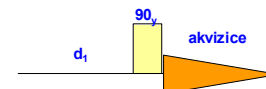


Kvantitativní NMR spektroskopie

- A. Jak správně integrovat NMR signály?
- B. Ukázky aplikací:
1. Analýza směsí: kinetika velmi pomalé chemické reakce
 2. Určení stereotakticity polymérů
 3. Průmyslové aplikace
 4. SNIF NMR (Specific site Natural Isotope Fractionation)

Jak správně integrovat NMR signály?

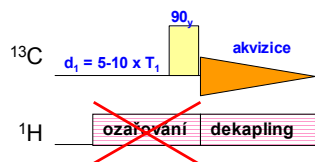
- Měření intenzit NMR signálů se prolíná s téměř všemi NMR aplikacemi.
- V této přednášce se omezíme na aplikace, kdy chceme z NMR spektra stanovit koncentraci měřených jader.
- Základní měřicí sekvence:



- Je nutné zajistit úplnou relaxaci signálu během relaxační periody d_1 ($8-10 \times T_1$).
- Stejněměrná excitace celého spektra = použití dostatečně tvrdých (silných) pulzů.
- Velmi vhodné je užití interního standardu (neinteragující látka – TMS, kapilára se standardem).
- Při zpracování signálu:
 - Signály se nesmí překrývat.
 - Vysoký poměr signál/šum.
 - Pečlivé fázování.
 - Odečtení pozadí!!!

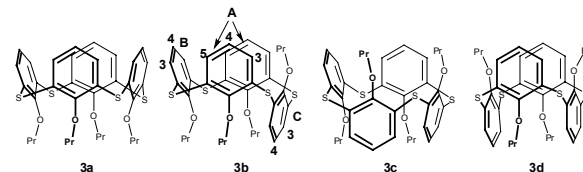
Jak správně integrovat NMR signály? - pokrač.

- Nesmí dojít k selektivnímu navýšení některých signálů (nutno zamezit přenosu magnetizace vlivem DD (NOE) i J-interakce).
- (Alternativně – je nutné přenos magnetizace přesně kontrolovat)
- Dekapling – omezit jen na dobu akvizice, na d_1 vypnout!!!

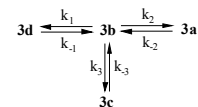


Měření kinetiky velmi pomalé reakce

Tetrapropoxythiakalix[4]aren v $C_2D_2Cl_4$. Synteticky bylo možné připravit jen 1,3-*alt* konformér. Ukázalo se, že za zvýšené teploty 393 K postupně dochází ke konformační přeměně na ostatní konforméry.



Reakční schéma:



Definice
rovnovážných
konstant:

$$K_{bd} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[3d]}{[3b]}$$

$$K_{ba} = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{[3a]}{[3b]}$$

$$K_{bc} = \frac{k_3}{k_{-3}} = \frac{[3c]}{[3b]}$$

Pohybové rovnice:

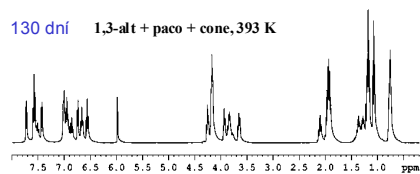
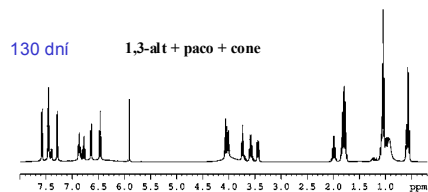
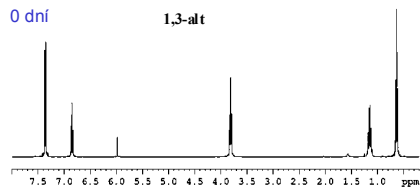
$$\frac{dc_d}{dt} = k_1c_b - k_{-1}c_d$$

$$\frac{dc_a}{dt} = k_2c_b - k_{-2}c_a$$

$$\frac{dc_c}{dt} = k_3c_b - k_{-3}c_c$$

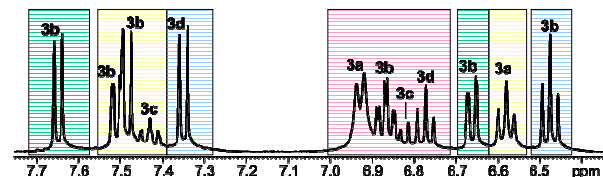
$$c_d^0 = c_a + c_b + c_c + c_d$$

Měření kinetiky velmi pomalé reakce - pokrač.

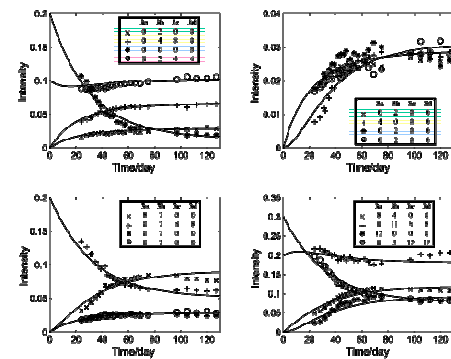


Měření kinetiky velmi pomalé reakce - pokrač.

Rozdělení spektra (na obrázku aromatická část) pro integraci:



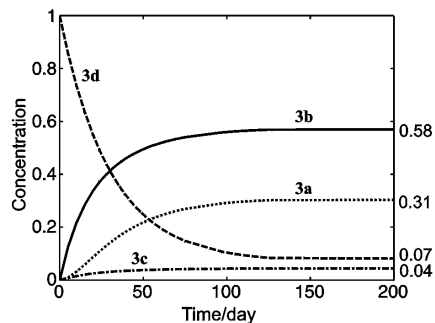
Časová závislost jednotlivých integrálů:



- Pro kvantifikaci řady spekter je nezbytná kalibrace intenzity.
- Nejlepší je interní standard - inertní látka, jejíž spektrum se nemění během studovaného děje (muže být v zatavené kapiláře).
- V příkladu: kalibrace na součet integrálů všech signálů kalixarenu.

Měření kinetiky velmi pomalé reakce - pokrač.

Výsledný časový vývoj koncentrací konformérů a tabulka rychlostních a rovnovážných konstant při 393 K.



i	$\frac{k_i}{10^{-7} \text{ s}^{-1}}$	$\frac{\Delta k_i}{10^{-7} \text{ s}^{-1}}$	G_{tr}^{\ddagger} kcal.mol ⁻¹	K	ΔK
1	0.43	0.04	23.9	0.117 ^a	0.011
-1	3.60	0.05	22.2		
2	3.74	0.18	22.2	0.531 ^b	0.009
-2	6.93	0.40	21.7		
3	8.4	2.5	21.6	0.077 ^c	0.007
-3	108	33	19.6		

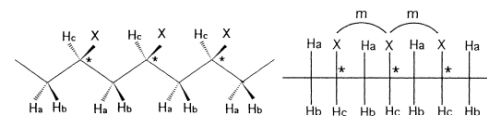
Závěr:

I integrace celých skupin překrývajících se signálů přinese dobré kvantitativní výsledky, pokud je provedeno odpovídající matematické zpracování.

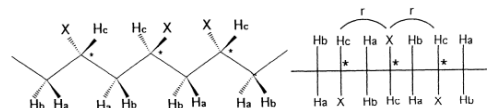
Určení konfigurace polymerů

Polymery na bázi vinylu mají v každé monomerní jednotce chirální uhlík. Podle konfigurace dvojice sousedních chirálních center rozlišujeme:

isotaktický polymer - dvojice = diáda je v *m* (meso) konfiguraci (souhlasná konfigurace)

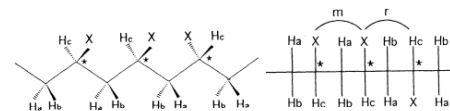


syndiotaktický polymer - diáda je v *r* (racemo) konfiguraci (nesouhlasná konfigurace)



Pokud uvažujeme trojice = triády:

mm (isotaktická), *mr* = *rm* (heterotaktická), *rr* (syndiotaktická)



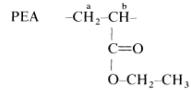
Obrázky z: Matsuzaki K., Uryu T., Asakura T.: NMR Spectroscopy and Stereoregularity of Polymers, Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Karger, Basel, 1996.

Určení konfigurace polymerů - pokrač.

Polymer bez stereoregulární struktury = ataktický

Podobně rozlišujeme diády, triády, tetrády (6), pentády (10), hexády, heptády.

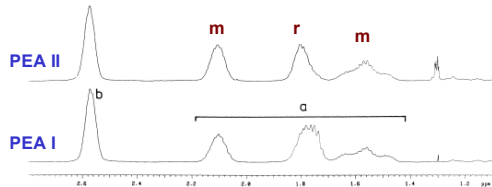
V ^1H NMR spektru polymethylmetakrylátu je vidět štěpení podle diád, triád, občas i tetrad.



PEA I - připraven pomocí „group transfer“ polymerace - měl by být ataktický

PEA II - připraven pomocí aniontové polymerace - měl by být isotaktický

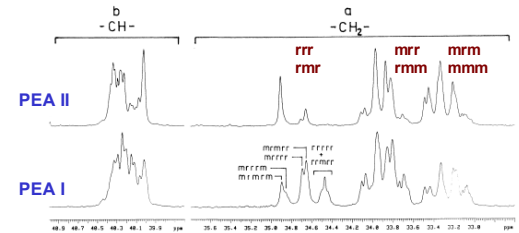
Částečná ^1H spektra dvou vzorků 10% PEA v C_6D_6 při 70 °C, 11.8 T



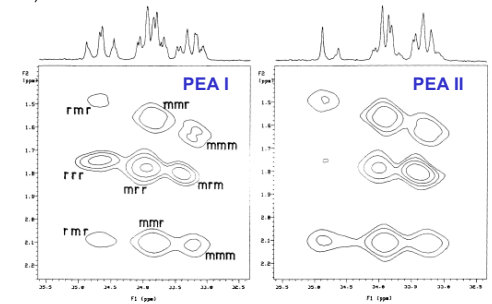
Určení konfigurace polymerů - pokrač.

V ^{13}C NMR spektrech jsou vidět triády, pentády, hexády.

Částečná ^{13}C spektra dvou vzorků 10% PEA v C_6D_6 při 70 °C, 11.8 T



Částečná ^1H - ^{13}C HMQC spektra dvou vzorků 10% PEA v C_6D_6 při 70 °C, 11.8 T



Určení konfigurace polymerů - pokrač.

Pomocí integrace NMR spekter je možné určit stereoregularitu polymeru, tj. ověřit např. mechanismus vzniku.

Stereoregularita polyméru závisí na mechanismu jeho vzniku, který se popisuje statisticky.

Experimentální a teoretické (na základě Bernoulliho nebo Markovovy statistiky) relativní koncentrace tetrad (nahore) a hexád (dole).

Tetrad	PEA I tetrad content			PEA II tetrad content			Integration limits in ^{13}C n.m.r. (ppm from HMDS)
	Bernoulli ($P_m = 0.53$)	First-order Markov ($P_{mm} = 0.49, P_{mr} = 0.43$)	Experimental	Bernoulli ($P_m = 0.65$)	First-order Markov ($P_{mm} = 0.83, P_{mr} = 0.445$)	Experimental	
mmmm	0.15 ₁	0.17 ₁	0.27	0.27 ₁	0.20 ₁	0.43	32.9-33.6
mmr	0.13 ₁	0.11 ₁		0.15 ₁	0.24 ₁		
mrm	0.26 ₁	0.26 ₁	0.51	0.30 ₁	0.32 ₁	0.45	33.6-34.3
mr	0.23 ₁	0.23 ₁		0.16 ₁	0.10 ₁		
rmr	0.12 ₁	0.10 ₁	0.22	0.08 ₁	0.13 ₁	0.12	34.3-35.1
rr	0.10 ₁	0.12 ₁		0.04 ₁	0.01 ₁		

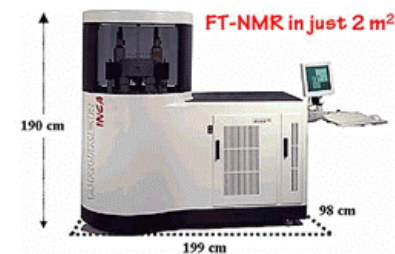
Hexad	PEA I hexad content			PEA II hexad content		
	Bernoulli ($P_m = 0.53$)	First-order Markov ($P_{mm} = 0.49, P_{mr} = 0.43$)	Experimental	Bernoulli ($P_m = 0.65$)	First-order Markov ($P_{mm} = 0.83, P_{mr} = 0.445$)	Experimental
rrrrr	0.02 ₁	0.03 ₁	0.06	0.00 ₁	0.00 ₁	0.00 ₁
rrrr	0.04 ₁	0.02 ₁		0.01 ₁	0.00 ₁	
rrrr	0.05 ₁	0.06 ₁	0.11	0.02 ₁	0.00 ₁	0.03 ₁
rrrr	0.11 ₁	0.11 ₁		0.03 ₁	0.03 ₁	
rrrr	0.05 ₁	0.04 ₁		0.03 ₁	0.03 ₁	
rrrr	0.02 ₁	0.02 ₁	0.05	0.01 ₁	0.00 ₁	0.08 ₁
rrrr	0.06 ₁	0.05 ₁		0.03 ₁	0.08 ₁	

Rutiní průmyslové aplikace NMR

Specializované, „jednoučelové“ NMR spektrometry
MINISPEC (Bruker) - mag. pole 0.23 - 1.41 T, připojení k PC



INCA - Integrated NMR Chemical Analyzer (Bruker) - kompaktní spektrometr vysokého rozlišení (6.3 - 11.8 T)



Rutinní průmyslové aplikace NMR - pokrač.

Potravinářský průmysl

- Určení obsahu pevných tuků a průběh tání tukových směsí a margarínů
- Obsah vlhkosti v margarínech
- Určení polárních částí v hluboko mrazících olejích
- Obsah oleje a tuku v potravinách, cukrářských produktech a krmivech pro zvířata
- Současné stanovení oleje a vlhkosti v olejninách
- Stanovení tuku a vlhkosti v produktech z mléčných prášků
- Stanovení vlhkosti v rýži a jiných potravinách
- Distribuce vody disperzích a gelech
- Velikost kapek v emulzích „voda v oleji“
- Studium procesů mrznutí
- Celkový obsah kaseinu v mléku



Ropný průmysl

- Celkový obsah vodíku v ropných destilátech a uhlí
- Obsah oleje ve vosku, břidlici, parafínu
- Porozita rud
- Viskozita nafty



Chemický a polymerní průmysl

- Přírodní vlákna, vlna a syntetická vlákna
- Hustota polyethylenu
- Rozpustnost xylenu v polypropylenu
- R21-hodnoty polypropylenu
- Změkčovačla a elastomery v polymerech
- Obsah gumy v polymerních směsích
- Kopolymerační poměry
- Obsah pevných částic v gumových latexech
- Sklo v nylonu
- Monitorování polymerizačních reakcí
- Viskozita polymerizačních reakčních směsí
- Změny hustoty zesíťování



Rutinní průmyslové aplikace NMR - pokrač.

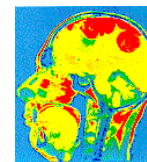
Farmaceutický a kosmetický průmysl

- Vlhkost v práscích (volná i vázaná)
- Vlhkost v katalyzátorech
- Olej a kapaliny v pevných matricích nebo práškových chemikáliích
- Difúze kapalin v kapalinách, práscích, nerostech, zeolitech
- Kapalně a voskově pokrytí pevných částic
- Viskozita kapalin
- Stanovení obsahu nitrace alkoholů
- Zobrazování



Lékařský výzkum

- Kontrastní látky
- *In-vitro* měření relaxačních časů



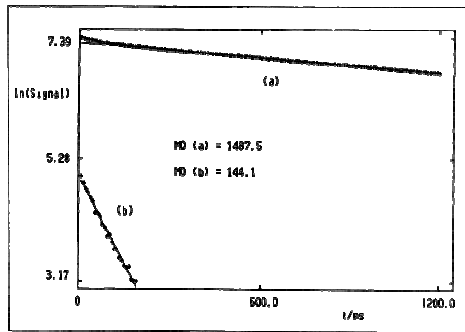
Detekce fluoru

- Obsah fluoru v zubní pastě
- Celková fluorová analýza v polymérech
- Fluorový povrch na vláknech

Příklad průmyslové aplikace

Analýza emulze „olej ve vodě“:

Olej má mnohem kratší relaxační čas T_2 než voda. Měření na MINISPECu (^1H , 20 MHz) metodou mnohonásobného spinového echa (CPMG) - měří se amplituda každého 10x echa.

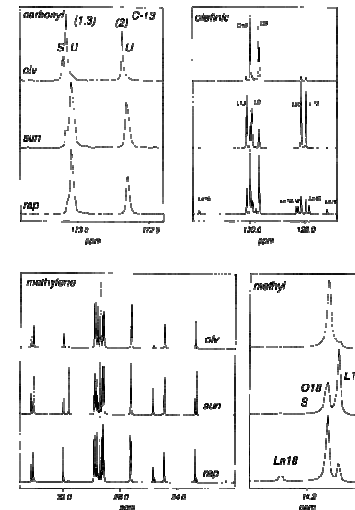


Po odečtení převažující dlouho-relaxující komponenty se získá **obsah oleje** (pozn. pro získání hmotnostního zlomku je ještě nutný kalibrační faktor) **extrapolací** křivky (b) do $t = 0$.

Obrázek z: Jones, S.A.: Determination of the components in oil-water emulsions by means of pulsed NMR; Minispec application notes 23, Bruker Analytische Messtechnik.

Analýza směsí - rostlinný olej

^{13}C spektra rostlinných olejů (olivového, slunečnicového a řepkového) s přiřazením: nasycené (S), nenasycené (U), olejové (O), linoleové (L), linolenové (Ln) kyseliny.



Zpracování se provádí pomocí pokročilých matematických metod - **analýza principiálních komponent** (principal component analysis) - zkoumané spektra je rozloženo do subspekter (jednotlivých esterů mastných kyselin) a jsou určeny jejich váhy (tj. koncentrace složek ve směsi).

Obrázky z: Ashurst, P.R., Dennis, M.J. Eds., Analytical Methods of Food Authentication, Blackie Academic & Professional, London 1992, str. 54.

Specific site Natural Isotope Fractionation (SNIF) NMR

Využívá se rozdílného izotopického zastoupení na jednotlivých místech molekuly.

Alternativní metoda: Hmotová spektrometrie (v praxi se tak měří zastoupení $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)

SNIF NMR: určení poměru D/H.

	D/H	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
Isotope abundance A = heavy/(heavy + light)	155.74 ppm	1.111233 %	0.20012 %
Isotope ratio R = heavy/light	155.76 ppm	1.12372 %	0.20052 %
Standard	H ₂ O V. SMOW	CaCO ₃ PDB	H ₂ O V. SMOW

$$\text{Isotope deviation} - \delta = \frac{(R - R_{ref})}{R_{ref}} \times 1000$$

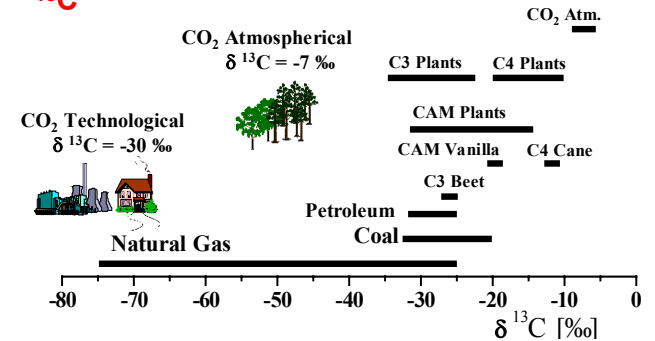
Izotopické rozdělení závisí na původu příslušné molekuly.

Např. D/H vody v Nantes (Francie) je 150 ppm; v Antarktidě 89 ppm. Je rozdíl např. v odpařování H₂O a HDO.

Použity jsou materiály a obrázky J. Mazáče a P. Havelce z Celní laboratoře MF ČR.

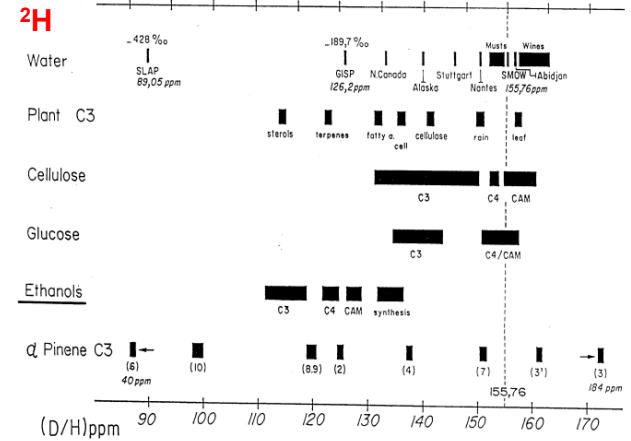
Distribuce stabilních izotopů v přírodních produktech

^{13}C



$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$

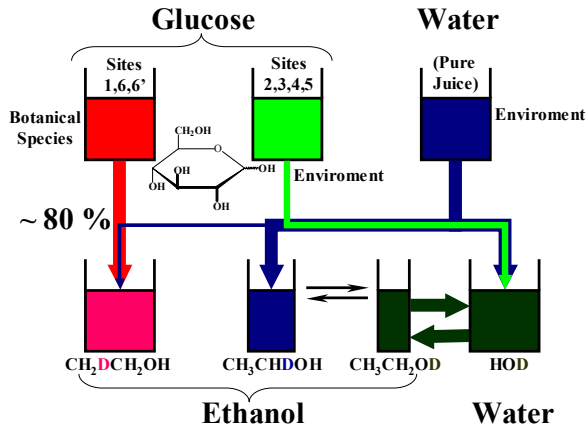
$\delta\text{D} \text{‰}$



(D/H)ppm

Specific site Natural Isotope Fractionation (SNIF) NMR - pokrač.

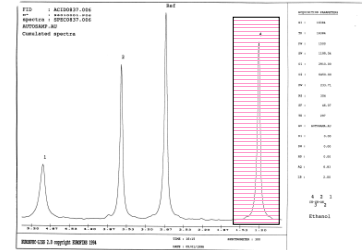
Izotopické rozdělení při kvašení



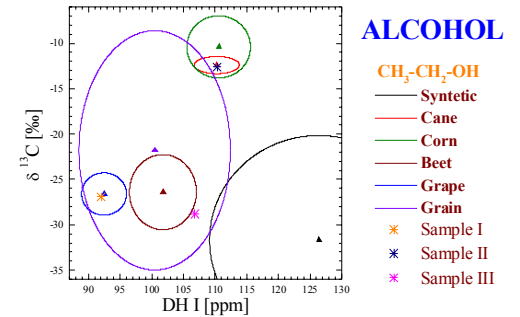
Jednotlivé fyzikálně chemické procesy ovlivňují izotopické rozdělení.

Specific site Natural Isotope Fractionation (SNIF) NMR - pokrač.

V případě alkoholu se stanovuje množství CH₂D (methylových) skupin.

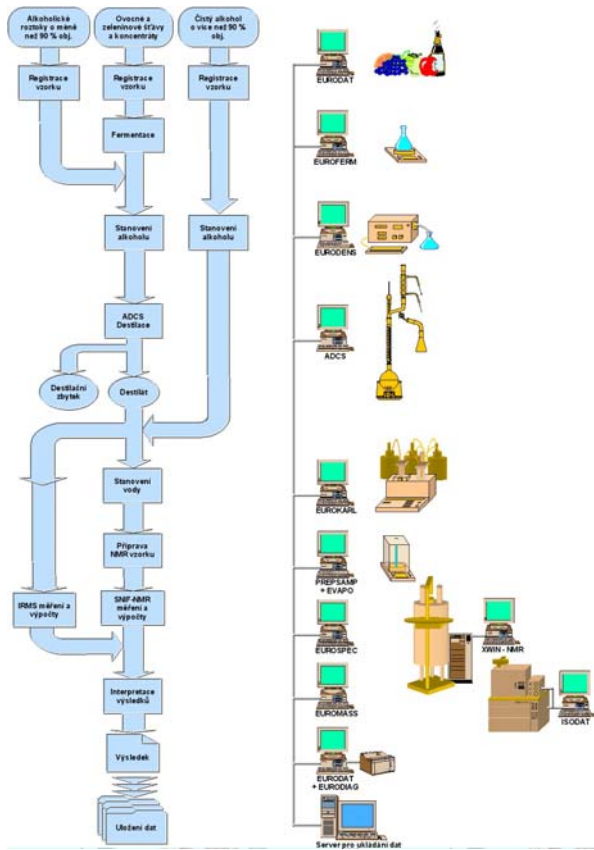


Bivariate 95 % normal probability contour plot for



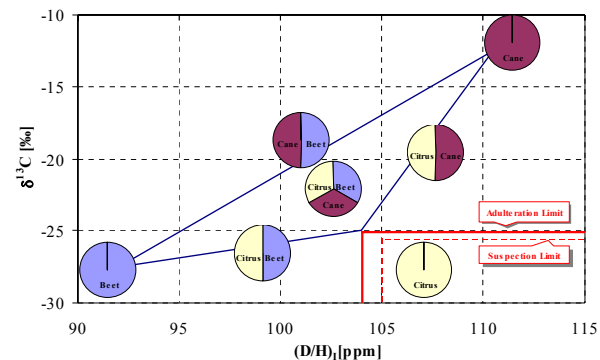
Je možné i ověření zeměpisného původu vzorku.

Specific site Natural Isotope Fractionation (SNIF) NMR - pokrač.



Specific site Natural Isotope Fractionation (SNIF) NMR - pokrač.

Trojúhelník falšování (adulteration triangle)



Důvod testování:

- Víno, ovocné šťávy – detekce přidání cukru.
- Alkohol, kyselina octová: detekce botanického původu, detekce přidavku syntetického lihu.
- Vanilín, benzaldehyd – detekce biologického/syntetického původu.