

Laboratorio di Chimica Organica 3

Luca Gabrielli

Edificio 207 secondo piano
luca.gabrielli@unipd.it

ESPERIMENTO

NMR

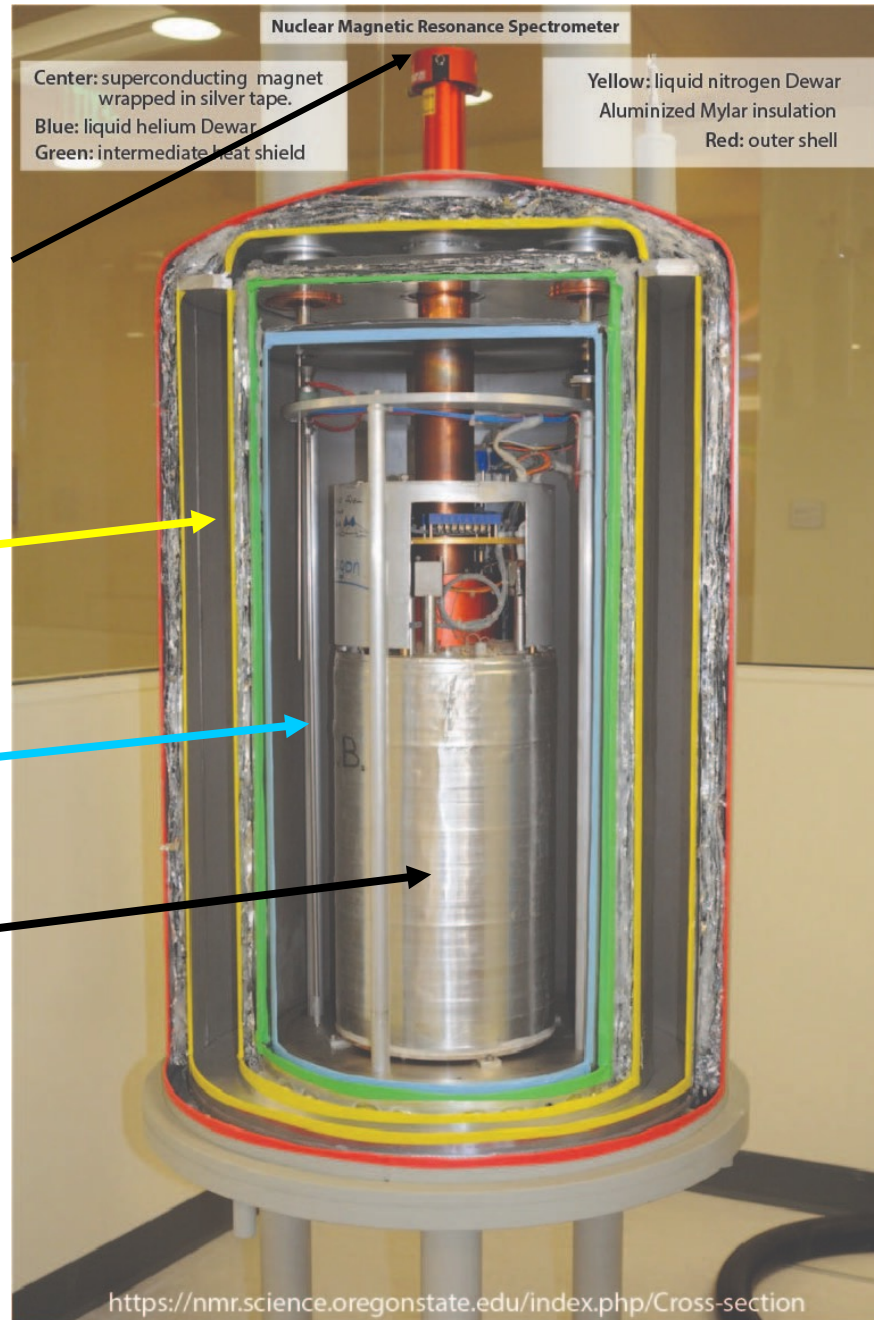
Vedere video dimostrativo

Qui si mette il tubo col
campione, un flusso di
aria compressa lo
mantiene in posizione

Dewar di N2
liquido

Dewar di He
liquido

Magnete
superconduttore





Preparazione del Campione

Solvente: CDCl_3 (600-700 μL)



Chloroform-d

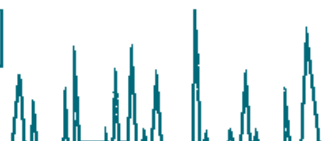
★★★★★ (0)

99.8 atom % D, contains 0.03 % (v/v) TMS

- Prelevare il solvente deuterato unicamente con pipette pulite.
- Non riutilizzare le pipette
- Non rimettere nella boccetta il solvente in eccesso

NMR Solvent Data Chart

Cambridge Isotope Labs



The ^1H spectra of the residual protons and ^{13}C spectra were obtained on a Varian Gemini 200 spectrometer at 295°K. The sample for the proton and ^{13}C spectra contain a maximum of 0.05% and 1.0% TMS (v/v) respectively. Since deuterium has a spin of 1, triplets arising from coupling to deuterium have the intensity ratio of 1:1:1. 'm' denotes a broad peak with some fine structure. It should be noted that the chemical shifts, in particular, can be dependent on solute, concentration and temperature.

Approximate values only, may vary with pH, concentration and temperature.

Melting and boiling points are those of the corresponding unlabeled compound (except for D_2O). These temperature limits can be used as a guide to determine the useful liquid range of the solvents.

SOLVENT	^1H Chemical Shift (ppm from TMS) (multiplicity)	JHD (Hz)	Carbon-13 Chemical Shift (ppm from TMS) (multiplicity)
Acetic Acid- d_4	11.65 (1) 2.04 (5)	2.2	178.99 20.0 (7)
Acetone- d_6	2.05 (5)	2.2	206.68 29.92 (7)
Acetonitrile- d_3	1.94 (5)	2.5	118.69 1.39 (7)
Benzene- d_6	7.16 (1)		128.39
Chloroform- d	7.24 (1)		77.23
Cyclohexane- d_{12}	1.38 (1)		26.43
Deuterium Oxide	4.80 (DSS) 4.81 (TSP)		NA
N,N-Dimethylformamide- d_2	8.03 (1) 2.92 (5) 2.75 (5)	1.9 1.9	163.15 34.89 29.76
Dimethyl Sulfoxide- d_6	2.50 (5)	1.9	39.51
1,4-Dioxane- d_8	3.53 (m)		66.66
Ethanol- d_5	5.29 (1) 3.56 (1) 1.11 (m)		56.96 17.31
Methanol- d_4	4.87 (1) 3.31 (5)	1.7	49.15
Methylene Chloride- d_2	5.32 (3)	1.1	54.00
Pyridine- d_5	8.74 (1) 7.58 (1) 7.22 (1)		150.35 135.91 123.87
Tetrahydrofuran- d_4	3.58 (1) 1.73 (1)		67.57 25.37 (5)
Toluene- d_8	7.09 (m) 7.00 (1) 6.98 (5) 2.09 (5)	2.3	137.86 (1) 129.24 (3) 128.33 (3) 125.49 (3) 20.4 (7)
Trifluoroacetic Acid- d_3	11.50 (1)		164.2 (4) 116.6 (4)
Trifluoroethanol- d_3	5.02 (1) 3.88 (4x3)	2(9)	126.3 (4) 61.5 (4X5)

SOLVENT

Acetic Acid- d_4

Acetone- d_6

Acetonitrile- d_3

Benzene- d_6

Chloroform- d

^1H Chemical Shift (ppm from TMS) (multiplicity)	JHD (Hz)	Carbon-13 Chemical Shift (ppm from TMS) (multiplicity)	JCD (Hz)	^1H Chemical Shift of HOD (ppm from TMS)
11.65 (1) 2.04 (5)	2.2	178.99 (1) 20.0 (7)	2.0	11.5
2.05 (5)	2.2	206.68 (1) 29.92 (7)	0.9 19.4	2.8
1.94 (5)	2.5	118.69 (1) 1.39 (7)	21	2.1
7.16 (1)		128.39 (3)	24.3	0.4
7.24 (1)		77.23 (3)	32.0	1.5



Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

50 Frontage Road, Andover, MA 01810-5413 USA
PH: 978.749.8000 PH: 800.322.1174 (USA)
PH: 800.643.7239 (CANADA) FAX: 978.749.2768

E-MAIL: cilsales@isotope.com (DOMESTIC)
E-MAIL: intlsales@isotope.com (INTERNATIONAL)
URL: <http://www.isotope.com>

https://www.isotope.com/usefiles/files/assetLibrary/NMR_solvents_data_chart_&_storage.pdf

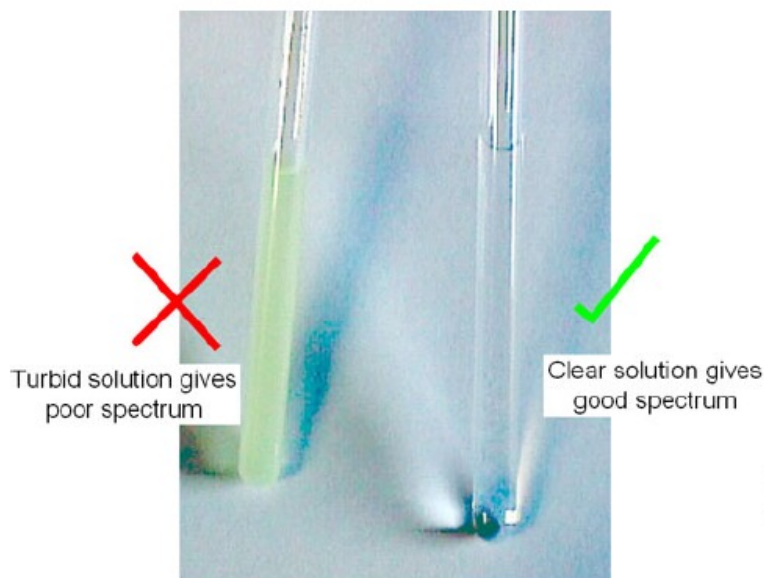
Preparazione del Campione

Solvente: CDCl_3 (600-700 μL)

Solidi: 10-20 mg, due punte di spatola

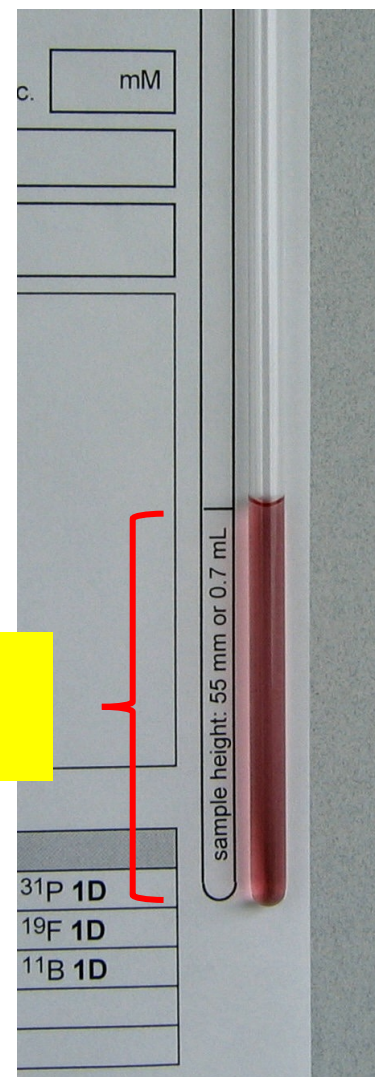
Liquidi: una goccia

La soluzione deve essere limpida

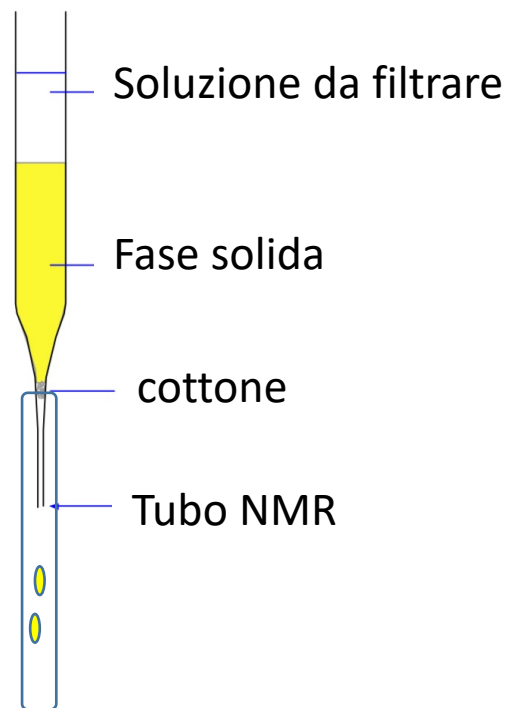
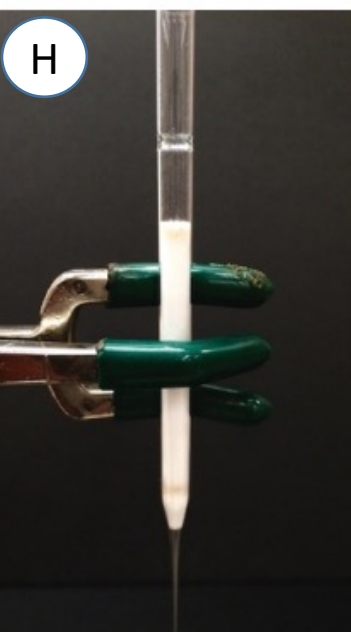
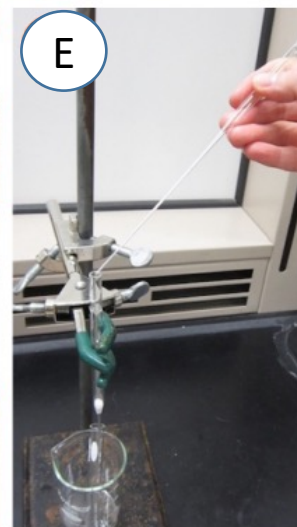
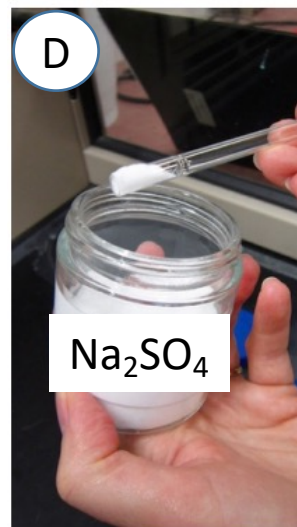


Microfiltrazione !!!!

Altezza 5 cm
0.6-0.7 mL



Microanidrificazione in pipetta

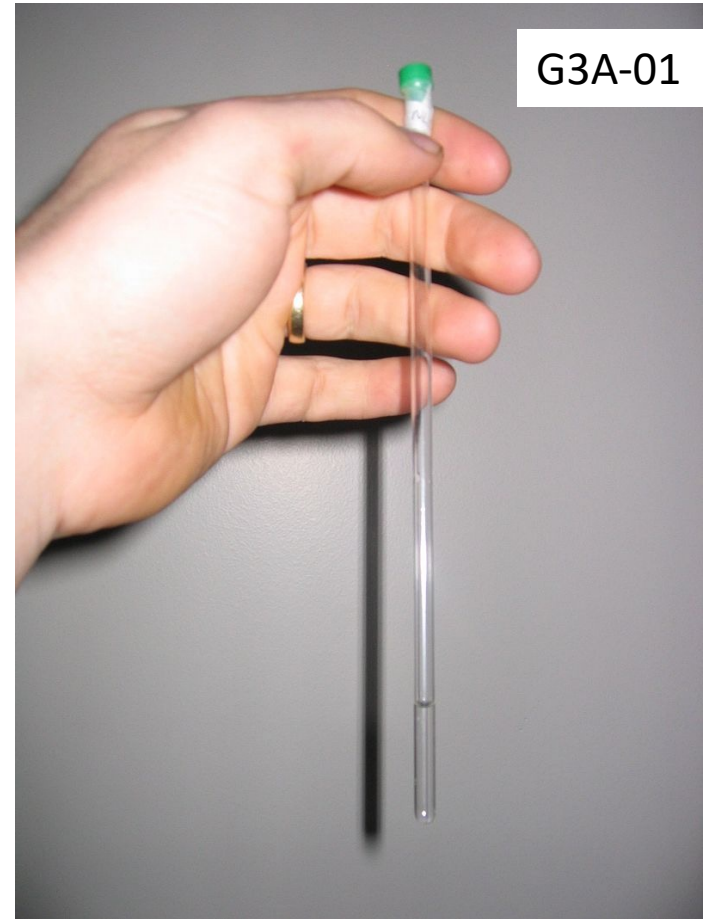


Prepara in un vial pulito la soluzione di campione in 0,7 mL in solvente deuterado

Preparazione del Campione

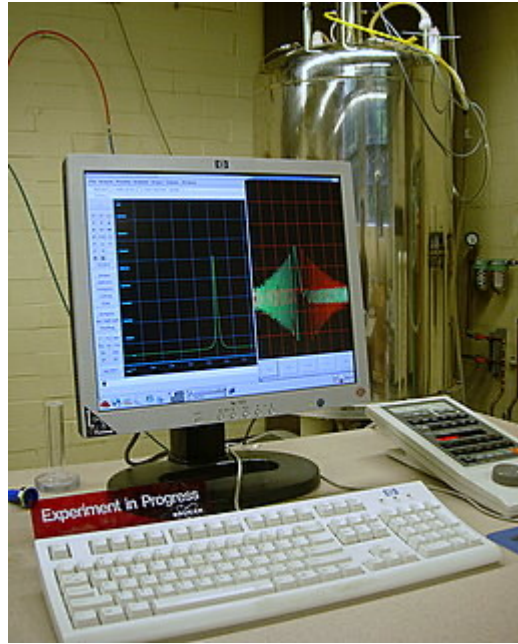
Scrivi nella parte superiore con pennarello il codice del campione,
Oppure utilizza un pezzettino di carta (che dopo devi togliere!!!)

Pulire la parte esterna del tubo con un fazzoletto morbido



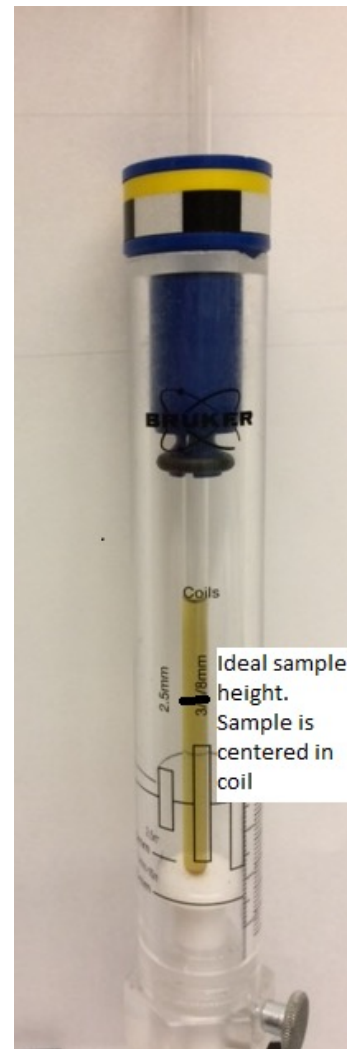
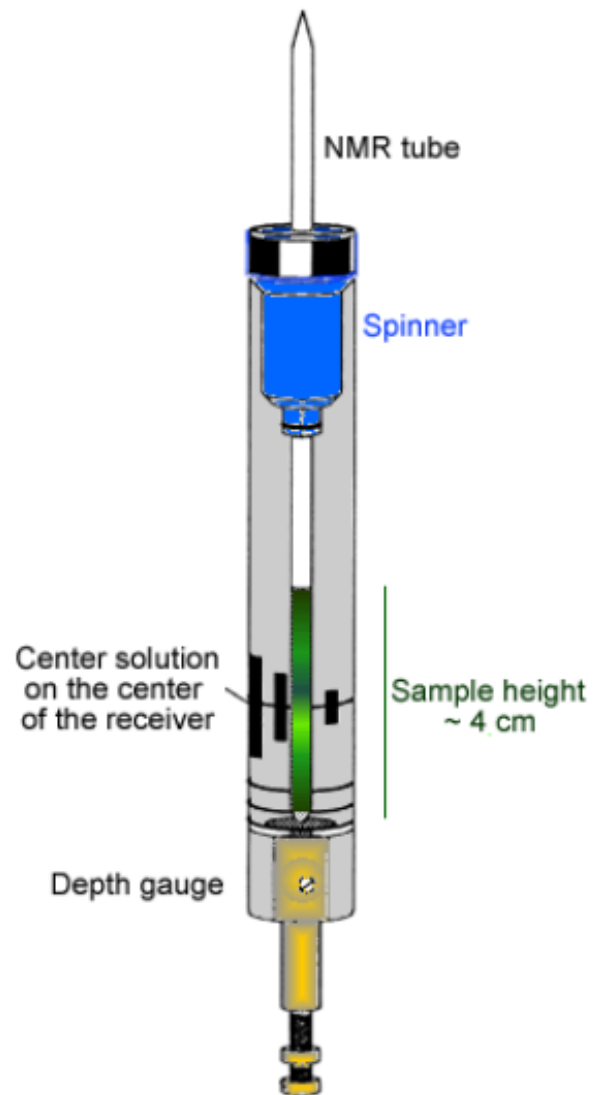


Bsms keyboard



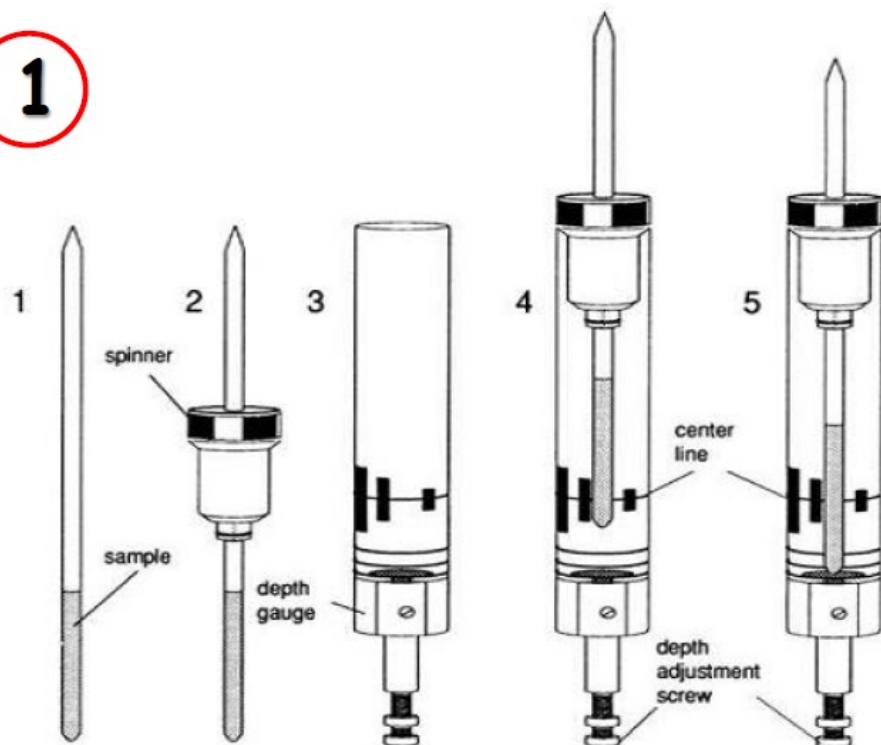
Computer with Bruker
topspin software
(gratuito per studenti e
docenti da bruker.com)





Inserimento del Campione

1



2

Azionare «LIFT»



Il tubo **con lo spinner** va posato sul flusso d'aria creato sopra il probe del magnete

3

Azionare di nuovo «LIFT»

4

Eventualmente iniziare la rotazione premendo «spin»

Lock

Lo spettrometro NMR possiede un canale permanentemente sintonizzato sulle frequenze di risonanza del deuterio (^2H)

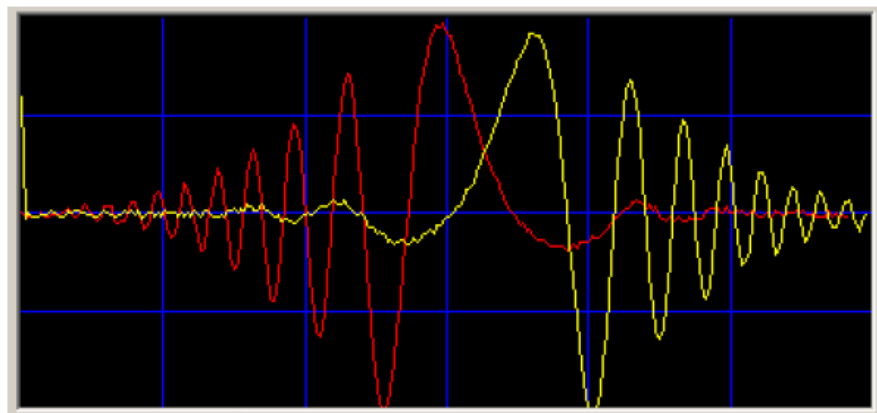
Lo strumento cerca questa frequenza in base al solvente che indichiamo

«lock» + indicare solvente

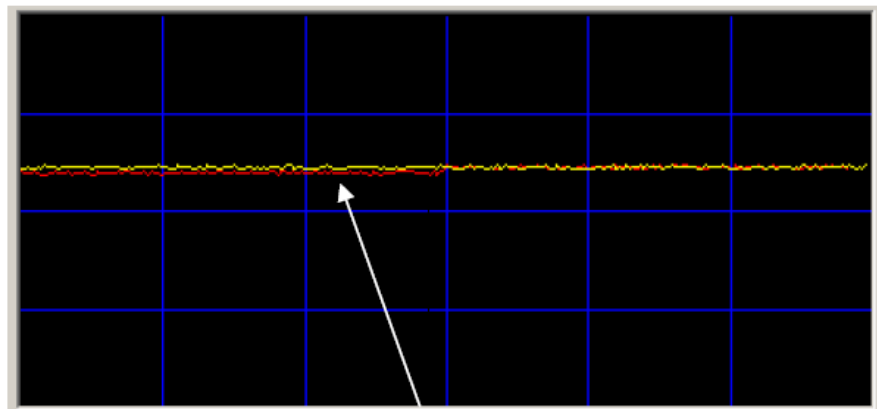
Il segnale generato dal ^2H può essere utilizzato per:

- monitorare eventuali drift di campo
- *shimmare* il campione

unlocked



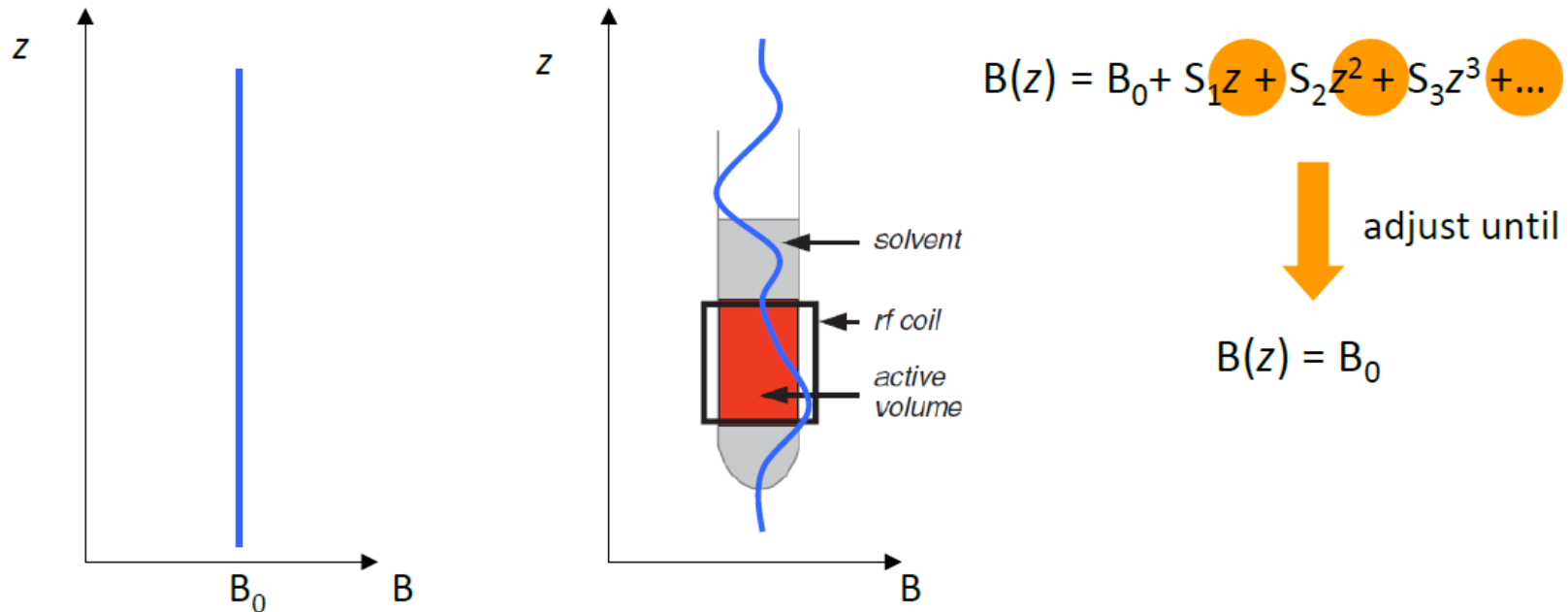
locked



livello di lock

Shimming

- Dopo aver “agganciato” il segnale lock, è necessario omogeneizzare il campo B_0 (renderlo uniforme lungo tutto il campione)

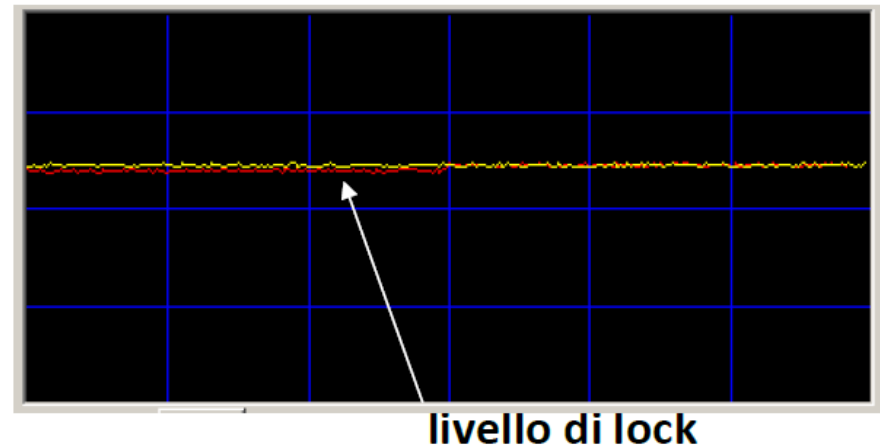


By changing the current in the shim coils, one can empirically match the values $S_1, S_2, S_3 \dots$ in such way as to cancel their effect on the field B .

Shimming

- Dopo aver “agganciato” il segnale lock, si agisce sugli shim coils z1 e z2 (raramente z3 e z4) in modo interattivo in modo da..
- ... far salire il livello di lock il più possibile

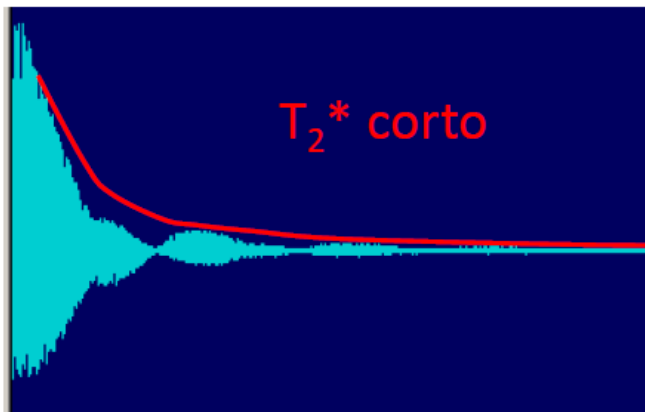
Disponibile file di shimatura



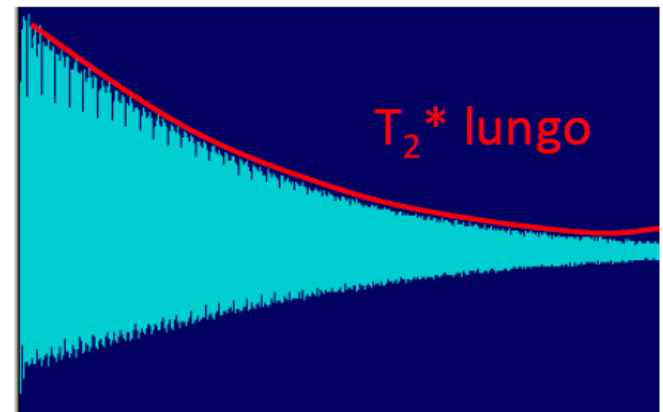
- L'innalzamento del livello di lock indica che il segnale del deuterio aumenta di intensità ed è correlabile ad un miglioramento di omogeneità di B_0

Influenza dello Shimming sul FID

Scarsa omogeneità

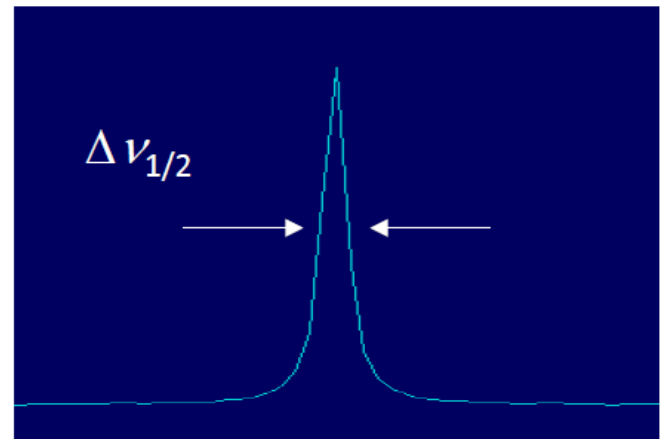


Buona omogeneità

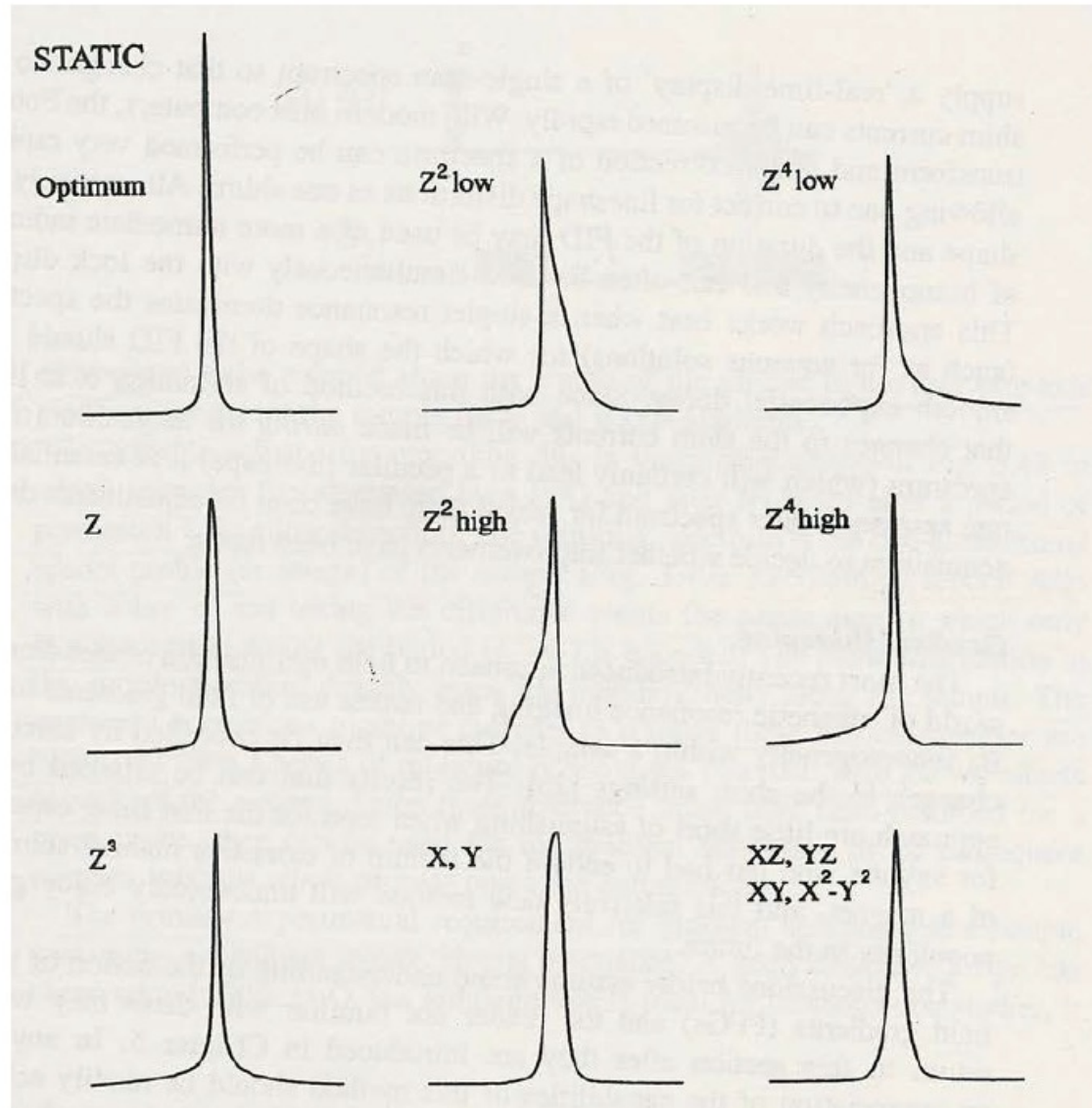


z^1, z^2

$$\Delta \nu_{1/2} = 1/(\pi T_2^*)$$



Influenza dello Shimming sul segnale



Acquisizione

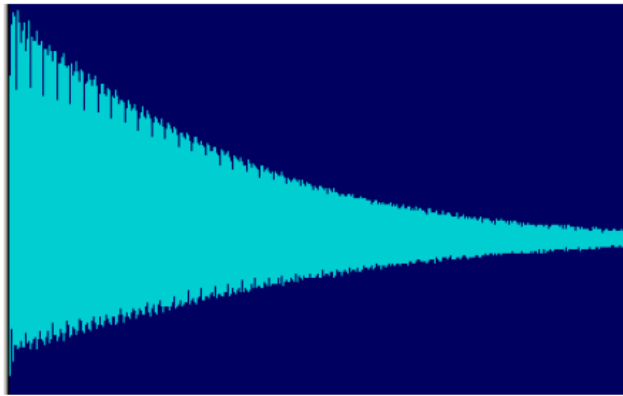
Parametri

PULPROG	PULse PROGram (experiment)	zg	
TD	Number of time domain samples (number of points used to define FID)	FIXED	
AQ	Acquisition time, TD/(2SW)	FIXED	
P1	Pulse width	FIXED	
SWH	Sweep width in Hz (spectral width)		
SW	Sweep width in ppm	10-15ppm	Depends on sample
o1	Transmitter center in Hz (Center of the spectrum in Hz)		
o1p	Center of the spectrum in ppm		Depends on SW
D1	Relaxation delay, time between two consecutive scans	1-3	Type of protons
RG	Receiver autogain-depends on concentration		RGA
NS	Number of scans	8-128	Depends on rg

Elaborazione del FID

SI PUO' ESEGUIRE COL PROGRAMMA MESTRE-C

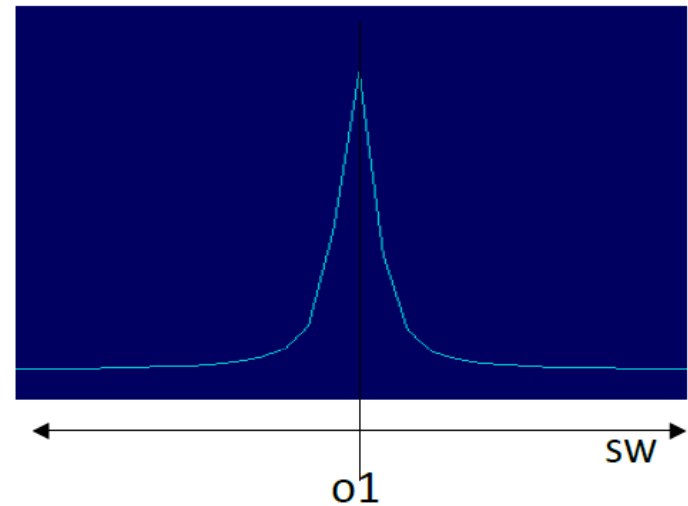
FID



FT



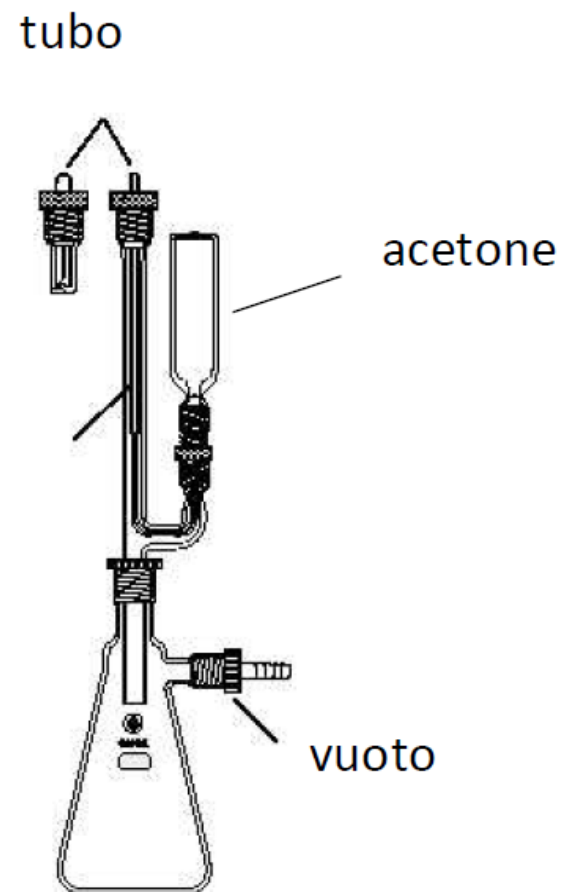
Spettro NMR

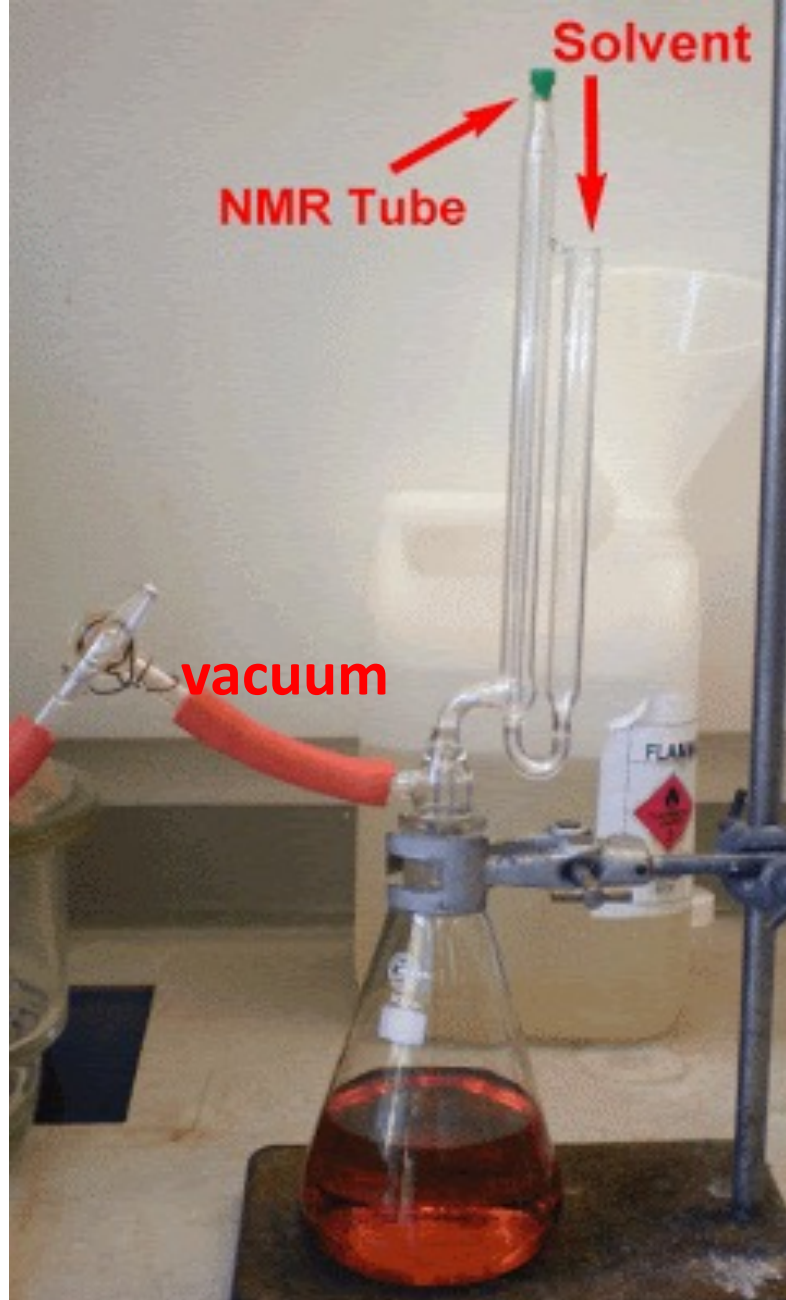


- FT
- Phase Correction
- Baseline Correction
- Integration
- Peak Peaking

Pulizia dei tubi da 5mm

- Inserire il tubo rovesciato (con tappo!!) senza sigillare
- riempire di acetone il recipiente
- aprire il vuoto
- sigillare premendo il tappo
- asciugare





II. Sources of contamination.

Solvents from a general use bottle can easily become contaminated. Deuterated solvents pick up easily water and grease used on glassware is usually detected close to 0 ppm.

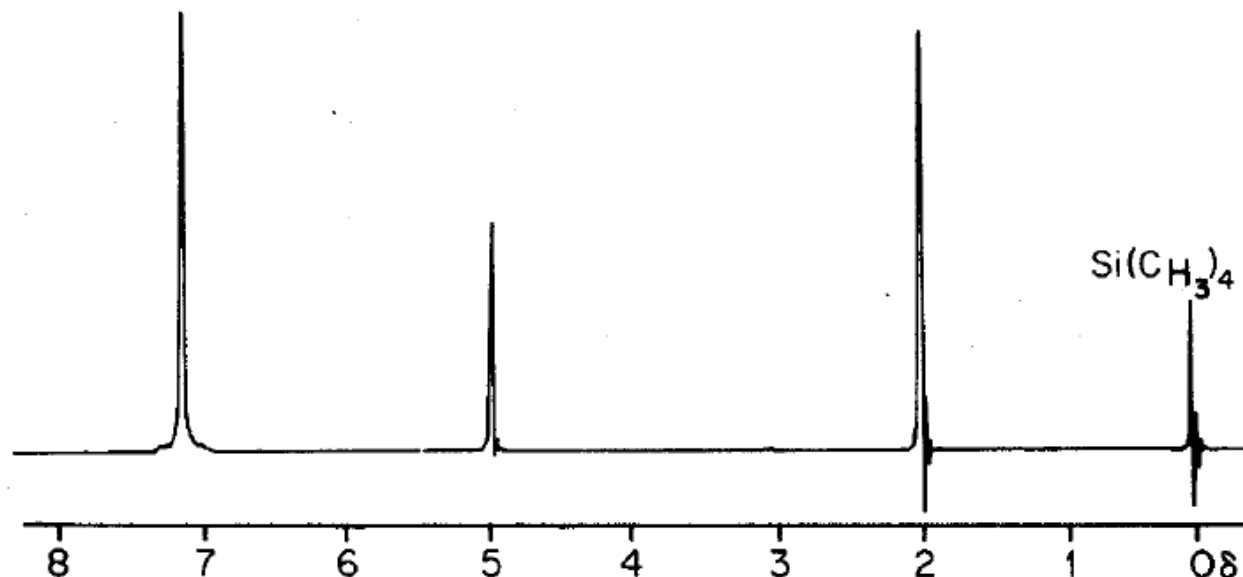
Useful references for identifying impurities:

(a) *J Org Chem* **1997**, 62, 7512-7515, "NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities".

(b) *Organometallics* **2010**, 29 (9), 2176-2179 "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist"

In uno strumento che opera in onda continua il trasmettitore di RF varia la frequenza in modo continuo nel corso della scansione.

Quando la frequenza corrisponde a quella di precessione dei nuclei presenti nella molecola questi vanno in risonanza, dando luogo ad un segnale che viene registrato dallo strumento per produrre lo spettro NMR



Procedura analoga alla spettroscopia UV o IR

L'NMR a onda continua (Continuous Wave NMR) è un metodo di spettroscopia Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) in cui un campo magnetico statico viene mantenuto costante e una singola frequenza di radiofrequenza (RF) viene variata o un campo magnetico statico viene variato mentre la frequenza RF è costante. La risonanza si verifica quando l'energia della radiazione RF corrisponde alla differenza di energia tra gli stati di spin dei nuclei, risultando in un assorbimento del segnale e la registrazione di uno spettro che mostra la frequenza o il campo magnetico al momento della risonanza.

Come funziona

1.Campo Magnetico e Spin Nucleare: I nuclei degli atomi (come i protoni dell'idrogeno) si comportano come piccoli magneti. Quando immersi in un forte campo magnetico, questi nuclei si allineano in due stati di spin: uno parallelo al campo e uno antiparallelo.

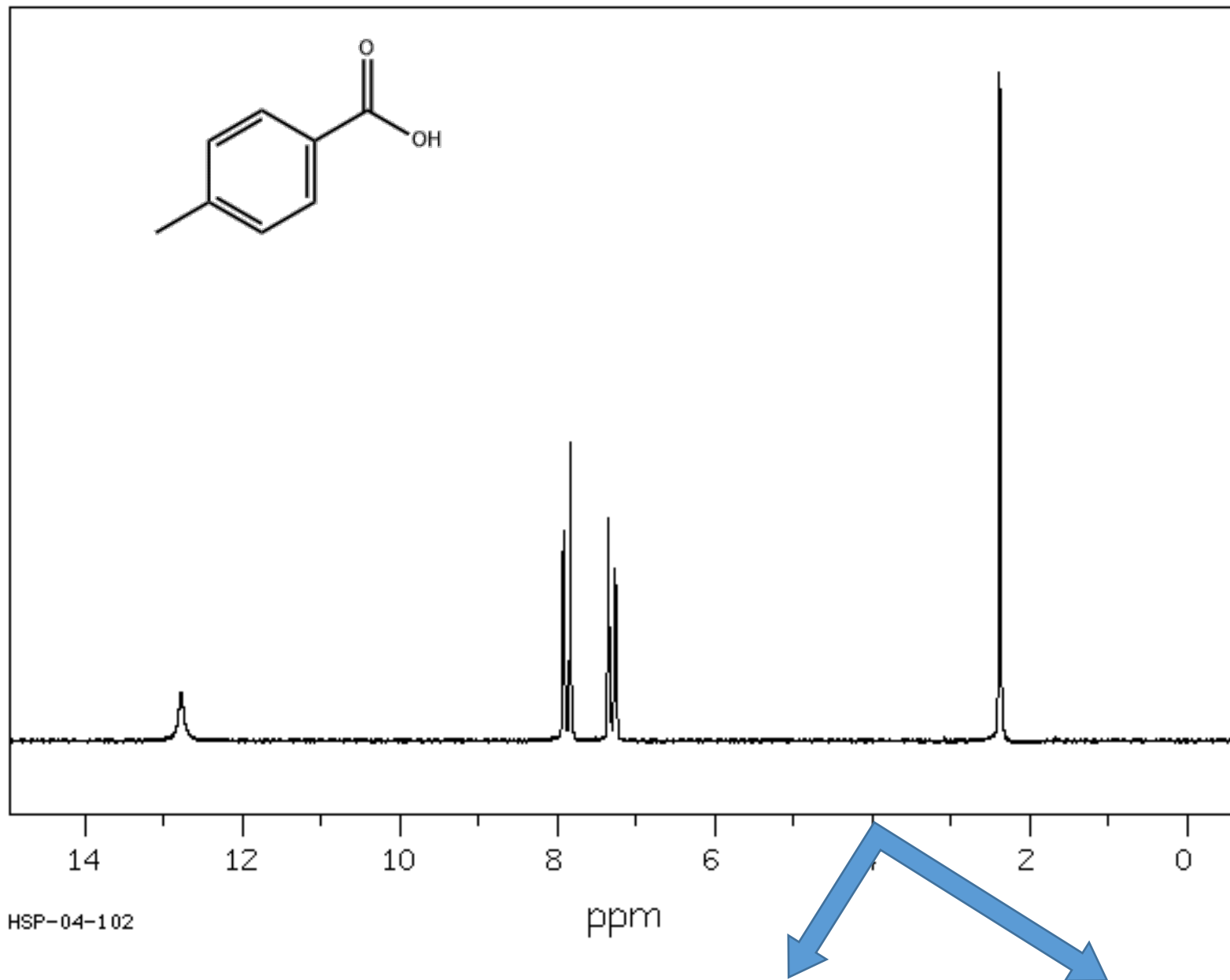
2.Stimolazione RF: Le due condizioni di spin hanno differenze di energia. Per osservare la risonanza, si utilizza una radiazione elettromagnetica di frequenza specifica, o radiofrequenza (RF).

3.Due Modi Operativi:

- 1. Scansione di Frequenza:** Si applica un campo magnetico statico costante al campione, mantenendo un impulso a frequenza costante. La frequenza dell'impulso RF viene quindi gradualmente variata fino a quando l'energia dell'impulso non corrisponde esattamente alla differenza di energia tra i due stati di spin nucleare. A questo punto, i nuclei assorbono energia (risonanza) e viene registrato un segnale.
- 2. Scansione di Campo Magnetico:** In alternativa, si può mantenere un campo RF costante e variare lentamente l'intensità del campo magnetico, sempre fino a quando non si raggiunge la condizione di risonanza.

Perché è stato sostituito dagli strumenti moderni

Gli spettrometri NMR a onda continua sono stati gli strumenti di prima generazione. I moderni strumenti NMR a trasformata di Fourier (FT-NMR) utilizzano un approccio più efficiente. Invece di variare lentamente un parametro, gli strumenti FT-NMR irradiano il campione con un breve impulso di energia RF che contiene un'ampia gamma di frequenze. Questo eccita tutti i nuclei contemporaneamente, producendo un segnale chiamato decadimento a induzione libera (FID). Questo segnale viene poi elaborato matematicamente attraverso una trasformata di Fourier per produrre uno spettro completo, fornendo molte più informazioni in modo più rapido e completo.



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 12.8 (bs, 1H), 7.94 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H).

SICUREZZA

Risonanza magnetica nucleare

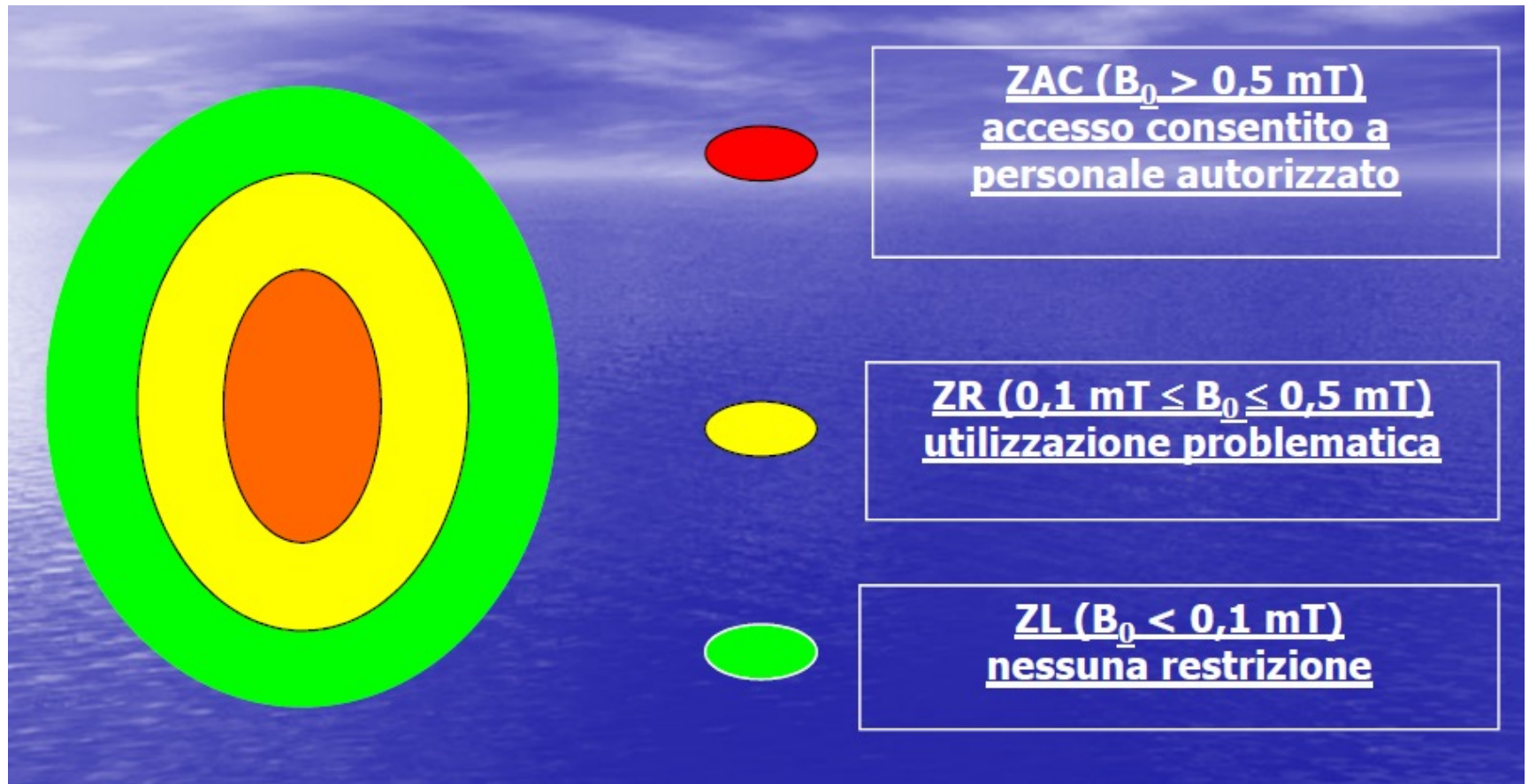
Sarete voi a usare personalmente lo strumento



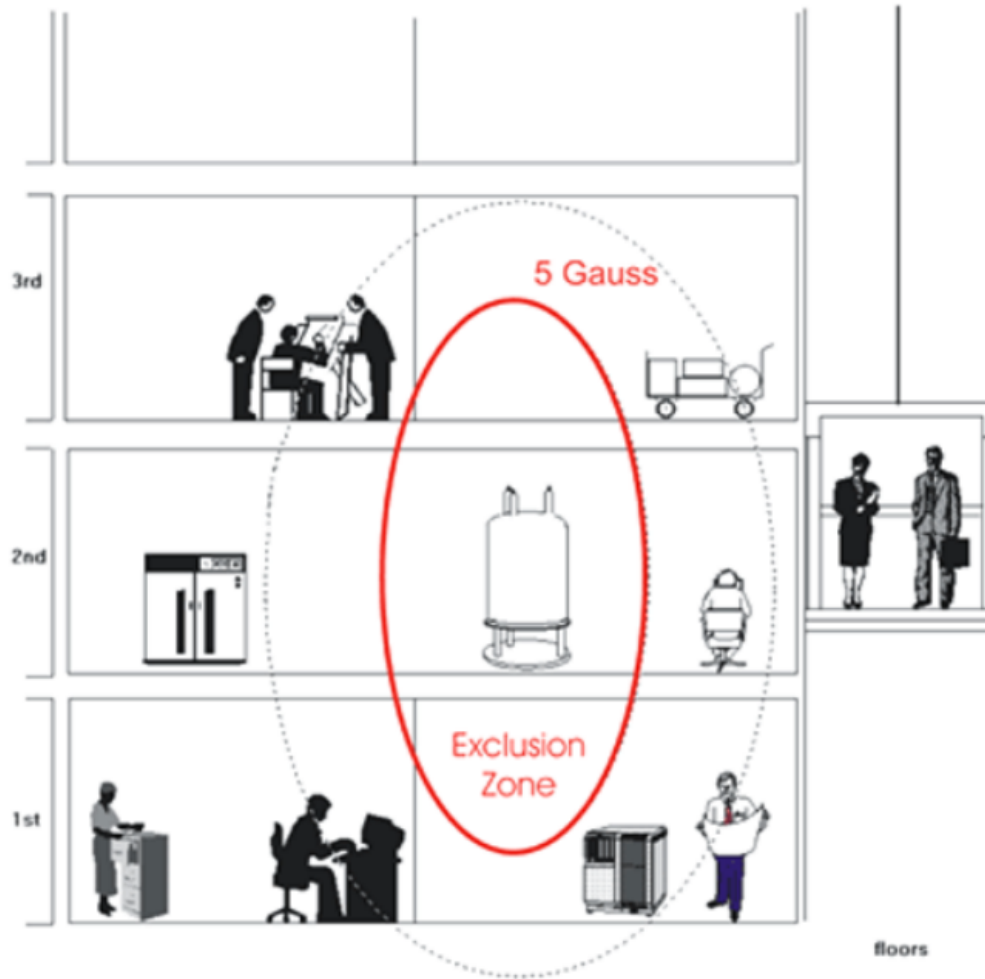
Fonti di pericolo

- campo magnetico B0
- Liquidi criogenici

Classificazione delle zone di rischio



Classificazione delle zone di rischio



ZAC ($B_0 > 0,5 \text{ mT}$)
accesso consentito a
personale autorizzato

ZR ($0,1 \text{ mT} \leq B_0 \leq 0,5 \text{ mT}$)
utilizzazione problematica

ZL ($B_0 < 0,1 \text{ mT}$)
nessuna restrizione

Zona ad accesso controllato (ZAC)



ATTENZIONE
CAMPO MAGNETICO MR



ATTENZIONE
CAMPO DI ALTA FREQUENZA



DIVIETO DI ACCESSO
AI PORTATORI DI
STIMOLATORI ELETTRICI
(PACE MAKERS)



Vietao usare
fiamme libere.
Vietao fumare



Divieto d'accesso
ai portatori di
protesi metalliche
ed oggetti metallici
nel corpo
es: schegge.



Vietao introdurre
orologi meccanici
digitali,
calcolatrici
tascabili, ecc.



Vietao utilizzare
estintori con
bombe
metalliche.



Vietao introdurre
qualsiasi oggetto
metallico.



Vietao introdurre
carte di credito o
tessere
magnetiche

La porta d'accesso al laboratorio NMR è tenuta chiusa e dotata di cartelloni che indicano i rischio e il divieto d'accesso a personale non autorizzato

La zona ZAC è all'interno della sala NMR, è delimitata da barriere fisiche e accessibile soltanto a personale autorizzato



Zona ad accesso controllato (ZAC)



- A questa zona si accede per inserire il campione e fare le operazioni di tuning
- La maggior parte degli strumenti moderni prevedono un tuning remoto e l'utilizzo di autocampionatori



Zona di rispetto (ZR)

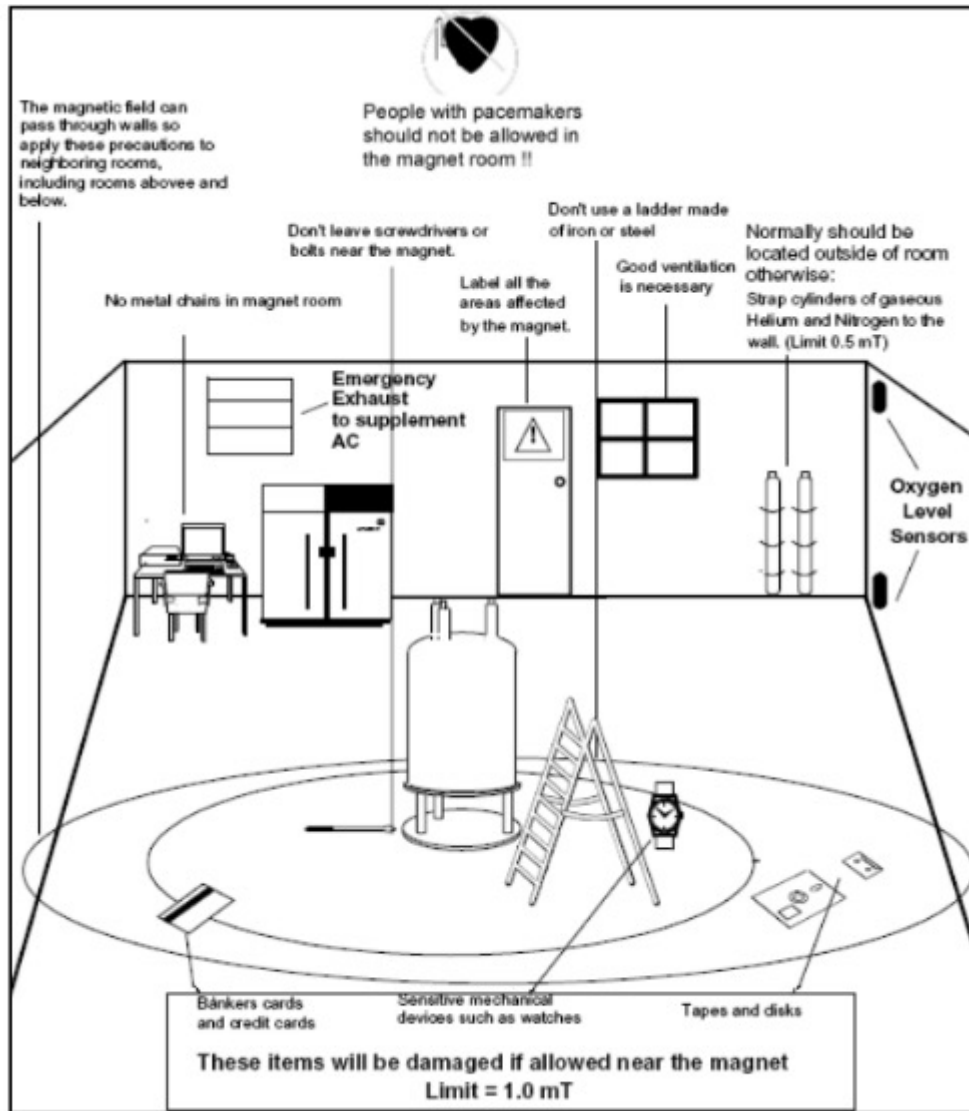


Figure 2.1. General Overview of Safety

- Evitare postazioni fisse
- Evitare macchinari che possano interferire col funzionamento dello spettrometro

Rischio per liquidi criogenici

Liquidi criogenici

He liquido

Temperatura -269 °C

Inodore, non infiammabile, no tossico

Lesioni da freddo

Sulla pelle provoca lesioni simili
a bruciature

Soffocamento

QUENCH

Risonanza magnetica nucleare

QUENCH

Evaporazione improvvisa di tutto il liquido criogenico dovuta a un aumento della temperatura o alla perdita del vuoto

Risonanza magnetica nucleare

<http://www.youtube.com/watch?v=nBVHnZ8tru0>



Risonanza magnetica nucleare

QUENCH

Evaporazione improvvisa di tutto il liquido criogenico dovuta a un aumento della temperatura o alla perdita del vuoto

Pericolo di soffocamento

Ci sono strumenti di misura della concentrazione di ossigeno nella sala NMR

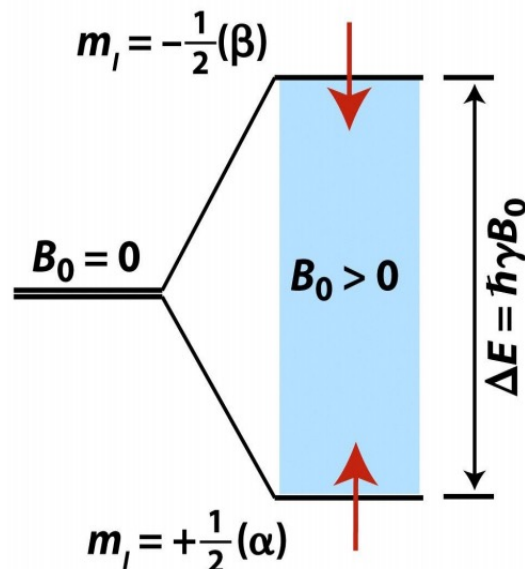
L'evaporazione porta anche ad un aumento della pressione atmosferica interna che può rendere più difficile l'apertura della porta

PRINCIPIO DELLA SPETTROSCOPIA NMR

1. In presenza di un campo magnetico esterno B_0 i due stati di spin hanno una energia diversa.

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0$$

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



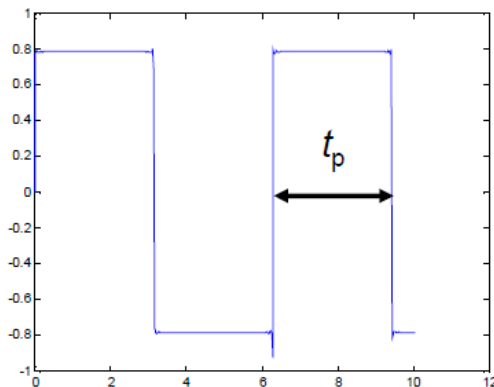
2. Un strumento NMR utilizza la transizione tra stati di spin per avere un segnale. Le transizioni avvengono nel range delle radiofrequenze

3. Irradiando il campione a una frequenza esattamente uguale alla frequenza di Larmor di un nucleo specifico, avviene un assorbimento di energia che dà luogo a una transizione di spin

NMR A IMPULSI / A TRASFORMATA DI FOURIER

Tutti i nuclei di una specie vengono eccitati inviando contemporaneamente tutte le radiofrequenze entro l'intervallo di interesse (IMPULSO di radiofrequenze). Ad esempio, per fare eccitare contemporaneamente tutti i protoni di una molecola si inviando simultaneamente tutte le radiofrequenze entro l'intervallo in cui risuonano i protoni. Una volta eccitati cessa la radiazione di radiofrequenze e si va a misurare l'emissione di energia in funzione del tempo.

Come ottengo questo impulso?

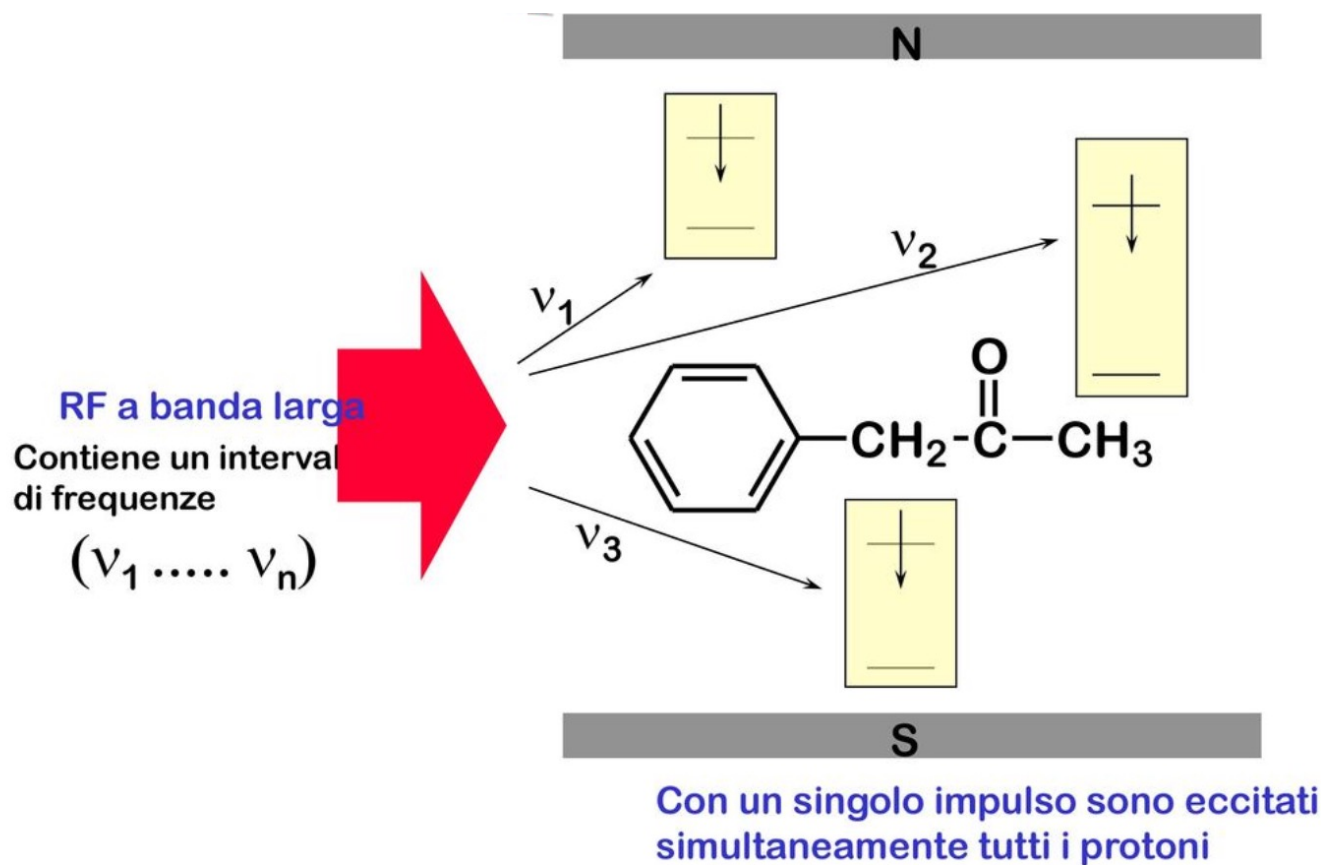


Per il principio di indeterminazione, un impulso di radiazione elettromagnetica della durata di 1 ms ha una indeterminazione sulla frequenza di ca. 1000 Hz! L'impulso contiene tutte le frequenze centrate su una frequenza portante (ν_0) tra $\nu_0 - 500$ Hz e $\nu_0 + 500$ Hz, ed ha una larghezza di 1000 Hz

Lo strumento NMR invia impulsi di radiofrequenze per tempi nel ordine dei microsecondi

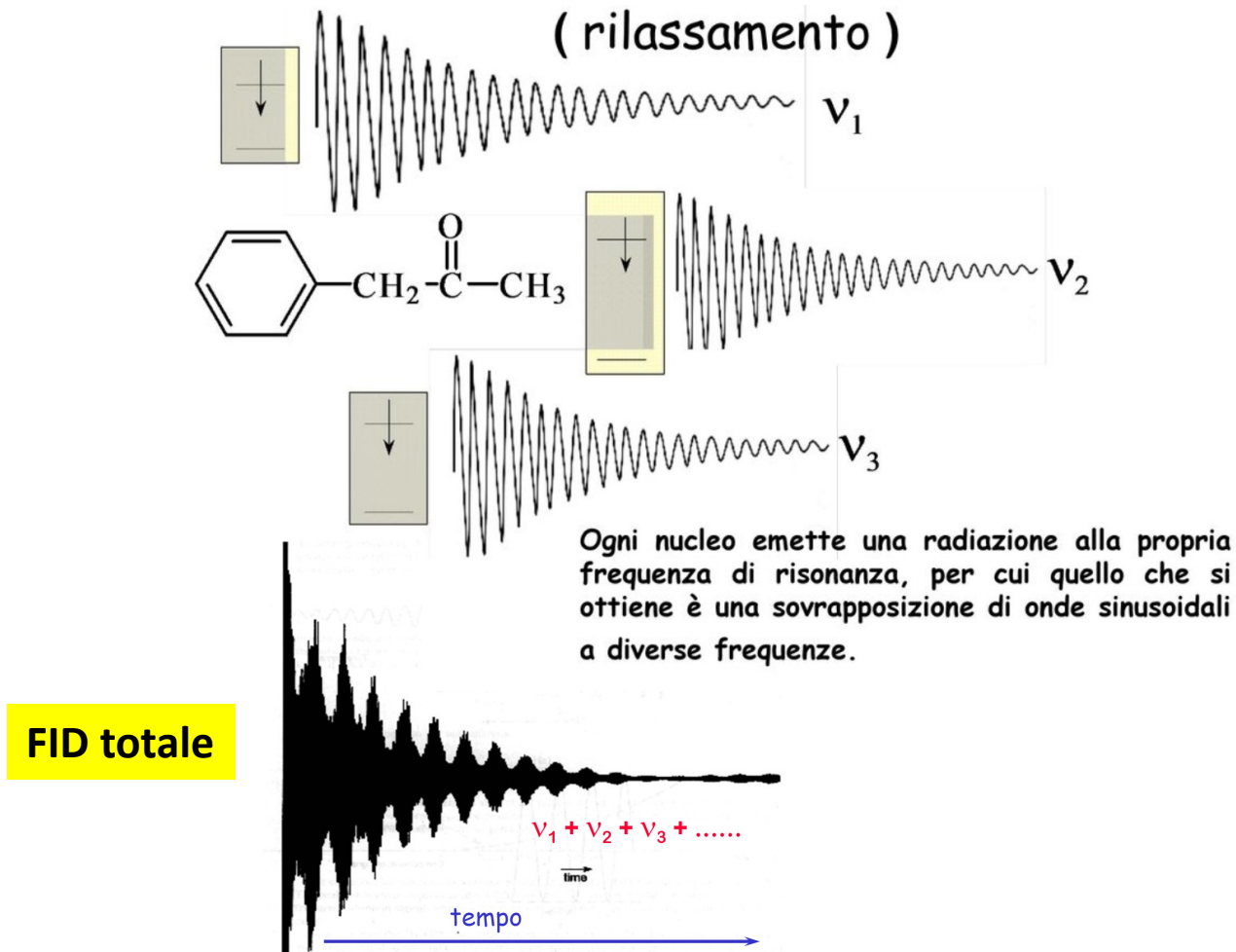
IMPULSO DI RADIOFREQUENZE

1. Il campione viene posto in un campo magnetico B_0
2. Invio di impulso di radiofrequenze

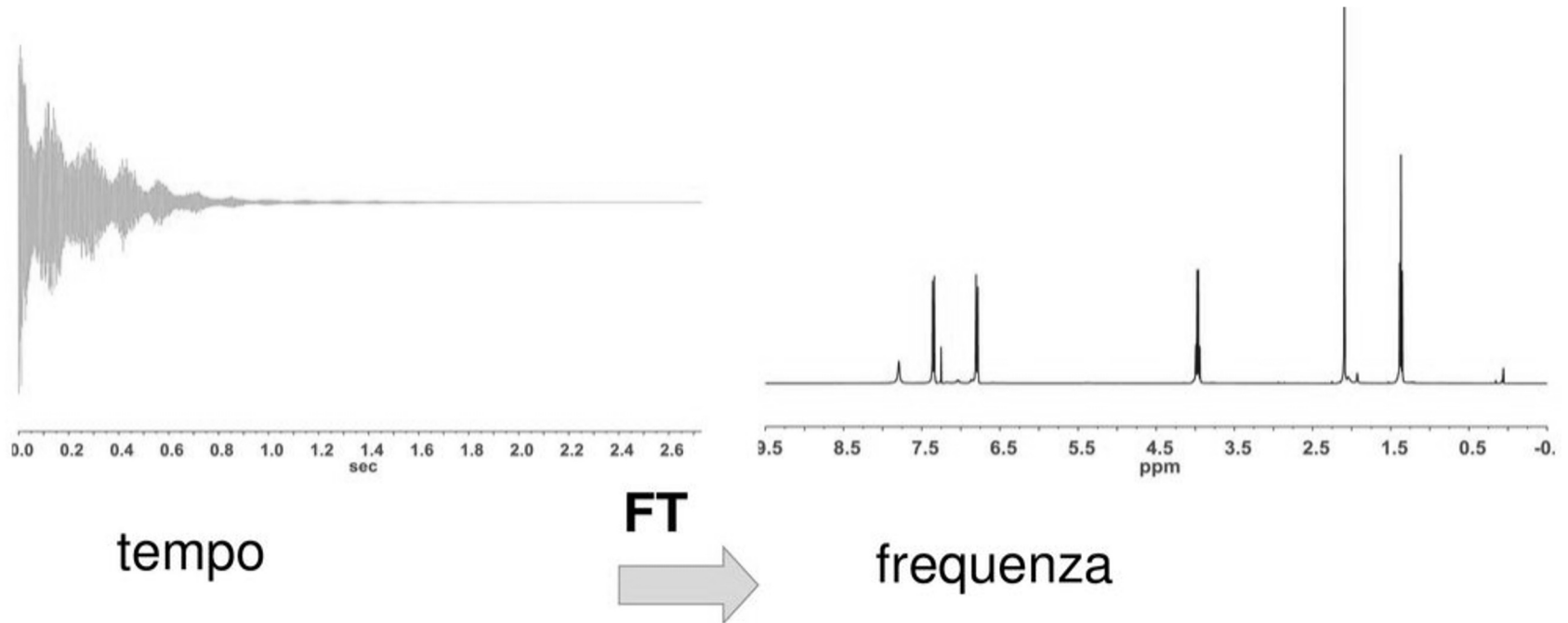


FREE INDUCTION DECAY (FID)

3. I nuclei riemettono l'energia assorbita producendo un segnale oscillante che decade nel tempo e che ha una frequenza uguale alla frequenza di Larmor (FID, Free Induction Decay)



4. Il FID è registrato ed è convertito in un segnale nel dominio delle frequenze tramite operazioni matematiche, la trasformata di Fourier



Con uno strumento FT è possibile acquisire un gran numero di FID in pochi secondi e sommarli → grande aumento della sensibilità

