Rovnovážnu magnetizáciu možno nezávisle definovať pre každú zložku vzorky. Rovnovážna magnetizácia celej vzorky je potom daná vektorovým súčtom rovnovážnych magnetizácií všetkých zložiek: $M_0 = \sum^k M_0^k$. Pretože orientácia všetkých zložiek je rovnaká a nemenná (orientovaná v smere z) nie je možné tieto zložky experimentálne rozlíšiť.

Treba si uvedomiť, že hoci M_0 sa makroskopicky nemení je to dynamická veličina. Mikrostav, z ktorého je M_0 zložená s časom zaniká, no neustále vzniká nový mikrostav ktorý poskytuje identickú rovnovážnu magnetizáciu. Usmernenie orientácie spinov v magnetickom poli, ktoré spôsobuje vznik nenulovej magnetizácie vzorky sa nazýva *polarizácia vzorky*. Stupeň polarizácie môžeme vyjadriť pomerom $\Delta N/N$. Z vyššie vyčíslenej hodnoty vyplýva, že polarizácia NMR vzoriek je vždy extrémne malá.

Vo všeobecnosti sa v spektroskopii pod pojmom polarizácia vzorky rozumie spontánne zvýšenie populácie vyšších (excitovaných) energetických stavov oproti nižším (základným) stavom. V porovnaní s inými metódami molekulovej spektroskopie (IČ, UV, EPR) je stupeň polarizácie pri NMR vzorkách veľmi malý. Z toho vyplýva jeden z hlavných nedostatkov NMR – jej relatívne malá citlivosť.

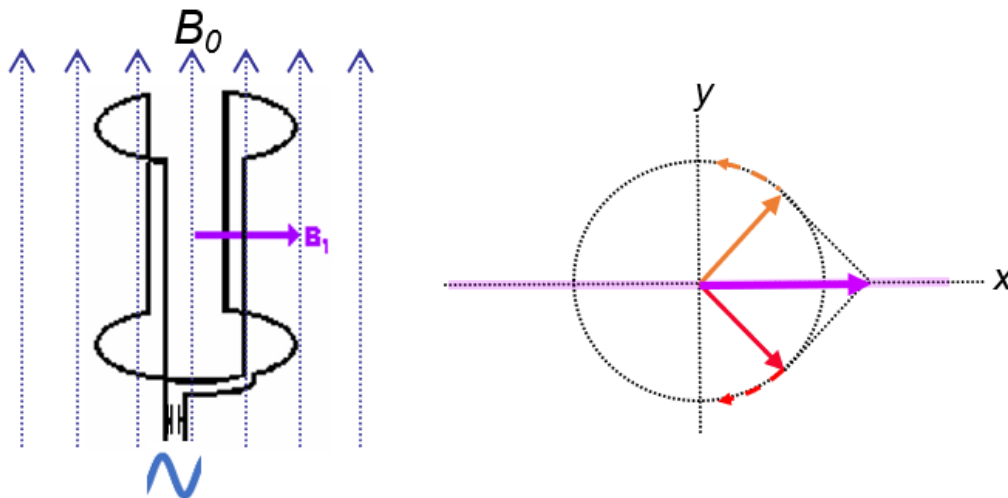
Poznámka: Rovnovážnu magnetizáciu je možné určiť aj bez dekompozície Blochového vektora do jeho zložiek s dobre definovanou energiou. Odvodenie je však matematicky trochu zložitejšie. Čitateľ si ho môže nájsť na: [\[Curie's law – Wikipedia\]](#).

1.4 Účinok rádiovfrekvenčného poľa B_1

1.4.1 Charakter poľa B_1

Na pozorovanie NMR javu je potrebné na vzorku pôsobiť elektromagnetickým žiarením (emž), ktoré interaguje s magnetickým momentom jadier. Vzhľadom na vlastnosti spinov (ich Larmorovu frekvenciu) musí to byť emž z rádiovfrekvenčnej oblasti. Takéto emž sa najčastejšie realizuje ako periodické lineárne alebo kruhovo polarizované makroskopické magnetické pole B_1 orientované kolmo na smer B_0 . Na takéto pole sa možno pozerat' ako na vysoko koherentné emž z rádiovfrekvenčnej oblasti, ako na obdobu lasera alebo masera z optickej oblasti. V dôsledku charakteru používaného emž a niektorých špeciálnych vlastností NMR systémov (pomalá relaxácia) sa NMR stala najrozvinutejšou metodikou tzv. koherentnej spektroskopie. To prinieslo pre NMR zo sebou niekoľko špecifických výhodných spektroskopických vlastností, vďaka ktorým sa NMR stala jednou z najefektívnejších metód molekulej spektroskopie.

Prakticky je pole B_1 realizované vhodnou cievkou na ktorú sa privedie potrebné striedavé elektrické napätie. V prípade magnetov, kde je vzorka orientovaná v smere poľa je to obvykle sedlová cievka ako je to ukázané na obrázku.

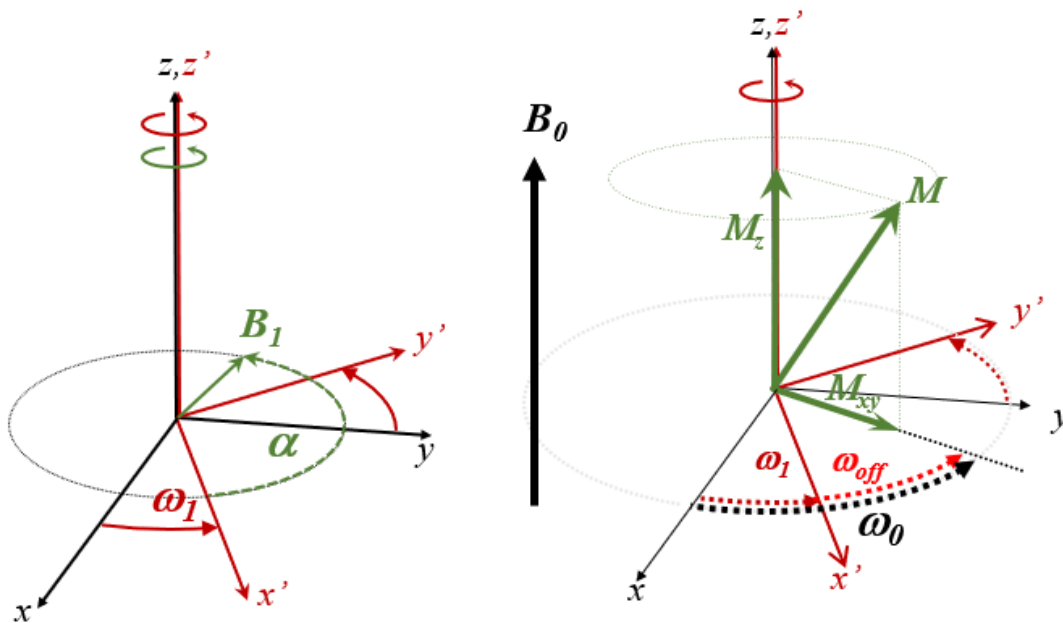


Obr. 6 Vľavo – sedlová cievka generujúca lineárne polarizované magnetické pole, vpravo - rozklad lineárne polarizovaného poľa na 2 kruhovo polarizované zložky rotujúce v rovine xy kolmej na B_0 .

Na spiny pôsobí iba jedna kruhovo polarizovaná zložka a to tá, ktorá rotuje okolo B_0 v rovnakom smere ako precesujú spiny a to iba vtedy ak frekvencia jej rotácie je blízka Larmorovej frekvencii precesie spinov. Inými slovami ak spiny a B_1 sú v rezonancii.

1.4.2 Rotujúca súradnicová sústava

Účinok \mathbf{B}_1 na spiny sa najlepšie sleduje v rotujúcej súradnicovej sústave (RSS), ktorá rotuje okolo \mathbf{B}_0 rovnakou rýchlosťou ako \mathbf{B}_1 (nie je pritom nutne aby \mathbf{B}_1 na spiny skutočne pôsobilo, stačí iba aby rýchlosť a fáza rotácie RSS bola odvodená od zdroja \mathbf{B}_1). RSS sa volí tak ako je ukázané na nasledujúcom obrázku: os z' má totožnú s osou z laboratórnej súradnicovej sústavy (LSS) a osi x' a y' rotujú okolo osi z (okolo \mathbf{B}_0) s frekvenciou ω_1 . V RSS je výhodné pozorovať nielen účinok rf. polí ale aj vývoj vzorky (spinových systémov) počas NMR experimentov ako aj konečnú odozvu vzorky (meraný signál). RSS je preto preferovanou súradnicovou na popis NMR javu a v ďalšom ju budeme výhradne používať.

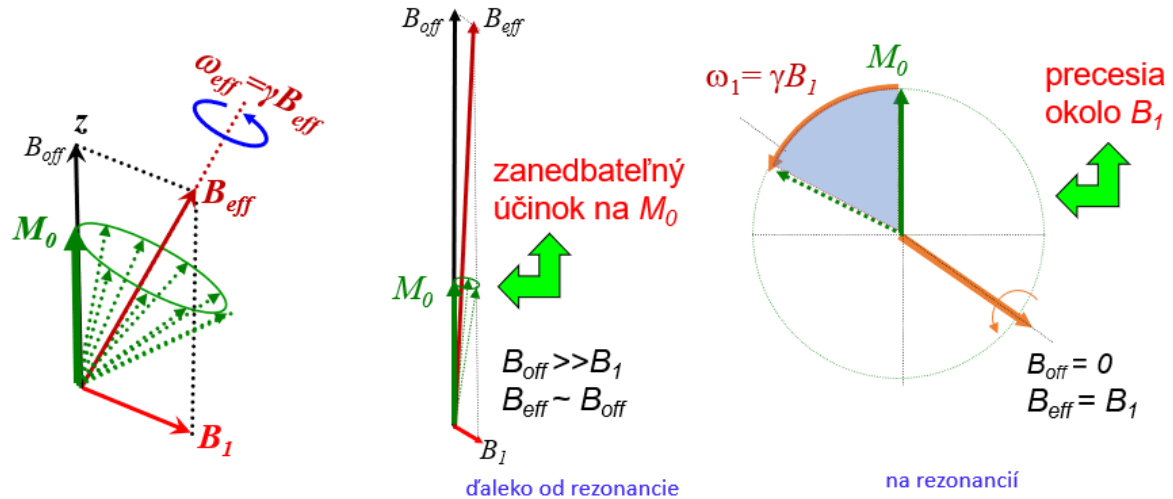


Obr. 7 Vľavo – znázornenie vzťahu medzi LSS (súradnice x, y, z) a RSS (súradnice x', y', z'). RSS rotuje synchronne s poľom B_1 okolo osi z LSS. Uhol α označuje fázu poľa B_1 v RSS. Vpravo – porovnanie rýchlosti precesie spinu z pohľadu v LSS a RSS. Rýchlosť precesie spinov v RSS (ω_{off}) je oproti rýchlosti ich precesie v LSS (ω_0) znížená o hodnotu rýchlosti rotácie B_1 (ω_1).

Pozorovanie účinku \mathbf{B}_1 na spiny v RSS prináša zo sebou oproti pozorovaniu v LSS dve významné zmeny. Prvou je, že \mathbf{B}_1 sa v RSS stáva poľom statickým. Druhou je, že pri pohľade na spiny z RSS sa rýchlosť precesie spinov zníži na tzv. ofsetovú hodnotu, ktorá je rovná rozdielu (ofsetu) ich Larmorovej frekvencii a rýchlosti rotácie \mathbf{B}_1 : $\omega_{off} = \omega_0 - \omega_1$. Túto skutočnosť možno tiež interpretovať ako zníženie indukcie poľa, ktoré pôsobí na spiny v RSS v smer osi z menšie ofsetové pole $\mathbf{B}_{off} = \mathbf{B}_0 - \omega_1/\gamma$.

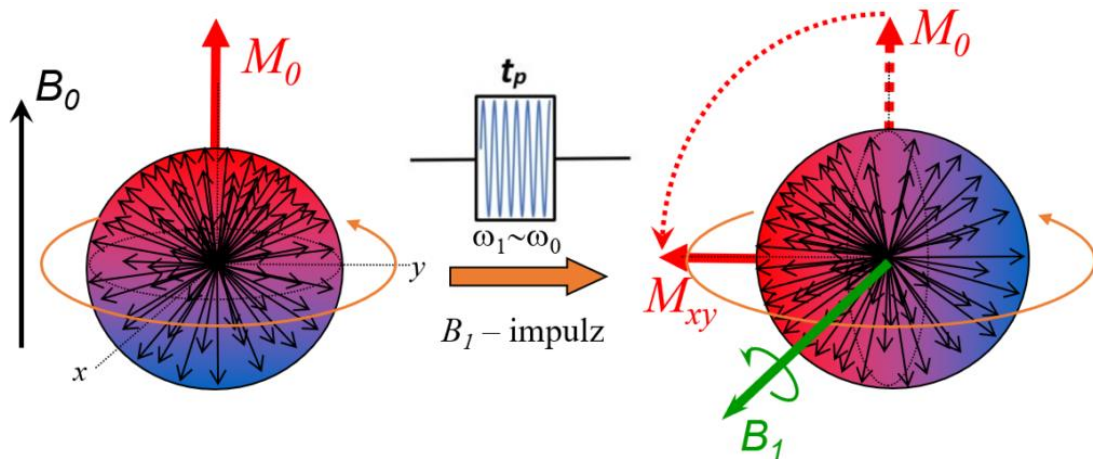
Výsledné efektívne magnetické pole $\mathbf{B}_{eff} = \mathbf{B}_{off} + \mathbf{B}_1$ je v RSS jediným, a pritom statickým poľom, ktoré pôsobí na spiny. To je tá hlavná príčina zjednodušenia popisu NMR experimentov v RSS oproti ich popisu v LSS. Pri pohľade z RSS spiny precesujú okolo výsledného poľa \mathbf{B}_{eff} , rovnakým spôsobom ako precesujú spinu okolo \mathbf{B}_0 v LSS. Pri precesii si zachovávajú odklon (precesný uhol) od \mathbf{B}_{eff} a rýchlosť precesie je úmerná efektívnej indukcií poľa: $\mathbf{B}_{eff} = (\mathbf{B}_{off}^2 + \mathbf{B}_1^2)^{1/2}$.

Dôležitou vlastnosťou B_1 je, že dokáže zmeniť stav z -zložky spinov, ktorá sa pri precesii v B_0 zachováva. Ako je zrejme z grafického znázornenia táto schopnosť B_1 závisí od orientácie B_{eff} . Pri veľkých hodnotách ofsetu je B_{eff} takmer totožné s B_{off} a paralelné s B_0 , a preto jeho efekt na z -zložky spinov zanedbateľný. Najväčší efekt má pole B_1 ak je presne v rezonancii so spinmi. Vtedy je B_{eff} orientované v rovine $x'y'$ a je totožné s B_1 .



Obr. 8 Precesia spinov v RSS pri pôsobení poľa B_1 . Spiny precesujú okolo B_{eff} pričom si zachovávajú precesný uhol k B_1 . V strede a vpravo – Účinok B_1 na zložku z magnetického momentu spinov je závislý od jeho amplitúdy B_1 a ofsetu (odchýlky) od rezonančnej frekvencií spinov.

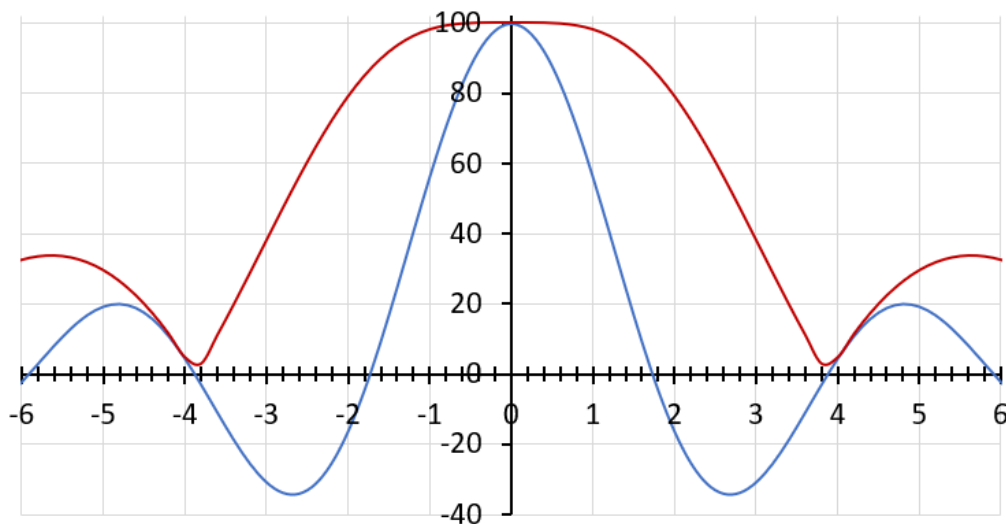
Od skúmania efektu B_1 na jednotlivé spiny prejdeme teraz k popisu jeho efektu na vzorku, teda na jej rovnovážnu magnetizáciu. Pôsobenie B_1 je jediný možný spôsob ako získať z rovnovážnej magnetizácie inú formu magnetizácie prakticky využiteľnú v spektroskopii alebo iných NMR aplikáciách.



Obr. 9 Vľavo: vzorka v rovnováhe, polarizovaná vzorka, magnetizácia M_0 v smere osi z . Vpravo: M_{xy} magnetizácia – fázová koherencia v rovine xy , vytvorená po aplikácii 90° impulzu B_1 .

Na Obr. 9 je znázornený efekt pravouhlého impulzu B_1 na rezonancii so spinmi. Spiny počas pôsobenia B_1 precesujú okolo osi x' v ktorej je vektor $B_1 = B_{eff}$ lokalizovaný. Po otočení

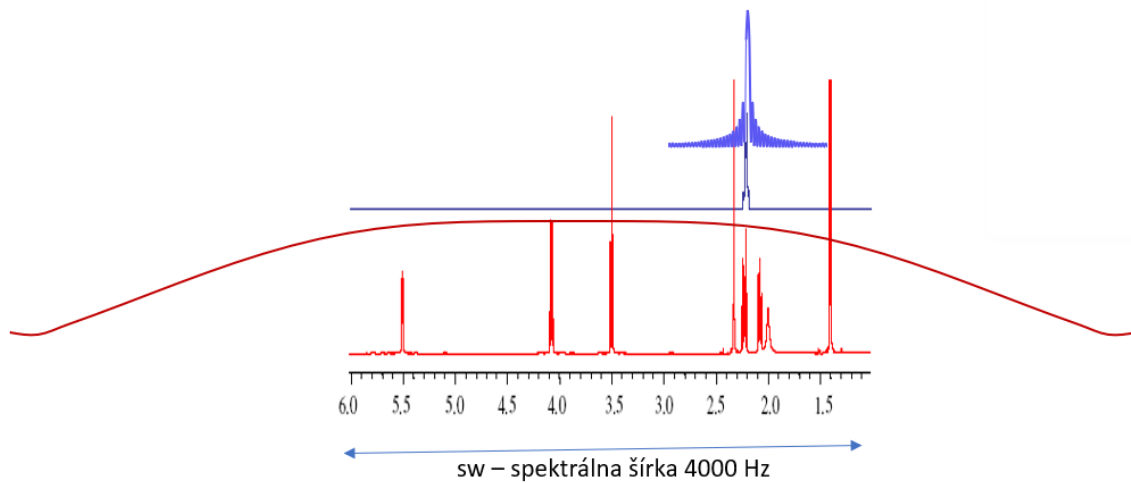
o 90° je pole \mathbf{B}_I vypnuté. Hovoríme že sme aplikovali 90° impulz z osi x' . Vznikla nám nová nerovnovážna magnetizácia M_{xy} pri ktorej pozorujeme novú formu usporiadania spinov: usporiadanie fázy spinov v rovine xy . Túto novú formu magnetizácie nazývame „fázová koherencia“. Je to forma usporiadania orientácie spinov vo vzorke, ktorá vznikla polarizáciou spinov v smere osi z ako rovnovážna magnetizácia \mathbf{M}_0 a impulzom bola transformovaná na usporiadanie fázy spinov v rovine xy . Tento makroskopický pozorovaný mikrostav vzorky sa na rozdiel dynamicky obnovujúceho stavu ktorý vytvára neobnovuje ale relaxáciou neodvratne zaniká. Ďalšia manipulácia s touto fázovou koherenciou ako aj záznam odozvy vzorky sú obmedzené na dobu trvania rôznych foriem usporiadania vzorky, ktoré bolo pôvodne vytvorené spontánne polarizáciou vzorky. Podobne ako pri \mathbf{M}_0 aj nerovnovážnu magnetizáciu M_{xy} možno nezávisle definovať pre každú zložku vzorky. Rovnovážna magnetizácia celej vzorky je potom daná vektorovým súčtom rovnovážnych magnetizácií všetkých zložiek: $M_{xy} = \sum_k M_{xy}^k$. Na rozdiel od rovnovážnej magnetizácie M_{xy} je experimentálne dobre merateľná a všetky spektrálne informácie o jej jednotlivých zložkách sa dajú experimentálne získať. M_{xy} je v NMR základnou merateľnou veličinou. Pravouhlý impulz \mathbf{B}_I , ktorý má presne na rezonancii určitý efekt (napr. otočenie \mathbf{M}_0 o 90°) má mimo rezonancie pre každý ofset iný účinok. Je to preto, že orientácia ako aj veľkosť \mathbf{B}_{eff} sa mení kontinuálne s ofsetom. Táto závislosť účinku impulzu \mathbf{B}_I od frekvencie (ofsetu) sa nazýva frekvenčná charakteristika impulzu. Pri jej určovaní je výhodné všetky relevantné magnetické polia (\mathbf{B}_I , \mathbf{B}_{off} , \mathbf{B}_{eff}) pomocou vzťahu $\omega = \gamma B$ vyjadrovať vo frekvenčných jednotkách (ω_I , ω_{off} , ω_{eff}).



Obr. 10 Frekvenčná charakteristika pravouhlého 90° impulzu z osi y' ako závislosť veľkosti M_x (modrá čiara) a M_{xy} (červená čiara) zložiek od ofsetu; ofset je vyjadrený v násobkoch amplitúdy B_I vyjadrenej vo frekvenčných jednotkách.

V NMR spektroskopii je dôležité aby účinok impulzu bol kontrolovateľný. Najjednoduchším spôsobom ako sa dá kontrolovať účinok impulzu \mathbf{B}_I je zmena jeho amplitúdy. Dôležité je pritom aj aká je celková šírka spektra (sw) a šírka jednotlivých signálov. Ak chceme dosiahnuť rovnomernú excitáciu všetkých frekvenčných zložiek, potom (ako to vyplýva z frekvenčnej charakteristiky uvedenej na predchádzajúcom obrázku) musí (pri umiestnení spektra do stredu frekvenčnej charakteristiky) byť sw na úrovni 2 desiatín amplitúdy \mathbf{B}_I . Pri $sw = 10\,000$ Hz (štandardná šírka ^1H NMR spektra pri spektrometroch so supravodivým magnetom) musí byť amplitúda B_I na úrovni $50\,000$ Hz. Táto amplitúda znamená $50\,000$ precesii spinov na rezonancii okolo \mathbf{B}_I za sekundu, čiže $\frac{1}{4}$ otáčky (90° impulz) sa vykoná za 5 ms. Naopak ak chceme veľmi selektívnu excitáciu jedného signálu v spektre, potom je nutne

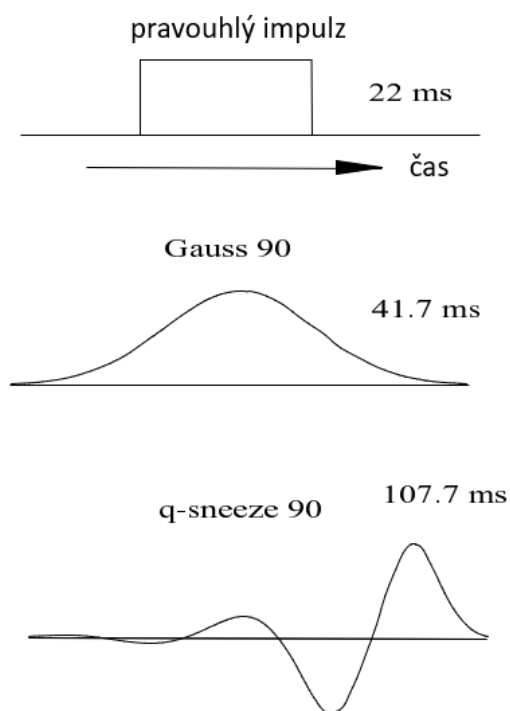
frekvenciu nastaviť na frekvenciu tohto signálu a amplitúdu B_1 cca na 5-násobok pološírky signálu (1-50 Hz), čomu zodpovedá 20 ms až 1 s dĺžka 90° impulzu. Na nasledujúcom obrázku je ilustrovaný efekt zmeny nastavenia amplitúdy a frekvencie impulzu na selektivitu excitácie spinov.



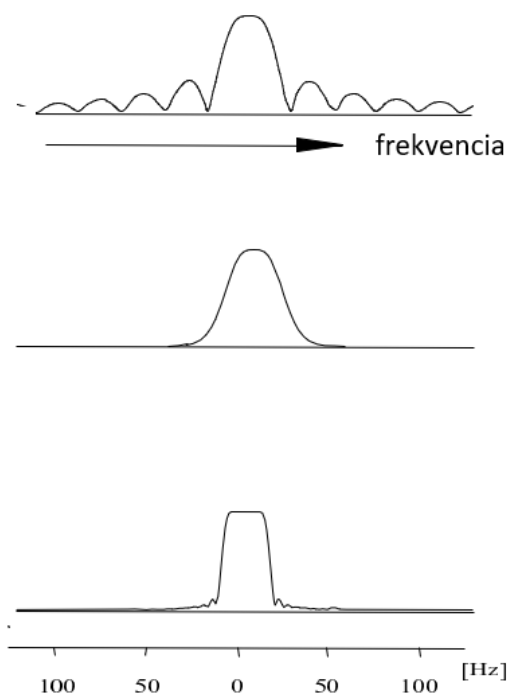
Obr. 11 Selektívna a neselektívna excitácia spektier. Hore: Excitácia časti spektra a frekvenčná charakteristika selektívneho impulzu B_1 (ofset = 2,25 ppm, amplitúda = 20 Hz, dĺžka impulzu = 12,5 ms). Dole: Excitácia celého spektra a frekvenčná charakteristika neselektívneho impulzu B_1 (ofset – stred spektra (3,6 ppm), amplitúda = 20 000 Hz, dĺžka impulzu = 12,5 μ s). Pri selektívnom impulze je excitovaná podstatne menšia časť spektra ako je spektrálna šírka celého spektra sw . Pri neselektívnom impulze je excitovaná podstatne väčšia časť frekvencií ako je sw .

Z frekvenčnej charakteristiky pravouhlého impulzu je zrejme, že excitácia celého spektra nie je ideálna. Napriek tomu sa tento najjednoduchší spôsob excitácie využíva takmer bez výnimky pri meraní najviac využívaných NMR spektier (štandardné ^1H a ^{13}C spektrá). Zlepšenie frekvenčnej charakteristiky impulzov B_1 sa dá dosiahnuť vhodnou moduláciou amplitúdy a/alebo frekvencie. Existuje množstvo impulzov s optimalizovaným účinkom na rôzne zložky magnetizácie vzorky. Na nasledujúcom obrázku je tvar niektorých takýchto impulzov ilustrovaný. Realizácia tvarovaných impulzov je technicky náročná, pretože je potrebná presná digitálna kontrola fázy a amplitúdy B_1 .

Tvar impulzu – časový priebeh amplitúdy



Frekvenčná charakteristika impulzu amplitúda M_{xy}



Obr. 12 Tvar (časový priebeh) niektorých amplitúdovo modulovaných impulzov (vľavo) a ich frekvenčná charakteristika (vpravo).

1.5 Relaxácia vzorky

Po vložení vzorky do magnetického poľa sú v prvom momente všetky energetické stavy spinov (všetky orientácie spinov v magnetickom poli) rovnako pravdepodobné. Z hľadiska termodynamiky to znamená, že systém spinov je pri nekonečne vysokej teplote (Boltzmanov zákon). Interakciou s ostatnými zložkami vzorky, ktoré je zvykom nazývať mriežka, spinový systém postupne odovzdá svoju prebytočnú energiu a ochladí sa na teplotu mriežky. Pretože celková energia spinov je oproti energii mriežky zanedbateľná, teplota mriežky sa prakticky nezmení. Výmena energie medzi spinmi a mriežkou spôsobuje čiastočnú polarizáciu vzorky v smere osi z (v smere \mathbf{B}_0) s čím je spojený vznik \mathbf{M}_0 .

Orientácia spinov v rovine xy síce neovplyvňuje celkovú energiu spinov, no vznik fázovej koherencie (M_{xy} zložky magnetizácie) po impulze \mathbf{B}_1 zvyšuje usporiadanosť v systéme spinov, a teda zníženie jeho entropie. Termodynamika však postuluje, že M_{xy} magnetizácia po svojom vzniku bude následne spontánne zanikať (zvyšovanie entropie).

Relaxácia vzorky, teda proces ustanovenia termodynamickej rovnováhy zahŕňa v sebe teda dva spontánne procesy: výmena energie a zmena entropie. O mechanizme týchto procesov však termodynamika nič nehovorí.

Pri väčšine spektroskopických metód (UV, IČ, Raman,..) je najdôležitejším mechanizmom relaxácie spontánne vyžiarovanie prebytočnej energie emisiou fotónov. Ustanovenie termodynamickej rovnováhy pri týchto metódikách je veľmi rýchle a trvá rádovo

femto- až mikrosekundy. Efektivita tohto mechanizmu prudko klesá s poklesom frekvencie emž, ktoré daná metodika používa a pri NMR je úplne zanedbateľná.

Pre NMR sú preto dôležité iné relaxačné procesy, ktoré sú menej efektívne. Na jednej strane to znižuje citlivosť metodiky, čo sa prakticky prejaví ako pomalá rýchlosť akumulácie spektier. Na druhej strane to však umožňuje merať veľmi malé rozdiely v energetickom spektre vzorky (tzv. spektrá vysokého rozlíšenia). Zároveň je možné vykonávať zložité NMR experimenty, ktoré sú technicky možné vďaka dlhej dobe trvania rôznych prechodných usporiadaných stavov vzorky. Tieto rôzne typy stavov, čiže koherencií, sa dajú počas experimentu cielene využívať na získanie cenných spektroskopických informácií.

1.5.1 Mechanizmus NMR relaxácie

Základným mechanizmom relaxácie spinov s $I = 1/2$ sú ich interakcie s náhodnými magnetickými poľami od susedných spinov, elektrónov a paramagnetických látok vo vzorke. Pôsobenie týchto náhodných magnetických polí si možno predstaviť ako sériu krátkych náhodných impulzov na spiny v rôznych lokalitách vzorky.

Medzi najdôležitejšie náhodné polia generované v rámci molekuly patria polia vybudené interakciou B_0 s elektrónovým oblakom molekuly (tieto polia súvisia s tzv. chemickým posunom spinov) a polia súvisiace interakciou medzi dvojicou spinov prenášanou priamo cez priestor (označenie DD interakcie) alebo prenášanou nepriamo cez väzby prostredníctvom väzbových elektrónov (označenie J interakcie). Okrem relaxácie tieto interakcie sú "zodpovedné" aj za vznik a vzhľad NMR spektier a ich podrobnejšia diskusia je uvedená nižšie.

1.5.2 Charakteristika náhodných magnetických polí

Zdrojom pohybu atómov a molekúl generujúcich premenlivé magnetické je tepelný pohyb vo vzorke. Ten je ovplyvnený skupenským stavom vzorky, jej teplotou a viskozitou ako aj veľkosťou a tvarom molekúl. Je to náhodný chaotický pohyb, ktorého časový priebeh a frekvenčné spektrum sú ukázané na obrázku 13.

Náhodný pohyb sa charakterizuje pomocou tzv. autokorelačnej funkcie $G(t, \tau)$. Je to funkcia času (zvaná tiež pamäťová funkcia), ktorá porovnáva stav nejakej vlastnosti systému v počiatočnom čase t so stavom tej istej vlastnosti v čase $t + \tau$. Ako príklad skúmanej vlastnosti systému uvažujme hodnotu magnetického poľa medzi dvojicou spinov I a S nachádzajúcich sa v tej istej molekule. Veľkosť a orientácia vektora ktorým spin S pôsobí na spin I budú vo všeobecnosti pre každú molekulu iné a budú sa s časom pri pohybe molekúl meniť. Označme vektor magnetického poľa, ktorým spin S pôsobí na spin I v i -tej molekule v čase t ako $B_i(t)$ a v čase $t + \tau$ ako $B_i(t + \tau)$ a urobme ich vektorový súčin. Následne urobme rovnaký vektorový súčin $B_i(t) \cdot B_i^*(t + \tau)$ vo všetkých molekulách vzorky. $G(t, \tau)$ potom možno vyjadriť ako súborové spriemerovanie tohto súčinu: $G(t, \tau) = 1/N \sum_i B_i(t) \cdot B_i^*(t + \tau)$, kde N je počet molekúl vo vzorke. Pre stacionárny náhodný proces (náhodný proces, ktorého charakter sa s časom nemení) autokorelačná funkcia nie je závislá od počiatku merania času t ale iba od dĺžky intervalu τ : $G(\tau) = 1/N \sum_i B_i(0) \cdot B_i^*(\tau)$.

Uvažujme aký bude časový vývoj funkcie $G(\tau)$. V čase $\tau = 0$ sú vo všetkých molekulách vektory $B_i(0)$ a $B_i^*(\tau = 0)$ totožné a teda ich súčin bude kladný: $B_i(0) \cdot B_i^*(0) \geq 0$. $G(0)$ je teda

tvorená iba súčtom nezáporných čísiel (súčet štvorcov veľkosti vektorov) a preto $G(0)$ bude mať kladnú hodnotu.

Po veľmi krátkom intervale τ možno predpokladať, že veľkosť i orientácia vektora $B_i(\tau)$ budú zmenené iba veľmi málo. Zmeny veľkosti $B_i(\tau)$ môžu byť kladné i záporné a ich vplyv na zmenu hodnoty autokorelačnej funkcie bude do značnej miery kompenzovaný a možno ho zanedbať. Na druhej strane zmena orientácie $B_i(\tau)$ jednoznačne umenšuje hodnotu skalárneho súčinu vektorov $B_i(0)$ a $B_i^*(\tau)$ čo sa prejaví na zmenšení hodnoty $G(\tau)$. Postupom času sa orientácia vektorov $B_i(0)$ a $B_i^*(\tau)$ bude z pôvodne usporiadaného paralelného stavu meniť na štatistický náhodný stav. V súčte definujúcom $\sum_i B_i(0) \cdot B_i^*(\tau)$ budú pribúdať záporne členy a pamäťová funkcia sa bude blížiť k nulovej hodnote $G(\tau) \rightarrow 0$.

Nulovú hodnotu $G(t)$, ktorá sa teoreticky dosiahne pri $\tau \rightarrow \infty$ možno považovať za jej rovnovážnu hodnotu. Odchýlku $G(\tau)$ od tejto rovnovážnej hodnoty potom podobne ako pri iných termodynamických procesov možno považovať za hnaciu silu jej časového vývoja. Dostaneme sa takto k exponenciálnemu vyjadreniu časovej závislosti pamäťovej funkcie: $G(\tau) = G(0) \cdot \exp(-\tau/\tau_c)$, kde konštanta τ_c charakterizuje rýchlosť zániku pamäťovej funkcie. Konštanta τ_c sa nazýva korelačný čas a charakterizuje rýchlosť zániku pamäťovej funkcie. Číselne je τ_c rovný priemernému času potrebnému na zmenu orientácie vektora $B_i(\tau)$ o 1 radián. Za čas $\tau = \tau_c$ poklesne hodnota $G(\tau)$ na cca 37% pôvodnej maximálnej hodnoty $G(0)$.

Keďže vidíme, že $G(\tau)$ má podobnú štruktúru ako NMR signál v časovej doméne. Konštanta τ_c sa nazýva korelačný čas a charakterizuje rýchlosť zániku pamäťovej funkcie. Číselne je τ_c rovný priemernému času potrebnému na zmenu orientácie vektora $B_i(\tau)$ o 1 radián.

Pretože náhodné procesy prebiehajú rovnakým spôsobom aj pri posune času t do minulosti (do záporných hodnôt) je funkcia $G(t)$ symetrická okolo počiatku ($\tau = 0$). Čo možno zapísať ako

$$G(\tau) = G(0) \cdot \exp(-|\tau|/\tau_c)$$

pričom τ sa mení od $-\infty$ do $+\infty$. Fourierovou transformáciou $G(\tau)$ sa získa frekvenčné spektrum (spektrálna funkcia) náhodných pohybov $J(\omega)$, ktoré zobrazuje distribúciu náhodných pohybov závislú od hodnoty τ_c ako funkciu ich frekvencie ω .

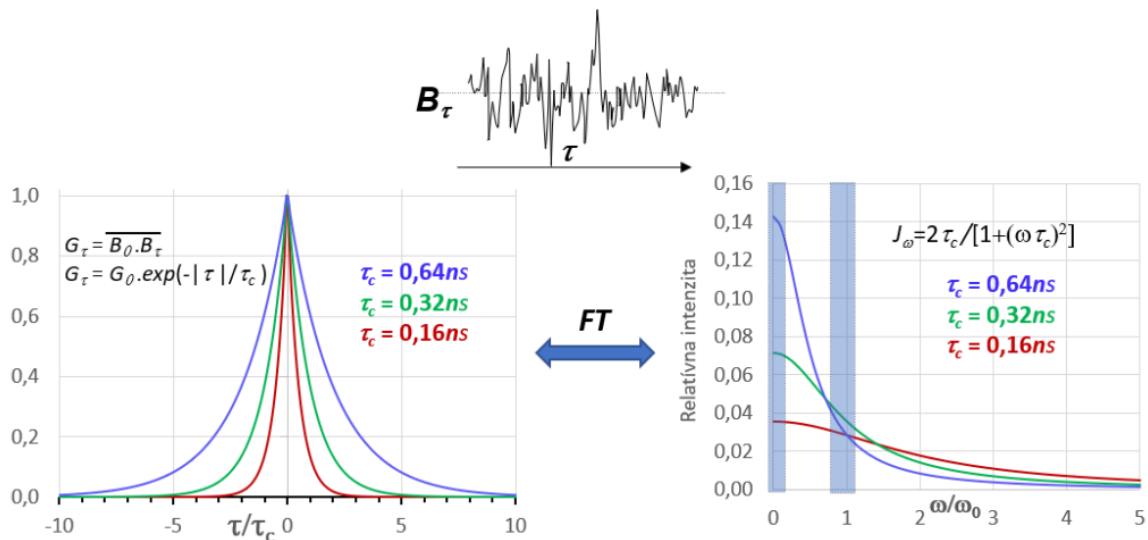
$$G(0) \cdot \exp(-|\tau|/\tau_c) \text{ — FT} \rightarrow J(\omega) = k \cdot (\tau_c / [1 + (\omega\tau_c)^2]) = k \cdot j(\omega)$$

kde konštanta k závisí od závisí od amplitúdy náhodných polí $B_i(t)$:

$$j(\omega) = J(\omega)/k = (\tau_c / [1 + (\omega\tau_c)^2])$$

tzv. redukovaná spektrálna hustota súvisí iba s frekvenčnou distribúciou náhodných polí.

Rôzne spiny viazané v tej istej molekule budú pociťovať náhodné polia s rovnakou frekvenčnou distribúciou len v prípade rigidných, sféricky symetrických molekúlách. Pre nesymetrické molekuly a molekuly, ktorých fragmenty vykazujú rôznu pohyblivosť je popis náhodných procesov ovplyvňujúcich ich relaxáciu zložitejší a čitateľ si ho môže nájsť v literatúre.



Obr. 13 Hore: priebeh náhodného magnetického poľa B_τ pôsobiaceho na spiny. Dole vľavo: funkcia G_τ vyjadrujúca koreláciu stavu systému v čase τ so stavom v čase $\tau = 0$ (v tomto prípade korelácia súborovo spriemerovanej hodnoty B_τ), korelačný čas τ_c charakterizuje rýchlosť zániku korelácie (rýchlosť straty podobnosti s pôvodným stavom). Dole vpravo: J_ω spektrálna funkcia (získaná Fourierovou transformáciou (FT) korelačnej funkcie G_τ) vyjadrujúca hustotu/intenzitu rôznych frekvenčných zložiek v poli B_τ . Priebeh J_ω pre konkrétne hodnoty τ_c platí pre rezonančnú frekvenciu 500 MHz.

Pre relaxáciu spinov je dôležitá hustota náhodných pohybov v určitých špecifických frekvenčných oblastiach. Pre všetky relaxačné mechanizmy (pozri nižšie) sú to najmä 2 frekvenčné oblasti J_ω na Obr. 13 vyznačené šedou farbou. Je to oblasť rezonančnej frekvencie spinov (oblasť frekvencie tzv. jednokvantových spektrálnych prechodov) a oblasť v blízkosti nulových frekvencií. Pri relaxačných mechanizmoch spojených so silnou vzájomnou interakciou spinov je dôležitá spektrálna hustota aj oblasti s frekvenciou rovnou frekvencii tzv. viackvantovým spektrálnym prechodom (pozri v ďalšom: dipól-dipólová relaxácia).

Efektivita relaxácie spinov závisí najmä od hustoty spektrálnych pohybov v oblasti rezonancie spinov (v grafe J_ω oblasť $\omega/\omega_0 \sim 1$). Vyplýva to z faktu, že zložku z magnetizácie M_z možno efektívne zmeniť iba poľom B_τ ktorého frekvencia je blízka frekvencií precesie spinov (pozri závislosť účinku B_I od offsetu). V závislosti od orientácie B_I jeho impulzami môžu zmeniť orientáciu všetkých zložiek magnetizácie vzorky ($M_z \leftrightarrow M_y$, $M_z \leftrightarrow M_x$, $M_x \leftrightarrow M_y$). Náhodné polia B_τ s frekvenciou blízkou rezonančnej frekvencii spinov majú v tomto smere rovnaké vlastnosti a preto budú rovnakým spôsobom prispievať k zmene a teda aj relaxácii M_z i M_{xy} . Jediný rozdiel medzi pôsobením B_I a polí B_τ je, že B_I počas svojho trvania pôsobí v každom okamžiku na všetky spiny vo vzorke rovnako, kým impulzy B_τ generované tepelným pohybom molekúl sú náhodné v čase i mikroskopickej lokalite svojho pôsobenia. Hustota pohybov B_τ na rezonancii spinov je maximálna ak tepelný pohyb vo vzorke je charakterizovaný korelačným časom $\tau_c = 1/\omega_0$. Pre spiny s rezonančnou frekvenciou $\omega_0 \sim 500$ MHz je to korelačný čas $\tau_c \sim 0,32$ ns ako je zrejme z grafov spektrálnych funkcií ukázaných na Obr. 13 vpravo.

Príspevok náhodných polí s frekvenciou blízkou nule ($\omega/\omega_0 \sim 0$) k relaxácii spinov súvisí s efektom nehomogenít poľa B_0 na stratu fázovej koherencie spinov. Okrem vlastnej nehomogenity poľa B_0 (danou nedokonalým naladením cievok vytvárajúcich pole B_0), ktorá sa s časom nemení a ktorej efekt sa dá eliminovať (spinové echo; pozri neskôr) k časovo

premenlivej nehomogenite poľa \mathbf{B}_0 prispievajú aj náhodné lokálne polia orientované v smere osi z s frekvenciou blízkou nule (pri náhodných poliach s vyššou frekvenciou sa efekt spriemeruje na nulu: efekt prvej polperiódy sa vykompenzuje efektom druhej polperiódy). Rôzna úroveň \mathbf{B}_0 v rôznych lokalitách vzorky znamená rozdiely v rýchlosti precesie spinov v týchto lokalitách a následne postupnú zmenu ich relatívnej orientácie spinov v rovine xy . Ak vo vzorke bola predtým vytvorená nejaká fázová koherencia (napr. M_{xy}), tento mechanizmus spôsobuje jej postupný zánik (relaxáciu). Nehomogenity \mathbf{B}_0 majú pritom zanedbateľný efekt na M_z zložku magnetizácie. Na rozdiel od efektu nehomogenity \mathbf{B}_0 je ich efekt náhodných poli na M_{xy} zložku magnetizácie nezvratný.

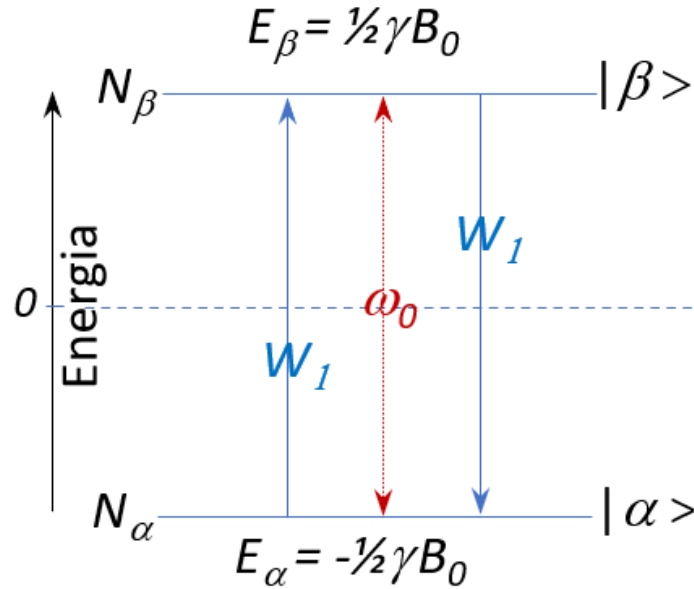
Najčastejším druhom pohybu s frekvenciou v oblasti Larmorovej frekvencie spinov pri bežných vzorkách z organickej chémie a biochémie je rotačný pohyb molekúl. Korelačný čas τ_c v tomto prípade znamená štatisticky priemerný čas za ktorý sa molekula pootočí o jeden radián.

Z vyššie uvedeného vyplýva, že relaxácia M_z a M_{xy} zložiek magnetizácie bude rozdielna, pretože relaxáciu M_z ovplyvňujú iba náhodné polia s frekvenciou v oblasti rezonančnej frekvencie spinov a k relaxácii M_{xy} majú významný príspevok aj náhodné polia s frekvenciou blízkou nule.

1.5.3 Relaxácia M_z zložky magnetizácie

Podľa zákonov fenomenologickej termodynamiky je hnacou silou relaxácie nerovnovážnych systémov odchýlka ich momentálneho stavu od rovnovážneho stavu. Ako bolo ukázané vyššie, pre jednospinový $I=1/2$ systém je hodnota M_z zložky magnetizácie úmerná rozdielu populácie dvoch možných stavov s dobre definovanou energiou: $M_z \sim (N_\alpha - N_\beta)$. Platí to aj pre rovnovážnu magnetizáciu $M_0 \sim (N_\alpha^0 - N_\beta^0)$. Pri relaxácii náhodné polia indukujú zmeny stavov spinov z $\alpha \leftrightarrow \beta$ s pravdepodobnosťou W úmernou spektrálnej hustote náhodných pohybov J_ω na rezonančnej frekvencii spinov. Zmeny stavov spinov pri relaxácii sa v literatúre označujú ako spektrálne prechody. Za "povolené" sa považujú prechody, pri ktorých sa magnetické kvantové číslo m (číslo spojené so zmenou energie systému) mení o jednotku. Treba si však uvedomiť, že pravdepodobnosť zmeny čistého stavu α na čistý stav β a naopak sa blíži k nule pretože samotný obsah čistých stavov vo vzorke je prakticky nulový. Namiesto toho sa pri relaxácii iba mení obsah stavu α a β stavu v rôznych zmiešaných stavov ($c_\alpha\alpha + c_\beta\beta$), ktoré sú vo vzorke výlučne prítomne. Ako bolo spomínané vyššie zmiešané stavy sa s časom periodicky vyvíjajú s frekvenciou rovnou Larmorovej frekvencii spinov ω_0 . Ak náhodné polia prítomné vo vzorke majú podobnú frekvenciu, potom krátkymi náhodnými impulzami menia zloženie zmiešaného stavu (menia hodnotu koeficientov c_α a c_β) tak aby ich súborovo spriemernené hodnoty $\langle c_\alpha \rangle$ a $\langle c_\beta \rangle$ boli v súlade s Boltzmanovým zákonom. V matematickom vyjadrení, aby $(\langle c_\alpha \rangle / \langle c_\beta \rangle)^2 = N_\alpha^0 / N_\beta^0$.

Relaxácia M_z zložky magnetizácie spinov sa v literatúre graficky popisuje pomocou schémy, na ktorej sú vyznačené stavy spinov s dobre definovanou energiou, ich populácie ako aj pravdepodobnosti a frekvencie spektrálnych prechodov.



Obr. 14 Schéma popisujúca relaxáciu jednospinového systému. W_1 označuje pravdepodobnosť zmeny stavu spinov, pričom index „1“ označuje, že ide o zmenu medzi stavmi líšiacimi sa v spinovom čísle m o jednotku. W_1 je úmerná hustote náhodných magnetických polí na rezonancii $J(\omega=\omega_0)$.

Hnacou silou zmeny N_α a N_β je ich rozdiel od rovnovážnej hodnoty:

$$dN_\alpha/dt = W_1(N_\beta - N_\beta^0) - W_1(N_\alpha - N_\alpha^0)$$

$$dN_\beta/dt = W_1(N_\beta - N_\alpha^0) - W_1(N_\beta - N_\beta^0),$$

kde W označuje pravdepodobnosť zmeny stavu spinov. W_1 je pre oba smery zmeny $\alpha \rightarrow \beta$ a $\alpha \leftarrow \beta$ rovnaká. Pre zmenu M_z zložky magnetizácie možno potom odvodiť:

$$\begin{aligned} dM_z/dt &= (N_\alpha - N_\beta)/dt = dN_\alpha/dt - dN_\beta/dt = W_1(N_\beta - N_\beta^0) - W_1(N_\alpha - N_\alpha^0) - W_1(N_\alpha - N_\alpha^0) + W_1(N_\beta - N_\beta^0) \\ &= -2W_1(N_\alpha - N_\beta) + 2W_1(N_\alpha^0 - N_\beta^0) = -2W_1(M_z - M_0) \end{aligned}$$

Dostali sme diferenciálnu rovnicu, ktorú je zvykom uvádzať v tvare:

$$dM_z/dt = -R_1(M_z - M_0) = -(M_z - M_0)/T_1$$

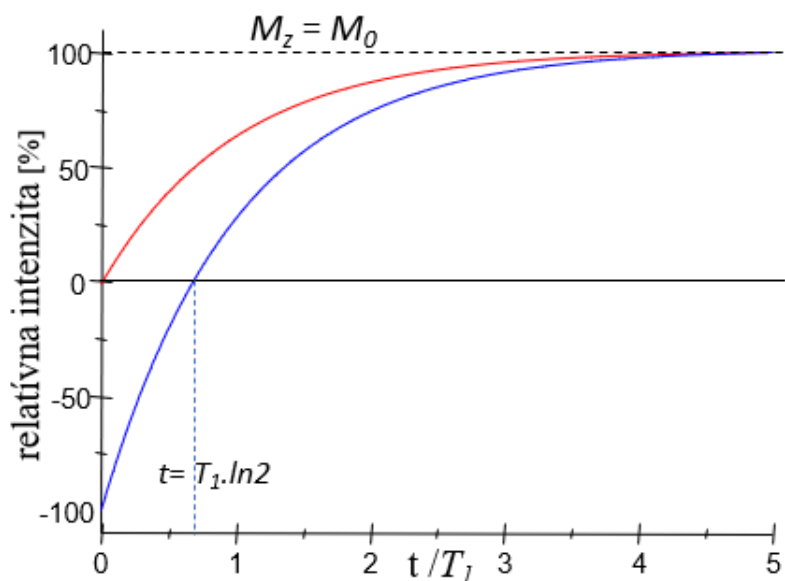
kde $(M_z - M_0)$ – odchýlka od rovnovážneho stavu je hnacia sila relaxácie a $R_1 = 2W_1$ je rýchlostná konštanta relaxácie. V praxi sa rýchlosť relaxácie M_z zložky magnetizácie najčastejšie vyjadruje pomocou relaxačného času $T_1 = 1/R_1$ a nie pomocou rýchlostnej konštanty R_1 . Taktiež miesto „relaxácia M_z zložky“ sa často používa označenie „ T_1 relaxácia“.

Po integrácii možno M_z ako funkciu času vyjadriť v tvare:

$$M_z(t) = M_0 + (M_z(0) - M_0)(1 - e^{-t/T_1})$$

Ako vyplýva z časového priebehu $M_z(t)$ (pozri Obr. 15) po čase $t \approx 3T_1$ je polarizácia vzorky obnovená na cca 90% po ľubovoľnom počiatočnom stave. Po čase $t \approx 5T_1$ je relaxácia M_z prakticky ukončená. Pre bežné organické vzorky je hodnota T_1 v rozsahu 0,1 -10 s.

Ako je to ukázané na predchádzajúcom obrázku (frekvenčné spektra tepelného pohybu) rýchlosť T_1 relaxácie bude veľmi závisieť od pohyblivosti molekúl. Optimálnu (maximálnu) relaxáciu majú vzorky u ktorých tepelný pohyb molekúl je charakterizovaný korelačným časom $\tau_c = 1/\omega_0$. Relaxácia vo vzorkách s kratším $\tau_c < 1/\omega_0$ (málo viskózne vzorky, malé molekuly) ako vo vzorkách s dlhším $\tau_c > 1/\omega_0$ (viskózne vzorky, veľké molekuly) bude menej efektívna a relaxačný čas bude sa predlžovať.



Obr. 15 Časový priebeh relaxácie M_z zložky magnetizácie z nulovej hodnoty (napr. po 90° impulze alebo po vložení vzorky do magnetu, červená čiara) alebo po inverzii rovnovážnej magnetizácie (po 180° impulze, modrá čiara). Invertovaná magnetizácia prechádza nulovou hodnotou v čase $t = T_1 \cdot \ln 2$.

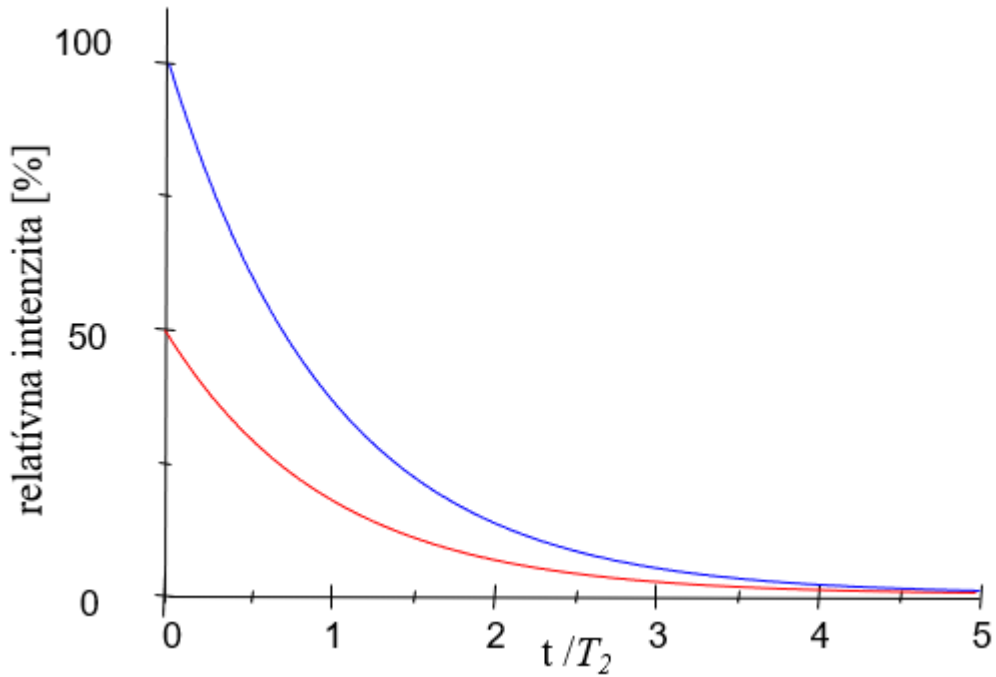
1.5.4 Relaxácia M_{xy} zložky magnetizácie

Podobne ako pre M_z zložku magnetizácie aj pre jej M_{xy} zložku možno časový priebeh relaxácie formulovať pomocou analogickej lineárnej fenomenologickej diferenciálnej rovnice 1. stupňa, kde hnacou silou relaxácie je rozdiel od rovnovážneho stavu. Oproti relaxáciám M_z zložky je rozdielny rovnovážny stav, pri ktorom je $M_{xy,rovn} = 0$ a rozdielna je aj rýchlosť relaxácie R_2 (a teda aj relaxačný čas $T_2 = 1/R_2$).

$$dM_{xy}/dt = -R_2(M_{xy} - M_{xy,rovn}) = -(M_{xy} - 0)/T_2 = -M_{xy}/T_2$$

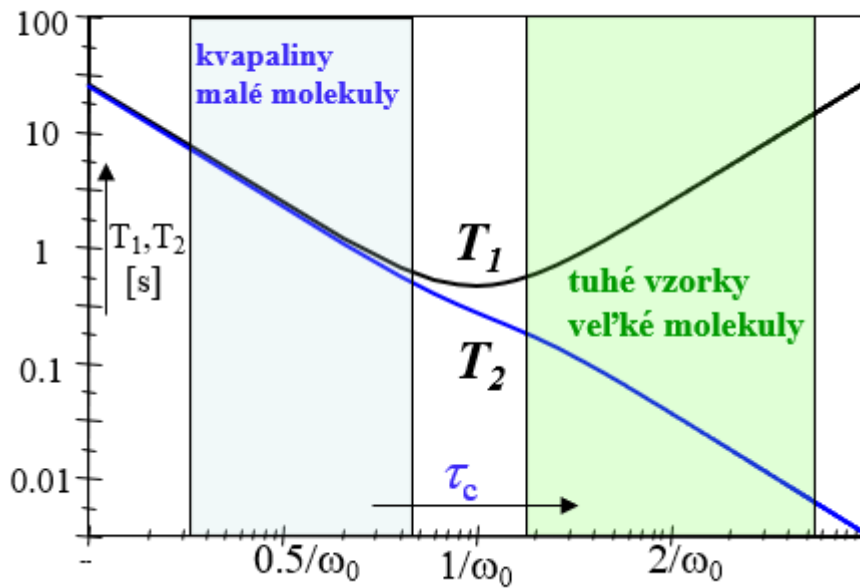
Po integrácii možno M_{xy} ako funkciu času vyjadriť v tvare: $M_{xy}(t) = M_{xy}(0) \cdot e^{-t/T_2}$

Ako vyplýva z časového priebehu $M_{xy}(t)$ (pozri nasledujúci obrázok) po čase $t \approx 3-5T_2$ je relaxácia M_{xy} prakticky ukončená.



Obr. 16 Časový priebeh relaxácie M_{xy} zložky magnetizácie vytvorenej po excitácii rovnovážnej magnetizácie; modrá čiara – po 90° , červená čiara – po 30° excitačnom impulze.

Pre bežné malé organické molekuly ($\tau_c < 1/\omega_0$) je hodnota T_2 v podobnom rozsahu ako hodnota T_1 : 0,01-10 s pretože príspevok náhodných polí z oblasti nulovej frekvencie ku relaxácii T_2 je malý (pozri Obr. 13). Pre veľké molekuly ($\tau_c > 1/\omega_0$) je však tento príspevok významný, a preto tieto molekuly $T_2 < T_1$.



Obr. 17 Závislosť relaxačných časov T_1 a T_2 od korelačného času charakterizujúceho molekulový pohyb vo vzorke.

Ako bolo spomenuté vyššie, zánik fázovej koherencie podporuje aj nehomogenita poľa B_0 . V nehomogénnom poli je preto výsledná rýchlosť zániku M_{xy} zložky magnetizácie zvýšená o príspevok úmerný nehomogenite poľa $\gamma\Delta B_0$:

$$R_2^* = 1/T_2^* = R_2 + \gamma\Delta B_0 = 1/T_2 + \gamma\Delta B_0,$$

kde ΔB_0 vyjadruje priemernú hodnotu nehomogenít B_0 a γ je gyromagnetický pomer meraného spinu.

1.5.5 Zdroje náhodných polí a relaxačné mechanizmy

Podľa zdroja náhodných magnetických polí spôsobujúcich relaxáciu spinov delíme relaxačné mechanizmy na viacero typov. Medzi základné typy patria:

Dipól-dipólová (DD) relaxácia je spôsobená DD interakciou magnetického dipólu spinov s magnetickým dipólom iných spinov nachádzajúcich obvykle v tej istej molekule. Interakcia medzi dvojicou dipólov závisí od ich vzájomnej vzdialenosti ako aj od orientácie ich spojnice v externom magnetickom poli. DD-relaxácia je pre ^1H a ^{13}C spiny v bežných organických látkach najdôležitejším relaxačným mechanizmom a podrobnejšie bude diskutovaná nižšie.

Relaxácia anizotropiou chemického posunu (z angl. chemical shift anisotropy, CSA), ktorá je spôsobená tieniacim efektom nesférického elektrónového obalu v okolí spinov. Veľkosť tieniaceho efektu je modulovaná zmenou orientácie molekúl. Význam má najmä pre relaxáciu ^{31}P spinov. Pre ^1H spiny ako aj pre sp^3 hybridizované ^{13}C spiny je CSA mechanizmus menej dôležitý. Dôležitejší je pre kvartérne sp^2 hybridizované ^{13}C spiny.

Spin rotačná (SR) relaxácia vzniká ako dôsledok interakcie medzi spinom (rotačným momentom) jadier a rotačným momentom molekúl alebo určitých fragmentov molekúl (napr. CH_3 skupiny).

Elektrická kvadrupólová relaxácia sa vyskytuje v molekulách obsahujúcich spiny s $I \geq 1$. Tie môžu vykazovať veľmi efektívnu relaxáciu v dôsledku interakcie ich elektrického kvadrupólového momentu s gradientom elektrických polí, ktorý sa pri tepelnom pohybe molekúl mení. Táto relaxácia je pre mnohé spiny s $I \geq 1$ (^{14}N , ^{35}Cl , ^{23}Na ,...) dominantná.

Skalárna relaxácia (1. a 2. druhu) obvykle sa prejaví ako dôsledok kvadrupólovej relaxácie alebo rýchlej chemickej výmeny interagujúceho spinu. Ak je spin s $I \geq 1$ v J -interakciách s inými spinmi, rýchla zmena jeho stavu v dôsledku kvadrupólovej relaxácie vyvolá náhodnú moduláciu J -interakcie tohto spinu s inými spinmi, čo následne môže prispievať k ich relaxácii. Podobný efekt vyvolá rýchla dynamická výmena spinu medzi rôznymi polohami v molekule. Pre ^1H a ^{13}C spiny je však tento relaxačný mechanizmus málo dôležitý.

Výsledná relaxácia je daná súčtom príspevkov rôznych relaxačných mechanizmov. Ako bolo spomenuté vyššie pre ^1H a ^{13}C spiny v bežných organických látkach najdôležitejším relaxačným mechanizmom je DD-relaxácia. Pôsobenie týchto náhodných magnetických polí si možno predstaviť ako sériu krátkych náhodných impulzov na spiny v rôznych lokalitách vzorky.

1.5.6 Kvantovo-mechanický popis relaxácie.

Všetky interakcie spinov sú v dôsledku tepelného pohybu molekúl časovo premenlivé. V kvapalnej fáze je ich zmena tak rýchla, že sa v spektrách prejavajú iba priemerné hodnoty interakcií. Chemický posun a J interakcie sa priemerňujú na nenulovú hodnotu. DD interakcie sa naopak priemerňujú na nulovú hodnotu.

Interakcie s nenulovou priemernou hodnotou pôsobia ako konštantné sily, ktoré sú zodpovedné za koherentnú časť časového vývoja spinových systémov. Tieto interakcie definujú základný hamiltonián spinového systému H_0 . Pre $I=1/2$ spinové systémy je tvorený iba z dvoch členov: $H_0 = \sum_i \nu_i I_{iz} + \sum_{i,j} J_{i,j} I_i I_j$, kde prvý je Zeemanov člen modifikovaný chemickým posunom spinov a druhý člen (J člen) vyjadruje J interakcie medzi spinmi. H^0 má dobre definované vlastné energie E_n^0 a vlastné stavy Ψ_n^0 . H^0 je stacionárny, časovo nezávislý.

Okamžitý hamiltonián $H(t)$ na rozdiel od H_0 je časovo premenlivý. Možno vyjadriť ako súčet $H(t) = H_0 + H_1(t)$, kde „chybový“ člen $H_1(t)$ v sebe zahŕňa časovo závislé odchýlky jednotlivých interakcií pôsobiacich na spiny od priemerných hodnôt. K chybovému členu prispievajú časové variácie oboch členov H_0 . Významný príspevok majú však aj interakcie, ktoré neprispievajú k H_0 . Patria sem rôzne externé (medzimolekulové) interakcie, no najmä vnútramolekulové DD interakcie.

Vývoj spinového systému určuje časovo závislá Schrödingerova rovnica $d\Psi/dt = -i.H(t)\Psi$. Pretože chybový člen $H_1(t)$ je oveľa menší ako H_0 ($H_1(t) \ll H_0$) vývoj sa vyhodnocuje štandardnou časovo-závislou kvantovomechanickou chybovou metódou. Pri tejto metóde variácia $H_1(t)$ nemení vlastné stavy (Ψ_n^0) a vlastné energie (E_n^0) hamiltoniánu H_0 . Namiesto toho $H_1(t)$ iba spôsobuje náhodné prechody medzi rôznymi stavmi $\Psi_i^0 \leftrightarrow \Psi_j^0$ a tým ovplyvňuje ich populáciu a posúva ju smerom k rovnovážnemu stavu. Výsledkom kvantovomechanickej analýzy je určenie pravdepodobnosti (označenie W_{ij}) zmeny stavu Ψ_i^0 na stav Ψ_j^0 a naopak za jednotku času.

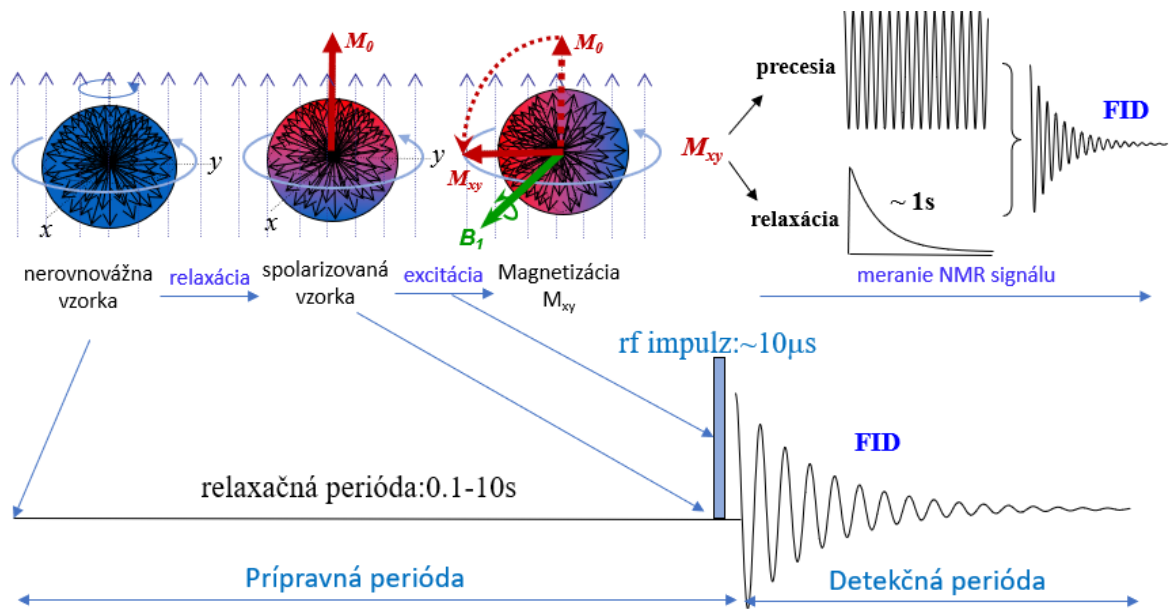
Vo všeobecnosti W_{ij} závisí od troch faktorov: $W_{ij} = \hat{A} \cdot X \cdot J(\omega_{ij})$. Prvý (\hat{A}) závisí od štruktúry spinových operátorov obsiahnutých v poruchovom hamiltoniáne. Aby $H_1(t)$ umožňoval prechody medzi stavmi Ψ_i^0 a Ψ_j^0 musí byť v jeho štruktúre operátor \hat{A} , ktorý vykonáva transformácie typu: $\hat{A}\Psi_i^0 \rightarrow \Psi_j^0$ a $\hat{A}\Psi_j^0 \rightarrow \Psi_i^0$. Druhý faktor vyjadruje veľkosť interakcie spôsobujúcej relaxáciu. Súvisí s charakterom zdroja náhodných polí ako aj geometriou molekuly. Tretím faktorom je spektrálna hustota pohybov $J(\omega_{ij})$ s frekvenciou zodpovedajúcou rozdielu energie v stavoch Ψ_i^0 a Ψ_j^0 : $\omega_{ij} = |(E_i^0 - E_j^0)/\hbar|$, kde \hbar je redukovaná Planckova konštanta.

Frekvencia spektrálneho prechodu W_{ij} je v skutočnosti frekvencia vývoja koherencie zmiešaného stavu zloženého zo stavov Ψ_i^0 a Ψ_j^0 . Pri spektrálnom prechode nedochádza k prechodu čistého stavu Ψ_i^0 na čistý stav Ψ_j^0 a naopak, ale iba ku zmene ich obsahu v zmiešanom stave.

1.6 Základný NMR experiment

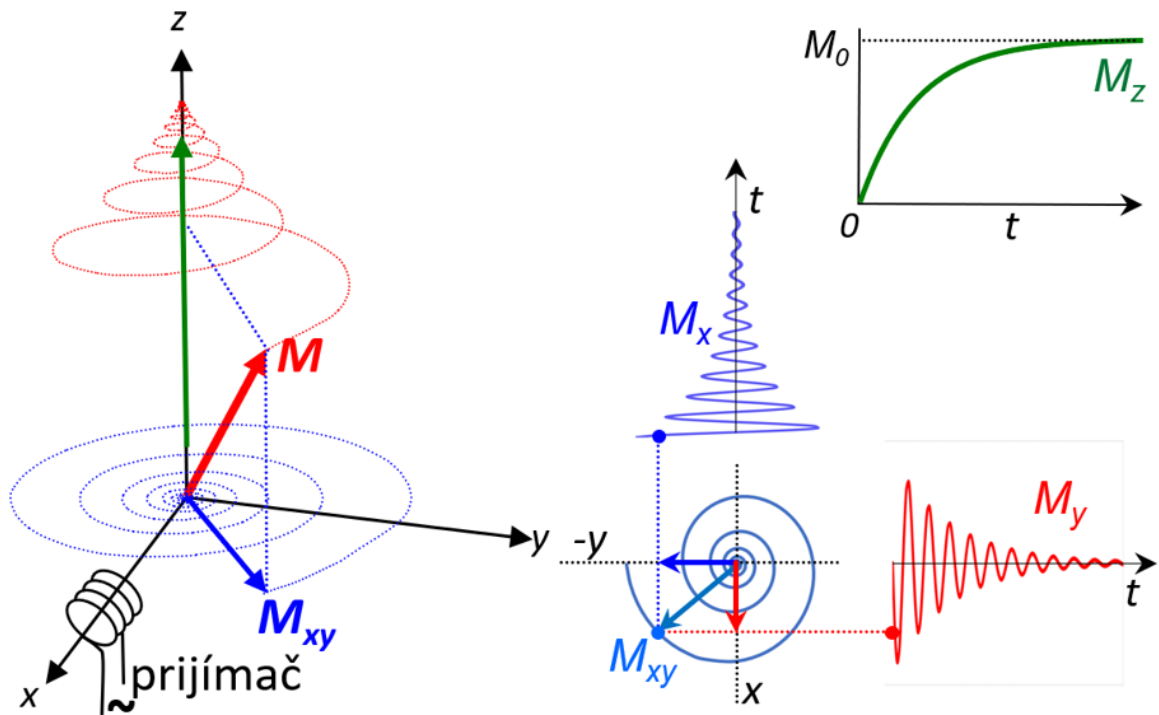
Po diskusií o základných vlastnostiach spinov, magnetizácie vzorky a efektu pol'a je možné pristúpiť k popisu praktickej vykonávania NMR experimentov. V súčasnosti sa väčšina NMR experimentov vykonáva v tzv. časovej doméne. Znamená to excitácia spinov ich vývoj

ako aj detekcia signálu sa sledujú ako funkcia času. Na nasledujúcom obrázku sú znázornené základné prvky najjednoduchšieho NMR experimentu v časovej doméne.



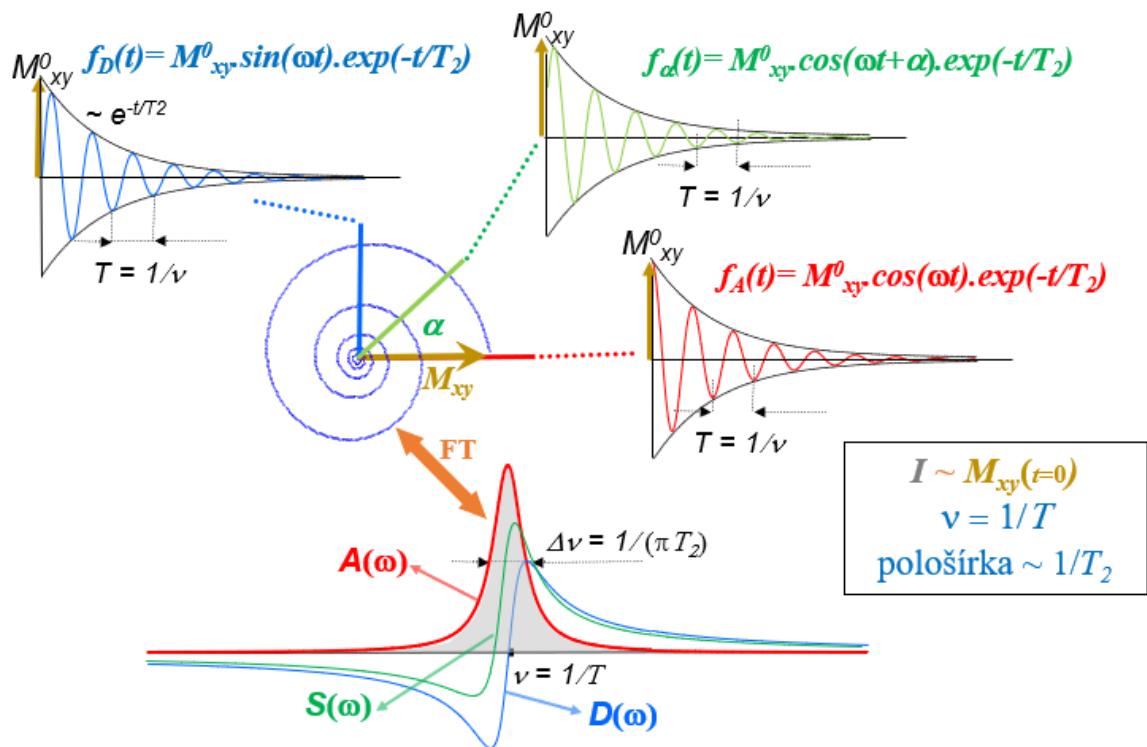
Obr. 18 Hore: vývojové etapy magnetizácie vzorky počas základného NMR experimentu.
Dole: schéma základného NMR experimentu.

Základný experiment možno rozdeliť na dve periódy: prípravnú a detekčnú. Súčasťou prvej periódy je relaxačný interval počas ktorého sa spontánnou relaxáciou vytvorí dostatočne veľká magnetizácia M_z . Následným impulzom B_1 sa M_z preklolí do roviny xy . V zložitejších NMR experimentov sa následne s vytvorenou magnetizáciou M_{xy} cielene manipuluje tak aby sa spinový systém dostal do požadovaného stavu. Pri základnom NMR experimente po impulze hneď nasleduje detekčná perióda. Počas tejto periódy sa vzorka (spinový systém) voľne vyvíja, pričom súčasne prebiehajú 2 procesy: precesia a relaxácia. Je to voľný zánik impulzom indukovaného signálu. V NMR je zvykom označovať ho anglickou skratkou FID (Free Induction Decay). Iný pohľad na vývoj magnetizácie počas detekčnej periódy a detekciu signálu je ukázaný na nasledujúcom obrázku.



Obr. 19 Zobrazenie vývoja celkovej magnetizácie ako aj jej jednotlivých zložiek počas detekčnej periódy. M_{xy} pretína cievku prijímača a indukuje v nej elektrické napätie s frekvenciou rovnou frekvencii precesie spinov. Detektor porovnáva signál prijímača s dvomi referenčnými signálmi vzájomne fázovo posunutými o 90° . Takáto kvadratívna detekcia umožňuje na rozdiel od jednoduchej detekcie aj určenie znamienka (smeru otáčania v RSS).

FID ako odozva vzorky na excitáciu spinov je pre NMR požadovanou merateľnou veličinou. Je to funkcia času, ktorá priamo neposkytuje štandardné spektroskopické informácie ako sú frekvencia signálu, tvar a pološírka spektrálnych čiar a integrálna intenzita signálu. Pre jednoduchý FID, ktorý obsahuje len je frekvenčnú zložku M_{xy} však spektrálne parametre možno jednoducho stanoviť ako je to ukázané na Obr. 20.

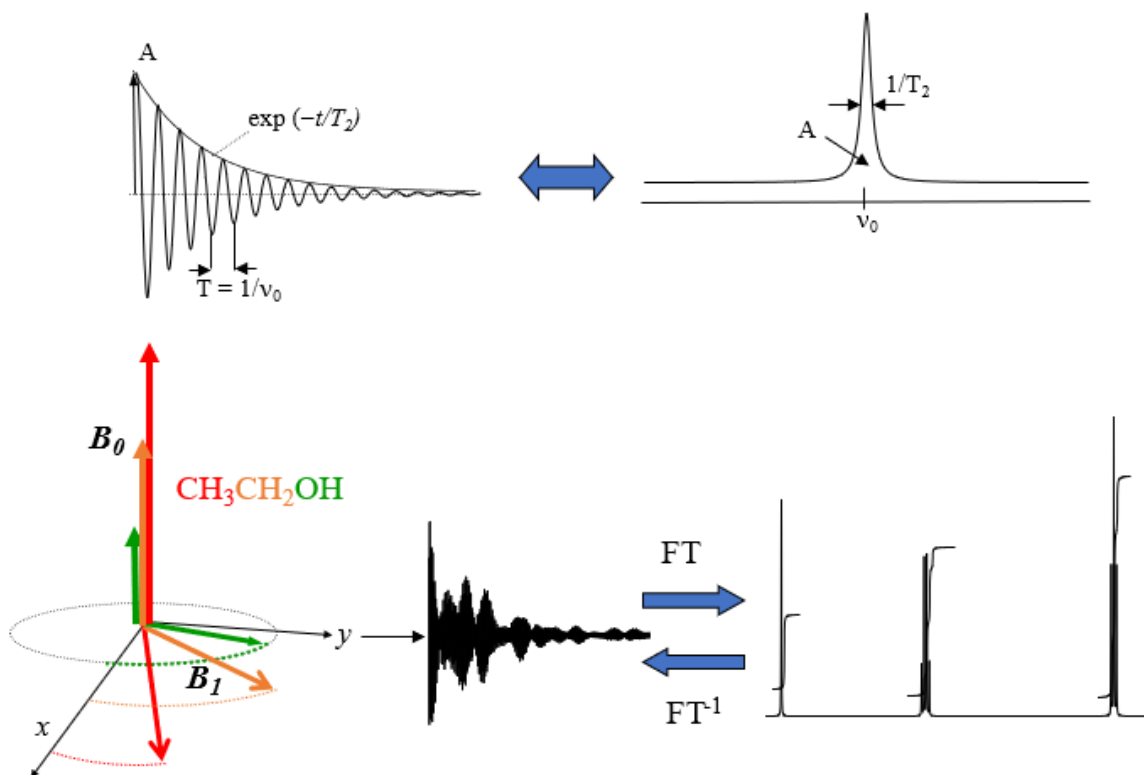


Obr. 20 Vzťah medzi parametrami FIDu a spektrálnymi parametrami signálu.

Spektrálnu frekvenciu ν , čiže polohu signálu v spektre, možno určiť z periódy kmitov T pomocou $\nu = 1/T$. Exponenciálnemu poklesu intenzity FIDu s časom zodpovedá Lorentzovský tvar čiary pričom jej fáza súvisí s počiatočnou fázou α M_{xy} (jej odchýlkou od fázy detektora). Ak $\alpha = 0$ spektrálna čiara má tvar absorpčnej Lorentzovskej čiary $A(\omega)$; ak $\alpha = 90$ spektrálna čiara má tvar disperznej Lorentzovskej čiary $D(\omega)$. Pre všeobecnú hodnotu má spektrálna čiara zmiešaný charakter a možno ju vyjadriť ako kombináciu absorpčnej a disperznej čiary $S(\omega) = A(\omega) \cdot \cos(\alpha) + D(\omega) \cdot \sin(\alpha)$. Integrálna intenzita čiary I je úmerná počiatočnej hodnote M_{xy} a zodpovedá ploche pod absorpčnou čiarou $A(\omega)$. Pokles intenzity FIDu, ktorý je charakterizovaný relaxačným časom, sa na spektrálnych čiarach prejaví hodnotou ich pološírky (pološírka $A(\omega)$: $\Delta\nu = 1/(\pi T_2)$). Po transformácii parametrov FIDu do spektrálnej domény možno tvar spektrálnych čiar vyjadriť rovnicami:

$$A(\omega) = (I / \{1 + [(\omega - \omega_0) / (1/T_2)]^2\})$$

$$D(\omega) = ((\omega - \omega_0) / \{1 + [(\omega - \omega_0) / (1/T_2)]^2\})$$



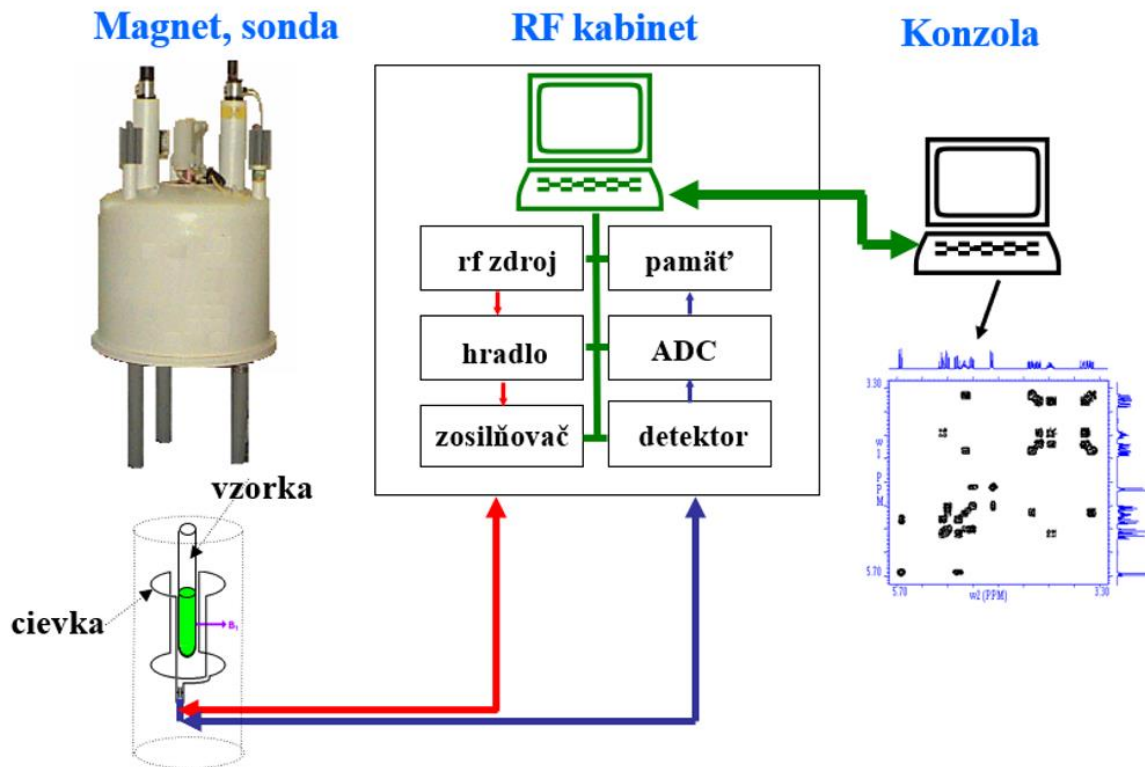
Obr. 21 Hore: M_{xy} obsahujúca iba jednu frekvenčnú zložku. Korešpondencia medzi FID a spektrom je zrejmá. Dole: Magnetizácia reálnych vzoriek sa skladá z viacerých frekvenčných zložiek, dôsledkom je komplikovaný FID a nutnosť Fourierovej transformácie pre získanie spektrálnych informácií.

V prípade väčšiny reálnych vzoriek M_0 a následne po excitácii aj M_{xy} obsahujú veľký počet rôznych frekvenčných zložiek a časový priebeh FIDu, v ktorom sú súčasne prítomne všetky tieto zložky sa stáva veľmi komplikovaným. Nie je z neho praktické priamo extrahovať spektrálne parametre jednotlivých zložiek. Riešením je Fourierova transformácia (FT), ktorá v oblasti spektroskopie začala byť využívaná po dostupnosti dostatočne výkonných počítačov. FT je v oblasti NMR spektroskopie veľmi dôležitá a často využívaná procedúra. Je základnou formou spracovania nameraných dát. Jej podrobnejší popis bude uvedený v kapitole venovanej vyhodnocovaniu dát.

1.7 Základná schéma NMR spektrometra

Súčasný štandardný NMR spektrometer používaný v oblasti organickej chémie a biochémie je moderný digitálny spektrometer vybavený supravodivým magnetom. Medzi jeho hlavné časti patrí supravodivý magnet so sondou. Hlavnou časťou sondy je sedlová cievka, ktorá slúži ak anténa *rf*-vysielača pri aplikácii impulzov na vzorku. Pri snímaní konečnej odozvy vzorky na predchádzajúcu excitáciu táto istá cievka slúži ako anténa *rf*-prijímača. Elektronika spektrometra môže byť formálne rozdelená na trasu vysielateľa a trasu prijímača. Trasa vysielateľa v sebe obsahuje generáciu požadovaných impulzov s presne digitálne kontrolovanou frekvenciou, fázou a amplitúdou. Trasa prijímača zahŕňa spracovanie odozvy vzorky včetně digitalizácie nameraných dát. Práca *rf*-trás je kontrolovaná akvizičným počítačom, ktorý riadi ich činnosť podľa pripravenej schémy daného NMR experimentu. Predpis pre prácu akvizičného procesora sa pripravuje na riadiacom počítači, ktorý okrem toho

umožňuje kontrolu stavu spektrometra (naladenie homogenity B_0 , kalibrácia impulzov,..), priebežnú kontrolu experimentov, spracovanie nameraných dát a komunikáciu so zákazníkmi.



Obr. 22 Základná schéma NMR spektrometra.

2 NMR – metóda molekulej spektroskopie

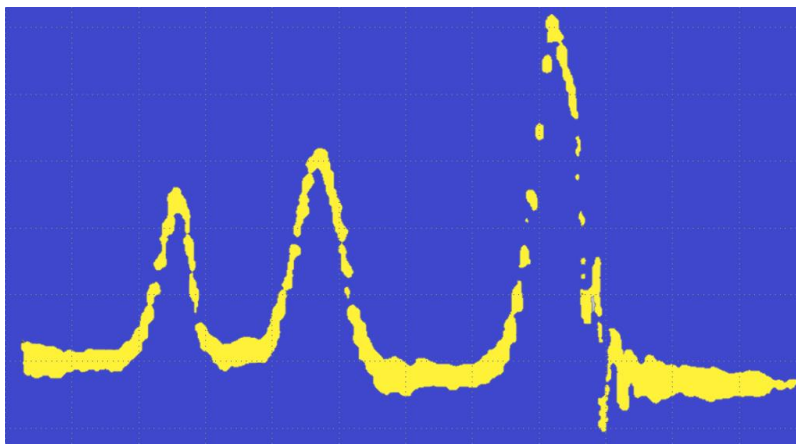
NMR spektroskopie sa od ostatných metód molekulej líši v mnohých aspektoch. Táto kapitola je venovaná rekapitulácii stručného vývoja NMR spektroskopie a diskusii špecifických vlastností tejto metódy.

2.1 Historický úvod

V počiatočných rokoch po svojom objave bol NMR jav využívaný najmä fyzikmi. Prvé aplikácie súviseli prevažne s fyzikálnymi štúdiami ako: štúdium magnetickej susceptibility látok, magnetických momentov rôznych izotopov, relaxácie spinov a podobne. S týmito štúdiami sa súčasne vylepšovala kvalita experimentálneho vybavenia na pozorovanie NMR javu.

Vďaka experimentálnemu pokroku sa na prelome 50. rokov pozorovalo, že spiny toho istého druhu (napr. ^{14}N , alebo ^{19}F , ^1H a viacerých kovov,...) v rôznych molekulách alebo aj v jednej molekule, no v chemicky rozdielnych polohách majú rozdielnu rezonančnú frekvenciu. Vysvetlenie tohto javu ako aj prvú definíciu pojmu „NMR chemický posun“ urobil Gutowsky, ktorý sa tiež zaslúžil o vysvetlenie multipletovej štruktúry NMR signálov, ktorá súvisí s interakciami medzi spinmi. Gutowsky je preto považovaný za priekopníka novej, veľmi dôležitej aplikačnej oblasti NMR javu – NMR spektroskopie.

Vznik NMR spektroskopie inicioval ďalší prudký rozvoj experimentálneho vybavenia. Prvý NMR spektrometer firmy Varian pre výskumné skupiny bol uvedený na trh v roku 1953. V roku 1961 bol dostupný prvý NMR spektrometer pre rutinné použitie (Varian A-60). V roku 1966 Anderson a Ernst publikovali článok o prvej aplikácii metódy Fourierovej transformácie (FT) v oblasti NMR a v roku 1969 Bruker prezentoval prvý komerčný FT NMR spektrometer. Začiatkom 70. rokov sa začali v NMR používať prvé supravodivé magnety. V roku 1971 J. Jeener navrhol prvý 2D NMR experiment. Ideu viac-rozmerných NMR metód rozvinul Richard Ernst v 80. rokoch za čo dostal v roku 1991 Nobelovu cenu. Za rozvoj aplikácie nových metód v oblasti molekulárnej biológie dostal Nobelovu cenu Kurt Wüthrich v roku 2002. V roku 2003 bola udelená Nobelova cena Paulovi Lauterbuovi a Petrovi Mansfieldovi za aplikácie nových NMR metód v oblasti MRI.



Obr. 23 Osciloskopický záznam prvého ^1H NMR spektra etanolu s rozlíšenými signálmi chemicky rozdielnych vodíkov.

Práce ocenené Nobelovými cenami na prelome tisícročia iniciovali veľký technický pokrok v oblasti rutinných aplikácií NMR spektroskopie (digitálne *rf* trasy, gradienty magnetického poľa, tvarované impulzy,...). NMR sa stala jednou z najefektívnejších metódik štúdia štruktúry organických molekúl.

2.2 Charakteristiky NMR spektroskopie

NMR spektroskopia vykazuje všetky charakteristiky NMR javu, tak ako boli spomenuté v prvej kapitole. Tie pozitívne (neinvazívnosť, nedeštruktívnosť) aj tie negatívne (malú citlivosť). Na základe charakteru používaného emž môžeme ešte dodať, že je to metóda koherentnej spektroskopie, ktorá (aj v dôsledku pomalej relaxácie spinov a teda relatívneho dlhého prežívania excitovaných stavov – rôznych typov koherencií) umožňuje vykonávať unikátne spektroskopické experimenty.

2.2.1 Výnimočnosť NMR

Cielením usmerňovaním vývoja spinového systému (často označovaným ako „spinové inžinierstvo“) počas týchto experimentov možno získať jedinečné spektroskopické informácie o vzorke. Podobná možnosť cielenej manipulácie experimentov v inej oblasti spektroskopie neexistuje. NMR je v tomto smere výnimočná.

2.2.2 Rôzne typy NMR experimentov a spektier

S touto výnimočnosťou súvisí aj vysoký počet rôznych typov NMR experimentov, ktoré sa v praxi využívajú. NMR spektrá možno rozdeliť podľa rôznych kritérií.

Za základné NMR spektrá budeme v ďalšom označovať spektra získané jednoduchou excitáciou vzorky tak, ako je to ukázané v kapitole 1.6 (pozri schéma základného experimentu). Pretože rezonančné oblasti pri konštantnom poli B_0 sú pre rôzne spiny veľmi rozdielne a nie je medzi nimi prekryv, nie je možné v jednom základnom spektre pozorovať signály viacerých typov spinov. NMR spektrá sa preto prirodzene rozlišujú podľa meraného jadra (^1H , ^{13}C , ^{31}P ,...).

Spektrá získané po špeciálnej manipulácii spinov sú veľmi rôznorodé. Môžu obsahovať špecifické selektívne informácie o častiach štruktúry vzorky, môžu korelovať signály rôznych spinov, a to v selektívnej i neselektívnej forme. Výsledné spektrá môžu mať viac frekvenčných osí (viac-rozmerné NMR experimenty). V ďalšom sa oboznámime s najdôležitejšími typmi moderných NMR experimentov, ktoré sa v súčasnosti okrem základných spektier rutinne používajú:

- APT J-modulované ^{13}C spektrá (rozlíšenie CH_3 , CH_2 , CH a C skupín)
- INEPT, DEPT J-modulované spektrá s prenosom signálu
- COSY homonukleárne korelované spektra 1D a 2D (napr. korelácia dvojíc ^1H - ^1H signálov)
- TOCSY homonukleárne korelované spektra 1D a 2D (napr. korelácia siete ^1H - ^1H ..., signálov)
- HSQC heteronukleárne korelované spektrá (napr. korelácia signálov priamo viazaných ^1H - ^{13}C spinov)

- HMBC heteronukleárne korelované spektrá (napr. korelácia signálov ^1H - ^{13}C spinov vzdialených cez 2,3 alebo viac väzieb)
- NOESY ^1H - ^1H korelácie cez priestor

2.3 NMR v kvapalnej a tuhej fáze

Špecifickou vlastnosťou NMR spektroskopie je tiež skutočnosť, že spôsob jej aplikácie ako aj charakter NMR spektier veľmi závisia od skupenského stavu vzorky.

Všetky sily, ktoré pôsobia na spiny vo vzorke závisia od momentálnej konfigurácie a orientácie molekúl v B_0 ako aj momentálneho usporiadania ich okolia. Všetky tieto sily sa veľmi rýchlo menia v dôsledku tepelného pohybu vo vzorke. Tento pohyb v sebe zahŕňa translačný a rotačný pohyb molekúl ako celku, vibračný a rotačný pohyb rôznych častí molekúl ako aj týmito pohybmi spôsobenú zmenu elektrónovej štruktúry molekúl.

Frekvencia silových polí spôsobených tepelnými pohybmi je rádovo (3-4 a viac rádov) vyššia ako sú frekvencie rozvoja spinových systémov (Larmorova frekvencia, veľkosť interakcií medzi spinmi vyjadrená vo frekvenčných jednotkách). Niekedy sa táto skutočnosť opisuje slovami, že časová škála NMR (čas, za ktorý sa prejaví kumulovaný efekt nejakej interakcie v NMR spektre) je oveľa väčšia ako je časová škála tepelných pohybov (čas potrebný aby sa prejavil tepelný pohyb). Dôsledkom je, že v NMR spektrách sa prejavuje iba spriemerovaný efekt rýchlejších tepelných pohybov vo vzorke. Inými slovami: NMR nám často poskytne informáciu iba o časovo „spriemernenej“ molekule. Je zrejmé, že efekt tepelných pohybov vo vzorke je veľmi závislý od skupenského stavu vzorky.

Plynné vzorky sa v NMR merajú veľmi zriedka, pretože vzájomná vzdialenosť molekúl znižuje ich koncentráciu. Na zvýšenie signálu sa často meria v špeciálnych kvetách pri zvýšenom tlaku. Obvykle sa merania uskutočňujú za iným účelom ako riešenie štruktúry molekúl, preto sa nimi ďalej nebudeme zaoberať.

V typických kvapalných vzorkách je tepelný pohyb obvykle intenzívny (závisí od viskozity) a izotropný (v žiadnom smere nie je obmedzený). Dôsledkom je, že všetky sily pôsobiace na spiny sú rýchle z hľadiska NMR časovej škály a teda sú spriemerované. Niektoré sú dokonca spriemerované na nulu. Tieto skutočnosti veľmi zjednodušujú tvar NMR spektrálnych čiar a celkový vzhľad NMR spektra v kvapalnej fáze. Obvykle šírka NMR čiar je oveľa menšia (~ 1 Hz) ako je spektrálna šírka celého spektra (niekoľko kHz). Spektrá v kvapalných vzorkách sa preto často označujú ako spektrá vysokého rozlíšenia.

V tuhých vzorkách je tepelný pohyb v dôsledku silnejších medzimolekulových interakcií menej intenzívny. Jeho frekvenčné spektrum sa posúva k nízkym frekvenciám. Zmenšuje sa aj amplitúda pohybov čo obvykle znemožňuje priestorové spriemerovanie interakcií spinov. Interakcie preto vykazujú anizotropný charakter, čo okrem iného znamená aj široké zložité spektrálne čiary. Pološírky spektrálnych čiar sú často mnohonásobne väčšie, ako sú rozdiely v rezonančnej frekvencii chemicky rozdielnych spinov. Spektrá v tuhej fáze komplikujú aj interakcie, ktoré sú v kvapalinách spriemerované na nulu. Základné NMR spektra v tuhej fáze sú preto veľmi zložité, až neanalyzovateľné a pre praktické aplikácie nepoužiteľné.

Skúmanie vzoriek v tuhej fáze je však veľmi dôležité, a preto od počiatkov rozvoja NMR boli veľké snahy o rozvoj metodík, ktoré by umožnili pomocou NMR získať štruktúrne

informácie i z tuhých vzoriek. Postupom času sa vyvinuli metodiky, ktoré cieľným spôsobom umožňujú manipulovať interakciami medzi spinmi, tak aby sa jednak získali spektra podobného charakteru ako v kvapalnej fáze a jednak aby sa cielene získali nové informácie nedostupne v kvapalnej fáze. NMR v tuhej fáze (solid-state NMR) je veľmi dôležitá oblasť aplikácií NMR.

3 NMR spektrá a štruktúrne informácie

3.1 Princíp „kódovania štruktúry“ v NMR spektrách

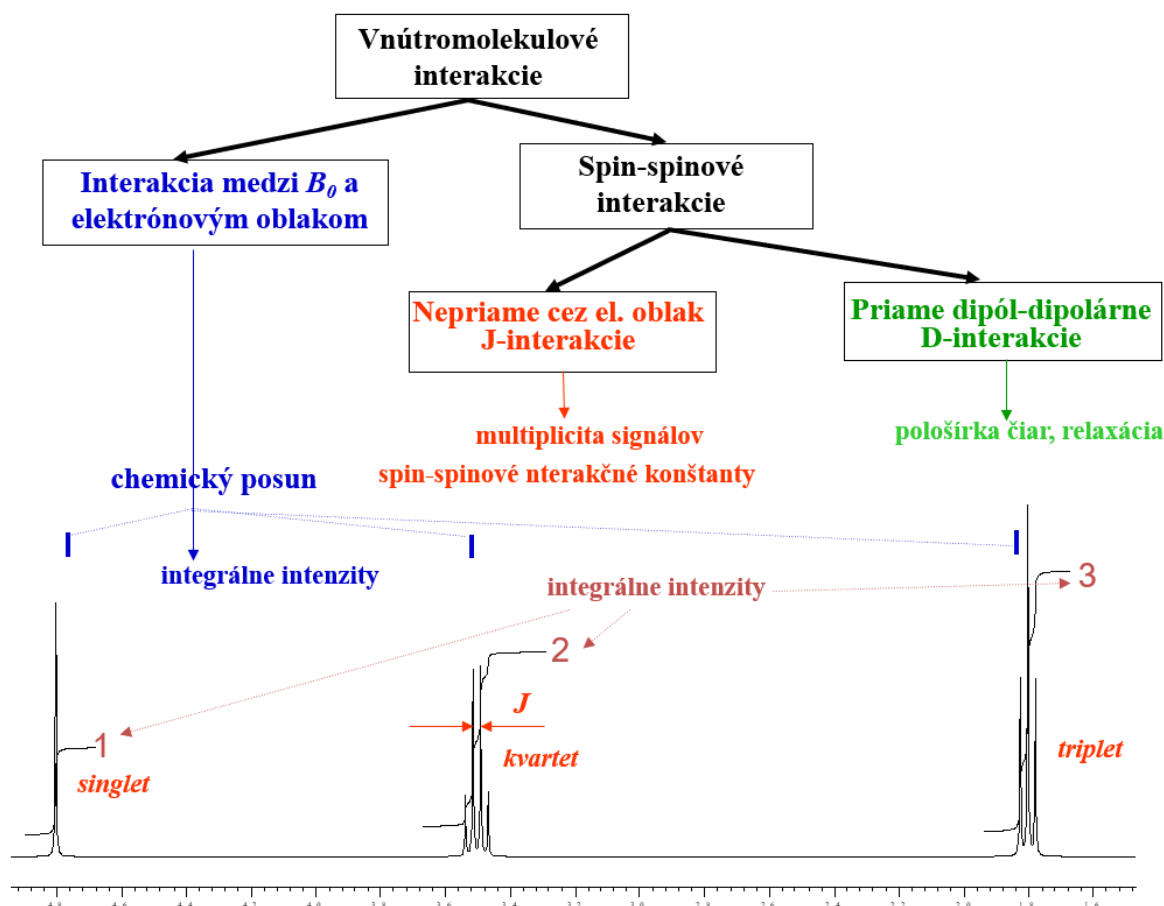
NMR je metóda molekulovej spektrometrií napriek tomu, že informácie o štruktúre a interakciách látok získava na atómovej úrovni ako informácie o stave NMR aktívnych spinov (^1H , ^{13}C ,...). Tieto spiny môžeme považovať za snímače zabudované v rôznych miestach molekuly, resp. nadmolekulovej štruktúry vzoriek. Tieto snímače nám poskytujú štruktúrne informácie rôzneho typu:

1) Špecifické informácie o fragmente molekuly, v ktorej sú zabudované: typ fragmentu, počet rovnakých (ekvivalentných) spinov v tomto fragmente, počet a charakter aktívnych spinov v susedných fragmentoch,... Tento typ informácií je podobný informáciám, ktoré získavame napr. z IČ alebo UV spektier. Ide o informáciu z akých štruktúrnych fragmentoch sa vzorka (molekula) skladá, aká je ich koncentrácia a prípadne aké sú ich interakcie. Výhodou NMR oproti IČ a UV metódam je že poskytuje informácie obvykle o viacerých fragmentoch (všetkých v ktorých sú prítomné jadrá meraného izotopu) danej molekuly.

2) Informácie o korelácií signálov v NMR spektre. Korelácia signálov je dôsledkom vzájomných (párových) interakcií medzi spinmi. Jej vyhodnotenie umožňuje spájať rôzne štruktúrne fragmenty do väčších štruktúr, resp. určenie celkovej štruktúry. Tento typ informácií je v spektroskopii unikátny a je jednou z hlavných príčin vysokej efektivity NMR pri riešení štruktúry látok.

3) Informácie o relatívnej konfigurácii väzieb v molekule. Sú to informácie o priestorovom usporiadaní molekuly, umožňujú určenie jej 3D štruktúry.

Štruktúrne informácie zakódované v NMR spektrách sú určované vnútro molekulovými resp. vnútro vzorkovými magnetickými poľami, ktoré pôsobia na spiny. Tieto polia možno rozdeliť podľa pôvodu a prenosu na 3 typy ako je to naznačené na nasledujúcom obrázku. Pre NMR spektroskopiu zásadný účinok majú interakcie spinov s magnetickým poľom generovaným elektrónovým oblakom molekuly pretože spôsobuje chemické rozlíšenie signálov v spektre, základný predpoklad pre existenciu spektier. Za štruktúru signálov a potenciál pre koreláciu signálov sú zodpovedné vzájomné interakcie medzi susednými spinmi. Tieto interakcie spin-spinové interakcie delíme podľa spôsobu ich prenosu na nepriame (označované *J*-interakcie) prenášané väzby prostredníctvom elektrónov a priame (označované *D*-interakcie) prenášané medzi spinmi priamo cez priestor.



Obr. 24 Interakcie spinov, ktoré spôsobujú vznik NMR spektra.

Tak, ako u všetkých spektroskopických metód, aj v prípade NMR sa štruktúrne informácie nezískavajú zo spektier priamo, ale prostredníctvom rôznych spektrálnych parametrov, ktoré je potrebné nasledovne vyhodnotiť.

3.2 Interakcie spinov a NMR spektrálne parametre

NMR spektrá sú generované interakciami na ktorých sa spiny zúčastňujú. V spektrách sa interakcie prejavujú cez rozličné NMR spektrálne parametre. Medzi najdôležitejšie NMR spektrálne parametre patria: počet signálov, ich intenzita, poloha signálov v spektre, multiplicita signálov, veľkosť štiepenia v multiplете, relaxačné časy, tzv. nukleárny Overhauserov efekt (NOE),... V nasledujúcej časti budú jednotlivé interakcie spinov a s nimi súvisiace spektrálne parametre podrobnejšie diskutované.

3.2.1 Počet signálov – vplyv symetrie a dynamických procesov

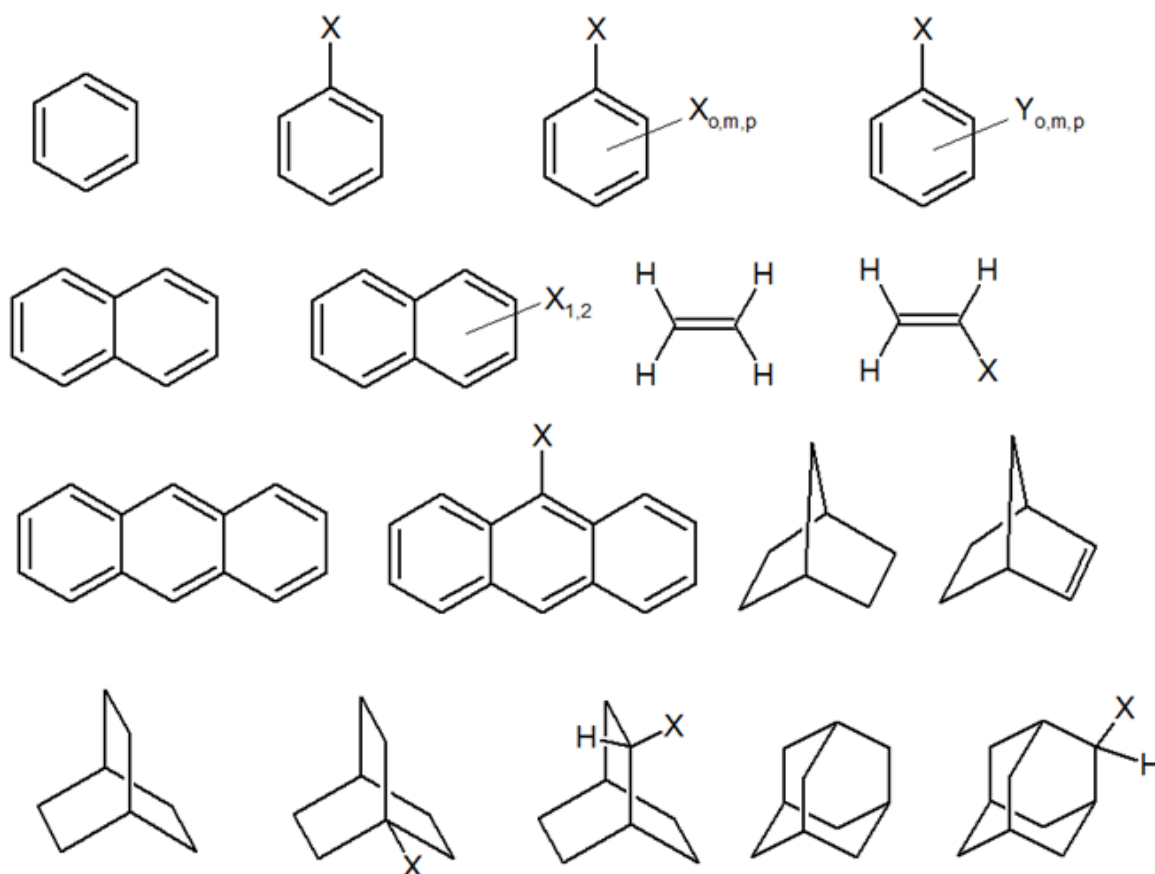
Informácia o počte signálov prislúchajúcich určitej štruktúre je veľmi užitočná spektrálna informácia, ktorá sama o sebe často umožní jednoduché rozlíšenie alternatívnych štruktúr. Aby sa dal počet signálov prislúchajúcich určitej štruktúre vo spektre určiť, musia byť signály prislúchajúce rôznym spinom vo spektre rozlíšené. Toto rozlíšenie „zabezpečujú“ interakcie spinov s elektrónovým oblakom molekuly a súvisí s nimi aj ďalší spektrálny parameter: NMR chemický posun (pozri v ďalšom).

Na rozdiel od ostatných metód molekulovej spektroskopie sú počet a relatívna intenzita signálov v základných NMR spektrách dobre definované. Počet signálov je určený počtom chemicky rozdielnych polôh v molekule (štruktúre) v ktorých sa nachádza meraný spin. Tento počet bytostne súvisí so symetriou molekuly. Spiny nachádzajúce sa v symetricky ekvivalentných polohách poskytujú identický signál s násobnou intenzitou úmernou počtu ekvivalentných spinov.

Druhým významným faktorom ovplyvňujúcim počet signálov sú rôzne dynamické procesy prebiehajúce vo vzorke ako napr. rotácia určitých fragmentov, zmena konformácie, tautomerizácia,.. Rýchlosť týchto procesov závisí od teploty vzorky a preto aj počet signálov sa s teplotou môže meniť

Najjednoduchšie možno počet signálov určiť u molekúl s rigidnou štruktúrou, ktoré nepodliehajú žiadnej dynamickej výmene. Medzi takéto molekuly patria napr. planárne kruhové štruktúry, polycyklické molekuly, Dôležité je prísne posudzovať symetriu molekuly, pričom je potrebné rozlišovať aj absolútnu konfiguráciu väzieb.

Problém 1 Na základe posúdenia symetrie molekúl určte očakávaný počet signálov v ich ^1H a ^{13}C spektrách. X a Y sú substituenty neobsahujúce uhlík a vodík.



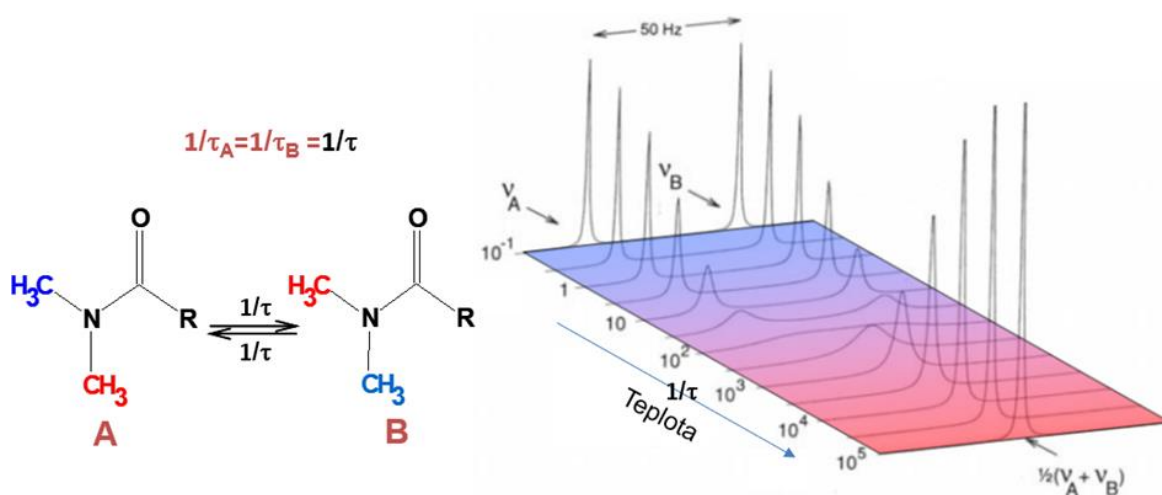
Zložitejšia situácia je v prípade zlúčenín, ktoré v dôsledku svojej flexibility môžu meniť svoju konformáciu. Sú to okrem väčšiny lineárnych molekúl (rôzne rotačné konforméry) aj väčšie cyklické molekuly s určitou flexibilitou. Typickým príkladom sú napr. deriváty cyklohexánu a rôznych heterocyklických zlúčenín. Počet signálov potom bude závislý od

rýchlosti s akou sa konformácia molekuly mení. Podobná situácia je v aj prípade existencie rôznych tautomérov a pri medzi molekulovej výmene vodíka alebo iných skupín.

Vo všeobecnosti dynamický proces možno vyjadriť ako vzájomnú premenu izomérov v rámci určitej skupiny. V závislosti od počtu rôznych izomérov a konkrétnej reakčnej cesty môže byť táto schéma rôzne komplikovaná. My sa v ďalšom obmedzíme na dynamický systém zložený iba z dvoch zložiek: izomérov A a B ($A \leftrightarrow B$). Pri dynamickom procese sa mení okolie, spinov to spôsobuje zmenu ich rezonančnej frekvencie $\nu_A \leftrightarrow \nu_B$ ako aj zmenu veľkosti J interakcie s ostatnými spinmi X : $J_{AX} \leftrightarrow J_{BX}$.

Rýchlosť dynamických procesov sa posudzuje v relatívnej NMR časovej škále. Jej relativita znamená, že ten istý dynamický proces posudzovaný na signáloch rôznych spinov môže mať iný charakter. Súvisí to s rozdielom $\Delta\nu_{AB} = (\nu_A - \nu_B)$ a $\Delta J_{AB} = (J_{AX} - J_{BX})$, ktorý môže byť pre spinu v každej chemicky rozdielnej polohe iný a s dobou životnosti stavov A a B: τ_A a τ_B .

Z hľadiska NMR časovej škály dynamický proces je klasifikovaný do 3 kategórií: pomalý proces, stredne rýchly proces a rýchly proces. Charakter procesu sa môže meniť so zmenou teploty ako je to ilustrované na tepelnej závislosti simulovaných spektier dimetylamidu.



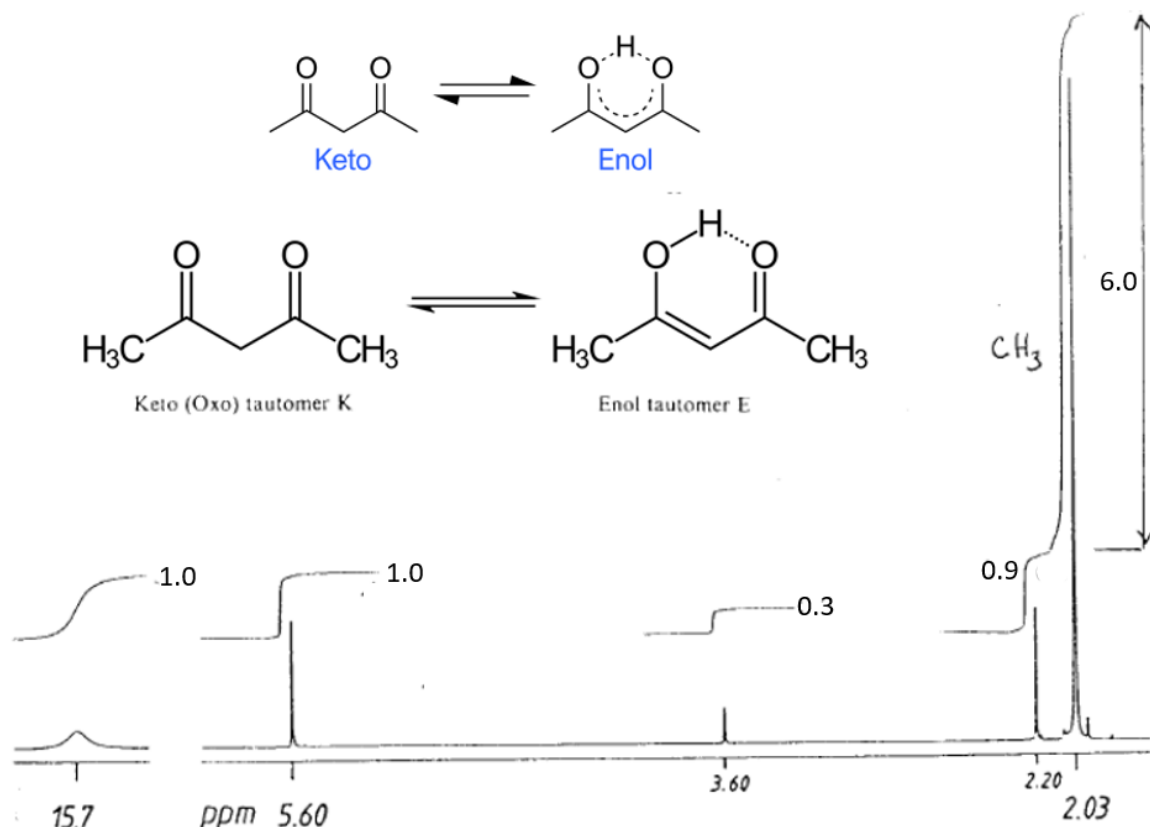
Obr. 25 Simulovaná tepelná závislosť signálu metylovej skupiny. Dimetylamidy vytvárajú 2 planárne štruktúry makroskopicky nerozlišiteľne, medzi ktorými je vzájomná výmena s frekvenciou $1/\tau$ (τ je stredná doba života stavu A aj B). Frekvencia výmeny sa zvyšuje s teplotou, pričom sa súčasne mení aj charakter procesu. Ak $\nu_A - \nu_B = 50 \text{ Hz} \gg 1/\tau$ je to proces pomalej výmeny. So zvyšovaním teploty sa postupne mení na stredne rýchly proces ($|\nu_A - \nu_B| = 50 \text{ Hz} \approx 1/\tau$) a nakoniec na rýchly proces ($\nu_A - \nu_B = 50 \text{ Hz} \ll 1/\tau$).

3.2.1.1 Pomalý dynamický proces

Ak je rozdiel $|\Delta\nu_{AB}|$ oveľa väčší ako frekvencia zmeny $A \leftrightarrow B$, ktorú možno vyjadriť ako prevrátenu hodnotu strednej doby života štruktúry A a B, teda ak $|\Delta\nu_{A,B}| \gg 1/\tau_A; 1/\tau_B$ v spektre sa pozorujú obe štruktúrne formy. Na Obr. 25 dynamický proces má charakter pomalej výmeny pri nízkej teplote, pri ktorej je životnosť oboch foriem dlhšia ako 0,1 s (frekvencia výmeny menšia ako 10 s^{-1}).

Na nasledujúcom obrázku je ukázané ^1H NMR spektrum acetylacetónu, ktorý sa vyskytuje v 2 tautomérnych formách. Spektrum bolo namerané pri teplote miestnosti. Z celkového počtu signálov v spektre je zrejme, že pri tejto teplote výmena medzi oboma tautomérmi pomalá.

Problém 2 Z počtu čiar prislúchajúcich keto a enol forme a ich z ich intenzít priradíte jednotlivé signály v spektre a určte relatívny obsah keto a enol formy. Poznámka: pri enol forme, je potrebné uvažovať symetrickú štruktúru s delokalizovaným elektrónovým systémom a symetrickou vnútromolekulovou vodíkovou väzbou.



3.2.1.2 Stredne rýchly dynamický proces.

Zvyšovaním teploty sa dynamický proces urýchľuje. Pri prechode zo stavu pomalej výmeny sa zvyšovaním teploty rozlíšené spektrálne čiary postupne rozširujú až v oblasti $|\Delta\nu_{A,B}| \approx 1/\tau_A; 1/\tau_B$ nastáva ich splynutie do jednej spektrálnej čiary. Ďalším zvyšovaním teploty sa pološírka zjednotenej čiary postupne zužuje (pozri Obr. 25 oblasť $1/\tau = 50$ až 500).

Pre zložitejšie spinové systémy sú spektra pre oblasť stredne rýchlej výmeny pomerne komplikované a na ich analýzu potrebujeme špeciálne programy. Tieto analýzy sa obvykle vykonávajú za účelom získania informácie o kinetických a termodynamických parametroch dynamického procesu. Voľne dostupné programy na simuláciu a analýzu NMR spektier dynamických procesov pre vybrané spinové systémy možno získať z internetu.

Pri riešení štruktúrnych problémov je vhodnejšie zmenou teploty zmeniť charakter procesu (na rýchly alebo pomalý) s cieľom získať jednoduchšie, ľahšie analyzovateľné spektrá. V ďalšom sa preto podrobnejšej diskusii stredne rýchlemu dynamickému procesu nebudeme venovať.

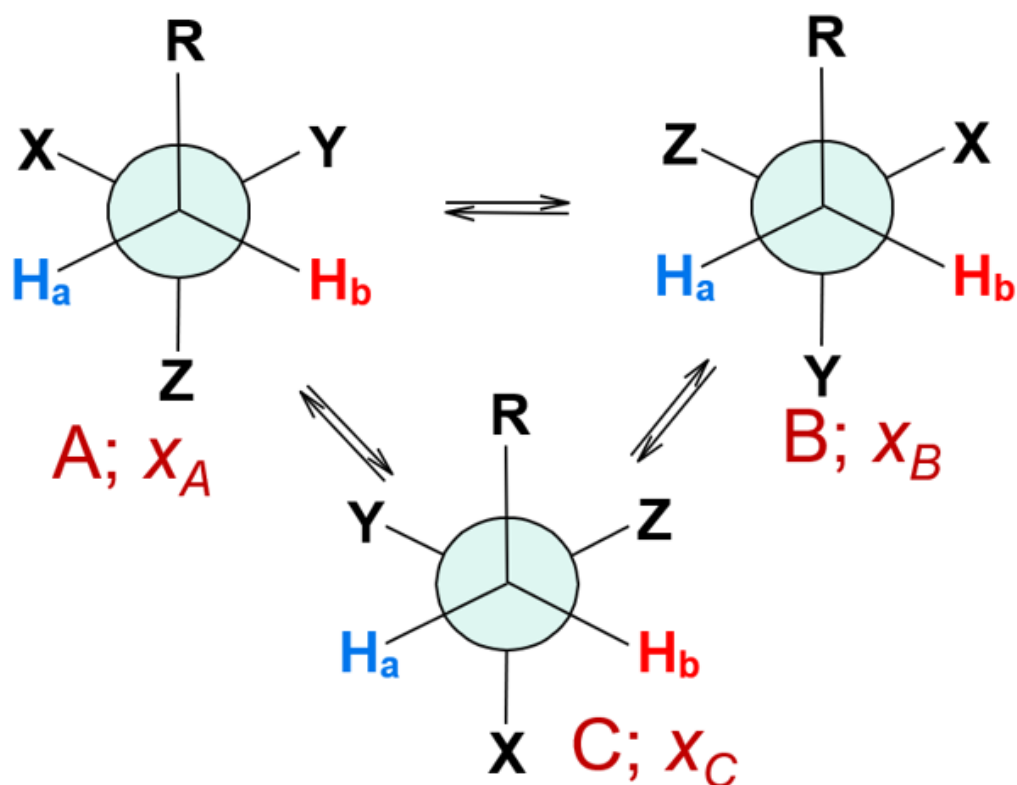
3.2.1.3 Rýchly dynamický proces.

Ak sa rýchlosť výmeny $A \leftrightarrow B$ zvýši tak, že doba životnosti oboch stavov je tak malá, že platí nerovnosť $|\Delta\nu_{A, B}| \ll 1/\tau_A; 1/\tau_B$ potom sa v spektre pozoruje pre spin i iba jeden spriemerený signál. Jeho frekvencia je daná váženým priemerom frekvencií v čistom stave A a B (pozri Obr. 25 oblasť $1/\tau > 1000$).

$$\nu_i = \nu_{iA} x_A + \nu_{iB} x_B$$

kde x_A a x_B sú mólové zlomky zastúpenia jednotlivých foriem v dynamickom systéme. Je zrejmé, že x_A a x_B sú priamo úmerne τ_A a τ_B dobe životnosti izomérov.

Typickým rýchlym dynamickým procesom je napr. rotácia okolo jednoduchej väzby v substituovaných derivátov lineárnych molekúl. Táto rotácia prebieha rýchlymi skokovými zmenami medzi 3 stericky výhodnými rotamérmi (A, B, C) ako je to znázornené na nasledujúcej Newmanovej projekcii pre rotáciu okolo C-C väzby vo fragmente $R-CH_aH_b - CXYZ$, kde R, X, Y a Z sú substituenty.



Obr. 26 Dynamický proces zmeny štruktúry medzi 3 rotamérmi A, B a C. Mólové zlomky obsahu jednotlivých rotamérov x_A , x_B a x_C sú úmerné ich strednej dobe životnosti τ_A, τ_B a τ_C .

Ak X, Y a Z sú všetky rozdielne (t.j. ak uhlík na ktorom sú viazané je chirálny alebo prochirálny) potom všetky 3 rotaméry majú inú konfiguráciu (nedajú sa navzájom stotožniť cez nejakú operáciu symetrie) a vo všeobecnosti ich výskyt (molárne zlomky x_A , x_B a x_C) je

rozdielny. Pre každý rotamér platí taktiež že rezonančná frekvencia H_a je rozdielna od frekvencie H_b : $\nu_{H_a,x} \neq \nu_{H_b,x}$, kde x označuje rotamér A, B alebo C. Pre spriemernené hodnoty frekvencie potom platí:

$$\nu(H_a) = X_A \cdot \nu_{H_a,A} + X_B \cdot \nu_{H_a,B} + X_C \cdot \nu_{H_a,C}$$

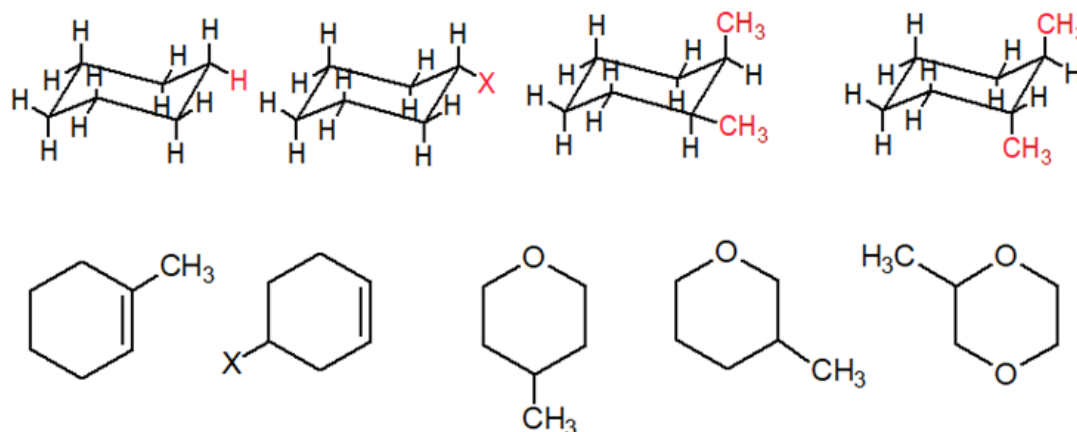
$$\nu(H_b) = X_A \cdot \nu_{H_b,A} + X_B \cdot \nu_{H_b,B} + X_C \cdot \nu_{H_b,C}$$

Pretože všetky sčítance sú oboch rovniciach rozdielne, možno vo všeobecnosti konštatovať, že vodíky CH_2 skupiny viazanej vedľa chirálneho alebo prochirálného uhlíka sú vždy (nezávisle od rýchlosti dynamického procesu) neekvivalentné $\nu(H_a) \neq \nu(H_b)$.

Príkladom chirálnych látok s neekvivalentnými CH_2 protónmi sú esenciálne amino kyseliny. Dobrým príkladom prochirálnych molekúl je glycerol $HO-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$, v ktorom centrálny uhlík má z pohľadu oboch CH_2 skupín viazané 3 rozdielne substituenty: $X=H$, $Y=OH$ a $Z=CH_2OH$. Podobne prochirálna centrá ako v glycerole sa vyskytujú aj v cyklických substituovaných cyklických.

Zdanlivú výnimku z uvedeného efektu chirálneho/prochirálného centra tvoria štruktúry, ktoré pri dynamickom procese sa síce menia na iný, no makroskopicky nerozlišiteľný izomér, a preto signály vodíkov CH_2 skupín sa prejavujú ako navzájom ekvivalentné. Ako príklad možno uviesť axial/ekvatoriál di-substituované deriváty cyklických zlúčenín (napr. 1,2-trans dimetylcyklohexán).

Problém 3 Za predpokladu rýchlej výmeny medzi možnými konformérmi uvedených cyklických derivátov určte počet očakávaných signálov v 1H a ^{13}C NMR spektrách.

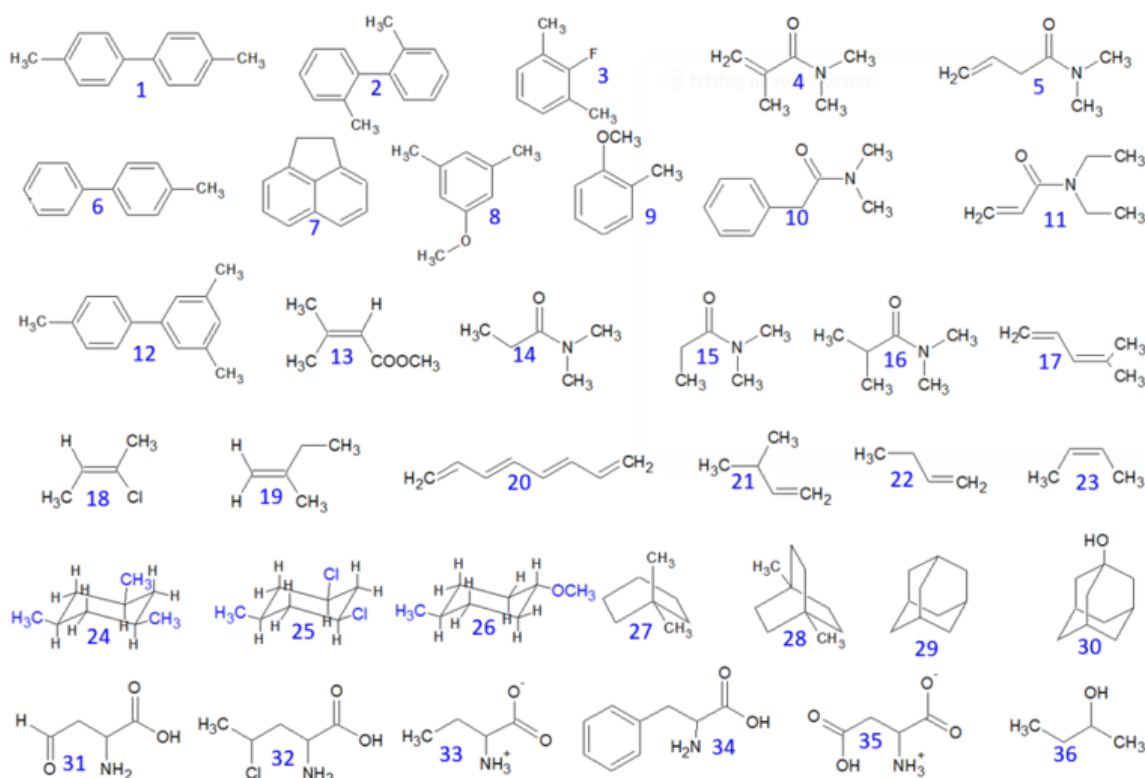


Častým typom dynamického procesu, ktorý ovplyvňuje NMR spektrá je medzimolekulová ako aj vnútramolekulová výmena vodíkov viazaných na heteroatóm, obvykle vodíkov OH a NH skupín. Medzimolekulová výmena je často sprostredkovaná vlhkosťou prítomnou vo vzorke. V dôsledku tejto výmeny sú 1H NMR signály OH a NH skupín obvykle širšie ako signály vodíkov viazaných na uhlík. Pri veľkej rýchlosti výmeny sa zlučujú do jedného spriemerneného signálu, ktorý môže byť veľmi široký až takmer splýva zo základnou čiarou spektra. Okrem toho táto výmena spriemerňuje spin-spinové interakcie vodíkov OH a NH skupín s inými vodíkmi. V dôsledku majú signály týchto vodíkov tvar širokých singletov

a signály CH_n skupín, na ktoré OH, resp. NH skupiny naviazané nie sú interakciou ovplyvnené (interakcia je dynamickým procesom spriemernená na nulu).

Celkový počet rozdielnych signálov prislúchajúcich určitej látke nemusí zodpovedať počtu signálov, ktoré sa dajú v spektre rozlíšiť. Príčinou je možný prekryv signálov. Platí to najmä pre ^1H NMR spektrá s multipletovou štruktúrou signálov a malým rozptylom rezonančných frekvencií. Intenzita signálov tiež často nezodpovedá predpokladanej hodnote, čo súvisí s viacerými možnými príčinami, ktoré budú diskutované neskôr.

Problém 4 Určte počet signálov v ^1H a ^{13}C NMR spektrách nasledovných látok. Predpokladajte rýchlu výmenu OH a NH vodíkov a pomalú rotáciu okolo amidickej väzby.



3.2.2 Chemický posun

Chemický posun je fenomén ktorému vďačíme za existenciu NMR spektroskopie. Je to jav ktorý umožňuje rozlíšiť v NMR spektrách spiny rovnakého druhu viazané v chemicky rozdielnych miestach štruktúry. Chemicky rozdielne spiny sú rozlíšené rozdielmi v ich rezonančnej frekvencii, čo umožňuje ich sledovanie spektroskopickou metódou.

Chemický posun je efekt elektrónového oblaku molekuly/štruktúry vynútený poľom B_0 . Najjednoduchšie jeho vysvetlenie je, že pole B_0 indukuje v molekule cirkuláciu elektrónov, teda vznik prúdovej slučky, ktorá je zdrojom malého sekundárneho magnetického poľa B_{ind} , ktorého veľkosť je úmerná veľkosti B_0 . Podľa zákona akcie a reakcie pole B_{ind} účinkuje proti poľu ktoré ho vytvorilo, čiže pôsobí ako pole, ktoré čiastočne tieni (zmenšuje) účinok B_0 na spiny. Vzťah medzi B_{ind} a B_0 možno vyjadriť rovnicou $B_{ind} = -\sigma \cdot B_0$, kde σ je tzv. tieniaca konštanta.

Účinok elektrónov na hodnotu σ závisí od elektrónovej štruktúry celej molekuly/štruktúry. Pre každý chemicky rozdielny fragment je však vo všeobecnosti iný, preto možno každému chemicky rozdielnemu spinu k priradiť špecifickú hodnotu σ_k . B_{ind} v mieste spinu k (označme ho $B_{ind,k}$) spôsobí malú zmenu výsledného lokálneho magnetického poľa (označme ho $B_{t,k}$) $B_{t,k} = B_0 + B_{ind,k} = B_0(1 - \sigma_k)$ a tým aj zmenu rezonančnej frekvencie spinu k : $\nu_k = (\gamma/2\pi) \cdot B_t = (\gamma/2\pi) \cdot B_0 \cdot (1 - \sigma_k)$, čo je podstatou efektu elektrónov a čo označujeme pojmom NMR chemický posun.

3.2.2.1 Stupnica NMR chemického posunu

Rezonančné frekvencie spinov ν_k majú v závislosti od indukcie B_0 a typu meraného jadra hodnotu desiatky až stovky MHz. Zmena rezonančných frekvencií spôsobená chemickým posunom býva, v závislosti od typu jadra a veľkosti B_0 , Hz až stovky kHz. Presnosť určovania frekvencie v moderných NMR prístrojoch je rádovo 0.1 Hz. Je zrejmé, že používanie absolútnej hodnoty rezonančnej frekvencie ako frekvenčnej súradnice NMR spektier pre veľkosť číselného vyjadrenia ν_k (potrebné 10 platných cifier) by bolo veľmi nepraktické. Ďalší, dôležitejší dôvod zavedenia alternatívnej súradnicovej stupnice je, že ν_k rovnako ako aj rozdiel medzi rezonančnými frekvenciami rôznych spinov ($\nu_k - \nu_j$) závisia od B_0 , čo by pri používaní tejto súradnicovej stupnice veľmi sťažilo porovnávanie spektier meraných na rôznych NMR spektrometroch. Preto sa časom ustálila relatívna stupnica zvaná δ -stupnica, pri ktorej oba vyššie spomenuté praktické nedostatky sú odstránené:

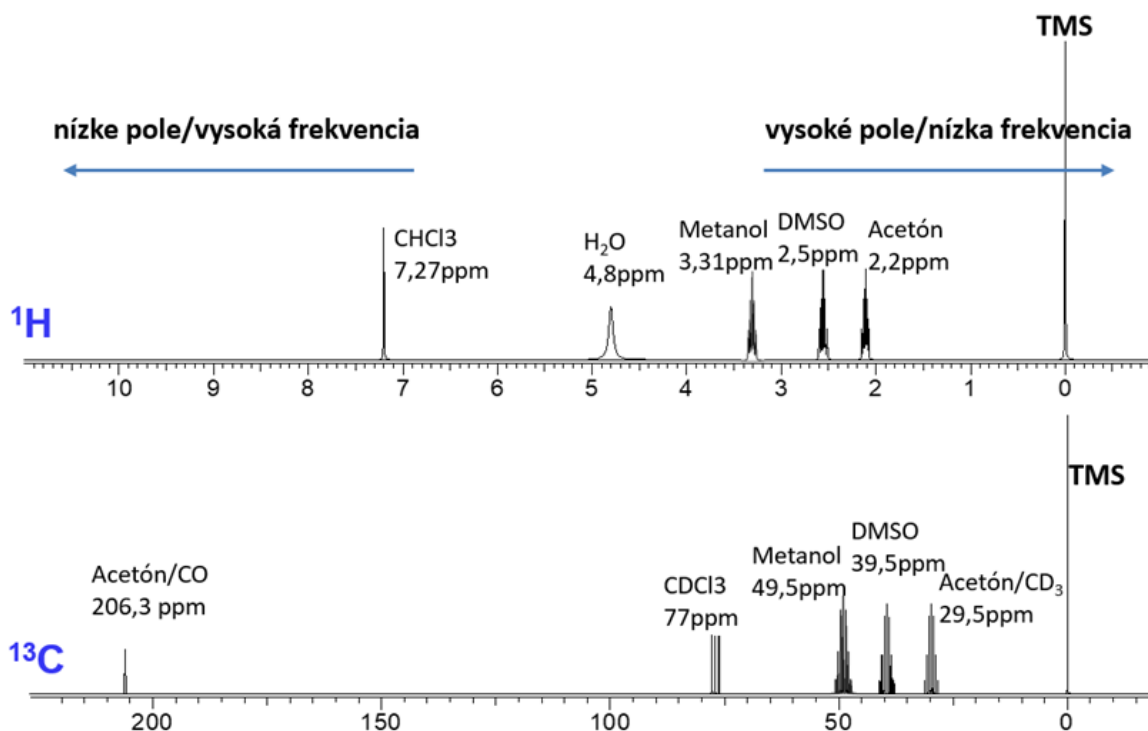
$$\delta_k = (\nu_k - \nu_{std})/\nu_{std}$$

Z definície je zrejmé, že δ -stupnica potrebuje pre každý meraný spin štandard, voči ktorého rezonančnej frekvencií ν_{std} sa chemický posun určuje. Z definície taktiež vyplýva že δ_k nezávisí od B_0 pretože závislosť čitateľa aj menovateľa od B_0 je rovnaká a preto sa vzájomne ruší. δ_k je bezrozmerná veličina vyjadrená veľmi malým číslom (čitateľ: $(\nu_k - \nu_{std})$ - Hz až kHz; menovateľ: (ν_{std}) - desiatky/stovky MHz), a preto sa vyjadruje v ppm (milióntinách).

Pre každý meraný spin je potrebné definovať vhodný štandard. Pre najčastejšie merané jadrá ^1H a ^{13}C (ako aj menej často meraný spin ^{29}Si) sa za štandard zvolil tetrametylsilán (TMS). Výhodou tohto štandardu je, že TMS má (kvôli vysokej symetrii svojej molekuly) v ^1H a ^{13}C spektrách silný dobre identifikovateľný (na kraji spektra mimo bežných signálov vzoriek) signál. Pre vodné roztoky, v ktorých je TMS málo rozpustný sa miesto neho používa DSS (trimetylsilylpropán-1-sulfonát sodný) alebo TSP (trimetylsilylpropiónová kyselina). Štandard sa môže použiť ako interný štandard priamym pridaním do vzorky (ako súčasť rozpúšťadla) alebo ako externý štandard zatavený v kapiláre ponorenej vo vzorke.

Štandardy pre iné dôležité spiny sú napr.: ^{15}N (ext. kvap. NH_3); ^{19}F (CFCl_3); ^{31}P (ext. 85% H_3PO_4); ^{17}O (ext. H_2O).

Ak štandard nebol ku vzorke pridaný tak na definovanie δ -stupnice sa ako sekundárny štandard často využíva signál rozpúšťadla. V NMR sa obvykle používajú deuterované rozpúšťadla. Ich signály majú známu polohu v spektre a typický multipletový tvar takže sú v spektre dobre identifikovateľné (pozri Obr. 27).



Obr. 27 δ -stupnica pre štandardný rozsah ^1H a ^{13}C NMR chemických posunov s vyznačenými signálmi v NMR bežne používaných deuterovaných rozpúšťadiel, ktoré sa môžu (pri absencii TMS) použiť ako sekundárny štandard. Multipletová signálov je dôsledkom interakcie ^1H jadier (obsiahnuté v neúplne deuterovaných rozpúšťadlách), resp. ^{13}C jadier s ^2H spinmi.

V moderných spektrometroch je možné pre ľubovoľný spin definovať δ -stupnicu aj bez prítomnosti akéhokoľvek (primárneho alebo sekundárneho) štandardu vo vzorke. Stačí na to poznať rozpúšťadlo na signál, ktorého je spektrometer stabilizovaný („locked” – uzamknutý). Na základe presnej absolútnej frekvencie „locku“ sa určí akú absolútnu rezonančnú frekvenciu by mal pri danom magnetickom poli preferovaný štandard pre daný spin. Tento spôsob určovania chemických posunov má veľký význam najmä pre jadrá, pre ktoré je prítomnosť interného štandardu nemožná (narušenie vzorky) alebo veľmi nepraktická (napr. pre ^{15}N spektrá, kde je obvykle potrebný štandard s ^{15}N izotopovým obohatením,..).

Použitie sekundárneho alebo externého, prípadne „počítačového“ štandardu je z teoretického hľadiska menej presne. Z praktického hľadiska (ovplyvňovanie vzorky) však oveľa výhodnejšie. Navyše presnosť (správnosť) určenia chemických posunov pri vyhodnocovaní nameraných NMR dát nikdy nie je kritickým parametrom.

3.2.2.2 Vznik chemického posunu

Ako bolo uvedené vyššie σ_k závisí od elektrónové stavu celej molekuly. Reálne dáta ale ukazujú, že najväčší efekt má elektrónová hustota v okolí samotného spinu. Veľký tieniaci efekt majú najmä elektróny s -orbitálu, ktoré majú nenulovú hustotu na povrchu jadra. Obsah s -elektrónov vo väzbových orbitáloch závisí od hybridizácie atómov uhlíka a najväčší je v nasýtených väzbách (sp^3 -hybridizácia). ^1H a ^{13}C spiny viazané v nasýtených fragmentov sú preto najviac tienené (majú najmenší chemický posun). Chemický posun ^1H spinov je

determinovaný hlavne týmto tieniacim účinkom *s*-elektrónov. Tento tieniaci účinok je zvykom označovať aj ako diamagnetický.

Uhlíkové atómy majú vo svojom okolí okrem *s*-elektrónov aj *p*-elektróny. Orbitálny magnetický moment *p*-elektrónov je mimo magnetického poľa B_0 dokonale vykompenzovaný spárovaním dvojice *p*-elektrónov s opačným spinom. Pole B_0 však spôsobí ich čiastočne rozparovanie a čiastočnú excitáciu jedného elektrónu z väzbového HOMO orbitálu (Highest Occupied Molecular Orbital) do antiväzbového LUMO orbitálu (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Čiastočne nespárený elektrón na HOMO orbitáli zvýši hodnotu B_t a tým aj hodnotu rezonančnej frekvencie v okolí ^{13}C spinu. Tento lokálny príspevok elektrónového oblaku sa nazýva paramagnetický. Lokálny paramagnetický príspevok elektrónového oblaku k chemickému posunu ^{13}C je dominantný a je zodpovedný za podstatne väčší rozsah ^{13}C chemických posunov oproti ^1H NMR chemickým posunom. Lokálny paramagnetický príspevok je dominantný aj v prípade iných spinov, ktoré majú *p*-elektróny. Je zaujímavé, že pri variácií štruktúry molekúl (napr. zmena substituentu) sa jej efekt prejavuje podobným spôsobom na diamagnetický i paramagnetický príspevok. To je príčinou skutočnosti, že medzi ^1H a ^{13}C chemickými posunmi existuje dobrá korelácia. Treba však zdôrazniť, že paramagnetický príspevok môže byť ovplyvnený viacerými faktormi (napr. sterickými), čo môže túto koreláciu narúšať.

V sérii derivátov líšiacich sa iba variáciou substituentu sa dá zmena dominantného lokálneho príspevku k chemickému posunu dobre korelovať s polárnym efektom substituentu (pozri nižšie: Efekt substituentu)

Elektróny na susedných väzbách majú vplyv ak na nich vznikajú intenzívne elektrónové prúdové slučky. Platí to teda pre najmä pre nenasýtené väzby s pohyblivými elektrónmi π -elektrónmi, no najmä pre konjugované π -väzbové systémy. Magnetické pole vytvorené prúdovou slučkou má dipólový charakter: nad rovinou slučky jeho siločiar pôsobia proti smeru B_0 , v rovine prúdovej slučky z vonkajšej strany slučky opačne v smere B_0 , čiže jej efekt na susedné spiny je anizotropný (závislý od polohy spinu *k* roviny prúdovej slučky). Tento efekt prúdovej slučky indukovanej na niektorých väzbách sa označuje ako anizotropia susedných väzieb. Graficky sa znázorňuje pomocou tzv. anizotropného kužľa. Celkove efekt magnetického poľa susedných väzieb je menší ako efekt lokálnej hustoty elektrónov, v prípade ^1H spinov však existujú významné výnimky (trojitá väzba, anulény,..).

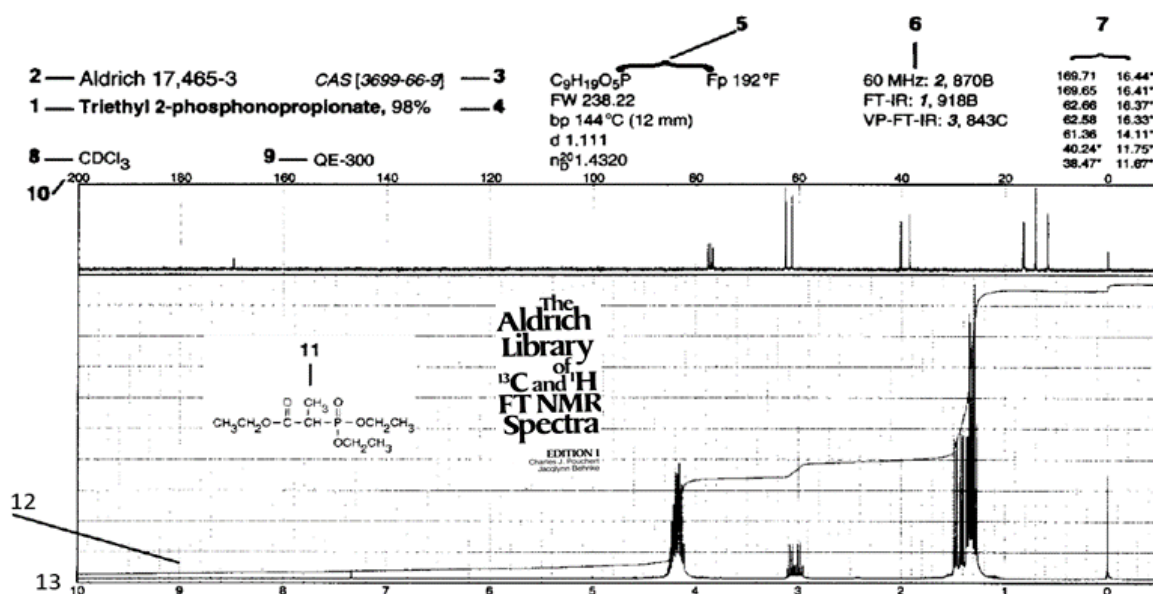
Ilustrácia tvaru anizotropného kužľa niektorých väzieb ako aj efektu anizotropie vo vybraných zlúčeninách sú uvedené v odseku: Efekt elektrónov na susedných väzbách – magnetická anizotropia.

Okrem efektu lokálnej elektrónovej hustoty a anizotropie susedných väzieb existujú ďalšie cesty akým elektrónový systém ovplyvňuje chemický posun spinov. Je to napr. čiastočná excitácia paramagnetických stavov vzdialenejších elektrónov, vplyv okolia molekúl a mnoho ďalších faktorov, ktoré ovplyvňujú elektrónový stav molekuly. Už od počiatkov NMR sa rozvíjali rôzne metódy molekulovej mechaniky a kvantovej teórie výpočtu NMR chemického posunu, ktoré komplexnejšie posudzujú efekt B_0 na elektrónový stav molekúl. S rozvojom výpočtovej kapacity sa tieto metódy stále zdokonaľujú. V mnohých oblastiach sa dosiahol pozoruhodný pokrok vďaka ktorému je možné interpretovať zložité spektrá (najmä v oblasti NMR tuhej fázy). Napriek tomu všetkému teoretické výpočty stále nie sú na takej úrovni, ktorá by umožnila spoľahlivú automatickú interpretáciu štandardných experimentálnych spektier. Príčinou je hlavne veľmi vysoká citlivosť NMR chemických posunov na malé variácie zloženia

vzorky (rozpúšťadlo, nečistoty,...) a tiež ich vysoká závislosť od experimentálnych podmienok (teplota, koncentrácia,...).

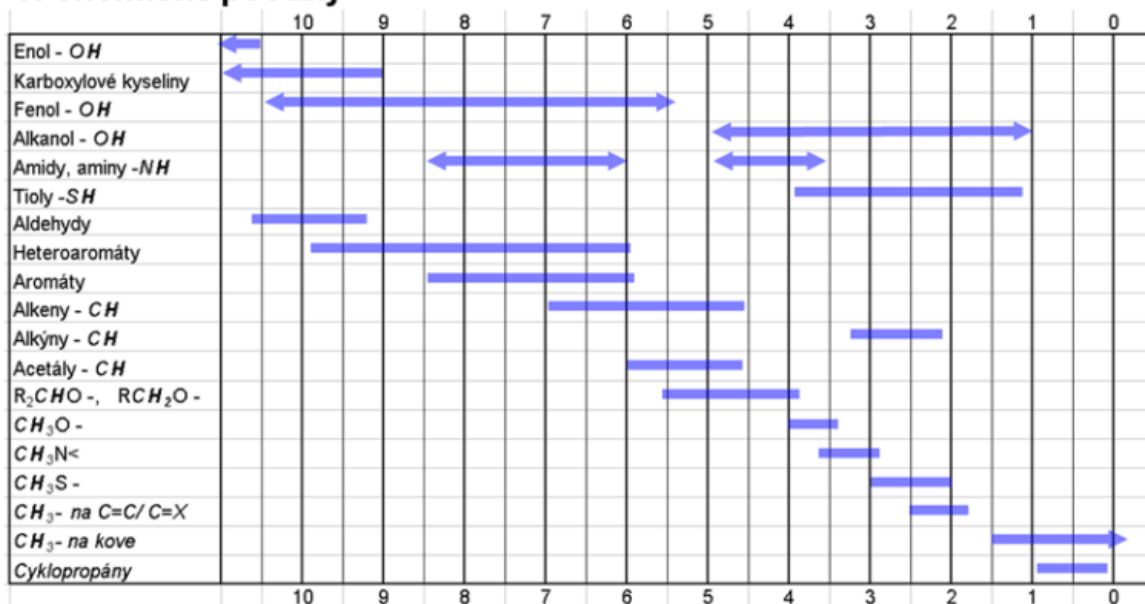
3.2.2.3 Empirické dáta

Napriek pokrokom v teoretickej interpretácii NMR dát najčastejším a najpraktickejším zdrojom informácií o NMR chemických posunov ako aj iných NMR parametrov (interakčných konštánt) sú empirické dáta. Tieto dáta môžu byť prezentované v rôznej forme. Najstaršou formou sú atlasy NMR spektier známych látok s priradením jednotlivých signálov (Obr. 28). Ďalšou formou sú tabuľky charakteristických oblasti chemických posunov pre rôzne typy štruktúrnych fragmentov s rôznym stupňom detailov popísania štruktúry (Obr. 29 - Obr. 31]. Pretože chemické posuny závisia hlavne od najbližšieho okolia spinov (poznámka: na mapovanie okolia spinov bol vyvinutý spôsob jeho záznamu pomocou tzv. HOSE kódov) tieto empirické informácie umožňujú predikovať chemické posuny aj nových štruktúr. Na predikciu NMR parametrov sa vyvinuli aj metódy neurónových sietí. Presnosť predpovedí závisí na dostupnosti podobných štruktúr v empirických databázach.

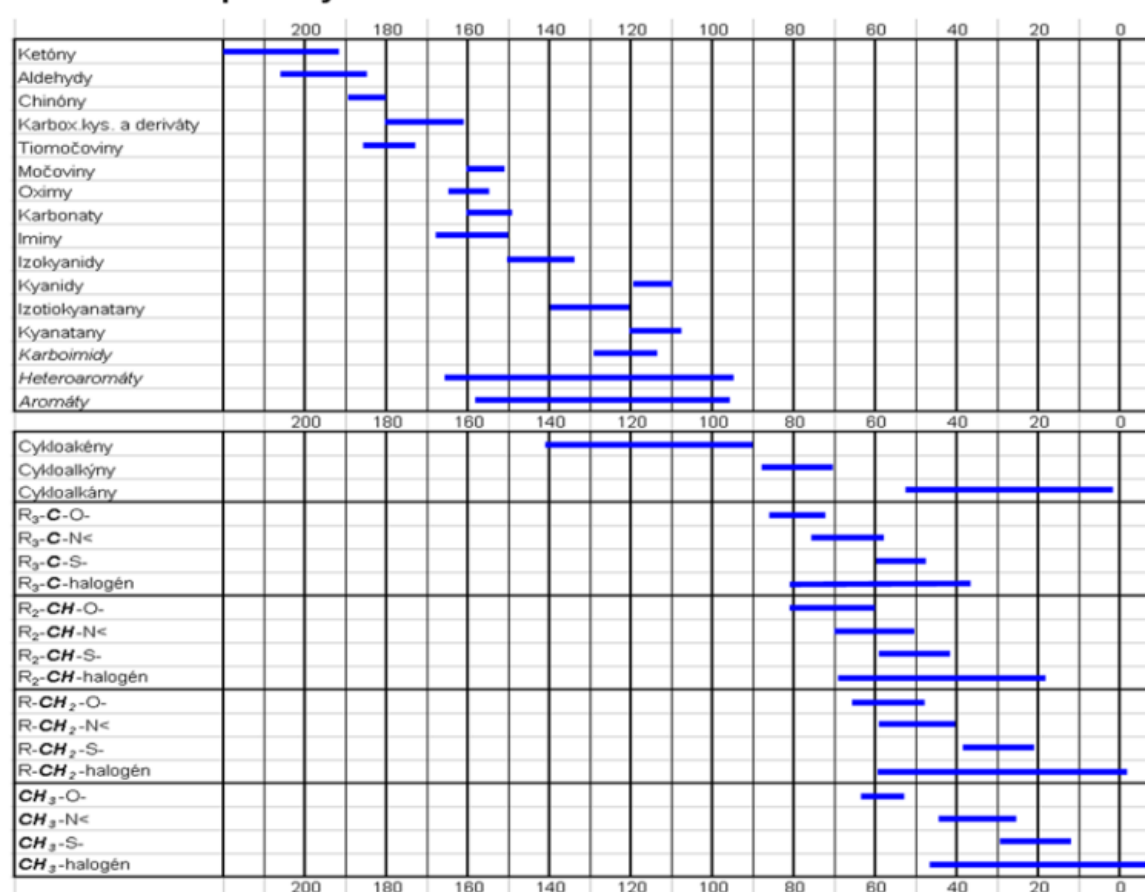


Obr. 28 Ukážka prezentácie NMR dát z katalógu firmy Aldrich (12 000 spektier), v ktorom okrem prezentácie experimentálnych 1H a ^{13}C NMR spektier sú uvedené aj informácie o fyzikálnych vlastnostiach látky a podmienky merania NMR spektier.

^1H chemické posuny



^{13}C chemické posuny



Obr. 29 Charakteristické oblasti ^1H a ^{13}C NMR rezonančných frekvencií. Podobné tabuľky pre iné jadrá možno nájsť v Bruker almanachu 2011.

The Practice of NMR Spectroscopy

with Spectra-Structure Correlations for Hydrogen-1

Nugent F. Chamberlain

Analytical Research Laboratory
EXXON Research and Engineering Company
Baytown, Texas

FUNCTIONAL GROUP	X	Y	Z	RANGE δ-VALUES	NO. CPDS.	NO. EXAM.	L ₁	L ₂
X-C≡CH-C-OR O	X = trans-(NR ₂ , NRφ)			4.72-4.30	4	4	1	
	X = cis-β-C-CR ₂			5.02-5.47	3	3	2	
	X = cis-β-C-COOR			6.17-5.96	4	6	3	
	X = cis-φ			6.75-6.12	23	29	4	
	X = cis-Cl			6.28	1	1	5	
	X = trans-COOR			6.27-5.99	12	12	6	
X-C≡CH-C-Z O	X = trans-CO-N(R ₂ , Rφ)			6.94-6.63	12	12	7	
	X = cis-CO-φ			6.60-6.25	8	8	8	
	X = cis-CO-R			6.80-6.69	9	9	9	
	X = cis-pyridinium-4			7.09-6.57	2	2	10	
X-C≡CH-C≡N	X = cis-φ			6.49	1	1	11	
	X = cis-COOR			6.60-6.25	7	7	12	
	X = NR ₂ (c or t?)			3.71	1	1	13	
⊙-C≡CH-S	X = cis-φ			5.84-5.53	3	3	14	
	X = cis-CN			6.26	1	1	15	
	φ = trans			6.08-5.88	5	8	16	
	φ = cis			6.75-6.47	5	8	17	
	φ = trans			6.52-6.25	6	6	18	
	φ = cis			6.88-6.66	5	5	19	
	φ = trans			6.59-6.35	4	4	20	
	φ = cis			7.20-6.70	10	10	21	
	φ = trans			6.94-6.30	3	6	22	
	φ = cis			7.48-6.93	5	5	23	
X-C≡CH-Hal.	X = c β t-Cl			6.30-6.18	2	2	26	
	X = c β t-Br			7.04-6.60	2	4	27	
	X = cis-COOR			7.50	1	1	28	
X-C≡CH-P	X = P = PR ₂			7.18, 6.78	2	2	29	
	X = P = P(O)φ ₂			7.40, 6.90	2	2	30	
X-C≡CH-N(2,3,4)	X = cis(?) -pyridyl-(2,4)			7.80-7.85	2	2	31	
	X = cis(?) -COOR			8.05-7.61	3	3	32	
	X = cis(?) -CO-φ			8.23-8.12	2	2	33	
X-C≡CH-Y	X = trans-CO-NR ₂			5.04	1	1	34	
	X = trans-CO-R			5.46-5.33	3	3	35	

Obr. 30 Atlas ¹H NMR chemických posunov s detailnejším popisom štruktúry okolia ¹H spinov.

Carbon-13 NMR Spectral Data

A "Living" COM-Microfiche Collection of Reference Material

58 108 Spectra of 48 357 Compounds
Scale of Reduction 1:48



Wolfgang Bremser
Hauptlaboratorium, BASF Aktiengesellschaft
Ludwigshafen

Ludger Ernst
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
Braunschweig-Stöckheim

Winfried Fachinger
Naturwissenschaftliche Informatik, BASF Aktiengesellschaft
Ludwigshafen

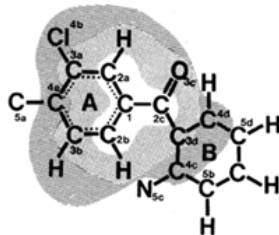
Reinhard Gerhards
Bergbauforschung GmbH
Essen

Alfons Hardt
Hauptlaboratorium, BASF Aktiengesellschaft
Ludwigshafen

Pamela M. E. Lewis
Wraybury
Middlesex, England

C40 H49 N1 O14 CNMR 4110
STREPTOVAL C
CA: 54955-14-5 MM: 767.314

SHIFT (PPM)	MULTIPLICITY	SHIFT (PPM)	MULTIPLICITY	SHIFT (PPM)	MULTIPLICITY
1	168.50 S *	11	69.20 D *	21	189.10 S
2	130.70 S *	12	36.00 D *	22	109.20 S
3	130.40 D	13	97.00 D	23	125.30 S
4	124.50 D	14	199.00 S	24	137.40 S
5	140.40 D	15	131.60 D	25	123.20 S
6	40.90 D	16	146.20 S	26	135.20 S
7	77.80 D	17	162.60 S	27	154.50 S
8	38.70 D *	18	106.40 S	28	13.20 Q
9	71.50 D *	19	159.50 S	29	18.70 Q
10	49.30 D	20	113.00 S	30	15.90 Q
11	174.90 S			31	174.90 S
12	52.30 Q			32	52.30 Q
13	10.60 Q			33	10.60 Q
14	32.30 Q			34	32.30 Q
15	16.90 Q			35	16.90 Q
16	90.10 T			36	90.10 T
17	7.60 Q			37	7.60 Q
18	168.60 S *			38	168.60 S *
19	20.80 Q			39	20.80 Q
20	15.90 Q			40	15.90 Q



- indexy: meno, vzorec, CAS
- subštruktúry: „HOSE“ kód

2a *C } *C*CC\$(
2b *C } 66470
2c C\$ }

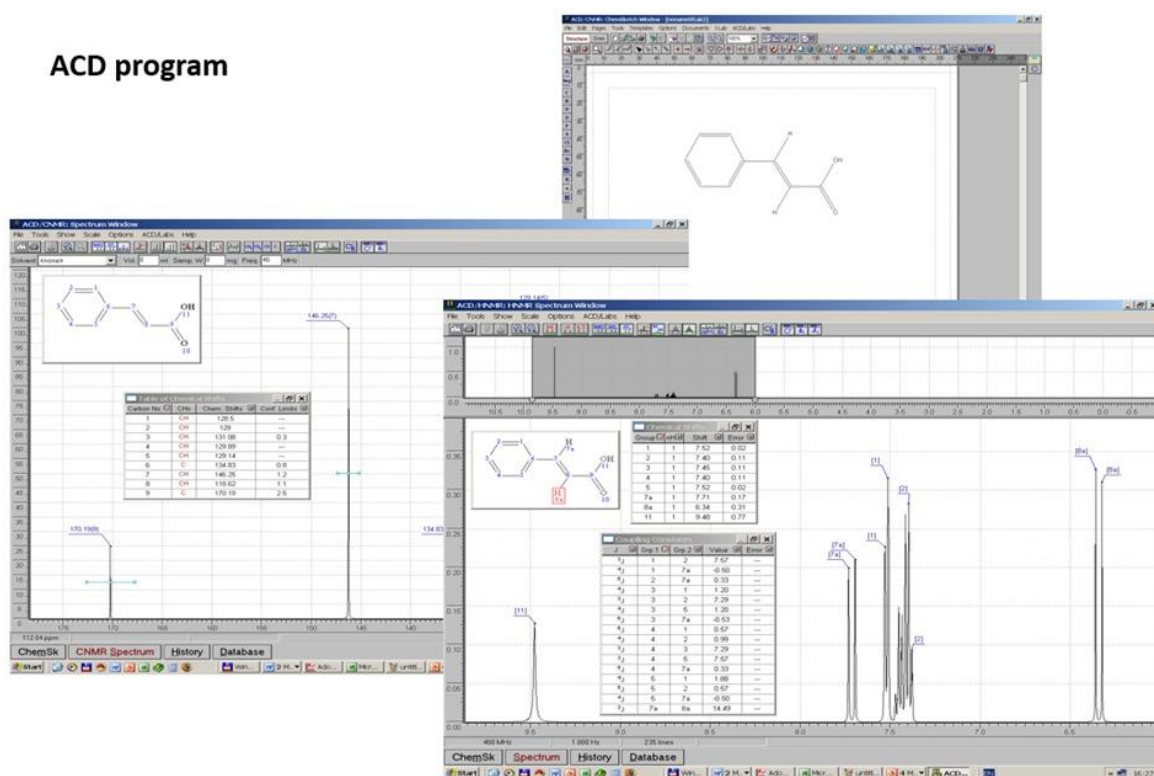
Obr. 31 Atlas ¹³C NMR chemických posunov s priradením všetkých signálov a možnosťou vyhľadávania podľa subštruktúrnych detailov (HOSE kódy).

V súčasnosti sa informácie o NMR chemických posunov a iných NMR parametrov transformovali do digitálnej formy a sú dostupné ako komerčné ale aj voľne dostupné databázy alebo prediktory NMR chemických spektier.

Databázy umožňujú hľadanie relevantných NMR dát podľa rôznych indexov (názov látky, molekulový vzorec, molekulová hmotnosť, ...). Čo je dôležité umožňujú tiež hľadať priradenie experimentálnych dát (najčastejšie ^{13}C NMR chemických posunov) k dátam (k látkam alebo ich fragmentom) z databázy.

Prediktory spektier používajú obvykle 2 algoritmy. Jeden na založený na systematickom zmapovaní okolia spinu (tzv. HOSE kódy) a druhý na využití trénovaných neurónových sietí.

Medzi najrozšírenejšie komerčné programy patrí databáza a prediktory NMR spektier od firmy ACD/Labs. Ich databáza obsahuje veľké množstvo spracovaných NMR dát (v roku 2022: ^1H - 380 tis., ^{13}C - 250 tis., ^{15}N - 32 tis., ^{19}F - 10 tis. a ^{31}P - 32 tis. štruktúr).



Obr. 32 Ukážka predikovaných NMR spektier pomocou programov ACD/Labs. Pomocou programu ChemSketch sa nakreslí vzorec požadovanej látky. Program C+H NMR Predictor vypočíta teoretické spektrá s označením všetkých signálov ako aj vyhodnotením ich možnej chyby.

Ďalšie významné komerčné databázy:

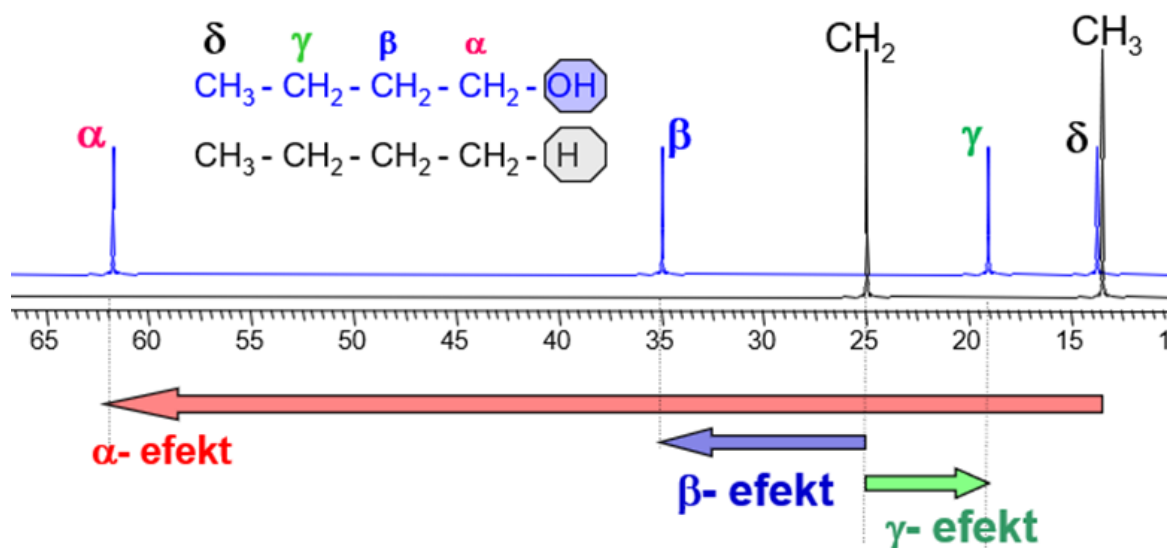
- NMRPredict od firmy Modgraph – spoľahlivá predikcia ^1H a ^{13}C spektier (ako prídavok integrovaný do populárneho programu na spracovanie NMR dát – MestReNova)
- Aldrich NMR Library for ACD/Labs – viac ako 35 tis. chemických štruktúr, ^1H a ^{13}C NMR spektra.

3.2.2.4 Efekt substituentu

Veľkou prednosťou NMR je, že v skupine látok rovnakého typu (v homologickom rade látok), ktoré sa líšia len variáciou určitej časti štruktúry (substituentom) možno variáciu chemických posunov so zmenou substituentu pomerne spoľahlivo určiť bez nutnosti použitia databáz, resp. programov na predikciu NMR spektier a to na základe polárneho efektu substituentu. Je to veľmi podobne ako pri posudzovaní vplyvu substituentu na reaktivitu organických látok pretože NMR chemické posuny i reaktivita reakčných centier závisia veľmi podobným spôsobom od elektrónovej hustoty v ich okolí. Na posúdenie vplyvu substituentov na NMR chemické posuny nám preto stačia základné vedomosti z organickej chémie pri posudzovaní vplyvu elektrónovej štruktúry na reaktivitu látok. Elektrónová hustota v okolí spinov je najdôležitejším faktorom vplývajúcim na hodnotu chemického posunu a z tohto dôvodu je jednoduchý koncept polárneho efektu dobre funkčný a spoľahlivý.

Efekt substituentu sa posudzuje ako zmena chemického posunu určitého jadra pri zámene vodíka za substituent. Efekt závisí od vzdialenosti (vyjadrenej počtom väzieb) medzi substituentom a daným jadrom. Obvykle s počtom väzieb efekt substituentu klesá. Podľa spôsobu prenosu možno efekt substituentu rozlíšiť na indukčný a mezomérny, ktorý sa prenáša cez π -elektrónový systém.

Indukčný efekt je spôsobený inou (obvykle vyššou) elektronegativitou substituentov oproti elektronegativite referenčného substituentu – vodíka. Prenáša cez σ -väzby a so vzdialenosťou klesá ako je to pre ^{13}C chemické posuny naznačené na nasledujúcom obrázku.



Obr. 34 Indukčný efekt substituentu na ^{13}C NMR chemické posuny. Efekt je ilustrovaný na porovnaní spektier butánu (nesubstituovaný derivát) a 1-butanolu (H nahradený substituentom- OH skupinou).

V tabuľke na Obr. 35 je ukázaný efekt rôznych substituentov na ^{13}C chemické posuny v n -alkánových a izo -alkánových skeletoch. Efekt substituentu je najvýraznejší v α -polohe vedľa substituentu a následne v β -polohe a γ -polohe. V δ -polohe je efekt obvykle veľmi malý, zanedbateľný, a preto sa v tabuľkách neuvádza.



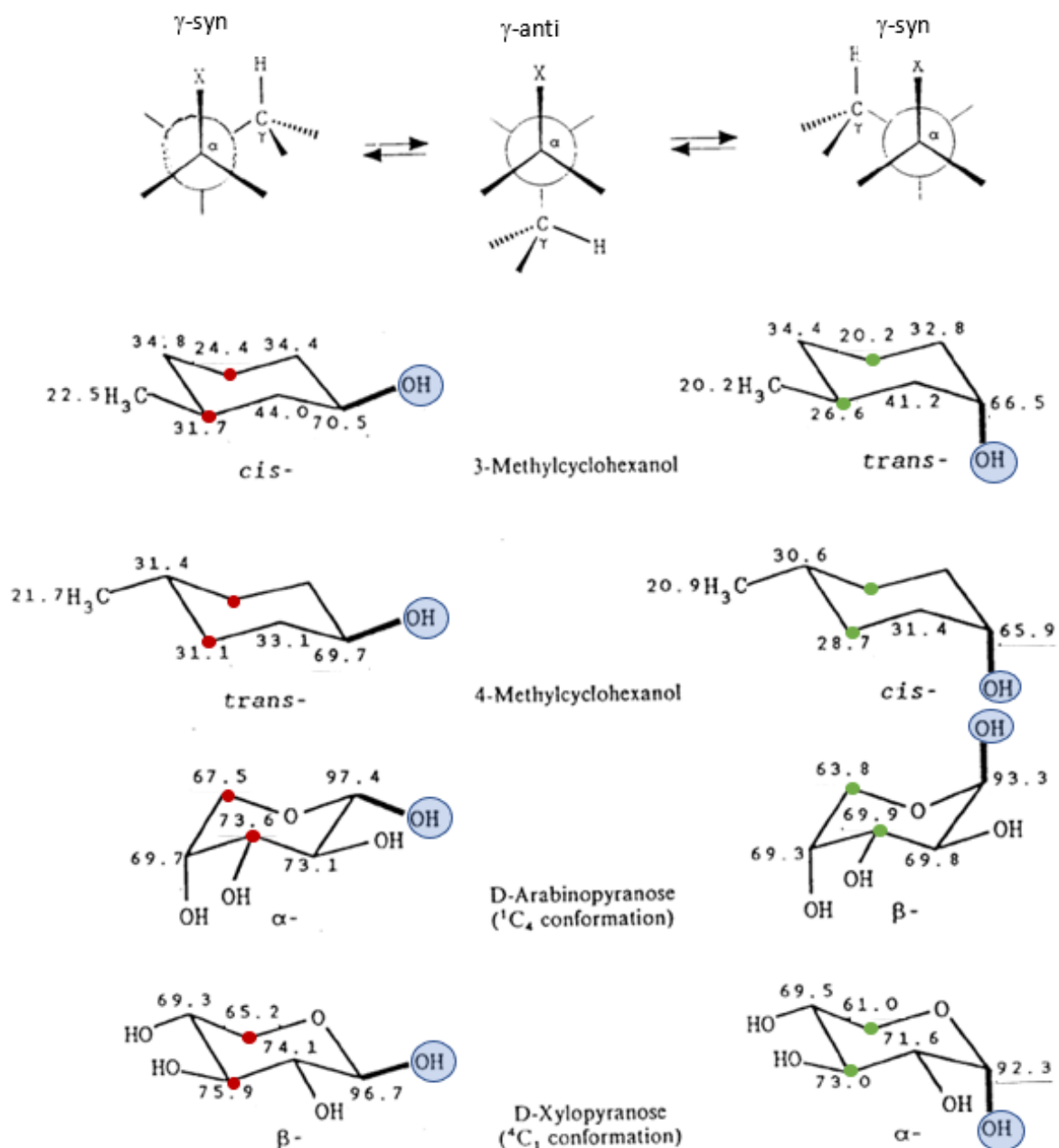
Carbon Substituent Parameters for Functional Groups*

X	Terminal			Internal X		
	α	β	γ	α	β	γ
F	68	9	-4	63	6	-4
Cl	31	11	-4	32	10	-4
Br	20	11	-3	25	10	-3
I	-6	11	-1	4	12	-1
OH	48	10	-5	41	8	-5
OR	58	8	-4	51	5	-4
OAc	51	6	-3	45	5	-3
NH ₂	29	11	-5	24	10	-5
NR ₂	42	6	-3			-3
CN	4	3	-3	1	3	-3
NO ₂	63	4		57	4	
CH=CH ₂	20	6	-0.5			-0.5
C ₆ H ₅	23	9	-2	17	7	-2
C≡CH	4.5	5.5	-3.5			-3.5
(C=O)R	30	1	-2	24	1	-2
(C=O)OH	21	3	-2	16	2	-2
(C=O)OR	20	3	-2	17	2	-2
(C=O)NH ₂	22		-0.5	2.5		-0.5

*From F.W. Wehrli, A.P. Marchand, and S. Wehrli, *Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 1988.

Obr. 35 Ukážka tabuľky konštant substituentov vyjadrujúcej ich efekt na ¹³C NMR chemické posuny v n-alkánoch a izo-alkánoch.

Podľa predpokladu, elektronegatívny substituent znižuje elektrónovú hustotu v susedných polohách, čo sa prejaví zvýšením chemických posunov v α -polohe a β polohe (okrem jódu, ktorý svojim objemom silne znižuje lokálny paramagnetický efekt p -elektrónov na C_α). Na prvý pohľad prekvapením je opačné znamienko γ -efektu. Doposiaľ nie je v literatúre dostupné jednoznačné vysvetlenie tejto skutočnosti. Najčastejšie sa to vysvetľuje ako dôsledok sterickej interakcie medzi vodíkom v γ -polohe a substituentom. Zaujímavosťou γ -efektu je, že je stereospecifický: jeho absolútna hodnota je väčšia (viac negatívna) v tzv. γ -syn konfigurácii ako v γ -anti konfigurácii (pozri Obr. 36). Túto skutočnosť možno využiť pri určovaní relatívnej konfigurácie väzieb v analyzovanej štruktúre.

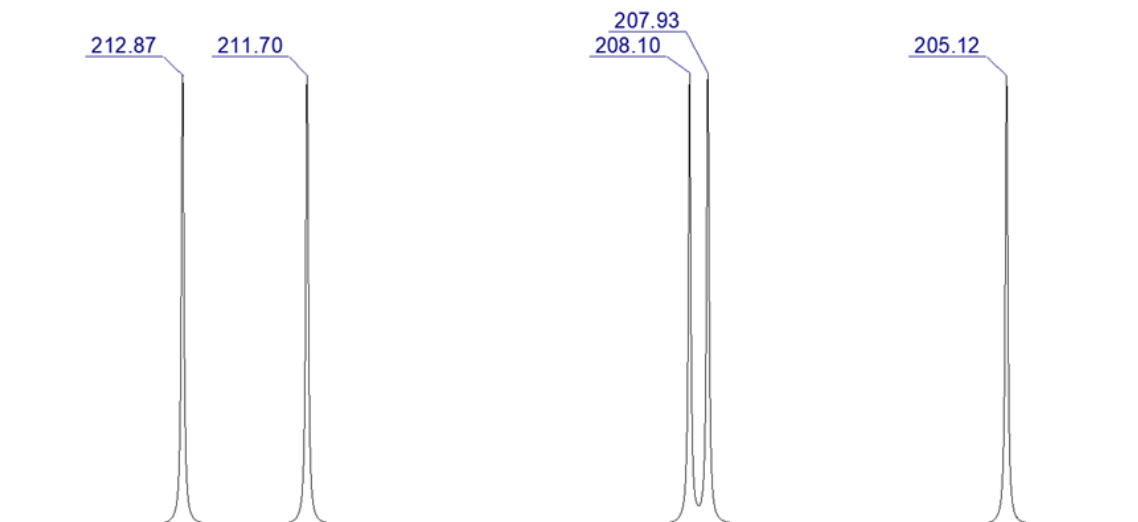


Obr. 36 Porovnanie γ -efektu substituentu (označená OH skupina) na cyklických štruktúrach. Pre všetky konfiguračné izoméry majú uhliky v γ -anti polohách (označené červenou farbou) väčší chemický posun ako uhliky v γ -syn polohách (označené zelenou farbou).

Čo sa týka efektu substituentov na ${}^1\text{H}$ NMR chemické posuny v α a β polohe je podobný (zvyšovanie chemického posunu), ale oveľa menší ako efekt na ${}^{13}\text{C}$ chemické posuny V γ polohe je obvykle zanedbateľný.

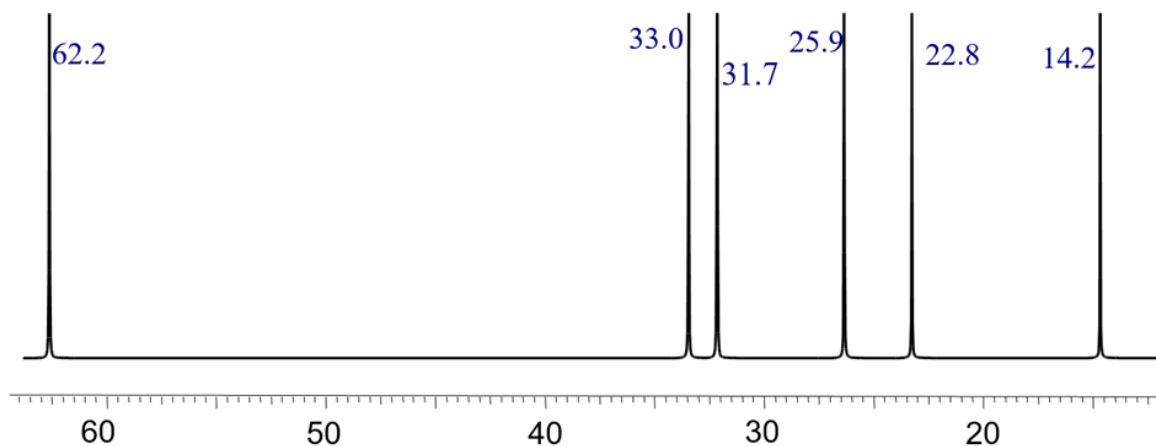
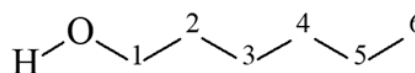
Efekt substituentov sa podobným spôsobom ako na alkánoch prejavuje aj na iných štruktúrach. Podobné tabuľky ako je tabuľka uvedená na Obr. 35 možno v literatúre nájsť aj pre iné homologické rady zlúčenín.

Problém 5 Na základe vyhodnotenia efektu substituentu prirad'te signály v karbonylovej skupiny ^{13}C NMR spektre zmesi ketónov: CH_3COCH_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCH}_3$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$ a $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$. (Nápoveda: porovnajte počet príspevkov substituentov v α , β a γ polohe ku karbonylovej skupine pre každý ketón).

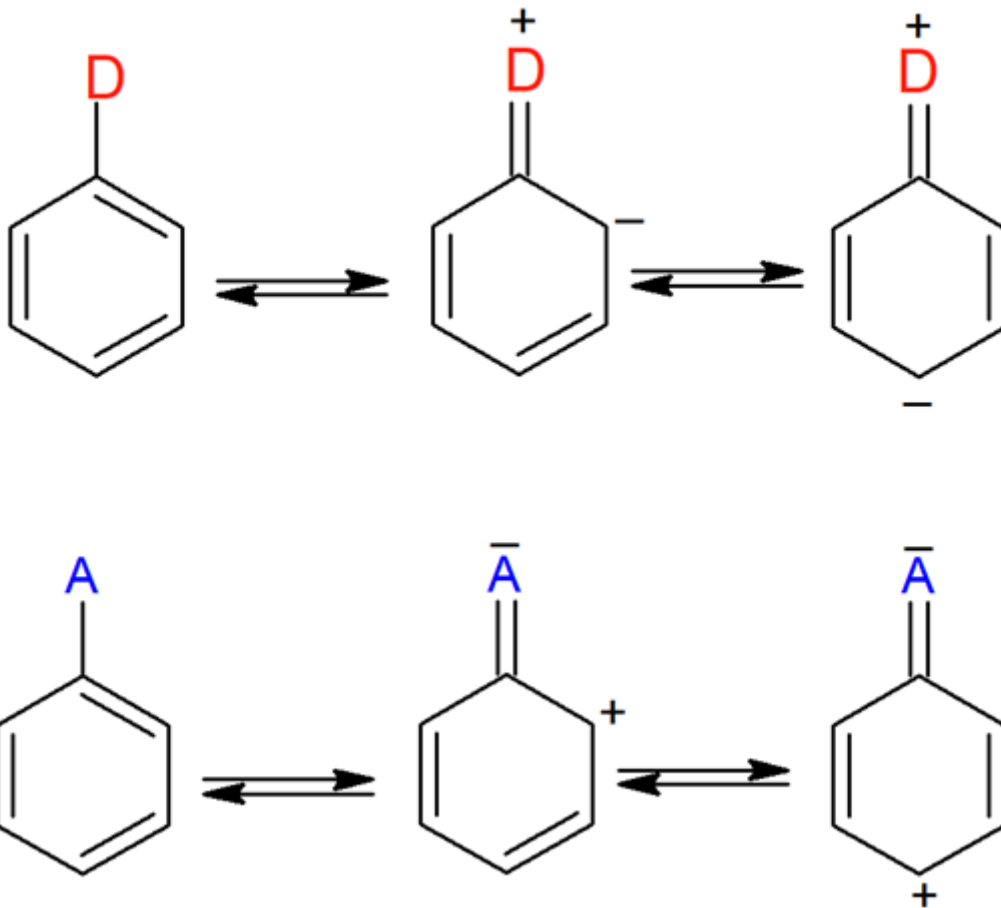


Problém 6 Na základe vyhodnotenia efektu substituentu prirad'te signály v ^{13}C NMR spektre 1-hexanolu.

Hexan: $\text{C}_{1,6}$ 14.2 ppm
 $\text{C}_{2,5}$ 22.1 ppm
 $\text{C}_{3,4}$ 33.0 ppm



Mezomérny efekt sa prenáša π -elektrónmi v konjugovanom systéme násobných väzieb ako je to naznačené pre systém na aromatickom jadre na Obr. 37. Elektrón-donorné substituenty ($-\text{O}^- > -\text{NH}_2 > -\text{OR} > -\text{NHCOR} > -\text{OCOR} > -\text{Ph} > -\text{CH}_3 > -\text{I} > -\text{Br} > -\text{Cl} > -\text{F}$) zahusťujú elektrónovú hustotu v polohách *orto* a *para* vzhľadom k substituentu. Znamená to zvyšovanie tienenia v týchto polohách čo súčasne znamená aj znižovanie ^1H a ^{13}C chemických posunov. Naopak, elektrón-akceptorné substituenty ($-\text{NO}_2 > -\text{CN} > -\text{SO}_3\text{H} > -\text{CHO} > -\text{COR} > -\text{COOR} > -\text{COOH} > -\text{CONH}_2 > -\text{COO}^-$) v týchto polohách zriedňujú elektrónovú hustotu, a teda spôsobujú zvyšovanie ^1H a ^{13}C chemických posunov. Chemický posun v *meta* polohe je mezomérnym efektom ovplyvňovaný veľmi málo.



Obr. 37 Prenos mezomerného efektu substituentu v aromatickom systéme cez vznik mezomérnych štruktúr. D označuje elektrón-donorný substituent, A – elektrón-akceptórny substituent.

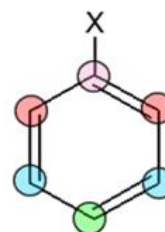
Mezomérny efekt je úplne nezávislý od indukčného efektu substituentu, a preto v polohách blízko substituentu (*ipso* a *orto* na aromatickom jadre), je potrebné uvažovať aj indukčný efekt. Celkový efekt v aromatických systémoch vystihujú empirické konštanty, v ktorých sú oba efekty zohľadnené (Obr. 38).

Carbon Substituent Parameters for Aromatic Systems*

X	<i>Ipsa</i>	<i>Ortho</i>	<i>Meta</i>	<i>Para</i>
CH ₃	8.9	0.7	-0.1	-2.9
CH ₂ OH	13.3	-0.8	-0.6	-0.4
CH=CH ₂	9.5	-2.0	0.2	-0.5
CN	-19.0	1.4	-1.5	1.4
CO ₂ CH ₃	1.3	-0.5	-0.5	3.5
CHO	9.0	1.2	1.2	6.0
CO—CH ₃	7.9	-0.3	-0.3	2.9
F	35.1	-14.1	1.6	-4.4
Cl	6.4	0.2	1.0	-2.0
Br	-5.4	3.3	2.2	-1.0
I	-32.0	10.2	2.9	1.0
NH ₂	19.2	-12.4	1.3	-9.5
OH	26.9	-12.6	1.8	-7.9
OCH ₃	30.2	-15.5	0.0	-8.9
SCH ₃	10.2	-1.8	0.4	-3.6
NO ₂	19.6	-5.3	0.8	6.0

*From J.B. Stothers, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1973.

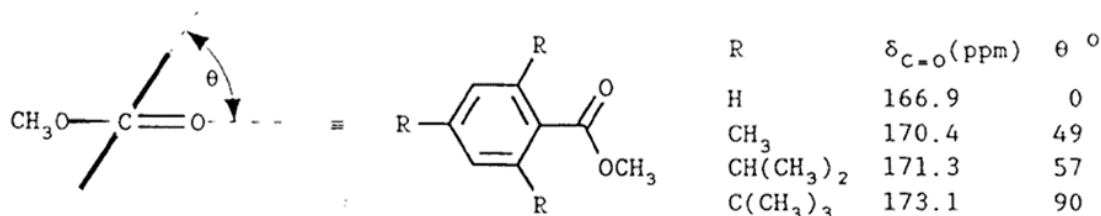
$$\delta = 128.7 + \sum S_i$$



Obr. 38 Konštanty substituentov S_i pre výpočet ^{13}C chemických posunov aromatických uhlíkov. Pri viacnásobnej substitúcií benzénového jadra je potrebné efekt substituentov sčítať. Táto aditívna schéma je platná iba ak sa substituenty navzájom neovplyvňujú.

Podrobnejší pohľad na parametre substituentov však naznačuje, že vyššie uvedené jednoduché pravidla pre interpretáciu polárneho efektu substituentov platia dobre iba pre *meta* a *para* polohy. V *ipso* a *orto* polohách v prípade silných elektrón-akceptorných (NO_2 , CN) ako aj objemných (*I*, *Br*) substituentov je ich polárny efekt iný ako predpokladaný. Vysvetlením môže byť, že lokálny paramagnetický príspevok k ^{13}C chemickému posunu uhlíkov (stupeň HOMO \rightarrow LUMO excitácie *p*-elektrónov) je v dôsledku sterického efektu týchto substituentov významne zmenšený.

Problém 7 Vysvetlite zmenu chemického posunu karbonylovej skupiny so zmenou veľkosti substituentu *R*.



3.2.2.5 Vodíkové väzby

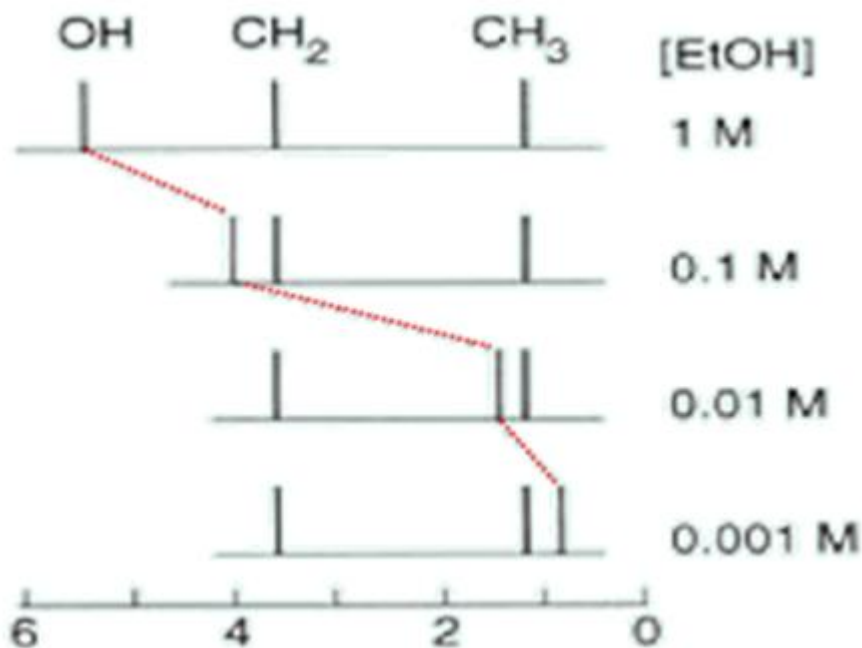
Chemické posuny protónov OH a NH sa menia v širokom rozsahu v závislosti od štruktúry látky, rozpúšťadla, teploty a koncentrácie. Zmeny sú veľmi silne ovplyvnené vodíkovými väzbami, pričom vodíková väzba zvyšuje chemický posun v porovnaní chemickým

posunom voľných skupín. Najväčšie chemické posuny OH skupín sa pozorujú v molekulách so silnou intramolekulovou vodíkovou väzbou



Obr. 39 Príklady vysokých chemických posunov vodíkov v OH skupine viazanej intramolekulovou vodíkovou väzbou. Vľavo: kyselina salicylová Vpravo: 4-hydroxy-3-pentén-2-ón.

Chemický posun protónov OH a NH sa taktiež zvyšuje s koncentráciou látok a to kvôli zvýšenému výskytu medzimolekulových vodíkových väzieb. Chemický posun OH aj NH signálov sa kvôli tvorbe vodíkových mostíkov zvyšuje v rozpúšťadlách, ako je DMSO alebo acetón. Naopak v rozpúšťadlách, kde možnosť vodíkových mostíkov je potlačená (CDCl_3 , CD_3CN ,...) chemický posun OH a NH vodíkov klesá so stupňom zriedovania analytu.

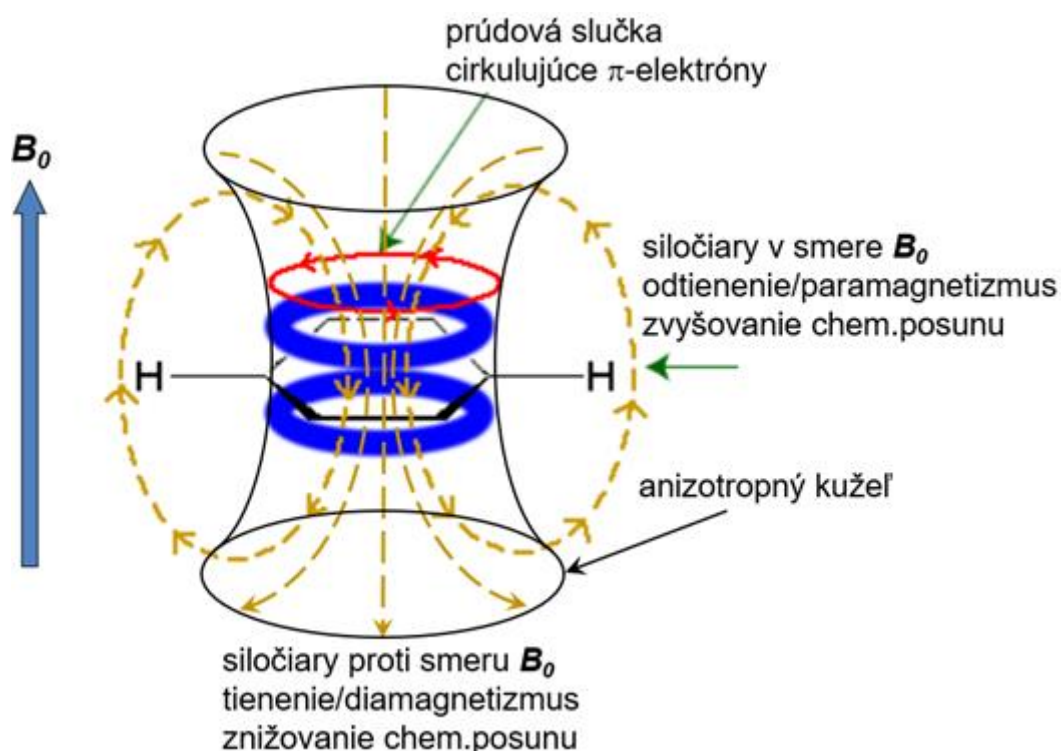


Obr. 40 Ukážka zmeny chemického posunu OH skupiny etanolu pri riedení vzorky bez možnosti tvorby vodíkových mostíkov.

3.2.2.6 Efekt elektrónov na susedných väzbách – magnetická anizotropia

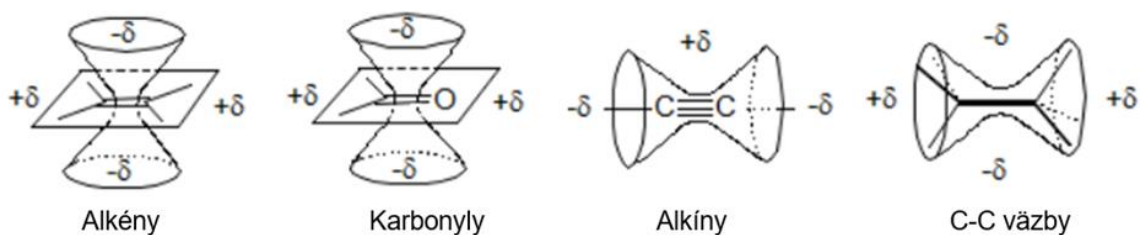
Zatiaľ čo lokálna cirkulácia elektrónov na atóme vodíka má jednoznačne tieniaci efekt (zníženie chemického posunu), cirkulácia elektrónov v iných častiach molekuly môže vykazovať dva opačne efekty – diamagnetický (tieniaci) i paramagnetický (znížovanie tienenia). Závisí to od vzájomnej polohy (orientácie i vzdialenosti) vodíka a danej elektrónovej slučky. Pre túto závislosť od polohy sa efekt označuje ako anizotropný.

Najväčší anizotropný efekt vykazujú štruktúry s konjugovaným systémom dvojitých väzieb ako je to v benzéne a iných aromatických kruhoch. Anizotropný efekt (aj keď menší) vykazujú aj iné štruktúrne fragmenty, a to najmä tie, ktoré obsahujú násobné väzby. Indukované pole má dipólový charakter a jeho priestorové zobrazenie sa vyjadruje pomocou anizotropného kužeľa. Cirkulácia π -elektrónov v benzénovom jadre je najintenzívnejšia ak je rovina jadra orientovaná kolmo na B_0 . V iných orientáciách je cirkulácia π -elektrónov zanedbateľná, a preto je spriemernený anizotropný efekt aromatického jadra determinovaný najmä jeho efektom v tejto orientácii. Na nasledujúcom obrázku je znázornené indukované magnetické pole cirkulujúcich π -elektrónov benzénového jadra. Tieniaci efekt tohto poľa (diamagnetická zóna) je vo vnútri kužeľa anizotropie; odtieňovací efekt (paramagnetická zóna) mimo kužeľa anizotropie.

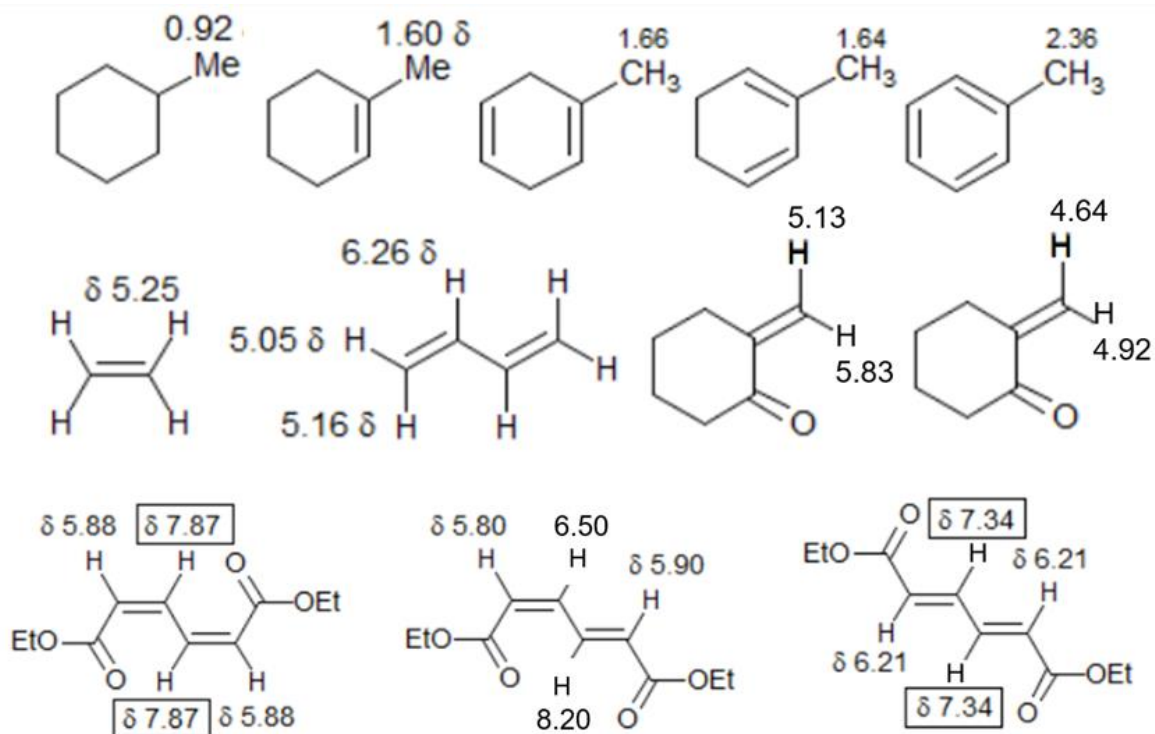


Obr. 41 Magnetické pole prúdovej slučky p -elektrónového systému benzénového jadra indukované poľom B_0 . Pole má anizotropný charakter, pričom jeho diamagnetickú a paramagnetickú zónu vymedzuje anizotropný kužeľ.

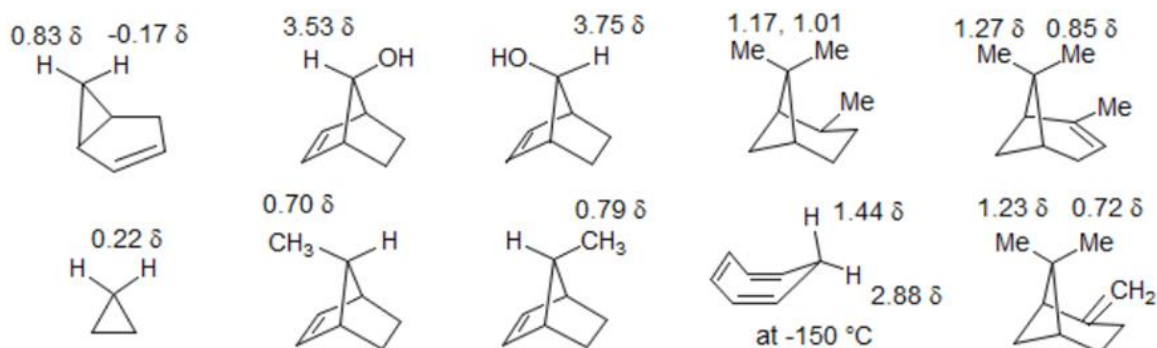
Na nasledujúcich obrázkoch sú znázornené anizotropné kužele niektorých základných väzieb (Obr. 42) ako aj anizotropný efekt alkénovej a karbonylovej dvojnej väzby na chemické posuny okolitých vodíkov (Obr. 43).



Obr. 42 Anizotropné kužele niekoľkých skupín a väzieb. $+\delta$ označuje paramagnetický efekt (zvýšenie frekvencie, zníženie tienenia), $-\delta$ označuje diamagnetický efekt (zníženie frekvencie, zvýšenie tienenia)

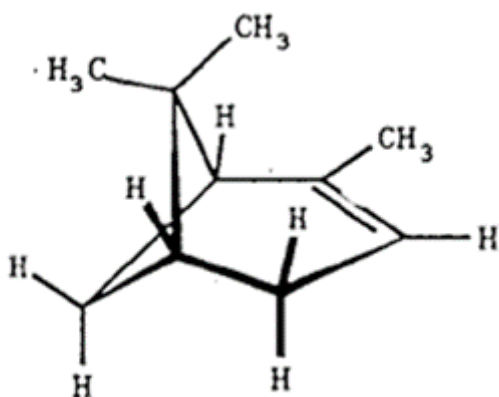


Obr. 43 Paramagnetický anizotropný efekt v rovine alkenickej a karbonylovej dvojnej väzby. (Prevzaté z Prof. Hans Reich Collection: NMR Spectroscopy :: 5-HMR-2 Chemical Shift (organicchemistrydata.org))

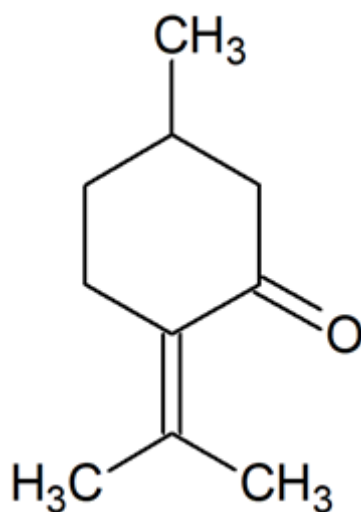


Obr. 44 Diamagnetický anizotropný efekt nad rovinou alkenickej dvojnej väzby. (Prevzaté z Prof. Hans Reich Collection: NMR Spectroscopy :: 5-HMR-2 Chemical Shift (organicchemistrydata.org))

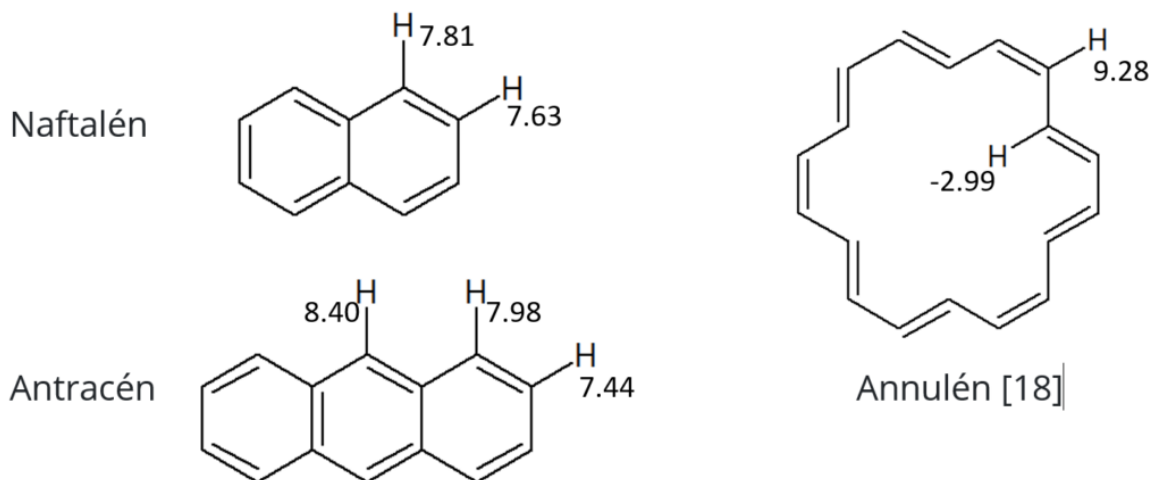
Problém 8 Tri metylové skupiny v α -pinéne majú v ^1H NMR spektre chemické posuny: 0,85; 1,27 a 1,63 ppm. Na základe vyhodnotenia efektu chemickej anizotropie dvojnej väzby rozlíšte jednotlivé signály.



Problém 9 ^1H NMR chemický posun dvoch metylových skupín na dvojnej väzbe v molekule pulegonu je 1,77 a 1,95 ppm. Na základe vyhodnotenia efektu chemickej anizotropie karbonylovej skupiny rozlíšte signály týchto skupín.



Problém 10 Vysvetlite rozdiely v ^1H NMR chemických posunoch rôzne lokalizovaných vodíkov v nasledujúcich aromatických uhľovodíkov



3.2.3 J-interakcie, spinové systémy a multipletová štruktúra signálov

Medzi dvojicou NMR aktívnych spinov (označme ich A a X) existujú 2 typy vzájomných magnetických interakcií: priama, prenášaná cez priestor (dipól-dipólová interakcia: D) a nepriama (skalárna) prenášaná (väčšinou) cez väzbové elektróny (spin-spinová interakcia: J). D interakcia je rádovo väčšia ako J interakcia. Prílišná veľkosť D interakcií spôsobuje zložitosť NMR spektier vzoriek v tuhej (kryštalická, amorfná) alebo kvapalno-kryštalickej fáze. Avšak v kvapalnej fáze rýchly izotropný tepelný pohyb molekúl spriemerní D interakcie na nulu. D -interakcie sa preto v kvapalnej fáze priamo prejavujú iba ovplyvňovaním pološírky spektrálnych čiar. Významný je však nepriamy prejav cez tzv. Nukleárny Overhauserov efekt (noe).

Na rozdiel od D -interakcií, skalárne J -interakcie od orientácie molekúl závisia oveľa menej takže ani rýchly izotropný tepelný pohyb ich nespriemerní na nulu ale na nenulovú hodnotu rovnú veľkosti interakčnej konštanty J . Preto ich prejav je v kvapalných vzorkách viditeľný a to vo forme multipletovej štruktúry signálov.

Skalárna interakcia J je interakcia cez väzbu, v ktorej spin jedného jadra (A) narúša (polarizuje) spin elektrónov v jeho okolí. Polarizácia sa cez väzbové elektróny prenáša na susedné spiny (X). To vedie k zmene (zníženiu alebo zvýšeniu) energie susedného jadra (X) v závislosti od stavu prvého spinu (A) a spôsobu prenosu polarizácie. Veľkosť tejto nepriamej interakcie medzi spinmi sa vyjadruje interakčnou konštantou J_{AX} , ktorá je nezávislá od poľa B_0 (preto sa vždy vyjadruje v Hz). Interakcia medzi spinmi sa prenáša rovnakým spôsobom oboma smermi preto platí $J_{AX} = J_{XA}$. J -interakcia spôsobuje štiepenie NMR signálov, ich multipletovú štruktúru.

J -interakcia sa zvyčajne prenáša cez väzbové elektróny a jej veľkosť rýchlo klesá s počtom intervenujúcich väzieb. Multipletovú štruktúru NMR signálov zvyčajne určujú interakcie cez jednu (označenie: $^1J_{AX}$), dve ($^2J_{AX}$) a tri ($^3J_{AX}$) väzby. Občas (najmä v štruktúrach s dvojítmymi a trojitými a aromatickými väzbami) sa prejaví aj interakcie cez 4, 5 alebo aj viac väzieb ($^4J_{AX}$, $^5J_{AX}$, ..), ktoré je zvykom označovať ako interakcie ďalekého dosahu $^nJ_{AX}$.

J_{AX} konštanta môže mať kladné alebo záporné znamienko: $J_{AX} > 0$ ak energia spinu A sa v dôsledku A-X interakcie zníži vtedy ak spin X má opačnú orientáciu ako spin A ; $J_{AX} < 0$ má opačný efekt. Podobne ako veľkosť aj znamienko J_{AX} závisí okrem iného aj od počtu väzieb medzi A a X spinmi. Tak napr. priama, jednoväzbová interakcia medzi H -C je vždy kladná ($^1J_{AX} > 0$), dvojjväzbové H-H interakcie na sp^3 -uhlíkov sú väčšinou záporné ($^2J_{AX} < 0$) a trojjväzbové H-H a H-C interakcie takmer vždy kladné ($^1J_{AX} > 0$).

Multipletová štruktúra je vo všeobecnosti veľmi zložitá a závisí jednak od počtu a celkového spinu interagujúcich jadier, veľkosti interakčných konštánt medzi spinmi ako aj od rozdielov v chemických posunov interagujúcich jadier. V nasledujúcom sa obmedzíme na interagujúce spiny so spinovým číslom $I = 1/2$.

3.2.3.1 Spinové systémy

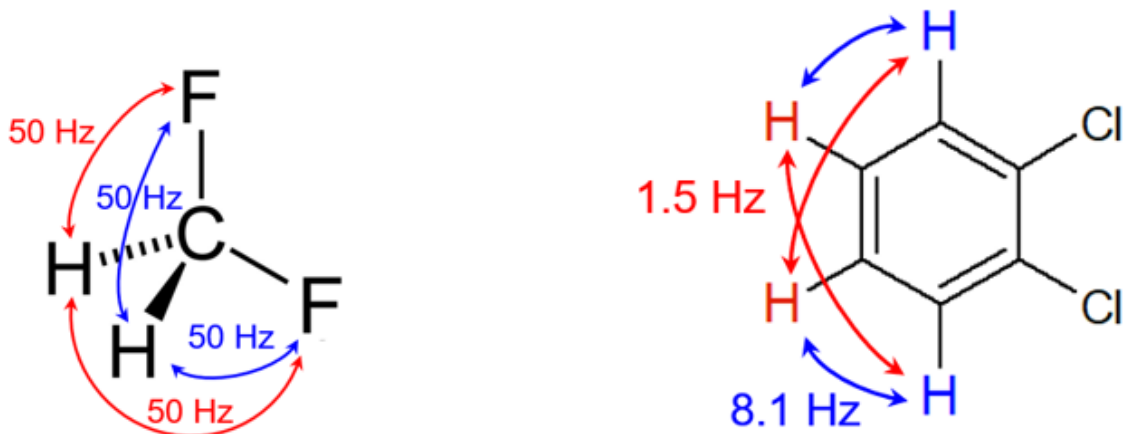
Pre charakterizáciu NMR spektier je vhodné definovať okruh spinov, navzájom prepojených do jedného celku J -interakciami. Skupinu spinov, ktoré do toho okruhu patria nazývame spinový systém. Spiny z jedného spinového systému nemajú žiadnu interakciu so spinmi mimo svojho systému. Jednotlivé spiny v systéme označujeme veľkými písmenami latinskej abecedy. Ekvivalentné spiny označujeme rovnakým písmenom. Poznáme 3 typy ekvivalencie. Jedna je náhodná zhoda chemického posunu dvoch alebo viacerých spinov nevyplývajúca z ich chemickej ekvivalencie. V takom prípade ich označíme rôznymi písmenami, teda ako chemicky neekvivalentné spiny. Ostatné dve ekvivalencie vyplývajú zo symetrie molekuly. Sú to chemická ekvivalencia (nižší stupeň ekvivalencie) a magnetická ekvivalencia (vyšší stupeň ekvivalencie).

Magnetická ekvivalencia: skupina chemicky ekvivalentných spinov, ktorých interakcia s ľubovoľným iným spinom alebo inou skupinou ekvivalentných spinov sa dá vyjadriť jedinou interakčnou konštantou. Skupinu n magnetický ekvivalentných spinov označíme jedným písmenom a indexom udávajúcim počet spinov v skupine, napr.: A_n .

Príklad: A_2X_2 spinový systém difluórometánu.

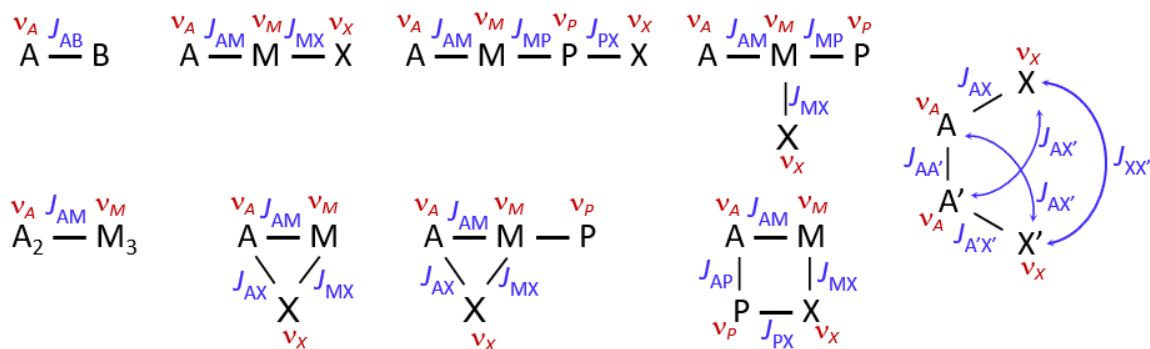
Chemická ekvivalencia: skupina chemicky ekvivalentných spinov, ktorých interakcia s spinmi patriacimi do spinového systému sa nedá vyjadriť jedinou interakčnou konštantou ale je na to potrebných viac interakčných konštánt. Každý spin skupiny chemický ekvivalentných spinov označíme rovnakým písmenom, pričom spiny v rámci skupiny rozlišujeme počtom apostrofov. Napr. skupinu 3 chemicky ekvivalentných spinov: A, A', A''..

Príklad: AA'XX' spinový systém 1,2-dichlórbenzénu.



Obr. 45 Vľavo: príklad magnetickej ekvivalencie v molekule difluórméтанu Vpravo: príklad chemickej ekvivalencie v molekule 1,2-dichlórbenzéну.

Na určenie NMR spektra spinového systému je okrem zoznamu spinov, z ktorých sa systém skladá potrebné poznať aj chemické posuny spinov a veľkosť a topológiu vzájomných J -interakcií. Najjednoduchší je spinový systém obsahujúci iba jeden izolovaný spin alebo izolovanú skupinu magneticky ekvivalentných spinov (napr. protóny $-OCH_3$ skupiny). Ich spektrum (singlet) je jednoznačne určený ich chemickým posunom. Jednoznačnú topológiu má systém zložený z dvoch neekvivalentných spinov alebo skupín magneticky ekvivalentných spinov. Systémy zložené z viacerých neekvivalentných spinov (skupín magneticky ekvivalentných skupín) majú zložitejšiu topológiu (pozri Obr. 46)



Obr. 46 Topológia jednoduchých spinových systémov s vyznačením spektrálnych parametrov potrebných na určenie ich spektier. V $AA'XX'$ systéme, v dôsledku jeho symetrie $J_{AX}=J_{A'X'}$ a $J_{A'X}=J_{AX'}$.

Znalosť všetkých parametrov spinového systému (počtu spinov, ich chemických posunov a interakčných konštánt) umožňuje vypočítať jeho spektrum metódami kvantovej teórie. Hamiltonián, ktorý je v kvantovej teórii operátor energie má pre NMR systémy v kvapalnej fáze (izotropnom prostredí) veľmi jednoduchý tvar. Je zložený z dvoch členov. Prvý vyjadruje príspevok od chemického posunu spinov a druhý príspevok od ich vzájomných J -interakcií.

$$H = -\sum_i v_i I_{z,i} + \sum_{i < j} J_{ij} \mathbf{I}_i \cdot \mathbf{I}_j$$

kde indexy i a j idú cez všetky spiny v systéme. Výpočet v sebe zahŕňa nájdenie vlastných energií a vlastných stavov operátora energie H a následne výpočet intenzity jednotlivých povolených spektrálnych prechodov.

V závislosti od konkrétnych spektrálnych parametrov ($\nu_i, J_{i,j}$) spektrá môžu byť rôzne komplikované. Veľmi komplikované spektrá (označujú sa aj ako spektrá vyššieho poriadku) je možné simulovať, resp. analyzovať len pomocou kvantovo-mechanického výpočtu. Takéto spektrá boli v minulosti často získavané na spektrometroch s nízkou pracovnou frekvenciou (60-100 MHz pre protóny). Súviselo to s malou disperziou (malými rozdielmi chemických posunov vyjadrenými v Hz) spektier pri nízkych magnetických poliach B_0 .

Väčšina ^1H NMR spektier organických látok nameraná na súčasných moderných NMR spektrometroch (vysoké B_0) má však charakter relatívne jednoduchých, dobre predvídateľných a ľahko analyzovateľných spektier. Takéto spektrá (označujú sa aj ako spektrá 1. poriadku) poskytujú tzv. slabo interagujúce spiny, pre ktoré platí, že J -interakcie medzi spinmi sú vzhľadom na rozdiely ich chemických posunov relatívne malé.

Slabo interagujúce spiny: Za slabo interagujúce spiny A a X považujeme spiny, pre ktoré absolútna hodnota rozdielu ich chemických posunov $\Delta\nu_{AX} = (\nu_A - \nu_X)$ vyjadrená v Hz je oveľa väčšia ako absolútna hodnota ich vzájomnej interakčnej konštanty J_{AX} , čiže ak pomer $|\Delta\nu_{AX}/J_{AX}|$ je veľké číslo.

Z teoretického hľadiska pri „slabej interakcii“ ide o tzv. sekulárnu (alebo X-) aproximáciu hamiltoniánu, pri ktorej sa J -interakcia medzi spinmi vyjadří iba ako interakcia zložiek vektorov spinov. To znamená, že v druhom člene hamiltoniánu sa skalárny súčin vektorov nahradí súčinom ich z-zložiek:

$$J_{i,j} \mathbf{I}_i \cdot \mathbf{I}_j = J_{i,j} (I_{xi} I_{xj} + I_{yi} I_{yj} + I_{zi} I_{zj}) \rightarrow J_{i,j} I_{zi} I_{zj}$$

Vynechané príspevky $J_{i,j} (I_{xi} I_{xj} + I_{yi} I_{yj})$ patria k nediagonálnym prvkom matice Hamiltoniánu. Tieto elementy sú zodpovedné za vzájomné zmiešavanie stavov interagujúcich spinov. Inými slovami nediagonálne príspevky spôsobujú, že spiny do určitej miery (závislej od sily vzájomnej interakcie) strácajú svoju vlastnú nezávislosť/individualitu a správajú sa ako zložitejšie systémy (dvojice, skupiny,..), ktorých správanie je intuitívne ťažko predpokladať. Toto zmiešavanie stavov je hlavnou príčinou zložitosti niektorých NMR spektier (spektrá vyššieho poriadku)

Ak pomer je $|\Delta\nu_{AX}/J_{AX}|$ veľké číslo potom príspevok nediagonálnych zložiek hamiltoniánu k energií spinov je malý a možno ho zanedbať. Spiny sa potom považujú za slabo interagujúce spiny, ktoré si počas NMR experimentov zachovávajú svoju identitu (nezávislosť). Vývoj spinových systémov zložených iba zo slabo interagujúcich spinov je počas NMR experimentoch ľahšie manipulovateľný (selektívne excitácia, dekapling,..). Výsledné spektrá sú prehľadnejšie a ľahšie analyzovateľné. S rastom poľa B_0 splnenie podmienky slabej interakcie medzi spinmi rastie, čiže s B_0 rastie aj efektívnosť NMR experimentov a kvalita spektier (rozlíšenie, menej artefaktov,..).

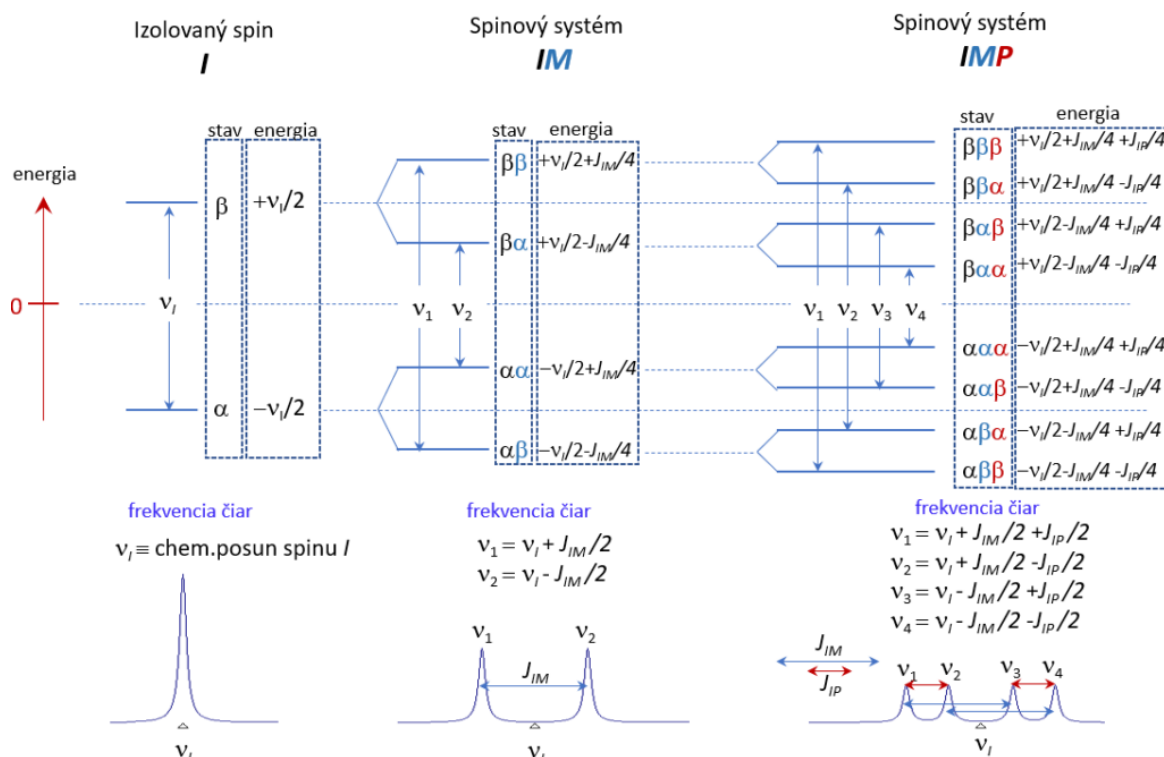
Slabo interagujúce spiny označujeme veľkými písmenami, ktoré sú v latinskej abecede od seba oddelené inými písmenami (nie sú susedné).

- dvoj-spinové systémy: AX alebo AM,...

- troj-spinové systémy: AMX, AM₂,...
- štvor-spinové systémy: AMPX, AM₂P, AX₃, AA'XX'..

Spektrá 1. poriadku poskytujú spinové systémy zložené iba zo slabo interagujúcich spinov. Patria sem napríklad všetky spinové systémy uvedené v predchádzajúcom odstavci okrem systému AA'XX', ktorý obsahuje skupiny chemicky ekvivalentné spiny. Spektrá 1. poriadku sa vyznačujú tým, že signály v nich obsiahnuté majú jednoduchú symetrickú štruktúru s dobre definovanými intenzitami spektrálnych čiar. Počet a intenzita spektrálnych čiar v multiplete spinu I , patriaceho do systému slabo interagujúcich spinov sa dá jednoducho odvodiť z diagramu jeho povolených energetických stavov (Obr. 47).

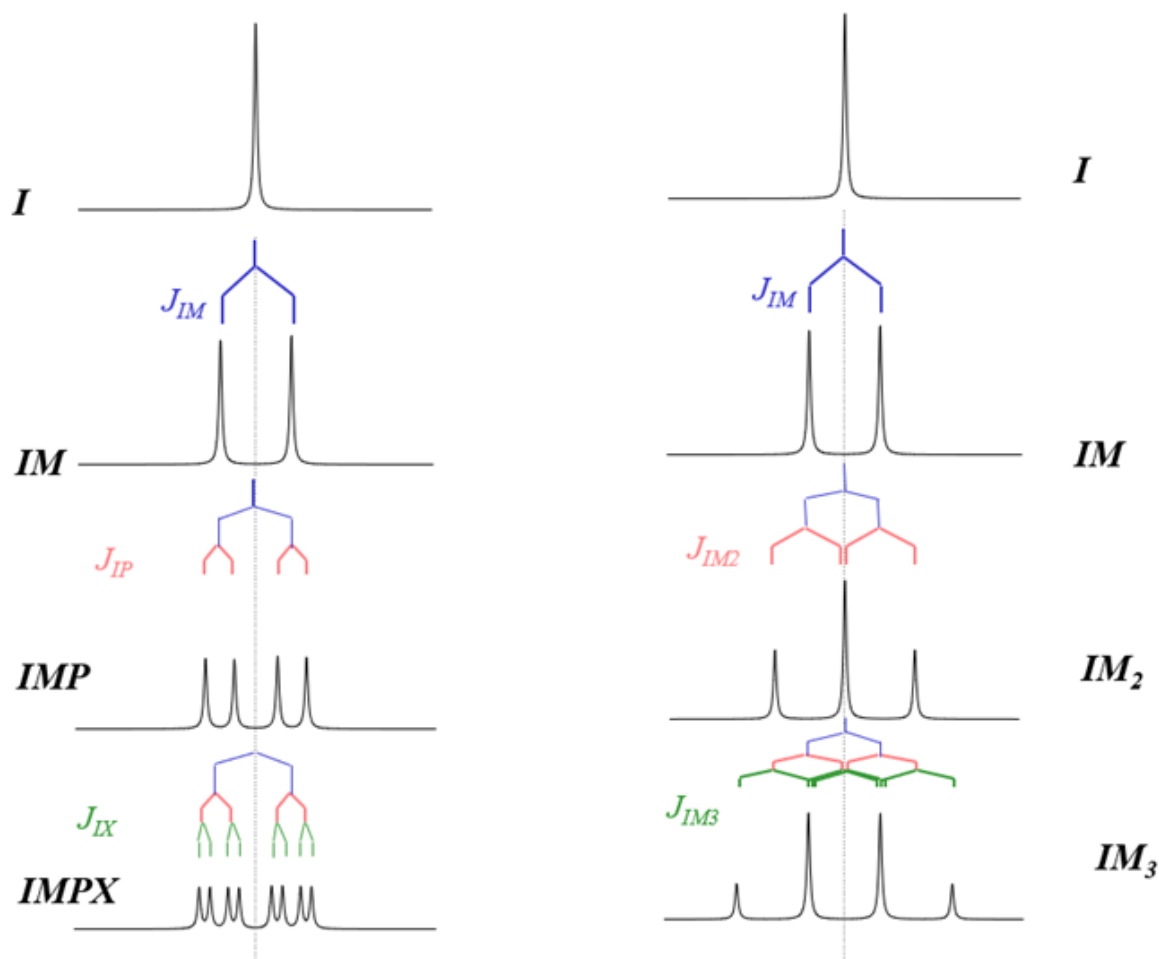
Pre izolovaný spin I existujú iba 2 stavy s dobre definovanou energiou (α a β). Koherencia, ktorá vznikne z týchto stavov má frekvenciu danú chemickým posunom ν_I . V dvojspinovom IM systéme každá energetická hladina spinu I zmení svoj stav v dôsledku interakcie so spinom M o hodnotu $+J_{IM}/4$ alebo $-J_{IM}/4$, v závislosti od znamienka interakčnej konštanty a stavu spinu M . Keďže oba stavy spinu M (α a β) sú rovnako pravdepodobne obe možnosti sa realizujú s rovnakou pravdepodobnosťou. Z pôvodnej hladiny vzniknú 2 nové so zmenenou energiou. Počet stavov s dobre definovanou energiou spinu I sa účinkom spinu M preto zdvojnásobí. Vznik nových stavov je príčinou, že po excitácii spinov môžu vzniknúť 2 rozdielne koherencie prislúchajúce spinu I : $\alpha\beta \leftrightarrow \beta\beta$ a $\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\alpha$ (prvý symbol označuje stav spinu I , druhý stav spinu M). Vidíme, že v týchto koherenciách je aktívny (zmiešavanie stavov α a β) iba spin I . Druhý spin M svoj stav nemení (pasívny spin). Pretože populácia oboch stavov pasívnych spinov je prakticky rovnaká, intenzita oboch koherencií je rovnaká.



Obr. 47 Energetický diagram spinu I v I , IM a IMP spinových systémov s vyznačením stavov s dobre definovanou energiou, hodnotami energií týchto stavov a frekvenciami čiar v signáli aktívneho spinu I . Tvar signálu spinu I označujeme: pri izolovanom spine I ako singlet (s); pri IM systéme ako dublet (d) a pri IMP systéme ako dublet dubletu (dd).

Pre väčšie spinové systémy slabo interagujúcich spinov spinovým číslom $I=1/2$ možno energetickú schému a tým aj multipletovú štruktúru aktívneho spinu určiť podobným spôsobom ako pre to je ukázané na Obr. 47 pre spin I v IMP systéme. Vychádza sa vždy z jednospinového systému (izolovaný spin I) a postupne sa pridáva interakcia pasívnych spinov. Každý ďalší pasívny spin zdvojnásobí počet možných stavov aktívneho spinu. Multiplet spinu I vytvárajú iba koherencie aktívneho spinu, v ktorých pasívne spiny zostávajú v nezmenenom stave. Pri n -pasívnych spinov má aktívny spin v multiplete 2^n spektrálnych čiar. Jeho tvar sa dá vo všeobecnosti charakterizovať ako *dublet dublet...dubletu* (*ddd..d*). Multiplet je vždy symetrický okolo svojho streda, ktorý leží na chemickom posune ν_I . Každá interakcia I s pasívnym spinom M, P, \dots sa prejaví existenciou dvojice (dvojíc) spektrálnych čiar navzájom frekvenčne separovaných o hodnotu J_{IM}, J_{IP}, \dots . Samozrejme málokedy všetky čiary *ddd..d* multipletu je možné v spektre rozlíšiť. Hlavnou príčinou je nedostatočné rozlíšenie NMR signálov spôsobené relatívne malými rozdielmi v hodnote interakčných konštánt J_{IM}, J_{IP}, \dots a nenulovou šírkou spektrálnych čiar. Ďalšou príčinou, nezávislou od rozlíšenia spektrálnych čiar, sú interakcie s magneticky ekvivalentnými spinmi. Rovnaká interakcia so všetkými členmi magneticky ekvivalentnej skupiny spinov spôsobí, že v energetickej schéme aktívneho spinu vzniknú viacnásobne degenerované hladiny (prislúchajúce súčasne viacerým stavom). Napr. ak by boli v 3-spinovom IMP systéme spiny MP ekvivalentné ($IMP \rightarrow IM_2, J_{IM} = J_{IP}$), potom by hladiny $\alpha\beta\alpha$ a $\beta\alpha\beta$ mali rovnakú energiu. Podobná rovnosť by platila aj pre hladiny $\alpha\beta\alpha$ a $\alpha\alpha\beta$. Dôsledkom by bolo, že koherencie $\beta\beta\alpha \leftrightarrow \alpha\beta\alpha$ a $\beta\alpha\beta \leftrightarrow \alpha\alpha\beta$ by mali rovnakú frekvenciu a v spektre by sa prekrývali, v dôsledku čoho by intenzita ich spoločnej spektrálnej čiary mala dvojnásobnú intenzitu. Multiplet by mal vzhľad tripletu s intenzitami 1:2:1.

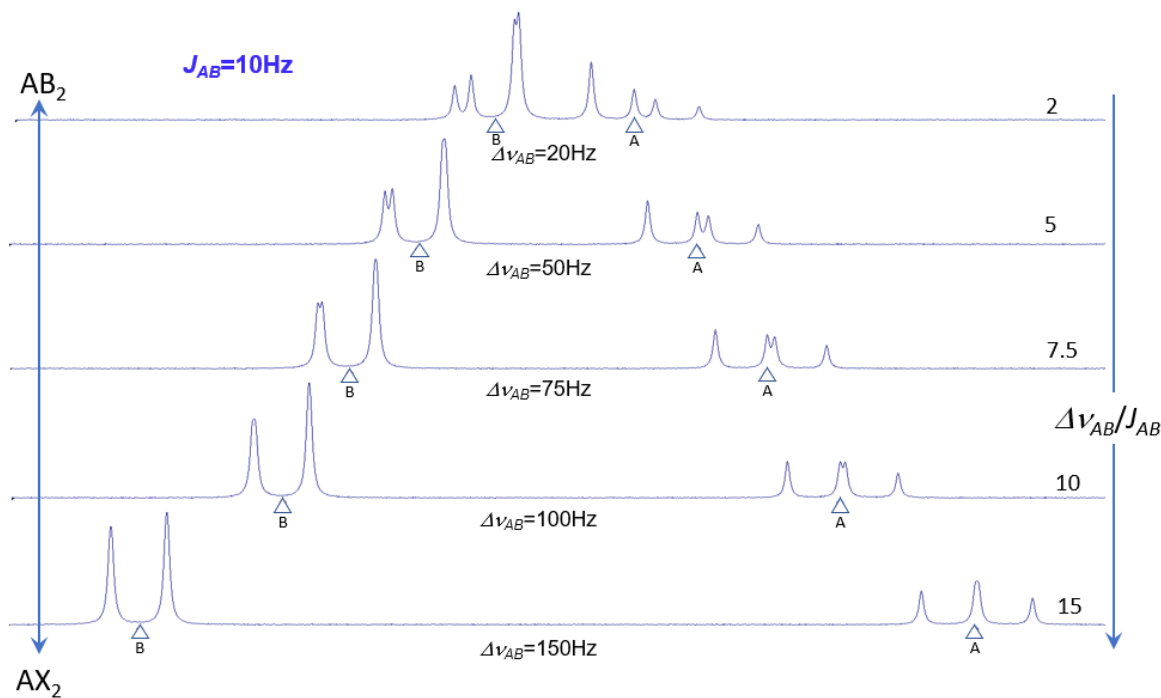
Vo všeobecnosti skupina n ekvivalentných spinov štiepi všetky už existujúce spektrálne čiary spinu I (vzniknuté v dôsledku interakcie s inými spinmi, s ktorým je v interakcii) na $n+1$ čiarový multiplet s intenzitami čiar úmernými binomickým koeficientom: $\binom{n}{0}, \binom{n}{1}, \binom{n}{2}, \dots, \binom{n}{n}$. V literatúre sa často uvádza alternatívne vyjadrenie: intenzity úmerné koeficientom $(n-1)$ riadku Pascalovho trojuholníka.



Obr. 48 Multiplety 1. poriadku pre spin I , v rôznych spinových systémoch. Postupne budovanie multipletu spinu I pre interakciu s tromi neekvivalentnými (vľavo) a tromi ekvivalentnými spinmi (vpravo).

Aj keď je štruktúra multipletov 1. poriadku je veľmi jednoduchá ich vzhľad môže byť komplikovaný a ich analýza zložitá. Príčinou môže byť prekryv viacerých čiar a to v dôsledku existencie podobnosti (totožnosti) viacerých interakčných konštánt a nenulovej šírky spektrálnych čiar.

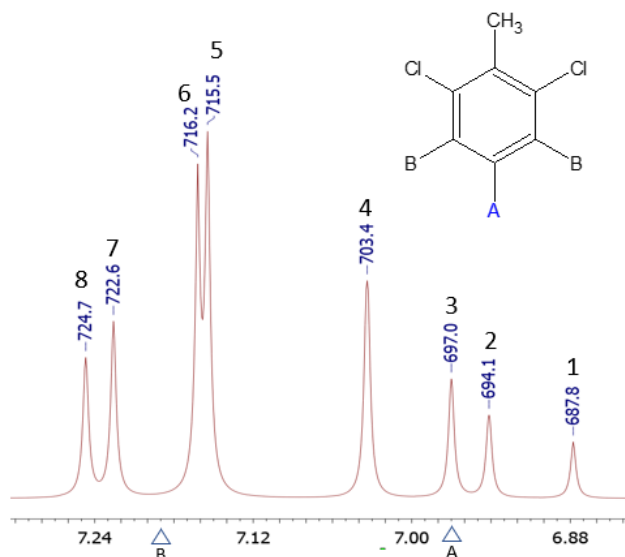
Podmienka slabej interakcie je striktné splnená iba pre heteronukleárne dvojice spinov, napr. pre ^1H a ^{19}F spiny v di-fluórméthane. Pre homonukleárne ^1H systémy interakcie medzi spinmi vždy spôsobujú odchýlku od ideálnych spektier 1. poriadku. Ak $|\Delta\nu_{\text{AX}}/J_{\text{AX}}| > 8-10$ je to iba malá odchýlka v intenzite spektrálnych čiar od predpokladanej intenzity. Pre menšie hodnoty $|\Delta\nu_{\text{AX}}/J_{\text{AX}}|$ sú odchýlky intenzít výraznejšie a v spektre sa začínajú objavovať ďalšie (kombinačné) čiary. Pri hodnote $|\Delta\nu_{\text{AX}}/J_{\text{AX}}| \sim 3$, signály interagujúcich spinov strácajú podobnosť so signálmi slabo interagujúcich spinov a na ich analýzu je potrebné použiť formalizmus kvantovej mechaniky. Na Obr. 49 je ukázaný efekt sily interakcie medzi neekvivalentnými spinmi v AB_2 spinovom systéme. Vidíme, že pri hodnote $|\Delta\nu_{\text{AB}}/J_{\text{AB}}| > 10$ spektrum sa veľmi dobre podobá na predpokladané spektrum AX_2 systému. Najviac viditeľnou odchýlkou je nerovnosť intenzít v dublete prislúchajúcemu X spinom. Podobnosť s AX_2 typom spektra sa už úplne stráca pri hodnotách $|\Delta\nu_{\text{AX}}/J_{\text{AX}}| \sim 5$.



Obr. 49 Simulované ^1H NMR spektrá AB_2 spinového systému pre rôzne hodnoty pomeru $|\Delta\nu_{\text{AB}}/J_{\text{AB}}|$. $J_{\text{AX}} = 10$ Hz, pološírka spektrálnych čiar 1 Hz.

Spektrá vyššieho poriadku. Spektrá vyššieho poriadku poskytujú systémy obsahujúce spiny, ktoré nespĺňajú podmienku slabej interakcie. Patria sem aj spinové systémy, ktoré obsahujú chemicky ekvivalentné (nižší stupeň ekvivalencie). Nie všetky spiny musia navzájom vykazovať silnú interakciu, aby ich systém bol zaradený medzi silne interagujúce systémy. Stačí aby bola v silnej interakcii jedna dvojica neekvivalentných spinov. Silne interagujúce dvojice neekvivalentných spinov označujeme susediacimi písmenami z latinskej abecedy. Príklad jednoduchých systémov: AB, AB_2 , ABX, ABC, $\text{AA}'\text{XX}'$, $\text{AA}'\text{BB}'$,...

Spektrá patriace systémom silne interagujúcich spinov môžu byť veľmi komplikované. Na rozdiel od spektier 1. poriadku, multiplety v spektre vyššieho poriadku nevykazujú symetriu okolo svojho stredy, chemický posun nemusí byť v strede multipletu, multiplet môže obsahovať neočakávané spektrálne čiary. Spektrum je ovplyvnené nielen veľkosťou interakčných konštánt ale aj ich znamienkom. Multiplet aktívneho spinu je ovplyvnený nielen priamymi interakciami aktívneho spinu ale aj interakciami medzi pasívnymi spinmi. Na výpočet (simuláciu) alebo analýzu spektier vyššieho poriadku treba použiť formalizmus kvantovej mechaniky. Pre niektoré jednoduchšie systémy (AB, AB_2 , ABX, $\text{AA}'\text{BB}'$,...) sa dajú využiť zjednodušené postupy odvodené od kvantovo-mechanickej analýzy. Na Obr. 50 je ukázaný takýto postup pre AB_2 spinový systém.



Analýza pomocou počítača

- kvantová teória, počítač
- programy ACD, Mestreck,...
- AB_2 systém -špeciálny prípad:

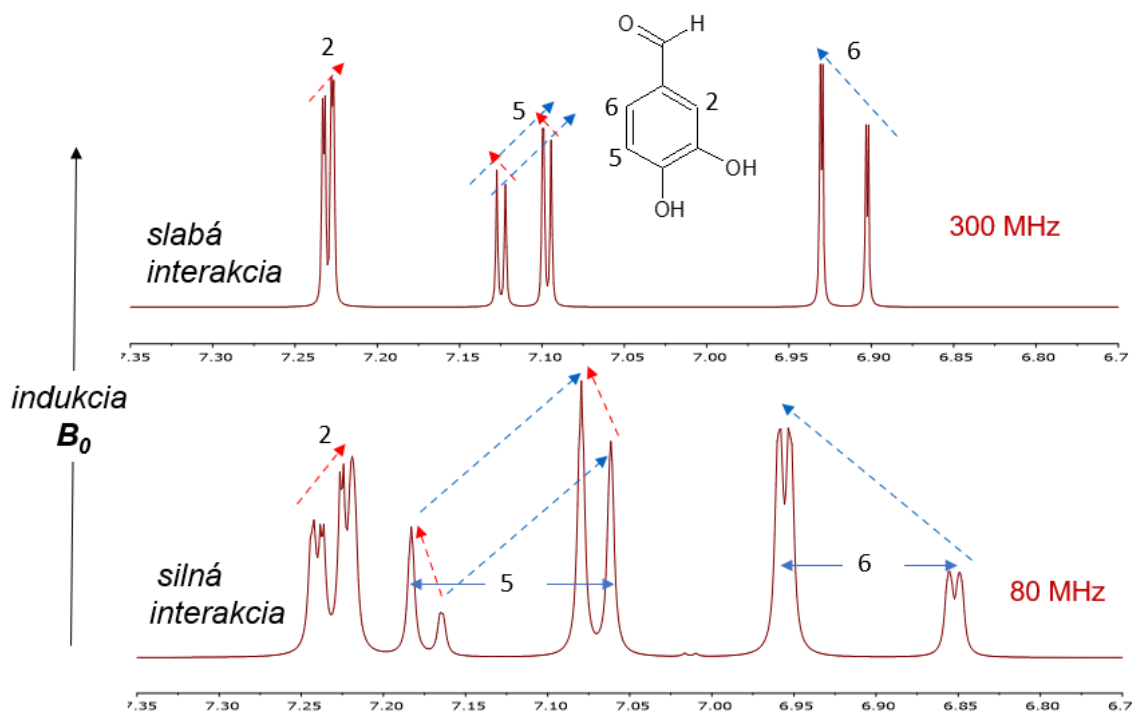
$$\nu_A = \nu_3 = 697.0 \text{ Hz}$$

$$\nu_B = (\nu_5 + \nu_7)/2 = 719.0 \text{ Hz}$$

$$J_{AB} = (\nu_1 - \nu_4 + \nu_6 - \nu_8)/3 = 8.03 \text{ Hz}$$

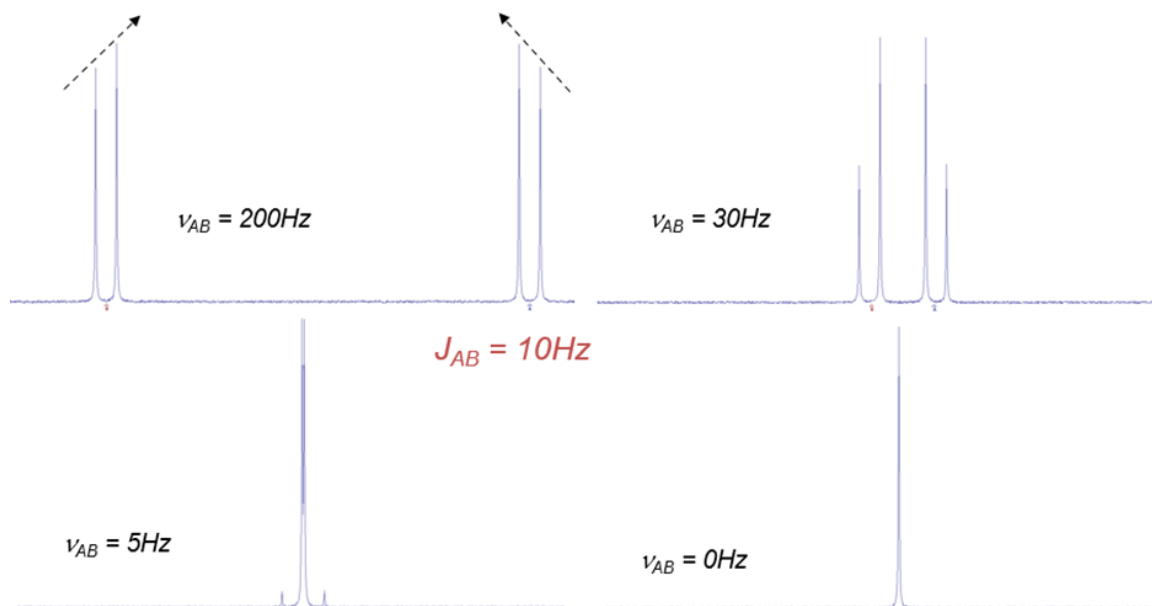
Obr. 50 Analýza ^1H NMR spektra prislúchajúceho AB_2 spinového systému vodíkov dichlórtoleúnu. Všetky spektrálne parametre systému (ν_A , ν_B , J_{AB}) boli odvodené z kvantovomechanickej analýzy.

Napriek tomu, že málokteré ^1H NMR spektra spĺňajú prísne kritérium slabej interakcie medzi spinmi, väčšina spektier (alebo aspoň ich časti) nameraných na moderných spektrometroch so supravodivým magnetom poskytuje spektrá, ktorých signály sa dostatočne podobajú na signály spektier 1. poriadku. Ako bolo spomenuté vyššie, najčastejšou odchýlkou je zmena intenzít čiar v multiplete. Táto odchýlka je známa ako „strieškový efekt“. Popri komplikáciám, ktoré spôsobuje má však aj jednu pozitívnu vlastnosť: umožňuje identifikovať dvojicu interagujúcich spinov ako je to ukázané na NMR spektre ABC spinového systému patriacemu 3 aromatickým protónom 3,4-dihydroxybenzaldehydu. Spektrum namerané pri vyššom poli sa zreteľne podobá na spektrum 1. poriadku a priradenie signálov je jednoduché. Identifikácia signálov v 80 MHz spektre môže byť na prvý pohľad komplikovaná. Medzi vodíkmi 5 a 6 je silná interakcia a medzi vodíkmi 2 a 6 slabšia interakcia. Farebné rozlíšené šípky znázorňujúce smer zmeny intenzity čiar v rámci multipletu vytvárajú striešky, ktoré jednoznačne identifikujú dvojicu spinov vo vzájomnej interakcii.



Obr. 51 ^1H NMR spektrá 3,4-dihydroxybenzaldehydu namerané na spektrometri s elektromagnetom ($B_0 = 1,88\text{ T}$; spodné spektrum) a na spektrometri so supravodivým magnetom ($B_0 = 7,05\text{ T}$; horné spektrum).

Ako už bolo spomenuté vyššie, interakcia medzi ekvivalentnými spinmi (môže ísť aj o náhodnú ekvivalenciu chemického posunu) sa v ich signáloch neprejaví. Ilustrované je to na Obr. 52 na príklade dvoch neekvivalentných spinov AB.



Obr. 52 Simulované spektra AB systému s rozličným stupňom sily interakcie spinov. Intenzita vonkajších čiar so silou interakcie klesá až nakoniec pri úplnej zhode chemických posunov zaniká.

Pre zložitejšie spinové systémy ako je AB systém, napr. pre ABX systém, pri náhodnej zhode $\nu_A = \nu_B$ hodnota J_{AB} nemá vplyv, len ak súčasne $J_{AX} = J_{BX}$, teda ak ABX sa správa ako A_2X systém.

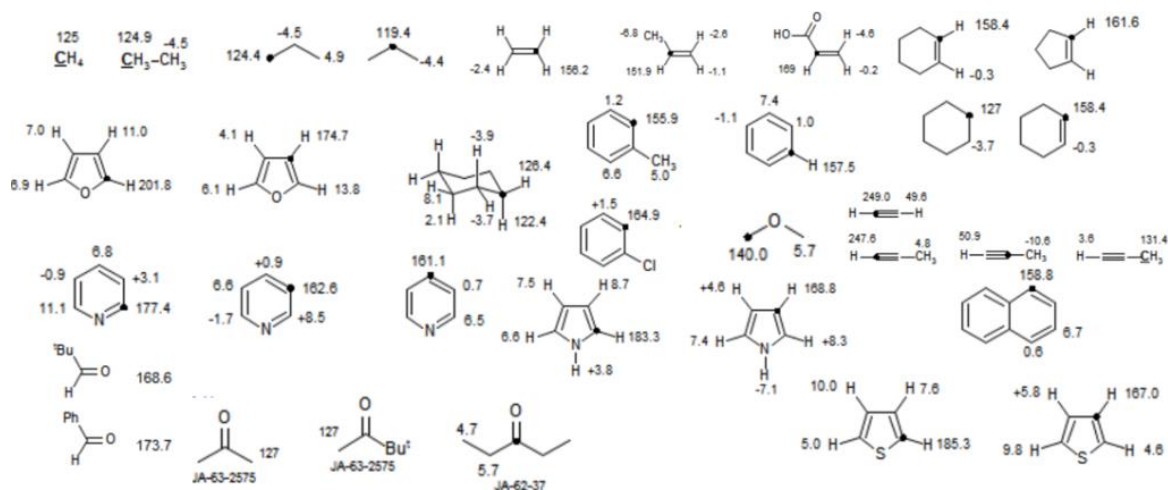
3.2.3.2 Veľkosť interakčných konštánt

Okrem informácií o susedných spinoch a ich topológií, ďalšie štruktúrne informácie, ktoré poskytujú J -interakcie možno získať z hodnôt interakčných konštánt. Najcennejšie sú informácie o konfigurácii susedných väzieb.

Vo všeobecnosti veľkosť J -interakčných konštánt klesá s počtom väzieb, ktoré oddeľujú interagujúce spiny. Najväčšie sú jednoväzbové interakcie. Z praktického hľadiska využitia NMR v organickej chémii sú to najmä interakčné konštanty $^1J_{H,C}$ medzi priamo viazanými vodíkmi a uhlíkom. Multiplety štandardných 1H NMR spektier sú najviac formované dvoj- a troj-väzbovými H-H interakciami. Ich veľkosť vyjadrujú konštanty $^2J_{H,H}$ a $^3J_{H,H}$. Interakcie cez 4 a viac väzieb sú obvykle zanedbateľné no občas sa prejavujú (najmä v štruktúrach s dvojitými a trojitými a aromatickými väzbami). Je zvykom označovať ako interakcie ďalekého dosahu (označenie $^nJ_{AX}$).

3.2.3.2.1 Jednoväzbové interakčné konštanty.

V štandardných 1H NMR spektrách sa interakcie $^1J_{H,C}$ prejavujú len v satelitných subspektrách, ktorých intenzita oproti hlavným signálom je veľmi malá ($\sim 1,1\%$) a často sú neviditeľne schované v základnej línii. $^1J_{H,C}$ sa neprejavujú ani v štandardných ^{13}C spektrách pretože sa rušia širokopásmovým dekaplingom vodíkov. $^1J_{H,C}$ najčastejšie možno pozorovať v ^{13}C spektrách s hradlovaným (gated) dekaplingom (zapnutý počas relaxácie, vypnutý počas akvizície signálu) alebo špeciálnych NMR experimentoch určených na ich meranie (J -spektrá, HSQC). Hodnota $^1J_{H,C}$ závisí najmä od hybridizácie uhlíka a elektronegativity okolitých atómov. Niektoré typické hodnoty sú uvedené v nasledujúcej schéme.



Obr. 53 Charakteristické J -interakčné konštanty medzi spinmi ^{13}C (označený bodkou alebo podčiarkovníkom) a 1H (označený hodnotou interakčnej konštanty). Extrahované z [NMR Spectroscopy: \$^{13}C\$ NMR Coupling Constants \(organicchemistrydata.org\)](http://www.organicchemistrydata.org).

3.2.3.2.2 Dvojvázbové interakčné konštanty.

Dvoj-vázbové (geminálne) H-(C)-H interakcie závisia komplikovaným spôsobom od štruktúry v ktorej sa fragment CH₂ nachádza. ²J_{H,H} môžu nadobúdať kladné aj záporne hodnoty v rozsahu +40 až -30Hz. Pre dve veľké skupiny látok sú však hodnoty ²J_{H,H} interakčných konštánt dobre definované. Prvou skupinou sú molekuly s sp³ CH₂ skupinami, zabudovaných v molekule bez väčších sterických interakcií, pre ktoré ²J_{H,H} ~ -12 Hz. Druhou skupinou sú molekuly obsahujúce vinylovú =CH₂ skupinu, pre ktorú ²J_{H,H} ~ +2 Hz. ²J_{H,H} sú veľmi závislé od okolia CH₂ skupiny a pri cyklických zlúčeninách aj od pnutia väzieb v kruhu. Preto sú na intuitívnu interpretáciu za účelom získania štruktúrnych informácií nie veľmi vhodné a rutinné sa nevyužívajú. Na Obr. 54 sú ilustrované hodnoty v rôznych štruktúrach.

CH ₄	-12.4	CH ₂ Cl ₂	-7.5		-4 to -8		-9.5
CH ₃ SiMe ₃	-14.1	CH ₂ (CN) ₂	-20.4		-12 to -15		-8.0
CH ₃ Ph	-14.5	CH ₂ (CN)CO ₂ Et	-18.7		-12 to -15		-10 ²
CH ₃ COCH ₃	-14.9				-9 to -13		+40.2
CH ₃ COOH	-14.5				-20.8		-21.5
CH ₃ CN	-16.9				-11 to -15		
CH ₃ NO ₂	-13.2						
CH ₃ F	-9.6						
CH ₃ OH	-10.8						
CH ₃ Cl	-10.8						
CH ₃ Br	-10.2						
CH ₃ I	-9.2						

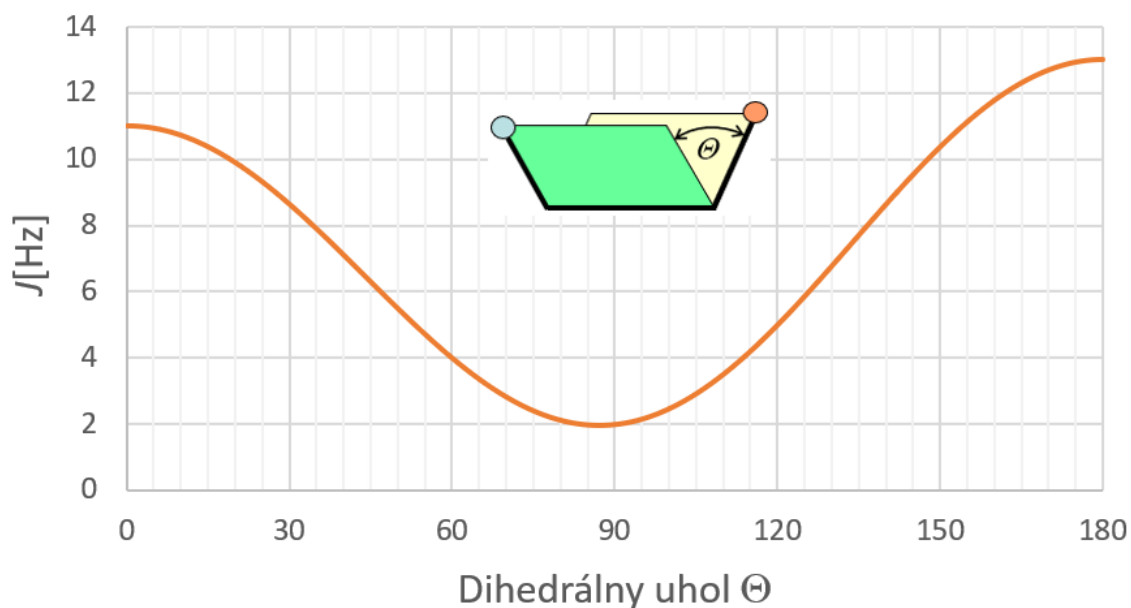
Obr. 54 Charakteristické geminálne ²J_{H,H} v rôznych štruktúrnych fragmentoch. Extrahované z [NMR Spectroscopy :: 5-HMR-4 Geminal Proton-Proton Couplings \(2JH-H\) \(organicchemistrydata.org\)](http://www.organicchemistrydata.org).

²J_{H,C} majú podobné správanie ako ²J_{H,H}. Hodnoty v niektorých základných štruktúrnych typov sú uvedené sú uvedené na Obr. 54.

3.2.3.2.3 Trojvázbové interakčné konštanty.

Trojvázbové interakcie sú z hľadiska ich využitia pri riešení štruktúry organických látok najužitočnejšie zo všetkých typov *J*-interakcií. Veľkosť ³J_{H,H} a ³J_{H,C} je dobre predpovedateľná a poskytuje informáciu o konfigurácii väzieb medzi 2 interagujúcimi spinmi. Prakticky všetky ³J_{H,H} a ³J_{H,C} sú kladné pričom amplitúda ³J_{H,H} sa kontinuálne mení (od 0 až 25 Hz) v závislosti od dihedrálneho uhla väzieb medzi interagujúcimi spinmi. ³J_{H,C} vykazujú podobnú závislosť od dihedrálneho uhla, no variácia ich amplitúdy je 2-3 krát menšia.

Závislosť ³J_{H,H} od dihedrálneho uhla Θ je v NMR literatúre podľa svojho objaviteľa pomenovaná ako Karplusova krivka (*J. Chem. Phys.* 1959, 30, 11). V súčasnosti sa viac využíva jej modifikovaná verzia (Bothner-By *Adv. Magn. Reson.* 1965, 1, 195.), ktorej matematické vyjadrenie je: ${}^3J_{H,H} = 7 - \cos\Theta + 5.\cos2\Theta$



Obr. 55 Závislosť od dihedrálneho uhla Θ , ktorý popisuje konfiguráciu väzieb medzi dvoma vicinálnymi vodíkmi (Karplusova krivka).

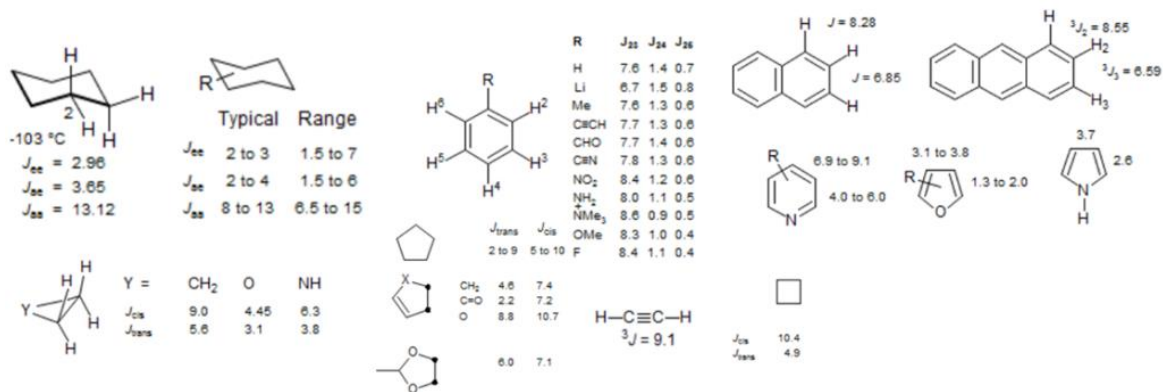
Karplusova závislosť má uplatnenie najmä pri konfiguračnej analýze substituovaných cyklických zlúčenín.

Pri malých troj a štvorčlenných kruhoch veľké pnutie väzieb do značnej miery modifikuje Karplusovú závislosť.

V päťčlenných kruhoch malá energetická bariéra medzi možnými konformáciami kruhu (obálka a twist) zasa spriemerňuje efekt vicinálnej interakcie. Podobne spriemerovanie umožňuje aj príliš flexibilná štruktúra väčších kruhov (7 členné a viac). Toto spriemerovanie komplikuje využitie Karplusovej závislosti na určovanie konfigurácie väzieb

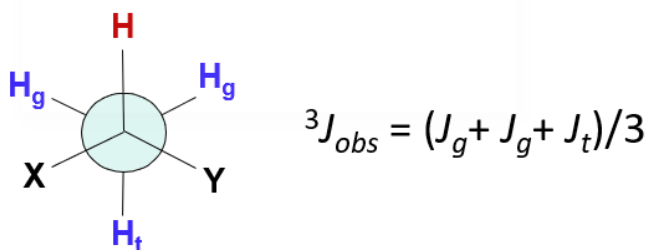
Optimálne využitie Karplusovej závislosti je v 6-členných cyklických zlúčeninách ako sú deriváty cyklohexánu a jeho heterocyklických derivátov. Pre tieto deriváty obvykle platí, že prevláda v nich stoličková forma, pre ktorú sú konfigurácie spinov vo vzájomnej vicinálnej interakcii dobre definované.

Okrem stérického efektu pnutia medzi väzbami a rýchlej výmeny medzi konformérmi veľkosť ovplyvňujú aj elektronegativita okolitých atómov a substituentov. Na obr. sú znázornené typické hodnoty $^3J_{H,H}$ na cyklohexánovom skelete ako aj typické hodnoty v aromatických a heteroaromatických zlúčeninách.



Obr. 56 Charakteristické vicinálne $^3J_{H,H}$ v rôznych štruktúrnych fragmentoch. Extrahované z [NMR Spectroscopy](http://NMR.Spectroscopy.org) :: [5-HMR-5 Vicinal Proton-Proton Coupling 3JHH \(organicchemistrydata.org\)](http://5-HMR-5.Vicinal.Proton-Proton.Coupling.3JHH.organicchemistrydata.org).

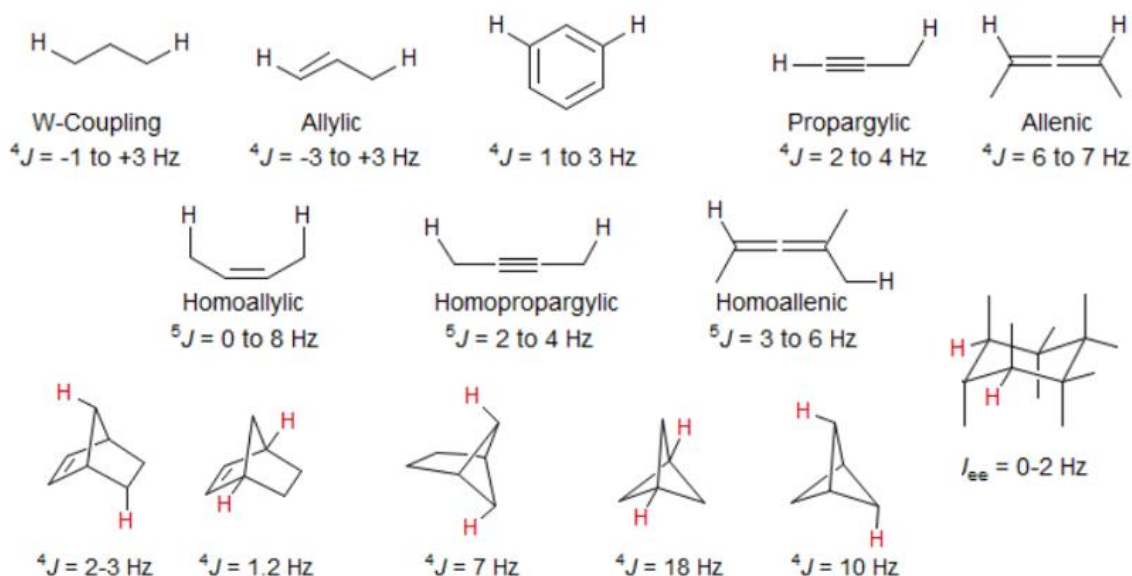
Pre lineárne alkanické štruktúry, pri ktorých dochádza k voľnej rotácii medzi 3 konformérmi (gauche-trans-gauche) sa pozoruje priemerná interakcia $^3J_{obs}$ v súlade s hodnotami predpovedanými podľa Karplusovej rovnice:



kde $J_g = ^3J_{Q=60^\circ} = ^3J_{Q=120^\circ} = 4 \text{ Hz}$ a $J_t = ^3J_{Q=180^\circ} = 13$.

3.2.3.2.4 Interakcie ďalekého dosahu

Ako interakcie ďalekého rozsahu („long-range interactions“) sa považujú interakcie cez viac ako 3 väzby. Interakčné konštanty cez 4 a viac väzieb 4J , 5J ,... spoločne označujeme tiež ako nJ . Obvykle sú tieto interakcie veľmi slabé, nJ majú hodnotu menšiu ako ^1Hz a sú v multiplotoch nerozlíšené. Výnimky sú najmä interakcie cez p-elektrónové väzby, napr. *meta*-interakcie v aromatickom jadre. 4-väzbové interakcie cez nasýtené väzby sú obvykle pozorovateľné len v cyklických zlúčeninách pri usporiadaní väzieb do tvaru písmena W. Pomerne veľké 5-väzbové interakcie sú pozorované pri prenose interakcie cez alkínové a alénové väzby.

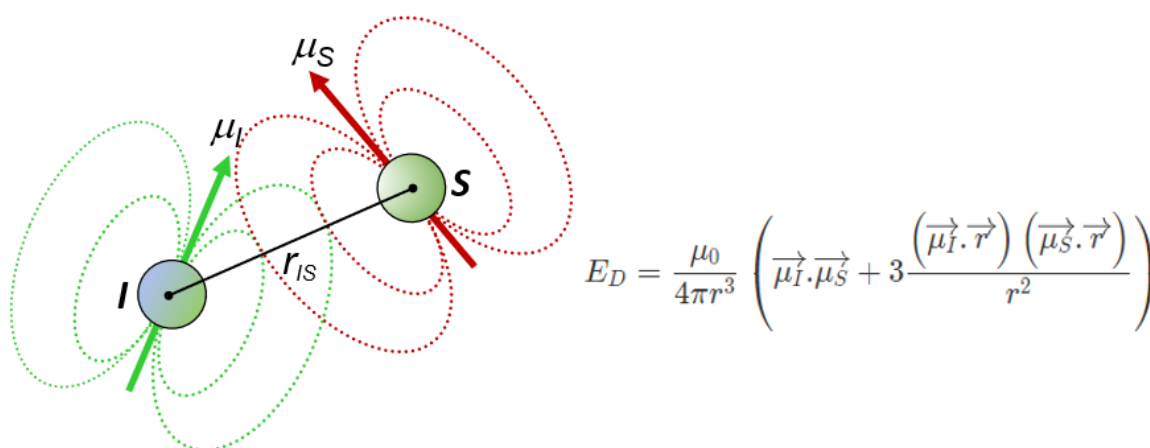


Obr. 57 Interakcie d'alekého dosahu $^4J_{H,H}$ v rôznych štruktúrnych fragmentoch. Extrahované z [NMR Spectroscopy :: 5-HMR-6 Long-Range \(4J and higher\) Proton-Proton Couplings \(organicchemistrydata.org\)](http://www.organicchemistrydata.org)

3.2.4 Dipól-dipólové interakcie

3.2.4.1 Veľkosť a vlastnosti dipól-dipólovej interakcii

Interakcie medzi magnetickými dipólmi spinov, ktoré sa prenášajú priamo cez priestor označujeme ako *D*- alebo *DD*-interakcie (od „direct“ alebo „dipól-dipól“). Na rozdiel od *J*-interakcií, pri ktorých je veľkosť interakcie medzi 2 spinmi v kvapalnej fáze vyjadrená jedným číslom (interakčnou konštantou), veľkosť *D*-interakcií má podstatne zložitejšiu závislosť od ich vzájomného priestorového usporiadania. Na obr.55 je uvedený vzťah pre energiu interakcie medzi dvojicou spinov mimo magnetického poľa.



Obr. 58 Interakcia 2 magnetických dipólov mimo vonkajšieho silového poľa. Klasicky vyjadrená energia interakcie závisí od vzdialenosti dipólov, od ich vzájomnej orientácií ako aj od orientácie každého z nich k ich spojnici r_{IS} .

Pre dvojicu spinov umiestnenú v silnom magnetickom poli sa vzťah pre energiu zjednoduší, lebo rýchla precesia spinov okolo \mathbf{B}_0 spriemerní orientácie spinov do smeru osi z . V poli \mathbf{B}_0 je orientačný člen závislý iba od orientácie vektora spojnice spinov \mathbf{r} k \mathbf{B}_0 . Zjednodušenie je väčšie pre dvojicu spinov rôzneho typu (energia interakcie závisí iba od z -zložiek spinu) ako pre homonukleárny systém (energia závisí aj od x , y – zložiek spinu). Kvantovomechanické vyjadrenie energie dipólovej interakcie dvojicu spinov (hamiltonián) v silnom magnetickom poli je:

$$H_D = d_{IS}(1 - 3\cos^2\theta) \left[I_z S_z - \frac{1}{2}(I_x S_x + I_y S_y) \right]$$

$$d_{IS} = \frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar^2}{4\pi (r_{IS})^3}$$

kde červenou farbou uvedené členy je potrebné uvažovať iba pre homonukleárne dvojice spinov.

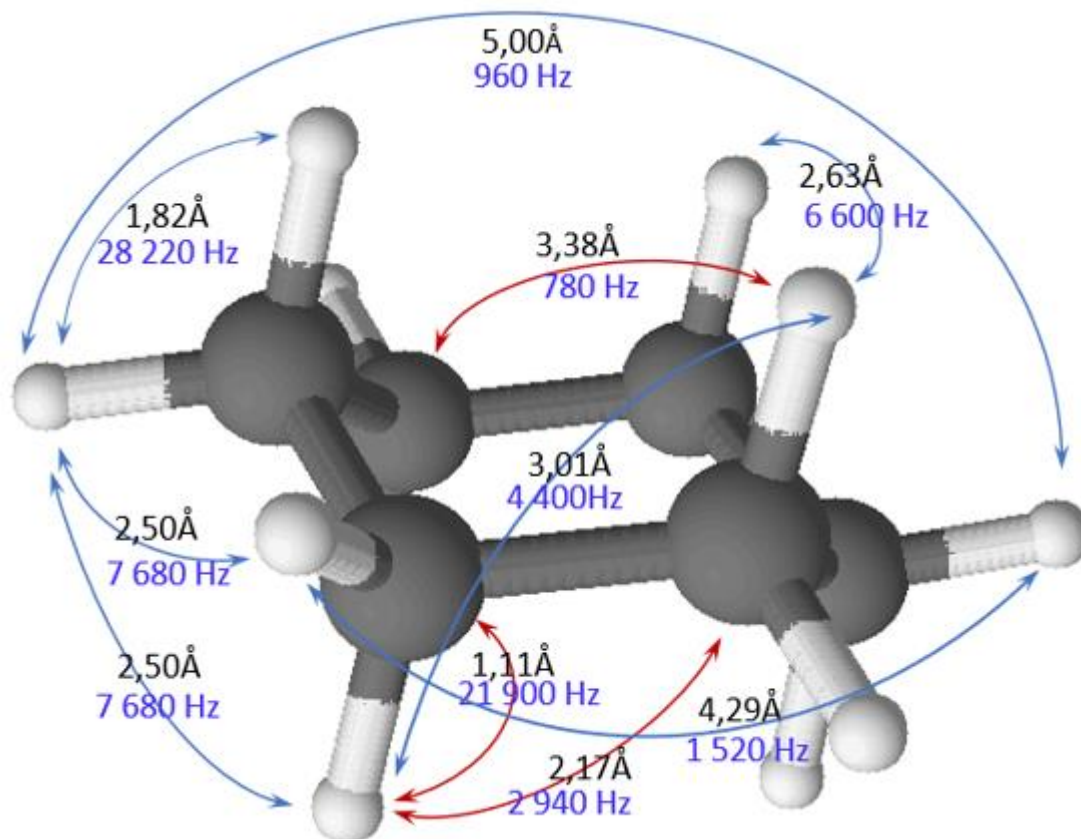
Uhol θ (0° až 180°) je uhol medzi spojnicou spinov I a S a poľom \mathbf{B}_0 . Orientačný člen $(1-3\cos^2\theta)$ môže nadobúdať hodnoty v rozsahu -2 (pre $\theta = 0^\circ$ alebo 180°) až $+1$ (pre $\theta = 90^\circ$). Pri $\theta = 54,74^\circ$ (tzv. magický uhol) sa orientačný člen rovná nule. $d_{IS} = (\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar^2) / 4\pi r_{IS}^3$ sa nazýva dipól-dipólová interakčná konštanta pričom μ_0 je permeabilita vákua ($4\pi \cdot 10^{-7} \text{ kg.m.s}^{-2} \cdot \text{A}^{-2}$), r_{IS} je vzdialenosť medzi spinmi, γ_I a γ_S sú gyromagnetické pomery spinov I a S .

Z hamiltoniánu vyplýva, že DD interakcia pre heteronukleárny IS systém sa formálne podobá na slabú J -interakciu spinov, pričom veľkosť interakcie (miesto konštanty J) vyjadruje výraz $d_{IS} (1 - \cos^2\theta)$. V spektre oboch spinov sa preto DD interakcia prejaví ako symetrický dublet s veľkosťou štiepenia $D_{IS} = d_{IS} (1 - \cos^2\theta)$.

Ako bolo povedané vyššie, pre silne interagujúcu dvojicu spinov rovnakého druhu, je potrebné do hamiltoniánu zahrnúť aj členy s x , y -zložkami spinov. To má 2 efekty: prvý, že DD interakcia sa (na rozdiel od J -interakcie) v spektre prejaví aj pre ekvivalentné spiny a druhý efekt, že veľkosť štiepenia v dublete je o 50% väčšia ako pre heteronukleárnu dvojicu spinov, čiže pre dvojicu spinov rovnakého druhu platí $D_{IS} = \frac{3}{2}d_{IS} (1 - \cos^2\theta)$. Z výrazu pre D_{IS} vidíme, že veľkosť d_{IS} číselne zodpovedá štiepeniu dubletu pre dvojicu spinov so spojnicou orientovanou kolmo na \mathbf{B}_0 ($\theta = 90^\circ$). Vidíme tiež že d_{IS} veľmi rýchle klesá so zväčšovaním vzdialenosti r_{IS} medzi spinmi I a S . V nasledujúcej tabuľke sú uvedené hodnoty d_{IS} pre vzdialenosti medzi atómami, ktoré sú v bežných molekulách (vyjadrené v angströnoch; $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$).

r_{IS} [Å]	d_{HH} [Hz]	d_{HC} [Hz]	d_{HN} [Hz]
1	120 000	30 000	12 000
2	15 000	3 750	1 500
3	4 444	1 111	444
4	1 875	469	188
5	960	240	96
10	120	30	12
20	15	2	1,5
30	4,4	1,1	0,4
40	2	0,5	0,2

Pre praktickú ilustráciu sú v nasledujúcom obrázku uvedené veľkosti d_{IS} pre dvojice spinov v zabrzdenej stoličkovej konformácii molekuly cyklohexánu.



Obr. 59 Vypočítané vzdialenosti medzi atómami v stoličkovej konformácii molekuly cyklohexánu a im zodpovedajúce hodnoty d_{IS} . Modré čiary identifikujú dvojicu $^1\text{H}-^1\text{H}$ spinov, červené dvojicu $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ spinov. Vzdialenosti medzi atómami sú vyjadrené v \AA , veľkosť d_{IS} v Hz.

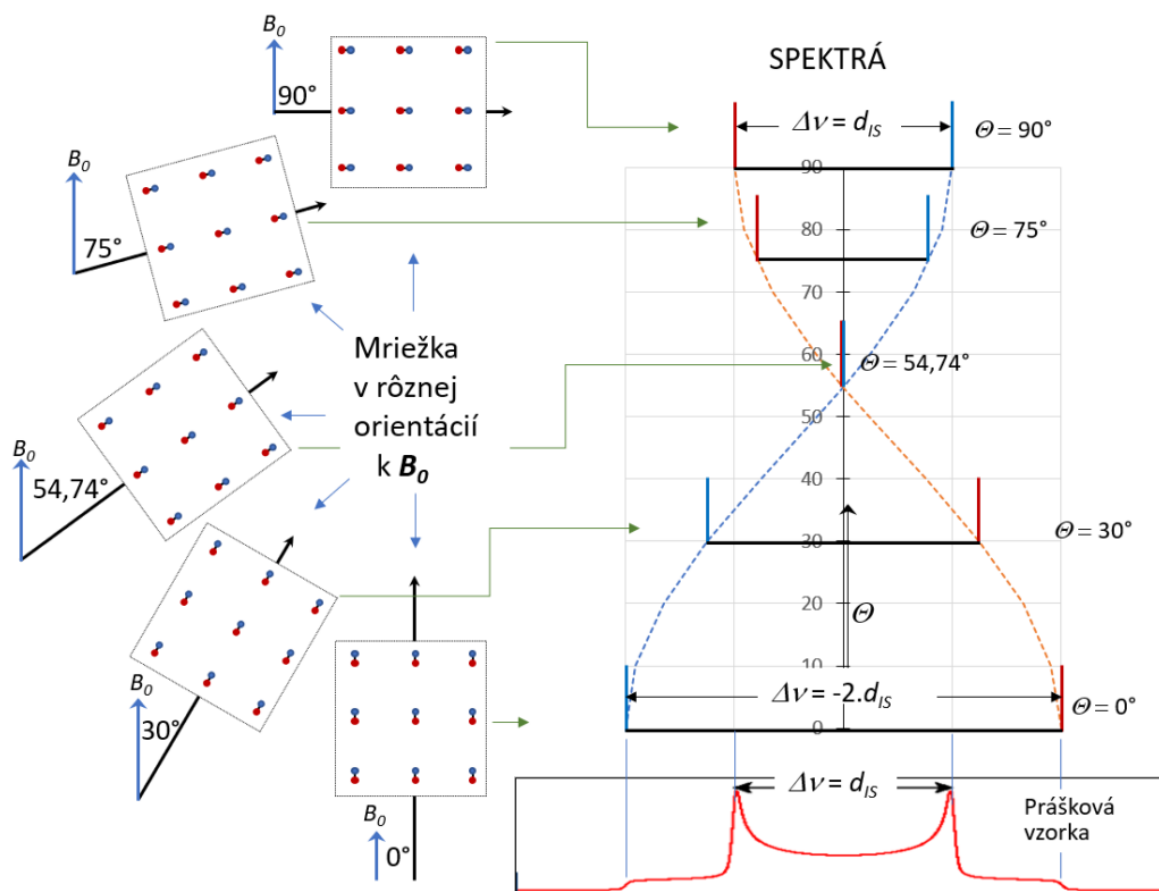
Na záver tejto časti je potrebné zdôrazniť jednu významnú vlastnosť DD interakcií. Keďže DD interakcie závisia od orientácie spojnice medzi interagujúcimi spinmi k poľu B_0 , umožňujú porovnávať orientáciu spinov aj vo vzdialených fragmentov molekúl. Hovoríme, že DD interakcie poskytujú štruktúrne informácie „ďalekého dosahu“ (long-range).

3.2.4.2 Dipól-dipólové interakcie v tuhej fáze

Vzhľadom na závislosť d_{IS} od pohyblivosti atómov vo vzorke (zmena r a θ s časom) ale aj veľkosti d_{IS} , ktoré často presahujúci rozdiely v chemických posunov spinov, je pozorovanie prejavu DD interakcií v spektrách veľmi obťažné. Ako bolo spomínané vyššie, v kvapalinách v dôsledku rýchleho izotropného pohybu molekúl sa d_{IS} spriemerujú na nulu takže nie sú pozorovateľné. Štandardné spektrá bežných organických látok v tuhej fáze sú v dôsledku veľkého počtu rôznych DD interakcií, ktoré môže každý spin vykazovať (= počtu NMR aktívnych spinov v okruhu cca 30-40 \AA od daného spinu,) ale aj intenzívnym prekryvom so signálmi iných spinov (v tuhej fáze prekryv zväčšený v dôsledku anizotropie chemického posunu) neanalyzovateľné. Prakticky pozorovať a analyzovať DD interakcie v základných spektrách je možné len pre jednoduché systémy (malý počet NMR aktívnych spinov), ktoré sú

usporiadané v tuhých kryštalických štruktúrach. Na ilustráciu uvádzame hypotetické ^{13}C spektrum látky s izolovanou ^{13}C izotopovo obohatenou C-H skupinou, izolovanou od ostatných vodíkov v molekule (vzdialených viac ako 20 Å) a usporiadanou do pravidelnej kryštalickej štruktúry (obr.57). Orientácia mriežky (a tým aj orientácia C-H spojnice) vzhľadom k B_0 sa nastaví v špeciálnej sonde pomocou goniometra.

Okrem kryštalických vzoriek, sú *DD*-interakcie analyzovateľné aj v prípade jednoduchých práškových vzoriek, pri ktorých (v kontraste k orientovaným kryštalickým vzorkám) sú vo vzorke s rovnakou pravdepodobnosťou prítomné všetky možné orientácie mriežky v priestore. „Práškové“ spektrum je superpozíciou spektier všetkých mikrokryštálov s rôznou orientáciou, ktoré sa vo vzorke vyskytujú. Váha jednotlivých subspektier je daná pravdepodobnosťou výskytu vo vzorke. Výsledné spektrum má charakteristický tvar, ktorý sa nazýva „Pake pattern“ podľa autora, ktorý prvý analyzoval spektrum tohto typu.



Obr. 60 ^{13}C spektrá izolovaného heteronukleárneho ^1H - ^{13}C systému usporiadaného v kryštalickej mriežke v závislosti od orientácie mriežky (od uhla θ). Stred dubletu je na chemickom posune ^{13}C spinu. V spodnej časti je uvedené hypotetické spektrum práškovej vzorky s charakteristickým „Pake“- tvarom signálu.

DD-interakcie obsahujú veľmi cenné informácie o priestorovom usporiadaní spinov. Žiaľ (ako bolo spomenuté vyššie), pre prílišnú komplikovanosť ich extrahovanie zo základných NMR spektier je možné iba pre jednoduché molekuly v tuhej fáze. Pre zložitejšie molekuly v tuhých vzorkách bolo na získanie takýchto informácií potrebné vyvinúť špeciálne NMR experimenty. V súčasnosti je dostupných veľa špeciálnych metód NMR v tuhej fáze

navrhnutých na tento účel. Treba však podotknúť, že tieto metódy sú často technicky veľmi náročne a ich používanie nie je rutinná záležitosť.

3.2.4.3 Dipól-dipólové interakcie v orientovanej kvapalnej fáze

Ako bolo už viackrát spomenuté v kvapalnej fáze sú informácie o d_{IS} pre ich efektívne spriemerňovanie na nulu nedostupné. Napriek tomu pretrvávala v NMR komunite neustála snaha o využitie ich veľkého potenciálu aj pre štruktúrnu analýzu kvapalných vzoriek. Jednou z hlavných motivácií je fakt, že zatiaľ čo štandardné NMR parametre (chemický posun, multiplicita signálov, veľkosť J, \dots) poskytujú iba lokálne štruktúrne informácie o okolí spinov na ktoré sa vzťahujú, DD interakcie poskytujú štruktúrne informácie „ďalekého dosahu“ (long-range). V kvapalnej fáze je to teda nový typ štruktúrnej informácie.

Vedelo sa, že jedinou možnosťou ako to dosiahnuť, je čiastočná orientácia molekúl v kvapalnej fáze. Zorientovanie vzorky sa môže dosiahnuť rozličným spôsobom, napr. jej rozpustením v kvapalno-kryštalickom prostredí, pridaním magneticky anizotropnej látky, ktorá sa v smere B_0 čiastočne orientuje alebo umiestnením v priestorovo anizotropnej matici (mechanický upravené polymérne gély).

Stupeň zorientovania molekúl x je možné zjednodušené vyjadriť ako zlomok úplne zorientovaných molekúl z celkového počtu molekúl prítomných vo vzorke. Molekuly sú v rýchlej výmene medzi zorientovaným a nezorientovaným stavom (mólový zlomok = $1 - x$, d_{IS} spriemernená na nulu). Táto rýchla výmena spôsobí spriemernenie d_{IS} na tzv. redukovanú hodnotu d_{IS}^r :

$$d_{IS}^r = x \cdot d_{IS} + (1-x) \cdot 0 = x \cdot d_{IS}$$

V odbornej literatúre sa na označenie d_{IS}^r zaužívalo označenie RDC (Reduced Dipolar Coupling). Okrem redukcie d_{IS} sa v kvapalnej fáze, v dôsledku tepelného pohybu, medzimolekulové DD interakcie prakticky vynulujú (čo znamená zmenšenie počtu medzi sebou interagujúcich spinov) a predlží sa relaxačný čas T_2 (zúženie spektrálnych čiar). To všetko spôsobuje zjednodušenie spektier oproti ekvivalentným spektrám v tuhej fáze.

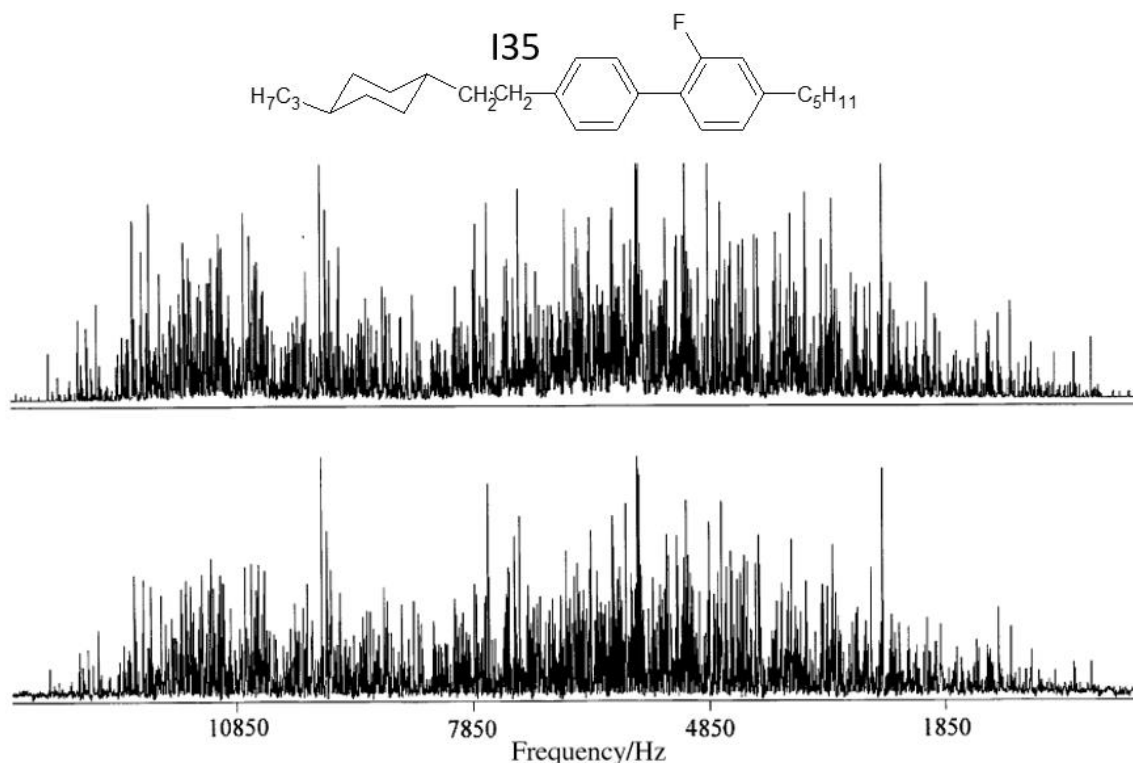
Ako bolo spomenuté vyššie, čiastočné zorientovanie molekúl v kvapalnej fáze možno dosiahnuť rôznymi spôsobmi, no ukázalo sa, že pre praktické aplikácie je potrebné, aby zorientovanie molekúl bolo relatívne malé a kontrolovateľné.

Molekuly s paramagnetickým centrom alebo silnou magnetickou anizotropiou (veľké asymetrické molekuly ako napr. polynukleotidy,...) sa sami čiastočne orientujú v silnom magnetickom poli B_0 . Pre štandardné diamagnetické molekuly je však stupeň orientácie v dostupných magnetických poliach zanedbateľný, a preto sa tento najjednoduchší spôsob zorientovania molekúl dá prakticky využiť len veľmi obmedzene.

Na zorientovanie molekúl možno využiť vhodné kvapalno-kryštalické média. Komerčne sú dostupné rôzne média. Potrebné je vybrať také, v ktorom sa analyzovaná látka dostatočne rozpúšťa a médium si zachováva anizotropný charakter aj pri malej koncentrácii mezogénov (molekúl vytvárajúcich kvapalno-kryštalickú štruktúru).

Stupeň usporiadania molekúl analytu v médiách, ktoré boli v 60. až 90. rokoch minulého storočia dostupné, bol relatívne vysoký ($x \sim 0.1$). Takýto stupeň usporiadania molekúl

znamená efektívnu redukciu hodnôt d_{IS} na desatinu statických hodnôt, čo ale stále pre blízko vzdialené spiny (C-H; N-H, H-C-H,...) znamená, že redukované hodnoty d_{IS}^r budú na úrovni niekoľko stoviek až tisíc Hz a taktiež to znamená existenciu veľkého počtu nezanedbateľných interakcií medzi vzdialenejšími spinmi. Veľký počet významných d_{IS}^r interakcií medzi spinmi spôsobuje pri väčších spinových systémov prílišnú komplikovanosť spektier. Na ilustráciu je na Obr. 61 uvedené spektrum etylbenzénu v komerčnom nematickom rozpúšťadle I35.



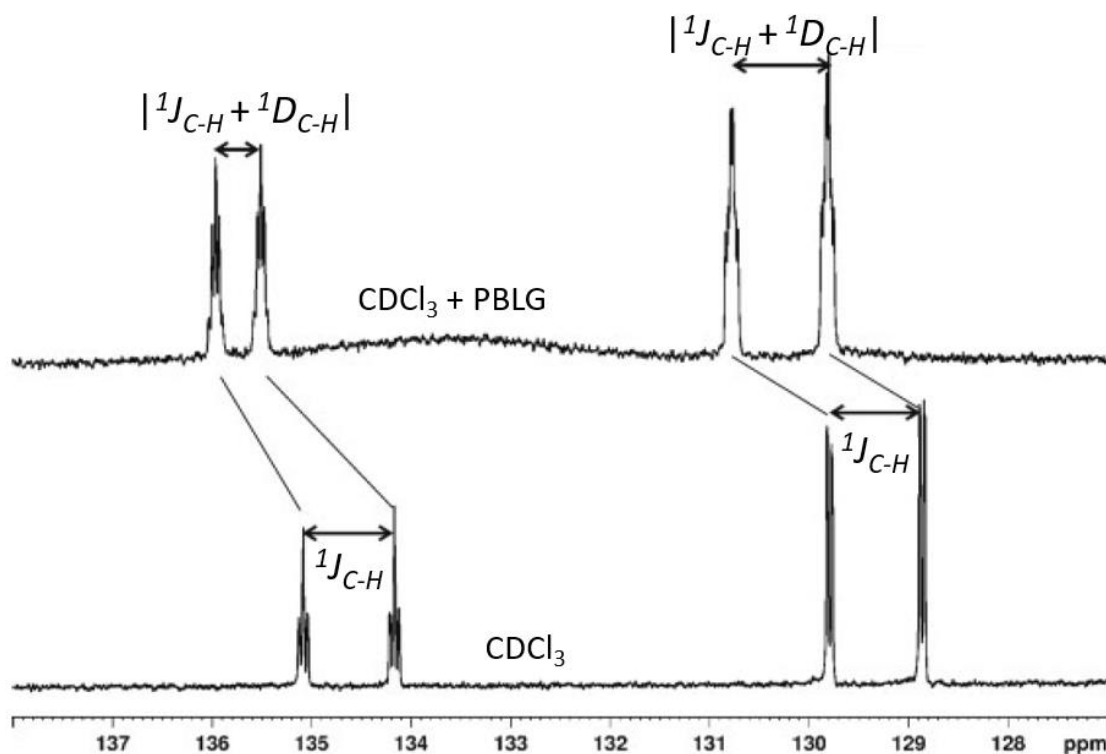
Obr. 61 Porovnanie 300 MHz ^1H spektra etylbenzénu rozpusteného v nematickom rozpúšťadle I35 (spodná stopa) so simulovaným spektrom (vrchná stopa).

Je zrejme, že analýza takýchto spektier je náročná a používajú pri nej rôzne stratégie, vrátane zjednodušovania spektier selektívnou náhradou vodíka v molekule skúmanej látky za deutérium a sofistikovaných výpočtových metód. Pri úspešnej analýze sa získajú cenné štruktúrne informácie o študovanej látke (presná geometrická štruktúra, zastúpenie konformérov,...). Je však zrejme, že táto metodika nebude mať nikdy rutinný charakter.

Z praktického hľadiska sú najdôležitejšie slabo orientujúce média, ktoré umožňujú zorientovanie molekúl analytu na úroveň cca 0,1 %. Takéto média sa objavili až v 90. rokoch minulého storočia. Sú rôzneho charakteru. Okrem špeciálnych kvapalno-kryštalických médií sem patria aj vodné roztoky rôznych nadmolekulových častíc s veľkou magnetickou anizotropiou (bicely, fágy, vírusy,...) a polymérne gély s anizotropnými kavitami (dutinami).

Pri takomto zorientovaní molekúl sú d_{IS}^r najväčších DD interakcií na úrovni ~ 10 Hz. Interakcie medzi vzdialenejšími spinmi sa stávajú zanedbateľnými. Výsledné spektrá sú preto veľmi podobné spektrám izotropných vzoriek a sú relatívne ľahko analyzovateľné. DD -interakcia sa prejaví ako príspevok k existujúcej J -interakcií medzi dvojicou spinov. V spektre sa teda pozoruje celková interakcia (T_{IS}) medzi dvojicou spinov I a S ako súčet ich J - a DD interakcie: $T_{IS} = J_{IS} + D_{IS}$. D_{IS} sa dá určiť z dvoch experimentov ako rozdiel celkovej interakcie T_{IS} v orientovanom a J_{IS} v izotropnom médiu.

Na nasledujúcom obrázku je ilustrovaný efekt slabej orientácie molekúl na vzhľad a charakter ^{13}C NMR spektra nitrobenzenu v chloroforme.



Obr. 62 Časť ^{13}C spektra nitrobenzenu nameraného bez dekaplingu vodíkov počas akvizície FIDu. Dublety pri $\sim 130\text{ppm}$ a $\sim 135\text{ppm}$ prislúchajú uhlíkom v meta resp. para polohe od nitro skupiny. Spodná stopa ukazuje spektrum namerané v izotropnom roztoku chloroformu, vrchná stopa patrí spektru nameranému v chloroforme, do ktorého bolo pridané orientačné médium PBLG (poly-g-benzyl-L-glutamát). Z porovnania oboch spektier a skutočnosti, že hodnota $^1J_{\text{C-H}}$ je vždy kladná a pomerne veľká vyplýva, že v prípade nitrobenzenu má $^1D_{\text{C-H}}$ v prípade meta uhlíkov kladnú a v prípade para uhlíka zápornú hodnotu. Zjavná zmena chemických posunov pri prechode z izotropného prostredia do zorientovaného média je spôsobená pomerne veľkou anizotropiou chemického posunu aromatických uhlíkov.

Štruktúrna analýza pomocou RDC sa v súčasnosti navyše využíva pri riešení štruktúry izotopovo (^{15}N alebo aj ^{13}C) obohatených proteínov. Analýza je zameraná najmä na RDC interakcie medzi priamo viazanými spinmi, hlavne na jednoväzbovú interakciu $^1\text{H}-^{15}\text{N}$. Veľkou výhodou, že vzdialenosť medzi spinmi ($r_{\text{N-H}} \sim 1.0 \text{ \AA}$) ako aj veľkosť $^1J_{\text{N-H}}$ ($J_{\text{N-H}} \sim 93 \text{ Hz}$) sú známe a s pohybom molekúl sa menia veľmi málo. Pre ^{15}N izotopovo obohatené je určovanie veľkosti a znamienka v súčasnosti viac-menej rutinnou záležitosťou.

Extrakcia štruktúrnych informácií pomocou RDC, nie je triviálna. Okrem získania dostatočného počtu RDC je potrebné poznať spôsob a stupeň orientácie molekuly (tenzor orientácie (časti) molekuly, t.j. „alignment tensor“). Analýza je pomerne jednoduchá v prípade rigidných molekúl. Takéto molekuly tvoria napr. niektoré proteíny, pre ktoré RDC analýza významne pomáha potvrdiť alebo spresniť ich terciárnu štruktúru. Analyzovateľné sú aj flexibilné molekuly zložené z viacerých rigidných častí (napr. modulárne proteíny). RDC analýza umožňuje spresniť 3D štruktúru jednotlivých modulov, ako aj stanoviť stupeň

flexibility medzi modulmi. Podobné ako pri proteínoch sa jednoväzbové RDC využívajú aj v prípade izotopovo obohatených fragmentov DNA a RNA molekúl

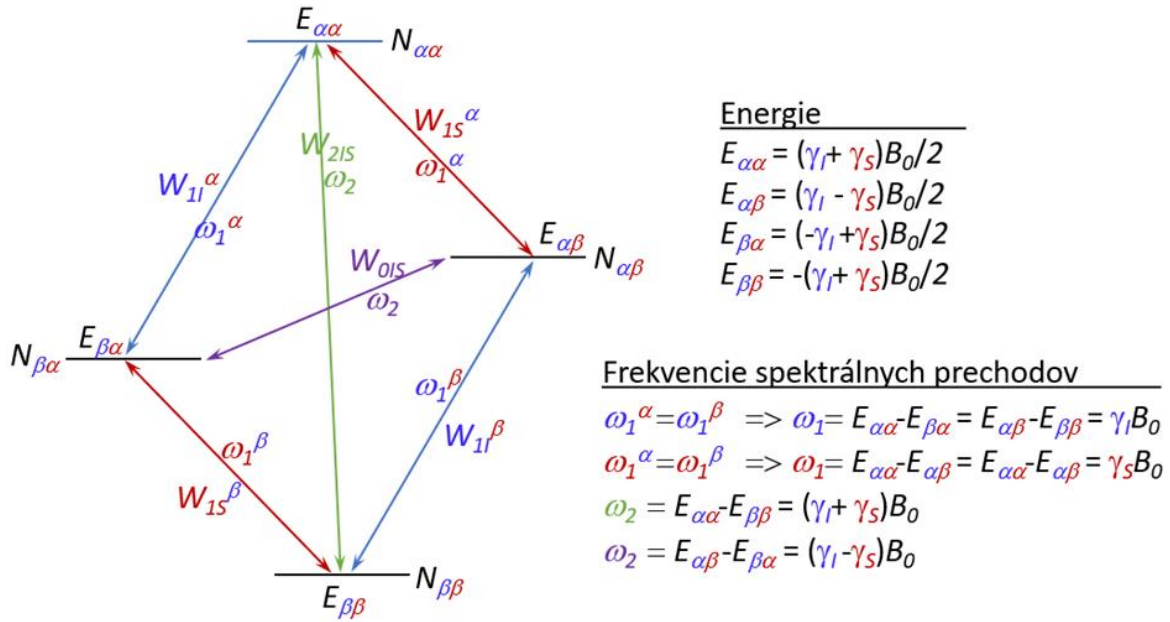
Zložitejšie je využitie RDC v menších molekulách s prirodzeným izotopovým zastúpením spinov. Analýza je kvôli citlivosti experimentov viac-menej obmedzená na vyhodnocovanie ^1H – ^1H RDC interakcií. Tie majú dobre definovanú vzdialenosť iba pre geminálne vodíky (vodíky viazané na tom istom uhlíku) a vodíky v rigidných cyklických štruktúrach. Napriek tomu záujem o využitie RDC metodík stále rastie. Je to aj preto, že na mnohé zaujímavé štruktúrne otázky môže dať odpoveď jednoduché porovnanie dvoch relevantných RDC, bez nutnosti analýzy celkovej štruktúry molekuly. Napr. odpoveď či sú dve C-H väzby na rigidnej štruktúre orientované paralelne alebo nie. Ak sú paralelne musí mať ich D_{IS} rovnakú hodnotu, inak platí opak. Informácie o možnosti využitia RDC v menších organických molekulách možno nájsť v literatúre.

3.2.4.4 Dipól-dipólová relaxácia

Napriek veľmi zaujímavým a dôležitým „long-range“ štruktúrnym informáciám, ktoré sa v čiastočne orientovaných kvapalných vzorkách dajú získať z D -interakčných konštánt pomocou špeciálnych NMR experimentov, najdôležitejší efekt DD -interakcií pre NMR v kvapalnej fáze súvisí s ich fundamentálnou úlohou pri relaxácii ^1H a ^{13}C spinov. DD -interakcie sú totiž pre tieto spiny v diamagnetických molekulách dominantným spôsobom výmeny energie medzi spinmi navzájom ako aj výmeny energie s inými zdrojmi náhodných magnetických poli, čiže dominantným spôsobom ich NMR relaxácie. Bez tohto relaxačného mechanizmu by NMR organických látok zďaleka nebola rutinná záležitosť. Navyše s DD -relaxáciou je spojený Nukleárny Overhauserov efekt (NOE), ktorý je zdrojom veľmi cenných štruktúrnych informácií.

Špecifičnosť DD -relaxácie je, že ustáľovanie rovnovážnej populácie stavov spinov sa dosahuje nie iba „povolenými“ jednokvantovými spektrálnymi prechodmi individuálnych spinov ale aj prostredníctvom „zakázaných“ viackvantových spektrálnych prechodov skupiny spinov. Príčinou je existencia silnej väzby medzi spinmi v dôsledku ich vzájomnej DD -interakcie.

Základné črty DD -relaxácie si ilustrujeme na systéme dvoch priestorovo blízkych spinov I a S nachádzajúcich sa v jednej molekule. Existencia J -interakcie má zanedbateľný vplyv na efekt DD -relaxácie preto ju môžeme považovať za nulovú. Časovo spriemerný, a teda konštantný hamiltonián H_0 takéhoto systému obsahuje iba dva členy vyjadrujúce Zeemanov člen (interakciu s poľom B_0) korigovaný chemickým posunom spinov: $H_0 = \omega_I I_z + \omega_S S_z$, kde $\omega_i = \gamma_i B_0(1 - \sigma_i)$ je absolútna frekvencia spinu i . H_0 má 4 stavy s dobre definovanou energiou (pozri Obr. 63). DD -interakcia medzi spinmi I a S , vyjadrená časovo premenlivým hamiltoniánom $H_D(t)$ je rádovo menšia ako Zemanova interakcia. $H_D(t)$ možno preto považovať za malú časovo premenlivú poruchu celkového hamiltoniánu $H_t(t)$ zloženého z H_0 a $H_D(t)$: $H_t(t) = H_0 + H_D(t)$. Účinok malej časovo premenlivej poruchy sa v kvantovej mechanike popisuje pomocou časovo závislej poruchovej teórie (time dependent perturbation theory). Táto teória postuluje, že porucha ($H_D(t)$) nemení základné stavové funkcie a vlastné hodnoty energie hamiltoniánu H_0 , ale iba generuje spektrálne prechody medzi stavmi s dobre definovanou energiou. Schéma DD relaxácie IS systému s vyznačením dovolených energetických stavov, ich energií, frekvencií spektrálnych prechodov a ich pravdepodobnosti je ukázaná na nasledujúcom obrázku.



Obr. 63 Schéma DD relaxácie dvojspinového IS systému s vyznačenými dovolenými energetickými hladinami ich populáciami a pravdepodobnosťami W spektrálnych prechodov. Dolný index pri W vyjadruje zmenu celkového magnetického kvantového čísla m pri spektrálnom prechode medzi dvomi stavmi. Takže $W1$, $W2$ a $W0$ sú pravdepodobnosti jedno-, dvoj- a nul- kvantových prechodov. Pri jednokvantových prechodoch spodný index navyše obsahuje aj označenia aktívneho spinu, ktorého stav sa pri spektrálnom prechode mení a horný index, ktorý označuje stav druhého (pasívneho) spinu (napr. $W11^\alpha$ – jednokvantový prechod spinu I pričom spin S zostáva v stave α). Parametre súvisiace so spinom I/S označené modrou/červenou farbou. $W2$ a $W0$ označujú pravdepodobnosti prechodov, pri ktorých sa mení stav oboch spinov súčasne.

Pri odvodení vzťahov pre DD-relaxáciu budeme postupovať analogicky ako pri popise relaxácie jednospinového systému (odseku 1.5.2). Okamžitú zložku z -magnetizácie spinu I (označenie I_z) a spinu S (označenie S_z) možno vyjadriť ako rozdiel okamžitých populácií stavov spojených s dvomi spektrálnymi prechodmi spinu I resp. spinu S : Podobne možno vyjadriť aj rovnovážne zložky z -magnetizácie (označenie I_z^0 a S_z^0):

$$I_z \sim (N_{\alpha\alpha} - N_{\beta\alpha}) + (N_{\alpha\beta} - N_{\beta\beta})$$

Podobne

$$I_z^0 \sim (N_{\alpha\alpha}^0 - N_{\beta\alpha}^0) + (N_{\alpha\beta}^0 - N_{\beta\beta}^0); S_z \sim (N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\beta}) + (N_{\beta\alpha} - N_{\beta\beta})$$

podobne

$$S_z^0 \sim (N_{\alpha\alpha}^0 - N_{\alpha\beta}^0) + (N_{\beta\alpha}^0 - N_{\beta\beta}^0)$$

Okamžitú zmenu z -zložky magnetizácie spinu I a spinu S možno vyjadriť rovnicami:

$$dI_z/dt = d[(N_{\alpha\alpha} - N_{\beta\alpha}) + (N_{\alpha\beta} - N_{\beta\beta})]/dt = dN_{\alpha\alpha}/dt - dN_{\beta\alpha}/dt + dN_{\alpha\beta}/dt - dN_{\beta\beta}/dt$$

$$dS_z/dt = d[(N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\beta}) + (N_{\beta\alpha} - N_{\beta\beta})]/dt = dN_{\alpha\alpha}/dt - dN_{\alpha\beta}/dt + dN_{\beta\alpha}/dt - dN_{\beta\beta}/dt$$

Hnacou silou zmeny z -zložky magnetizácie pri relaxácii spinov sú odchýlky okamžitej populácie jednotlivých stavov od ich rovnovážnej hodnoty. Rýchlostná konštanta je vyjadrená pravdepodobnosťou prechodu (označenie W_{II} , W_{IS} , W_2 , W_0 , pozri Obr. 63) medzi dvojicou stavov, pričom prechody v oboch smeroch sú rovnako pravdepodobne. Pravdepodobnosti oboch jednokvantových prechodov spinu I sú veľmi podobné a možno ich považovať rovnaké ($W_{II}^b \approx W_{II}^a = W_{II}$). Podobne zjednodušenie platí aj pre spin S ($W_{IS}^b \approx W_{IS}^a = W_{IS}$). Potom časovú zmenu populácie jednotlivých stavov možno vyjadriť nasledujúcimi diferenciálnymi rovnicami:

$$dN_{\alpha\alpha}/dt = W_{II}(N_{\beta\alpha} - N_{\beta\alpha}^0) + W_{IS}(N_{\alpha\beta} - N_{\alpha\beta}^0) + W_2(N_{\beta\beta} - N_{\beta\beta}^0) - (W_{II} + W_{IS} + W_2)(N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\alpha}^0)$$

$$dN_{\alpha\beta}/dt = W_{II}(N_{\beta\beta} - N_{\beta\beta}^0) + W_{IS}(N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\alpha}^0) + W_0(N_{\beta\alpha} - N_{\beta\alpha}^0) - (W_{II} + W_{IS} + W_0)(N_{\alpha\beta} - N_{\alpha\beta}^0)$$

$$dN_{\beta\alpha}/dt = W_{II}(N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\alpha}^0) + W_{IS}(N_{\beta\beta} - N_{\beta\beta}^0) + W_0(N_{\alpha\beta} - N_{\alpha\beta}^0) - (W_{II} + W_{IS} + W_0)(N_{\beta\alpha} - N_{\beta\alpha}^0)$$

$$dN_{\beta\beta}/dt = W_{II}(N_{\alpha\beta} - N_{\alpha\beta}^0) + W_{IS}(N_{\beta\alpha} - N_{\beta\alpha}^0) + W_2(N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\alpha}^0) - (W_{II} + W_{IS} + W_2)(N_{\beta\beta} - N_{\beta\beta}^0)$$

V každej rovnici prvé 3 členy vyjadrujú prírastok populácie daného stavu prechodom z ostatných 3 stavov a posledný člen naopak úbytok populácie daného stavu prechodom na ostatné 3 stavy.

Po dosadení týchto výrazov do rovníc pre dI_z/dt a dS_z/dt a následnej úprave dostaneme tzv. Solomonove rovnice, nazvané podľa autora, ktorý prvý popísal DD -relaxáciu dvojspinového systému [Solomon I. 1955. Relaxation processes in a system of two spins. Phys Rev 99:559–565.]:

$$\begin{aligned} dI_z/dt &= -(W_0 + 2W_{II} + W_2)(I_z - I_z^0) - (W_2 - W_0)(S_z - S_z^0) = -R_I(I_z - I_z^0) - \sigma_{IS}(S_z - S_z^0) \\ dS_z/dt &= -(W_2 - W_0)(I_z - I_z^0) - (W_0 + 2W_{IS} + W_2)(S_z - S_z^0) = -R_S(S_z - S_z^0) - \sigma_{IS}(I_z - I_z^0) \end{aligned}$$

kde rýchlostné konštanty $R_I = (W_0 + 2W_{II} + W_2)$ a $R_S = (W_0 + 2W_{IS} + W_2)$ vyjadrujú vlastnú "samorelaxáciu" spinu I , resp. spinu S . Konštanta $\sigma_{IS} = (W_2 - W_0)$ vyjadruje rýchlosť ich vzájomnej kros-relaxácie. Miesto rýchlostnej konštanty R sa rýchlosť samorelaxácie vyjadruje aj pomocou DD -relaxačného času $T_I^{DD} = 1/R$. Vidíme, že veľkosť T_I^{DD} a σ_{IS} ovplyvňujú pravdepodobnosti spektrálne „zakázaných“ W_2 a W_0 . Na rozdiel od kros-relaxácie však samorelaxácia existuje aj pri absencii viackvantových spektrálnych prechodov.

Integráciou diferenciálnych rovníc sú bi-exponenciálne funkcie času, priebeh ktorých okrem rýchlostných konštánt R_I , R_S a σ_{IS} závisí aj od počiatkových hodnôt I_z a S_z .

Pre úplnosť popisu relaxácie je potrebné ešte odvodiť výrazy pre jednotlivé pravdepodobnosti spektrálnych prechodov. Ako bolo spomenuté vyššie, odvodenie sa vykonáva na základe teórie časovo závislej poruchy Hamiltoniánu vyjadrenej pomocou $H_D(t)$. Odvodenie je pomerne náročné a možno ho nájsť v literatúre [Gupta, A., Stait-Gardner, T., Moghaddam, M. J., Price, W. S. (2015). *Dipolar relaxation revisited - A complete derivation for the two spin case. Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 44(2), 74–113. doi 10.1002/cmr.a.21334]. Na tomto mieste uvádzame iba výsledné vzťahy.

$$W_0 = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_I \gamma_S)^2}{r_{IS}^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} = \frac{1}{10} \frac{k}{r_{IS}^6} j(\omega_I - \omega_S; \tau_c)$$

$$W_2 = \frac{3}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_I \gamma_S)^2}{r_{IS}^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} = \frac{1}{10} \frac{k}{r_{IS}^6} j(\omega_I - \omega_S; \tau_c)$$

$$W_{1I} = \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_I \gamma_S)^2}{r_{IS}^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} = \frac{3}{20} \frac{k}{r_{IS}^6} j(\omega_I; \tau_c)$$

$$W_{1S} = \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{(\gamma_I \gamma_S)^2}{r_{IS}^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega_S^2 \tau_c^2} = \frac{3}{20} \frac{k}{r_{IS}^6} j(\omega_S; \tau_c)$$

kde $k = (\mu_0 \gamma_I \gamma_S / 4\pi)^2$ zahŕňa v sebe fyzikálne konštanty. Vidíme, že pravdepodobnosť všetkých spektrálnych prechodov pri *DD* relaxácii prudko klesá so vzdialenosťou medzi spinmi r_{IS} a je úmerná redukovanej spektrálnej hustote $j(\omega)$ pri frekvencii daného spektrálneho prechodu. Pre každý zo štyroch spektrálnych prechodov je to iná frekvencia. Parameter τ_c je korelačný čas, ktorý určuje tvar frekvenčnej distribúcie náhodných pohybov vo vzorke. τ_c závisí od veľkosti molekúl a viskozity vzorky.

Ako bolo uvedené vyššie, *DD* relaxácia má mať biexponenciálny charakter. Pre ^1H homonukleárny spinový systém má však priebeh veľmi podobný mono-exponenciálnej relaxácii. Súvisí to s malými rozdielmi ^1H NMR chemických posunov vzhľadom na veľkosť ich vzájomných *DD* interakcií. Z hľadiska *DD*-relaxácie možno preto priestorovo blízke spiny viazané v jednej molekule považovať za ekvivalentné. Takéto spiny nie je možné z hľadiska *DD* relaxácie rozlíšiť, ale je možné pozorovať iba ich spoločnú relaxáciu. Ich ekvivalencia znamená, že pravdepodobnosti spektrálnych prechodov pre ekvivalentné spiny sú rovnaké ($W_{II} = W_{IS} \Rightarrow W_I$). Pre homonukleárny dvojspinový systém potom dostaneme:

$$\begin{aligned} dI_z/dt + dS_z/dt &= d(I_z + S_z)/dt = -(W_0 + 2W_1 + W_2) \cdot [(I_z - I_z^0) + (S_z - S_z^0)] - \\ &- (W_2 - W_0) \cdot [(I_z - I_z^0) + (S_z - S_z^0)] = -(2W_1 + 2W_2) \cdot [(I_z + S_z) - (I_z^0 + S_z^0)] = \\ &= 1/T_1^{DD} [(I_z + S_z) - (I_z^0 + S_z^0)] \end{aligned}$$

Po dosadení výrazov za W_1 a W_2 dostaneme pre relaxačný čas homonukleárneho systému $T_1^{DD} = (2W_1 + 2W_2)^{-1}$ vzťah:

$$\frac{1}{T_1^{DD}} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + (2\omega)^2 \tau_c^2} \right) = \frac{3}{10} \frac{k}{r^6} [j(\omega; \tau_c) + 4j(2\omega; \tau_c)]$$