

Βασικές αρχές της φασματοσκοπίας NMR,

Διάλεξη 1: Εισαγωγή στη φασματοσκοπία NMR

Απόστολος Σπύρος
Επικ. Καθηγητής, Εργαστήριο NMR
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

aspyros@chemistry.uoc.gr

<http://www.chemistry.uoc.gr/aspyros>



Μερικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR

Διερεύνηση δομής

- Χημεία Φυσικών προϊόντων
- Συνθετική οργανική χημεία

Μελέτη δυναμικών φαινομένων

- Χημική κινητική
- Χημική ισορροπία

Προσδιορισμός τρισδιάστατης δομής

- Πρωτεΐνες
- DNA, RNA
- σύμπλοκα πρωτεΐνη/DNA, πρωτεΐνη/RNA
- Πολυσακχαρίτες

Σχεδιασμός φαρμάκων

- Σχέση δομής-δραστηκότητας

Πολυμερή, συμπολυμερή και πολυμερικά μίγματα

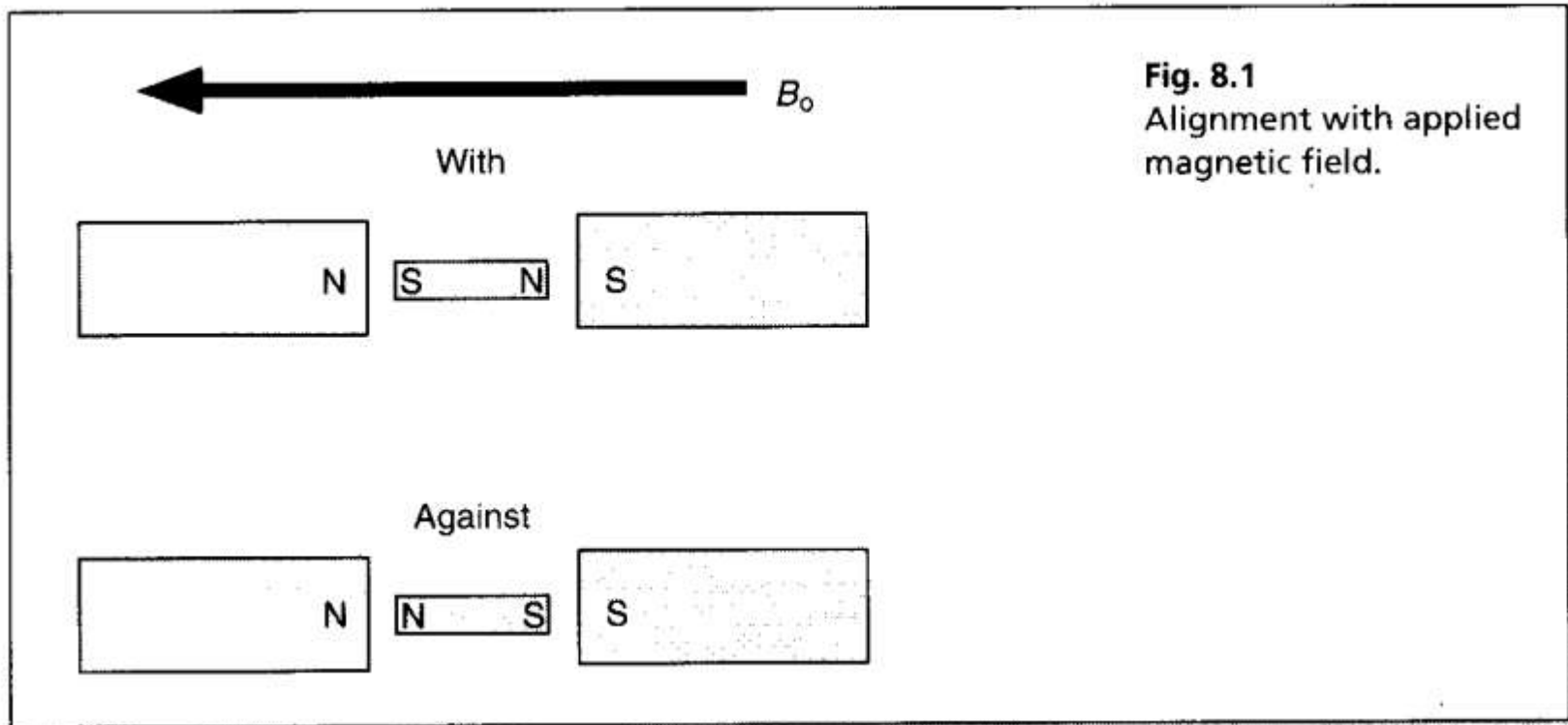
- Σύσταση και δομή
- Συμβατότητα
- Δυναμική

Ιατρική - MRI

Φασματοόμετρα NMR

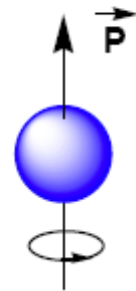


Προσανατολισμός μαγνήτη σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο



Σπιν

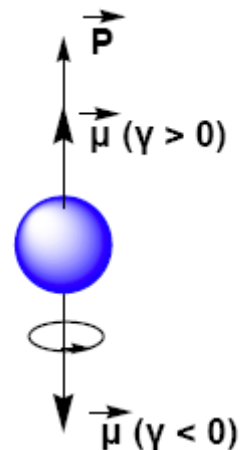
Τι είναι σπιν; Είναι μια θεμελιώδης ιδιότητα της ύλης, όπως η μάζα ή το ηλεκτρικό φορτίο και αναφέρεται στην **αυτοπεριστροφή γύρω από ένα φανταστικό άξονα** υποατομικών, μεμονωμένων σωματιδίων (ηλεκτρονίων, πρωτονίων, νετρονίων), τα οποία χαρακτηρίζονται από από μαγνητικό κβαντικό αριθμό $+1/2$ ή $-1/2$. Λόγω της περιστροφής το σωματίδιο εμφανίζει **ιδιοστροφορμή ή σπιν**, η οποία παρίσταται με το άνυσμα **P**.



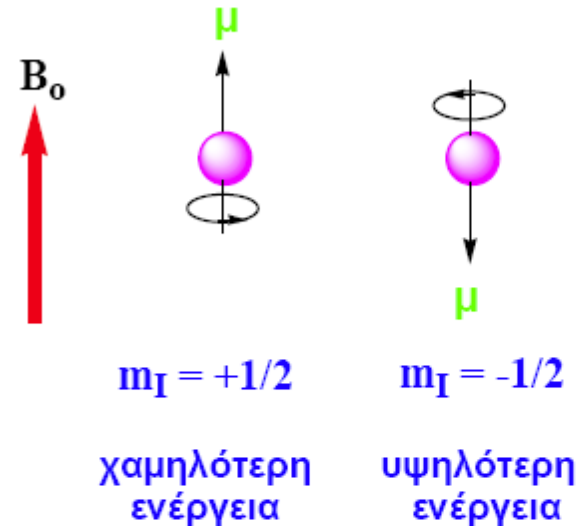
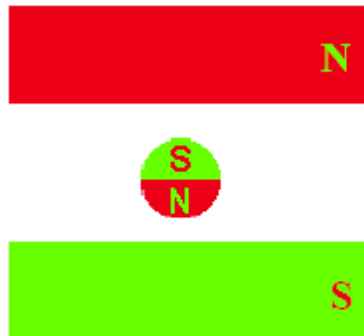
Πυρηνικό σπιν πρωτονίου

Ο πυρήνας του ατόμου του υδρογόνου έχει ένα πρωτόνιο, το οποίο εκδηλώνει την ιδιότητα του σπιν. Η ύπαρξη του σπιν συνεπάγεται εγγενή πυρηνική μαγνητική ροπή. Δηλαδή το **πρωτόνιο συμπεριφέρεται ως ένα μαγνητικό δίπολο ή ως ένας μικροσκοπικός μαγνήτης**.

Το άνυσμα της μαγνητικής ροπής, μ , είναι συγγραμμικό με το άνυσμα της ιδιοστροφορμής, \vec{P} , ενώ η φορά του εξαρτάται από τον γυρομαγνητικό λόγο, γ .



Πυρηνικό ενός σπιν εντός μαγνητικού πεδίου



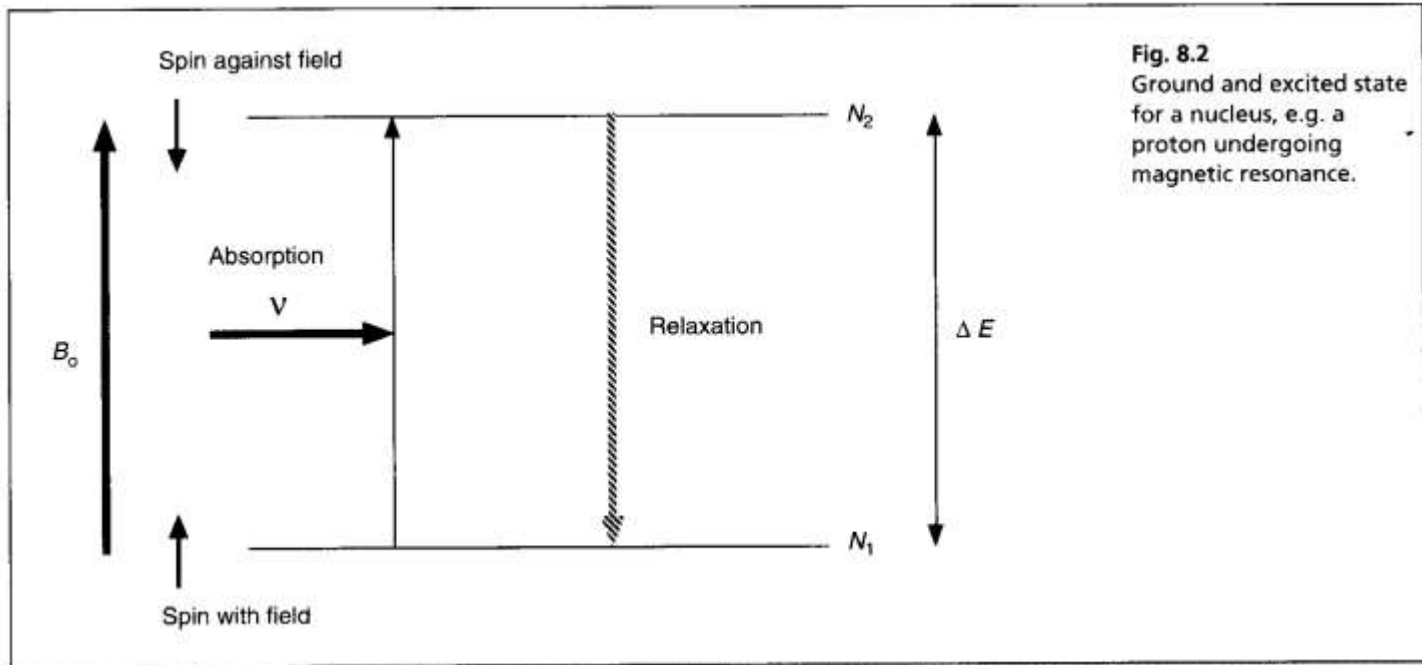
Οι κατευθύνσεις του ανύσματος της μαγνητικής ροπής, μ , καθορίζονται από τον μαγνητικό κβαντικό αριθμό του σπιν, m_I . Για $I = 1/2$ (π.χ. πρωτόνιο), ο m_I παίρνει δύο τιμές $+1/2$ (η μαγνητική ροπή έχει την ίδια κατεύθυνση με το πεδίο B_0) και $-1/2$. (η μαγνητική ροπή έχει την αντίθετη κατεύθυνση με το πεδίο B_0). Οι δύο προσανατολισμοί της μ ορίζουν δύο ενεργειακές στάθμες με διαφορετική ενέργεια.

Αριθμός σταθμών πυρήνα με σπιν I

$2I + 1$ (Πολλαπλότητα)

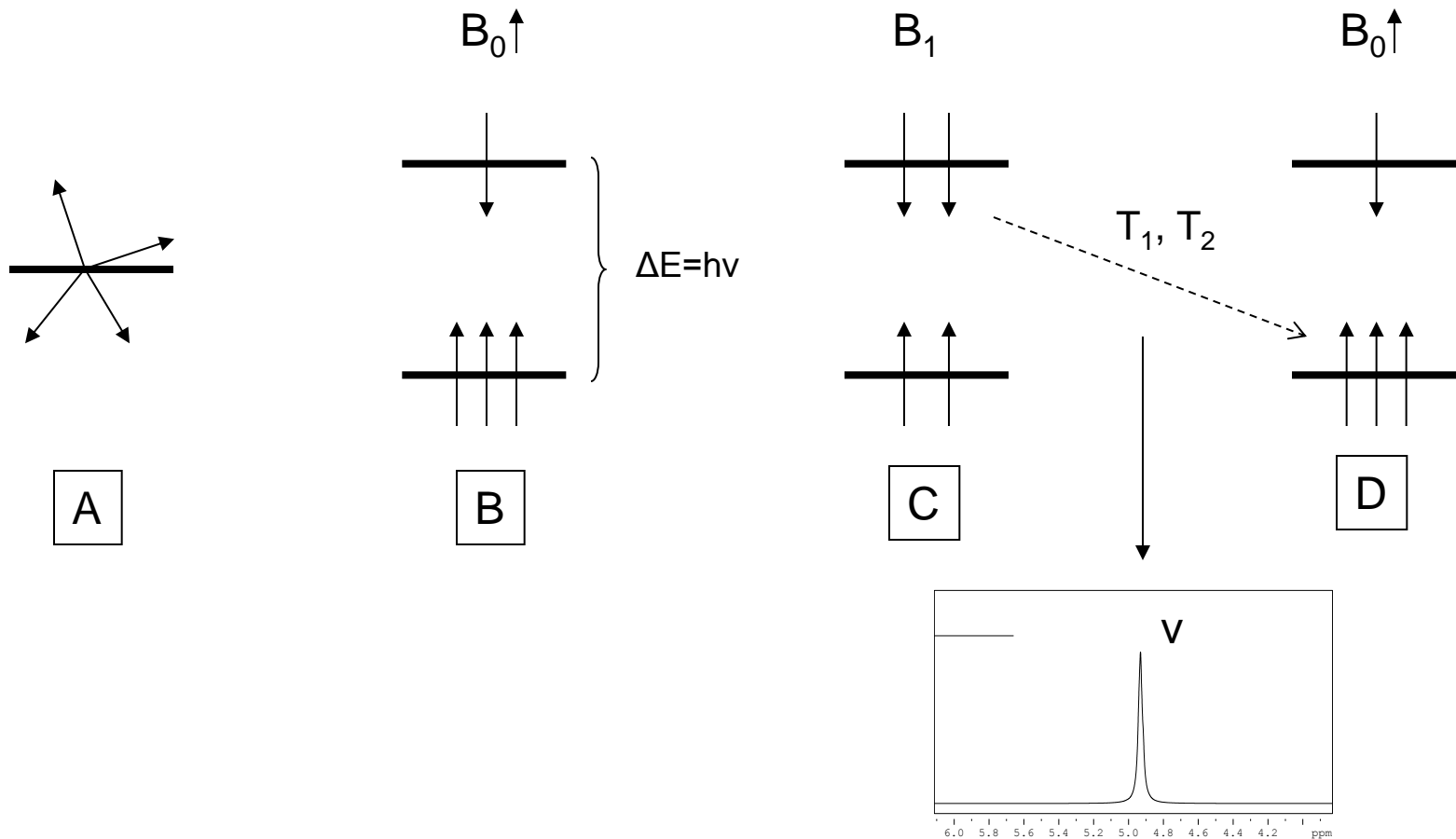
$m_I = -I, -I+1, -I+2, \dots, (I-1), I$

Ενεργειακό διάγραμμα NMR



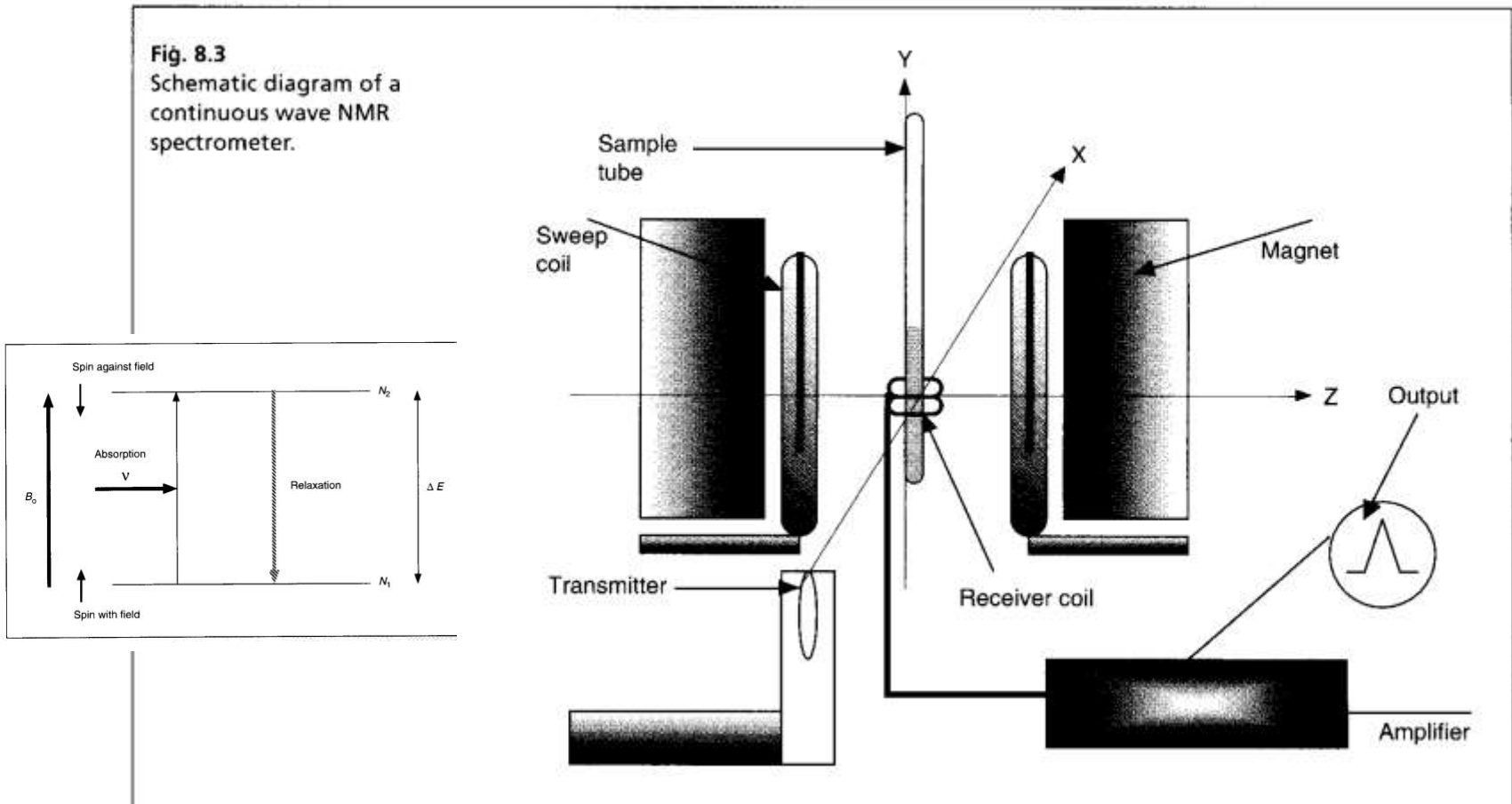
$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = \nu_0 h \quad \Rightarrow \quad \nu_0 = \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0$$

Θεωρητική περιγραφή λήψης ενός φάσματος NMR

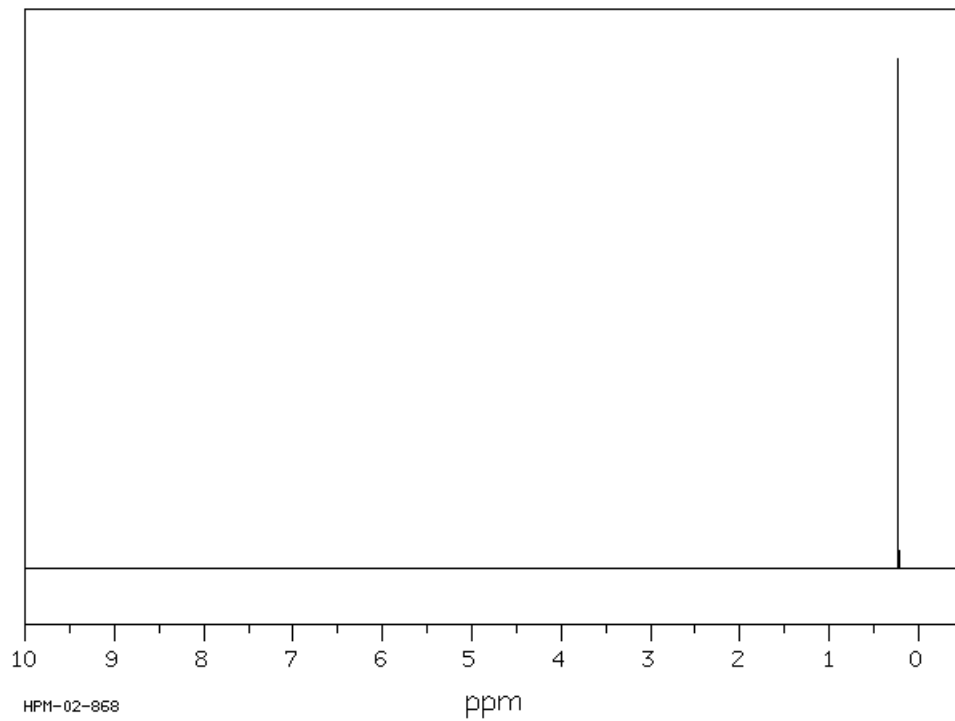


Φασματοόμετρο NMR

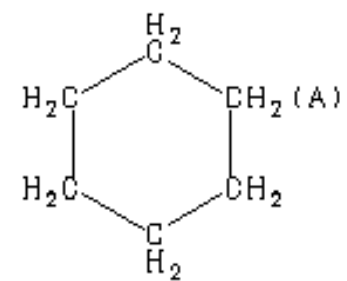
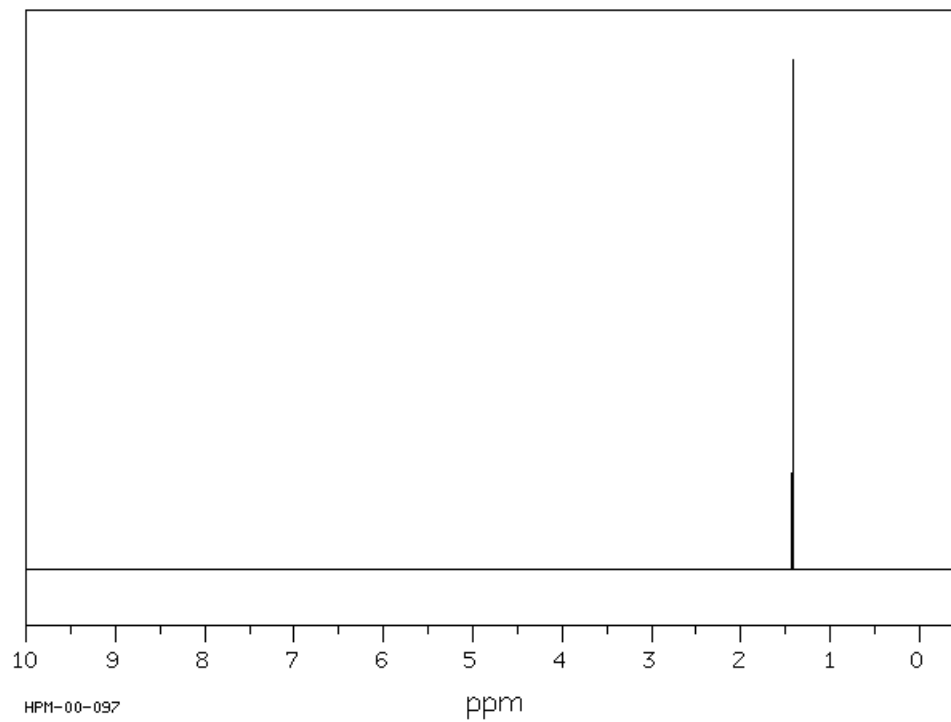
Fig. 8.3
Schematic diagram of a
continuous wave NMR
spectrometer.

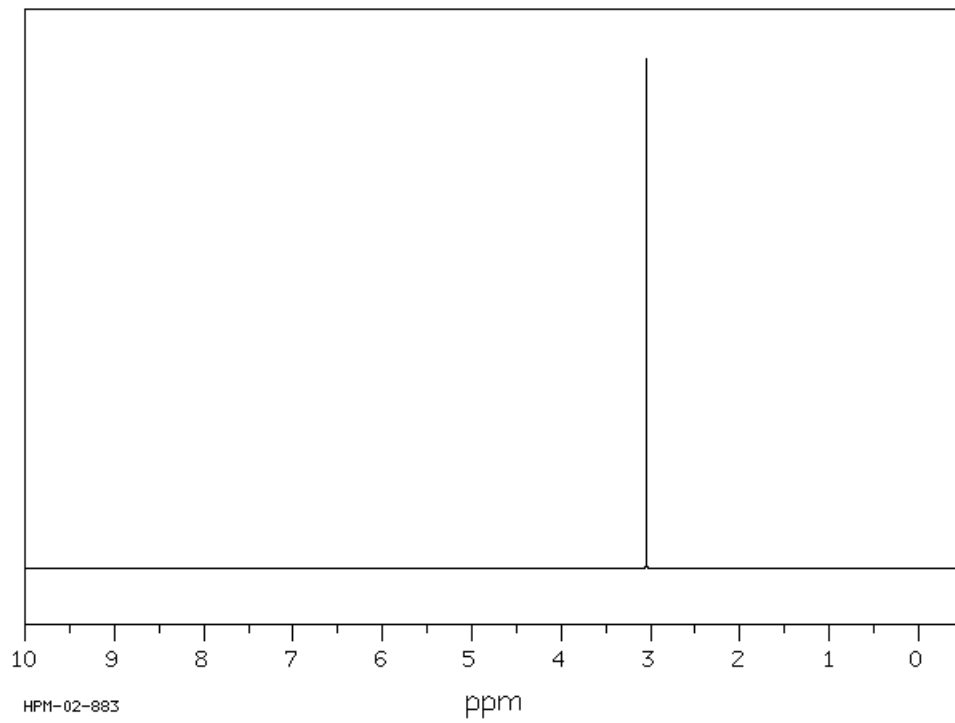


^1H NMR spectroscopy

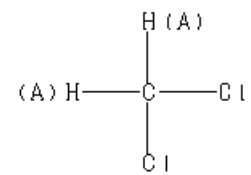
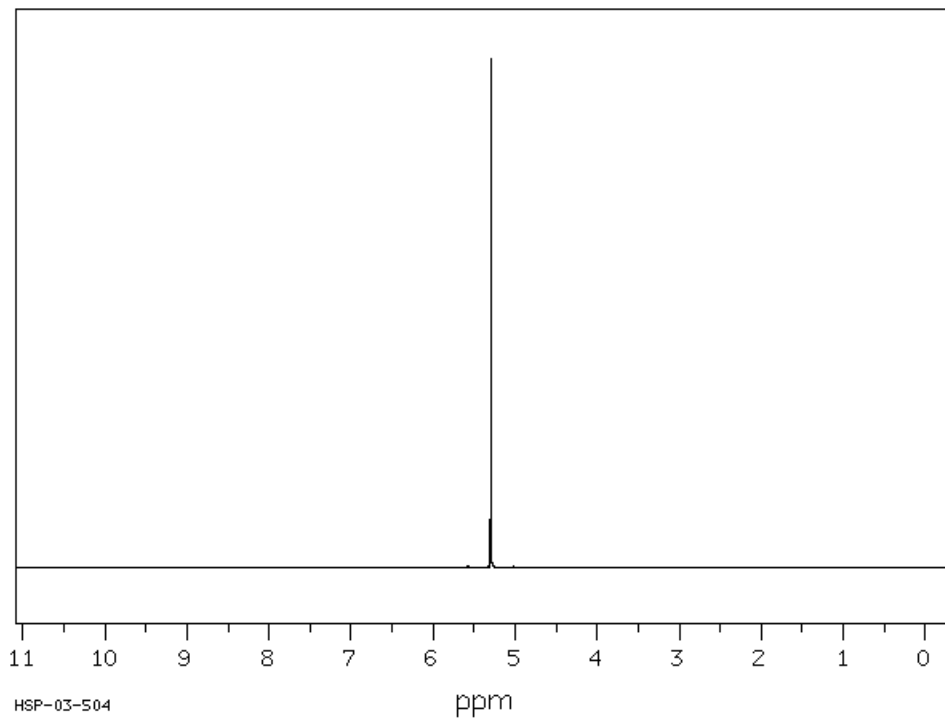


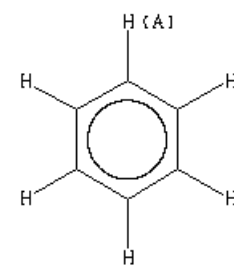
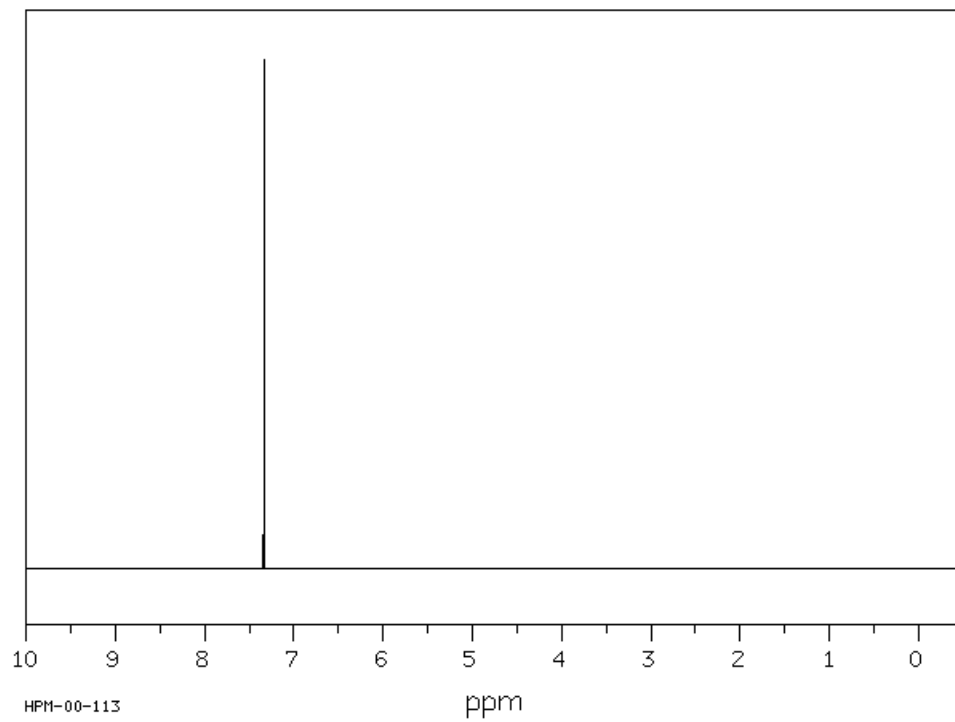
CH_4

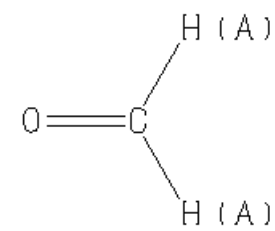
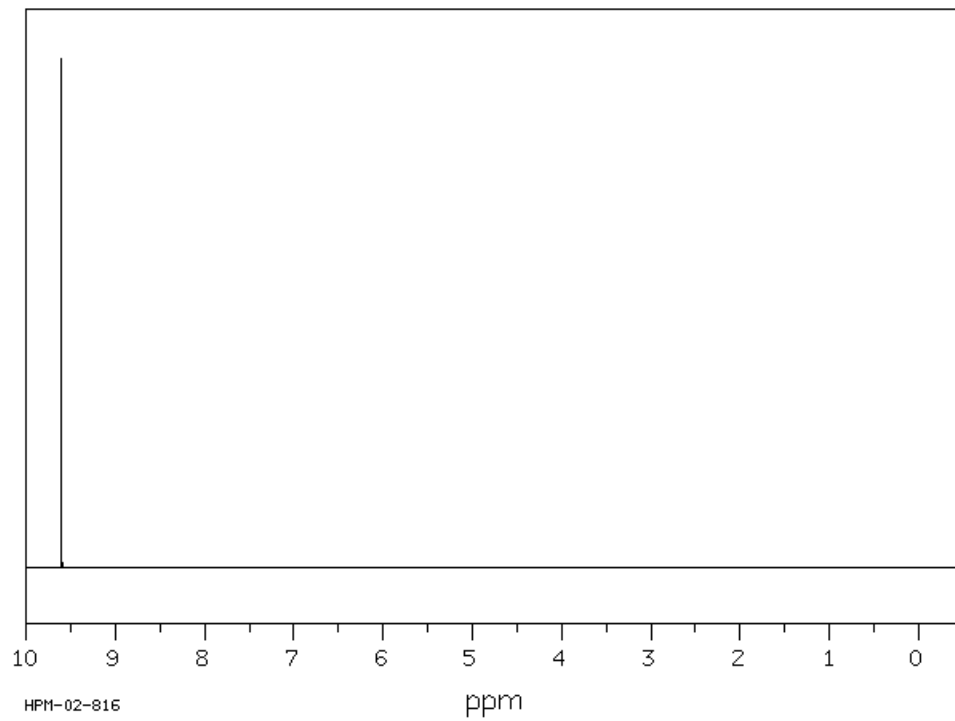




CH₃Cl



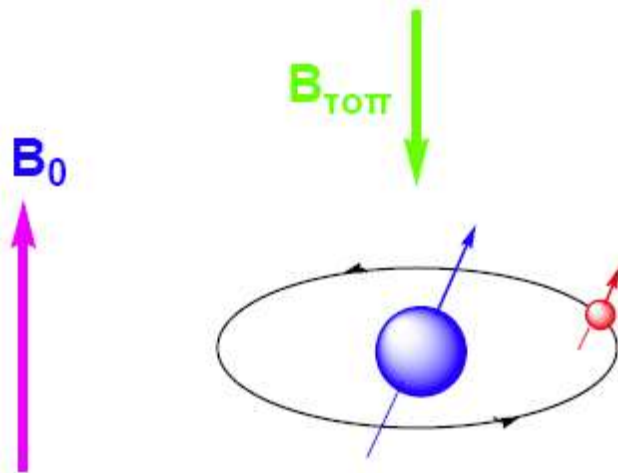




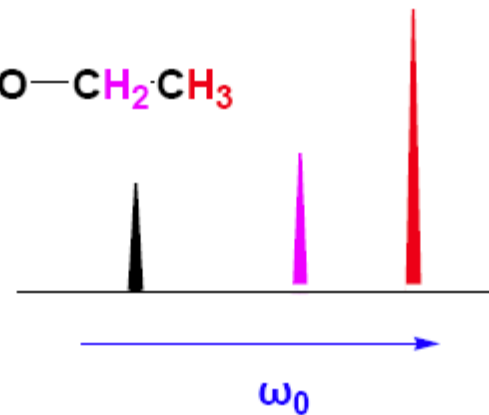
Χημική μετατόπιση

Εάν όλοι οι πυρήνες σ' ένα μόριο είχαν την ίδια συχνότητα συντονισμού, ω_0 , τότε το NMR δεν θα ήταν χρήσιμο. Ευτυχώς όμως, η συχνότητα συντονισμού των πυρήνων στο μόριο επηρεάζεται από το χημικό περιβάλλον, το οποίο τροποποιεί το μαγνητικό πεδίο που αισθάνονται οι πυρήνες, ακόμα και του ίδιου τύπου (π.χ. πρωτόνια).

Το αποτελεσματικό μαγνητικό πεδίο, B_{eff} , που αισθάνονται οι πυρήνες λόγω του τοπικού πεδίου, $B_{\text{τοπ}}$, που δημιουργεί το χημικό περιβάλλον είναι



Κάθε πρωτόνιο δίνει την κορυφή του



H(1s)

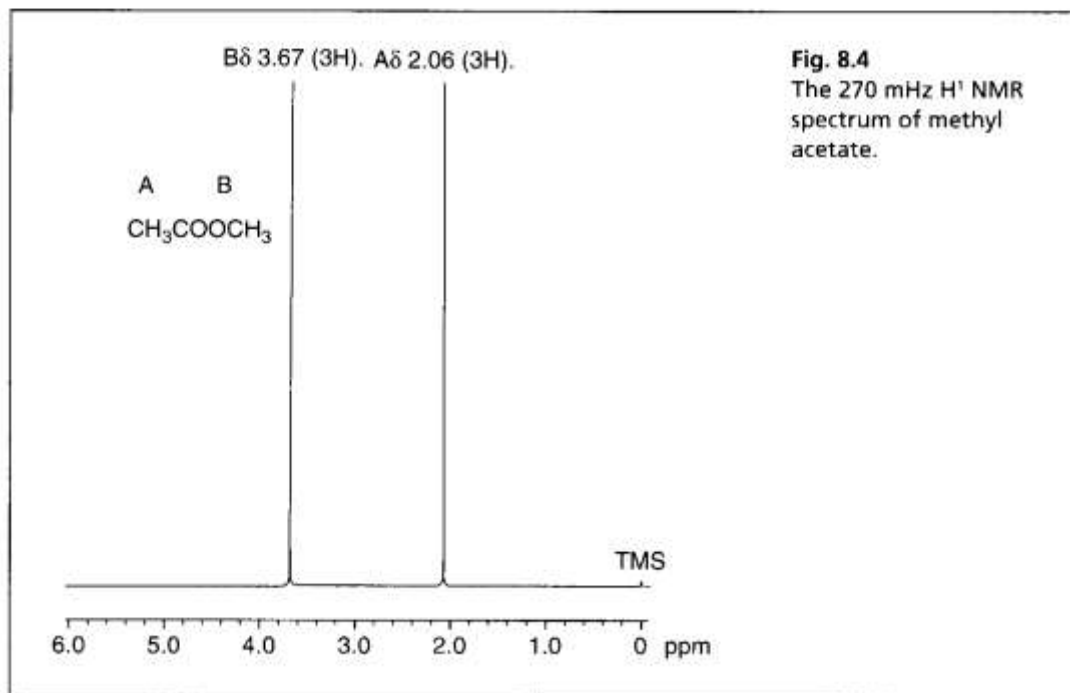
H(1s)

C(sp^3)

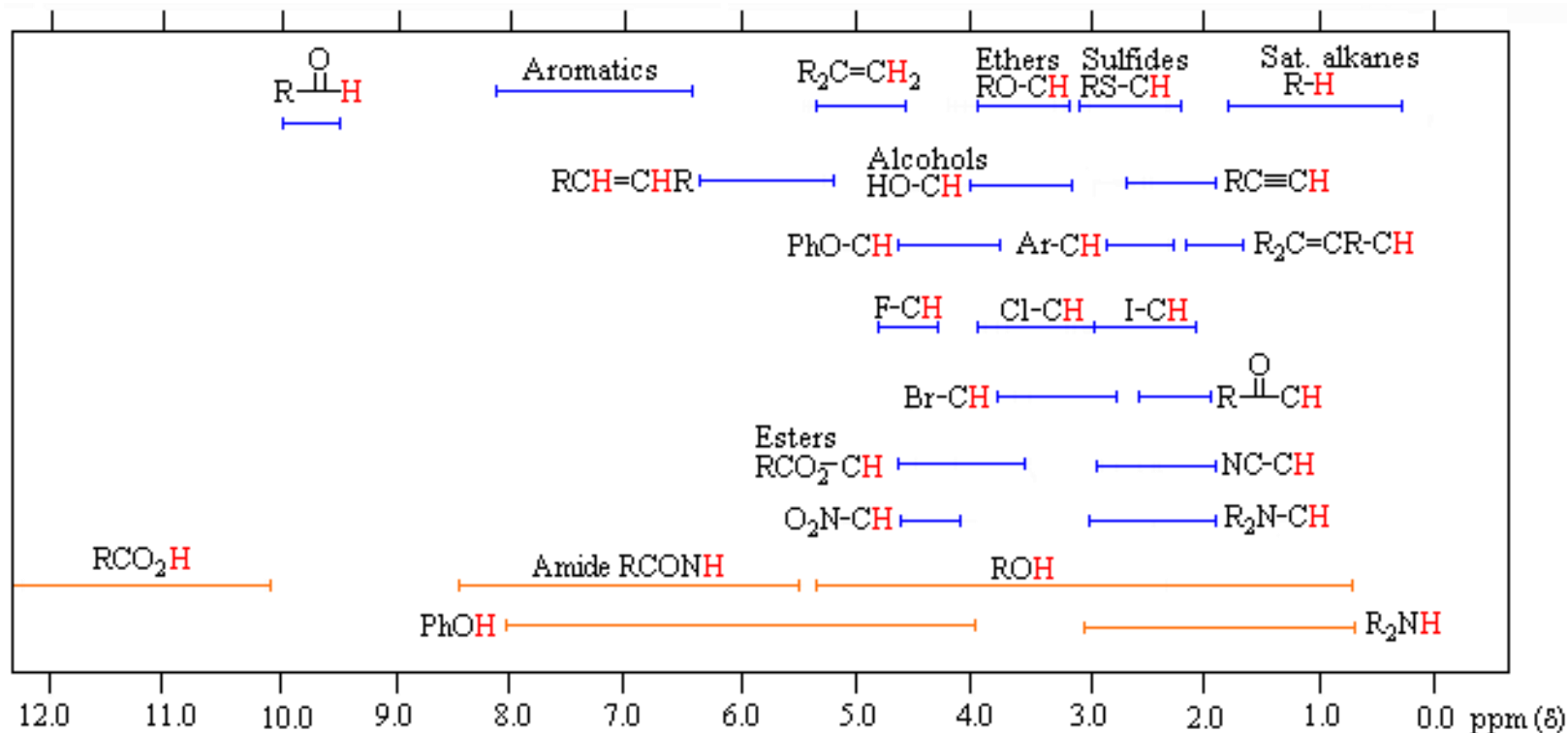
Χημική μετατόπιση

Table 8.1 Approximate chemical shift values for non-aromatic protons attached to carbon

Group	δ ppm	Group	δ ppm	Group	δ ppm
CH ₃ -C	0.9	R-CH ₂ -C	1.4	CH-C	1.5
CH ₃ -C-O	1.3	R-CH ₂ -C-N	1.4	CH-C-O	2.0
CH ₃ -C=C	1.6	R-CH ₂ -C-O	1.9	CH-CO-N	2.4
CH ₃ -CO	2.0	R-CH ₂ -CO-N	2.2	CH-CO	2.7
CH ₃ -CO-N	2.0	R-CH ₂ -C=C	2.3	CH-N	2.8
CH ₂ -N	2.4	R-CH ₂ -CO	2.4	CH-Ar	3.3
CH ₂ -Ar	2.3	R-CH ₂ -N	2.5	CH-O	3.9
CH ₃ -O	3.3	R-CH ₂ -Ar	2.9	CH-N-CO	4.0
CH ₃ N ⁺ (R) ₃	3.3	R-CH ₂ -O	3.6	CH-Cl	4.2
CH ₃ -O-CO	3.7	R-CH ₂ -O-CO	4.1	R-CH=C	4.5-6.0

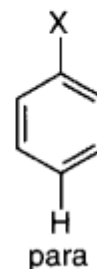
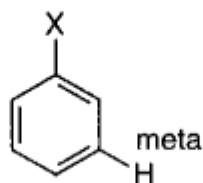
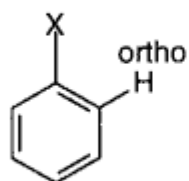


Κάθε πρωτόνιο δίνει την κορυφή του



Χημική μετατόπιση

Table 8.2 Chemical shift values for protons attached to an aromatic ring. The effects of the substituents are either added to or subtracted from the chemical shift for benzene at $\delta = 7.27$



Substituent X	H ortho	H meta	H para
NO ₂	0.94	0.18	0.39
OH	-0.49	-0.13	-0.20
NH ₂	-0.76	-0.25	-0.63
Cl	0.01	-0.06	-0.08
COOH	0.80	0.16	0.25
NH ₃ ⁺	0.40	0.20	0.20
CH ₃	-0.16	-0.09	-0.17
OR	-0.46	-0.1	-0.46
CH ₃ -CO-NH	-0.12	-0.07	-0.21
COOR	0.71	0.1	0.21

Ένταση κορυφών στα φάσματα ^1H NMR

Ορίζουμε ως ένταση κορυφών το εμβαδόν της επιφάνειας που περικλείεται από μια κορυφή. Το εμβαδόν το μετράμε αυτόματα με ηλεκτρονικό ολοκληρωτή, ο οποίος βρίσκεται ενσωματωμένος στον φασματογράφο NMR, υπό τη μορφή ενός βήματος, όπως φαίνεται στο σχήμα. Το ύψος του βήματος μετρούμενο σε αυθαίρετες μονάδες είναι ανάλογο του εμβαδού της κορυφής.

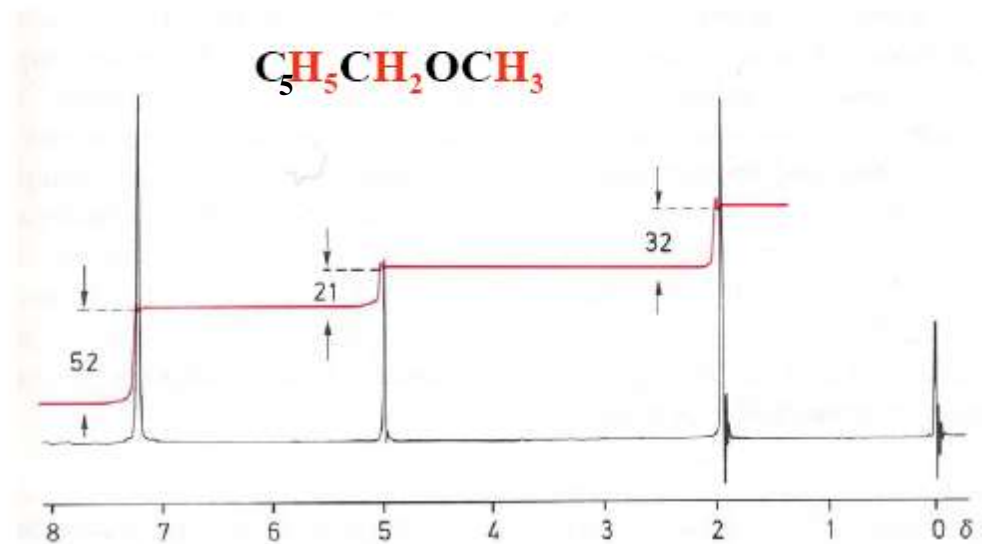
Η λεπτομερής εξέταση του εμβαδού της κορυφής αποκαλύπτει ότι αυτό είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που δίνουν το συγκεκριμένο σήμα.

Πάντως πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι μόνο ο σχετικός αριθμός των πρωτονίων μπορεί να προσδιορισθεί με την ολοκλήρωση.

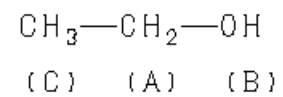
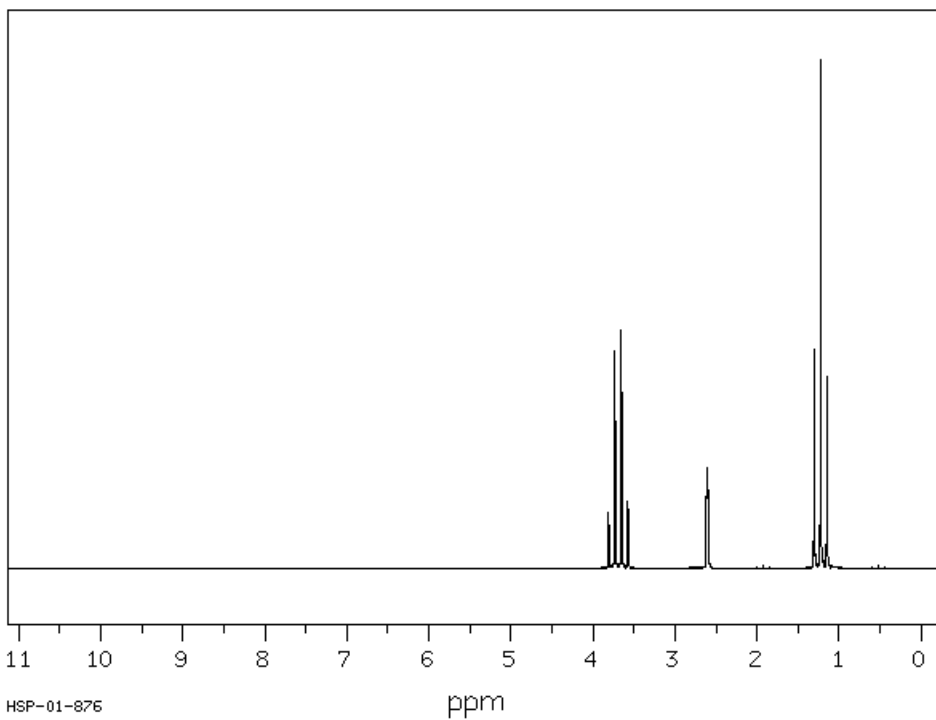
$$\frac{52}{21} = 2.5 \quad \frac{32}{21} = 1.5 \quad \frac{21}{21} = 1$$

$$2.5 \times 2 = 5 \quad 1.5 \times 2 = 3 \quad 1 \times 2 = 2$$

Αναλογία πρωτονίων: 5:3:2

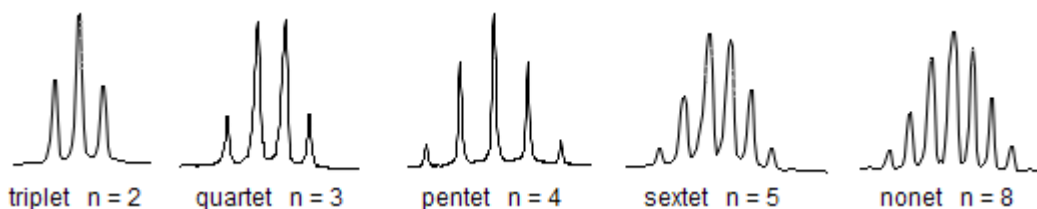


Σύζευξη σπιν-σπιν: κανόνας N+1

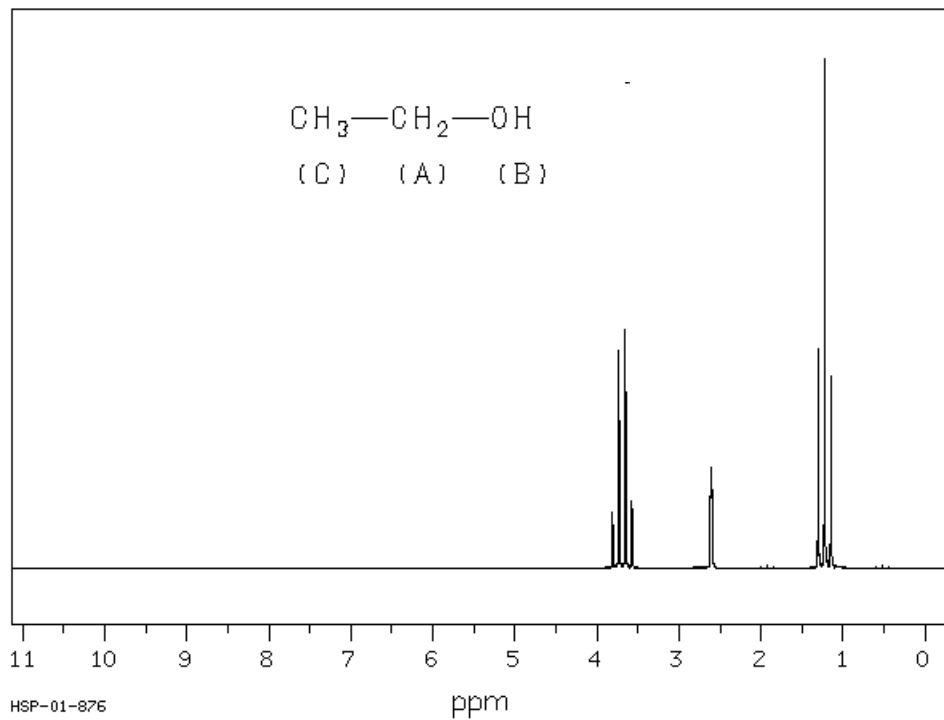


Nuclear spin coupling, the N+1 rule

n	2ⁿ	Multiplet Intensities - Pascal's triangle	
0	1	1	Singlet (s)
1	2	1 1	Doublet (d)
2	4	1 2 1	Triplet (t)
3	8	1 3 3 1	Quartet (q)
4	16	1 4 6 4 1	Pentet
5	32	1 5 10 10 5 1	Sextet
6	64	1 6 15 20 15 6 1	Septet
7	128	1 7 21 35 35 21 7 1	Octet
8	256	1 8 28 56 70 56 28 8 1	Nonet



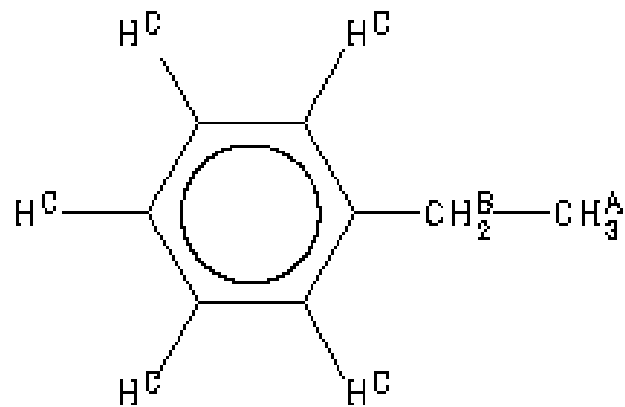
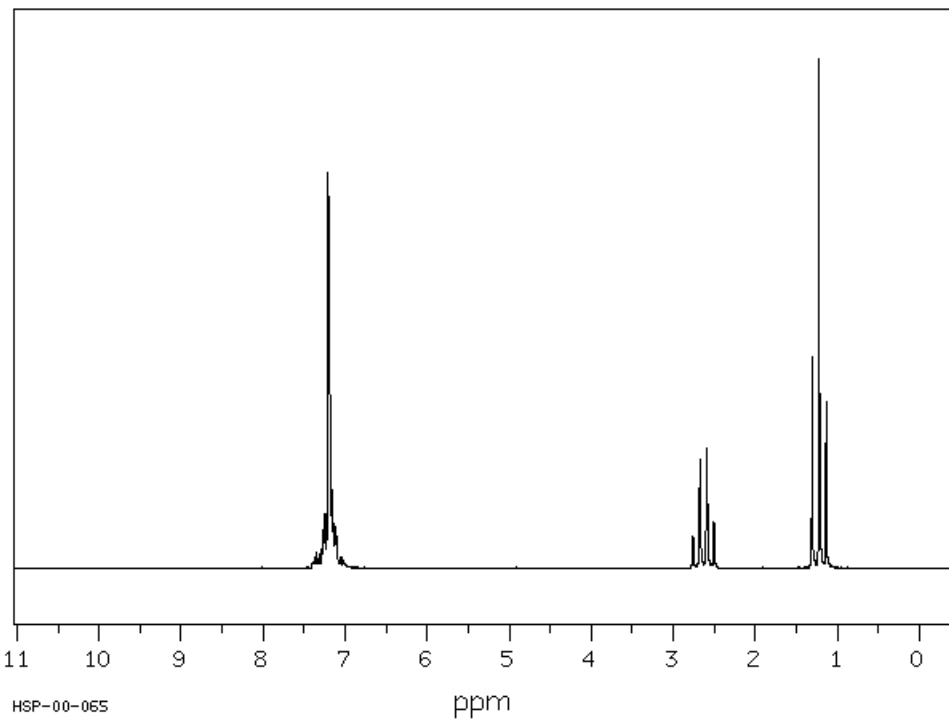
Σύζευξη σπιν-σπιν: κανόνας N+1



Assign.	Shift(ppm)
A	3.687
B	2.61
C	1.226

singlet			1			
doublet		1		1		
triplet		1	2		1	
quartet		1	3	3		1
quintet	1	4	6	4		1
sextet	1	5	10	10	5	1

Toluene



Assign. Shift(ppm)

A	1.22
B	2.63
C	7.0 to 7.45

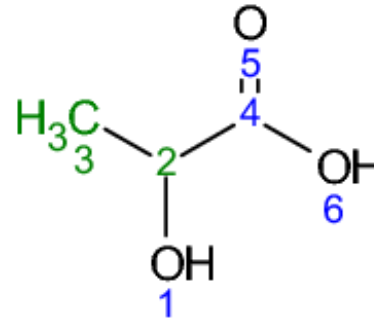
Lactic acid

HMDB00190

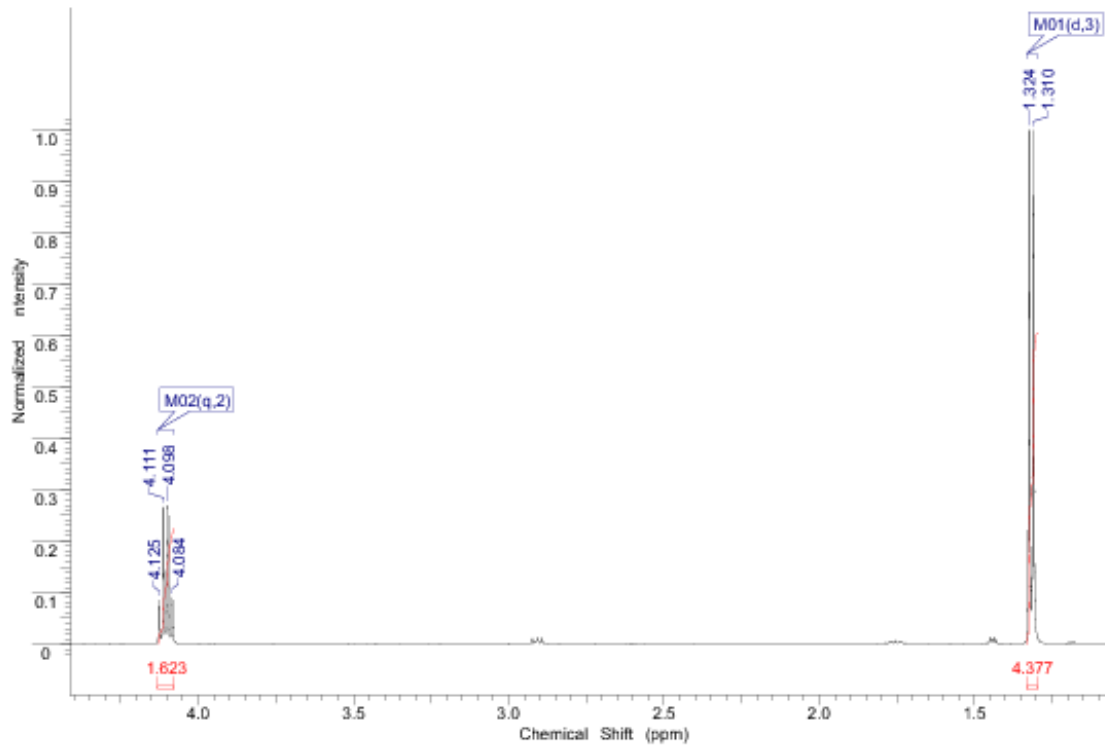
^1H NMR Spectrum: 500 MHz, D_2O

Sample: 50 mM at pH 7.0

Referenced to DSS



Zoomed ^1H NMR spectrum

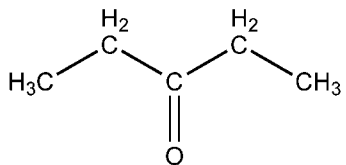


singlet					1					
doublet					1		1			
triplet					1	2		1		
quartet					1	3	3		1	
quintet					1	4	6	4	1	
sextet					1	5	10	10	5	1

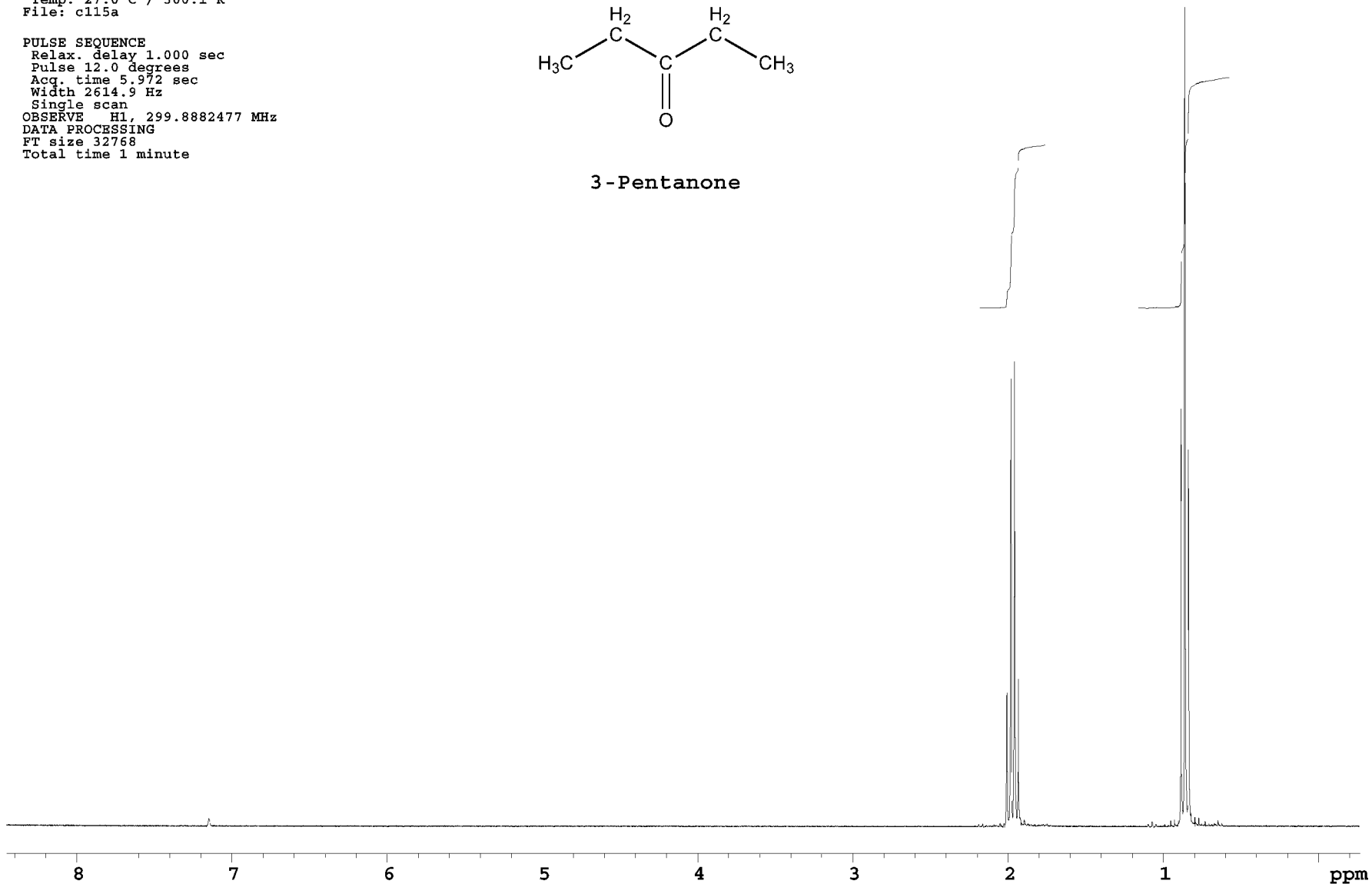
3-pentanone
c5d6
c115a

Solvent: Benzene
Temp. 27.0 C / 300.1 K
File: c115a

PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 12.0 degrees
Acq. time 5.972 sec
Width 2614.9 Hz
Single scan
OBSERVE H1, 299.8882477 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 minute



3-Pentanone

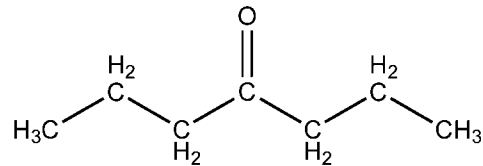


4-heptanone
c6d6
f13a

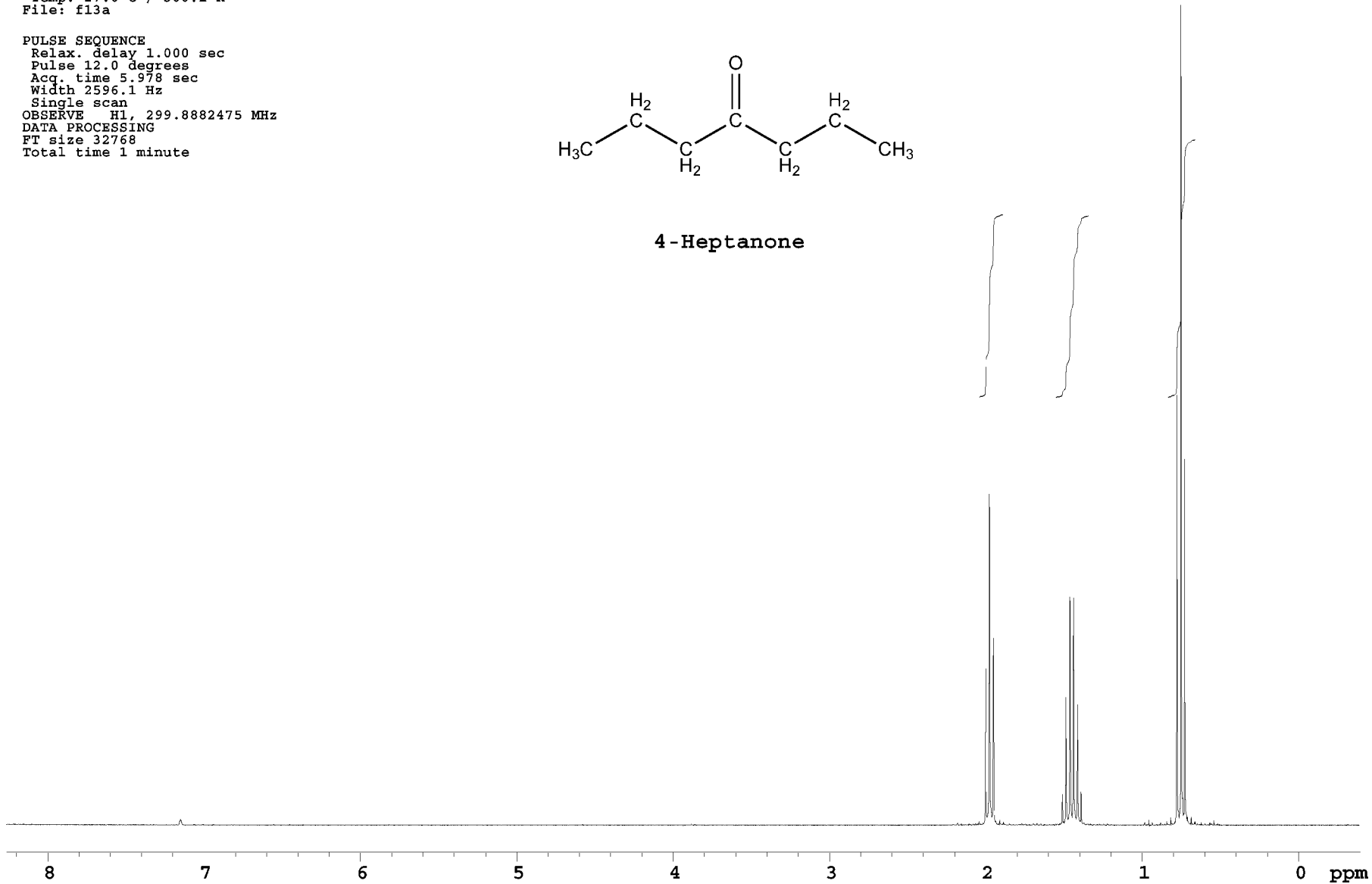
Solvent: Benzene
Temp. 27.0 C / 300.1 K
File: f13a

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 12.0 degrees
Acq. time 5.978 sec
Width 2596.1 Hz
Single scan
OBSERVE H1, 299.8882475 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 minute

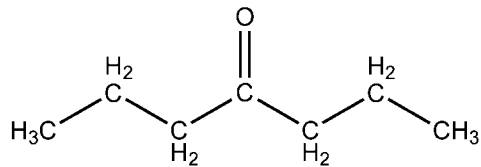


4-Heptanone

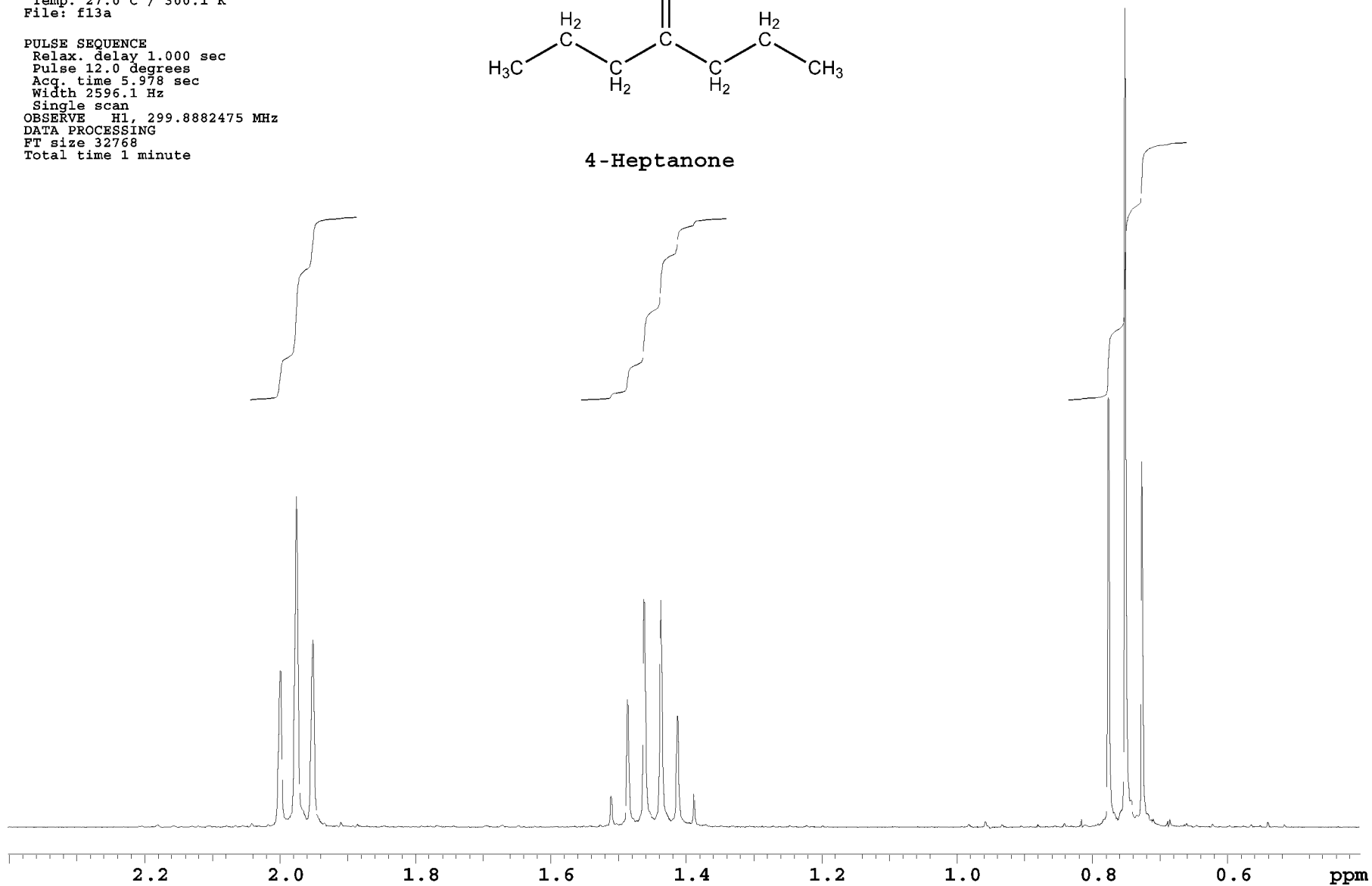


4-heptanone
c6d6
f13a
Solvent: Benzene
Temp. 27.0 C / 300.1 K
File: f13a

PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 12.0 degrees
Acq. time 5.978 sec
Width 2596.1 Hz
Single scan
OBSERVE H1, 299.8882475 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 minute

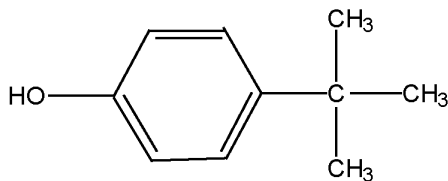


4-Heptanone

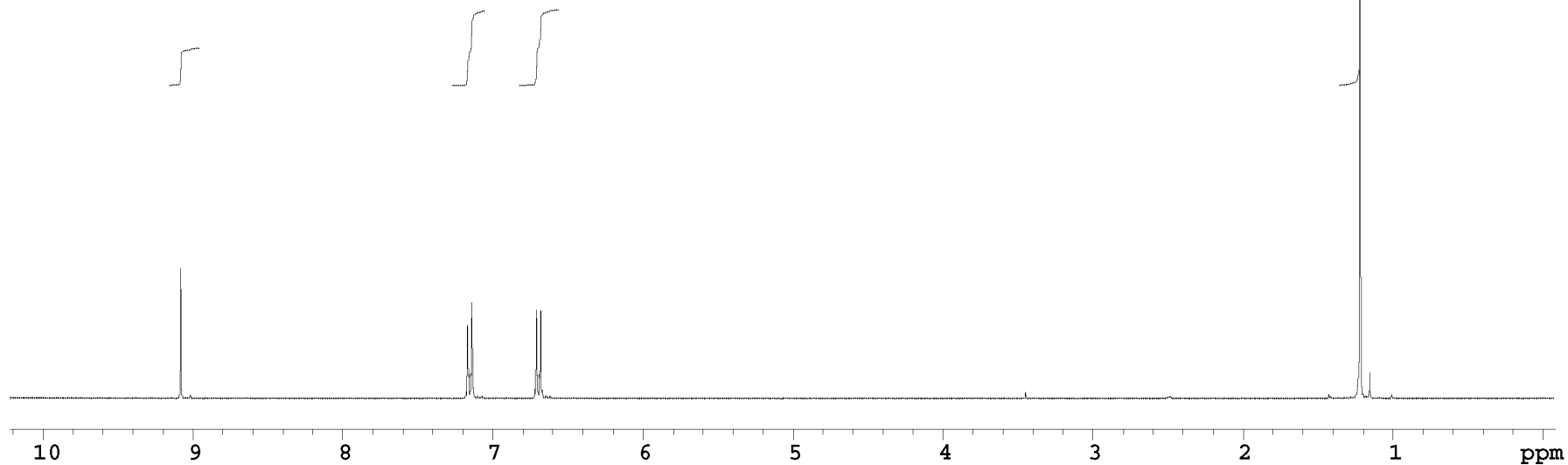


4-t-Butylphenol
DMSO-d6
Shoulders
e21a
Solvent: DMSO
Temp. 27.0 C / 300.1 K
File: e21a

PULSE SEQUENCE
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 12.0 degrees
Acq. time 5.980 sec
Width 3087.8 Hz
Single scan
OBSERVE H1, 299.8896532 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 1 minute



4-t-Butylphenol



α -Linolenic acid (HMDB01388)

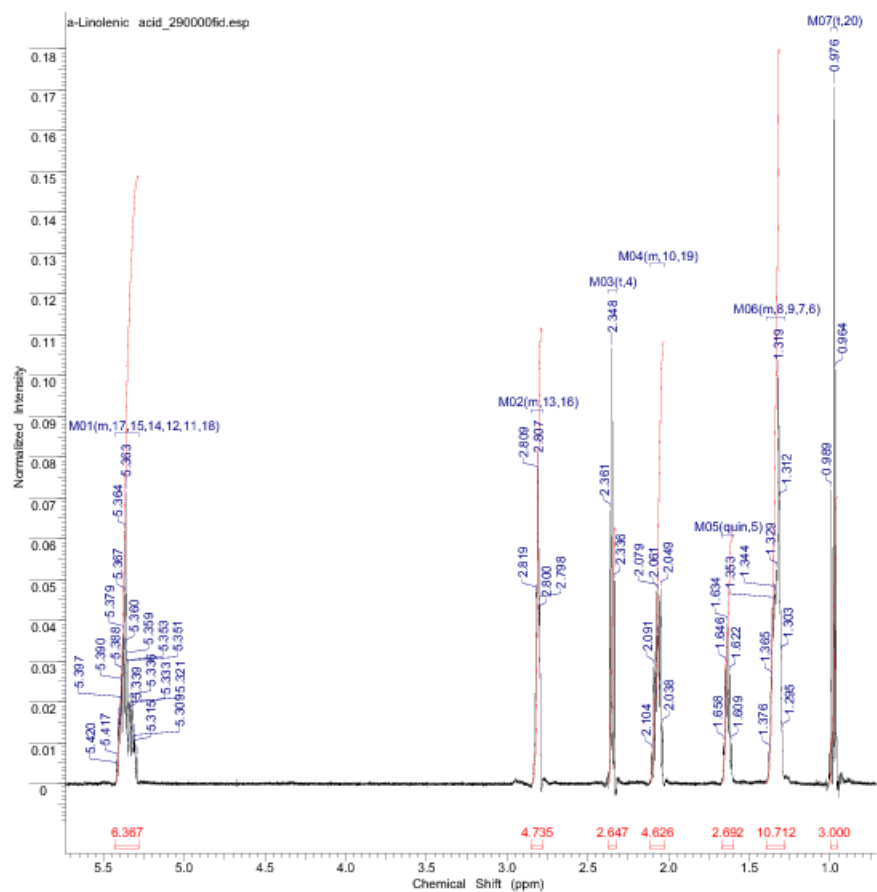
^1H NMR spectrum: 600 MHz in CDCl_3

Sample: 50 mM

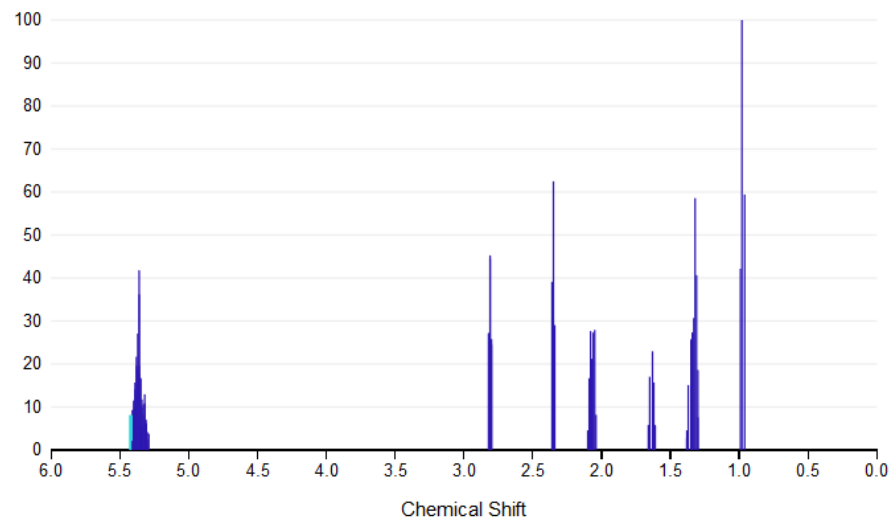
Referenced to TMS



Φασματοσκοπικό ΑΠΟΤΥΠΩΜΑ



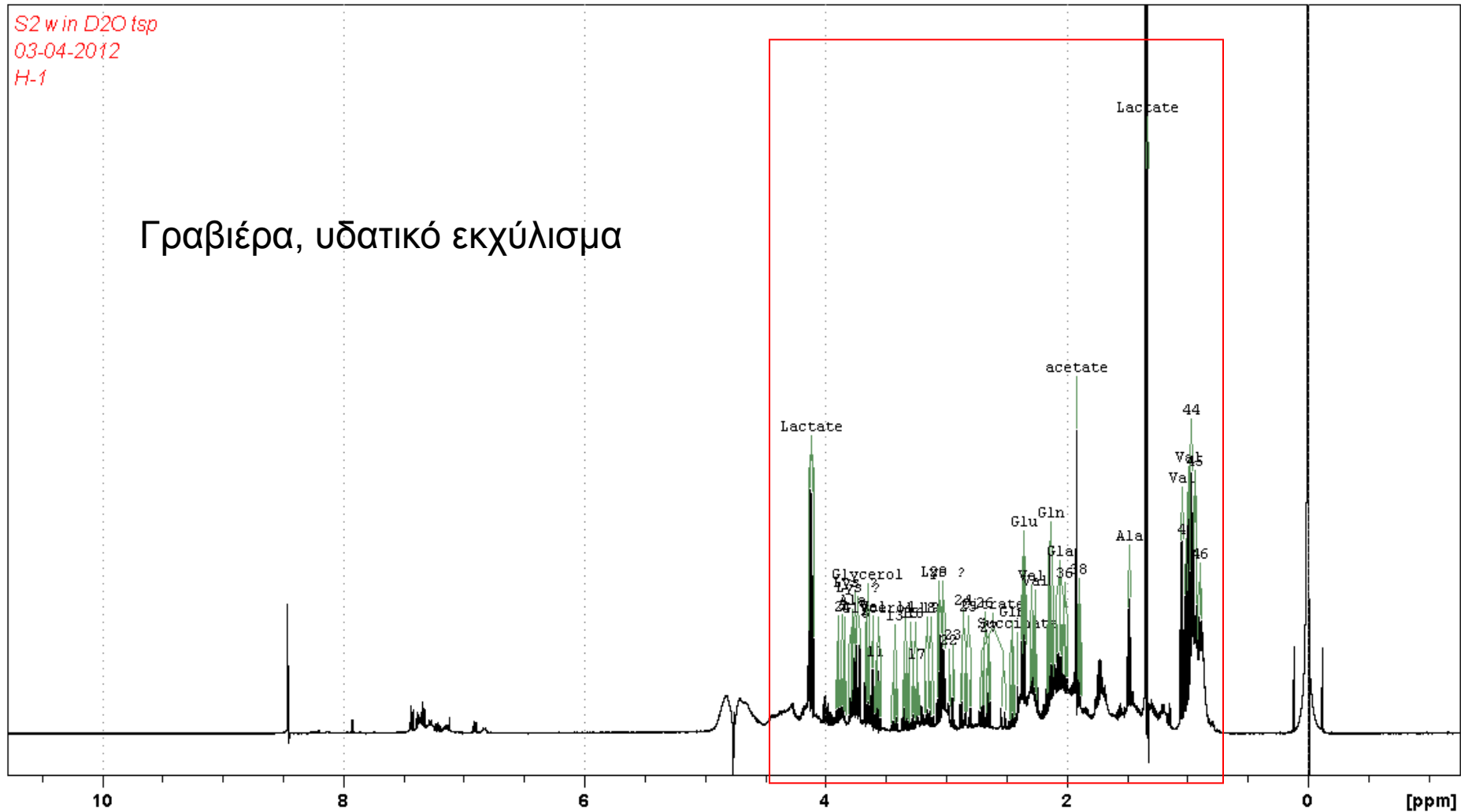
^1H NMR Spectrum (HMDB01388)



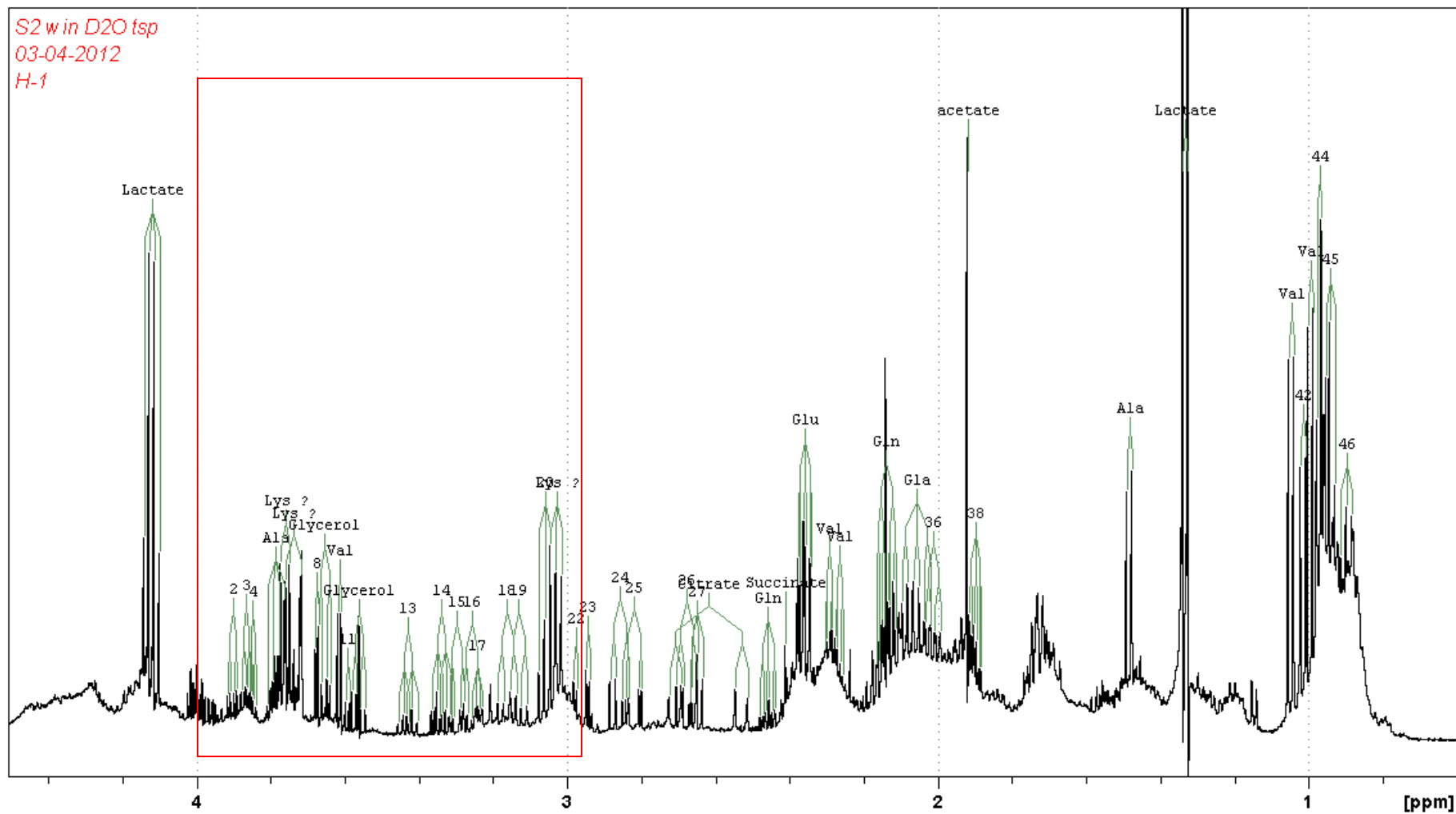
Ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων με τη Φασματοσκοπία NMR

S2 w in D2O tsp
03-04-2012
H-1

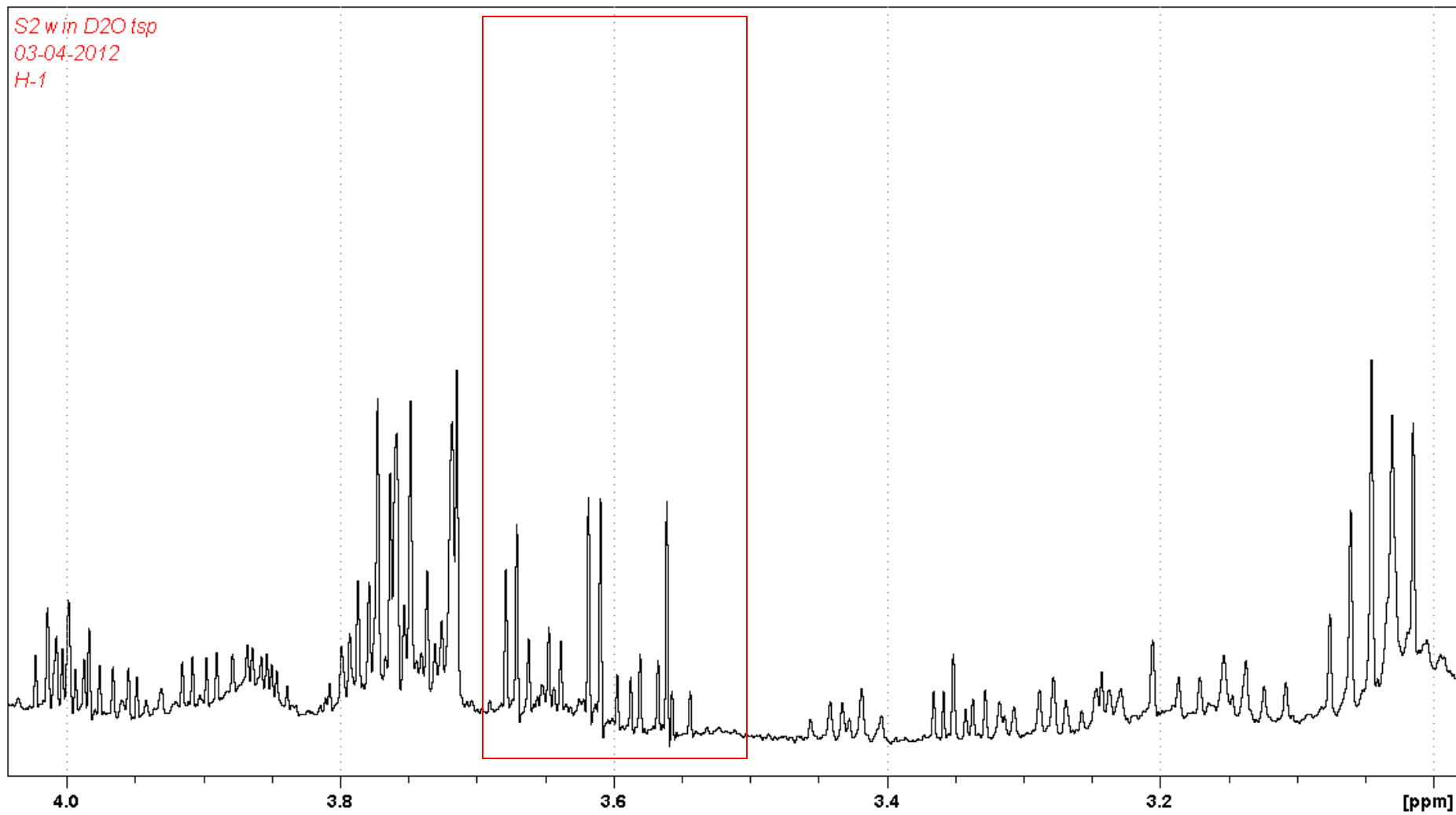
Γραβιέρα, υδατικό εκχύλισμα



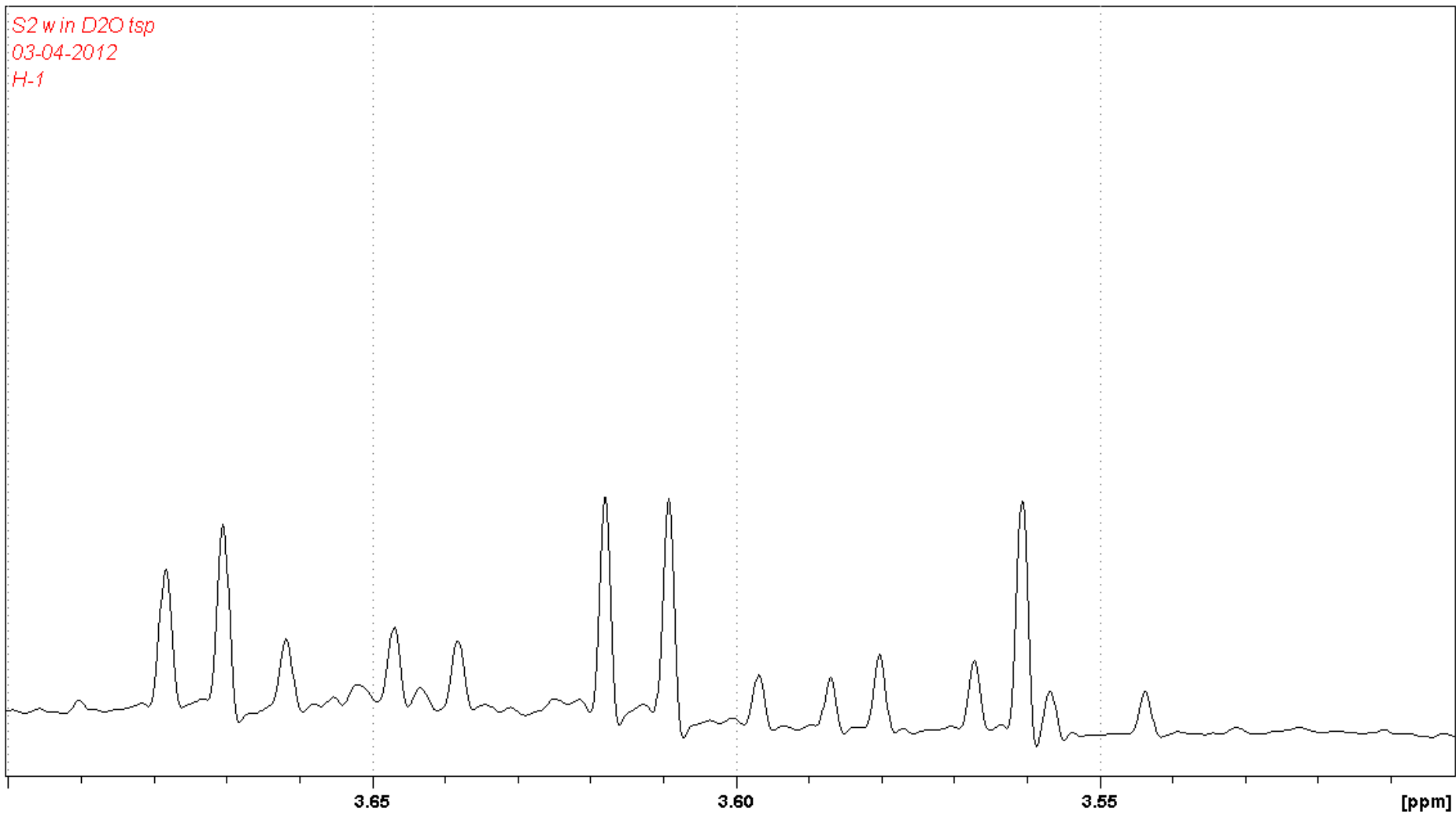
S2 w in D2O tsp
03-04-2012
H-1



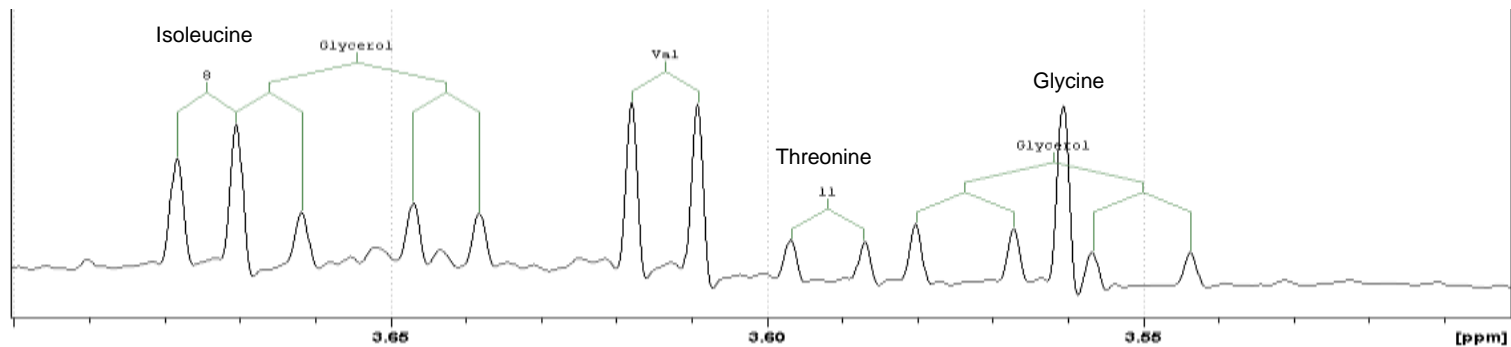
S2 w in D2O tsp
03-04-2012
H-1



S2 w in D2O tsp
03-04-2012
H-1

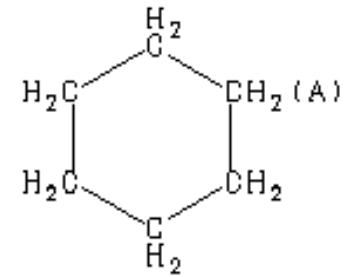
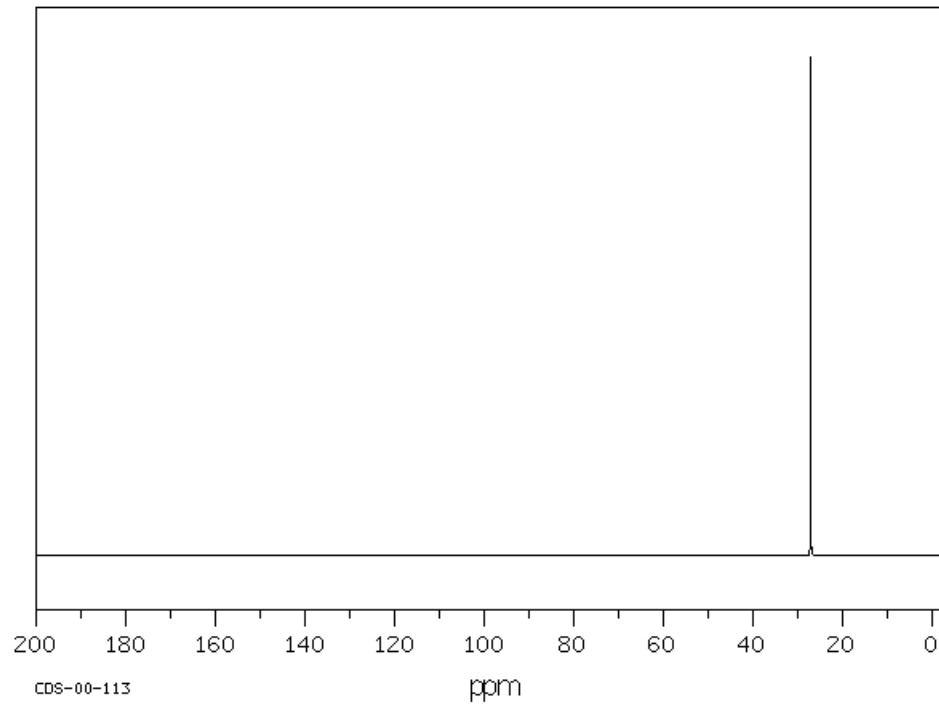


Γραβιέρα, υδατικό εκχύλισμα

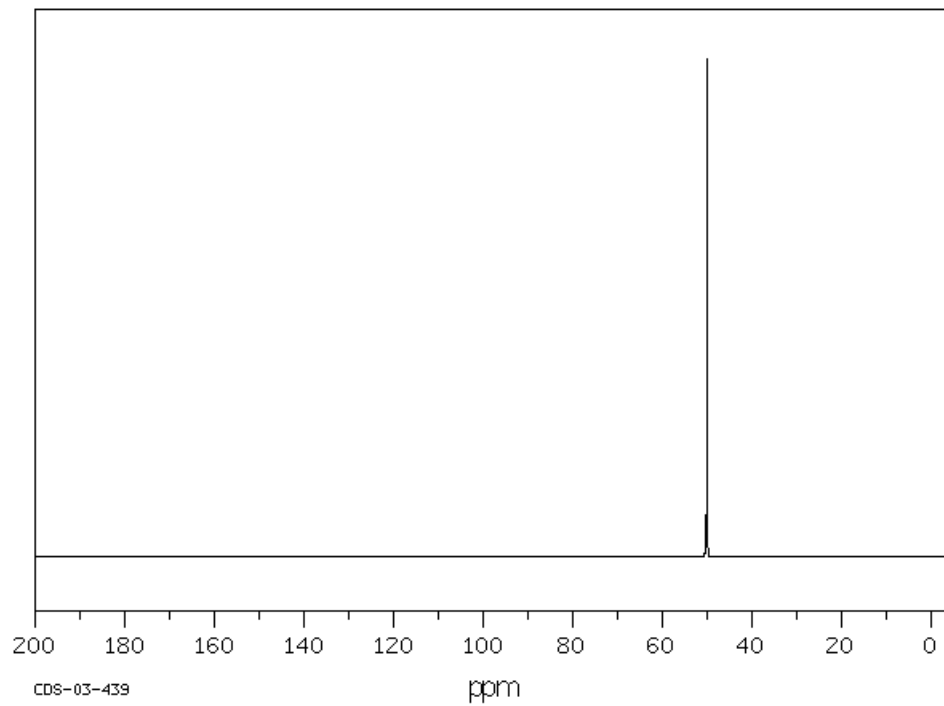


Το φάσμα ^1H NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μείγματα

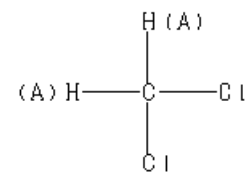
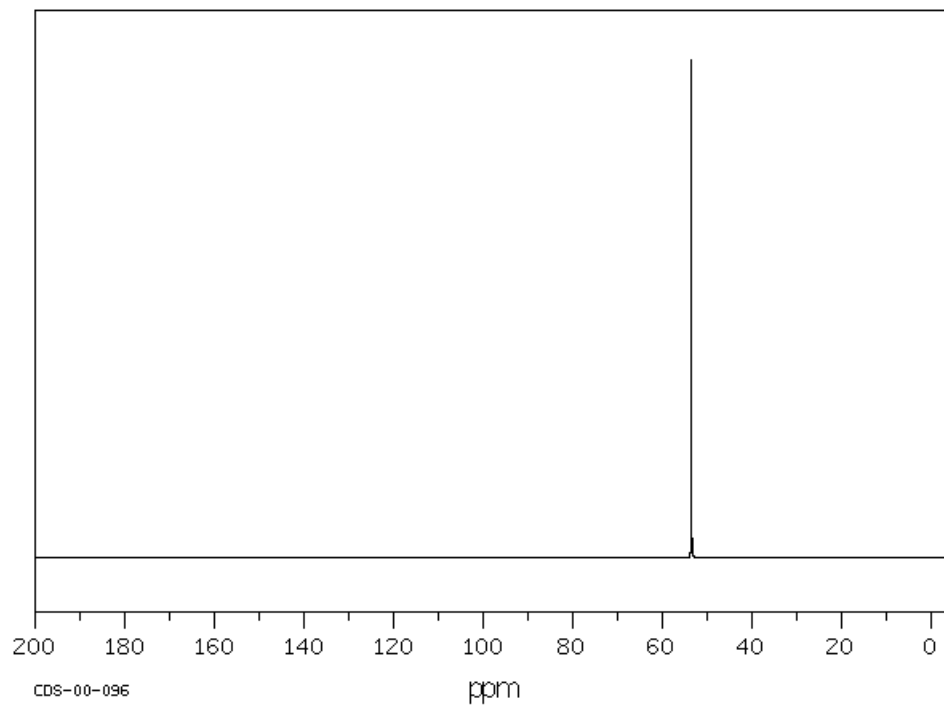
Φασματοσκοπία ^{13}C NMR

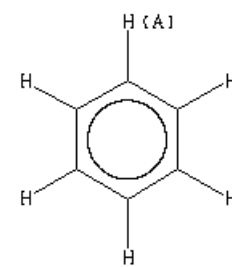
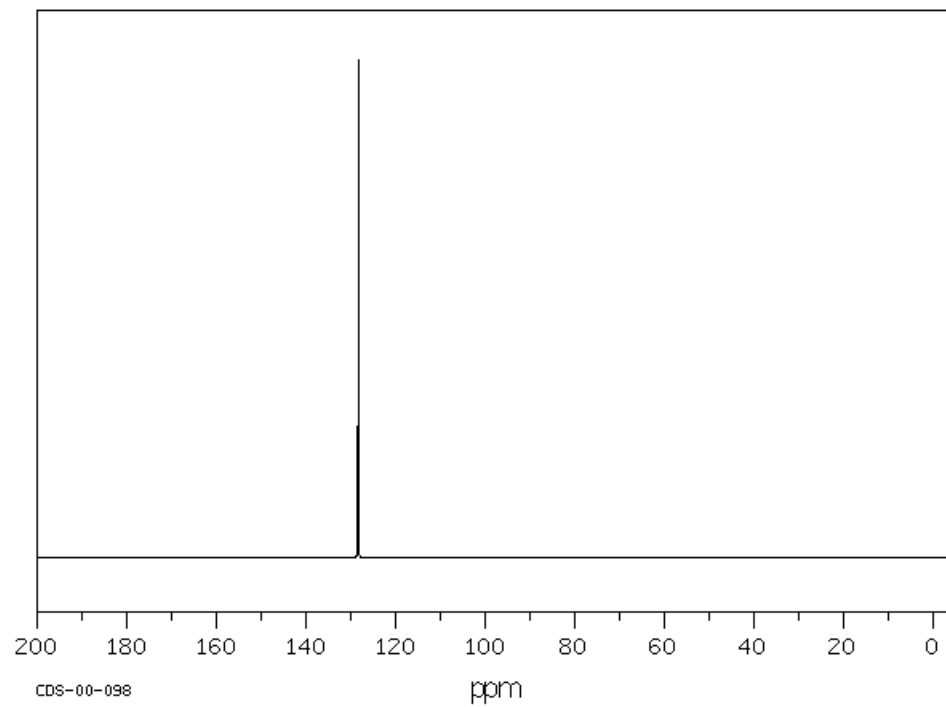


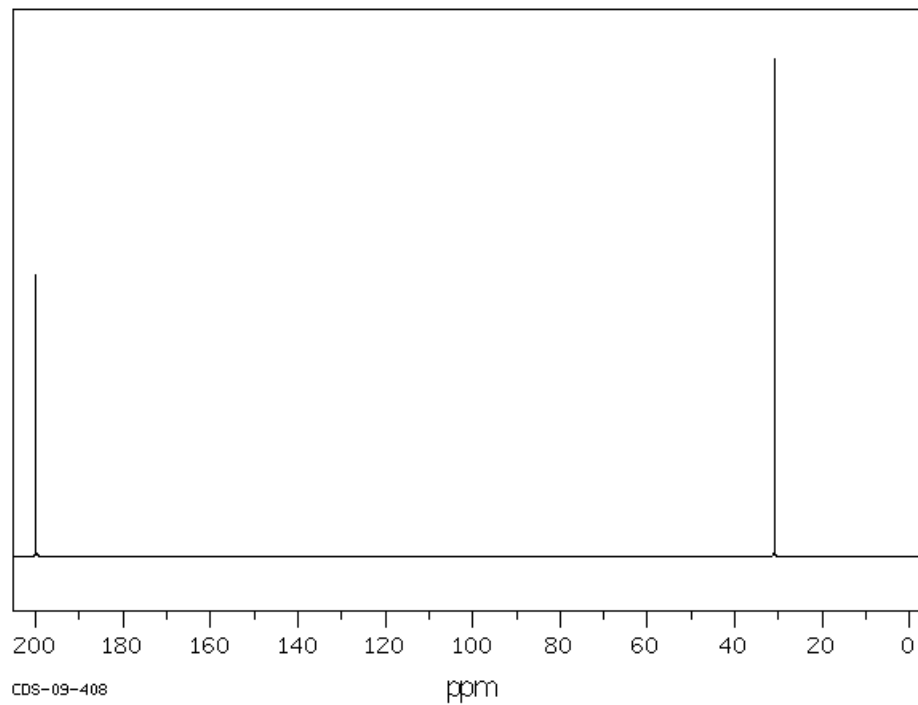
Αλλαγή κλίμακας ! 0-200 ppm



CH₃OH

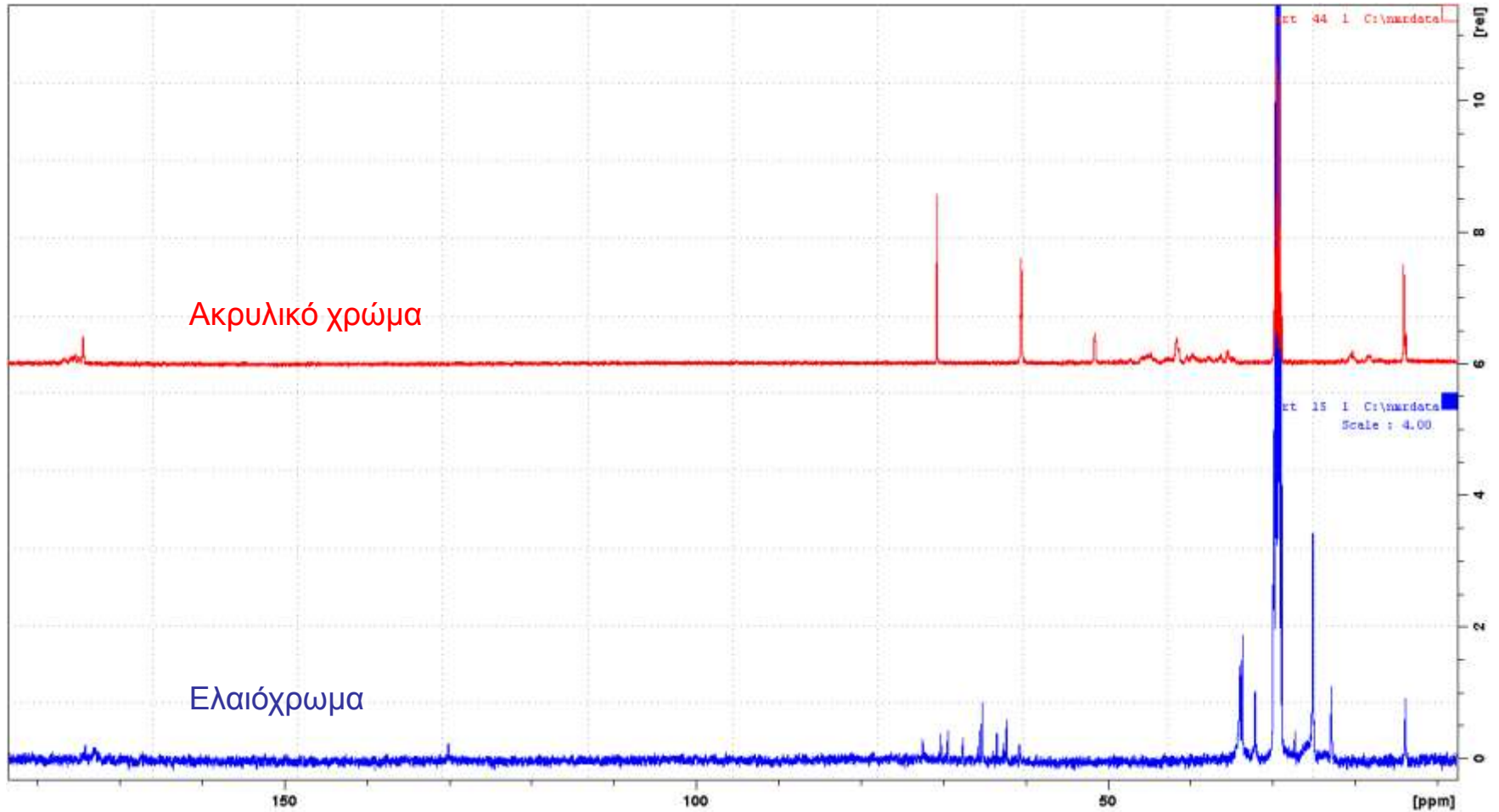






Μία κορυφή για κάθε διαφορετικό τύπο άνθρακα C στο φάσμα της ένωσης

Φασματοσκοπία ^{13}C NMR: φασματικό αποτύπωμα

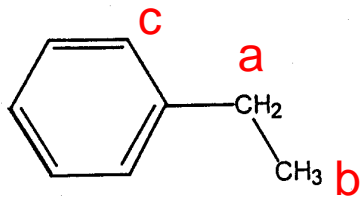


2D NMR

Δισδιάστατη Φασματοσκοπία NMR

- ^1H - ^1H COSY (COrelation SpectroscopY)
- Παρέχει πληροφορίες για την συνδεσιμότητα των πρωτονίων (ποιοό πρωτόνιο είναι κοντά σε ποιοό άλλο στην χημική δομή μιας ένωσης), άρα και για τη ίδια την δομή μιάς ένωσης.

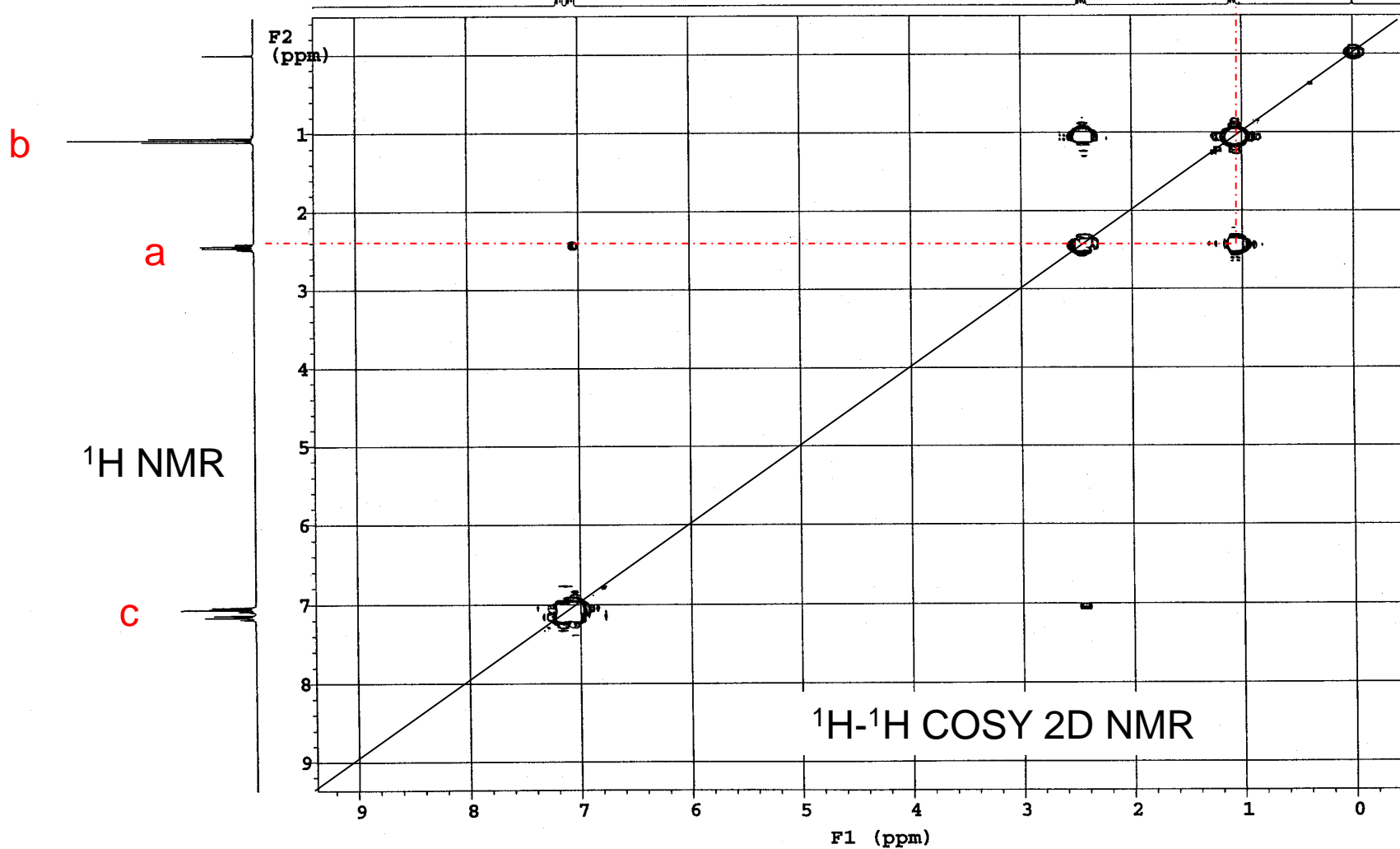
Ethylbenzene
C6D6, TMS
Shoulders
y67d



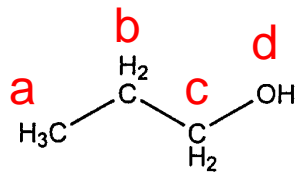
Ethylbenzene

COSY

¹H NMR

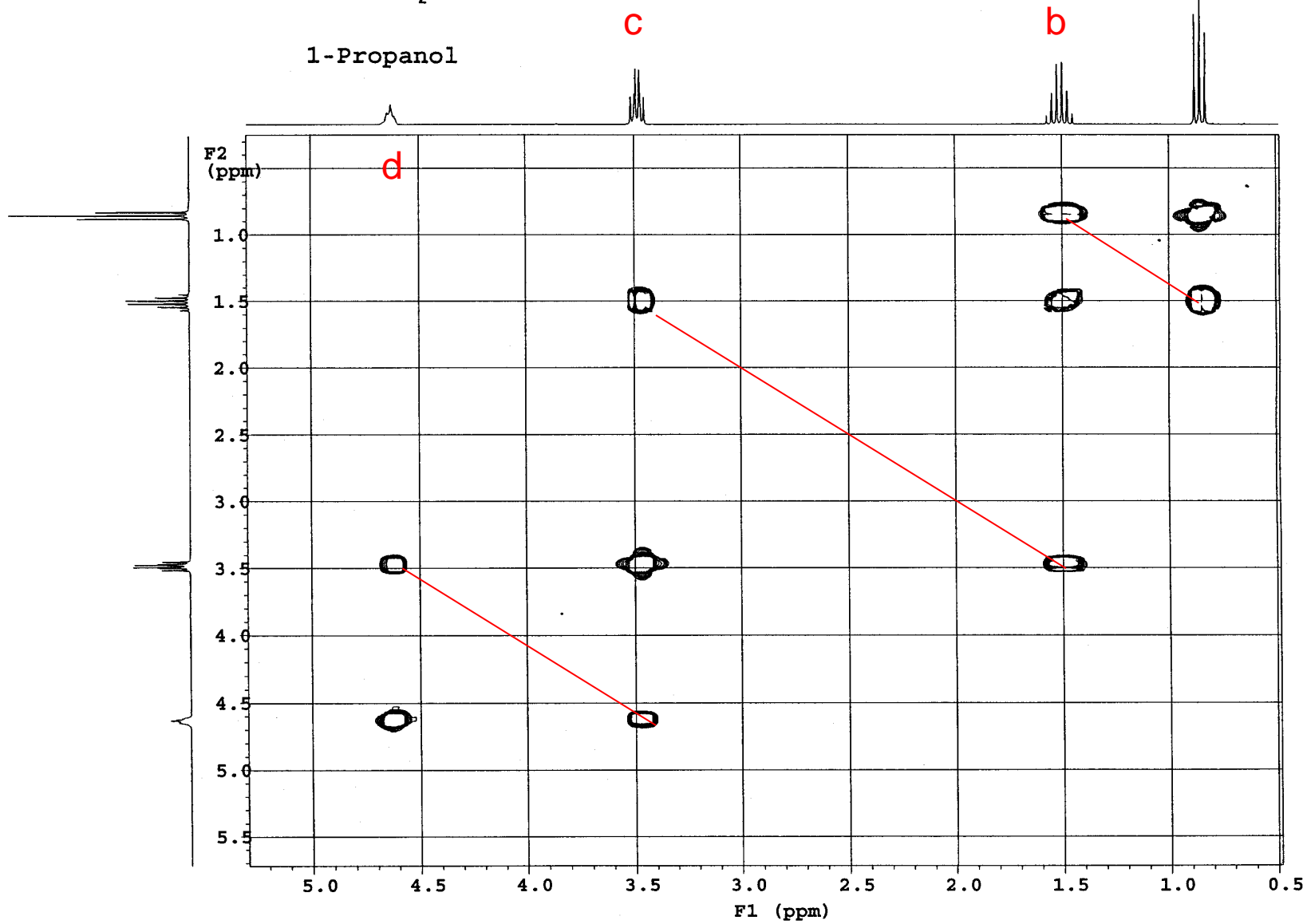


1-propanol
c6d6
c79d



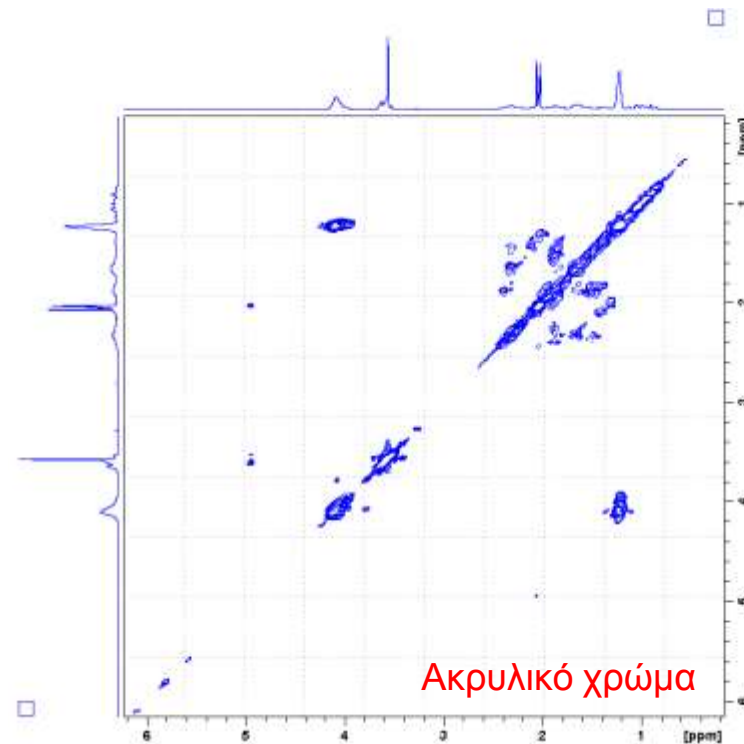
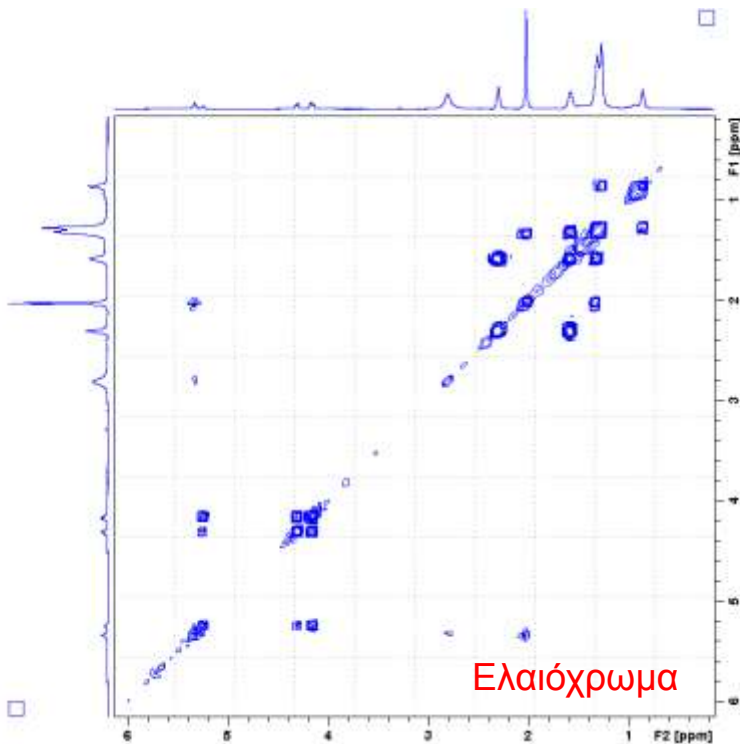
1-Propanol

COSY



^1H - ^1H COSY 2D NMR

- Τα φάσματα αυτά επίσης δίνουν μοναδικά φασματοσκοπικά αποτυπώματα για τις οργανικές ενώσεις, αλλά και για τα μείγματά τους

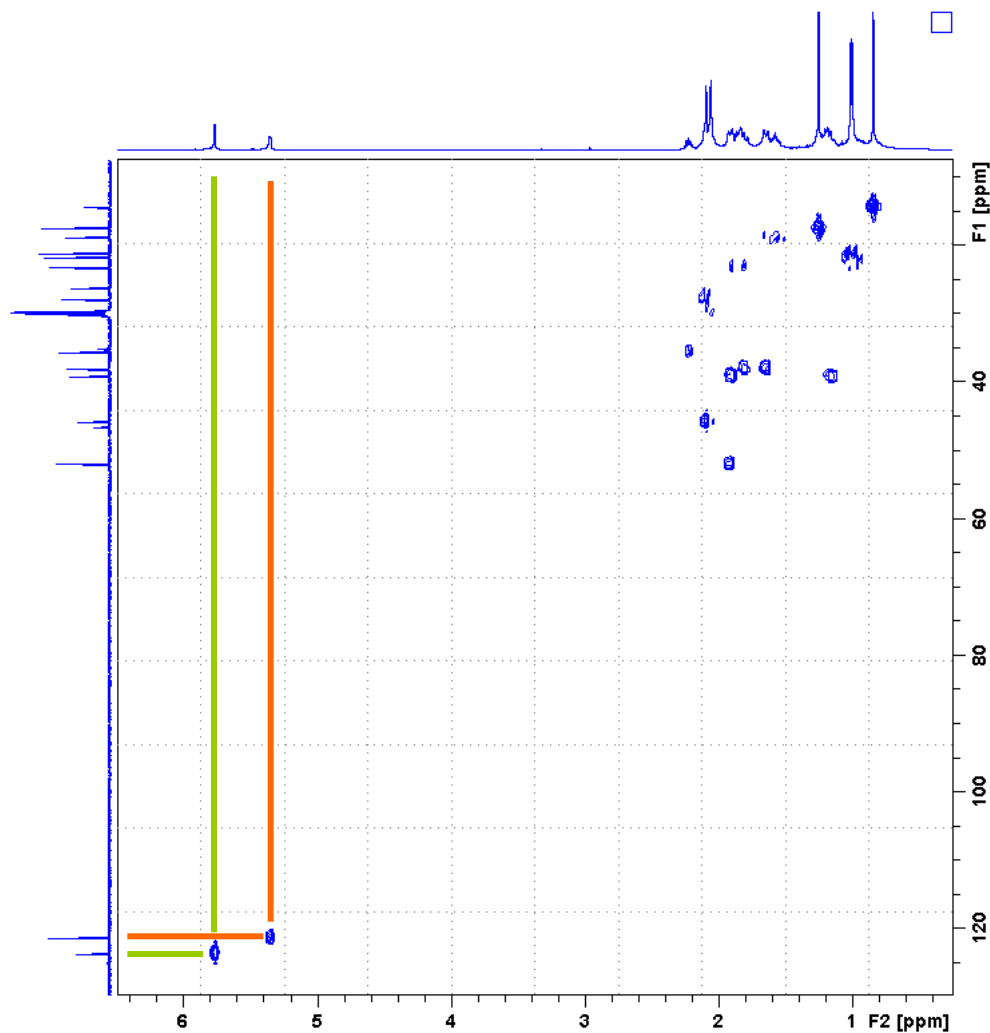


2D NMR

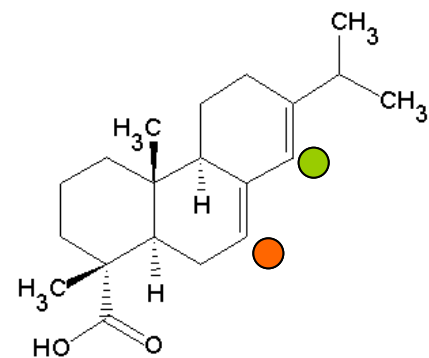
^1H - ^{13}C HSQC (correlation spectroscopy)

- Παρέχει πληροφορίες για την συνδεσιμότητα των πρωτονίων με άνθρακες (ποιο πρωτόνιο ενώνεται με ποιόν άνθρακα), άρα και για τη ίδια την δομή μιάς ένωσης.

^1H - ^{13}C HSQC 2D NMR



Abietic acid



Δείγματα που σχετίζονται με την Πολιτιστική Κληρονομιά (και προσφέρονται για ανάλυση με NMR)

- Συνδετικά μέσα (έλαια, τέμπερες, ακρυλικά χρώματα)
- Βερνίκια, επιχρίσματα, ρητίνες, κεριά, ξύλο
- Απευθείας δείγματα από έργα τέχνης (ετερογενή μείγματα πολλών συστατικών)
- Νέα πολυμερικά υλικά σε έργα τέχνης (καουτσούκ, πλαστικά, πολυεστερικές ρητίνες, κλπ)
- Οργανικά υπολείμματα σε αντικείμενα

Αρκεί να περιέχουν οργανικές χημικές ενώσεις !

Πειραματική διαδικασία

- 100 μg – 10 mg δείγματος
- Εκχύλιση του δείγματος με έναν οργανικό διαλύτη, ή διαχωρισμός με χρωματογραφία του οργανικού κλάσματος
- Επαναδιάλυση του δείγματος σε 0,5-0,6 mL δευτεριωμένου οργανικό διαλύτη (ακετόνη, χλωροφόρμιο, μεθανόλη, νερό)
- Εισαγωγή του διαλύματος σε σωληνάκι NMR
- Λήψη φάσματος

Επιλογή διαλύτη:

Εξαρτάται από την πολικότητα των οργανικών ενώσεων που περιέχονται στο δείγμα.

Χλωροφόρμιο (άπολα, πχ. λιπαρά οξέα, γλυκερίδια)

Νερό (πολικά, π.χ. αμινοξέα, αλκοόλες)

Ακετόνη (άπολα και πολικά)



Φασματοσκοπία NMR στερεής κατάστασης

Normal magnet



Special probe



MAS rotors



- Απευθείας λήψη φάσματος
- Καμία προκατεργασία του δείγματος