

Protoni equivalenti

Due protoni sono equivalenti se si trovano nello stesso intorno chimico.

Due protoni equivalenti hanno *sempre* la stessa frequenza di risonanza.

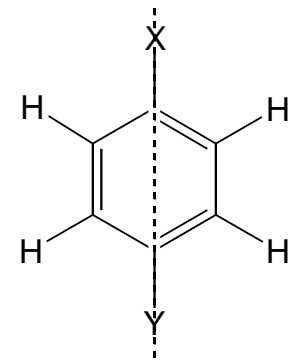
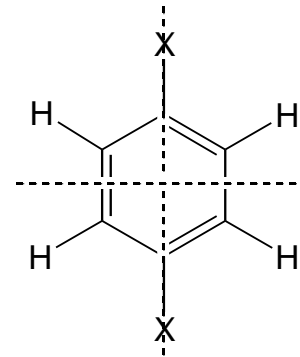
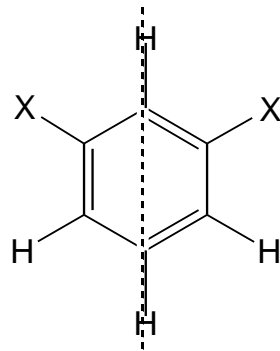
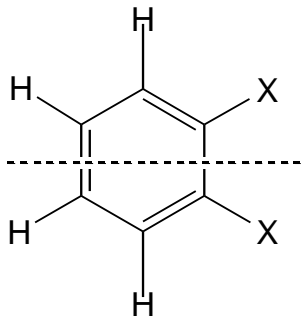
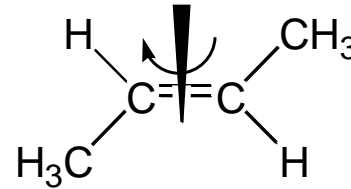
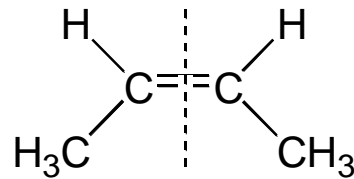
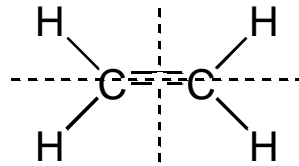
Tuttavia due protoni possono avere la *stessa* frequenza di risonanza *anche se non sono equivalenti*, per caso o perché gli intorni chimici dei due protoni, pur non essendo identici, sono molto simili.

Ci sono due motivi per l'equivalenza:

- Simmetria molecolare
- Scambio chimico (equilibrio conformazionale)

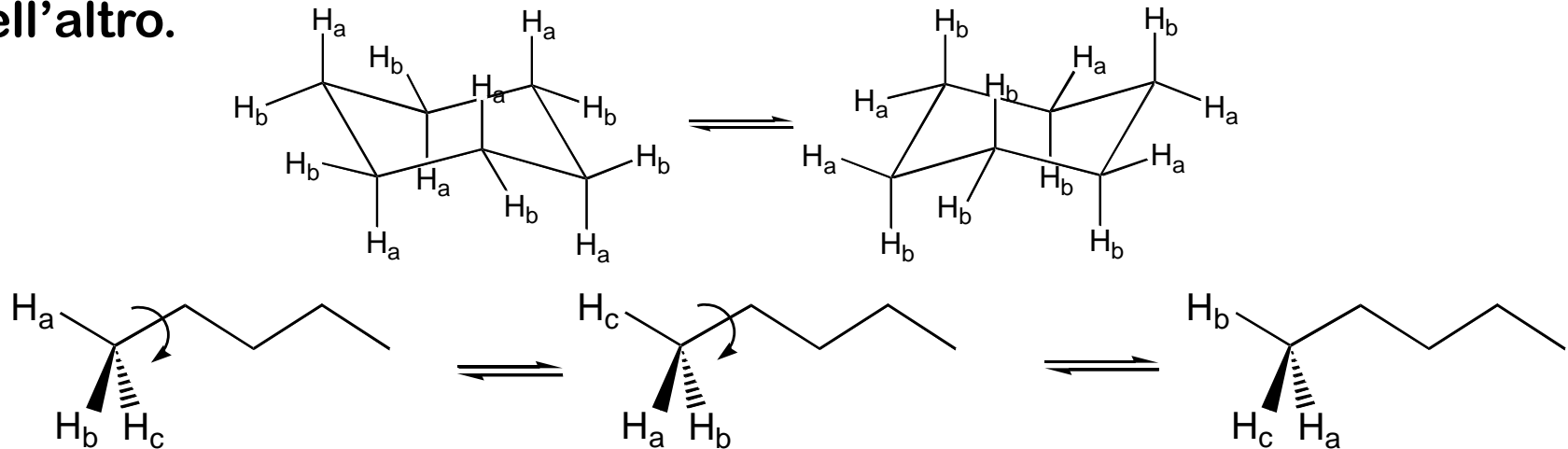
Simmetria molecolare

Due protoni sono equivalenti per simmetria molecolare se, in una molecola con un qualunque elemento di simmetria, i protoni sono correlati dall'elemento di simmetria.

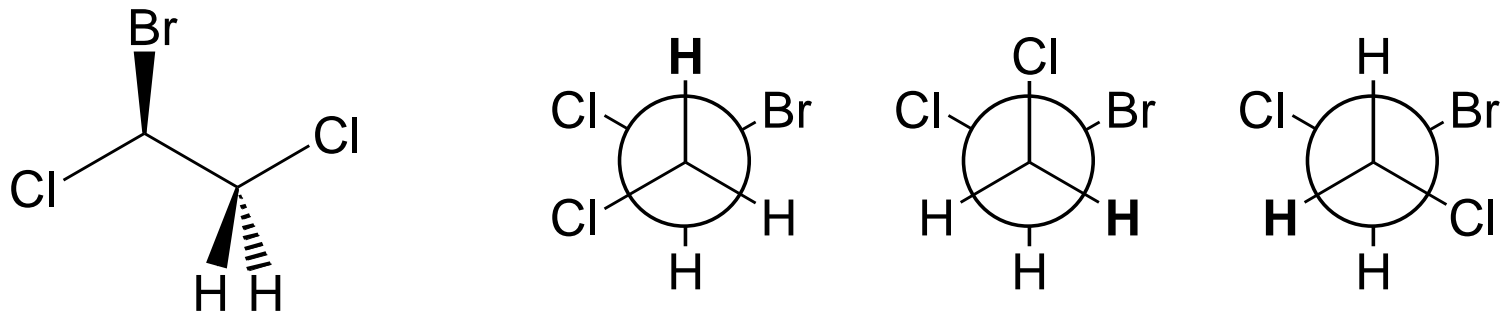


Scambio chimico

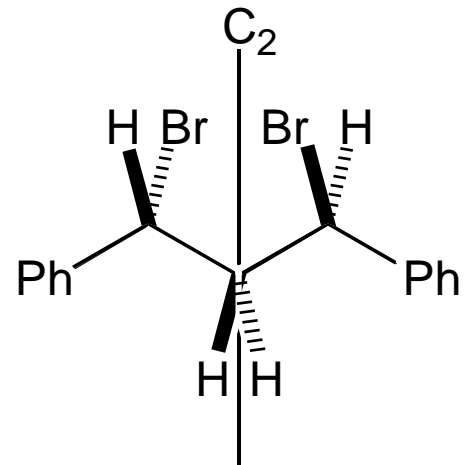
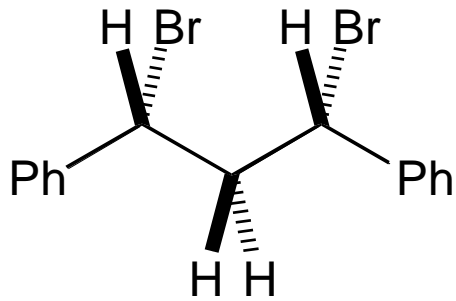
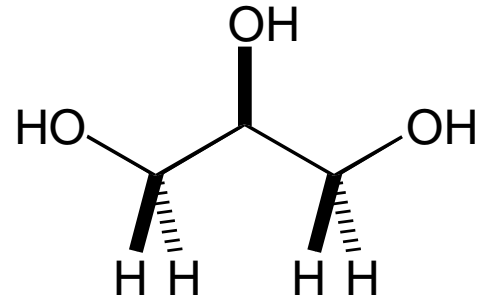
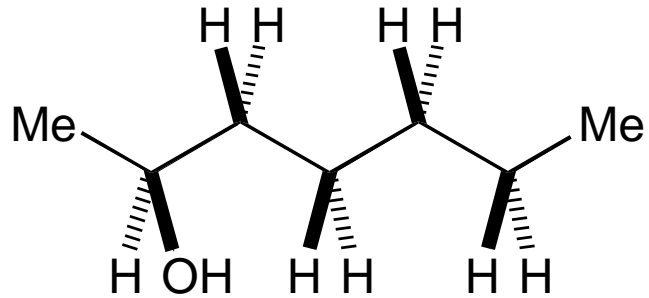
Due protoni equivalenti per scambio chimico sono rapidamente interconvertibili, ossia possono facilmente passare l'uno al posto dell'altro.



I protoni di un metilene in sistemi ciclici e/o vicino ad un centro chirale sono spesso non equivalenti:



Protoni equivalenti: casi complessi

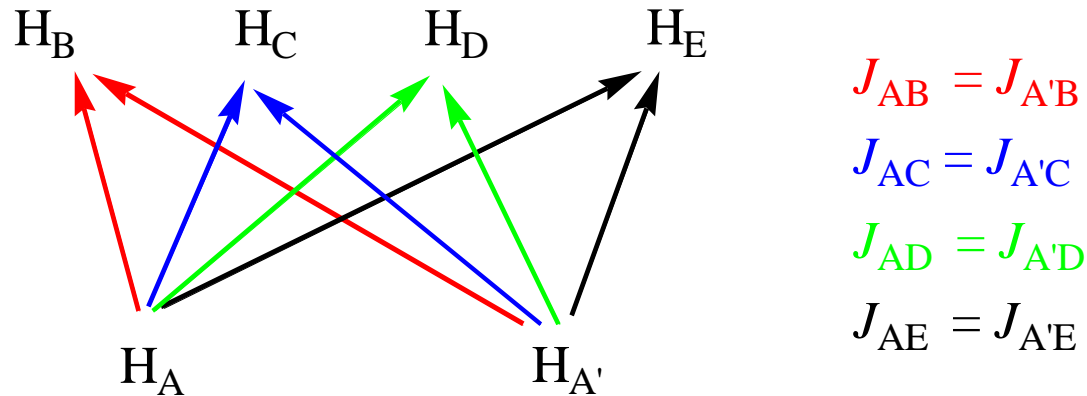


Equivalenza magnetica e di chemical shift

Nell'NMR protonico esistono due tipi di equivalenza:

Due protoni che sono nello stesso intorno chimico (per simmetria o per scambio chimico) sono detti *equivalenti per chemical shift*.

I protoni sono anche *magneticamente equivalenti* se hanno la stessa costante di accoppiamento con tutti i protoni appartenenti al sistema di spin.

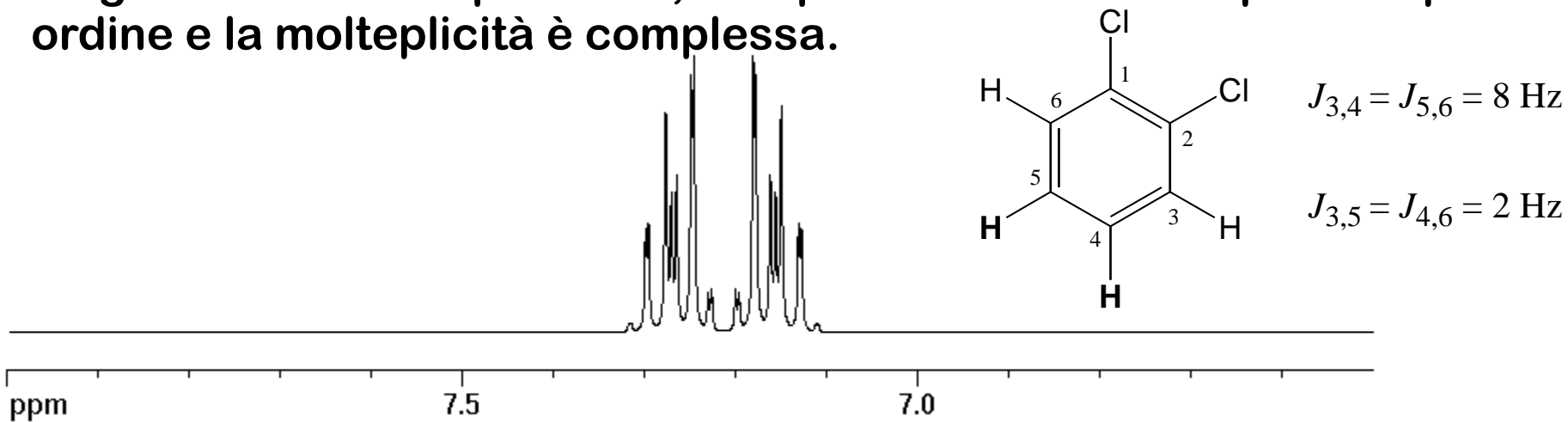


In altre parole, H_A e $H_{A'}$ sono magneticamente equivalenti se hanno la stessa costante di accoppiamento con ogni altro protone con cui sono entrambi accoppiati.

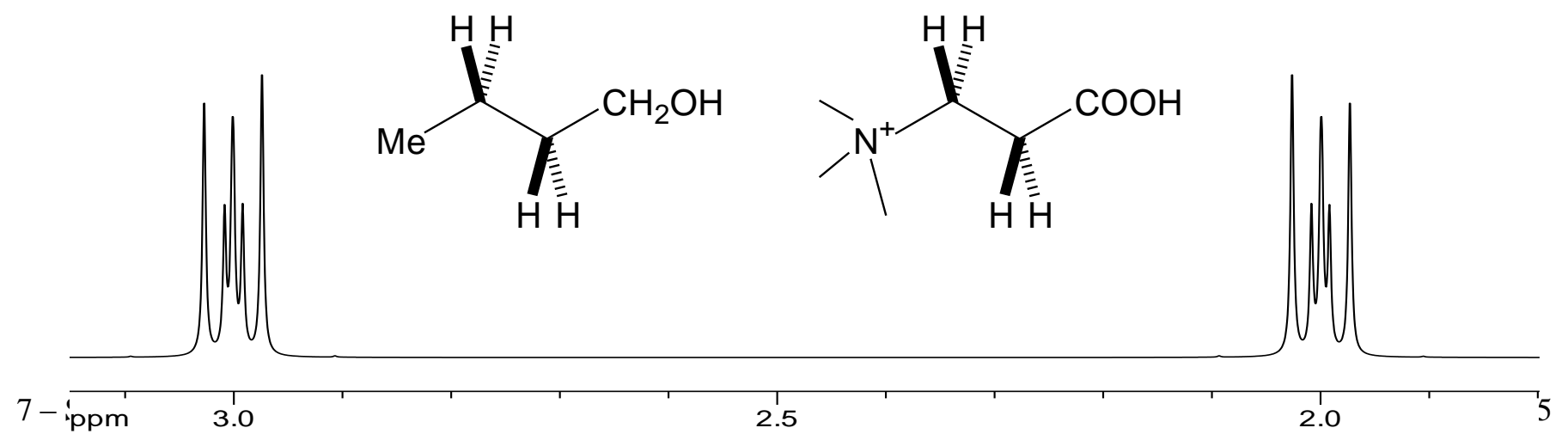
Se, al contrario, queste eguaglianze non si verificano, i protoni continuano ad essere equivalenti per chemical shift, ma *non sono* magneticamente equivalenti.

Equivalenza magnetica e di chemical shift

Se due protoni sono equivalenti per chemical shift, ma non magneticamente equivalenti, lo spettro NMR non è più del primo ordine e la molteplicità è complessa.



In questo caso il sistema di spin non è più chiamato A_2B_2 , ma $AA'BB'$

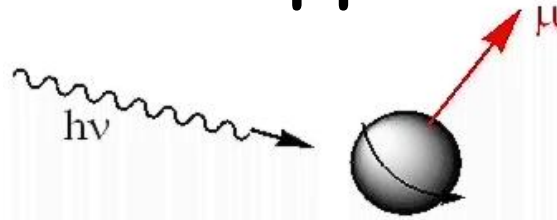


❖ *Disaccoppiamento di spin*

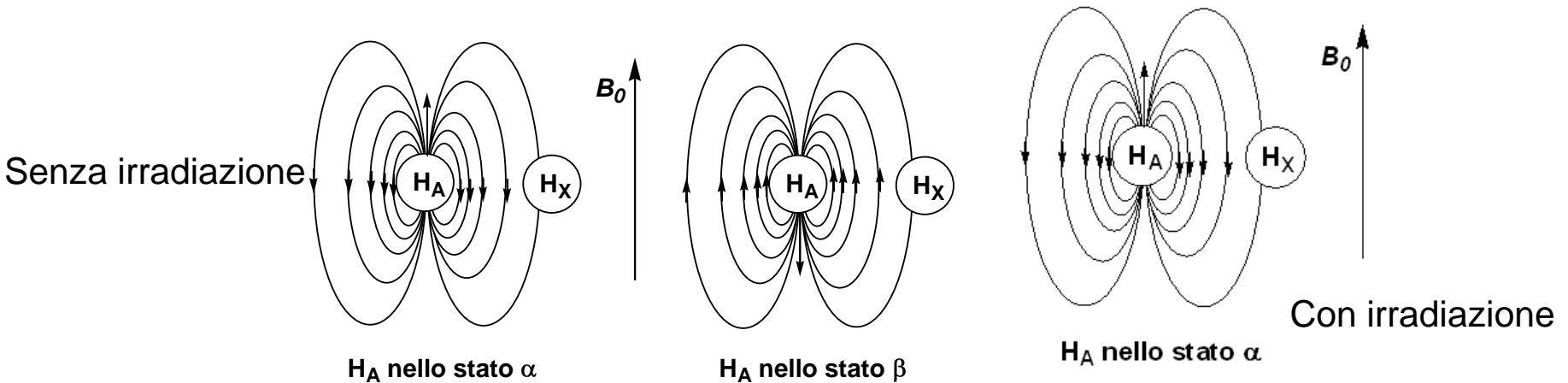
Se un protone, in una molecola è irradiato con continuità, la radiazione elettromagnetica causa un continua variazione dello stato di spin di quel protone da α a β e viceversa. Le conseguenze dell'irradiazione continua sono:

- in seguito al continuo passaggio tra gli stati α e β , la differenza di popolazione tra i due stati si annulla. Per questo il segnale del nucleo irradiato sparisce dallo spettro.
- il nucleo accoppiato con quello irradiato non si trova più nelle vicinanze di un protone α o nello stato α oppure nello stato β , ma nelle vicinanze di un protone che cambia continuamente il suo stato di spin per cui non risente più dell'accoppiamento e risuona come singoletto, cioè come se il nucleo irradiato non esistesse.

Il disaccoppiamento di spin



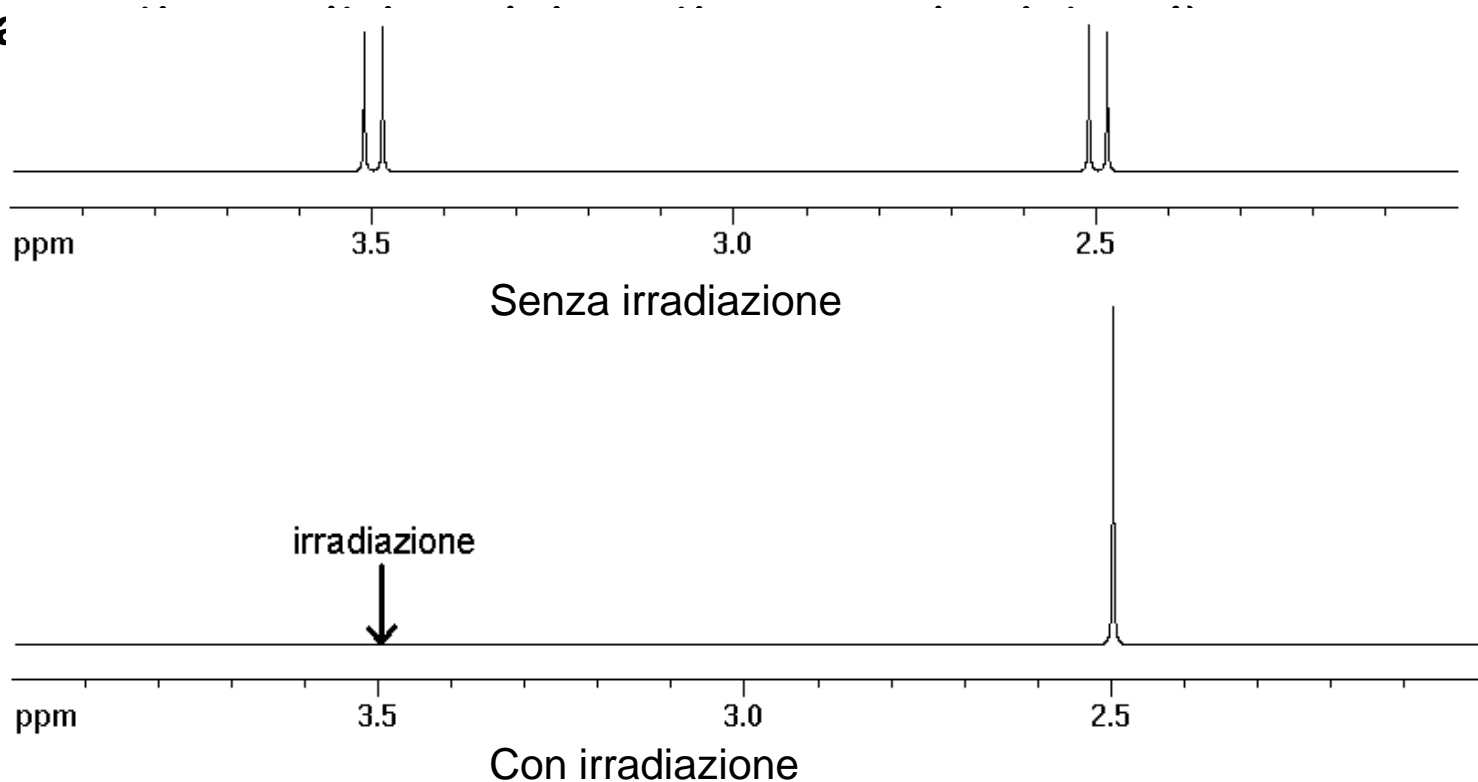
Consideriamo ora un sistema AX, e supponiamo di registrare uno spettro (ad onda continua o in trasformata di Fourier) mentre è in corso una continua irradiazione del nucleo A.



Il protone X non si trova più nelle vicinanze di un protone nello stato α oppure nello stato β , ma nelle vicinanze di un protone che cambia continuamente il suo stato di spin. Il protone X risente quindi dello momento magnetico *medio* del nucleo A, che è zero.

Il disaccoppiamento di spin

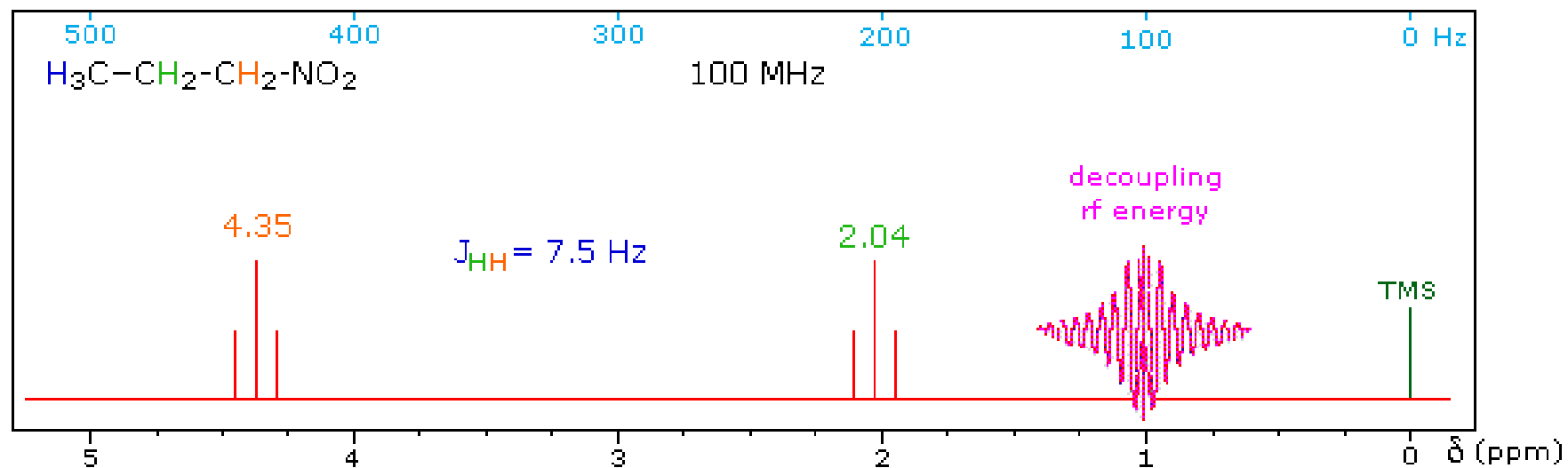
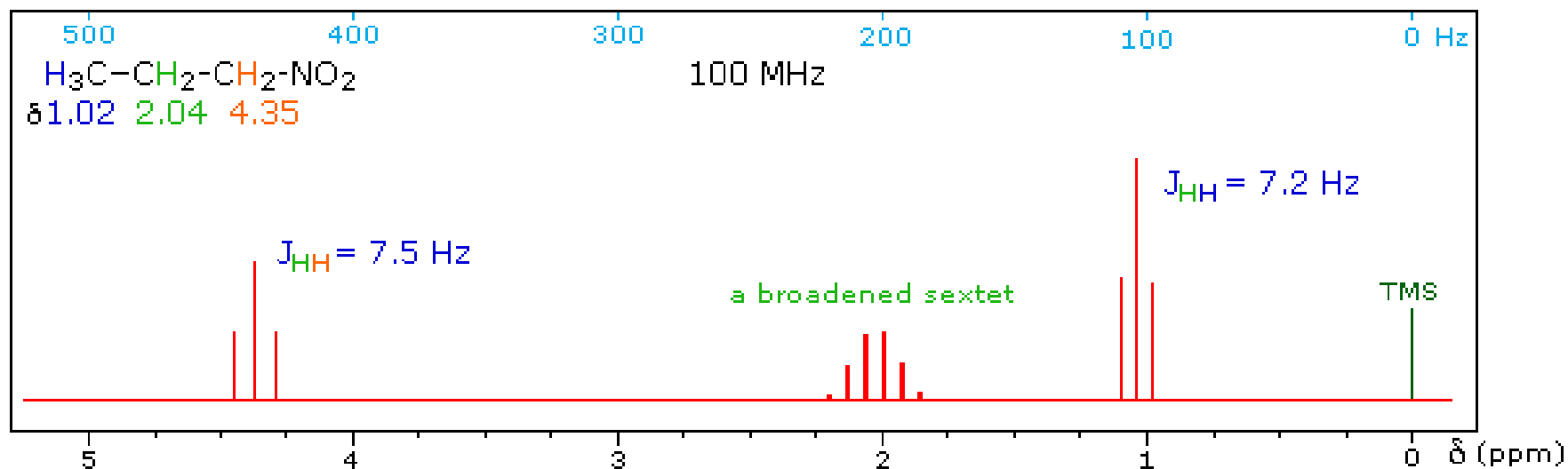
In definitiva, se si irradia con continuità sul nucleo *A*, *il nucleo X non risente più dell'accoppiamento con il nucleo A*, e risuona come singoletto, cioè *come se il nucleo A non esistesse* (ma eventuali accoppiamenti con altri nuclei restano).



Nello stesso tempo, il segnale del nucleo *A* non è più presente poiché la continua irradiazione fa sì che le popolazioni degli stati α e β diventino identiche.

Le informazioni che ci vengono da esperimenti di disaccoppiamento di spin sono oggi ottenibili più facilmente dall'esperimento NMR bidimensionale COSY.

Questa informazione è di grande importanza nell'interpretazione di spettri di una certa complessità.



L'effetto nucleare Overhauser (NOE)

L'effetto nucleare Overhauser è una *variazione dell'intensità* del segnale di un protone *in seguito all'irradiazione* di un protone che si trova nelle vicinanze del protone osservato

Il fenomeno del NOE è legato all'accoppiamento dipolare, e quindi *vicini* significa effettivamente vicini nello spazio, e non separati da pochi legami.

Generalmente si osserva un aumento dell'intensità per molecole organiche, diminuzione per macromolecole. Se si ha aumento di intensità si parla di *NOE positivo*, se si ha diminuzione di *NOE negativo*.

Gli aumenti e diminuzioni di intensità sono in genere piccoli per NOE omonucleari, con un valore massimo teorico del 50% e valori reali che sono tipicamente compresi tra l'1% ed il 10%.

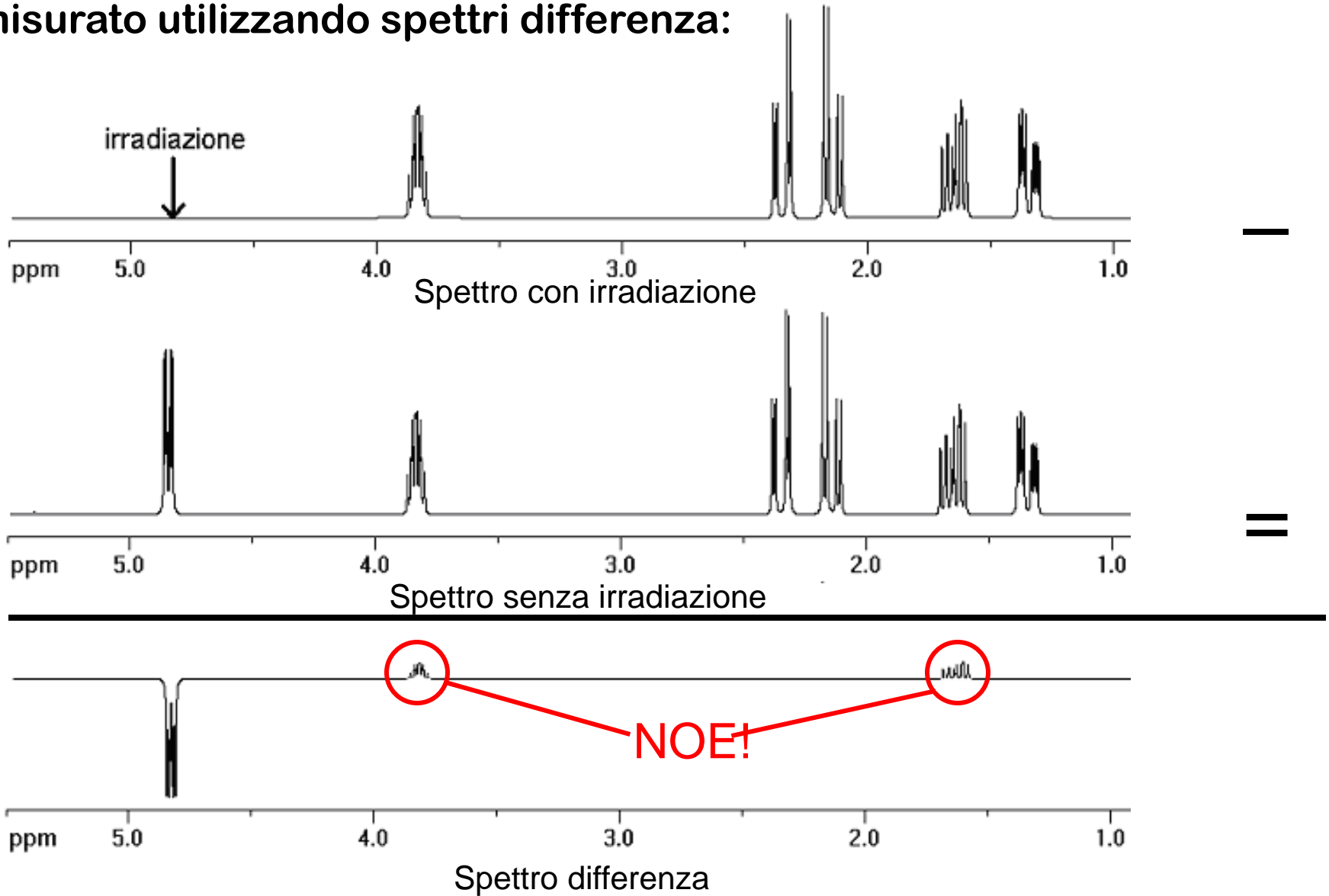
Non spiegheremo in dettaglio il meccanismo del NOE.

Diciamo solo che l'irradiazione su un nucleo fa sì che la differenza di popolazione tra gli stati α e β si annulla. Di conseguenza* nei nuclei accoppiati dipolarmente (quindi vicini), la differenza di popolazione tra gli stati α e β dei nuclei varia (aumenta se il NOE è positivo), e per questo l'intensità del segnale di questo nuclei aumenta.

* Perché questo sia una conseguenza non lo spieghiamo!

L'effetto nucleare Overhauser (NOE)

Poiché l'aumento di intensità è piccolo, normalmente il NOE viene misurato utilizzando spettri differenza:

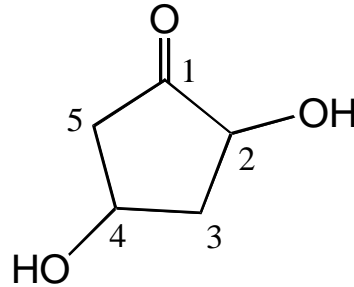


Uso dell'effetto nucleare Overhauser

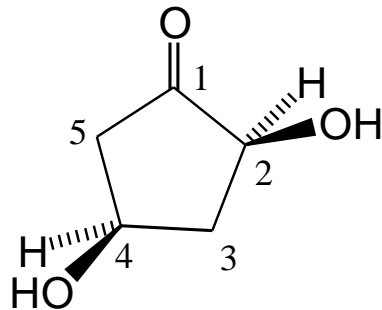
L'aumento della intensità del segnale di un protone in seguito all'irradiazione su un altro protone è in generale considerata prova della vicinanza spaziale (diciamo entro 3-4 Å) tra i due protoni.

Non è vero il contrario, cioè non possiamo concludere dall'assenza di NOE che i due protoni sono lontani.

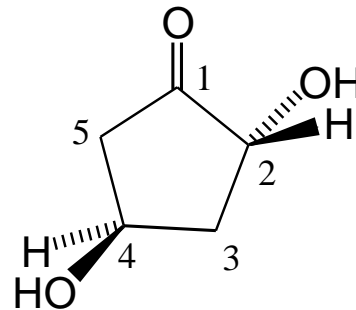
Il NOE è di enorme utilità per la determinazione della stereochimica delle molecole. Per esempio se stiamo studiando la stereochimica di:



un effetto NOE tra i protoni in 2 e in 4 indica vicinanza spaziale tra i due protoni, e questo è in accordo solo con il diastereoisomero *cis*.



cis



trans

NOE e disaccoppiamento

Una irradiazione su un protone è in grado di provocare sia NOE che disaccoppiamento di spin, ed i due effetti avvengono contemporaneamente in un esperimento ad onda continua.

Questo è un problema, perché il disaccoppiamento, facendo variare le molteplicità, rende difficile l'uso dell'esperimento differenza.

In un esperimento a trasformata di Fourier, tuttavia, i due fenomeni possono essere tenuti ben distinti.

Nel NOE la variazione dell'intensità del segnale è alla variazione della differenza tra le popolazioni degli stati α e β : l'intensità del segnale dipende dalla differenza di popolazione *al momento dell'impulso*, per cui è importante avere irradiazione *prima dell'impulso*, non dopo.

Nel disaccoppiamento di spin l'irradiazione fa variare la frequenza a cui il nucleo *emette*, e quindi l'irradiazione deve avvenire durante l'emissione, cioè *dopo l'impulso*.

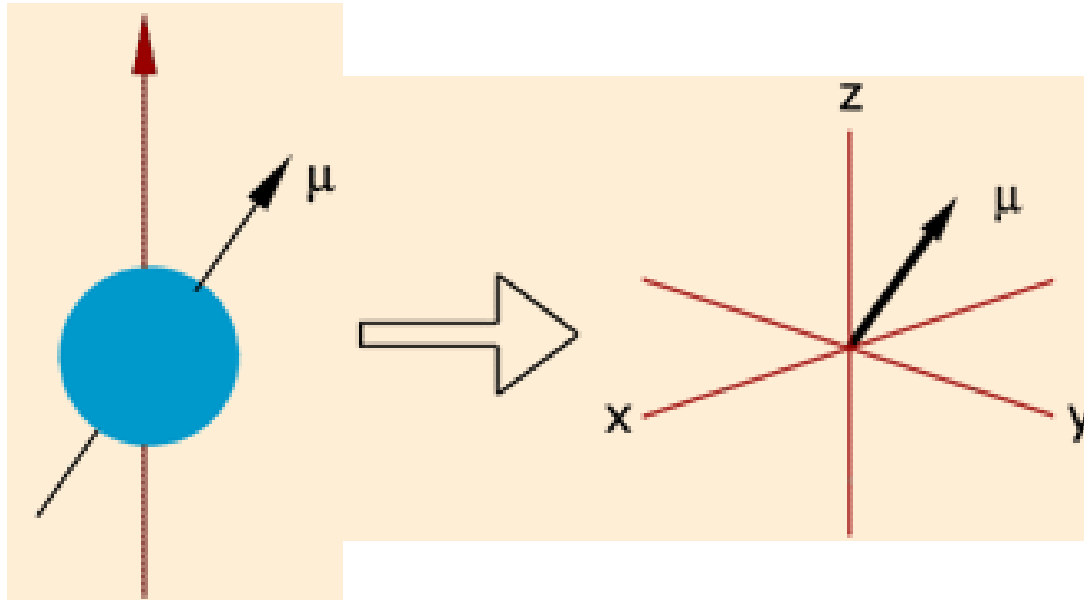
Quindi:

Irradiazione prima dell'impulso	⇒	NOE
Irradiazione dopo l'impulso	⇒	disaccoppiamento

La precessione

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 precessa attorno alla direzione del campo come un giroscopio



L' asse magnetico del protone compie una precessione intorno all'asse di applicazione di B_0 allo stesso modo di una trottola inclinata sotto l'effetto della gravità terrestre.

Quando un protone è posto in un campo magnetico

..... Comincia a precessere

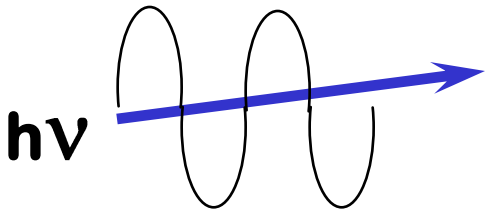


N

ω



RADIOFREQUENZA
40 - 600 MHz



Se $\nu = \omega$ il nucleo assorbirà la radiazione con conseguente inversione del suo spin

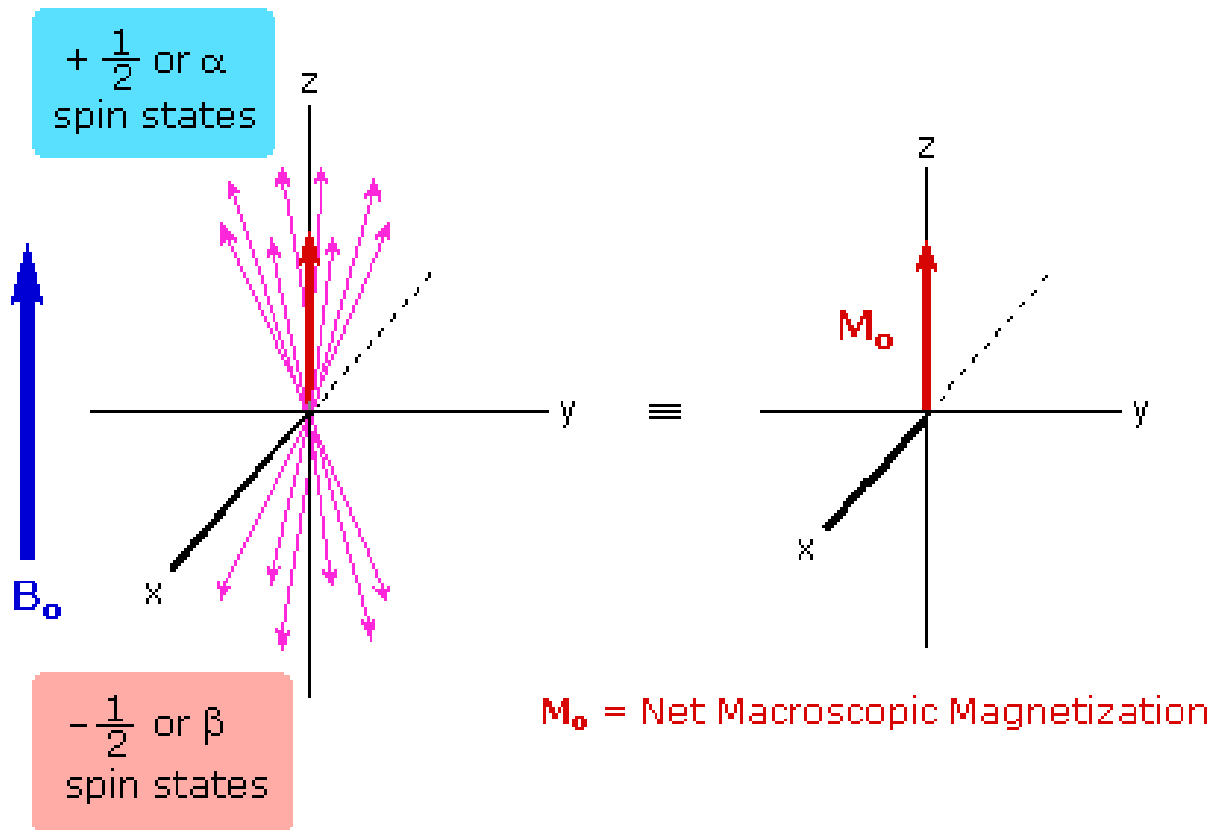
Quando sono posti in un campo magnetico, i nuclei precessano con frequenza ω .

NMR

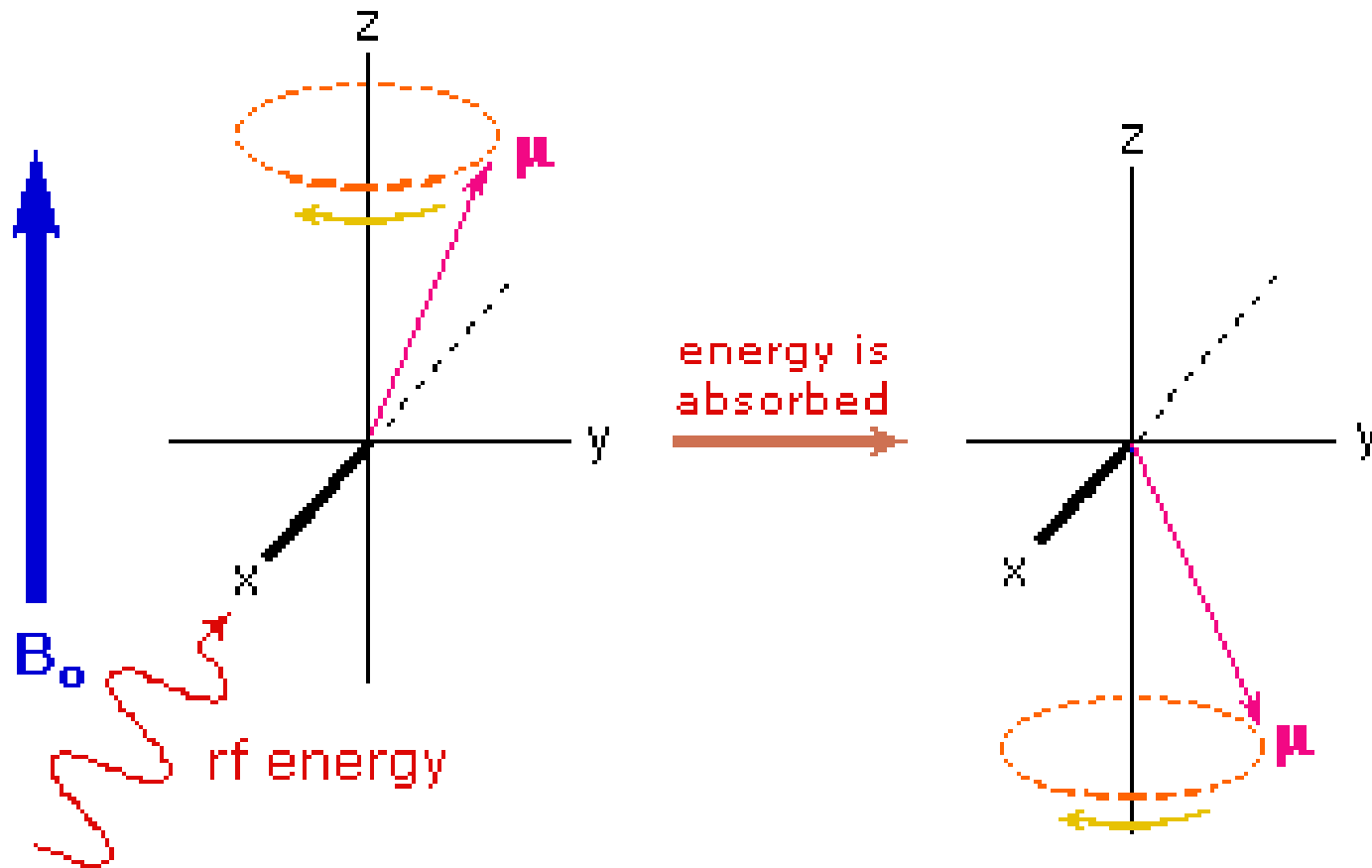
S

Modello vettoriale

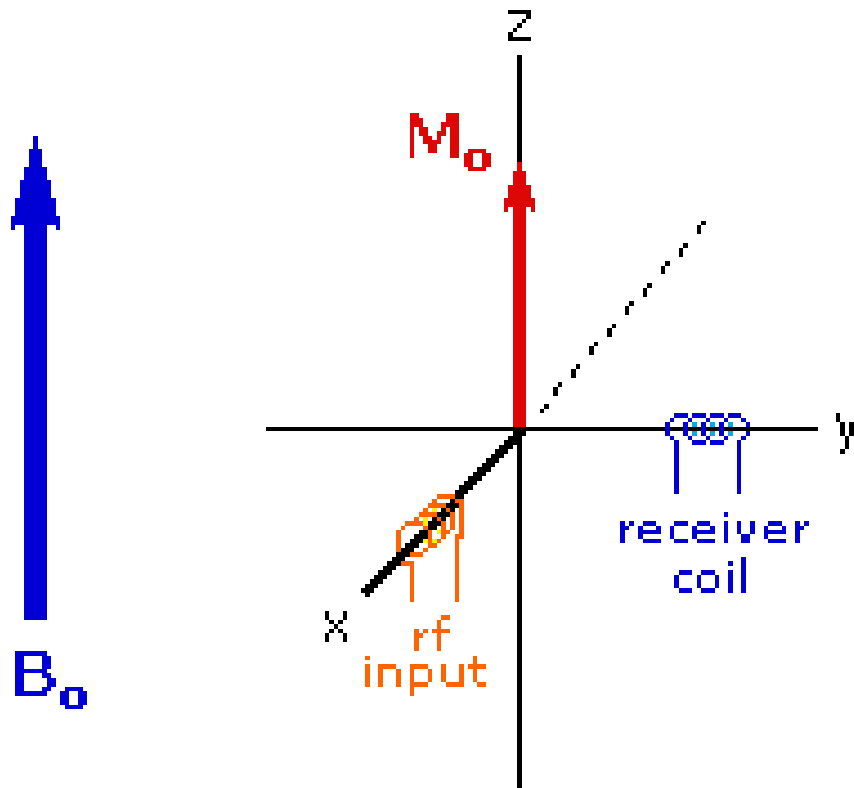
Un insieme di protoni equivalenti che compiono una precessione in fase casuale lungo l'asse z (direzione di B_0) producono una magnetizzazione macroscopica netta M_0 , detta **magnetizzazione longitudinale**, lungo l'asse z.



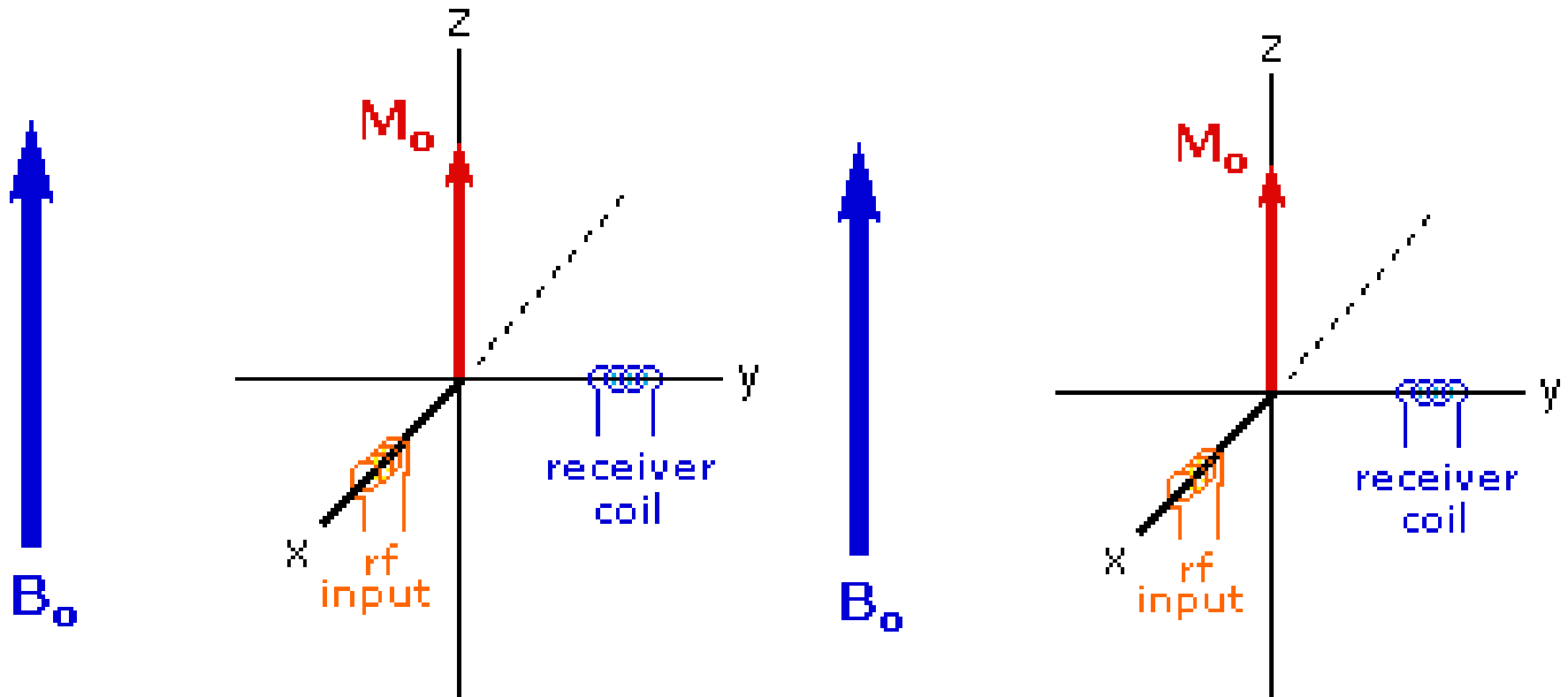
Quando la radiofrequenza applicata è uguale alla frequenza di precessione, i nuclei entrano in risonanza.



La radiofrequenza viene generata con un oscillatore posto lungo l'asse x in modo che produca un campo magnetico rotante B_1 , ortogonale a B_0 e oscillante ad onda continua lungo la direzione x . Quando, variando la frequenza dell'oscillatore, la frequenza di B_1 entrerà in risonanza con le frequenze di Larmor, la magnetizzazione M_0 sarà inclinata producendo una componente M nel piano xy , detta **magnetizzazione trasversale**, che può essere rivelata mediante una bobina posta sul piano xy .



La radiofrequenza viene generata con un oscillatore posto lungo l'asse x in modo che produca un campo magnetico rotante B_1 , ortogonale a B_0 e oscillante ad onda continua lungo la direzione x . Quando, variando la frequenza dell'oscillatore, la frequenza di B_1 entrerà in risonanza con le frequenze di Larmor, la magnetizzazione M_0 sarà inclinata producendo una componente M nel piano xy , detta **magnetizzazione trasversale**, che può essere rivelata mediante una bobina posta sul piano xy .



Rilassamento

Il rilassamento è il ritorno all'equilibrio di un sistema che è stato perturbato.

In generale il rilassamento è un processo esponenziale, e può essere definita una costante di tempo T (il cosiddetto tempo di rilassamento) che ci dice quanto velocemente il sistema rilassa.

Come il sistema torna all'equilibrio?

Come M_0 ritorna lungo z ?

Come scompare o decade la magnetizzazione trasversale?

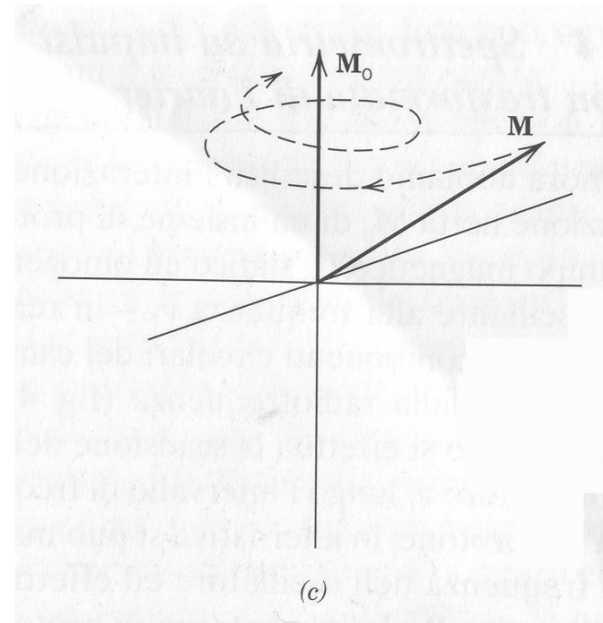
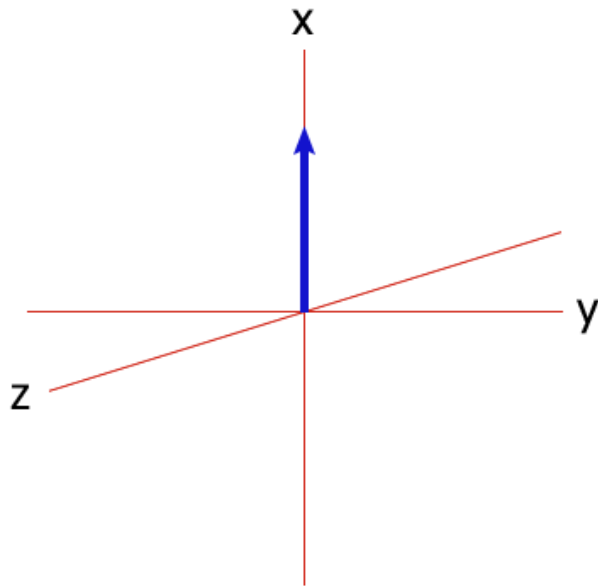
Come scompare il segnale?

Esistono due meccanismi fondamentali per il rilassamento:

longitudinale e trasversale

Rilassamento longitudinale

Il primo è il rilassamento longitudinale (spin-reticolo) comporta un trasferimento di energia dai nuclei eccitati ai nuclei spazialmente adiacenti che si muovono a una frequenza opportuna (rilassamento dipolo-dipolo). Il **Rilassamento longitudinale** è di fatto il ritorno da uno stato eccitato allo stato di equilibrio. Il rilassamento longitudinale può essere visto come ritorno alla distribuzione di Boltzmann tra i due stati di spin. 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 $+x$ con un movimento a spirale di ampiezza decrescente.



T_1 è la costante di tempo che descrive come la magnetizzazione trasversale ritorna al suo valore di equilibrio.

Rilassamento longitudinale (T1):

Il ritorno allo stato fondamentale può essere spontaneo o stimolato

L'emissione spontanea è un fenomeno trascurabile per l'NMR poiché la ΔE tra i due stati è piccola.

L'emissione stimolata richiede l'interazione del nucleo con un campo magnetico oscillante alla sua frequenza di risonanza.

Le fonti di campi magnetici sono:

- **Momenti magnetici di altri nuclei** (principale meccanismo di rilassamento nelle molecole piccole e dipende da r^{-3})
- **Momenti magnetici elettronici** (per composti con elettroni spaiati)

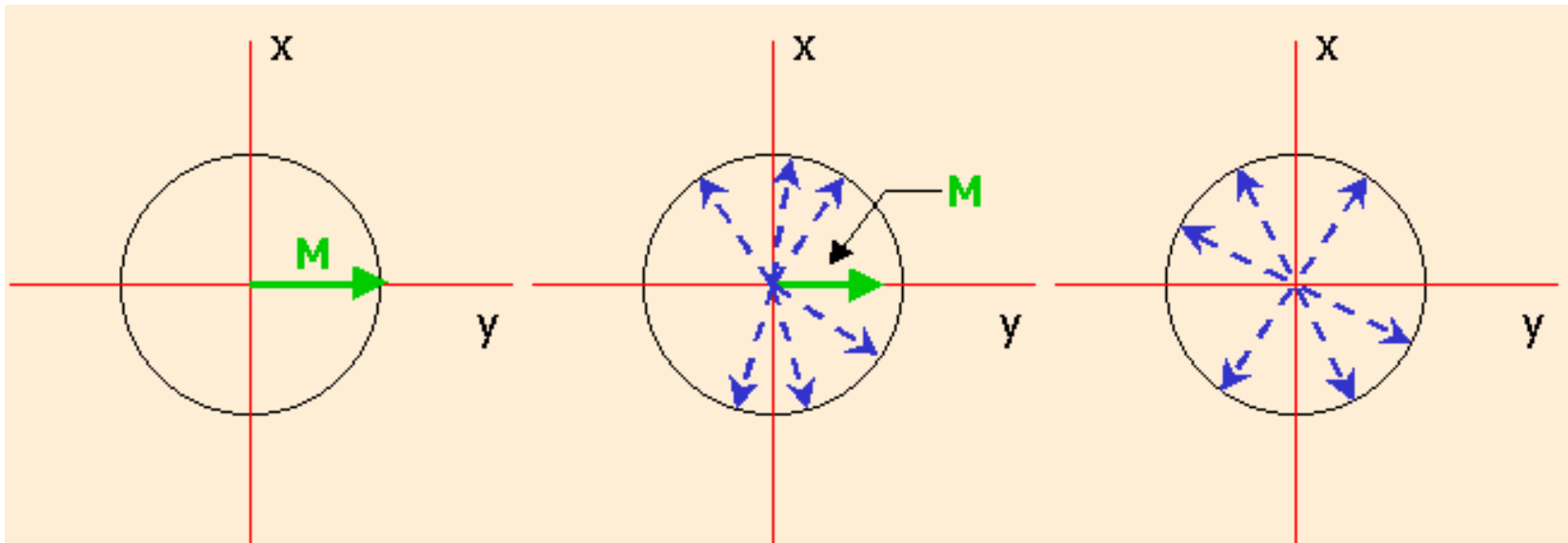
L'oscillazione è prodotta generalmente dal moto (rotazioni) termico della molecola

Rilassamento trasversale

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 $+x$. 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.

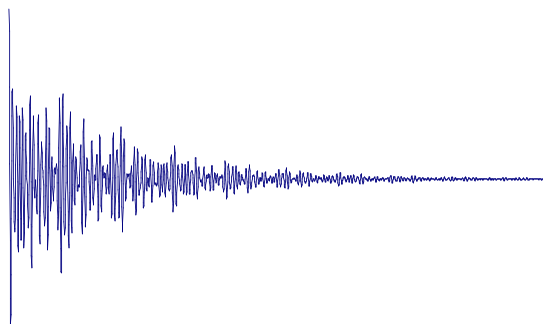
T_2 (rilassamento spin-spin) è la costante di tempo che descrive il decadimento della magnetizzazione trasversale.

Esso comporta il trasferimento di energia tra protoni in precessione la qual cosa produce una perdita di fase e di segnale. Uno dei contributi più importanti a T_2 è rappresentato dalla disomogeneità di campo.

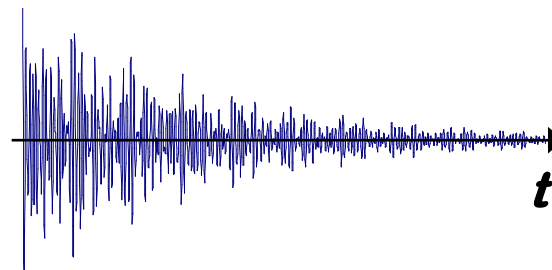


Il tempo di rilassamento T_2 regola anche la velocità di decadimento del FID in uno spettrometro ideale, in cui il campo magnetico è assolutamente omogeneo

←→
 T_2



Rilassamento veloce
(T_2 piccolo)

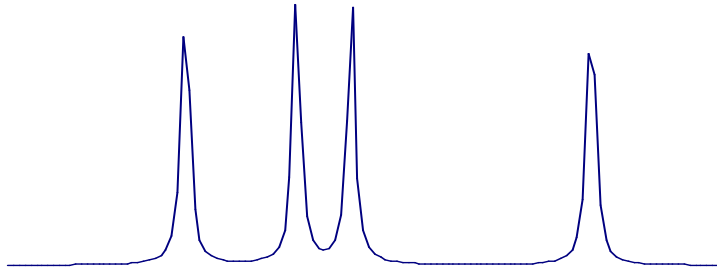


Rilassamento lento
(T_2 grande)

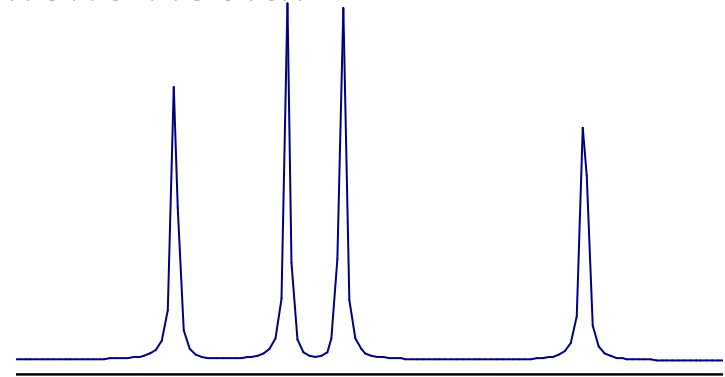
Dal punto di vista microscopico, il rilassamento trasversale può essere visto come una perdita di fase dei nuclei che modificano la loro velocità ma tuttavia non modificano il loro spin. Esso richiede solo interazioni tra nucleo e nucleo.

Rilassamento

Nel FID di destra della pagina precedente, il segnale decade più velocemente, e la frequenza è più indefinita: dopo la trasformata di Fourier, i segnali saranno più larghi e meno risolti.



Rilassamento veloce (T_2 piccolo)



Rilassamento lento (T_2 grande)

Quindi:

Un tempo di rilassamento piccolo (rilassamento veloce) riduce la risoluzione.

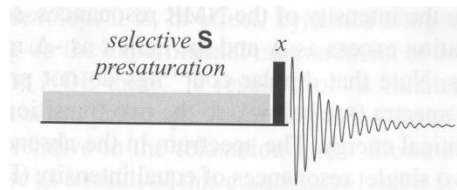
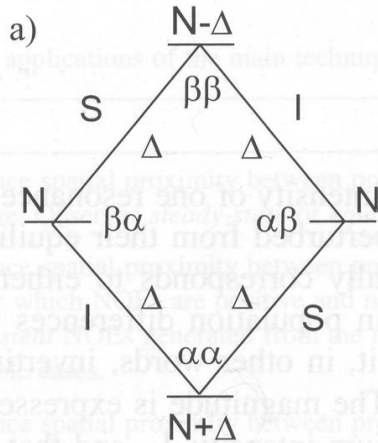
Però dobbiamo dire che prima di poter ripetere un esperimento NMR, dobbiamo aspettare che si ristabilisca la distribuzione di popolazioni di Boltzmann.

Se il tempo di rilassamento è lento, dobbiamo aspettare molto tempo, e possiamo ripetere l'esperimento meno volte per unità di tempo: il rapporto segnale/rumore scende.

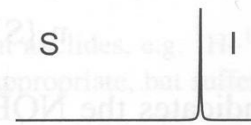
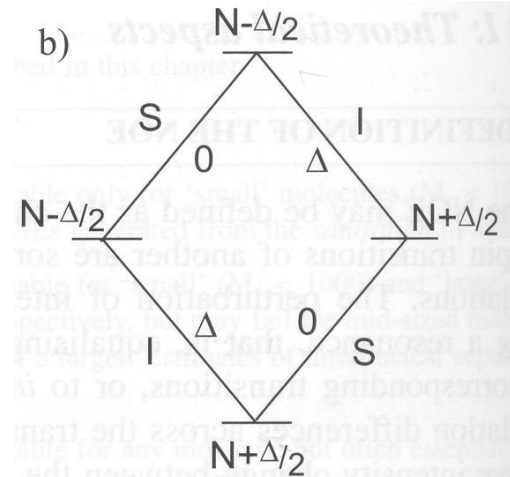
Quindi: Un tempo di rilassamento grande (rilassamento lento) riduce la sensibilità.

Origine del Noe

Consideriamo due nuclei con $I=1/2$, spazialmente vicini ma non scalarmente accoppiati.



Saturiamo S e quindi forziamo il sistema in una situazione di non equilibrio con nuove popolazioni di spin



Sistema all'equilibrio

$$\alpha\alpha - \beta\alpha = \alpha\alpha - \alpha\beta = \Delta$$

$$\alpha\beta - \beta\beta = \beta\alpha - \beta\beta = \Delta$$

$$\alpha\beta - \beta\alpha = 0$$

$$\alpha\alpha - \beta\beta = 2\Delta$$

Sistema non all'equilibrio

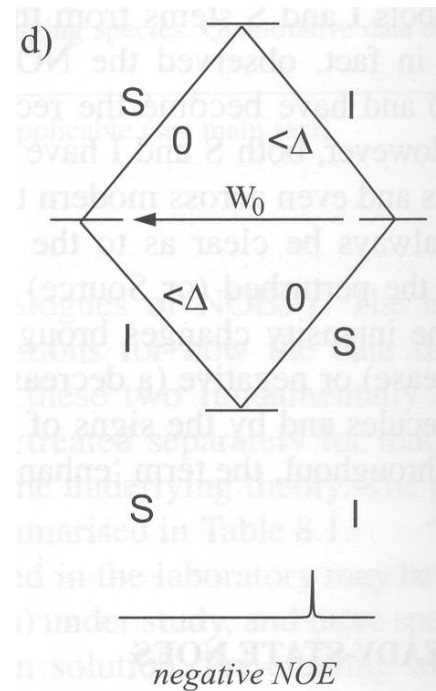
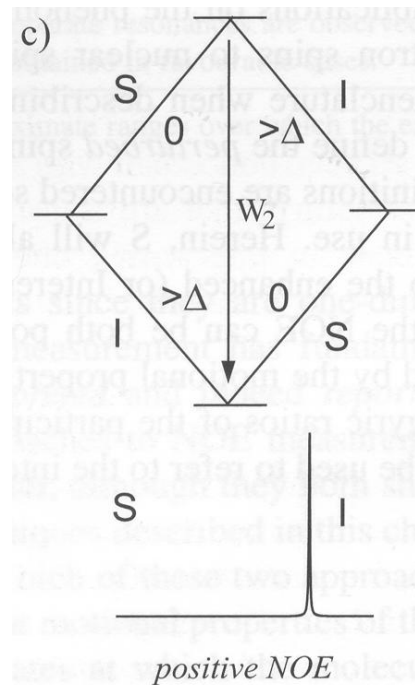
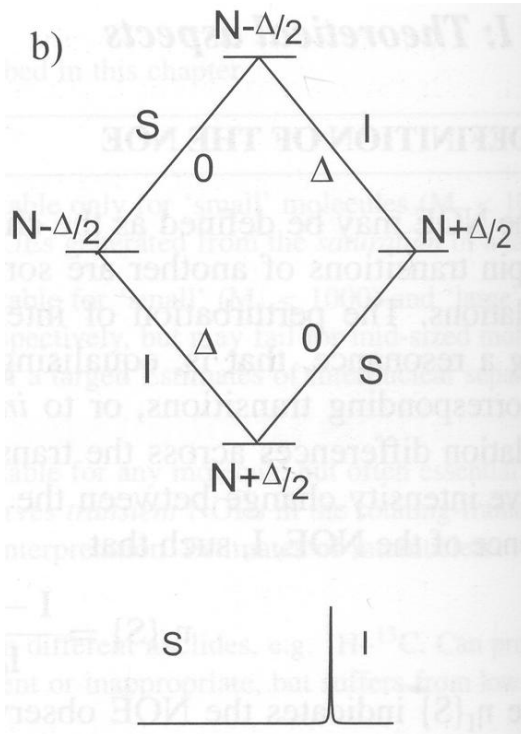
$$\alpha\alpha - \beta\alpha = \Delta$$

$$\alpha\beta - \beta\beta = \Delta$$

$$\alpha\beta - \beta\alpha = \Delta$$

$$\alpha\alpha - \beta\beta = \Delta$$

Il sistema cercherà di ritornare nella condizione iniziale di popolazioni.



Sistema non all'equilibrio

$$\alpha\beta - \beta\alpha = \Delta$$

$$\alpha\alpha - \beta\beta = \Delta$$

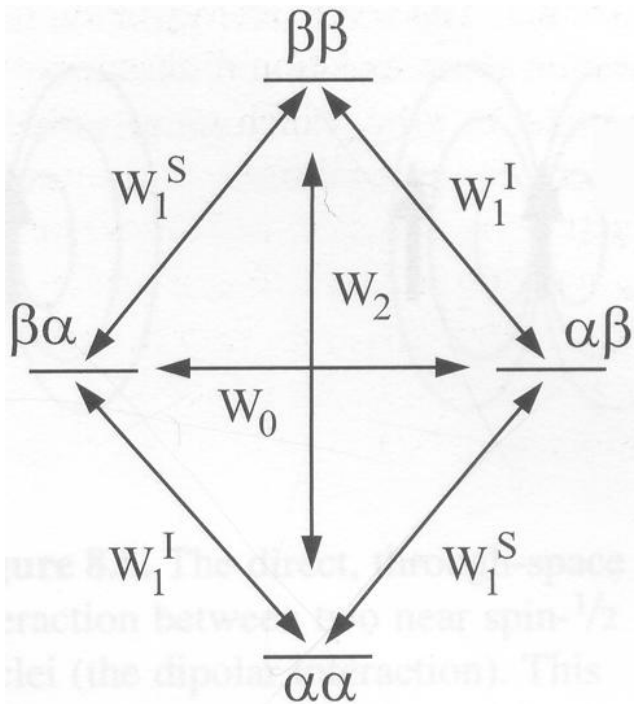
Sistema all'equilibrio

$$\alpha\beta - \beta\alpha = 0$$

$$\alpha\alpha - \beta\beta = 2\Delta$$

Attraverso processi di rilassamento incrociato

W_2 e W_0 competono l'un l'altro e il percorso dominante determina il segno del Noe. Inoltre le condizioni di equilibrio per I possono essere generate anche attraverso percorsi di rilassamento non incrociato, indipendenti da S (W_1).



Tutti i possibili cammini di rilassamento dipendono dalla distanza tra i due nuclei (inversamente proporzionale a r^6) e dal tempo di correlazione rotazionale τ_c)

τ_c : l'intervallo di tempo necessario alla molecola per ruotare di un angolo di 1 rad rispetto ad un asse

$$\tau_c = M \times 10^{-12} \text{ s}$$

Molecole piccole in soluzioni non viscosi, che ruotano e si muovono velocemente, hanno piccoli valori di τ_c e rilassano preferenzialmente attraverso meccanismi W_2

Noe positivo

Molecole grandi che ruotano e si muovono lentamente hanno grandi valori di τ_c e rilassano preferenzialmente attraverso meccanismi W_0

Noe negativo