

Θεοδ. Μαυρομούστακος
Ανδρέας Τζάνης
Γεωργίου Σπυρούλια
Εμμανουήλ Μικρός

Αντωνίου Κολοκούρη
Κωνσταντίνου Παπακωνσταντίνου
Ιωάννη Γεροθανάση
Ιωάννη Ματσούκας

Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός



Θ. Μαυρομούστακος, Α.
Τζάνης, Γ. Σπυρούλιας,
Ε. Μικρός, Α. Κολοκούρης, Κ.
Παπακωνσταντίνου, Ι.
Γεροθανάσης, Ι. Ματσούκας.
Εκδόσεις Συμμετρία 2019.
ISBN 978-960-266-504-6.



ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

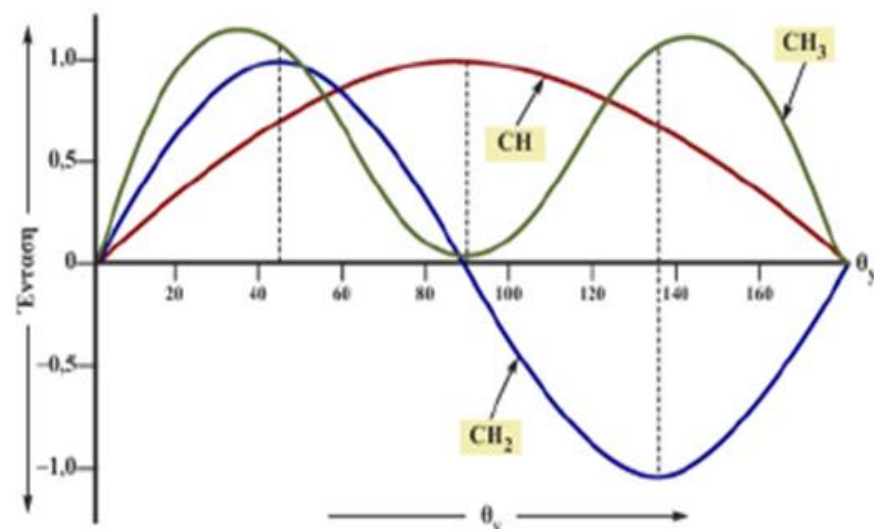
(**N**UCLEAR **M**MAGNETIC **R**ESONANCE SPECTROSCOPY)

Κεφάλαιο 6^ο Απλοποίηση φασμάτων- Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων

Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη
atzan@chem.uoa.gr

03/04/2023

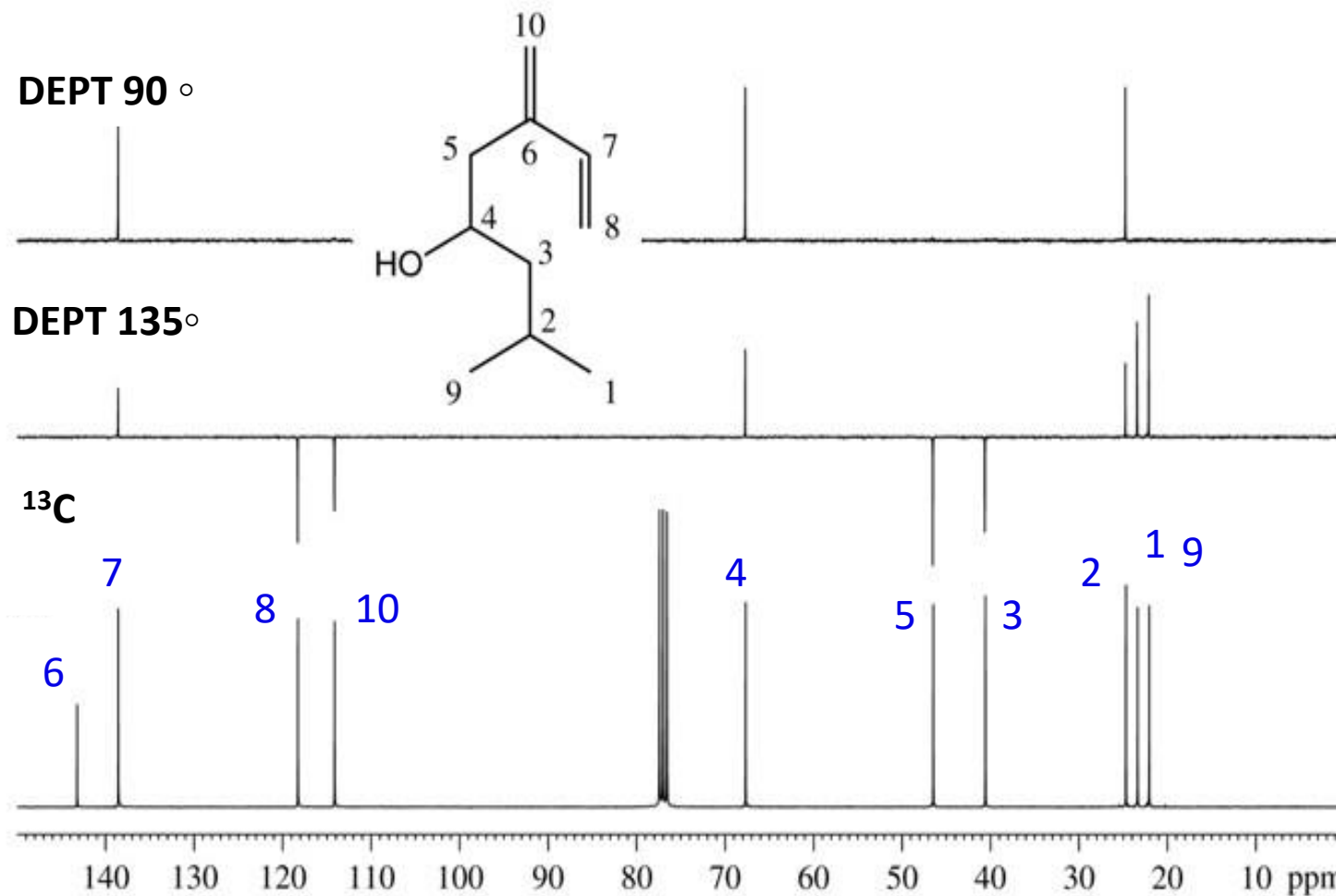
Ας θυμηθούμε...



DEPT C-13 NMR Spectra

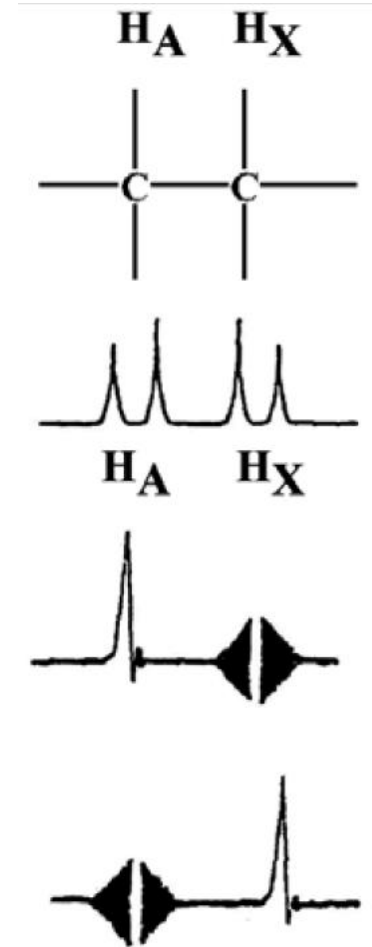
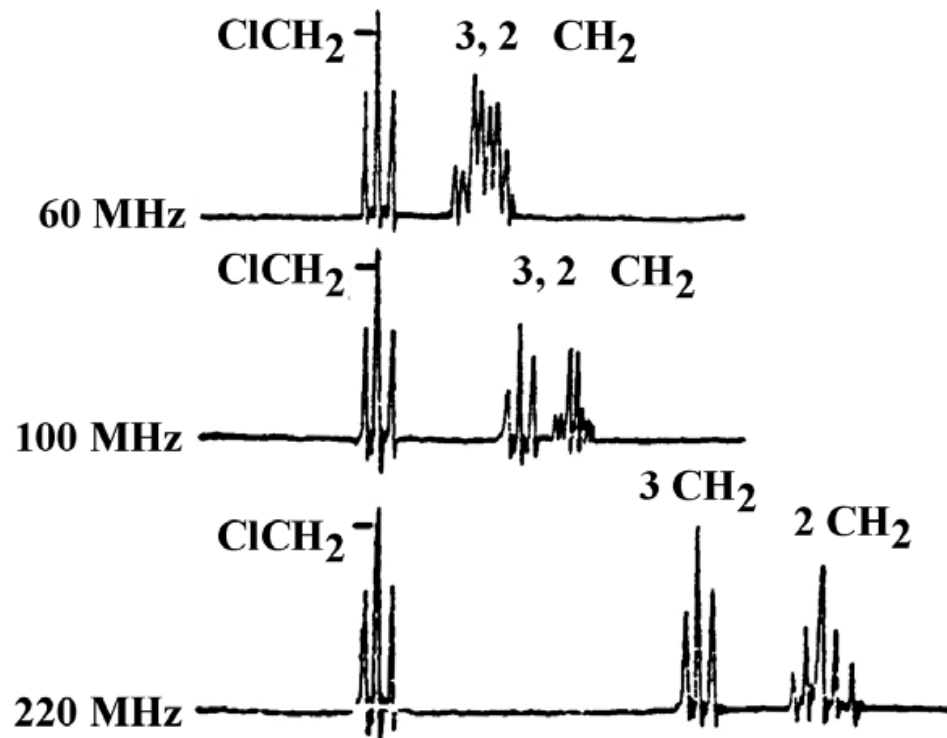
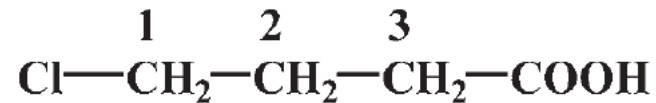
Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT Spectroscopy)

Type	C	CH	CH ₂	CH ₃
135°	0	+	-	+
90°	0	+	0	0
45°	0	+	+	+
Normal	+	+	+	+



Απλοποίηση φασμάτων NMR

- α) αύξηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου,
β) διπλό συντονισμό ή αποσύζευξη των σπιν,



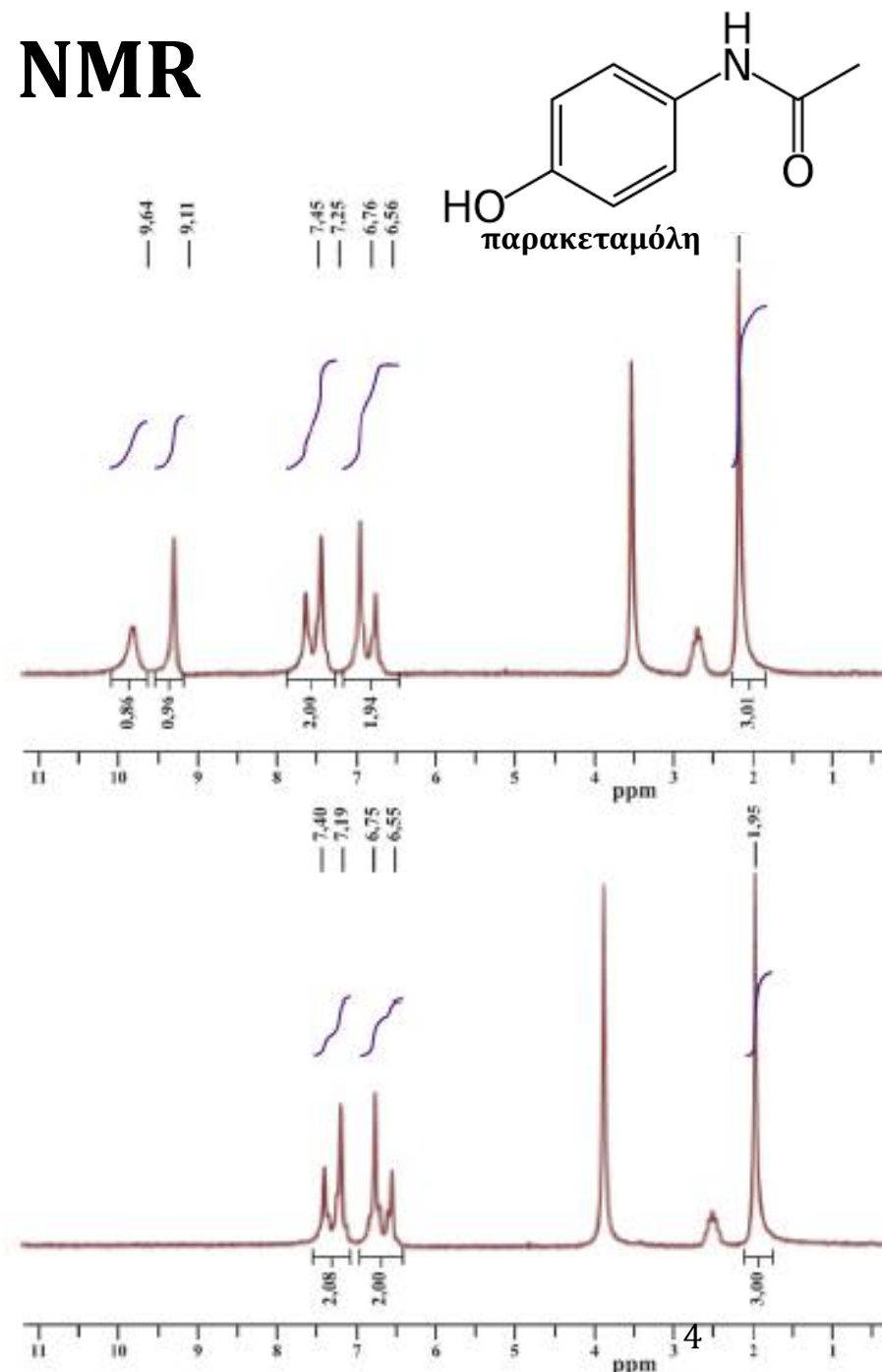
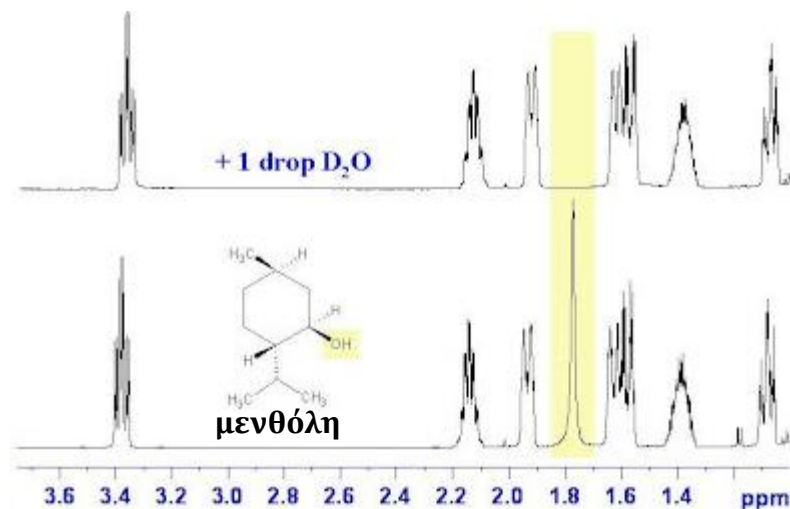
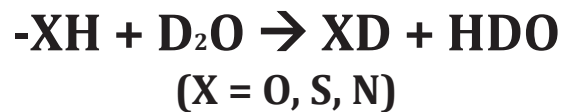
Αυτή η τεχνική απλοποίησης είναι επιτυχής μόνο, αν οι δύο απορροφήσεις των συζευγνυομένων πρωτονίων βρίσκονται τουλάχιστον σε μία απόσταση 20 Hz μεταξύ τους

Απλοποίηση φασμάτων NMR

γ) ανταλλαγή με δευτεριωμένο νερό

Κατά τη μέθοδο αυτή η **προσθήκη δευτεριωμένου νερού**, σε διάλυμα οργανικών μορίων έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των υδρογόνων των συνδεδεμένων με ετεροάτομο από το δευτέριο. Τα υδρογόνα που είναι ευκίνητα, ανταλλάσσονται εύκολα από το δευτέριο (**exchangeable protons**).

Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την άμεση διαπίστωση της ύπαρξης ή όχι υδρογόνων συνδεδεμένων με ετεροάτομο (**-OH, -SH, -NH₂ ή -NHR**).



Απλοποίηση φασμάτων NMR

δ) αντιδραστήρια που επιδρούν στη χημική μετατόπιση (shift reagents)

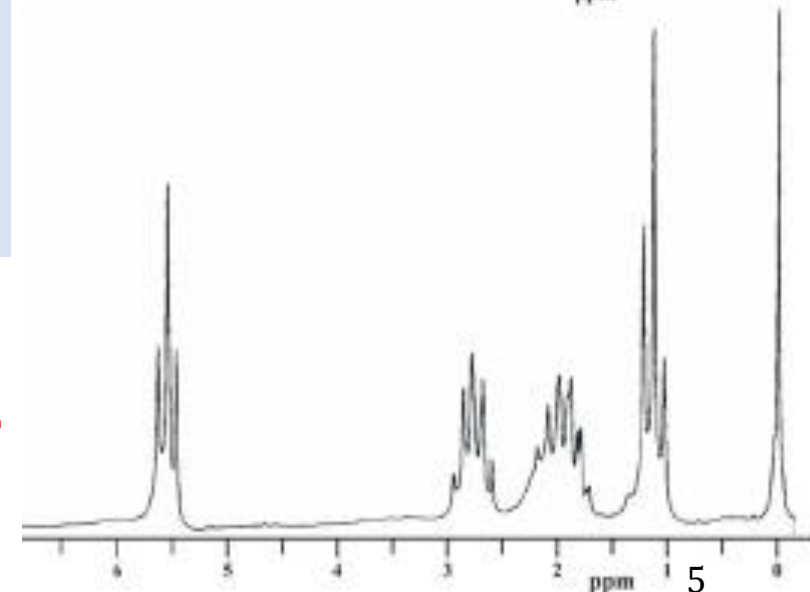
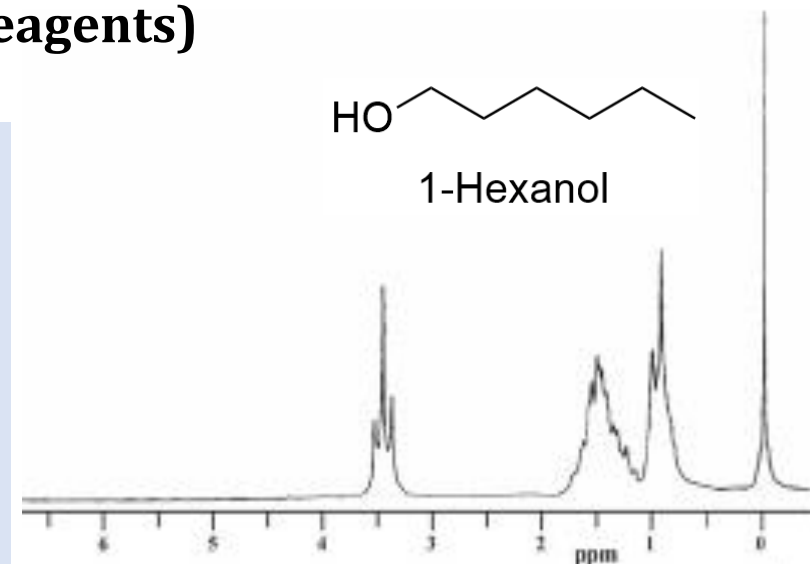
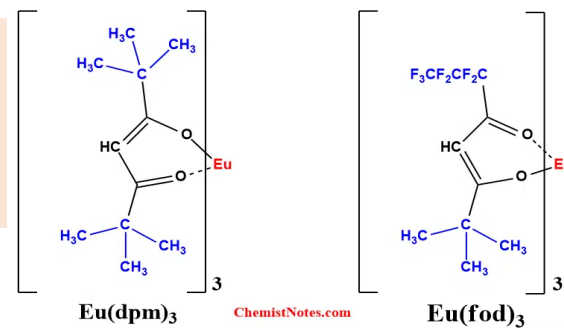
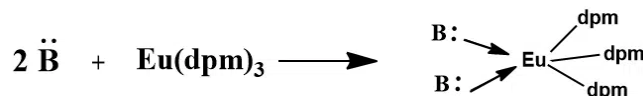
Το παραμαγνητικό ιόν του λανθανιδίου σχηματίζει σε διάλυμα **σύμπλοκο με το οργανικό μόριο**.

Η παρουσία ασύζευκτων ηλεκτρονίων, προκαλεί ισχυρή χημική μετατόπιση των κορυφών απορρόφησης του μορίου προς ασθενέστερο πεδίο και προκύπτει:

- διαχωρισμός των αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών
- απλοποίηση του φάσματος.

Προϋπόθεση για τον σχηματισμό συμπλόκου, είναι η παρουσία δραστικών ομάδων στο οργανικό μόριο όπως **-NH₂**, **-OH**, **C=O**, **-CN**, οι οποίες να διαθέτουν μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων

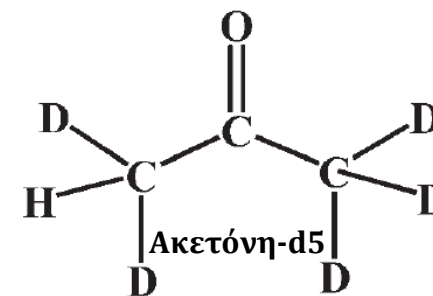
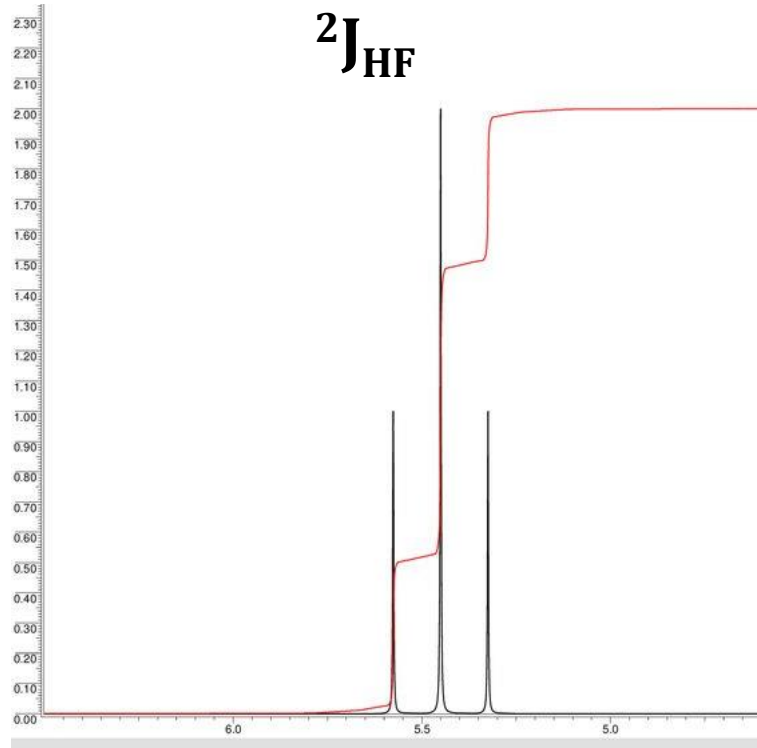
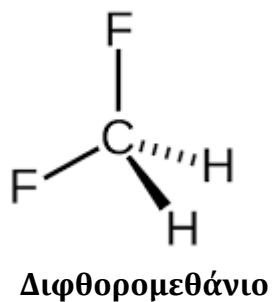
Συνηθέστερα χρησιμοποιείται το **Eu(fod)₃**:
2,2-διμεθυλο-6,6,7,7,8,8,8επτάφθορο-3,5-οκτανεδιόνη-ευρώπιο



Απλοποίηση φασμάτων NMR

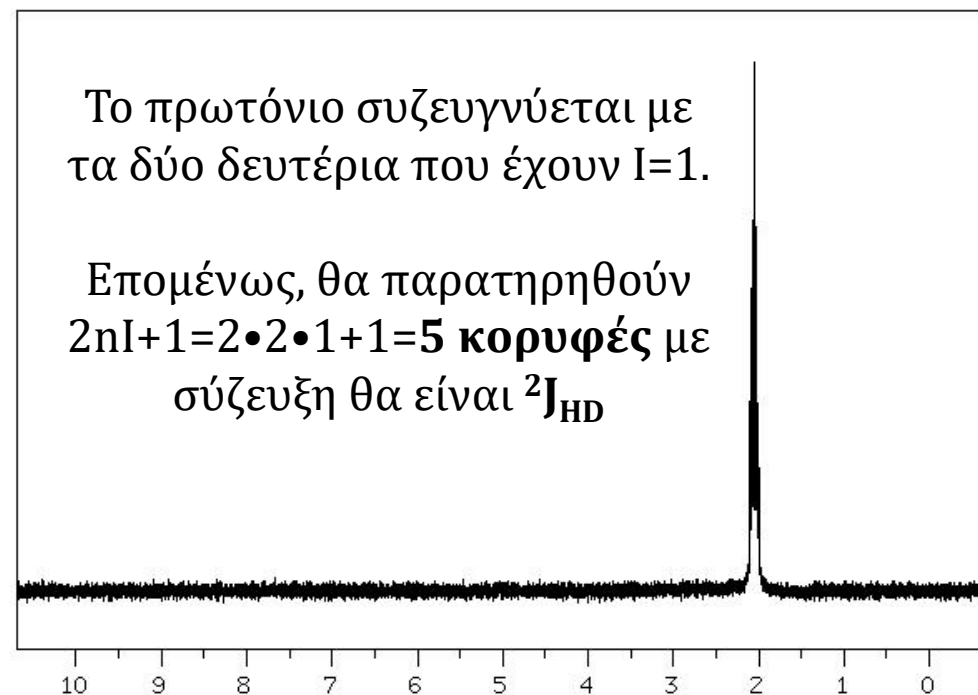
ε) ετεροπυρηνική σύζευξη

Η μαγνητική σύζευξη μεταξύ πυρήνων μπορεί να είναι ομοπυρηνική, αλλά και ετεροπυρηνική



Το πρωτόνιο συζευγνύεται με
τα δύο δευτέρια που έχουν $I=1$.

Επομένως, θα παρατηρηθούν
 $2nI+1=2 \cdot 2 \cdot 1+1=5$ κορυφές με
σύζευξη θα είναι $^2J_{\text{HD}}$



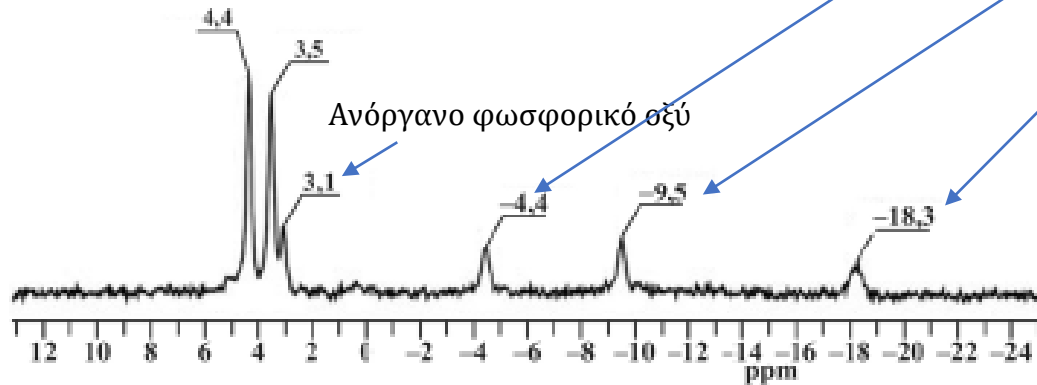
Απλοποίηση φασμάτων NMR

ε) ετεροπυρηνική φασματοσκοπία μιας διάστασης

Κύριο μειονέκτημα είναι η μικρή μαγνητική ροπή και η σχετική αφθονία, μεγάλα εύρη κορυφών και μεγάλοι χρόνοι εφησυχασμού. Όμως, παρουσιάζουν μεγάλες χημικές μετατοπίσεις

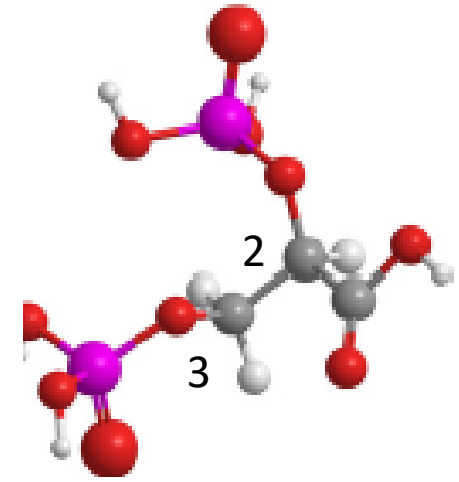
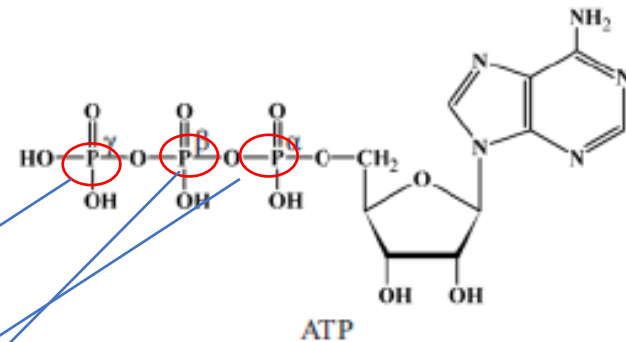
Πυρήνας ^{31}P

Ο πυρήνας ^{31}P ευρίσκει ευρείες εφαρμογές στη Βιοχημεία και για αρκετές βιολογικές ενώσεις και υγρά. Ένα τυπικό φάσμα φώσφορου-31 αίματος το οποίο έχει ληφθεί αμέσως μετά την αιμοδοσία και αφού τοποθετήθηκε σε αντιπηκτικό, παριστάνεται στο σχήμα 6.4.1.

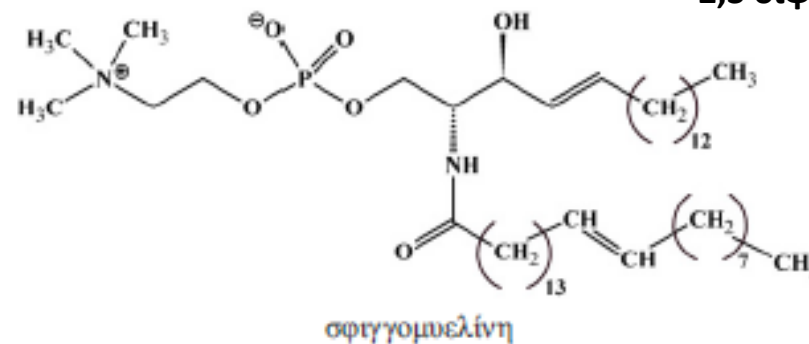


Σχήμα 6.4.1. Φάσμα ^{31}P αίματος του συγγραφέως Θ. Μπαρομούστακου.

Ο πυρήνας ^{31}P έχει φυσική αφθονία 100% και 1/2 και μπορεί να συζευχθεί με το πρωτόνιο.



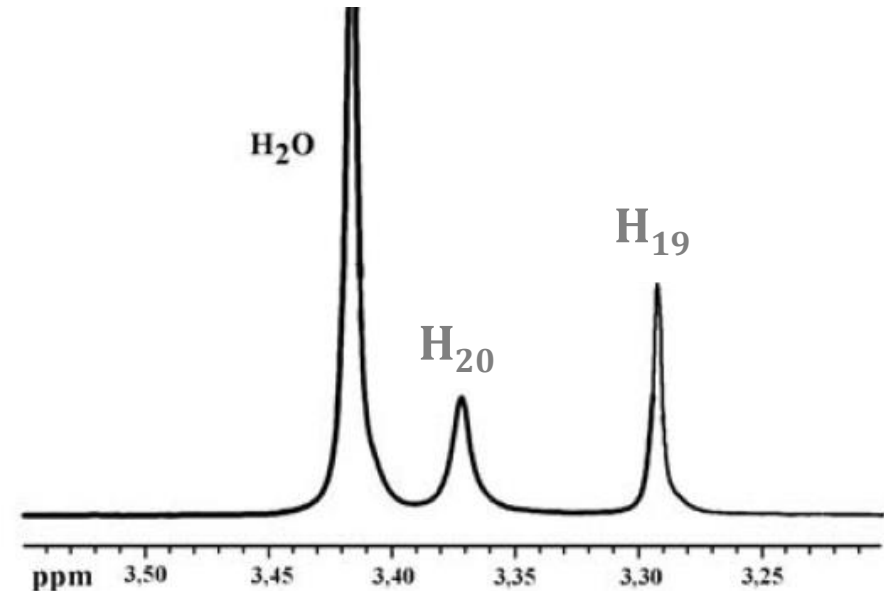
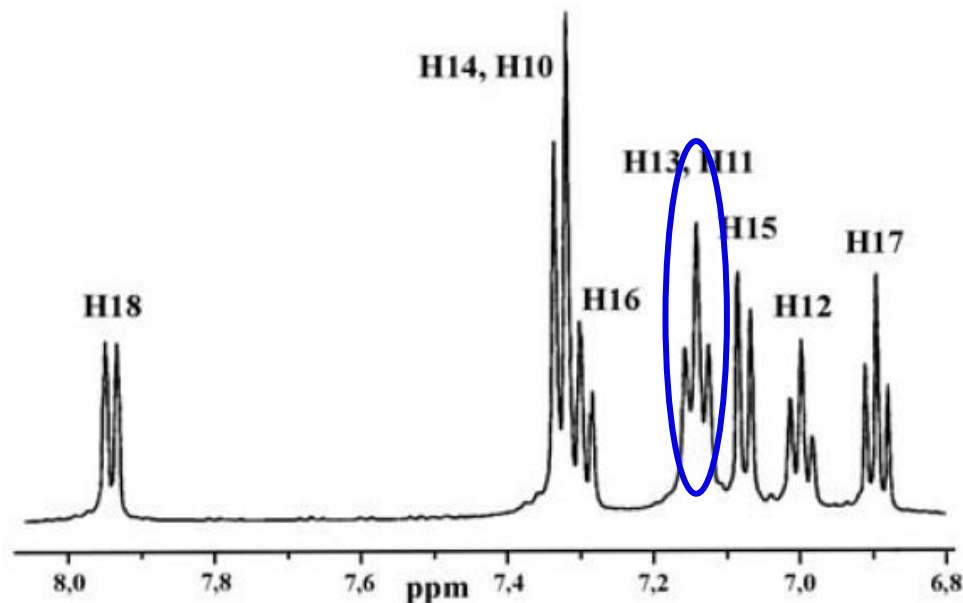
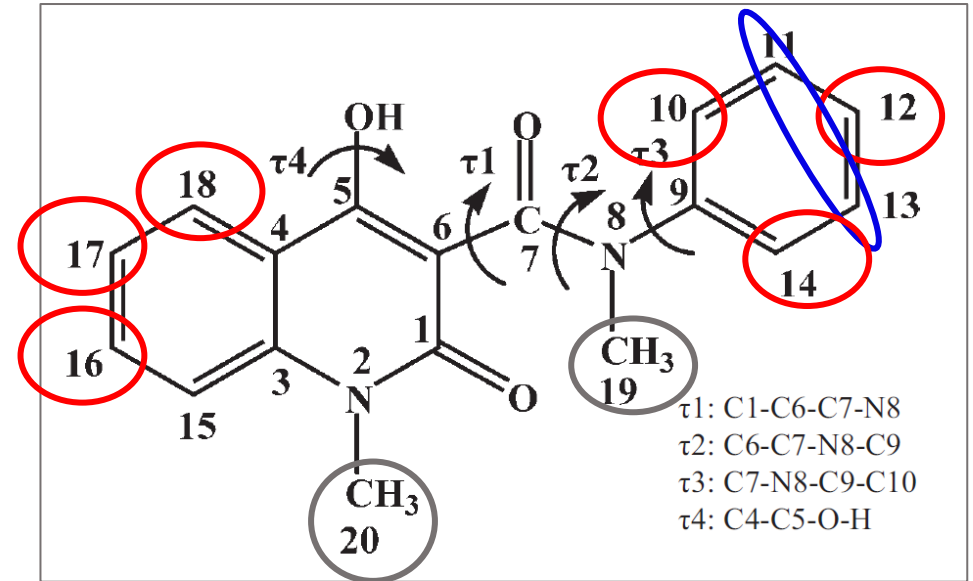
2,3 διφωσφογλυκοκερικό οξύ



Αναγκαιότητα των 2D NMR

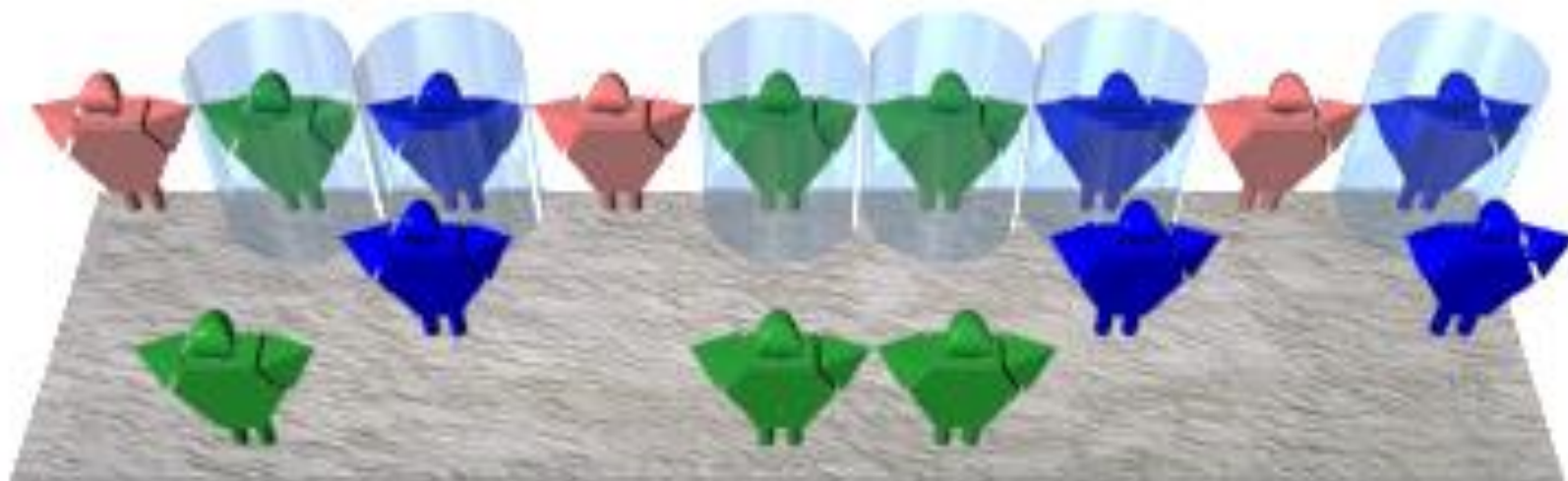
στ) φασματοσκοπία δύο ή περισσότερο διαστάσεων

Λινομίδη (Linomide): Δραστική ένωση, που διεγείρει διάφορες λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος και αντιπροσωπεύει ένα ελκυστικό φάρμακο στη θεραπεία των διαφόρων αυτοάνοσων ασθενειών



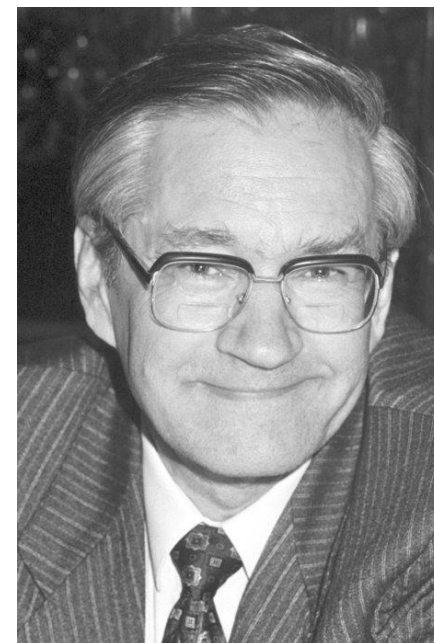
Αναγκαιότητα των 2D NMR

Διαχωρισμός κορυφών σε περισσότερες από μια διαστάσεις!



1D NMR: συντονισμός πυρήνων
2D NMR: σύνδεση πυρήνων μέσω
δεσμών ή εγγύτητας στο χώρο

Γ' Οικογένεια
(Παραμένοντες στην αρχική θέση)
Α' Οικογένεια
(Ένα βήμα μπροστά)
Β' Οικογένεια
(Δύο βήματα μπροστά)



Richard R. Ernst,
1933 - 2021
Nobel Prize for
Chemistry 1991

“for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy”

Φασματοσκοπία 2D NMR

2 διαφορετικές πληροφορίες

σε 2 διαφορετικές διαστάσεις

(2 άξονες συχνότητων: **f2**-συνήθως απορρόφηση **f1**-άλλες πληροφορίες)

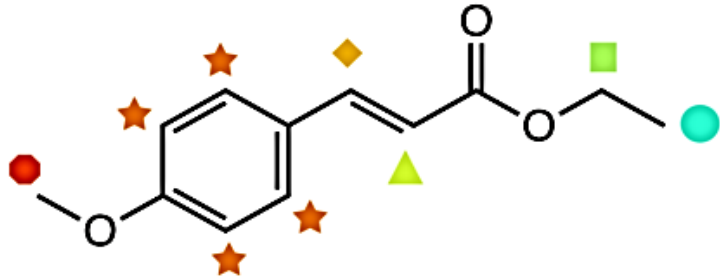
Κύριες Κατηγορίες NMR:

α) **2D-J NMR** ή 2D-NMR φάσματα ανάλυσης σταθεράς σύζευξης J (2D *J*-resolved NMR)

β) **COSY-NMR** (Correlated Spectroscopy) ή 2D NMR φάσματα συσχέτισης-πυρήνων

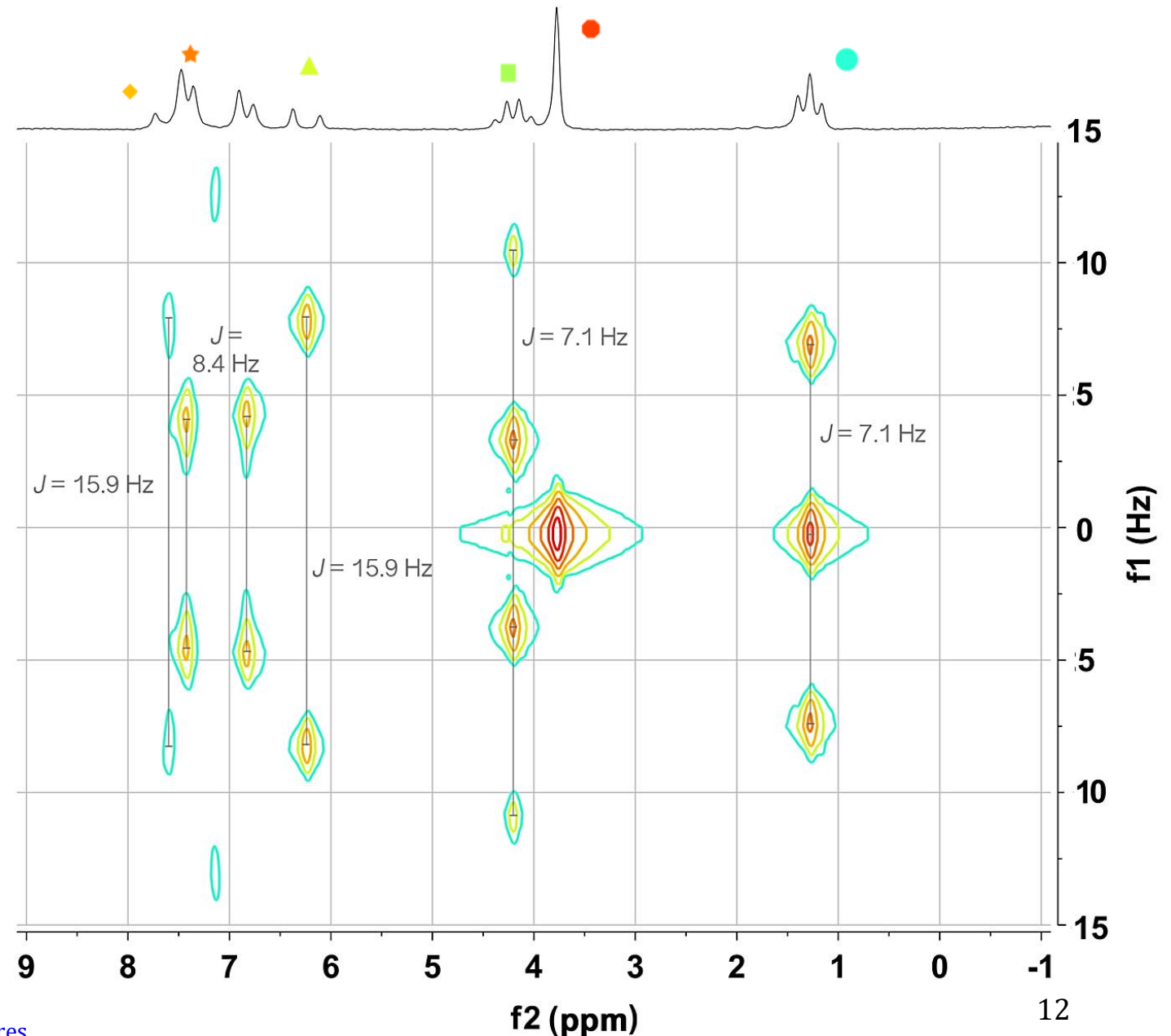
γ) **NOESY-NMR** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) ή 2D NMR φάσματα συσχετισμού αλληλεπίδρασης πυρήνων με NOE μέσω του χώρου

A) 2D-NMR φάσματα ανάλυσης σταθεράς σύζευξης J



Άξονας f2: απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα

Άξονας f1: σταθερά σύζευξης (ομοποιρηνικής ή ετεροπυρηνικής)

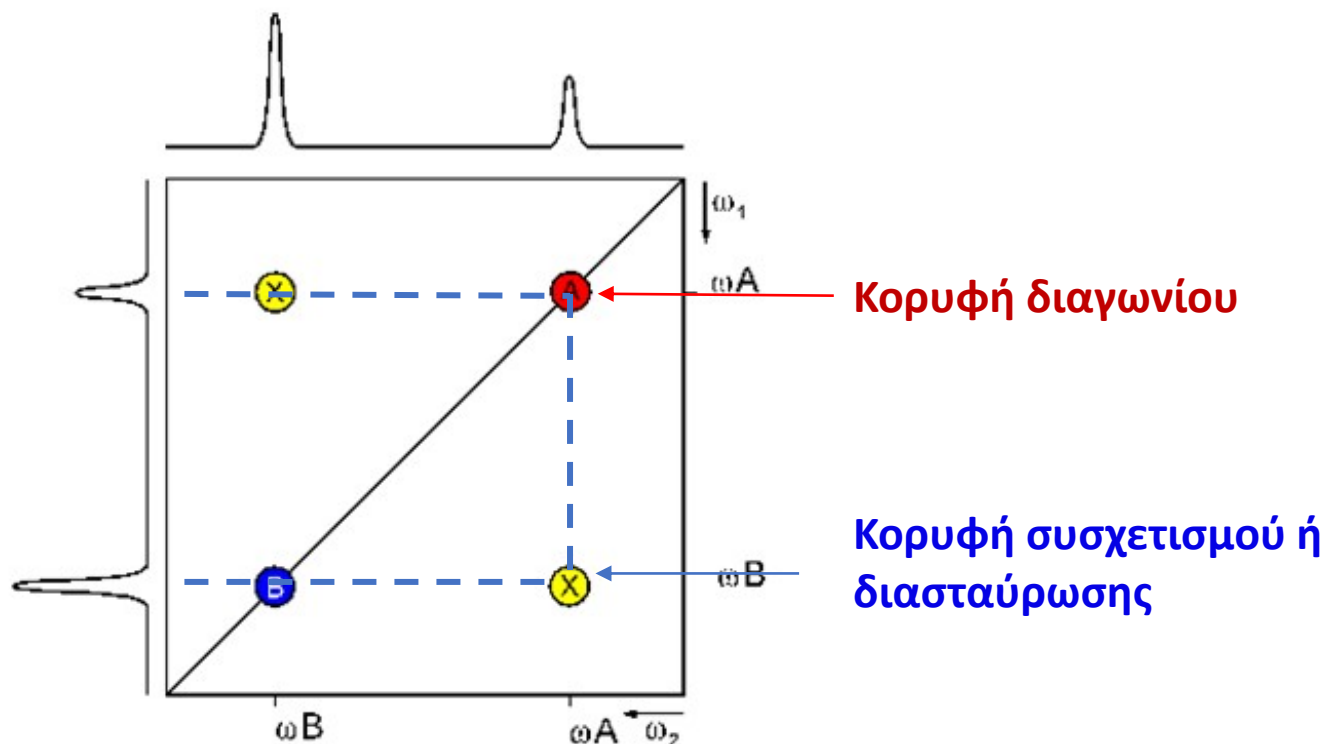


B) COSY - 2D NMR (φάσματα συσχέτισης)

Και οι δυο άξονες **f2** και **f1** του COSY φάσματος NMR περιέχουν **συχνότητες**.

- Στα **ομοπυρηνικά φάσματα COSY** και οι δύο άξονες f2, f1 περιέχουν απορροφήσεις του ίδιου πυρήνα, όπως ^1H - ^1H ή ^{13}C - ^{13}C .
- Στα **ετεροπυρηνικά φάσματα COSY** φάσματα ο ένας άξονας **f2** περιέχει απορροφήσεις του ενός πυρήνα, συνήθως ^1H , ενώ ο άλλος άξονας **f1** περιέχει απορροφήσεις του **άλλου πυρήνα** π.χ. ^{13}C .

2 πληροφορίες: συσχετίσεις & σταθερές σύζευξης



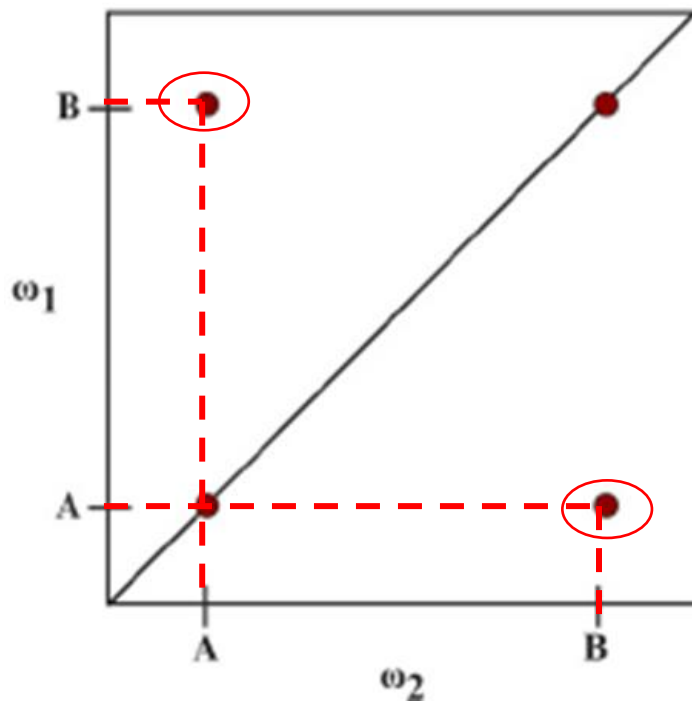
Γ) NOESY - 2D NMR

Τα συμμετρικά σημεία που εμφανίζονται σε ένα NOESY φάσμα και τα οποία συνδέουν τις απορροφήσεις δύο πυρήνων στους δύο άξονες, μας παρέχουν πληροφορίες για τη **χωρική αλληλεπίδραση** των δύο πυρήνων.

Η αλληλεπίδραση αυτή είναι δυνατή, όταν οι δύο πυρήνες είναι πολύ κοντά ($\leq 5,5 \text{ \AA}$), έτσι ώστε να υπάρχει NOE αποτέλεσμα μέσω του χώρου κατά τη διέγερση και αποκατάσταση των πυρήνων

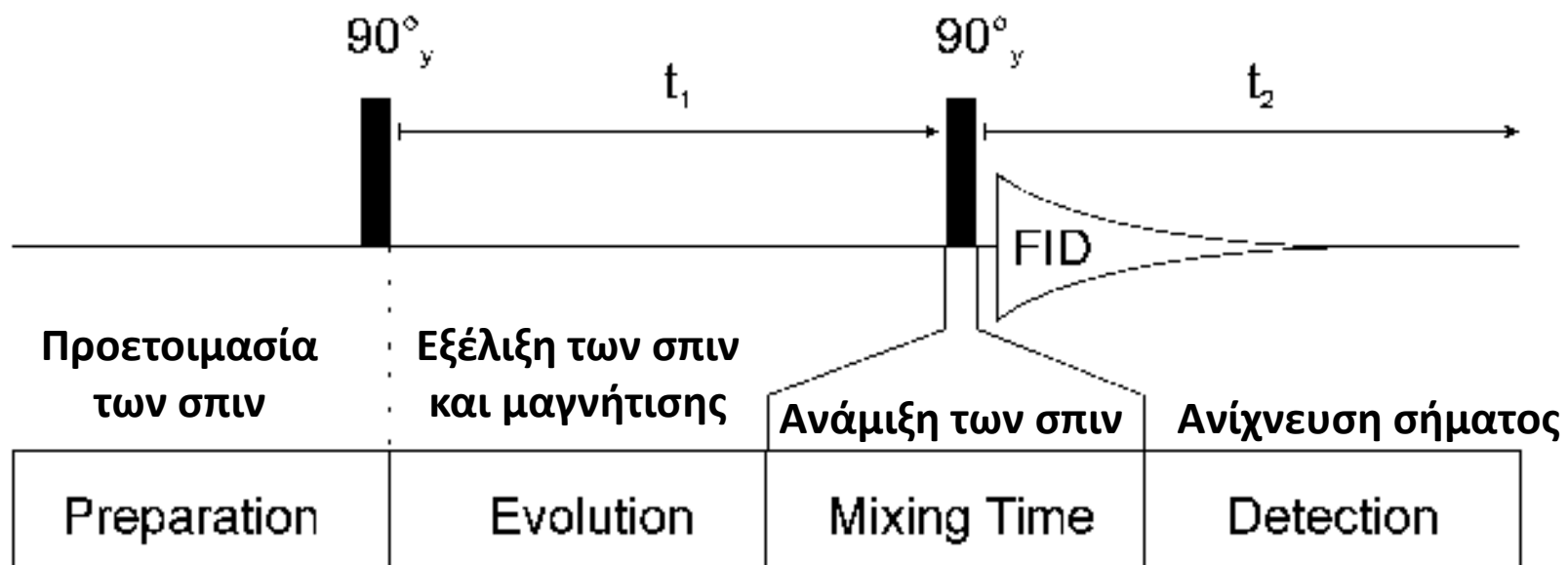
Πληροφορίες: διαμόρφωση πυρήνων (ενδομοριακές επιδράσεις των πυρήνων του μορίου)

Οι **εκτός διαγωνίου κορυφές** παρέχουν πληροφορίες για τη σύζευξη των πυρήνων A και B **μέσω χώρου**.

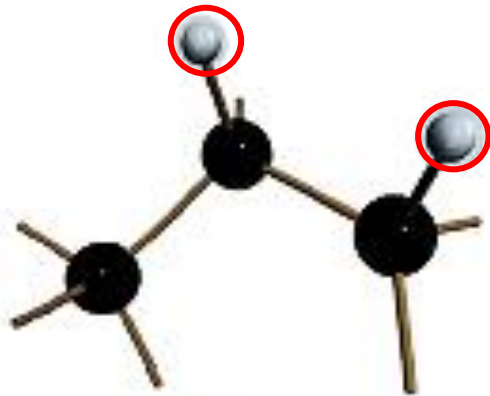


2D NMR

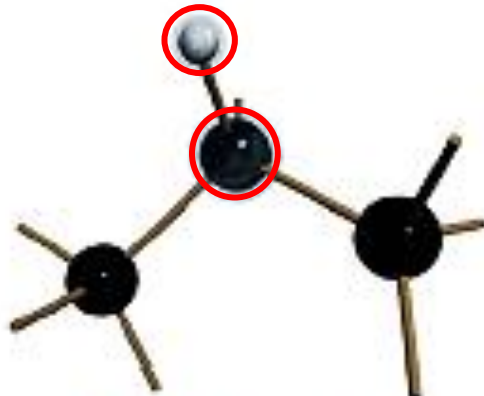
Στάδια διεξαγωγής ενός πειράματος δύο διαστάσεων



Κατηγορίες φασμάτων 2D NMR συσχέτισης πυρήνων μέσω δεσμών



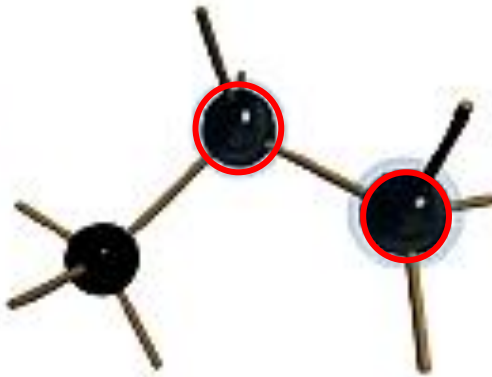
HH - COSY



CH - HSQC



$C_A C_X H_X$ HMBC

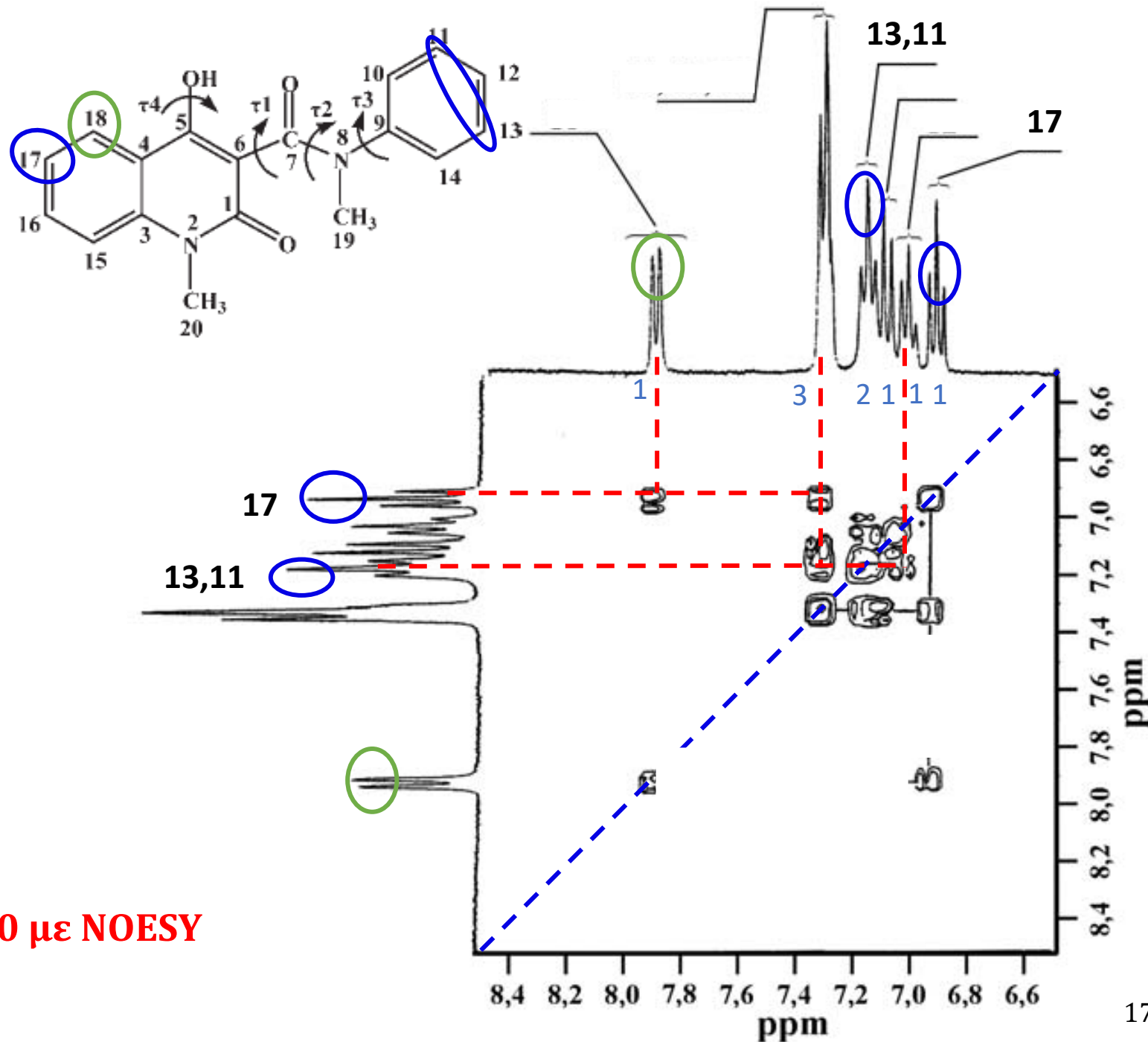
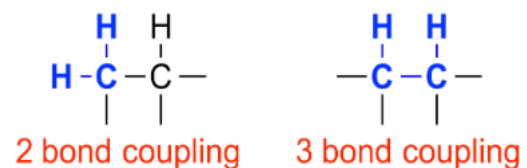


$C_A C_X$ INADEQUATE

- **HH COSY** (**C**orrelation **S**pectroscop**Y**) → 2 γειτονικά H
- **CH HSQC** (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) → 2 γειτονικά πρωτόνια C-H
- **$C_A C_X H_X$ HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple-**B**ond **C**orrelation) → H_X με απομακρυσμένο C_A
- **$C_A C_X$ INADEQUATE** (**I**ncredible **N**atural **A**bundant**E** **D**ouble **Q**uantum **T**ransfer **E**xperiment) → 2 γειτονικοί ^{13}C

Παράδειγμα 1

Ομοπυρηνικό φάσμα COSY
της λινόμидης

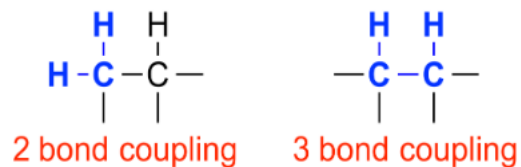


Ταυτοποίηση των H19 & H20 με NOESY

Παράδειγμα 2

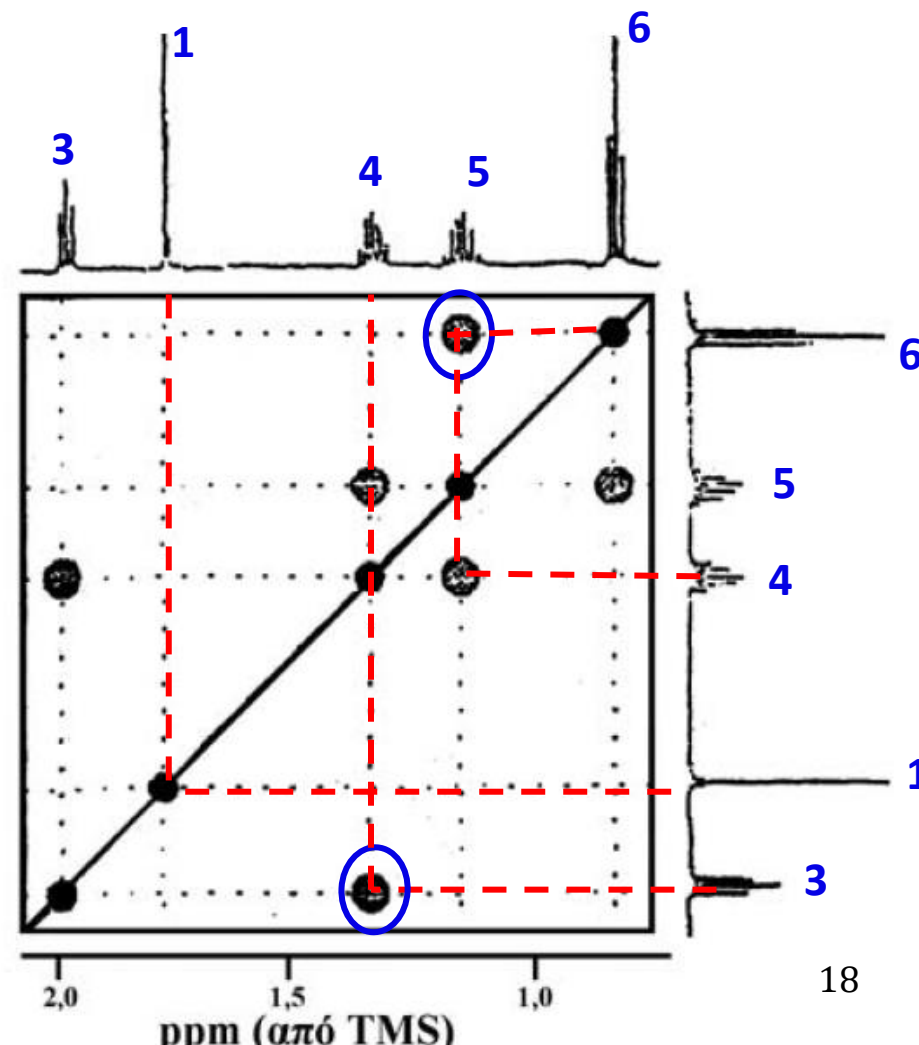
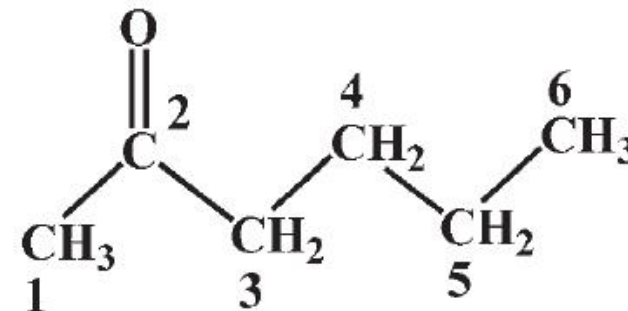
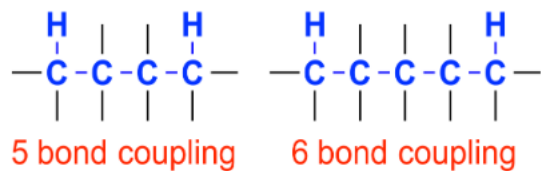
Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της εξανόνης

COSY



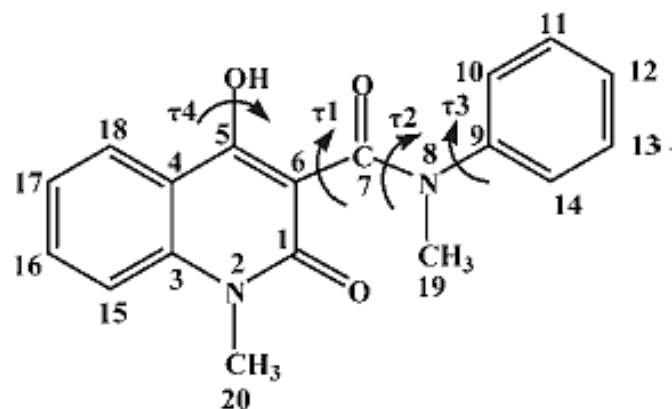
1,6 → 5 → 4 → 3

TOCSY

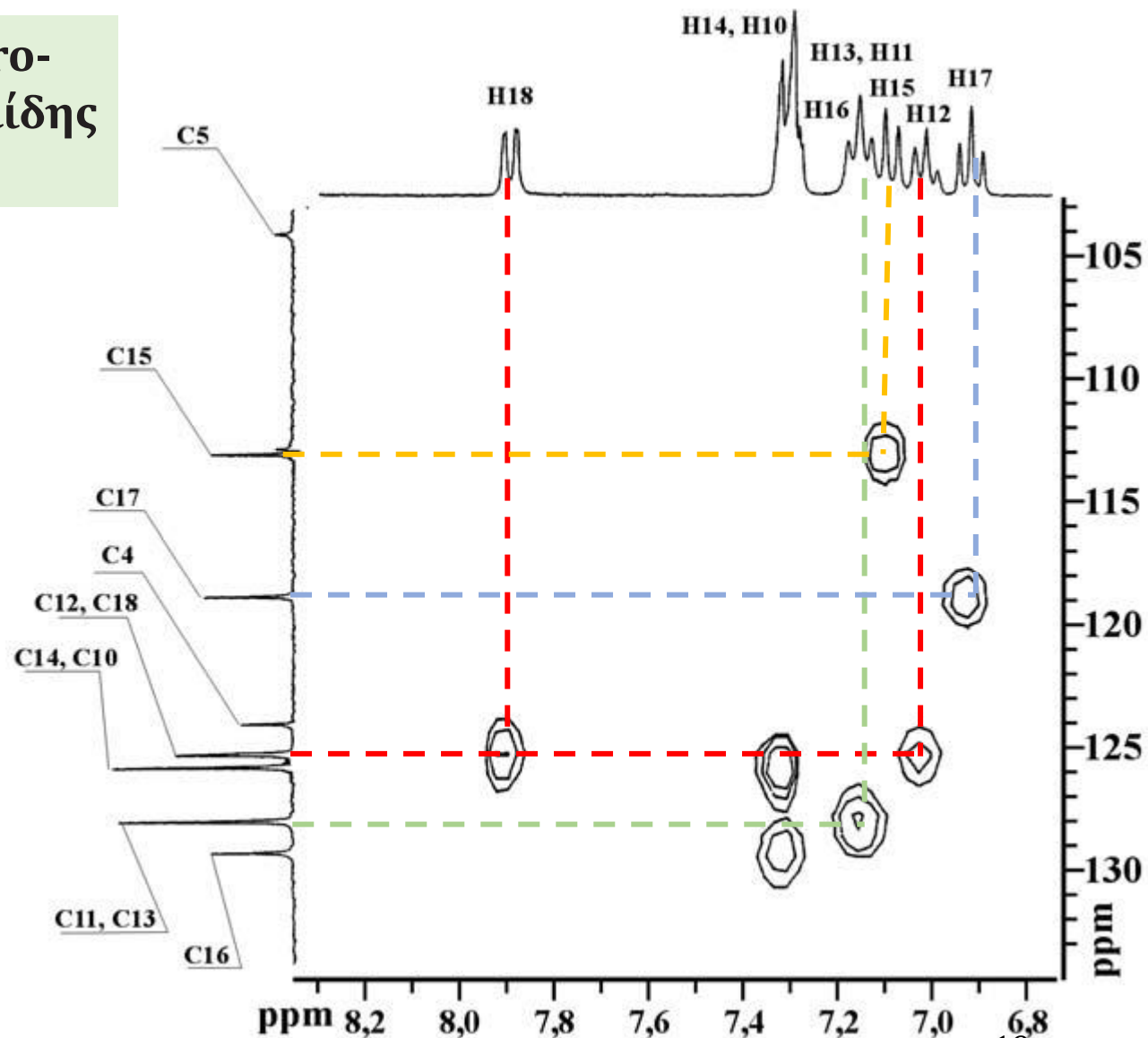


Παράδειγμα 3

Ετεροπυρηνικό πείραμα ^{13}C - ^1H (HSQC Hetero-nuclear Single Quantum Coherence) της λινομίδης (αρωματική περιοχή)

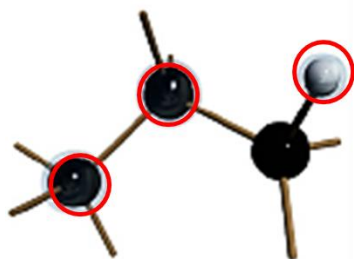
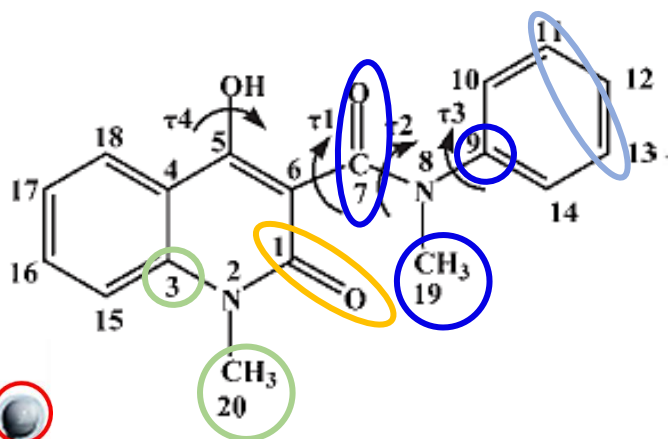
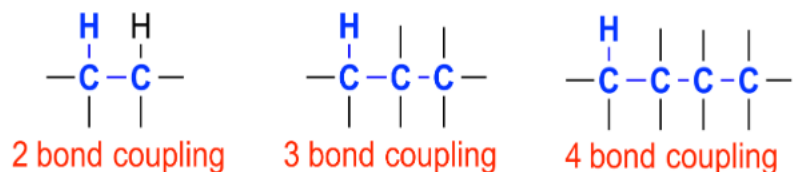


CH - HSQC



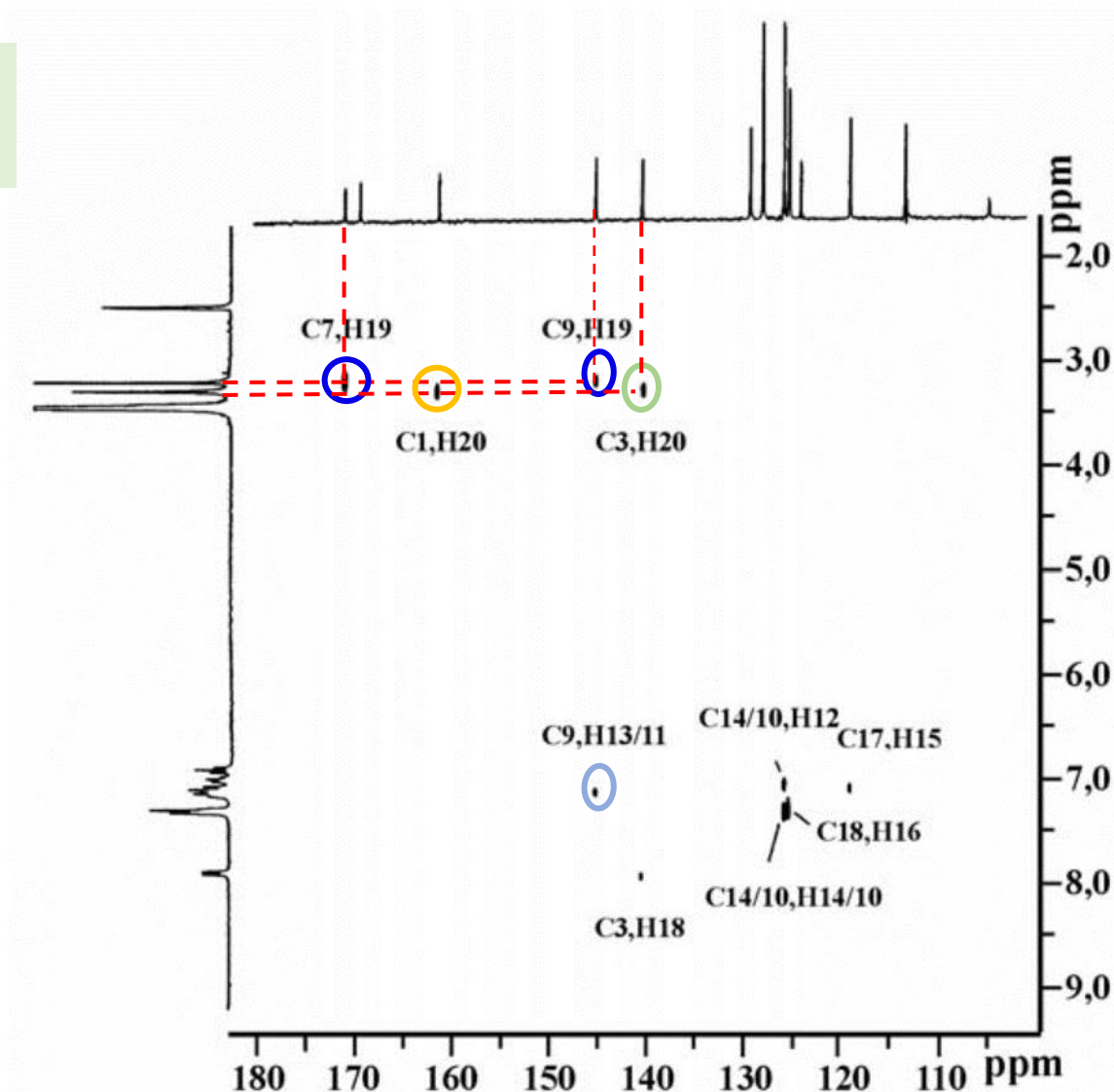
Παράδειγμα 4

Ετεροπυρηνικό πείραμα HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) της λινομίδης



$\text{C}_A\text{C}_X\text{H}_X$ HMBC

Ταυτοποίηση τεταρτοταγών ανθράκων και ανθράκων καρβonyλομάδων



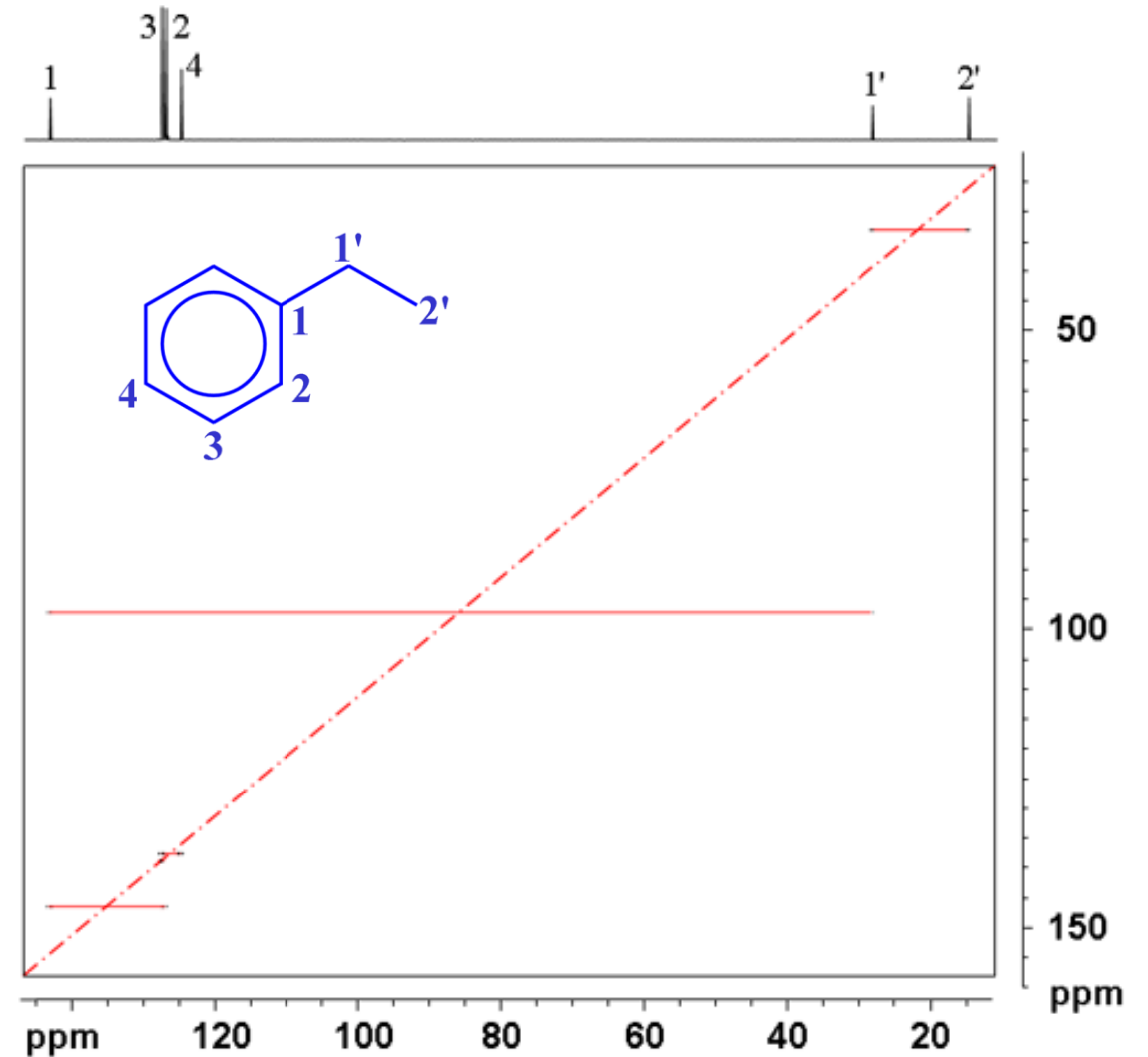
Παράδειγμα 5

Ομοπυρηνικό πείραμα INADEQUATE του αιθυοβενζολίου

Όταν το HSQC και HMBC δεν επικυρώνουν την ταυτοποίηση ενός μορίου

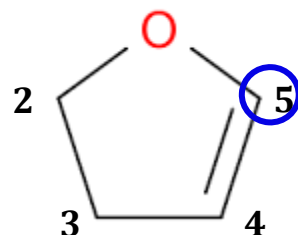
2'-1'-1-2-3-4

- **CH HSQC** → 2 γειτονικά πρωτόνια C-H
- **C_AH_AH_X HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple-**B**ond **C**orrelation) → H_X με απομακρυσμένο C_A

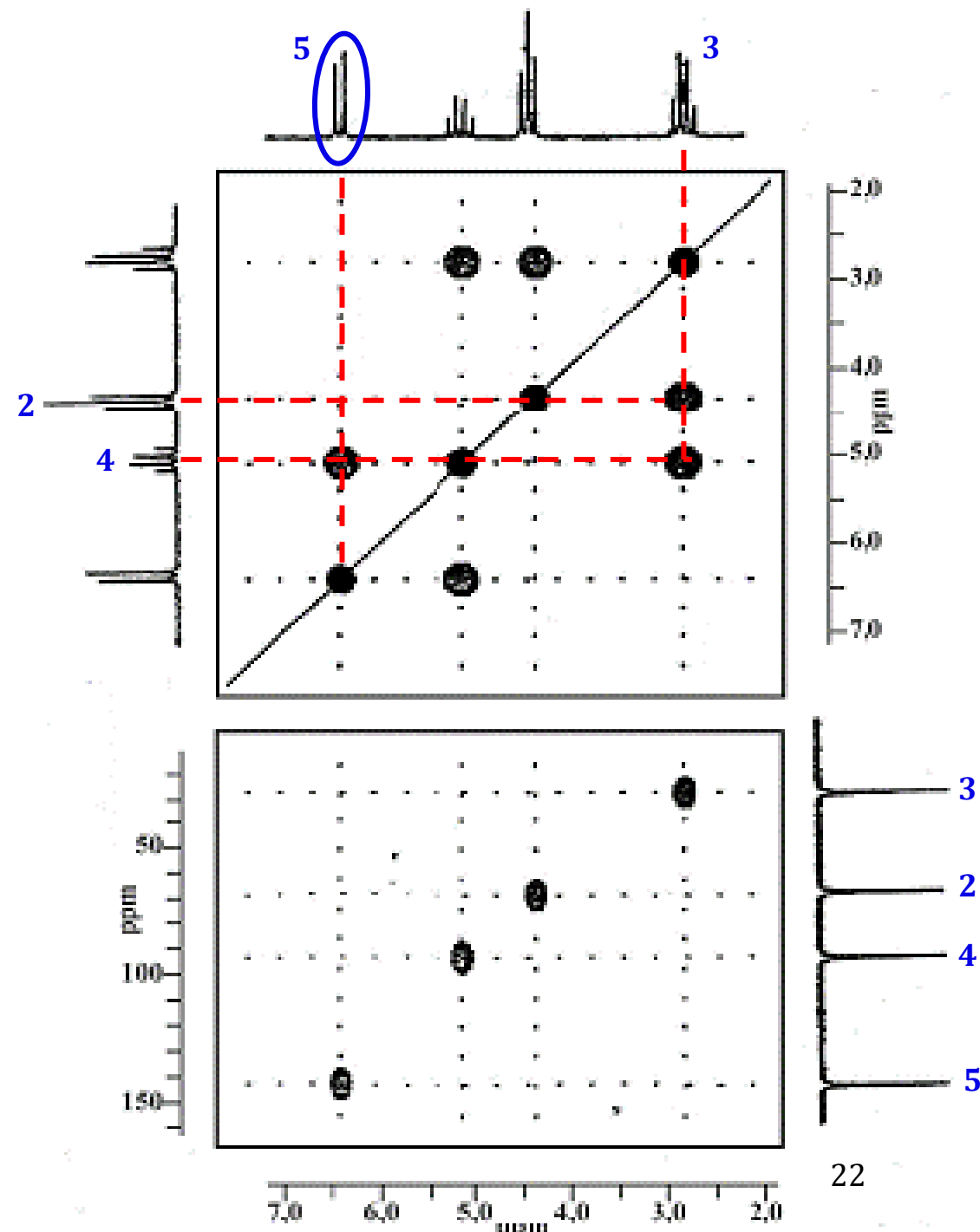


Άσκηση 1

Πως με χρήση COSY και HSQC NMR ταυτοποιείται το 2,3-διυδροφουράνιο;



- **HH COSY** → 2 γειτονικά H
- **CH COSY-HSQC** → 2 γειτονικά πρωτόνια C-H



Βιβλιογραφία

«Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός» Θ. Μαυρομούστακος, Α. Τζάκος, Γ. Σπυρούλιας, Ε. Μικρός, Α. Κολοκούρης, Κ. Παπακωνσταντίνου, Ι. Γεροθανάσης, Ι. Ματσούκας. Εκδόσεις Συμμετρία 2019. ISBN 978-960-266-504-6.