

Praktické příklady měření a interpretace chemické výměny a relaxací

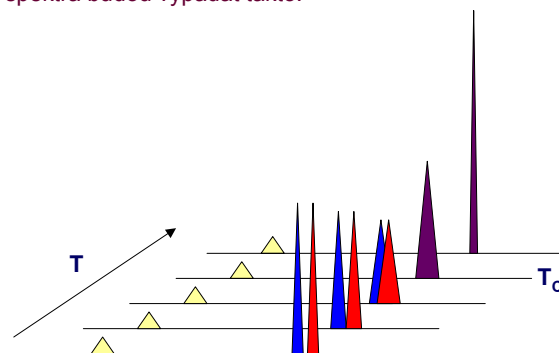
A. Chemická výměna

1. Dynamická NMR - teplotně závislá 1D spektra
2. Výměnná spektroskopie - EXSY (EXchange Spectroscopy)

B. Měření pohyblivosti pomocí ^{13}C relaxací

Měření rychlostních konstant

- Rychlost reakce závisí na ΔG reakce, které je teplotně závislé. Rychlost reakce se zvýší při zvyšování teploty T . NMR spektra budou vypadat takto:



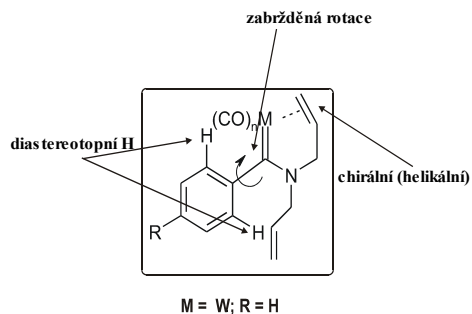
- Při **koalescenční teplotě** se rychlost o výměny k mezi jednotlivými stavy stává srovnatelná s rozdílem chemických posunů (v Hz),

$$\text{při } T_c: k = \pi(\delta\nu)/\sqrt{2}$$

- Chemická výměna ovlivňuje jak posun, tak tvar signálu a tedy má vliv na příčnou relaxaci

Studium rotační bariéry kolem vazby aromát-karben

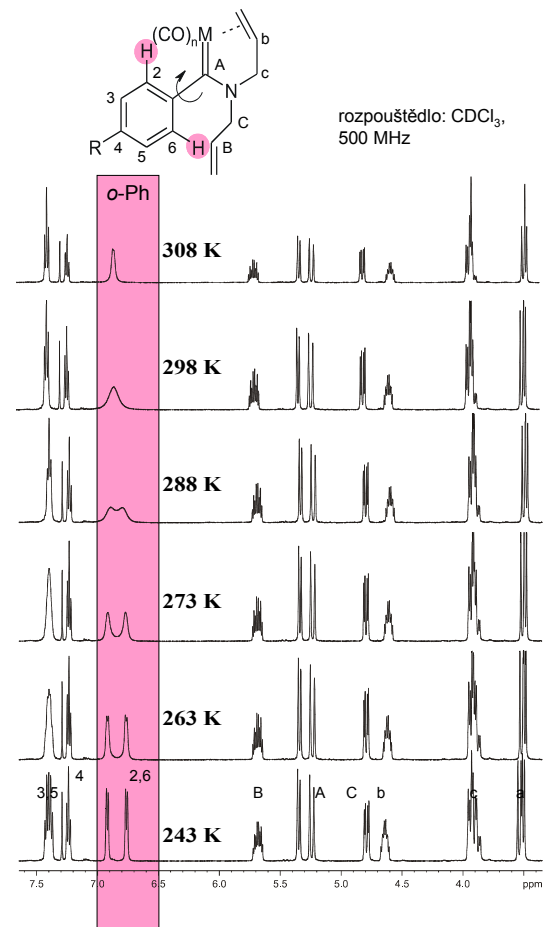
η^2 -chelatovaný (N,N-dialkylamino)(aryl)karben wolframu



Motivace:

Stanovení **původu bariéry rotace** ze dvou předpokládaných možností:

- 1) sterická interakce mezi aromatickým kruhem a karbenovou částí,
- 2) překryv aromatického π -systému s elektronově chudým karbenovým uhlíkem, který způsobuje zvýšení řádu vazby.



Hana Dvořáková, Tomáš Tobrman, Dalimil Dvořák, OMCOS Taipei 2001

Praktické aspekty měření

• Měří se základní 1D homonukleární spektra při různých teplotách. **Metodicky velmi jednoduché.**

• Je nutné zajistit:

přesnou kalibraci teploty (standardní vzorek MeOH 200-300 K, ethylenglykol 330-450 K),
stejně **kvalitní naladění magnetu** v celém rozsahu teplot.
nutný **vyšší poměr signál/šum**.

Zpracování spekter a výpočty

O co je jednodušší měření, o to jsou těžší výpočty.

Nezbytné je velmi **pečlivé zpracování spekter**:

Fourierova transformace - **bez LB a jiných apodizací**,
fázování,

kvalitní odečtení pozadí (baseline correction)

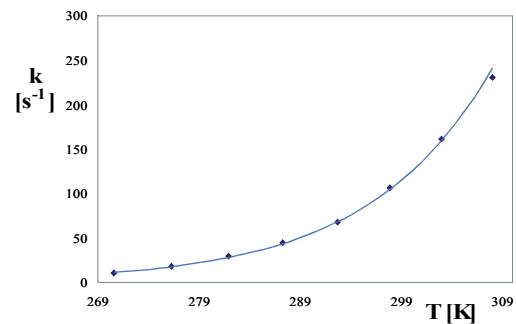
Zpracování spekter a výpočty (pokrač.)

Rychlostní konstanty chemické výměny se získají **fitováním pološířek a poloh příslušných rezonancí** (např. program **g-NMR**).

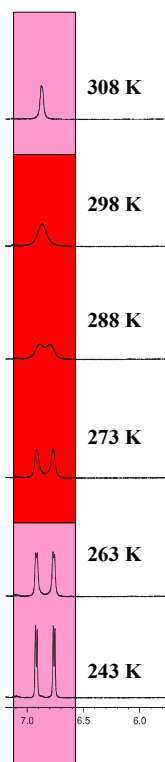
U pomalé výměny: $\Delta\nu = k/\pi$,
v přechodné oblasti je závislost složitá.

Správné nařizování signálů je překvapivě moc citlivé na kvalitu zpracování spekter!!!

Získají se rychlostní konstanty při každé měřicí teplotě.

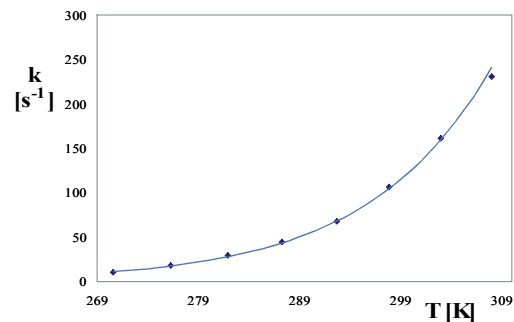


Důležité poznámky:



Relativně přesně se rychlostní konstanty získají jen při teplotách, kdy je rozšíření čáry >> než „přirozená“ šířka čáry (bez chemické výměny), tj. v relativně malém rozmezí kolem teploty koalescence.

„Přirozená“ šířka čáry není *a priori* známa - může se mezi jednotlivými signály lišit. A navíc se mění s teplotou, což běžný výpočet zanedbává.



$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}}$$

ΔG^\ddagger aktivační volná energie ($\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$)

ΔH^\ddagger aktivační enthalpie

ΔS^\ddagger aktivační entropie

k_B Boltzmannova konstanta $1.3805 \times 10^{-24} \text{ J/K}$

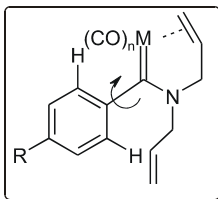
h Planckova konstanta $6.6256 \times 10^{-34} \text{ Js}$

R univerzální plynová konstanta 8.3144 J/K/mol

T teplota v K

Výsledek

Obdobná měření byla provedena pro různě substituované (R) deriváty.

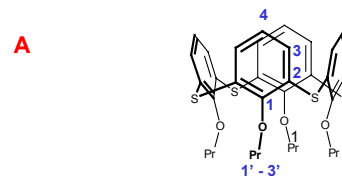


R	ΔH^\ddagger kJ/mol	ΔS^\ddagger J/mol/K	ΔG^\ddagger_{298} kJ/mol
CF ₃	81.8 ± 9.5	53.0 ± 17	66.5
CO ₂ CH ₃	73.4 ± 2.5	20.1 ± 4.4	67.7
H	59.8 ± 4.5	9.0 ± 8.2	62.5
Cl	55.8 ± 1.2	-18.6 ± 2.2	61.4
CH ₃	49.1 ± 1.6	-34.2 ± 3.0	59.3
OCH ₃	39.6 ± 2.5	-50.7 ± 4.8	54.7

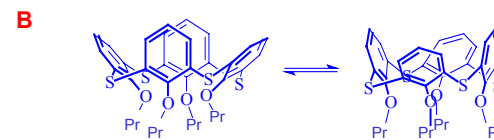
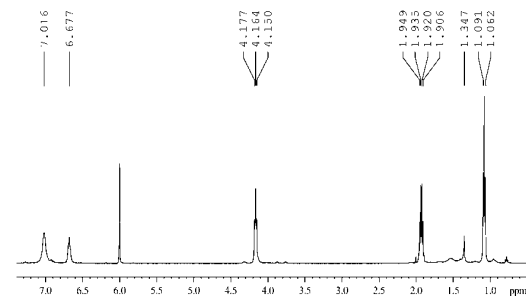
↑ electron acceptors
 ↓ electron donors

- Bráněná rotace je **enthalpicky řízená reakce**.
- Měření různých derivátů prokázalo, že bariéra rotace je vyšší pro substituenty, které jsou akceptory elektronů. **Původ bariéry rotace je tedy sterická interakce mezi aromatickým kruhem a karbenovou částí.**

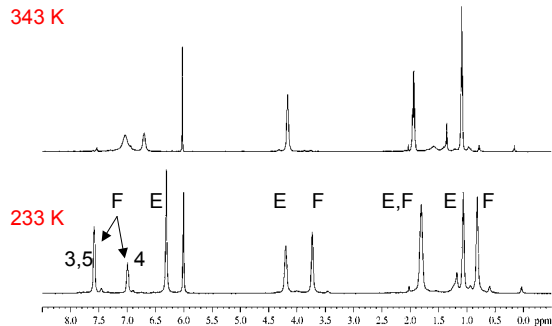
Konformační výměna v kalix[4]arenech



Tetrapropoxythiokalix[4]aren - konický konformer, ¹H spektrum v C₂D₂Cl₄, teplota 373 K

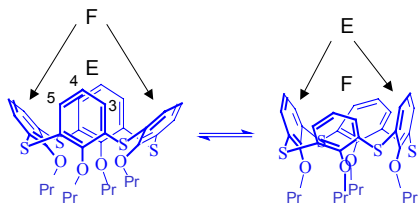


Odpovídá spektrum statické struktury **A** nebo dynamické rovnováže **B**?



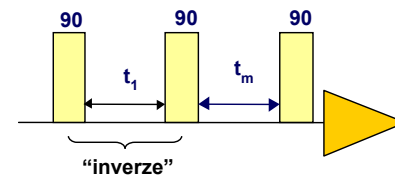
Spektra při nižších teplotách dokazují, že se jedná o dynamickou rovnováhu **B**.

Počet signálů ve spektru souvisí se symetrií molekuly - čím vyšší symetrie, tím větší počet degenerovaných signálů.



chemická výměna mezi polohami E ↔ F

2D EXSY (EXchange Spectroscopy)

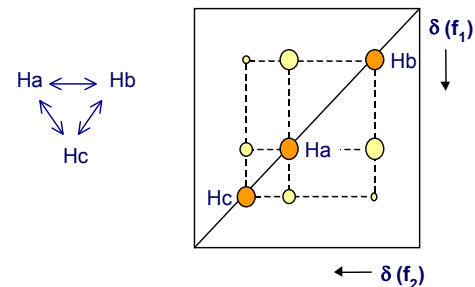


Během směšovacího času t_m dochází k přenosu magnetizace vlivem chemické výměny.

V 2D spektru jsou v obou dimenzích chemické posuny, mezi vyměňujícími se spiny jsou krosníky.

Velikost krosníků závisí na rychlosti chemické výměny.

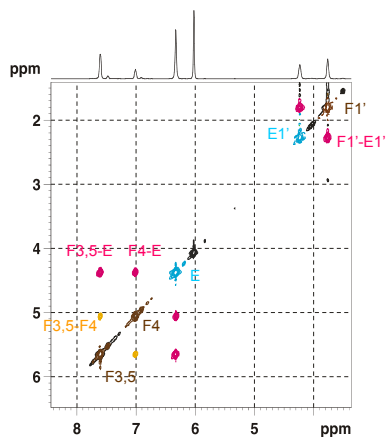
Sekvence je totožná s NOESY - ve spektru budou též krosníky v důsledku NOE.



Poznámka: 1D EXSY je totožná s 1D NOESY (diferenční NOE). Výběr 1D nebo 2D sekvence je dán jen počtem počtem krosníků, které chceme analyzovat - v 1D excitujeme jediný signál jako „zdroj“ chemické výměny, ve 2D sekvenci takto slouží všechny signály.

EXSY - výměnná spektroskopie

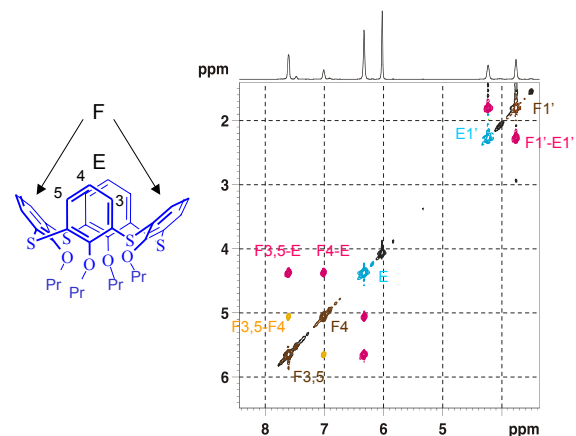
Měření rychlosti chemické výměny analýzou pološířek v 1D spektrech je komplikováno náhodným překryvem aromatických signálů kruhů E. Proto je výhodnější EXSY (v tomto případě 2D).



Toto spektrum: 237.5 K, $t_m = 200$ ms

Krospíky:
chemická výměna: F3,5-E, F4-E, F1'-E1'
NOE: F3,5-F4

EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.



Integrace krospíků i diagonálních píků ve 2D spektru:

- Diagonální píky vždy slouží jako **reference**.
- Pro stanovení rychlosti chemické výměny $A \rightarrow B$ potřebujeme relativní **velikost krospíku** $I(A-B)$ vzhledem k velikosti $I(A)$ (zdroje ch. výměny).
- Krospíky, **symetrické** vzhledem k diagonále, jsou vždy **stejné** (pokud ne, je to artefakt) $I(A-B) = I(B-A)$.
- Můžeme použít jen dobře separované signály (signál E je nepoužitelný!)

EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.

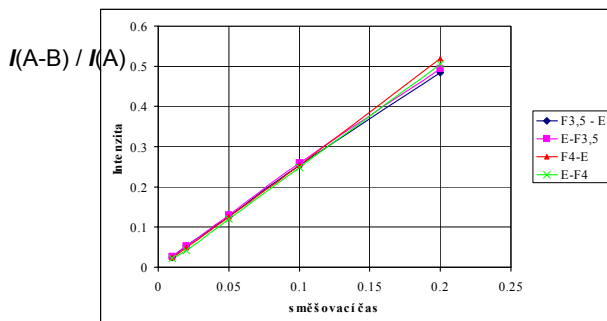
Změříme spektra pro několik hodnot směšovacího času t_m .
Obecně (tj. v případě nesymetrické výměny, $[A] \neq [B]$) \Leftrightarrow
 $(I(A) \neq I(B))$ jsou rychlostní konstanta dány:

$$I(A-B) / I(A) = k(A \rightarrow B) * t_m$$

$$I(A-B) / I(B) = k(B \rightarrow A) * t_m$$

Tento vzorec platí jen pro „počáteční nárůst“, který je lineární.

Odchylka od linearity je způsobena členy s vyššími mocninami t_m ($t_m^2, t_m^3, t_m^4, \dots$), které jsou pro dostatečně malé t_m zanedbatelné (tzv. spinová difúze).



$$I(A-B) = F_{3,5-E}; F_{4-E}$$

$$I(A) = F_{3,5}; F_4$$

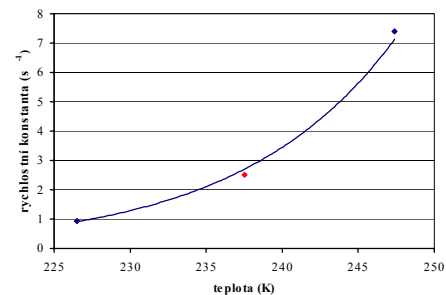
směšovací časy: 10, 20, 50, 100, 200 ms

EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.

V našem případě je chemická výměna symetrická ($[E]=[F]$) a tedy jako reference postačí diagonální signály F a nepotřebujeme překrývající se aromatické signály E.

$$k(E \leftrightarrow F) = 2.51 \text{ s}^{-1}$$

Podobně se změní rychlostní konstanta při jiných teplotách a spočítají se aktivační parametry.



$$\Delta G^\ddagger = 56.0 \text{ kJ/mol} \text{ aktivační volná energie při } 337 \text{ K}$$

$$\Delta H^\ddagger = 43.7 \text{ kJ/mol} \text{ aktivační enthalpie}$$

$$\Delta S^\ddagger = -51 \text{ J/mol/K} \text{ aktivační entropie}$$

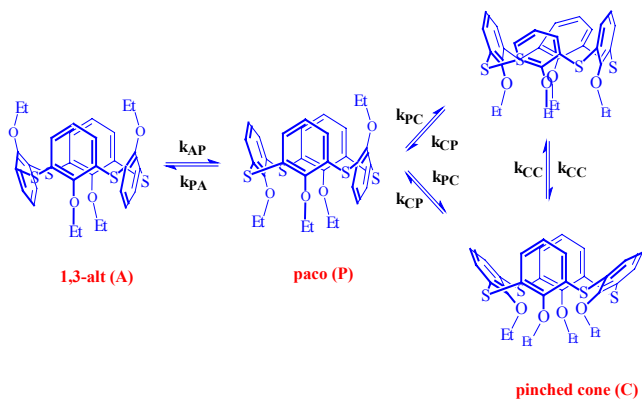
Srovnání EXSY a měření pološířek signálu

- + EXSY je přesnější než měření pološířek signálu,
- + EXSY nevodí složitá reakční schémata,
- EXSY je mnohem pracnější - pro jeden bod teplotní závislosti je třeba změřit řadu spekter (třeba 5),
- x obě metody pokrývají rozdílný rozsah rychlostí chemických výměn:
 - EXSY - pomalá výměna, která příliš nerozšiřuje čáry (nesmí docházet k překryvu),
 - měření pološířek je nejpřesnější, když chemická výměna rozšiřuje čáru maximálně, tj. v oblasti koalescence (oblast přechodu mezi pomalou a rychlou výměnou).
- = Z hlediska časových režimů chemické výměny jsou tyto metody komplementární.
- = Měření rychlé výměny, která znatelně nerozšiřuje signál je obtížné. Pomoci může měření relaxační doby T_2 .

EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.

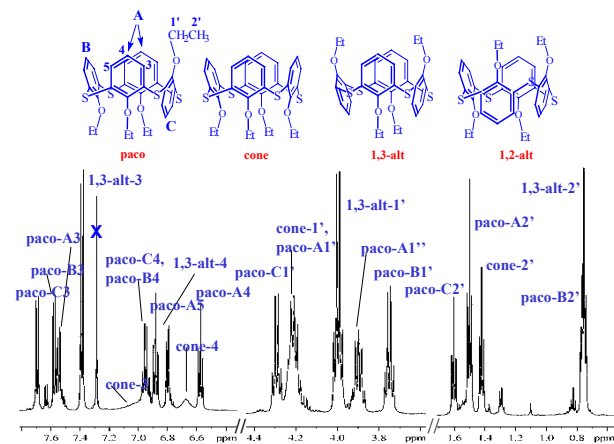
Případ, kdy je použití EXSY nezbytné: komplikovanější reakční schéma.

Chemická výměna konformérů tetraethyletheru thiakalix[4]arenu.



Různé konformery mají různou koncentraci a symetrii - výměna proto vesměs **není symetrická**. Jednotlivé rychlostní konstanty jsou odlišné (celkem 5 různých konstant).

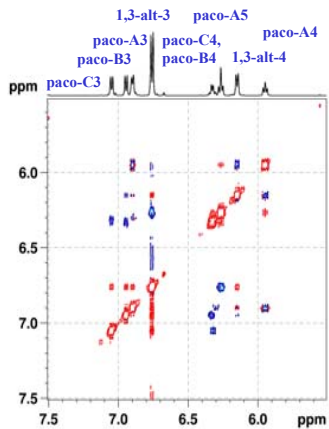
EXSY - výměnná spektroskopie



^1H spektrum tetraethoxythiakalix[4]arenu v CDCl_3 při 303 K.

Koncentrace jednotlivých konformérů jsou různé, vzájemně se vyměňující se signály mají rozdílnou míru degenerace. Je to **nesymetrická chemická výměna**.

EXSY - výměnná spektroskopie



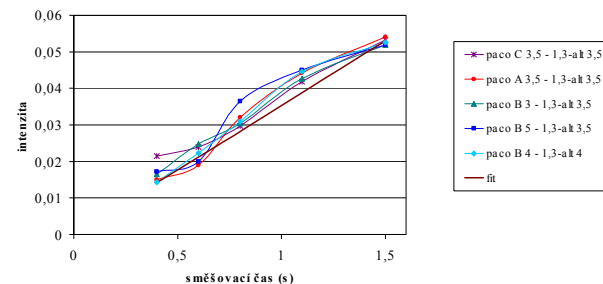
^1H NOESY (EXSY) spektrum aromatické oblasti tetraethoxythiakalix[4]arenu v $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$ při 298 K, $t_m = 1.5$ s.
Kladné píky (červené) = diagonála a chemická výměna,
záporné píky (modré) = NOE.

Koncentrace jednotlivých konformérů jsou různé, vzájemně se vyměňující se signály mají rozdílnou míru degenerace. Je to nesymetrická chemická výměna.

Ve spektru jsou vidět jen signály 1,3-alt a paco konformérů. cone je rozšířený v blízkosti koalescenční teploty chemické výměny pinched cone - pinched cone.

EXSY - výměnná spektroskopie

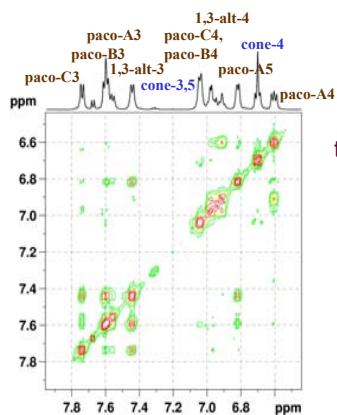
Závislost relativní intenzity krospektrů na směšovací čase.



$k_{PA} = 0,0238 \text{ s}^{-1}$ při 298 K

EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.

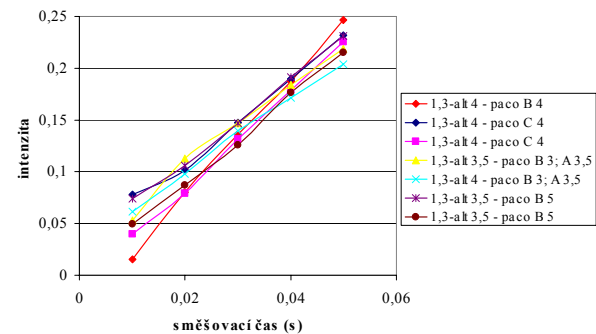
Při vyšší teplotě jsou v ^1H spektru pozorovatelné i signály cone konformeru.



$t_m = 0.05$ s, 363 K

EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.

Závislost relativní intenzity krosníků na směšovací čase

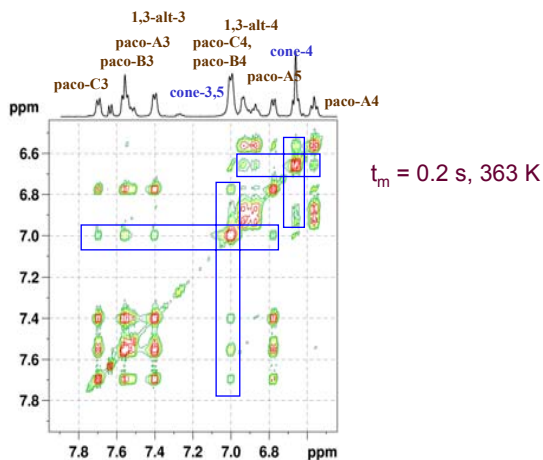


$k_{PA} = 4,97 \text{ s}^{-1}$ při 363 K

Poměrně rychlou chemickou výměnu paco \rightarrow 1,3-alt je potřeba měřit při velmi krátkých směšovacích časech. Za těchto podmínek nejsou měřitelné krosníky v důsledku výměny paco \leftrightarrow cone.

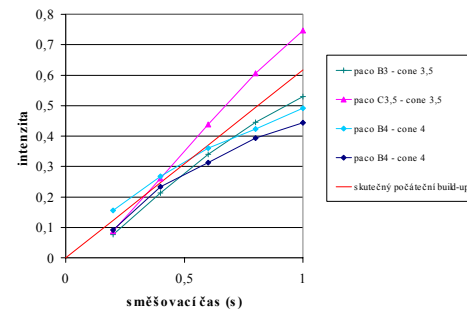
EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.

Pro měření výměny paco → cone je nutné použít mnohem delších směšovacích časů.



EXSY - výměnná spektroskopie - pokrač.

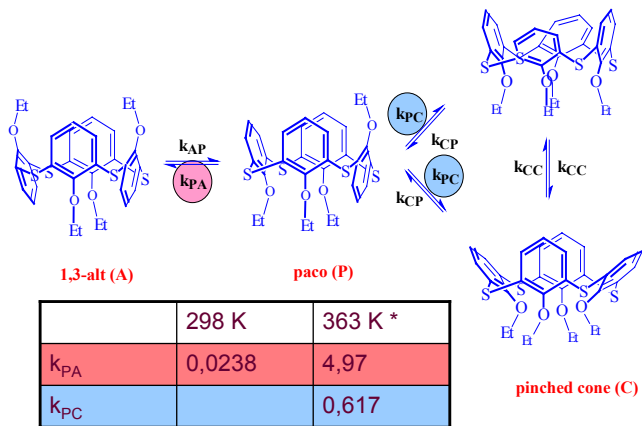
Závislost relativní intenzity krospektrů na směšovacím čase



$$k_{PC} = 0,617 \text{ s}^{-1} \text{ při } 363 \text{ K}$$

- Vlivem mnohem (cca 10x) rychlejších procesů dochází k rozsáhlé spinové difúzi a počáteční lineární část výstavbové křivky prakticky neexistuje.
- Je vhodné/nutné použít přesný výpočet pomocí relaxační a výměnné matice - na řádcích a sloupcích jsou jednotlivé spiny, maticové prvky obsahují příslušné rychlosti chemických výměn, kros-relaxační rychlosti a na diagonále též podélné relaxační rychlosti.

EXSY - výměnná spektroskopie - závěr



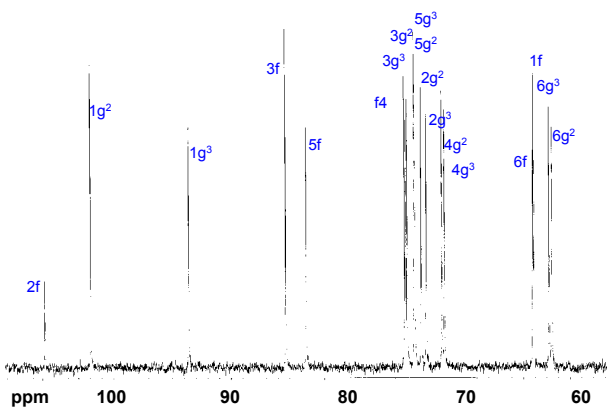
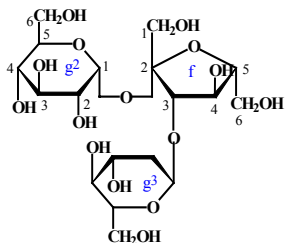
* výměna k_{CC} je při 363 K rychlá - pro vyhodnocení EXSY ji není třeba uvažovat

Závěr:

- Pomocí EXSY lze studovat i systémy, ve kterých dochází k mnoha různým přenosům magnetizace (s odlišnými rychlostmi) vlivem NOE a chemické výměny.
- Je potřebné matematicky rigorózně vyhodnocení (neplatí aproximace počátečního lineárního nárůstu).
- Užitečná jsou měření při různých teplotách. Aktivační parametry jednotlivých procesů se stanoví v různých teplotních režimech. Přitom se mění relativní rychlosti různých přenosů magnetizace.

Měření pohyblivosti pomocí ^{13}C relaxací

Lokální pohyblivost trisacharidu melezitidy



^{13}C NMR spektrum, $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 7/3, 303 K, 11.8 T

Lokální pohyblivost trisacharidu melezitidy

Základní princip

- Reorientační molekulová dynamika moduluje jadernou relaxaci.
- Jádra ^{13}C v molekule cukru, která nesou přímo vázaný proton, relaxují téměř výlučně vlivem přímé dipól-dipólové interakce s tímto protonem.

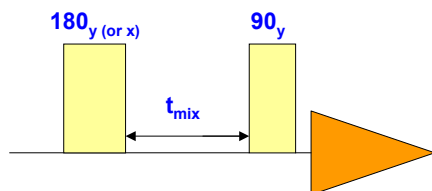
Experimentální metodika

- Měření ^{13}C relaxačních dob T_1 , T_2 a heteronukleárního NOE při různých intenzitách magnetického pole B_0 . Podmínkou je režim mimo „extrémní zúžení“ (extreme narrowing) - musí být $\omega\tau_M \geq 1$, aby relaxační doby byly závislé na B_0 .
- Základní pulzní sekvence: inversion recovery (T_1)
spinové echo - CPMG (T_2)
měření stacionárního heteronukleárního NOE

Metody měření relaxačních dob

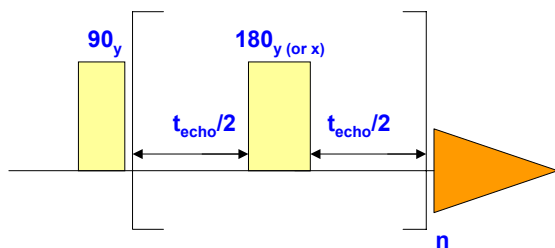
Inversion recovery

- Podélná relaxační doba T_1 – návrat po inverzi (inversion recovery).



CPMG

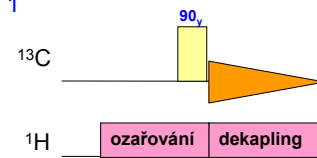
- Příčná relaxační doba T_2 - sekvence CPMG (Carr, Purcell, Meiboom, Gill) – mnohonásobné spinové echo s konstantním echočasem a proměnným počtem cyklů n .



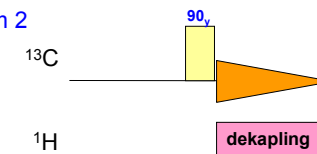
Měření heteronukleárního NOE

- heteronukleární stacionární NOE mezi ^{13}C a ^1H

Spektrum 1



Spektrum 2



NOE se získá jako podíl intenzit signálů {(spektrum 1) / (spektrum 2)}.

Maximální navýšení ^{13}C intenzity (tj. v režimu extrémního zúžení): $NOE = 1 + 0,5 \gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}} \cong 3$

Lokální pohyblivost trisacharidu melezitosa

Lipari-Szabóův přístup

Pro analýzu je nutný model pohybu molekuly jako celku a jejích částí.

Jeden z nejpřesnějších je **Lipari-Szabóův** „bezmodelový“ přístup (“model-free“ approach)

Předpoklady **Lipari-Szabóova modelu**:

- relaxace je modulována dvěma pohyby: globálním a lokálním
- oba pohyby jsou statisticky nezávislé
- globální reorientace je izotropní
- molekulární pohyb je charakterizován parametry:

τ_M	korelační čas globálního pohybu
S^2	parametr uspořádanosti (hodnota 0 - 1)
τ_e	korelační čas lokálního pohybu

Lokální pohyblivost trisacharidu melezitosa

Závislost jaderné relaxace na molekulárním pohybu

$$T_1^{-1} = \frac{n_H}{4} D^2 [J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H + \omega_C)]$$

$$T_2^{-1} = \frac{n_H}{8} D^2 [4J(0) + J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_C)]$$

$$\eta = \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_C} \right) \frac{6J(\omega_H + \omega_C) - J(\omega_H - \omega_C)}{J(\omega_H - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_H + \omega_C)}$$

Dipól-dipolární interakční konstanta:

$$D = (\mu_0 / 4\pi) \gamma_C \gamma_H \hbar r_{CH}^{-3}$$

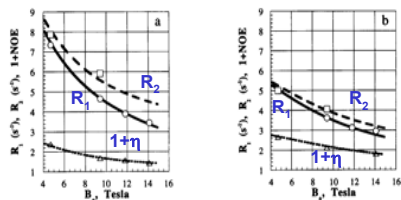
Lipari-Szabóovy spektrální hustoty :

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left(\frac{S^2 \tau_M}{1 + \omega^2 \tau_M^2} + \frac{(1 - S^2) \tau_e}{1 + \omega^2 \tau_e^2} \right) \quad \tau^{-1} = \tau_M^{-1} + \tau_e^{-1}$$

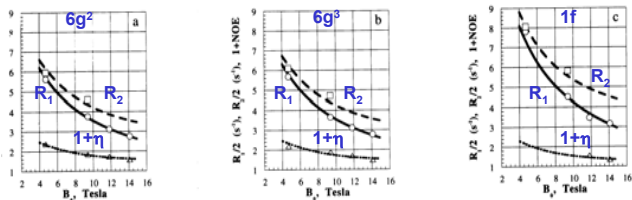
- Rotační molekulární pohyb ovlivňuje jadernou relaxaci prostřednictvím **spektrálních hustot** $J(\omega)$ - udávají (zhruba) „množství“ molekulárního pohybu **na frekvenci** ω . Pro jadernou relaxaci jsou nejvýznamnější ω_H , ω_C , $(\omega_H + \omega_C)$, $(\omega_H - \omega_C)$ a 0 s^{-1} .
- Při různém magnetickém poli B_0 se mění i **kruhové frekvence** ω , a tedy zkoumáme **pohyby při různých frekvencích**.

Lokální pohyblivost trisacharidu melezitosy

Závislost relaxačních rychlostí a NOE pro ^{13}C jádra cukerných kruhů ($R_1 = 1/T_1$, $R_2 = 1/T_2$) na magnetickém poli B_0 při teplotách 303 K (a) a 323 K (b).

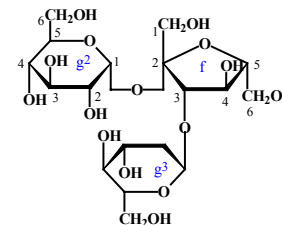


Závislost relaxačních rychlostí a NOE pro ^{13}C jádra exocyklických CH_2OH skupin na magnetickém poli B_0 při teplotě 303 K.



Dynamické charakteristiky trisacharidu melezitosy

Atom	T(K)	τ_M (ns)	S^2	τ_c (ns)
C-cykl.	303	0.67 ± 0.02	0.84 ± 0.01	
C- $6g^2$	303	0.67	0.61 ± 0.01	0.04 ± 0.01
C- $6g^3$	303	0.67	0.63 ± 0.02	0.03 ± 0.01
C-1f	303	0.81 ± 0.07	0.77 ± 0.02	
C-cykl.	323	0.35 ± 0.02	0.79 ± 0.01	
C- $6g^2$	323	0.35	0.59 ± 0.02	0.02 ± 0.01
C- $6g^3$	323	0.35	0.62 ± 0.02	0.01 ± 0.01
C-1f	323	0.38 ± 0.03	0.70 ± 0.03	
C-6f	323	0.35	0.52 ± 0.03	0.03 ± 0.01



Závěr:

- Jednotlivé kruhy jsou dynamicky ekvivalentní.
- Hydroxymethylová skupina C-1f je podstatně méně pohyblivá než ostatní hydroxymethylové skupiny.

Obecné:

- Pomocí měření relaxací se studuje pohyblivost jak malých tak velkých molekul a jejich funkčních skupin v časové škále 10^{-12} - 10^{-8} s.