

ZÁKLADNÍ EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY NMR ROZTOKŮ A KAPALIN

Jana Svobodová
Ústav Makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i.

PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

○ Bruker 600 Avance^{III}

- Aktivně stíněný, supravodivý magnet UltraShield™ 14.1T
- Digitální konzole
- Orthogonální shimovací systém BOSSII s 34 gradienty
- Možnost deuteriového dekaplingu
- Měřicí sondy: 5mm (10mm) BBO sonda (přímé pozorování jader ^1H a možností manipulace s jádry ^{13}C a ^{15}N)
- 5mm (3mm) inverzní sonda

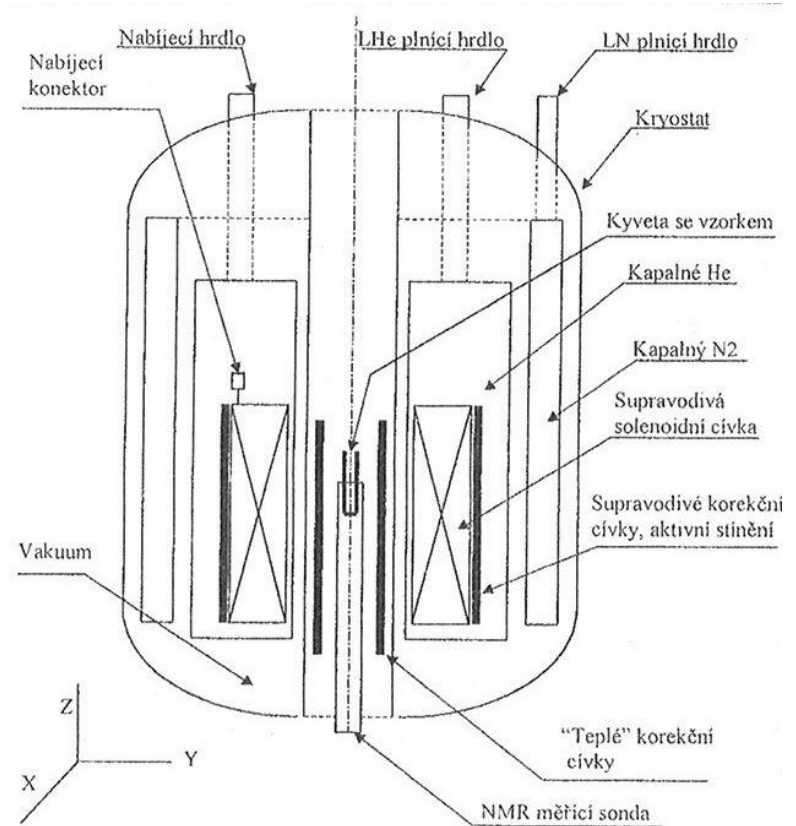
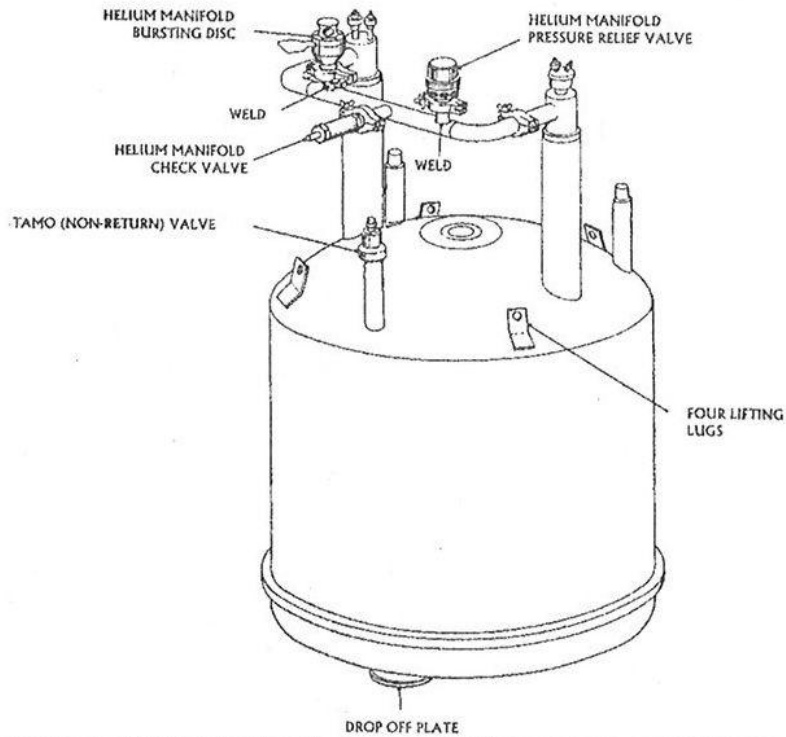
○ Bruker DPX 300 (vylepšený)

- Supravodivý magnet 7.05T
- Digitální konzole
- Orthogonální shimovací systém s 20 gradienty
- Měřicí sondy: 5mm inverzní sonda (^1H přímý, BB dekapl.)

5mm BB sonda (^{31}P - ^{15}N), ^1H dekapling



SUPRAVODIVÝ MAGNET



MĚŘÍCÍ SONDA

- Přijímací a vysílací cívky, korekční cívky pro dosažení maximální homogenity pole, zařízení ovládající přesné nastavení teploty vzorku
- NMR sonda vybavena obvody pro vícenásobnou rezonanci → kromě měřícího kanálu má ještě obvody umožňující excitaci jiných jader
- Speciální sondy obsahují přídatné cívky vytvářející pulsní gradienty magnetického pole → speciální experimenty s PFG

▪ *Nanosondy* - extrémně malé množství vzorku nebo heterogenních vzorku

▪ *Průtočné sondy* - sondy s vysokou citlivostí

▪ *Sondy se supravodivou nebo podchlazenou měřící cívkou* - vycházejí z principu snížení elektrického šumu snížením absolutní teploty číla - teoreticky lze dosáhnout až 10x vyšší citlivosti



MĚŘÍCÍ SONDA

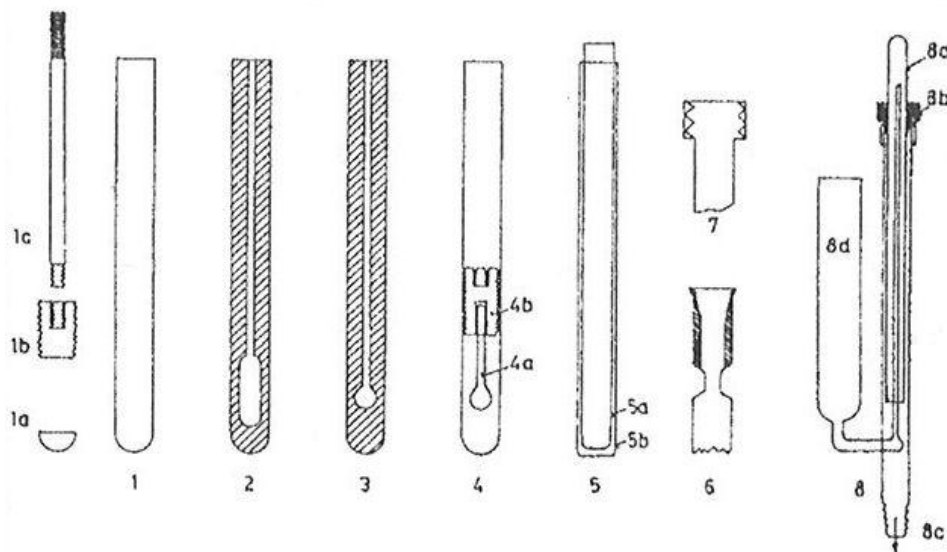
○ *Hlavní funkce:*

- Vybuzení spinového systému měřeného vzorku a snímání jeho odezvy
- Zabezpečení stability rezonanční podmínky (udržení platnosti rezonanční podmínky → lockovací kanál)
- Regulace teploty měřeného vzorku
- Přídavné cívky vytvářející pulsní gradienty magnetického pole → speciální experimenty s PFG (experimenty s puls.gradien. mag. Pole)
- Citlivost NMR experimentu → speciální sondy



VZOREK, ROZPOUŠTĚDLO, STANDARD

- Tenkostěnné koaxiální kyvety umístěné v plastových rotorech
- Maximální vnější průměr kyvety závisí na typu NMR sondy (5mm, 3mm, 10 mm)
- K měření je třeba připravit 0.6 ml roztoku studované látky v deuterovaném rozpouštědle
- Minimální množství vzorku – typ jádra, citlivost spektrometru, typ experimentu, doba měření, molekulová hmotnost
- Reálná množství vzorku: 1-50 mg pro ^1H 10-100 mg pro ^{13}C NMR experimenty



1. Tenkostěnné (omezovací výplně pro zmenšení objemů a vírů při rotaci)
2. Silnostěnné s malým objemem
3. Silnostěnné s malým objemem
4. Kyveta s držákem a mikrokyvetou pro malé objemy
5. Koaxiální objemy



VZOREK, ROZPOUŠTĚDLO, STANDARD

○ Volba rozpouštědla:

- Mělo by obsahovat deuterium pro stabilizaci rezonanční podmínky („lock signal“)
- Dostatečná rozpustnost studované látky
- Rozpouštědlo chemicky inertní, stálé a nepříliš viskózní při teplotách měření
- Signály rozpouštědla by neměly interferovat se signály vzorku
- Důležitá role → cena rozpouštědla

- Nerozpustné částice vzorku, mechanické nečistoty → filtrace, centrifugace
- Odstranění rozpuštěného kyslíku (paramagnetický=rozšířené čáry) → probublávání dusíkem, odplynění vzorku opakovaným vymražením roztoku

Rozpouštědlo	Vzorec	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
Chloroform	CDCl_3	7,26	77,0
Benzen	C_6D_6	7,27	128,0
Acetonitril	CD_3CN	1,94	1,3 118,2
Aceton	CD_3COCD_3	2,05	29,8 206,3
Dimethylsulfoxid	CD_3SOCD_3	2,50	39,5
Methanol	CD_3OD	3,31	49,0
Voda	D_2O	~4,8	-



VZOREK, ROZPOUŠTĚDLO, STANDARD

- *Standard*
 - a) Vnitřní – přidán přímo k měřenému roztoku
 - b) Vnější – umístěn v kapiláře ponořené do roztoku
 - c) Sekundární standard – signál rozpouštědla se známým chemickým posunem

Jádro	Standard (zkratka)	Vzorec	δ (ppm)
^1H	Tetramethylsilan (TMS)	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{Si}$	0
	Hexamethyldisilan (HMDS)	$\text{C}_6\text{H}_{18}\text{Si}_2$	0.037
	Hexamethyldisiloxan	$\text{C}_6\text{H}_{18}\text{OSi}_2$	0.055
	Sodná s. l kyseliny 3-(trimethylsilyl)propansulfonové (DSS)	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NaO}_3\text{SSi}$	0
	Sodná s. l kyseliny 3-(trimethylsilyl)propionové (TSP)	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NaOSi}$	0
^{13}C	Tetramethylsilan (TMS)	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{Si}$	0
	Deuteriochloroform	CDCl_3	77.0
	Hexadeuterodimethylsulfoxid	CD_3SOCD_3	39.7
	Tetradeteromethanol	CD_3OD	49.0



KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

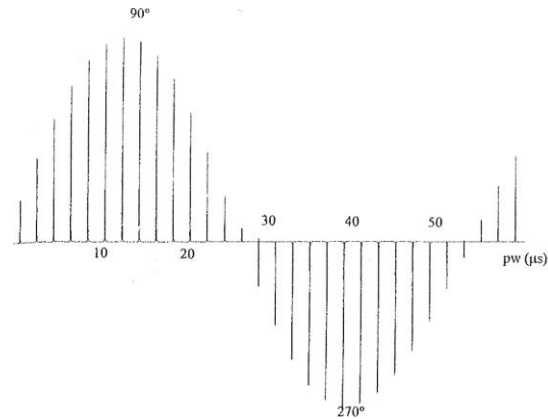
1. Kalibrační měření základních parametrů jsou do značné míry nezávislé na měřeném vzorku a proto je netřeba opakovat před každým měřením
2. Testy a procedury optimalizující nastavení parametrů, jsou ovlivněny měřeným vzorkem, je třeba provádět před měřením každého vzorku
3. Speciální testovací procedury (test stability rf pulsu, test linearity vysílače, test tvaru pulsu, test přijímače...)



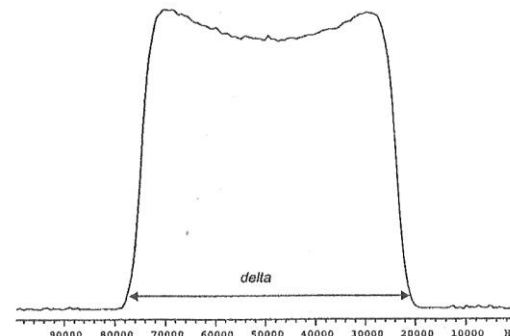
KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

1. Kalibrační měření základních parametrů

- a) Určení délky 90° pulsu pro určitý výkon zesilovače v měřícím kanálu pro všechna měřená jádra



- b) Kalibrace výkonu v dekaplovacím kanálu a délky 90° pulsu dekapleru pro všechna dekaplovaná jádra
- c) Kalibrace pulsních gradientů magnetického pole



KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

1. Kalibrační měření základních parametrů jsou do značné míry nezávislé na měřeném vzorku a proto je netřeba opakovat před každým měřením
2. Testy a procedury optimalizující nastavení parametrů
3. Speciální testovací procedury (test stability rf pulsu, test linearity vysílače, test tvaru pulsu, test přijímače...)



KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

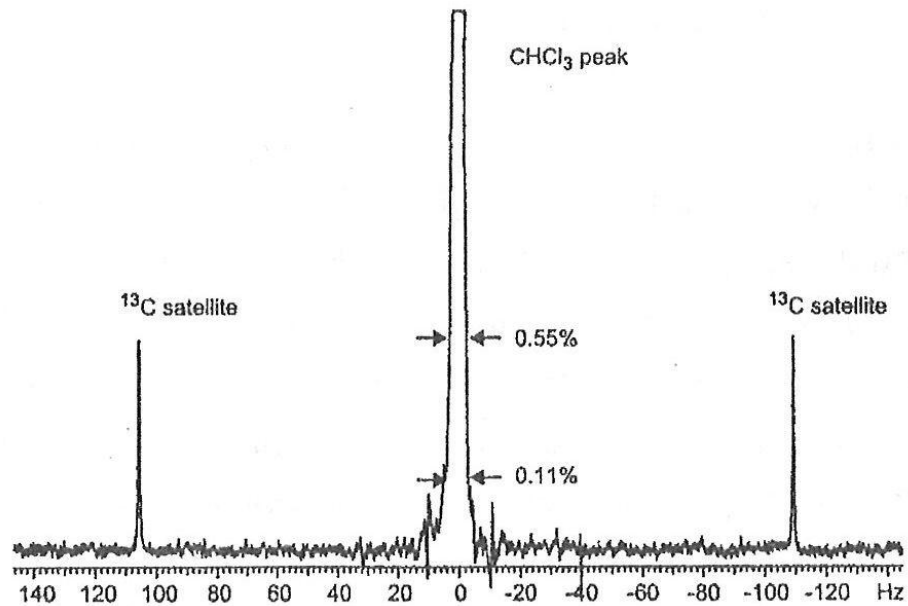
Testy a procedury optimalizující nastavení parametrů je třeba provádět před měřením každého vzorku!

- *Nastavení optimální homogenity statického magnetického pole (tzv. shimming)*
 - Korekční cívky vytvářející gradienty magnetického pole ve směru osy Z (obvykle 1.- 6. řádu) → zásadní vliv na tvar NMR linie – běžné měření → pouze nastavení korekčních cívek 1. – 2. řádu
 - Gradienty mag. pole ve směru os X a Y → nežádoucí „ rotační pásy“ → ke korekci gradientní korekční cívky X, Y (nastavení s vypnutou rotací)
 - Při výměně sondy → standardní testovací vzorek, tvar NMR linie musí odpovídat danému kritériu (viz obrázek)
 - Při výměně vzorku → nastavení gradientů nižšího řádu (Z1, Z2) na maximální úroveň lockovacího signálu – kontrola přímo na reálném vzorku (signál rozpouštědla dostatečně úzký)



KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

Test homogenity magnetického pole



KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

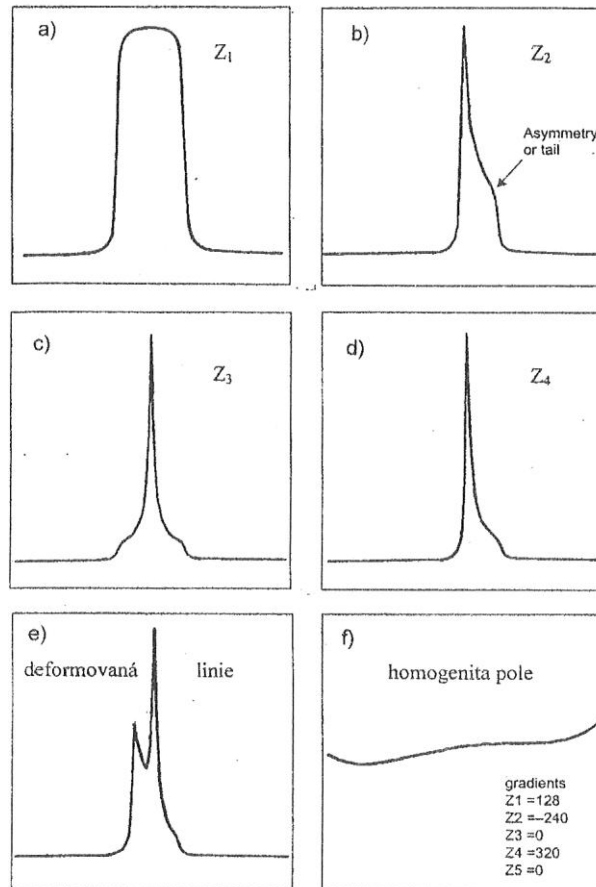
Testy a procedury optimalizující nastavení parametrů je třeba provádět před měřením každého vzorku!

- *Nastavení optimální homogenity statického magnetického pole (tzv. shimming)*
 - Korekční cívky vytvářející gradienty magnetického pole ve směru osy Z (obvykle 1.- 6. řádu) → zásadní vliv na tvar NMR linie – běžné měření → pouze nastavení korekčních cívek 1. – 2. řádu
 - Gradienty mag. pole ve směru os X a Y → nežádoucí „rotační pásy“ → ke korekci gradientní korekční cívky X, Y (nastavení s vypnutou rotací)
 - Při výměně sondy → standardní testovací vzorek, tvar NMR linie musí odpovídat danému kritériu (viz obrázek)
 - Při výměně vzorku → nastavení gradientů nižšího řádu (Z1, Z2) na maximální úroveň lockovacího signálu – kontrola přímo na reálném vzorku (signál rozpouštědla dostatečně úzký s pološířkou ca 0.5 Hz nebo menší)



KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

- Vliv gradientů korekčních cívek na tvar NMR signálů



KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

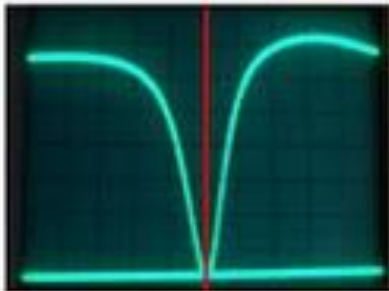
- Kritéria správného nashimování magnetu:
 - a) Velikost signálu deuteria z rozpouštědla
 - b) Šířka čáry vybraného signálu ^1H (rozpouštědlo)
 - c) Velikost FIDu
- Moderní NMR spektrometry mají polo- nebo automatické shimování (nejčastěji na principu využití pulsních gradientů magnetického pole)



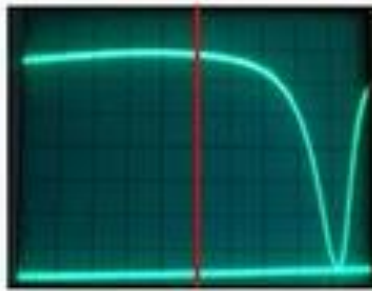
KALIBRACE, NASTAVENÍ A TESTY NMR SPEKTROMETRU

- Ladění pozorovacího kanálu sondy (wobbling) – při změně měřeného jádra

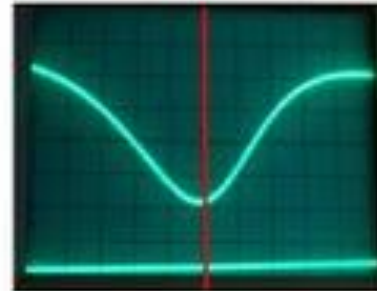
Probe Tuning and Matching



Well Tuned and
Well Matched



Poorly Tuned but
Well Matched



Well Tuned but
Poorly Matched



MĚŘENÍ PULSNÍCH NMR SPEKTER

1. Kyveta s rotorem na polštáři stlačeného vzduchu je spuštěna do sondy magnetu
2. Zvolí se typ experimentu
3. Zalockování (stabilizace rezonanční podmínky pomocí deuteriového signálu rozpouštědla)
4. Optimalizace homogenity statického mag. pole (naladění pomocí soustavy korekčních cívek – lockovací signál co nejvyšší)
5. Ladění frekvence měřeného jádra – (wobbling)
6. Zkontrolovat akviziční parametry:

Nosná frekvence rf pulsu („ tof“)

Šířka snímaného spektra („ sw“)

Délky pulsů

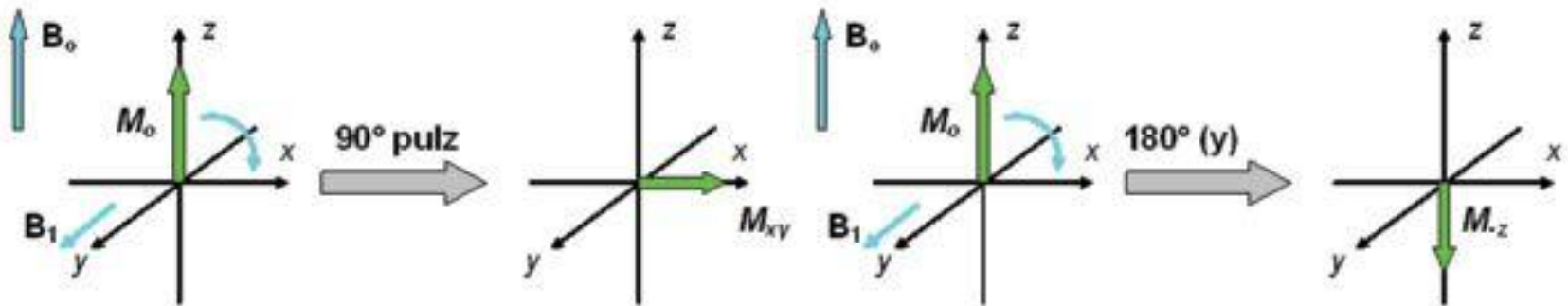
Akviziční doby

- Po excitaci RF pulsem je indukovaná příčná magnetizace detekována jako NMR signál → časový průběh magnetizace $M(t)$ → volně doznívající indukce (FID)



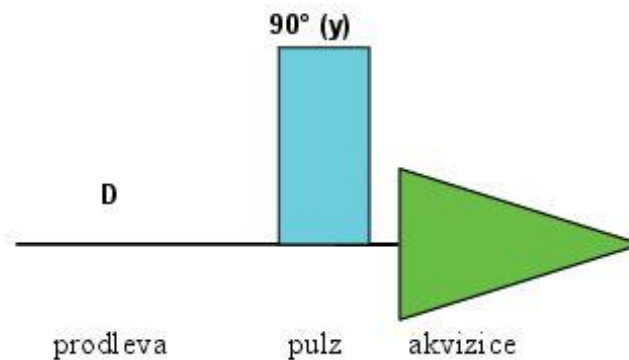
PULZY, PULSNÍ SEKVENCE

- *Radiofrekvenční puls způsobuje otáčení vektoru magnetizace M kolem osy pole B_1*



PULZY, PULSNÍ SEKVENCE

- *Pulsní sekvence* = detailní popis dějů v pozorovacím i dekaplovacím kanálu spektrometru → forma časových diagramů

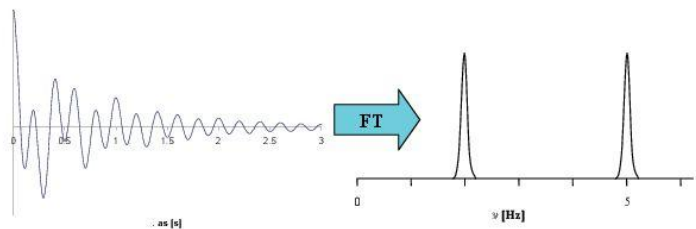
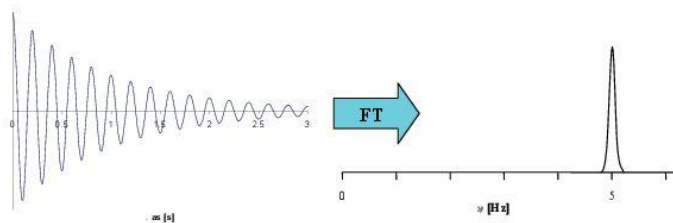
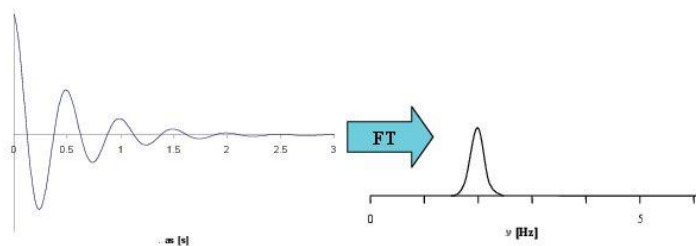
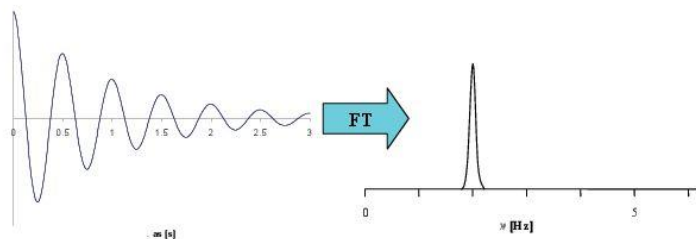


- *Přípravná perioda D* = trvá několik minut, během ní působí na vzorek pouze vnější magnetické pole, ustaví se rovnováha v populacích spinů po pulsu
- *90° puls* = jeho vliv závisí na jeho amplitudě, délce a fázi, na stavu spinového systému v okamžiku pulsu
- *Snímání dat (akvizice)*



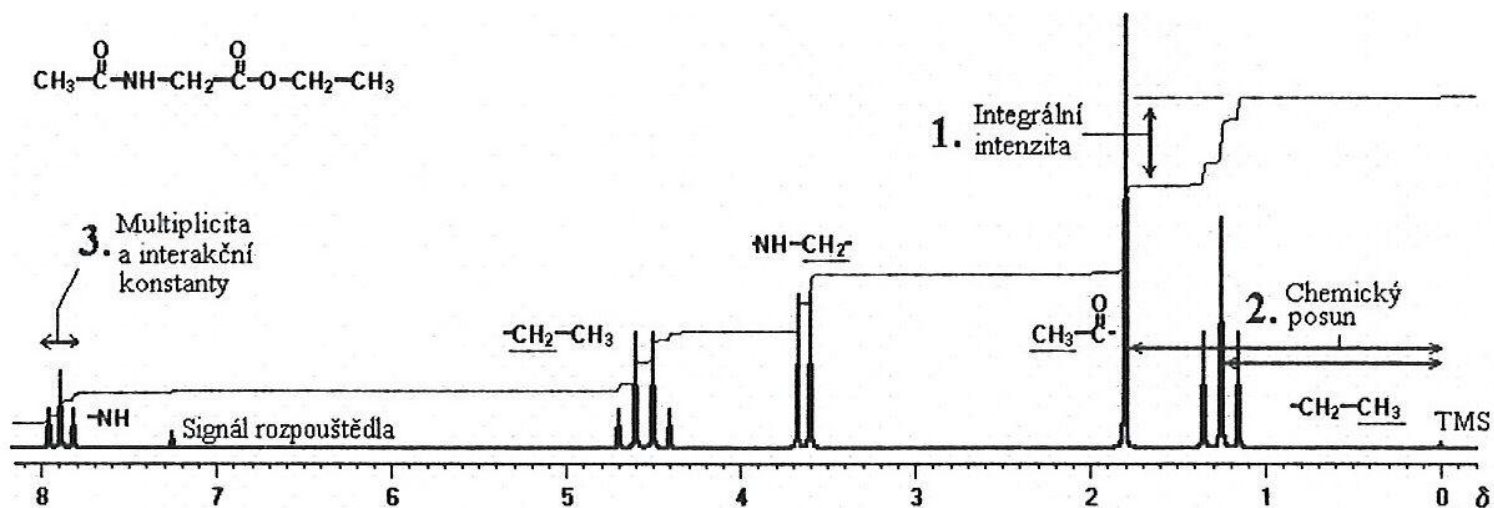
FOURIEROVA TRANSFORMACE

- *FID* = časový záznam intenzity indukovaného proudu v měřící cívce → Fourierova transformace umožňuje z časového záznamu (*FIDu*) získat spektrum



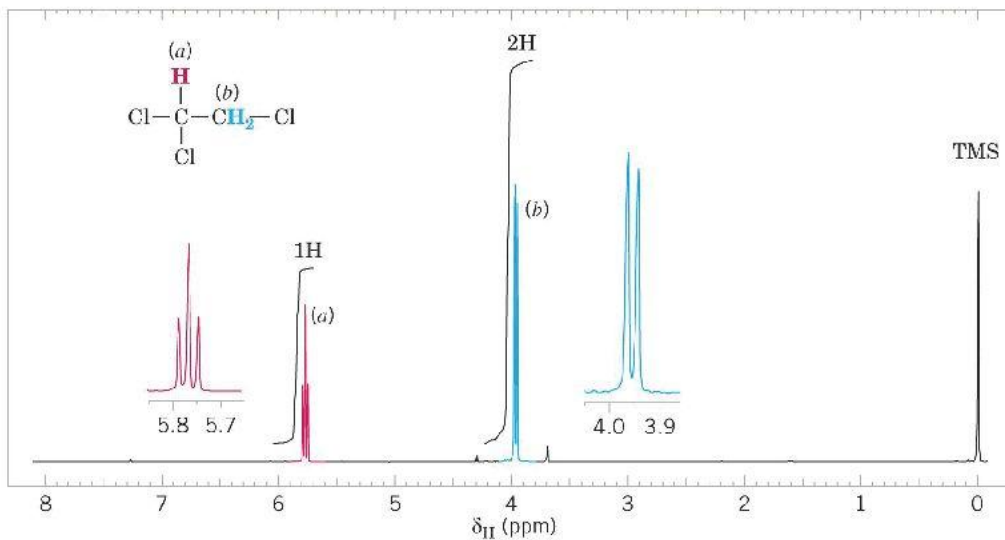
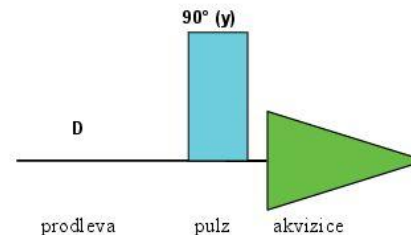
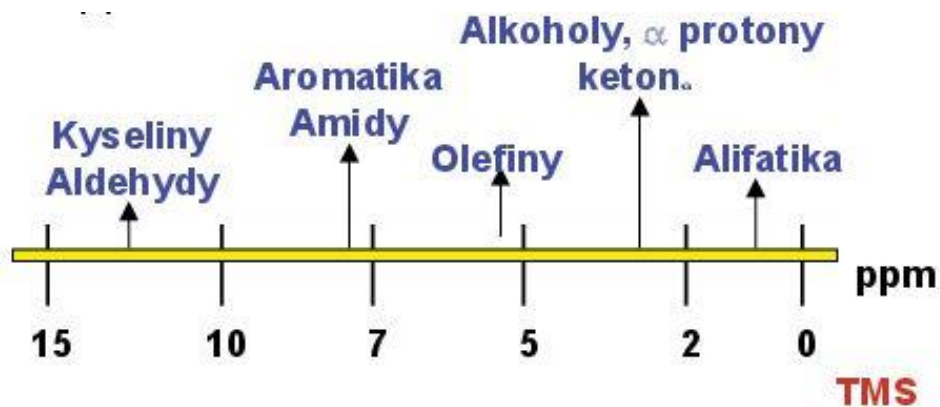
URČOVÁNÍ STRUKTURY Z NMR SPEKTER

1. *Integrální intenzita* → informuje o počtu chemicky ekvivalentních atomů v molekule
2. *Chemický posun* → informuje o chemickém okolí měřeného jádra (δ)
3. *Multiplicita signálů a interakční konstanty (J)* → informují o počtech sousedních magneticky aktivních jader a jejich geometrickém uspořádání
4. *Počet signálů* → počet chemicky neekvivalentních jader



JEDNOROZMĚRNÁ ^1H NMR SPEKTRA

- Chemický posun ^1H spekter – 0-15 ppm



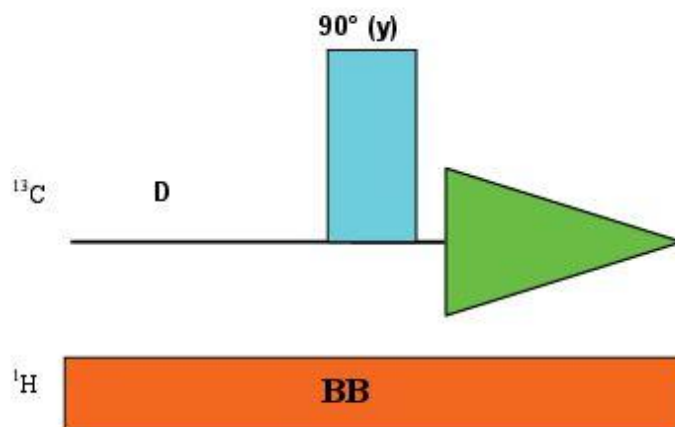
$$(2nI + 1)$$

$$I = \frac{1}{2}$$



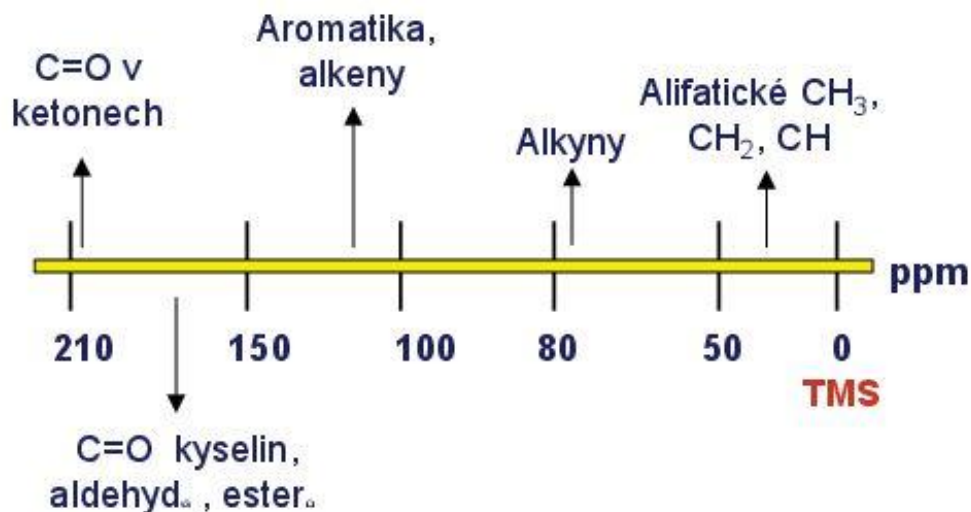
JEDNOROZMĚRNÁ ^{13}C NMR SPEKTRA

- *Nízká citlivost ^{13}C : $\gamma (^1\text{H}) \approx 4 \gamma (^{13}\text{C}) \rightarrow ^1\text{H}$ je 64x citlivější*
- *Přirozené zastoupení ^{13}C – 1.11% (^1H – 99.98%)*
 - Nutno provádět měření na více akumulací (skenů)
 - Vzájemné interakce ^{13}C - ^{13}C nepozorovatelné
 - Lze sledovat interakce ^1H - ^{13}C \rightarrow komplikují interpretaci spekter
 - Užití dekaplinku (odstranění interakce s protony)



JEDNOROZMĚRNÁ ^{13}C NMR SPEKTRA

- *Rozsah chemických posunů – 0-300 ppm*
- Chemické posuny závisí na hybridizaci daného uhlíku a na povaze sousedních skupin

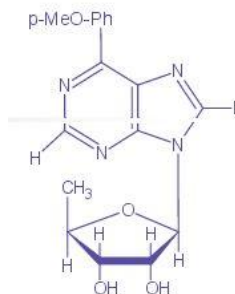


- *Intenzity signálů* – v dekaplovaném spektru nejsou úměrné počtu odpovídajících jader uhlíku

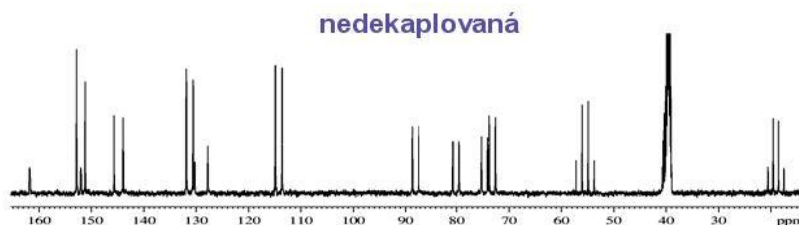


JEDNOROZMĚRNÁ ^{13}C NMR SPEKTRA

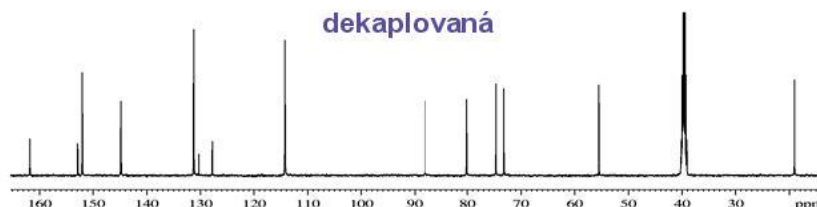
Různé modifikace ^{13}C spekter



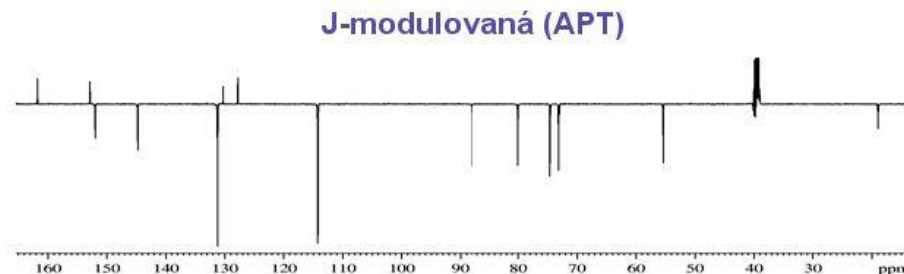
- *Nedekaplovaná* – zachování multiplicity, ale značné snížení intenzity



- *Dekaplovaná* – ozařování RF polem, odstranění interakce s protony, přehlednější spektrum



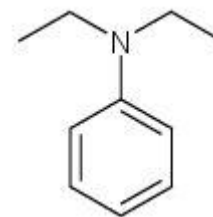
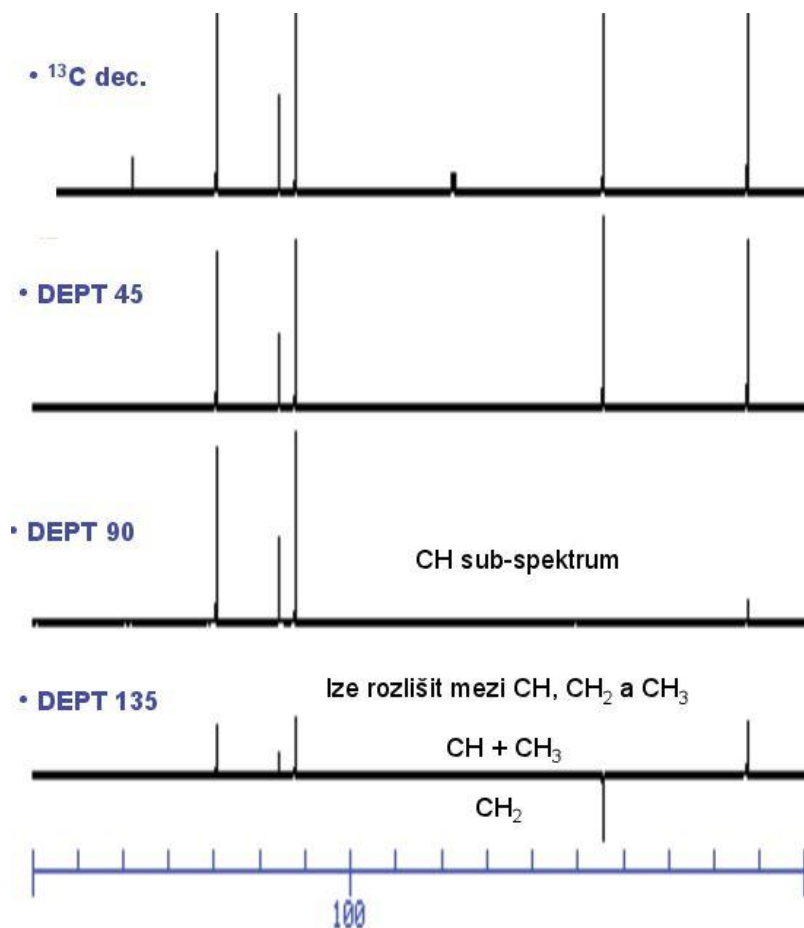
- *J-modulovaná (APT)* – podle počtu vázaných protonů pozitivní (C, CH₂) a nebo negativní (CH, CH₃)



JEDNOROZMĚRNÁ ^{13}C NMR SPEKTRA

Různé modifikace ^{13}C spekter

- *DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)*– využití přenosu polarizace (předání polarizace citlivého jádra (^1H) méně citlivému (^{13}C)) – měří se 3 experimenty pro různé hodnoty úhlu



DĚKUJI ZA POZORNOST!

