

## Fag SIF4090 Molekylær biofysikk

### Lab.oppgave 3. Høsten 2000

Fil: D:\fag\MolBiofys\Lab\00\Mbl\_nmr.doc

**Sted: Kjemiblokk III, 1. eller 2. etasje:**  
**Mandag 23.10 kl 10:15** 1. etasje, rom 118  
**Tirsdag 24.10 kl. 8:15** 2. etasje, rom 2xx  
**Onsdag 25.10 kl. 9:15** 1. etasje, rom 118  
**Fredag 27.10 kl. 8:15** 1. etasje, rom 118

# NMR

## Advarsel!

Personer med Pacemaker har p.g.a det sterke magnetfeltet ikke adgang til NMR-laboratoriet. Personer med jern eller ferromagnetiske materialer operert inn i kroppen må ikke nærme seg magneten. Kort m/magnetstripe samt disketter bør holdes langt unna magneten. Legg fra deg nøkler, lommebok, klokke og walkman før du nærmer deg magneten.

Hvis noe magnetisk fester seg på magneten prøv **IKKE** å fjerne det selv. Kontakt den som er ansvarlig for instrumentet.

## Oppgavens formål:

- Bli kjent med oppbygningen av et MR-spektrometer med supraleidende magnet og en metode for opptak av et enkelt  $^1\text{H}$ -NMR-spekter.
- Det 1. ordens MR-spekter som fremkommer ved demonstrasjon, skal benyttes for å bestemme strukturformelen for et organisk molekyl.
- MR-spektre for noen enkle organiske molekyler skal utledes.



innebærer at halvverdbredden av linjene,  $(\Delta\omega)_{1/2}$ , reflekterer den effektive transversale relaksasjonstiden  $T_2^*$  i prøven:

$$(\Delta\omega)_{1/2} = 1/T_2^* .$$

Halverdbredden i resonanslinjene gir også informasjon om homogeniteten i det statiske magnetfeltet,  $B_0$ . En høy grad av homogenitet og stabilitet kreves for en magnet til spektroskopiske formål, siden resonanslinjenes bredde øker ved inhomogeniteter i magnetfeltet (FID-signalets envelope faller raskere). Dette kan forklares ved at den transversale defasingen av spinnene vil gå raskere i et inhomogent felt og  $T_2^*$  blir mindre:

$$1/T_2^* = 1/T_2 + \gamma\Delta B_0/2 ,$$

hvor  $T_2$  representerer spinn-spinn relaksasjon og  $\Delta B_0$  er variasjonen i  $B_0$  grunnet inhomogeniteter.

Det kan benyttes permanente, elektromagnetiske eller superledende magneter. Permanente magneter har høy inherent stabilitet, men er svært temperaturfølsomme og er dessuten begrenset oppad til ca. 2 tesla (ca. 90 MHz for  $^1\text{H}$ ). Elektromagneter er brukbare i området 1,8-2,3 tesla (80-100 MHz) og kan gi plass til større prøverør, som igjen gir bedre signal-støy forhold. Høye strømmer benyttes (ca. 50 A) og disse må stabiliseres skikkelig. I tillegg produserer strømmene mye varme og elektromagnetene må derfor vannavkjøles.

Superledende magneter (som benyttes ved denne demonstrasjonen) er utviklet for høye feltstyrker og store prøvevolum. En elektrisk strøm etableres i en spole med superledende materiale, f.eks niobium-titanium legering ved 4,2 K (kokepunktet for helium). Spolen har ingen elektrisk motstand og strømmen opprettholdes, dersom betingelsene for superledning opprettholdes. I praksis gjøres dette ved å etterfylle kryogener (helium, og nitrogen til kjøling av helium). Superledende magneter opptil ca. 14 Tesla benyttes i dag (ca. 600 MHz) til NMR spektroskopi. Homogeniteten i disse magnetfeltene kan forbedres ved bruk av "shimme"-spoler (av engelsk "svak flimring"). Dette er små elektriske spoler som er plassert rundt omkring proben. Ved å justere strømmen i "shimme"-spolene, kan korrigerende magnetfelter settes opp og homogeniteten i magneten forbedres.

Prøverøret spennes også med flere hundre omdreininger per minutt om den radielle akse, for å redusere effekten av gjenværende inhomogeniteter.

### 1.2 RF-generator

Et spektrometer som brukes til å måle forskjellige kjerner må kunne generere et spekter av frekvenser (100 MHz for  $^1\text{H}$ , men bare 10 MHz for  $^{15}\text{N}$  ved 2,3 tesla). Apparaturen må også generere de nødvendige frekvenser for låsing av spektrometeret (se under) og for eventuelle dobbelresonans eksperimenter (se under) som benyttes. Alle disse frekvensene blir vanligvis generert ved frekvens-syntese ved bruk av en enkelt kilde for å sikre frekvens- og fase-stabilitet.

Spektrometeret består også av forsterkere og porter som kontrollerer pulsingen og deteksjonen av signalet.

### 1.3 Probe og prøve

Proben er den følsomme delen av spektrometeret. Den sitter midt i magneten og har plass til blant annet prøven, RF-sendere og mottakere, samt den fasefølsomme detektoren. Prøven består vanligvis av omlag 1 ml løsning i et 15 cm glassrør med diameter ca. 5 mm. Bare en

viss del av prøven, rundt 5 mm av rørets lengde, sitter i detektorspolen, men det kreves et større prøvevolum, rundt 2 cm av rørets lengde, for å unngå kanteffekter.

Proben kan bestå av en enkelt spole eller en krysset spole. Med en enkelt spole sendes og mottas RF-strålingen i samme spole. En RF-brokopling benyttes til å skille absorpsjonssignalet fra eksitasjonspulsen. Med en krysset spole eksiteres prøven via den ene spolen, mens induert spenning i den andre spolen utgjør absorpsjonssignalet.

#### 1.4 Felt/Frekvens lås

For å minimalisere effekten av fluktasjoner i det statiske magnetfeltet, låses feltet til RF-frekvensen ved hjelp av servokontroller. NMR-signalet er et vekselstrøms-signal som består av to komponenter med 90 graders faseforskjell. Ved å benytte en fasefølsom detektor kan den ene komponenten brukes som detektert signal, mens den andre komponenten samtidig benyttes til felt/frekvens låsing.

Låsingen kan være intern eller ekstern, det vil si at enten låses systemet ved hjelp av en kjerne i prøven (f.eks. deuterium i løsningsmiddelet) eller ved hjelp av en ekstern prøve utenfor selve prøven (f.eks. tetrametylsilane, TMS). Referansekjernen bestråles kontinuerlig med sin resonansfrekvens gjennom eksperimentet. Dersom feltet forandrer seg, endres resonansfrekvensen til referansekjernen og et signal kan sendes til "shimme"-spolene helt til den opprinnelige resonans gjenopprettes.

#### 1.5 Datamaskinen

Signalet fra detektoren digitaliseres via en A/D-krets og lagres i datamaskinen. Deretter kan maskinen midle data fra suksessive FID-signaler og utføre Fouriertransformasjonen som trengs for å synliggjøre NMR-spekteret for oss. Software i datamaskinen styrer elektronikken rundt magneten og gir i tillegg mange muligheter for behandling av rådata fra eksperimentene.

## 2. Teori

### 2.1 Kjemisk skift

Bruken av NMR i strukturanalyse er basert på det faktum at resonansfrekvensen til kjerner av en bestemt isotop varierer, avhengig av kjernes kjemiske omgivelser. Dette skyldes den magnetiske skjermingen hver kjerne oppnår fra elektronene i atomet og som fører til at hver kjerne i virkeligheten føler et magnetisk felt som er mindre enn det påtrykte feltet  $B_0$ . Det effektive magnetiske feltet ved en kjerne,  $B_{kjerne}$  er:

$$B_{kjerne} = B_0(1 - \sigma),$$

der  $\sigma$  er skjermingskonstanten. Verdien av  $\sigma$  for en kjerne blir vanligvis ikke gitt absolutt, men skjermingen er snarere uttrykt som et kjemisk skift  $\delta$  i forhold til en referanse:

$$\delta = \frac{\nu_P - \nu_R}{\nu_R} \cdot 10^6 \text{ ppm (parts per million),}$$

hvor  $\nu_P$  og  $\nu_R$  er resonansfrekvensen til henholdsvis prøven og referansen. Jo **svakere** skjerming av protoner i prøven, jo **høyere** resonansfrekvens  $\nu_P$  og dermed **høyere** kjemisk skift  $\delta$ . Vanlig brukt referanse for  $^1\text{H}$  er tetrametylsilane (TMS,  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ). TMS inneholder 12 protoner som er kjemisk skift ekvivalente og relativt godt skjermede. Protoner i de fleste prøver har svakere skjerming, dermed  $\nu_P > \nu_R$  og  $\delta > 0$ . Typiske verdier er  $\delta = 1-10$  ppm.

## 2.2 Spinn-spinn kopling

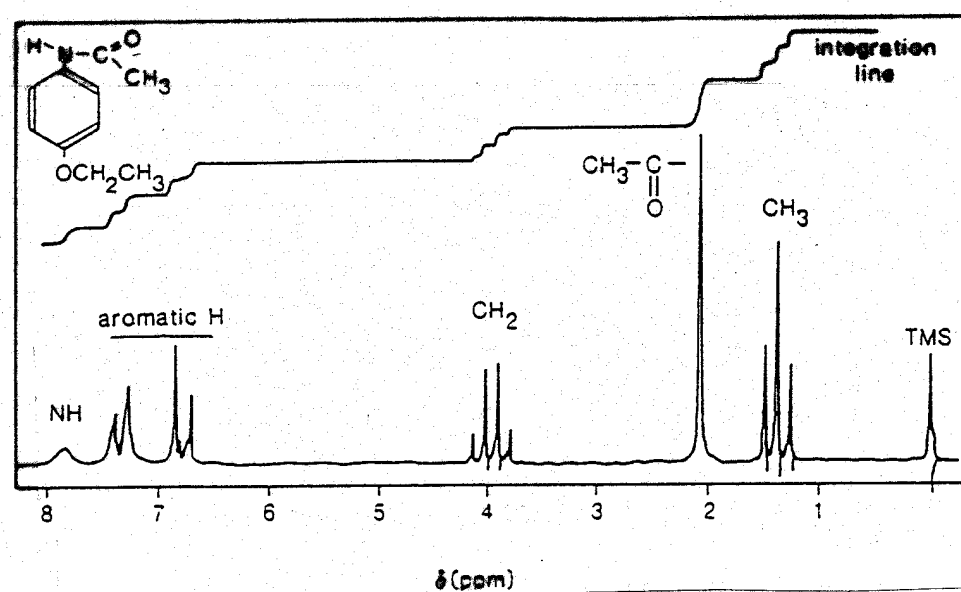
Kjerner kan vekselvirke med hverandre og forårsake gjensidig splitting av de ellers skarpe resonanslinjene i NMR-spekteret, til multiplerter. Dette skyldes såkalt *spinn-spinn kopling*. Multiplottene oppstår når de magnetiske momentene til kjernene påvirker hverandre gjennom vekselvirkning med bindingselektronene i molekylet.

Styrken i koplingen,  $J$  (Hz) er gitt av avstanden mellom toppene i multiplottene og er uavhengig av feltstyrke (i motsetning til det kjemiske skiftet i Hz). Når  $B_0$  øker vil derfor multiplottene flyttes lengre fra hverandre i Hz-spekteret, mens avstanden mellom toppene i multiplotten forblir konstant. Når  $J$  blir mye mindre enn forskjellen i resonansfrekvens for nabomultiplottene (grovt sett  $J/\Delta\omega < 0,1$ ) kalles spekteret et *1. ordens spekter*. Proton-proton koplinger virker hovedsakelig over to til tre bindinger, men svake koplinger kan virke over flere. Spinn-spinn kopling avhenger også av molekylgeometri, eksempelvis dihedral vinkel.

Kombinasjon av kjemiske skift data og spinn-spinn splittingsmønstre utgjør basis for tilordning av signaler i NMR-spektroskopien.

## 2.3 Integrasjon

Arealet under en gitt absorpsjonstopp er proporsjonalt med antallet kjerner med resonansfrekvenser i toppen. Kommersielle NMR-spektrometre har innebygd en elektronisk integrator og kan tegne en linje over spekteret, hvor arealet under en absorpsjonstopp er proporsjonalt med det vertikale skrittet linjen gjør ved hver topp (se figur 2). Denne integrasjonen er verdifull under tolkningen av spektra og muliggjør også kvantitativ analyse av blandinger med NMR.



Figur 2. Integrasjon i et NMR-spekter.

#### 2.4 Teknikker for å tydeliggjøre NMR-spektra

Etter å ha studert kjemiske skift, spinn-spinn splittingsmønstre, koplingskonstanter og integrasjon, er det ofte nødvendig å benytte flere andre teknikker for å identifisere ukjente stoffer med komplekse spektra. Det er gitt en kort beskrivelse av disse nedenfor.

##### 2.4.1 Opptak av spektrum ved høyere magnetisk feltstyrke

Resonansfrekvensen til en kjerne er proporsjonal med den påtrykte feltstyrke og et sterkere statisk magnetfelt vil forsterke forskjellen i resonansfrekvens mellom ulike multipletter, uten å påvirke spinn-spinn koplingskonstantene. Detaljer i spekteret fremheves derfor ved høyere feltstyrke.

##### 2.4.2 $D_2O$ i prøven

Vann utveksler raskt kjerner med funksjonelle grupper med labile protoner, slik som -OH, -NH og -COOH.  $D_2O$  vil derfor gi kollaps av signaler (f.eks. splittings i spekteret) forårsaket av disse gruppene i et annet løsningsmiddel.

##### 2.4.3 Dobbelresonans eksperimenter

Denne klassen av eksperimenter involverer bestråling av prøven med et sekundært RF-felt. Flere typer dobbelresonans eksperimenter kan utføres for å forenkle et spektrum, avgjøre hvilke kjerner som kopler eller for økt sensitivitet i målingen. Eksempler på slike teknikker er: Spinndekopling, Internukleær dobbelresonans (INDOR) og Kjerne Overhauser Effekt (NOE).

##### 2.4.4 Kjemisk skift reagenser

Paramagnetiske ioner kan endre det kjemiske skift for protoner i nærheten av bindingsstedet for ionet. Signaler i NMR-spekteret som ikke er adskilt kan, ved bruk av slike kjemisk skift reagenser, adskilles ved at de ulike kjernene gis ulikt kjemisk skift. Eksempler på slike ioner er lantan og europium.

##### 2.4.5 Todimensjonale NMR-spektra

Ved å detektere FID-signalene fra suksessive pulser, der tiden mellom hver puls varierer, kan en separere spinn-spinn-koplingsinformasjon fra kjemiske skift data. Denne informasjonen presenteres i et todimesjonalt diagram. En rekke ulike eksperimenter kan utføres, avhengig av antall pulser, effekten i pulsen og samtidig frekvens, amplitude, fase og tidsintervaller i pulsen.

### 3. Demonstrasjon

Vi skal gjennomgå forberedelse og opptak av MR-spekteret for det organiske molekylet *ethylbenzene* løst i kloroform  $CDCl_3$  med TMS som referanse.

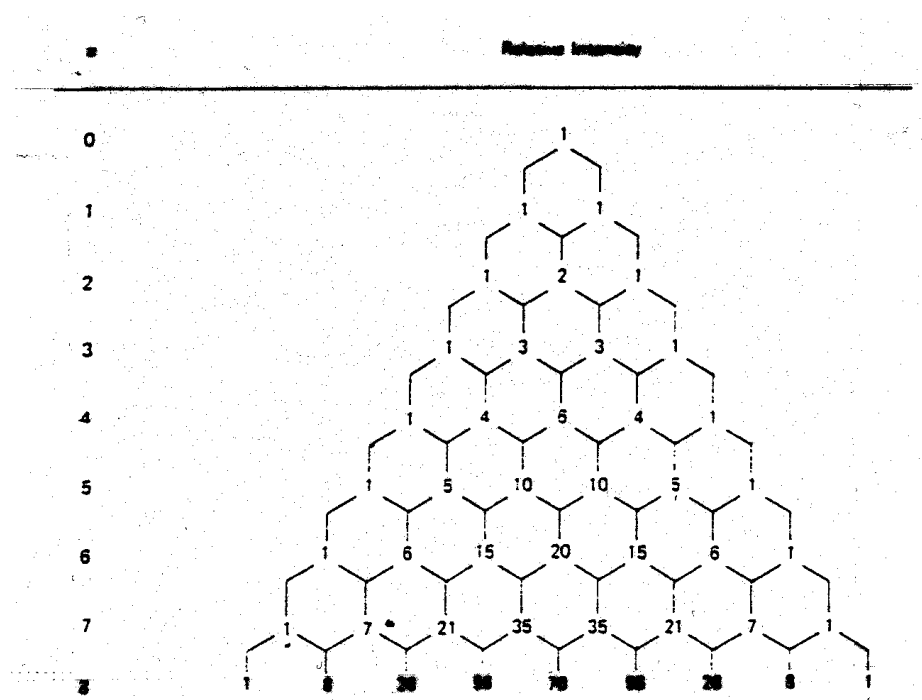
## 4. Oppgaver

- a) Hvorfor og hvordan *shimmer* vi spektroskopet før bruk? Hvordan kan effekten av *shimming* måles?
- b) Hvorfor benyttes flytende helium rundt magneten? Hva med nitrogen? Hva skjer dersom vi ikke etterfyller nitrogen og helium?
- c) Enkle MR-spektra som fremkommer ved kopling mellom protoner med svært forskjellig kjemisk skift, kalles 1. ordens spektra. Disse kan vanligvis analyseres ved å bruke to regler:

1. Splittingen av et protons absorpsjon skyldes vekselvirkning med naboprotoner og multiplisiteten av splittingen er bestemt av antallet naboprotoner. Ett naboproton forårsaker en dublett, to ekvivalente naboprotoner en triplett o.s.v. Generelt, for alle kjerner, vil vil multiplisiteten følge formelen  $2nI + 1$ , der  $n$  er antall ekvivalente nabokjerner med spinnkvantetall  $I$ .

2. Den relative intensiteten av absorpsjonstoppene avhenger også av  $n$ . Dubletter har intensitetsforhold 1:1, triplerter 1:2:1 o.s.v. Generelt er intensitetsforholdet beskrevet av formelen  $(a+b)^n$ , der hvert ledds koeffisienter gir den relative intensiteten.

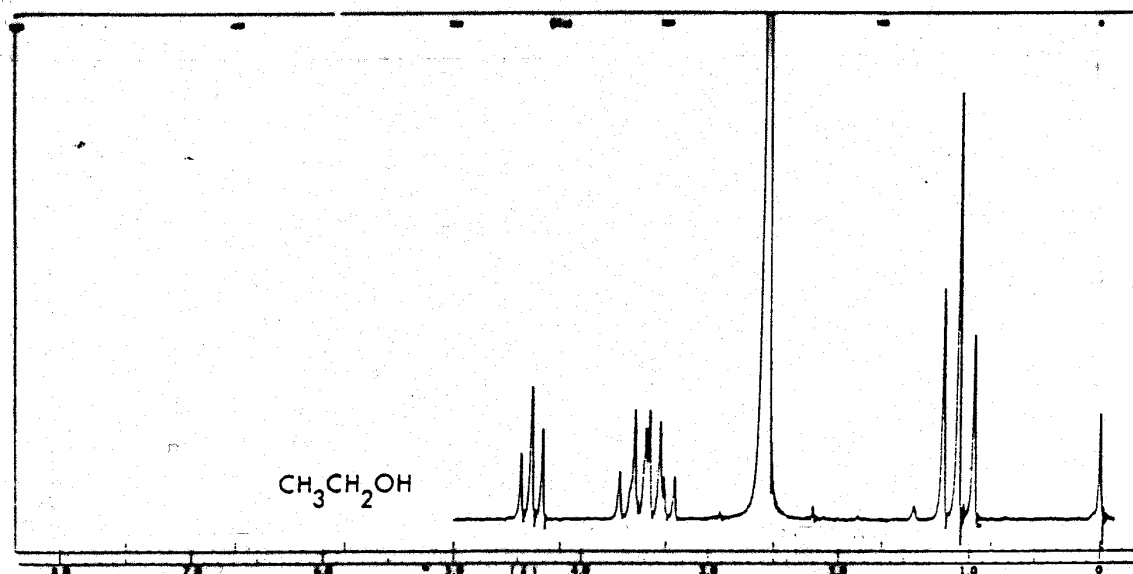
Multiplisiteten og de relative intensiteter fås enkelt fra Pascals triangel (figur 3), hvor  $n$  er antallet ekvivalent koplede protoner.



**Figur 3.** Pascals triangel. Relativ intensitet i første ordens multiplerter.

Sett opp strukturformelen for molekylet i prøven ved demonstrasjonen. Studer spekteret som ble skrevet ut og identifiser hver av gruppene i molekylet. Hvordan ville spekteret ha forandret seg, dersom vi brukte et spektrometer med sterkere magnetisk feltstyrke?

d) Et NMR-spekter og molekylformelen for etanol er vist i figur 4.



**Figur 4.** Molekylformel og NMR-spekter for etanol i løsningsmiddelet DMSO ved 60 MHz. Absorpsjon ved ca. 2,6 ppm skyldes løsningsmiddelet DMSO.

Tilordne toppene i spekteret til gruppene i molekylet. Hvorfor har metyléngruppen større kjemisk skift enn metylgruppen?

Dersom vi fortynner etanolløsningen med et upolart løsningsmiddel og akvirerer et nytt spekter, vil hydroksyltoppen forflytte seg til høyre i spekteret. Hvis vi senker temperaturen i prøven vil den samme toppen forflytte seg mot venstre i spekteret. Hva er årsaken til dette?

e) Dersom vi substituerer hydroksylgruppene i etanol med kloratomer, vil spekteret endres. Skisser spekteret for ethylklorid, gitt  $\delta_{\text{metylén}} \sim 3,6$  ppm og  $\delta_{\text{metyl}} \sim 1,5$  ppm.

Hvordan ville spekteret endret seg hvis vi istedet substituerer hydroksylgruppene i etanol med fluoratomer? Hva om vi satte jodatomer i hydroksylposisjonene? Hvordan forklarer du fysisk sett endringene i spekteret fra ethylklorid til ethylfluorid og ethyljodid?

f)<sup>+</sup> Hvordan ville NMR-spekteret for etanol blitt med vann som løsningsmiddel istedet for DMSO?

## 5. Rapport

Skriv en rapport fra hver gruppe med svar på oppgavene.

<sup>+</sup> Dagens nøtt.