

# NMR e Biologia strutturale

Forza di Lorentz  $\vec{F} = q\vec{v} \times \vec{B}$

Legge di Biot-Savart  $\mathbf{B} = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int \frac{d\ell \times \hat{\mathbf{r}}}{r^2},$

Legge di Ampère  $\oint \mathbf{B} \cdot d\ell = \mu_0 I_{\text{enc}},$

# Magnetismo

- Il magnetismo è una proprietà della materia
- Generato da cariche in movimento, come elettroni
- Le proprietà magnetiche della materia derivano dall'organizzazione e dal movimento degli elettroni attraverso l'allineamento casuale o non casuale dei domini magnetici.

# Suscettibilità Magnetica

- La suscettibilità magnetica descrive la capacità ed il modo per cui un materiale si magnetizza quando piazzato in un campo magnetico
- *Materiali Diamagnetici* hanno suscettibilità magnetica negativa e si oppongono al campo magnetico applicato
  - Per esempio calcio, acqua e materiali organici.

# Suscettibilità Magnetica

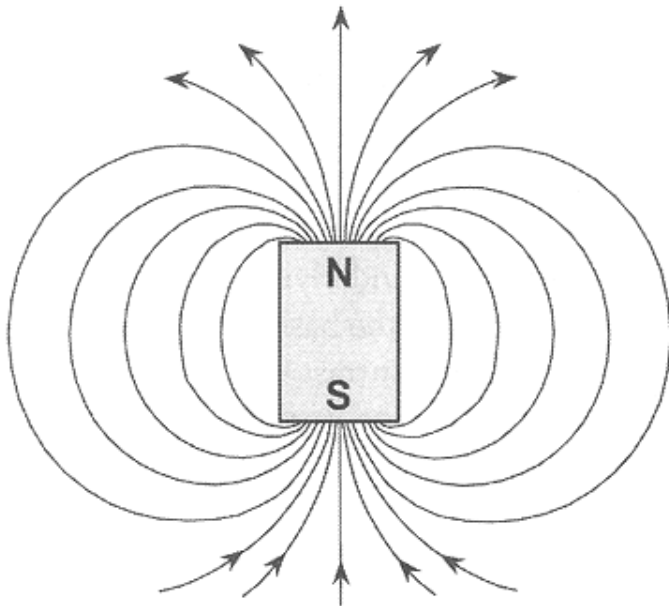
- *Materiali Paramagnetici* hanno una suscettibilità leggermente positiva e aumentano il campo magnetico, ma non hanno un magnetismo intrinseco
  - Per esempio ossigeno molecolare ( $O_2$ ) e agenti di contrasto a base di gadolinio
- *I materiali ferromagnetici* aumentano sensibilmente il campo magnetico esterno; può esibire magnetismo interno in molti casi
  - Per esempio ferro, cobalto e nickel.

# Campi magnetici

- Campi magnetici hanno due poli
- Poli opposti si attraggono e poli simili si attraggono.
- L' *intensità del campo magnetico*,  $B$ , può essere pensato come il numero di linee magnetiche di forza per unità d'area
- Il campo magnetico si misura in tesla (T) nel sistema internazionale; unità alternativa è il gauss (G), where  $1 \text{ T} = 10,000 \text{ G}$

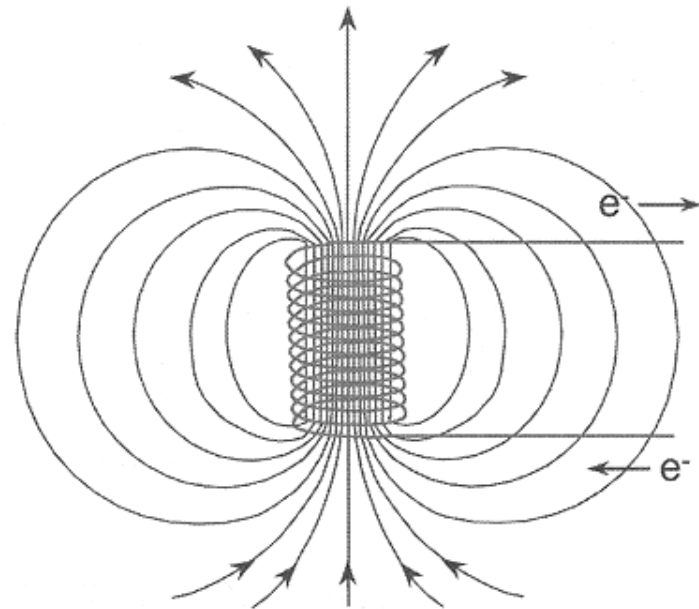
# Campi magnetici da una spira

Bar magnet



A

Current-carrying coiled wire

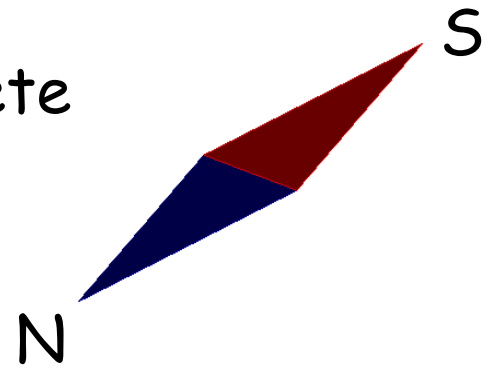


B

Legge di Biot-Savart  $\mathbf{B} = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int \frac{d\boldsymbol{\ell} \times \hat{\mathbf{r}}}{r^2},$

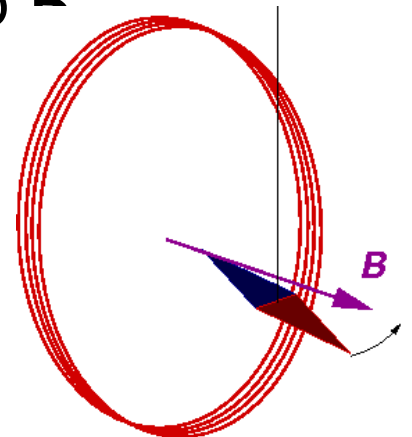
La corrente che passa per un filo devia l'ago della bussola

L'ago e' un piccolo magnete



La corrente produce un campo magnetico  $B$  intorno a se'

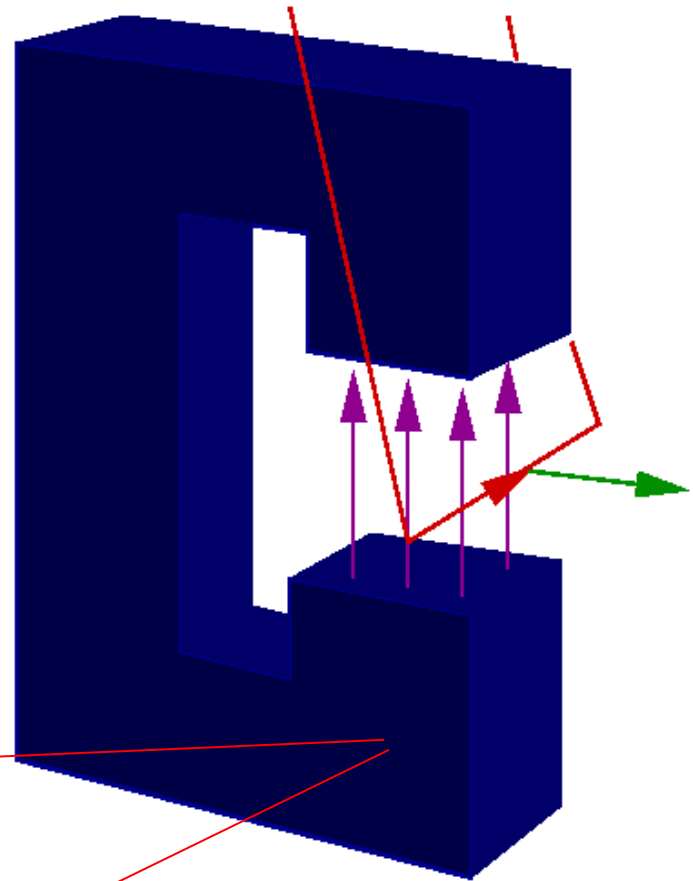
L'ago si allinea lungo il campo magnetico  $B$



Le correnti esercitano una forza sugli aghi magnetici

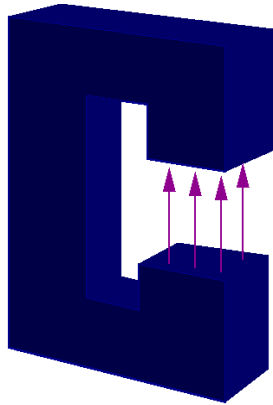
I magneti (**B**) esercitano una forza sulle correnti

Anche il campo del magnete e' dovuto a microcorrenti: quelle degli atomi (ad esempio del ferro)





i campi magnetici sono  
l'effetto di correnti

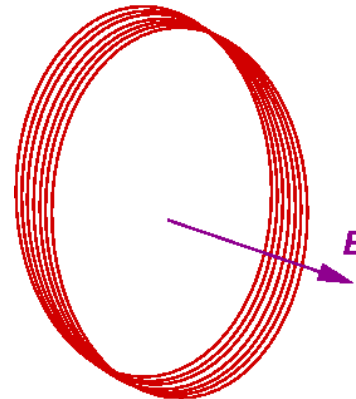


oppure  
2) correnti elevatissime  
e molte spire

Per ottenere  $B$  intensi:

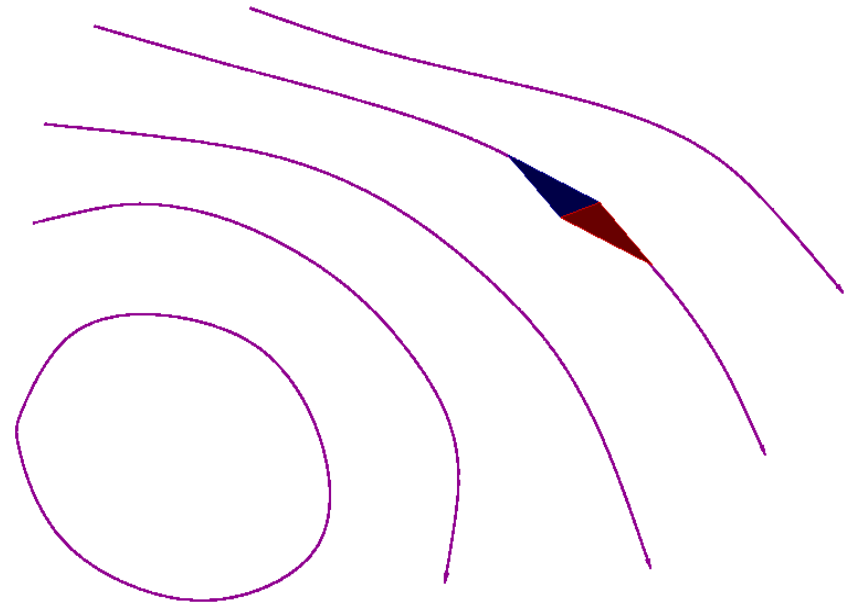
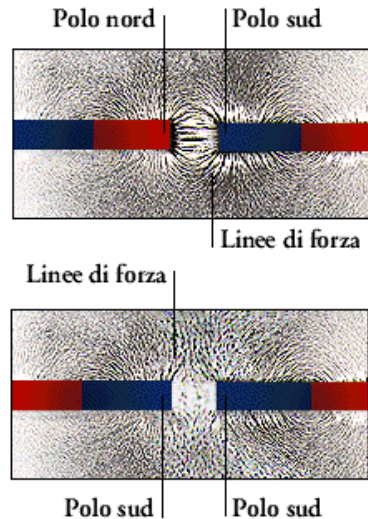
1) Materiali magnetici

$$B_{\max} \sim 2T \sim 30000 \text{ volte } B_{\text{terra}}$$



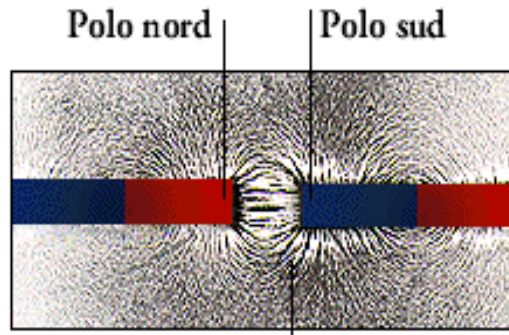
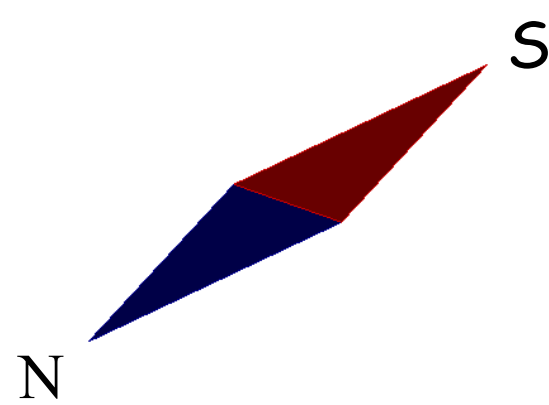
# Cosa e' il campo magnetico?

le curve immaginarie  
(linee di forza)  
lungo cui si allineano  
gli aghi magnetici delle  
bussole



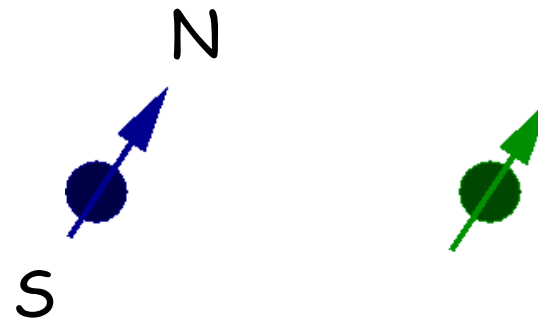
limatura come  
piccoli aghetti

Aghi sempre piu`  
piccoli

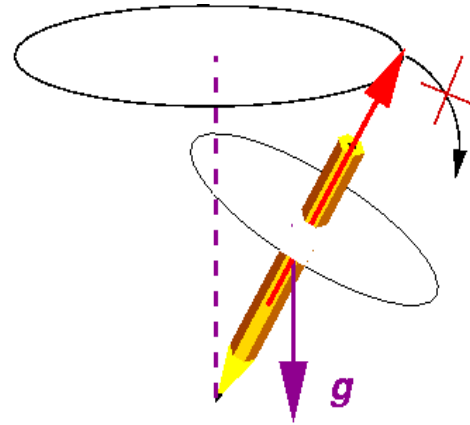
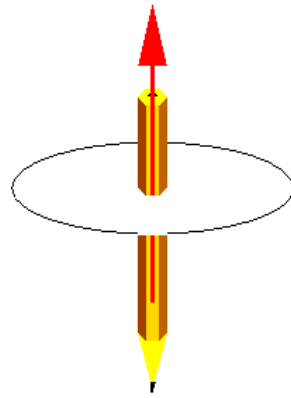


la limatura di ferro

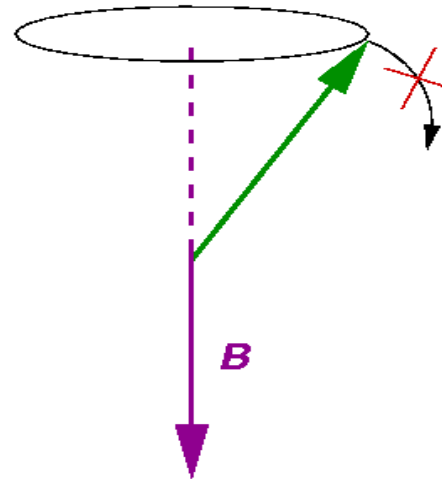
aghi femtoscopici:  
lo spin dei nuclei  
dell'atomo di idrogeno  
(i protoni,  $^1\text{H}$ )



# La precessione, ovvero non sempre gli aghi si allineano

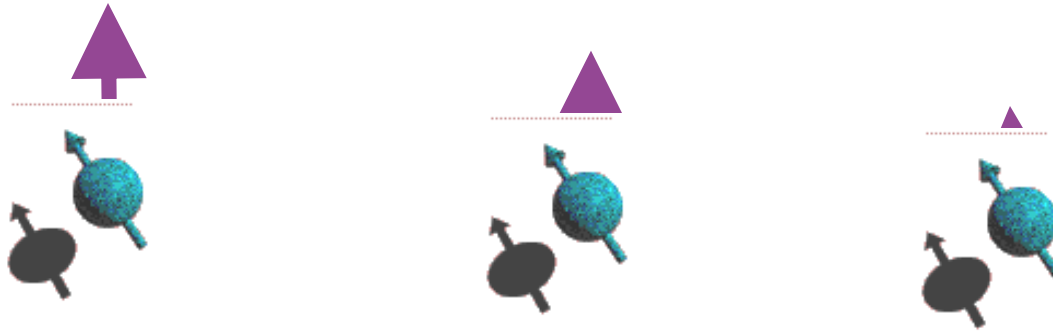


Trottola: il momento angolare precede attorno a  $g$



protoni ( $^1\text{H}$ ): lo spin precede attorno a  $B$

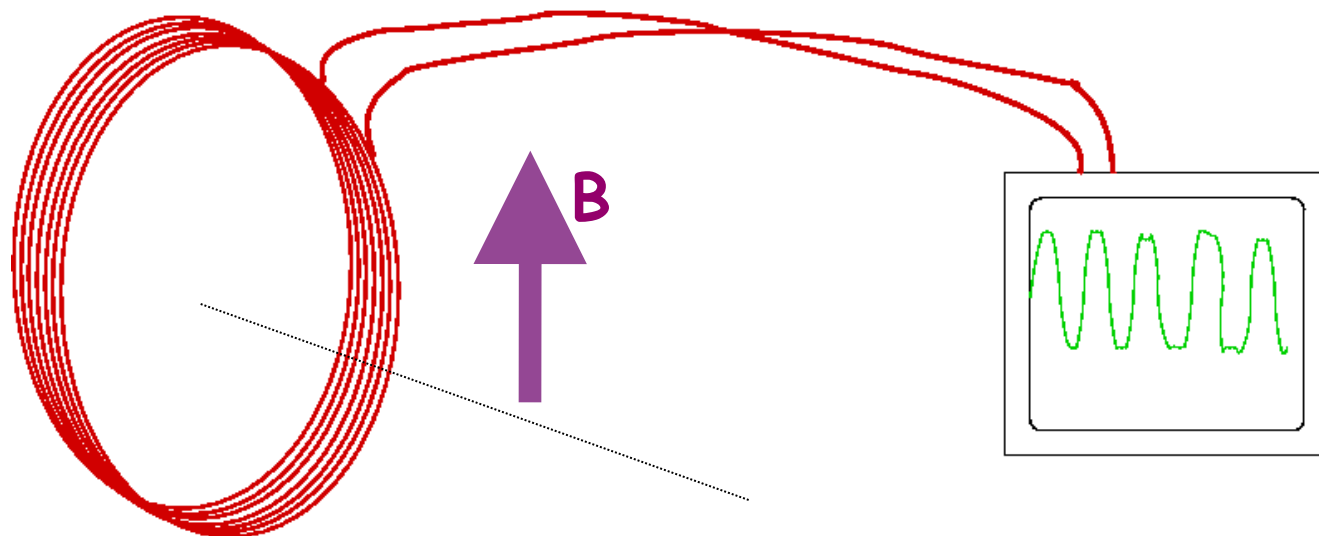
La frequenza di precessione è regolata dal campo magnetico



$$\omega = \gamma B$$

Precessione di  
Larmor

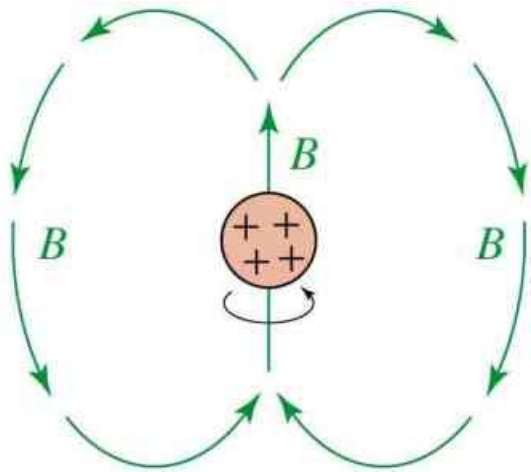
# Legge di Faraday



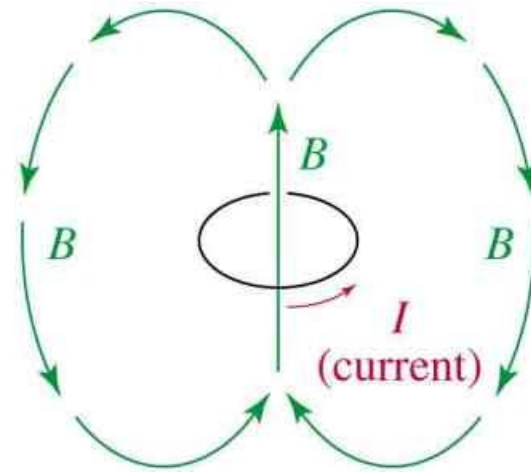
bobine di ricezione

# Spin nucleare

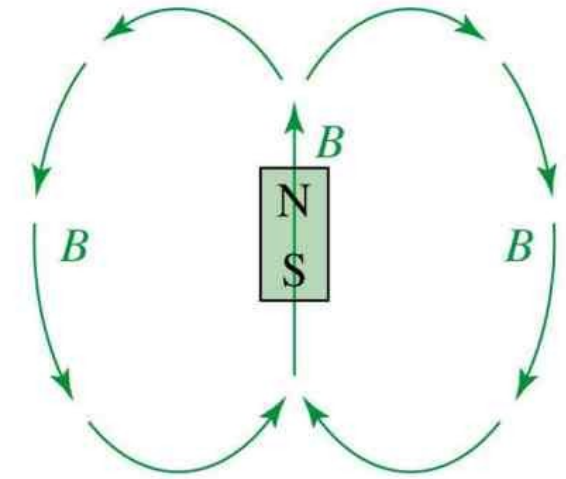
- Un nucleo con un numero atomico dispari ha uno spin nucleare.
- Il nucleo caricato di spin genera un campo magnetico.



spinning proton



loop of current

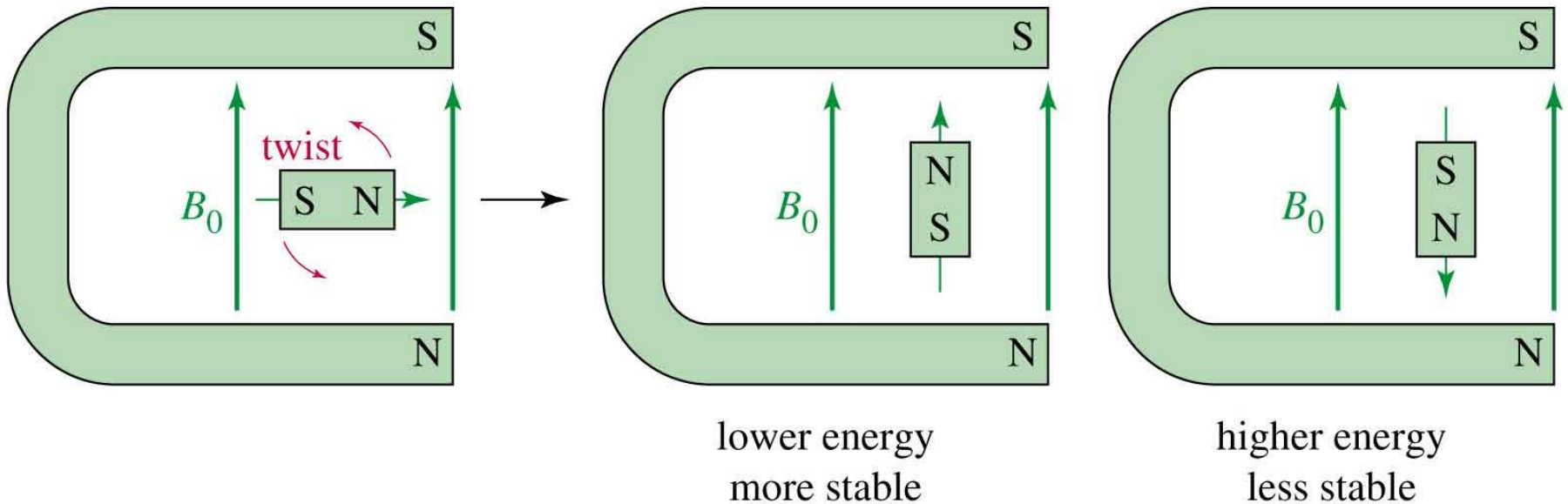


bar magnet



# Campo magnetico esterno

In un campo magnetico gli spin dei protoni si comportano come barre magnetiche.



=>

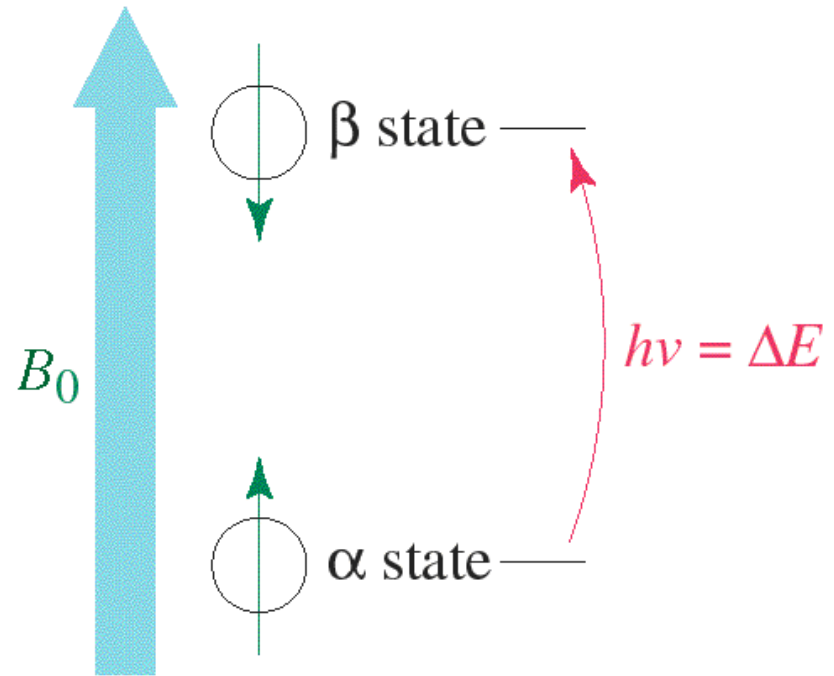


# Due stati energetici

I campi magnetici dello spin del nucleo si allineano con il campo magnetico o contro il campo.

Un fotone con la giusta energia può essere assorbito e causare il cambio di spin del protone.

=>



# $\Delta E$ e forza del magnete

- La differenza di energia è proporzionale al campo magnetico.
- $$\Delta E = h \nu = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi}$$
- Rapporto giromagnetico,  $\gamma$ , è tipico per ogni tipo di nucleo (26,753 s<sup>-1</sup>gauss<sup>-1</sup> for H).
- In un campo di 14,092 gauss, un fotone di 60 MHz “gira” il protone.
- Bassa energia, radio frequenza.

# Caratteristiche magnetiche del nucleo

- Il nucleo esibisce caratteristiche magnetiche su una scala molto minore.
- Proprietà magnetiche sono influenzate dalla distribuzione di carica e di spin del protone e del neutrone
- Lo “spin” nucleare del protone, che ha una una carica positiva, produce un dipolo magnetico
- I neutroni hanno un campo magnetico di direzione opposta e approssimativamente della stessa intensità del protone
- Il *momento magnetico* descrive il campo magnetico caratteristico del nucleo

# Proprietà di risonanza magnetica di nuclei utili

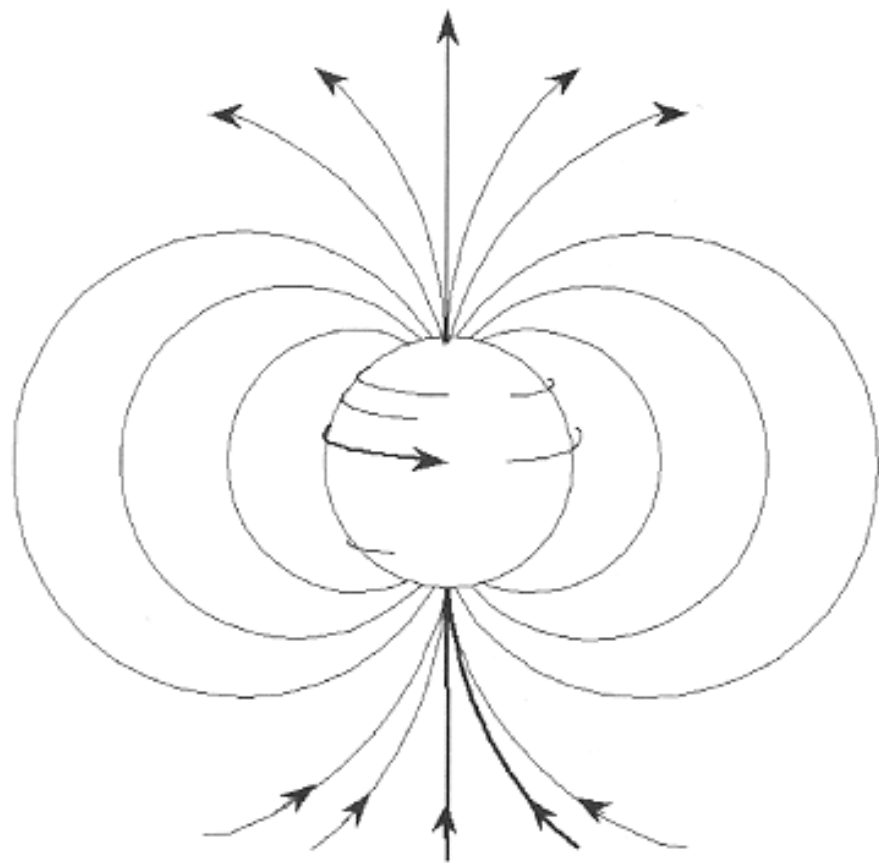
| Nucleus          | Spin Quantum Number | % Isotopic Abundance | Magnetic Moment | Relative Physiologic Concentration* | Relative Sensitivity |
|------------------|---------------------|----------------------|-----------------|-------------------------------------|----------------------|
| $^1\text{H}$     | $\frac{1}{2}$       | 99.98                | 2.79            | 100                                 | 1                    |
| $^{16}\text{O}$  | 0                   | 99.0                 | 0               | 50                                  | 0                    |
| $^{17}\text{O}$  | $\frac{5}{2}$       | 0.04                 | 1.89            | 50                                  | $9 \times 10^{-6}$   |
| $^{19}\text{F}$  | $\frac{1}{2}$       | 100                  | 2.63            | $4 \times 10^{-6}$                  | $3 \times 10^{-8}$   |
| $^{23}\text{Na}$ | $\frac{3}{2}$       | 100                  | 2.22            | $8 \times 10^{-2}$                  | $1 \times 10^{-4}$   |
| $^{31}\text{P}$  | $\frac{1}{2}$       | 100                  | 1.13            | $7.5 \times 10^{-2}$                | $6 \times 10^{-5}$   |

\*Note: all isotopes of a given element.

# Caratteristiche magnetiche nucleari degli elementi

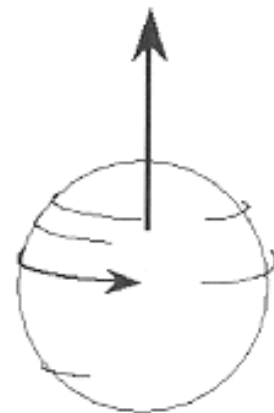
- Idrogeno, ha il momento magnetico più grande e molto abbondante.
- Il protone è l'elemento principale usato per l'imaging di risonanza magnetica
- Lo spin del protone è classicamente considerato come una barra magnetica con polo nord e sud
- Una rappresentazione vettoriale (con ampiezza e direzione) è utile per considerare gli effetti additivi di molti protoni.

Spinning proton with  
dipole magnetic field



A

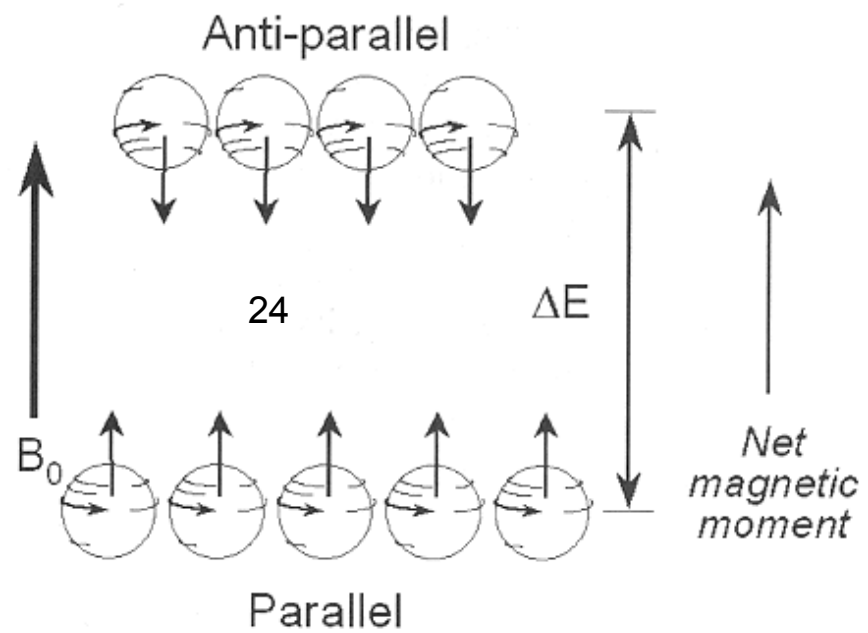
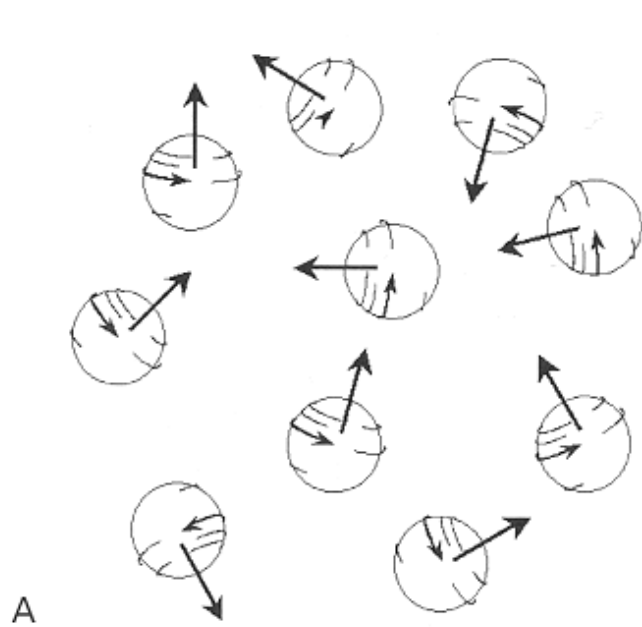
Corresponding  
"magnetic moment"



B

# Effetti del campo magnetico esterno

- Sotto l'influenza di un forte campo magnetico,  $B_0$ , gli spin sono distribuiti in due stati energetici
  - Allineamento lungo il campo magnetico applicato a livello energetico basso
  - Allineamento opposto al campo magnetico a livelli leggermente più alti



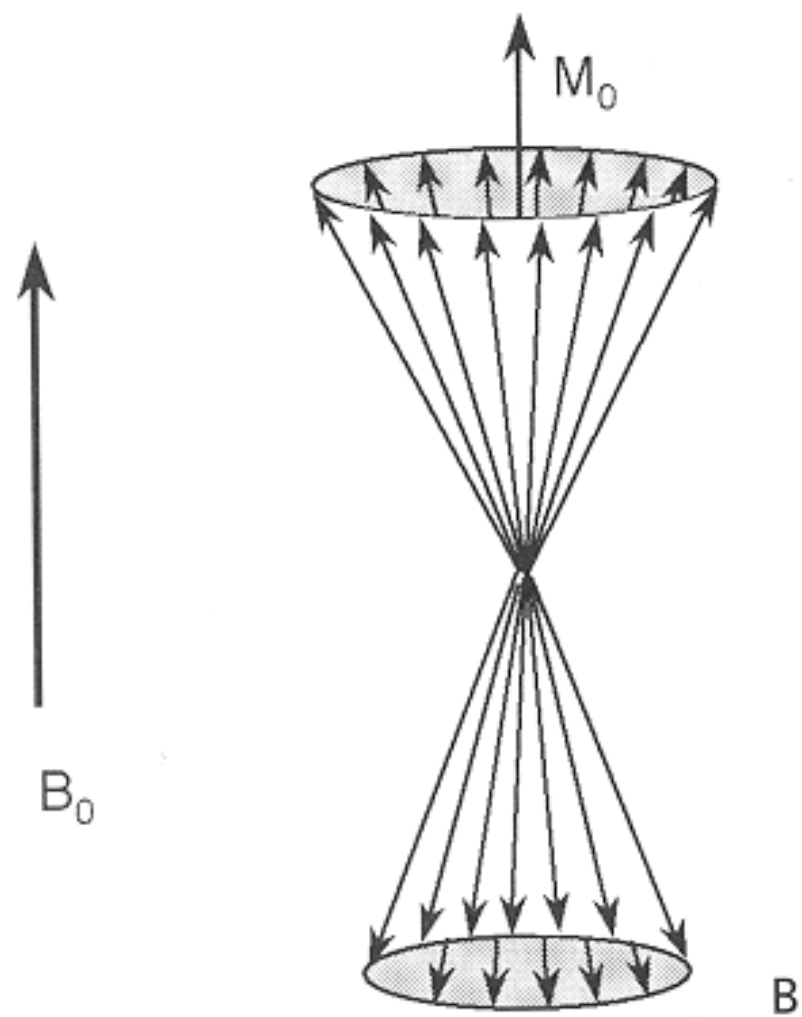
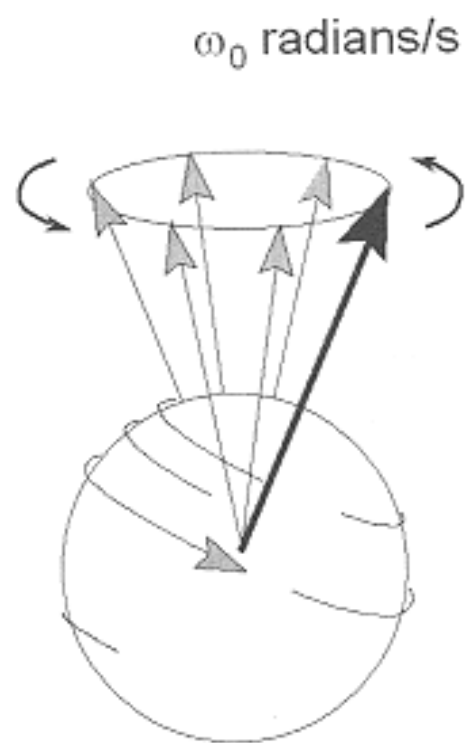


# Frequenza di Larmor

- I protoni subiscono anche una torsione dal campo magnetico applicato che causa una precessione, come una trottola oscilla a causa della forza di gravità
- La precessione accade a frequenze angolari (rotations/sec circa un asse di rotazione) che è proporzionale a  $B_0$
- L' *equazione di Larmor* descrive la relazione:

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

$$f_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$



# Rapporto giromagnetico dei nuclei più usati nella risonanza magnetica

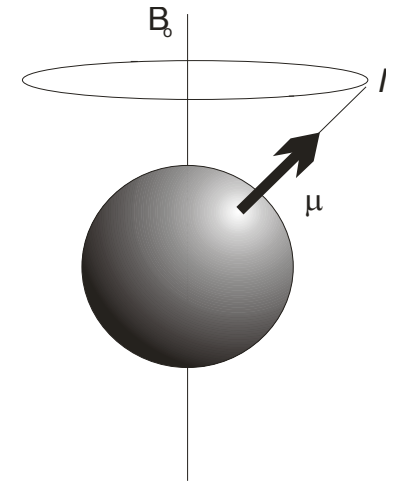
| Nucleus          | $\gamma/2\pi$ (MHz/T) |
|------------------|-----------------------|
| $^1\text{H}$     | 42.58                 |
| $^{13}\text{C}$  | 10.7                  |
| $^{17}\text{O}$  | 5.8                   |
| $^{19}\text{F}$  | 40.0                  |
| $^{23}\text{Na}$ | 11.3                  |
| $^{31}\text{P}$  | 17.2                  |

# I principi fisici dietro l'NMR

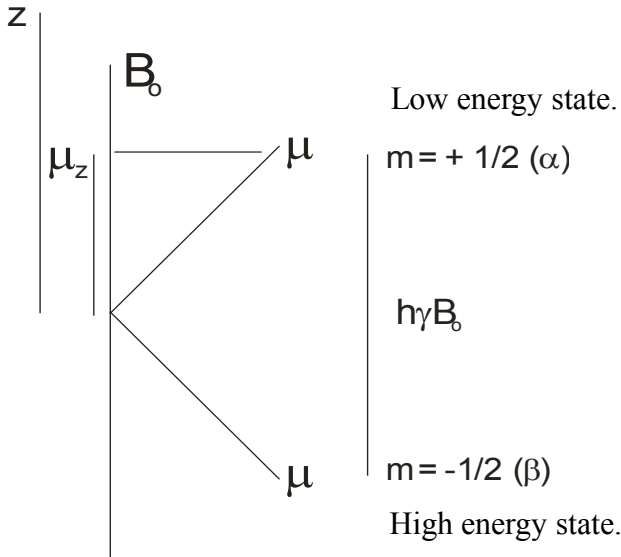
Quantization of nuclear spin,  $m$

Energy of separation  $\Delta E = -m\hbar\gamma B_0$

$$I_z = m\hbar$$

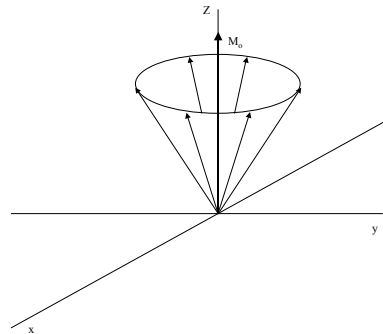


dove  $m = -1/2, 1/2$  e  $I_z$  è il **momento angolare del nucleo**. Definiamo una quantità chiamata momento magnetico,  $\mu$ , che è legato ad  $I$  da una costante  $\gamma$ , il rapporto giromagnetico. L'interazione di  $\mu$  con un campo magnetico induce  $\mu$  a ruotare (precede) attorno al campo magnetico ( $B_0$ ).



## Magnetizzazione d'equilibrio

Quando mettiamo il campione nel magnete, gli spin precedono attorno all'asse Z in modo casuale. Se li sommiamo tutti, si cancellano in modo che non ci sia segnale netto nel campione. La maggior parte della popolazione è nello stato di bassa energia.



## Rapporto giromagnetico ( $\gamma$ )

- Relativo alla sensibilità del segnale NMR
- Momento magnetico ( $\mu$ ) è creato lungo l'asse dello spin nucleare

$$\mu = \gamma p$$

$$\gamma = \frac{2\pi}{h} \frac{\mu}{I} = \frac{\mu}{\hbar I}$$

dove:

$p$  – momento angolare

$\gamma$  – rapporto giromagnetico (valore diverso per ogni tipo di nucleo)

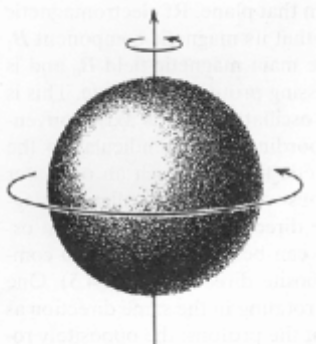
- Momento magnetico è quantizzato ( $m$ )

$$m = I, I-1, I-2, \dots, -I$$

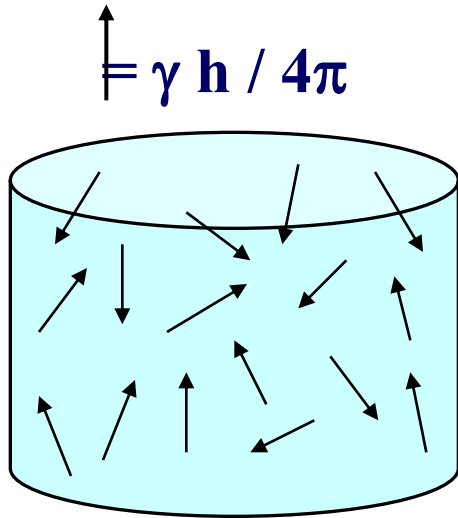
*generalmente:*

$$m = +\frac{1}{2} \ \& \ -\frac{1}{2}$$

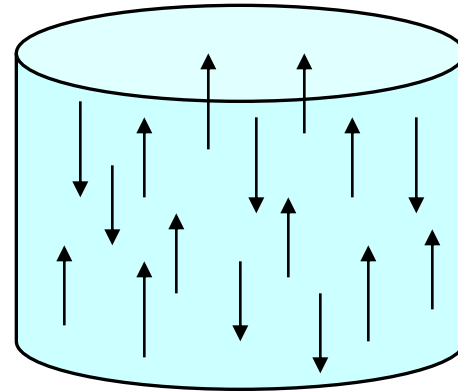
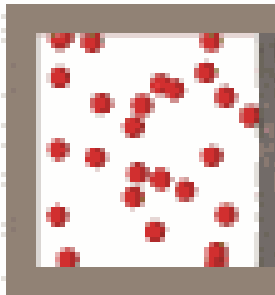
| Isotope          | Net Spin | $\gamma$ / MHz T <sup>-1</sup> | Abundance / % |
|------------------|----------|--------------------------------|---------------|
| <sup>1</sup> H   | 1/2      | 42.58                          | 99.98         |
| <sup>2</sup> H   | 1        | 6.54                           | 0.015         |
| <sup>3</sup> H   | 1/2      | 45.41                          | 0.0           |
| <sup>31</sup> P  | 1/2      | 17.25                          | 100.0         |
| <sup>23</sup> Na | 3/2      | 11.27                          | 100.0         |
| <sup>14</sup> N  | 1        | 3.08                           | 99.63         |
| <sup>15</sup> N  | 1/2      | 4.31                           | 0.37          |
| <sup>13</sup> C  | 1/2      | 10.71                          | 1.108         |
| <sup>19</sup> F  | 1/2      | 40.08                          | 100.0         |



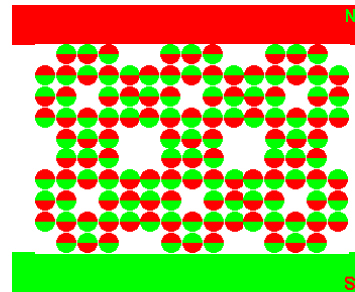
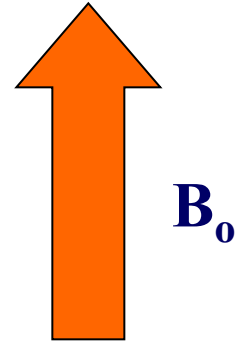
## Allineamento magnetico



In assenza del campo esterno,  
Ogni nucleo è energeticamente degenere



Aggiungiamo un forte campo esterno ( $B_0$ ) e il  
momento magnetico nucleare si allinea:  
Lungo il campo (bassa energia)  
In verso opposto al campo (alta energia)



# *Orientazione degli spin in un campo magnetico ( Livelli energetici )*

- I momenti magnetici non sono più equivalenti
- I momenti magnetici sono orientati in  $2I + 1$  direzioni nel campo magnetico

- ♦ La lunghezza del vettore è:

$$\hbar\sqrt{I(I+1)}$$

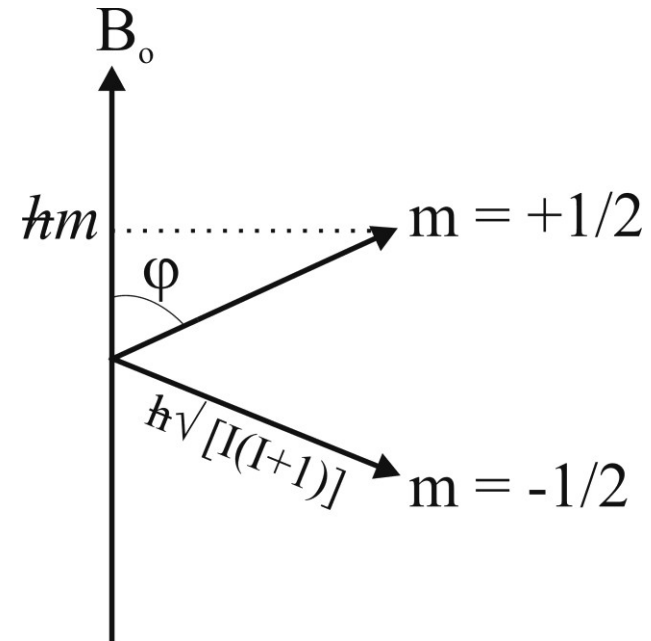
- ♦ L'angolo è dato da ( $\varphi$ ):

$$\cos \varphi = \sqrt{\frac{m}{I(I+1)}}$$

- ♦ L'energia è data da:

$$E = -\frac{m\mu}{I} B_0$$

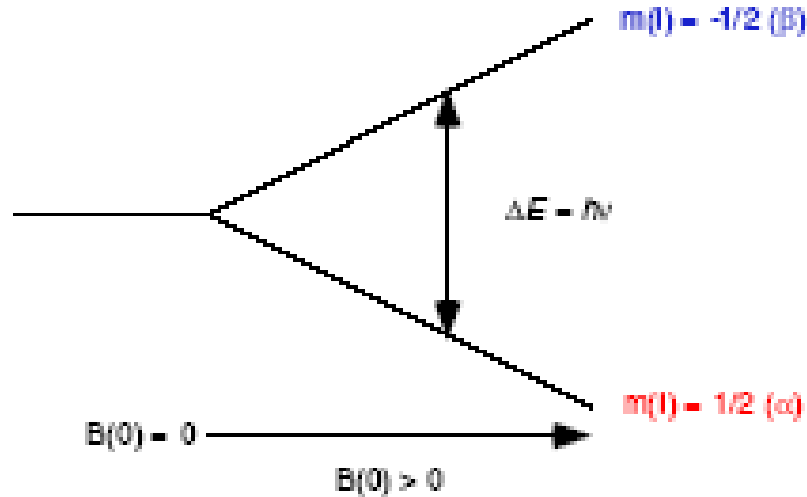
where,  
 $B_0$  – magnetic Field  
 $\mu$  – magnetic moment  
 $h$  – Planck's constant



For  $I = 1/2$

# *Orientazione degli spin in un campo magnetico ( Livelli energetici )*

- I momenti magnetici sono orientati in una o due direzioni nel campo magnetico (per  $I=1/2$ )



- La differenza tra i due stati di energia è:

$$\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi$$

$B_0$  – campo magnetico esterno

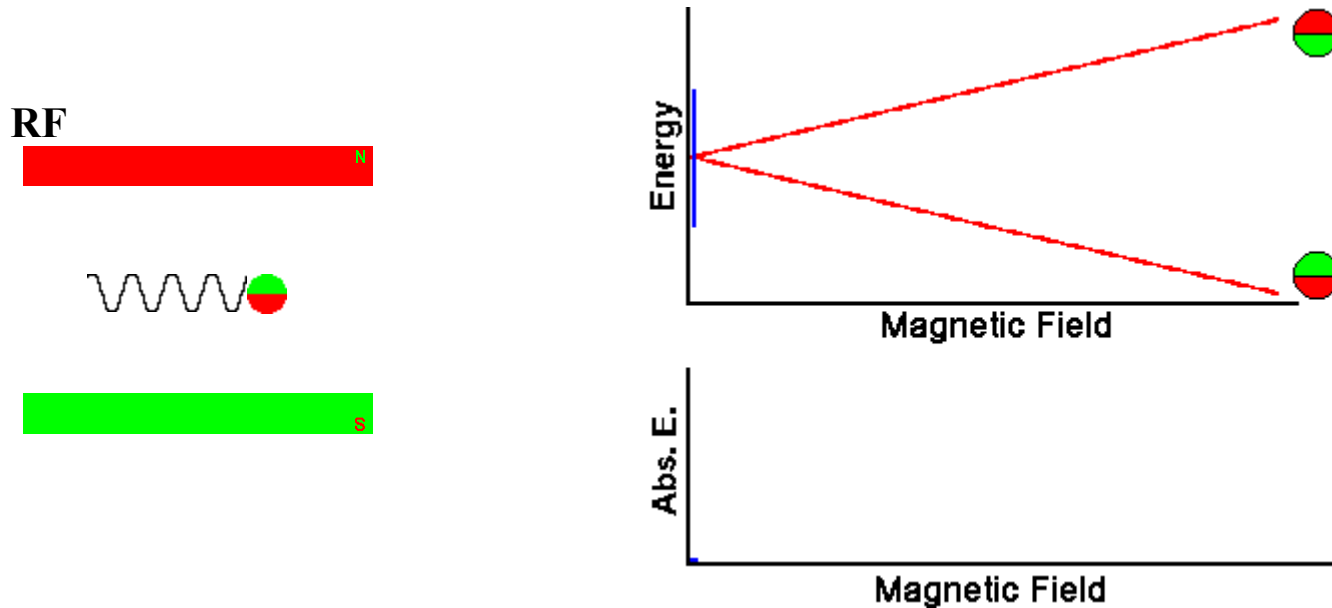
$h$  – Planck's constant

$\gamma$  – rapporto giromagnetico



## *Orientazione degli spin in un campo magnetico ( Livelli energetici )*

- Transizione da energia bassa all'alta energia di stato di spin accade attraverso l'assorbimento di un fotone di radio-frequenza

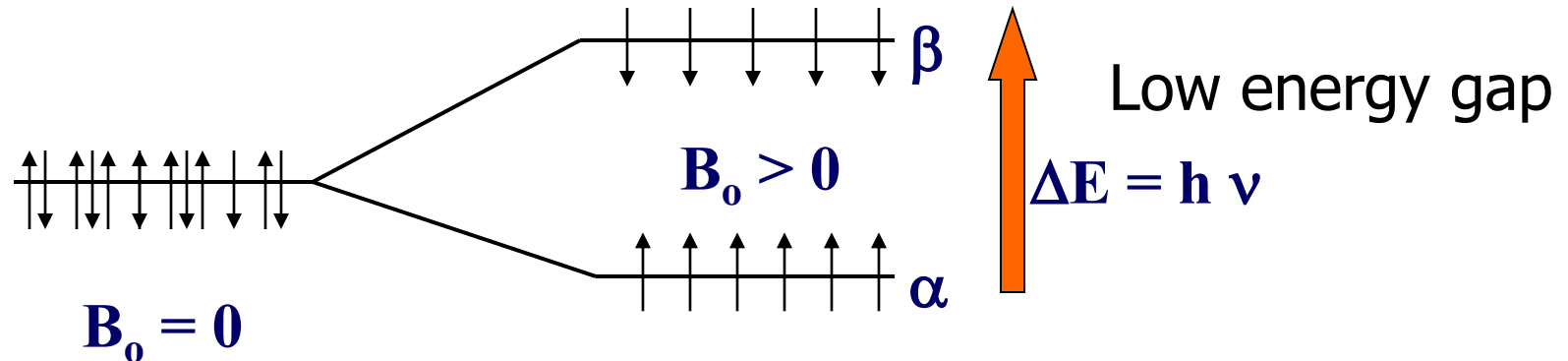


Frequenza di assorbimento:

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

## Segnale NMR (sensibilità)

- Il campo magnetico applicato causa una differenza di energia tra i nuclei allineati ( $\alpha$ ) e quelli non allineati ( $\beta$ )
- Il segnale NMR deriva dalla transizione degli spin dallo stato  $\alpha$  allo stato  $\beta$
- La forza del segnale dipende dalla differenza di popolazione tra gli stati di spin  $\alpha$  e  $\beta$



- La differenza di popolazione ( $N$ ) può essere determinata dalla distribuzione di Boltzmann e dalla separazione di energia tra gli stati  $\alpha$  e  $\beta$ :

$$N_{\alpha} / N_{\beta} = e^{\Delta E / kT}$$

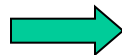
## Segnale NMR (sensibilità)

$$\Delta E = h\nu$$

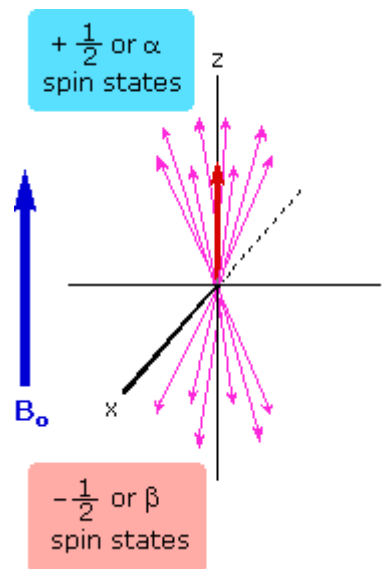
$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$$

quindi:

$$N_\alpha / N_\beta = e^{\Delta E / kT}$$



$$N_\alpha / N_\beta = e^{(\gamma h B_0 / 2\pi kT)}$$



Il  $\Delta E$  per  $^1\text{H}$  a 400 MHz ( $B_0 = 9.39$  T) è  $6 \times 10^{-5}$  Kcal / mol

$$N_\alpha / N_\beta = 1.000060$$

**Molto piccolo**  
 **$\sim 60$  spin per**  
**milione**

# I Principi fisici dietro all'NMR

Più grande è  $\mu$ , più grande è la corrente nella spira. Per cui  $\gamma$  definisce la sensitività intrinseca di un nucleo in NMR. Per diverse ragioni siamo maggiormente interessati con nuclei con  $I_z = \pm \frac{1}{2}$ .

Nuclei che sono generalmente trovati in biomacromolecole, spin e  $\gamma$ .

| Nuclide         | Spin          | $\gamma$ ( $10^7$ /Tesla<br>sec) | Natural<br>abundance |
|-----------------|---------------|----------------------------------|----------------------|
| $^1\text{H}$    | $\frac{1}{2}$ | 26.75                            | 99.99%               |
| $^2\text{H}$    | 1             | 4.11                             | 0.015%               |
| $^{13}\text{C}$ | $\frac{1}{2}$ | 6.73                             | 1.1%                 |
| $^{15}\text{N}$ | $\frac{1}{2}$ | -2.71                            | 0.37%                |
| $^{31}\text{P}$ | $\frac{1}{2}$ | 10.84                            | 100%                 |

# Generazione e rilevazione del segnale di risonanza magnetica

- Accensione di una radiofrequenza (RF) sincronizzata alla frequenza precessionale dei protoni che causa l'allontanamento delle condizioni di equilibrio del momento magnetico
- Si ritorna alla situazione di equilibrio con l'emissione dei segnali MR proporzionali al numero di protoni eccitati nel campione, a seconda delle caratteristiche del tessuto

# Nuclear Magnetic Resonance

- NMR studia la struttura organica delle molecole.
- Può essere usato per una varietà di nuclei:
  - $^1\text{H}$
  - $^{13}\text{C}$
  - $^{15}\text{N}$
  - $^{19}\text{F}$
  - $^{31}\text{P}$

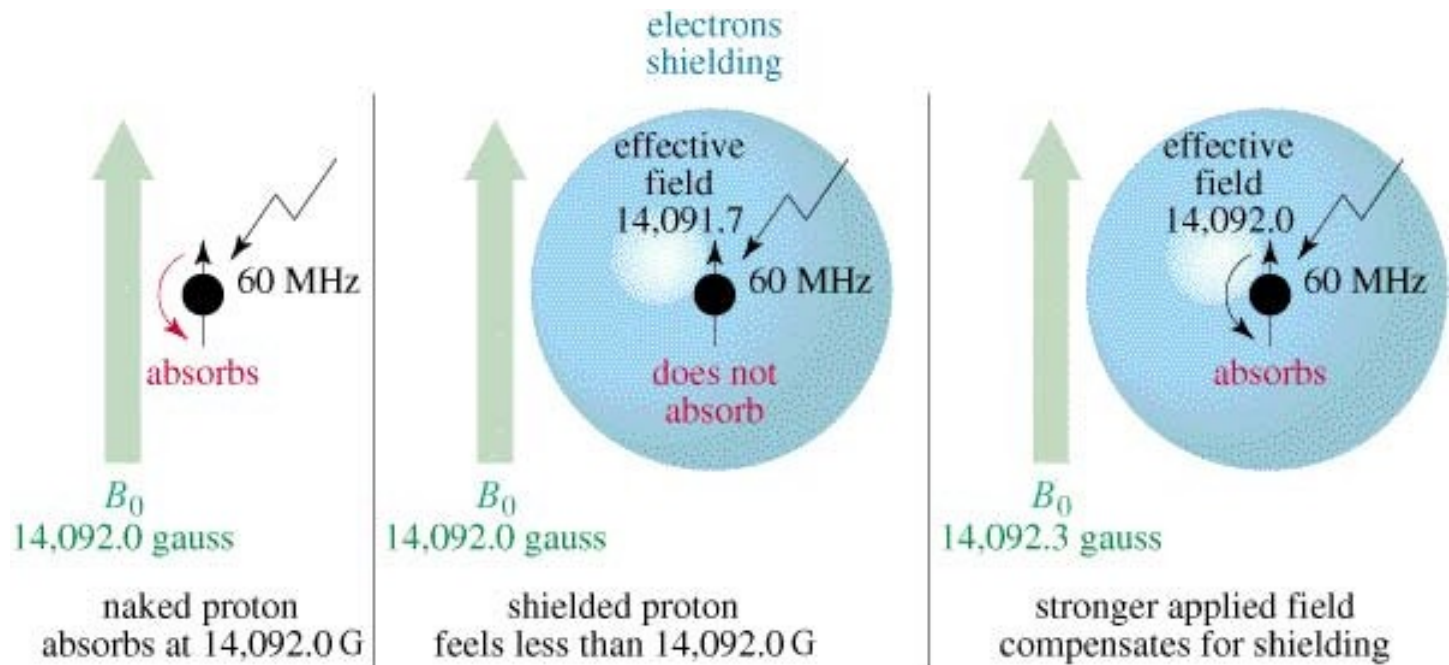
=>

# Ombreggiamento magnetico

- Se tutti i protoni assorbono la stessa quantità di campo magnetico non si ottengono informazioni.
- I protoni sono circondati dagli elettroni che li ombreggiano dal campo magnetico.
- Gli elettroni tendono a circolare in modo da indurre un campo magnetico che si oppone al campo magnetico esterno.

# Protoni schermati

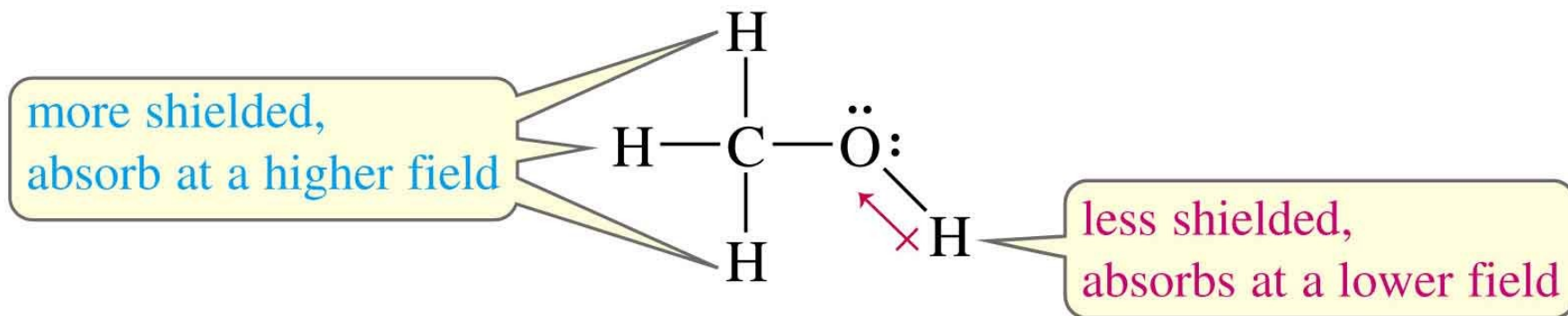
Il campo magnetico deve essere aumentato per far cambiare lo spin ad un protone schermato.





# Protoni in una Molecola

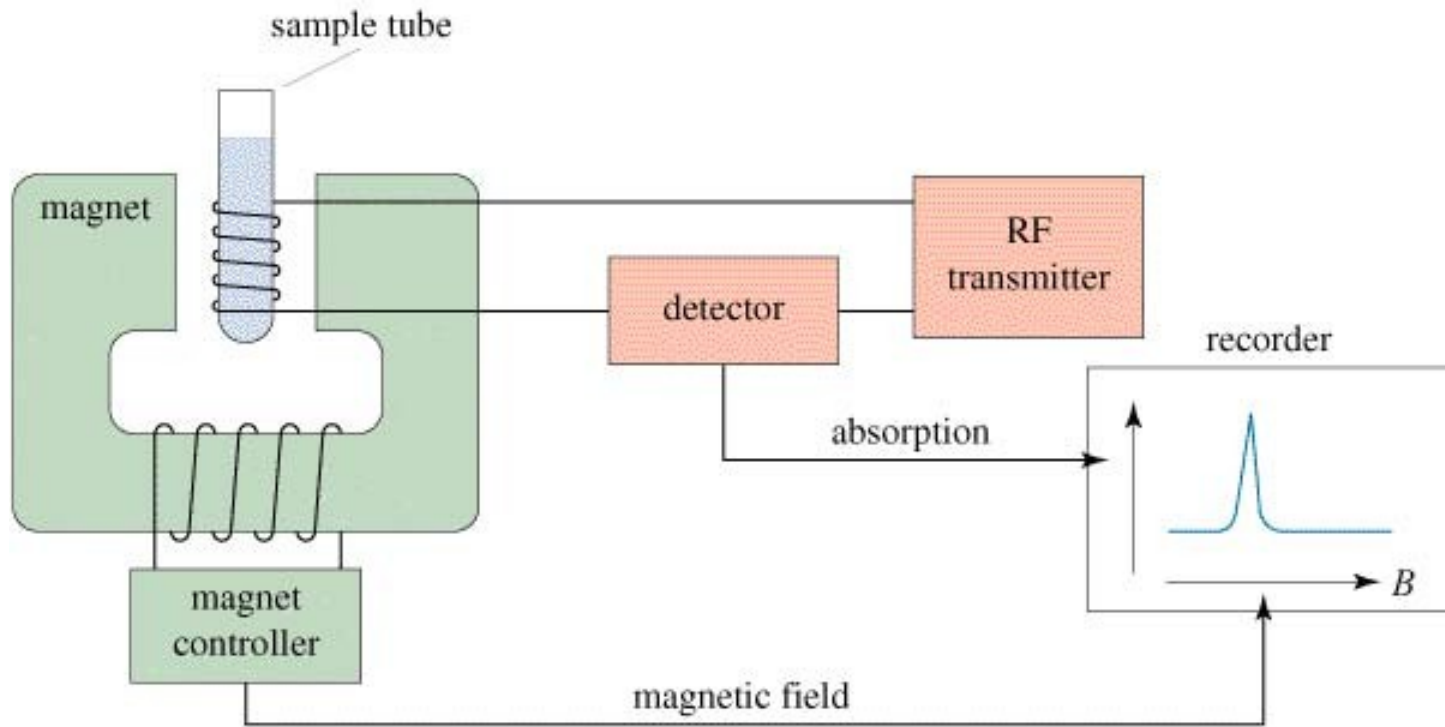
A seconda dell'ambiente chimico, I protoni in una molecola sono schermati in modi diversi.



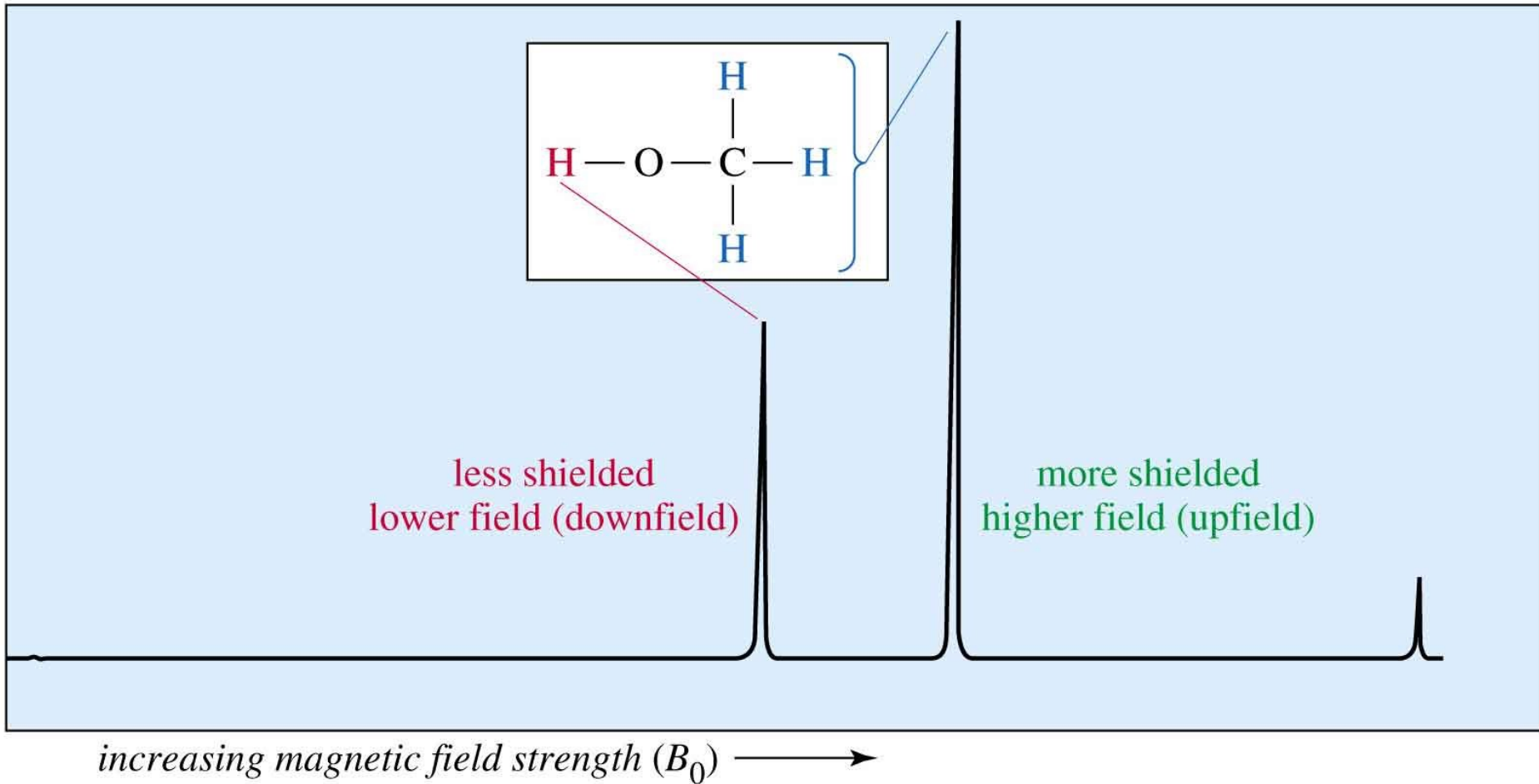
# I Segnali NMR

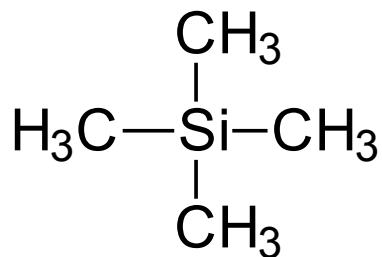
- Il *numero* dei segnali mostra quanti tipi di protoni sono presenti.
- La *posizione* dei segnali mostra quanto il protone sia schermato o non schermato.
- L' *intensità* del segnale mostra il numero dei protoni di quel tipo.
- Signal *splitting* shows the number of protons on adjacent atoms.

# Lo spettrometro NMR



# Il grafico NMR





## Tetrametilsilano

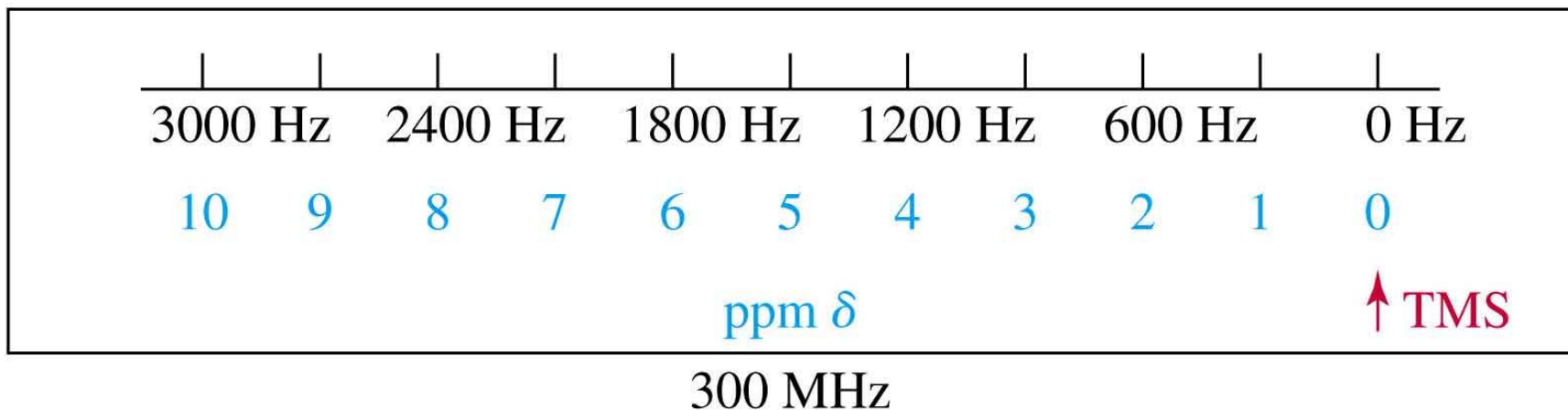
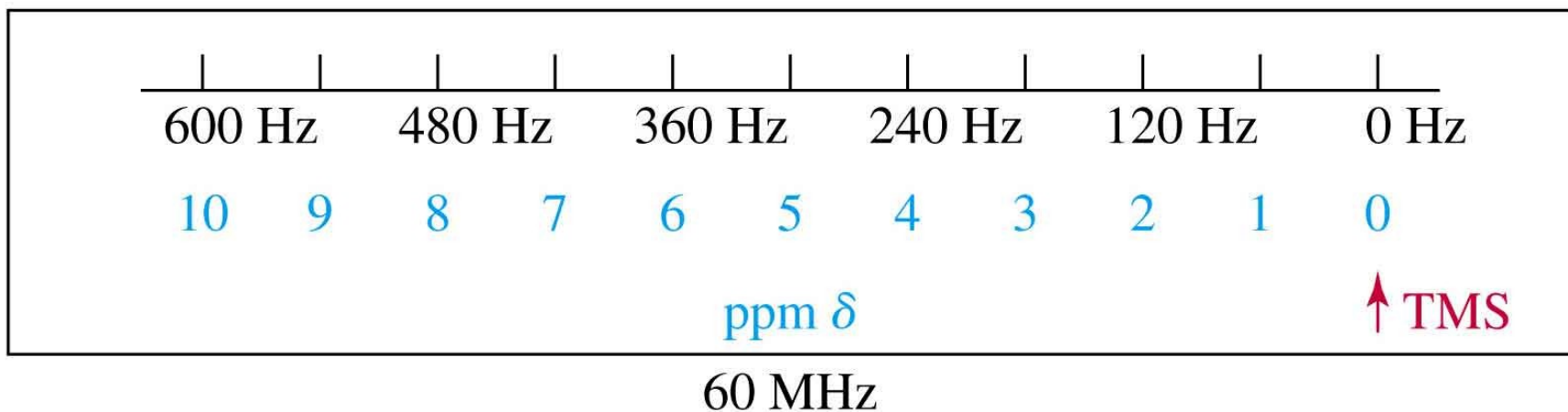
- TMS viene aggiunto al campione.
- Silicio è meno elettronegativo del carbonio, i protoni TMS sono schermati. Il segnale viene preso come zero.
- I protoni organici assorbono alla sinistra del segnale TMS.

# Shift chimico

- In parti per milione.
- Rapporto dello shift a sinistra del TMS (Hz) con la frequenza totale dello spettrometro (Hz).
- Stesso valore per macchine 60, 100, o 300 MHz.

# Delta Scale

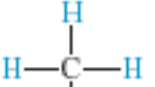
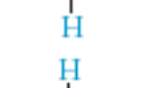
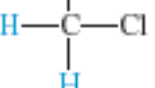
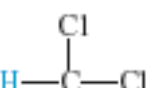
$$\text{chemical shift, ppm } \delta = \frac{\text{shift downfield from TMS (in Hz)}}{\text{spectrometer frequency (in MHz)}}$$



=>

# Posizione dei segnali

**TABLE 13-2** Chemical Shifts of the Chloromethanes

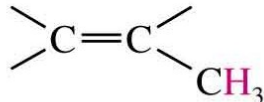
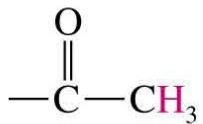
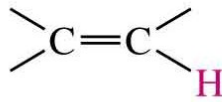
| Compound  | Chemical Shift | Difference |
|---|----------------|------------|
|  | 80.2           |            |
|  | 83.0           | 2.8 ppm    |
|  | 85.3           | 2.3 ppm    |
|  | 87.2           | 1.9 ppm    |

*Note:* Each chlorine atom added changes the chemical shift of the remaining methyl protons by about 2 to 3 ppm. These changes are nearly additive.

- Atomi più elettronegativi sono meno schermati e danno valori più alti.
- L'effetto diminuisce con la distanza.
- Atomi elettronegativi in più aumentano lo shift chimico.

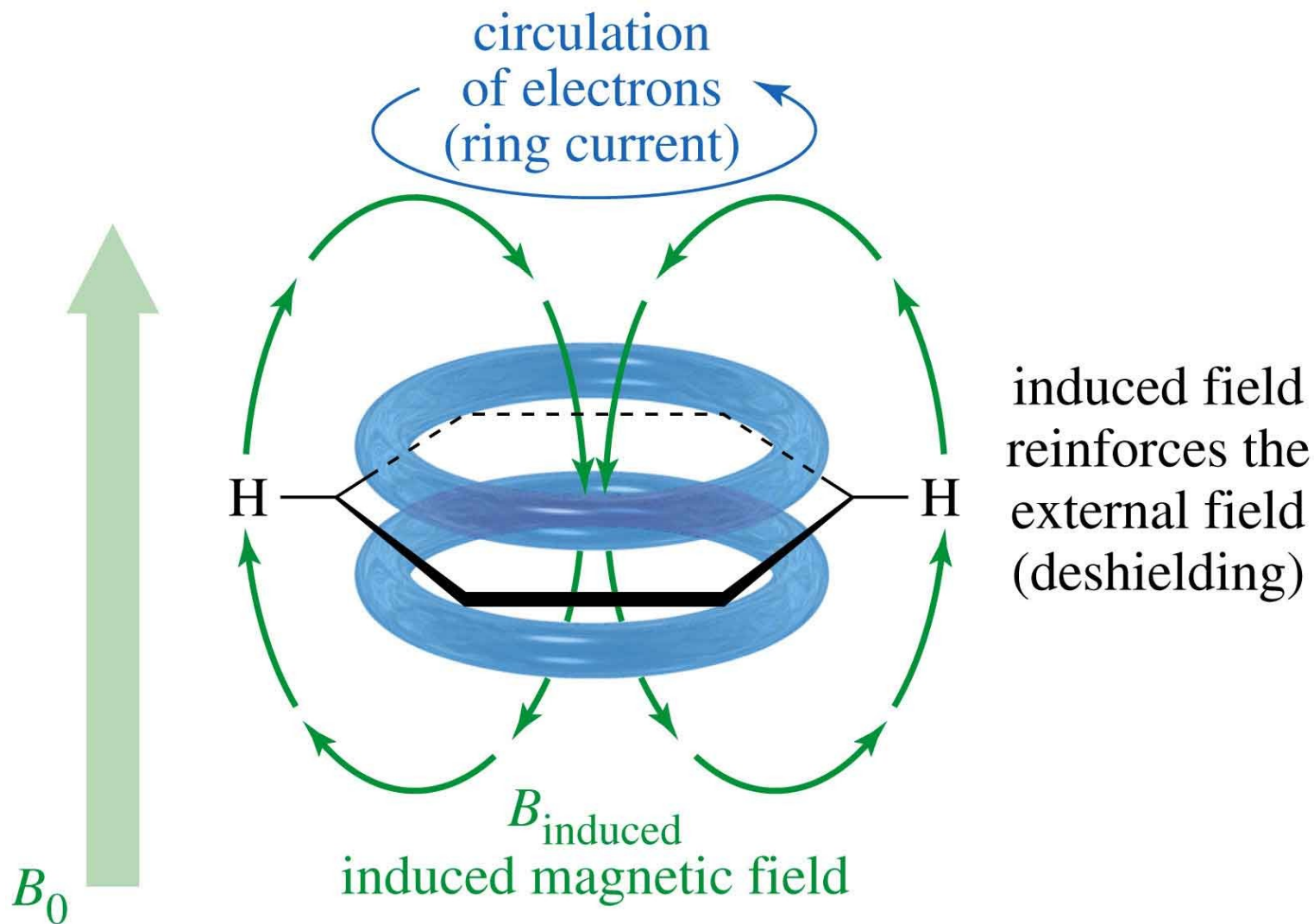


# Valori tipici

| Type of Proton  | Approximate $\delta$ | Type of Proton  | Approximate $\delta$  |
|---|----------------------|---|-----------------------|
| alkane ( $-\text{CH}_3$ )   | 0.9                  |  | 1.7                   |
| alkane ( $-\text{CH}_2-$ )  | 1.3                  | Ph—H  | 7.2                   |
| alkane ( $-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}\text{H}-$ )                          | 1.4                  | Ph—CH <sub>3</sub>  | 2.3                   |
|    | 2.1                  | R—CHO   | 9–10                  |
| $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$  | 2.5                  | R—COOH  | 10–12                 |
| R—CH <sub>2</sub> —X  | 3–4                  | R—OH  | variable, about 2–5   |
| (X = halogen, O)  |                      | Ar—OH   | variable, about 4–7   |
|  | 5–6                  | R—NH <sub>2</sub>   | variable, about 1.5–4 |

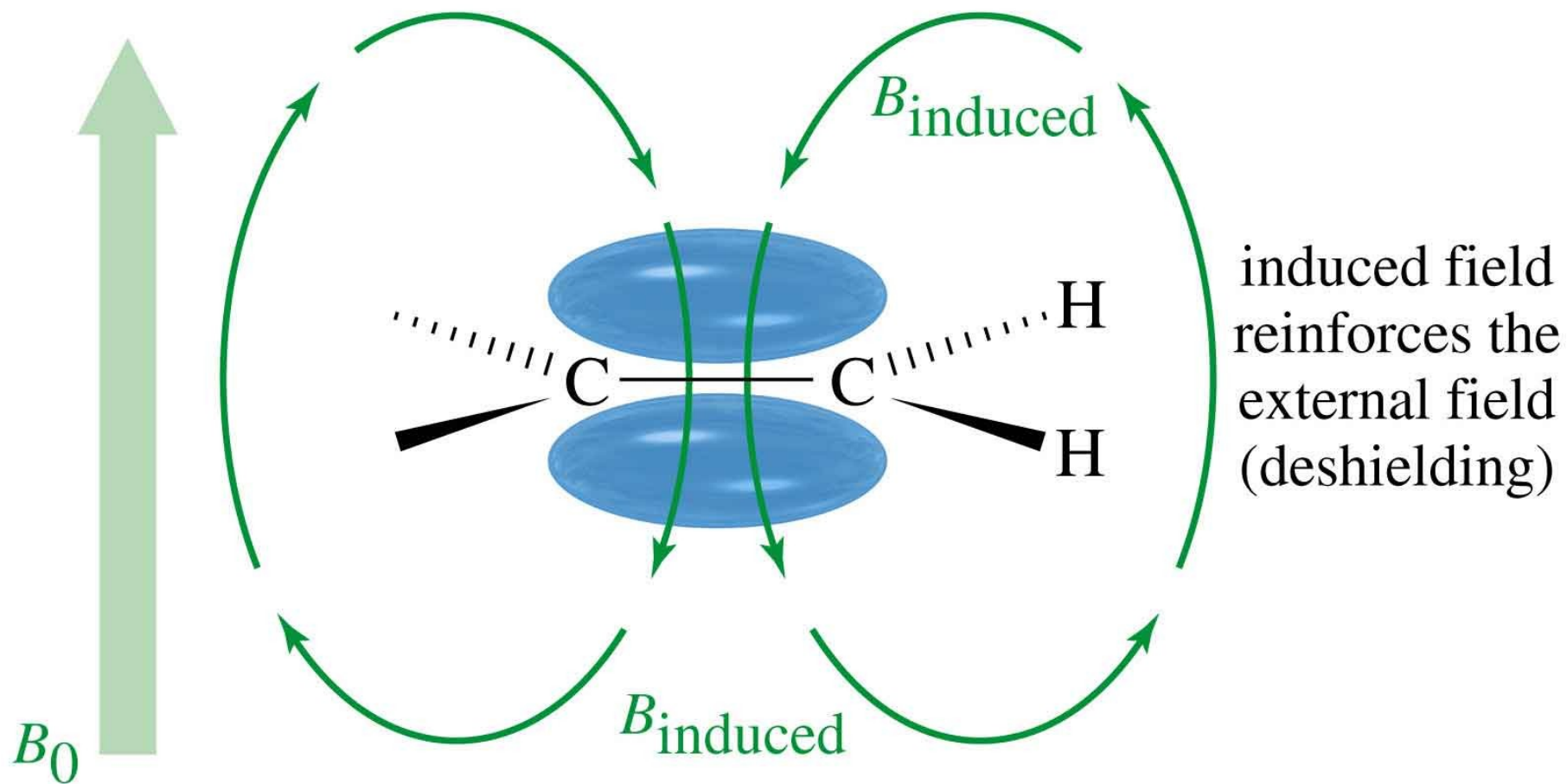
*Note:* These values are approximate, as all chemical shifts are affected by neighboring substituents. The numbers given here assume that alkyl groups are the only other substituents present. A more complete table of chemical shifts appears in Appendix 1.

# Aromatic Protons, $\delta 7$ - $\delta 8$

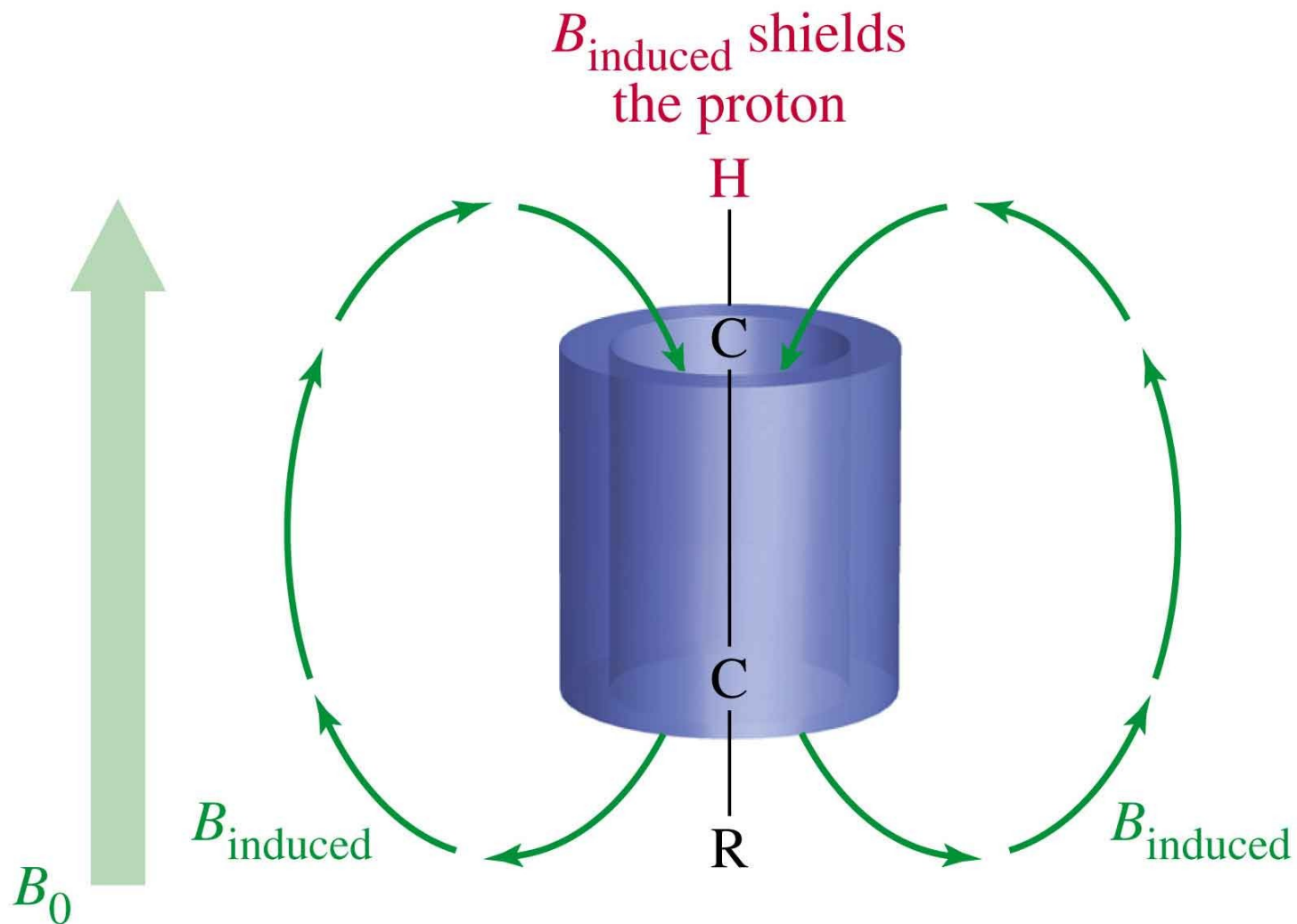


=>

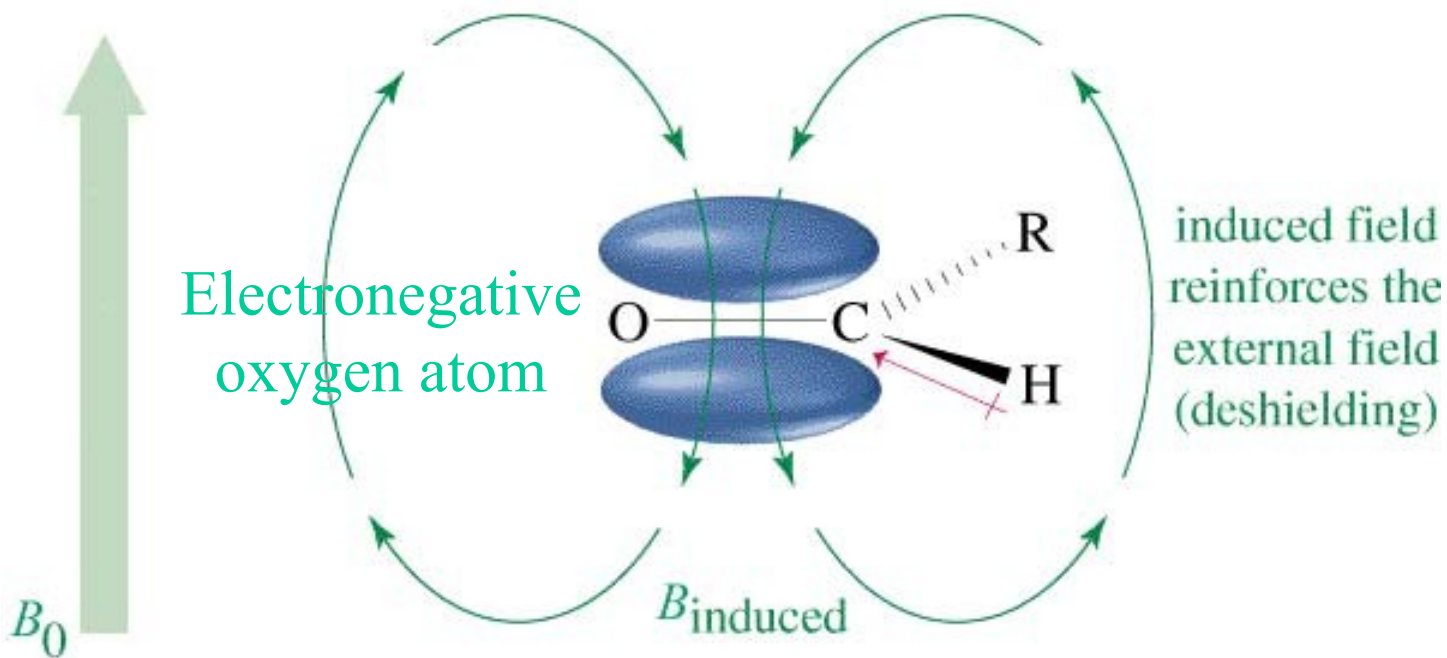
# Vinyl Protons, $\delta 5\text{-}\delta 6$



# Acetylenic Protons, $\delta 2.5$



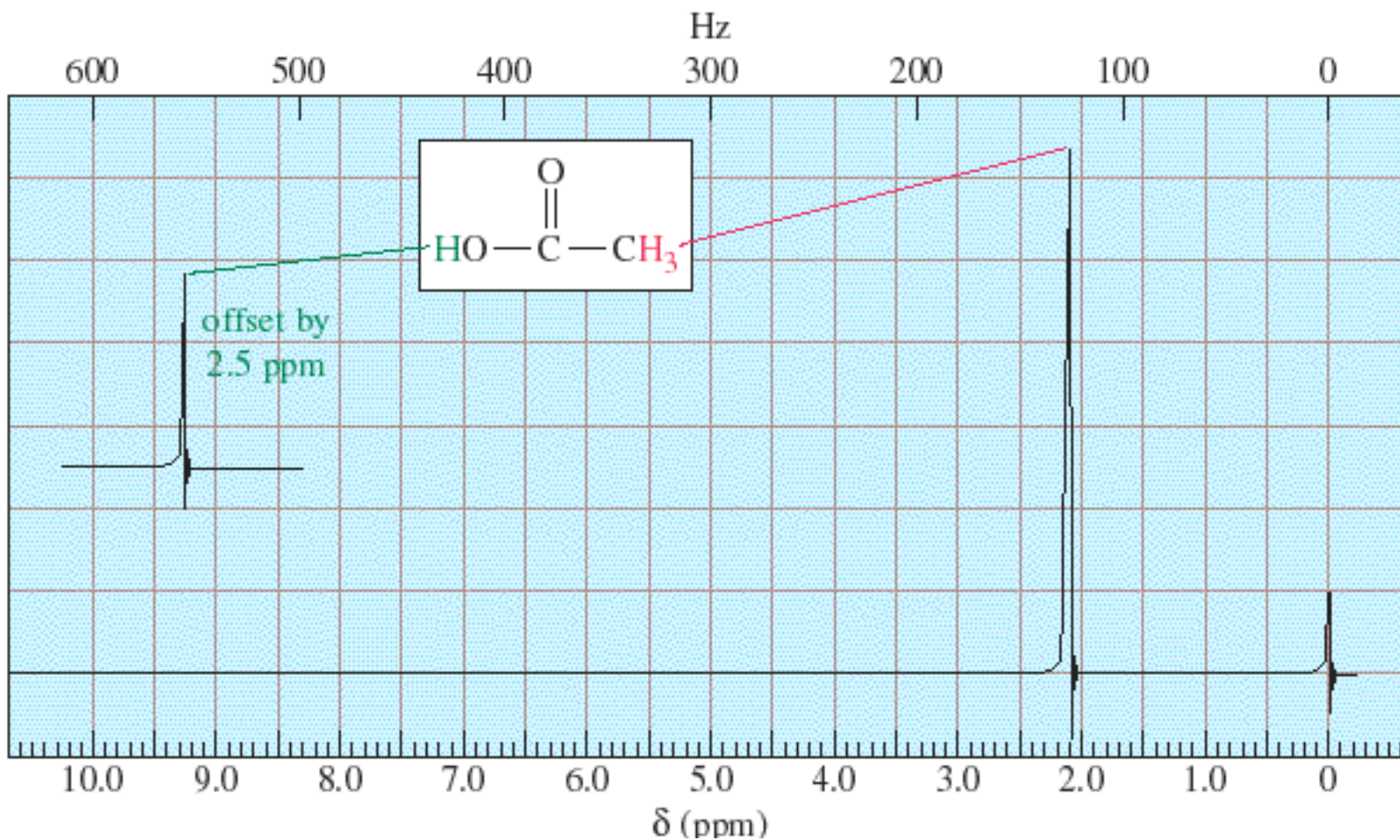
# Aldehyde Proton, $\delta 9$ - $\delta 10$



# Segnali O-H e N-H

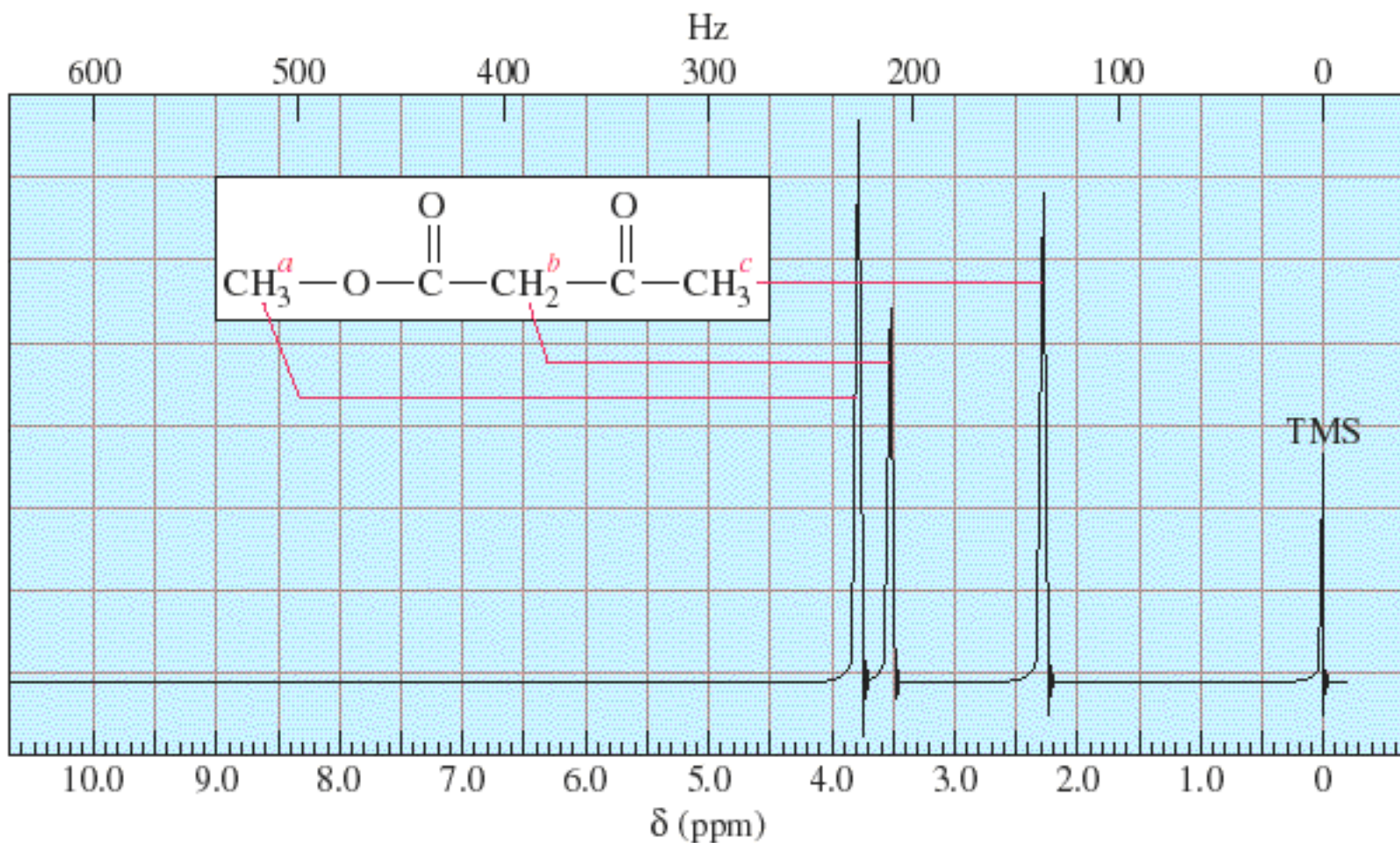
- Lo shift chimico dipende dalla concentrazione.
- Il legame a idrogeno in soluzioni concentrate de-scherma i protoni, il segnale è circa  $\delta 3.5$  per N-H e  $\delta 4.5$  per O-H.
- Scambi protonici tra le molecole allargano il picco.

# Carboxylic Acid Proton, $\delta 10+$



# Numero dei segnali

Gli idrogeni equivalenti hanno lo stesso shift chimico.



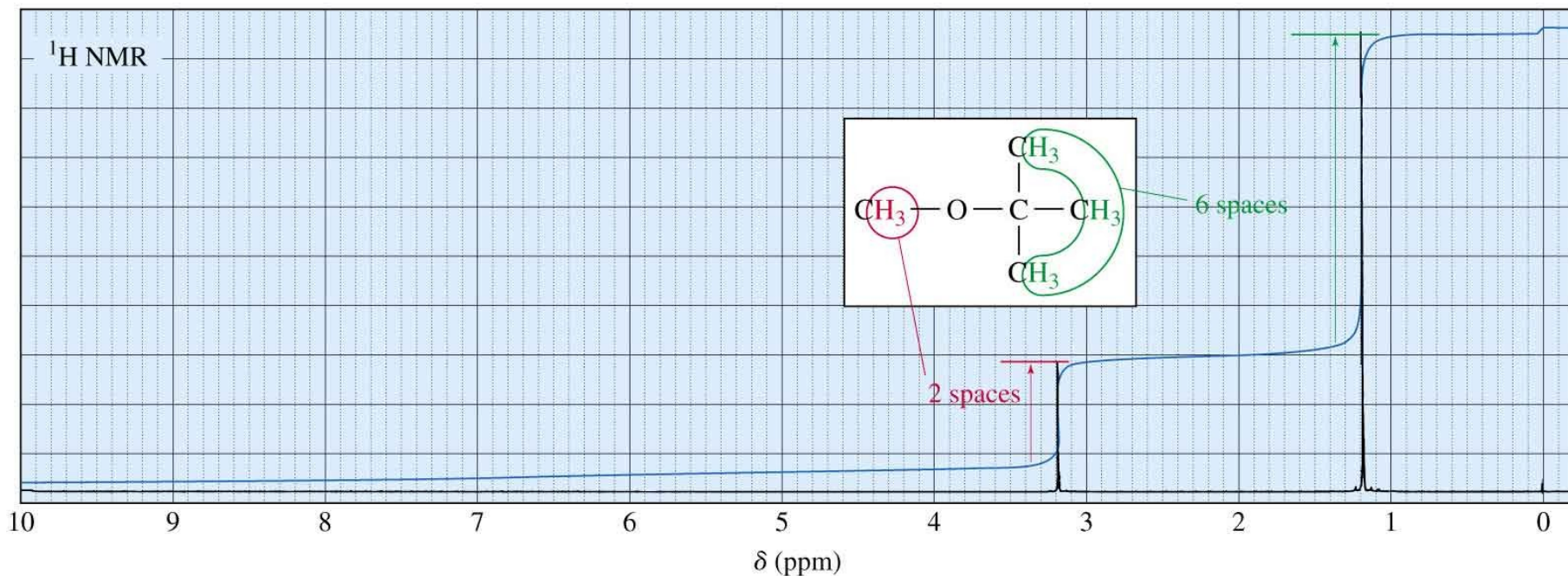


# Protoni equivalenti

- Si definiscono magneticamente equivalenti protoni (non necessariamente legati allo stesso atomo) che abbiano le seguenti caratteristiche:
  - 1. Stesso intorno magnetico e quindi stesso chemical shift;
  - 2. Stessa costante di accoppiamento con TUTTI I GLI ALTRI
- NUCLEI con cui essi accoppiano.

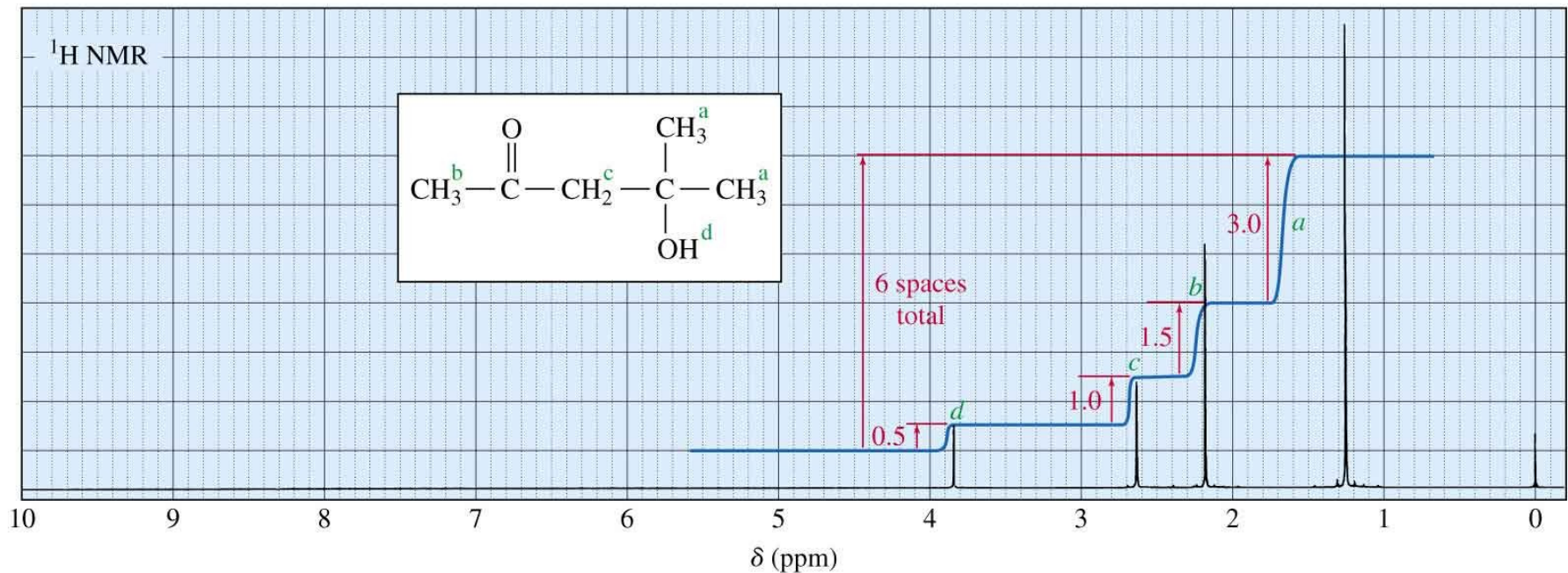
# Intensità dei segnali

- L'area sotto ciascun picco è proporzionale al numero dei protoni



# Quanti idrogeni?

Quando la formula molecolare è conosciuta, ciascun aumento dell'integrale può essere assegnato ad un numero particolare di idrogeni.

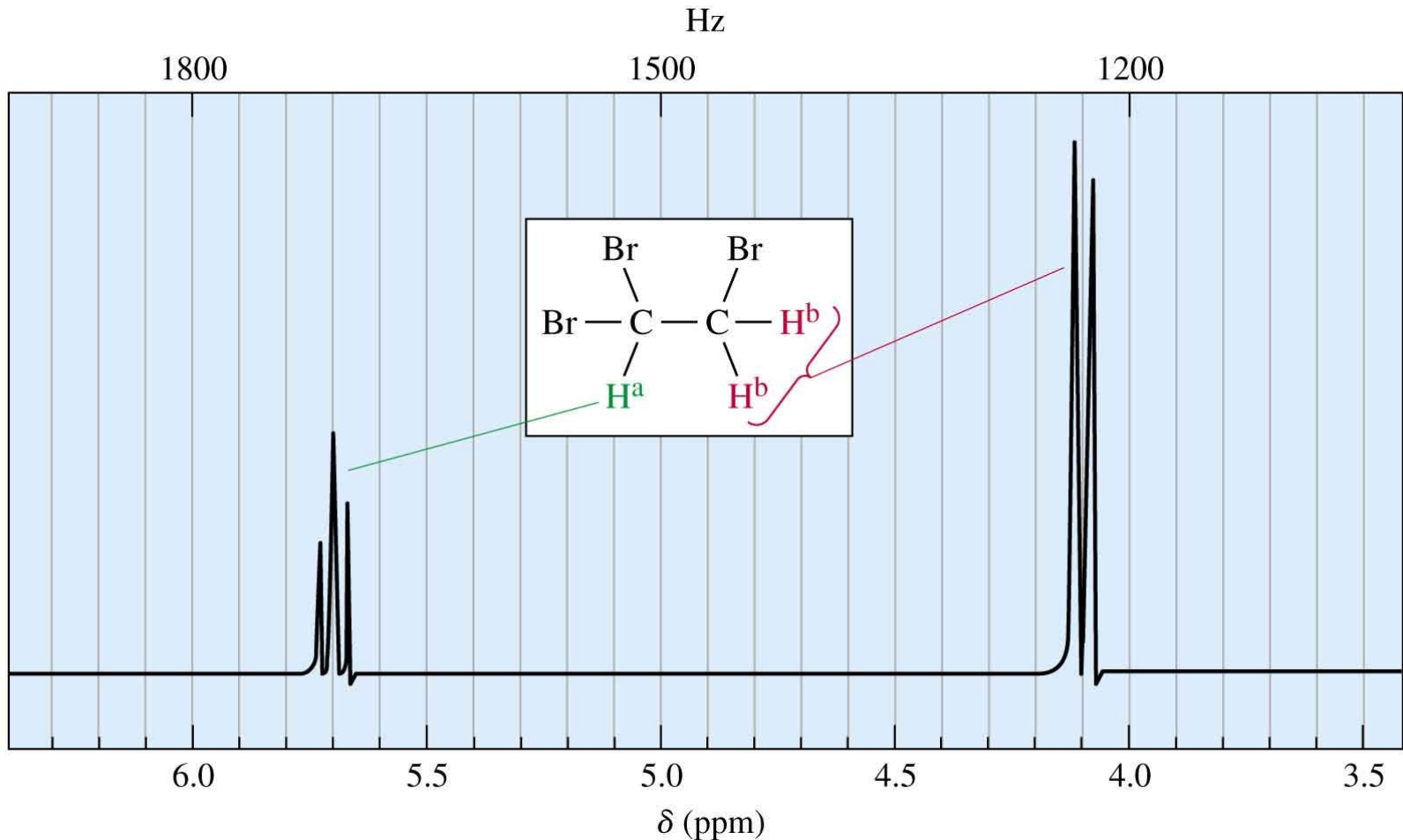


# Spin-Spin Splitting

- Protoni non equivalenti su carboni adiacenti hanno i campi magnetici che si possono allineare o disallineare al campo magnetico.
- Questo accoppiamento magnetico fa che il protone assorba leggermente a sinistra quando il campo magnetico è rinforzato e a destra quando il campo magnetico è opposto.

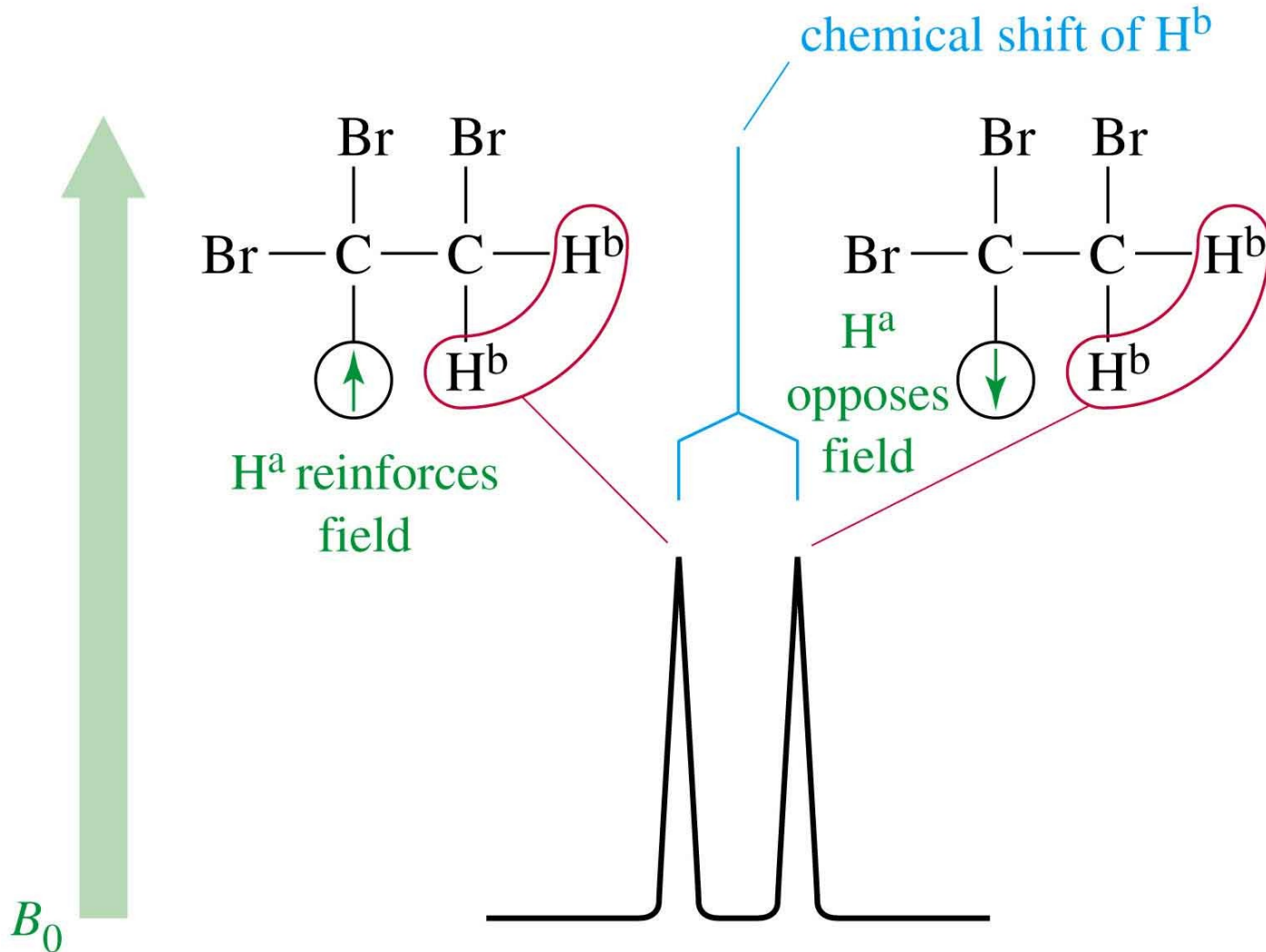
# 1,1,2-Tribromoetano

Protoni non equivalenti su carboni adiacenti.

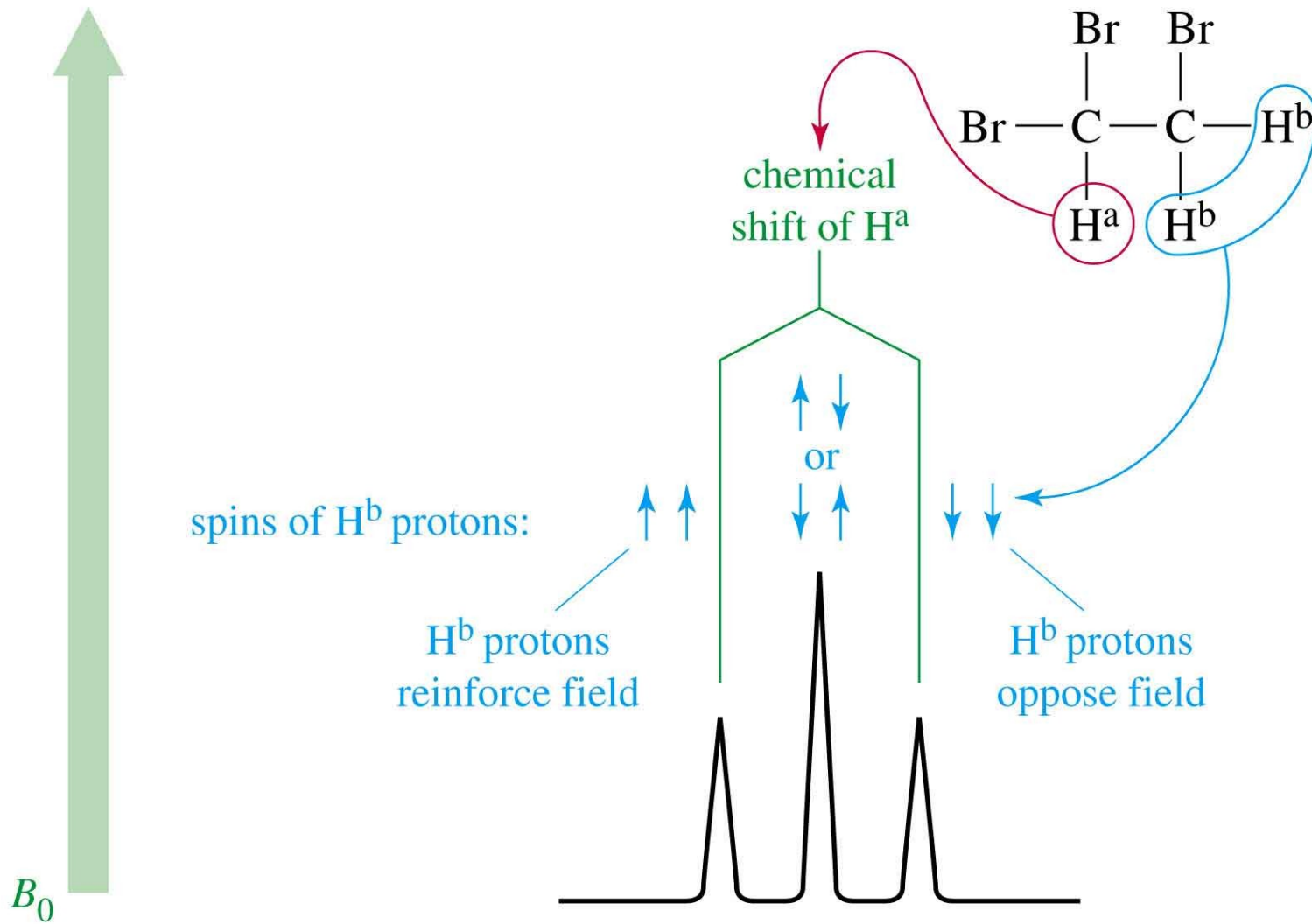


=>

# Doppio: 1 Protone adiacente



# Tripletto: 2 protoni adiacenti



# La regola $N + 1$

Se un segnale è spezzato da protoni  $N$  equivalenti, è spezzato in picchi  $N + 1$ .

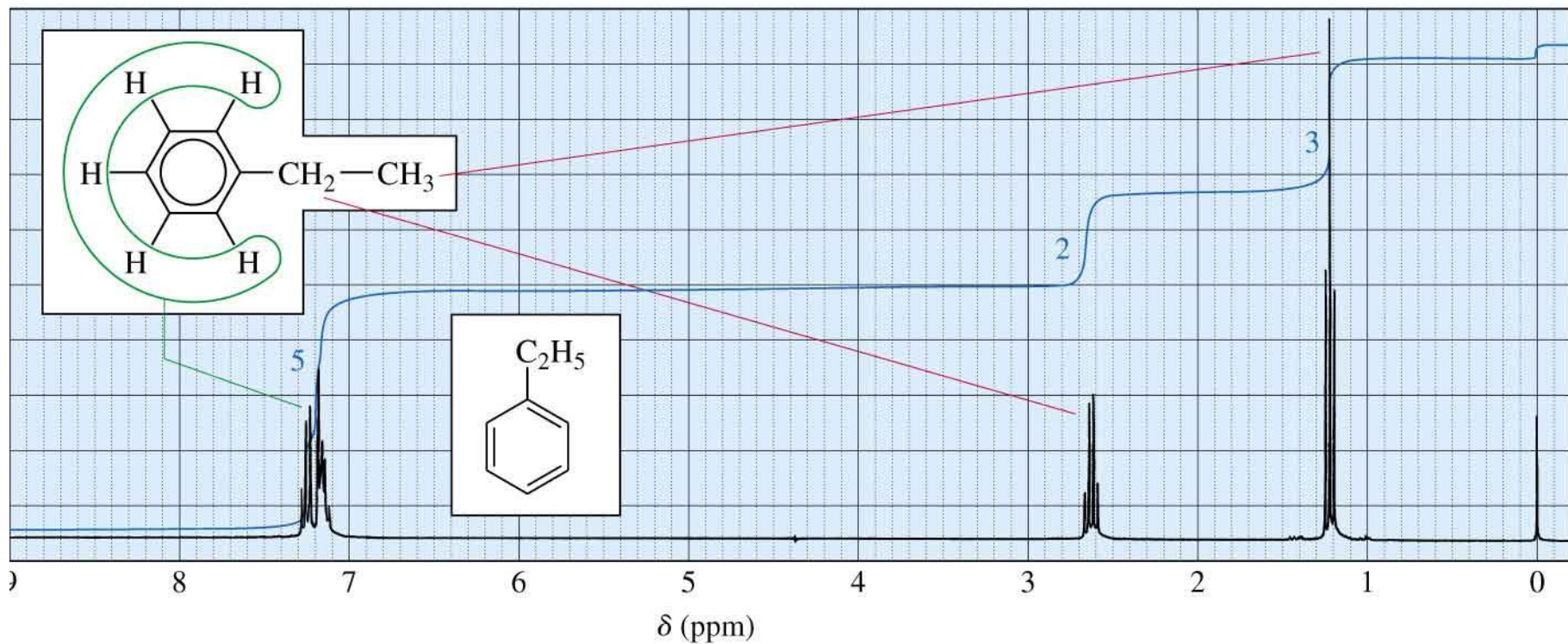
| Relative Peak Intensities of Symmetric Multiplets     |                                       |  |
|---|---------------------------------------|--|
| <i>Number of Equivalent Protons Causing Splitting</i> | <i>Number of Peaks (multiplicity)</i> | <i>Area Ratios (Pascal's triangle)</i> |
| 0   | 1 (singlet)                           | 1                                      |
| 1   | 2 (doublet)                           | 1 1                                    |
| 2   | 3 (triplet)                           | 1 2 1                                  |
| 3   | 4 (quartet)                           | 1 3 3 1                                |
| 4   | 5 (quintet)                           | 1 4 6 4 1                              |
| 5   | 6 (sextet)                            | 1 5 10 10 5 1                          |
| 6   | 7 (septet)                            | 1 6 15 20 15 6 1                       |



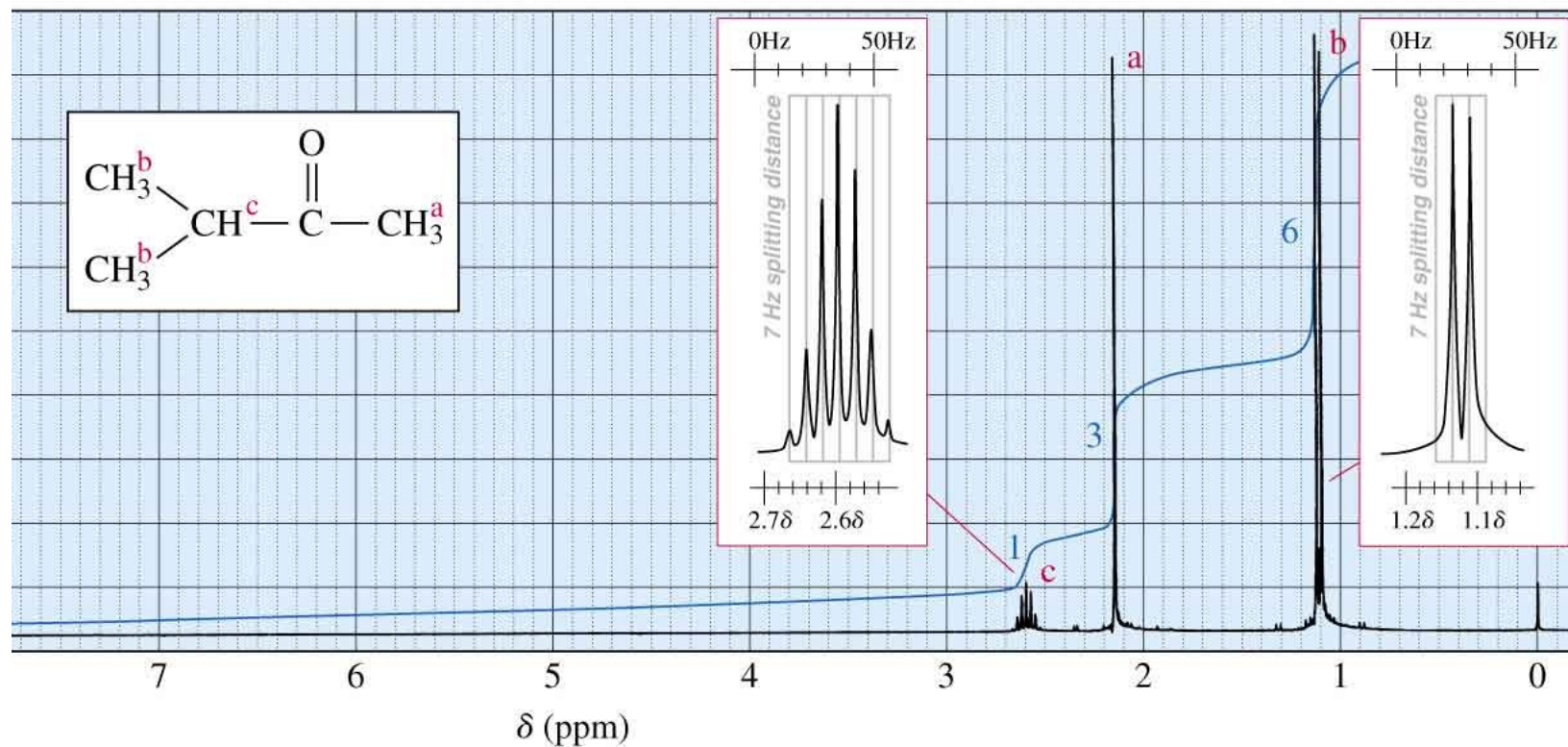
# Accoppiamento magnetico

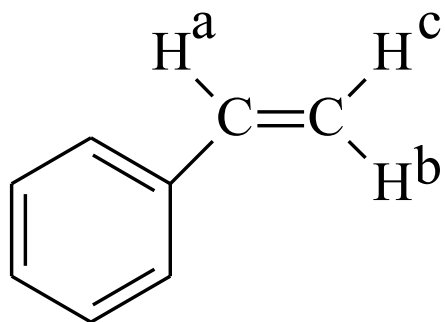
- Protoni equivalenti non si splittano tra loro.
- I Protoni legati allo stesso carbonio si splittano solo se non sono equivalenti.
- I Protoni su carboni adiacenti normalmente si accoppiano.
- I Protoni separati da quattro o più legami non si accoppiano.

# Splitting for Ethyl Groups



# Splitting for Isopropyl Groups

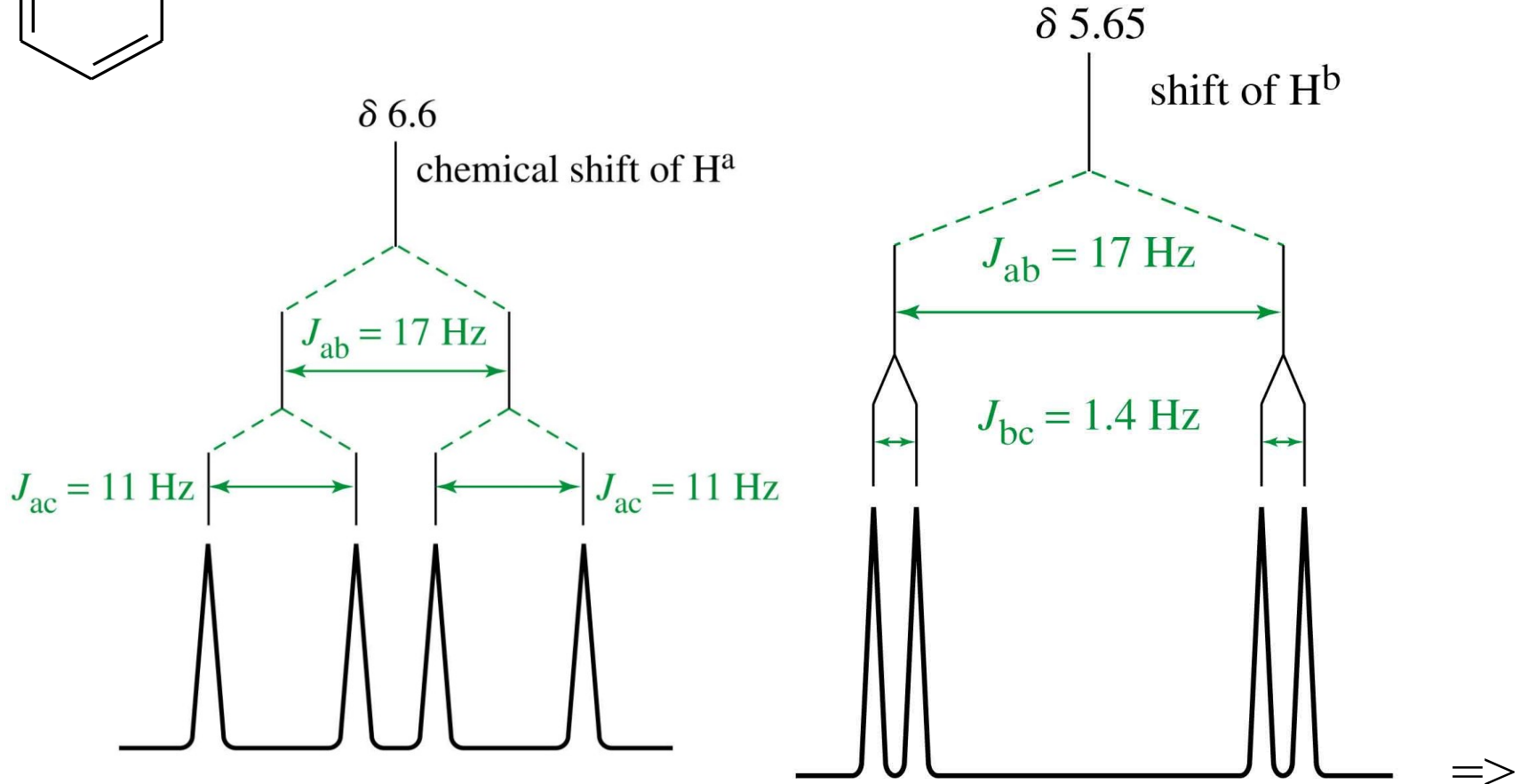
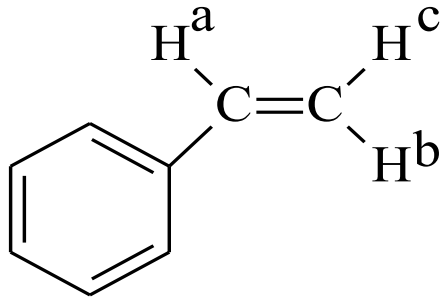




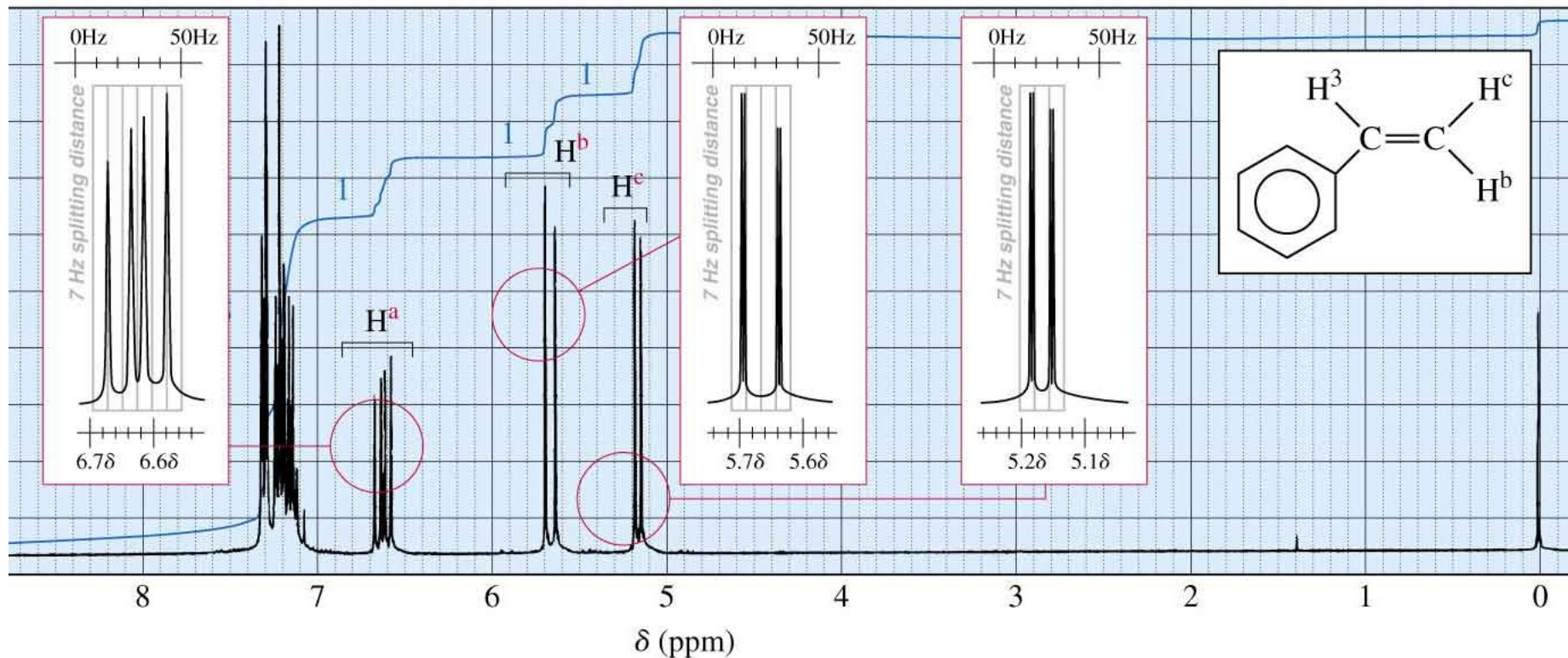
## Complex Splitting

- I segnali possono essere splittati da protoni adiacenti, diversi l'uno dall'altro con diverse costanti di accoppiamento.
- Esempio: H<sup>a</sup> dello styrene viene splittato da un adiacente H *trans* ( $J = 17$  Hz) e un adiacente H *cis* ( $J = 11$  Hz).

# Splitting Tree

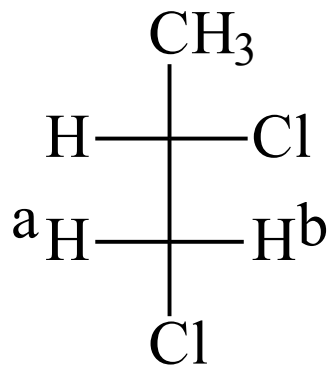
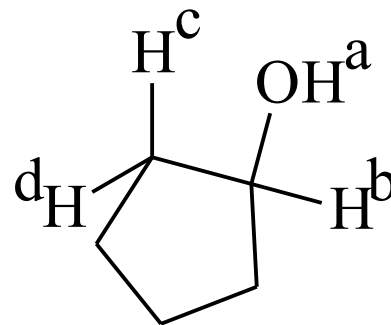
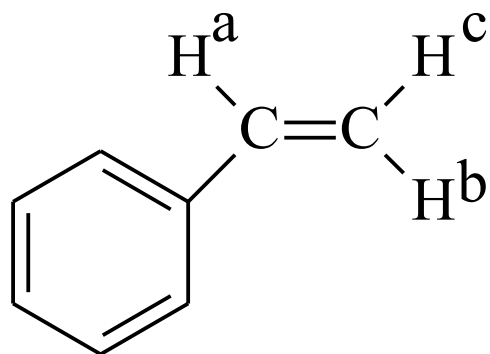


# Spectrum for Styrene



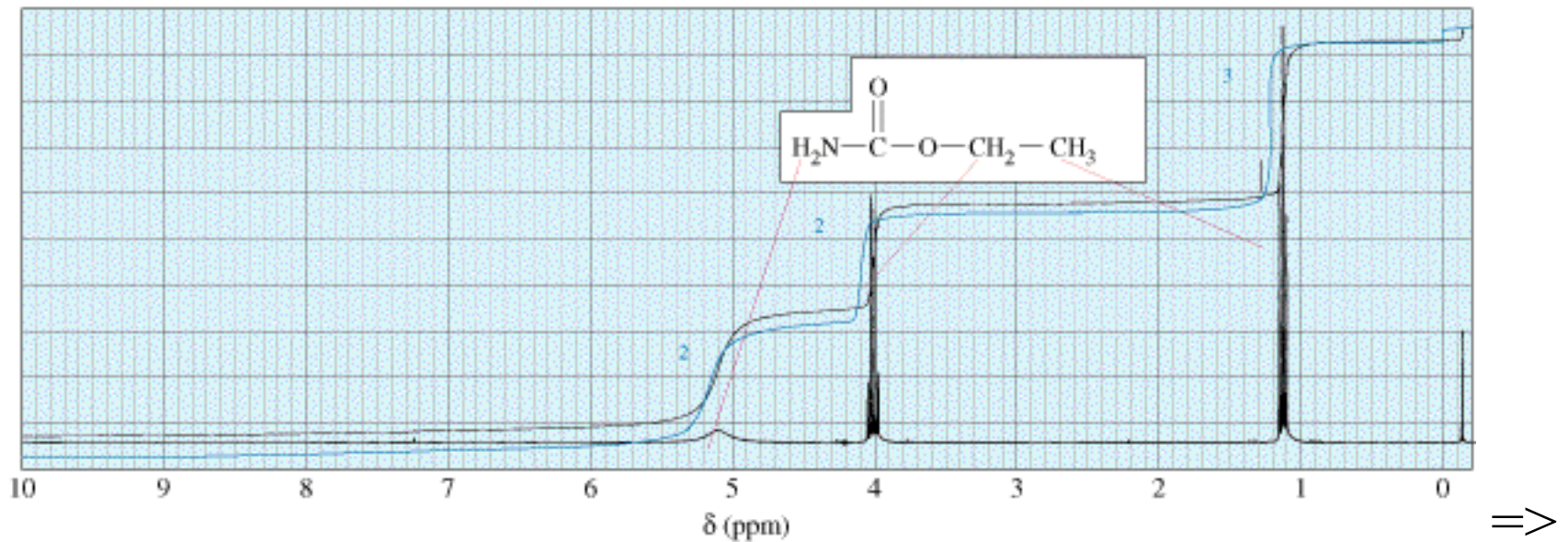
=>

# Alcuni protoni non equivalenti



# N-H Proton

- Moderate rate of exchange.
- Peak may be broad.





# Identificare il picco O-H o N-H

- Lo shift chimico dipende dalla concentrazione e dal solvente.
- Per verificare che un picco particolare sia legato O-H or N-H, bisogna utilizzare D<sub>2</sub>O
- Il deuterio scambia protoni con O-H o N-H.
- Quindi rifacendo lo spettro NMR il picco si spegne o diventa molto meno intenso.

# Carbonio-13

- $^{12}\text{C}$  non ha spin magnetico.
- $^{13}\text{C}$  ha spin magnetico ma solo 1% del carbonio nel campione.
- Il rapporto giromagnetico del  $^{13}\text{C}$  è un quarto del  $^1\text{H}$ .
- I segnali sono deboli, confondendosi nel rumore.
- Bisogna prendere molti spettri.

# Fourier Transform NMR

- I nuclei in un campo magnetico vengono immersi in un pulse di radiofrequenza vicino alla frequenza di risonanza.
- I nuclei assorbono energia e precedono come trottoline.
- Viene prodotto un segnale complesso, quindi decade durante la perdita energetica dei nuclei.
- Il decadimento viene convertito in spettro

# Il Segnale NMR

Gli spin nucleari si comportano come barrette magnetiche. Quando rotiamo un barra magnetica in una spira induciamo corrente nella spira (dinamo) . All'equilibrio i diversi spin si cancellano tra loro.

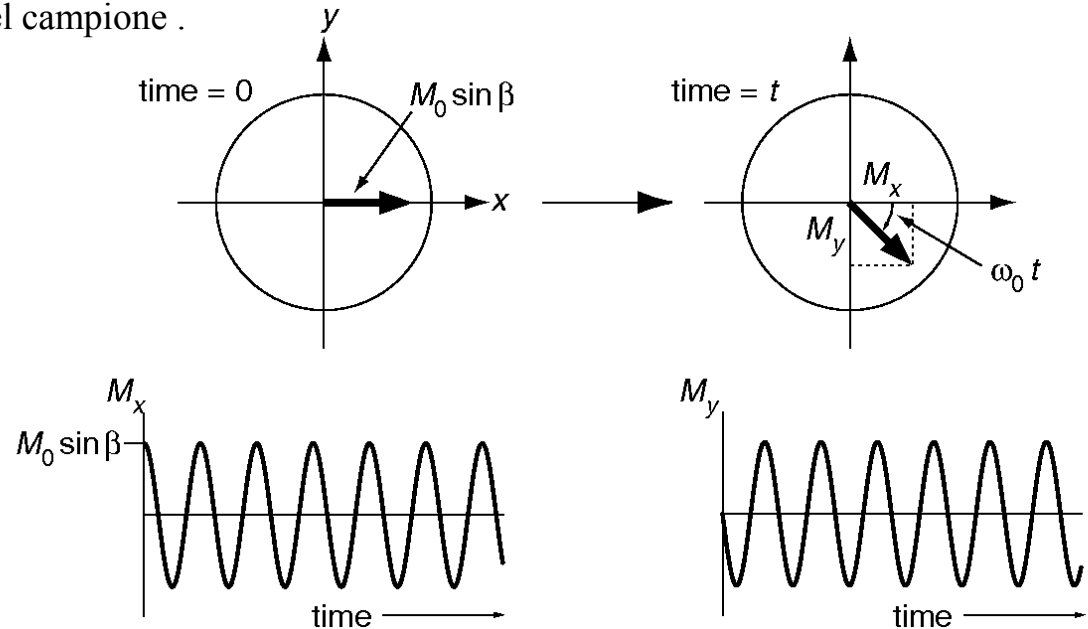
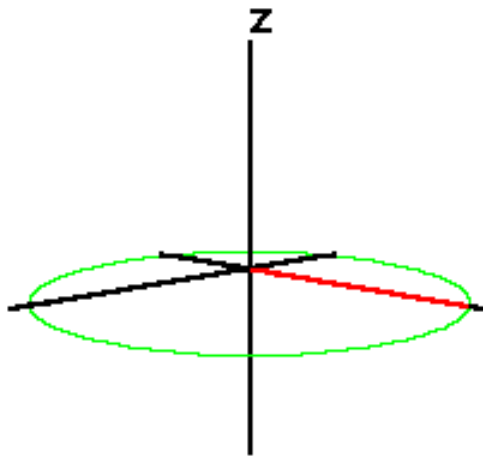
Dobbiamo generare uno stato di coerenza di fase per generare un segnale.

Applichiamo un impulso di eccitazione in radio frequenza sull'asse x o y.

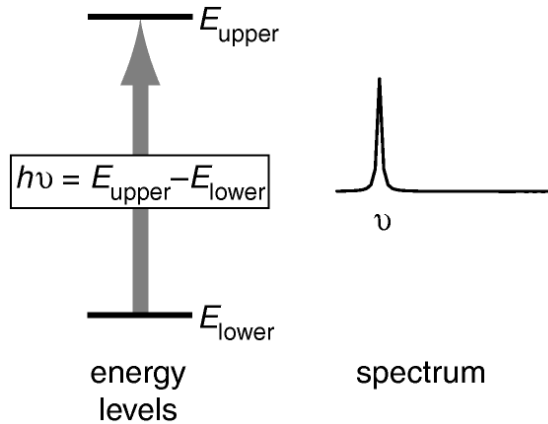
Questo aggiunge un secondo campo magnetico, in modo che gli spin precedono attorno ad esso. Spegnendo l'impulso nel tempo giusto gli spin finiscono su un asse. Ora i più spin sono in uno stato energetico più alto.

Poi precedono sul piano xy con coerenza di fase tornando allo stato energetico più basso.

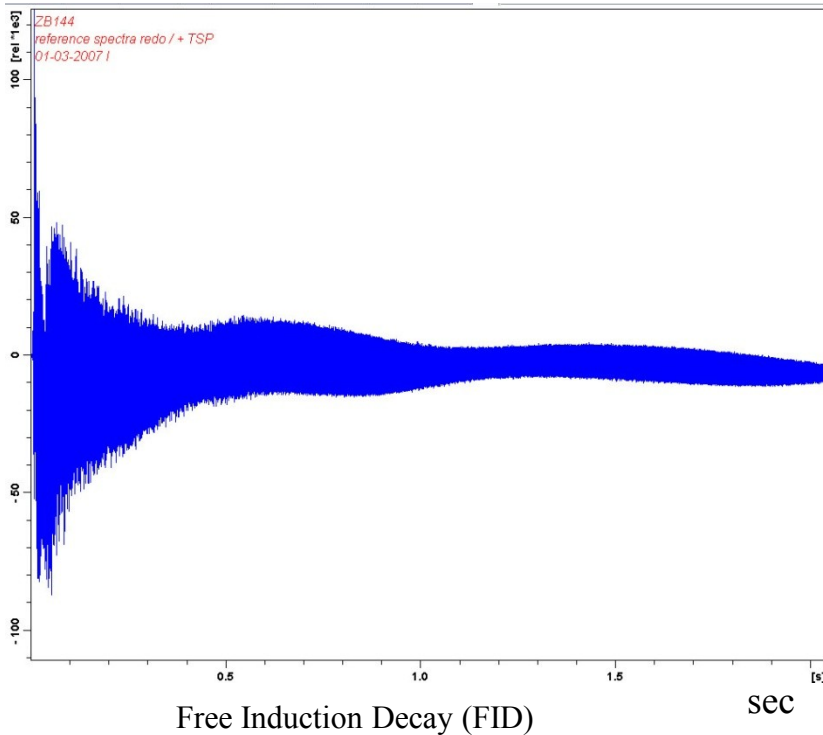
Questo porta ad un segnale nella spira del campione .



# Il segnale NMR e lo spettro

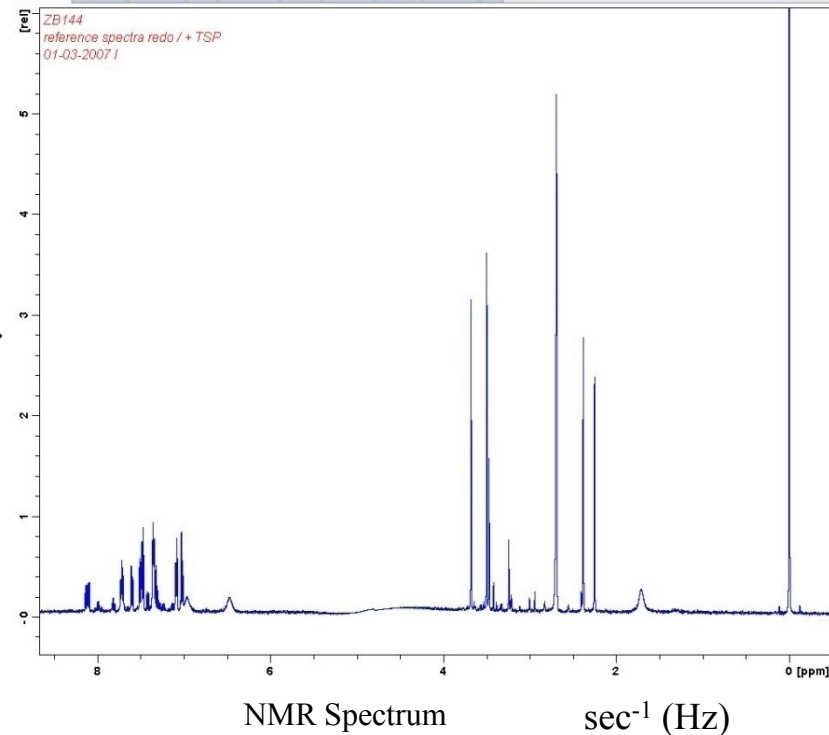


La differenza in energia tra i due stati dello spin deve corrispondere all'energia della radiazione di eccitazione (condizione di risonanza). Il rate in cui  $\mu$  precessa nel piano xy dipenderà da questa differenza di energia. Quindi ogni spin che precessa darà un segnale nello spettro NMR ad una certa frequenza.

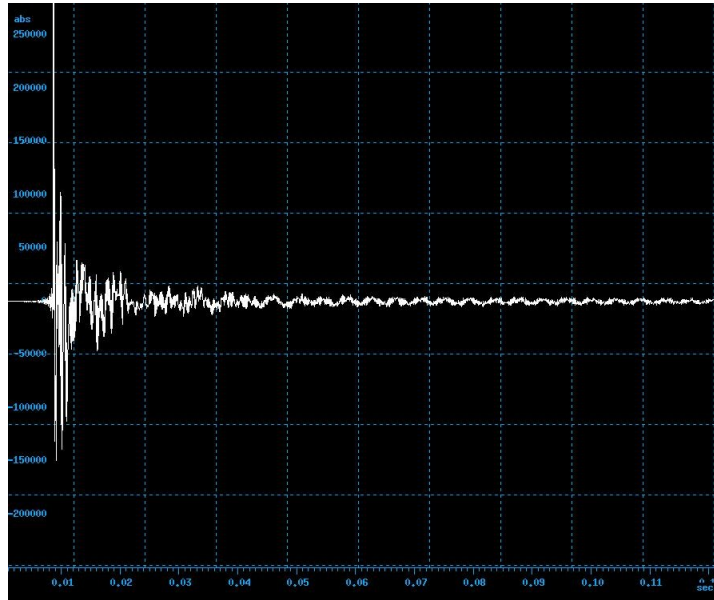


Fourier Transform

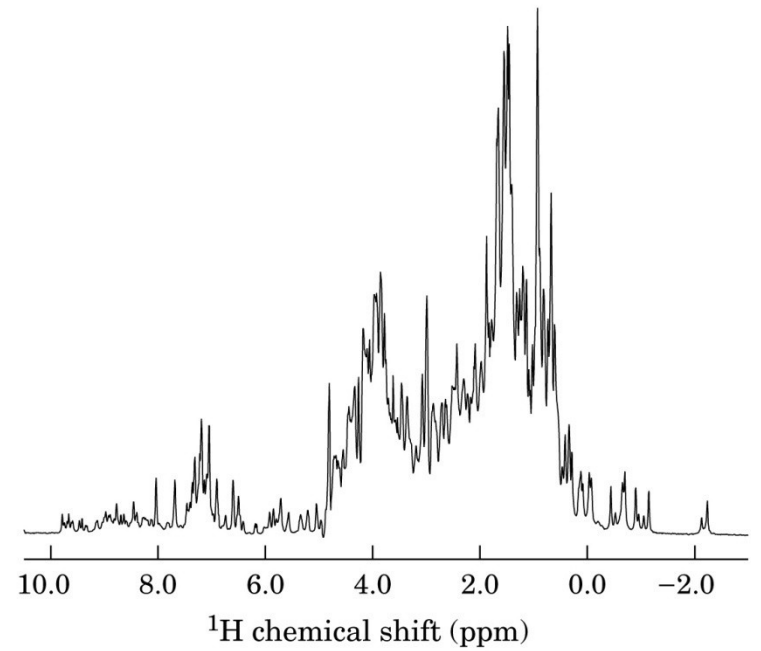
A large black double-headed arrow points from the FID plot on the left to the NMR Spectrum plot on the right, indicating the Fourier Transform process.



# Raccolta dei dati NMR



FT



Time domain data

Frequency domain data

# Free Induction Decay

Misurazione del segnale

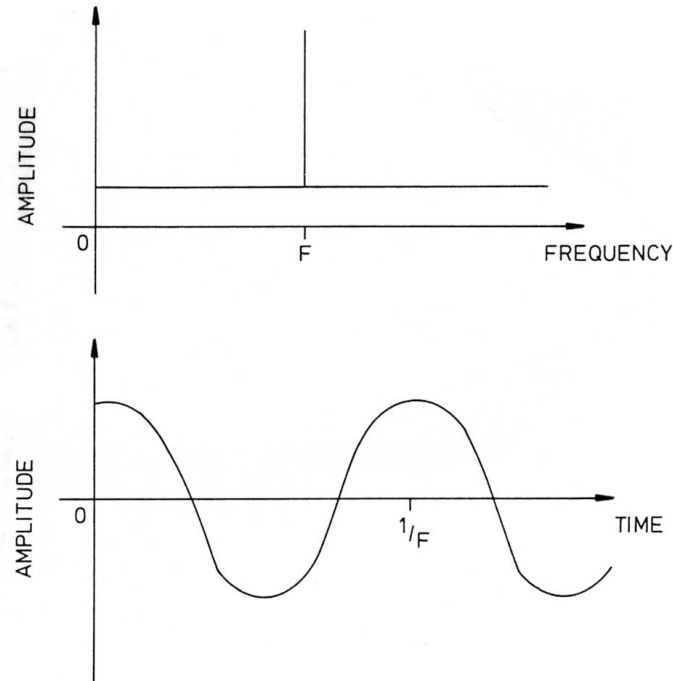
-> si misura la risposta per un periodo di tempo dell'ordine del secondo.

La risposta viene detta Free Induction Decay -FID.

**Tempo e frequenza sono inversamente correlati, per andare dal dominio del tempo al dominio della frequenza abbiamo bisogno della trasformata di Fourier,**

# Come funziona FT NMR?

Queste due rappresentazioni sono le stesse



Nel NMR, ci sono più di un segnale come questo.

Nel dominio del tempo tutte le risonanze agiscono insieme e l'oscillazione dell'onda sarà una combinazione delle frequenze e delle ampiezze.



# Trasformata di Fourier

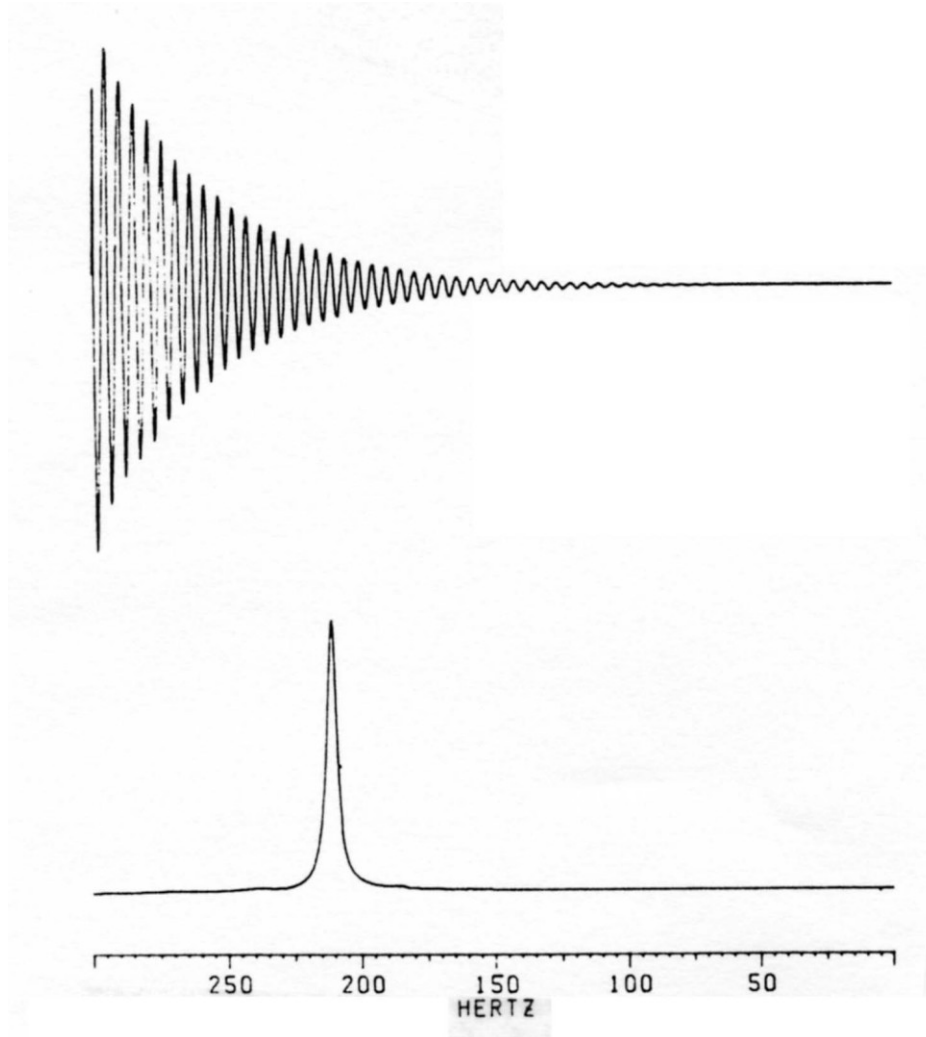
Per estrarre le informazioni del dominio della frequenza dal dominio del tempo, partiamo dalla relazione:

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{i\omega t} dt$$

$f(\omega)$  = dominio dello spettro delle frequenze

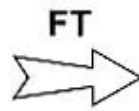
$f(t)$  = dominio dello spettro del tempo

# Implementazione pratica del Pulse NMR

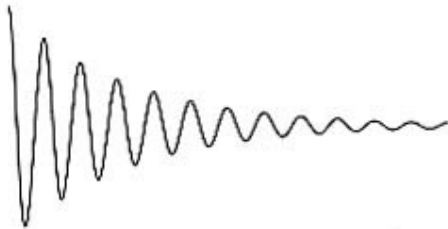
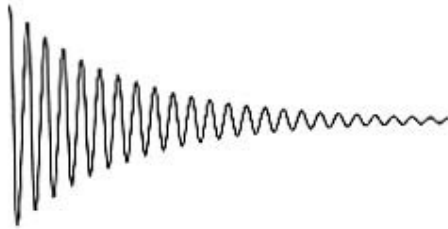
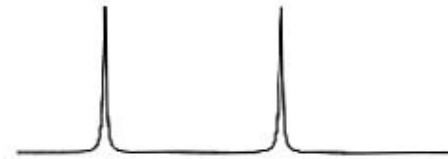
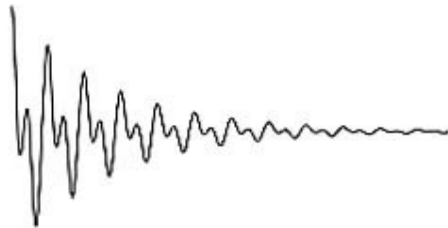


Nell’NMR il segnale decade esponenzialmente . Quindi il FID decade ad ampiezza zero sul tempo esponenzialmente.

time domain



frequency domain

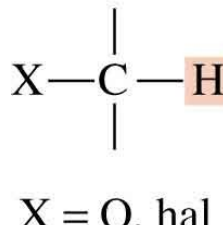
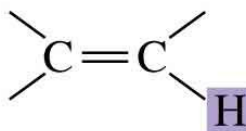
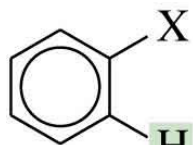
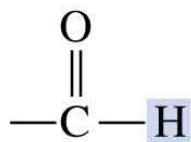


time

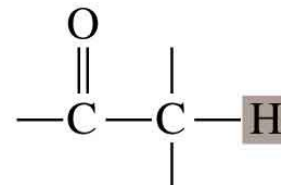
frequency

# Hydrogen and Carbon Chemical Shifts

-COOH  
 $\delta 11-12$



X = O, hal



10

9

8

7

6

5

4

3

2

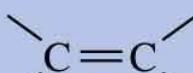
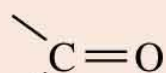
1

0

aromatic C



C-Cl, C-Br



alkanes

200

150

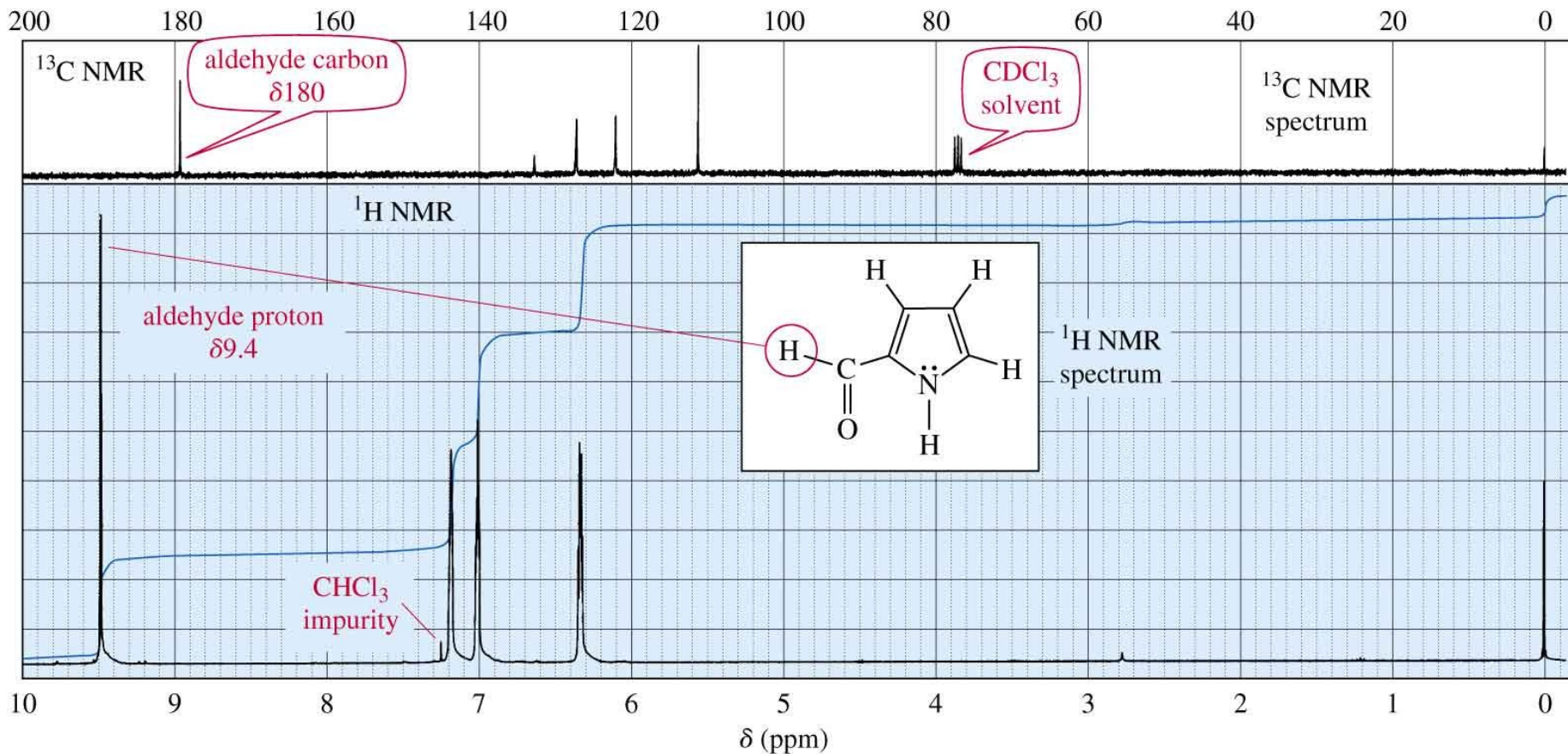
100

50

0

$\Rightarrow$

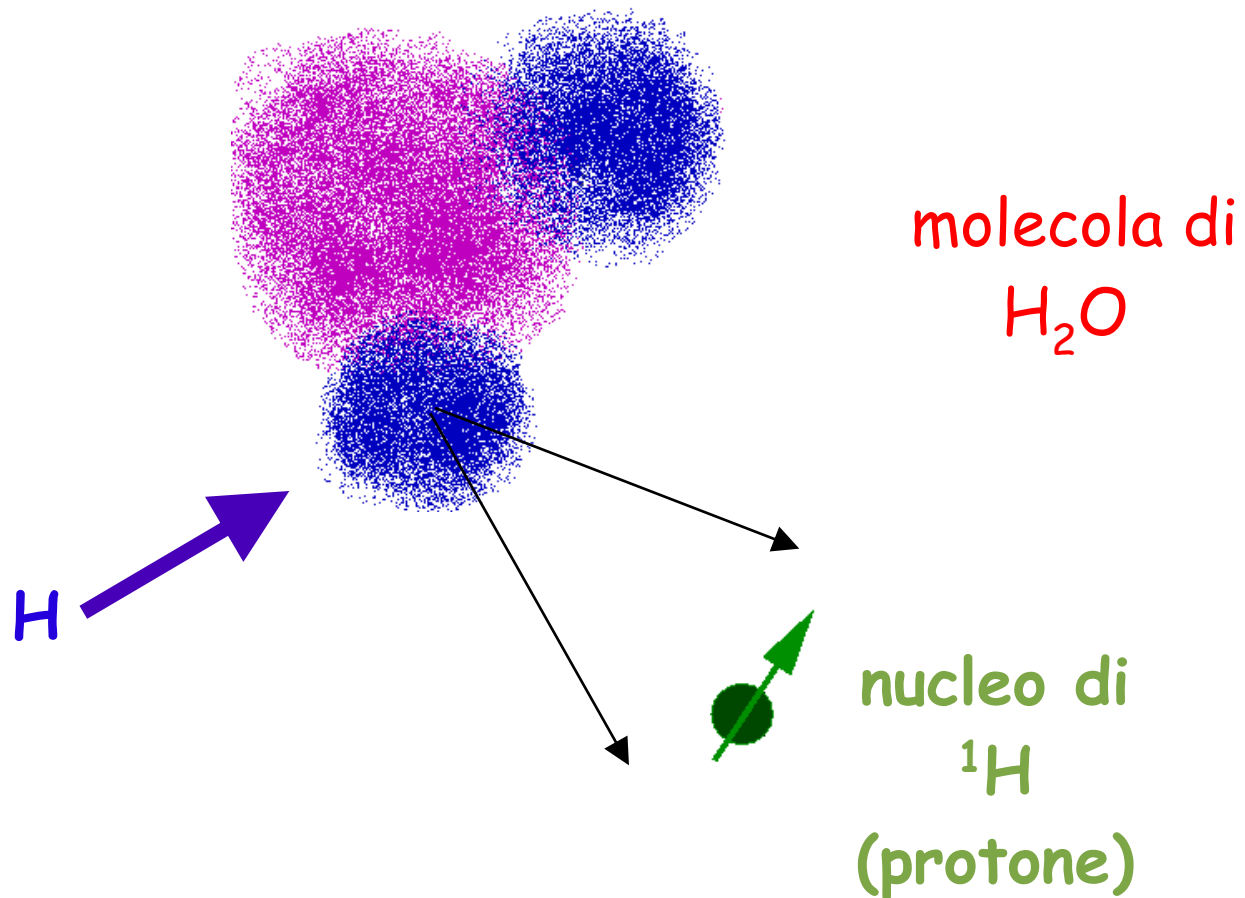
# Combined $^{13}\text{C}$ and $^1\text{H}$ Spectra



# MRI

- Magnetic resonance imaging, non invasiva
- Solo protoni sullo stesso piano posso risuonare allo stesso tempo.
- Computer mette insieme “fette” per ricostruire il 3D.
- I tumori vengono rilevati.

# La Risonanza Magnetica Nucleare (NMR): cosa si osserva?

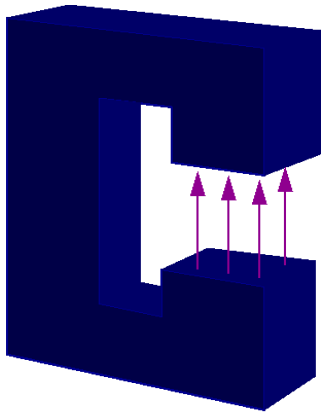


NMR (e MRI) c)

occorre

farli danzare a tempo

irraggiandoli inizialmente con onde radio



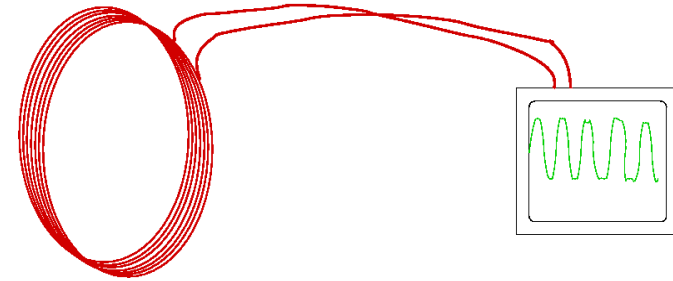
+



+



+



a)

magnete  
nucleari

b)

spin

d)

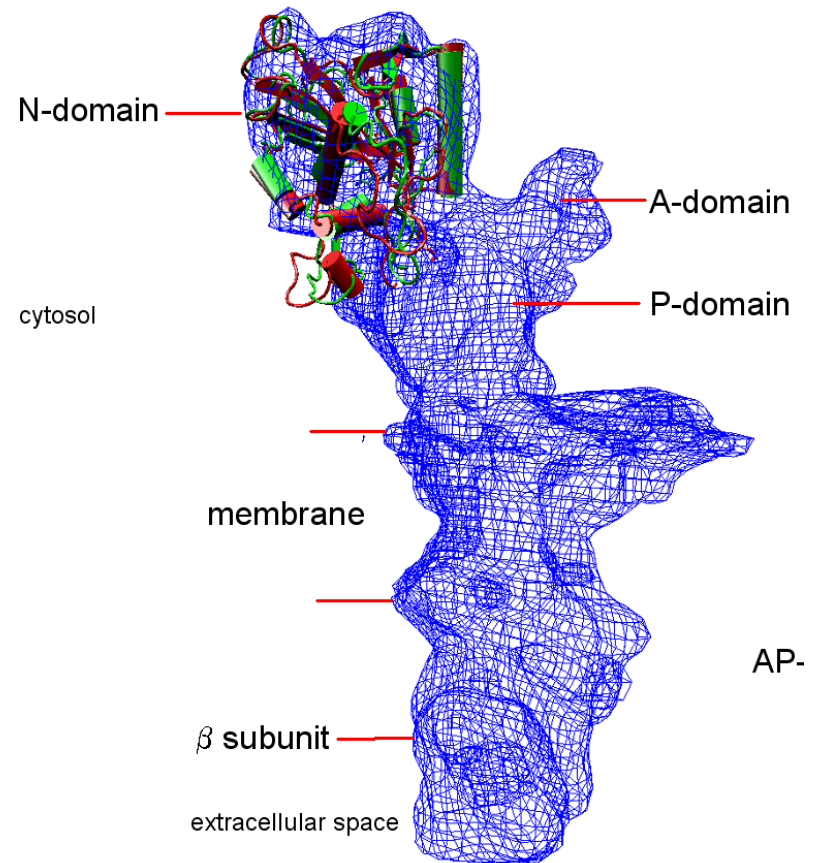
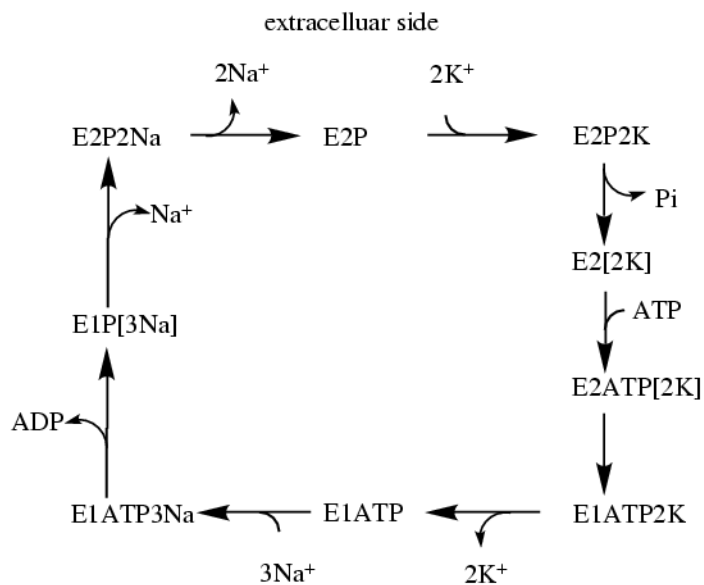
induzione di un  
segnale  
alla frequenza



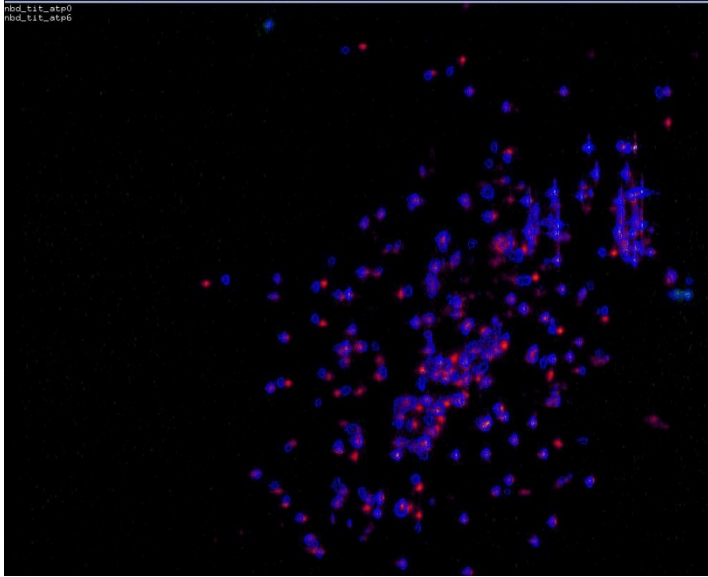
# Che si può fare con l' NMR?

- Strutture 3D
- Rilevare/quantizzare legami
- Dinamiche
- Sviluppare nuovi farmaci
- Prendere immagini

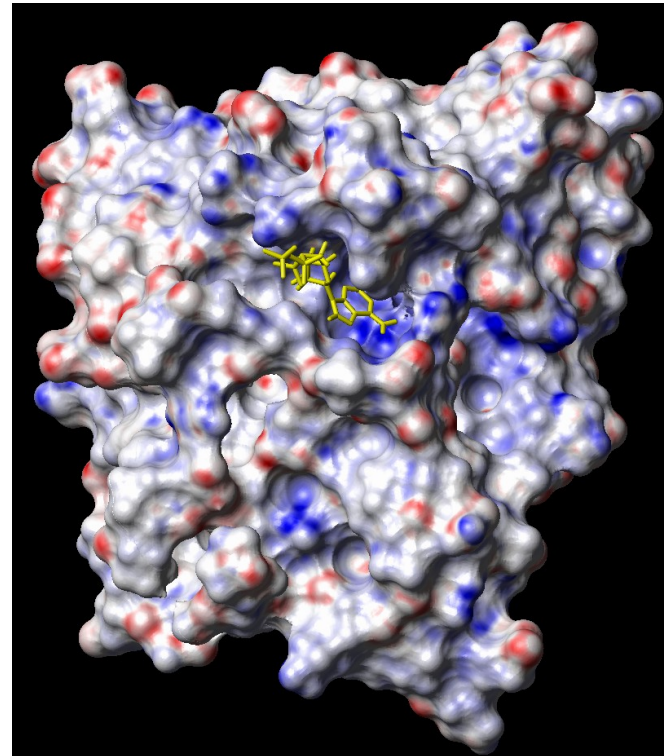
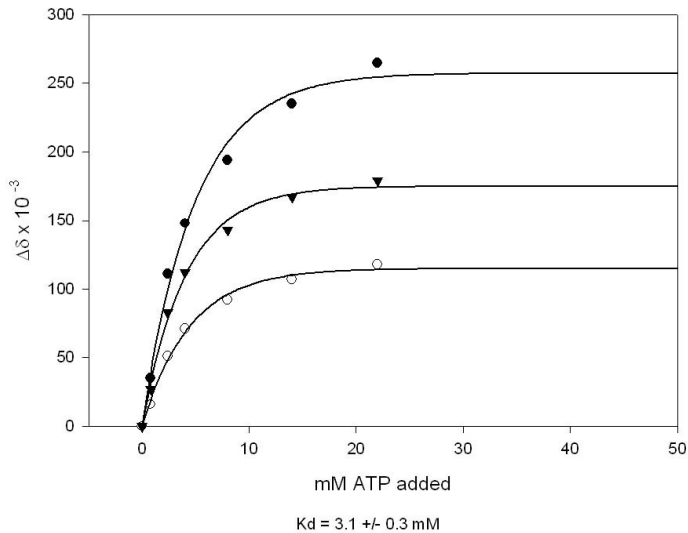
# Che si può fare con l'NMR?



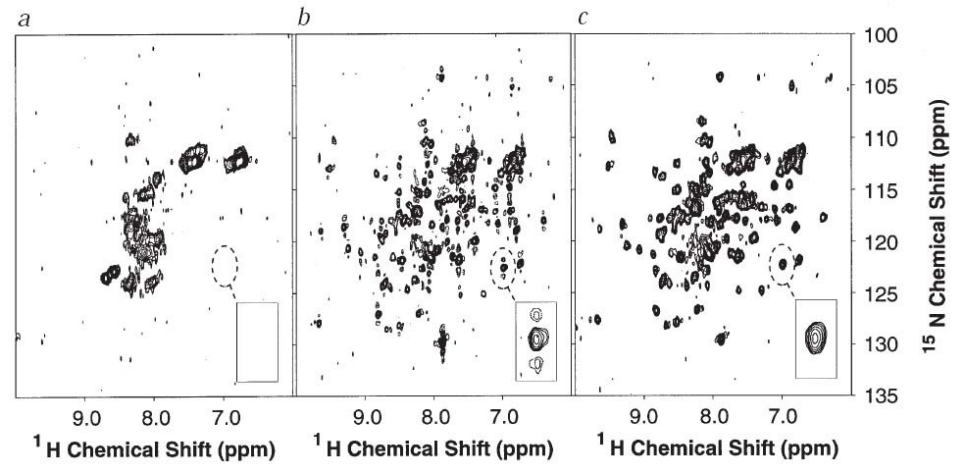
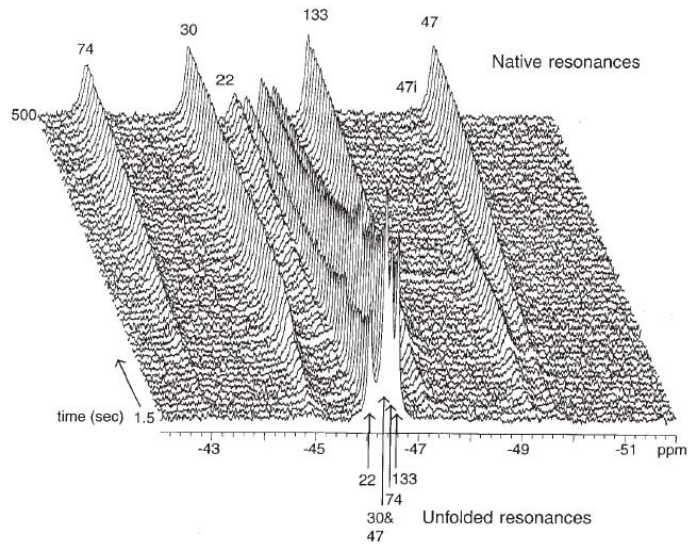
# Detect, Measure and Map Ligand Binding



titration of NBD sample 3 with ATP

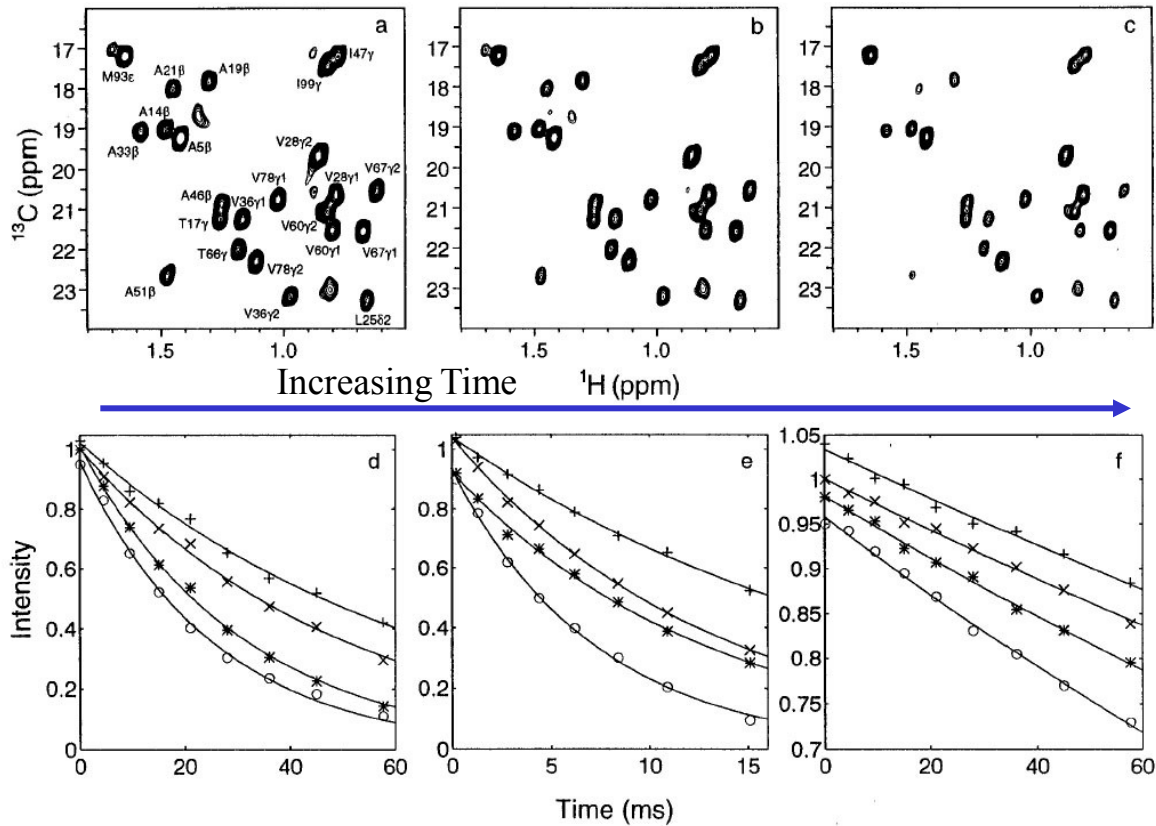


# Metodi per studiare il folding: NMR

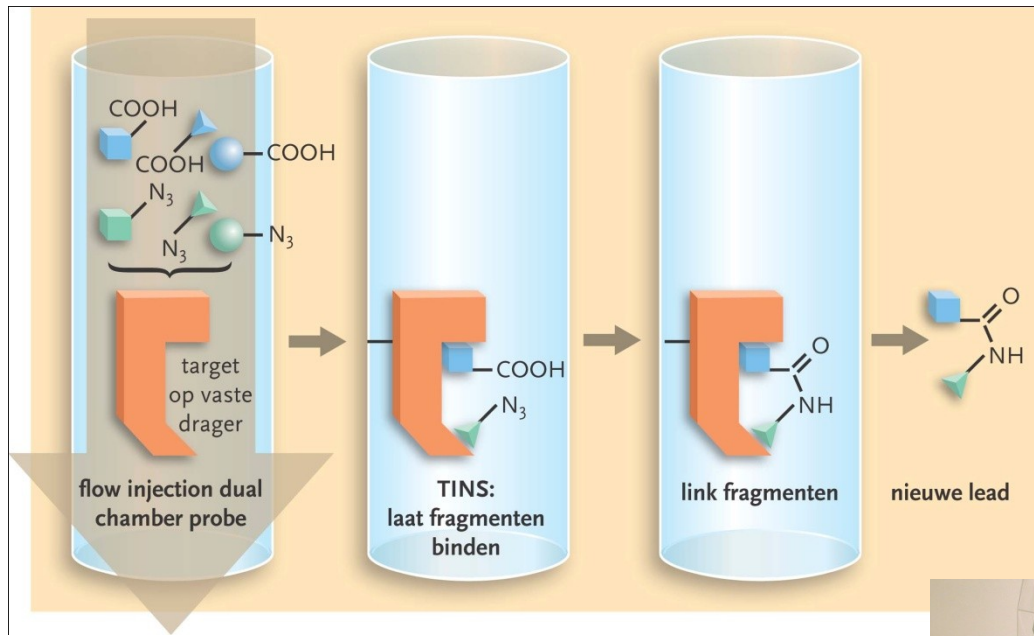


Folding of Lysozyme

# Studiare la dinamica delle proteine



# NMR in Drug Discovery



# MRI NMR Imaging



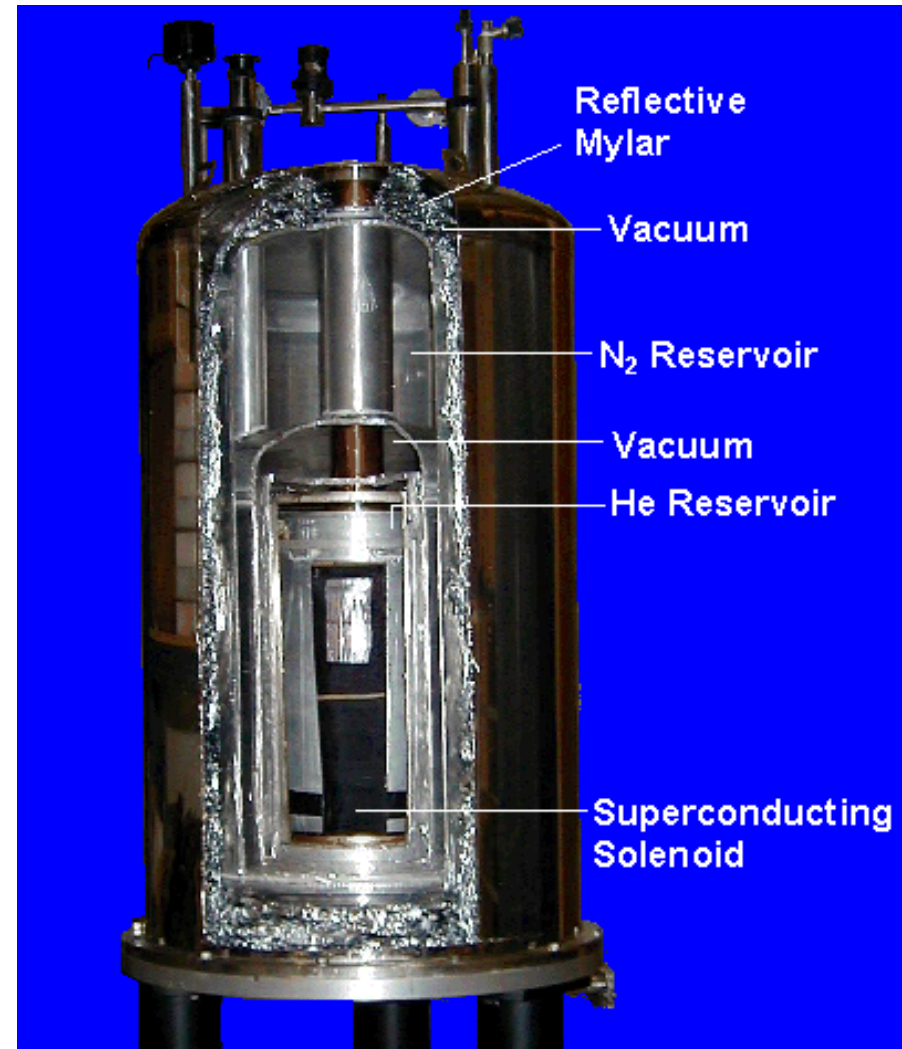
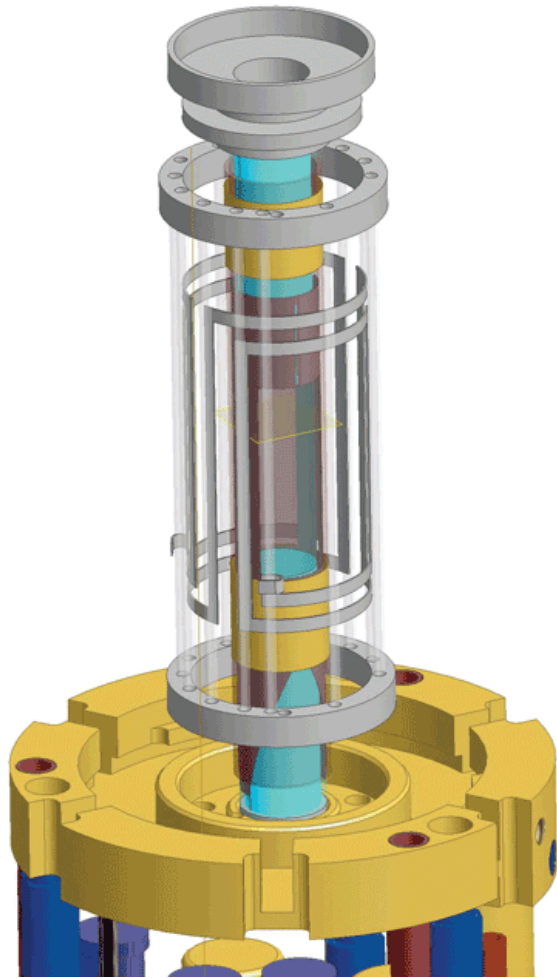
# The Spectrometer

600 MHz  $^1\text{H}$  frequency





# Spettrometro NMR



# Spettroscopia NMR – Paragone con UV/Vis

## Livelli energetici

UV/vis → e- che salta su un orbitale differente ( $3.6 \times 10^{-17}$  J)

NMR → momento angolare di spin nucleare (**I**) che salta un un livello differente ( $2.6 \times 10^{-25}$  J)

## Eccitazione

UV/vis → luce

NMR → pulse in radio frequenza

## Misura

UV/vis → assorbanza del segnale incidente

NMR → segnale indotto nella spira

## Rilevazione

UV/vis → con onda continua (assorbimento su frequenze)

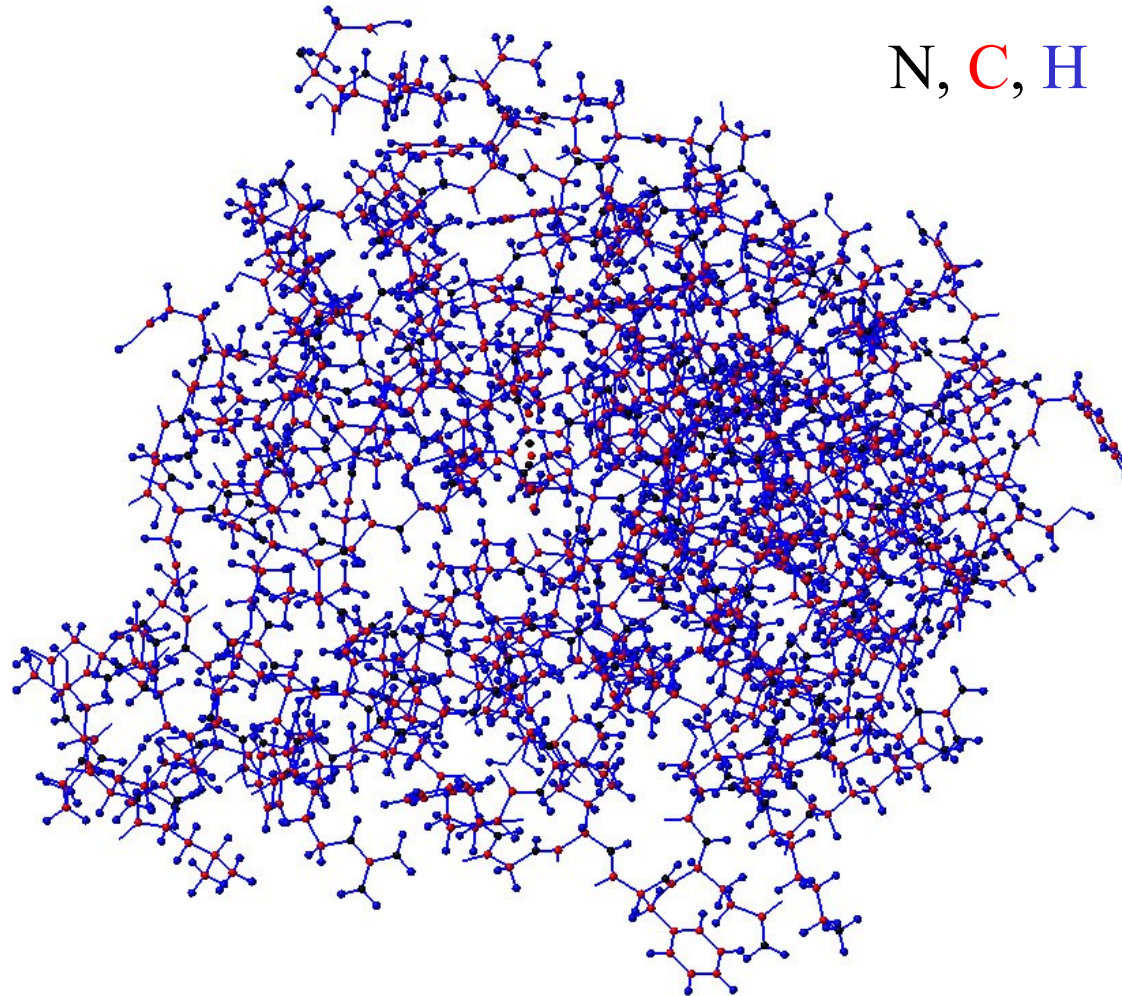
NMR → modo dei tempi (s(t), la trasformata di fourier lo porta al dominio delle frequenze)

## Larghezza della riga

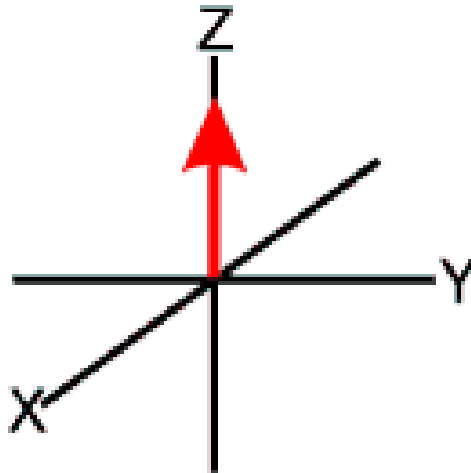
UV/vis → 50 nm o  $3.7 \times 10^9$  Hz

NMR → 0.1 Hz per piccola molecola (10 Hz protein)

# NMR ha rivelatori intrinseci nella proteina



# Fine del segnale.



Il segnale NMR non dura per sempre.

Dopo circa un secondo svanisce.

Lo stato eccitato generato con l'impulso in radio frequenza decade (rilassa) allo stato energetico più basso (equilibrio).

# NMR Periodic Table

NMR “active” Nuclear Spin ( $I$ ) =  $\frac{1}{2}$ :

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$

biological and chemical relevance

Odd atomic mass

$I = +\frac{1}{2}$  &  $-\frac{1}{2}$

NMR “inactive” Nuclear Spin ( $I$ ) = 0:

$^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$

Even atomic mass & number

Quadrupole Nuclei Nuclear Spin ( $I$ ) >  $\frac{1}{2}$ :

$^{14}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{10}\text{B}$

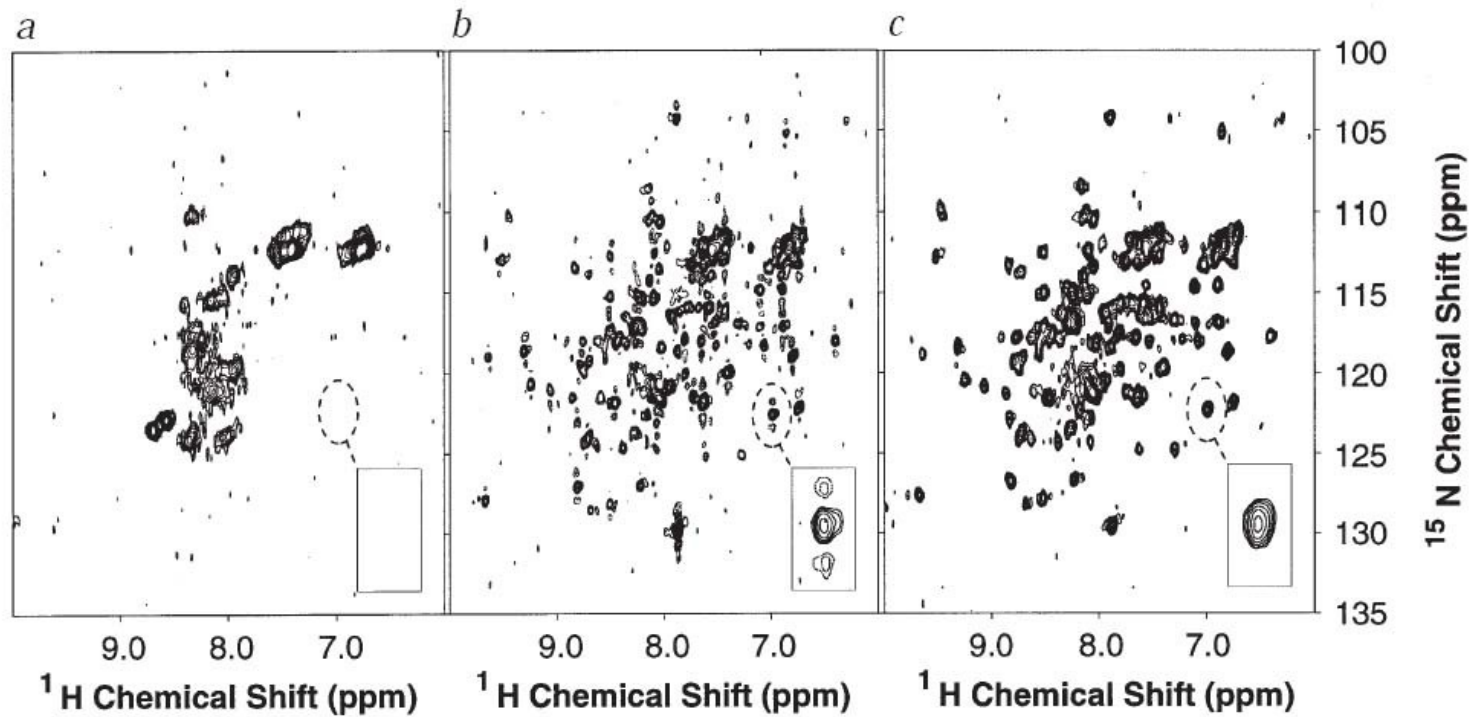
Even atomic mass & odd number

$I = +1, 0$  &  $-1$

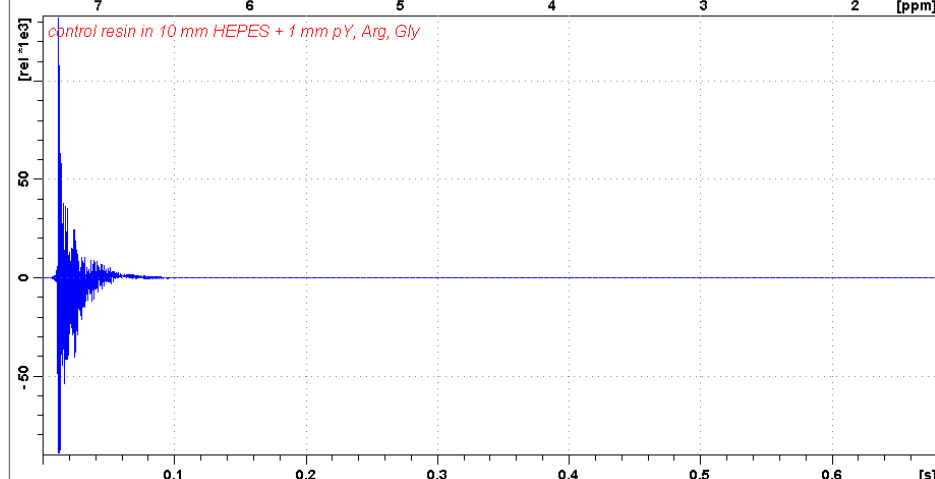
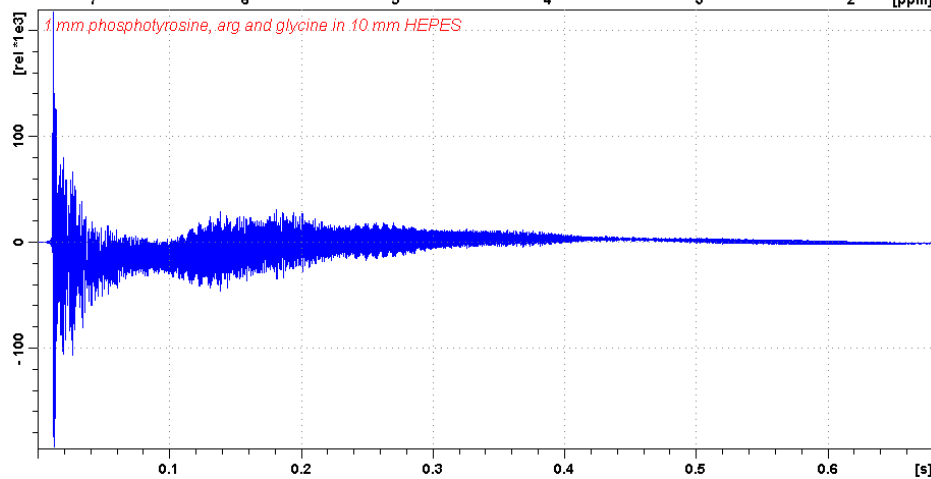
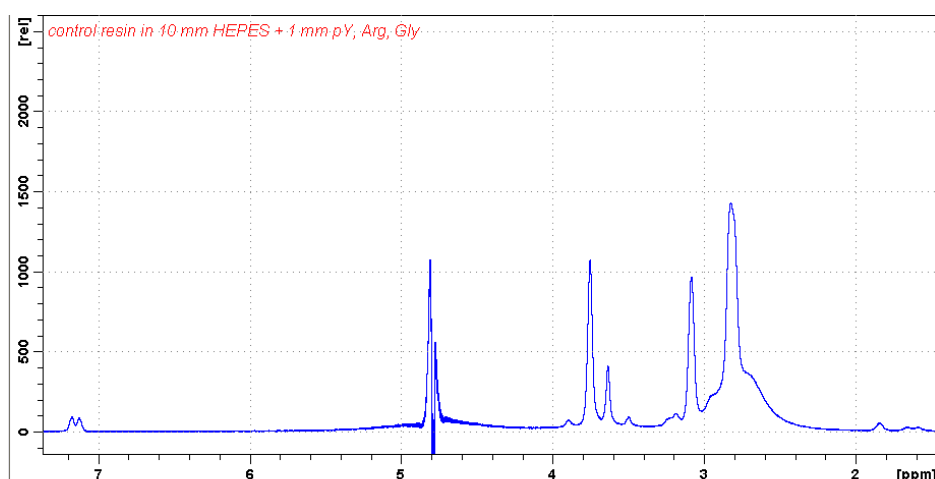
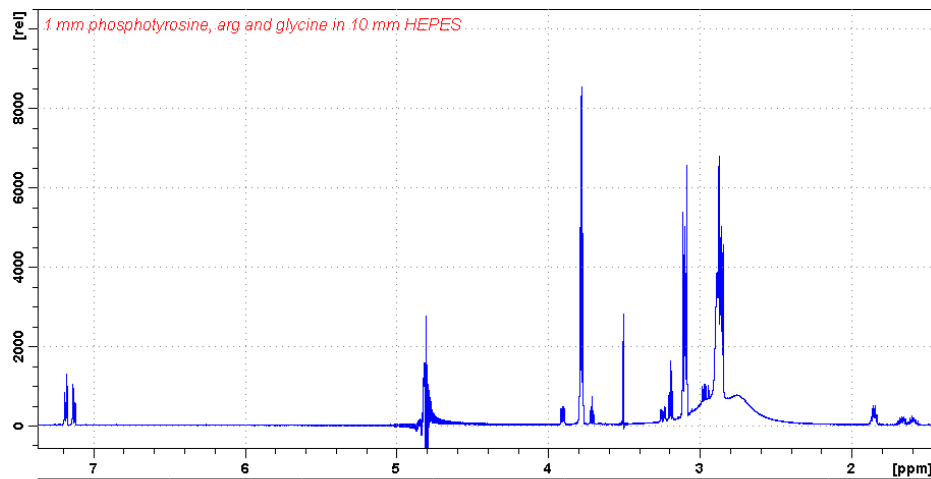
**Table 1.1** Nuclear properties of some of the elements

| Element    | Atomic mass | Spin $I$ | Natural abundance (%) | Receptivity ( $^{13}\text{C} = 1.00$ ) | Quadrupole moment ( $10^{30} \text{ m}^2$ ) | Resonant frequency (MHz) at 2.348 T |
|------------|-------------|----------|-----------------------|--|---|-------------------------------------|
| Hydrogen   | 1           | 1/2      | 99.985                | 5670                                   | None  | 100.00                              |
| Deuterium  | 2           | 1        | 0.015                 | 0.0082                                 | 0.287                                       | 15.35                               |
| Tritium    | 3           | 1/2      | Radioactive           | –                                      | None  | 106.66                              |
| Helium     | 3           | 1/2      | 0.00014               | 0.0035                                 | None  | 76.18                               |
| Lithium    | 6           | 1        | 7.42                  | 3.58                                   | –0.064                                      | 14.72                               |
| Lithium    | 7           | 3/2      | 92.58                 | 1540                                   | –3.7  | 38.87                               |
| Beryllium  | 9           | 3/2      | 100                   | 78.8                                   | 5.3   | 15.06                               |
| Boron      | 10          | 3        | 19.58                 | 22.1                                   | 7.4   | 10.75                               |
| Boron      | 11          | 3/2      | 80.42                 | 754                                    | 4.1   | 32.08                               |
| Carbon     | 13          | 1/2      | 1.108                 | 1.00                                   | None  | 25.15                               |
| Nitrogen   | 14          | 1        | 99.63                 | 5.70                                   | 1.67  | 7.23                                |
| Nitrogen   | 15          | 1/2      | 0.37                  | 0.022                                  | None  | 10.14                               |
| Oxygen     | 17          | 5/2      | 0.037                 | 0.061                                  | –2.6  | 13.56                               |
| Fluorine   | 19          | 1/2      | 100                   | 4730                                   | None  | 94.09                               |
| Neon       | 21          | 3/2      | 0.257                 | 0.0036                                 | 9   | 7.90                                |
| Sodium     | 23          | 3/2      | 100                   | 524                                    | 10  | 26.43                               |
| Magnesium  | 25          | 5/2      | 10.13                 | 1.54                                   | 22  | 6.13                                |
| Aluminium  | 27          | 5/2      | 100                   | 1170                                   | 14  | 26.08                               |
| Silicon    | 29          | 1/2      | 4.7                   | 2.1                                    | None  | 19.87                               |
| Phosphorus | 31          | 1/2      | 100                   | 377                                    | None  | 40.48                               |
| Sulfur     | 33          | 3/2      | 0.76                  | 0.098                                  | –6.4  | 7.67                                |
| Chlorine   | 35(37)      | 3/2      | 75.53                 | 20.2                                   | –8.2  | 9.81                                |
| Potassium  | 39          | 3/2      | 93.1                  | 2.69                                   | 5.5   | 4.67                                |
| Calcium    | 43          | 7/2      | 0.145                 | 0.053                                  | –5  | 6.74                                |
| Scandium   | 45          | 7/2      | 100                   | 1720                                   | –22   | 24.33                               |
| Titanium   | 49(47)      | 7/2      | 5.51                  | 1.18                                   | 24  | 5.64                                |
| Vanadium   | 51(50)      | 7/2      | 99.76                 | 2170                                   | –5.2  | 26.35                               |
| Chromium   | 53          | 3/2      | 9.55                  | 0.49                                   | –15   | 5.64                                |
| Manganese  | 55          | 5/2      | 100                   | 1014                                   | 40  | 24.84                               |
| Iron       | 57          | 1/2      | 2.19                  | 0.00425                                | None  | 3.24                                |
| Cobalt     | 59          | 7/2      | 100                   | 1560                                   | 42  | 23.73                               |
| Nickel     | 61          | 3/2      | 1.19                  | 0.24                                   | 16  | 8.93                                |
| Copper     | 63(65)      | 3/2      | 69.09                 | 368                                    | –22   | 26.51                               |
| Zinc       | 67          | 5/2      | 4.11                  | 0.67                                   | 15  | 6.25                                |
| Gallium    | 71(69)      | 3/2      | 39.6                  | 322                                    | 11  | 30.58                               |
| Germanium  | 73          | 9/2      | 7.76                  | 0.62                                   | –17   | 3.48                                |
| Arsenic    | 75          | 3/2      | 100                   | 144                                    | 29  | 17.18                               |
| Selenium   | 77          | 1/2      | 7.58                  | 3.02                                   | None  | 19.07                               |
| Bromine    | 81(79)      | 3/2      | 49.46                 | 279                                    | 27  | 27.10                               |
| Krypton    | 83          | 9/2      | 11.55                 | 1.24                                   | 27  | 3.86                                |
| Rubidium   | 87(85)      | 3/2      | 27.85                 | 280                                    | 13  | 32.84                               |
| Strontium  | 87          | 9/2      | 7.02                  | 1.08                                   | 16  | 4.35                                |
| Yttrium    | 89          | 1/2      | 100                   | 0.676                                  | None  | 4.92                                |
| Zirconium  | 91          | 5/2      | 11.23                 | 6.05                                   | –21   | 9.34                                |
| Niobium    | 93          | 9/2      | 100                   | 2770                                   | –32   | 24.55                               |
| Molybdenum | 95(97)      | 5/2      | 15.72                 | 2.92                                   | –1.5  | 6.55                                |
| Technetium | 99          | 9/2      | Radioactive           | –                                      | –0.13                                       | 22.51                               |
| Ruthenium  | 99(101)     | 5/2      | 12.72                 | 0.815                                  | 7.6   | 4.61                                |
| Rhodium    | 103         | 1/2      | 100                   | 0.18                                   | None  | 3.16                                |
| Palladium  | 105         | 5/2      | 22.23                 | 1.43                                   | 65  | 4.58                                |
| Silver     | 109(107)    | 1/2      | 48.18                 | 0.28                                   | None  | 4.65                                |
| Cadmium    | 113(111)    | 1/2      | 12.26                 | 7.69                                   | None  | 22.18                               |

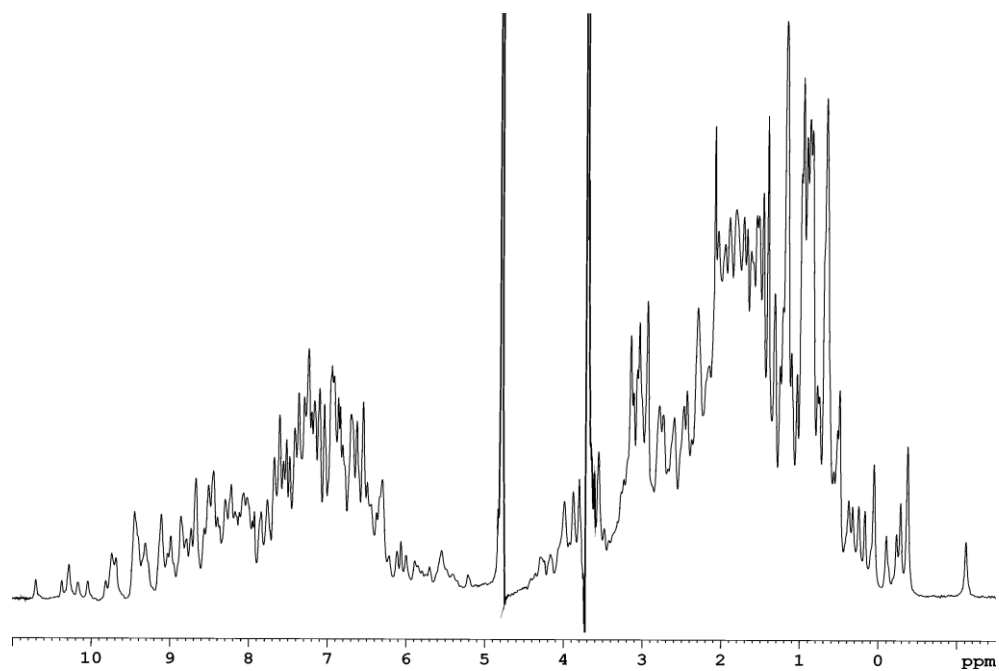
# Folded vs Unfolded



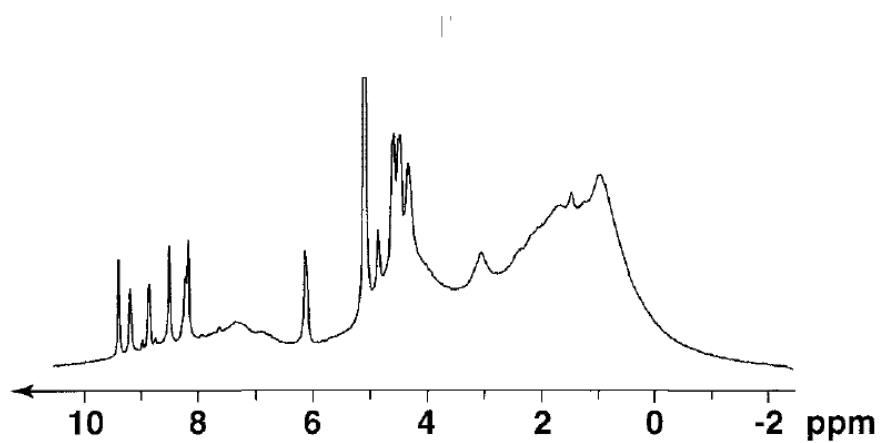
# Relaxation and the Measurement of Molecular Movement



# Narrow vs Broad Lines

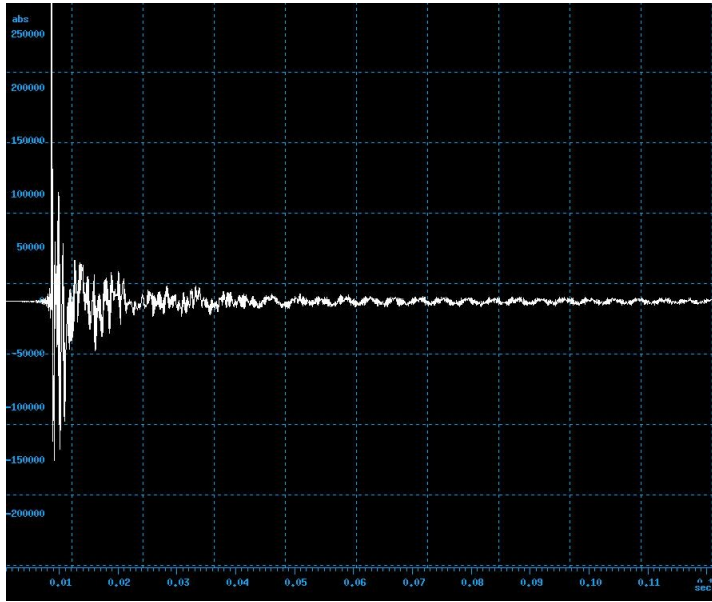


**b**

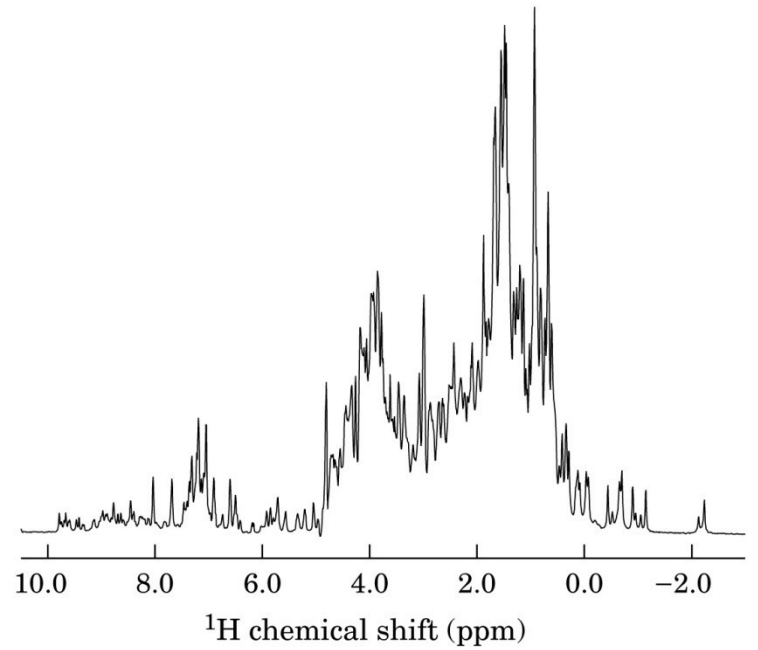




# Presentation of NMR Data



FT



Time domain data

Frequency domain data