

Рекламная статья / Sponsored article



Использование 2D экспериментов с обратной гетероядерной корреляцией на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse для исследования строения гемфиброзила

Статья предоставлена компанией ООО «АВРОПА»

В статье рассмотрено применение двух мощных техник ЯМР ME-HSQC и HMBC для определения строения молекул на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse на примере молекулы гемфиброзила. Полученные результаты дают основания утверждать, что применение настольного спектрометра X-Pulse позволяет получить надежные результаты за короткое время.

Using 2D experiments with reverse heteronuclear correlation on a benchtop NMR spectrometer X-Pulse to study the structure of gemfibrozil

The article is presented by the company LLC "AVRORA"

The article discusses application of two powerful NMR techniques ME-HSQC and HMBC to determine the structure of gemfibrozil molecules as an example on the benchtop NMR spectrometer X-Pulse. The obtained results give grounds to assert that the use of the benchtop X-Pulse NMR spectrometer allows obtaining reliable results in a short time.

Метод ядерного магнитного резонанса широко применяется в синтетической химии для исследования строения молекул. Широкое применение он нашел и в фармацевтической индустрии, как метод исследования строения фармацевтических субстанций и определения примесей, ОФС.1.2.1.1.0007.15 и ОФС.1.7.2.0014.15. В настоящее время в области ЯМР-риборостроения активно развивается направление настольных ЯМР-спектрометров с редкоземельными магнитами^{1,2,3}. Спектр решаемых задач настольными приборами постоянно расширяется с ростом их характеристик.

¹ Pagès G., Gerdova A., Williamson D., Gilard V., Martino R., Malet-Martino M. Evaluation of a Benchtop Cryogen-Free Low-Field 1H NMR Spectrometer for the Analysis of Sexual Enhancement and Weight Loss Dietary Supplements Adulterated with Pharmaceutical Substances. *ACS Analytical Chemistry*. 2014;86(23):11897–11904.

² Калабин Г. А., Васильев В. Г., Ивлев В. А., Комаров Н. А., Абрамович Р. А. Быстрый скрининг лекарственных средств без стандартных образцов: ренессанс низкочастотных спектрометров ЯМР. *Аналитика*. 2017;6:44–50.

³ Gerdova A., Defomez M., Jakes W., Limer E., McCallum C., Nott K., Parker T., Rigby N., Sagidullin A., Watson A. D., Williamson D., Kemsley E. K. Magnetic Resonance in Food Science: Defending Food by Magnetic Resonance. In: Royal Society of Chemistry. 2015. 223 p.

Одним из значительных достижений в области ЯМР с момента его создания стало внедрение 2-мерных (2D) ЯМР-экспериментов. Их использование значительно повысило мощность метода ЯМР для подтверждения строения молекул, расширило круг и сложность решаемых проблем^{4,5,6}.

Данные эксперименты представляют собой серию одномерных (1D) экспериментов, отличающихся лишь шагом по времени, который вводится через последовательность импульсов. В результате

⁴ Caprio V., McLachlan A. S., Sutcliffe O. B., Williamson D. C., Mewis R. E. Structural Elucidation of Unknowns: A Spectroscopic Investigation with an Emphasis on 1D and 2D 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education*. 2018;27(2):223–234.

⁵ Fallaise D., Tweedie H. B., Konzuk J., Cheyne C., Mack E. E., Longstaffe J. G. Practical application of 1 H benchtop NMR spectroscopy for the characterization of a nonaqueous phase liquid from a contaminated environment. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2019;57(2–3):93–100.

⁶ Antonides L. H., Brignall R. M., Costello A., Ellison J., Firth S. E., Gilbert N., Groom B. J., Hudson S. J., Hulme M. C., Marron J., Pullen Z. A., Robertson T. B. R., Schofield C. J., Williamson D. C., Kemsley E. K., Sutcliffe O. B., Mewis R. E. Rapid Identification of Novel Psychoactive and Other Controlled Substances Using Low-Field 1H NMR Spectroscopy. *ACS Omega*. 2019;4(4):7103–7112.

получается двумерный массив данных с двумя отдельными временными изменениями – прямым измерением (t_2) и непрямым (t_1) измерением. В результате двумерного дискретного преобразования Фурье получается двумерный спектр с двумя осями F1 и F2, по которым отложено значение частоты. Эксперименты по двумерной гетероядерной корреляции широко применяются в ЯМР при работе на спектрометрах с сильным полем. Представляется важным, чтобы данная мощная практика нашла широкое применение среди настольных ЯМР-спектрометров 60 МГц с постоянными магнитами, которые значительно дешевле и проще в обслуживании и эксплуатации. И которые с успехом применяются для решения широкого спектра задач по исследованию строения молекул.

Эксперименты с гетероядерными корреляциями позволяют определять взаимосвязь между сигналами протона и углерода через спин-спиновое взаимодействие и используются для определения строения неизвестного соединения.

В данной статье рассмотрены результаты двух таких экспериментов, ME-HSQC и HMBC¹. Эти эксперименты часто описываются как обратные эксперименты, поскольку сигналы от протона измеряются напрямую, а сигнал от ядра X (например, ^{13}C или любого другого X) – через протонный канал прибора для максимизации чувствительности экспериментов. Это позволяет выполнять гетероядерные корреляции намного быстрее, чем в обычном эксперименте HETCOR [7] и сокращает необходимое время с нескольких часов до десятков минут. В статье рассмотрены результаты экспериментов ME-HSQC и HMBC 1 М раствора гемфиброзила (рисунок 1), лекарственного препарата, используемого для лечения аномальных уровней содержания липидов в крови.

Метод ME-HSQC позволяет установить прямую связь спектров, полученных на протоне и на углероде. Сигнал от протона может коррелировать с сигналом от углерода, с которым он непосредственно химически связан. В спектре HSQC данная корреляция проявляется как перекрестные пики (пики, появляющиеся как в протонном, так и в углеродном спектре). Сигналы в 1D углеродном спектре, не имеющие перекрестных пиков, относятся к сигналам четвертичных атомов углерода.

Популярным дополнением к базовому эксперименту HSQC является эксперимент с, так называемой, коррективкой по мультиплетности (ME), иногда называемый откорректированным по DEPT [7], так как результат очень похож на результат эксперимента DEPT-135, только в двумерном варианте. Ана-

¹ Claridge T.D.W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Volume 2. 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier Science. 2008. 398 с.

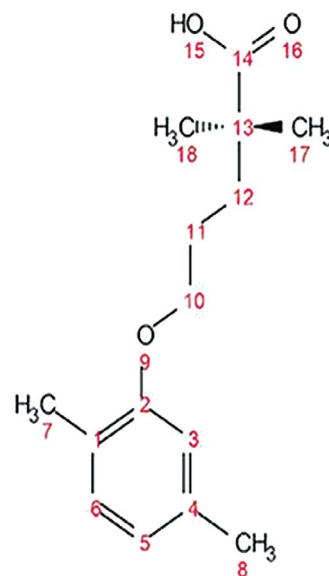


Рисунок 1. Спектр HMBC для 1 М раствора гемфиброзила. 16 сканирований с общим временем эксперимента 1 час 40 минут. Спектр получен на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse

Figure 1. HMBC spectrum for 1 M gemfibrozil solution. 16 scans with a total experiment time of 1 hour and 40 minutes. The spectrum was obtained on a desktop NMR spectrometer X-Pulse

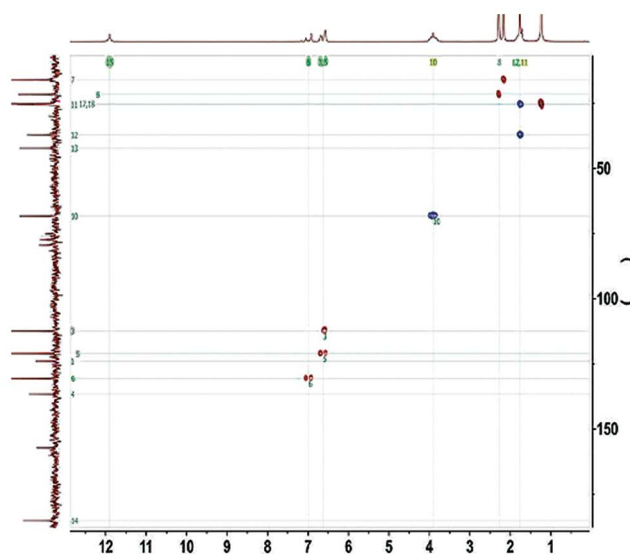


Рисунок 2. Спектр ME-HSQC для 1 М раствора гемфиброзила. 4 сканирования с общим временем эксперимента 35 мин. Спектр получен на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse. Числа на перекрестных пиках соответствуют пронумерованным позициям углеродных атомов на рисунке 1

Figure 2. ME-HSQC spectrum for 1 M gemfibrozil solution. 4 scans with a total experiment time of 35 min. The spectrum was obtained on the desktop NMR spectrometer X-Pulse. The numbers on the cross peaks correspond to the numbered positions of the carbon atoms in figure 1

логично эксперименту HSQC, сигналы от протона и углерода, которые непосредственно химически связаны, сопряжены через перекрестный пик в спектре ME-HSQC.

В дополнение, используемая импульсная последовательность позволяет получить взаимосвязь между фазой сигнала и количеством связей атома углерода с протонами, т. е. тип углеродного атома (первичный, вторичный, третичный, четвертичный). Пики групп CH_3 и CH являются положительными (красные на рисунке 2), а пики групп CH_2 являются отрицательными (синие на рисунке 2). Способность быстро определять тип углеродного атома важна для исследования строения. Одномерный углеродный спектр на рисунке 2 дает информацию лишь по амплитуде сигнала и не дает информацию о его фазе, поэтому пики групп CH_2 являются положительными. Полный двумерный спектр, полученный методом ME-HSQC для гемфиброзила, показан на рисунке 2.

Эксперимент HSQC дает ценную информацию об углеводородных функциональных группах, чего обычно достаточно для подтверждения известной структуры. Однако, этого недостаточно для установления строения неизвестной молекулы. В целом, определение строения требует больше информации о связях вдоль углеродного скелета молекулы. Эксперимент HMBC позволяет получить эту информацию.

В эксперименте HMBC сигналы от протонов коррелируют с сигналами от ядер углерода, расположенными на расстоянии 2, 3 иногда 4 связи друг от друга. При рассмотрении части углеводородной цепочки типа: $\text{C}^1 \text{H}^a - \text{C}^2 \text{H}^b - \text{C}^3 \text{H}^c$ в спектре ME-HSQC проявятся перекрестные пики между C^1 и H^a , C^2 и H^b , и C^3 и H^c . Перекрестный пик между C^2 и H^b будет отрицательным (синим). В спектре HMBC перекрестные пики HSQC будут подавлены, и вместо этого будут наблюдаться перекрестные пики C^1 с H^b и H^c , C^2 с H^a и H^c и C^3 с H^a

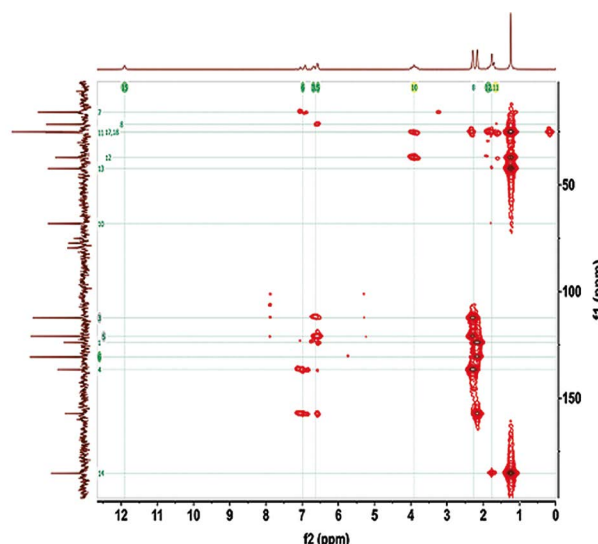


Рисунок 3. Спектр HMBC для 1 М раствора гемфиброзила. 16 сканирований с общим временем эксперимента 1 час 40 минут. Спектр получен на настольном ЯМР-спектрометре X-Pulse

Figure 3. HMBC spectrum for 1 M gemfibrozil solution. 16 scans with a total experiment time of 1 hour and 40 minutes. The spectrum was obtained on a desktop NMR spectrometer X-Pulse

и H^b . Комбинация двух спектров позволяет пользователю ЯМР определить углеводородный скелет молекулы и связанные с ним углеводородные группы. Полный спектр HMBC гемфиброзила показан на рисунке 3.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что настольный ЯМР-спектрометр X-Pulse является надежным инструментом для проведения экспериментов по гетероядерной корреляции. Эксперименты ME-HSQC, HMBC позволяют пользователям определять структуру совершенно неизвестных молекул путем получения корреляционных двумерных спектров на настольном приборе. Применение этих экспериментов позволяет получать более высокую чувствительность при измерении сигналов протонов и получать надежные данные по строению молекул неизвестных соединений менее чем за 3 часа.

