

Jednowymiarowe widma NMR

Jan Stanek

Zespół redakcyjny: Michał Górka, Katarzyna Grudziąż, Wiktor Koźmiński,
Anna Zawadzka-Kazimierczuk, Szymon Żerko

21 lutego 2023 r.

Spektroskopia NMR

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) pozwala na badanie struktury, dynamiki oraz oddziaływań cząsteczek zawierających magnetyczne izotopy za pomocą pól elektromagnetycznych częstości radiowej. Głównym obszarem zastosowań są fazy skondensowane, tj. cząsteczki w ciekłych rozpuszczalnikach lub materiałach w fazie stałej. NMR znalazł wiele zastosowań w chemii, biologii strukturalnej, a także w diagnostyce medycznej (np. w metabolomice). Pokrewna technika obrazowania magnetycznego (MRI) opiera się na wspólnych fundamentach fizycznych.

Spinowy moment pędu

W 1922 r. w doświadczeniu Sterna-Gerlacha wykazano, że atomy posiadające jeden niesparowany elektron w niejednorodnym polu magnetycznym poruszają się po dwóch trajektoriach. Jedynym sensownym wytłumaczeniem było, iż elektrony posiadają wewnętrzny moment pędu, nazwany spinem. Nie ma on odpowiednika klasycznego, zatem wprowadzono go tylko do formalizmu mechaniki kwantowej opisującego zachowania obiektów w mikroświecie. Podsumujmy podstawowe fakty dotyczące spinowego momentu pędu.

Jak każdej wielkości obserwowalnej w mechanice kwantowej, spinowi przypisuje się operatory: kwadratu długości spinowego momentu pędu, \hat{S}^2 , oraz rzutu spinowego momentu pędu na wyróżnioną oś, \hat{S}_z ¹.

Istnieją cząstki, które mogą mieć więcej niż 2 dozwolone rzuty spinu. Dla ogólnego opisu wprowadzamy dwie liczby kwantujące długość i rzut wektora spinu. **Spinowa liczba kwantowa** S określa długość spinu

$$\hat{S}^2|k\rangle = S(S+1)\hbar^2|k\rangle \quad (1)$$

tzn. długość ta jest równa $\sqrt{S(S+1)}\hbar$ i jest niezmienną cechą cząstki niezależnie od jej stanu. Liczba spinowa S przyjmuje wartości nieujemne połówkowe ($\frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \dots$) lub całkowite ($0, 1, 2, \dots$).

Natomiast **magnetyczna spinowa liczba kwantowa** m_S określa rzut spinu na dowolnie wybraną oś (tutaj oś z):

$$\hat{S}_z|k\rangle = m_S\hbar|k\rangle \quad (2)$$

czyli dla stanów własnych $|k\rangle$ jest on równy $S_z = m_S\hbar$. Magnetyczna spinowa liczba kwantowa m_S przyjmuje jedną z $2S+1$ wartości ze zbioru $\{-S, -S+1, \dots, +S\}$. Nie jest możliwe jednoczesne określenie rzutu wektora spinu na więcej niż jedną oś.

Przypadek liczby spinowej $S = 1/2$ jest bardzo ważny dla NMR, dlatego wprowadza się specjalną notację. Stany własne operatora rzutu spinu oznaczamy jako $|\alpha\rangle$ oraz $|\beta\rangle$:

$$\begin{aligned} \hat{S}_z|\alpha\rangle &= +1/2\hbar|\alpha\rangle \\ \hat{S}_z|\beta\rangle &= -1/2\hbar|\beta\rangle \end{aligned} \quad (3)$$

¹Symbole półgrube (np. $\boldsymbol{\mu}$) oznaczają wektory lub tensory. Symbol $\hat{}$ oznacza operatory

Cząstka o $S = 1/2$ może być albo w stanie własnym $|\alpha\rangle$ lub $|\beta\rangle$, albo w stanie mieszanym czyli superpozycji stanów własnych. W ostatnim przypadku rzut spinu na oś z nie jest określony, tzn. w momencie pomiaru z określonym prawdopodobieństwem przyjmie jedną z wartości $\pm 1/2\hbar$.

Magnetyzm jądrowy

Zjawisko NMR można zaobserwować dla jąder o niezerowym momencie magnetycznym, $\boldsymbol{\mu}$. Ten, podobnie jak dla elektronu, wynika z niezerowego wektora spinu \boldsymbol{S} , a stałą proporcjonalności nazywamy współczynnikiem żyromagnetycznym danego jądra I , γ_I :

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma_I \boldsymbol{S} \quad (4)$$

Wartości współczynników żyromagnetycznych jąder są charakterystyczne dla poszczególnych izotopów. Mogą być dodatnie lub ujemne, a wyznacza się je eksperymentalnie.

Moment magnetyczny wynika z ładunku elektrycznego protonów współtworzących jądro oraz ich ruchu obrotowego w jądrze (opisywanego przez wypadkowy spin jądra)². Zależnie od liczby nukleonów i budowy jądra (liczby protonów i neutronów), spin jest równy zero (dla izotopów parzysto-parzystych, np. ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S), lub jest opisany przez połówką (dla jąder parzysto-nieparzystych albo nieparzysto-parzystych, np. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{27}Al , ^{35}Cl) albo całkowitą (dla jąder nieparzysto-nieparzystych, np. ^2H , ^{14}N) liczbą spinową S . Technika NMR najprościej badać jądra o **liczbie spinowej** $S = 1/2$ (np. ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{29}Si , ^{31}P); jądra o $S > 1/2$ posiadają elektryczny moment kwadrupolowy utrudniający rejestrację widm. Pożądane jest, aby jądro miało **duży współczynnik żyromagnetyczny** (co do wartości bezwzględnej). Stabilnym izotopem o najwyższym współczynniku $\gamma = 42.58 \text{ rad MHz T}^{-1}$ jest ^1H . Ponadto cząsteczka albo mieszanina powinny zawierać odpowiednio dużo jąder danego izotopu, tj. jego duże stężenie (co najmniej rzędu μM dla ^1H NMR). Dlatego ogromne znaczenie ma również **rozpowszechnienie izotopu**, przykładowo powszechność występowania ^1H (99,9885%) decyduje o łatwości pomiarów NMR jąder wodoru, natomiast niska zawartość magnetycznego izotopu ^{13}C (1,07%) stanowi pewną trudność.

Moment magnetyczny w zewnętrznym polu B

W zewnętrznym polu magnetycznym \boldsymbol{B} energia momentu magnetycznego jest zależna od orientacji:

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \boldsymbol{B} = -(\mu_x B_x + \mu_y B_y + \mu_z B_z) \quad (5)$$

Przyjmując oś z w kierunku zewnętrznego pola ($\boldsymbol{B} = B\boldsymbol{e}_z$) otrzymujemy

$$E = -\mu_z B \quad (6)$$

Dla spinu, który jest obiektem kwantowym, konstruujemy więc operator energii (hamiltonian) w następującej postaci:

$$\hat{H} = -\hat{\mu}_z B = -\gamma_I \hat{S}_z B \quad (7)$$

Stany własne hamiltonianu są jednakowe jak operatora dla rzutu spinu (np. $|\alpha\rangle$ i $|\beta\rangle$) dla $S = 1/2$. Energie własne, tj. skwantowane poziomy energetyczne, są równe:

$$E_{m_S} = -\gamma_I \hbar m_S B, \quad (8)$$

liczba dozwolonych poziomów wynosi $2S + 1$, a rozszczepienie poziomów energetycznych rośnie liniowo z indukcją pola magnetycznego B . Zgodnie z konwencją, w dalszej części skryptu będziemy stosować m_I (zamiast m_S) dla oznaczenia jądrowej magnetycznej spinowej liczby kwantowej jądra I .

²Moment magnetyczny jądra ^1H czyli protonu, wynika bezpośrednio z budowy elementarnej protonu i nie jest do końca wyjaśniony

Rezonans magnetyczny

Aby doszło do przejścia NMR, zmiana magnetycznej spinowej liczby kwantowej jądra musi być równa ± 1 (**reguła wyboru**)

$$\Delta m_I = \pm 1 \quad (9)$$

W efekcie dozwolone są przejścia o następujących energiach:

$$\Delta E = -\gamma_I B \hbar \Delta m_I = \mp \hbar \gamma_I B$$

przy czym energia ta jest dodatnia przy absorpcji i odpowiada $\Delta m_I = -1$ dla dodatniego współczynnika żyromagnetycznego. Energia ta, zrównana z energią fotonu $E = h\nu = \hbar\omega$, daje **warunek rezonansu**

$$\hbar\omega = \hbar\gamma_I B \quad (10)$$

skąd częstość przejścia NMR, zwana też *częstością Larmora*:

$$\omega = \gamma_I B$$

W silnym polu magnetycznym współczesnych spektrometrów NMR (o indukcji pola magnetycznego od 7 do 23,5 T) częstości jądra ^1H wynoszą od 300 do 1000 MHz, a zatem znajdują się w zakresie częstości fal radiowych.

Przesunięcie chemiczne

W rzeczywistości częstości jąder danego izotopu w danym zewnętrznym polu \mathbf{B}_0 nie są jednakowe, lecz zależą od otoczenia chemicznego, przez co stanowią dla chemików bardzo ważny parametr. Zewnętrzne pole magnetyczne można traktować jako niewielkie zaburzenie do ruchu elektronów w polu elektrycznym jąder. W efekcie elektrony generują przeciwstawne pole indukowane \mathbf{B}_{ind} , zatem jądra znajdują się w polu efektywnym:

$$\mathbf{B} = \mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_{\text{ind}} = (1 - \sigma)\mathbf{B}_0 \quad (11)$$

W powyższym wzorze σ oznacza **tensor ekranowania**, który w ogólności posiada 3 różne wartości własne ($\sigma_{x'x'}$, $\sigma_{y'y'}$ i $\sigma_{z'z'}$), pole efektywne zależy więc od orientacji cząsteczki względem pola \mathbf{B}_0 . W cieczeniach izotropowych i gazach w wyniku szybkiej i przypadkowej względem kierunku pola \mathbf{B}_0 rotacji cząsteczek obserwuje się wartość uśrednioną (skalar), zwaną **stałą ekranowania** $\sigma = \frac{1}{3}(\sigma_{x'x'} + \sigma_{y'y'} + \sigma_{z'z'})$ i jedną częstość NMR:

$$\omega = \gamma_I(1 - \sigma)B_0$$

Stałą ekranowania σ (gdzie $0 < \sigma \ll 1$) można także zdefiniować jako względną zmianę indukcji pola magnetycznego

$$\sigma = \frac{B_0 - B}{B_0} \quad (12)$$

Zjawisko zmniejszenia indukcji pola magnetycznego w miejscu położenia jąder na skutek ruchu elektronów nazywamy *ekranowaniem*. Jądra bardziej ekranowane (duża stała σ), wykazują rezonans przy niższych częstościach i *vice versa*. Należy podkreślić, że stałe ekranowania są niewielkie co do wartości, $\sigma \ll 1$ (np. dla ^1H wartości σ są rzędu 10^{-6}).

Eksperymentalne wyznaczenie bezwzględnych stałych ekranowania nie jest w praktyce możliwe. Zamiast tego, częstości jąder porównuje się z częstością próbki wzorcowej (ω_{ref}), np. tetrametylosilanu (TMS) dla jąder ^1H i ^{13}C . Względna **skala przesunięć chemicznych**, δ

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{\text{ref}}}{\omega_{\text{ref}}} = \frac{\sigma_{\text{ref}} - \sigma}{1 - \sigma_{\text{ref}}} \frac{B_0}{B_0} \approx \sigma_{\text{ref}} - \sigma \quad (13)$$

jest wielkością charakterystyczną dla jądra w danej cząsteczce (podobnie jak stała ekranowania) i nie zależy od indukcji pola magnetycznego B_0 . Dzięki temu przesunięcia chemiczne są jednakowe

na różnych spektrometrach. Przesunięcie chemiczne może być dodatnie albo ujemne, ponieważ jest wyrażone w odniesieniu do wybranej substancji wzorcowej (stałej ekranowania wzorca σ_{ref}). Z uwagi na niewielkie wartości wyrażamy je w ppm (*parts per million*), tj. po pomnożeniu wartości ze wzoru (13) przez 10^6 .

Wartości typowych przesunięć ^1H wynoszą od 0 do 12 ppm, natomiast zakres przesunięć dla cięższych jąder, o bardziej polaryzowanym otoczeniu elektronowym, jest znacznie większy, np. ok. 0-250 ppm dla ^{13}C , -180 do 250 ppm dla ^{31}P czy od -6500 do 200 ppm dla ^{195}Pt . Przesunięcia chemiczne są podstawowym parametrem NMR, a przypisanie sygnałów do konkretnych jąder na widmach jednowymiarowych (1D) jest jednoznaczne tylko w prostych przypadkach. Dla większej pewności przypisanie potwierdza się za pomocą widm korelacyjnych (dwu- lub wyżejwymiarowych) lub obliczeń kwantowo-mechanicznych.

Równocенność chemiczna jąder

Dla chemika kluczowa jest umiejętność przewidywania liczby linii jakie powinny pojawić się w widmie NMR danego związku. W tym celu wprowadza się pojęcie równocенności chemicznej jąder, która wynika albo z symetrii związku, albo z dozwolonych przekształceń konformacyjnych.

Jądra równocenne chemicznie mają identyczne otoczenie, a zatem identyczne przesunięcie chemiczne.

Warunkiem równocенności jest istnienie elementu symetrii zamieniającego oba jądra. Jest to np. oś 3-krotna w chlorometanie (CH_3Cl), płaszczyzna symetrii w 1,1-difluoroetenie, oś 6-krotna w benzenie czy płaszczyzna symetrii w 1,2-dichlorobenzenie (Rys. 1a,b,c,d). Natomiast protony³ w grupach CH_3 większości związków nie są formalnie równocenne (np. etanolu, Rys. 1e), ale szybka rotacja wokół wiązania C-C doprowadza do uśrednienia w czasie otoczenia chemicznego każdego z jąder ^1H . W przeciwieństwie do etanolu, gdzie oba protony metylenowe można powiązać płaszczyzną symetrii, w związkach zawierających centra chiralne (ale nie tylko!) protony grup CH_2 nie są równocenne chemicznie (nazywamy je wówczas *diastereotopowymi*). Nie istnieje bowiem element symetrii wymieniający protony takiej grupy, czego przykłady znajdujemy w naturalnych aminokwasach (Rys. 1f,h). Podobna uwaga dotyczy protonów różnych grup metylowych w walinie (lub leucynie) (Rys. 1g,i), które także nie są równocenne, a ich przesunięcia chemiczne ^1H mogą się znacznie różnić!

Sprzężenia spinowo-spinowe

Jądrowe dipolowe momenty magnetyczne oddziałują ze sobą przez przestrzeń (bezpośrednio) i poprzez elektrony (pośrednio).

Energia oddziaływania dipol-dipol (DD) dla pary jąder I i K zależy od kąta θ między wektorem międzyjądrowym r_{IK} a kierunkiem pola B , oraz odległości międzyjądrowej r_{IK} :

$$E_{IK}^{\text{DD}} = \frac{\mu_0 \hbar^2 \gamma_I \gamma_J}{4\pi r_{IK}^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (14)$$

Energia ta dla pary protonów, wyrażona w skali częstości (podzielona przez \hbar) jest rzędu kilkuset - kilkudziesięciu tysięcy herców, zależnie od odległości. W cieczech izotropowych sprzężeń DD nie obserwuje się wprost, ponieważ szybka rotacja cząsteczek powoduje *uśrednienie energii bezpośredniego oddziaływania dipolowego do zera* (nawiasy $\langle \rangle$ oznaczają uśrednienie po czasie):

$$E_{IK}^{\text{DD}} \propto \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle = 0. \quad (15)$$

Oddziaływanie za pośrednictwem elektronów nazywamy **sprzężeniem skalarnym**. Jednym z mechanizmów jakościowo tłumaczących to zjawisko jest mechanizm kontaktowy Fermiego, który wymaga

³W żargonie NMR jądra wodoru nazywamy niemal zawsze protonami

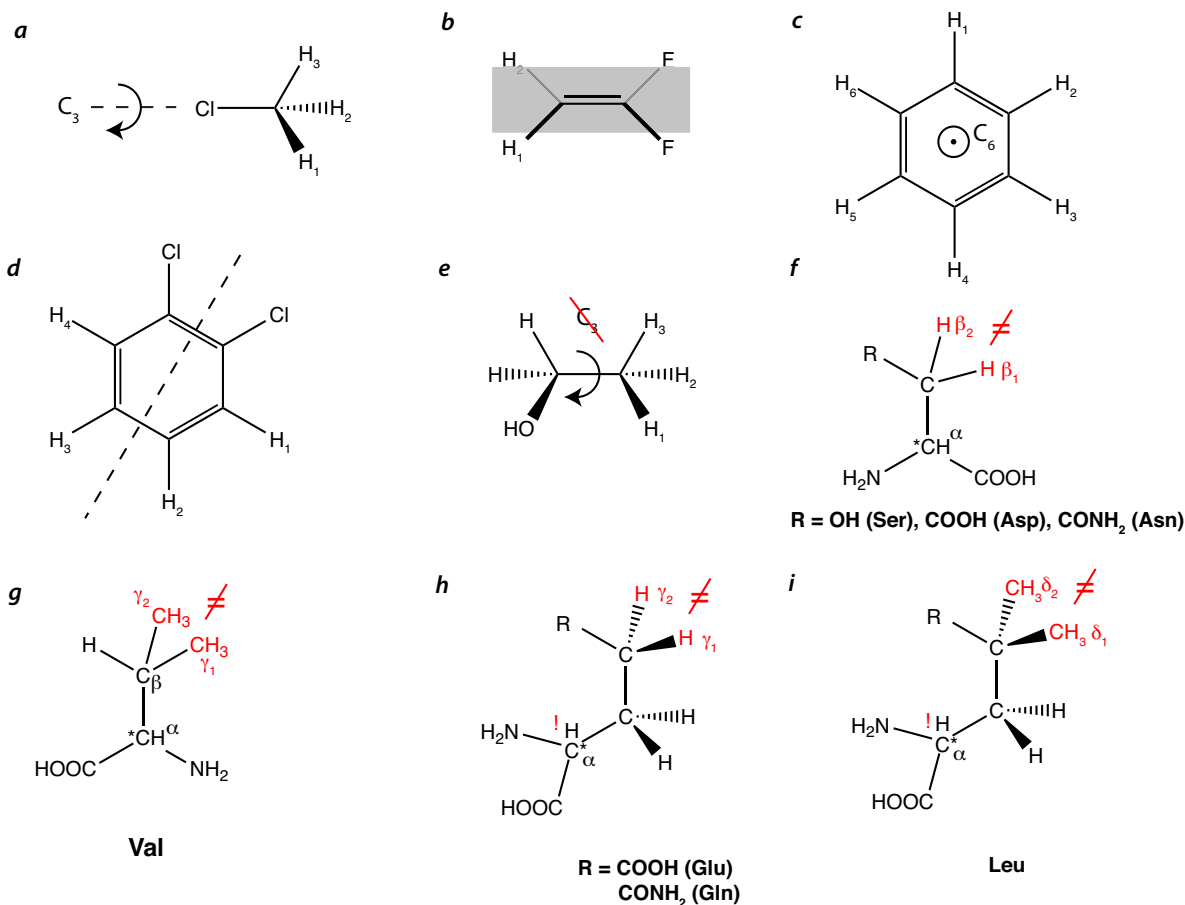
aby funkcja falowa opisująca elektrony pośredniczące miała udział orbitalu s , czyli niezerowe prawdopodobieństwo obecności w jądrach. Sprzężenie skalarne jest zależne od orientacji, ale w odróżnieniu od oddziaływania bezpośredniego, nie uśrednia się do zera przy szybkiej izotropowej rotacji i ujawnia się w widmach NMR.

Efektom sprzężeń jest rozszczepienie linii, tj. zamiast pojedynczych linii rezonansowych obserwujemy multiplety. Ich nazewnictwo dla typowych przypadków podaje Tabela 1. Liczba linii w multiplicie zależy od liczby n_K równocennych jąder (nazwijmy je K) sprzężonych z jądrem I , którego sygnał rozpatrujemy, oraz ich liczby spinowej (S_K):

$$P = 2n_K S_K + 1 \quad (16)$$

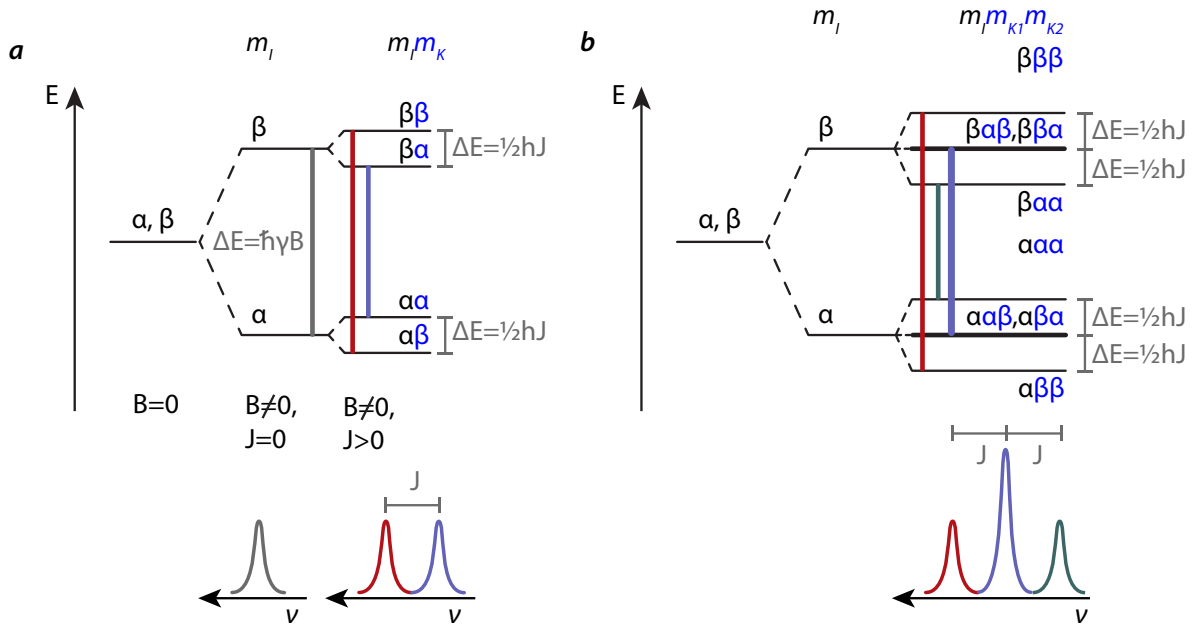
Przykładowo sygnał jądra sprzężonego z grupą CH_3 ($n_K = 3$, $S_K = 1/2$) jest rozszczepiony na $P = 4$ linie, czyli jest kwartetem. Ponadto, odległości pomiędzy sąsiednimi liniami rezonansowymi są równe i wyrażamy je poprzez stałą sprzężenia skalarne J . Nie zależy ona od pola B_0 i jej wartość zawsze podajemy w hercach (a nie w ppm !).

Zjawisko rozszczepienia linii na równoodległe składowe możemy wytłumaczyć odwołując się do schematów poziomów energetycznych. W przypadku jednego ($n_K = 1$) sprzężonego jądra o $S_K = 1/2$



Rysunek 1: Wpływ symetrii cząsteczek na równocенność chemiczną jąder ^1H na przykładzie (a) cholometanu, (b) 1,1-difluoroetenu, (c) benzenu, (d) 1,2-dichlorobenzenu, (e) etanolu oraz (f-i) naturalnych aminokwasów zawierających centra chiralności (oznaczone gwiazdką). Płaszczyznę symetrii w (b) oznaczono szarym prostokątem, natomiast płaszczyzna rysunku w (h) oraz (i), zawierająca wiązania $\text{R}-\text{C}\gamma$, $\text{C}\gamma-\text{C}\beta$ oraz $\text{C}\beta-\text{C}\alpha$, nie jest płaszczyzną symetrii z powodu centrum chiralności na atomie $\text{C}\alpha$ (wyróżniono poprzez „!”).

poziomy dla stanów $|\alpha\rangle$ i $|\beta\rangle$ jądra I rozszczepiają się o niewielką energię $\Delta E = 1/2hJ$ (Rys. 2a). Pamiętajmy, że $J \ll \frac{\gamma}{2\pi}B$. W zależności od liczb m_I oraz m_K mamy więc 4 poziomy energetyczne.



Rysunek 2: (a) Schemat rozszczepień poziomów spinowych w polu B z uwzględnieniem jednego jądra sprzężonego o $S_K = 1/2$. (b) Analogiczny schemat dla dwóch równocennych jąder sprzężonych. Poniżej schematów przedstawiono postać multipletu

Ich energia, po uwzględnieniu wkładu pochodzącego od sprzężenia skalarnego, jest równa:

$$E_{m_I, m_K} = -\gamma_I(1 - \sigma)B_0\hbar m_I + hJm_I m_K, \quad (17)$$

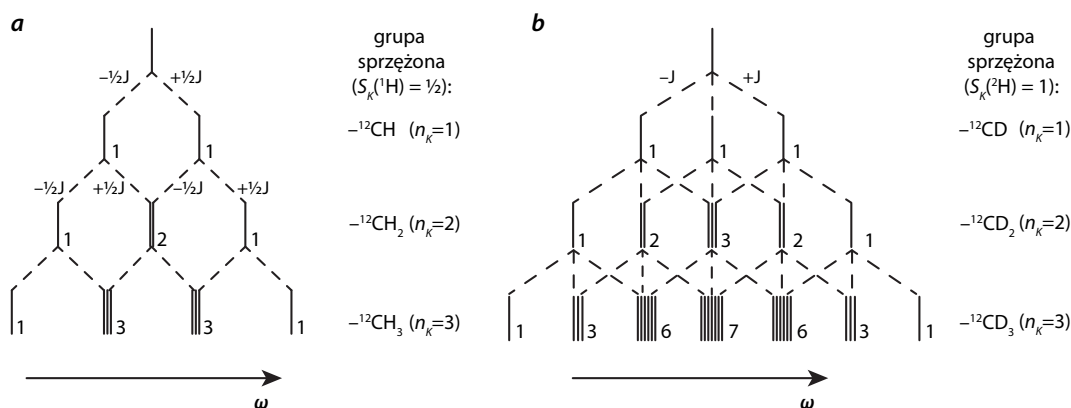
Kluczowa jest obserwacja, iż podczas przejścia NMR zmienia się stan *aktywnego* spinu I ($\Delta m_I = \pm 1$), natomiast stan spinowy sprzężonego jądra K nie zmienia się, $\Delta m_K = 0$. Dozwolone są więc tylko dwa przejścia między 4 stanami: $|\alpha\beta\rangle \leftrightarrow |\beta\beta\rangle$ oraz $|\alpha\alpha\rangle \leftrightarrow |\beta\alpha\rangle$ (wytłuszczono stan jądra I). Jak pokazano na Rys. 2a, energie tych przejść różnią się o hJ , zatem w widmie zaobserwujemy dublet o rozszczepieniu J (w hercach). Równoważnie możemy podstawić warunki $\Delta m_I = \pm 1$ oraz $\Delta m_K = 0$ do wzoru (17) otrzymując 2 energie przejść w zależności od stanu sprzężonego jądra ($m_K = \pm 1/2$):

$$\Delta E_{m_K} = \gamma_I(1 - \sigma)B_0\hbar - hJm_K \quad (18)$$

Z powyższego wzoru wynika, że gdy jądro sprzężone K ma spin S_K , następuje rozszczepienie na $2S_K + 1$

Tablica 1: Nomenklatura struktury multipletowej sygnałów

Liczba składowych	Nazwa
1	siglet
2	dublet
3	tryplet
4	kwartet
5	kwintet
6	sektet
7	septet
8	oktet



Rysunek 3: Schematy rozszczepień w wyniku sprzężeń do kilku równocennych spinów o $S = 1/2$ (a) oraz $S = 1$ (b)

linii. Zauważmy, że rozszczepione poziomy (roóżniące się tylko stanem jądra K) mają podobną energię, a więc niemal jednakowe obsadzenie. W efekcie intensywności $2S_K + 1$ przejść (linii) są równe.

Rozważmy teraz przypadek gdy jądro I jest sprzężone z dwoma równocennymi jądrami K . Jak pokazano na Rys. 2b, dostępnych jest 8 stanów spinowych, z tym że np. stany $|\beta\alpha\beta\rangle$ oraz $|\beta\beta\alpha\rangle$ mają równe energie (poziomy zdegenerowane). Zastosowanie tej samej reguły wyboru prowadzi do otrzymania 4 przejść, z tym że dwa przejścia mają równą energię ($\Delta E = h\gamma_I B$) i dają wkład do jednej linii. Obserwujemy więc tryplet o względnych intensywnościach 1:2:1.

Przewidywanie struktury multipletowej dla większej liczby jąder sprzężonych K przeprowadza się analogicznie. Dla szybszego określenia względnych intensywności w multiplicie można skorzystać z tzw. trójkąta Pascala (Rys. 3). Wyrazy (intensywności) w danym rzędzie otrzymuje się poprzez sumę sąsiednich wyrazów z rzędu powyżej.

Wielkość stałej sprzężenia zależy od wielu czynników, w tym: liczby wiązań pomiędzy jądrami, współczynników żyromagnetycznych sprzężonych jąder, rzędowości wiązań, przez które przenoszone jest sprzężenie (tj. udział orbitalu s). Przyjmuje się, że w nasyconych związkach organicznych sprzężenie ^1H - ^1H obserwuje się jeżeli protony są oddalone nie więcej niż o 3 wiązania pojedyncze. Typowe wartości sprzężeń podane są w Tabeli 2. Wielkość stałej sprzężenia wyrażamy w hercach tj. po podzieleniu wartości w dżulach przez stałą Plancka h . Energia sprzężenia skalarnego jest kilka rzędów wielkości mniejsza niż sprzężenia dipolowego.

Na koniec zaznaczmy, iż powyższe rozumowanie dotyczące liczby składowych i względnych intensywności w multiplicie jest słuszne tylko gdy spełniony jest warunek $|\Delta\omega/(2\pi)| \gg J$, tj. różnica częstości przejść sprzężonych jąder I i K , $\Delta\omega = \omega_I - \omega_K$, dominuje nad ich stałą sprzężenia. Dla jąder nierównocennych chemicznie warunek ten można zawsze spełnić w odpowiednio silnym polu B.

Tabela 2: Typowe wartości stałych sprzężeń w nasyconych związkach organicznych

Sprężone jądra	L. wiązań	Symbol	Wartość, Hz
^{13}C , ^1H	1	$^1\text{J}_{\text{CH}}$	120... 220
^{13}C , ^{13}C	1	$^1\text{J}_{\text{CC}}$	35... 55
^{13}C , ^2H	1	$^1\text{J}_{\text{CD}}$	20... 35
^{13}C , ^1H	2	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	-2... -1
^1H , ^1H (gem.)	2	$^2\text{J}_{\text{HH}}$	-10... -13
^1H , ^1H (wic.)	3	$^3\text{J}_{\text{HH}}$	-2... 25

Równocенność magnetyczna jąder

Aby przewidzieć postać widma NMR w obecności sprzężeń skalarnych, należy uwzględnić, które jądra są równocenne z punktu widzenia sprzężeń do pozostałych jąder. Jądra równocenne chemicznie, mimo

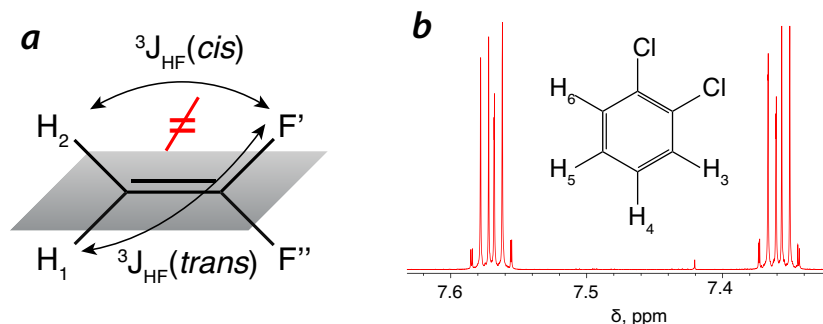
jednakowych przesunięć chemicznych, mogą posiadać inną sieć sprzężeń, a więc także inną strukturę multipletową. Pełna równocенność jąder w NMR wymaga więc silniejszego warunku niż opisana równocенność chemiczna.

Jądra równocenne magnetycznie muszą być równocenne chemicznie oraz mieć jednakowe sprzężenia skalarne do wszystkich pozostałych jąder w cząsteczce

Przykładowo równocenne magnetycznie są protony w chlorometanie oraz benzenie (Rys. 1a,c). Sprzężenia skalarne pomiędzy jądrami równocennymi magnetycznie nie powodują rozszczepienia ich linii. Fakt ten musimy w tym skrypcie przyjąć bez formalnego uzasadnienia, odsyłając do literatury (poniżej).

Natomiast przykład nierównocенności magnetycznej jąder równocennych chemicznie znajdujemy w cząsteczce 1,1-difluoroetanu. Protony H_1 i H_2 są nierównocenne magnetycznie, ponieważ mają różne stałe sprzężenia do jąder fluoru, ${}^3J_{HF}(trans) \neq {}^3J_{HF}(cis)$ (Rys. 4a). W efekcie, poza strukturą spowodowaną 2 sprzężeniami z jądrami ${}^{19}F$, pojawi się złożona struktura wynikająca ze sprzężenia ${}^2J(H_1, H_2)$.

Podobna sytuacja ma miejsce w 1,2-dichlorobenzenie (Rys. 1d). Postać widma tego związku (Rys. 4b) można przewidzieć jedynie na drodze obliczeń kwantowomechanicznych.



Rysunek 4: (a) Przykład nierównocенności magnetycznej jąder 1H , które są równocenne chemicznie. Przyczyną zjawiska w 1,1-difluoroetanu są różne sprzężenia protonów H_1 i H_2 do każdego z jąder fluoru. (b) Widmo 1H 1,2-dichlorobenzenu. Widoczne są dwa multiplety należące do nierównocennych magnetycznie protonów $H_3&H_6$ oraz $H_4&H_5$

Analiza struktury multipletowej

Przedstawmy prosty przykład analizy struktury multipletowej. W butanionie wyróżnimy 3 rodzaje protonów równocennych chemicznie i magnetycznie:



Ponieważ protony metylowe grupy H_a są równocenne magnetycznie, nie obserwujemy rozszczepienia pomiędzy protonami w obrębie tej grupy. Protony H_a są także oddalone o > 3 wiązania od protonów H_b , więc przyjmujemy, iż nie sprzęgają się z zauważalną stałą sprzężenia. Zatem rezonans H_a jest sigletem.

Natomiast protony metylowe H_c są rozszczepiane przez 2 równocenne protony H_b z jednakową stałą sprzężenia, co prowadzi do trypletu o względnych intensywnościach 1:2:1 (jak na Rys. 3a, drugi rząd trójkąta Pascala). Z kolei protony H_b są sprzężone z trzema równocennymi protonami H_c , co prowadzi do powstania kwartetu 1:3:3:1 (Rys. 3a, trzeci rząd trójkąta Pascala).

Widmo butanonu, przedstawione schematycznie na Rys. 5, można przypisać opierając się wyłącznie na analizie struktury multipletowej. Widzimy, że sprzężenia skalarne uwidaczniające się jako rozszczepienia linii niosą cenną informację o topologii wiązań w cząsteczkach.

Rozważmy następnie strukturę multipletową w widmie ^2H NMR kompletnie zdeuterowanego butanonu, tj.



Każde z jąder ^2H (o $S_K = 1$) prowadzi do rozszczepienia na 3 linie o równych intensywnościach. Jak pokazano na Rys. 3b, grupa Dc jest kwintetem 1:2:3:2:1, a grupa Db jest sekstetem 1:3:6:7:6:3:1.

Na koniec zauważmy, że w przypadku sprzężeń do dwóch nierównocennych magnetycznych grup jąder (o liczebności n_{K_1} oraz n_{K_2}) obserwujemy niezależny efekt rozszczepień linii, tj. sumarycznie

$$P = (2n_{K_1}S_{K_1} + 1)(2n_{K_2}S_{K_2} + 1) \quad (19)$$

linii. Przykładem są protony $\text{H}\beta_2$ i $\text{H}\beta_3$ fenyloalaniny, których sygnał ma postać dubletu dubletów na skutek sprzężenia (a) pomiędzy nierównocennymi chemicznie protonami β_2 i β_3 oraz (b) sprzężenia z protonem $\text{H}\alpha$ (Rys. 6).

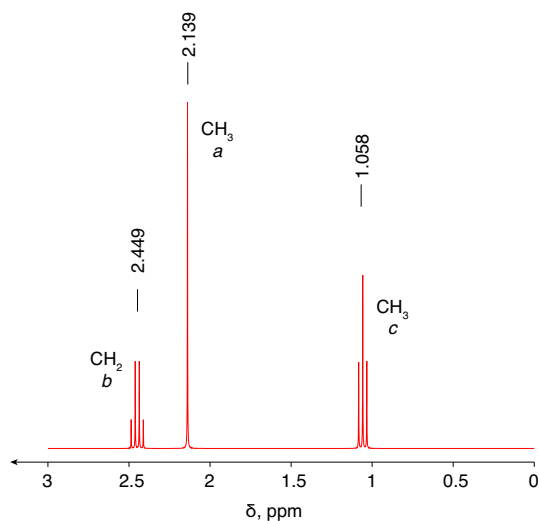
W przypadku występowania sprzężeń do wielu grup nierównocennych jąder, w sytuacji gdy stałe sprzężenia J są podobne, linie te nakrywają się prowadząc do multipletu o nieoczywistej strukturze.

Pomiar metodą impulsową i relaksacja jądrowa

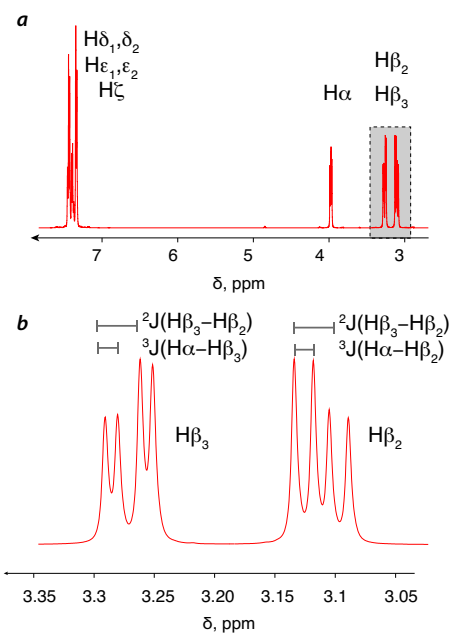
Współcześnie stosuje się pomiar widm NMR metodą impulsową. Aby go wyjaśnić, musimy wprowadzić pojęcie magnetyzacji, czyli wektorowej sumy momentów magnetycznych wszystkich spinów w próbce, M . W stanie równowagi jest ona skierowana wzdłuż pola B_0 . W metodzie impulsowej stan próbki zakłócamy krótkim (rzędu mikrosekund) impulsem częstości radiowej o indukcji $B_1(t)$, spolaryzowanym prostopadłe do pola B_0 (Rys. 7). Powoduje on przeniesienie magnetyzacji do płaszczyzny prostopadłej do B_0 , w której podlega on rotacji wokół B_0 z częstością Larmora ($\omega = \gamma_I B_0$). Ruch ten indukuje napięcie elektryczne w cewce sondy, które po spróbkowaniu (przekształceniu na postać cyfrową) daje wkład do sygnału swobodnej indukcji (FID, ang. *free induction decay*).

**fragment nieobowiązkowy*

Uzasadnienie: na poziomie mikroskopowym spiny nie znajdują się w stanach własnych operatorów energii (oraz rzutu spinu) $|\alpha\rangle$ i $|\beta\rangle$, lecz w ich superpozycjach. Oznacza to również, iż są to stany niestacjonarne, tj. ewoluujące w czasie zgodnie z zależnym od czasu równaniem



Rysunek 5: Uproszczone widmo ^1H butanonu



Rysunek 6: (a) Eksperymentalne widmo ^1H fenyloalaniny. (b) Powiększony obszar rezonansów β . Widoczne są dwa multiplety (protonów $\text{H}\beta_2$ oraz $\text{H}\beta_3$) o przybliżonej strukturze dubletu-dubletów

Schrödingera. Okazuje się, że w polu B_0 każdy taki stan podlega precesji wokół pola B_0 , tzn. wartości oczekiwane rzutów na osie x i y zmieniają się cyklicznie w czasie:

$$\begin{aligned}\langle k|\hat{S}_x|k\rangle &\propto \cos(\omega t + \phi_k) \\ \langle k|\hat{S}_y|k\rangle &\propto \sin(\omega t + \phi_k)\end{aligned}\quad (20)$$

Powyżej ω oznacza częstotliwość Larmora, która występuje w operatorze energii dla spinu w polu B_0 (hamiltonianie):

$$\hat{H} = -\omega\hat{S}_z \quad (21)$$

W stanie równowagi fazy spinów ϕ_k są zupełnie nieskorelowane, zatem suma składowych poprzecznych wszystkich spinów jest równa zero. Natomiast efektem impulsu częstotliwości radiowej jest wytworzenie populacji spinów o stanach w zgodnej fazie. Makroskopowo odpowiada to magnetyzacji poprzecznej podlegającej precesji wokół B_0 z częstotliwością Larmora.

Dalszą ewolucję wektora magnetyzacji wygodnie opisać rozkładając go na składową poprzeczną (prostopadłą do pola B_0) i podłużną (równoległą do pola B_0): $M = M_{\perp} + M_{\parallel}$. Wzbudzony wektor magnetyzacji poprzecznej, M_{\perp} , poza precesją wokół pola B_0 , podlega zanikowi wykładniczemu. Dla tego procesu definiuje się charakterystyczną stałą zaniku zwaną stałą czasową relaksacji poprzecznej lub spinowo-spinowej, T_2 (o wymiarze czasu):

$$|M_{\perp}(t)| = \exp(-t/T_2)|M_{\perp}(t=0)| \quad (22)$$

Mikroskopowo zanik ten wynika z utraty spójności fazowej spinowych stanów kwantowych. Źródłem tej dekoherencji są lokalne fluktuujące (losowe) pola magnetyczne wywołane przez ruchy cząsteczkowe.

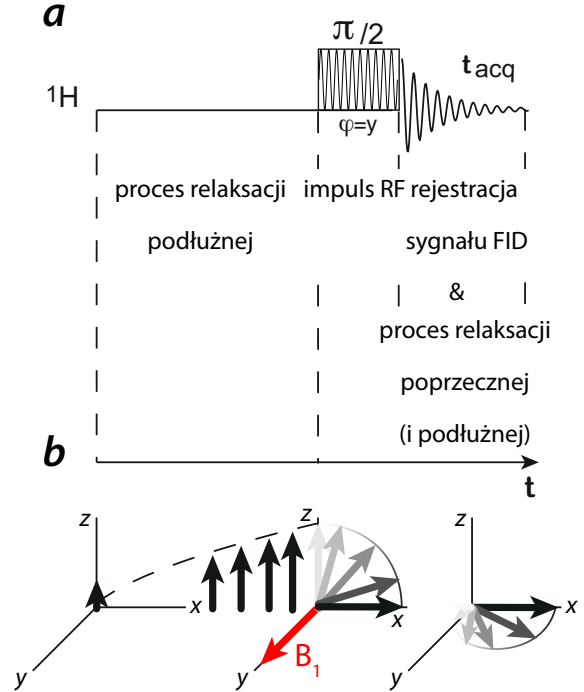
Magnetyzacja podłużna (M_z) odbudowuje się z inną stałą czasową, T_1 , zwaną stałą relaksacji podłużnej lub spinowo-sieciowej:

$$M_z = (1 - \exp(-t/T_1))M_z(\infty) \quad (23)$$

Odpowiada ona szybkości powrotu układu do równowagi termodynamicznej, tj. szybkości konwersji energii spinowej na termiczną. Źródłem tego procesu są także lokalne pola magnetyczne fluktuujące z częstotliwościami radiowymi. Z czasem, w wyniku przejść pomiędzy stanami (m.in. $\alpha \rightarrow \beta$ oraz $\beta \rightarrow \alpha$) ustala się równowagowa magnetyzacja.

Przewagą metody impulsowej nad metodą fali ciągłej, stosowaną powszechnie w innych spektroskopiach, jest jej szybkość (a przez to wyższa czułość), ponieważ wszystkie częstotliwości sygnału są rejestrowane jednocześnie. Sygnał FID jest superpozycją oscylacji o różnych częstotliwościach i rejestrowany jest w funkcji czasu (który upłynął od końca impulsu wzbudzającego). Przejścia do domeny częstotliwości, tj. widma, dokonuje się za pomocą **transformacji Fouriera**. Ważną cechą tego przekształcenia jest liniowość, tj. nie zaburza ona stosunków ilościowych sygnałów:

$$FT\left(\sum_i S_i(t)\right) = \sum_i FT(S_i(t)) = \sum_i \tilde{S}_i(\omega) \quad (24)$$

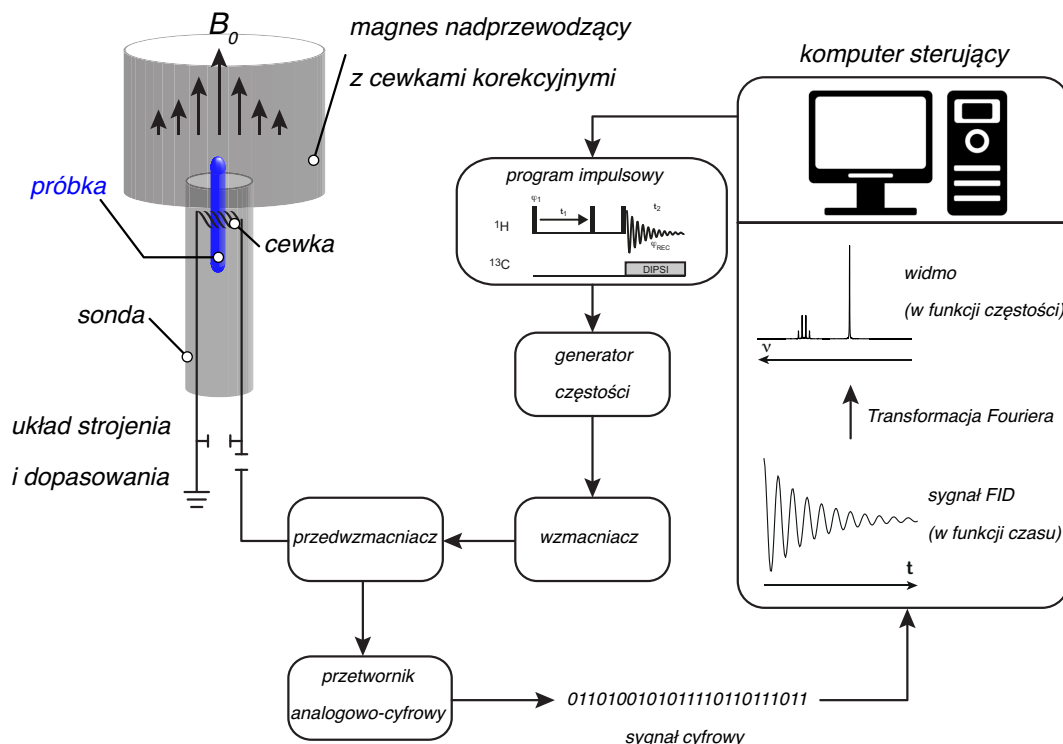


Rysunek 7: (a) Schemat blokowy prostego eksperymentu NMR metodą impulsową. Wyróżniamy 3 okresy: równowagowania (rzędu sekund), impulsu częstotliwości radiowej (μs) oraz rejestracji i zaniku sygnału FID (od μs do s). (b) Ewolucja w czasie wektora magnetyzacji.

Dzięki powyższej właściwości, można dokonać całkowania sygnałów w prostych widmach ^1H co niesie informację o stosunkach liczby protonów danego rodzaju.

Budowa spektrometru NMR

Do pomiaru widm NMR metodą impulsową z Transformacją Fouriera używa się spektrometru schematycznie przedstawionego na Rys. 8. Składa się on z (1) magnesu nadprzewodzącego, (2) sondy, (3)



Rysunek 8: Schemat budowy spektrometru NMR z Transformacją Fouriera

konsoli zawierającej generatory częstotliwości radiowych oraz elektronikę oraz (4) komputera sterującego.

Współcześnie stosuje się magnesy nadprzewodzące utrzymywane w temperaturze wrzenia helu pod ciśnieniem atmosferycznym ($T \approx 4\text{ K}$) lub obniżonym ($T \approx 2\text{ K}$). Magnesy te generują stabilne pole o indukcji B_0 do ok. 23.5 T, czyli o czynnik 10^6 większe niż ziemskie pole magnetyczne. Pole magnesu ulega stopniowemu osłabieniu (tzw. *dryft magnesu*), zachodzącym w tempie kilku-kilkunastu Hz (częstości jąder ^1H) na godzinę. Nie ma ono wpływu na żywotność urządzenia, ale uwidacznia się w dłuższych eksperymentach NMR jako zmiana częstości rezonansowych. Z tego powodu stosuje się układ stabilizacji pola oparty na detekcji częstości jąder deuteru (*lock deuterowy*). Jego zadaniem jest ciągły pomiar rezonansu deuteru (pochodzącego zazwyczaj z deuterowanego rozpuszczalnika) i utrzymanie jego stałej i dobrze określonej częstości. Pole korygujące zmiany B_0 jest wytwarzane przez dodatkową, oporową cewkę. Dodatkowo magnes jest wyposażony w cewki korekcyjne (tzw. *shimy*) pozwalające na osiągnięcie jednorodności pola B_0 w obszarze próbki na poziomie ok. 1 ppb.

Próbki roztworów przygotowuje się standardowo w szklanych probówkach o średnicy 5 mm (ok. 500-600 μl), a następnie umieszcza w odpowiedniej sondzie, która jest montowana współosiowo do magnesu tak, aby próbka znajdowała się w jego centrum. Sondy NMR różnią się zakresem częstości radiowych które mogą efektywnie nadawać i odbierać. Współcześnie sondy posiadają zazwyczaj co najmniej 2 niezależne kanały częstości, odpowiednie dla wysokich (^1H lub ^{19}F) i niskich częstości (przestrajalne), albo wyspecjalizowane tylko dla danego jądra (^{13}C albo ^{31}P albo ^{15}N , etc.). W

celu maksymalizacji przepływu energii pola o częstotliwości radiowej pomiędzy cewką w sondzie (próbką) a generatorami częstotliwości sondę trzeba dostroić i dopasować tak, aby całkowita impedancja obwodu osiągnęła przyjętą wartość 50 ohmów. Sondy zazwyczaj zawierają jeszcze układ regulacji temperatury oraz kanał gradientowy do wytwarzania niejednorodnego pola B_0 .

Każdy eksperyment NMR, niezależnie od stopnia komplikacji, jest kontrolowany przez komputer sterujący. Układ częstotliwości radiowej w konsoli jest każdorazowo programowany aby wykonać precyzyjnie zsynchronizowaną sekwencję impulsów, które po odpowiednim wzmocnieniu są przesyłane do sondy za pomocą kabli koncentrycznych.

Sygnal odbierany w cewce sondy jest słaby (napięcie rzędu μV) i korzystne jest analogowe odfiltrowanie nieinteresujących nas częstotliwości (w tym szumów elektronicznych oraz sygnałów radiowych z otoczenia) oraz wzmocnienie przez tzw. przedwzmacniacz, umieszczony możliwie blisko cewki – jeszcze w sondzie lub blisko magnesu. Następnie sygnał jest prowadzony do konsoli, w której przetwornik analogowo-cyfrowy zamienia go na postać cyfrową. Zdigitalizowany sygnał FID jest następnie zapisywany w pamięci komputera sterującego i przetwarzany do postaci widma poprzez Transformację Fouriera.

(Nie)Czułość spektroskopii NMR

Cechą szczególną spektroskopii NMR jest jej relatywnie niska czułość (stosunek sygnału do szumu) w stosunku np. do spektroskopii EPR, IR czy UV-VIS. Podstawowym źródłem tej różnicy jest niewielka różnica energii między stanami momentu magnetycznego w polu B_0 , wynosząca $\Delta E = \hbar\gamma_I B_0$, znacznie mniejsza niż analogiczne różnice energii stanów własnych dla innych spektroskopii. Przyjmijmy chwilowo, że spiny mogą znajdować się tylko w stanach własnych operatora energii (α albo β , „równoległych” i „antyrównoległych” do pola kierunku B_0). Rozkład Boltzmana przewiduje, że stosunek obsadzeń tych 2 poziomów jest równy:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp\left(-\frac{E_\beta - E_\alpha}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{\hbar\gamma_I B_0}{kT}\right) \quad (25)$$

gdzie k jest stałą Boltzmana, a T temperaturą. Przyjmijmy dla przykładu $T = 298 \text{ K}$ oraz pole magnetyczne o indukcji $B_0 = 18.8 \text{ T}$ (w którym protony mają częstotliwość $\nu = \gamma_{\text{H}} B_0 / (2\pi) = 800 \text{ MHz}$). Wyrażenie kT odpowiadające energii ruchów termicznych przyjmuje wartość $4.1 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ (dżula), natomiast różnica energii spinów $E_\beta - E_\alpha = h\nu = 5.3 \cdot 10^{-25} \text{ J}$, czyli ok. 0.013% kT . Ponieważ jest to względnie mała energia, można zastosować przybliżenie $\exp(-x) \approx 1 - x$ do wzoru (25), otrzymując

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} \approx 1 - \frac{\hbar\gamma_I B_0}{kT}$$

Stosunek obsadzeń dla naszego przykładu jest równy 0.99987, czyli jest różny od jedności w przybliżeniu o wartość ilorazu $\Delta E/kT$. Oznacza to, iż nawet w polu silnego spektrometru NMR zaledwie jedno na 10 000 jąder ^1H daje wkład do przejścia NMR, przesądzając o niskiej czułości tej techniki.

** Lektura poniższego wyjaśnienia nie wchodzi do wymagań na kolokwium wejściowe*

Powyższe rozumowanie jest zbyt uproszczone, ponieważ (1) spektroskopia NMR nie jest wykonywana metodą fali ciągłej i wielkość sygnału nie wynika jedynie z różnicy obsadzeń poziomów; (2) spinowe momenty magnetyczne nie znajdują się w czystych stanach własnych operatora energii (α albo β , „równoległych” i „antyrównoległych” do pola B_0), ale w niestacjonarnych (ewoluujących w czasie) stanach będących ich superpozycjami.

Choć poszczególne spiny nie mają dobrze zdefiniowanej orientacji ani energii, można wyznaczyć prawdopodobieństwo znalezienia go w stanie α albo β , odpowiednio p_α i p_β . Korzystając z ogromnej liczby spinów w próbce (N), można dokonać uśrednienia po populacji (oznaczonego nawiasami $\langle \rangle$), wyznaczając wypadkowy równowagowy moment magnetyczny zbioru spinów, tj. makroskopową magnetyzację M_z . Będzie on równoległy do pola B_0 i równy:

$$M_z = \frac{1}{2} \hbar\gamma_I N (\langle p_\alpha \rangle - \langle p_\beta \rangle) \quad (26)$$

Rozkład Boltzmana przewiduje wielkości populacji odpowiadających danym stanom energii (dopiero w momencie pomiaru!):

$$N_{\alpha/\beta} = N \langle p_{\alpha/\beta} \rangle = N \frac{\exp(-E_{\alpha/\beta}/kT)}{\exp(-E_{\alpha}/kT) + \exp(-E_{\beta}/kT)} \quad (27)$$

Zważając na fakt, iż energie spinowe są niewielkie w stosunku do energii ruchów termicznych (tj. kT) wyrażenie w mianowniku upraszcza się:

$$N_{\alpha/\beta} \approx N \frac{\exp(\pm 1/2 \hbar \gamma_I B_0 / kT)}{1 - \exp(-1/2 \hbar \gamma_I B_0 / kT) + 1 - \exp(-1/2 \hbar \gamma_I B_0 / kT)} = \frac{1}{2} N \exp(\pm 1/2 \hbar \gamma_I B_0 / kT) \quad (28)$$

Podstawiając ten wynik do wzoru (26), otrzymujemy wielkość równowagowej magnetyzacji:

$$M_z = \frac{1}{4} \hbar \gamma_I N (\exp(1/2 \hbar \gamma_I B_0 / kT) - \exp(-1/2 \hbar \gamma_I B_0 / kT)) \approx \frac{1}{4} N \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 B_0}{kT} \quad (29)$$

W najprostszym impulsowym eksperymencie NMR, wirujący wektor magnetyzacji indukuje mierzony sygnał FID. Ponieważ cewka odbiorcza sondy NMR rejestruje sygnał na zasadzie indukcji Faraday'a, amplituda mierzonych sygnałów jest również proporcjonalna do szybkości zmian strumienia magnetycznego, czyli do prędkości precesji wektora magnetyzacji (częstości Larmora).

$$\text{sygnał} \propto \omega = \gamma_I B_0 \quad (30)$$

W oczywisty sposób, sygnał ten jest także proporcjonalny do wielkości samego wektora magnetyzacji

$$\text{sygnał} \propto M_z \propto N \gamma_I^2 B_0 / kT \quad (31)$$

Natomiast empirycznie ustalono, iż szum elektroniczny zakłócający pomiar sygnału NMR jest proporcjonalny do pierwiastka częstości detekcji:

$$\text{szum} \propto \sqrt{\omega} = \gamma_I^{1/2} B_0^{1/2} \quad (32)$$

Podsumowując wzory (30)-(32) otrzymujemy, że czułość w NMR, wynikająca z magnetyzacji równowagowej i natury detekcji, jest zależna od indukcji pola i współczynnika żyromagnetycznego w następujący sposób:

$$\frac{\text{sygnał}}{\text{szum}} \propto \frac{\omega M_z}{\sqrt{\omega}} \propto |\gamma_I|^{5/2} B_0^{3/2} \quad (33)$$

Jeżeli (jak w niektórych eksperymentach korelacyjnych) jądra wzbudzone i rejestrowane są różne, czułość zależy w różny sposób od ich współczynników żyromagnetycznych:

$$\frac{\text{sygnał}}{\text{szum}} \propto |\gamma_{I_{DET}}|^{3/2} |\gamma_{I_{EX}}| B_0^{3/2} \quad (34)$$

Pytania i problemy

- Dlaczego spektroskopia ^1H NMR jest bardziej czuła od ^{13}C . Ile razy?
- Czy jądro ^{15}N jest nieparzysto-nieparzyste czy parzysto-nieparzyste? Czy przyjmuje połówkową czy całkowitą liczbę spinową?
- Które jądra są nieaktywne w spektroskopii NMR i dlaczego?
- Jak zmienia się częstość przejścia NMR ze zmianą pola B_0 ?
- Dlaczego wprowadzono skalę przesunięć chemicznych δ ?
- Jakiemu zakresowi częstości odpowiada 1 ppm dla jąder ^1H i ^{13}C w polu w którym częstość Larmora protonów jest równa 700 MHz?
- Dlaczego jądra ciężkich pierwiastków mają większy zakres przesunięć chemicznych?
- W jakich sytuacjach protony geminalne (CH_2) są równocenne chemicznie?

- Dlaczego sprzężenie bezpośrednie dipol-dipol nie ujawnia się w widmach NMR w cieczy?
- Podaj strukturę multipletową wszystkich sygnałów w cząsteczce etanolu.
- Czy za pomocą jednowymiarowego widma NMR można odróżnić octan tert-, izo- oraz n-butyłu?
- Zidentyfikuj równocenne chemicznie protony w cząsteczkach *o*-, *m*- i *p*-dichlorobenzenu
- Zidentyfikuj równocenne magnetycznie protony w cząsteczkach *o*-, *m*- i *p*-dichlorobenzenu
- Jaka część jąder ^1H w próbce jest wzbudzona w eksperymencie NMR w polu $B_0 = 10\text{ T}$ i temperaturze $T = 298\text{ K}$?
- Przedstaw schematycznie widmo ^1H ludzkiej ubikwityny

Wymagania

- zachowanie spinów jądrowych w zewnętrznym polu magnetycznym
- reguła wyboru dla NMR i warunek rezonansu
- zjawisko ekranowania i definicja przesunięcia chemicznego
- sprzężenia spinowo-spinowe i ich wpływ na widma NMR
- zasada pomiaru widm NMR metodą impulsową z transformacją Fouriera
- budowa spektrometru NMR

Literatura

1. Peter William Atkins. *Chemia Fizyczna*, chapter 18. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1 edition, 2002
2. Andrzej Rajca and Andrzej Skibiński. Spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego. In Wojciech Zieliński i Andrzej Rajca, editor, *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, chapter 2-4, pages 38–270. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2 edition, 2000
3. Andrzej Ejchart and Adam Gryff-Keller. *NMR w cieczach. Zarys teorii i metodologii*, chapter 1-3. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1 edition, 2004

W języku angielskim:

4. James Keeler. *Understanding NMR Spectroscopy*, chapter 2-5, 12. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 1 edition, 2005. Bezpłatna wersja online www-keeler.ch.cam.ac.uk/lectures/
5. Malcolm H. Levitt. *Spin dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, chapter 1-5, 8-11, 14-15. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2 edition, 2008