

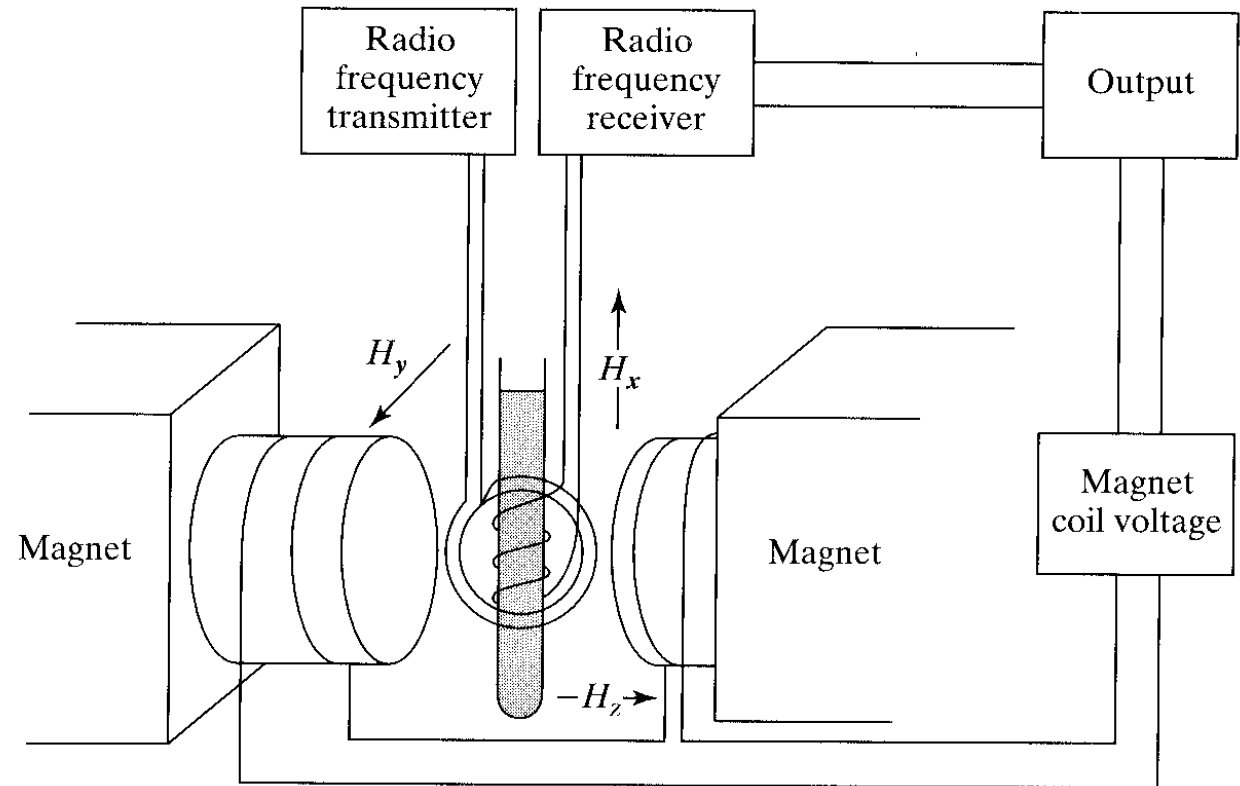
TFYA78 Molekylfysik
Föreläsning 15
NMR

Thomas Ederth
Linköpings universitet
IFM

NMR-spektrometern

Vad krävs?

- Ett externt magnetfält (B_0) för magnetisering, och som definierar z -riktningen.
- Ett oscillerande RF-fält (H_y) som exciterar provet.
- En RF-mottagare för att fånga upp resonansen i provet (H_x).



- Exciterade kärnor precesserar kring z -axeln vid Larmorfrekvensen – dessa är i fas eftersom det exciterande fältet B_0 är koherent (homogent) över provet.
- Precessionen inducerar en oscillerande ström i en spole längs x -axeln, som förstärks, och sedan utgör signalen som mäts.
- Enklaste mätmetoden är att svepa H_y -frekvensen och se vid vilka frekvenser absorption (resonans) sker i H_x -signalen (används *inte* i moderna spektrometrar!).

Inverkan av det externa fältet, B_0

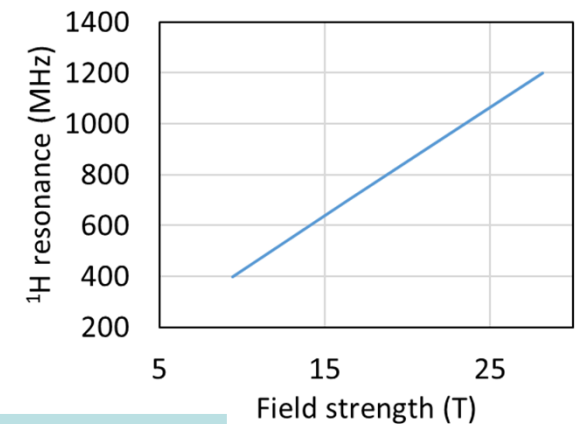
Från tidigare:

Intensiteten i en övergång är proportionell mot

- Magnetfältet B_0
 - Populationsskillnaden $N_\alpha - N_\beta \approx \frac{N}{2} \frac{\gamma \hbar B_0}{kT} \propto B_0$
- $$\left. \begin{array}{l} \text{Magnetfältet } B_0 \\ \text{Populationsskillnaden } N_\alpha - N_\beta \approx \frac{N}{2} \frac{\gamma \hbar B_0}{kT} \propto B_0 \end{array} \right\} \Rightarrow I \propto (B_0)^2$$

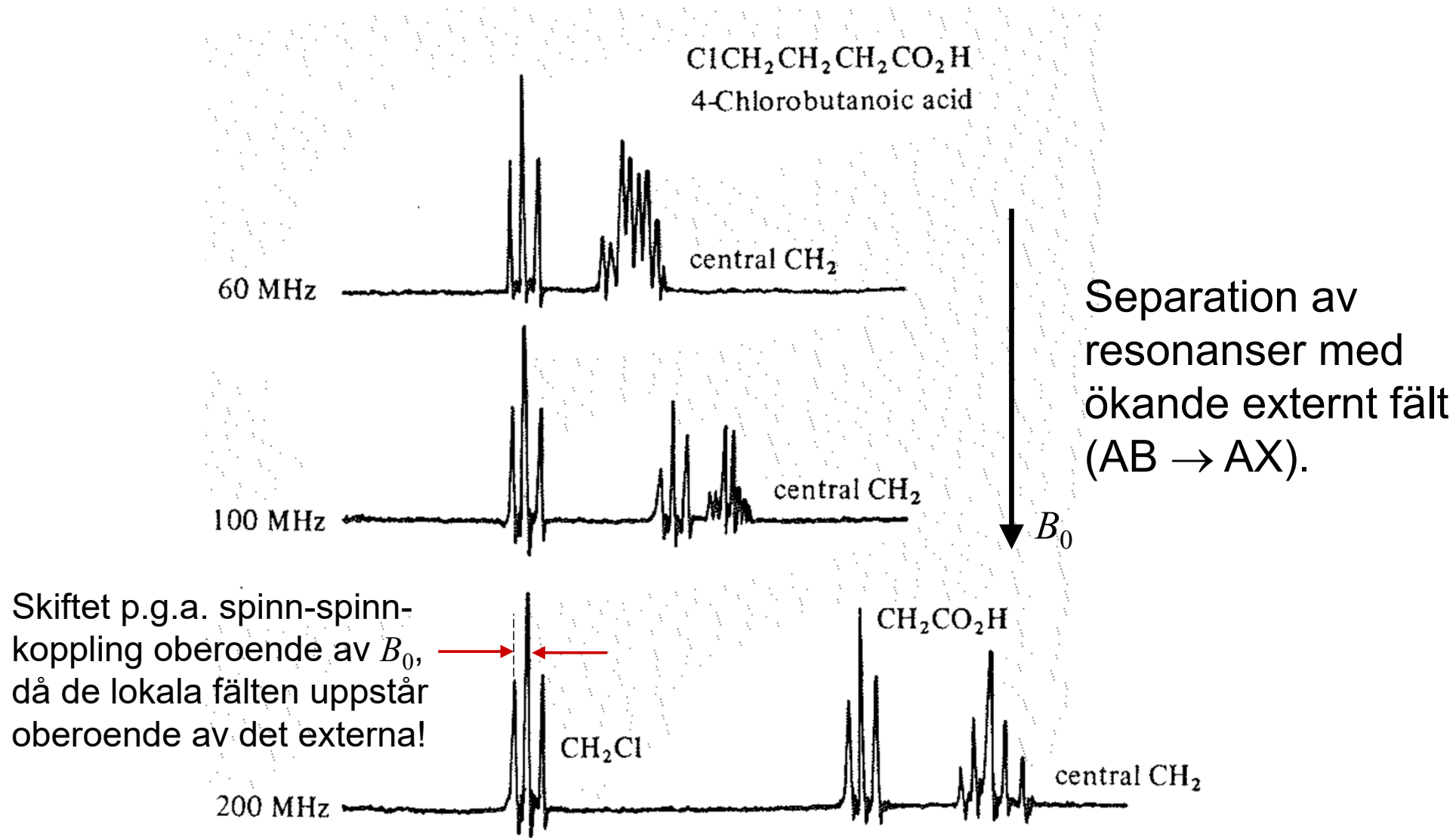
Vad kan göras för att öka intensiteten?

- Öka B_0
- Öka γ (välj protoner!)
- Minska T



Kärna	I	Naturlig förekomst (%)	γ ($10^{-7} \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Känslighet relativt ^1H (%)
^1H	$\frac{1}{2}$	99,89	26,75	100
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1,11	6,726	1,59
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0,36	-2,711	0,104
^{19}F	$\frac{1}{2}$	100	25,17	83,3
^{31}P	$\frac{1}{2}$	100	10,83	6,63

Inverkan av det externa fältet, B_0

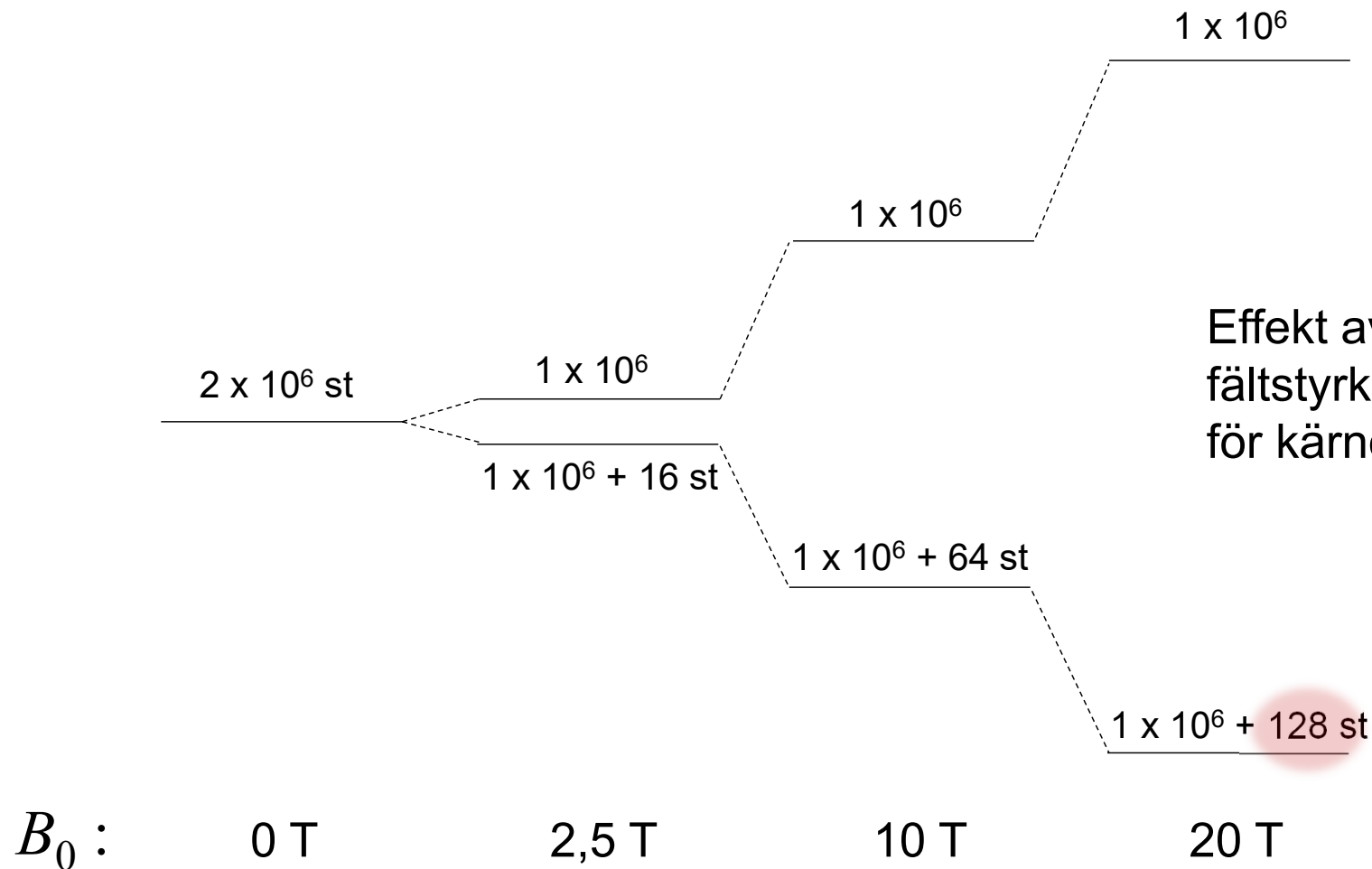


Resonanserna får olika *frekvens* med ökande B_0 ,
men det *kemiska skiftet* δ är detsamma!

Inverkan av det externa fältet, B_0

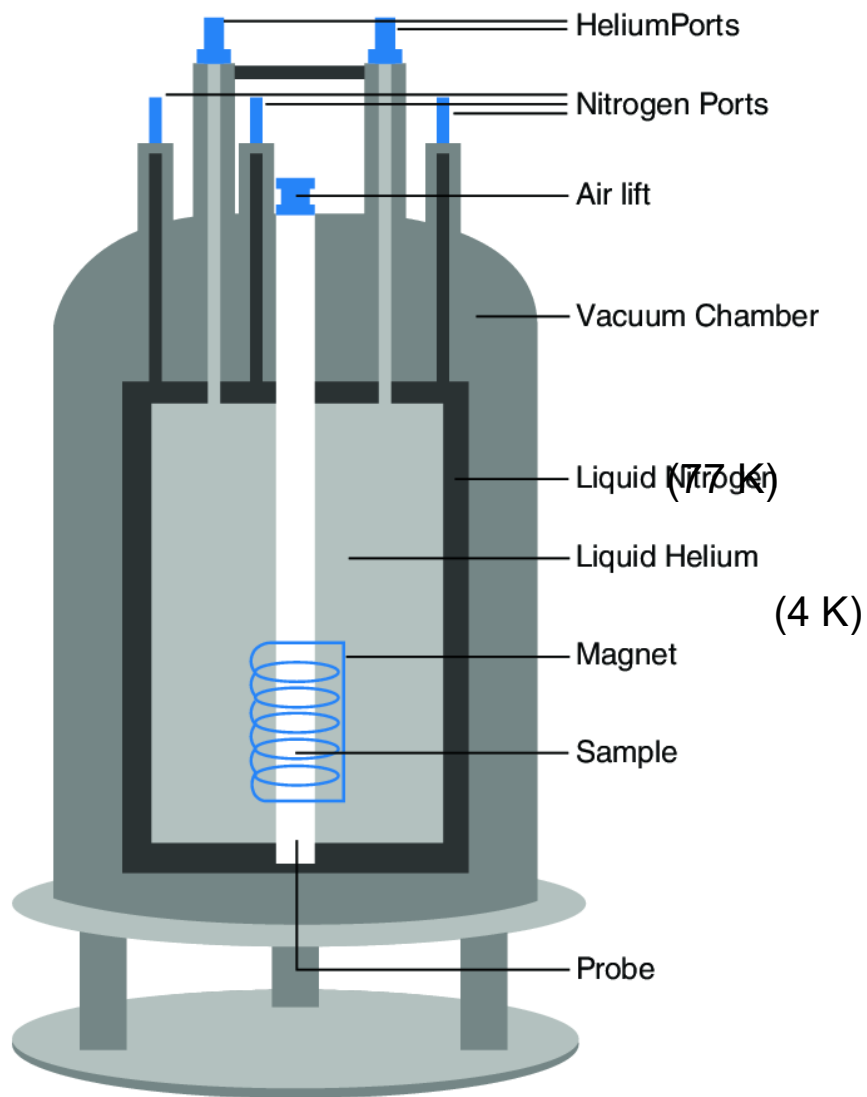
B_0	3 T	10 T	20 T
$\frac{N_\alpha - N_\beta}{N}$	2×10^{-5}	7×10^{-5}	1×10^{-4}

Hög känslighet krävs hos NMR-spektrometern, då endast en liten andel av alla moment deltar i en övergång!



Effekt av den magnetiska fältstyrkan på populationerna för kärnor med $I = \frac{1}{2}$.

NMR-spektrometrar



Världsrekordet sedan 2019:
36 T / 1500 MHz



500 MHz (12 T) spektrometer, IFM



1200 MHz (28 T)



80 MHz (2 T), 73 kg!

Fouriertransform-spektroskopi

Fouriertransformer (FT) gör det möjligt att behandla signaler i tidsdomänen i stället för i frekvensdomänen, och i FT-spektroskopi (FTS) mäts typiskt signaler i tidsdomänen och transformeras sedan till frekvensdomänen.

Fouriermetoder kan **förbättra noggrannhet, känslighet och upplösning**, beroende på omständigheterna.

Konventionell spektrometer: En monokromator väljer ut en våglängd i taget, och intensiteten mäts. Ett spektrum fås genom att svepa våglängden, t.ex. mekaniskt genom att rotera ett gitter eller ett prisma.

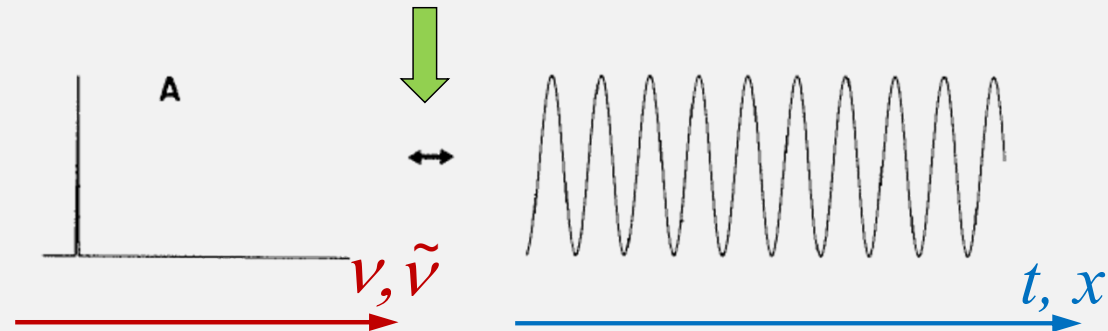
FT-spektrometer: Hela våglängdsintervallet studeras på en gång, och Fouriertransformeras till frekvensdomänen. I praktiken genomförs detta på två olika sätt, antingen via kontinuerlig/svepande FT-spektroskopi (t.ex. IR) eller via pulstekniker (t.ex. NMR).

Förbättringen ligger främst i effektivare tidsanvändning; i stället för att studera en frekvens i taget, mäts hela spektrumet på en gång, vilket gör det möjligt att förbättra signal/brus-förhållandet för jämförbara mättider.

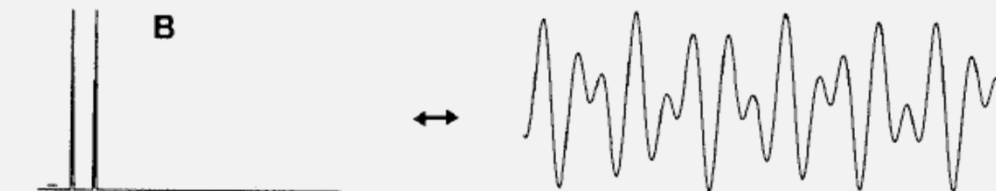
Från interferogram till spektrum

Fouriertransform

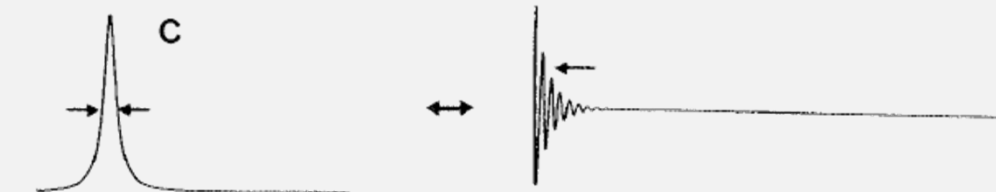
Frekvensdomän
(reciprok längd)



Tidsdomän
(längd)



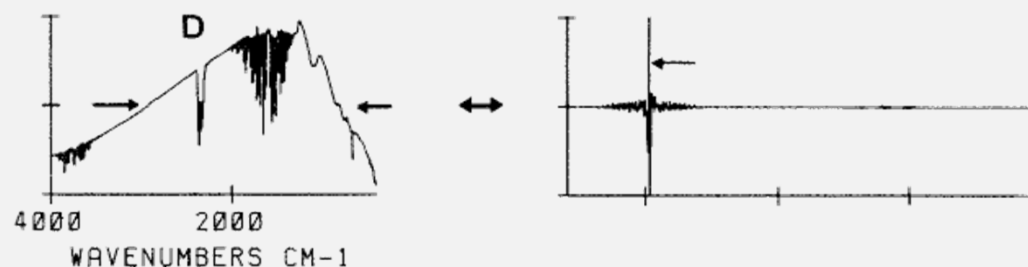
Lorenzian



Analytisk
lösning

Stor bandbredd i spektrum $\Leftrightarrow$ liten bandbredd i interferogrammet!

Bredbandigt
spektrum från
IR-källa (global).



Numerisk
lösning
krävs

Fourier-transformen

$$\hat{f}(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-2\pi i \tilde{\nu} t} dt$$

Transformen av en funktion $f(t)$ i tidsdomänen till dess Fouriertransform $\hat{f}(\tilde{\nu})$ i frekvensdomänen.

$$f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \hat{f}(\tilde{\nu}) e^{2\pi i t \tilde{\nu}} d\tilde{\nu}$$

Inverstransform...

Kräver **oändliga** och **kontinuerliga** integrationsvariabler... vilket vi inte har, så vi behöver en diskret version, **Discrete Fourier Transform (DFT)**:

Ersätt de kontinuerliga variablerna $(\tilde{\nu}, t)$ med $(k \cdot \Delta \tilde{\nu}, n \cdot \Delta t)$ och sampla interferogrammet i N ekvidistanta punkter.

$$S(k \cdot \Delta \tilde{\nu}) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n \cdot \Delta x) e^{i2\pi n k / N}$$

$$I(n \cdot \Delta x) = \frac{1}{N} \sum_{k=0}^{N-1} S(k \cdot \Delta \tilde{\nu}) e^{-i2\pi n k / N}$$

$$\Delta \tilde{\nu} = \frac{1}{N \cdot \Delta x}$$

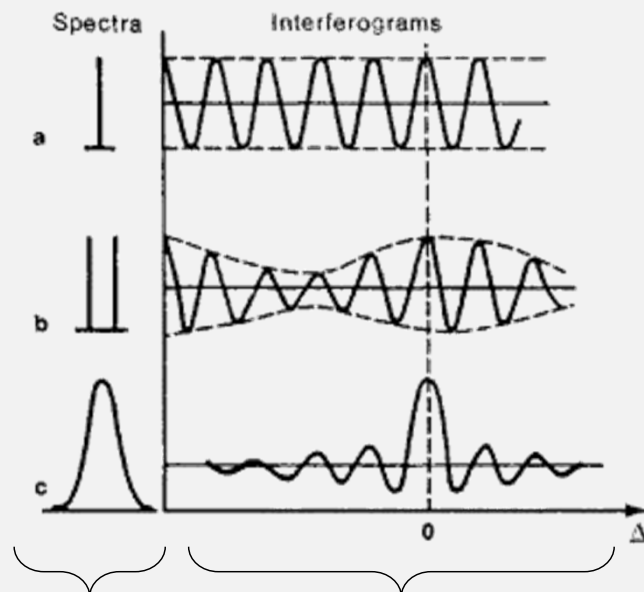
Fast Fourier Transforms (FFTs) är algoritmer som snabbar på beräkningen, men till priset att N inte kan väljas godtyckligt, utan N måste typiskt vara en potens av 2.

FT-metoder i spektroskopi

Kontinuerlig/svepande FTS

En interferometer med rörlig spegel används för att mäta intensiteten vid olika positioner hos spegeln (motsvarande olika optisk längd), vilket resulterar i ett interferogram, vars FT är spektrumet.

- FT-IR spektroskopi

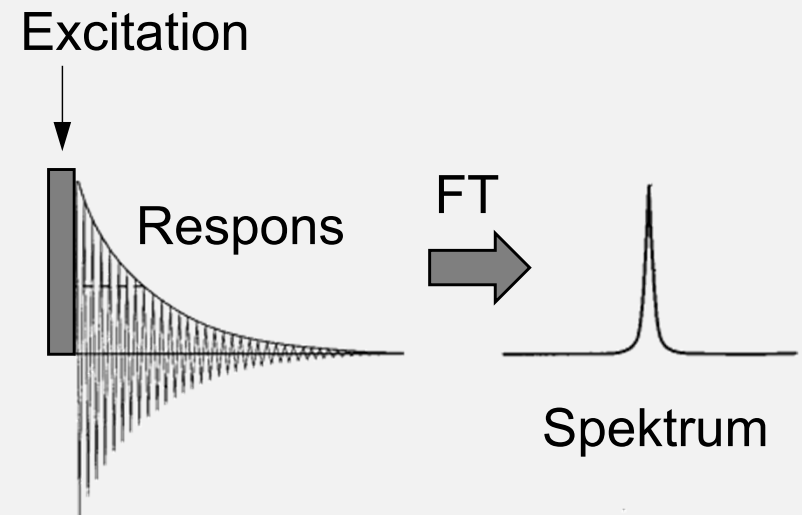


Frekvensdomän Tidsdomän

Pulstekniker

En kort excitationspuls inducerar en periodisk respons, överlagrad på en exponentiellt avtagande intensitet. Frekvensen hos responsen beror på provet.

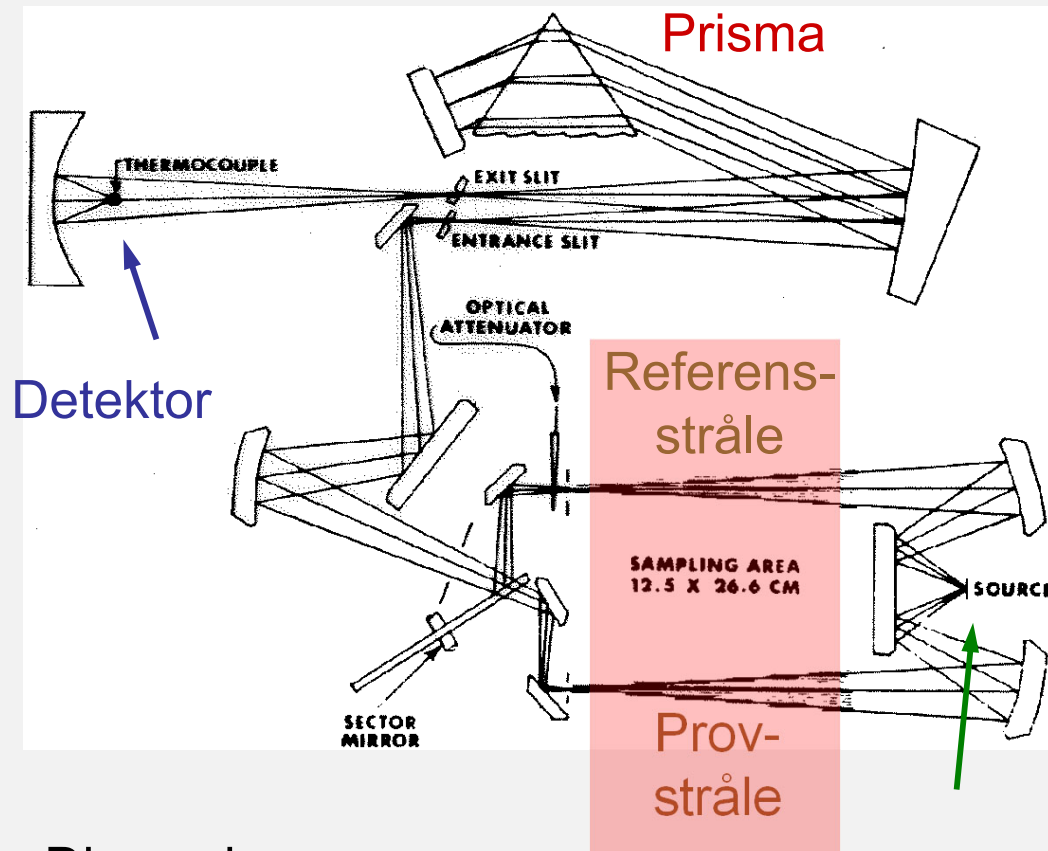
- NMR-spektroskopi



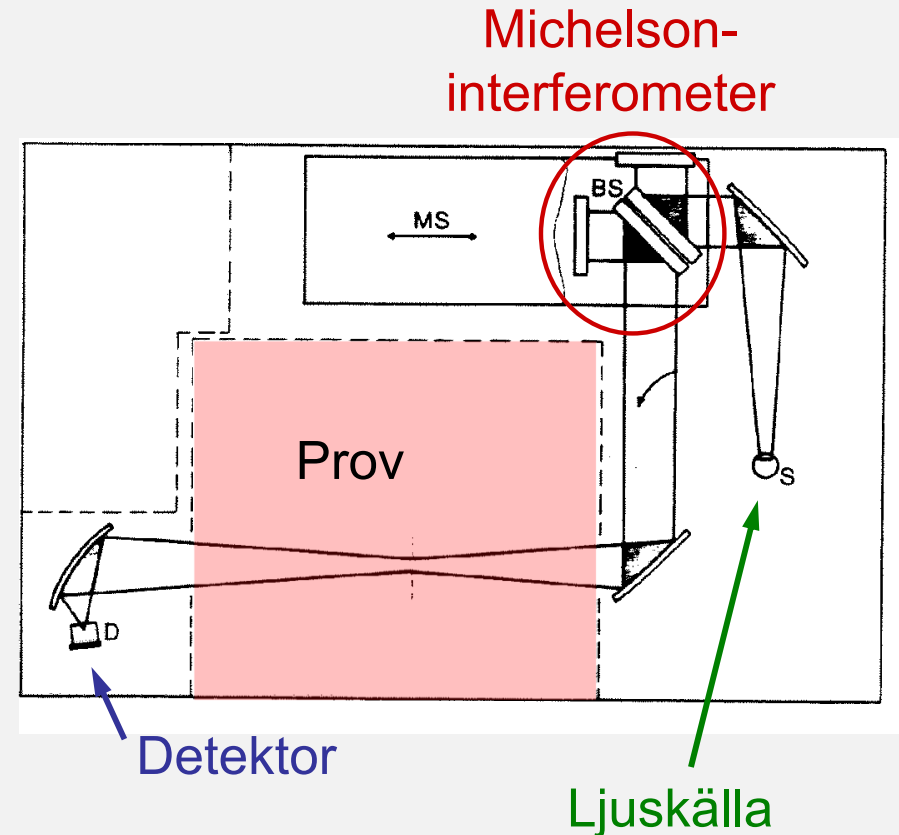
IR-spektrometrar: dispersiva eller FT-IR?

Moderna IR-spektrometrar använder interferometrar!

Perkin Elmer 137 Infracord Spektrofotometer



Bruker IFS 48 FTIR-Spektrometer



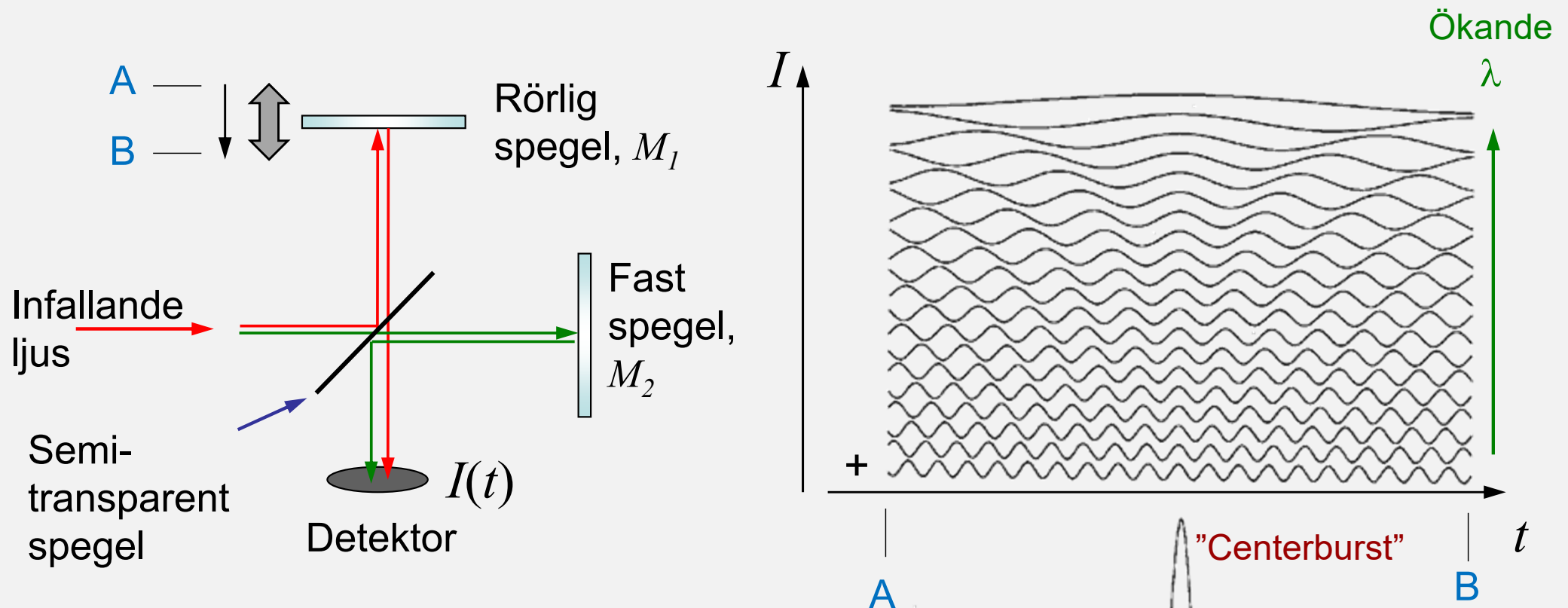
Dispersiv

En bredbandig ljuskälla belyser provet, den detekterade våglängden väljs med en monokromator (prisma eller gitter), och $I(\lambda)$ registreras.

Fourier

I ett interferogram registreras intensiteten under en hel cykel hos spegeln, $I(t)$, som sedan Fourier-transformeras för att ge $I(\lambda)$.

Michelson-interferometern



Om infallande ljus är monokromatiskt, och spegel M_1 rör sig med konstant hastighet, varierar intensiteten på detektorn periodiskt.

För ett kontinuum av våglängder, blir det resulterade interferogrammet en summering av dessa.

Summering av sinussignaler till ett *interferogram*.

Fouriertransformation ger signalens frekvenskomponenter.

Fördelar med FTIR-spektroskopi

FTIR = Fourier-transform IR

1. **Jaquinots fördel** (multiplex): I FTIR mäts signalen över hela våglängdsområdet på en gång, inte var för sig för varje våglängd.
2. **Fellgetts fördel**: hela intensiteten hos infallande ljus utnyttjas hela tiden, inte bara intensiteten vid en viss våglängd.
3. **Connes' fördel**: Genom att låta ljuset från en HeNe-laser passera genom interferometern parallellt med IR-ljuset, fås en exakt referens för den rörliga spegelns position, vilket ger hög noggrannhet i frekvensskalan.

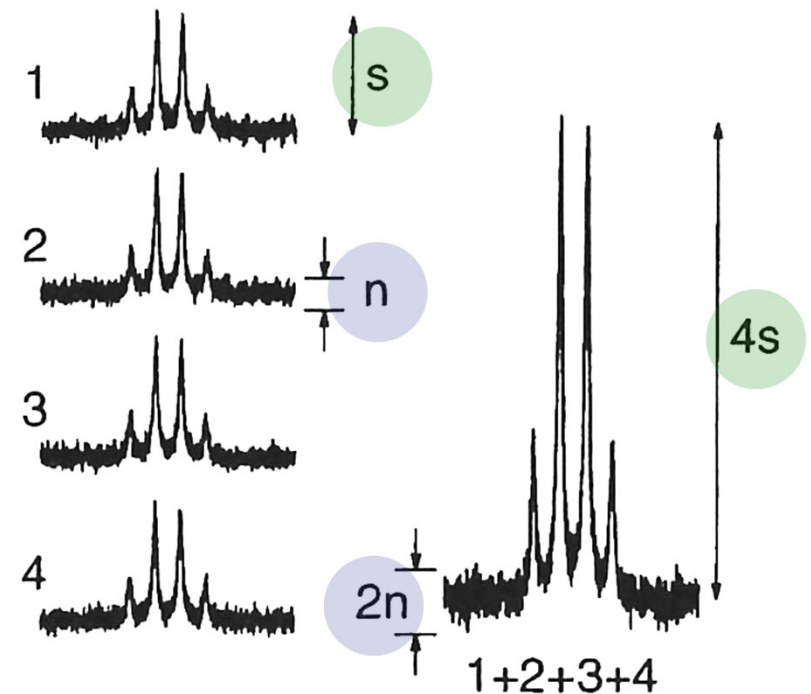
Den spektrala upplösningen bestäms av längden hos spegelns rörelse:

$$\Delta \nu \propto \frac{1}{x} \quad \text{T.ex. } x = 5 \text{ cm ger en upplösning på ca } 0.1 \text{ cm}^{-1}.$$

Normalt är *ett* svep med spegeln alldeles för lite för att få en användbar signal, så i praktiken summeras ett stort antal svep ("scans") i ett experiment.

Fördelar med pulstekniker i NMR

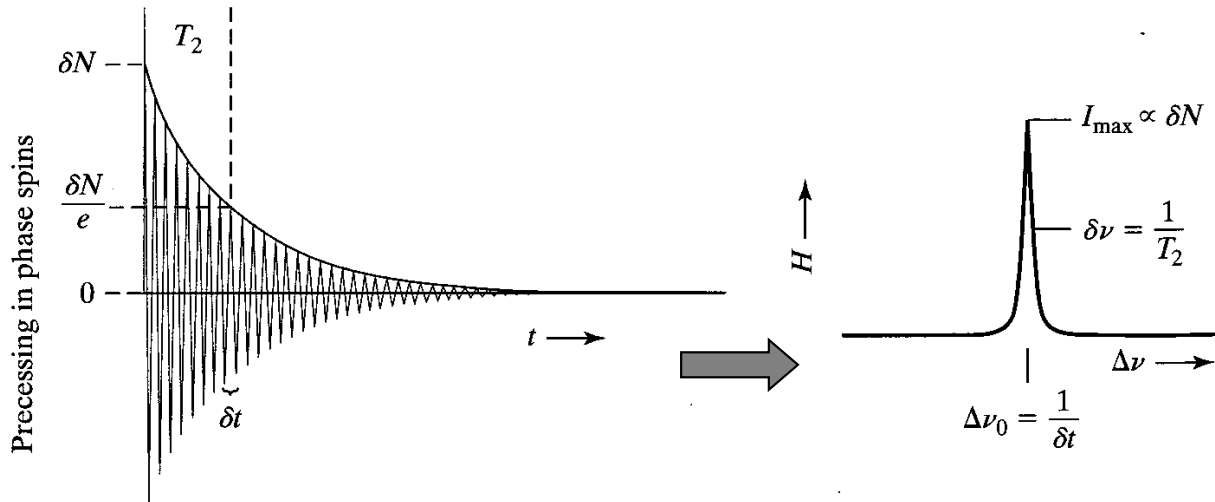
- FT-NMR tar upp ett spektrum 100-1000 gånger snabbare än en dispersiv spektrometer som arbetar med kontinuerliga spektra, och tidsbesparingen kan användas till att summera 100-1000 spektra, för att förbättra den uppmätta intensiteten.
- Signal/brus-förhållandet förbättras. Intensiteten hos signalen ökar proportionellt mot antalet summerade spektra, N , medan bruset ökar med $\sqrt{N}$.
- Gör det möjligt att använda avancerade pulssekvenser för att excitera eller manipulera spinn på olika sätt, vilket är grunden för många NMR-tillämpningar.



"Free-induction decay" (FID) i NMR

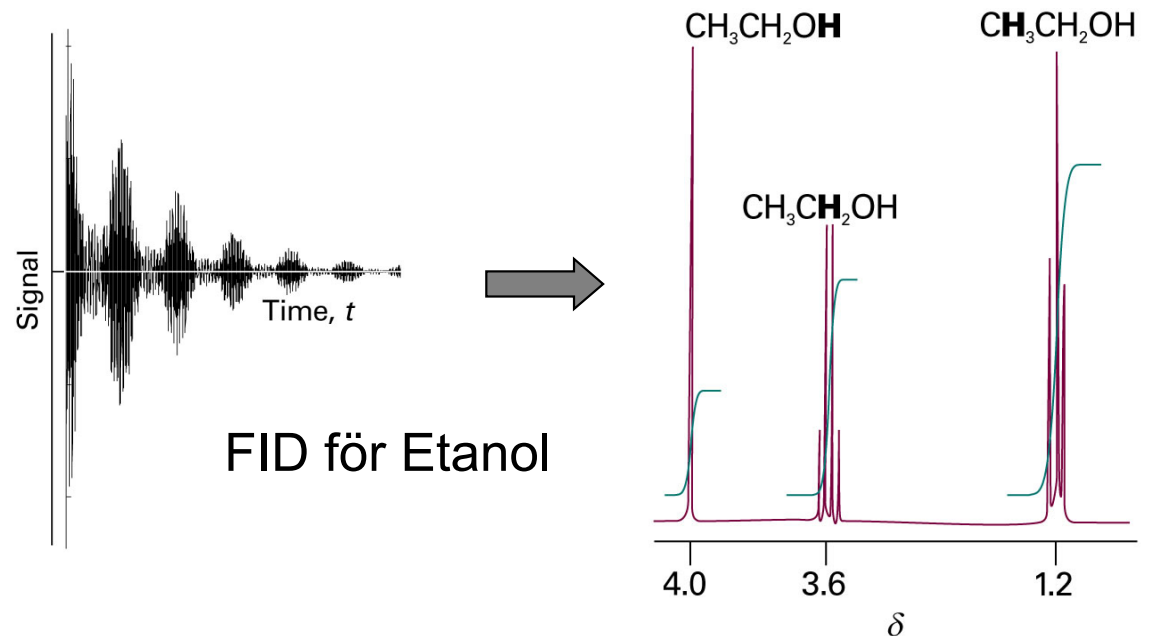
En frekvens i taget:

Excitera spinn så att ett magnetiskt moment skapas, stäng av det exciterande fältet, och låt signalen klinga av.



Fourier-metod:

Applicera en puls (många frekvenser samtidigt). Via Fouriertransform fås alla frekvenskomponenterna i signalen samtidigt.



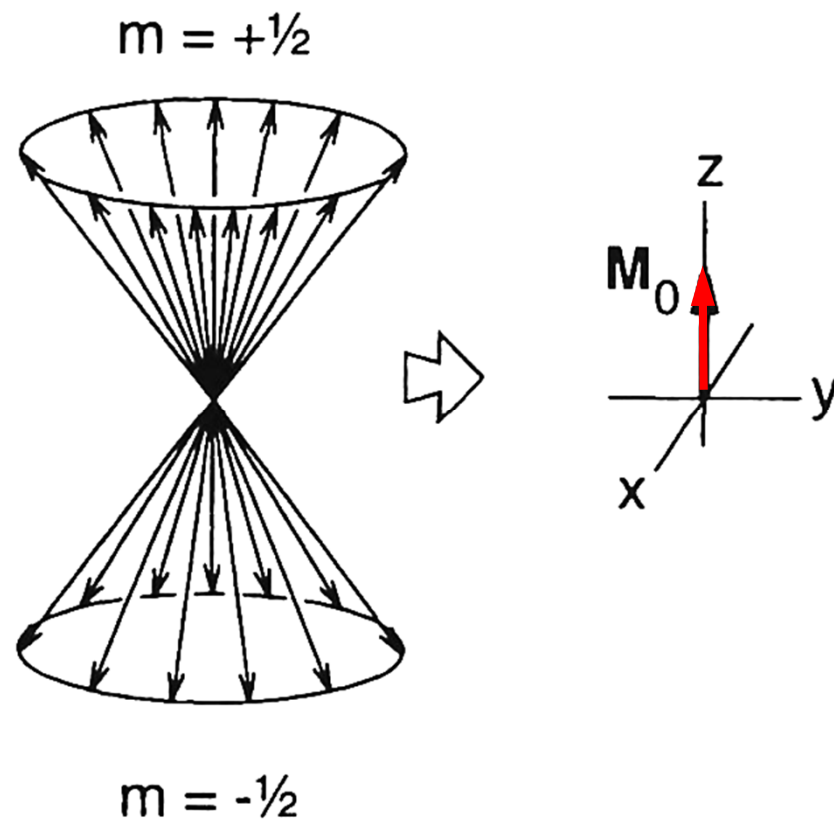
Vektormodellen i NMR

För en spinn-1/2-kärna i ett externt magnetfält finns bara två möjliga tillstånd, och dessa bidrar med $\pm\gamma\hbar/2$ till den totala magnetiseringen

$$\mathbf{M}_0 = \frac{1}{2}\gamma\hbar\Delta N$$

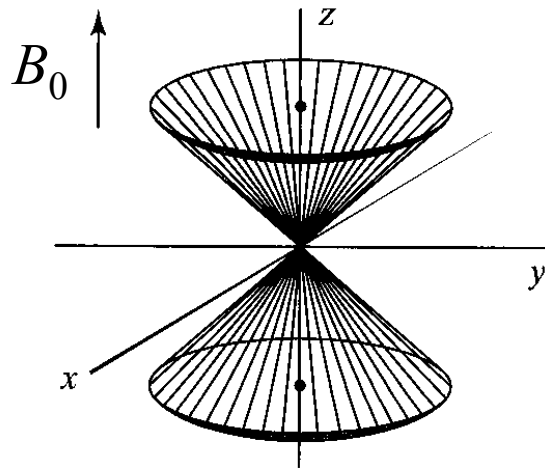
Vid termiskt jämvikt är alla spinn ur fas och slumpmässigt orienterade på konen, och det är en svag övervikt för spinn i det lägre tillståndet $m = +1/2$ (för kärnor med $\gamma > 0$)

De individuella magnetiska momenten måste behandlas kvantmekaniskt, medan den totala magnetiseringen $\mathbf{M}$ kan behandlas klassiskt!

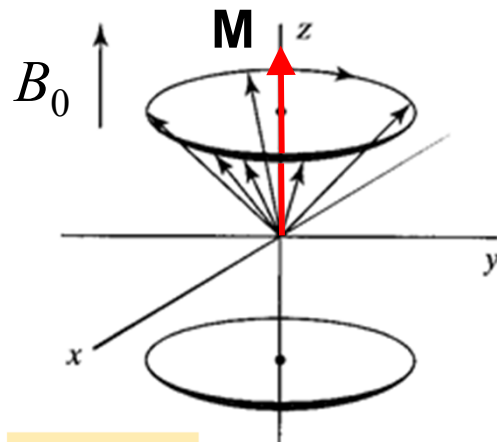


Kärnspinn är opåverkade av molekylrörelser, och behåller sin orientering även om molekylen roterar!

Pulstekniker



$$B_0 = 0 \quad N_\alpha \approx N_\beta$$

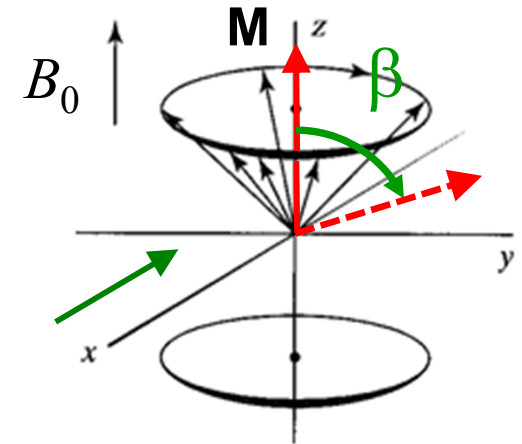


$$B_0 > 0$$

Fler spinn i grundtillståndet.
Nettomagnetisering **M**

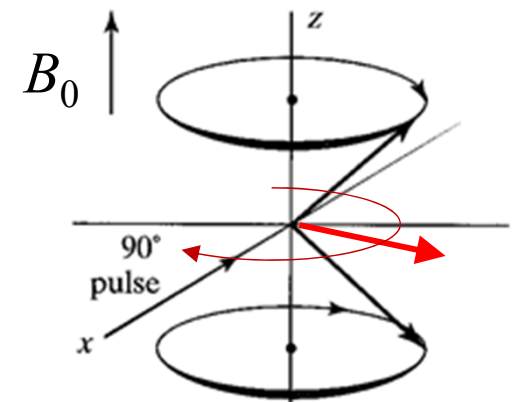
Magnetisering kan inte detekteras i z -riktningen: vrid magnetiseringen till xy -planet!

$$\beta = \gamma B_1 t$$

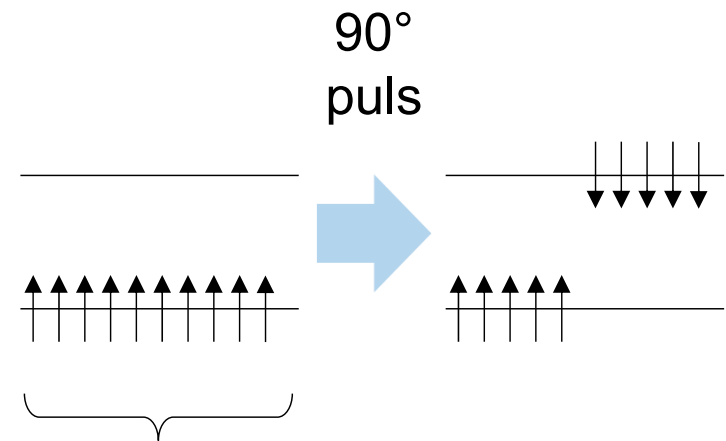
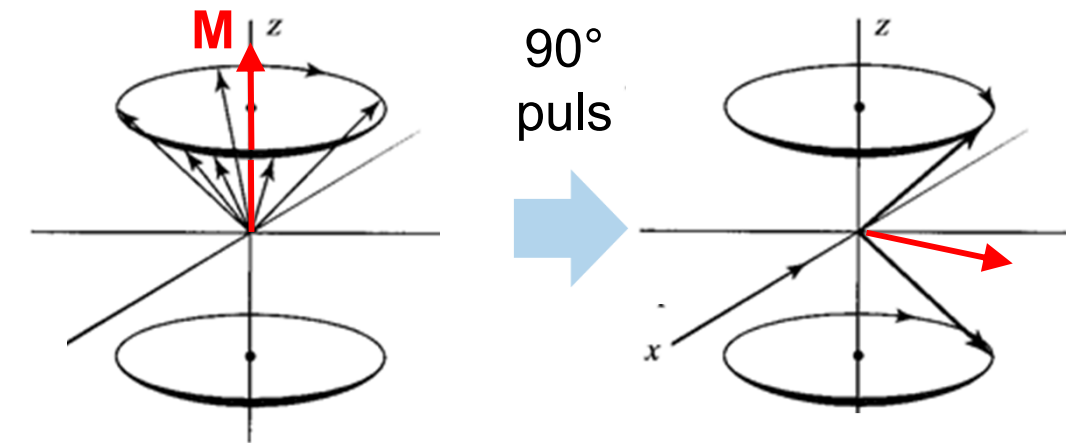


Ett cirkulärpolariserat fält i xy -planet med frekvensen ν_L vrider magnetiseringen. Vinkeln β styrs genom att variera tiden som fältet (med styrkan B_1) appliceras.

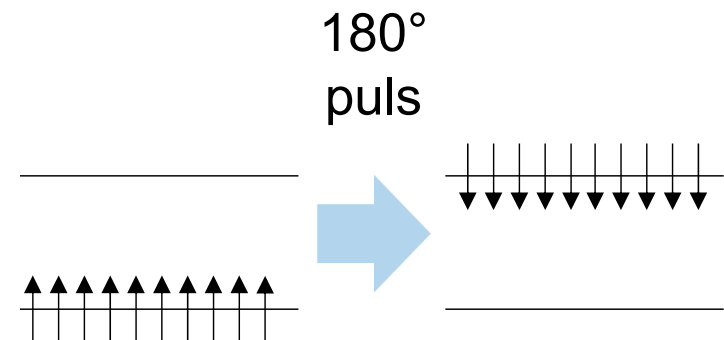
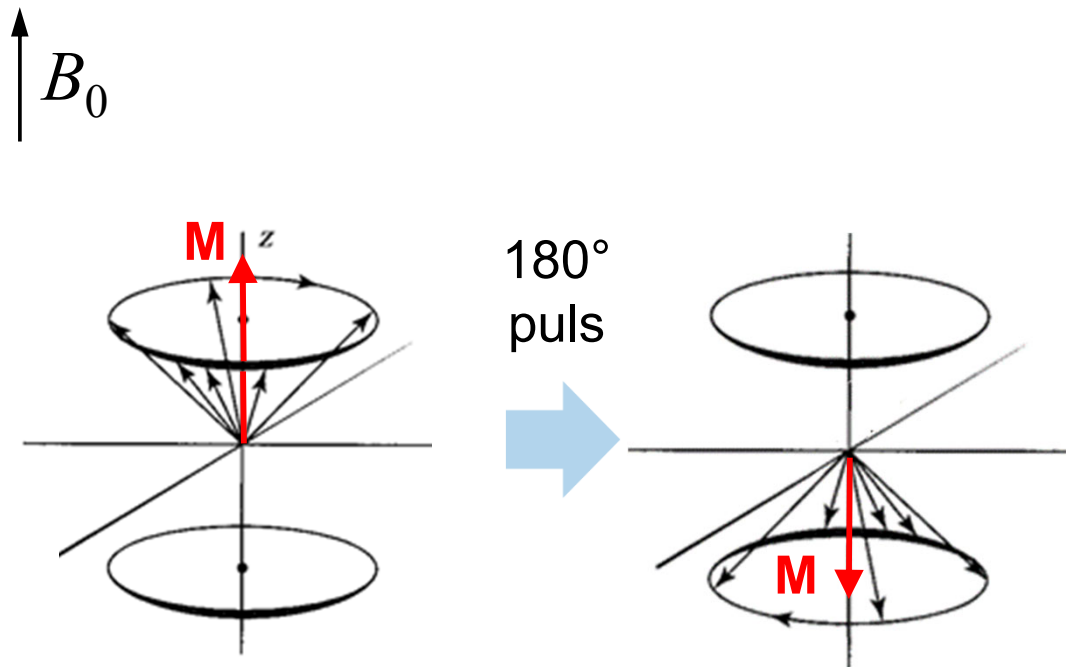
En 90° -puls vrider magnetiseringen till xy -planet, där **M** sedan roterar med frekvensen ν_L .



Vad gör en puls med populationerna?

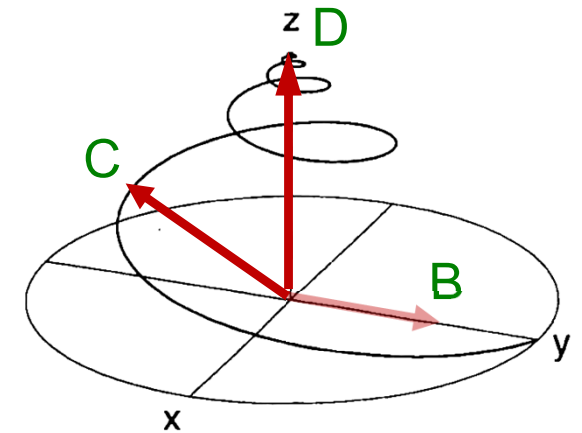
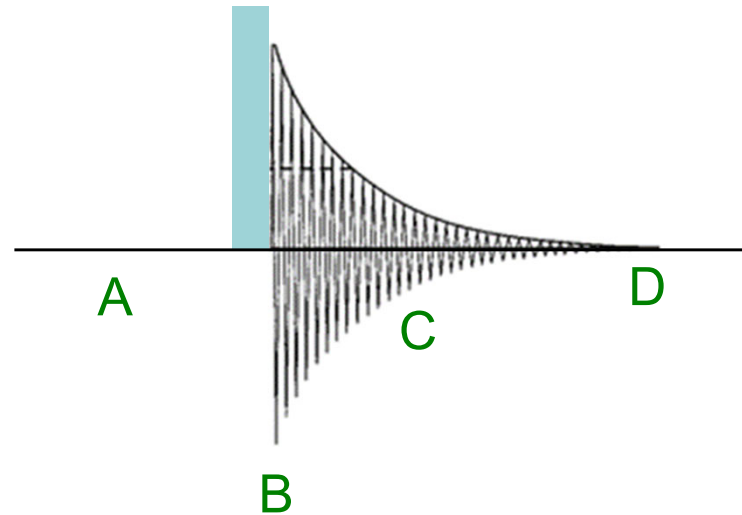
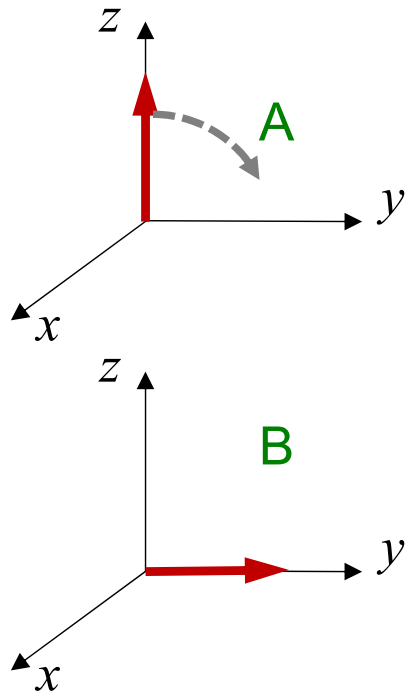


OBS! Endast den fraktion som deltar i en övergång...



"Free-induction decay"

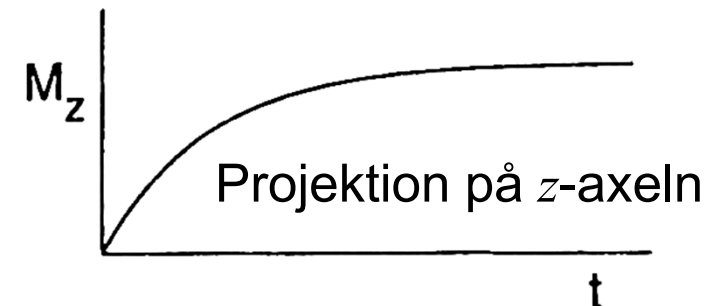
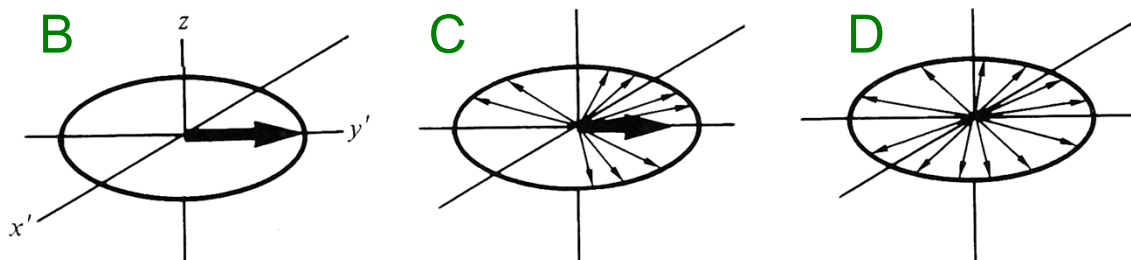
Applicera en 90° puls, och mät responsen.



Magnetiseringsvektorn precesserar och återgår till att vara orienterad i z -riktningen.



Projektion på xy -planet (T_2 -relaxation)



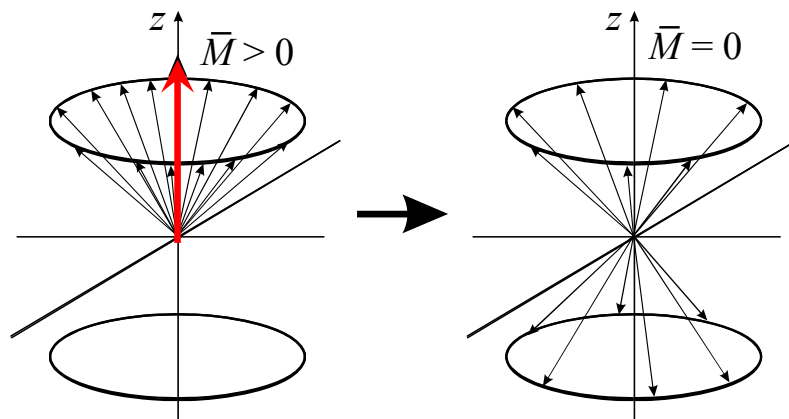
Spinnrelaxation – Diffusion och dynamik

”Spin-lattice (longitudinal) relaxation”

Excitera spinn (invertera systemet), och mät hur snabbt de återgår till grundtillståndet (T_1).

Energi avges till omgivande kärnor vars lokala fält varierar nära $\alpha \rightarrow \beta$ -övergången.

Är rörelsen hos en kärna för snabb eller för långsam blir Dopplerskiftet för stort för att få energiutbyte, och T_1 blir stor!



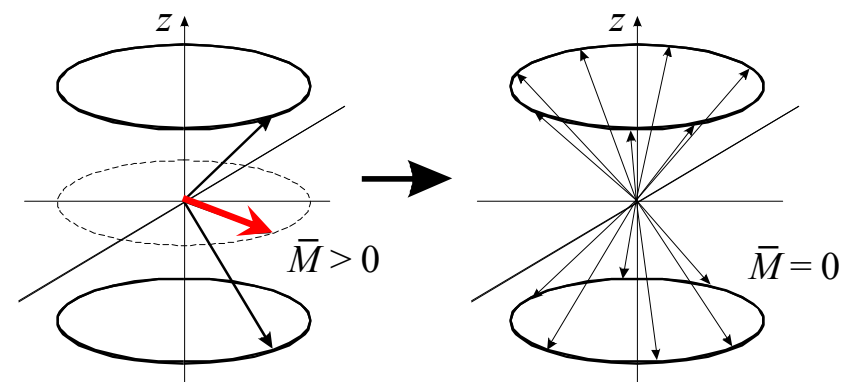
”Longitudinal magnetization recovery”
(relaxation längs z-axeln)

”Spin-spin (transverse) relaxation”

Vrid alla spinn i fas; mät hur fort orienteringen försvinner (T_2):

Växelverkan med omgivande kärnor ger variationer i Larmorfrekvens som gör att spinn hamnar ur fas.

En kärna som rör sig fort får liten netto-variation i ν_L , och T_2 blir stor!



”Transverse magnetization decay”
(spinn-utbyte i xy-planet)

T_1 -relaxation

Longitudinell magnetisering ($\mathbf{M}_z$) återgår till stationärt tillstånd ($\mathbf{M}_0$) med tidskonstant T_1 .

Spinnenergi avges till omgivningen i olika grad, beroende på...:

Diffusionshastighet

Temperatur

Fastillstånd

Salthalt

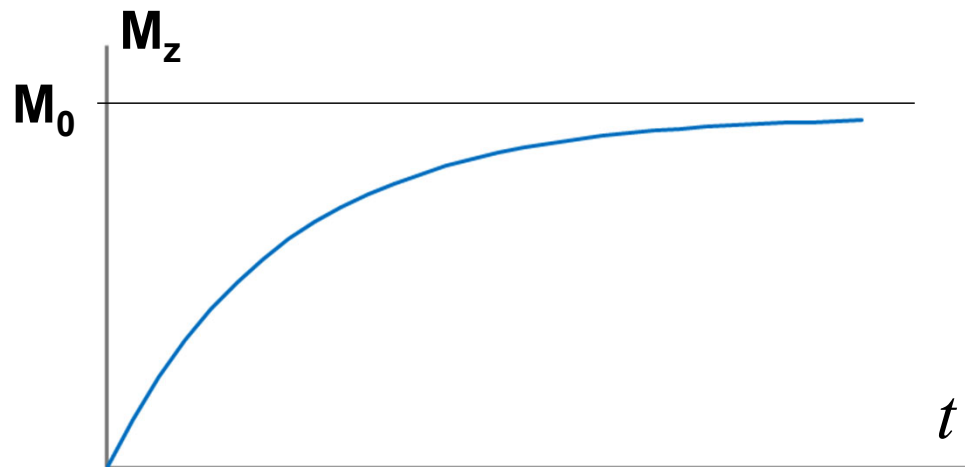
Vattenhalt

Viskositet

etc., etc., ...

T_1 är tiden det tar att nå 63% av den ursprungliga magnetiseringen ($\mathbf{M}_z$), vilket typiskt kan ta några sekunder.

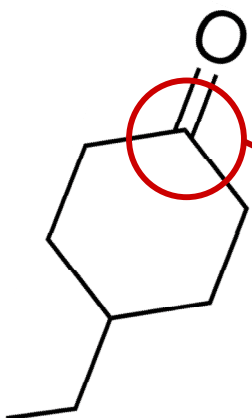
$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{(M_z - M_0)}{T_1}$$



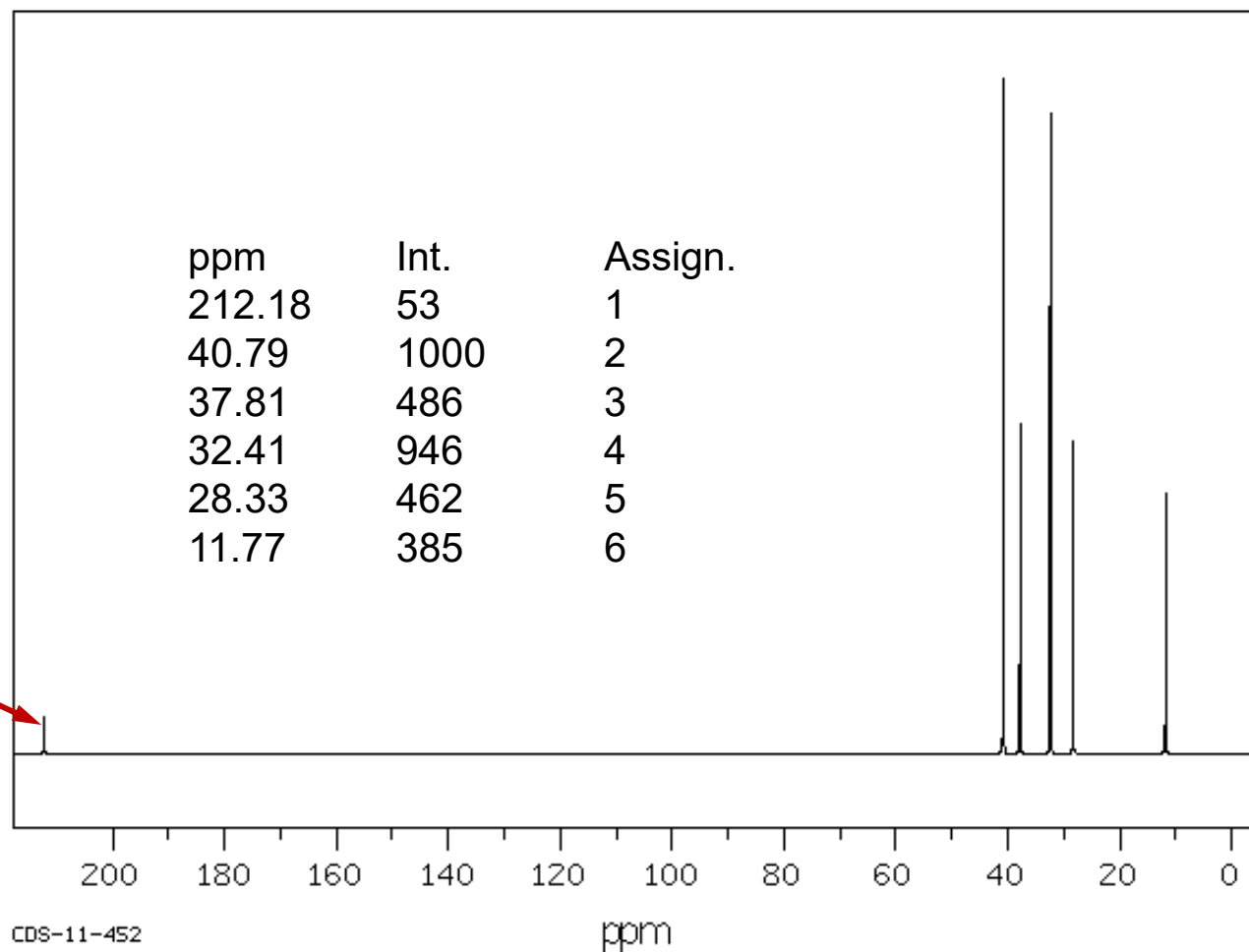
T₁-relaxation

Karbylkolet ger lägre intensitet än kol med bundna väten, p.g.a. mer homogen miljö, vilket ger stor tidskonstant T₁

$$I \propto \frac{1}{T_1}$$

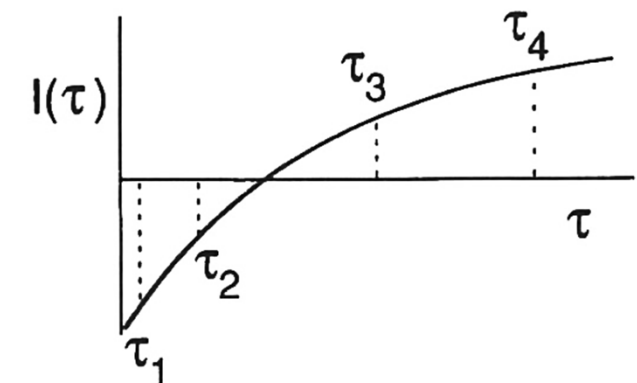
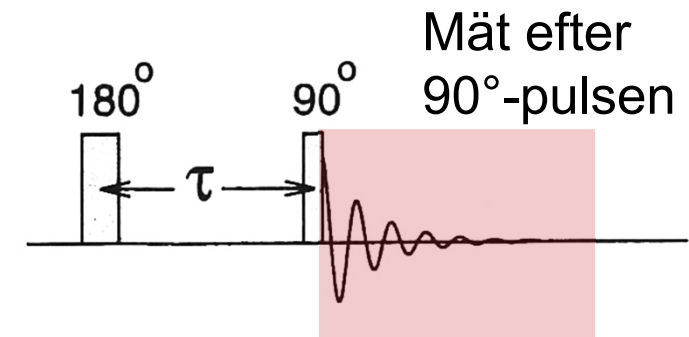
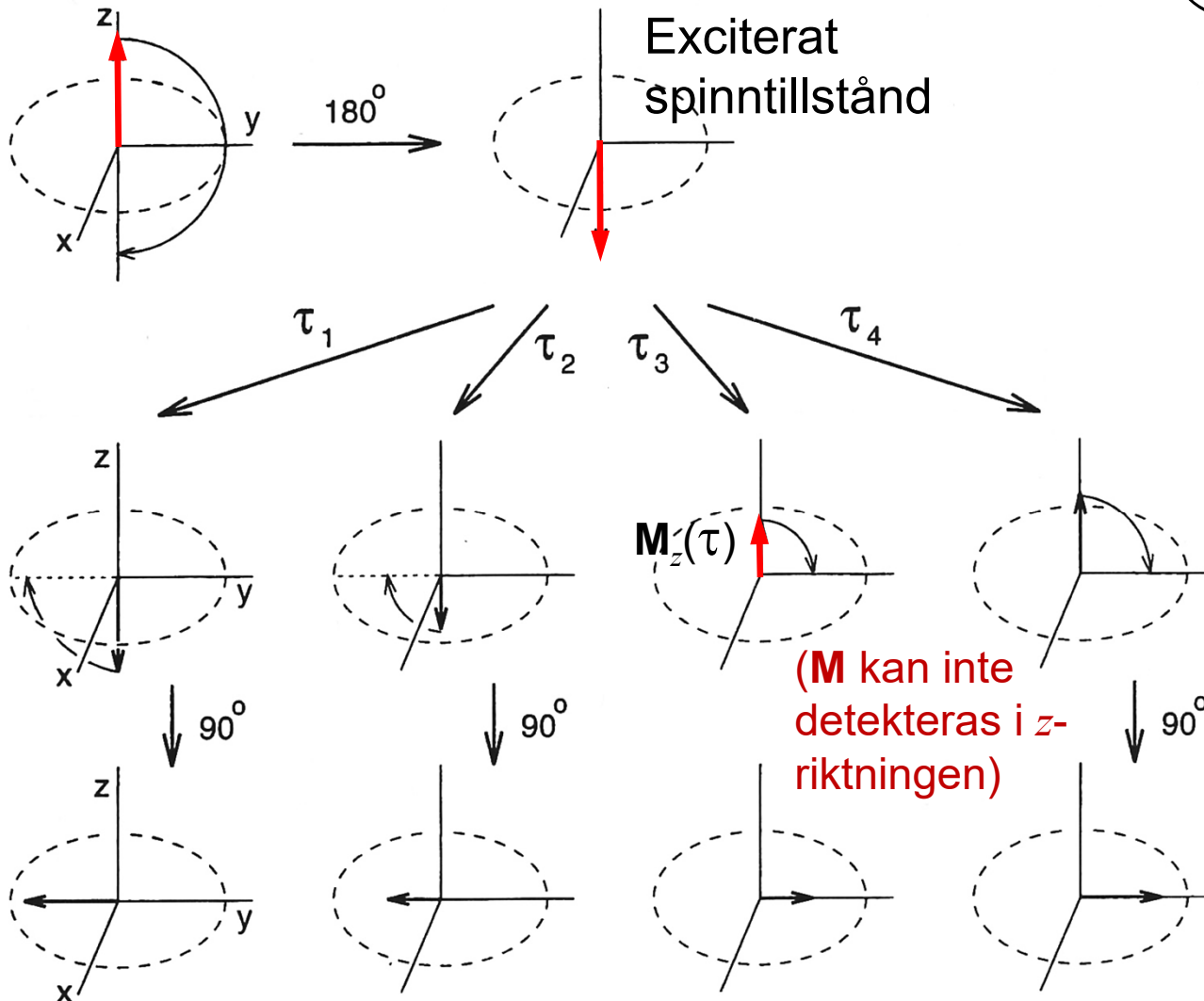
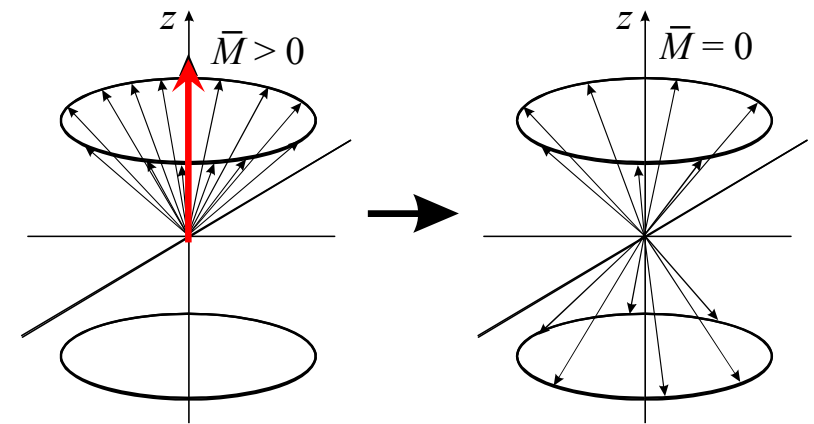


4-etylcyklohexanon



T₁-relaxation

Mäts med pulssekvensen 180° – τ – 90° ;
Invertera systemet, och mät hur snabbt
spinn återgår till grundtillståndet.



Upprepa FID-mätningar för olika tider τ_n

T₂-relaxation

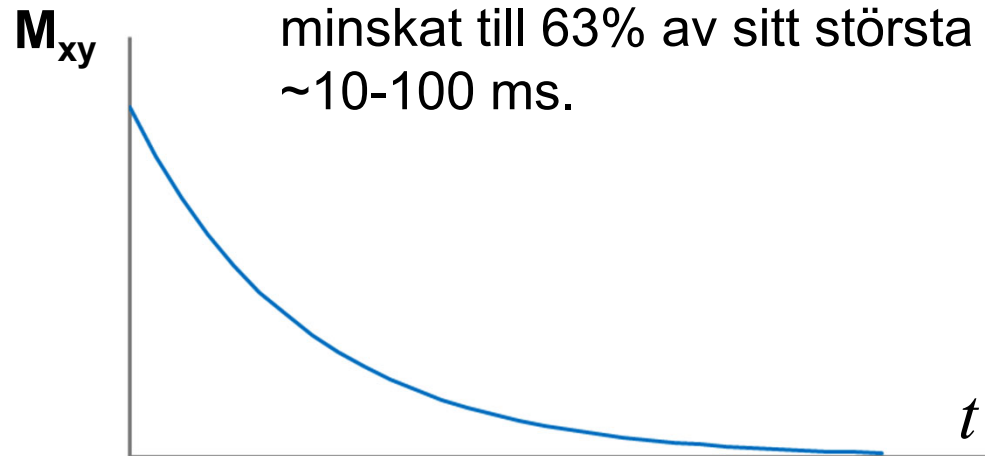
Transversell magnetisering (**M**_{xy}) återgår till 0 med tidskonstant T₂.

Spinnenergi avges till omgivningen i olika grad, beroende på...:

- T₁ (eftersom T₂ ≤ T₁)
- Lokala inhomogeniteter i magnetfältet
- Variationer i magnetisk susceptibilitet hos omgivande material
- Kemiska skift

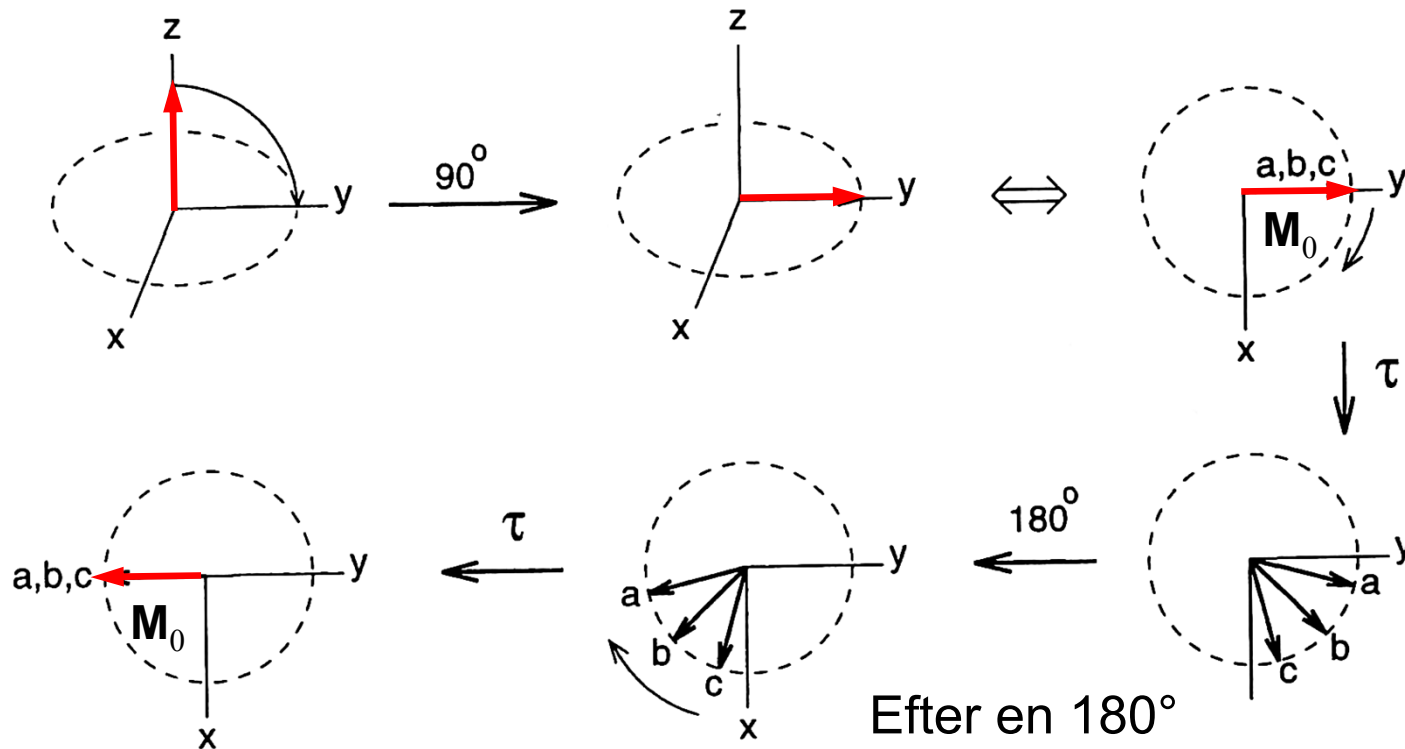
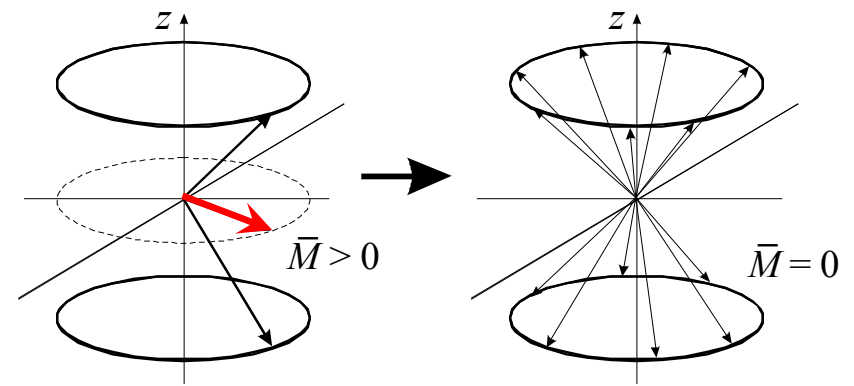
$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2}$$

T₂ är tiden det tar innan den transversella magnetiseringen har minskat till 63% av sitt största värde, ~10-100 ms.



T₂-relaxation

Pulssekvensen $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau$



Variation i lokala fält ger spridning i ν_L som ökar med tiden τ .

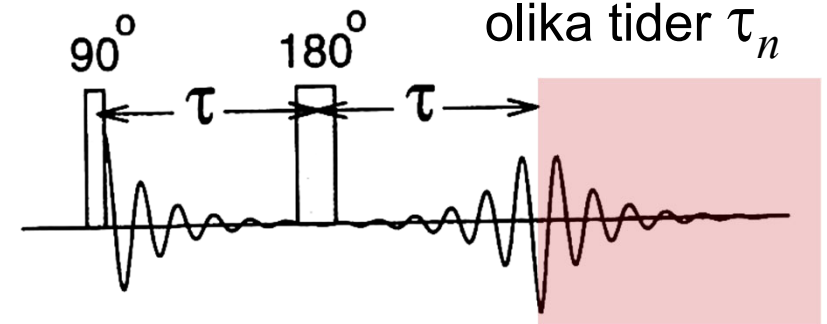
c har högre frekvens än **a**, och ligger före.

Efter en 180° puls hamnar alla spinn i omvänd ordning.

Efter tiden τ har **c** kommit ikapp **a**, och *utan* relaxation är magnetiseringen åter $\mathbf{M}_0$.

(Spinn-eko)

Mät FID här för olika tider τ_n



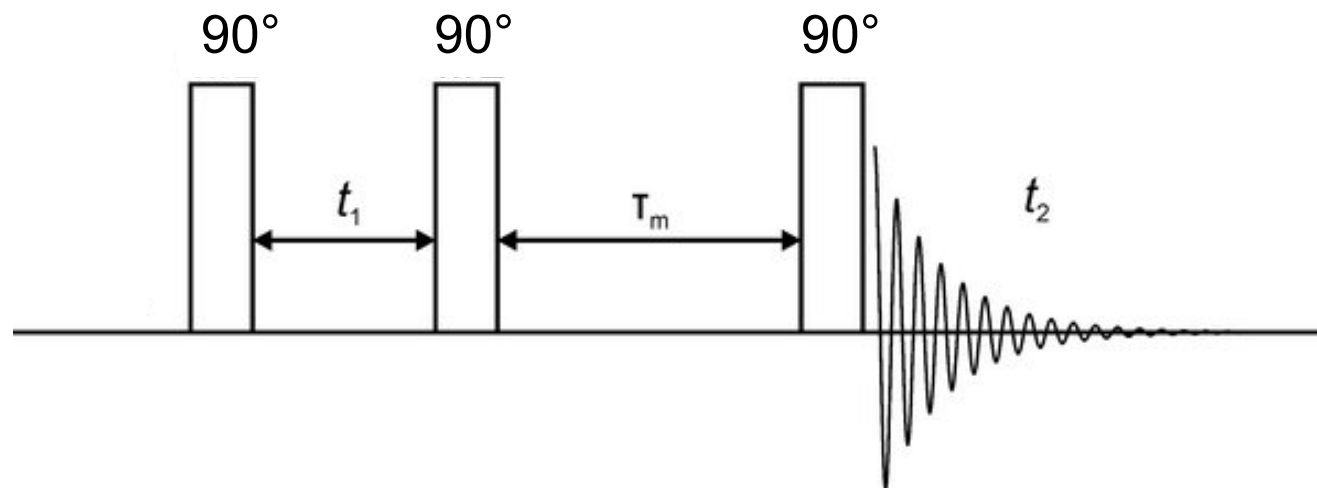
2D-NMR

Spinn-spinn-koppling kan ske

- Via bindningar (J-koppling eller skalär koppling) med räckvidd ca 3 bindningar.
- Genom rumsligt närliggande kärnor (D-koppling eller dipolkoppling, *Nuclear Overhauser Effect*, NOE), med räckvidd ca 5-6 Å.

Kärnor med lika δ via J-koppling kan ha olika rymd-koppling via NOE, och kan skiljas åt i ett 2D-spektrum.

Pulssekvens:



Variera T_m i ett experiment (jfr T_2 -relaxation):

J-kopplingen kommer att vara densamma oavsett T_m , medan relaxation via NOE varierar med tiden som kärnorna hinner växelverka med varandra

→ De två bidragen kan separeras!

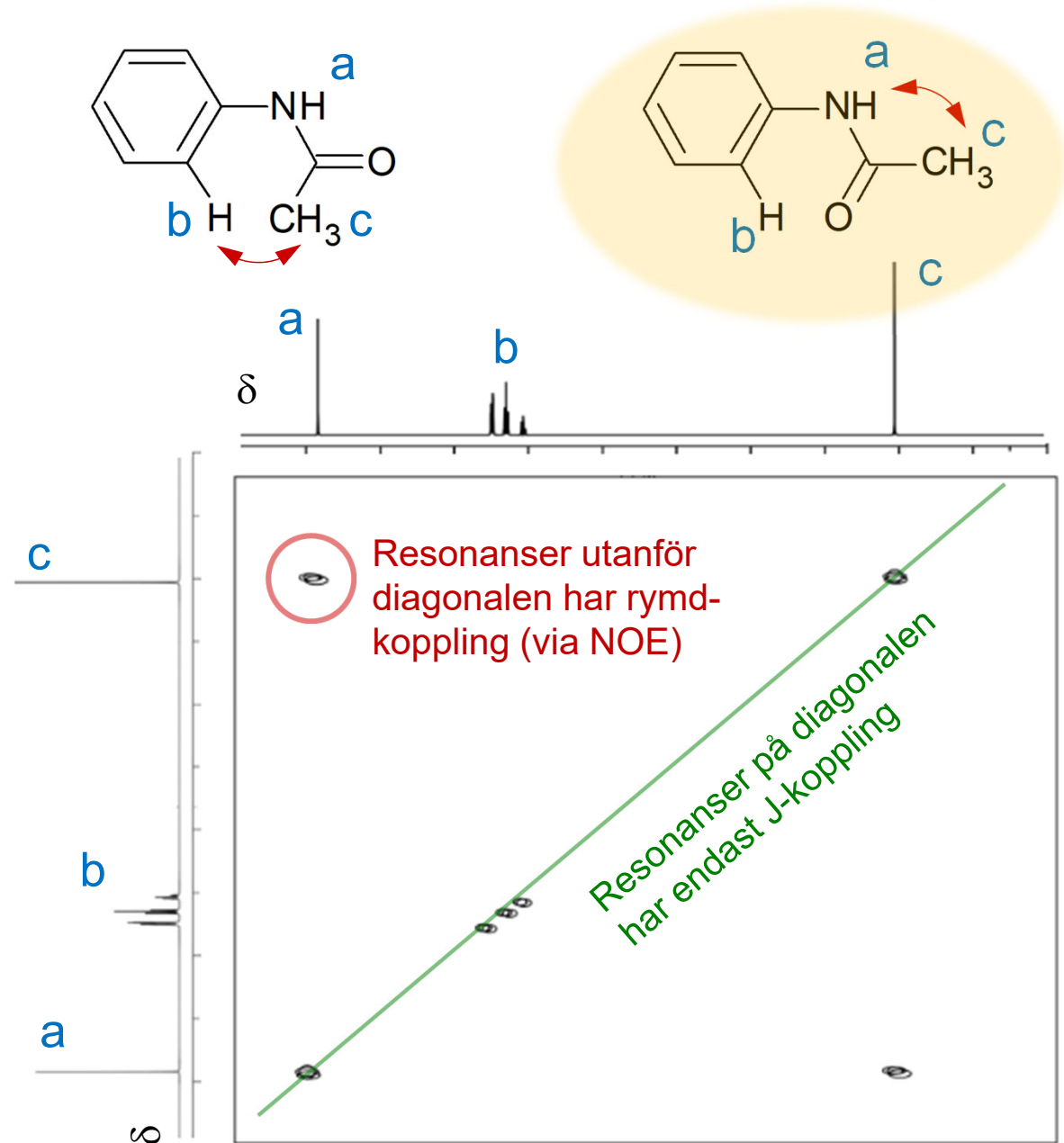
Strukturinformation via ^1H NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Acetanilid har två tautomerer, med begränsad rotation kring amidbindningen.

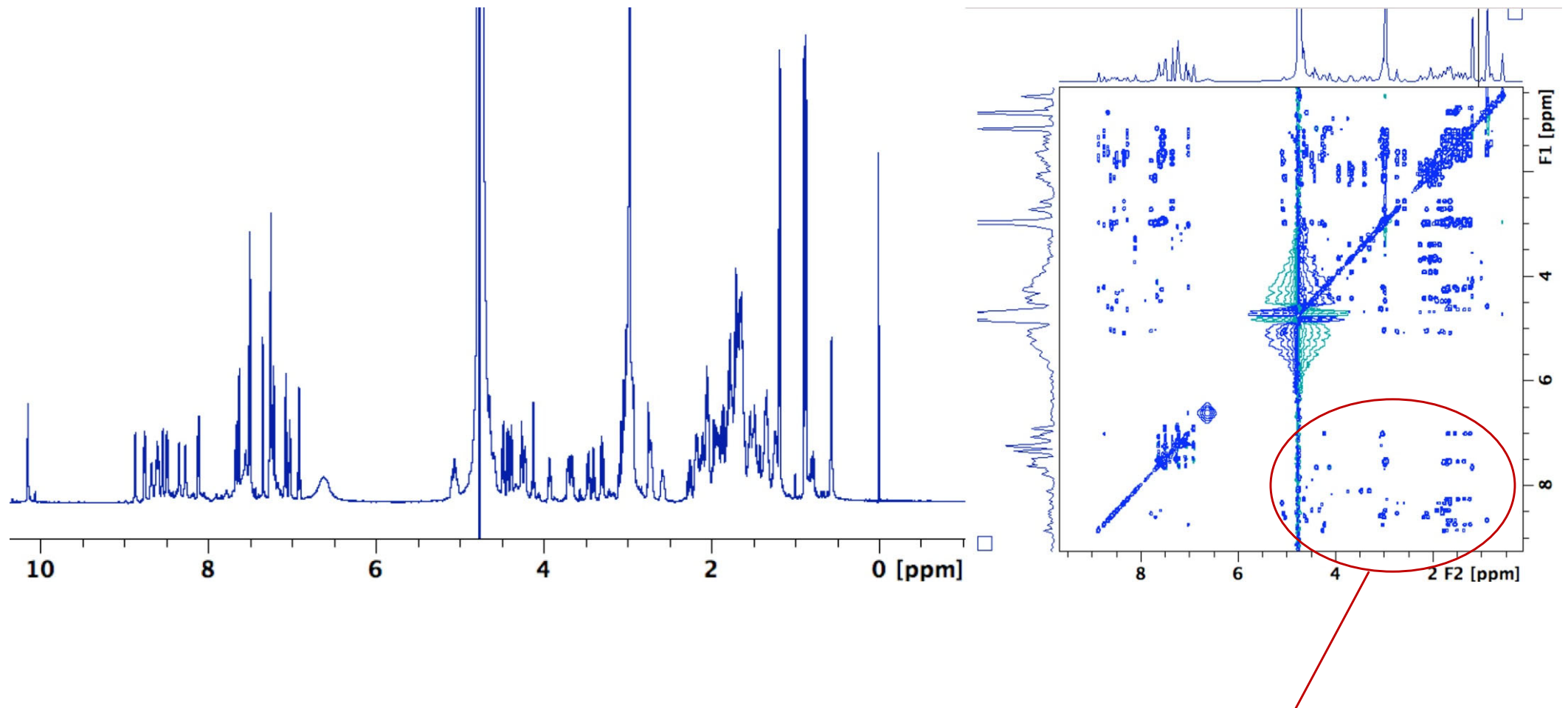
Metylprotonerna (c) växelverkar olika med andra protoner via NOE beroende på konformationen.

På samma sätt kan koppling mellan *olika* kärnor, t.ex. ^1H mot ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P ... etc. ge ytterligare strukturinformation.

Mät vid olika T_m och rita utfallen mot varandra i ett diagram:



1D & 2D ^1H -NMR för proteinanalys



Toppar utanför diagonalen ger 3D-information från protoner som är rumsligt nära varandra

Tillämpningar av NMR

Kemisk analys – identifiering och strukturbestämning av molekyler.

Molekylstruktur – veckning av proteiner, struktur hos membranproteiner (i membran), polymerstruktur.

Lösningsmedelsstruktur och växelverkan med lösta ämnen.

Dynamik hos makromolekyler, diffusion.

Intermolekylär växelverkan – specifik bindning, vätebindningar, hydratisering av biomolekyler, jonisationstillstånd hos funktionella grupper.

Konformation hos växelverkande molekyler, enzym-substrat- och receptor-ligand-interaktioner.

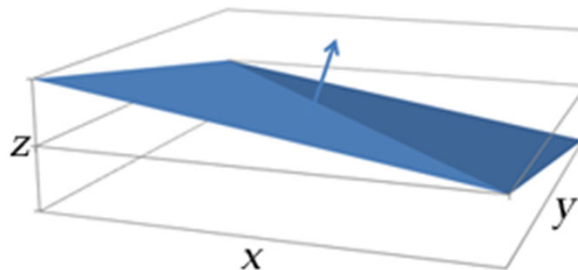
...

MRI – Magnetic Resonance Imaging

Variationer i T_1 och T_2 mellan olika vävnadstyper är grunden för avbildning med magnetresonans, MRI.

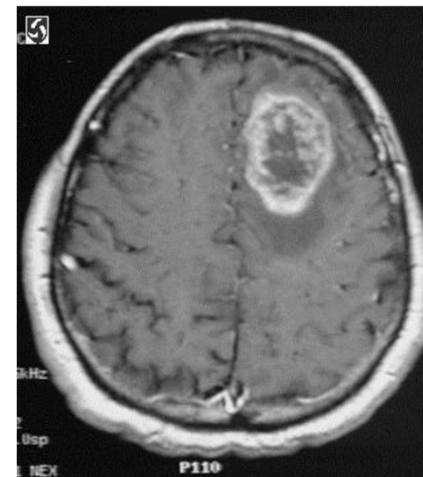
Med ett homogent fält över en hel kropp fås ett medelvärde av responsen från alla protoner i fältet – hela kroppen.

Genom att skapa en fältgradient ($\Delta B_x, \Delta B_y, \Delta B_z \ll B_0$) fås resonans från olika punkter i rummet vid olika frekvenser.

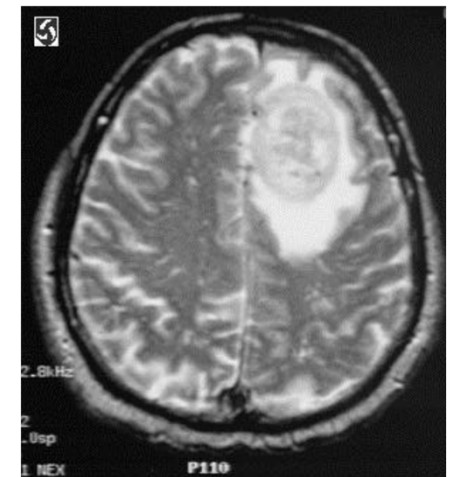


	T_1 (ms)	T_2 (ms)
Vatten	4000	2000
Fett	400	45
Vit substans	850	80
Grå substans	1300	120
CSF	4000	500
Benmärg	500	100
Muskulatur	1000	30

MRI-avbildning av en hjärntumör



T_1 -viktad



T_2 -viktad

(Bild från Brigham and Women's Hospital teaching files)