

# ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)



Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών



**ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Α. ΣΠΥΡΟΥΛΙΑΣ

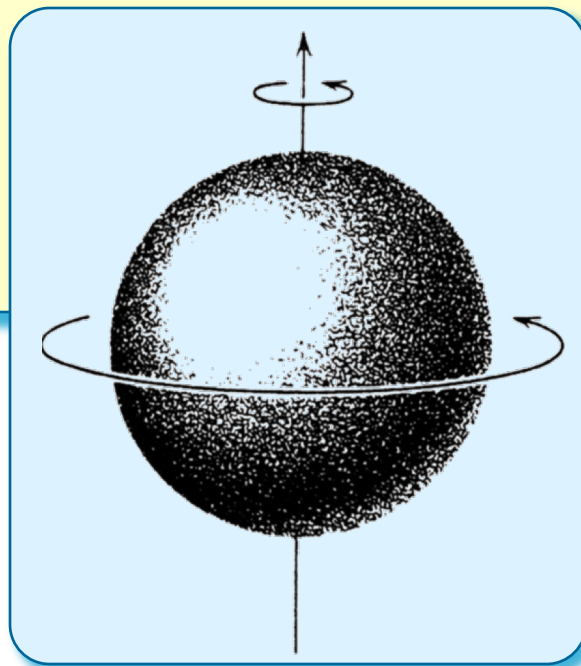
ΧΕΙΜΕΡΙΝΟ ΕΞΑΜΗΝΟ

# Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Διέγερση πυρήνων υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας όταν αυτοί βρίσκονται σε μαγνητικό πεδίο.

Εκτός από τη στροφορμή (spin) των ηλεκτρονίων υπάρχει και το φαινόμενο της **στροφορμής των πυρήνων**. Δηλαδή, τόσο τα νετρόνια, όσο και τα πρωτόνια διαθέτουν στροφορμή και η συνισταμένη τους δίνει την στροφορμή του πυρήνα. Το μέτρο της στροφορμής αυτής  $P$  εξαρτάται από τον **κβαντικό αριθμό του spin  $I$**  του πυρήνα:

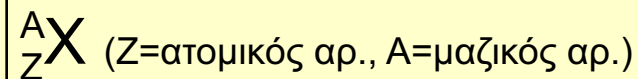
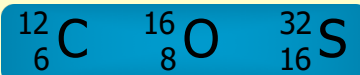
$$P = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)}$$



# Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Ισχύουν τρεις εμπειρικοί κανόνες πρόσθεσης των ανυσμάτων στροφορμής των σωματιδίων του πυρήνα.

1. Άρτιος αριθμός πρωτονίων και νετρονίων (άρτιος ατομικός και μαζικός αριθμός)  
*συνισταμένη στροφορμή = 0*



2. Περιττός αριθμός πρωτονίων ή νετρονίων (περιττός μαζικός αριθμός) *συνισταμένη στροφορμή = περιττό πολλαπλάσιο του 1/2*



3. Περιττός αριθμός πρωτονίων και νετρονίων (περιττός ατομικός και άρτιος μαζικός αριθμός) *συνισταμένη στροφορμή = πολλαπλάσιο του 1*



Ως μαγνητική διπολική ροπή  $\mu$  ορίζεται το γινόμενο:

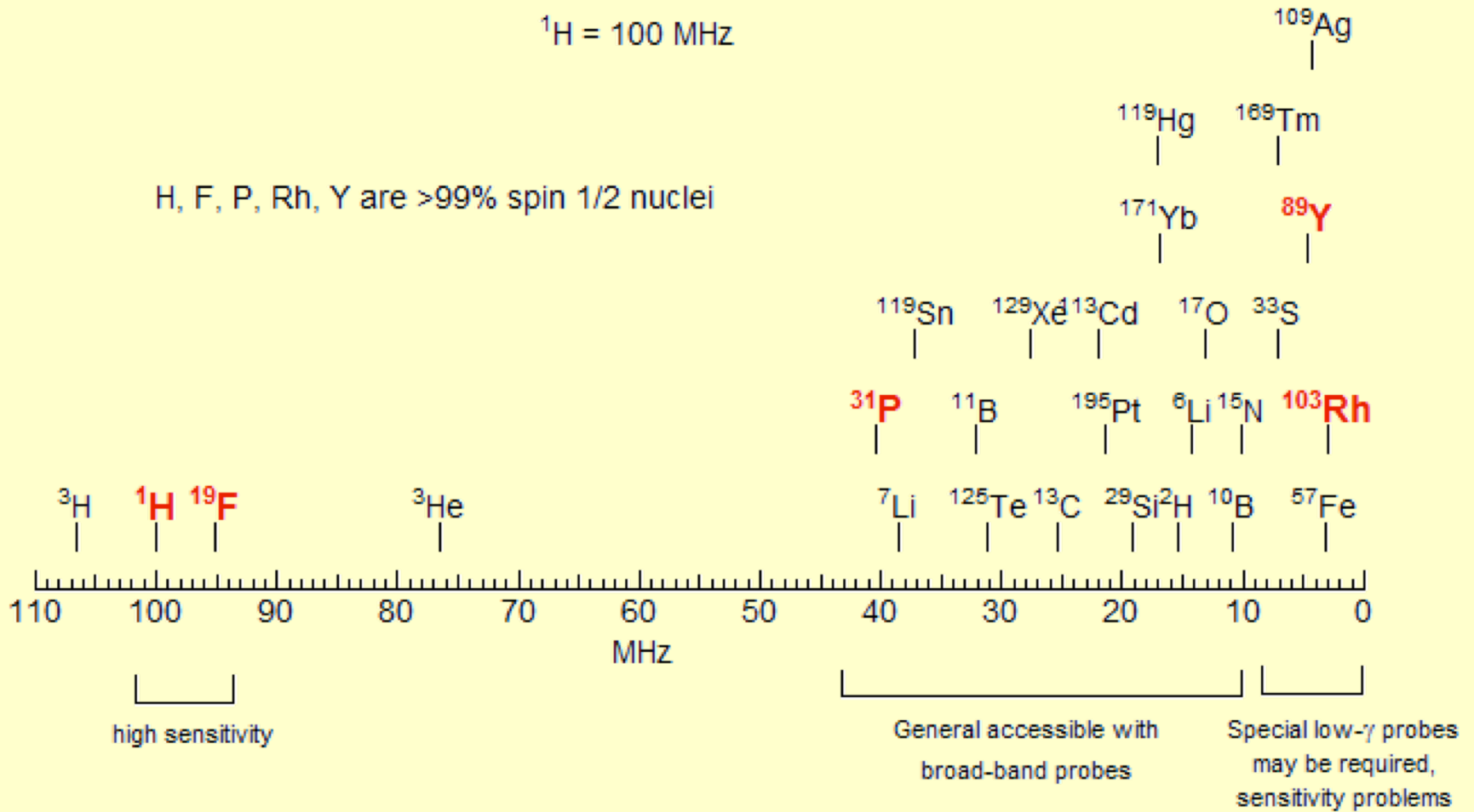
$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \quad \text{ή} \quad \mu = \gamma \hbar \vec{I}$$

όπου:  $\gamma$  ονομάζεται γυρομαγνητικός λόγος και εξαρτάται από τη φύση του πυρήνα

# Συχνότητα Συντονισμού διαφόρων Πυρήνων

$${}^1\text{H} = 100 \text{ MHz}$$

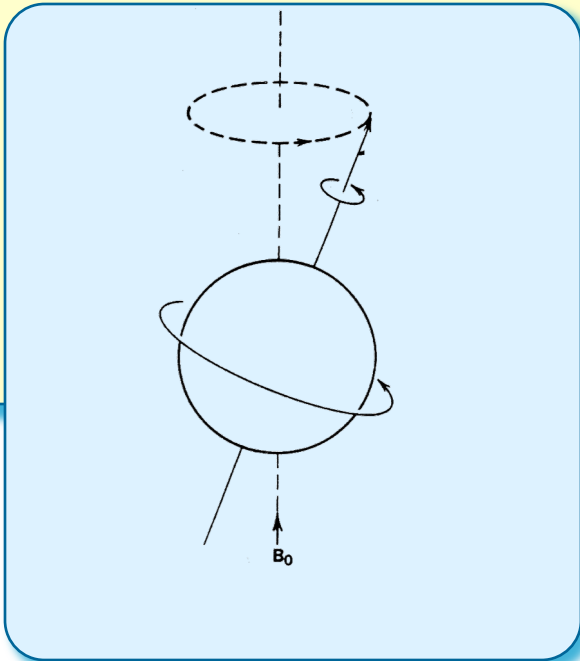
H, F, P, Rh, Y are >99% spin 1/2 nuclei





# Αλληλεπίδραση Πυρήνα και Μαγνητικού Πεδίου

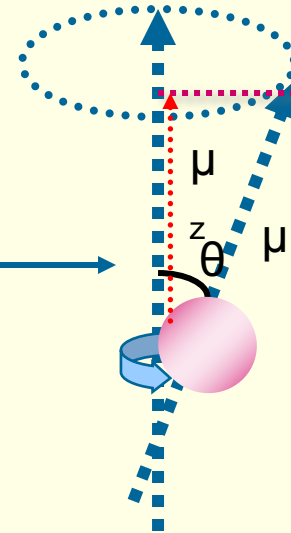
Ένας πυρήνας που βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου  $B_0$  προσανατολίζεται κατάλληλα, και λόγω της ιδιοπεριστροφής του αποκτά γυροσκοπική κίνηση. Η κίνηση αυτή λέγεται **μεταπτωτική (precessional orbit)**.



Η γωνιακή ταχύτητα  $\omega$  της μεταπτωτικής κίνησης χαρακτηρίζεται από τη **συχνότητα Larmor**:

$$\omega = 2\pi \nu_0 = \gamma B_0$$

Η γωνία  $\theta$  είναι κβαντισμένη και μπορεί να πάρει τιμές  **$2I+1$**

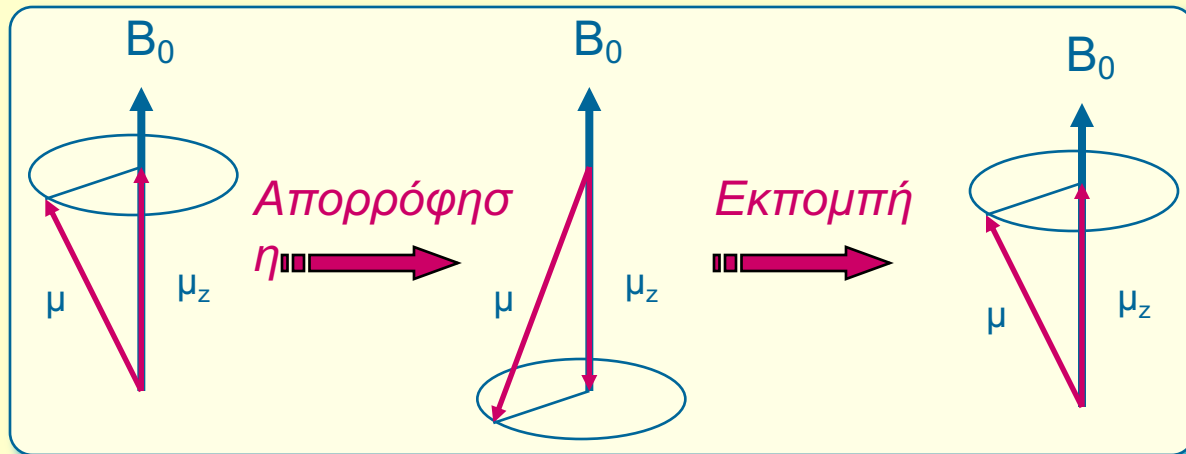


# Αλληλεπίδραση Πυρήνα και Μαγνητικού Πεδίου

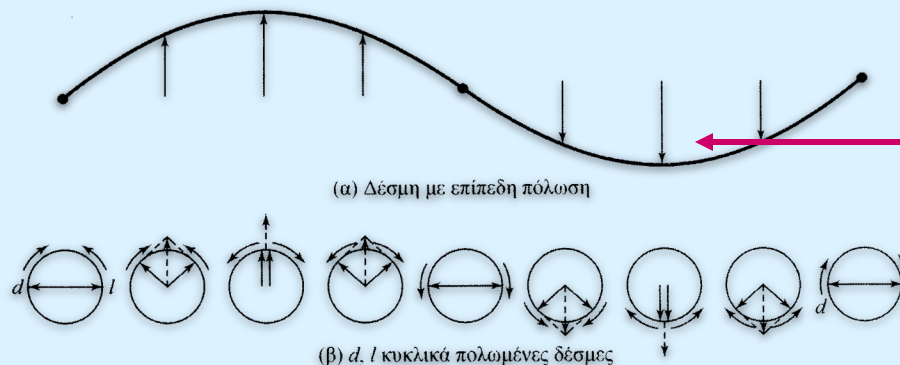
Κάθε πυρήνας μέσα σε μαγνητικό πεδίο μπορεί να πάρει  $2I+1$  διαφορετικούς προσανατολισμούς.

Στην περίπτωση πυρήνων με *spin*  $1/2$  μόνο δύο προσανατολισμοί ( $2 \times 1/2 + 1 = 2$ ) είναι δυνατοί.

Η απορρόφηση ενέργειας (στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων) από πυρήνα με κβαντικό αριθμό *spin*  $1/2$  προκαλεί αναστροφή του ανύσματος της μαγνητικής ροπής.



Αυτό μπορεί να γίνει δυνατό με την επίδραση *κυκλικά πολωμένης ακτινοβολίας*, της οποίας η συχνότητα περιστροφής είναι η ίδια με την μεταπτωτική κίνηση του πυρήνα.



Άνυσμα που αλληλεπιδρά με την συνιστώσα  $\mu_z$  του περιστρεφόμενου πυρήνα.

# Ενεργειακές Καταστάσεις σε Μαγνητικό Πεδίο

Η **διέγερση των πυρήνων** είναι δυνατόν να παραχθεί από πηγίο, με διεύθυνση κάθετη προς την διεύθυνση του ανύσματος του μαγνητικού πεδίου.

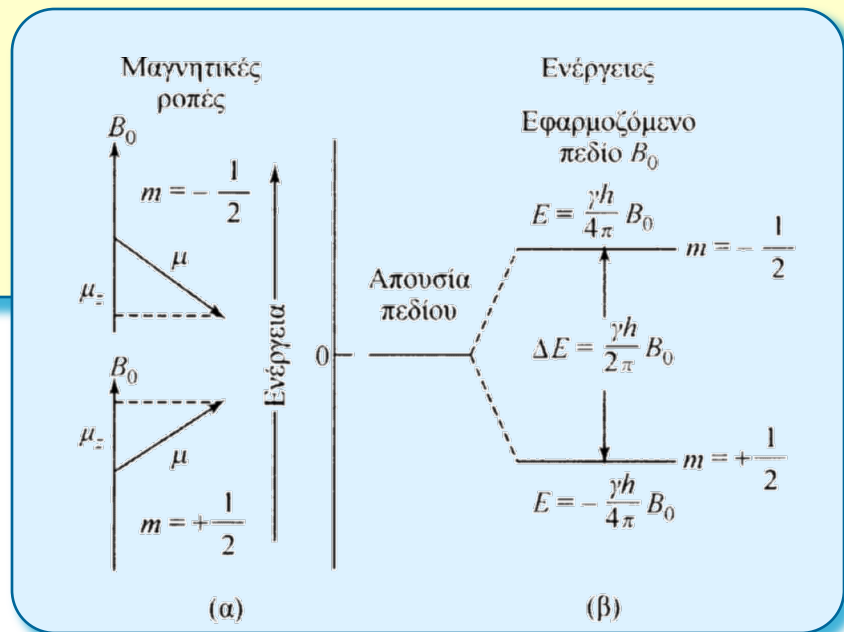
Η **διαφορά ενέργειας** μεταξύ των δύο καταστάσεων δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E = \frac{\gamma \hbar}{2\pi} B_0$$

και η **συχνότητα της απορροφούμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας** από τη σχέση:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

Όπως φαίνεται, η συχνότητα εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου  $B_0$  και από το είδος του πυρήνα



# Διεργασίες Αποδιέγερσης σε Μαγνητικό Πεδίο

## Αποδιέγερση *spin-πλέγματος* (*spin-lattice relaxation, T1*)

Ο εξεταζόμενος πυρήνας βρίσκεται μέσα σε ένα πλήθος άλλων πυρήνων (πλέγμα), που διαθέτουν και αυτοί μαγνητικά πεδία, τα οποία δημιουργούν το **μαγνητικό πεδίο του πλέγματος**. Πολλές από τις συνιστώσες αυτών των πεδίων, αντιστοιχούν και βρίσκονται **σε φάση με το μαγνητικό πεδίο** του εξεταζόμενου μορίου. Έτσι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και αναγκάζουν τους πυρήνες του εξεταζόμενου μορίου να χάσουν ενέργεια και να μεταπέσουν σε **χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση spin**.

## Αποδιέγερση *spin-spin* (*spin-spin relaxation, T2*)

Ο εξεταζόμενος πυρήνας αποδιεγείρεται λόγω της σύζευξής του με γειτονικούς πυρήνες που διαθέτουν **την ίδια ταχύτητα αποδιέγερσης, αλλά διαφορετικές μαγνητικές κβαντικές καταστάσεις**. Οι πυρήνες μπορούν να ανταλλάξουν κβαντικές καταστάσεις, και είναι δυνατόν ο μέσος χρόνος ζωής του πυρήνα που ευρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση να μειωθεί με αποτέλεσμα την διεύρυνση των φασματικών γραμμών (line broadening).

# Βασικές έννοιες Φασματοσκοπίας NMR

## ➤ Χημική Μετατόπιση :

$$\delta = ((W_{\text{signal}} - W_{\text{reference}}) / W_{\text{reference}}) * 10^6 \quad \delta \text{ σε ppm (parts per million)}$$

Τη χημική μετατόπιση προκαλούν μικρά μαγνητικά πεδία, τα οποία δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια καθώς αυτά κινούνται γύρω από τους πυρήνες. Για τον λόγο αυτό οι συχνότητες Larmor διαφόρων πυρήνων διαφοροποιούνται ανάλογα με το χημικό τους περιβάλλον. Αυτή η διαφοροποίηση στην συχνότητα συντονισμού των πυρήνων, καλείται **χημική μετατόπιση**. Τα ppm (αλλά όχι τα Hz) είναι ανεξάρτητα από το  $B_0$  (μαγνητικό πεδίο).

## ➤ Spin-spin σταθερά σύζευξης ( $J$ ) :

χαρακτηρίζει τις γειτονικές (μέσω δεσμών - *scalar interactions*) αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρήνων οι οποίοι συνδέονται μέσω μικρού αριθμού ομοιοπολικών (δεσμών).

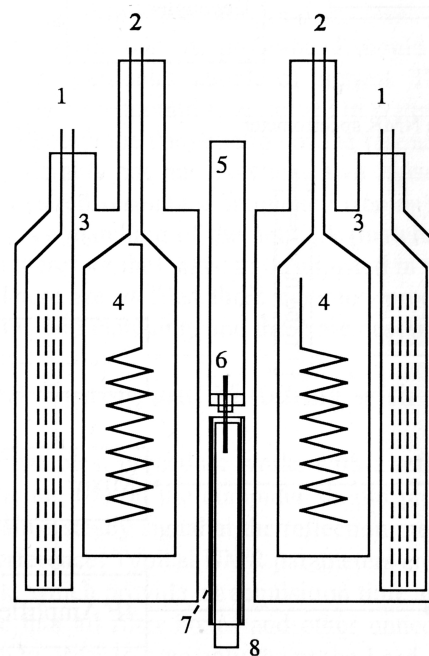
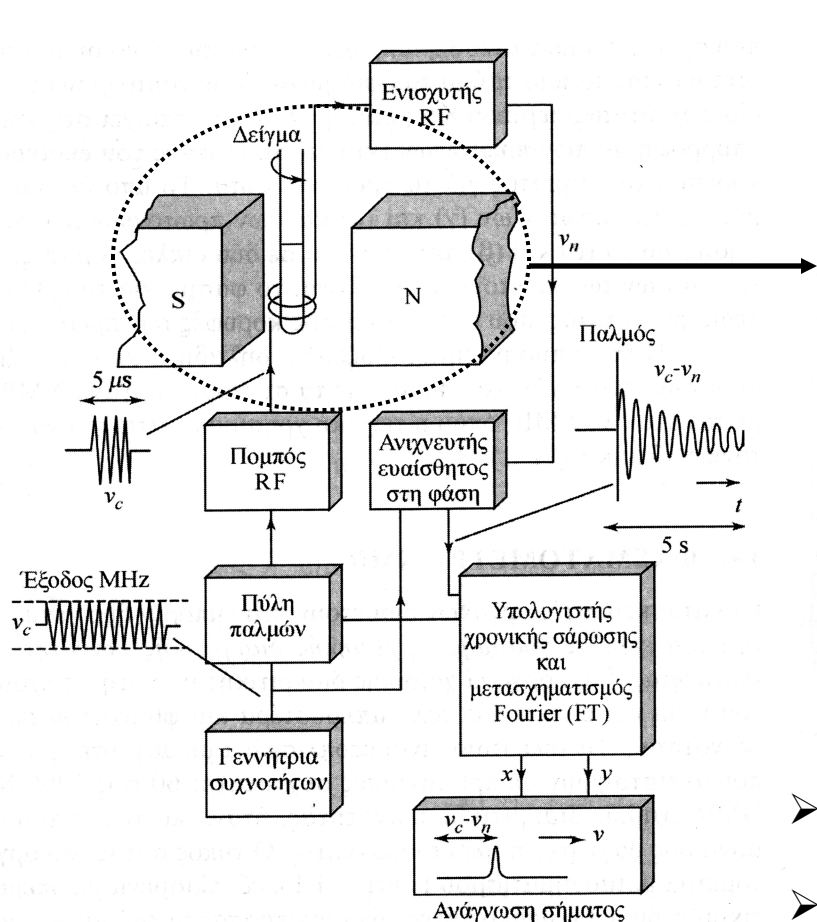
## ➤ NMR κορυφές/ένταση κορυφών διασταύρωσης :

Σε ένα κανονικό 1D NMR φάσμα η ένταση του σήματος αντικατοπτρίζει τον αριθμό των πυρήνων που προκαλούν το σήμα ενώ το εύρος του σχετίζεται με δυναμικά φαινόμενα (χημική ανταλλαγή). Σε φάσματα NOESY 2D αντικατοπτρίζει την απόσταση ανάμεσα σε δύο πυρήνες οι οποίοι αλληλεπιδρούν και προκαλούν το σήμα.

## ➤ Nuclear Overhauser enhancement ή nuclear Overhauser effect (NOE) :

Είναι η κλασματική αλλαγή στην ένταση μιας κορυφής NMR όταν κάποιος άλλος πυρήνας ακτινοβολείται σε ένα πείραμα διπλής ακτινοβολίας. Το φαινόμενο NOE οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις διαμέσω χώρου *-dipolar interactions-* μεταξύ διαφορετικών πυρήνων και είναι  $\sim 1/r^6$

# Ανατομία ενός φασματομέτρου NMR



- 1 Ports for liquid N<sub>2</sub>
- 2 Ports for liquid He
- 3 Superinsulation and high vacuum
- 4 Main magnet coils + liquid helium
- 5 Sample lift and spinner assembly
- 6 NMR tube
- 7 Shim assembly
- 8 Probe head

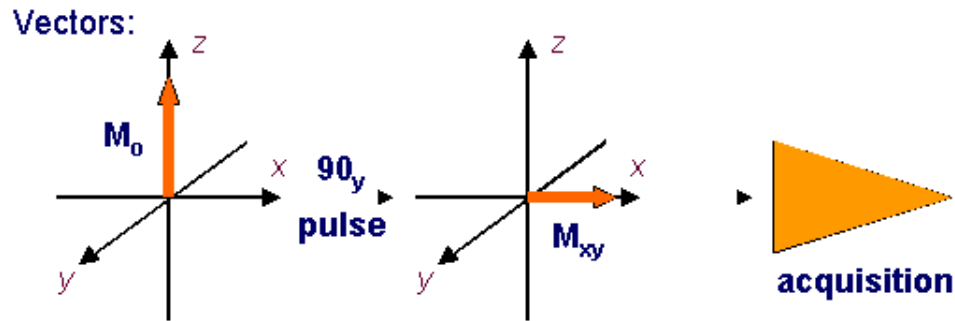
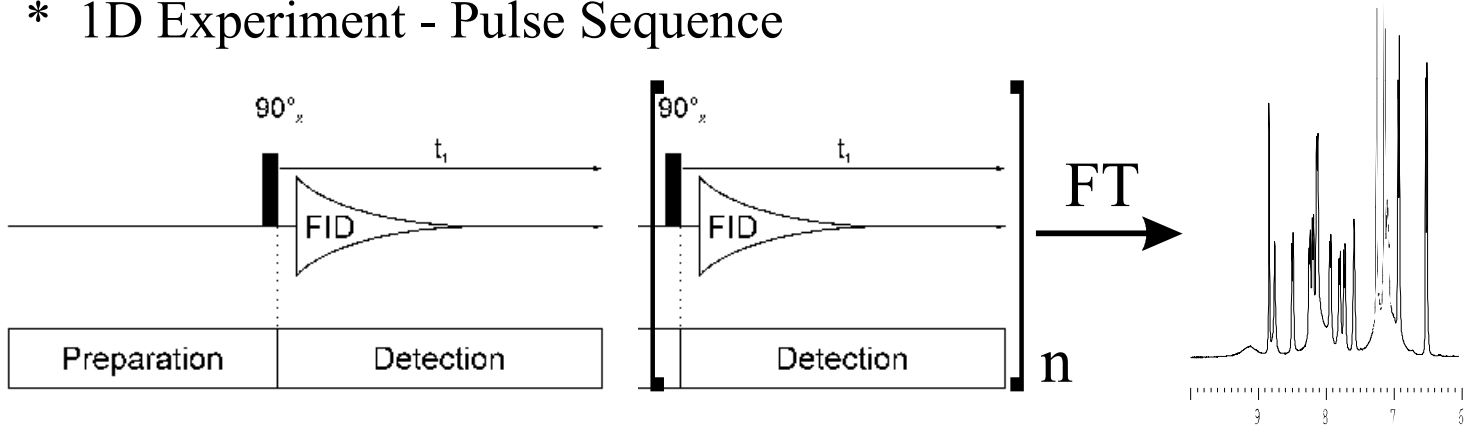
Fig. 1.1 Principles of a superconducting magnet

**Σχήμα 19-21** Τμηματικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου NMR με μετασχηματισμό Fourier. (Προσαρμοσμένο από το: J. W. Akitt, NMR and Chemistry, 2nd ed., p. 14. London: Chapman and Hall, 1983. Με άδεια).

- Μαγνήτες ...1000 MHz το 2010 (σύντομα 1200MHz) !!!
- Υποδοχέας δείγματος (Probe)
  - Πηνία εκπομπής/λήψης, Γεννήτρια παλμών, σύστημα λήψης.....
- Ανιχνευτής και σύστημα επεξεργασίας δεδομένων
  - Ολοκληρωτές σήματος, Δειγματολήπτες σήματος, κ.λ.π.

# Ανατομία 1D πειράματος φασματοσκοπίας NMR

## \* 1D Experiment - Pulse Sequence



Preparation : spinsystem is set to a state

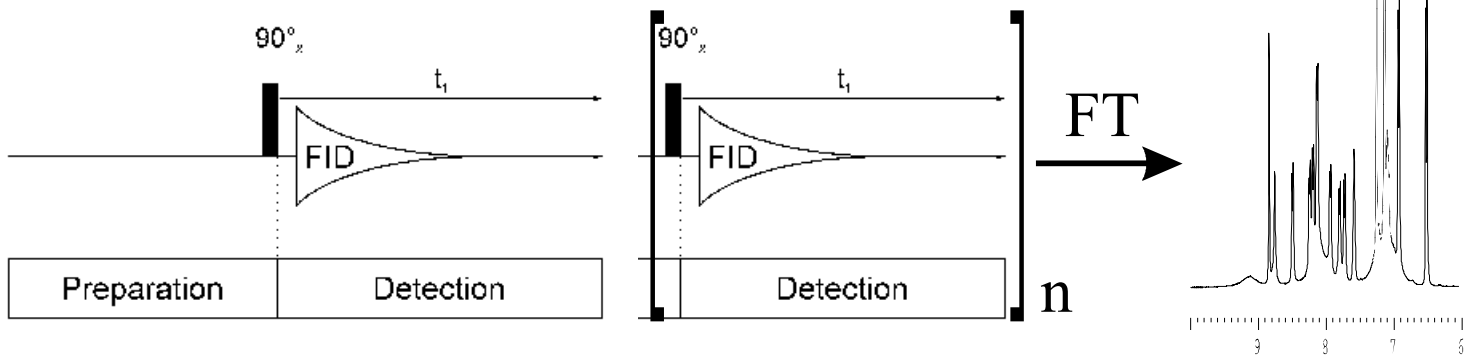
$90^\circ$ : magnetization  $M_z$  (or  $M_0$ ) onto xy plane( $M_{xy}$ )

Signal decays due to T2 relaxation (Free Induction Decay)

Detection : signal is recorded

# Ανατομία 1D πειράματος φασματοσκοπίας NMR

## \* 1D Experiment - Pulse Sequence



## FID : Ελεύθερη Επαγωγική απόσβεση

Το διάνυσμα της μαγνήτισης περιστρέφεται γύρω από τον άξονα  $z$  με συχνότητα Larmor και δημιουργεί σήμα ραδιοσυχνότητας το οποίο ανιχνεύεται στην κατά την διεύθυνση του άξονα  $x$ . Όσο η αποδιέγερση προχωρεί, το σήμα ελαττώνεται εκθετικά σε συνάρτηση με τον χρόνο και αποδίδει την ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (free induction decay, FID).

**\*\*Επανάληψη της εφαρμογής παλμών για βελτίωση του λόγου σήματος-προς-θόρυβο\*\***

## FT : Μετασχηματισμός Fourier

Μαθηματική επεξεργασία του σήματος - **μετατρέπει το σήμα από το πεδίο του χρόνου στο πεδίο των συχνοτήτων** ώστε να είναι πιο εύκολη η ψηφιακή επεξεργασία του.

FT της FID αποδίδει το κλασικό μονοδιάστατο φάσμα NMR



# Τύποι φασμάτων NMR

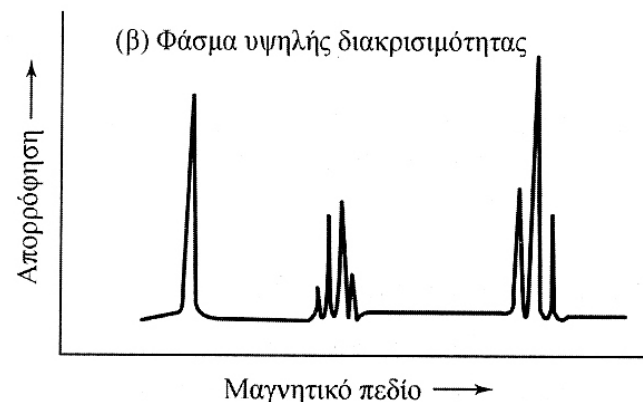
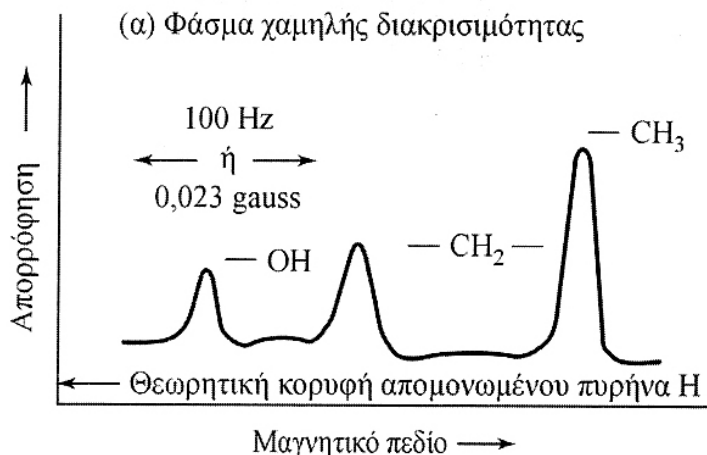
## Φάσματα ευρείας γραμμής

Τα φάσματα Ευρείας Γραμμής παρουσιάζουν σχετικά μεγάλο εύρος κορυφών, και απώλεια της υπέρλεπτης υφής (η οποία οφείλεται στο χημικό περιβάλλον). Περιπτώσεις όπου υπάρχει : Παραμαγνητικό μέταλλο, χημική ανταλλαγή ανάμεσα σε δύο είδη, μίγμα διαφόρων ισοτόπων.

## Φάσματα υψηλής διακρισιμότητας

Τα φάσματα Υψηλής Διακρισιμότητας συλλέγονται από όργανα ικανά να διακρίνουν πολύ μικρές διαφορές συχνοτήτων (0,01 ppm ή λιγότερο).

Εφαρμογή : \*σε 1D φάσματα για την παρατήρηση υπέρλεπτης δομής (αλληλεπίδραση & σταθερά σύζευξης με γειτονικούς πυρήνες), \* σε 2D φάσματα με πλήθος κορυφών διασταύρωσης



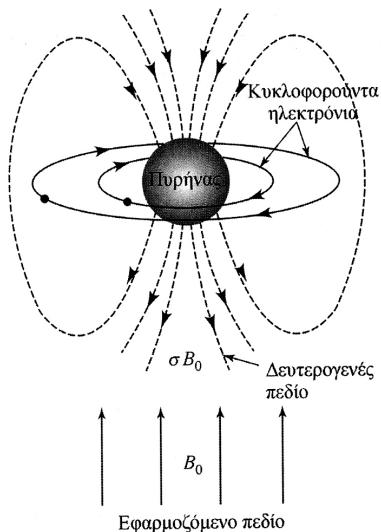
**Σχήμα 19-12** Φάσμα NMR της αιθανόλης σε συχνότητα 60 MHz. Διακρισιμότητα: (α) ~1 στα  $10^6$ , (β) ~1 στα  $10^7$ .

# Χημικό Περιβάλλον στα φάσματα NMR

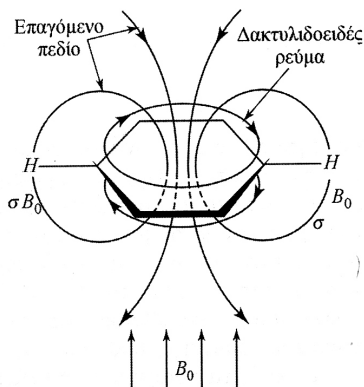
## ➤ Χημική Μετατόπιση :

$\delta = ((W_{\text{signal}} - W_{\text{reference}}) / W_{\text{reference}}) * 10^6$  δ σε ppm (parts per million). Τη χημική μετατόπιση προκαλούν

μικρά μαγνητικά πεδία, τα οποία δημιουργούνται από τα ηλεκτρόνια καθώς αυτά κινούνται γύρω από τους πυρήνες.



Σχήμα 19-14 Διαμαγνητική θωράκιση ενός πυρήνα.

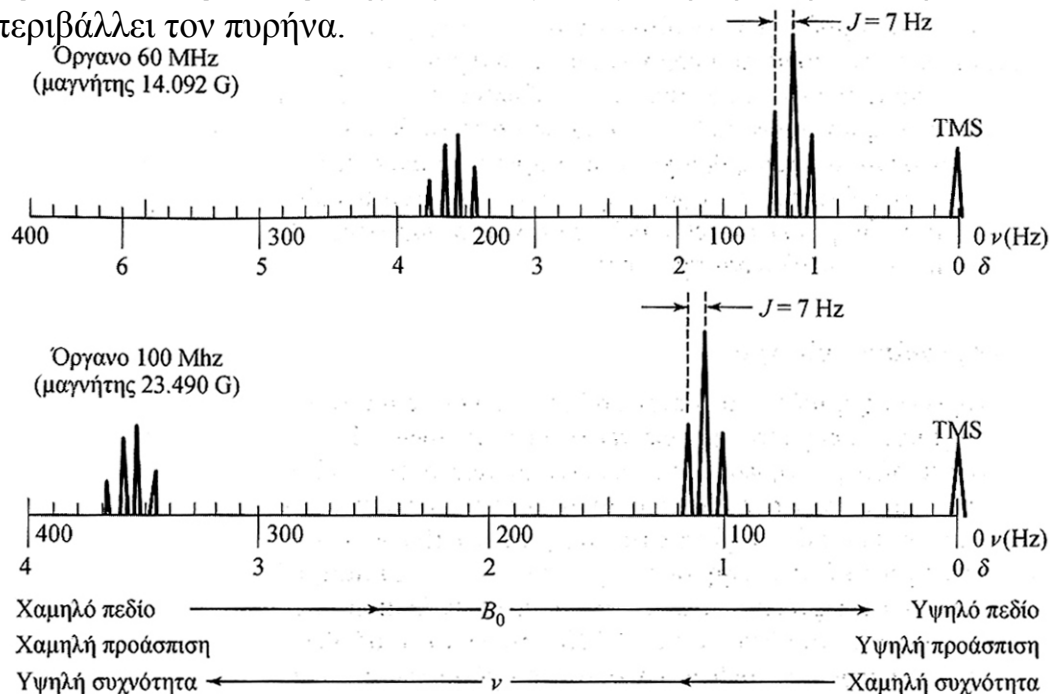


Σχήμα 19-15 Αποθωράκιση αρωματικών πρωτονίων που προκαλείται από το δακτυλιοειδές ρεύμα.

Για τον λόγο αυτό οι συχνότητες Larmor διαφόρων πυρήνων διαφοροποιούνται ανάλογα με το χημικό τους περιβάλλον. Αυτή η διαφοροποίηση στην συχνότητα συντονισμού των πυρήνων, καλείται **χημική μετατόπιση**. Τα ppm (όχι τα Hz) είναι ανεξάρτητα από το B₀ (μαγνητικό πεδίο).

**Τοπικά διαμαγνητικά ρεύματα** - επάγονται από το σταθερό μαγνητικό πεδίο και παράγουν δευτερογενή πεδία, τα οποία εξασθενίζουν ή ενισχύουν το πεδίο το οποίο αντιστοιχεί ένα συγκεκριμένο πρωτόνιο.

**Θωράκιση και αποθωράκιση** - σχετίζεται άμεσα με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα η οποία περιβάλλει τον πυρήνα.



Σχήμα 19-13 Κλίμακες τετμημένων στα φάσματα NMR.

# Χημικό Περιβάλλον στα φάσματα NMR

## ➤ Μαγνητική Ανισοτροπία :

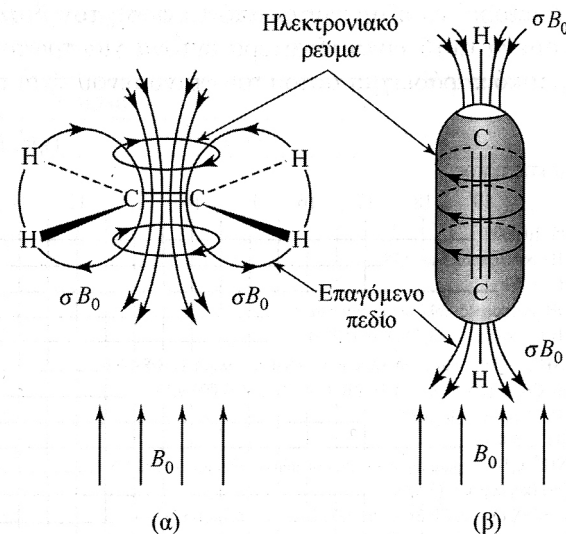
Φάσματα ουσιών με διπλούς ή/και τριπλούς δεσμούς παρουσιάζουν πρωτονιακά σήματα μακριά από τις αναμενόμενες τυπικές τιμές τους. Τιμές  $\delta$  για πρωτόνια υδρογονανθράκων κατά σειρά αυξανόμενης οξύτητας/ηλεκτραρνητικότητας/τάξη δεσμού

$\text{CH}_3\text{-CH}_3$  ( $\delta=0.9$  ppm **τυπική τιμή -CH<sub>3</sub>**)     $\text{CH}_2=\text{CH}_2$  ( $\delta=5,8$  ppm)     $\text{CH}\equiv\text{CH}$  ( $\delta=2,9$  ppm)

Για τις ασυνήθιστες τιμές χημικών μετατοπίσεων στις παραπάνω περιπτώσεις οφείλεται η μαγνητική ανισοτροπία λόγω της πολλαπλότητας των διπλών δεσμών (αυξημένη ηλεκτρονική πυκνότητα).

**Παράδειγμα :** αρωματικός δακτύλιος – χημικές μετατοπίσεις των *o*-, *m*-, *p*- H ~ 7.0-7.6 ppm ...!!!!

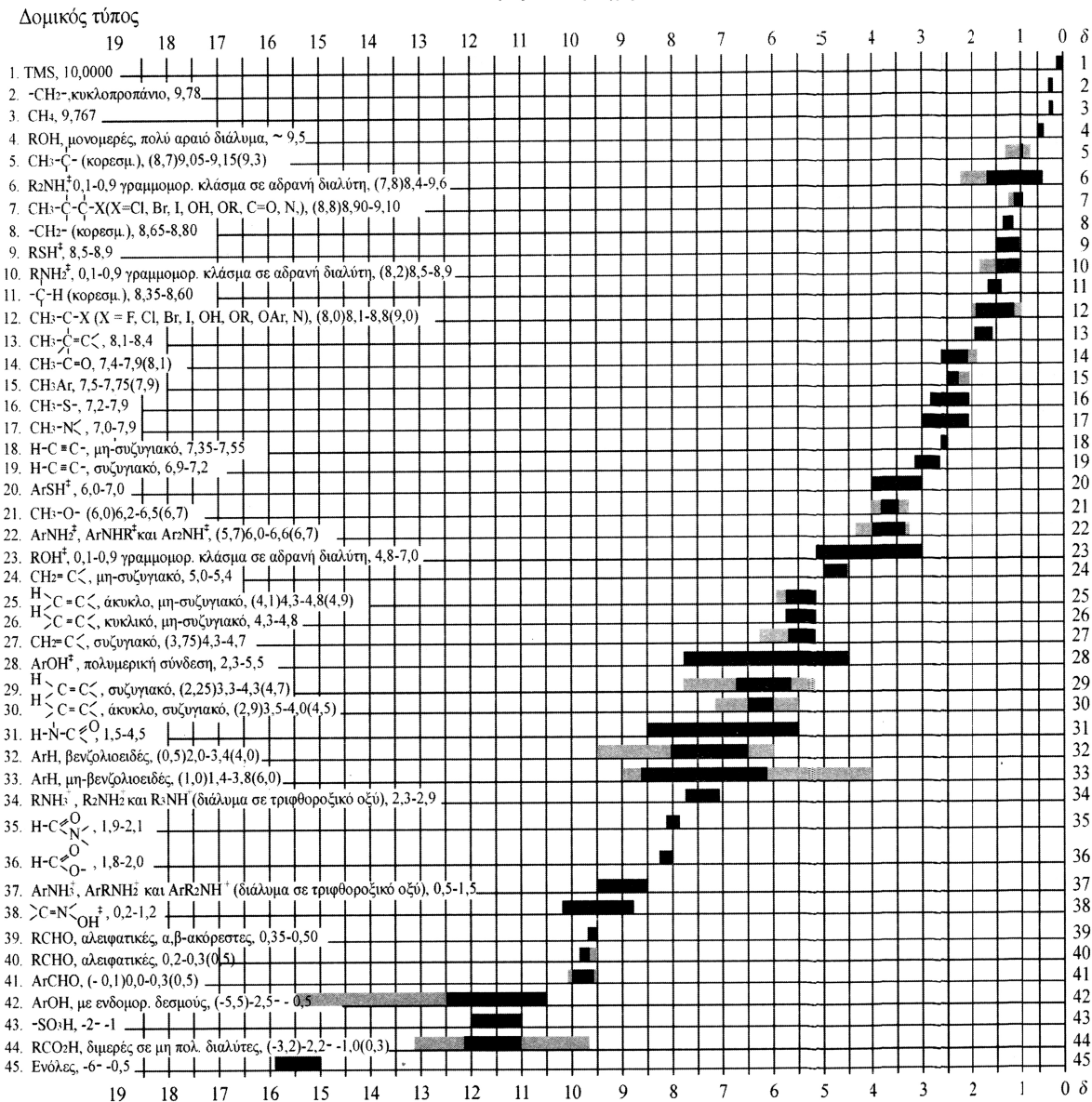
Το μαγνητικό πεδίο (κάθετο στο επίπεδο δακτυλίου) επάγει ροή  $\pi$  ηλεκτρονίων γύρω από το δακτύλιο για να δημιουργήσει το λεγόμενο **ρεύμα δακτυλίου (ring current)**. Δηλαδή επάγεται ένα δευτερογενές μαγνητικό πεδίο, το οποίο επηρεάζει τις χημικές μετατοπίσεις κοντινών (είτε μέσω δεσμών είτε μέσω χώρου) πρωτονίων. Ανάλογα φαινόμενα ισχύουν και για τους δεσμούς.



**Σχήμα 19-16** Αποπροάσπιση του αιθυλενίου και προάσπιση του ακετυλενίου, που προκαλούνται από ηλεκτρονιακά ρεύματα.

# Χημικές Μετατοπίσεις πρωτονίων σε διαφορετικό δομικό περιβάλλον

Τιμές και περιοχές των  $\delta$  και  $\tau^\dagger$



<sup>†</sup> Κανονικά, οι απορροφήσεις της χαρακτηριστικής ομάδας βρίσκονται στην υποδεικνυόμενη περιοχή. Περιπτώσιακά, μια χαρακτηριστική αάδα μπορεί να απορροφεί και εκτός της περιοχής αυτής. Τα κατά προσέγγιση όρια για αυτές τις περιπτώσεις δείχνονται με τις τιμές απορρόφησης στις παρενθέσεις και με γκριζό χρώμα στο σχήμα.

<sup>‡</sup> Οι θέσεις απορρόφησης των ομάδων αυτών εξαρτώνται από τη συγκέντρωση και μετατοπίζονται προς υψηλότερες τιμές  $\tau$  στακαριαότερα ιαλύματα.

# NMR Φάσματα Πρώτης & Δεύτερης Τάξης

➤ **Φάσματα Πρώτης Τάξης** : Τα φάσματα *πρώτης τάξης* είναι αυτά τα οποία η χημική μετατόπιση ανάμεσα στις ομάδες αλληλεπιδρώντων πυρήνων είναι μεγάλη σε σχέση με την σταθερά σύζευξης τους  $J$ . Για να υπάρχει απόλυτη συμπεριφορά πρώτης τάξης απαιτείται ο λόγος  $J/\delta$  να είναι μικρότερος από 0,05

➤ **Φάσματα Δεύτερης Τάξης** :

Πολύπλοκα Φάσματα. Στα φάσματα *δεύτερης τάξης* το  $\delta$  αυξάνει όσο αυξάνει η ένταση του μαγνητικού πεδίου ενώ δεν ισχύει το ίδιο για την  $J$ . Φάσματα τα οποία λαμβάνονται με όργανο ισχυρού μαγνητικού πεδίου ερμηνεύονται πολύ πιο εύκολα από αυτά τα οποία λαμβάνονται από φασματομέτρα με ασθενέστερο μαγνήτη (1 ppm : 400, 500...800... Hz !!!! )

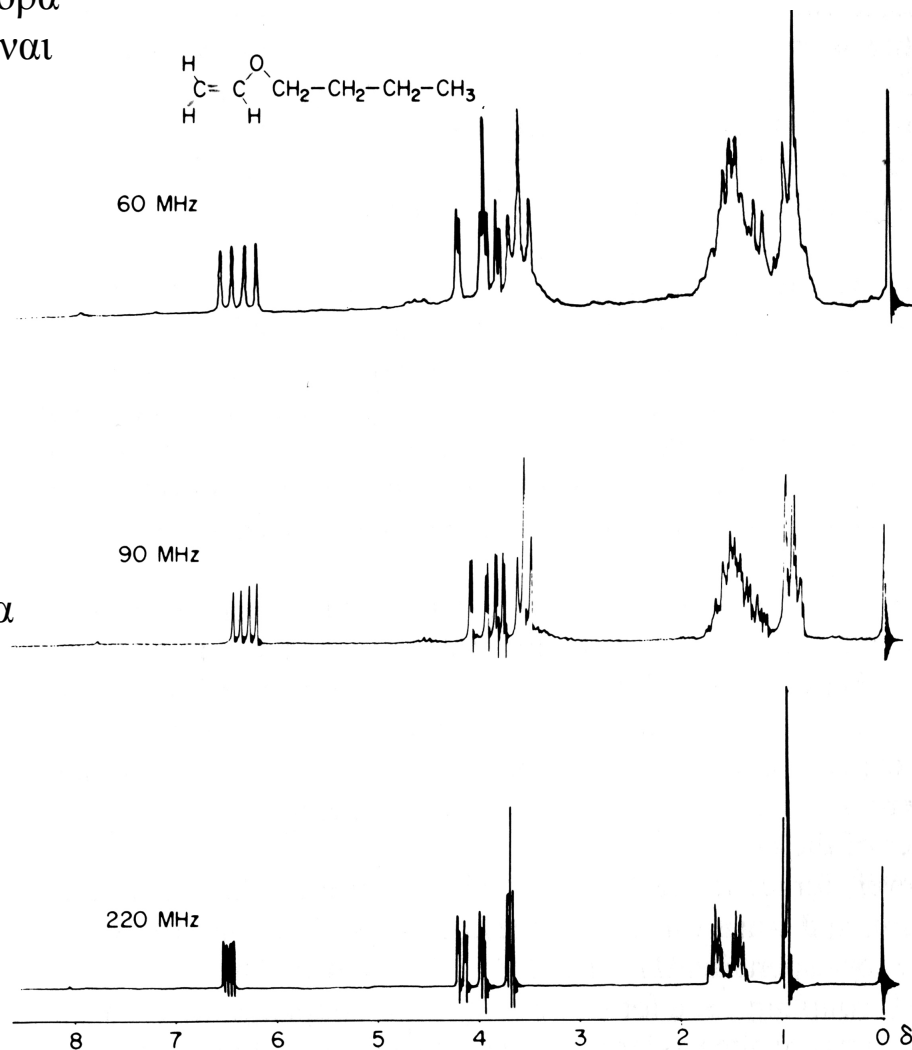


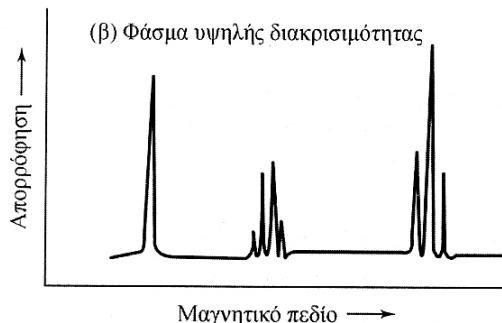
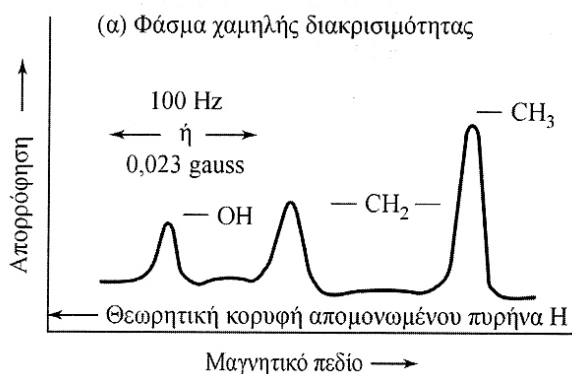
Fig. 3.5 The 60, 90 and 220 MHz  $^1\text{H}$  spectra of *n*-butylvinylether in  $\text{CDCl}_3$ .



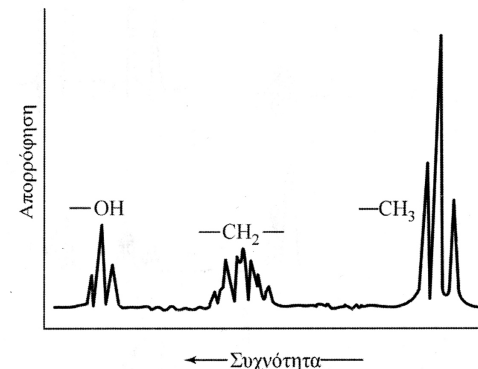
# Χημική ανταλλαγή και Φάσματα NMR

➤ **Επίδραση Χημικής Ανταλλαγής στα Φάσματα** : Το σήμα συντονισμού για το OH της αλκοόλης είναι μία **απλή**, ευρεία, κορυφή όταν υπάρχουν προσμίξεις στο διάλυμά της αλλά είναι μία **τριπλή** κορυφή όταν βρίσκεται σε απόλυτα καθαρή μορφή. Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει **ανταλλαγή** του -OH μεταξύ των μορίων της αλκοόλης.

Η χημική ανταλλαγή εξαρτάται από την ταχύτητα ανταλλαγής ενός πρωτονίου ανάμεσα στις δύο μορφές του (διαφορετικό χημικό περιβάλλον).



**Σχήμα 19-12** Φάσμα NMR της αιθανόλης σε συχνότητα 60 MHz. Διακρισιμότητα: (α) ~1 στα 1<sup>6</sup> (β) ~1 στα 10<sup>7</sup>.



**Σχήμα 19-19** Φάσμα πολύ καθαρής αιθανόλης που δείχνει την επιπλέον σχάση των κορυφών των OH και CH<sub>2</sub> (συγκρίνατε με το φάσμα του Σχήματος 19-12).

## Κανόνες ερμηνείας φασμάτων NMR πρώτης τάξης

- **Ισοδύναμοι πυρήνες δεν αλληλεπιδρούν ο ένας με τον άλλον** για να δώσουν πολλαπλές κορυφές απόρροφησης. Τα τρία πρωτόνια της μεθυλικής ομάδας στην αιθανόλη προκαλούν σχάση μόνο της κορυφής των γειτονικών μεθυλενικών πρωτονίων και όχι σχάση της κορυφής των ιδίων.
- **Οι σταθερές σύζευξης μειώνονται σημαντικά όσο αυξάνει η απόσταση των ομάδων** και σπάνια παρατηρείται σύζευξη σε αποστάσεις μεγαλύτερες από μήκος τεσσάρων δεσμών.
- **Η πολλαπλότητα μιας κορυφής καθορίζεται από τον αριθμό  $n$  των μαγνητικώς ισοδύναμων πρωτονίων των γειτονικών ατόμων και έχει τιμή  $n + 1$ .** Συνεπώς η πολλαπλότητα της μεθυλενικής κορυφής στην αιθανόλη καθορίζεται από τον αριθμό των πρωτονίων της γειτονικής μεθυλικής ομάδας και είναι ίση με  $3 + 1 = 4$ .
- **Εάν τα πρωτόνια στο άτομο B επηρεάζονται από τα πρωτόνια στα άτομα A και C, τα οποία δεν είναι ισοδύναμα η πολλαπλότητα του B είναι ίση με  $(n_A + 1)(n_C + 1)$ ,** όπου  $n_A$  και  $n_C$  ο αριθμός των ισοδύναμων πρωτονίων στα A και C, αντίστοιχα.
- Τα σχετικά **εμβαδά μιας πολλαπλής κορυφής είναι συμμετρικά** γύρω από το κεντρικό σημείο της ζώνης και είναι ανάλογα με τους συντελεστές των όρων του αναπτύγματος  $(x + 1)^n$ . Η εφαρμογή αυτού του κανόνα φαίνεται στον Πίνακα 19/3 και στα παραδείγματα που ακολουθούν.
- **Η σταθερά σύζευξης είναι ανεξάρτητη από το εφαρμοζόμενο πεδίο.** Επομένως, οι πολλαπλές κορυφές διακρίνονται εύκολα από κορυφές με μικρή χημική μετατόπιση με λήψη φασμάτων σε δύο διαφορετικές εντάσεις πεδίου

# Παραδείγματα

Για κάθε μία από τις παρακάτω ενώσεις, να υπολογισθεί ο αριθμός των πολλαπλών κορυφών για κάθε ταινία και τα σχετικά εμβαδά τους

- $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ . Η πολλαπλότητα της κορυφής, που σχετίζεται με τα τέσσερα ισοδύναμα πρωτόνια των δύο άκρων του μορίου, καθορίζεται από τον αριθμό των πρωτονίων στον κεντρικό άνθρακα. Επομένως, η πολλαπλότητα είναι  $2 + 1 = 3$  και τα εμβαδά έχουν λόγο 1:2:1. Η πολλαπλότητα των 2 πρωτονίων του κεντρικού μεθυλενίου καθορίζεται από τα 4 ισοδύναμα πρωτόνια στις άκρες και είναι  $4 + 1 = 5$ . Το ανάπτυγμα του  $(x + 1)^4$  παρέχει συντελεστές (Πίνακας 19-3) με σχέση εμβαδών κορυφών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19-3 Σχετικές εντάσεις κορυφών πολλαπλότητας πρώτης τάξης ( $I = 1/2$ )

Πλήθος ισοδύναμων πρωτονίων, $n$	Πολλαπλότητα, $(n + 1)$	Σχετικά εμβαδά κορυφών									
0	1	1									
1	2	1									1
2	3	1								2	1
3	4	1						3	3	1	
4	5	1				4	6	4	1		
5	6	1		5	10	10	5	1			
6	7	1	6	15	20	15	6	1			
7	8	1	7	21	35	35	21	7	1		



# Παραδείγματα

➤  $\text{CH}_3\text{CHBrCH}_3$ .

Η κορυφή για τα 6 μεθυλικά πρωτόνια αποτελείται από  $1 + 1 = 2$  κορυφές με σχετικά εμβαδά 1:1. Το πρωτόνιο του κεντρικού άνθρακα παρουσιάζει πολλαπλότητα  $6 + 1 = 7$ . Βάση του Πίνακα 19-3, οι κορυφές αυτές έχουν σχέση εμβαδών 1:6:15:20:15:6:1

➤  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_3$ .

Τα πρωτόνια του δεξιού μεθυλίου χωρίζονται από τα άλλα πρωτόνια με περισσότερους από τρεις δεσμούς έτσι, ώστε γι' αυτά παρατηρείται μόνο μία απλή κορυφή. Τα πρωτόνια της κεντρικής μεθυλενικής ομάδας έχουν πολλαπλότητα  $3 + 1 = 4$  και λόγο 1:3:3:1. Τα πρωτόνια του αριστερού μεθυλίου έχουν πολλαπλότητα  $2 + 1 = 3$  και λόγο εμβαδών 1:2:1.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 19-3** Σχετικές εντάσεις κορυφών πολλαπλότητας πρώτης τάξης ( $I = 1/2$ )

Πλήθος ισοδύναμων πρωτονίων, $n$	Πολλαπλότητα, $(n + 1)$	Σχετικά εμβαδά κορυφών																																																															
0	1	1																																																															
1	2	1		1																																																													
2	3	1			2			1																																																									
3	4	1				3				1																																																							
4	5	1					4					1																																																					
5	6	1						5						10						10						5						1																																	
6	7	1							6							15							20							15							6							1																					
7	8	1								7								21								35								35								21								7								1							

# Εφαρμογές του Πρωτονιακού NMR

## ➤ Ταυτοποίηση ουσιών

Αναγνώριση είδους ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , ...), και διακρίβωση αριθμού πυρήνων (μέσω ολοκλήρωσης), ταυτοποίηση γειτονικών πυρήνων (μέσω σταθερών σύζευξης), υπολογισμός χρόνων αποδιέγερσης... Το 1D  $^1\text{H}$  NMR φάσμα δεν είναι αρκετό και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες αναλυτικές μεθόδους, π.χ. UV-vis, MS, IR, στοιχειακή ανάλυση. **Τα 2D φάσματα είναι ικανά να δώσουν ικανοποιητικές πληροφορίες για τον χαρακτηρισμό και την διαμόρφωση ενός μορίου.**

## ➤ Εφαρμογή στην Ποσοτική Ανάλυση – Μίγματα Ουσιών.

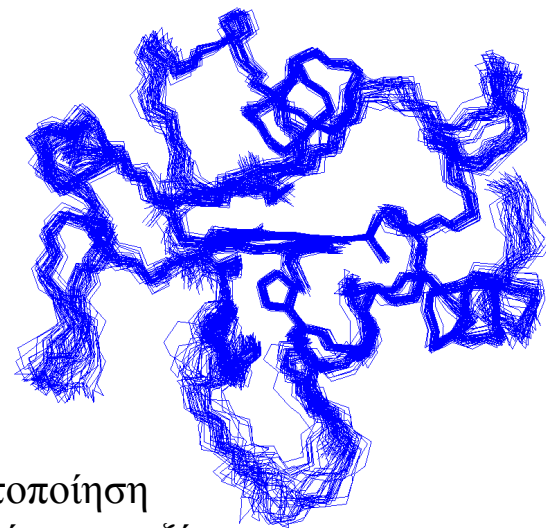
Ανάλυση συστατικών δείγματος – Εφαρμογή στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, μιγμάτων ουσιών στα φάρμακα (μέθοδος προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών όπως *ασπιρίνη*, *καφεΐνη*, *φαινακετίνη*, κ.λ.π.), τρόφιμα, καύσιμα, κ.λ.π.

## ➤ Δομική Βιολογία/Βιοχημεία.

Υπολογισμός τρισδιάστατων δομών βιομορίων σε διάλυμα με ανάλυση σχεδόν εφάμιλλη της Κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X. Μελέτη δυναμικής συμπεριφοράς βιομορίων σε ποικιλία πειραματικών συνθηκών

## ➤ Καινούργιες Τάσεις – Αναγνώριση/Σχεδιασμός Φαρμακευτικών Ουσιών.

Ανάλυση μίγματος ενώσεων για ταυτοποίηση των δραστικών, απέναντι σε πρωτεΐνες/ένζυμα στόχους. Σχεδιασμός και βελτιστοποίηση για ενίσχυση των φαρμακοφόρων ομάδων και της φαρμακευτικής τους αξίας.



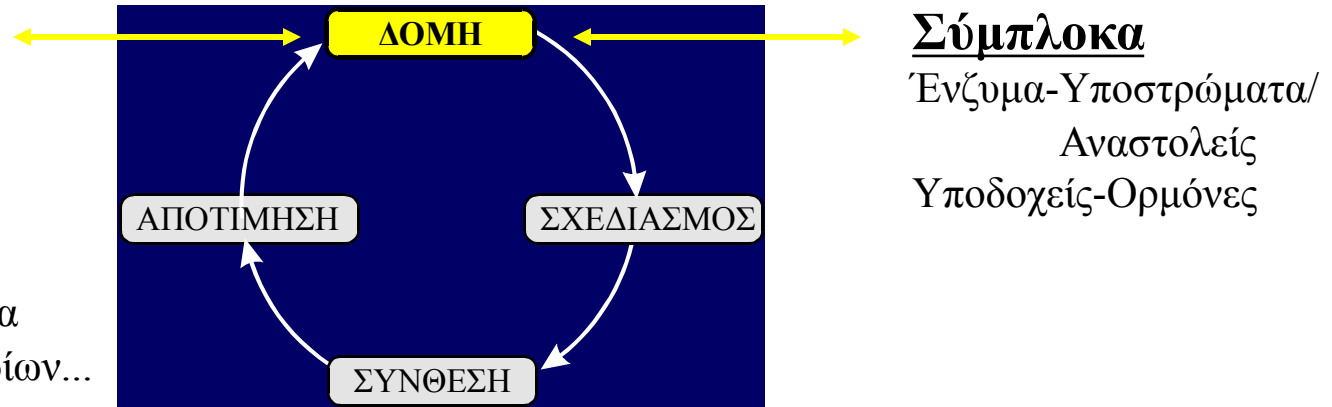
# Σχέση Δομής-Δραστικότητας & Σχεδιασμός Βιοδραστικών Ενώσεων

## Μεγάλα Μόρια

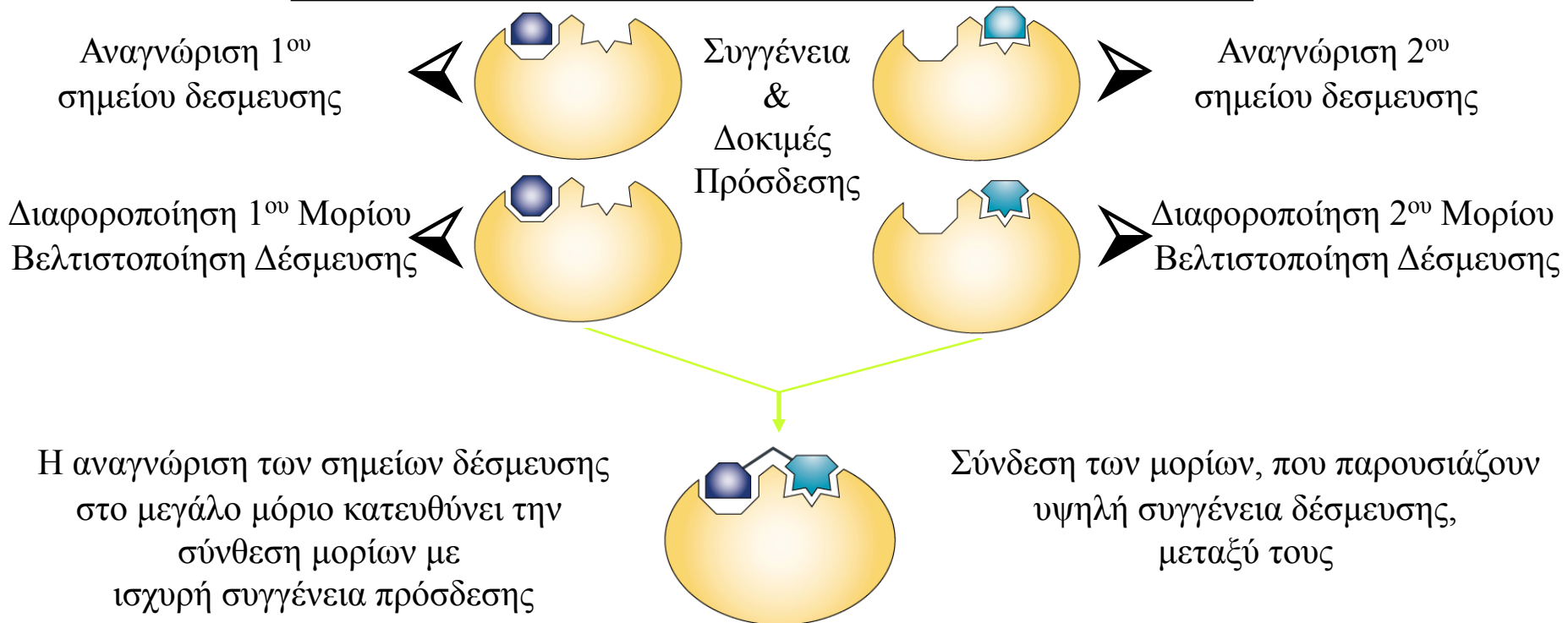
Ένζυμα, Πρωτεΐνες,  
Υποδοχείς, DNA, RNA...

## Μικρά Μόρια

Πεπτίδια, Οργανικά Μόρια  
Υβριδικά Ανάλογα Πεπτιδίων...



## Διαδικασία Σχεδιασμού Φαρμακολογικών Ουσιών



# Δομική μελέτη βιομορίων με χρήση πειραματικών δεδομένων

**Κρυσταλλογραφία Ακτίνων-X**

**&**

**Φασματοσκοπία NMR**

## Πλεονεκτήματα

- Μόρια, Μοριακά Σύμπλοκα MB>>100kDa !!!
- Ταχύτητα... όταν υπάρχουν κρύσταλλοι
- Εξέλιξη τεχνικής

- Δεν απαιτείται κρυστάλλωση
- Διαλύματα .... Υδατικά ή μη
- Μεγάλη κλίμακα πειραματικών συνθηκών (θερμοκρασία, pH, ιονική ισχύς κ.λπ.)
- Δυναμική συμπεριφορά βιομορίων (κινητικότητα, χημική ισορροπία, unfolding)
- Σύγκριση μεταξύ δομών NMR και X-ray ►►
  - Δομικές διαφορές σε Στερεά Κατάσταση & Διάλυμα

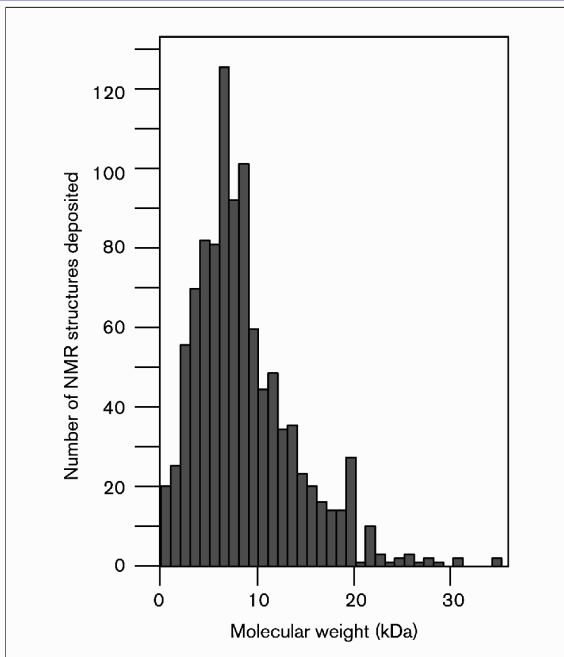
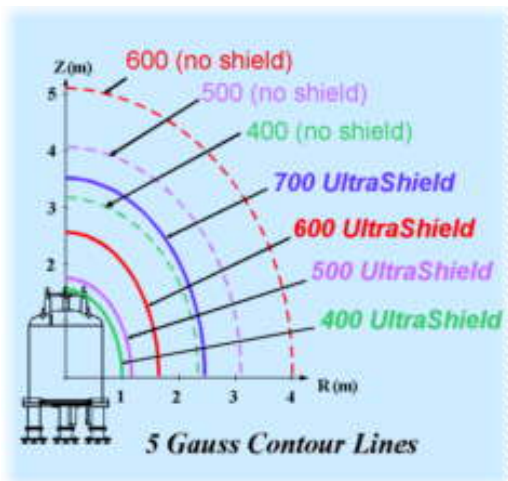
## Μειονεκτήματα

- Υψηλή συγκέντρωση αλάτων
- Κρυστάλλωση Βιομορίου \*\*\*

- Μέγεθος μορίων... Τώρα : 35-50kDa  
Μέλλον : 100-150kDa
- Εμπλουτισμός Βιομορίου σε  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  &  $^2\text{H}$  (για βιομόρια > 10-12 kDa)

# 3D Δομές Βιομοριών Υψηλής Ανάλυσης σε Διάλυμα μέσω NMR

## Τεχνολογία



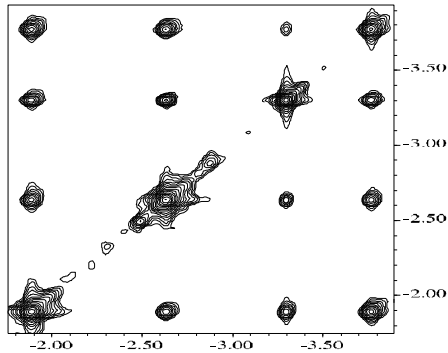
Molecular weight distribution of the NMR structures deposited in the Brookhaven PDB as of December 1997. The number of structures deposited is plotted versus the molecular weight. Reproduced with permission from [2].

## Χρονική Διάρκεια Μελέτης

- Proteins	~ 100	AA	(12kDa)	- $^1\text{H}$	2D NMR	12-36 months
- Proteins	~ 120-260	AA	(15-35kDa)	- $^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}$ , $^2\text{H}$	3D, 4D NMR	> 36 months
- Peptides	~ 40-50	AA	(5-6kDa)	- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ / $^{15}\text{N}$	2D NMR	2-3 months
- Peptides	~ 10-15	AA	(1-2kDa)	- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ / $^{15}\text{N}$	2D NMR	2-3 weeks

# 3D Δομές Βιομοριών Υψηλής Ανάλυσης σε Διάλυμα μέσω NMR

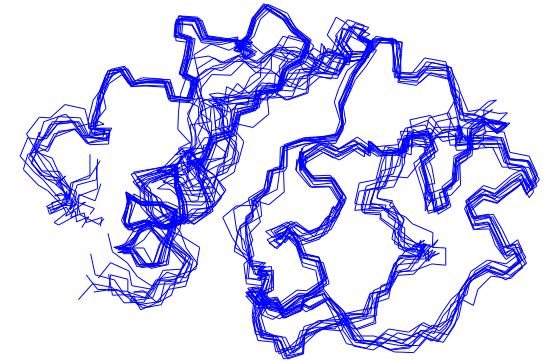
## Ιστορία & Μεθοδολογία



Από 2D NMR φάσματα σε

Αποτίμηση  
Δομικές  
Πληροφορίες

Υπολογισμοί  
Δομής  
Βελτιστοποίηση

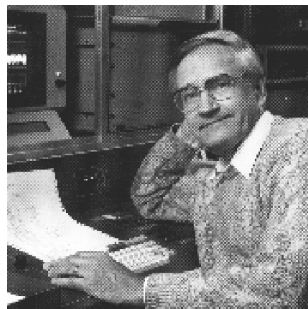


...3D δομές σε διάλυμα

“Complete Sequence-Specific Resonance assignments” σε βιομόρια

(K. Wüthrich In *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, 1986)

Prof Richard Ernst  
ETH, Zürich



**Nobel Prize 1991**



Prof Kurt Wüthrich  
ETH, Zürich &  
Scripps, California

**Nobel Prize 2002**



# Παραδείγματα

➤ Το φάσμα NMR, Σχ 19-27, ανήκει σε οργανική ένωση με εμπειρικό τύπο  $C_5H_{10}O_2$ . Να ταυτοποιηθεί...

**Απάντηση :** Παρουσία 4 τύπων H. Ολοκλήρωση + Εμπειρικός τύπος ένωσης  $\rightarrow$  3:2:2:3 ο λόγος των H.

\*Η απλή κορυφή σε  $\delta=3,6$  ppm πρέπει να οφείλεται σε απομονωμένη μεθυλική ομάδα.

\*Σύμφωνα με Σχ. 19-27 (απλή κορυφή) και Πίν. 19-2  $\rightarrow$  χαρακτηριστική ομάδα  $CH_3OC(=O)-$

\*Ο λόγος των 2:2:3 H, υποδεικνύει την παρουσία *n*-προπυλομάδας...  $CH_2-CH_2-CH_3$ .

\*Η τριπλή κορυφή σε  $\delta=0,9$  ppm συμφωνεί με  $-CH_3$  δίπλα σε  $-CH_2-$ .

\*Από τον Πίν. 19.2 τα πρωτόνια της  $-CH_2$  ομάδας κοντά στην καρβοξυλική ομάδα πρέπει να συντονίζονται σε τιμές 2,2, ppm περίπου (τριπλή λόγω σχάσης από την άλλη  $-CH_2$  ομάδα).

\*Η ενδιάμεση  $-CH_2$  ομάδα πρέπει

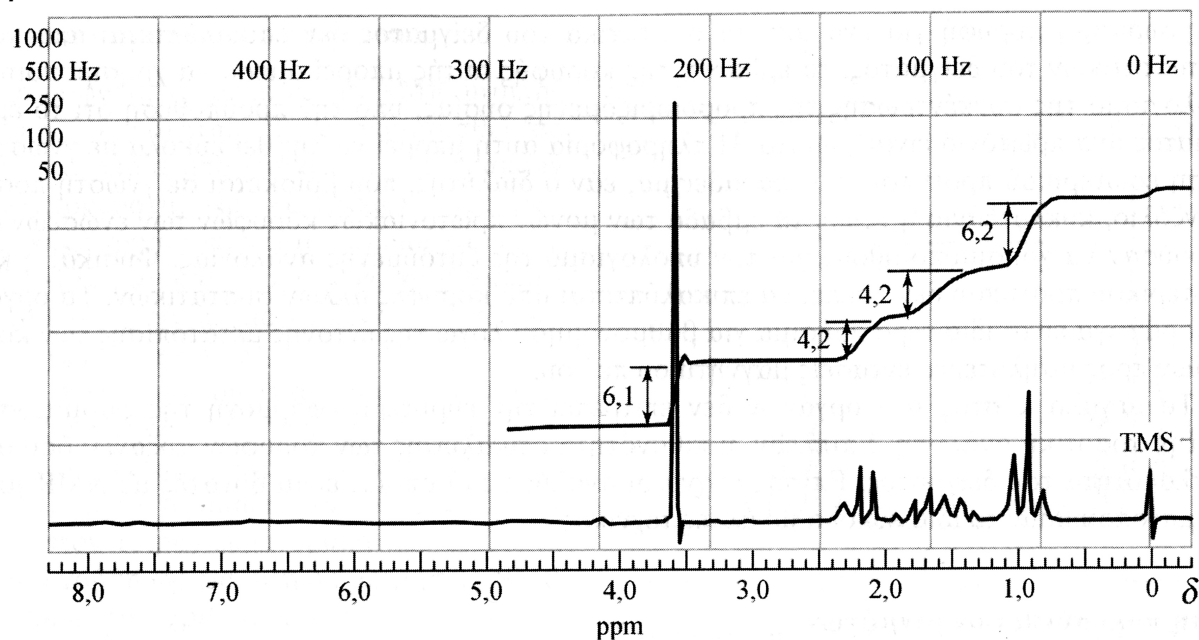
να έχει πολλαπλότητα  
 $3 \times 4 = 12$  σε  $\delta = 1,7$  ppm  
(τριπλή λόγω της  $-CH_2$   
και τετραπλή λόγω της  
 $-CH_3$  ομάδας)

\*Βάση ολοκλήρωσης  
των κορυφών οι  
κορυφές σε

$\delta = 3,6$  ppm και

$\delta = 0,9$  ppm

ανήκουν σε  $-CH_3$ .



**Σχήμα 19-27** Φάσμα NMR και καμπύλη ολοκλήρωσης της οργανικής ένωσης  $C_5H_{10}O_2$  σε  $CCl_4$ . (Από το: R. M. Silverstein, G. C. Bassler, and T. C. Morrill, Spectrometric Identification of Organic Compounds, 3rd ed., p. 296. New York: Wiley, 1974. Με άδεια των John Wiley & Sons, Inc.).

# Παραδείγματα

➤ Τα φάσματα NMR, Σχ 19-28, ανήκουν σε άχρωμες ισομερές ενώσεις υγρής κατάστασης οι οποίες περιέχουν μόνο άνθρακα και υδρογόνο. Ποιες είναι...???

**Απάντηση :**

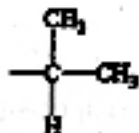
\* Απλή κορυφή σε  $\delta=7,2$  ppm (φάσμα A)  $\rightarrow$  αρωματικά πρωτόνια. Το σχετικό εμβαδόν της κορυφής αυτής αντιστοιχεί σε **5** πρωτόνια (και όχι 6)  $\rightarrow$  μόνο- υποκατεστημένος αρωματικός δακτύλιος

\* Πολλαπλότητα **επτά** για **1 H** σε  $\delta=2,9$  ppm.

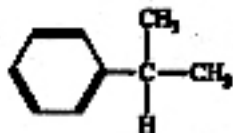
\* **Διπλή** κορυφή για **6 H** σε  $\delta=1,2$  ppm

\*\*\*\*\*

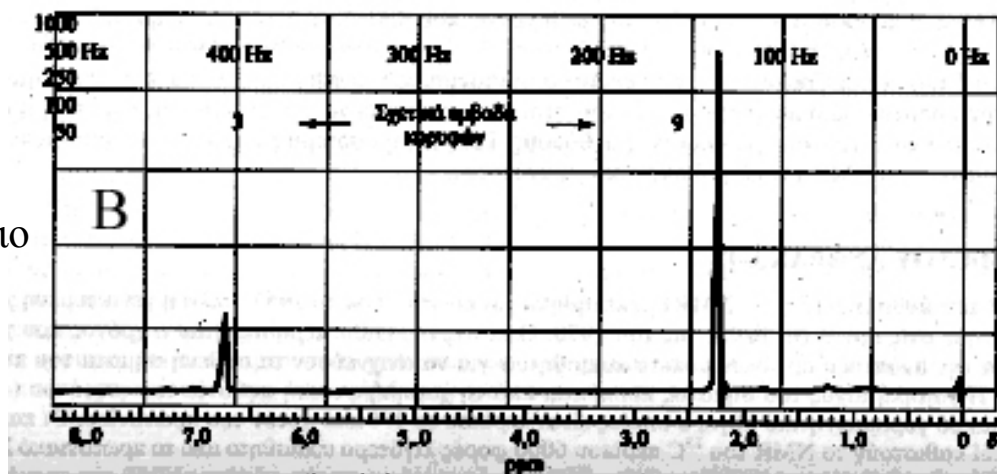
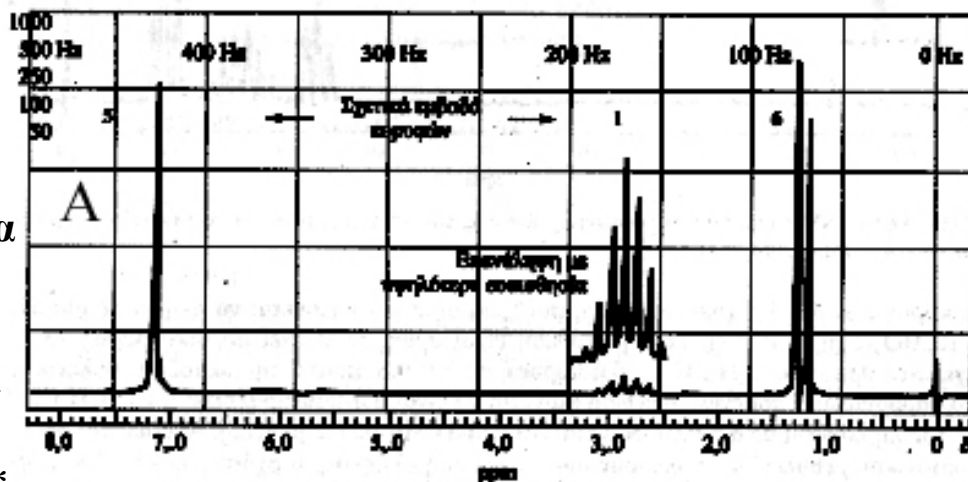
Τα χαρακτηριστικά των αλειφατικών H συμφωνούν με την δομή:



Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον βενζολικό δακτύλιο (μονο-υποκατεστημένος) καταλήγουμε στην δομή :



Η ισομερές ένωση στο φάσμα **B** παρουσιάζει μία κορυφή σε  $\delta=6,8$  ppm και μία ακόμα σε  $\delta=2,2$  ppm με σχετικό λόγο εμβαδών 1: 3  $\rightarrow$  τρις-υποκατεστημένο βενζόλιο με τύπο  $C_6H_3(CH_3)_3$ .





# Παραδείγματα

➤ Το φάσμα NMR, Σχ 19-29, ανήκει σε οργανική ένωση με μοριακό βάρος 72, η οποία περιέχει μόνο άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο. Να ταυτοποιηθεί...

**Απάντηση :** Η τριπλή κορυφή σε  $\delta=9,8$  ppm  $\rightarrow$  αλειφατική αλδεΐδη RCHO (Σχ. 19-17)

Εάν η υπόθεση αυτή είναι σωστή τότε η ομάδα R θα έχει Μοριακό Βάρος 43  $\rightarrow$  C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>.

Η τριπλή κορυφή σε  $\delta=9,8$  ppm απαιτεί την ύπαρξη της -CH<sub>3</sub> ομάδας κοντά στο καρβονύλιο -CHO. Συνεπώς η ένωση φαίνεται πως είναι η *n*-βουτυραλδεΐδη CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO.

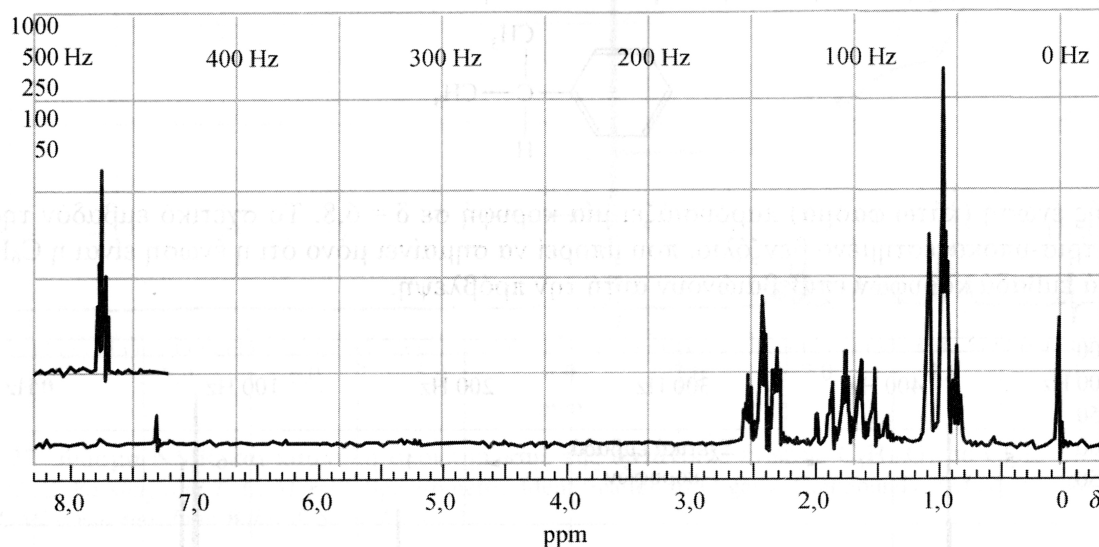
Η τριπλή κορυφή σε  $\delta=0,97$  ppm φαίνεται να ανήκει στο τελικό -CH<sub>3</sub>. Αναμένεται ότι τα H του γειτονικού -CH<sub>2</sub> θα δώσουν μία πολλαπλή κορυφή με σχάση  $4 \times 3 = 12$  και η ομάδα των H σε  $\delta=1,7$  ppm το επιβεβαιώνει.

Τέλος, η κορυφή των H του -CH<sub>2</sub> δίπλα στο -CHO θα παρουσιάζει πολλαπλότητα 6.

(ομάδα κορυφών σε  $\delta=2,4$  ppm).

## ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ 19-6

Το φάσμα του Σχήματος 19-29 ανήκει σε οργανική ένωση με μοριακό βάρος 72, η οποία περιέχει μόνο άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο. Να ταυτοποιηθεί η ένωση.



**Σχήμα 19-29** Φάσμα NMR μιας καθαρής οργανικής ένωσης που περιέχει μόνο C, H και O. (Προσφορά της Varian Instrument Division, Palo, Alto, CA).