Vyučující: Ing. Richard Hrabal, CSc.
Ing. Hana Dvořáková, CSc.
Mgr. Jan Lang, PhD.

(Číslo dveří A 42, telefon 3805, e-mail hrabalr@vscht.cz)

Termín: každé úterý od 7.30 do 9.10
Místo: posluchárna A20
Studijní materiály: http://staff.vscht.cz/nmr

Proč se učit NMR spektroskopii?

- Zkoumání chemické struktury
  - Chemie přírodních látek.
  - Syntetická organická chemie, důležitý analytický nástroj pro organickou syntézu.
- Studie dynamických procesů
  - Reakční kinetika.
  - Studium chemických výměn (chemických nebo strukturních).
- Konformační studie
  - Proteiny.
  - DNA. Protein/DNA komplexy.
  - Polysacharidy.
- Návrh nových typů léčiv
  - Zkoumání vztahu struktura -aktivita
    Structure Activity Relationships (SAR) by NMR

Úvodní poznámky

- Absorpční (emisní) spektroskopie, podobně jako IČ nebo UV. Detekuje absorbci radiofrekvenčního záření jádry atomů v molekule.

- Bohužel, k pochopení je třeba trochu kvantové mechaniky (hodně k opravdovému porozumění :-)……).

- Aktivní jsou pouze jádra se **spinovým kvantovým číslem** (**I**) ≠ 0. Tato jádra mohou absorbovat RF záření.

  - Sudé hmotové číslo & sudé atomové číslo ⇒ ⇒ **I = 0** (^{12}C, ^{16}O)
  - Sudé hmotové číslo & liché atomové číslo ⇒ ⇒ **I = celočíselný** (^{14}N, ^{2}H, ^{10}B)
  - Liché hmotové číslo ⇒ **I = polovinový** (^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{31}P)

- Spinové stavy jádra jsou kvantovány.

$$m = I, (I - 1), (I - 2), \ldots , -I$$

- m je magnetické kvantové číslo.

- Pro ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P (nejběžnější jádra) platí:

$$I = 1/2 \Rightarrow m = 1/2, -1/2$$

- To znamená, že tato jádra mohou zaujmout pouze dva stavy (energetické hladiny).

- Další důležitou vlastností částic s nábojem je tzv. **magnetický moment (μ),** který může být vyjádřen

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

- Je to vektorová veličina, která má velikost a směr (nukleární magnet)

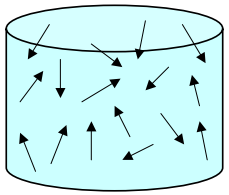
  - **h** je Planckova konstanta

  - **γ** je gyromagnetický poměr (konstanta), která je závislá na povaze jádra.

- Různá jádra mají různý magnetický moment.

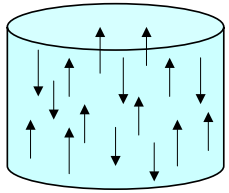
Vliv magnetického pole (I = 1/2)

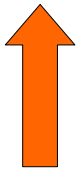
- V základním stavu nejsou jaderné spiny uspořádány a neexistuje mezi nimi žádný energetický rozdíl. Jsou tzv. degenerované:



$B_o = 0$

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



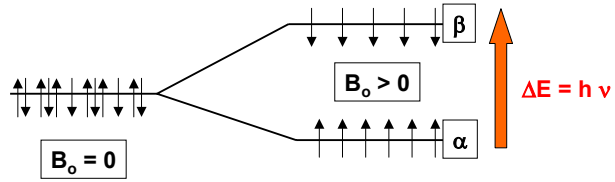


B_o

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

Energie a populace spinových stavů

- Vlivem externího magnetického pole dojde k vytvoření **energetického rozdílu** mezi spinovými stavy souhlasně a nesouhlasně orientovaných jaderných magnetických momentů:



- Rozdíl v populaci jednotlivých stavů je dán rozdílem v jejich energiích a řídí se Boltzmanovým rozdělením:

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

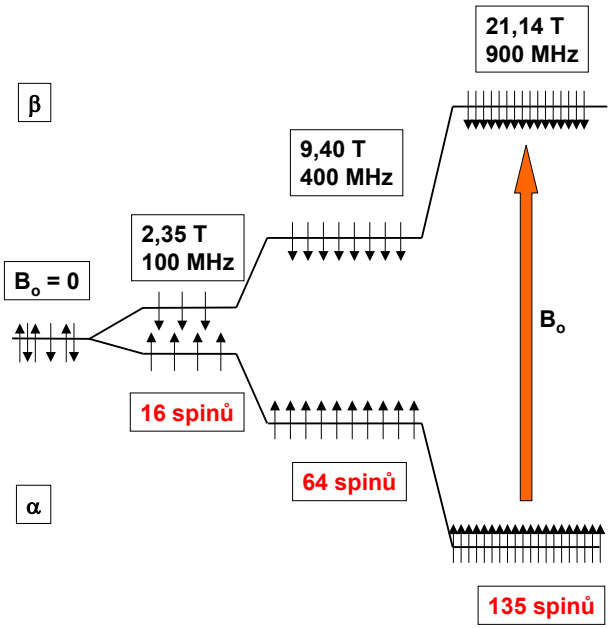
- ΔE pro ^1H při 400 MHz (B_o = 9.5 T) je 3.8×10^{-5} Kcal / mol

$$N_\alpha / N_\beta = 1.000064$$

- Rozdíl v populacích je velmi malý ve srovnání s ostatními spektroskopickými metodami.

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 obsahuje10^6+přebytek.



Energie a citlivost

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

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

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

- Toto ovlivňuje velikost energie (intenzitu signálu a citlivost), kterou každé jádro je schopno absorbovat:

- Větší magnety **(vyšší B_o)** způsobují vyšší citlivost NMR přístrojů.

- Jádra s větší gyromagnetickou konstantou γ absorbují více energie a jsou tudíž citlivější. Citlivost je úměrná μ a $N_\alpha - N_\beta$, a magnetickému toku v RF cívce, což opět závisí na γ, konkrétně γ^3.

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

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

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

- Přidáme-li k tomu nižší přirozené zastoupení ^{13}C, citlivost tohoto jádra se sníží dokonce o faktor **6400** vzhledem k ^1H.

Energie a frekvence

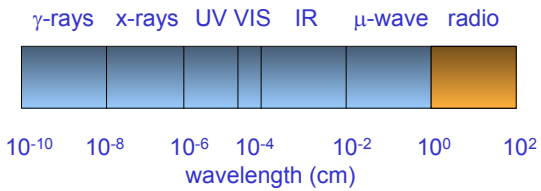
- Energie je též přímo úměrná frekvenci elektromagnetického záření…

$$\Delta E = h\,\nu$$

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

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

- Pro jádro ^1H je tato frekvence při využití komerčně dostupných magnetů (2,35 – 21,14 T) v rozsahu 100-900 MHz.

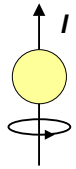


Precesní pohyb

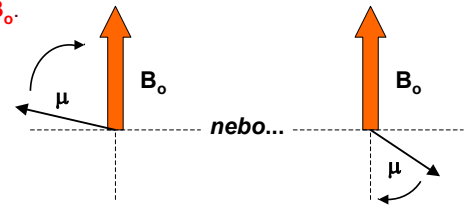
- Z pohledu klasické mechaniky vykonává vektor magnetického momentu precesní pohyb okolo osy z (směru externího magnetického pole). Frekvence tohoto pohybu se nazývá ***Larmorova*** frekvence a značí se ω:

$$|\omega| = 2\pi\nu \Rightarrow \omega_o = -\gamma B_o \text{ (radiany)}$$

- Každé jádro má tzv. **moment hybnosti I**, který je vlastností všech (nejen magneticky aktivních jader). Jádro si lze potom představit rotující kolem vlastní z osy.

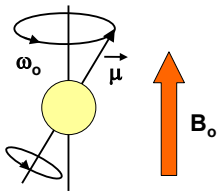


- Má-li jádro nenulový magnetický moment dostaneme rotující atomový magnet. Interakcí s externím polem B_o vzniká kroutící moment. Bez ohledu na původní orientaci vektoru μ tento má vždy snahu orientovat se podle externího pole B_o.



Precesní pohyb (pokračování)

- Precesní pohyb je výslednicí interakce síly, která se snaží přimět vektor μ k souhlasné nebo nesouhlasné orientaci s vektorem B_o, a síly udržující jej v rotaci:

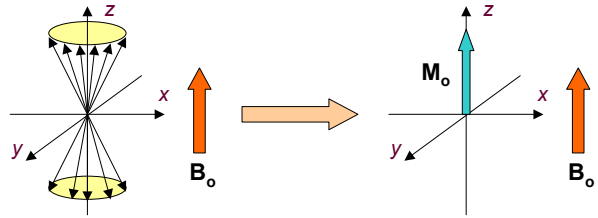


- Tento jev lze přirovnat k pohybu osy otáčejícího se setrvačníku pod vlivem gravitace.

- Frekvence tohoto precesního pohybu je přímo úměrná rozdílu energií dvou spinových stavů, což lze odvodit na základě kvantové mechaniky.

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 μ zprůměrovány:



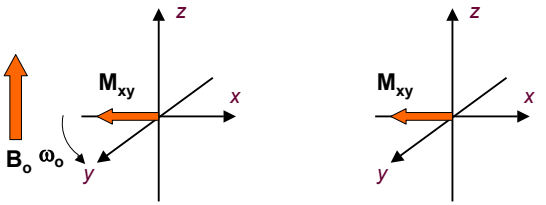
- Každý vektor μ může být rozložen na složku v ose z a v rovině <xy>. Distribuce komponent v rovině <xy> je náhodná, takže se vyprůměrují a navzájem vyruší. Velikost makroskopické magnetizace je potom dána rozdílem populací spinových stavů α a β $N_\alpha - N_\beta$.

- Mezi μ and M_o je podstatný rozdíl. Zatímco μ je kvantován (může se vyskytovat ve dvou stavech α **a** β), M_o odráží stav celé populace spinů a představuje kontinuum.

Laboratorní a rotující soustava souřadnic

- Systém koordinát doposud používaný se nazývá **laboratorní soustava souřadnic**. Jedná se o fixní systém, ve kterém jaderné spiny rotují rychlostí ω_o, což znesnadňuje jakoukoliv další analýzu.

- Řešením je souřadná soustava, která sama rotuje rychlostí ω_o, tzv. **rotující soustava souřadnic**.
  Z fyzikálního pohledu odstraníme takto vliv magnetického pole $\mathbf{B_o}$.

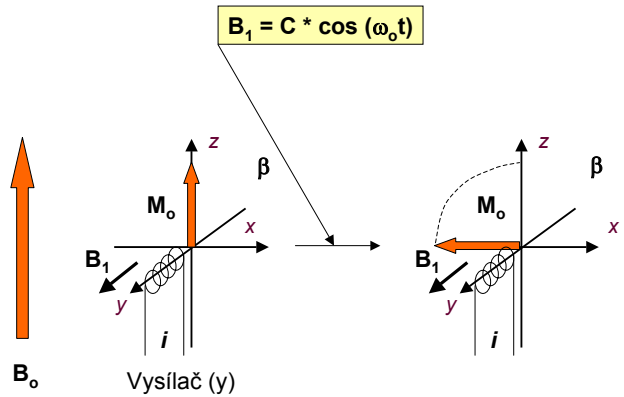


Laboratorní soustava **Rotující soustava**

- V rotujícím systému souřadnic se vektor $\mathbf{M_{xy}}$ nepohybuje za podmínky, že jsme v rezonanci (ω pole $\mathbf{B_1}$ je přesně frekvence jádra ω_o). Jsme-li mimo rezonanci, pohyb vektoru je stále pomalý ve srovnání s rychlostí rotace ω_o.

NMR excitace

- Nyní potřebujeme, aby systém absorboval energii. Zdrojem je oscilující elektromagnetické záření s frekvencí ω_o generované střídavým proudem :

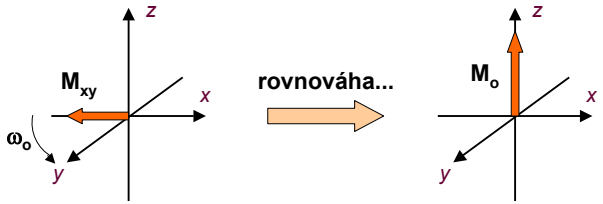


- Je-li frekvence RF pole $\mathbf{B_1}$ a precesního pohybu magnetizace $\mathbf{M_o}$ stejná, je dosaženo tzv. **rezonanční podmínky** a systém absorbuje energii.

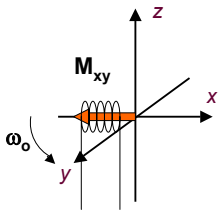
- Vzájemnou interakcí RF pole $\mathbf{B_1}$ a magnetizace $\mathbf{M_o}$ dojde k jejímu překlopení kolem tohoto pole $\mathbf{B_1}$ o úhel β, který odpovídá velikosti dodané energie a době jejího působení.

Návrat magnetizace M_o zpět do rovnováhy (detekce NMR signálu)

- Při absenci externího mag. pole B_1 se M_{xy} bude snažit přejít zpět na M_o (rovnováha) obnovením původní distribuce populací N_α / N_β . Tento jev se nazývá **relaxace**.



- Oscilace vektoru M_{xy} vytváří fluktující magnetické pole, které generuje elektrický proud v přijímací cívce:

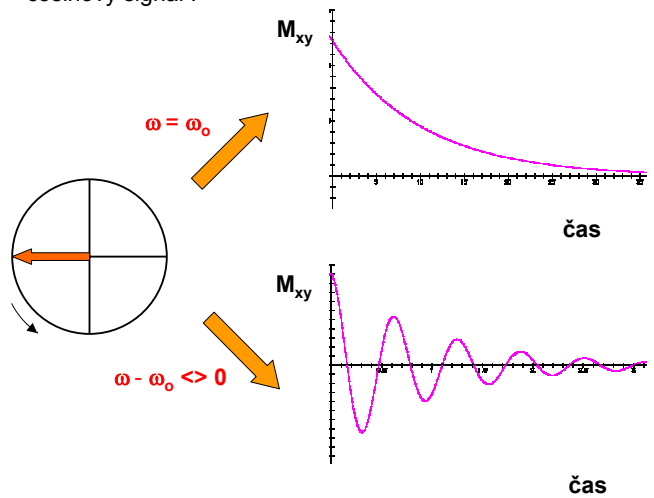


Přijímací cívka (-x) ⟹ **NMR signál**

Free Induction Decay (FID)

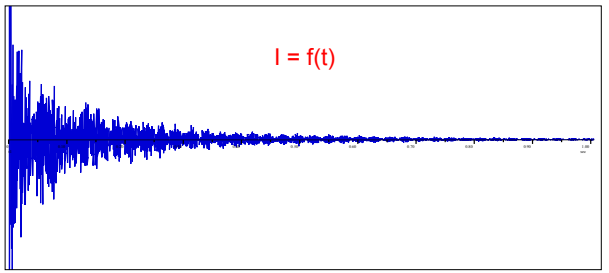
- Nyní analyzujme signál, který se objeví v přijímací cívce po sklopení vektoru makroskopické magnetizace do roviny **<xy>** (π **/ 2** puls).

- Po aplikaci RF pulsu se vzorek postupně dostane do rovnováhy, t.j.obnoví se původní obsazení energetických hladin a vektor makroskopické magnetizace se dostane zpět do osy z, okolo níž vykonává precesní pohyb. V rotující soustavě souřadnic $\omega - \omega_o$. Relaxace M_o v rovině **<xy>** je exponenciální. V přijímací cívce detekujeme zanikající cosinový signál :

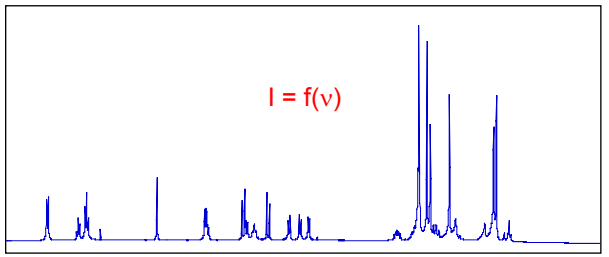


FID (pokračování)

- V reálném vzorku je mnoho spinových systémů, jejichž frekvence jsou odlišné od frekvence $\mathbf{B_1}$ (***carrier frequency***). Protože jsme efektivně excitovali všechny tyto spiny, dostaneme kombinaci signálů a různé frekvenci ***Free Induction Decay*** (***FID***):

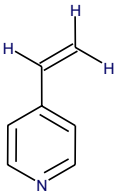


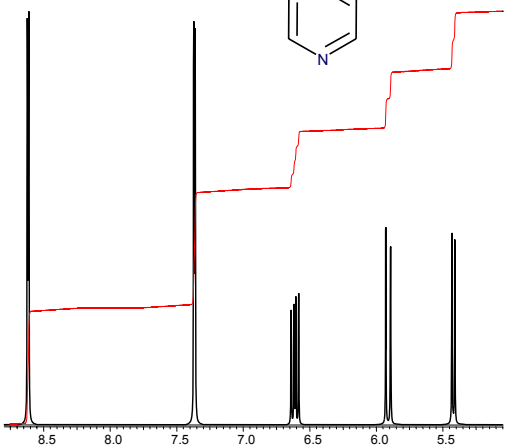
- Po zpracování Fourierovou transformací dostaneme:



Základní NMR parametry

- Chemický posun
- Interakční konstanta
- Počet signálů ve spektru
- Intenzita signálu
- Relaxační vlastnosti jádra (NOE)





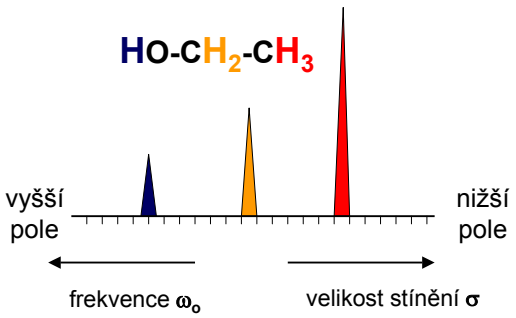
Chemický posun

- 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_o a lokálním magnetickým polem B_{loc}.

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

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



Původ σ (B_{loc})

- Stínění jader závisí na elektronové hustotě v jejich okolí. Celkový efekt lze rozložit na jednotlivé příspěvky:

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

σ^{dia} je diamagnetický příspěvek, který má původ v magnetickém poli vytvářeném elektrony orbitalů ***s***. Je opačně orientován než externí magnetické pole B_o.

- σ^{para} je paramagnetický příspěvek generovaný elektrony orbitalů ***p*** (rovněž π elektrony vazeb…). Je souhlasný se směrem B_o.

- Třetí příspěvek, σ^{I}, odráží vliv sousedních atomů a skupin a může být jak kladný, tak záporný. Toto je příspěvek, který způsobuje, že jádra stejného typu mají v různých molekulách rozdílné chemické posuny.

Původ σ (pokračování)

- V případě ^{1}H dominuje diamagnetický příspěvek σ^{dia}, protože ^{1}H má pouze ***1s*** orbital. Naopak ^{13}C obsahuje ***p*** electrony, kterých je více, proto dominuje paramagnetický příspěvek σ^{para}.

- Výpočet chemického posunu je záležitost kvantové mechaniky.

- Většina efektů může být kvalitativně popsána s využitím σ^{dia} a σ^{I} pro protony a přidáním σ^{para} pro jádra ostatních prvků.

- Hlavními složkami stínící konstanty je ***indukční a mezomerní efekt*** a ***anizotropie chemického posunu***.

NMR škála (δ, ppm)

- Každý signál ve spektru je charakterizován svou pozicí vyjádřenou ve frekvenčních jednotkách. Problémem je však skutečnost, že $\mathbf{B_{loc}}$ je mnohem menší než $\mathbf{B_o}$ (rozsah tisíce Hz oproti milionům Hz) a také závislost na velikosti $\mathbf{B_o}$.

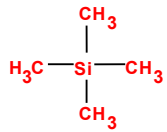
- Proto používáme relativní stupnici a vztahujeme posun každého signálu k signálu referenčnímu **(standardu).**

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

ppm (parts per million)

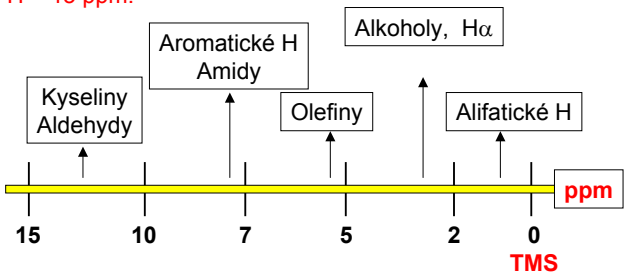
- Potom je pozice signálu stejná pracujeme-li se 100 MHz (2.35 T) nebo 900 MHz (21,14 T) magnetem.

- Př. ***Tetramethylsilan*** (**TMS**) je standarden jak pro ^{1}H, tak pro ^{13}C spektroskopii. Je dobře rozpustný, inertní a poskytuje vždy jeden signál.

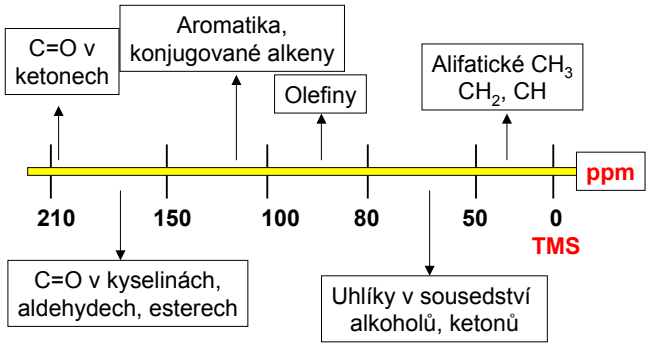


Příklady rozsahů chemických posunů v ppm

- ^{1}H ~ 15 ppm:

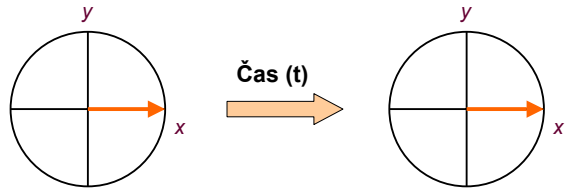


^{13}C ~ 220 ppm:

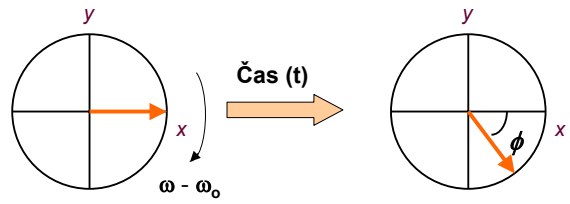


Chemický posun v rotující soustavě souřadnic

- Analyzujeme pouze složku magnetizace v rovině **<xy>**. Uvažujme nejprve signál, jehož ω_o je rovna ω RF pole B_1 (frekvence signálu je stejná jako tzv. nosná frekvence. Vidíme, že nedochází k žádné změně.



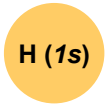
- Nyní uvažujme případ, kdy se tyto frekvence liší ($\omega - \omega_o \neq 0$), vektor $\mathbf{M_{xy}}$ se bude vyvíjet (pohybovat) v čase. Úhel, o který se pootočí je úměrný času a rozdílu úhlových rychlostí $\omega - \omega_o$.



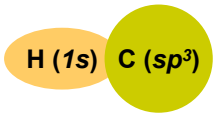
$$\phi = (\omega - \omega_o) * t$$

Indukční efekt.

- Izolovaný atom ^1H má symetrický orbital ***1s.***



- Nyní přidáme -CH_3, čímž získáme methan. Elektronový oblak ^1H (kteréhokoliv ze 4) se deformuje vlivem elektronegativnějšího atomu uhlíku, který bude přitahovat elektrony ***1s.***



- Tímto způsobem se sníží elektronová hustota okolo jader ^1H, dojde k jejich ***odstínění*** a posunu k vyšším hodnotám magnetického pole (ppm). Nahradíme-li jeden z vodíků halogenem, pozorujeme, že čím je příslušný halogen elektronegativnější, tím dochází k většímu odstínění ostatních jader ^1H.
  Jinými slovy, s rostoucí elektronegativitou připojeného atomu (skupiny atomů), klesá stínící konstanta σ.

σ (HF) < σ (HCl) < σ (HBr) < σ (HI)

Indukční efekt (pokračování)

	H-CH_3	H-CH_2I	H-CH_2Br	H-CH_2Cl	H-CH_2F
E	2.1	2.5	2.8	3.0	4.0
δ	0.23	1.98	2.45	2.84	4.13

- Skupiny vykazující výrazný indukční efekt jsou např. **-NO_2, -OH, -SH, -NH_2**…….

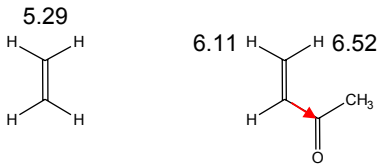
- Snížení stínění lze též dosáhnout např. prodloužením uhlíkového řetězce:

3.05 **H-CH_2-Cl** 1.42 **H-CH_2-CH_2-Cl** 1.04 **H-CH_2-CH_2-CH_2-Cl**

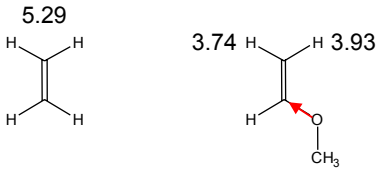
Mezomerní efekt

- Nyní se podívejme na ethylen různě substituovaný skupinami, které mají kladný a záporný **mezomerni efekt.**

- Porovnáme-li posun olefinických vodíků ethylenu a methylvinylketonu, vidíme, že je karbonylová skupina svým záporným mezomerním efektem **–M** odstíní. Dojde k jejich posunu k vyšším hodnotám ppm.

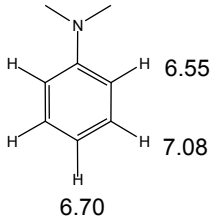


- Naproti tomu methoxy skupina s kladným mezomerním efektem (dodává elektrony do systému) zvyšuje elektronovou hustotu na sledovaných atomech vodíku **+M**, čímž dojde k jejich posunu k nižším hodnotám ppm (zvýší se jejich stínění):

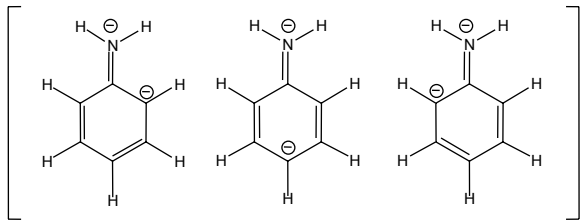


Mezomerní efekt (pokračování)

- Stejná pravidla platí i pro aromatický systém. Máme-li anilin (NH_2 vykazuje **+M** efekt), dojde k většímu stínění protonů, než v případě benzenu (7.24 ppm). Aromatický systém obsahuje více elektronů.

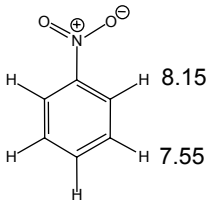


- Z rezonančních struktur je vidět větší elektronová hustota v polohách ***ortho*** *a* ***para***. Protony v těchto polohách jsou tedy více stíněny a tedy posunuty k nižším hodnotám ppm.

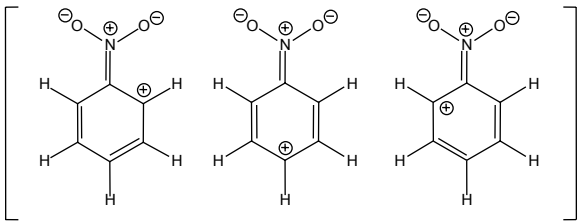


Mezomerní efekt (…)

- Na druhé straně, nitrobenzen vykazuje výrazný **-M** efekt.Všechny protony jsou více odstíněny a tím pádem posunuty k vyšším hodnotám ppm než benzen.



- Opět polohy ***ortho*** a ***para*** mají tento efekt výraznější.



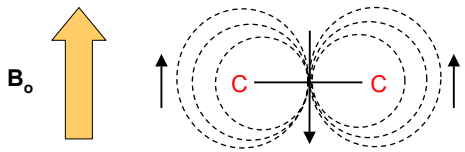
Anizotropní efekt

- Jakákoliv chemická vazba je **anizotropní**, protože je orientována v prostoru.

- Jestliže takovouto vazbu (vazebné elektrony) vložíme do externího magnetického pole, bude indukovat magnetický moment, který bude také anizotropní.

- Magnetické okolí protonů v okolí takovéto vazby bude též anizotropní. Lokální magnetické pole bude buď zvyšovat nebo naopak snižovat efektivní magnetické pole.
  Bude-li tento efekt kladný nebo záporný záleží na poloze příslušného atomu vodíku.

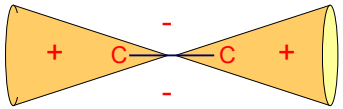
- Máme-li jednoduchou C-C vazbu, která má válcovou symetrii, indukovaný dipól bude mít střed uprostřed vazby, situace bude vypadat následovně:



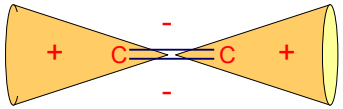
- Atomy vodíku, které se nacházejí na krajích této vazby budou odstíněny více, než atomy nacházející se nad nebo pod touto vazbou.

Anizotropní efekt (…)

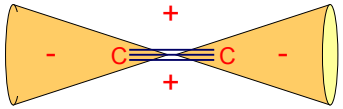
• Výpočtem lze získat přesně oblasti stínění a odstínění.



• Pro dvojnou vazbu (C=O, C=C) je tvar podobný, efekt je však díky π elektronům daleko výraznější:



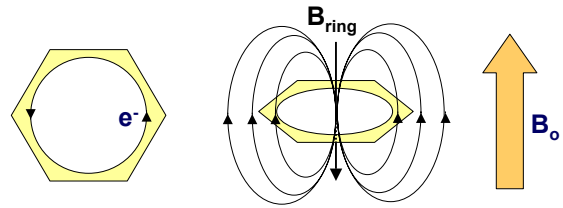
• Pro trojnásobnou vazby je situace obrácená:



„Ring current“ efekt

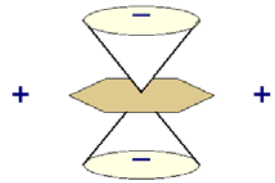
• **Anizotropní efekt** aromatického jádra je zesilován systémem konjugovaných dvojných vazeb.

• Siločáry indukovaného magnetického pole jsou kolmé k rovině aromatického kruhu.



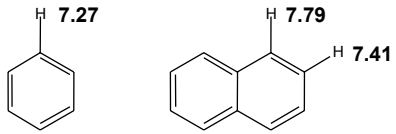
• Vodíky v rovině kruhu jsou odstíněny (posun k vyšším hodnotám ppm), zatímco vodíky nad nebo pod rovinou kruhu jsou stíněné (nižší hodnoty ppm).

• Výpočtem dostaneme podobné oblasti jako v případě jedno-, dvoj- nebo trojných vazeb.

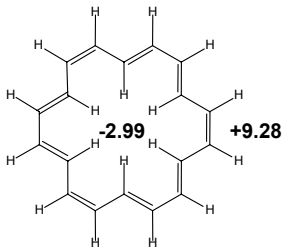


„Ring current“ efekt (…)

- Toto je důvod, proč je chemický posun aromatických protonů v rozmezí 6 to 9 ppm:

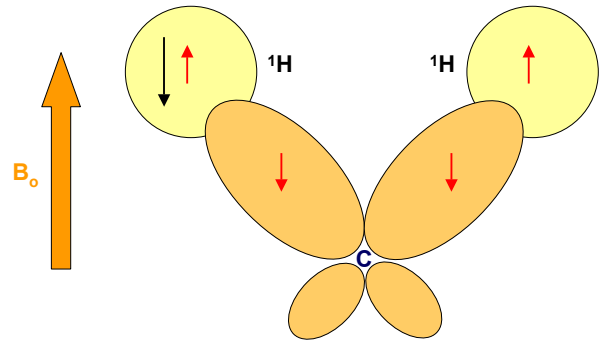


- Dalším příkladem tohoto efektu je ***[18]anulen:***



Interakční konstanta

- Energetické hladiny jednotlivých jader jsou ovlivňovány spinovými stavy jader v okolí. Toto je nazýváno **nepřímou spin-spinou interakcí.** Nepřímá interakce je to proto, že je zprostředkována vazebnými elektrony (na rozdíl od přímé dipól-dipólové interakce jaderných spinů):

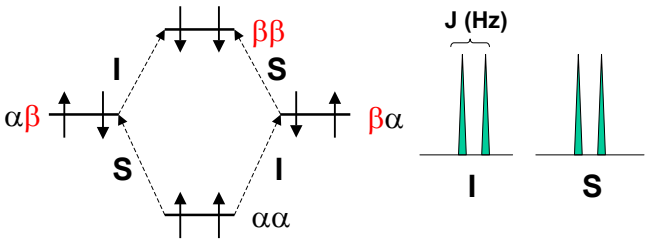


- Magnetický moment jádra polarizuje vazebné elektrony, resp. jejich magnetické momenty a tato polarizace je přenášena na další jádra.

$$E = J_{AB} * I_A * I_B$$

Interakční konstanta (pokračování)

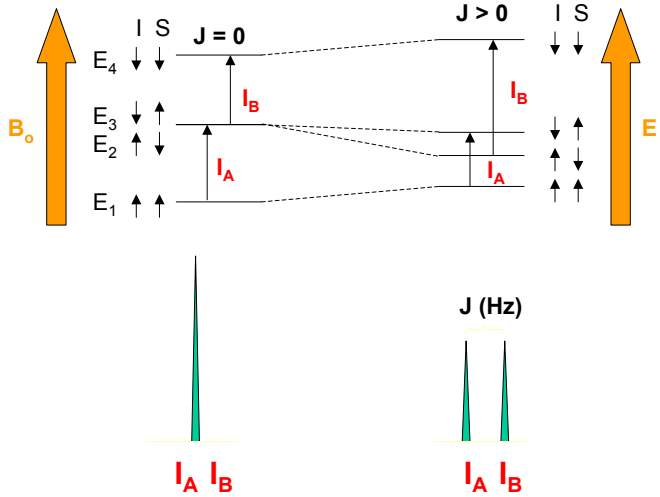
- Předpokládejme nyní systém dvou spinů IS, které jsou v interakci. Pokud je jejich spinové kvantové číslo ½, bude mít každý spin možnost přechodu mezi dvěma dvojicemi energetických hladin.



- Analyzujme nyní stav spinu **I**. Z předchozího schématu je zřejmé, že signál tohoto jádra je tvořen dvěma přechody I_A(αα ⇨ βα) a I_B (αβ ⇨ ββ).

- To samé platí o spinu **S**.

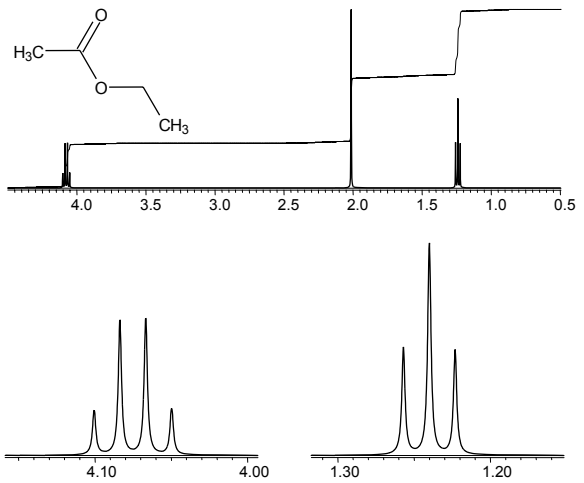
Interakční konstanta (…)



- Pokud je (**J = 0**), jejich energetický rozdíl je stejný, čemuž odpovídá stejná frekvence obou signálů (jsou degenerované) Ve spektru pozorujeme pouze jeden signál. V případě **J>0 (J<0),** jsou energetické rozdíly různé a dojde k rozštěpení signálu. Pozorujeme dva signály s poloviční intensitou. Jejich vzdálenost se nazývá skalární (nepřímá) spin-spinová interakční konstanta.

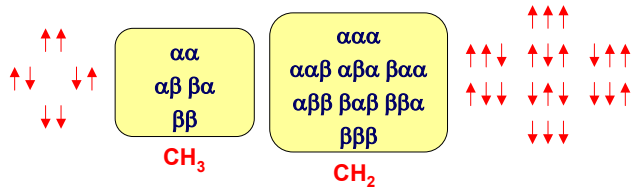
- **Důležitým rysem tohoto parametru je, že nezávisí na velikosti externího magnetického pole!!!**

Interakční konstanta (intenzita a počet čar)



- Každý atom ^1H ve skupině CH_2 „vidí“ **4 možné stavy** atomů ^1H v sousední skupině CH_3.
- Naproti tomu každý atom ^1H skupiny CH_3 „vidí“ **3 možné stavy** protonů CH_2 skupiny.
- 2 protony skupiny CH_2 a 3 protony skupiny CH_3 jsou navzájem ekvivalentní.

Interakční konstanta (pokračování)



- Je-li jádro **A** v interakci s ***n* jádry (spin ½),** která jsou identická je počet čar v multipletu A roven ***n + 1*** .
- Signál CH_2 skupiny se objeví jako ***kvartet* (4 čáry),** zatímco CH_3 skupina jako ***triplet* (3 čáry).**
- Je-li jádro **A** v interakci s ***n*** jádry, která mají spin I platí pro počet čar multipletu A:

$$m = 2\,n\,I + 1$$

- Vzdálenost jednotlivých čar v multipletu je rovna velikosti interakční konstanty v Hz. Je stejná v obou multipletech jak CH_2, tak CH_3 skupiny (7 Hz).

Interakční konstanta (pokračování)

- Z předchozího diagramu lze též odvodit intenzity jednotlivých čar multipletu. Protože existuje stejná pravděpodobnost, že se systém nalézá v jakémkoliv stavu (stavy v řádcích jsou energeticky degenerované), poměr intenzit je **1:2:1** pro CH_3 a **1:3:3:1** pro CH_2 skupinu.

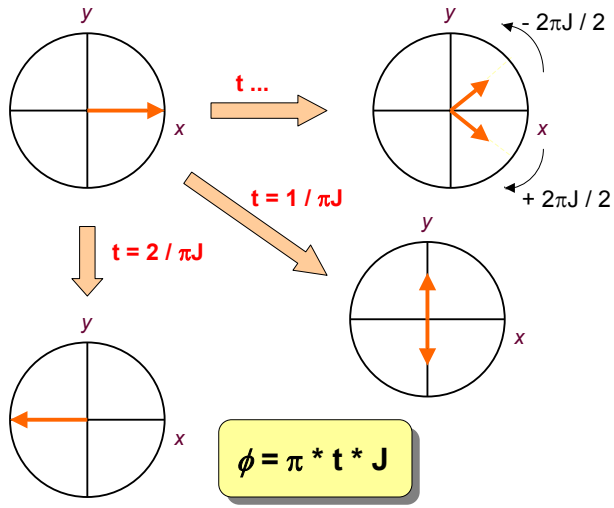
- Obecně lze intenzitu čar získat z koeficientů binomického rozvoje:

1 : n / 1 : n (n - 1) / 2 : n (n - 1) (n - 2) / 6 : ...

- Pro rychlou orientaci slouží tzv. **Pascalův trojúhelník**.

```
1
1 1
1 2 1
1 3 3 1
1 4 6 4 1
```

Interakční konstanta v rotující soustavě souřadnic

- Uvažujme soubor spinů **I**, které jsou v interakci s dalším spinem **S** a jejich rezonanční frekvence je rovna rezonanci **RF pole B_1 (ω B_1 je ω_o).**

- Situace je analogická chemickému posunu. V tomto případě máme dvě energetické hladiny, čemuž odpovídají dva signály znázorněné dvěma vektory, které se otáčejí proti sobě rychlostí, která je úměrná velikosti interakční konstanty J.