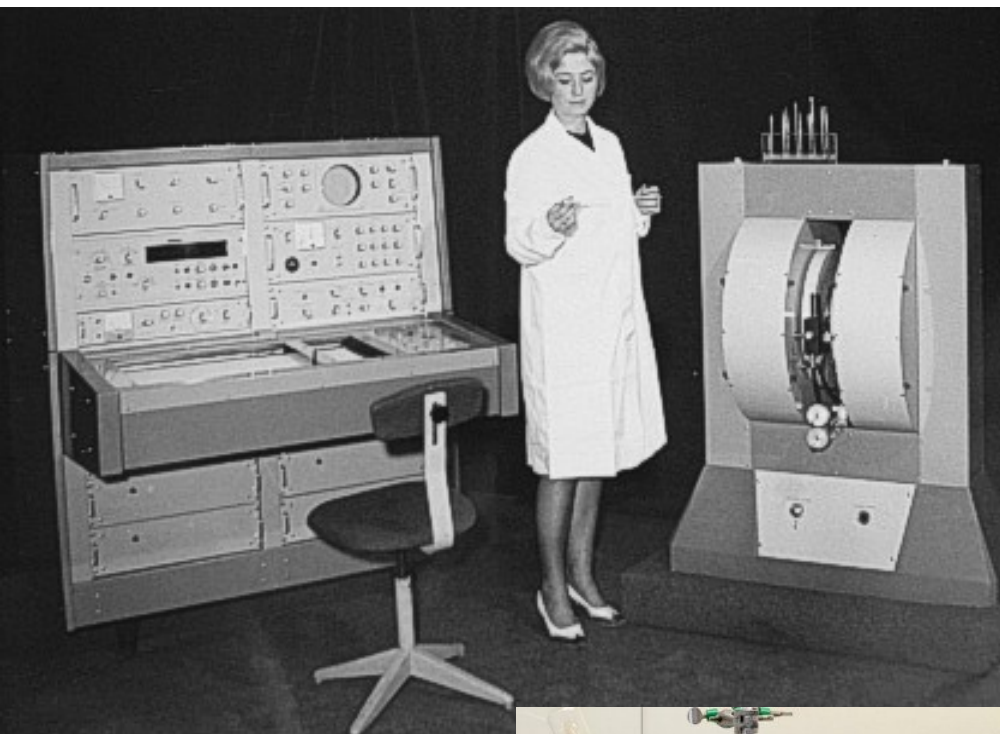


NMR spektroskopie



▪ **Izolace a identifikace přírodních látek, syntéza... se neobejde bez analytických nástrojů:**

▪ **1) separační metody:** krystalizace, filtrace, destilace, chromatografie (TLC, plynová, kapalinová...)

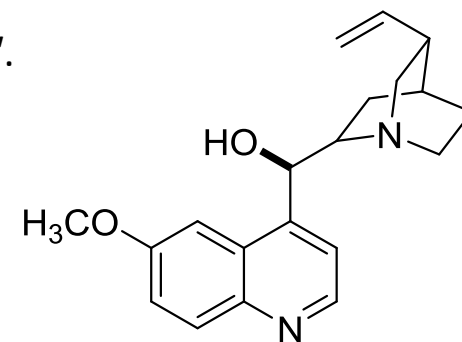
▪ **2) strukturní, fyzikálně-chemické metody:** spektroskopie

▪ **historie:** bod tání/varu, index lomu, rozpustnost, důkazní reakce funkčních skupin a jednotlivých prvků, polarimetrie, elementární analýza

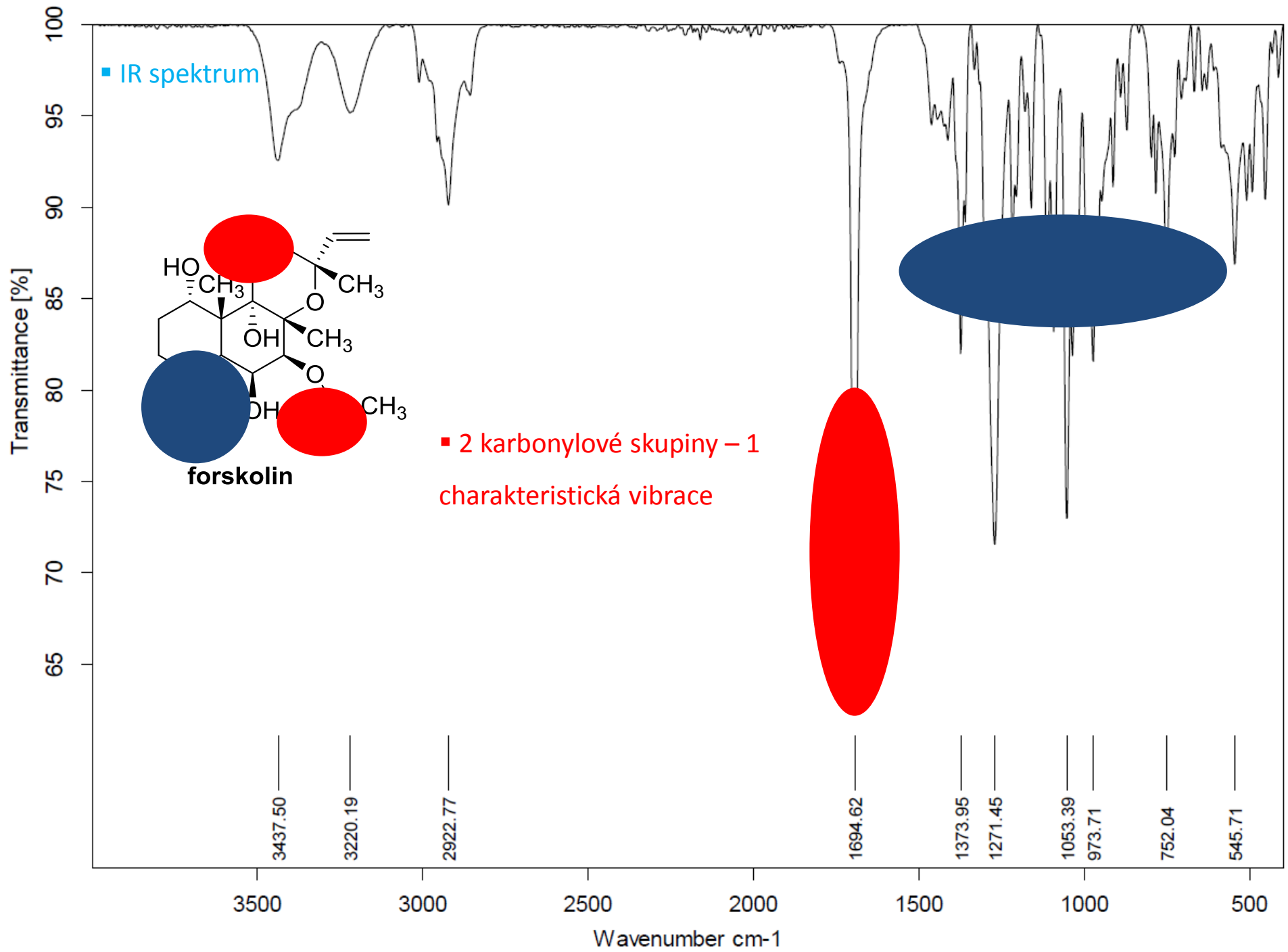
▪ **UV, IR (Raman)** – velmi omezené informace o struktuře (přítomnost standardních funkčních skupin –CN, –COR, –N₃)

▪ **Robert Burns Woodward** – určení struktur mnoha přírodních látek pomocí totálních syntéz a aplikací jednoduchých empirických pravidel UV spektroskopie („Woodward era of total synthesis“)

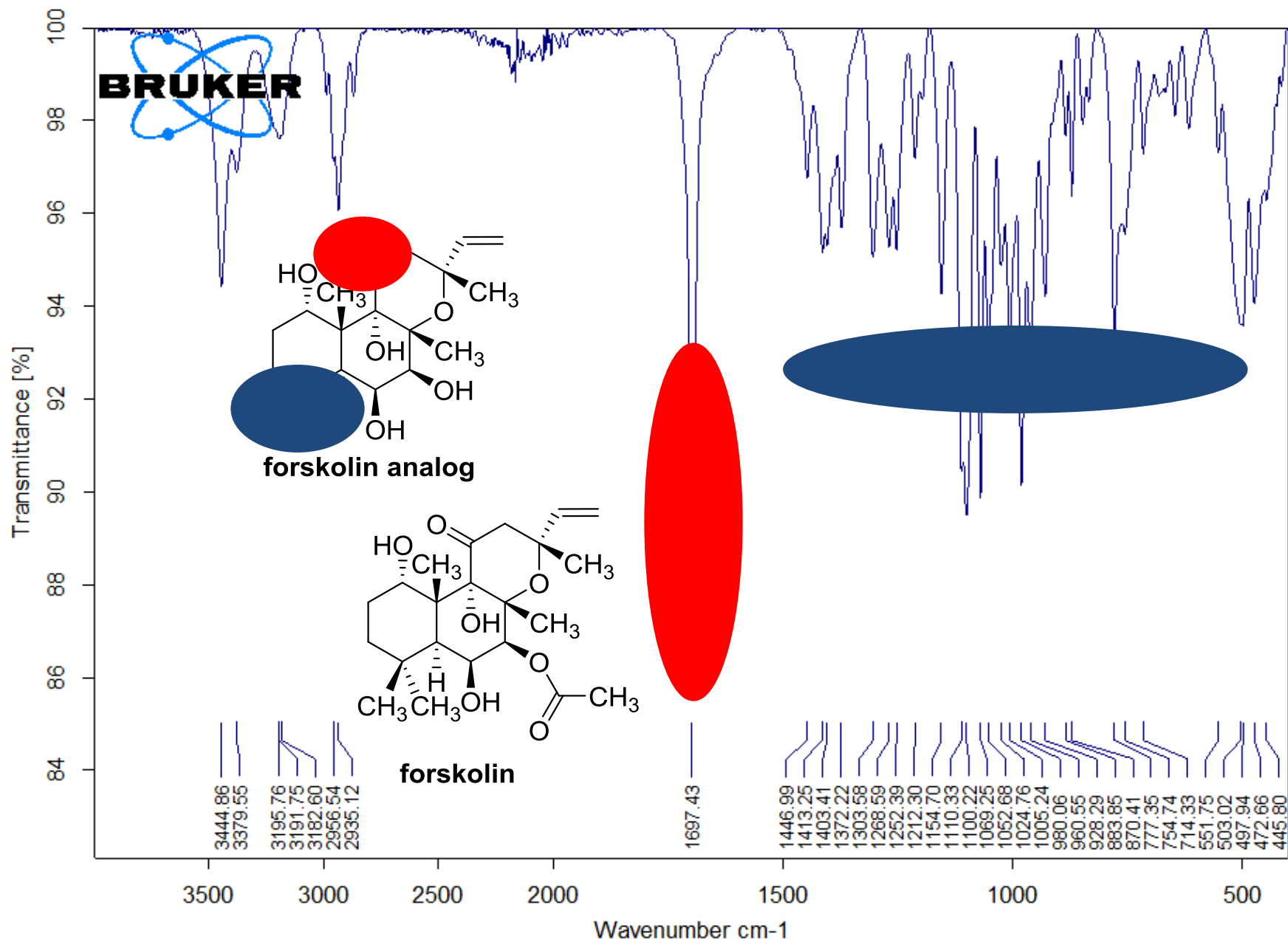
(N.C. 1964) - "for his outstanding achievements in the art of organic synthesis".



chinin - 1944

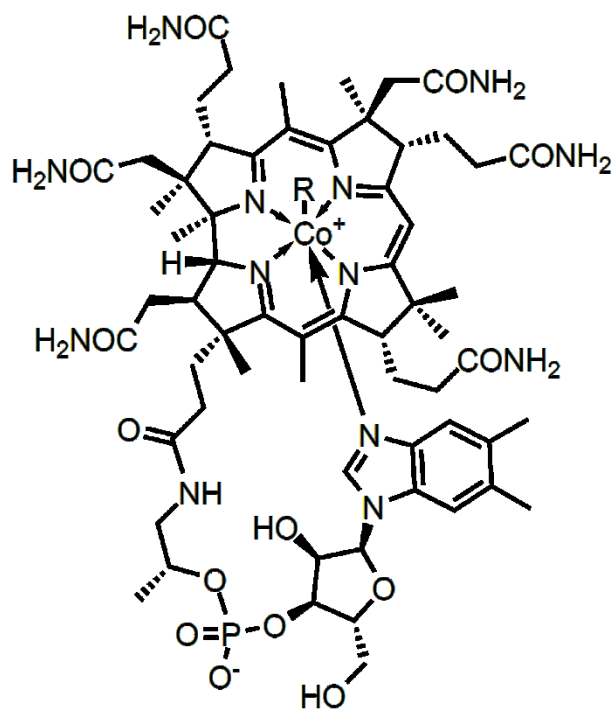


IR spektrum

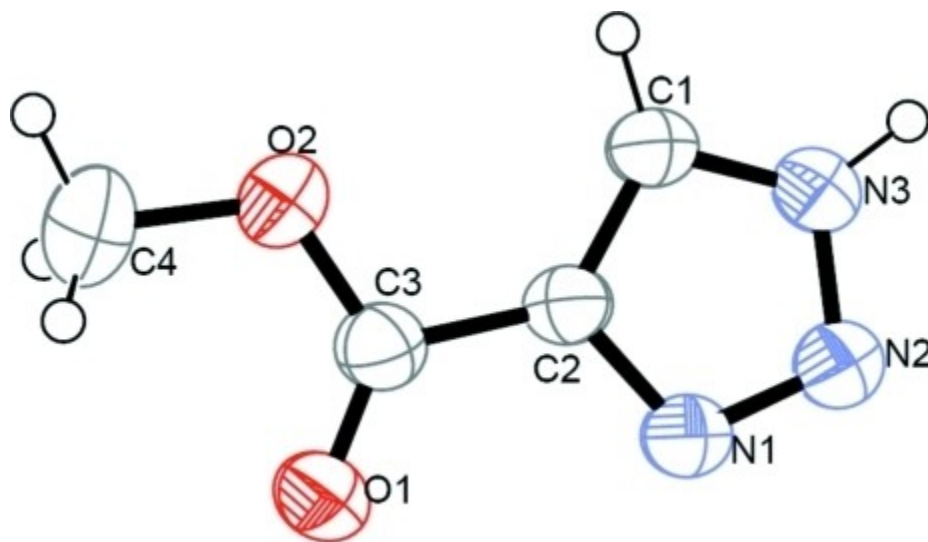


▪ **RTG difrakce** – zcela zásadní význam při studiu struktur malých i velkých (bio)molekul, relativní/absolutní stereochemie, ale pouze pro krystalické vzorky, informace o chování látek v roztoku zcela chybí

▪ **struktura vitamínu B₁₂** – vyřešena pomocí x-ray difrakce – 1948-1955, D.M. Hodkin (N.C. -1964) - *"for her determinations by X-ray techniques of the structures of important biochemical substances"*.



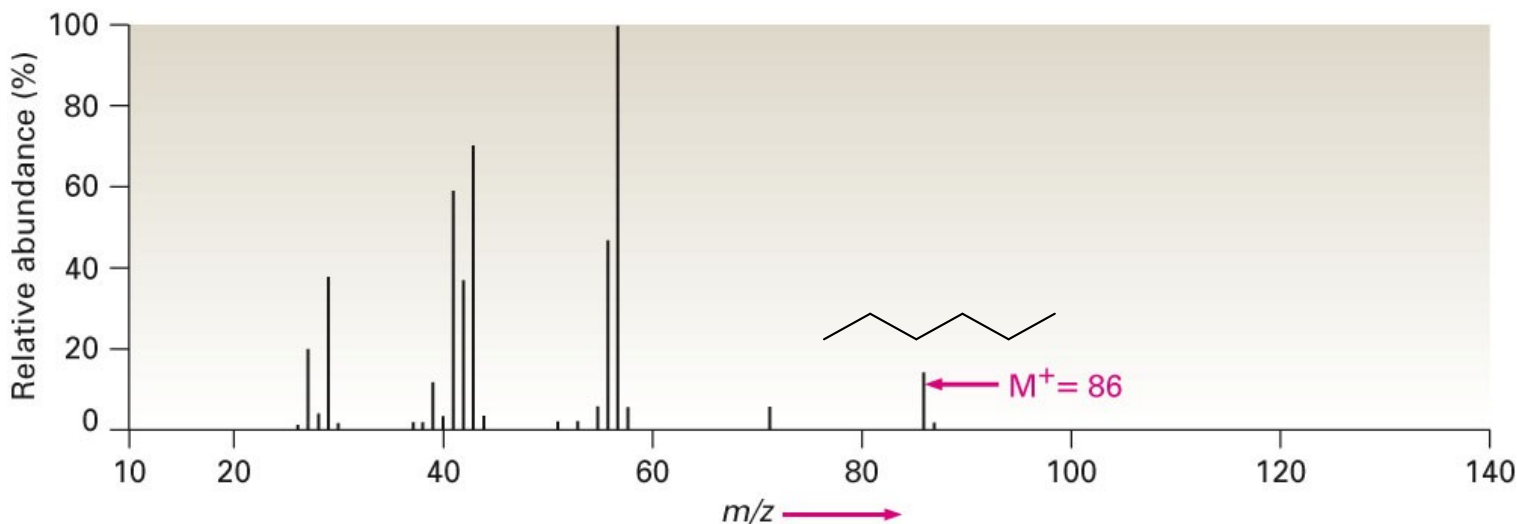
R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN



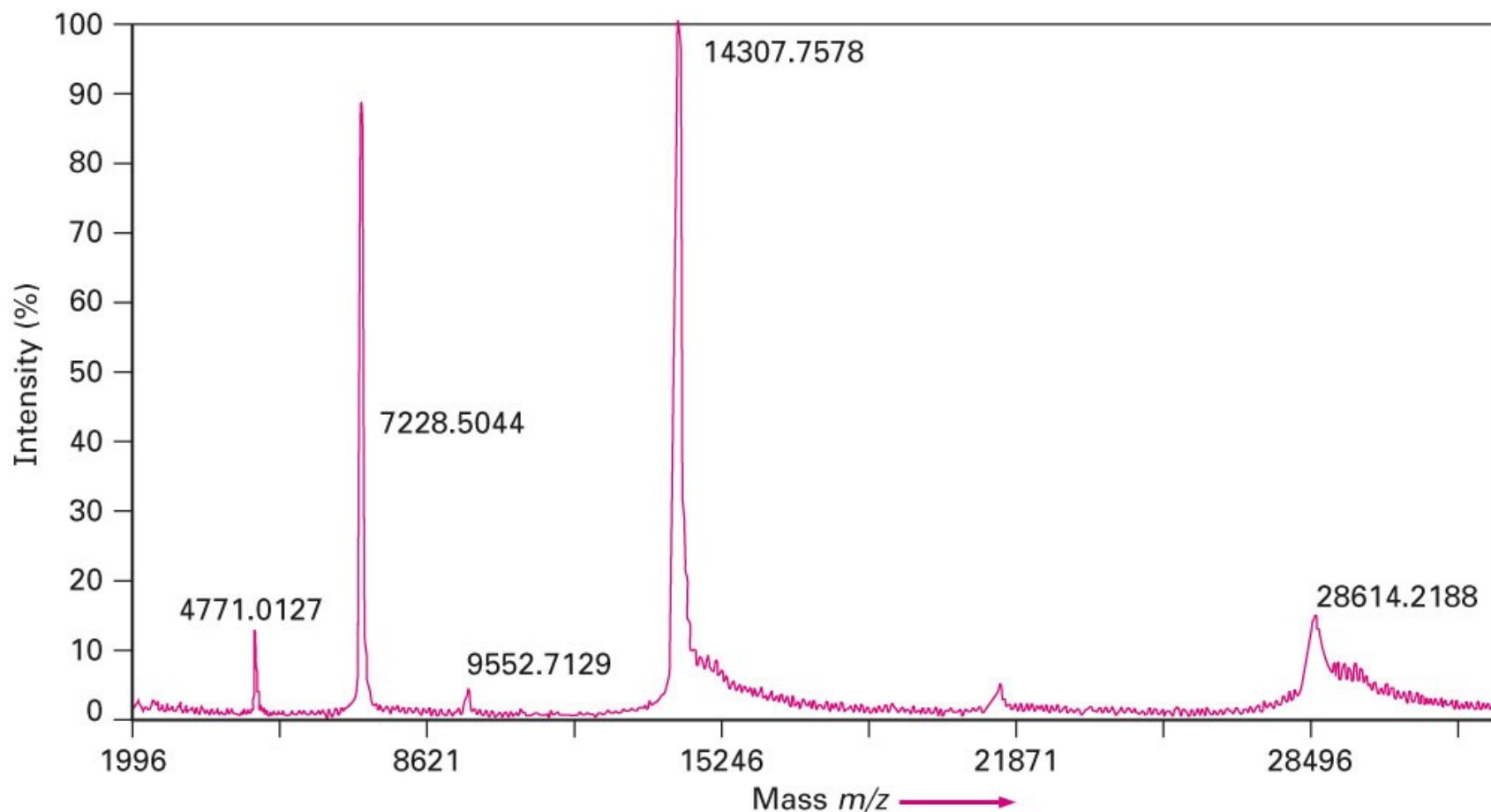
▪ typické zobrazení struktury vyřešené pomocí x-ray difrakce

- **MS** – hmotnostní spektrometrie, určení molekulární struktury (sumární vzorec) – ale pro rozlišení regioisomerů, diastereomerů a enantiomerů je MS nevhodnou metodou, velký význam má dnes HR-MS (MS s vysokým rozlišením) v kombinaci s jemnými ionizačními technikami, která poskytuje informace o identitě molekuly
- Určení struktury však může být komplikováno fragmentací, nestabilitou molekul při přechodu do plynné fáze apod.

hexan (C_6H_{14} ; MW = 86)



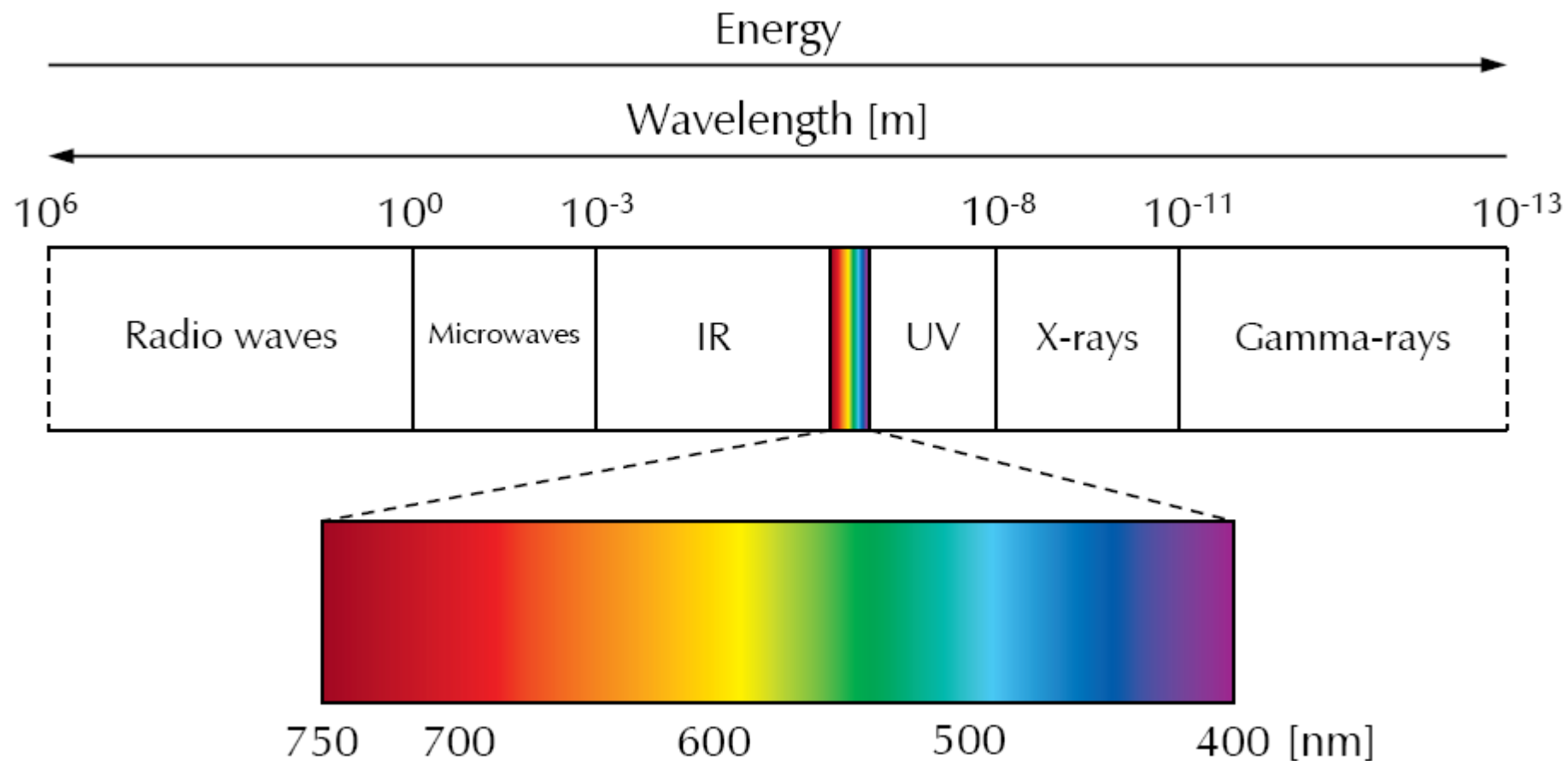
- **MS-MALDI-TOF** – excelentní nástroj pro studium biomolekul - proteinů
- **HR-MS spektrum** vaječného lysozymu s $M_R = 14307.7578$



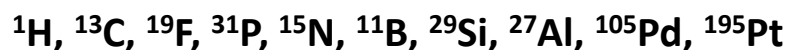
- **NMR spektroskopie** – **N**ukleární **M**agnetická **R**ezonance – zcela zásadní a unikátní spektrální metoda, s
možností pracovat se vzorky v plynném, kapalném a pevném stavu
- nedestruktivní, detailní informace o struktuře látek, dynamickém chování molekul – tautomerie,
konformační pohyb, nekovalentní interakce, stereochemie
- **určení 3D struktury proteinů za fyziologických podmínek včetně dynamického chování**
- **studium difúzních jevů**
- **NMR v pevné fázi se využívá při studiu různých materiálů, farmaceuticky aktivních látek – studie
krystalových polymorfů apod.**
- **MRI** – magnetic resonance imaging medicínální aplikace – diagnostika



- spektroskopie je obecně založena na interakci hmoty s elektromagnetickým zářením



v NMR jde o absorpci **radiofrekvenčních vln** magneticky aktivními jádry ve vysokém magnetickém poli



- některá atomová jádra (izotopy) mohou mít spin – nenulový jaderný spin (rotace kolem vlastní osy), který produkuje magnetický dipól moment

^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N : $I = \frac{1}{2}$

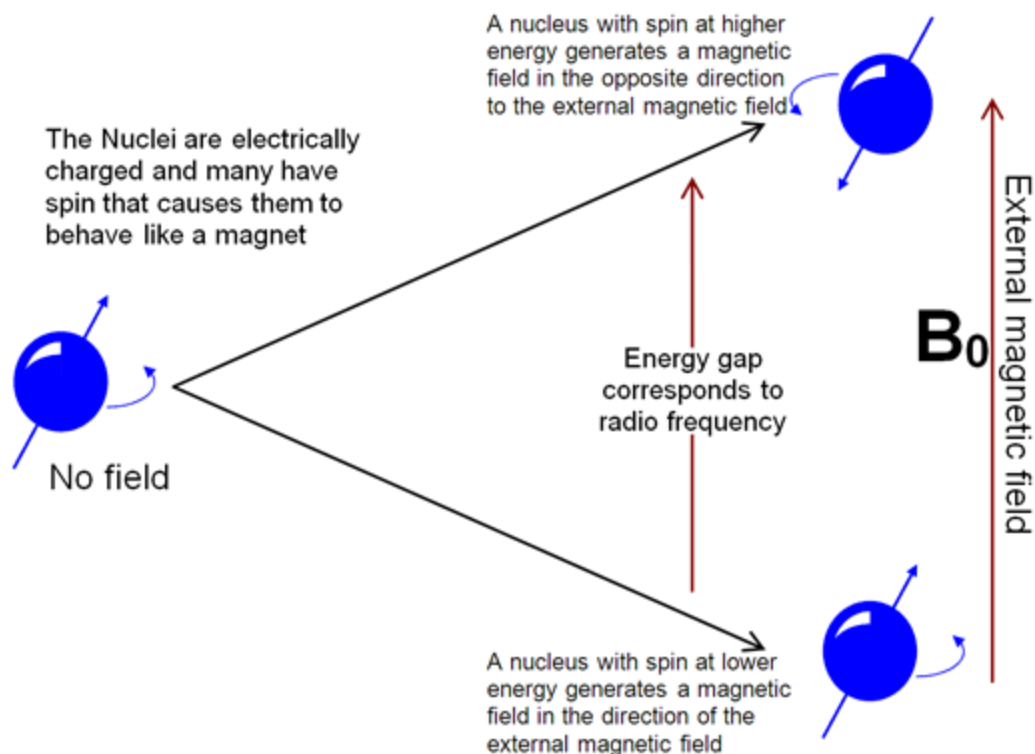
^{11}B : $I = \frac{3}{2}$

^{14}N , ^2H : $I = 1$

$I > \frac{1}{2}$ kvadrupolární jádra – chování v NMR spektroskopii je mnohem komplikovanější

^{12}C , ^{16}O , ^{19}F , ^{32}S : $I = 0$ - NMR neaktivní jádra – nedají se měřit

The case of the spin- $\frac{1}{2}$ nucleus



rezonanční podmínka:

$$\Delta E = h\gamma B_0 / 2\pi = h\nu$$

B_0 – externí magnetické pole (Tesla)

9.5 T = 400 Mhz NMR stroj

γ – magnetogyrická konstanta –

vlastnost daného jádra,

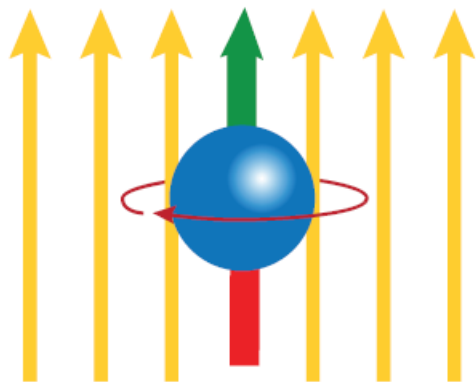
čím větší tím je jádro v NMR citlivější

$$N_\alpha / N_\beta = e^{\Delta E / kT}$$

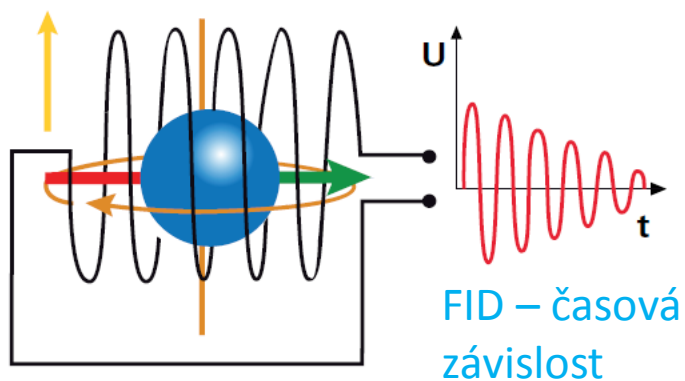
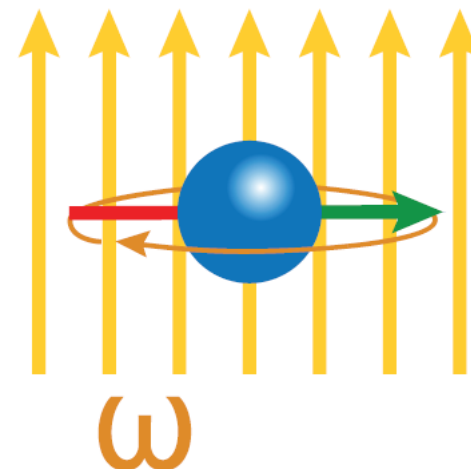
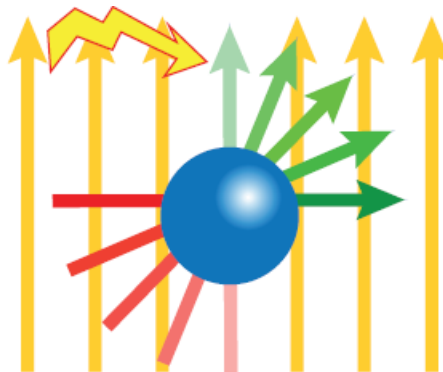
ΔE pro ^1H při 400 Mhz je 3.8×10^{-5}

Kcal/mol = $N_\alpha / N_\beta = 1.000064$!!! – velmi malý rozdíl v populacích, NMR je velmi necitlivá metoda

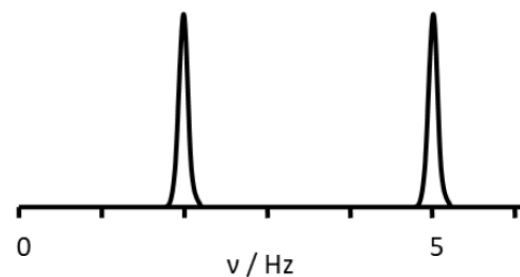
jádra v magnetickém poli vytvoří makroskopickou magnetizaci



krátkým pulsem (μsec) radiových vln (o širokém spektru frekvencí) se jádra ozáří a vektor magnetizace začne rezonovat (precesní pohyb)



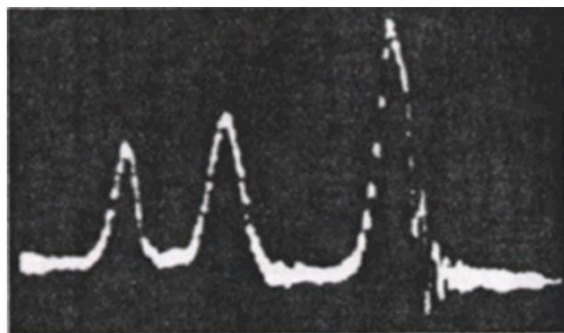
Fourierova transformace



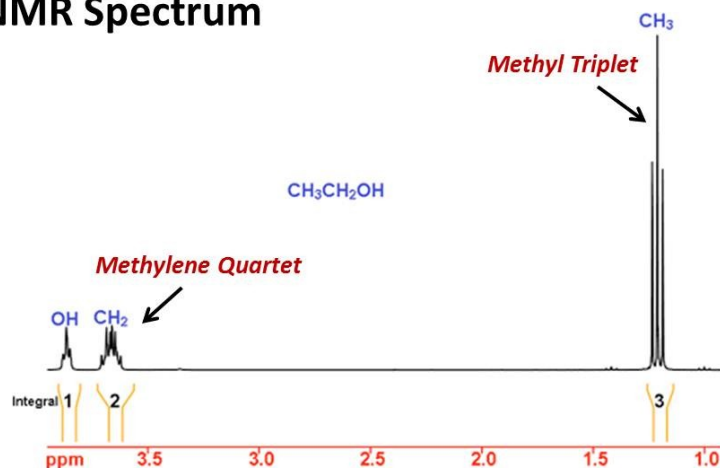
frekvenční závislost - NMR spektrum

- 1946 – první NMR spektrometr 30 Mhz
- 1957 – první ^{13}C NMR spektrum
- 1961 – první FT-NMR spektrum vyrobený v ČSR (Tesla Brno, J.Dadok)
- 1966 – aplikace Fourierovy transformace v NMR
- 1975 – 2D NMR techniky
- 1985 – vyřešena první 3D struktura proteinu pomocí NMR

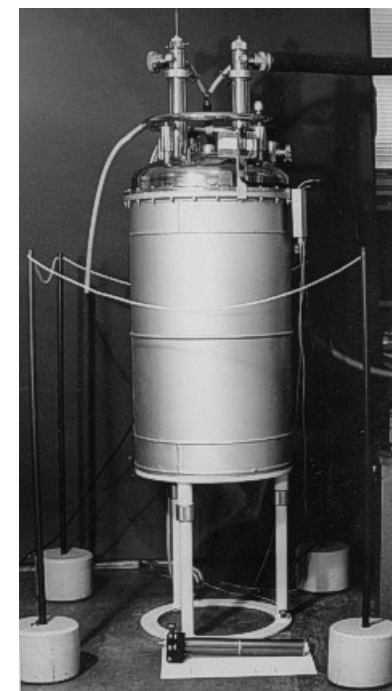
Ethanol ^1H NMR Spectrum



First ^1H NMR Spectrum of *ethanol*
at **30 MHz** -1951 Stanford Univ



^1H NMR Spectrum of *ethanol* at 700 MHz



Supravodivý magnet
(200Mhz) Tesla Brno

- Nobelovy ceny: 1943 – O. Stern (Fyzika)
 1944 – O. Rabi (Fyzika)
 1952 – E. Bloch, F. Purcell (Fyzika)
 1991 – R. Ernest (Chemie)
 2002 – K. Wütrich (Chemie)
 2003 – P. Lauterbur, P. Mansfield (Fyziologie a medicína)

Vyšší magnetické pole, větší rozlišení a citlivost

40 MHz

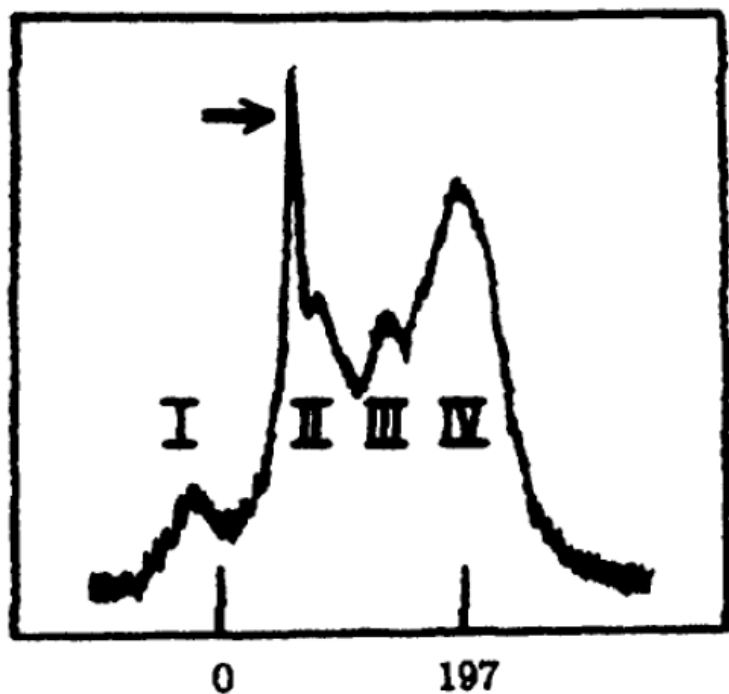
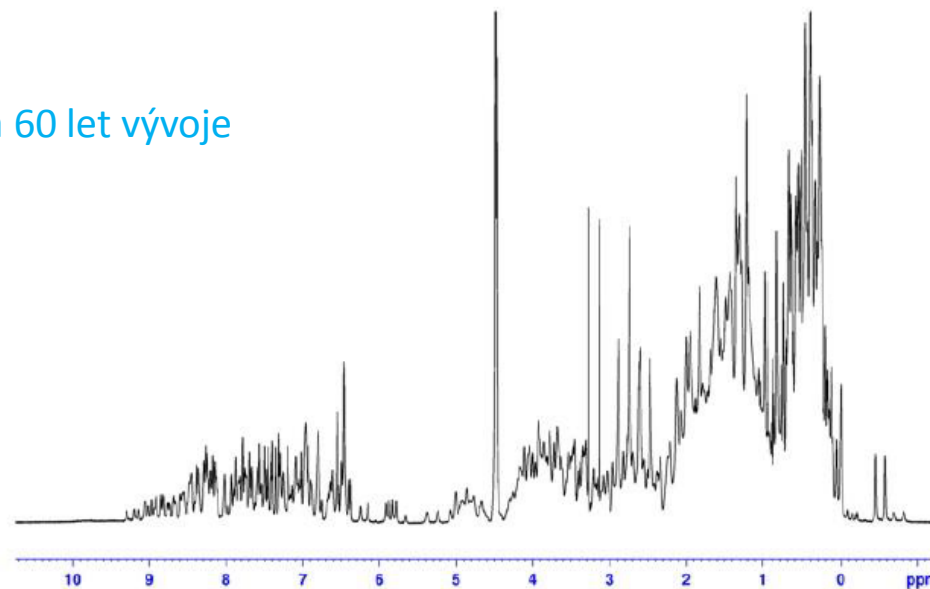


Fig. 1. The first NMR spectrum of a protein (RNase A; 20% (w/v) in D₂O) published, a single slow scan at 40 MHz [14].

1000 MHz

cca 60 let vývoje



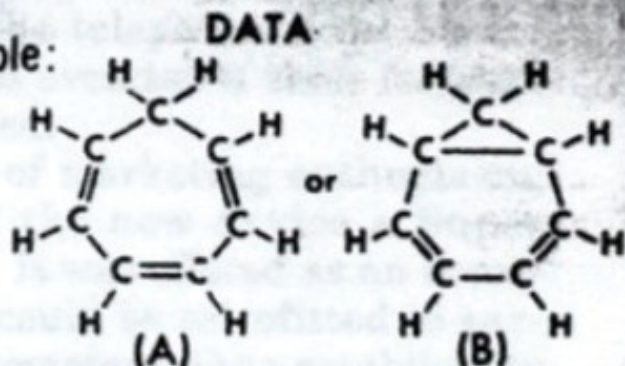
1 GHz NMR spectrum of 2 mM ubiquitin

První strukturální problém vyřešen pomocí ^1H NMR spektroskopie

20 USE OF INTEGRATED INTENSITIES IN STRUCTURE ANALYSIS

(Number 20 of a series)

Sample:



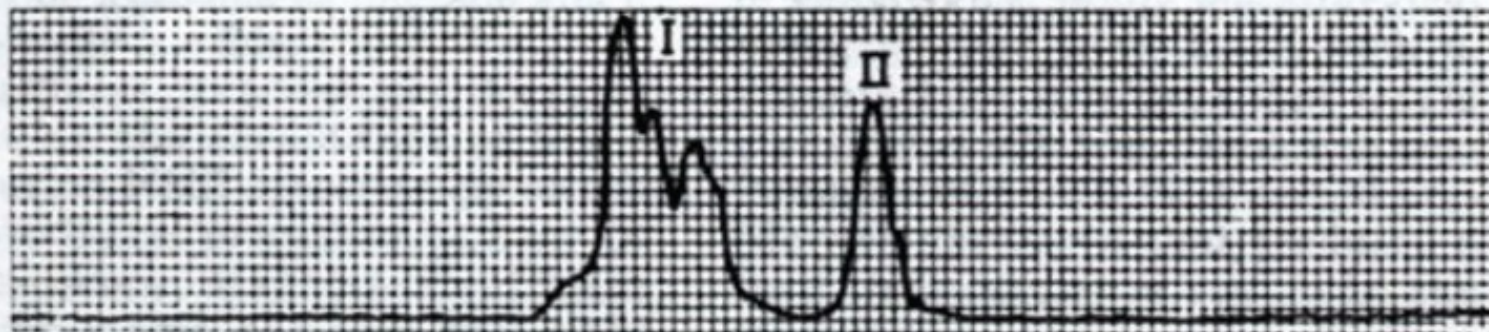
Volume: 0.01 cc.
 Signals Observed: H^1
 Frequency: 30 mc.
 Field: 7050 gauss

INTERPRETATION

In solving the problem of whether structure A or B correctly represents the sample submitted for analysis, it becomes necessary to measure the areas under the nuclear resonance peaks. Region I contains peaks corresponding to the protons attached to doubly bonded carbon atoms, while region II corresponds to protons attached to carbon atoms forming only single bonds. The ratio of areas (I:II) should be 3:1 for compound A and 1:1 for compound B. The measured value of 2.9:1 leaves no doubt of the identity of the sample with structure A.

The sample was furnished through the courtesy of
 Professor E. J. Corey, Chemistry Department, University of Illinois.

INCREASING MAGNETIC FIELD \longrightarrow

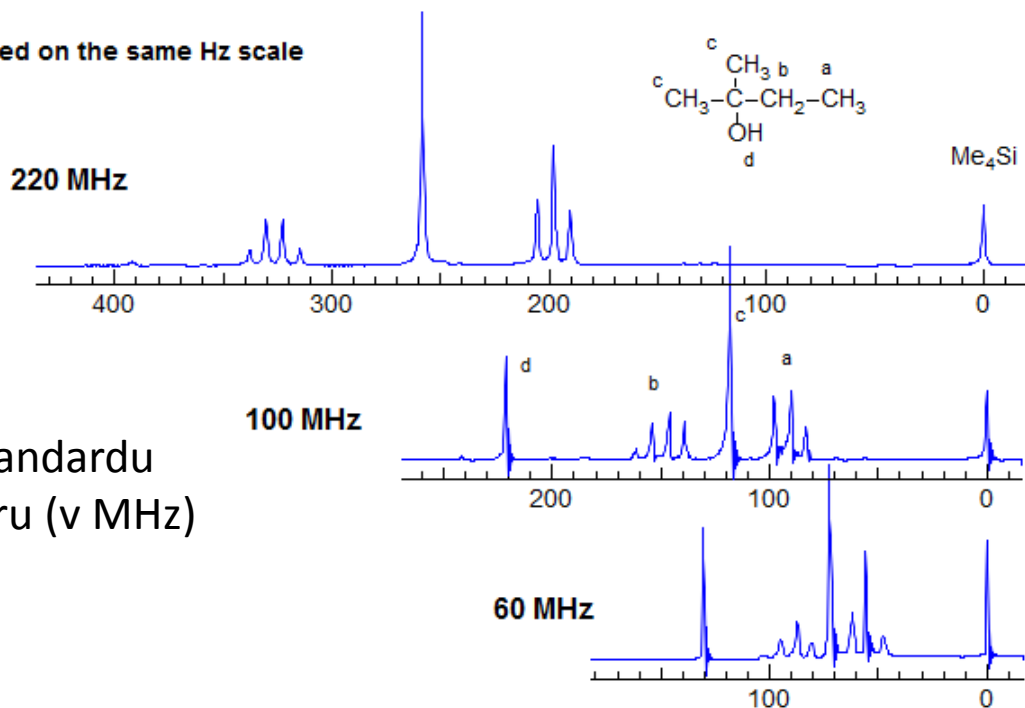


- Chemický posun
- Počet signálů ve spektru
- Relativní integrální intenzita
- Multiplicita signálu -interakční konstanty
- Polo-šířka signálu – relaxace/dynamické jevy

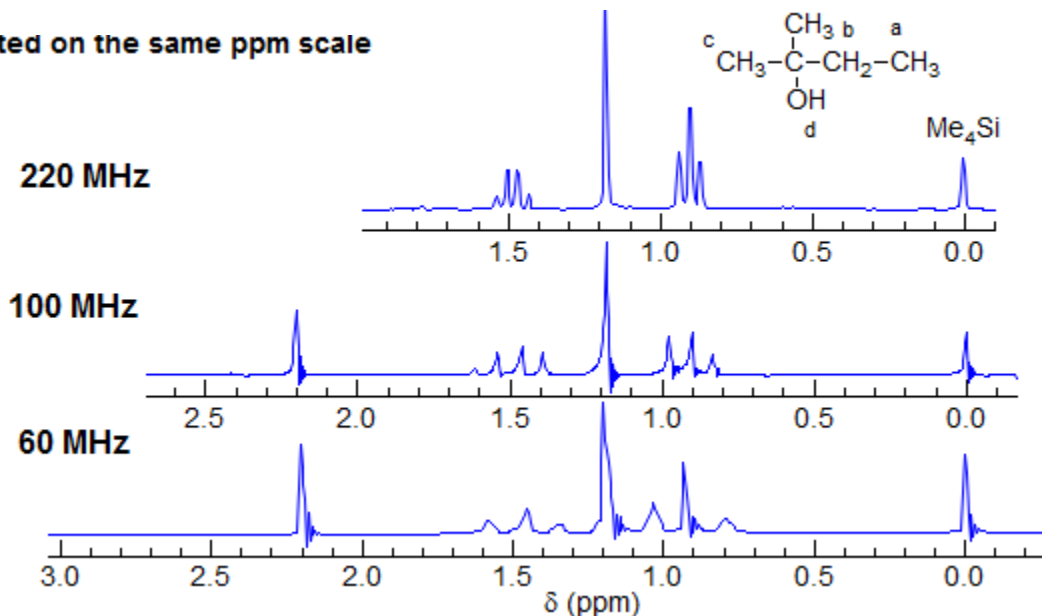
Z jednoho spektra lze vyčíst obrovské množství informací

Chemický posun = δ (ppm)

Plotted on the same Hz scale

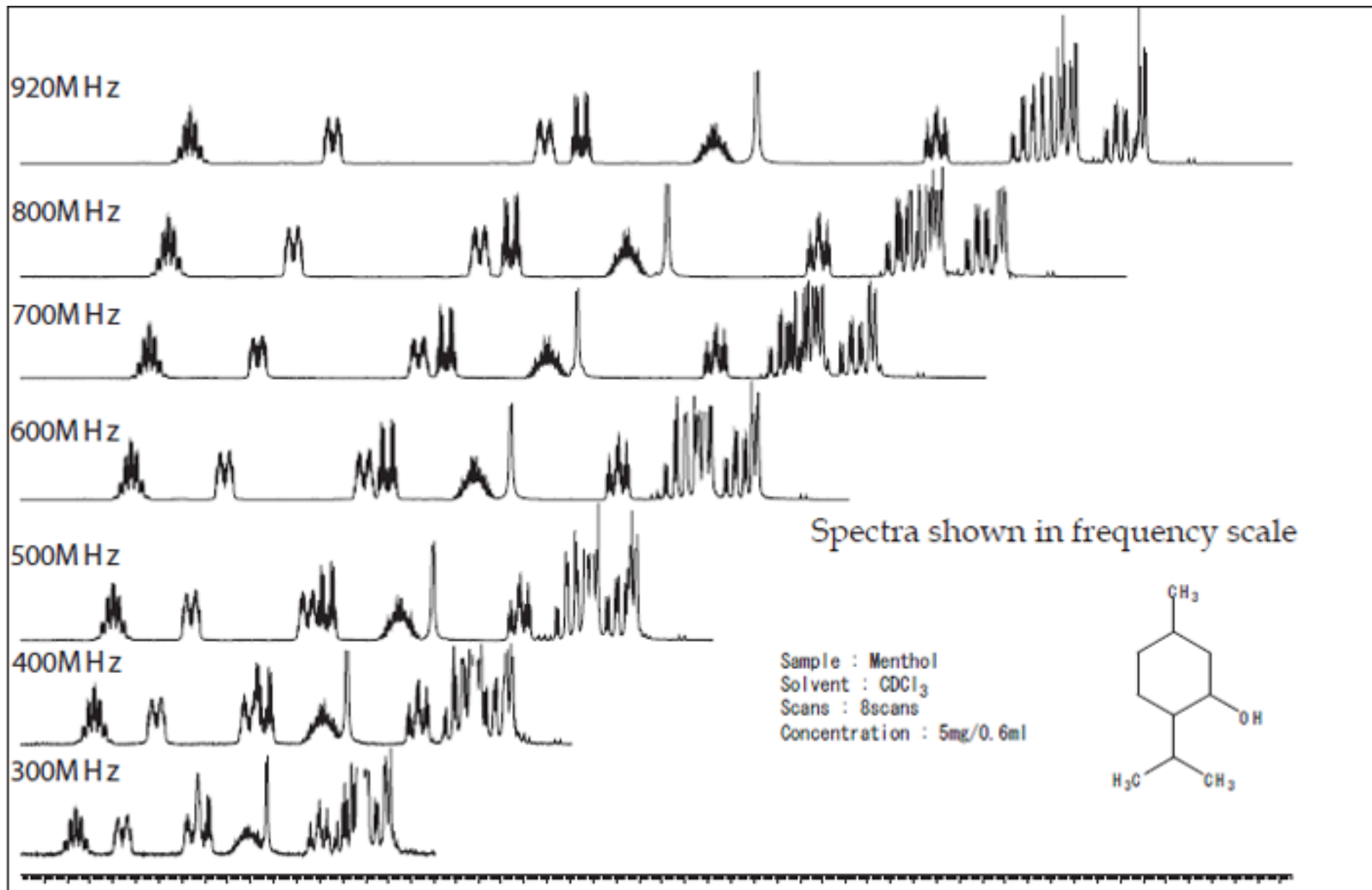


Plotted on the same ppm scale

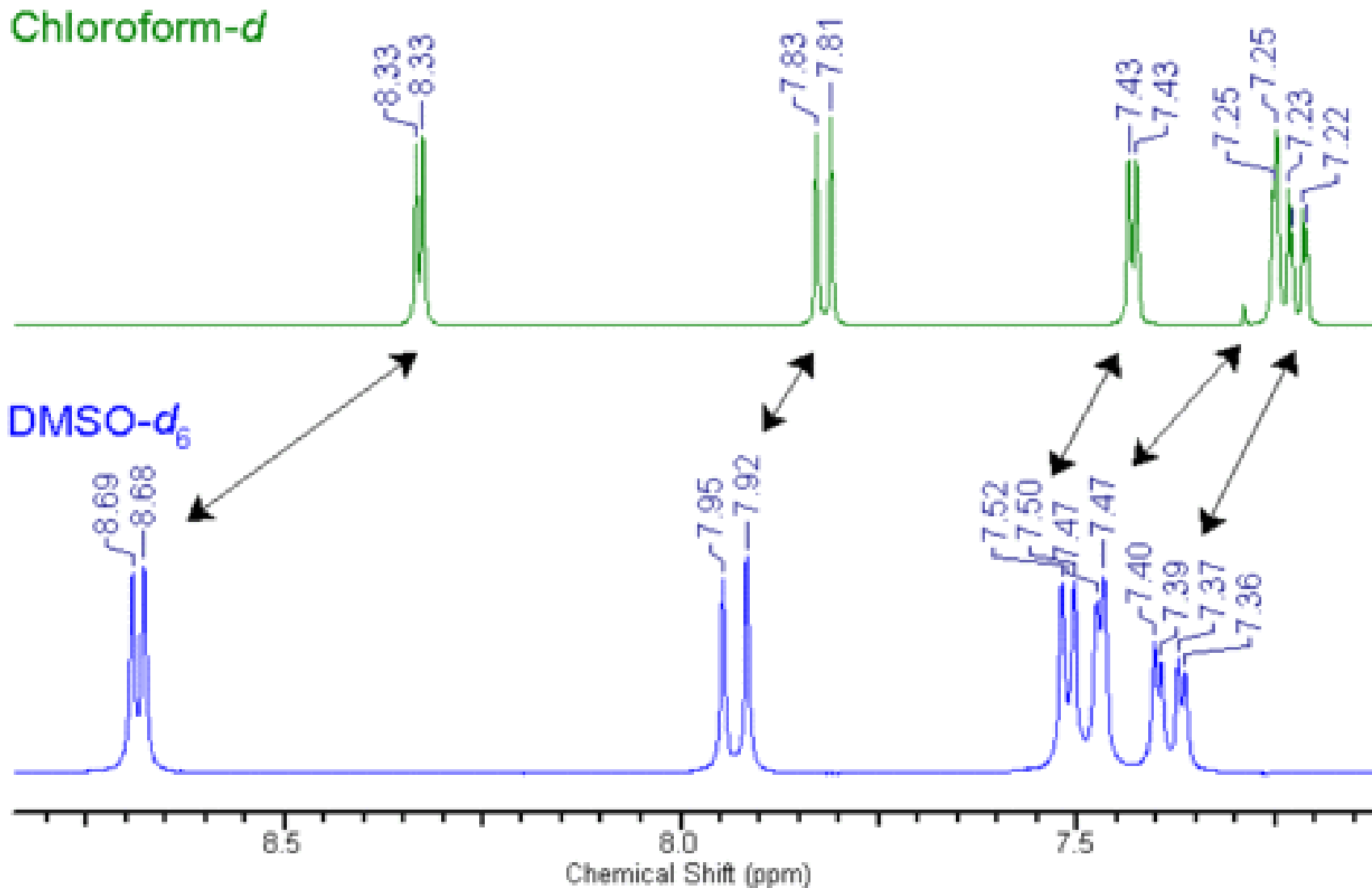


δ = frekvence signálu - frekvence standardu
(Me₄Si v Hz)/frekvence spektrometru (v MHz)

→ nezávislý na použitém poli

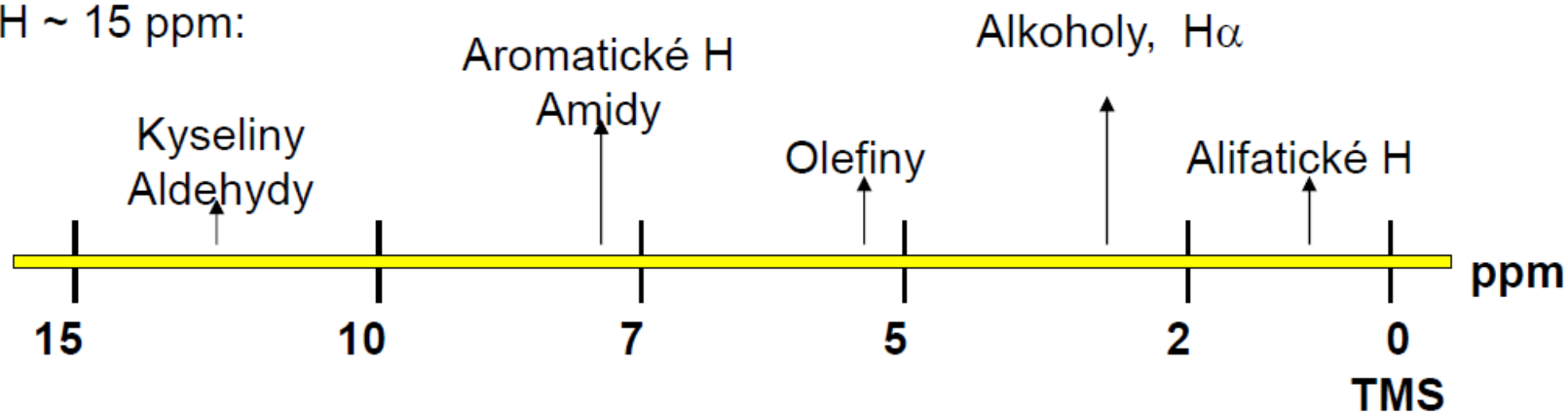


- Chemický posun = δ (ppm), závisí na rozpouštědle, teplotě, pH, iontové síle apod.

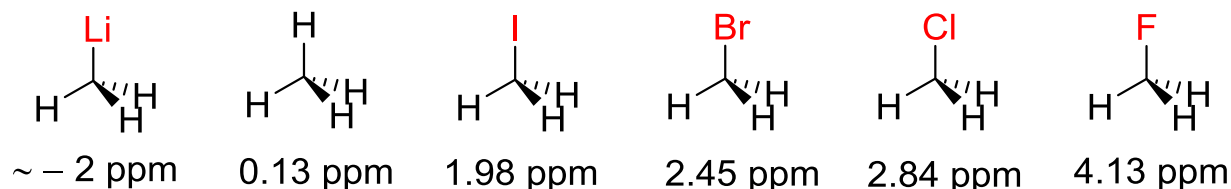


- Chemický posun je velmi důležitou kvalitativní veličinou – na každé jádro působí okolní jádra a elektrony svým magnetickým polem → strukturní informace

• ^1H ~ 15 ppm:

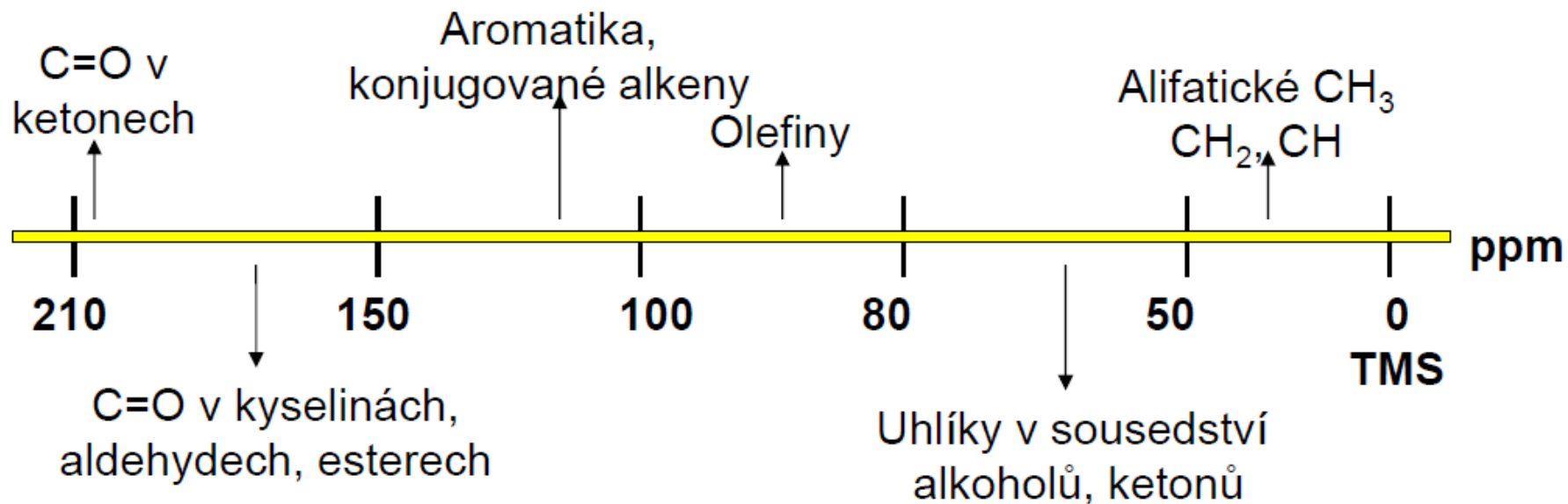
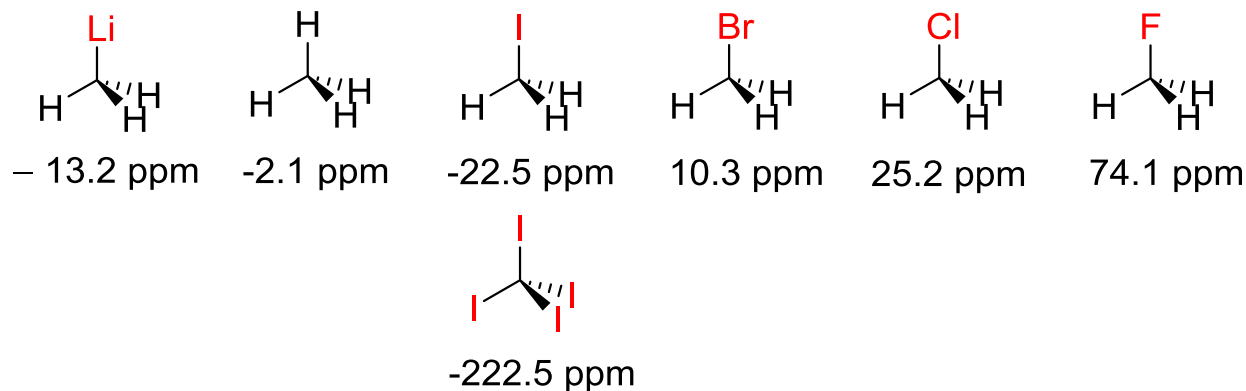


- Efekt elektronegativity na chemický posun methyl skupiny:

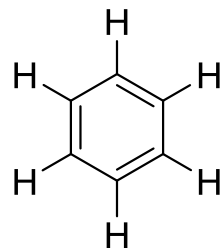


rostoucí elektronegativita, větší odstínění, větší chemický posun

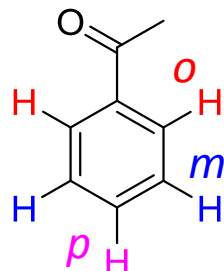
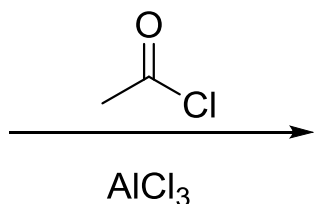
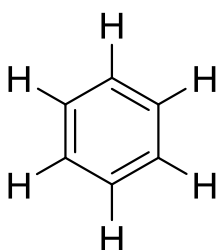
→ chemický posun odráží elektronické a stereochemické jevy, intra a intermolekulární interakce (H-vazby, π - π interakce, interakce s rozpouštědlem...)

^{13}C NMR chemické posuny $^{13}\text{C} \sim 220$ ppm:**Efekt elektronegativity + stínění elektrony na chemický posun methyl skupiny:**

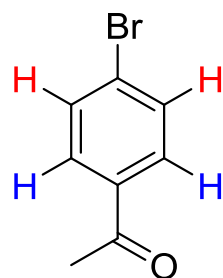
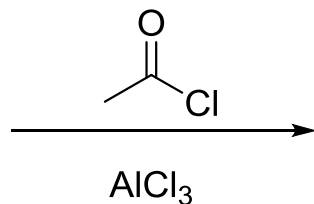
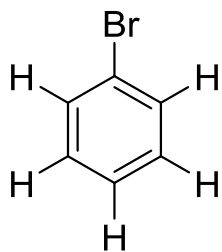
- Počet signálů ve spektru odráží symetrii molekuly – rozlišení isomerů apod.



všech 6 atomů H i C je ekvivalentních – ztotožnitelných operací symetrie → pouze jeden signál v ^1H i ^{13}C spektru

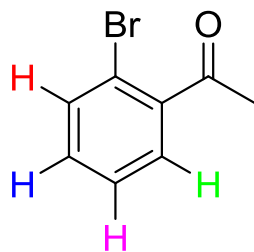
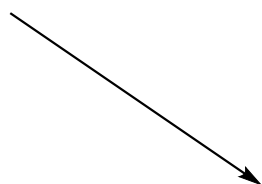


zavedením substituentu na jádro se snížila symetrie a počet aromatických signálů bude 3 – ortho, meta, para a jejich integrální intenzita v poměru, 2:2:1



zavedením substituentu na jádro se opět změnila symetrie a počet aromatických signálů bude 2, v poměru 2:2 → 1:1

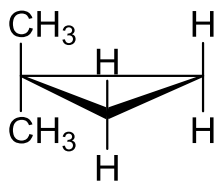
3 ^1H signály



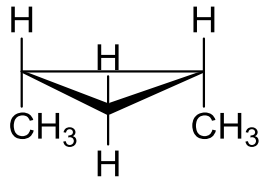
acylací do ortho polohy se opět změnila symetrie a všechny polohy jsou chemicky a magneticky neekvivalentní - počet aromatických signálů bude 4, v poměru 1:1:1:1

Pomocí IR nebo MS velmi obtížně či nerozlišitelné

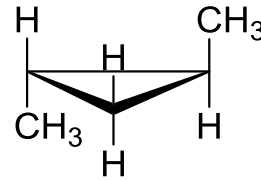
isomery dimethylcyklopropanu



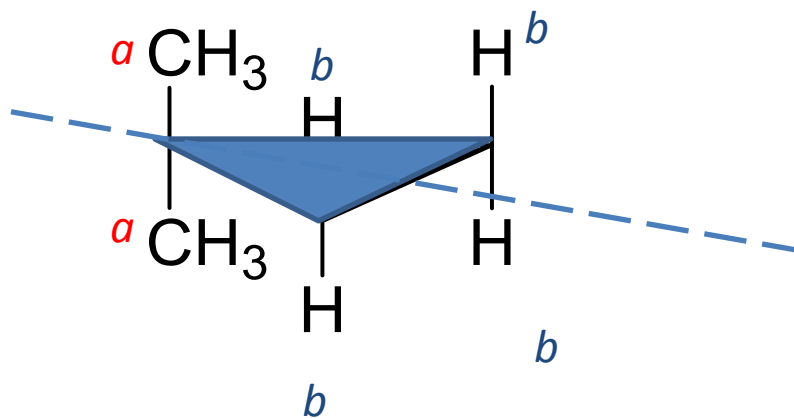
2 signály, 2:1



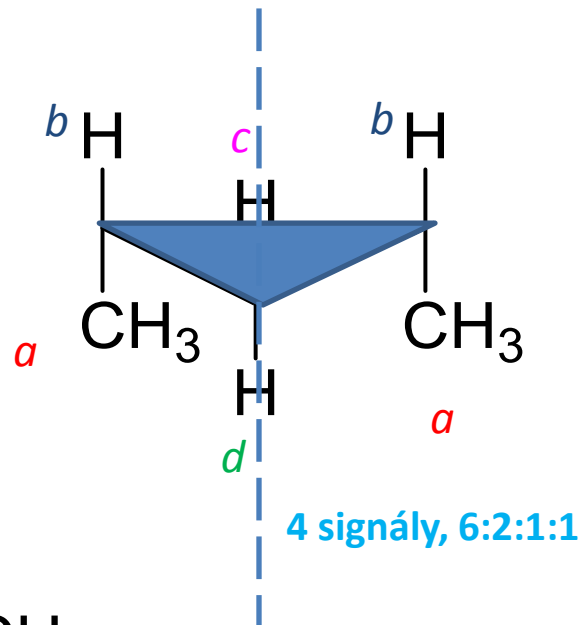
4 signály, 6:2:1:1



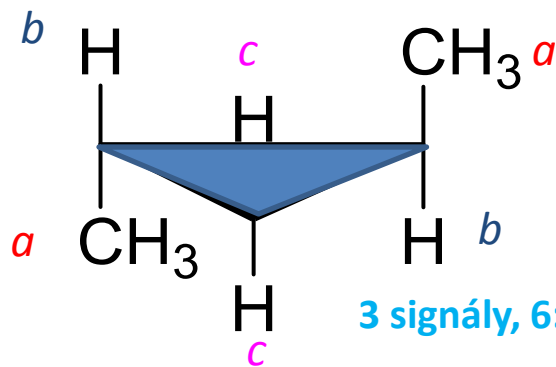
3 signály, 3:1:1



2 signály, 6:4 → 2:1



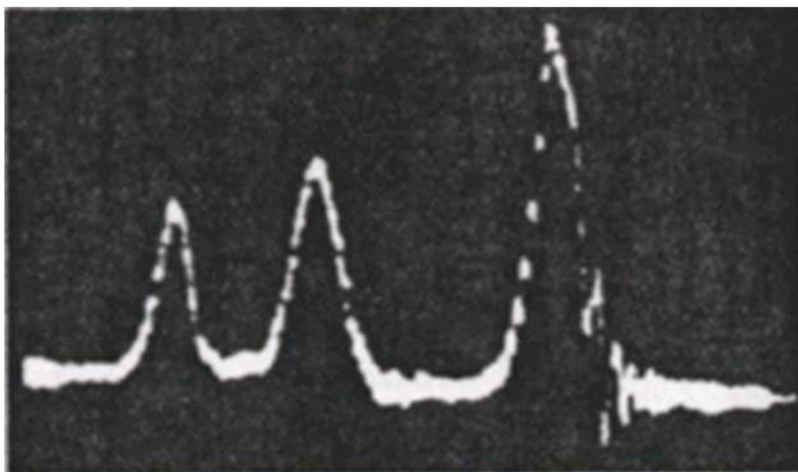
4 signály, 6:2:1:1



3 signály, 6:2:2 → 3:1:1

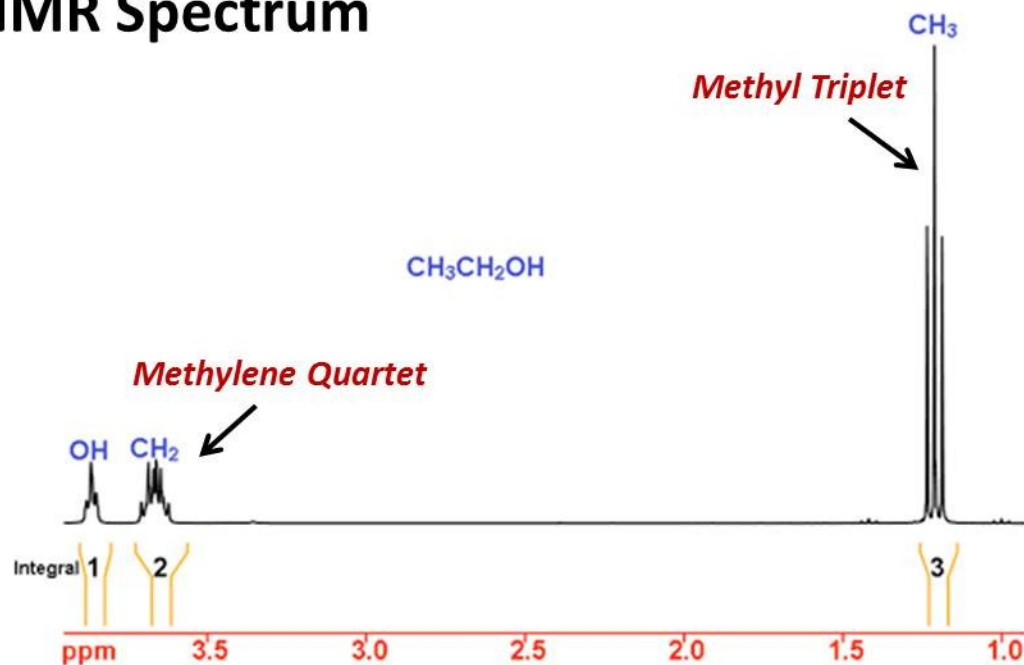
- neekvivalentní jádra, skupiny atomů navzájem interagují – jemná struktura spekter - multiplety

Ethanol ^1H NMR Spectrum

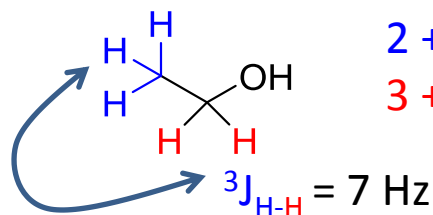


First ^1H NMR Spectrum of *ethanol* at **30 MHz** -1951 Stanford Univ

- Počet linií v multipletu = $2I * n + 1$
- I – spinové číslo, $\frac{1}{2}$ pro ^1H
- n – počet sousedících atomů
- pro $^1\text{H} = n + 1$



^1H NMR Spectrum of *ethanol* at 700 MHz

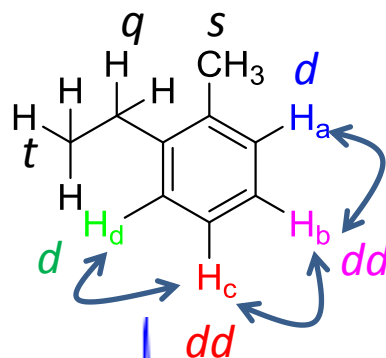
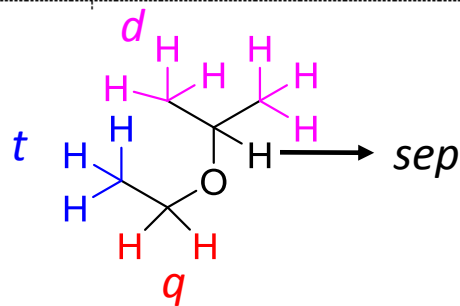
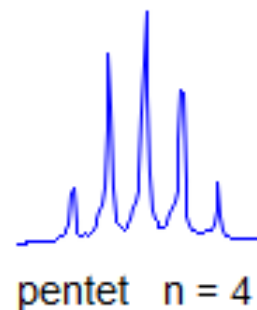


$2 + 1 = 3$ – triplet t

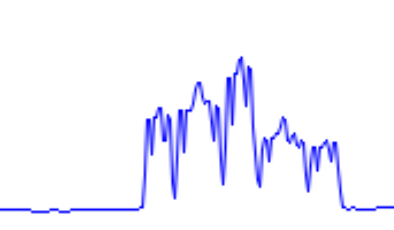
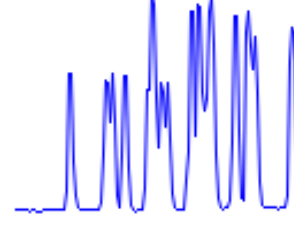
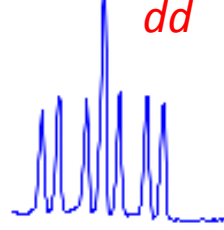
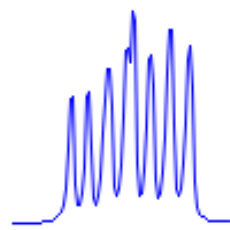
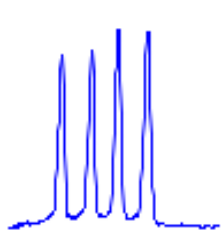
$3 + 1 = 4$ – quartet q

- Počet linií a jejich intenzita – Pascalův trojúhelník

0		1							Singlet (s)
1		1	1						Dublet (d)
2		1	2	1					Triplet (t)
3		1	3	3	1				Kvartet (q)
4		1	4	6	4	1			Kvintet (kv)
5		1	5	10	10	5	1		Sextet (sex)
6		1	6	15	20	15	6	1	Septet (sep)

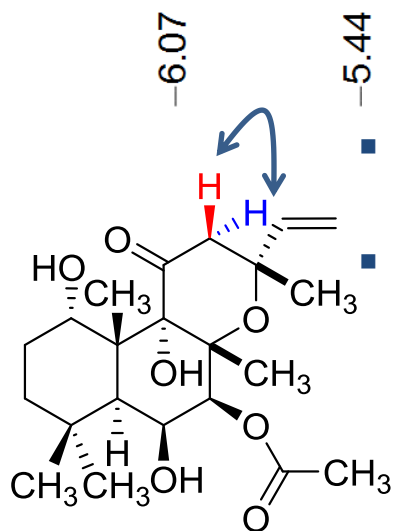


H_b-H_a , ale i $H_b-H_c \rightarrow dd$ (nebo multiplet (4 linie) *ne t, protože* $H_a \neq H_c$)



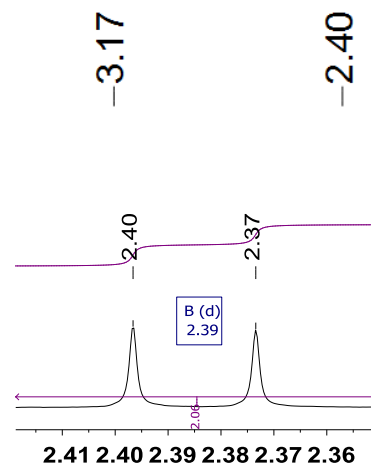
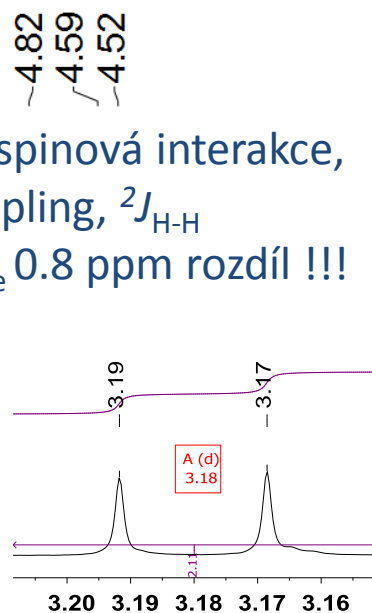
- Komplexní molekuly mohou mít velmi komplexní spektrum

- neekvivalentní jádra (NMR aktivní) navzájem interagují prostřednictvím chemických vazeb (elektronů) - jemná struktura spekter – multiplety

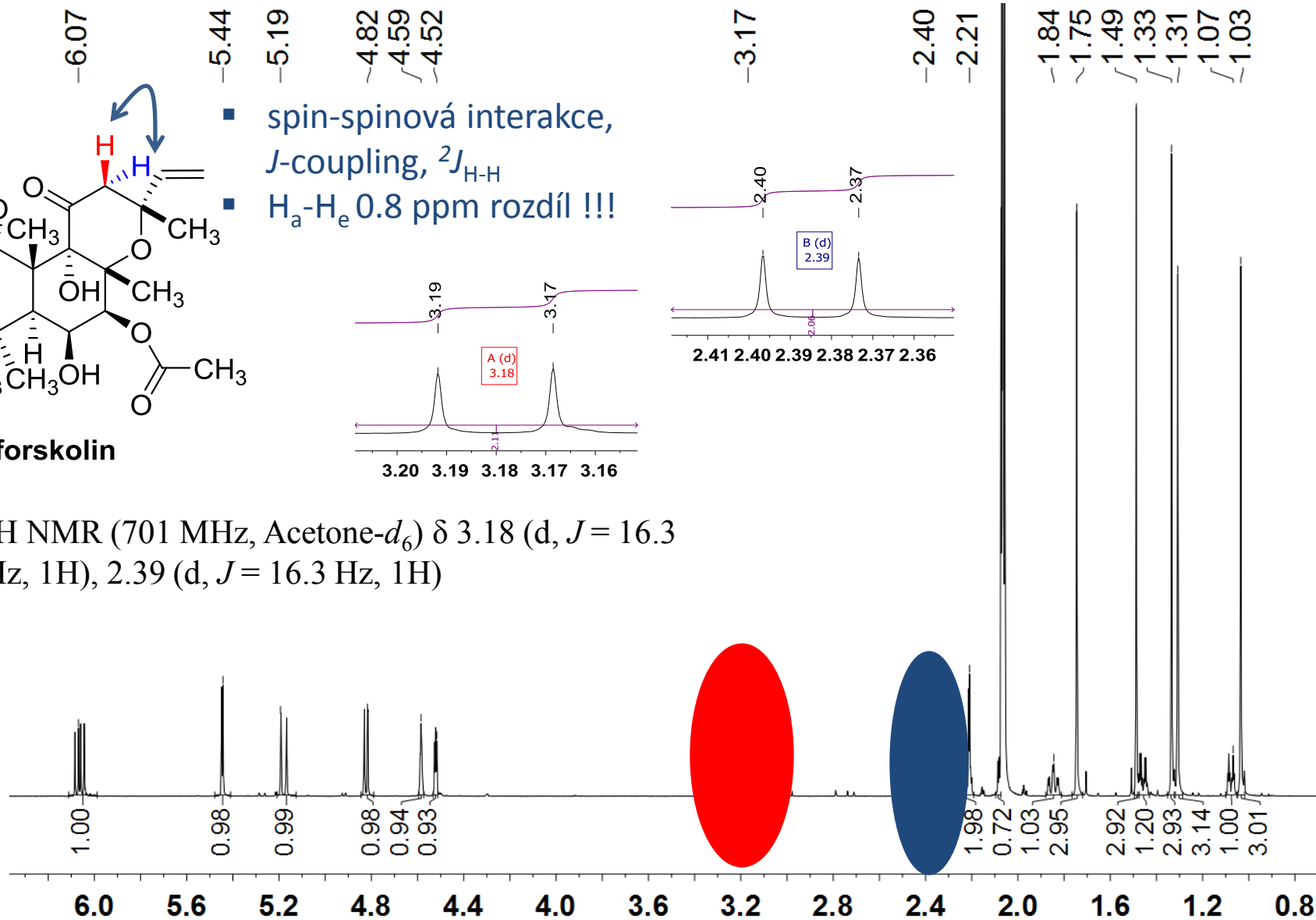


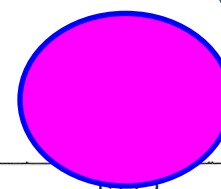
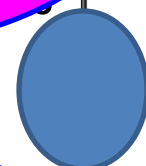
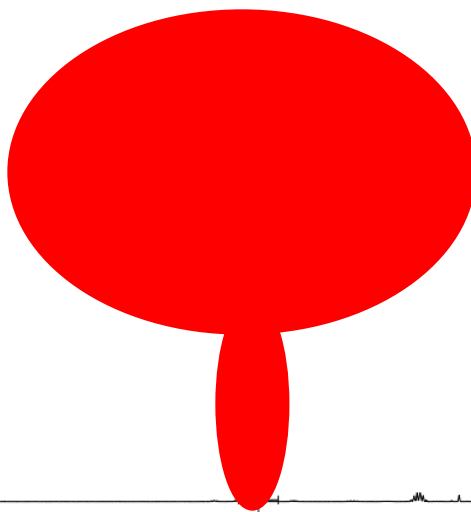
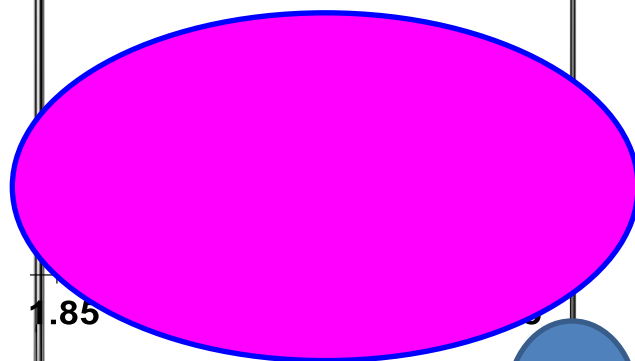
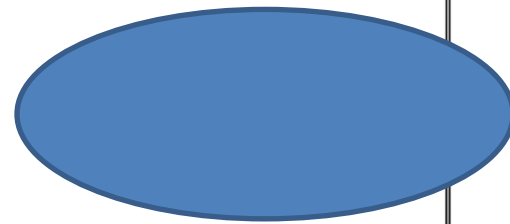
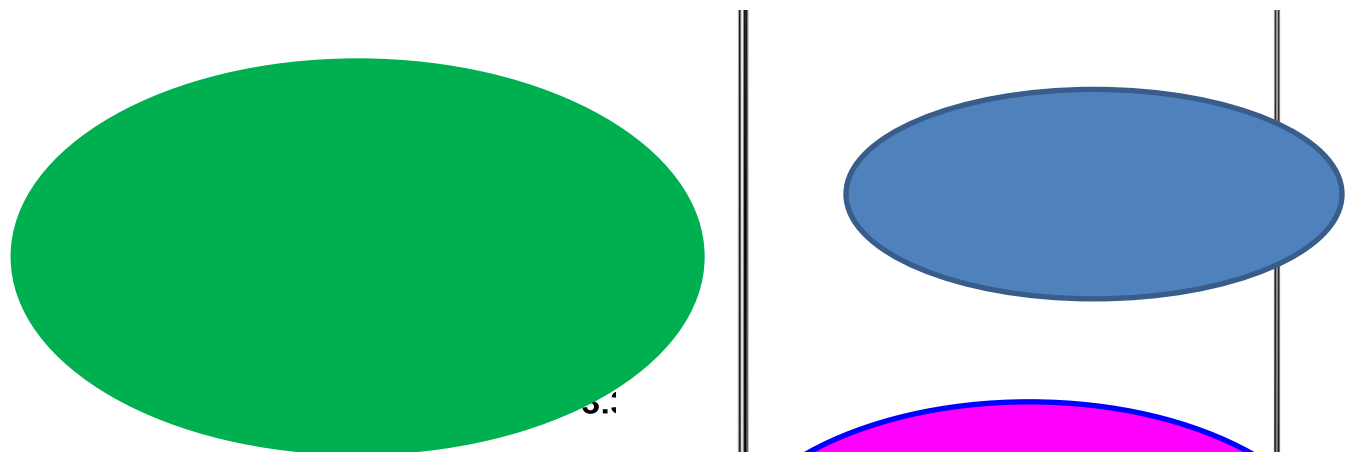
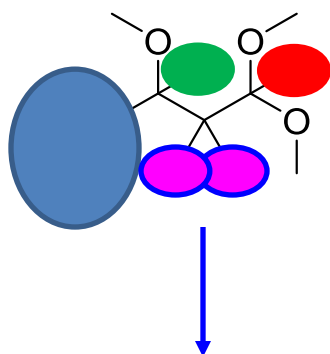
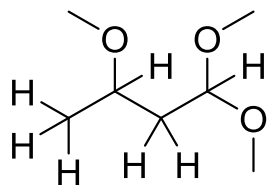
forskolin

- spin-spinová interakce, J -coupling, ${}^2J_{\text{H-H}}$
- H_a-H_e 0.8 ppm rozdíl !!!

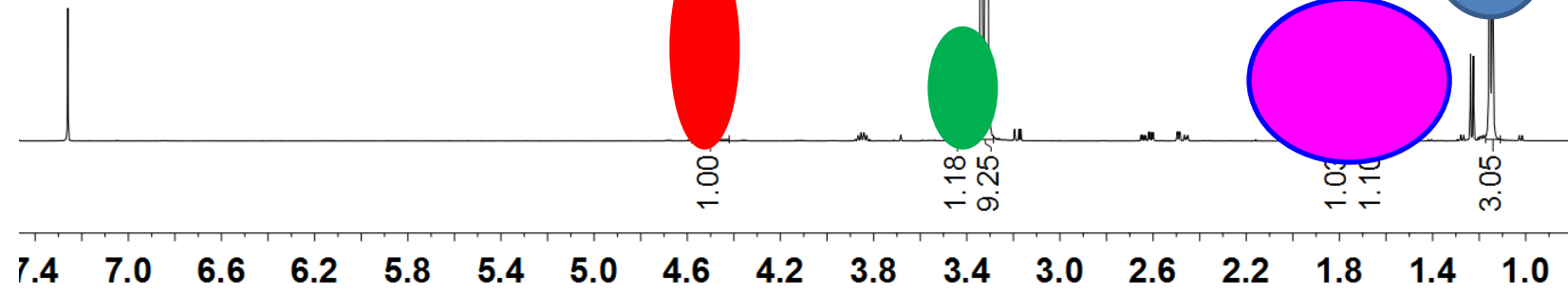


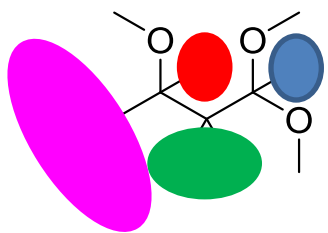
${}^1\text{H}$ NMR (701 MHz, Acetone- d_6) δ 3.18 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 2.39 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H)



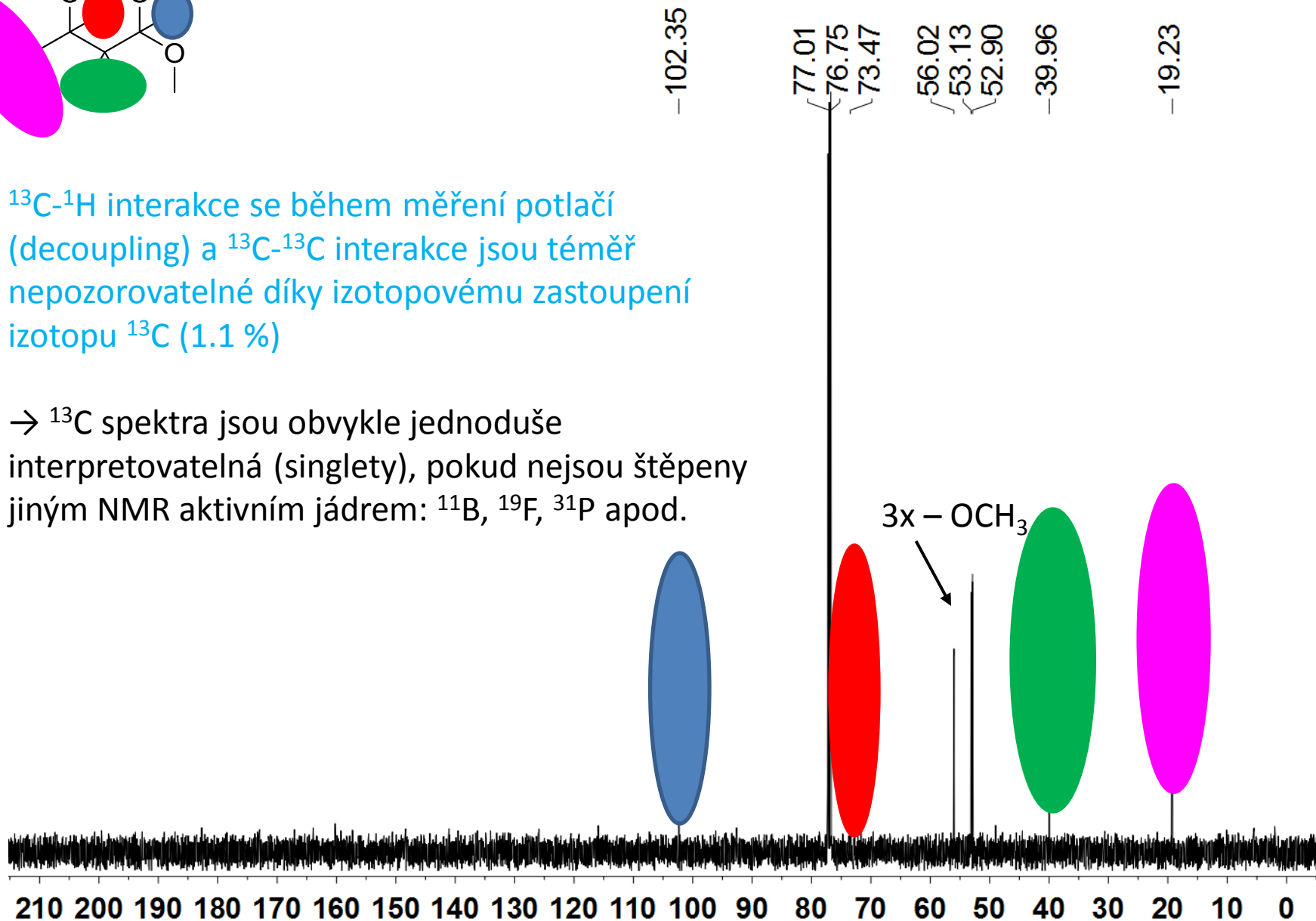


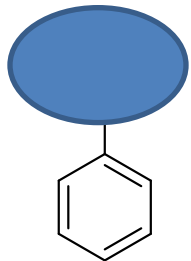
- chemicky ekvivalentní, magneticky neekvivalentní
- diastereotopicitá



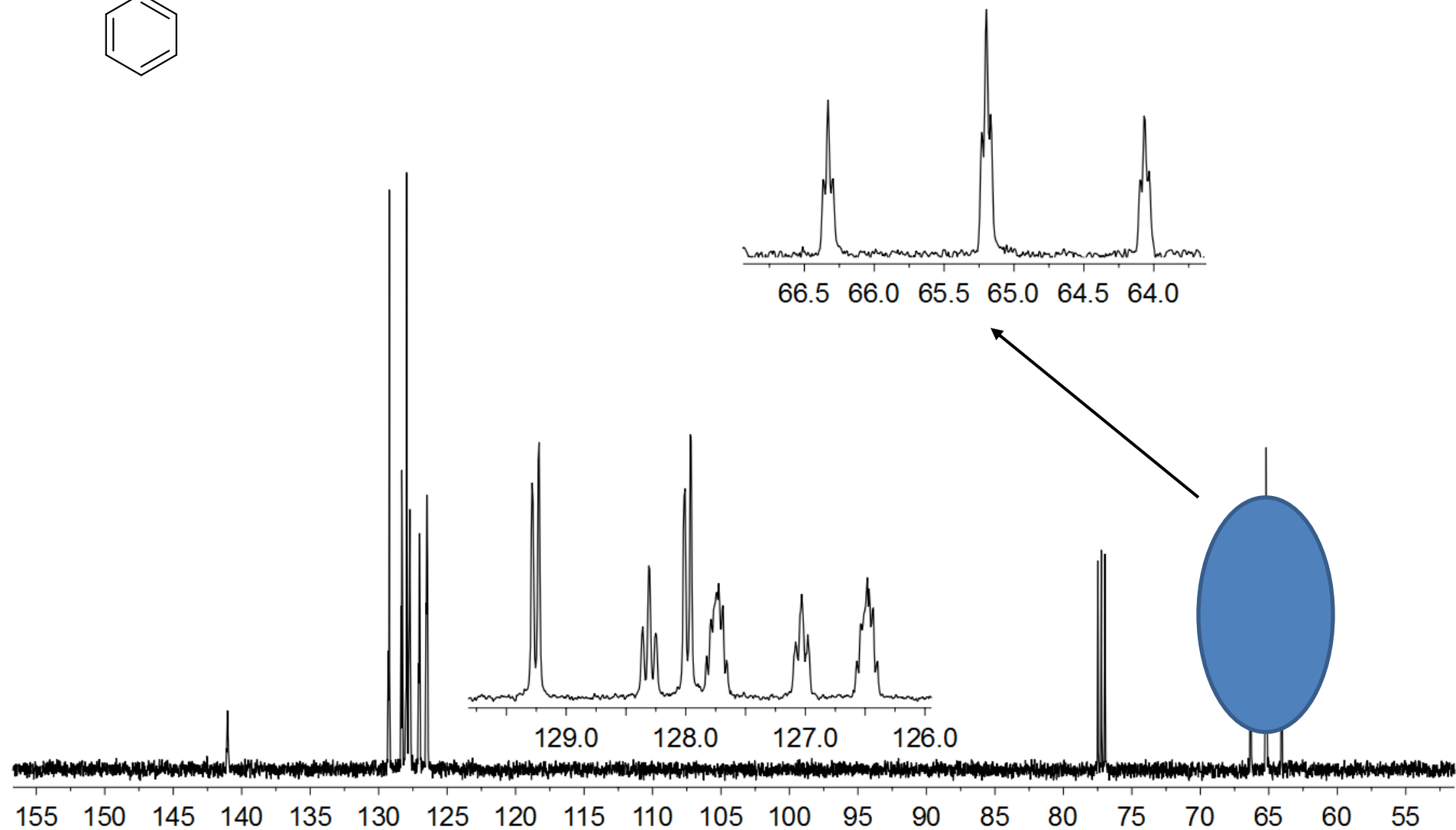


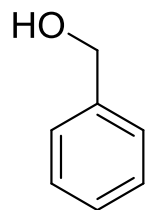
- ^{13}C - ^1H interakce se během měření potlačí (decoupling) a ^{13}C - ^{13}C interakce jsou téměř nepozorovatelné díky izotopovému zastoupení izotopu ^{13}C (1.1 %)
- → ^{13}C spektra jsou obvykle jednoduše interpretovatelná (singlety), pokud nejsou štěpeny jiným NMR aktivním jádrem: ^{11}B , ^{19}F , ^{31}P apod.





- ^{13}C NMR spektrum s ^1H interakcemi





■ $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ NMR spektrum

-140.99
128.57
127.62
127.06

-65.15

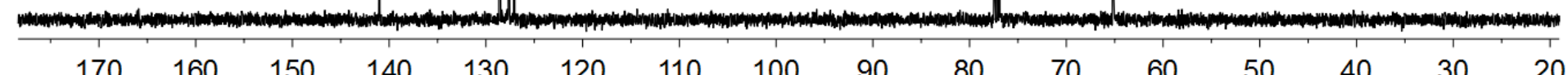
-65.15

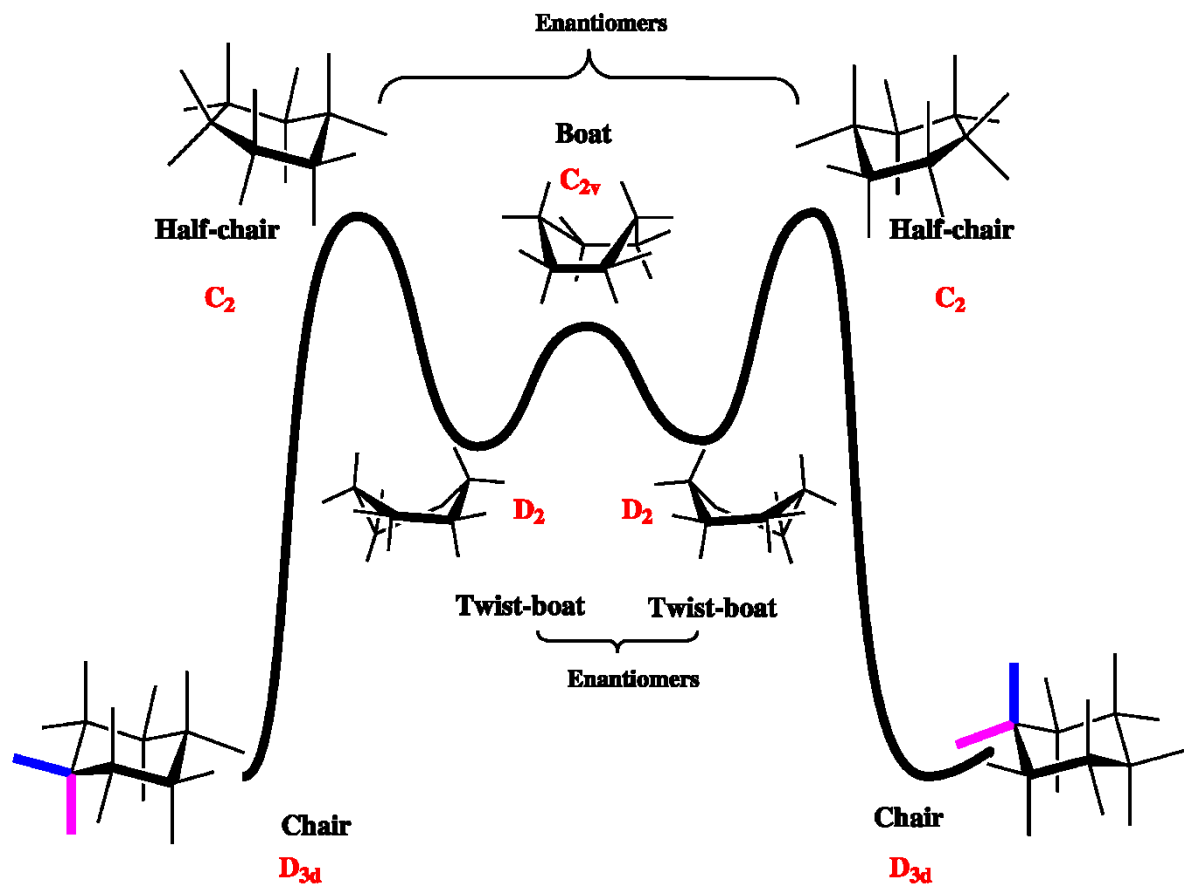
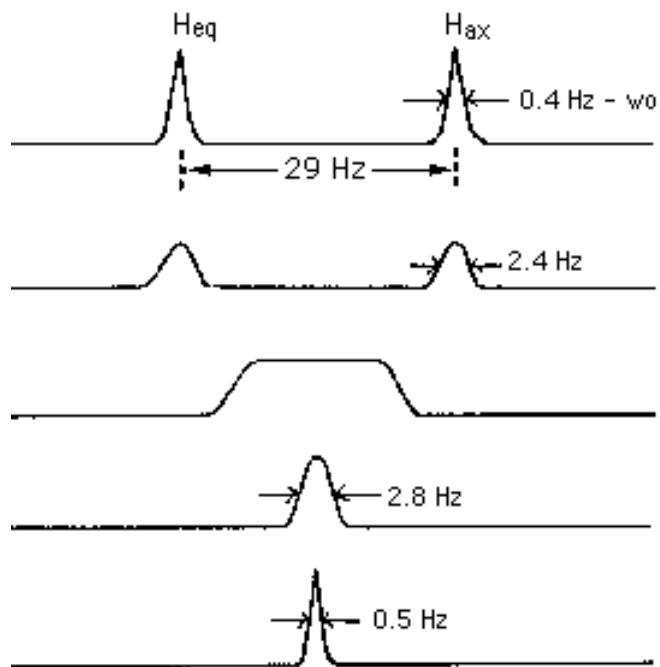
128.57
127.62
127.06

67 66 65 64 63 62

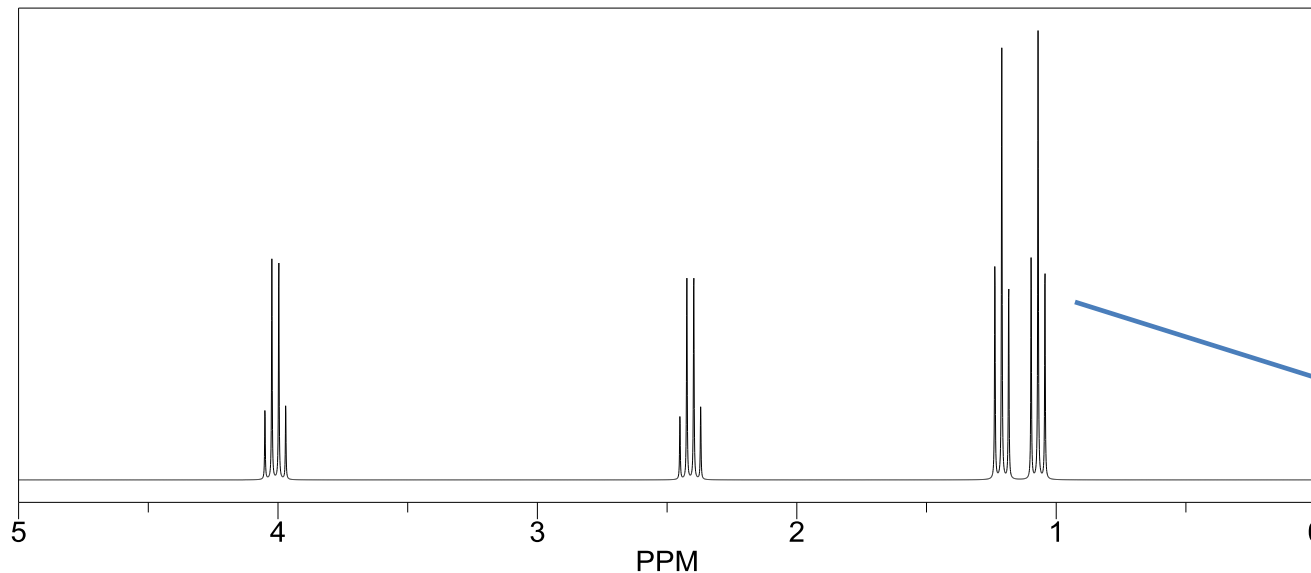
131 130 129 128 127 126 125 124

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

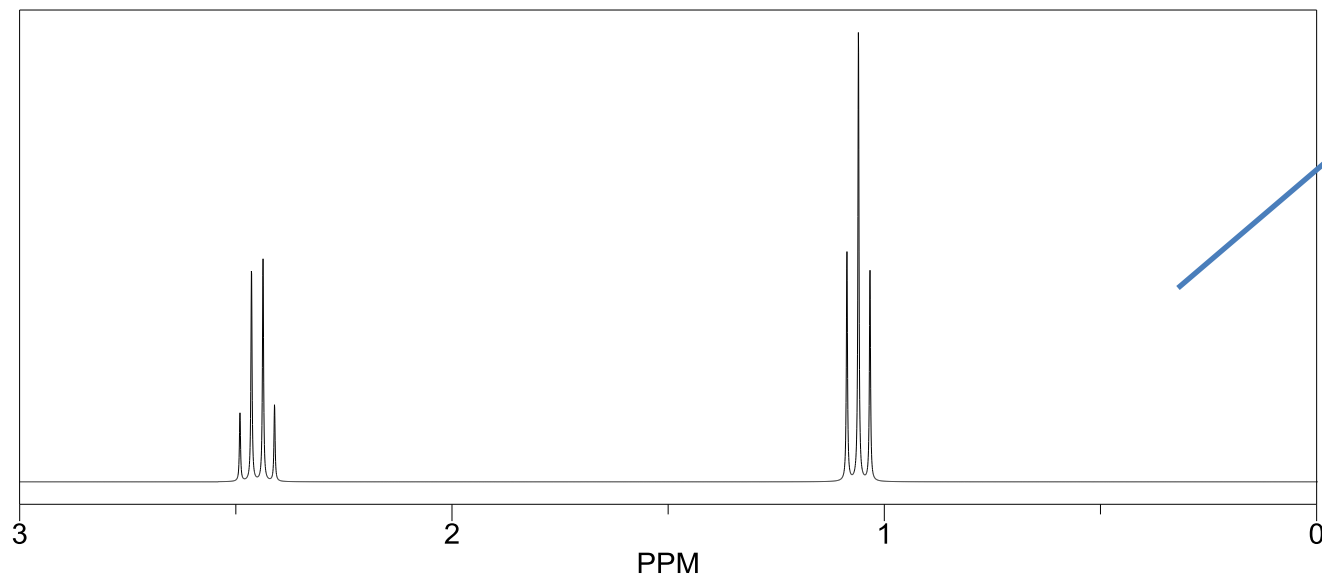
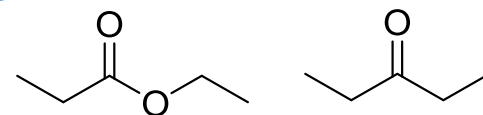


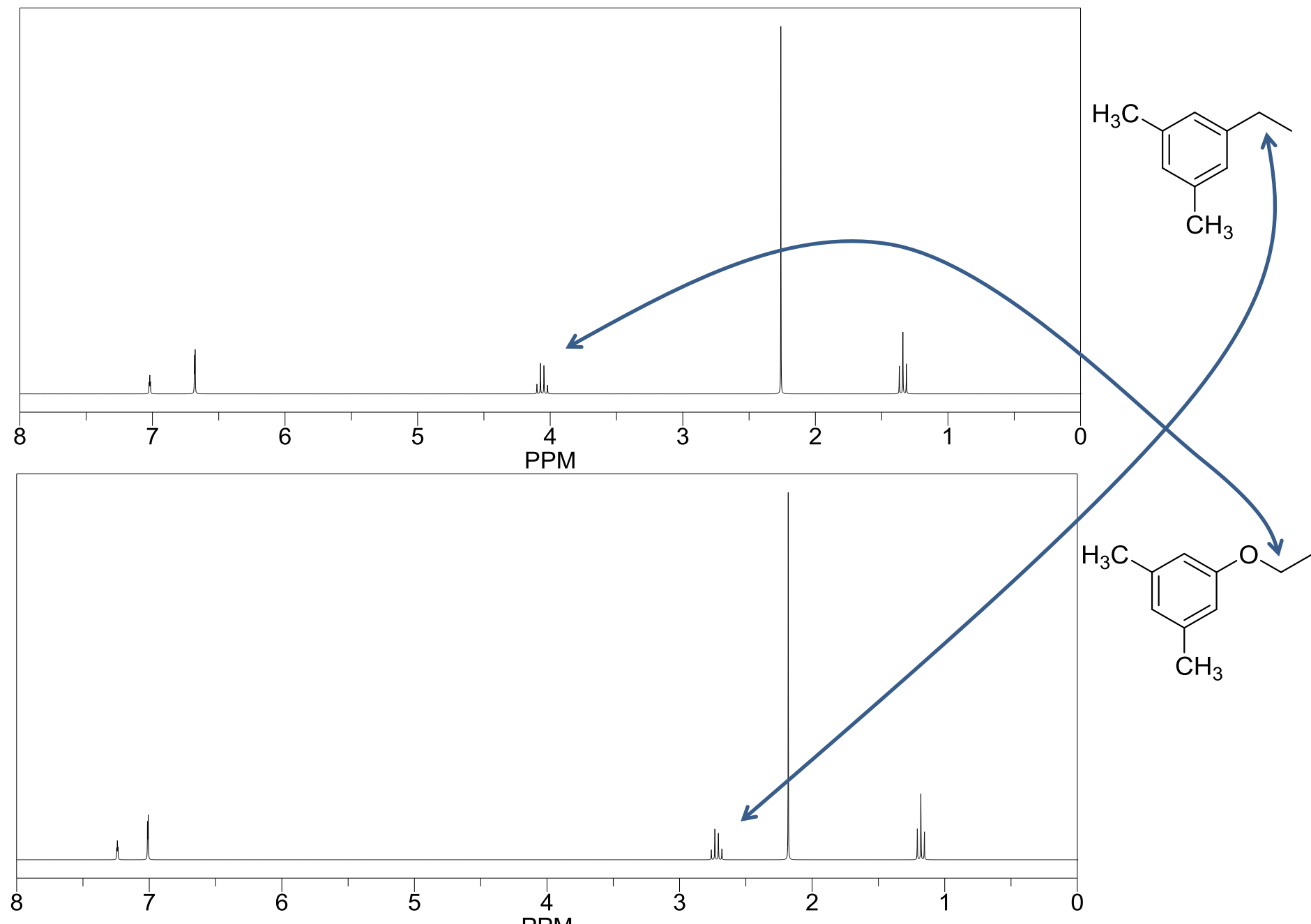


- konformační pohyb cyklohexanu
- při 0 °C je inverze kruhu velmi rychlá a pozorujeme průměrný signál
- při -90 °C je pohyb „zastaven“ a pozorujeme dva typy signálu H_{ax} a H_{eq}

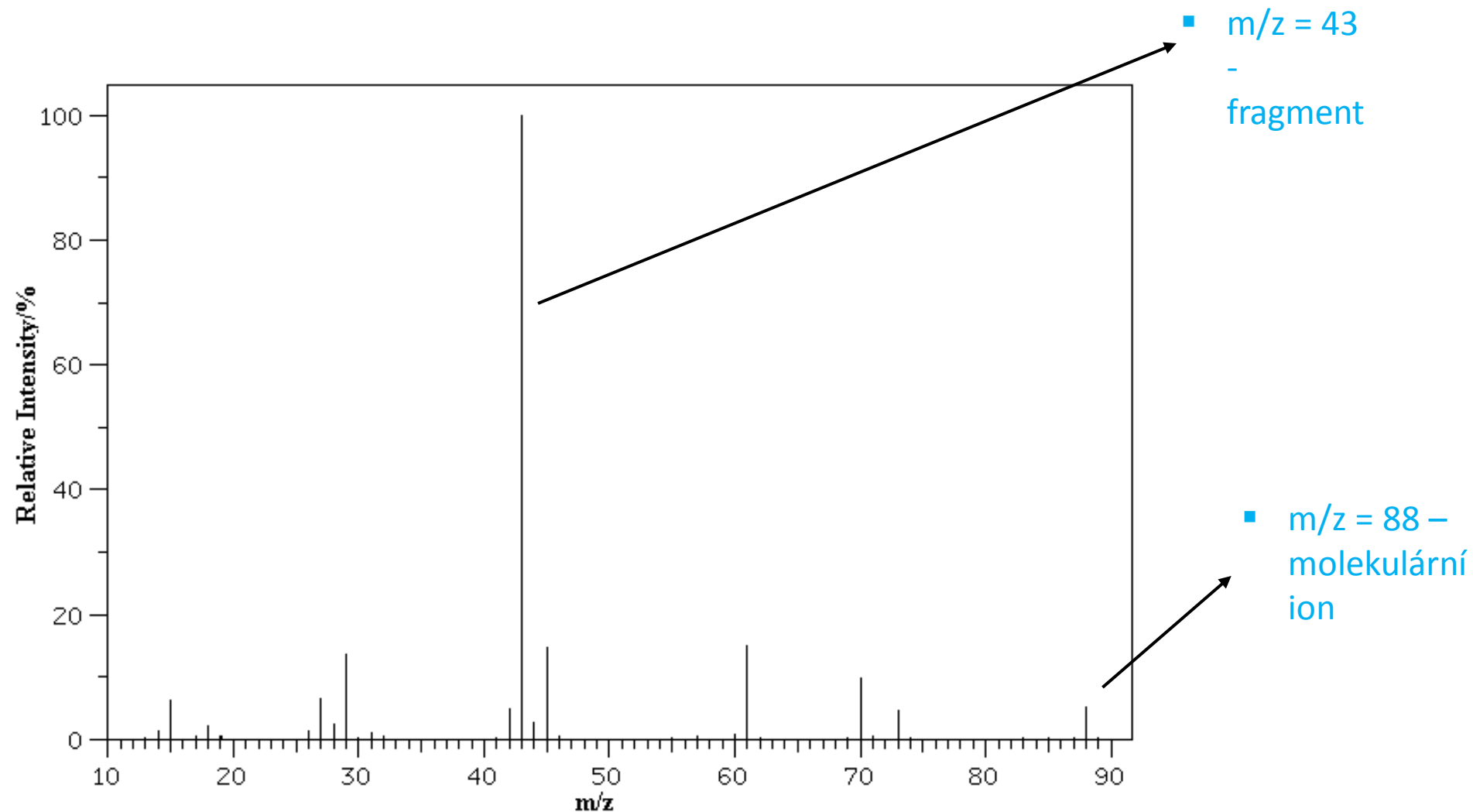


které molekule
odpovídá ^1H NMR
spektrum ?



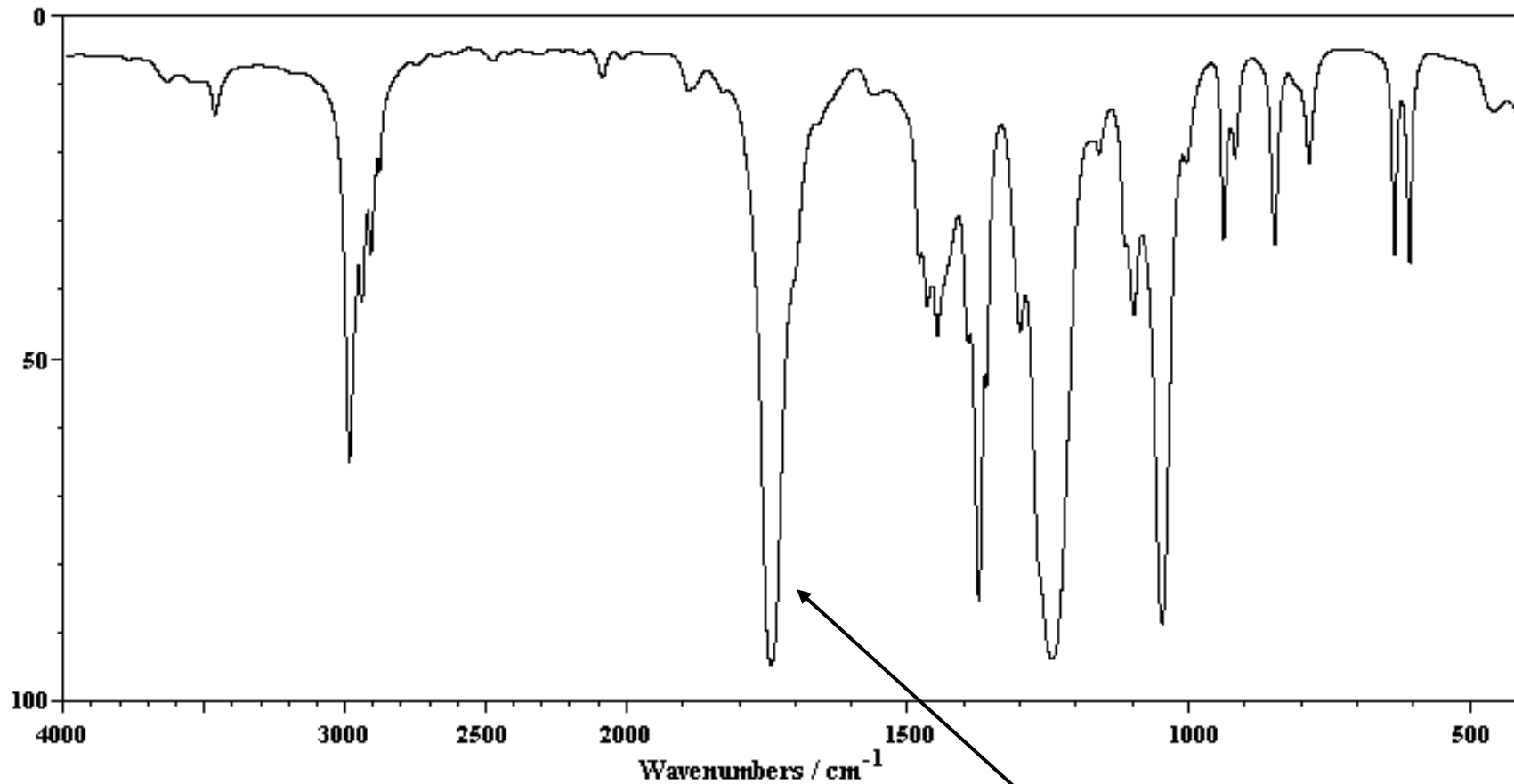


- Určete strukturu neznámého vzorku za pomoci MS, IR a NMR

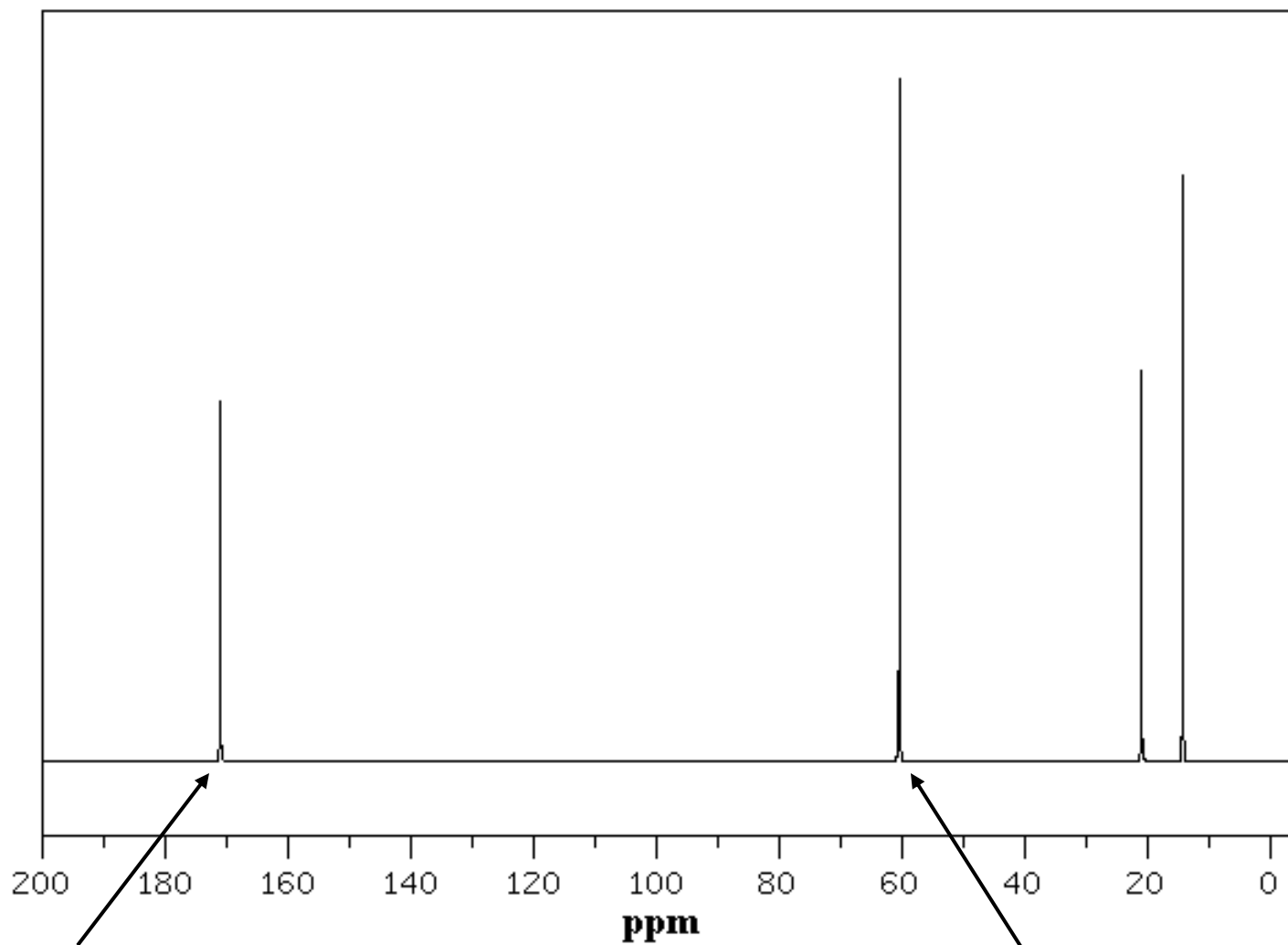


- Určete strukturu neznámého vzorku za pomoci MS, IR a NMR

Absorbance / % ■ IR spektrum



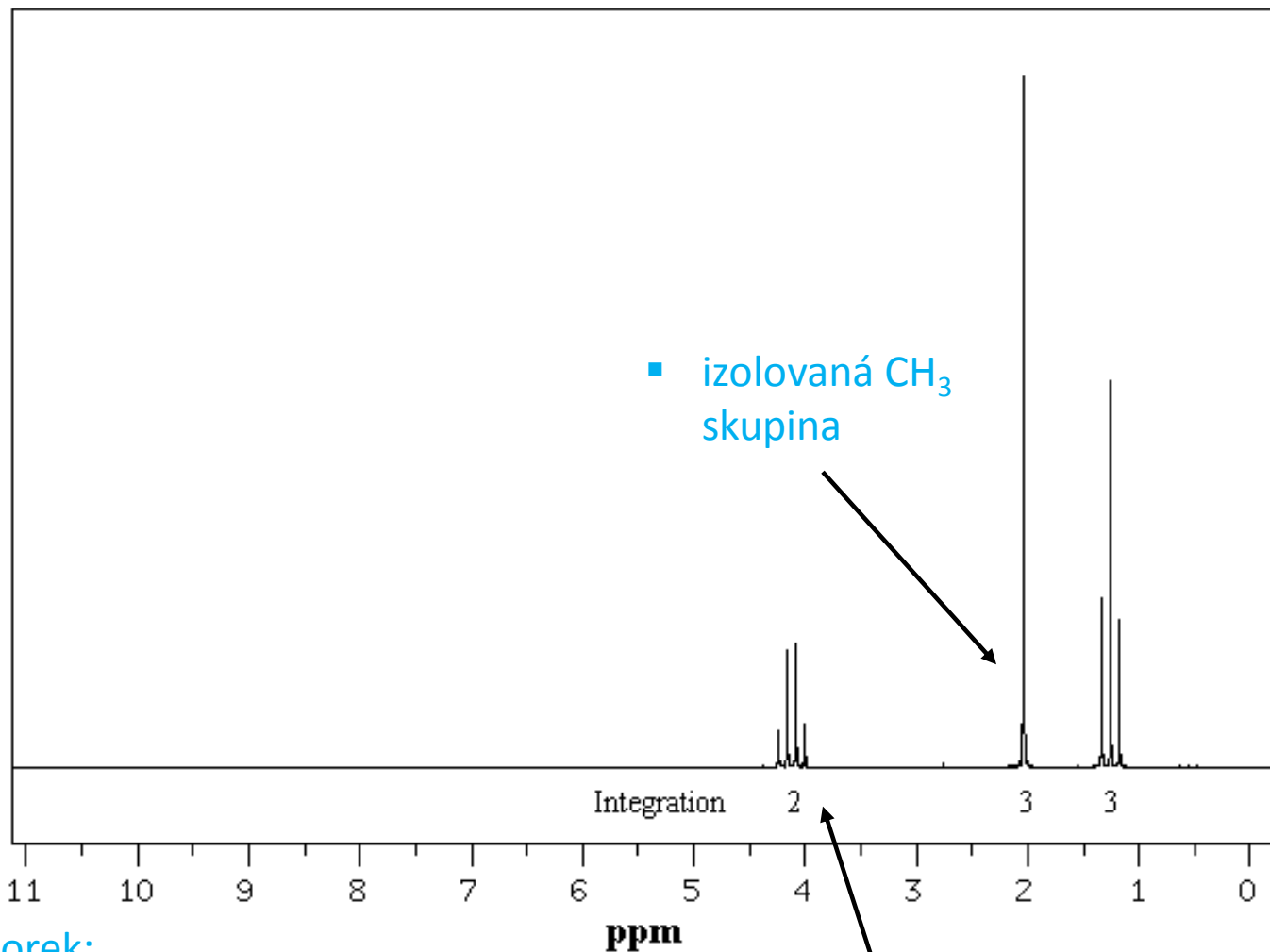
- $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$, vibrace C=O

■ ^{13}C NMR spektrum

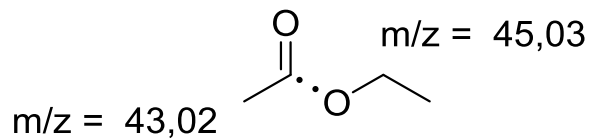
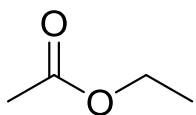
■ karboxylová skupina, ester,
anhydrid (amid)

■ C-O skupina

■ 2 x C- alkyl

▪ ^1H NMR

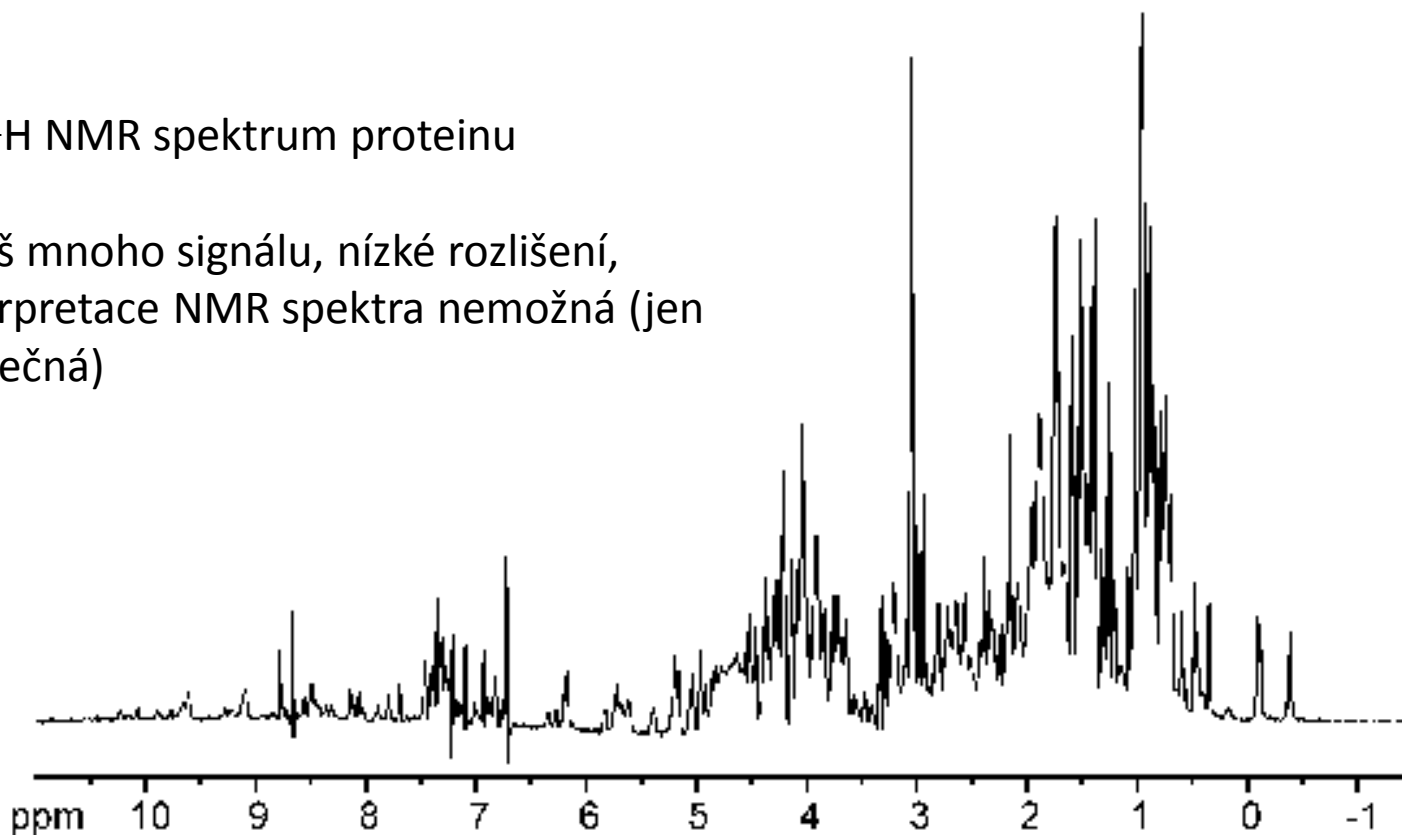
▪ neznámý vzorek:



$m/z = 45,03$

▪ $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ skupina

- 1D ^1H NMR spektrum proteinu
- Příliš mnoho signálu, nízké rozlišení, interpretace NMR spektra nemožná (jen částečná)

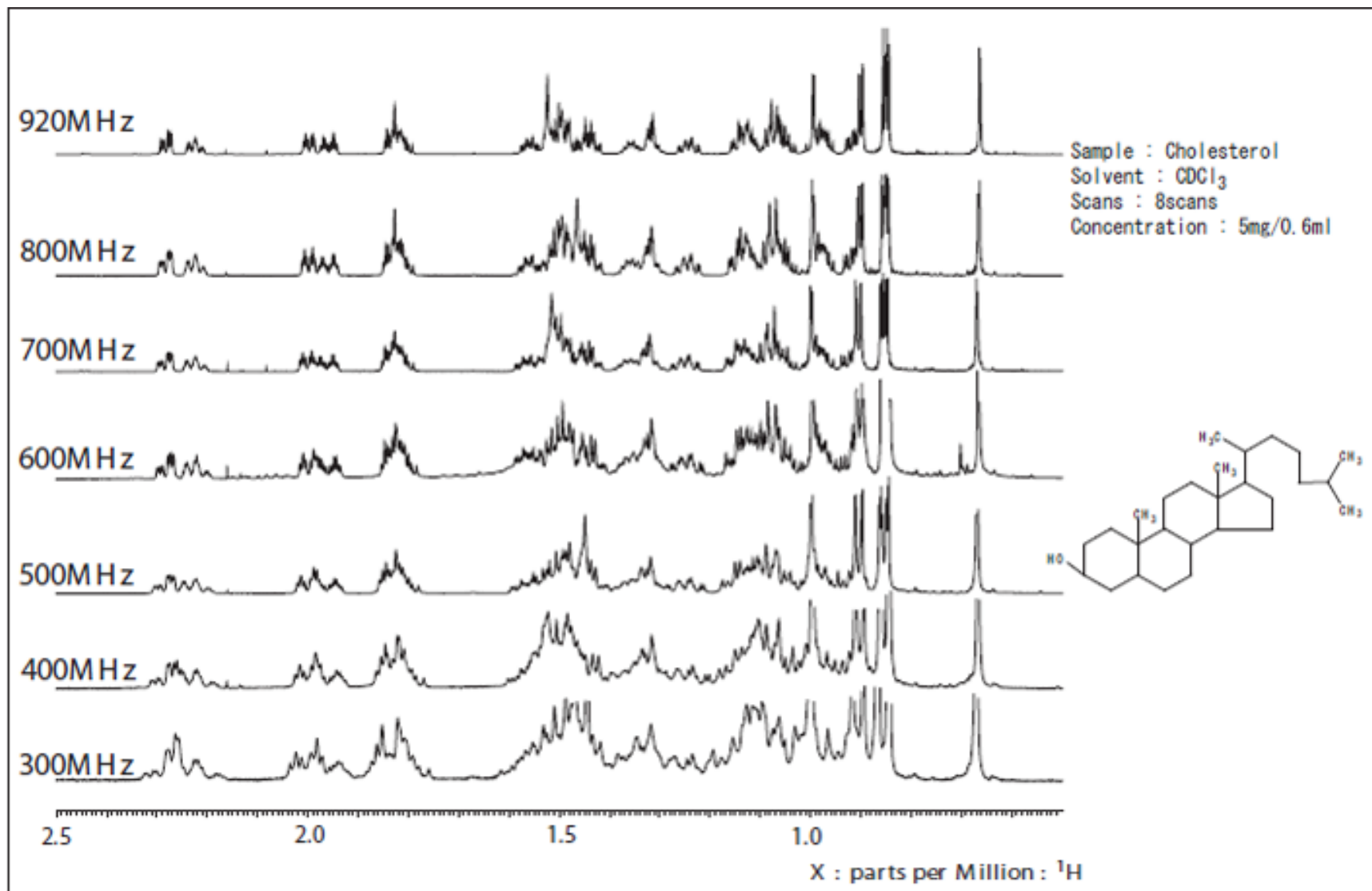


→ 2D, 3D... NMR experimenty

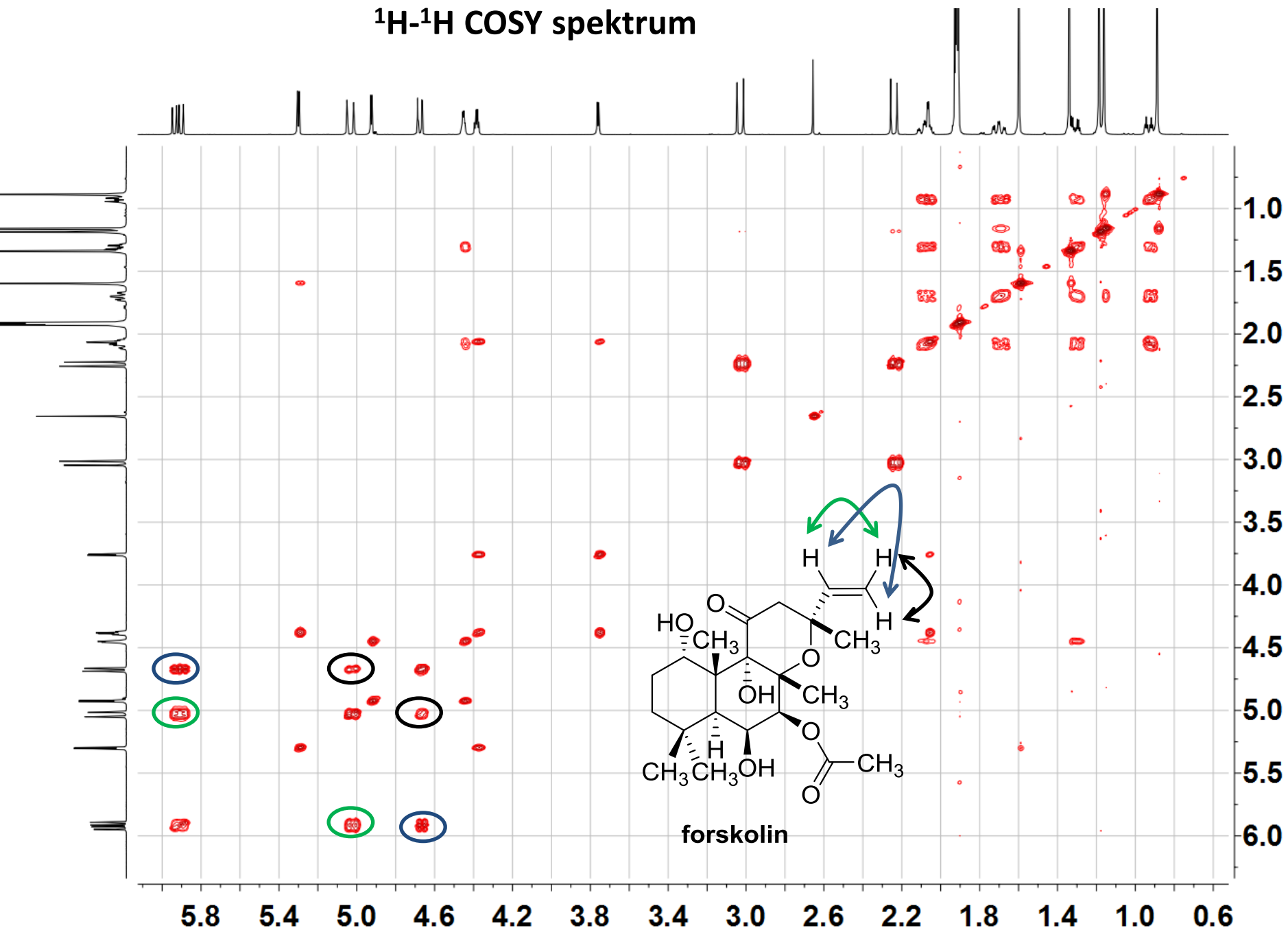
Několik desítek používaných 2D experimentů - COSY, NOESY, DOSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, s....

3D NOESY-HSQC, NOESY-TOCSY...

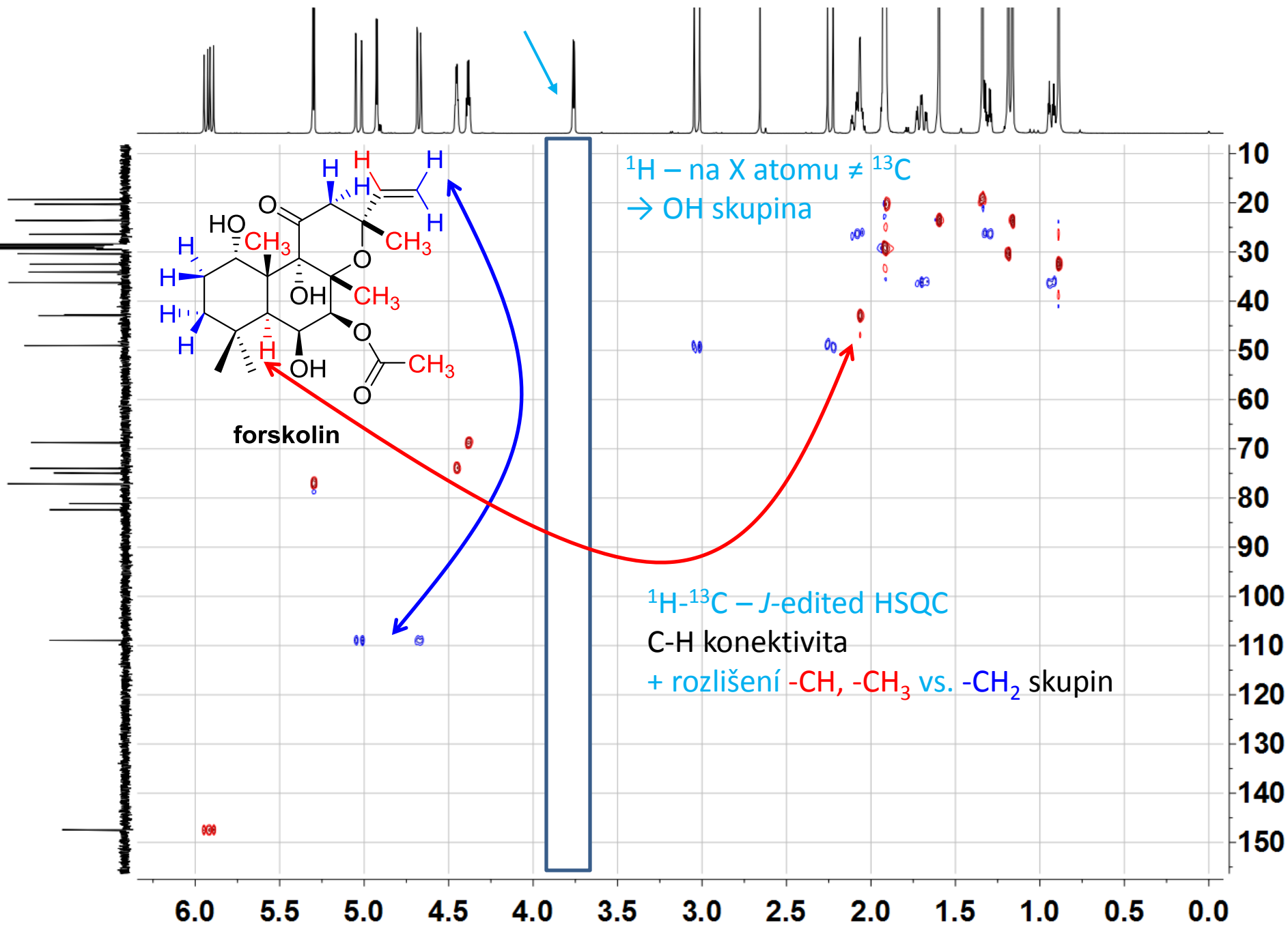
- I malé organické molekuly, mohou mít velmi komplikované spektrum – expanze do více dimenzí poskytne detailnější informace



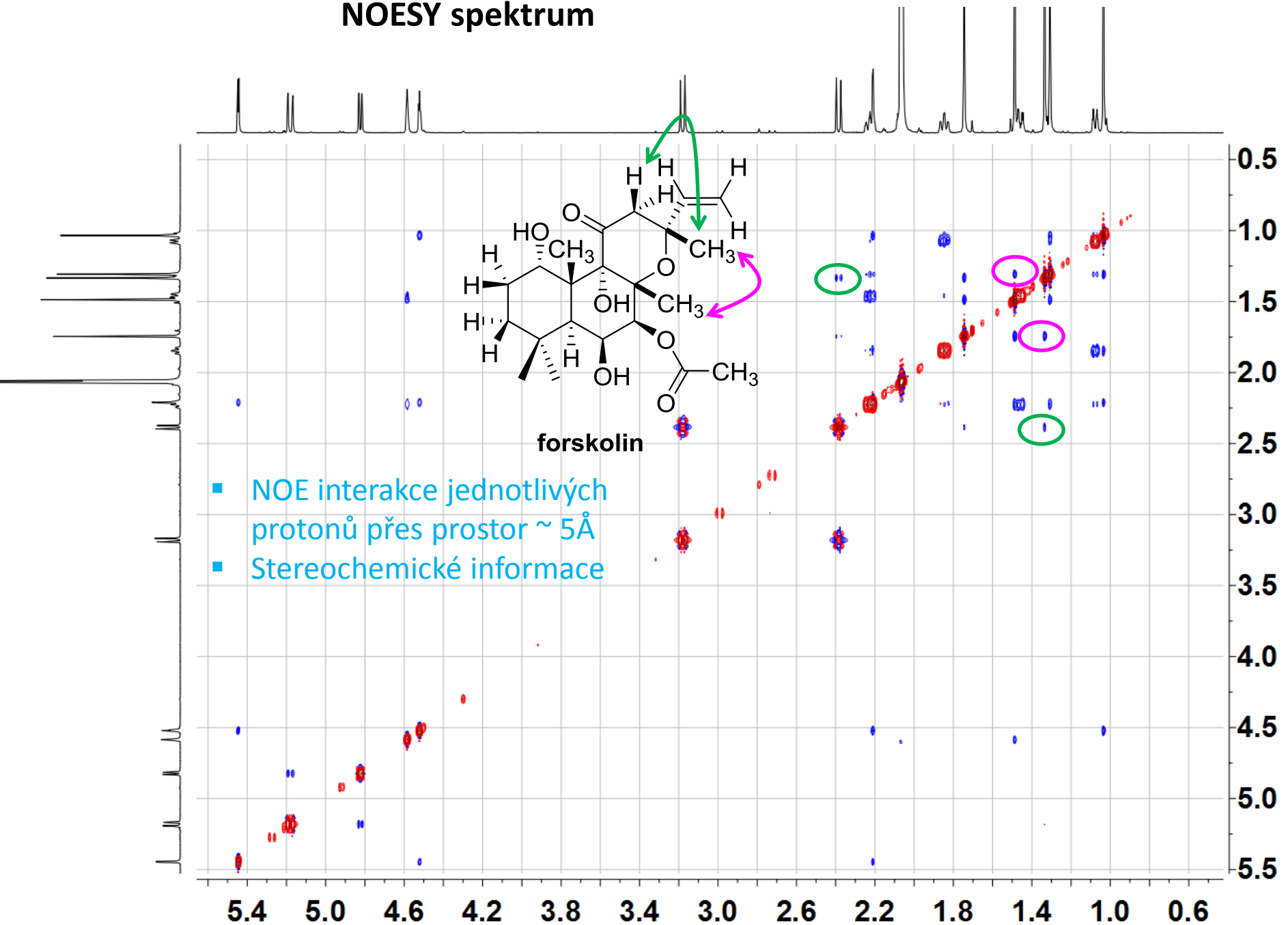
^1H - ^1H COSY spektrum



^1H - ^{13}C – *J*-edited HSQC spektrum

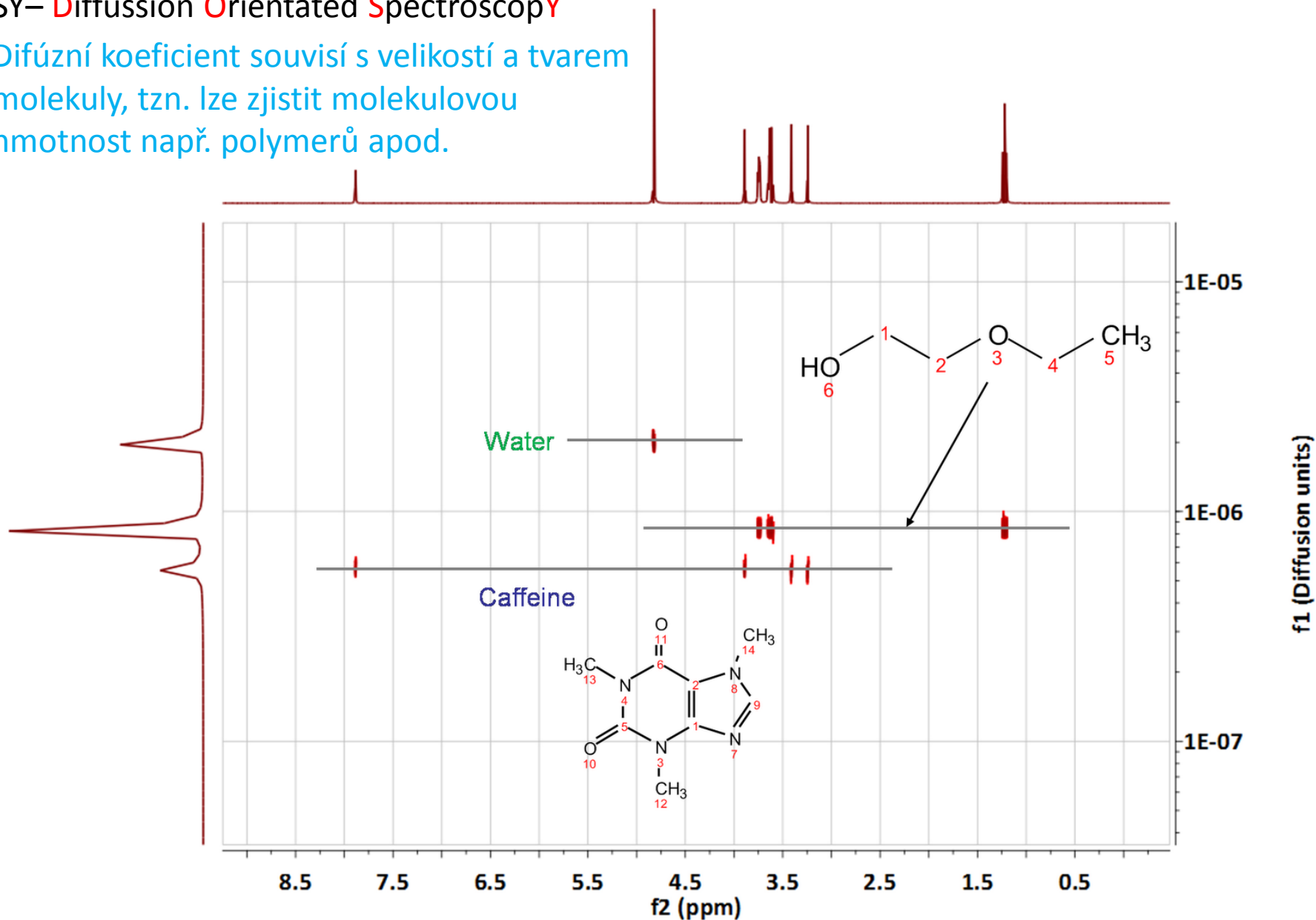


NOESY spektrum



DOSY– Diffusion Orientated SpectroscopY

- Difúzní koeficient souvisí s velikostí a tvarem molekuly, tzn. lze zjistit molekulovou hmotnost např. polymerů apod.



Konstrukce NMR spektrometru

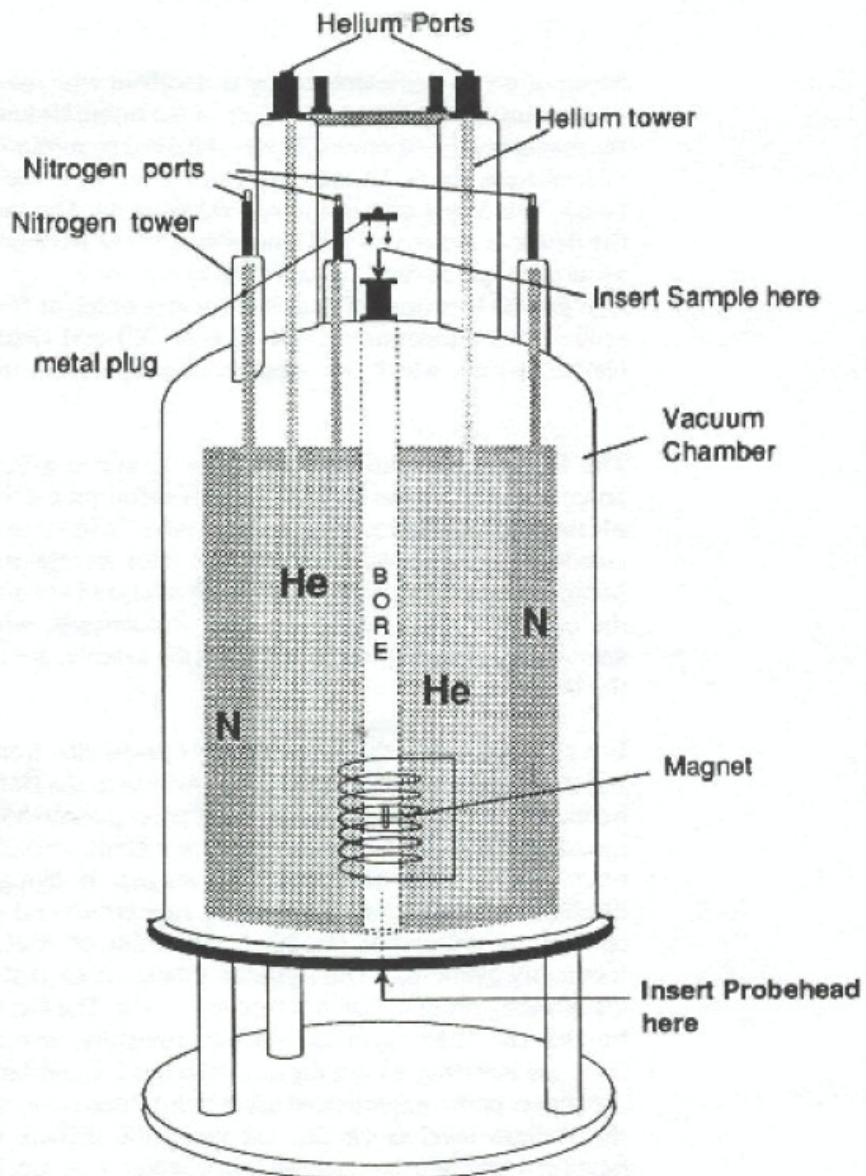
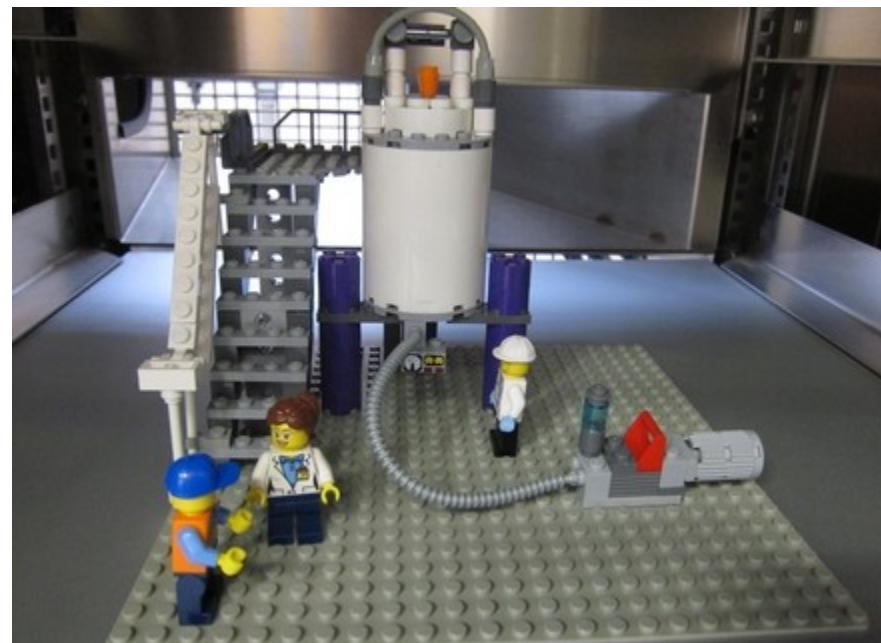


Figure 3.B Magnet and dewar

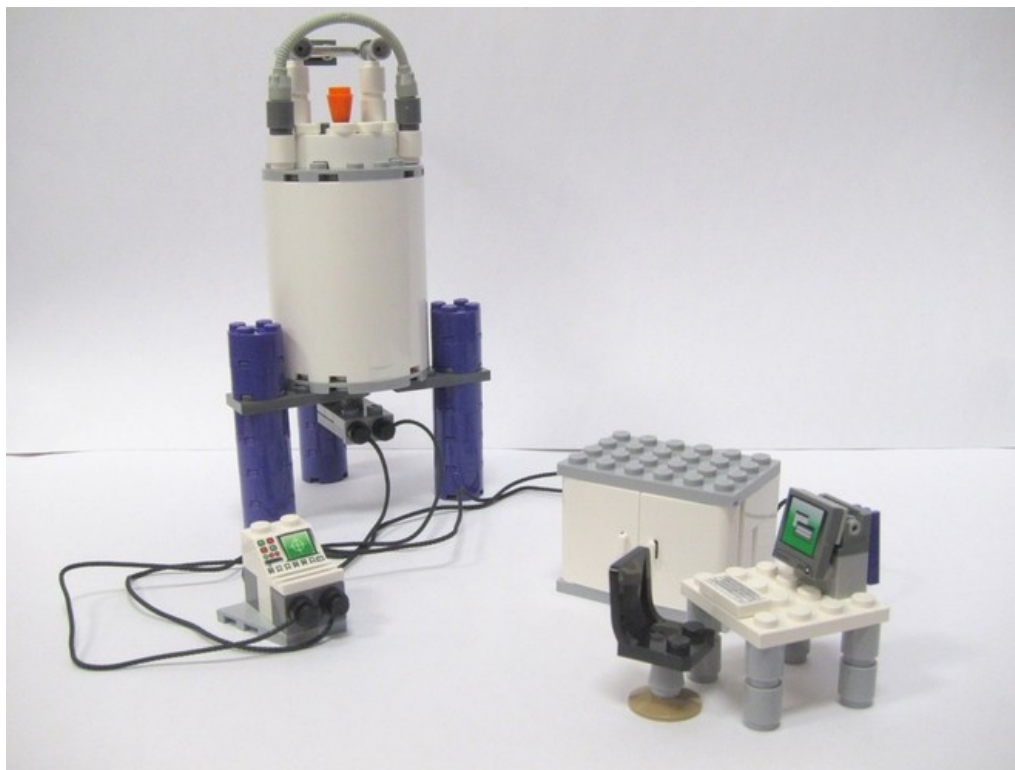


Nevýhody

- relativně velké nároky na prostor
- vysoká pořizovací cena
- relativně vysoké provozní náklady
- časová náročnost měření/interpretace dat
- nízká citlivost

Výhody

- nedestruktivní
- v kapalně i pevné fázi
- detailní strukturní informace
- studium dynamických procesů



- **C8950** NMR - Strukturní analýza
- **C5320** Fyzikálně chemické základy

NMR

- **C6770** NMR Spectroscopy of Biomolecules
- **C7998** Základy experimentální NMR
- ...