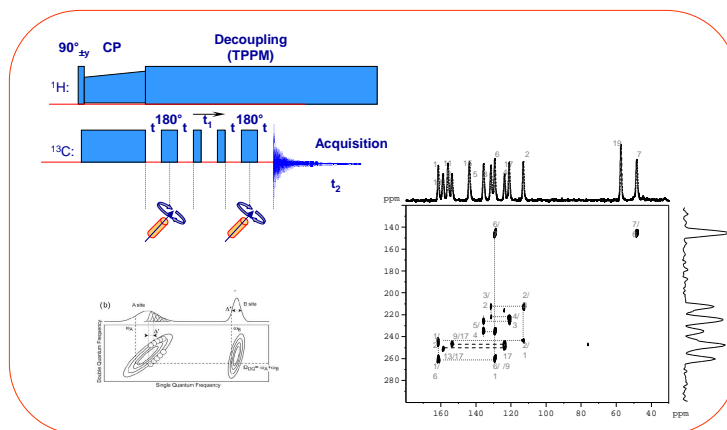


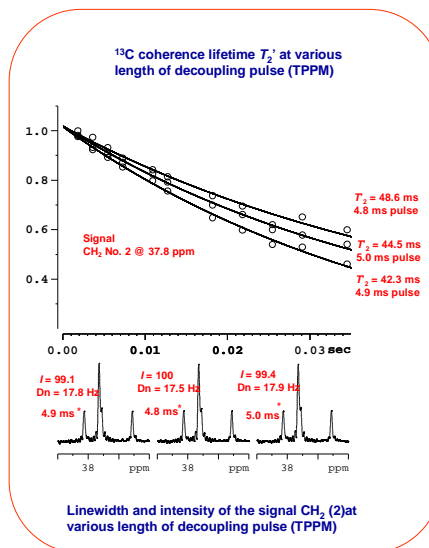
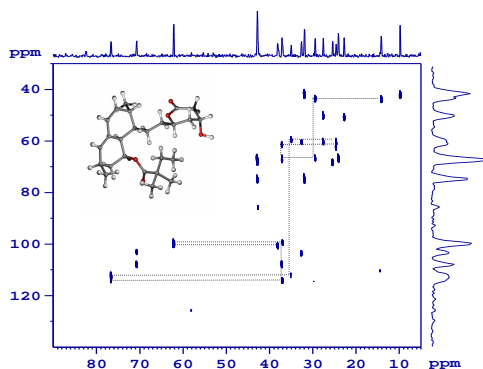
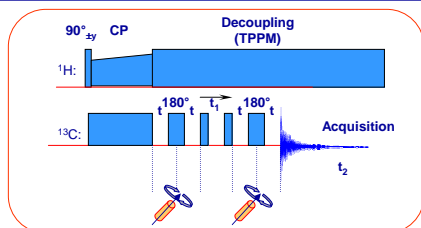
(9) X-X a X-Y korelace – zvýšení spektrálního rozlišení

Joint Laboratory of Organic Chemistry and NMR
MASCOR and MASCOR CH



Ačkoli korelační experimenty, které dávají do vztahu chemické posuny vodíku ^1H mohou ve specifických případech poskytovat zajímavé informace o struktuře a pohyblivosti látek, tak disperze ^1H chemických posunů, spolu s problémy s odstraňováním dipolárního rozšíření, neumožňují jejich obecné využití. Zvláště pro získání strukturních informací o tak složitých systémech, jako jsou velké proteiny nebo peptidy, je nutné dosáhnout podstatného zvýšení spektrálního rozlišení.

Optimalizace INADEQUATE

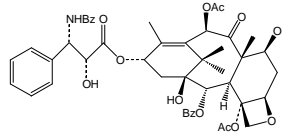
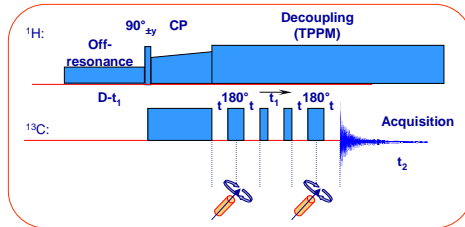


V návaznosti na předchozí diskusi je vhodné uvést klasický dvoukvantový experiment, který je založený na přenosu polarizace díky působení spin-spinových skalárních interakcí mezi uhlíky ^{13}C . V přirozeném izotopickém zastoupení je pravděpodobnost přímého kontaktu dvou jader s izotopovým číslem C^{13} přibližně 1:10000. To znamená, že experiment je velmi málo citlivý, a proto je potřeba o každý kousek koherence bojovat. Bez izotopického obohacení je limitujícím faktorem pro provedení tohoto experimentu velikost spinového systému, tedy počet signálů, které jsou zapojeny do korelační sítě. Ukazuje se, že maximální počet uhlíkových atomů ve skeletu může být maximálně 35-40. Navíc pološířka signálů by neměla být větší než 50Hz. Přesto a nebo právě proto je potřeba co nejlépe pulsní sekvenci optimalizovat.

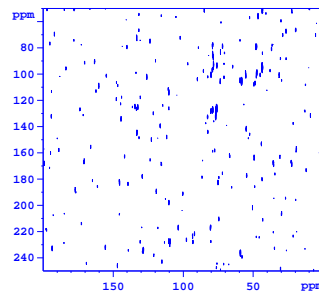
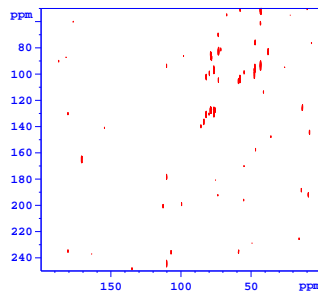
1. Periody pro vývoj dvoukvantové koherence je nutno synchronizovat s periodou rotace a jejich délka má být asi přibližně 4-5 ms. Největší pečlivost je však nutno věnovat optimalizaci dekaplinku, zvláště proto, že pulsní sekvence je poměrně dost dlouhá. Problém je v tom, že pološířka signálů je od určitého okamžiku již nezávislá na některých parametrech dekaplinku, přesto se doba života uhlíkové koherence v průběhu dekaplinku podstatně mění. Pečlivou optimalizací je možno ušetřit až 40% koherence a to je pro takto málo citlivý experiment velmi významné.

Optimalizace INADEQUATE

Joint Laboratory of **Bohemia MRI**
AMC AS CR and JRC ACB



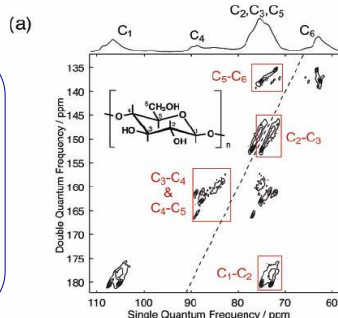
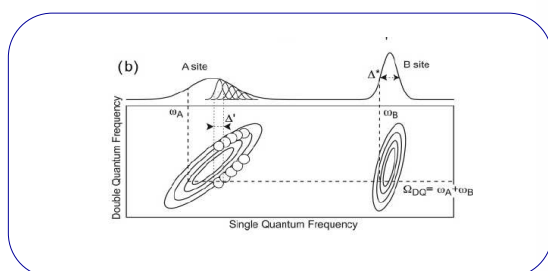
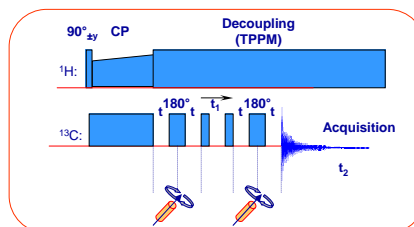
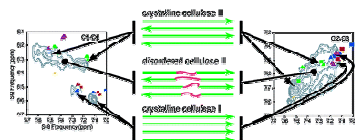
$C_{42}H_{64}NO_{14}$
Exact Mass: 853.33
Mol. Wt.: 853.91



Samozřejmě, že i účinné chlazení vzorku během rychlé rotace kolem 12-15 kHz a zajištění stability elektronických obvodů vede ke zvýšení citlivosti experimentu. Namáhání elektronických součástek by mělo být pro každý inkrement stejné. Proto je vhodné v určité části opakovací periody zapnout 1H kanál s nízkou amplitudou a zcela mimo 1H rezonanci. Doba zapnutí by se zkracovala stejně jak by rostl počet inkrementů. Na obrázku je uvedeno INADEQUATE spektrum taxolu (100 signálů v ^{13}C CP/MAS NMR spektru – limitní případ).

Korelace disperze chemických posunů

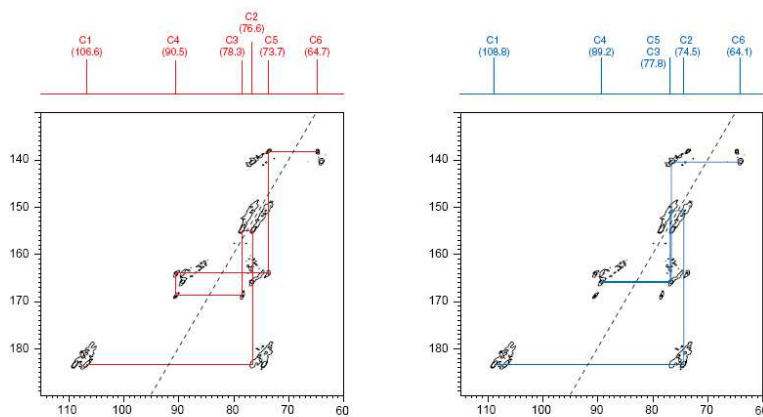
Joint Laboratory of Biomimetic
AMC AS CR and JRC ACB CH



Většina látek v pevném stavu, jako jsou například polymery nebo skla, vykazuje jistý prvek neuspořádání a znalost rozsahu tohoto neuspořádání přináší zajímavou strukturní informaci. Někdy v těchto korelačních spektrech sledujeme zvláštní tvary korelačních signálů. Tvar a rozšíření těchto korelačních signálů ve 2D spektrech totiž odráží různou distribuci chemických posunů. Vzhledem k tomu, že disorder jedné části molekuly je korelován se sousedními jednotkami, pak se tato korelace projeví i ve spektru, tedy ve tvaru korelačních signálů. Zvláštní sklon korelačních signálů od paralelního směru jasně naznačuje různé stupně neuspořádání.

Korelace disperze chemických posunů

Joint Laboratory of Solid State NMR
AMC AS CR and JRC-AS CR

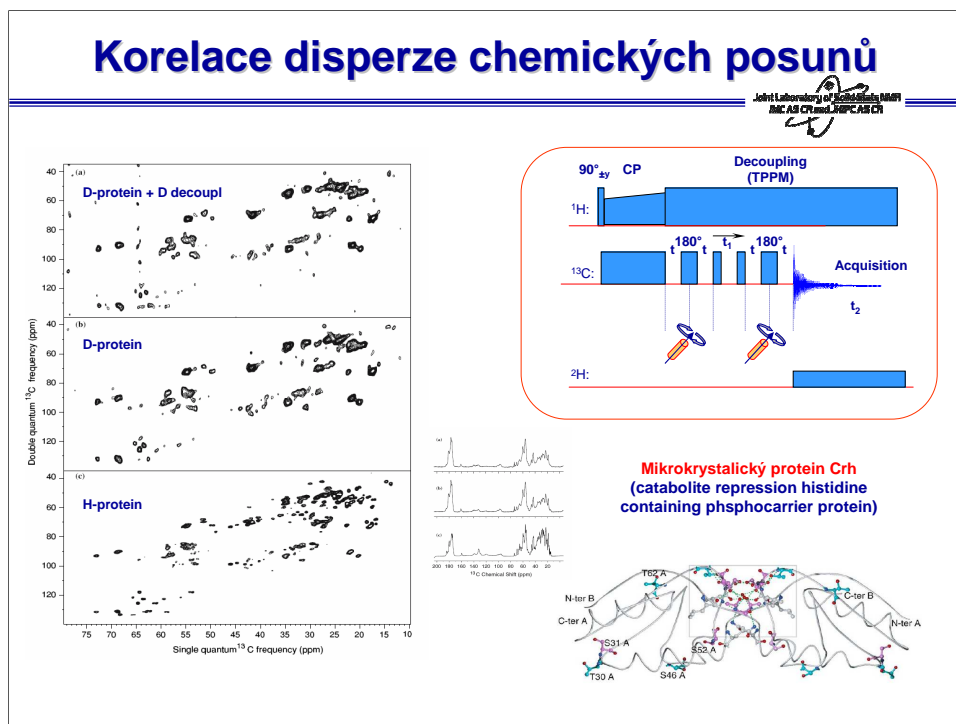


In more complex systems, correlations can be exploited to extract *chains of correlated shifts*.
Each chain corresponds to the chemical shifts of an entire subunit with a given conformation.

U složitých systémů jako je například celulóza, lze tato 2D spektra využít k získání řetězců vzájemně korelovaných chemických posunů. Každý tento řetězec pak koresponduje s chemickými posuny jedné podjednotky s danou konformací. Zde vidíme příklad dvou typů řetězce celulózy.

Korelace disperze chemických posunů

Joint Laboratory of Biomolecular NMR
AMC AB CPmad, JRCF AS CR



Velmi zjednodušeně řečeno různý sklon korelačních signálů v různých částech molekuly může podávat informace o míře konformační jednotnosti daného systému. S problémem rostoucí míry neuspořádání se např. můžeme setkat u deuterovaných proteinů.

Rozšíření NMR signálů u deuterovaných proteinů může být způsobeno:

- Částečnou nebo neúplnou deuterací
- dipolární interakcí s ^{13}C s ^2H
- nedokonalostmi v 3D struktuře řetězce.

Rozlišení jednotlivých příspěvků může alespoň částečně podat 2D INEQUATE experiment. V tomto konkrétním případě je vzrůst pološířky signálů, ke kterému došlo díky deuteraci, zcela jednoznačný. Protože tvar korelačních signálů je pro všechny aminokyselinové zbytky stejný, zřejmě se nejedná o přítomnost disorderu, ale o neúplnou deuteraci.

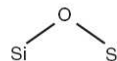
Korelace disperze chemických posunů

Joint Laboratory of Solid State NMR
AMC AS CR and JRC PTB

Chemical Disorder (local effect)

a change in the isotropic chemical shift
from one molecule to another

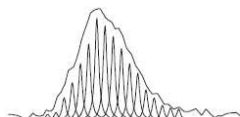
e.g., glasses, catalysts, polymers



Magnetic Susceptibility (bulk effect)

a change in the Larmor frequency
from one part of the sample to another

heterogeneous samples



*How can the chemical shift differences
due to disorder be removed without
removing the chemical shift differences
that distinguish sites from each other?*

Jiným vysvětlením rozšíření NMR signálů může být i změna susceptibilit vzorku. To je časté u paramagnetických systémů. V každém případě bychom se rádi tohoto rozšíření zbavili a odstranili ho a tím bychom rádi získali NMR spektra s vysokým spektrálním rozlišením. Otázkou je: Jak to zařídit? Aby bylo možné tento problém řešit, pak musí platit, aby signály byly vzájemně korelované tak, aby vytvářely ve 2D spektrech korelační síť.

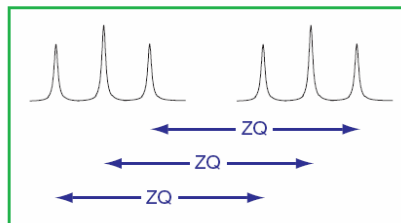
Korelace disperze chemických posunů

Joint Laboratory of Solid State NMR
AMC AS CR and JRC ACCH

Zero-Quantum Spectroscopy

For susceptibility broadening or broadening due to an inhomogeneous applied field, the shifts at one nucleus are perfectly correlated in a one-to-one fashion with the shifts at another nearby nucleus

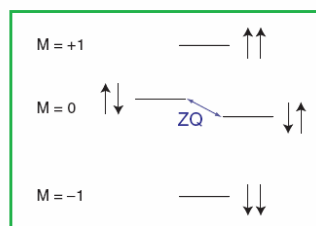
Thus, while the individual chemical shifts change, the chemical shift differences remain the same



Hall et al. 1981: Zero-quantum NMR spectra are free of B_0 broadening

Warren et al. 1996: Intermolecular solvent-solute ZQ coherences yield high-resolution spectra in unstable very high magnetic fields

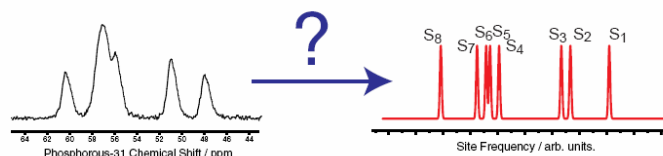
Terao et al. 1999: ZQ sideband spectra are free of susceptibility broadening in paramagnetic solids



Pokud je potřeba odstranit problém různé susceptibilitě analyzovaného materiálu, pak lze teoreticky využít principů nula-kvantové NMR spektroskopie. Nachází-li se vzorek v nehomogenním magnetickém poli pak v každém místě vzorku poskytuje molekula stejné spektrum, které je pouze poněkud posunuto. Relativní rozdíly mezi signály v těchto spektrech jsou ale stejné. S využitím výše uvedených prací a tedy principů nula-kvantové spektroskopie je zřejmě možné upravit pulsní sekvence tak, aby výsledná NMR spektra byla prostá rozšíření NMR signálů vlivem nehomogenity B_0 pole.

Korelace disperze chemických posunů

Joint Laboratory of Solid State NMR
AMC AS CR and JRC AR CH



To record this red spectrum we must refocus the chemical shift distribution due to disorder within a site, **without** refocusing the chemical shifts that distinguish sites from each other.

This cannot be done if the sites are isolated from each other.

It can be achieved if

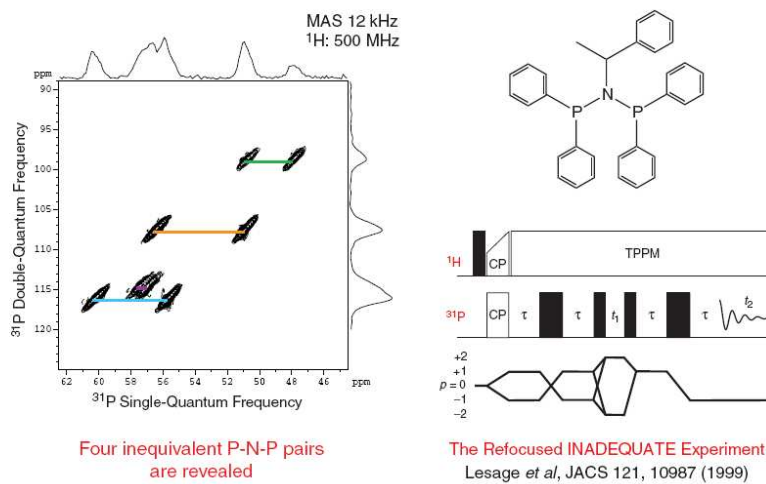
- (i) the sites can be connected in a multi-dimensional spectrum
- (ii) the chemical shifts between coupled pairs of spins are highly correlated.

V případě konformačního neuspořádání se konformace molekul v krystalech poněkud liší, nebo existují drobné rozdíly v pakování molekul a tím se mění lokální okolí jader v těchto molekulách. Díky tomu sledujeme v NMR spektrech rozšíření signálů. Naším cílem tedy je zaznamenat NMR spektrum, ve které bude distribuce chemických posunů vlivem neuspořádání odstraněna, ale bude zachována distribuce chemických posunů, která rozlišuje jednotlivé strukturní jednotky. To samozřejmě nemůže být učiněno pro izolovaná strukturní jednotky. Strukturní jednotky musí být vzájemně korelovány ve více-dimenzionálních spektrech.

Korelace disperze chemických posunů

Joint Laboratory of ¹H and ³¹P NMR
AMC AS CR and MPPC AS CR

³¹P-³¹P Through-Bond Connectivities

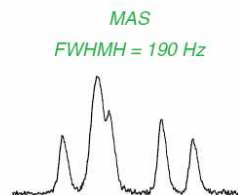
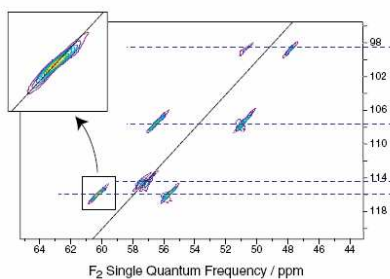


Typickým příkladem může být ³¹P-³¹P INADEQUATE korelační spektrum této látky, ve kterém lze identifikovat čtyři P-N-P páry.

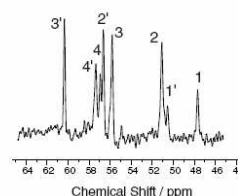
Korelace disperze chemických posunů

Joint Laboratory of Solid State NMR
 AMO, AFM, JRC, JRC, JRC, JRC

*The shifts are well correlated,
 but there are deviations
 from a 1:2 ratio for the
 SQ and DQ frequencies*



reconstructed spectrum
 FWHMH = 35 Hz

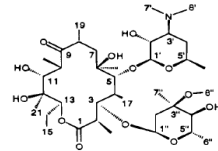


Na základě analýzy korelace chemických posunů pak lze zrekonstruovat NMR spektrum, ve kterém se vliv disperze chemických posunu neprojeví. Lze si to představit tak, že každý korelační signál se transformuje tak, aby byl paralelní se směrem osy F1.

¹³C-¹³C korelace (PDSD)

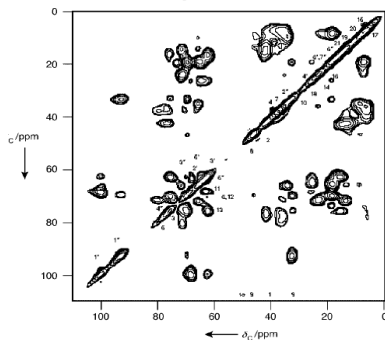


Proton Driven Spin Diffusion

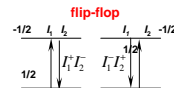
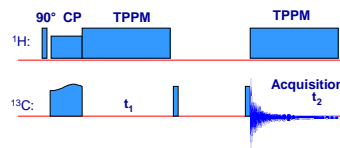


Mixing - 1-50ms

$$P(t) = \frac{1}{2} \pi g_0^{jk} (\omega_j - \omega_k \omega_D^2) t$$



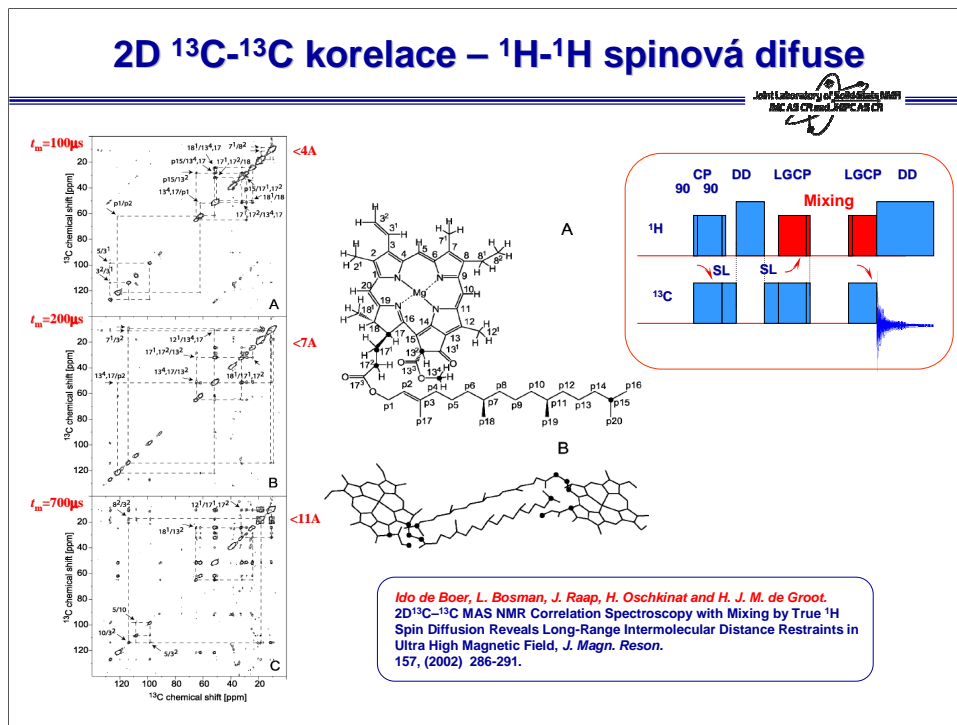
2D ¹³C-¹³C PSD NMR



Spin-spinové interakce jsou ale velmi malé v porovnání s dipolárními interakcemi a navíc spin-spinové interakce neposkytují informace o prostorovém uspořádání a meziatomových vzdálenostech. Proto se právě k těmto interakcím musíme vrátit. Nejjednodušší cestou, jak získat korelační spektrum s vysokým stupněm spektrálního rozlišení, je provedení spin-difuzního experimentu. Tento experiment je obdobou dříve diskutovaných 1H-1H korelačních spekter, ale tentokrát spinová difuze probíhá mezi uhlíkovými atomy. Je tedy zřejmé, že je nutné pracovat s izotopicky obohacenými materiály. To že spinová difuze probíhá mezi uhlíkovými atomy má ale také několik nevýhod. Malý gyromagnetický poměr způsobuje, že dosah dipolárních interakcí je poměrně malý a tak doba přenosu magnetizace musí být podstatně delší. Ta dosahuje až 50 ms, přičemž korelovaná meziatomová vzdálenost je maximálně 3Å. Experiment probíhá tak, že po CP se během první detekční periody nepřímo detekuje ¹³C magnetizace. Ta je pak uložena do směru osy z a nechá se probíhat spinová difuze. Na konci této periody ze zbylá magnetizace převede na transverzální magnetizaci, která se detekuje. Výsledkem je pak ¹³C-¹³C korelační spektrum. Intenzity signálů pak odrážejí meziatomovou vzdálenost. Tento experiment je ekvivalentem pro NOESY spektra roztoků a kapalin.

2D ^{13}C - ^{13}C korelace – ^1H - ^1H spinová difuze

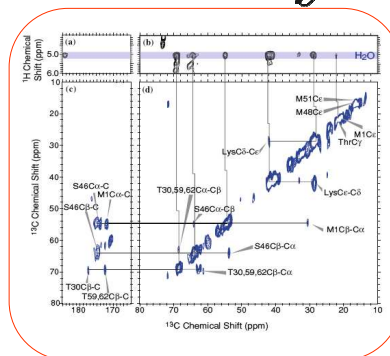
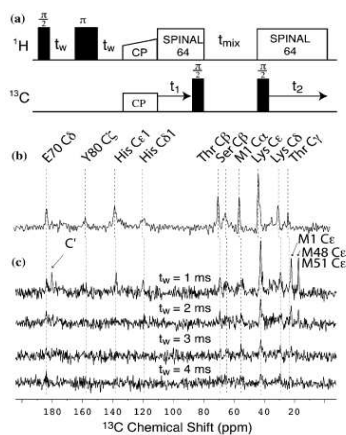
Joint Laboratory of Biomolecular NMR
AMC AB CPmad, JRCPC AB CH



Jinou možností jak získat ^{13}C - ^{13}C korelační spektra je využití přímo ^1H spinové difuze. Tento typ experimentu byl krátce zmíněn v kapitole 7 a zde je uveden příklad využití tohoto experimentu při popis uspořádání komplexu Chlorofilu a/ H_2O . Pro krátké směřovací doby do $100 \mu\text{s}$, odpovídají korelační signály pouze intramolekulárním kontaktům. Pro delší časy spinové difuze se objevují další signály, jež indukují mezimolekulární přenos polarizace, a které tak mohou být využity k určení vzájemné orientace molekul. V tomto konkrétním případě byl sledován vznik korelačního signálu mezi koncem tohoto řetězce a polycyklickou částí. A to indikuje „back-to-back“ uspořádání, kdy jednotlivé řetězce jsou zcela natažené. Překvapivá je rychlost šíření magnetizace. Během $100 \mu\text{s}$ dojde k přenosu až do vzdálenosti 4\AA a po $700 \mu\text{s}$ je tato vzdálenost dokonce 11\AA . V tomto okamžiku se magnetizace dostane z jednoho konce molekuly na druhý a pak je vyhodnocení a interpretace vzniklých korelačních signálů velmi obtížná. Nicméně pro kratší směšovací doby, lze tímto způsobem velmi dobře posoudit právě mezimolekulární kontakty a uspořádání molekul v agregátech.

Lokalizace molekul vody - ^{13}C - ^{13}C

Joint Laboratory of ^1H and ^{13}C NMR
 JMC AS CR and JMC AF CH



A. Böckmann, M. Juy, E. Bettler, L. Emsley, A. Galinier, F. Penin, A. Lesage.
 Water-Protein Hydrogen Exchange in the Micro-Crystalline Protein Crh as Observed by Solid State NMR Spectroscopy, *Journal of Biomolecular NMR*, 32 195 (2005).

Jiným pěkným příkladem ^{13}C - ^{13}C korelací je experiment, který byl modifikován tak aby dokázal lokalizovat molekul vody podél proteinového řetězce. A nejenom to, aby také dokázal podat přesnější informace o mechanismu vzniku korelačních signálů. Klasický heteronukleární korelační experiment ^1H - ^{13}C podává pouze částečné informace, protože nelze jednoznačně rozlišit jednotlivé uhlíkové atomy. Ovšem 2D ^{13}C - ^{13}C korelační experiment spektrální rozlišení zvyšuje a vede k přesné interpretaci dat. Experiment využívá poměrně zajímavou přípravnou periodu. Před CP je použit T2 dipolární filtr, který zachová pouze ^1H magnetizaci vody. Molekuly vody musí být relativně imobilizované a musí existovat mezi nimi a molekulou proteinu nějaký typ dipolární interakce. Tato magnetizace pak vstoupí do CP a je využita k přenosu polarizace do ^{13}C spinového systému. Pak již následuje běžná ^{13}C - ^{13}C spinová difuze.

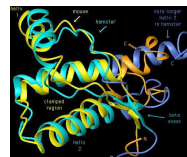
2D ^{13}C - ^{13}C korelace – Prionové proteiny

Joint Laboratory of Biochemistry and
AMC AB CPMAS, JRC-AS CR



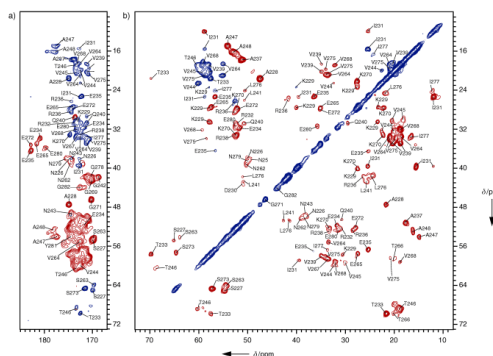
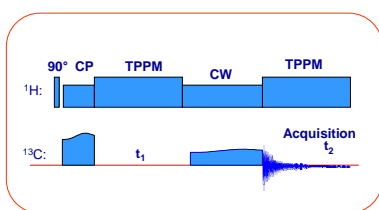
Meier B.H.
*1954

Meier B.H. et al.
Correlation of Structural Elements and Infectivity of the HET-s prion,
Nature (2005); 435(9): 844.



2D ^{13}C - ^{13}C DREAM NMR

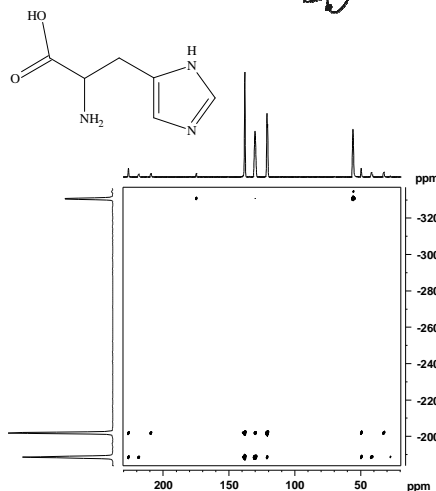
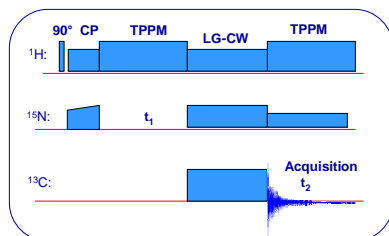
Dipolar Recoupling Enhancement through Amplitude Modulation



V některých případech je ale samotná ^{13}C spinová difuze příliš nespécifická nebo příliš pomalá a tak se jí musíme pomoci rf polem. To je analogie ^1H - ^1H ROESY nebo TOCSY experimentů, kdy k přenosu magnetizace dochází během spin-locku. Stejně tak i v tomto ^{13}C - ^{13}C korelační experimentu jsou signály odrážející přímou korelaci pozitivní, zatímco zatím co několikanásobný nebo štafetový přenos polarizace je reflektován negativními signály.

2D ^{13}C - ^{15}N dvojitá cross-polarizace

Joint Laboratory of ^1H and ^{13}C NMR
AMC AB CP and ^{15}N CP



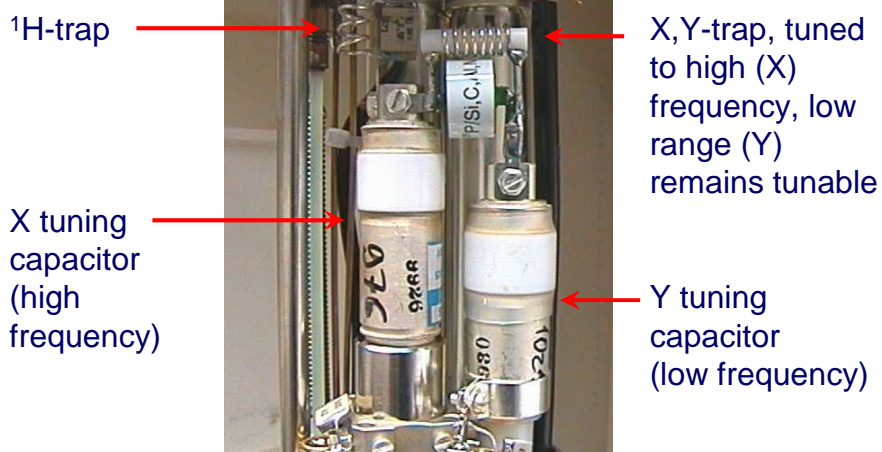
- Avance 500 WB
- 4 mm sonda
- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$, 2 ms kontakt
- $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, 1 ms kontakt
- variable amplitude (50 % ramp)
- ^{15}N RF field: 64 kHz
- ^{13}C RF field: 64 kHz
- ^1H RF field: 89 kHz

Není nutné se ale soustřeďovat pouze na experimenty které korelují stejná jádra. Například korelace mezi uhlíkem ^{13}C a dusíkem ^{15}N je zvláště pro biologické systémy velmi užitečná a vede nejenom k lepšímu spektrálnímu rozlišení, ale i k získání informací o lokální geometrii obou typů jader. Přenos polarizace mezi těmito jádry je opět podmíněn existencí silných dipolárních interakcí a při jejich přítomnosti je možné opět použít principu cross-polarizace. Tentokrát mezi dusíkem ^{15}N a uhlíkem ^{13}C . Jedná se o experiment, který je znám jako „dvojitá cross-polarizace“. Nejprve je přenesena polarizace z vodíkového spinového systému do dusíkového. V následné detekční periodě se snímá vývoj dusíkové magnetizace podle chemického posunu. Pak se přeneše polarizace do uhlíkového spinového systému a uhlíková magnetizace je přímo detekována. Při tomto druhém přenosu polarizace je nutné nejenom splnit Hartmann-Hahnovu podmínku pro jádra ^{15}N a ^{13}C ale musíme také odstranit vliv vodíků použitím ^1H dekaplinku. Musíme si ale dát pozor aby nedošlo ke zpětnému přenosu polarizace do vodíkového spinového systému. Proto je na místě pečlivost při optimalizaci experimentálních parametrů.

2D tří-rezonanční experimenty ^{13}C - ^{15}N korelace



SONDA



Provedení experimentu však vyžaduje speciální vybavení, tedy tří-rezonanční sondu. Až do letošního roku byly k těmto účelům používány sondy, které byly vybaveny vyměnitelnými inserty. Ty určovaly, která jádra lze korelovat. To znamená, že sondy nebyly plně laditelné v celém frekvenčním rozsahu.

Shrnutí



- a. ^{13}C - ^{13}C korelace – INADEQUATE
- b. Pečlivá optimalizace dekaplinku.
- c. Spektra podávají informace o konektivě uhlíkového skletetu.
- d. Prvek neuspořádání – rozšíření signálů.
- e. ZQC nebo speciální transformace spekter = odstranění disperse posunů.
- f. ^{13}C - ^{13}C korelace – spinová difuze mezi jádry ^{13}C .
- g. ^{13}C - ^{13}C korelace – spinová difuze mezi jádry ^1H .
- h. X-Y korelace – dvojité cross-polarizace.
- i. Speciální sondy.