

# Zastosowanie spektroskopii NMR do badania związków pochodzenia naturalnego



# Literatura



- W. Zieliński, A. Rajcy, Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2000.
- A. R. Silverstein, F. Webster, D. Kiemle, Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.
- A. Ejchart, A. Gryff-Keller, NMR w cieczech. Zarys teorii i metodologii, Wydawnictwo: OWPW, 2004.
- A. Ejchart, L. Kozerski, Spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego  $^{13}\text{C}$ , PWN, 1981.
- H. Gunther, Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego, PWN, 1983.
- K. Hausser, H. Kalbitzer, NMR w biologii i medycynie, Wydawnictwo Naukowe UAM, 1993.

## Dipolowy moment magnetyczny:

$$\mu = \gamma P = \gamma \hbar I$$



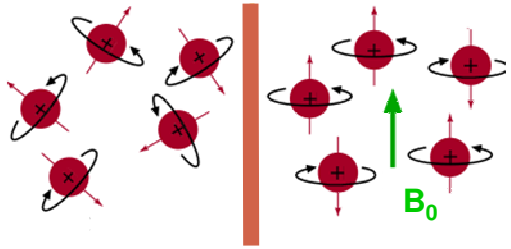
$\gamma$  [rad/(T·s)] – JĄDROWY WSPÓŁCZYNNIK MAGNETOGIRYCZNY

**$P$  - SPINOWY MOMENT PĘDU**

$\hbar = h/2\pi$ , gdzie  $h$  – stała Plancka

$I$  – tzw. **spin jądrowy**

Liczba masowa	Liczba atomowa	Spin jądrowy, $I$	Przykład jądra
nieparzysta	parzysta lub nieparzysta	1/2, 3/2, 5/2 ...	$I = 1/2$ : $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{31}\text{P}$ , $^{19}\text{F}$ , $^{15}\text{N}$
parzysta	parzysta	0	$^{12}\text{C}$ , $^{16}\text{O}$
parzysta	nieparzysta	1, 2, 3 ...	$I = 1$ : $^{14}\text{N}$ , $^2\text{H}$



Liczba dozwolonych orientacji względem pola  
magnetycznego dla izolowanego jądra:

$$N = 2I + 1$$

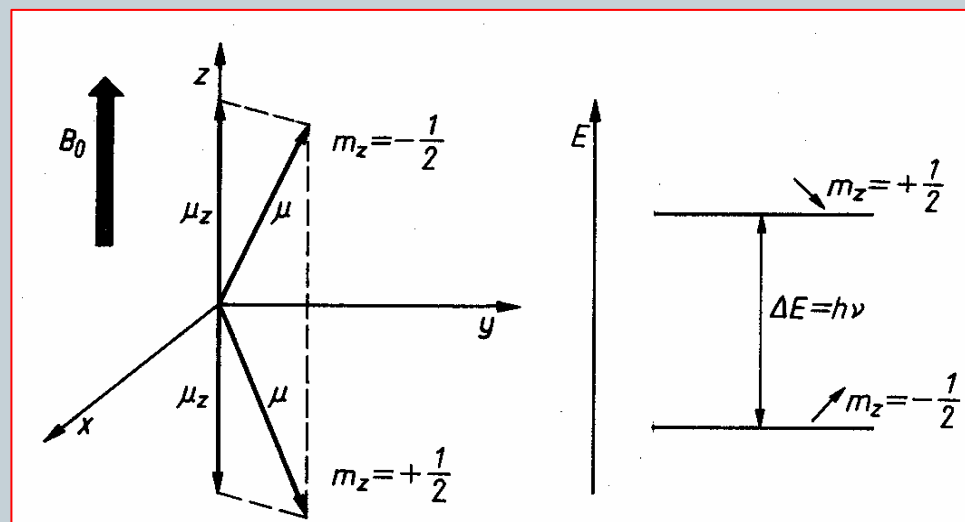
rzut spinu na kierunek wektora  $B_0$

$$I_z = m_I$$

$m_I$  – **MAGNETYCZNA LICZBA KWANTOWA**

$$m_I = -I, -I+1, \dots, I-1, I$$

jądra o  $I = 1/2$ , np.  $^1\text{H}$



$$\mathbf{E} = \mu_z \cdot \mathbf{B}_0 = \gamma \hbar m_I B_0$$

Dla jąder  $^1\text{H}$  ( $I = 1/2$ ):

$$m_I = +1/2 \text{ i } m_I = -1/2$$

$$E_\alpha = -1/2 \gamma \hbar B_0 \quad E_\beta = +1/2 \gamma \hbar B_0$$

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0 = (h/2\pi) \gamma B_0 \quad \text{oraz} \quad \Delta E = h\nu$$

$$(h/2\pi) \gamma B_0 = h\nu$$

$$\nu = (1/2\pi) \gamma B_0 = \nu_L$$

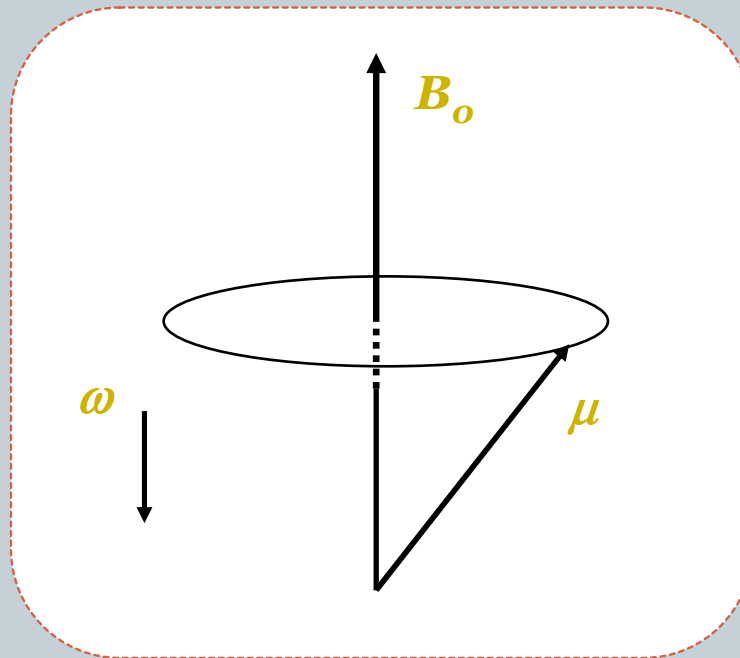
## Precesja Larmora



prędkość kątowna,  $\omega_0$

$$\omega_0 = 2\pi\nu_L = \gamma B_0$$

Precesja Larmora magnetycznego momentu jądrowego  $\mu$



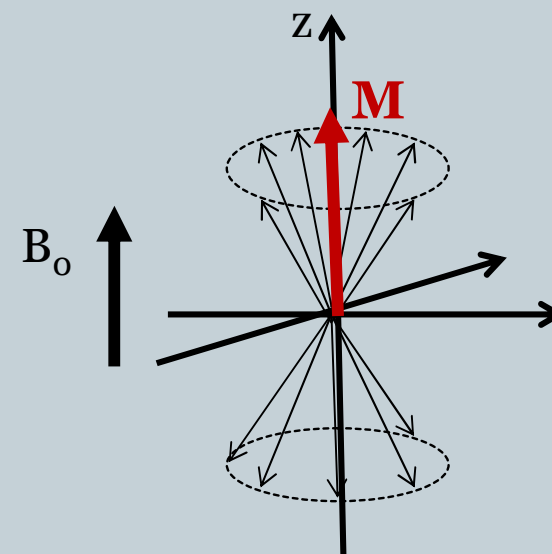
## Jądra $^1\text{H}$ ( $I = 1/2$ )



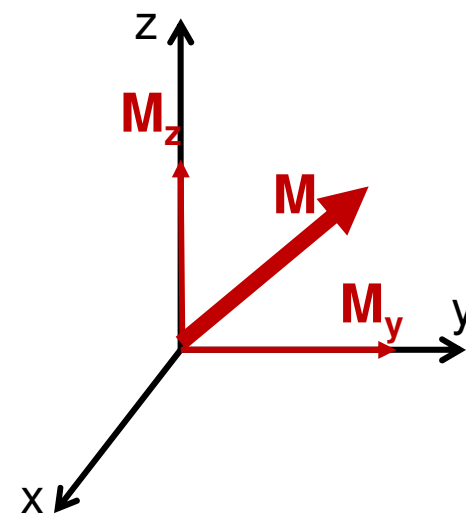
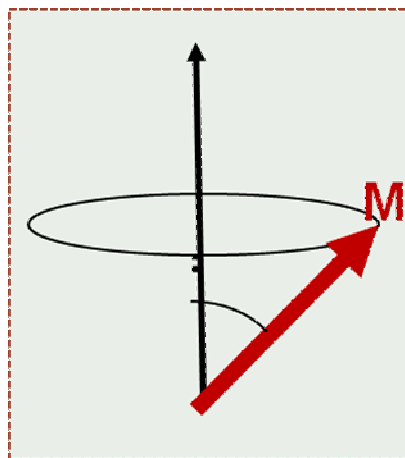
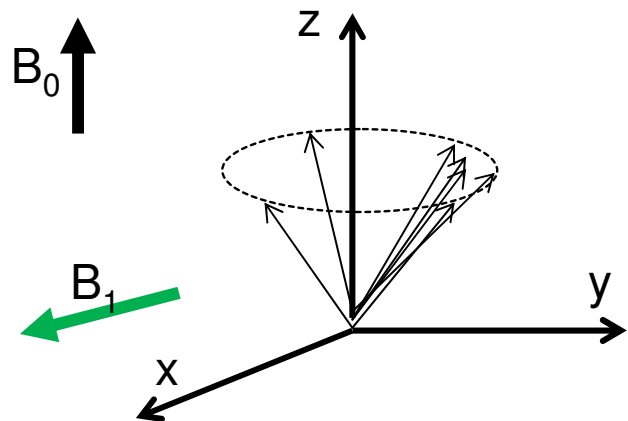
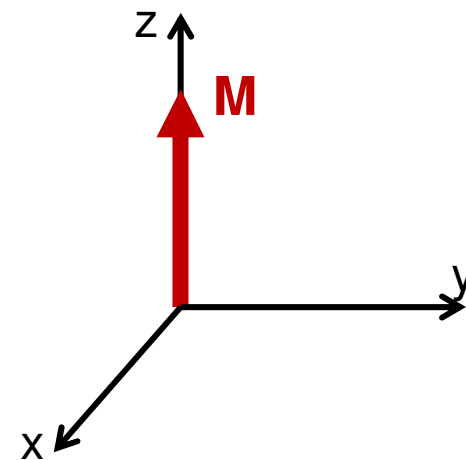
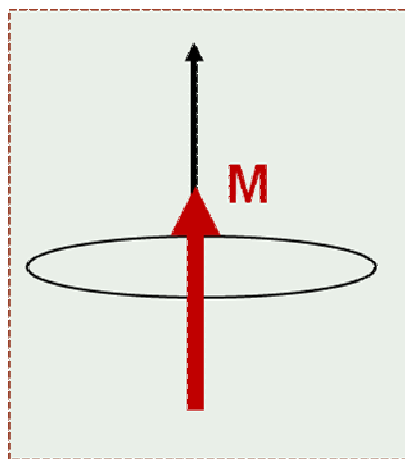
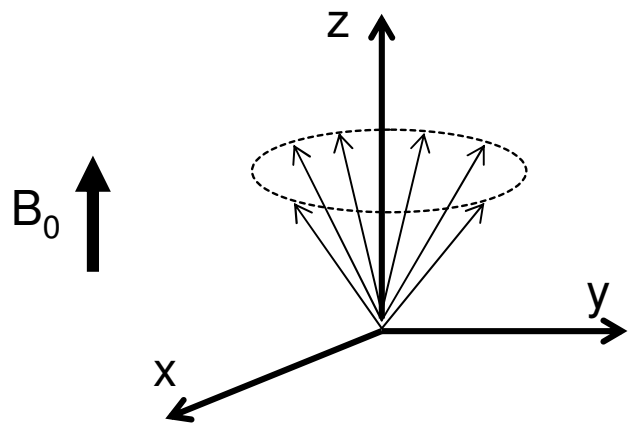
Prawo Boltzmannna:

$$N_{\alpha}/N_{\beta} = \exp(-\Delta E/k_B T) \approx 1 - \hbar \gamma B_0 / k_B T$$

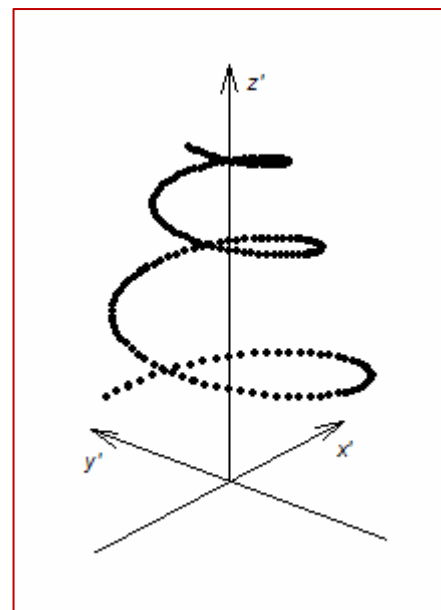
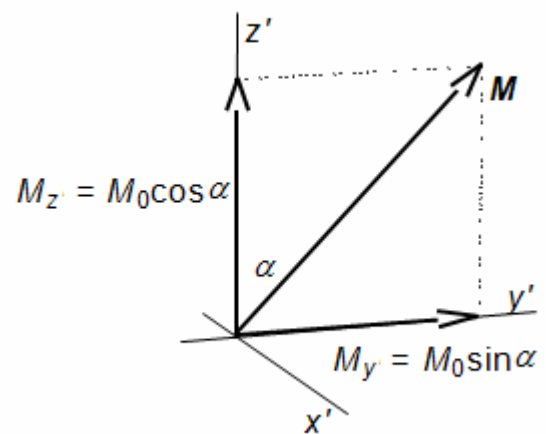
$k_B$  – stała Boltzmannna





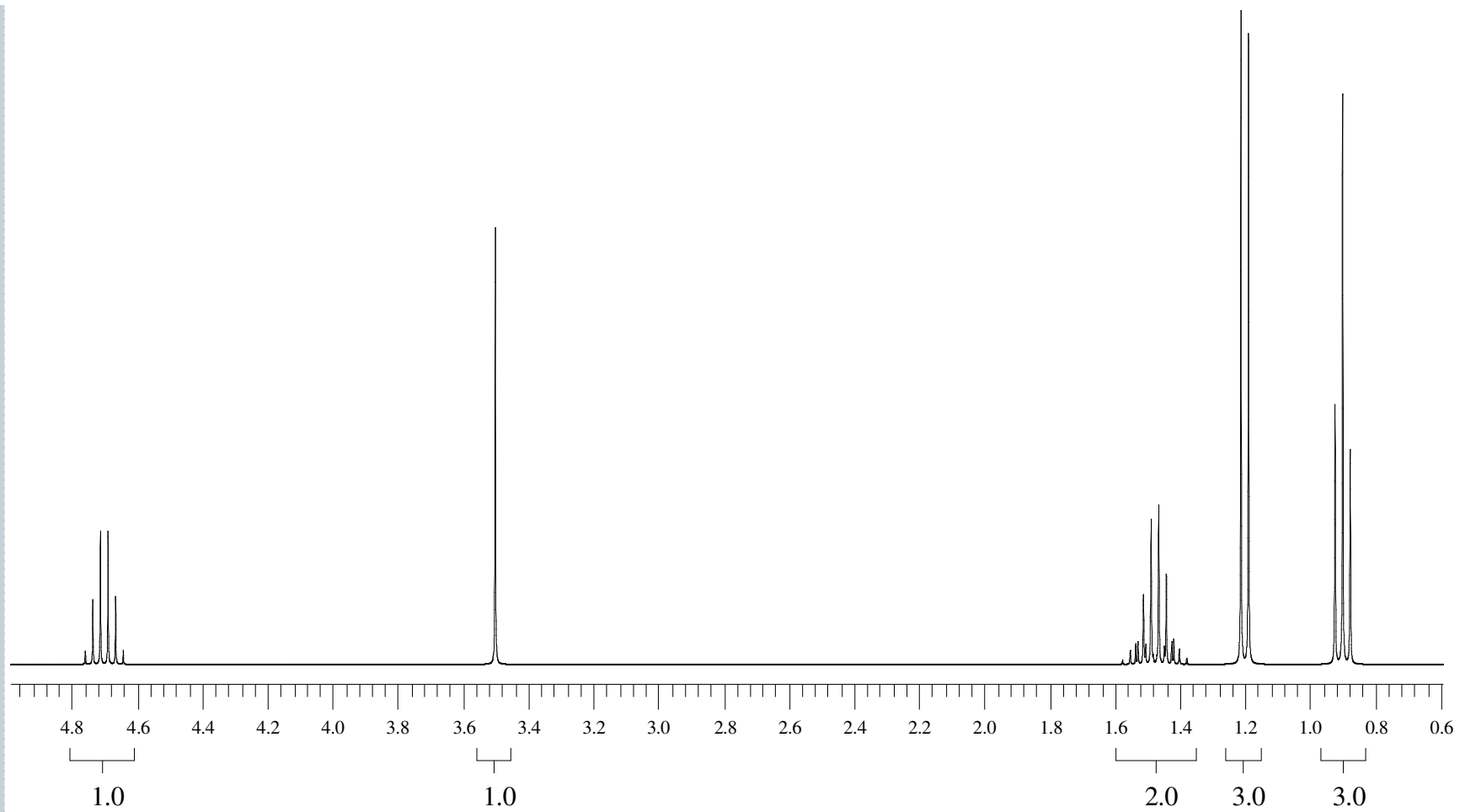


W wirującym układzie współrzędnych



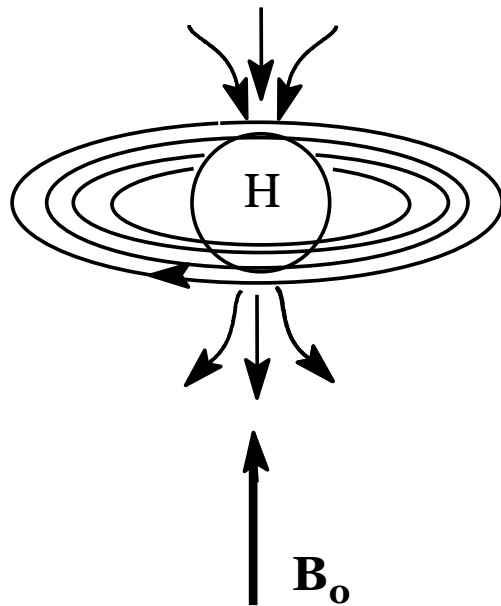
Jądro	Spin I	Zawartość naturalna [%]	Częstotliwość rezonansowa [MHz] (B <sub>0</sub> =2,3488 T)	Współczynnik magnetogiryczny $\gamma$ [10 <sup>7</sup> rad T <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<sup>1</sup> H	1/2	99,98	100,000	26,7519
<sup>2</sup> H	1	0,016	15,351	4,1066
<sup>12</sup> C	0	98,90	-	-
<sup>13</sup> C	1/2	1,108	24,144	6,7283
<sup>14</sup> N	1	99,63	7,224	1,9338
<sup>15</sup> N	1/2	0,37	10,133	-2,712
<sup>16</sup> O	0	99,96	-	-
<sup>17</sup> O	5/2	0,037	13,5	3,6264
<sup>19</sup> F	1/2	100,00	94,077	25,181
<sup>29</sup> Si	1/2	4,70	19,865	-5,3188
<sup>31</sup> P	1/2	100,00	40,481	10,841

# $^1\text{H}$ NMR



indukowane pole  
magnetyczne  $B'$

$$\omega_0 = 2\pi\nu_L = \gamma B_0$$



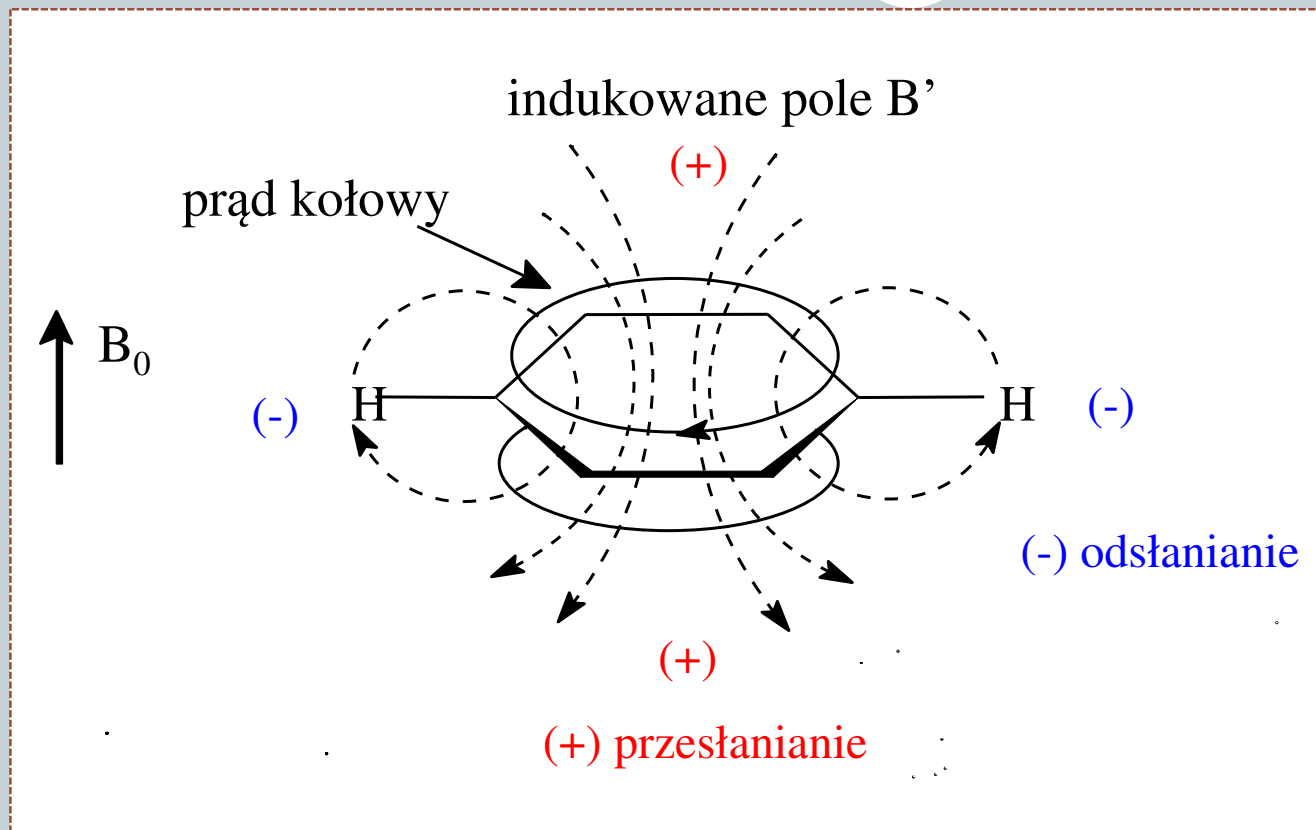
cyrkulacje elektronowe

przesłanianie = ekranowanie

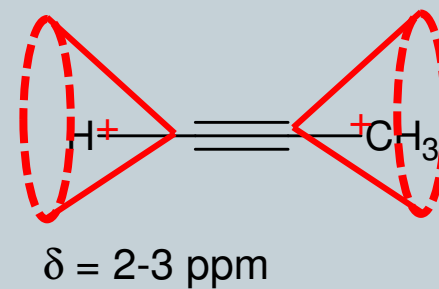
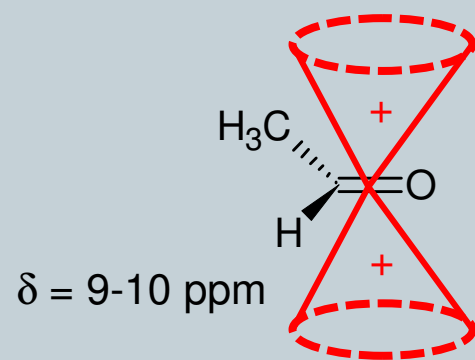
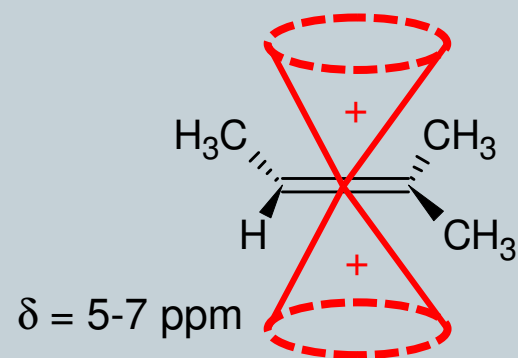
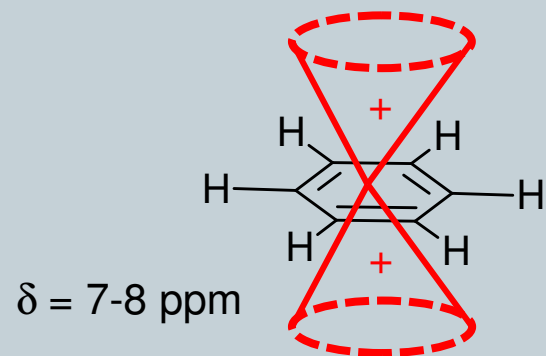
$$B_{\text{ef}} = B_0 - B' = B_0 - \sigma B_0$$

$\sigma$  - stała ekranowania

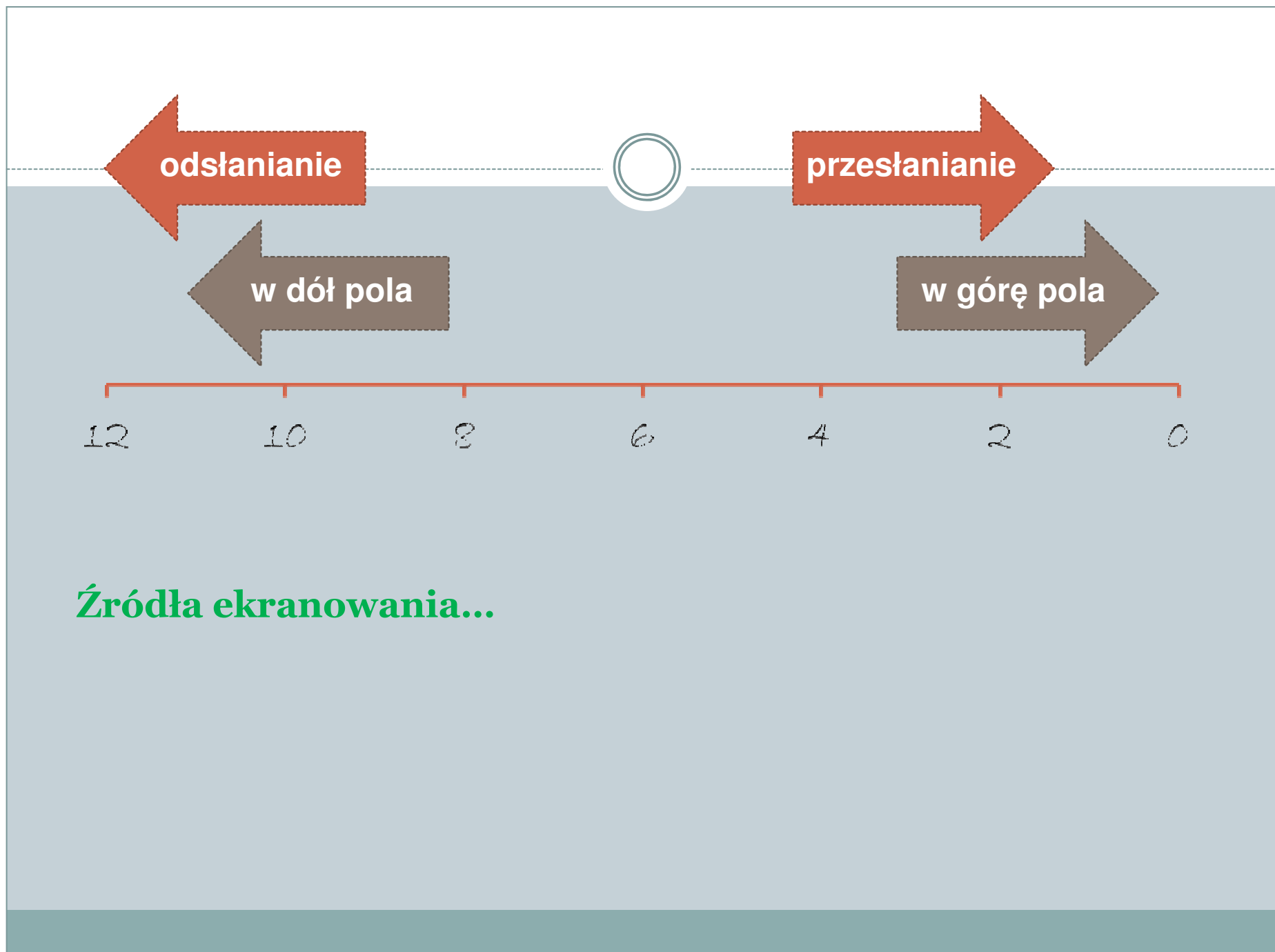
# Anizotropia magnetyczna pierścienia aromatycznego



# Stożki przesłaniania



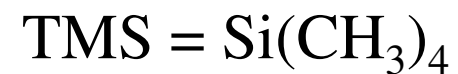
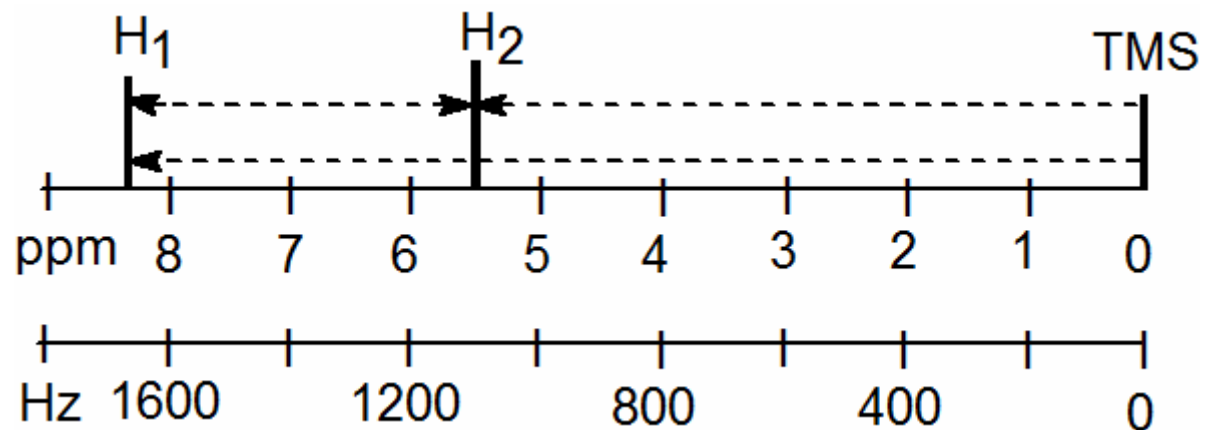
(+) przesłanianie



**Źródła ekranowania...**



## DEFINICJA SKALI WIDM $^1\text{H}$ NMR



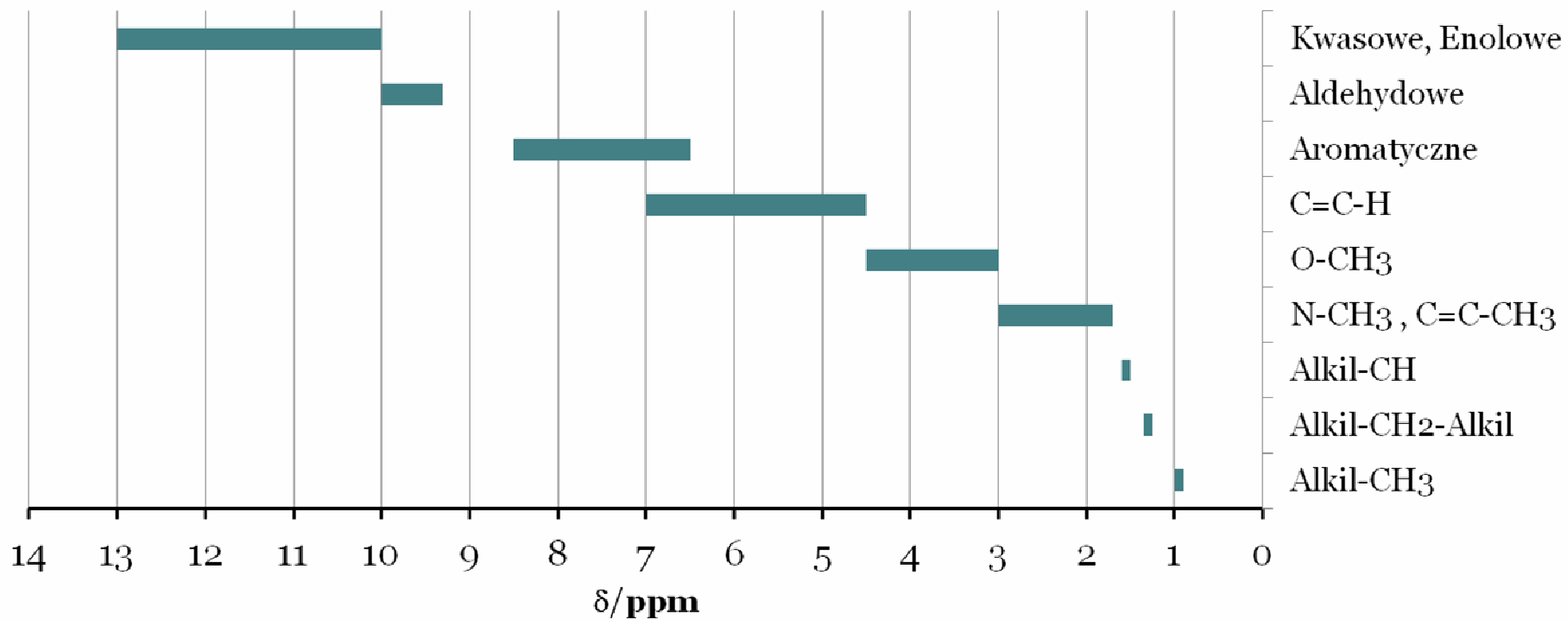
- Przesunięcie chemiczne,  $\delta$
- Różnica przesunięcia chemicznego,  $\Delta\delta$

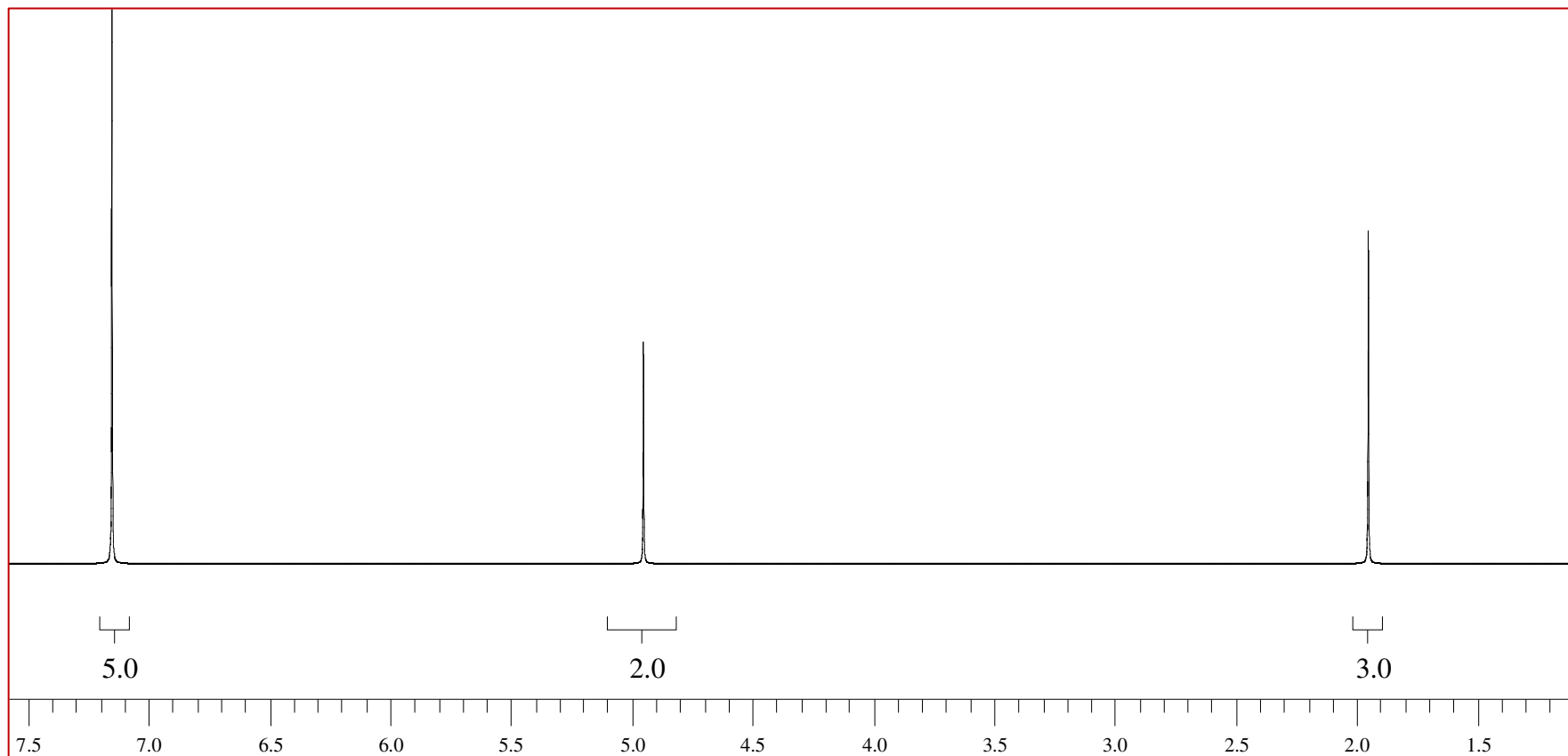
Jądro	Wzorec przesunięcia chemicznego ( $\delta = 0,0$ ppm)
$^1\text{H}$	$\text{Me}_4\text{Si}$
$^{13}\text{C}$	$\text{Me}_4\text{Si}$
$^{14}\text{N}$	$\text{MeNO}_2$ lub $\text{NO}_3^-$
$^{15}\text{N}$	$\text{MeNO}_2$ lub $\text{NO}_3^-$
$^{17}\text{O}$	$\text{H}_2\text{O}$
$^{19}\text{F}$	$\text{CCl}_3\text{F}$
$^{29}\text{Si}$	$\text{Me}_4\text{Si}$
$^{31}\text{P}$	85% $\text{H}_3\text{PO}_4$
$^{33}\text{S}$	$\text{CS}_2$ or $\text{SO}_4^{2-}$

	$\delta = 0,0$ ppm
$^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$	DSS (kwas 2,2-dimetylo-2-silapentano-5-sulfonowy) TSP (3-(trimetylosililo)-propianosulfonian sodu)

<b>Rozpuszczalnik</b>	<b>Wzór</b>	<b><math>\delta_H</math> [ppm] związku monoprotowanego</b>
Chloroform -d	$\text{CDCl}_3$	7,26
Sulfotlenek dimetylowy-d <sub>6</sub>	$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	2,49
Acetonitryl-d <sub>3</sub>	$\text{CD}_3\text{CN}$	1,95
Aceton-d <sub>6</sub>	$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	2,05
Benzen-d <sub>6</sub>	$\text{C}_6\text{D}_6$	7,28
„Ciężka woda”	$\text{D}_2\text{O}$	4,72
Kwas trifluorooctowy-d	$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$	11,6

# Typowe zakresy protonowych przesunięć chemicznych





## Stała sprzężenia spinowo-spinowego

- Podobnie jak w przypadku oddziaływania spinu jądrowego z zewnętrznym polem magnetycznym (przesunięcie chemiczne), oddziaływanie między dwoma spinami jądrowymi  $i$  i  $j$  określane jako **stała sprzężenia**, można podzielić na dwa typy oddziaływań:
- **Pośrednie** – sprzężenie spinowo-spinowe (skalarne) gdzie  ${}^nJ_{A,B}$ , **stała sprzężenia spinowo-spinowego to odległość w hercach dwóch linii powstałych w wyniku sprzężenia spinowo-spinowego między jądrami A i B przez n wiązań łączących te jądra.**
- **Bezpośrednie** – sprzężenie dipolowe **D**- stała sprzężenia dipolowego, (efekt Overhausera)
- W cieczach zachodzi szybka izotropowa reorientacja następuje uśrednienia anizotropowych części oddziaływań i nie obserwuje się oddziaływań dipolowych

# Podstawowe cechy sprzężeń spinowo-spinowych

Np.  ${}^2J_{H2,H3}$  [Hz]

- Niezależność od pola magnetycznego.
- Wzajemność.
- Zależność od trwałości kontaktu pomiędzy sprzężonymi jądrami.
- Zależność od momentu magnetycznego jąder.
- W celu umożliwienia porównania stałych sprzężenia różnych par jąder zdefiniowano *zredukowaną stałą sprzężenia*:

$$J_{AB} = (1/h)(\gamma_A/2\pi)(\gamma_B/2\pi)K_{AB}$$

$$J_{XH}/J_{XD} = \gamma_H/\gamma_D = 6,514$$

## Proste reguły interpretacji subtelnej struktury widma

- Dla jąder o spinowej liczbie kwantowej  $I = 1/2$  **multipletowość** wynosi  $n + 1$ , przy czym  $n$  jest liczbą jąder w grupie sąsiedniej. Jeżeli w sąsiedztwie jest kilka grup różniących się przesunięciem chemicznym, to trzeba je rozpatrywać oddzielnie, przy czym przyjęta kolejność nie wpływa na wynik końcowy. Jeśli zatem jądro  $H_M$  sąsiaduje z dwoma różnymi chemicznie jądrami  $H_A$  i  $H_X$ , to jego sygnał rozpada się na dublet dubletów. Tryplet wystąpi tylko wtedy, gdy przypadkowo  $J_{AM} = J_{MX}$ .
- Odległości linii (w hercach) odpowiadają stałej sprzężenia.
- Względne natężenia linii multipletu mają się do siebie jak współczynniki dwumianu:

$$1 : \frac{n}{1} : \frac{n(n-1)}{2 \cdot 1} : \frac{n(n-1)(n-2)}{3 \cdot 2 \cdot 1} \dots$$



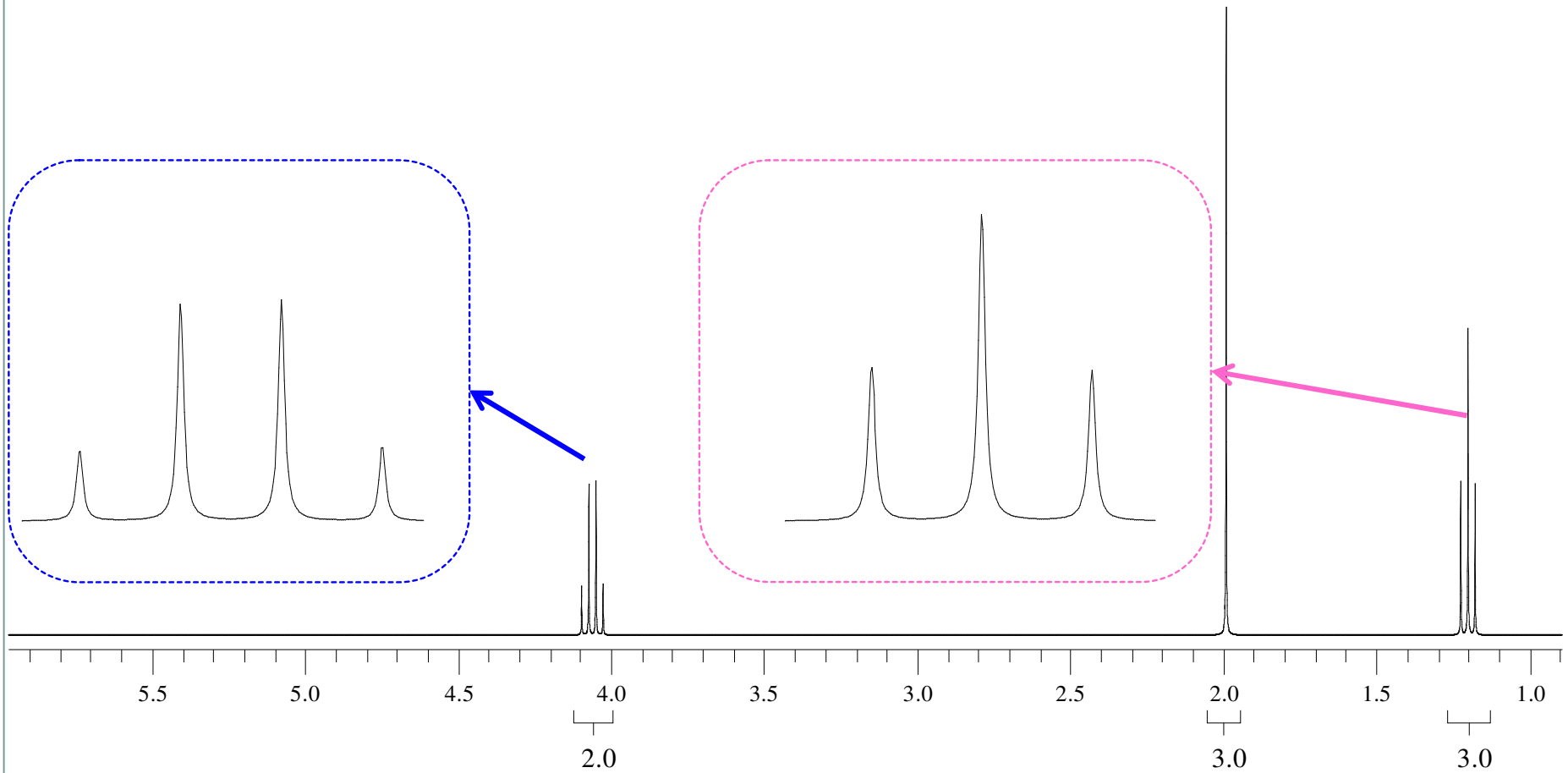
# Proste reguły interpretacji subtelnej struktury widma

## Trójkąt Pascala:

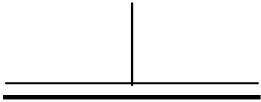
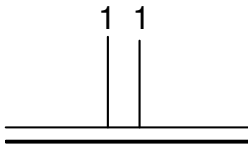
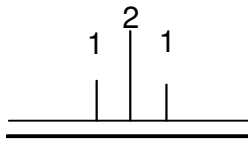
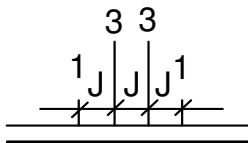

<b>n = 0</b>												
<b>1</b>						<b>1</b>						
<b>2</b>					<b>1</b>		<b>2</b>		<b>1</b>			
<b>3</b>				<b>1</b>		<b>3</b>		<b>3</b>		<b>1</b>		
<b>4</b>			<b>1</b>		<b>4</b>		<b>6</b>		<b>4</b>		<b>1</b>	
<b>5</b>	<b>1</b>			<b>5</b>		<b>10</b>		<b>10</b>		<b>5</b>		<b>1</b>

- Wartość stałej sprzężenia maleje na ogół ze wzrostem odległości między jądrami. Gdy wielkość rozszczepienia stanie się porównywalna z naturalną szerokością linii, sprzężenie znika.
- Typ rozszczepienia nie zależy od znaku stałej sprzężenia. Trzeba go więc określać innymi metodami.

# $^1\text{H}$ NMR

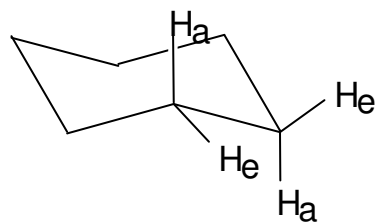
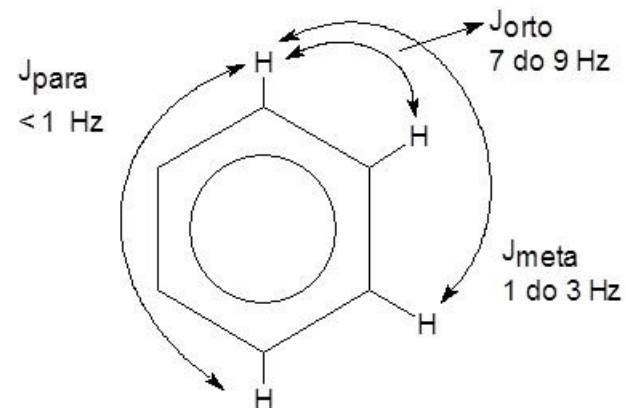
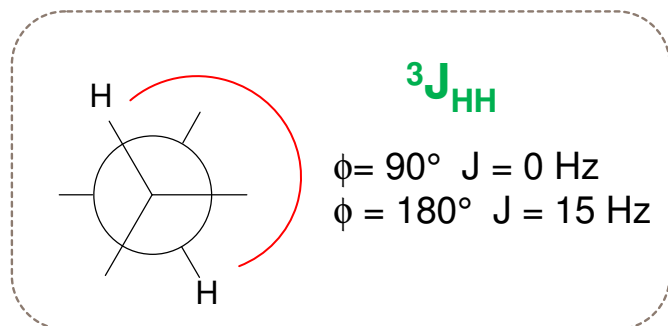


## MULTIPLIOWOŚĆ (krotność) SYGNAŁÓW ( $2nI+1$ )

Typ układu Spinowego Notacja Pople'a	Wygląd widma protonów <b>A</b>	Nazwa (multiplet)	Przykład
$A_3$		singlet (s)	$CH_3I$
$A_3X$		dublet (d)	$CH_3CHO$
$A_3X_2$		tryplet (t)	$CH_3CH_2OR$
$A_2X_3$		kwartet (q)	$CH_3CH_2OH$
$AX_6$		septet	$CH_3CHICH_3$

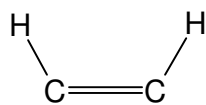
# STAŁE SPRZĘŻENIA SPINOWO-SPINOWEGO

$^3J$  – wicynalne;  $^2J$  – geminalne



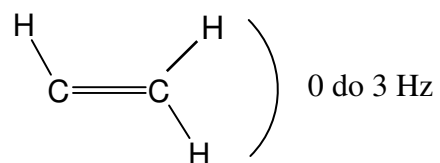
$$^3J_{a,a} = 7 \text{ do } 9 \text{ Hz}$$

$$^3J_{a,e} \sim ^3J_{e,e} = 2 \text{ do } 5 \text{ Hz}$$



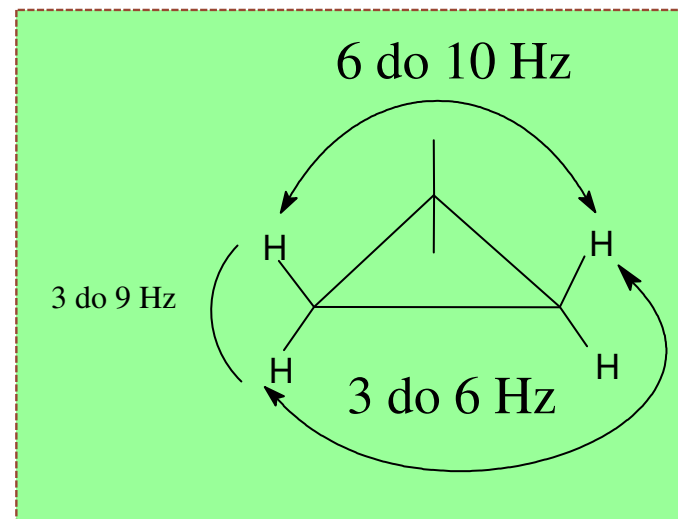
$$^3J_{cis} = 6 \text{ do } 14 \text{ Hz}$$

zwykle ~ 10 Hz



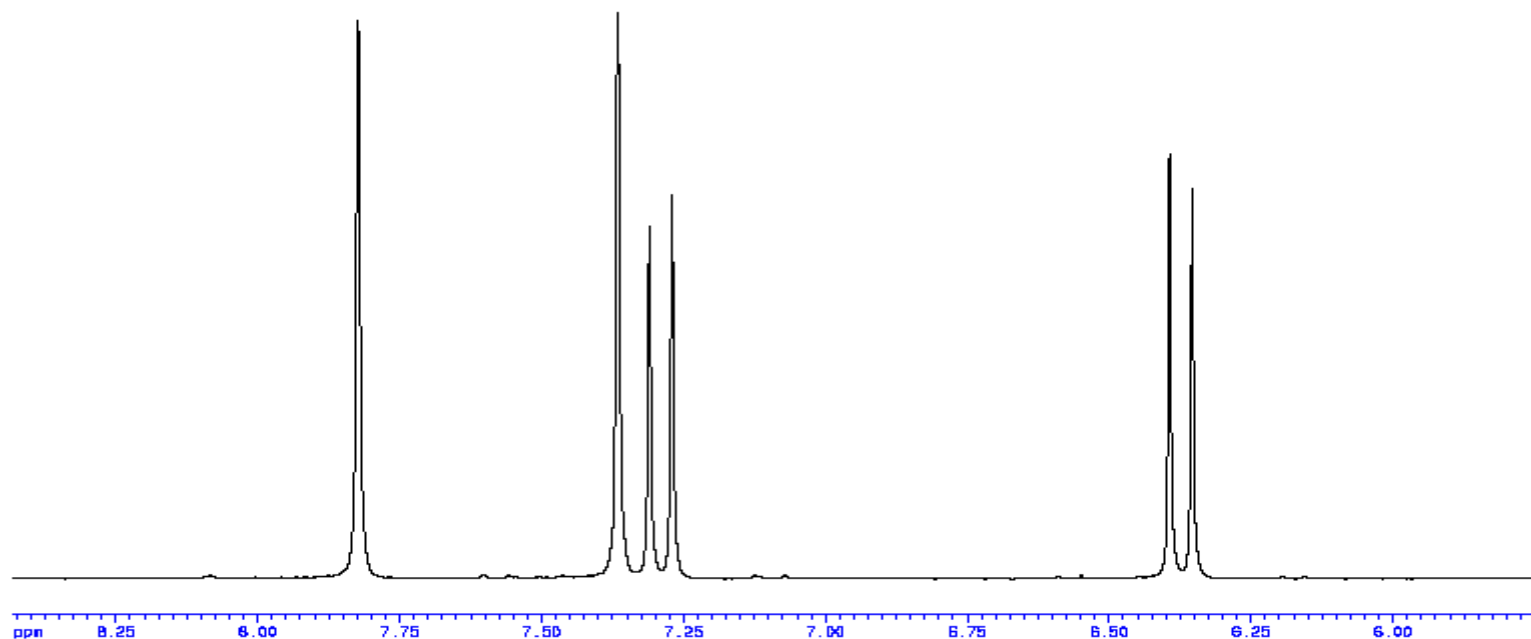
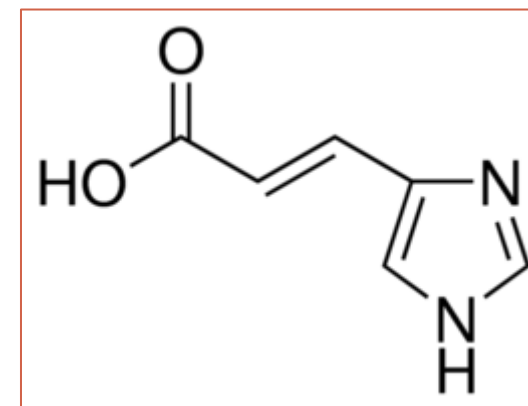
$$^3J_{trans} = 14 \text{ do } 20 \text{ Hz}$$

zwykle ~ 16 Hz



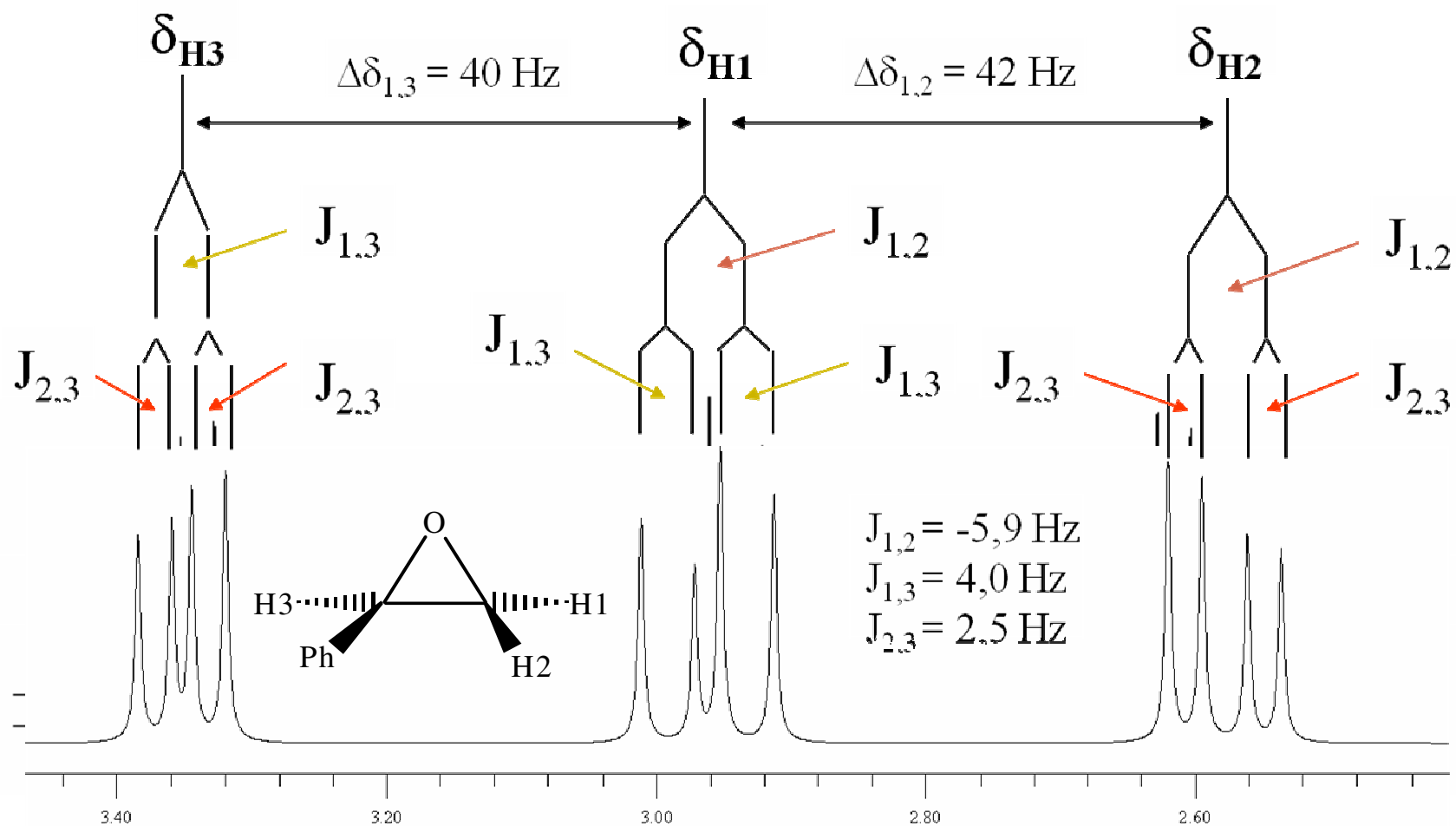
pik	$\delta$ /ppm	Intensywność
1	7.823	171406
2	7.366	181272
3	7.310	109783
4	7.270	119712
5	6.394	134046
6	6.354	122984

proton	$\delta$ /ppm
1	7.823
2	7.365
3	7.289
4	6.371
	J/Hz
	16 (trans)



1H NMR, 400MHz, D<sub>2</sub>O, pH 7,4 (bufor fosforanowy)  
Kwas urokanowy w chorobie Kwashiorkor

# UKŁAD SPINOWY AMX



$^1\text{H NMR (CDCl}_3\text{): 2,56 (dd, 1H, H}_2, ^2J_{H_1, H_2} = -5,9 \text{ Hz, } ^3J_{H_3, H_2} = 2,5 \text{ Hz}), 2,96 (dd, 1H, H_1,$   
 $^2J_{H_1, H_2} = -5,9 \text{ Hz, } ^3J_{H_3, H_1} = 4,0 \text{ Hz}), 3,35 (dd, 1H, H_3, ^3J_{H_3, H_1} = 4,0 \text{ Hz, } ^3J_{H_3, H_2} = 2,5 \text{ Hz})$

## Granice stosowalności prostych reguł rozszczepienia

- Sprzężenie spinowo-spinowe pomiędzy jądrami równocernnymi magnetycznie nie uwidocznia się w widmie. Termin **równocenne magnetycznie** oznacza jądra o tej samej **częstotliwości rezonansowej** i o tej **samej stałej sprzężenia** z jądrami grup sąsiednich. Jądra **równocenne magnetycznie** są zawsze **równocenne chemicznie**. Równocenność chemiczna jednak nie zawsze pociąga za sobą równocenność magnetyczną. Jądra równocenne magnetycznie określa się także mianem *izochronowych*.
- Sformułowane reguły interpretacji struktury subtelnej widm NMR mają zastosowanie tylko do jąder **równocennych magnetycznie**. Jeżeli istnieje nierównocenność magnetyczna, to nie można już odczytać poszczególnych stałych sprzężenia bezpośrednio z widma.

# Granice stosowalności prostych reguł rozszczepienia

## Znaczenie stosunku $(\nu_i - \nu_j) / J$

- Reguły pierwszego rzędu ograniczają się do przypadków, w których względne przesunięcie chemiczne  $(\nu_i - \nu_j)$  (Hz) sprzęgających się grup magnetycznie równocennych jąder jest duże w stosunku do ich stałej sprzężenia. Mówimy wówczas o **widmie pierwszego rzędu**.
- Jeżeli wartość  $(\nu_i - \nu_j)$  jest tego samego rzędu co  $J$ , to w widmie obserwuje się więcej linii, niż możnaby się spodziewać na podstawie reguł pierwszego rzędu
- Zmienia się wówczas także rozkład natężeń linii w multipletach. Natężenie linii zbliżonych najbardziej do multipletu sprzężonego wzrasta kosztem linii najbardziej oddalonych. Jest to *efekt dachowy*.
- Zwiększona multipletowość i zmieniony rozkład natężeń są więc cechami **widm wyższych rzędów**, które muszą być analizowane metodami dokładnymi.
- na widma wyższych rzędów ma wpływ jeszcze względny znak stałej sprzężenia (jeśli mamy do czynienia z układem większym niż dwuspinowy).



## Nazewnictwo układów spinowych

**W zależności od relacji symetrii między sprzężonymi skalarnie spinami oraz siły sprzężenia, krotności i intensywności składowych multipletów (pojawiających się na skutek sprzężeń skalarnych) przejawiają się w różny sposób- klasyfikacja układów spinowych:**

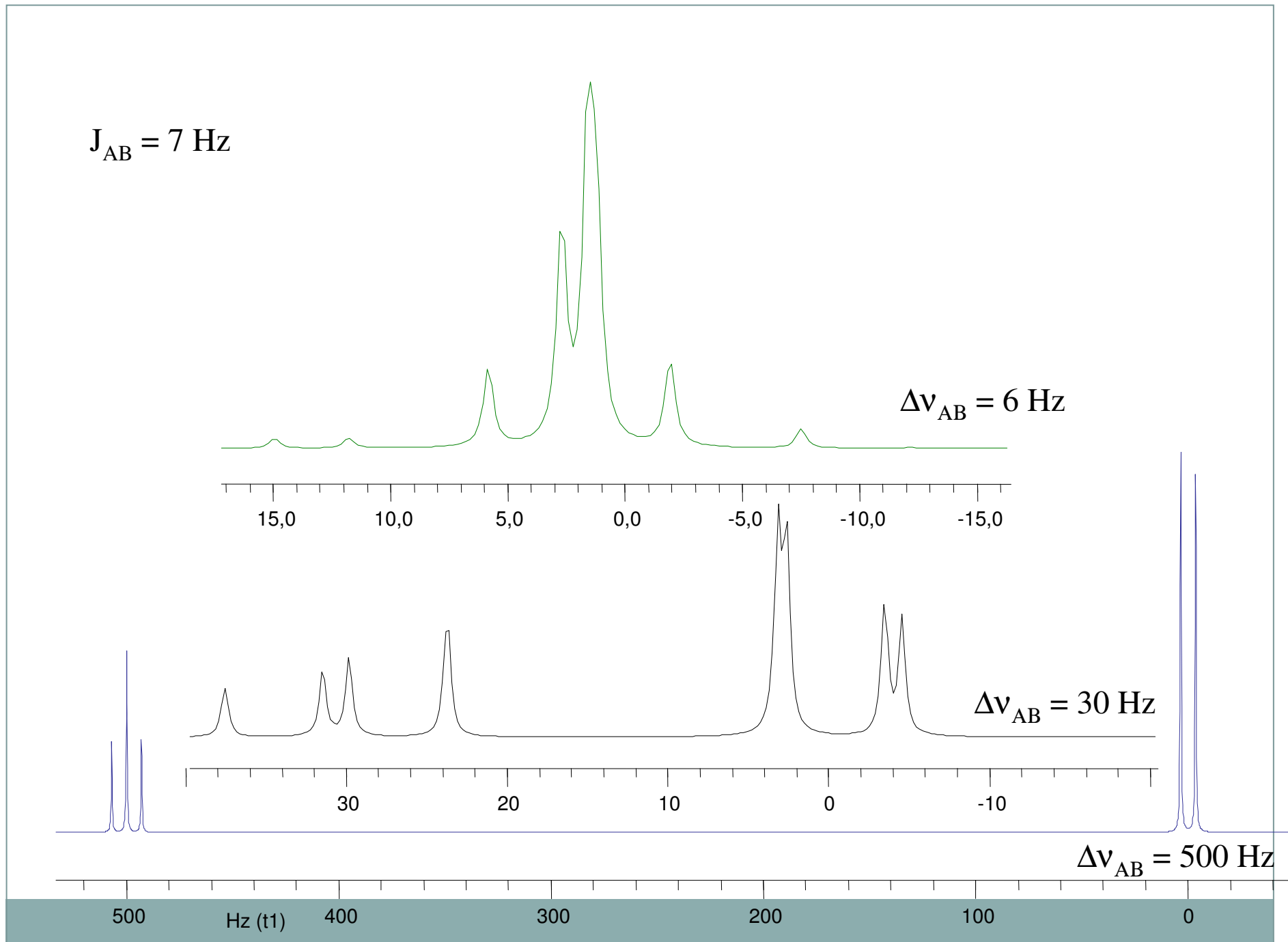
- Grupę  $n$  izochronowych spinów, nie wykazujących nierównocенności sprzężeń spinowych oznaczamy -  $A_n$ .
- Jeśli izochronowe spiny wykazują nierównocенność sprzężeń spinowych, to oznaczane są symbolem  $AA'A''...$
- Grupa anizochronowych spinów, między którymi występują jedynie słabe sprzężenia spinowo-spinowe, są oznaczane odległymi literami alfabetu  $A_k M_l X_m$ .
- Grupy silnie sprzężonych spinów anizochronowych są oznaczone kolejnymi literami alfabetu  $A_k B_l C_m$ .

$J_{AB} = 7 \text{ Hz}$

$\Delta\nu_{AB} = 6 \text{ Hz}$

$\Delta\nu_{AB} = 30 \text{ Hz}$

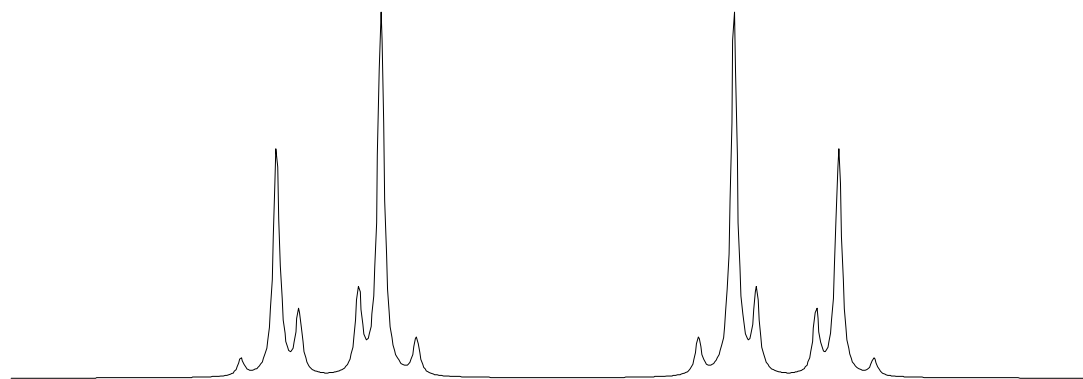
$\Delta\nu_{AB} = 500 \text{ Hz}$



# UKŁADY SPINOWE AA'BB' i AA'XX'

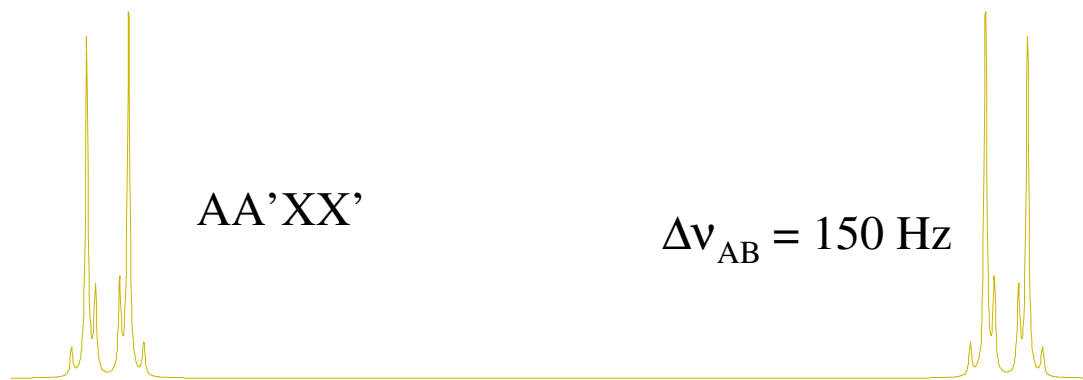
AA'BB'  
24 linie spektralne

$$\Delta\nu_{AB} = 5 \text{ Hz}$$
$$J_{AB} = 7 \text{ Hz}$$



AA'XX'

$$\Delta\nu_{AB} = 150 \text{ Hz}$$



8,00

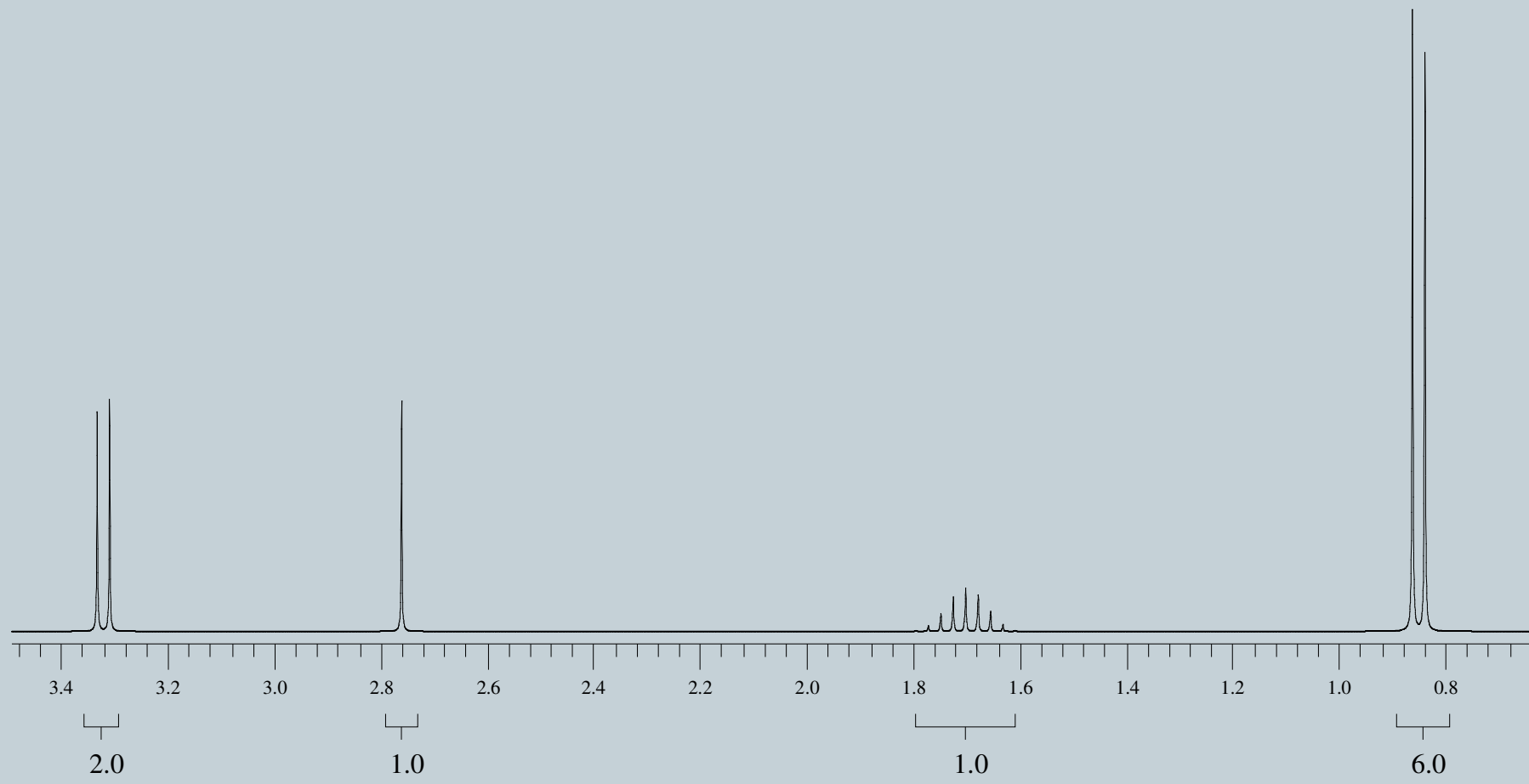
7,90

7,80

7,70

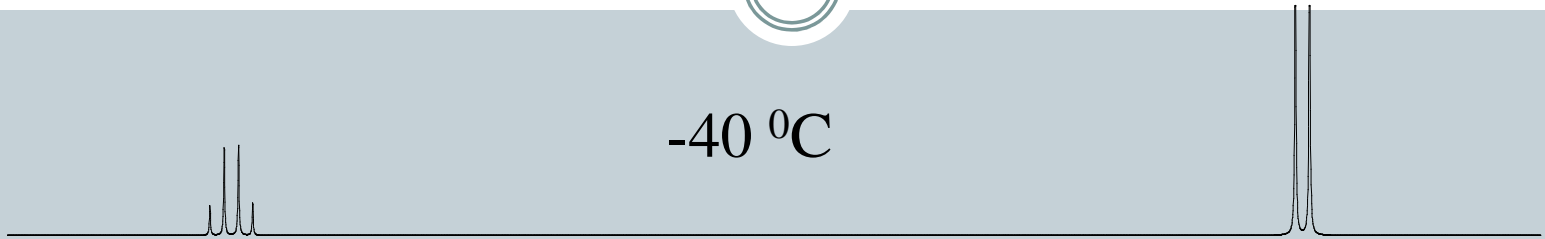
7,60

7,50

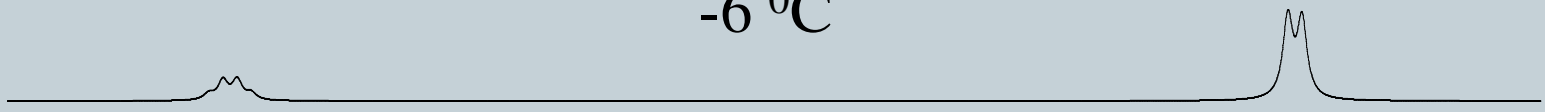




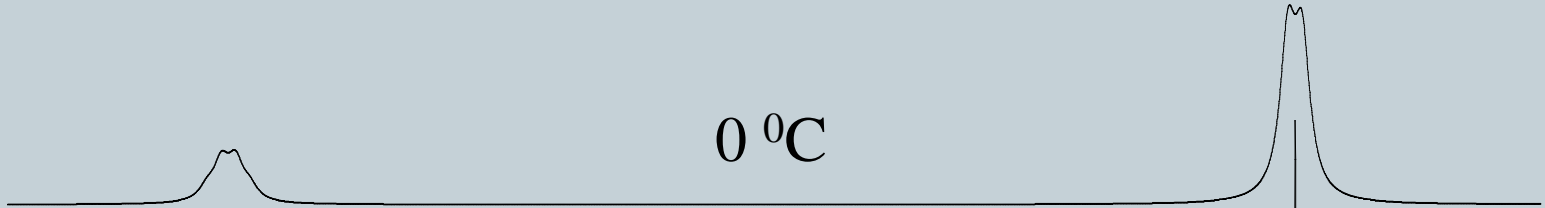
-40 °C



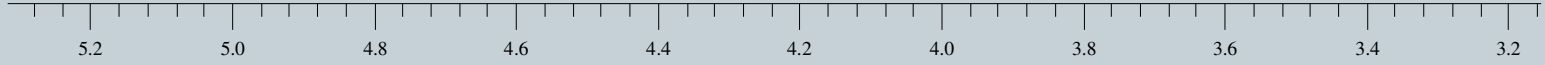
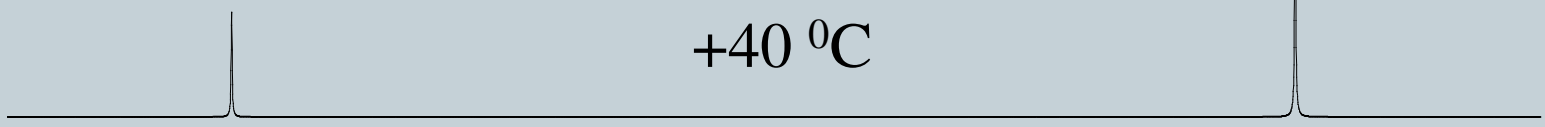
-6 °C



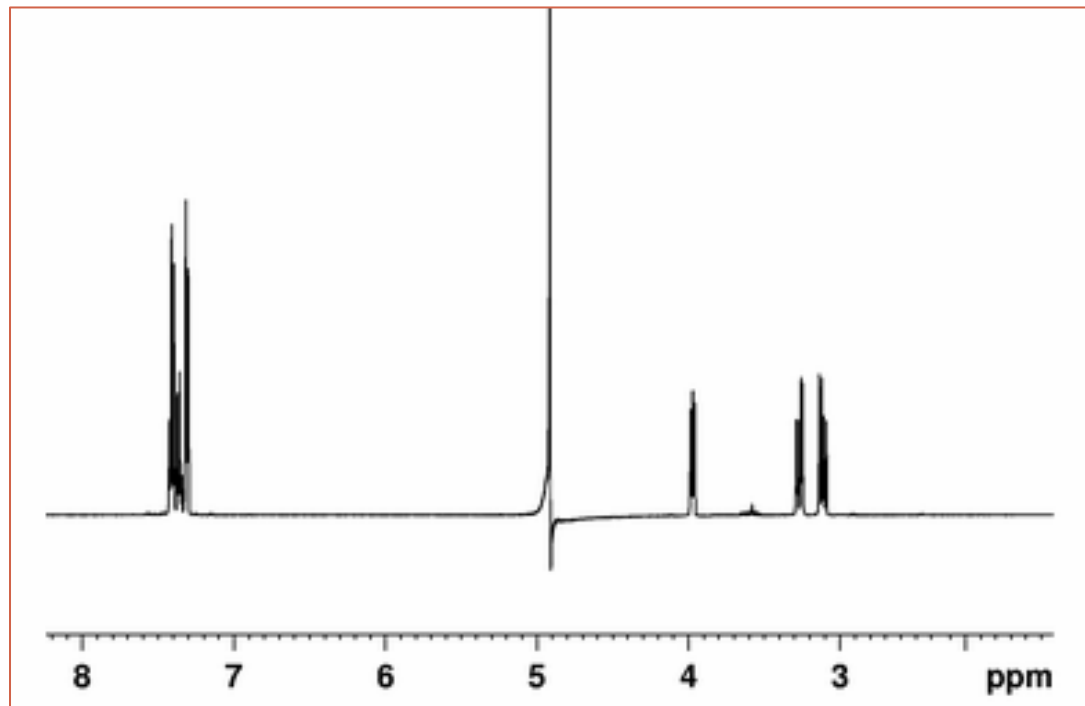
0 °C



+40 °C

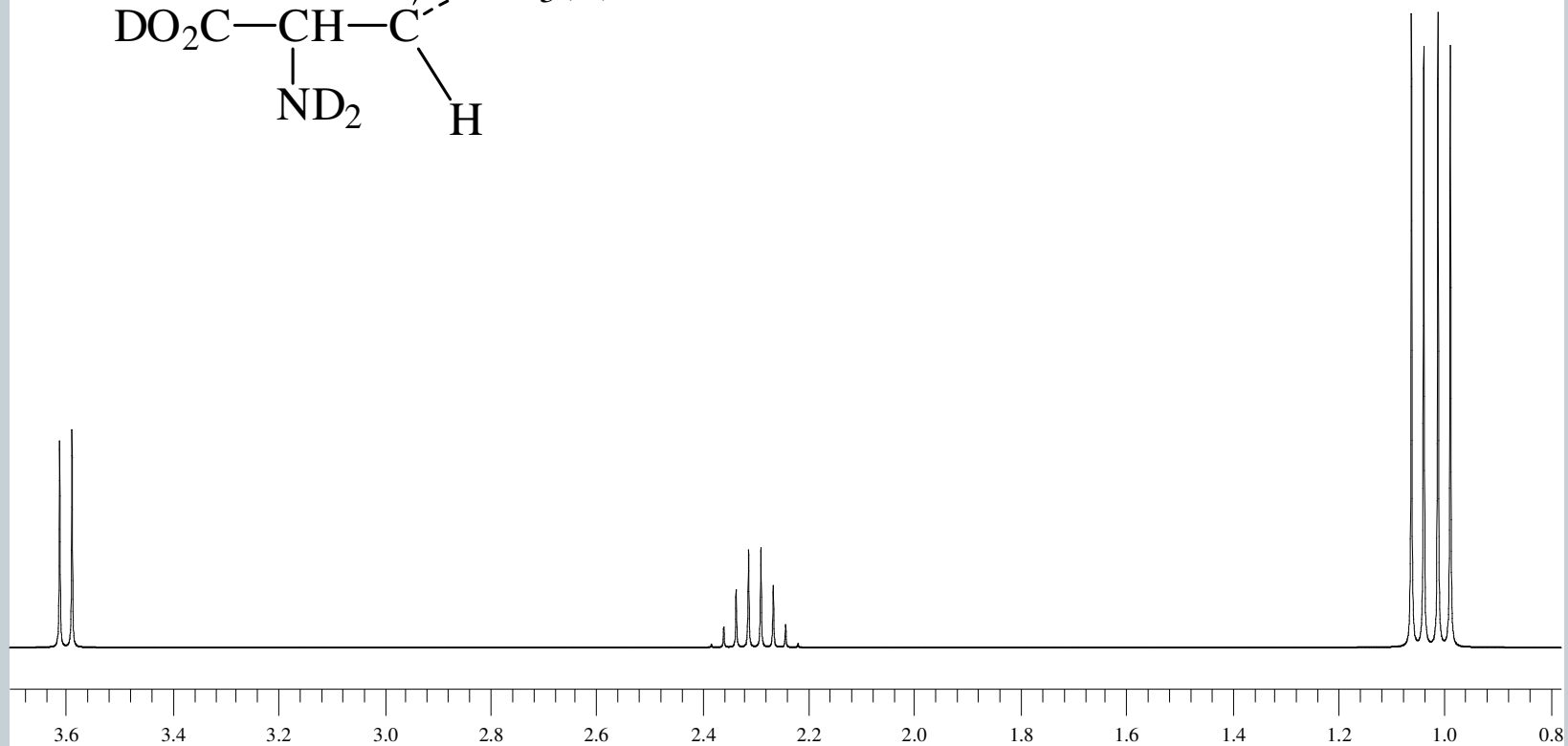
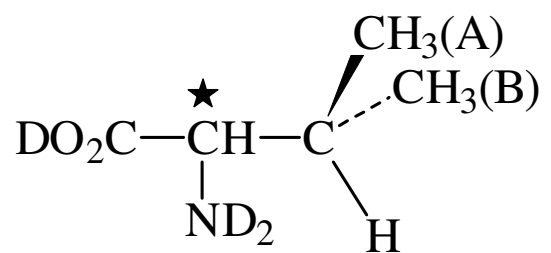


## PODSTAWNIKI DIASTEREOTOPOWE



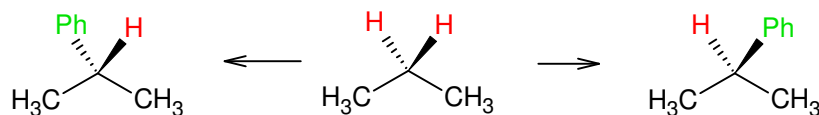
# PODSTAWNIKI DIASTEREOTOPOWE

walina



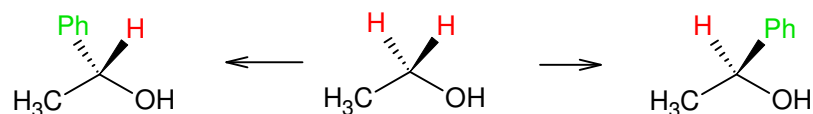
## Kryterium symetrii i kryterium podstawienia

- Jądra **homotopowe** – oś  $C_n$



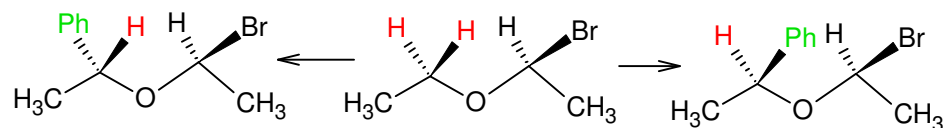
Podstawienie daje  
identyczne cząsteczki

- Jądra **enantiotopowe** – płaszczyzna symetrii ( $\sigma$ ) lub środek symetrii ( $i$ )



Podstawienie daje  
enantjomery

- Jądra **diastereotopowe** – brak wymiany przez operację symetrii



Podstawienie daje  
diastereoizomery



# Określanie składu mieszanin

