



*Técnicas 2D (bi-
dimensionales)
en RMN en sólidos
para espines 1/2*

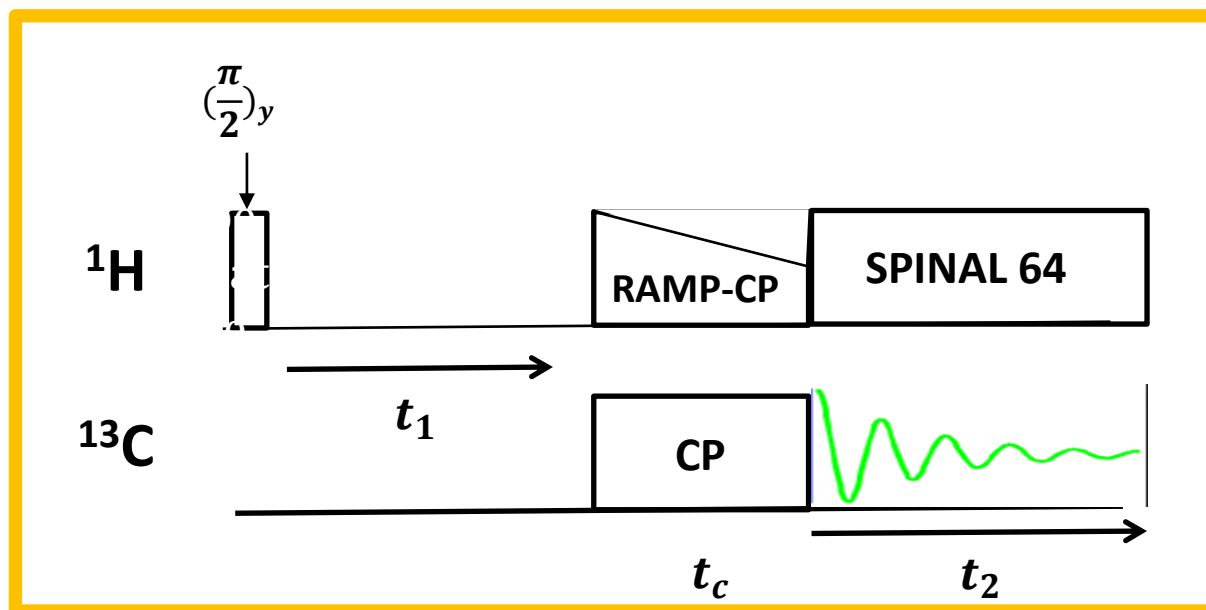


2D WISE

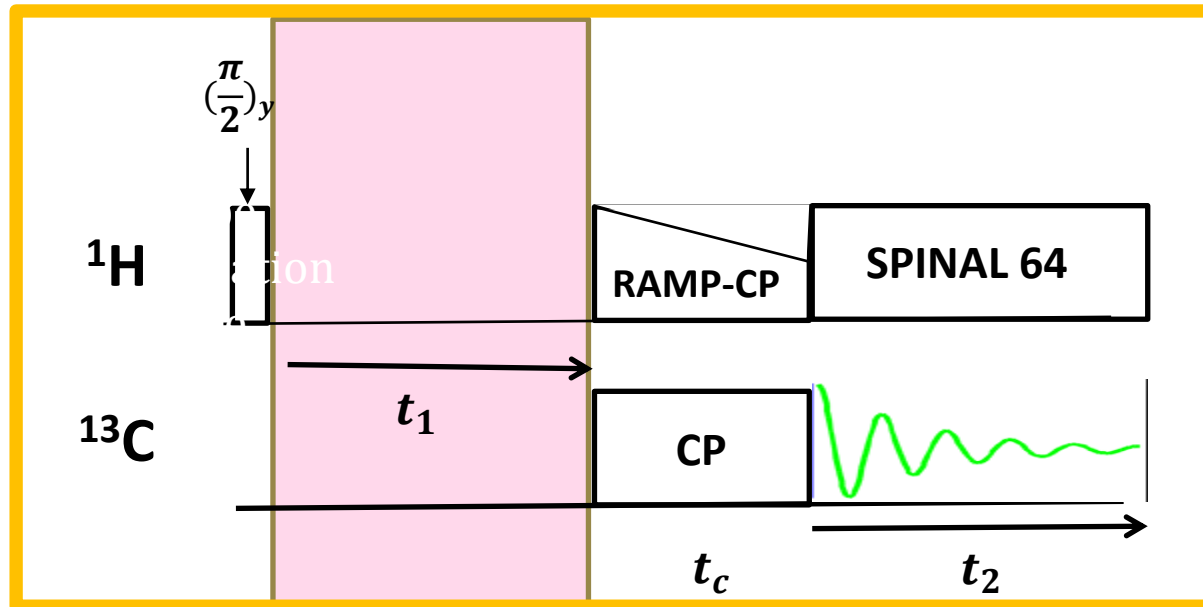
^1H - ^{13}C WISE


El principal objetivo de realizar un experimento 2D WISE es caracterizar *heterogeneidades* en polímeros, observando el *ancho de línea* de ^1H asociada a diferentes sitios de ^{13}C . El ancho de línea refleja la *interacción dipolar promedio* y puede ser usado para monitorear la movilidad en el sistema.

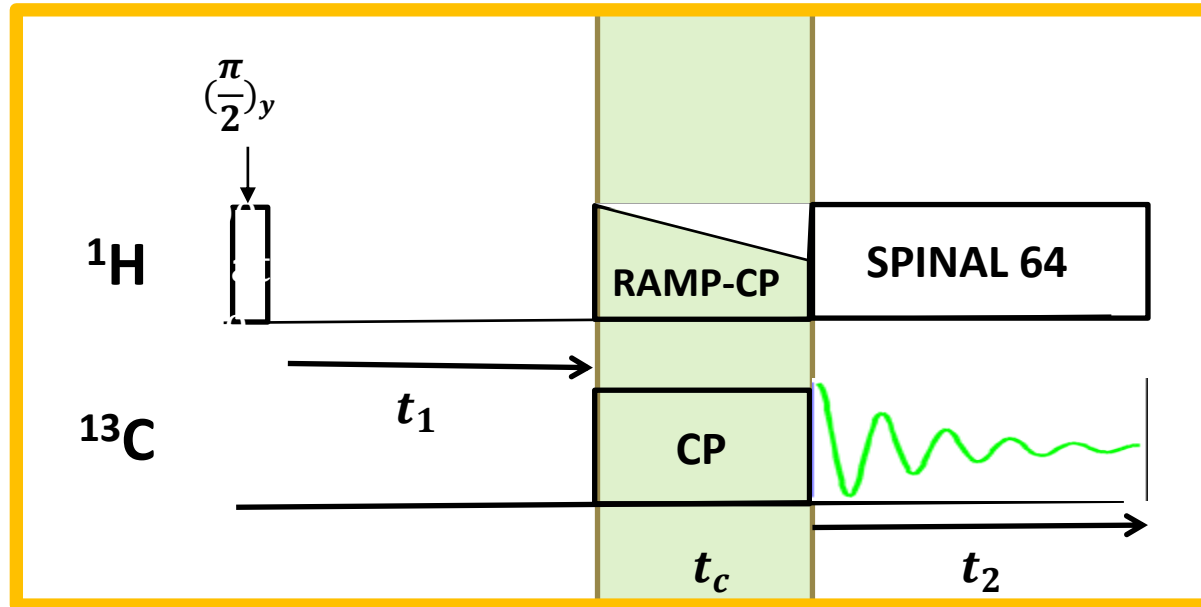
Por ejemplo, distintas partes de una cadena polimérica puede presentar distinta movilidad (que promedia el acople dipolar) o por otro lado, cadenas enteras pueden presentar fases de distinta movilidad




¿Qué realiza cada parte de la secuencia?

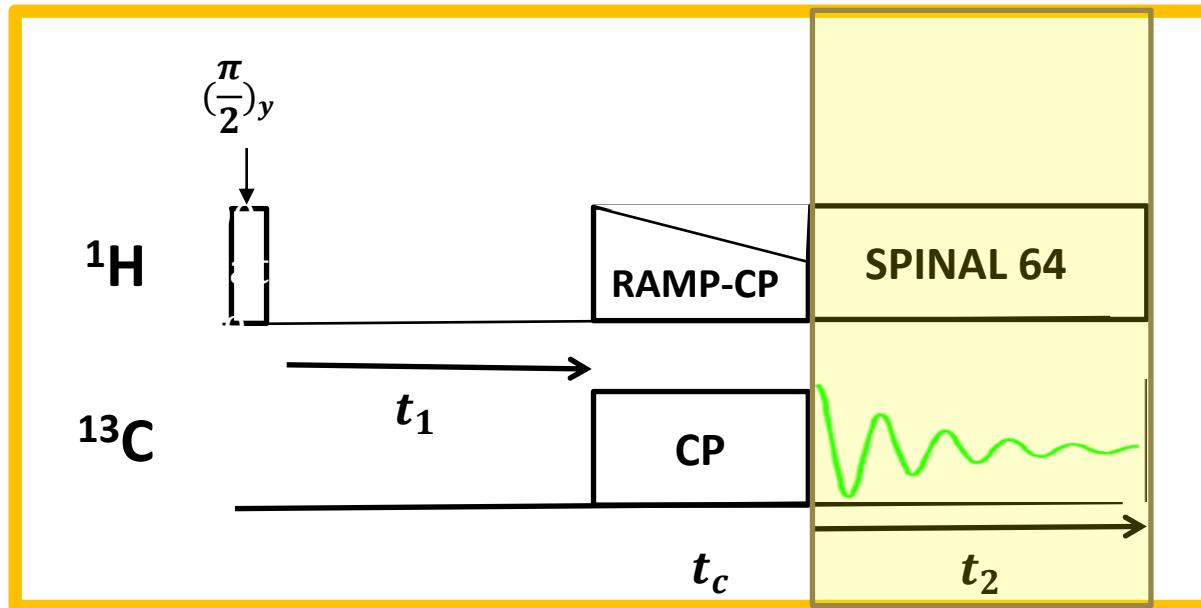



-  Evolución de la magnetización de ^1H en el plano xy durante un dado tiempo t_1 , en presencia de sus corrimientos químicos y el acople dipolar homonuclear. Al transformar Fourier el espectro es un espectro de sólidos de ^1H , tipo estático, no de alta resolución (wide-line). Por ello se rota a una velocidad baja (4-5 kHz) para no «desarmar» en bandas rotacionales la línea de ^1H .



-  Se realiza un paso de polarización cruzada CP, para transferir la magnetización de ^1H a ^{13}C . El tiempo de contacto t_c es pequeño a fin de que se transfiera magnetización solo a los vecinos cercanos y no haya difusión de espines que borree la evolución observada en t_1 .

¿Qué realiza cada parte de la secuencia?



 Se adquiere la magnetización de ^{13}C con desacople heteronuclear durante t_2 para observar un espectro de alta resolución en ^{13}C .

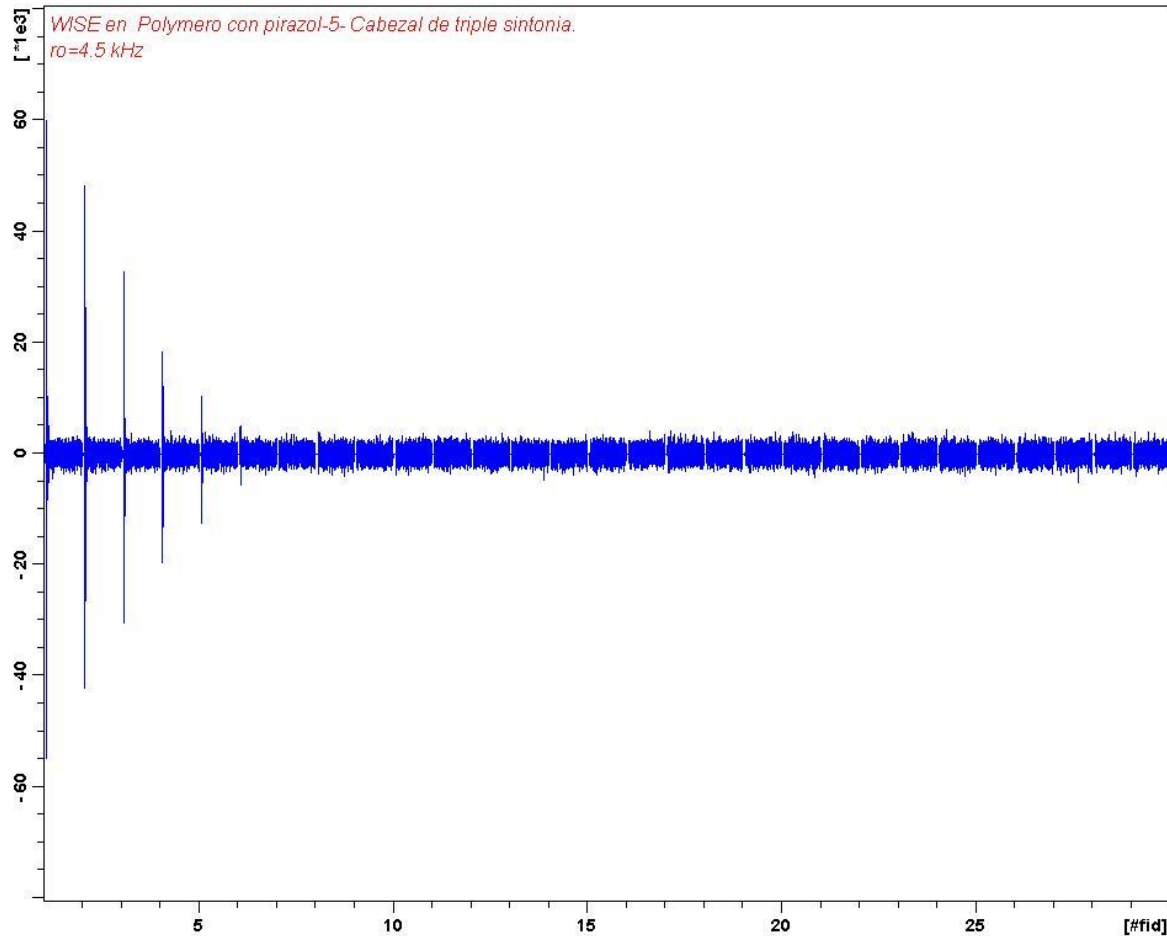
A tener en cuenta..:

- Se trabaja sobre dos núcleos diferentes: ^1H (H), ^{13}C (X). Distintas partes de la secuencia requieren la irradiación de dos núcleos diferentes a la frecuencia de Larmor de cada núcleo (300,13 para ^1H , 75,468 para ^{13}C a 7 T). Para ello se necesita un generador para dos frecuencias diferentes y un cabezal (probe) que permite sintonizar simultáneamente las dos frecuencias.
- Como en la CP y en HETCOR, se adquiere sobre ^{13}C (t_2). Por eso, la dimensión directa (f_2) corresponde a la frecuencia de carbonos .
- El experimento se realiza rotando (MAS) pero a una velocidad de rotación que permite observar en alta resolución al núcleo diluído pero que no muestre bandas de rotación en ^1H (entre 4-5 kHz)

Parámetros experimentales

- Velocidad de rotación (4-5 KHz)
- Tiempo de contacto corto ($200 \mu\text{s}$)
- Variación de t_1 en múltiplos de $3 \mu\text{s}$ $\text{TD}_1 = 2^N = 32, 64, \text{etc}$
- Secuencia de Desacople (SPINAL 64, TPPM) durante adquisición (t_2)
- Valor de T_1 (relajación spin-red de ^1H). Recycling-delay $D_1 = 5 * T_1$ (del orden de 5 s)
- $NS > 100$. Número de escanes para obtener un espectro de ^{13}C aceptable con tiempo de contacto corto y que el experimento total no sea excesivamente largo.
- Tiempo total del experimento: $NS * \text{TD}_1 * D_1 \sim 9 \text{ hs}$

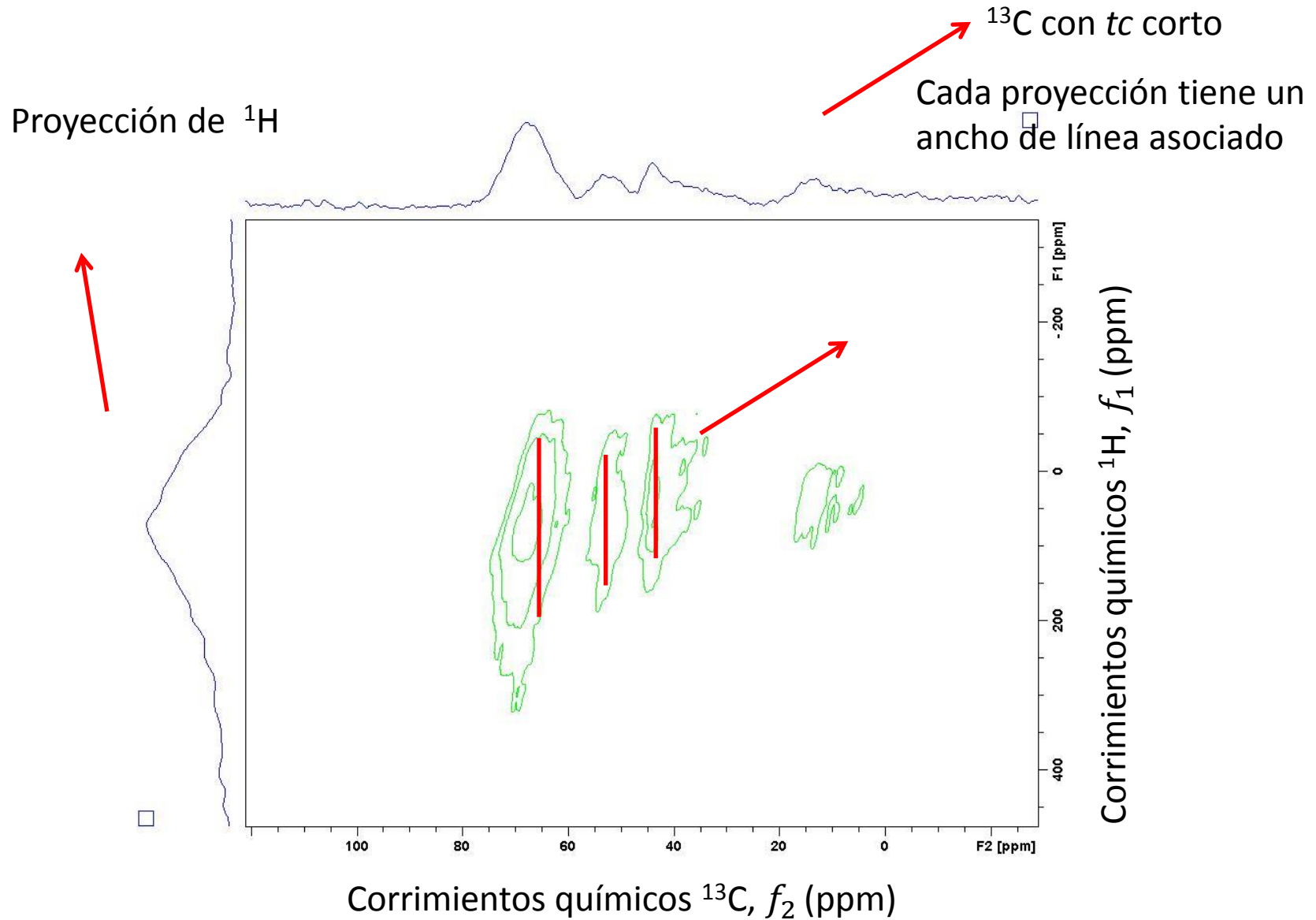
Resultado de un experimento



Una señal compuesta por (32) FIDs de ^{13}C , cada una para diferentes t_1

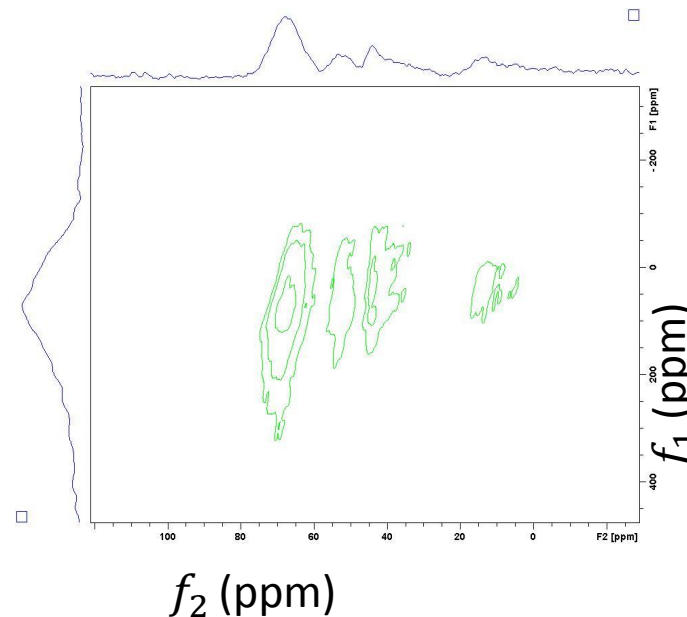
^1H - ^{13}C WISE

Haciendo la transformada de Fourier 2D, obtenemos



Notar que...

- ✓ No es necesario referenciar ^1H ya que nos interesa solo el ancho de línea
- ✓ Los anchos de línea se obtienen proyectando ^1H .
- ✓ Al utilizar tiempos de contacto cortos, se observan solo los protones que tienen «cerca» un ^{13}C .
- ✓ Mayor ancho de línea corresponde a mayor acople dipolar o menor movilidad.

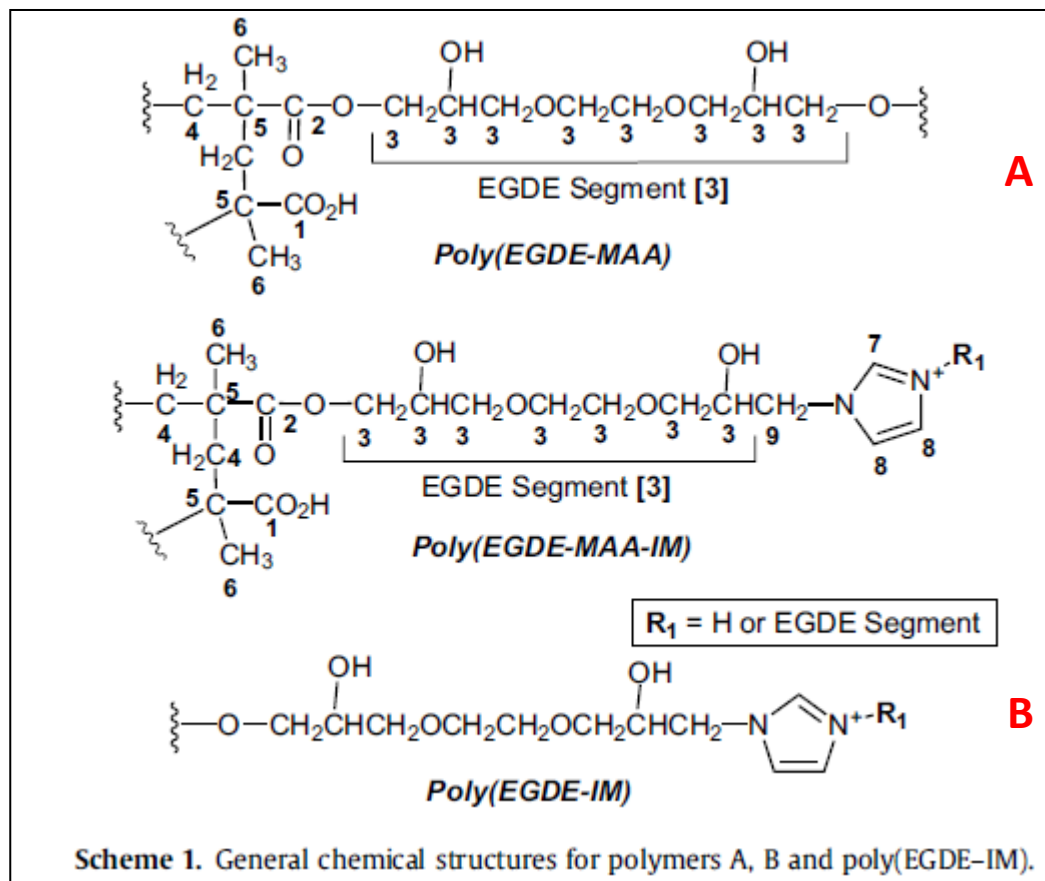


Nombre-Acrónimo	Objetivo, Nombre, Núcleos	Referencia	Condiciones experimentales	Resultado
<p>WISE</p>	<p>Wideline separation.</p> <p>Heterogeneidad en polímeros. Correlación de la dimensión de ^{13}C (cs) con movilidad segmental en la dimensión de ^1H (ancho de línea)</p> <p>$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$</p>	<p>Schmidt-Rohr K, Clauss J, Spiess HW. Macromolecules 1992;25:3273.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Abundancia natural. • Velocidades de rotación $\omega_R \sim 4-5$ kHz (para no afectar línea ^1H) • CP. Tiempo de contacto corto (100 us-500 us) • No hay desacople homonuclear. • Duración total aprox. 9 hs. 	<ul style="list-style-type: none"> • Espectro sólidos ^1H estático asociado a diferentes sitios. • Ancho de línea de ^1H relación con la interacción dipolar media entre ^1H (segundo momento)



Aplicaciones

1) Complejos Polímero-metal: Poly(EGDE-MAA) , Poly(EGDE-MAA-IM)



Referencia: Juan M. Lázaro et al., Polymer, vol. 49, pag. 5482, (2008)

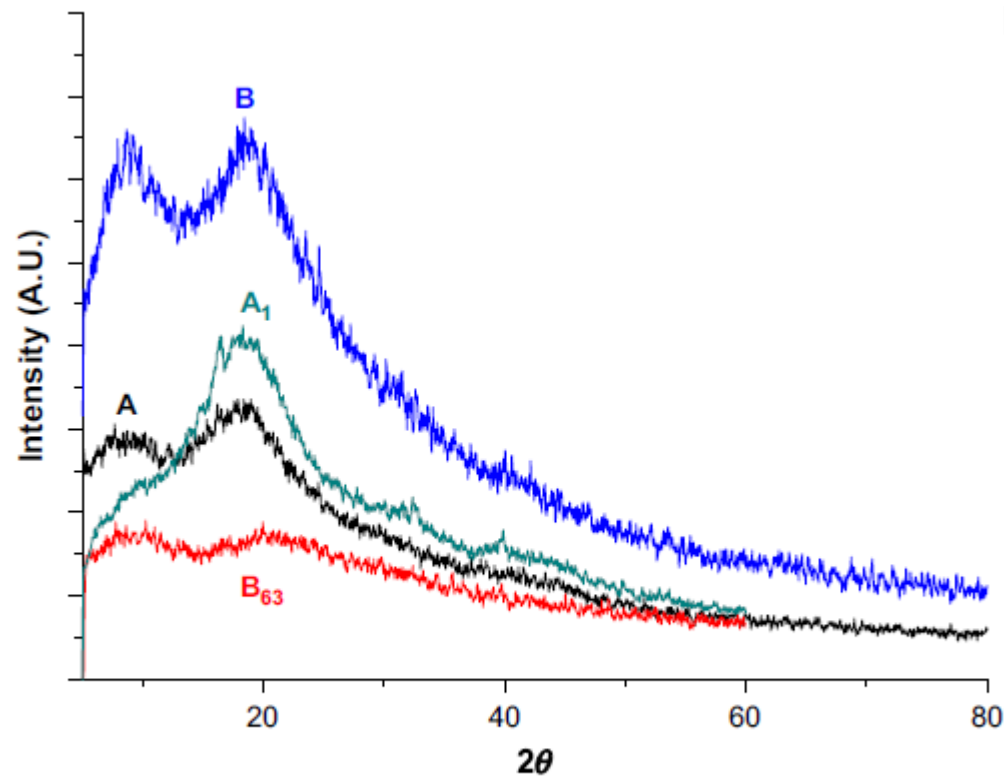
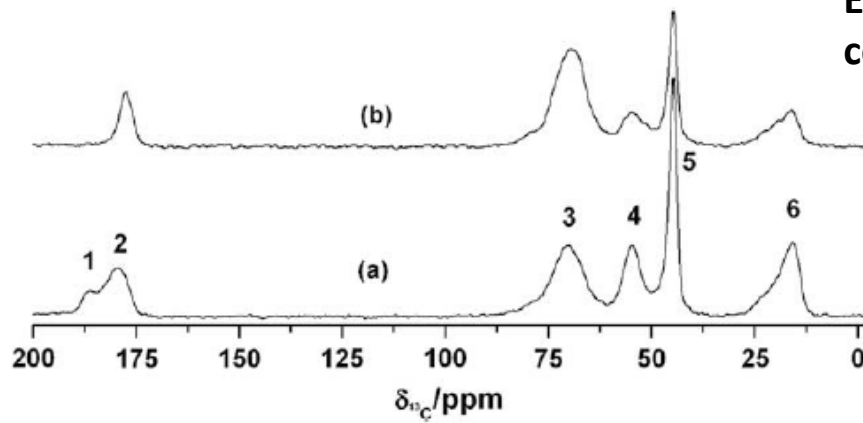


Fig. 1. X-ray powder diffraction profiles for A, A₁, B and B₆₃ polymers.

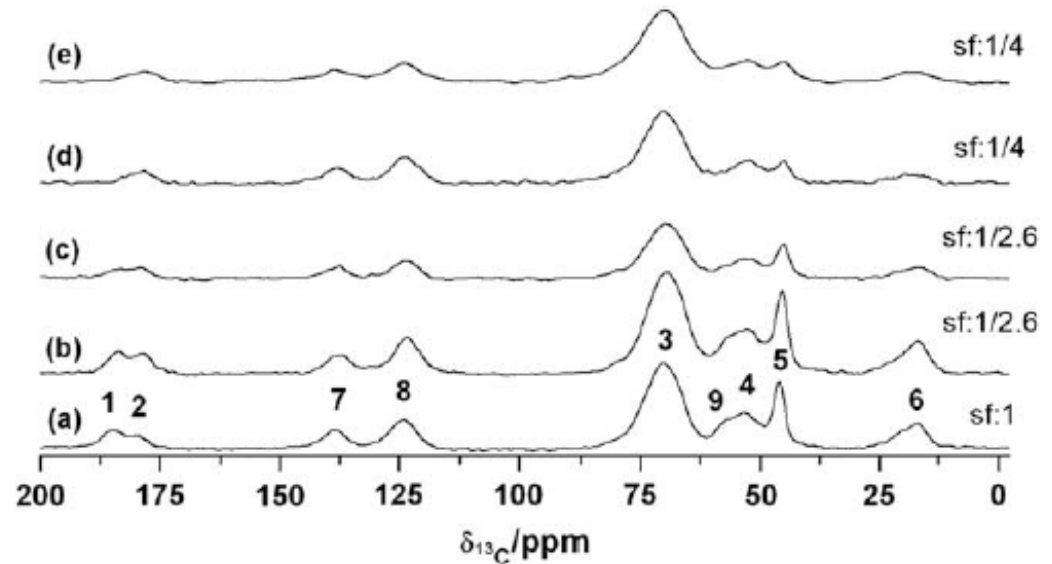
Ausencia de picos indican que los polímeros son amorfos tanto en los polímeros puros como sus complejos

Espectros ^{13}C CP-MAS de A, B y sus complejos de cobre.



A

Fig. 7. ^{13}C CP-MAS spectra of polymer A (a) and its copper complex A_1 (b). The numbering corresponds to that in Scheme 1. The number of scans for both spectra was 1600.

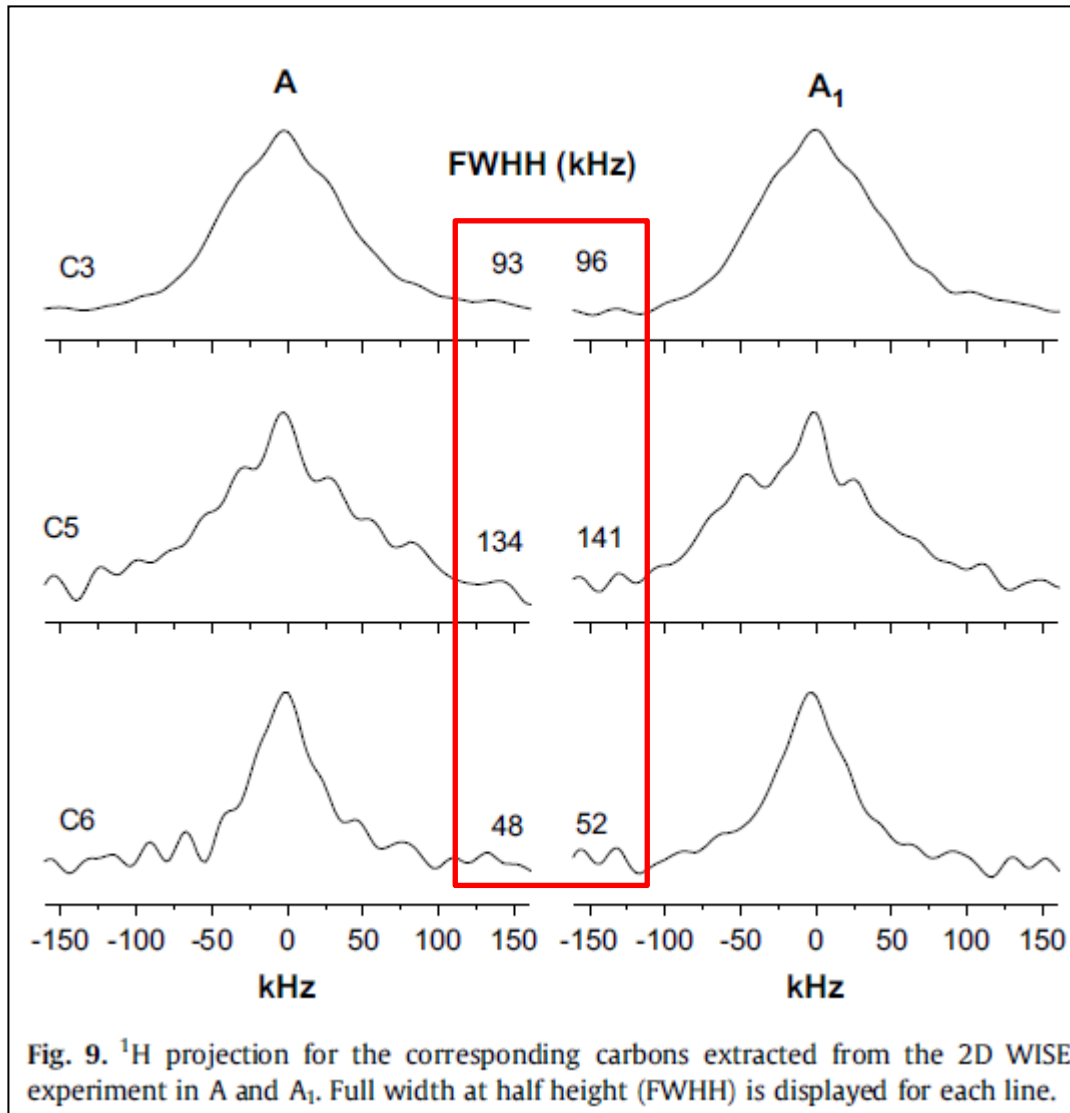


B

Fig. 8. ^{13}C CP-MAS spectra of: B (a), and the copper complexes B_8 (b), B_{26} (c), B_{48} (d) and B_{63} (e). The labels correspond to those in Scheme 1. The number of scans was: 1000 (a), 2600 in (b) and (c), 4000 in (d) and (e). (Sf: scaling factor).

2D ^1H - ^{13}C WISE

$\omega_R = 4.5$ kHz

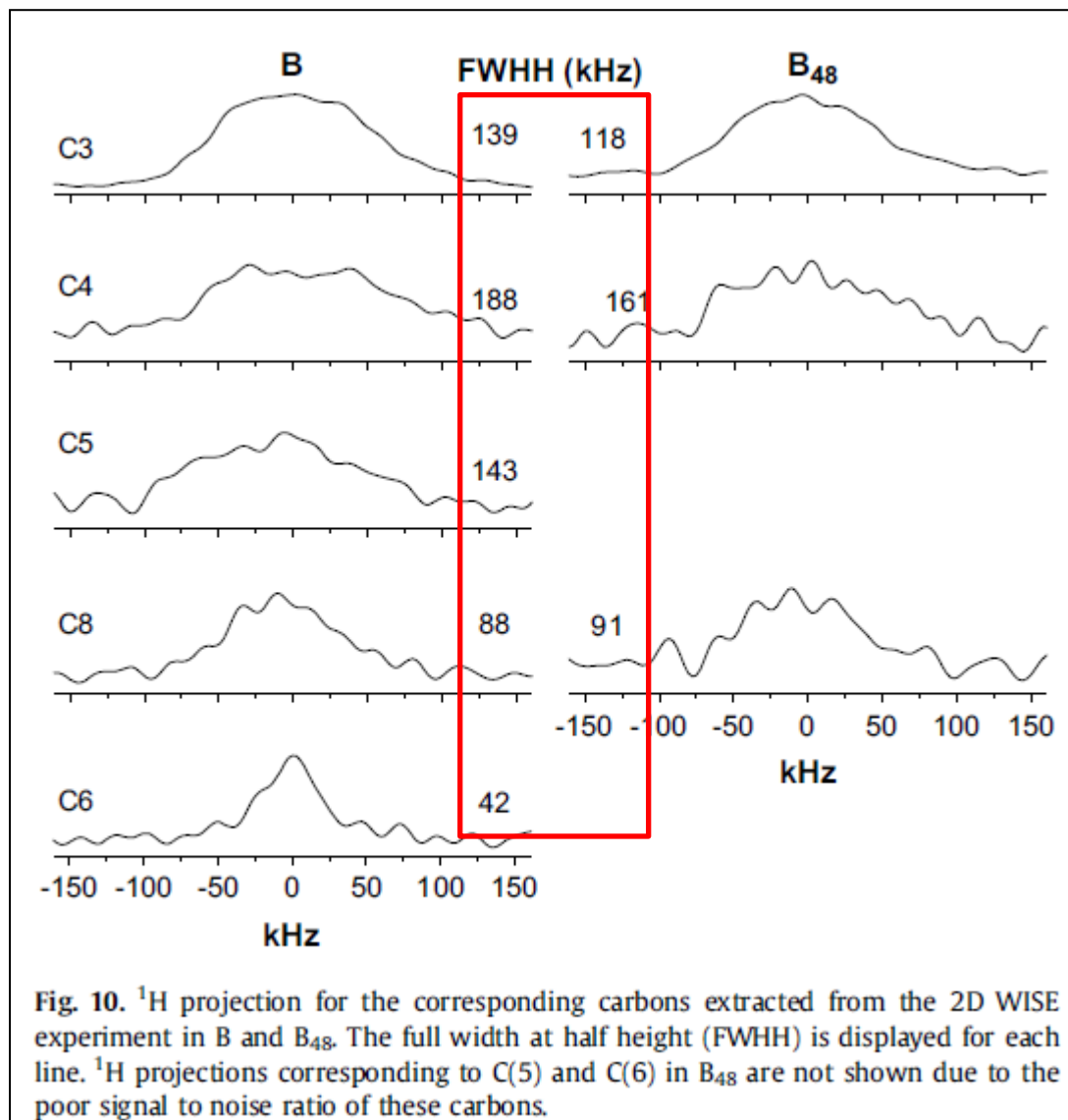


- Las proyecciones en los compuestos puros muestran que la línea es contribución de dos componentes con diferentes anchos, por lo tanto el material es no homogéneo.
- Las líneas no cambian su ancho con la incorporación de cobre, por lo que el cobre no produce cambios en la movilidad del sistema
- Diferentes carbonos de la cadena muestran el mismo comportamiento, no hay microfases

A partir del 2D, Se obtienen las proyecciones correspondientes a cada carbono, luego se mide el ancho altura mitad de la línea.

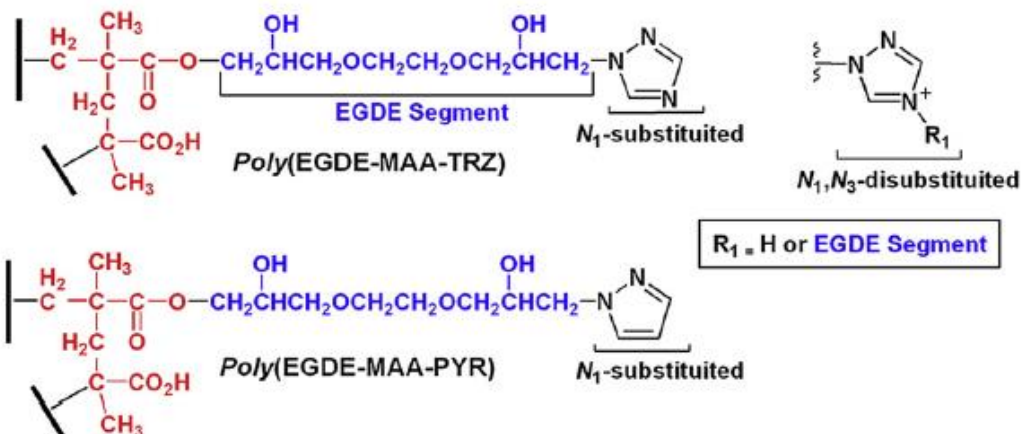
2D ^1H - ^{13}C WISE

$\omega_R = 4.5$ kHz



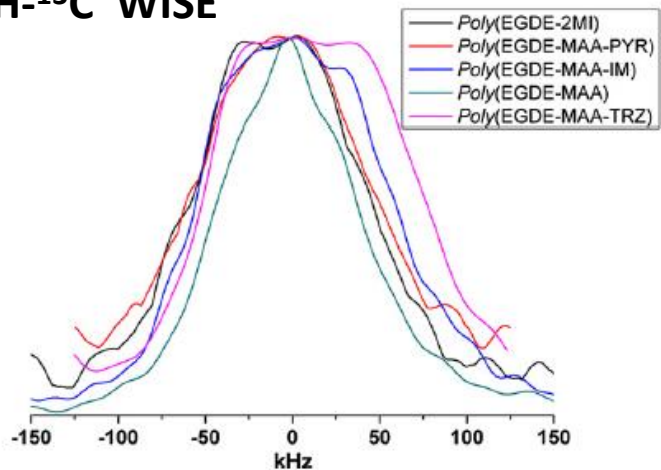
2) Nuevos polímeros conteniendo imidazole, pirazole, triazole

J.M. Lázaro Martínez et al. / Polymer 53 (2012) 1288–1297



Mayor FWHH en polímeros con TRZ y PYR muestran baja movilidad

^1H - ^{13}C WISE




Full width at half height (FWHH) corresponding to the ^1H projection from the C_3 signal at 70 ppm extracted from the 2D WISE experiment in the indicated polymers.

Polymer	FWHH (kHz)
EGDE-MAA [27]	90
EGDE-2MI	120
EGDE-MAA-IM [27]	125
EGDE-MAA-PYR	124
EGDE-MAA-TRZ	140

Fig. 6. ^1H projection for the C_3 extracted from the ^1H - ^{13}C 2D WISE experiments in the indicated polymer materials.



Tiempos de relajación



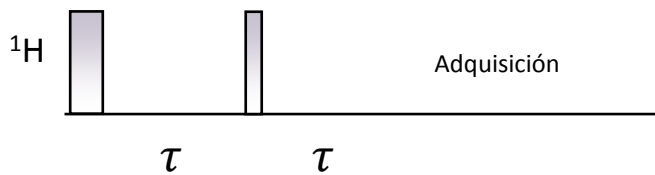
Los tiempos de relajación son mediciones sencillas que permiten determinar cambios, homogeneidad, heterogeneidad en *mezclas, complejos, complejos de inclusión, polímeros, etc*

En general la magnetización vs tiempo, tiene un comportamiento exponencial. Si el decaimiento o recuperación es bi-exponencial podemos hablar de dos componentes y algo heterogéneo.

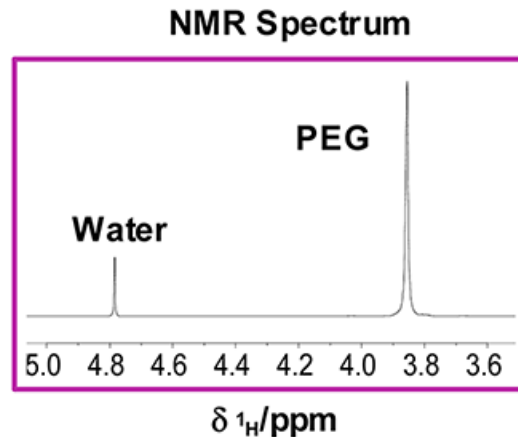
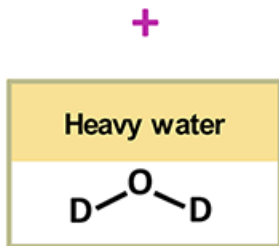
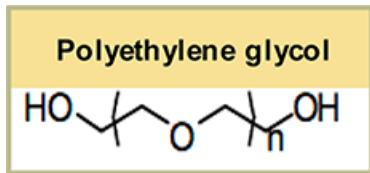
$$M_C(\tau) = M_0 \exp(-\tau/\tau_1)$$

$$M_C(\tau) = A \exp(-\tau/\tau_1) + (1 - A) \exp(-\tau/\tau_2)$$

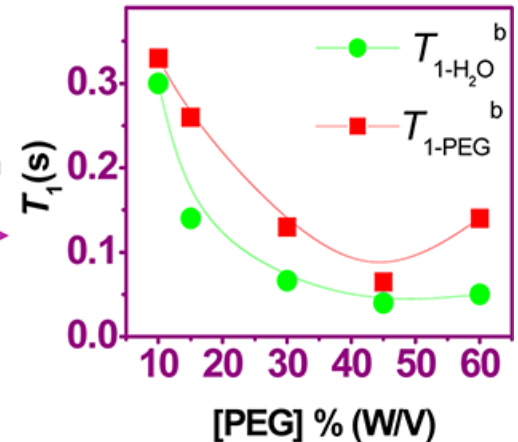
1) Soluciones de PEG en agua a distintas concentraciones, $T_{1,H}$



Experimento inversion-recovery



Inversion Recovery
 $\pi - \tau - \pi/2$

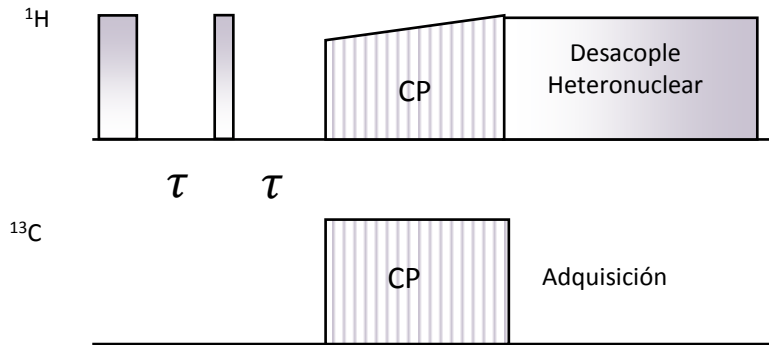


- Descripción de dos poblaciones de agua (móvil y ligada)
- Tiempos de agua ligada, similares a tiempos de PEG evidencian interacciones entre soluto y solvente y la formación de agregados de PEG (de tamaños de 40 nm-100 nm)

Referencia: E.M. Clop et. al, Journ. Phys. Chem. B, vol. 116, pag 11953, (2012)

2) Complejos de Norfloxacin-beta-Ciclodextrina, $T_{1,H}$

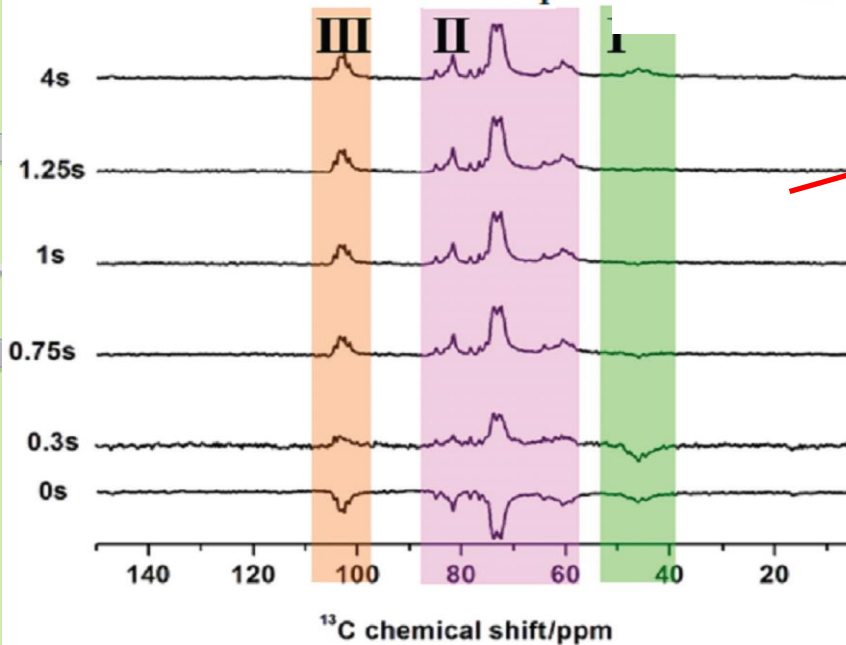
Medición de T_1 a través del espectro de ^{13}C . T_1 se obtiene para las distintas partes del sistema, esto permite diferenciar mezclas físicas (heterogéneo) y complejos donde hay interacción (homogéneo)



- Se toma un espectro para cada valor de τ
- NS aprox 200
- Los tiempos de contacto CP cortos para evitar difusión de espines
- Unos 7-10 valores de τ para poder hacer un buen ajuste.
- Duración aproximada de 5-8 hs

Mezcla física

Chattah et al., JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 102:3717–3724, 2013



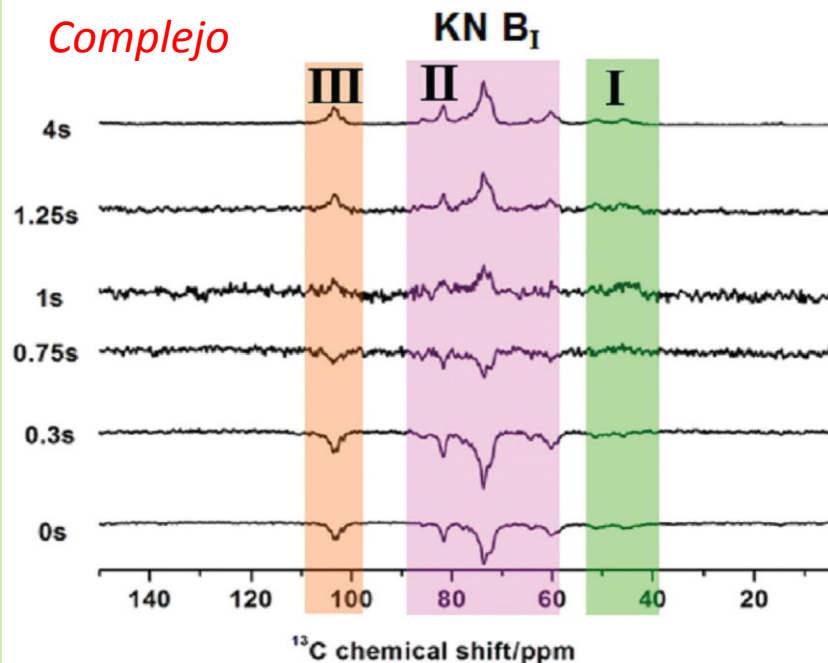
Espectros en función de τ

Table 1. Values of Spin-Lattice Relaxation Times (T_1) of Protons Corresponding to Each Region of the Carbon Spectra (I, II, or III) in All the Compounds

	$^1\text{H}-T_1$ (s)		
	Region I (55–36 ppm)	Region II (87–56 ppm)	Region III (110–100 ppm)
NOR B _I	1.82	–	1.64
PM B _I	1.85	0.46	0.60
KN B _I	1.55	1.45	1.38
NOR C	1.91	–	1.71
PM C	1.80	0.46	0.64
KN C	1.0	0.50	0.62

Errors are within 5%.

Complejo



Recordemos M para inversion -recovery

$$M = M_0 \left(1 - 2 \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right)$$

M se anula para $t^* = T_1/\ln 2$

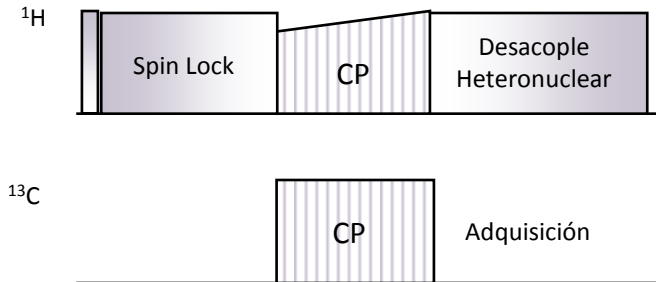
Esta medición permitió determinar que el complejo era una muestra homogénea a diferencia de la MF

2) Complejos Norfloxacin-Ciclodextrina, $T_{1,H}$

2) Tiempos de relajación en el sistema rotante vistos en ^{13}C

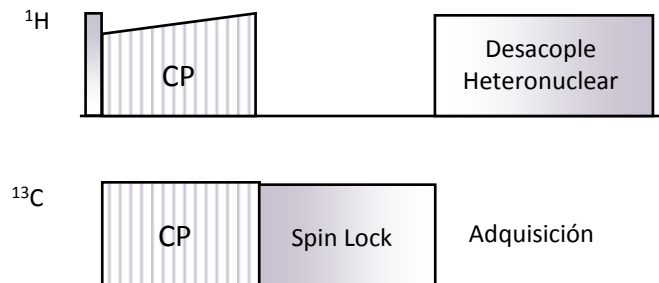
Tiempo de Relajación de protones en la Terna Rotante visto en ^{13}C $T_{1\rho\text{H}}$

Con esta secuencia de pulsos es posible ver el tiempo de relajación de ^1H ($T_{1\rho\text{H}}$) mirado a través de ^{13}C .



Tiempo de Relajación de carbono en la Terna Rotante $T_{1\rho\text{C}}$

En este experimento, una CP es seguida por un spín-lock en carbono durante un tiempo variable t . Durante t se produce la relajación espín-red de ^{13}C en la terna rotante.

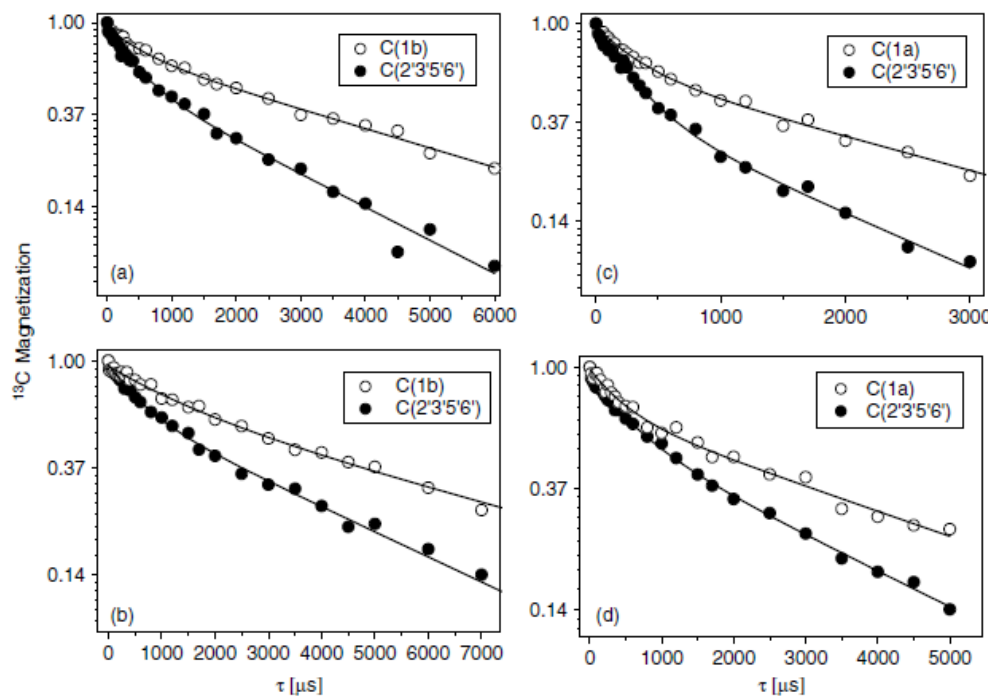


La relajación en la terna rotante es sensible a movimientos en la escala de los kHz, dando información de compuestos espacialmente no homogéneos.

- Se toma un espectro para cada valor de τ
- NS aprox 200
- Los tiempos de contacto CP cortos para evitar difusión de espines
- Unos 7-10 valores de τ para poder hacer un buen ajuste.
- Duración aproximada de 5-8 hs

Complejos ciprofloxacina y norfloxacina (fármacos) con aluminio, $T_{1\rho,C}$

^{13}C	$T_{1\rho,C}$ [μs]			
	(HCL.CIP) $_3$ Al method I	(HCL.CIP) $_3$ Al method II	(HCL.NOR) $_3$ Al method I	(HCL.NOR) $_3$ Al method II
1a	–	–	340 (50%) 2900	500 (30%) 4800
1b	400 (28%) 4400	1100 (23%) 7000	–	–
2'6'3'5'	450 (36%) 2800	800 (40%) 4300	320 (34%) 1800	580 (35%) 3400



Doble decaimiento: compuestos no homogéneos con al menos dos fases con diferentes órdenes o movilidades

$$M_C(\tau) = A \exp(-\tau/\tau_1) + (1 - A) \exp(-\tau/\tau_2)$$

- A , $(1-A)$ determinan el porcentaje de material presentando τ_1 y τ_2
- $T_{1\rho}$ corto indica fase amorfa
- $T_{1\rho}$ largo indica fase cristalina

2) Complejos Polímero-metal: Poly(EGDE-MAA), Poly(EGDE-MAA-IM), $T_{1\rho,H}$

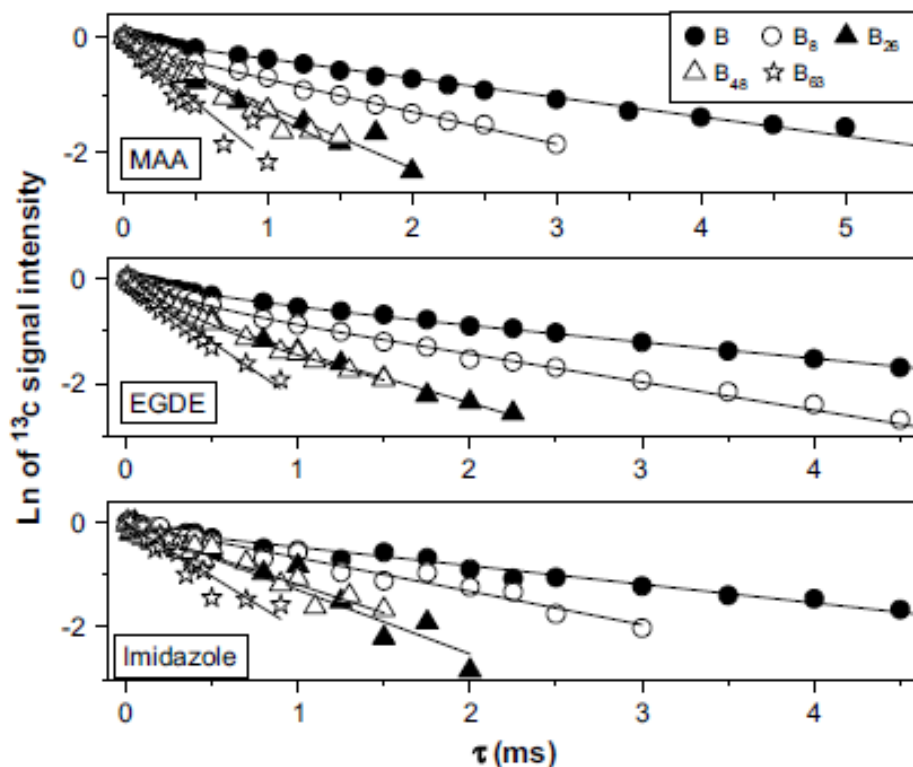


Fig. 12. Semilogarithmic plot of the ^{13}C magnetization as a function of the spin-lock time τ for the $T_{1\rho}^H$ experiment in polymer B and its copper complexes. The MAA segment corresponds to the signal at 53.6 ppm, the EGDE segment corresponds to the signal at 71.3 ppm, and the imidazole segment corresponds to the signal at 123.7 ppm. The fittings of the experimental data to Eqs. (1) and (2) are shown. The fitting values are given in Table 4.

Una o dos componentes

$$M_C(\tau) = M_0 \exp(-\tau/\tau_1)$$

$$M_C(\tau) = A \exp(-\tau/\tau_1) + (1 - A) \exp(-\tau/\tau_2)$$

- Se observan dos componentes en acuerdo con WISE.
- Podemos obtener el porcentaje de cada componente
- Se observa que el tiempo de relajación disminuye abruptamente con la concentración de cobre

Complexes	$T_{1\rho}^H$ (EGDE)		$T_{1\rho}^H$ (MAA)			$T_{1\rho}^H$ (IM)	
	C(3)		C(4)	C(5)	C(6)	C(7)	C(8)
A	3.3	0.5 (37%)	3.4	2.9	3.1	-	-
A ₁	2.9	0.42 (33%)	3.2	2.6	2.3	-	-
B	3.3	0.6 (26%)	3.0	2.6	-	2.8	2.8
B ₈	1.9	0.3 (33%)	1.7	1.4	-	1.9	1.6
B ₂₆	0.9	-	0.9	0.7	-	-	0.8
B ₄₈	0.7	-	0.8	-	-	-	0.9
B ₆₃	0.5	-	0.5	-	-	-	0.5



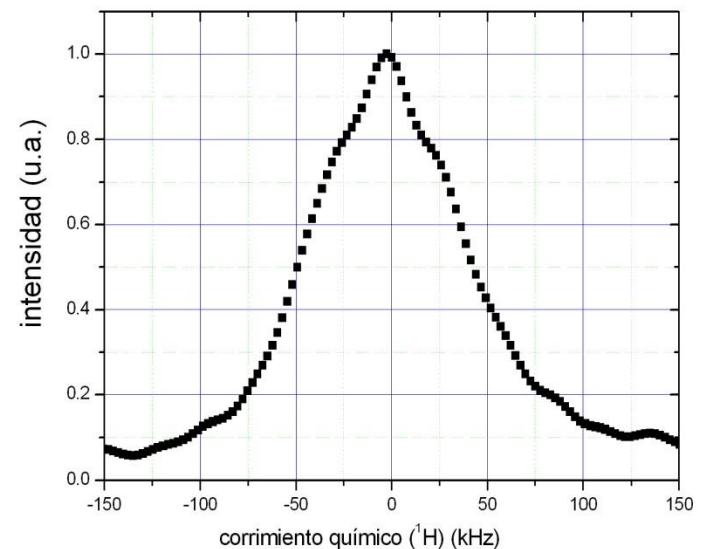
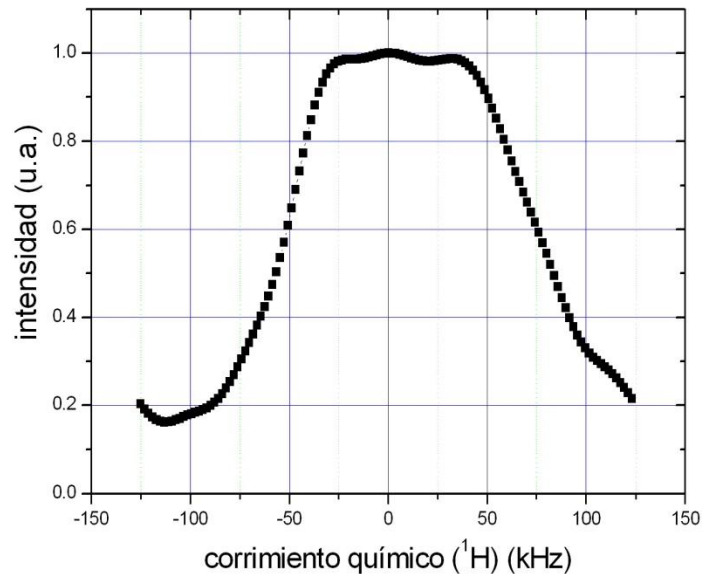
Ejercicios

Preguntas

- 1) Se realiza un experimento 2D WISE, en el cual la dimensión F1 consta de 32 puntos, adquiridos con 200 scans cada uno. Si se usa un *recycling time* de 4 seg. Diga cual es el tiempo total del experimento.
- 2) En un experimento para medir T1 de H a traves de ^{13}C por medio del inversion recovery, sabiendo que el T1H global del compuesto es de 1.2 seg. Cada espectro de ^{13}C necesita unos 200 escanes. Arme el experimento (lista de tiempos, recycling time, duracion total, etc)

Ejercicio 6: Se realizó un experimento ^1H - ^{13}C WISE en dos polímeros relacionados. Se muestran las proyecciones de la línea de protones correspondientes al mismo carbono en ambos.

- (a) Obtener en forma aproximada el ancho altura mitad de cada línea
- (b) Discutir cual de las dos líneas evidencia una mayor rigidez en la estructura.



Ejercicio 7: En una medición de tiempos de relajación spin-red (T_1) en un fármaco puro (Furosemda), BCD y una mezcla física del fármaco con B-CD, se obtuvo el siguiente comportamiento para $\ln\left(1 - \frac{M}{M_0}\right)$ vs. el tiempo de recuperación, en un experimento *inversion-recovery*.

- Indique que grafico corresponde al fármaco puro, cual a la BCD y cual a la mezcla física.
- Mencione con que ecuación puede ajustar los datos experimentales y de un valor estimado para los tiempos de relajación característicos del sistema.

