



PRACOWNIA PODSTAW BIOFIZYKI

**Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku
„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”
Biofizyka molekularna**

**Jedno- i dwuwymiarowa spektroskopia NMR w
wyznaczaniu struktury cząsteczek organicznych
(PPB17d)**

mgr Michał Górka



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Cel ćwiczenia

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR - *nuclear magnetic resonance*) jest wszechstronną techniką badawczą znajdującą liczne zastosowania w biologii, chemii, fizyce oraz medycynie. Metoda ta jest jednym z podstawowych narzędzi służących do badania struktury i dynamiki cząsteczek organicznych w roztworach (*solution-state NMR*). Obok krystalografii jest to główna metoda wyznaczania struktury cząsteczki (*structure elucidation*) z dokładnością atomową.

Choć istnieje wiele wyspecjalizowanych eksperymentów NMR zasady ich konstrukcji, sposoby przetwarzania otrzymanych danych oraz ich prezentacji są zazwyczaj podobne, co jest jedną z przyczyn popularności tej gałęzi spektroskopii. Celem ćwiczenia jest zapoznanie się studentów z powszechnie stosowanymi typami jedno- i dwuwymiarowych widm NMR przez określenie za ich pomocą struktury prostego związku organicznego dysponując dodatkowo tylko podstawowymi informacjami, jakie można uzyskać z analizy elementarnej czy spektrometrii mas.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Wstęp

Podstawy

Teoria leżąca u podstaw spektroskopii NMR przedstawiona została na wykładzie „Spektroskopia molekularna” oraz w literaturze (przykładowe pozycje na końcu opisu). Pełny opis sposobu projektowania wielowymiarowych eksperymentów NMR wymaga wykorzystania metod mechaniki kwantowej układów złożonych, ale do praktycznego zastosowania wielu z nich wystarczy tylko podstawowa wiedza. W tym ćwiczeniu ograniczymy się do spektroskopii jąder o spinie $\frac{1}{2}$ związków w stanie ciekłym, co jest zdecydowanie najpowszechniejszym typem spektroskopii NMR.

Dla każdego jądra o spinie $\frac{1}{2}$ na podstawie jego częstości rezonansowej w zewnętrznym polu magnetycznym można wprowadzić parametr nazywany przesunięciem chemicznym δ (liczbę rzeczywistą). Przesunięcia chemiczne różnych izotopów (wodór-1, węgiel-13...) mierzone są na osobnych skalach. Wartości przesunięć chemicznych pozwalają na określenie typu grupy funkcyjnej, z której pochodzi dane jądro.

Poszczególne jądra o spinie $\frac{1}{2}$ z jednej cząsteczki mogą ze sobą oddziaływać i dla oddziaływań przenoszonych przez elektrony – a więc związanych ze strukturą chemiczną cząsteczki – miarą tego siły tego oddziaływania są stałe sprzężenia skalarnego J . W górnym indeksie dla danej stałej sprzężenia umieszcza się liczbę wiązań dzielących rozważane jądra 1J dla bezpośrednio związanych jąder (np. proton i węgiel z grupy CH), 2J np. dla geminalnych protonów, 3J dla wicynalnych. Dla jąder odleglejszych oddziaływania są często zbyt słabe by miały większe zastosowanie w standardowych eksperymentach.

Na widmach jednowymiarowych sprzężenia między jądrami objawiają się przez występowanie grup sygnałów (multipletów) pochodzących od jednego jądra (szczegóły w literaturze). Przez zastosowanie impulsów radiowych o odpowiednio dobranej mocy i długości i oddzielonych w czasie przez dobrze określone przerwy czasowe oddziaływania między spinami można wykorzystać do rejestracji eksperymentów wielowymiarowych. W najprostszym przypadku mamy do czynienia z eksperymentami dwuwymiarowymi (2D), gdzie intensywność sygnału jest funkcją dwóch przesunięć chemicznych. Z przyczyn praktycznych jednym z tych przesunięć chemicznych jest przesunięcie protonów, drugie może także być przesunięciem protonów (eksperymenty homojądrowe) lub dotyczyć innego jądra (często węgla lub ew. azotu) – są to tak zwane eksperymenty heterojądrowe.

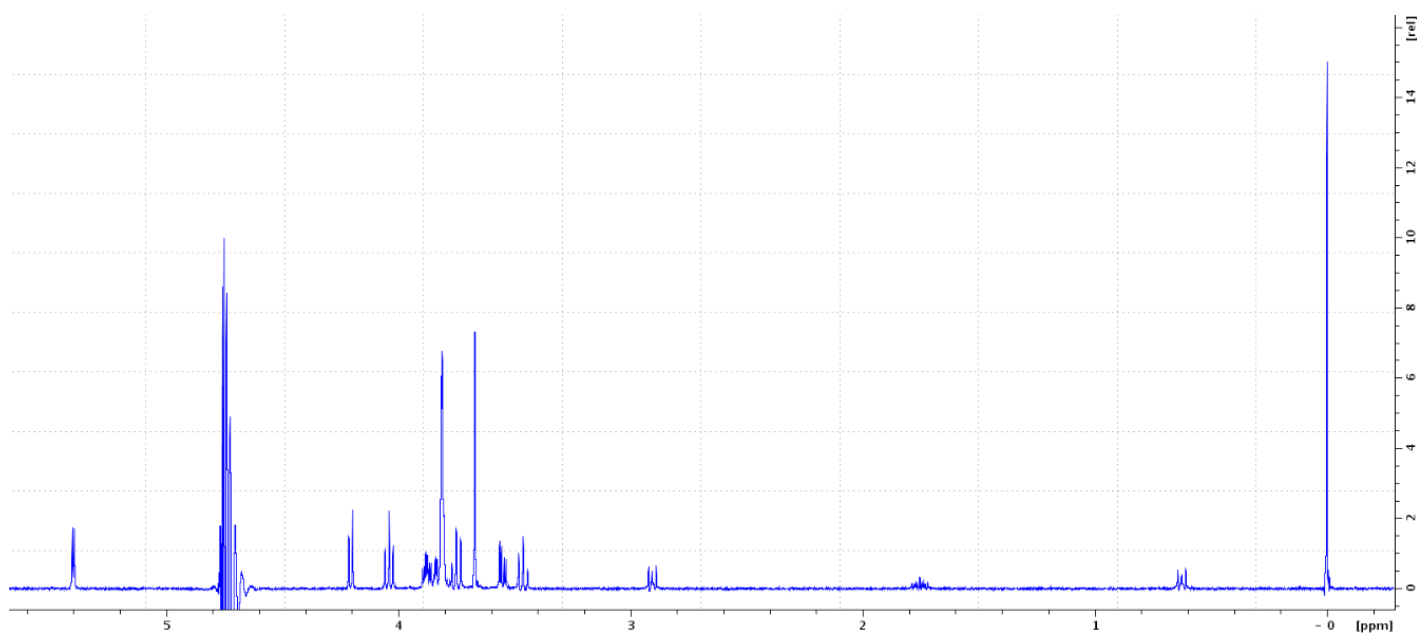


KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY





Rys. 1 Przykładowe jednowymiarowe widmo protonowe, tu sacharozy w wodzie. Sygnał przy 0 ppm pochodzi od związku referencyjnego (DSS), sygnał przy 4,7 ppm pochodzi od wody i jest zniekształcony przez operacje mające na celu zmniejszenie jego intensywności.

Najprostszym typem eksperymentu 2D jest homojądrowe widmo COSY (*correlation spectroscopy*), gdzie sygnały na widmie pojawiają się dla sprzężonych skalarnie jąder – zazwyczaj dotyczy to protonów wicynalnych. Na widmach HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) sygnały pojawiają się dla par przesunięć chemicznych protonów i bezpośrednio związanych heterojąder (w chemii organicznej najczęściej węgla). Eksperymenty HMBC (*heteronuclear multiple-bond correlation*) są podobne do eksperymentów HSQC, ale projektowane są w taki sposób, że sygnały pojawiają się zasadniczo dla słabiej oddziałujących par jąder – między odleglejszymi jądrami, a sygnały od jąder bezpośrednio związanych są niewidoczne lub znacznie osłabione. Choć dla związków zawierających węgiel w naturalnej abundancji (nie wzbogaconych izotopowo) rejestracja widma HMBC trwa zazwyczaj wiele godzin, to uzyskane z niego informacje (w połączeniu z widmami COSY i HSQC) są niezwykle pomocne przy wyznaczaniu struktury złożonych cząsteczek organicznych. Bardziej szczegółowe informacje o poszczególnych widmach podane zostaną przez osobę prowadzącą ćwiczenie.

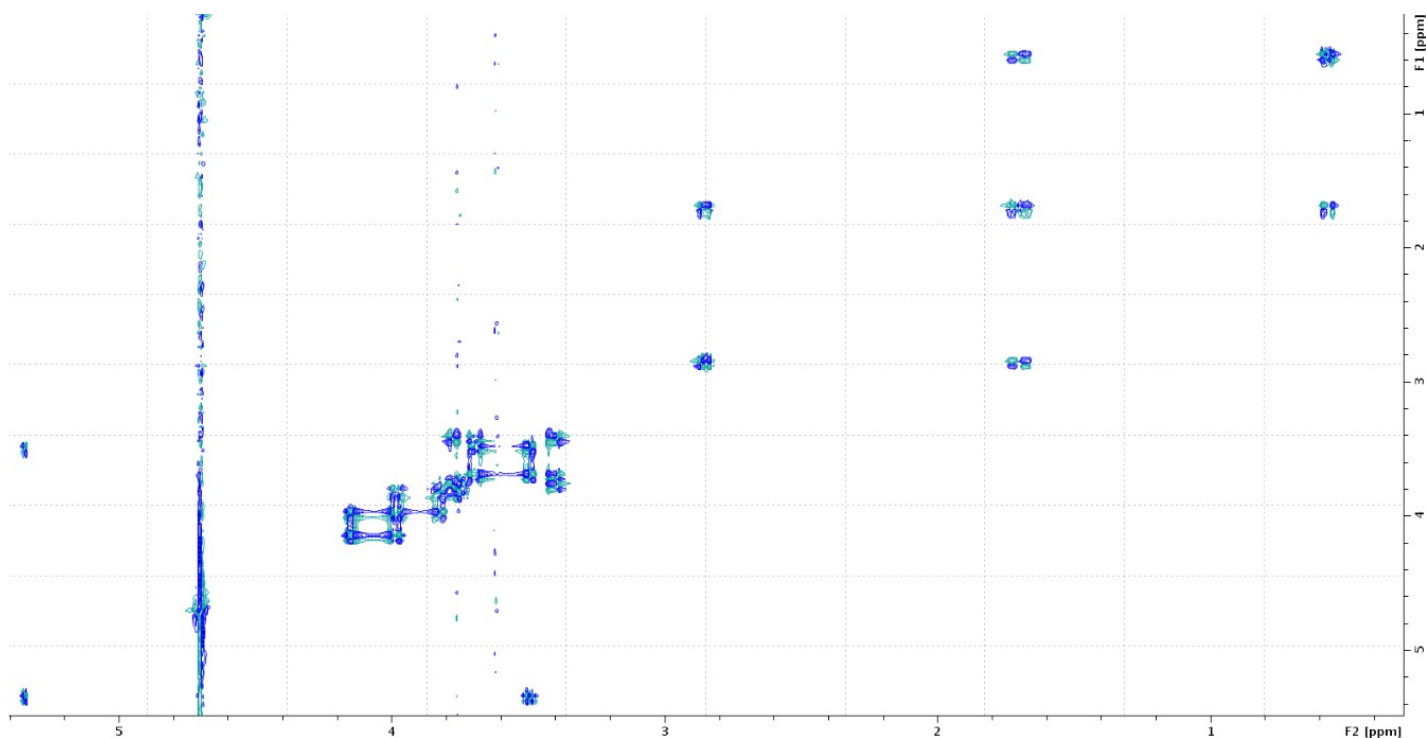


KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY





Rys. 2 Przykładowe widmo dwuwymiarowe – ^1H , ^1H DQF COSY sacharozy w wodzie.

Praktyczne aspekty spektroskopii NMR

Do prawidłowego przeprowadzenia eksperymentów NMR wymagane jest zachowanie stałości pola magnetycznego w czasie. Można wyróżnić dwa typy zaburzeń tej stałości. Pierwszym jest fakt, że nadprzewodzący magnes ulega powolnemu rozładowywaniu, co przekłada się na słabnięcie pola magnetycznego – w przełożeniu na zmiany częstości rezonansowej protonów są to zmiany rzędu kilku Hz na godzinę. Drugim jest występowanie zewnętrznych zakłóceń o różnej amplitudzie i częstości – związanych np. ze zmianami obciążenia sieci elektrycznej, przejazdem tramwaju nawet w odległości kilkudziesięciu metrów itd. By wykrywać i niwelować te efekty (przynajmniej w pierwszym rzędzie) współczesne spektrometry NMR wyposażone są w tak zwany układ locku. Jest to w swej istocie samodzielny spektrometr rejestrujący sygnał od obecnych w próbce jąder deuteru i tak zmieniający prąd w głównej cewce pomocniczej magnesu (nazywanej shimem z_0 bądź „field”) by sygnał ten nie zmieniał położenia. Ponieważ naturalna abundancja deuteru jest niska (poniżej 0,02%) trzeba go dodać do próbki, zazwyczaj w formie deuterowanego rozpuszczalnika – częstym przykładem jest dodanie ciężkiej wody (D_2O) do końcowego stężenia 5-10% dla roztworów wodnych. W przypadku roztworów niewodnych często stosuje się w pełni deuterowany rozpuszczalnik. Powoduje to jednocześnie usunięcie z widm protonowych sygnału od rozpuszczalnika, co może być pożądane z uwagi na możliwość nakładania się z sygnałami z



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



badanego związku.

Element spektrometru umieszczony wewnątrz nadprzewodzącego magnesu określa się mianem sondy lub głowicy (*probe head*). Za naświetlanie próbki oraz zbieranie sygnału odpowiada odpowiednio skonstruowany układ z cewkami wokół miejsca na umieszczenie próbki z badanym związkiem. Właściwości tego układu elektrycznego będą zależały zarówno od składu próbki (w szczególności od jej podatności elektrycznej i magnetycznej), jak i materiału, z którego wykonana jest próbka. Przed przystąpieniem do pomiarów parametry elektryczne muszą zostać zoptymalizowane pod kątem jak najwydajniejszego transferu energii między cewką i próbką oraz między cewką a dalszymi fragmentami układu (jak wzmacniacze). Odbywa się to przez przemieszczanie (za pomocą odpowiednich prętów) dwóch kondensatorów, określanych angielskimi nazwami *tune* i *match*. Jest to proces strojenia sondy, analogiczny do strojenia tradycyjnego radia. We współczesnych spektrometrach pręty są często przesuwane przez silniki elektryczne kontrolowane za pomocą komputera.

Pole magnetyczne wytwarzane przez nadprzewodzący magnes ma ograniczoną jednorodność w objętości badanej próbki, dalece niewystarczającą do przeprowadzanie eksperymentów NMR o wysokiej rozdzielczości. Sytuację pogarsza też niejednorodność próbki (co do materiału, jak i jej geometrii) i efekty brzegowe. By uzyskać wymaganą jednorodność pola magnetycznego magnesy wykorzystywane w spektroskopii NMR wyposażone są w wiele (zazwyczaj ponad 20) cewki pomocnicze o różnej geometrii. Przez zmiany natężenia przepływającego w nich prądu (wytwarzającego zgodnie z zasadami elektrodynamiki pole magnetyczne) można zmienić rozkład pola magnetycznego w objętości próbki. Z przyczyn historycznych proces ten nazywa się shimowaniem magnesu (od angielskiego *shim*).

Długość impulsu, który przy ustalonej mocy obróci wektor namagnesowania o określony kąt, wyznacza się empirycznie. Ponieważ na jego długość wpływ ma zarówno geometria i materiał z którego wykonana jest próbka, jak i roztwór, w którym rozpuszczona jest badana próbka – szczególnie ważna jest zawartość soli – przed wykonaniem eksperymentu należy przeprowadzić taką kalibrację. Z przyczyn praktycznych najłatwiej przeprowadzić kalibrację przez znalezienie długości impulsu obracającego wektor namagnesowania o 360° , przyjmując za punkt wyjścia długość impulsu dla innej, jak najbardziej podobnej próbki.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Rejestracja widm NMR odbywa się przez poddanie próbki szeregowi impulsów elektromagnetycznych (radiowych) o dobrze określonej mocy, długości i kształcie oraz występujących po sobie w dobrze określonych odstępach czasu, a następnie obserwacji odpowiedzi układu. Z uwagi na powyższe praktyczną realizację eksperymentu NMR określa się mianem sekwencji impulsów (*pulse sequence*) lub programu pulsowego (*pulse program*). Pojedynczy przebieg sekwencji impulsów (od namagnesowania podłużnego do rejestracji namagnesowania poprzecznego) określa się mianem skanu.

Powrót układu do warunków równowagi termicznej i odtworzenie namagnesowania podłużnego po jej wykorzystaniu do rejestracji danych zachodzi w skończonym czasie i mechanizm tego zjawiska (relaksacja podłużna) opisany jest w literaturze). W praktyce dla protonów czasy relaksacji podłużnej mieszczą się w zakresie 1-10 s. Przerwa między kolejnymi skanami eksperymentu musi więc wystarczać do odtworzenia przynajmniej z części tej namagnesowania i dla protonów ustala się ją zazwyczaj na 1-2 s. Ponieważ często nie wystarcza to do pełnego odtworzenia namagnesowania podłużnego by kolejne skany eksperymentu zaczynały się od takiej samej wartości wyjściowej przed właściwym eksperymentem stosuje się „puste skany” (*dummy scans*) próbkę poddaje się pełnym przebiegom sekwencji impulsów, ale nie zbiera się danych. W przypadku eksperymentów powodujących nagrzewanie się próbki i/lub sondy umożliwia to także ustalenie temperatury przed właściwymi pomiarami.

Eksperymenty bardziej skomplikowane niż najprostsze widma jednowymiarowe realizowane są przez zastosowanie wielu impulsów elektromagnetycznych i wszelkie niedoskonałości kalibracji impulsów prowadzić mogą do pojawienia się na widmach dodatkowych, niepożądanych sygnałów. Przez wykonanie powtórzeń eksperymentu zmieniając w określony sposób fazy wybranych impulsów można spowodować, że sygnały niepożądane będą miały różne znaki w kolejnych powtórzeniach i po dodaniu zebranych danych ulegną stłumieniu. Powtórzenia takie nazywane są cyklami fazowymi. Zastosowanie cyklu fazowego o długości n wydłuża czas trwania eksperymentu n -krotnie i zwiększa stosunek S/N (sygnału do szumu) $n^{1/2}$ krotnie. Choć wiele współczesnych eksperymentów może być rejestrowana bez wykonywania cykli fazowych tradycyjna metody rejestracji eksperymentów wielowymiarowych wymagały ich zastosowania i



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



każdorazowo zaczynając pracę z nową sekwencją impulsów należy sprawdzić, jaki jest minimalny cykl fazowy oraz jaka jest maksymalna długość cyklu fazowego przewidzianego w danej sekwencji impulsów.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Przebieg ćwiczenia

Zadaniem do rozwiązania w trakcie ćwiczenia jest określenie struktury chemicznej otrzymanego związku, wraz z uzasadnieniem na podstawie analizy widm NMR. O otrzymanym związku wiadomo, że jest to bezbarwna ciecz (w temperaturze pokojowej) o woni zbliżonej do benzyny. Z analizy elementarnej i masowej wynika, że wzór sumaryczny związku to C_8H_{10} . Otrzymana próbka to mieszanina powstała zawierająca 10% badanego związku oraz 90% w pełni deuterowanego chloroformu ($CDCl_3$). Z uwagi na lotność otrzymanej mieszaniny nie należy jej podgrzewać do temperatury powyżej $40^\circ C$.

Po zapoznaniu się ze spektrometrem i zasadami pracy z nim:

1. Próbkę umieścić w turbince (*spinner*) i po wyśrodkowaniu słupa cieczy na wysokości odpowiadającej środkowi cewki odbiorczej sondy wprowadzić razem z turbinką do spektrometru.
2. Zestroić kanał protonowy sondy i sprawdzić strojenie kanału dla węgla.
3. Włączyć układ utrzymujący stałą wartość pola magnetycznego w czasie (tzw. układ locku) i ustawić jego parametry (moc impulsu, wzmocnienie sygnału, poprawka fazowa).
4. Zwiększyć homogenność pola magnetycznego wewnątrz próbki przez zmiany napięć w cewkach pomocniczych spektrometru (tzw. shimowanie).
5. Przeprowadzić kalibrację impulsu protonowego przez znalezienie czasu trwania impulsu obracającego sygnał wody o 360 stopni.
6. Zarejestrować widma jednowymiarowe: protonowe, węglowe, węglowe z odprzęgnięciem protonów, DEPT-90 i DEPT-135.
7. Zarejestrowane widma jednowymiarowe poddać transformacji Fouriera. Czy na podstawie tych widm da się ustalić pochodzenie poszczególnych sygnałów, wielkości stałych sprzężenia, przypisać poszczególne sygnały do konkretnych pozycji w strukturze chemicznej związku? Na ile istotne jest zastosowanie odprzęgnięcia czy zwiększenie intensywności przez wykorzystanie namagnesowania z jąder o wyższym (co do wartości bezwzględnej) współczynniku żyromagnetycznym?
8. Zarejestrować widmo 1H , ^{13}C HSQC (czas: do godziny). Poddać je transformacji Fouriera i przeanalizować. Jakie informacje można uzyskać z tego widma, czy pomaga ono wyodrębnić multiplety z widm jednowymiarowych?
9. Zarejestrować widmo 1H , ^{13}C HMBC (czas: do godziny) zoptymalizowane dla stałych sprzężenia proton-węgiel rzędu 8 Hz. Poddać je transformacji Fouriera i przeanalizować.
10. Zarejestrować dodatkowe widma w zależności od pozostałego czasu – COSY, TOCSY, NOESY. Dla każdego z nich wystarczyć powinno 20-40 minut rejestracji. Czy dostarczają one dodatkowych informacji o strukturze związku? Omówić zgodność z wcześniej zarejestrowanymi widmami.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Raport z wykonanego ćwiczenia

Opis końcowy powinien mieć układ typowy dla raportu z badań doświadczalnych, w szczególności zawierać winien:

- streszczenie,
- krótki wstęp teoretyczny,
- opis wykorzystanej aparatury, badanej próbki oraz przeprowadzonych eksperymentów (liczby punktów, szerokości spektralne) i sposobu przetwarzania danych (funkcje ważące),
- opracowanie uzyskanych danych, które zawierać powinno informacje o tym, jak przypisano poszczególne grupy sygnałów na widmach. Zaproponować strukturę chemiczną badanego związku i ocenić, czy jest ona zgodna ze wszystkimi wynikami. Podać przypisane poszczególnym jądom przesunięcia chemiczne oraz wartości zaobserwowanych stałych sprzężeń. Dla poszczególnych widm (lub ich zbiorów) odpowiedzieć na przedstawione w „Przebiegu ćwiczenia” pytania.

Kolokwium wstępne

Przystąpienie do wykonywania ćwiczenia uwarunkowane jest zaliczeniem kolokwium wstępnego, przeprowadzonego w formie określonej przez osobę prowadzącą ćwiczenie. Osoby przystępujące do ćwiczenia powinny zapoznać się z podaną na końcu niniejszego opisu literaturą. Na kolokwium pojawić się mogą następujące zagadnienia:

- Izotopy o spinie $\frac{1}{2}$ (w stanie podstawowym) ważnych biologicznie pierwiastków oraz ich abundancja naturalna.
- Spiny w (zewnątrznym) polu magnetycznym. Zjawisko rezonansu magnetycznego, współczynnik żyromagnetyczny.
- Ekranowanie jąder i pole efektywne. Definicja przesunięcia chemicznego δ i powód wprowadzenia tej wielkości.
- Oddziaływania między spinami w cząsteczce. Stała sprzężenia J. Struktura subtelna widm i multiplety.
- Jakościowy opis czynników wpływających na wygląd widma NMR na przykładzie prostego związku organicznego (np. etanol).
- Pojęcie transformaty Fouriera i jej wykorzystanie w spektroskopii NMR.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Literatura

Podstawowa:

- Podrozdział 3.7 z
David Sheehan *Physical Biochemistry. Principles and Applications. Second Edition.* Wiley-Blackwell, 2009
- Rozdział J1 z
Igor N. Serdyuk, Nathan R. Zaccai i Joseph Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics. Structure, Dynamics, Function*, Cambridge University Press, 2007
- Materiały o spektroskopii NMR w cieczech z
Peter Atkins *Chemia Fizyczna* PWN (lub w oryginale - OUP) dowolne wydanie

Uzupełniająca/rozszerzająca:

- Rozdziały 3-5 z
Robert M. Silverstein, Francis X. Webster i David J. Kiemle, *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, PWN, 2007
(Opis różnych metod spektroskopii NMR wraz z zastosowaniami w chemii organicznej)
- Rozdział J2 z
Igor N. Serdyuk, Nathan R. Zaccai i Joseph Zaccai, *Methods in Molecular Biophysics. Structure, Dynamics, Function*, Cambridge University Press, 2007
(Rozszerzony opis wielowymiarowej spektroskopii NMR)
- Kazimierczuk, K., Misiak, M., Stanek, J., Zawadzka-Kazimierczuk, A. i Koźmiński, W. (2012). *Generalized Fourier transform for non-uniform sampled data.* W *Novel Sampling Approaches in Higher Dimensional NMR* (strony 79-124). Springer Berlin Heidelberg.
(Głównie przetwarzanie danych, czyli od zmierzonego sygnału do widma. Także prezentacja sposobu uzyskiwania widm o wysokiej wymiarowości i/lub rozdzielczości przez zastosowanie próbkowania niejednorodnego.)
- James Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy* Wiley, 2013
(Dość przystępny opis teorii spektroskopii NMR na poziomie podstawowym, trzeba jednak uważać na odmienne niż przyjęte w fizyce wykorzystanie terminologii z zakresu mechaniki kwantowej - w szczególności pojęć stanu czystego i mieszanego oraz macierzy gęstości i zredukowanej macierzy gęstości.)



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY

