



Univerzita Palackého
v Olomouci

Spektrometrie nukleární magnetické rezonance (NMR)

Instrumentální metody ACH/IME

(c) David MILDE, 2025

1



Univerzita Palackého
v Olomouci

Úvod a historie

- Jsou-li atomová jádra některých prvků v externím magnetickém poli vystavena vysokofrekvenčnímu (radiofrekvenčnímu) elektromagnetickému záření, mohou absorbovat záření určitých frekvencí (ν). Je-li atom součástí molekuly, ν absorbovaného záření závisí na charakteru vazby v molekule:
 - Jádra stejných atomů, která jsou vázána v molekule různým způsobem, absorbují záření různých frekvencí – **kvalitativní údaj**, lze určit jaké vazby jsou v molekule.
 - Každé jádro atomu stejného druhu vázaného v molekule stejným způsobem přispívá k absorpci – **kvantitativní údaj**, dle intenzity absorbovaného záření lze stanovit počet atomů v určité vazbě či skupině.
- NMR objevena v roce 1945 v USA, přinesla průlom v identifikaci molekul, protože poskytuje informace o „uhlovodíkové kostře“ molekul a nejen o funkčních skupinách.
- Význam NMR oceněn nejméně 4 Nobelovými cenami za fyziku, 2 Nobelovými cenami za chemii a 1 Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu – objevy týkající se MRI.
- NMR má významné uplatnění v medicíně: MRI = magnetic resonance imaging.

2



Univerzita Palackého
v Olomouci

Fyzikální princip

- Atomové jádro si lze představit jako kouli (či elipsoid) rotující okolo své osy s rozloženým elektrickým nábojem na povrchu. Náboj vytváří magnetické pole charakterizované jaderným magnetickým momentem μ :

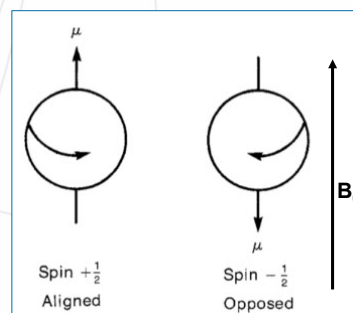
$$\mu = \gamma \cdot P$$

γ ... jaderný gyromagnetický poměr (př. γ (1H) při 400 MHz je $26,75 \cdot 10^7 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$); P ... rotační moment hybnosti jádra

- Z hlediska NMR lze jádra rozdělit podle hodnoty spinového kvantového čísla I :

- jádra s $I = 0$: tzv. nemagnetická jádra (nemají jaderný magnetický moment) v NMR neaktivní.
- jádra s $I = \frac{1}{2}$: mají jaderný magnetický moment a jsou snadno měřitelná.
- jádra s $I > \frac{1}{2}$ - mají jaderný magnetický moment a elektrický kvadrupólový moment a jsou obtížně měřitelná.

- 63 prvků má alespoň jeden NMR aktivní nuklid. V NMR jsou zcela neaktivní pouze: Ar, Tc, Ce a Pm.



3



Univerzita Palackého
v Olomouci

Fyzikální princip

- Princip: interakce spinů jader umístěných v silném homogenním magnetickém poli s radiofrekvenčním zářením (10 – 1000 MHz).
- Jaderný spin vybraných nuklidů (červeně nuklidy, kterými se budeme zabývat):

I	Nuklid	Počet p	Počet n
0	^{12}C , ^{16}O	Sudý	Sudý
1, 2, ...	^2H , ^{14}N	Lichý	lichý
$\frac{1}{2}$, $\frac{3}{2}$, ...	^1H , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P ^{13}C	lichý Sudý	sudý Lichý

- E jádra v magnetickém poli o indukci B_0 :

$$E = -\mu \cdot B_0 = m_I \cdot \frac{h}{2\pi} \gamma \cdot B_0 \quad m_I = +\frac{1}{2} \text{ nebo } m_I = -\frac{1}{2}$$

m_I ... magnetické
kvantové číslo

- Změna E při absorpci záření:

$$\Delta E = \frac{1}{2} \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot B_0 - \left(-\frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot B_0 = \frac{h}{2\pi} \cdot \gamma \cdot B_0$$

- Larmorova rezonanční podmínka (musí být splněna pro přechod mezi hladinami): $\nu = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi}$

4



Univerzita Palackého
v Olomouci

Fyzikální princip

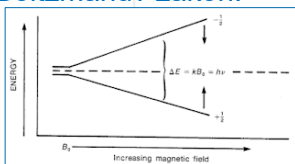
- Rezonanční frekvence a indukce magnetického pole pro ^1H :

Rezonanční frekvence (MHz)	Indukce magnetického pole (T)	Rozdíl v počtu jader v základním a excitovaném stavu
60	1,41	9
200	4,70 [#]	32
300	7,05	48
600	14,09	96

- # 100000× silnější magnetické pole než má Země.

- Boltzmanův zákon:

$$\frac{N_{exc}}{N_{zakl}} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \quad (k \text{ Boltzmanova konstanta})$$



- Každá orientace magnetického momentu odpovídá různé hladině.
- Celkem možných: $(2I + 1)$ E hladin.

- Z Boltzmanova zákona \Rightarrow při 60 MHz a $T = 298 \text{ K}$ je poměr $N_{exc}/N_{zakl} = 0,999991 \Rightarrow$ rozdíl v počtu jader je 9.

5



Univerzita Palackého
v Olomouci

Fyzikální princip – precesní pohyb



Precese setrvačnicku

- V rovnovážném stavu při působení vnějšího magnetického pole budou jaderné magnetické momenty jádra s $m_l = \frac{1}{2}$ orientovány shodně se směrem magnetické indukce (*základní stav*) a s $m_l = -\frac{1}{2}$ nesouhlasně se směrem magnetické indukce (*excitovaný stav*).
- Vektor jaderného magnetického momentu vykonává ve vnějším magnetickém poli precesní pohyb s frekvencí odpovídající rezonanční Larmorově frekvenci.
- Přechod shodné orientace v nesouhlasnou je možný, absorbuje-li jádro externě dodanou E – ze zdroje RF záření.

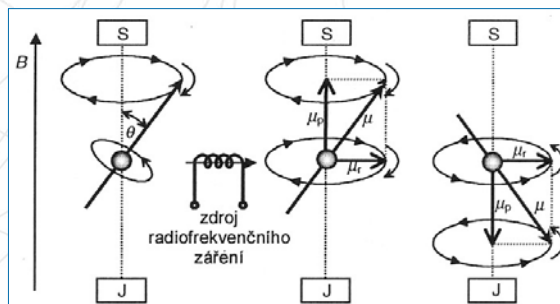


Schéma precesního pohybu vektoru jaderného magnetického momentu (μ) a změny při absorpci záření

6



Univerzita Palackého
v Olomouci

Fyzikální princip – relaxační procesy

- Boltzmanovo rozdělení populací spinových hladin (N_{exc} , N_{zakl}) se ozářením vhodným radiofrekvenčním pulsem vyrovná, nastane stav nasycení, tj. již nedochází k další absorpci.
- Stav nasycení se vrací do původního rovnovážného stavu procesem zvaným relaxace, snižují tedy celkovou energii spinů. Dochází k volnému zániku indukce (tzv. FID – free induction decay) dvěma mechanismy:
 - **Spin-mřížková** (podélná) **relaxace**: dochází k přenosu tepelné E ze spinového systému do okolí (tzv. mřížky); čas T_1 je v kapalinách milisekundy až sekundy, u pevných látek i hodiny.
 - **Spin-spinová** (příčná) **relaxace**: postupné předávání E dalším jádrům; jedno jádro snižuje E a další jí zvyšuje; uplatňuje se především u tuhých látek; čas T_2 závisí na homogenitě magnetického pole a viskozitě vzorku.
- Velikost T_1 určuje, jak dlouho je třeba po excitaci počkat před dalším měřením.
- Spin-spinová relaxace způsobuje rozšiřování spektrálních linií.

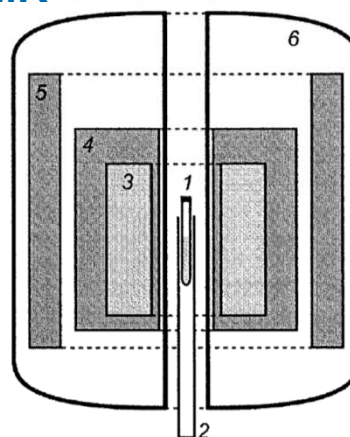
7



Univerzita Palackého
v Olomouci

Instrumentace NMR

- **Základní části spektrometru:**
 - zdroj silného homogenního magnetického pole,
 - měřicí sonda s cívkami pro excitaci a detekci signálu,
 - pulsní RF zdroj,
 - přijímač se zesilovačem signálu,
 - A/D převodník pro digitalizaci dat,
 - řídicí jednotka (PC + SW).



Řez NMR spektremem: (1) – kyveta, (2) měřicí sonda, (3) – supravodivá selenoidní cívka, (4) kapalné He, (5) kapalný N_2 , (6) - kryostat

8



Univerzita Palackého
v Olomouci

Instrumentace NMR

- Zdroj silného magnetického pole: **supravodivý magnet** obsahuje supravodivou selenoidní cívku tvořenou kruhovým kovovým jádrem s navinutými závitů drátu z materiálu, který při $T < 6\text{ K}$ vykazuje supravodivost.
 - Za podmínek supravodivosti je elektrický odpor nulový, po nabití cívky proudí jejími závitů elektrický proud beze ztrát a generuje magnetické pole, aniž by musel být magnet připojen ke zdroji elektrické energie.
 - Kryostat je chlazen kapalným He a N_2 , uvnitř měřicí sondy je laboratorní teplota.
- **Měřicí sonda** obsahuje cívku používanou k excitaci a současně detekci a „turbínu“, jejíž proud vzduchu umožňuje rotaci kyvety během měření.
- **RF zdroj** (generátor) produkuje signály o určité frekvenci.
- **Přijímač** (detektor) zaznamená a zesílí napětí generované elektrickým proudem vytvořeným při návratu spinu jader z excitovaného do základního stavu.



Ilustrační fotka 400 MHz
NMR spektrometru

9



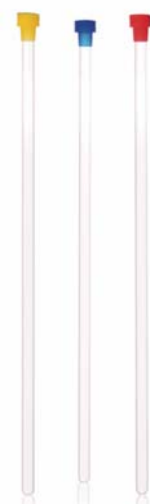
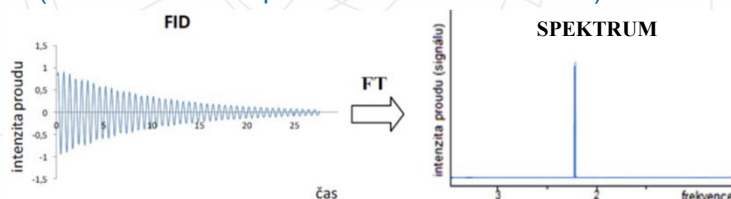
Univerzita Palackého
v Olomouci

Měření vzorku

- Vzorek se umístí do křemenné kyvety a vloží do měřicí sondy.
- Lze měřit vzorky všech 3 skupenství, převažuje měření kapalin.
- K ředění vzorku se používají deuterovaná rozpouštědla, např.: těžká voda (D_2O) $CDCl_3$, deuterovaný ethanol (CD_3OD), deuterovaný dimethylsulfoxid.
- Původní NMR spektrometry (tzv. CW-NMR) proměřovaly odezvu na postupně se měnící frekvenci zdroje (frekvence spektrometru byla 60 MHz).
- Současné NMR spektrometry (tzv. FT-NMR) využívají výhradně ozařování vzorku širokým intervalem frekvencí a využitím Fourierovy transformace pro zpracování signálu. Výsledkem měření je časová závislost elektrického proudu (tzv. FID), která se transformuje na spektrum (běžné frekvence spektrometru 300 – 600 MHz).

Výhody FT-NMR:

Rychlejší: sekundy místo minut.
Vyšší „citlivost“ = změřit slabší signál vzhledem k opakovanému načítání spekter



NMR kyvety

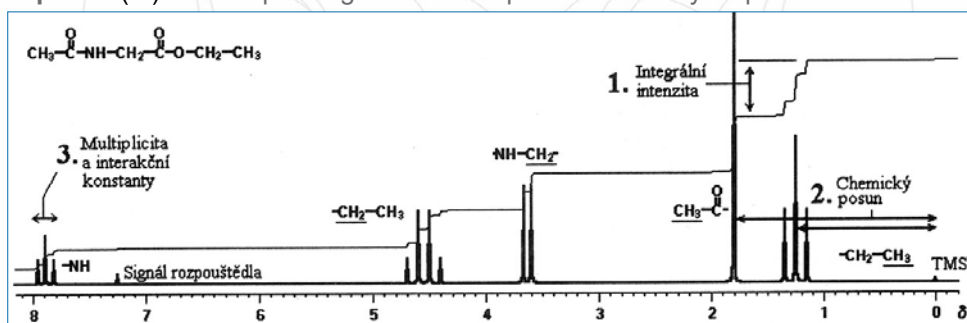
10



Univerzita Palackého
v Olomouci

Parametry NMR spektra

- Základní parametry NMR spektra:
 - chemický posun (2.),
 - (relativní) **integrální intenzita** (1.) – informuje o počtu ekvivalentních atomů v molekule,
 - **multiplicita** (3.) – rozštěpení signálů do multipletové struktury a spinová interakční konstanta J.



11



Univerzita Palackého
v Olomouci

Parametry NMR spektra – chemický posun

- S ohledem na závislost rezonanční frekvence na B_0 použitého spektrometru, přepočítávají se naměřené frekvence pomocí vnitřního standardu na chemický posun δ (udává se v ppm):

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \cdot 10^6$$

ν ... naměřená frekvence jader vzorku, ν_{ref} ... frekvence jader vnitřního standardu

- Vnitřní standard pro ^1H a ^{13}C : tetramethylsilan (TMS) či 2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonová kyselina (DDS).
- Chemický posun naměřených jader lze určit i pomocí známého chemického posunu nedeuterovaných částí rozpouštědla, např. v CDCl_3 je pozorován i signál CHCl_3 se známým δ .
- Jádro stejného nuklidu umístěné v různých strukturách molekuly se projeví různými signály. Jádra v molekule jsou ovlivňována (stíněna) e^- okolních atomů. Obíhající e^- vytvářejí slabé magnetické pole, které je namířeno proti vnějšímu poli (B_0).

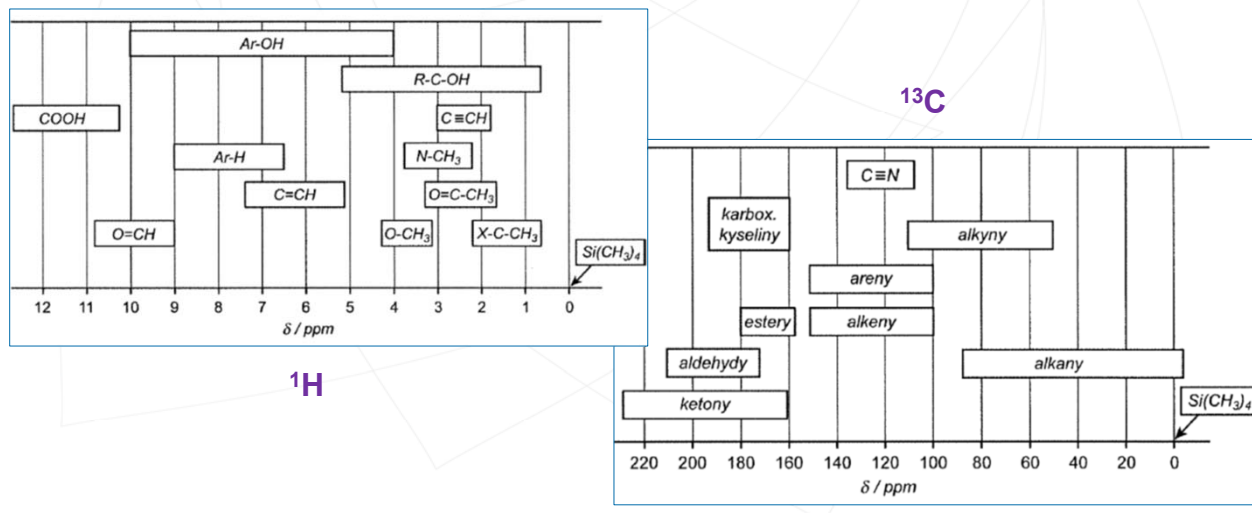
$$B_{ef} = B_0 \cdot (1 - \sigma), \sigma \dots \text{stínící konstanta } (10^{-6} - 10^{-4})$$

12



Univerzita Palackého
v Olomouci

Typické chemické posuny



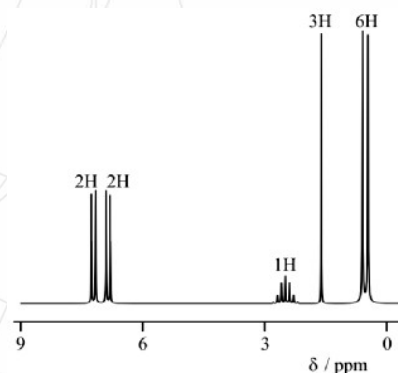
13



Univerzita Palackého
v Olomouci

Parametry NMR spektra – integrální intenzita

- Intenzita signálů vodíků závisí na počtu H reprezentovaných daným signálem a měří se jako plocha pod křivkou signálu = integrální intenzita. Plocha každého signálu je úměrná počtu chemicky ekvivalentních jader v molekule.
- Pro strukturní analýzu je důležitá relativní integrální intenzita, která vyjadřuje poměr intenzity daného signálu k celkovému součtu všech signálů.
- Př.: integrální intenzita skupiny CH₃ bude násobek 3, integrální intenzita CH₂ skupiny bude násobek 2. Tj. poměr signálů skupin CH₃ a CH₂ v molekule chlorethanu bude 3:2.
- V ¹³C spektrech naplatí výše zmíněné pravidlo, ale platí souvislost mezi relativní integrální intenzitou signálů a počtem ekvivalentních uhlíků s výjimkou uhlíků kvarterních.



¹H NMR spektrum látky se
sumárním vzorcem C₁₀H₁₄

14



Univerzita Palackého
v Olomouci

Parametry NMR spektra – multiplicita

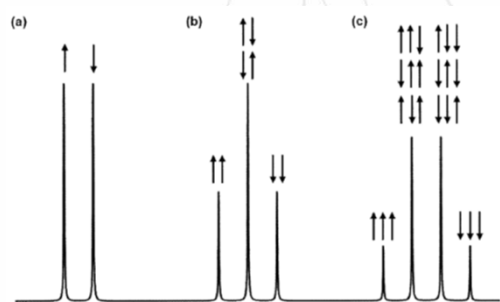
- Interakce sousedních jader, dána různou možnou orientací spinů, vede ke štěpení signálů na multiplety. Příčinou je **spin-spinová interakce**, která je přenášena vazebnými e⁻.
- Vzájemné ovlivňování jaderných spinů atomů v molekule přes jejich chemickou vazbu (či více vazeb).
- V případě interakce:
 - 2 magneticky aktivních jader A a X, bude signál A štěpen na **dublet**.
 - 2 ekvivalentních jader X s A (AX₂), bude signál A štěpen na **triplet**.
 - 3 ekvivalentní jádra X s A (AX₃), bude signál A štěpen na **kvartet**.
- Pravidla multipletového štěpení signálů spinovými interakcemi:
 - počet dílčích signálů, tzv. multiplicita (M) závisí na počtu interagujících jader: **M = 2nI + 1**
 - poměr intenzit signálů je dán rozvojem binomické řady (Pascalův trojúhelník): **(a+1)ⁿ**

15



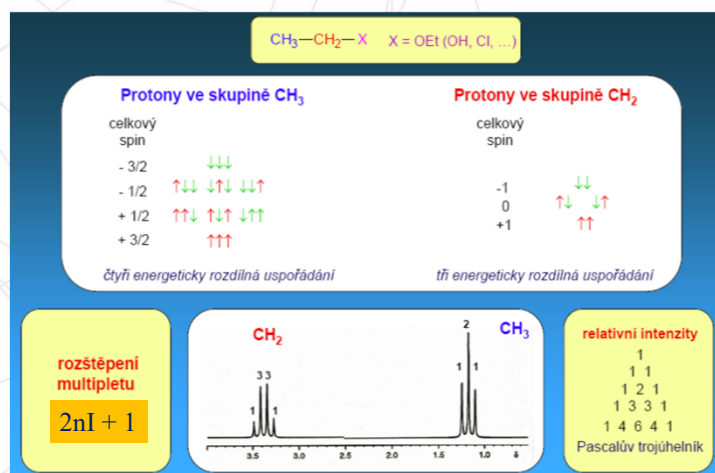
Univerzita Palackého
v Olomouci

Parametry NMR spektra – multiplicita



Schématický popis vzniku multipletů, šipky značí orientaci spinů jader X vůči dané orientaci spinu jádra A

Jádro A štěpeno: (a) 1X, (b) 2X, (c) 3X



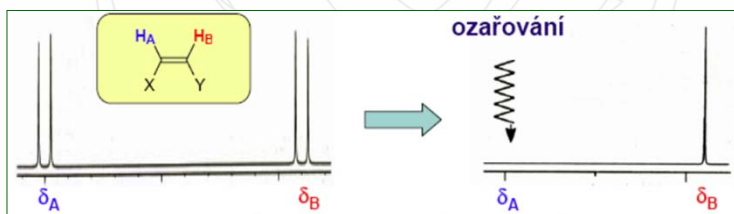
16



Univerzita Palackého
v Olomouci

Dekapling

- Možnost odstranění spinové interakce (tj. štěpení do multipletů).
- SELEKTIVNÍ (homonukleární) dekapling: ozařování spinu H_A během měření. Orientace spinu H_A vůči vnějšímu magnetickému poli se rychle mění a signál spinu H_A „zmizí“ a dublet spinu H_B splyne v singlet.



- PLOŠNÝ (heteronukleární) dekapling: ozařuje se jiné jádro než se měří – nejčastěji 1H při měření ^{13}C , dojde ke zjednodušení interpretace spekter.

17



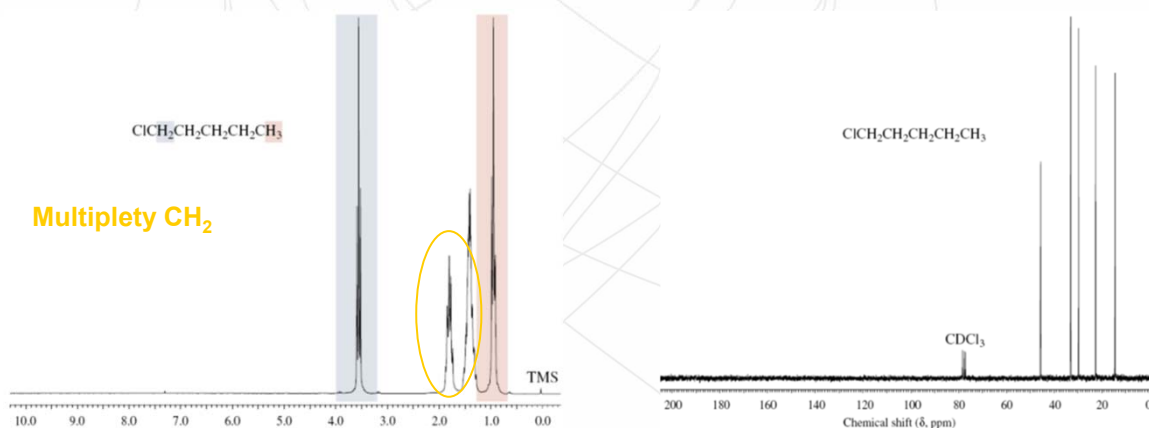
Univerzita Palackého
v Olomouci

Ukázka NMR spekter

– 1-chlorpentan

1H NMR spektrum

^{13}C NMR spektrum



18



Univerzita Palackého
v Olomouci

Dvourozměrná NMR

- 2D NMR spektra umožňují řešit složitější strukturální problémy týkající se např. určení konkrétního isomeru nebo sekvence aminokyselin v peptidovém řetězci.
- Při měření se využívá přenosu magnetizace mezi jádry, tj. intenzita signálu závisí na chemickém posunu obou jader.
- Ve spektrech osy x a y odpovídají chemickým posunům obou jader a osa z naměřené intenzitě (vrstevnicový graf).
- 2D NMR experiment je založen na působení dvou RF pulsů a následné detekci.
- Příklad 2D NMR (z řady technik): **COSY** (correlation NMR spectroscopy):
 - Homonukleární (H,H)-COSY – přenos magnetizace mezi dvěma jádry ^1H . Hodnotí se diagonální a mimodiagonální (tzv. cross) píky.
 - Heteronukleární (H,C)-COSY – přenos magnetizace mezi jádrem ^{13}C a na něm přímo navázanými jádry ^1H .

19

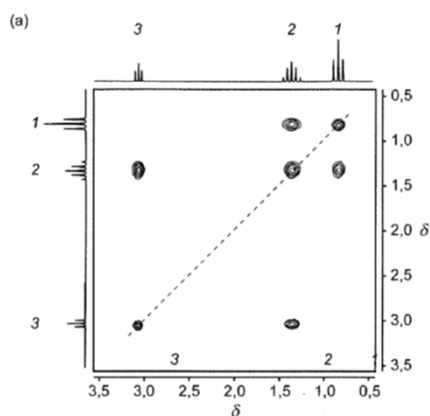


Univerzita Palackého
v Olomouci

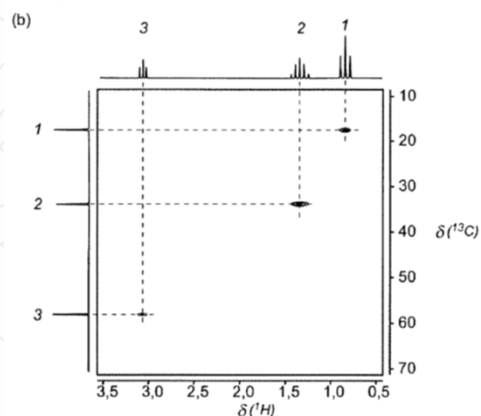
Dvourozměrná NMR

- Modelová 2D COSY spektra fragmentu $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$:

(a) (H,H)-COSY



(b) (H,C)-COSY



20



Univerzita Palackého
v Olomouci

Interpretace NMR spekter, využití metody

- **Poznámky k interpretaci ^1H NMR spektra:**
 - Není-li vzorek čistá chemická látka, bude spektrum odpovídat všem měřeným látkám ve vzorku.
 - Všechny informace ve spektru se týkají pouze ^1H , informace z tohoto spektra obvykle nestačí k určení struktury.
- **Poznámky k interpretaci ^{13}C NMR spektra:**
 - Rozsah chemických posunů do cca 200 ppm umožňuje lepší rozlišení signálů.
 - Homonukleární spin-spinové interakce nejsou vidět, přítomnost 2 jader ^{13}C v molekule vedle sebe je nepravděpodobná.
 - Heteronukleární spin-spinové interakce ^{13}C a ^{12}C není, protože ^{12}C je neaktivní.
 - Heteronukleární spin-spinová interakce ^{13}C a ^1H se odstraňuje protonovým dekaplingem.
- **Využití NMR:**
 - určování struktury organických sloučenin,
 - **K určování struktury neznámé (organické) látky se využívá kombinace spekter: ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2D NMR, MS a IR.**
 - studium konformací, chemických dějů a rovnováh,
 - kvantitativní analýza – výška píků souvisí s koncentrací.

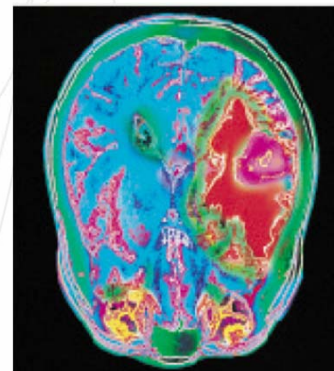
21



Univerzita Palackého
v Olomouci

MRI (magnetic resonance imaging)

- MRI představuje aplikaci NMR v medicíně, je to neinvazivní vyšetřovací metoda, která umožňuje prozkoumat vnitřní orgány pomocí méně škodlivého RF záření ve srovnání s rentgenovým.
- MRI detekuje protony. Místa s různým výskytem ^1H jsou různě ztmavlá/barevná.
- Pulzní RF excitace pevných „objektů“ je pomocí FT převedena na 3D snímky.
- Rozdíl informace z RTG a MRI:



MRI snímek části mozku, kde je barevně zvýrazněn nádor v levé hemisféře
fialová = nádor

22