Seminiario «La Risonaanza Magnetica Nucleare nel settore alimentare»
Teramo 11-12 luglio 2013

SPETTROSCOPIA NMR: INTRODUZIONE ALLA TECNICA E ALLA STRUMENTAZIONE

Anna Paola Minoja

BRUKER ITALIA

anna.minoja@bruker.it

Il fenomeno fisico e la sua utilità

I nuclei di alcuni atomi immersi in un campo magnetico statico rilasciano energia se perturbati da un campo elettro-magnetico oscillante a frequenza opportuna.

Se si riesce a captare questa energia (segnale) si possono dedurre informazioni strutturali e dinamiche del campione in esame.

I protagonisti

NMR

Risonanza Magnetica Nucleare

Una radiazione elettromagnetica

$\omega_L = \gamma B_0$

Un campo magnetico statico

Un nucleo magneticamente attivo

NUCLEO	SPIN I
^{1}H	1/2
^{2}H	1
^{13}C	1/2
^{19}F	1/2
^{23}Na	3/2
^{31}P	1/2

Come si genera il campo magnetico B_0

Le unità di misura di B_0 sono il Tesla nel sistema MKS e il Gauss nel sistema cgs → 1T = 10^4 G

E' consuetudine in NMR quantificare l'intensità di B_0 in MHz …

I nuclei e lo SPIN

Non tutti i nuclei sono osservabili tramite uno strumento NMR. Un nucleo per essere " NMR attivo" deve avere una proprietà: lo SPIN, che deve essere non nullo.

Cosa è lo spin?

Lo SPIN è una proprietà fondamentale delle particelle, analogamente alla massa e alla carica elettrica. In meccanica quantistica lo spin rappresenta il momento angolare intrinseco associato alle particelle. I possibili valori dello SPIN sono multipli interi di ½.

Le componenti fondamentali del nucleo atomico (protoni e neutroni) hanno spin ½; anche l'altro componente fondamentale dell'atomo, l'elettrone, ha spin ½

I nuclei e lo SPIN

Quindi lo spin del nucleo è dato dall'accoppiamemto degli spin dei neutroni e dei protoni che lo costituiscono.

L' isotopo principale dell'atomo di IDROGENO è costituito da

1 protone; spin nucleare: ½.

Ma ci sono altri isotopi dell'idrogeno.

Il nucleo del DEUTERIO è costituito da:

1 protone + 1 neutrone; spin nucleare: 1.

Il nucleo del TRIZIO è costituito da:

1 protone + 2 neutrone; spin nucleare: ½.

I nuclei e lo SPIN

REGOLA GENERALE

Nuclei il cui numero di massa è dispari hanno spin nucleare multiplo di ½.

Nuclei il cui numero di massa e quello atomico sono pari hanno spin nucleare 0.

Nuclei il cui numero di massa è pari e quello atomico dispari hanno spin nucleare **intero** .

I nuclei, lo SPIN e l'abbondanza naturale

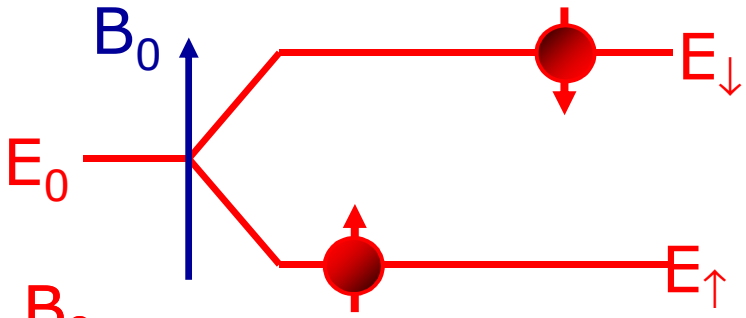
Nucleo	spin I	Abbondanza nat. (%)
^{1}H	1/2	99.98
^{2}H	1	0.015
^{13}C	1/2	1.108
^{19}F	1/2	100
^{23}Na	3/2	100
^{31}P	1/2	100

.....

Lo SPIN in un campo magnetico

Una particella con spin non nullo, può essere immaginata come un piccolo magnete

In presenza di un campo esterno, una particella con spin ½ può assumere due diverse orientazioni: una a maggiore energia (antiparallela al campo) ed una ad energia minore (parallela al campo).

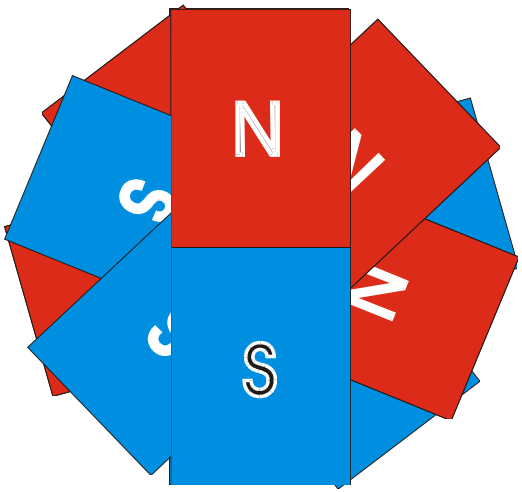


$$E_{(\uparrow/\downarrow)} - E_0 = -\mu \cdot B_0 = (\gamma h/2\pi)\, I \cdot B_0$$

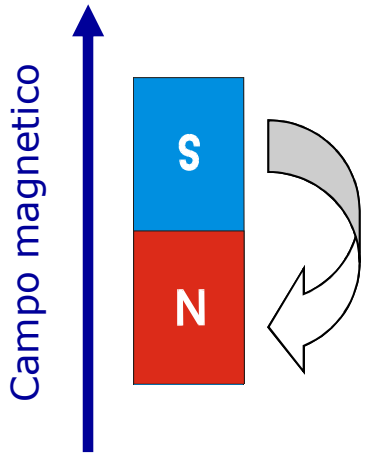
La Bussola

Una particella con spin ½ è come una bussola.

In assenza del campo magnetico terrestre si orienta in modo casuale.

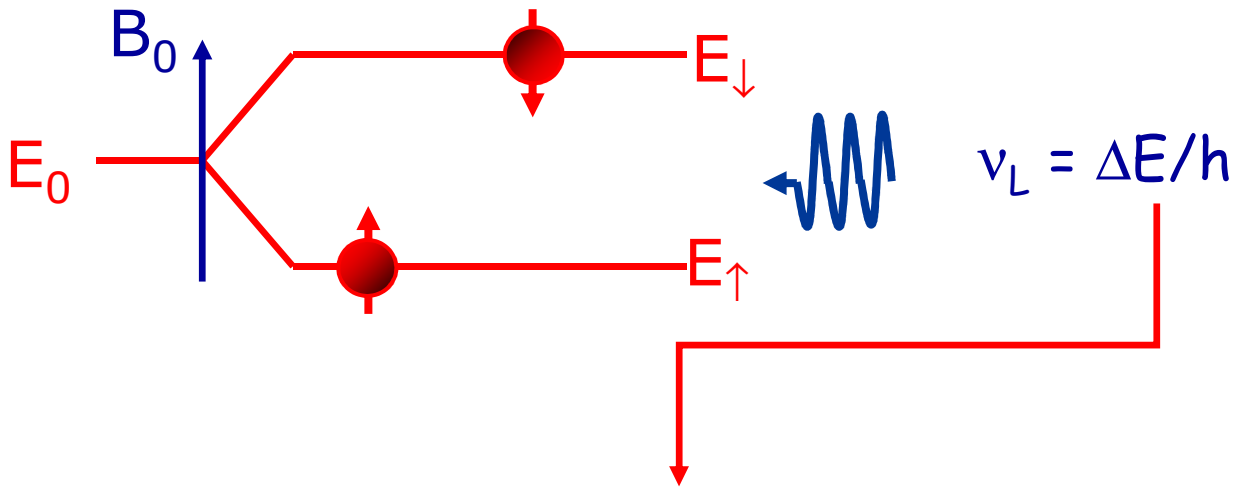


In presenza di un campo magnetico si orienta secondo una orientazione preferenziale. Una certa quantità di energia è necessaria per far girare il momento di dipolo magnetico, cioè la bussola.



Risonanza

Il nucleo immerso nel campo magnetico é in grado di assorbire e rilasciare radiazione elettromagnetica con frequenza corrispondente al salto energetico tra i due livelli 'Zeeman':



$$\nu_L = (\gamma/2\pi)\cdot B_0 \quad \omega_L = \gamma B_0$$

con γ = rapporto giromagnetico del nucleo

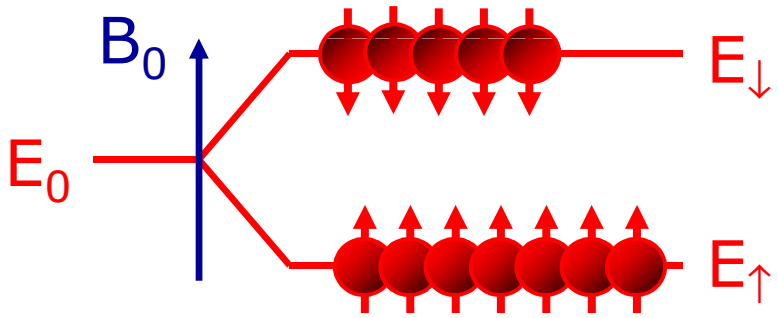
Risonanza

Nucleus	spin I	Natur. Abund. (%)	$\gamma/2\pi$	ν_L @ 4 T	ν_L @ 21.139 T
^{1}H	1/2	99.98	42.576	170.21	900
^{2}H	1	0.015	6.536	26.14	138.165
^{13}C	1/2	1.108	10.705	42.83	226.293
^{19}F	1/2	100	40.054	160.21	846.702
^{23}Na	3/2	100	11.262	45.05	238.067
^{31}P	1/2	100	17.235	69.94	364.331
			(MHz/T)	(MHz)	(MHz)

.....

SPIN in un campo magnetico

Ad una data temperatura gli spin nucleari contenuti in un campione macroscopico si distribuiranno secondo la statistica di Boltzmann : $N_{\uparrow}/N_{\downarrow} = \exp[-\Delta E/K_B T]$



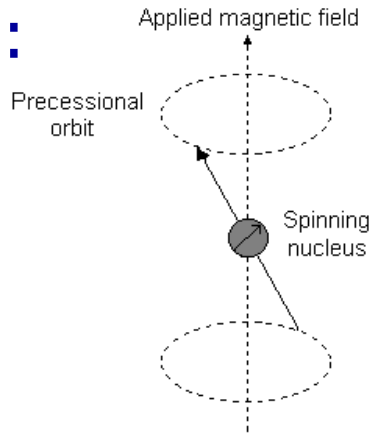
Determinando una magnetizzazione netta:

$M = \mu (N_{\uparrow} - N_{\downarrow})$

(@ 1T, 37 ° C → 6 spin per 1 milione di ^1H nuclei)

Risonanza (visione 'classica')

Il vettore magnetizzazione 'M' è una quantità macroscopica e può essere trattato classicamente. Nella formulazione classica M precede attorno all'asse del campo B_0 a frequenza di Larmor:



$$\nu_L = (\gamma/2\pi)\cdot B_0$$

$$(\omega_L = \gamma B_0)$$

L'angolo di precessione (all'equilibrio = 0) può essere modificato irraggiando il sistema in risonanza.

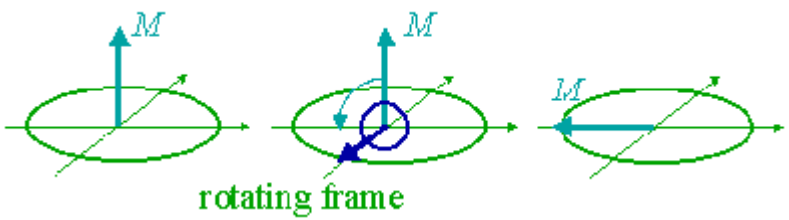
L'Esperimento NMR in breve

Schematicamente l'esperimento NMR può essere descritto nel modo seguente:

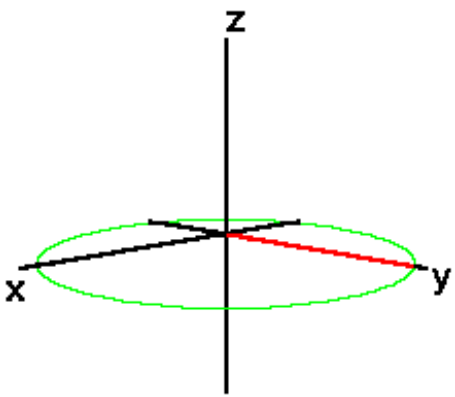
- il campione viene irraggiato in risonanza,
- le popolazioni vengono perturbate dalla situazione di equilibrio (visione quantistica)
- si sposta l'angolo di precessione del vettore M (visione classica)
- si riceve la radiazione emessa dal sistema stesso durante il ritorno all'equilibrio (SEGNALE NMR).

Effetto dell'irraggiamento RF

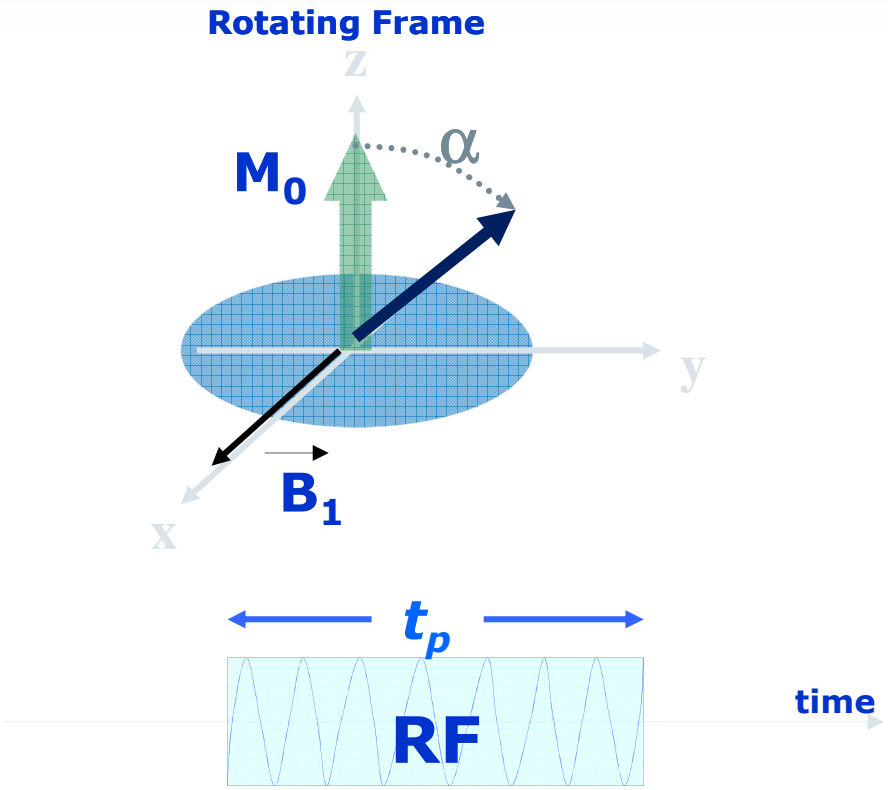
Applicando un campo oscillante B_1 lungo X (Y) in condizioni di risonanza (SFO1 = ν_L) l'angolo di precessione ruota attorno ad X (Y).



Possiamo rappresentare l'effetto mediante un <u>sistema di riferimento rotante</u> attorno a Z con frequenza SFO1



L'impulso RF



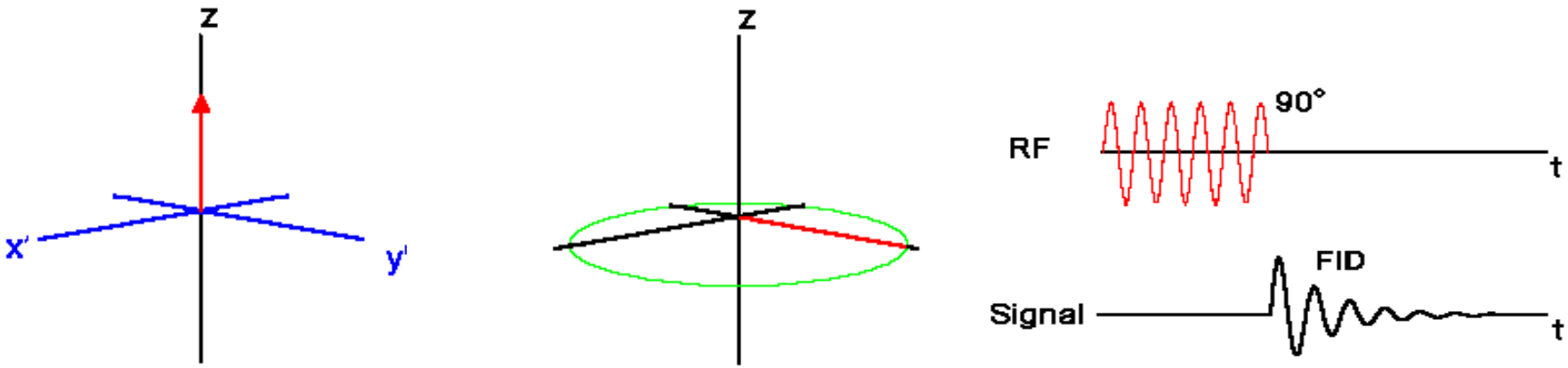
Per ruotare la magnetizzazione di un determinato angolo α (flip angle) la radiazione incidente dovrà agire per tempo t_p (durata dell'impulso).

Il segnale NMR

- Finito il periodo di eccitazione ottenuto attraverso B_1, la magnetizzazione tende a tornare nelle condizioni di equilibrio termico precedendo a frequenza ν_L.
- I meccanismi di rilassamento che tendono a ristabilire le condizioni di equilibrio del sistema di spin, provocano l'annullamento della componente trasversale di M
- La componente di M in moto nel piano XY induce una tensione nella stessa bobina precedentemente usata per trasmettere.

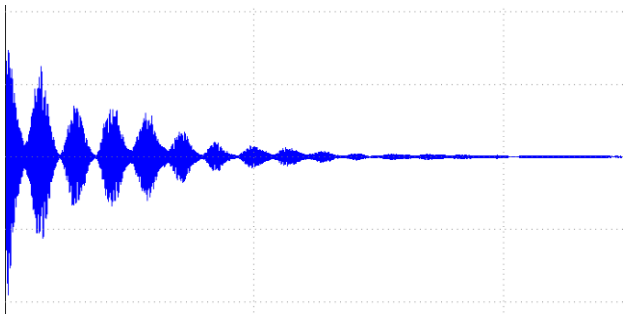
Il segnale NMR

- La tensione in uscita viene rilevata attraverso la catena di ricezione e costituisce il SEGNALE NMR NEL SISTEMA DI LABORATORIO (nel dominio del tempo).
- Il campionamento diretto (a diverse centinaia di MHz) risulta difficoltoso. Si usa quindi demodulare il segnale dalla frequenza portante SFO1, osservando il SEGNALE NMR NEL ROTATING FRAME, a frequenza ν_L - SFO1 → *Free Induction Decay* (FID)

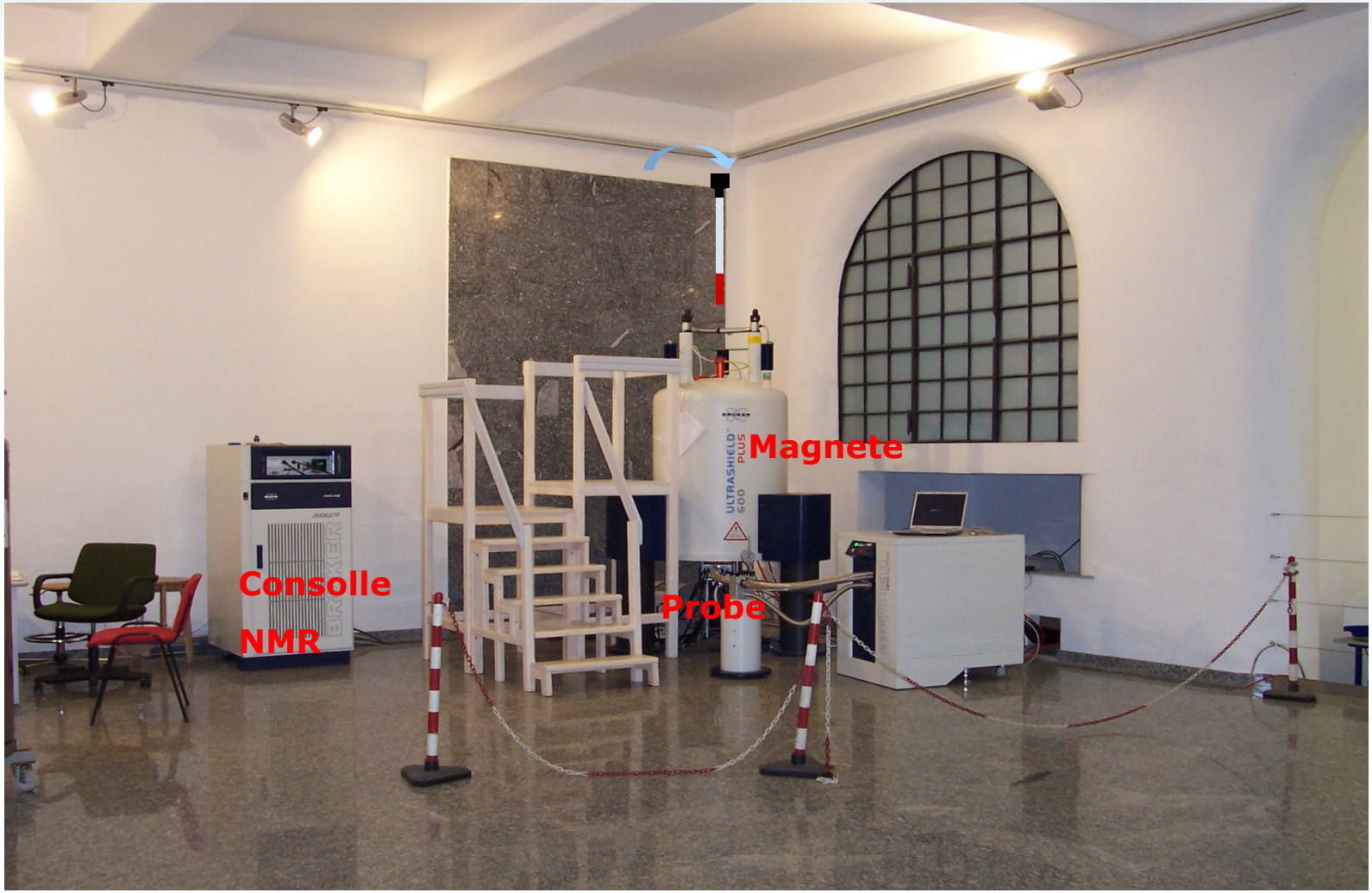


Il segnale NMR

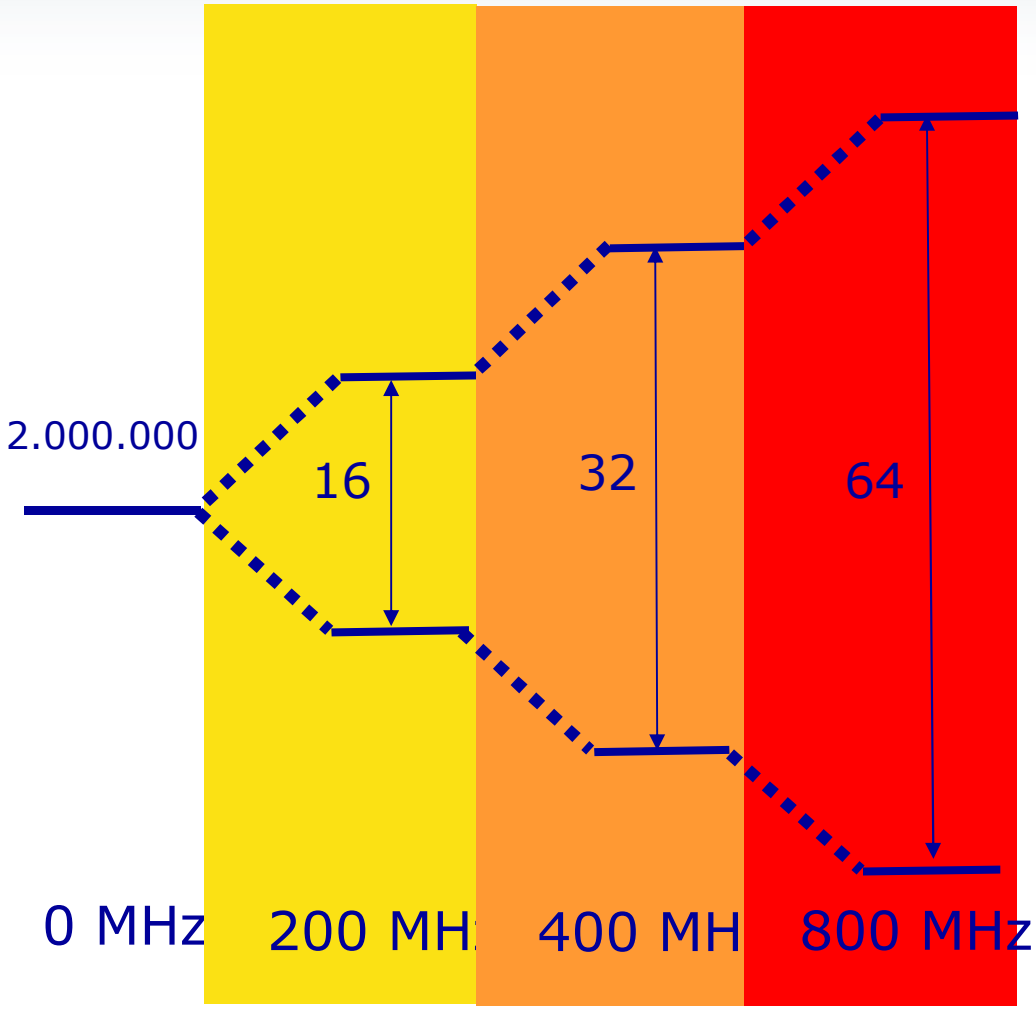
- Se si irraggia il sistema in risonanza (ν_L = SFO1), il FID risulta essere una funzione decrescente (tipo exp o gauss, senza oscillazioni) che si annulla con un tempo caratteristico T_2*.
- Se il sistema viene invece irraggiato fuori risonanza, il FID risulta una funzione decrescente e oscillante a frequenza ν_L - SFO1.
- Descritto così l'NMR altro on è che una bella curiosità accademica, ma fortunatamente un FID 'reale' appare così:

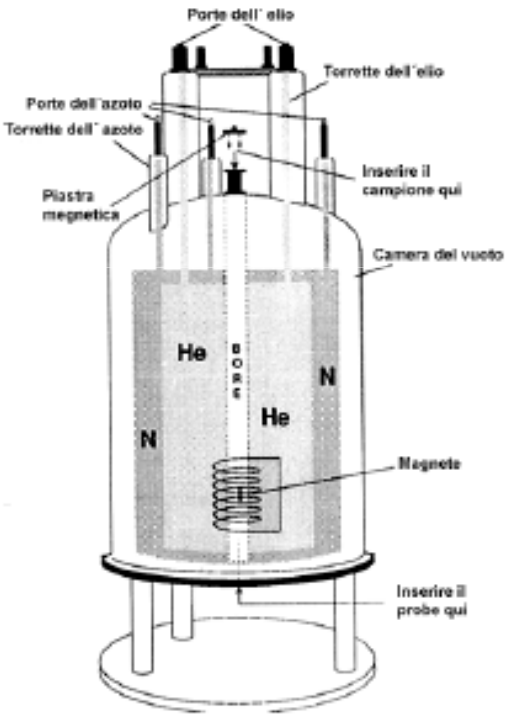


LABORATORIO NMR

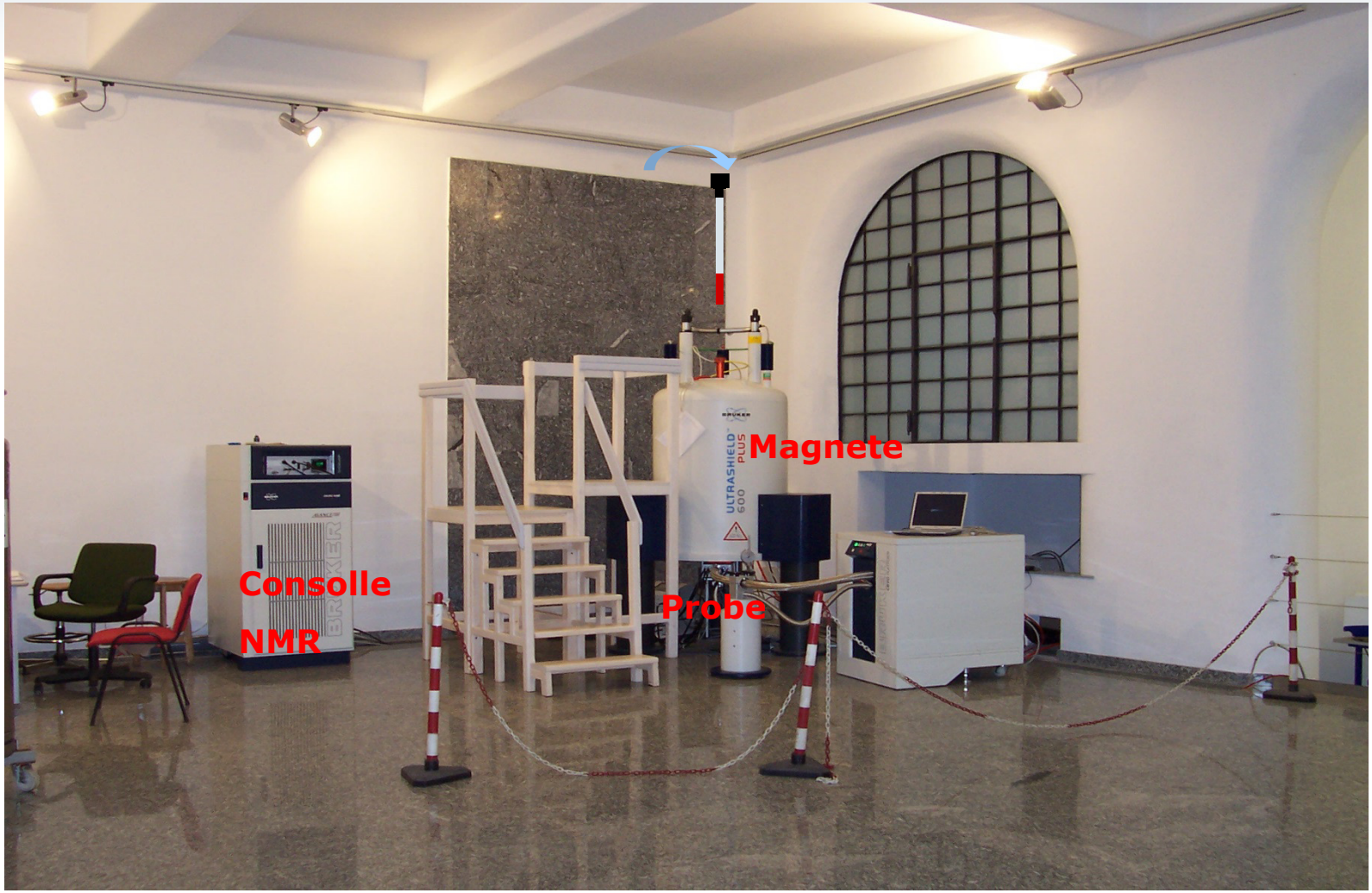


Intensità magnete e sensibilità

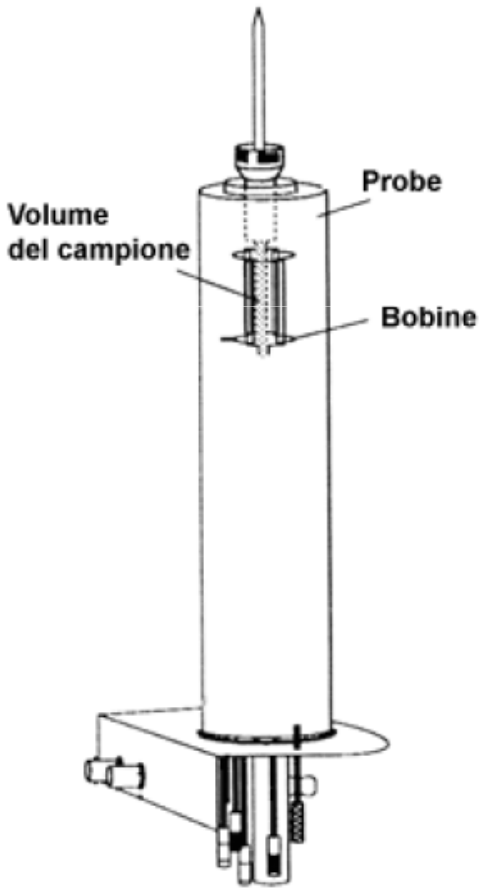




LABORATORIO NMR



PROBES



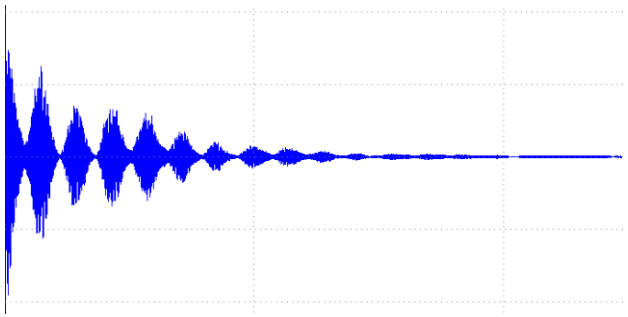
I probe sono disponibili in diversi tipi e configurazioni a seconda del:

- diametro del tubo
- numero e tipo di bobine: la bobina interna è posizionata il più possibile vicino al volume del campione al fine di massimizzarne la sensibilità.

Lo stesso cavo è usato sia per portare il segnale al probe che per riceverlo.

Il segnale NMR

- Se si irraggia il sistema in risonanza (ν_L = SFO1), il FID risulta essere una funzione decrescente (tipo exp o gauss, senza oscillazioni) che si annulla con un tempo caratteristico T_2*.
- Se il sistema viene invece irraggiato fuori risonanza, il FID risulta una funzione decrescente e oscillante a frequenza ν_L - SFO1.
- Descritto così l'NMR altro on è che una bella curiosità accademica, ma fortunatamente un FID 'reale' appare così:



Interazioni interne e shift di frequenza

A causa delle interazioni microscopiche il campo magnetico locale di cui risentono i singoli nuclei dipende dall'intorno chimico del nucleo: $\nu = (\gamma/2\pi)\cdot B_{eff} = (\gamma/2\pi)\cdot(B_0 + B_{LOC}) = \nu_L + \delta$.

Lo shift in frequenza contiene l'informazione chimico-fisica che rende la tecnica NMR un potente strumento per lo studio della struttura della materia.

Lo shift può essere espresso in frequenza o in unità relative (ppm).

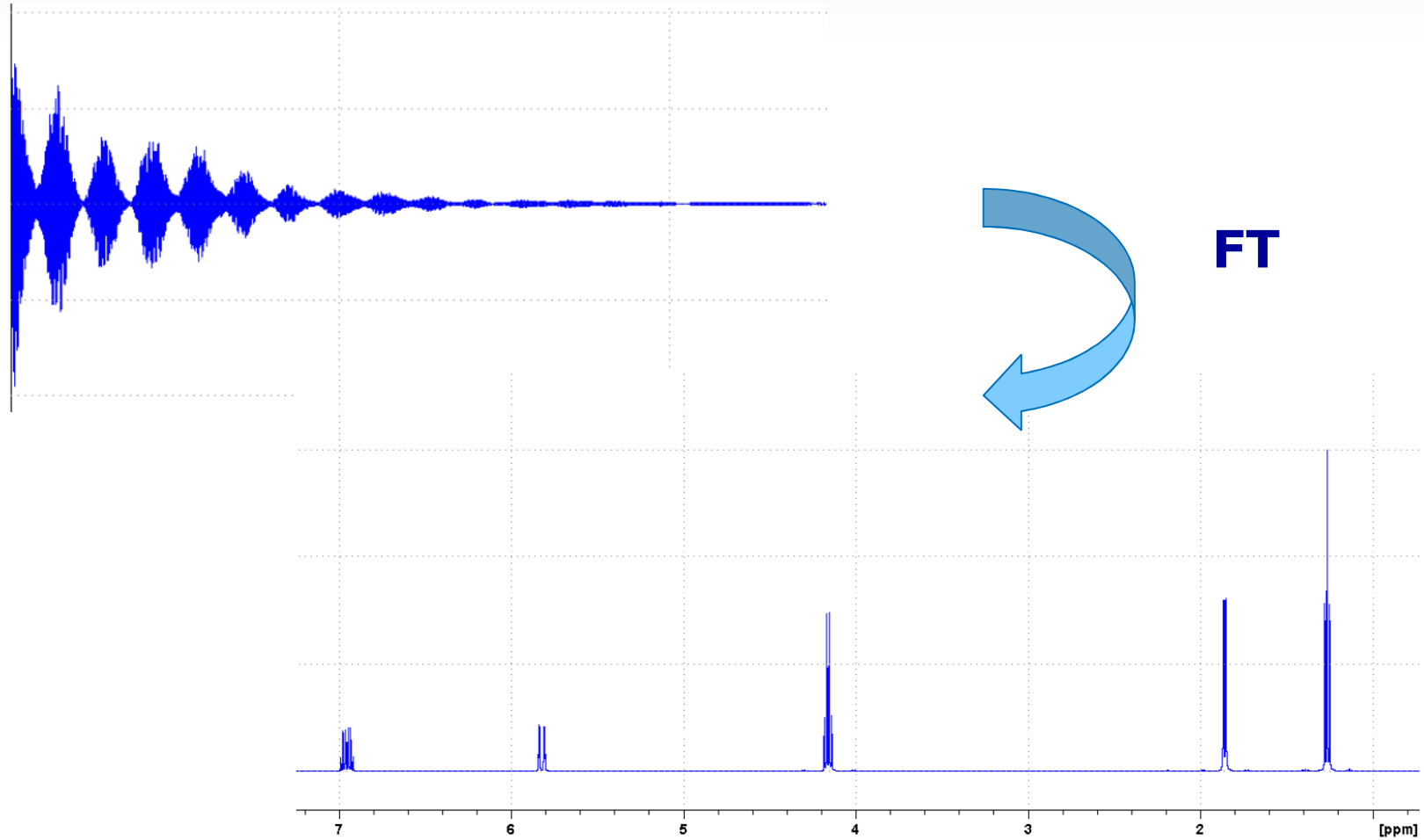
Questo shift, proprio perché dipende dall'intorno chimico, è definito <u>CHEMICAL SHIFT</u>.

Dal FID allo spettro: FT

Il FID misurato su un campione contenente diverse specie nucleari (nuclei con diverso intorno chimico) risulta quindi una sovrapposizione di andamenti sinusoidali smorzati.

La TRASFORMATA DI FOURIER permette di ricavare dal FID la distribuzione di frequenze di risonanza nel campione, cioè lo SPETTRO NMR: ogni segnale di precessione (sinusoide) osservato nel dominio del tempo è trasformato in una riga alla corrispondente frequenza del dominio (reciproco) delle frequenze.

Dal FID allo spettro: FT



Spettro ^1H: parametri e informazioni

Frequenze di risonanza (δ)

- Rispecchiano l'intorno chimico del nucleo in esame (protone aromatico, alifatico, vinilico, ecc.)

Numero di segnale e Integrali

- L'area di ogni segnale è proporzionale al numero di nuclei che generano il segnale

Costanti di accoppiamento (J)

- In alcuni casi sono indicativi del tipo di intorno chimico – es: un gruppo –CH- genera un tripletto o un quartetto se legato ad un $-CH_2-$ o $-CH_3$

Spettro ^{1}H: parametri e informazioni

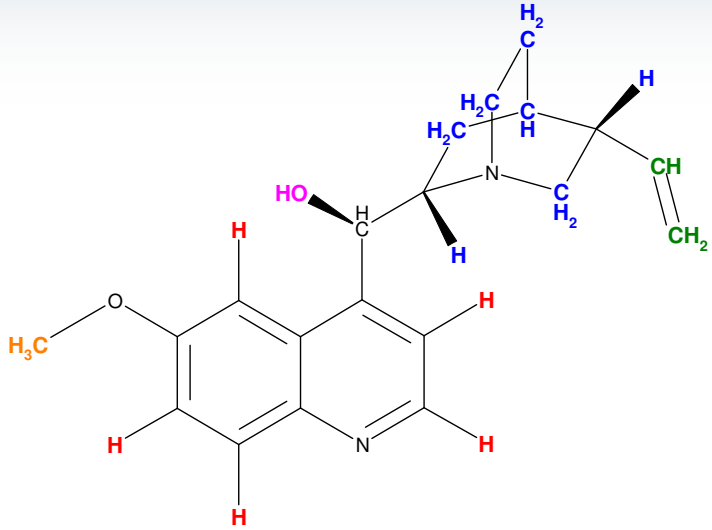
Frequenze di risonanza

La frequenza di risonanza di un nucleo dipende dal suo intorno chimico, ossia dall'insieme di atomi e gruppi di atomi che lo circondano.

Ogni nucleo risente quindi di uno specifico campo magnetico effettivo in funzione della sua posizione all'interno della molecola.

Nella maggior parte dei casi lo spettro ^{1}H ha un range di chemical shift che va da 0 a 15 ppm.

Al'interno della molecola di chinina possiamo individuare 5 tipi principali di atomi di idrogeno (e di carbonio). Questi segnali andranno cercati in regioni specifiche dello spettro.



Aromatici

Alifatici

Alcolici

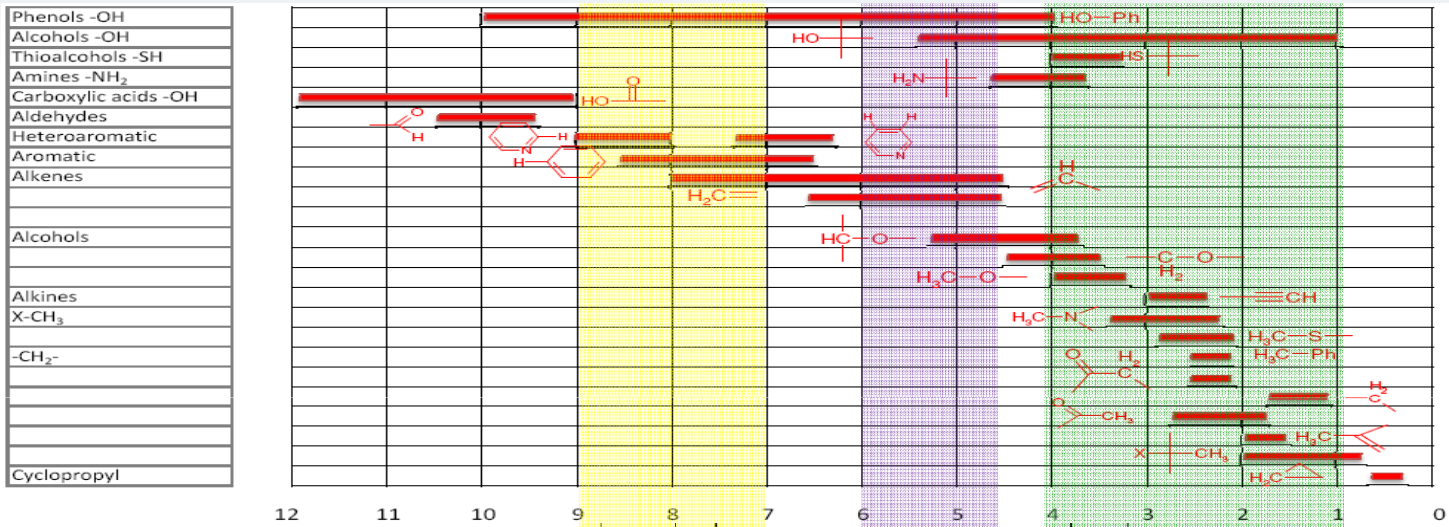
Vinilici

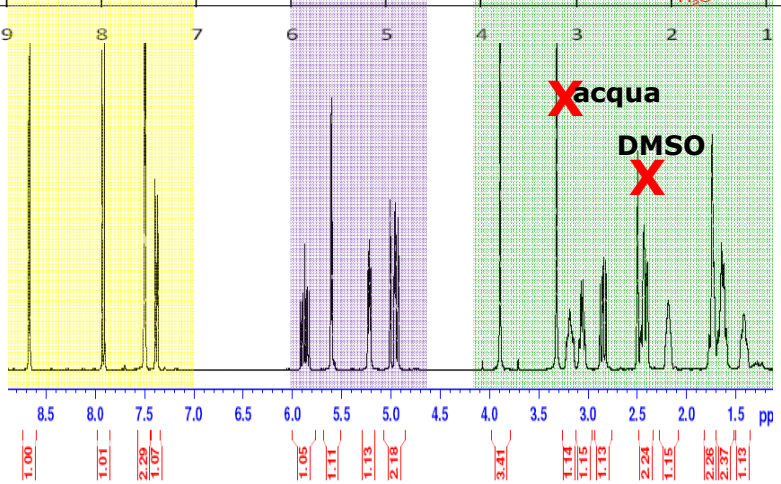
Metossilici

...

Spettro ^{1}H: parametri e informazioni

Frequenze di risonanza





In giallo la zona dei segnali aromatici tra 7 e 9 ppm.

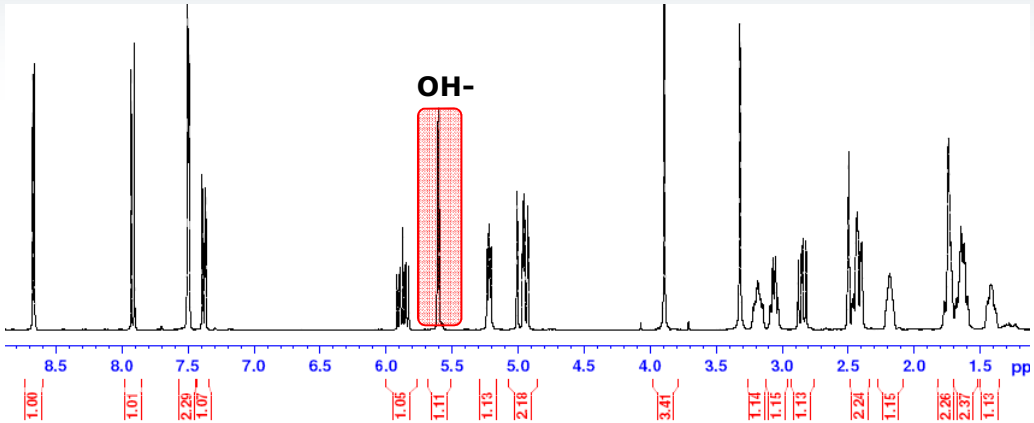
Al centro identifichiamo i segnali vinilici e –OH.

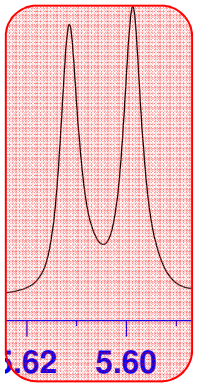
Nella parte destra dello spettro abbiamo i rimanenti segnali alcilici e metossilici.

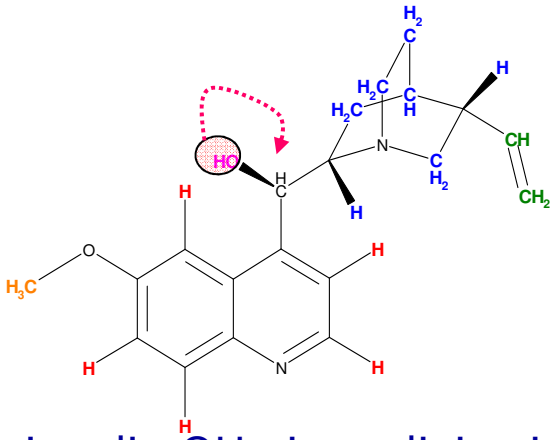
Spettro ^{1}H: parametri e informazioni

Molteplicità dei segnali

Il numero di righe (o componenti) di un segnale spettrale viene chiamato "molteplicità". Essa è dovuta all'interazione fra il nucleo in esame e gli altri nuclei magnetici ai quali è legato, ossia è dovuta all'interazione *scalare* fra i vari spin



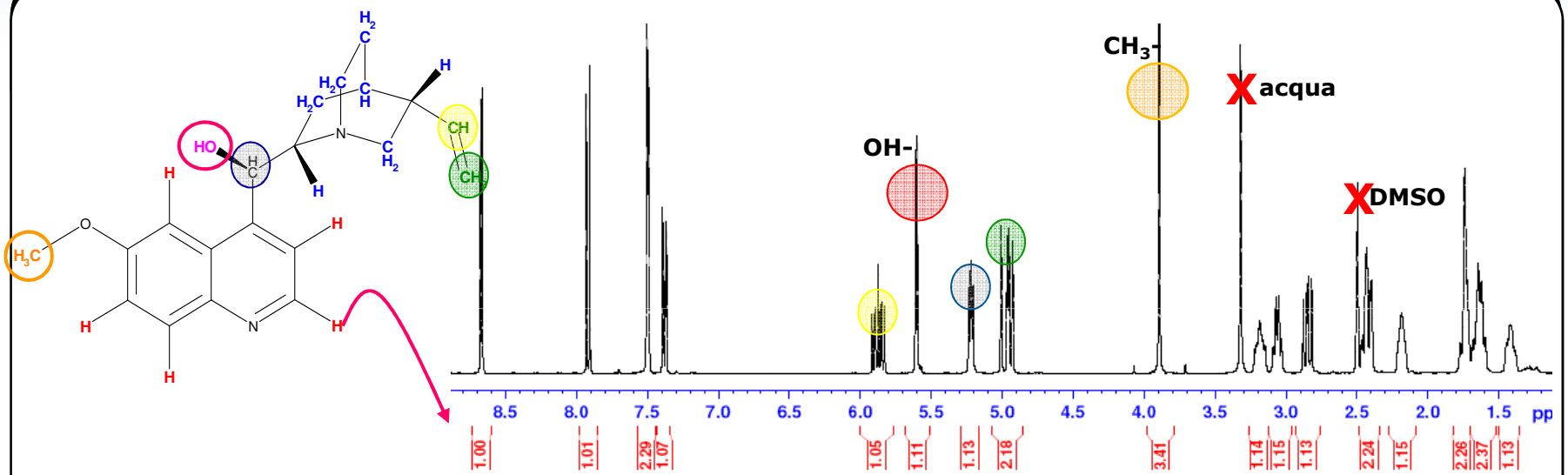




ESEMPIO: Il segnale protonico di –OH viene diviso in due componenti dall'accoppiamento con il protone del –CH.

Spettro ^{1}H: parametri e informazioni

Integrali

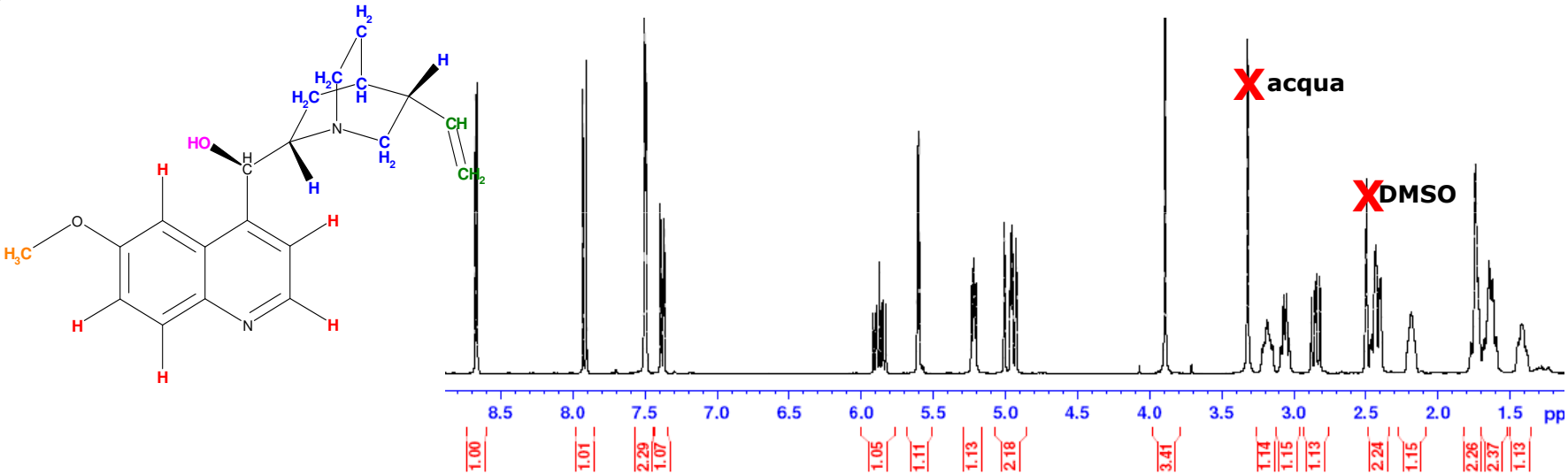


L'area sottesa al picco è direttamente proporzionale al numero di protoni che lo generano.

Assegnato un valore di riferimento ad un picco noto o di facile interpretazione; gli altri integrali verranno scalati.

Spettro ^{1}H: parametri e informazioni

Numero di segnali



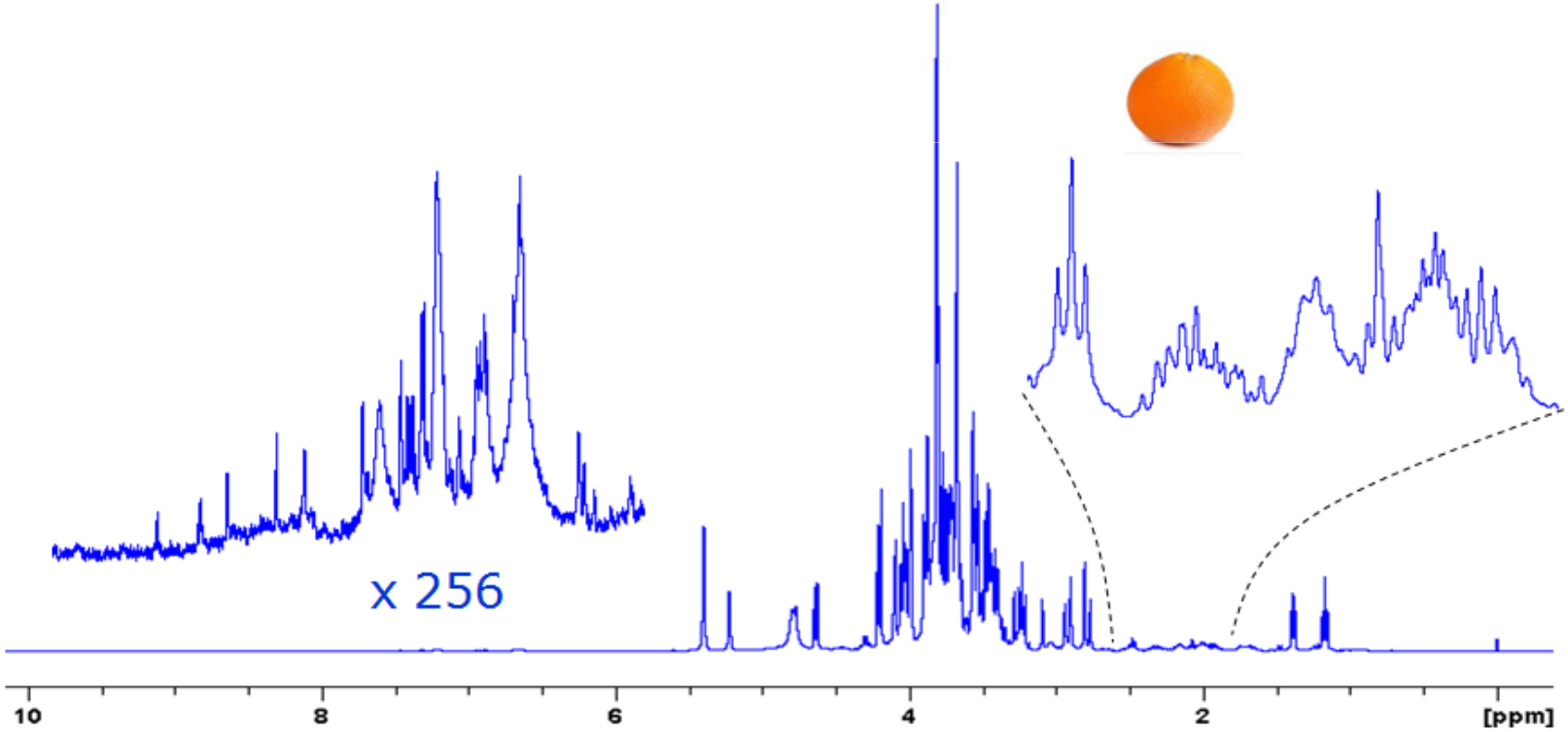
24 atomi H

OH	1
CH	10
CH_2	5
CH_3	1

La chinina contiene 24 atomi H contenuti in 17 gruppi risonanti.

QUANTE INFORMAZIONI IN UNO SPETTRO NMR !!!

La principale difficoltà nell'analisi di matrice agroalimentari è determinata dalla complessità stessa del campione che è una miscela di molte componenti in rapporti estremamente diverse tra loro.



BRUKER