



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

**Αρχές Λειτουργίας και Εφαρμογές Φασματογράφου Πυρηνικού
Μαγνητικού Συντονισμού**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Άννα Π. Κουνέλη

Επιβλέπων: Γεώργιος Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

**Αρχές Λειτουργίας και Εφαρμογές Φασματογράφου Πυρηνικού
Μαγνητικού Συντονισμού**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Άννα Π. Κουνέλη

Επιβλέπων: Γεώργιος Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την 17η Ιουλίου 2019.

.....

Γ. Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....

Κ. Νικήτα
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

.....

Δ. Κουτσούρης
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Ιούλιος 2019

.....
Άννα Π. Κουνέλη

Διπλωματούχος Ηλεκτρολόγος Μηχανικός και Μηχανικός Υπολογιστών Ε.Μ.Π.

Copyright © Άννα Π. Κουνέλη, 2019

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση των βασικών αρχών του φαινομένου του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) και των αρχών λειτουργίας της φασματοσκοπίας NMR, καθώς και η παρουσίαση των κυριότερων εφαρμογών της. Συγκεκριμένα, ορίστηκαν βασικές έννοιες όπως οι ιδιότητες των πυρήνων, η αλληλεπίδρασή τους με ένα μαγνητικό πεδίο, η μαγνήτιση, ο εφησυχασμός, και το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser. Έγινε ξεχωριστή αναφορά στα βασικά τμήματα που απαρτίζουν έναν φασματογράφο NMR και παρουσιάστηκαν τα στάδια της διαδικασίας διεξαγωγής ενός πειράματος NMR, που μπορούν να συνοψιστούν ως η προετοιμασία του δείγματος, η συλλογή και η ανάλυση των δεδομένων.

Στη συνέχεια, παρουσιάστηκαν τα βασικά μονοδιάστατα πειράματα NMR, δηλαδή το πείραμα Pulse-Acquire, το Spin-Echo και το Inversion Recovery, καθώς και τα βασικά δισδιάστατα πειράματα NMR, όπως τα ομοπυρηνικά πειράματα COSY, NOESY, ROESY, TOCSY, INADEQUATE και J-Resolved, και τα ετεροπυρηνικά πειράματα HETCOR και HMQC. Έπειτα, αναλύθηκαν τα στάδια επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων, δηλαδή η λήψη του σήματος της Ελευθέρως Φθίνουσας Επαγωγής, η προσθήκη μηδενικών, η βελτίωση ευαισθησίας και ανάλυσης, ο μετασχηματισμός Fourier, η διόρθωση φάσης και η διόρθωση βασικής γραμμής. Τέλος, αναφέρθηκαν οι σημαντικότερες εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR στον τομέα της ιατρικής, της φαρμακολογίας, της έρευνας τροφίμων και ποτών και της δομικής βιολογίας.

Λέξεις Κλειδιά

Φασματογράφος Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Μονοδιάστατα Πειράματα, Δισδιάστατα Πειράματα, Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων

Abstract

The objective of this thesis is to analyze the basic principles of the nuclear magnetic resonance (NMR) phenomenon and NMR spectroscopy, as well as to present its main applications. Specifically, fundamental concepts such as the properties of the nuclei, their interaction with a magnetic field, the magnetization, the relaxation, and the nuclear Overhauser effect were defined. Separate reference was made to the main parts of a NMR spectrometer, and the stages of a NMR experiment, which can be summarized as the sample preparation, the collection and analysis of the data.

Moreover, primary one-dimensional NMR experiments, namely the Pulse-Acquire, the Spin-Echo and the Inversion Recovery experiments, as well as primary two-dimensional NMR experiments, such as the co-nuclear experiments COSY, NOESY, ROESY, TOCSY, INADEQUATE and J-Resolved as well as the hetero-nuclear experiments HETCOR and HMQC, were presented. Next, the stages of the data processing procedure, namely the acquisition of the Free Induction Decay signal, the zero-filling process, the sensitivity and resolution enhancement, the phase correction and the baseline correction were analyzed. Finally, the most important applications of NMR spectroscopy in the fields of medicine, pharmacology, food and beverage research and structural biology were mentioned.

KeyWords

Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, One-Dimensional Experiments, Two-Dimensional Experiments, Data Processing

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή	11
1.1 Συνοπτική περιγραφή μεθόδου	11
1.2 Ιστορική αναδρομή	12
2. Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	14
2.1 Ορισμός και Επεξήγηση.....	14
2.2 Ιδιότητες πυρήνα	14
2.2.1 Στοιχειώδη σωματίδια πυρήνα	14
2.2.2 Στροφορμή L	15
2.2.3 Ιδιοστροφορμή I και σχετικός κβαντικός αριθμός m	15
2.2.4 Μαγνητική ροπή μ	15
2.2.5 Γυρομαγνητικός λόγος γ	16
2.3 Αλληλεπίδραση πυρήνων με μαγνητικό πεδίο.....	16
2.3.1 Εφαρμογή μαγνητικού πεδίου B_0	16
2.3.2 Εφαρμογή μαγνητικών πεδίων B_0 και B_1	18
2.3.2.1 Μετάπτωση Larmor	18
2.3.2.2 Πυρηνική Θωράκιση.....	19
2.4 Μαγνήτιση.....	20
2.5 Εφησυχασμός.....	23
2.6 Ανίχνευση σήματος.....	24
2.6.1 Παράμετροι φάσματος NMR.....	26
2.6.1.1 Χημική μετατόπιση δ	26
2.6.1.2 Σταθερά σύζευξης.....	27
2.7 Πυρηνικό Φαινόμενο Overhauser (NOE)	31
3. Φασματογράφος NMR	33
3.1 Μαγνήτης	33
3.2 Probe.....	35
3.2.1 Γενικές κατηγορίες probe.....	36
3.2.1.1 Υγρά Probes	36
3.2.1.2 Στερεά Probes	36
3.3 Πομπός Ραδιοσυχνοτήτων	37

3.4	Δέκτης	38
3.5	Μετατροπέας ADC	39
3.6	Προγραμματιστής Παλμών	41
3.7	Υπολογιστής.....	41
4.	Διεξαγωγή Πειράματος NMR.....	43
4.1	Προετοιμασία δείγματος	44
4.2	Συλλογή και Ανάλυση Δεδομένων	45
4.2.1	Μέτρηση έντασης σήματος και αύξηση SNR	45
4.2.2	Μέτρηση χημικής μετατόπισης δ και τρόποι βελτιστοποίησης διαχωρισμού	46
4.2.3	Μέτρηση φάσης.....	47
4.2.4	Μέτρηση χαλάρωσης.....	48
5.	Μονοδιάστατα πειράματα NMR	49
5.1	Βασική πειραματική διαδικασία μονοδιάστατων πειραμάτων	49
5.2	Μονοδιάστατο φάσμα	50
5.3	Παράμετροι μονοδιάστατων πειραμάτων	50
5.4	Χαρακτηριστικά μονοδιάστατα πειράματα.....	51
5.4.1	Πείραμα Pulse-Acquire	51
5.4.2	Πείραμα Spin Echo	52
5.4.3	Πείραμα Inversion Recovery	53
6.	Δισδιάστατα Πειράματα NMR.....	55
6.1	Βασική πειραματική διαδικασία δισδιάστατων πειραμάτων	55
6.2	Δισδιάστατο φάσμα.....	56
6.3	Παράμετροι δισδιάστατων πειραμάτων	59
6.4	Χαρακτηριστικά δισδιάστατα πειράματα	59
6.4.1	Ομοπυρηνικά πειράματα	60
6.4.1.1	Πείραμα COSY (Correlation Spectroscopy).....	60
6.4.1.2	Πείραμα NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy).....	61
6.4.1.3	Πείραμα ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy)	63
6.4.1.4	Πείραμα TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).....	64
6.4.1.5	Πείραμα INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment).....	66
6.4.1.6	Πείραμα J-Resolved.....	67

6.4.2	Ετεροπυρηνικά πειράματα	68
6.4.2.1	Πείραμα HETCOR (Heteronuclear Correlation Spectroscopy).....	68
6.4.2.2	Πείραμα HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence).....	69
7.	Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων.....	72
7.1	Ελευθέρως Φθίνουσα Επαγωγή (FID).....	72
7.2	Προσθήκη μηδενικών.....	73
7.3	Βελτίωση ευαισθησίας.....	73
7.4	Βελτίωση ανάλυσης.....	75
7.5	Μετασχηματισμός Fourier	76
7.6	Διόρθωση φάσης.....	78
7.7	Διόρθωση βασικής γραμμής	81
8	Εφαρμογές Φασματοσκοπίας NMR.....	85
8.1	Ιατρική.....	87
8.1.1	Καρδιαγγειακές ασθένειες	87
8.1.2	Ψυχιατρικές ασθένειες.....	88
8.1.3	Καρκίνος.....	91
8.2	Φαρμακολογία.....	92
8.2.1	Προσδιορισμός θεραπευτικού στόχου.....	93
8.2.2	Τοξικότητα	94
8.3	Έρευνα τροφίμων και ποτών.....	94
8.3.1	Ανίχνευση νοθείας ελαιόλαδου	94
8.3.2	Ανίχνευση νοθείας και προέλευσης αλκοολούχων ποτών.....	96
8.3.3	Ανίχνευση νοθείας σε χυμούς φρούτων	97
8.4	Δομική Βιολογία	97
9	Βιβλιογραφία.....	99

1. Εισαγωγή

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές για την ταυτοποίηση, διαμορφωτική ανάλυση και μελέτη των ιδιοτήτων των χημικών ενώσεων με εφαρμογές στη χημεία, βιοχημεία, ιατρική και φαρμακευτική. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περιγραφή της συγκεκριμένης αναλυτικής τεχνικής και των εφαρμογών της. Στη συνέχεια του κεφαλαίου 1 γίνεται συνοπτική περιγραφή της μεθόδου που μελετάται καθώς και ιστορική αναδρομή με αναφορά στα σημαντικότερα γεγονότα που συντέλεσαν στην εξέλιξή της. Στο κεφάλαιο 2 επεξηγούνται τα σημαντικότερα μεγέθη που είναι απαραίτητα για την καλύτερη κατανόηση της συγκεκριμένης φασματοσκοπικής τεχνικής, όπως για παράδειγμα οι ιδιότητες των πυρήνων, η αλληλεπίδρασή τους με μαγνητικό πεδίο, η συμπεριφορά της μαγνήτισης, η διαδικασία εφησυχασμού, η ανίχνευση του σήματος και το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser. Στο κεφάλαιο 3 αναλύονται τα τμήματα ενός σύγχρονου φασματογράφου NMR. Στο κεφάλαιο 4 γίνεται αναφορά στη διαδικασία της διεξαγωγής ενός πειράματος NMR. Στα κεφάλαια 5 και 6 αναφέρονται τα σημαντικότερα μονοδιάστατα και δισδιάστατα πειράματα αντίστοιχα. Στο κεφάλαιο 7 αναφέρονται τα στάδια επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων, δηλαδή η λήψη του σήματος της Ελευθέρως Φθίνουσας Επαγωγής, η προσθήκη μηδενικών, η βελτίωση της ευαισθησίας και της ανάλυσης του σήματος, ο μετασχηματισμός Fourier, η διόρθωση της φάσης και η διόρθωση της βασικής γραμμής του φάσματος. Τέλος, στο κεφάλαιο 8 αναφέρονται μερικές από τις πιο σημαντικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR στον τομέα της ιατρικής, της φαρμακολογίας, της έρευνας τροφίμων και ποτών καθώς και της δομικής βιολογίας.

1.1 Συνοπτική περιγραφή μεθόδου

Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στο φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, σύμφωνα με το οποίο οι πυρήνες εντός ενός μαγνητικού πεδίου απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το σήμα NMR λαμβάνεται από τη διέγερση των πυρήνων μέσω ραδιοκυμάτων. Η διαδικασία που ακολουθείται σε ένα πείραμα NMR είναι η εξής. Το δείγμα προς μελέτη εισάγεται εντός ενός ομογενούς μαγνητικού πεδίου και οι πυρήνες του δείγματος προσανατολίζονται σε σχέση με την ένταση του πεδίου. Στη συνέχεια, το δείγμα απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (παλμοί ραδιοσυχνότητας) με αποτέλεσμα οι πυρήνες να διεγείρονται και να μεταβαίνουν σε άλλο ενεργειακό επίπεδο. Αφού διακοπεί η ακτινοβολία του δείγματος, οι πυρήνες επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση (κατάσταση ισορροπίας) και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από την οποία προκύπτει το σήμα NMR. Το σήμα NMR που λαμβάνεται βρίσκεται στο πεδίο του χρόνου, προκειμένου, όμως, να μελετηθεί πρέπει να μετατραπεί στο πεδίο της συχνότητας μέσω του μετασχηματισμού Fourier.[1][2]

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία ισχυρή φασματοσκοπική τεχνική καθώς παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα. Αρχικά, προσφέρει τη δυνατότητα εξέτασης μεγαλύτερου εύρους δειγμάτων και παρέχει περισσότερες πληροφορίες για το εκάστοτε δείγμα σε σύγκριση με τις περισσότερες φασματοσκοπικές τεχνικές. Παρουσιάζει υψηλή διεισδυτικότητα στους

ιστούς χωρίς να καταστρέφει το δείγμα. Δεδομένου ότι ο πυρήνας καταλαμβάνει πολύ μικρό χώρο σε ένα άτομο, η ακτινοβολία που στοχεύει σε έναν ιστό έχει μικρή πιθανότητα να «χτυπήσει» έναν πυρήνα, γι' αυτό καταφέρνει να διεισδύσει δεκάδες εκατοστά. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR διακρίνεται για την αξιοπιστία και την αναπαραγωγιμότητά της. Εφόσον ένας φασματογράφος NMR ρυθμίζεται και λειτουργεί σωστά, πολλαπλές επαναλήψεις του πειράματος του ίδιου δείγματος παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλό βαθμό αναπαραγωγιμότητας, καθιστώντας τη φασματοσκοπία NMR μία πιο αξιόπιστη και αναλυτική τεχνική από αυτές που βασίζονται στη χρωματογραφία ή τη φασματομετρία μάζας. Πρακτικά, όσο ακολουθείται ένα σταθερό πρωτόκολλο λειτουργίας, η οποιαδήποτε διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων αντικατοπτρίζει βιολογικές αποκλίσεις και όχι αποκλίσεις των οργάνων που χρησιμοποιούνται. Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία ισχυρή παγκόσμια αναλυτική προσέγγιση που συχνά μπορεί να εντοπίσει απροσδόκητες βιολογικές διακυμάνσεις σε μία βάση δεδομένων, οι οποίες μπορεί να αφορούν τη διατροφή, την ηλικία, τις συνθήκες ανάπτυξης και την ορμονική κατάσταση φυτών, ζώων και μικροοργανισμών.[1]

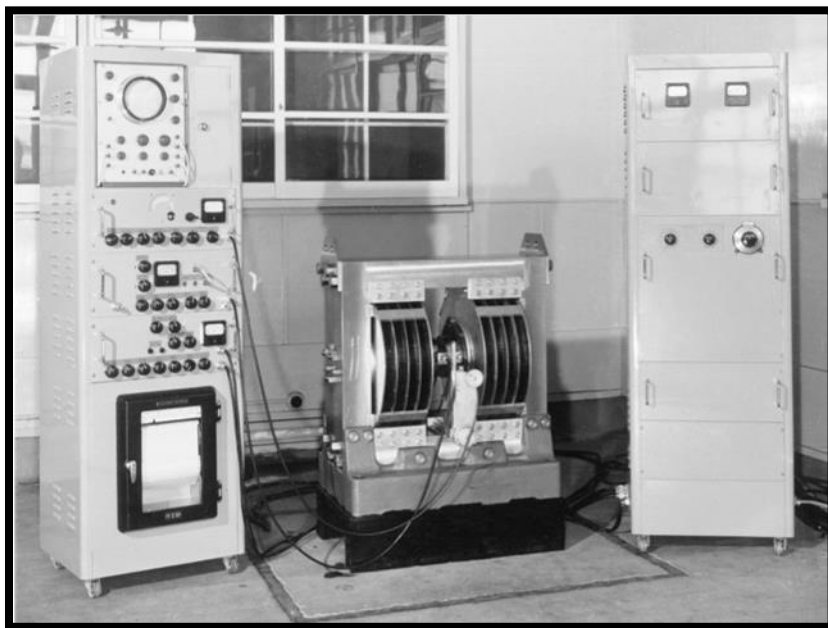
1.2 Ιστορική αναδρομή

Στις αρχές της δεκαετίας του 1920, οι *Stern* και *Gerlach* έδειξαν πως μία δέσμη ατόμων η οποία εισέρχεται σε ένα ανομοιογενές μαγνητικό πεδίο χωρίζεται σε δύο διακριτές δέσμες εξαιτίας των μαγνητικών επιδράσεων που προκύπτουν από την κβαντισμένη τροχιακή ορμή των ηλεκτρονίων. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1930, βελτιώσεις στη μέθοδο *Stern-Gerlach* επέτρεψαν την παρατήρηση πολύ μικρότερων πυρηνικών μαγνητικών επιδράσεων και το εργαστήριο του *I. I. Rabi* στο πανεπιστήμιο Columbia αποτέλεσε ένα σημαντικό κέντρο για τέτοιες μελέτες. Το 1938 ο *Rabi* και οι συνεργάτες του εξέλιξαν τα παραπάνω πειράματα, αφ' ενός χρησιμοποιώντας έναν ομοιογενή μαγνήτη, αφ' ετέρου εφαρμόζοντας μία ηλεκτρομαγνητική ραδιοσυχνότητα στα μόρια καθώς διέρχονταν μέσα από το ομοιογενές πεδίο. Δημιουργήθηκαν τότε δύο κβαντισμένα ενεργειακά επίπεδα με αποτέλεσμα ο προσανατολισμός των spin των πυρήνων να χωριστεί σε δύο επίπεδα και η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια να απορροφηθεί από το πυρηνικό σύστημα περιστροφής προκαλώντας μία μικρή αλλά υπολογίσιμη απόκλιση της προαναφερθείσας δέσμης. Η απόκλιση αυτή αποτελεί την πρώτη παρατήρηση του *πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού*. Ο *Rabi* κέρδισε για το έργο του το βραβείο Nobel το 1944.[3][4]

Το 1945 οι *Edward M. Purcell*, *Henry C. Torrey* και *Robert V. Pound* κατασκεύασαν στο MIT ένα απλό φασματόμετρο ραδιοσυχνοτήτων βασισμένο σε τεχνικές ραντάρ. Στις 15 Δεκεμβρίου 1945 παρατήρησαν το πρώτο σήμα NMR από ένα δείγμα κεριού παραφίνης. Λίγους μήνες πριν στο πανεπιστήμιο Stanford, ο *Felix Bloch* σε συνεργασία με τον *W. W. Hansen* προσπάθησαν να παρατηρήσουν τις επιδράσεις του πυρηνικού μαγνητισμού ακολουθώντας μία διαφορετική μέθοδο. Στις αρχές του 1946, παρατήρησαν ένα σήμα από τους πυρήνες υδρογόνου σε ένα δείγμα υγρού νερού μέσω μίας μεθόδου την οποία ο *Bloch* χαρακτήρισε ως «πυρηνική επαγωγή». Μέσα σε λίγους μήνες, οι *Bloch* και *Purcell* συνειδητοποίησαν πως παρατηρούσαν δύο διαφορετικές πτυχές του ίδιου φαινομένου και ο *Bloch* συμφώνησε πως η μέθοδος θα πρέπει να ονομάζεται πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός σύμφωνα με την ορολογία του *Rabi*. Οι *Bloch*

και *Purcell* μοιράστηκαν το βραβείο Nobel Φυσικής το 1952 καθώς οι δύο ανακαλύψεις στα πανεπιστήμια MIT-Harvard και Stanford θεωρήθηκαν ανεξάρτητες και ουσιαστικά ταυτόχρονες.[3][4]

Η φασματοσκοπία NMR δεν είχε προσελκύσει ιδιαίτερα την προσοχή των χημικών μέχρι το 1950, όταν ανακαλύφθηκε ότι η ακριβής συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα εξαρτάται από την κατάσταση του χημικού του περιβάλλοντος. Η ανακάλυψη της *χημικής μετατόπισης* κατέστησε τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR καθοριστική στην ανίχνευση της δομής των μορίων. Το 1956 ο πρώτος JNM-1 φασματογράφος NMR με δυνατότητα επιλογής συχνότητας συντονισμού ανάμεσα στα 4, 12 και 32 MHz έγινε διαθέσιμος από την εταιρία JEOL (Japan Electron Optics Laboratory) (Σχήμα 1.1). Παρατηρήθηκαν τρία ξεχωριστά σήματα ^1H αιθυλικής αλκοόλης στα 32 MHz. Το 1971 ο *Jean Jeener* ανακάλυψε έναν καινούριο τρόπο εφαρμογής παλμικών ακολουθιών με τα αποτελέσματα να εμφανίζονται με βάση δύο ξεχωριστές κλίμακες συχνοτήτων. Η ανακάλυψη αυτή σύντομα εξελίχθηκε στην μέθοδο της *δισδιάστατης φασματοσκοπίας* NMR. Τέλος, με τη συστηματική προσέγγιση που έθεσε ο *Kurt Wüthrich* με τους συνεργάτες του στις αρχές του 1980, σε συνδυασμό με πιο εξελιγμένες τεχνικές χρήσης παλμών που αναπτύχθηκαν από τον *Ad Bax*, είναι πλέον εφικτό να προσδιοριστούν δομές πρωτεϊνών με ακρίβεια αντίστοιχη της κρυσταλλογραφίας των ακτίνων X.[3][4]



Σχήμα 1.1: Φασματογράφος NMR JEOL. Πηγή: [4]

2. Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

2.1 Ορισμός και Επεξήγηση

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός είναι μία μορφή φασματοσκοπίας απορρόφησης όπου οι πυρήνες του δείγματος τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο, με αποτέλεσμα το δείγμα να απορροφά και να επανεκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η απορρόφηση και η επανεκπομπή ενέργειας εξαρτάται από τον παρατηρούμενο πυρήνα, με αποτέλεσμα οι συχνότητες της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας να είναι χαρακτηριστικές του πυρήνα. Το σήμα NMR που λαμβάνεται βρίσκεται, αρχικά, στο πεδίο του χρόνου αλλά προκειμένου να μελετηθεί μετατρέπεται, με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, στο πεδίο της συχνότητας. Το τελικό φάσμα NMR αποτελείται από μία πληθώρα κορυφών, οι οποίες συντονίζονται σε διάφορες συχνότητες.[1][5]

Η μέθοδος NMR βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με συγκεκριμένες τιμές *ιδιοστροφορμής (spin)*, η έννοια της οποίας αναλύεται στην επόμενη παράγραφο. Συγκεκριμένα, πυρήνες με μη μηδενικές τιμές spin είναι κατάλληλοι για να μελετηθούν με τη μέθοδο NMR, ενώ πυρήνες με μηδενικές τιμές spin δεν ανιχνεύονται με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Παράδειγμα κατάλληλων πυρήνων αποτελούν οι ^1H , $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_7$ και $^{27}\text{Al}_{13}$ ενώ παράδειγμα μη ανιχνεύσιμων πυρήνων αποτελούν οι $^{12}\text{C}_6$, $^{16}\text{O}_8$ και $^{56}\text{Fe}_{28}$. Αξίζει να σημειωθεί πως οι πυρήνες που μελετώνται πιο συχνά με τη μέθοδο NMR είναι οι ^1H και ^{13}C . [5]

Η λήψη των φασμάτων NMR γίνεται εντός μαγνητικού πεδίου το οποίο παράγεται από τον υπεραγωγίμο μαγνήτη του φασματογράφου. Η ένταση του πεδίου προσδιορίζει το πόσο ευδιάκριτα είναι τα φάσματα που λαμβάνονται. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση, τόσο πιο ευδιάκριτα είναι τα φάσματα. Ακόμη, η ομοιογένεια και η σταθερότητα του πεδίου αποτελούν βασικούς παράγοντες για την επιτυχή λήψη των φασμάτων, η οποία εξετάζεται με την εκπομπή και λήψη μίας δεδομένης συχνότητας αναφοράς.[5]

Ο συντονισμός στον οποίο βασίζεται η μέθοδος NMR αποτελεί την ταυτόχρονη διέγερση όλων των πυρήνων του δείγματος που μελετάται και επιτυγχάνεται στο τμήμα του φασματογράφου που ονομάζεται αισθητήρας ή *probe*¹. Το probe διαθέτει τον απαραίτητο εξοπλισμό (συντονιζόμενα κυκλώματα) για την παραγωγή παλμοσειρών, οι οποίες περιλαμβάνουν το πιθανό εύρος συχνοτήτων ώστε να διεγερθούν όλοι οι παρατηρούμενοι πυρήνες και να γίνει λήψη της κυματομορφής αποδιέγερσης.[5]

2.2 Ιδιότητες πυρήνα

2.2.1 Στοιχειώδη σωματίδια πυρήνα

Τα στοιχειώδη σωματίδια από τα οποία αποτελείται ένας πυρήνας είναι τα πρωτόνια, τα νετρόνια και τα ηλεκτρόνια. Τα πρωτόνια και τα νετρόνια ονομάζονται με μία λέξη *νουκλεόνια*. Το πλήθος των πρωτονίων του πυρήνα ονομάζεται *ατομικός αριθμός* και συμβολίζεται με **Z**. Ο

αριθμός των νετρονίων του πυρήνα συμβολίζεται με N . Το άθροισμα του ατομικού αριθμού Z και του αριθμού νετρονίων N αποτελεί το *μαζικό αριθμό* του πυρήνα και συμβολίζεται με A .

2.2.2 Στροφορμή L

Η στροφορμή L είναι ένα διανυσματικό μέγεθος που αντιστοιχεί στην περιστροφική κίνηση, ανάλογο με την ορμή που αντιστοιχεί στη γραμμική κίνηση και ορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (2.2.1):

$$\vec{L} = \vec{r} \times \vec{p} \quad (2.2.1)$$

όπου \vec{r} η απόσταση του σώματος από τον άξονα περιστροφής του και $\vec{p} = m\vec{v}$ η ορμή του.

Στην κλασική μηχανική, η στροφορμή μπορεί να οφείλεται σε τροχιακή κίνηση (όπως είναι η ετήσια κίνηση της Γης γύρω από τον ήλιο) ή στο spin (όπως είναι η καθημερινή περιστροφή της Γης γύρω από τον άξονά της).[6]

2.2.3 Ιδιοστροφορμή I και σχετικός κβαντικός αριθμός m

Όλα τα νουκλεόνια που συνθέτουν οποιονδήποτε ατομικό πυρήνα, έχουν την εγγενή κβαντική ιδιότητα της *ιδιοστροφορμής* I (*spin*). Σε αναλογία με την κλασική μηχανική, το spin αντιπροσωπεύει μία εγγενής στροφορμή του στοιχειώδους σωματιδίου και εκφράζει πώς το σωματίδιο φαίνεται από διάφορες κατευθύνσεις. Το spin ενός πυρήνα είναι η συνισταμένη των spin των νουκλεονίων που τον αποτελούν. Το πυρηνικό spin είναι κβαντισμένο μέγεθος, έχει μέτρο I (σε μονάδες $\frac{h}{2\pi}$ όπου h η σταθερά του Planck), μπορεί να πάρει διακριτές τιμές και εξαρτάται από τον αν ο μαζικός αριθμός A είναι άρτιος ή περιττός. Αν οι αριθμοί Z και N είναι άρτιοι, που σημαίνει ότι και ο A είναι άρτιος, τότε ισχύει $I = 0$. Παραδείγματα τέτοιων πυρήνων είναι οι ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S . Αν οι αριθμοί Z και N είναι περιττοί, που σημαίνει ότι ο A είναι άρτιος, τότε $I = \text{ακέραιο πολλαπλάσιο του } 2(1/2)$. Παραδείγματα τέτοιων πυρήνων είναι οι ^2H ($I = 1$), ^{14}N ($I = 1$) και ^{10}B ($I = 3$). Αν ο Z είναι περιττός αριθμός και ο N άρτιος ή αντίστροφα, που σημαίνει ότι ο A είναι περιττός, τότε $I = n(1/2)$ όπου n περιττός ακέραιος αριθμός (1,3,5,...). Παραδείγματα τέτοιων πυρήνων αποτελούν οι πιο ευρέως μελετούμενοι με τη μέθοδο NMR πυρήνες ^1H , ^{13}C και ^{31}P με $I = 1/2$ αλλά και πυρήνες όπως οι ^{11}B και ^{17}O με $I = 3/2$ και $I = 5/2$ αντίστοιχα.[2][6]

Η ιδιοστροφορμή κάθε πυρήνα είναι κβαντισμένη και δίνεται από τον τύπο $I = m\hbar$, όπου \hbar είναι η ανηγμένη σταθερά του Planck και m ο σχετικός κβαντικός αριθμός γνωστός και ως μαγνητικός κβαντικός αριθμός. Για τον εκάστοτε υπό μελέτη πυρήνα, υπάρχει ένα σύνολο από $(2I + 1)$ καταστάσεις στροφορμής και ο σχετικός κβαντικός αριθμός m μπορεί να πάρει τιμές από $-I, -I + 1, -I + 2, \dots, I - 1, +I$. [2][6]

2.2.4 Μαγνητική ροπή μ

Όταν οι ιδιοστροφορμές των πρωτονίων και νετρονίων δεν είναι συζευγμένες, δηλαδή λαμβάνουν μη μηδενικές τιμές, τότε το ολικό spin του πυρήνα δημιουργεί ένα μαγνητικό δίπολο κατά μήκος του άξονα περιστροφής. Το μέγεθος του δημιουργούμενου διπόλου αποτελεί

θεμελιώδη πυρηνική ιδιότητα που καλείται πυρηνική μαγνητική ροπή μ , η οποία ορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (2.2.2):

$$\mu = \gamma p \quad (2.2.2)$$

όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος και p η ορμή του πυρήνα.[2]

2.2.5 Γυρομαγνητικός λόγος γ

Ο γυρομαγνητικός λόγος γ αποτελεί θεμελιώδη πυρηνική σταθερά. Εξαρτάται από τη φύση του πυρήνα, με αποτέλεσμα να λαμβάνει διαφορετικές τιμές για κάθε είδος πυρήνα. Ο γυρομαγνητικός λόγος σχετίζεται με τη μαγνητική ροπή μ και την ιδιοστροφορμή I σύμφωνα με την εξίσωση (2.2.3):

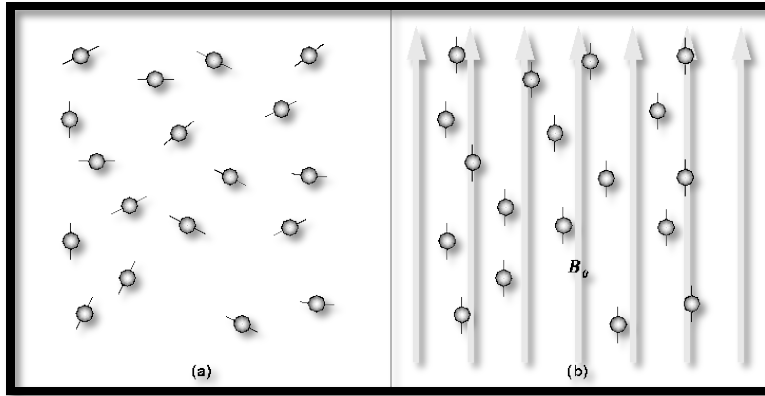
$$\gamma = \frac{2\pi\mu}{hI} \quad (\text{MHz/T})(2.2.3)$$

όπου h η σταθερά Planck.[7]

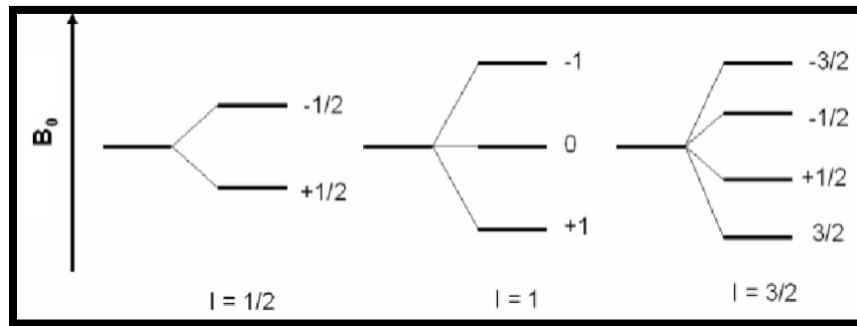
2.3 Αλληλεπίδραση πυρήνων με μαγνητικό πεδίο

2.3.1 Εφαρμογή μαγνητικού πεδίου B_0

Όταν ένα δείγμα πυρήνων βρίσκεται εκτός μαγνητικού πεδίου, τα spin των πυρήνων έχουν όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς και οι πυρήνες περιστρέφονται γύρω από τον άξονα τους (Σχήμα 2.1a). Αν το δείγμα εισαχθεί σε σταθερό ομογενές μαγνητικό πεδίο (έστω B_0), τα spin των πυρήνων προσανατολίζονται σε σχέση με την ένταση B_0 (Σχήμα 2.1b). Σύμφωνα με το *φαινόμενο Zeeman*, οι πυρήνες διατάσσονται ανάλογα με τα ενεργειακά επίπεδα $(2I + 1)$ που τους αντιστοιχούν (Σχήμα 2.2). Συγκεκριμένα, το spin ενός πυρήνα με $I = 1/2$ είτε θα ευθυγραμμισθεί με την ένταση B_0 όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση θα ισχύει $m = 1/2$ και θα βρίσκεται στη χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, είτε θα αντιτεθεί προς τη συγκεκριμένη ένταση οπότε θα ισχύει $m = -1/2$ και θα βρίσκεται στην υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση (Σχήμα 2.3).[5][8]



Σχήμα 2.1: Προσανατολισμός των spin πρωτονίων με την απουσία και την παρουσία μαγνητικού πεδίου. (a) Με απουσία μαγνητικού πεδίου τα spin των πρωτονίων προσανατολίζονται προς όλες τις πιθανές διευθύνσεις. (b) Με παρουσία μαγνητικού πεδίου προσανατολίζονται παράλληλα ή αντιπαράλληλα προς το πεδίο. Πηγές: [5][9]



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση των ενεργειακών επιπέδων $(2I+1)$ για τιμές της ιδιοστροφορμής $1/2, 1$ και $3/2$. Πηγή: [8]

Όπως προαναφέρθηκε, η εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου έντασης B_0 έχει ως αποτέλεσμα η πυρηνική μαγνητική ροπή μ του πυρήνα να υιοθετήσει $(2I + 1)$ προσανατολισμούς είτε με επαύξηση (re-enforcing) είτε με αντίθεση (opposition) στο B_0 . Ο ενεργειακός προσανατολισμός που είναι παράλληλος προς το μαγνητικό πεδίο ($I_z = 1/2$) συμβολίζεται με το γράμμα α (χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση), ενώ ο αντιπαράλληλος προσανατολισμός ($I_z = -1/2$) με το γράμμα β (υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση). Αξίζει να σημειωθεί πως ο άξονας περιστροφής του κάθε πυρήνα δεν μπορεί να προσανατολιστεί ακριβώς παράλληλα ή αντιπαράλληλα με τη διεύθυνση του εφαρμοσμένου μαγνητικού πεδίου, αλλά διαγράφει γυροσκοπική πορεία γύρω από το πεδίο με γωνιακή ταχύτητα που δίνεται από τη σχέση (2.3.1).[5][8][10]

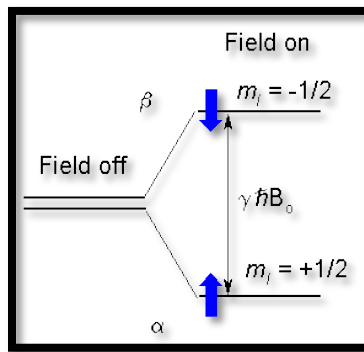
$$\omega = \gamma B_0 \quad (\text{rad/s})(2.3.1)$$

Ο προσανατολισμός των spin των πυρήνων υπακούει στη σταθερά Boltzmann, σύμφωνα με την οποία υπάρχει περίσσειμα πυρήνων στη βασική κατάσταση με προσανατολισμό παράλληλο προς την ένταση B_0 . Η αναλογία μεταξύ των πληθυσμών στο υψηλότερο (n^2) και

χαμηλότερο (n^1) ενεργειακό επίπεδο σε θερμοκρασία δωματίου υπακούει στο *νόμο κατανομής Boltzmann*, σύμφωνα με την εξίσωση (2.3.2),

$$\frac{n^2}{n^1} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \cdot 0.9999382 \quad (2.3.2)$$

όπου ΔE η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο ενεργειακών επιπέδων, k η σταθερά Boltzmann και T η θερμοκρασία δωματίου. Πράγματι, ο νόμος κατανομής Boltzmann αποδεικνύει ότι η πιθανότητα παρατήρησης της n^1 (α) ως προς τη n^2 (β) είναι λίγο μεγαλύτερη. Σε αυτή την πληθυσμιακή διαφορά βασίζεται η φασματοσκοπία NMR. Η αύξηση της έντασης του πεδίου B_0 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργειακής διαφοράς ΔE , η οποία συνεπάγεται αύξηση της πληθυσμιακής διαφοράς μεταξύ των δύο κβαντικών καταστάσεων, αυξάνοντας την ισχύ της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας. Επομένως, μεγαλύτερες εντάσεις πεδίων συμβάλλουν στην αύξηση της ευαισθησίας του πειράματος NMR.[5][8][10]

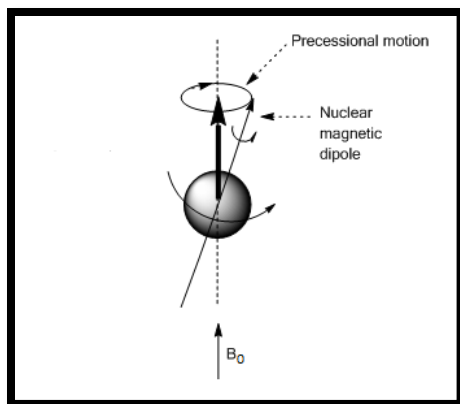


Σχήμα 2.3: Μεταβάσεις μεταξύ δύο καταστάσεων που συμβαίνουν με την απορρόφηση ή εκπομπή κβαντικής ενέργειας ισοδύναμης με την ενεργειακή διαφορά των δύο καταστάσεων. Πηγή: [11]

2.3.2 Εφαρμογή μαγνητικών πεδίων B_0 και B_1

2.3.2.1 Μετάπτωσηση Larmor

Με την εφαρμογή ενός δεύτερου μαγνητικού πεδίου B_1 (που λαμβάνει τη μορφή παλμών ραδιοσυχνότητας όπως αναλύεται στην παράγραφο 2.4), ο άξονας περιστροφής του πυρήνα μεταπίπτει γύρω από τη διεύθυνση του ομογενούς πεδίου B_0 , δηλαδή ο άξονας περιστροφής της μαγνητικής ροπής μ εκτελεί περιστροφή γύρω από το \vec{B}_0 . Η κίνηση αυτή ονομάζεται *μετάπτωσηση Larmor (Larmor precession)* (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4: Αναπαράσταση της κίνησης του περιστρεφόμενου πυρήνα στην οποία φαίνεται ότι το πυρηνικό μαγνητικό δίπολο δεν ευθυγραμμίζεται με το πεδίο B_0 αλλά μεταπίπτει ελαφρώς εκτός άξονα. Πηγή: [12]

Όταν σε ένα σταθερό μαγνητικό πεδίο κατάλληλης ισχύος εφαρμόζεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στη συχνότητα που αντιστοιχεί στη διαφορά ενέργειας μεταξύ των πυρηνικών σταθμών spin, επιτυγχάνεται η απορρόφηση συντονισμού (*resonant absorption*). Η συχνότητα στην οποία επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη διέγερση των πυρήνων, με αποτέλεσμα να συντονίζονται με την εφαρμοσμένη ακτινοβολία, καλείται συχνότητα **Larmor** και ορίζεται σύμφωνα με τις εξισώσεις (2.3.3),(2.3.4):

$$\omega_L = \gamma B_0 \quad (\text{rad/s})(2.3.3)$$

$$\nu_L = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (\text{Hz})(2.3.4)$$

Η ενέργεια ενός απορροφούμενου φωτονίου είναι τότε $E = h\nu_0$, όπου ν_0 η ραδιοσυχνότητα συντονισμού η οποία πρέπει να είναι ίση με τη συχνότητα Larmor (ν_L). Τότε, λοιπόν, ο πυρήνας και η ακτινοβολία της πηγής συντονίζονται και ισχύει:

$$\Delta E = h\nu_L \quad (2.3.5)$$

Επομένως, η ενεργειακή διαφορά ΔE των δύο καταστάσεων σχετίζεται με την ένταση B_0 του μαγνητικού πεδίου μέσω της εξίσωσης (2.3.6),

$$\Delta E = \frac{h\gamma}{2\pi} B_0 = \gamma\hbar B_0 \quad (2.3.6)$$

όπου $\hbar = h/2\pi$ η ανηγμένη σταθερά Planck.[5][8][10]

2.3.2.2 Πυρηνική Θωράκιση

Το φαινόμενο της πυρηνικής θωράκισης αποτελεί την πιο σημαντική διαταραχή της συχνότητας Larmor. Σύμφωνα με αυτό, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε τροχιά γύρω από τον πυρήνα παράγουν ένα μικρό μαγνητικό πεδίο το οποίο αντιτίθεται στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 , θωρακίζοντας τον πυρήνα από το B_0 . Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του

μαγνητικού πεδίου στον πυρήνα και κατ' επέκταση τη μείωση της απαιτούμενης για την επίτευξη συντονισμού συχνότητας (Σχήμα 2.5). Η συχνότητα Larmor μπορεί, λοιπόν, να επαναδιατυπωθεί ώστε να περιλαμβάνει και την ηλεκτρονιακή επίδραση σύμφωνα με την εξίσωση (2.3.7).[5][10][13]

$$v_L = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 - B_1) \quad (\text{Hz})(2.3.7)$$

Όσο μεγαλύτερη είναι η πυκνότητα των ηλεκτρονίων γύρω από τον πυρήνα, τόσο μεγαλύτερης έντασης είναι το πεδίο που παράγουν και που αντιτίθεται στο B_0 , και επομένως, τόσο μεγαλύτερη η θωράκιση. Τότε, η συχνότητα Larmor του πυρήνα θα μετατοπιστεί «προς υψηλότερες τιμές πεδίου» (upfield), δηλαδή θα παρατηρηθεί μία χαμηλότερη χημική μετατόπιση (lower ppm). Αντίστοιχα, αν ο πυρήνας είναι λιγότερο θωρακισμένος (deshielding), η συχνότητά του θα μετατοπιστεί «προς τις χαμηλότερες τιμές πεδίου» (downfield), δηλαδή θα παρατηρηθεί υψηλότερη χημική μετατόπιση (higher ppm).[5][10][13]

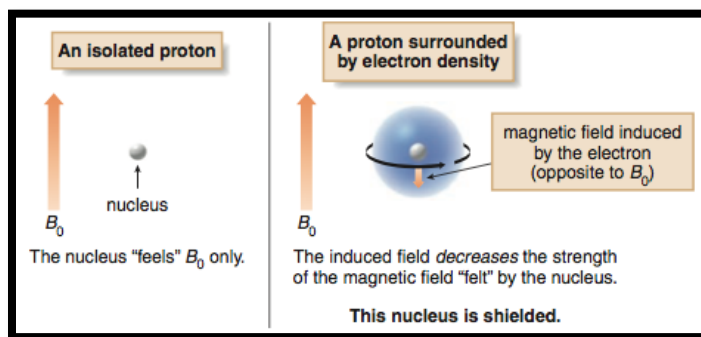
Η ένταση του μαγνητικού πεδίου B_1 που παράγεται από τα ηλεκτρόνια σχετίζεται με την ένταση του πεδίου B_0 σύμφωνα με τη σχέση (2.3.8):

$$B_1 = \sigma B_0 \quad (2.3.8)$$

όπου σ είναι η σταθερά θωράκισης του πυρήνα.

Έτσι, κάθε ενεργός πυρήνας που μελετάται με την τεχνική του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού δέχεται διαφορετική συνολική ένταση πεδίου B , η οποία ορίζεται από τη σχέση (2.3.9). [5][10][13]

$$B = B_0 - \sigma B_0 \quad (2.3.9)$$



Σχήμα 2.5: Αναπαράσταση της «θωράκισης» ενός πυρήνα ως αποτέλεσμα του μαγνητικού πεδίου που παράγουν τα ηλεκτρόνια γύρω του, το οποίο αντιτίθεται στο υπάρχον μαγνητικό πεδίο B_0 . Πηγή: [14]

2.4 Μαγνήτιση

Η μαγνήτιση (magnetization) \vec{M} αποτελεί το διανυσματικό άθροισμα όλων των μαγνητικών ροπών $\vec{\mu}$ των μορίων ενός δείγματος και δίνεται από την εξίσωση (2.4.1):

$$\vec{M} = \vec{M}_x + \vec{M}_y + \vec{M}_z \quad (2.4.1)$$

Σε κατάσταση ισορροπίας (equilibrium) του δείγματος, για τη μαγνήτιση ισχύουν οι σχέσεις (2.4.2)-(2.4.4):

$$\vec{M}(= \vec{M}_0) \parallel \vec{B}_0 \quad (2.4.2)$$

$$\vec{M}_0 = \vec{M}_z \neq 0 \quad (2.4.3)$$

$$\vec{M}_{xy} = 0 \quad (2.4.4)$$

Το διάνυσμα της μαγνήτισης σε κατάσταση ισορροπίας ορίζεται μόνο από τη συνιστώσα της μαγνήτισης στον άξονα z η οποία λαμβάνει τιμή M_0 και είναι παράλληλη στη διεύθυνση του πεδίου B_0 . Η συνιστώσα της μαγνήτισης στο επίπεδο xy είναι μηδενική σε κατάσταση ισορροπίας του δείγματος (Σχήμα 2.6(α)).[8]

Το μαγνητικό πεδίο B_0 κατά μήκος του άξονα z παράγεται από έναν πολύ ισχυρό υπεραγωγίμο μαγνήτη με αποτέλεσμα το διάνυσμα της μαγνήτισης να μην μπορεί εύκολα να μετατοπιστεί στο επίπεδο xy. Η μετατόπιση του διανύσματος της μαγνήτισης από τον άξονα z στο επίπεδο xy επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ενός πολύ μικρού μαγνητικού πεδίου B_1 κατά μήκος του άξονα x το οποίο ταλαντώνεται στη συχνότητα Larmor και είναι ικανό να στρέψει τη μαγνήτιση μακριά από τον άξονα z παρά την ύπαρξη του πολύ ισχυρού πεδίου B_0 . Για την παραγωγή του συγκεκριμένου πεδίου χρησιμοποιείται ένα πηνίο το οποίο τροφοδοτείται με ισχύ ραδιοσυχνοτήτων (RF) με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μαγνητικού πεδίου B_1 κατά μήκος του άξονα x, το οποίο ονομάζεται *πεδίο ραδιοσυχνοτήτων* ή *πεδίο RF*. [8]

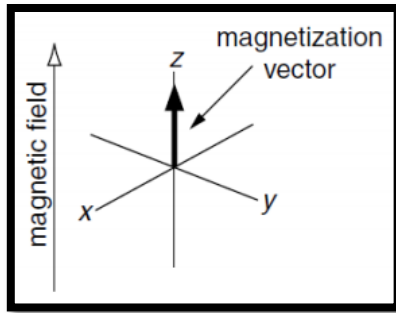
Η εφαρμογή του πεδίου RF έχει ως αποτέλεσμα η \vec{M} να φεύγει από την κατάσταση ισορροπίας και να περιστρέφεται στην κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου \vec{B}_0 σχηματίζοντας έναν κώνο με σταθερή γωνία β (Σχήμα 2.6 (β)). Η γωνία β ορίζεται σύμφωνα με τη σχέση (2.4.5), όπου ω_L η συχνότητα Larmor και t_p ο χρόνος εφαρμογής του πεδίου RF.

$$\beta = \omega_L t_p \quad (2.4.5)$$

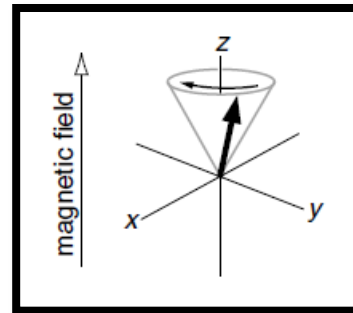
Σε αυτό το στάδιο, για τις συνιστώσες z και xy της μαγνήτισης ισχύουν οι σχέσεις (2.4.6) και (2.4.7):

$$\vec{M}_z < \vec{M}_0 \quad (2.4.6)$$

$$\vec{M}_{xy} \neq 0 \quad (2.4.7)$$



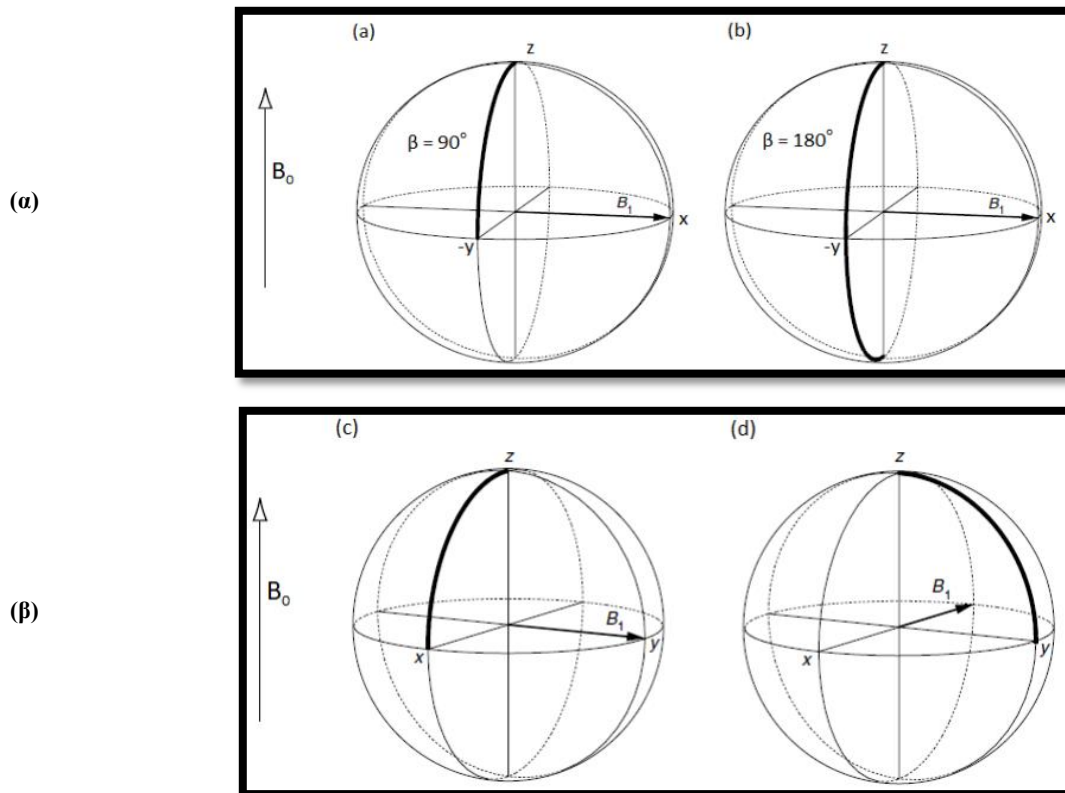
(α)



(β)

Σχήμα 2.6: (α) Διάνυσμα μαγνήτισης σε κατάσταση ισορροπίας. (β) Περιστροφή του διανύσματος της μαγνήτισης γύρω από τον άξονα z κατά μία σταθερή γωνία β . Πηγή: [8].

Η γωνία περιστροφής της μαγνήτισης ονομάζεται γωνία νέυσης (*flip angle*). Οι παλμοί RF χαρακτηρίζονται από την τιμή της εκάστοτε γωνίας β . Αν, για παράδειγμα, ισχύει $\beta = 90^\circ$ τότε ο παλμός RF χαρακτηρίζεται ως παλμός 90° . Στο Σχήμα 2.7 φαίνεται η περιστροφή της μαγνήτισης για διάφορες γωνίες νέυσης και κατευθύνσεις του πεδίου B_1 . [8]



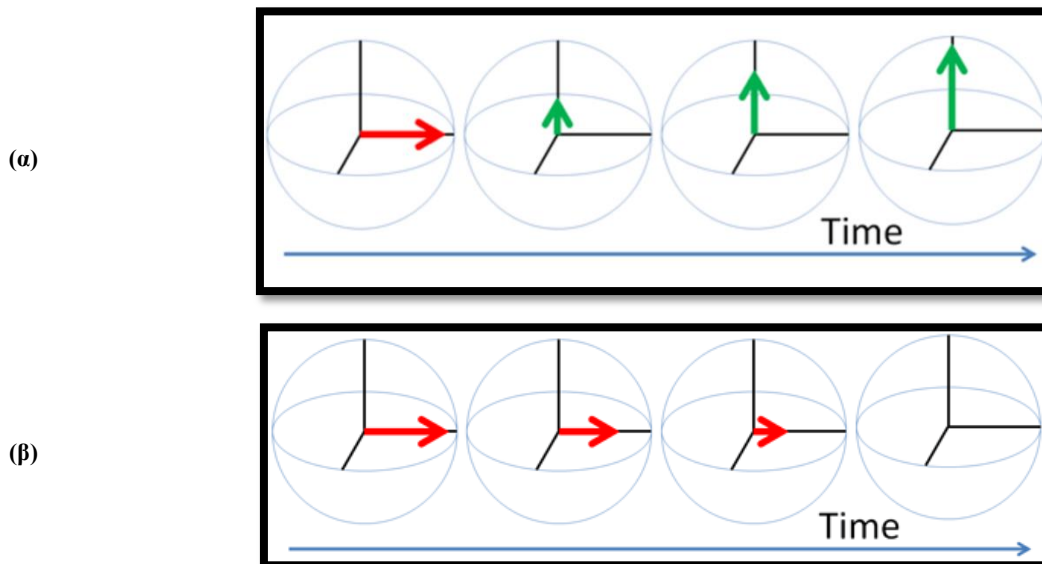
Σχήμα 2.7: (α) Αναπαράσταση της περιστροφής της μαγνήτισης στην περίπτωση εφαρμογής παλμών RF στον άξονα x με γωνία νέυσης $\beta=90^\circ$ (αριστερά) και $\beta=180^\circ$ (δεξιά). (β) Αναπαράσταση της περιστροφής της μαγνήτισης στην περίπτωση εφαρμογής παλμών RF με γωνία νέυσης $\beta=90^\circ$ με την κατεύθυνση του B_1 (c) στον άξονα y (αριστερά) και στον άξονα $-x$ (δεξιά). Πηγή: [8]

2.5 Εφησυχασμός

Εφησυχασμός ή αποκατάσταση είναι η διαδικασία κατά την οποία, αφού διακοπεί η ακτινοβολήση του δείγματος, οι πυρήνες του δείγματος επιστρέφουν στην κατάσταση ισορροπίας (equilibrium), στην οποία ισχύουν οι σχέσεις (2.4.2), (2.4.3) και (2.4.4). Το διάνυσμα της μαγνήτισης \vec{M} θα αρχίσει να επανέρχεται στον άξονα z. Οι συνιστώσες \vec{M}_{xy} και \vec{M}_z κατά την επαναφορά στην κατάσταση ισορροπίας μπορούν να μεταβάλλονται με διαφορετικές ταχύτητες και παρέχουν διαφορετικές πληροφορίες.[5][8]

Οι ταχύτητες με τις οποίες γίνεται η αποκατάσταση των δύο συνιστωσών χαρακτηρίζονται από τις σταθερές R_1 και R_2 , όπου $R_1 = 1/T_1$ και $R_2 = 1/T_2$. Οι χρόνοι T_1 και T_2 είναι οι χρόνοι εφησυχασμού των συνιστωσών \vec{M}_z και \vec{M}_{xy} αντίστοιχα και καθορίζουν το πόσο γρήγορα μπορεί να επαναληφθεί ένα πείραμα.. Οι συγκεκριμένοι χρόνοι επηρεάζονται από τις φυσικές ιδιότητες των μορίων του δείγματος, επομένως μελετώντας τους μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες για αυτές τις ιδιότητες.[5][8]

Ο εφησυχασμός της συνιστώσας \vec{M}_z ονομάζεται **διαμήκης μαγνητική επαναφορά** (longitudinal magnetic relaxation) ή **spin-lattice** επαναφορά και έχει σαν αποτέλεσμα την αποκατάσταση της \vec{M}_z ($\vec{M}_z = \vec{M}_0$) (Σχήμα 2.8 (α)). Ο εφησυχασμός της συνιστώσας \vec{M}_{xy} ονομάζεται **εγκάρσια επαναφορά** (transverse relaxation) ή **spin-spin** επαναφορά, γίνεται ταχύτερα συνήθως από την επαναφορά της \vec{M}_z ($T_2 < T_1$), γιατί η επαναφορά της \vec{M}_z προκαλεί αυτόματα μείωση της συνιστώσας \vec{M}_{xy} (Σχήμα 2.8 (β)).[5][8]



Σχήμα 2.8: (α) Η διαμήκης μαγνητική επαναφορά T_1 (longitudinal relaxation) είναι η διαδικασία κατά την οποία το διάνυσμα M_z , που είναι παράλληλο και στον άξονα του εφαρμοσμένου μαγνητικού πεδίου, επιστρέφει στην κατάσταση ισορροπίας. Στην κατάσταση ισορροπίας $M_z = M_0$. (β) Η εγκάρσια επαναφορά T_2 (transverse relaxation) είναι η διαδικασία κατά την οποία το διάνυσμα M_{xy} φθίνει. Στην κατάσταση ισορροπίας $M_{xy} = 0$. Πηγή: [15]

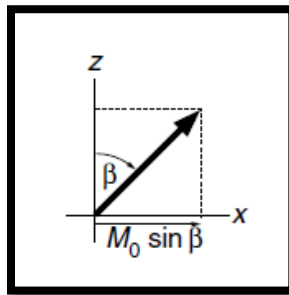
Η επαναφορά των πυρηνικών spin απαιτεί ένα μικροσκοπικό μηχανισμό ώστε ο πυρήνας να αλλάξει προσανατολισμό με αναφορά το εφαρμοσμένο μαγνητικό πεδίο και να ανταλλάξει ενέργεια με το περιβάλλον του, το οποίο καλείται πλέγμα (lattice). Ο σπουδαιότερος μηχανισμός εφησυχασμού είναι ο μηχανισμός διπόλου-διπόλου (dipole-dipole interaction), σύμφωνα με τον οποίο η μεταφορά ενέργειας γίνεται σε γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες ή με τα μονήρη ηλεκτρόνια σθένους δύο αλληλεπιδρώντων γειτονικών ατόμων. Αυτή η αλληλεπίδραση εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ των ζευγών spin αλλά και από τον προσανατολισμό τους σε σχέση με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.[15][16]

2.6 Ανίχνευση σήματος

Η ανίχνευση του σήματος NMR βασίζεται στην ανίχνευση της μετάπτωσης του διάνυσματος της μαγνήτισης. Η ανίχνευση της μαγνήτισης πραγματοποιείται με το ίδιο πηνίο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των παλμών RF (παράγραφος 2.4), το οποίο τοποθετείται γύρω από το δείγμα με τον άξονά του να είναι ευθυγραμμισμένος με το επίπεδο xy. Καθώς το διάνυσμα της μαγνήτισης «τέμνει» το πηνίο, παράγεται ένα σήμα το οποίο ενισχύεται και καταγράφεται. Πρόκειται για το σήμα της *Ελευθέρως Φθίνουσας Επαγωγής (Free Induction Decay-FID)* που ανιχνεύεται σε ένα πείραμα NMR.[8]

Η συνιστώσα της μαγνήτισης που ανιχνεύεται από το πηνίο είναι η συνιστώσα x. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.4, το διάνυσμα της μαγνήτισης ξεκινάει στην κατάσταση ισορροπίας από τον άξονα z και έχει τιμή M_0 (Σχέση (2.4.3)). Καθώς στρέφεται προς τον άξονα x κατά γωνία β , η συνιστώσα x της μαγνήτισης εκφράζεται μέσω της σχέσης (2.6.1) (Σχήμα 2.9).

$$M_x = M_0 \sin \beta \quad (2.6.1)$$

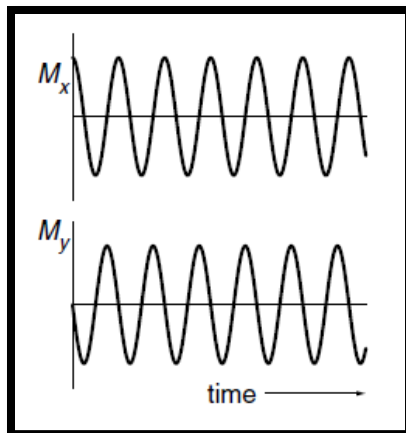


Σχήμα 2.9: Αναπαράσταση της συνιστώσας x της μαγνήτισης η οποία ξεκινά από τον άξονα z και στρέφεται προς τον άξονα x. Πηγή: [8]

Τη χρονική στιγμή $t = 0$ υπάρχει μόνο η συνιστώσα x. Μετά από χρονικό διάστημα t, το διάνυσμα της μαγνήτισης στρέφεται με γωνία $\omega_0 t$ και οι συνιστώσες x, y της μαγνήτισης εκφράζονται με τις σχέσεις (2.6.2), (2.6.3) (Σχήμα 2.10).

$$M_x = M_0 \sin \beta \cos(\omega t) \quad (2.6.2)$$

$$M_y = -M_0 \sin \beta \sin(\omega t) \quad (2.6.3)$$



Σχήμα 2.10: Κυματομορφές των συνιστωσών x και y της μαγνήτισης κατά τη διάρκεια του χρόνου. Πηγή: [8]

Για την εύρεση των μαθηματικών σχέσεων που εκφράζουν το σήμα FID, επιλέγεται αυθαίρετα η μαγνήτιση να ξεκινά από τον άξονα x και η γωνία νεύσης β να είναι ίση με 90° . Οι συνιστώσες της μαγνήτισης εκφράζονται, τότε, με τις σχέσεις (2.6.4), (2.6.5).

$$M_x = M_0 \cos \omega t \quad (2.6.4)$$

$$M_y = M_0 \sin \omega t \quad (2.6.5)$$

Το σήμα που ανιχνεύεται είναι ανάλογο με τις συνιστώσες της μαγνήτισης και δίνεται στο πεδίο του χρόνου από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$S_x(t) = S_0 \cos \Omega t \quad (2.6.6)$$

$$S_y(t) = S_0 \sin \Omega t \quad (2.6.7)$$

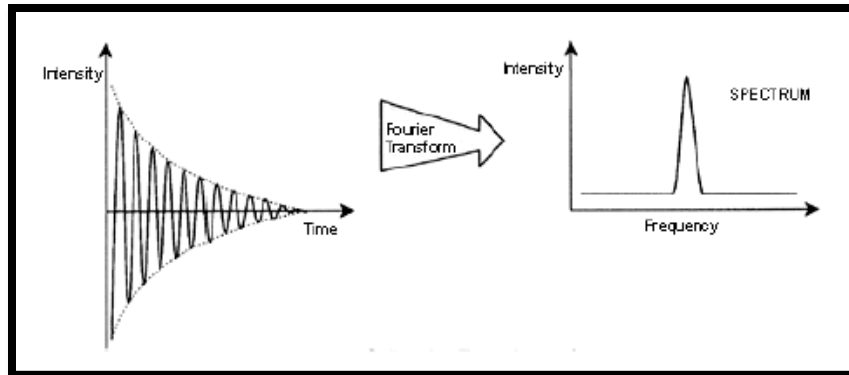
Σημειώνεται πως οι συνιστώσες $S_x(t)$ και $S_y(t)$ αποτελούν το πραγματικό και φανταστικό μέρος, αντίστοιχα, του σήματος που ανιχνεύεται στο πεδίο του χρόνου, με το σήμα να δίνεται από την εξίσωση (2.6.8):

$$S(t) = S_x(t) + iS_y(t) = S_0 \cos \Omega t + iS_0 \sin \Omega t = S_0 e^{i\Omega t} \quad (2.6.8)$$

Καθώς η εγκάρσια συνιστώσα M_{xy} της μαγνήτισης φθίνει, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.5, το σήμα αναπαριστάται από την εξίσωση (2.6.9), και φθίνει ταχύτερα όσο μικρότερη είναι η εγκάρσια επαναφορά T_2 . [8]

$$S(t) = S_0 e^{i\Omega t} e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (2.6.9)$$

Το σήμα $S(t)$ μετατρέπεται μέσω του μετασχηματισμού Fourier στο πεδίο της συχνότητας και λαμβάνεται το φάσμα NMR $s(\omega)$ το οποίο παρέχει πληροφορίες για το δείγμα υπό μελέτη (Σχήμα 2.11).



Σχήμα 2.11: Μετασχηματισμός Fourier του σήματος FID που βρίσκεται στο πεδίο του χρόνου στο φάσμα NMR που βρίσκεται στο πεδίο της συχνότητας. Πηγή: [17]

2.6.1 Παράμετροι φάσματος NMR

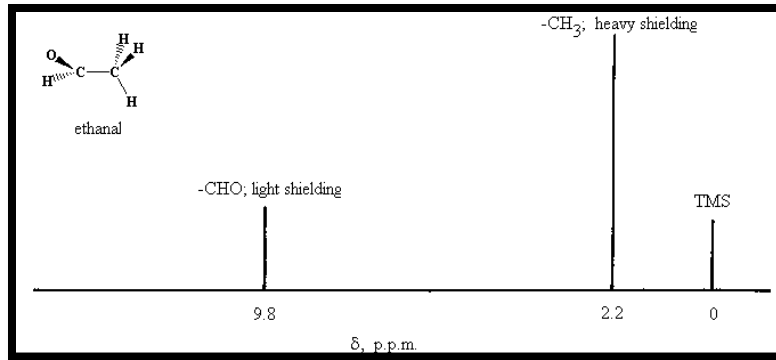
2.6.1.1 Χημική μετατόπιση δ

Με τον όρο *χημική μετατόπιση* δ εκφράζεται η μετατόπιση στη συχνότητα NMR λόγω της ηλεκτρονιακής σύζευξης του μοριακού τροχιακού με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, η οποία εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον των πρωτονίων. Πρωτόνια που βρίσκονται σε διαφορετικό χημικό περιβάλλον θα παρουσιάζουν και διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις. Η κλίμακα του φάσματος NMR δείχνει τις διάφορες χημικές μετατοπίσεις του παρατηρούμενου πυρήνα. Η χημική μετατόπιση ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας σε Hz του συγκεκριμένου πρωτονίου (ω) προς τη συχνότητα σε Hz του φασματογράφου NMR που χρησιμοποιείται πολλαπλασιαζόμενο επί 10^6 :

$$\delta = \frac{\nu_0 - \nu_R}{\nu_R} \cdot 10^6 \quad (2.6.10)$$

όπου ν_0 η συχνότητα του δείγματος και $\nu_R = \nu_{TMS}$ η συχνότητα αναφοράς.[3][5][8][10]

Η χημική μετατόπιση δ είναι αδιάστατο μέγεθος και ανεξάρτητο του οργάνου που χρησιμοποιείται. Εκφράζεται σε μονάδες ppm (parts per million) σε σχέση με τη θέση που συνήθως εμφανίζεται η κορυφή απορρόφησης των πρωτονίων του *τετραμεθυλοσιλανίου* (TMS), στην οποία αυθαίρετα προσδίδεται η τιμή $\delta=0$ ppm (Σχήμα 2.12).[5][8][10]

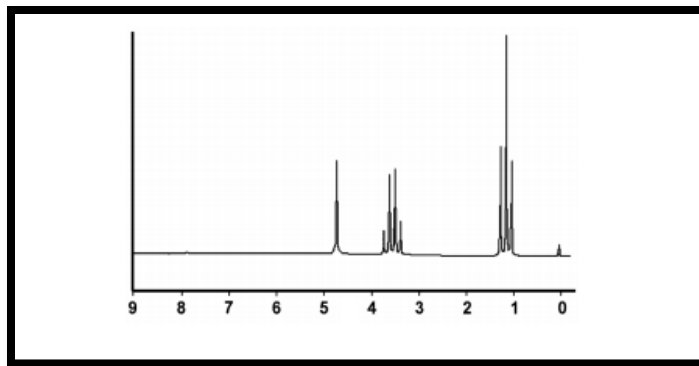


Σχήμα 2.12: Χημικές μετατοπίσεις των ομάδων που συνιστούν τη χημική ένωση της ακεταλδεΐδης σε σχέση με το σημείο αναφοράς TMS. Το -CHO αποτελεί την αλδεΐδομάδα και το -CH₃ τη μεθυλομάδα. Όσο λιγότερο θωρακισμένος είναι ο πυρήνας τόσο πιο αριστερά παρατηρείται η απορρόφηση στην κλίμακα. Πηγή: [18]

2.6.1.2 Σταθερά σύζευξης

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.3, τα πρωτόνια των πυρήνων διαθέτουν πυρηνικό spin και όταν τοποθετούνται σε ένα μαγνητικό πεδίο, περίπου τα μισά από αυτά προσανατολίζονται παράλληλα με αυτό και τα υπόλοιπα μισά αντιπαράλληλα. Η μετάβαση μεταξύ αυτών των δύο καταστάσεων είναι το κύριο αντικείμενο μελέτης του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.[5][19]

Στην απλούστερη περίπτωση, παρατηρείται μία απλή κορυφή για κάθε τύπο πρωτονίου σε ένα μόριο. Παρόλα αυτά, αν ένα πρωτόνιο, έστω H_A, βρίσκεται κοντά σε ένα άλλο πρωτόνιο, έστω H_B, τότε στα μισά μόρια του δείγματος υπό μελέτη το πρωτόνιο H_A θα είναι γειτονικό σε ένα πρωτόνιο H_B ευθυγραμμισμένο με το πεδίο και στα υπόλοιπα μισά θα είναι γειτονικό σε ένα πρωτόνιο H_B αντιπαράλληλο με το πεδίο. Επομένως, το πρώτο μισό των πρωτονίων H_A θα επηρεαστεί από ένα ελαφρώς μεγαλύτερο μαγνητικό πεδίο από εκείνο που θα τα επηρέαζε σε περίπτωση απουσίας του πρωτονίου H_B, και το δεύτερο μισό θα «αντιληφθεί» ένα ελαφρώς μικρότερο μαγνητικό πεδίο. Παρατηρούνται, λοιπόν, δύο απορροφήσεις για το πρωτόνιο H_A. Αντίστοιχα, παρατηρούνται δύο απορροφήσεις και για το H_B. Ο διαχωρισμός της απορρόφησης του H_A σε δύο κορυφές ονομάζεται **σύζευξη των spin**. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της σύζευξης των spin είναι το φάσμα NMR της αιθανόλης CH₃CH₂OH στο οποίο παρατηρούνται τρεις απορροφήσεις, που αποδίδονται στα τρία είδη πρωτονίων του μορίου (CH₃, CH₂, OH), από τις οποίες οι δύο εμφανίζονται υπό μορφή πολλαπλών κορυφών (Σχήμα 2.13).[5][19]



Σχήμα 2.13: ^1H NMR φάσμα της αιθανόλης. Πηγή: [5]

Η πολλαπλότητα των δύο απορροφήσεων είναι αποτέλεσμα της σύζευξης των spin των γειτονικών πρωτονίων και χαρακτηρίζεται από τη **σταθερά σύζευξης J (J -coupling)**. Ως σταθερά σύζευξης J ορίζεται η απόσταση μεταξύ των υποκορυφών που συνιστούν μία πολλαπλή κορυφή. Η σταθερά σύζευξης εξαρτάται από τη στερεοχημεία του μορίου και μετριέται σε μονάδες συχνότητας Hz. Η υποδιαίρεση μίας πολλαπλής απορρόφησης δίνει επιπλέον πληροφορίες για τη δομή του οργανικού μορίου. Από την πολλαπλότητα μίας απορρόφησης πρωτονίου ή ομάδας πρωτονίων, μπορεί να διαπιστωθεί το πλήθος των υδρογόνων που συνδέονται στο γειτονικό ή στα γειτονικά άτομα άνθρακα. [5][19]

Τα παραπάνω γίνονται περισσότερο κατανοητά με το ακόλουθο παράδειγμα. Έστω η ένωση $\text{X}_2\text{CH}_\beta\text{ΨC}(\text{H}_\alpha)_2\text{Ψ}$, όπου το πρωτόνιο H_β γειτνιάζει με δύο πρωτόνια H_α . Το πρωτόνιο H_β και στις δύο περιπτώσεις βρίσκεται σε διαφορετικό χημικό και μαγνητικό περιβάλλον από τα δύο H_α πρωτόνια. Τα δύο H_α υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου B_0 είναι δυνατόν να πάρουν τους εξής προσανατολισμούς:

- i. και τα δύο H_α παράλληλα προς την ένταση B_0 ,
- ii. το ένα παράλληλο H_α προς την ένταση B_0 και το δεύτερο H_α αντιπαράλληλο,
- iii. το ένα H_α αντιπαράλληλο και το άλλο παράλληλο προς το H_α ,
- iv. και τα δύο H_α αντιπαράλληλα προς την ένταση B_0 .

Από τους 4 πιθανούς προσανατολισμούς, οι μεσαίοι (ii) και (iii) είναι ισοδύναμοι. Επομένως, υπάρχουν τρεις πιθανοί προσανατολισμοί για το πρωτόνιο H_β και θα εμφανισθεί ως *τριπλή* κορυφή. Η ένταση της μεσαίας κορυφής της τριπλής, είναι διπλάσια γιατί προκύπτει από τη συγχώνευση των δύο μεσαίων ισοδυνάμων προσανατολισμών. Για τον ίδιο λόγο, τα δύο πρωτόνια H_α θα εμφανισθούν με τη μορφή μίας διπλής κορυφής, γιατί μόνο δύο είναι οι πιθανοί προσανατολισμοί του πρωτονίου H_β σε σχέση με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 . [5]

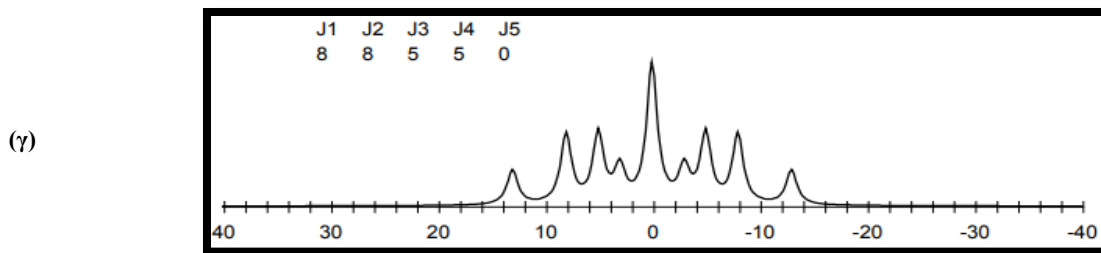
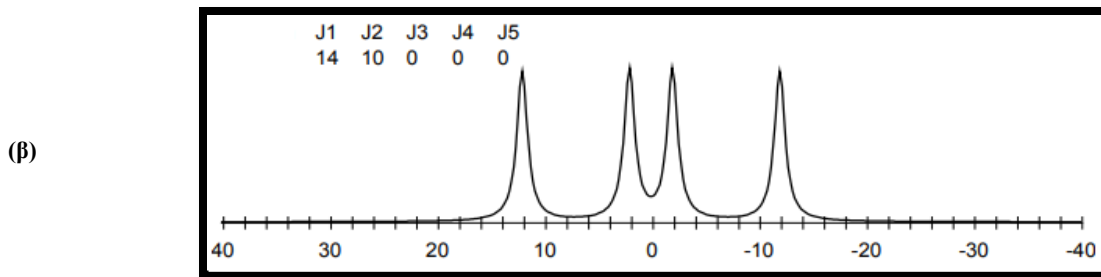
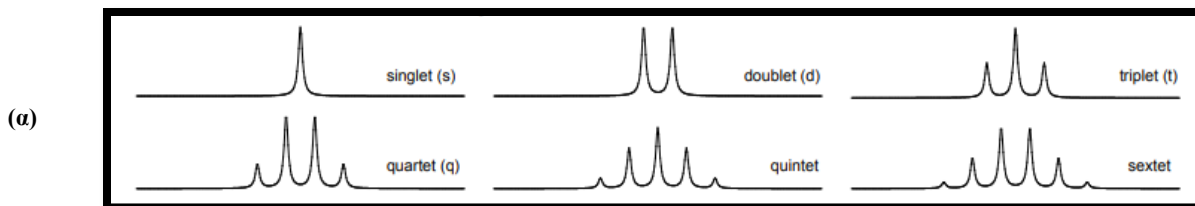
Ανάλογα με τον τρόπο που τα πρωτόνια είναι συζευγμένα μεταξύ τους, η πολλαπλότητα των κορυφών τους χωρίζεται σε τέσσερις τάξεις:

- Πολλαπλές κορυφές πρώτης τάξης (A order multiplets). Αν ένα πρωτόνιο είναι συζευγμένο με ένα σύνολο n πρωτονίων με τιμή σταθεράς σύζευξης J , τότε η κορυφή του διαχωρίζεται σε $n+1$ υποκορυφές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα ύψη των κορυφών ακολουθούν τη δομή του τριγώνου Pascal (Σχήματα 2.14, 2.15(a)). [20][21]

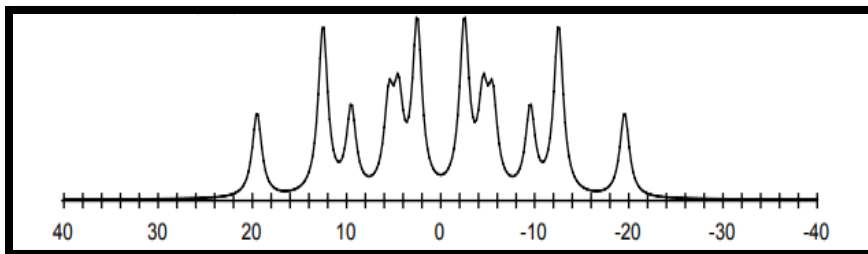
- Πολλαπλές κορυφές δεύτερης τάξης (B order multiplets). Αν ένα πρωτόνιο είναι συζευγμένο με ένα σύνολο n πρωτονίων με τιμή σταθεράς σύζευξης J_1 και με ένα σύνολο μ πρωτονίων με τιμή σταθεράς σύζευξης J_2 διαφορετική από την J_1 , τότε η κορυφή του διαχωρίζεται σε $(n+1)(\mu+1)$ υποκορυφές (Σχήματα 2.15 (β),(γ)).[20][21]
- Πολλαπλές κορυφές τρίτης τάξης (C order multiplets). Ένα πρωτόνιο είναι συζευγμένο με τέσσερα πρωτόνια, δύο από τα οποία έχουν την ίδια τιμή σταθεράς σύζευξης J_1 και τα άλλα δύο έχουν διαφορετικές τιμές σταθεράς σύζευξης J_2 και J_3 (Σχήμα (2.15 (δ)).[20][21]
- Πολλαπλές κορυφές τέταρτης τάξης (multiplets D τάξης). Ένα πρωτόνιο είναι συζευγμένο με τέσσερα πρωτόνια τα οποία έχουν διαφορετικές τιμές σταθεράς σύζευξης μεταξύ τους J_1, J_2, J_3, J_4 . (Σχήμα 2.15 (ε) [20][21]

$n=0$							1						
$n=1$							1	1					
$n=2$							1	2	1				
$n=3$							1	3	3	1			
$n=4$							1	4	6	4	1		
$n=5$							1	5	10	10	5	1	
$n=6$							1	6	15	20	15	6	1

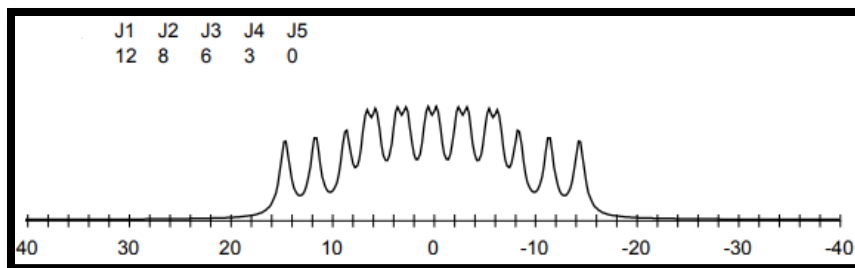
Σχήμα 2.14: Τρίγωνο Pascal. Πηγή: [20]



(δ)



(ε)

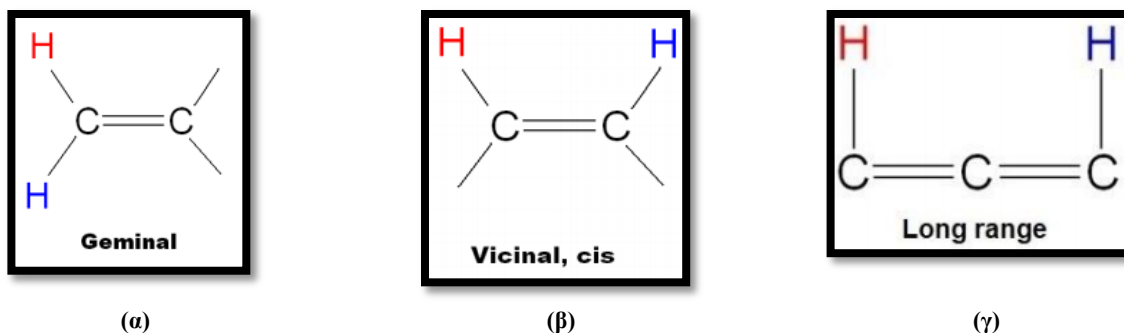


(ε)

Σχήμα 2.15: (α) Multiplets A τάξης. (β): Doublet of Doublets (dd) Σύζευξη με δύο πρωτόνια με τιμές σταθεράς σύζευξης $J_1 = 14$ και $J_2 = 10$ αντίστοιχα. (γ) Triplet of Triplets (tt): Σύζευξη με τέσσερα πρωτόνια, δύο με τιμή σταθεράς σύζευξης $J_1 = J_2 = 8$ και δύο με τιμή σταθεράς σύζευξης $J_3 = J_4 = 5$. (δ) Doublet of Doublets of Triplets (ddt): Σύζευξη με τέσσερα πρωτόνια, δύο με τιμή σταθεράς σύζευξης $J_1 = 15$, ένα με $J_2 = 10$ και ένα με $J_3 = 7$. (ε) Doublet of Doublets of Doublets of Doublets (dddd): Σύζευξη με τέσσερα πρωτόνια με τιμές σταθεράς σύζευξης $J_1 = 12, J_2 = 8, J_3 = 6, J_4 = 3$. Πηγή: [21]

Το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης είναι ανεξάρτητο από την ένταση του μαγνητικού πεδίου, αλλά εξαρτάται από τον αριθμό των δεσμών που μεσολαβούν μεταξύ δύο πρωτονίων, την ηλεκτραρνητικότητα των γειτονικών ομάδων και τη διαμόρφωση του μορίου. Με βάση τις παραπάνω παραμέτρους, λοιπόν, προκύπτουν οι ακόλουθες περιπτώσεις σύζευξης:

- *Δίδυμη σύζευξη (germinal)*. Είναι εκείνη στην οποία τα δύο πρωτόνια βρίσκονται στο ίδιο άτομο άνθρακα ($H_{\alpha'}-C-H_{\alpha}$) και απέχουν μόνο κατά δύο δεσμούς. Επομένως, συμβολίζεται ως 2J . Το μέγεθος της δίδυμης σύζευξης εξαρτάται από την τιμή της γωνίας H-C-H. Για γωνίες μεταξύ 105° και 125° η τιμή της σταθεράς κυμαίνεται μεταξύ 0-20 Hz. (Σχήμα 2.16(α)) [5][19][20]
- *Γειτονική σύζευξη (vicinal)*. Είναι εκείνη στην οποία τα δύο πρωτόνια βρίσκονται σε δύο γειτονικά άτομα άνθρακα και απέχουν κατά 3 δεσμούς. Επομένως, συμβολίζεται ως 3J . Μεγάλες τιμές της σταθεράς αντιστοιχούν σε τιμές της γωνίας κοντά στις 0° και 180° , ενώ μικρότερες τιμές σταθεράς αντιστοιχούν σε τιμές της γωνίας κοντά στις 90° . (Σχήμα 2.16(β)) [5][19][20]
- *Σύζευξη μεγάλης εμβέλειας (long range coupling)*. Οφείλεται στην αλληλεπίδραση πρωτονίων διαμέσου τεσσάρων ή πέντε δεσμών και βρίσκεται στην κλίμακα 0.1-3 Hz. (Σχήμα 2.16(γ)) [5][19][20]



Σχήμα 2.16: (α) Σχηματική αναπαράσταση της δίδυμης σύζευξης. (β) Σχηματική αναπαράσταση της γειτονικής σύζευξης. (γ) Σχηματική αναπαράσταση της σύζευξης μεγάλης εμβέλειας. Πηγή: [22]

2.7 Πυρηνικό Φαινόμενο Overhauser (NOE)

Σε ένα σύστημα πυρήνων A και X, η αλλαγή στην ένταση μίας NMR απορρόφησης του πυρήνα A επέρχεται όταν διαταράσσονται οι πληθυσμοί των ενεργειακών καταστάσεων spin του πυρήνα X. Αυτή η διαταραχή είναι δυνατόν να γίνει με το λεγόμενο *κορεσμό* (saturation) της αντίστοιχης απορρόφησης, δηλαδή την ακτινοβολήσή της, ώστε να μην υπάρχει περίσσεια πυρήνων στη βασική κατάσταση και κατά συνέπεια, να υπάρχουν οι ίδιοι πληθυσμοί στη βασική και διεγερμένη κατάσταση. Σε αυτήν την περίπτωση η προσπάθεια του συστήματος των πυρήνων A και X να επανέλθει σε μία κατάσταση θερμικής ισορροπίας αποτελεί το **πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (Nuclear Overhauser Effect, NOE)**. Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser έχει μεγάλη σημασία για τη μελέτη της διαμόρφωσης και της στεreoχημείας των οργανικών μορίων. Ένα από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου φαινομένου είναι και η μεταβολή στην ένταση απορρόφησης ενός πρωτονίου, όταν γειτονικό ή πλησίον ευρισκόμενο πρωτόνιο ακτινοβολείται.[5][23]

Συγκεκριμένα, το φαινόμενο Overhauser είναι η προσπάθεια του συστήματος των πυρήνων A και X να αντισταθμίσει μία τεχνητή μεταβολή που προκλήθηκε σε αυτό από την ακτινοβολή ενός μέρους του. Μία μεταβολή πληθυσμού ενός άλλου μέρους του συστήματος επέρχεται έτσι ώστε τελικά να επικρατήσει πάλι θερμική ισορροπία στο σύστημα. Μία έκφραση του φαινομένου δίνεται από τη σχέση (2.7.1):

$$NOE(n_{A(X)}) = \frac{I - I_0}{I_0} \quad (2.7.1)$$

όπου $n_{A(X)}$ είναι το NOE στην απορρόφηση των πυρήνων A όταν η απορρόφηση των πυρήνων X ακτινοβολείται, I_0 είναι η ένταση του σήματος των πυρήνων A σε κατάσταση θερμικής ισορροπίας, δηλαδή πριν την ακτινοβολή των πυρήνων X, I είναι η ένταση του σήματος των πυρήνων A σε κατάσταση θερμικής ισορροπίας του συστήματος μετά την ακτινοβολή των πυρήνων X.[5][23]

Από τον παραπάνω ορισμό, είναι φανερό πως το αποτέλεσμα του NOE θα έχει θετική τιμή αν η νέα ένταση I των πυρήνων A είναι μεγαλύτερη της έντασης I_0 και θα έχει αρνητική τιμή αν η ένταση I είναι μικρότερη της έντασης I_0 . [5][23]

Το φαινόμενο NOE μπορεί να εκφραστεί και μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$NOE(n_{A(X)}) = \frac{1}{r^6} \cdot f(\tau_c) \quad (2.7.2)$$

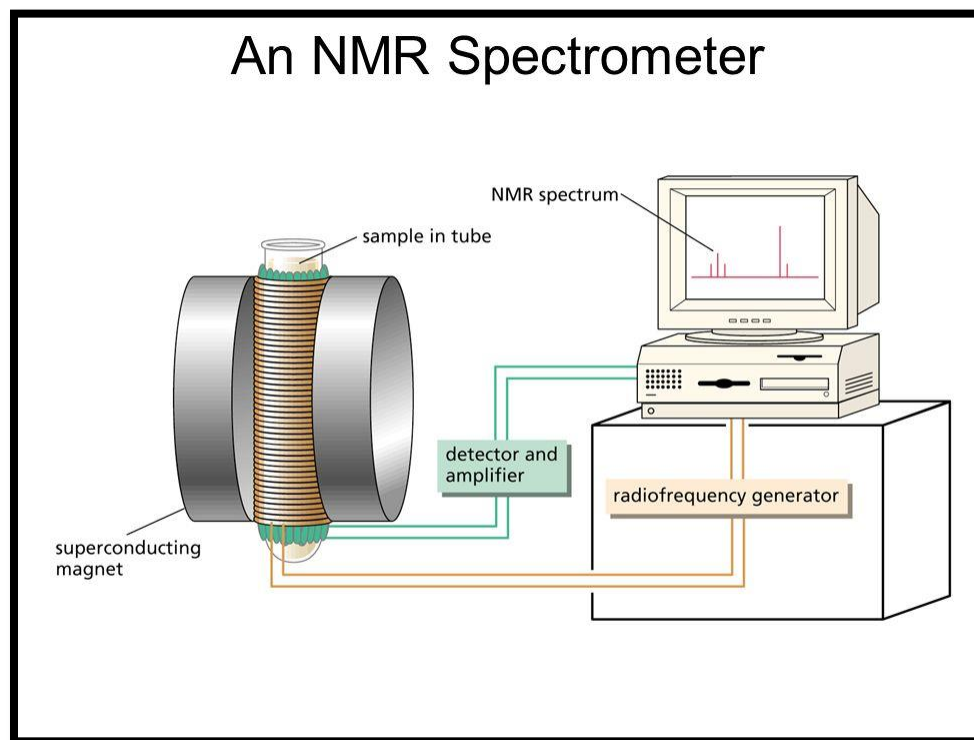
όπου r η απόσταση μεταξύ των πυρήνων A και X, τ_c ο χρόνος συσχετισμού περιστροφής του μορίου (correlation time).[5][23]

Ο χρόνος τ_c που απαιτείται για την περιστροφή του μορίου κατά μία μονάδα ακτίνας (1 rad) εξαρτάται από το ιξώδες του διαλύτη και την ακτίνα του μορίου, αν θεωρηθεί σφαιρικό. Από τη σχέση (2.7.2) φαίνεται πως για σταθερό τ_c το NOE αποτέλεσμα μεταξύ δύο πυρήνων A και X είναι αντιστρόφως ανάλογο της έκτης δύναμης της απόστασης μεταξύ τους r . Προκειμένου να υπάρχει μεταβίβαση ενέργειας και εκδήλωση του φαινομένου NOE μεταξύ δύο πυρήνων A και X, η απόσταση r δεν πρέπει να ξεπερνά τα 5.5 Å. Η σχέση (2.7.2), που ισχύει όταν η αποδιέγερση και η αποκατάσταση γίνονται μέσω του μηχανισμού διπόλου-διπόλου, επιτρέπει να υπολογιστεί η απόσταση r μεταξύ δύο μορίων υδρογόνου από το NOE αποτέλεσμα ή από το χρόνο εφησυχασμού T_1 , ο οποίος μπορεί να υπολογιστεί στη διάρκεια ενός πειράματος NOE κι, επομένως, καθιστά το φαινόμενο Overhauser ένα σπουδαίο εργαλείο, προκειμένου να προσδιοριστούν οι ενδομοριακές αποστάσεις μεταξύ διαφόρων ατόμων του μορίου και να μελετηθεί η στερεοχημεία του.[5][23]

3. Φασματογράφος NMR

Ο σύγχρονος φασματογράφος NMR είναι ένα αρκετά σύνθετο σύστημα και αποτελείται από τα εξής βασικά τμήματα, καθένα από τα οποία επιτελεί ένα συγκεκριμένο στάδιο της διεξαγωγής ενός πειράματος NMR (Σχήμα 3.1):

- Έναν ισχυρό, υπεραγώγιμο μαγνήτη ο οποίος είναι ικανός να δημιουργήσει ένα σταθερό μαγνητικό πεδίο υψηλής έντασης.
- Ένα probe που βοηθά στην τοποθέτηση του - απαραίτητου για την ανίχνευση του σήματος NMR - πηνίου κοντά στο δείγμα.
- Έναν πομπό ραδιοσυχνοτήτων που παράγει τους κατάλληλους παλμούς RF για τη μετάπτωση του διανύσματος της μαγνήτισης.
- Έναν δέκτη ο οποίος ενισχύει τα σήματα NMR που λαμβάνονται.
- Έναν μετατροπέα ADC ο οποίος μετατρέπει τα σήματα NMR σε ψηφιακή μορφή ώστε να μπορούν να αποθηκευτούν σε υπολογιστή.
- Έναν προγραμματιστή παλμών (pulse programmer) ώστε να παράγονται με ακρίβεια οι χρόνοι, οι παλμοί και οι καθυστερήσεις.
- Έναν υπολογιστή που ελέγχει την παραπάνω διαδικασία και επεξεργάζεται τα δεδομένα.



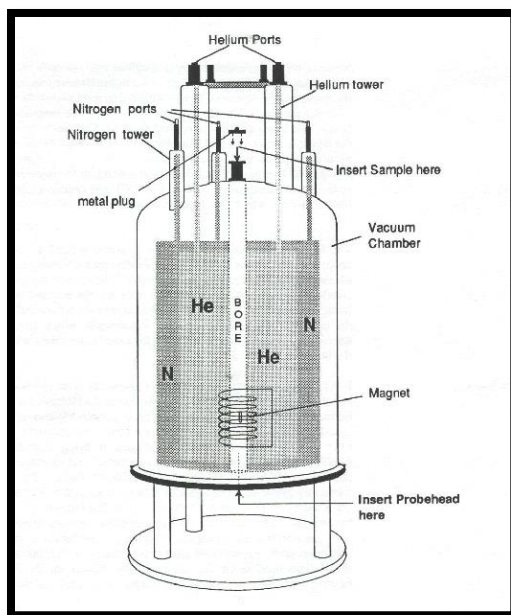
Σχήμα 3.1: Αναπαράσταση φασματογράφου NMR. Πηγή: [24]

3.1 Μαγνήτης

Το σημαντικότερο τμήμα ενός φασματογράφου NMR είναι ένας ισχυρός *υπεραγώγιμος* μαγνήτης ο οποίος παράγει το ομοιογενές, σταθερό και υψηλής έντασης μαγνητικό πεδίο B_0 . Το

πεδίο παράγεται όταν το πηνίο του μαγνήτη διαρρέεται από ρεύμα.. Το πηνίο είναι κατασκευασμένο από υπεραγώγιμο σύρμα το οποίο βρίσκεται βυθισμένο σε υγρό ήλιο θερμοκρασίας 4.2 K, με αποτέλεσμα η ηλεκτρική του αντίσταση να είναι μηδενική. Ο κρυοστάτης υγρού ηλίου περιβάλλεται από φιάλες υγρού αζώτου σε θερμοκρασία 77 K και από στρώματα κενού με σκοπό τη μείωση της ροής της θερμότητας από τον περιβάλλοντα χώρο προς το εσωτερικό. Τόσο το υγρό ήλιο όσο και το υγρό άζωτο αποτελούν «θερμικές ασπίδες» για το πηνίο του μαγνήτη. Με δεδομένο ότι το εκάστοτε δείγμα που μελετάται πρέπει να βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, ο μαγνήτης διαπερνάται από έναν κάθετο σωλήνα που ονομάζεται bore tube, στο εσωτερικό του οποίου τοποθετείται το δείγμα (Σχήματα 3.2, 3.3).[8][25][26][27]

Δεδομένου ότι κανένας υπεραγώγιμος μαγνήτης δεν μπορεί να παράγει ένα απόλυτα ομοιογενές πεδίο, είναι απαραίτητη η ύπαρξη *αντισταθμιστικών πηνίων (shim coils)*, καθένα από τα οποία παράγει ένα πολύ μικρό μαγνητικό πεδίο με σκοπό τη διόρθωση των υπολειπόμενων ανομοιογενειών του μαγνητικού πεδίου που παράγεται από το κύριο πηνίο. Υπάρχουν δύο κατηγορίες αντισταθμιστικών πηνίων που τοποθετούνται στο εσωτερικό του μαγνήτη, τα cryo-coils τα οποία τοποθετούνται στο εσωτερικό του κρυοστάτη υγρού ηλίου και ρυθμίζονται από τους μηχανικούς κατά τη διάρκεια της εγκατάστασης του φασματογράφου και τα πηνία σε θερμοκρασία δωματίου (room-temperature shim coils) τα οποία τοποθετούνται στην επιφάνεια του bore tube και ρυθμίζονται από τον χρήστη κάθε φορά που τοποθετείται καινούριο δείγμα στο μαγνήτη ή παρατηρείται αλλαγή της θερμοκρασίας.[8][27]



Σχήμα 3.2: Σχεδιάγραμμα υπεραγώγιμου μαγνήτη που χρησιμοποιείται σε πείραμα NMR. Πηγή: [24]

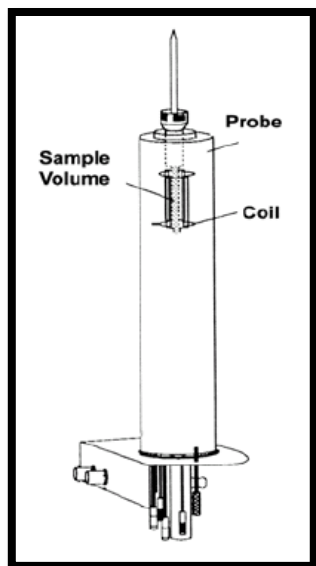


Σχήμα 3.3: Υπεραγωγίμος μαγνήτης NMR 18.8 T για διεξαγωγή πειραμάτων ^1H σε συχνότητα 800 MHz ο οποίος βρίσκεται στο πανεπιστήμιο Imperial στο Λονδίνο. Πηγή: [26]

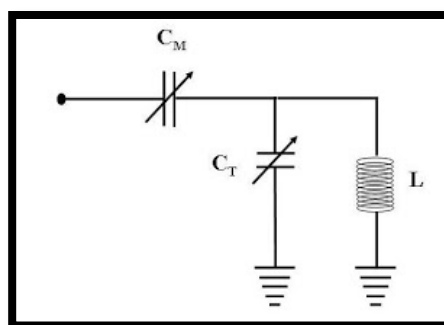
3.2 Probe

Το probe ή αισθητήρας είναι ένας κυλινδρικός μεταλλικός σωλήνας ο οποίος εισέρχεται στο κάτω μέρος του bore tube του μαγνήτη και περιλαμβάνει το πηνίο που χρησιμοποιείται για τη μετάπτωση του διανύσματος της μαγνήτισης μέσω του πεδίου RF (παράγραφος 2.4) και την ανίχνευση του σήματος NMR (παράγραφος 2.6). Το πηνίο πρέπει να βρίσκεται όσο πιο κοντά γίνεται στο δείγμα το οποίο εισέρχεται από την κορυφή του bore tube, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ευαισθησίας του σήματος που λαμβάνεται και τη μείωση των απωλειών του. Ουσιαστικά, το πηνίο πρέπει να «τυλίγει» το σωλήνα του δείγματος (Σχήμα 3.4(α)).[8][26][27]

Η συνδεσμολογία του probe παριστάνεται στο σχήμα 3.5 και αποτελείται από το βασικό κομμάτι του κυκλώματος, το πηνίο, και δύο πυκνωτές. Ο πυκνωτής C_T αποτελεί τον *πυκνωτή συντονισμού* (*tuning capacitor*) και χρησιμοποιείται για το συντονισμό του κυκλώματος στην κατάλληλη συχνότητα. Η αυτεπαγωγή του πηνίου και η χωρητικότητα του πυκνωτή C_T ρυθμίζονται ώστε το κύκλωμα να συντονίζεται πάντα με τη συχνότητα Larmor. Ο πυκνωτής C_M (*matching capacitor*) χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση της ισχύος που μεταφέρεται μεταξύ του probe, του πομπού ραδιοσυχνοτήτων και του δέκτη (Σχήμα 3.4(β)). Το probe είναι ικανό να υπολογίζει φάσματα NMR σε ένα εύρος θερμοκρασιών, τυπικά μεταξύ 125 K και 475 K.[8][26][27][28]



(α)



(β)

Σχήμα 3.4(α): Σχεδιάγραμμα του probe. (β): Συνδεσμολογία probe. Πηγές: [28][29]

3.2.1 Γενικές κατηγορίες probe

3.2.1.1 Υγρά Probes

Περίπου το 80% των πειραμάτων NMR διεξάγονται με τη χρήση υψηλής ανάλυσης υγρών probes (liquid probes) τα οποία είναι ειδικά σχεδιασμένα για δείγματα που τοποθετούνται μέσα σε αξονικά ευθυγραμμισμένους γυάλινους σωλήνες στο εσωτερικό υπεραγωγίων μαγνητών που χρησιμοποιούν σαμαροειδή πηνία για τη λήψη του σήματος (Σχήμα 3.5 (α)). Η χρήση της συγκεκριμένης κατηγορίας probe επιτυγχάνει φασματική ανάλυση σε επίπεδο μερών ανά δισεκατομμύριο (parts per billion ή ppb), συνήθως σε αργά περιστρεφόμενα δείγματα. Ένα μικρό ποσοστό της χρήσης τους γίνεται σε *in vivo* πειράματα σε μικρά ζωντανά ζώα, καθώς και σε *ex vivo* ή *in vitro* πειράματα σε ιστούς που έχουν αφαιρεθεί χειρουργικά και έχουν διατηρηθεί ζωντανοί για μικρά χρονικά διαστήματα μέσω έγχυσης με θρεπτικά συστατικά σε αλατούχα διαλύματα.[30][31][32]

Τα περισσότερα probes της συγκεκριμένης κατηγορίας διατίθενται εμπορικά για πειράματα από -180°C μέχρι 500°C και είναι εφοδιασμένα με ένα πηνίο μεταβλητού σπειρώματος ανάλογα με το μαγνητικό πεδίο B_0 , το οποίο αξιοποιείται για τη μέτρηση των συντελεστών διάχυσης ή την καταστολή του διαλύτη. Η χρήση τους έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια, κυρίως γιατί προσφέρουν σημαντική εξοικονόμηση χρόνου όσον αφορά τα δισδιάστατα πειράματα NMR. Συνήθως, αυτό το πηνίο είναι ικανό να παράγει μία κλίση μόνο παράλληλα με τον άξονα z και σχετικά υψηλής μαγνήτισης. Τέτοια probes συχνά αναφέρονται ως Pulsed Field Gradient (PFG) probes.[33]

3.2.1.2 Στερεά Probes

Τα στερεά probes χρησιμοποιούνται στα πειράματα NMR στερεών δειγμάτων (Σχήμα 3.5(β)). Το πρωτότυπο και πιο απλό στερεό probe ονομάζεται *wideline probe* και

χαρακτηρίζεται έτσι, καθώς έχει τη δυνατότητα να παράγει παλμούς 90° διάρκειας μικρότερης των 3 μ s. Η αποσύζευξη των πρωτονίων στα στερεά συχνά απαιτεί ραδιοσυχνότητες στο εύρος 50-150 kHz και μία μαγνήτιση υψηλότερη από ότι είναι φυσικά εφικτό στα υγρά probes. Αυτό μπορεί να προκαλέσει υπερθέρμανση του δείγματος σε μαγνήτες υψηλού πεδίου εκτός αν χρησιμοποιούνται ειδικά πηνία εξαιρετικά χαμηλού E-πεδίου (ultra-low-E-field coils).[34]



(α) (β)
Σχήμα 3.5: (α) Liquid probe. (β) Solid probe. Πηγές: [33][34]

3.3 Πομπός Ραδιοσυχνοτήτων

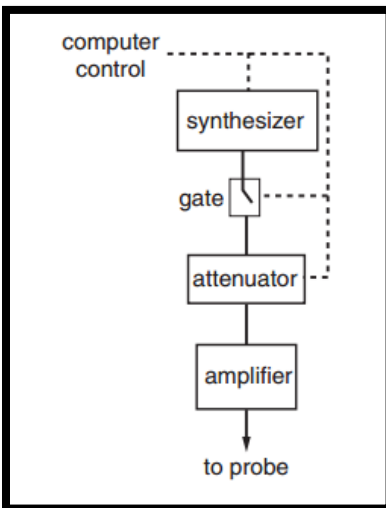
Ο πομπός ραδιοσυχνοτήτων (RF transmitter) αποτελεί το τμήμα του φασματογράφου που ευθύνεται για την παραγωγή των παλμών RF που προκαλούν τη μετάπτωση της μαγνήτισης και στη συνέχεια την ανίχνευση του εκπεμπόμενου σήματος NMR. Βασικά στοιχεία του πομπού είναι η πηγή συχνοτήτων, η πύλη, ο εξασθενητής και ο ενισχυτής (Σχήμα 3.6). Ως πηγή ραδιοσυχνοτήτων επιλέγεται ένας ψηφιακός *συνθέτης συχνοτήτων* (*frequency synthesizer*), ο οποίος παράγει κυματομορφές (ημίτονα και συνημίτονα) σε σταθερή συχνότητα δίνοντας τη δυνατότητα αλλαγής της φάσης τους (*phase shifting*). Μετατοπίζοντας τη φάση των κυματομορφών που παράγονται, για παράδειγμα κατά 90°, μπορούν να προκύψουν παλμοί εφαρμοσμένοι στον επιθυμητό άξονα κάθε φορά, χωρίς να χρειάζεται να εγκατασταθεί επιπλέον πηνίο στο κύκλωμα του probe.[8][26][27]

Δεδομένου ότι ο παλμός RF που προκύπτει πρέπει να είναι μικρής διάρκειας και μεγάλης έντασης, η έξοδος της πηγής πρέπει να είναι *φραγμένη* (*gated*). Ταυτόχρονα, είναι απαραίτητη η δυνατότητα ρύθμισης της έντασης του πεδίου B_1 στην επιθυμητή τιμή, γι' αυτό χρησιμοποιείται αρχικά ένας *εξασθενητής* (*attenuator*) ο οποίος μειώνει το σήμα RF που διέρχεται. Η εξασθένιση εκφράζεται σε decibels (dB) και δίνεται από τον τύπο:

$$attenuation = 10 \times \log_{10} \frac{P_{out}}{P_{in}} \quad (3.3.1)$$

όπου P_{in} η ισχύς εισόδου και P_{out} η ισχύς εξόδου του σήματος.[8][26][27]

Τέλος, το σήμα διέρχεται από τον ενισχυτή (*amplifier*), ο οποίος ενισχύει το αρχικό ασθενές σήμα (μερικά mW) στην τιμή των 100 W ή και περισσότερο πριν καταλήξει στο πηνίο του probe. Όλο το σύστημα του πομπού ελέγχεται μέσω υπολογιστή ώστε να ρυθμίζονται ακριβώς το μήκος και η διάρκεια των παλμών.[8][26][27]



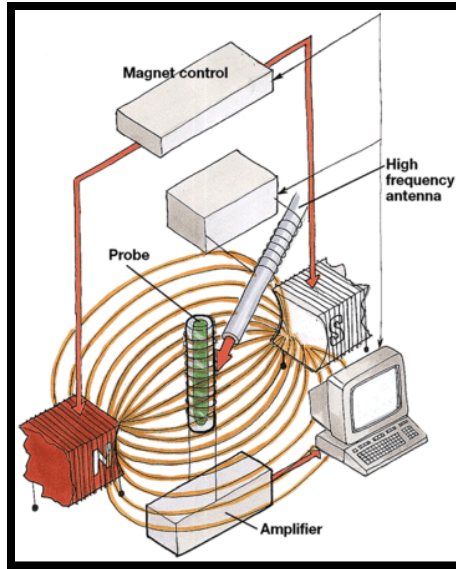
Σχήμα 3.6: Σχεδιάγραμμα πομπού ραδιοσυχνότητων. Πηγή: [8]

3.4 Δέκτης

Το σήμα NMR που προέρχεται από το probe έχει πολύ μικρή ένταση/τάση (της τάξεως των μV) με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η ενίσχυσή του σε ένα επίπεδο που να επιτρέπει την ψηφιοποίησή του. Ο δέκτης (*receiver*) είναι το τμήμα του φασματογράφου στο οποίο επιτυγχάνεται αυτή η διαδικασία με τη χρήση ενισχυτών χαμηλού θορύβου (*low-noise amplifiers*). Ο πρώτος ενισχυτής ονομάζεται *προενισχυτής (preamplifier)* και τοποθετείται όσο πιο κοντά γίνεται στο probe.[8][26]

Με δεδομένο ότι το πηνίο του probe έχει τη διπλή λειτουργία αφ' ενός της διέγερσης των πυρήνων του δείγματος, αφ' ετέρου της ανίχνευσης του σήματος NMR, τη μία στιγμή εφαρμόζεται σήμα πολύ μεγάλης ισχύος ενώ την άλλη ανιχνεύεται ένα σήμα μερικών μόλις μV . Προκειμένου, λοιπόν, το σήμα υψηλής ισχύος να μην καταλήξει στο δέκτη καταστρέφοντάς τον, χρησιμοποιείται ένας διακόπτης για το διαχωρισμό του πομπού και του δέκτη. Ο διακόπτης είναι ουσιαστικά ένας *πολυπλέκτης δύο εισόδων (diplexer)*. Όταν ο παλμός υψηλής ισχύος διέρχεται από το πηνίο, ο διακόπτης βρίσκεται στη θέση «on» με αποτέλεσμα ο δέκτης να προστατεύεται με αποσύνδεση ή γείωση και ο παλμός να διοχετεύεται στο probe. Όταν το ασθενές σήμα διέρχεται από το πηνίο, ο διακόπτης βρίσκεται στη θέση «off» με αποτέλεσμα ο δέκτης να συνδέεται με το probe και ο πομπός να αποσυνδέεται.[8][27]

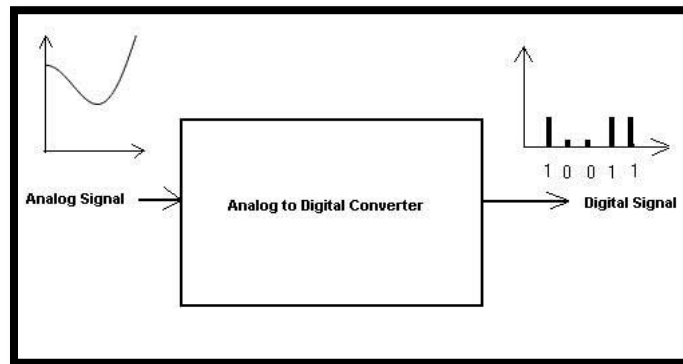
Στο Σχήμα 3.7 φαίνεται η αναπαράσταση του μαγνήτη, του probe, του ενισχυτή και του πομπού ενός φασματογράφου NMR.



Σχήμα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση του μαγνήτη, του probe, του ενισχυτή και του πομπού ενός φασματογράφου NMR. Πηγή: [35]

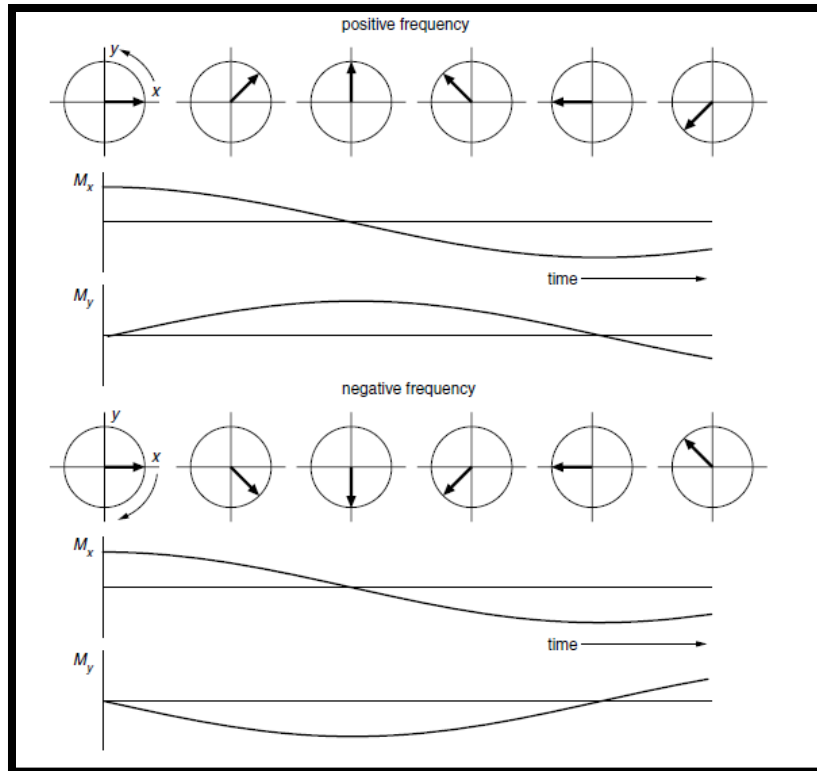
3.5 Μετατροπέας ADC (Analogue to Digital Converter)

Μετά την ενίσχυσή του, το σήμα NMR τροφοδοτείται σε ένα μετατροπέα αναλογικού σήματος σε ψηφιακό στον οποίο η αναλογική τάση του probe μετατρέπεται σε ένα ψηφιακό σήμα ώστε να μπορέσει να αποθηκευτεί στη μνήμη του υπολογιστή και στη συνέχεια να υποστεί επεξεργασία (Σχήμα 3.8). Στους σύγχρονους φασματογράφους NMR χρησιμοποιούνται μετατροπείς μεταξύ 16 και 32 bits. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των bits που χρησιμοποιείται τόσο καλύτερη είναι η ανάλυση του μετατροπέα.[8][26][27]



Σχήμα 3.8: Σχεδιάγραμμα μετατροπέα ADC. Πηγή: [36]

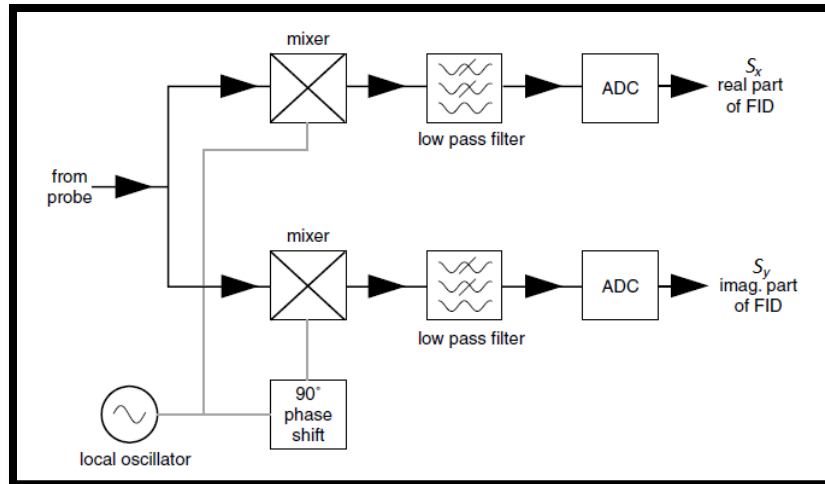
Το πηνίο του probe δεν μπορεί να διαχωρίσει τις θετικές από τις αρνητικές συχνότητες που περιέχονται σε ένα σήμα NMR. Για αυτό το λόγο ακολουθείται μία διαδικασία που ονομάζεται *ανίχνευση τετραγωνισμού* (*quadrature detection*) και βασίζεται στην ανίχνευση των συνιστωσών x και y της μαγνήτισης και κατ' επέκταση των συνιστωσών S_x και S_y του σήματος.[8][27]



Σχήμα 3.9: Απεικόνιση των x και y συνιστωσών της μαγνήτισης σε περίπτωση θετικής και αρνητικής συχνότητας αντίστοιχα. Πηγή: [8]

Το πάνω μέρος του σχήματος 3.9 δείχνει ένα διάνυσμα που περιστρέφεται με θετική συχνότητα, όπου η συνιστώσα x της μαγνήτισης είναι ένα συνημίτονο και η συνιστώσα y ένα ημίτονο. Στο κάτω μέρος φαίνεται η περιστροφή ενός διανύσματος με αρνητική συχνότητα, όπου η συνιστώσα x παραμένει η ίδια ενώ η συνιστώσα y αλλάζει πρόσημο. Επομένως, για τον διαχωρισμό των θετικών συχνοτήτων από τις αρνητικές είναι απαραίτητος ο εντοπισμός τόσο τη συνιστώσας x όσο και τη συνιστώσας y της μαγνήτισης.[8]

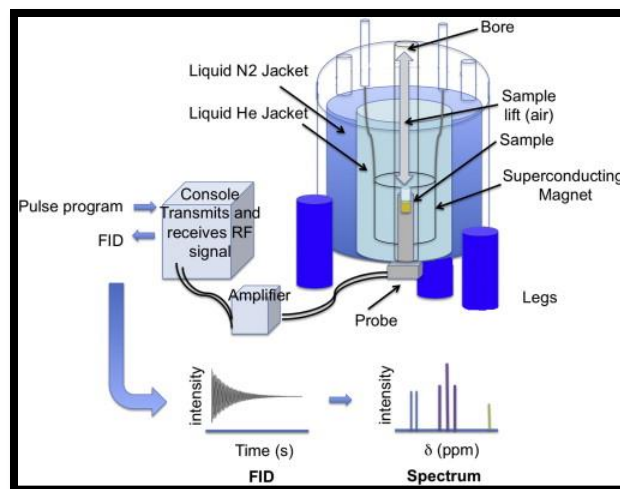
Η διάταξη που χρησιμοποιείται για τη διαδικασία της ανίχνευσης τετραγωνισμού φαίνεται στο σχήμα 3.10. Το σήμα NMR που προέρχεται από το πηνίο του probe χωρίζεται σε δύο σήματα τα οποία αναμειγνύονται στη συνέχεια με τη συχνότητα του πομπού, δηλαδή τη συχνότητα του πεδίου B_1 , και είναι μετατοπισμένα κατά 90° το ένα σε σχέση με το άλλο. Ως αποτέλεσμα, τα σήματα εξόδου που προκύπτουν είναι ισοδύναμα των x και y συνιστωσών και αποτελούν τα πραγματικά και φανταστικά μέρη του σήματος NMR στο πεδίο του χρόνου.[8][27]



Σχήμα 3.10: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης για την ανίχνευση συντονισμού. Πηγή: [8]

3.6 Προγραμματιστής Παλμών

Ο προγραμματιστής παλμών (pulse programmer) είναι το τμήμα του φασματογράφου που ελέγχει όλες τις λειτουργίες του. Είναι υπεύθυνος για την παραγωγή των παλμών με μεγάλη χρονική ακρίβεια και για τη συλλογή των δεδομένων ενώ λειτουργεί ανεξάρτητα από τον κύριο υπολογιστή (Σχήμα 3.11).[8]



Σχήμα 3.11: Σχεδιάγραμμα συνδεσμολογίας φασματογράφου NMR όπου φαίνεται και η θέση του προγραμματιστή παλμών. Πηγή: [37]

3.7 Υπολογιστής

Κάθε σύγχρονος φασματογράφος NMR αποτελείται από δύο ξεχωριστά υπολογιστικά συστήματα. Το πρώτο είναι υπεύθυνο για την απόκτηση του σήματος NMR. Το δεύτερο είναι ο κεντρικός υπολογιστής, στον οποίο μεταφέρεται το σήμα στο τέλος της διαδικασίας του πειράματος NMR και υπόκειται σε επεξεργασία από τον χειριστή. Η λειτουργία των

υπολογιστών βασίζεται σε σύγχρονα λειτουργικά συστήματα όπως τα Linux ή Windows (Σχήμα 3.12).[26]

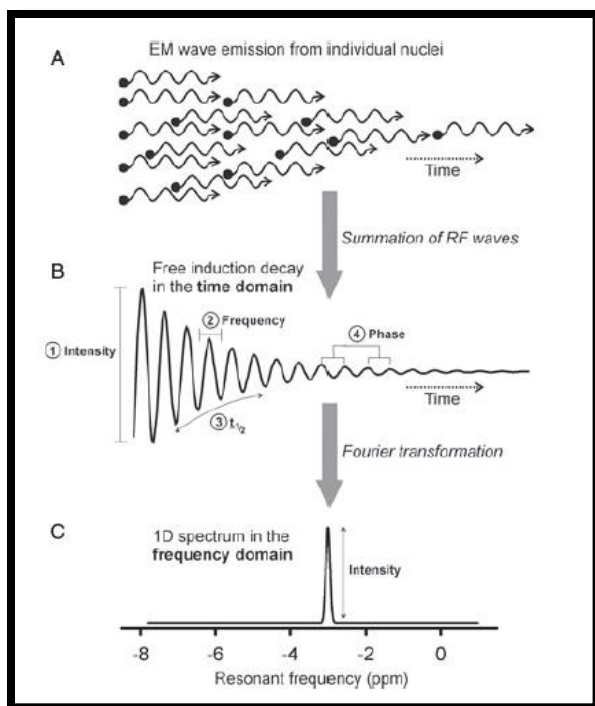


Σχήμα 3.12: Εικόνα ενός εργαστηρίου NMR όπου φαίνεται ο μαγνήτης και η κονσόλα του υπολογιστή από όπου ο χειριστής διεξάγει τα πειράματα. Πηγή: [38]

4. Διεξαγωγή Πειράματος NMR

Τα βασικά στάδια στα οποία διακρίνεται ένα πείραμα NMR είναι η προετοιμασία του δείγματος, η συλλογή και η ανάλυση δεδομένων. Οι σημαντικότερες παράμετροι που εξετάζονται κατά τη διεξαγωγή κάθε πειράματος NMR είναι η ένταση του σήματος που λαμβάνεται, η αύξηση του λόγου σήματος προς θόρυβο (signal to noise ratio-SNR), η χημική μετατόπιση δ , η φάση και η χαλάρωση.[1]

Κατά την προετοιμασία του δείγματος, ο υπό μελέτη ιστός παρασκευάζεται συνήθως ως ένα διάλυμα στο εσωτερικό του γυάλινου σωλήνα, ο οποίος τοποθετείται στο εσωτερικό του ηλεκτρομαγνήτη υψηλού πεδίου (παράγραφος 3.1). Μετά την εγκατάστασή του στο εσωτερικό του μαγνήτη, το δείγμα τοποθετείται όσο το δυνατόν πιο κοντά στο πηνίο του probe, το οποίο αποτελεί το πηνίο ανίχνευσης του σήματος NMR (παράγραφος 3.2). Κατά τη διάρκεια της λήψης των δεδομένων, το δείγμα ακτινοβολείται με ραδιοκύματα που παράγονται από τον πομπό ραδιοσυχνότητας και αποτελούν το πεδίο B_1 (παράγραφος 3.3). Με την εφαρμογή αυτών των ραδιοκυμάτων, τα οποία είναι οργανωμένα σε μία ακολουθία παλμών, οι πυρήνες του δείγματος μεταβαίνουν από τη μία ενεργειακή κατάσταση στην άλλη (παράγραφος 2.3). Στη συνέχεια, διακόπτεται η εφαρμογή του πεδίου B_1 και οι πυρήνες επανέρχονται στην κατάσταση ισορροπίας τους, εκπέμποντας ραδιοκύματα των οποίων οι παράμετροι παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για το δείγμα. Τα εκπεμπόμενα ραδιοκύματα συλλέγονται ως *Ελευθέρως Φθίνουσες Επαγωγές (FIDs)* στο πεδίο του χρόνου και μεταφέρονται στο πεδίο της συχνότητας, με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, όπου παρουσιάζονται με τη μορφή μονοδιάστατων ή διδιάστατων φασμάτων (παράγραφος 2.6) (Σχήμα 4.1).[1]



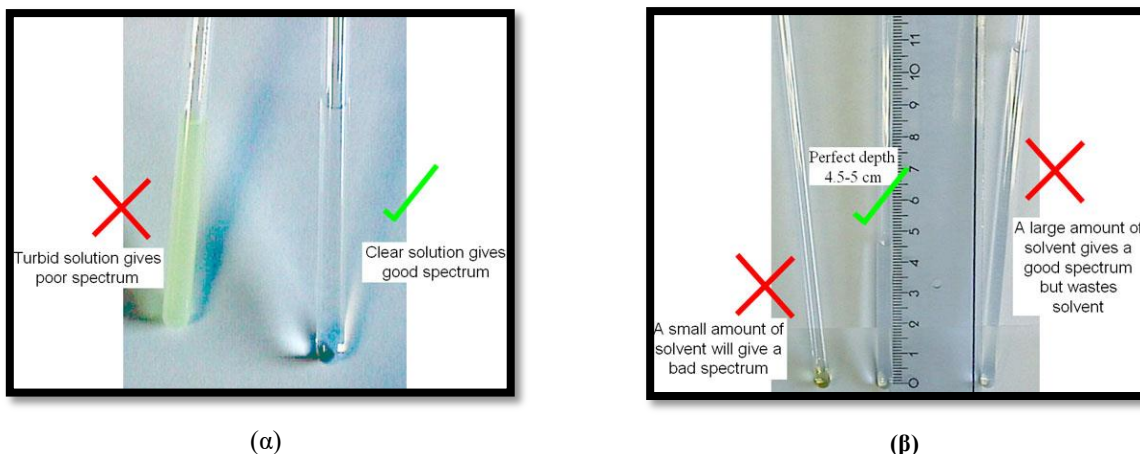
Σχήμα 4.1: Διαδικασία λήψης της Ελευθέρως Φθίνουσας Επαγωγής. (A) Οι πυρήνες (κουκίδες) που έχουν διεγερθεί σε μία υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση, επιστρέφουν στην κατάσταση ισορροπίας εκπέμποντας φωτόνια ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (κυματιστές γραμμές). (B) Η πτώση της έντασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την πάροδο του χρόνου παράγει το FID στον τομέα του χρόνου. (C) Με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier το σήμα FID μετατρέπεται στο φάσμα NMR. Πηγή: [1]

4.1 Προετοιμασία δείγματος

Τα βιολογικά δείγματα που εξετάζονται με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας NMR χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: δείγματα *in vivo*, δείγματα *ex vivo* και δείγματα *in vitro*. Τα δείγματα *in vivo* προέρχονται από το εσωτερικό ζωντανών οργανισμών, όπως για παράδειγμα το ανθρώπινο σώμα, τα δείγματα *ex vivo* από απομονωμένα παρασκευάσματα οργάνων ή δείγματα άθικτων ιστών και τα δείγματα *in vitro* από εκχυλίσματα ομοιογενών ιστών σε στερεά, υγρή ή αέρια μορφή. Όλα τα δείγματα βρίσκονται πάντα στο εσωτερικό διαλύματος με σκοπό την παραγωγή φασμάτων με την καλύτερη δυνατή ανάλυση. Τα συνηθέστερα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιούνται στα πειράματα NMR είναι ο ορός αίματος, τα ούρα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ οι πιο συνηθισμένες διαλύτες είναι το δευτεριούχο νερό (D_2O), το δευτεριούχο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$) και το δευτεριούχο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).[1]

Για τη σωστή προετοιμασία του δείγματος ακολουθούνται συγκεκριμένα βήματα που αφορούν τη ρύθμιση του pH του δείγματος, τα χαρακτηριστικά των σωλήνων που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή του πειράματος και τις αναλογίες στις οποίες πρέπει να βρίσκονται τόσο το δείγμα όσο και ο διαλύτης ώστε το διάλυμα να είναι όσο το δυνατόν πιο «καθαρό». Το pH κάθε δείγματος επηρεάζει σημαντικά τις χημικές μετατοπίσεις που παρατηρούνται σε ένα φάσμα NMR γι' αυτό και πρέπει να διατηρείται στις τιμές 7.2 ή 7.5. Οι μέθοδοι με τις οποίες ρυθμίζεται το pH κάθε δείγματος είναι η προσθήκη ενός ρυθμιστικού

διαλύματος με pH 7 ή 7.4 ή η χειροκίνητη ρύθμισή του χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και υδροχλωρικό οξύ (HCl). Η διάμετρος του σωλήνα μέσα στον οποίο τοποθετείται το δείγμα πρέπει να είναι 5 mm, ενώ το μήκος του bore tube του μαγνήτη είναι συνήθως μεταξύ 17.8 και 20.3 cm. Κάθε σωλήνας που χρησιμοποιείται πρέπει να φέρει μία ταμπέλα στην οποία αναγράφεται το όνομα του δείγματος στο εσωτερικό του. Στα πειράματα ^1H NMR η αναλογία δείγματος/διαλύτη πρέπει να είναι 2-10 mg δείγματος σε 0.6-1 mL διαλύτη. Αντίθετα, στα πειράματα ^{13}C NMR, που χαρακτηρίζονται από μικρότερη ευαισθησία, όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία δείγματος/διαλύτη τόσο καλύτερη είναι η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει. Επομένως, η ποσότητα του δείγματος πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 5 mg και η ποσότητα του διαλύτη πρέπει να είναι 0.5-0.6 mL (Σχήμα 4.2 (α)). Τέλος, το βάθος του διαλύματος στο εσωτερικό του σωλήνα πρέπει να είναι μεταξύ 4.5 και 5 cm. (Σχήμα 4.2 (β))[1][39][40]



Σχήμα 4.2: (α) Αναπαράσταση σωστής αναλογίας δείγματος/διαλύτη για την παραγωγή ενός «καθαρού» διαλύματος. (β) Αναπαράσταση σωστού βάθους του διαλύματος στο εσωτερικό του σωλήνα. Πηγή:[39]

4.2 Συλλογή και Ανάλυση Δεδομένων

Μετά την προετοιμασία τους, τα δείγματα τοποθετούνται στο εσωτερικό του ηλεκτρομαγνήτη για να ξεκινήσει η διαδικασία συλλογής δεδομένων. Όπως αναφέρθηκε στην αρχή του κεφαλαίου, μετά τη διακοπή της εφαρμογής του πεδίου B_1 , οι πυρήνες επιστρέφουν στην κατάσταση ισορροπίας τους εκπέμποντας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (παράγραφος 2.6). Οι κύριες παράμετροι της εκλυόμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εξετάζονται σε ένα πείραμα NMR αναλύονται παρακάτω.[1]

4.2.1 Μέτρηση έντασης σήματος και αύξηση SNR

Όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio, SNR) σε ένα πείραμα NMR, τόσο καλύτερο είναι το φάσμα που προκύπτει. Για την αύξηση του λόγου SNR εφαρμόζεται η μέθοδος της αύξησης της έντασης του μαγνητικού πεδίου B_0 , η ανάμειξη διάφορων σημάτων και η μείωση της θερμοκρασίας του δείγματος.[1]

Αύξηση έντασης B_0

Η ένταση ενός μαγνητικού πεδίου μετράται σε Tesla (T) και οι συνήθεις τιμές που λαμβάνει το πεδίο B_0 είναι 2-21 T. Ο πρώτος τρόπος αύξησης του λόγου SNR είναι η αύξηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου B_0 , η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πληθυσμιακής διαφοράς μεταξύ χαμηλών και υψηλών καταστάσεων spin και κατ' επέκταση την αύξηση του λόγου SNR. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν προτιμάται καθώς είναι εξαιρετικά ακριβή δεδομένου ότι οι δαπάνες του μαγνήτη αυξάνονται ραγδαία με την ένταση του πεδίου.[1]

Ανάμειξη σημάτων

Η δεύτερη πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αύξηση του λόγου SNR είναι η ανάμειξη ανεξάρτητων φασμάτων NMR. Όσο αυξάνεται το σήμα ως συνάρτηση ενός αριθμού ανεξάρτητων φασμάτων, n , ο θόρυβος αυξάνεται ως συνάρτηση του \sqrt{n} , το οποίο συνεπάγεται ότι ο ο λόγος SNR αυξάνεται ως συνάρτηση του \sqrt{n} . [1]

Μείωση θερμοκρασίας του δείγματος

Ο τρίτος τρόπος αύξησης του λόγου SNR είναι η μείωση της θερμοκρασίας του δείγματος, με μοναδικό περιορισμό τη θερμοκρασία στην οποία παγώνει ο διαλύτης. Το αποτέλεσμα αυτό επιτυγχάνεται είτε με ψύξη του δείγματος, είτε με μείωση της θερμοκρασίας του εξοπλισμού, χρησιμοποιώντας κρυογονικά probes. Η ψύξη του δείγματος μειώνει τη θερμική κίνηση, με αποτέλεσμα περισσότεροι πυρήνες να βρίσκονται σε χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα και να αυξάνεται η πληθυσμιακή διαφορά μεταξύ χαμηλών και υψηλών καταστάσεων spin. Η χρήση κρυογονικών probe μειώνει τόσο τον ηλεκτρονικό όσο και το θερμικό θόρυβο, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μία θεωρητική τετραπλάσια αύξηση του λόγου SNR.[1]

4.2.2 Μέτρηση χημικής μετατόπισης δ και τρόποι βελτιστοποίησης διαχωρισμού

Η χημική μετατόπιση δ , που αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά που παρατηρούνται σε ένα φάσμα NMR (παράγραφος 2.6.1.1), είναι πιο χρήσιμη όταν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των σημάτων που προκύπτουν από πυρήνες διαφορετικών χημικών ουσιών. Απαραίτητη προϋπόθεση για τον επιτυχή διαχωρισμό των σημάτων είναι η ομοιογένεια τόσο του μαγνητικού πεδίου B_0 όσο και του χημικού περιβάλλοντος των πυρήνων. Οι τρόποι βελτιστοποίησης του συγκεκριμένου διαχωρισμού συνοψίζονται ως η αντιστάθμιση (shimming) του πεδίου B_0 , η μείωση της έντασης B_0 του μαγνητικού πεδίου, η περιστροφή δείγματος, η χρήση διαλυτών και η μαγνητική περιστροφή (Magic Angle Spinning-MAS).[1]

Αντιστάθμιση (shimming) του πεδίου B_0

Δεδομένου ότι κανένας ηλεκτρομαγνήτης, ανεξάρτητα από το κόστος, δεν μπορεί να δημιουργήσει ένα απόλυτα ομοιογενές πεδίο και το δείγμα από μόνο του διαταράσσει το πεδίο B_0 , ο πρώτος τρόπος βελτιστοποίησης του διαχωρισμού των σημάτων είναι η επαναομοιογένεση του πεδίου (παράγραφος 3.1) με τη διαδικασία της αντιστάθμισης

(*shimming*). Η έννοια της αντιστάθμισης προέρχεται από τη μηχανική και χρησιμοποιείται όταν μικρές σφήνες ρυθμίζουν τη θέση ενός μεγάλου αντικειμένου. Η συγκεκριμένη διαδικασία ήταν χρονοβόρα, αλλά πλέον γίνεται αυτοματοποιημένα στις σύγχρονες μηχανές.[1]

Μείωση της έντασης B_0

Ένας ακόμη τρόπος βελτιστοποίησης της ομοιογένειας του πεδίου B_0 και κατ' επέκταση του διαχωρισμού των σημάτων είναι η μείωση της έντασής του. Όσο μικρότερη είναι η ένταση, τόσο πιο ομοιογενές είναι το πεδίο και επομένως, τόσο καλύτερη η ανάλυση του σήματος.[1]

Περιστροφή δείγματος

Η ομοιογένεια του πεδίου μπορεί να επιτευχθεί περιστρέφοντας το δείγμα με συχνότητα κοντά στα 20 Hz. Η διαδικασία αυτή απαλείφει οποιαδήποτε υπολειπόμενη ανομοιογένεια του πεδίου στο οριζόντιο επίπεδο xy.[1]

Χρήση διαλυτών

Όπως προαναφέρθηκε, το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων που μελετώνται βρίσκονται στο εσωτερικό διαλύματος με σκοπό την καλύτερη δυνατή ομοιογένεια του πεδίου και την παραγωγή φασμάτων με την καλύτερη δυνατή ανάλυση. Σε ένα ετερογενές δείγμα, διαφορετικές περιοχές του δείγματος βιώνουν διαφορετικά μαγνητικά περιβάλλοντα, τα οποία προκαλούν τοπικές ανωμαλίες στο πεδίο B_0 με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μη ευδιάκριτες φασματικές κορυφές. Στο εσωτερικό ενός διαλύματος, είναι εφικτή η ελεύθερη περιστροφή των διαλυμένων ουσιών που σημαίνει ότι τα χημικά περιβάλλοντά τους είναι πιο όμοια με αποτέλεσμα να μειώνεται η διεύρυνση των φασματικών γραμμών και να διακρίνονται πιο ξεκάθαροι, μη επικαλυπτόμενοι συντονισμοί στο φάσμα.[1]

Μαγνητική περιστροφή (Magic Angle Spinning- MAS)

Στα δείγματα στερεών ιστών, οι ενώσεις δεν μπορούν να περιστραφούν τόσο εύκολα όσο στα δείγματα σε διάλυμα, με αποτέλεσμα να είναι έντονη η διεύρυνση των αντίστοιχων φασματικών γραμμών. Η διεύρυνση αυτή εξαρτάται συχνά από τη γωνία στην οποία τοποθετείται το δείγμα σε σχέση με το πεδίο B_0 . Η γρήγορη περιστροφή ενός στερεού δείγματος στη λεγόμενη «μαγική γωνία» 54.7° έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φασμάτων με σημαντικά μειωμένα εύρη φασματικών γραμμών. Ο συνδυασμός των φυσικών επιδράσεων που προκαλούν το παραπάνω φαινόμενο είναι ιδιαίτερα περίπλοκος, γι' αυτό χρησιμοποιείται ο όρος «μαγική» γωνία.[1]

4.2.3 Μέτρηση φάσης

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της φασματοσκοπίας NMR είναι η δυνατότητα προσδιορισμού της φάσης των σημάτων που παράγονται. Η πρώτη περίπτωση εφαρμογής της φάσης είναι ο μετασχηματισμός Fourier ο οποίος χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του σήματος FID, που βρίσκεται στο πεδίο του χρόνου, στο φάσμα NMR που βρίσκεται στο πεδίο της συχνότητας. Με αυτόν τον τρόπο έχει επιταχυνθεί σημαντικά η φασματοσκοπία NMR, καθώς

καθίσταται εφικτή η απόκτηση ενός εύρους συχνοτήτων σε ένα μόνο παλμό, αντί να απαιτείται μία χρονοβόρα σάρωση σε ένα φάσμα συχνοτήτων. Η δεύτερη περίπτωση εφαρμογής της φάσης είναι η χρήση των ακολουθιών παλμών και η πολυδιάστατη φασματοσκοπία, η οποία αναλύεται στο κεφάλαιο 6.[1]

4.2.4 Μέτρηση χαλάρωσης

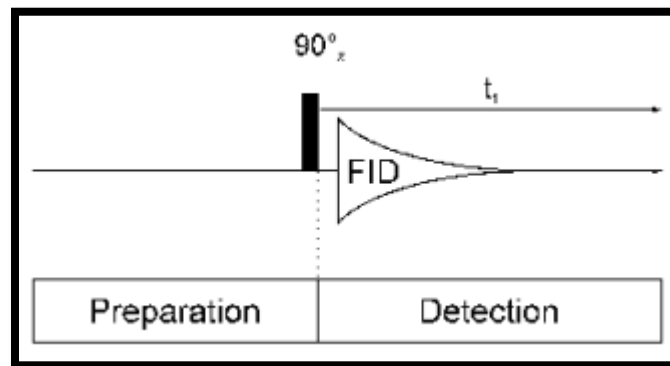
Ο υπολογισμός των χρόνων χαλάρωσης T_1 και T_2 (παράγραφος 2.5) παρέχει απαραίτητες πληροφορίες για ένα φάσμα NMR. Ο χρόνος T_1 , ή αλλιώς χρόνος spin-lattice, αφορά την αποκατάσταση του πληθυσμού ισορροπίας των καταστάσεων spin κατά μήκος του πεδίου B_0 και επηρεάζει το ρυθμό εφαρμογής των παλμών RF στο δείγμα κατά τη διεξαγωγή ενός πειράματος NMR. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος T_1 τόσο μεγαλύτερη πρέπει να είναι η καθυστέρηση χαλάρωσης μεταξύ των παλμών. Ο χρόνος T_2 , ή αλλιώς χρόνος spin-spin, αφορά την απώλεια της μαγνήτισης στο επίπεδο xy και καθορίζει το εύρος των συντονισμών που εμφανίζονται στο φάσμα NMR.[1]

5. Μονοδιάστατα πειράματα NMR

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η βασική πειραματική διαδικασία των μονοδιάστατων (1D) πειραμάτων, η συμπεριφορά της μαγνήτισης κατά τη διεξαγωγή τους, η μορφή των μονοδιάστατων φασμάτων που λαμβάνονται, οι παράμετροι που πρέπει να ρυθμίζονται για τη λήψη των μονοδιάστατων φασμάτων, τα πιο συνηθισμένα μονοδιάστατα πειράματα καθώς και οι παλμικές ακολουθίες που αντιστοιχούν στο καθένα.

5.1 Βασική πειραματική διαδικασία μονοδιάστατων πειραμάτων

Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας κατά τη διεξαγωγή των μονοδιάστατων πειραμάτων φαίνονται στο σχήμα 5.1 που ακολουθεί. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, η μαγνήτιση διαταράσσεται από τον πρώτο παλμό, αφήνεται να εκτελέσει μετάπτωση για ένα διάστημα και διαταράσσεται εκ νέου από επόμενους παλμούς. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αντίχνευσης t_1 , το δείγμα αφήνεται να επιστρέψει στην κατάσταση ισορροπίας και το εκπεμπόμενο σήμα καταγράφεται.[8]



Σχήμα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων διεξαγωγής ενός μονοδιάστατου πειράματος NMR. Πηγή: [8]

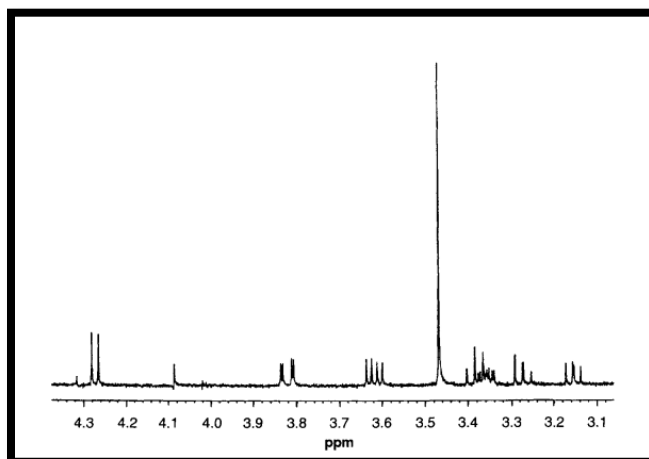
Η συμπεριφορά της μαγνήτισης κατά τη διεξαγωγή ενός μονοδιάστατου πειράματος NMR χαρακτηρίζεται από τρία στάδια: την κατάσταση ισορροπίας, την κατάσταση συντονισμού των πυρήνων του δείγματος και την επαναφορά τους στην αρχική τους κατάσταση. Με την εισαγωγή του δείγματος στο πεδίο B_0 , οι πυρήνες έρχονται σε κατάσταση ισορροπίας και για τη μαγνήτιση ισχύουν οι σχέσεις $\vec{M}_z = \vec{M}_0 \neq 0$ (2.4.3), $\vec{M}_{xy} = 0$ (2.4.4).[8]

Στη συνέχεια, εφαρμόζονται οι παλμοί RF (πεδίο B_1) και οι πυρήνες έρχονται σε κατάσταση συντονισμού. Σε αυτό το στάδιο, για τη μαγνήτιση ισχύουν οι σχέσεις $\vec{M}_z < \vec{M}_0$ (2.4.6), $\vec{M}_{xy} \neq 0$ (2.4.7).[8]

Αφού διακοπεί η επίδραση του πεδίου B_1 , ακολουθεί η επαναφορά των πυρήνων στην κατάσταση ισορροπίας. Η συνιστώσα στο επίπεδο xy επιστρέφει στη μηδενική τιμή και η συνιστώσα z της μαγνήτισης επιστρέφει στην τιμή M_0 . [8]

5.2 Μονοδιάστατο φάσμα

Ένα μονοδιάστατο φάσμα, $S(\omega)$, λαμβάνεται μέσω του μετασχηματισμού Fourier από ένα σήμα, $s(t)$, στο πεδίο του χρόνου (παράγραφος 2.6) και χαρακτηρίζεται από δύο διαστάσεις x και y . Ο άξονας x είναι ο άξονας των συχνοτήτων (όπου οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε ppm) και ο άξονας y αναφέρεται στην ένταση του σήματος όπως φαίνεται στο σχήμα 5.2.[41]



Σχήμα 5.2: Μονοδιάστατο φάσμα NMR πρωτονίων από 1 μg μεθυλο- β -D-γλυκοκυρανοσίδη στο εσωτερικό 80 μl από D_2O που αποκτήθηκε σε 67 λεπτά. Πηγή: [3]

5.3 Παράμετροι μονοδιάστατων πειραμάτων

Οι εντολές που χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση των παραμέτρων διαφέρουν ανάλογα με το όργανο που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος. Παρόλα αυτά, η φυσική έννοια των παραμέτρων παραμένει η ίδια. Οι πιο βασικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται στη διεξαγωγή ενός μονοδιάστατου πειράματος είναι οι εξής:

Εύρος συχνοτήτων φάσματος (spectrum width)

Το εύρος του φάσματος ορίζεται ως το παρατηρούμενο εύρος συχνοτήτων του, και μετράται σε Hz ή ppm. Οι τυπικές τιμές του εύρους για τους τρεις πιο γνωστούς πυρήνες ^1H , ^{13}C και ^{31}P είναι αντίστοιχα [-1, 14] ppm, [-20, 240] ppm και [-130, 100] ppm. Σε μερικές περιπτώσεις κάποιες κορυφές δεν μπορούν να διακριθούν εύκολα στο φάσμα. Αλλάζοντας το εύρος φάσματος, μπορεί να διαπιστωθεί αν αυτές οι κορυφές είναι αλληλεπικαλυπτόμενες ή όχι.

Καθυστέρηση παλμού (pulse delay)

Η καθυστέρηση παλμού συνιστά το διάστημα μεταξύ των παρατηρούμενων παλμών και μετράται σε seconds.

Εύρος παλμού (pulse width)

Το εύρος παλμού είναι ο χρόνος που χρησιμοποιείται για την εφαρμογή ενός παλμού RF με σκοπό τη διαταραχή της μαγνήτισης και μετράται σε microseconds. Για παράδειγμα, ένας παλμός RF που εφαρμόζεται στον άξονα x προκαλεί την περιστροφή του διανύσματος της

μαγνήτισης M στο επίπεδο xy . Η γωνία περιστροφής του διανύσματος της μαγνήτισης δίνεται από τον τύπο:

$$\theta = \gamma B_1 t_p \quad (5.3.1)'$$

όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος του υπό μελέτη πυρήνα, B_1 η ένταση του εφαρμοσμένου πεδίου και t_p το εύρος του παλμού σε microseconds.

Αριθμός σαρώσεων (Number of Scans)

Ο αριθμός σαρώσεων χρησιμοποιείται για την ρύθμιση των επαναλήψεων λήψεως του δείγματος με σκοπό την αύξηση του λόγου SNR. Όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο (4.2.1), η πρόσθεση των φθίνουσων επαγωγών (FIDs) έχει ως αποτέλεσμα το άθροισμα των αντίστοιχων σημάτων που λαμβάνονται. Αντιθέτως, ο θόρυβος αποτελεί μία τυχαία συνάρτηση χωρίς καμία συνοχή φάσης. Επομένως, η πρόσθεση των FIDs αυξάνει την ένταση του σήματος με αποτέλεσμα ο λόγος SNR να αυξάνεται κατά την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των σαρώσεων.

Κέρδος (Gain)

Το κέρδος χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της μεγέθυνσης ενός σήματος NMR και ορίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$Gain = 20 \text{Log}(P_{output}/P_{input}) \quad (5.3.2)$$

Όπου P_{output} και P_{input} είναι η ισχύς εξόδου και εισόδου αντίστοιχα. Μετράται σε dB.

Συχνότητα παρατήρησης

Η συχνότητα παρατήρησης πρόκειται για την παρατηρούμενη συχνότητα Larmor του μελετούμενου πυρήνα, η οποία ορίζεται στο αρχείο ρυθμίσεων σε σχέση με την ένταση του μαγνητικού πεδίου και μετράται σε Hz.[42]

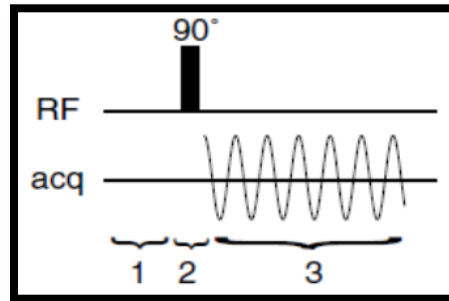
5.4 Χαρακτηριστικά μονοδιάστατα πειράματα

5.4.1 Πείραμα Pulse-Acquire

Το πείραμα pulse-acquire είναι το πιο απλό μονοδιάστατο πείραμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταγραφή του φάσματος NMR. Η διεξαγωγή του πειράματος χωρίζεται σε τρεις περιόδους (Σχήμα 5.3):

1. Το δείγμα έρχεται σε κατάσταση ισορροπίας. Σε αυτό το στάδιο η μαγνήτιση είναι παράλληλη στον άξονα z ($\vec{M} \parallel z$).
2. Εφαρμόζεται ένας παλμός RF 90° ο οποίος μετατοπίζει τη μαγνήτιση ώστε να γίνεται παράλληλη στον άξονα $-y$ ($\vec{M} \parallel -y$).

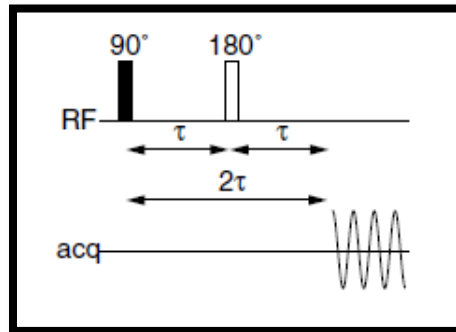
3. Διακόπτεται ο παλμός RF και ανιχνεύεται το σήμα που προκύπτει καθώς η μαγνήτιση περιστρέφεται στο εγκάρσιο επίπεδο xy. [2]



Σχήμα 5.3: Χρονοδιάγραμμα (ακολουθία παλμών) για το πείραμα pulse-acquire. Η ένδειξη «RF» δείχνει το σημείο εφαρμογής του παλμού ενώ η ένδειξη «acq» δείχνει τη χρονική στιγμή που καταγράφεται το σήμα. Πηγή: [8]

5.4.2 Πείραμα Spin Echo

Το πείραμα Spin Echo αποτελεί το πιο γνωστό μονοδιάστατο πείραμα NMR και πρόκειται για ένα συχνό στοιχείο πολλών σύνθετων πειραμάτων. Η ακολουθία παλμών αποτελείται από δύο παλμούς, έναν παλμό 90° και έναν παλμό 180° που εφαρμόζεται μετά από χρονικό διάστημα τ (Σχήμα 5.4).[8]

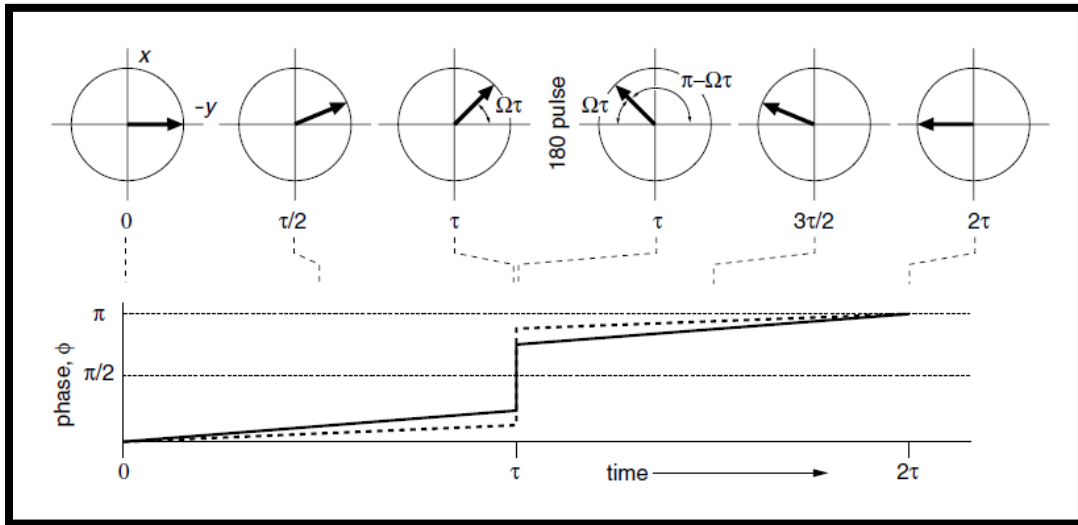


Σχήμα 5.4: Ακολουθία παλμών για το πείραμα spin echo. Πηγή: [8]

Ο αρχικός παλμός 90° μετατοπίζει τη μαγνήτιση \vec{M} από τον άξονα z στον άξονα $-y$. Κατά τη διάρκεια της πρώτης καθυστέρησης τ , το διάνυσμα της μαγνήτισης μεταπίπτει από τον άξονα $-y$ προς τον άξονα x. Η γωνία με την οποία το διάνυσμα περιστρέφεται ορίζεται ως *φάση*, φ , και έχει τύπο $\varphi = \Omega\tau$. Ο παλμός 180° μετατοπίζει τη μαγνήτιση \vec{M} στην αντικατοπτρική θέση ως προς το επίπεδο xz. Το διάνυσμα της μαγνήτισης σχηματίζει γωνία $\Omega\tau$ με τον θετικό άξονα y. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης καθυστέρησης τ , το διάνυσμα της μαγνήτισης περιστρέφεται με γωνία μεγαλύτερη από $\Omega\tau$ και καταλήγει στον άξονα y. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ακολουθίας είναι πως στο τέλος της δεύτερης καθυστέρησης τ , η μαγνήτιση καταλήγει στον ίδιο άξονα ανεξάρτητα από τις τιμές των τ και Ω . [8]

Στο σχήμα 5.5 που ακολουθεί φαίνεται η μετατόπιση του διανύσματος της μαγνήτισης κατά τη διάρκεια του πειράματος *spin echo* και το διάγραμμα της φάσης, φ , ως συνάρτηση του

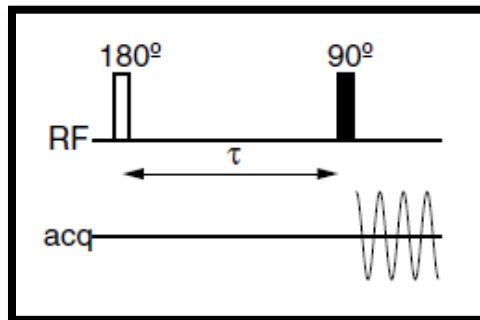
χρόνου. Κατά τη διάρκεια της πρώτης καθυστέρησης τ , η φάση αυξάνεται γραμμικά σε σχέση με τον χρόνο. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής του παλμού 180° είναι η αλλαγή της φάσης από $(\Omega\tau)$ σε $(\pi - \Omega\tau)$ που εξηγείται και από το αντίστοιχο άλμα στο διάγραμμα τη χρονική στιγμή $t = \tau$. Καθώς αυξάνεται ο χρόνος, η φάση αυξάνεται κατά $(\Omega\tau)$ και λαμβάνει την τελική της τιμή στο τέλος της δεύτερης καθυστέρησης τ , η οποία είναι ίση με π . Το συμπέρασμα αυτό είναι ανεξάρτητο της τιμής Ω , όπως φαίνεται στο διάγραμμα με τη διακεκομμένη γραμμή η οποία αντιπροσωπεύει την εξέλιξη της φάσης για μικρότερη τιμή Ω και καταλήγει και αυτή στην τιμή π . [8]



Σχήμα 5.5: Διάγραμμα μετατόπισης του διανύσματος της μαγνήτισης κατά τη διάρκεια του πειράματος spin echo και διάγραμμα της φάσης ως συνάρτηση του χρόνου. Πηγή: [8]

5.4.3 Πείραμα Inversion Recovery

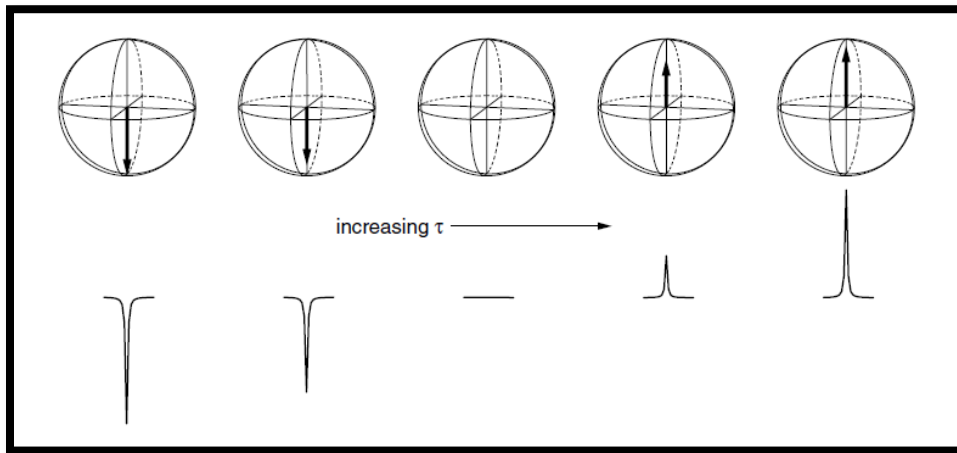
Η ακολουθία παλμών του πειράματος inversion recovery αποτελείται από δύο παλμούς, έναν παλμό 180° και έναν παλμό 90° που εφαρμόζεται μετά από χρονική διάρκεια τ . Ο παλμός 180° περιστρέφει τη μαγνήτιση ισορροπίας από τον άξονα z στον άξονα $-z$. Στην περίπτωση που η καθυστέρηση τ είναι πολύ σύντομη, ώστε στο τέλος της η μαγνήτιση να μην έχει μεταβληθεί ιδιαίτερα, ο παλμός 90° που ακολουθεί περιστρέφει τη μαγνήτιση στον άξονα $+y$ (Σχήμα 5.6). [8]



Σχήμα 5.6: Ακολουθία παλμών για το πείραμα inversion recovery. Πηγή: [8]

Στην περίπτωση που η καθυστέρηση τ διαρκεί περισσότερο, η μαγνήτιση συρρικνώνεται προς το μηδέν με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μία αρνητική γραμμή στο φάσμα. Τελικά, η μαγνήτιση διέρχεται από το μηδέν και στη συνέχεια αρχίζει να αυξάνεται επί του άξονα z, προσδίδοντας μία θετική γραμμή στο φάσμα. Από την καταγραφή του φάσματος για διαφορετικές τιμές της καθυστέρησης τ , μπορεί να μετρηθεί ο ρυθμός εφησυχασμού της συνιστώσας \vec{M}_z από την ένταση των παρατηρούμενων γραμμών (Σχήμα 5.7).[8]

Στον πίνακα 5.1 συνοψίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των προαναφερθέντων μονοδιάστατων πειραμάτων.



Σχήμα 5.7: Απεικόνιση του αποτελέσματος ενός πειράματος inversion recovery. Το μέγεθος και το πρόσημο της μαγνήτισης \vec{M}_z αντικατοπτρίζεται στο φάσμα που φαίνεται κάτω από τις μετατοπίσεις του διανύσματος. Αναλύοντας τα ύψη των κορυφών σε συνάρτηση της καθυστέρησης τ , υπολογίζεται ο ρυθμός ανάκτησης της μαγνήτισης \vec{M}_z . Πηγή: [8]

Πίνακας 5.1: Σύνοψη βασικών χαρακτηριστικών των μονοδιάστατων πειραμάτων NMR που παρουσιάστηκαν στο παρόν κεφάλαιο.

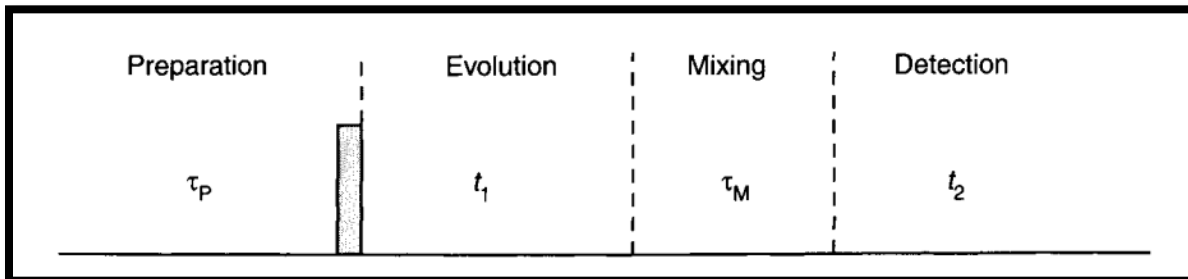
Ονομασία πειράματος	Παλμική ακολουθία	Αρχική θέση μαγνήτισης	Μετατόπιση μαγνήτισης	Χαρακτηριστικά
Pulse-Acquire	Ένας παλμός 90°	$\vec{M} \parallel z$	$\vec{M} \parallel -y$	Το απλούστερο μονοδιάστατο πείραμα
Spin Echo	Δύο παλμοί, ένας 90° και ένας 180°	$\vec{M} \parallel z$	$\vec{M} \parallel -y$ και $\vec{M} \parallel y$	Η μαγνήτιση καταλήγει στον ίδιο άξονα ανεξάρτητα από τις τιμές των τ και Ω
Inversion Recovery	Δύο παλμοί, ένας 180° και ένας 90°	$\vec{M} \parallel z$	$\vec{M} \parallel -z$ και $\vec{M} \parallel y$	Μέτρηση του ρυθμού εφησυχασμού της συνιστώσας \vec{M}_z

6. Δισδιάστατα Πειράματα NMR

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάζεται η βασική πειραματική διαδικασία των δισδιάστατων (2D) πειραμάτων, η συμπεριφορά της μαγνήτισης κατά τη διεξαγωγή τους, η μορφή των δισδιάστατων φασμάτων που λαμβάνονται, οι παράμετροι που πρέπει να ρυθμίζονται για τη λήψη των δισδιάστατων φασμάτων και τα πιο συνηθισμένα δισδιάστατα πειράματα. Η δισδιάστατη φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται κυρίως για τη διευκρίνιση της δομής μεγαλύτερων μορίων προσφέροντας τα εξής πλεονεκτήματα: (i) διασπορά των σημάτων σε δύο ορθογώνιες διαστάσεις, (ii) σημαντική ελάττωση του υπερπληθυσμού των γραμμών συντονισμού, καθώς οι πληροφορίες του φάσματος απλώνονται σε ένα επίπεδο και όχι σε έναν μόνο άξονα συχνότητας και (iii) δυνατότητα συσχέτισης ζευγών απορροφήσεων.[3][7]

6.1 Βασική πειραματική διαδικασία δισδιάστατων πειραμάτων

Τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας κατά τη διεξαγωγή των δισδιάστατων πειραμάτων είναι η περίοδος προετοιμασίας (preparation period, t_p), η περίοδος εξέλιξης (evolution period, t_1), η περίοδος ανάμιξης (mixing period, t_M) και η περίοδος ανίχνευσης (detection period, t_2), όπως φαίνονται στο σχήμα 6.1.[3]

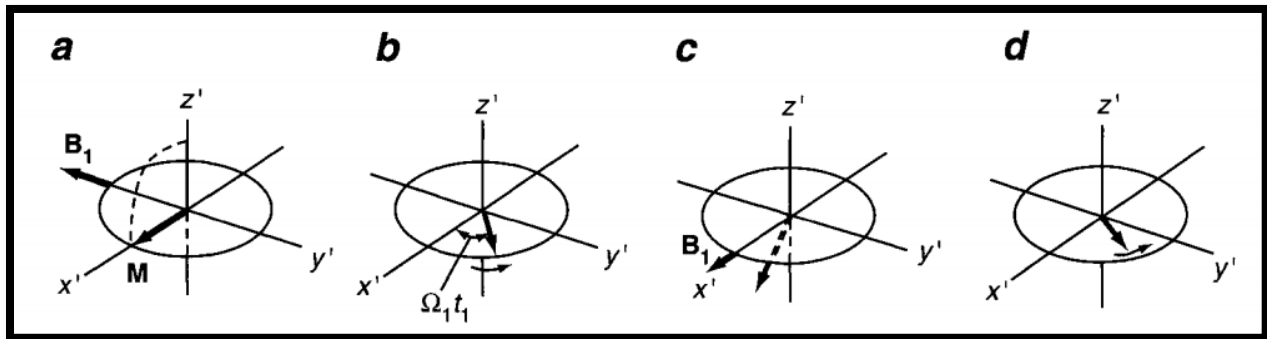


Σχήμα 6.1: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων διεξαγωγής ενός δισδιάστατου πειράματος NMR. Πηγή: [3]

Κατά τη διάρκεια της περιόδου προετοιμασίας t_p , εφαρμόζεται ο πρώτος παλμός ακολουθίας και το σύστημα πυρηνικών spin «προετοιμάζεται» για τα επόμενα στάδια του δισδιάστατου πειράματος. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εξέλιξης t_1 , το διάνυσμα της μαγνήτισης αφήνεται να εκτελέσει ελεύθερη μετάπτωση στη συχνότητα Larmor. Κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης t_M , εφαρμόζεται ο δεύτερος παλμός ακολουθίας με αποτέλεσμα η μαγνήτιση να μεταφέρεται από τον έναν πυρήνα στον άλλον. Τέλος, κατά τη διάρκεια της περιόδου ανίχνευσης t_2 , το σύστημα επανέρχεται σε κατάσταση ισορροπίας και γίνεται λήψη του σήματος FID. Κατά τη διεξαγωγή ενός δισδιάστατου πειράματος, η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές, με διαφορετική διάρκεια της περιόδου εξέλιξης t_1 κάθε φορά, διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες ρυθμίσεις σταθερές. Για κάθε τιμή του χρόνου t_1 , το σήμα που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια του χρόνου t_2 ψηφιοποιείται και αποθηκεύεται στη μνήμη του υπολογιστή ως συνάρτηση του t_2 . [3][41][42]

Η συμπεριφορά της μαγνήτισης κατά τη διεξαγωγή ενός δισδιάστατου πειράματος φαίνεται στο σχήμα 6.2 που ακολουθεί. Αρχικά, το σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση

ισορροπίας και η μαγνήτιση \vec{M} είναι παράλληλη στον άξονα z. Κατά τη διάρκεια της περιόδου προετοιμασίας t_p (a), εφαρμόζεται ένας παλμός 90° (πεδίο B_1) με αποτέλεσμα η μαγνήτιση να μεταφέρεται στον άξονα x. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εξέλιξης t_1 (b), η μαγνήτιση \vec{M} κινείται ελεύθερα στο επίπεδο xy, σχηματίζοντας με τον άξονα x γωνία $\Omega_1 t_1$. Κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης t_M (c), εφαρμόζεται ένας δεύτερος παλμός 90° με αποτέλεσμα η μαγνήτιση να κινείται πλέον στο επίπεδο xz σχηματίζοντας πάλι γωνία $\Omega_1 t_1$ με τον άξονα x. Τέλος, κατά τη διάρκεια της περιόδου ανίχνευσης t_2 (d), εντοπίζεται μόνο η εγκάρσια μαγνήτιση M_{xy} , η οποία περιστρέφεται με γωνιακή συχνότητα Ω_2 ίση με την Ω_1 , καθώς κανένας παράγοντας δεν έχει προκαλέσει τη μεταβολή της.[3]



Σχήμα 6.2: Σχηματική αναπαράσταση της συμπεριφοράς της μαγνήτισης κατά τη διεξαγωγή ενός δισδιάστατου πειράματος NMR. (a) Η μαγνήτιση μεταφέρεται στον άξονα x κατά τη διάρκεια της περιόδου προετοιμασίας. (b) Η μαγνήτιση κινείται ελεύθερα στο επίπεδο xy, σχηματίζοντας με τον άξονα x γωνία $\Omega_1 t_1$ κατά τη διάρκεια της περιόδου εξέλιξης. (c) Η μαγνήτιση κινείται στο επίπεδο xz σχηματίζοντας γωνία $\Omega_1 t_1$ με τον άξονα x κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης. (d) Η εγκάρσια μαγνήτιση M_{xy} περιστρέφεται με γωνιακή συχνότητα Ω_1 κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης. Πηγή: [3]

6.2 Δισδιάστατο φάσμα

Ένα δισδιάστατο φάσμα, $S(\omega_1, \omega_2)$, λαμβάνεται μέσω ενός δισδιάστατου μετασχηματισμού Fourier από ένα σήμα, $s(t_1, t_2)$, στο πεδίο του χρόνου, που αποτελεί συνάρτηση δύο ανεξάρτητων μεταξύ τους χρονικών μεταβλητών, t_1 και t_2 και δίνεται από τον εξής τύπο:

$$s(t_1, t_2) = M_0 \cos(\Omega_1 t_1) e^{i\Omega_2 t_2} e^{-t_1/T_2(1)} e^{-t_2/T_2(2)} \quad (6.2.1)$$

όπου $T_2(1)$ και $T_2(2)$ είναι οι εγκάρσιες σταθερές αποσβέσεως κατά τη διάρκεια των περιόδων εξέλιξης και ανίχνευσης, αντίστοιχα.[3]

Ορίζοντας αυθαίρετα μία τιμή του χρόνου t_1 , εφαρμόζεται ο μετασχηματισμός Fourier στο σήμα FID σε σχέση με τη μεταβλητή t_2 και λαμβάνεται το δισδιάστατο φάσμα που δίνεται από τη σχέση:

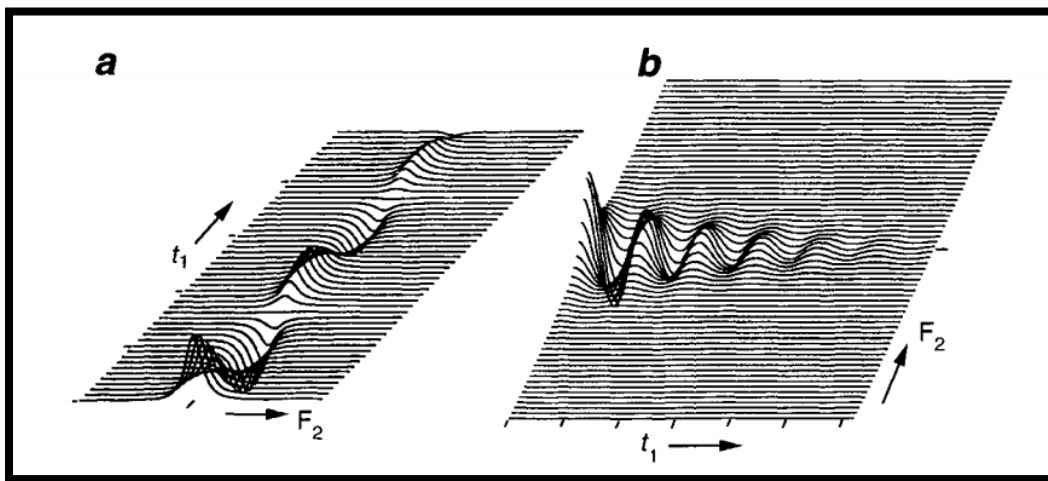
$$S(t_1, \omega_2) = M_0 \cos(\Omega_1 t_1) e^{-\frac{t_1}{T_2(1)}} [A(\omega_2) + iD(\omega_2)] \quad (6.2.2)$$

όπου $A(\omega_2)$ και $D(\omega_2)$ είναι το πραγματικό και φανταστικό μέρος του φάσματος, αντίστοιχα, που δίνονται από τις σχέσεις:

$$A(\omega_2) = \frac{T_2}{1+[T_2(\omega_2-\Omega_2)]^2} \quad (6.2.3)$$

$$D(\omega_2) = \frac{[T_2]^2(\omega_2-\Omega_2)}{1+[T_2(\omega_2-\Omega_2)]^2} \quad (6.2.4)$$

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές για αυξανόμενες τιμές t_1 . Το πραγματικό μέρος ενός συνόλου φασμάτων που λαμβάνονται για ένα σύνολο από διαφορετικές τιμές t_1 φαίνεται στο σχήμα 6.3(a) που ακολουθεί. Αν προκύπτουν $2N$ σημεία δεδομένων για κάθε τιμή του t_1 , το πραγματικό μέρος κάθε σήματος που λαμβάνεται από τον μετασχηματισμό Fourier t_2 , αποτελείται από N σημεία. Επομένως, μπορούν να ληφθούν N διατομές παράλληλες στον άξονα t_1 με αποτέλεσμα να προκύπτει το διάγραμμα που φαίνεται στο σχήμα 6.3(b). Αν χρησιμοποιούνται $2M$ τιμές της μεταβλητής t_1 (όπου οι τιμές M και N δεν είναι απαραίτητα ίσες), τότε κάθε διάγραμμα περιλαμβάνει $2M$ σημεία δεδομένων. Συνολικά, λοιπόν, το φάσμα περιέχει MN σημεία δεδομένων που προκύπτουν από τα $(2M) \times (2N)$ σημεία στο πεδίο του χρόνου.[3]

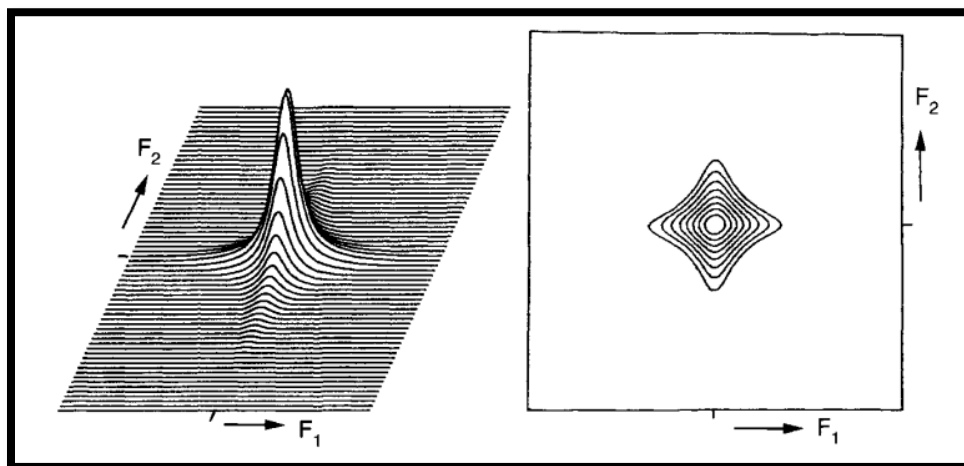


Σχήμα 6.3: (a) Διάγραμμα που προκύπτει από το πραγματικό μέρος ενός συνόλου φασμάτων για διάφορες τιμές του t_1 . (b) Διάγραμμα που προκύπτει με περιστροφή των αξόνων του διαγράμματος (a). Πηγή: [3]

Δεδομένου ότι το σήμα FID που λαμβάνεται κατά τη διεξαγωγή ενός δισδιάστατου πειράματος εκφράζεται ως συνάρτηση δύο χρονικών μεταβλητών t_1 και t_2 , κάθε δισδιάστατο φάσμα NMR που προκύπτει περιέχει, αντίστοιχα, δύο άξονες συχνότητας, ώστε να επιτρέπεται η συσχέτισή τους. Ο οριζόντιος άξονας ονομάζεται άξονας άμεσης συχνότητας, F_1 , και ο κάθετος άξονας ονομάζεται άξονας έμμεσης συχνότητας, F_2 . Οι συχνότητες των σημάτων που βρίσκονται στην άμεση διάσταση έχουν εντοπιστεί απευθείας από το πηνίο του δέκτη, ενώ αυτές στην έμμεση διάσταση προέρχονται από το δεύτερο μετασχηματισμό Fourier των σημάτων.[3][7][41]

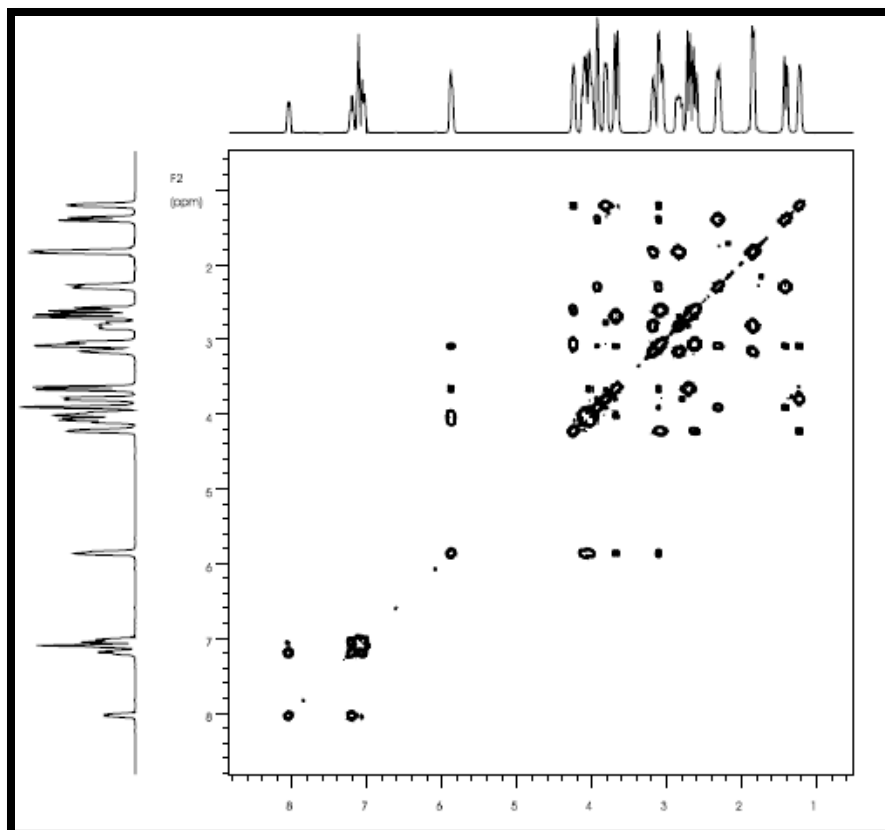
Οι εντάσεις των σημάτων εμφανίζονται στον τρίτο άξονα και μπορούν να απεικονιστούν με διαγράμματα επιστοίβασης (*stacked plots*) ή διαγράμματα ισουψών καμπυλών (*contour plots*)

(Σχήμα 6.4). Στην πρώτη κατηγορία, καθίσταται δύσκολη η ακριβής μέτρηση των συντεταγμένων συχνότητας, ειδικά στην περίπτωση αλληλεπικαλυπτόμενων συντονισμών. Γι' αυτό και τα *διαγράμματα ισουψών καμπυλών* αποτελούν την πιο συχνή αναπαράσταση των δισδιάστατων φασμάτων όπου τα περιγράμματα σχεδιάζονται μέσω σημείων ίδιας έντασης, ανάλογα με τις γραμμές ανύψωσης σε ένα γεωγραφικό χάρτη.[3][41]



Σχήμα 6.4: Γενική απεικόνιση δισδιάστατων φασμάτων NMR με δύο τρόπους: *stacked plot* (αριστερά) και *contour plot* (δεξιά). Πηγή: [3]

Σε ένα δισδιάστατο φάσμα NMR, όπως αυτό που απεικονίζεται στο σχήμα 6.5, οι διαγώνιες κορυφές αντιστοιχούν στο κανονικό μονοδιάστατο φάσμα ενώ οι διασταυρούμενες κορυφές (*cross peaks*) υποδεικνύουν σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις βρίσκονται στις αντίστοιχες διαγώνιες κορυφές.[3]



Σχήμα 6.5: Δισδιάστατο φάσμα στρυχνίνης σε CDCl_3 . Πηγή: [42]

6.3 Παράμετροι δισδιάστατων πειραμάτων

Οι παράμετροι που ρυθμίζονται πριν τη διεξαγωγή ενός δισδιάστατου πειράματος είναι ίδιες με αυτές των μονοδιάστατων πειραμάτων, δηλαδή το εύρος συχνοτήτων του φάσματος, η καθυστέρηση και το εύρος παλμού, ο αριθμός σαρώσεων, το κέρδος και η συχνότητα παρατήρησης (παράγραφος 5.3). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί μία διαφορά που εντοπίζεται μεταξύ των μονοδιάστατων και των δισδιάστατων πειραμάτων όσον αφορά τον όγκο των παραγόμενων δεδομένων Ένα μονοδιάστατο πείραμα διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα και περιλαμβάνει, συνήθως, 32768 σημεία δεδομένων που αντιστοιχούν σε 128 KB χώρου στο δίσκο. Ανάγοντάς το στις δύο διαστάσεις, το αντίστοιχο θεωρητικό δισδιάστατο πείραμα αποτελείται από 32768^2 σημεία δεδομένων που καταλαμβάνουν 2 GB χώρου στο δίσκο και απαιτούν χρόνο πειραματικής διεξαγωγής 2 μέρες. Δεδομένου ότι η συγκεκριμένη διαδικασία είναι πολύ απαιτητική σε χρόνο και χώρο αποθήκευσης, στην πράξη επιλέγεται να καταγράφονται 512 (σήματα FID) x 2048 (σημεία δεδομένων) με αποτέλεσμα να δεσμεύονται μόνο 2 MB χώρου στο δίσκο και η διεξαγωγή του πειράματος να διαρκεί περίπου 18 λεπτά.[41]

6.4 Χαρακτηριστικά δισδιάστατα πειράματα

Τα δισδιάστατα πειράματα NMR διακρίνονται σε ομοπυρηνικά και ετεροπυρηνικά. Ομοπυρηνικά ονομάζονται τα πειράματα στα οποία οι συχνότητες και των δύο διαστάσεων

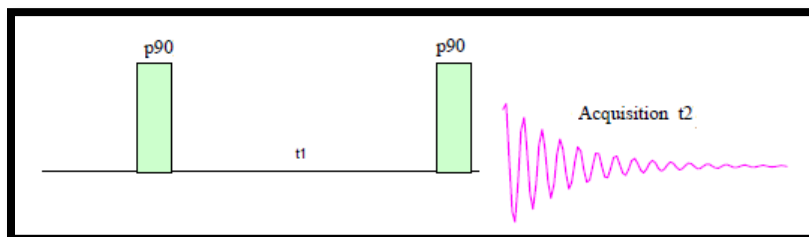
αναφέρονται σε πυρήνες ίδιου ατόμου, ενώ ετεροπυρηνικά τα πειράματα στα οποία οι συχνότητες των δύο διαστάσεων αναφέρονται σε πυρήνες διαφορετικού ατόμου.[7]

6.4.1 Ομοπυρηνικά πειράματα

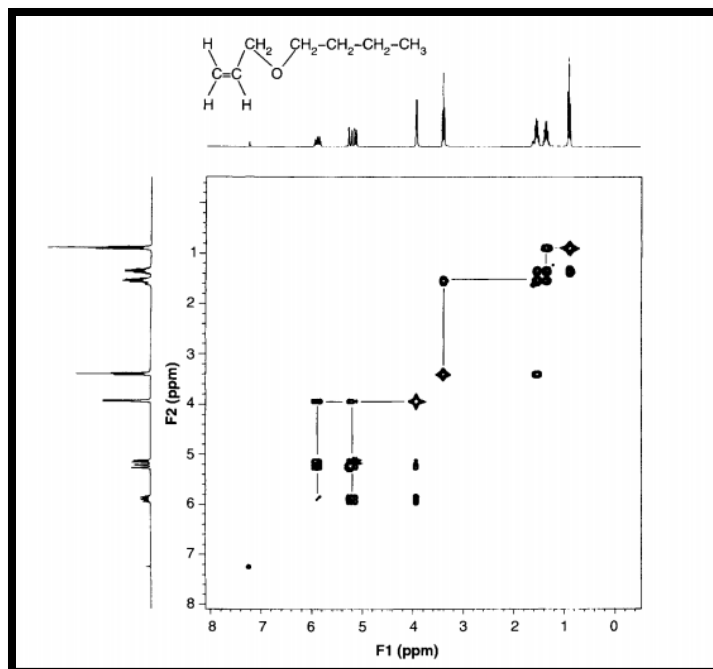
6.4.1.1 Πείραμα COSY (Correlation Spectroscopy)

Το πείραμα COSY είναι ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα, στο οποίο οι δύο άξονες F_1 και F_2 περιέχουν απορροφήσεις του ίδιου πυρήνα, είτε ^1H - ^1H είτε ^{13}C - ^{13}C . Το COSY είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο δισδιάστατο πείραμα και το πιο χρήσιμο για την απόκτηση πληροφοριών σύζευξης.[42]

Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται για τη διεξαγωγή του πειράματος COSY αποτελείται από δύο παλμούς 90° , έναν στην αρχή και έναν στο τέλος της περιόδου εξέλιξης (Σχήμα 6.6). Η πιο διαδεδομένη παλμική ακολουθία COSY δίνεται για τιμές της σταθεράς σύζευξης J γύρω στα 3-15 Hz, οι οποίες είναι τυπικές για τις περισσότερες συζεύξεις ^1H - ^1H . Οι κορυφές εκτός διαγωνίου που φαίνονται στο σχήμα 6.7 παρέχουν μία άμεση ένδειξη της σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων.[3][42]



Σχήμα 6.6: Παλμική ακολουθία πειράματος COSY. Πηγή: [42]

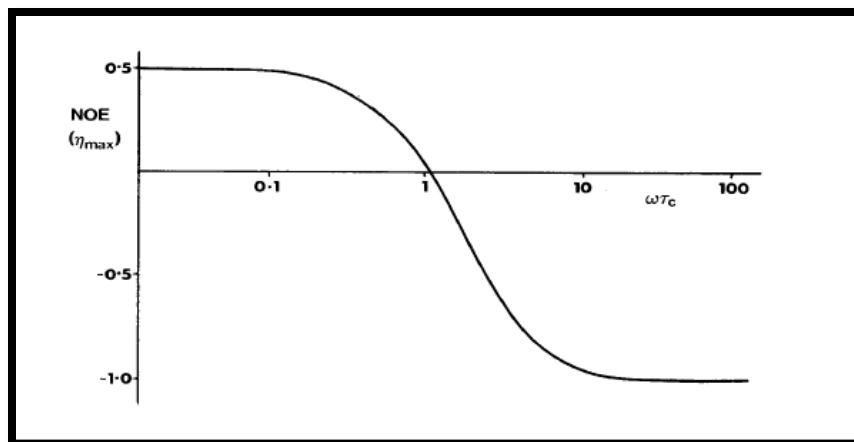


Σχήμα 6.7: Φάσμα COSY (300 MHz) αλκυλοβουτυλαιθέρα σε CDCl_3 . Το αντίστοιχο μονοδιάστατο φάσμα φαίνεται στο αριστερό και πάνω μέρος του δισδιάστατου φάσματος. Οι κορυφές στη διαγώνιο αντιστοιχούν στις χημικές μετατοπίσεις κάθε πρωτονίου, ενώ οι διασταυρούμενες κορυφές (cross peaks) υποδεικνύουν σύζευξη των spin μεταξύ των πρωτονίων των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις βρίσκονται στις αντίστοιχες διαγώνιες κορυφές. τα πρωτόνια στα 3.4 ppm είναι συζευγμένα μόνο με αυτά στα 1.5 ppm, τα οποία είναι επίσης συζευγμένα με πρωτόνια στα 1.3 ppm. Οι συσχετίσεις αυτές γίνονται φανερές με τις γραμμές ένωσης. Πηγή: [3]

6.4.1.2 Πείραμα NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy)

Το πείραμα NOESY είναι ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα, στο οποίο οι διαγώνιες κορυφές στο φάσμα προκύπτουν από τις διπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των spin των πυρήνων. Το πείραμα NOESY αφορά τη συσχέτιση πυρήνων ^1H - ^1H . Οι διπολικές συζεύξεις, οι οποίες συχνά αναφέρονται ως συζεύξεις διπόλου-διπόλου, εξαρτώνται από τον προσανατολισμό του μορίου σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο καθώς και την απόσταση μεταξύ των spin.[3][41]

Το πείραμα NOESY βασίζεται στο πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (NOE), στο οποίο ένας πληθυσμός από α και β καταστάσεις που δε βρίσκονται σε ισορροπία, επανέρχεται στην τιμή ισορροπίας του, με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί των ενεργειακών επιπέδων των spin (και συνεπώς η ένταση του σήματός τους) να μεταβάλλονται (παράγραφος 2.7). Το πρόσημο του NOE είναι θετικό για μικρά και αρνητικό για μεγάλα μόρια. Για μόρια μεσαίου μεγέθους η τιμή του NOE είναι πολύ μικρή ή κοντά στο μηδέν. Το NOE εξαρτάται από το χρόνο συσχετισμού περιστροφής του μορίου (correlation time), τ_c , για αυτό και οι κορυφές στο φάσμα NOESY μπορεί να είναι είτε θετικές (για μεγάλα μόρια) είτε αρνητικές (για μικρά μόρια) (Σχήμα 6.8).[41]

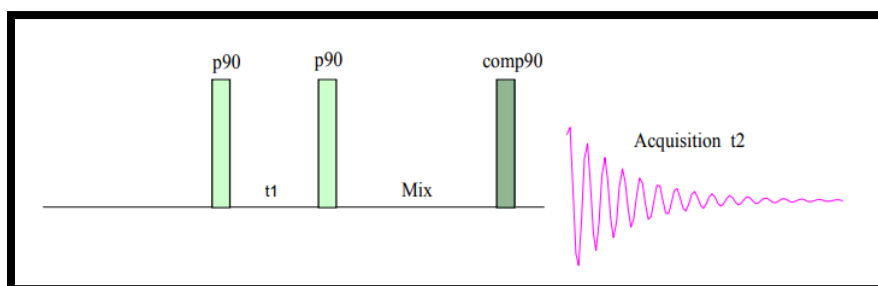


Σχήμα 6.8: Εξάρτηση του NOE από το χρόνο τ_c . Πηγή: [41]

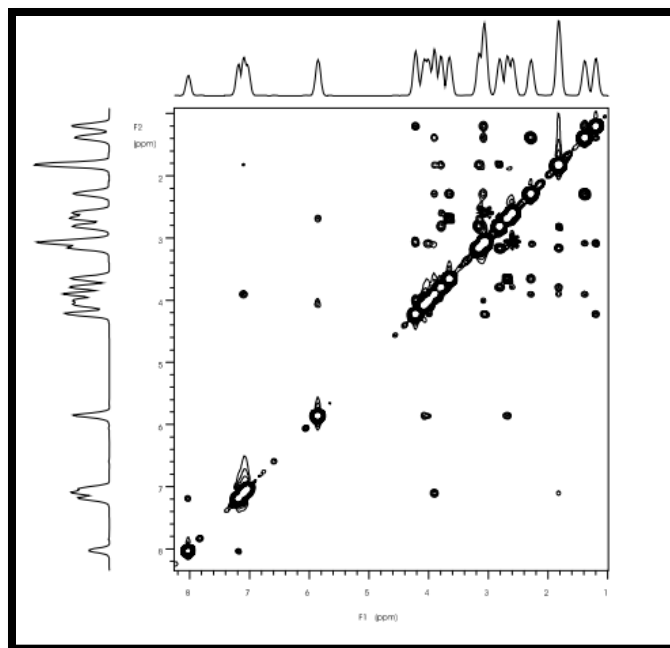
Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος NOESY αποτελείται από τρεις παλμούς των 90° . Ο πρώτος παλμός δημιουργεί την εγκάρσια μαγνήτιση, η οποία «επισημαίνεται» με μία συχνότητα κατά τη διάρκεια της περιόδου εξέλιξης t_1 . Ο δεύτερος παλμός περιστρέφει τις επισημασμένες συνιστώσες στον άξονα z. Αυτές οι συνιστώσες αναμειγνύονται μέσω διαδικασιών χαλάρωσης των κορυφών κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης, τ_M . Ο τελευταίος παλμός περιστρέφει τη μαγνήτιση στο εγκάρσιο επίπεδο (Σχήμα 6.9).[42]

Το πείραμα NOESY παρέχει ένα χάρτη συσχέτισης βασισμένο σε διαδικασίες μεταφοράς μαγνήτισης, όπως η διπολική σύζευξη και η χημική ανταλλαγή. Η ασυνάρτητη μεταφορά μαγνήτισης γίνεται κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης και πρέπει να ρυθμίζεται ώστε να παρατηρείται το μέγιστο φαινόμενο NOE. Το πείραμα NOESY χρησιμοποιείται για την παρατήρηση πυρήνων με απόσταση μέχρι $4\text{-}5 \text{ \AA}$ και αποτελεί την κύρια δισδιάστατη τεχνική για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με την εγγύτητα των πρωτονίων σε μακρομόρια και τον ακριβή προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής τους.[3][41][42]

Στο σχήμα 6.10 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό δισδιάστατο φάσμα NOESY.



Σχήμα 6.9: Παλμική ακολουθία πειράματος NOESY. Πηγή: [42]



Σχήμα 6.10: Δισδιάστατο φάσμα NOESY στρυχνίνης σε CDCl_3 . Πηγή: [42]

6.4.1.3 Πείραμα ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy)

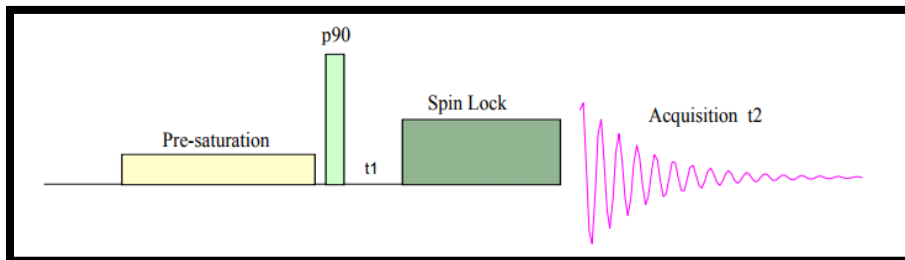
Το πείραμα ROESY, όπως και το πείραμα NOESY, είναι ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα στο οποίο οι διπολικές συζεύξεις γίνονται για πρωτόνια διαχωρισμένα με απόσταση μικρότερη των 5\AA και αφορά τη συσχέτιση πυρήνων ^1H - ^1H . Η μεταφορά του NOE γίνεται σε ένα περιστρεφόμενο πλαίσιο το οποίο οδηγεί σε μία διαφορετική εξάρτηση του προσήμου του ROE από τις κινητικές ιδιότητες του μορίου.[41][42]

Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος ROESY ξεκινάει με μία καθυστέρηση της χαλάρωσης και ακολουθείται από έναν παλμό προ-κορεσμού για την εξάλειψη της μεγάλης κορυφής που εμφανίζεται στο φάσμα από την παρουσία του διαλύτη. Στο τέλος της περιόδου κορεσμού, εφαρμόζεται ένας παλμός 90° ο οποίος μεταφέρει τη μαγνήτιση στον άξονα y και στη συνέχεια, ενεργοποιείται ένα ισχυρό πεδίο RF για τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης, κατά τη διάρκεια της οποίας συμβαίνει ανταλλαγή των spin κατά μήκος του άξονα κλειδώματος περιστροφής (spin lock) (Σχήμα 6.11).[41][42]

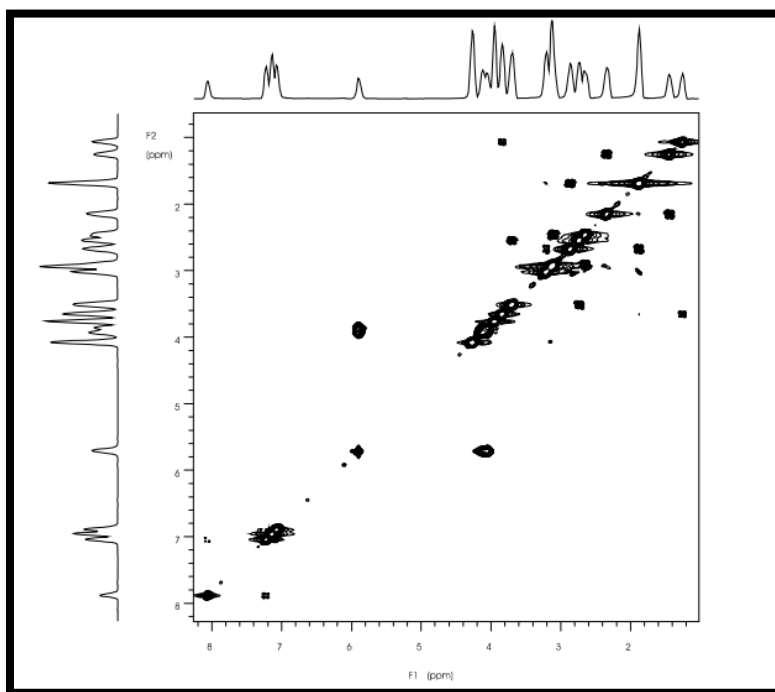
Το φαινόμενο NOE χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της δομής των μορίων. Με ένα φασματογράφο NMR υψηλού πεδίου, η ανίχνευση του NOE με τη διαδικασία NOESY μερικές φορές καθίσταται αρκετά δύσκολη όταν το βάρος του μορίου είναι μεγάλο, δεδομένου ότι το NOE αλλάζει το πρόσημό του ανάλογα με το μοριακό χρόνο συσχετισμού περιστροφής. Όταν για τα μόρια ισχύει η συνθήκη $\omega_0\tau_c = 1$, όπου ω_0 είναι η συχνότητα Larmor, τότε δεν παρατηρείται το φαινόμενο Overhauser. Όταν ισχύει $\omega_0\tau_c > 1$, όπως στην περίπτωση των μακρομορίων, τότε το NOE πλησιάζει την τιμή -1 και η ακρίβεια χάνεται λόγω της διάχυσης των spin. Το πείραμα ROESY χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση αυτών των δυσκολιών αφού το ROE είναι πάντα θετικό και αυξάνεται μονοτονικά με τον όρο $\omega_0\tau_c$. Στο

φάσμα ROESY, οι κορυφές NOE εμφανίζονται σε θετική φάση ενώ οι διαγώνιες κορυφές σε αρνητική. Το πείραμα ROESY χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη μικρών ή μεσαίου μεγέθους μορίων.[41][42]

Στο σχήμα 6.12 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό δισδιάστατο φάσμα ROESY.



Σχήμα 6.11: Παλμική ακολουθία πειράματος ROESY. Πηγή: [42]



Σχήμα 6.12: Δισδιάστατο φάσμα ROESY στρυχνίνης σε CDCl₃. Πηγή: [42]

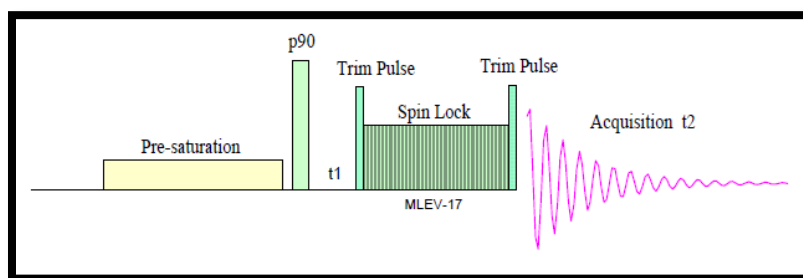
6.4.1.4 Πείραμα TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)

Το πείραμα TOCSY είναι ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα συσχέτισης της μετατόπισης στο οποίο, σε αντίθεση με το COSY, μπορεί να παρατηρηθεί η συσχέτιση μεταξύ ενός spin και όλων των υπολοίπων spin από το ίδιο σύστημα. Όπως και τα προηγούμενα πειράματα, έτσι και το πείραμα TOCSY αφορά τη συσχέτιση πυρήνων ^1H - ^1H . Στο πείραμα TOCSY μία μη επικαλυπτόμενη απορρόφηση μπορεί να είναι αρκετή ώστε να προσδιοριστούν τα spin που αποτελούν μέρη του ίδιου συστήματος spin, ακόμα και αν αυτά συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό με άλλα συστήματα spin.[41][42]

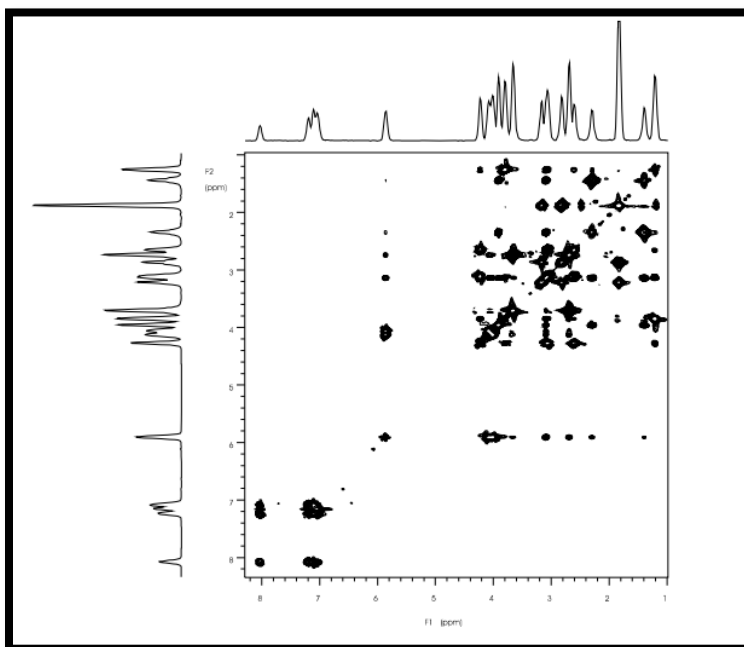
Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος TOCSY αποτελείται από έναν παλμό 90° , τη σύνθετη ακολουθία MLEV-17 (τρεις παλμοί 90° - 180° - 90°) και δύο παλμούς που ρυθμίζονται στα 2-4 ms (trim pulses) και εφαρμόζονται στην αρχή και στο τέλος της ακολουθίας MLEV-17(Σχήμα 6.13).[42]

Το πείραμα TOCSY αποτελεί μία από τις κυριότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την καθιέρωση της συνδεσιμότητας μεταξύ πυρήνων σε κλιμακωτά συζευγμένα συστήματα spin. Ένα πείραμα TOCSY με σύντομη περίοδο ανάμιξης προτιμάται για τη μελέτη μεγαλύτερων μορίων από ένα πείραμα COSY. Για πολύπλοκα μόρια, το φάσμα TOCSY που προκύπτει παρέχει μία αξιόπιστη αναγνώριση των συστημάτων spin η οποία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με άλλες μεθόδους.[41][42]

Στο σχήμα 6.14 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό δισδιάστατο φάσμα TOCSY.



Σχήμα 6.13: Παλμική ακολουθία πειράματος TOCSY. Πηγή: [42]



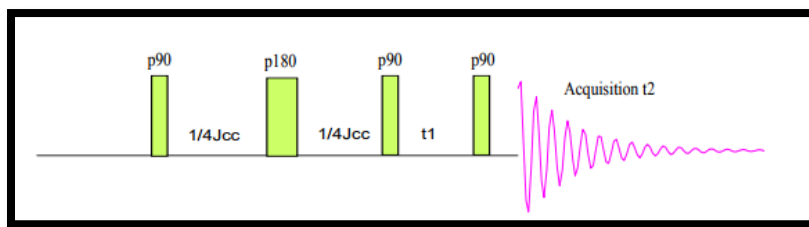
Σχήμα 6.14: Δισδιάστατο φάσμα TOCSY στρυχνίνης σε CDCl_3 . Πηγή: [42]

6.4.1.5 Πείραμα INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment)

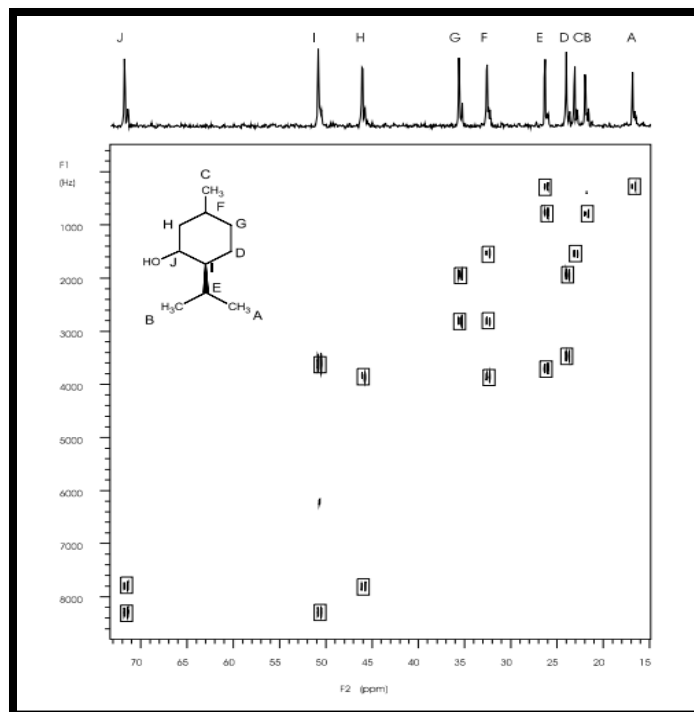
Το πείραμα INADEQUATE είναι ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα το οποίο, όπως και το βασικό πείραμα COSY, παρέχει ομοπυρηνικά φάσματα με συσχέτιση χημικής μετατόπισης. Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος INADEQUATE αποτελείται από έναν παλμό 90° , έναν παλμό 180° και δύο παλμούς 90° (Σχήμα 6.15).[42]

Το πείραμα INADEQUATE χρησιμοποιείται κυρίως για φάσματα με συσχέτιση πυρήνων ^{13}C - ^{13}C , σε μόρια με φυσική αφθονία ^{13}C . Με δεδομένο ότι ο άνθρακας βρίσκεται σε φυσική αφθονία σε ποσοστό μόνο 1.1%, η πιθανότητα ύπαρξης δύο πυρήνων ^{13}C άμεσα συνδεδεμένων μεταξύ τους είναι 1/10000. Παρόλα αυτά, με αρκετή ποσότητα δείγματος είναι δυνατόν να αποκτηθούν οι απαραίτητες πληροφορίες. Η ονομασία του πειράματος παραπέμπει ακριβώς σε αυτή την ιδιαιτερότητα της συγκεκριμένης μεθόδου, ότι είναι απίστευτο πώς η φυσική αφθονία πυρήνων ^{13}C μπορεί να παράγει τα απαραίτητα σήματα που προέρχονται από τη μεταφορά της πόλωσης μέσω μίας διαδικασίας διπλού κβαντισμού. Το πείραμα είναι πολύ ισχυρό και χρήσιμο για ενώσεις στις οποίες η πυκνότητα των πρωτονίων είναι χαμηλή.[3][41]

Στο σχήμα 6.16 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό δισδιάστατο φάσμα INADEQUATE.



Σχήμα 6.15: Παλμική ακολουθία πειράματος INADEQUATE. J_{CC} είναι η σταθερά σύζευξης των spin μεταξύ πυρήνων ^{13}C - ^{13}C . Πηγή: [42]



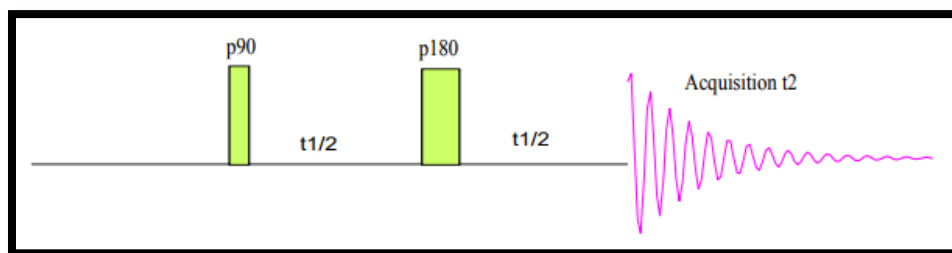
Σχήμα 6.16: Δισδιάστατο φάσμα INADEQUATE μενθόλης σε C_6D_6 . Πηγή: [42]

6.4.1.6 Πείραμα J-Resolved

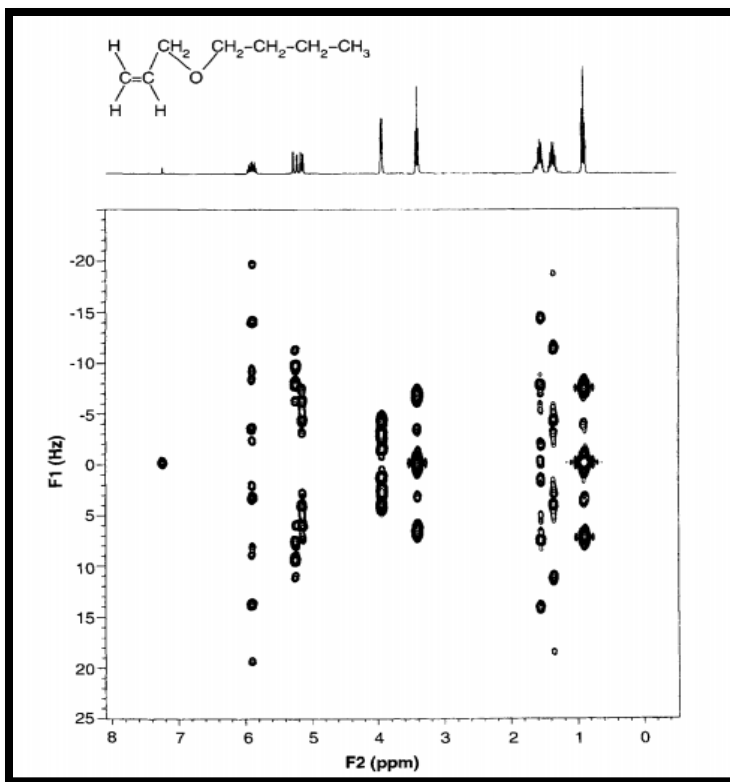
Το πείραμα J-Resolved είναι ένα ομοπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενός δισδιάστατου φάσματος που διαχωρίζει τις χημικές μετατοπίσεις από τις συζεύξεις που σχετίζονται με το spin και αφορά κυρίως τη συσχέτιση πυρήνων 1H - 1H . Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του είναι αρκετά απλή και αποτελείται από έναν παλμό 90° και έναν παλμό 180° (Σχήμα 6.17).[3][42]

Το πείραμα J-Resolved παρέχει διαφορετικού είδους πληροφορίες κατά μήκος κάθε άξονα, αφού ο ένας άξονας περιέχει πληροφορίες για τις συνιστώσες των συζεύξεων J ενώ ο άλλος άξονας για τις χημικές μετατοπίσεις. Το χαρακτηριστικό αυτό έχει καταστήσει το συγκεκριμένο πείραμα ιδιαίτερα χρήσιμο για την επεξεργασία φασμάτων με αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές.[3][42]

Στο σχήμα 6.18 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό δισδιάστατο φάσμα J-Resolved.



Σχήμα 6.17: Παλμική ακολουθία για τη διεξαγωγή πειράματος J-Resolved. Πηγή: [42]



Σχήμα 6.18: J-Resolved φάσμα ^1H (300 MHz) αλκυλοβουτυλαιθέρα σε CDCl_3 . Στον άξονα F_1 φαίνονται οι συζεύξεις ^1H - ^1H σε Hz και στον άξονα F_2 οι χημικές μετατοπίσεις σε ppm. Στο πάνω μέρος παρουσιάζεται και το μονοδιάστατο ^1H φάσμα. Πηγή: [3]

6.4.2 Ετεροπυρηνικά πειράματα

6.4.2.1 Πείραμα HETCOR (Heteronuclear Correlation Spectroscopy)

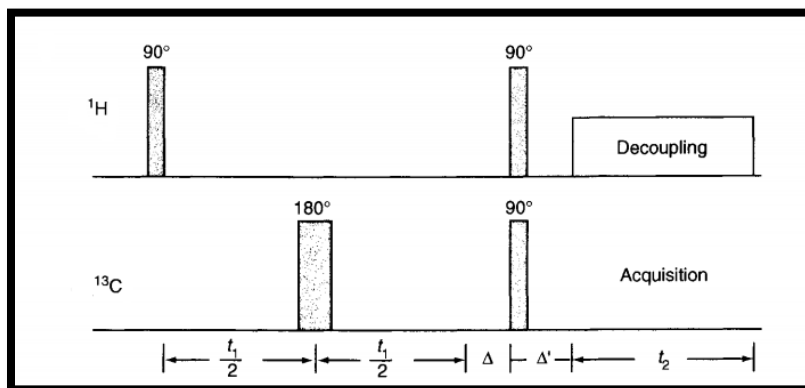
Το πείραμα HETCOR είναι ένα ετεροπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα ανάλογο του ομοπυρηνικού πειράματος COSY, στο οποίο οι δύο πυρήνες που παρατηρούνται διαθέτουν διαφορετικές συχνότητες Larmor. Εξ' αιτίας αυτής της ιδιότητάς του, γίνεται συχνά αναφορά σε αυτό ως H, X-COSY, όπου το X μπορεί να αναφέρεται στους πυρήνες ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P κ.ο.κ.[42]

Η διεξαγωγή του πειράματος HETCOR γίνεται με τις εξής παλμικές ακολουθίες. Η περίοδος εξέλιξης αρχίζει με τον ^1H παλμό 90° ο οποίος ακολουθείται στη συνέχεια από τον ^{13}C παλμό 180° . Όπως συμβαίνει και στο πείραμα COSY, η διαδικασία ανάμιξης προκύπτει ως αποτέλεσμα της ταυτόχρονης εφαρμογής των ^1H και ^{13}C παλμών 90° . Ο χρόνος καθυστέρησης Δ ακριβώς πριν τους παλμούς ανάμιξης επιτρέπει στην πόλωση των πρωτονίων να μεταφερθεί στους πυρήνες ^{13}C κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάμιξης. Ο ^{13}C παλμός 180° στη μέση της περιόδου εξέλιξης οδηγεί στην αποτελεσματική αποσύζευξη των spin, όπως φαίνεται στο σχήμα 6.19 που ακολουθεί.[3]

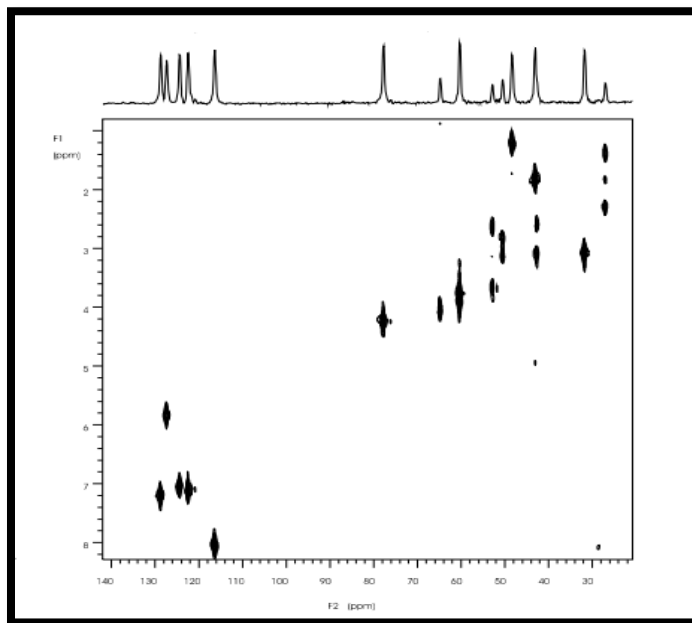
Το πείραμα HETCOR χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της συσχέτισης των χημικών μετατοπίσεων των X-πυρήνων με τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων που είναι συζευγμένα

με τους X-πυρήνες και συγκεκριμένα για τη συσχέτιση των συχνοτήτων συντονισμού των πυρήνων ^1H και ^{13}C . [3][42]

Στο σχήμα 6.20 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό δισδιάστατο φάσμα HETCOR.



Σχήμα 6.19: Παλμική ακολουθία πειράματος HETCOR. Πηγή: [3]



Σχήμα 6.20: Δισδιάστατο φάσμα HETCOR στρυχνίνης σε CDCl_3 . Πηγή: [42]

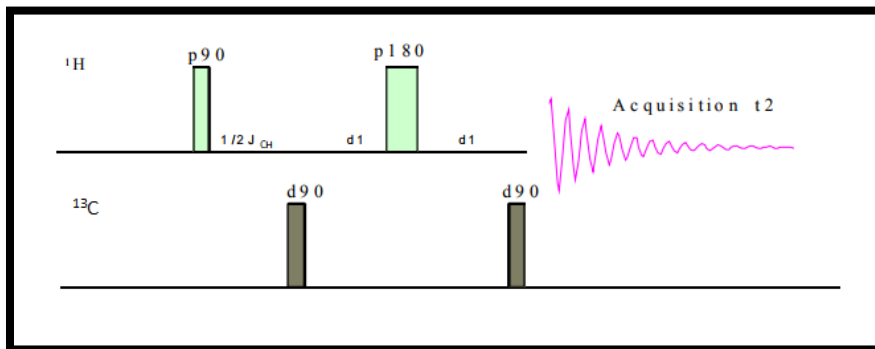
6.4.2.2 Πείραμα HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)

Το πείραμα HMQC είναι ένα ετεροπυρηνικό δισδιάστατο πείραμα το οποίο παράγει φάσματα με σκοπό τον προσδιορισμό μη ευαίσθητων πυρήνων όπως οι ^{13}C και ^{15}N , υποδεικνύοντας τη συσχέτιση μεταξύ διαφορετικών πυρήνων κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης πρωτονίων με τα οποία είναι συζευγμένοι. [42]

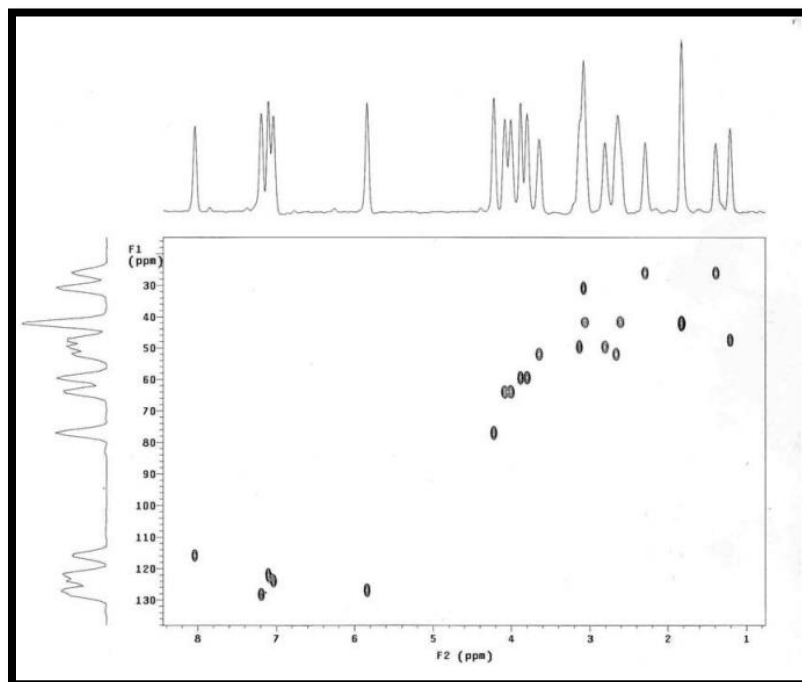
Η παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή του πειράματος HMQC αποτελείται από έναν παλμό 90° και έναν παλμό 180° (Σχήμα 6.21). Ο σκοπός του πειράματος είναι η εξάλειψη των σημάτων των πρωτονίων που είναι συνδεδεμένα στους πυρήνες ^{12}C ,

αφήνοντας μόνο τα σήματα των συνδεδεμένων πρωτονίων στους πυρήνες ^{13}C να συνεισφέρουν στην παραγωγή ενός φάσματος συσχέτισης χημικής μετατόπισης ^{13}C - ^1H . [42]

Στο σχήμα 6.22 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό διδιάστατο φάσμα HMQC ενώ στον πίνακα 6.2 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των προαναφερθέντων διδιάστατων πειραμάτων.



Σχήμα 6.21: Παλμική ακολουθία πειράματος HMQC. J_{CH} είναι η σταθερά σύζευξης μεταξύ των πυρήνων ^1H - ^{13}C . Πηγή: [42]



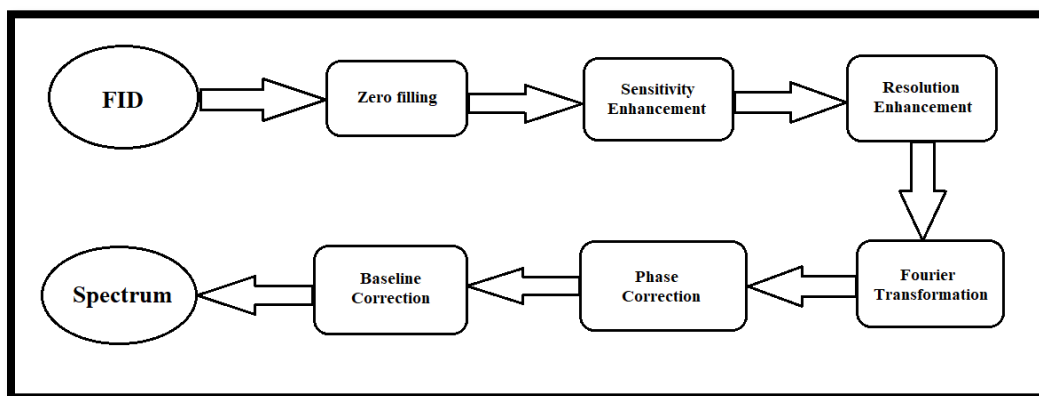
Σχήμα 6.22: Διδιάστατο φάσμα HMQC στρυχνίνης σε CDCl_3 . Πηγή: [42]

Πίνακας 6.2: Σύνοψη βασικών χαρακτηριστικών των δισδιάστατων πειραμάτων NMR που παρουσιάστηκαν στο παρόν κεφάλαιο

Ονομασία πειράματος	Κατηγορία πειράματος	Παλμική ακολουθία	Χρήση
COSY	Ομοπυρηνικό	Δύο παλμοί 90°	Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο δισδιάστατο πείραμα για την απόκτηση πληροφοριών σύζευξης
NOESY	Ομοπυρηνικό	Τρεις παλμοί 90°	Προσδιορισμός τρισδιάστατης δομής μακρομορίων
ROESY	Ομοπυρηνικό	Δύο παλμοί: ένας 90° και ένας παλμός spin-lock	Μελέτη μικρών η μεσαίου μεγέθους μορίων
TOCSY	Ομοπυρηνικό	Ένας παλμός 90°, δύο trim pulses (2-4 ms) και η ακολουθία MLEV-17	Αξιόπιστη αναγνώριση συστημάτων spin πολύπλοκων μορίων
INADEQUATE	Ομοπυρηνικό	Τέσσερις παλμοί: Ένας 90°, ένας 180° και δύο 90°	Μελέτη ενώσεων με χαμηλή πυκνότητα πρωτονίων
J-RESOLVED	Ομοπυρηνικό	Δύο παλμοί: ένας 90° και ένας 180°	Επεξεργασία φασμάτων με αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές
HETCOR	Ετεροπυρηνικό	¹ H: Δύο παλμοί 90° ¹³ C: Δύο παλμοί, ένας 180° και ένας 90°	Συσχέτιση συχνοτήτων συντονισμού των πυρήνων ¹ H και ¹³ C
HMQC	Ετεροπυρηνικό	¹ H: Δύο παλμοί, ένας 90° και ένας 180° ¹³ C: Δύο παλμοί 90°	Προσδιορισμός μη ευαίσθητων πυρήνων όπως ο ¹³ C

7. Επεξεργασία Πειραματικών Δεδομένων

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή του τέταρτου κεφαλαίου, καθώς οι πυρήνες του δείγματος που μελετάται επανέρχονται στην κατάσταση ισορροπίας τους, εκπέμπονται ραδιοκύματα τα οποία συλλέγονται ως *Ελευθέρως Φθίνουσες Επαγωγές (FIDs)* στο πεδίο του χρόνου. Προκειμένου να συλλεχθούν οι απαραίτητες πληροφορίες για το δείγμα, πρέπει οι επαγωγές να μεταφερθούν στο πεδίο της συχνότητας με μετασχηματισμό Fourier και στη συνέχεια τα δεδομένα υπόκεινται σε ειδικές μεθόδους επεξεργασίας ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για το δείγμα που μελετάται (Σχήμα 7.1).



Σχήμα 7.1: Σχεδιάγραμμα των σταδίων της επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων μέχρι τη λήψη του τελικού φάσματος το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων του δείγματος που μελετάται.

7.1 Ελευθέρως Φθίνουσα Επαγωγή (FID)

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.6, η μαγνήτιση ξεκινάει από τον άξονα x και οι συνιστώσες της δίνονται από τις εξισώσεις (2.6.4),(2.6.5).

$$\begin{aligned}M_x &= M_0 \cos \Omega t \\M_y &= M_0 \sin \Omega t\end{aligned}$$

Το σήμα στο πεδίο του χρόνου που ανιχνεύεται είναι ανάλογο με τις συνιστώσες της μαγνήτισης και δίνεται από τις εξισώσεις (2.6.6),(2.6.7).

$$\begin{aligned}S_x(t) &= S_0 \cos \Omega t \\S_y(t) &= S_0 \sin \Omega t\end{aligned}$$

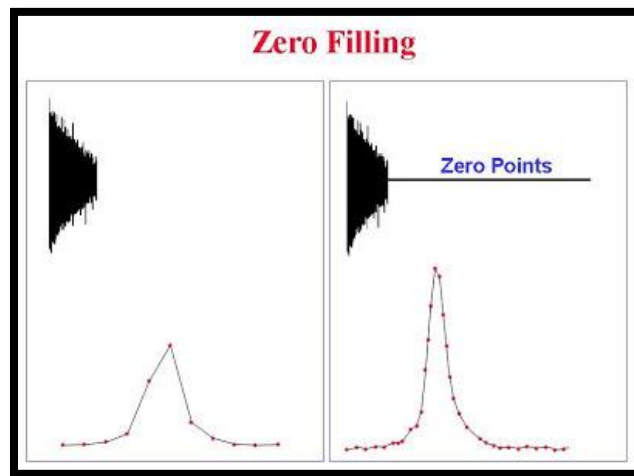
όπου $S_x(t)$ και $S_y(t)$ το πραγματικό και το φανταστικό μέρος, αντίστοιχα, του σήματος στο πεδίο του χρόνου.

Το σήμα δίνεται τελικά από την εξίσωση (2.6.8). [2]

$$S(t) = S_x(t) + iS_y(t) = S_0 \cos \Omega t + iS_0 \sin \Omega t = S_0 e^{i\Omega t}$$

7.2 Προσθήκη μηδενικών

Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων αφορά την προσθήκη μηδενικών στο ψηφιοποιημένο σήμα FID με σκοπό τη λήψη επιπρόσθετων σημείων δεδομένων. Αφού καταγραφεί το σήμα Ελευθέρως Φθίνουσας Επαγωγής (FID), πρέπει να μετατραπεί σε ψηφιακή μορφή ώστε να μπορεί να αποθηκευτεί στη μνήμη του υπολογιστή πριν υποβληθεί σε περαιτέρω επεξεργασία. Το αναλογικό σήμα μετατρέπεται σε ένα σύνολο σημείων δεδομένων. Η προσθήκη τόσων μηδενικών όσα είναι τα πειραματικά σημεία δεδομένων ονομάζεται «one zero filling» και είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας ανακτώνται πληροφορίες οι οποίες θα είχαν χαθεί με την απόρριψη του φανταστικού φάσματος. Η προσθήκη διπλάσιων μηδενικών από τον αριθμό των σημείων δεδομένων ονομάζεται «two zero filling» κ.ο.κ. Τα επιπλέον σύνολα μηδενικών δεν προσθέτουν καινούριες πληροφορίες, αντιθέτως βελτιώνουν την εμφάνιση του φάσματος ώστε οι γραμμές να είναι καλύτερα καθορισμένες (Σχήμα 7.2).[3][8]



Σχήμα 7.2: Προσθήκη μηδενικών στο αρχικό σήμα με σκοπό την αύξηση της ψηφιακής του ανάλυσης. Πηγή: [43]

7.3 Βελτίωση ευαισθησίας

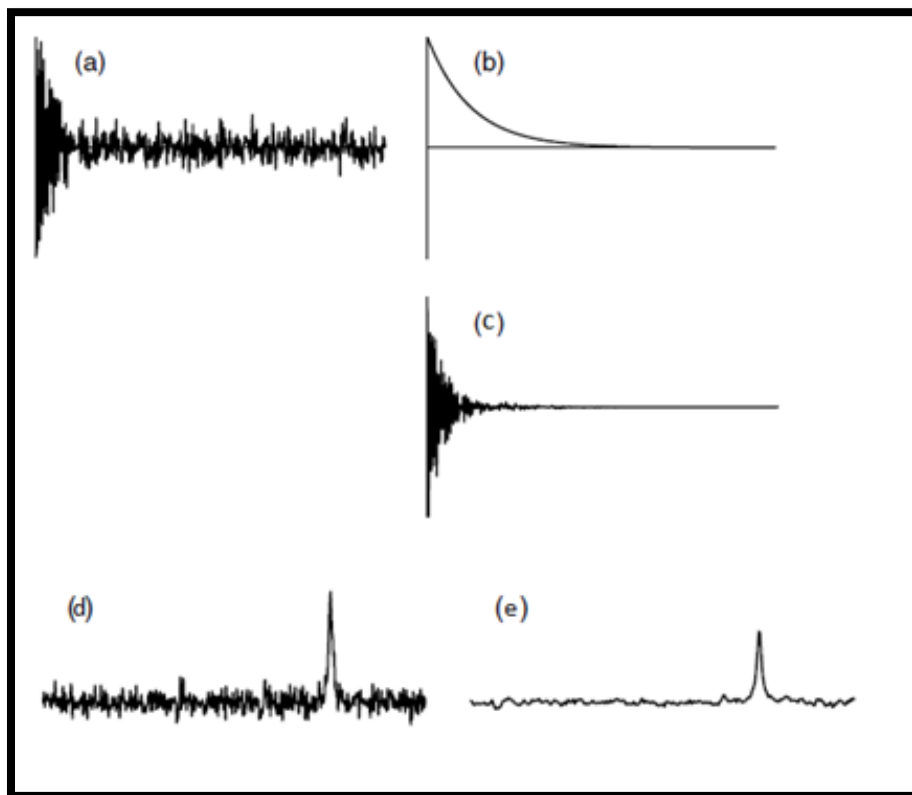
Το δεύτερο στάδιο επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων αφορά τη διατήρηση του αρχικού μέρους του σήματος FID που περιέχει τις περισσότερες πληροφορίες με σκοπό τη βελτίωση του λόγου SNR και κατ' επέκταση της ευαισθησίας του σήματος. Το σήμα φθίνει ως συνάρτηση του χρόνου και, επομένως, γίνεται όλο και πιο αδύναμο, σε αντίθεση με τον καταγραφόμενο θόρυβο που παραμένει σταθερός. Επομένως, τα σημεία δεδομένων στην αρχή του FID συμβάλλουν περισσότερο στην ένταση του συντονισμού από τα σημεία που βρίσκονται κοντά στο τέλος του FID. Ο διαχωρισμός των σημείων προς το τέλος του σήματος που έχουν χαμηλό λόγο SNR, χωρίς να γίνει απότομη περικοπή του FID, επιτυγχάνεται είτε μειώνοντας το χρόνο απόκτησης του σήματος (acquisition time), είτε με τη χρήση ενός εκθετικού φίλτρου το οποίο πολλαπλασιάζεται με το σήμα $S(t)$ και δίνεται από την εξίσωση (7.3.1).

$$q(t) = \exp(-t/T_L) \quad (7.3.1)$$

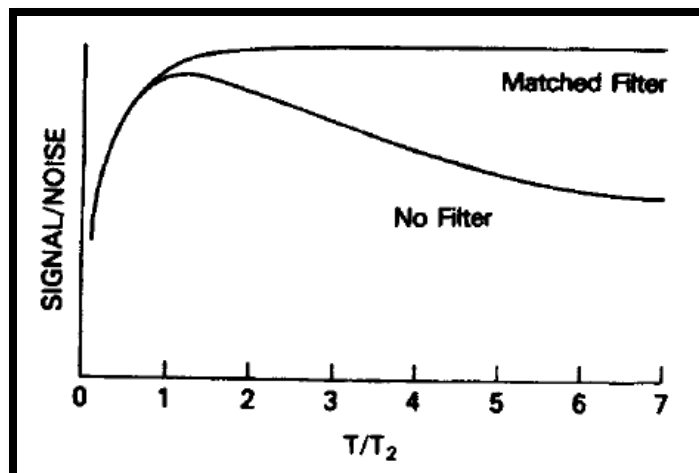
όπου το T_L είναι μία σταθερά ρυθμού η οποία επιλέγεται αυθαίρετα (Σχήμα 7.3).[3][8]

Όσο πιο γρήγορος είναι ο ρυθμός απόσβεσης του $q(t)$, τόσο μειώνεται ο θόρυβος στο τέλος του FID συμβάλλοντας στην αύξηση του λόγου SNR, αλλά ταυτόχρονα τόσο διευρύνονται οι φασματικές γραμμές συμβάλλοντας στη μείωση του λόγου SNR. Για την απόκτηση του βέλτιστου λόγου SNR επιλέγεται ως σταθερά του φίλτρου $T_L = T_2$ και το φίλτρο που εφαρμόζεται ονομάζεται *matched filter* (Σχήμα 7.4). Το σήμα μετά την εφαρμογή του φίλτρου αναπαριστάται από την εξίσωση (7.3.2).[3][8]

$$S'(t) = S(t)q(t) = S_0 \exp(i\Omega t) \exp(-t/T_2) \quad (7.3.2)$$



Σχήμα 7.3: (a) Αρχικό σήμα FID $S(t)$. (b) Εκθετικό φίλτρο $q(t)$. (c) Σήμα $S'(t)=S(t)q(t)$. (d) Το φάσμα που προκύπτει μέσω του μετασχηματισμού Fourier από το αρχικό σήμα FID (a). (e) Το φάσμα που προκύπτει μέσω του μετασχηματισμού Fourier από το πολλαπλασιασμένο με το εκθετικό φίλτρο σήμα (c). Είναι φανερή η βελτίωση του λόγου SNR στο φάσμα (e) σε σχέση με το φάσμα (d). Πηγή: [8]

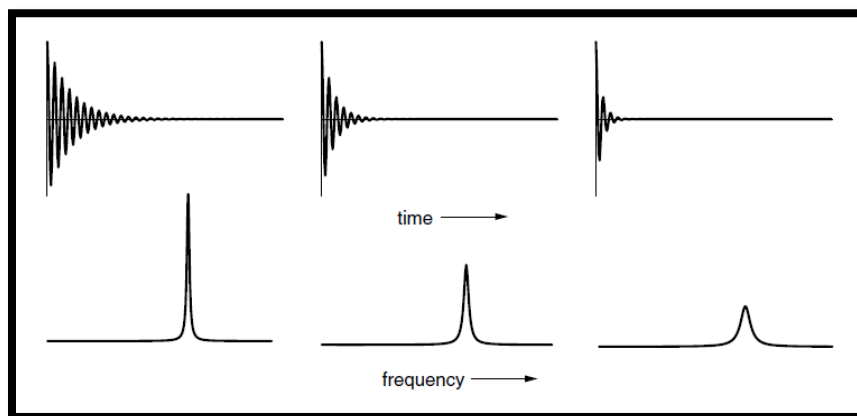


Σχήμα 7.4: Συνάρτηση του λόγου SNR με το χρόνο λήψης με και χωρίς την παρουσία του matched filter. Πηγή: [3]

7.4 Βελτίωση ανάλυσης

Το επόμενο στάδιο επεξεργασίας των πειραματικών δεδομένων αφορά τη μείωση του ρυθμού απόσβεσης του σήματος FID με σκοπό τον περιορισμό του πλάτους των φασματικών γραμμών και κατ' επέκταση τη βελτίωση της ανάλυσης του φάσματος NMR. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 7.3, όσο πιο γρήγορα φθίνει το σήμα τόσο περισσότερο διευρύνονται οι φασματικές γραμμές, φαινόμενο που απεικονίζεται στο σχήμα 7.5. Για τη μείωση του εύρους των φασματικών γραμμών, χρησιμοποιείται ένα εκθετικό φίλτρο το οποίο πολλαπλασιάζεται με το σήμα FID και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου σύμφωνα με την εξίσωση (7.4.1), όπου T_L μία σταθερά που επιλέγεται αυθαίρετα και για την οποία ισχύει $T_L > 0$. [3][8]

$$q_1(t) = \exp(+t/T_L) \quad (7.4.1)$$

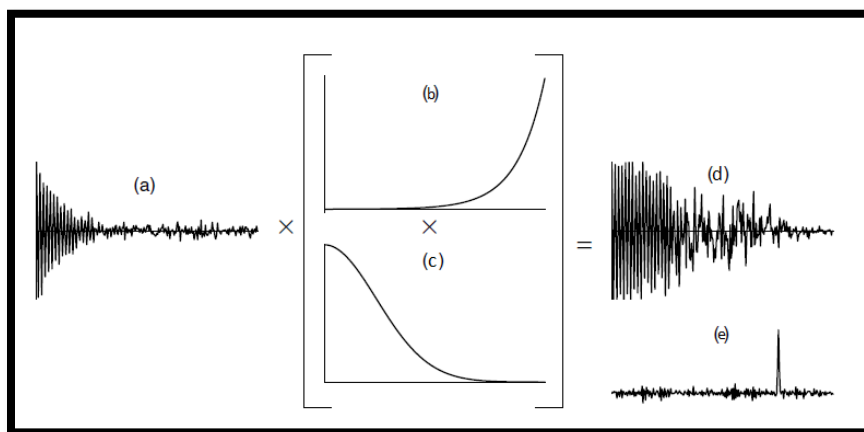


Σχήμα 7.5: Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ του ρυθμού απόσβεσης και της μορφής των φασματικών κορυφών. Όσο πιο μεγάλος ο ρυθμός απόσβεσης του σήματος, τόσο πιο ευρείες οι φασματικές γραμμές στο αντίστοιχο φάσμα. Πηγή: [8]

Η χρήση του συγκεκριμένου φίλτρου, όμως, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του θορύβου που καταγράφεται στο τέλος του FID και κατ' επέκταση τη μείωση του λόγου SNR. Είναι απαραίτητη, λοιπόν, η χρήση ενός δεύτερου φθίνοντος εκθετικού φίλτρου, με σκοπό την

περικοπή του θορύβου στο τέλος του FID, το οποίο φθίνει αργά στο μεγαλύτερο μέρος του σήματος και πολύ γρήγορα προς το τέλος. Η πιο συχνή επιλογή για το συγκεκριμένο φίλτρο είναι η Γκαουσιανή συνάρτηση σύμφωνα με την εξίσωση (7.4.2), όπου a η παράμετρος που καθορίζει το ρυθμό απόσβεσης. Όσο μεγαλύτερο το a , τόσο μεγαλύτερος είναι και ο ρυθμός απόσβεσης (Σχήμα 7.6).[3][8]:

$$q_2(t) = \exp(-at^2) \quad (7.4.2)$$



Σχήμα 7.6: Το αρχικό σήμα FID (a) πολλαπλασιάζεται με το αύξον εκθετικό φίλτρο (b) και τη φθίνουσα Γκαουσιανή συνάρτηση (c) και λαμβάνεται το σήμα (d) στο πεδίο του χρόνου, στο οποίο φαίνεται η μείωση του θορύβου προς το τέλος του. Η χρήση του μετασχηματισμού Fourier στο σήμα (d) δίνει το σήμα (e) στο πεδίο της συχνότητας. Πηγή: [8]

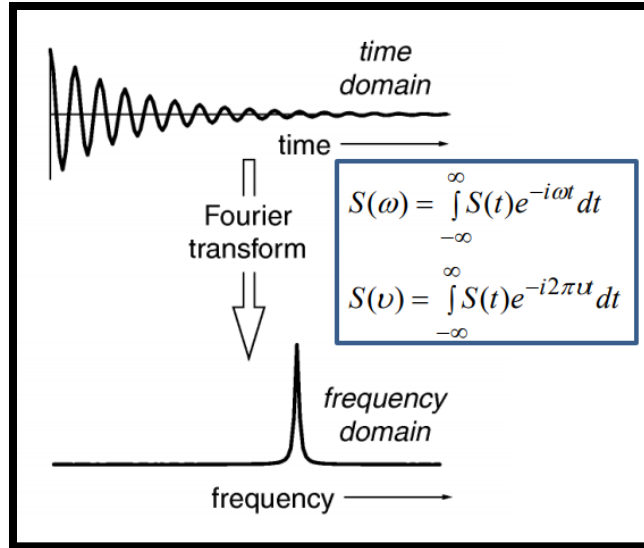
Τέλος, ένα χρήσιμο φίλτρο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της ανάλυσης του σήματος βασίζεται στη διαφορά μεταξύ δύο επεξεργασμένων φασμάτων, A και B και δίνεται από τον τύπο:

$$q(t) = \exp(-t/T_A) - k \exp(-t/T_B) \quad (7.4.3)$$

Η χρονική σταθερά T_A επιλέγεται να είναι αρνητική, προσδίδοντας σχετικά στενές φασματικές γραμμές στο φάσμα A, ενώ η σταθερά T_B είναι αρκετά μικρή ώστε να συμβάλλει στη διεύρυνση των φασματικών κορυφών στο φάσμα B. Ένα τμήμα k ($k \approx 0.5 - 1$) του φάσματος B αφαιρείται τότε από το φάσμα A, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα φάσμα με βελτιωμένη ανάλυση. Το συγκεκριμένο φίλτρο χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την απομάκρυνση ευρείων κορυφών από φάσματα που περιέχουν σήματα χαμηλής έντασης.[3]

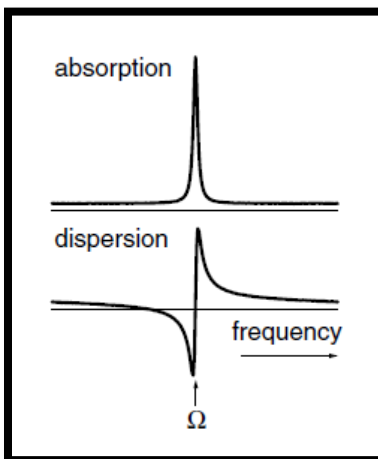
7.5 Μετασχηματισμός Fourier

Προκειμένου να εξαχθούν οι κατάλληλες πληροφορίες από το σήμα $S(t)$, πρέπει να μετατραπεί, από το πεδίο του χρόνου στο οποίο λαμβάνεται, στο πεδίο της συχνότητας. Αυτή η μετατροπή γίνεται μέσω του μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transformation) (Σχήμα 7.7).



Σχήμα 7.7: Μετατροπή από το πεδίο του χρόνου μέσω του μετασχηματισμού Fourier του σήματος $S(t)$ στο φάσμα $S(\omega)$ στο πεδίο της συχνότητας το οποίο μετριέται είτε σε rad/s είτε σε Hz. Πηγή: [44]

Όπως το σήμα $S(t)$ αποτελείται από το πραγματικό και το φανταστικό του μέρος, (παράγραφος 7.1), έτσι και το αντίστοιχο φάσμα $S(\omega)$ αποτελείται από το πραγματικό μέρος $S_x(\omega)$, το οποίο προσδίδει τη γραμμή που καλείται *absorption mode line*, και το φανταστικό μέρος $S_y(\omega)$, το οποίο προσδίδει τη γραμμή που καλείται *dispersion mode line*. Το πραγματικό μέρος $S_x(\omega)$ λαμβάνει μόνο θετικές τιμές ενώ το φανταστικό μέρος $S_y(\omega)$ λαμβάνει και θετικές και αρνητικές τιμές (Σχήμα 7.8), οι οποίες, όμως, ενδέχεται να αλληλοακυρωθούν σε ένα πολύπλοκο φάσμα με αποτέλεσμα το φανταστικό μέρος του φάσματος να μην χρησιμοποιείται.[8][44]

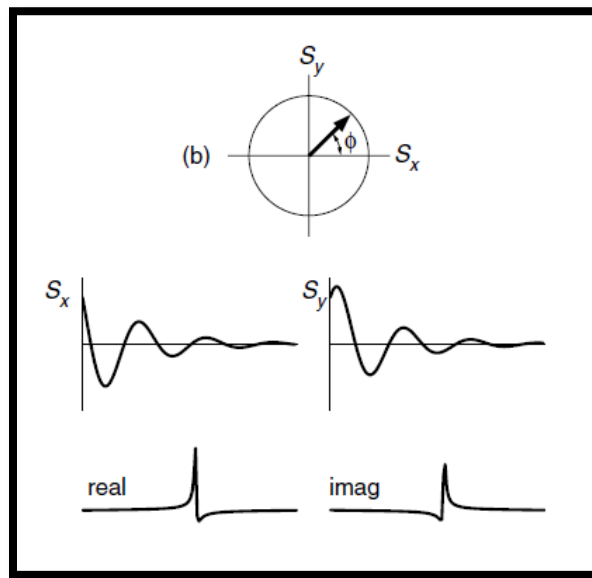


Σχήμα 7.8: Αναπαράσταση του πραγματικού και φανταστικού μέρους του φάσματος $S(\omega)$. Πηγή: [8]

7.6 Διόρθωση φάσης

Το φάσμα NMR πρέπει να βρίσκεται σε μορφή πλήρους απορρόφησης (pure absorption mode) με σκοπό την καλύτερη δυνατή ανάλυση του φάσματος. Από τις σχέσεις (2.6.6),(2.6.7) φαίνεται πως τη χρονική στιγμή $t = 0$, δηλαδή τη χρονική στιγμή έναρξης της λήψης του FID, το πραγματικό μέρος του σήματος $S(t)$ αναμένεται να λάβει τη μέγιστη τιμή ενώ το φανταστικό του μέρος αναμένεται να μηδενιστεί. Παρόλα αυτά, ενδέχεται αυτό να μη συμβαίνει πάντα (Σχήμα 7.9). Σε αυτή την περίπτωση, λέγεται ότι η φάση του σήματος έχει μετατοπιστεί ή ότι έχει προκύψει *σφάλμα φάσης* και το σήμα μπορεί να αναπαρασταθεί με την εξίσωση (7.6.1).[3][8]

$$S(t) = S_0 \exp(i\varphi) \exp(i\Omega t) \exp(-t/T_2) \quad (7.6.1)$$



Σχήμα 7.9: Μετατόπιση της φάσης του σήματος, φ , κατά 45° που προκαλεί ανάμιξη της απορρόφησης (absorption) και της διασποράς (dispersion) στο πραγματικό και φανταστικό μέρος του φάσματος. Πηγή: [8]

Για την επαναφορά του φάσματος στη μορφή πλήρους απορρόφησης, μπορεί να εφαρμοστεί *διόρθωση φάσης* (phase correction) είτε στο σήμα $S(t)$ είτε στο φάσμα $S(\omega)$. Στο πεδίο του χρόνου, το σήμα $S(t)$ πολλαπλασιάζεται με τον όρο $\exp(i\varphi_{corr})$ και προκύπτει η παρακάτω εξίσωση:

$$\begin{aligned} \exp(i\varphi_{corr}) S(t) &= \exp(i\varphi_{corr}) \times [S_0 \exp(i\varphi) \exp(i\Omega t) \exp(-t/T_2)] \\ &= \exp(i(\varphi_{corr} + \varphi)) [S_0 \exp(i\Omega t) \exp(-t/T_2)] \end{aligned} \quad (7.6.2)$$

Θέτοντας $\varphi_{corr} = -\varphi$, το σήμα στο πεδίο του χρόνου γίνεται:

$$\exp(i\varphi_{corr}) S(t) = S_0 \exp(i\Omega t) \exp(-t/T_2) \quad (7.6.3)$$

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο, που ονομάζεται *διόρθωση φάσης μηδενικής τάξης*, δεν υπάρχει πλέον μετατόπιση φάσης και το φάσμα που προκύπτει περιλαμβάνει μόνο το πραγματικό μέρος το οποίο προσφέρει την επιθυμητή γραμμή απορρόφησης.[3][8]

Στο πεδίο της συχνότητας, δεδομένου ότι το πραγματικό (R) και το φανταστικό (I) μέρος του φάσματος πάντα έχουν ακριβώς μία διαφορά φάσης 90° μεταξύ τους σε κάθε συχνότητα συντονισμού, είναι εύκολο να δημιουργηθεί ένα φάσμα πλήρους απορρόφησης X(ω) (εξίσωση (7.6.4) και ένα φάσμα πλήρους διασποράς Y(ω) (εξίσωση (7.6.5).

$$X(\omega) = \cos(\varphi - \varphi_{rf}) R[F(\omega)] - \sin(\varphi - \varphi_{rf}) I[F(\omega)] \quad (7.6.4)$$

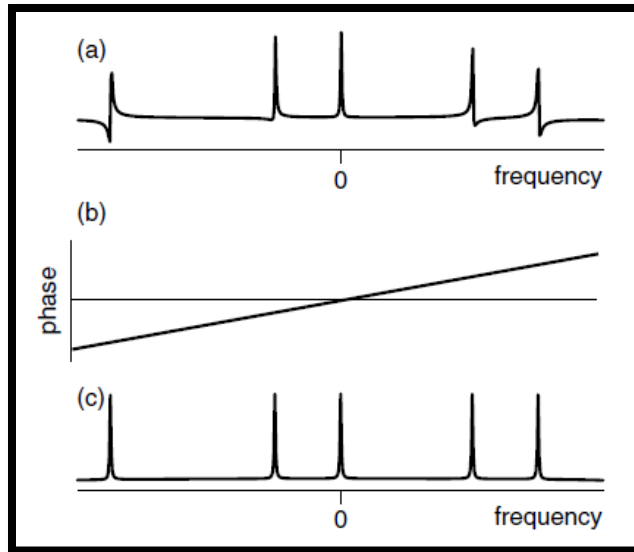
$$Y(\omega) = \sin(\varphi - \varphi_{rf}) R[F(\omega)] + \cos(\varphi - \varphi_{rf}) I[F(\omega)] \quad (7.6.5)$$

όπου φ_{rf} η συχνότητα του ραδιοπαλμού.[3][8]

Η διαδικασία της διόρθωσης φάσης στο φάσμα αποτελείται από την επιλογή των συντελεστών του πραγματικού και του φανταστικού μέρους για τη βελτιστοποίηση της εμφάνισης του συνολικού φάσματος, είτε με χειροκίνητη ρύθμιση είτε με την εφαρμογή συγκεκριμένου αλγορίθμου.[3][8]

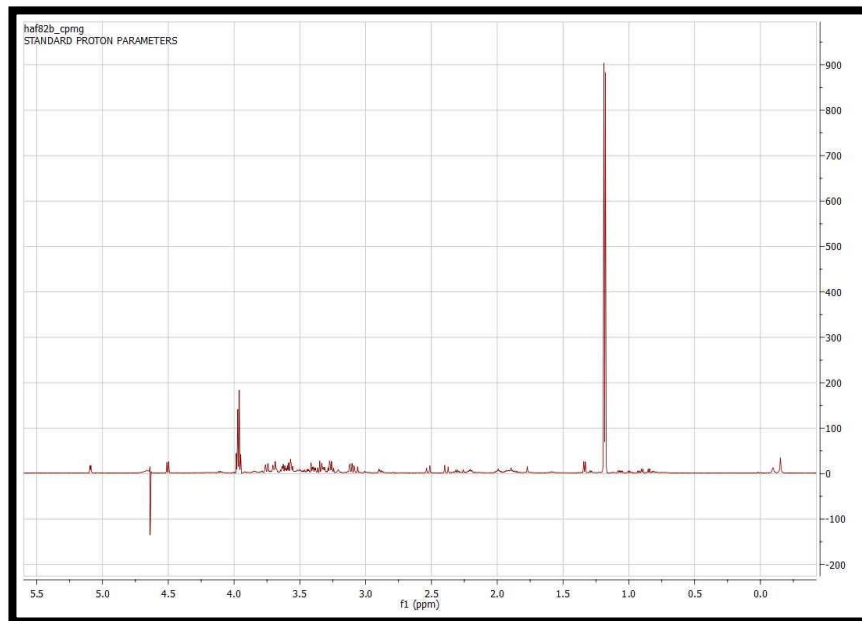
Στην περίπτωση που η μετατόπιση φάσης μεταβάλλεται με τη συχνότητα εφαρμόζεται η μέθοδος διόρθωσης φάσης *πρώτης τάξης*, η οποία εξαρτάται από τη συχνότητα (Σχήμα 7.10). Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μεταβάλλεται το ποσοστό αλλαγής της φάσης με τη συχνότητα μέχρι το φάσμα να λάβει την επιθυμητή του μορφή. Πρακτικά, για να γίνει σωστά η διόρθωση φάσης σε οποιοδήποτε φάσμα NMR απαιτείται επανάληψη διορθώσεων μηδενικής και πρώτης τάξης.[3][8]

Στο Σχήμα 7.11 που ακολουθεί φαίνονται τα στάδια διόρθωσης φάσης ενός φάσματος από τη βάση δεδομένων Metabolights με τη χρήση του προγράμματος mNova.

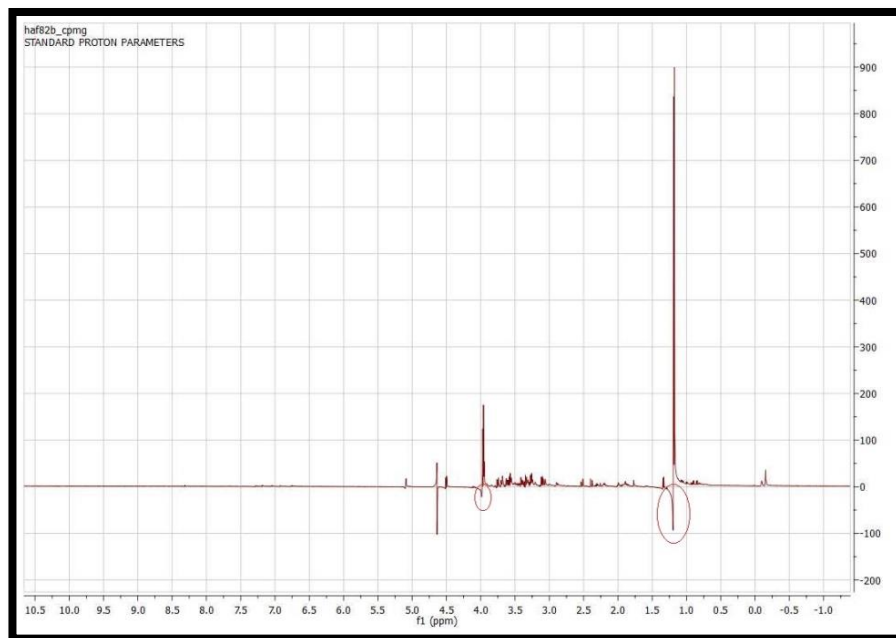


Σχήμα 7.10: Αναπαράσταση διόρθωσης φάσης πρώτης τάξης. Στο φάσμα (a) η κορυφή στη συχνότητα 0 βρίσκεται σε πλήρη απορρόφηση, αλλά όσο αυξάνεται η μετατόπιση των άλλων κορυφών αυξάνεται και το σφάλμα της φάσης τους. (b) Γραμμική συνάρτηση με κατάλληλη κλίση με σκοπό τη διόρθωση της φάσης για όλες τις φασματικές κορυφές. (c) Το βελτιωμένο φάσμα που προκύπτει μετά τη διόρθωση φάσης στο φάσμα (a). Πηγή: [8]

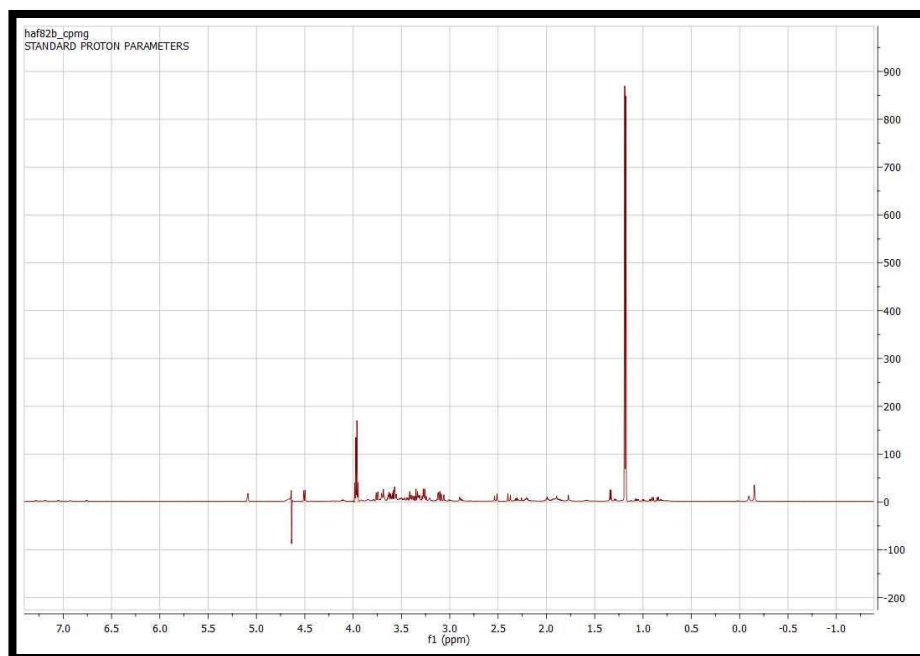
(a)



(β)



(γ)



Σχήμα 7.11: (α) Φάσμα δείγματος αμνιακού υγρού (human amniotic fluid) με ονομασία haf82b από τη βάση δεδομένων Metabolights. (β) Φάσμα του δείγματος haf82b μετά την αυτόματη διόρθωση φάσης μέσω του προγράμματος mNona. Είναι σημειωμένες οι γραμμές dispersion που υποδεικνύουν ότι το φάσμα δεν βρίσκεται στην επιθυμητή μορφή πλήρους απορρόφησης. (γ) Διορθωμένο φάσμα του δείγματος haf82b στο οποίο, μετά από επανειλημμένες χειροκίνητες διορθώσεις μηδενικής και πρώτης τάξης μέσω του προγράμματος mNona, δεν εμφανίζονται πια οι ανεπιθύμητες γραμμές και το φάσμα βρίσκεται σε μορφή πλήρους απορρόφησης.

7.7 Διόρθωση βασικής γραμμής

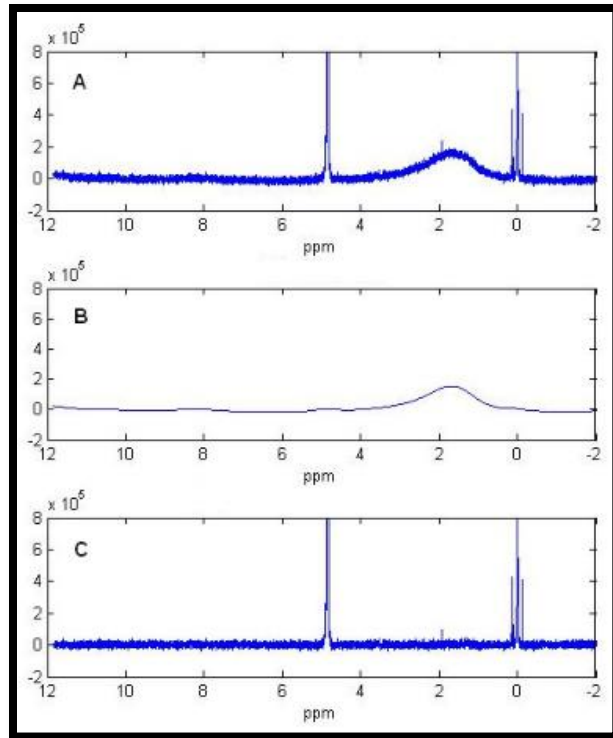
Οι διαταραχές της βασικής γραμμής στα μονοδιάστατα φάσματα NMR προκαλούνται κυρίως από την αλλοίωση των πρώτων σημείων δεδομένων στο σήμα FID, τα οποία προσθέτουν

χαμηλές συχνότητες στο φάσμα NMR συμβάλλοντας στην παραμόρφωση της βασικής γραμμής. Η διόρθωση των συγκεκριμένων παραμορφώσεων είναι ένα απαραίτητο βήμα επεξεργασίας επειδή μετατοπίζουν τις τιμές έντασης και οδηγούν σε ανακρίβειες των φασματικών κορυφών (Σχήμα 7.12). Ειδικά στον τομέα της μεταβολομικής, η οποία περιλαμβάνει πολλές μικρές αλλά στατιστικά σημαντικές κορυφές που είναι ευαίσθητες στις διαταραχές της βασικής γραμμής, τα συγκεκριμένα σφάλματα είναι ιδιαίτερα κρίσιμα. Η λανθασμένη ποσοτικοποίηση αυτών των κορυφών μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα όσον αφορά την ανίχνευση σημαντικών μεταβολιτών ή την αναγνώριση πιθανών βιοδεικτών.[45]

Οι υπάρχουσες μέθοδοι αυτόματης διόρθωσης της βασικής γραμμής χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τη διόρθωση στο πεδίο του χρόνου και τη διόρθωση στο πεδίο της συχνότητας. Οι μέθοδοι διόρθωσης της πρώτης κατηγορίας ανακατασκευάζουν τα κατεστραμμένα σημεία δεδομένων για να μειώσουν τις παραμορφώσεις χαμηλής συχνότητας και παρέχουν γενικές διορθώσεις στο σήμα FID. Οι μέθοδοι διόρθωσης της δεύτερης κατηγορίας κατασκευάζουν καμπύλες βασικής γραμμής απευθείας στα φάσματα και τις αφαιρούν για να απομακρύνουν τις παραμορφώσεις παρέχοντας λεπτομερέστερη διόρθωση στο φάσμα συχνοτήτων. Συνήθως χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός των δύο μεθόδων για την επίτευξη της βέλτιστης διόρθωσης.[45]

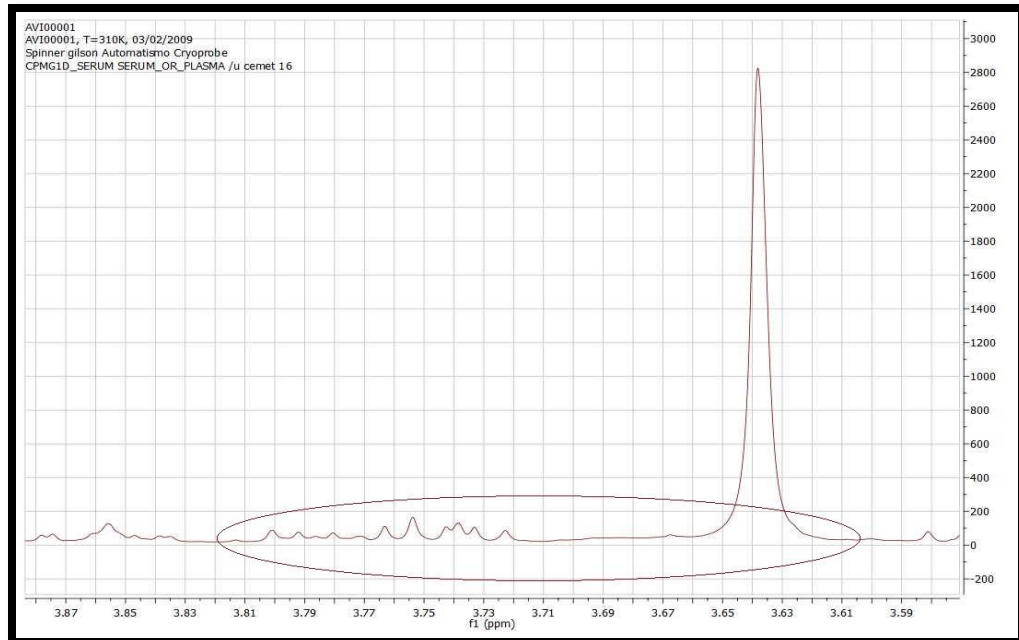
Μία από τις συχνότερες μεθόδους διόρθωσης της βασικής γραμμής είναι η ανίχνευση των περιοχών θορύβου και η κατασκευή της καμπύλης βασικής γραμμής με *παρεμβολή* μεταξύ των αναγνωρισμένων περιοχών θορύβου. Ακόμη, μία μέθοδος είναι το *μοντέλο παραμετρικής εξομάλυνσης* που στοχεύει στη μοντελοποίηση της βασικής γραμμής ως μία ομαλή καμπύλη αυθαίρετης μορφής που διέρχεται από την περιοχή του θορύβου αντί των συνδεδεμένων κομματιών των επιλεγμένων σημείων θορύβου.[45]

Στο Σχήμα 7.13 που ακολουθεί φαίνονται τα στάδια διόρθωσης της βασικής γραμμής ενός φάσματος από τη βάση δεδομένων Metabolights με τη χρήση του προγράμματος mNova.

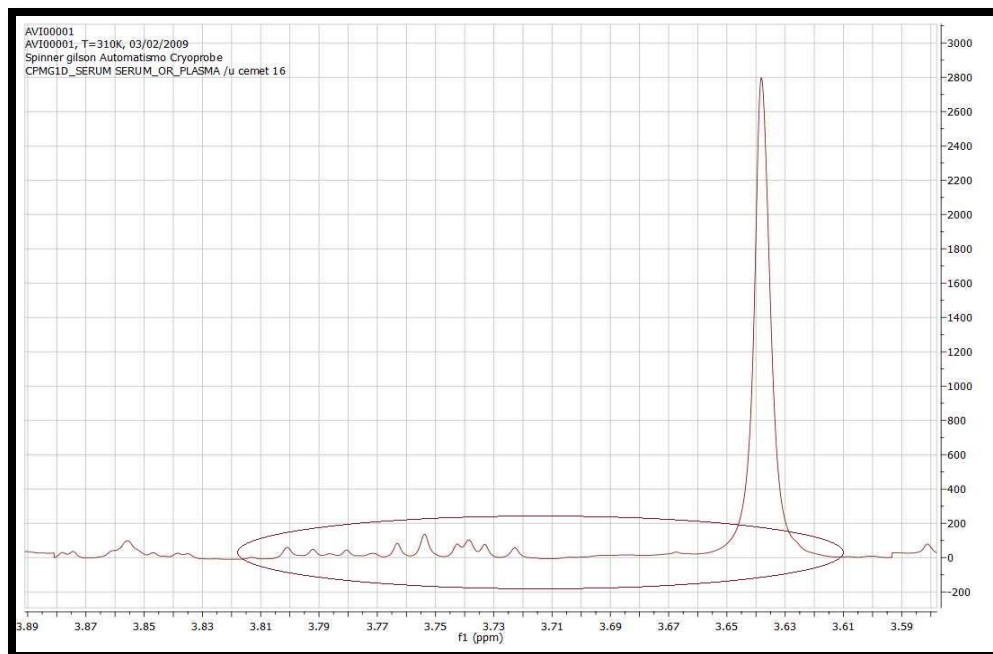


Σχήμα 7.12: Διόρθωση βασικής γραμμής με χρήση του μοντέλου παραμετρικής εξομάλυνσης. (A) Αρχικό φάσμα NMR με ένωση αναφοράς DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid) με παραμορφωμένη βασική γραμμή. (B) Καμπύλη βασικής γραμμής. (C) Διορθωμένο φάσμα μετά την αφαίρεση της καμπύλης βασικής γραμμής. Πηγή: [45]

(α)



(β)



Σχήμα 7.13: (α) Μεγέθυνση φάσματος από δείγμα πλάσματος με ονομασία AVI00001 από τη μελέτη MTBLS46 από τη βάση δεδομένων Metabolights. Επισημαίνεται η περιοχή που θα υποστεί διόρθωση βασικής γραμμής. (β) Μεγέθυνση φάσματος από δείγμα πλάσματος με ονομασία AVI00001 μετά από αυτόματη διόρθωση της βασικής γραμμής (baseline correction) μέσω του προγράμματος mNova. Φαίνεται η διόρθωση της βασικής γραμμής του φάσματος στην επισημασμένη περιοχή.

8 Εφαρμογές Φασματοσκοπίας NMR

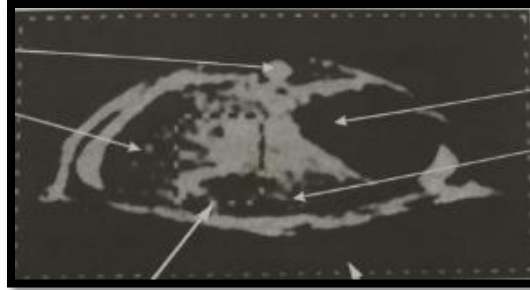
Η φασματοσκοπία NMR είναι μία τεχνική που έχει εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών κλάδων, κυρίως μέσω των μεθόδων της φασματοσκοπίας *in vivo* και της μεταβολομικής οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

Η φασματοσκοπία NMR *in vivo* αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για βιοχημική έρευνα ευπαθών μελών (π.χ. εγκέφαλος) καθώς είναι μη καταστρεπτική. Παρουσιάζει πολλαπλά πλεονεκτήματα καθώς μπορεί να εφαρμοστεί επανειλημμένα για την παρακολούθηση της εξέλιξης θεραπειών σε ασθενείς, ενώ ο όγκος, από τον οποίο συλλέγονται οι χημικές πληροφορίες, μπορεί να σκιαγραφηθεί με ευκρίνεια και να συσχετισθεί με μία απεικόνιση NMR. Ταυτόχρονα, επιτρέπει στον ασθενή να υποβληθεί γρήγορα σε σάρωση για μία περιοχή με ένα φάσμα ^1H NMR απεικόνισης και μετά είναι δυνατή η ταυτοποίηση του επιλεγμένου όγκου με εντοπισμένη φασματοσκοπία NMR.[5]

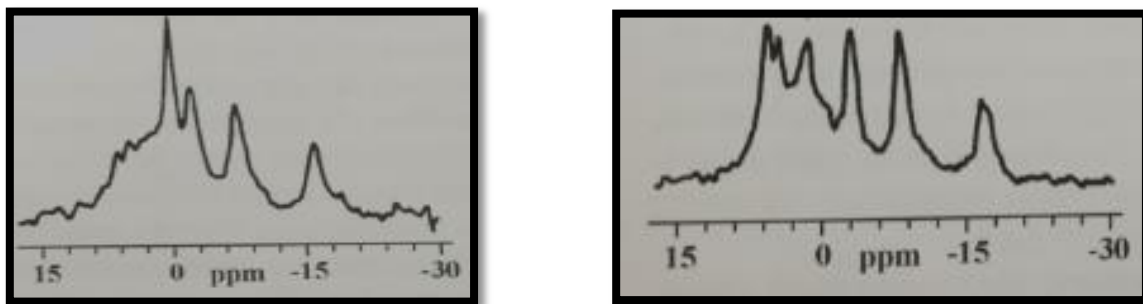
Η σημαντικότερη εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR *in vivo* είναι η ιατρική διάγνωση μέσω της διερεύνησης ενός αντικειμένου, με συνδυασμό ^1H NMR απεικόνισης για μία περιοχή που παρουσιάζει ενδιαφέρον, και εξέτασης της χημικής σύνθεσης και του μεταβολισμού του. Προκειμένου να πραγματοποιηθούν πειράματα NMR *in vivo*, χρειάζεται επαρκής εξοπλισμός. Σε αντίθεση με τους συμβατικούς αναλυτικούς φασματογράφους NMR, οι οποίοι διαχειρίζονται δείγματα μέχρι 20 mm σε διάμετρο, οι σύγχρονοι φασματογράφοι *in vivo* μπορούν να δεχθούν μικρά ζώα, ανθρώπινα άκρα ή ακόμη και ολόκληρους ανθρώπινους οργανισμούς.[5]

Η επιλεκτική διέγερση όγκων (Volume Selective Excitation) είναι η προτιμώμενη μέθοδος για τη λήψη φάσματος NMR κάποιας καλά καθορισμένης περιοχής που βρίσκεται βαθιά μέσα στο αντικείμενο μελέτης με υψηλή ευαισθησία. Παράδειγμα της μεθόδου παρουσιάζεται με φάσμα *in vivo* ^{31}P σε ήπαρ ποντικού στο σχήμα 8.1, όπου η απεικόνιση ^1H NMR προς τα πάνω, που έχει ληφθεί από τον ίδιο φασματογράφο, δείχνει μία διασταυρούμενη τομή διά μέσου της κοιλιακής χώρας του ποντικού στο ύψος του ήπατος. Ουσίες με υψηλή πρωτονιακή πυκνότητα και υψηλή κινητικότητα, π.χ. νερό ή λίπος, φαίνονται ανοιχτόχρωμες, ενώ ουσίες με χαμηλή πρωτονιακή πυκνότητα φαίνονται σκούρες. Για παράδειγμα, ο νωτιαίος μυελός, η αορτή, το υποδόριο λίπος και ο ιστός αδιπόζης φαίνονται λευκά, ενώ το στομάχι και ο νωτιαίος μυελός είναι σκούρα.[5]

Στο σχήμα 8.2(α) απεικονίζεται το φάσμα που έχει εξαχθεί από τον σκελετό του ποντικού και παρουσιάζει ίχνη τρισφωφορικής αδενοσίνης στα -2.4, -7.7 και -16.2 ppm, φωσφοκρεατίνη στα 0 ppm, ανόργανες φωσφορικές ομάδες στα 5.1 ppm καθώς και φωσφομονοεστέρα στα 6.4 ppm. Στο σχήμα 8.2(β) απεικονίζεται το φάσμα που προκύπτει από την επιλεκτική διέγερση του όγκου στον εσωτερικό σκελετό, το οποίο δείχνει μόνο σήματα του ήπατος του ποντικού. Αναγνωρίζονται σήματα τριφωφορικής αδενοσίνης και ανόργανων φωσφορικών ομάδων, αυξημένα ποσά φωσφομονοεστέρα και μία επιπρόσθετη κορυφή στα 2.1 ppm από φωσφοδιεστέρες. Η κορυφή της φωσφοκρεατίνης είναι απύσα, κάτι που υποδεικνύει την καθαρή επιλογή του φάσματος επιλεκτικής διέγερσης όγκων για ηπατικό ιστό, που δεν περιέχει καθόλου φωσφοκρεατίνη.[5]



Σχήμα 8.1: Απεικόνιση ήπατος ποντικού μέσω της φασματοσκοπίας *in vivo*. Πηγή: [5]



(α) Φάσμα ^{31}P σκελετού ποντικού. (β) Φάσμα ^{31}P εσωτερικού σκελετού ποντικού. Πηγή: [5]

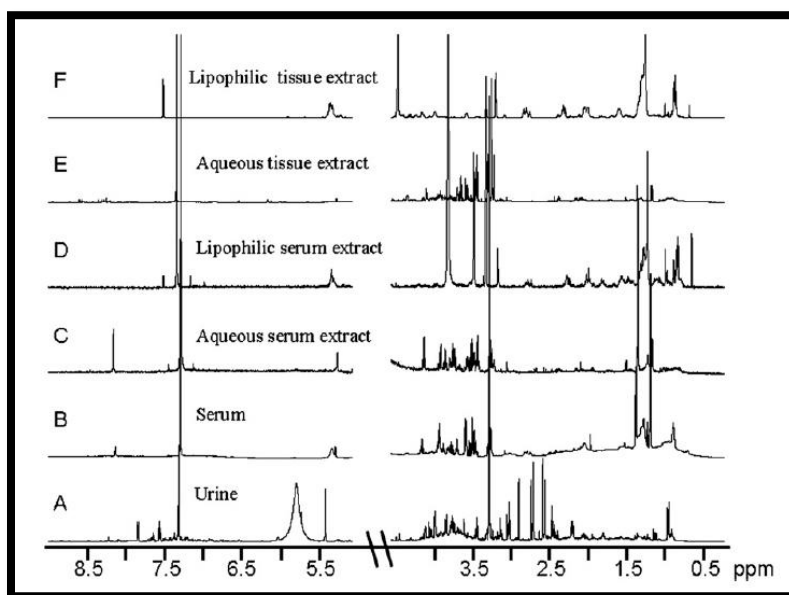
Η *μεταβολομική* είναι το επιστημονικό πεδίο που ασχολείται με την ανίχνευση, ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση και καταγραφή των μεταβολικών αλλαγών στο χρόνο ενός βιολογικού συστήματος ως απόκριση σε διάφορους ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες, όπως οι γενετικοί ή οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και ο τρόπος ζωής. Οι μεταβολίτες αποτελούν χημικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους που εντοπίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων, αποτελούν παράγωγα των ενζυμικών χημικών αντιδράσεων και είναι απαραίτητες για τη συντήρηση, ανάπτυξη και φυσιολογική λειτουργία ενός κυττάρου.[36]

Η φασματοσκοπία NMR έχει την ικανότητα να εντοπίζει εκατοντάδες μεταβολίτες στα βιολογικά δείγματα, όπως τα ούρα, ο ορός αίματος, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), το σάλιο, καθώς και στα εκχυλίσματα δειγμάτων ορού και ιστών (Σχήμα 8.3). Η φασματοσκοπία NMR είναι ιδιαίτερα πλεονεκτική για μεταβολομικές μελέτες καθώς όλα τα πρωτόνια ενός μορίου ανιχνεύονται με την ίδια ευαισθησία και τα δεδομένα που καταγράφονται είναι ιδιαίτερα αναπαράξιμα με λιγότερο από 2% διακύμανση μεταξύ των εργαστηρίων, ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται φασματογράφοι με διαφορετικές εντάσεις πεδίου. Αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν καταστήσει δυνατή την ποσοτική ανίχνευση εκατοντάδων μεταβολιτών μέσα σε λίγα λεπτά. Τα φάσματα ^1H NMR των βιολογικών υγρών και ιστών παρέχουν ένα χαρακτηριστικό «δακτυλικό αποτύπωμα» για ένα εύρος βιολογικά σημαντικών μεταβολιτών, όπως η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και τα αμινοξέα.[36]

Περισσότερες από το 80% των διαγνωστικών δοκιμών βασίζονται στην ανίχνευση και μέτρηση των μεταβολιτών μικρών μορίων που αποτελούν δείκτες της εκάστοτε νόσου που μελετάται, δηλαδή τους *βιοδείκτες*. Ως βιοδείκτης μπορεί να οριστεί ένα μετρήσιμο

χαρακτηριστικό που αντικατοπτρίζει την κατάσταση των φυσιολογικών ή παθογενών διεργασιών. Η μεταβολομική επικεντρώνεται κυρίως στην ταυτοποίηση, τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε μη φυσιολογικές συνθήκες.[46]

Στη συνέχεια αναλύονται σημαντικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR στον τομέα της ιατρικής, της φαρμακολογίας, της έρευνας τροφίμων και ποτών καθώς και της δομικής βιολογίας.



Σχήμα 8.3: Αντιπροσωπευτικό μονοδιάστατο φάσμα NMR από ούρα (A), ορό (B), υδατικό εκχύλισμα ορού (C), λιποφιλικό εκχύλισμα ορού (D), υδατικό εκχύλισμα νεφρικού ιστού (E), λιποφιλικό εκχύλισμα νεφρικού ιστού (F). Πηγή: [36]

8.1 Ιατρική

8.1.1 Καρδιαγγειακές ασθένειες

Η φασματοσκοπία NMR έχει αξιοποιηθεί στο πλαίσιο μεταβολομικών μελετών καρδιαγγειακών ασθενειών, κάποιες από τις οποίες είναι η στεφανιαία νόσος, η υπέρταση, το έμφραγμα, η κολπική μαρμαρυγή και η περιφερειακή αρτηριακή νόσος.[47]

Για την πρόβλεψη και διάγνωση της στεφανιαίας νόσου έχει πραγματοποιηθεί μελέτη σε δείγματα αίματος με στόχο τη διάκριση μεταξύ των ασθενών με στεφανιαία νόσο και των υγιών ατόμων. Βρέθηκε ότι οι μεταβολίτες που μπορούν να συμβάλουν στη μελλοντική πρόληψη της ανάπτυξης της νόσου είναι οι δικαρβοξυλακυλοκαρνιτίνες, οι ακυλοκαρνιτίνες μεσαίας αλυσίδας, καθώς και τα λιπαρά οξέα. Όσον αφορά την υπέρταση, η ανάλυση 20 δειγμάτων πλάσματος από υπερτασικούς ασθενείς και υγιή άτομα παρουσίασε διαφορές στα επίπεδα της γλυκίνης, της λυσίνης και της κυστίνης. Όσον αφορά το έμφραγμα, έχει πραγματοποιηθεί μελέτη σε δείγματα πλάσματος και ούρων, με τη χρήση πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης. Στα δείγματα πλάσματος παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων γλουταμίνης και μεθανόλης και αυξημένες ποσότητες γαλακτικού, πυροσταφυλικού και γλυκολικού ενώ στα δείγματα ούρων

παρατηρήθηκε μείωση του κιτρικού οξέος, του ιππουρικού οξέος και της γλυκίνης. Ένα παράδειγμα μελέτης με επίκεντρο την κοιλική μαρμαρυγή πραγματοποιήθηκε σε δείγματα καρδιακού ιστού τα οποία συλλέχθηκαν από ασθενείς κατά τη διάρκεια καρδιακής χειρουργικής επέμβασης. Η ανάλυση ανθρώπινων καρδιακών ιστών έδειξε αυξημένα επίπεδα β-υδροξυβουτυρικού, κετογόνων αμινοξέων και γλυκίνης καθώς και ανωμαλίες στη σύνθεση των ενεργών μεταβολιτών σε μετεγχειρητικούς ασθενείς. Τέλος, για την περιφερειακή αρτηριακή νόσο έχει πραγματοποιηθεί μελέτη σε δείγματα πλάσματος που λήφθηκαν από 20 ασθενείς που απεβίωσαν εντός 8 μηνών από την τελευταία εξέταση αίματος και 21 ασθενείς που έζησαν τουλάχιστον 30 μήνες μετά την τελευταία εξέταση αίματος. Η έρευνα έδειξε πως ο επικείμενος θάνατος μπορεί να προβλεφθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια όταν εξετάζονται μεταβολές στο μεταβολισμό των λιπιδίων παρά στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και των αμινοξέων.[47]

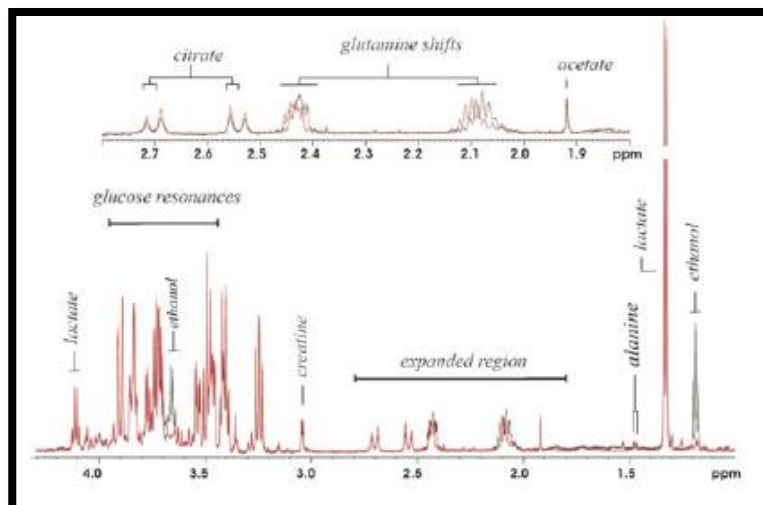
8.1.2 Ψυχιατρικές ασθένειες

Οι βιοδείκτες που ανιχνεύονται σε δείγματα βιολογικών υγρών με μεταβολομική ανάλυση βοηθούν στον έγκαιρο εντοπισμό αλλαγών που σχετίζονται με την εκδήλωση ψυχικών διαταραχών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR για την αντιμετώπιση της σχιζοφρένειας. Όσον αφορά το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) μπορούν να ανιχνευτούν και να ποσοτικοποιηθούν αξιόπιστα περίπου 20 μεταβολίτες. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολλές μελέτες ασθενειών που εκτελούνται σε βιολογικά υγρά όπως τα ούρα και το πλάσμα, λίγες μόνο μελέτες μεταβολικού προφίλ έχουν διεξαχθεί πάνω στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με σκοπό τη διάγνωση ασθενειών.[48]

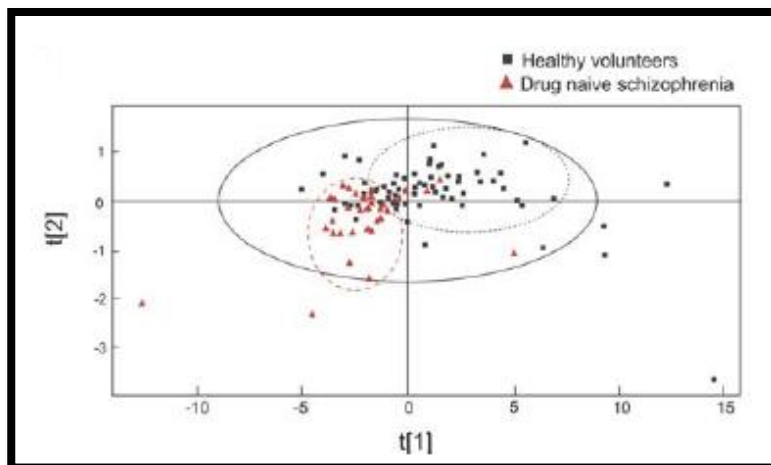
Η φασματοσκοπία ^1H NMR χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την υπολογιστική ανάλυση αναγνώρισης προτύπων στη διεξαγωγή εκτεταμένης μεταβολικής ανάλυσης δειγμάτων ENY από άτομα ελέγχου και ασθενείς με σχιζοφρένεια, με σκοπό την αναγνώριση ενός πιθανού αλλοιωμένου βιοχημικού προφίλ του ENY σε ασθενείς με σχιζοφρένεια και τον προσδιορισμό του μεταβολικού αντίκτυπου των αντιψυχωτικών φαρμάκων σε ασθενείς με σχιζοφρένεια. Η ανάλυση των φασμάτων έδειξε μία διαφορετική κατανομή των μεταβολιτών σε δείγματα από υγιείς εθελοντές σε σύγκριση με τα δείγματα από ασθενείς με σχιζοφρένεια πρώτου τύπου (Σχήματα 8.4(α), (β)). Το μεταβολικό προφίλ του ENY μεταβλήθηκε χαρακτηριστικά στους ασθενείς με σχιζοφρένεια και η πλειοψηφία των βασικών μεταβολιτών που συμβάλλουν στο διαχωρισμό αναπαραστάθηκε σε ξεχωριστή δοκιμή (Σχήμα 8.5).[48]

Οι παρατηρήσεις που προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων NMR αφορούν την αύξηση της γλυκόζης και τη μείωση του οξικού άλατος. Η αύξηση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης του ENY σε ασθενείς με σχιζοφρένεια υποδηλώνει πως αλλοιώσεις στις ρυθμίσεις της μπορεί να είναι εγγενείς στο σύνδρομο της σχιζοφρένειας από τη στιγμή που τα δείγματα ENY που συγκεντρώθηκαν από ασθενείς με σχιζοφρένεια πρώτου τύπου εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη γλυκόζη. Ταυτόχρονα, η μειωμένη συγκέντρωση οξικού άλατος υποδεικνύει μία σύνθεση από λιπαρά οξέα που σχετίζονται με τη μυελίνη και λιπίδια στον εγκέφαλο του ασθενούς με σχιζοφρένεια.[48]

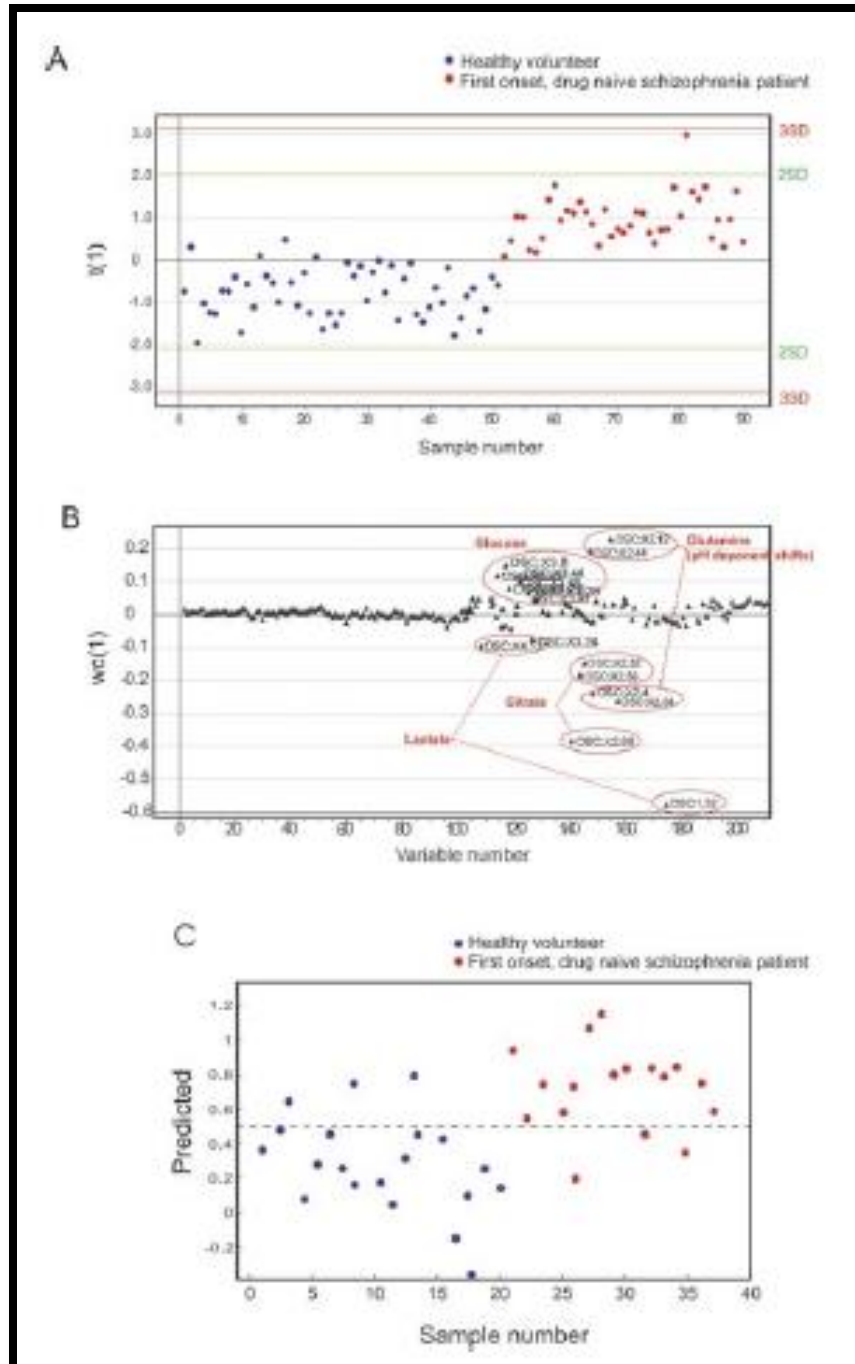
(α)



(β)



Σχήμα 8.4:(α) Μερικό ^1H NMR φάσμα από δείγμα ENY από έναν ασθενή με σχιζοφρένεια πρώτου τύπου (κόκκινη γραμμή) και έναν υγιή ασθενή (μαύρη γραμμή). (β) Διάγραμμα που δείχνει τη διαφοροποίηση μεταξύ των ασθενών με σχιζοφρένεια και των υγιών εθελοντών. Πηγή: [48]



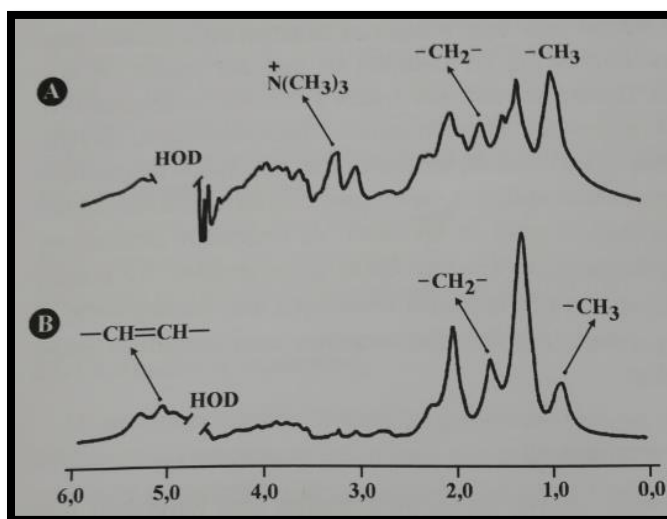
Σχήμα 8.5: Το PLS μοντέλο κατασκευάστηκε με τη χρήση δεδομένων από 37 ασθενείς με σχιζοφρένεια πρώτου τύπου και 50 τυχαία επιλεγμένους υγιείς εθελοντές. Τα γραφήματα (A) και (B) υποδεικνύουν βασικούς συντονισμούς μεταβολιτών που συνέβαλαν στο διαχωρισμό: γαλακτικό οξύ, γλυκόζη, γλουταμίνη και κιτρικό άλας. Το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη του διαχωρισμού των ασθενών από τους υγιείς εθελοντές (C). Πηγή: [48]

8.1.3 Καρκίνος

Η φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό και την αντιμετώπιση διαφόρων περιπτώσεων καρκίνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η διαφοροποίηση των καλοήθων από τα κακοήθη νεοπλάσματα, η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα και η μελέτη των παιδικών όγκων.[5]

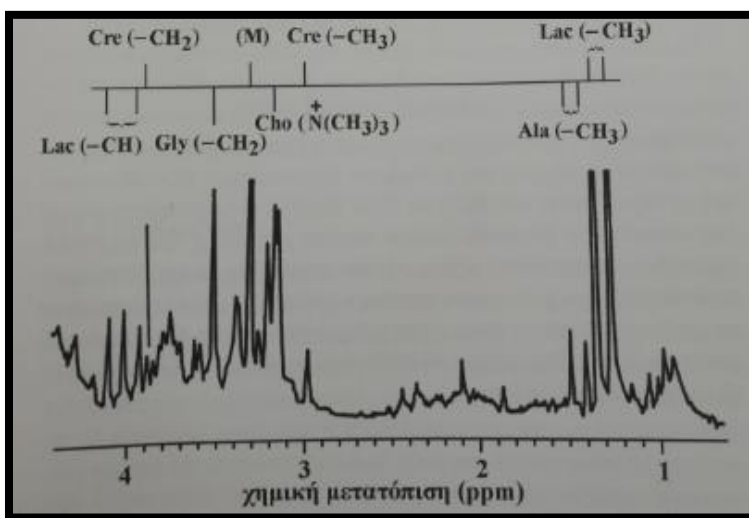
Η διαφοροποίηση των καλοήθων από τα κακοήθη νεοπλάσματα βασίζεται σε συγκεκριμένες κορυφές που εμφανίζονται με διαφορετική αναλογία στους ιστούς διαφορετικής παθογούς προέλευσης και οφείλονται σε μεταβολίτες όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, συστατικά μεμβρανών και νευροδιαβιβαστές. Οι λόγοι εντάσεων των κορυφών, αφού υποστούν στατιστική ανάλυση, χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικοί δείκτες ασθένειας. Οι χρόνοι αποδιέγερσης των διαφόρων χημικών συστατικών των ιστών ποικίλουν ανάλογα με την παθογενή τους κατάσταση. Η σταθερά σύζευξης J των πρωτονίων των πυρήνων που εξετάζονται είναι χρήσιμη για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη διαφοροποιημένη κυτταρική χημεία των υγιών και καρκινικών κυττάρων.[5]

Η φασματοσκοπία NMR έχει εφαρμοστεί σε θυλακοειδή νεοπλάσματα. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε εκχυλίσματα, ενυδατωμένα τεμάχια ή εναιωρήματα ιστών. Οι όγκοι, που αυθαίρετα προσδιορίζονται ως θυλακοειδή αδενώματα και θυλακοειδή καρκινώματα δεν μπορούν να διακριθούν με κλινικά, ραδιολογικά ή εμφανή παθολογικά χαρακτηριστικά. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα κυτταρικά συστατικά και των δύο τύπων όγκων έχουν κοινή ιστομορφολογία. Σε τέτοιους όγκους, το κριτήριο της κακοήθειας είναι η ανεύρεση ινώδους θύλακα ή αγγειακού σχηματισμού στην περιφέρεια του νεοπλάσματος. Αυτό απαιτεί χειρουργική αφαίρεση ολόκληρου του όγκου και εκτεταμένη εργαστηριακή εξέταση. Φάσματα ^1H NMR από υγιή θυρεοειδή και από θηλοειδές καρκίνωμα παριστάνονται στο Σχήμα 8.6. Στο φάσμα ενός ιστού θυρεοειδούς αδένου εμφανίζονται οι κορυφές των μεθυλίων CH_3 (0.09 ppm) και μεθυλενίων CH_2 (1.7 ppm) που προέρχονται από τους μεταβολίτες αμινοξέων και από τα λιπίδια του ιστού αντίστοιχα.[5]



Σχήμα 8.6: Φάσματα NMR πρωτονίου από φυσιολογικό θυρεοειδή ιστό (A) και από θηλοειδές καρκίνωμα (B). Πηγή: [5]

Η φασματοσκοπία ^1H NMR μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ των καρκίνων του πνεύμονα. Η διάγνωση γίνεται με χρήση δειγμάτων που λαμβάνονται από διαβρογχική βιοψία και ανοιχτή βιοψία του πνεύμονα. Σε μία σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε, τα φάσματα που λήφθηκαν, προήλθαν από δείγματα υγιών ιστών και τεσσάρων τύπων καρκίνου του πνεύμονα (πλακώδη κύτταρα, αδενοκαρκίνωμα, μακροκύτταρα και μικροκύτταρα). Ο λόγος των εμβαδών των κορυφών χρησιμοποιήθηκε ως παράμετρος για τον χαρακτηρισμό ιστών πνευμόνων διαφορετικής παθογένειας. Η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων με διακριτική ανάλυση παραγόντων (discriminant factor analysis) έδειξε μέχρι και 90% ακρίβεια στη διάκριση μεταξύ υγιούς πνευμονικού ιστού και κάθε καρκινικού τύπου ιστού. Στο Σχήμα 8.7 παριστάνεται ένα φάσμα ^1H NMR υγιούς ιστού του πνεύμονα.[5]



Σχήμα 8.7: Φάσμα ^1H NMR δείγματος από υγιή ιστό πνεύμονα. Οι συντομογραφίες είναι: Lac (γαλακτικό οξύ), Cre (κρεατινίνες), Cho (χολίνες), Gly (γλυκίνη), Ala (αλανίνη) και υπόλειμμα μεθανόλης (M) από τις εκχυλίσσεις. Πηγή: [5]

Τέλος, η φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη καρκίνων στον εγκέφαλο παιδιών, στην οποία εξετάστηκαν συγκριτικά τα φάσματα ^1H NMR των εγκεφάλων 5 υγιών παιδιών και 25 παιδιών που έπασχαν από καρκίνο. Σε αυτά μετρήθηκε ο λόγος των μεταβολιτών χολίνης, N-ακετυλοασπαρτικού οξέος, κρεατινίνης, φωσφοκρεατινίνης και γαλακτικού οξέος. Οι εγκεφαλοι των υγιών παιδιών έδειξαν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις χολίνης και ακετυλοασπαρτικού οξέος και σχεδόν καθόλου γαλακτικό οξύ ενώ οι εγκεφαλοι των παιδιών με κακοήθεις όγκους είχαν αυξημένο λόγο χολίνης προς N-ακετυλοασπαρτικό οξύ.[5]

8.2 Φαρμακολογία

Η ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων είναι μία δαπανηρή, αργή και ριψοκίνδυνη διαδικασία για τις φαρμακευτικές βιομηχανίες. Μόνο 6 από τα 200 επικυρωμένα δοκιμαστικά φάρμακα φτάνουν στις κλινικές δοκιμές φάσης I και μόνο 1 από αυτά τα 6 προχωρά στη φάση IV. Επίσης, ακόμα και αν ένα φάρμακο φτάσει στην αγορά, υπάρχει ένα ρίσκο (5%) απόσυρσης του φαρμάκου λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Με τη χρήση της μεταβολομικής, τα φάρμακα που είναι πιθανό να αποτύχουν λόγω τοξικότητας μπορούν εύκολα να εντοπιστούν στα

προκλινικά στάδια ανάπτυξης. Τα μισά φάρμακα μικρών μορίων προέρχονται από ήδη υπάρχοντες μεταβολίτες ή φυσικά προϊόντα, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα κορτικοστεροειδή και τα παράγωγά τους (που λαμβάνονται από διάφορες φυτικές και ζωικές πηγές), το ασκορβικό οξύ (από εσπεριδοειδή φρούτα), το σαλικυλικό οξύ (από φλοιό ιτιάς), τα αντιβιοτικά, αντιμυκητιασικά και τα αντιικά φάρμακα. Με την ενσωμάτωση της μεταβολομικής, ο χρόνος για την κλινική ανάπτυξη μπορεί να μειωθεί για να γίνει πιο γρήγορη η διαθεσιμότητα των φαρμάκων στην αγορά και οι κλινικές δοκιμές μπορούν να σχεδιάζονται επιλέγοντας ή στοχεύοντας συγκεκριμένα υποσύνολα πληθυσμού ασθενών. [37]

8.2.1 Προσδιορισμός θεραπευτικού στόχου

Η ανάγκη για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων είναι επιτακτική. Οι ασθένειες, στις οποίες έγινε αναφορά στις προηγούμενες παραγράφους, είναι πολύπλευρες με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν με απλές τεχνικές. Οι φαρμακευτικοί στόχοι για αυτές τις πολύπλοκες ασθένειες μπορούν να διερευνηθούν με τη βοήθεια των μεταβολομικών προσεγγίσεων. Η λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και στην παραγωγή ενέργειας στα καρκινικά κύτταρα χρησιμεύει στο σχεδιασμό νέων μορίων φαρμάκου.[46]

Η μελέτη απορρόφησης (absorption), διανομής (distribution), μεταβολισμού (metabolism), απέκκρισης (excretion) και τοξικολογίας (toxicology) (ADMET) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες για την ανάπτυξη φαρμάκων. Η ADMET ασχολείται με την αναγνώριση των μορίων-οδηγών που ενδέχεται να είναι επιβλαβή έτσι ώστε να αποκλειστούν στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του φαρμάκου. Οι μελέτες ADMET διεξάγονται τόσο σε προκλινικά όσο και σε κλινικά στάδια ανάπτυξης. Στο προκλινικό στάδιο, η δοκιμή ADMET περιλαμβάνει συλλογή δεδομένων βιομετασχηματισμού των φαρμάκων από δοκιμές *in vitro*, διεξαγωγή μελετών *in vivo* σε ζώα και συλλογή λεπτομερών ιστοπαθολογικών και τοξικολογικών δεδομένων. Στο κλινικό στάδιο, πραγματοποιούνται βιοχημικές μελέτες του αίματος, των ούρων και των περιττωμάτων. Οι παραδοσιακές μέθοδοι των μελετών ADMET είναι επιθετικές, ακριβές, επιρρεπείς σε λάθη και χρονοβόρες. Πρόσφατα, η μεταβολομική έχει γίνει ένας από τους σημαντικότερους συντελεστές στη διαδικασία ανεύρεσης και ανάπτυξης φαρμάκων, βοηθώντας στη βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων ADMET. Οι μεταβολομικές μέθοδοι παρέχουν μία πιο ακριβή και λεπτομερή εικόνα για το τι πραγματικά συμβαίνει στο εσωτερικό του σώματος μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Οι εφαρμογές της μεταβολομικής χρησιμοποιούνται ευρέως από τις φαρμακευτικές βιομηχανίες για τη διεξαγωγή των μελετών ADMET, ενώ η FDA (Food and Drug Administration) σχεδιάζει να καταστήσει τις μεταβολομικές μελέτες ως αναπόσπαστο κομμάτι των νέων φαρμακευτικών εφαρμογών.[46]

8.2.2 Τοξικότητα

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της μεταβολομικής είναι η διερεύνηση της τοξικότητας των φαρμάκων. Είναι απαραίτητη η ανάπτυξη νέων βιοδεικτών που μπορούν να προβλέψουν με ακρίβεια την τοξικότητα ήδη από το προκλινικό στάδιο ανάπτυξης των νέων φαρμάκων. Για αυτό το λόγο, η μέθοδος της μεταβολομικής έχει χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές μελέτες ενώσεων που προκαλούν ηπατοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα.[36]

Η έγκαιρη ταυτοποίηση της *ηπατικής* τοξικότητας αποτελεί ένα σημαντικό λόγο για τον οποίο κάποιο φάρμακο αποτυγχάνει στα μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης του ή αποσύρεται από την αγορά. Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο που είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία τόσο των διαιτητικών όσο και των ξеноβιοτικών συστατικών και για το μεταβολισμό φαρμάκων φάσης I και II. Πολλά ένζυμα του ήπατος μπορούν είτε να ενεργοποιηθούν είτε να κατασταλούν από τα βιολογικά ενεργά θρεπτικά συστατικά ή από άλλα φάρμακα και οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να επηρεάσουν το μεταβολισμό και την κάθαρση του μελετώμενου φαρμάκου από το ήπαρ. Η μεταβολομική προσέγγιση μπορεί να κρίνει αν συμβαίνει μία τοξική αντίδραση στο ήπαρ καθώς και αν ο ασθενής είναι ικανός να ξεπεράσει την προσβολή. Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της ηπατοτοξικότητας που προκαλείται από το φάρμακο Bay41-4109, μία ένωση κατά του ιού της ηπατίτιδας Β. Σε αυτή τη μελέτη, αναλύθηκαν εκχυλίσματα από ούρα, ορό και ηπατικό ιστό. Οι αλλαγές στους μεταβολίτες που εντοπίστηκαν στα βιολογικά υγρά και τους ιστούς υπέδειξαν πως η διαταραχή στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνέβαλαν στην ηπατοτοξικότητα του φαρμάκου υπό μελέτη.[36]

Όσον αφορά την κατανόηση των μεταβολικών αλλαγών που προκύπτουν από τη νεφροτοξικότητα που μπορεί να προκληθεί από κάποιο φάρμακο, έρευνες έχουν δείξει πως τα καλύτερα αποτελέσματα προέρχονται από την ταυτόχρονη εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας MS. Ένα παράδειγμα φαρμάκου με γνωστές κυτταροτοξικές επιδράσεις στο νεφρό είναι η κυκλοσπορίνη Α (CsA), ένας ανοσοκατασταλτικός παράγοντας που συνήθως συνταγογραφείται μετά τη μεταμόσχευση οργάνου. Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε σε μία έρευνα που έγινε για τα μεταβολικά αποτελέσματα της CsA σε συνδυασμό με δύο άλλα κοινώς χρησιμοποιούμενα ανοσοκατασταλτικά σε ασθενείς, με σκοπό να προσδιοριστεί αν η συνδυαστική θεραπεία προκάλεσε αλλαγές στις νεφροτοξικές επιδράσεις της CsA σε αρουραίους. Η ανάλυση των φασματικών δεδομένων από το αίμα έδειξε ότι η θεραπεία μόνο με CsA οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, υδροξυβουτυρικού, κρεατίνης, κρεατινίνης TMAO και χοληστερόλης και σε μειωμένη συγκέντρωση γλουταθειόνης. Η ανάλυση των μεταβολικών προφίλ έδειξε ότι η συνδυαστική θεραπεία της CsA με το ανοσοκατασταλτικό *everolimus* βελτίωσε την τοξικότητα ενώ με το *sirolimus* την ενίσχυσε.[36]

8.3 Έρευνα τροφίμων και ποτών

8.3.1 Ανίχνευση νοθείας ελαιόλαδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται κυρίως από μίγμα τριγλυκεριδίων και λιπαρών οξέων. Ένας τρόπος νοθείας του είναι η ανάμιξή του με ελαιόλαδο χαμηλότερης ποιότητας. Μέσω της

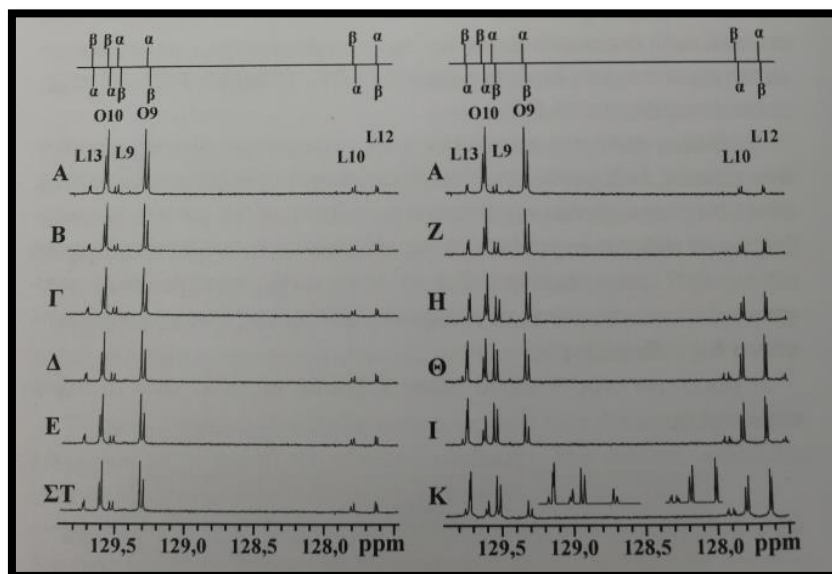
μεταβολομικής ανάλυσης διεξάγεται η παρακάτω διαδικασία ανίχνευσης της νοθείας του. Το δείγμα ελαιόλαδου διαλύεται σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και στο διάλυμα προστίθεται γνωστή ποσότητα ουσίας αναφοράς, ώστε να υπάρχει δυνατότητα σύνδεσης των αποτελεσμάτων με μονάδες μάζας, αντί για αναλογίες μεταξύ των λιπαρών οξέων. Ως ουσία αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί η 1,4 διαζίνη ή η πυραζίνη, καθώς όταν διαλύεται στο μίγμα ελαιόλαδου-χλωροφόρμιο, δίνει μία μόνο κορυφή στο φάσμα ^{13}C NMR χωρίς να συμπίπτει με κάποια από τις κορυφές του ελαιόλαδου και έχει χρόνο αποδιέγερσης T_1 της ίδιας τάξης μεγέθους με το χρόνο αποδιέγερσης των ανθράκων των τριγλυκεριδίων.[5]

Με την τεχνική ^{13}C NMR είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων λιπαρών οξέων που υπάρχουν στα έλαια. Οι μέσες τιμές ποσοτικού προσδιορισμού των κύριων λιπαρών οξέων αγνού παρθένου ελαιόλαδου είναι: ελαϊκό οξύ (73,3 %), κορεσμένα οξέα (17,1%) και λινολεϊκό οξύ (7%).[5]

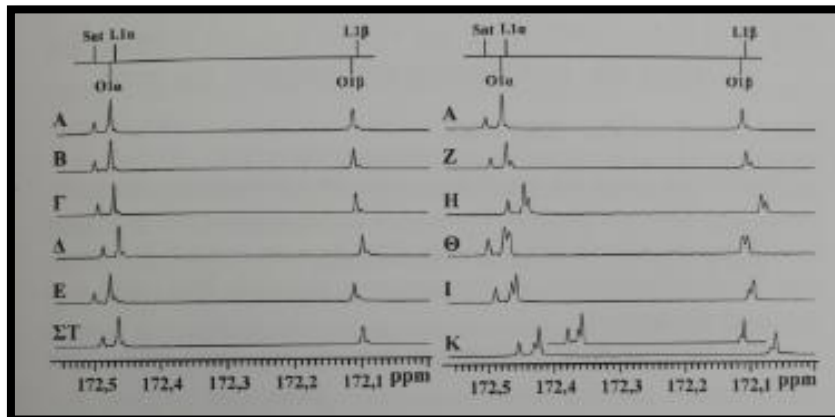
Στα σχήματα 8.8(α) , (β) παριστάνονται τα φάσματα ^{13}C NMR της αιθυλενικής περιοχής ([129.2,127.5] ppm) και της καρβονυλικής περιοχής ([172.5, 172.1] ppm) 11 δειγμάτων αγνού παρθένου ελαιόλαδου και μίξης του με σογιέλαιο σε αναλογίες 0-100%. Οι περιοχές που επιλέχθηκαν για τη λήψη των φασμάτων αποτελούν τις πιο χρήσιμες για την ανίχνευση της νοθείας. Η ταυτοποίηση των οξέων επισημαίνεται πάνω από τις κορυφές (O= ελαϊκό, L= λινολεϊκό και Sat= κορεσμένα).[5]

Από τα φάσματα των σχημάτων 8.8(α),(β) φαίνεται πως η περιοχή που προσφέρει τα καλύτερα αποτελέσματα για την αναγνώριση της νοθείας είναι η αιθυλενική καθώς οι κορυφές που την αποτελούν έχουν την ελάχιστη αλληλοεπικάλυψη κι επομένως, η προσομοίωσή τους είναι πιο ακριβής και λιγότερο χρονοβόρα. Ακόμα, στα φάσματα μιγμάτων του αγνού παρθένου ελαιόλαδου με σογιέλαιο, οι εντάσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στο λινολεϊκό είναι υψηλότερες και εκείνες που αντιστοιχούν στο ελαϊκό χαμηλότερες από τις αντίστοιχες εντάσεις στα φάσματα του αγνού παρθένου ελαιόλαδου. Η μέθοδος ^{13}C NMR είναι ικανή να ανιχνεύσει τη νοθεία του ελαιόλαδου και με άλλα σπορέλαια, όπως για παράδειγμα, το καλαμποκέλαιο, το βαμβακέλαιο και το ηλιέλαιο αποτελώντας ένα απαραίτητο αναλυτικό εργαλείο για την ανίχνευση διαφόρων μορφών νοθείας του ελαιόλαδου.[5]

(α)



(β)



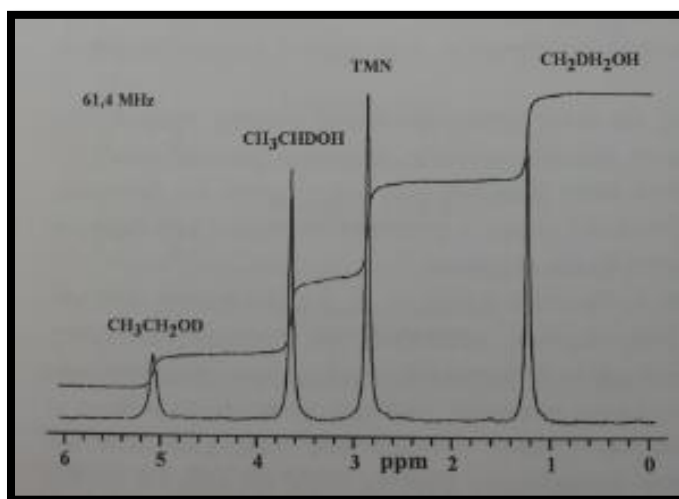
Σχήμα 8.8:(α) Φάσματα ^{13}C NMR της αιθυλενικής περιοχής ([129.2,127.5] ppm) αγνού παρθένου ελαιόλαδου και μιγμάτων του με προσθήκη σογιέλαιου σε αναλογίες 0-100%. (A) 0%, (B) 2%, (Γ) 4%, (Δ) 6%, (E) 8%, (ΣΤ) 10%, (Ζ) 20%, (Η) 40%, (Θ) 60%, (Ι) 80%, (Κ) 100%. (β) Φάσματα ^{13}C NMR καρβονυλικής περιοχής ([172.5, 172.1] ppm) αγνού παρθένου ελαιόλαδου και μιγμάτων του με προσθήκη σογιέλαιου σε αναλογίες 0-100%. (A) 0%, (B) 2%, (Γ) 4%, (Δ) 6%, (E) 8%, (ΣΤ) 10%, (Ζ) 20%, (Η) 40%, (Θ) 60%, (Ι) 80%, (Κ) 100%. Πηγή: [5]

8.3.2 Ανίχνευση νοθείας και προέλευσης αλκοολούχων ποτών

Η συχνότερη μορφή νοθείας στα αλκοολούχα ποτά είναι η προσθήκη εξωγενών σακχάρων με στόχο την αύξηση της αξίας του φτωχού σε σάκχαρα μούστου από το οποίο προκύπτει κρασί χαμηλού αλκοολικού βαθμού. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της νοθείας και της προέλευσης των αλκοολούχων ποτών ονομάζεται SNIF-NMR και αποτελεί τον Φυσικό Ισοτοπικό Διαχωρισμό που γίνεται σε κάθε θέση του εξεταζόμενου μορίου (Site Natural Isotope Fractionation). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη διαφορά που παρουσιάζουν οι ποσότητες ισωτόπων που βρίσκονται σε φυτά τα οποία ακολουθούν διαφορετικές φωτοσυνθετικές οδούς και στην παρατήρηση του δευτερίου. Η μέθοδος SNIF-NMR μπορεί να ανιχνεύσει τη συγκεκριμένη μορφή νοθείας γιατί η αφθονία του δευτερίου είναι πολύ χαμηλότερη στην αιθανόλη που προέρχεται από σακχαρότευτλα, σε σχέση με την

αιθανόλη που προέρχεται από τα σάκχαρα του σταφυλιού. Ταυτόχρονα, αποτελεί και τη μοναδική εφαρμοζόμενη μέθοδο για την ανίχνευση γεωγραφικής προέλευσης αλκοολούχων ποτών. Σε περίπτωση μιγμάτων με τη χρήση της μεθόδου μπορεί να διαπιστωθεί αν η ζύμωση προέρχεται από αλκοολικούς βαθμούς, λόγω προσθήκης εξωγενών σακχάρων και όχι σταφυλιού.[5]

Τα φάσματα δευτερίου λαμβάνονται από δείγματα αλκοόλης (άνω των 95%), που προέρχονται από απόσταξη του αλκοολούχου ποτού. Στο φάσμα ^2H NMR που φαίνεται στο σχήμα 8.9, λόγω της χαμηλής αφθονίας των δευτερίων, καθένα δίνει μία κορυφή ενώ στο μέσο του εμφανίζεται η κορυφή της τετραμεθυλοουρίας (TMU), που χρησιμοποιείται ως ουσία αναφοράς.[5]



Σχήμα 8.9: Φάσμα ^2H NMR αιθανόλης με τρεις κορυφές και ουσία αναφοράς TMU. Πηγή: [5]

8.3.3 Ανίχνευση νοθείας σε χυμούς φρούτων

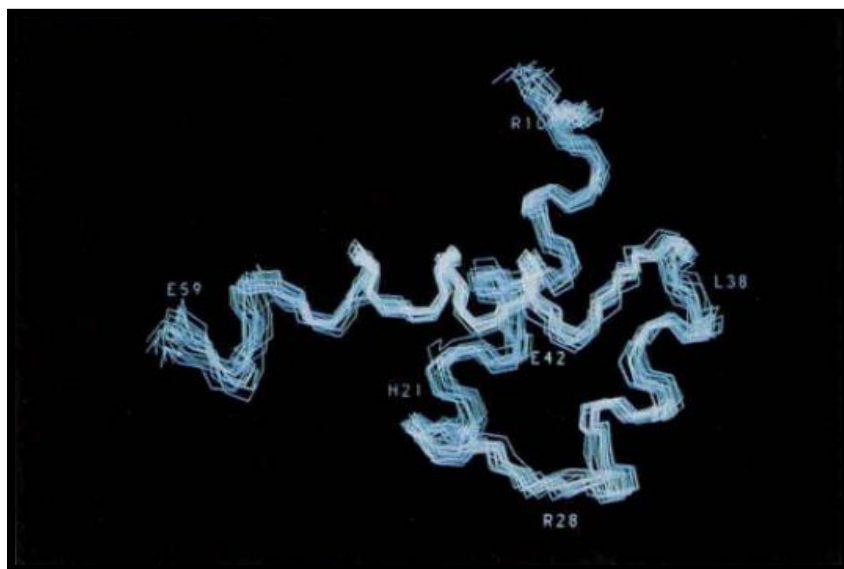
Η μέθοδος SNIF-NMR χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση της νοθείας στους χυμούς φρούτων η οποία προκύπτει από προσθήκη σακχάρου, πλυμένου πολτού, χρωμάτων, αμινοξέων, ύδατος, οργανικών οξέων ή τεχνητών αρωμάτων. Όπως και στους οίνους, η πιο διαδεδομένη μορφή νοθείας είναι η εξωγενής προσθήκη σακχάρων στα φρούτα η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με παρόμοια ανάλυση με εκείνη των οίνων. Για την ανίχνευση νοθείας που προέρχεται από μίξη διαφορετικών ειδών χυμών απαιτείται συνδυασμός της μεθόδου με άλλες τεχνικές, όπως για παράδειγμα η φασματομετρία μάζας.[5]

8.4 Δομική Βιολογία

Μία ιδιαίτερα σημαντική εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR, η οποία ανακαλύφθηκε από τον Kurt Wüthrich στις αρχές του 1980, αποτελεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής χημικών ενώσεων ο οποίος επιτυγχάνεται με ταυτόχρονη εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR και της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X. Περισσότερες από 10000 δομές πρωτεϊνών έχουν ήδη προσδιοριστεί με τον συνδυασμό των δύο μεθόδων ενώ εξακολουθούν να προσδιορίζονται καινούριες κάθε μέρα. Με τον λεπτομερή προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής τους,

αντλούνται πληροφορίες για το πώς οι πρωτεΐνες αναγνωρίζουν και δεσμεύουν άλλα μόρια, πώς λειτουργούν ως ένζυμα καθώς και πώς εξελίσσονται.[49]

Τα κυριότερα στοιχεία της φασματοσκοπίας NMR που συνδυάζονται για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών είναι το φαινόμενο Overhauser (NOE), μία συγκεκριμένη ακολουθία για τον διαχωρισμό των εκατοντάδων κορυφών που προκύπτουν στο φάσμα μίας πρωτεΐνης, κατάλληλα υπολογιστικά εργαλεία για την αξιολόγηση των μοριακών δομών που προκύπτουν καθώς και η πολυδιάστατη φασματοσκοπία NMR για την αποτελεσματική συλλογή δεδομένων. Μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των οποίων η τρισδιάστατη δομή έχει προσδιοριστεί είναι οι *Antennapedia homedomain*, *cyclophilin A-cyclosporin A complex* και *murine prion* (Σχήμα 8.10).[50]



Σχήμα 8.10: Τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης *Antennapedia homedomain* στο εσωτερικό διαλύματος. Πηγή: [51]

9 Βιβλιογραφία

- [1] Bothwell, J. H. F., & Griffin, J. L. (2011, May). An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biological Reviews*, Vol. 86, pp. 493–510. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00157.x>
- [2] <http://www.chemistry.uoc.gr/nmr/lectures/Lecture1.pdf>
- [3] Hayes, R. G. (2009). High resolution NMR theory and chemical applications, 2nd edition (Becker, Edwin D.). *Journal of Chemical Education*, 58(7), A226. <https://doi.org/10.1021/ed058pa226.2>
- [4] <https://www.jeol.co.jp/en/products/nmr/history.html>
- [5] Θ. Μαυρομούστακος, Ι. Μαρτσούκας. (2006). Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία Τροφίμων και Ποτών, Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος, ISBN 960-88751-5-3
- [6] http://atlas.physicsmasterclasses.org/gr/zpath_spin.htm
- [7] <http://mri-q.com/gyromagnetic-ratio-gamma.html>
- [8] Keeler, J. H., & Keeler, J. (2013). Understanding NMR spectroscopy. *Choice Reviews Online*, 43(10), 43-5896-43-5896. <https://doi.org/10.5860/choice.43-5896>
- [9] http://www.cs.sfu.ca/~stella/papers/blairthesis/main/_4056_figure87.gif
- [10] Nesbitt, G. J. (1992). Principles of NMR microscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 11(6), XVIII. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(92\)80053-9](https://doi.org/10.1016/0165-9936(92)80053-9)
- [11] <https://web.nmsu.edu/~snsn/classes/chem435/Lab8/intro.html>
- [12] [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/In_Class_Activities/Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/03_Text/06_Classical_Description_of_NMR_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/In_Class_Activities/Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/03_Text/06_Classical_Description_of_NMR_Spectroscopy)
- [13] http://www.chem.ucla.edu/~harding/ec_tutorials/tutorial51.pdf
- [14] <https://socratic.org/questions/what-is-shielding-and-deshielding-in-nmr-can-you-give-me-an-example>
- [15] <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/other/t1t2/t1t2.html>
- [16] A. Abragam, A. (1994). *The Principles Of Nuclear Magnetism*. 10.1119/1.1937646
- [17] <http://triton.iqfr.csic.es/guide/man/beginners/chap3-9.htm>
- [18] <http://goingtomedschool.com/2013/01/11/mass-ir-spectroscopy-and-nmr/>
- [19] <http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/NMR/coupling.htm>
- [20] <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/Notes-05-HMR-v26-part2.pdf>
- [21] <https://www.chem.uci.edu/~jsnowick/groupweb/files/MultipletGuideV4.pdf>
- [22] <https://chem.libretexts.org/>
- [23] <https://www.chemie.uni-hamburg.de/>
- [24] <http://slideplayer.com/slide/7582600/>
- [25] <https://books.google.gr/books?id=6yrqCAAQBAJ&pg=PA10&lpg=PA10&dq=heat+shield+nmr&source=bl&ots=OtNkoqRTAN&sig=JR2QitTxNZ1ieqbMOtdncDOymqw&hl=el&sa=X>

&ved=0ahUKEwitk5udi9TTAhUIa1AKHUI8ALkQ6AEIPjAH#v=onepage&q=heat%20shield%20nmr&f=false

[26] J.C. Lindon. (1986). NMR spectroscopy: Analytical applications from chemistry to the clinic, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 4, Issue 2, 1986, Pages 137-145, ISSN 0731-7085. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(86\)80035-8](https://doi.org/10.1016/0731-7085(86)80035-8)

[27] <https://www.research-collection.ethz.ch/handle/20.500.11850/146315>

[28] <http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/2008/04/electronics-for-simple-single-frequency.html>

[29] <http://triton.iqfr.csic.es/guide/man/beginners/chap4-8.htm>

[30] H.J. Schneider and P. Dullenkopf. (1977). Slotted tube resonator: A new NMR probe head at high observing frequencies, *Review of Scientific Instruments* 48, 68. <https://doi.org/10.1063/1.1134852>

[31] Fuks, L. F., Huang, F. S. C., Carter, C. M., Edelstein, W. A., & Roemer, P. B. (1992). Susceptibility, lineshape, and shimming in high-resolution NMR. *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 100(2), 229–242. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(92\)90258-9](https://doi.org/10.1016/0022-2364(92)90258-9)

[32] F.D. Doty, G. Entzminger, Y.A. Yang. (1998). Magnetism in high-resolution NMR probe design. I: General methods, *Concepts in Magnetic Resonance*, Volume 10, Issue 3. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0534\(1998\)10:3<133::AID-CMR1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0534(1998)10:3<133::AID-CMR1>3.0.CO;2-Y)

[33] Nicolay, K., Braun, K. P. J., Graaf, de, R. A., Dijkhuizen, R. M., & Kruiskamp, M. J. (2001). Diffusion NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, 14(2), 94-111. DOI:10.1002/nbm.686

[34] F. David Doty, Jatin Kulkarni, Christopher Turner, George Entzminger, Anthony Bielecki. (2006). Using a cross-coil to reduce RF heating by an order of magnitude in triple-resonance multinuclear MAS at high fields. *Journal of Magnetic Resonance*, Volume 182, Issue 2, Pages 239-253, ISSN 1090-7807, <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2006.06.031>.

[35] <http://photosmedical.blogspot.gr/2011/09/what-is-mri-nmri-mrt-nmrs-nmr-mri.html>

[36] Beger, R. D., Sun, J., & Schnackenberg, L. K. (2010). Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(2), 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.019>

[37] https://www.researchgate.net/figure/Simplified-diagram-of-a-nuclear-magnetic-resonance-spectrometer-At-the-heart-of-the-1H_fig2_266562962

[38] <http://nmr.uoregon.edu/mercury300.shtml>

[39] <https://www.ucl.ac.uk/nmr/nmr-sample>

[40] <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/preparation/preparation.html>

[41] www.chem.uzh.ch/zerbe/2D-NMR

[42] Dr. Shaoxiong Wu. (2011). 1D and 2D NMR Experiment Methods. Emory University / https://www.emory.edu/NMR/mysite06/NMR%20Course/all_book_041410.pdf

[43] University of Ottawa NMR Facility Blog / <http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/2007/>

[44] http://chemsites.chem.rutgers.edu/~nmurali/nmr_course/Chem_542_Spring2010_Lecture_3.pdf

- [45] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2516527/>
- [46] Kumar, B., Prakash, A., Ruhela, R. K., & Medhi, B. (2014). Pharmacological Reports Potential of metabolomics in preclinical and clinical drug development. *Pharmacological Reports*, 66(6), 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.06.010>
- [47] Kordalewska, M., & Markuszewski, M. J. (2015). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Metabolomics in cardiovascular diseases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 121–136. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.021>
- [48] Holmes, E., Tsang, T. M., Huang, J. T., Leweke, F. M., Koethe, D., Gerth, C. W. (2006). Metabolic Profiling of CSF: Evidence That Early Intervention May Impact on Disease Progression and Outcome in Schizophrenia. 3(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030327>
- [49] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22393/>
- [50] Wüthrich, Kurt. (2001). The way to NMR structures of proteins. *Nature structural biology*. 8. 923-5. [10.1038/nsb1101-923](https://doi.org/10.1038/nsb1101-923)
- [51] Wüthrich, K. (1990). Protein Structure Determination in Solution by NMR Spectroscopy. *Science*, Volume 243, Issue 4887, pp. 45-50 DOI: [10.1126/science.2911719](https://doi.org/10.1126/science.2911719)