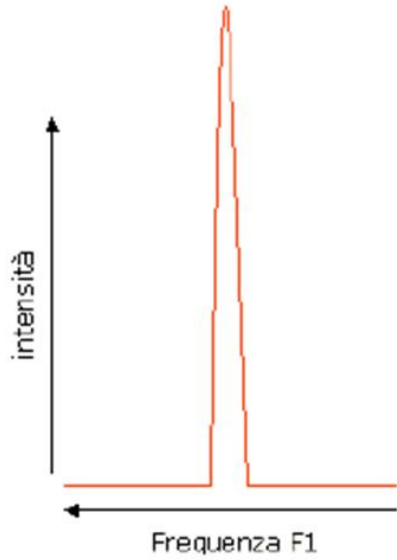


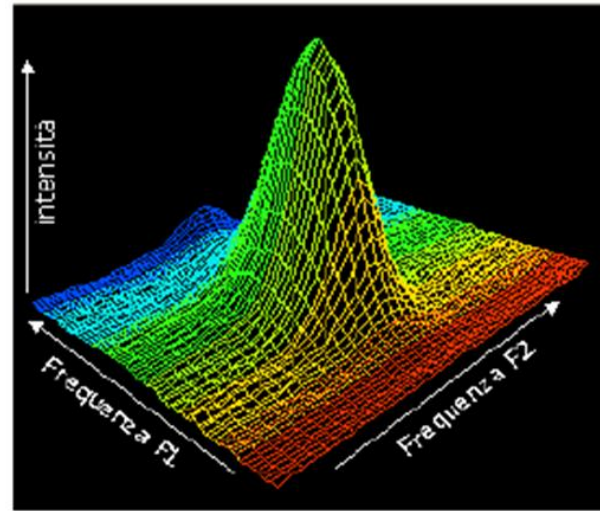
# Spettroscopia NMR bidimensionale (2D)

Spettroscopia NMR di correlazione

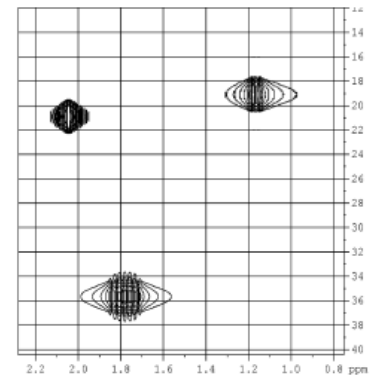
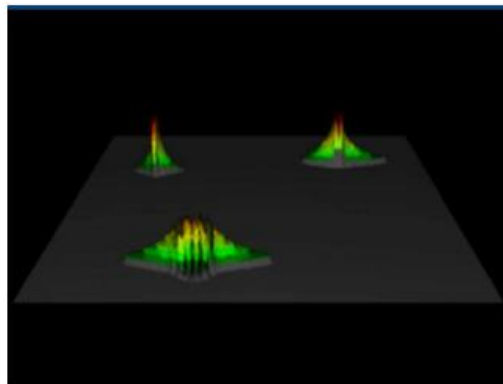
# NMR - 2D



Spettro monodimensionale  
INTENSITA VS FREQUENZA

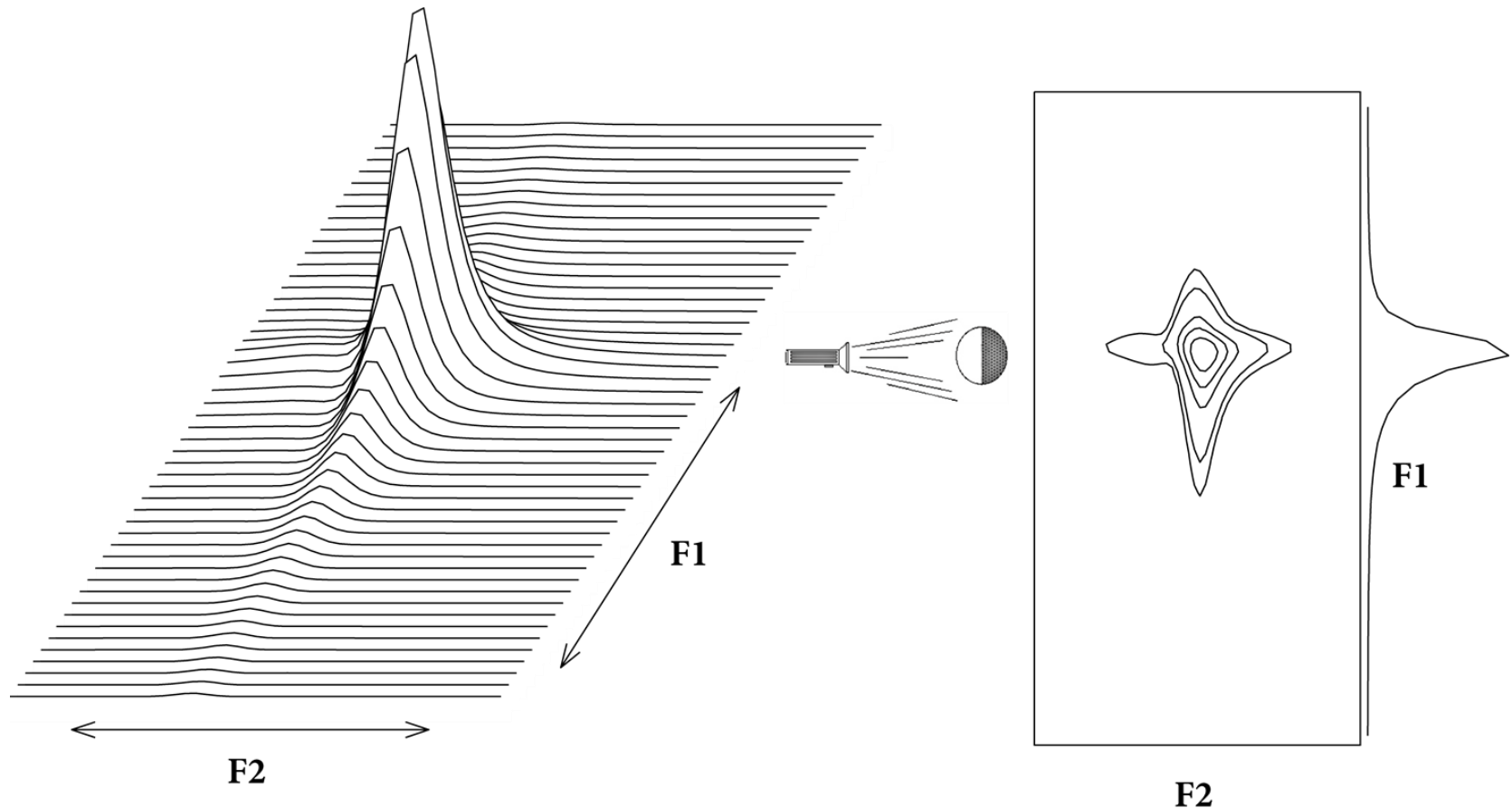


Spettro bidimensionale  
INTENSITA VS FREQUENZA1 VS FREQUENZA2



# NMR - 2D

- Per facilitarne l'interpretazione, gli spettri 2D sono sezionati ad una certa altezza (threshold o soglia)
- L'intensità dei picchi è generalmente proiettata sul piano che li seziona o mediante una scala di colori o attraverso curve di livello
- Ogni curva di livello (o colore) unisce punti del picco caratterizzati dalla medesima intensità



# Tipi di spettri 2D

Gli spettri 2D mostrano **correlazioni** di frequenza (chemical shift) fra nuclei.

Ci sono diversi tipi di correlazione che vengono mostrate a seconda dell'esperimento 2D

- correlazioni attraverso legami (es COSY)
- correlazioni attraverso lo spazio (es NOESY)
- correlazioni attraverso scambio chimico o conformazionale (es. EXSY)

Inoltre le correlazioni possono essere:

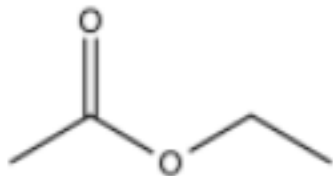
OMONUCLEARI fra nuclei dello stesso tipo ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ )

ETERONUCLEARI fra nuclei diversi ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ )

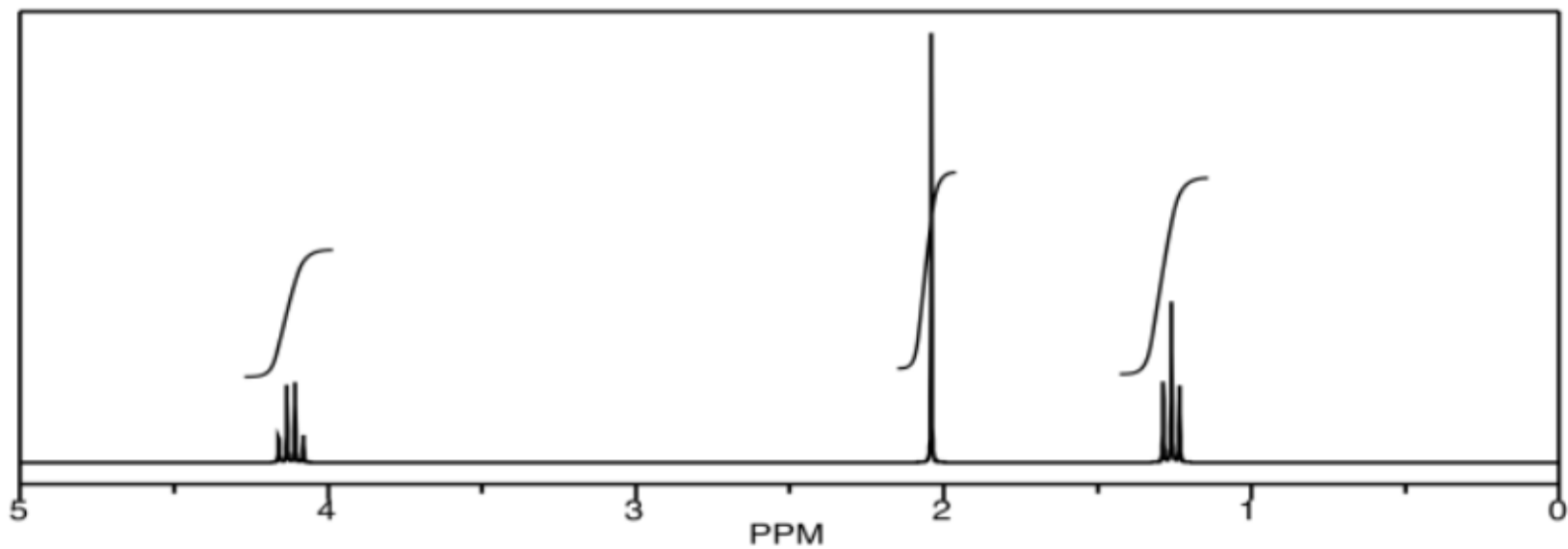
# 2D omonucleare COSY

- COSY: acronimo di **C**orrelation **S**pectroscop**Y**
- Primo esperimento 2D omonucleare sviluppato
- Le correlazioni sono dovute all'accoppiamento scalare.
- Quindi lo spettro COSY mostra gli idrogeni che sono accoppiati fra loro.

# Esempio

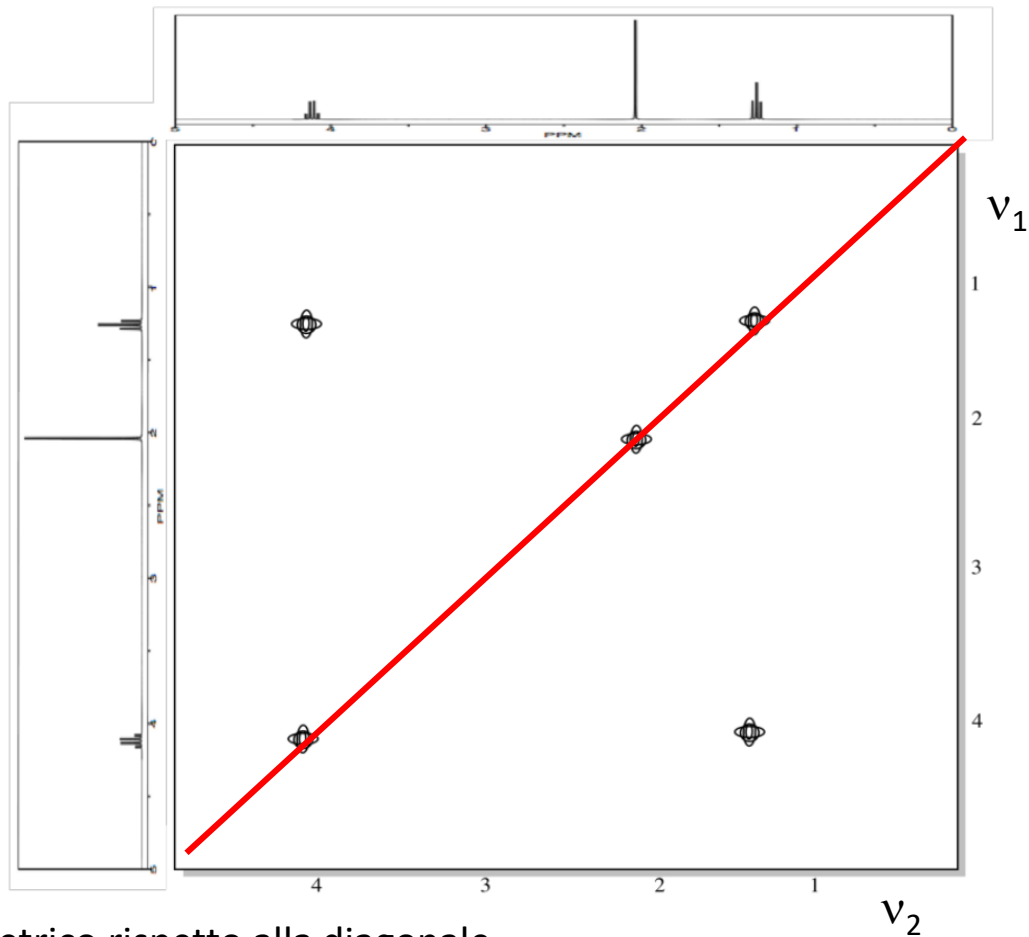


Spettro  $^1\text{H}$  NMR dell'acetate di etile



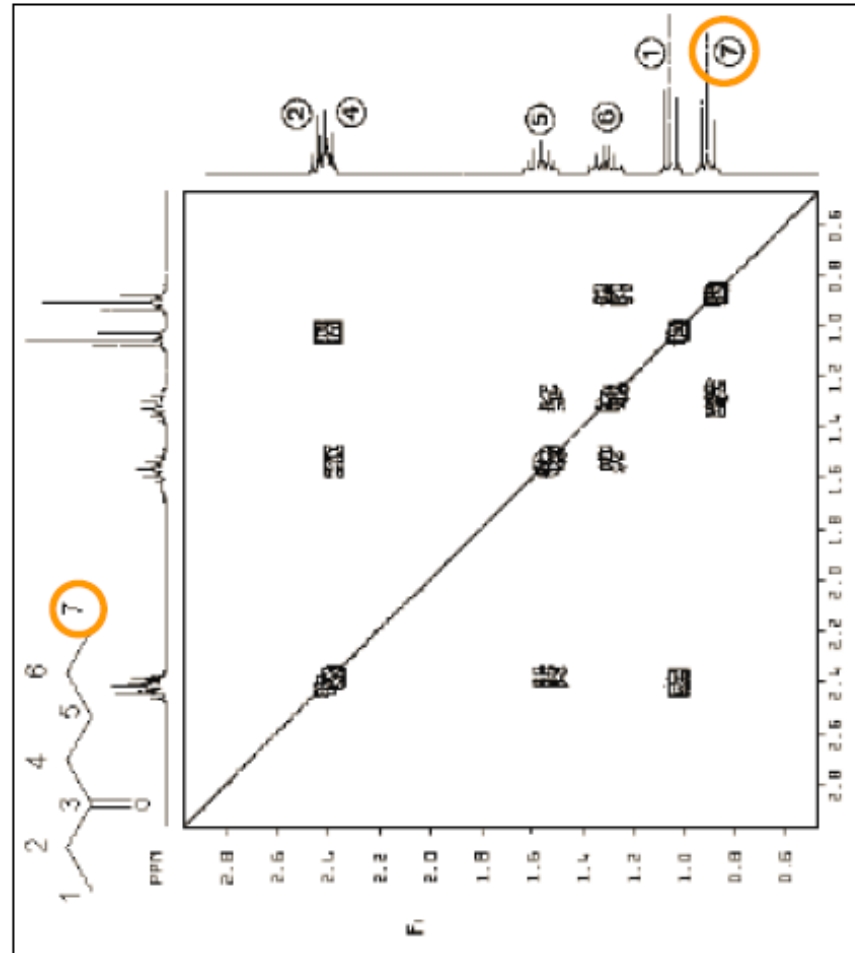
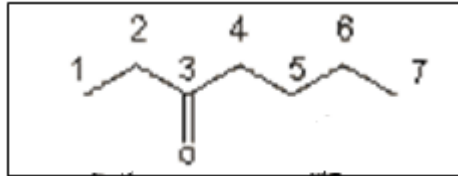
$^1\text{H}$  NMR  $\delta$ , ppm: 1.25 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 2.10 (3H, s) 4.20 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz)

# Spettro COSY dell'acetato di etile



- Lo spettro è simmetrico rispetto alla diagonale.
- I picchi sulla diagonale sono detti di autocorrelazione (frequenze uguali sui due assi)
- I picchi sulla diagonale corrispondono allo spettro monodimensionale
- I picchi fuori dalla diagonale (cross peaks) hanno coordinate diverse sui due assi e sono i picchi di correlazione
- I singoletti (nello spettro  $^1\text{H}$  NMR) generano nello spettro COSY soltanto picchi di autocorrelazione

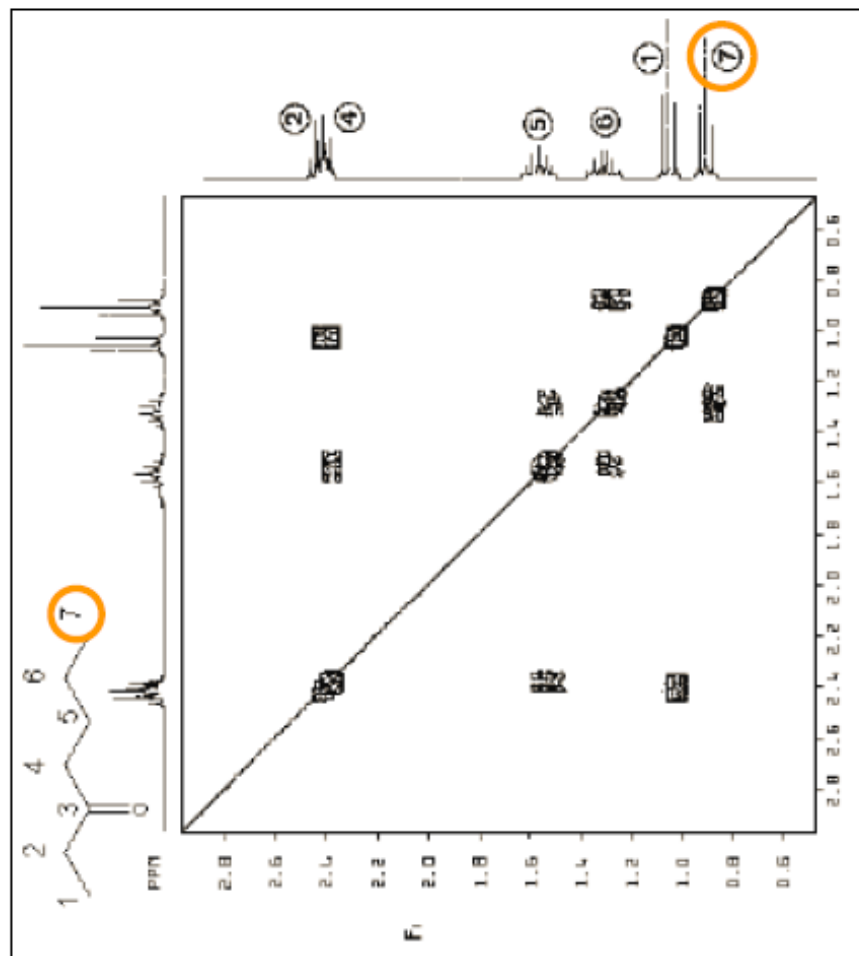
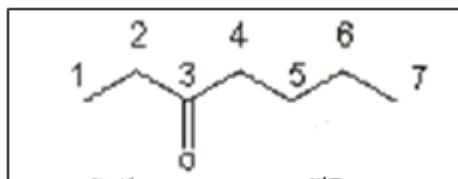
# Come leggere uno spettro COSY



- I picchi sulla diagonale corrispondono allo spettro monodimensionale.

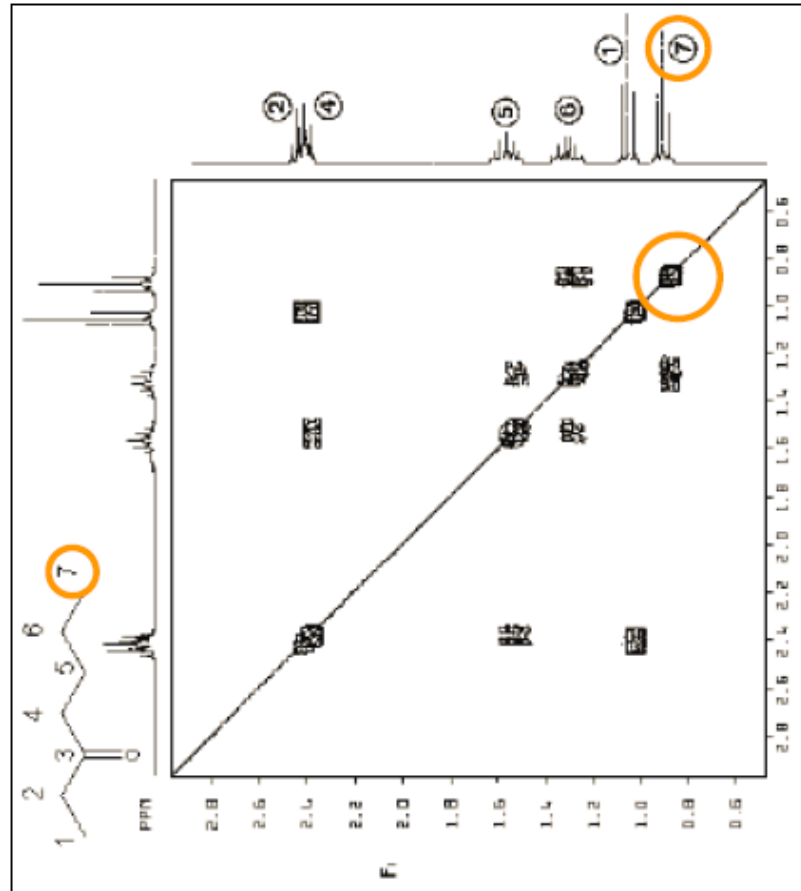
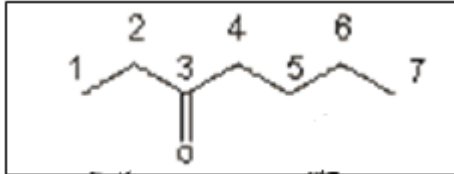


# Come leggere uno spettro COSY



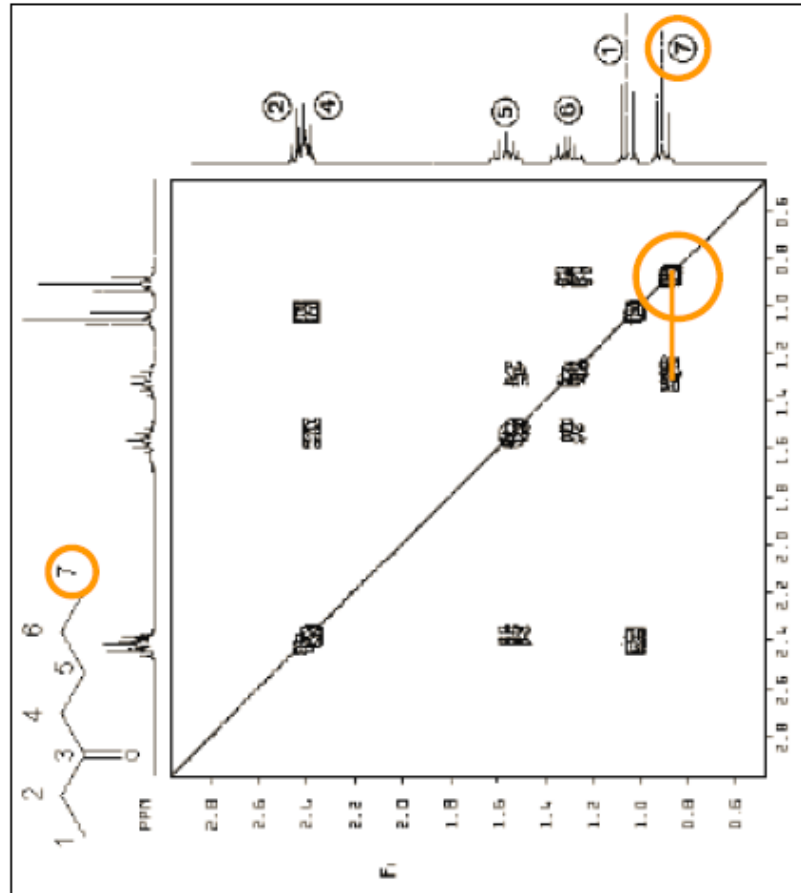
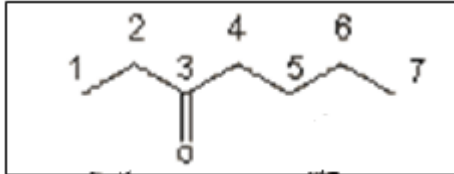
- Si parte da un picco di cui si conosce l'attribuzione per stabilire le correlazioni

# Come leggere uno spettro COSY



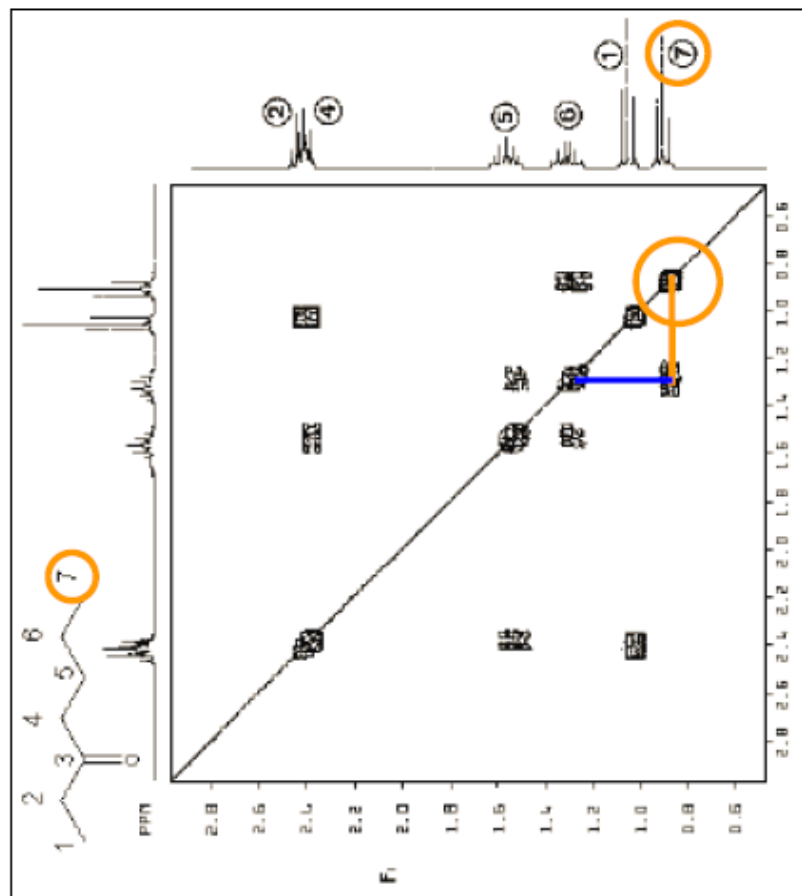
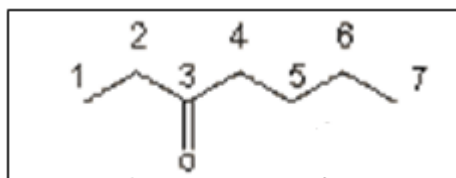
- Si rintraccia il picco relativo sulla diagonale

# Come leggere uno spettro COSY



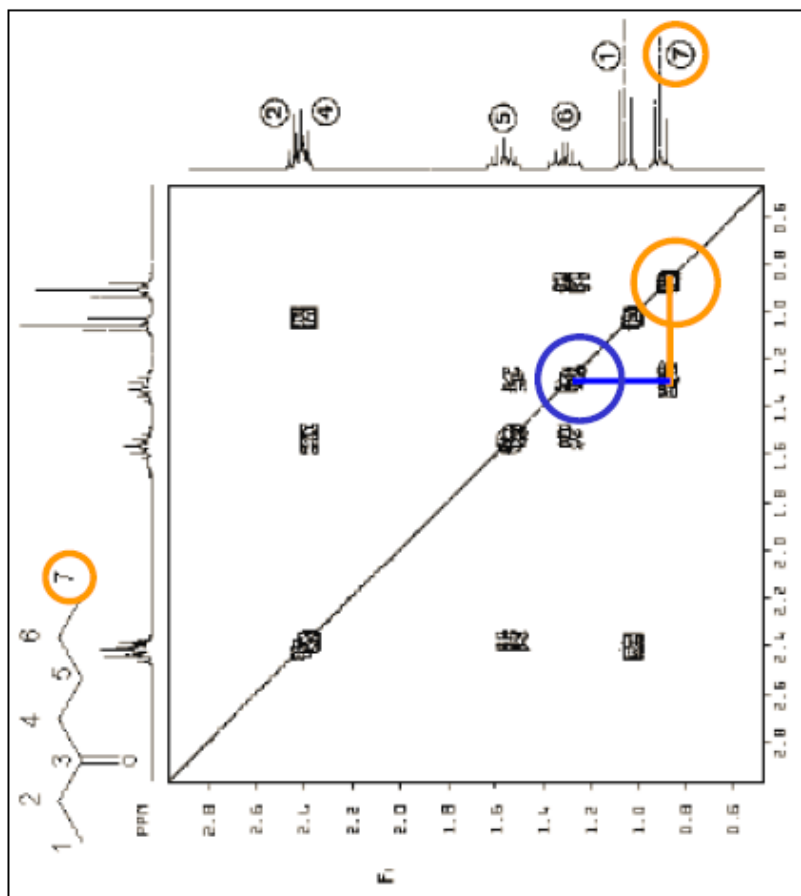
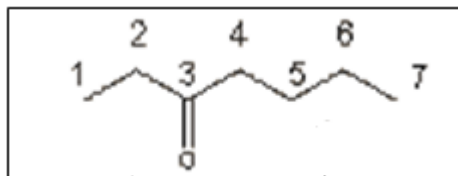
- Si traccia una retta ortogonale all'asse sino a incontrare un cross peak

# Come leggere uno spettro COSY



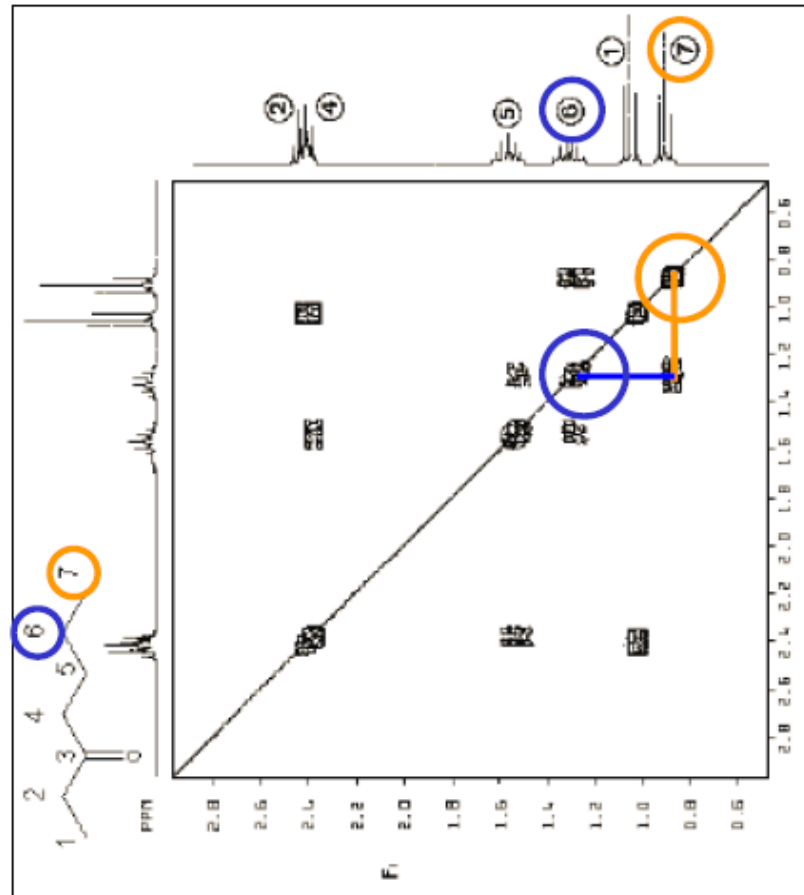
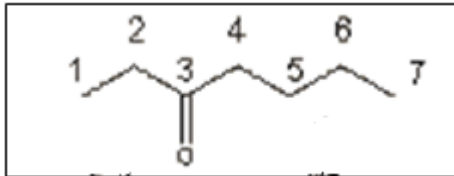
- Dal cross peak si traccia una linea ortogonale alla prima per andare a incrociare sulla diagonale il picco correlato

# Come leggere uno spettro COSY



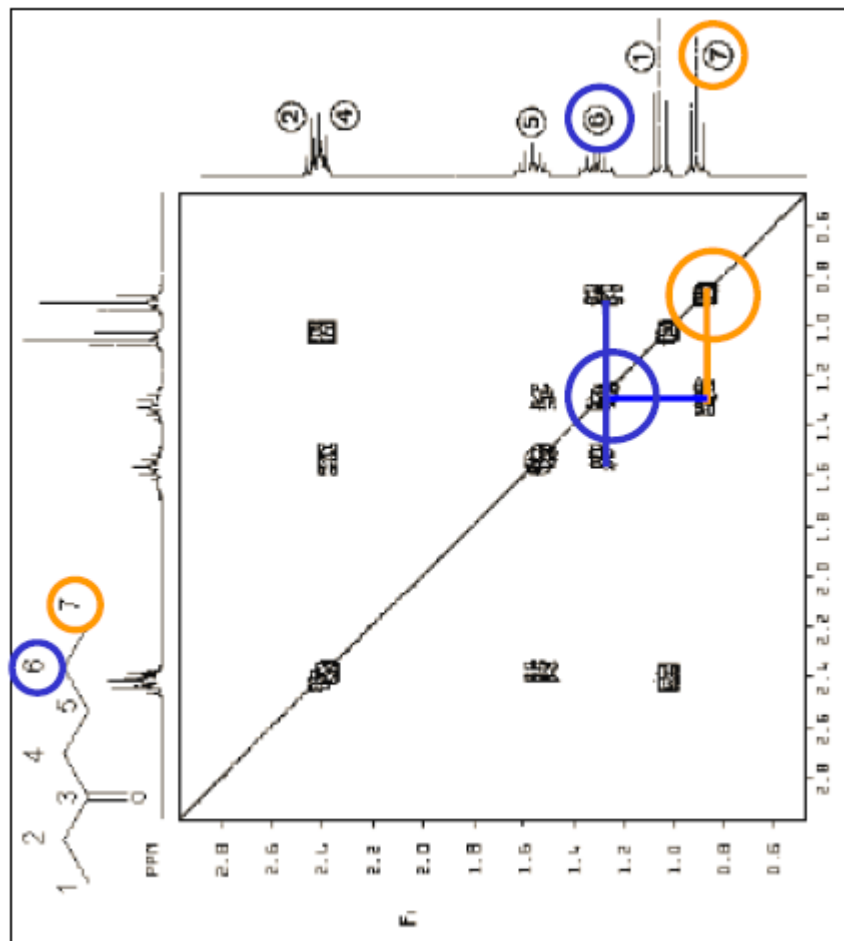
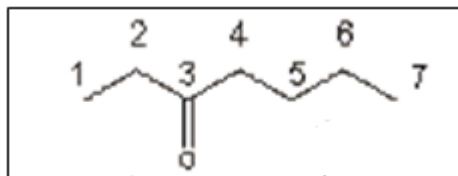
- Dal cross peak si traccia una linea ortogonale alla prima per andare a incrociare sulla diagonale il picco correlato

# Come leggere uno spettro COSY



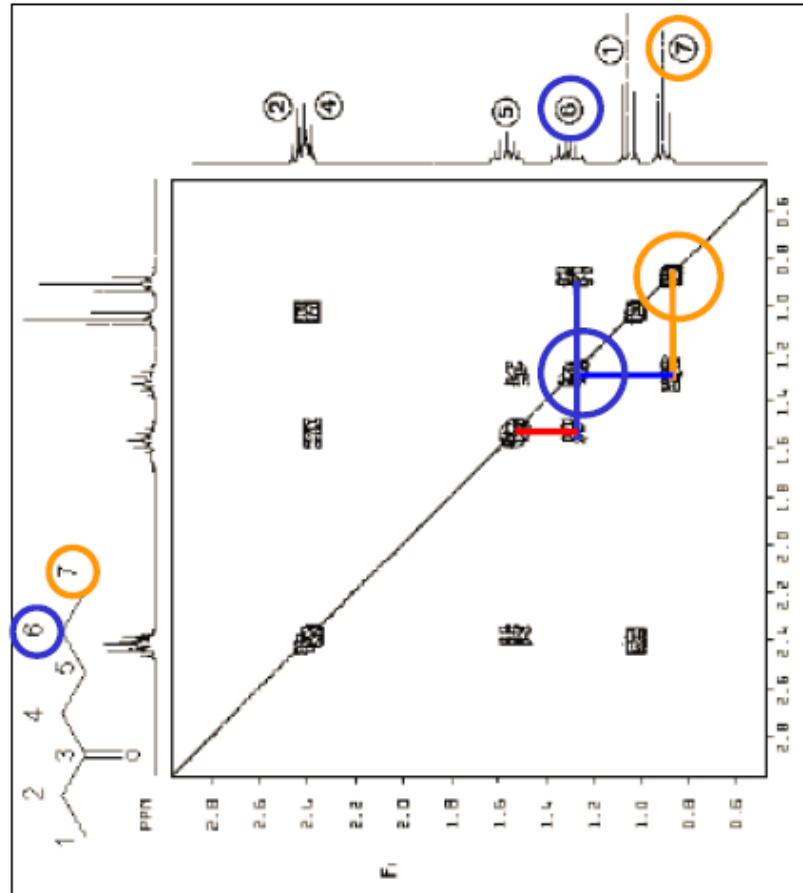
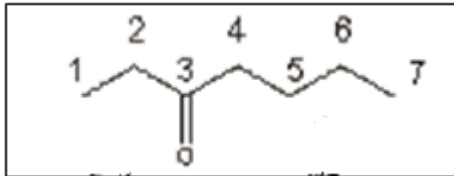
- Dal picco sulla diagonale si torna sull'asse delle frequenze identificando il picco correlato al 7 che corrisponde ai protoni in 6

# Come leggere uno spettro COSY



Dal picco sulla diagonale attribuita agli idrogeni in posizione 6 si traccia un segmento ortogonale all'asse delle frequenze sino ad incontrare i cross peak, un cross peak è relativo all'accoppiamento con 7, l'altro deve essere relativo all'accoppiamento con 5

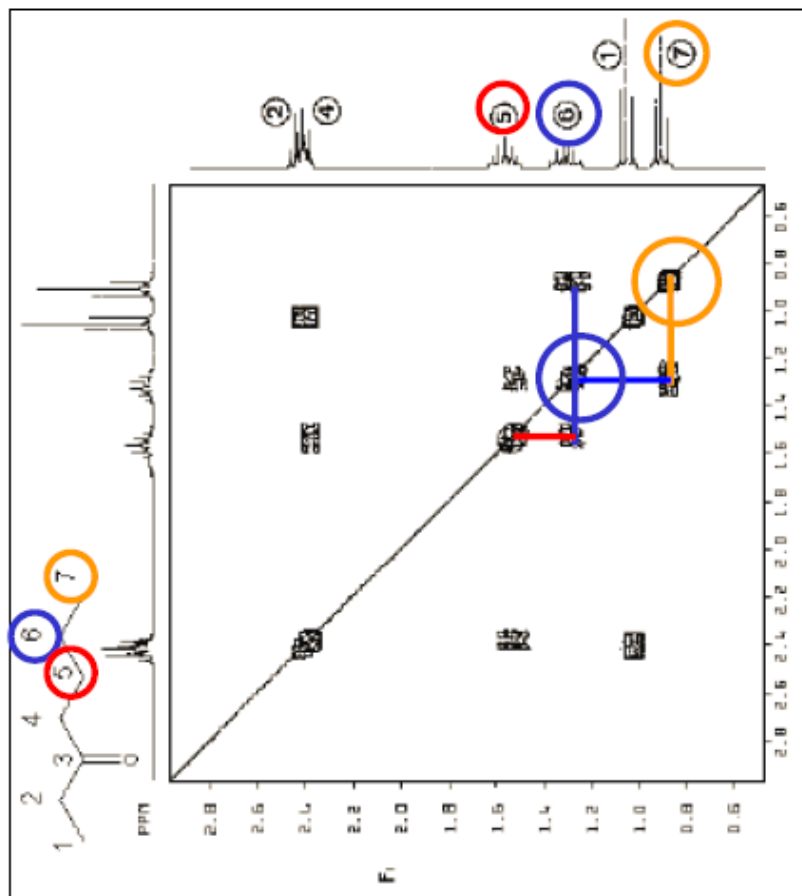
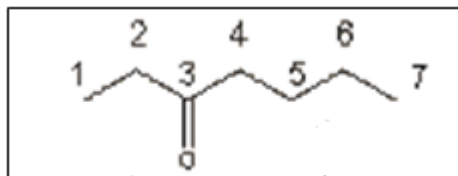
# Come leggere uno spettro COSY



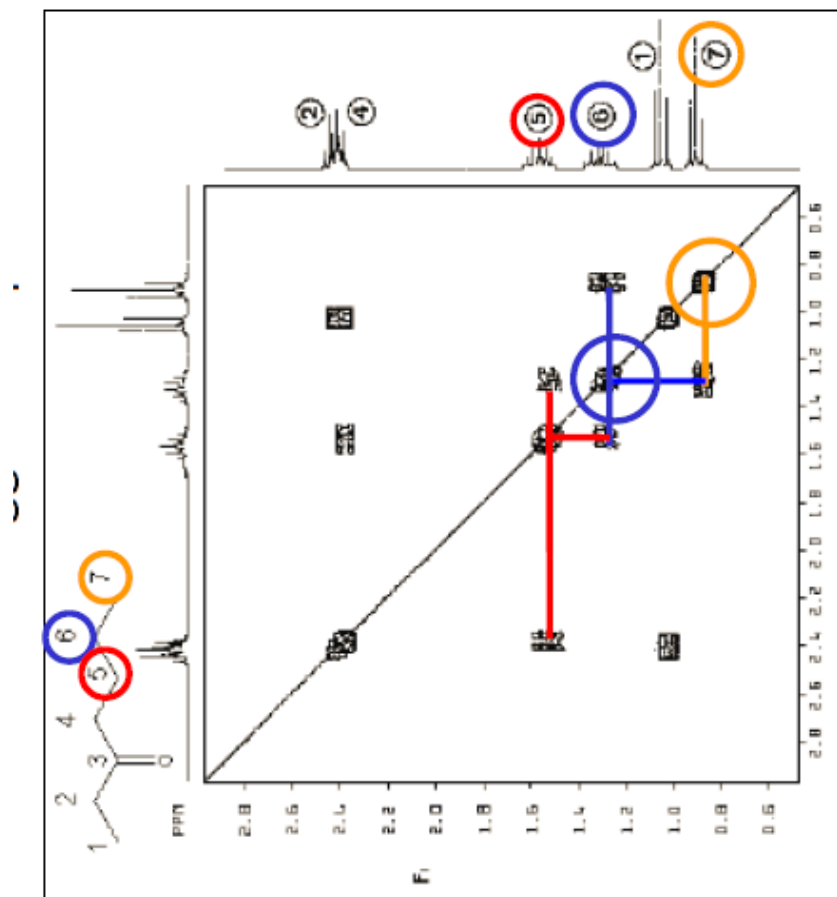
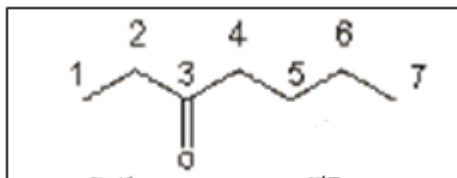
- Per identificare sulla diagonale il picco dei protoni in 5 si traccia un nuovo segmento a partire dal nuovo cross peak



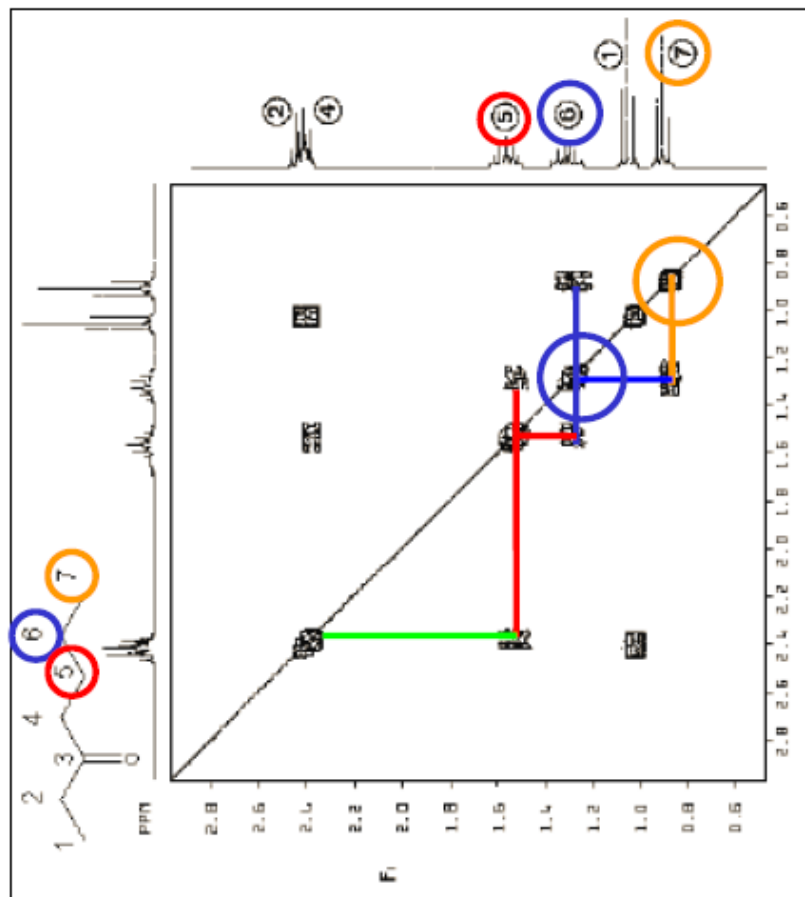
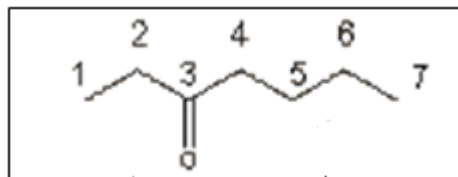
# Come leggere uno spettro COSY



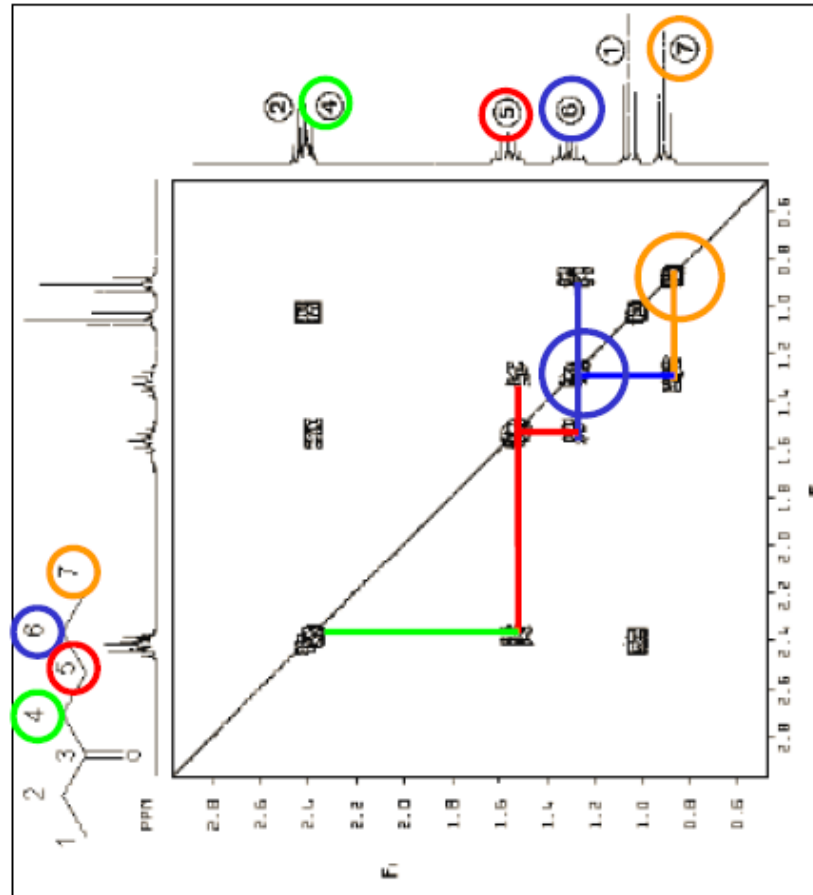
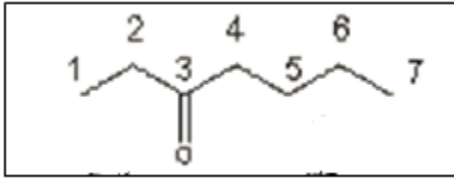
# Come leggere uno spettro COSY



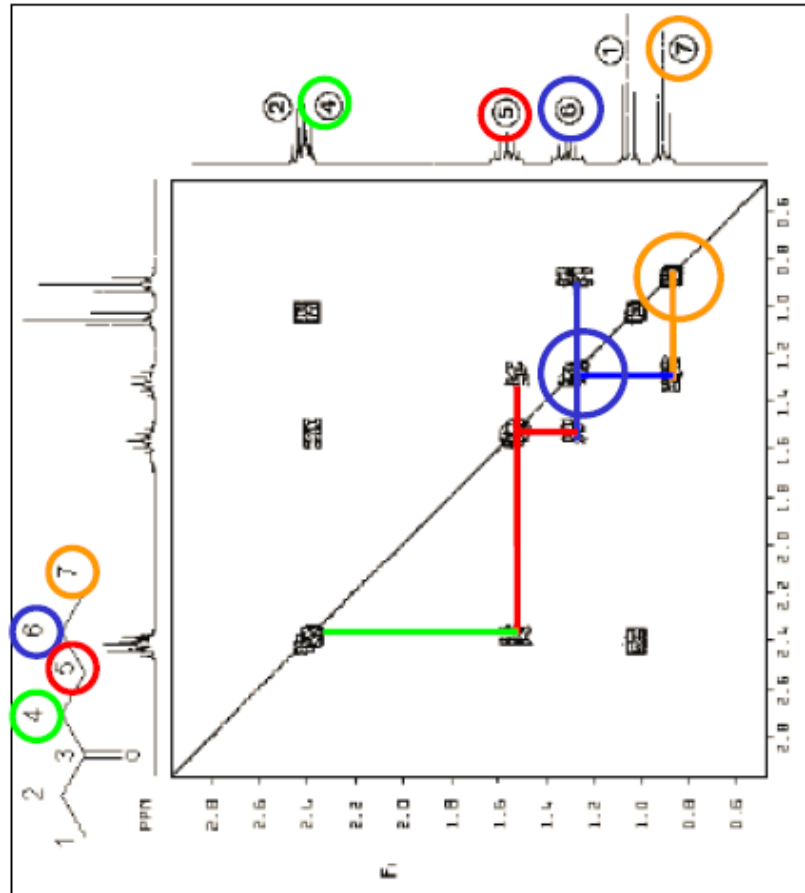
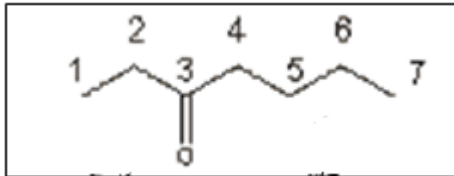
# Come leggere uno spettro COSY



# Come leggere uno spettro COSY

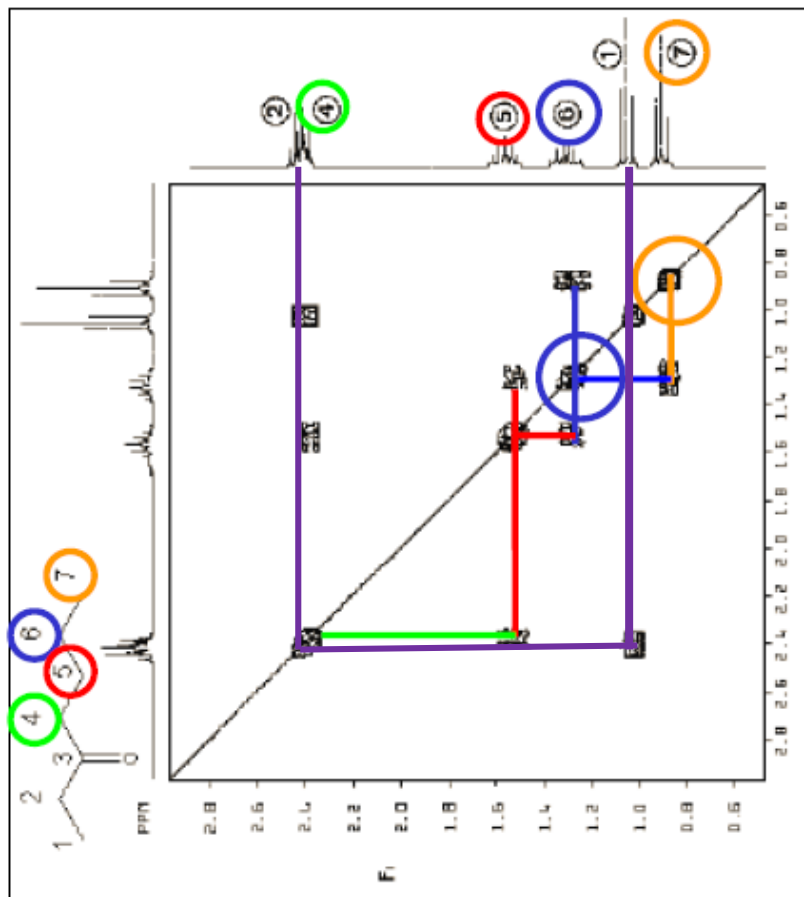
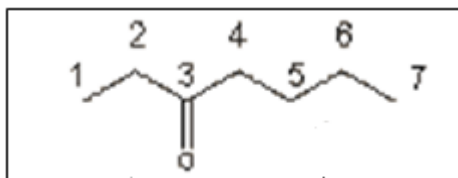


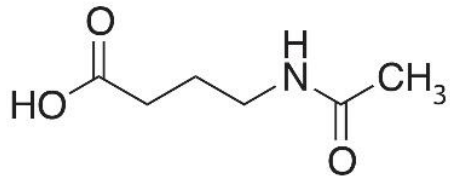
# Come leggere uno spettro COSY



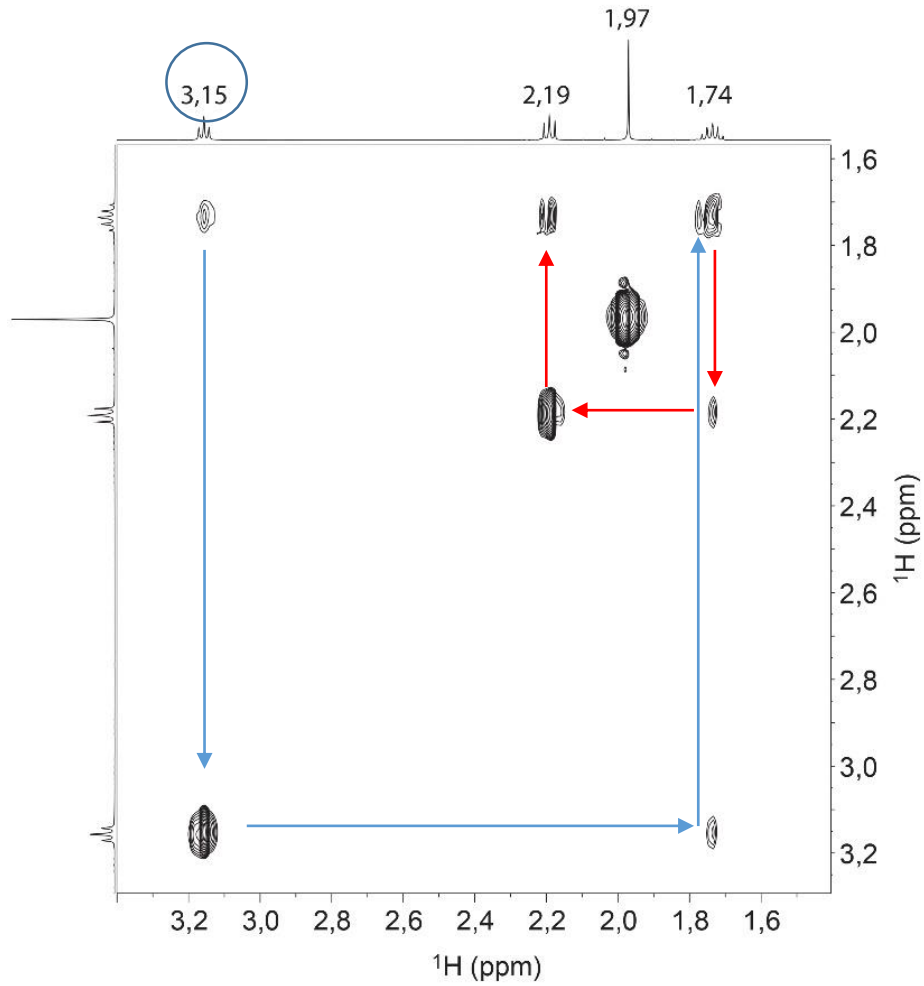
- Come si identificano 1 e 2?

# Come leggere uno spettro COSY

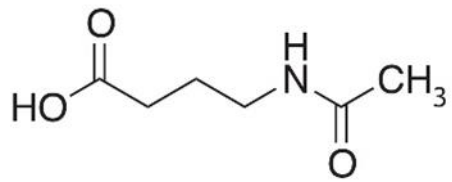




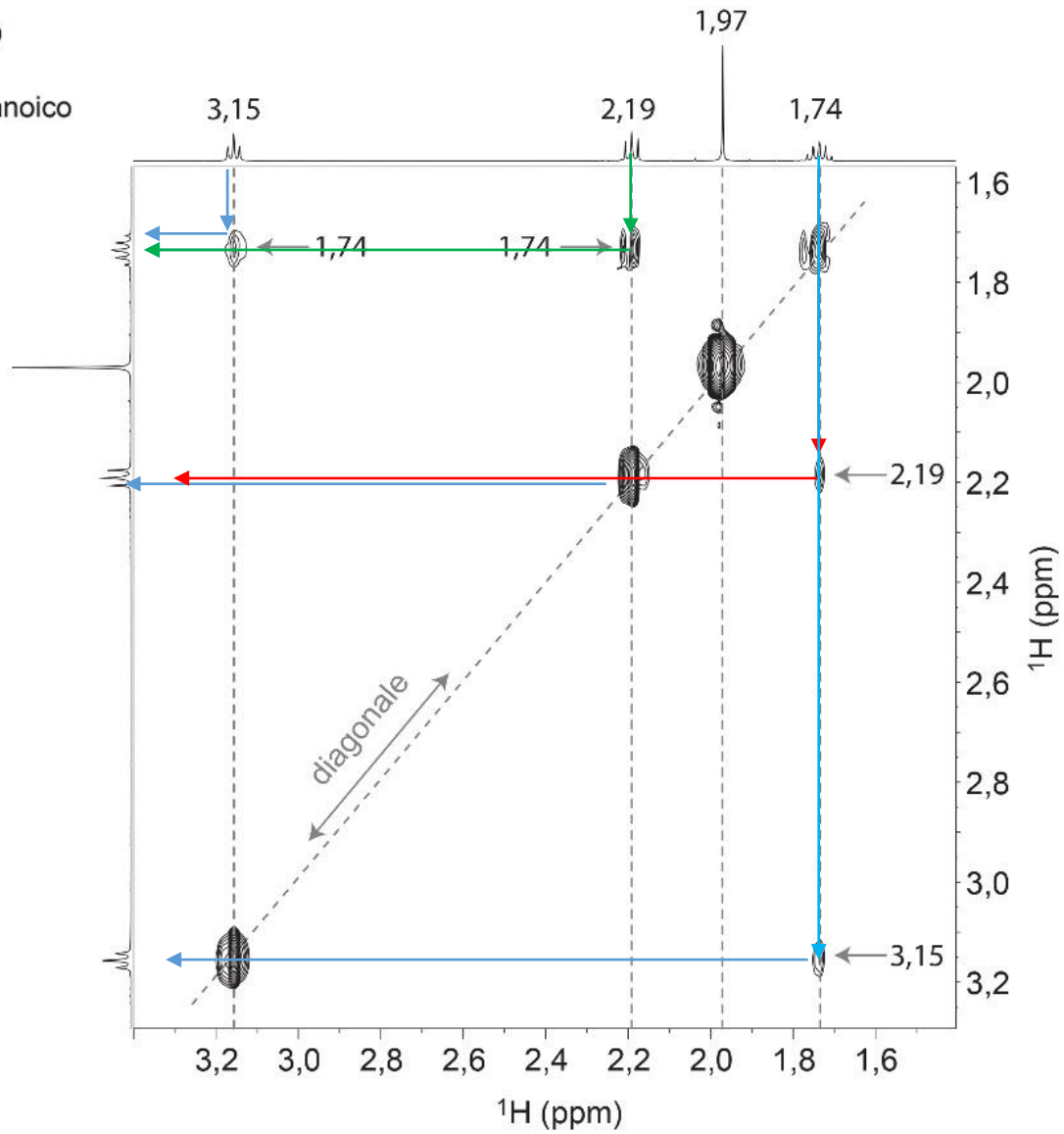
acido 4-acetammidobutanoico



I protoni scambiabili non sono osservabili in  $\text{CDCl}_3$



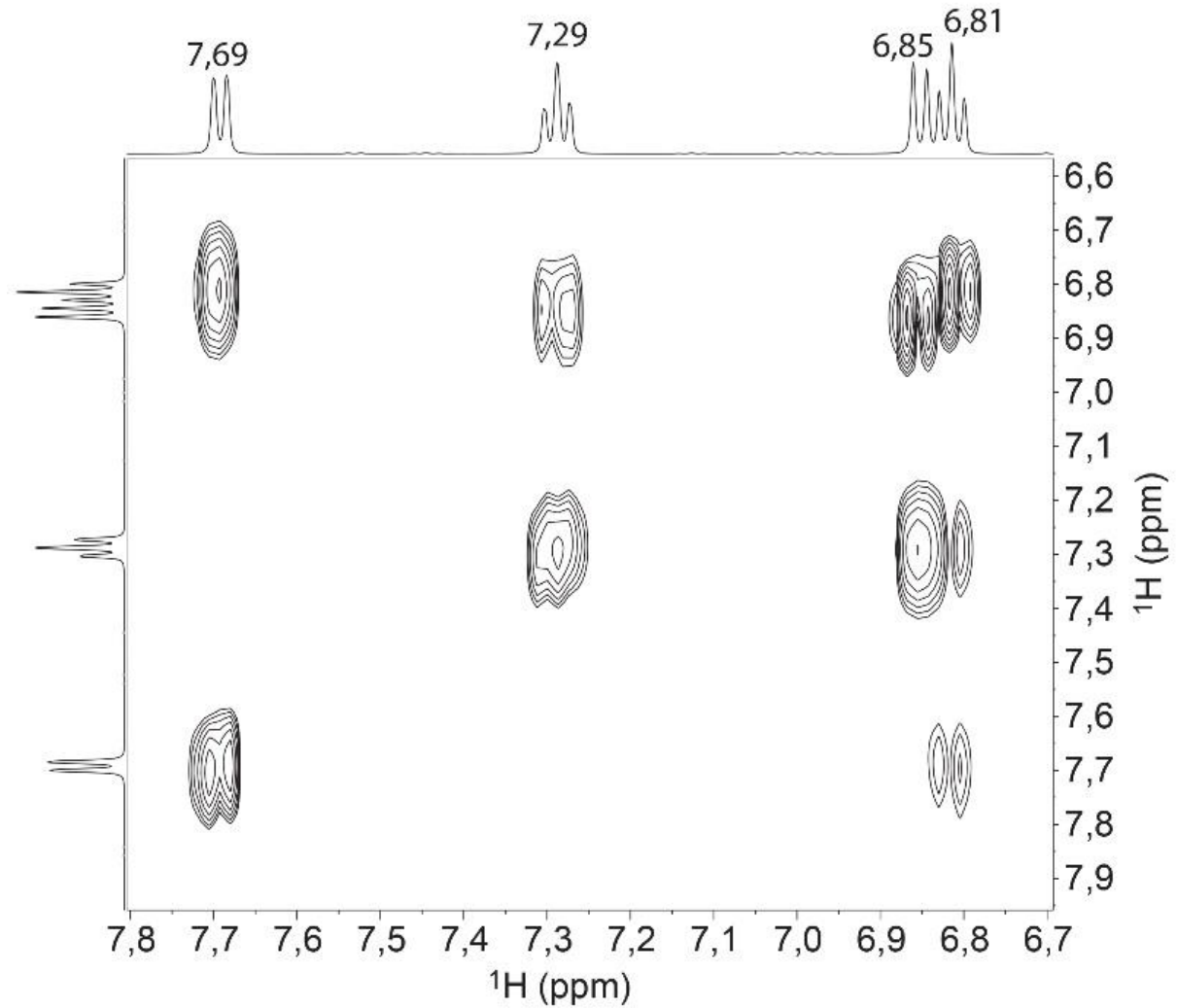
acido 4-acetamidobutanoico



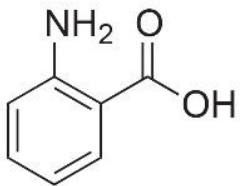




acido 2-amminobenzoico



I cross-peaks sono larghi e parzialmente sovrapposti, è necessario tracciare delle linee perfettamente centrate su ciascun segnale



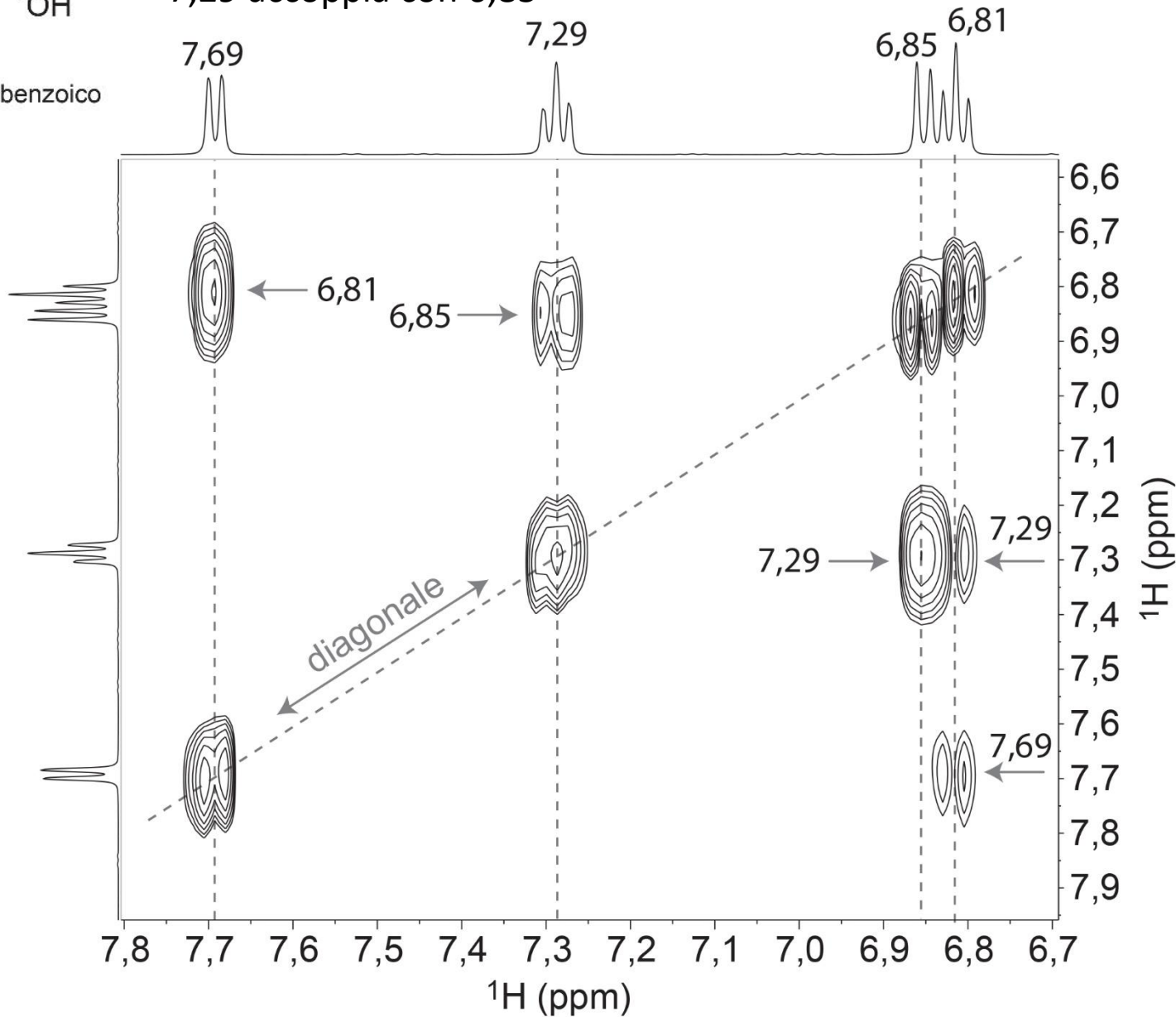
acido 2-amminobenzoico

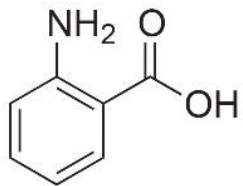
7,69 accoppia con 6,81

7,29 accoppia con 6,85

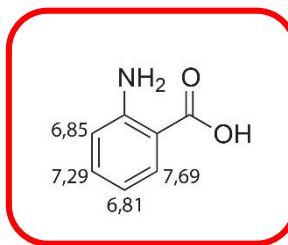
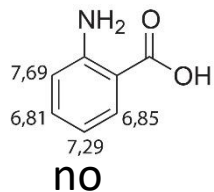
6,85 accoppia con 7,29

6,81 accoppia con 7,29 e 7,69

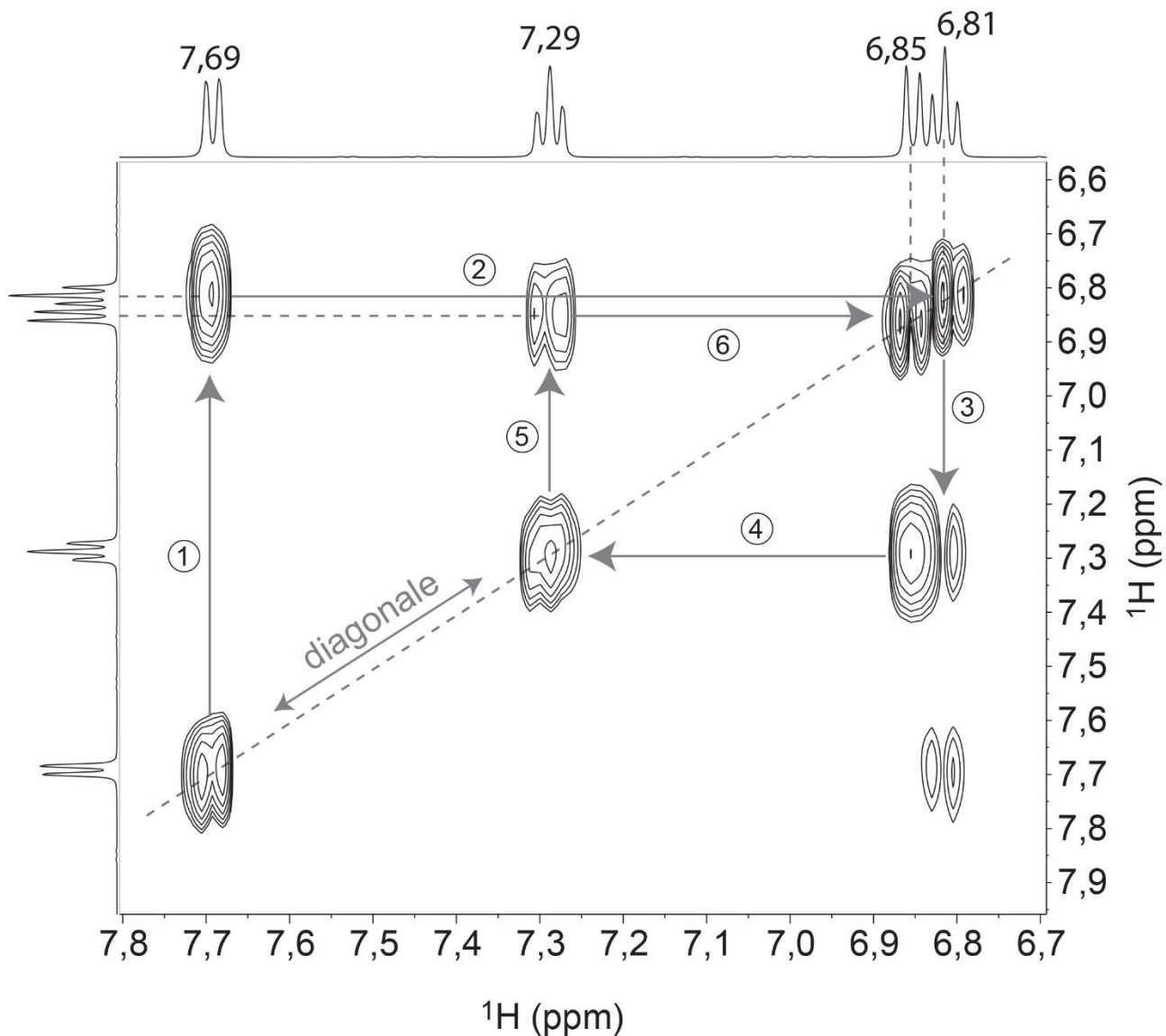


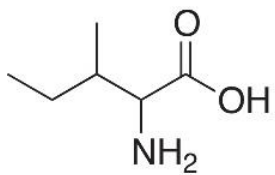


acido 2-amminobenzoico

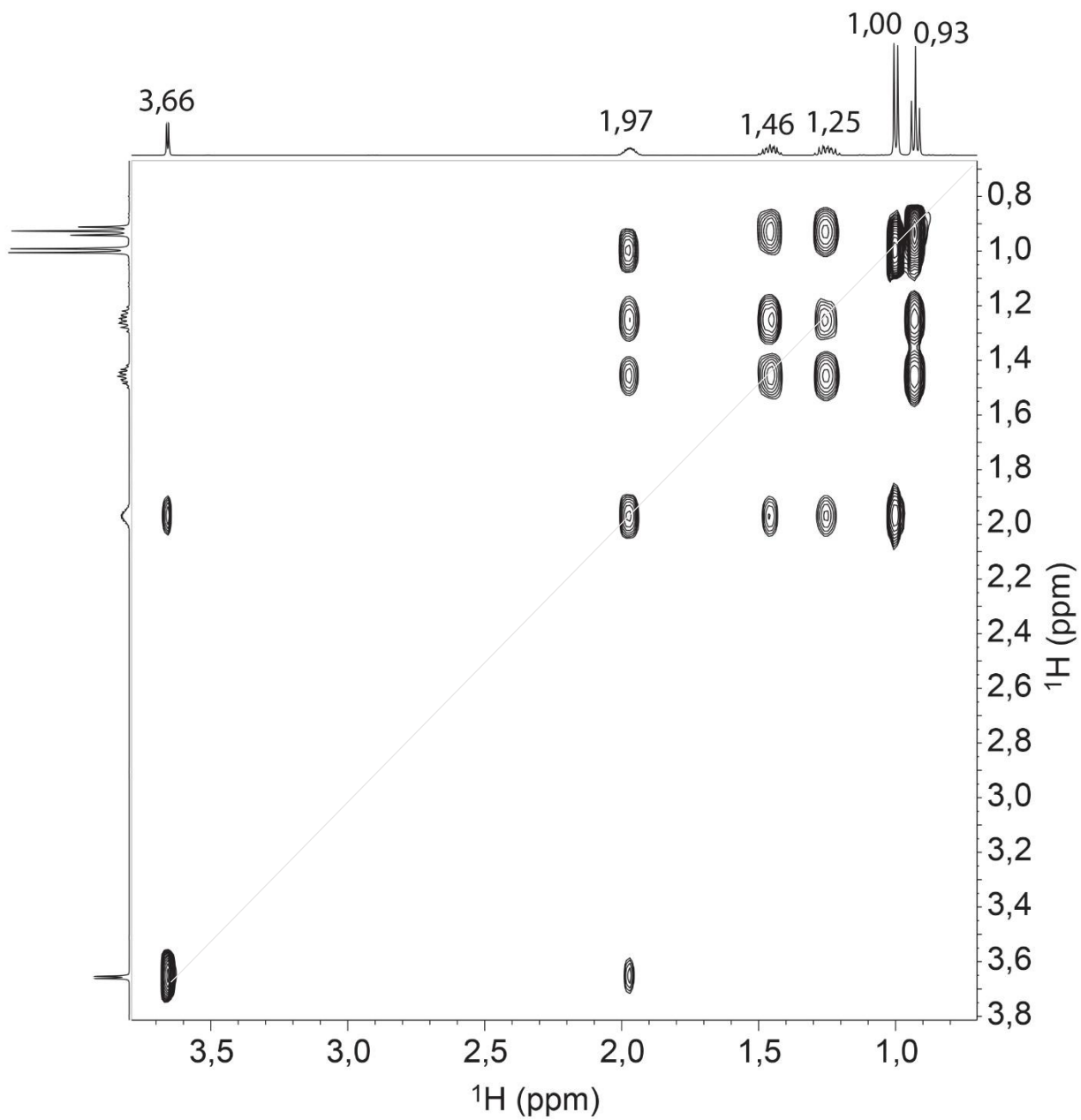


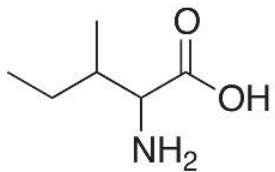
7,69 accoppia con  
6,81 che accoppia  
con 7,29 che  
accoppia con 6,85



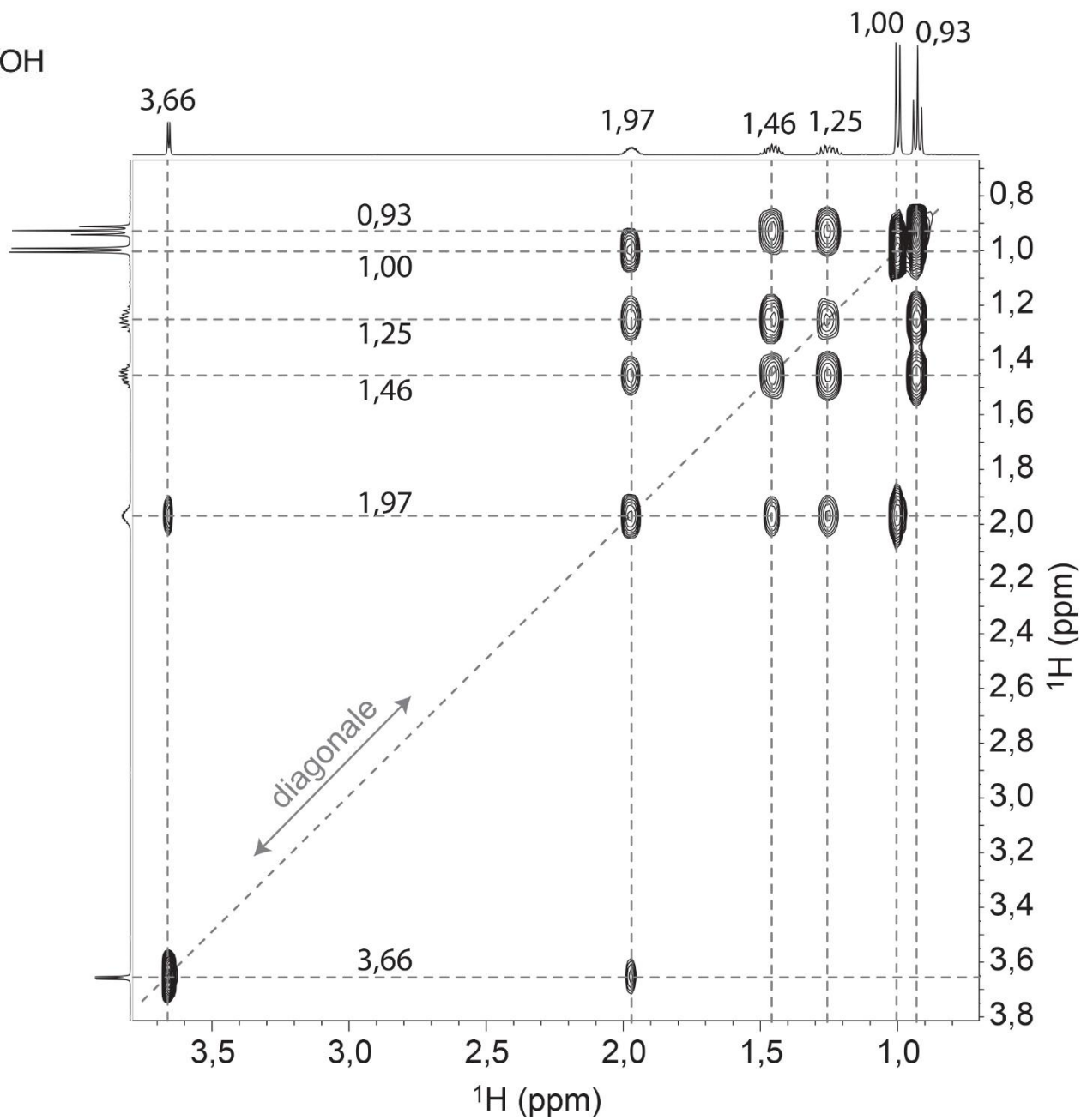


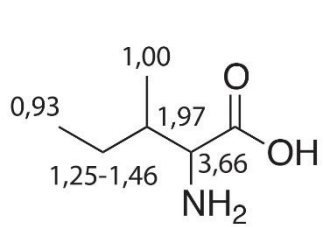
isoleucina



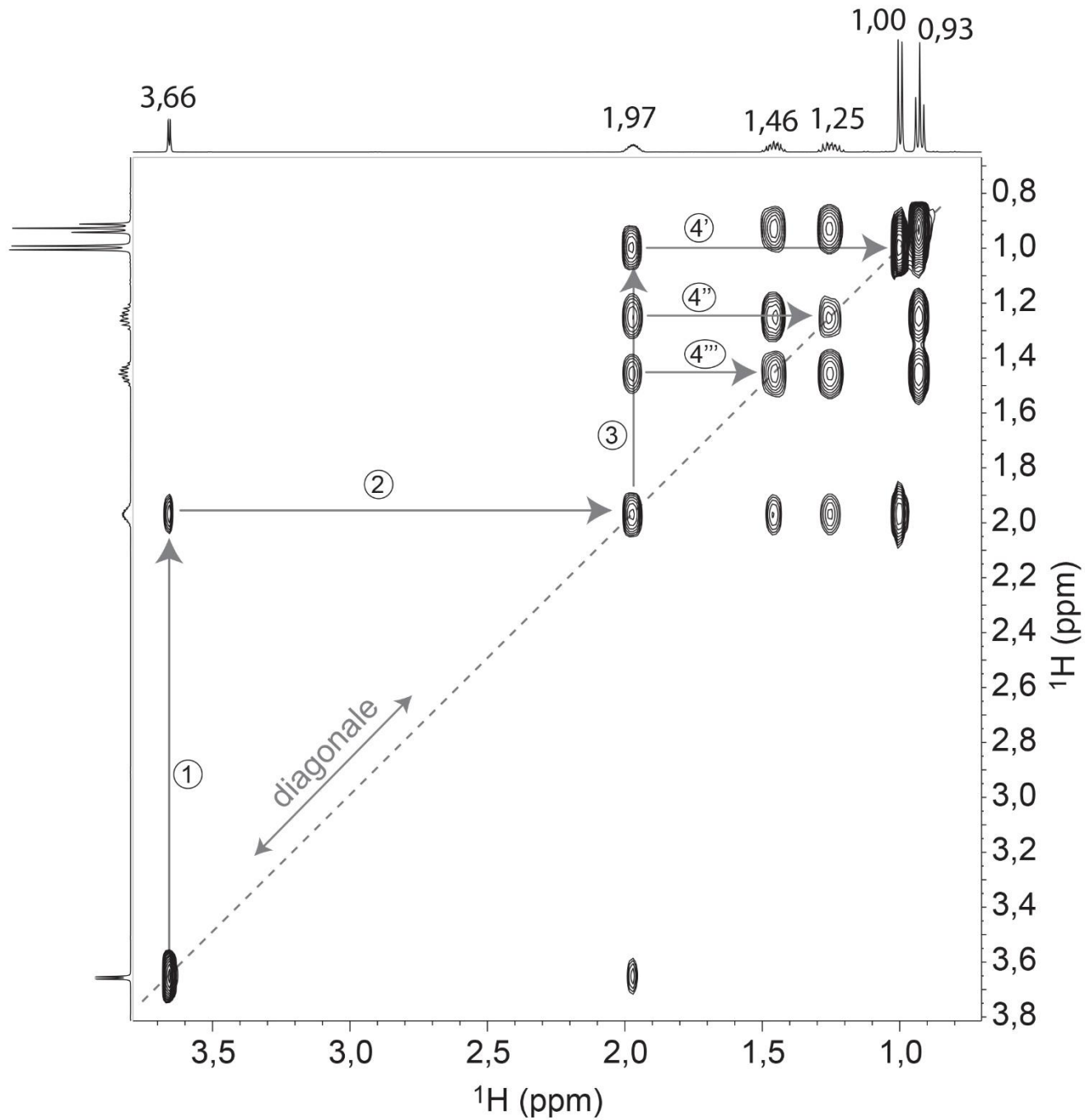


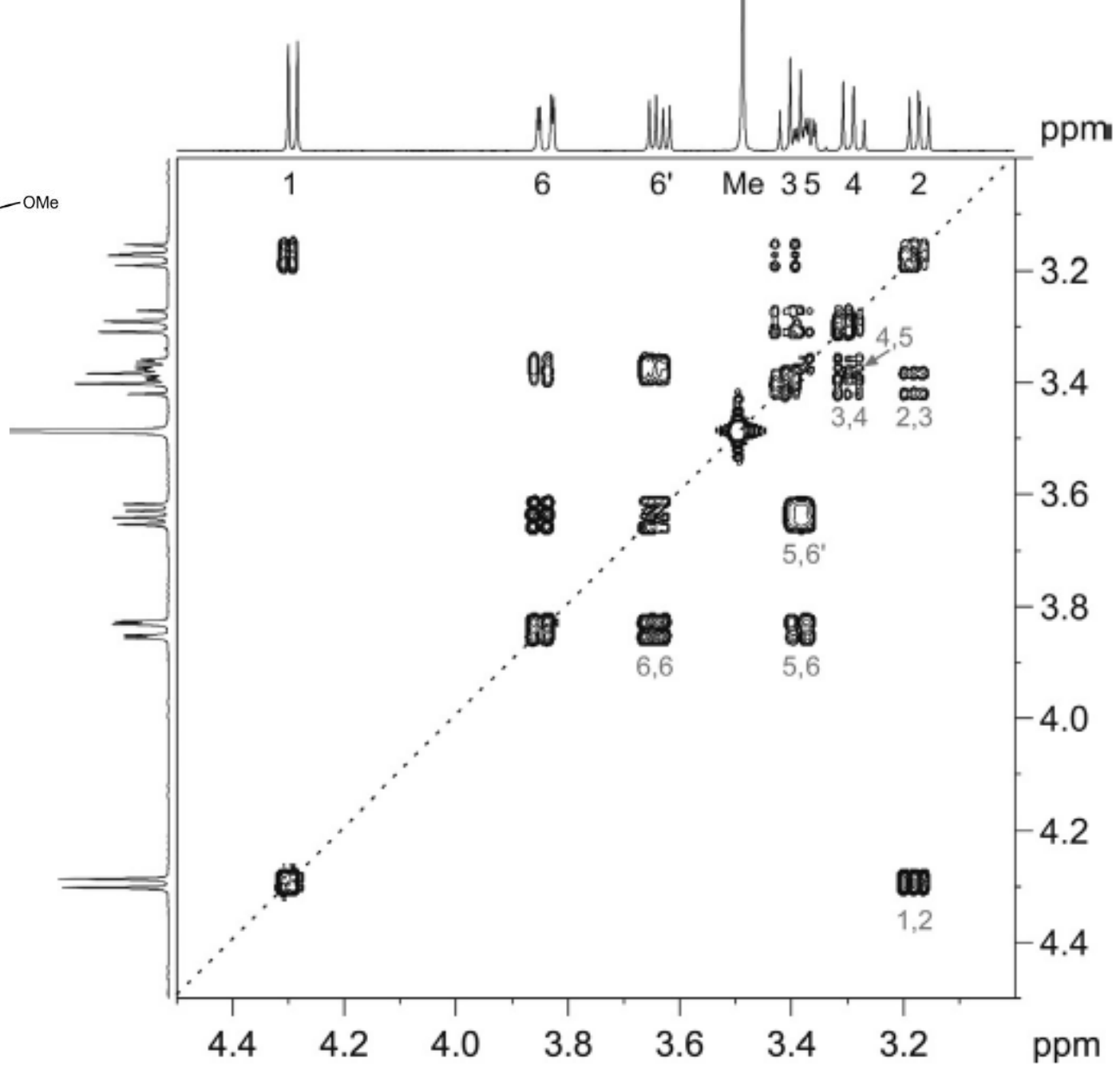
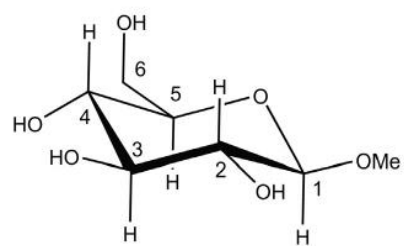
isoleucina

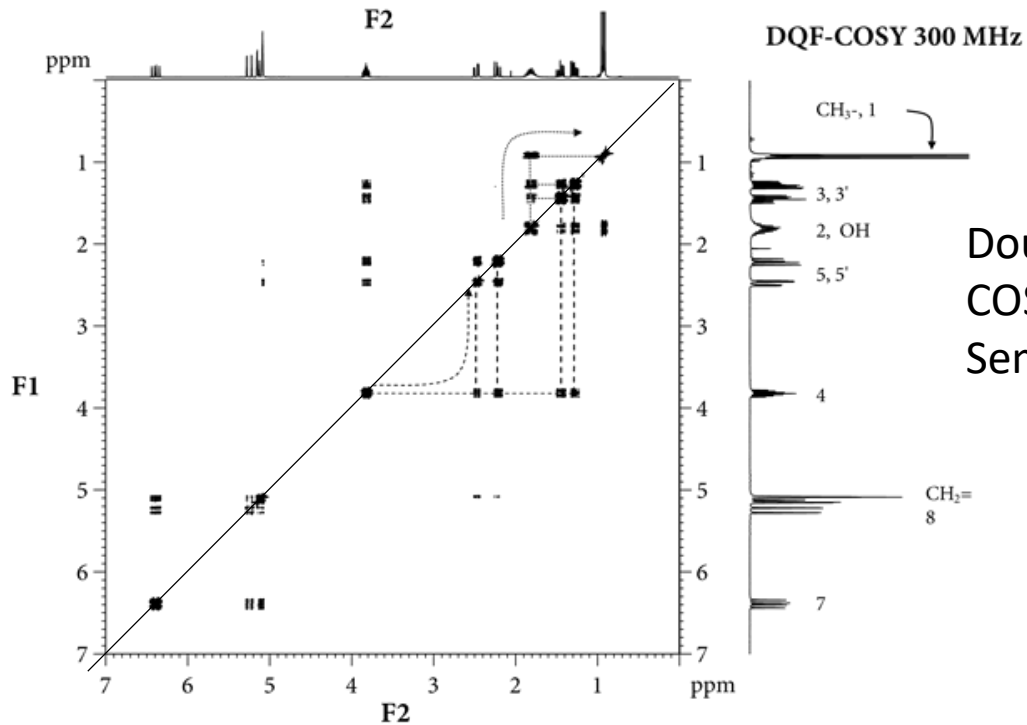
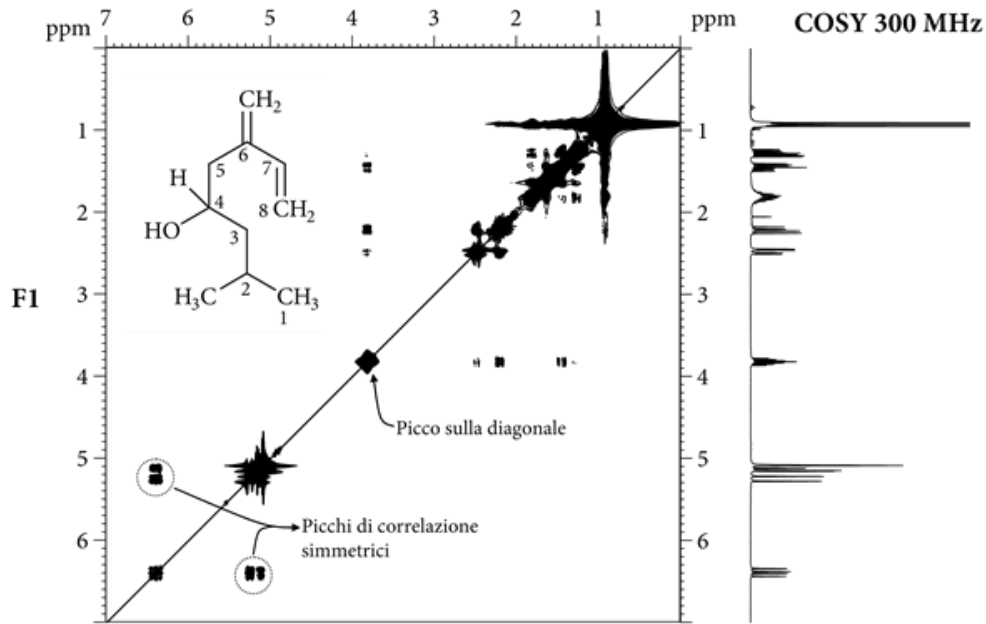




Isoleucina





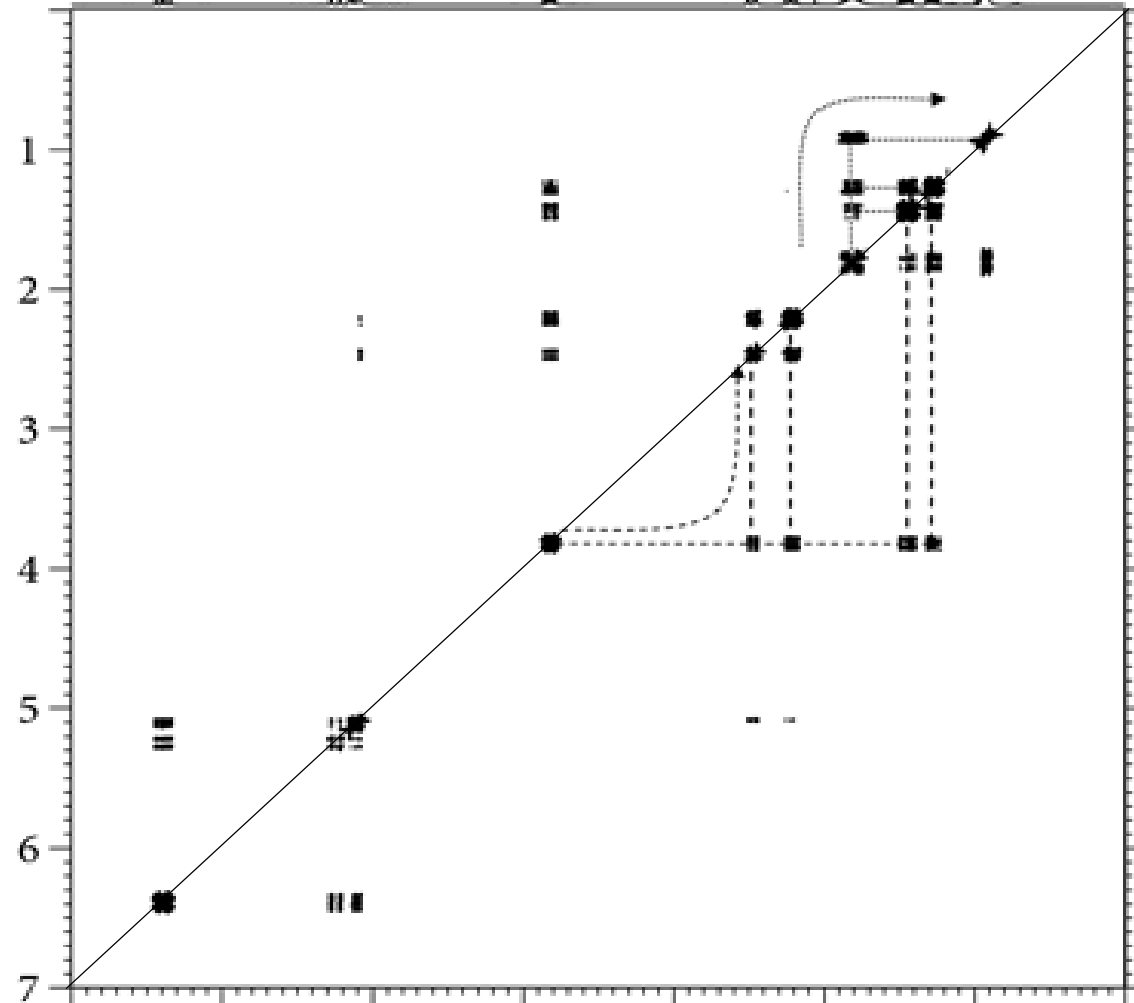


Double Quantum Filtered COSY  
 COSY con filtro a doppio-quanto  
 Semplifica segnali sulla diagonale

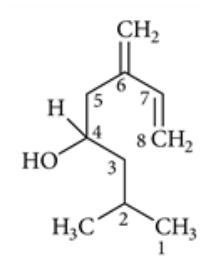
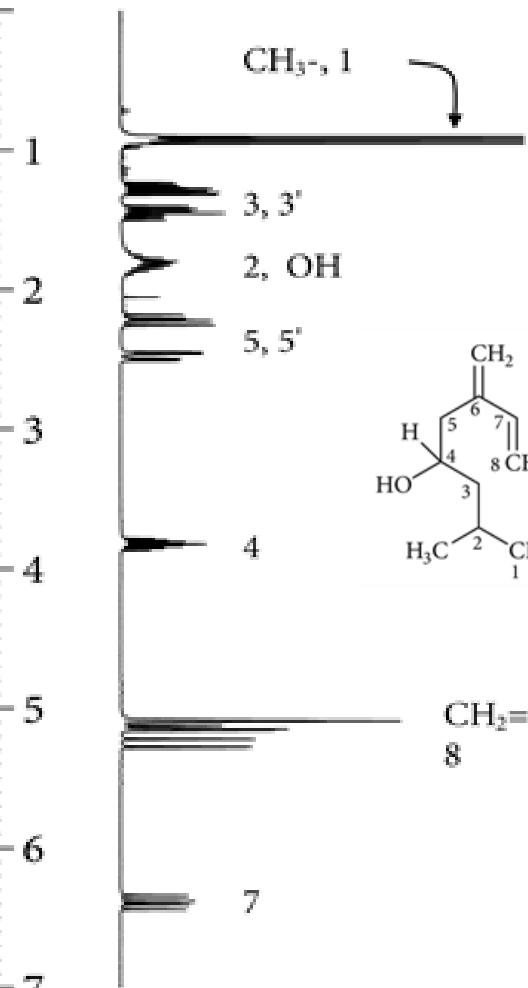


F2

ppm

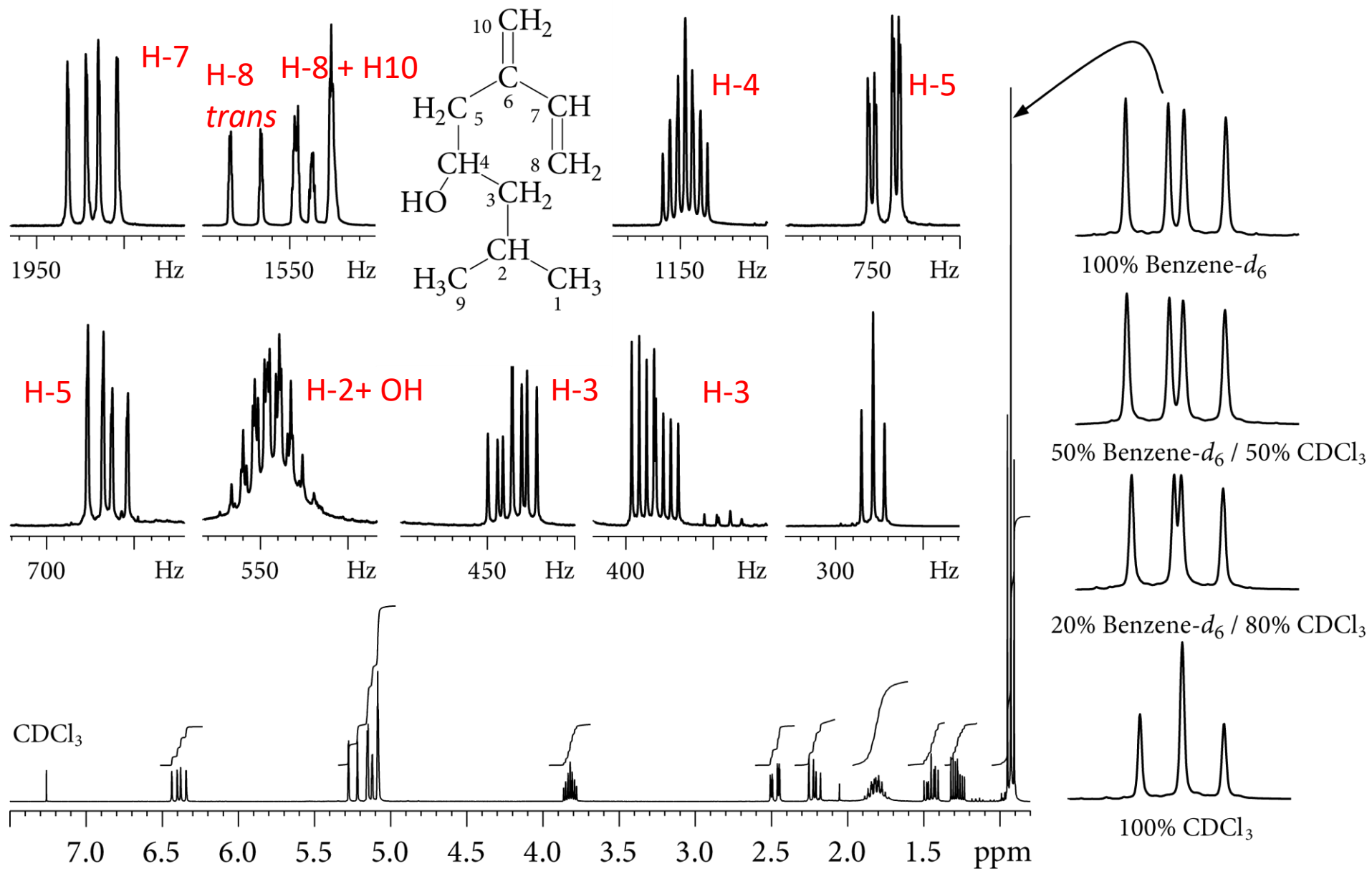


DQF-COSY 300 MHz



F2

ppm

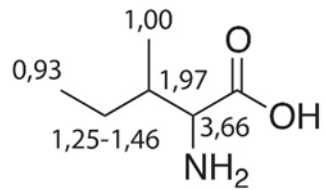


Spettro protonico NMR di 2-metil-6-metilen-7-otten-4-olo (ipsenolo) in  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz ed effetto della titolazione con benzene- $d_6$ .

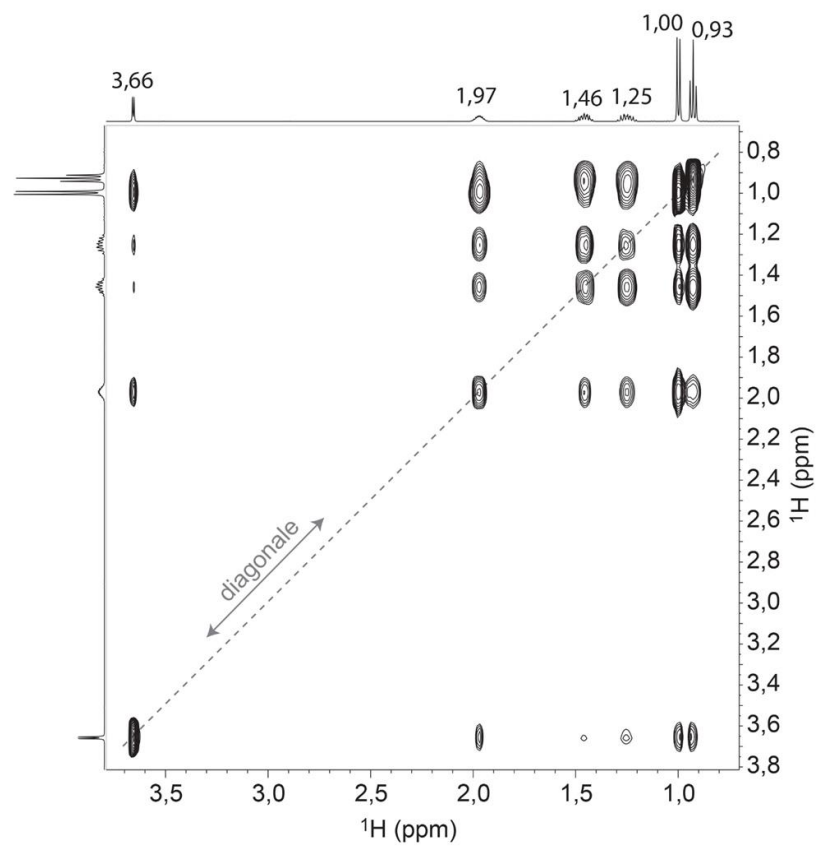
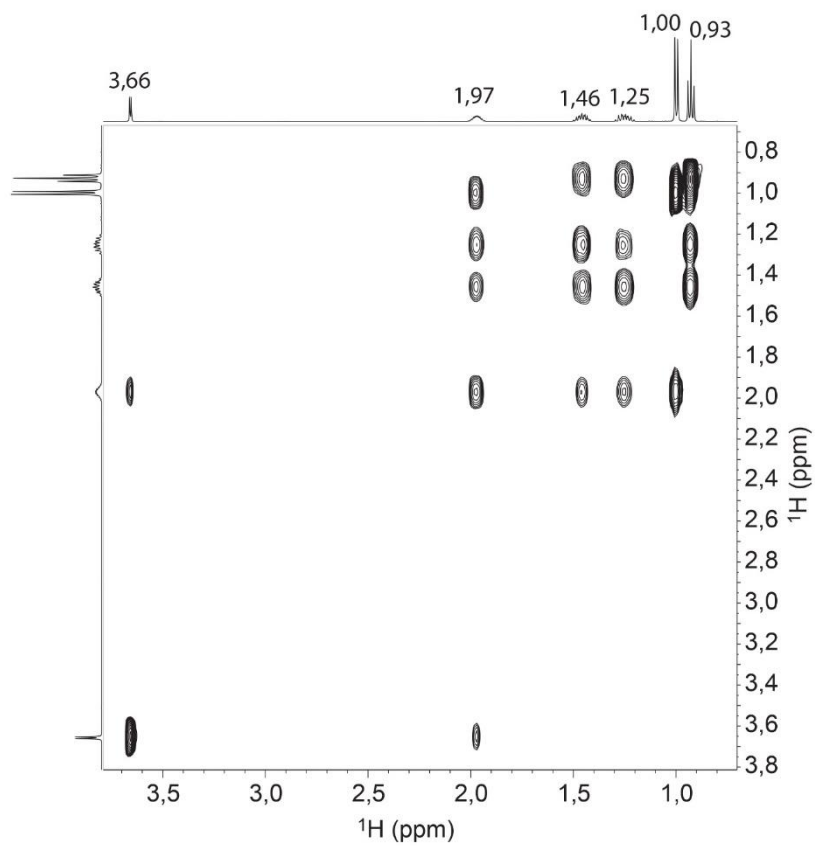
# TOCSY

- TOCSY: acronimo di **TO**tal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**
- Lo spettro TOCSY mostra correlazioni tra tutti i protoni che fanno parte dello stesso sistema di spin.
- La sequenza serve a trasferire interazione magnetica lungo un sistema di spin fino a 5-6 legami.
- Tale trasferimento si interrompe in caso di accoppiamenti piccoli o prossimi allo zero.
- Utile quando sono presenti più sistemi di spin separati che danno segnali sovrapposti nello spettro  $^1\text{H}$  NMR.
- Utile il confronto con lo spettro COSY.

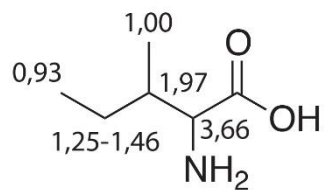
COSY



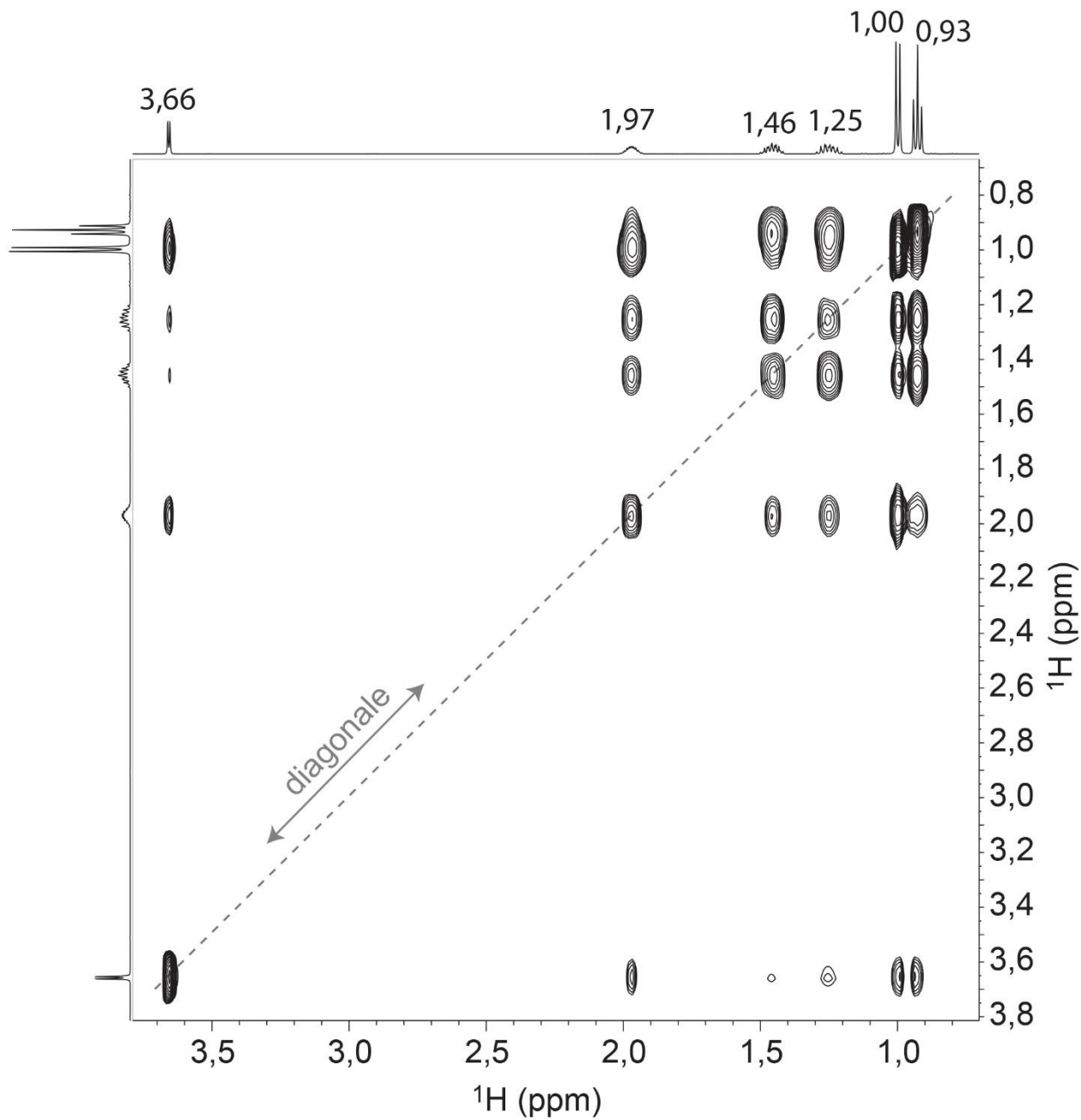
TOCSY



# TOCSY



Isoleucina

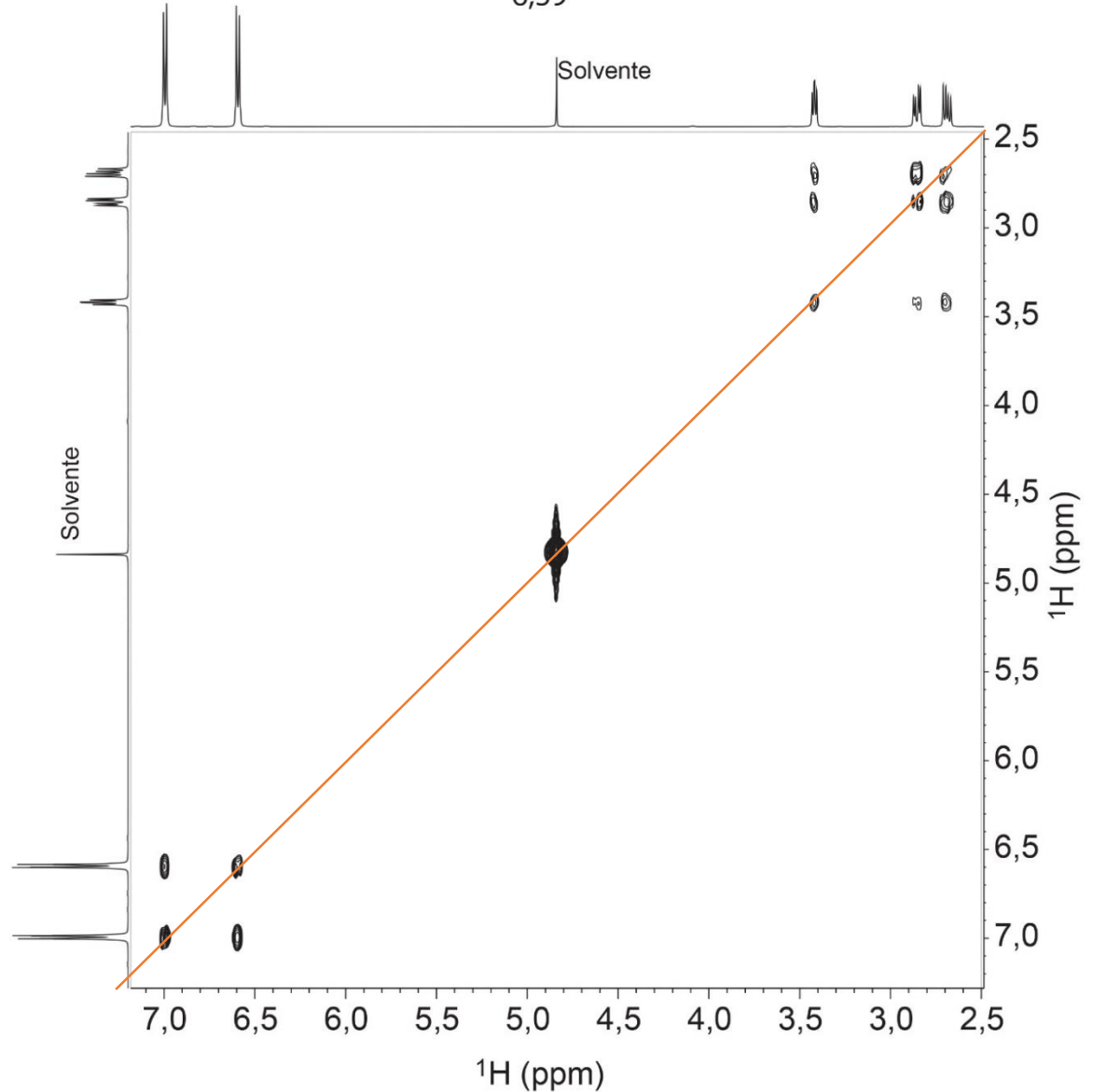
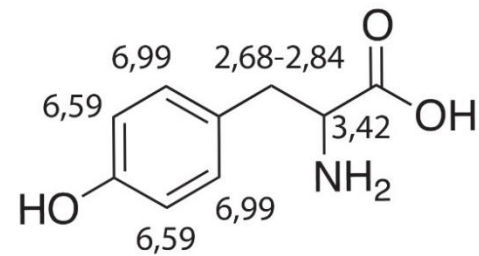


# TOCSY

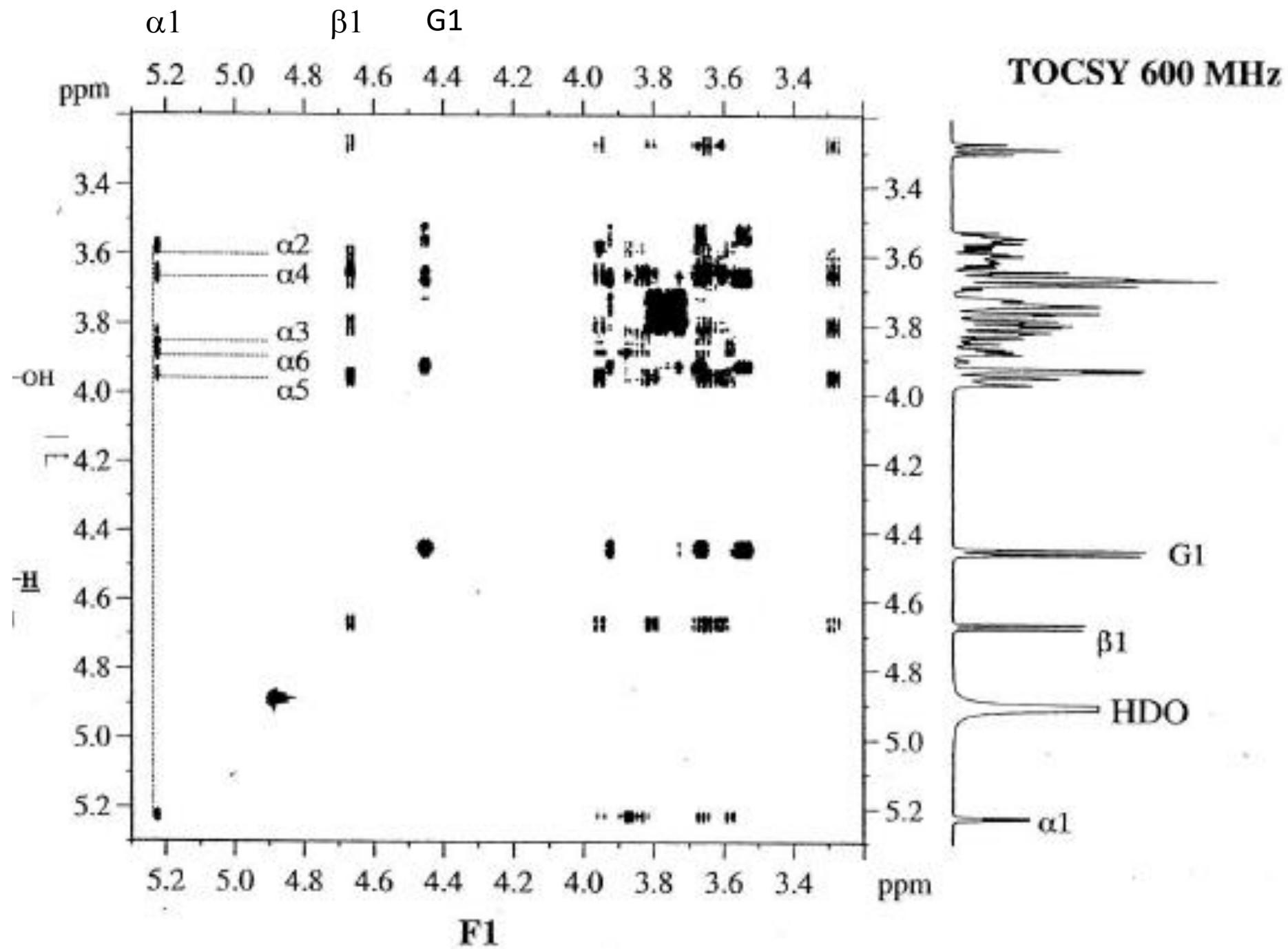
Tirosina

Sono presenti due sistemi di spin all'interno della molecola: uno alifatico e l'altro aromatico.

Nello spettro TOCSY è possibile identificare chiaramente i due sistemi perché formano due gruppi di cross-peak ben distinti

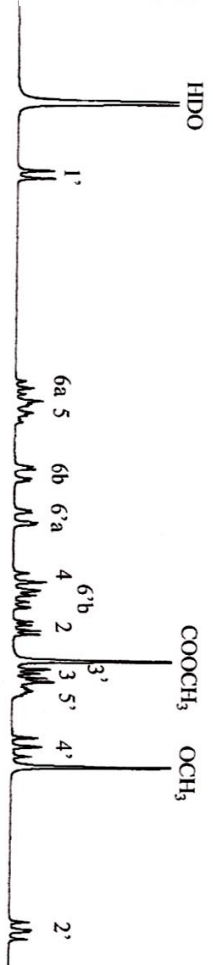
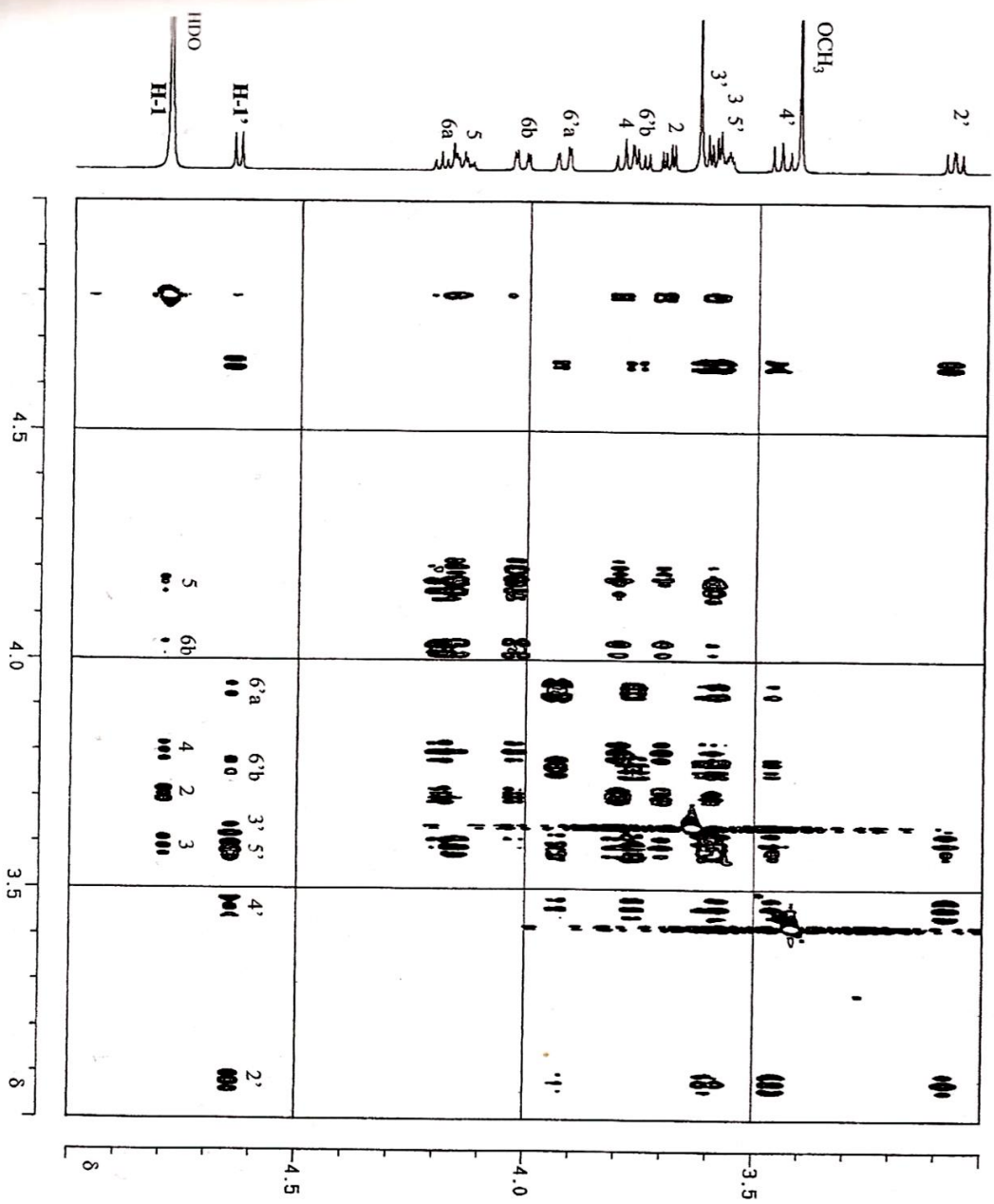
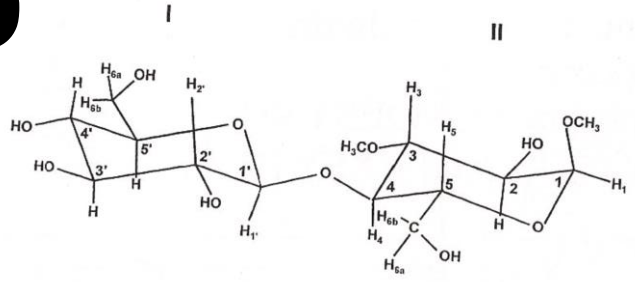


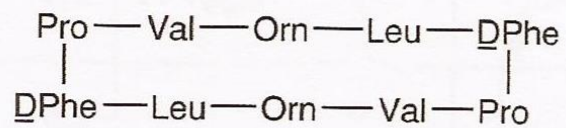
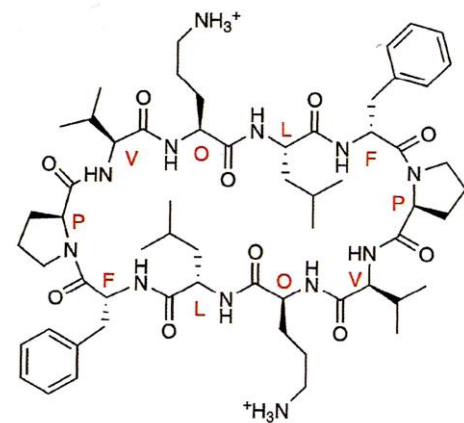
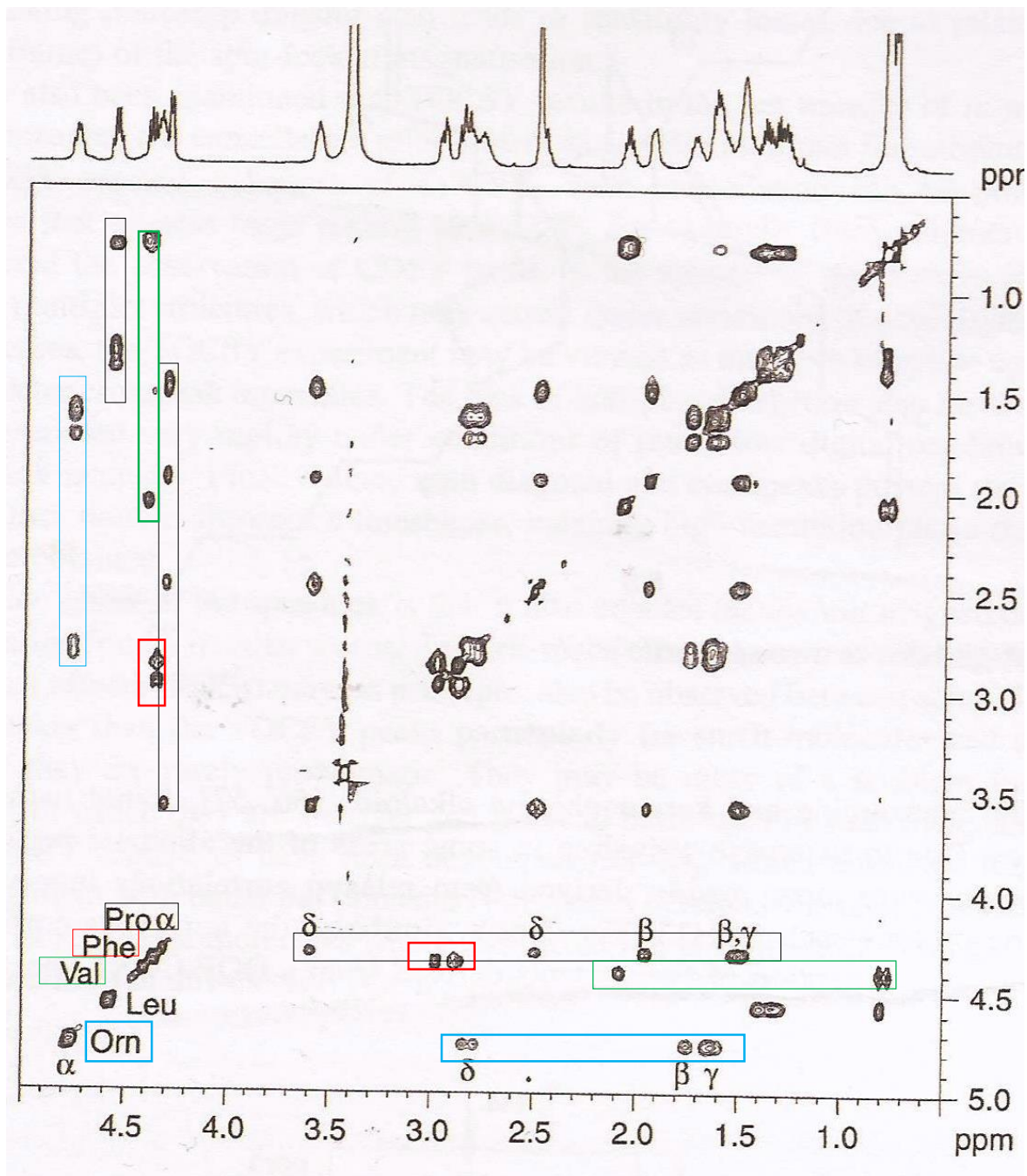






# TOCSY 2D

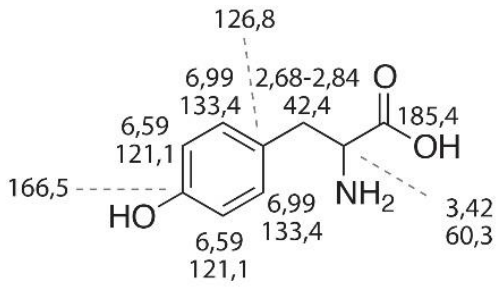




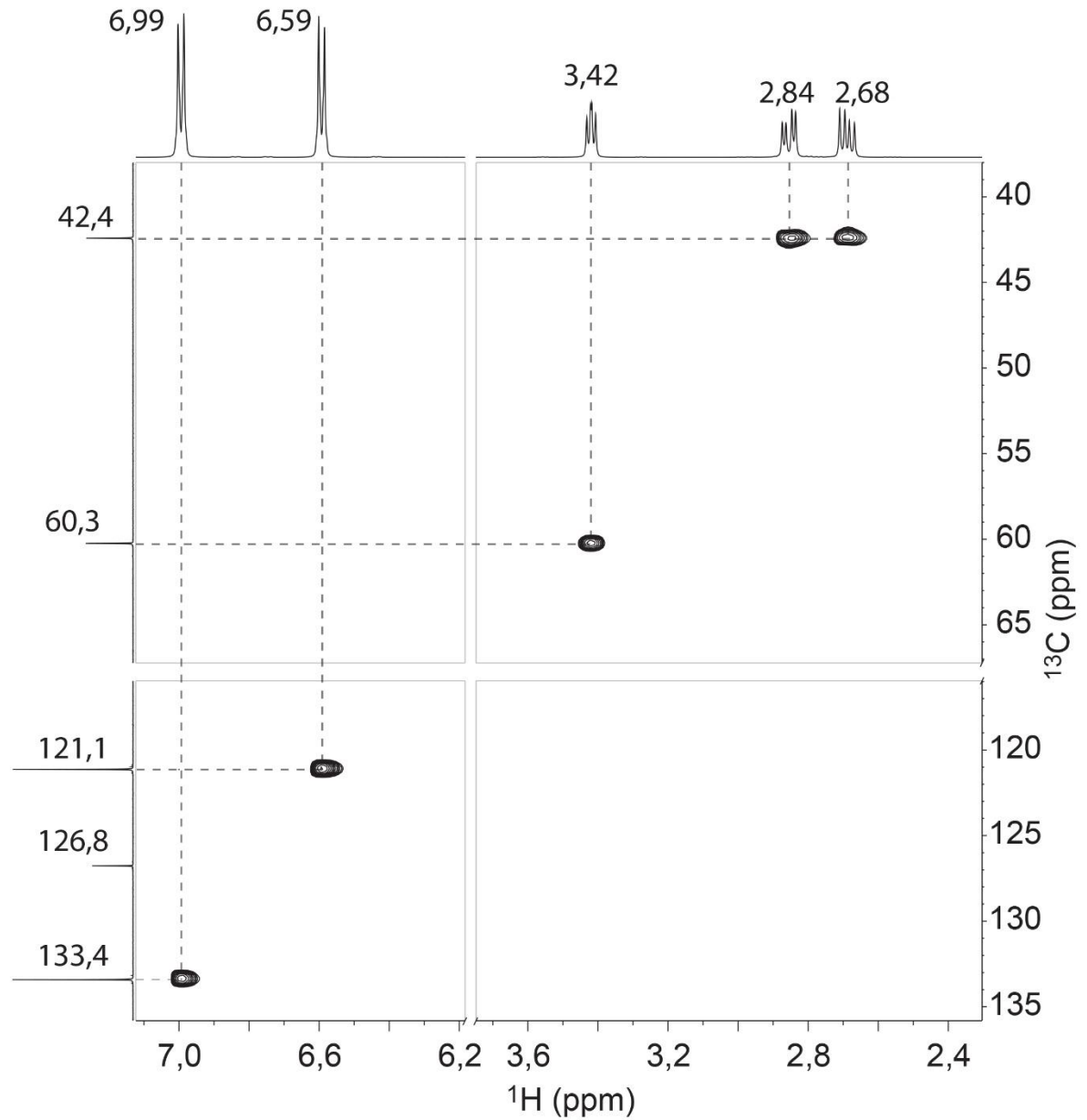
# 2D Eteronucleare HSQC e HMQC

- Identificano le correlazioni fra  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  direttamente legati ( $^1J$ ).
- HSQC: acronimo di **H**eteronuclear **S**ingle-**Q**uantum **C**orrelation.
- HMQC: acronimo di **H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence.
- Essendo eteronucleare, non ci sono picchi di autocorrelazione (diagonale) e lo spettro non è simmetrico.
- Ogni cross-peak è generato dall'accoppiamento di un dato idrogeno ( o un gruppo di idrogeni equivalenti) con il carbonio a cui è direttamente legato.

# HSQC

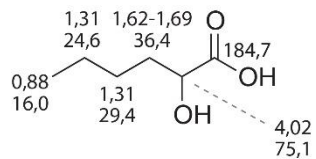


Tirosina

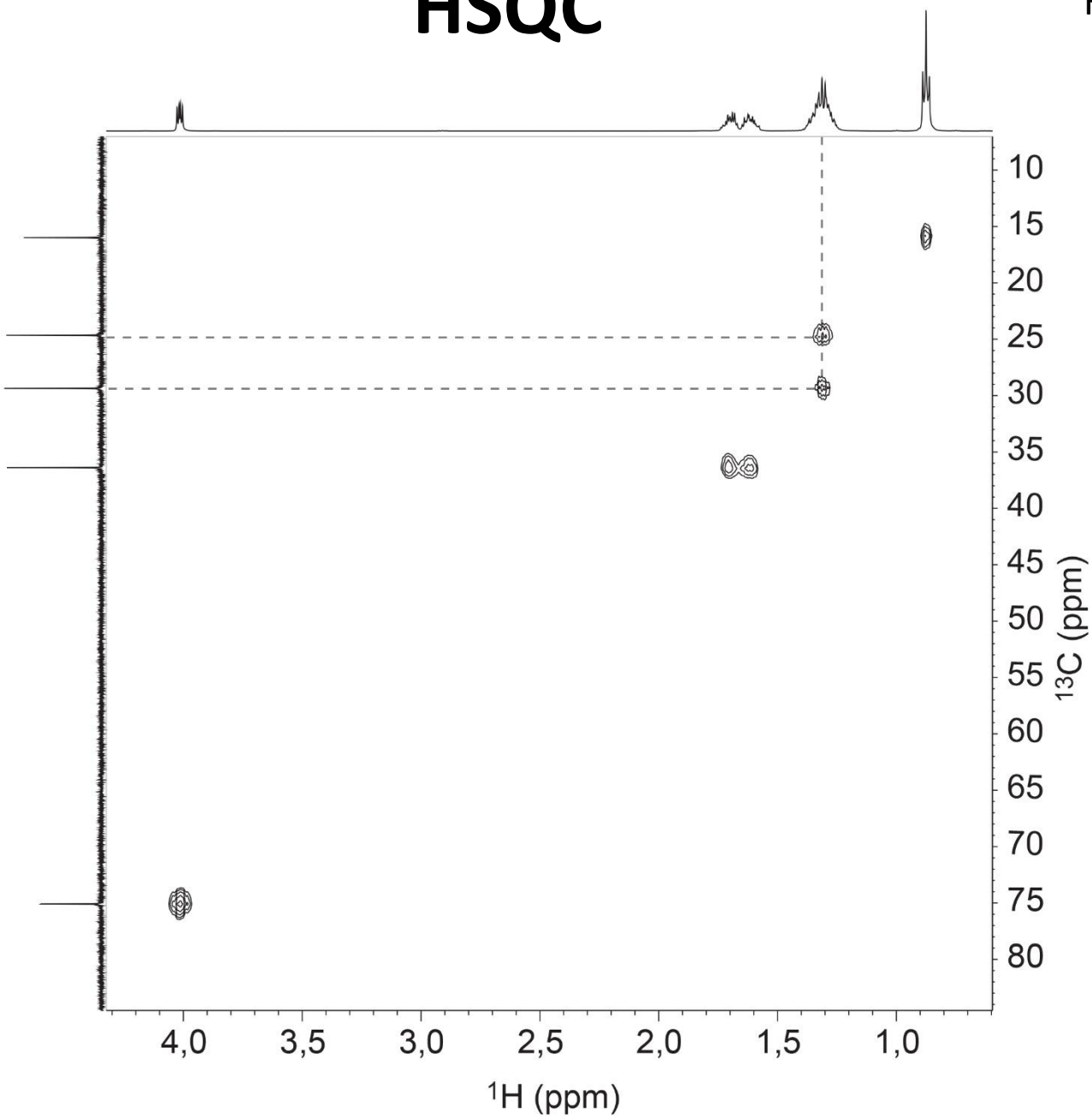


# HSQC

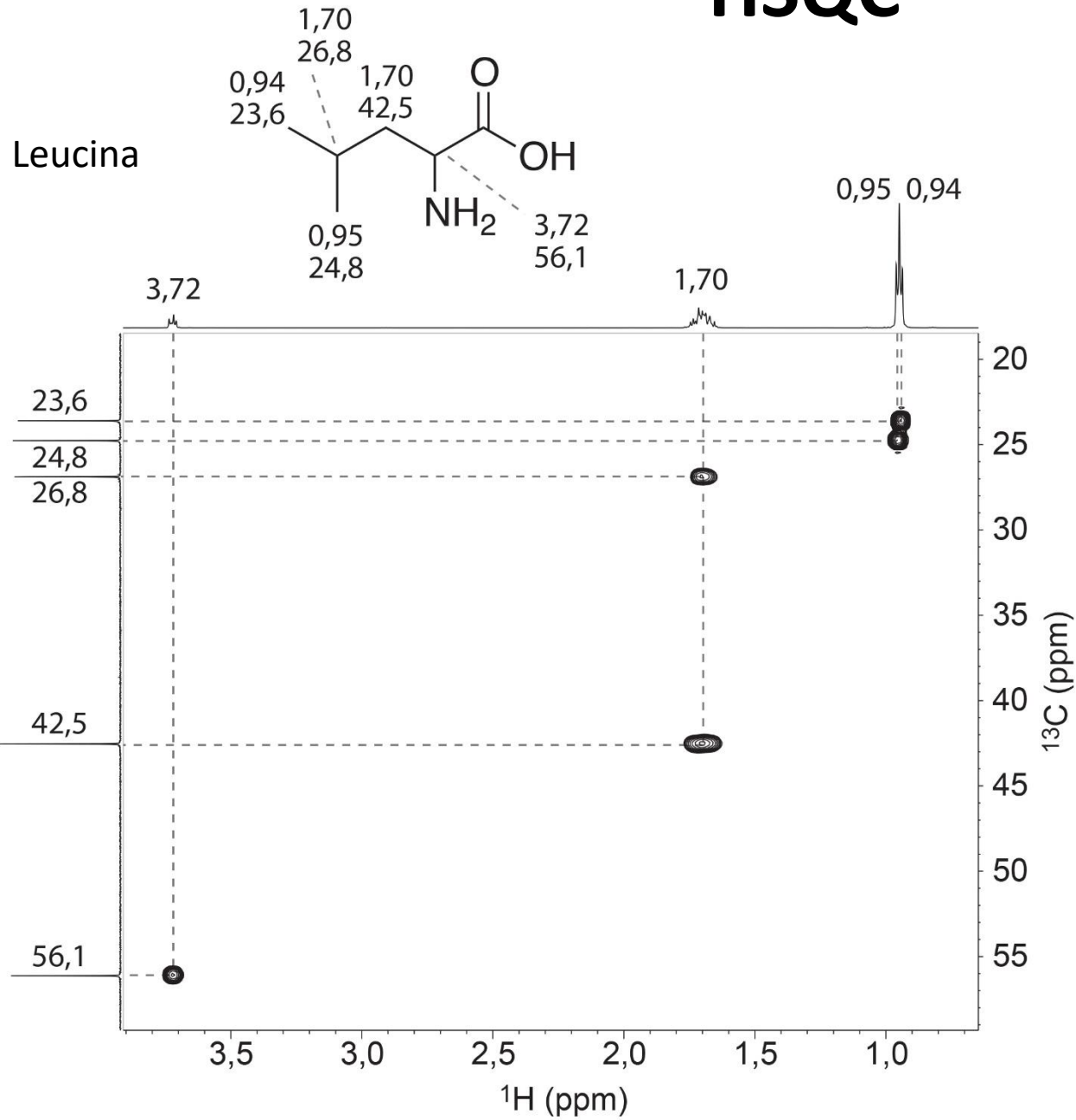
HSQC



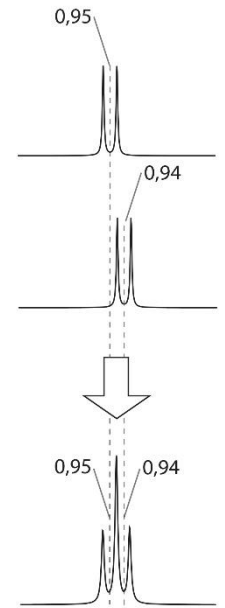
Acido 2-idrossiesanoico



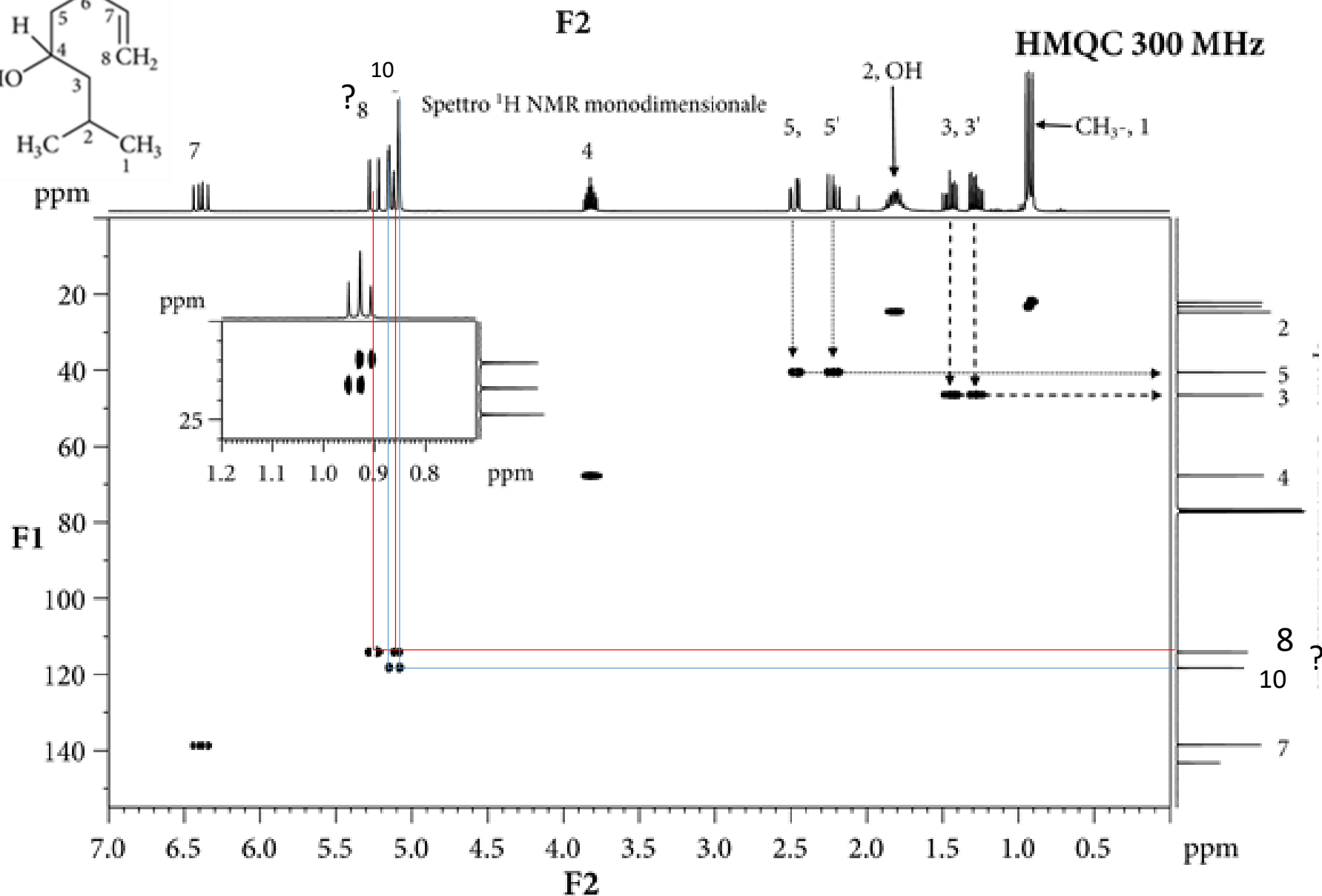
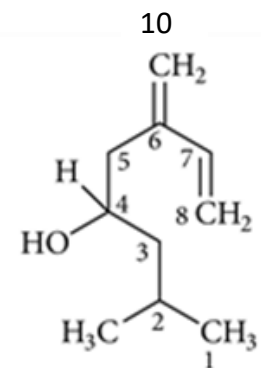
# HSQC



# HSQC



# Ipsenolo - HMQC

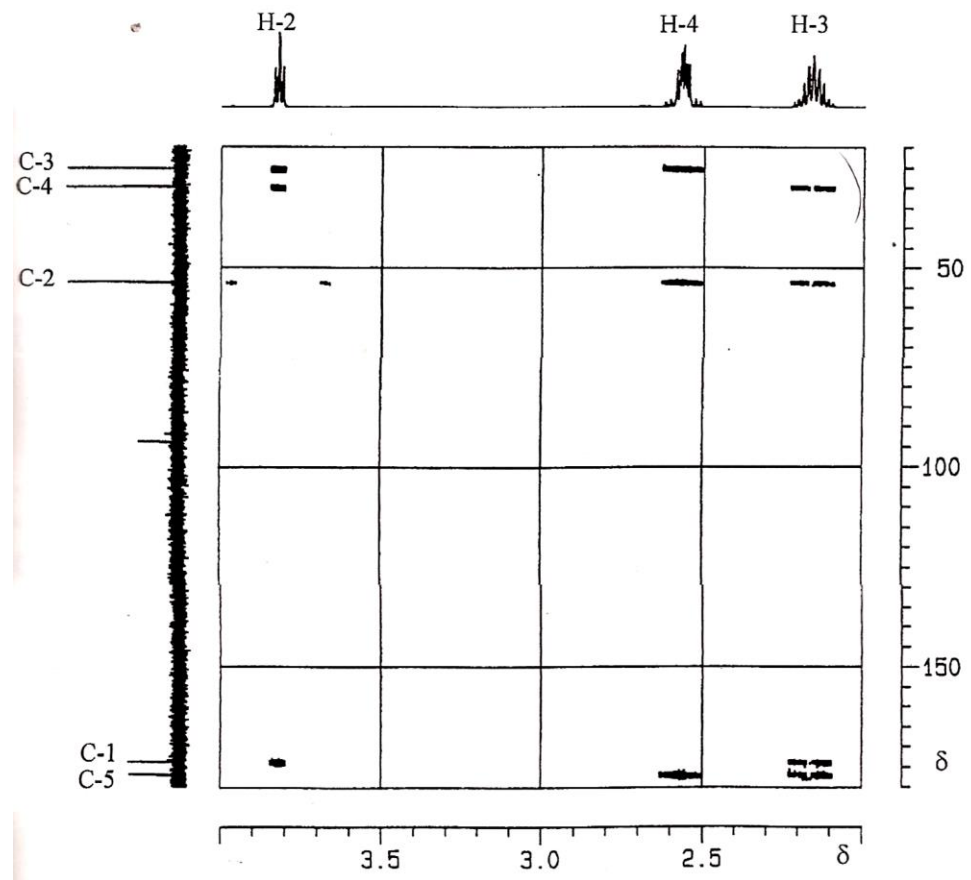
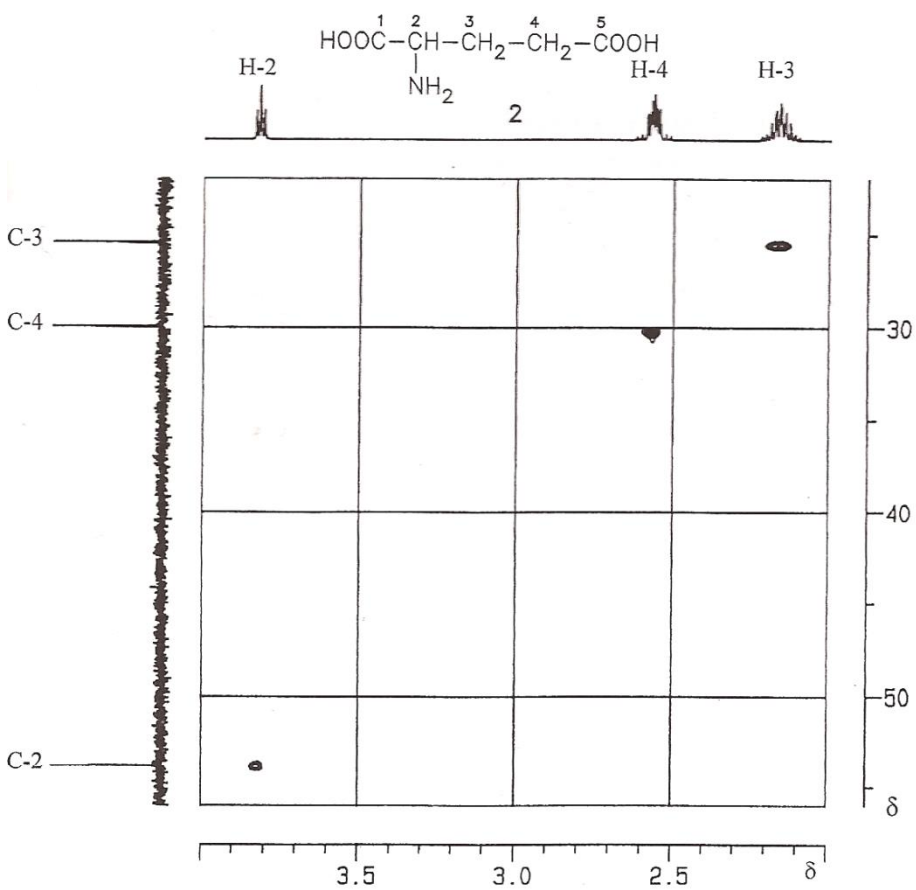


# HMBC

- HMBC: acronimo di **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation
- Esperimento eteronucleare che permette di identificare le correlazioni tra i protoni e gli eteroatomi che si trovano a 2-4 legami di distanza
- Acquisito in modo da rimuovere gli accoppiamenti tra nuclei direttamente legati (X-H, C-H)
- Permette di assegnare correttamente i carboni quaternari
- Lo spettro HMBC non presenta picchi diagonali e ogni cross-peak indica una correlazione protone/carbonio di *long range*

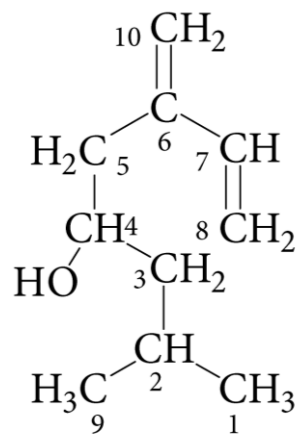


# HMBC

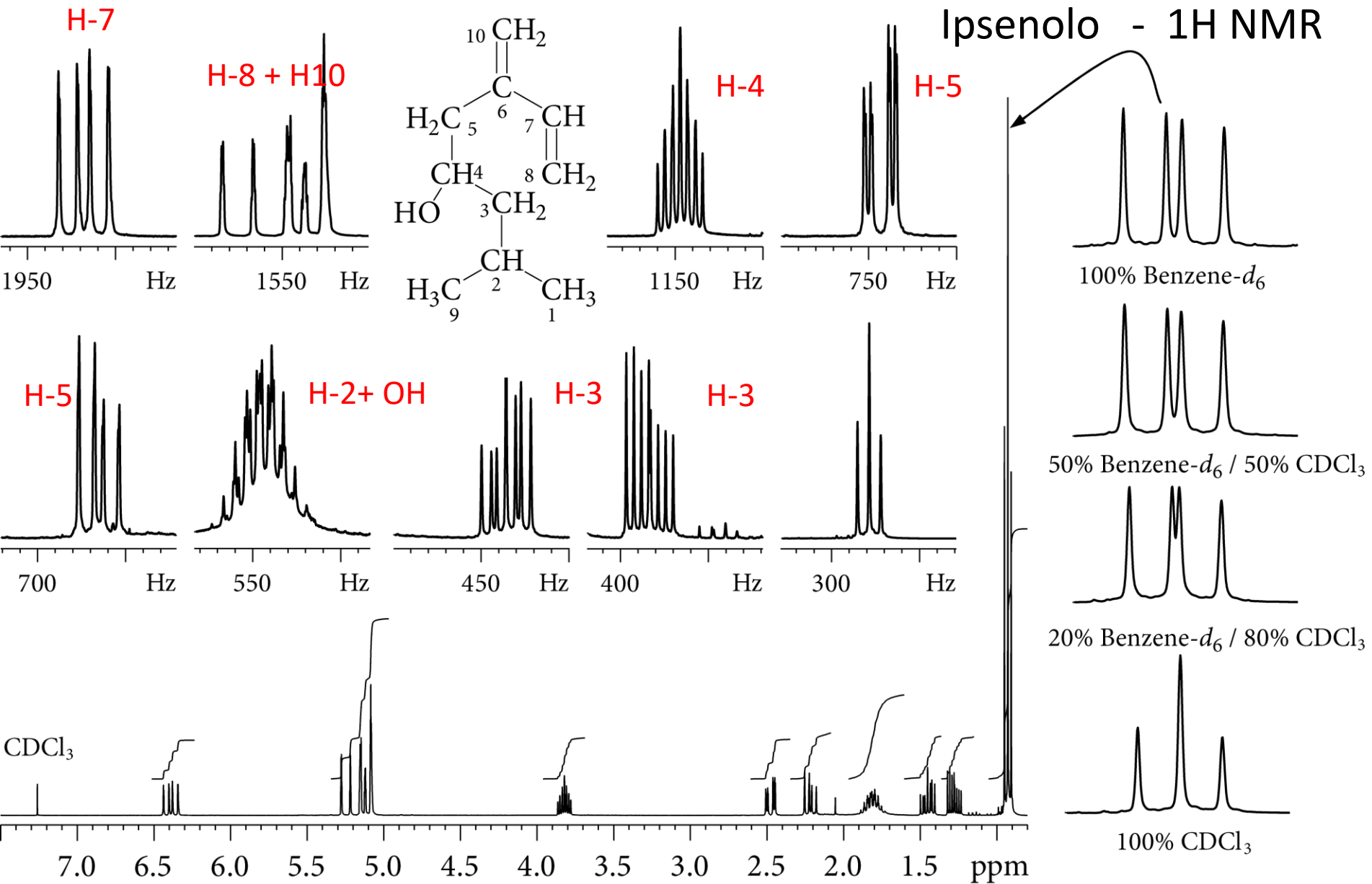




Esercizio: identificare i segnali dei =CH<sub>2</sub> nelle posizioni 8 e 10.



# Ipsenolo - 1H NMR

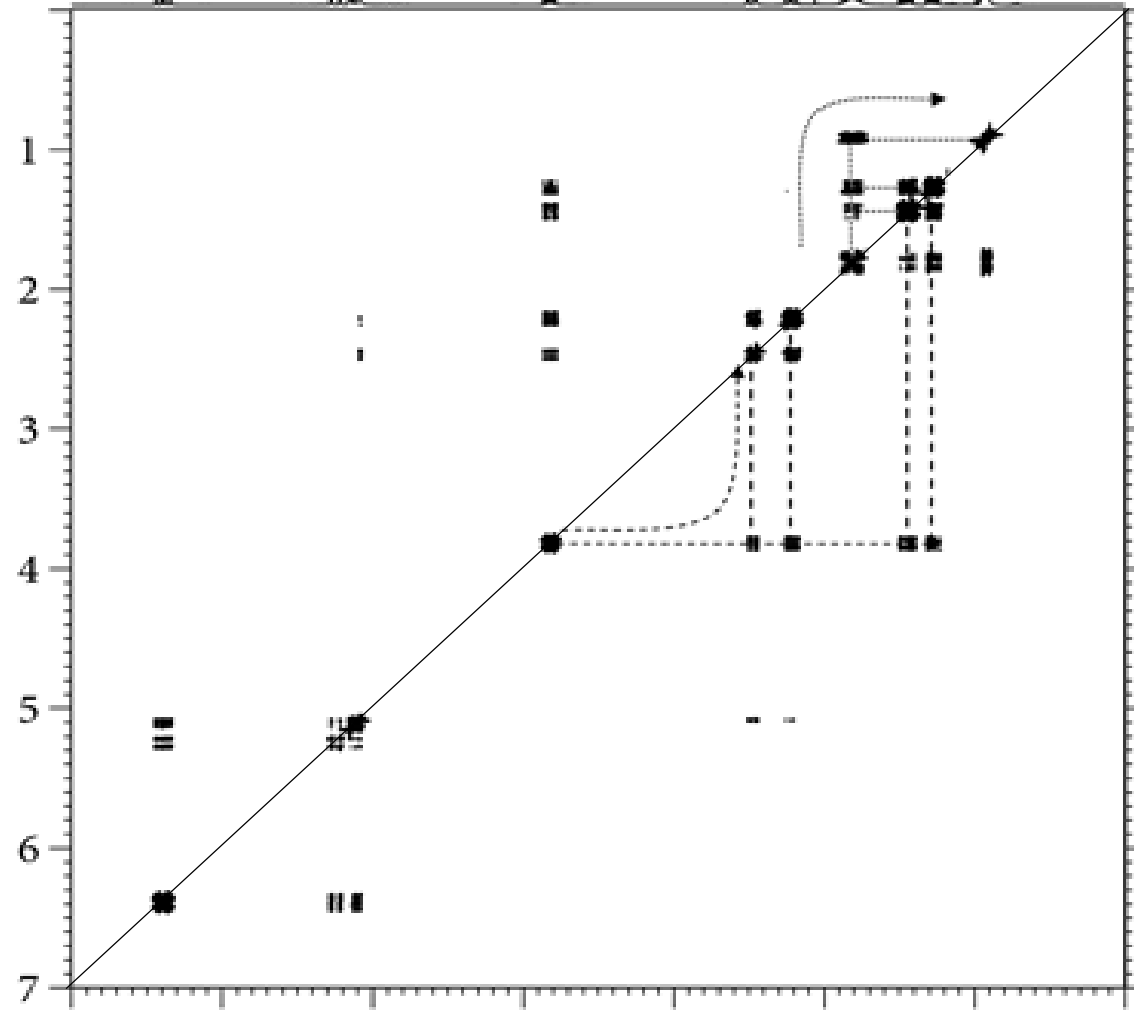


Spettro protonico NMR di 2-metil-6-metilen-7-otten-4-olo (ipsenolo) in CDCl<sub>3</sub> a 300 MHz ed effetto della titolazione con benzene-*d*<sub>6</sub>.

# Ipsenolo - COSY

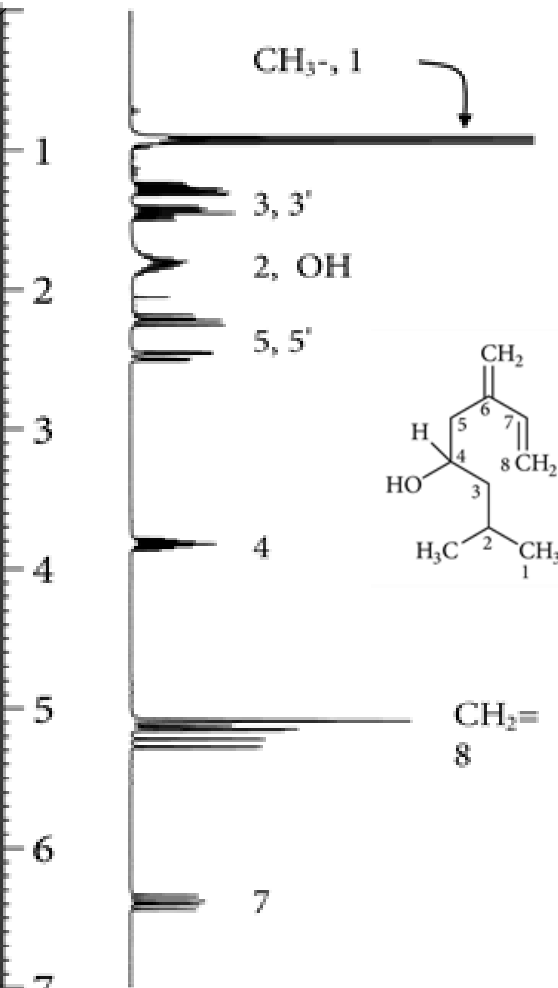
F2

ppm



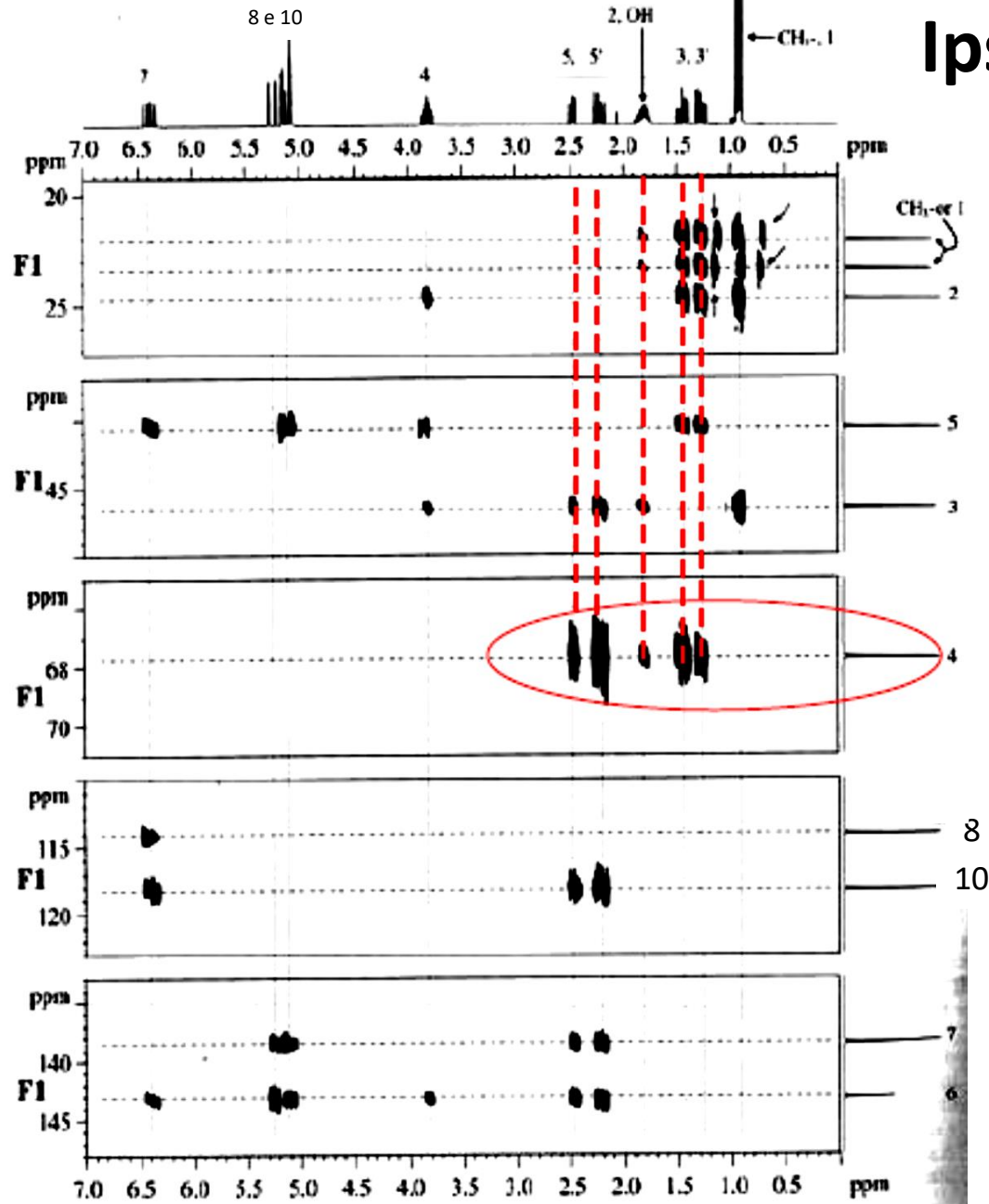
F2

DQF-COSY 300 MHz

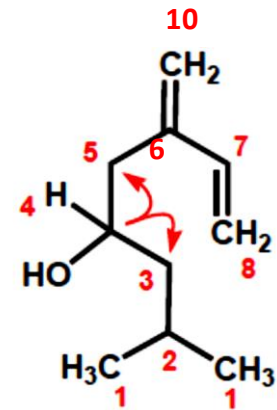




# Ipsenolo - HMBC



Non si osservano costanti dirette



# INADEQUATE

Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment

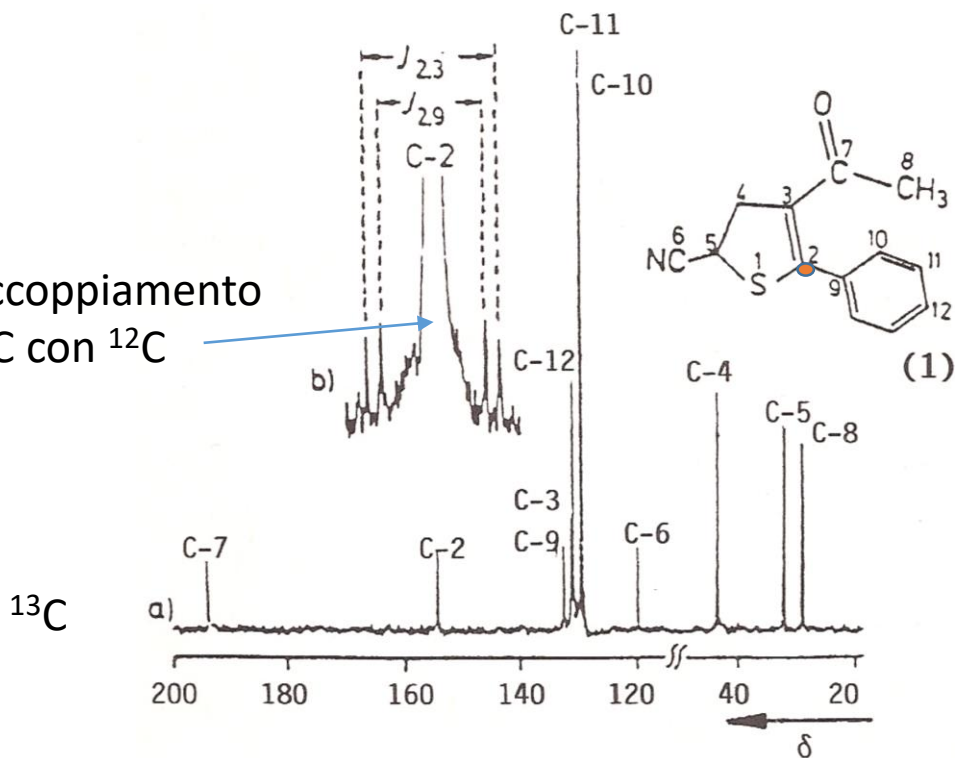
Rivela accoppiamenti carbonio-carbonio attraverso un legame (atomi di carbonio direttamente legati).

A causa della bassa abbondanza naturale del  $^{13}\text{C}$  (1.1%), l'accoppiamento  $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$  ha una probabilità  $10^{-4}$ .

Nello spettro del  $^{13}\text{C}$  appare come picchi satelliti ai lati del segnale del  $^{12}\text{C}-^{13}\text{C}$ , con intensità 0.5% per ciascun picco.

$$^{13}\text{C} - ^{13}\text{C} \quad 1J = 30-70 \text{ Hz}$$

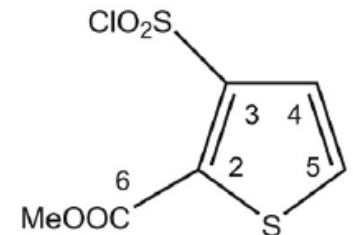
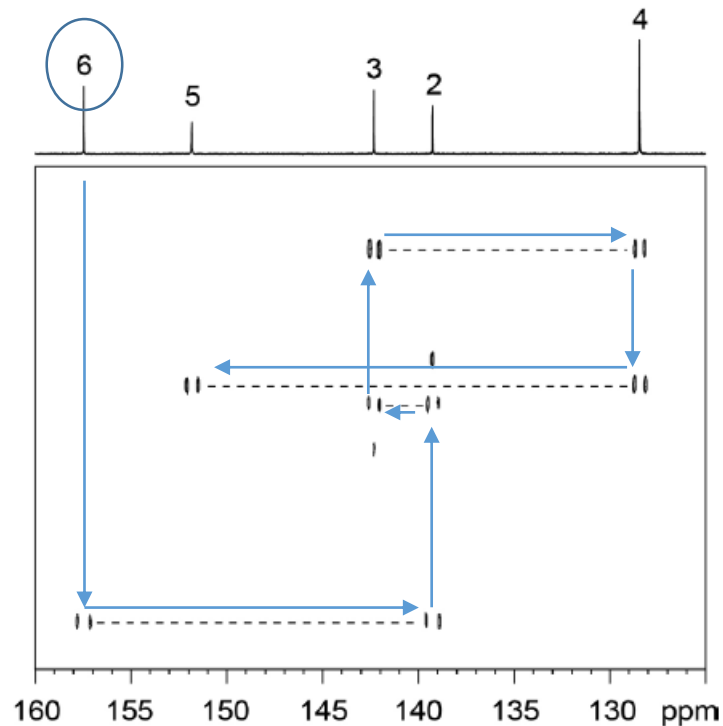
Accoppiamento  
 $^{13}\text{C}$  con  $^{12}\text{C}$





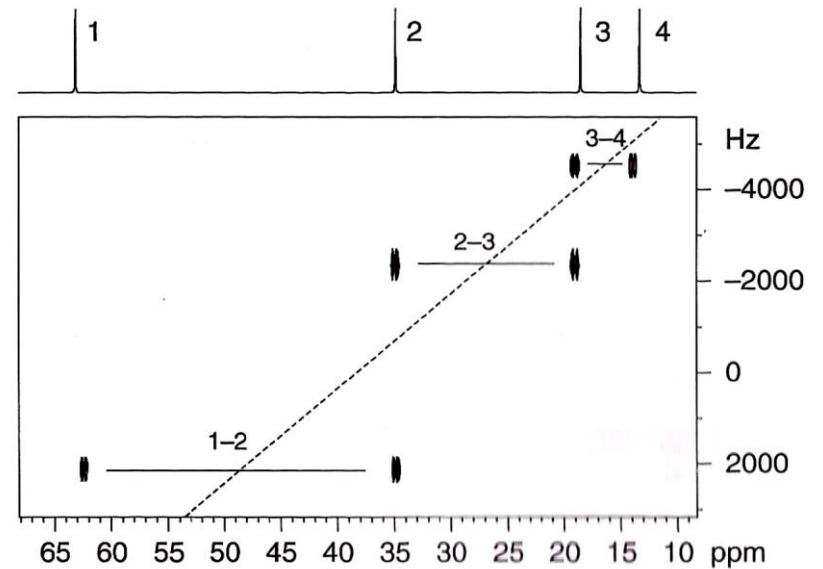
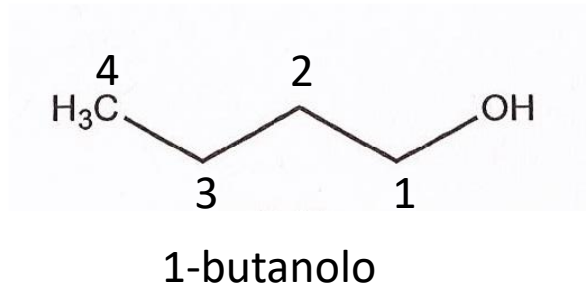
# INADEQUATE

- Il problema della bassa sensibilità viene superato con la tecnica del filtro a doppio-quantum che abbatte il picco principale dovuto all'accoppiamento  $^{13}\text{C}$ - $^{12}\text{C}$ .
- Sono necessarie grandi quantità di campione (almeno 100 mg), e tempi molto lunghi (più giorni)
- I picchi di correlazione appaiono come doppietti con una separazione pari alla costante di accoppiamento  $^1J_{\text{CC}}$

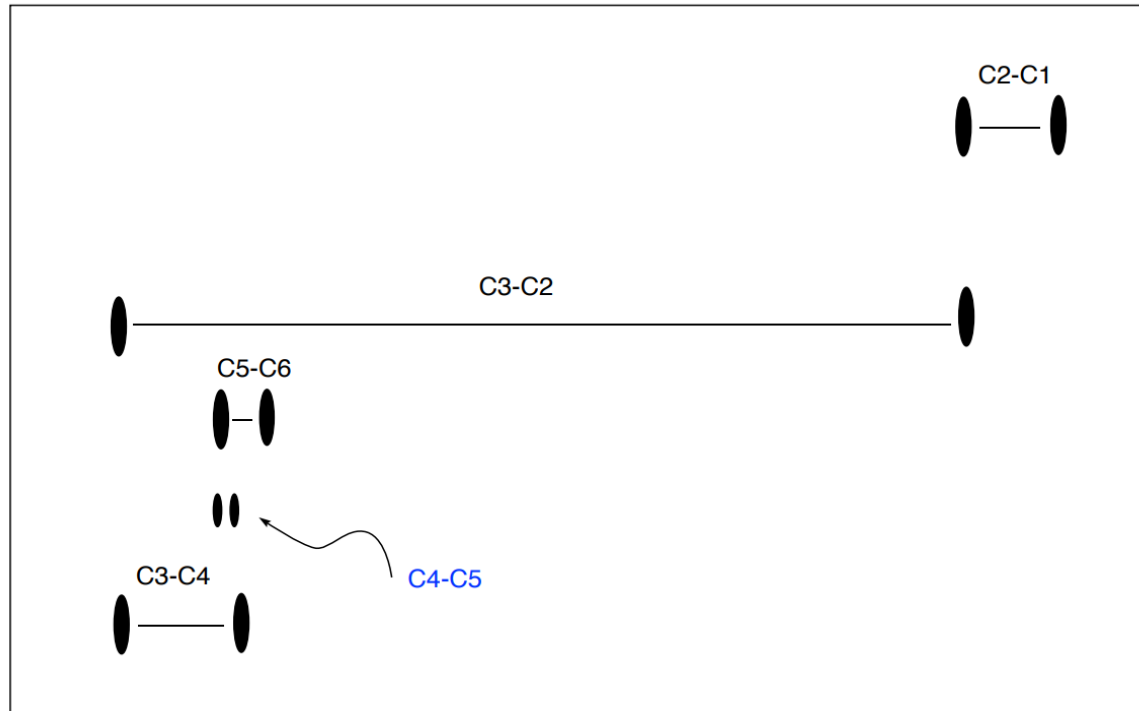
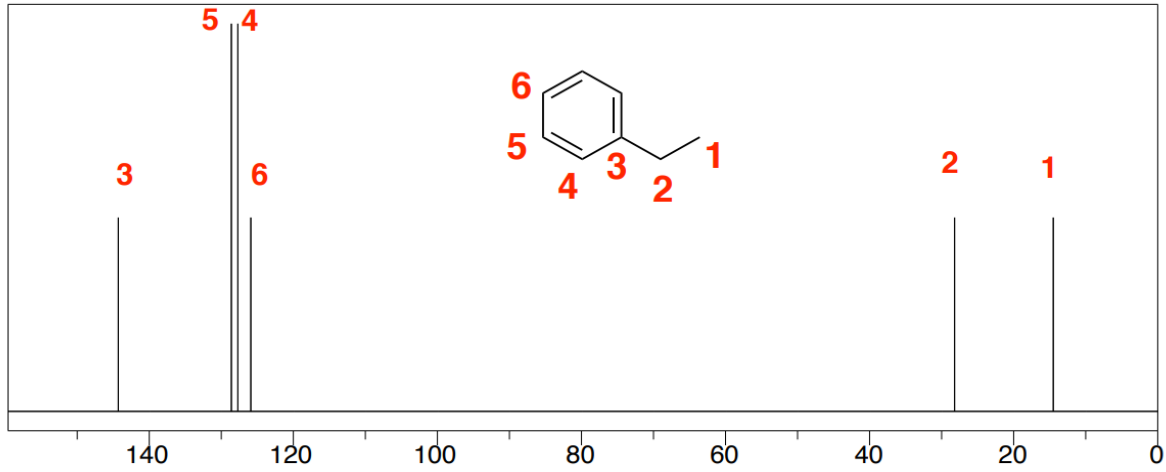


# INADEQUATE

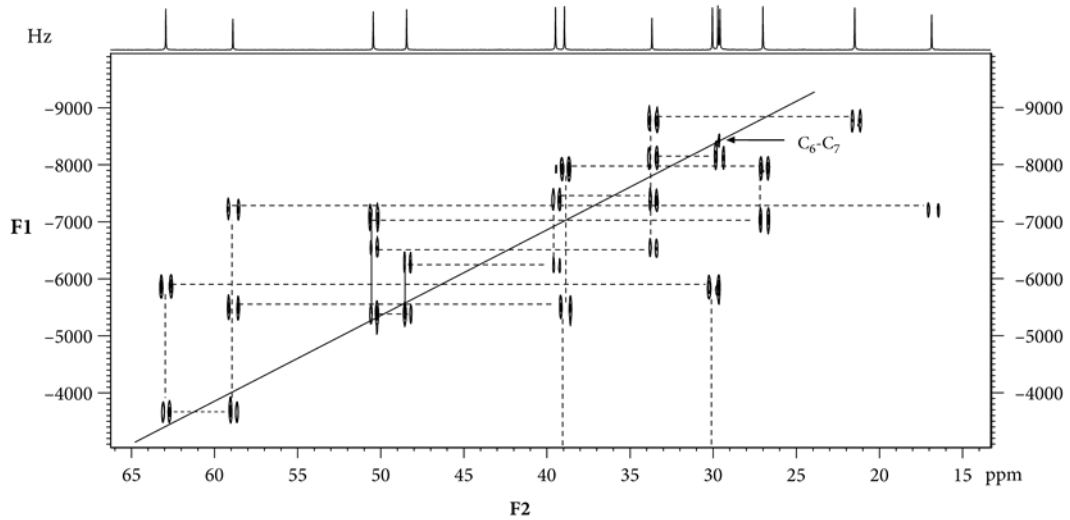
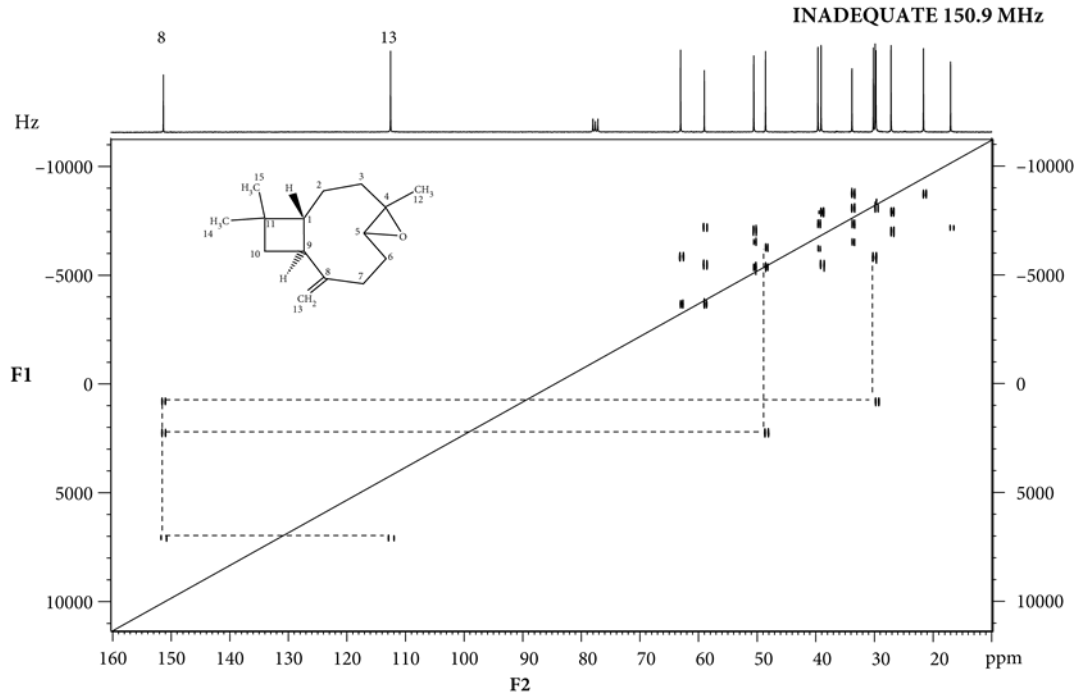
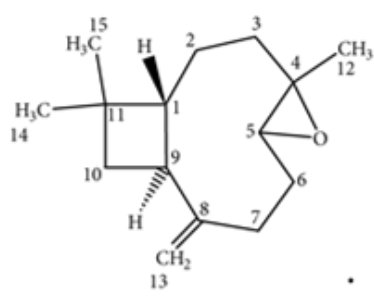
L'insieme dei punti medi per tutte le coppie di doppietti giace su una linea che si sviluppa lungo la diagonale



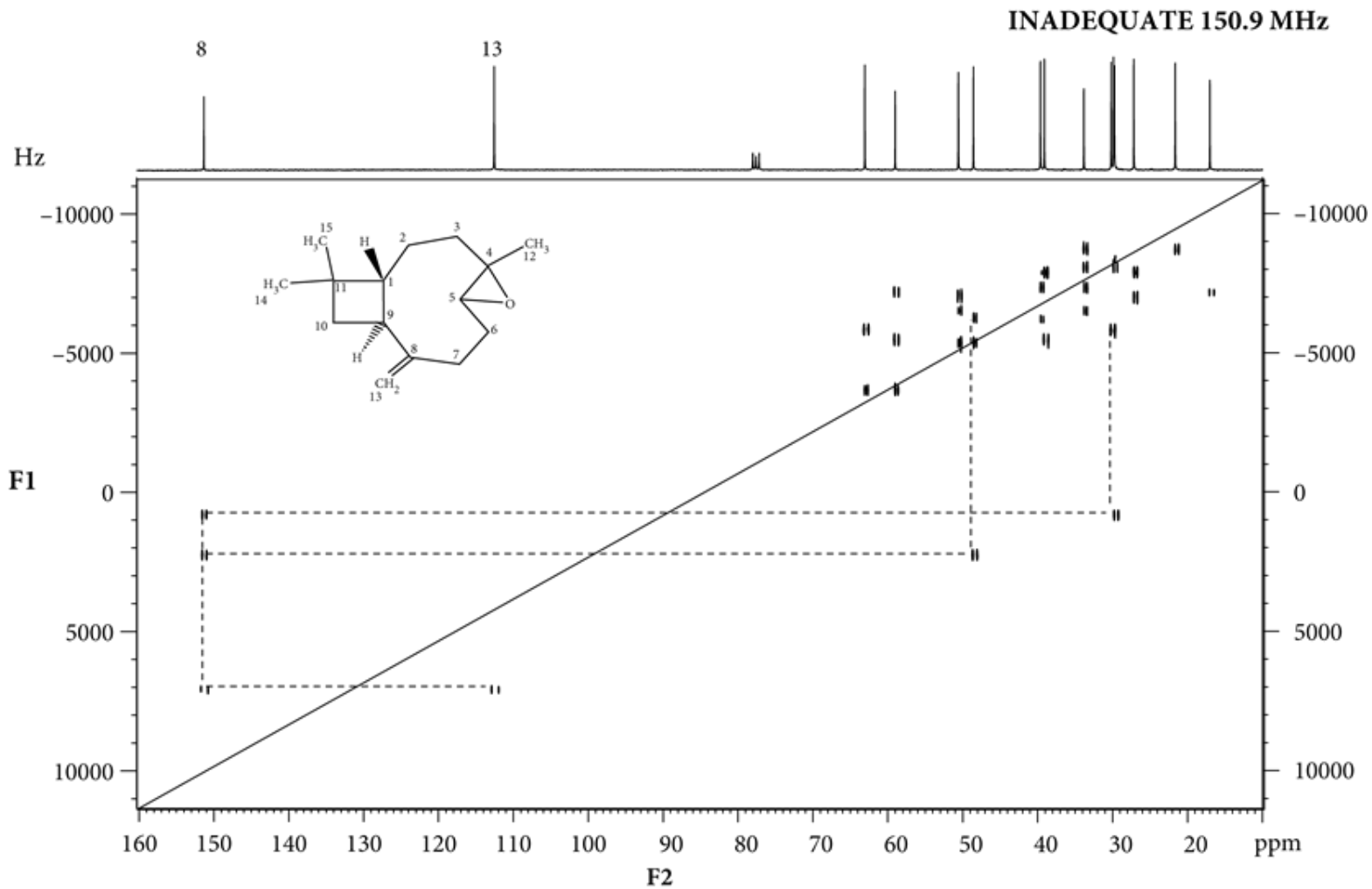
# INADEQUATE



# Spettro INADEQUATE del cariofillene ossido



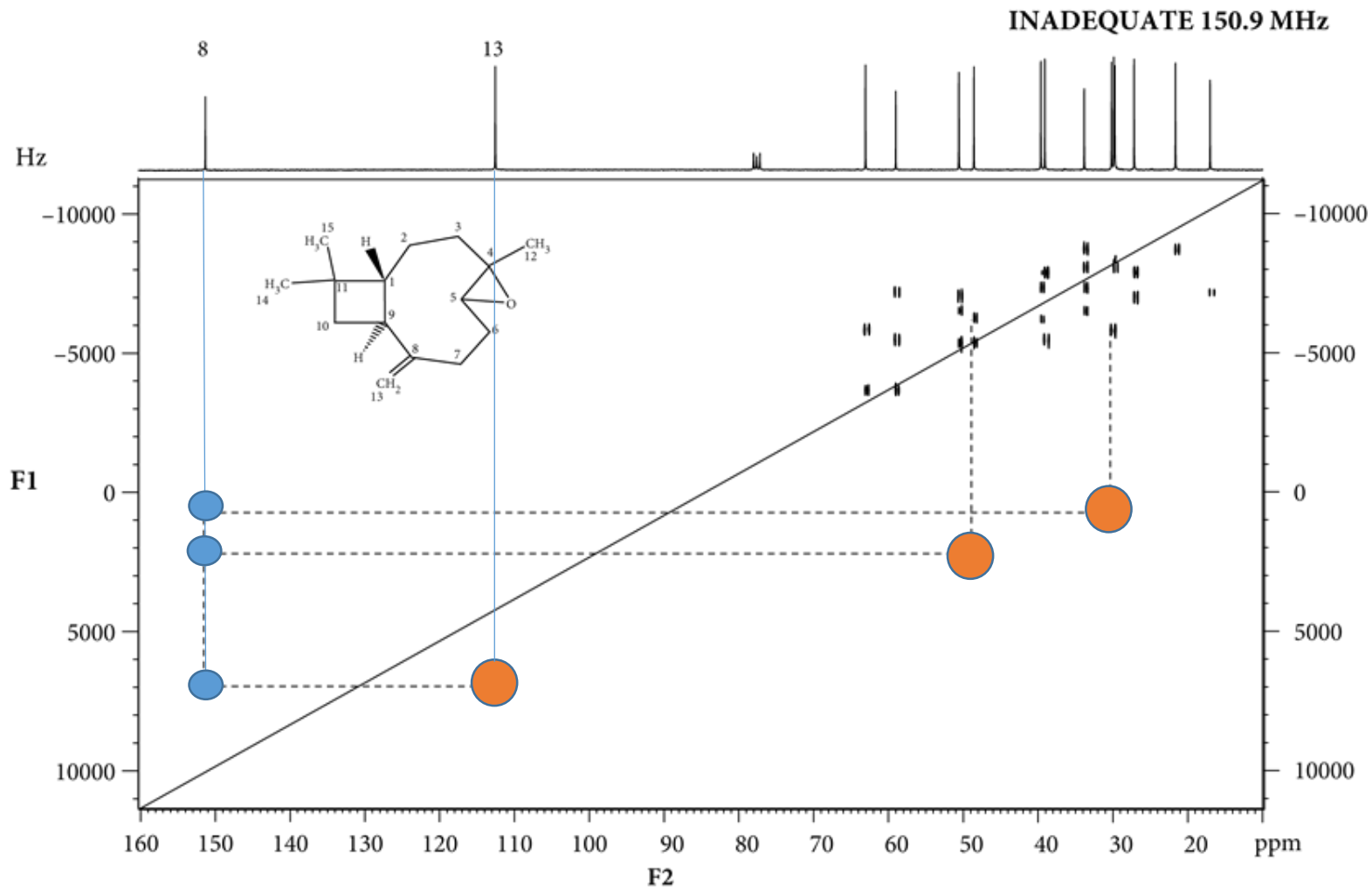
# Spettro INADEQUATE del cariofillene ossido



Il carbonio a frequenza più elevata (151.0 ppm) è il C8 (olefinico), tracciamo una linea che parte dal picco e incontra tre doppietti di correlazione

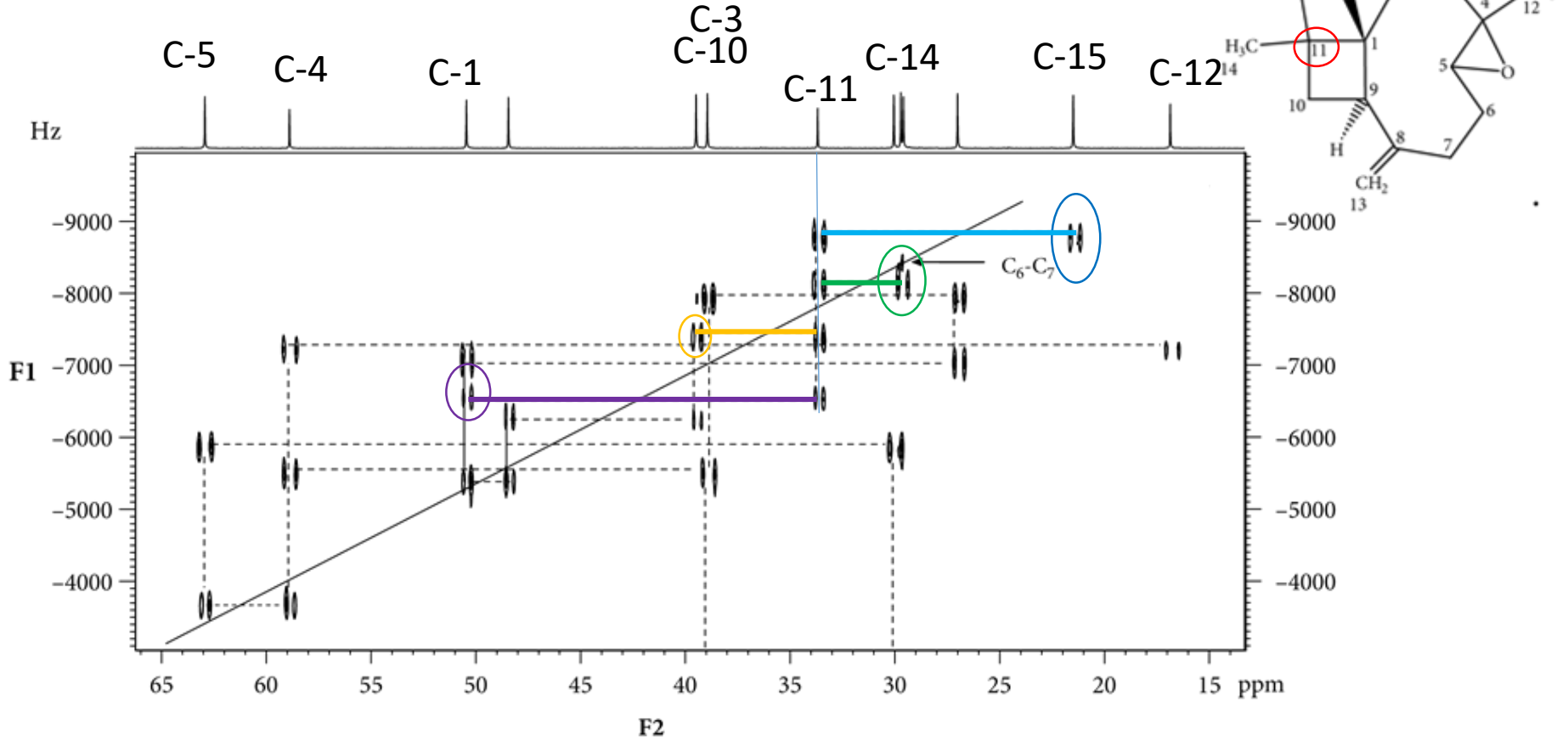


# Spettro INADEQUATE del cariofillene ossido



Questi picchi sono in connessione orizzontale con C7 a 29.2 ppm, C9 a 48.0 ppm e con C13 a 112.0 ppm  
C13 a 112.0 ppm correla solo con C8

# Spettro INADEQUATE del cariofillene ossido



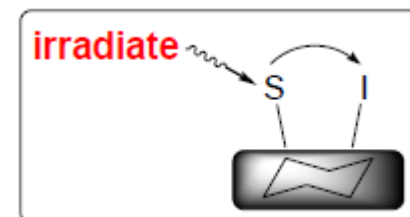
Il carbonio **C11** a 33.3 ppm è un carbonio quaternario e mostra 4 picchi di correlazione con **C-15** a 22.6 ppm, con **C-14** a 29.3 ppm, con **C-10** a 39.1 ppm e con **C-1** a 50.1 ppm. C-6 e C-7 cadono sulla diagonale perché sono un sistema di spin AB e non AX come tutti gli altri.



# ROESY e NOESY

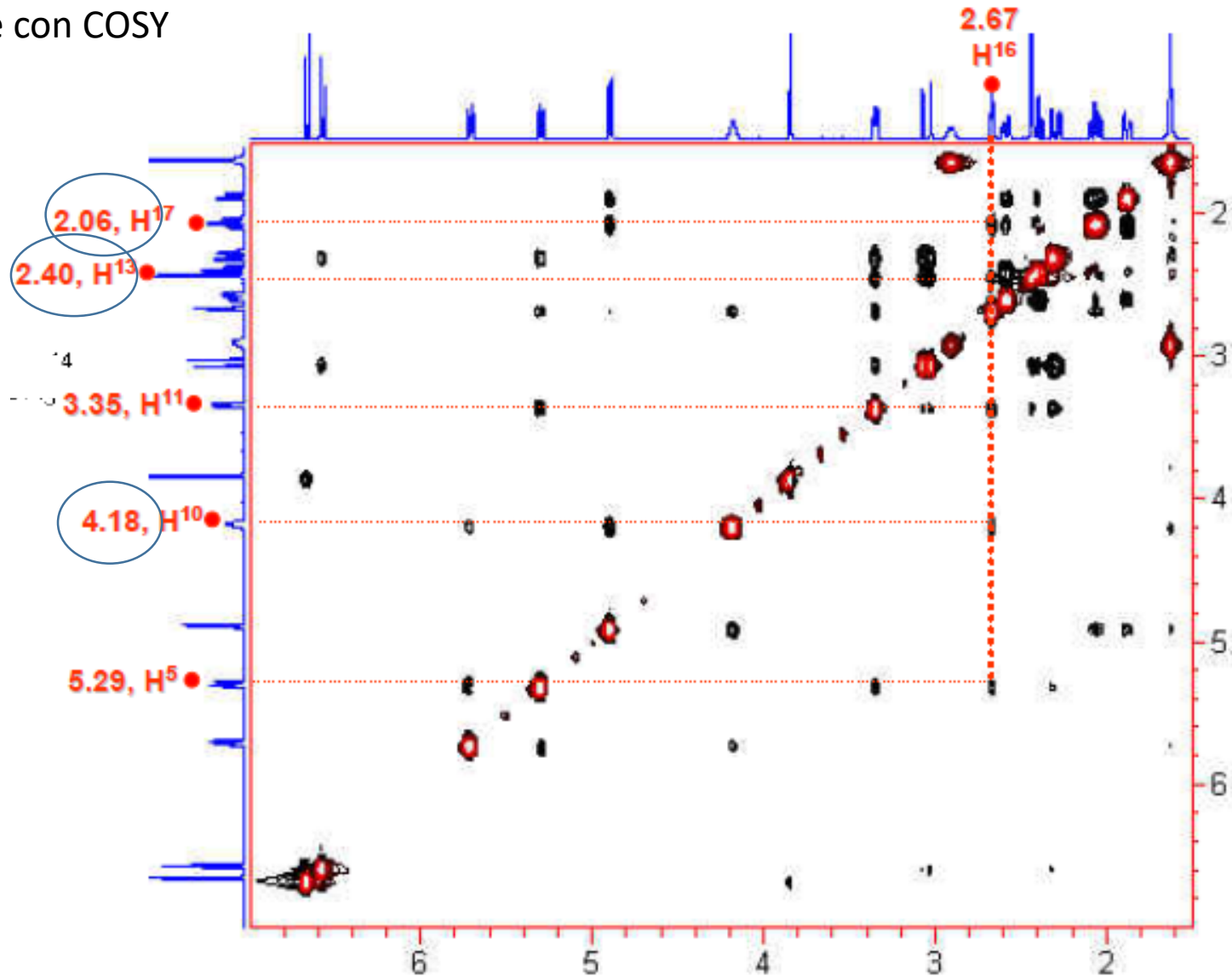
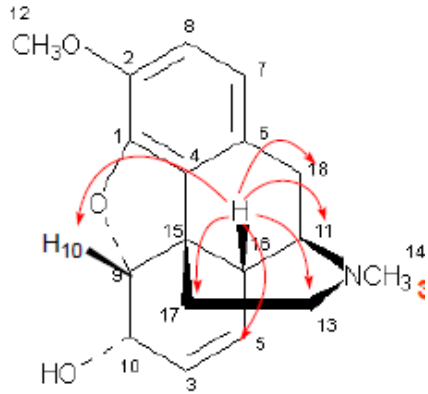
- ROESY acronimo di **R**otating-frame **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**
- NOESY acronimo di **N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**
- Sono analoghi 2D dell'esperimento NOE
- ROESY adatto a molecole di qualsivoglia dimensione
- NOESY più adatto a molecole piccole
- Entrambi gli esperimenti correlano protoni che sono vicini attraverso lo spazio con distanze inferiori a  $4.5\text{\AA}$

NOE: variazione dell'intensità del segnale di un nucleo I a seguito dell'irraggiamento selettivo di un nucleo S vicino nello spazio ad I

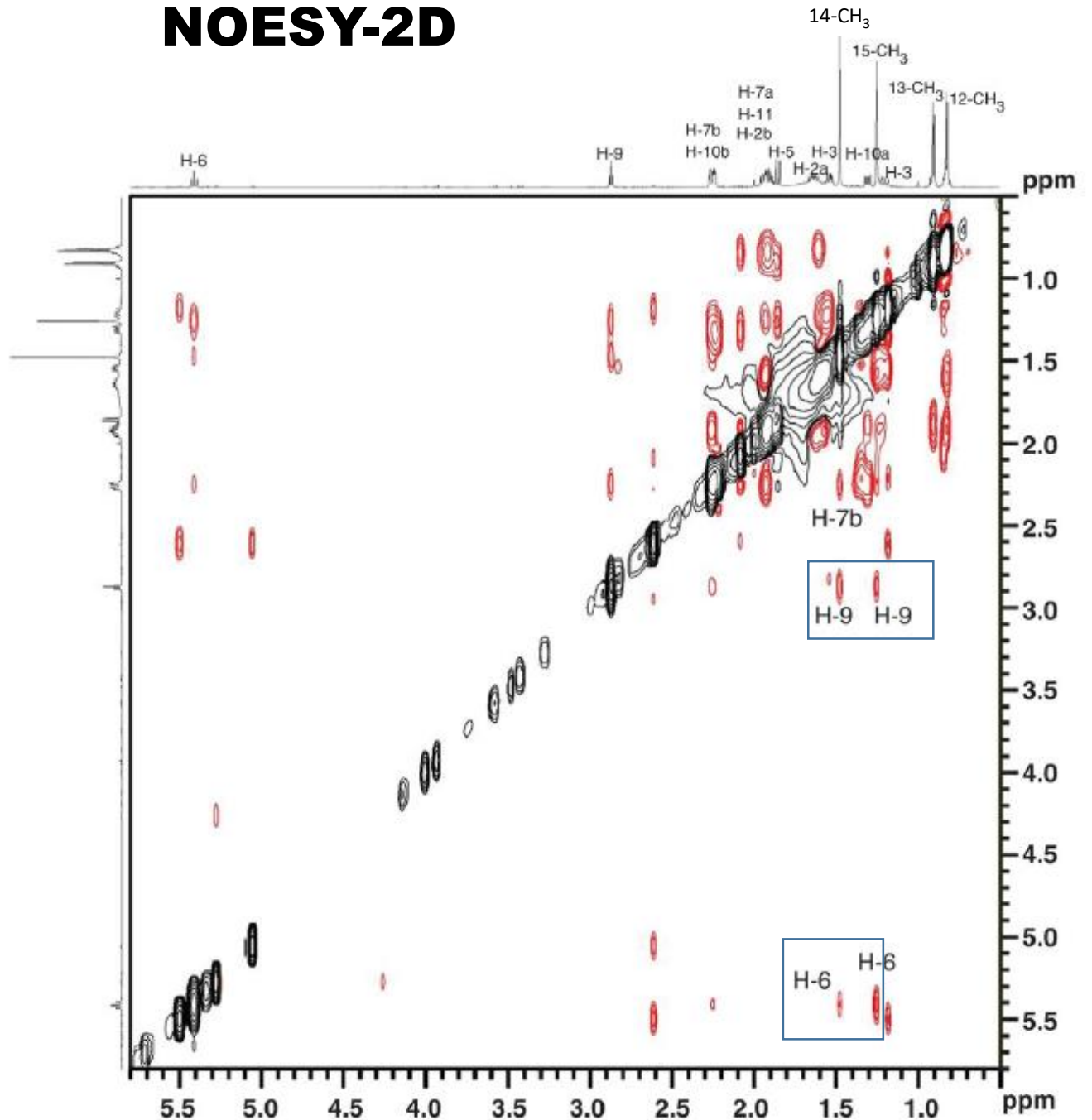
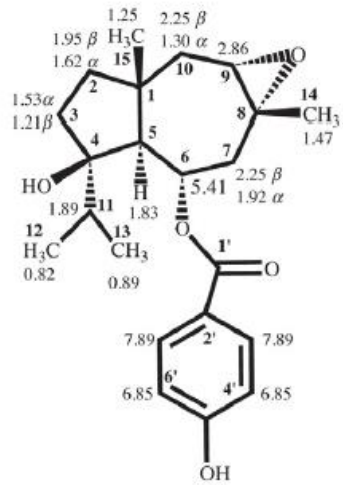


# NOESY-2D

Nelle molecole piccole i picchi correlati attraverso NOE sono in antifase rispetto alla diagonale  
Confrontare sempre con COSY



# NOESY-2D



- Il NOESY e il ROESY si leggono allo stesso modo del COSY, e hanno un aspetto molto simile. Cambia naturalmente il significato del picco di correlazione. Un picco di correlazione nello spettro NOESY indica che tra i due protoni c'è NOE, ed i due nuclei sono vicini nello spazio.
- Un picco di correlazione nello spettro ROESY indica che tra i due protoni c'è ROE. Il ROE è un fenomeno simile al NOE (dipende dalla vicinanza spaziale tra i nuclei), che però può essere messo in evidenza solo con esperimento 2D, e al contrario del NOE, è sempre positivo

# Riassunto

<b>Esperimento</b>	<b><math>F_2</math></b>	<b><math>F_1</math></b>	<b>Correlazione</b>
COSY	Chemical shift $^1\text{H}$	Chemical shift $^1\text{H}$	$J_{\text{HH}}$
NOESY	Chemical shift $^1\text{H}$	Chemical shift $^1\text{H}$	NOE
ROESY	Chemical shift $^1\text{H}$	Chemical shift $^1\text{H}$	ROE
TOCSY	Chemical shift $^1\text{H}$	Chemical shift $^1\text{H}$	Serie di $J_{\text{HH}}$
HMQC e HSQC	Chemical shift $^1\text{H}$	Chemical shift $^{13}\text{C}$	$^1J_{\text{CH}}$
HMBC	Chemical shift $^1\text{H}$	Chemical shift $^{13}\text{C}$	$^{2,3}J_{\text{CH}}$