

Corso di Metodi Fisici in Chimica Organica e Chimica Analitica Per Biotecnologie Farmaceutiche

Modulo di Metodi Fisici in Chimica Organica

Dr. Elisabetta Rossi

Lezione 1

- Spettrometria di risonanza magnetica protonica.
- Principi teorici della spettrometria di risonanza magnetica nucleare ad impulsi FT.
- Come si ottiene un segnale di risonanza e sua descrizione attraverso un sistema di riferimento rotante o stazionario.
- Acquisizione del segnale e trasformata di Fourier.
- Lo spettro di risonanza magnetica nucleare del protone "nudo".

La spettroscopia NMR (Nuclear Magnetic Resonance) è lo studio di molecole attraverso la registrazione delle interazioni di una **radiazione elettromagnetica dell'ordine delle radiofrequenze** con i **nuclei** di molecole poste in un forte **campo magnetico**.

Al pari di altre spettroscopie quali l'IR e l'UV, è una spettroscopia di assorbimento in cui viene registrata una determinata transizione energetica generata dall'assorbimento, da parte del campione, dell'energia associata ad una radiazione elettromagnetica della frequenza opportuna.

Per descrivere un esperimento NMR è necessario conoscere alcune peculiari caratteristiche dei nuclei atomici, il loro comportamento in presenza di un campo magnetico e il tipo di transizioni energetiche causate dall'interazione con una radiazione elettromagnetica dell'ordine delle radiofrequenze.

Ciascun **nucleo** atomico possiede una carica e alcuni nuclei possiedono inoltre la caratteristica particolare di ruotare attorno al proprio asse cioè possiedono uno "spin". Come conseguenza, se assimiliamo il nucleo ad una carica elettrica, questa rotazione produrrà un dipolo magnetico con orientamento parallelo all'asse nucleare stesso e caratterizzato da un momento magnetico μ . Ad ogni nucleo inoltre è associato un "numero quantico di spin" (I) che è caratteristico per ogni nucleo, variando da $I = 0$ per i nuclei senza spin fino ad assumere valori interi o frazionari ($\frac{1}{2}$ e suoi multipli), e dipende dalla massa atomica e dal numero atomico dei diversi nuclei.



Poiché il primo esperimento NMR che descriveremo riguarda il nucleo dell'idrogeno (protone, $I = \frac{1}{2}$) la trattazione che segue è per semplicità riferita a questo nucleo ma potrà in seguito essere estesa ad altri nuclei (Fig. 1).

Fig. 1

Valutiamo inizialmente il suo comportamento quando viene sottoposto all'azione di un **campo magnetico** esterno (Fig. 2). Nella figura il nucleo protonico viene rappresentato, omettendo la carica positiva, come un piccolo magnete dotato di un polo positivo e di un polo negativo e ne viene descritto il comportamento in presenza o in assenza di un campo magnetico esterno. In assenza di campo magnetico esterno i dipoli sono disposti casualmente nello spazio. In presenza di un campo magnetico esterno B_0 , il protone può assumere due diversi orientamenti: α (parallelo al campo) e β (opposto al campo).

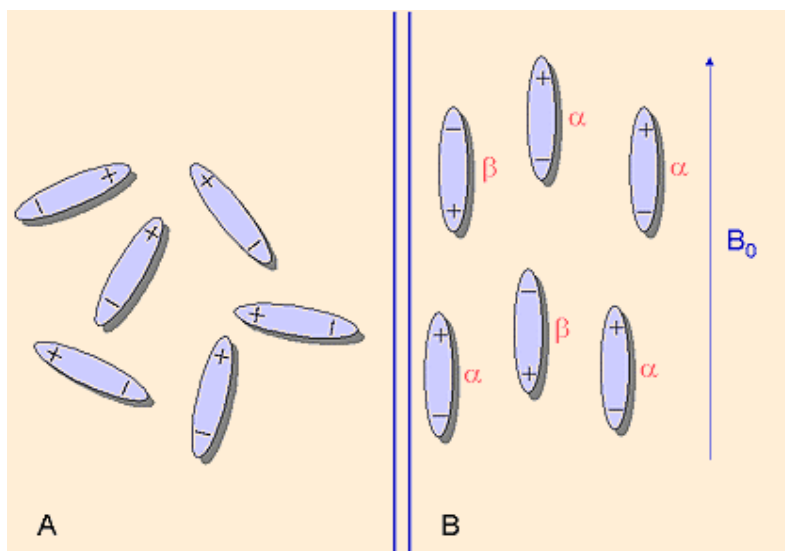


Fig. 2

In generale gli orientamenti che un nucleo può assumere sono fissati dal suo numero quantico di spin ed in particolare

Orientamenti = $2I + 1$.

Nel caso del protone con numero quantico di spin = $\frac{1}{2}$ gli orientamenti possibili sono quindi due. Osservando la tabella che riporta i valori di I di alcuni nuclei possiamo già osservare come alcuni nuclei non si orientano, $I = 0$, mentre altri possono assumere più di un orientamento, nella stessa tabella è riportata per ogni isotopo la relativa abbondanza naturale (Fig. 3).

Isotopo	I	Abbondanza naturale %
^1H	$\frac{1}{2}$	99.9
D	1	1.56×10^{-2}
^{12}C	0	98.9
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1.108
^{14}N	1	99.6
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0.365
^{16}O	0	99.76
^{17}O	$\frac{5}{2}$	3.70×10^{-2}
^{19}F	$\frac{1}{2}$	100
^{32}S	0	95.06
^{33}S	$\frac{3}{2}$	0.74
^{34}S	0	4.2
^{31}P	$\frac{1}{2}$	100

^{28}Si	0	92.28
^{29}Si	1/2	4.7
^{30}Si	0	3.20

Fig. 3: **Numero quantico di spin I per alcuni nuclei atomici.**

Nel caso del protone ai due orientamenti corrispondono due livelli energetici: un livello superiore (β , spin $- 1/2$) e uno inferiore (α , spin $+ 1/2$) con una leggera differenza di popolazione a favore del livello energetico inferiore (Fig. 4)

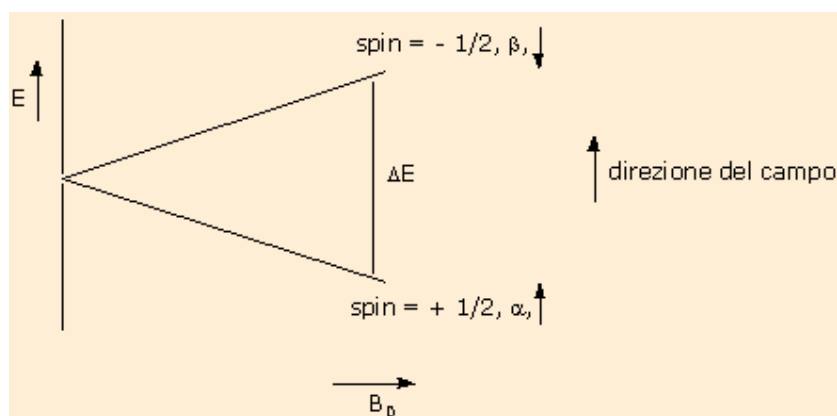


Fig. 4

La differenza di energia tra i due livelli è data da:

$$\Delta E = h\gamma B_0/2\pi$$

h = costante di Planck.

γ = costante giromagnetica (con valore caratteristico per ogni nucleo).

B_0 = intensità del campo magnetico applicato (Tesla).

È importante notare come la differenza di energia tra i due livelli dipenda dal campo magnetico applicato essendo gli altri termini dell'equazione delle costanti.

È evidente inoltre che se esistono due livelli energetici è possibile variare la popolazione e promuovere una transizione dal livello inferiore a quello superiore fornendo al sistema l'energia necessaria sotto forma di radiazione elettromagnetica di frequenza opportuna. Poiché

$$\Delta E = h\nu$$

$$\nu = \gamma B_0/2\pi.$$

Questo significa, sempre per il protone ($\gamma = 26.7$), che se lavoriamo con un campo magnetico di 4.7 Tesla la frequenza necessaria per soddisfare l'equazione sarà di 200 MHz (megahertz) cioè dell'ordine delle **radiofrequenze**. Quando la proporzionalità tra frequenza e campo magnetico viene soddisfatta si dice che il sistema è in risonanza ed il nucleo è in grado di assorbire l'energia associata alla radiofrequenza applicata e passare allo stato energetico superiore e quindi dare origine ad uno spettro di assorbimento.

È importante sottolineare fin d'ora che l'equazione che correla campo magnetico applicato e frequenza dipende dalla costante giromagnetica del nucleo osservato. A campo magnetico costante (per esempio 4.7 Tesla) quindi per realizzare lo spettro del protone ($\gamma = 26.7$) la frequenza impiegata sarà 200 MHz mentre ad esempio per lo spettro del carbonio 13 ($I = 1/2$, $\gamma = 6.7$) la frequenza impiegata sarà 50.3 MHz.

Nella tabella allegata vengono riportati i valori, sia in termini di frequenza che di energia associata, per una serie di radiazioni elettromagnetiche, alcune delle quali utilizzate in altre forme di spettroscopia. La stessa tabella riporta per ogni radiazione elettromagnetica il tipo di effetto o transizione generate (Fig. 5).

Radiazione	Lunghezza d'onda, λ nm	Frequenza, ν Hz	Energia kJ mol⁻¹	Transizione osservata
Raggi X	Da 10 a 10 ⁻¹	Da 3x10 ¹⁶ a 3x10 ¹⁸	Da 1.2x10 ⁴ a 1.2x10 ⁶	Transizioni elettroniche degli elettroni interni
UV lontano	Da 200 a 10	Da 1.5x10 ¹⁵ a 3x10 ¹⁶	Da 6x10 ¹² a 1.2x10 ⁴	Transizioni elettroniche degli elettroni di valenza negli atomi e nelle molecole
UV	Da 380 a 200	Da 8x10 ¹⁴ a 1.5x10 ¹⁵	Da 3.2x10 ² a 6x10 ²	Transizioni elettroniche degli elettroni di valenza negli atomi e nelle molecole
Visibile	Da 780 a 380	Da 4x10 ¹⁴ a 8x10 ¹⁴	Da 1.6x10 ² a 3.2x10 ²	Transizioni elettroniche degli elettroni di valenza negli atomi e nelle molecole
Infrarosso vicino	Da 3x10 ⁴ a 780	Da 10 ¹³ a 4x10 ¹⁴	Da 4 a 1.6x10 ²	Transizioni vibrazionali
Infrarosso lontano	Da 3x10 ⁵ a 3x10 ⁴	Da 10 ¹² a 10 ¹⁵	Da 0.4 a 4	Transizioni rotazionali
Microonde	Da 3x10 ⁷ a 3x10 ⁵	Da 10 ¹⁰ a 10 ¹²	Da 4x10 ⁻³ a 0.4	Transizioni rotazionali
Radiofrequenze	Da 10 ¹¹ a 3x10 ⁷	Da 10 ⁶ a 10 ¹⁰	4x10 ⁻⁷ a 4x10 ⁻³	Transizioni dello spin nucleare

Fig. 5: **Spettro delle radiazioni elettromagnetiche**

Il modo migliore per comprendere e approfondire lo studio della risonanza magnetica nucleare è quello di ricorrere ad una descrizione "pittorica" del fenomeno.

Da un punto di vista fisico il protone può essere assimilato ad una carica elettrica rotante con un momento dipolare che per azione di un campo magnetico esterno si allinea con esso (nelle due possibili direzioni) mentre il suo asse di rotazione precede attorno alla direzione del campo come un giroscopio (Fig. 6).

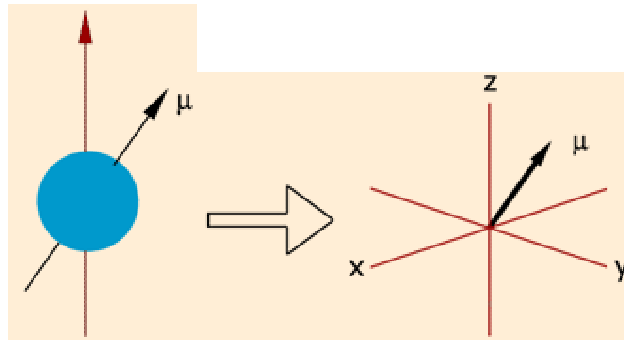


Fig. 6

La frequenza di rotazione attorno all'asse viene definita come frequenza di risonanza (ω) o di Larmor ed è, come vedremo meglio in seguito, la frequenza che soddisfa l'equazione fondamentale della risonanza magnetica descritta in precedenza cioè la frequenza che è necessaria perché il sistema sia in risonanza:

$$\omega = \gamma B_0 / 2\pi.$$

Descrivendo questo fenomeno per un insieme di protoni (ci riferiamo sempre a protoni isolati e quindi identici fra loro) e assimilando ogni protone al suo asse magnetico potremo descriverli come vettori magnetici in un sistema di assi cartesiani come riportato in figura 7.

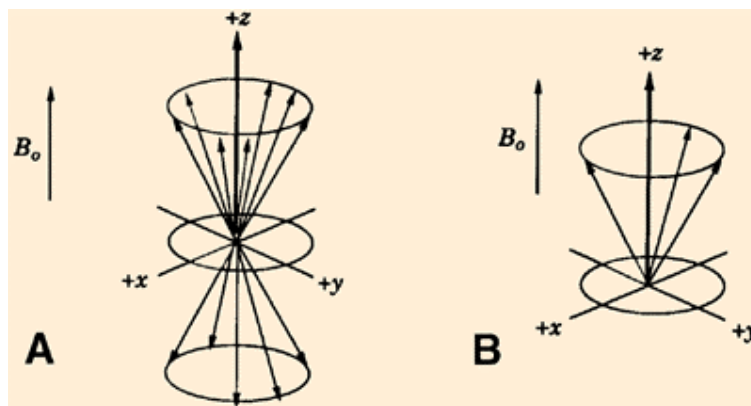


Fig.7

Nella rappresentazione vettoriale riportata, la parte A è un insieme di protoni in un campo magnetico, il cono superiore rappresenta i vettori corrispondenti a protoni allineati nella stessa direzione del campo e quindi a minore energia, il cono inferiore costituito da un numero inferiore di vettori rappresenta invece l'insieme di protoni allineati contro il campo e quindi ad energia superiore. Nella parte B della figura il cono inferiore è stato sottratto da quello superiore ed esprime l'eccesso di popolazione allineato con B_0 che si traduce in un vettore di magnetizzazione netta allineato lungo la direzione $+z$. Questo sistema di riferimento stazionario tuttavia è di difficile utilizzo per descrivere un esperimento NMR e di solito si preferisce ricorrere all'ausilio di un sistema di riferimento ruotante in cui l'intero sistema di assi cartesiani ruota con la stessa frequenza dei protoni osservati. Questo artificio permette di osservare un vettore stazionario allineato lungo l'asse $+z$. E' lo stesso principio che viene utilizzato nella messa in orbita dei satelliti geostazionari che ruotano attorno alla Terra con una velocità che permette loro di osservare sempre lo stesso punto e di vedere quindi la Terra come se fosse ferma. In un sistema di questo tipo la magnetizzazione netta, descritta nella parte B della figura precedente, potrà essere così rappresentata (Fig. 8).

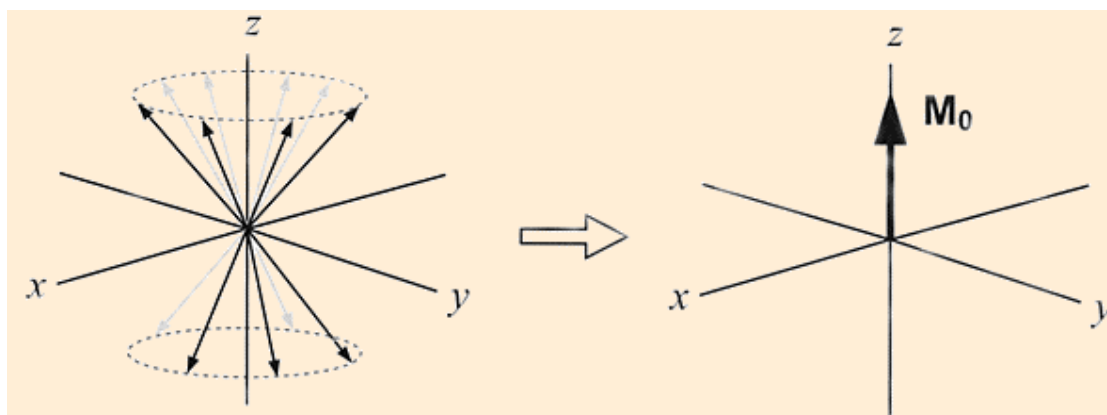


Fig. 8

Il vettore magnetizzazione M rappresenta quindi la condizione iniziale di un sistema di protoni equivalenti posti in un campo magnetico. Per ottenere uno spettro di assorbimento dobbiamo fornire energia al sistema e osservarne le variazioni (Fig. 9).

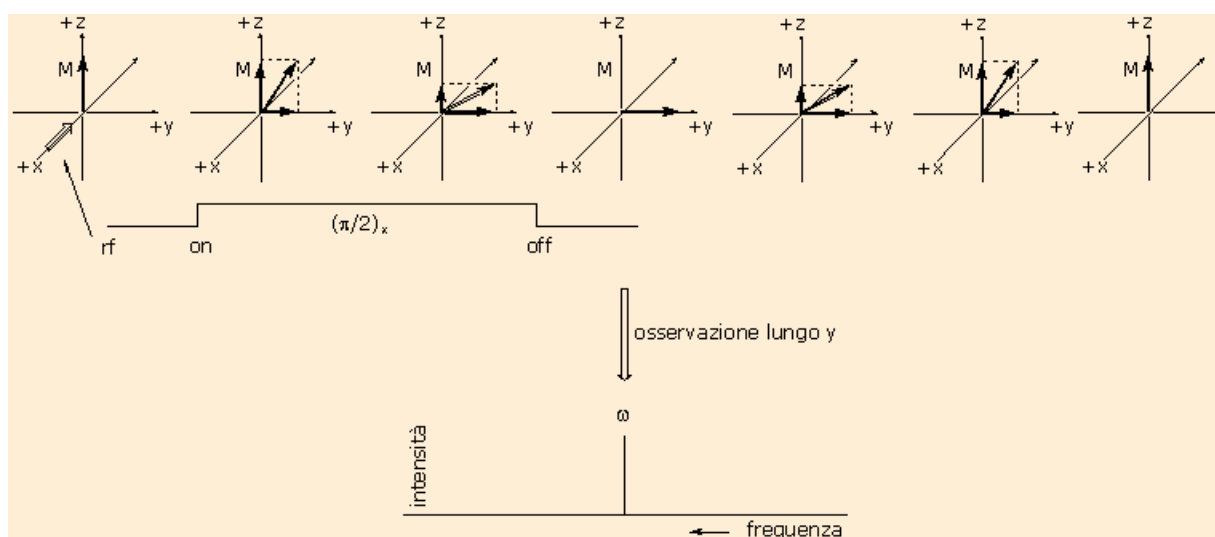


Fig. 9: **Segnale ^1H -NMR in un sistema di riferimento rotante.**

In pratica un trasmettitore di radiofrequenza viene attivato perpendicolarmente al vettore M , lungo l'asse $+x$. L'energia fornita provocherà una variazione delle popolazioni α e β (α verso β) e il vettore M ruoterà verso l'asse $+y$, se osserviamo le sue proiezioni vedremo una diminuzione di intensità lungo $+z$ e un aumento lungo $+y$ fino ad arrivare per una rotazione di 90° in cui avremo tutta la magnetizzazione lungo $+y$. Interrompendo a questo punto la trasmissione dell'impulso il sistema tenderà a tornare all'equilibrio cedendo energia al suo intorno e il vettore magnetizzazione tornerà alla posizione iniziale compiendo un cammino inverso. Se durante questo esperimento osserviamo (registriamo) la variazione dell'intensità della magnetizzazione esclusivamente lungo l'asse $+y$ vedremo l'intensità di M passare da zero ad un massimo per tornare poi nuovamente a zero: avremo cioè registrato un segnale di risonanza magnetica. Riportando i risultati in un grafico frequenza/intensità troveremo il segnale in corrispondenza della frequenza applicata. Attraverso quindi una sequenza impulso \rightarrow acquisizione del segnale abbiamo registrato lo spettro di risonanza magnetica nucleare di un insieme di protoni isolati ed equivalenti.

L'impulso di radiofrequenza utilizzato nell'esperimento è descritto in precedenza nell'equazione fondamentale della spettroscopia NMR deve essere equivalente alla frequenza di Larmor, questo in base alla teoria quantomeccanica dell'energia.....o più semplicemente come riportato da alcuni autori immaginate di avere un panino (un quanto di energia) nella mano destra mentre la vostra mano sinistra ruota costantemente con una particolare velocità angolare. Per passare il panino dalla mano destra a quella sinistra senza interromperne la rotazione, la vostra mano destra dovrà ruotare con la stessa velocità angolare. Il trasferimento di energia (panino) dalla mano destra alla sinistra avverrà solo se le due mani ruotano in maniera sincrona. Allo stesso modo solo quando la radiofrequenza applicata è identica alla frequenza di precessione del protone, il nucleo sarà in grado di assorbire energia e passare al livello energetico superiore.

La trattazione che segue descrive lo stesso esperimento senza utilizzare un sistema di riferimento rotante ma un sistema stazionario (Fig. 10).

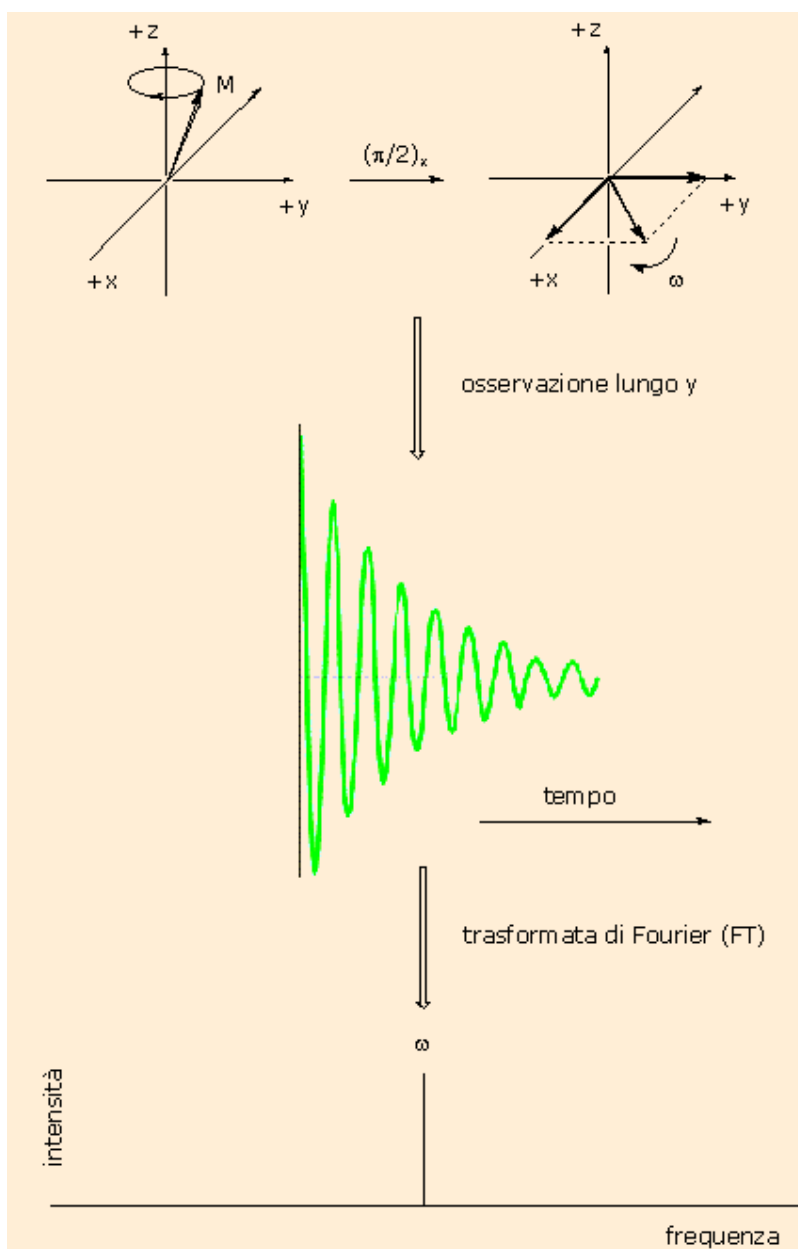


Fig. 10: **Segnale ^1H -NMR in un sistema di riferimento stazionario.**

In questo caso la magnetizzazione netta M sotto l'influenza dell'impulso di radiofrequenza raggiungerà il piano xy con un cono di precessione sempre più largo rispetto a $+z$ fino a precedere nel piano xy alla frequenza ω o frequenza di Larmor. Il segnale reale osservato, sempre osservando le variazioni di M lungo y , avrà un andamento sinusoidale legato alle diverse posizioni di M nel piano xy . La sinusoide inoltre varierà di intensità diminuendo nel tempo a causa del graduale ritorno verso la posizione di equilibrio iniziale (il cono di precessione torna a stringersi verso $+z$). Il grafico che otteniamo realmente quindi riporta una variazione di intensità nel tempo. Si passa dal dominio del tempo a quello delle radiofrequenze e quindi al grafico frequenza/intensità descritto in precedenza applicando una equazione matematica detta trasformata di Fourier.

Corso di Metodi Fisici in Chimica Organica e Chimica Analitica Per Biotecnologie Farmaceutiche

Modulo di Metodi Fisici in Chimica Organica

Dr. Elisabetta Rossi

Lezione 2

- Il concetto di spostamento chimico ed i fattori che lo influenzano.
- Lo spettro di risonanza magnetica del cloroformio.
- Lo spettro di risonanza magnetica della miscela cloroformio/tetrametilsilano.
- Il concetto di frequenza operativa e la scala in ppm (δ).
- Integrazione dei picchi.
- Esempi di spettri reali.

Lo spettro di risonanza magnetica che abbiamo ottenuto secondo la procedura descritta nella lezione 1 riguarda lo spettro di un protone isolato. In questa lezione passeremo ad occuparci di protoni "reali". Il nucleo di un protone, quando questo fa parte di una molecola organica, non è isolato ma circondato (schermato) dalla propria nube elettronica che a sua volta può essere più o meno intensa a seconda dell'effetto elettronattrattore o elettrondonatore degli atomi adiacenti. L'effetto di schermatura è dovuto ai campi magnetici generati dagli elettroni in movimento che agiscono in opposizione al campo magnetico applicato B_0 . Il campo magnetico effettivo (B_{eff}) con cui si trova ad interagire un protone in una molecola organica è quindi minore del campo magnetico applicato (B_0) e anche la frequenza di risonanza sarà di conseguenza inferiore.

Protone isolato $\omega = \gamma B_0 / 2\pi$.

Protone schermato $\omega = \gamma B_{\text{eff}} / 2\pi$ con $B_{\text{eff}} < B_0$

Gli spettri di assorbimento dei protoni di una molecola organica saranno quindi tutti caratterizzati da frequenze di assorbimento inferiori a quelle di un protone isolato. Ad esempio per un campo magnetico applicato pari a 4.7 Tesla il protone isolato ha una frequenza di risonanza pari a 200 MHz (si dice che lo strumento lavora a 200 MHz), mentre i protoni di una molecola organica hanno frequenze di risonanza inferiori ed in particolare cadono in un range di 2400 Hz. Questi valori variano naturalmente a seconda del campo magnetico applicato, infatti per uno strumento operante con un campo magnetico di 7.04 Tesla, la frequenza di risonanza del protone isolato è di 300 MHz (si dice che lo strumento lavora a 300 MHz), mentre il range di risonanza dei protoni di una molecola organica cade a frequenze inferiori in un range di 3600 Hz (Fig. 1).

spettro di risonanza di un protone isolato a $B_0 = 4.7 \text{ T}$

$$\omega = \gamma B_0 / 2\pi$$

frequenza di risonanza o di Larmor



spettro di risonanza di un protone isolato e di protoni reali a $B_0 = 4.7 \text{ T}$

per il protone isolato

per protoni reali

$$\omega = \gamma B_0 / 2\pi$$

$$\omega = \gamma B_{\text{eff}} / 2\pi \text{ con } B_{\text{eff}} < B_0$$

frequenza di risonanza o di Larmor

protone isolato

protoni reali a frequenze più basse
(range 2400 Hz)



spettro di risonanza di un protone isolato e di protoni reali a $B_0 = 7.04 \text{ T}$

per il protone isolato

per protoni reali

$$\omega = \gamma B_0 / 2\pi$$

$$\omega = \gamma B_{\text{eff}} / 2\pi \text{ con } B_{\text{eff}} < B_0$$

frequenza di risonanza o di Larmor

protone isolato

protoni reali a frequenze più basse
(range 3600 Hz)

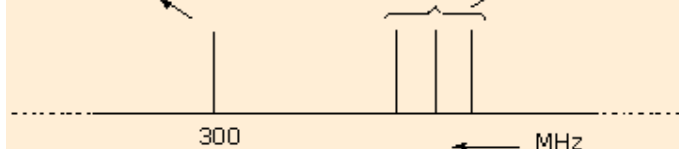


Fig. 1

Questa variazione nella posizione dell'assorbimento viene definita "spostamento chimico" e viene misurata rispetto ad una frequenza di riferimento. La frequenza di riferimento tuttavia non è quella del protone isolato ma è la frequenza di assorbimento del tetrametilsilano (TMS). Questo composto ha la particolarità di possedere un atomo di silicio, più elettropositivo del carbonio, di conseguenza i protoni del tetrametilsilano risulteranno particolarmente schermati, anzi risultano essere più schermati di quasi tutti i protoni organici. A questo punto possiamo quindi disegnare una scala per i nostri spettri di assorbimento con alla frequenza 0 l'assorbimento del TMS e, sempre operando con un campo magnetico di 4.7 Tesla, con un range di circa 2400 Hz in cui troveremo praticamente tutti i protoni organici (Fig. 2).

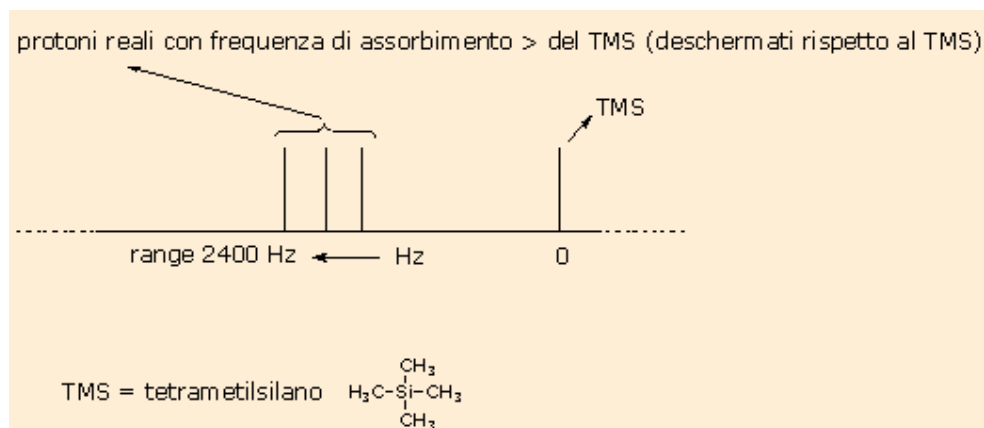


Fig. 2: **Spostamento chimico e riferimento interno $B_0 = 4.7 \text{ T}$, strumento operante a 200 MHz**

Se proviamo a registrare, in queste condizioni, lo spettro del cloroformio (CHCl_3) in presenza di TMS otterremo un grafico di frequenza/intensità come quello riportato in figura 3 che presenta un assorbimento per il CHCl_3 alla frequenza di 1450 Hz. Se registriamo lo stesso spettro con uno strumento che lavora a 100 MHz ($B_0 = 2.35 \text{ Tesla}$) troveremmo per il cloroformio un assorbimento pari a 725 Hz. Se operiamo a 60 MHz ($B_0 = 1.40 \text{ Tesla}$) l'assorbimento del cloroformio sarà pari a 435 Hz. In pratica per la stessa molecola organica saremmo di fronte a tre diversi spettri di risonanza magnetica nucleare in cui la frequenza di assorbimento varia a seconda del magnete in dotazione allo strumento (Fig. 3).

Per ovviare a questo inconveniente si ricorre ad una scala in parti per milione (ppm) o scala in δ in cui lo spostamento chimico viene calcolato come riportato nello schema. Questa "normalizzazione" permette di ottenere per ogni campione, anche operando con strumenti diversi, sempre gli stessi spostamenti chimici espressi in ppm, anche se le frequenze di risonanza variano al variare del campo magnetico applicato (Fig. 4).

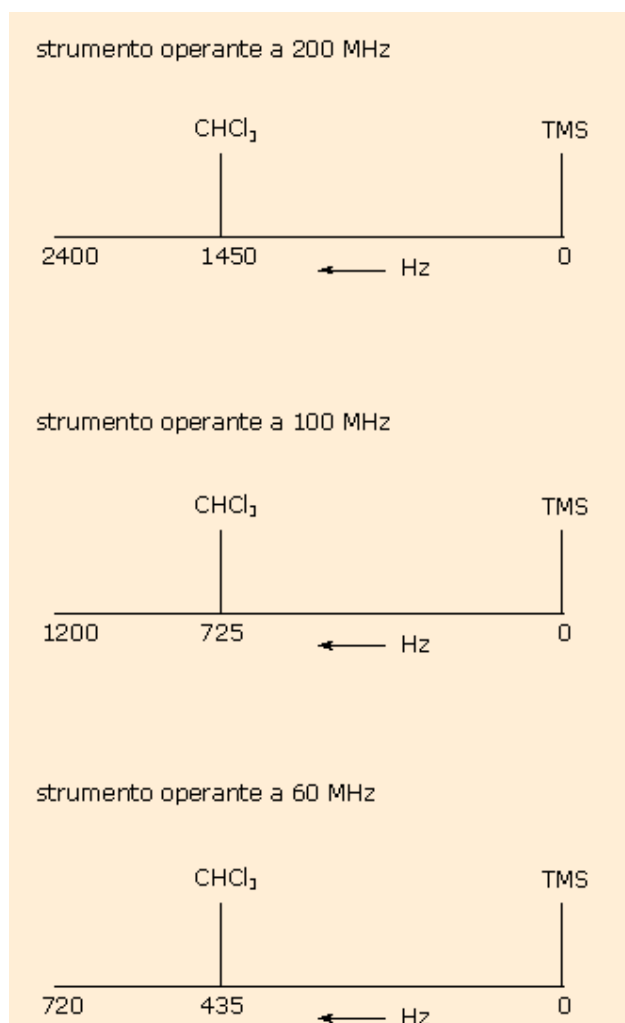


Fig. 3: **Spettro di risonanza magnetica protonica ($^1\text{H-NMR}$) del cloroformio (CHCl_3), TMS come riferimento interno.**

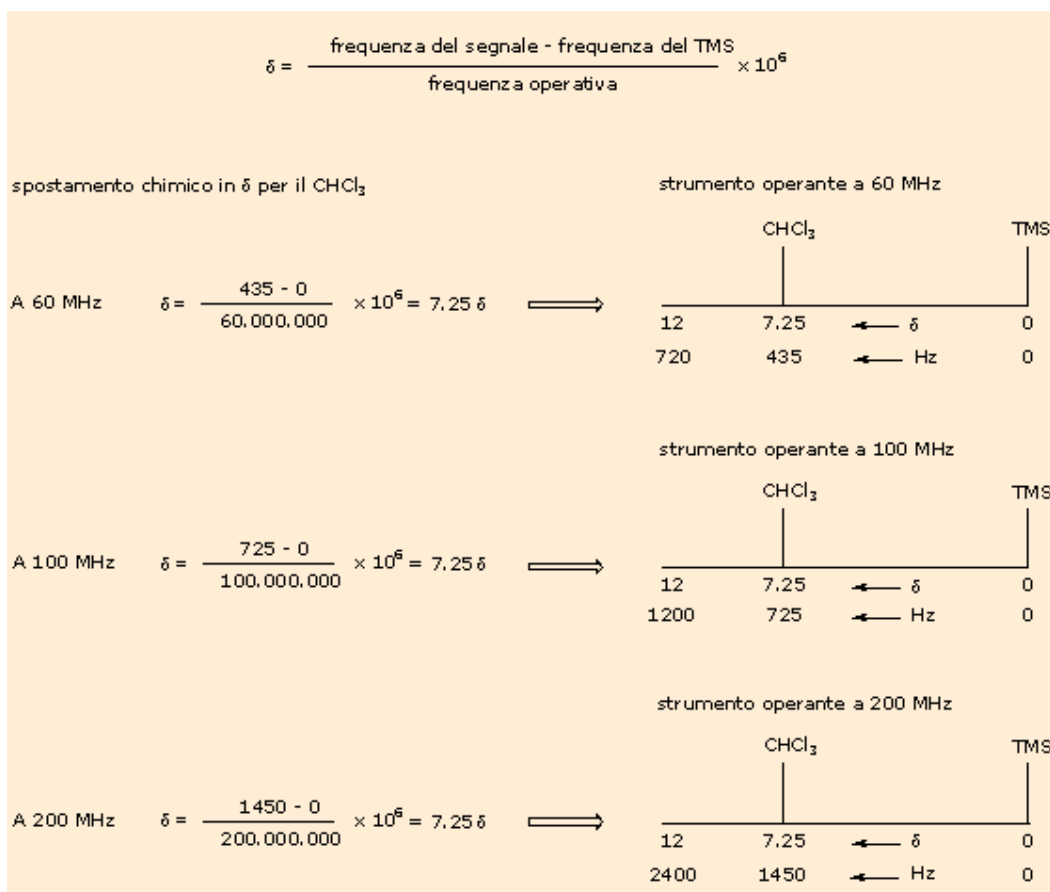


Fig. 4: **Spostamento chimico in δ (ppm)**

L'intensità dei picchi presenti negli spettri è direttamente proporzionale al numero di protoni associati. La misura dell'area dei picchi viene valutata direttamente dallo strumento con un processo detto "integrazione" che trasforma le aree (L^2) in lunghezze (L). L'integrale disegnato sullo spettro dà per ogni "salto" il valore corrispondente all'area sottostante. L'analisi degli spettri chiarirà meglio questo concetto e l'utilizzo dell'integrale.

Proviamo ora ad analizzare alcuni spettri ^1H -NMR di sostanze molto semplici per correlare gli spostamenti chimici con la struttura e cominciare a capire quali sono le informazioni che si possono ricavare dalla risonanza magnetica nucleare.

Tutti gli spettri riportati sono registrati a 200 MHz se non altrimenti specificato.

Terbutilmetiletere (Fig. 5)

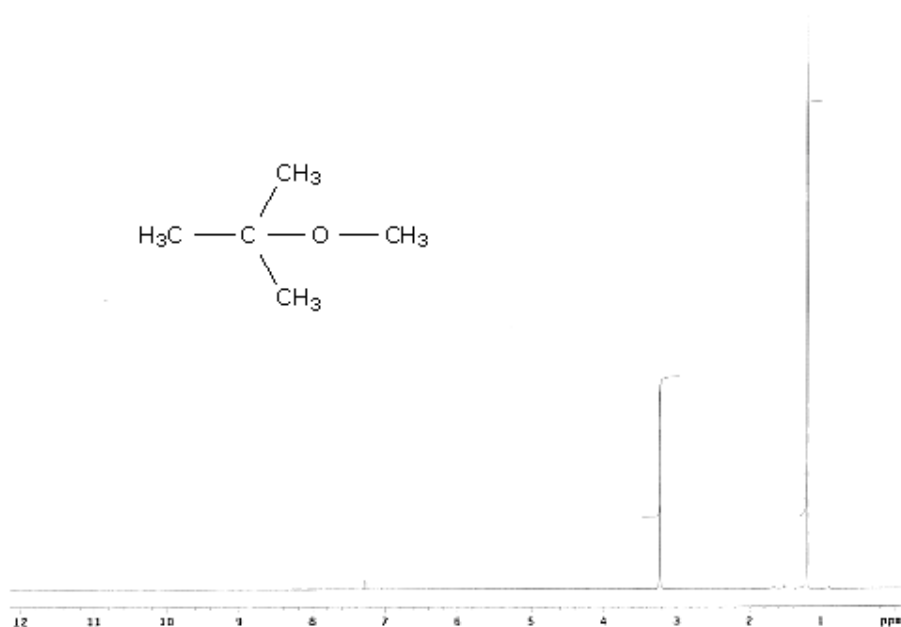


Fig. 5

Nello spettro del terbutilmetiletere sono presenti due segnali: il primo a 1.20 ppm ed il secondo a 3.21 ppm. In base a quanto finora esposto i segnali spostati a frequenze più basse (a più bassi valori di spostamento chimico) sono relativi a protoni schermati mentre a frequenze (o ppm) maggiori si trovano i segnali relativi a protoni deschermati. Nel caso del composto in esame i protoni più deschermati sono quelli del gruppo metilico adiacente al gruppo elettronattrattore (ossigeno più elettronegativo del carbonio) mentre i nove idrogeni del gruppo terbutile risentiranno in maniera minore dell'influenza dell'ossigeno in posizione β . Anche la lettura dell'integrale conferma l'ipotesi di attribuzione dei segnali basata sullo spostamento chimico, infatti il rapporto tra i segnali a 1.20 e 3.21 è 3:1 cioè 9:3. Lo spettro del terbutilmetiletere potrà essere così descritto:

1.20 ppm, 9H, $(\text{CH}_3)_3$,

3.21 ppm, 3H, OCH_3 .

Acetato di terbutile (Fig. 6)

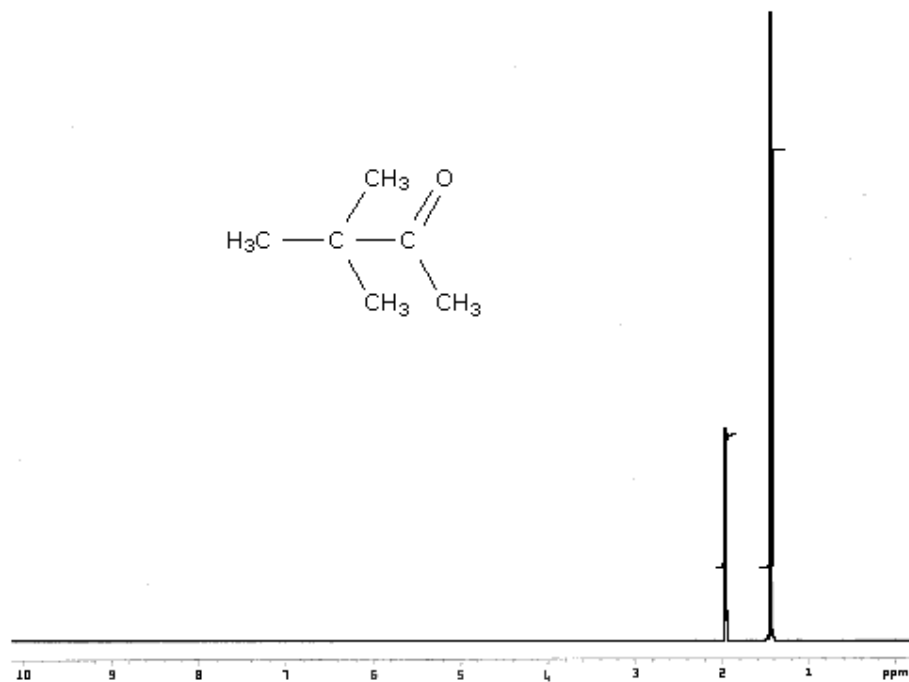


Fig.6

1.42 ppm, 9H, (CH₃)₃,

1.98 ppm, 3H, CH₃.

Anche in questo caso l'attribuzione dei segnali può essere fatta in modo intuitivo sulla base dell'effetto schermante dei gruppi funzionali presenti nella molecola in esame e sulla base del valore dell'integrale. Sia il gruppo terbutilico che il gruppo metilico subiscono l'effetto schermante del gruppo estereo elettroattrattore, e l'attribuzione dei relativi spostamenti chimici può essere fatta sulla base dell'integrale. E' interessante notare come varia lo spostamento chimico del gruppo metilico dell'acetato di terbutile (1.98 ppm) rispetto al gruppo metilico del terbutilmetil etero (3.21 ppm) dell'esempio precedente dovuto al maggior effetto elettronattrattore dell'ossigeno rispetto al carbonile.

Metanolo (Fig. 7)

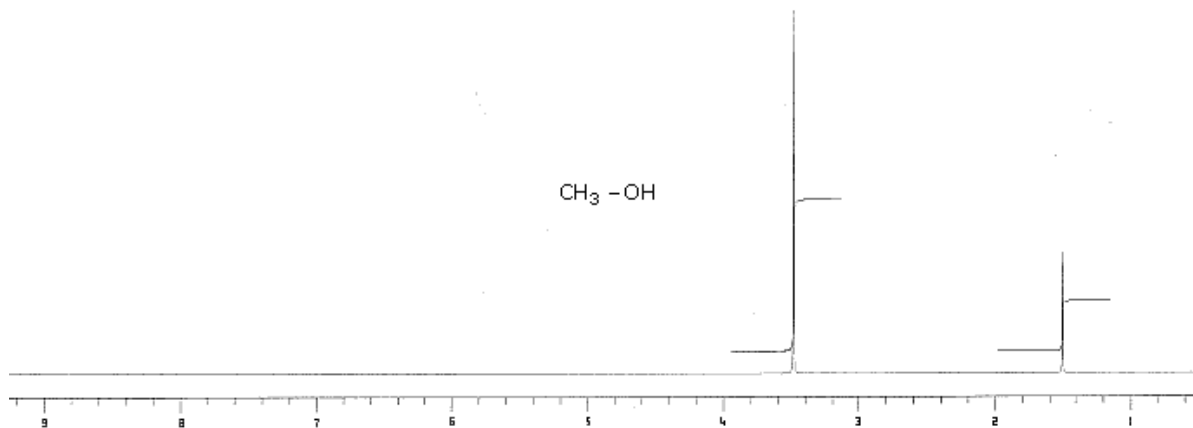
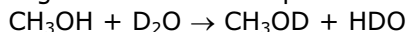


Fig. 7

Lo spettro del metanolo si presta ad alcune interessanti osservazioni: il metile è direttamente legato al gruppo elettronattrattore e come nel caso del terbutilmetiletere ha uno spostamento chimico intorno a 3.2 ppm. Nello spettro è inoltre presente un secondo segnale a integrazione 1 relativo all'idrogeno legato all'eteroatomo. I protoni legati ad eteroatomi hanno spostamento chimico variabile, strettamente legato alla possibilità di formazione di legami di idrogeno intra o intermolecolari, maggiore è l'intensità del legame idrogeno maggiore è lo spostamento chimico osservato cioè la deschermatura del nucleo protonico legato all'eteroatomo. Vengono anche definiti "protoni mobili" perché soggetti a scambio protonico. Questa particolarità viene sfruttata per identificare i picchi relativi ai protoni mobili in quanto trattando il campione con acqua deuterata (D_2O) si ha scambio idrogeno \rightarrow deuterio a livello dei protoni mobili ed il segnale relativo scompare dallo spettro:



Nello spettro deuterato del metanolo (Fig. 8) si osserva la scomparsa del picco relativo all'ossidrile e la comparsa di un nuovo segnale relativo a HOD.

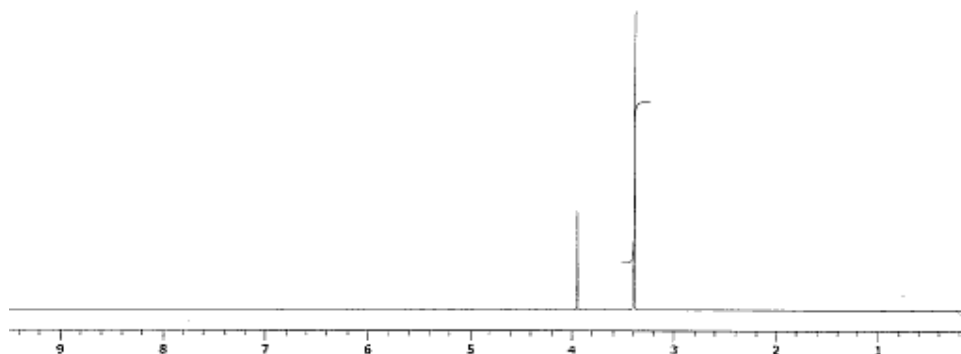


Fig. 8

Oltre che ad identificare i protoni mobili, nell'ambito di uno spettro complesso, l'effetto della deuterazione equivale ad una semplificazione dello spettro stesso.

Altri esempi di spettri di risonanza magnetica protonica sono raccolti nella sezione esercizi.

I valori di spostamento chimico, che fino ad ora abbiamo ricavato in modo intuitivo dall'analisi degli spettri, sono valori tabulati. L'invito a tutti coloro che vogliono approfondire la lettura degli spettri è di fare uso delle tabelle riportate sia nei testi consigliati che nella maggior parte dei libri che trattano di NMR.

Lezione 3

- Accoppiamento di spin semplice.
- Sistemi di spin con due o tre costanti di accoppiamento.
- Costanti di accoppiamento e struttura

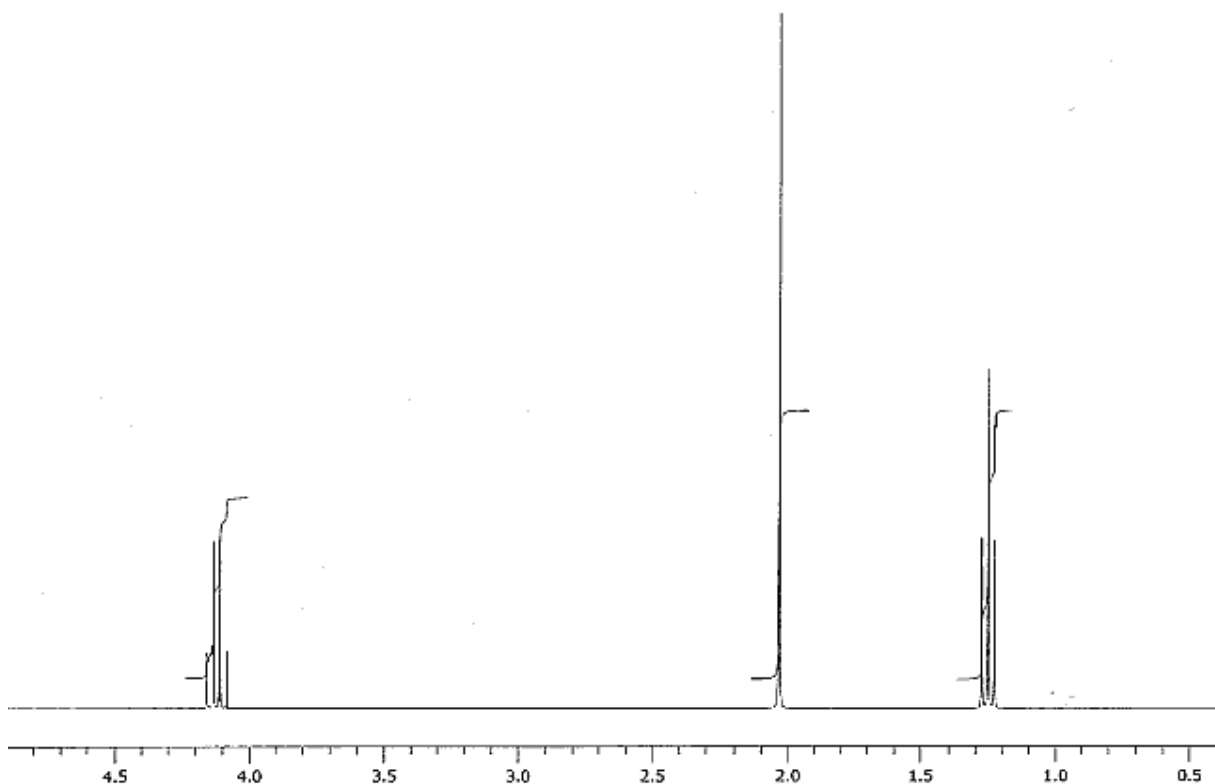


Fig.1: spettro ^1H -NMR dell' acetato di etile

Se osserviamo ora lo spettro dell'acetato di etile (Fig. 1) e lo analizziamo nel modo usuale in base al valore degli integrali e allo spostamento chimico possiamo facilmente attribuire il segnale a 1 ppm alla risonanza del metile adiacente al gruppo metilenico, il segnale a 2 ppm al metile adiacente al gruppo carbonilico e il segnale a 4.2 ppm al gruppo metilenico. Tuttavia mentre il segnale a 2 ppm è costituito da una sola linea, i segnali a 1 e a 4.2 ppm sono formati da tre e quattro linee rispettivamente. La scomposizione del segnale (molteplicità in termini NMR) in più linee è una delle caratteristiche peculiari della spettrometria NMR e lungi da essere una complicazione riveste, come vedremo in seguito, grande importanza nell'analisi e nella determinazione delle strutture.

Per spiegarne l'origine proviamo a considerare un protone legato ad un carbonio adiacente ad un secondo carbonio cui sono legati due atomi di idrogeno equivalenti (Fig. 2).

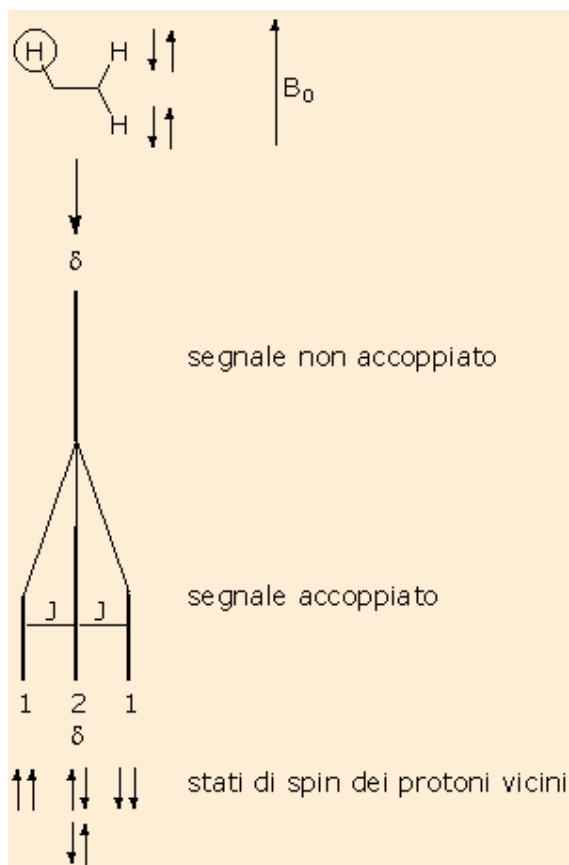


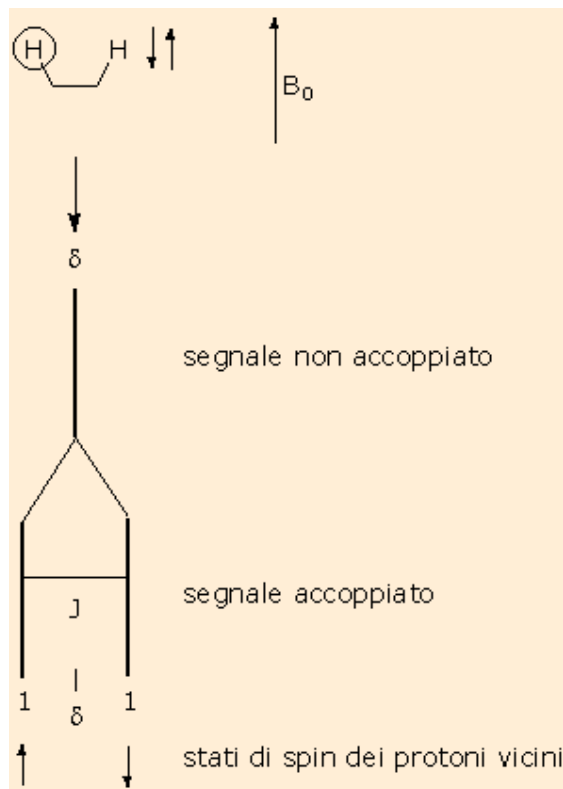
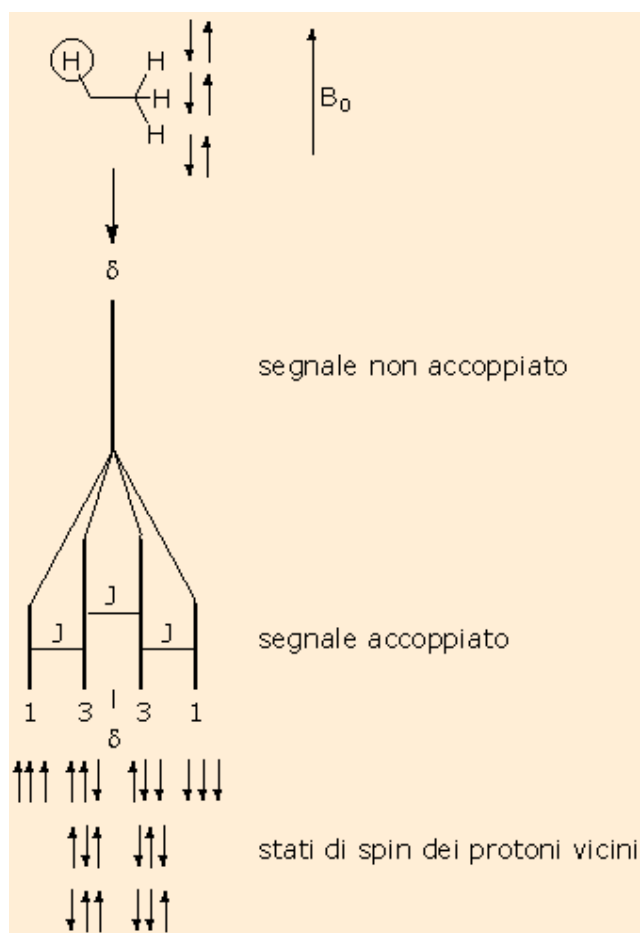
Fig. 2

Il protone osservato, quello cerchiato, risente del campo magnetico applicato B_0 secondo le regole già stabilite ed ha una frequenza di risonanza e quindi uno spostamento chimico dati dalla solita equazione $\omega = \gamma B_{\text{eff}}/2\pi$. Lo stesso protone inoltre risente dell'influenza degli stati di spin dei protoni adiacenti. Gli spin adiacenti infatti possono essere paralleli al campo e sommare quindi al campo magnetico applicato il campo magnetico da loro generato provocando un piccolo innalzamento della frequenza di assorbimento ω e dello spostamento chimico in ppm, oppure possono essere opposti al campo magnetico applicato e sottrarre al campo applicato quello da loro generato provocando un piccolo abbassamento della frequenza di assorbimento e dello spostamento chimico. Infine, i due spin adiacenti possono essere di direzione opposta e quindi avere effetto nullo sulla frequenza di assorbimento e sullo spostamento chimico del protone osservato. La morfologia del segnale rilevato nello spettro sarà data da un segnale composto da tre linee (tripletto) con la linea centrale, corrispondente allo spostamento chimico, di intensità doppia rispetto alle due linee laterali poste rispettivamente a frequenza superiore e inferiore rispetto alla frequenza di risonanza. La distanza tra le linee osservate (tra la prima e la seconda o tra la seconda e la terza) è caratteristica per ogni sistema, prende il nome di costante di accoppiamento (J) e viene misurata in Hz. Il suo valore, trattandosi di una costante, non varia al variare dello strumento utilizzato per la registrazione dello spettro e dipende essenzialmente dalla struttura del composto in esame. L'analisi delle costanti di accoppiamento di un sistema permette quindi di ottenere informazioni sulla struttura.

Consideriamo ora il caso di un sistema CH-CH (Fig. 3)

Lo spin del protone adiacente genererà un campo magnetico che può essere parallelo o antiparallelo rispetto al campo magnetico applicato ed il nucleo osservato risentirà di questa situazione dando origine ad un segnale formato da due linee (doppietto) di uguale intensità. La linea a frequenze più alte corrisponde alla transizione in cui lo spin adiacente è parallelo a B_0 ed il suo campo magnetico si somma a quello applicato causando lo spostamento dell'assorbimento a frequenze più alte mentre la linea a frequenze più basse corrisponde alla transizione in cui lo spin adiacente è antiparallelo a B_0 . Lo spostamento chimico in questo caso è posto al centro del doppietto mentre la costante di accoppiamento è data dalla distanza in Hz tra le due linee.

Sia nel caso del tripletto che del doppietto la somma delle aree e quindi l'integrale corrispondono all'area e all'integrale del sistema non accoppiato.



Da ultimo consideriamo il caso di un sistema CH-CH₃ (Fig. 4).

In questo caso la morfologia del segnale sarà quella di un sistema di quattro linee (quartetto) con intensità 1:2:2:1.

Tutti i casi finora considerati si riferiscono ad un protone "accoppiato" attraverso tre legami (J vicinale o 3J) con uno due o tre protoni magneticamente equivalenti (con lo stesso spostamento chimico).

Il numero di linee generato da un protone accoppiato con un numero "n" di protoni equivalenti (accoppiamento di spin semplice, con J sempre uguale) è pari quindi a $n + 1$ mentre l'intensità relativa delle linee che compongono il sistema può essere ricavato dal triangolo di Pascal (Fig. 5).

Numero di nuclei vicini	Molteplicità	Intensità relativa delle linee
0	Singoletto	1
1	Doppietto	1 1
2	Tripletto	1 2 1
3	Quartetto	1 3 3 1
4	Quintetto	1 4 6 4 1
5	Sestetto	1 5 10 10 5 1
6	Settetto	1 6 15 20 15 6 1

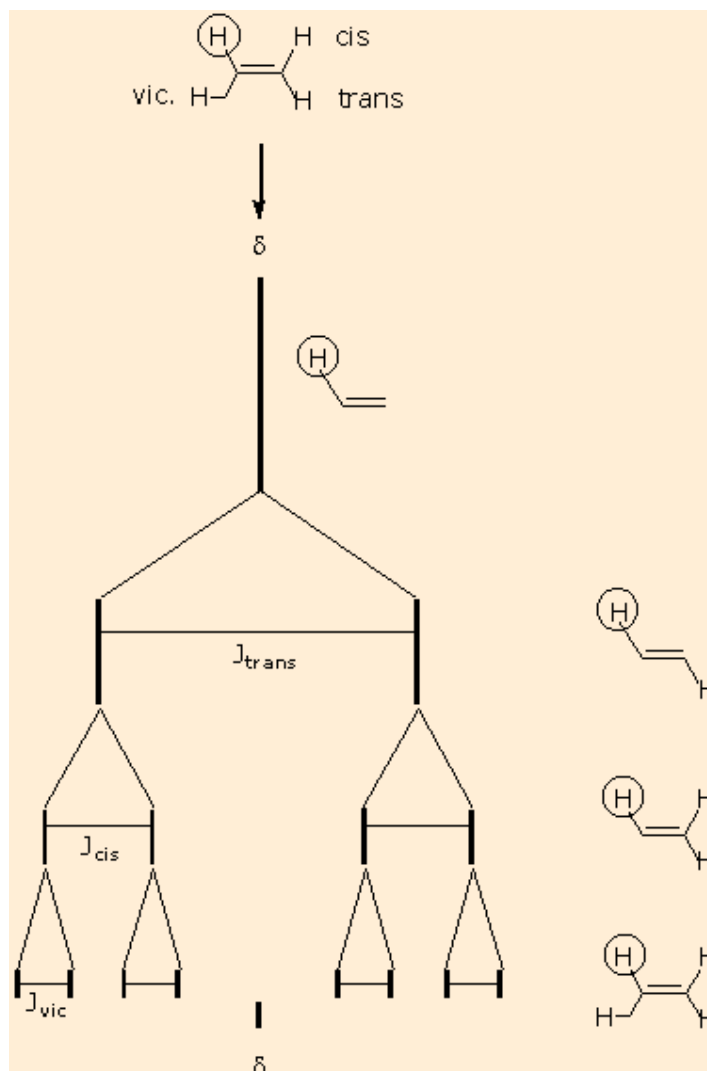
Fig. 5

Se il protone osservato è accoppiato con protoni non equivalenti darà origine ad un segnale in cui saranno presenti diverse costanti di accoppiamento (sistemi di spin con due o più costanti di accoppiamento).

Consideriamo ad esempio il sistema vinilico riportato in figura (Fig. 6).

Il protone osservato è accoppiato, sempre con J vicinale, con tre protoni non equivalenti (hanno diverso intorno chimico e diverso spostamento chimico). Il segnale dell'idrogeno non accoppiato darà origine ad un doppietto a causa dell'accoppiamento con l'idrogeno in trans (3J trans), ogni linea del doppietto verrà a sua volta sdoppiata dalla costante di accoppiamento con l'idrogeno in cis (3J cis) dando origine ad un sistema di quattro linee (doppio doppietto) che verranno ulteriormente sdoppiate dalla terza costante di accoppiamento con l'idrogeno vicinale (3J vic). Il sistema sarà quindi formato da otto linee (doppio quartetto).

La nomenclatura dei sistemi di spin tiene conto dell'equivalenza o meno delle costanti di accoppiamento coinvolte: un sistema di quattro linee



con una sola costante di accoppiamento (accoppiamento di spin semplice) è un quartetto mentre un sistema di quattro linee con due costanti di accoppiamento (sistema di spin con due costanti di accoppiamento) viene definito doppio doppietto.

Il sistema di linee costruito per il vinile considerando in successione la J_{trans} , la J_{cis} e la J_{vic} può naturalmente essere costruito considerando le J coinvolte in diversa successione: il risultato non cambia! L'invito è naturalmente quello di esercitarsi a costruire seguendo uno schema diverso il sistema di linee del vinile considerando sempre che le J sono costanti! Una delle possibili alternative è riportata in figura (Fig. 7).

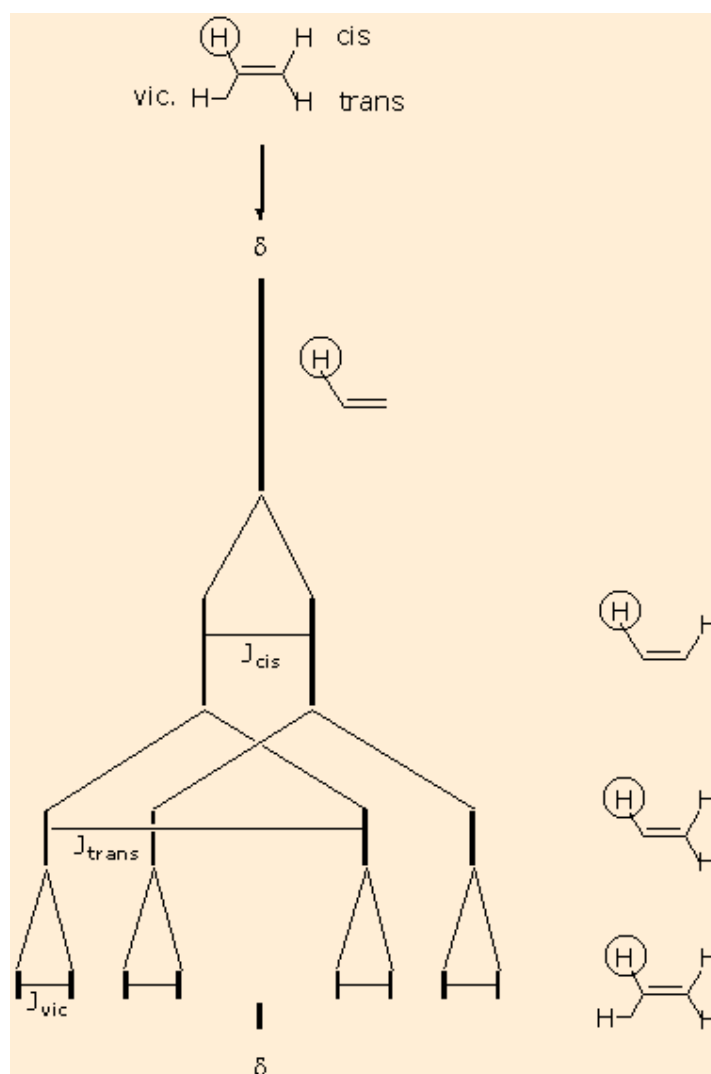


Fig. 7

Il numero di linee di un sistema generato da un protone accoppiato con n nuclei non equivalenti è dato da 2^n .

Da ultimo consideriamo un sistema vinilico in cui il protone è accoppiato con due protoni magneticamente equivalenti e con due protoni magneticamente non equivalenti (Fig. 8).

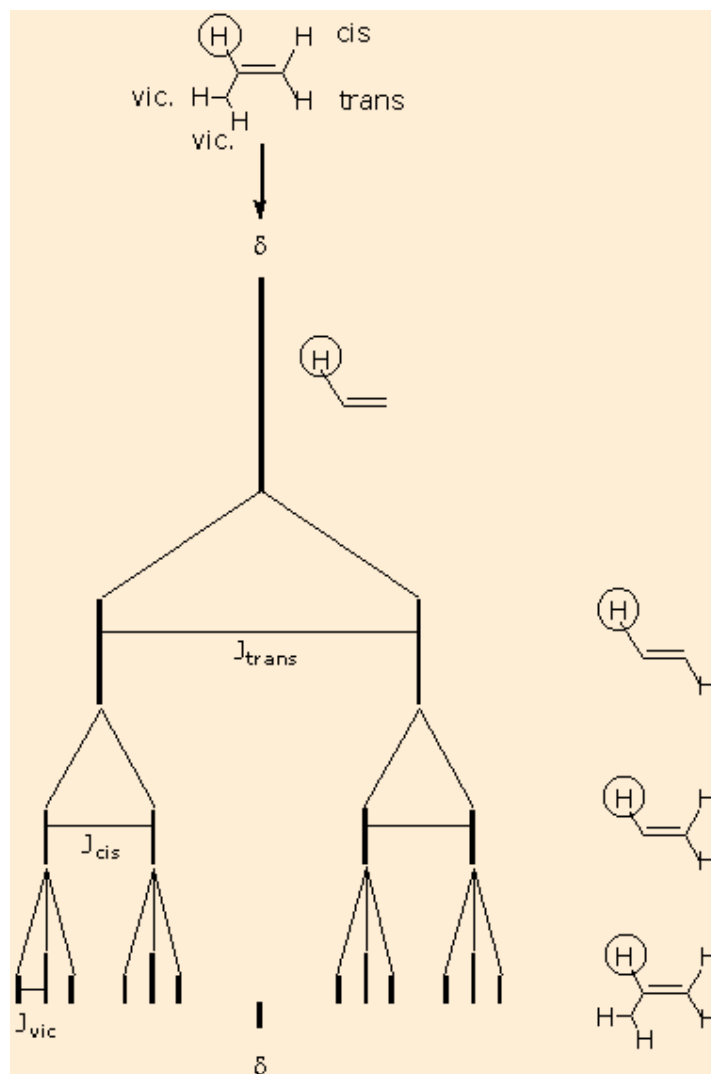


Fig. 8

Il sistema di linee corrispondente al protone osservato viene costruito prendendo in considerazione prima l'accoppiamento con l'idrogeno in trans poi quello con l'idrogeno in cis ed esattamente come nell'esempio precedente otterremo un doppio doppietto, da ultimo consideriamo l'accoppiamento con i due idrogeni vicinali equivalenti per effetto del quale ogni linea del doppio doppietto verrà divisa in un tripletto le cui linee hanno intensità 1:2:1 dando origine ad un segnale formato da 12 linee. Anche in questo caso il diagramma a cascata può essere disegnato considerando le J con una diversa successione rispetto a quella riportata in figura.

I valori delle costanti di accoppiamento sono espressi in Hz, dipendono strettamente dalla struttura della molecola in esame e possono essere sia negativi che positivi per motivi che non sottolineiamo in quanto esulano dagli scopi didattici di questo corso, per tanto prenderemo in considerazione solo i valori assoluti.

- **Costanti di accoppiamento geminali, 2J .** La costante di accoppiamento tra protoni separati da due legami (gruppo metilenico) è visibile solo quando i due protoni sono diastereotopici (ciascuno possiede cioè un proprio spostamento chimico) ed è inversamente proporzionale al valore dell'angolo di legame α variando da circa 12-18 Hz per il metilene saturo, con valore di α intorno a 109° , fino a 0-3 Hz per il metilene insaturo, con α di circa 120° (Fig. 9).

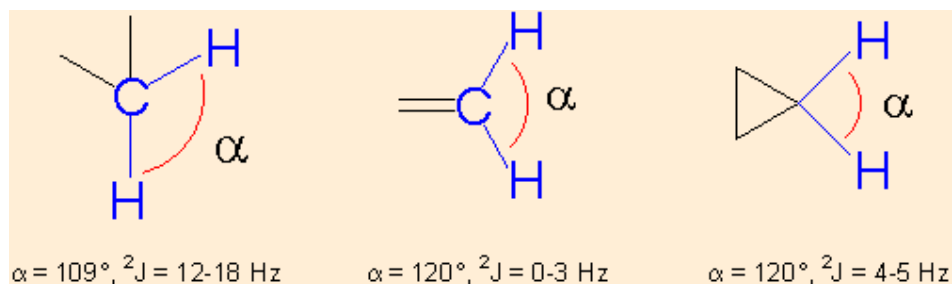


Fig. 9

La presenza di gruppi elettronattrattori provoca una diminuzione del valore della costante di accoppiamento, mentre la presenza di atomi di carbonio a ibridazione sp^2 o sp ha effetto opposto.

- **Costanti di accoppiamento vicinali, 3J .** La costante di accoppiamento tra protoni separati da tre legami dipende da tre fattori principali: il valore dell'angolo diedro Φ , la lunghezza del legame / carbonio – carbonio ed il valore dell'angolo α HCC (Fig. 10)

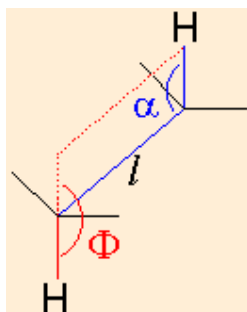
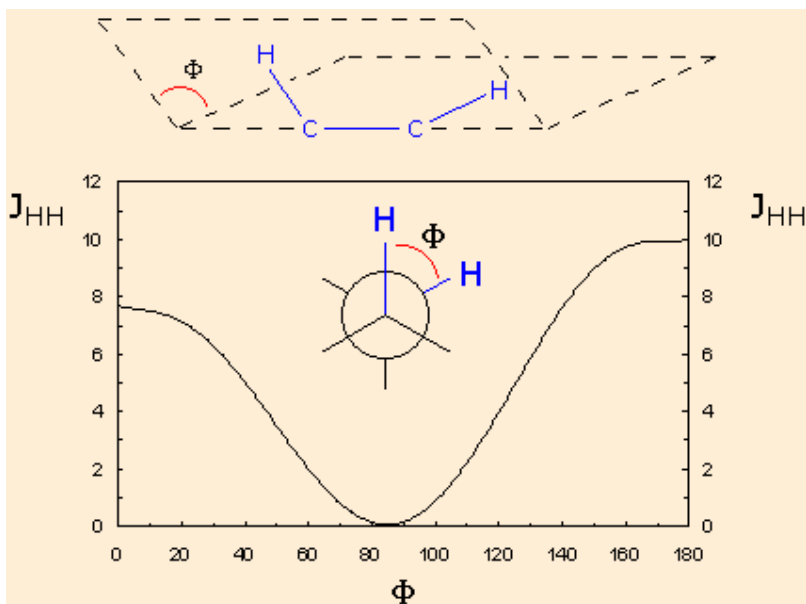


Fig. 10

L'angolo diedro Φ può essere facilmente visualizzato ricorrendo alle proiezioni di Newman e la correlazione del suo valore con il valore della costante di accoppiamento si ricava dall'equazione di Karplus che qui per semplicità viene riportata esclusivamente in forma grafica. L'equazione di Karplus contiene delle approssimazioni e, mentre è molto utile nella valutazione delle J in sistemi ciclici o policiclici, va utilizzata con cautela nel caso di catene lineari. E' importante sottolineare la presenza di J prossime allo zero per valori di Φ di 90° . Nella figura vengono riportati a titolo di esempio i valori reali e quelli calcolati con l'equazione di Karplus delle J del sistema cicloesanoico (Fig. 11).



Una correlazione di Karplus modificata viene utilizzata per la determinazione dell'accoppiamento vicinale negli alcheni. In ogni caso i protoni in *trans*, angolo diedro di 180° , hanno J maggiore dei protoni in *cis*, angolo diedro 0° , con valori reali di 12-18 Hz per la J_{trans} e di 7-10 Hz per la J_{cis} (Fig. 12)

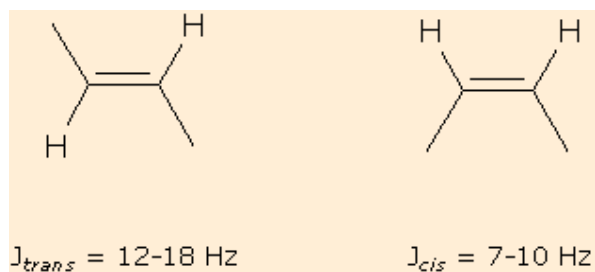


Fig. 12

Le costanti di accoppiamento vicinali infine sono inversamente proporzionali all'angolo α HCC e alla lunghezza del legame C - C (Fig.13).

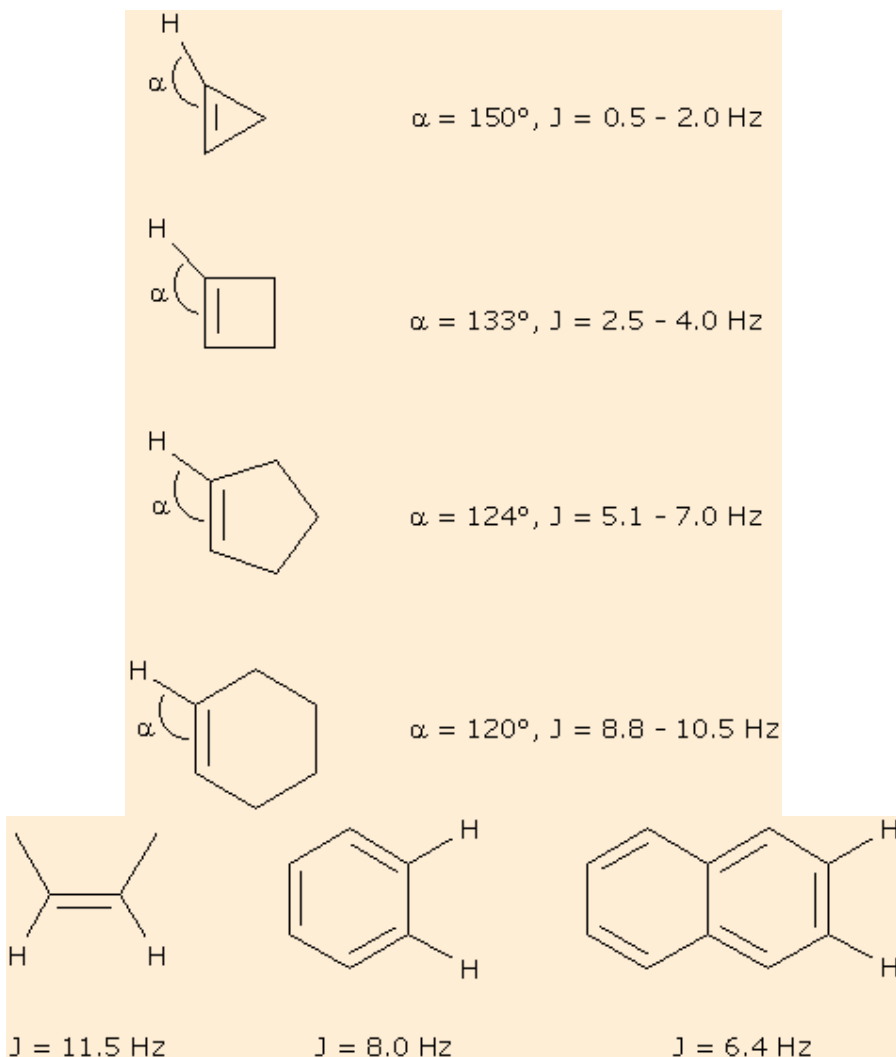


Fig. 13

- **Costanti di accoppiamento lontane (long range).** Costanti di accoppiamento tra protoni distanti 4 o più legami si riscontrano in sistemi particolari quali:

sistemi insaturi: sono misurabili la costante di accoppiamento tra protoni in posizione allilica ($^4J = 0-3$ Hz) e omoallilica ($^5J = 0-2$ Hz) (Fig. 14);

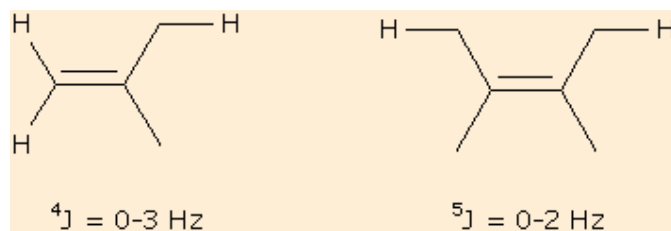


Fig. 14

sistemi aromatici ed eterociclici: nell'anello benzenico è misurabile la costante di accoppiamento tra idrogeni in posizione meta tra loro ($^4J = 1-3$ Hz) mentre di più difficile misurazione è la costante di accoppiamento tra protoni in para tra loro ($^5J = 0-1$ Hz). Nei sistemi eterociclici infine la costante di accoppiamento tra i protoni in posizione 2 e 4 dei sistemi pentaatomici ha un valore di circa 0-2 Hz (4J) (Fig. 15);

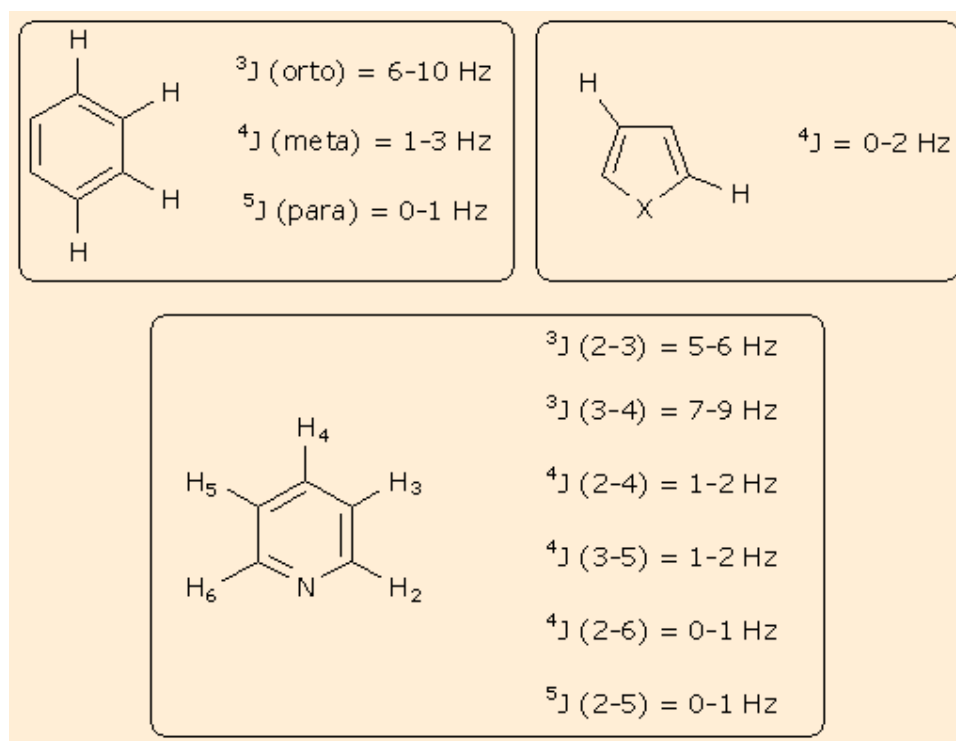


Fig. 15

sistemi saturi biciclici e policiclici: in alcuni sistemi ciclici particolarmente rigidi è osservabile un costante di accoppiamento 4J tra protoni posti alle estremità di un sistema di quattro legami con conformazione a "W". Questa costante di accoppiamento ha valori particolarmente elevati per una long range ($^4J = 7$ Hz) (Fig. 16).

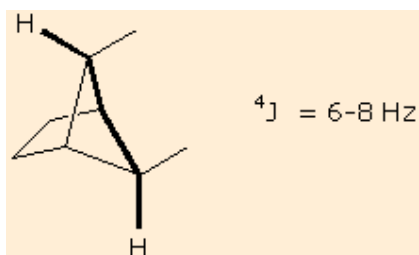
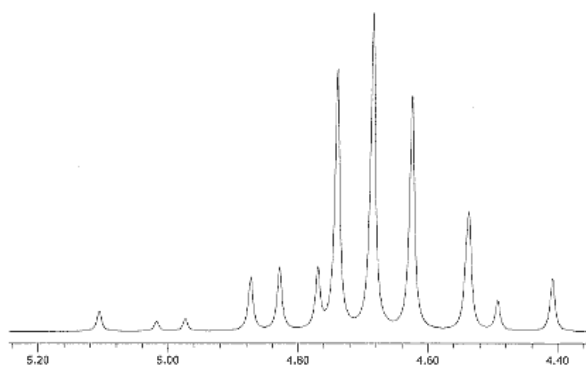
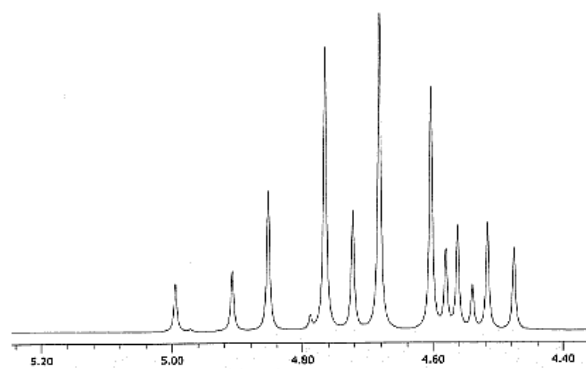


Fig. 16

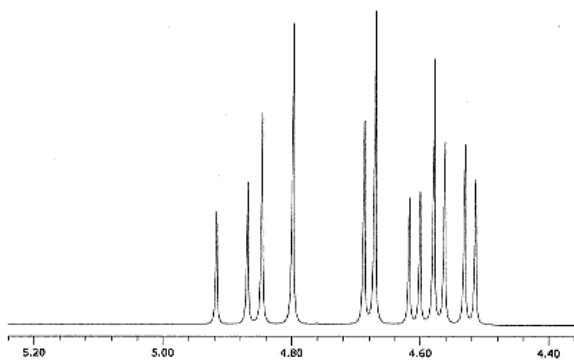
La facile lettura ed identificazione delle costanti di accoppiamento presenti in uno spettro è strettamente correlata allo strumento utilizzato. E' infatti di facile intuizione che mentre lavorando con uno strumento a 60 MHz si hanno a disposizione, nell'usuale scala dei 10 ppm, 600 Hz su cui "disegnare" le linee di un sistema accoppiato, lavorando con uno strumento a 200 MHz si hanno a disposizione ben 2000 Hz e quindi sarà molto più semplice discriminare tra linee distanti anche pochi Hertz. Un esempio può servire a chiarire questo concetto (Fig. 17).



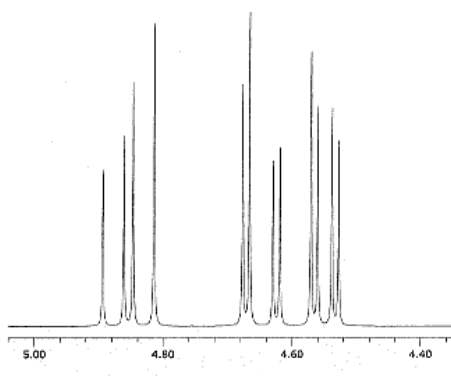
strumento operante a 60 MHz



strumento operante a 90 MHz



strumento operante a 200 MHz



strumento operante a 300 MHz

Fig. 17

Corso di Metodi Fisici in Chimica Organica e Chimica Analitica Per Biotecnologie Farmaceutiche

Modulo di Metodi Fisici in Chimica Organica

Dr. Elisabetta Rossi

Lezione 4

- Classificazione di sistemi di spin e loro descrizione.
- Lettura di spettri protone.

I diversi sistemi di spin (due o più protoni accoppiati tra loro) vengono classificati in sistemi del primo e del secondo ordine a seconda del valore del rapporto tra la differenza di spostamento chimico ($\Delta\nu$) in Hz e la costante di accoppiamento (J):

$\Delta\nu / J > 10 \rightarrow$ sistema debolmente accoppiato \rightarrow I ordine

$\Delta\nu / J < 10 \rightarrow$ sistema fortemente accoppiato \rightarrow II ordine

Anche in questo caso è importante sottolineare la differenza esistente tra spettri registrati su strumenti diversi. Il valore del rapporto infatti tende ad aumentare utilizzando strumenti potenti (aumento del $\Delta\nu$ e J costante).

Classificazione dei sistemi di spin.

- I sistemi di spin debolmente accoppiati (I ordine) vengono classificati utilizzando lettere dell'alfabeto maiuscolo distanti tra loro:

sistema AX, due protoni debolmente accoppiati

sistema AMX, tre protoni debolmente accoppiati.

- I sistemi di spin fortemente accoppiati (II ordine) vengono classificati utilizzando lettere dell'alfabeto maiuscolo in sequenza tra loro:

sistema AB, due protoni fortemente accoppiati

sistema ABC, tre protoni fortemente accoppiati.

- Il numero al piede della lettera indica il numero di protoni equivalenti (stesso intorno chimico e stesso spostamento chimico):

A_2MX , sistema a quattro spin con due protoni equivalenti (A_2) debolmente accoppiati con i protoni M e X.

Gli spettri riportati sono registrati con uno strumento operante a 200 MHz se non diversamente specificato.

SISTEMI DEL I ORDINE

SISTEMA AX

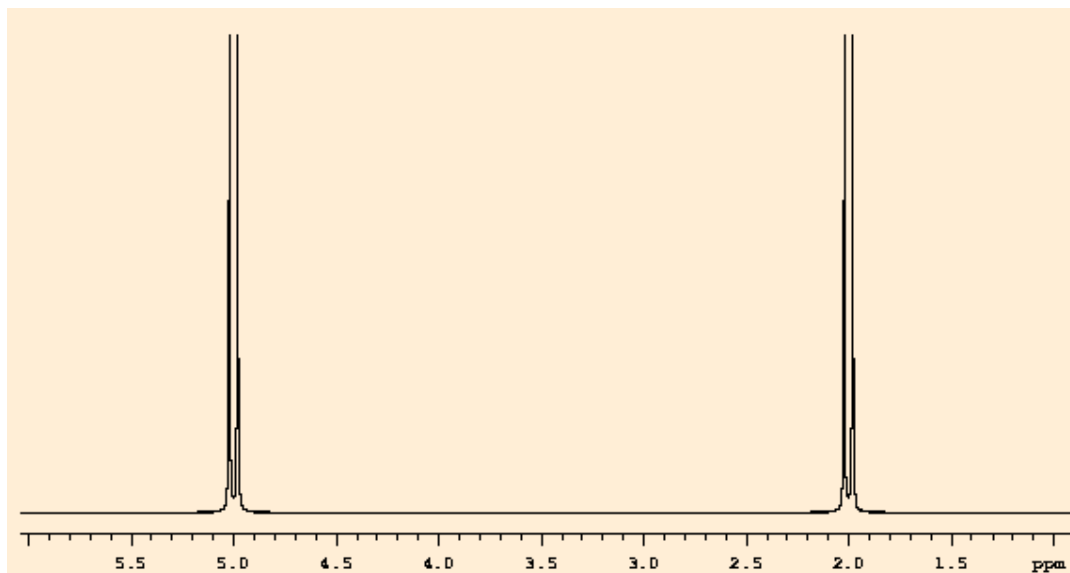


Fig. 1

Il sistema AX è il sistema di spin più semplice ed è formato da due protoni debolmente accoppiati con $\Delta\nu/J > 10$. Il protone A risente dell'influenza degli stati di spin del protone X e viceversa, il sistema quindi sarà formato da due doppietti di uguale intensità. Dall'analisi del sistema è possibile ricavare:

- **δA** : spostamento chimico del protone A che corrisponde al centro del doppietto,
- **δX** : spostamento chimico del protone X che corrisponde al centro del doppietto,
- **$J_{AX} (=J_{XA})$** : costante di accoppiamento AX corrispondente alla distanza in hertz tra le due linee di ciascun doppietto.

SISTEMA AX₂

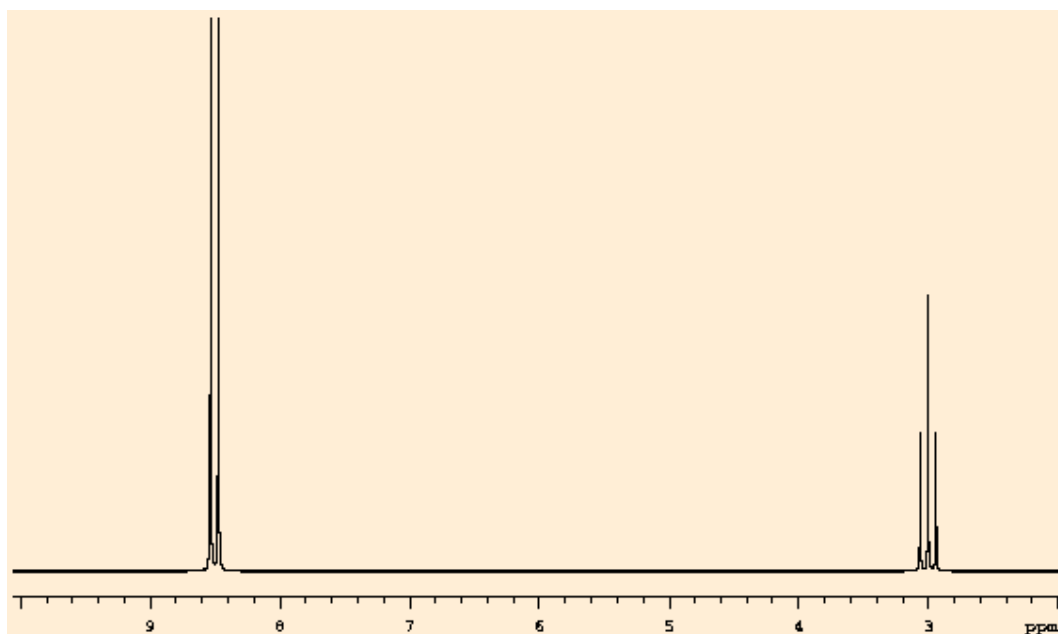


Fig. 2

Il sistema AX₂ è formato da tre protoni: due protoni equivalenti (X) debolmente accoppiati con il protone A. Come discusso nella lezione precedente il protone A risente degli stati di spin dei protoni X dando origine ad un tripletto cioè ad un sistema di tre linee con intensità relative pari a 1:2:1, mentre i protoni X risentono dell'influenza di A dando origine ad un doppietto.

Parametri del sistema:

- **δA** : spostamento chimico del protone A che corrisponde alla linea centrale del tripletto,
- **δX** : spostamento chimico del protone X che corrisponde al centro del doppietto,
- **$JAX (=JXA)$** : costante di accoppiamento AX corrispondente alla distanza in hertz tra la prima e la seconda linea (o tra la seconda e la terza) del tripletto o tra le due linee del doppietto.

SISTEMA A_2X_2

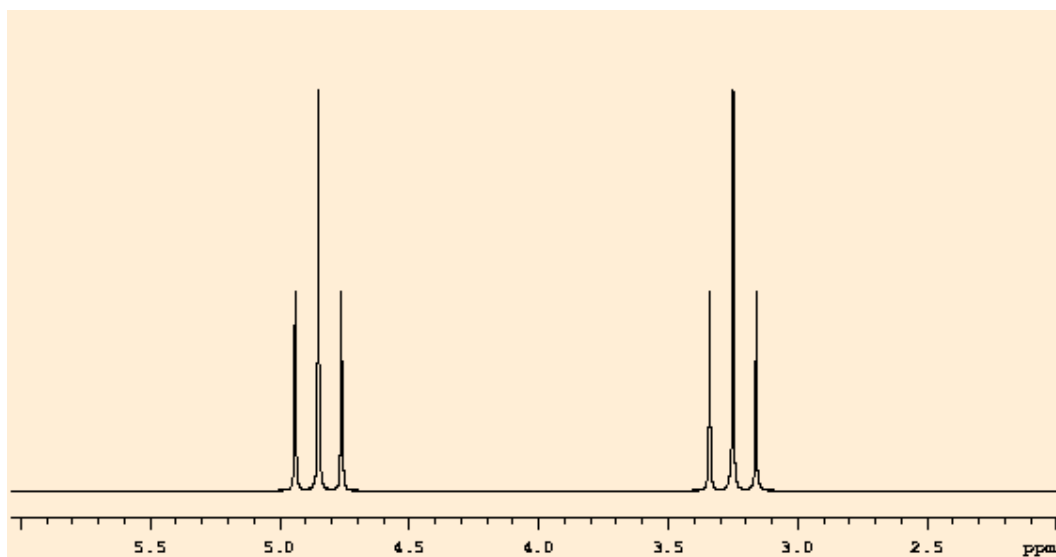


Fig. 3

Il sistema A_2X_2 è formato da quattro protoni: due protoni equivalenti (X) debolmente accoppiati con altri due protoni equivalenti A. I due protoni A risentono degli stati di spin dei protoni X dando origine ad un tripletto cioè ad un sistema di tre linee con intensità relative pari a 1:2:1, i due protoni X risentono dell'influenza dei protoni A dando origine a loro volta ad un tripletto.

Parametri del sistema:

- δA : spostamento chimico del protone A che corrisponde alla linea centrale del tripletto,
- δX : spostamento chimico del protone X che corrisponde alla linea centrale del tripletto,
- $JAX (=JXA)$: costante di accoppiamento AX corrispondente alla distanza in hertz tra la prima e la seconda linea (o tra la seconda e la terza) dei tripletti.

SISTEMA AX₃

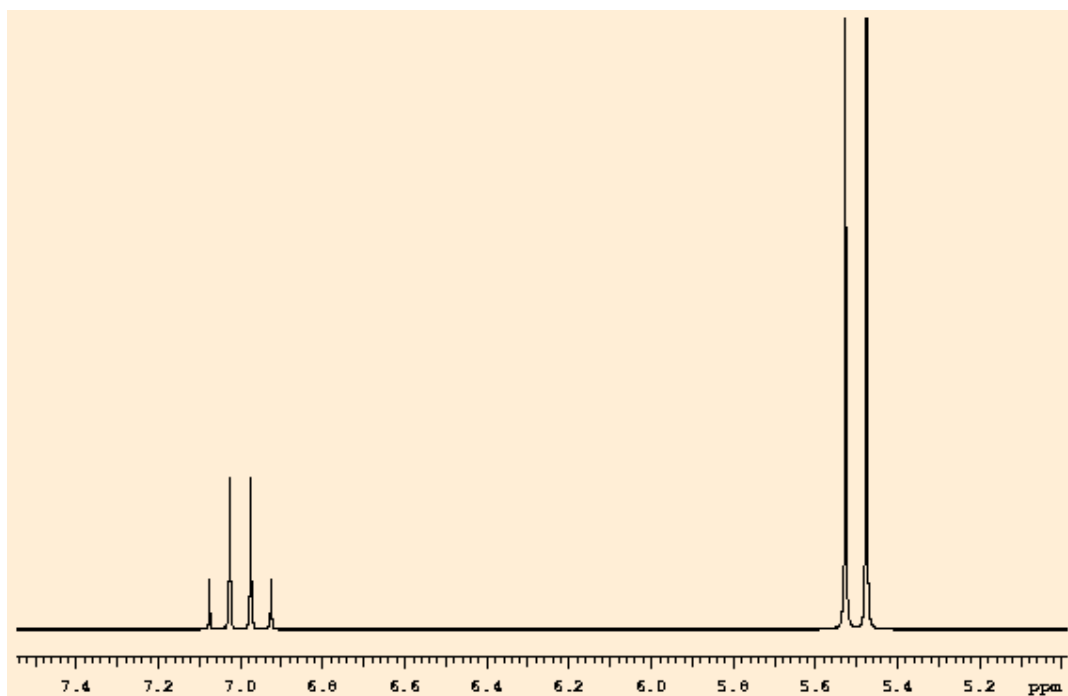


Fig. 4

Il sistema AX₃ è formato da quattro protoni: tre protoni equivalenti (X) debolmente accoppiati con il protone A. Come discusso nella lezione precedente il protone A risente degli stati di spin dei protoni X dando origine ad un quartetto cioè ad un sistema di quattro linee con intensità relative pari a 1:2:2:1, mentre i protoni X risentono dell'influenza di A dando origine ad un doppietto.

Parametri del sistema:

- **δA**: spostamento chimico del protone A che corrisponde al centro del quartetto,
- **δX**: spostamento chimico del protone X che corrisponde al centro del doppietto,
- **JAX (=JXA)**: costante di accoppiamento AX corrispondente alla distanza in hertz tra la prima e la seconda linea (o tra la seconda e la terza o tra la terza e la quarta) del quartetto o tra le due linee del doppietto.

SISTEMA AX₆

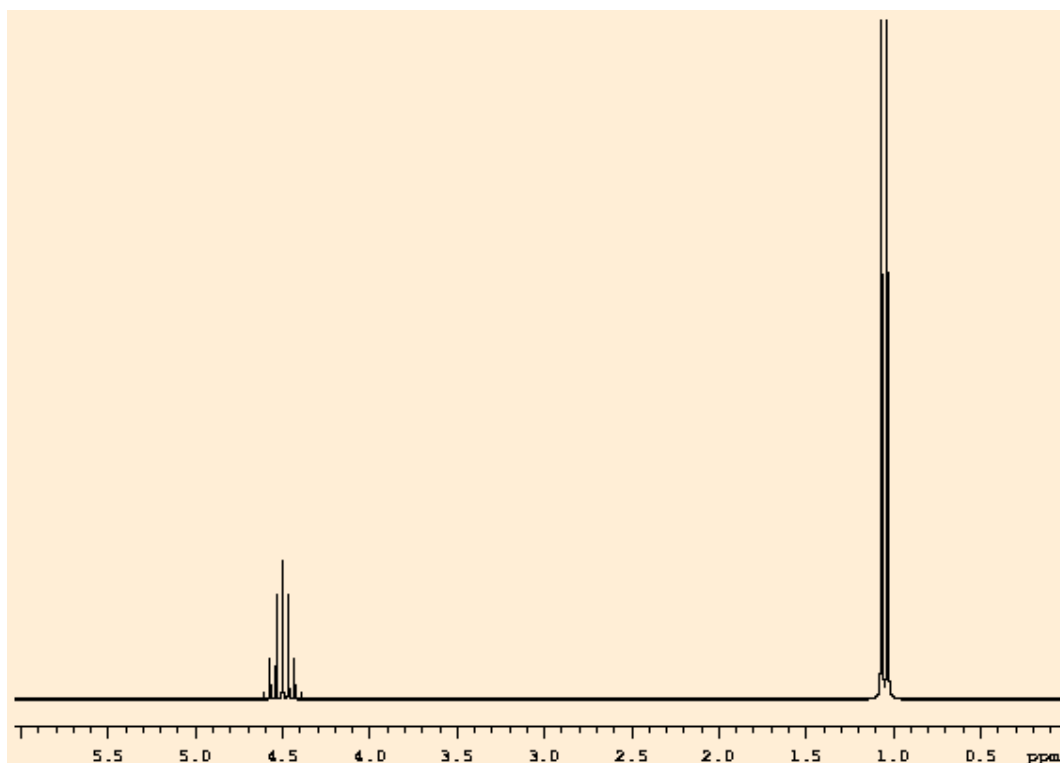


Fig. 5

Il sistema AX₆ è formato da sette protoni: sei protoni equivalenti (X) debolmente accoppiati con il protone A. Come discusso nella lezione precedente il protone A risente degli stati di spin dei protoni X dando origine ad un settetto cioè ad un sistema di sette linee con intensità relative pari a 1:6:15:20:15:6:1, mentre i protoni X risentono dell'influenza di A dando origine ad un doppietto.

Parametri del sistema:

- **δA**: spostamento chimico del protone A che corrisponde alla linea centrale del settetto,
- **δX**: spostamento chimico del protone X che corrisponde al centro del doppietto,
- **JAX (=JXA)**: costante di accoppiamento AX corrispondente alla distanza in hertz tra la prima e la seconda linea (o tra la seconda e la terza.....) del tripletto o tra le due linee del doppietto.

SISTEMA AMX

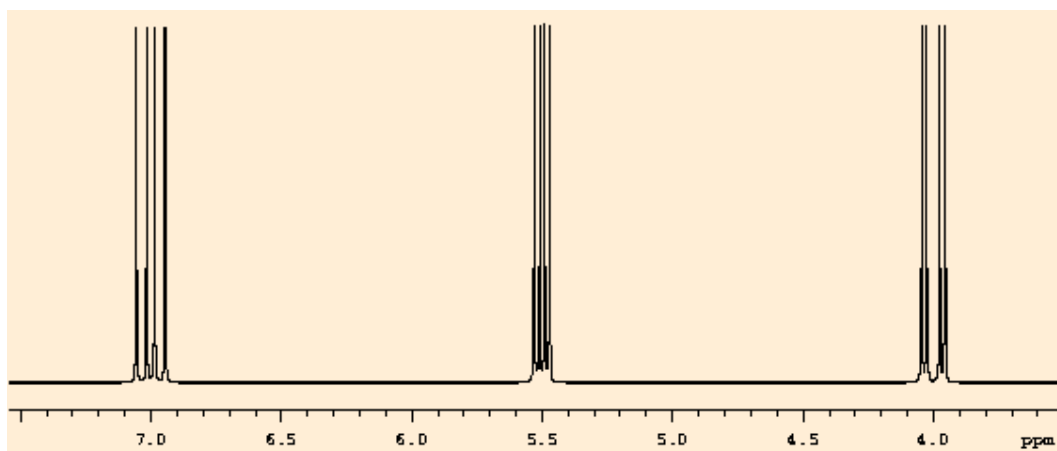


Fig. 6

Il sistema AMX è il più semplice tra i sistemi di spin formati da tre protoni magneticamente non equivalenti e debolmente accoppiati tra loro. Come discusso nella lezione precedente ogni protone risente degli stati di spin dei protoni accoppiati dando origine ad un doppio doppietto cioè ad un sistema di quattro linee. Il protone A ad esempio accoppierà con M con JAM dando origine ad un doppietto le cui linee verranno a loro volta sdoppiate dall'accoppiamento con X (JAX).

Parametri del sistema:

- δA : spostamento chimico del protone A che corrisponde al centro del quartetto,
- δM : spostamento chimico del protone M che corrisponde al centro del quartetto,
- δX : spostamento chimico del protone X che corrisponde al centro del quartetto,
- **J**: il sistema comprende tre costanti di accoppiamento: $JAM = JMA$, $JAX = JXA$ e $JMX = JXM$. Il valore delle tre costanti di accoppiamento si ricava facilmente ricordando che ogni segnale è costituito da una coppia di doppietti e contiene pertanto due costanti di accoppiamento. Consideriamo il segnale più a sinistra (A) dove è possibile misurare due costanti: la prima corrisponde alla distanza tra la prima e la seconda linea (oppure tra la terza e la quarta) (8 Hz), la seconda corrisponde alla distanza tra la prima e la terza riga (oppure tra la seconda e la quarta) (14 Hz). Effettuando le stesse misurazioni anche per i segnali relativi a M e X troveremo in M i valori di 4 Hz e 8 Hz e in X i valori di 4 Hz e 14 Hz. Tenendo conto della costanza delle interazioni tra spin il sistema AMX potrà essere quindi così descritto:

$JAM = JMA = 8 \text{ Hz}$ perché questo valore si trova in A e M;

$JAX = JXA = 14 \text{ Hz}$ perché questo valore si trova in A e X;

$JMX = JXM = 4 \text{ Hz}$ perché questo valore si trova in M e X.

SISTEMA AMX₂

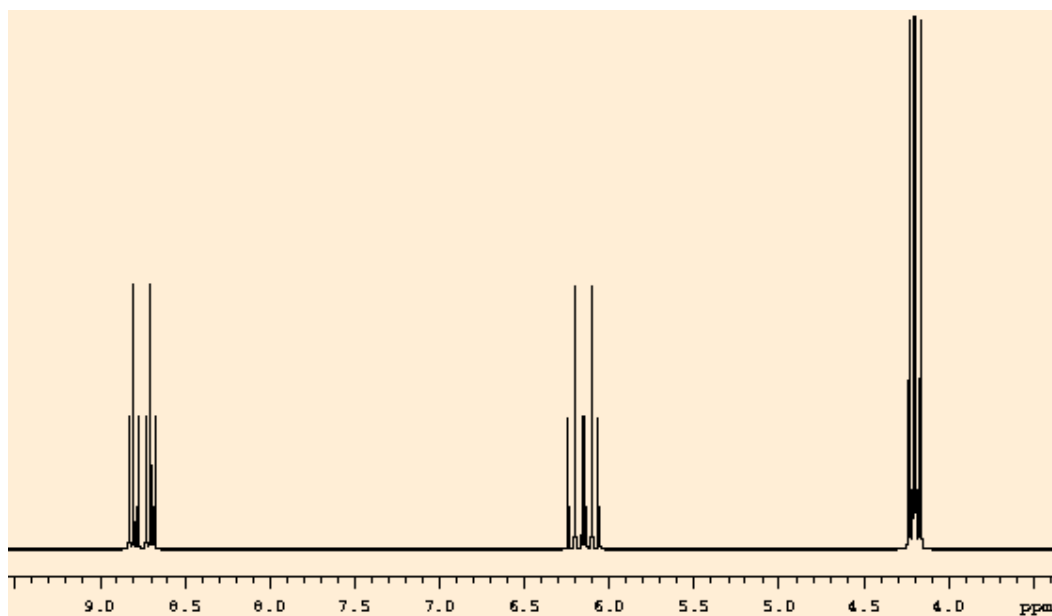


Fig. 7

Il sistema AMX₂ è formato da quattro protoni, due di questi sono equivalenti mentre gli altri non lo sono né tra loro né con X. Come discusso nella lezione precedente ogni protone risente degli stati di spin dei protoni accoppiati dando origine a due doppi tripletti (A e M) cioè ad un sistema di sei linee e ad un doppio doppietto cioè ad un sistema di quattro linee. Il protone A ad esempio accoppierà con M con JAM dando origine ad un doppietto, ogni linea del doppietto darà origine a sua volta ad un tripletto per l'accoppiamento con i due protoni X (JAX). La stessa molteplicità di segnale, se pur con costanti diverse, sarà osservata per il protone M, mentre X accoppierà con M con JXM dando origine ad un doppietto le cui linee verranno a loro volta sdoppiate dall'accoppiamento con A (JXA).

Parametri del sistema:

- **δA**: spostamento chimico del protone A che corrisponde al centro del doppio tripletto,
- **δM**: spostamento chimico del protone M che corrisponde al centro del doppio tripletto,
- **δX**: spostamento chimico del protone X che corrisponde al centro del quartetto,
- **J**: il sistema comprende tre costanti di accoppiamento: JAM = JMA, JAX = JXA e JMX = JXM. Il valore delle tre costanti di accoppiamento si ricava facilmente ricordando che ogni segnale contiene due costanti di accoppiamento. Consideriamo il segnale più a sinistra (A) dove è possibile misurare due costanti: la prima corrisponde alla distanza tra la prima e la seconda linea (oppure tra la seconda e la terza) del tripletto (3 Hz), la seconda corrisponde alla distanza tra due linee equivalenti dei due tripletti (per comodità di lettura solitamente si utilizza la linea centrale) (20 Hz). E' chiaro che il valore di 3 Hz misurato nel tripletto corrisponde alla JAX mentre il valore di 20 Hz corrisponde alla JAM. Effettuando le stesse misurazioni anche per il segnale relativo a M si ricavano JMX = 8 Hz e JMA = 20 Hz. Infine analizzando come al solito il doppio doppietto relativo ad X si ricavano JXA (3Hz) e JXM (8 Hz). Tenendo conto della costanza delle interazioni tra spin il sistema AMX₂ potrà essere quindi così descritto:
JAM = JMA = 20 Hz perché questo valore si trova in A e M;
JAX = JXA = 3 Hz perché questo valore si trova in A e X;
JMX = JXM = 8 Hz perché questo valore si trova in M e X.

LO SPETTRO DELLA *TRANS* CROTONALDEIDE

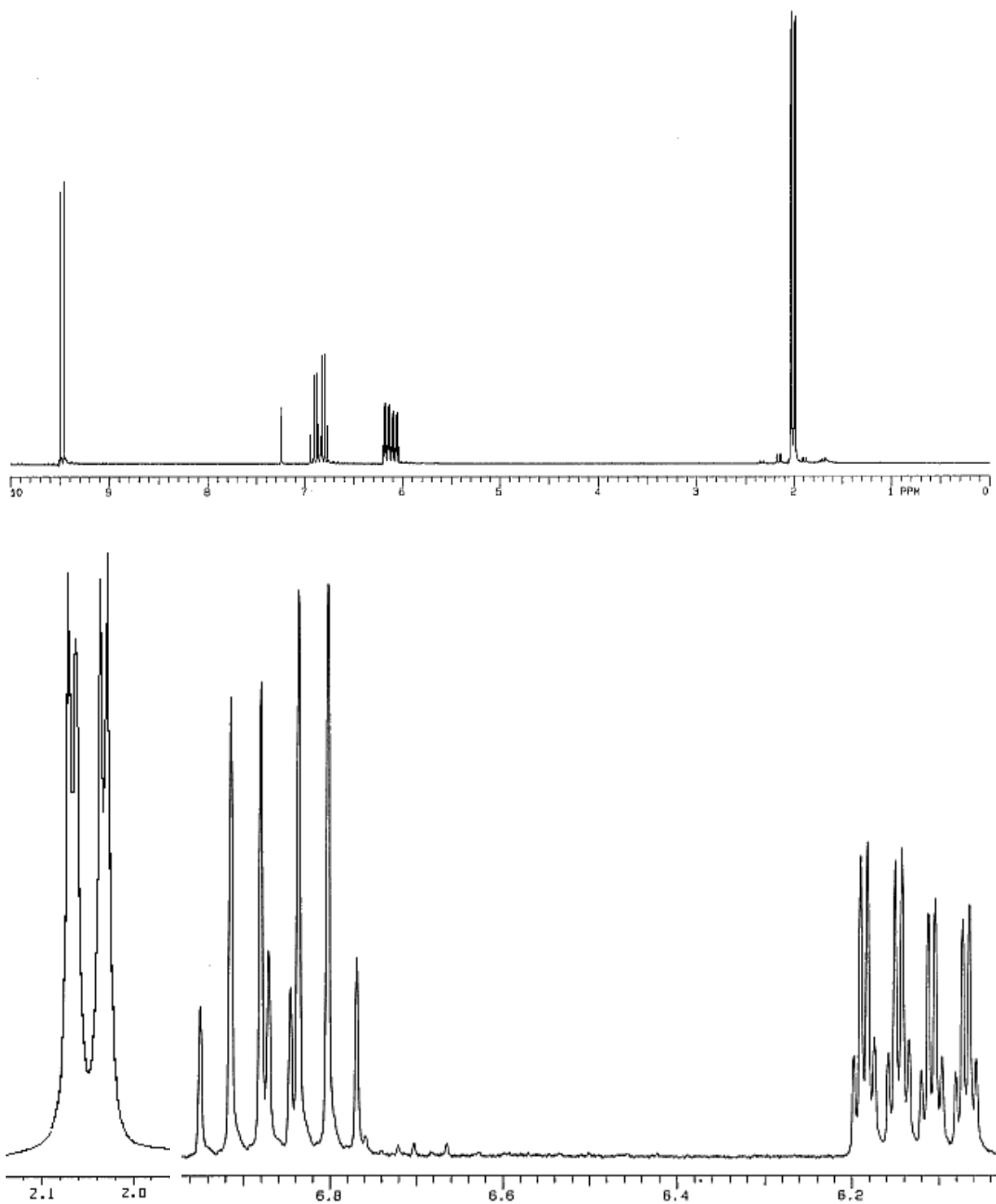


Fig. 8: **Spettro della *trans* crotonaldeide.**

Un classico esempio di spettro del primo ordine è quello della *trans* crotonaldeide riportato in figura 8. Nello spettro è possibile osservare quattro sistemi di linee a molteplicità ben definita soprattutto se si analizzano i segnali espansi. Le attribuzioni dei segnali in base agli spostamenti chimici e all'area dei segnali sono abbastanza semplici:

- 9.5 ppm, un idrogeno, H₁,

- 6.88 ppm, un idrogeno, H_3 ,
- 6.14 ppm, un idrogeno, H_2 ,
- 2.02 ppm, tre idrogeni, H_4 .
-

L'analisi della molteplicità dei segnali in questo caso è più impegnativa e richiede particolare attenzione. L'idrogeno aldeidico H_1 è un doppietto con costante di accoppiamento vicinale con H_2 (8 Hz), anche il segnale relativo ai tre idrogeni metilici è di semplice interpretazione trattandosi di un doppio doppietto con J di 7 Hz (J_{4-3} , J vicinale) e 2 Hz (J_{4-2} , J allilica). I segnali più complessi si riferiscono ad H_2 e H_3 . Il segnale relativo ad H_3 si presenta come un doppio quartetto, il segnale di H_3 infatti diventa un doppietto per la presenza di una costante vicinale di tipo trans con H_2 ($J_{3-2} = 16$ Hz, J trans), ed ogni linea del doppietto viene poi modificata in quartetto per la presenza di una costante di accoppiamento vicinale con i tre idrogeni metilici equivalenti H_4 ($J_{3-4} = 7$ Hz, J vicinale). Ancora più complessa è la struttura del segnale di H_2 che si presenta come una doppia coppia di quartetti: il segnale di H_2 infatti viene inizialmente trasformato in un doppietto dall'accoppiamento con H_4 ($J_{2-3} = 16$ Hz, J trans) e successivamente in un doppio doppietto per l'accoppiamento con H_1 ($J_{2-1} = 8$ Hz, J vicinale). Infine ciascuna linea viene modificata in quartetto per la presenza di una costante allilica con i tre idrogeni metilici equivalenti H_4 ($J_{2-4} = 2$ Hz, J allilica).

E' importante esercitarsi su questo e sugli spettri raccolti nella sezione esercizi al fine di esercitarsi nel calcolo delle J, nella lettura degli integrali e nell'attribuzione dei segnali effettuata anche con il supporto delle tabelle.

SISTEMI DEL II ORDINE

Quando $\Delta\nu / J < 10$ la morfologia del sistema subisce delle modificazioni e in alcuni casi il sistema non è più riconoscibile ed interpretabile con facilità. E' importante ricordare che i sistemi di spin possono essere debolmente o fortemente accoppiati in funzione dello strumento utilizzato per l'esperimento. I sistemi si semplificano cioè utilizzando strumenti operanti ad alte frequenze in cui il $\Delta\nu$ è maggiore e di conseguenza è maggiore il rapporto $\Delta\nu / J$. Si ricordi che J è una costante indipendente dallo strumento utilizzato per l'analisi!

SISTEMA AB

Il sistema AB è solitamente analizzabile qualunque sia il rapporto $\Delta\nu / J$. In figura 9 sono riportate le variazioni subite dal sistema di linee passando da un sistema AX a un sistema AB.

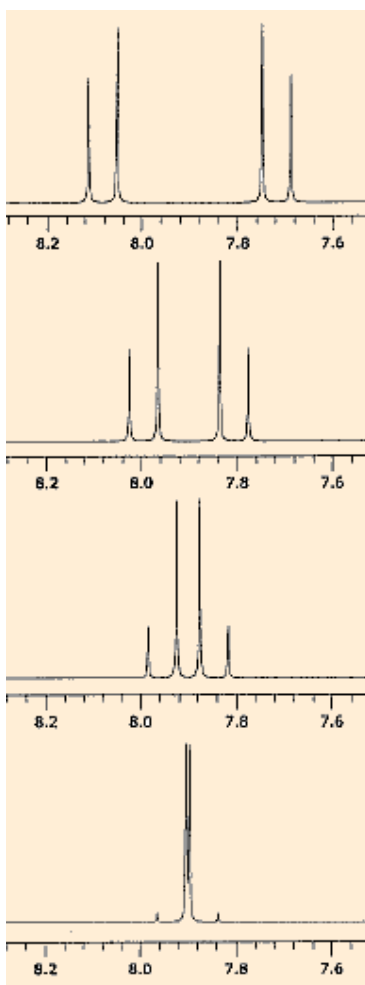


Figura 9

Nelle figure seguenti vengono invece analizzate le variazioni subite dagli altri sistemi del primo ordine analizzati nella sezione precedente. Per il sistema AMX vengono riportate le variazioni da AMX ad ABX e da AMX ad ABC.

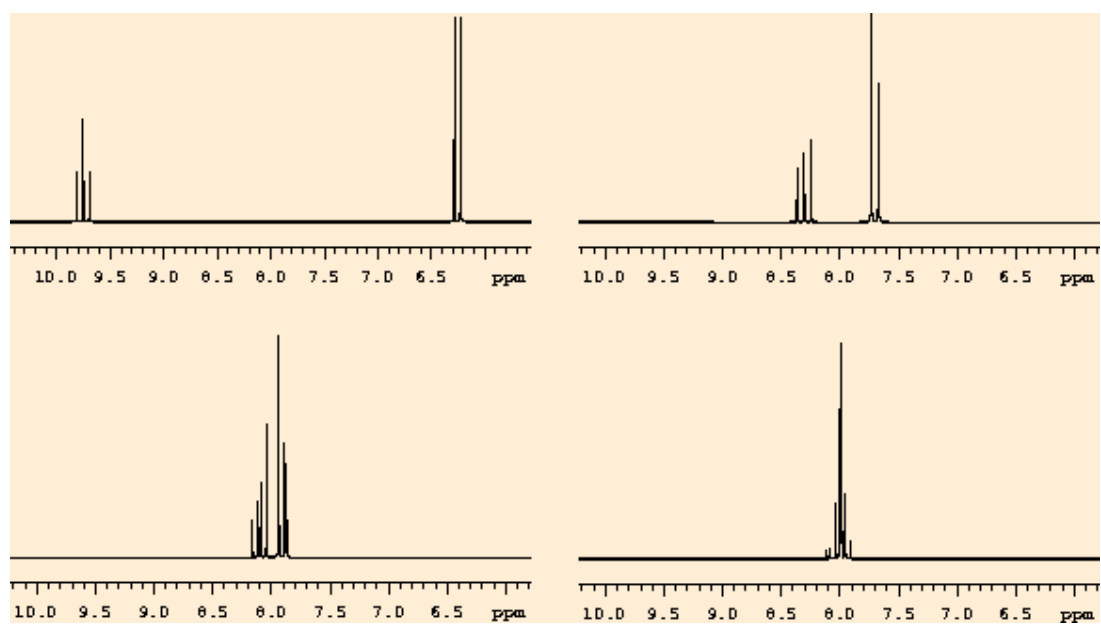


Fig. 10: da AX_2 ad AB_2

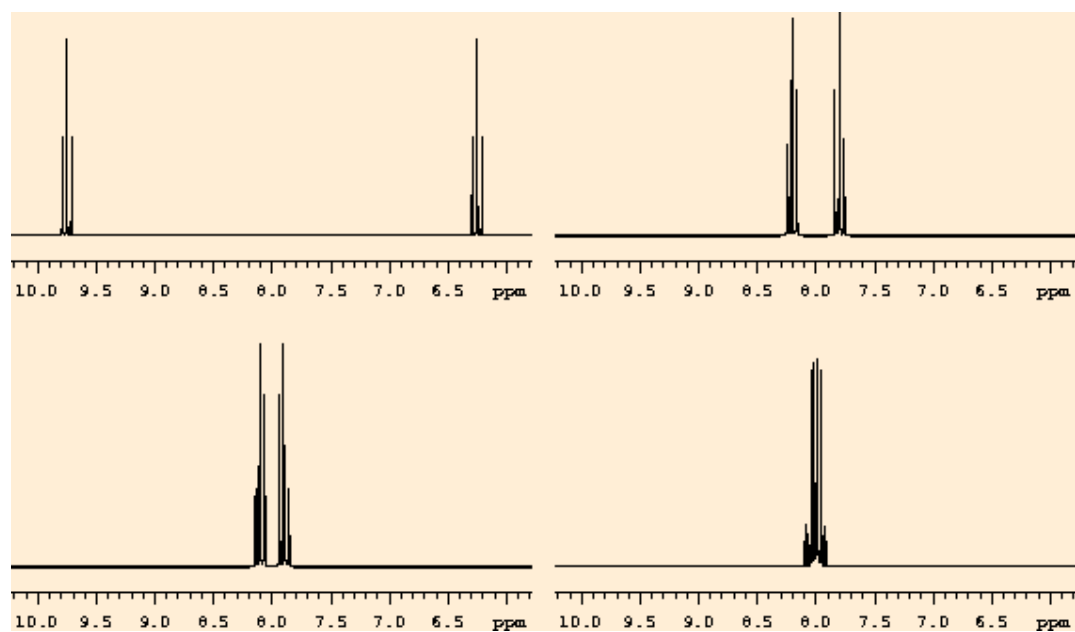


Fig. 11: da A_2X_2 ad A_2B_2

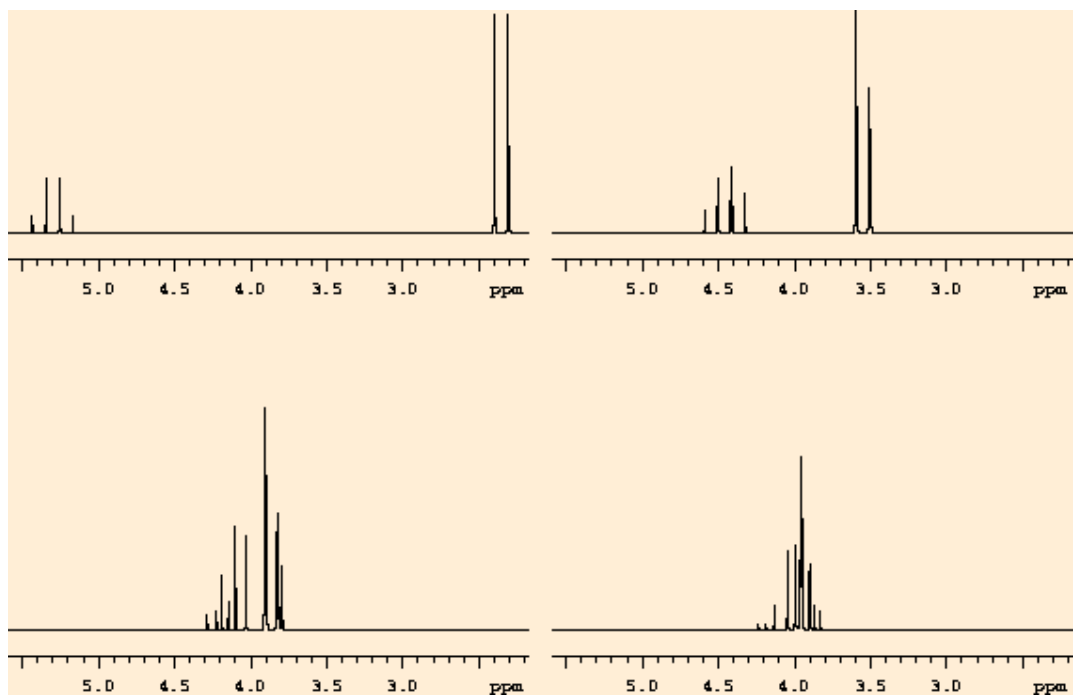


Fig. 12: **da** AX_3 **ad** AB_3

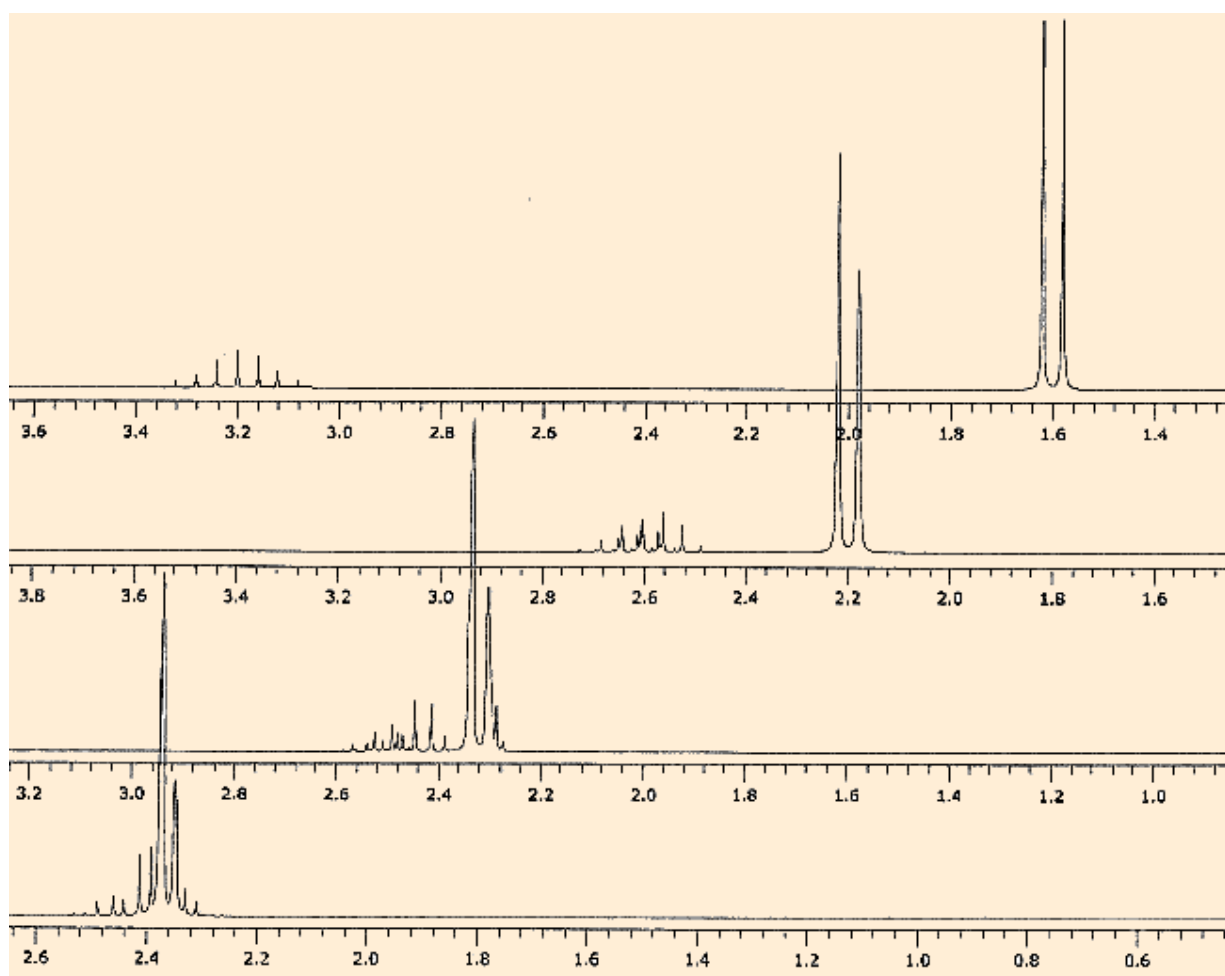


Fig. 13: **da AX6 ad AB6**

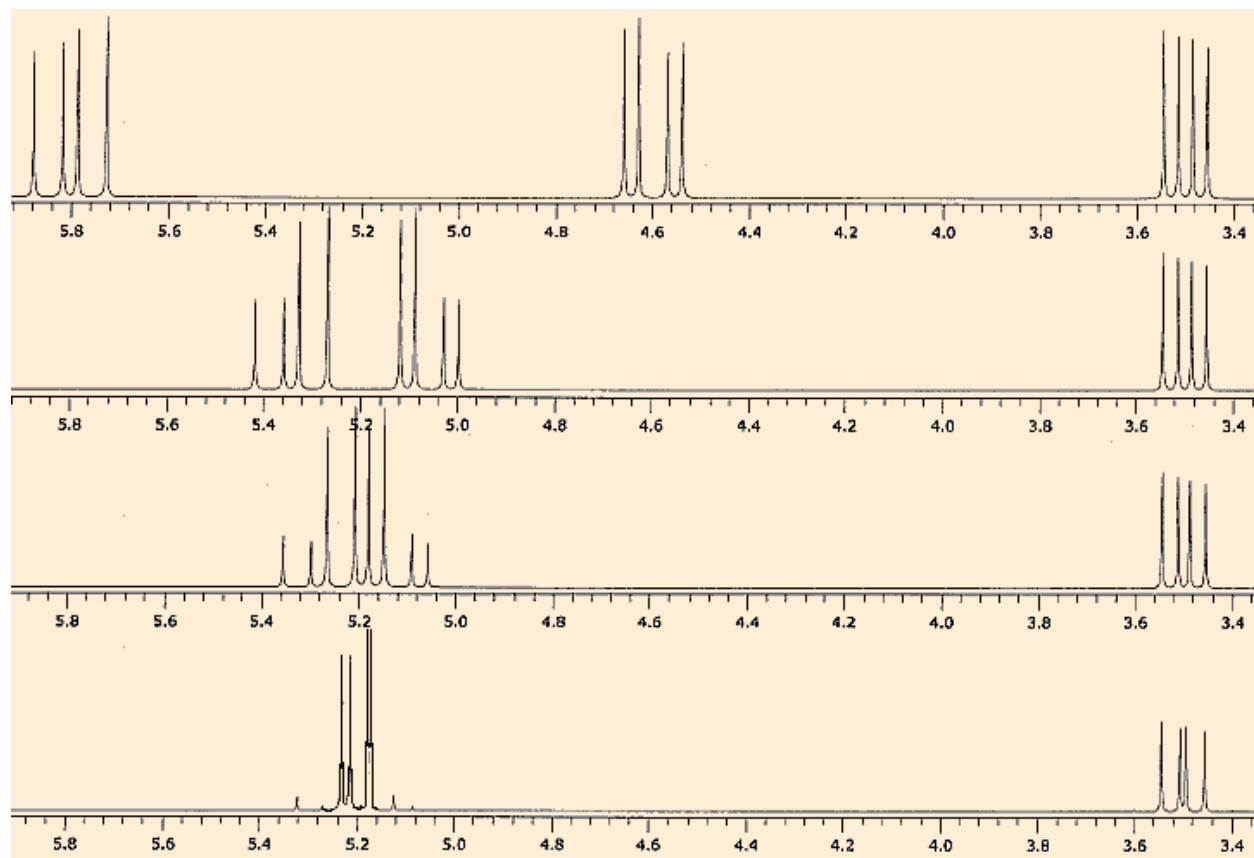


Fig. 14: da **AMX a ABX**

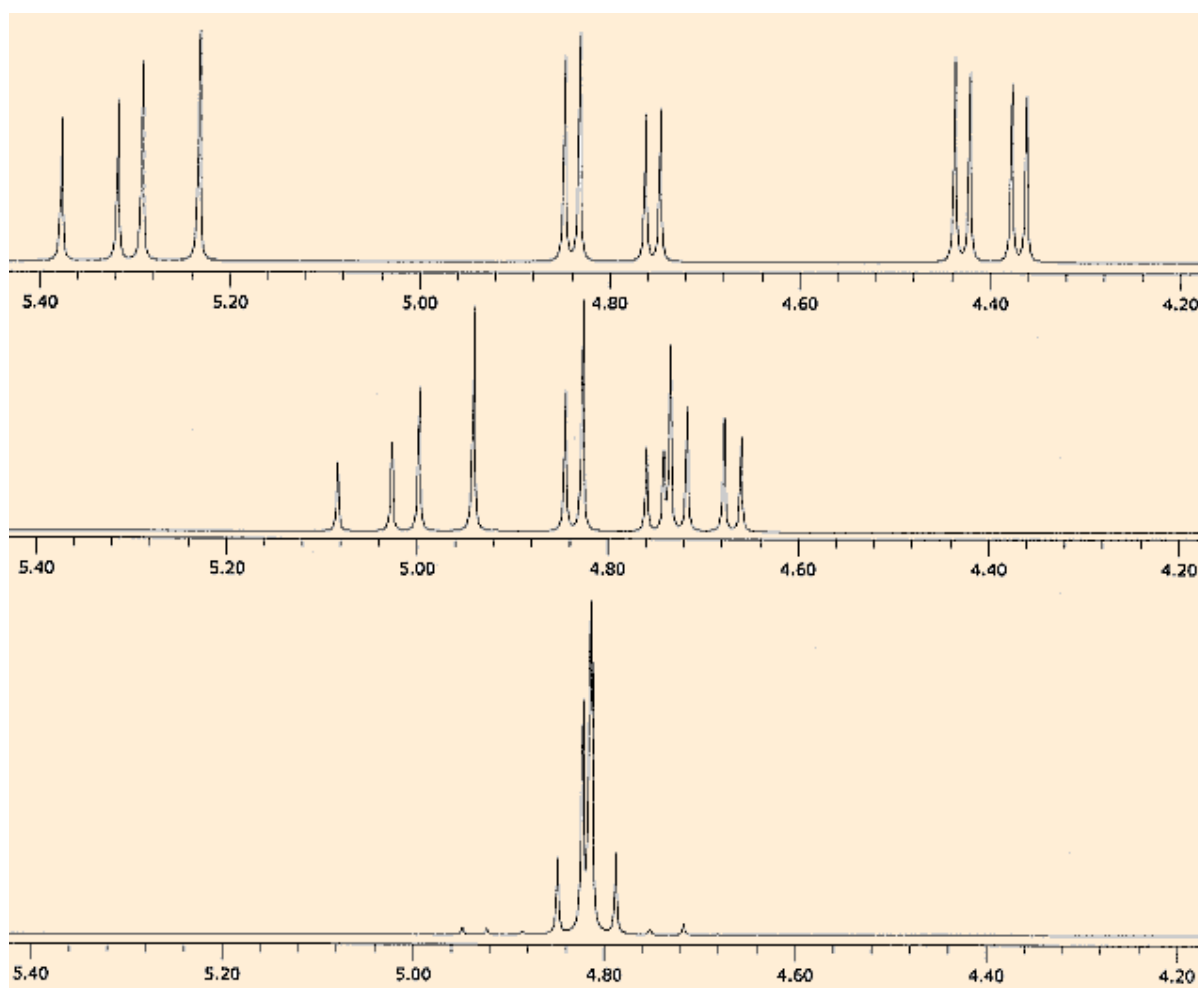


Fig. 15: **da AMX a ABc**

Corso di Metodi Fisici in Chimica Organica e Chimica Analitica Per Biotecnologie Farmaceutiche

Modulo di Metodi Fisici in Chimica Organica

Dr. Elisabetta Rossi

Lezione 5

- Schema di uno spettrometro NMR a trasformata di Fourier.
- Parametri di acquisizione di uno spettro protone.

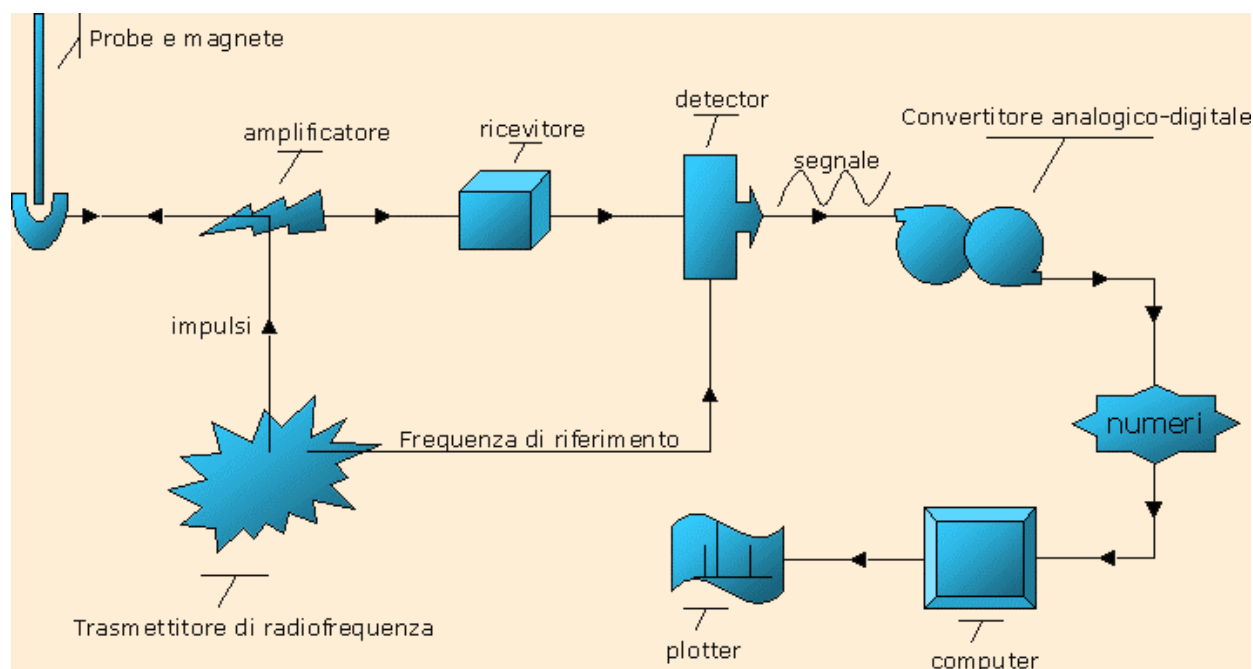


Fig. 1

Sulla base della discussione teorica riportata nella lezione 1, lo schema di uno spettrometro di risonanza magnetica nucleare comprende un trasmettitore di radiofrequenza in grado di inviare il segnale, attraverso un amplificatore, al probe in cui è inserita la provetta contenente il campione da analizzare sciolto in un opportuno solvente e che a sua volta si trova al centro del magnete utilizzato per l'esperimento. Il segnale in uscita dal probe, costituito anch'esso da una radiofrequenza, viene inviato ad un ricevitore e ad un detector a cui contemporaneamente viene inviato il segnale emesso dal trasmettitore. La funzione del detector è quella di sottrarre la frequenza operativa dalla frequenza ottenuta in modo da lavorare con numeri più piccoli. Un esempio pratico può servire a chiarire la funzione del detector. Consideriamo il caso di uno strumento operante a 200 MHz; per quanto discusso nella parte generale i segnali relativi ai diversi protoni presenti risuonano nella regione dei 200 MHz o 200.000.000 Hz in un range di frequenze comprese in circa 2400 Hz, tra 0 e 12 ppm, ed nulla vieta in principio di elaborare numeri dell'ordine delle centinaia di milioni anche se probabilmente lavorare solo nel range di frequenze di interesse rende l'esperimento di più facile attuazione. Questo può essere realizzato sottraendo dalle frequenze in uscita dal ricevitore la stessa frequenza trasmessa al probe ottenendo così solo le frequenze relative agli spostamenti chimici di interesse (0-2400 Hz). A questo punto dell'esperimento abbiamo ottenuto il segnale o i segnali che compongono

il FID. Dobbiamo ora trasformare il segnale da analogico (segnale elettrico) a digitale cioè in numeri che possano poi essere analizzati da un computer che effettuerà la trasformata di Fourier fornendo così lo spettro intensità/frequenza che abbiamo imparato a leggere. La trasformazione dei dati da analogici a digitali avviene a livello dell'ADC (analog to digital converter).

Per descrivere una delle frequenze contenute nel FID è necessario decidere con quale intervallo si vuole campionare il segnale e per quanto tempo si vuole farlo. E' evidente che quanto più tempo spendiamo nell'osservazione del segnale migliore sarà la descrizione che sapremo darne e in termini NMR migliore sarà la risoluzione delle linee nello spettro finale. Il tempo dedicato alla campionatura del segnale viene definito acquisition time A_t ed è inversamente proporzionale alla risoluzione che si vuole ottenere cioè alla differenza in Hz tra due segnali che si vuole leggere nello spettro finale. In pratica se voglio discriminare due linee distanti tra loro 0.4 Hz ($\Delta\nu$) dovrò utilizzare un tempo di acquisizione pari a $1 / \Delta\nu$, $1 / 0.4$ secondi cioè 2.5 secondi. Se la risoluzione desiderata è inferiore, ad esempio 20 Hz, il tempo di acquisizione sarà di 0.05 secondi:

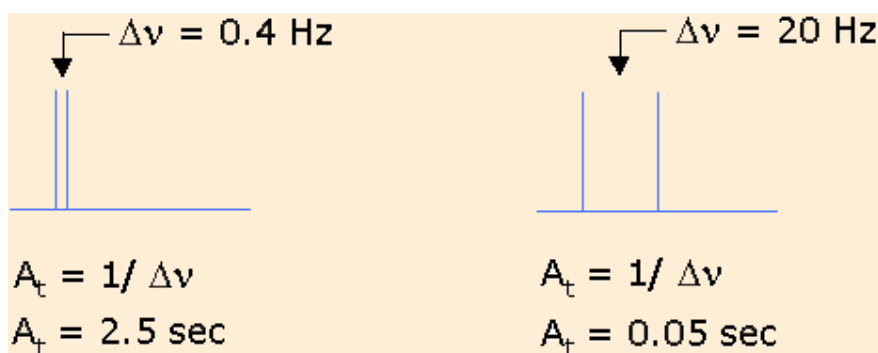


Fig. 2

Normalmente per l'acquisizione di uno spettro protone A_t è pari a 2-3 secondi che corrisponde ad una buona risoluzione ed è anche il tempo di decadimento totale del segnale, in pratica si osserva l'intero FID dalla sua parte ad ampiezza maggiore fino alla coda in cui il segnale è ormai nullo.

Mentre la durata della campionatura dipende dalla minima differenza di frequenza che si vuole osservare la velocità di campionatura, cioè ogni quanto tempo prendere un punto di campionatura sulla curva, dipende dalla massima frequenza che si vuole osservare. Per descrivere un ciclo di una radiofrequenza è necessario prendere almeno due punti, se la maggiore frequenza che si vuole osservare è, nel caso di uno strumento operante a 200 MHz, 2400 Hz (da 0 a 12 ppm) la velocità di campionatura sarà $1 / 2 \times \text{SW}$ dove SW è l'ampiezza spettrale e quindi $1 / 2 \times 2400 = 0.208 \text{ msec}$.

In figura è riportata una porzione di FID che contiene due frequenze da campionare F e F_1 con $F > F_1$. Gli intervalli di campionatura sono rappresentati dalle linee verticali mentre i punti di campionatura corrispondono all'intersezione tra le linee verticali e la frequenza da campionare.

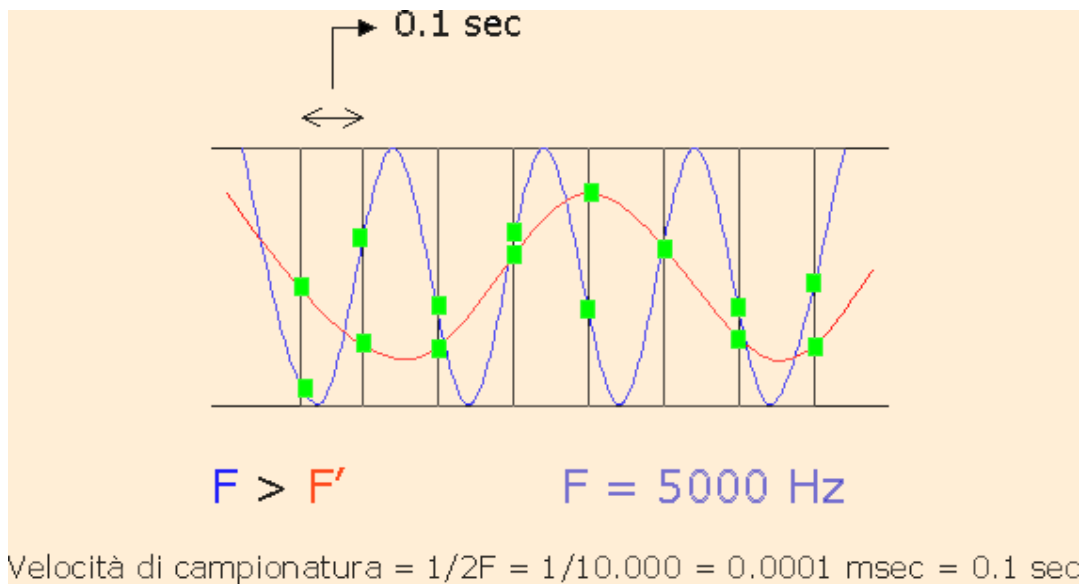


Fig. 3

In pratica, supponiamo di lavorare con uno strumento operante a 300 Mhz e di volere per lo spettro finale una risoluzione di 0.2 Hz. Questo significa che il tempo di acquisizione sia di 5 secondi. In base alle considerazioni fatte inoltre la velocità di campionatura sarà per una ampiezza spettrale di 3600 Hz (da 0 a 12 ppm) pari a 0.55 msecondi. Campionare ogni 0.55 msecondi per 5 secondi significa generare circa 10.000 data points da passare al computer per la trasformata finale. Questi valori sono perfettamente compatibili con la potenza degli elaboratori oggi disponibili. E' sempre opportuno comunque valutare con attenzione i dati di acquisizione impostati per un esperimento.

Frequenza operativa 300 MHz

Risoluzione desiderata = $\Delta\nu = 0.2 \text{ Hz}$

Tempo di acquisizione = $A_t = 5 \text{ sec}$

Velocità di camp. = $1/2 \times \text{SW} = 0.55 \text{ msec}$

Data point = $5\text{sec}/0.55 \text{ msec} = 10.000 \text{ circa}$

Lezione 6

- Disaccoppiamento di spin

Oltre all'esperimento fondamentale discusso fino ad ora esistono diversi esperimenti in cui modificando le condizioni di acquisizione dello spettro protone è possibile ottenere informazioni supplementari sul composto in esame o facilitare la lettura di spettri complessi.

Una delle tecniche più semplici è quella della doppia risonanza. Prendiamo come esempio uno spettro semplice come quello di un sistema AMX costituito da tre segnali di intensità uguale con molteplicità di doppio doppietto. Il sistema, riportato nella parte superiore della figura 1, corrisponde ai seguenti parametri:

$\delta A = 7.47 \text{ ppm}$	$J_{AM} = 17 \text{ Hz}$
$\delta M = 6.30 \text{ ppm}$	$J_{AX} = 6 \text{ Hz}$
$\delta X = 5.45 \text{ ppm}$	$J_{MX} = 12 \text{ Hz}$

Supponiamo ora di applicare, oltre all'impulso di radiofrequenza in grado di mandare in risonanza l'intero sistema, un impulso addizionale la cui frequenza corrisponda esattamente alla frequenza di risonanza di A (5.45 ppm = 1090 Hz). In queste condizioni lo stato di spin (l'orientamento) di A varierà continuamente e rapidamente ed i nuclei X ed M non saranno più in grado di distinguere i due stati di spin di A. La conseguenza pratica di questo fenomeno sarà la perdita dell'accoppiamento di M e X con A. Lo spettro **disaccoppiato** avrà l'aspetto riportato nella parte inferiore della figura 1.

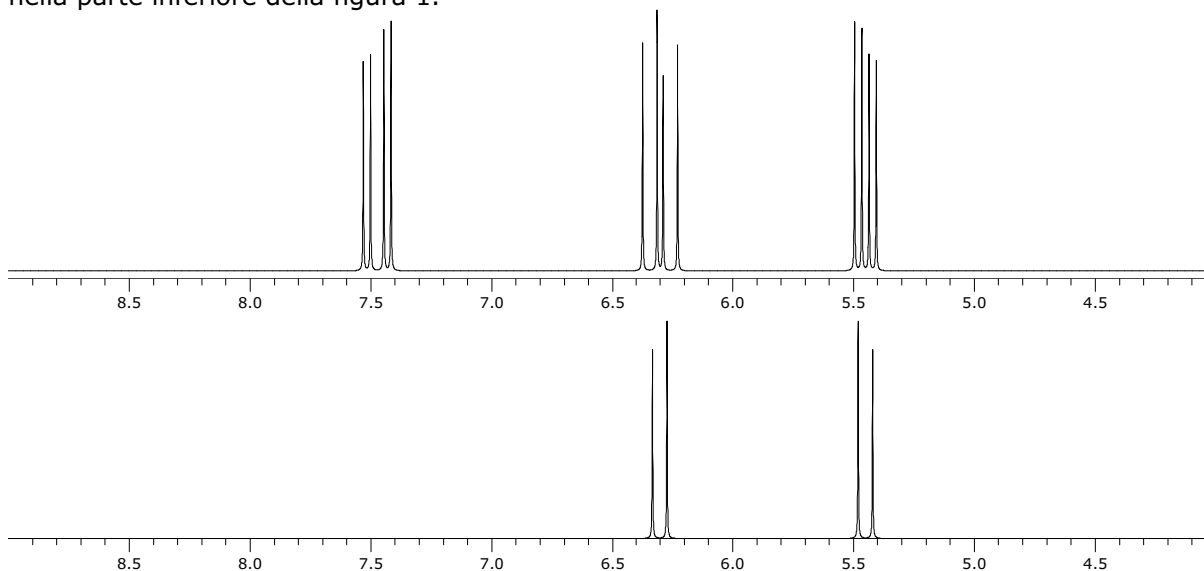
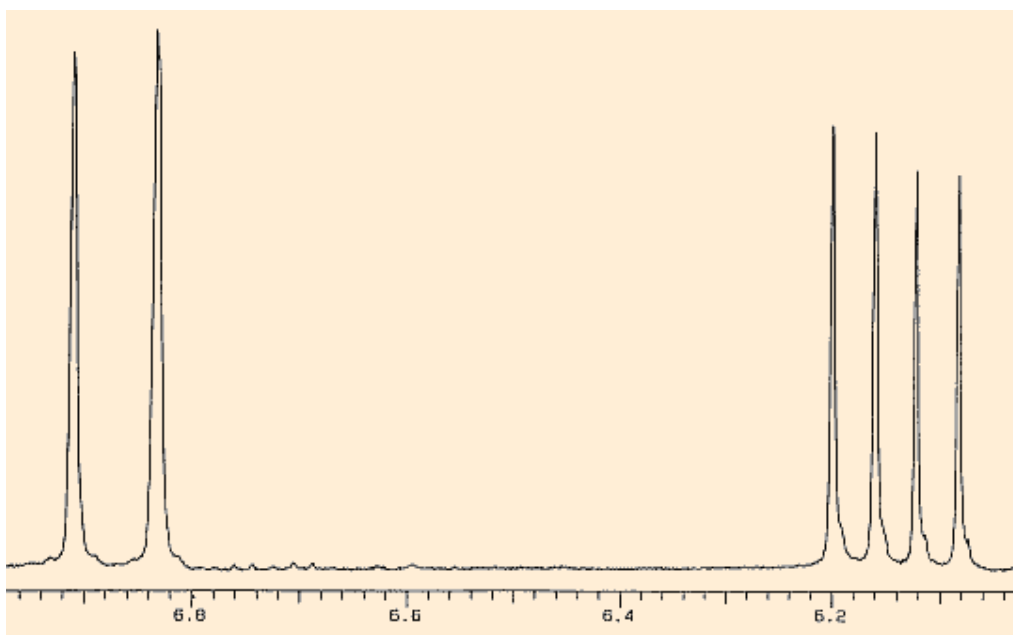
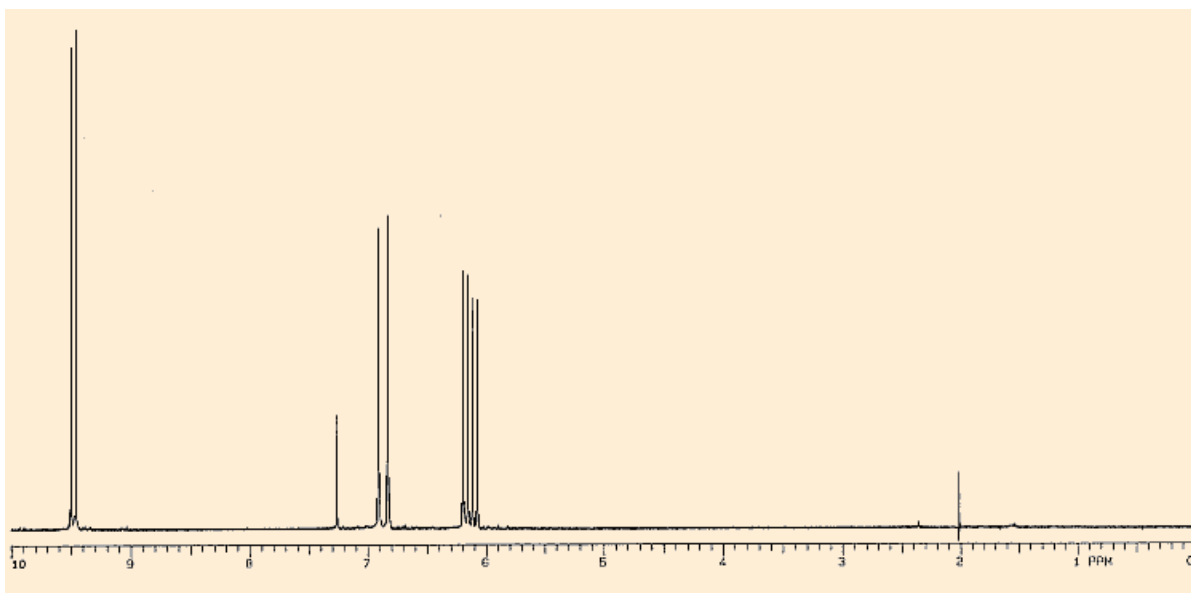


Fig. 1

Un esempio pratico di facile e interessante lettura è quello della trans-crotonaldeide in cui vengono eseguiti diversi disaccoppiamenti, il lettore è invitato a interpretare gli spettri in base a quanto già esposto per il sistema AMX.



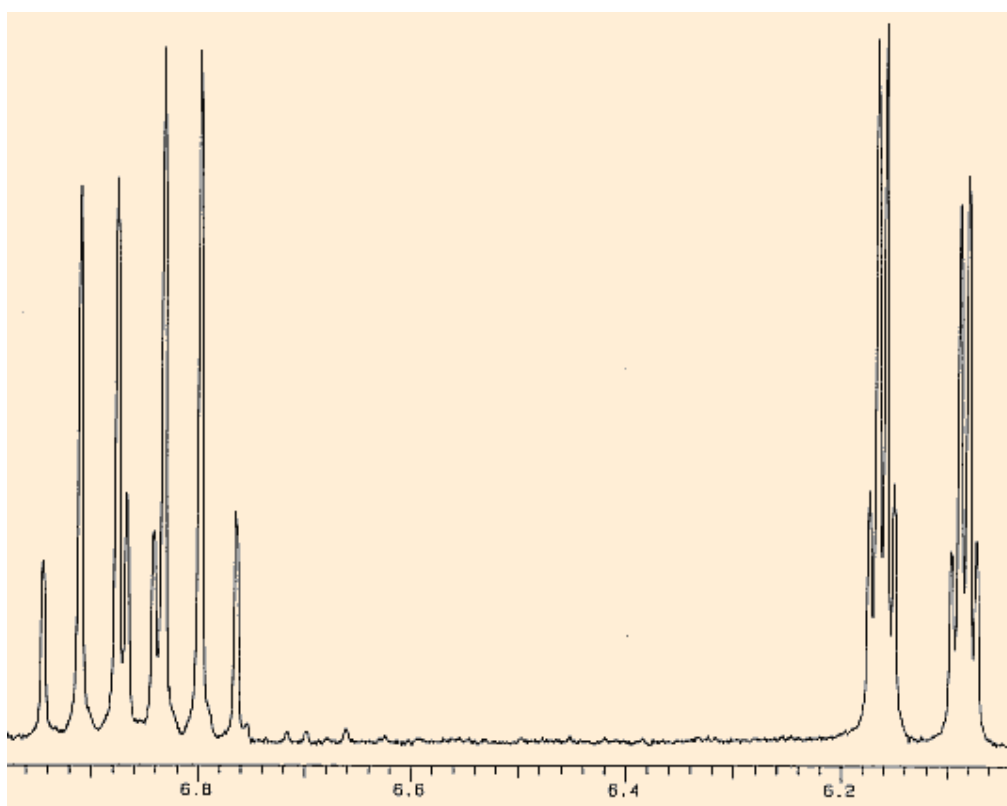
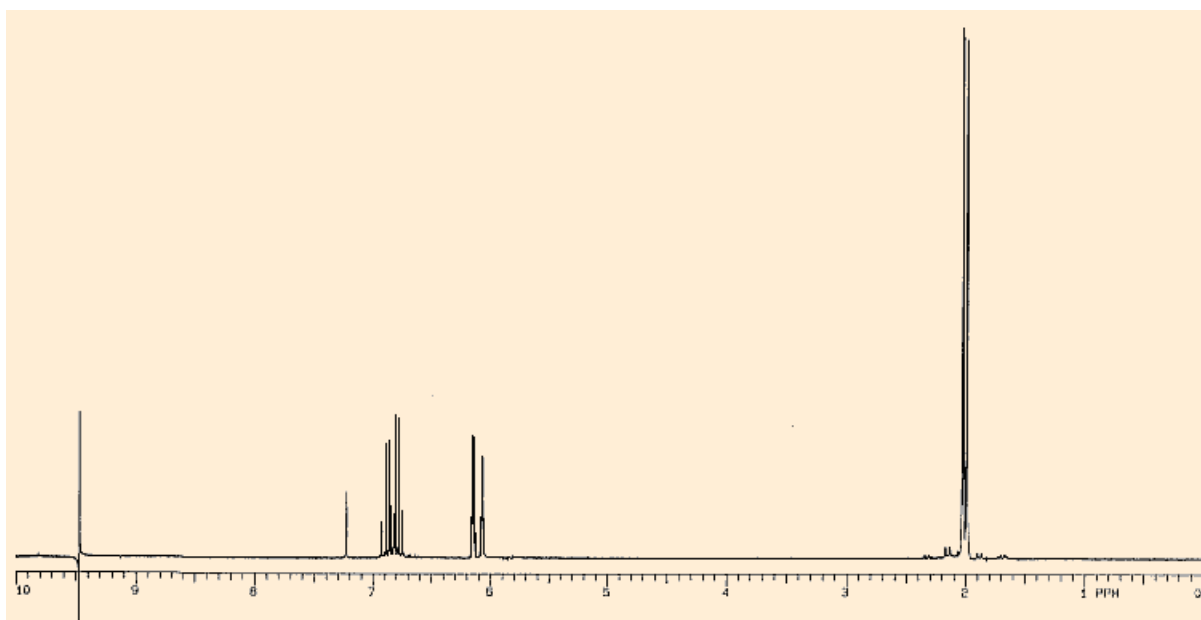


Fig. 2: **Spettri disaccoppiati della *trans*-crotonaldeide.**

Corso di Metodi Fisici in Chimica Organica e Chimica Analitica Per Biotecnologie Farmaceutiche

Modulo di Metodi Fisici in Chimica Organica

Dr. Elisabetta Rossi

Lezione 7

- Rilassamento ed effetto N.O.E..
- Spettri N.O.E.-diff..

Un'altra tecnica frequentemente applicata alla spettroscopia di risonanza magnetica protonica e che permette di approfondire l'indagine strutturale di molecole anche complesse si basa sull'effetto n.O.e. (nuclear Overhauser effect). Per comprendere i fenomeni fisici alla base dell'effetto n.O.e. è necessario introdurre una breve trattazione sui tempi di rilassamento cioè il tempo impiegato dal sistema per tornare all'equilibrio dopo l'applicazione di un impulso di radiofrequenza. In pratica i tempi necessari affinché il vettore magnetizzazione spostato sull'asse +y dall'impulso di radiofrequenza torni ad riallinearsi lungo +z. Esistono due meccanismi fondamentali per il rilassamento.

Il primo è il rilassamento spin-reticolo (longitudinale) attraverso il quale i nuclei cedono l'energia in eccesso ai nuclei spazialmente adiacenti che si muovono alla frequenza opportuna (rilassamento dipolo-dipolo). Il tempo correlato a questo meccanismo di rilassamento viene definito come T_1 . Il tempo T_1 può essere descritto come il ritorno della magnetizzazione M lungo +z con un movimento a spirale di ampiezza decrescente (Fig.1):

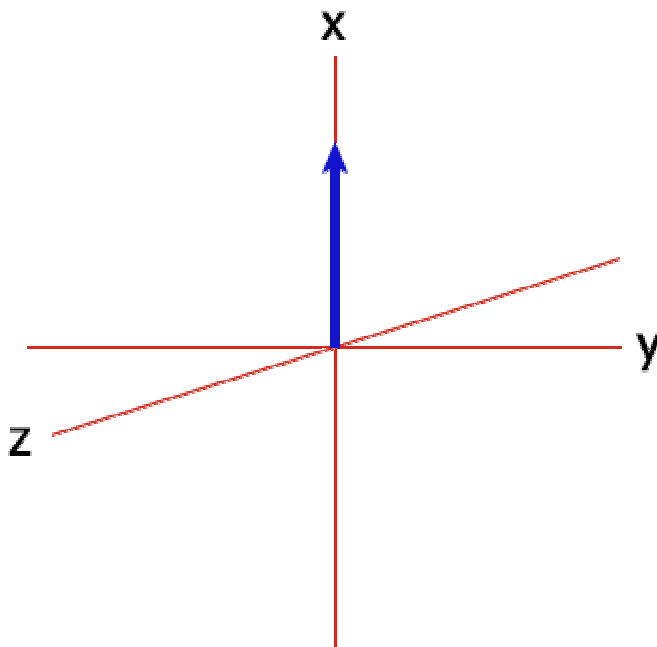


Fig. 1

Se il vettore M rappresenta una sola frequenza e quindi un solo nucleo si osserva la progressiva diminuzione della componente di M lungo $+y$ e contemporaneamente l'aumento della componente di M lungo $+z$. Se il vettore M è invece un vettore somma cioè rappresenta più nuclei a frequenza diversa e quindi idrogeni con diverso spostamento chimico quando si troverà a ruotare nel piano xy si scinderà a ventaglio nelle sue componenti ognuna delle quali avrà una propria frequenza (velocità) di rotazione nel piano xy . Questo processo viene definito sfasamento o perdita della coerenza di fase. Lo sfasamento nel piano xy porta dopo un certo tempo T_2 (tempo di rilassamento spin-spin o trasversale) all'annullamento della risultante vettoriale (Fig.2).

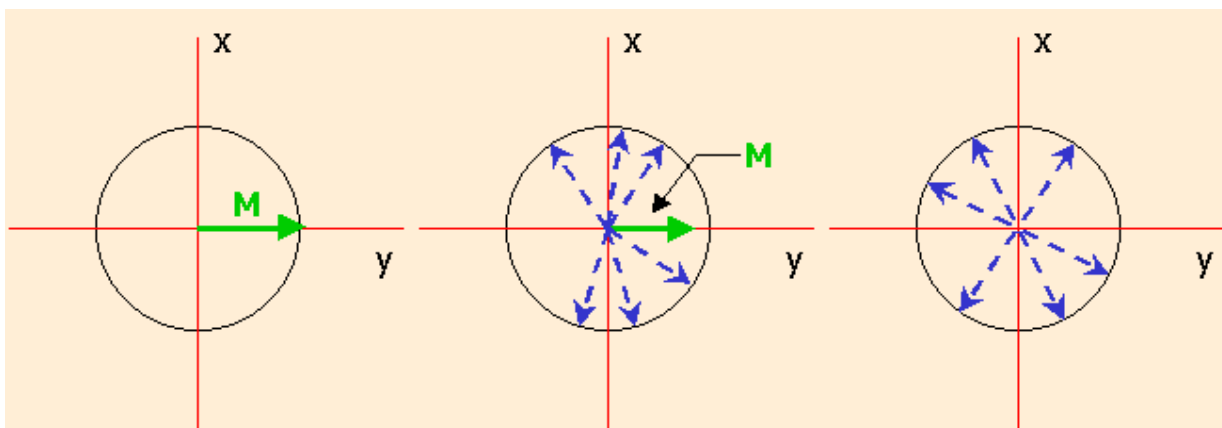


Fig. 2

La costante di tempo T_2 è in ogni caso molto inferiore a T_1 .

Supponiamo ora di osservare due nuclei A e B di una stessa molecola posti ad una distanza tale da interagire l'un l'altro favorendo attraverso uno scambio di energia il reciproco rilassamento dipolo-dipolo (T_1). E' importante notare che non si tratta necessariamente di protoni accoppiati attraverso legami (non devono avere necessariamente una J_{AB}) ma semplicemente di nuclei vicini nello spazio. Se il campione viene irradiato con una radiofrequenza supplementare (come nel caso del disaccoppiamento di spin) pari alla frequenza di risonanza di B avremo un aumento nella popolazione di B al livello energetico superiore e questo aumento provocherà una variazione anche nelle popolazioni dei livelli energetici di A che si traduce nello spettro finale in un aumento dell'intensità del segnale di A. In pratica è come se A non avesse più la possibilità di rilassare sfruttando il nucleo vicino perché questo si trova già al livello massimo di energia. Il tempo di rilassamento T_1 di A subirà quindi un incremento che si traduce in una maggiore permanenza del vettore M su $+y$ ed in ultima analisi ad un aumento del segnale di A nello spettro finale.

L'incremento massimo ottenibile per effetto n.O.e. viene definito come

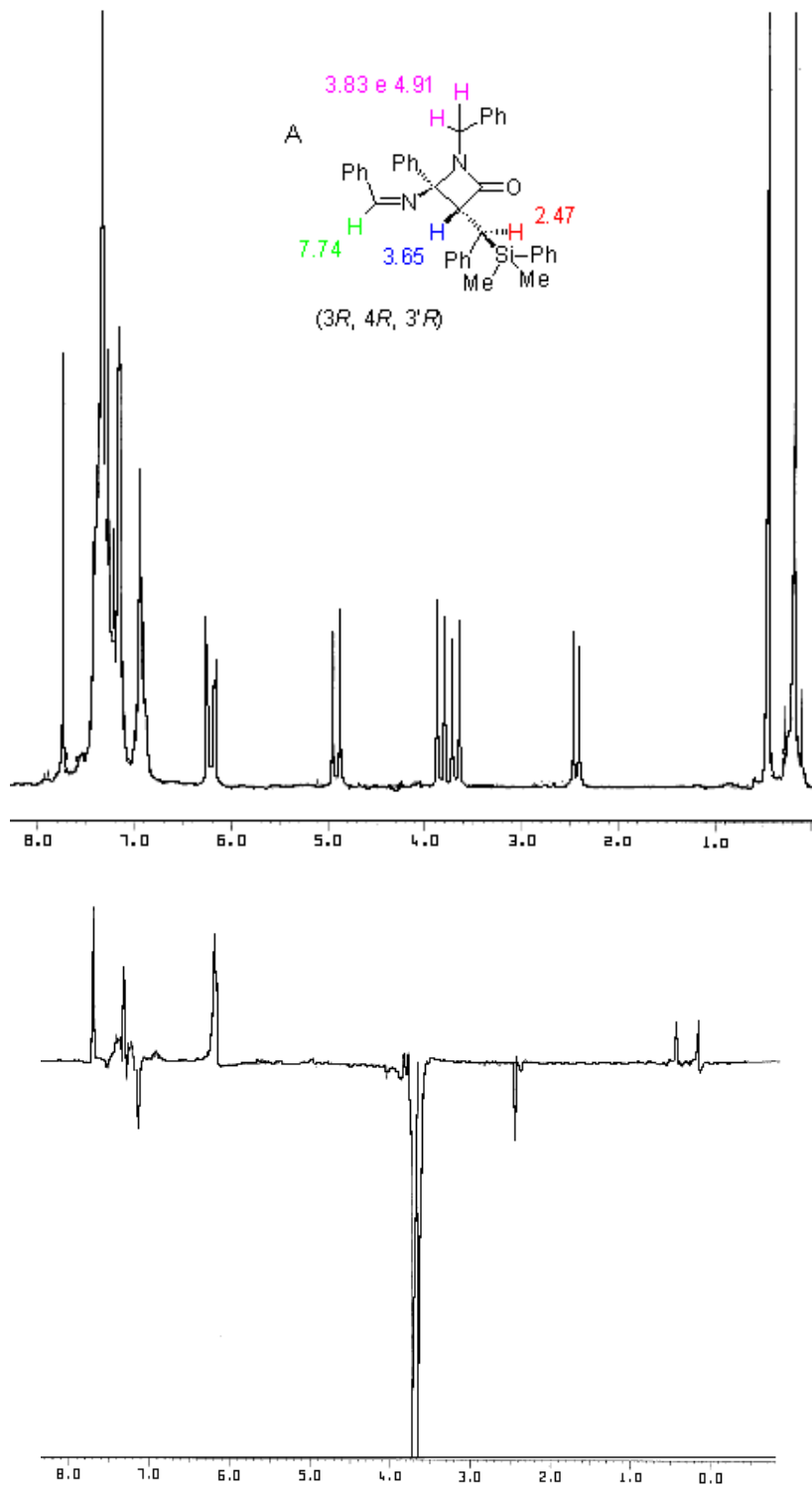
Fattore n.O.e. = $\eta = 1/2 \times \gamma_A/\gamma_B$

Dove γ_A e γ_B sono le costanti giromagnetiche dei due nuclei in esame. Come verrà ripreso infatti nelle prossime lezioni il fenomeno n.O.e. è riferibile anche a nuclei diversi dal protone. Nel caso del protone quindi l'incremento massimo ottenibile è pari a 0.5. Trattandosi quindi di piccoli incrementi di segnale è difficile osservarli attraverso la semplice lettura dell'integrale. E' necessario invece registrare lo spettro protone in condizioni normali, registrare successivamente un secondo spettro applicando la radiofrequenza supplementare scelta e infine sottrarre lo spettro "normale" dallo spettro "n.O.e." in modo da ottenere uno spettro in cui siano visibili solo gli incrementi di segnale dovuti ad una interazione n.O.e. tra protoni spazialmente adiacenti. Lo spettro ottenuto prende il nome di "spettro n.O.e.-diff.".

La distanza minima a cui è osservabile l'effetto n.O.e. è di circa 3 Å e questo tipo di esperimento è di enorme aiuto nelle indagini strutturali e soprattutto per distinguere tra diversi isomeri di una stessa molecola.

Il primo esempio riportato di un esperimento di n.O.e.-diff. riguarda l'assegnazione della configurazione di due beta-lattami diastereoisomeri. Vengono riportati per ogni composto gli spettri protone e gli spettri N.O.e.-diff. realizzati.

Nel caso del diastereoisomero A irraggiando il protone a 3.65 ppm si osserva tra l'altro un incremento del segnale a 7.74 che permette di attribuire geometria *cis* tra il sostituito imminico in posizione 4 e l'idrogeno in posizione 3. Irradiando invece il protone benzilico a 2.47 ppm non si osserva effetto n.O.e. con l'idrogeno in posizione 3 a conferma del fatto che i due idrogeni sono da parte opposta rispetto al piano (Fig. 3).



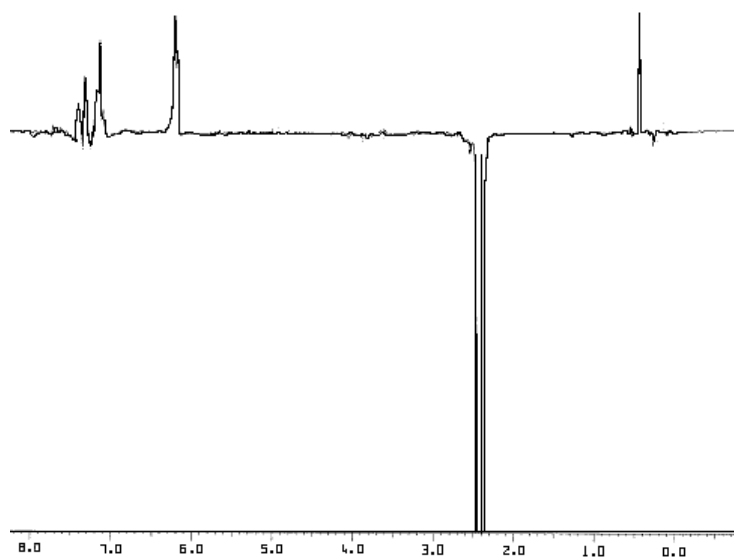


Fig. 3

Nel caso del diastereoisomero B irradiando il protone a 3.68 ppm si osserva incremento sia del segnale a 7.81 che del segnale a 2.50 a conferma della geometria *cis* già osservata per il diastereoisomero A e a conferma della posizione reciproca tra l'idrogeno benzilico a 2.50 ppm e l'idrogeno in posizione 3 dell'anello beta-lattamico (Fig. 4).

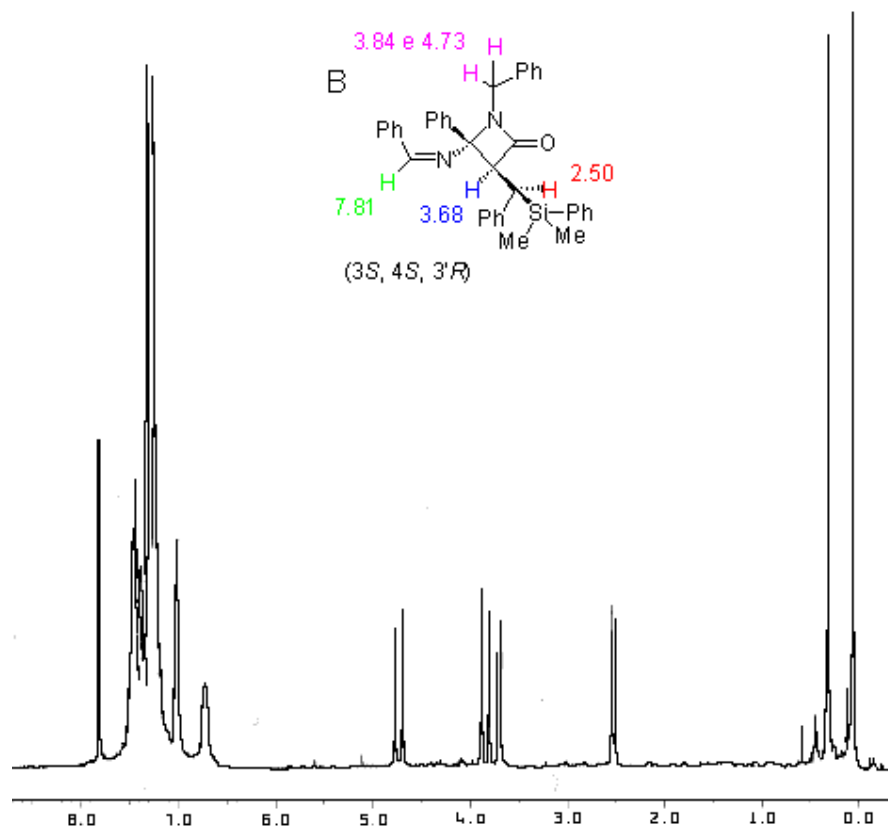




Fig. 4

Una seconda applicazione della spettroscopia n.O.e.-diff riguarda l'assegnazione della posizione reciproca dei sostituenti della triazina riportata in figura 6. Irradiando uno dei due protoni benzilici (sono due protoni diastereotopici con J geminale) e precisamente quello a 4.18 ppm si osserva incremento del segnale a 6.00 ppm relativo all'idrogeno dell'anello triazinico. Questa interazione permette di attribuire al composto in esame la struttura A (Fig. 5).

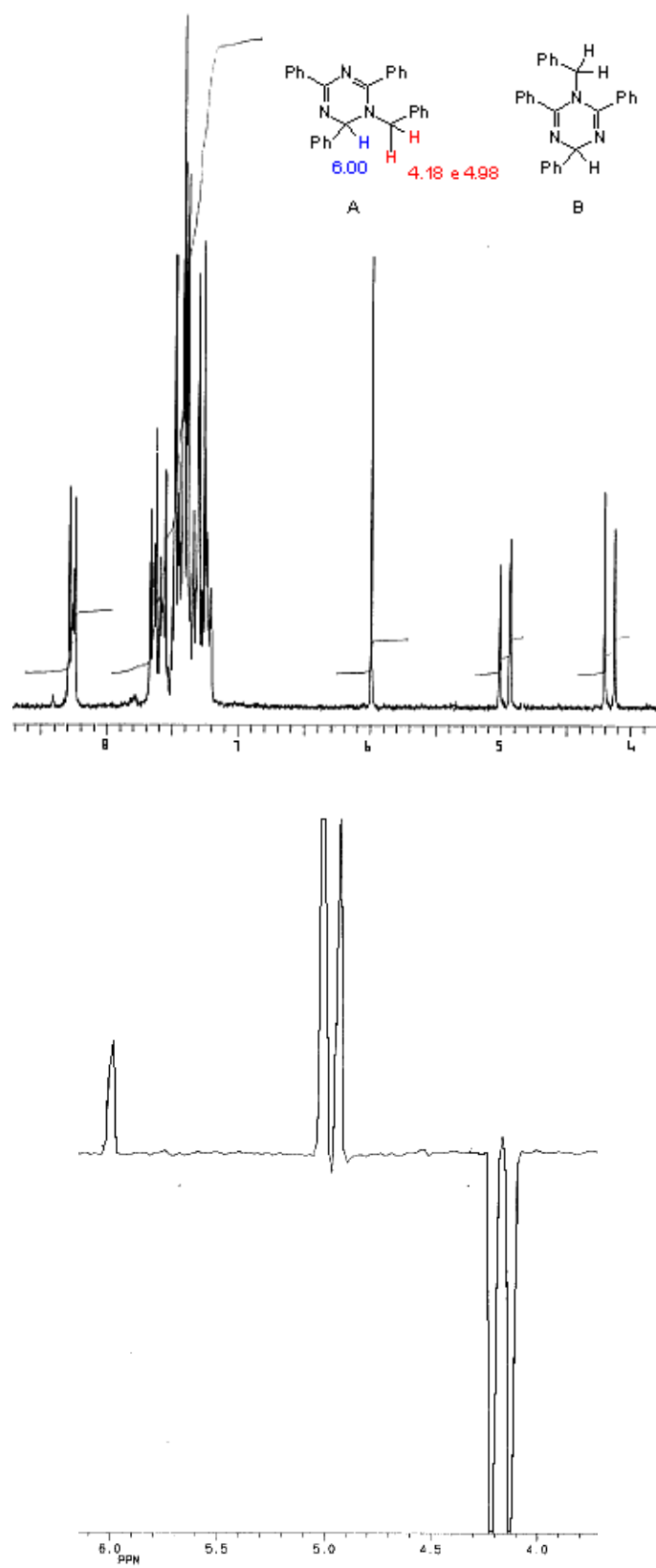


Fig. 5

Corso di Metodi Fisici in Chimica Organica e Chimica Analitica Per Biotecnologie Farmaceutiche

Modulo di Metodi Fisici in Chimica Organica

Dr. Elisabetta Rossi

Lezione 8

- Spettrometri di risonanza magnetica del carbonio.
- Acquisizione dello spettro.
- Spettri accoppiati e disaccoppiati.
- Spostamento chimico.
- Spettri APT.

Come già accennato in diversi punti nelle precedenti lezioni il fenomeno della risonanza magnetica nucleare può essere applicato non solo al nucleo dell'idrogeno ma anche ad altri elementi i cui nuclei siano magneticamente attivi. Un nucleo si definisce magneticamente attivo quando posto in un campo magnetico è in grado di assumere due o più orientamenti ad ognuno dei quali è associato un diverso livello energetico. Le transizioni tra livelli generate dall'interazione con una opportuna radiazione elettromagnetica (dell'ordine delle radiofrequenze) opportunamente rilevate danno luogo ad uno spettro di risonanza magnetica che abbiamo fino ad ora analizzato nel dettaglio nel caso dell'idrogeno.

In particolare l'idrogeno assume in un campo magnetico due orientamenti, alfa e beta, poiché possiede $\text{spin} = 1/2$. Il numero di orientamenti è infatti dato da

$2I + 1$ dove I è il numero quantico di spin

Se osserviamo la tabella notiamo anche che l'idrogeno (come isotopo fondamentale ^1H) ha una abbondanza naturale praticamente del 100%. Questo significa che tutti i nuclei di idrogeno presenti in una molecola "contribuiscono" alla creazione del segnale NMR e di conseguenza la sensibilità relativa dell'idrogeno è pari a 1. Anche la sensibilità assoluta, definita come il prodotto tra sensibilità relativa ed abbondanza naturale, è nel caso dell'idrogeno pari a 1. Nella tabella viene poi riportata la frequenza di risonanza del nucleo osservato in un campo magnetico di 4.7 tesla. La frequenza di risonanza data da

$$\omega = \gamma B_0 / 2\pi$$

nel caso dell'idrogeno con $\gamma = 26.7$ è pari a 200 MHz. Le ultime due colonne della tabella riportano rispettivamente il composto di riferimento su cui si costruisce la scala in ppm (nel caso dell'idrogeno il tetrametilsilano, TMS) e l'intervallo in ppm in cui possono essere osservati, cioè risuonano, praticamente tutti i nuclei (Fig.1).

isotopo	spin	abbondanza naturale, %	sensibilità		MHz a 4.7 tesla	composto di riferimento	scala (ppm)
			relativa	assoluta			
^1H	1/2	99.98	1.00	1.00	200.00	$\text{Si}(\text{CH}_3)_4$	Da 12 a 0
^2H	1	1.05×10^{-2}	9.65×10^{-3}	1.45×10^{-6}	30.70	$\text{Si}(\text{CD}_3)_4$	Da 12 a 0
^{13}C	1/2	1.108	1.59×10^{-2}	1.76×10^{-4}	50.30	$\text{Si}(\text{CH}_3)_4$	Da 240 a 0
^{14}N	1	99.63	1.01×10^{-3}	1.01×10^{-3}	14.45	$^{14}\text{NH}_3$	Da 900 a 0
^{15}N	1/2	0.37	1.04×10^{-3}	3.85×10^{-6}	20.26	$^{15}\text{NH}_3$	Da 900 a 0
^{19}F	1/2	100	0.83	0.83	188.15	CFCl_3	Da 276 a -280
^{31}P	1/2	100	6.63×10^{-2}	6.63×10^{-2}	80.96	85% H_3PO_4	Da 270 a -480

Fig. 1: **Dati di risonanza magnetica nucleare di alcuni nuclei magneticamente attivi.**

Le stesse considerazioni possono essere applicate anche al carbonio ricordando che il ^{12}C , isotopo con abbondanza naturale del 99 % circa, ha numero quantico di spin pari a 0 e quindi non ha orientamenti e non è magneticamente attivo. L'isotopo ^{13}C invece ha numero quantico di spin 1/2 come il protone e quindi si comporterà come l'idrogeno dal punto di vista della risonanza magnetica nucleare con alcune importanti differenze.

Innanzitutto l'abbondanza naturale è solo dell'1.1 % e questo significa che solo questa percentuale di nuclei contribuisce alla creazione del segnale NMR. Come conseguenza rispetto all'idrogeno con sensibilità relativa di 1 il carbonio ha una sensibilità relativa molto inferiore come inferiore sarà anche la sensibilità assoluta dato fondamentale per valutare la fattibilità di un esperimento NMR per ogni nucleo. Inoltre, poiché la γ del carbonio è pari a 6.7, la frequenza di risonanza (quella da applicare per ottenere il segnale) a 4.7 tesla è di 50.3 MHz. Il composto di riferimento è ancora il TMS mentre l'intervallo di osservazione è più ampio e cade nell'intervallo da 0 a 240 ppm.

In termini pratici quindi è facile dedurre che per ottenere uno spettro di risonanza magnetica del carbonio sarà necessario ripetere la sequenza di impulso e acquisizione per un numero superiore di volte rispetto all'idrogeno. Durante l'acquisizione di uno spettro protone la sequenza viene ripetuta normalmente per 16 volte e i FID ottenuti vengono sommati, sottoposti a trasformata di Fourier e infine riportati in forma grafica. Nel caso del carbonio 16 acquisizioni non sono più sufficienti per ottenere un buon rapporto segnale rumore, i picchi cioè non sono più alti della linea di base. Tenendo conto che sperimentalmente l'ampiezza di un segnale NMR è proporzionale circa al cubo della costante giromagnetica la sensibilità dell'esperimento NMR applicato al ^{13}C sarà:

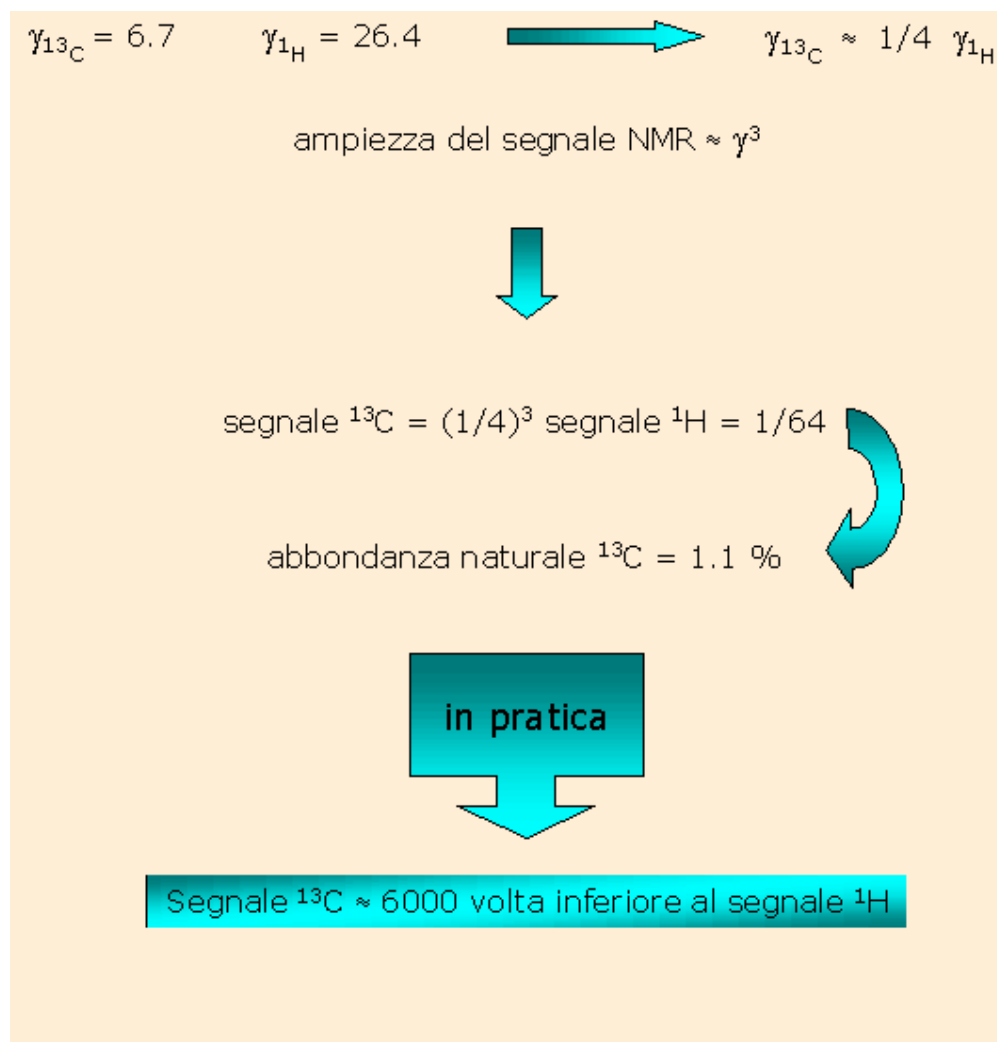


Fig. 2

A causa di queste difficoltà sperimentali la spettroscopia del carbonio si è sviluppata più tardi rispetto a quella del protone ed attualmente con gli strumenti operanti ad elevato campo magnetico è diventata indagine di routine nella determinazione della struttura e della stereochimica di composti organici.

Analisi degli spettri ^{13}C

La bassa abbondanza naturale del ^{13}C rende in teoria molto semplice lo spettro poiché gli accoppiamenti ^{13}C - ^{13}C non sono in pratica osservabili in quanto è estremamente improbabile che due nuclei ^{13}C si trovino adiacenti nella stessa molecola. In teoria quindi lo spettro del carbonio dovrebbe essere formato da un insieme di singoletti. In pratica i nuclei del carbonio risentono dello stato di spin degli idrogeni direttamente legati ed i relativi segnali si presentano come doppietti nel caso del CH , come tripletti nel caso del CH_2 , come quartetti nel caso del CH_3 mentre ovviamente sono singoletti i segnali relativi ai carboni quaternari che non hanno idrogeni legati direttamente. A prima vista questa complicazione dello spettro potrebbe sembrare di utilità diagnostica perché permetterebbe di distinguere a prima vista tra carboni primari, secondari ecc. tuttavia poiché le costanti di accoppiamento C-H hanno valori molto elevati spesso le linee relative ai vari segnali sono sovrapposte e lo spettro risulta troppo complicato. Si preferisce in genere acquisire gli spettri del carbonio con la tecnica della doppia risonanza già discussa per il protone. Un canale supplementare irradia alla frequenza di risonanza dell'intero spettro protone annullando gli accoppiamenti con il carbonio. Lo spettro finale quindi sarà effettivamente formato da soli singoletti ognuno dei quali rappresenta un atomo di carbonio a meno di una fortuita coincidenza di spostamento chimico tra due carboni. La spettroscopia del carbonio e del protone si integrano quindi a vicenda ed in particolare con la spettroscopia del carbonio si osserva l'intero scheletro molecolare compresi tutti i gruppi funzionali invisibili al protone quali $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{S}$.

Spostamenti chimici

Gli spostamenti chimici nella spettroscopia del carbonio sono paralleli, cioè dipendono dagli stessi parametri già individuati per il protone quali ibridazione del carbonio ed elettronegatività del sostituyente, anche se si estendono per un maggior numero di ppm da 0 a 240 circa.

Nella tabella seguente vengono riportati in generale gli spostamenti chimici del ^{13}C mentre come nel caso del protone si consiglia l'uso di tabelle più dettagliate reperibili nei più comuni testi che trattano di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare.

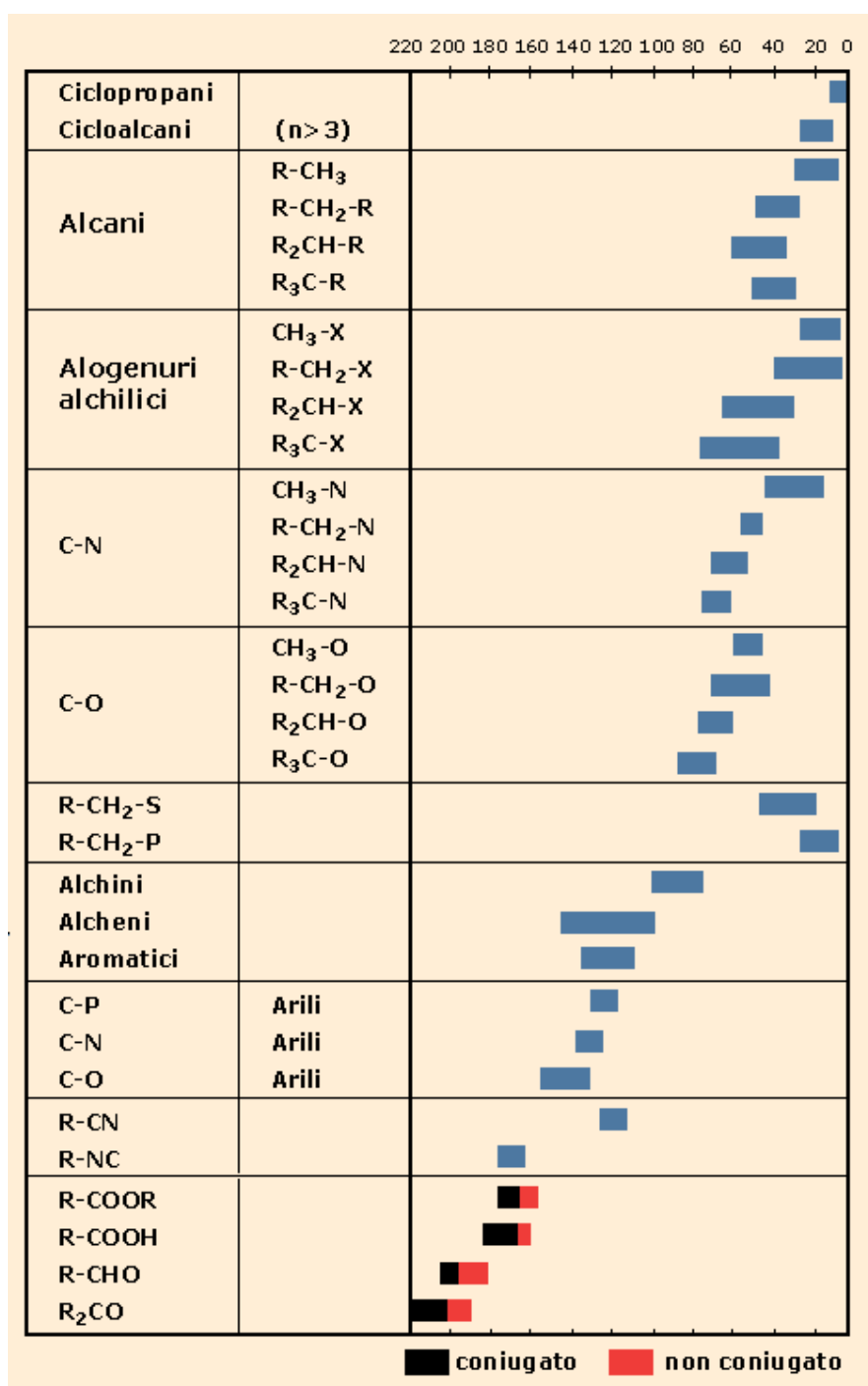


Fig. 3

A titolo di esempio analizziamo alcuni spettri reali mentre nella sezione esercizi sono riportati gli spettri ^{13}C degli stessi composti già analizzati nell'esercizio 2 della lezione 4. Facendo riferimento all'aspetto generale degli spettri dobbiamo innanzitutto notare l'assenza dell'integrale. Nella spettroscopia del carbonio infatti non esiste più proporzionalità tra l'ampiezza del segnale ed il numero di carboni che il segnale stesso rappresenta.

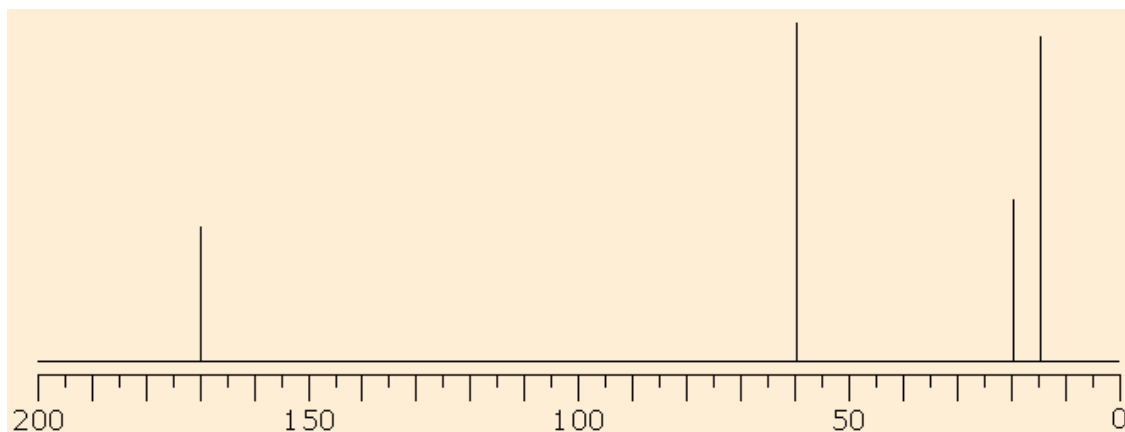


Fig.4: **Spettro ^{13}C dell'acetato di etile.**

Lo spettro dell'acetato di etile riportato in figura 4 presenta quattro picchi relativi ai quattro carboni presenti nello scheletro molecolare. Alle frequenze più basse, nella parte destra dello spettro, troveremo i carboni ad ibridazione sp^3 (più schermati) ed all'interno di questo gruppo gli spostamenti chimici saranno influenzati dall'elettronegatività dei gruppi o atomi adiacenti. Nel caso dell'acetato di etile a 15 ppm troveremo il segnale relativo al metile adiacente al metilene, a 20 ppm il metile adiacente al gruppo carbonilico ed a 60 ppm il segnale relativo al gruppo metilenico che risulta essere il più deschermato in quanto direttamente legato ad un atomo elettronegativo. Possiamo quindi affermare che il gruppo carbonilico ha un effetto elettronegativo inferiore all'ossigeno cioè è meno deschermante. Se confrontiamo il ^{13}C ed lo spettro ^1H dell'acetato di etile riportato nella figura 1 della lezione 3 è possibile notare come esista una stretta analogia tra gli spostamenti chimici osservati per il protone e quelli osservati per il carbonio. Nella parte sinistra dello spettro troveremo i carboni a ibridazione sp^2 di tipo etilenico e aromatico (vedere anche la tabella di figura 3). Nel caso dell'acetato di etile in questa zona troveremo il segnale relativo al carbonio del gruppo carbonilico che risuona a frequenze particolarmente elevate (170 ppm) in quanto legato ad un elemento elettronegativo come l'ossigeno.

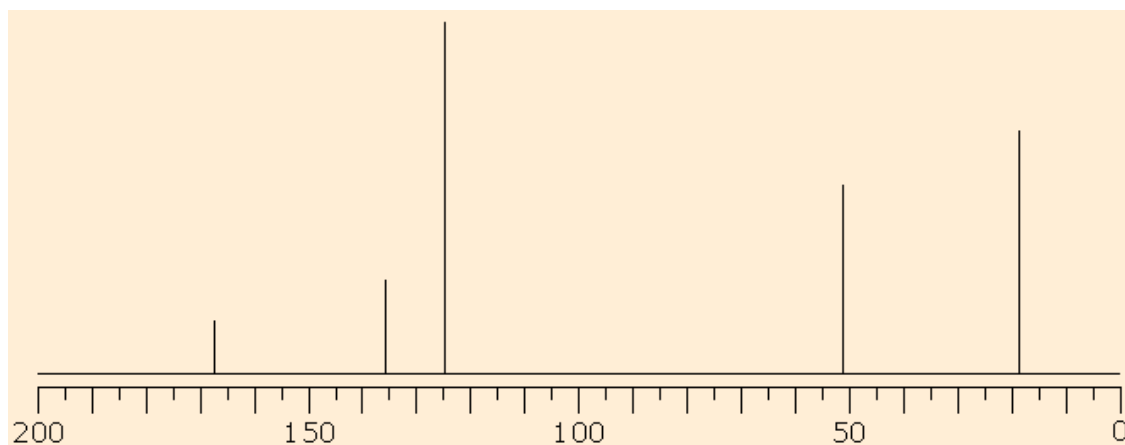


Fig. 5: **Spettro ^{13}C del metacrilato di metile.**

In figura 5 è riportato lo spettro del metacrilato di metile. Nella zona degli alifatici sono facilmente distinguibili i segnali relativi ai metili: a 18 ppm il segnale del metile legato al carbonio sp^2 ed a 50 ppm il segnale più deschermato del metile legato all'eteroatomo. Nella zona dei carboni di tipo etilenico troviamo a 125 ppm il segnale del $CH_2=$ ed a 137 ppm il segnale del $C=$. Come nel caso dell'acetato di etile il segnale a frequenze più alte (167 ppm) va attribuito al $C=O$.

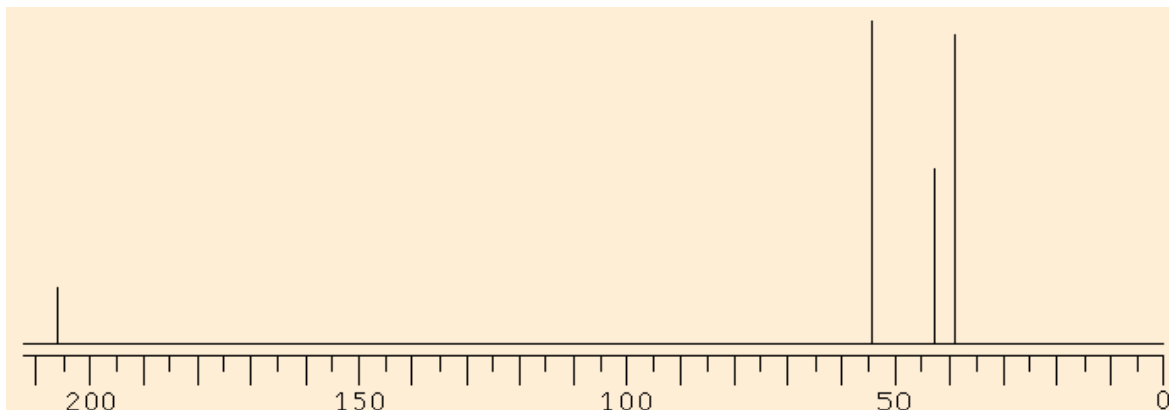


Fig. 6: **Spettro ^{13}C dell'N-metil-piperidin-4-one.**

In figura 6 è riportato lo spettro dell'N-metil-piperidin-4-one che si differenzia da quelli precedenti per la presenza di carboni equivalenti. I due carboni metilenici adiacenti al gruppo carbonilico sono infatti identici e daranno origine ad un solo segnale così come i due gruppi metilenici adiacenti all'azoto. Il carbonio più deschermato è ancora quello del gruppo $C=O$, mentre nella zona degli alifatici possiamo attribuire il segnale a 55 ppm ai metileni adiacenti all'azoto, mentre è più difficile distinguere i due segnali relativi ai metileni adiacenti al $C=O$ e al metile su azoto. Anche se, come abbiamo già ricordato, non esiste proporzionalità diretta tra numero di atomi di carbonio ed ampiezza del segnale possiamo affermare che il segnale più intenso si riferisce ai due carboni metilenici mentre il meno intenso ad un solo carbonio, quello del metile.

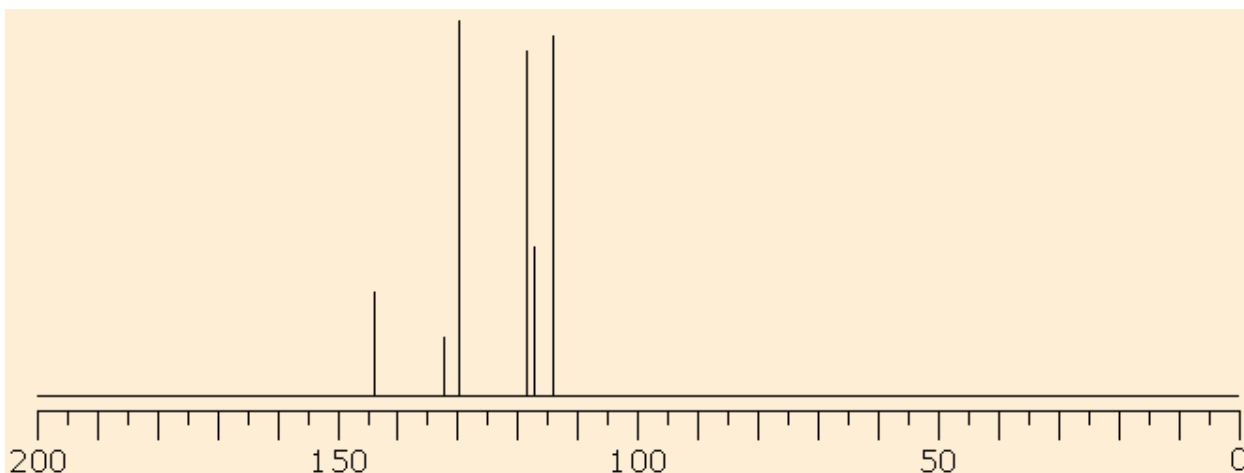


Fig. 7: **Spettro ^{13}C della 2,5-dicloro-anilina.**

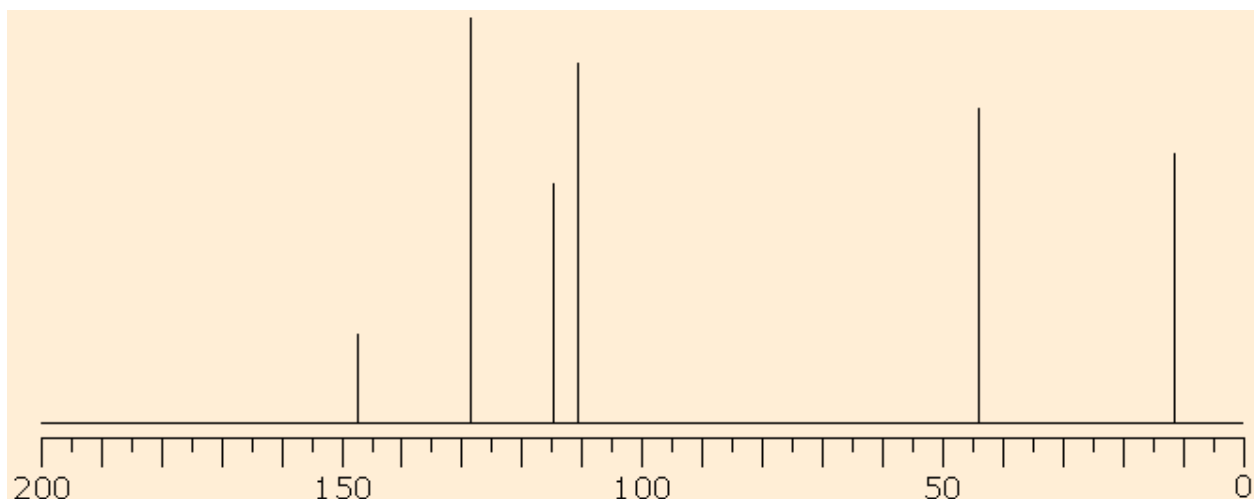


Fig. 8: **Spettro ^{13}C della N-etilanilina.**

Gli ultimi due spettri si riferiscono a due anelli aromatici. Il primo con sostituzione asimmetrica, la 2,5-dicloro-anilina, presenta nello spettro 6 segnali distinti (Fig. 7), mentre il secondo relativo alla N-etilanilina presenta nella zona degli aromatici quattro segnali in quanto i carboni in orto ed in meta rispetto al sostituito sono equivalenti a due a due (Fig. 8). L'attribuzione dei segnali va fatta in base agli effetti mesomeri ed induttivi dei diversi sostituenti ed esula dagli scopi didattici del corso per biotecnologi.

Come nel caso del protone, oltre all'esperimento fondamentale discusso fino ad ora esistono diversi esperimenti in cui modificando le condizioni di acquisizione è possibile ottenere informazioni supplementari sul composto in esame o facilitare la lettura di spettri complessi. Una delle tecniche più utilizzate prende il nome di APT (Attached Proton Test) in cui una particolare sequenza di acquisizione dello spettro permette di variare la fase del segnale (In positivo od in negativo) a seconda del numero di protoni legato al carbonio. In particolare negli spettri APT i segnali positivi si riferiscono a carboni cui sono legati 2 o 0 idrogeni (gruppi CH_2 o carboni quaternari) mentre i segnali negativi si riferiscono a carboni di tipo metilico o metinico (CH_3 o CH). Gli spettri riportati nella sezione esercizi sono acquisiti utilizzando la sequenza APT.

Corso di Metodi Fisici in Chimica Organica e Chimica Analitica Per Biotecnologie Farmaceutiche

Modulo di Metodi Fisici in Chimica Organica

Dr. Elisabetta Rossi

Lezione 9

- Spettrometria NMR di correlazione.
- Spettri COSY.
- Spettri HETCOR

Come già discusso nei capitoli relativi al disaccoppiamento di spin e all'effetto n.O.e. esistono diversi esperimenti in cui modificando le condizioni di acquisizione dello spettro protone è possibile ottenere informazioni supplementari sul composto in esame o facilitare la lettura di spettri complessi.

La spettrometria di correlazione, cui è dedicato questo capitolo, è una tecnica di acquisizione relativamente recente e che ha avuto sviluppi applicativi enormi con l'aumentare della potenza dei magneti dedicati alla registrazione degli spettri fino a diventare tecnica di routine almeno per quanto riguarda gli esperimenti più semplici.

In molti libri di testo la spettrometria di correlazione viene indicata come spettrometria bidimensionale e questo termine è riferito alla particolare tecnica di registrazione dello spettro che prevede l'acquisizione di due frequenze nella stessa sequenza di impulsi, gli esperimenti trattati nei capitoli precedenti in cui la frequenza osservata è una sola vengono definiti esperimenti monodimensionali. I termini mono e bidimensionale tengono conto solo del numero di frequenze osservate, è importante sottolineare che in entrambi i casi è comunque presente un'altra dimensione: l'intensità!

Spettri COSY (COrrelation SpectroscopY)

L'approccio più semplice alla spettroscopia bidimensionale è quella di imparare prima a leggere gli spettri e poi occuparsi di come si ottengono.

Mentre uno spettro monodimensionale contiene due dimensioni, frequenza e intensità, uno spettro COSY contiene tre dimensioni: due frequenze F1 e F2 ed una intensità. L'aspetto di un segnale NMR sarà quindi diverso nei due casi:

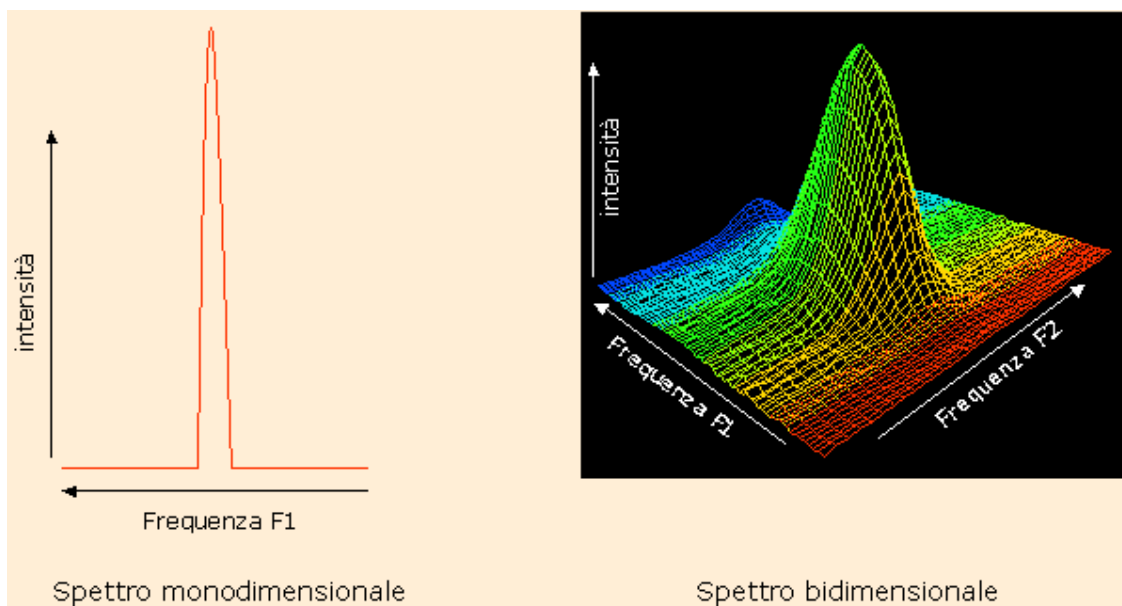


Fig. 1

In figura 2 è riportato lo spettro COSY del 3-eptanone. Gli spettri riportati sugli assi F1 e F2 si riferiscono allo spettro monodimensionale e servono, come vedremo per facilitare la lettura del bidimensionale. Il diagramma a livelli compreso tra i due assi F1 e F2 mostra tutti i picchi generati dall'esperimento visti dall'alto ed è molto simile alla rappresentazione di un insieme di rilievi in una cartina geografica. Questo tipo di rappresentazione è la più utilizzata negli esperimenti bidimensionali.

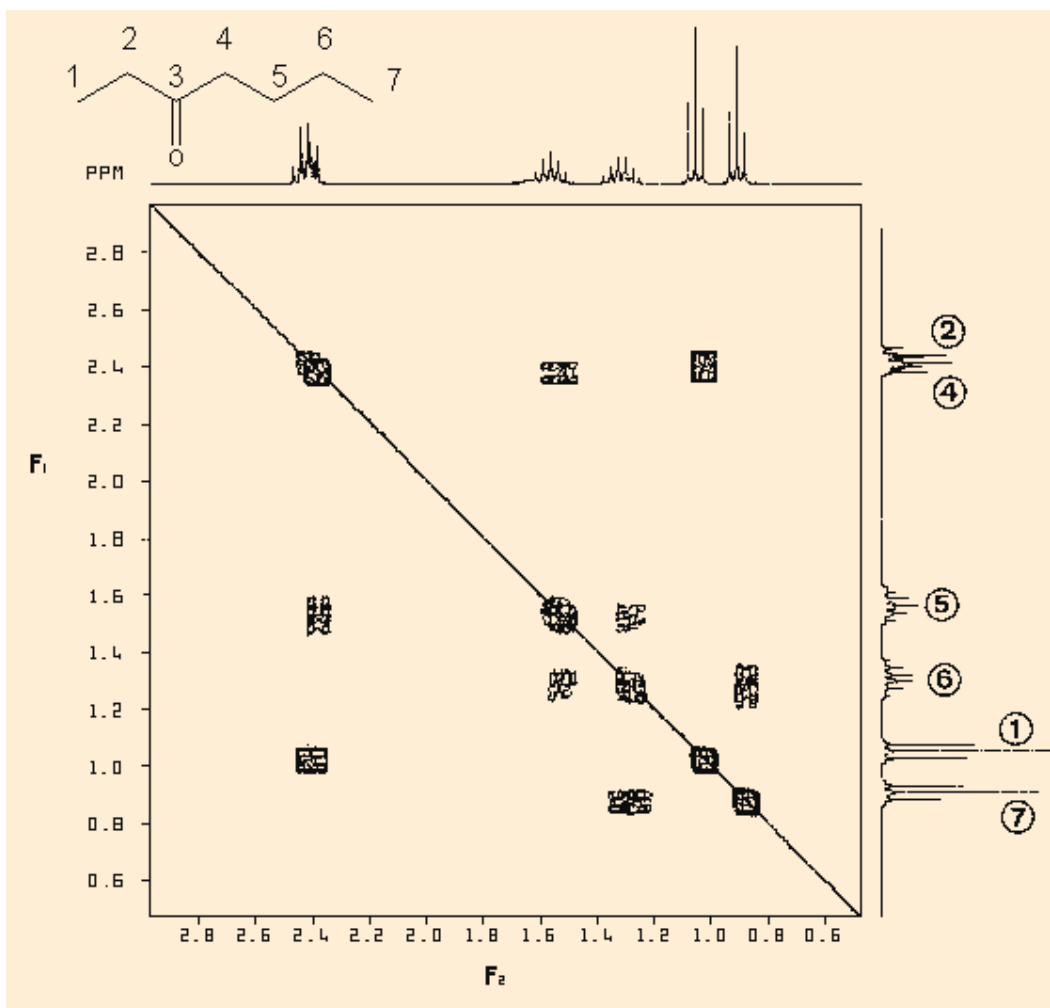


Fig. 2

Nell'esperimento COSY viene generato un diagramma simmetrico rispetto alla diagonale sulla quale compaiono dei picchi o macchie. Tracciando una retta da ogni macchia della diagonale sull'asse F1 e sull'asse F2 ritroviamo, in entrambe le direzioni, la stessa frequenza o lo stesso spostamento chimico, corrispondenti allo spettro ad una dimensione. Possiamo quindi affermare che i picchi contenuti sulla diagonale rappresentano lo spettro monodimensionale. Oltre alle macchie sulla diagonale lo spettro presenta anche delle macchie simmetricamente disposte al di fuori della diagonale che mettono in correlazione due diversi valori di frequenza e quindi due valori diversi di spostamento chimico. Queste macchie definite macchie di correlazione o cross-peak indicano che i protoni corrispondenti sono accoppiati tra loro. Nel caso del 2-eptanone ad esempio il cross-peak che correla gli spostamenti chimici di 1.3 e 0.9 ppm indica che i due picchi corrispondenti a quegli spostamenti chimici rappresentano degli idrogeni accoppiati tra loro.

Per leggere uno spettro COSY si sceglie solitamente un picco di attribuzione certa (quando si può!!) e partendo da questo si stabiliscono le connettività dell'intera molecola. Per il 2-eptanone scegliamo il segnale a frequenza più bassa, 0.9 ppm, che possiamo attribuire con certezza al metile in posizione 7 (il metile in posizione 1 avrà spostamento chimico maggiore perché più vicino al gruppo elettronattrattore) e procediamo alla lettura secondo il seguente schema:

- Rintracciamo sulla diagonale la macchia corrispondente al picco a 0.9 ppm
- Partendo da questa tracciamo una retta ortogonale all'asse fino ad incrociare il cross-peak
- Dal cross-peak torniamo sulla diagonale dove identifichiamo la macchia correlata a quella di partenza.
- Dalla diagonale torniamo sull'asse delle frequenze ed identifichiamo il picco accoppiato al CH₃ in 7 e che corrisponde quindi al CH₂ in posizione 6.
- Partendo ora dalla macchia sulla diagonale attribuita agli idrogeni in posizione 6 tracciamo una nuova retta ortogonale all'asse delle frequenze.
- Si rintracciano due cross-peak: uno relativo all'accoppiamento con 7 ed un nuovo cross-peak.
- Partendo da quest'ultimo e tornando sulla diagonale è possibile rintracciare la macchia correlata a 6.
- Dalla diagonale torniamo sull'asse delle frequenze ed identifichiamo il picco accoppiato al CH₂ in 6 e che corrisponde quindi al CH₂ in posizione 5.

Proseguendo nella lettura con lo stesso metodo sarà quindi possibile stabilire l'intera connettività H-H della molecola con un solo esperimento senza dover necessariamente effettuare una approfondita analisi delle costanti di accoppiamento e degli spostamenti chimici. Questo tipo di esperimento si rivela particolarmente utile nel caso di spettri più complessi che possono essere interpretati oltre che senza analisi sulle costanti di accoppiamento e sugli spostamenti chimici anche senza dover ricorrere ad esperimenti di doppia risonanza. Lo spettro riportato in figura 3 si riferisce ad una molecola più complessa della precedente, la N-trifluoroacetil-L-daunosamina- α -O-metilglicoside.

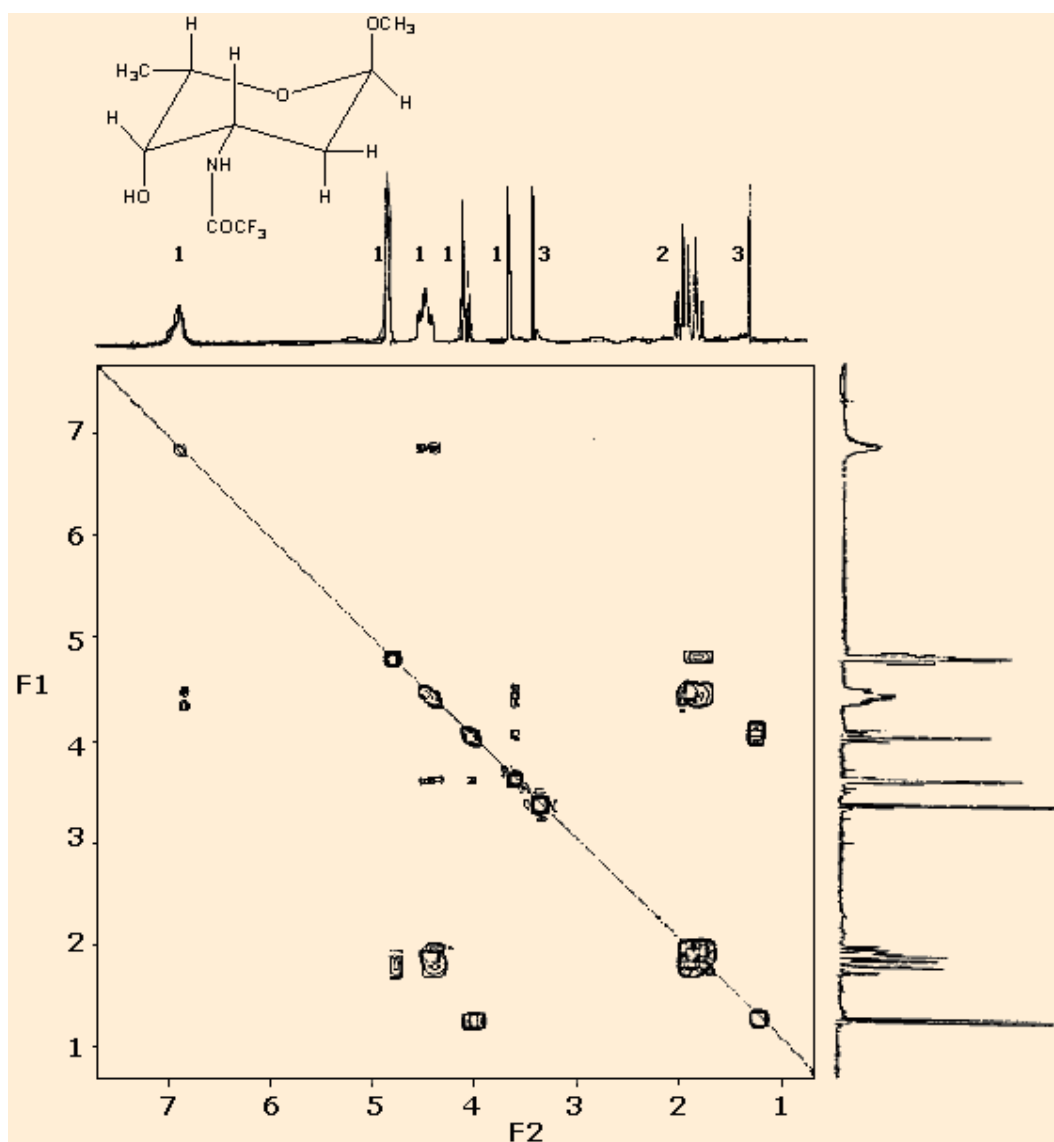


Fig. 3

Anche in questo caso sugli assi F1 e F2 viene riportato lo spettro protone monodimensionale al fine di facilitare la lettura e facilitare l'identificazione dei corrispondenti picchi sulla diagonale. Come punto di partenza per l'attribuzione dei diversi segnali scegliamo il doppietto a 1.2 ppm relativo al metile 6 accoppiato con J vicinale all'H-5. Una volta identificato il relativo picco sulla diagonale si rintracciano i relativi cross-peak. In questo caso la macchia di correlazione è una sola e permette di identificare il segnale relativo ad H-5 a 4.1 ppm. Per il segnale di H-5 sono presenti due cross-peak: uno con il metile già attribuito ed uno nuovo che è relativo all'accoppiamento con H-4, unico protone adiacente ad H-5 oltre agli idrogeni del metile 6. Lo spostamento chimico di H-4 è quindi di 3.6 ppm. H-4 a sua volta possiede due cross-peak: con H-5 e con H-3 cui è quindi possibile attribuire il segnale a 4.5 ppm. Il segnale di H-3 è più complesso, presenta infatti 3 cross-peak: con H-4, già attribuito, con il segnale a 6.8 ppm e con il segnale centrato a 1.8 ppm. Anche senza voler ricorrere all'analisi di molteplicità e spostamento chimico, si può attribuire il segnale a 6.8 ppm all'NH in quanto questo segnale presenta nella bidimensionale una sola macchia di correlazione con H-3, mentre il segnale a 1.8 ppm ha due cross-peak con H-3 e con H-1 e va quindi attribuito agli idrogeni in posizione 2. Dall'analisi dei cross-peak degli H-2 si risale al segnale di H-1 a 4.9 ppm. Il segnale a 3.2

ppm non presenta nessun cross-peak nello spettro bidimensionale e va attribuito al metile su ossigeno legato alla posizione 1.

Nel capitolo relativo agli esercizi sono riportati gli spettri COSY dei prodotti di cui sono già stati analizzati gli spettri monodimensionali protone e carbonio.

Spettri HETCOR (HETeronuclear chemical shift CORrelation)

L'esperimento che mette in correlazione idrogeni accoppiati tra loro (COSY) non è l'unico esperimento bidimensionale possibile. L'esperimento HETCOR mette in correlazione i nuclei di carbonio con i protoni ad esso direttamente legati e quindi accoppiati con una J_{CH} attraverso un solo legame. L'utilità di questo esperimento è immediata, esso permette infatti di attribuire i segnali del carbonio conoscendo lo spettro protone e viceversa. Chiariamo con un esempio come si leggono questi spettri. Lo spettro HETCOR riportato in figura 4 si riferisce al glucoside di cui abbiamo già analizzato lo spettro COSY.

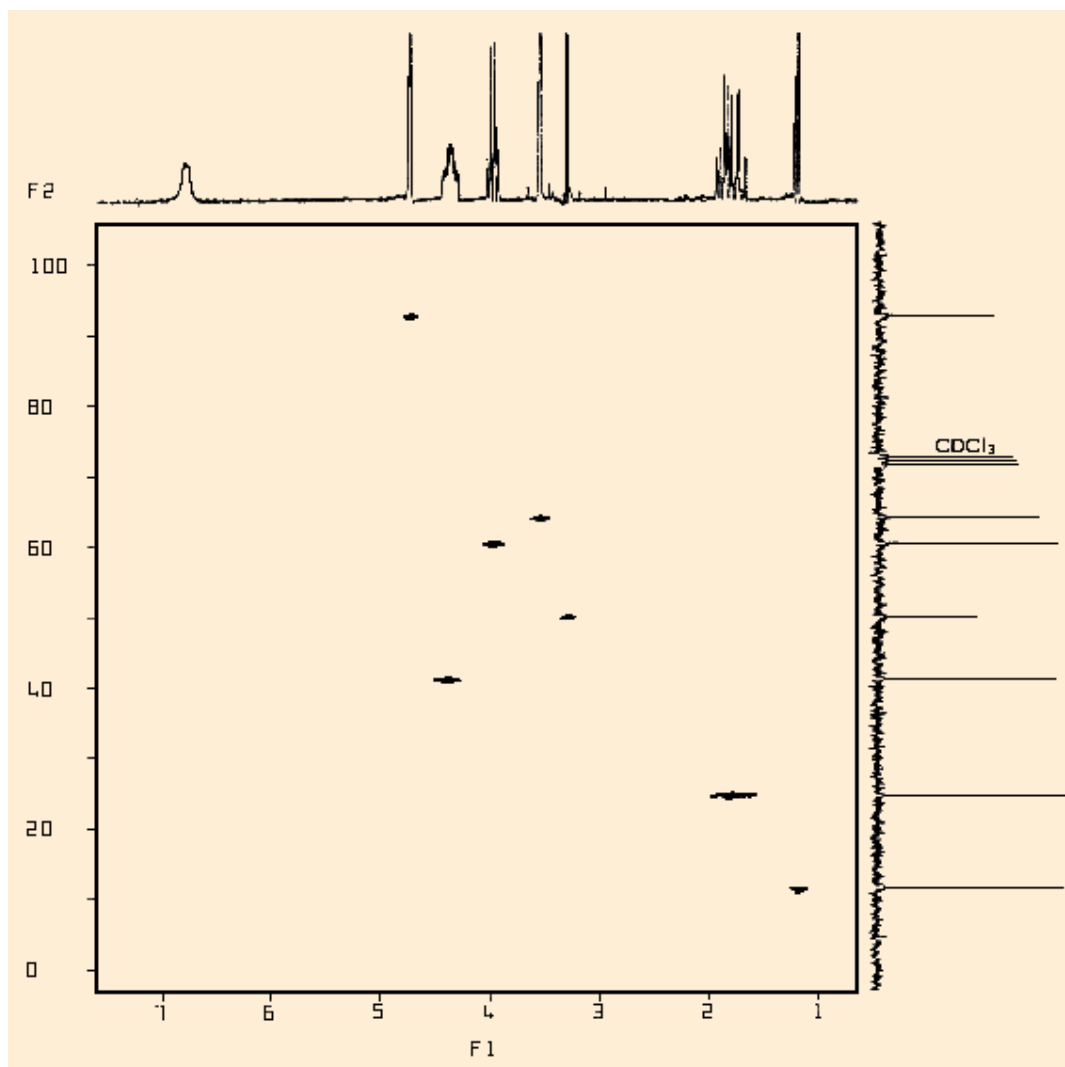


Fig. 4

Lo spettro presenta ancora due assi F1 ed F2 su cui questa volta sono riportate le frequenze di protone e carbonio rispettivamente. Ovviamente lo spettro, correlando due nuclei diversi, non è più simmetrico rispetto alla diagonale ma presenta esclusivamente dei cross-peak che mettono in correlazione ciascun protone o gruppo di protoni con i carboni cui sono direttamente legati.

- Il segnale a 1.2 ppm nello spettro protone , attribuito al metile 6 attraverso l'analisi dello spettro COSY, ha un solo picco di correlazione con il segnale carbonio a 15 ppm attribuibile al C-6.
- Il segnale a 1.8 ppm nello spettro protone, attribuito al metilene in posizione 2 è correlato nello spettro HETCOR con il segnale carbonio a 22 ppm e relativo quindi al C-2.
- Il segnale a 3.2 ppm nello spettro protone, attribuito agli idrogeni metossilici in posizione 1 e che non hanno correlazioni nello spettro COSY, sono correlati nello spettro HETCOR al segnale carbonio a 52 ppm e relativo quindi al C metossilico.
- Il segnale a 3.6 ppm nello spettro protone, attribuito al protone in posizione 4 è correlato nello spettro HETCOR con il segnale carbonio a 65 ppm e relativo quindi al C-4.
- Il segnale a 4.1 ppm nello spettro protone, attribuito al protone in posizione 5 è correlato nello spettro HETCOR con il segnale carbonio a 61 ppm e relativo quindi al C-5.
- Il segnale a 4.5 ppm nello spettro protone, attribuito al protone in posizione 3 è correlato nello spettro HETCOR con il segnale carbonio a 41 ppm e relativo quindi al C-3.
- Il segnale a 4.9 ppm nello spettro protone, attribuito al protone in posizione 1 è correlato nello spettro HETCOR con il segnale carbonio a 92 ppm e relativo quindi al C-3.
- Il segnale a 6.8 ppm non ha picchi di correlazione in quanto è relativo al protone su azoto e non è direttamente legato ad alcun carbonio.

Ovviamente anche gli spettri bidimensionali presentano diversi livelli di difficoltà interpretative e non sempre la loro lettura è così immediata. Nelle figure 5 e 6 sono riportati gli spettri COSY ed HETCOR dell'anello tetraciclico A relativi alla porzione di spettro che contiene i segnali di idrogeni e carboni aliciclici. L'attribuzione dei segnali richiede in questo caso la lettura combinata dei due esperimenti attraverso cui è comunque possibile giungere ad una corretta attribuzione dei segnali.

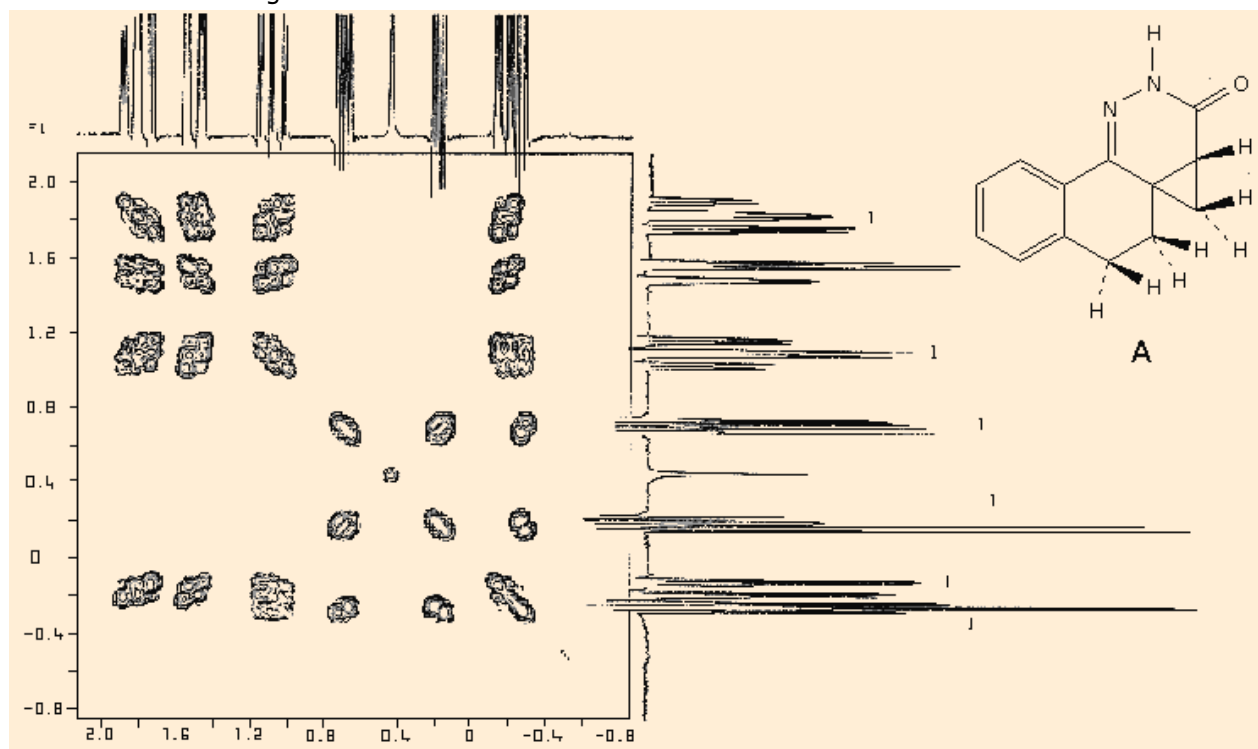


Fig. 5

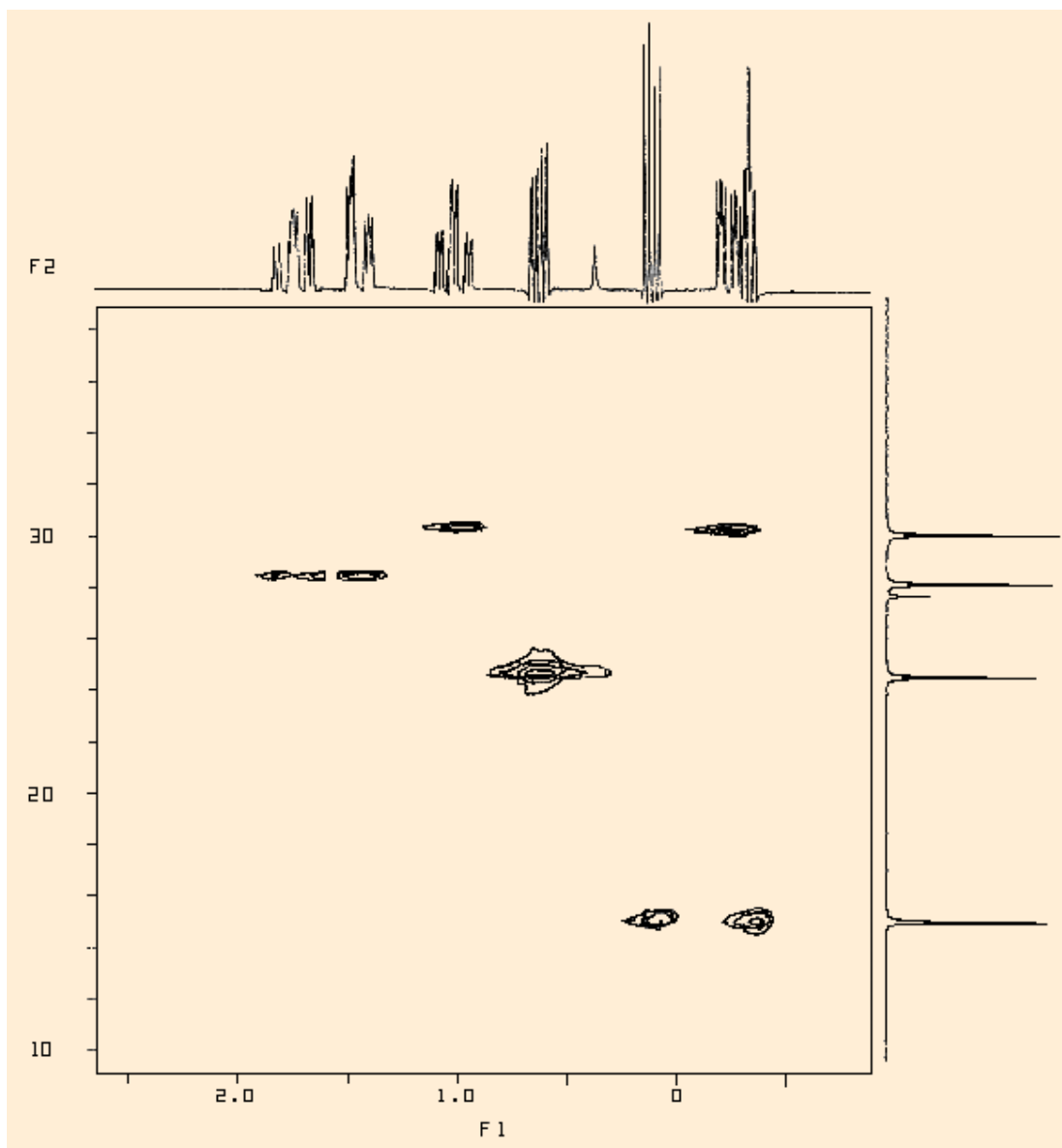


Fig. 6

Dalla semplice lettura degli integrali riportata sull'asse F2 è evidente che gli idrogeni metilenici sono diastereotopici, cioè ognuno dà luogo ad un segnale distinto con costanti di accoppiamento vicinali e geminali. All'interno della molecola esistono poi due sistemi di spin separati: si parla di sistemi di spin separati quando all'interno di una stessa molecola esistono due o più insiemi di protoni che presentano accoppiamenti all'interno dello stesso insieme ma non con gli altri.

Nel caso dell'anello tetraciclico A esiste un sistema di spin relativo ai tre idrogeni dell'anello ciclopropanico in cui ogni idrogeno è accoppiato esclusivamente con gli altri due ed un sistema di spin relativo ai quattro idrogeni dell'anello cicloesenico in cui ogni idrogeno presenta tre costanti di accoppiamento: con l'idrogeno geminale e con i due idrogeni vicinali. Nello spettro COSY quindi i segnali che presentano due cross-peak sono relativi al sistema ciclopropanico mentre i segnali che presentano tre cross-peak sono da attribuire agli idrogeni dell'anello cicloesenico.

Sulla base di queste premesse si possono fare le seguenti osservazioni:

- I segnali del sistema ciclopropanico cadono a - 0.30, 0.20 e 0.70 ppm.
- I segnali relativi al sistema cicloesenico cadono a - 0.18, 1.10, 1.50 e 1.80 ppm.

L'analisi dello spettro HETCOR permette poi di stabilire quali sono le coppie di idrogeni diastereotopici: tra i segnali relativi al sistema ciclopropanico i due segnali presenti rispettivamente a - 0.30 e 0.20 ppm sono correlati allo stesso carbonio e sono quindi attribuibili ai due idrogeni del gruppo metilenico. Tra i segnali del sistema cicloesenico alle due "coppie" di idrogeni diastereotopici è possibile attribuire rispettivamente spostamenti chimici pari a - 0.18 e 1.10 ppm per la prima coppia e 1.50 e 1.80 ppm alla seconda.

A quale o a quali esperimenti si potrebbe ricorrere per attribuire gli spostamenti chimici all'interno di ogni coppia di idrogeni diastereotopici?