


NMR ad onda continua

- In uno strumento che opera in onda continua il trasmettitore di radiofrequenza varia la frequenza in modo continuo nel corso della scansione.
- Quando la frequenza corrisponde a quella di precessione dei nuclei questi risuonano, dando luogo ad un segnale che viene registrato dallo strumento producendo per produrre lo spettro NMR
- ... è la stessa cosa che accade per spettroscopia IR ed UV, ma nella realtà...

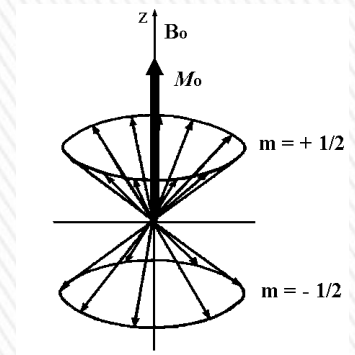


NMR a trasformata di Fourier (FT-NMR)

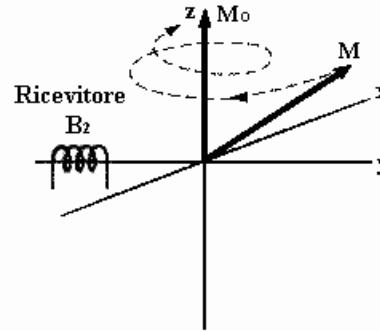
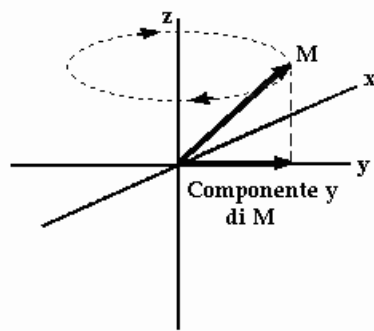
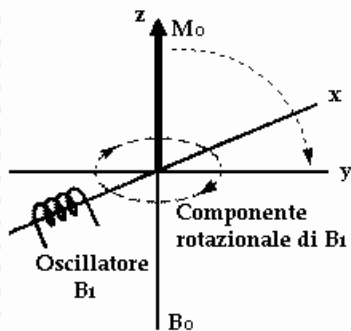
- Quando si acquisisce uno spettro NMR, invece di misurare l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche a frequenze via via diverse (esperimento in onda continua), si sottopone il campione ad un **solo, intenso, e brevissimo impulso di radiofrequenza**.
- Questo impulso è capace di eccitare tutti i nuclei (di un certo tipo!) nello stesso tempo, indipendentemente dal loro chemical shift.
- Dopo la fine dell'impulso, **i nuclei ritornano alla normale distribuzione di Boltzmann emettendo fotoni**, ogni nucleo **alla propria frequenza di risonanza**.
- L'emissione non va avanti all'infinito, ma diminuisce nel tempo  in maniera esponenziale.

La Magnetizzazione Macroscopica

Quando il campione viene irradiato lungo l'asse x con un impulso di radiofrequenza che contiene anche la frequenza n di Larmor dei nuclei in esame (ad es. ^1H), questi assorbono energia e subiscono una transizione di spin. A livello macroscopico il vettore **Magnetizzazione Macroscopica** M_0 ruota allontanandosi dall'asse z per avvicinarsi al piano xy e inizia un moto di precessione attorno all'asse z (vedi figura a fianco).



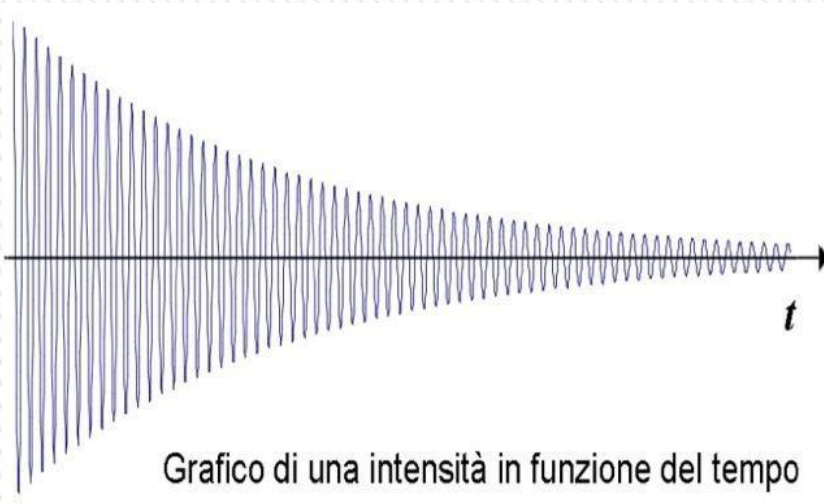
A questo punto si interrompe l'impulso di radiofrequenza emesso dall'**oscillatore** B_1 lungo l'asse x . I nuclei eccitati continuano ad emettere per qualche istante un debole segnale di radiofrequenza che si spegne nel tempo. Per registrare questo segnale entra in funzione un **circuito ricevente** B_2 posto lungo l'asse y che ha lo scopo di misurare l'**oscillazione della componente y del vettore M** .



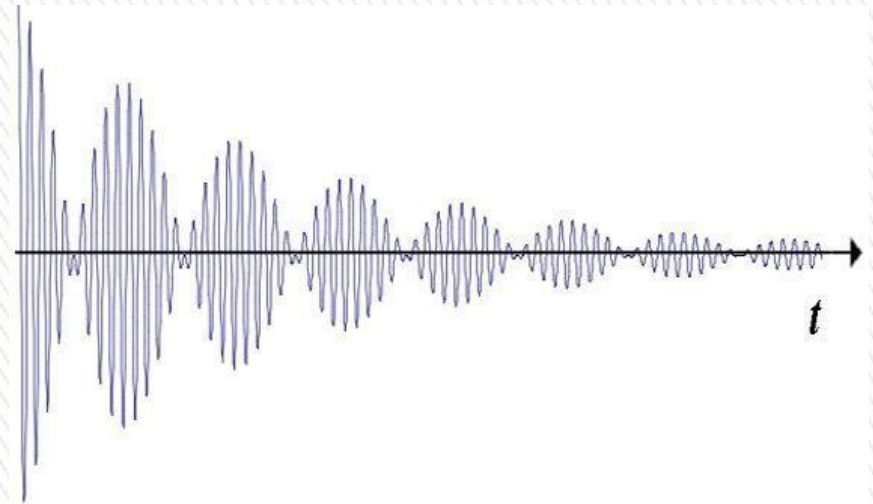
La **Magnetizzazione Macroscopica** è la risultante di tutti i momenti magnetici nucleari.

La radiofrequenza emessa dai nuclei

- Per un singolo nucleo, la radiofrequenza emessa è una sola, e può essere misurata direttamente. Nella figura in basso a sinistra è ben visibile il decadimento esponenziale del segnale emesso.
- Se però abbiamo due nuclei che emettono a frequenze diverse, le due onde si sommano e interferiscono (figura in basso a destra).



La radiofrequenza emessa da un singolo nucleo decade esponenzialmente

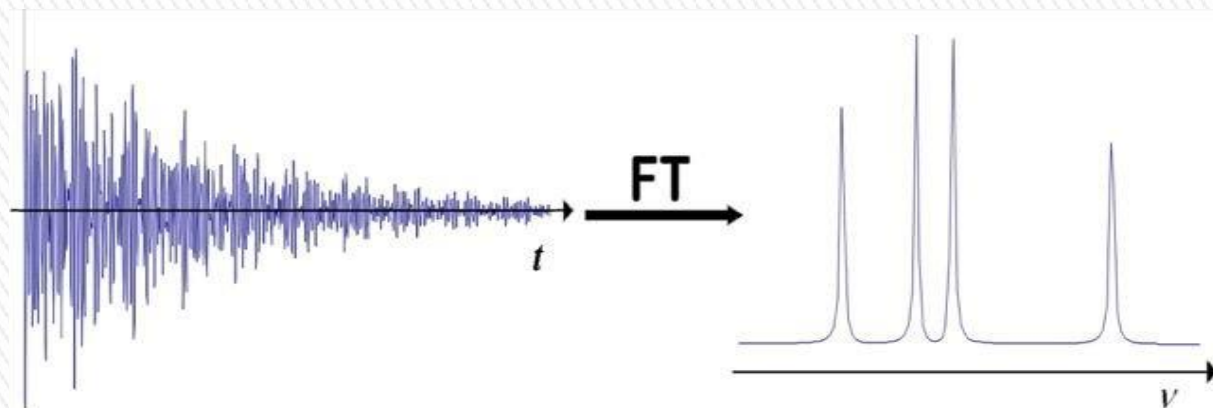


Le radiofrequenze emesse da due nuclei interferiscono

Il FID e la Trasformata di Fourier

- Il segnale emesso dal campione è dunque una sovrapposizione di radiofrequenze, cioè di segnali sinusoidali in funzione del tempo, ognuno alla frequenza di risonanza del nucleo che lo produce, ed è detto **FID** (da **Free Induction Decay**). Già in presenza di soli 4 nuclei l'interferogramma diventa incomprensibile.
- In realtà le informazioni del normale spettro NMR sono tutte presenti nel FID, ma in maniera non facilmente comprensibile.
- Per fortuna esiste una operazione matematica (detta **trasformata di Fourier**, o FT) che permette di trasformare il FID (il grafico di una intensità in funzione del tempo) nel normale **spettro NMR** (il grafico di una **intensità in funzione della frequenza**).
- Lo spettro ottenuto dopo la FT è del tutto equivalente a quello ottenuto dalla scansione del campo magnetico o della frequenza.

La trasformata di Fourier trasforma il FID nel normale spettro NMR



L'impulso

- Come può un solo impulso di radiofrequenza eccitare nuclei che risuonano a frequenze differenti?
- In realtà la frequenza di un treno d'onde è perfettamente definita solo se esso ha lunghezza infinita. Se invece dura solo un tempo t , la sua frequenza non è più del tutto definita, e si ha:

$$\Delta\nu \cdot \Delta t \approx 1$$

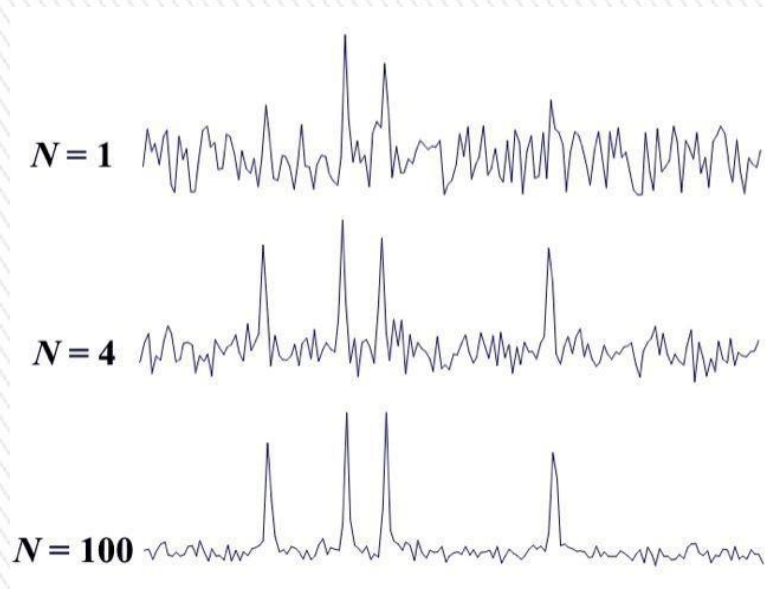
dove $\Delta\nu$ è l'indeterminazione della frequenza e Δt la durata del treno d'onde.

- **Quanto più breve è l'impulso, tanto più indefinita è la frequenza.**
- Per impulsi di circa $10 \mu\text{s}$, l'indeterminazione è 100.000 Hz (200 ppm a 500 MHz), e l'impulso può quindi eccitare tutti i nuclei.
- Per essere efficace, un impulso così breve deve anche essere molto intenso.

Vantaggi dell'FT-NMR: sensibilità

- Tutte le frequenze sono registrate contemporaneamente, invece che sequenzialmente come nell'esperimento ad onda continua, e l'intero esperimento dura 1-2 secondi (il tempo che la radiofrequenza impiega ad andare a zero) invece che qualche minuto.
- L'esperimento può essere ripetuto molte volte in poco tempo, e questo migliora drasticamente il rapporto S/R e quindi la sensibilità della spettroscopia NMR.
- Quando un esperimento è ripetuto molte volte, il segnale (S) si trova sempre nello stesso punto, mentre il rumore (R), che è casuale, no.
- Se sommiamo un certo numero N di esperimenti, il segnale S aumenta in maniera proporzionale a N.
- Il rumore, che è casuale, aumenta anch'esso sommando gli esperimenti, ma in maniera proporzionale alla radice quadrata di N.

- Quindi il rapporto segnale rumore (S/R) aumenta all'aumentare del numero di esperimenti N , e questo aumento è proporzionale alla radice quadrata di N .
- Poiché usando l'FT-NMR il singolo esperimento dura molto di meno, a parità di tempo possono essere registrati molti più esperimenti, per cui S/R aumenta.
- Registrando un numero molto alto di esperimenti (anche 100.000) è possibile evidenziare segnali completamente nascosti dal rumore di fondo.



Se

$$S \propto N$$

e

$$R \propto \sqrt{N}$$

allora

$$S/R \propto \frac{N}{\sqrt{N}} \propto \sqrt{N}$$

Con 100 esperimenti il rapporto S/R è ancora migliore che con 4 esperimenti

Vantaggi dell'FT-NMR: flessibilità

- Mentre l'NMR ad onda continua è una spettroscopia di assorbimento, l'**FT-NMR è una spettroscopia di emissione** (i nuclei emettono radiofrequenza dopo l'eccitazione).
- Poiché il momento dell'eccitazione dei nuclei è separato da quello dell'acquisizione dati (emissione della radiofrequenza) è possibile eccitare gli spin nucleari in maniera più sofisticata. Diventano possibili:
 - **esperimenti multiimpulso**
 - **spettroscopia NMR bidimensionale**
- Tutta la spettroscopia NMR moderna è in trasformata di Fourier.



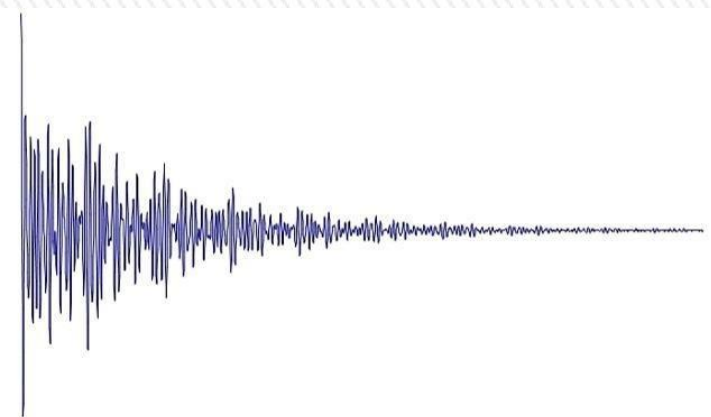
Il rilassamento

- Il rilassamento è il **ritorno all'equilibrio di un sistema che è stato perturbato**.
- Il rilassamento è un processo esponenziale, la cui **costante di tempo T** (il cosiddetto tempo di rilassamento) ci dice quanto velocemente il sistema rilassa.
- Il tempo di rilassamento **T_1** ci dice quanto velocemente il sistema torna alla distribuzione di equilibrio di Boltzmann.
- Il tempo di rilassamento **T_2** ci dice quanto velocemente il FID decade (i due processi sono diversi, ma in molecole piccole vanno più o meno alla stessa velocità).

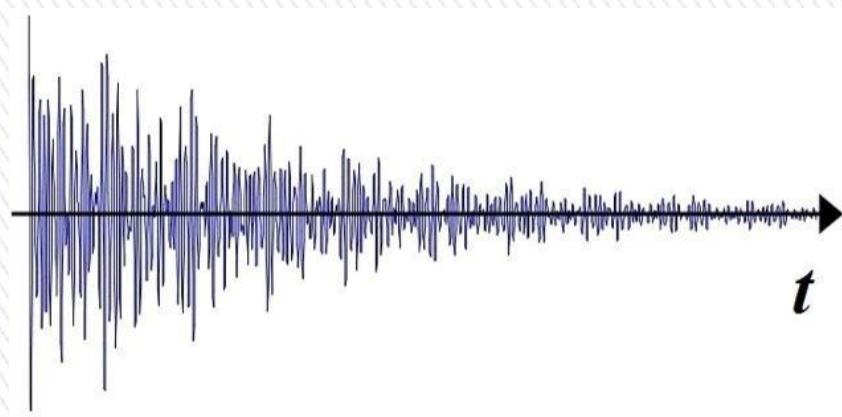
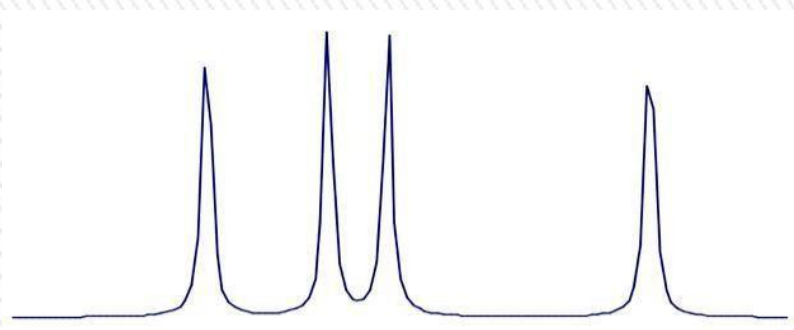


Rilassamento e risoluzione

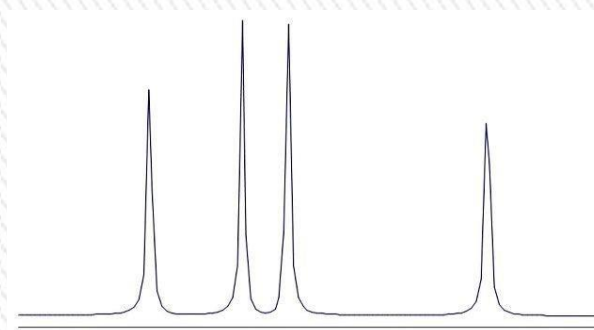
- Nel FID in basso a sinistra il segnale decade più velocemente, e la frequenza è più indefinita: dopo la trasformata di Fourier, i segnali saranno più larghi e meno risolti.
- Quindi: **un rilassamento veloce (tempo di rilassamento piccolo) riduce la risoluzione.**



Rilassamento veloce (T2 piccolo)



Rilassamento lento (T2 grande)



Rilassamento e sensibilità

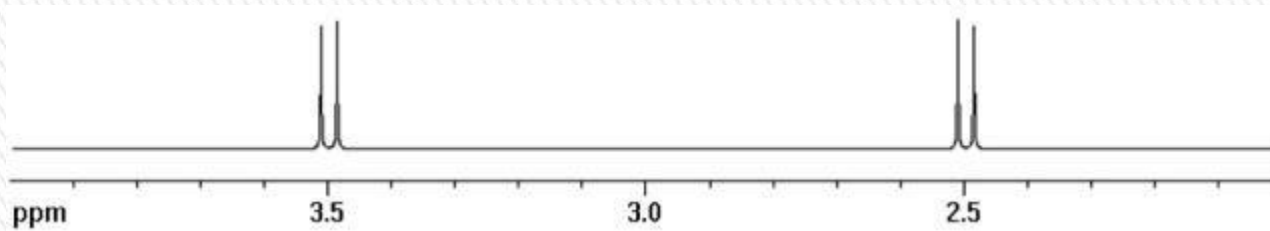
- Ripetendo più volte un esperimento e sommando i risultati aumenta il rapporto segnale/rumore (e quindi la sensibilità).
- Prima di poter ripetere l'esperimento NMR, dobbiamo attendere che si ristabilisca la distribuzione di popolazioni di Boltzmann.
- Se il tempo di rilassamento è lento, dobbiamo aspettare molto tempo, e possiamo ripetere l'esperimento meno volte per unità di tempo: il rapporto segnale/rumore scende.
- Quindi: **un rilassamento lento (tempo di rilassamento grande) riduce la sensibilità.**



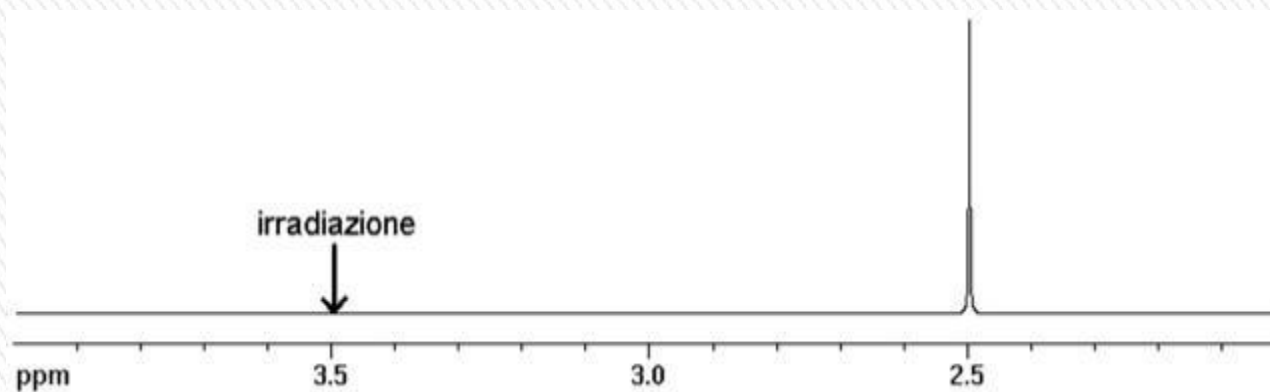
Il disaccoppiamento di spin

- Se non è influenzato dall'esterno, un protone rimane nel suo stato di spin α o β .
- Se però il protone è irradiato con continuità alla sua frequenza di risonanza, la radiazione elettromagnetica causa una continua variazione del suo stato di spin da α a β e viceversa (si tratta di una serie continua di assorbimenti ed emissioni stimolate).
- Consideriamo ora un sistema AX, e supponiamo di registrare uno spettro mentre è in corso una continua irradiazione del nucleo A.
- Il protone X non si trova più nelle vicinanze di un protone nello stato α oppure nello stato β , ma nelle vicinanze di un protone che cambia continuamente il suo stato di spin. Il protone X risente quindi dello momento magnetico medio del nucleo A, che è zero. ➤

- In definitiva, se si irradia con continuità sul nucleo A, il nucleo X non risente più dell'accoppiamento con il nucleo A, e risuona come singoletto, cioè come se il nucleo A non ci fosse (ma eventuali accoppiamenti con altri nuclei continuano ad esistere!).



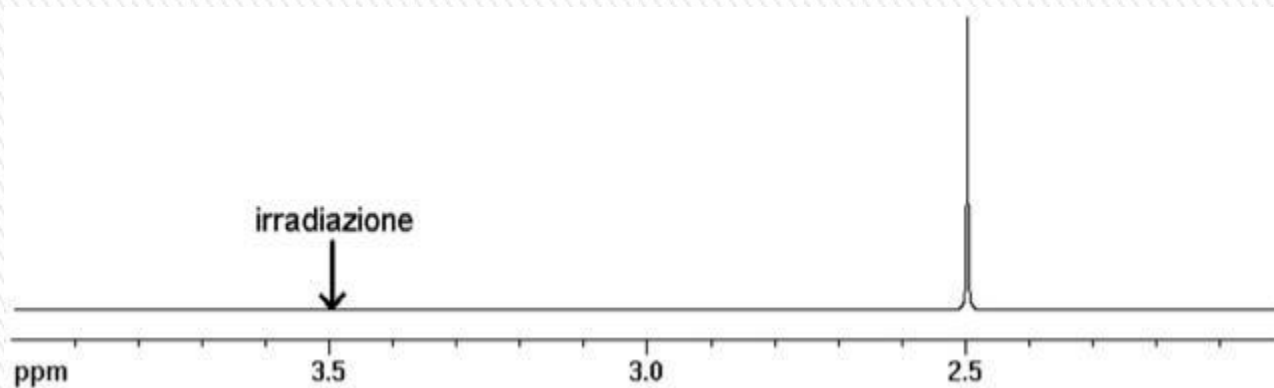
Spettro di un sistema AX



Spettro di un sistema AX disaccoppiato su A: X diventa un singoletto



- Nello stesso tempo, il segnale del nucleo A non è più presente nello spettro, poiché la continua irradiazione fa sì che le popolazioni degli stati α e β diventino identiche.
- Col disaccoppiamento è possibile stabilire quali protoni sono accoppiati ad un certo protone. Questa informazione si ricava oggi più facilmente dall'esperimento NMR bidimensionale COSY.



Per il nucleo A - le popolazioni degli stati α e β diventano uguali: il segnale scompare



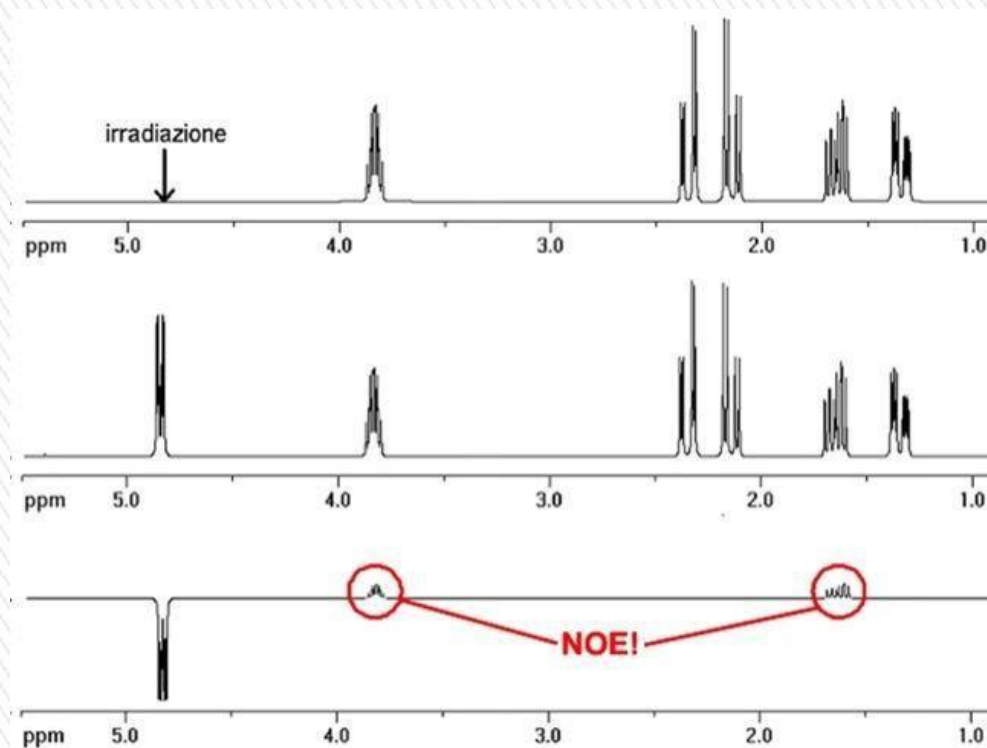
L'effetto nucleare Overhauser

- L'effetto nucleare Overhauser (NOE) è una **variazione dell'intensità del segnale di un protone in seguito all'irradiazione di un protone che si trova nelle vicinanze del protone osservato.**
- Il fenomeno del NOE è legato all'**accoppiamento dipolare**, e quindi vicini significa vicini nello spazio, e non separati da pochi legami.
- Di solito si osserva un aumento dell'intensità (*NOE positivo*) per molecole organiche piccole, una diminuzione per macromolecole (*NOE negativo*).
- Per i *NOE omonucleari* l'aumento di intensità è in genere piccolo, con un valore massimo teorico del 50% e valori reali che sono tipicamente compresi tra l'1% ed il 10%.
- L'irradiazione su un nucleo fa sì che la differenza di popolazione tra gli stati α e β si annulli. Di conseguenza nei nuclei accoppiati dipolarmente (quindi vicini), la differenza di popolazione tra gli stati α e β dei nuclei varia (aumenta se il NOE è positivo), e per questo l'intensità del segnale di questo nuclei aumenta.

Spettri NOE difference

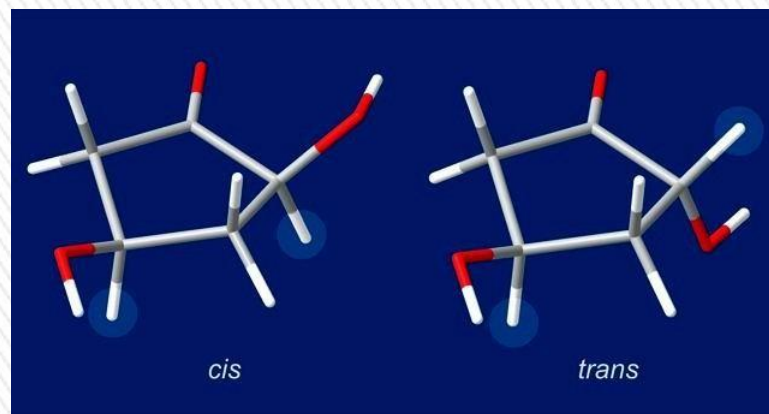
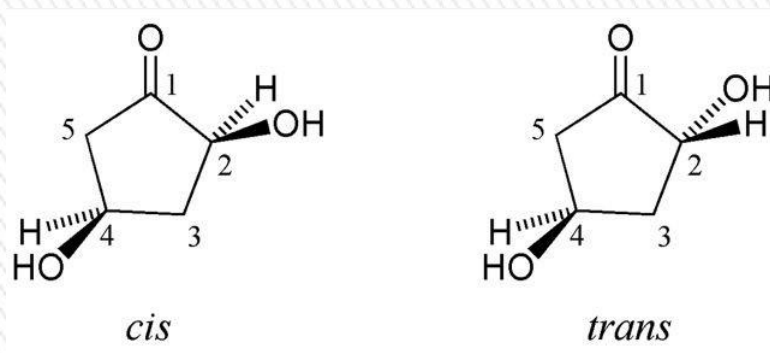
- Poiché l'aumento di intensità è piccolo, normalmente il NOE viene misurato utilizzando **spettri differenza** (NOE difference).
- Si effettua uno spettro con irradiazione e uno senza irradiazione, e si fa la differenza tra i due.
- Nello spettro differenza sono presenti solo i protoni che variano di intensità tra i due spettri, e che quindi mostrano NOE.

Nello spettro differenza compaiono solo i segnali i protoni che mostrano NOE



NOE e stereochimica delle molecole

- Il NOE è in generale considerato prova della vicinanza spaziale (entro 3-4 Å) di due protoni.
- Al contrario, l'assenza di NOE suggerisce soltanto, ma non dimostra, che i due protoni siano lontani.
- Il NOE è di grande utilità per determinare la stereochimica delle molecole.



L'effetto NOE tra i protoni in 2 e in 4 indica vicinanza spaziale tra i due protoni, e quindi che i due protoni sono in cis.

NOE e disaccoppiamento

- Sia NOE che disaccoppiamento di spin sono provocati dall'irradiazione selettiva di un protone.
- In un esperimento ad onda continua, i due fenomeni avvengono contemporaneamente. Ciò è un problema, perché il disaccoppiamento, facendo variare le molteplicità, rende difficile l'uso dell'esperimento differenza.
- In un esperimento a trasformata di Fourier, tuttavia, i due fenomeni possono essere tenuti ben distinti.
- L'intensità del segnale NMR dipende dalla differenza di popolazione tra gli stati α e β al momento dell'impulso.
- **Nel NOE è necessario che l'irradiazione** (che provoca una variazione nella differenza di popolazione) **sia prima dell'impulso.**
- **Nel disaccoppiamento di spin l'irradiazione** fa variare la frequenza a cui il nucleo emette, e quindi l'irradiazione **deve avvenire durante l'emissione**, cioè dopo l'impulso.

Spettroscopia ^{13}C NMR

- I principi dell'NMR ^{13}C sono identici a quelli dell'NMR protonico, quindi esaminiamo solo le differenze.
- **La sensibilità è molto minore rispetto a NMR protonico** a causa di:
 - **bassa abbondanza isotopica** (1.1% invece di ~100%);
 - **basso rapporto magnetogirico**, $\gamma_{\text{C}} = \frac{1}{4}\gamma_{\text{H}}$, e visto che sensibilità $\propto \gamma^{5/2}$, allora la sensibilità è solo 1/32 di quella protonica (senza considerare l'abbondanza isotopica);
 - **tempi di rilassamento più lunghi** (anche decine di secondi).

Chemical shift

- **range 0-220 ppm** (invece degli 0-12 ppm dell'NMR protonico);
- il riferimento per la scala dei δ sono i carboni del TMS.



Costanti di accoppiamento e broadband decoupling

- Le $^1J_{CC}$, $^2J_{CC}$ e $^3J_{CC}$ esistono ma non danno luogo a molteplicità nello spettro (è improbabile avere 2 ^{13}C vicini);
- Le $^1J_{CH}$ (125-250 Hz) e le $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ (0-15 Hz) darebbero luogo a una molteplicità complessa, ma...
- ...si usa il **disaccoppiamento di spin a banda larga** (broadband decoupling).
- Quindi, in uno spettro ^{13}C NMR i segnali sono tutti singoletti (a meno di accoppiamenti con ^{19}F , ^{31}P , ecc...)



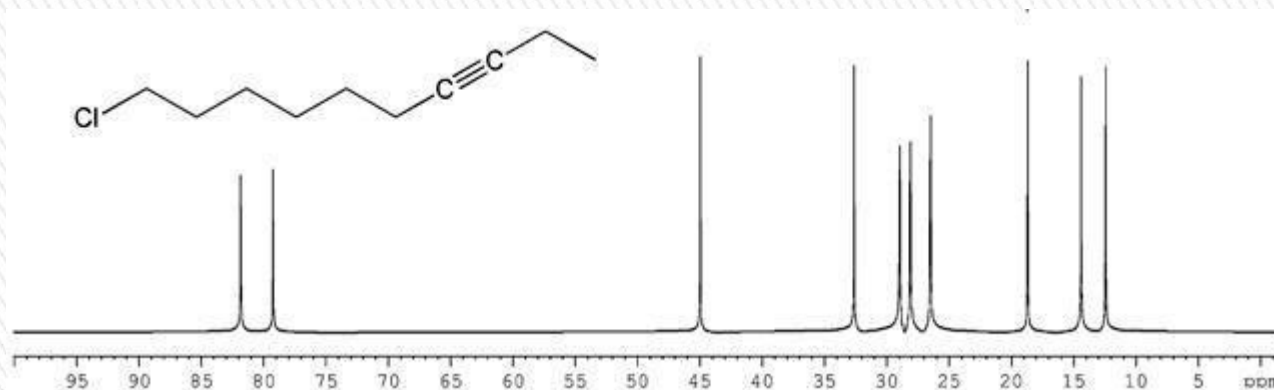
Broadband decoupling

- Gli esperimenti ^{13}C vengono normalmente effettuati in presenza di disaccoppiamento protonico.
- Questo è come un disaccoppiamento di spin, ma deve funzionare su tutti i protoni e non solo su quelli che risuonano a una certa frequenza. Per questo viene detto **disaccoppiamento a banda larga (broad band decoupling - BB)**.
- Si effettua con un irraggiamento ad alta potenza, e di intensità variabile nel tempo. Una irradiazione del genere influenza tutti i protoni, poiché è come se fosse realizzata attraverso una serie continua di impulsi di radiofrequenza.
- Nell'esperimento disaccoppiato **la sensibilità aumenta** perché:
 - i segnali sono tutti singoletti;
 - c'è il NOE eteronucleare (segnali fino a 3 volte più intensi per CH , CH_2 e CH_3)
- la presenza di NOE però significa che **l'intensità dei segnali non è più proporzionale al numero di ^{13}C** (non si può usare l'integrazione). Un'altra causa sono i lunghi tempi di rilassamento di alcuni carboni (particolarmente quelli non protonati).

Spettri ^{13}C NMR

L'intervallo più ampio di chemical shift e il fatto che i segnali sono tutti singoletti fa sì che:

- in uno spettro ^{13}C è molto raro che due segnali siano **sovrapposti** (a meno che non siano di carboni equivalenti!);
- il numero di atomi di carbonio in una molecola è **almeno** pari al numero di segnali nello spettro ^{13}C (può essere maggiore se ci sono carboni equivalenti).

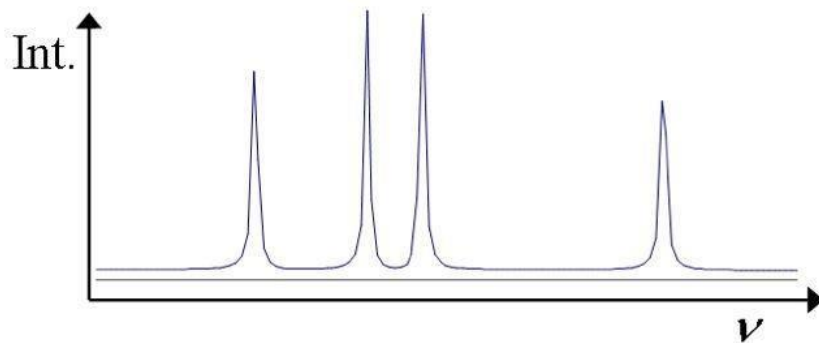


Spettro ^{13}C NMR del 10-cloro-3-decino

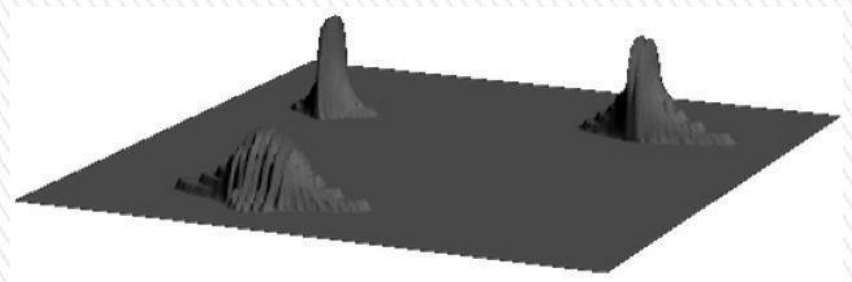


Spettroscopia 2D o di correlazione

- Un normale spettro NMR (detto anche **NMR monodimensionale** o **1D NMR**) è il grafico di una intensità in funzione di una frequenza (ν).
- Esistono anche spettri NMR in cui l'intensità è funzione di due frequenze (indicate con ν_1 e ν_2 o, più spesso, F_1 e F_2). Si parla in questo caso di **NMR bidimensionale** o **2D NMR**. In questo caso il grafico che rappresenta lo spettro è un grafico tridimensionale.



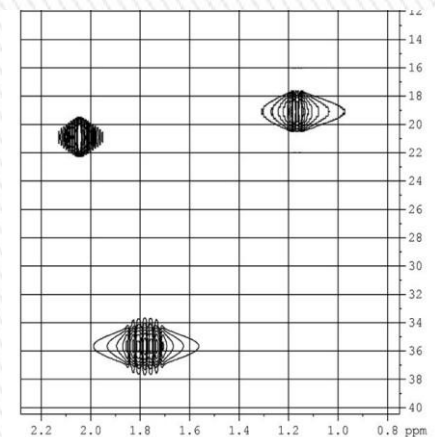
Uno spettro 1D NMR: intensità in funzione della frequenza



Uno spettro 2D NMR è rappresentato da una superficie, che qui è vista in prospettiva.

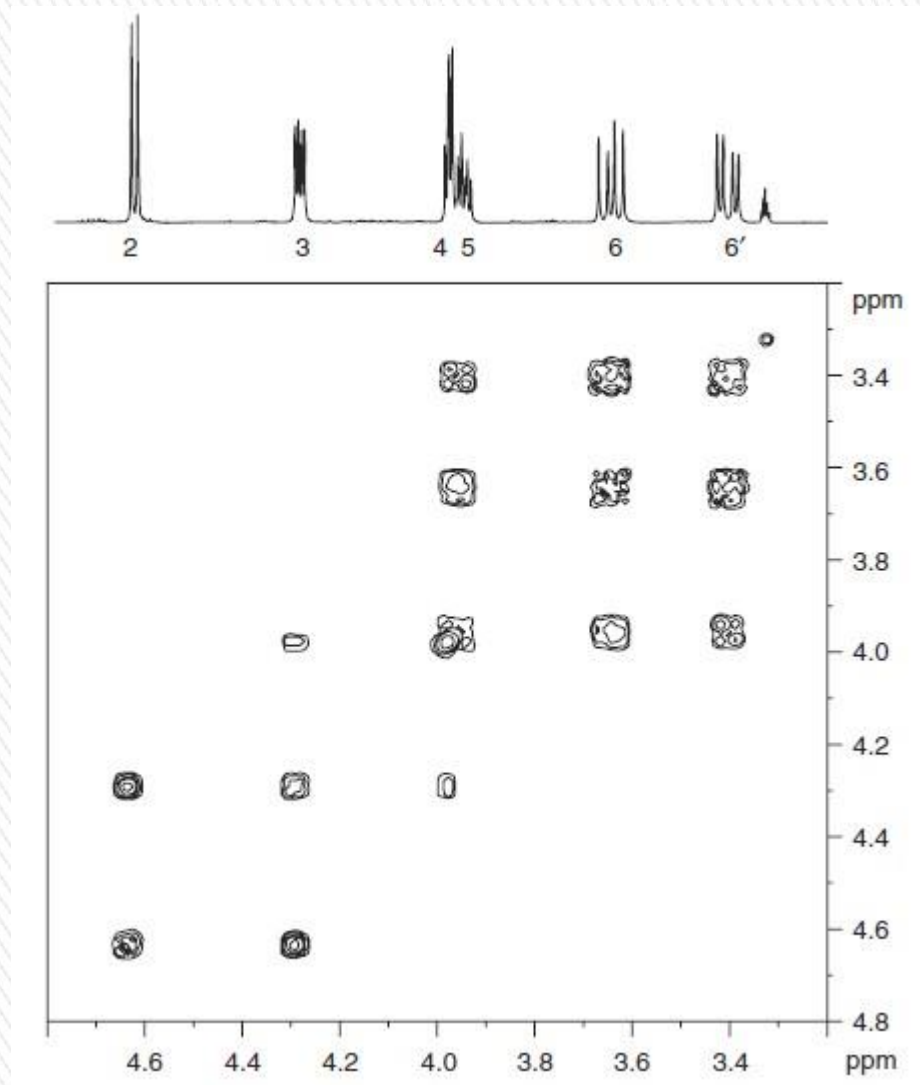
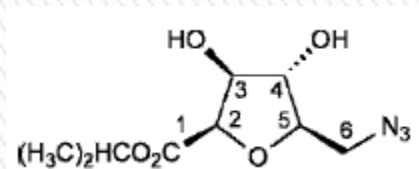
- Le due frequenze sono spesso (ma non sempre) chemical shifts. In uno spettro 2D NMR, **ogni picco definisce quindi due frequenze di risonanza**, e quindi **mette in correlazione i due nuclei che risuonano a quelle frequenze**.
- **Il significato della correlazione** (che può essere accoppiamento scalare tra i due nuclei, oppure NOE, ecc.) **dipende dal particolare tipo di esperimento 2D NMR che si sta effettuando**.
- Uno spettro 2D NMR è rappresentato da una superficie.
- Normalmente si utilizzano **curve di livello**, che uniscono punti dello spettro in cui l'intensità è la stessa, come nelle carte geografiche.
- È come guardare lo spettro dall'alto (dalla direzione dell'intensità): gli assi che si vedono sono F1 e F2, ed i **picchi di correlazione** appaiono come macchie (in realtà serie di anelli concentrici), le cui coordinate sono i chemical shifts dei nuclei messi in correlazione (perché accoppiati, vicini nello spazio, ecc.).

Lo spettro precedente visto "dall'alto" e rappresentato con curve di livello.



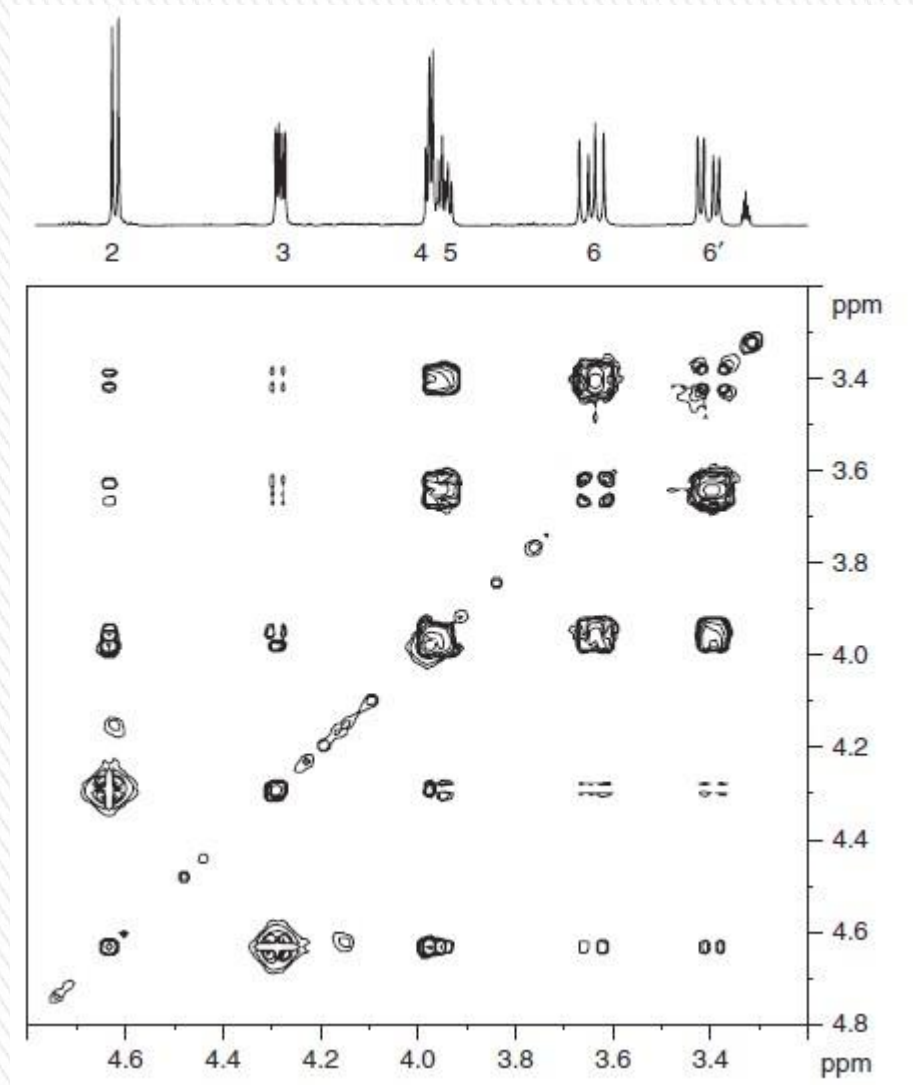
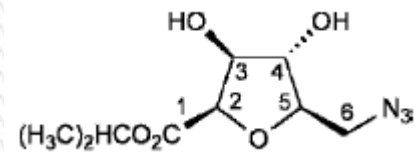
Homonuclear shift correlation

COSY (COrrrelation SpectroscopY)



Homonuclear shift correlation

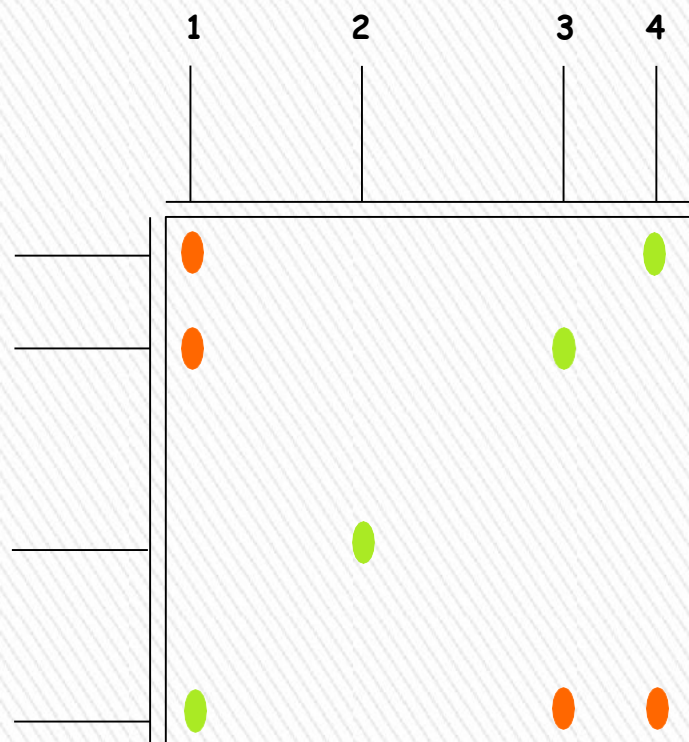
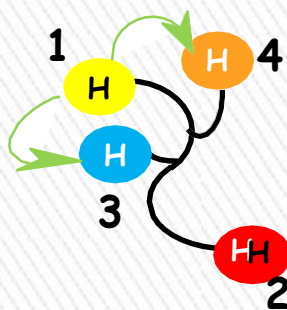
TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)



Correlations through space

NOESY (NOE SpectroscopY)

$$\text{NOE} = \sim f(\tau_c) / r^6$$



NOESY

