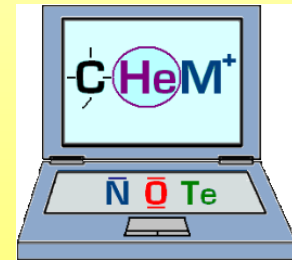


Metody spektrální

- **Metody molekulové spektroskopie**
– **NMR**



**Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti**

Spektroskopie NMR

- teoretické základy

- spin nukleonů, spin jádra, kvantová čísla
- energetické stavy jádra v magnetickém poli
- rezonanční podmínka

- instrumentace

- pulsní metody, pulsní sekvence
- relaxační procesy, FID, Fourierova transformace

- NMR spektra a jejich interpretace

- chemický posun, spin-spinové interakce
- integrální intenzita
- vícedimenzionální NMR

Spektroskopie NMR

- teoretické základy

- **spin jádra, kvantová čísla**

- **spinový rotační moment** (moment hybnosti)

- kvantové číslo jaderného spinu I

- *pro NMR - jádra s $I \neq 0$*

- $I = 0$ - sudé hmotnostní a atomové číslo - ^{12}C , ^{16}O

- $I = \text{celočíslné}$ - sudé hmotnostní a liché atomové číslo
- ^{14}N , ^{10}B , ^2H

- $I = \text{polovinové}$ - liché hmotnostní číslo

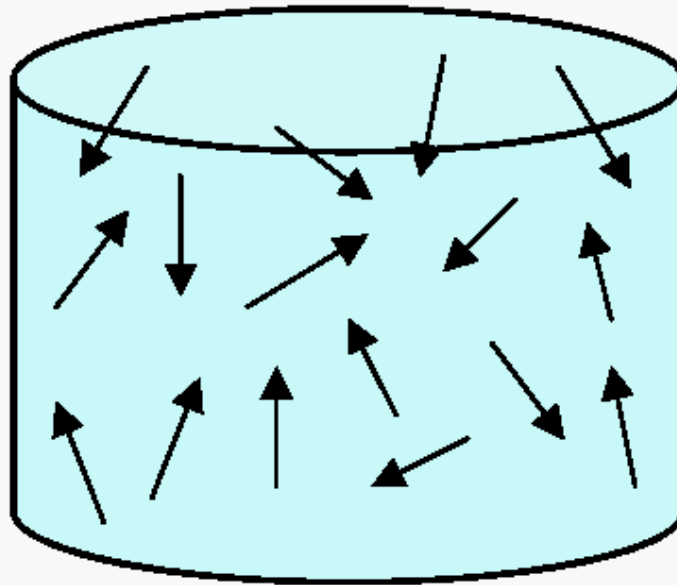
- ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P

- **projekce spinu** magnetické kvantové číslo
jaderného spinu - M_I

Spektroskopie NMR

NEUSPOŘÁDANÉ JADERNÉ SPINY

- V základním stavu nejsou jaderné spiny uspořádány a neexistuje mezi nimi žádný energetický rozdíl. Jsou tzv. degenerované:

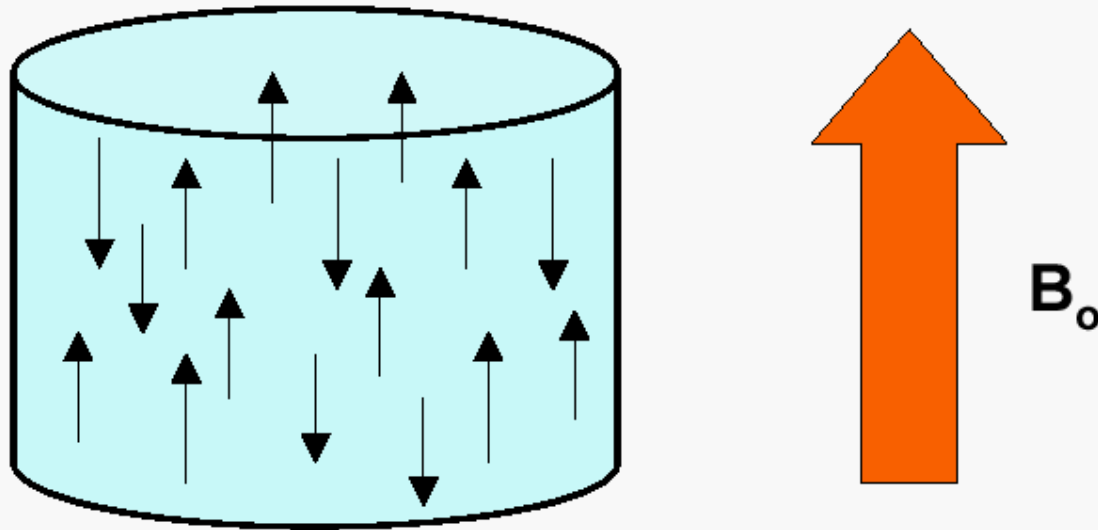


$$B_0 = 0$$

Spektroskopie NMR

Vliv magnetického pole ($I = 1/2$)

- Vlivem silného externího magnetického pole dojde však k jejich uspořádání buď v souhlasném nebo opačném směru:



- Vždy existuje malý přebytek jader uspořádaných souhlasně se směrem externího magnetického pole než nesouhlasně.

Spektroskopie NMR

Energie a citlivost

- Energie (jednoho spinu) je přímo úměrná magnetickému momentu jádra a velikosti externího magnetického pole:

$$E = - \vec{\mu} \cdot \vec{B}_o \Rightarrow E_{(\text{up})} = \gamma h |B_o| / 4\pi \text{ --- } E_{(\text{down})} = - \gamma h |B_o| / 4\pi$$

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} h / 2\pi$$

$$\Delta E = \gamma h |B_o| / 2\pi$$

$$\nu = \gamma |B_o| / 2\pi$$

$$\gamma^{13}\text{C} = 6,728 \text{ rad / G}$$

$$\gamma^1\text{H} = 26,753 \text{ rad / G}$$

^1H je ~ 64x citlivější než ^{13}C
jen z důvodu konstanty γ

gyromagnetický poměr

Spektroskopie NMR

- teoretické základy

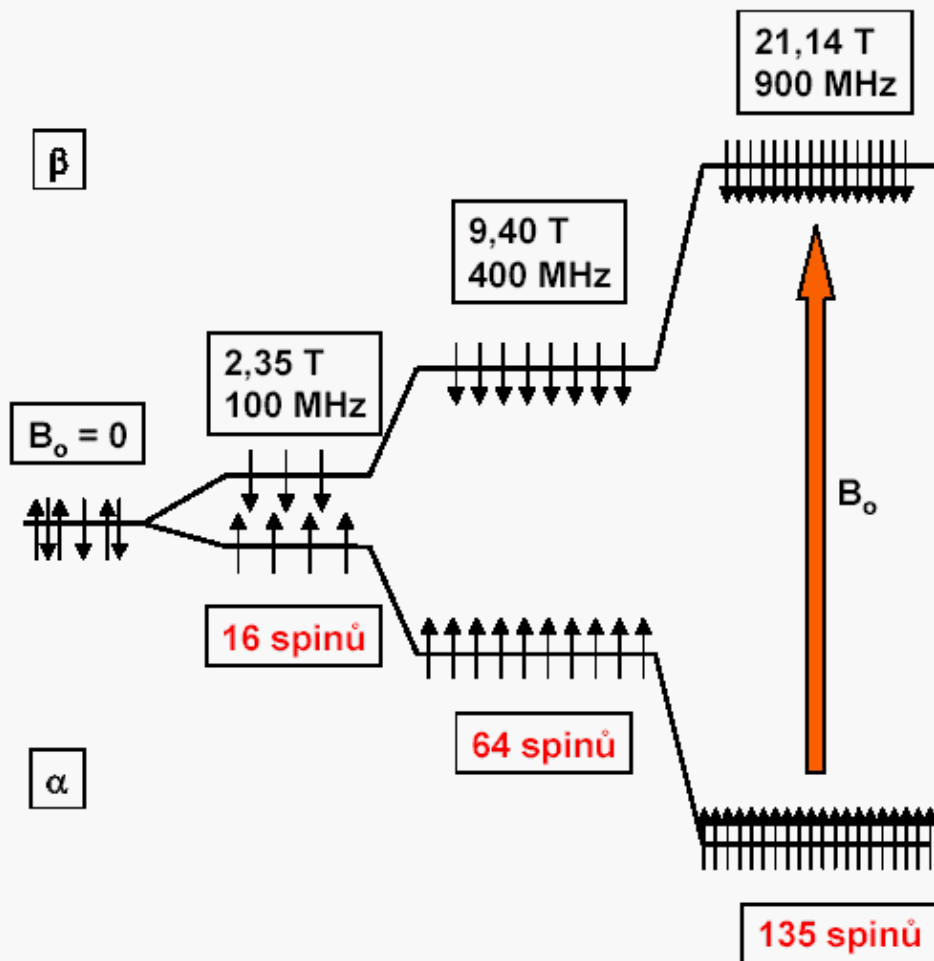
- energetické stavy jádra v magnetickém poli

POPULACE STAVŮ

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = \exp\left[-\frac{\Delta E}{kT}\right]$$

Zvyšující se rozdíl v populacích obou spinových stavů α a β pro jádro ^1H vlivem vyššího externího magnetického pole.

Je-li stav β obsazen 10^6 spinů, stav α obsahuje $10^6 + \text{přebytek}$.



Spektroskopie NMR - klasické přiblížení

PRECESNÍ POHYB

- Z pohledu klasické mechaniky vykonává vektor magnetického momentu precesní pohyb okolo osy z (směru externího magnetického pole). Frekvence tohoto pohybu se nazývá *Larmorova* frekvence a značí se ω :

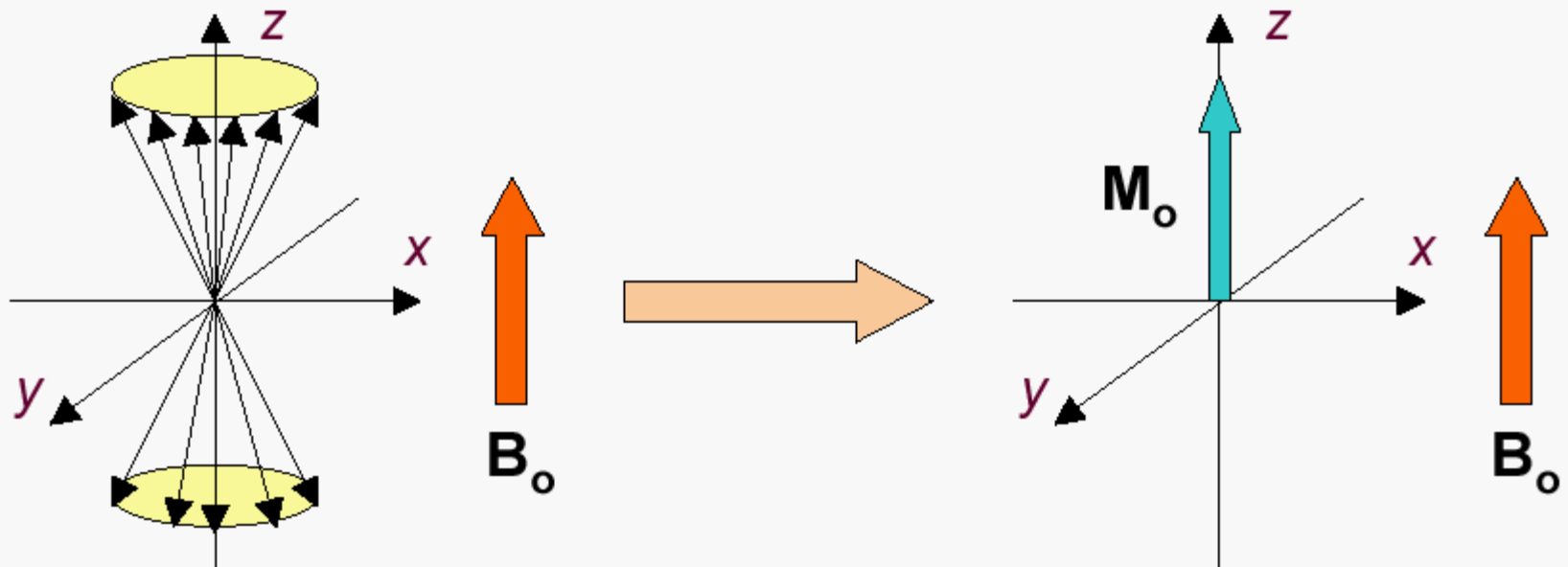
$$|\omega| = 2\pi\nu \Rightarrow$$

$$\omega_0 = -\gamma \mathbf{B}_0 \text{ (radiany)}$$

Spektroskopie NMR

MAKROSKOPICKÁ MAGNETIZACE

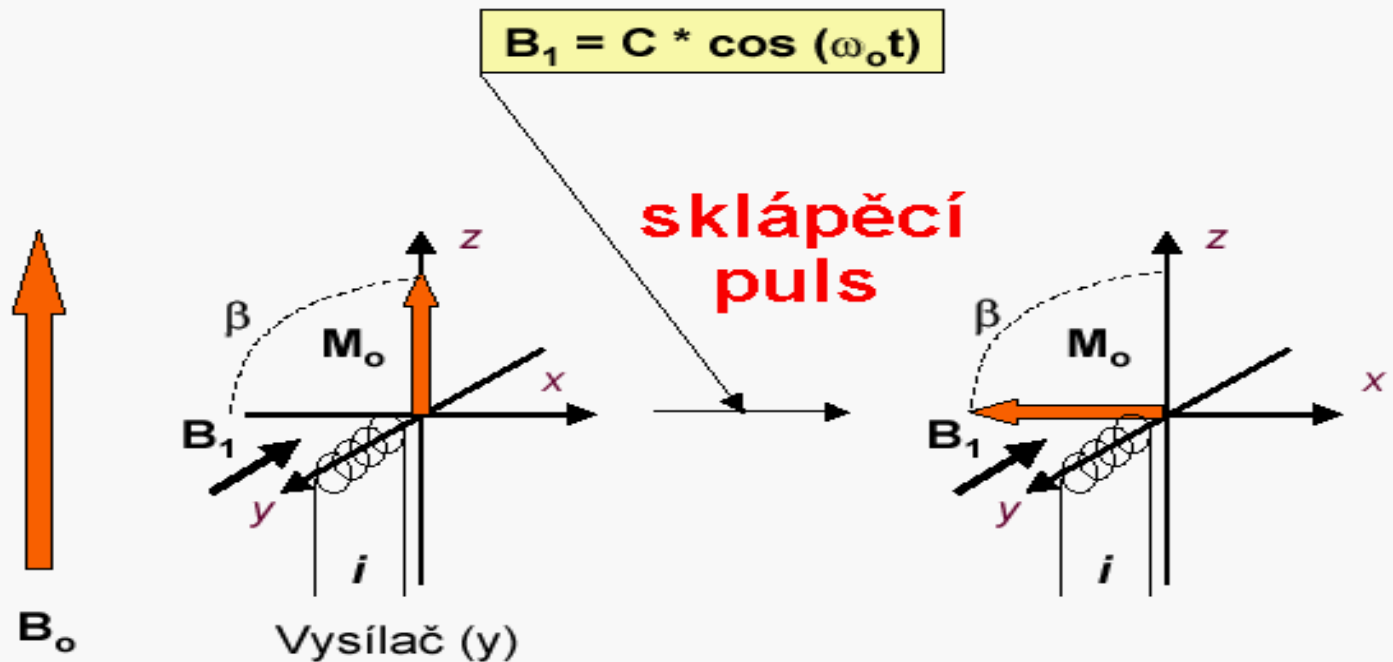
- Nyní je možné zavést pojem makroskopická magnetizace, M_o , který je přímo úměrný rozdílu populací ($N_\alpha - N_\beta$), kdy byly příspěvky jednotlivých vektorů $\vec{\mu}$ zprůměrovány:



Spektroskopie NMR

NMR excitace

- Zdrojem energie pro excitaci jader je oscilující elektromagnetické záření s frekvencí ω_0 generované střídavým proudem :



- Je-li frekvence RF pole B_1 a precesního pohybu magnetizace M_0 stejná, je dosaženo tzv. **rezonanční podmínky** a systém absorbuje energii.

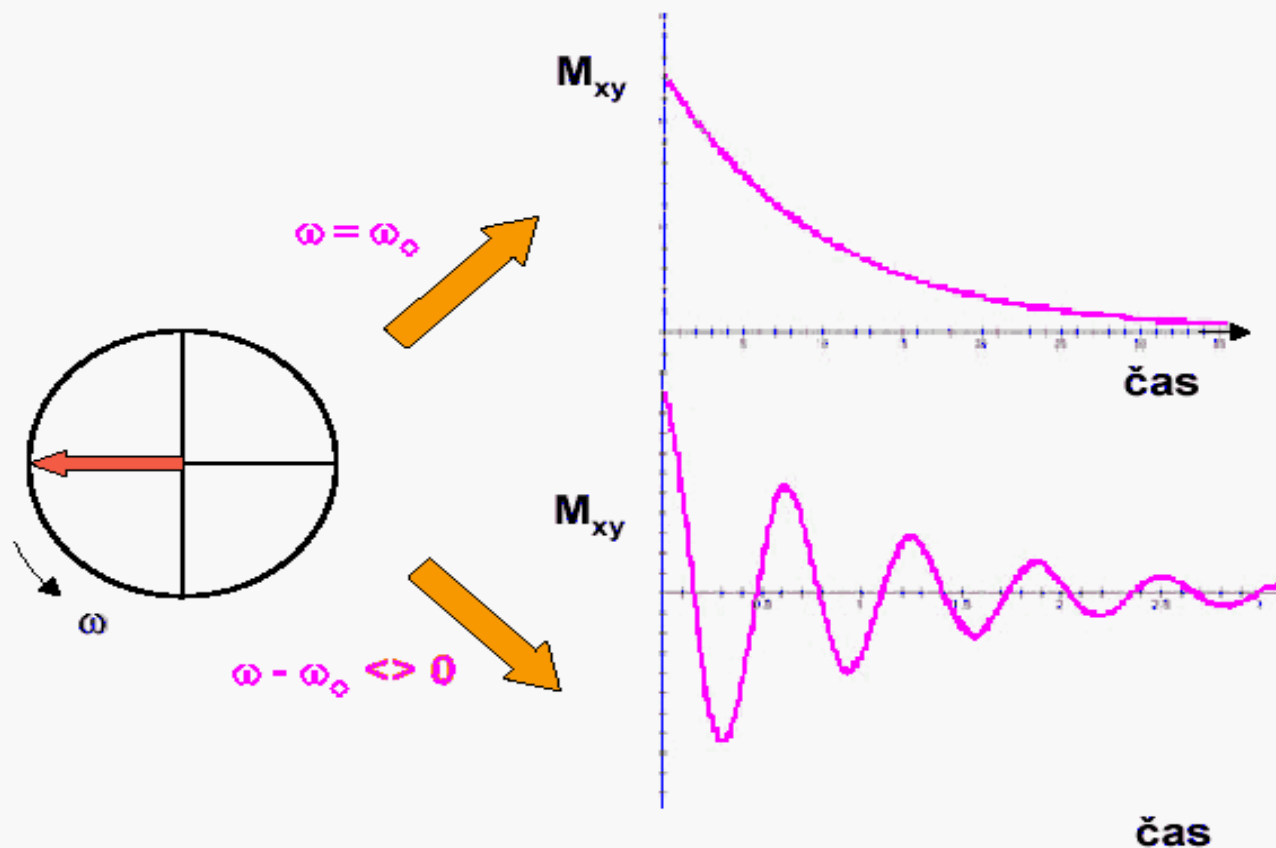
Spektroskopie NMR

Free Induction Decay (FID)

- Z důvodu relaxace NMR odezvy jednotlivých jader zanikají. Tento zánik probíhá exponenciálně a získáme tak signál, který je superpozicí kosinové a exponenciální funkce.

spin-mřížková

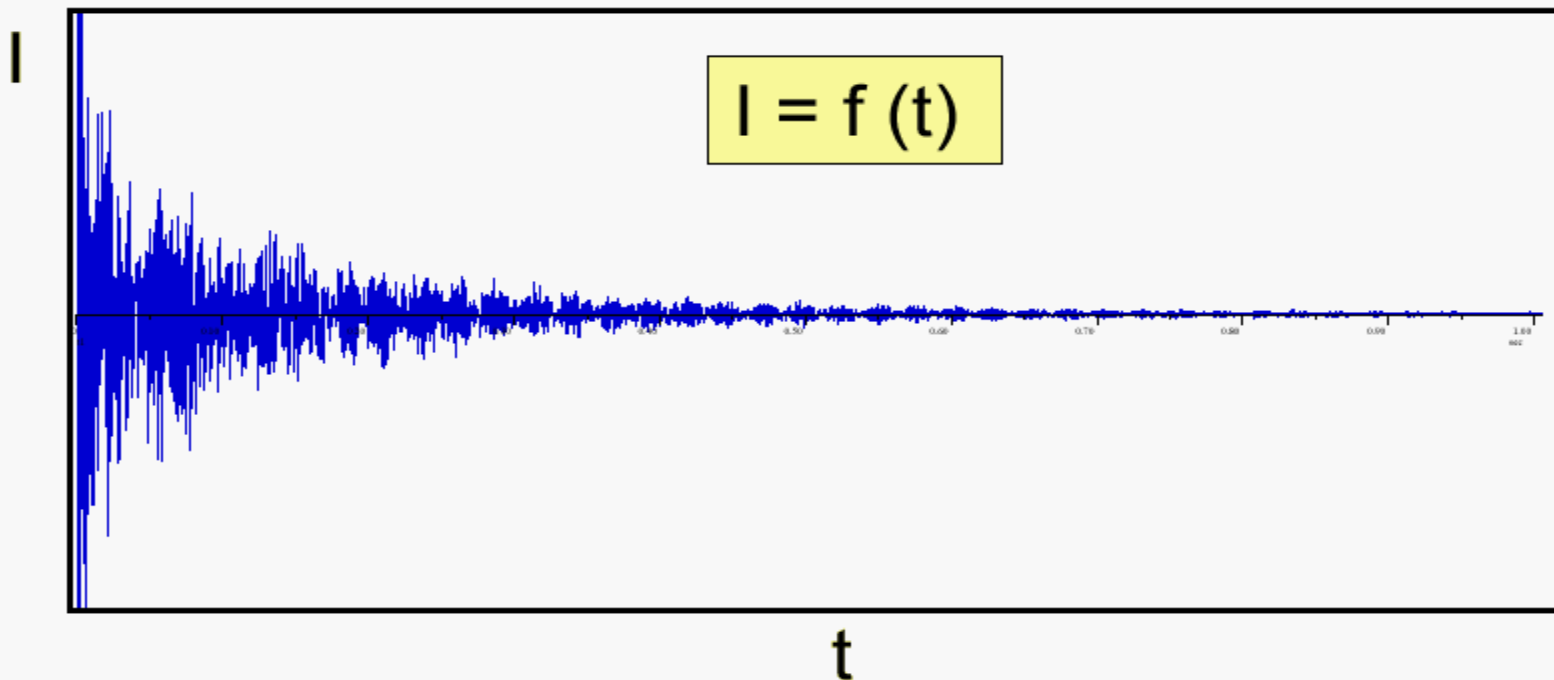
spin-spinová



Spektroskopie NMR

FID

- V reálném vzorku existuje mnoho spinových systémů o různých frekvencích, většinou rozdílných od nosné frekvence B_1 . Z tohoto důvodu získáme mnoho odezev, které mají různou periodu a rozdílnou rychlost zániku. Takováto kombinace signálů vzorku se nazývá **Free Induction Decay (FID)**:

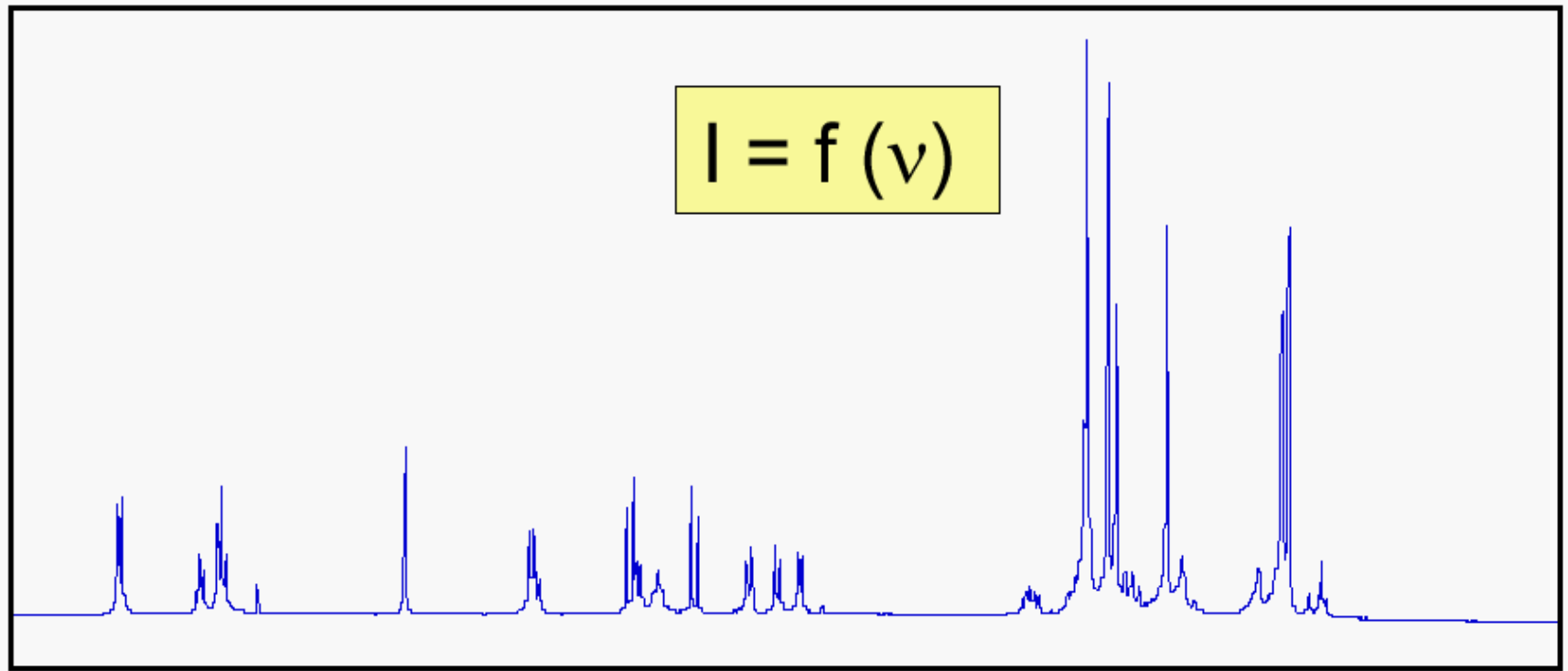


Spektroskopie NMR

SPEKTRUM jednodimenzionální

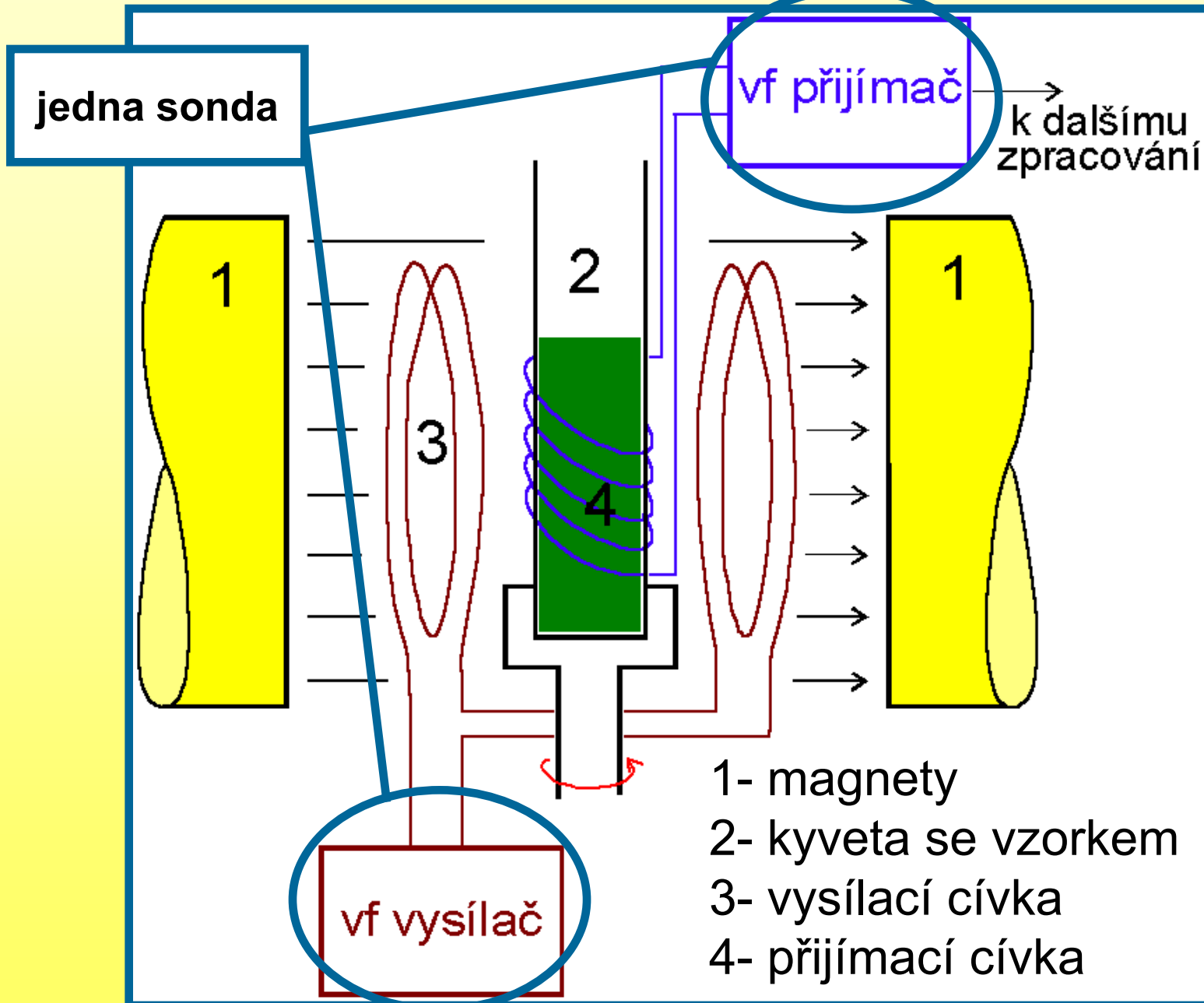
- Abychom získali NMR spektrum, musíme provést tzv. **Fourierovu transformaci:**

$$I = f(\nu)$$



ν

Spektroskopie NMR



jedna sonda

vf přijímač

k dalšímu zpracování

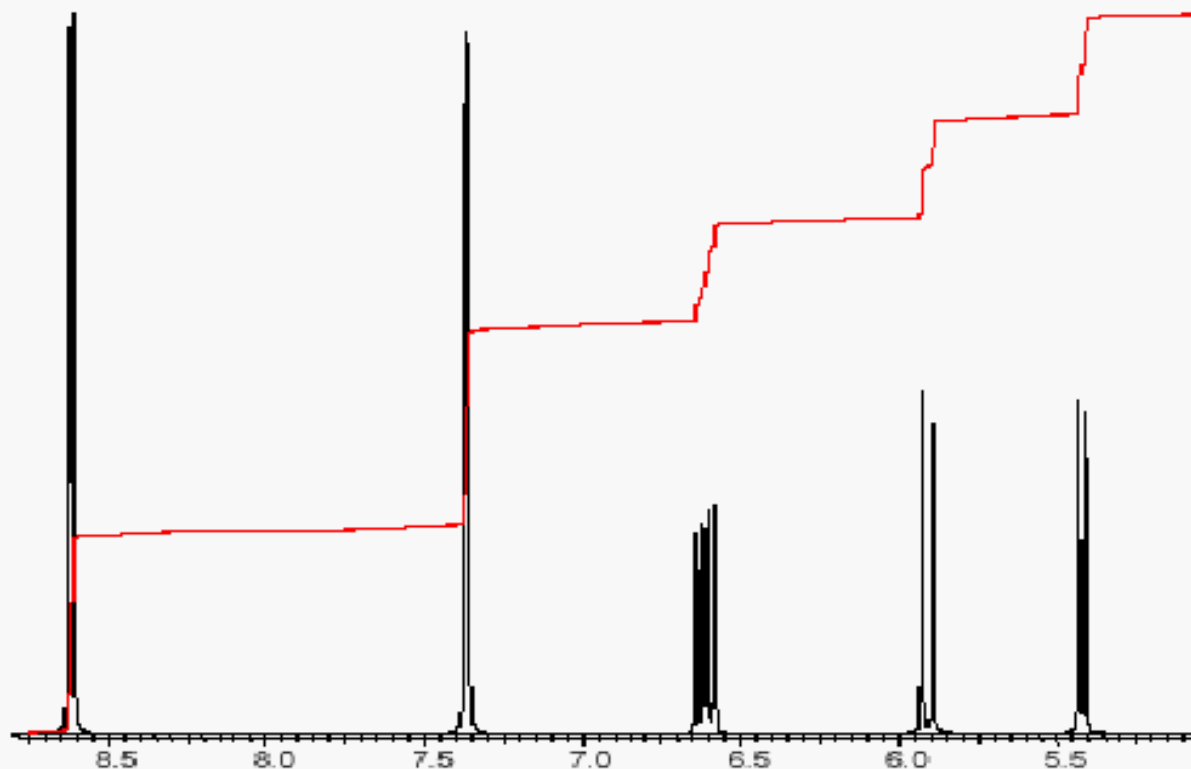
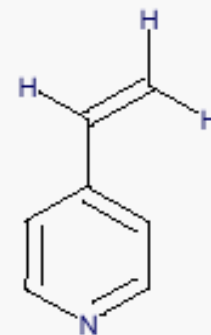
vf vysílač

- 1- magnety
- 2- kyveta se vzorkem
- 3- vysílací cívka
- 4- přijímací cívka

NMR - interpretace

Základní parametry NMR

- Chemický posun
- Počet signálů ve spektru
- Interakční konstanta
- Intenzita signálu



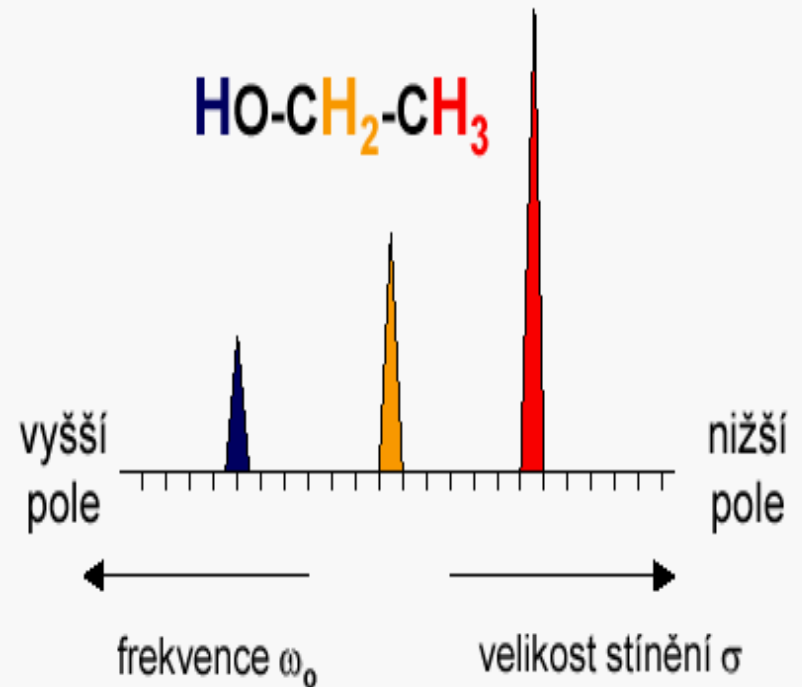
NMR - interpretace

Chemický posun

- Jestliže má každý druh jádra svoji charakteristickou frekvenci, proč je NMR spektroskopie tak užitečná?
- Vlivem tzv. **chemického okolí** dochází ke změnám magnetického pole, které působí na každé jádro stejného typu. Hovoříme o tzv. **efektivním magnetickém poli** B_{eff} , které je tvořeno hlavním magnetickým polem B_0 a lokálním magnetickým polem B_{loc} .

$$B_{eff} = B_0 - B_{loc} \quad \dots \quad B_{eff} = B_0(1 - \sigma)$$

σ je tzv. **konstanta magnetického stínění**.



orbitaly **s**

orbitaly **p**

$$\sigma = \sigma^{dia} + \sigma^{para} + \sigma^I$$

sousední atomy

Spektroskopie NMR

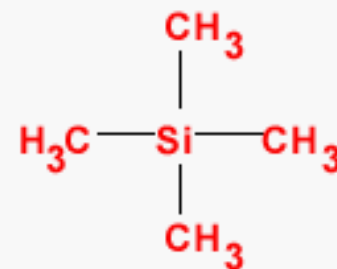
STUPNICE pro NMR spektra

- Každý signál ve spektru je charakterizován svou pozicí vyjádřenou ve frekvenčních jednotkách.
- Používáme relativní stupnici a vztahujeme posun každého signálu k signálu referenčnímu (**standardu**).

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{\text{ref}}}{\omega_{\text{ref}}}$$

δ , ppm parts per million

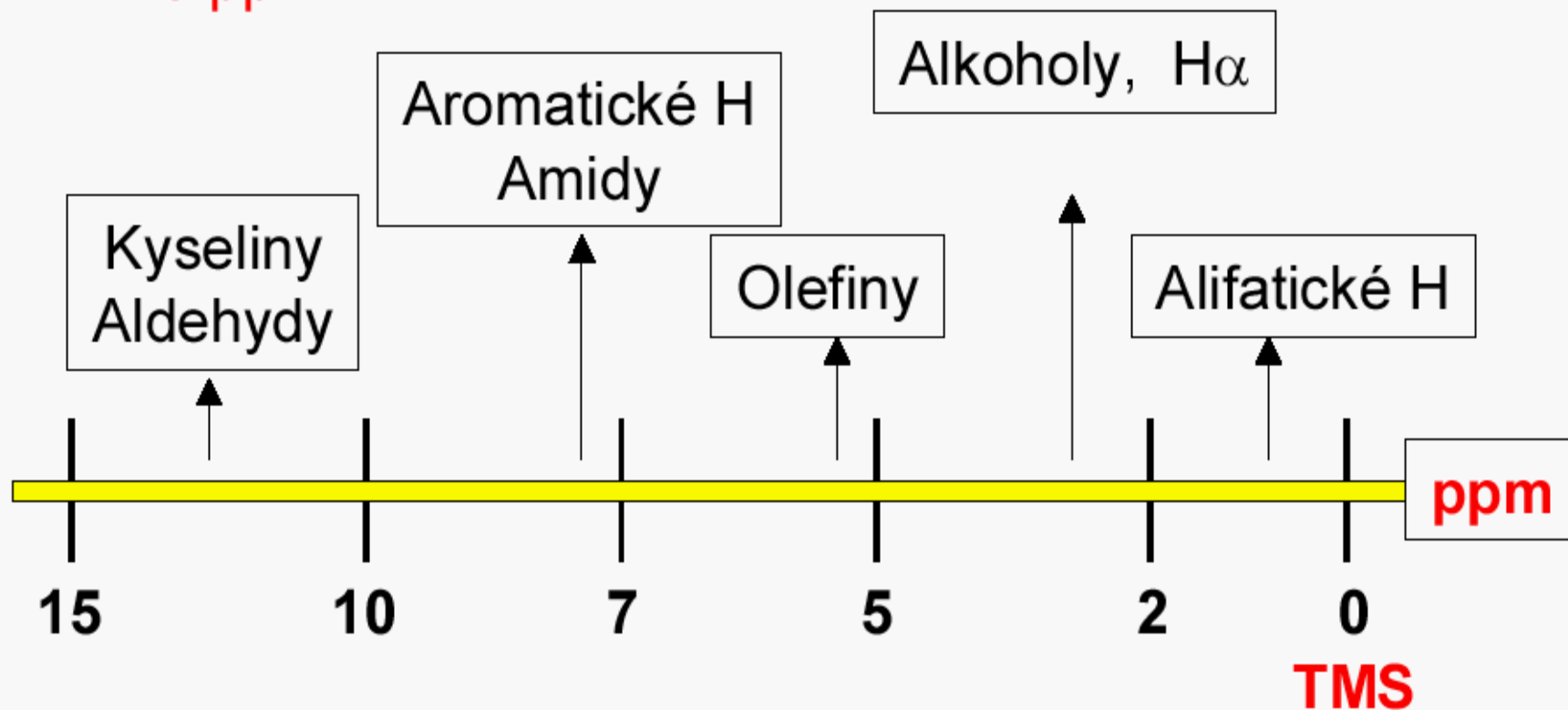
- Potom je pozice signálu stejná pracujeme-li se 100 MHz (2,35 T) nebo 900 MHz (21,14 T) magnetem.
- Příklad **Tetramethylsilan (TMS)** je standardem jak pro ^1H , tak pro ^{13}C spektroskopii. Je dobře rozpustný, inertní a poskytuje vždy jeden signál.



NMR - interpretace

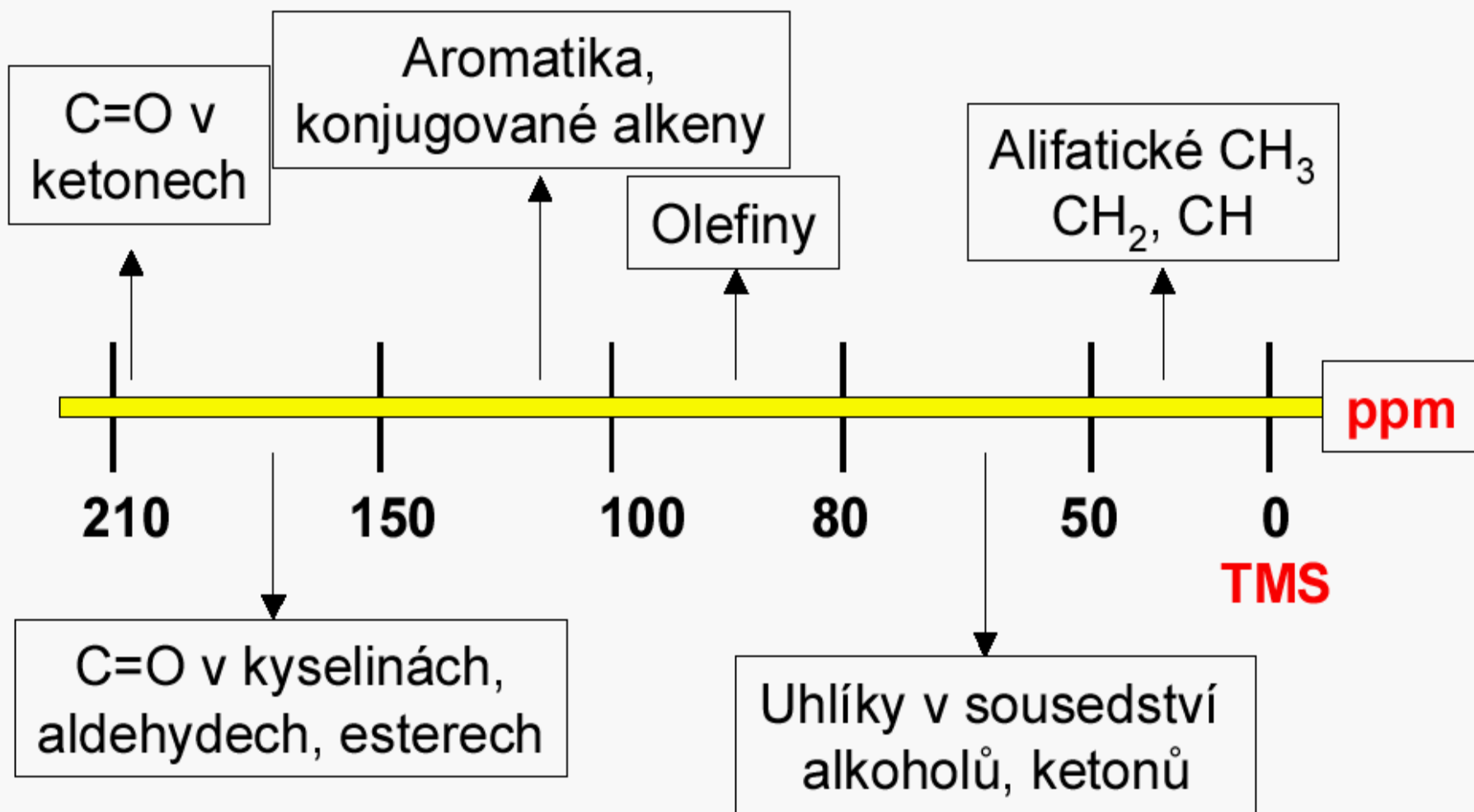
CHEMICKÉ POSUNY - ^1H

^1H ~ 15 ppm:



NMR - interpretace

$^{13}\text{C} \sim 220$ ppm: **CHEMICKÉ POSUNY - ^{13}C**



NMR - interpretace

CHEMICKÉ POSUNY

- vlivy chemického okolí
- indukční efekt
 - deformace elektronové hustoty v okolí měřeného jádra



H ($1s$)



H ($1s$) C (sp^3)



NMR - interpretace

CHEMICKÉ POSUNY

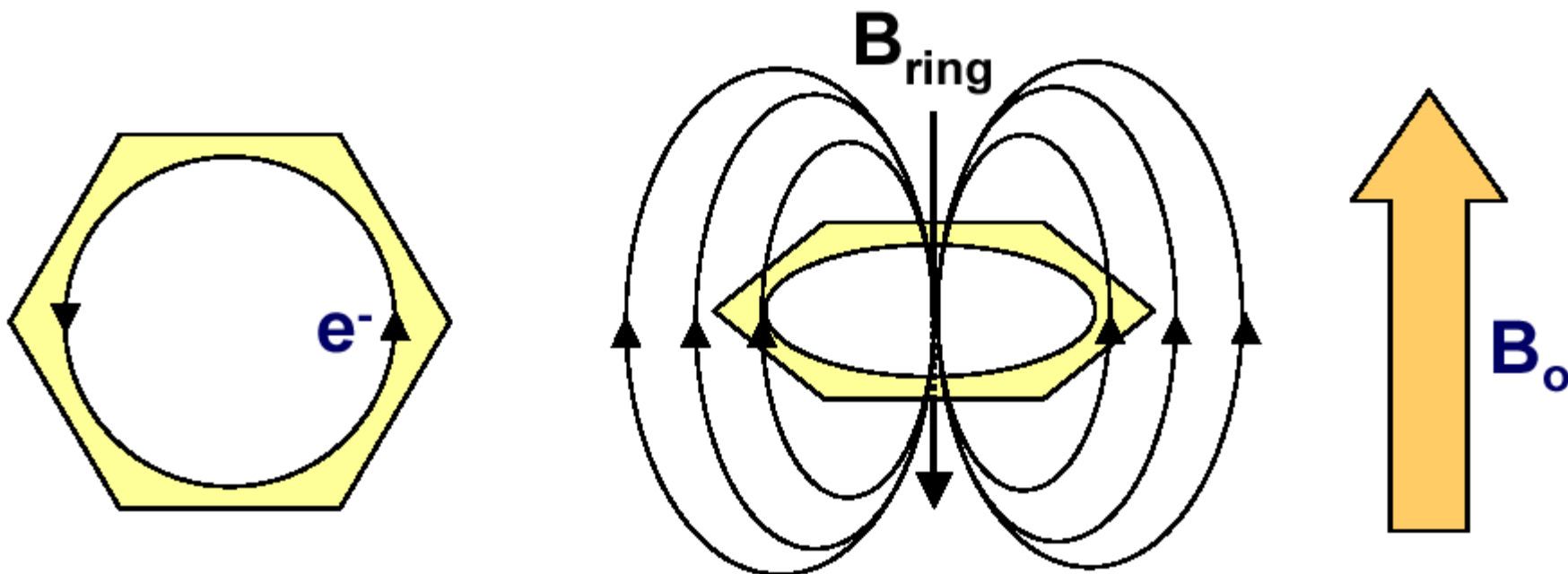
- vlivy chemického okolí
- indukční efekt
 - deformace elektronové hustoty v okolí měřeného jádra

	H-CH ₃	H-CH ₂ I	H-CH ₂ Br	H-CH ₂ Cl	H-CH ₂ F
<i>E</i>	2.1	2.5	2.8	3.0	4.0
δ	0.23	1.98	2.45	2.84	4.13

NMR - interpretace

CHEMICKÉ POSUNY

- vlivy chemického okolí
- vlastnosti aromatického kruhu
 - indukční „cívka“



NMR - interpretace

INTERAKČNÍ KONSTANTY - Hz

- nepřímé spin-spinové interakce
 - vliv spinových stavů jader v okolí
 - zprostředkován vazebnými e⁻
- HOMONUKEÁRNÍ
- HETERONUKEÁRNÍ

DEKAPLINK - DECOUPLING

Důležitým rysem tohoto parametru je, že nezávisí na velikosti externího magnetického pole!!!

NMR - interpretace

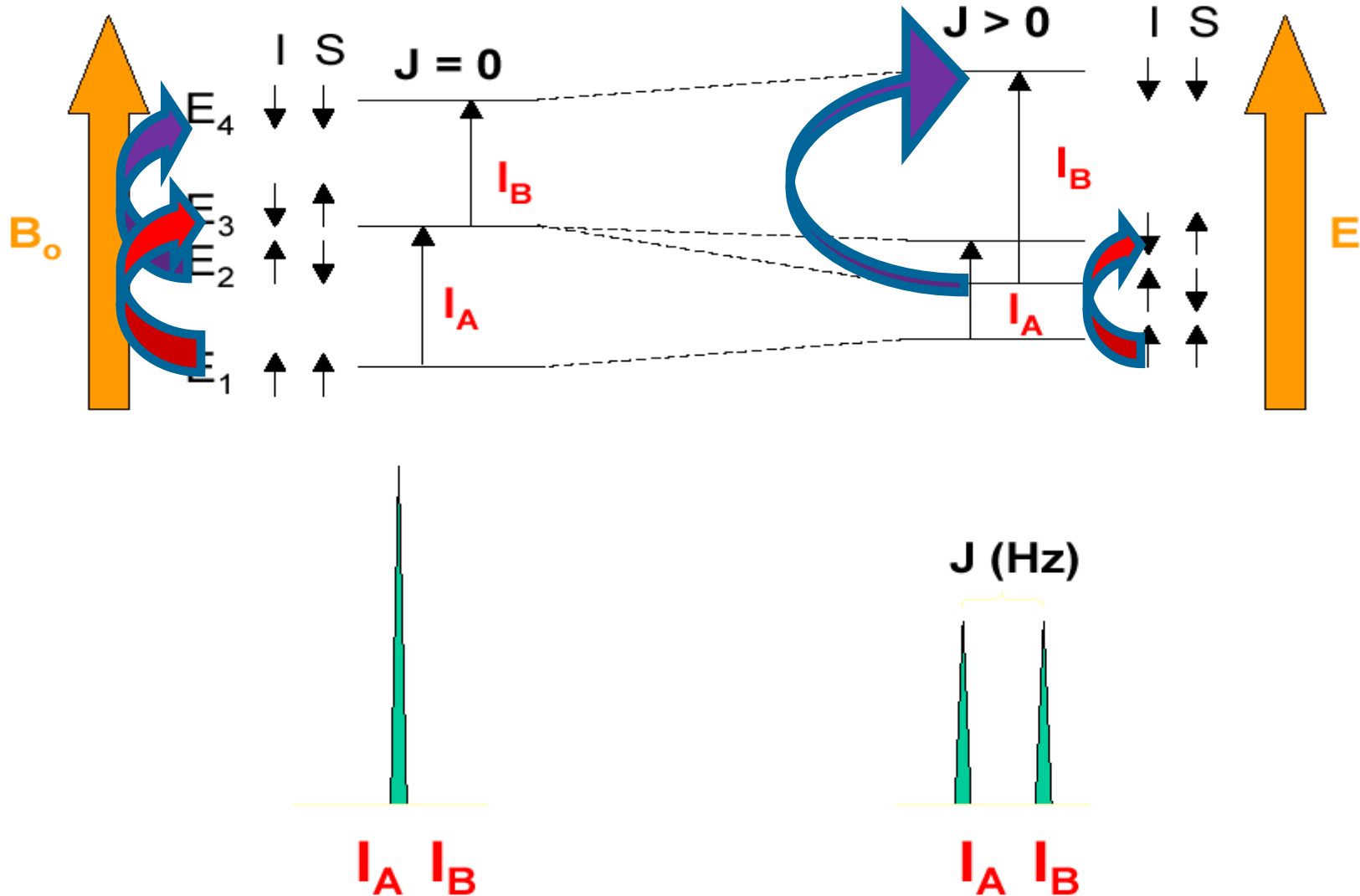
Nepřímá spin - spinová interakce

- interakční konstanty poskytují cenné informace o struktuře, protože jsou velmi citlivé ke strukturním změnám
- faktory ovlivňující interakční konstanty: hybridizace, vazebné a dihedrální úhly, délka vazby, přítomnost sousedních π vazeb, efekt substituentů atd.
- ve spektru odečítáme jen absolutní hodnoty

	J(H,H) [Hz]	znaménko	J(C,H) [Hz]	znaménko
1J			125 - 250	+
2J	0 - 30	-	-10 až 20	+/-
3J	0 - 18	+	1 - 10	+
^{3+n}J	0 - 3	+/-	<1	+/-

NMR - interpretace

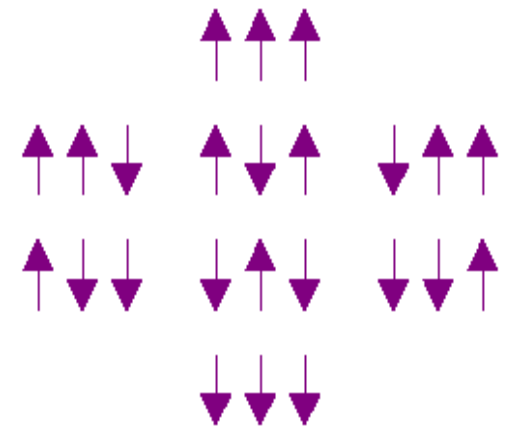
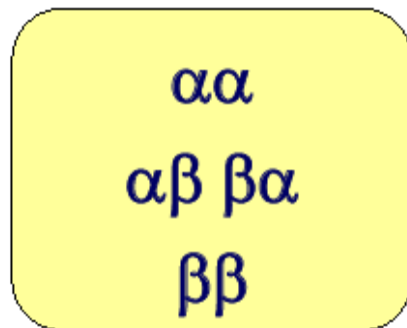
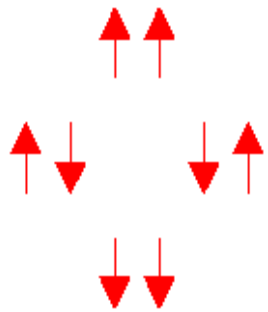
INTERAKČNÍ KONSTANTY - Hz



NMR - interpretace

INTERAKČNÍ KONSTANTY - Hz

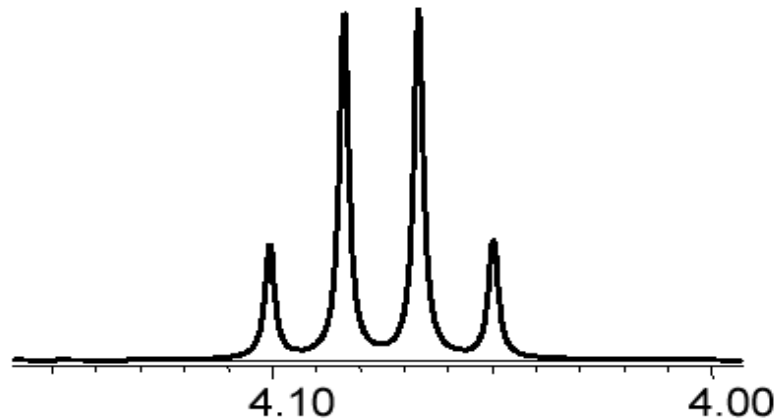
- možnosti vzájemné orientace více spinů



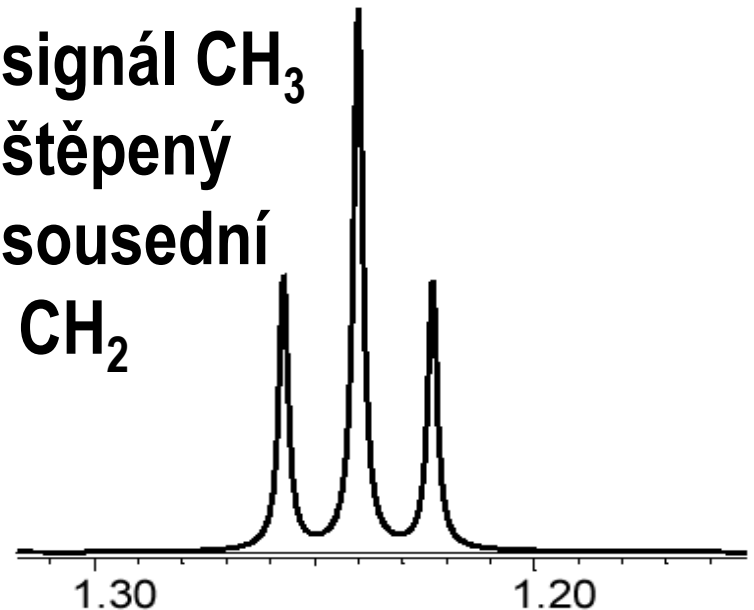
NMR - interpretace

INTERAKČNÍ KONSTANTY - Hz

signál CH₂
štěpený sousední
CH₃



signál CH₃
štěpený
sousední
CH₂



- Každý atom ¹H ve skupině CH₂ „vidí“ **4 možné stavy** atomů ¹H v sousední skupině CH₃.
- Naproti tomu každý atom ¹H skupiny CH₃ „vidí“ **3 možné stavy** protonů CH₂ skupiny.

NMR - interpretace

INTERAKČNÍ KONSTANTY - Hz

- spektra 1. řádu

- difference mezi chemickými posuny mnohem větší než spin-spinové interakční konstanty

LZE IDENTIFIKOVAT SKUPINY
CHEMICKY EKVIVALENTNÍCH JADER
(např. dva protony na volně rotující $-CH_2$)

NMR - interpretace

Spektra 1. řádu

- pravidla pro interpretaci
 - ekvivalentní jádra se navzájem neštěpí, neposkytují multiplety
 - interakční konstanta klesá se vzájemnou vzdáleností skupin v molekule
 - multiplicita pásu \underline{m} je dána počtem magneticky ekvivalentních jader na sousední skupině - \underline{n} se spinovým číslem l
 - pro ^1H $l = 1/2$
 $m = n + 1$

$$m = 2 n l + 1$$

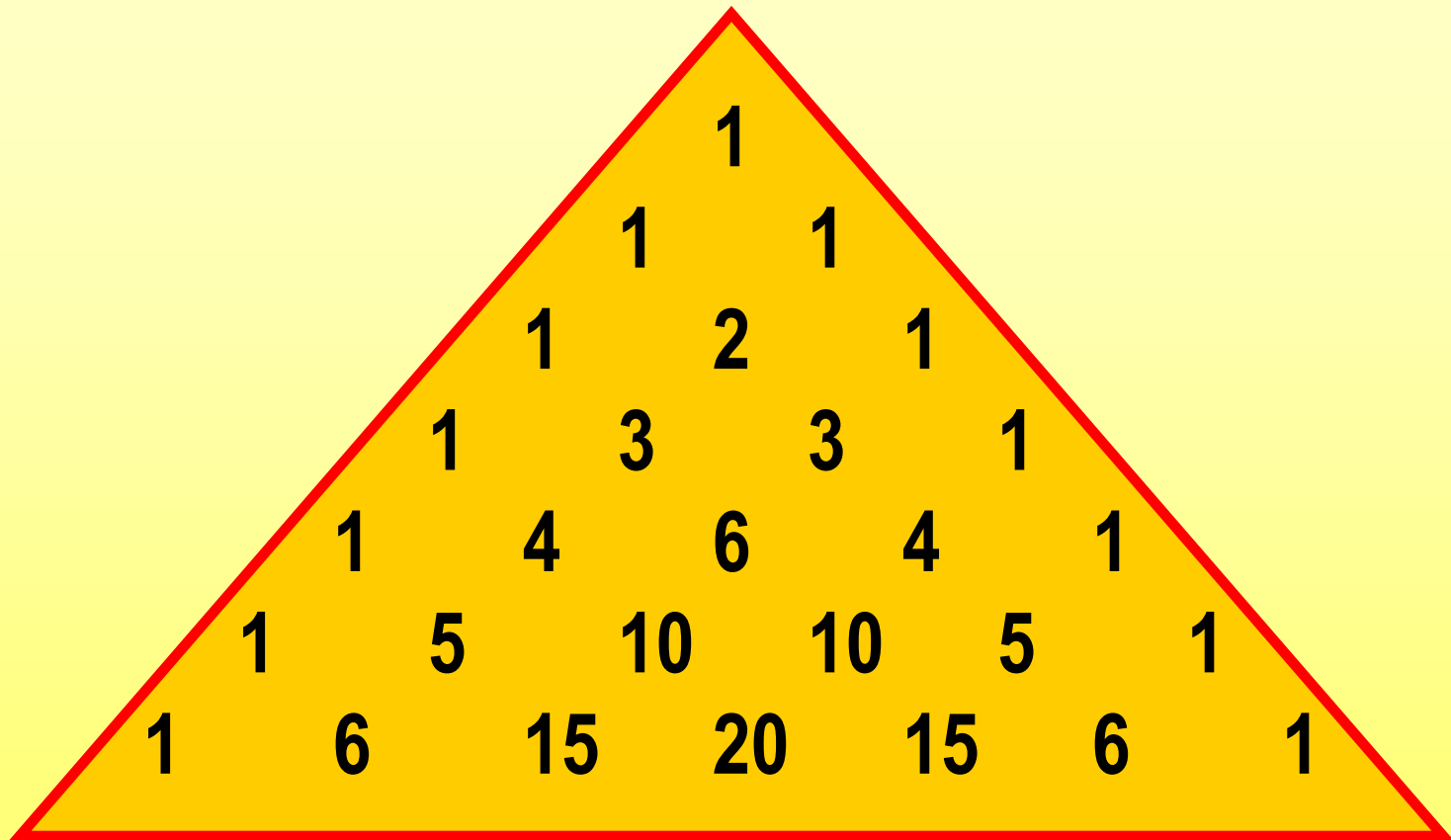
NMR - interpretace

Spektra 1. řádu

- pravidla pro interpretaci - pro ^1H
 - jsou-li protony na atomu B ovlivněny protony na atomu A a atomu C, které nejsou ekvivalentní, multiplicita pásu pro skupinu na atomu B bude:
 $(n_A + 1)(n_B + 1)$
 - při jednoduchém štěpení jsou relativní velikosti plochy složek multipletu dané koeficienty binomického rozvoje (Pascalův trojúhelník)

NMR - interpretace

Pascalův trojúhelník



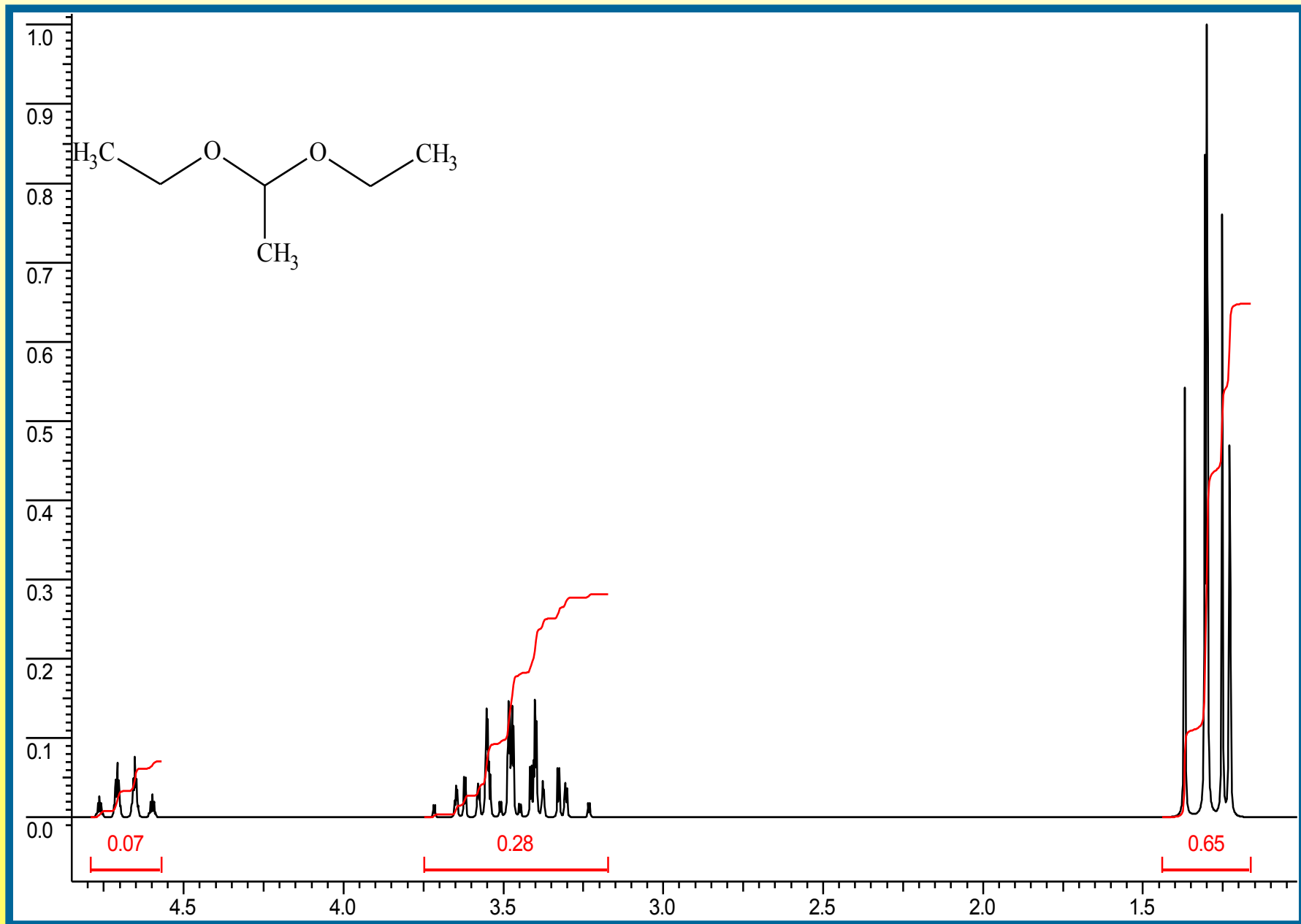
NMR - interpretace

INTENZITA SIGNÁLU - pro ^1H

- integrace plochy pásů pro jednotlivé chemické posuny
 - úměra k počtu protonů v dané skupině

např. poměr ploch $\text{CH}_3 : \text{CH}_2 : \text{CH}$
3 : 2 : 1

NMR - interpretace



NMR - interpretace

Interpretace ^{13}C NMR spekter

- **nízká citlivost** ^{13}C , $\gamma (^1\text{H}) \approx 4 \gamma (^{13}\text{C})$
 - ^1H je 64x citlivější jen z důvodu γ
- **přirozené zastoupení** ^{13}C : 1.11% (^1H : 99.98%)
 - ^1H je tedy 6400x citlivější, nutnost provádět měření na více akumulací (scanů)
 - vzájemné interakce ^{13}C - ^{13}C nepozorovatelné (1:10000)
 - lze sledovat interakce ^1H - ^{13}C - komplikují vzhled spektra
 - užití dekaplinku (odstranění interakce s protony)
- **rozsah chemických posunů**: 0 - 300 ppm
 - vzhledem k většímu rozsahu signály lépe rozlišitelné
 - chemické posuny závisí na hybridizaci daného C ($\text{sp}^3 < \text{sp} < \text{sp}^2$) a na povaze sousedních skupin

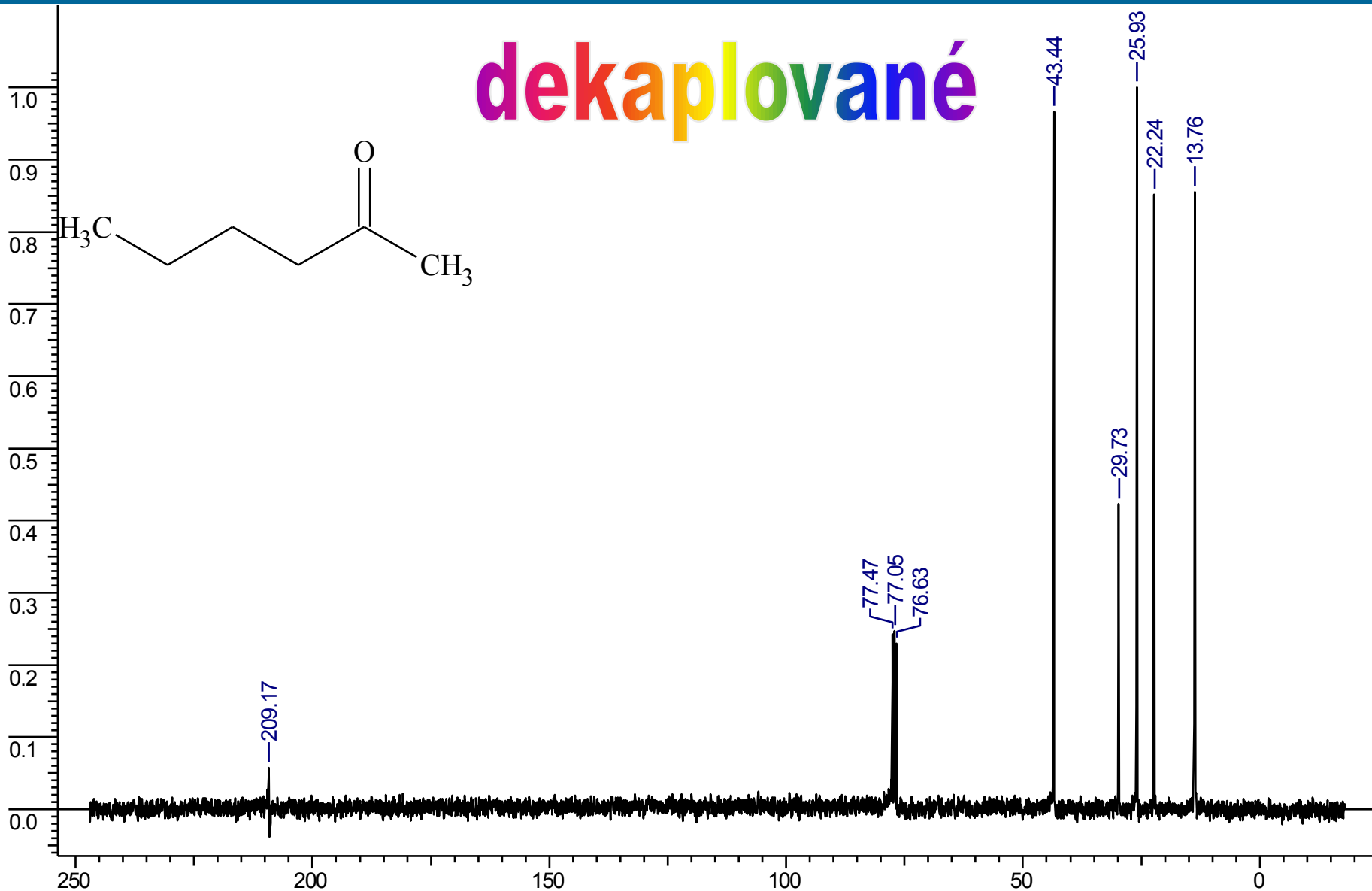
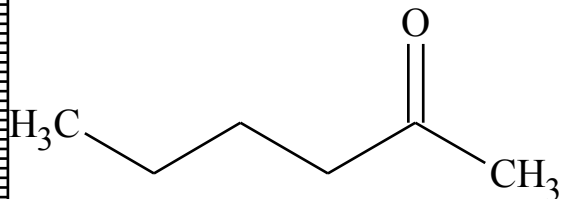
NMR - interpretace

¹³C NMR

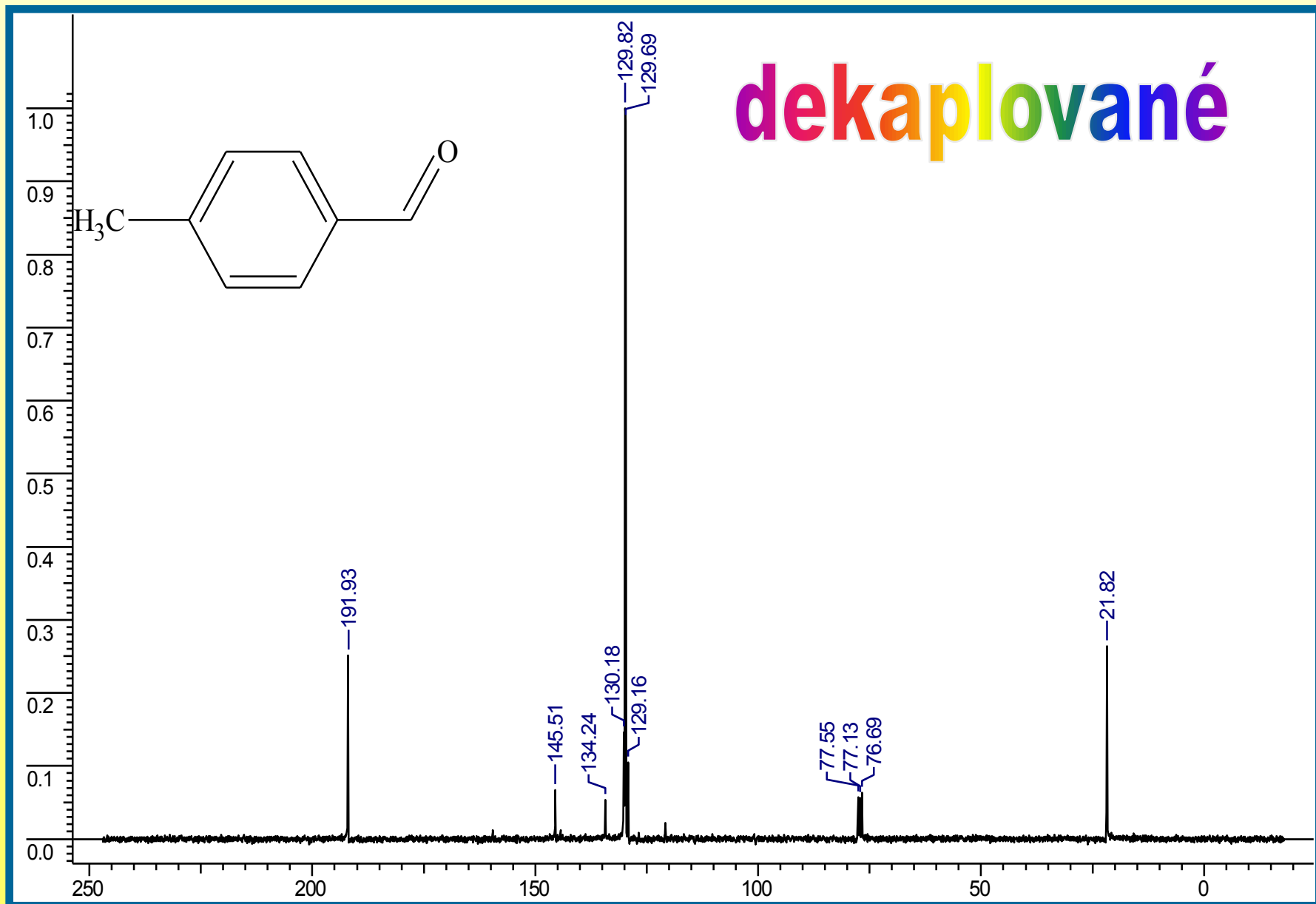
- nedekaplovaná
- dekaplovaná
- J - modulovaná - APT test
 - attached proton
 - pozitivní signály - C, CH₂
 - negativní signály - CH, CH₃

NMR - interpretace

dekaplované

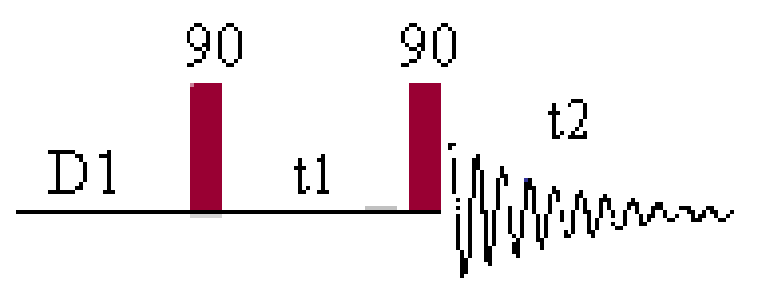


NMR - interpretace

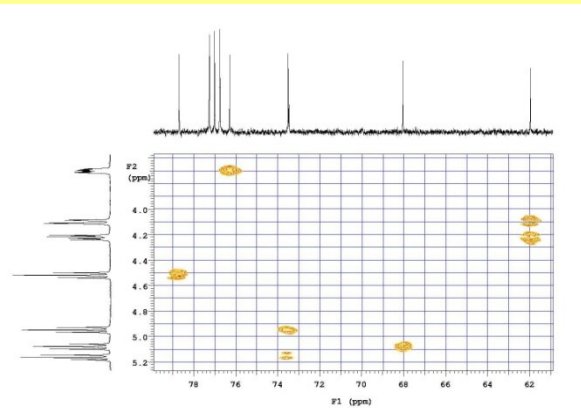
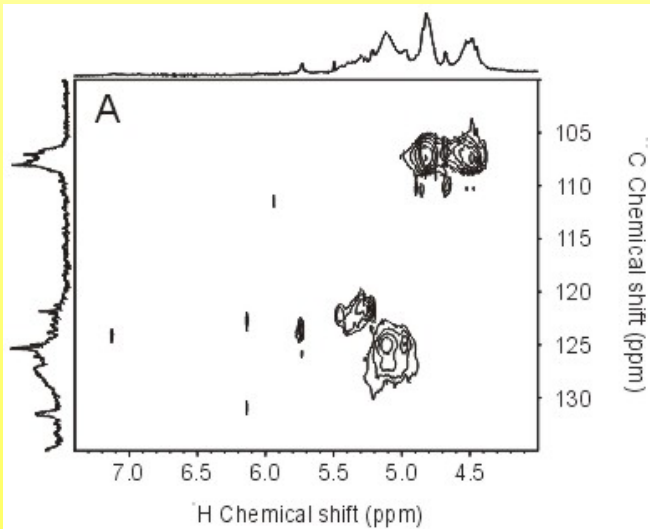


2D NMR

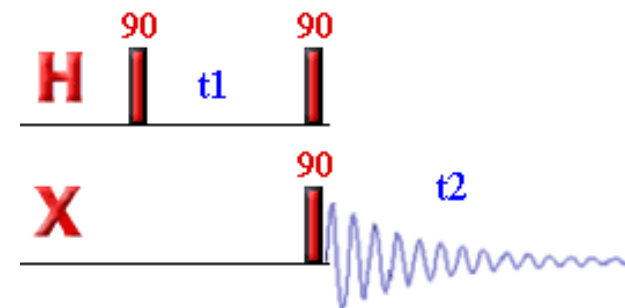
homonukleární



heteronukleární



COSY-HETCOR



2D NMR

příprava

vývoj t_1

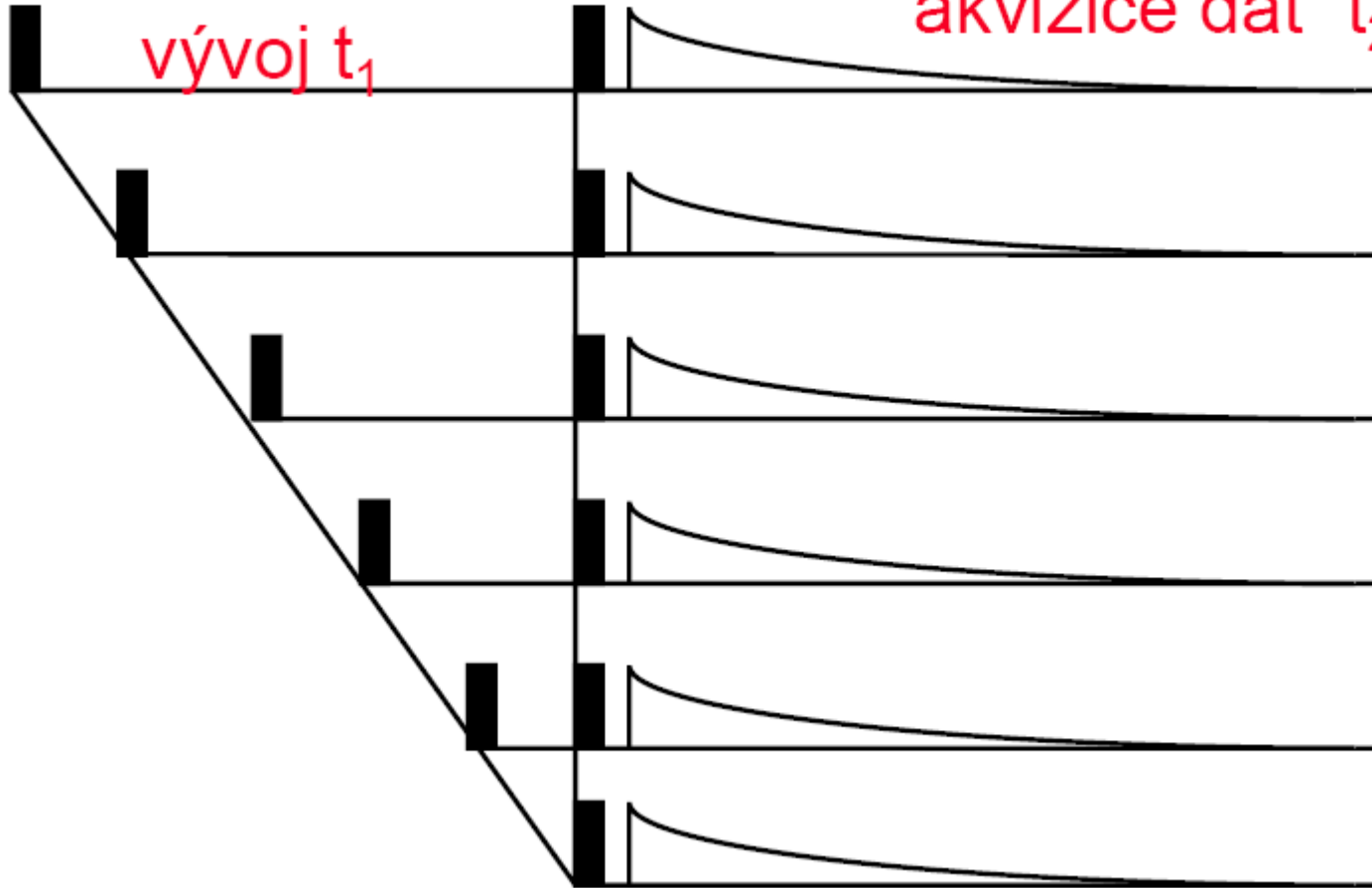
směšování

akvizice dat t_2

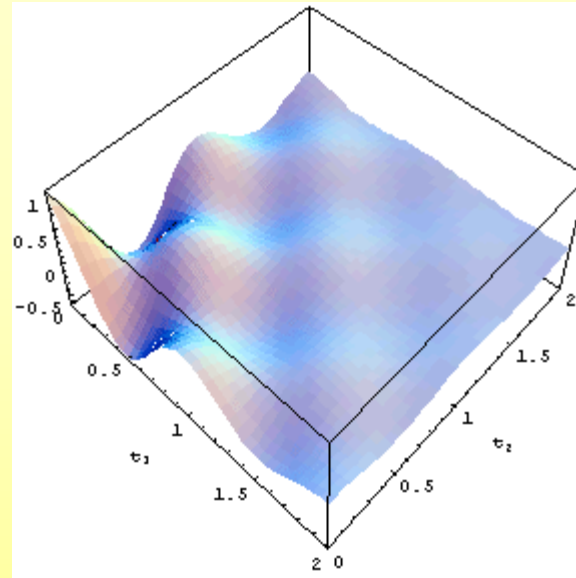
2D



1D



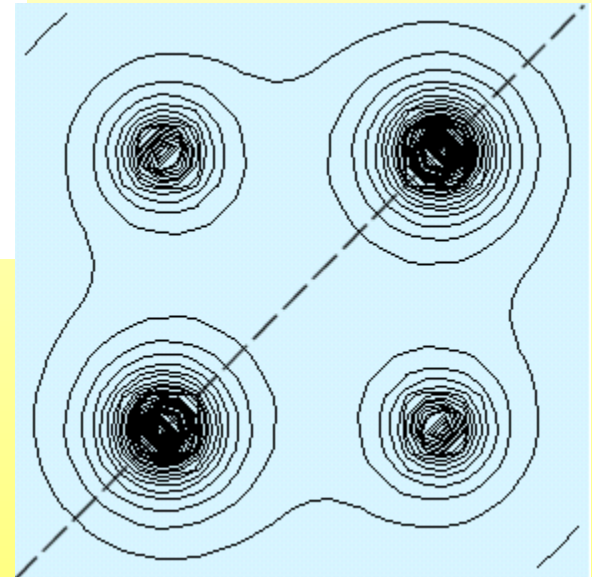
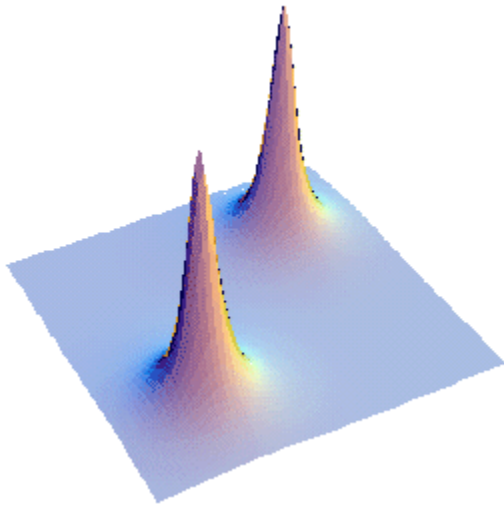
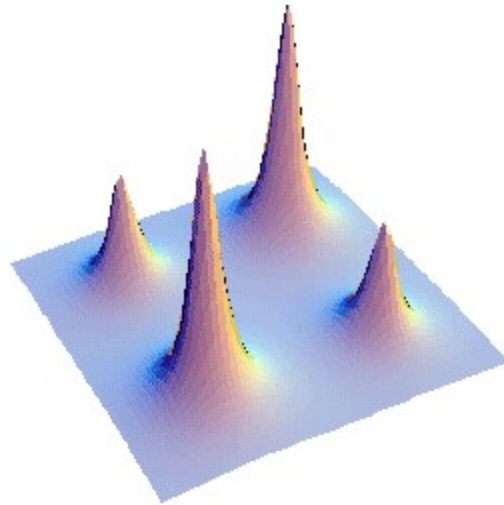
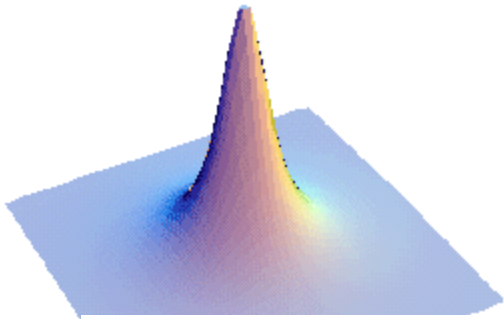
2D NMR



- **Závislost magnetizace na dvou časech**
 - akvizičním a vývojovém
 - příklad – vývoj magnetizace během akvizice

$$M_A^+(t) = M_{A0} \exp(-t_1 / T_{2A}) \cos \Omega_A t_1 \exp(-t_m / T_{1A}) \exp[t_2 (i\Omega - 1 / T_{2A})]$$

2D NMR

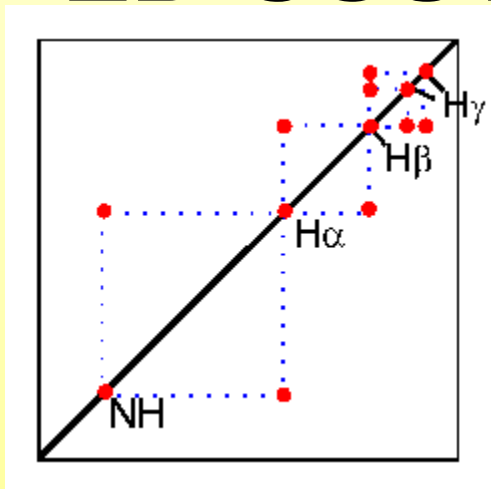
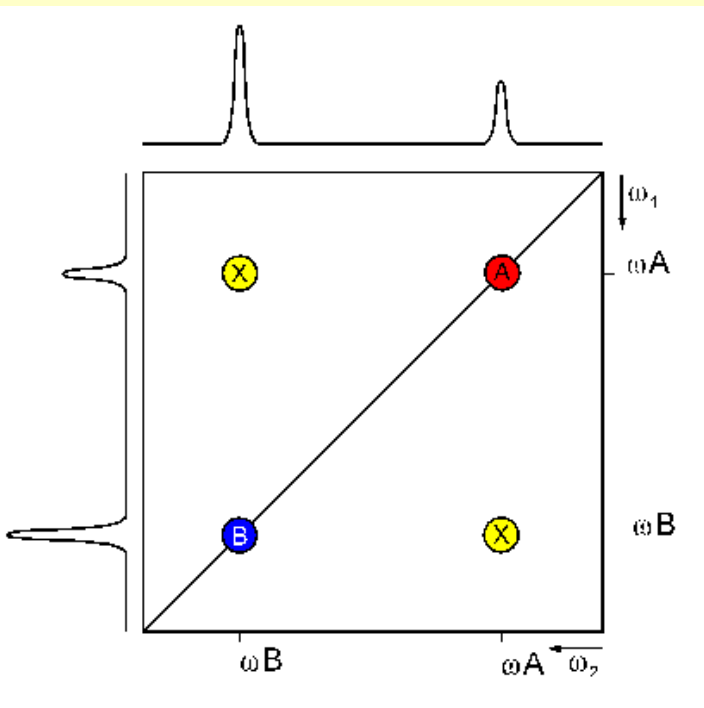


- **FT transformace obou časových dimenzí na frekvenční dimenze**

2D NMR - homonukleární

2D COSY – přes vazby

Correlated Spectroscopy



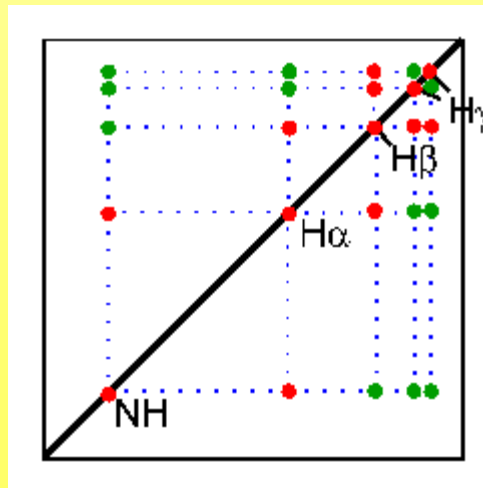
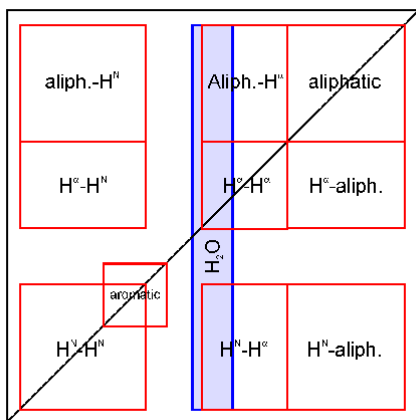
total

2D TOCSY – přes

vazby

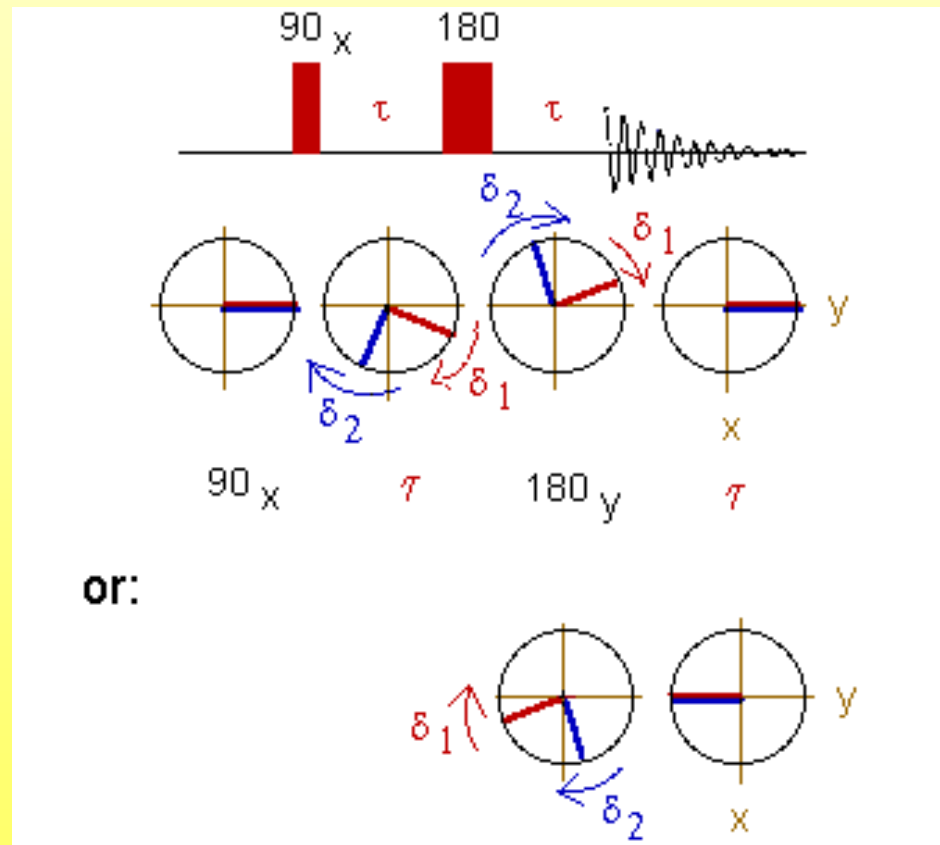
**Nuclear
Overhauser
enhancement**

**2D NOESY
přes prostor**



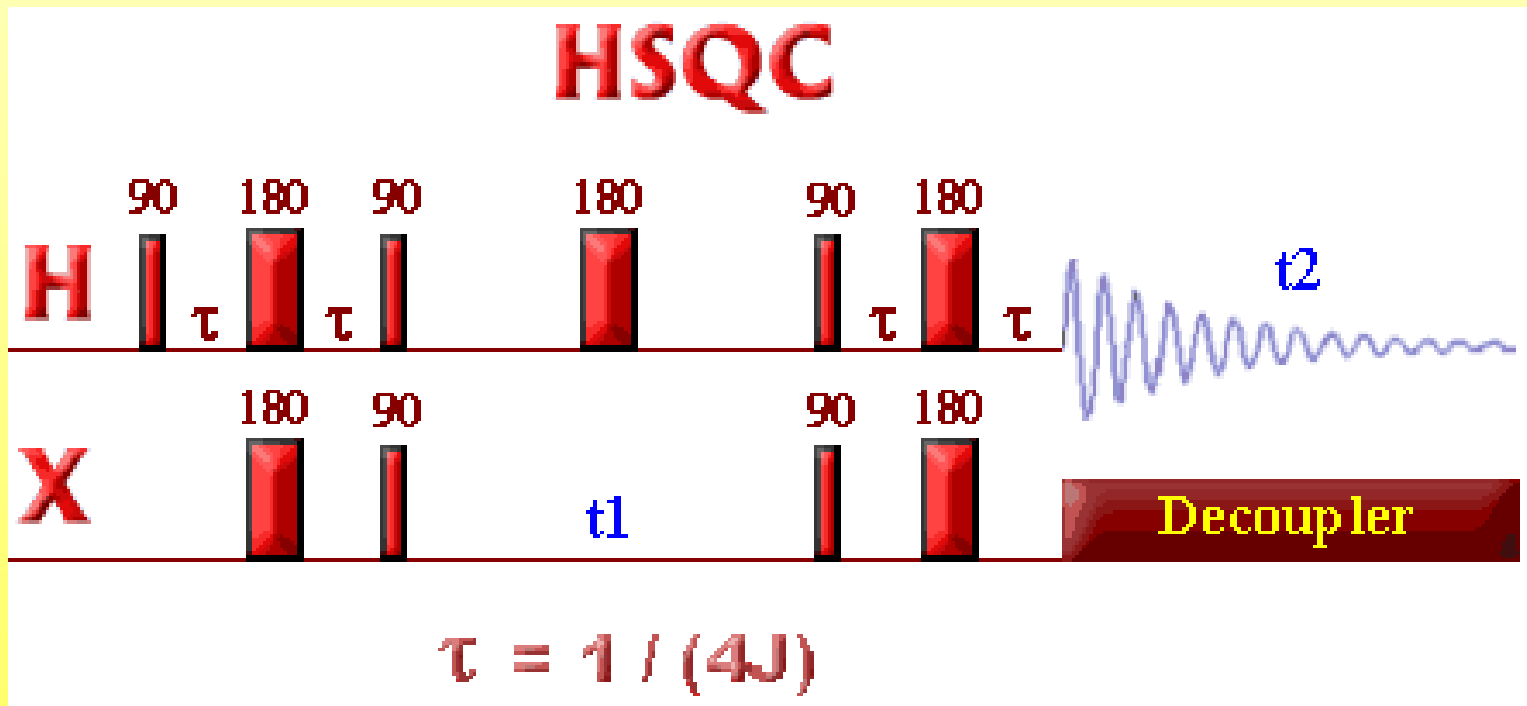
NMR – spinové echo

Refokusace chemických posuvů



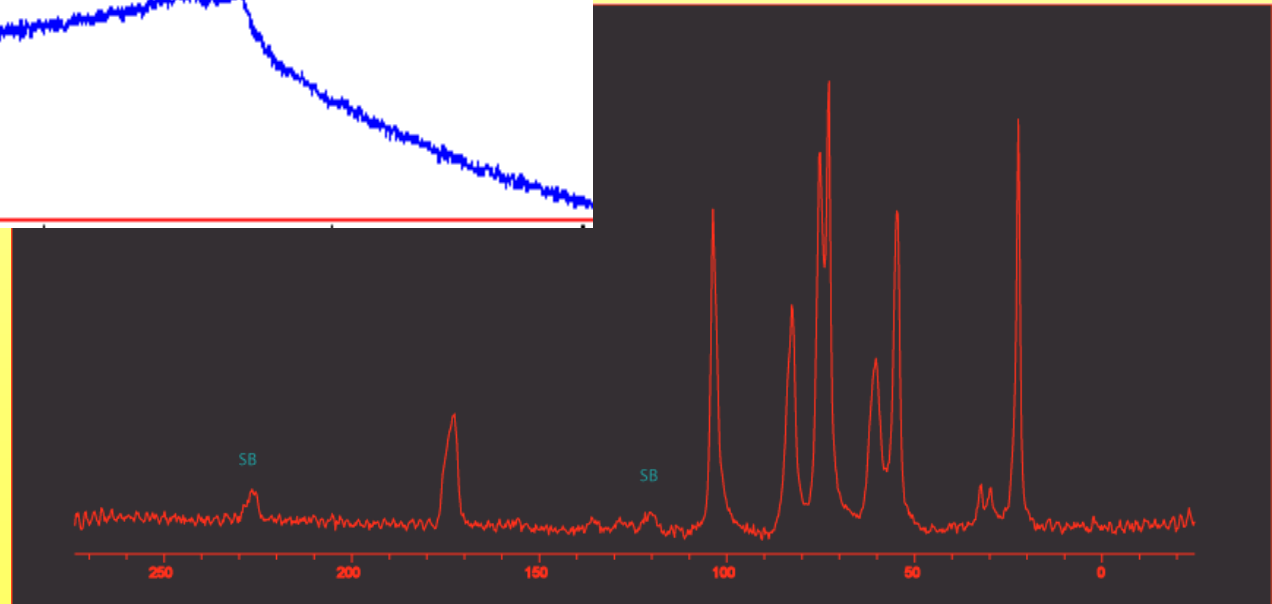
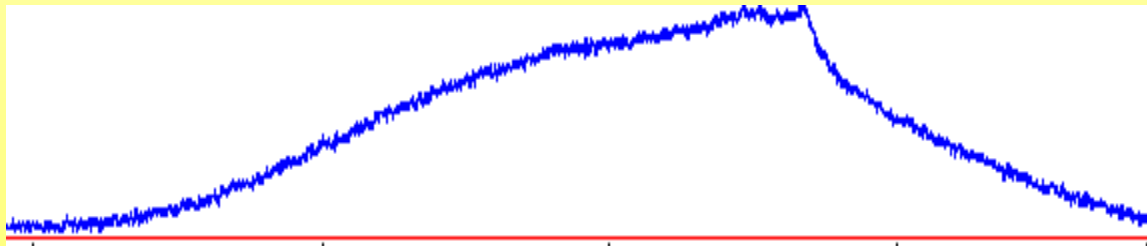
NMR – pulsní sekvence

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)



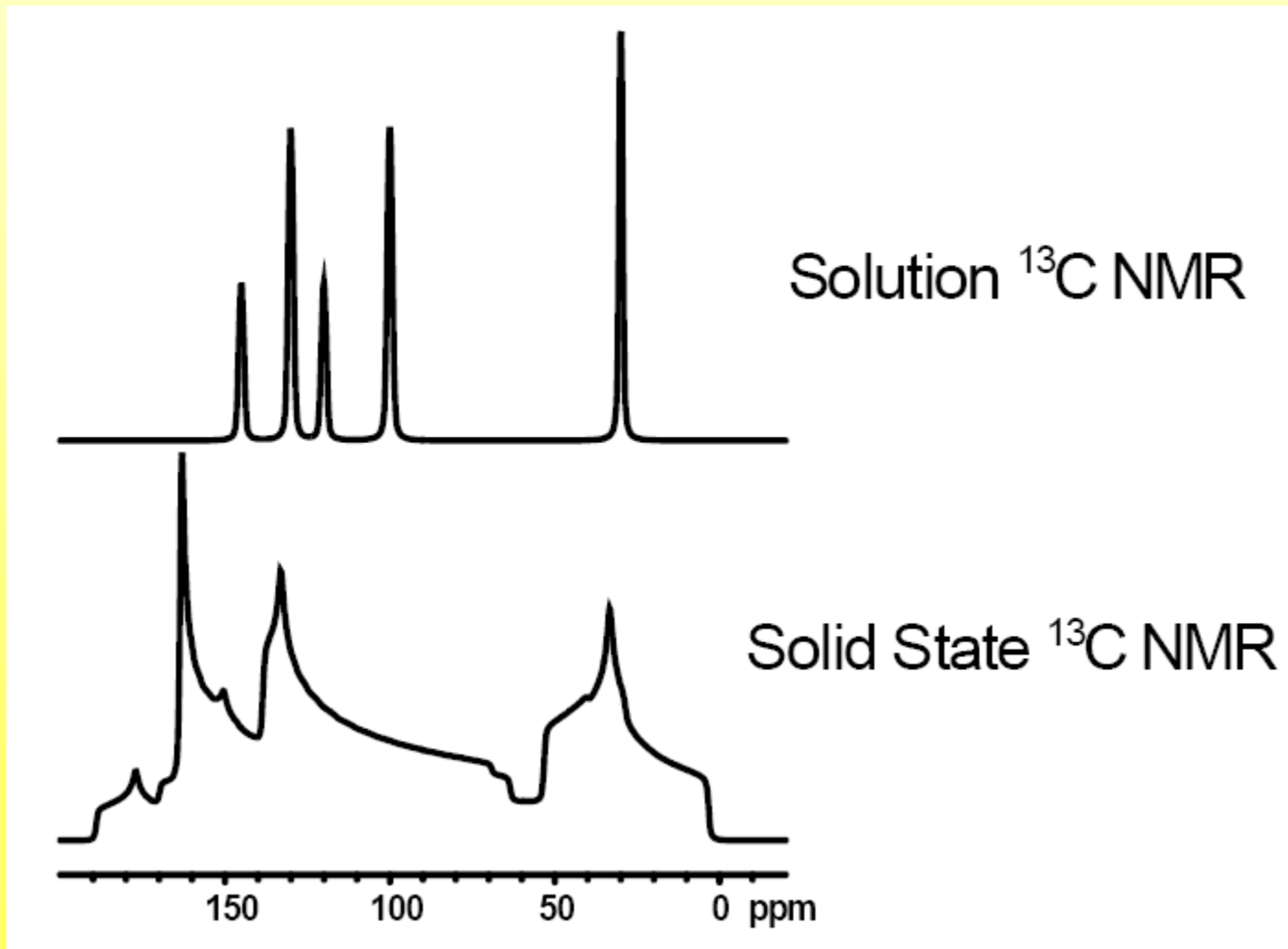
NMR – pevná fáze

- **Kromě běžně měřených roztoků možnost měřit pevnou fázi**
 - **Charakterizace farmaceuticky aktivních substancí – API**
 - **Od roku 1997 doporučována FDA (Food and Drug Administration)**



NMR – pevná fáze

- **Anisotropické efekty**
– směrově závislé interakce



NMR – pevná fáze

- **Anisotropické efekty - potlačení**
- **vyžaduje speciální techniky a vybavení – CP-MAS spektra**
 - **rotace pod magickým úhlem $54,7^\circ$ (magic-angle spinning - MAS) s vhodnou frekvencí – 7-35 kHz**
 - **vysoce výkonný dekaplink**
 - **multipulsní sekvence**
 - **měření řídce se vyskytujících jader**
 - **křížová polarizace – CP (cross polarization)**

NMR – pevná fáze

- **CP**

- přenos polarizace z hojně se vyskytujícího jádra – ^1H , ^{19}F , ^{31}P na „zředěná“ jádra – ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si

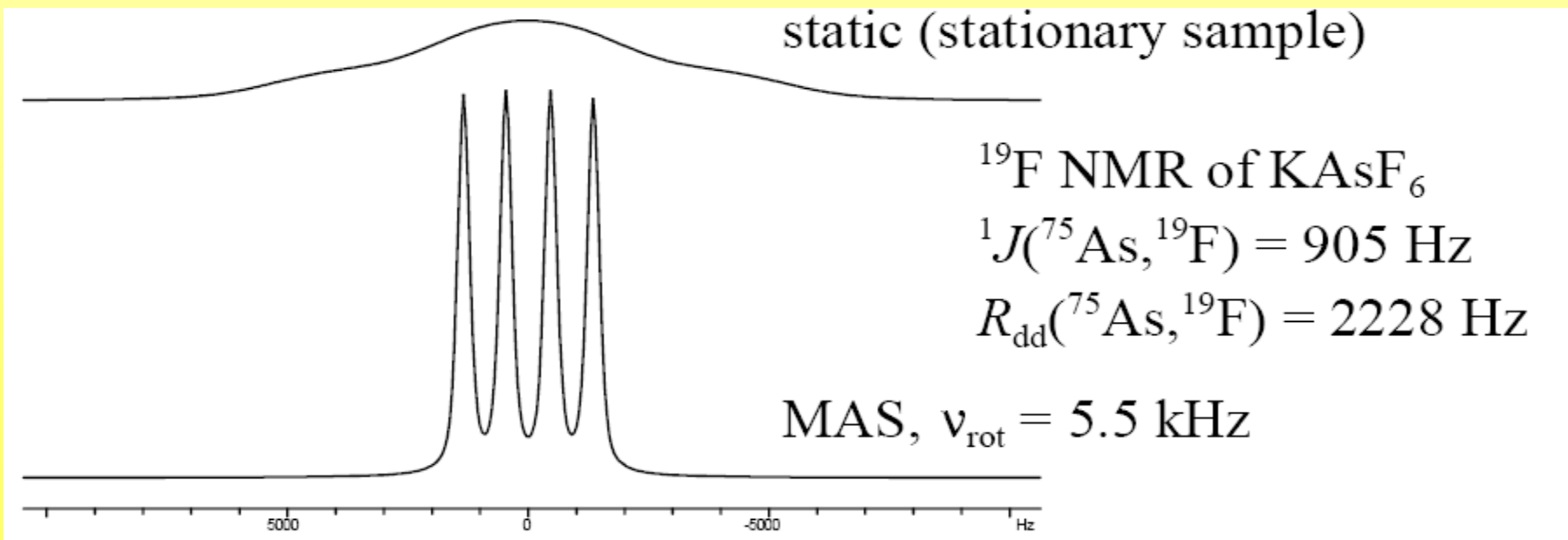
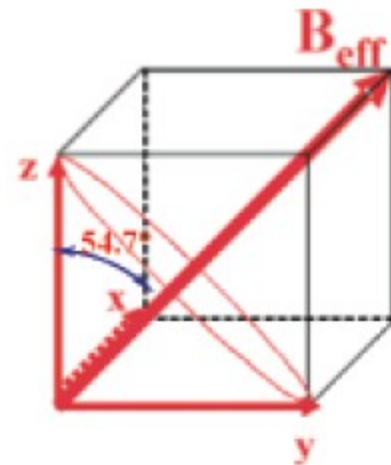
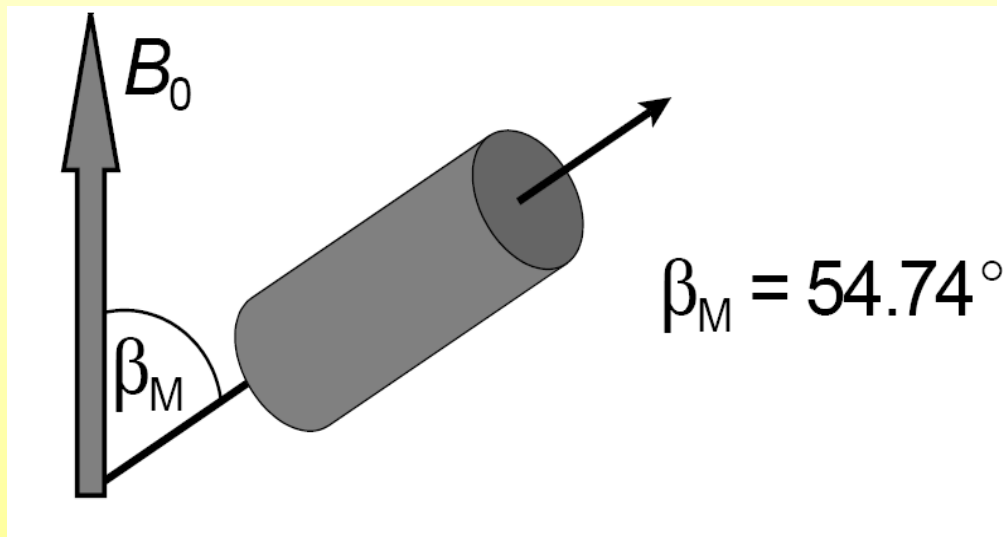
- **NMR spektra pevné fáze**

- bouřlivý rozvoj v posledních letech
- farmacie, polymery i anorganické materiály, málorozpustné proteiny
- membránové proteiny, priony
- vazebné a dihedralní úhly, vzdálenosti dvojic spinů

NMR – pevná fáze

MAS

práškové vzorky ve speciálním rotoru



NMR – pevná fáze

MAS

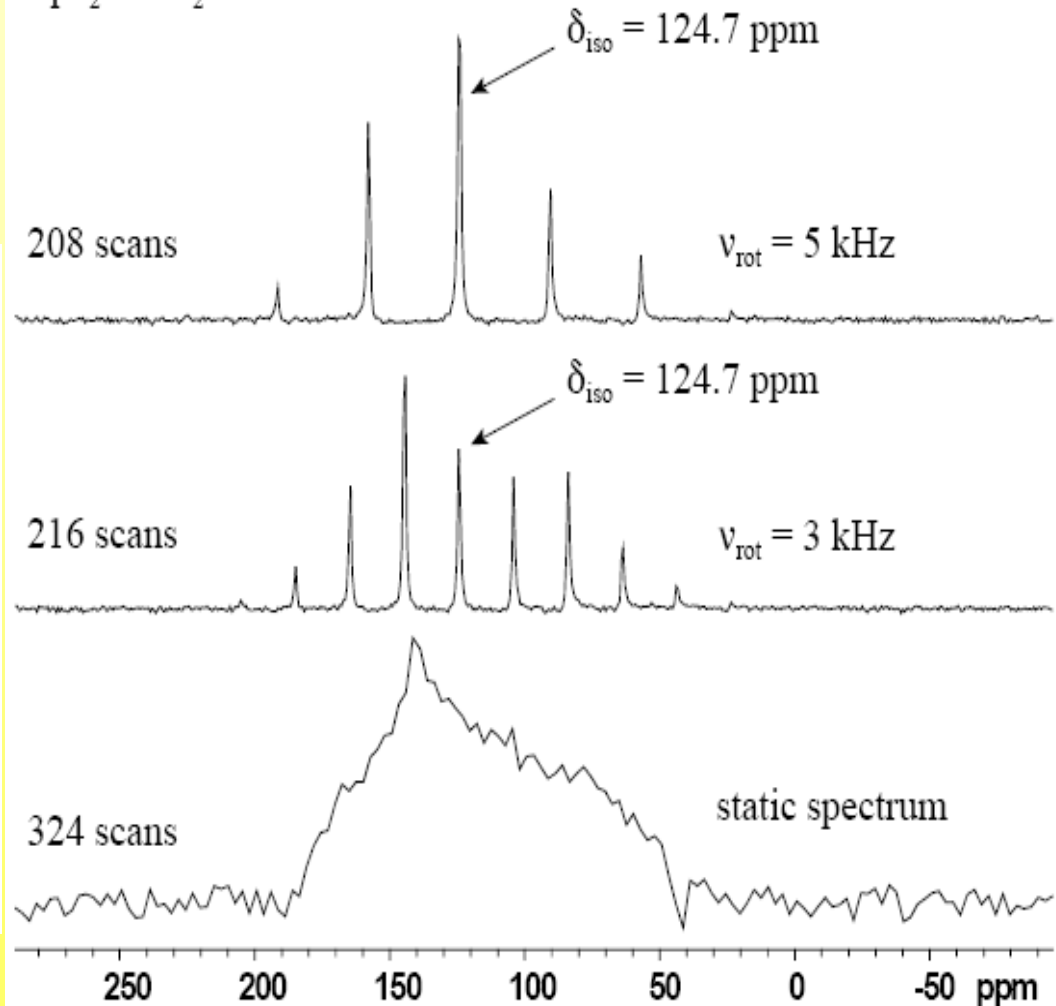
měření jader i těžkých prvků

Most abundant isotopes in the periodic table

H																	He
Li	Be	SPIN-1/2										B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	INTEGER SPINS										Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															
Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu				
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr				

HALF-INTEGER QUADRUPOLEAR SPINS

Here is an example of a ^{119}Sn CPMAS NMR spectrum of $\text{Cp}^*_2\text{SnMe}_2$ at 9.4 T:



NMR – pevná fáze

- nejen měření prášků, ale i monokrystalů
- měření kvadrupólových spinů
 - MQ MAS multiple-quantum MAS

Solid state NMR has been applied to:

organic complexes

zeolites

microporous solids

minerals

glasses

food products

ceramics

semiconductors

archaeological specimens

resins

inorganic complexes

mesoporous solids

aluminosilicates/phosphates

biological molecules

cements

wood

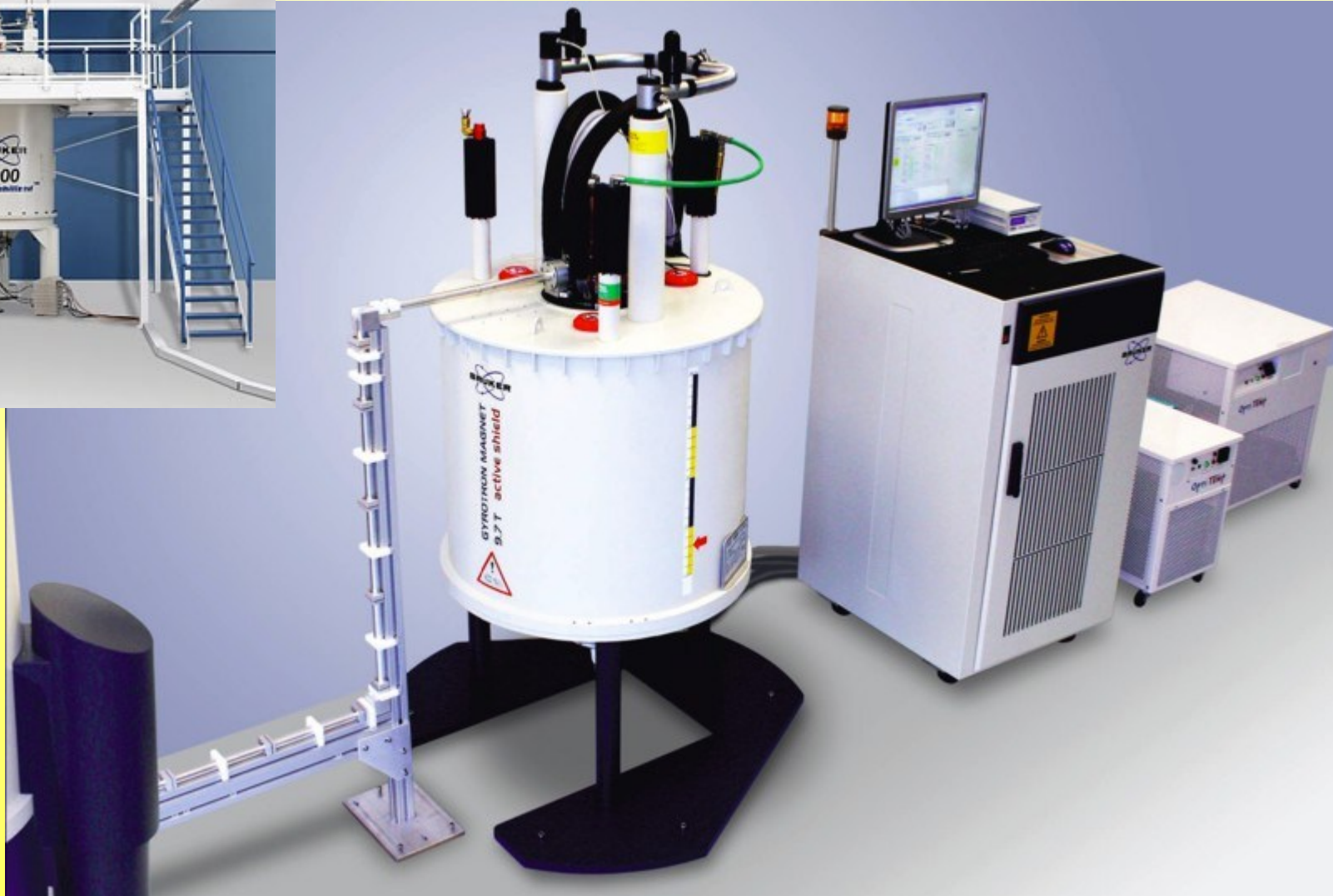
bones

metals and alloys

polymers

surfaces

NMR – spektrometr



picoSpin-45 /levný, malý

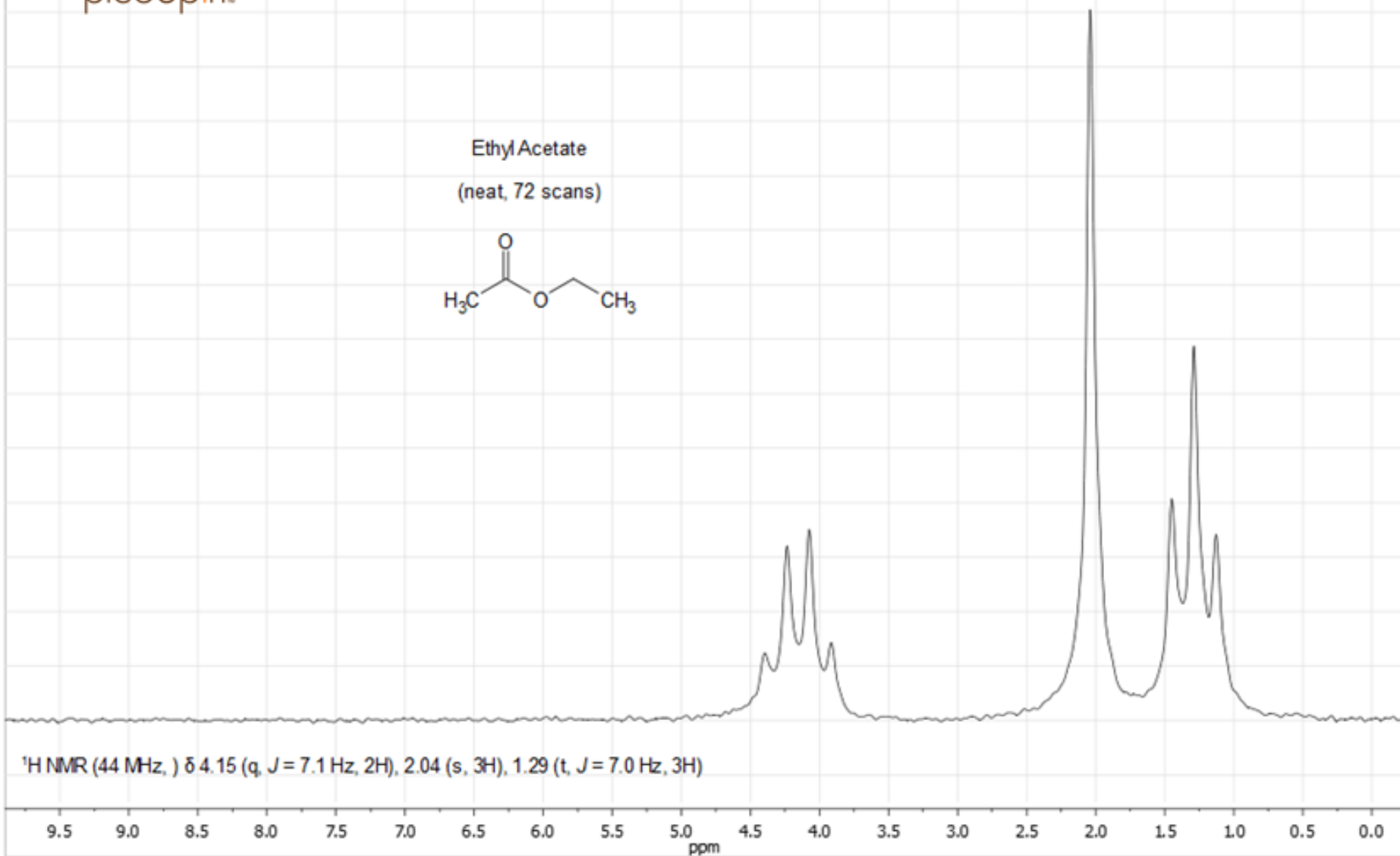
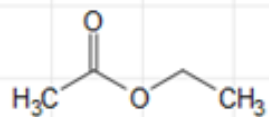


picoSpin-45

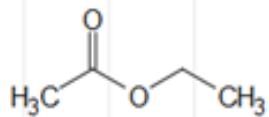
- **Specifications**

- **Larmor frequency** 45 MHz +/- 1 MHz
- **Nucleus** proton
- **Sample form** liquid
- **Resolution** better than 100 ppb
- **Signal-to-noise ratio** 300 for water, single shot
- **Magnet type** permanent
- **Capillary** 300 micron ID
- **Weight** 10.5 lbs.
- **Dimensions** 7"W x 5.75"H x 11.5"D
- **Power** 115/230 VAC, 50/60Hz, 150 W

Ethyl Acetate
(neat, 72 scans)



¹H NMR (44 MHz,) δ 4.15 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.29 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)



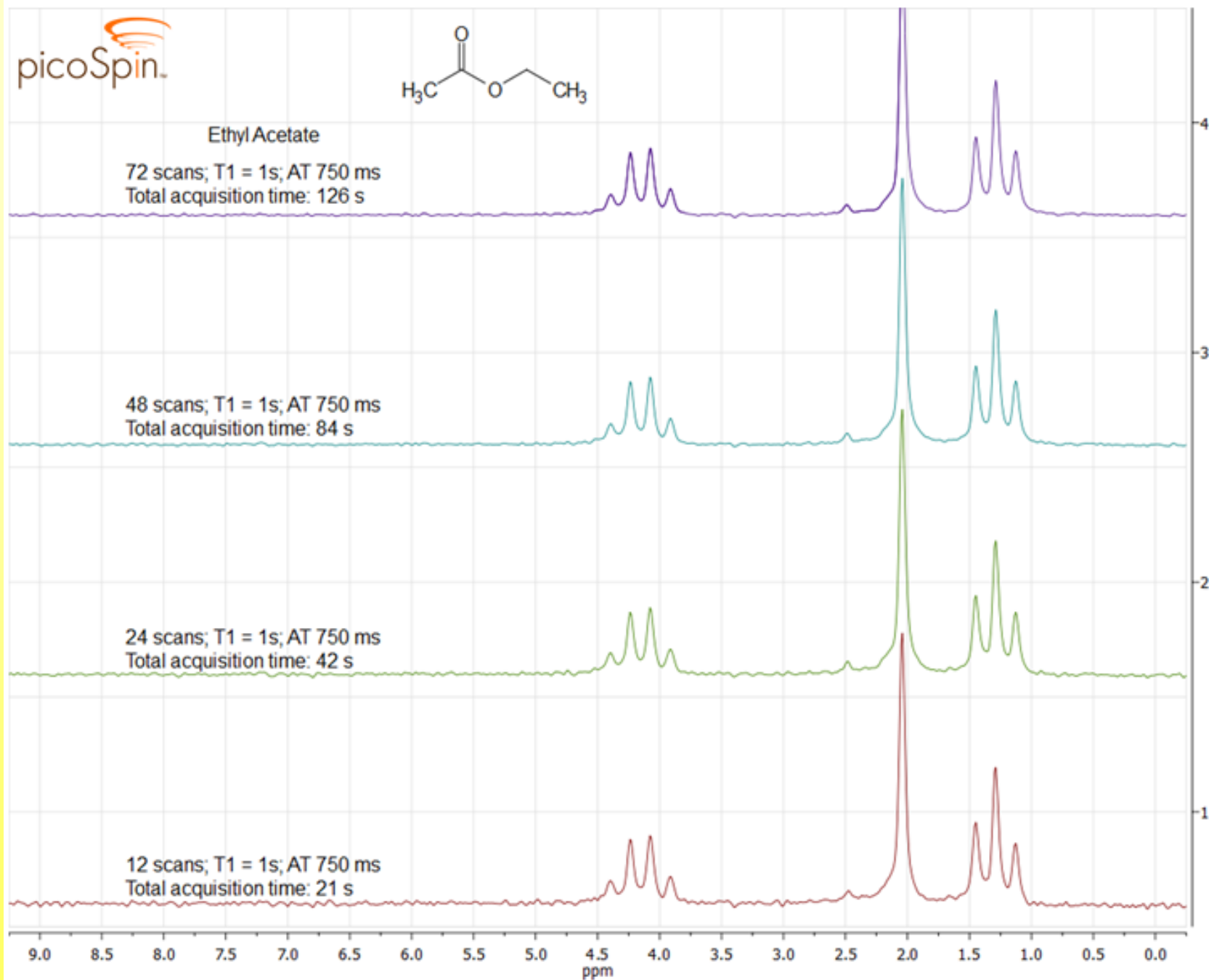
Ethyl Acetate

72 scans; T1 = 1s; AT 750 ms
Total acquisition time: 126 s

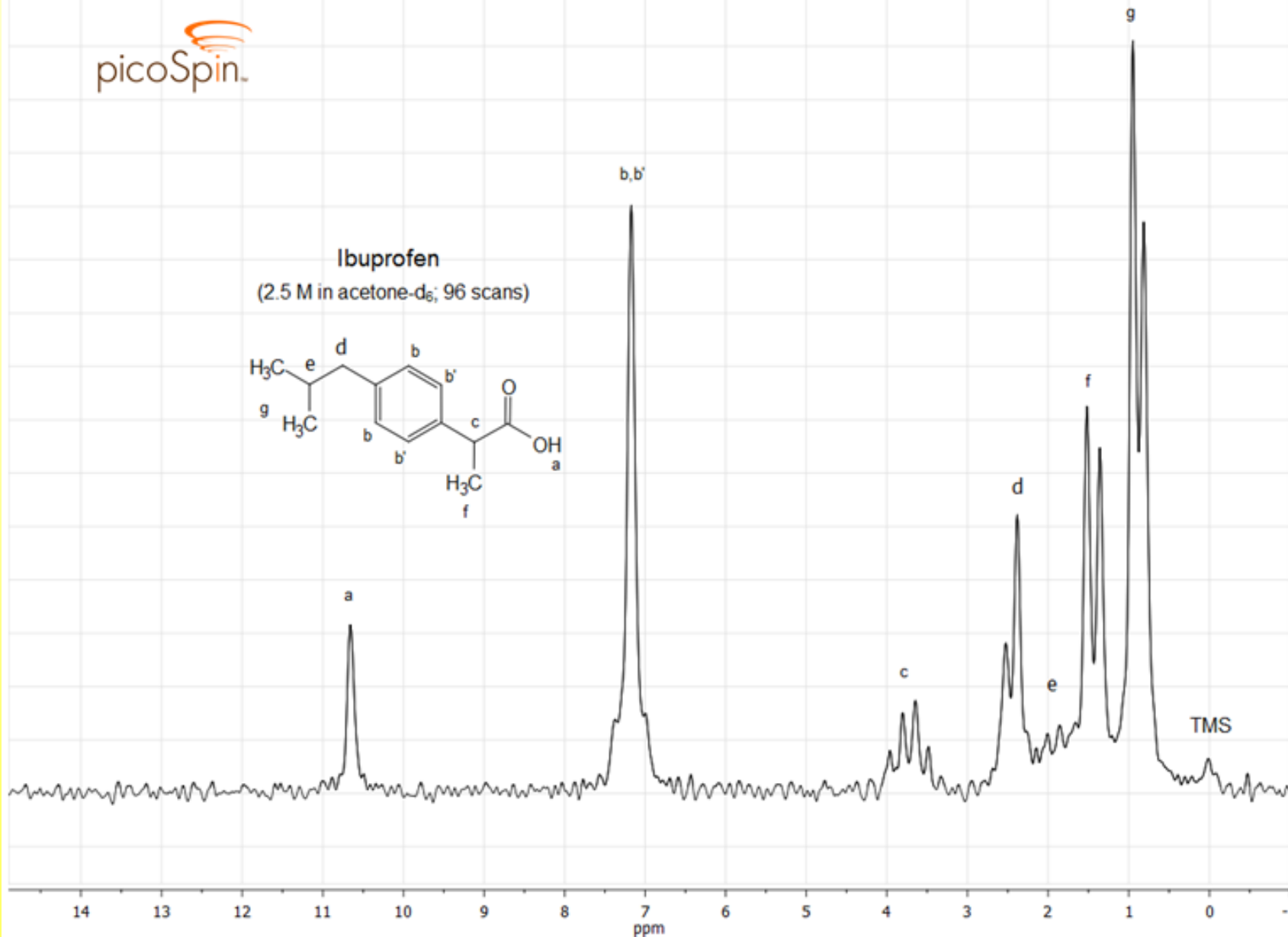
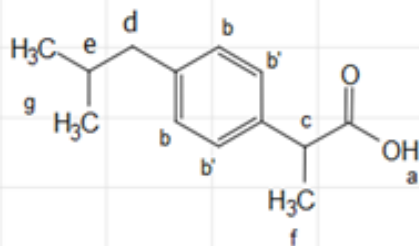
48 scans; T1 = 1s; AT 750 ms
Total acquisition time: 84 s

24 scans; T1 = 1s; AT 750 ms
Total acquisition time: 42 s

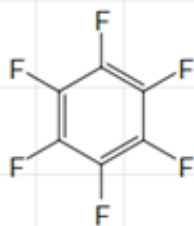
12 scans; T1 = 1s; AT 750 ms
Total acquisition time: 21 s



Ibuprofen
(2.5 M in acetone-d₆; 96 scans)



picoSpin.



Neat, 72 scans

