

•
•
•
•
•
•
•

Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco
Sez. Chimica Organica Università di Perugia
santi@unipg.it
www.metodifisici.net

Dottorato di Ricerca in Chimica e Tecnologia del Farmaco

Claudio Santi

Spettroscopia 2D - NMR



• • • • • • • • • •

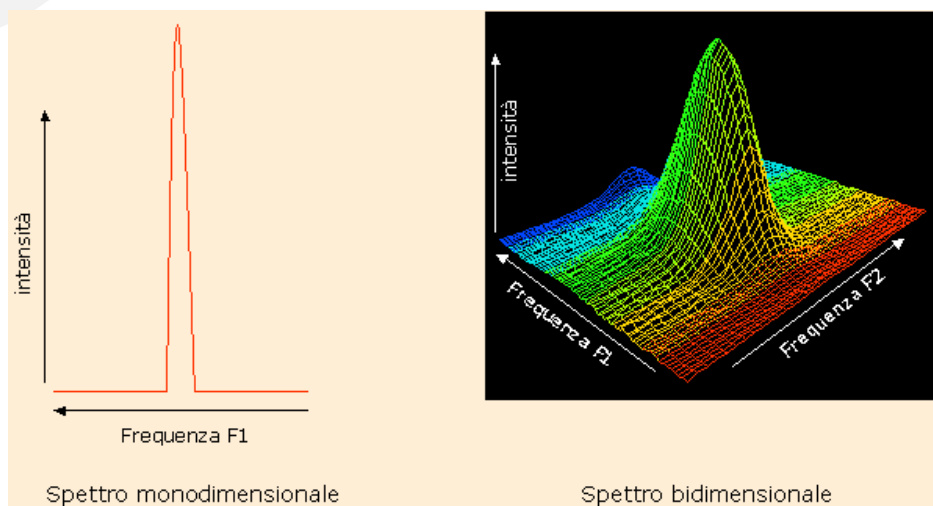
*Una serie di Efficaci Tecniche
Analitiche a disposizione del Chimico
Organico e Farmaceutico*

1 *Sequenze multi-impulso che permettono di creare una seconda dimensione temporale.*

Introduzione alla seconda dimensione – Spettroscopia *J-Resolved*

Uno spettro NMR 1D è un grafico che esprime delle intensità in funzione di frequenze (δ): si tratta di un grafico a due dimensioni, anche se è definito monodimensionale in quanto esiste una sola dimensione “frequenza”. Uno spettro NMR bidimensionale è invece un grafico a tre dimensioni anche se viene in genere rappresentato su due dimensioni di frequenza, omettendo l’intensità.

Quindi in un esperimento 2D (bidimensionale) le due dimensioni a cui si fa riferimento sono sempre assi di frequenze. Considerando che in un esperimento di pulse-NMR le frequenze vengono ricavate trasformando una funzione tempo (attraverso la trasformata di Fourier) uno spettro 2D implica l’acquisizione simultanea di due funzioni temporali. Due scale dei tempi indipendenti che, dopo una doppia trasformata di Fourier dà luogo ad una matrice quadrata di punti che esprime valori di frequenza su entrambe gli assi.

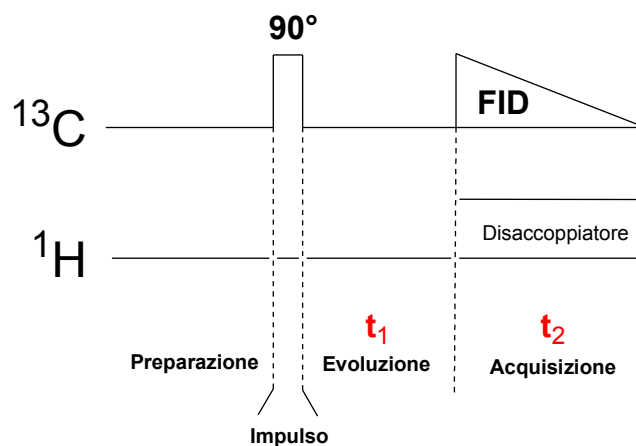


In un normale esperimento NMR l'impulso di eccitazione è immediatamente seguito dalla registrazione dell'interferogramma (FID). Negli esperimenti che sfruttano invece sequenze di impulsi, come ad esempio l'esperimento APT (Attached Proton Test), il sistema di spins viene sottoposto ad una fase di preparazione prima di acquisire i dati relativi al FID.

Una sequenza 2D queste due fasi sono separate da uno o due intervalli (evoluzione e mixing), il primo dei quali viene utilizzato per generare una artificiale scala dei tempi, introducendo così la seconda dimensione.

Per capire come si passa da 1D a 2D analizzeremo un esperimento molto semplice:

Si consideri il sistema di spin AX nella molecola di cloroformio in cui $A = {}^1\text{H}$ ed $X = {}^{13}\text{C}$. Immaginiamo di osservare la risonanza del carbonio modificando la sequenza normalmente utilizzata per registrare un esperimento in broad band come segue: -1. Inseriamo tra impulso di eccitazione ed acquisizione del FID un delay variabile detto periodo di evoluzione t_1 ; - 2. accendiamo il disaccoppiatore a banda larga solo durante la registrazione del FID lasciandolo spento durante le fasi di preparazione ed evoluzione..

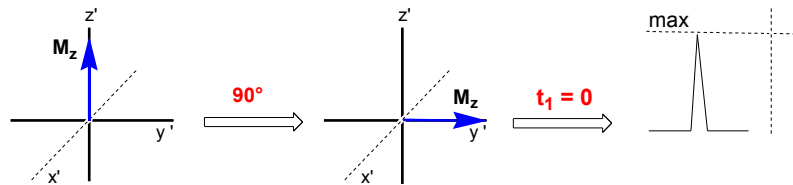


L'impulso di eccitazione, contrariamente a quanto avviene in un normale esperimento di carbonio 13 deve essere esattamente di 90° . A questo punto supponiamo di effettuare una serie di n esperimenti a differenti valori di t_1 iniziando da un valore di 0 con un incremento di pochi ms tra un esperimento ed il successivo.

Dopo aver registrato un certo numero di FID, la loro trasformata di Fourier rispetto al t_2 darà luogo ad una serie di spettri nel dominio delle frequenze F_2 . Poiché nel nostro esempio stiamo considerando la molecola di cloroformio e durante l'acquisizione viene acceso il disaccoppiatore ogni spettro sarà costituito da un singoletto.

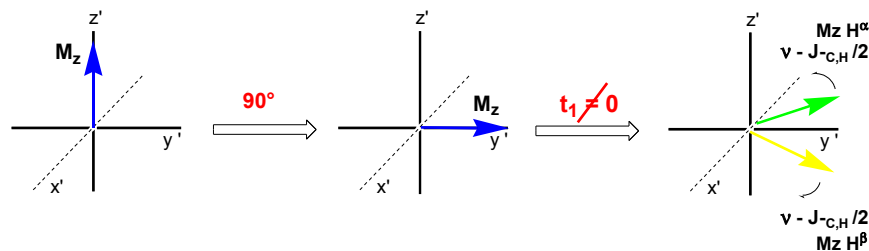
∴
 L'intensità del tale segnale nei vari esperimenti della serie, registrati a diversi valori di t_1 , sarà invece funzione dell'accoppiamento eteronucleare carbonio protone, vediamo come:

Dopo l'impulso a 90° il vettore magnetizzazione M_z sarà perfettamente allineato all'asse y' del sistema di riferimento rotante e per $t_1 = 0$ darà luogo al segnale di intensità massima, poiché tutta la magnetizzazione viene restituita sotto forma di segnale.



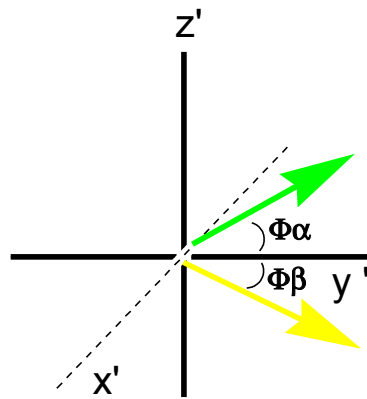
Quando t_1 è invece diverso da zero, poiché durante il periodo di evoluzione il disaccoppiatore rimane spento, bisogna tenere conto dell'accoppiamento scalare dovuto alla J diretta tra carbonio e protone. Introducendo quindi un periodo di evoluzione (t_1), l'intensità del segnale sarà funzione di due parametri: la durata di t_1 e la $J_{C,H}$.

Durante tale periodo infatti il vettore M_z , osservato nel sistema di riferimento rotante si risolve in due componenti $M_z^{H\alpha}$ ed $M_z^{H\beta}$. Indicando con ν la frequenza di risonanza e quindi la frequenza di rotazione del sistema di riferimento le due componenti ruoteranno rispettivamente a $\nu - J_{C,H}/2$ e $\nu + J_{C,H}/2$.



Risulterà quindi che le due componenti $M_z^{H\alpha}$ ed $M_z^{H\beta}$ ruoteranno alla stessa velocità radiante rispetto al sistema di riferimento rotante ma con direzione opposta e dopo un tempo pari a t_1 avranno descritto un angolo rispettivamente di Φ_α ed Φ_β gradi (equazione 1)

•
•
•
•
•
•
•



$$\Phi\alpha = 2\pi (vc - 1/2 J) t_1$$

$$\Phi\beta = 2\pi (vc + 1/2 J) t_1$$

equazione 1

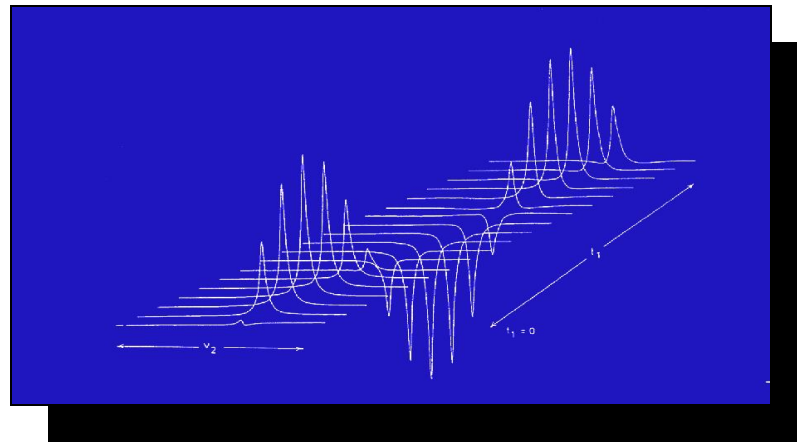
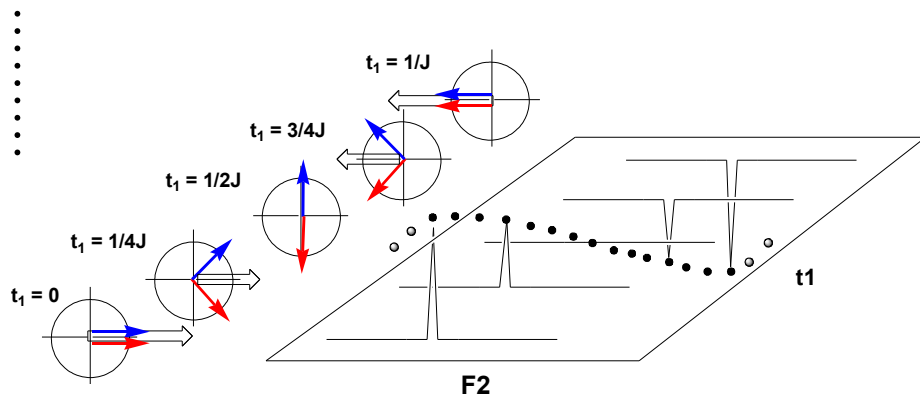
Tra i due vettori esisterà una differenza di fase Θ che evolverà nel tempo t_1 in base all'equazione 2 ed influenzando l'intensità del segnale prodotto.

$$\Theta = \Phi\beta - \Phi\alpha = 2\pi J t_1$$

equazione 2

Prendiamo in considerazione 5 punti limite di t_1 per vedere come evolve l'intensità del segnale nella dimensione temporale generata artificialmente: $t_1 = 0$, $t_1 = 1/4J$, $t_1 = 1/2J$, $t_1 = 3/4J$, $t_1 = 1/J$.

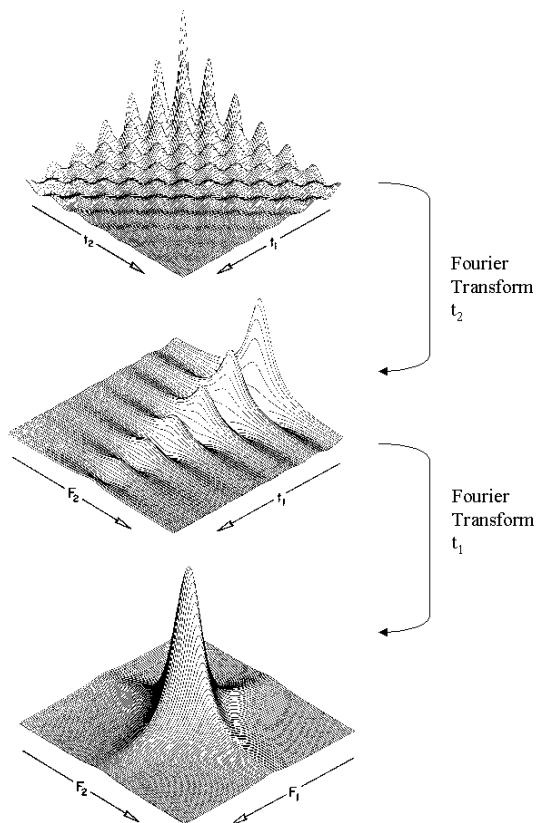
Abbiamo quindi detto che quello che si registra alla fine del periodo di evoluzione nella dimensione F2 è comunque un singoletto poiché durante l'acquisizione viene riacceso il disaccoppiatore che annulla l'effetto dell'accoppiamento, e che l'intensità del segnale prodotto sarà però influenzata dalla differenza di fase che esiste tra i due vettori al momento dell'acquisizione e sarà proporzionale alla somma delle relative componenti sull'asse y' . Per $t_1 = 0$, quindi, essendo la differenza di fase nulla si otterrà un singoletto di intensità positiva massima. All'aumentare di t_1 l'intensità del segnale andrà progressivamente diminuendo poiché diminuisce la somma vettoriale della componenti in antifase sull'asse y' , annullandosi per $t_1 = 1/2J$. Per differenze di fase che vanno poi da 180° a 360° il segnale assumerà intensità negative fino ad un massimo di intensità negativa per $t_1 = 1/J$.



Come si vede nella figura lo spettro **F2** risulta modulato nella dimensione t_1 dalla costante di accoppiamento carbonio idrogeno. La dimensione **F2** conterrà quindi l'informazione del chemical shift δ mentre la dimensione t_1 quella della $J_{C,H}$. Nell'esempio del cloroformio quindi nella dimensione **F2** lo spettro sarà costituito da un singoletto sdoppiata in **F1** dalla costante di 209,0 Hz. I risultati acquisiti in un esperimento 2D vengono sottoposti ad una doppia trasformata di Fourier per ottenere una matrice quadrata di punti nel dominio delle frequenze

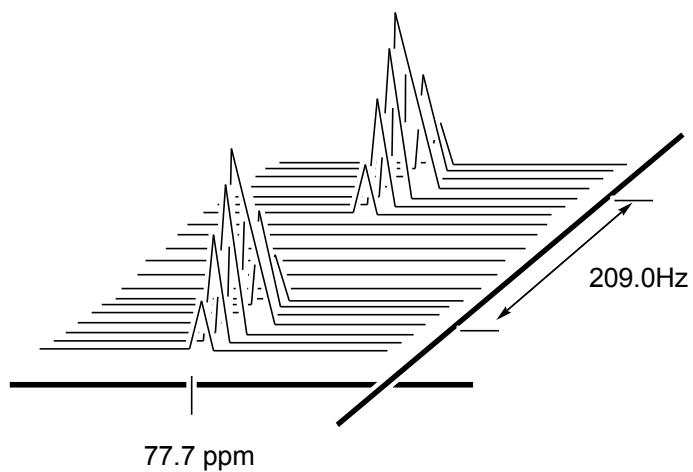
$$S(t_1, t_2) \xrightarrow{FT_1} S(t_1, F_2) \xrightarrow{FT_2} S(F_1, F_2)$$

•
•
•
•
•
•
•

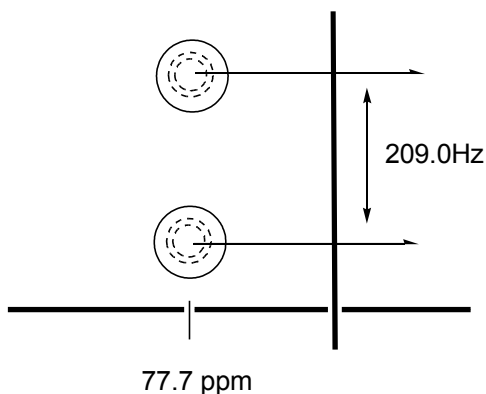


Gli spettri ottenuti dopo la trasformazione possono essere riportati in due modi, vediamo come, prendendo come esempio il risultato del nostro esperimento sul cloroformio:

1. In maniera tridimensionale (*stacked plot*). Pur producendo immagini piuttosto pittoresche le stesse risultano piuttosto complesse epoco adatte alla lettura degli spettri:



⋮
2. Sottoforma di mappa bidimensionale di punti (*contour plot*), in cui non si tiene conto graficamente della intensità dei picchi. Questa è la forma normalmente utilizzata per rappresentare. Tutti gli spettri 2D

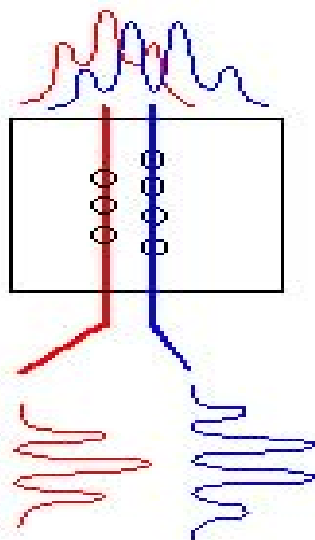


L'esperimento appena descritto, rappresenta la forma più semplice di spettroscopia J-resolved, una tecnica che viene solitamente utilizzata per misurare il valore di costanti di accoppiamento eteronucleari o in sistemi omonucleari che presentano una considerevole sovrapposizione di segnali.

Le sequenze utilizzate in realtà prevedono combinazioni di impulsi più complesse che introducono periodi di rifocalizzazione per aumentare la sensibilità e la risoluzione dello spettro. Per motivi di tempo non ci addenteremo in queste tecniche che peraltro trovano un impiego modesto nella determinazione strutturale di molecole organiche.

Vediamo comunque un esempio di correlazione J-resolved: per capire come, nel caso di due multipletti molto sovrapposti la mappa di correlazione 2D ci permetta di risalire agevolmente sia alla molteplicità che alle costanti di accoppiamenti presenti nei segnali analizzati.

•
•
•
•
•
•
•



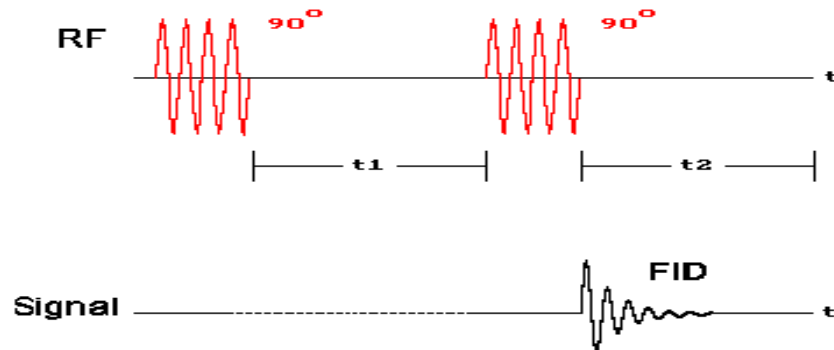
2 *Correlazioni scalari omo ed eteronucleari per una completa assegnazione e determinazione strutturale*

Spettroscopia di Correlazione Omonucleare– COSY

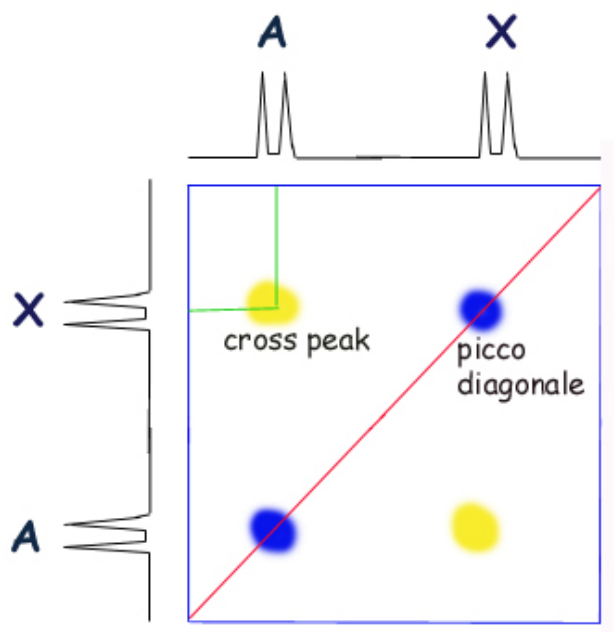
Prendiamo ora in esame una classe di esperimenti che vengono indicati come “shift correlation spectroscopy”

Diversamente a quanto visto per la spettroscopia J-resolved in un esperimento di shift-correlazione entrambe gli assi della mappa 2D esprimono valori di chemical shift ed i cross peak correlano spins nucleari accoppiati scalarmene o dipolarmente. Il più comune tra gli esperimenti di shift-correlazione è il COSY (CORrelation SpettrascopY). L'esperimento correla i chemical shift di protoni accoppiati scalarmene e contrariamente a quanto visto per la spettroscopia J-resolved lo scopo principale non è quello di misurare il valore delle costanti di accoppiamento, ma quello di ottenere informazioni strutturali dalla determinazione della connettività nucleare.

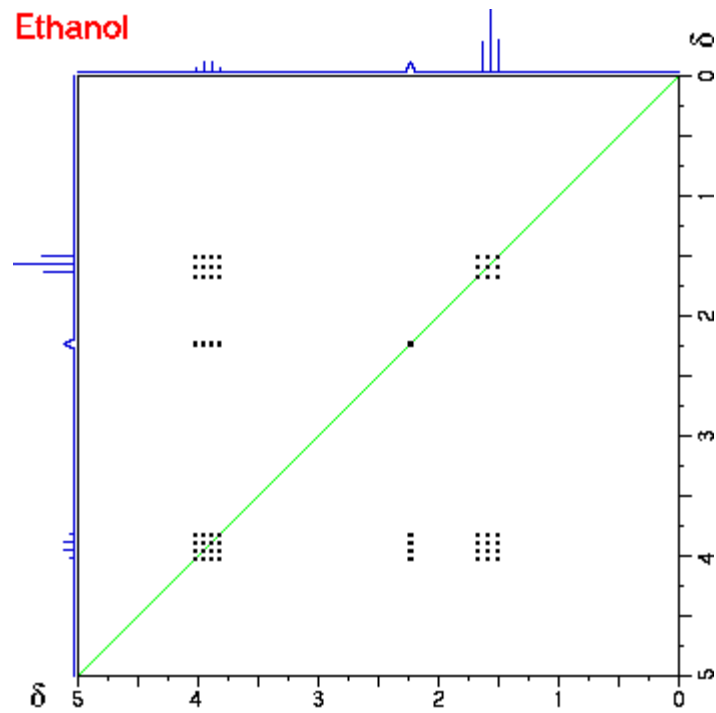
Si può affermare che un esperimento COSY è l'equivalente bidimensionale dell'esperimento di spin spin homo-decoupling e rispetto a questo presenta il vantaggio di fornire, con un unico esperimento, tutte le connettività presenti nella molecola. La sequenza di impulsi ne prevede due 90° separati dal tempo di evoluzione t_1 e seguiti da quello di acquisizione t_2 .



Per un sistema di spin AX la mappa di correlazione COSY consiste in segnali diagonale centrati alle coordinate $\nu_A\nu_A$ e $\nu_B\nu_B$ e di due cross peak alle coordinate $\nu_A\nu_B$ $\nu_B\nu_A$. Il cross peak correla i chemical shift di due picchi diagonali ed indica l'esistenza di una costante di accoppiamento tra i due protoni, questo porta ad una diretta assegnazione dei protoni adiacenti fornendo importanti informazioni in merito alla struttura molecolare.



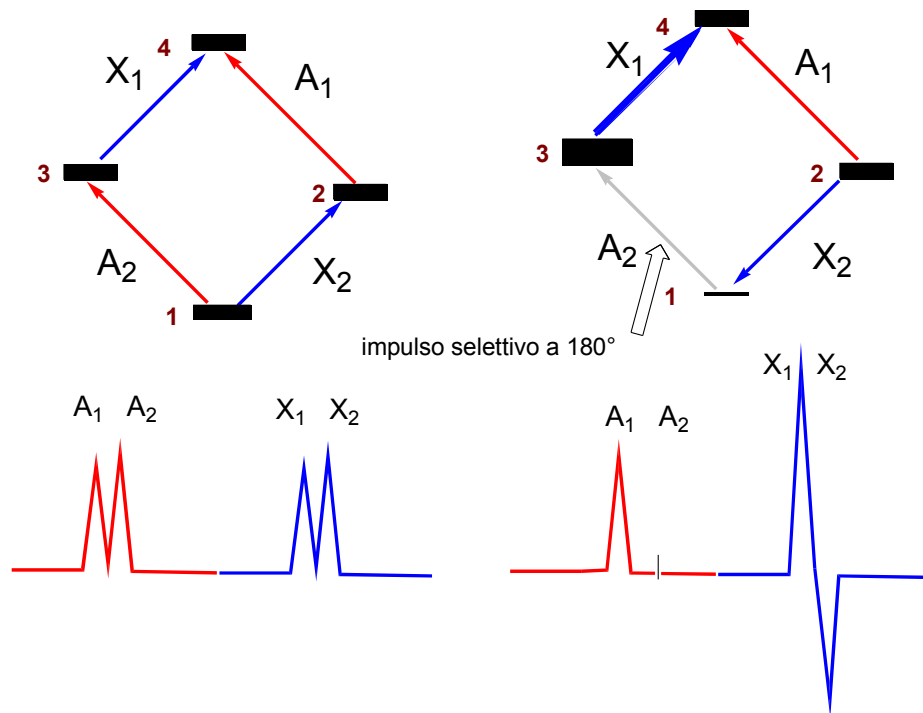
In condizioni di alta risoluzione si può osservare una struttura fine sia nei picchi diagonali che in quelli di correlazione, come schematizzato qui di seguito nello spettro dell'etanolo e questo permette un calcolo agevolato delle molteplicità e delle costanti di accoppiamento

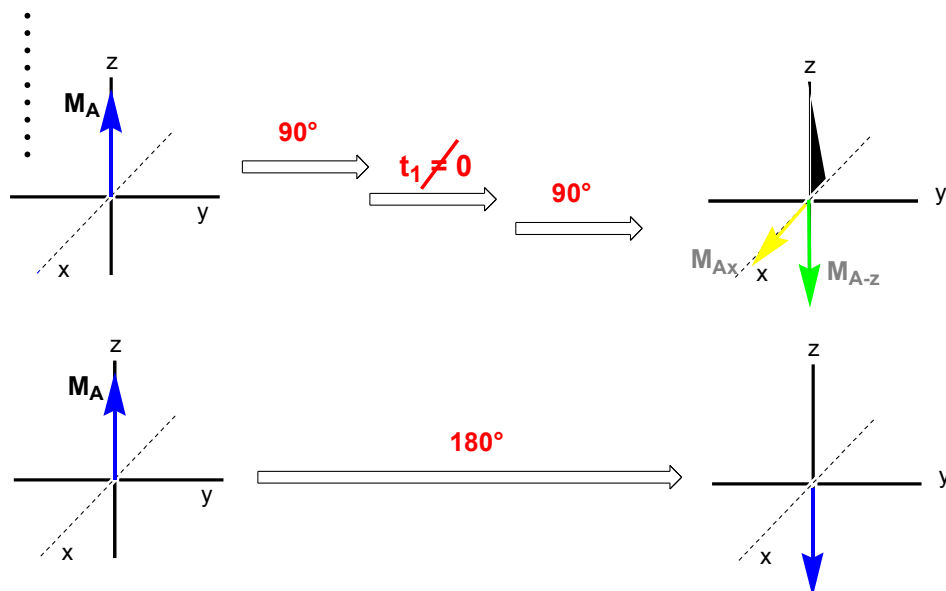


Cerchiamo ora di capire cosa origina i picchi che compongono uno spettro COSY partendo dai picchi diagonale. Analizziamo quindi l'evoluzione del chemical shift del nucleo A senza considerare per il momento il suo accoppiamento con X. L'impulso a 90° produce una magnetizzazione trasversale M_A che ruota alla frequenza ν_A attorno all'asse z del sistema di riferimento statico x,y,z.

...
 Possiamo quindi dire che la perturbazione selettiva del segnale A con un impulso a 180° provoca un trasferimento di magnetizzazione sul nucleo X generando un segnale che va a modificare le intensità di quello originario.

Una condizione analoga la troviamo nell'esperimento COSY. Dopo il secondo impulso a 90° , la componente della magnetizzazione lungo l'asse $-z$ non è altro che la risultante residua di un impulso a 180° e sarà in grado di produrre un trasferimento di magnetizzazione ai nuclei scalarmene accoppiati modulando nel tempo t_1 il chemical shift di tali nuclei.





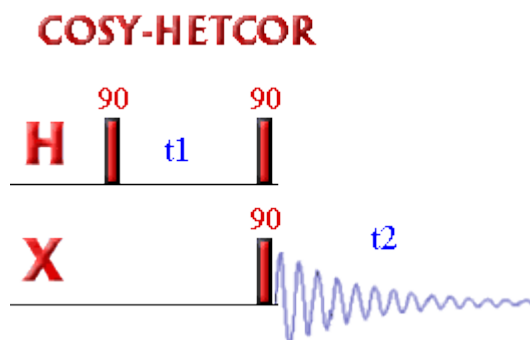
Spettroscopia di Correlazione Eteronucleare *HETCOR, HMQC, COLOC*

Una interessante evoluzione della spettroscopia di shift correlazione è rappresentato dall'esperimento HETCOR che mette in correlazione i nuclei di carbonio (ma possono essere presi in considerazione anche altri X-nuclei) con i protoni ad esso direttamente legati e quindi accoppiati con una J_{CH} diretta. L'utilità di questo esperimento è immediata, poichè permette di attribuire i segnali del carbonio conoscendo lo spettro protone e/o viceversa.

HETCOR non è altro che la versione eteronucleare dell'esperimento di correlazione COSY visto in precedenza. Una semplice sequenza, come quella di seguito riportata schematizza efficacemente la tecnica di acquisizione di dati relativi a connettività eteronucleari, attraverso una tecnica 2D.

Immaginiamo di sottoporre il nostro sistema di spins ad una sequenza composta da due impulsi a 90° sul canale del protone applicando, contemporaneamente al secondo, un impulso a 90° anche nel canale del carbonio. Il primo impulso eccita il protone, il cui chemical shift viene registrato durante il periodo di evoluzione t_1 . L'esistenza di una costante di accoppiamento diretta tra il protone ed il carbonio a cui è legato permette al secondo impulso di trasferire magnetizzazione all'X-nucleo (che può essere un atomo di carbonio ^{13}C o qualsiasi altro nucleo magneticamente sensibile).

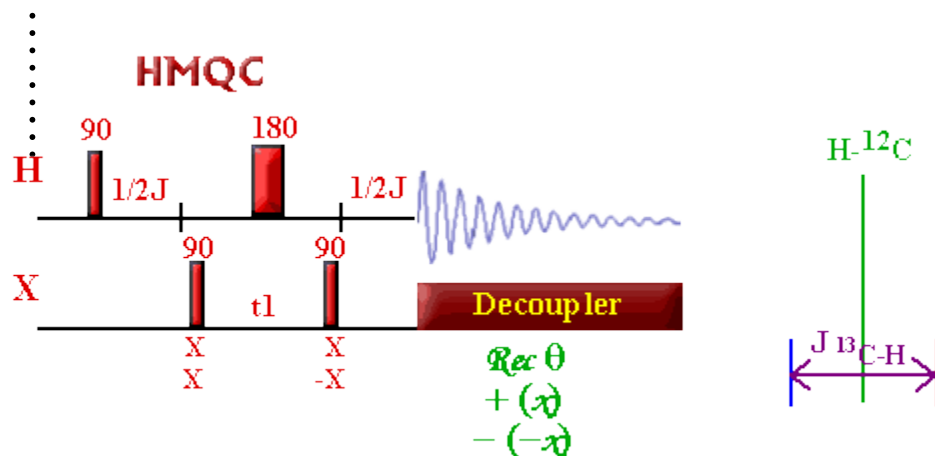
•
•
•
•
•
•



Questa sequenza tuttavia non trova pratica applicazione nella forma appena descritta poiché non prevede la possibilità di acquisire il carbonio in maniera disaccoppiata. Per questo motivo sono state messe a punto numerose altre sequenze che introducono un periodo di rifocalizzazione (HETCOR), una sequenza di tipo Bird per il disaccoppiamento (INEPT-HETCOR), tutti accorgimenti mirati ad incrementare la sensibilità nella registrazione del segnale del carbonio 13 e la semplificazione nel numero di righe dello spettro.

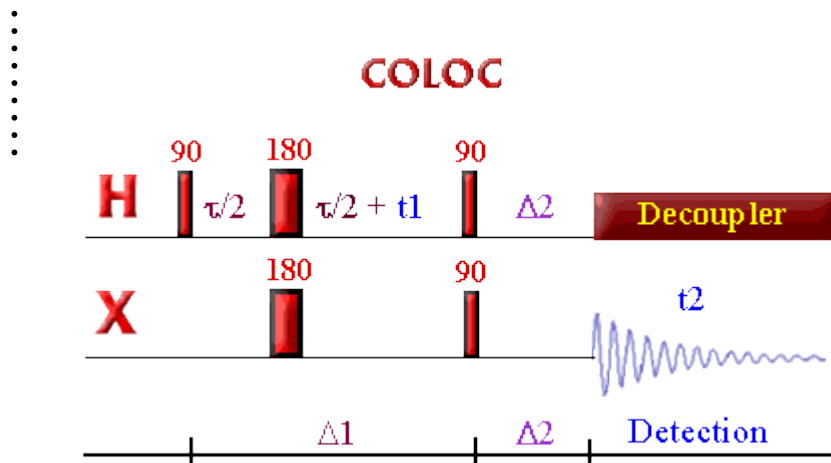
Di recente queste tecniche sono state quasi completamente sostituite dalla cosiddette tecniche inverse, in cui viene registrato il segnale del protone durante il tempo t2 mentre il chemical shift dell'eteronucleo viene registrato durante il tempo di evoluzione t1. Lo scopo è quello di incrementare la sensibilità dell'esperimento andando ad osservare il nucleo più sensibile, contrariamente a quanto invece non avveniva nell'HETCOR.

Esistono sostanzialmente 2 tipi di esperimenti inversi, quelli che sfruttano durante il tempo di evoluzione transizioni a multiplo quanto (HMQC HMBQC) e quelle che invece utilizzano transizioni INEPT a singolo quanto (HSQC). Per motivi di tempo non ci addentreremo nella descrizione delle varie sequenze d'impulsi, basterà tenere presente che nel caso della tecnica HMQC e HMBQC, quelle più comunemente utilizzate, viene introdotta la cosiddetta tecnica "echo-difference" che con opportuni cicli di fase elimina il segnale dovuto ai protoni non accoppiati con l'eteronucleo.

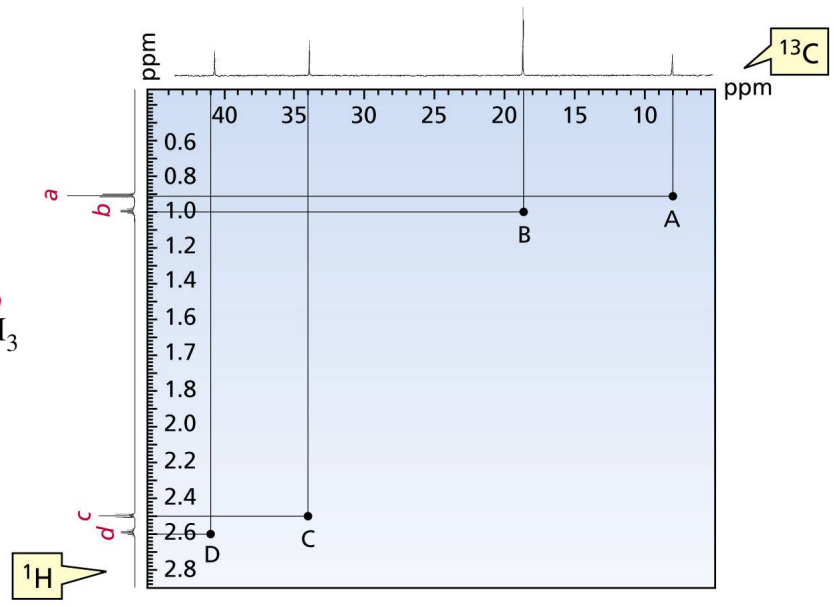
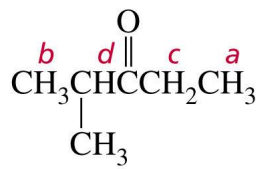


La sequenza inizia con un impulso sul canale del protone seguito da un delay pari a $1/2J$ durante il quale la magnetizzazione dei protoni accoppiati all'eteronucleo acquista un carattere di antifase. A questo punto un impulso di 90° sugli X-nuclei genera una magnetizzazione a multiplo quanto che evolve nel tempo $t1$ sotto l'influenza del nucleo X. Durante tale periodo il chemical shift del protone e la costante di accoppiamento dell'eteronucleo vengono rifocalizzate utilizzando un impulso a 180° . Alla fine del tempo di evoluzione un altro impulso a 90° sugli X-nuclei trasferisce magnetizzazione alla magnetizzazione a singolo quanto osservabile del protone. Che viene lasciata evolvere per un ulteriore periodo di $1/2J$ per rifocalizzare la magnetizzazione in antifase. La fase dell'ultimo impulso a 90° variata, variando la fase del ricevitore e questo comporta la cancellazione dei protoni non accoppiati ad eteronuclei. Per finire, durante la registrazione gli X-nuclei vengono disaccoppiati utilizzando sequenze di tipo Waltz o Garp.

Modificando la sequenza è possibile ottenere la correlazione carbonio idrogeno sulla base degli accoppiamenti a lungo raggio attraverso due o tre legami. Questa tecnica prende il nome di COLOC (CORrelate Long range Coupling) e viene frequentemente utilizzata per la completa caratterizzazione di sostanze naturali vista la possibilità che offre di ottenere informazioni anche su carboni quaternari.



In una mappa di correlazioni eteronucleari come quelle appena descritte non compare più una linea diagonale correlata da cross peaks ma solamente dei picchi che correlano i chemical shift riportati sui due assi in F1 il protone ed in l'eteronucleo.

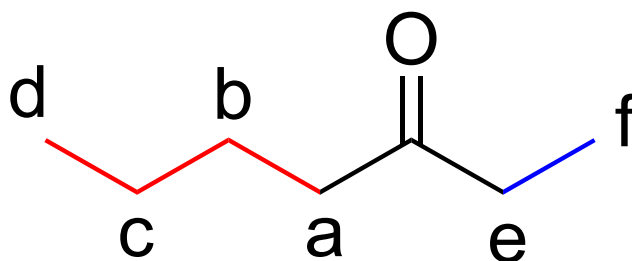


⋮

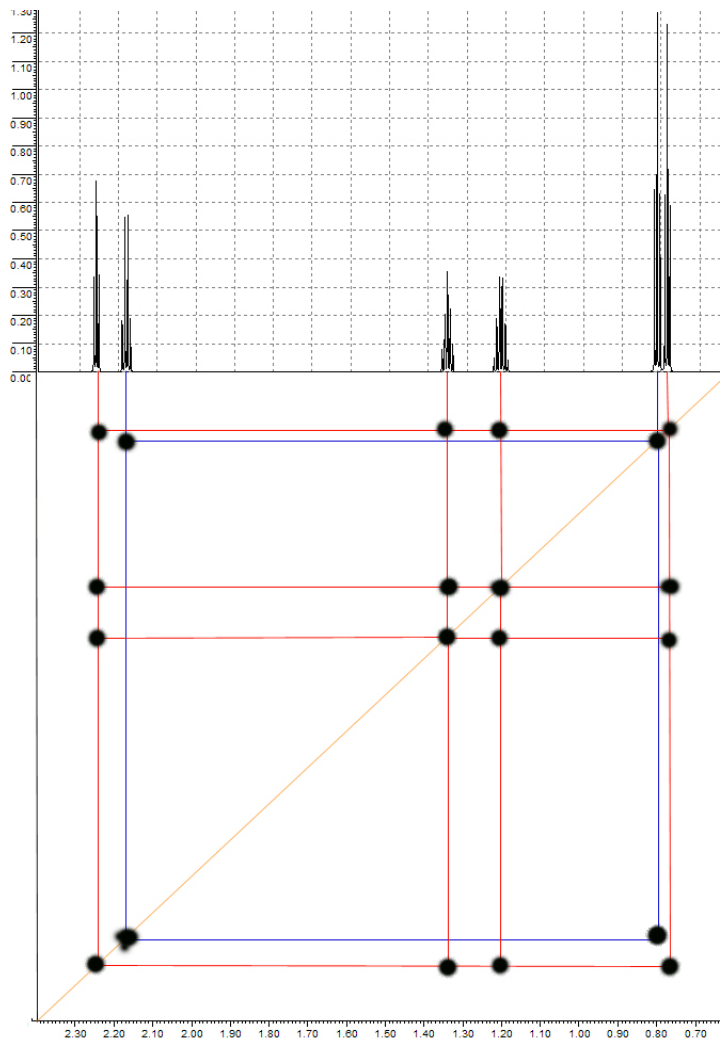
Técniche di Correlazione Totale – TOCSY

Senza entrare nel dettaglio delle varie sequenze, la spettroscopia TOCSY (Total COrrelation SpettroscopY) è, dal punto di vista grafico, molto simile alla spettroscopia COSY. La correlazione tuttavia non si basa solo sull'esistenza di costanti di accoppiamento dirette o vicinali ma si estende a tutto il sistema di spins.

Per capire cosa è un sistema di spin si consideri la molecola del 3 eptanone. La presenza del carbonile che interrompe il network di accoppiamenti nella catena alifatica permette di distinguere due differenti sistemi di spins. I protoni **a,b,c,d** costituiscono il primo sistema di spins ed il protoni **e** ed **f** il secondo.

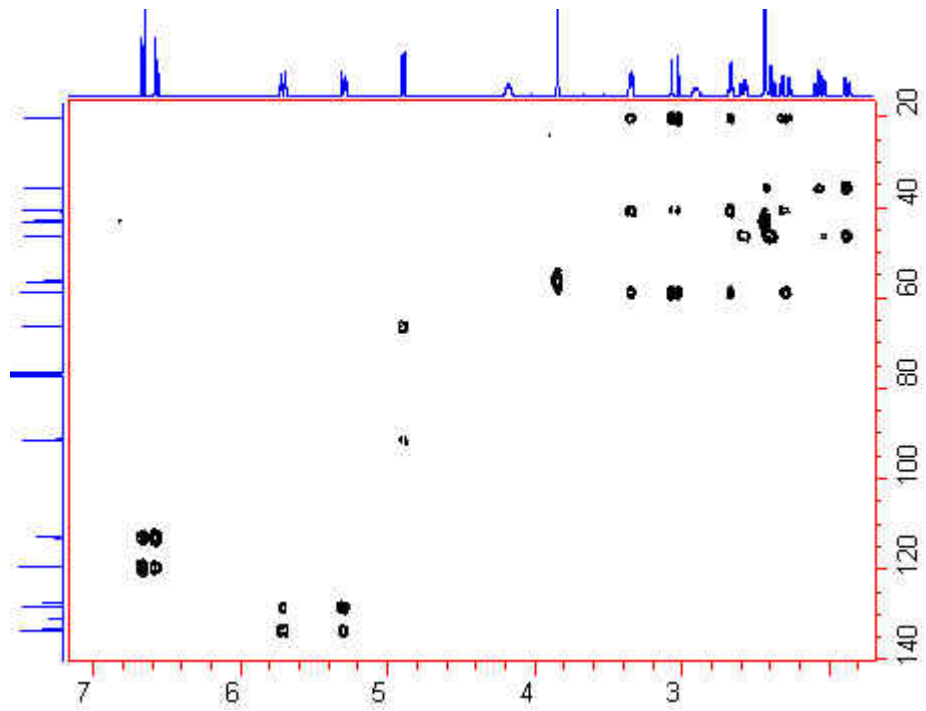
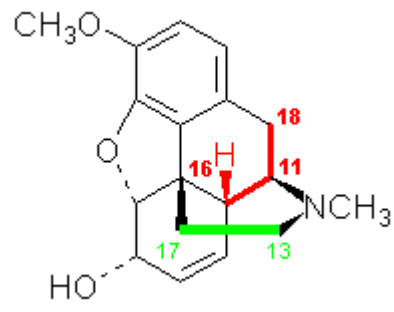


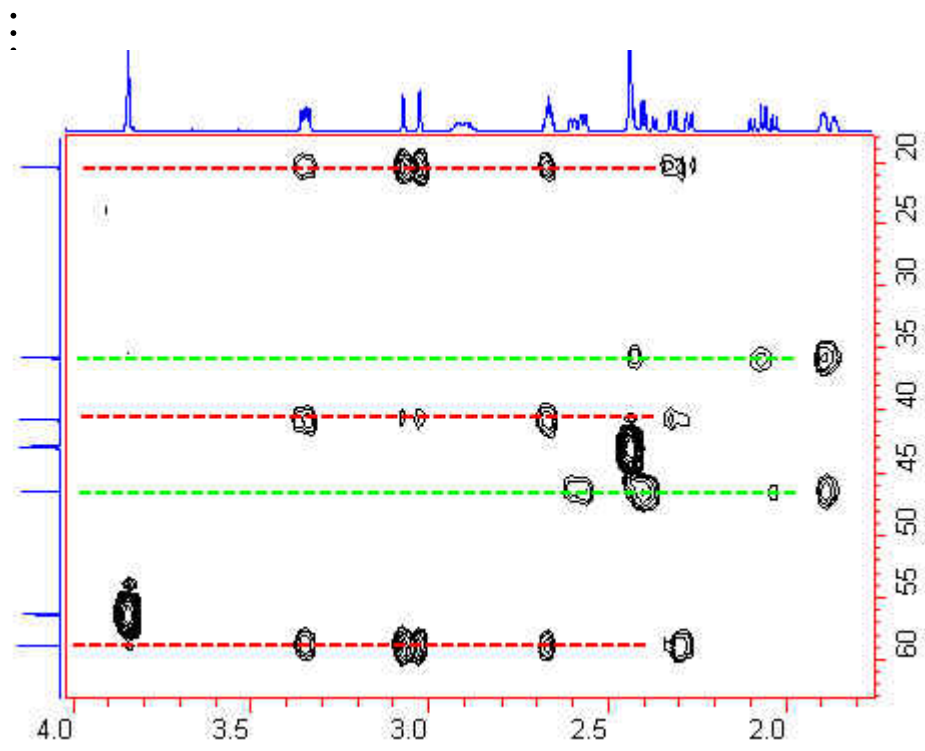
•
•
•
•
•
•
•
•



E' una tecnica molto importante e versatile soprattutto per quanto riguarda l'assegnazione di strutture molto complesse e macromolecole. Una estensione della tecnica di correlazione totale è la cosiddetta HMQC-TOCSY, una correlazione eteronucleare che correla il chemical shift di ciascun carbonio con l'intero network protonico del sistema di spins a cui appartiene. Vediamo un esempio riportato per la molecola della codeina:

.....



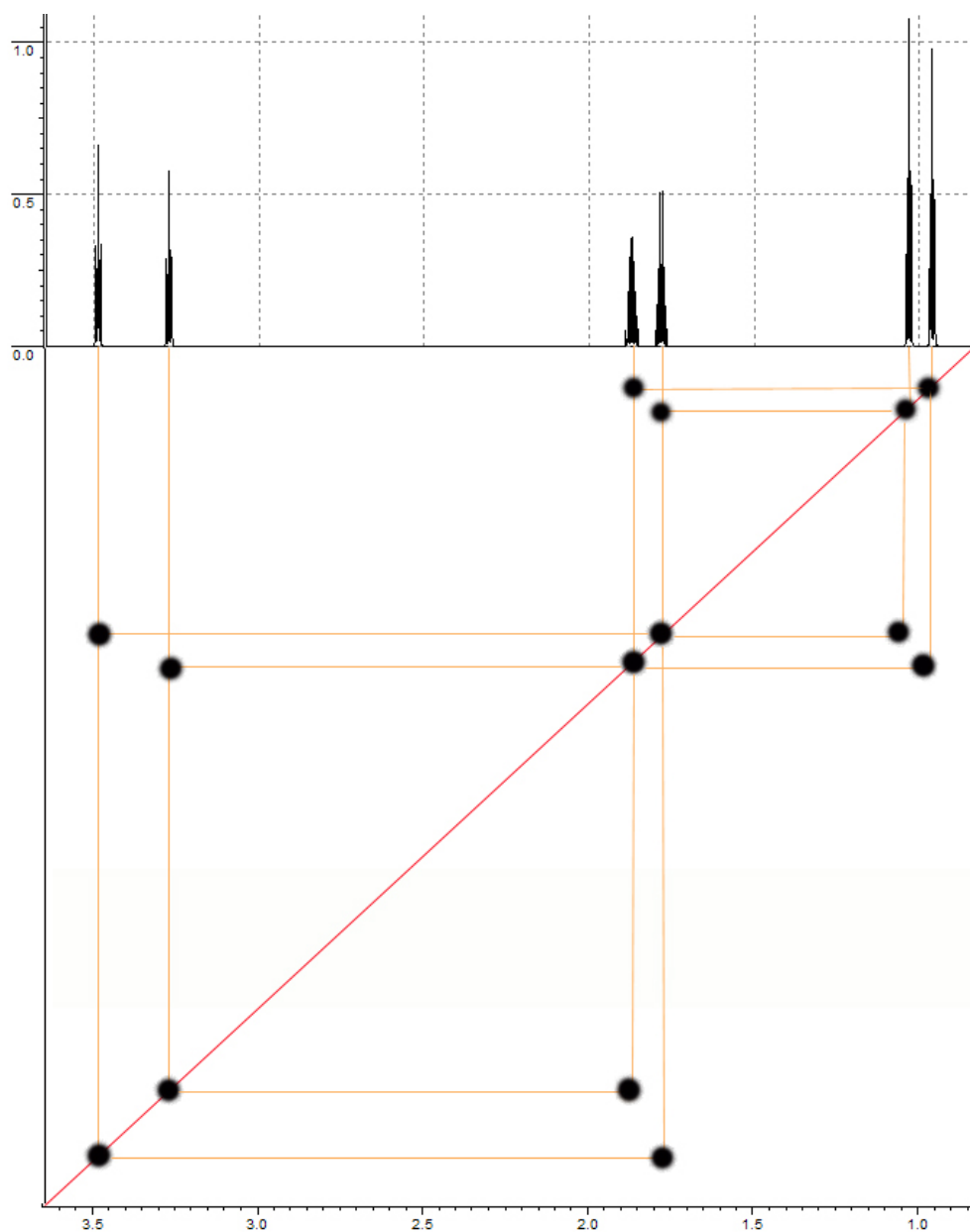




Esercizi

Esercizio 1

Dallo spettro COSY di una miscela equimolare di *n*-Bromo-Propano ed *n*-Cloro-Propano assegnare i segnali relativi a ciascuna delle due strutture.

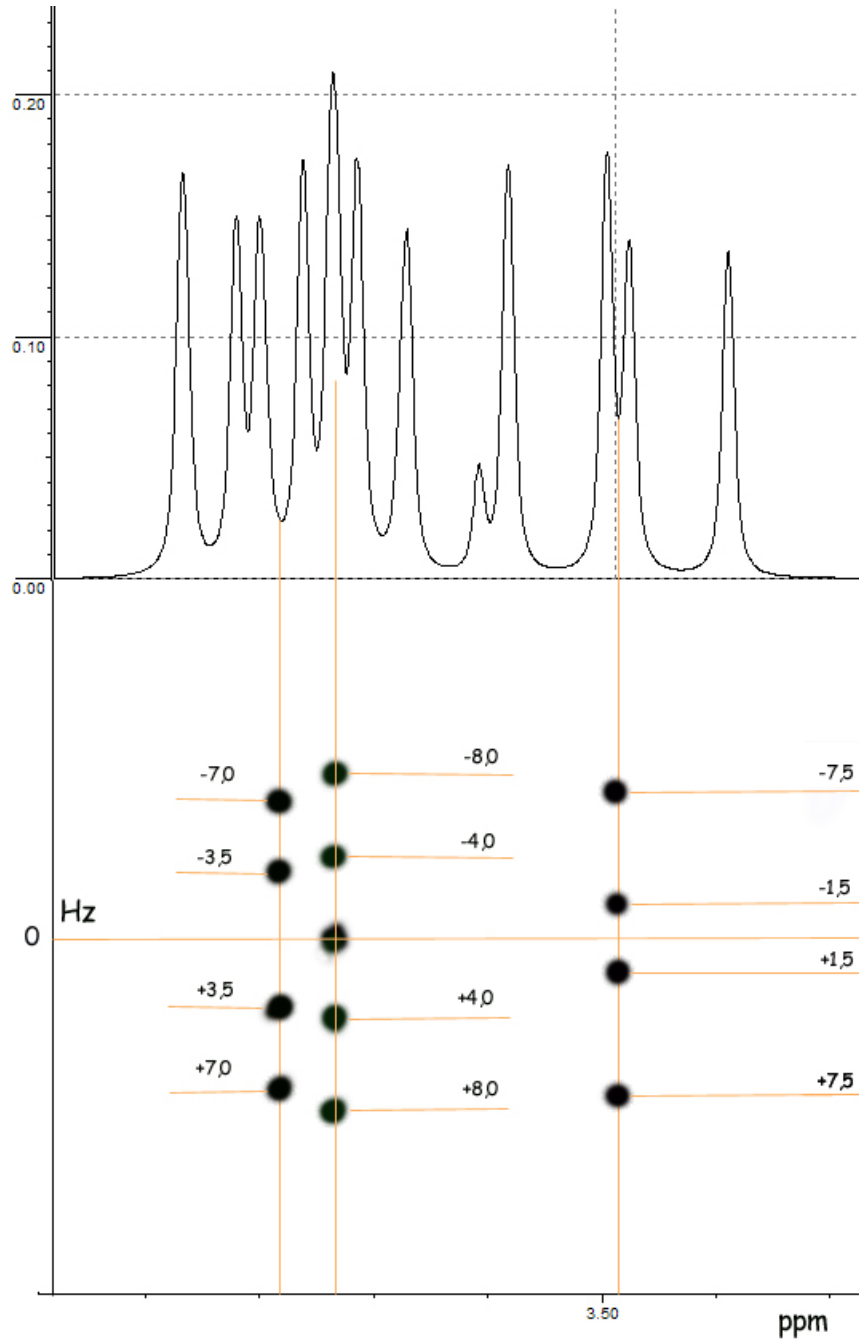


•
•
•
•
•
•
•
•

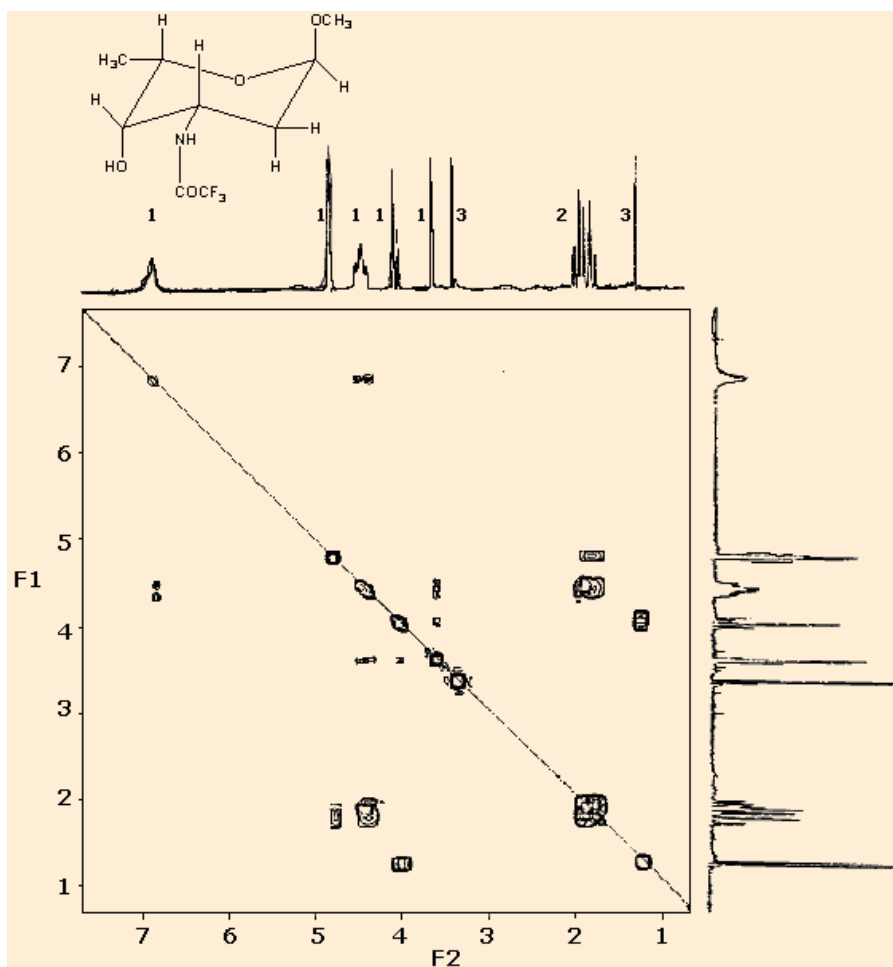
⋮

Esercizio 2

Indicare la molteplicità ed il valore delle costanti di accoppiamento dei segnali che compongono il seguente multipletto:



•
•
•
•
•
•
•
•
•
•



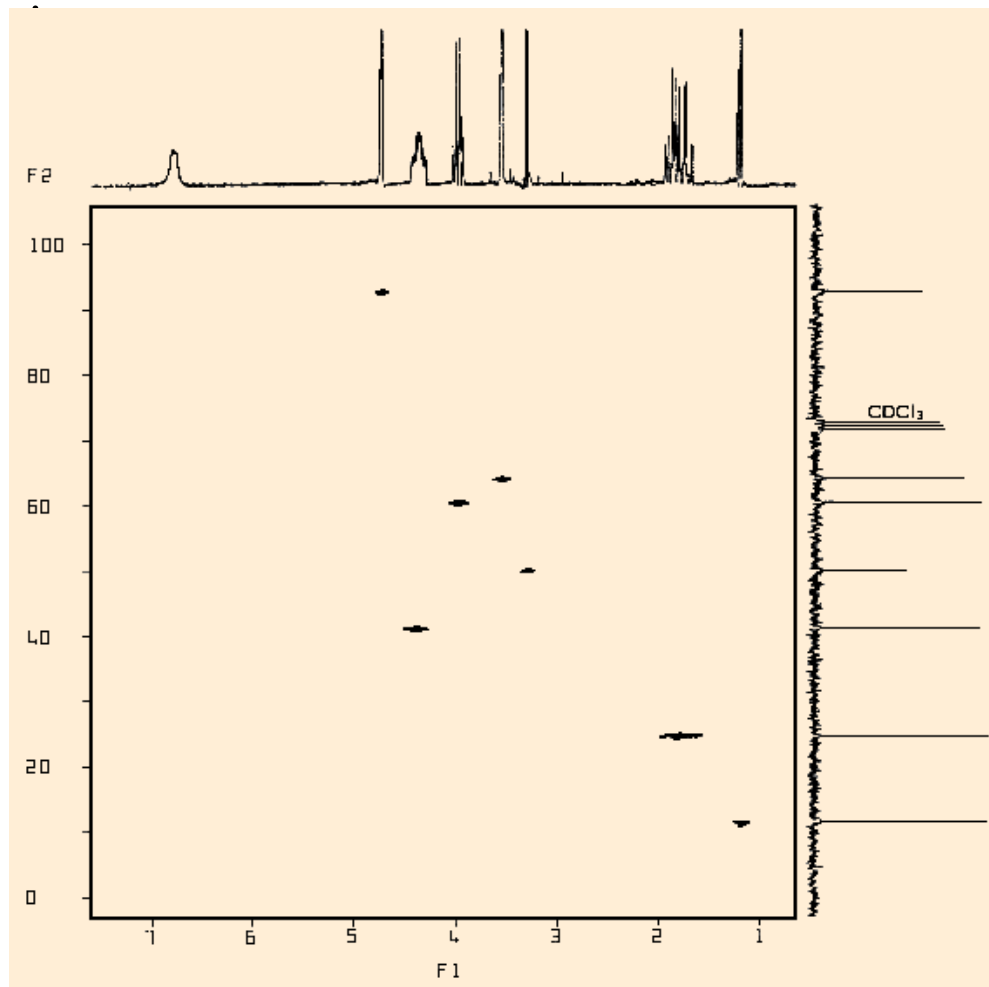


Fig. 4

TOCSY-NMR-Experiment

TOTAL CORRELATED SPECTROSCOPY

