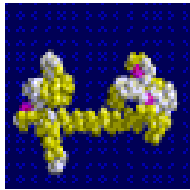
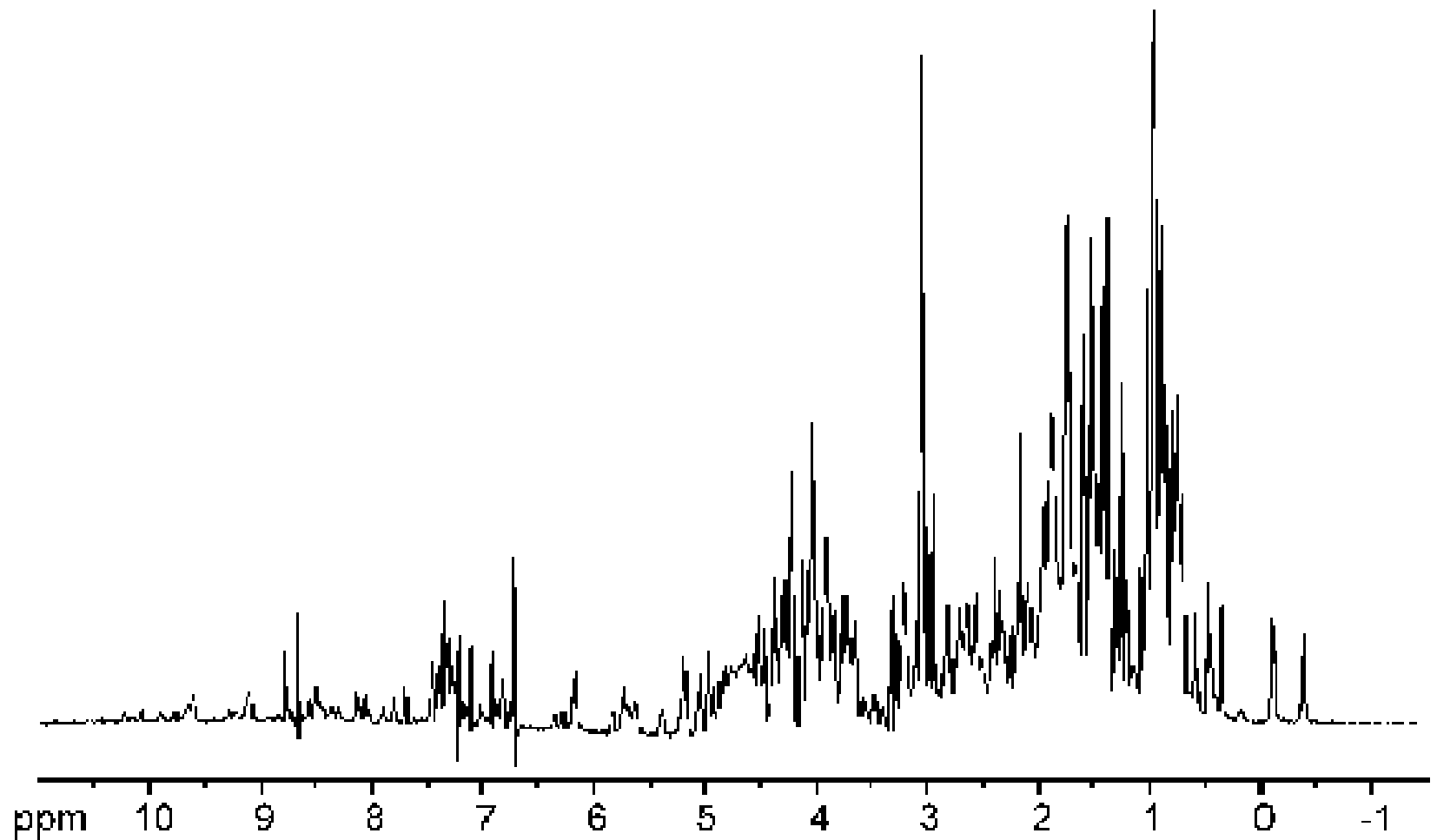


• ¹H NMR (500 MHz, C₆D₆) of theonellasterol

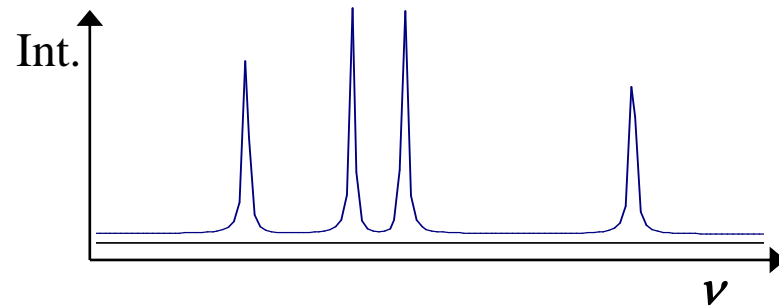


Spectrum of a protein

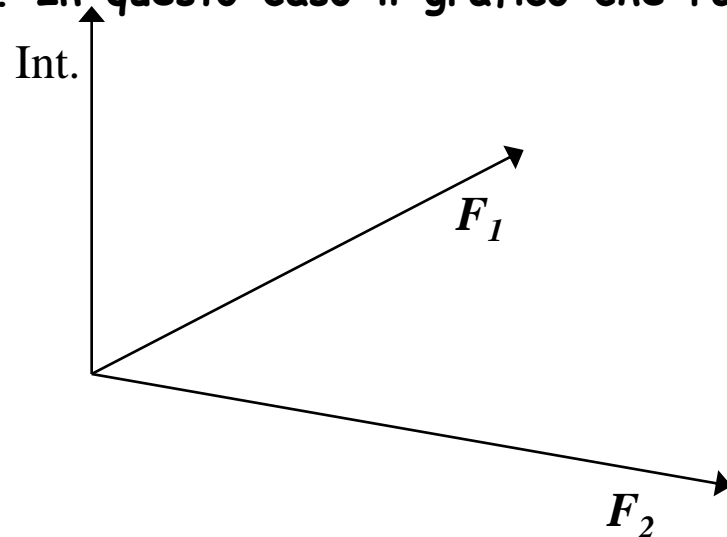


NMR - Bidimensionale

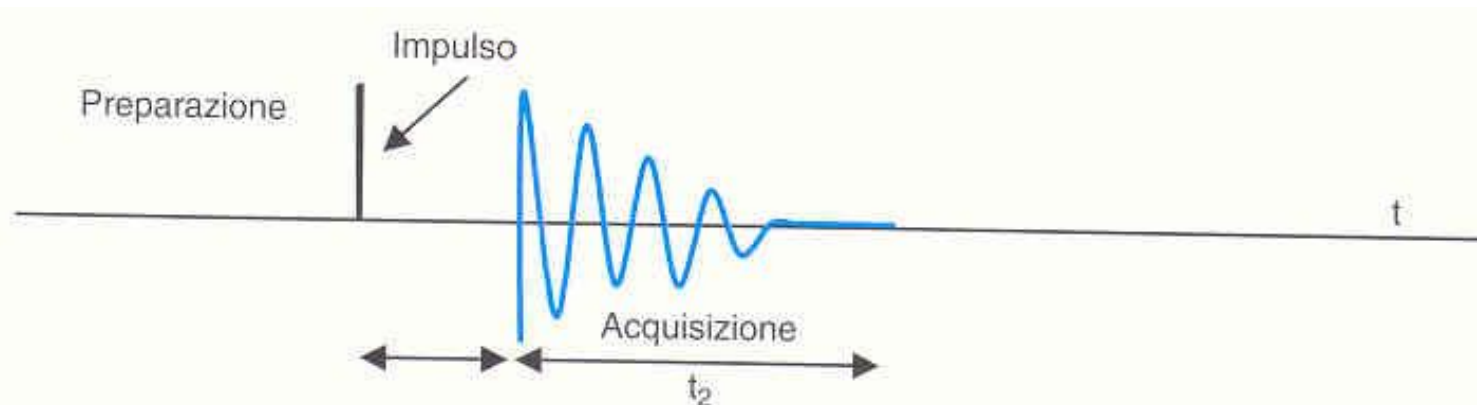
Gli spettri protonici e ^{13}C sono grafici a due dimensioni che riportano il c. s in funzione dell'intensità del segnale. Tuttavia li si definisce esperimenti monodimensionali in quanto esiste una sola variabile indipendente rappresentata dalla frequenza che deriva dall' FT del FID.



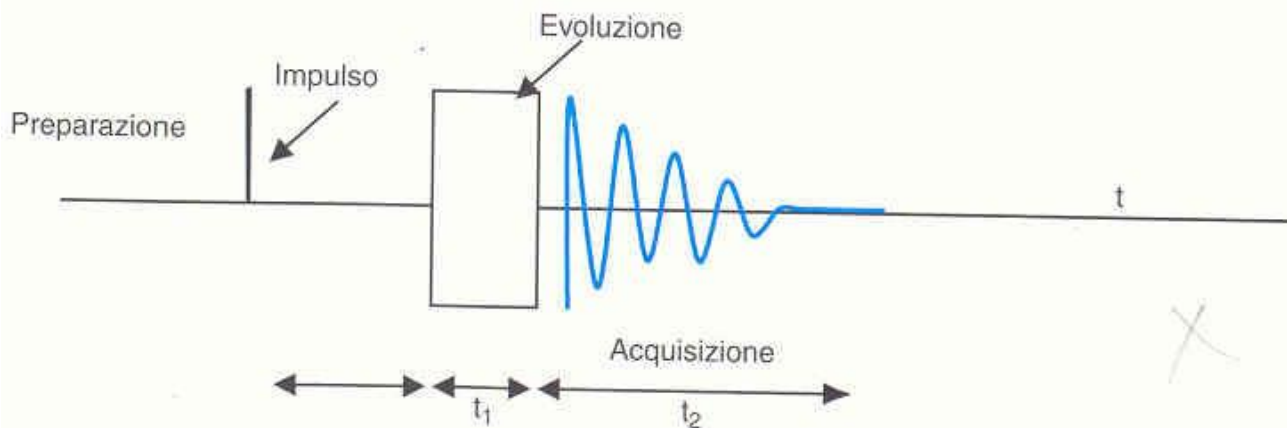
È possibile realizzare anche spettri NMR in cui l'intensità è funzione di due frequenze (indicate con ν_1 e ν_2 o, più spesso, F_1 e F_2) si parla in questo caso di NMR bidimensionale o 2D NMR. In questo caso il grafico che rappresenta lo spettro è un grafico tridimensionale.



Negli esperimenti monodimensionali i FID sono solo in funzione del tempo t_2



Invece negli esperimenti bidimensionali viene inserito t_1 variabile così da ottenere una serie di FID diversi in funzione appunto di t_2 e t_1 .



Esperimenti NMR-2D

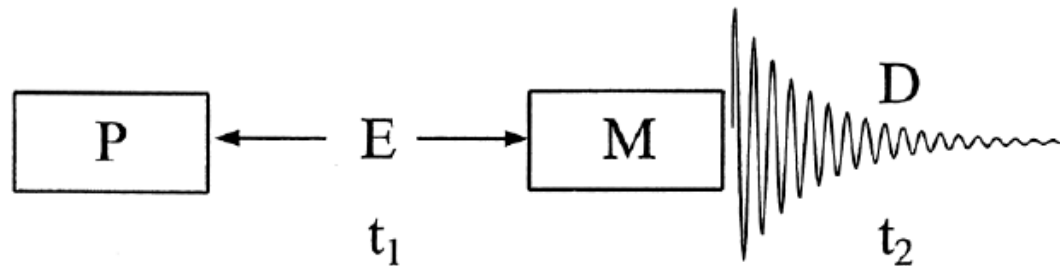
Tutte le sequenze bi-dimensionali si basano sullo stesso principio e hanno un formato base che può essere suddiviso in 4 fasi:

1.Preparazione

2.Evoluzione

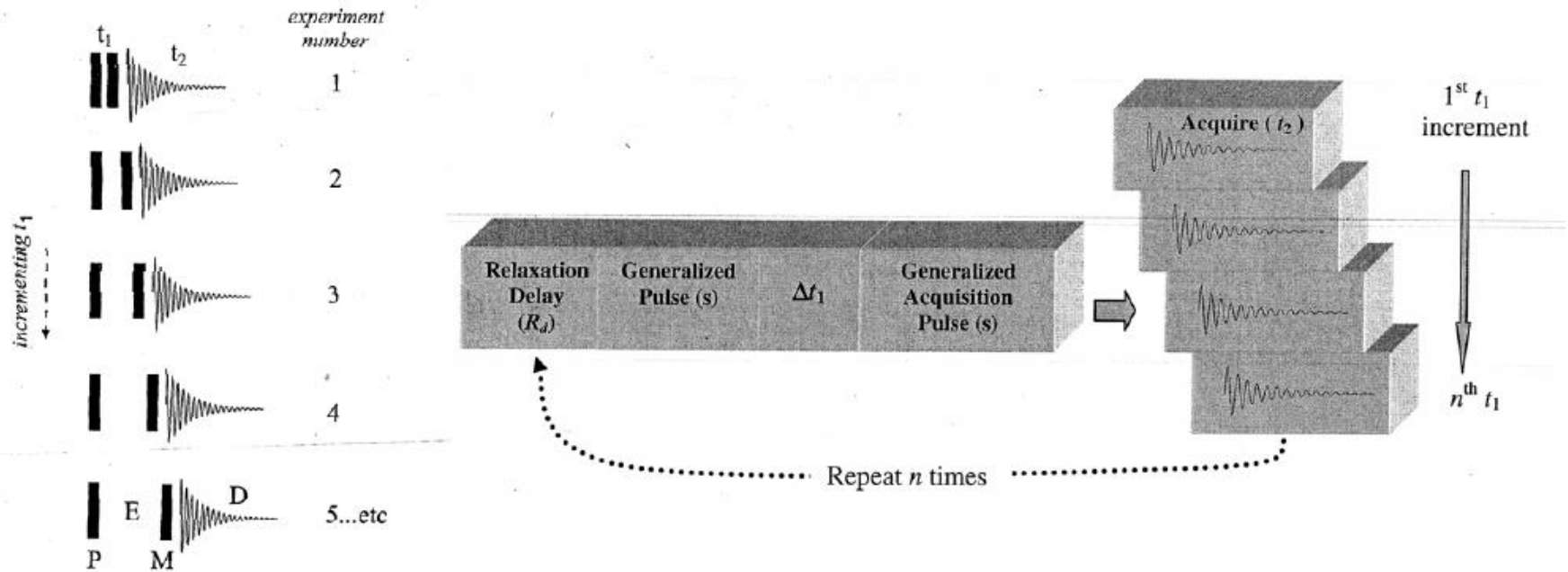
3.Mixing

4.Detection (Acquisizione del segnale)

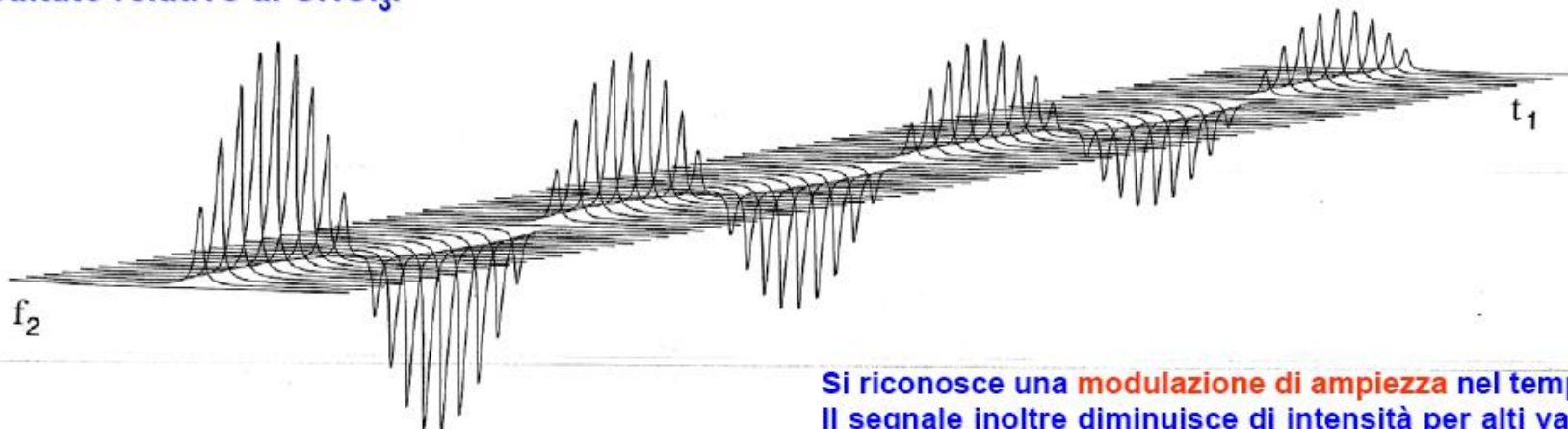


Nel periodo di evoluzione si determinano le condizioni per la seconda dimensione in quanto consente l'ottenimento di una variazione della magnetizzazione in funzione del tempo.

Esperimenti NMR-2D

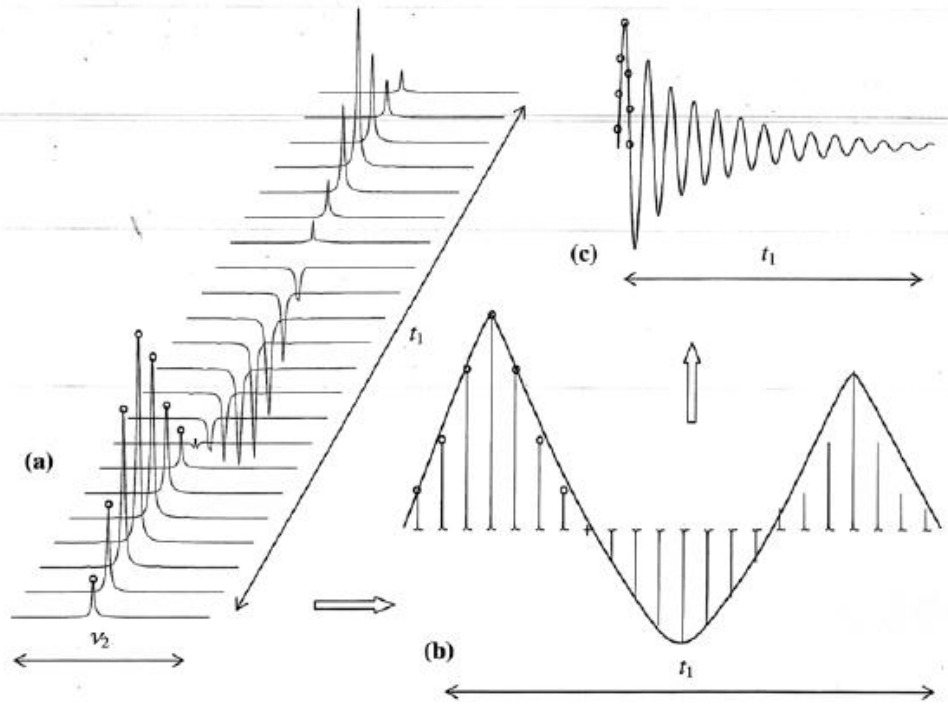


Analizzando i vari FID ottenuti variando il tempo di evoluzione t_1 , si ottengono una serie di spettri i cui segnali mostrano una intensità che varia nel tempo. Nel'esempio è riportato il risultato relativo al CHCl_3 .

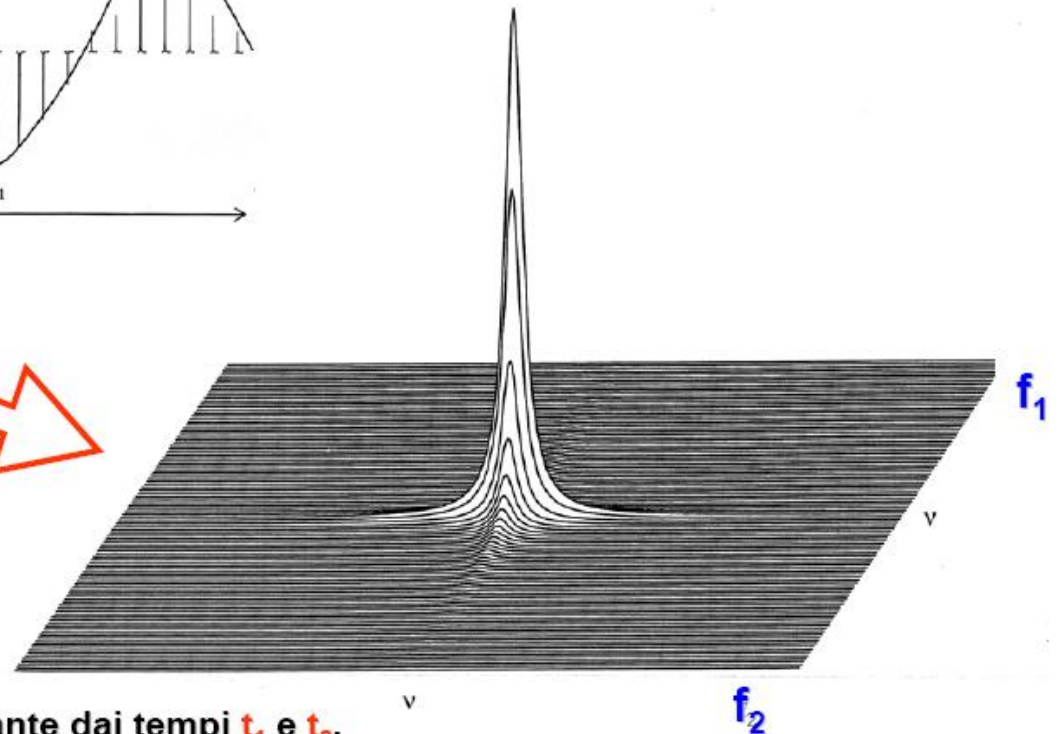
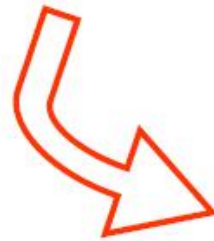


Si riconosce una **modulazione di ampiezza** nel tempo. Il segnale inoltre diminuisce di intensità per alti valori di t_1 , a causa del rilassamento T_2^*

Esperimenti NMR-2D



La variazione di intensità nel tempo consente di ricavare un secondo FID che è funzione di t_1 . Sottoponendo questo nuovo FID creato "artificialmente" è possibile ricavare la seconda dimensione f_1 con l'informazione di chemical shift.

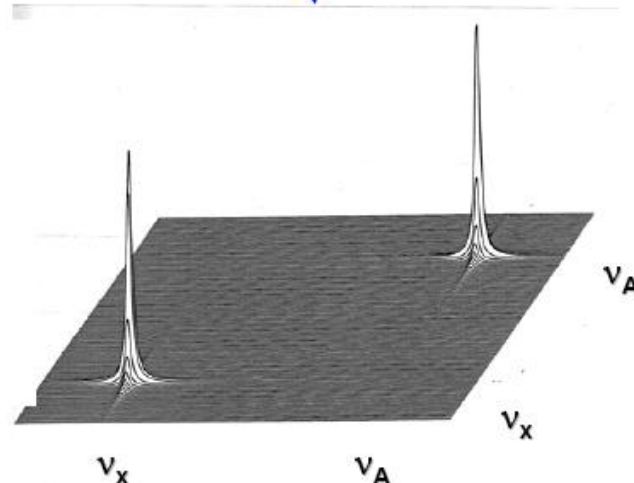
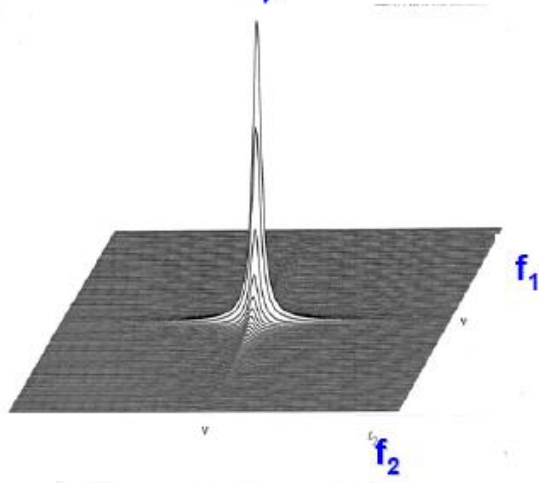


La notazione f_1 e f_2 segue l'ordine derivante dai tempi t_1 e t_2 .

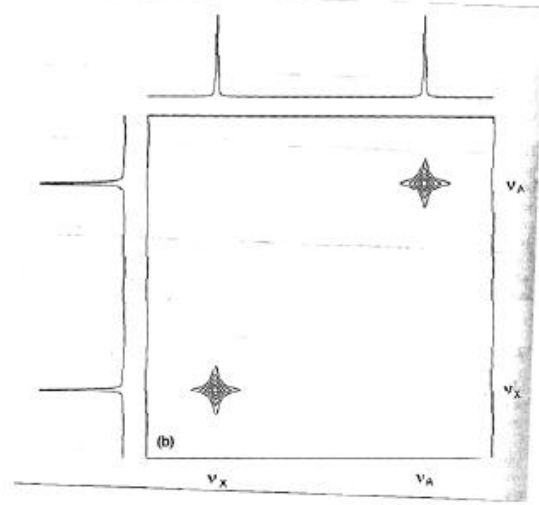
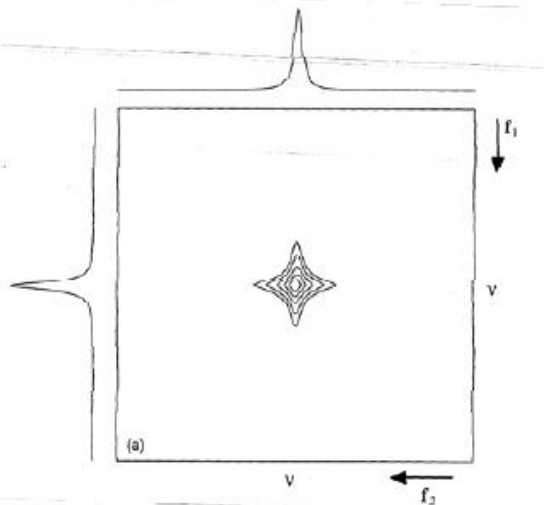
Esperimenti NMR-2D



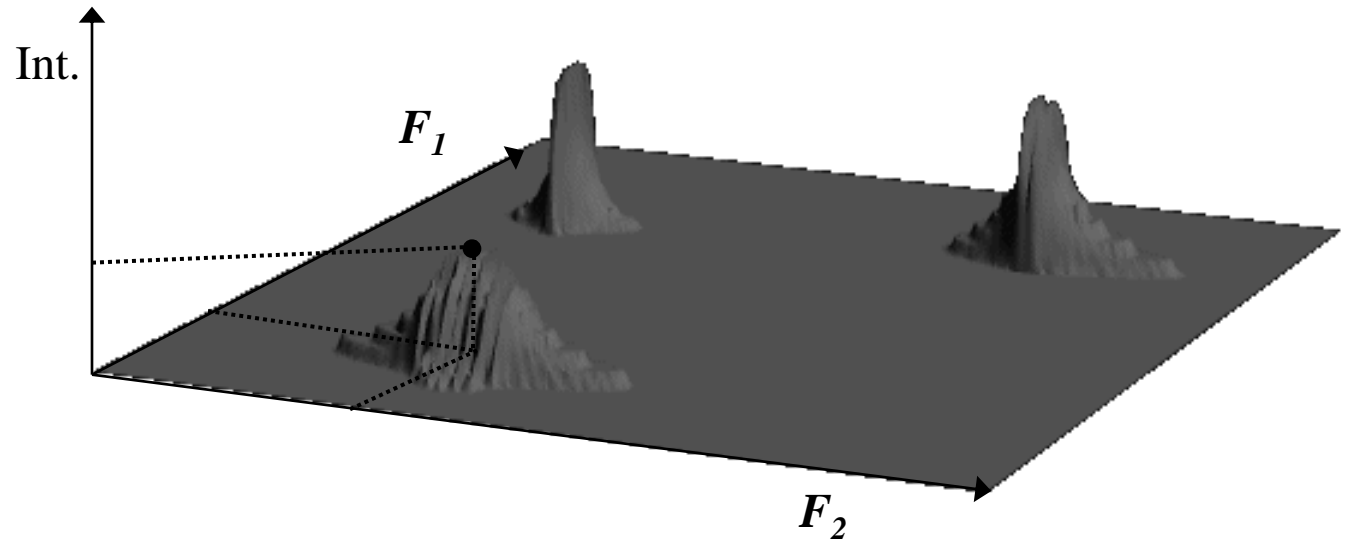
Rappresentazione di uno spettro 2D come contour plot con curve di livello



È come guardare lo spettro dall'alto (dalla direzione dell'intensità): gli assi che si vedono sono F_1 e F_2 , ed i picchi di correlazione appaiono come macchie (in realtà serie di cerchi concentrici), le cui coordinate sono i chemical shift dei nuclei messi in correlazione (perché accoppiati, vicini nello spazio, ecc.).



Le due frequenze sono normalmente (ma non necessariamente) chemical shift. Ogni picco dello spettro definisce quindi due frequenze di risonanza, e quindi mette in relazione i due nuclei che risuonano a quelle frequenze.



La spettroscopia 2D NMR quindi mette in correlazione due nuclei. Il significato della correlazione (accoppiamento scalare, NOE, ecc.) dipende dal particolare tipo di esperimento 2D NMR che si sta effettuando.

Gli esperimenti 2D NMR sono realizzati con sequenze multiimpulso, ma non spiegheremo come è possibile ottenere spettri di questo tipo.

Oggi esistono varie centinaia di esperimenti 2D NMR descritti, anche se tutti possono essere raggruppati in una decina di esperimenti fondamentali.

Tipi di esperimenti bidimensionali

Esperimenti omonucleari

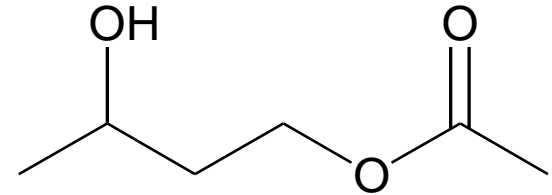
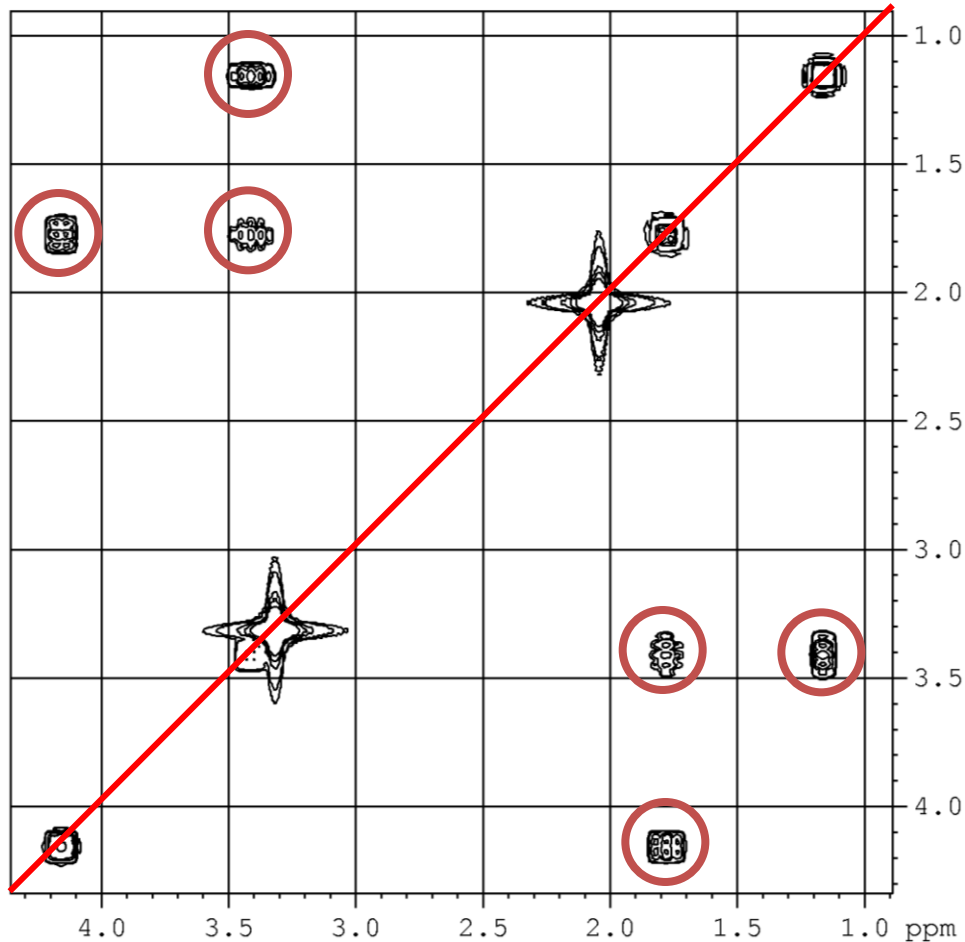
- 2D-COSY (^1H - ^1H scalare)
- HOHAHA (^1H - ^1H scalare)
- NOESY (^1H - ^1H dipolare)

Esperimenti eteronucleari

- HMQC (^1H - ^{13}C diretta, ^1J)
- HMBC (^1H - ^{13}C long-range, ^2J , ^3J)

Esperimenti 2D NMR omonucleari: COSY

Un esperimento 2D NMR si dice omonucleare se F_1 e F_2 sono relativi allo stesso nucleo. Un tipico esperimento omonucleare è il COSY:



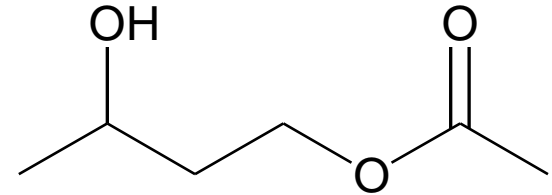
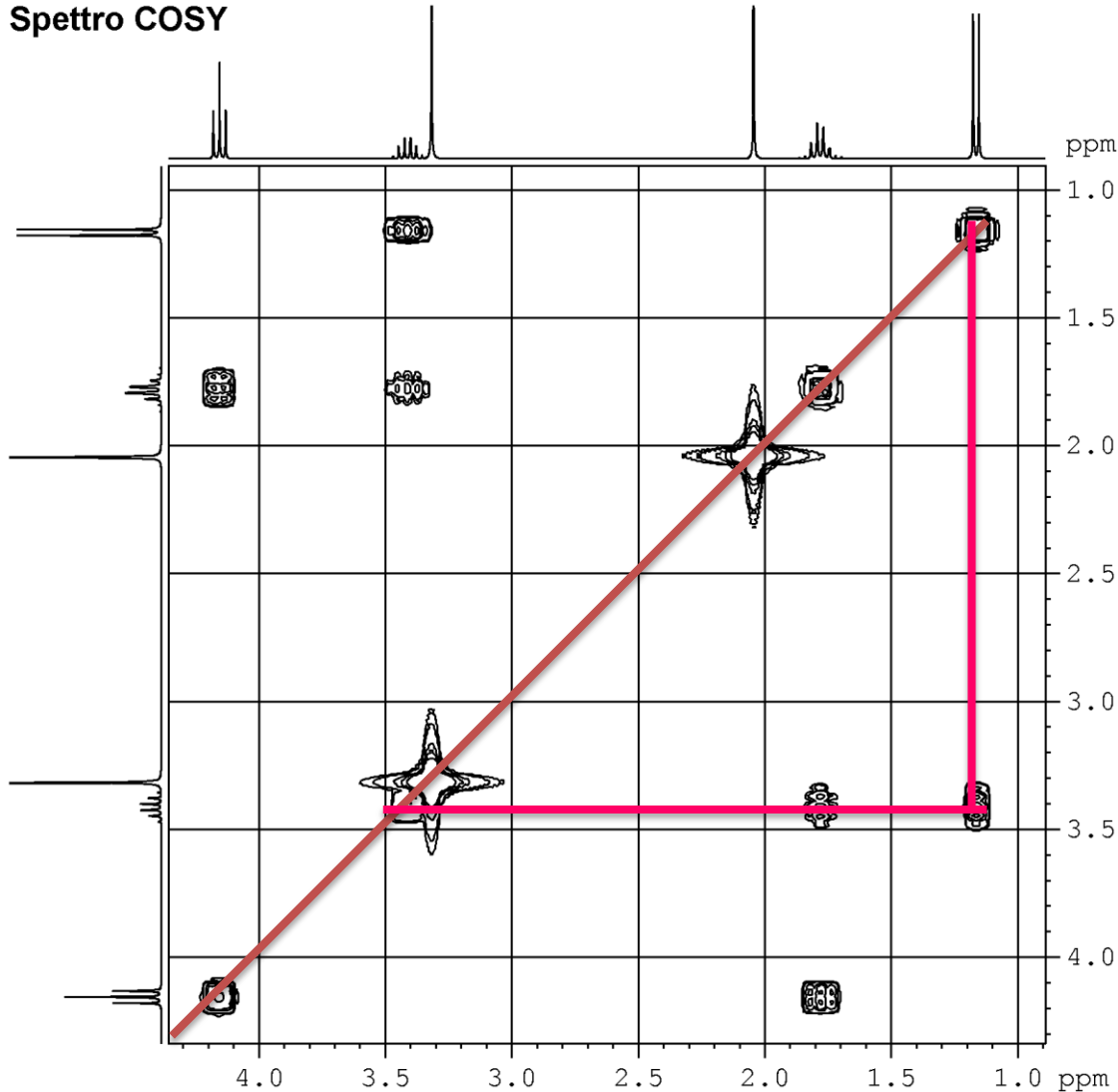
Negli esperimenti 2D NMR omonucleari sono presenti picchi di correlazione a $F_1 = F_2$ (come se un nucleo fosse correlato con se stesso). Questi picchi sono detti **picchi diagonali** perché sono sulla diagonale dello spettro.

I picchi al di fuori della diagonale, che sono quelli che realmente forniscono informazioni, sono invece detti **picchi di correlazione** o in inglese cross peaks. Lo spettro COSY è inoltre simmetrico rispetto alla diagonale.

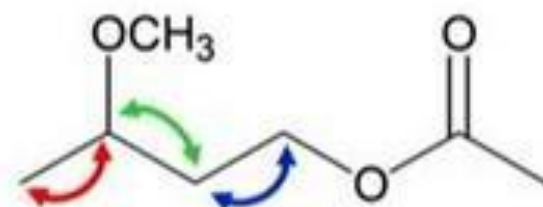
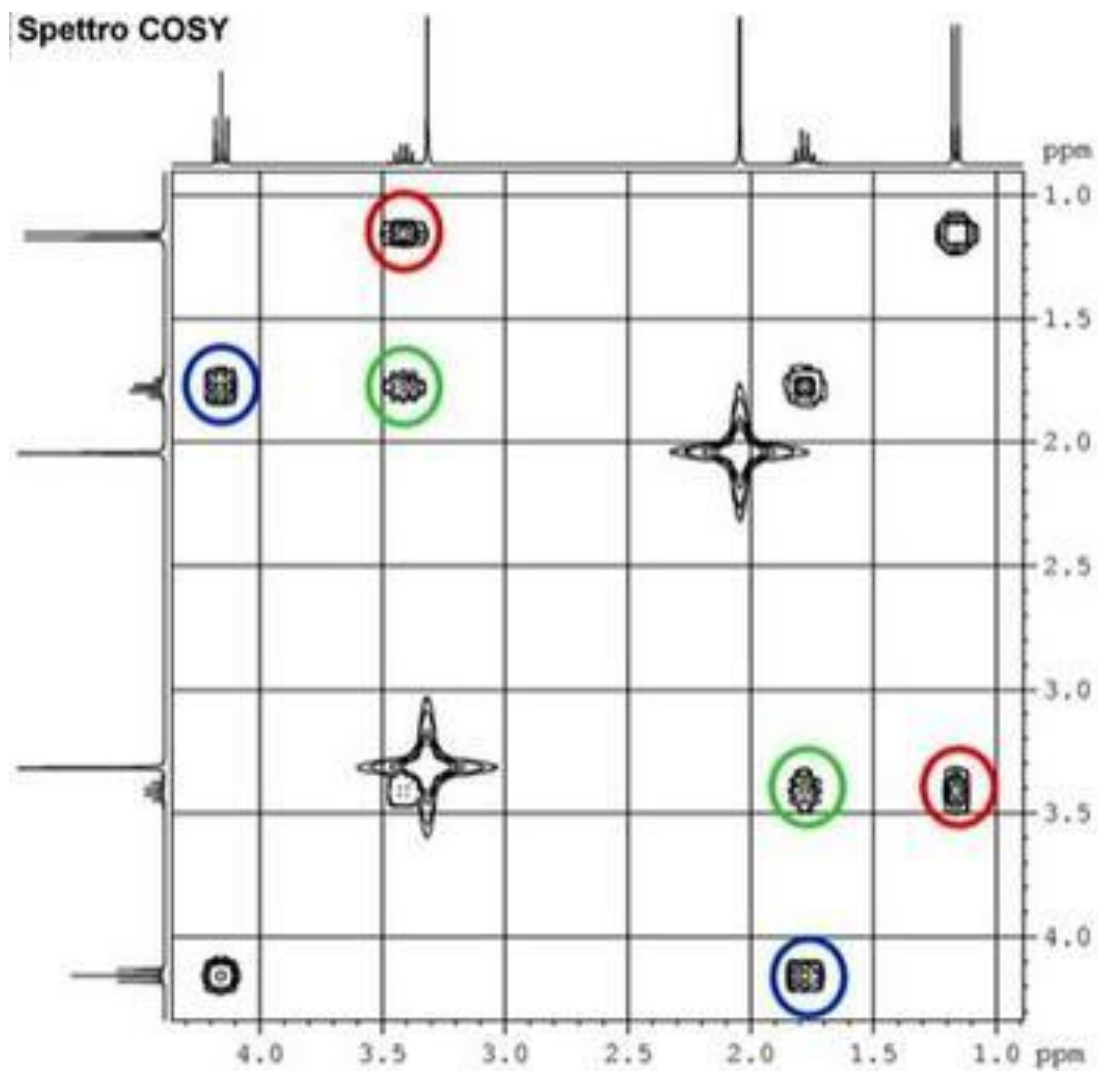
Esperimenti 2D NMR omonucleari: COSY

Normalmente sui bordi di uno spettro 2D NMR sono riportati gli spettri 1D relativi alle due frequenze (quindi in questo caso lo spettro protonico in entrambi i lati) per facilitare la lettura dello spettro.

Spettro COSY

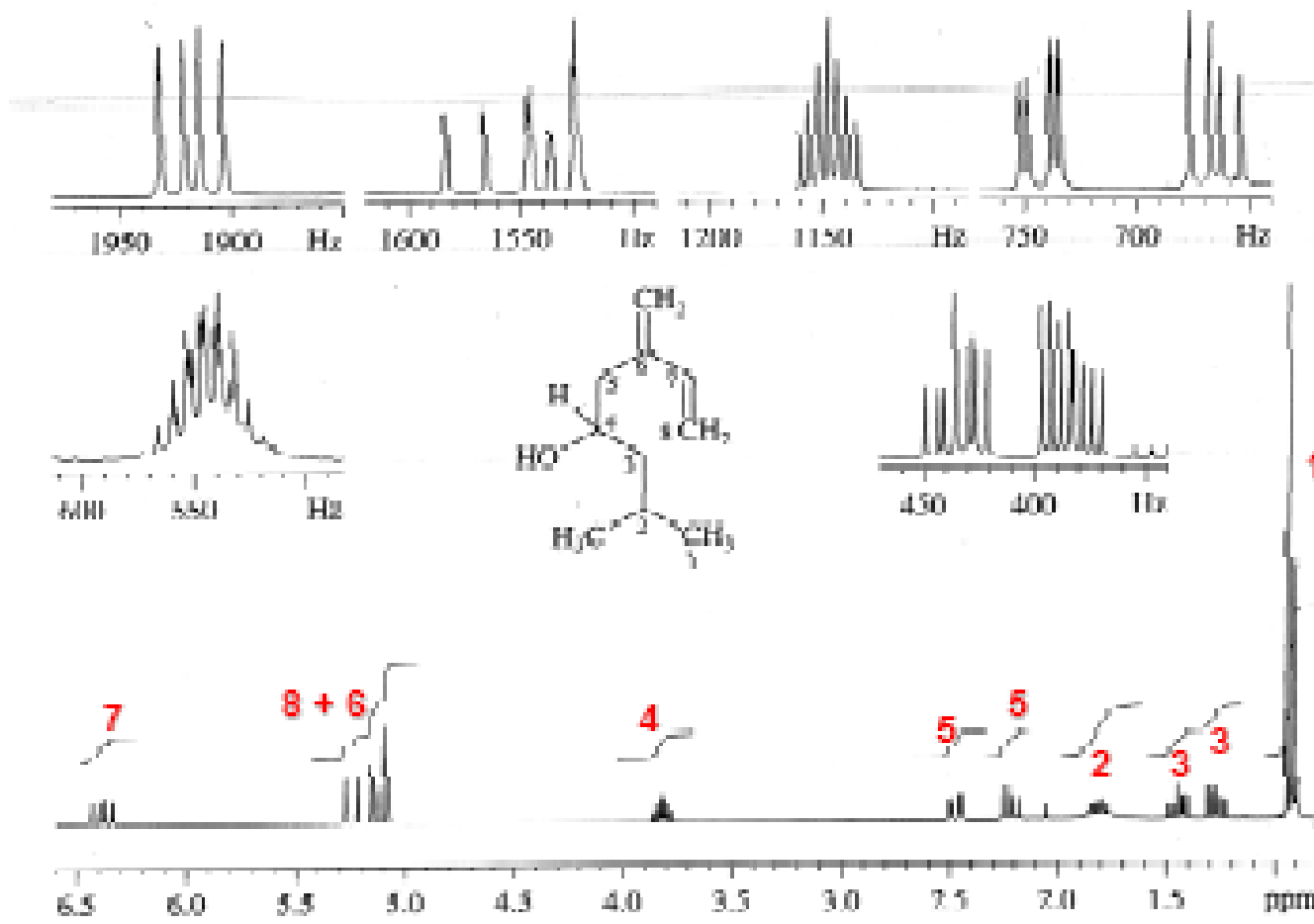


Spettro COSY

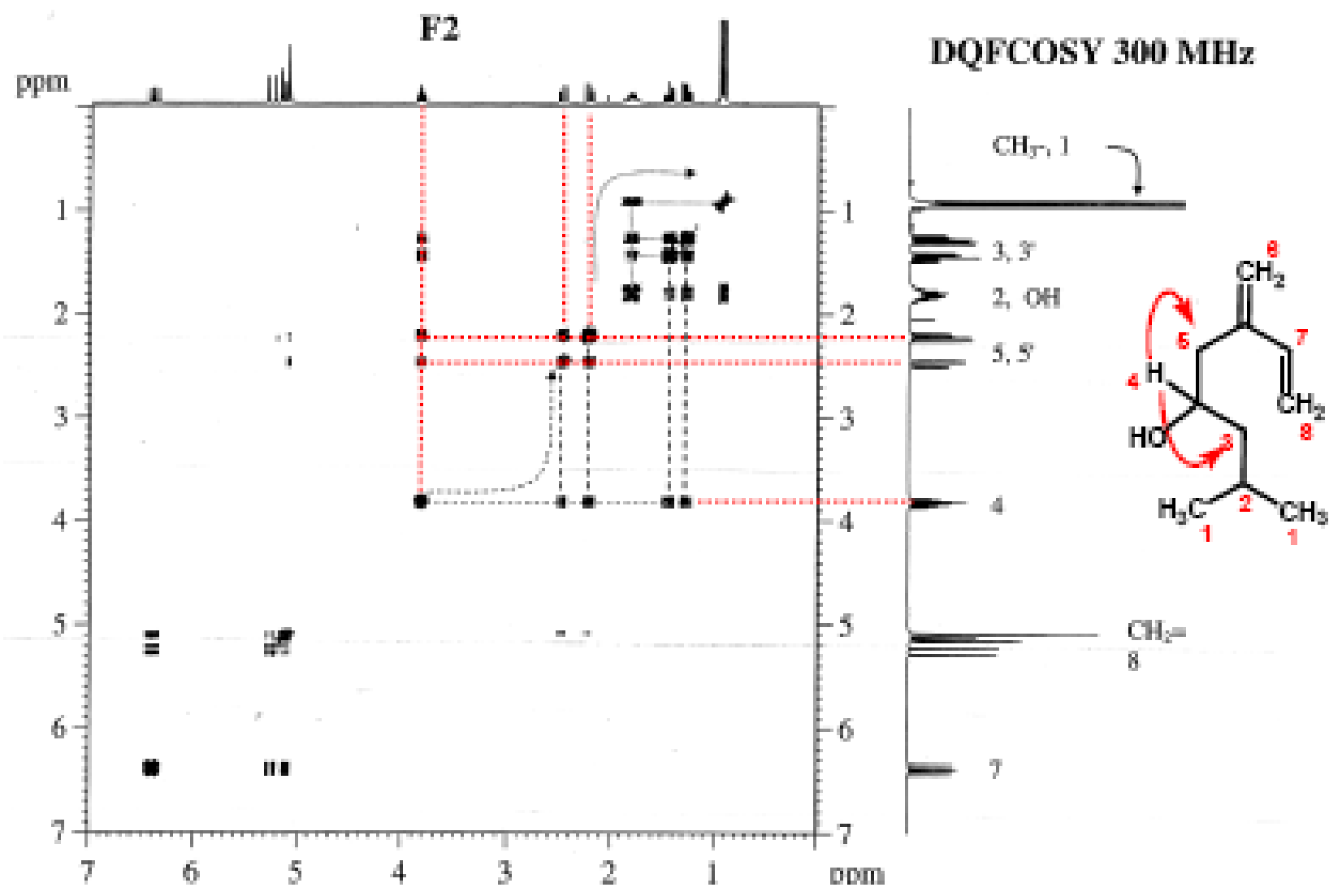


COSY: COrrelation SpectroscopY

^1H NMR 300 MHz



COSY: COrrelation Spectroscopy



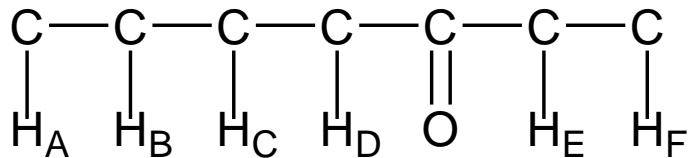
Esperimenti 2D NMR: NOESY, ROESY, TOCSY

Il NOESY, il ROESY ed il TOCSY si leggono allo stesso modo del COSY, e hanno un aspetto molto simile. Cambia naturalmente il significato del picco di correlazione.

Un picco di correlazione nello spettro NOESY indica che tra i due protoni c'è NOE, ed i due nuclei sono vicini nello spazio.

Un picco di correlazione nello spettro ROESY indica che tra i due protoni c'è ROE. Il ROE è un fenomeno simile al NOE (dipende dalla vicinanza spaziale tra i nuclei), che però può essere messo in evidenza solo con esperimento 2D, ed al contrario del NOE è sempre positivo.

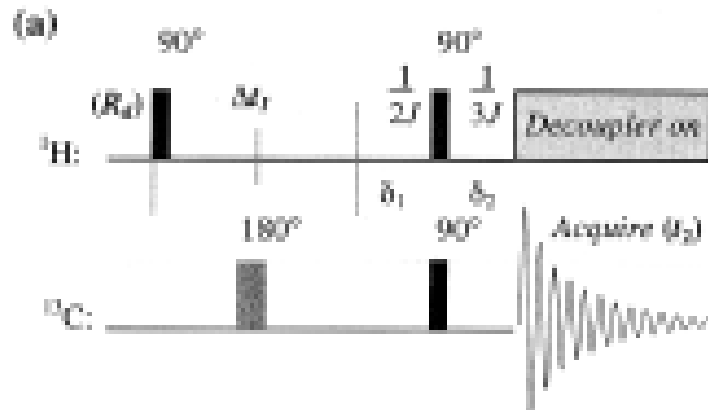
Un picco di correlazione nello spettro TOCSY indica che i protoni sono nello stesso sistema di spin: è possibile arrivare da un protone all'altro attraverso una serie di accoppiamenti scalari spin-spin.



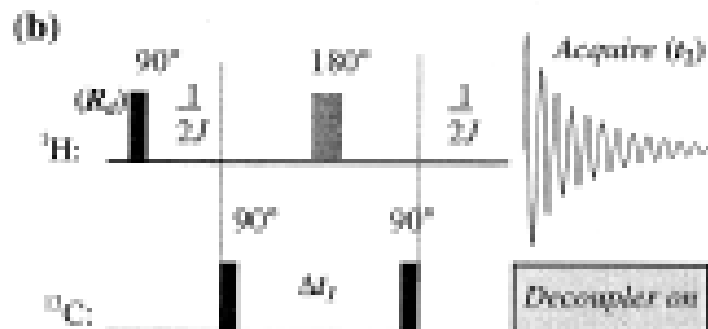
Nello spettro è presente un picco di correlazione tra H_D e H_A , poiché H_A è accoppiato con H_B , H_B con H_C , ed H_C con H_D . Invece non c'è picco di correlazione tra H_D ed H_E

Esperimenti di correlazione attraverso i legami: Eteronucleare

In questo tipo di esperimenti è possibile ricavare informazioni di correlazioni tra eteronuclei. Ad esempio nella correlazione ^{13}C - ^1H è possibile risalire ai carboni direttamente legati a protoni. Usando particolari sequenze è possibile fare correlazioni a lunga distanza.



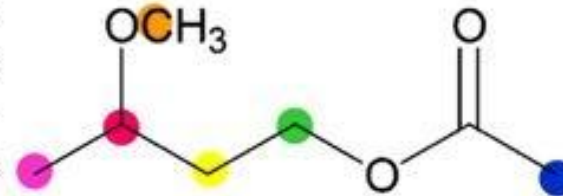
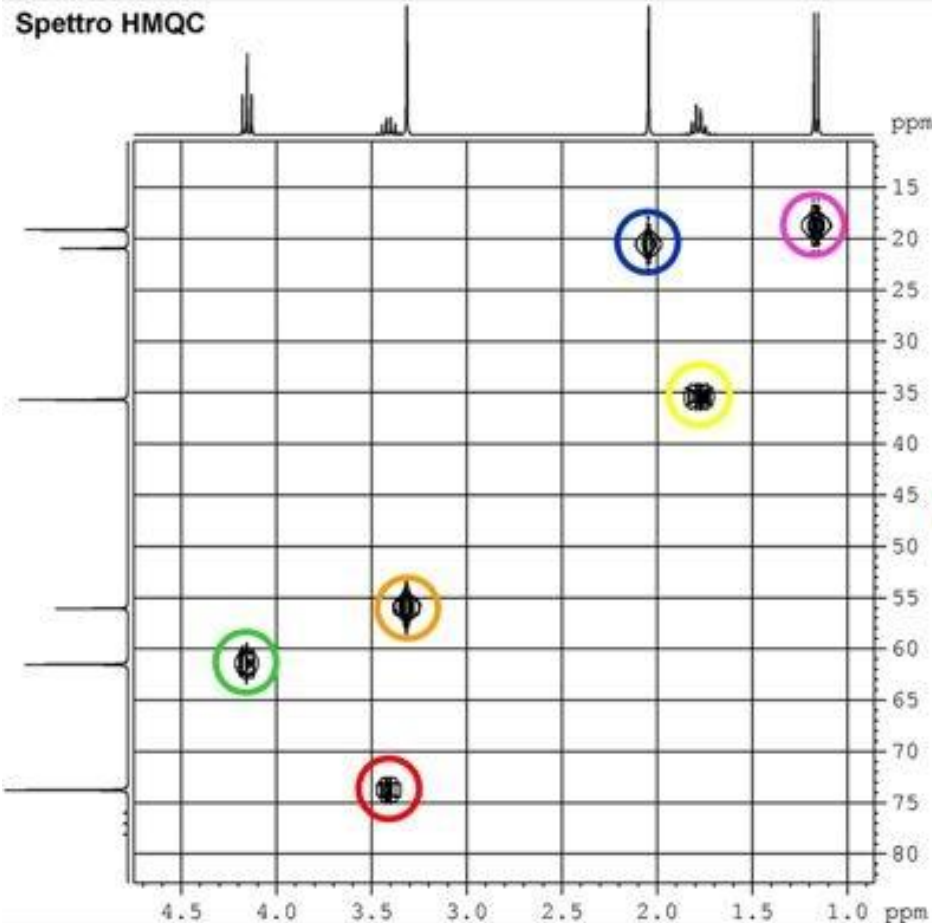
**HETCOR: con
rilevazione sul
canale del Carbonio**



**HMQC, HSQC, HMBC: con
rilevazione sul canale del
protone**

Esperimenti 2D NMR eteronucleari: HMQC

Un esperimento 2D NMR si dice eteronucleare se F_1 e F_2 sono relativi a nuclei diversi (qui ^{13}C e ^1H). Un tipico esperimento omonucleare è l'HMQC:



Nell'esperimento HMQC il picco di correlazione indica una $^1J_{\text{CH}}$ tra il carbonio ed il protone.

L'esperimento HMQC permette di identificare i protoni che sono legati a un certo carbonio, e il carbonio a cui è legato un certo protone.

Negli esperimenti 2D NMR eteronucleari non ci sono picchi diagonali, e tutti i picchi sono picchi di correlazione.

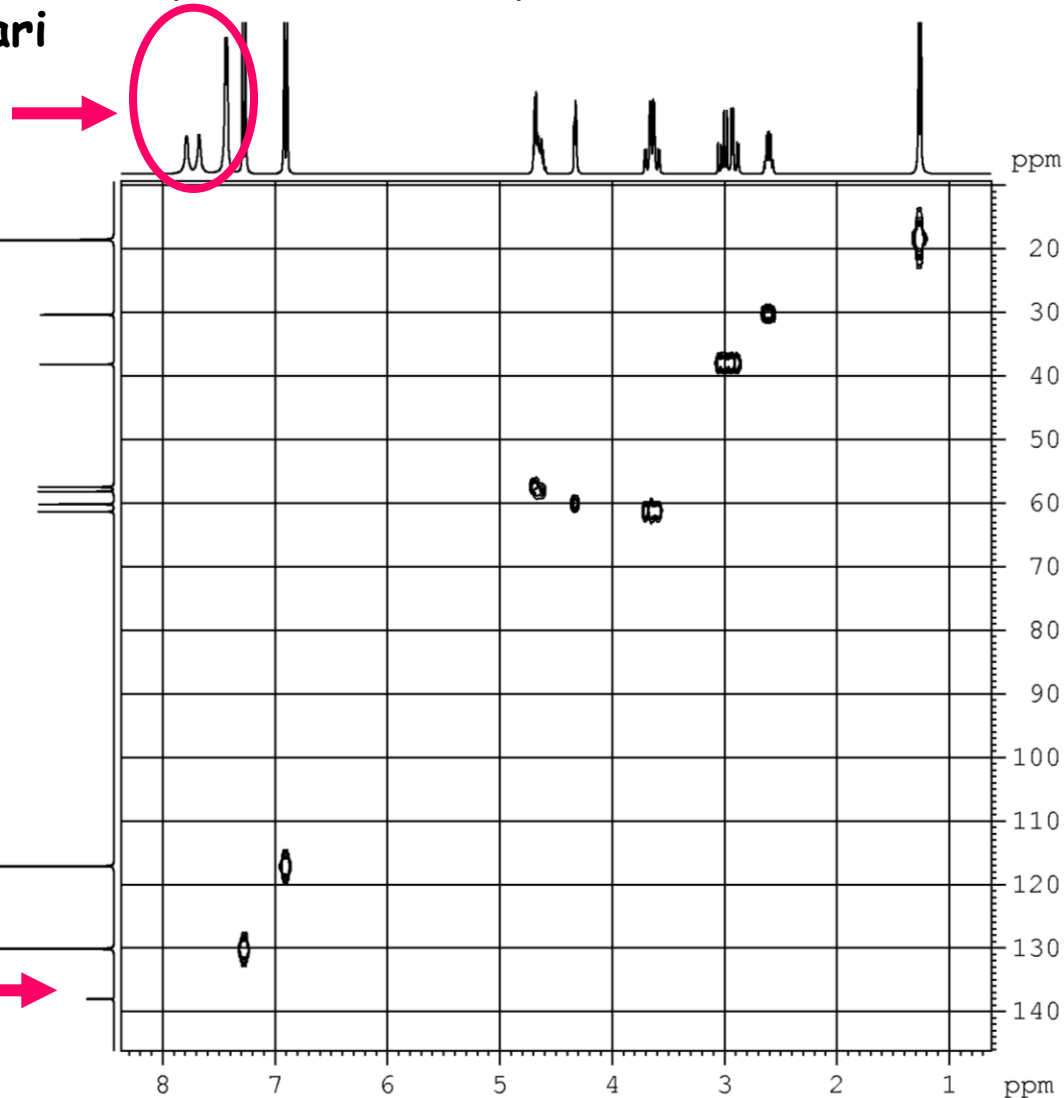
Vantaggi HMQC

L'HMQC permette di identificare facilmente:

Protoni su eteroatomi (non sono correlati a C)

Protoni metilenici non equivalenti (due protoni correlati allo stesso C)

Carboni quaternari

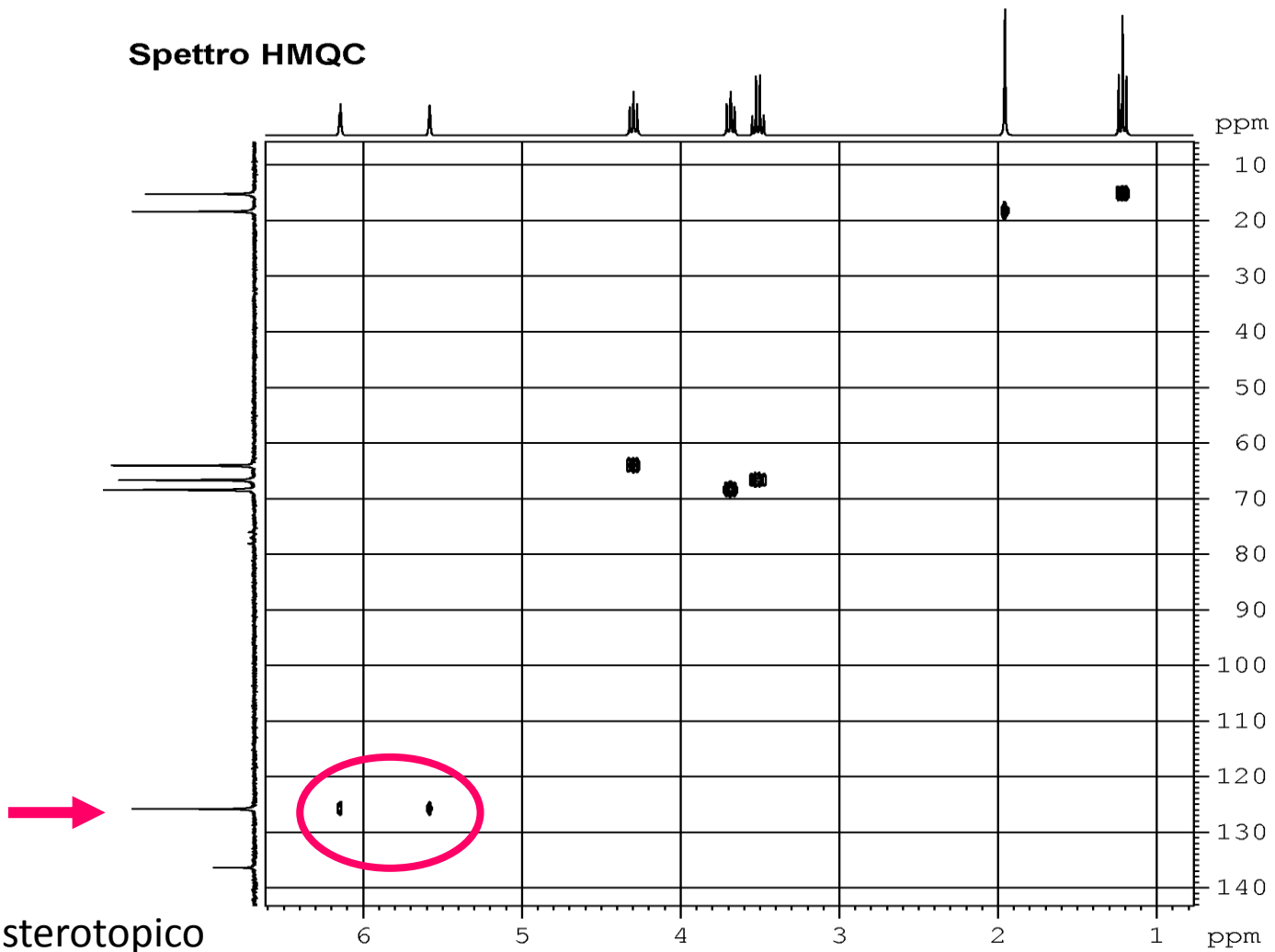


Protoni su eteroatomi

C. quaternario

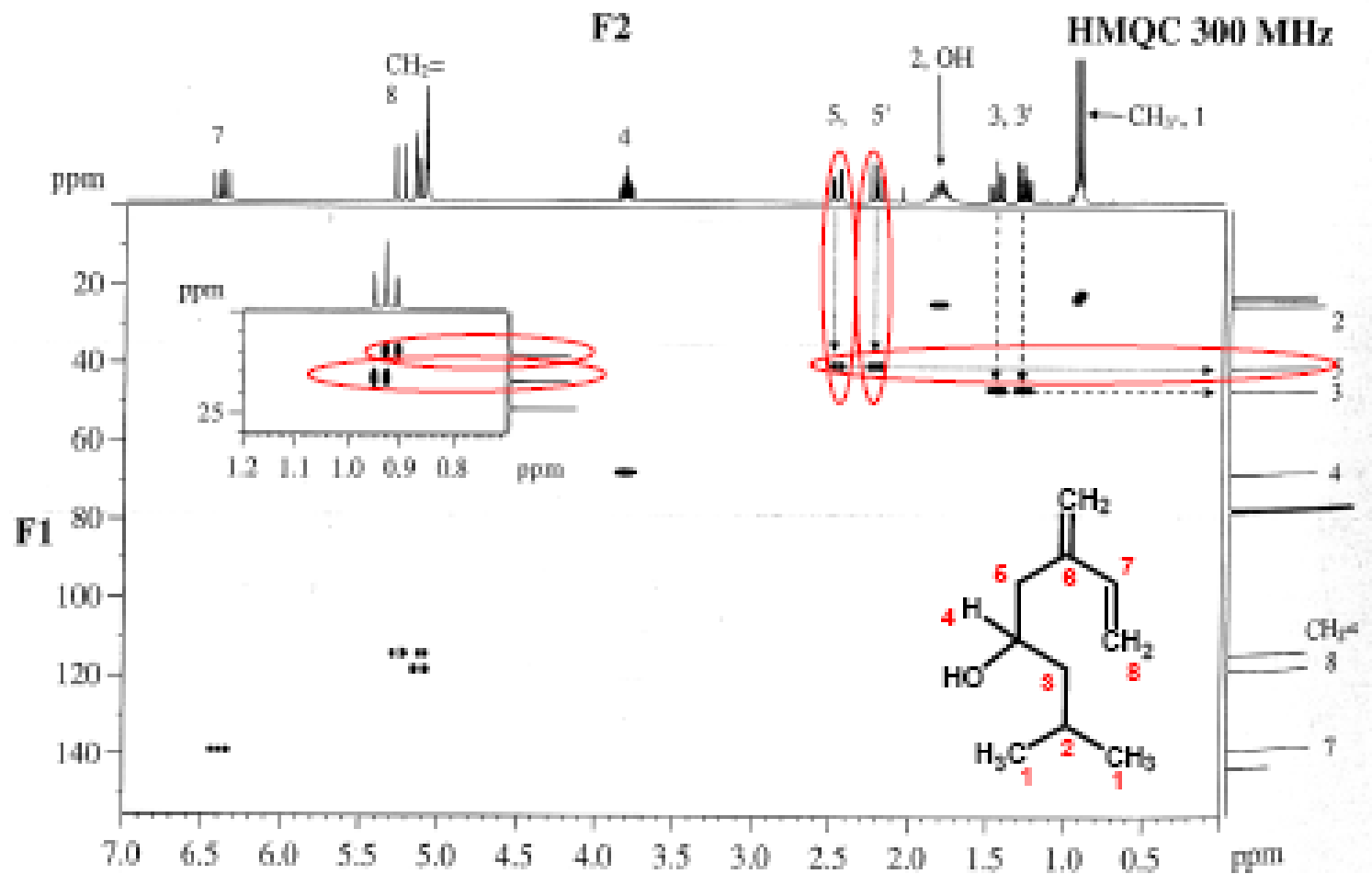
Vantaggi HMQC

Spettro HMQC

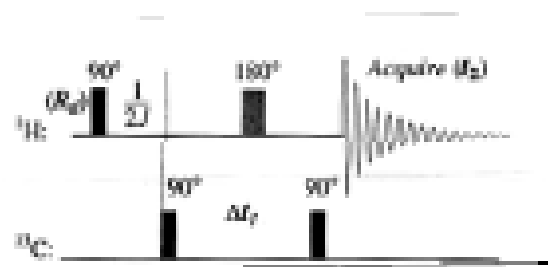
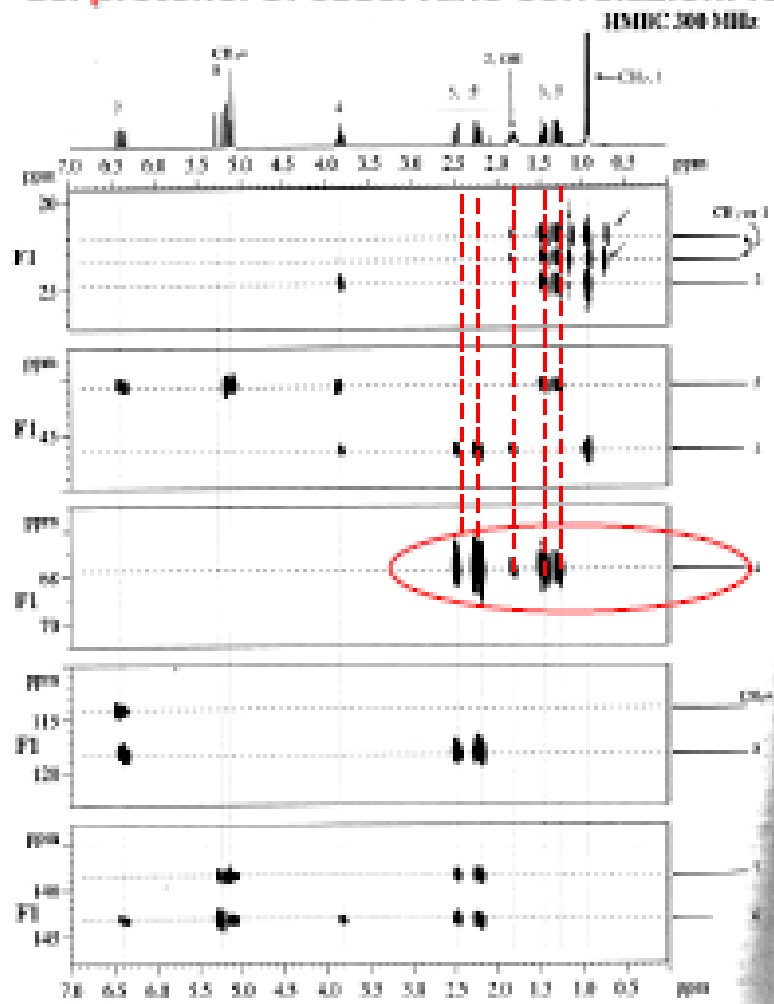


Metilene diasterotopico

HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) con rilevazione sul canale del protone

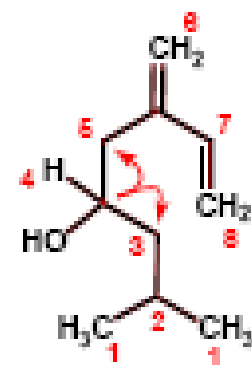


HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) con rilevazione sul canale del protone. Si osservano correlazioni long range $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$



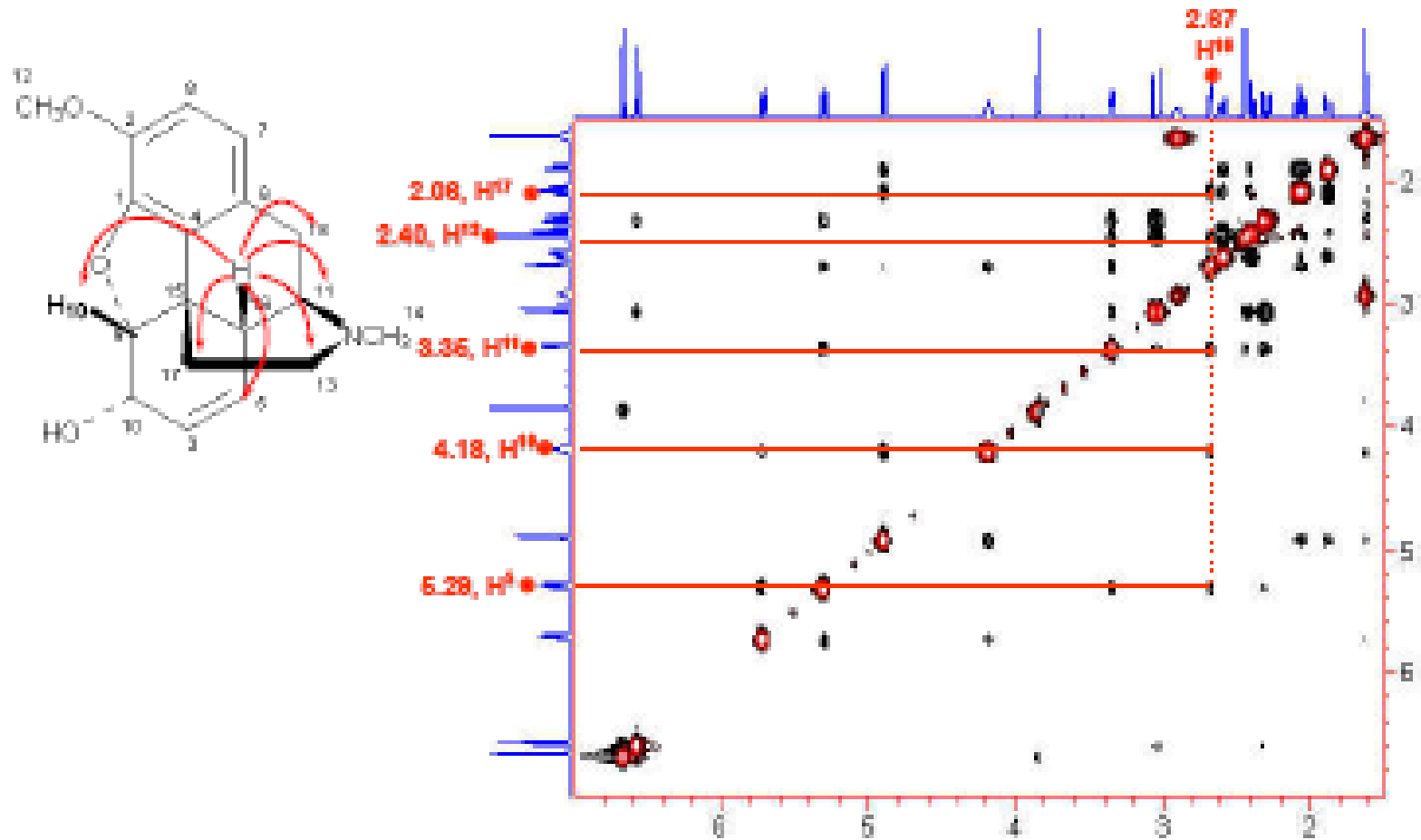
Il tempo delay $1/2J$ puo' essere ottimizzato a seconda della J che si desidera trovare.

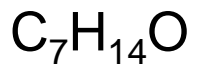
Nello spettro HMBC non si osservano le costanti dirette.



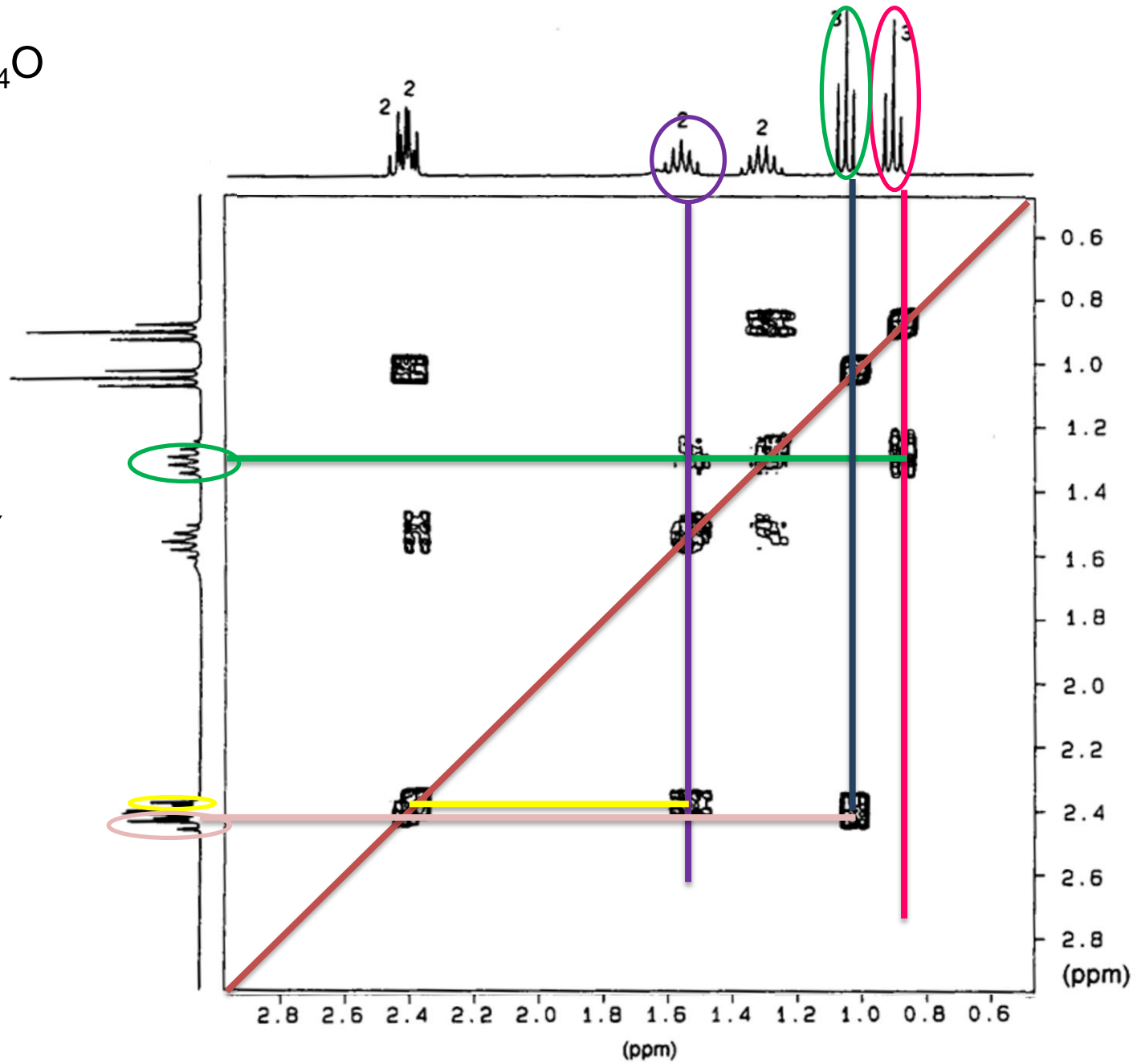
NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy)

E' una tecnica utile per le analisi strutturali e le determinazioni stereochimiche. Si sfrutta l'interazione dipolare (NOE) tra nuclei spazialmente vicini. I picchi di correlazione sono in antifase rispetto alla diagonale.





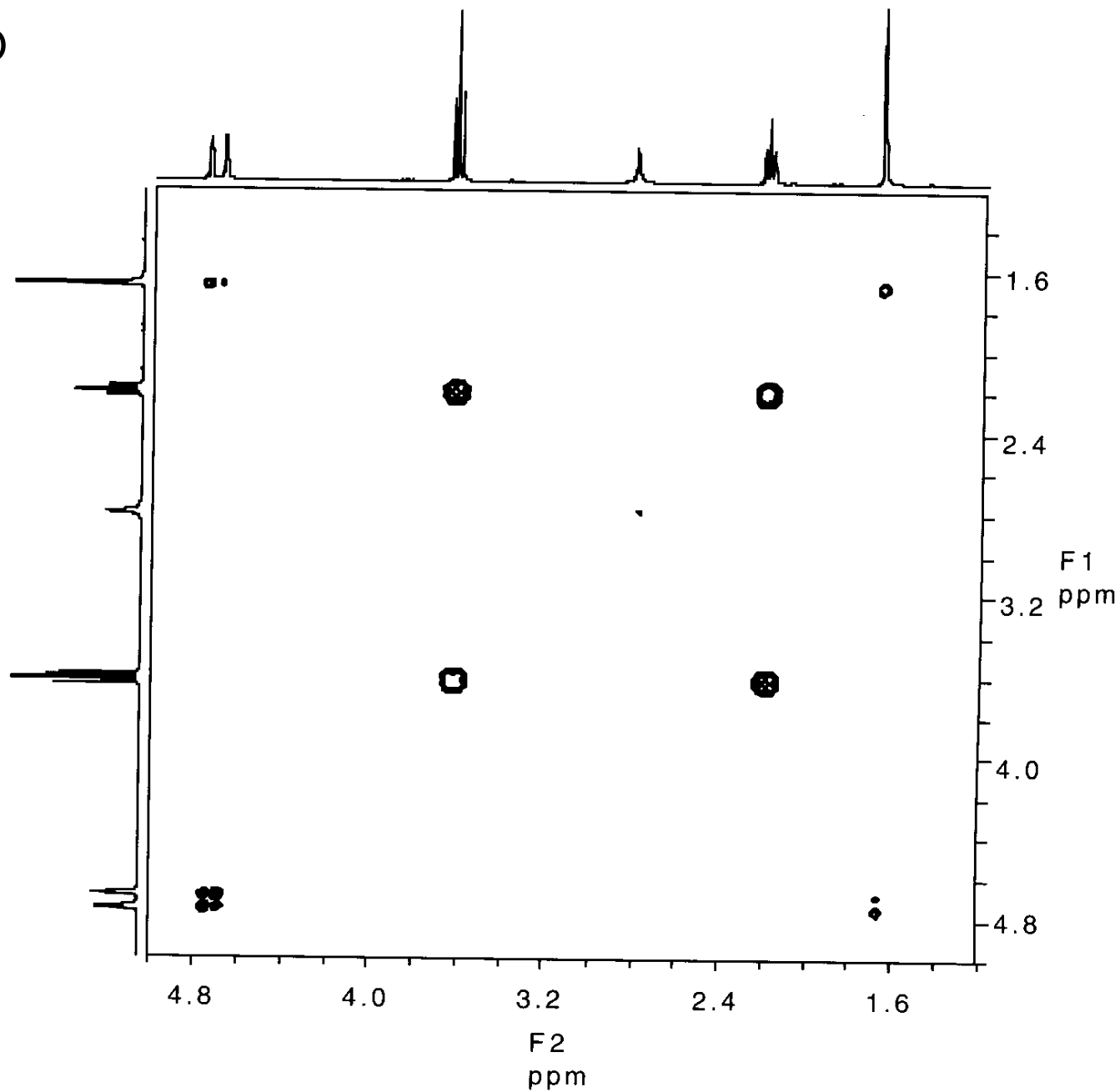
COSY



$C_5H_{10}O$

1 di 2

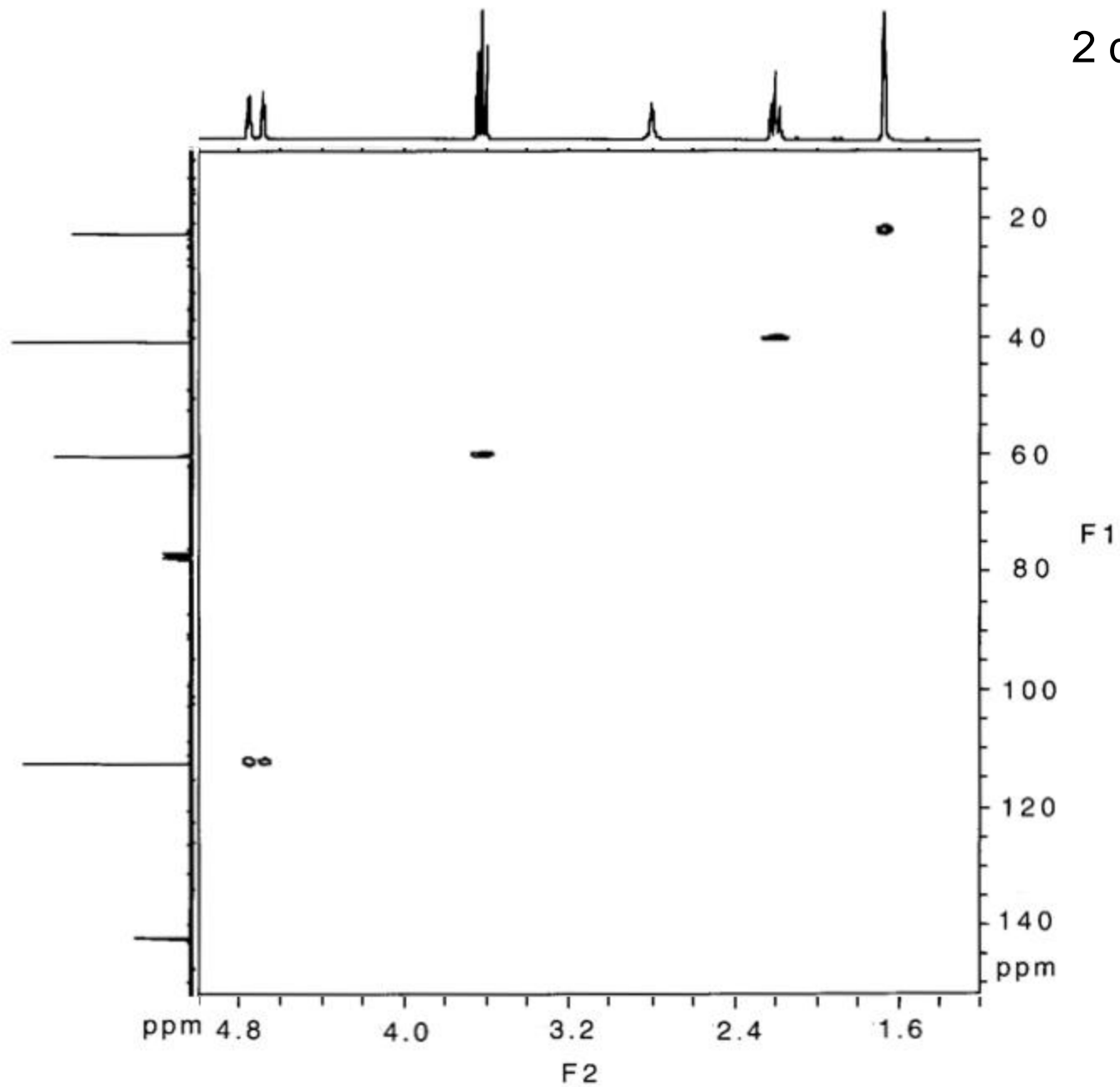
COSY



$C_5H_{10}O$

2 di 2

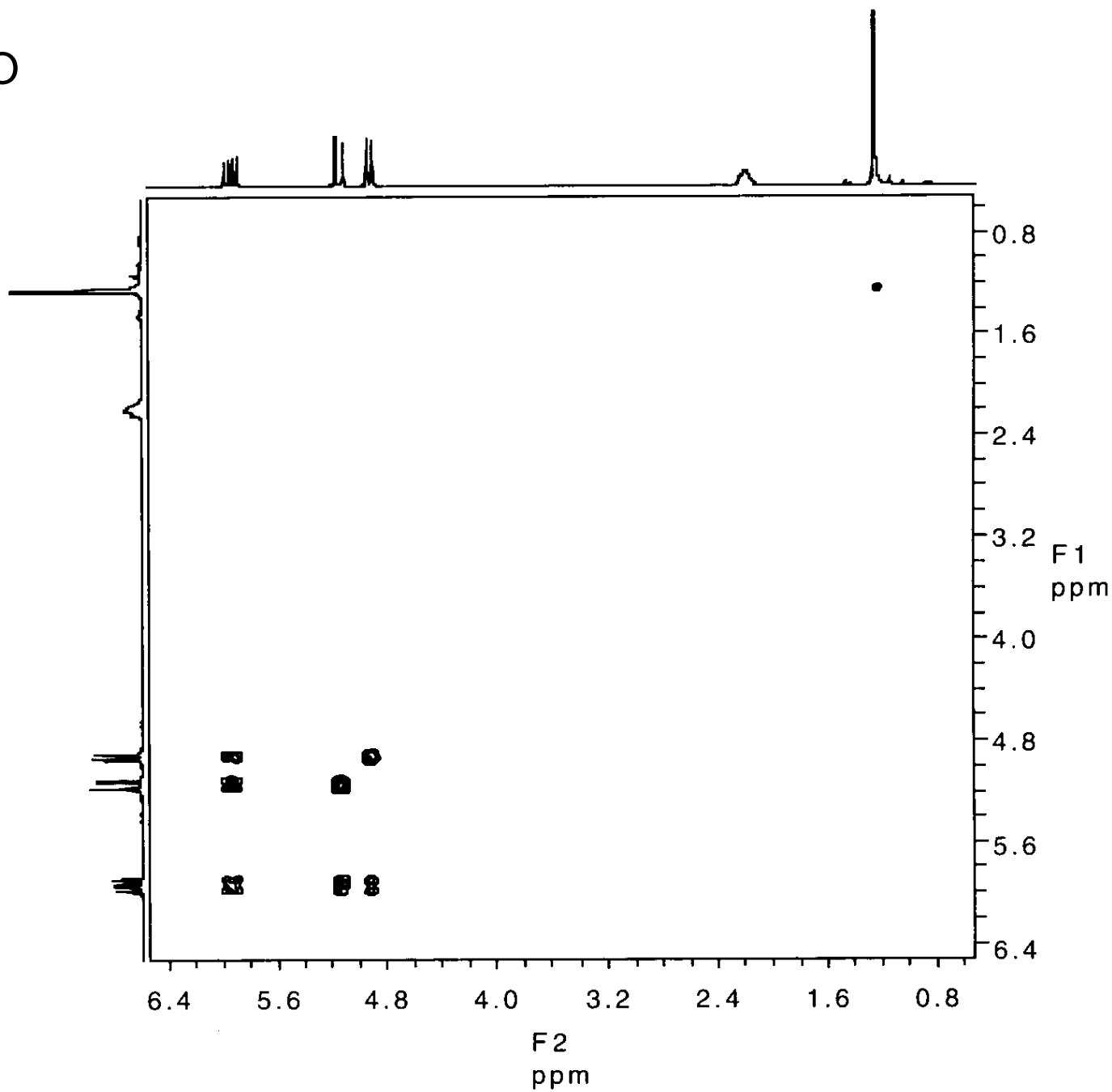
HSQC



$C_5H_{10}O$

1 di 2

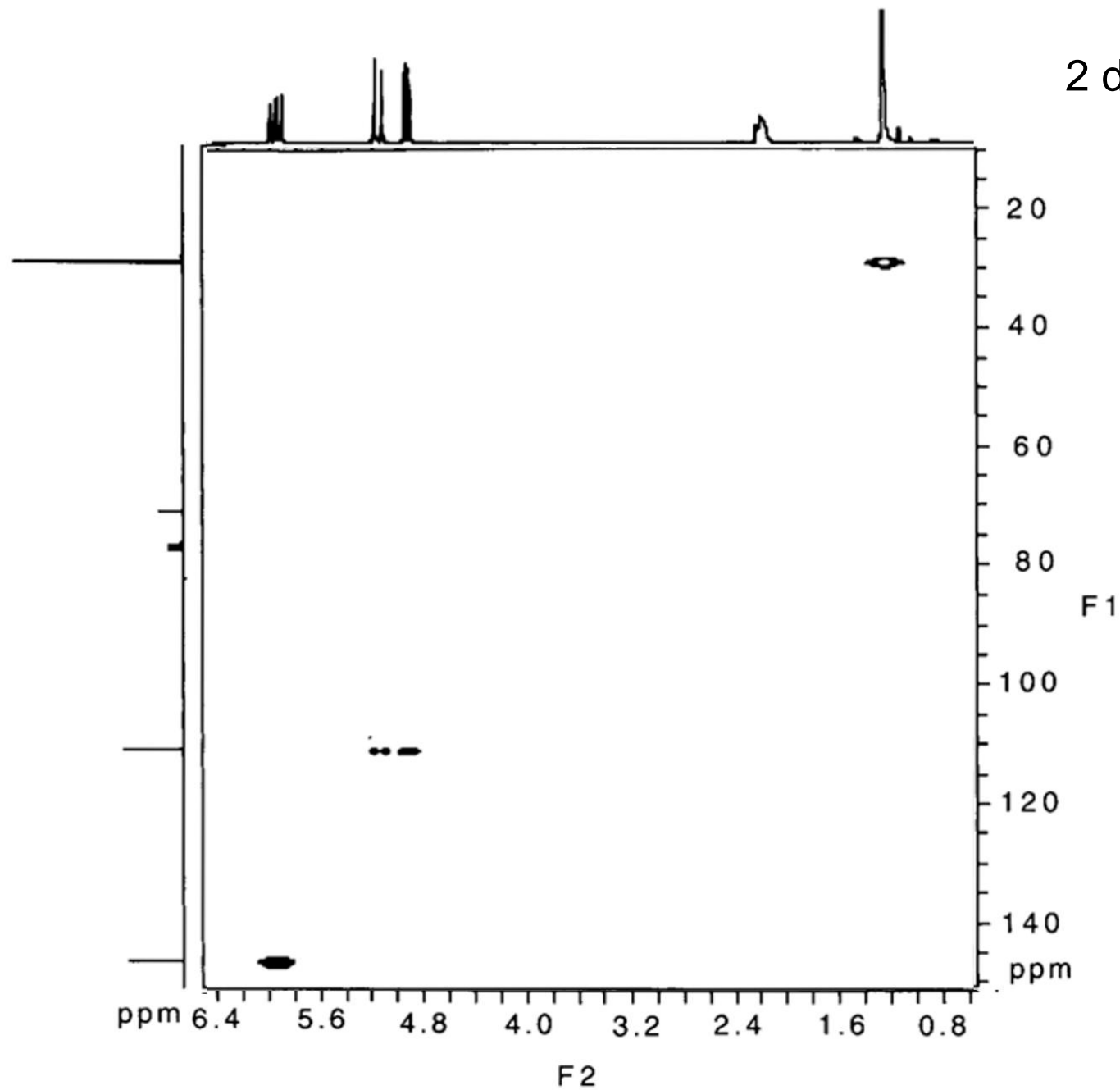
COSY



$C_5H_{10}O$

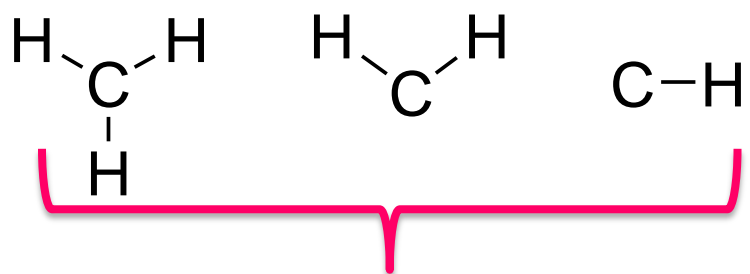
2 di 2

HSQC



Bignamino!!!!

1. Spettro di massa.....numero di C e di insaturazioni
2. IR per individuare **gruppi funzionali** come esteri, ammidi, alcoli, carbonili
3. ^{13}C e DEPT...**individuare tutti i C previsti dalla formula molecolare (la somma deve fare il totale 😊)**...eventuali carboni equivalenti....carboni di gruppi funzionali compatibili con IR e massa (esteri, carbonili, funzioni alcoliche etc)
4. HMQC per assegnare a ciascun carbonio i corrispondenti H. Scrivere sulla funzione C, il tipo di carbonio (CH, CH₃, CH₂, C....**vedi DEPT!!!!**)
5. Quindi sappiamo a chi si riferiscono i segnali del protonico!!!!!!
6. Scriviamo tutte le informazioni



C

Che tipo di quaternari?????

Scrivere i c.s ^{13}C e ^1H !!!!!!!
Dai c.s aggiungere eventuali eteroatomi, ossigeno, azoto
Dai c.s individuare doppi e tripli legami...compatibili con il numero di insaturazioni

7. **Assegnare i sistemi di spin con il COSY!!!!!!**
8. Verificare la struttura proposta con l'analisi delle frammentazioni in MS