

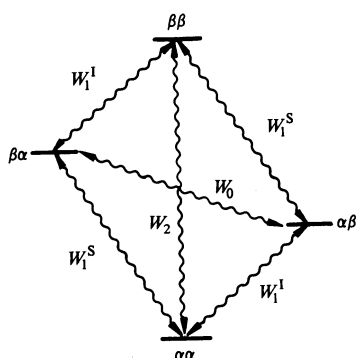
# JĄDROWY EFEKT OVERHAUSERA

Wiktor Koźmiński

Najstarszą i jak dotąd najczęściej wykorzystywaną metodą w badaniach strukturalnych molekuł metodami spektroskopii NMR jest pomiar jądrowego efektu Overhausera (NOE – *Nuclear Overhauser Effect*). Pomiary NOE pozwalają uzyskiwać więzy odległości, pomiędzy badanymi jądrami (najczęściej  $^1\text{H}$ ). Za wkład w zastosowaniach między innymi tej metody do badań białek, w 2002 roku został wyróżniony nagrodą Nobla Kurt Wüthrich z ETH w Zurychu.

– częstością rezonansową ( $\gamma B_0$ ) a  $r$  – odległością międzyjądrową.

Mierzalne efekty NOE objawiają się częściowym przeniesieniem magnetyzacji pomiędzy jądrami związanymi wzajemnym oddziaływaniem dipol – dipol<sup>1</sup>. Efektywność tego procesu zależy od częstotliwości rezonansowej  $\omega = \gamma B_0$  i szybkości reorientacji cząsteczek w przestrzeni, określonej przez czas korelacji  $\tau_c$ . Warunkiem koniecznym dla obserwacji efektów NOE jest niezerowe i różne prawdopodobieństwo relaksacji dwu- lub zerokwantowej, odpowiednio  $W_2$  i  $W_0$ . Wielkość NOE zależy od różnicy prawdopodobieństw  $W_2$  i  $W_0$  i jest, w przypadku dwóch jednakowych jąder<sup>2</sup>, określona wzorem (1):



**Rys. 1** Schemat poziomów energetycznych dla dwóch jąder I i S związanych oddziaływaniem dipolowym.  $W_1^I$  i  $W_1^S$  prawdopodobieństwa relaksacji odpowiednio jąder I i S,  $W_2$  i  $W_0$  prawdopodobieństwa relaksacji dwu- i zerokwantowej

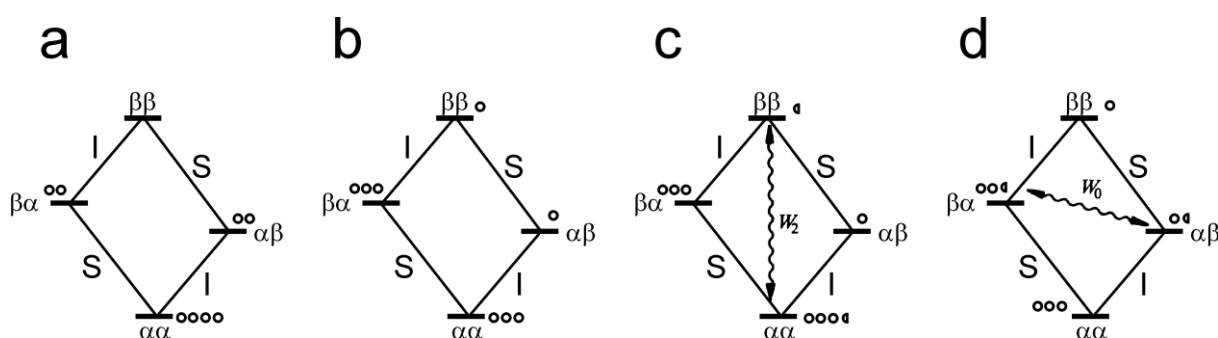
$$\sigma_{\text{NOE}} = W_2 - W_0 = \frac{\gamma^4 h^2 \tau_c}{4\pi^2 10^6} \left( \frac{6}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - 1 \right) \quad (1)$$

Gdzie  $\tau_c$  jest czasem korelacji, którego wielkość jest miarą szybkości reorientacji molekuł,  $\omega$

<sup>1</sup> Sprzężenia spin-spin typu dipolowego (bezpośredniego) w izotropowych cieczach nie są obserwowalne w postaci rozszczepień, daje się jednak zaobserwować ich wpływ na postać widm NMR między innymi przez efekt NOE.

<sup>2</sup> Przede wszystkim wykorzystuje się homojądrowe efekty NOE -  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$ . Efekty heterojądrowe, choć możliwe do uzyskania w analogiczny sposób, są znacznie słabsze ze względu na silną zależność od  $\gamma$ , a także mogą być trudniejsze do interpretacji w układach wielospinowych.

Przy danej częstotliwości rezonansowej spektrometru,  $\sigma_{\text{NOE}}$  zależy od odległości międzyjądrowej  $\sim(r^{-6})$  i czasu korelacji  $\tau_c$ . Łatwo zauważyć, że  $\sigma_{\text{NOE}}$  zeruje się dla  $\omega\tau_c \approx 1.12$ . Dla małych cząsteczek o relatywnie krótkich czasach korelacji ( $\omega\tau_c < 1.12$ ), a co za tym idzie, szybkiej reorientacji w przestrzeni, dominuje wysokoczęstotliwościowa relaksacja dwukwantowa i w konsekwencji efekty NOE są dodatnie. Natomiast w przypadku dużych czasów korelacji cząsteczkowej, lub równoważnie w wyższych polach  $B_0$  ( $\omega\tau_c > 1.12$ ), dominuje relaksacja zerokwantowa i efekt NOE zmienia znak na ujemny.



**Rys. 2** Generowanie efektu Overhausera dwóch jąder I i S. (a) – obsadzenia w stanie równowagi, względne różnice obsadzeń dla obu jąder – dwie jednostki – kółka. (b) – stan zaburzony – obsadzenie poziomów dla jąder S wyrównane (np. stan nasycenia po absorpcji promieniowania), dla jąder I różnice obsadzeń – bez zmian (c) – relaksacja dwukwantowa powoduje zwiększenie populacji poziomu  $\alpha\alpha$  i odpowiedni spadek dla  $\beta\beta$ . Zwiększenie różnicy obsadzeń dla przejść jąder I powodują wzrost intensywności sygnału – dodatni efekt NOE. (d) – relaksacja zerokwantowa powoduje efekt przeciwny – zmniejszenie różnicy obsadzeń poziomów  $\alpha\alpha$  i  $\alpha\beta$  oraz  $\beta\alpha$  i  $\beta\beta$  – słabszy sygnał jąder I – ujemny efekt NOE.

Pomiaru efektów NOE dokonuje się najczęściej przez pomiar intensywności sygnałów korelacyjnych w widmach dwuwymiarowych NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*). Można się jednak spotkać zarówno z wielowymiarowymi kombinacjami NOESY z innymi technikami, jak i – w przypadku niewielkich cząsteczek – z wykorzystującym selektywne wzbudzenie, wariantami jednowymiarowymi z selektywnym wzbudzeniem wybranych jąder lub ich grupy np. DPFGE (*Double Pulsed Field Gradient Selective Echo*) NOE.

Zerowanie się jądrowego efektu Overhausera dla iloczynu  $\omega\tau_c$  zbliżonego do 1.12 było przyczyną wynalezienia analogicznej techniki ROESY (*Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy*), w której decydującą rolę w przeniesieniu magnetyzacji odgrywają prawdopodobieństwa przejść zero- i dwukwantowych, odpowiednio  $u_0$  i  $u_2$ , w tak zwanym wirującym układzie współrzędnych<sup>3</sup>. W technice tej stosuje się tak zwany „impuls ujarzmiający” (ang. *spin lock*), tj. włącza na czas mieszania ( $\tau_m$ ) liniowo spolaryzowane – w

<sup>3</sup> Kartezyjski układ współrzędnych wirujący wokół osi z częstotliwością  $\omega$ .

wybrany, prostopadłym do  $B_0$  kierunku – promieniowanie elektromagnetyczne o stosunkowo niewielkiej mocy i częstotliwości  $\omega$ . Efekty ROE są zawsze dodatnie i określone przez  $\sigma_{\text{ROE}}$ :

$$\sigma_{\text{ROE}} = u_2 - u_0 = \frac{\gamma^4 h^2 \tau_c}{4\pi^2 10r^6} \left( \frac{3}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} + 2 \right) \quad (2)$$

Metoda ROESY, stosowana czasem także w selektywnej wersji jednowymiarowej, jest metodą z wyboru dla roztworów małych i średnich cząsteczek, gdy  $\omega\tau_c \approx 1.12$ . Warunek ten spełniony jest często w roztworach wodnych w temperaturze 20 °C i przy częstotliwości rezonansowej  $^1\text{H}$  500 MHz dla cząsteczek o masie molowej około 1500, a w rozpuszczalnikach organicznych o mniejszej lepkości – dla molekuł nawet dwukrotnie cięższych.

Ze względu na silną zależność wielkości efektów NOE i ROE od odległości ( $r$ ), więzy uzyskane w ten sposób dotyczą zazwyczaj protonów oddalonych najwyżej o 5 Å (0.5 nm). Istnieją dwa główne sposoby uzyskiwania informacji o odległościach z pomiarów NOE i ROE. Pierwszy polega na rejestracji serii widm z różnym czasem mieszania  $\tau_m$  i wykreśleniu intensywności integralnych  $I_{ij}$  sygnałów korelacyjnych w funkcji czasu mieszania  $\tau_m$ . Zależność ta w początkowej fazie, dla małych czasów mieszania  $\tau_m$ , jest liniowa, a wielkość  $\sigma_{ij}$  jest wprost proporcjonalna do początkowej prędkości narastania sygnału, tj. pochodnej (3) oraz odległości  $r_{ij}^{-6}$ :

$$\sigma_{ij} = \frac{dI_{ij}(\tau_m = 0)}{d\tau_m} \sim r_{ij}^{-6} \quad (3)$$

Drugi sposób, łatwiejszy i dlatego częściej stosowany w praktyce, polega na rejestracji pojedynczego widma NOESY bądź ROESY, mieszającego się w zakresie liniowej zależności uzyskanego wzmocnienia NOE od czasu mieszania  $\tau_m$ . W tym przypadku przyjmuje się liniową zależność intensywności sygnałów korelacyjnych od  $\sigma_{ij}$ , a więc jednocześnie  $r_{ij}^{-6}$ . W obu przypadkach bez znajomości cząsteczkowych czasów korelacji nie można jednak bezpośrednio określić odległości  $r_{ij}$ . Najczęściej więc wykorzystuje się w tym celu znane odległości wzorcowe  $r_{\text{ref}}$ , na przykład pomiędzy protonami geminalnymi czy aromatycznymi:

$$r_{ij} = r_{\text{ref}} \left( \frac{I_{ij}}{I_{\text{ref}}} \right)^{\frac{1}{6}} \quad (4)$$

Więzy strukturalne uzyskiwane z pomiarów efektów Overhausera, choć łatwe do uzyskania, są jednak dość mało precyzyjne, wymagają bowiem dokładnego pomiaru

intensywności sygnałów w widmach o słabym często stosunku sygnału do szumu. Jednocześnie liczne konkurencyjne zjawiska, jak wymiana chemiczna i dyfuzja spinowa, zakłócają teoretyczną zależność obserwowanych efektów od odległości międzyjądrowych. Dla uniknięcia niejednoznaczności często przedkłada się więc ilość więzów nad próby ich precyzyjnego określenia, dzieląc efekty na „słabe”, „średnie” i „mocne” oraz przypisując im odpowiednie przedziały odległości.

#### Wymagania kolokwialne

Zasada działania spektrometru NMR z zastosowaniem transformacji Fouriera. Widma korelacyjne, Jądrowy efekt Overhausera (NOE), metody pomiaru NOE, zastosowania w chemii.

#### Polecana literatura:

1. Andrzej Ejchart, Adam Gryff-Keller, „NMR w cieczech. Zarys teorii i metodologii”; Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2003.
2. Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych, pod red. W. Zielińskiego i A. Rajcy, rozdz. 2 – 4., WNT, Warszawa 1995.
3. James Keeler “Understanding NMR Spectroscopy.”
4. Skrypt „Spektroskopia molekularna – ćwiczenia laboratoryjne”.3. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, eds. W.R. Croasmun i R.M.K. Carlson, VCH Weinheim 1987.