

NOTA APLIKACYJNA — JAGIELLOŃSKIE CENTRUM INNOWACJI

POMIARY WIDM HOMO- I HETEROKORELACYJNYCH [^1H - ^{13}C], [^1H ^{15}N] $^{2\text{D}}$

dr Marek Źylewski*

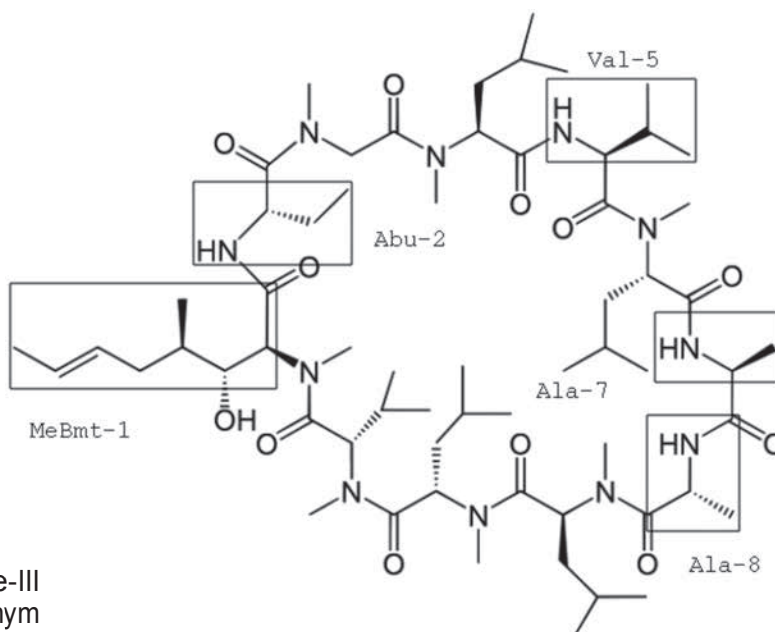
*Laboratorium Spektroskopii NMR, Jagiellońskie Centrum Innowacji, ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków

WSTĘP

Spektroskopia NMR jest jedną z najbardziej potężnych i niosących największą ilość informacji o strukturze chemicznej metod badawczych, stosowanych w chemii i naukach pokrewnych. Głównym zastosowaniem jest określanie za jej pomocą struktury związków chemicznych, umożliwiając nie tylko wyznaczenie sposobu połączenia atomów budujących związek chemiczny, ale również pozwalając niejednokrotnie na określenie jego budowy przestrzennej. Olbrzymi rozwój tej techniki badawczej, jaki dokonuje się, począwszy od lat 80-tych ubiegłego wieku, w zakresie zarówno metodologii pomiarowej, jak i udoskonalień sprzętowych zaowocował możliwością wykonywania wielu różnych typów eksperymentów NMR, niosących kompleksową informację o strukturze chemicznej związków. Celem niniejszej noty jest przedstawienie najczęściej stosowanych, zaawansowanych metod dwuwymiarowej (2D) spektroskopii NMR do badań strukturalnych.

MATERIAŁY I METODY

W pomiarach użyto roztworu 10 mg cyklosporyny w 0,6 ml CDCl_3 . Cyklosporyna jest cyklicznym undekapeptydem, ważnym związkiem używanym w immunosupresji, głównie w terapii po przeszczepach. Na rysunku 1 przedstawiono strukturę chemiczną związku. Na wzorze wskazano elementy strukturalne (reszty aminokwasowe) istotne dla dyskusji przedstawionych eksperymentów.

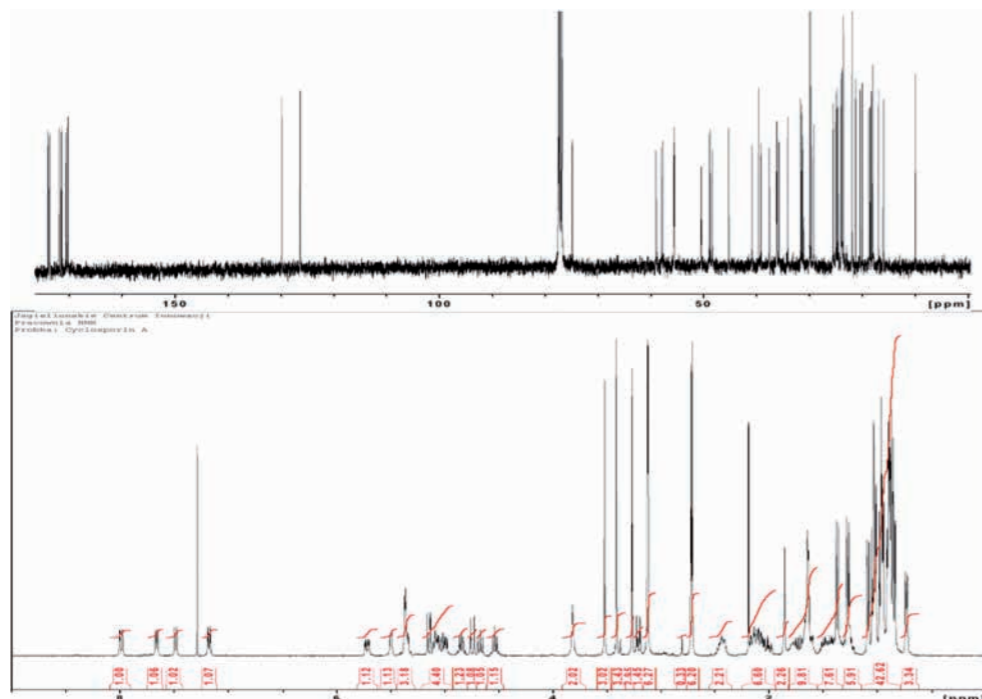


Rysunek 1. Struktura cyklosporyny

Pomiary wykonano na spektrometrze Avance-III HD 400 MHz firmy Bruker, wyposażonym w szerokopasmową sondę gradientową BBO.

WYNIKI I DYSKUSJA

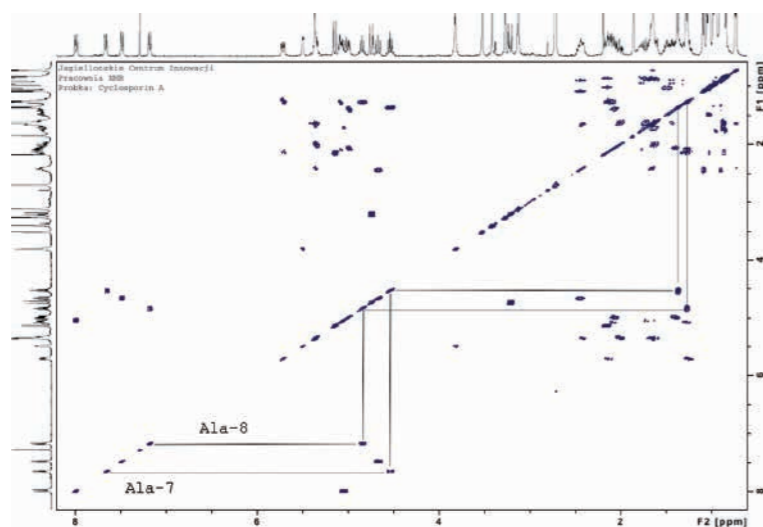
Na rysunku 2 przedstawiono widma 1D, ^1H i ^{13}C NMR.



Rysunek 2. Widma 1D ^1H (dół) i ^{13}C (góra) NMR cyklosporyny

Widma wykazują duży stopień skomplikowania, przez co ich analiza na podstawie prostych reguł pierwszego rzędu nie jest możliwa. Sytuacja taka często występuje w przypadku bardziej skomplikowanych związków organicznych, a jest praktycznie regułą w przypadku biomolekuł i związków wyodrębnianych ze źródeł naturalnych. W takich przypadkach, aby dokonać pełnej analizy spektroskopowej i co za tym idzie potwierdzenia struktury chemicznej badanego związku, z pomocą przychodzą widma 2D, zarówno homo-, jak i heterokorelacyjne.

wskazują na istniejące sprzężenia skalarnie pomiędzy sąsiadującymi protonami, zatem pozwalają na śledzenie wzajemnego sąsiedztwa protonów w związku. Widmo COSY cyklosporyny przedstawiono na rysunku 3. Liniami wskazano sygnały korelacyjne występujące pomiędzy protonami dwóch reszt aminokwasowych Ala-7 i Ala-8. Proton grupy NH reszty Ala-8 (δ 7,18) jest skorelowany z protonem H α (δ 4,84), który z kolei wykazuje sygnał korelacyjny z protonami grupy CH $_3$ (δ 1,26). Analogicznie można prześledzić sąsiedztwo protonów w reszcie Ala-7,



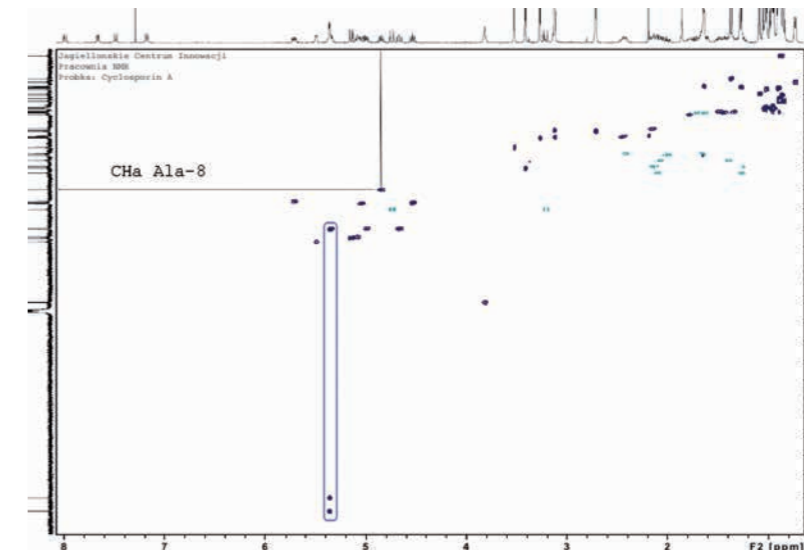
Rysunek 3. Widmo COSY

Podstawowym eksperymentem homokorelacyjnym jest eksperyment COSY. Sygnały pozadiagonalne

natomiast pełna i dokładna analiza wskaże sieć korelacji w każdej reszcie aminokwasowej związku.

Niestety często zdarza się, że taka analiza jest mocno utrudniona, ze względu na nakładanie się sygnałów – skala przesunięć chemicznych dla widm ^1H NMR jest stosunkowo niewielka – najczęściej nie większa niż 10-12 ppm (taką sytuację widać również na prezentowanym widmie – w szczególności w zakresie 0,6-2,5 ppm). Wtedy bardzo pomocne w analizie okazują się widma heterokorelacyjne, wskazujące na oddziaływania pomiędzy protonami i innymi atomami w związku (najczęściej z atomami węgla i azotu).

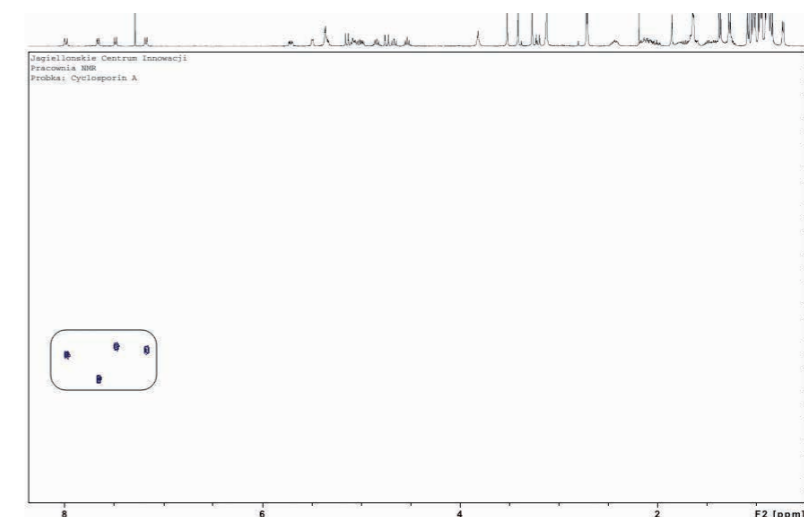
Na widmie zaznaczono przypisanie sygnałów protonu H α i C α reszty Ala-8. Widma HSQC wykazują również bezspornie nakładające się sygnały pochodzące od różnych protonów w cząsteczce. Taką sytuację wskazano na widmie niebieską ramką. Na widmie ^1H NMR sygnał δ 5,4 ppm wydaje się pochodzić od jednej grupy protonów w związku – dopiero analiza widma HSQC wskazuje, że są to nałożone sygnały od trzech różnych grup protonów w związku. Bez tej informacji analiza widma 1D ^1H NMR byłaby bardzo utrudniona.



Rysunek 4. Widmo [^1H - ^{13}C]HSQC cyklosporyny

Bardzo powszechnie wykorzystywane są widma HSQC, wskazujące korelację atomów węgla (lub azotu) z bezpośrednio z nimi związanymi atomami wodoru. W przypadku widm [^1H - ^{13}C]HSQC dodatkowo, dzięki zastosowaniu odpowiedniej sekwencji impulsowej, poprzez fazę sygnału korelacyjnego otrzymuje się informację o stopniu podstawienia atomu węgla (sygnały korelacyjne grup CH i CH $_3$ są dodatnie a grupy CH $_2$ ujemne, co z reguły przedstawiane jest poprzez odmienną barwę tych sygnałów). Widmo [^1H - ^{13}C]HSQC cyklosporyny przedstawiono na rysunku 4.

Analogiczną sytuację zaobserwować można dla sygnałów protonów w zakresie 0,6-2,5 ppm, gdzie występuje silne nakładanie się sygnałów. Istotną informację niesie również brak sygnałów korelacyjnych, jaki obserwuje się dla sygnałów protonów w zakresie 6,5-8 ppm. Świadczy on o tym, iż protony te nie są bezpośrednio związane z atomami węgla. Potwierdzenie znajduje się w analogicznym widmie korelacyjnym [^1H - ^{15}N]HSQC, które świadczy o tym, że sygnały te należą do protonów czterech grup amidowych reszt Abu-2, Val-5, Ala-7 i Ala-8 (rysunek 5). Widma typu HSQC oczywiście nie niosą informacji



Rysunek 5. Widmo [^1H - ^{15}N]HSQC cyklosporyny

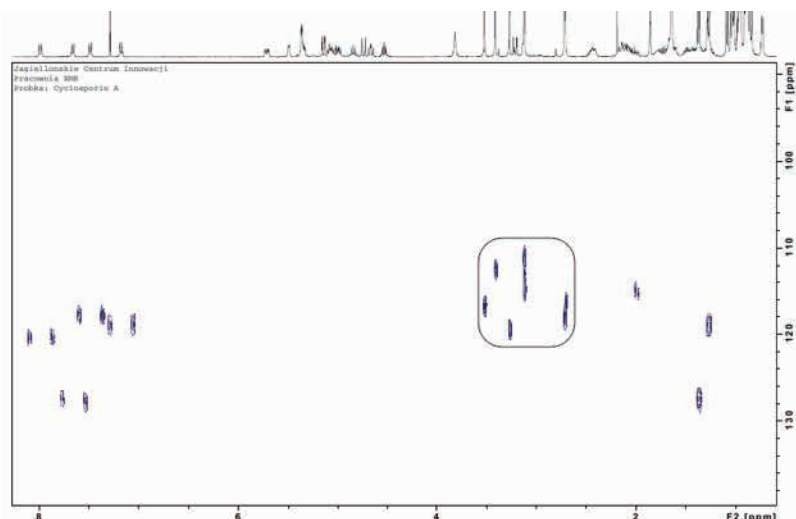
o heteroatomach niepodstawionych atomami wodoru – aby móc poprawie przypisywać sygnały heteroatomów oraz atomów wodoru w grupach związanych z takimi heteroatomami stosuje się widma HMBC obrazujące sprzężenia „dalekiego zasięgu” (o dwa i więcej wiązań) pomiędzy atomem wodoru i heteroatomem. Przykładowe widmo [^1H - ^{15}N] HMBC cyklosporyny zamieszczono na rysunku 6. Na widmie zaznaczono sygnały korelacyjne wiążące protony grup metylowych z trzeciorzędowymi atomami azotu N-metylowych reszt amidowych pierścienia oligopeptydowego, również ujawniające nakładanie sygnałów na widmie 1D ^1H NMR.

KONTAKT

dr Marek Żylewski
Kierownik Laboratorium NMR

K: +48 601 530 326
E: marek.zylewski@jci.pl

Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o.
ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków



Rysunek 6. Widmo [^1H - ^{15}N]HMBC cyklosporyny

PODSUMOWANIE

Analiza strukturalna NMR złożonych związków organicznych, a w szczególności biomolekół obecnie z reguły przeprowadzana jest na podstawie wielu eksperymentów NMR, z których najczęściej używane przedstawiono w niniejszej notce. Często, ze względu na złożoność problemu badawczego i stopień skomplikowania układu wykonuje się dodatkowe eksperymenty, wśród których warto jeszcze wymienić popularne sekwencje DQ-COSY, TOCSY czy heterokorelacyjną HMQC/TOCSY bardzo dobrze sprawdzającą się w przypadkach silnego nakładania sygnałów w widmie protonowym, kiedy eksperymenty homokorelacyjne nie pozwalają na jednoznaczne przypisywanie sygnałów. Bardzo istotny dla rozwiązywania problemów izomerii i stereoizomerii jest eksperyment NOESY, który koreluje protony znajdujące się w sąsiedztwie w przestrzeni oraz pozwala na wyciąganie wniosków dotyczących budowy przestrzennej i konformacji badanych cząsteczek. Bogactwo możliwych do wykorzystania różnorodnych eksperymentów NMR i możliwość istotnej modyfikacji parametrów pomiarowych pozwala na uzyskanie szeregu informacji o badanej substancji. Umożliwia również dokładne dopasowanie rodzaju przeprowadzanych eksperymentów do rozwiązania konkretnego problemu badawczego.

Projekt został zrealizowany w ramach programu Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący (KNOW)



Treść niniejszej noty jest rozpowszechniana na licencji Creative Commons Użycie niekomercyjne – Bez Utworów Zależnych 4.0 (CC BY-NC-ND 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode.pl>

Listopad 2018 r.