

Nuclear Magnetic Resonance a versatile and powerful SPECTROSCOPY

Sergio Tamburini

CNR-ICMATE Padova

22 maggio 2019



Spettroscopia NMR

Principali utilizzi

- **Determinazione della struttura (chimica)**
 - Chimica organica di sintesi. (Metodo analitico di elezione per il chimico sintetico)
 - Chimica dei prodotti naturali (organici e inorganici).
- **Studio di processi dinamici**
 - Cinetiche di reazione
 - Studio di equilibri (chimici o strutturali)
- **Studi strutturali (tridimensionali)**
 - Proteine
 - DNA. Complessi proteine/DNA
 - Polisaccaridi
- **Progettazione di farmaci**
 - Relazione Struttura/Attività
- **Medicina - MRI**



Principi BASE

spin nucleare

La spettroscopia NMR misura l'**assorbimento** di radiazione elettromagnetica (frequenze radio) in molecole immerse in un forte campo magnetico.

L'assorbimento è generato dall'INTERAZIONE MAGNETICA tra i **NUCLEI** delle molecole ed il campo magnetico esterno.

Ogni informazione dell'intorno chimico viene dedotta osservando il comportamento dei nuclei atomici

Sono osservabili solo i nuclei che possiedono un **momento magnetico nucleare di spin**:

$$\mu = I\gamma \frac{h}{2\pi}$$

I = numero quantico di spin nucleare
 γ = rapporto giromagnetico
h = costante di Plank

Lo spin nucleare è prodotto dalle particelle che costituiscono il nucleo, **protoni** e **neutroni** che si comportano come se fossero in rotazione (spin) attorno al loro asse e hanno **spin 1/2**.

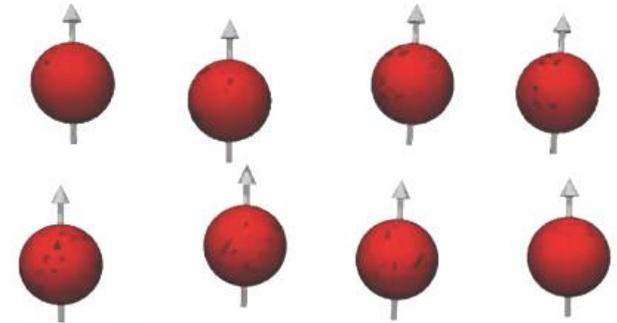
Numero di Massa M:	PARI	PARI	DISPARI
Numero Atomico Z:	PARI	DISPARI	DISPARI o PARI
I	0	1,2,3....	1/2, 3/2, 5/2,...
Es:	^{12}C , ^{16}O	^{14}N , ^2H , ^{10}B	^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P

Principi BASE

Nucleo con spin non nullo in campo magnetico

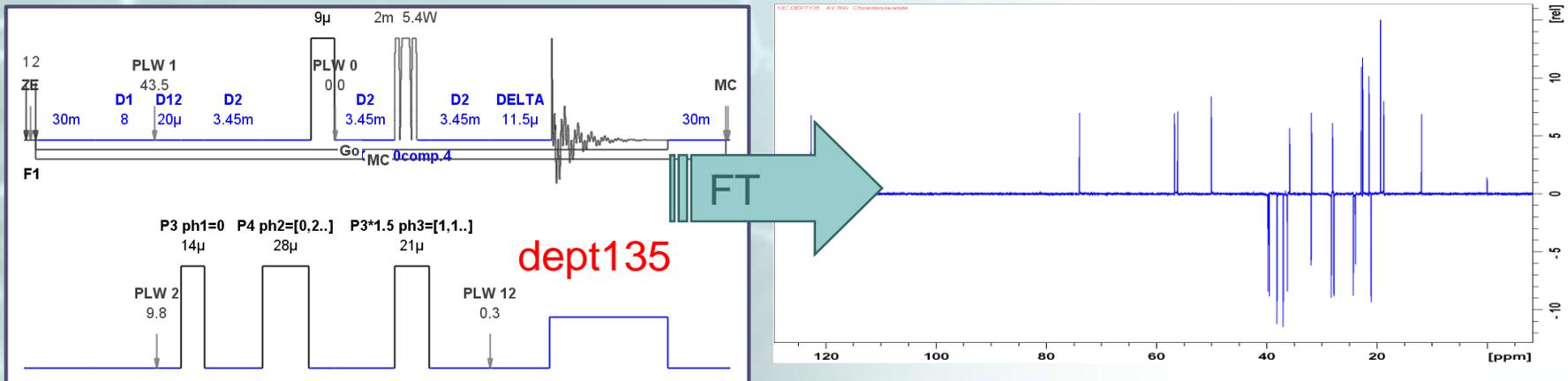
Eccitazione a Impulsi

Un breve *impulso* di radiofrequenza contiene tutto l'intervallo di frequenze per eccitare contemporaneamente tutti i nuclei di una specie (es 1H).



Trasformata di Fourier

E' uno strumento matematico che permette di trasformare le informazioni nel dominio del tempo in quello delle frequenze



La Spettroscopia

A causa delle interazioni microscopiche, il CAMPO MAGNETICO locale sentito dai singoli nuclei viene a dipendere dall'ambiente chimico in cui il nucleo:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + b)$$

Ogni nucleo viene a contatto con diverse tipologie di

Interazioni Magnetiche

- Interazione col magnetone esterno (o di Zeeman)
- Interazione con gli impulsi RF
- Chemical shift (dagli elettroni di legame)
- Interazione fra nuclei attraverso gli elettroni di legame (accoppiamento scalare o J coupling)
- Interazione diretta nucleo-nucleo (accoppiamento dipolare)

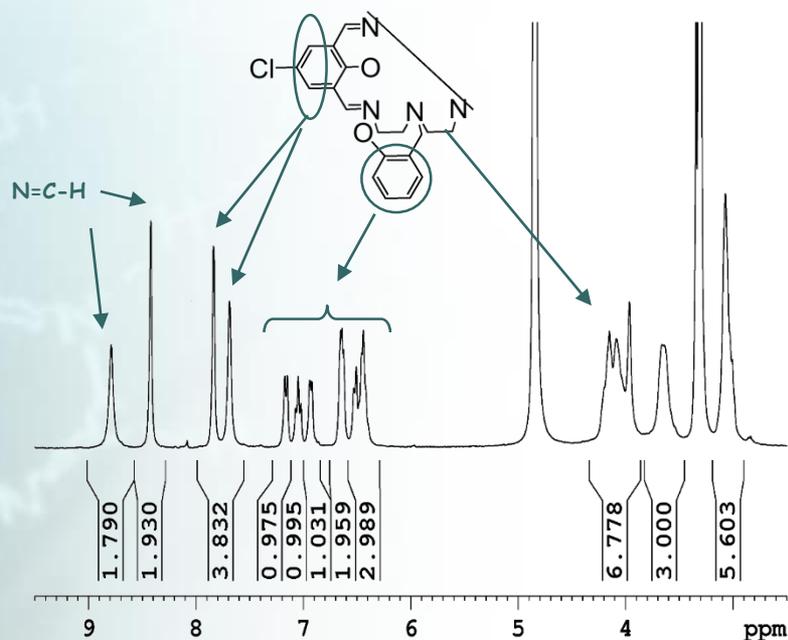
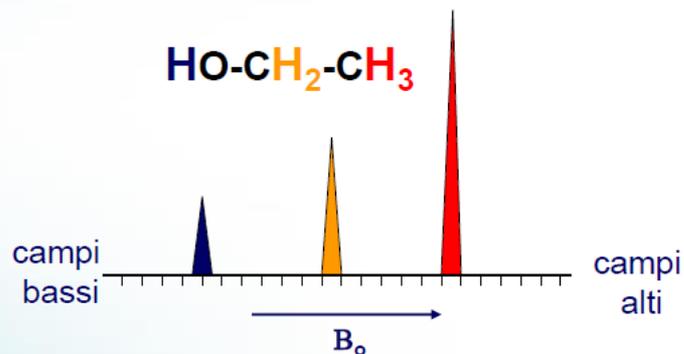
Bassa
Risoluzione

Alta
Risoluzione

La Spettroscopia

Chemical Shift Bassa Risoluzione

- La **POSIZIONE** dei segnali indica quanto i protoni sono schermati o deschermati.
- Il **NUMERO** dei segnali indica quanti tipi differenti di protoni sono presenti
- La **INTENSITA'** del segnale indica il numero di protoni di quel particolare tipo: l'area dei picchi (l'integrale) è direttamente proporzionale al numero di idrogeni che li hanno prodotti.



La Spettroscopia

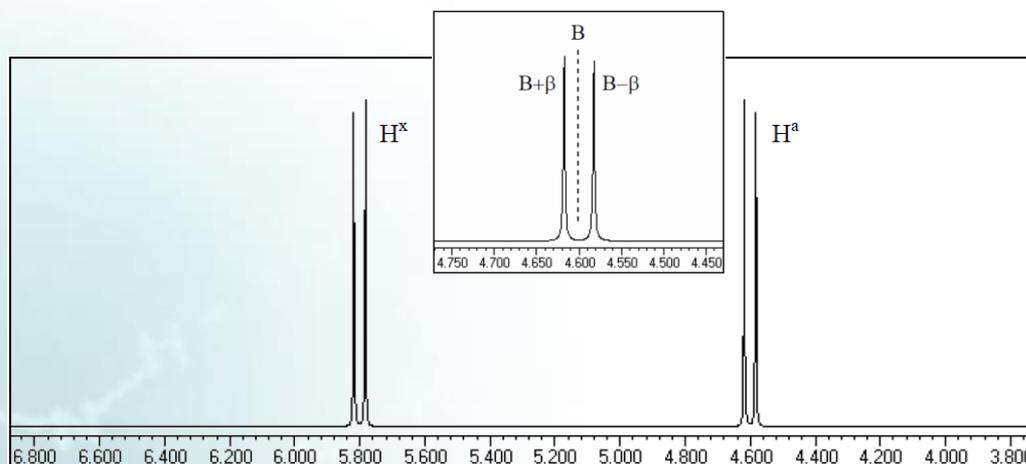
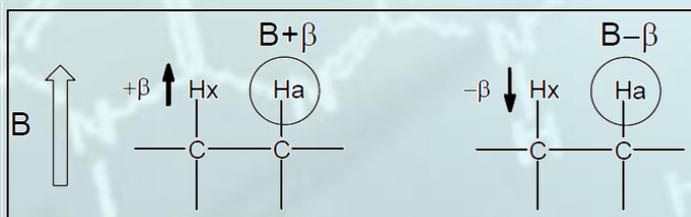
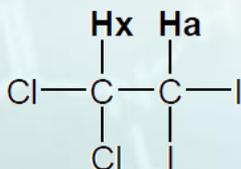
Accoppiamento scalare

Alta Risoluzione

INTERAZIONE ATTRAVERSO I LEGAMI

L'accoppiamento spin-spin permette di determinare la struttura di un composto chimico.

Si osserva uno "splitting", o struttura fine del segnale tra due nuclei con spin attivi **connessi attraverso legami chimici** (direttamente legati o attraverso più legami)



L'idrogeno (H_a) sente **due tipi di campo magnetico**.

B, è il campo magnetico (**uguale in tutte le molecole**), applicato B₀ schermato dagli elettroni dell'intorno chimico.

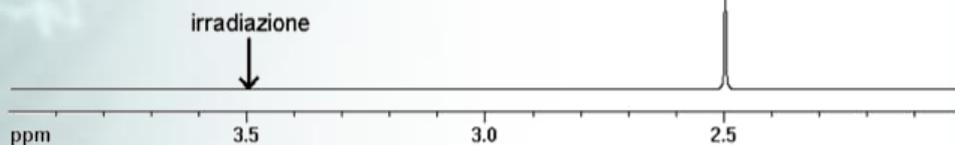
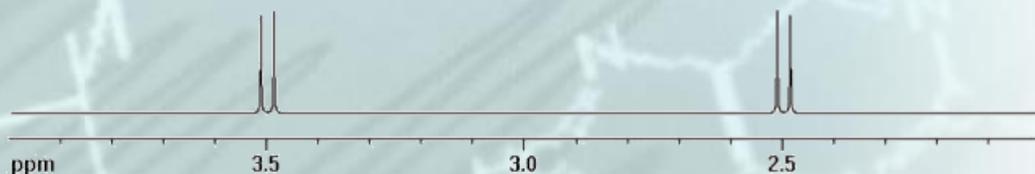
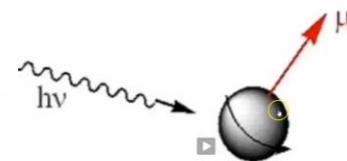
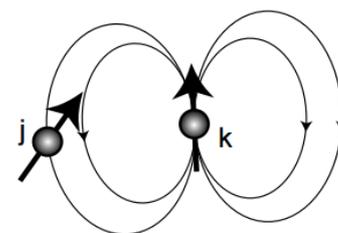
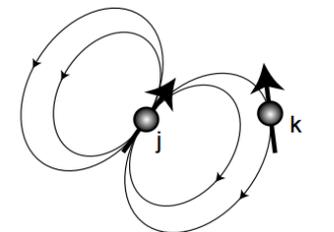
b, è il **piccolo campo magnetico del nucleo degli idrogeni vicini non equivalenti** (si possono disporre paralleli od opposti al campo B, questa componente varia da una molecola all'altra). H_a e H_x hanno un diverso spostamento chimico. La separazione in Hertz tra i due picchi del doppietto è la stessa per H_a e H_x (7 Hz, 0,035 ppm) e viene chiamata **costante di accoppiamento J** e dipende **dalla geometria molecolare**.

La Spettroscopia

Interazione dipolare Alta Risoluzione

INTERAZIONE ATTRAVERSO LO SPAZIO

- L'interazione dipolare avviene direttamente tra nucleo e nucleo
- **Attraverso lo spazio** due nuclei sufficientemente vicini si influenzano l'un l'altro attraverso il proprio campo magnetico
- **È molto importante nei processi di rilassamento (T_1 e T_2)**
- In soluzione il rapido movimento reciproco dei nuclei (tumbling) porta a zero questa interazione con nessuna conseguenza sulla molteplicità come nell'accoppiamento scalare ma c'è localmente un residuo intramolecolare che produce l'effetto NOE
- L'effetto NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) modifica l'intensità di un picco tramite l'irraggiamento di un picco associato a un nucleo nelle vicinanze, aumentandola per un fattore η



La Spettroscopia

Rilassamento

Meccanismo che riporta la magnetizzazione all'equilibrio.

2 tipi di rilassamento, entrambi dipendenti dal tempo in modo esponenziale.

Rilassamento longitudinale o Spin-Lattice (T_1)

- Opera sulla componente della magnetizzazione lungo l'asse z (M_z). - Il sistema perde energia come calore ad opera dell'ambiente circostante (lattice). - oppure per accoppiamento dipolare con altri spin, interazione con particelle paramagnetiche, ecc...

Rilassamento trasversale o Spin-Spin (T_2)

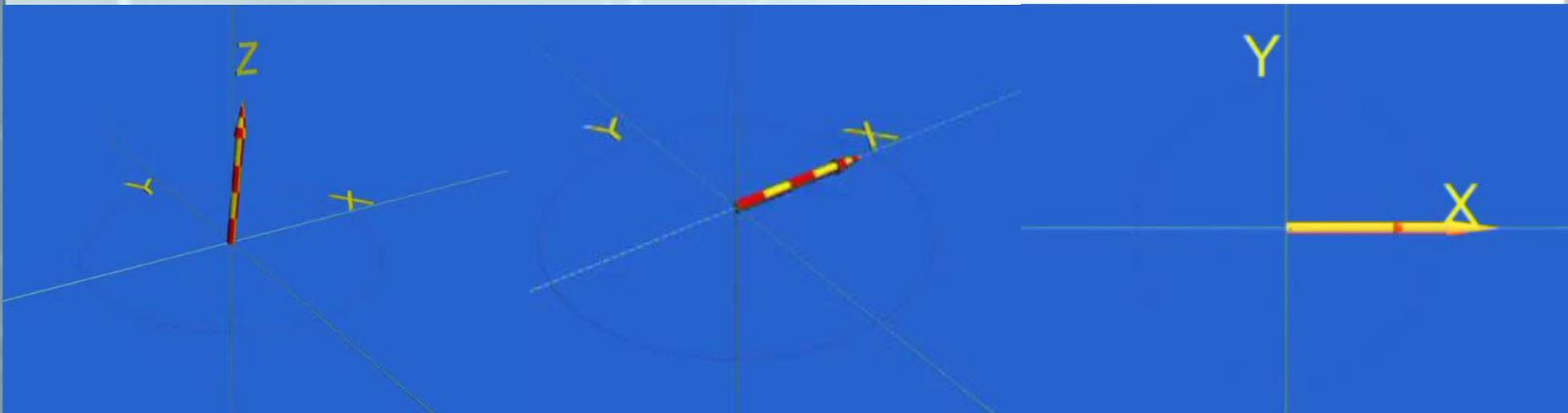
- Opera sulla componente della magnetizzazione lungo il piano $\langle xy \rangle$ (M_{xy}). - Interazioni Spin-spin defasano M_{xy} - anche a causa di inomogeneità del campo magnetico (fanning out). - non può essere maggiore di T_1 .

Nell'indagine NMR in medicina, il tempo di rilassamento spin-reticolo T_1 , è indicativo del tessuto nel quale sono immersi gli idrogeni in esame

Spin-Lattice (T_1)

Spin-Spin (T_2)

Spin-Spin (T_2) (visto da z)



BRUKER

AVANCE III 300

Magnet 7T

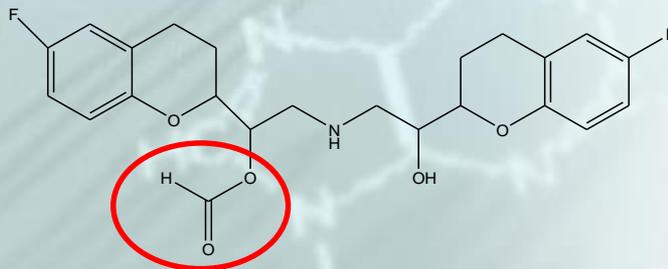
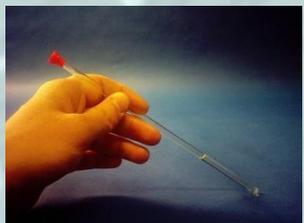
Probes:

Liquid:

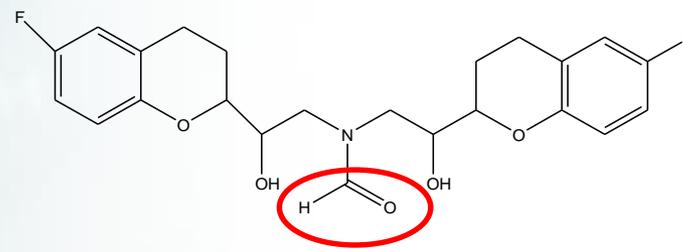
- 5mm BB z-grad auto tuning dir.
- 5mm BB z-grad inv.
- 10mm BB dir

Solid

- 4mm MAS BB 15KHz



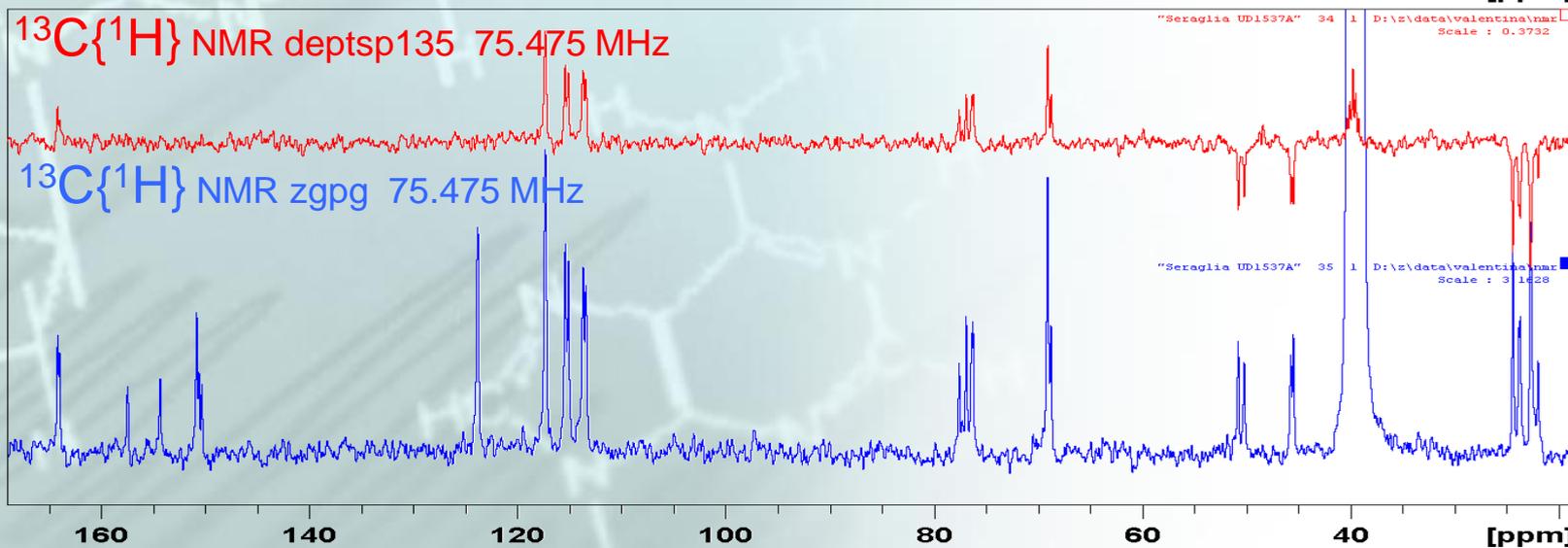
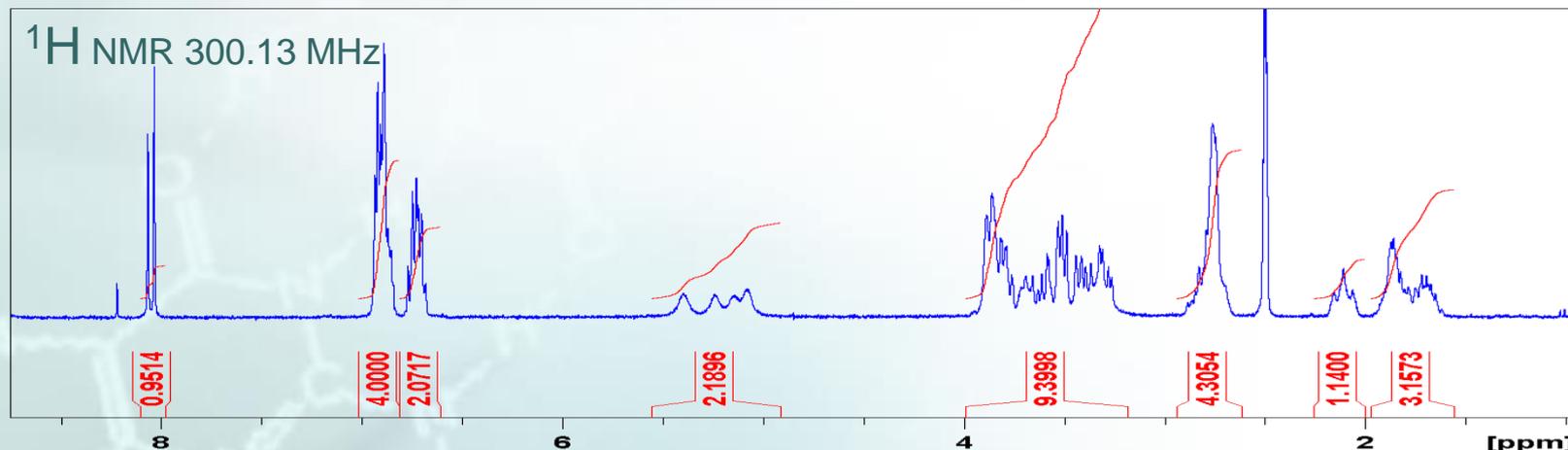
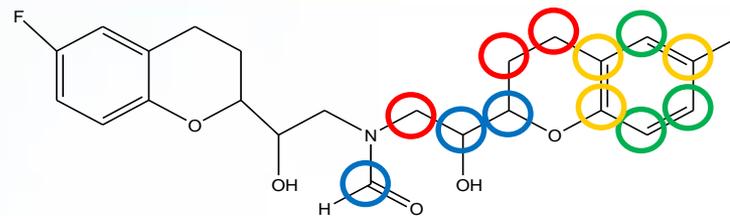
Struttura 3

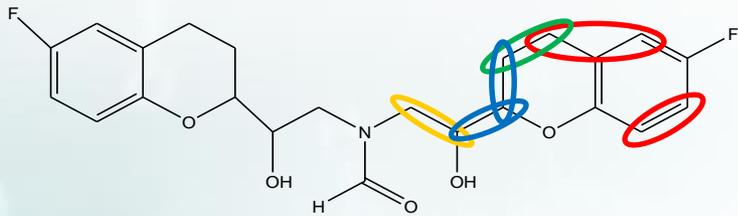


Struttura 1

Un esempio pratico:

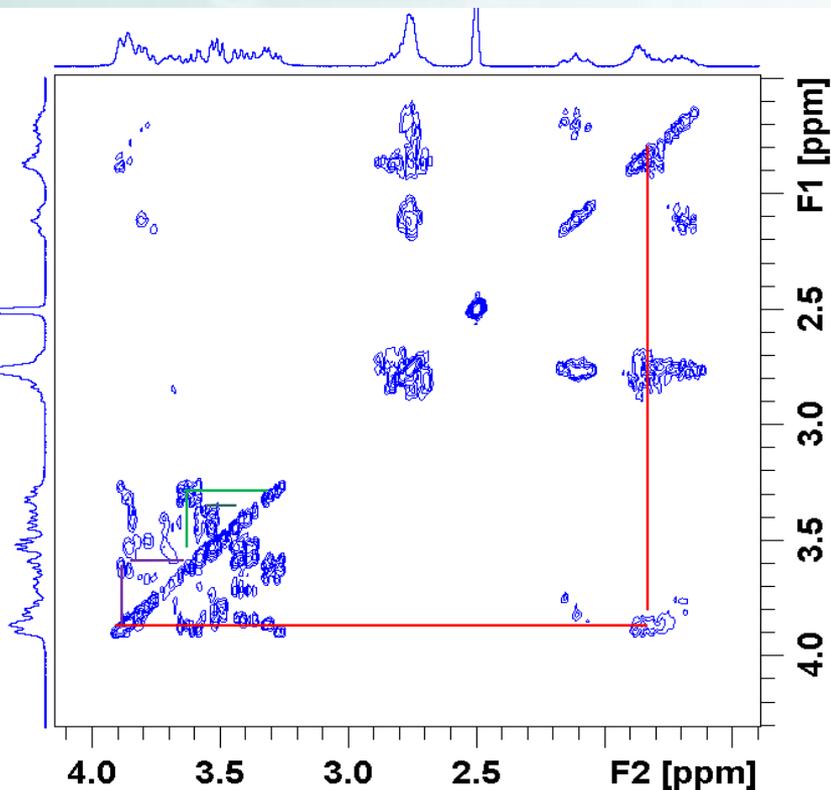
Un esempio pratico



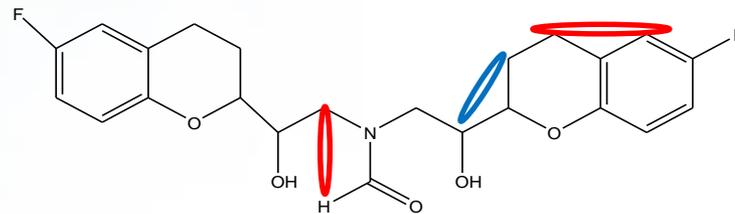


COSY

Connessioni attraverso i legami

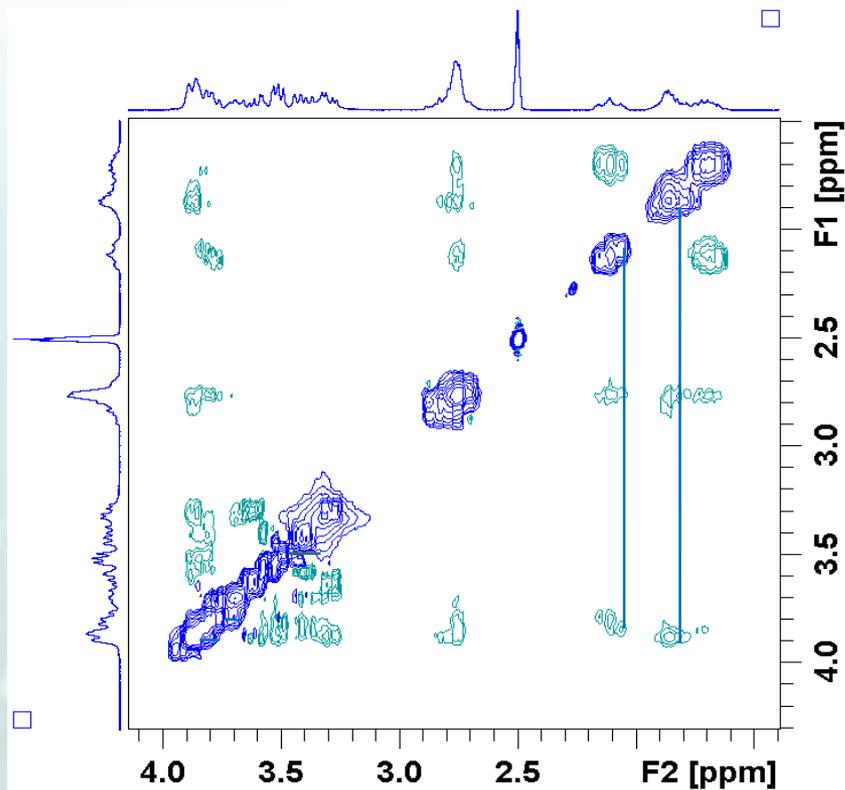


^1H 2D NMR cosyqf 300.13 MHz



NOESY

Connessioni attraverso lo spazio



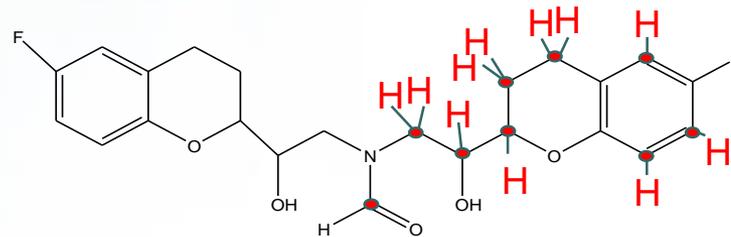
^1H 2D NMR noesypphph 300.13 MHz

Un esempio pratico

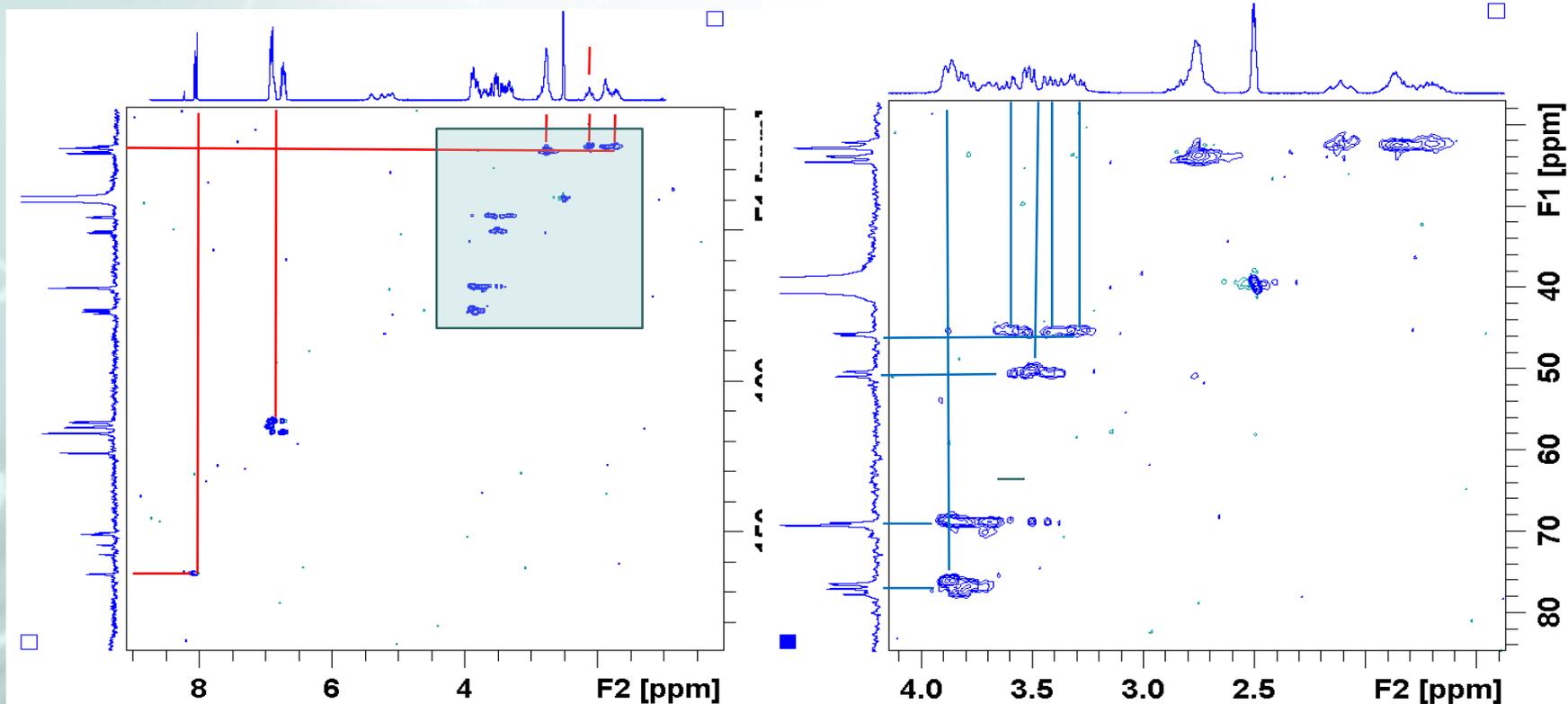
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ 2D NMR hmqcetgpsi.2

74.374 - 300.13 MHz

DMSOd6 - 2s relax



HMQC: Correlazioni tra nuclei diversi



NMR Stato Solido

Analisi non distruttiva di:

Solidi cristallini, amorfi, polveri, polimeri insolubili, membrane cellulari, materiali ceramici, minerali, materiali inorganici, carta, legno, ossa... etc

Studio di conformazioni e moti molecolari allo stato solido

Nuclei a spin $1/2$

a) Intorno chimico (primi e talora secondi vicini). **Chemical shift isotropo.**

Nuclei migliori: ^{13}C , ^{29}Si , ^{31}P , ^{109}Ag .

b) Transizioni di fase rivelate da variazione di intorno chimico. **Chemical shift isotropo.**

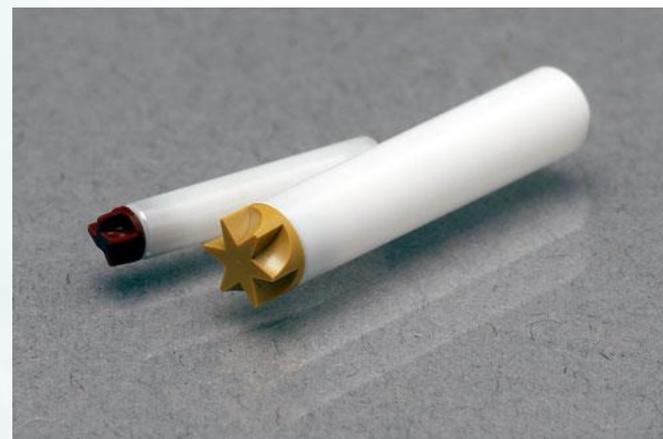
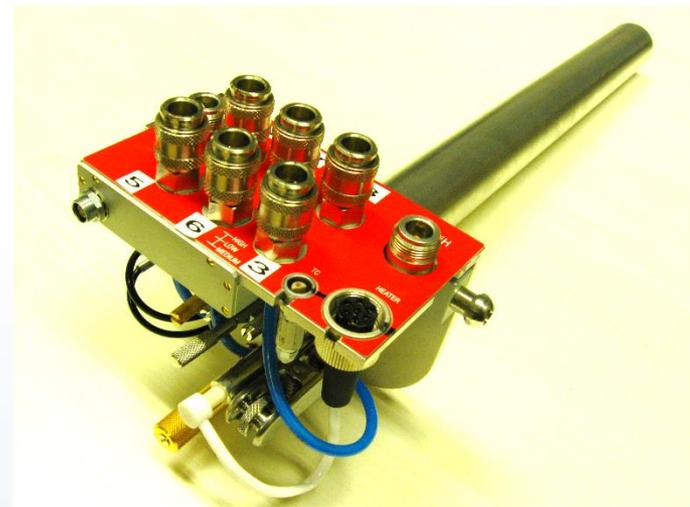
c) Lunghezze di legame. **Interazione dipolare magnetica o accoppiamento scalare.** Tutti i nuclei.

Nuclei a spin $>1/2$

Coordinazione e/o ordine a corto (medio) raggio. **Interazione quadrupolare.**

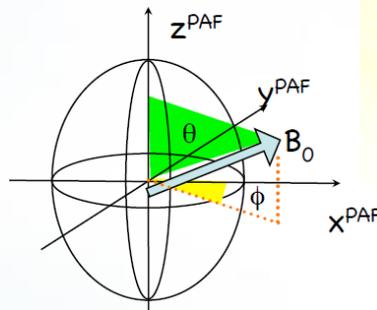
Nuclei migliori: ^{11}B , ^{17}O , ^{27}Al .

**Non richiede preparazione del campione,
posso analizzare miscele senza separarle.
Rotore da 4mm circa 120 mg di campione**



NMR Stato Solido

Normalmente i campioni solidi analizzati mediante NMR si trovano sotto forma di "polveri", in cui sono presenti tutte le interazioni «anisotropiche» o «dipendenti dall'orientazione». Di conseguenza, tutti i valori degli angoli θ e φ sono rappresentati.



Energia di uno spin nucleare in un campo magnetico B_0 :

$$H = H_Z + H_D + H_{csa} + H_J + H_Q$$

H_Z = Interazione di Zeeman (con B_0)

H_D = interazione dipolare

H_{csa} = interazione con la nube elettronica (chemical shift)

H_J = accoppiamento scalare (elettroni di legame)

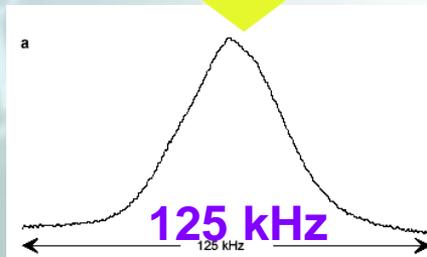
H_Q = Interazione quadrupolare

SSNMR
(Solid State)

La natura tensoriale delle interazioni si mantiene

$$\delta = \begin{pmatrix} \delta_{xx} & \delta_{xy} & \delta_{xz} \\ \delta_{yx} & \delta_{yy} & \delta_{yz} \\ \delta_{zx} & \delta_{zy} & \delta_{zz} \end{pmatrix}$$

Linee larghe

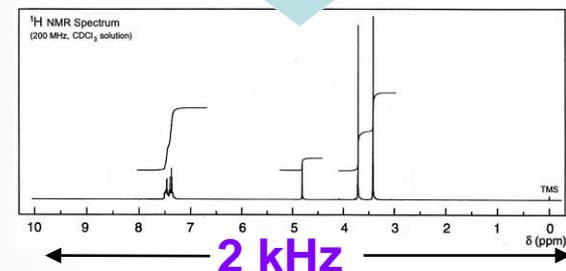


In soluzione

Moto molecolare isotropo

Tensori mediato a un singolo valore isotropo

Linee strette



NMR Stato Solido

Tecniche per incrementare la risoluzione e sensibilità degli spettri:



- Dilution*
- Magic Angle Spinning*
- Dipolar Decoupling*
- Cross Polarizzazione*
- Multiple Pulse Decoupling*

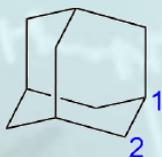


statico + no disacc. ^1H
(Anis. di Chem Shift + etero dipol.)
→ **1000 Hz** line width

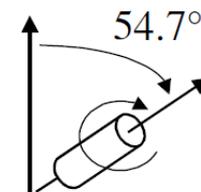
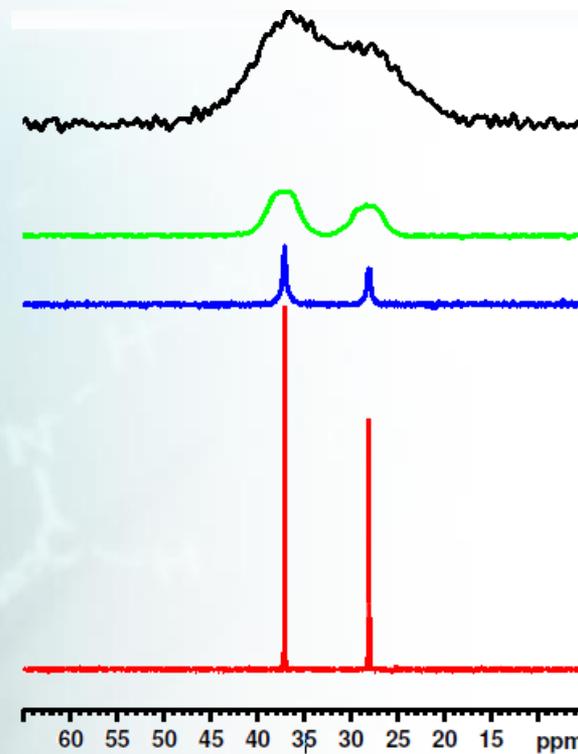
statico + **disacc.** ^1H
(ACS + no etero dipol.)
→ **500 Hz** line width

MAS + no disacc. ^1H
(no ACS + etero dipol.)
→ **50 Hz** line width

MAS + disacc. ^1H
(no ACS + no etero dipol.)
→ **5 Hz** line width

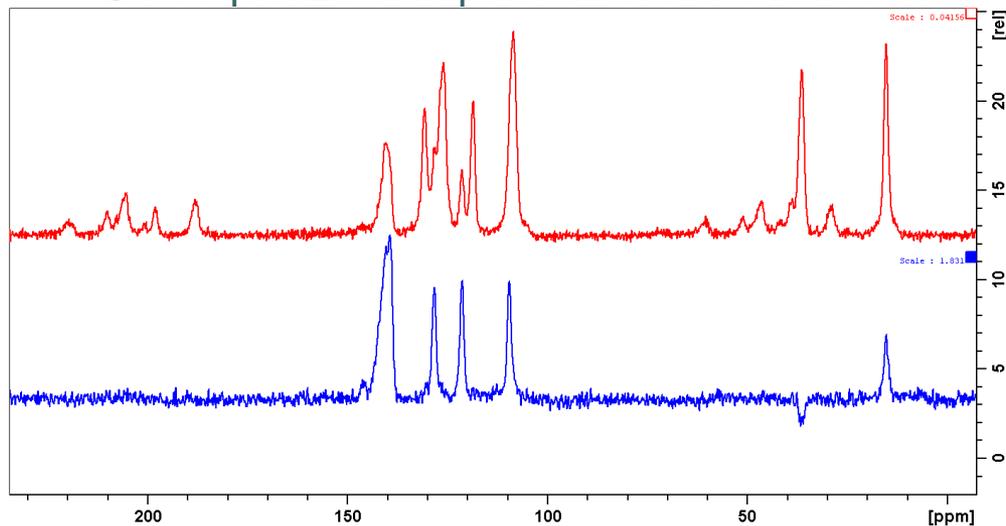


^{13}C adamantano



NMR Stato Solido

- ^{13}C : sequenze di impulsi differenti chiariscono la struttura



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR CPMAS

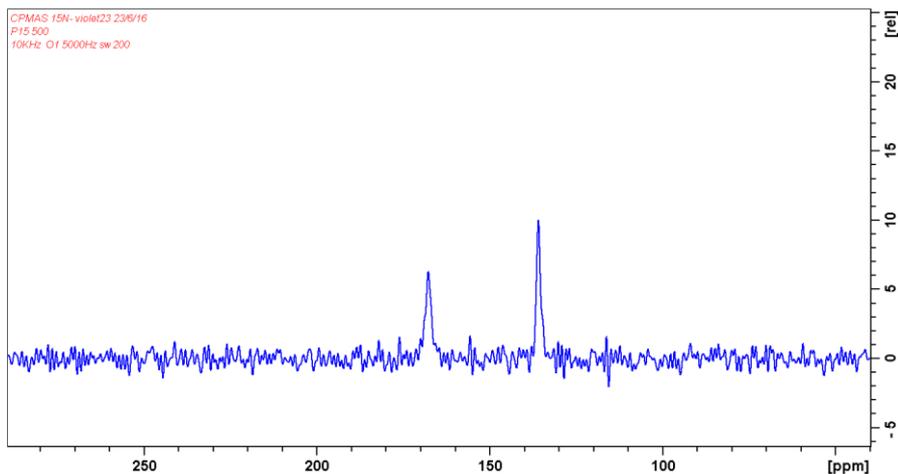
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR CPPI

C terz=nulli

C quater/prim=pos

C sec=neg

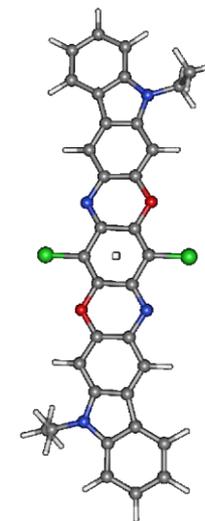
- ^{15}N : osservazione di altri nuclei



$^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NMR CPMAS



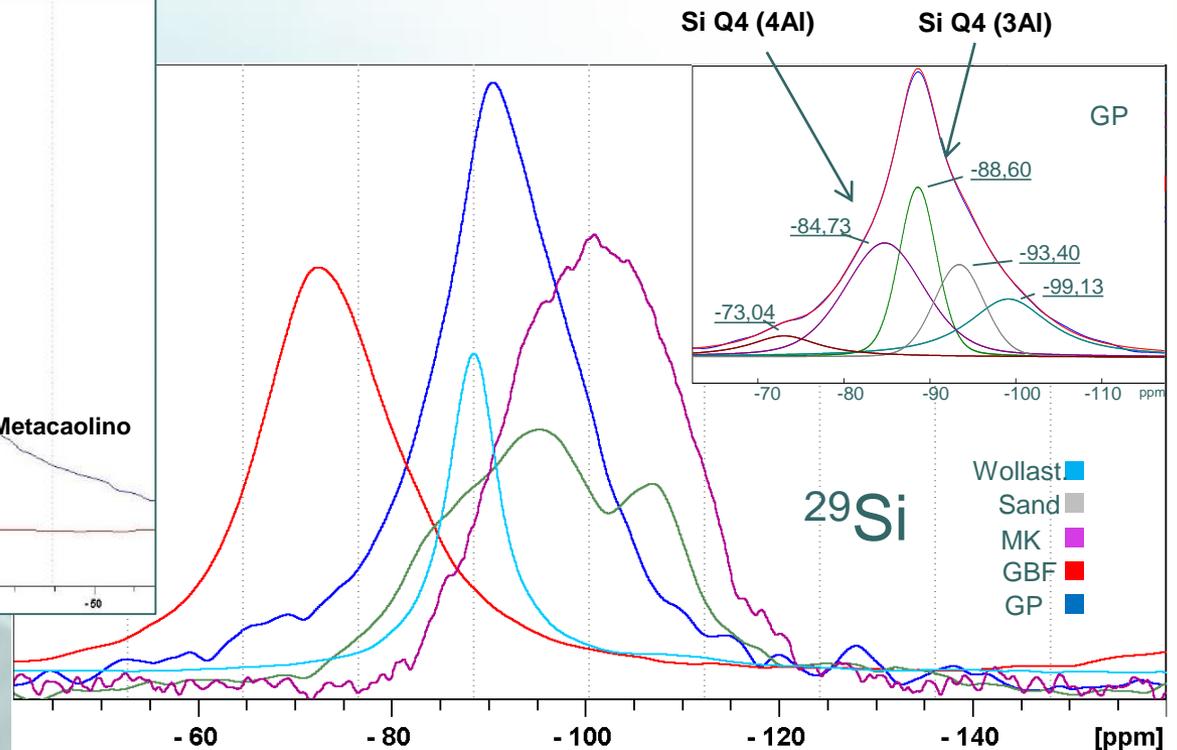
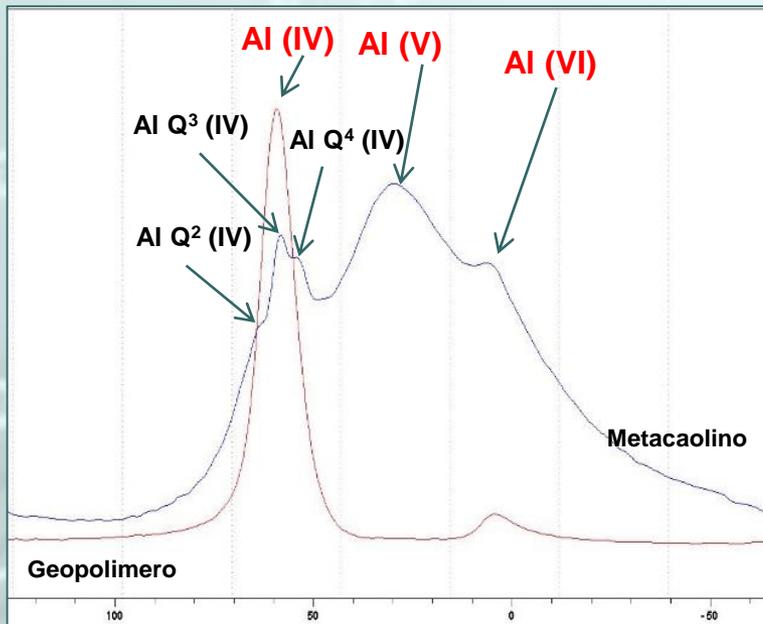
Colorante Violet23



NMR Stato Solido



- ^{27}Al : diversa coordinazione dell'alluminio
- ^{29}Si : Lo shift nei silicati è legato al numero di sostituenti del Si ed al numero di Al presente nei sostituenti



Nuclear Magnetic Resonance una SPETTROSCOPIA versatile e potente

Sergio Tamburini

CNR-ICMATE Padova

22 maggio 2019



Grazie dell'ATTENZIONE !



w^e-n^r

