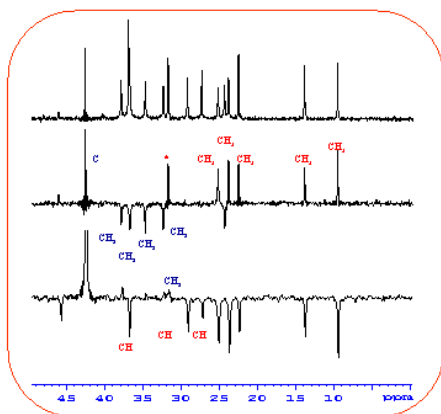
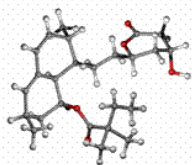


(4) Editace 1D spekter – přiřazení signálů strukturním jednotkám

Joint Laboratory of Solid-State NMR
IMC AS CR and JRPSC AS CR



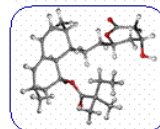
Jiří Brus

*(Verze 1.0.1-2005)
(neupravená a neúplná)*

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, Praha 6 -
Petřiny 162 06
e-mail: brus@imc.cas.cz

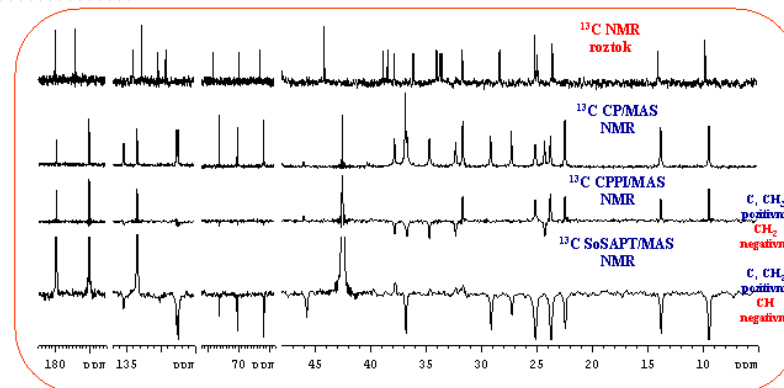
¹³C CP/MAS NMR organických látek

Joint Laboratory of Solid-State NMR
IMC AS CR and JRPSC AS CR



¹³C NMR spektra látek v roztoku a v pevné
fázi se mohou značně lišit

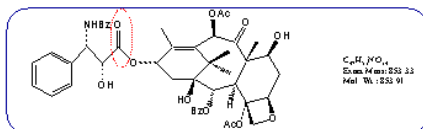
Významné postavení 1D editačních technik



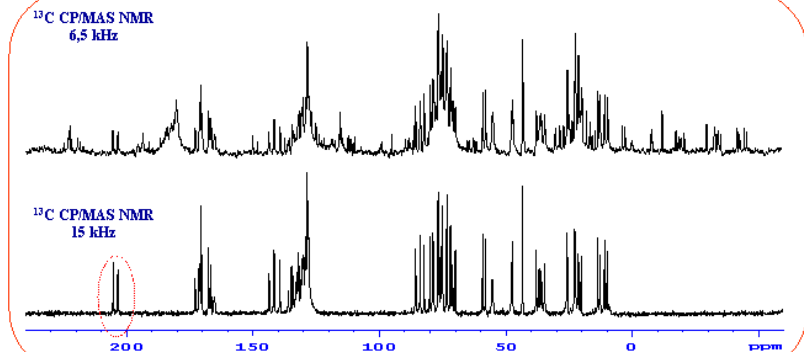
Vzhledem k tomu, že provedení v roztoku zcela standardních korelačních experimentů jako je COSY nebo HETCOR je pro tuhé látky poněkud komplikované ne-li nemožné, mají 1D techniky editace uhlíkových NMR spekter významné postavení. Umožňují totiž v relativně krátkém čase přiřadit signálům základní strukturní jednotky a pak na základě znalosti chemických posunů v roztoku provést úplné přiřazení. Ale pozor, v drtivé většině případů chemické posuny v NMR spektrech roztoků a pevných látek se významně liší a tak přímá korespondence mezi spektry roztoků a krystalických látek ne vždy existuje.

^{13}C CP/MAS NMR organických látek

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



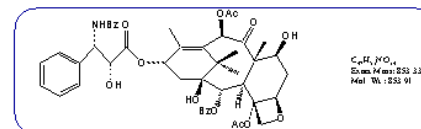
^{13}C CP/MAS NMR spektra
krystalických organických látek
– více molekul v nezávislé části
krystalografické jednotky



V některých případech se ve spektru objeví dvou- nebo vícenásobný počet signálů. To nastává asi u cca. 10-ti procent organických krystalických látek, kdy v nezávislé části krystalografické jednotky se nachází dvě a více molekul. Ty jsou díky tomu magneticky neekvivalentní. Proto pak pozorujeme v NMR spektrech dvě a více sad NMR signálů. Příkladem takového složitějšího systému je taxol, v jehož spektru dokážeme rozlišit téměř 90 signálů. Je tedy zřejmé že přímé přiřazení není vůbec jednoduché, i když spektrální rozlišení je skvělé a pološířka signálů je pod 20 Hz. Pokud by takové spektrum navíc komplikovala přítomnost rotačních signálů, pak je přiřazení signálů prakticky neřešitelný problém.

Potlačení rotačních signálů

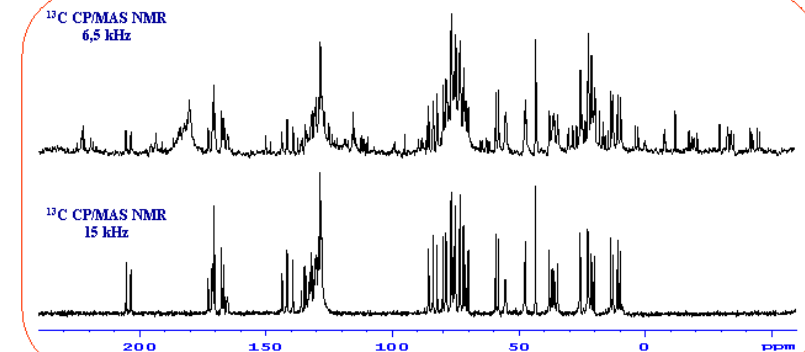
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



^{13}C CP/MAS NMR
zvýšení frekvence MAS



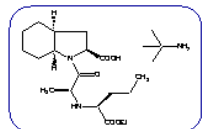
2.5 mm ($\approx 35\text{kHz}$)
4mm ($\approx 17\text{kHz}$)
7mm ($\approx 7\text{kHz}$)



Naším prvním úkolem je tedy odstranění nebo potlačení rotačních signálů. Jistě nejjednodušší technikou je použití dostatečně vysoké frekvence rotace tak, aby rotační pásy nezasahovaly do frekvenčního rozsahu spektra anebo byly velmi málo intenzivní. To v případě uhlíkových spekter a intenzitě magnetického pole 11,7 T (500 MHz spektrometr) je kolem 12-17 kHz. To jsou frekvence rotace dosažitelné ve 4 mm sondě (výborně). Ovšem v některých případech není možné použít takto vysoké frekvence rotace.

Potlačení rotačních signálů

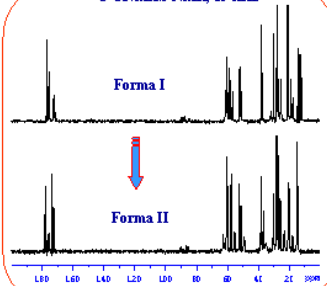
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



Nestabilní při vyšších frekvencích MAS

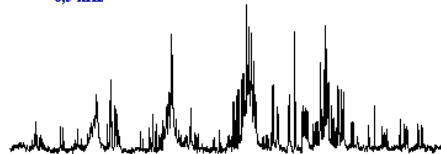
(teplota + tlak = fázový přechod)

¹³C CP/MAS NMR, 15 kHz

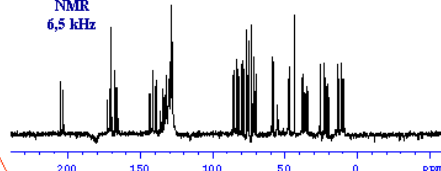


¹³C CP-TOSS/MAS NMR
TOtal Sideband Suppression

¹³C CP/MAS NMR
6,5 kHz



¹³C CP-TOSS/MAS
NMR
6,5 kHz

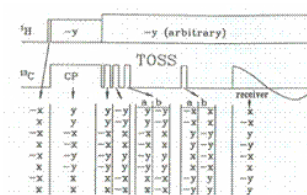


Příkladem, kdy toto nastává, může být látka perindopryl – zřejmě nestechiometrický hydrát. Molekuly vody jsou poměrně volně uloženy v dutinách a kanálech krystalu. Při zvýšení frekvence rotace se rapidně zvýší teplota vzorku díky tření pláště se vzduchem a navíc narostou i odstředivé síly. Díky teplotě a tlaku pak během několika hodin přejde jedna krystalová forma na druhou. V tomto okamžiku musíme buď provést experiment ve velmi krátkém čase (při vysoké frekvenci rotace) anebo použít poměrně komplikovanou pulsní sekvenci, která potlačí rotační signály při relativně pomalých rotacích. Tato pulsní sekvence se nazývá TOSS.

Potlačení rotačních signálů

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

¹³C CP-TOSS/MAS NMR
TOtal Sideband Suppression



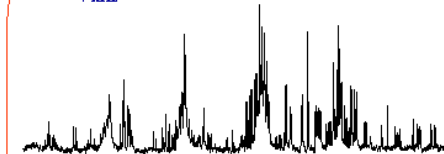
Časování prodlev mezi 180° pulsy

$\Delta t_1/t_r$	$\Delta t_2/t_r$	$\Delta t_3/t_r$	$\Delta t_4/t_r$	$\Delta t_5/t_r$
0,1226	0,0773	0,2236	1,0433	0,7744
0,1885	0,0412	0,5018	0,9588	0,2287

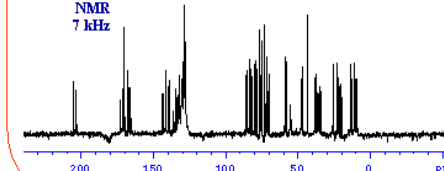
Dixon W.T.

NMR Spectra in Spinning Samples (TOSS), *J. Chem. Phys.* (1982); 77: 1800.

¹³C CP/MAS NMR
7 kHz



¹³C CP-TOSS/MAS
NMR
7 kHz



Navržena byla v roce 1982 a je založena na aplikaci 4 fázově posunutých rotor synchronizovaných 180° uhlíkových pulsů. Každý ze čtyř 180 pulsů invertuje směr precese uhlíkové magnetizace. Díky přesnému načasování pulsů se vznikající rotační echa odečtou a jsou potlačena. Díky komplikovanému fázovému cyklu se zkompenzují i nepřesnosti v délce a fázi pulsů. Nakonec pak ve spektru nepozorujeme vznik intenzivních rotačních pásů. Nicméně tato pulsní sekvence a její odvozeniny dobře pracují pouze do frekvencí rotace maximálně do 5-6 kHz. Pak se projevují jisté nepřesnosti. Důsledkem těchto nepřesností je neúplné potlačení signálů nebo vznik negativních či disperzních pásů.

Izotropní chemický posun – velká CSA

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

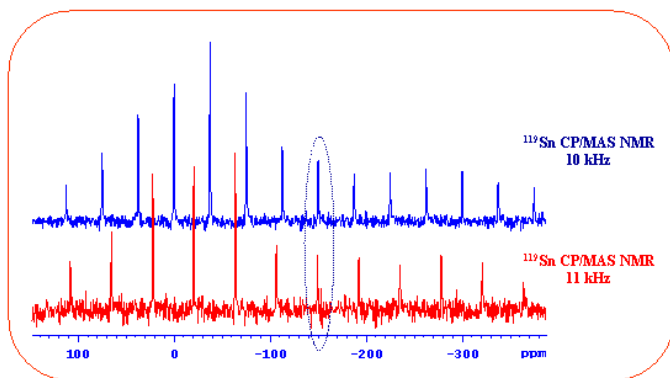
^{119}Sn :

Anizotropie chemického posunu 500 -100 ppm – 93-186 kHz (spektrometr 11,7 T)

Ultra-rychlá rotace 35 kHz – **nedostatečné**

TOSS – **nefunguje**

Nutno měřit několik spekter při různé frekvenci rotace



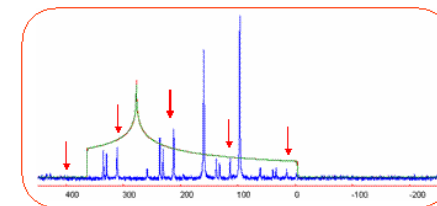
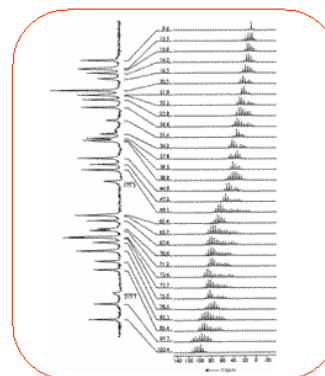
Přes tyto komplikace je situace v uhlíkových nebo dusíkových spektrech velmi jednoduchá a čitelná. Anizotropie chemického posunu není v těchto případech taková, aby nebylo možné identifikovat a nalézt centrální signál odpovídající izotropní hodnotě chemického posunu. U těžších atomových jader např. ^{119}Sn , kde může CSA dosahovat až 500 ppm, což při 11,7 T (na 500 MHz spektrometru) odpovídá 93 kHz, je situace o něco zapeklitější. Ani nejvyšší možná rotace kolem 30 kHz (2,5 mm sonda) nepomůže. Navíc centrální signál zdaleka nekorresponduje se signálem s největší intenzitou. Proto musíme naměřit dvě až tři spektra při různé frekvenci rotace. Centrální signál odrážející izotropní hodnotu chemického posunu by měl zůstat na stejném místě. „By měl“, protože velmi často jsou tato jádra citlivá na teplotu a tak i malé změny v teplotě vzorku se odrážejí na hodnotě chemického posunu.

Rotační signály – vlastní hodnoty CSA

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

Určení vlastních hodnot tenzoru chemického posunu

Z intenzit rotačních signálů lze určit vlastní hodnoty tenzoru chemického posunu
Z 1D spektra pouze pro jednoduché sloučeniny
Pro složité látky – 2D separační techniky.

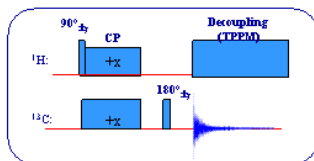


*D. W. Alderman, G. McGeorge, J. Z. Hu, R. J. Pugmire, D. M. Grant
Mol. Phys. 1998, 95, 1113.*

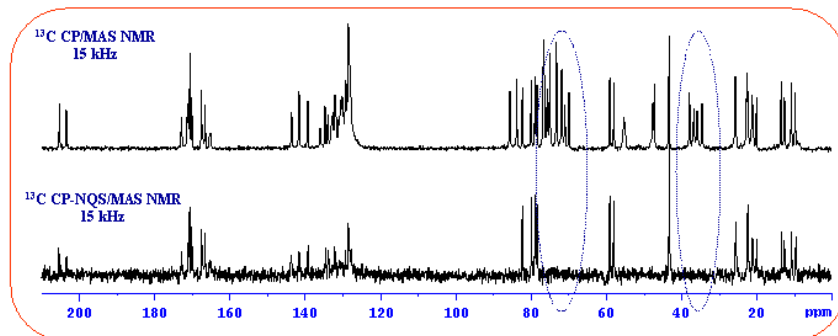
Na druhou stranu rotační signály v sobě nesou velmi zajímavou informaci. Z jejich intenzit je možné určit vlastní hodnoty tenzoru chemického posunu. Z tradičního 1D NMR spektra měřeného při poměrně malé rotaci je toto určení možné provést pouze tehdy, pokud je zkoumaná sloučenina jednoduchá (malý počet signálů ve spektru). Signály se nesmí překrývat. Pro komplikované systémy se musí použít 2D technika separace anizotropie chemického posunu. Díky poměrně komplikované pulsní sekvenci se anizotropie chemického posunu separuje podle izotropního chemického posunu do druhé dimenze. Pokud cíleně nezkoumáme CSA, pak se ale většinou snažíme rotační signály potlačit.

Potlačení CH a CH₂ signálů

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRCAS CR



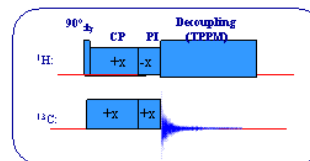
¹³C CP-NQS/MAS NMR
Non-Quaternary Suppression
– potlačení CH₂ a CH signálů silnou dipolární interakcí
C a CH₃ signály zůstávají (vzdálené protony + rotace)



V následujícím kroku je nutné získané spektrum zjednodušit. Prvním a velmi jednoduchým experimentem pro hrubé přiřazení signálů strukturním jednotkám je přerušovaný dekapling neboli „nqs“ experiment. Jeho základem je CP, za kterou se nachází krátká vývojová perioda. Ta je rozdělena 180° pulsem, který refokusuje vývoj chemického posunu a kompenzuje fázové distorze. Během této periody jsou aktivní heteronukleární dipolární interakce, které pokud jsou silné, vedou k velmi rychlé ztrátě fázové koherence ¹³C magnetizace. Dojde tedy k rychlému rozfázování vektorů magnetizace a signál zaniká. Čím je velikost dipolární interakce větší tím je rychlejší i proces ztráty koherence. Ten je nejrychlejší u strukturních jednotek s přímo vázanými ¹H atomy (CH₂ a CH). Kvartérní uhlíky jsou od ostatních protonů podstatně dále 2-2,5 Å a metyly zase rotují dostatečně rychle, aby velikost dipolárních interakcí byla oslabena.

Potlačení CH signálů

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRCAS CR



Rozhoduje dynamika cross-polarizace

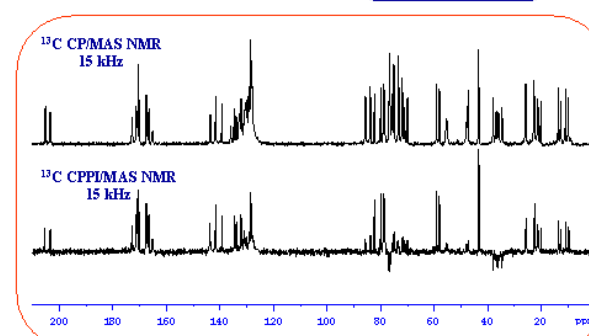
1. CP – maximální signál
2. PI – depolarizace
CH prochází nulovým bodem
CH₂ už je negativní

CP: 1-2 ms
PI: 45-65 μs

¹³C CPPI/MAS NMR
Cross-Polarization Polarization Inversion

– rychlá depolarizace potlačí CH, zatímco CH₂ jsou invertované

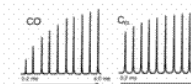
C a CH₃ signály zůstávají pozitivní



Rozhoduje dynamika cross-polarizace

Čím silnější dipolární interakce tím rychleji se vystavuje ¹³C magnetizace

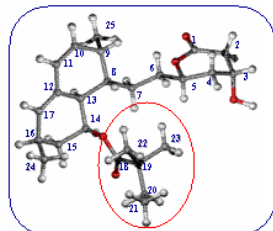
Nejrychleji pro
CH₂ > CH > CH₃ > C



Nyní je důležité rozlišit CH a CH₂ signály. K tomuto účelu byl navržen experiment, který je založený na tom, že dynamika CP je pro různé funkční skupiny různá. Rychlost výstavby a vzniku ¹³C signálu je závislá na síle dipolárních interakcí. Nejrychleji k ní dochází v případě CH₂ skupin díky tomu, že dochází k přenosu polarizace ze dvou protonů současně. Při tomto experimentu se během první CP periody vytvoří maximální ¹³C magnetizace pro všechny strukturní jednotky. Během následující krátké „inverzní“ periody se změní fáze spinlockovacího protonového pole. To vede k tomu, že směr vektoru magnetizace, který se během této periody vytváří má přesně opačný směr. Nastává tedy inverze uhlíkové magnetizace. Nejrychleji invertují signály CH₂ jednotek, ty jsou následované CH skupinami, zatímco CH₃ a C jsou dlouho v klidu. A pokud délku této inverzní periody optimalizují, pak v určitém okamžiku jsou signály CH skupin velmi potlačeny, zatímco CH₂ jsou už invertované a negativní.

CPPI – problém se segmentální dynamikou

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRPSCAS CR

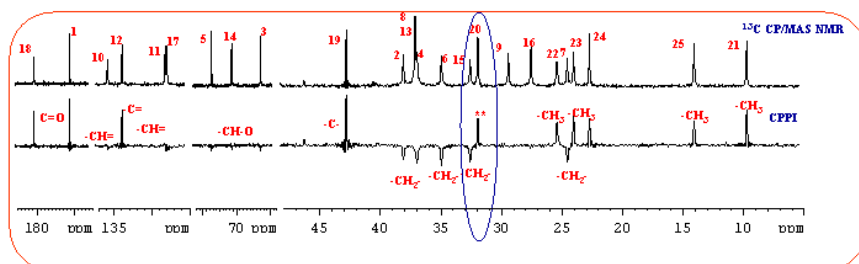


Rozhoduje dynamika cross-polarizace

Čím silnější dipolární interakce tím rychleji se vystavuje ^{13}C magnetizace

Nejrychleji pro $\text{CH}_2 > \text{CH} > \text{CH}_3 > \text{C}$

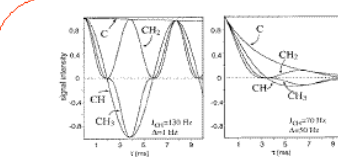
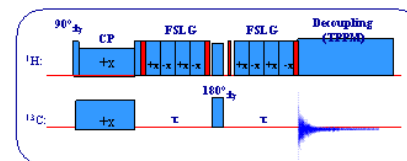
Pozor na rychlé vnitřní pohyby celých segmentů



Ale pozor! I zde existuje jisté nebezpečí nesprávné interpretace signálů ve spektru. Toto nebezpečí plyne z toho faktu, že hnací silou experimentu a inverze polarizace jsou dipolární interakce. Ty mohou být oslabeny rychlým vnitřním pohybem celých segmentů. A k těmto pohybům dochází i ve vysoce krystalických systémech. Zde je uveden jeden typický příklad. Po provedení velmi pečlivě zoptimalizovaného experimentu s inverzí uhlíkové magnetizace (CPPI) jsou v získaném spektru patrné negativní signály CH_2 jednotek, signály CH skupin jsou potlačeny a signály C a CH_3 jednotek jsou pozitivní. Ale jeden pozitivní signál přebývá zatímco negativní signál chybí! Buď je navržená struktura špatná nebo se něco výjimečného děje s dynamikou systému. Celý tento esterový ocásek v krystalu rotuje a to tak rychle, že velikost dipolárních interakcí v něm je snížena na $1/3$. To vede k tomu, že CH_2 skupina se zdánlivě chová jako methyl.

Využití ^1H - ^{13}C J -interakcí – SoS-APT

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRPSCAS CR

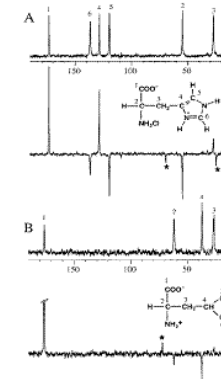


SoS-APT – velikost J -interakcí

1. CP – maximální ^{13}C signál
2. FSLG – potlačení homonukleárních ^1H - ^1H interakcí
3. MAS – potlačení CSA a heteronukleárních ^1H - ^{13}C interakcí
4. 180° pulsy – refokuse ^1H a ^{13}C chemického posunu
5. τ – vývoj pouze podle J -interakce
6. škálovací faktor – $1/\sqrt{3}$

Rozhoduje velikost J -interakce a počet vázaných atomů ^1H

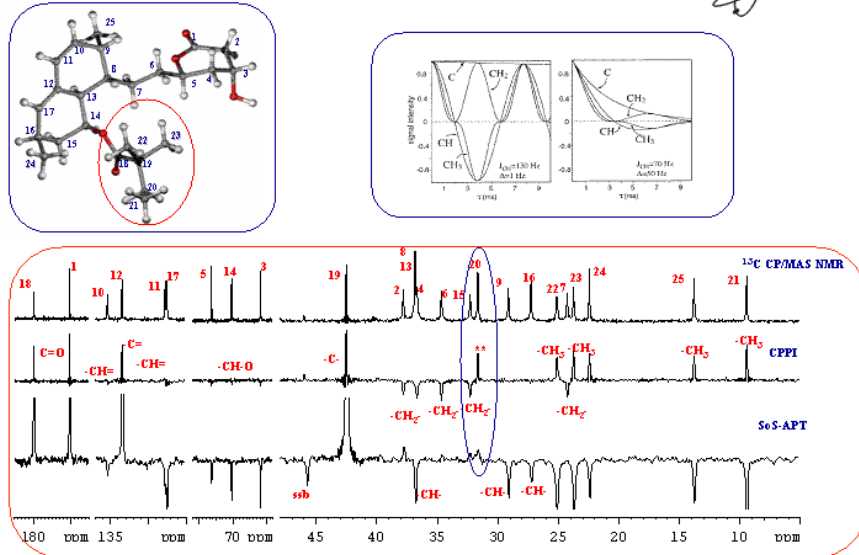
$$I = I_0 \cos^n(2\pi J_{\text{CH}} \tau) e^{-2\tau/T_2}$$



V tomto případě je pro vyřešení tohoto problému nezbytně nutné využít spin-spinových interakcí, které jsou nezávislé na pohybovém stavu molekul. Velikost těchto interakcí je poměrně malá v porovnání se silou přímých dipol-dipolových interakcí a z toho plyne značná obtíž při provádění těchto experimentů. Pulsní sekvence je velmi dlouhá, dochází během ní ke značné ztrátě uhlíkové magnetizace a citlivost experimentu je tedy nízká. Nicméně je to experiment proveditelný a probíhá následovně: nejprve CP vytvoříme maximální ^{13}C magnetizaci, tu potom během periody τ necháme vyvíjet pouze pod vlivem spin-spinové skalární J interakce (heteronukleární). 180° pulsy refokusuji ^1H a ^{13}C chemické posuny, FSLG potlačí silné ^1H - ^1H dipolární interakce a MAS potlačí heteronukleární dipolární interakce a CSA. Za tohoto nastavení se detekovaný ^{13}C signál vyvíjí v závislosti na délce periody τ podle uvedeného vztahu a tak lze najít odpovídající čas, kdy jsou signály CH a CH_3 negativní zatímco C a CH_2 budou pozitivní.

CPPI vs. SoS APT

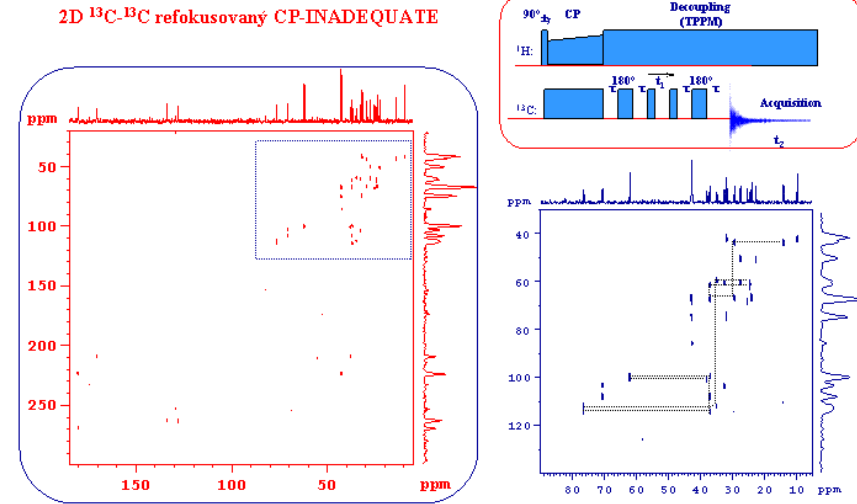
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRPSCAS CR



Zde je uvedeno porovnání obou editačních experimentů provedených na dříve diskutovaném simvastatinu s velmi pohyblivým esterovým koncem. Nejprve se jasně potvrdilo, že daný podivný signál skutečně odpovídá CH_2 strukturální jednotce. Co je dále patrné na těchto spektrech, je velmi malá intenzita CH_2 skupin. To plyne z toho, že působení heteronukleárních dipolárních interakcí je pohou rotací vzorku pod magickým úhlem potlačeno jen částečně. I když je rotace vzorku poměrně vysoká kolem 13-15kHz, tak zbytkové interakce způsobí rychlé rozfázování a pokles intenzity signálu. To se samozřejmě nejvíce projeví u CH_2 skupin (působení dvou vodíkových atomů na jeden uhlíkový atom, u CH skupiny je tento vliv přinejmenším poloviční).

Využití ^{13}C - ^{13}C J -interakcí – CP-INADEQUATE

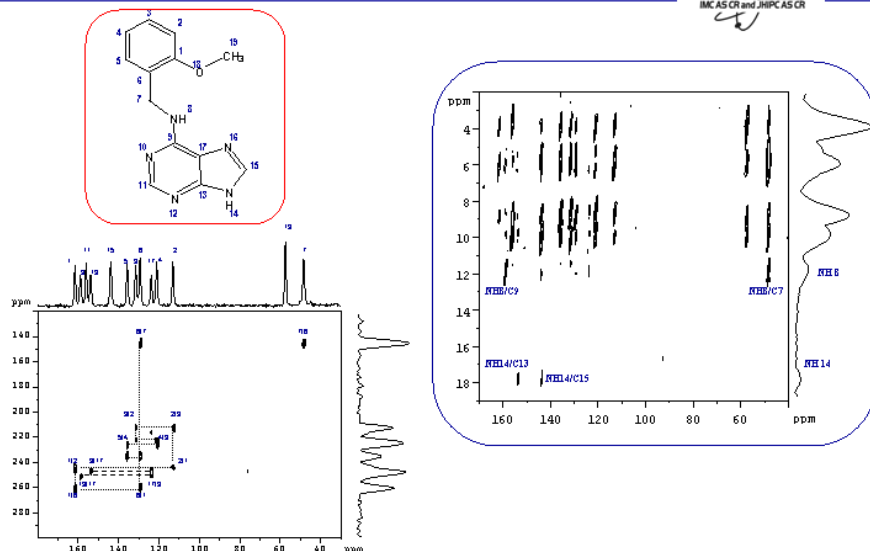
Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JRPSCAS CR



Nicméně pro úplné a zcela jednoznačné přiřazení signálů strukturálním jednotkám je potřeba provést 2D experimenty. Vzhledem k tomu, že v pevném stavu pracujeme se 100% koncentrací látky, je dostupný i velmi málo citlivý experiment INADEQUATE. Ten je založen na ^{13}C - ^{13}C spin-spinových interakcích. To v případě látky s přirozeným izotopickým zastoupením znamená, že pravděpodobnost výskytu dvou izotopů ^{13}C vedle sebe je jen 1:10000. Pokud ale máme spinový systém do velikosti 20-30 uhlíkových atomů a pokud jsou signály relativně úzké 20-50 Hz, lze tento experiment provést v reálném čase. Během 4 dnů až týdne lze získat velmi kvalitní spektrum a už za dva dny lze vysledovat korelační stopu. Optimalizace tohoto experimentu bude uvedena později.

HETCOR & CP-INADEQUATE

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR



V některých případech ani tento typ experimentu, který sleduje konektivitu uhlíkového skeletu není dostatečný. Například rozlišení uhlíkového atomu 9 a 13 v této sloučenině není zcela jednoznačné. Pak je nutné využít jiný 2D experiment a tím je ^1H - ^{13}C HETCOR, který přináší další doplňkové informace. Z toho tedy plyne, že přiřazení signálů komplikovaných organických sloučenin v přirozeném izotopickém zastoupení je proces zdlouhavý a vyžaduje kombinaci jak 1D technik zjednodušení a editace ^{13}C NMR spekter tak ve finále i aplikaci 2D postupů korelace různých jader.

Shrnutí

Joint Laboratory of Solid State NMR
IMCAS CR and JHPCAS CR

- Velké rozdíly v chemických posunech mezi „kapalinou“ a „krystalem“.
- Více molekul v nezávislé části krystalové jednotky – více signálů.
- Potlačení rotačních signálů – rychlá rotace vzorku pod magickým úhlem.
- Potlačení rotačních signálů – TOSS – pomalé rotace (rozklad vzorku).
- CSA – 90-180 kHz – více experimentů s rozdílnou frekvencí MAS.
- Intenzita rotačních signálů – vlastní hodnoty tenzoru chemického posunu.
- Potlačení CH a CH_2 – NQS – dipolární rozfázování.
- Inverze CH_2 a potlačení CH – CPPI - dynamika CP.
- CPPI selhává v případě intenzivní vnitřní segmentální pohyblivosti.
- Rozlišení na základě ^1H - ^{13}C J -interakci – SoS-APT.
- Úplné přiřazení - 2D experimenty – INADEQUATE, HETCOR.