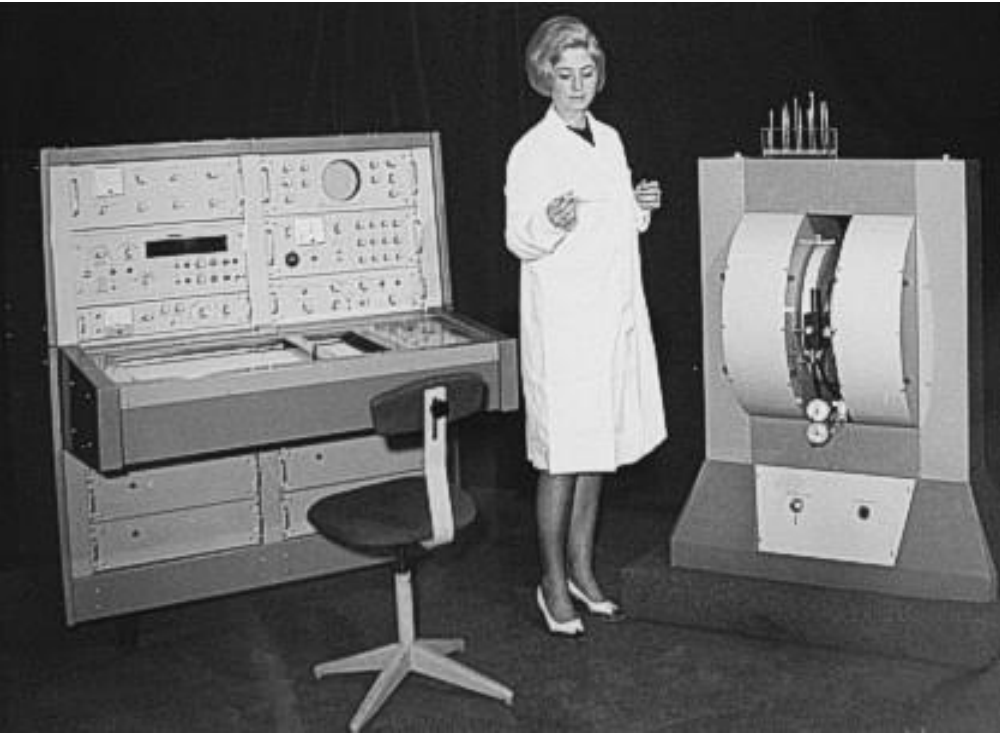


NMR spektroskopie



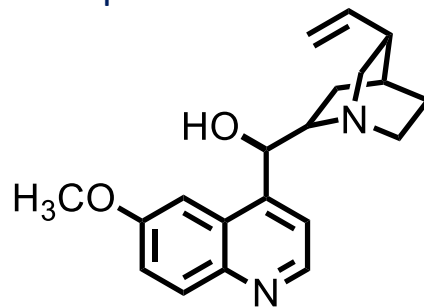
Lukáš Maier
Imaier@mail.muni.cz

Studium struktury organických molekul

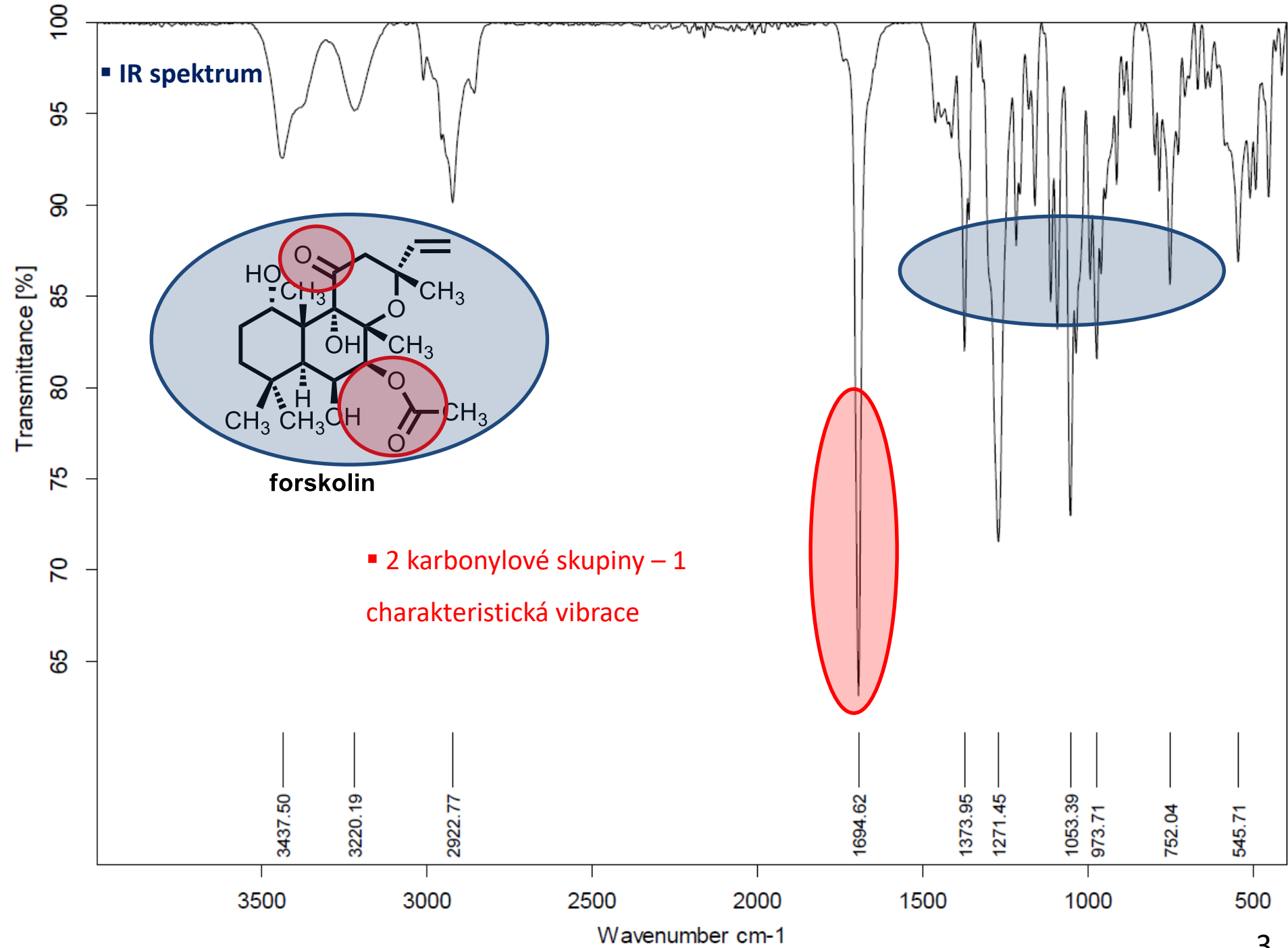
- Izolace a identifikace přírodních látek, syntéza nových molekul, studium reakčních mechanismů...

... 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** – (NP – 1964 - *"for his outstanding achievements in the art of organic synthesis,,)* - určení struktur mnoha přírodních látek pomocí totálních syntéz a aplikací jednoduchých empirických pravidel UV spektroskopie

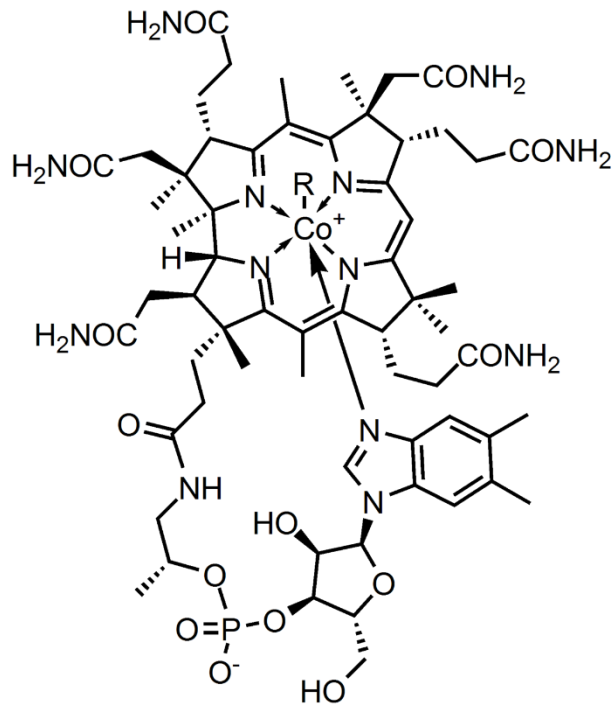


chinin - 1944

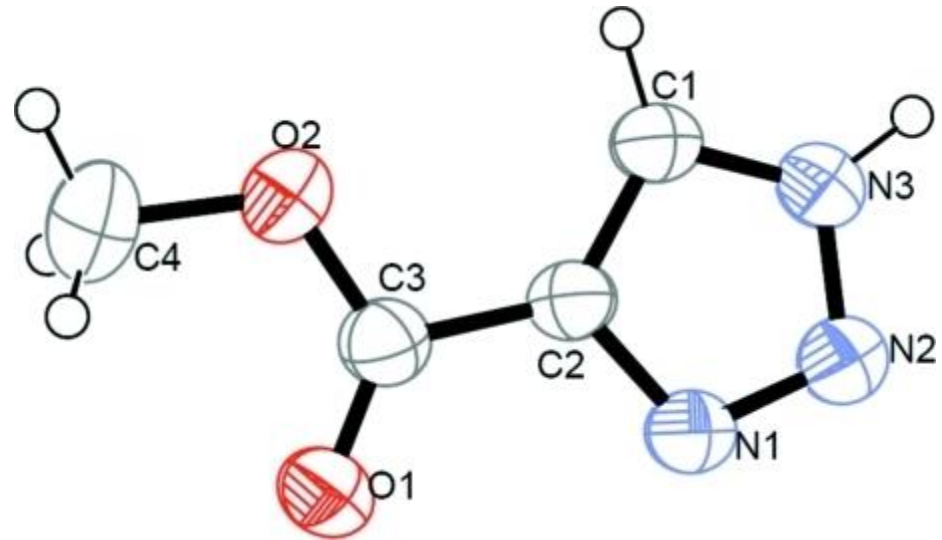


Studium struktury organických molekul

- **RTG difrakce** – zcela zásadní význam při studiu struktur malých i velkých (bio)molekul, relativní/absolutní stereochemie, informace o chování látek (dynamické jevy) 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

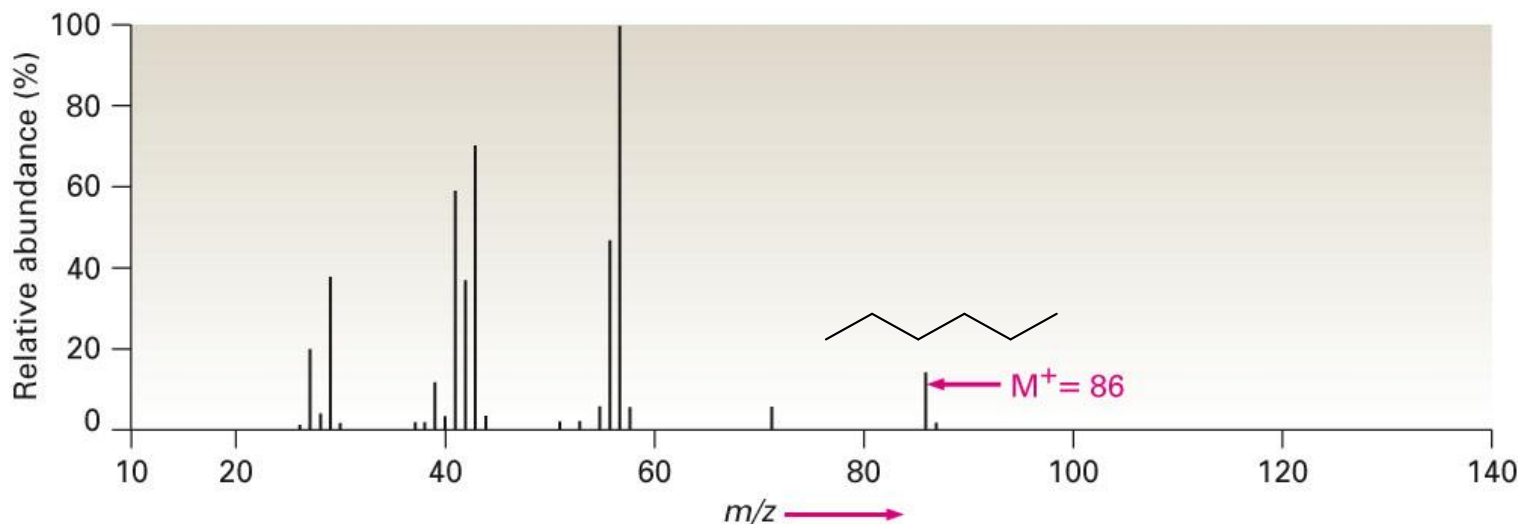


- typické zobrazení struktury vyřešené pomocí x-ray difrakce

Studium struktury organických molekul

- 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)



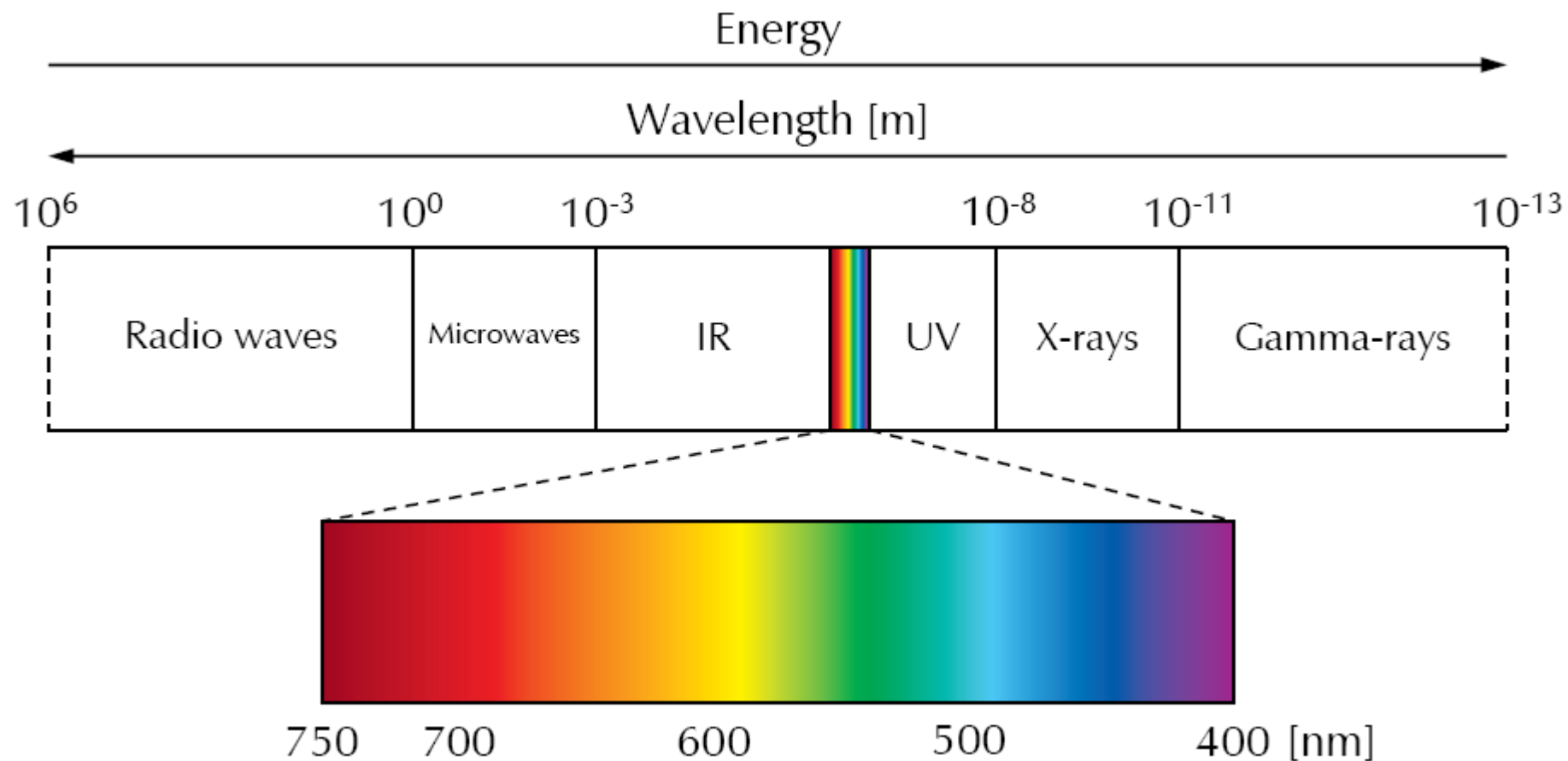
NMR spektroskopie

- **NMR spektroskopie** – Nukleární Magnetická Rezonance – 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**



NMR spektroskopie

- spektroskopie je obecně založena na interakci hmoty s elektromagnetickým zářením



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

^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N , ^{11}B , ^{29}Si , ^{27}Al , ^{105}Pd , ^{195}Pt

NMR spektroskopie

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

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

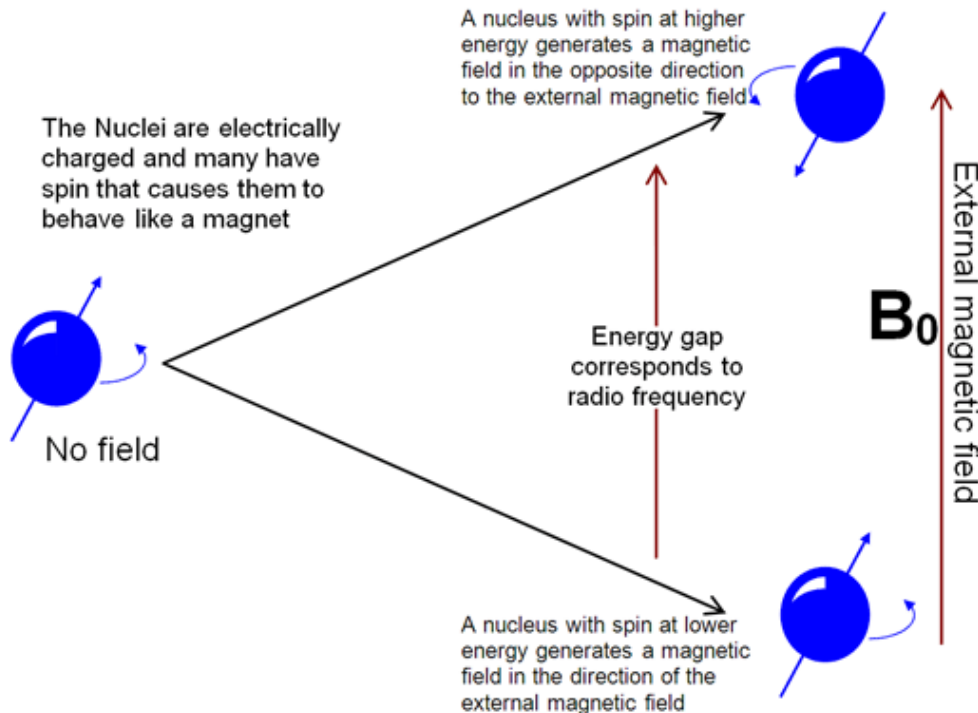
$^{11}\text{B} = I = \frac{3}{2}$

$^{14}\text{N}, ^2\text{H} : I = 1$ →

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

$^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}, ^{32}\text{S} : I = 0$ - 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

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

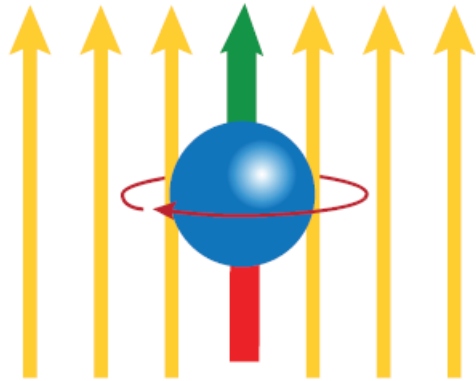
ΔE pro ^1H při 400 Mhz je 3.8×10^{-5} Kcal/mol =

$N_\alpha / N_\beta = 1.000064$!!! – velmi malý rozdíl v populacích

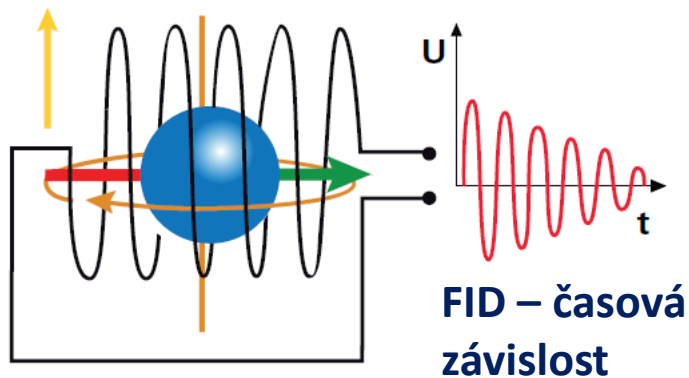
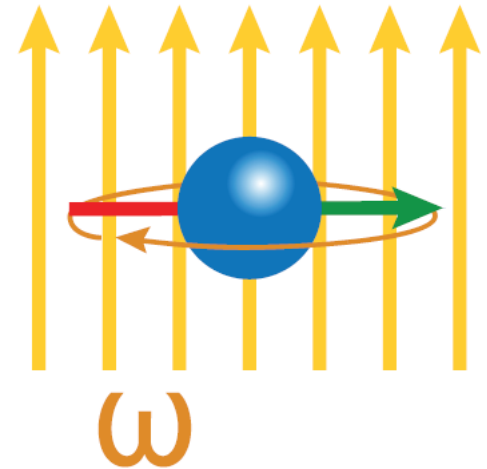
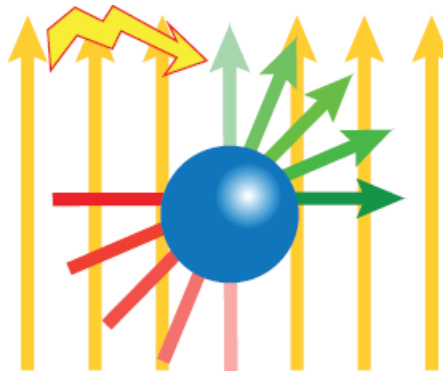
→ NMR je velmi necitlivá metoda

NMR spektroskopie

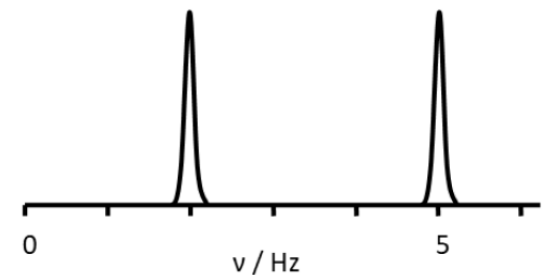
jádra v magnetickém poli vytvoří makroskopickou magnetizaci



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



Fourierova transformace

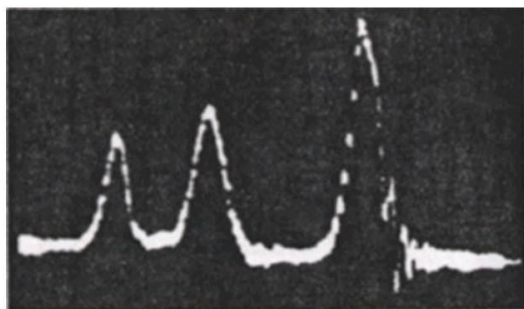


frekvenční závislost - NMR spektrum

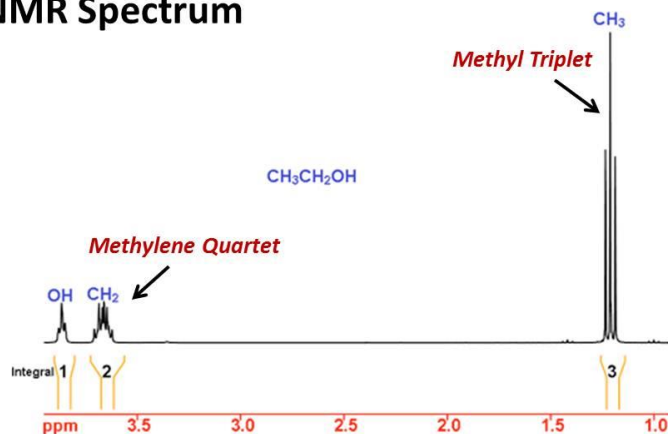
Stručná historie vývoje NMR

- 1946** – první NMR spektrometr 30 Mhz
- 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

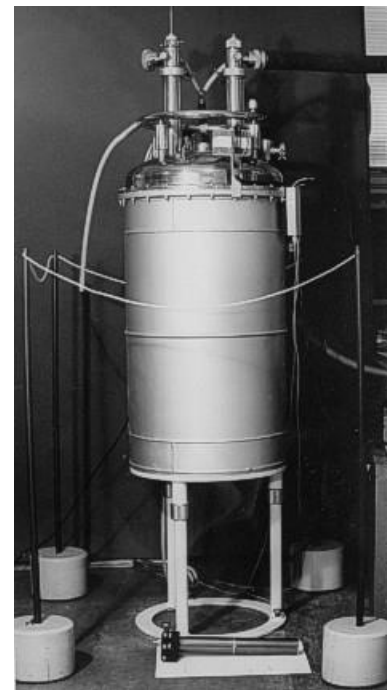
Ethanol ^1H NMR Spectrum



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)
 - 1987** – K. Alexander Müller (Fyzika)
 - 1991** – R. Ernest (Chemie)
 - 2002** – K. Wütrich (Chemie)
 - 2003** – P. Lauterbur, P. Mansfield (Fyziologie a medicína)

Vývoj instrumentace NMR

Vyšší magnetické pole, větší rozlišení a citlivost

40 MHz

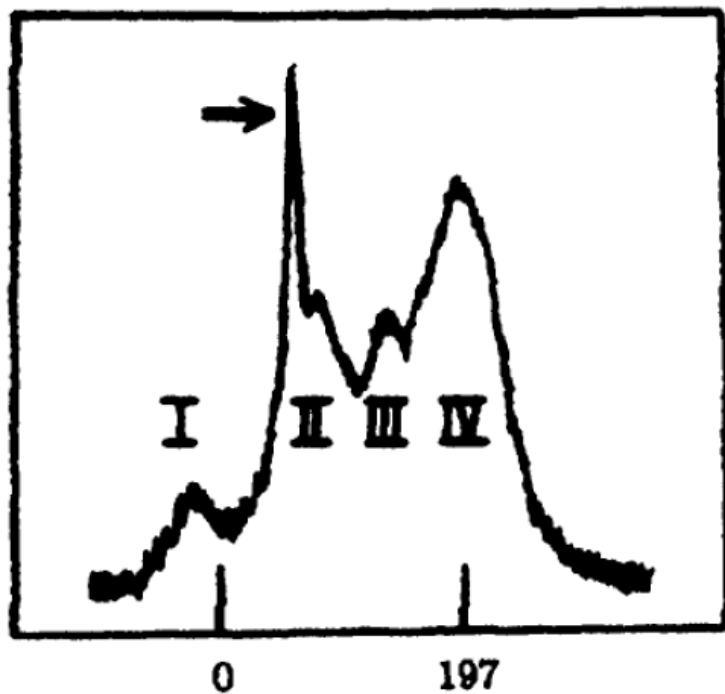
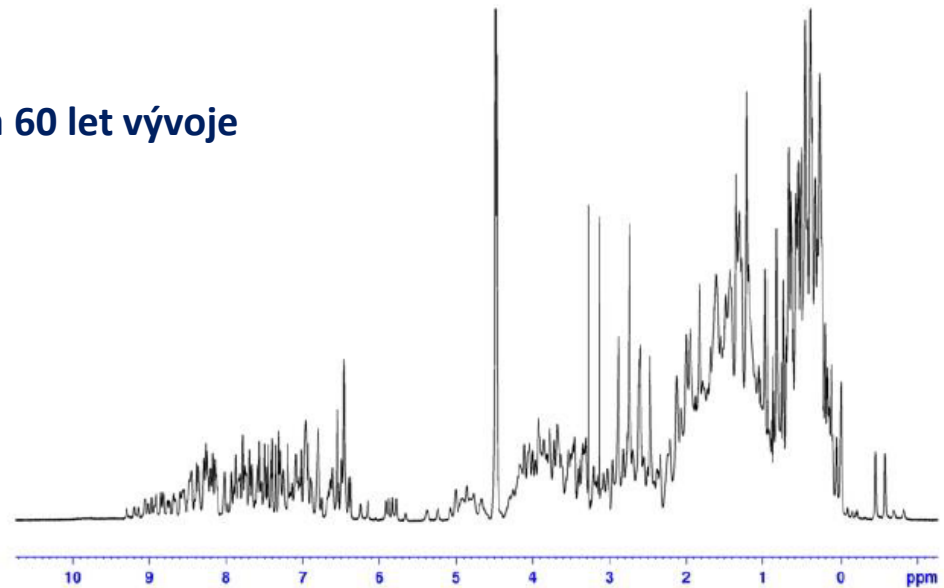


Fig. 1. The first NMR spectrum of a protein (RNase A; 20% (w/v) in D₂O) published, a single slow scan at 40 MHz [14].

1000 MHz

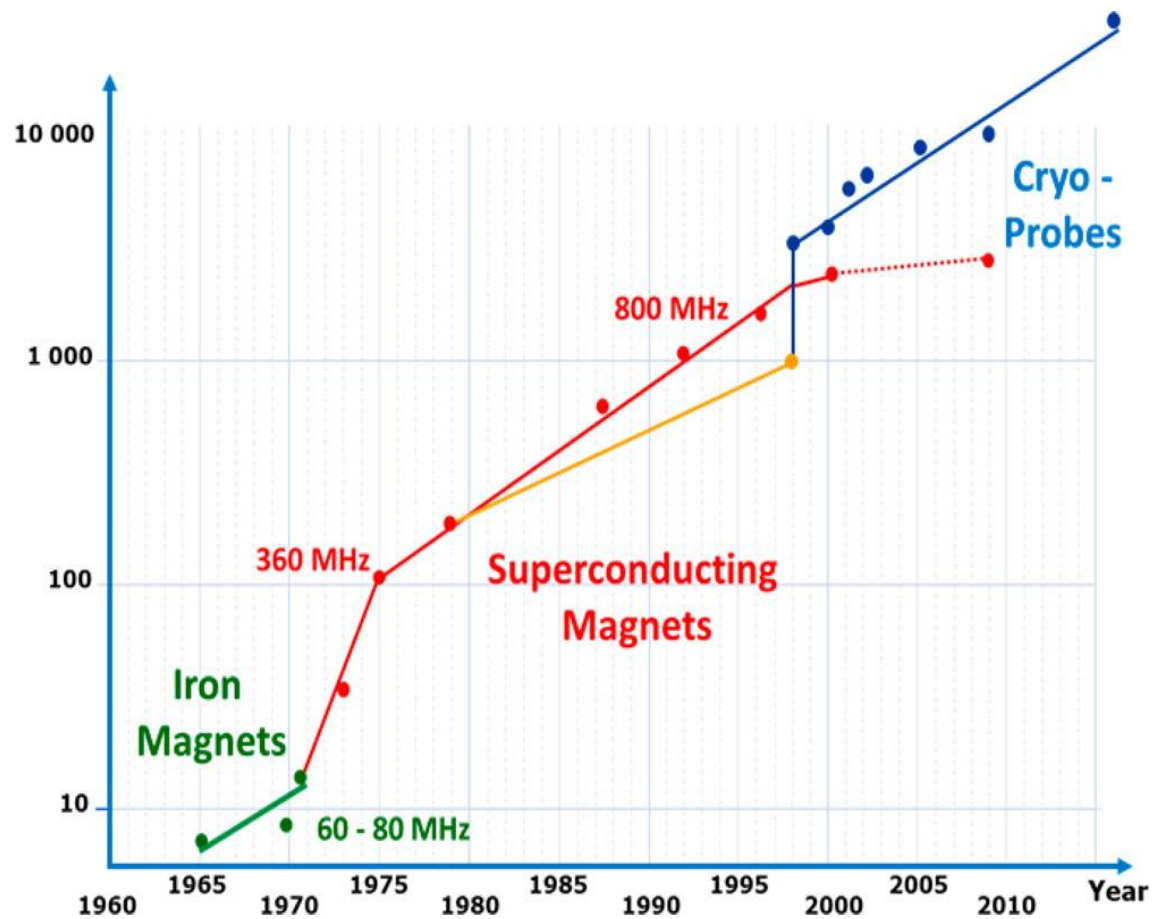
cca 60 let vývoje



1 GHz NMR spectrum of 2 mM ubiquitin

Vývoj instrumentace NMR

Citlivost ^1H NMR experimentu pro standardní 0.1% roztok ethylbenzenu

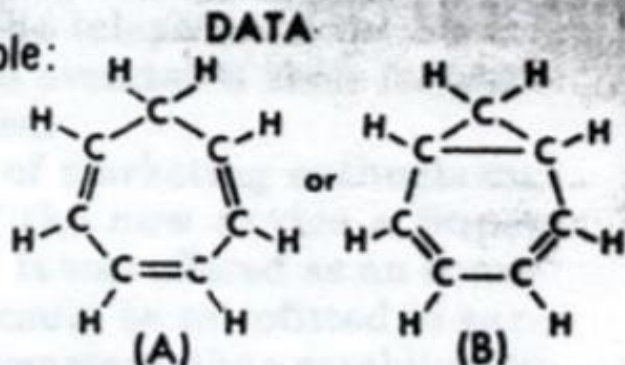


DOI: (10.1021/acs.macromol.6b02736)

První strukturální problém vyřešen pomocí ^1H NMR spektroskopie (1955)

20 USE OF INTEGRATED INTENSITIES IN STRUCTURE ANALYSIS (Number 20 of a series)

Sample:



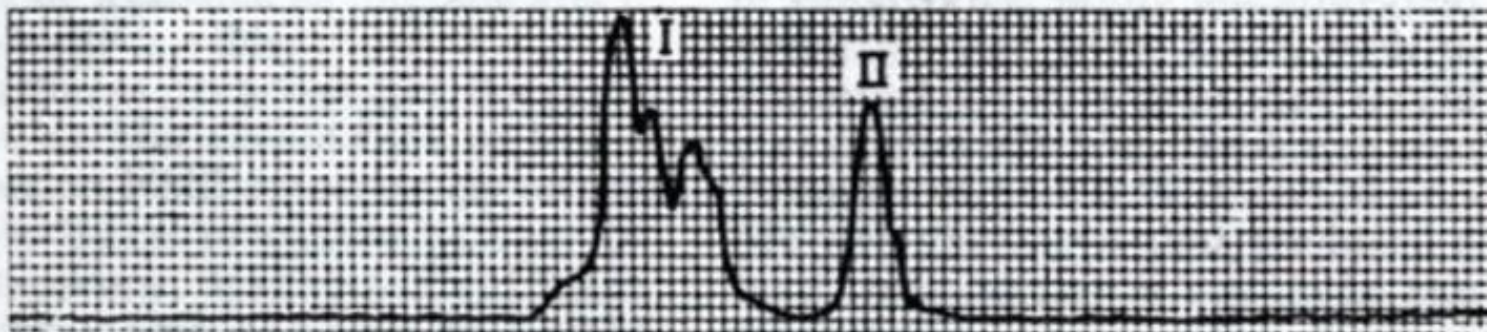
Volume: 0.01 cc.
Signals Observed: H^1
Frequency: 30 mc.
Field: 7050 gauss

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



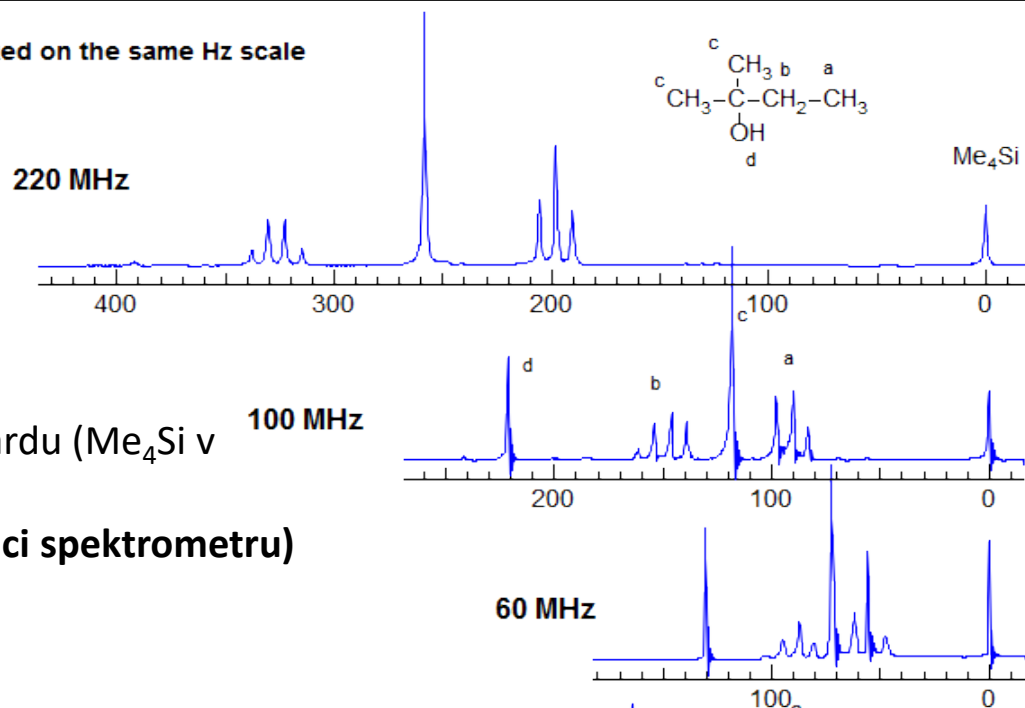
- **Chemický posun**
- Počet signálů ve spektru
- **Relativní integrální intenzita**
- Multiplicita signálu -interakční konstanty
- **Polo-šířka signálu – relaxace/dynamické jevy**

Z jednoho spektra lze vyčíst obrovské množství informací

Základní NMR parametry – Chemický posun

Chemický posun = δ (ppm)

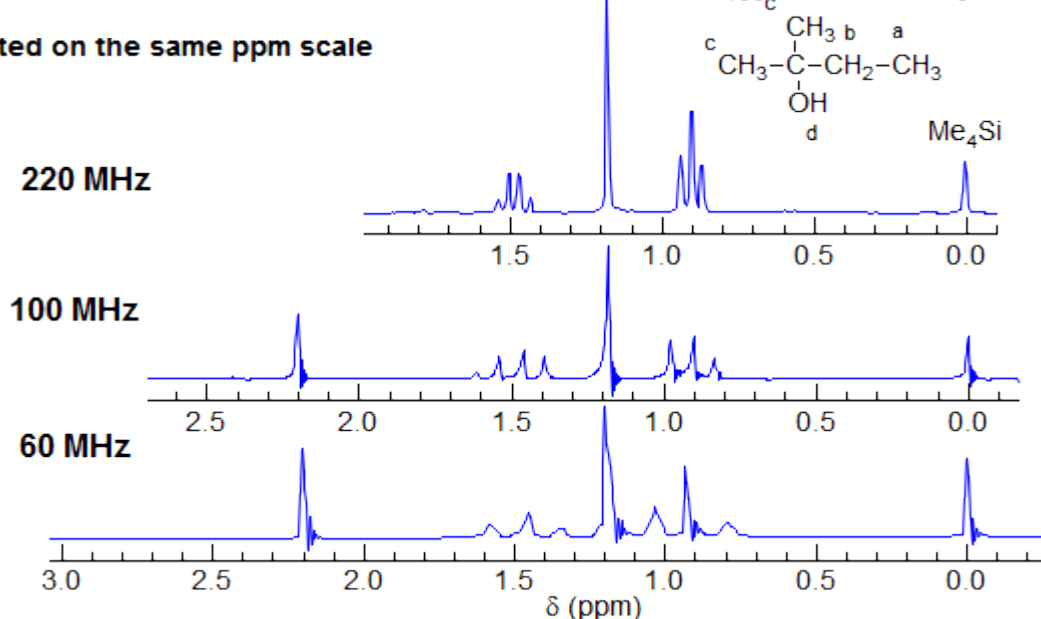
Plotted on the same Hz scale



δ = frekvence signálu - frekvence standardu (Me_4Si v Hz)/frekvence spektrometru (v MHz)

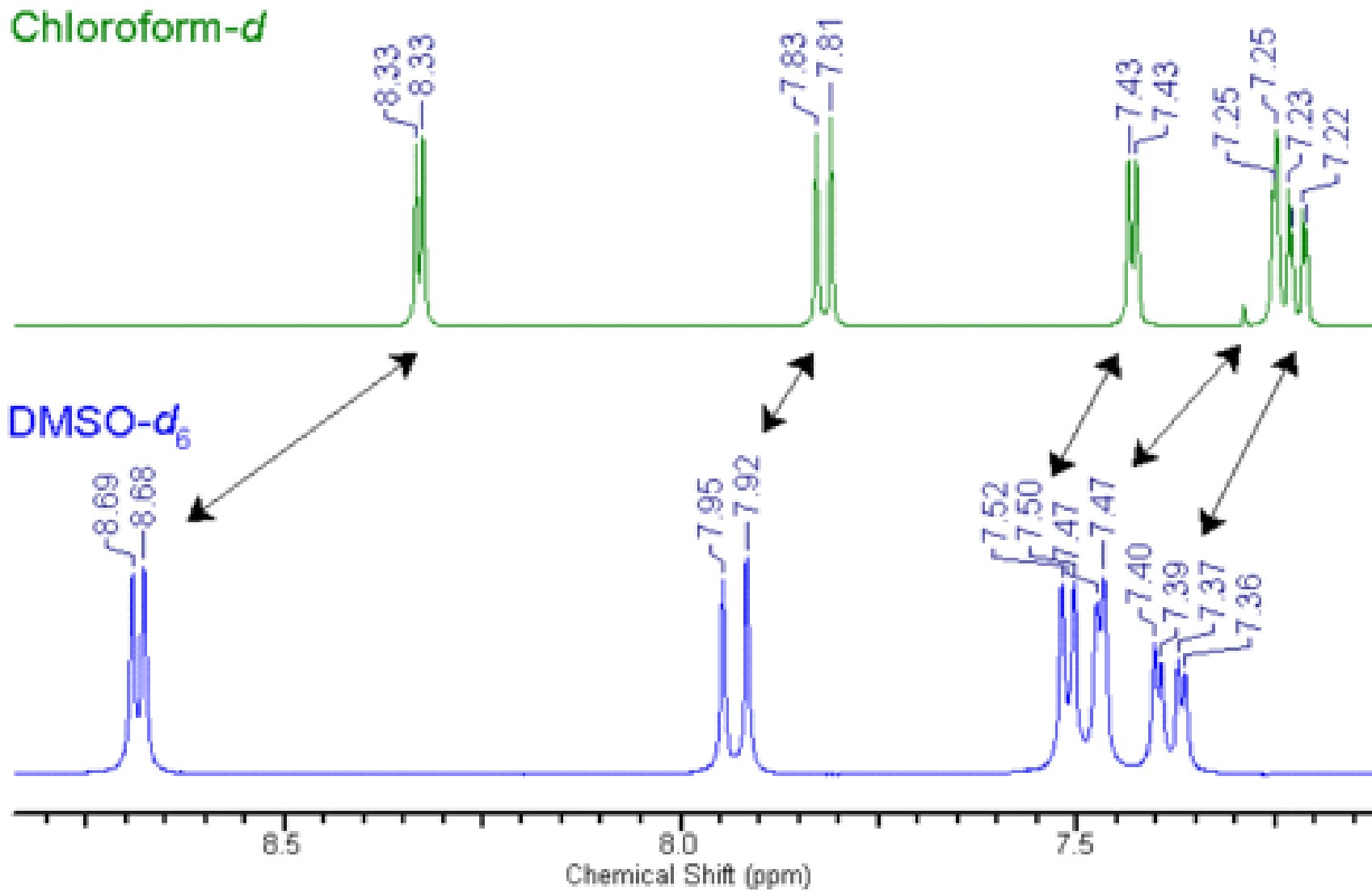
→ nezávislý na použitém poli (frekvenci spektrometru)

Plotted on the same ppm scale



Základní NMR parametry – Chemický posun

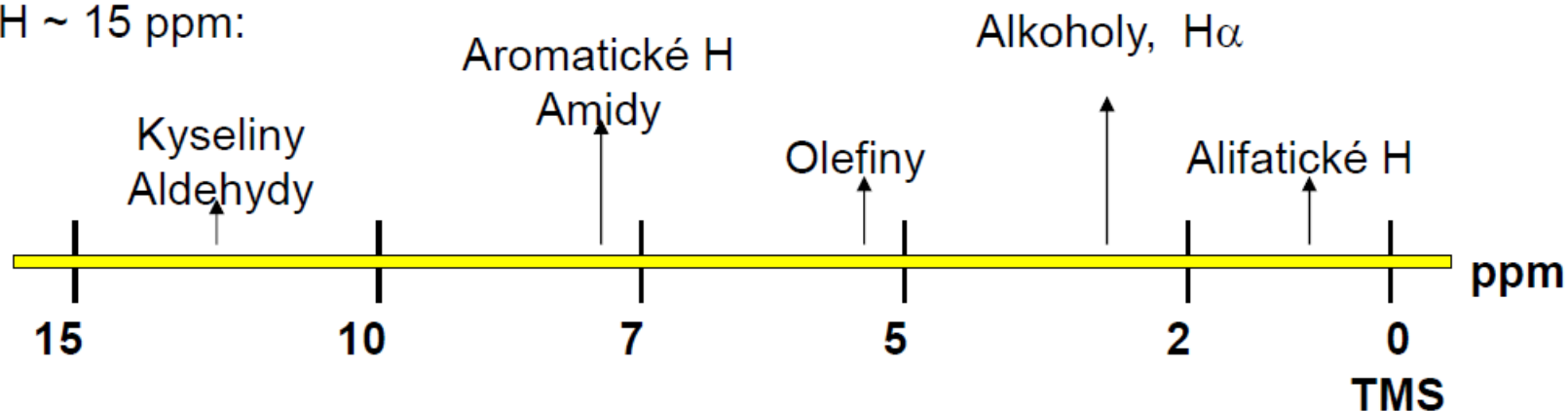
- Chemický posun = δ (ppm), závisí na rozpouštědle, teplotě, pH, iontové síle apod.



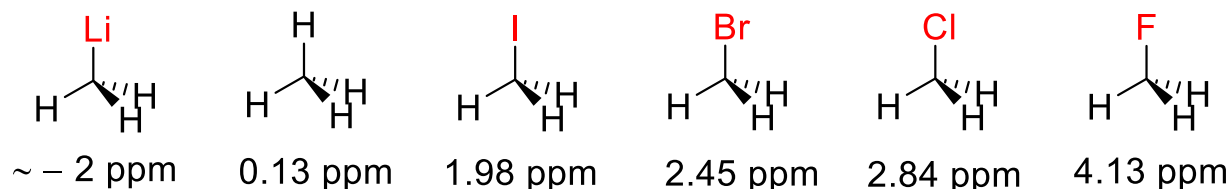
Základní NMR parametry – Chemický posun

- 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:



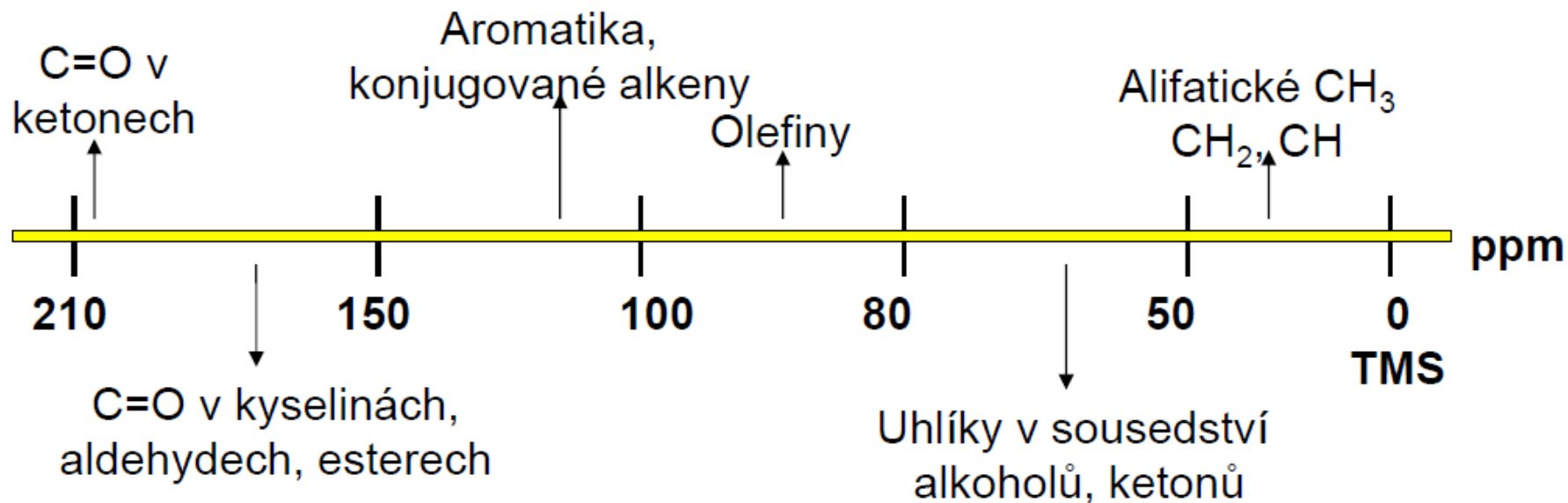
rostoucí elektronegativita, větší odstínění, větší chemický posun

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

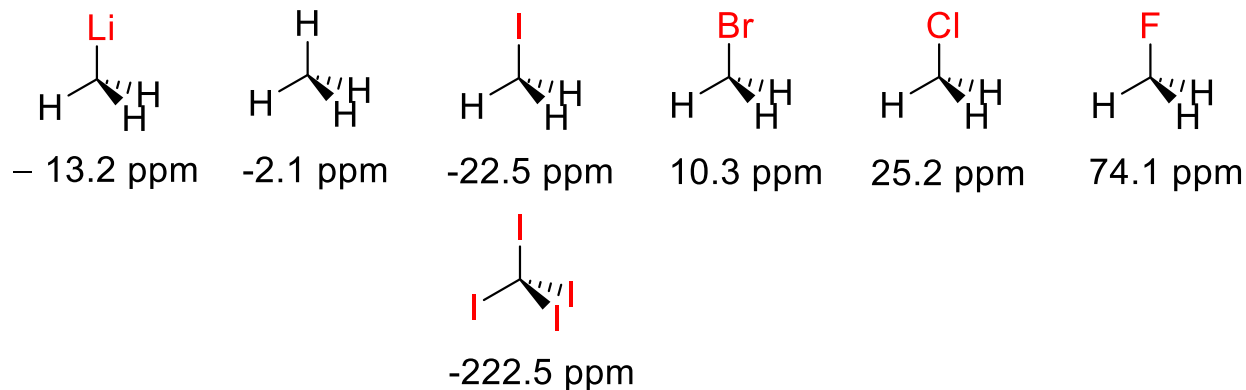
Základní NMR parametry – Chemický posun

■ ^{13}C NMR chemické posuny

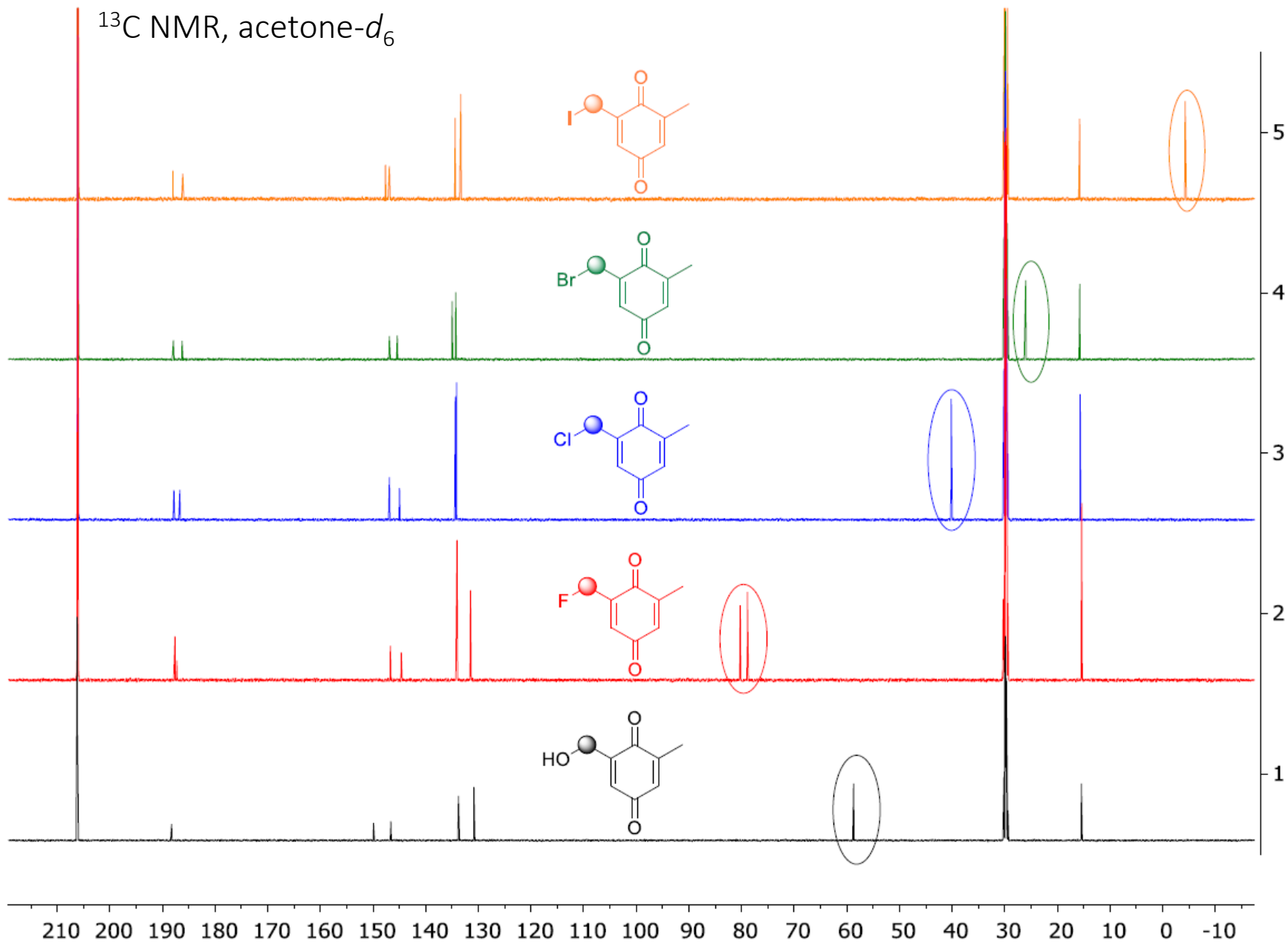
$^{13}\text{C} \sim 220$ ppm:



■ Efekt elektronegativity + stínění elektrony na chemický posun methyl skupiny:

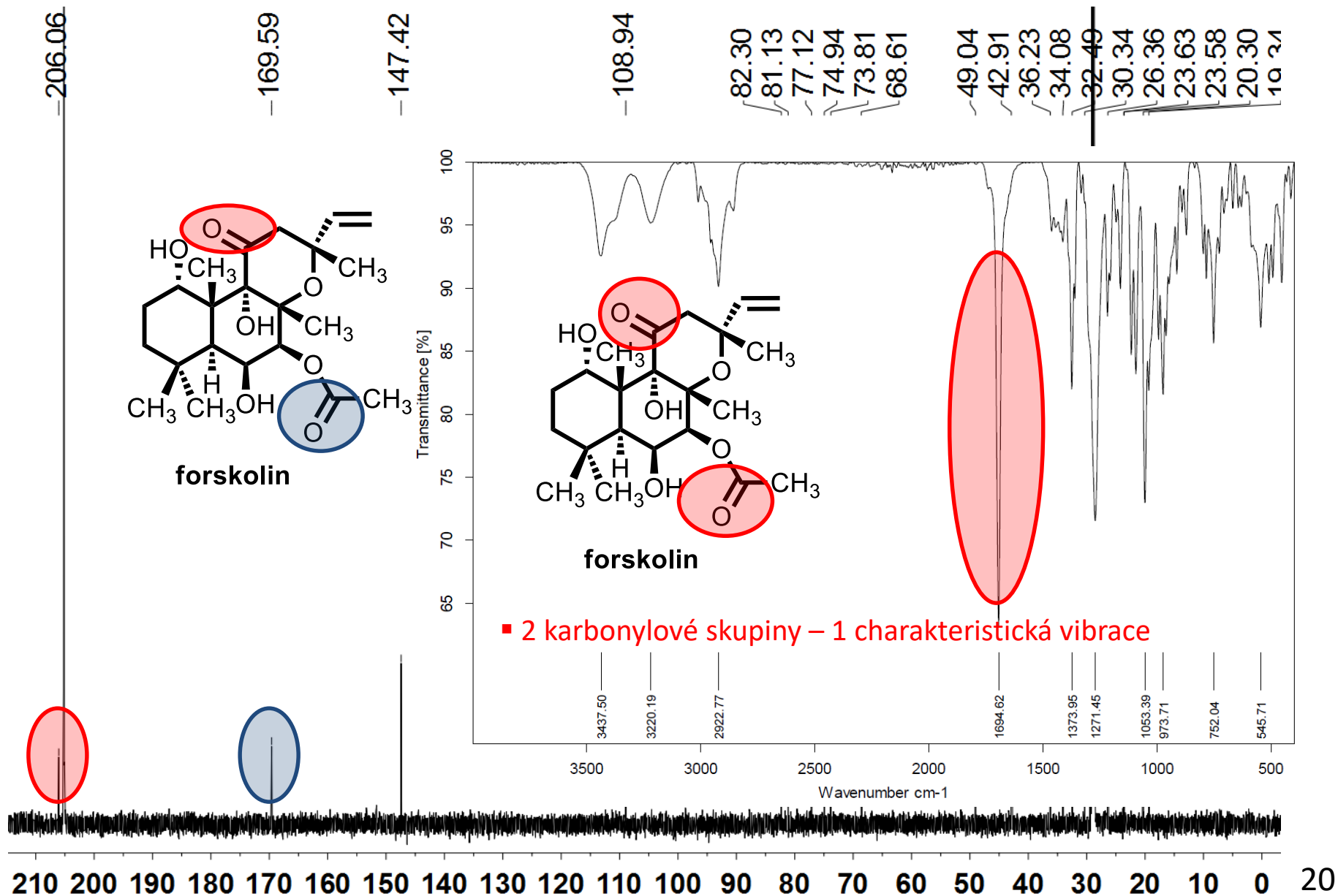


^{13}C NMR substituovaných benzochinonů



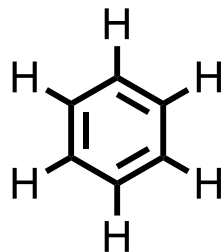
Základní NMR parametry – Chemický posun

■ ^{13}C NMR spektrum

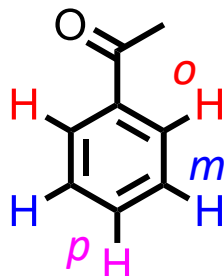
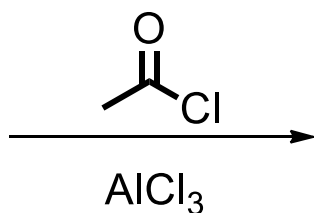
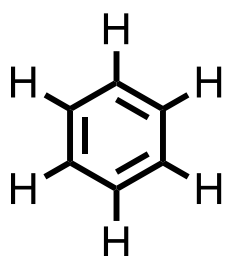


Základní NMR parametry – počet signálů/intenzita

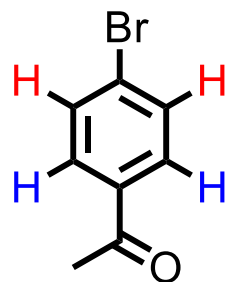
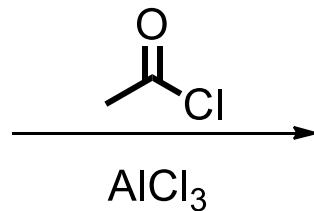
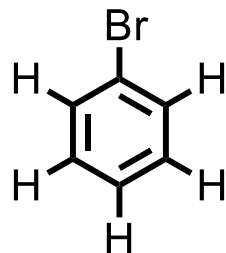
- Počet signálů ve spektru odráží symetrii molekuly – rozlišení isomerů apod.



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

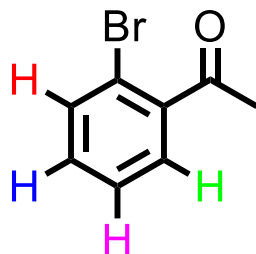
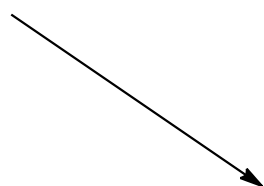


zavedením substituentu na jádro se snížila symetrie a počet aromatických signálů bude 3 – ortho, meta, para a jejich integrální intenzita v poměru, 2:2:1



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

3 ^1H signály



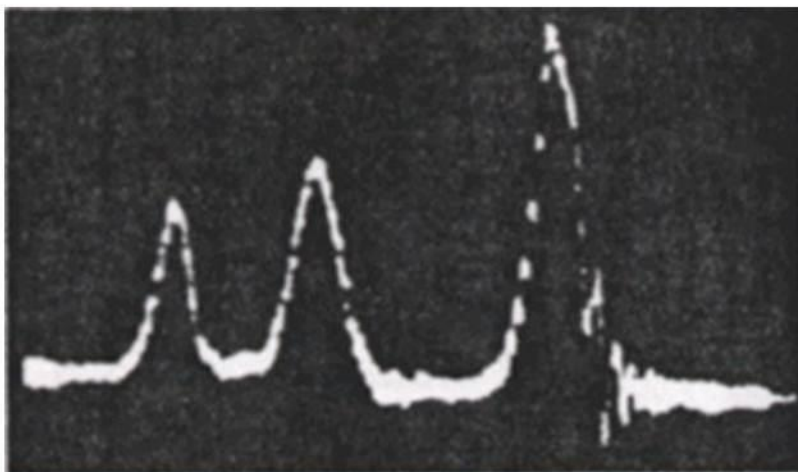
acylací do ortho polohy se opět změnila symetrie a všechny polohy jsou chemicky a magneticky neekvivalentní - počet aromatických signálů bude 4, v poměru 1:1:1:1

Pomocí IR nebo MS velmi obtížně či nerozlišitelné

Základní NMR parametry – multiplicita

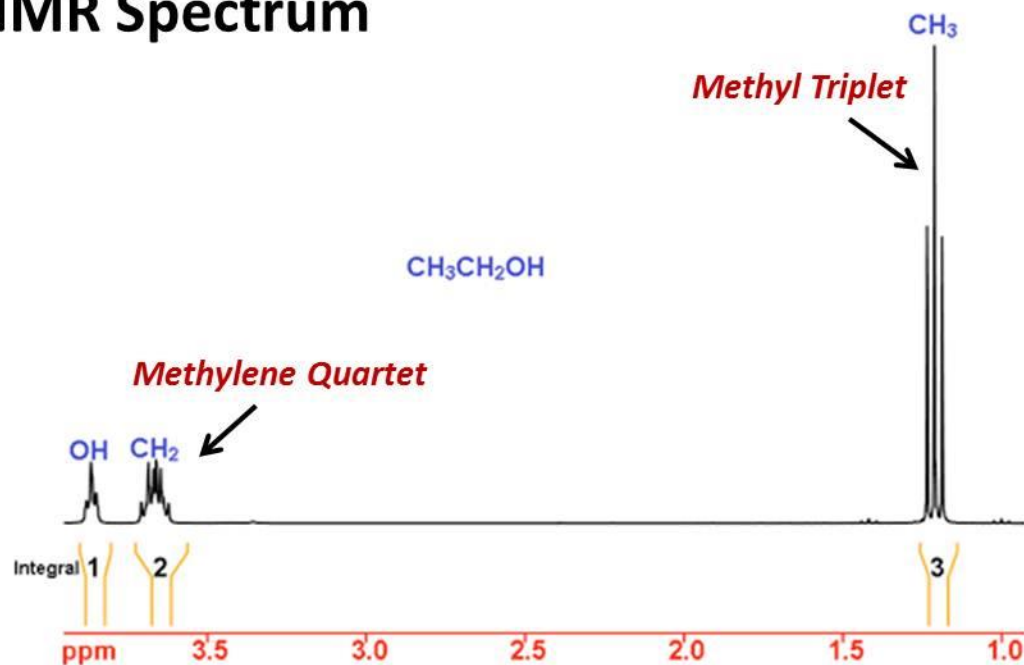
- neekvivalentní jádra, skupiny atomů navzájem interagují – jemná struktura spekter - multiplety

Ethanol ^1H NMR Spectrum

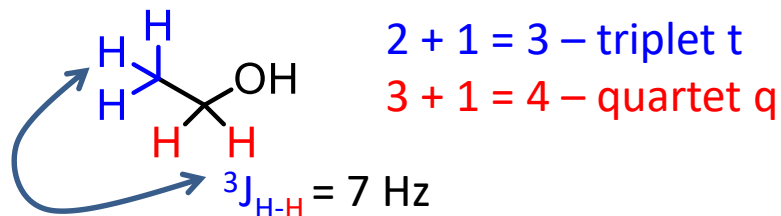


First ^1H NMR Spectrum of *ethanol* at **30 MHz** -1951 Stanford Univ

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



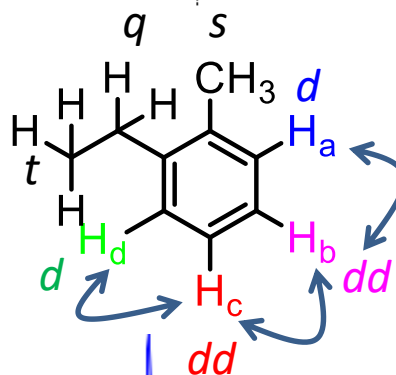
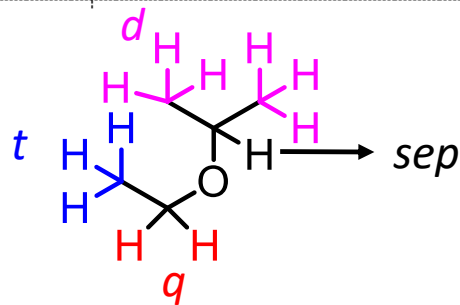
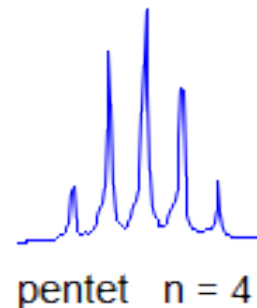
^1H NMR Spectrum of *ethanol* at 700 MHz



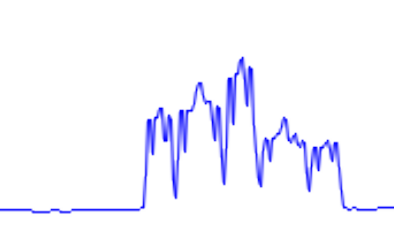
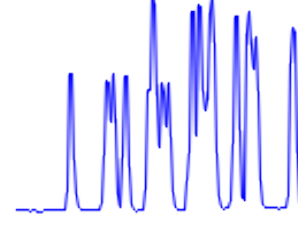
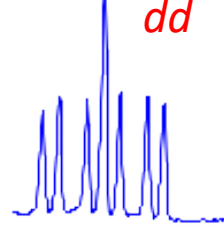
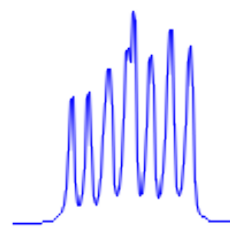
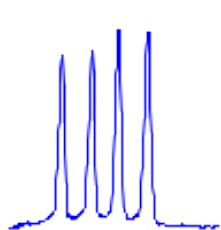
Základní NMR parametry – multiplicita

■ 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)

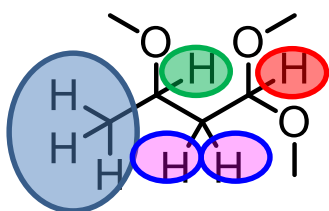
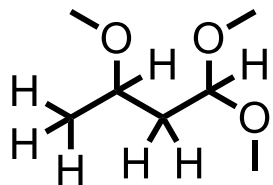


H_b-H_a , ale i $H_b-H_c \rightarrow dd$ (nebo multiplet (4 linie) *ne t, protože* $H_a \neq H_c$)

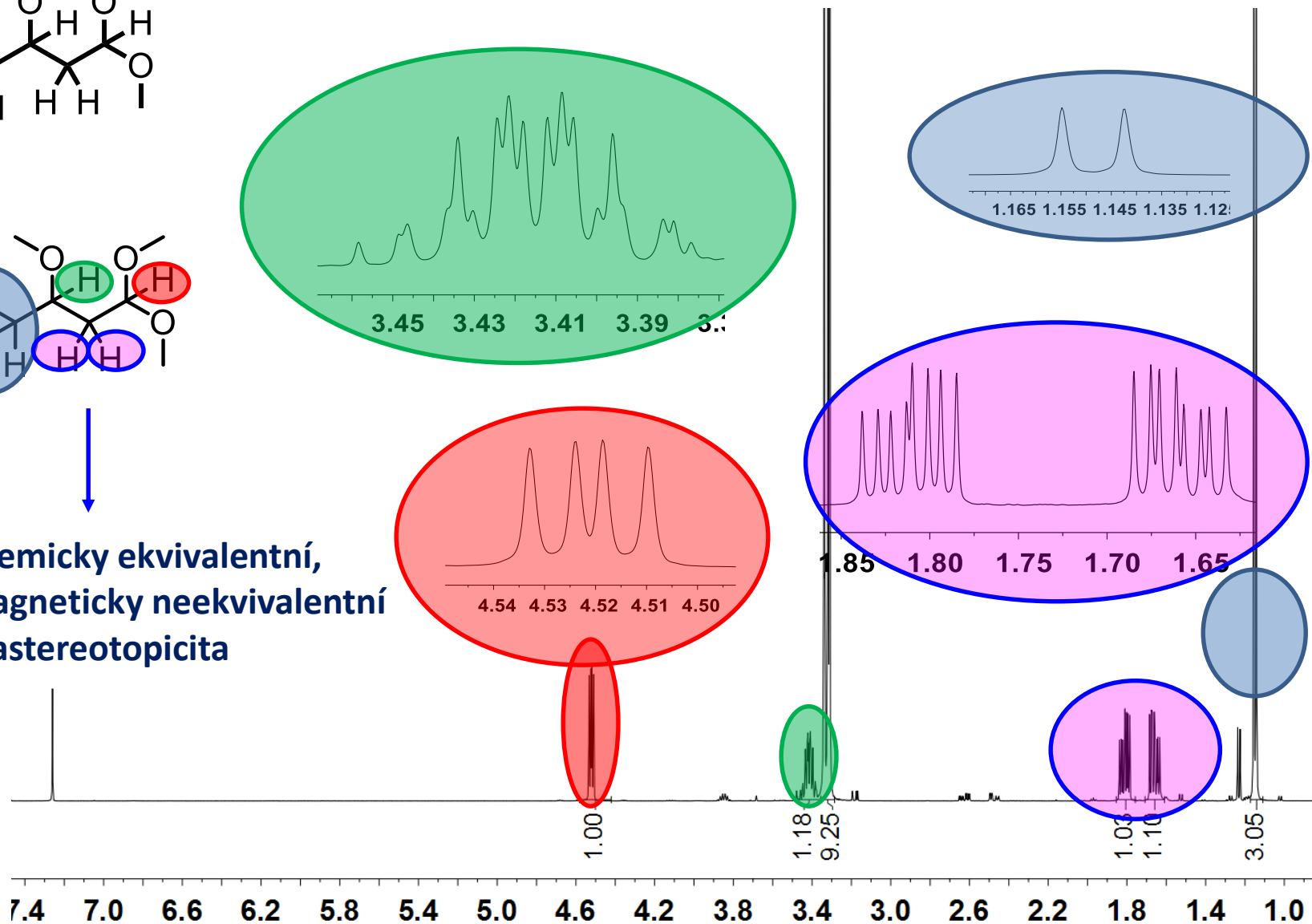


■ Komplexní molekuly mohou mít velmi komplexní spektrum

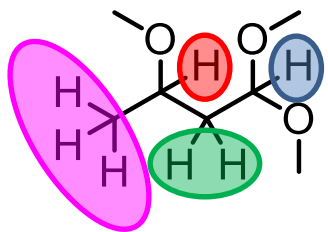
Základní NMR parametry – multiplicita



- chemicky ekvivalentní, magneticky neekvivalentní
- diastereotopicita

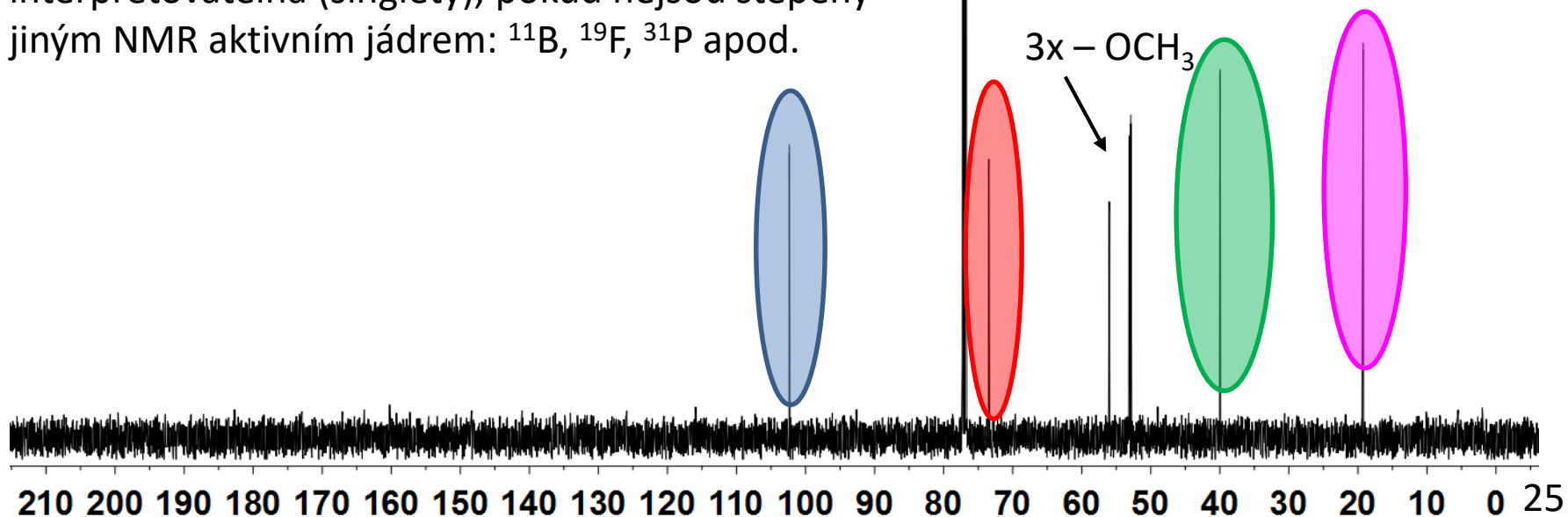


Základní NMR parametry – multiplicita

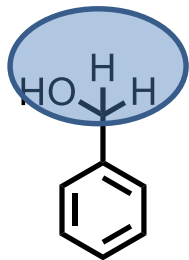


- ^{13}C - ^1H interakce se během měření potlačí (decoupling) a ^{13}C - ^{13}C interakce jsou téměř nepozorovatelné díky izotopovému zastoupení izotopu ^{13}C (1.1 %)
- → ^{13}C spektra jsou obvykle jednoduše interpretovatelná (singlety), pokud nejsou štěpeny jiným NMR aktivním jádrem: ^{11}B , ^{19}F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

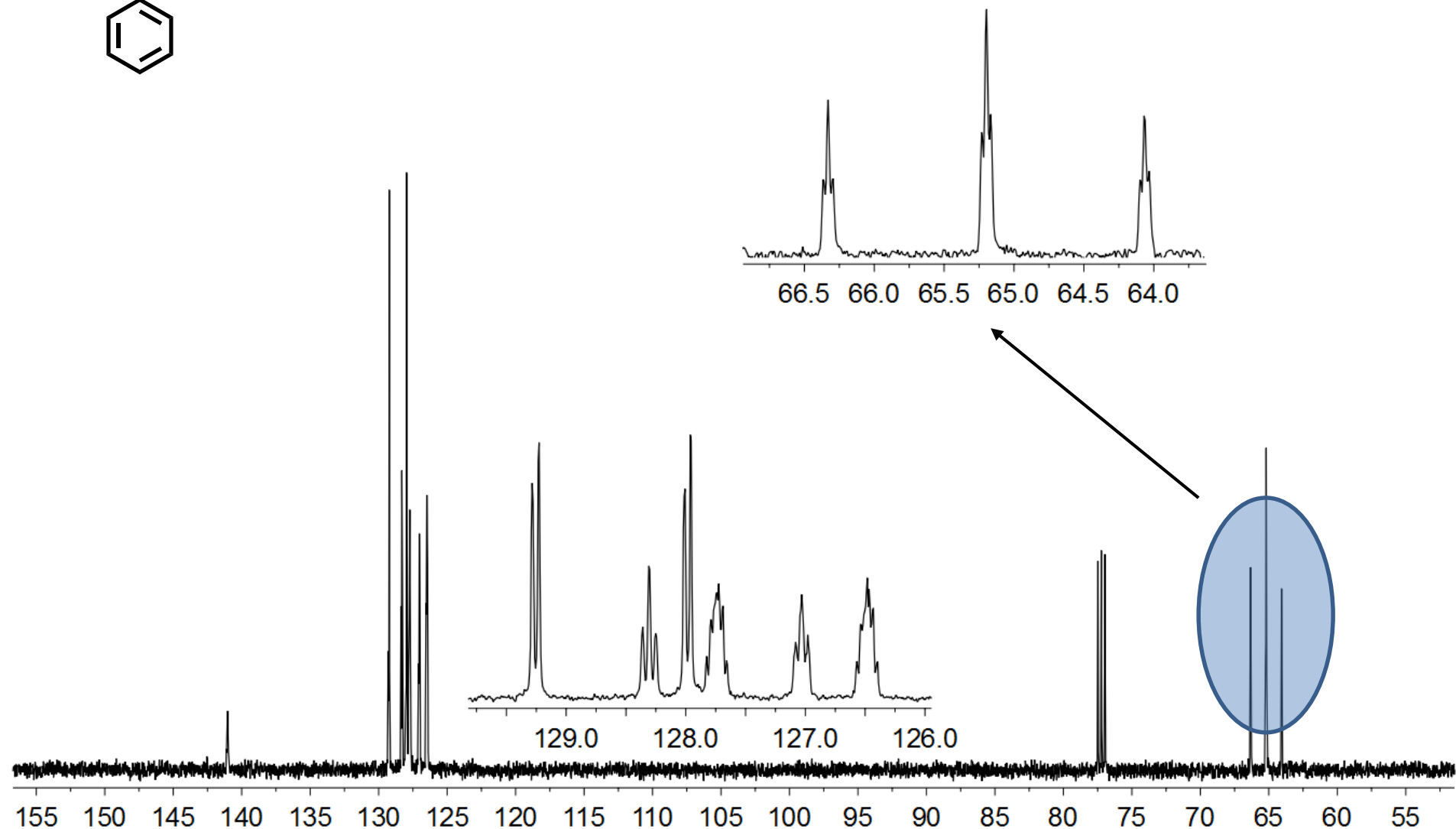
-102.35
77.01
76.75
73.47
56.02
53.13
52.90
-39.96
-19.23



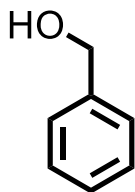
Základní NMR parametry – multiplicita



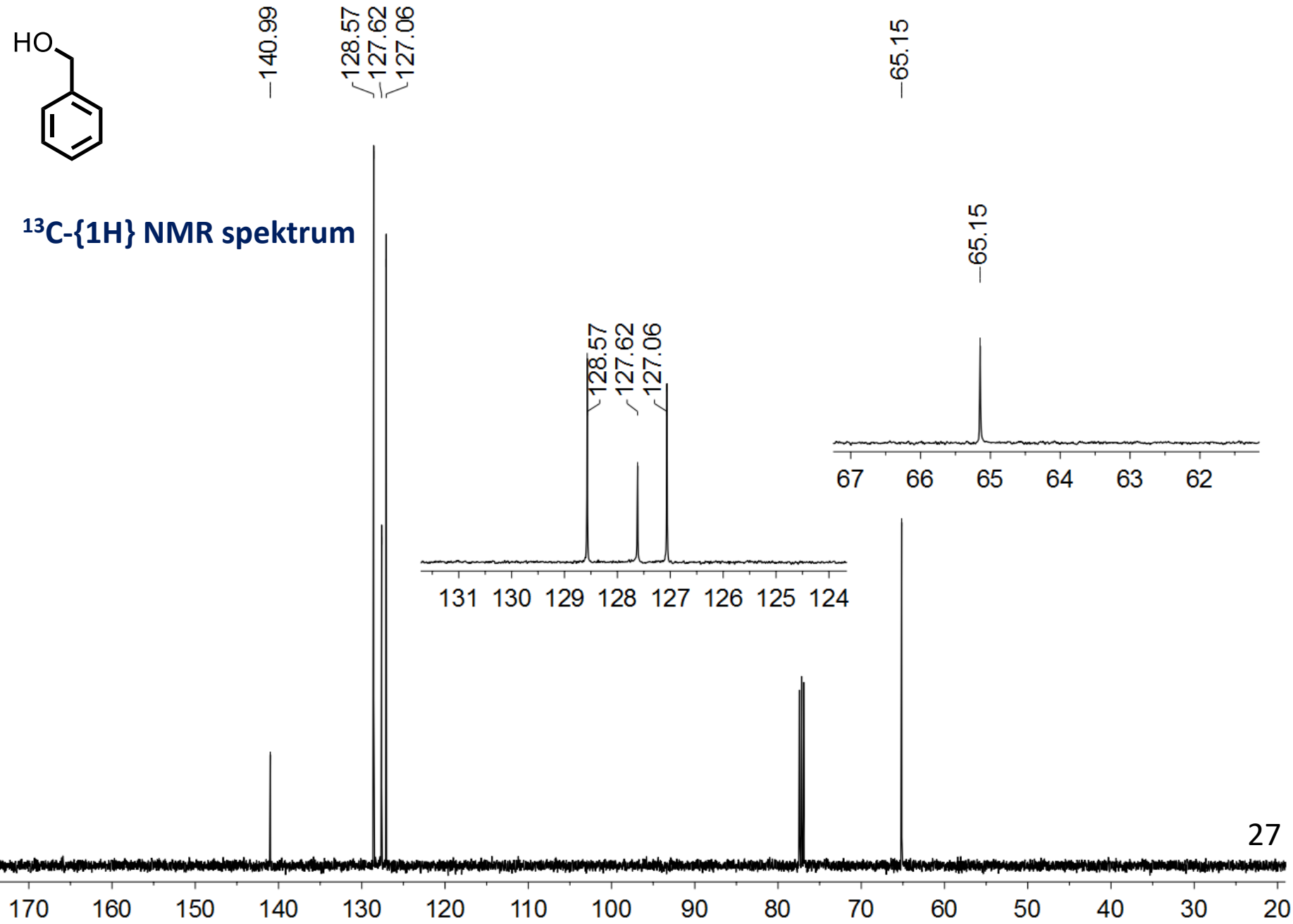
- undecoupled ^{13}C NMR spektrum s ^1H interakcemi



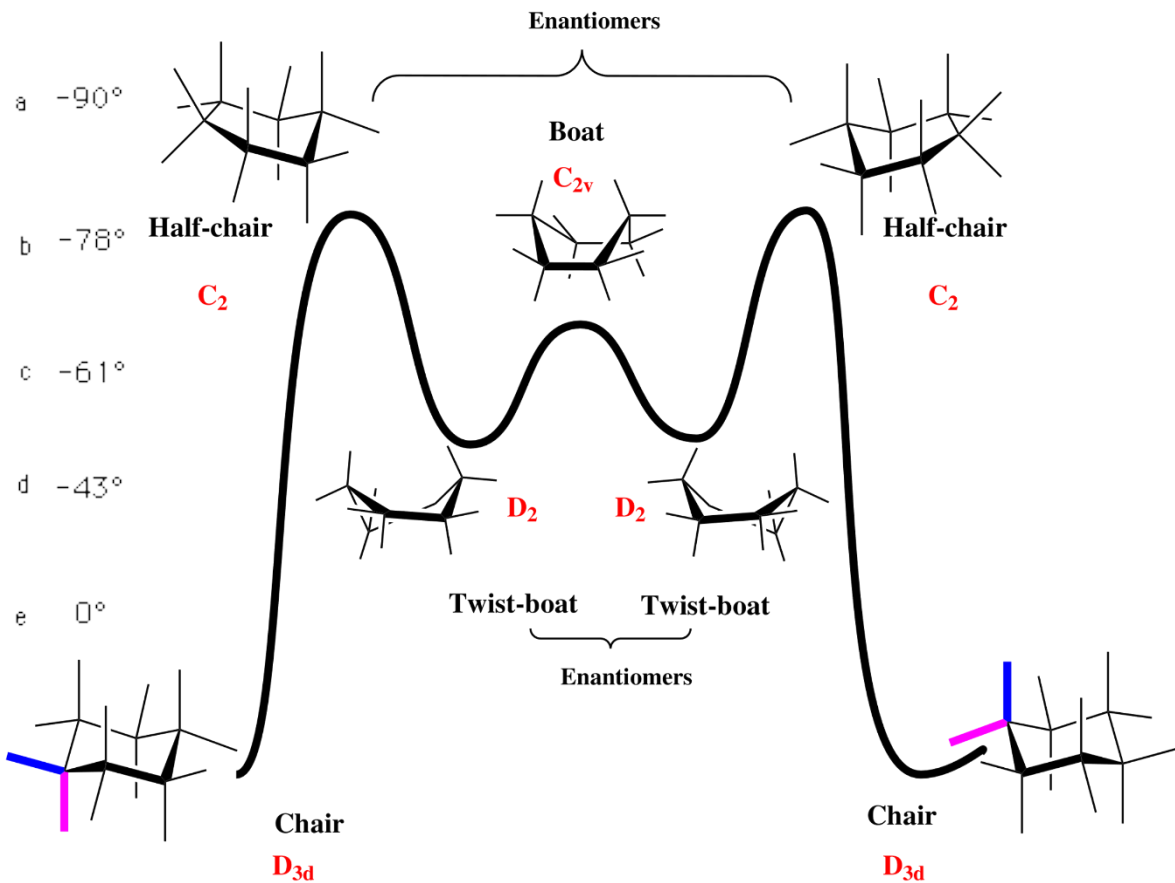
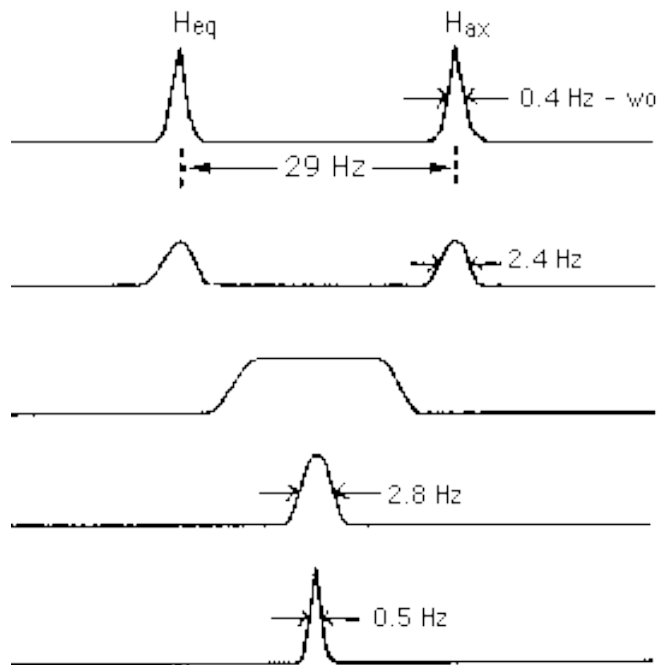
Základní NMR parametry – multiplicita



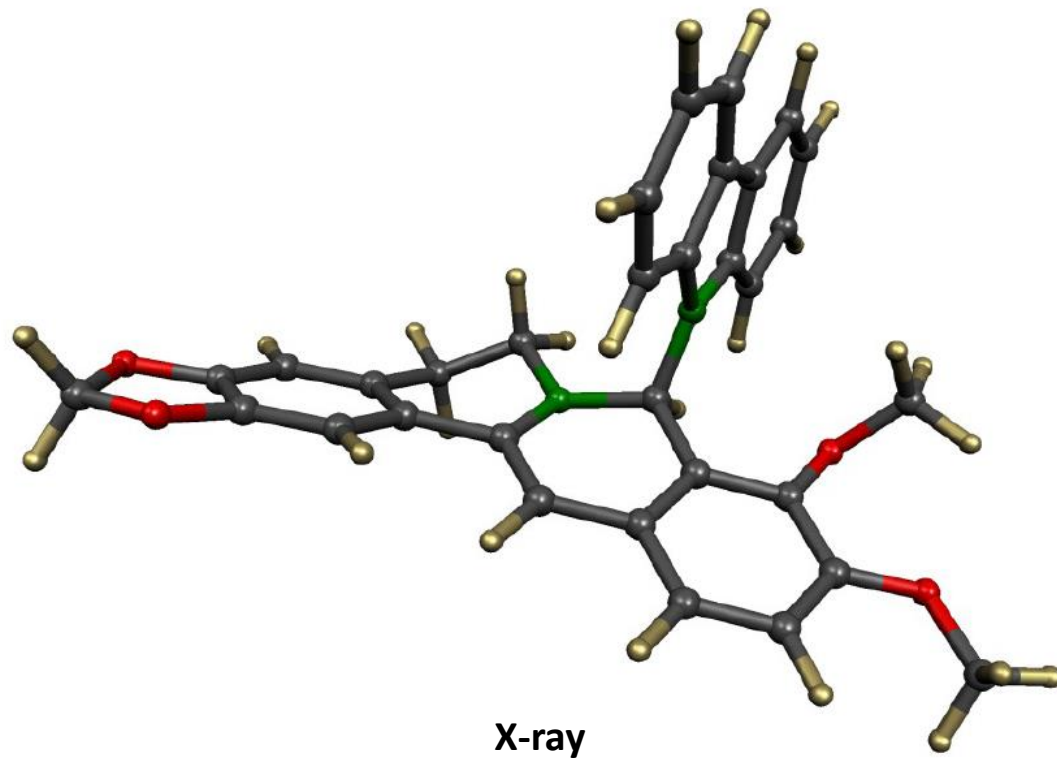
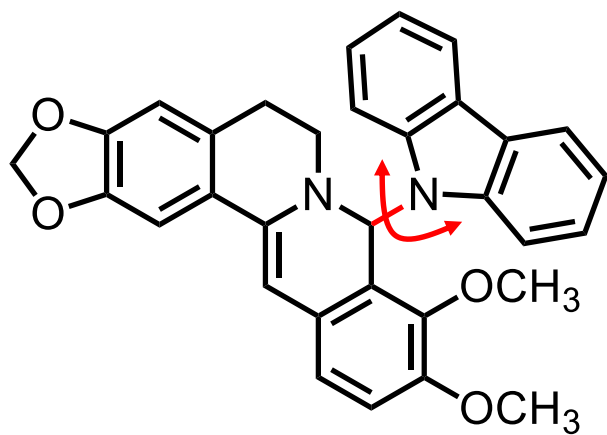
■ $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ NMR spektrum



Dynamické chování molekul

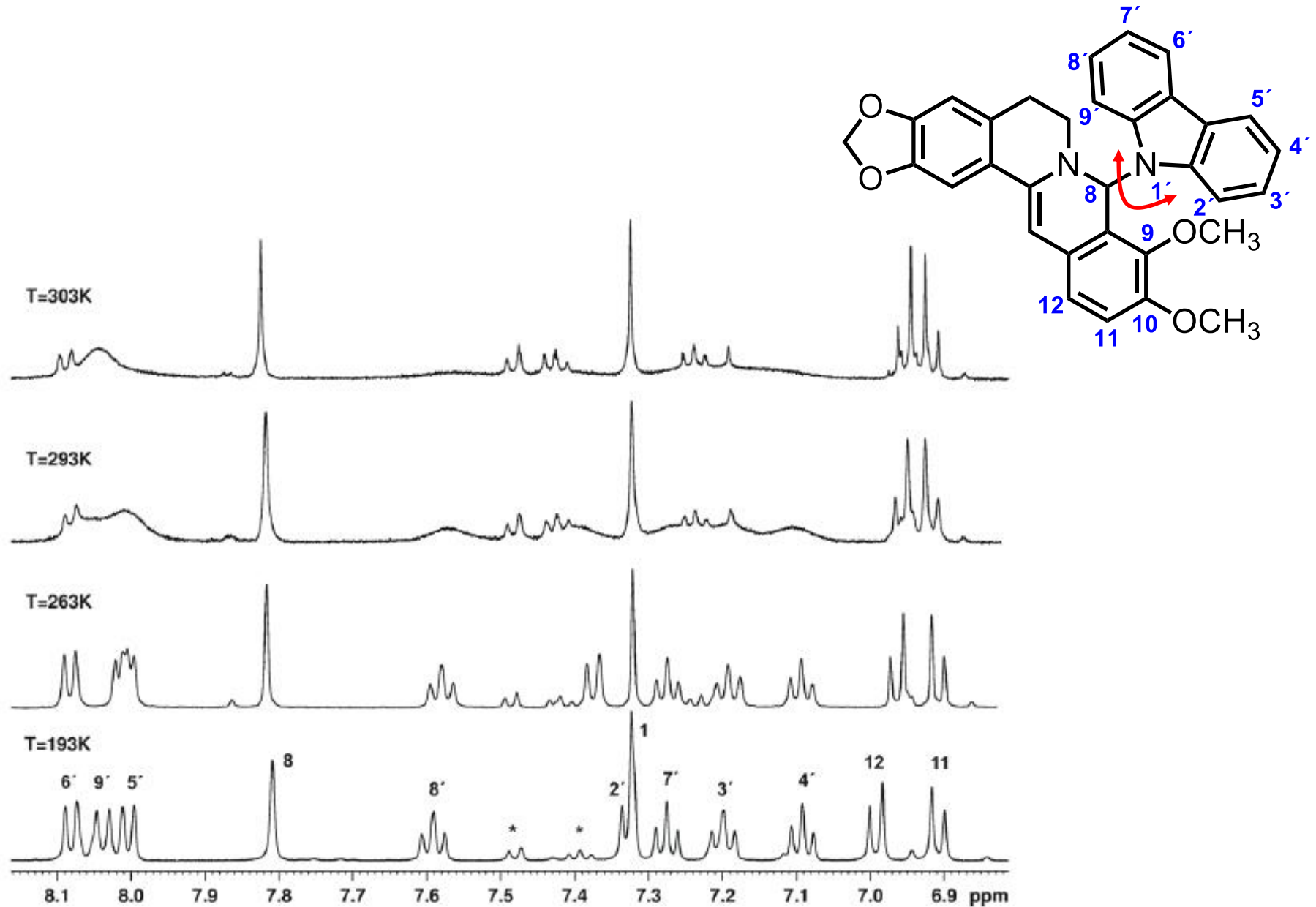


- konformační pohyb cyklohexanu
- při 0°C je inverze kruhu velmi rychlá a pozorujeme průměrný signál
- při -90°C je pohyb „zastaven“ a pozorujeme dva typy signálu H_{ax} a H_{eq}



- Studium rotace okolo σ C-N vazby

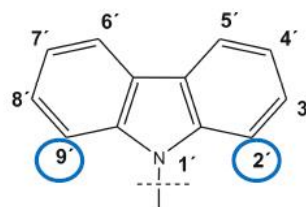
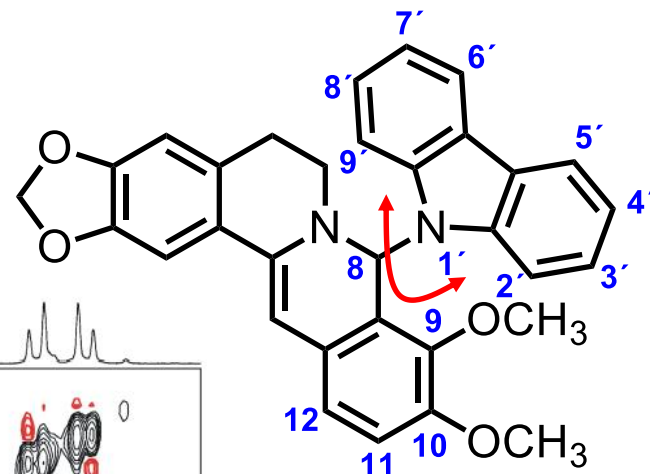
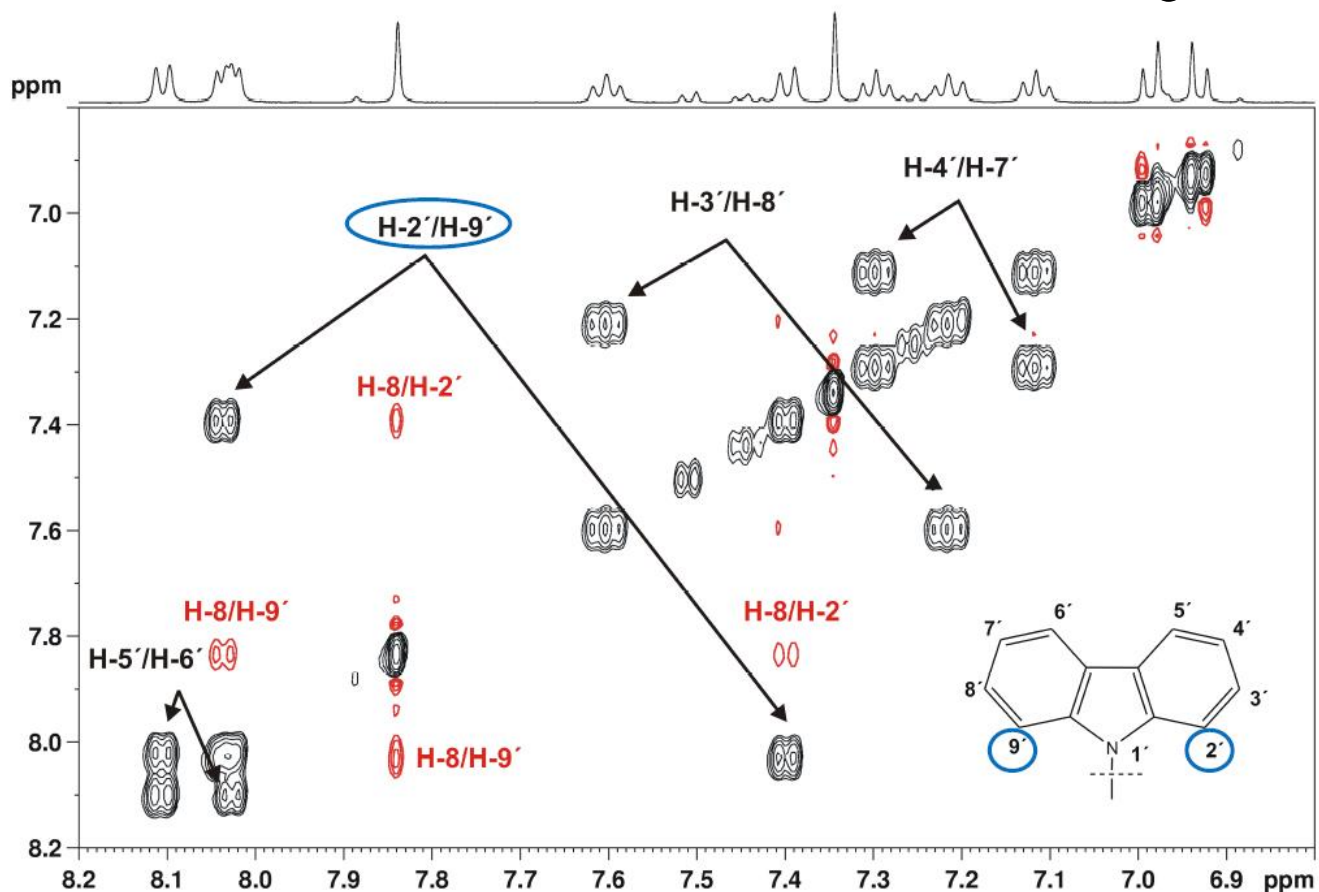
Teplotně závislá ^1H NMR spektra



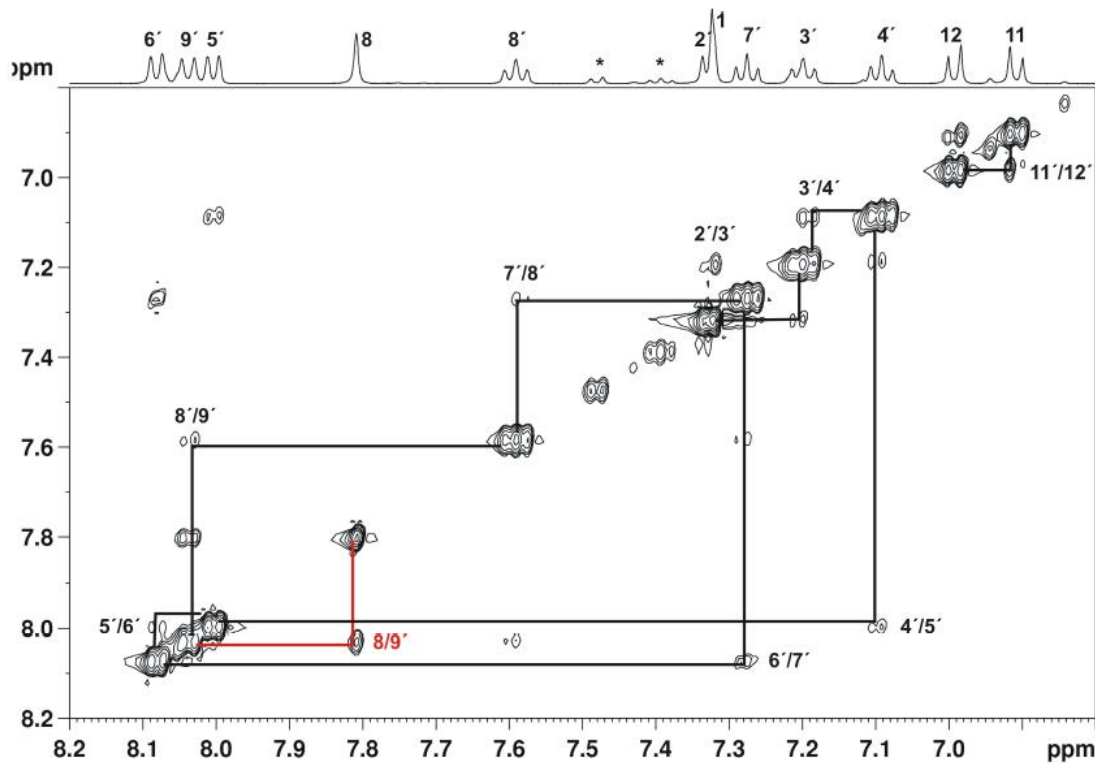
NOESY spektra při 263K

Konformační výměna H signálů při nižší teplotě

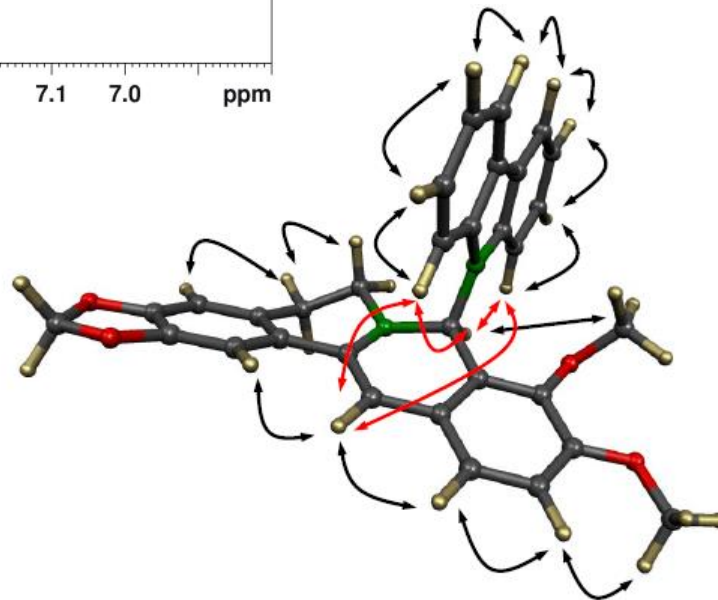
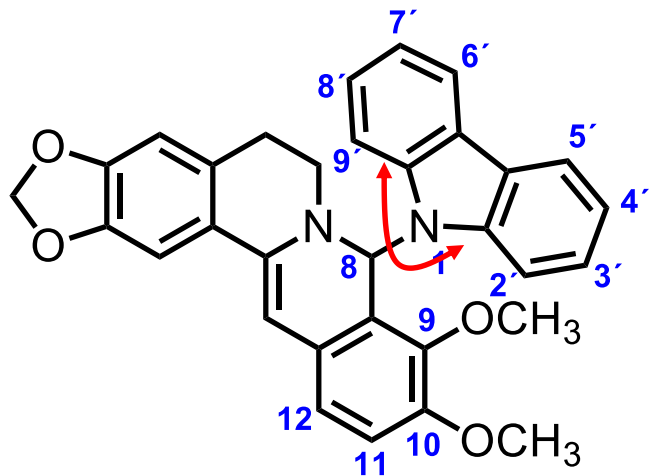
Exchange NOE/standardní NOE interakce



NOESY spektra při 193K



Při velmi nízké teplotě je rotace „zastavena“ a v NMR spektrech je vidět pouze sada standardních NOE interakcí



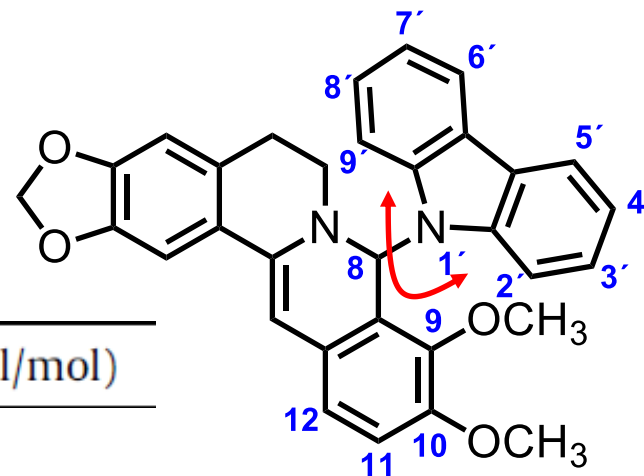
Výpočet velikosti bariéry rotace z NMR parametrů

$$k_c = \pi \Delta\nu / \sqrt{2}$$

$$k_c = k_B T / h * e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$$

$$\Delta G^\ddagger_c = 4.58 T_c (10.32 + \log T_c / k_c) \text{ cal/mol}$$

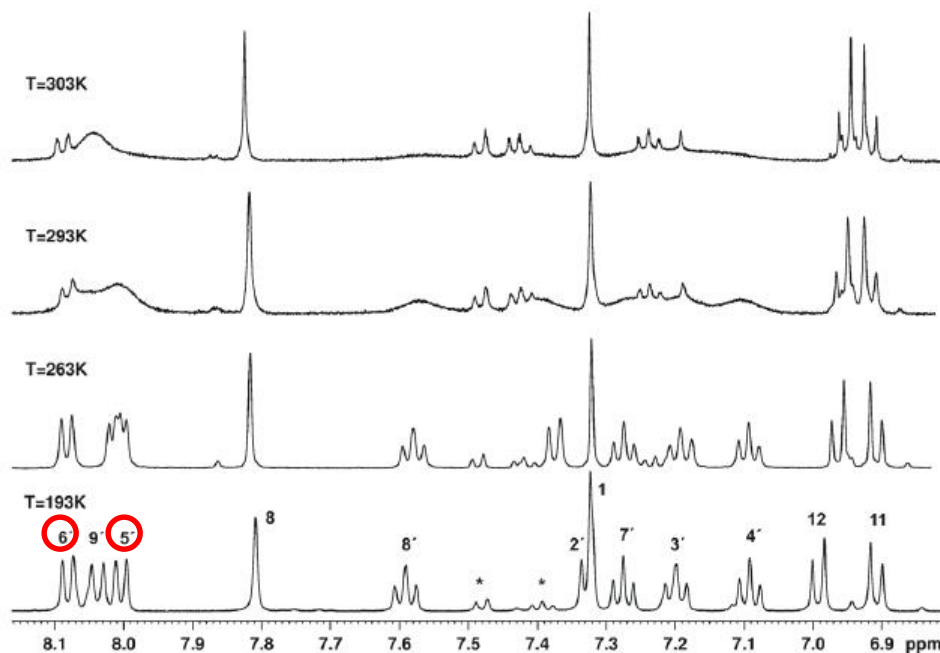
$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta G^\ddagger_{\text{obs}} \text{ (kcal/mol)}$	$\Delta G^\ddagger_{\text{calcd}} \text{ (kcal/mol)}$
$86.47^{293\text{K}}$	$14.56^{293\text{K}}$	14.96



$$\Delta\nu = 38.95 \text{ Hz (H-5' / H-6')}$$

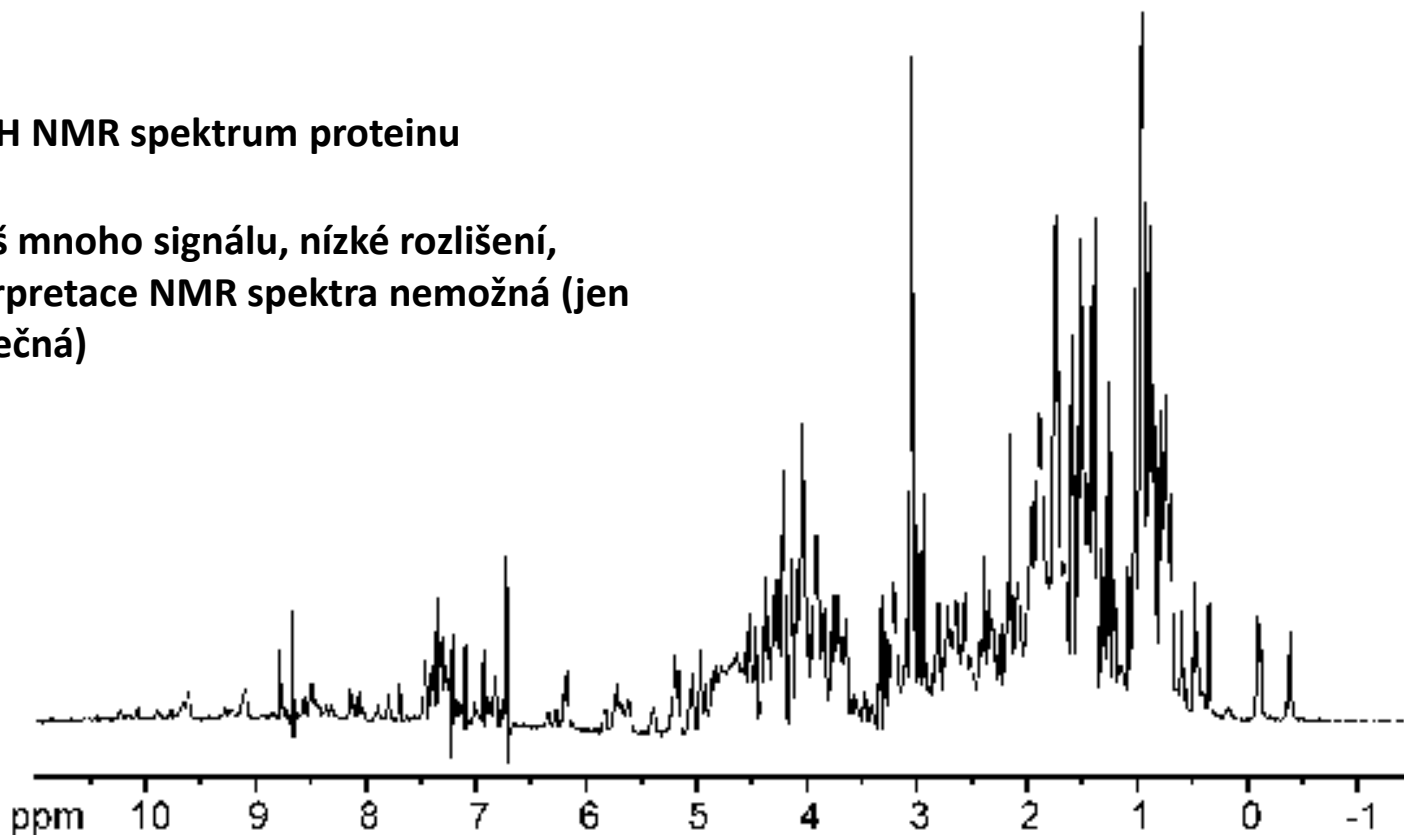
$$T_c = 293\text{K}$$

$$k_c = 86.47 \text{ s}^{-1}$$



2D NMR spektroskopie

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



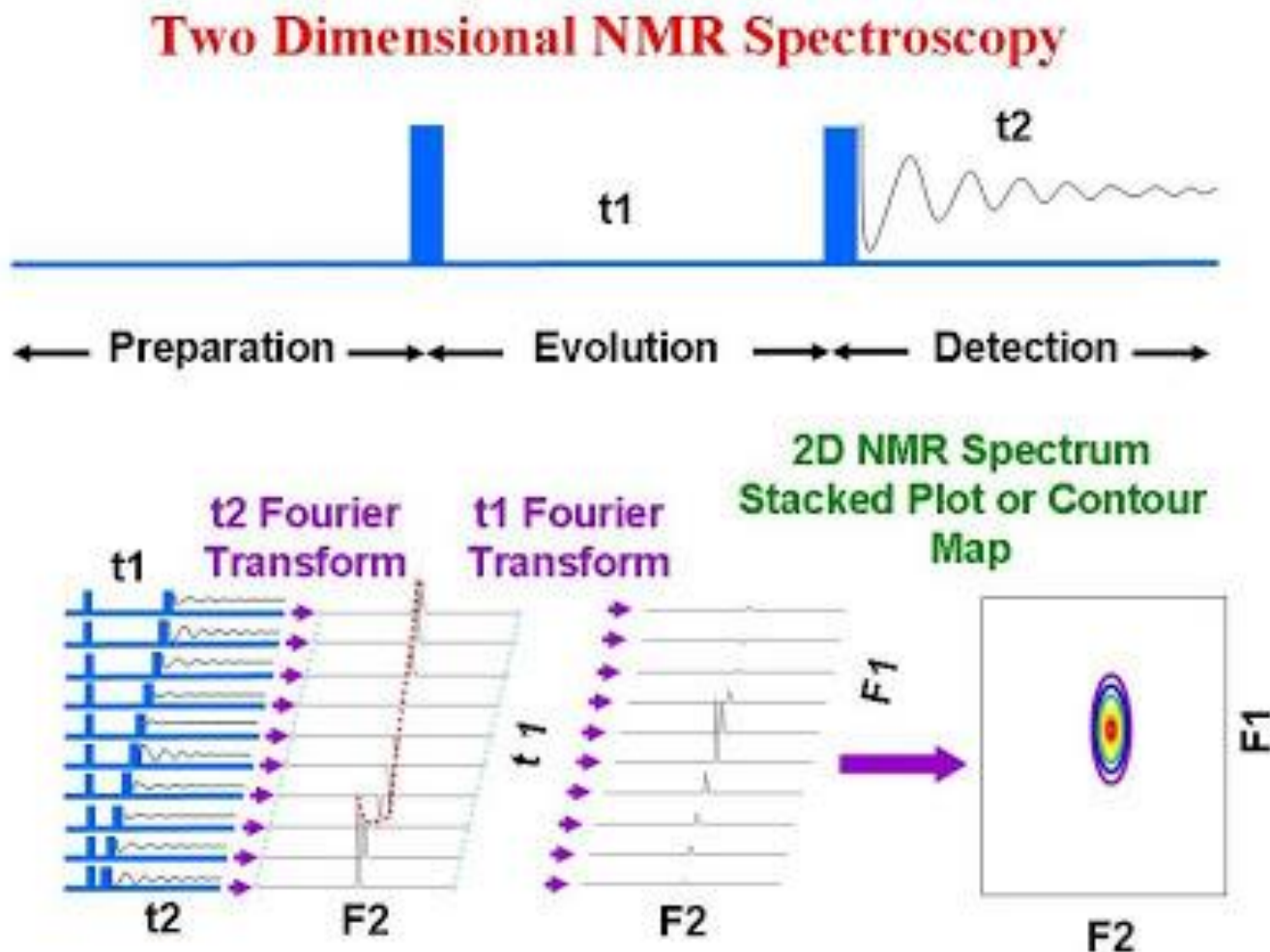
→ 2D, 3D... NMR experimenty

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

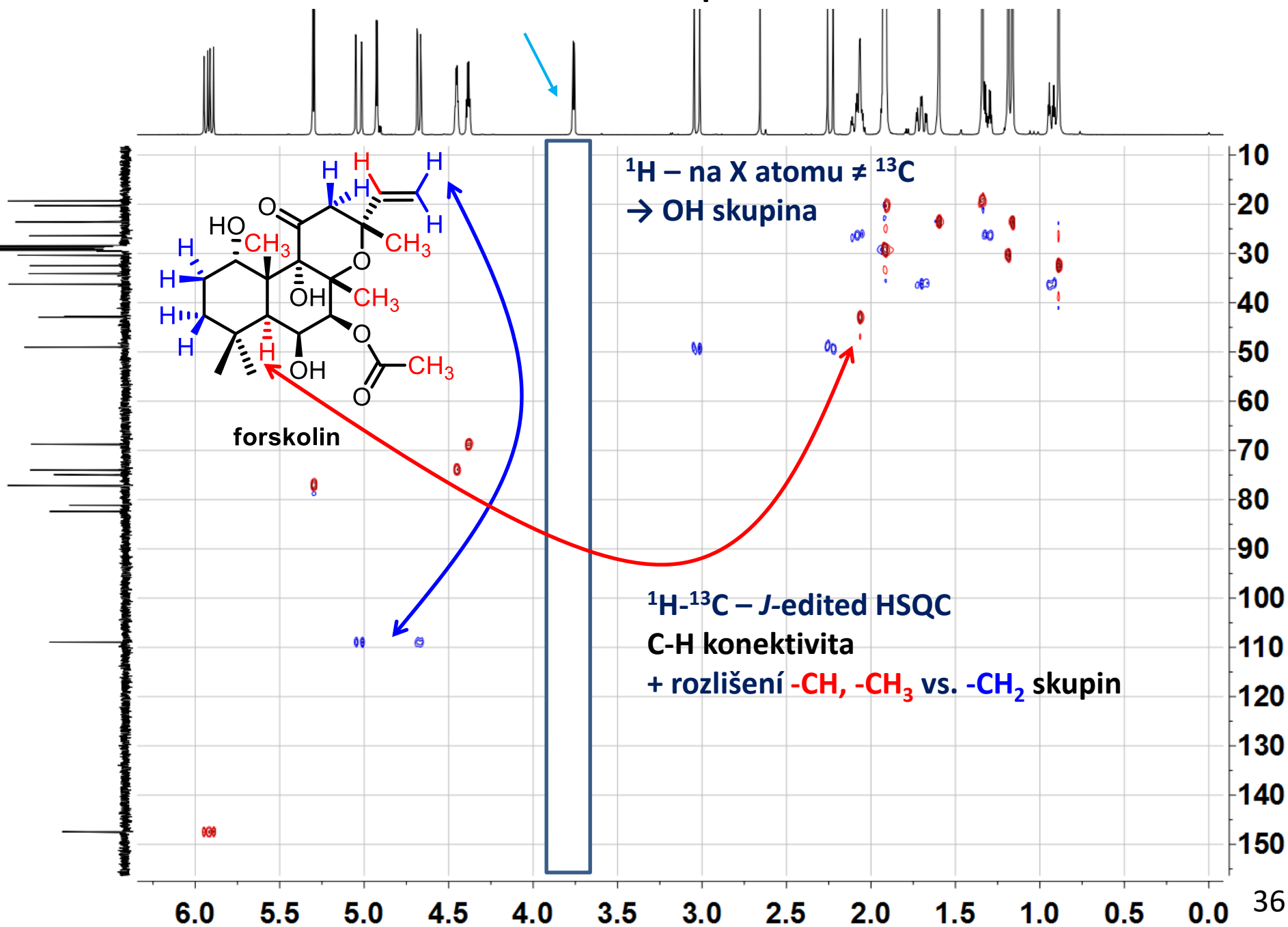
3D NOESY-HSQC, NOESY-TOCSY...4D...5D!!!

2D NMR spektroskopie

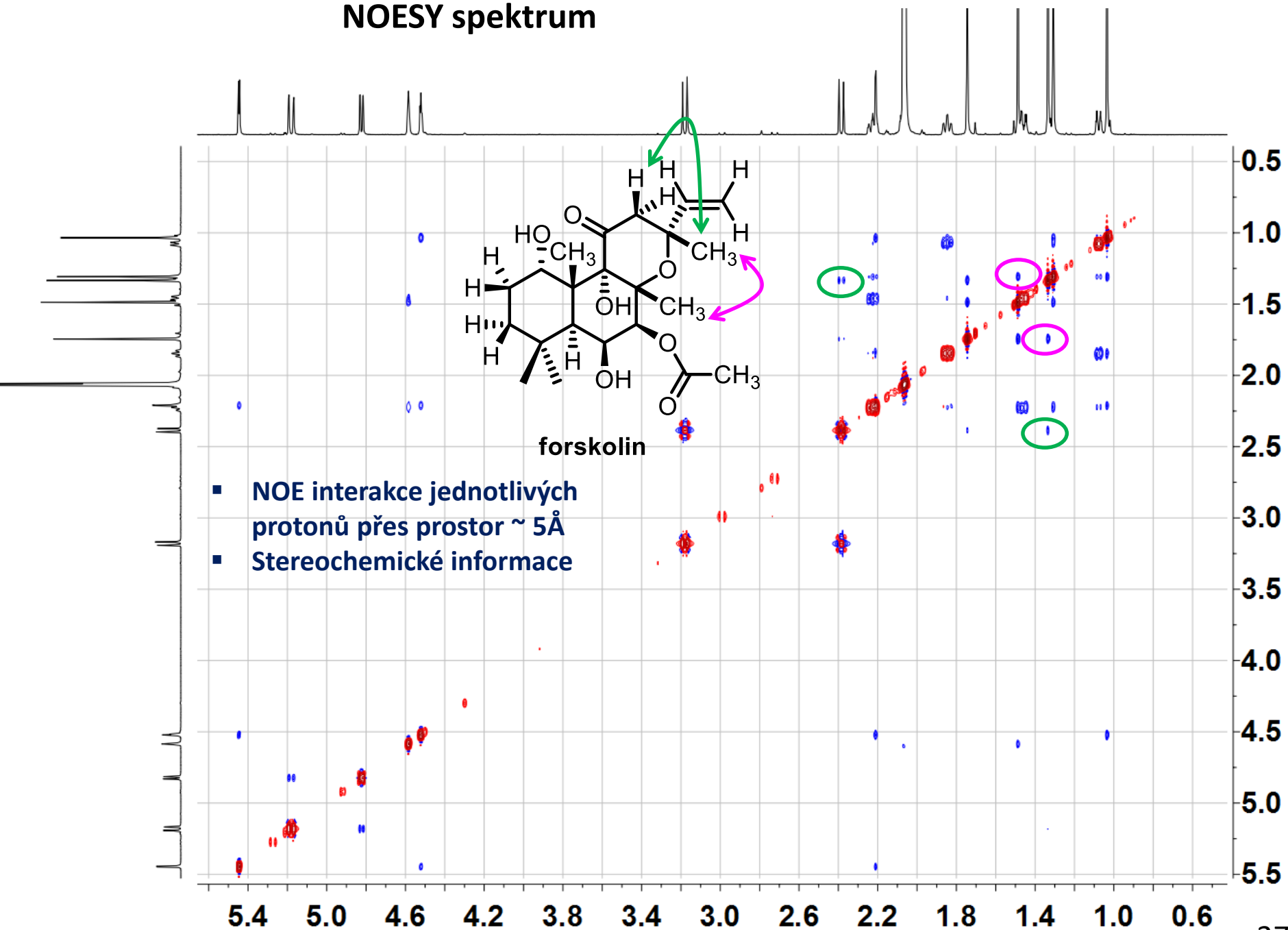
- I malé organické molekuly, mohou mít velmi komplikované spektrum – expanze do více dimenzí poskytne detailnější informace



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



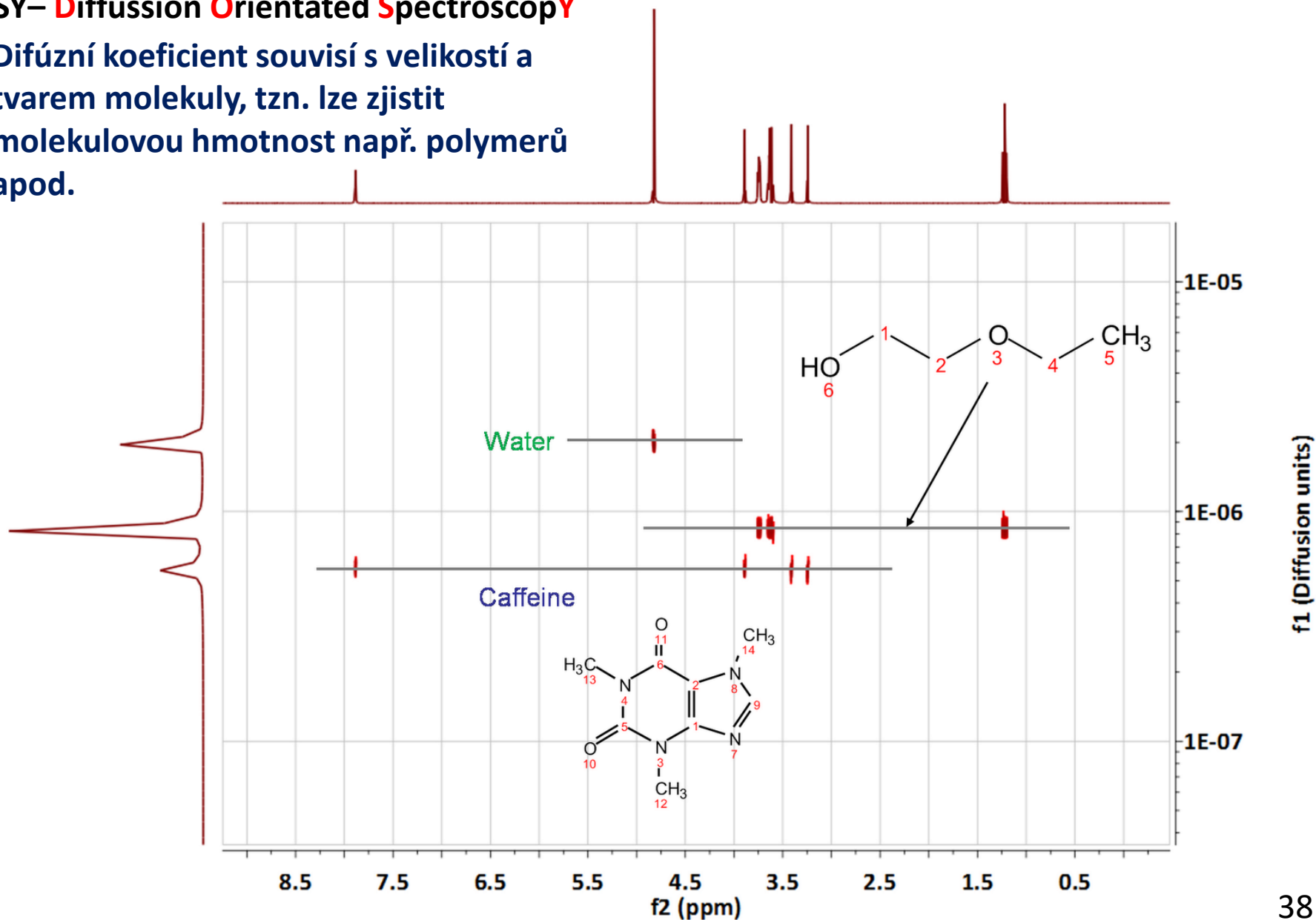
NOESY spektrum



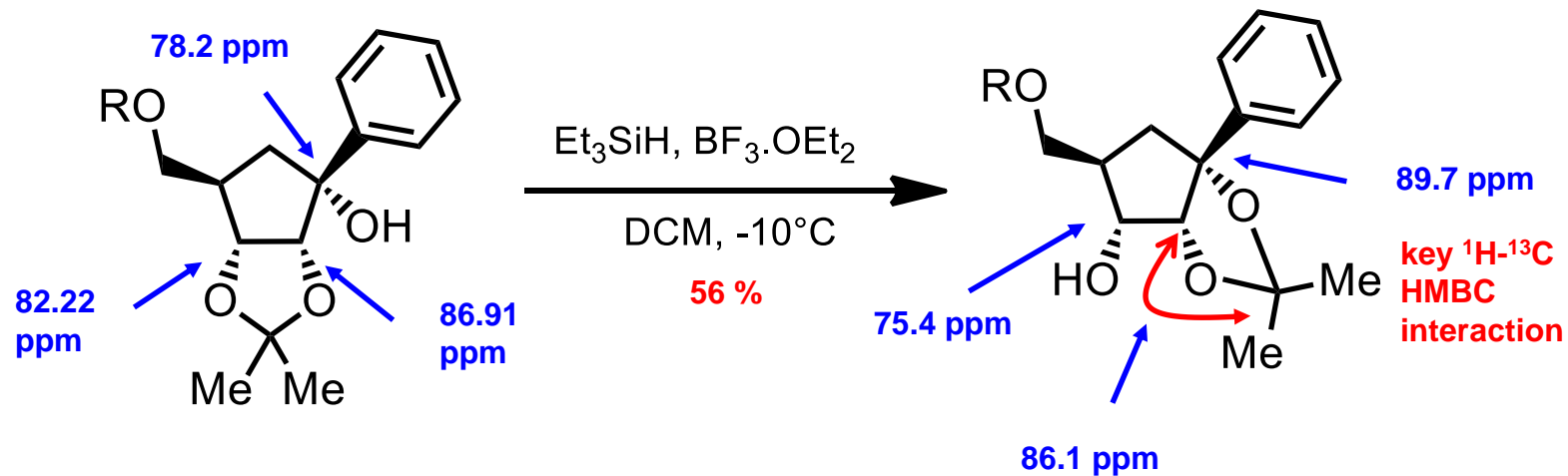
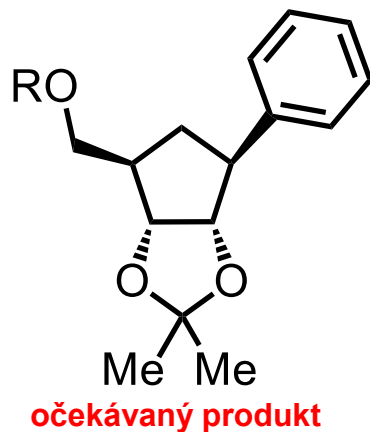
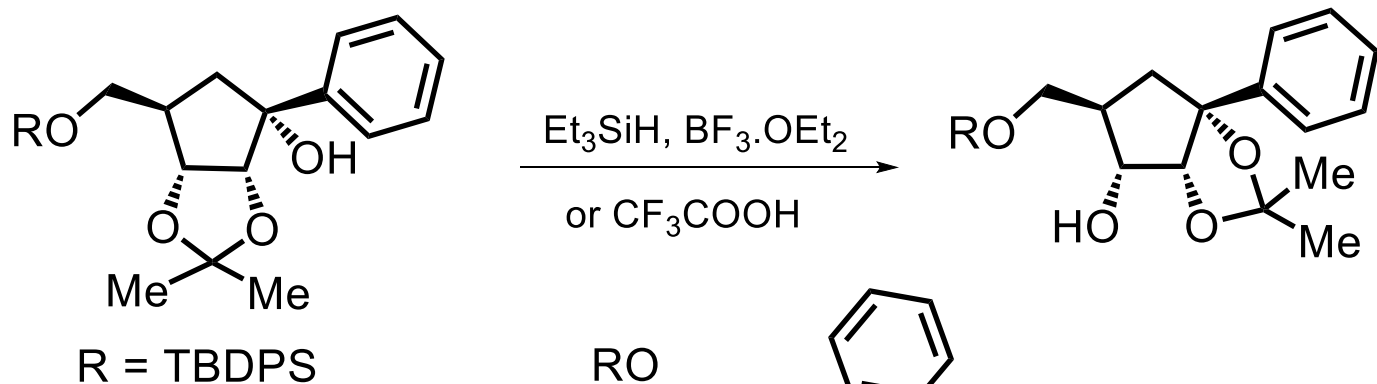
2D NMR spektroskopie

DOSY– Diffusion Orientated SpectroscopY

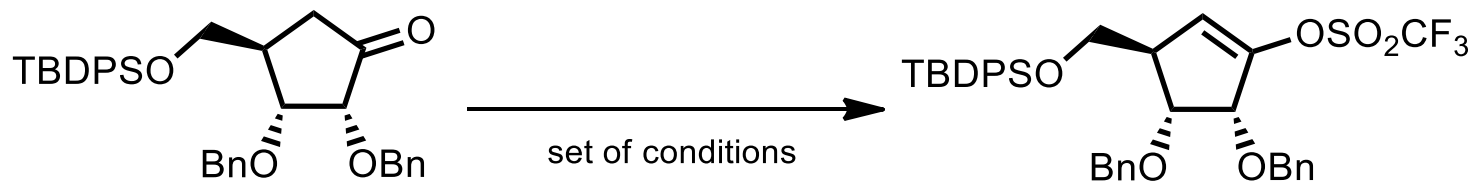
- Difúzní koeficient souvisí s velikostí a tvarem molekuly, tzn. lze zjistit molekulovou hmotnost např. polymerů apod.



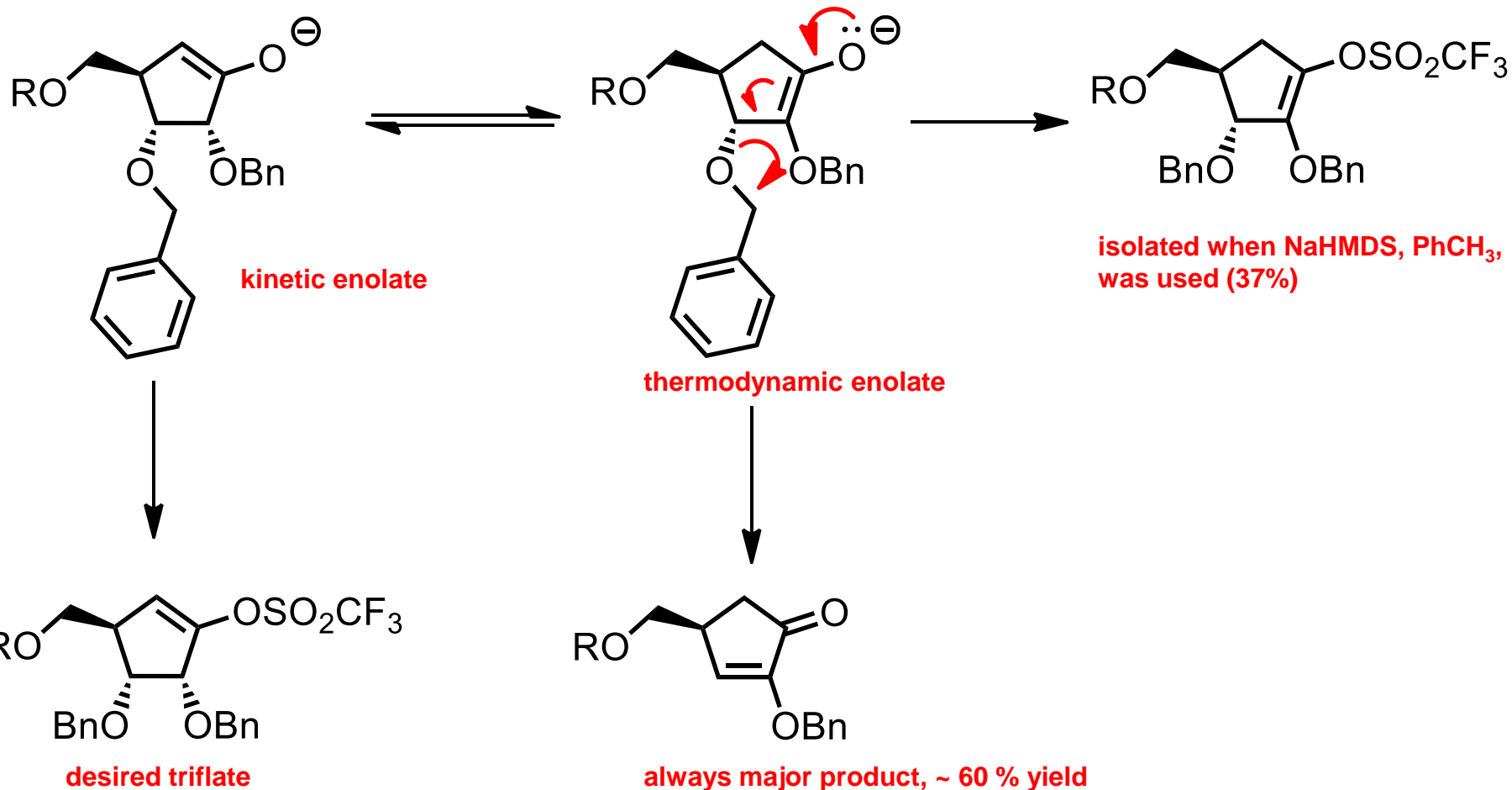
Určení struktury pomocí NMR



Určení struktury pomocí NMR



Desired product

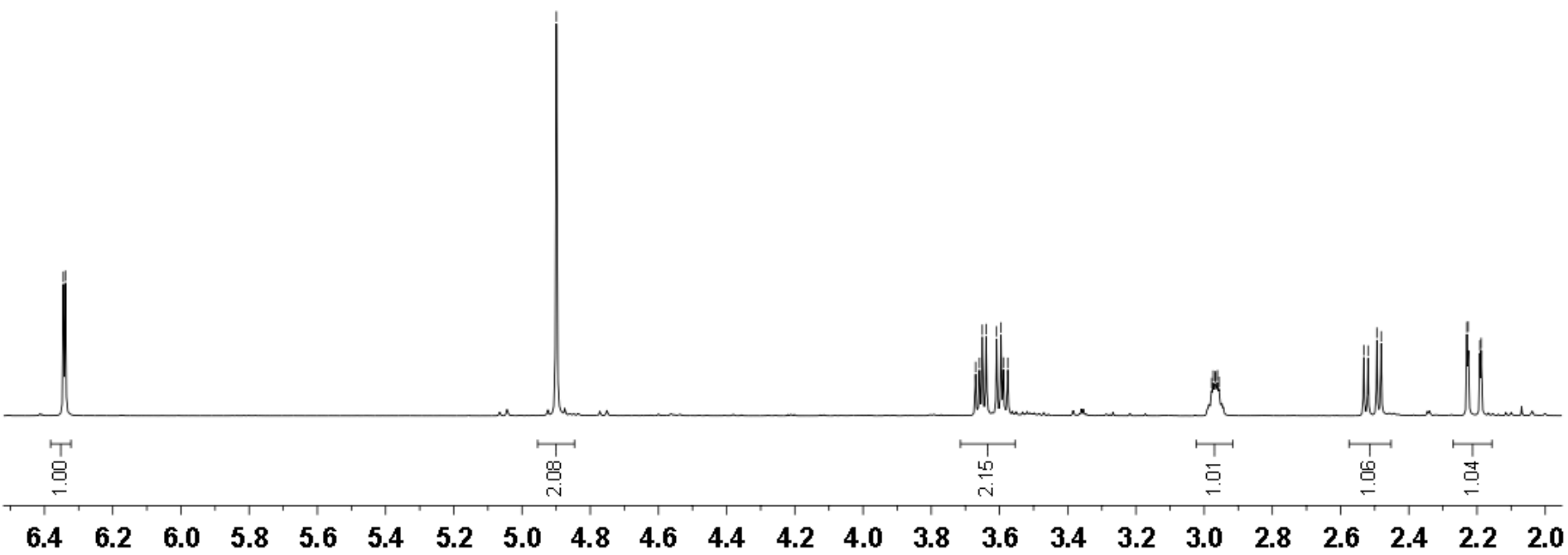
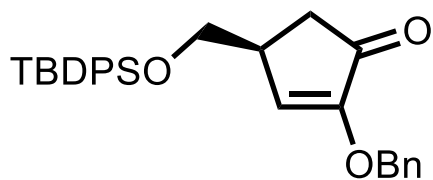


6.34
6.34

4.90

3.67
3.66
3.65
3.64
3.61
3.60
3.59
3.58
2.98
2.97
2.97
2.97
2.96
2.96
2.53
2.52
2.49
2.48
2.23
2.23
2.19
2.19

¹H NMR



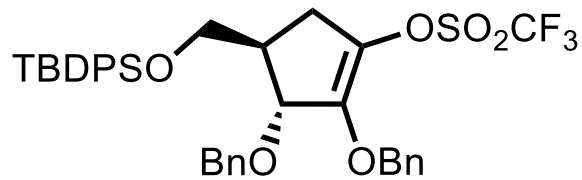
5.12
5.10
4.97
4.95
4.57
4.55
4.49
4.46
4.44

3.63
3.61
3.61
3.59
3.54
3.52
3.52
3.50

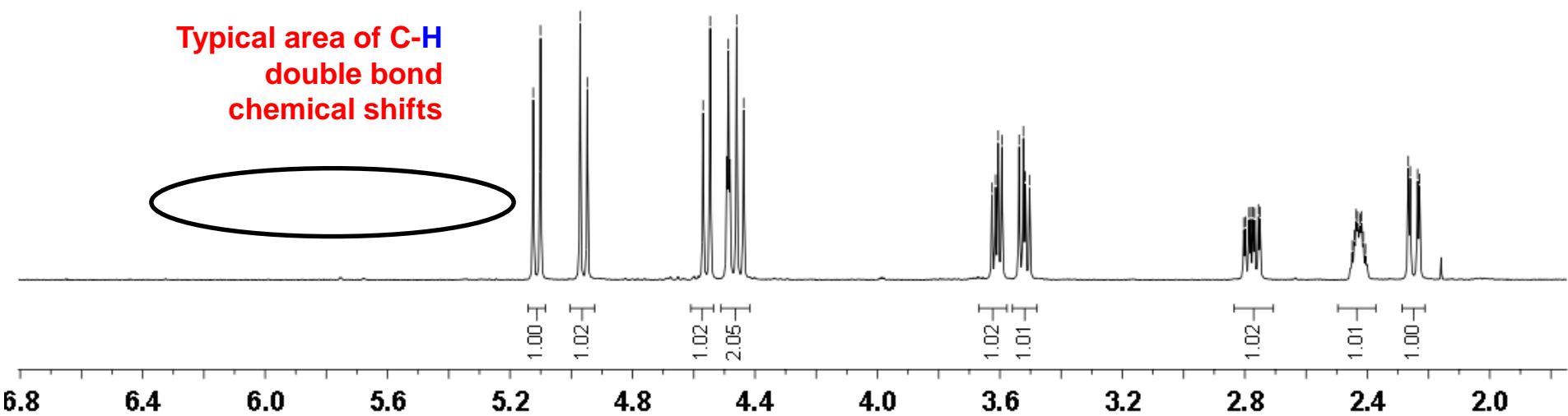
2.79
2.78
2.77
2.76
2.75

2.44
2.43
2.42
2.42
2.27
2.26
2.24
2.23

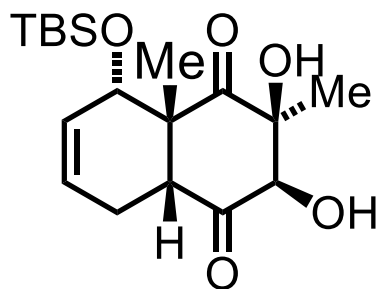
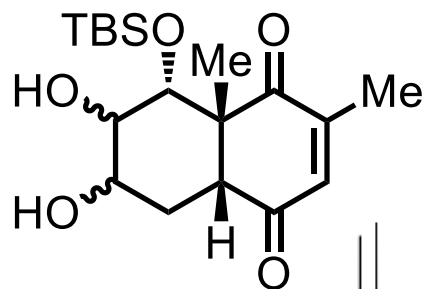
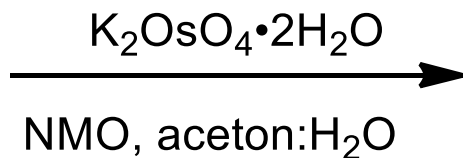
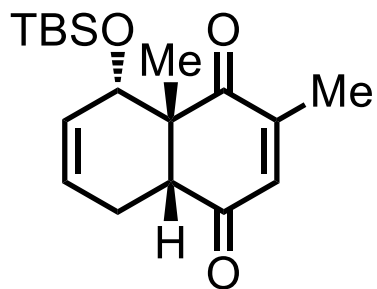
¹H NMR



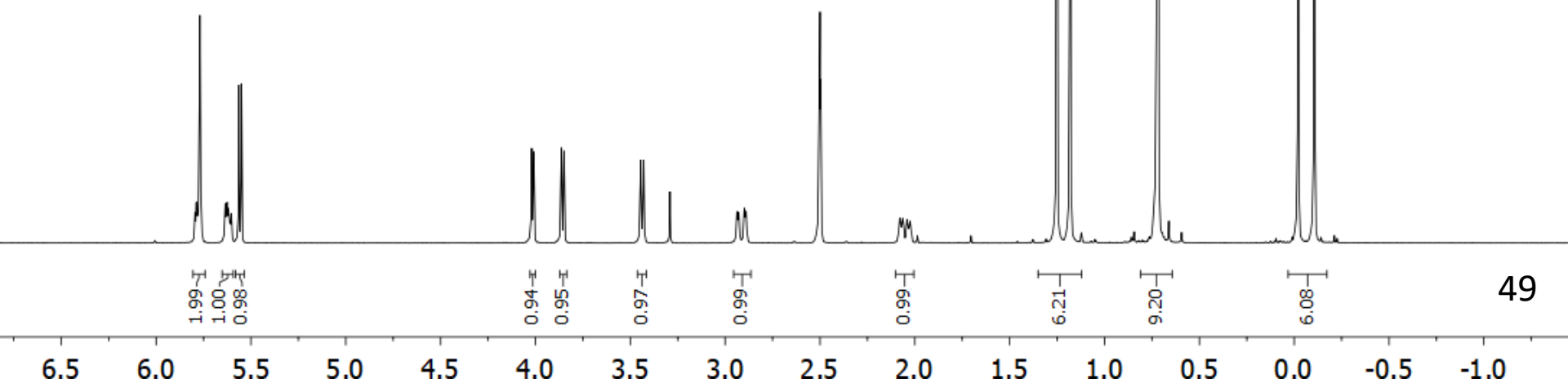
**Typical area of C-H
double bond
chemical shifts**

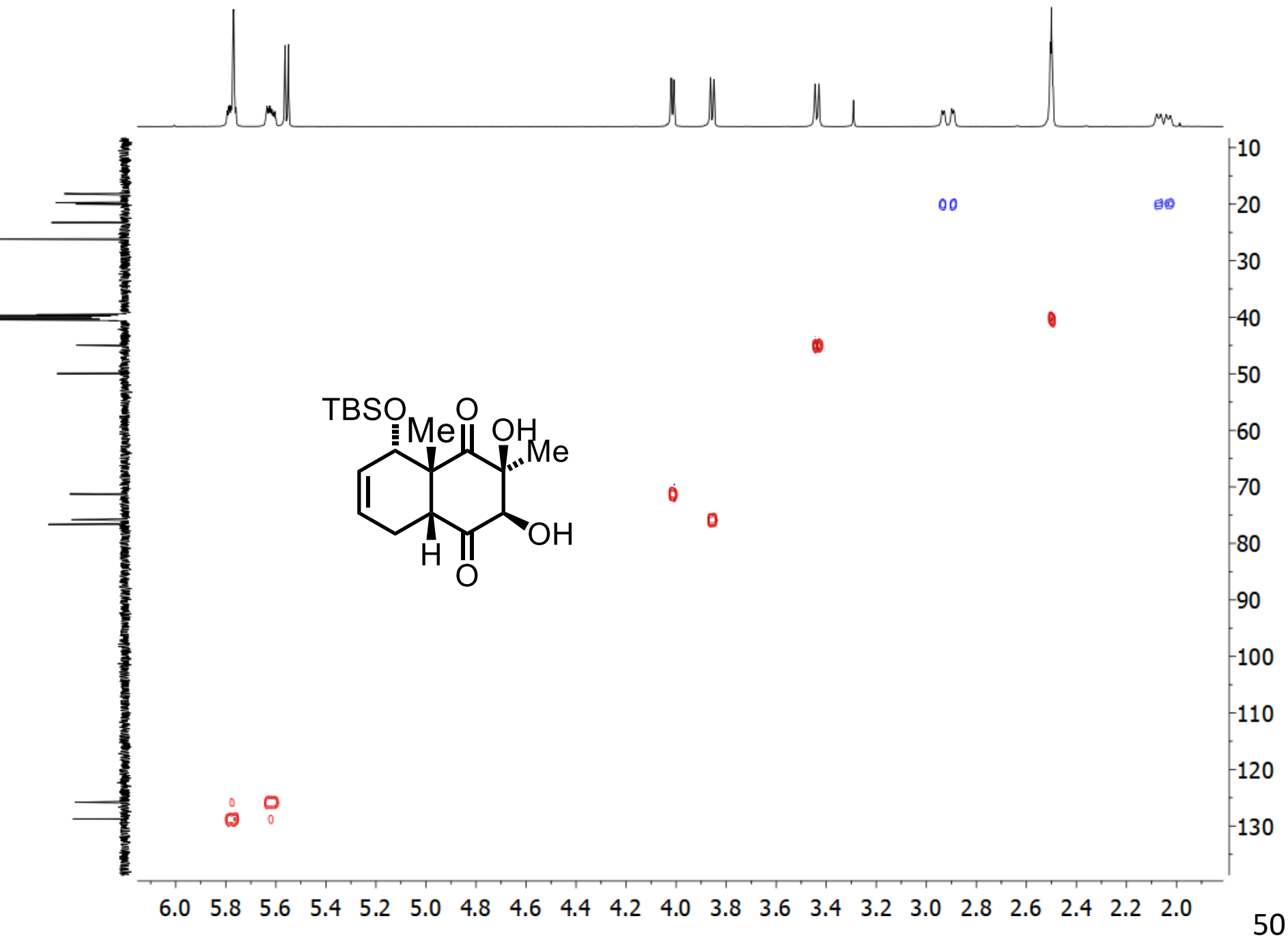


Příklady neočekávaného produktu

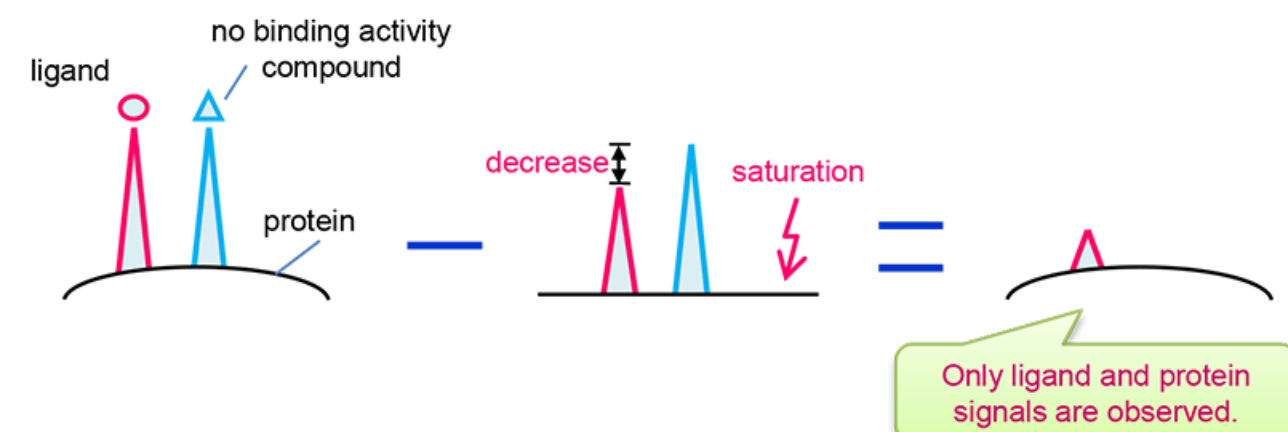
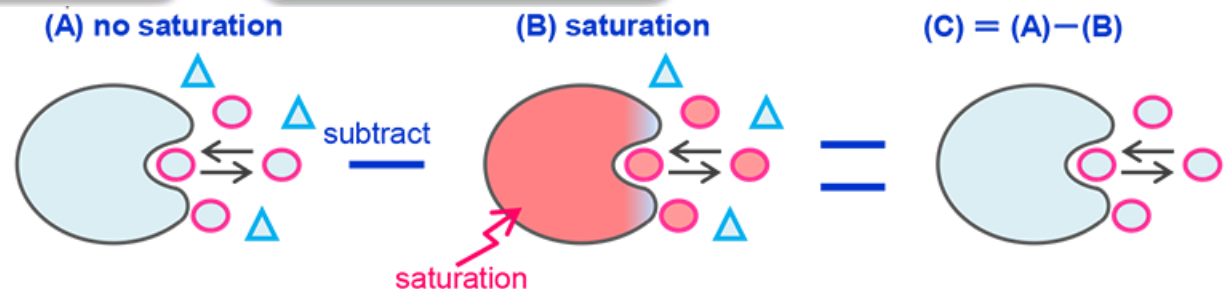
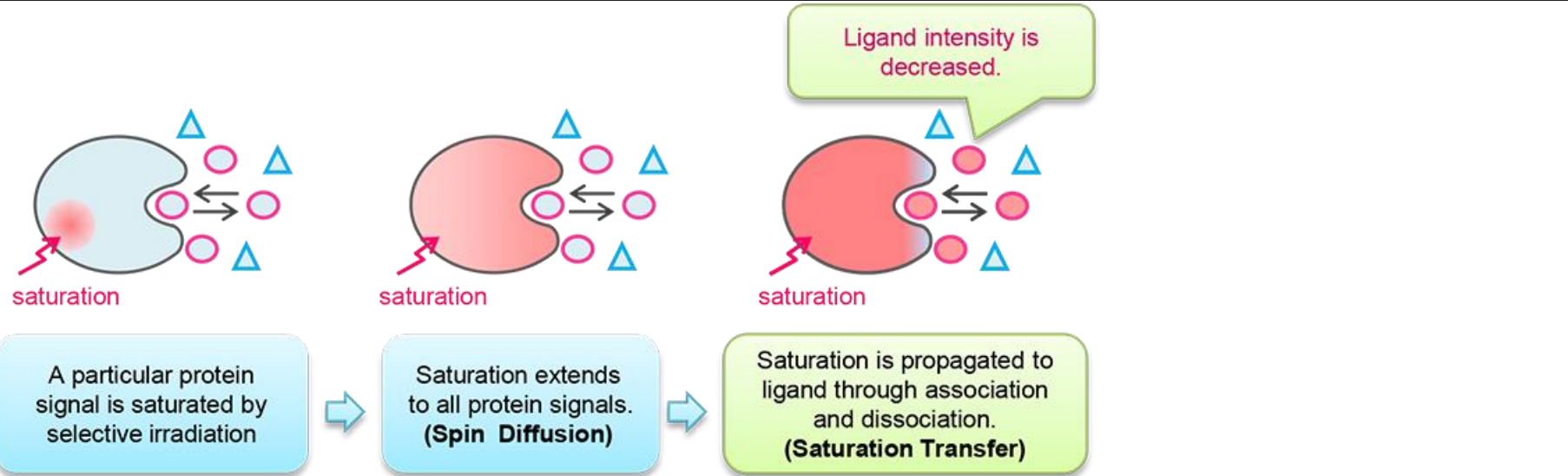


72%

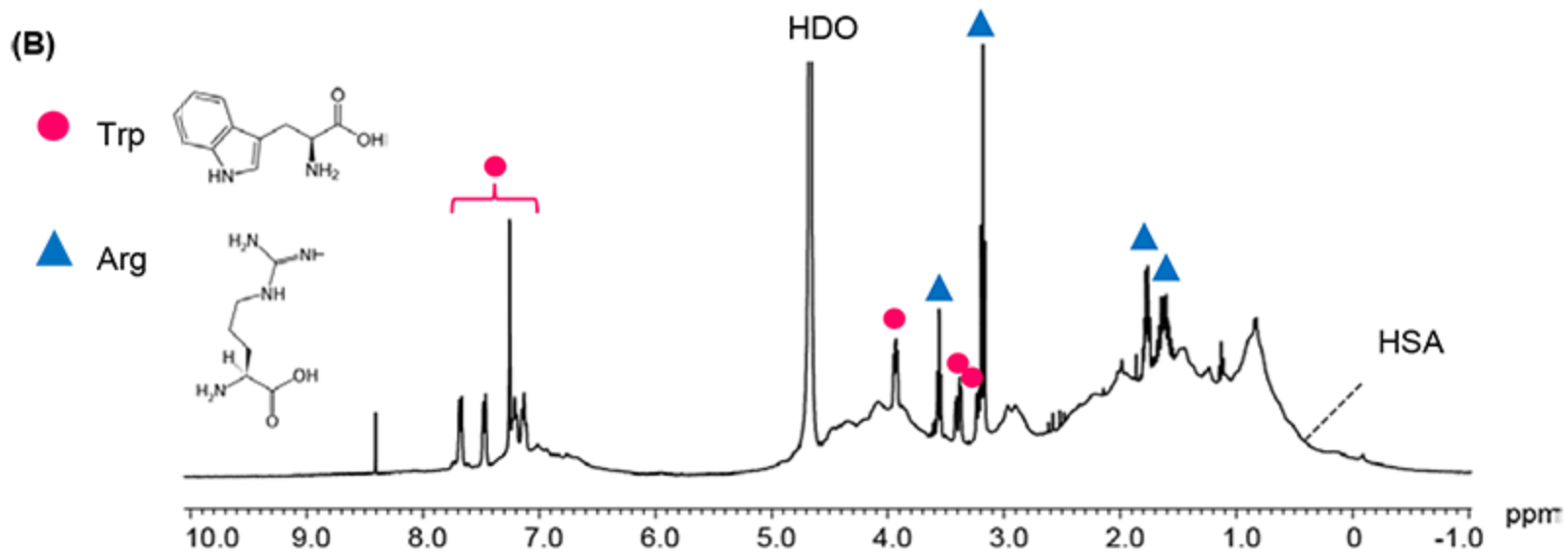
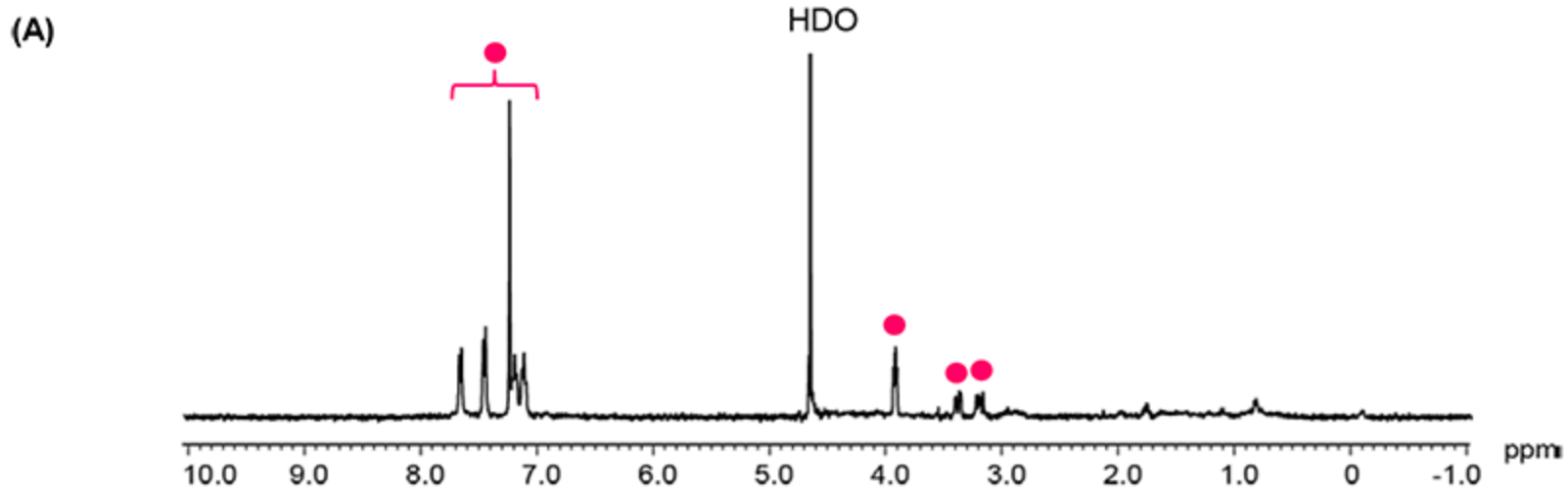




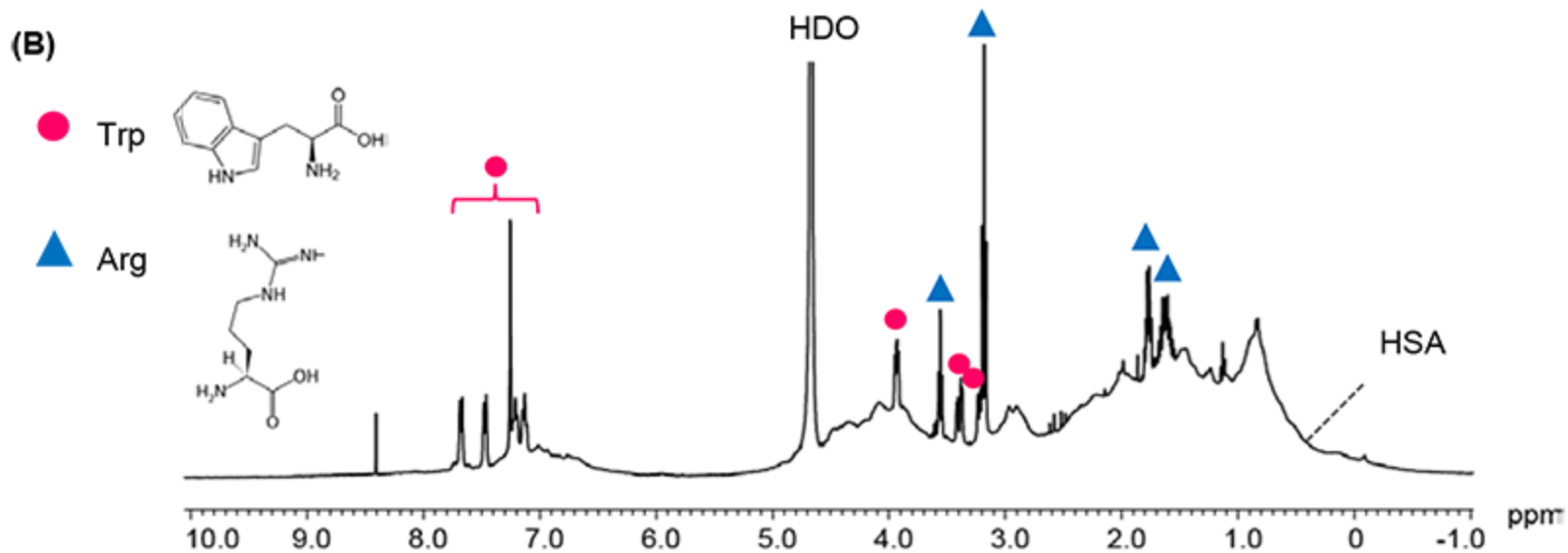
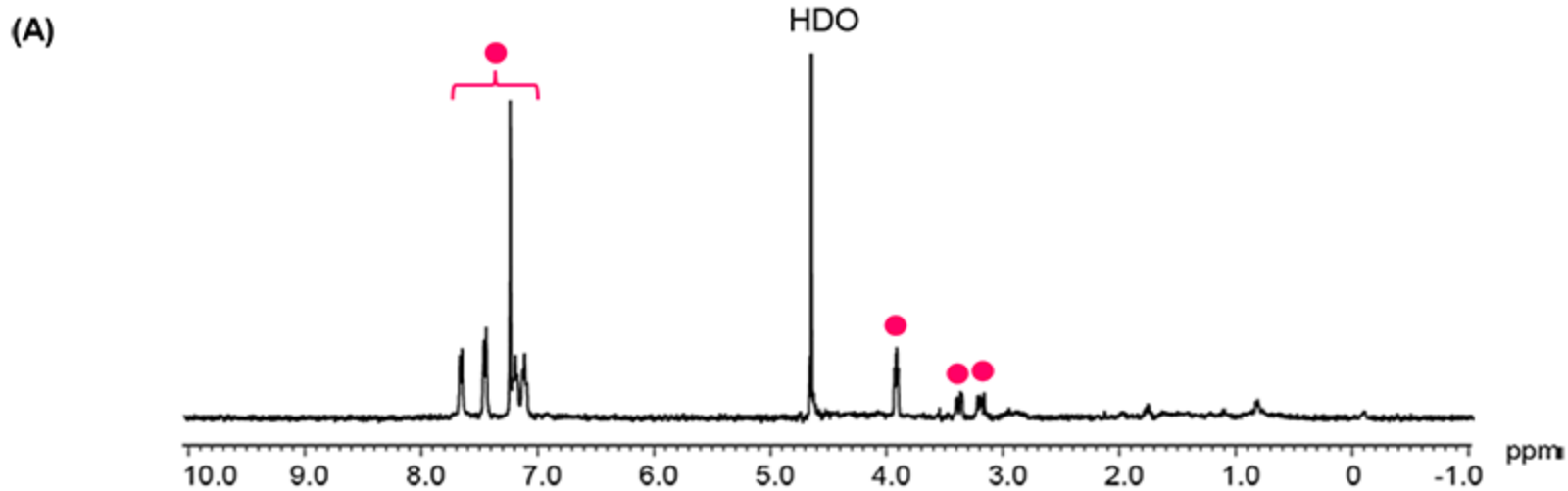
Jednoduchá aplikace ve farmacii a biologii - ligand-protein binding



Jednoduchá aplikace ve farmacii a biologii - ligand-protein binding



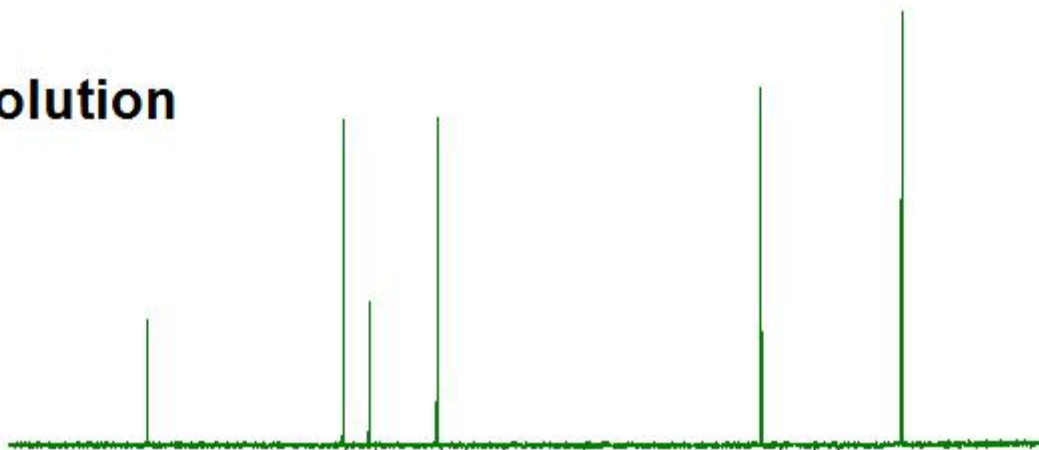
Jednoduchá aplikace ve farmacii a biologii - ligand-protein binding



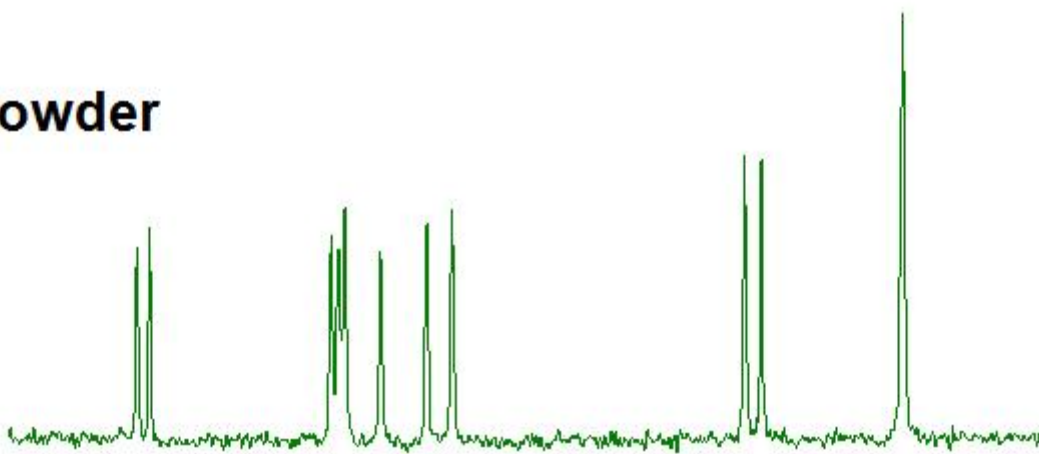
Kapalná fáze vs. pevná fáze

Směs volné báze a hydrochloridu

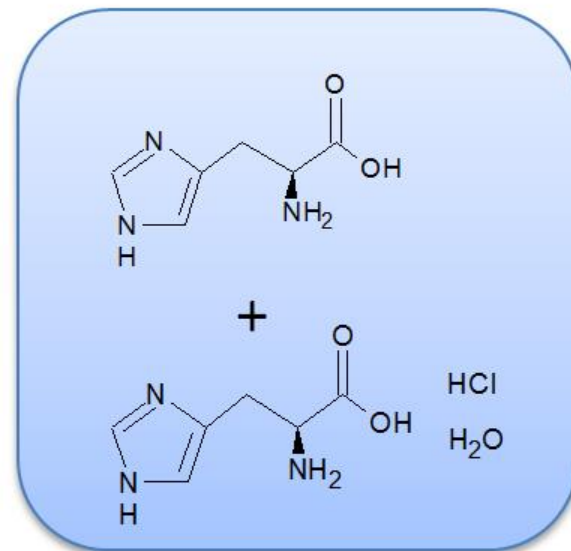
solution



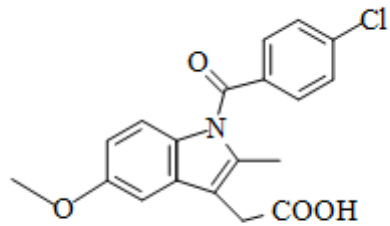
powder



¹³C/ppm



NMR spektroskopie v pevné fázi – solid state NMR



Structure of indomethacin

Určení typu krystalového polymorfu –
extrémně důležité ve farmacii.

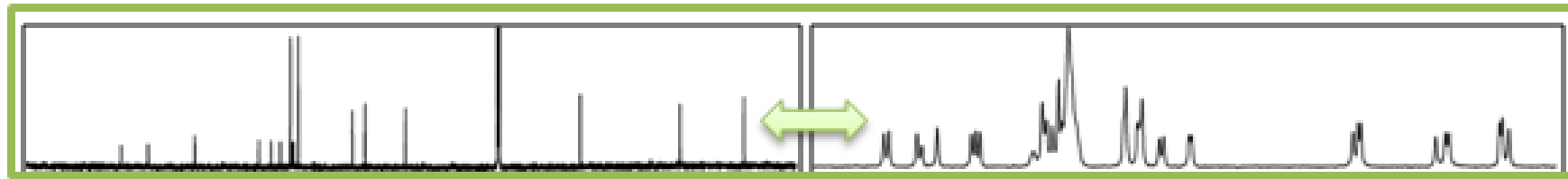
[^{13}C liquid NMR]

Sample dissolved in CDCl_3 for analysis

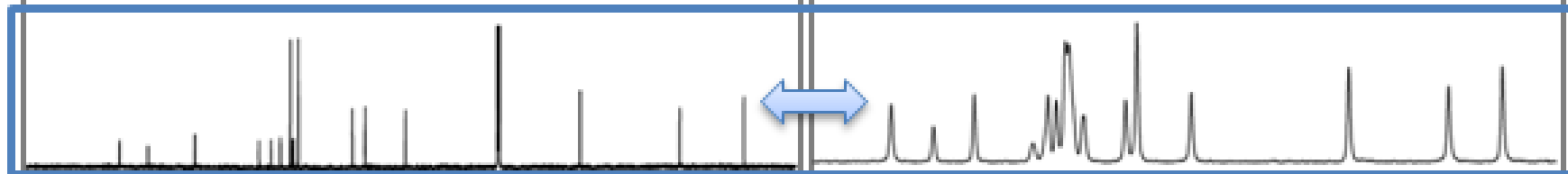
[^{13}C solid NMR]

Sample analyzed in powder form

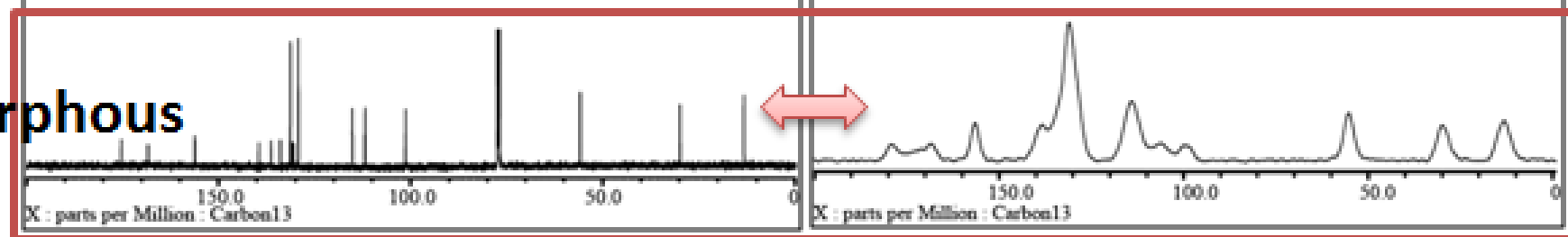
α



γ



Amorphous



Konstrukce NMR spektrometru

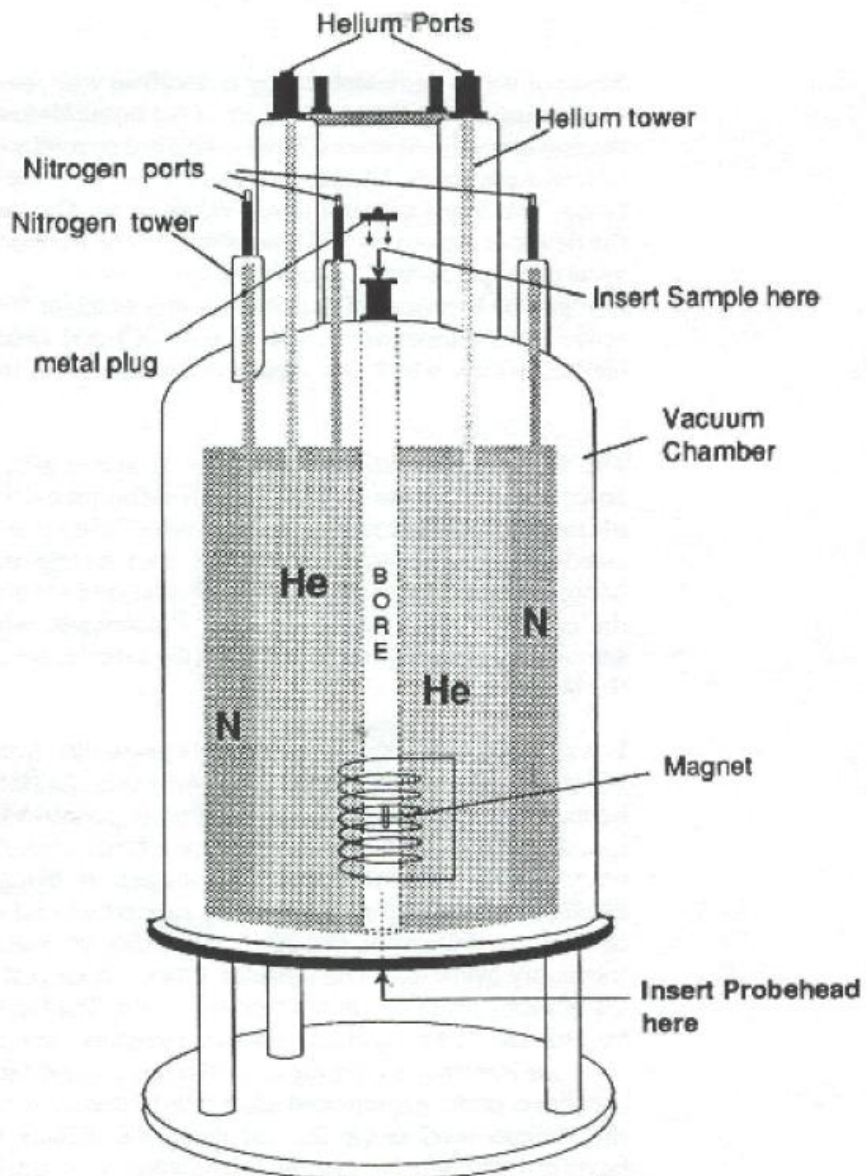
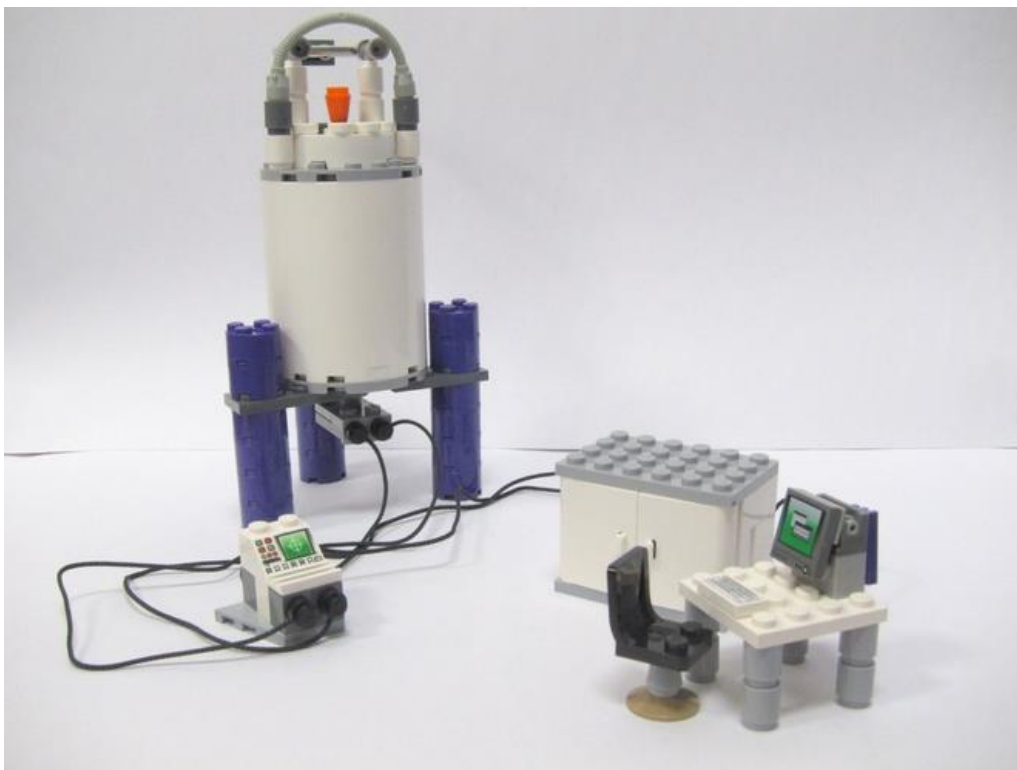


Figure 3.B Magnet and dewar



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** Theoretical concepts of NMR
 - **C6770** NMR Spectroscopy of Biomolecules
 - **C7998** Základy experimentální NMR