

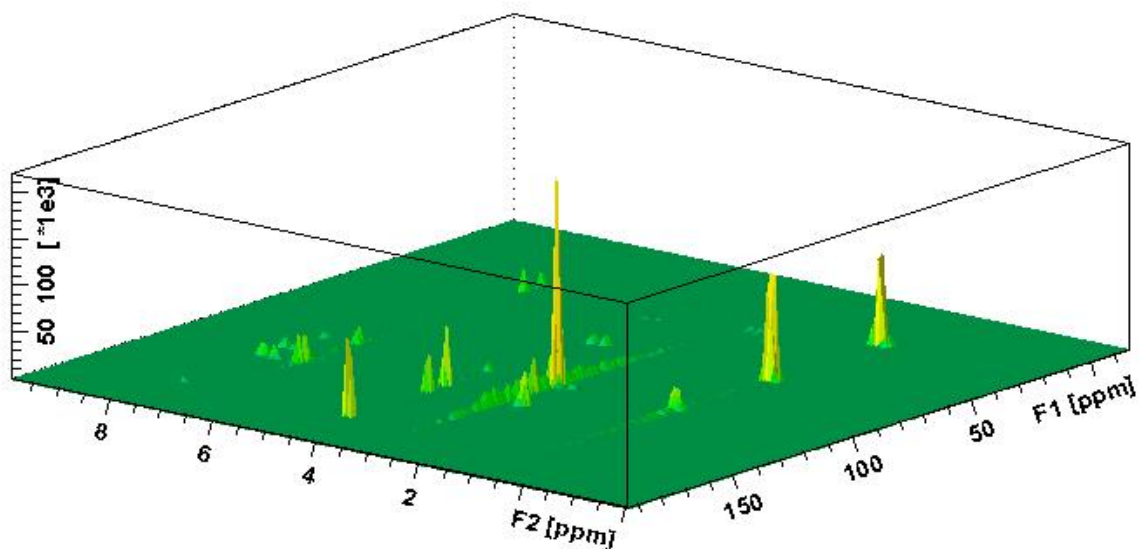
Dvourozměrná NMR spektroskopie – metody

Marcela Strnadová

1D-NMR: experimentální FID je funkcí jediné časové proměnné - detekčního času t_2 , spektrum získané Fourierovou transformací je funkcí frekvence F_2 .

2D-NMR: Zavedení další časové proměnné - evoluční doby t_1 , na detekovaný signál mají určující vliv změny spinového systému probíhající během doby t_1 . Druhá Fourierova transformace ve směru t_1 poskytne druhou frekvenční dimenzi F_1 . Získáme trojrozměrné spektrum, pro jehož grafické znázornění musíme redukovat jednu dimenzi. Při měření měníme délku evoluční doby t_1 , přičemž doba detekce t_2 zůstává stejná. Pak měřením získáme sérii 1D-spekter s různou amplitudou signálů, které následně podrobíme druhé Fourierově transformaci.

Perspektivní znázornění (stacked, white-whasted plot): dvě osy chemických posunů tvoří rovinu nad níž vystupují velikosti signálů, zahrnuje kompletní informace o intenzitě. Nevýhody jsou obtížná interpretace, nebezpečí překryvu signálů, časově náročný zápis. (viz následující obrázek č.1.)



Vrstevnicové zobrazení (contour plot): odpovídá řezům v rovinách - hladinách rovnoběžných s rovinou F_1 F_2 v různých výškách, výhodou je přehlednost a snadná interpretace. Volbou hladiny můžeme eliminovat šum, je-li příliš vysoká pak hrozí ztráta malých píků. (všechny následující grafy jsou vrstevnicové)

Základní dělení 2D-NMR spekter:

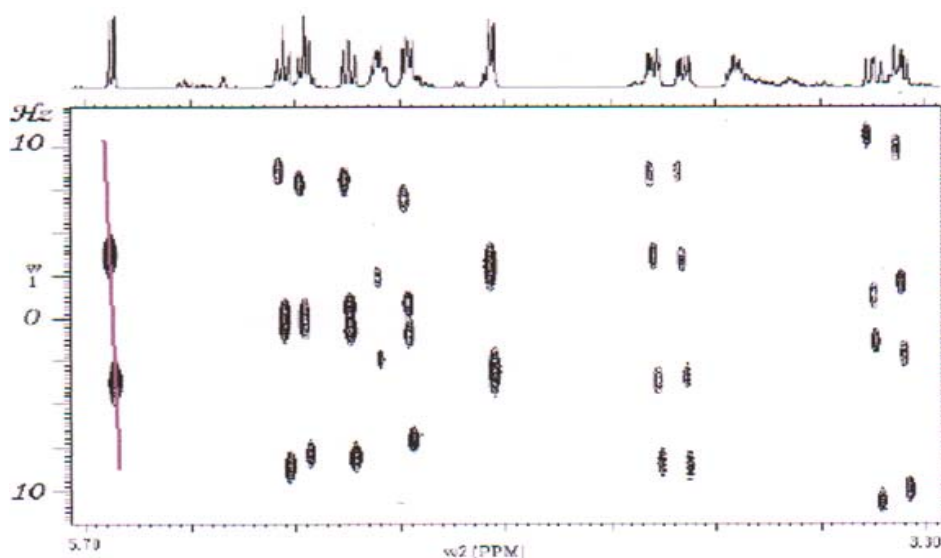
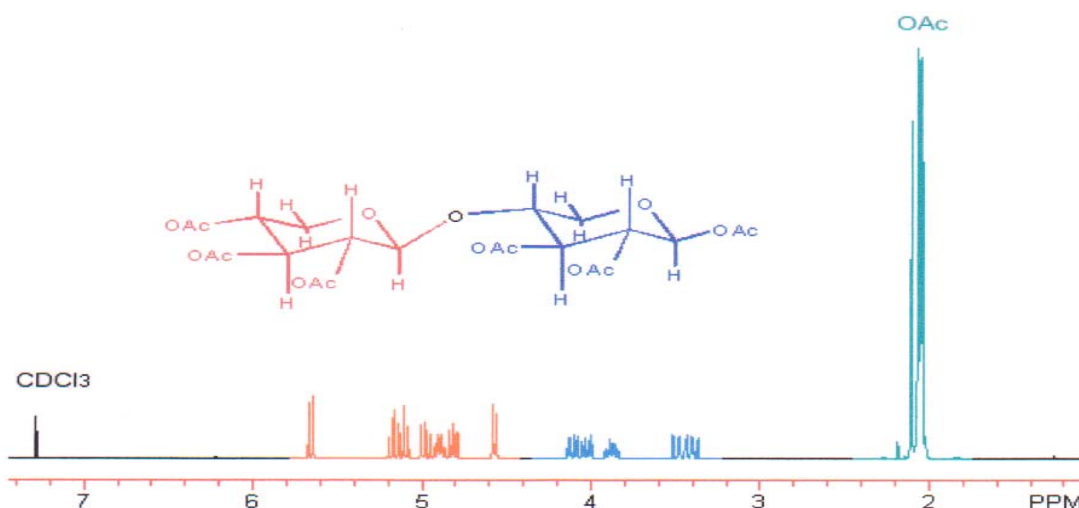
Rozlišená (homonukleární a heteronukleární) – jsou rozlišená podle interakčních konstant J ($J(\text{H},\text{H})$ = homonukleární, $J(\text{C},\text{H})$ = heteronukleární), na jedné ose jsou chemické posuny $\delta(\text{C})$ nebo $\delta(\text{H})$ a na druhé jsou příslušné interakční konstanty J .

Korelovaná (homonukleární a heteronukleární) – na obou osách jsou chemické posuny δ .

Homonukleární 2D-NMR spektra rozlišená podle interakční konstanty $J(\text{H},\text{H})$:

Pulsní sekvence: ${}^1\text{H} \quad t_2 - 90^\circ - t_1/2 - 180^\circ - t_1/2 - \text{FID}$.

Homonukleární metoda sleduje jeden druh jader, vhodné pro vodíky, můžeme rozlišit multiplety v oblastech překryvu signálů a určit posuny $\delta(\text{H})$ a interakční konstanty $J(\text{H},\text{H})$. Spektrum jsou separované chemické posuny vodíků v ose F_2 od interakčních konstant $J(\text{H},\text{H})$ v ose F_1 . Projekce do osy F_2 je ekvivalentní 1D-NMR pro ${}^1\text{H}$ a řezy rovnoběžné s osou F_1 jsou separované multiplety jednotlivých vodíků. Jde o starší metodu dnes méně používanou. (příklad – spektrum disacharidu, obr. č.2.)

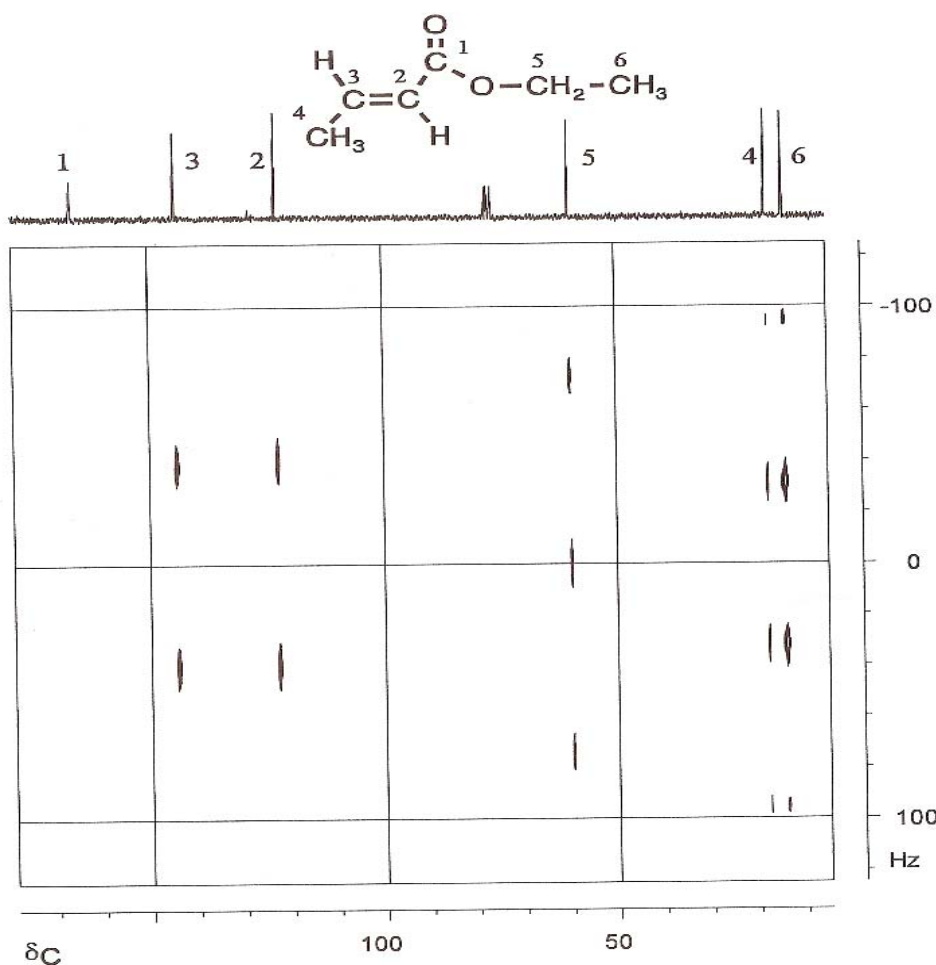


Heteronukleární 2D-NMR spektra rozlišená podle interakční konstanty J(C,H):

Pulsní sekvence: ^{13}C $t_2 - 90^\circ - t_1/2 - 180^\circ - t_1/2 - \text{FID}$.

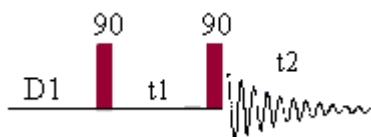
^1H [dekapling] - $t_1/2$ - [- dekapling -].

Spektrum jsou separované chemické posuny uhlíků v ose F_2 od interakčních konstant $J(\text{C,H})$ v ose F_1 . Metoda heteronukleární se zabývá více jádry, opět umožňuje lepší rozlišení multiplétů, které by se v 1D-NMR překrývaly (eliminuje rozšíření čar nehomogenitami magnetického pole). Zase jde o starší metodu. Ze spektra č. 3. můžeme určit chemické posuny uhlíků a počet vodíků na ně přímo navázaných, na ose F_1 pak odečteme jejich příslušné interakční konstanty $J(\text{C,H})$. (příklad – spektrum ethylkrotonátu, obr. č.3.)



COSY (2D-NMR Correlation Spectroscopy) – Homonukleární ^1H - ^1H COSY:

Pulsní sekvence:



Jedna z nejpoužívanějších technik. Homonukleární korelované 2D-spektrum. V obou dimenzích jsou chemické posuny vodíků $\delta(H)$ a spektrum je symetrické podle diagonály. Máme dva typy signálů: **diagonální píky** odpovídají 1D-NMR a **mimodiagonální píky = krosníky** odpovídají sousedícím skupinám, ty najdeme pomocí horizontální a vertikální čáry vycházející z krosníku a protínající diagonálu (interpretace – spektra pro ethanol). Určíme skalární interakce přes vazby. Lze detekovat i takové interakce, které nejsou v 1D-NMR rozlišitelné (např.: krosníky odpovídající malým interakcím $J(H,H)$ přes čtyři vazby v kondenzovaných aromátech).

Tato metoda má mnoho dalších variant:

E-COSY (Exclusive Correlation Spectroscopy)

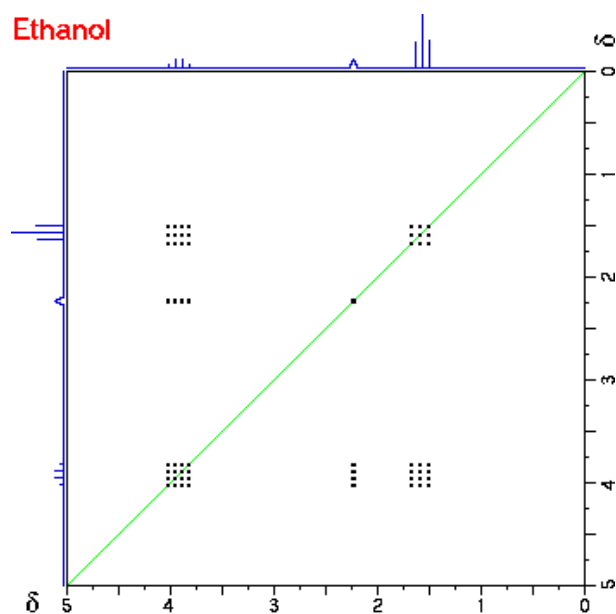
P-COSY (Purge Correlation Spectroscopy)

PE-COSY (Primitive Exclusive Correlation Spectroscopy)

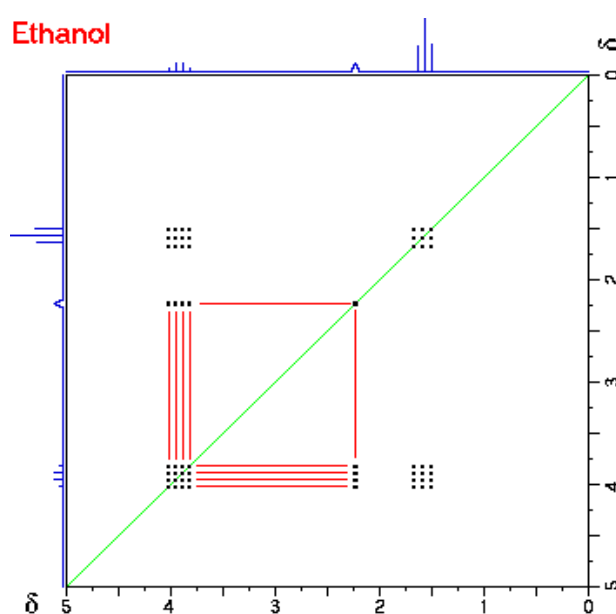
Z-COSY (Correlation Spectroscopy with z-Filter)

DQ-COSY (Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy with z-Filter)

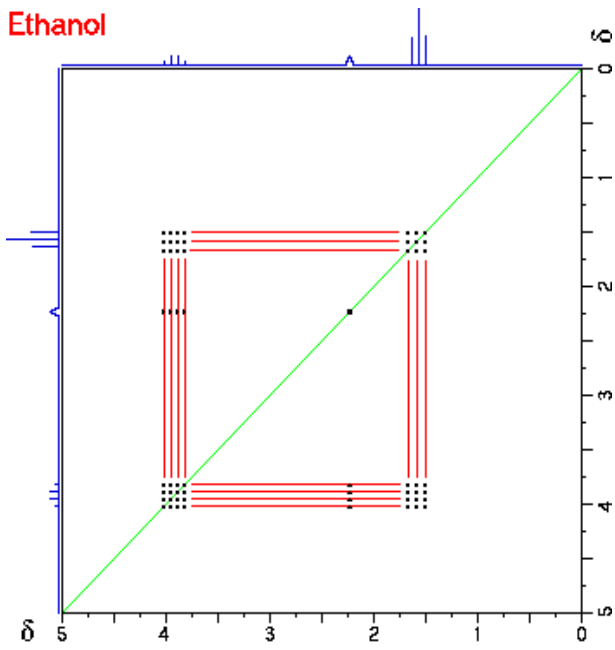
COSY – 2D spektrum ethanolu diagonálně symetrická podle zelené čáry (obr. č.4.), nahoře a vlevo je pro porovnání vodíkové 1D-NMR. Na obrázku č.5. je znázorněn krosník OH a CH₂ další spektrum č.6. ukazuje krosník mezi CH₃ a CH₂, naopak není krosník mezi CH₃ a OH skupinou obr. č.7., protože zde není spin-spinový kapling mezi vodíky. Obrázky č. 8. a 9. jsou reálná spektra disacharidu xylobiosy.



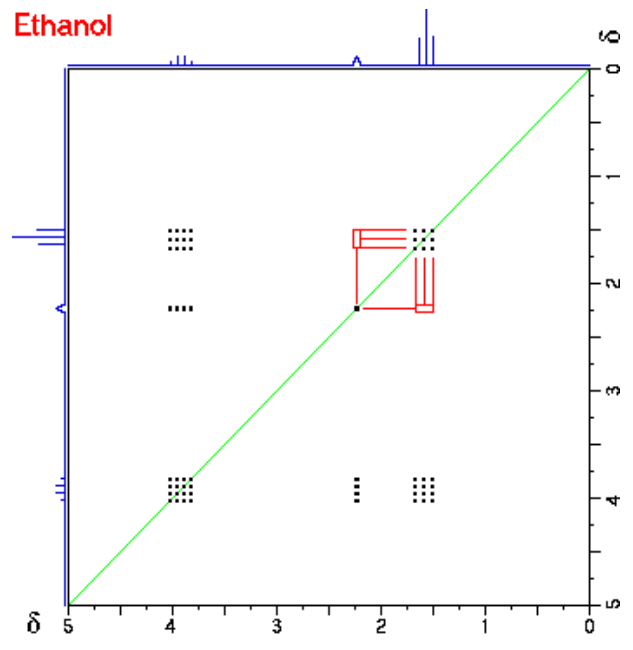
Obr. č.4.



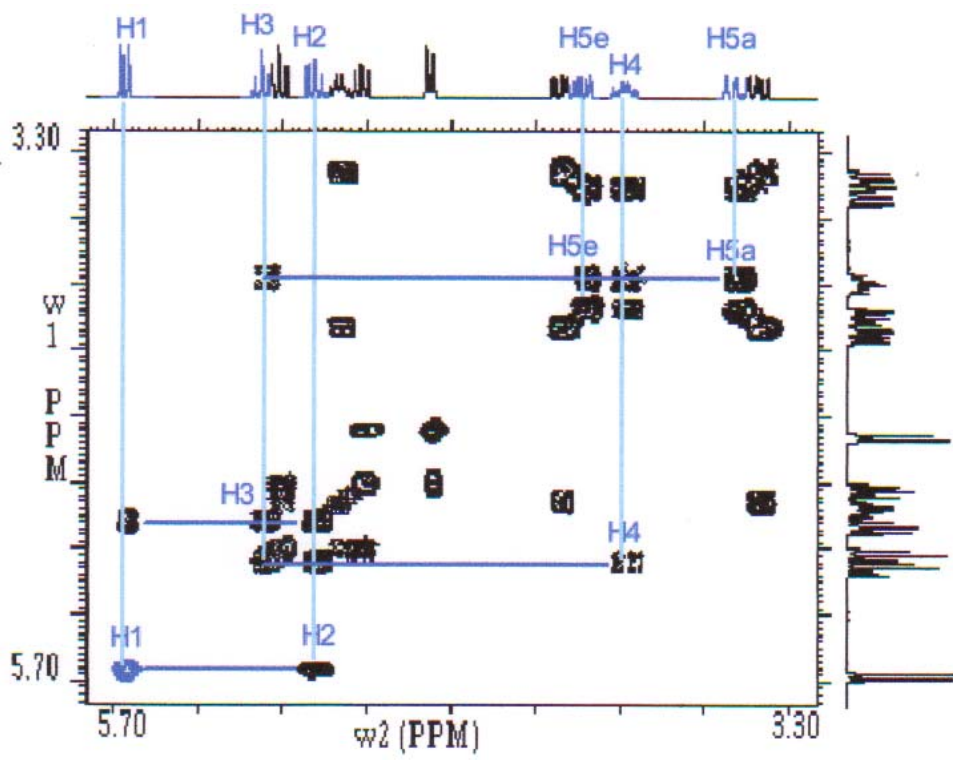
Obr. č.5.



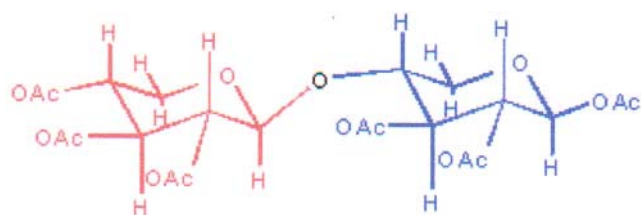
Obr. č.6.

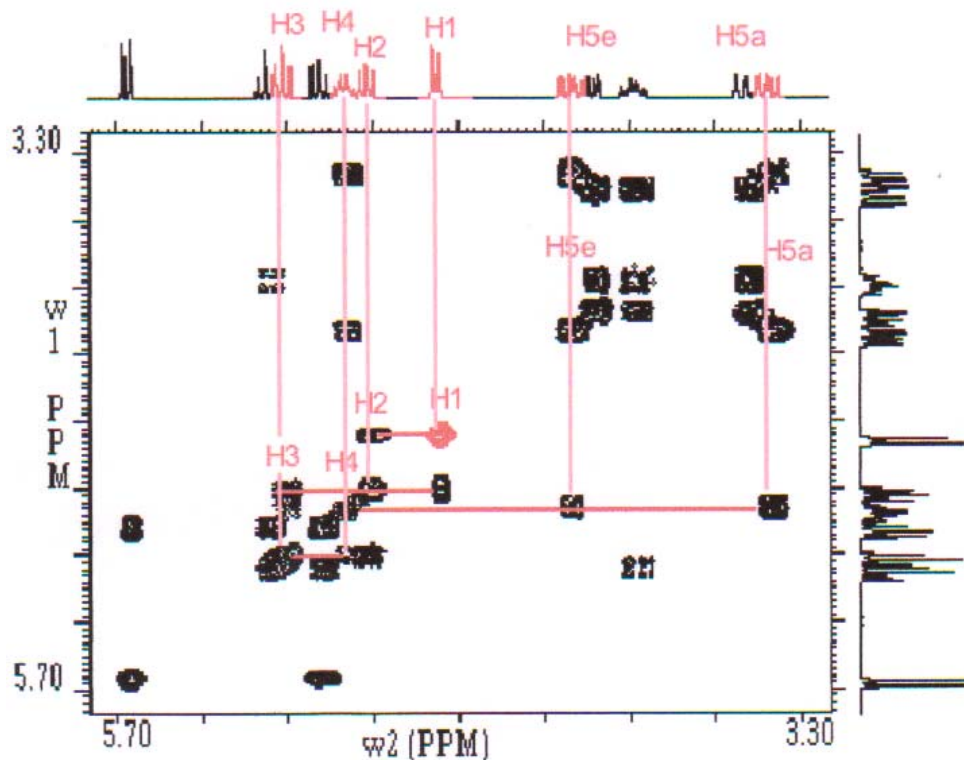


Obr. č.7.



Obr. č. 8.

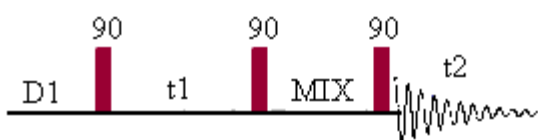




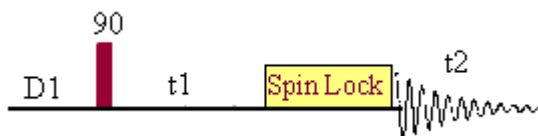
Obr. č. 9.

NOESY (2D-NOE Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, Homonukleární):

Pulsní sekvence NOESY: MIX = směšovací doba 0,5-2s

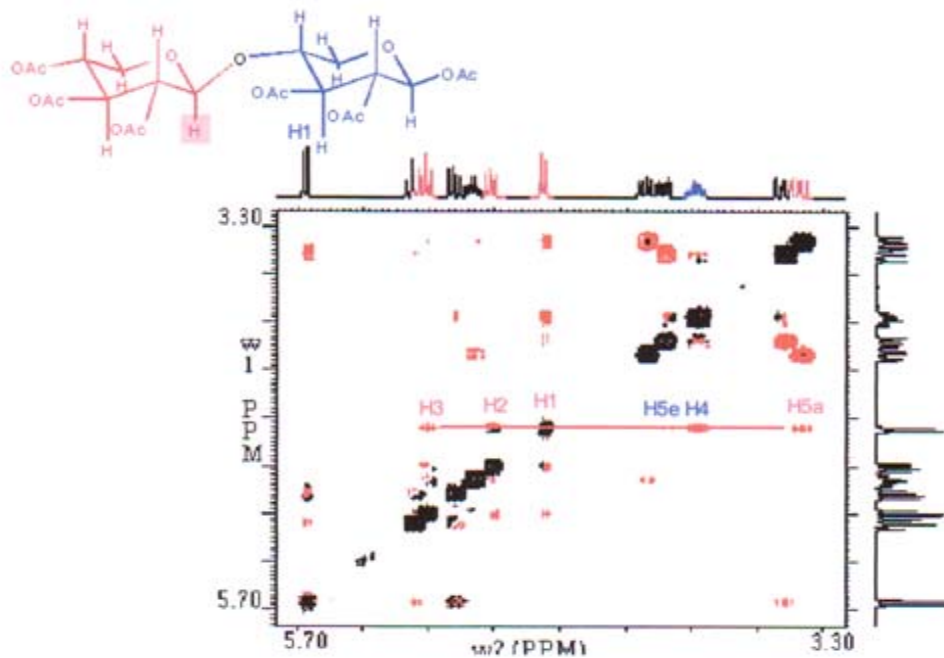


Pulsní sekvence ROESY:

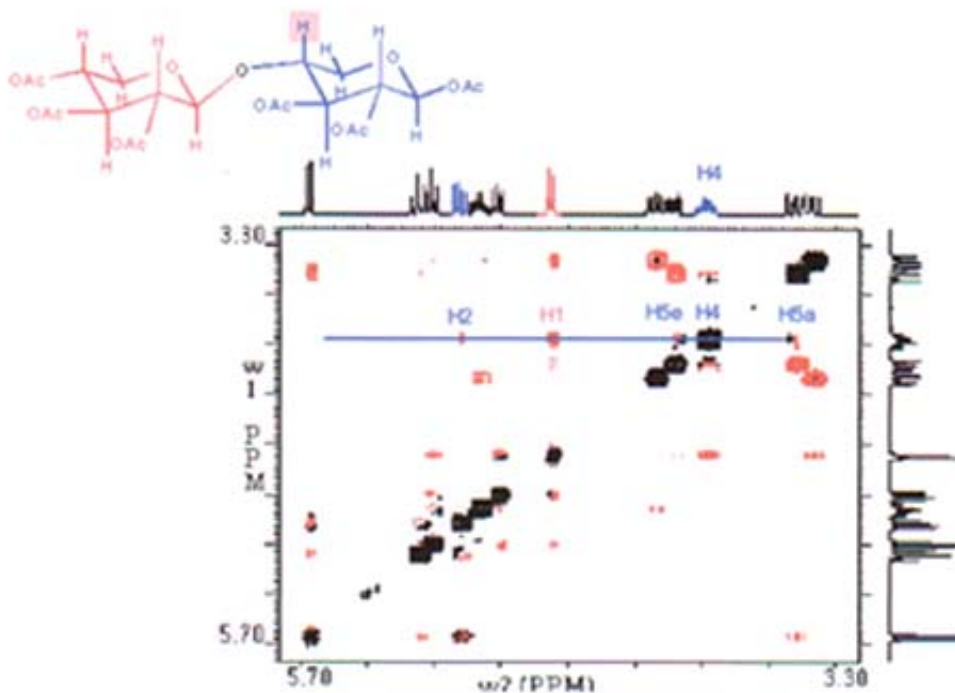


Dvoudimenzionální varianta NOE umožňující měřit v jediném experimentu NOE mezi všechny vodíky molekuly. Na obou osách jsou chemické posuny vodíků $\delta(H)$, jedná se tedy o homonukleární korelovaná spektra. Získáme dipolární interakce přes prostor, vhodné pro velké molekuly při návrhu jejich 3D struktury (varianta k rentgenostrukturní analýze, můžeme měřit v roztoku za podmínek různých teplot, pH, iontové síla...). U menších molekul se metody používá k přiřazování prostorově blízkých vodíků a řešení stereochemie. Nevýhodou je, že pro molekuly s velkou molekulovou hmotností (řádově 1000 – 3000) poskytují velmi slabé až žádné signály,

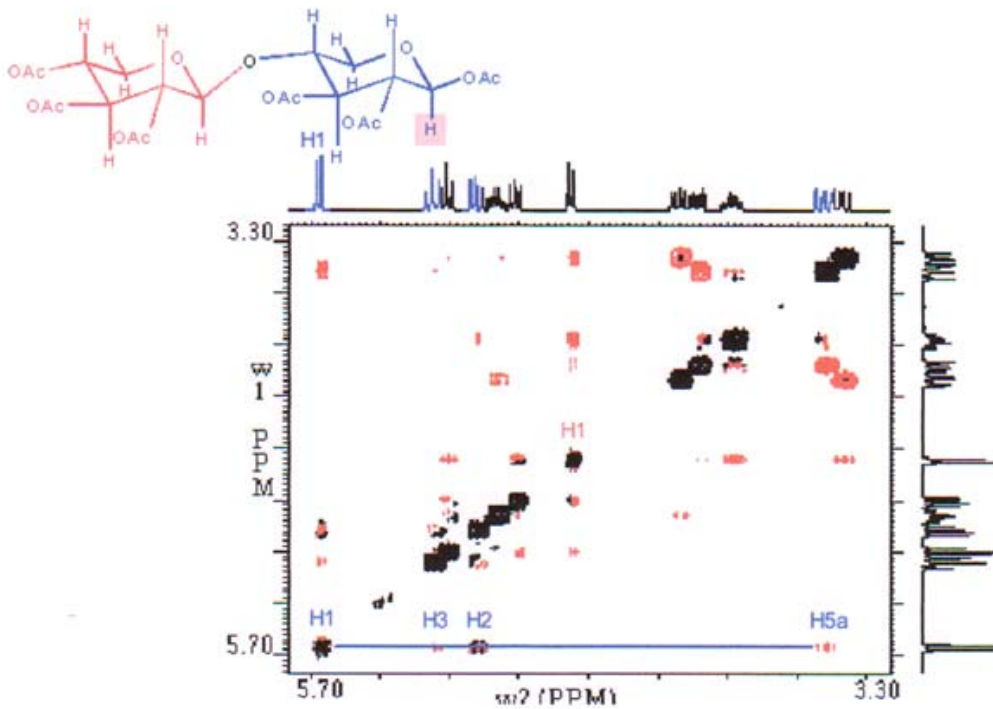
protože NOE efekt mění znaménko s rostoucím korelačním časem. Toto řeší metoda **ROESY (Rotating Frame NOESY)**, kdy NOE v rotujícím systému souřadnic je vždy pozitivní. Měření se provádí za podmínek spinlocku, který je realizován sérií 180° pulsu během směšovací doby d_1 (0,3 s). Experiment poskytuje v zásadě stejné výsledky jako NOESY, ale v kratším čase a snižuje výskyt artefaktů. Červené píky na obrázku č. 10.,11. a 12. jsou záporné signály a černé jsou kladné. Spektrum je symetrické podle diagonály a krosník znamená prostorovou blízkost (do 5 Å).



Obr. č. 10.



Obr. č. 11.

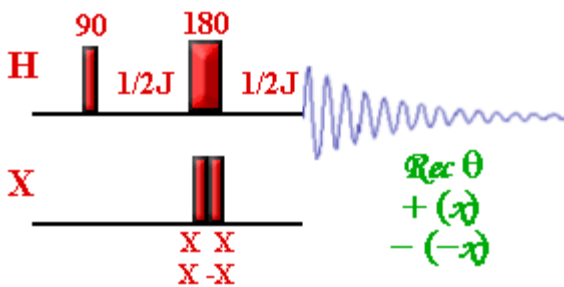


Obr. č. 12.

HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence):

Pulsní sekvence:

$$X = {}^{13}\text{C}, d_2 = 1/2 J(\text{C,H})$$



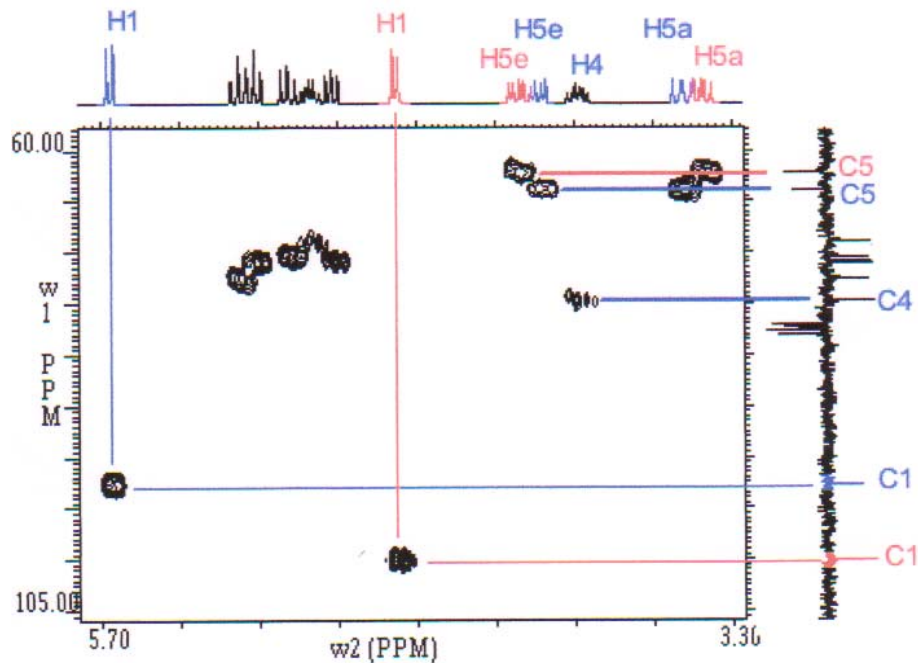
Spektrum není symetrické podle diagonály, na ose F_2 jsou chemické posuny vodíků $\delta(\text{H})$ a na ose F_1 jsou chemické posuny uhlíků $\delta(\text{C})$. Metoda patří mezi heteronukleární korelovaná 2D-NMR. Inverzní signály vodíků (hlavně methylů) vázaných k uhlíkům se často objevují jako pásy podél osy F_1 . Metoda patří mezi inverzní techniky, kdy detekujeme jádra s velkou citlivostí – ${}^1\text{H}$ zatímco jádra s malou citlivostí – ${}^{13}\text{C}$ a ${}^{15}\text{N}$ jsou vystavena řadě pulsu. Výsledné spektrum pak poskytuje informace o málo citlivém jádru, které je takto nepřímou detekováno. Spektrum poskytuje pouze signály vodíků, které mají spin-spinové interakce s nepřímými měřenými jádry, ostatní ${}^1\text{H}$ je nutné eliminovat. Inverzní experimenty jsou náročnější na přístrojové vybavení, vyžadují speciální sondu s inverzním

uspořádáním tras – měřící trasa je nastavena na detekci ^1H a dekaplovací trasa je naladěna na kmitočet jader s nízkou citlivostí. Příkladem je obrázek disacharidu č. 13.

Další varianty této metody:

HMQC-TOCSY (HMQC combined with a TOCSY experiment)

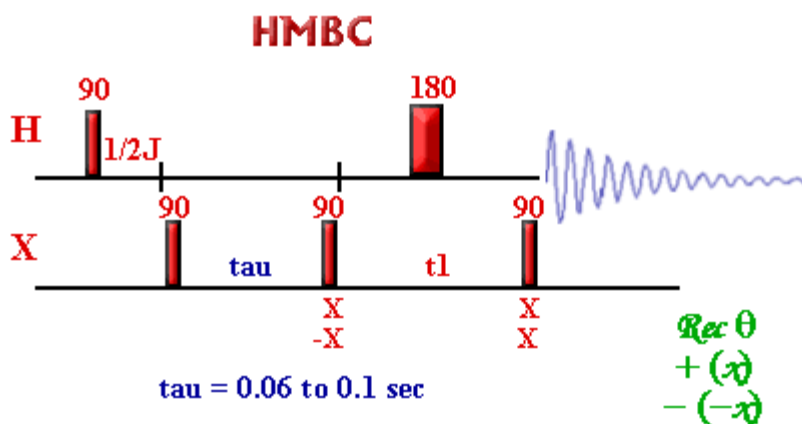
HMQC-NOESY (HMQC combined with a NOESY experiment)



Obr. č. 13. (HMQC spektrum již uvedeného disacharidu)

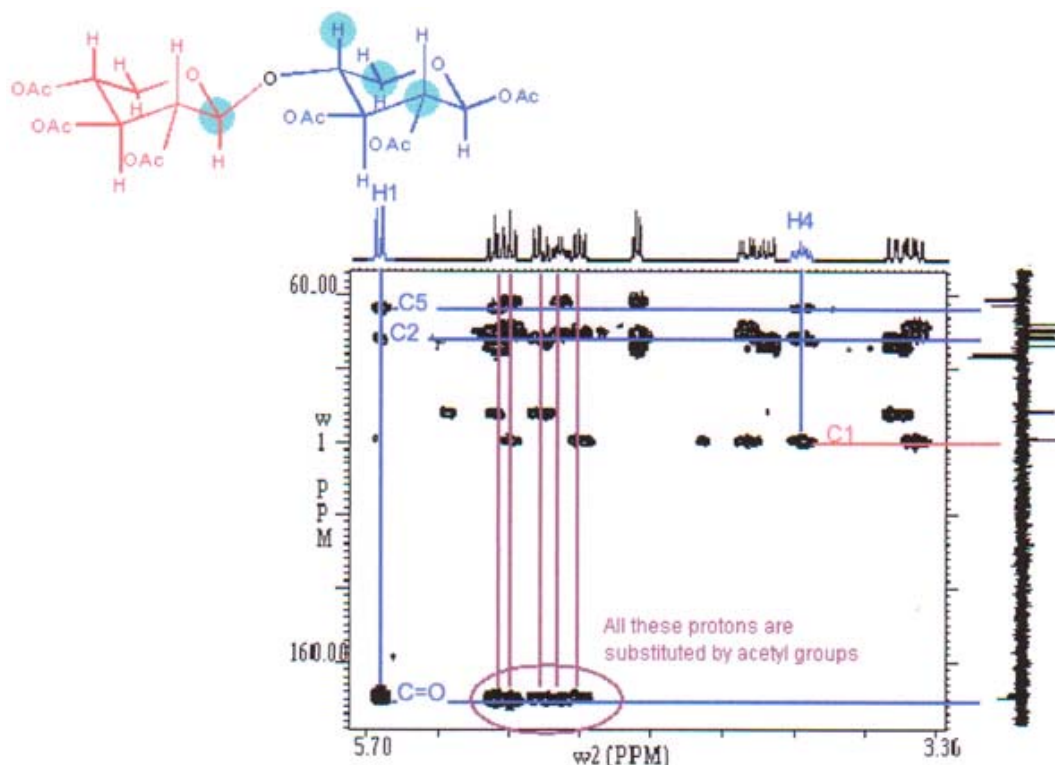
HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation):

Pulsní sekvence:



Pulsní sekvence zůstává stejná jako pro HMQC jen se změní hodnota $d_1 = J(\text{C}, \text{H})$ což odpovídá 50 ms ($J(\text{C}, \text{H}) = 10 \text{ Hz}$). Spektrum vypadá opět stejně, ale můžeme

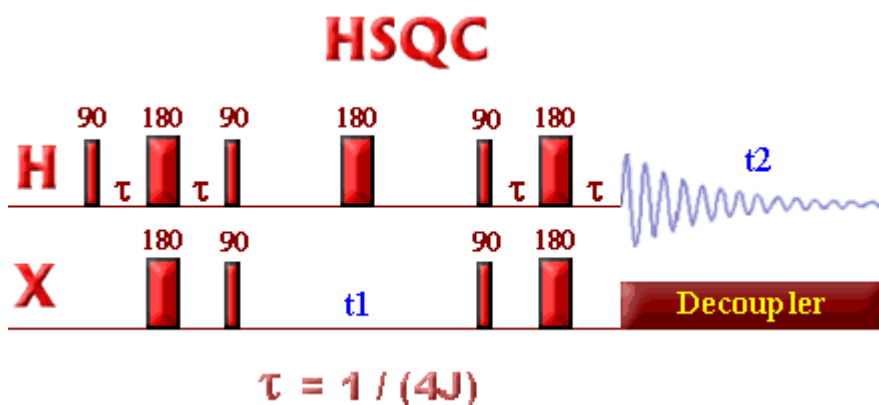
pozorovat interakce přes více vazeb, tedy získáme korelace přes interakční konstanty $^2J(C,H)$ a $^3J(C,H)$. Zároveň potlačíme interakce $^1J(C,H)$, tedy nedetekujeme vodíky přímo navázané na uhlíky, ale přes více vazeb. Jde o korelované heteronukleární spektrum, kde na ose F_2 jsou chemické posuny vodíků $\delta(H)$ a na ose F_1 jsou chemické posuny uhlíků $\delta(C)$. Ze spektra č. 14. můžeme určit chemické posuny uhlíků a vodíků, a jejich interakce přes více vazeb. Typicky přes tři vazby, u aromátů je možno ještě přes více vazeb. Velikost píku závisí na příslušných interakčních konstantách.



Obr. č. 14.

HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy):

Pulsní sekvence:



Heteronukleární korelované spektrum nesymetrické podle diagonály. Na osách jsou chemické posuny vodíku a uhlíku. Ze spektra č. 11. můžeme odečíst chemické posuny uhlíků a vodíků přímo na ně navázaných, neurčíme interakce přes více vazeb. Pulsní sekvence zahrnuje INEPT přenos z ^1H na ^{13}C , evoluční dobu se 180° pulsem na ^1H a nakonec zpětný INEPT přenos z ^{13}C na ^1H . Spektrum v ose F_2 obsahuje $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$, které jsou štěpeny interakcemi $\text{J}(\text{H},\text{H})$. Na rozdíl od HMQC nejsou signály v ose F_1 rozšířeny homonukleárními interakcemi $\text{J}(\text{H},\text{H})$, což je výhodné, kdy ^{13}C NMR obsahuje mnoho signálů s podobnými chemickými posuny. Pro biomolekuly má HSQC vyšší citlivost, protože se neuplatní ztráty intenzity rychlou relaxací v t_1 . (příklad – spektrum ethylkrotonátu, obr. č.15.)

