### Dr Jasmina Dimitrić Marković, redovni profesor Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu <u>markovich@ffh.bg.ac.rs</u>

# Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)

- jedna od najsavremnijih i najpouzdanijih instrumentalnih metoda koja se koristi u ispitivanjima strukture molekula
- zajedno sa spektroskopskim metodama kao što su infracrvena, ramanska, ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija, NMR spektroskopija takođe omogućava dobijanje najpotpunijih i najtačnijih informacija o:
  - molekulskoj strukturi
  - elektronskoj strukturi
  - dinamičkim
  - kinetičkim i
  - termodinamičkim parametrima reakcija
- > NMR spektroskopija se koristi i za:
  - praćenje metaboličkih procesa u uslovima *in vivo*
  - biološka i medicinska ispitivanja (NMR tomografija, funkcionalni NMR imidžing)

- prvi NMR signal registrovan je 1945. od strane Parsela i Bloha koji su 1952. dobili Nobelovu nagradu za to otkriće
- prvi komercijalni instrumenti javljaju se 60-tih godina prošlog veka a razvoj elektronike i tehnike dovodi do značajnog napretka na polju razvoja NMR-a



- u osnovi NMR metode leži rezonantna apsorpcija RF zračenja od strane jezgara (sa rezultujućim spinom) koja se nalaze u statičkom magnetskom polju
- metoda srodna metodi NMR spektroskopije je ESR/EPR spektroskopija (elektronska spinska rezonancija/elektronska paramagnetska rezonancija) karakteristična za neutralne/jonske vrste koje imaju nesparene elektrone

# <u>Najčešće ispitivana jezgra</u> <u>metodom NMR spektroskopije</u>

- metodom nukelarne magnetske rezonancije moguće je anlalizirati različita jezgra
- bez obzira na vrstu jezgra koje se ispituje svako jezgro mora ispunjavati osnovni uslov a to je da ima rezultujući spin
- izbor jezgara (nuklida) zavisi:
  - prvenstveno od naučne discipline i specijalnosti u kojoj se metoda želi primeniti
  - faktora koji su posledica specifičnosti određenih jezgara

- > u specifičnosti jezgara spadaju:
  - vrednost spina
  - prirodna zastupljenost jezgara
  - prirodna osetljivost jezgara
  - "dostupnost" (engl. receptivity, amenability) jezgara
- u organskoj hemiji najčešće ispitivana jezgra su izotopi jezgara H, C, O i N
- u biohemijskim istraživanjima to je P a u oblastima fizičke hemije, organometalne i neorganske hemije to mogu biti i jezgra B, Si, Pb, Hg, Pt, Fe, K

- jezgra su u prirodi zastupljena u različitim procentima što zavisi od izotopskog sastava
  - •<sup>19</sup>F (100%)
  - •<sup>31</sup> P (100%)
  - •<sup>1</sup>H (99,985%)
  - •<sup>13</sup>C (1,1%)
  - •<sup>17</sup>O (<1%)
  - •<sup>15</sup>N (<1%)
- pored prirodne zastupljenosti jezgra poseduju i prirodnu osetljivost na mehanizam nuklerane rezonancije koja je uslovljena vrednošću žiromagnetskog odnosa jezgra γ
- "dostupnost" (engl. receptivity, amenability) jezgara metodi NMR spektroskopije je veličina data kao proizvod prirodne zastupljenosti i prirodne osetljivosti jezgra, to je relativna veličina čija se vrednost određuje u odnosu na proizvod istih parametara za izotop <sup>13</sup>C

# <u>Magnetska svojstva jezgara, ponašanje jezgara</u> <u>u statičkom magnetskom polju</u>

- metodom nuklearne magnetske rezonancije moguće je analizirati samo ona jezgra koja poseduju spin\* različit od nule
- spin čestice se može vizuelno zamisliti kao mali magnet koji rotira oko sopstvene ose

 Spin jezgara otkrio je Pauli je 1924. god. objašnjavajući hiperfinu strukturu spektralnih linija atoma.



Jezgro	Rezultujući spin	γ (MHz/T)
<sup>1</sup> H	1/2	42,58
$^{2}\mathrm{D}$	1	6.54
<sup>31</sup> P	1/2	17.25
<sup>23</sup> Na	3/2	11.27
<sup>14</sup> N	1	3,08
<sup>13</sup> C	1/2	10,71
<sup>19</sup> F	1/2	40,08

- spinski momenat jezgra (spin jezgra) se po talasnoj mehanici kvantuje kao i spinski momenat elektrona
- spin jezgra (I) je rezultanta vektorskog zbira spinova svih nukleona (protona i neutrona) u jezgru
- moguće vrednosti spina jezgra su:

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

I - kvantni broj spina jezgra

### Jezgra mogu imati spin:

- $i I = 0 ({}^{12}_{6}C, {}^{18}_{8}O...)$
- $ightarrow I = 1, 2, 3...({}^{2}_{1}D, {}^{14}_{7}N,...)$
- $i = 1/2, 3/2, 5/2..., ({}^{1}_{1}H, {}^{15}_{7}N, {}^{17}_{8}O, {}^{13}_{6}C)$
- ➤ za NMR eksperimente su od interesa sva jezgra stabilnih izotopa koja imaju rezultujući spin različit od nule, I ≠ 0

$$I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, 5/2, \dots 9/2$$

vrednosti nuklearnog spina za danas poznata jezgra

### > magnetski momenat koji se pridružuje spinu jezgra:

$$\mu_I = g_N \frac{e}{2m_p} I$$

\*g<sub>N</sub> - nuklearni g faktor koji je konstanta za svako jezgro
I - kvantni broj spina jezgra

m<sub>p</sub> – masa protona

$$g_N = \frac{h v_{rez}}{\mu_N B_0}$$

\* Bezdimenziona konstanta proporcionalnosti koja daje vezu između magnetskog momenta čestice i kvantnog broja ugaonog momenta čestice.

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

$$|\mu_{I}| = g_{N} \frac{e}{2m_{p}} |I| = g_{N} \frac{e}{2m_{p}} \sqrt{I(I+1)} \frac{h}{2\pi}$$

$$|\mu_I| = g_N \mu_N \sqrt{I(I+1)}$$

$$\mu_N = \frac{e\hbar}{2m_p} = 5,05 \times 10^{-27} JT^{-1}$$

nuklearni magneton

$$\mu_N = \frac{\mu_B}{1836}$$

prostorna orijentacija vektora μ<sub>I</sub> u spoljašnjem magnetskom polju određena je komponentom μ<sub>z</sub> duž pravca polja i data je relacijom:

$$\mu_{I,z} = g_N \mu_N m_I = \gamma \hbar m_I$$

$$\gamma \hbar = g_N \mu_N$$

γ- žiromagnetski odnos jezgra (MHz/T) (konstanta za svako jezgro, eksperimentalno se određuje)

### Osnova rezonantnog eksperimenta



$$\mu_{I,z} = g_N \mu_N m_I = \gamma \hbar m_I$$

$$m_I = I, I - 1, I - 2, \dots - I = (2I + 1)$$

$$\Delta m_I = \pm 1$$

m<sub>i</sub>- magnetski kvantni broj spina jezgra

paralelna orijentacija





$$\Delta E = \gamma \left(\frac{h}{2\pi}\right) B_0$$





Larmorova frekvencija

$$\omega = 2\pi v_L$$
$$2\pi v_L = \gamma B_0$$
$$v_L = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$



$$E_{m_I} = -\mu_z B_0 = -g_N \mu_N m_I B_0$$

$$\mu_{I,z} = g_N \mu_N m_I = \gamma \hbar m_I$$

$$\Delta E = E_{-1/2} - E_{+1/2} = g_N \mu_N B_0$$

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{g_N \mu_N}{h} B_0$$

uslov rezonancije

kako je prenos energije dvosmeran koji od procesa će dominirati zavisi od naseljenosti stanja između kojih se prelaz vrši

$$\frac{n_{\beta}}{n_{\alpha}} = e^{-(E_{\beta} - E_{\alpha})/RT}$$

$$\frac{B_{0} = 2,35 \ T}{\Delta E = 6,7 \times 10^{26} J}$$

$$B_{0} = 7,4 \ T$$

$$B_{0} = 7,4 \ T$$

$$\frac{n_{\alpha}}{n_{\beta}} = 1,000017$$

$$\frac{n_{\alpha}}{n_{\beta}} = 1,000050$$

vrednost B<sub>0</sub> ne prelazi 14,1 T (odgovara rezonantnoj frekvenciji protona od 600 MHz)

# <u>Magnetizacija uzorka</u>

- ukoliko se magnetski momenti svih jezgara istog tipa vektorski saberu rezultujući vektor magnetskog momenta biće usmeren u pravcu +z ose usled viška jezgara sa orijentacijom spina m<sub>I</sub> = +1/2
- makroskopska magnetizacija (M) je suma svih pojedinačnih magnetskih momenata jezgara istog tipa

$$M = \sum_i \mu_i$$





makroskopska magnetizacija (M) je u odsustvu polja jednaka nuli jer su sve orijentacije vektora magnetskog momenata moguće



# <u>Pobuđivanje spinskog sistema, apsorpcija i emisija</u> <u>zračenja</u>

- postizanje uslova rezonancije omogućava se primenom dodatnog magnetskog polja indukcije B<sub>1</sub> koje je normalno na statičko magnetsko polje indukcije B<sub>0</sub>
- > ozračivanje spinskog sistema može da bude:
  - kontinualno (CW, Continuous Wave)
  - pulsno (FT) (znatno brža i osetljivija tehnika pobuđivanja; pulsnim ozračivanjem može se istovremeno pratiti više vrsta jezgara; koristi se jako snažan puls pri čemu se pobuđuju svi energetski prelazi u posmatranom uzorku)

### kod pulsnog pobuđivanja sistem se izlaže delovanju RF pulsa odn. dodatnom polju B<sub>1</sub>

F deluje duž određenog pravca, karakteriše se uglom θ za koji otklanja vektor ukupne magnetizacije od z ose

$$\theta = \gamma B_1 \Delta t$$

- primenom sekundarnog magnetskog polja B<sub>1</sub>, (manjeg intenziteta od B<sub>0</sub>) vektor ukupne magnetizacije se izvodi iz ravnoteže (iz položaja koji je paralelan statičkom polju B<sub>0</sub>)
- frekvencija polja B<sub>1</sub> se menja sve do dostizanja frekvencije rezonacije, Larmorove frekvencije jezgara
- vektor magnetizacije se otklanja od Oz ose i prelazi u xy transverzalnu ravan



- izborom vremena trajanja pulsa vektor magnetizacije se možeizvesti iz ravnoteže za tačno određeni ugao
- izvođenjem iz ravnoteže vektor ukupne magnetizacije je moguće razložiti na komponente: longitudinalnu (M<sub>z</sub>) i transverzalnu magnetizaciju (M<sub>xy</sub>)

# <u>Relaksacija spinskog sistema</u>

- prestankom RF pulsa sistem se spontano vraća u stanje ravnoteže (M<sub>xy</sub>=0 i M<sub>z</sub>=M<sub>0</sub>)
- vraćanje nuklearnih spinova u ravnotežu postiže se prirodnim mehanizmima koji se nazivaju relaksacija
- procesima relaksacije pobuđena jezgra se vraćaju u početno stanje bez emisije zračenja i ponovo postaju sposobna da apsorbuju RF zračenje

### > spin-rešetka (longitudinalna relaksacija)



# spin-spin relaksacija



# Spin-rešetka (longitudinalna, spin-okolina) relaksacija

- spin-rešetka relaksacija su svi procesi koji nakon ozračivanja (pulsa) vraćaju longitudinalnu magnetizaciju u ravnotežno stanje
- Iongitudinalna relaksacija potiče od lokalnih oscilujućih magnetskih polja u uzorku; izvor ovih polja su okolna magnetska jezgra koja su u pokretu

# $M_{z}(t) = M_{0}(1 - e^{-t/T_{1}})$ spin-rešetka relaksaciono vreme

- čvrste supstance:  $T_1 \approx 10^{-4} 10^{-2} s$
- tečnosti:  $T_1 \approx 10^{-2} 10 \text{ s}$

- $M_z(t)$  longitudinalna magnetizacija u vremenu t
- M<sub>0</sub> početna vrednost magnetizacije
- T<sub>1</sub>-longitudinalno vreme relaksacije



Vraćanje longitudinalne magnetizacije u ravnotežu po prestanku pulsa (s leva na desno)

# <u>Spin–spin (transverzalna) relaksacija</u>

- spin-spin relakscija su svi procesi koji vraćaju transverzalnu, M<sub>xy</sub>, magnetizaciju u ravnotežno stanje
- prenos energije u spin-spin relaksaciji se dešava sa pobuđenih na nepobuđena susedna jezgra iste vrste ali suprotnih spinova od spinova pobuđenih jezgara

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2}$$

- čvrste supstance:  $T_2 \approx 10^{-4}$  s
- tečnosti:  $T_1 \approx T_2$ ,  $(10^{-2} 10 \text{ s})$

- M<sub>xy</sub>(t) transverzalna magnetizacija u vremenu t
- M<sub>0</sub> početna vrednost magnetizacije T<sub>2</sub> – transverzalno vreme relaksacije

- opadanja intenziteta transverzalne magnetizacije se generalno dešava usled dva efekta:
  - prostorne, lokalne, nehomogenosti spoljašnjeg magnetskog polja
  - magnetske interakcije između susednih spinova
  - vremenska konstanta koja opisuje raspad transverzalne komponente makroskopske magnetizacije usled navedena dva faktora označava se sa T<sub>2</sub>\* (T<sub>2</sub>\* < T<sub>2</sub>)



Vraćanje transverzalne magnetizacije u ravnotežu po prestanku pulsa (s desna na levo)

$$\Delta v_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{\pi T_2}$$

- $\Delta v_{1/2} = 0,15$  Hz tečnosti
- $\Delta v_{1/2} = 10^3 \, \text{Hz} \check{\text{c}} \text{vrsti uzorci}$
- na širinu linija utiče i homogenost polja tako da nije sasvim tačno na osnovu širina linija određivati vreme života pobuđenih stanja

# <u>Detekcija signala u NMR spektrima,</u> <u>raspad slobodne indukcije</u>

vraćenje transverzalne magnetizacije u stanje ravnoteže naziva se raspad slobodne indukcije (FID - free induction decay)

- >FID se detektuje u xy ravni
- FID predstavlja NMR signal



Senerisanjem longitudinalne magnetizacije u usled procesa koji se naziva T2\* raspad transverzalnoj ravni u kalemu prijemnika se indukuje promena gustine magnetskog fluksa u vremenu što predstavlja elektromotornu silu

$$emf = -\frac{d\phi}{dt}$$

- veoma kratkim pulsom (1-10 µs) pobuđuju se sva jezgra iste vrste (shodno Hajzenbergovom principu neodređenosti)
- posle prestanka delovanja RF pulsa spinovi gube koherentnost izlazeći iz faze što ima za posledicu precesiju različitim frekvencijama
- > usled ovakvog kretanja intenzitet transverzalne magnetizacije eksponencijalno opada
- Furijeova transformacija pretvara vremenski domen u domen frekvencije (spektar)
- ukoliko spinski sistem ima samo jednu frekvenciju precesije u spektru se javlja jedna linija
- ukoliko spinski sistem ima više frekvencija precesije signal je složen od onoliko komponenata koliko ima različitih frekvencija u intervalu pulsa koji se primenjuje



# <u>Tehnika rada</u>

- magnet koji daje homogeno magnetsko polje (to su obično permanentni ili superprovodni, krio, magneti)
  - magnet čini zavojnica, kalem (od specijalne legure), kroz koju prolazi struja (zavojnica je na niskoj temperaturi, oko 6K, pa je otpor praktično nula) koja generiše magnetsko polje
  - kalem se nalazi zaronjen u tečni He (4K)
  - rezervoar helijuma se dodatno hladi tečnim azotom (na takav način se minimalizuje potrošnja helijuma)
  - da bi se održala homogenost polja uvode se dodatni tzv. shim kalemi koji proizvode svoja magnetska polja odeređenog prostornog profila
  - struja se u shim kalemima podešava do postizanja jačine magnetskih polja koja omogućavaju dovoljnu homogenost glavnog polja



900 MHz, 21.2 T NMR magnet u HWB-NMR, Birmingham, UK

### 🕨 proba

- cilindrična metalna cev koja se unosi u šupljinu magneta
- glavni deo probe je mali kalem koji se koristi za pobuđivanje i detekciju magnetizacije
- da bi imao optimalnu osetljivost ovaj kalem mora da bude jako blizu uzorku koji se meri
- kalem je deo kola koje sadrži dva kondenzatora; indukcija kalema i kapacitet kondenzatora se podešavaju na Larmorovu frekvenciju (tzv. "tuning the probe")

### > izvor RF zračenja (RF predajnik)

# > prijemnik

### > sistem za detekciju

#### Delovi NMR spktrometra sa CW pobuđivanjem



**Obično se koriste jača polja jer:** 

- se lakše dobija spektar
- je veća ∆E pa time i naseljenost nižeg stanja
- je signal jači (≈ B<sub>0</sub><sup>2</sup> )

Svi aparati imaju:

- integrator koji daje površinu ispod pikova
- uređaj za rasprezanje spinova
- uređaj za podešavanje temperature uzorka

### NMR spektar

- spinski sistem koji se nalazi u homogenom magnetskom polju pobuđuje se EMZ iz RF oblasti i meri se odziv sistema
- NMR spektar se sastoji od signala, rezonantnih makismuma, koji se nalaze na različitim frekvencijama
- njihov položaj je relativan i daje se u odnosu na položaj linija nekog standardnog jedinjenja

# Osnovne karakteristike <sup>1</sup>H NMR spektara

# > hemijski pomeraj

### Fina struktura rezonantnih maksimuma

### ➢ intenzitet rezonantnih maksimuma

# <u>Hemijski pomeraj</u>

- rezultati ispitivanja pokazuju da u različitim jedinjenjima pa čak i u istim jedinjenjima ali u različitim funkcionalnim grupama jezgrima iste vrste u spektrima odgovaraju rezonantni maksimumi na različitim frekvencijama
- posledica je nalaženja jezgara u različitim okruženjima usled čega osećaju različite jačine magnetskog polja

$$v_L = \frac{g_N \mu_N}{h} B_0$$

 $B_i = \sigma B_0$ 





#### σ - konstanta magnetskog zaklanjanja (tenzorska veličina, anizotropnog karaktera)

$$B_{ef} = B_0 - B_i = B_0(1 - \sigma)$$

$$B_{ef} < B_0$$

$$\Delta E = g_N \mu_N B_{EF}$$



$$v_{\scriptscriptstyle REZ} = g_{\scriptscriptstyle N} \mu_{\scriptscriptstyle N} B_0(1-\sigma)$$

$$v_{rez} = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0$$

$$\delta_i = \sigma_{REF} - \sigma_i$$

hemijski pomeraj (δ) je pomeranje rezonantnog maksimuma jezgra u NMR spektru pod dejsvom različitog hemijskog okruženja

#### <sup>1</sup>H NMR spektar metoksiacetonitrila (CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>CN) (2



$$\delta_{i} = \sigma_{REF} - \sigma_{i} = \frac{\nu_{i} - \nu_{ref}}{\nu_{0}}$$
$$\delta_{i} = \frac{pomak(Hz)}{\nu_{INSTRUMENTA}(MHz)} \ (ppm)$$

- $v_0$  radna frekvencija instrumenta
- prednost δ skale je ta što su pomeraji dati na njoj nezavisni od jačine primenjenog polja

- hemijski pomeraj protona je relativna veličina, određuje se u odnosu na standardno jedinjenja TMS (tetrametilsilan)
- > TMS se dodaje uzorcima
- TMS je pogodno jedinjenje jer:
  - ima nisku tačku ključanja (27°C)
  - nereaktivan je
  - lako se rastvara u većini organskih rastvarača







### Konstanta magnetskog zaklanjanja

$$\delta_i = \sigma_{REF} - \sigma_i$$



# Lokalna konstanta magnetskog zaklanjanja

$$\sigma_{loka\ln o} = \sigma_{dijamagnetsko} + \sigma_{paramagnetsko}$$

# <u>Dijamagnetska zaštita,</u> σ<sub>D</sub>

- potiče od "s" elektrona koji se nalazi oko protona u rezonanciji koji svojim kretanjem proizvode izotropno magnetsko polje B<sub>i</sub> koje je suprotnog smera od smera polja B<sub>0</sub>
- dijamagnetsko zaklanjanje je dominantan faktor u zaklanjanju protona ali ne i drugih, težih, jezgara; zavisi od elektronske gustine oko jezgra u rezonanciji





Lambova formula

# <u>Faktori uticaja na </u> $\sigma_{ m D}$

elektronegativnost supstituenata



$$\delta_{CH_4} = 0,23$$
  $\delta_{CH_3Cl} = 3,05$   $\delta_{CH_2Cl_2} = 5,30$   $\delta_{CHCl_3} = 7,27$ 

- efekat vodonične veze
- > efekat hibridizacija (elektronegativnost C atoma)





# <u>Paramagnetska zaštita,</u> $\sigma_P$

$$\sigma_{loka\ln o} = \sigma_{dijamagnetsko} + \sigma_{paramagnetsko}$$

- pojačava delovanje spoljašnjeg polja i "otkriva" jezgro u rezonanciji, prouzrokuje pomeraj rezonantnih maksimuma ka višim frekvencijama
- paramagnetska zaštita, σ<sub>P</sub>, potiče od indukovanog kretanja elektrona u orbitalama koje su:
  - u osnovnom stanju nepopunjene
  - aksijalne simetrije

- dominantan je doprinos u spektrima svih jezgara osim <sup>1</sup>H
- izraz "paramagnetska zaštita" se koristi da bi se opisao efekat suprotan efektu dijamagnetske zaštite ali ga nikako ne treba mešati sa fenomenom paramagnetizma koji je karakteristika vrsta koji imaju nesparene elektrone

$$\sigma_{P} = -\left(\frac{1}{\Delta E}\right)\left(\frac{1}{r^{3}}\right)\sum Q_{ij}$$

 $\Delta E$  - srednja vrednost energije pobuđivanja 1/r<sup>3</sup> - radijus p orbitale  $\Sigma Q_{ij}$  - mera broja  $\pi$  veza (red veze)

$$\sigma_{P} = -\left(\frac{1}{\Delta E}\right)\left(\frac{1}{r^{3}}\right)\sum Q_{ij}$$

# <u>Energetski član</u>

# ≻ velike vrednosti parametra ∆E imaju:

- zasićeni ugljovodonici koji imaju visoko ležeća pobuđena stanja
- neka teža jezgra

# ≻ male vrednosti parametra ∆E imaju:

• karbonilna jedinjenja koja imaju niskoležeća n- $\pi^*$  stanja (imaju znatnu paramagnetsku zaštitu)

$$\sigma_{P} = -\left(\frac{1}{\Delta E}\right)\left(\frac{1}{r^{3}}\right)\sum Q_{ij}$$

### <u>Radijalni član</u>

- analogan dejstvu induktivnog efekta na protonsku rezonanciju
- ovaj član je mera udaljenosti p elektrona od protona
- supstituenti sa " +" ili "-" induktivnim efektom jako utiču na vrednost  $\sigma_p$

# <u>Član ΣQ <sub>ij</sub></u>

 mera gustine naelektrisanja i može se smatrati merom višestrukosti veze (red veze)