

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ



Ο Richard R. Ernst (1933 -) τιμήθηκε το 1991 με βραβείο Νόμπελ για τη συνεισφορά του στην πρόοδο της φασματοσκοπίας NMR (Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων). Αυτή η πρόοδος άνοιξε το δρόμο στην άμεση παρατήρηση της δράσης της φαρμακευτικής αγωγής στον ανθρώπινο οργανισμό.

6.1. Απλοποίηση Πολύπλοκων Φασμάτων

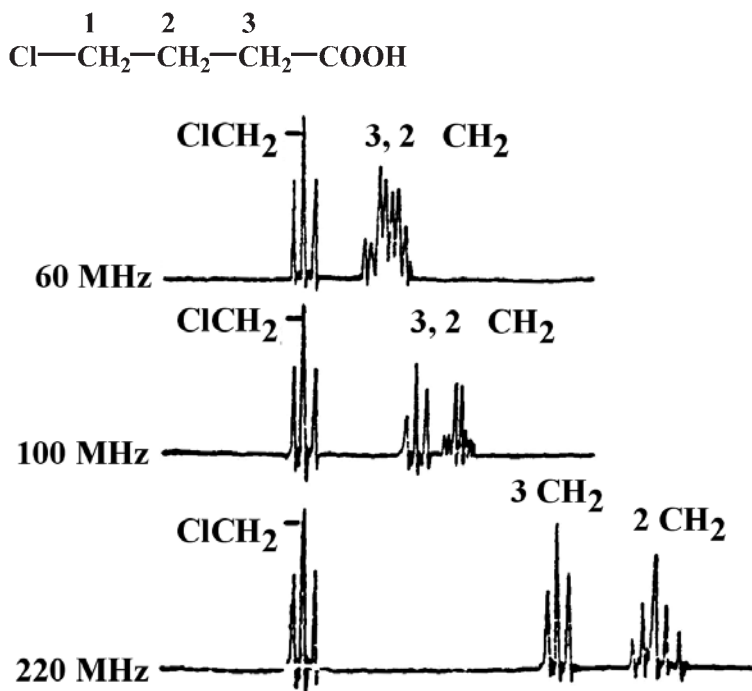
Αν ένα πολύπλοκο φάσμα δεύτερης τάξης ληφθεί σε φασματογράφο που φέρει μαγνητικό πεδίο μικρής ισχύος, τότε είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί μία σειρά τεχνικών ώστε αυτό να απλοποιηθεί και να ληφθούν ακριβή στοιχεία τόσο για τη θέση και για τη μορφή μιας απορρόφησης, όσο και για το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης των διάφορων πρωτονίων. Η απλοποίηση πετυχαίνεται κυρίως με:

- α) αύξηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου,
- β) διπλό συντονισμό ή αποσύζευξη των σπιν,
- γ) ανταλλαγή με δευτεριωμένο νερό,
- δ) χρησιμοποίηση παραμαγνητικών συμπλοκών,
- ε) ετεροπυρηνική φασματοσκοπία και
- στ) φασματοσκοπία δύο ή περισσότερων διαστάσεων

Χρήση NMR οργάνου με αυξημένη ισχύ πεδίου: Έχει ήδη αναφερθεί ότι φάσματα πρώτης τάξης λαμβάνονται, όταν $\Delta\nu/J > 6\text{Hz}$. Έχει λεχθεί επίσης ότι η χημική μετατόπιση εκφρασμένη σε Hz ή ppm είναι συνάρτηση της έντασης του πεδίου και ότι η σταθερά σύζευξης J που μετρείται σε Hz είναι ανεξάρτητη από αυτό. Επομένως, ο λόγος $\Delta\nu/J$ αυξάνεται, καθώς η ισχύς του πεδίου αυξάνεται. Δεδομένου δε ότι ο λόγος $\Delta\nu/J$ είναι καθοριστικός για το αν θα έχουμε φάσμα πρώτης ή δεύτερης τάξης, μπορούμε με απλή αύξηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου να διαχωρίσουμε δυο καμπύλες απορρόφησης οι οποίες, σε ένα φασματογράφο, στο οποίο εφαρμόζεται μικρής έντασης στατικό μαγνητικό πεδίο, επικαλύπτονται. Έτσι, με αύξηση της έντασης του πεδίου πετυχαίνουμε την αύξηση της απόστασης $\Delta\nu$ σε σχέση με τη σταθερά σύζευξης J, η οποία παραμένει η ίδια. Με συνεχή αύξηση της έντασης του πεδίου, μπορούμε να πετύχουμε μετατροπή ενός φάσματος δεύτερης τάξης σε φάσμα πρώτης τάξης.

Αυτό γίνεται αντιληπτό στην περίπτωση του 4-χλωροβουτυρικού οξέος, το φάσμα NMR του οποίου έχει ληφθεί σε φασματογράφους των 60MHz, 100 MHz και 220MHz. Στο φασματογράφο των 60 MHz η απορρόφηση της κεντρικής μεθυλενομάδας $-\text{CH}_2$ όπως και η απορρόφηση της μεθυλενομάδας κοντά στη καρβοξυλομάδα επικαλύπτονται, έτσι ώστε να έχουμε ένα φάσμα δεύτερης τάξης. Στο φασματογράφο των 100 MHz οι

παραπάνω απορροφήσεις έχουν αρχίσει να διαχωρίζονται, ενώ σε φασματογράφο των 220 MHz ήδη έχουν διαχωριστεί και το φάσμα είναι πρώτης τάξης. Μετά τον διαχωρισμό των δύο απορροφήσεων παρουσιάζεται μια πενταπλή κορυφή για τα $-CH_2$ πρωτόνια της κεντρικής μεθυλομάδας. Το απλοποιημένο φάσμα μπορεί να θεωρηθεί τώρα ότι είναι του τύπου $A_2M_2X_2$ (σχ. 6.1.1).



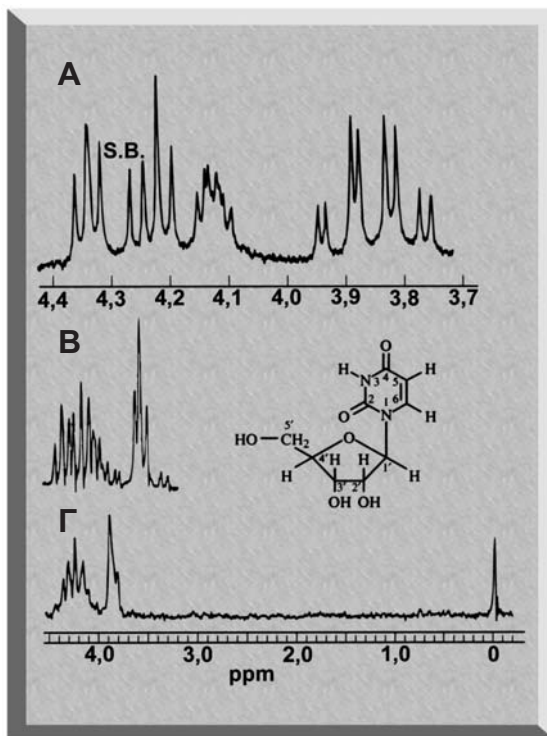
Σχήμα 6.1.1. 1H NMR φάσματα του 4-χλωροβουτυρικού οξέος που έχουν ληφθεί από φασματογράφο των 60 MHz (άνω), 100 MHz (μεσαίο) και 220 MHz (κάτω).

Η τεχνική απλοποίησης ενός φάσματος βρίσκει ευρεία εφαρμογή στις μέρες μας, λόγω της χρήσεως φασματογράφων ευρείας κλίμακας έντασης μαγνητικών πεδίων 200-900 MHz.

Παράδειγμα 6.1.1.

Δίνονται τρία NMR φάσματα πρωτονίου ουριδίνης (περιοχή συντονισμού 3.7-4.4 ppm) τα οποία έχουν ληφθεί σε τρεις φασματογράφους:

A (άνω φάσμα), B (μεσαίο φάσμα) και Γ (κάτω φάσμα), που διαθέτουν διαφορετικής έντασης υπεραγωγίσιμους μαγνήτες. Μπορείτε να αποφανθείτε ποιος από τους τρεις έχει τη μεγαλύτερη ισχύ και ποιος τη μικρότερη; Να δικαιολογήσετε την απάντησή σας.

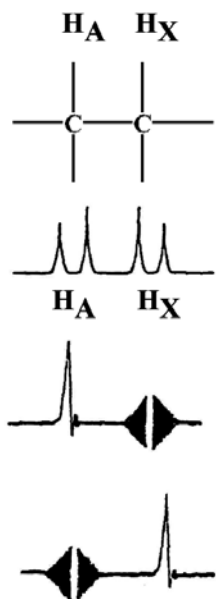


Σχήμα 6.1.2. NMR φάσματα πρωτονίου ουριδίνης τα οποία έχουν ληφθεί σε τρεις φασματογράφους οι οποίοι διαθέτουν υπεραγωγίσιμους μαγνήτες διαφορετικής έντασης μαγνητικού πεδίου.

Αποσύζευξη των σπιν ή διπλός συντονισμός: Η πολλαπλότητα μιας απορρόφησης είναι αποτέλεσμα της σύζευξης των σπιν γειτονικών πρωτονίων. Έτσι, στο σύστημα $\text{CH}_A - \text{H}_X\text{C}$ η απορρόφηση του πρωτονίου H_A εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή, γιατί το γειτονικό πρωτόνιο H_X έχει δύο προσανατολισμούς σπιν. Ομοίως, η απορρόφηση του πρωτονίου H_X εμφανίζει μια διπλή κορυφή (Σχ. 6.1.3).

Αν το σύστημα αυτό ακτινοβοληθεί με τη συχνότητα συντονισμού του πρωτονίου H_X , τότε θα προκληθεί τέτοια διέγερση ώστε αυτό να βρεθεί

σε μία κατάσταση συνεχούς και πολύ γρήγορης μεταβίβασης μεταξύ των δύο προσανατολισμών σπιν του H_X . Η διέγερση, που προκαλείται έχει ως συνέπεια ο μέσος χρόνος ζωής του ακτινοβολούμενου πρωτονίου στις δύο ενεργειακές καταστάσεις να είναι μηδανινός. Έτσι, το πρωτόνιο H_A αδυνατεί να διακρίνει το πρωτόνιο H_X ξεχωριστά στις δύο καταστάσεις, αλλά βλέπει μόνο μία ενεργειακή κατάσταση του H_X , με αποτέλεσμα η απορρόφηση του H_A να εμφανίζεται ως μία απλή και όχι ως διπλή κορυφή (κορεσμός). Κατά συνέπεια, το πρωτόνιο A θα συντονισθεί σε μία συχνότητα. Κατά τον ίδιο τρόπο, αν ακτινοβοληθεί το σύστημα των δύο πρωτονίων με τη συχνότητα συντονισμού του H_A , τότε το πρωτόνιο H_X θα διακρίνει μια μόνο ενεργειακή κατάσταση του H_A και έτσι η απορρόφηση αυτού θα έχει τη μορφή απλής κορυφής.

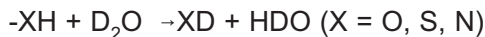


Σχήμα 6.1.3. Εφαρμογή διπλού συντονισμού σε AX σύστημα. Οι διπλές κορυφές του H_A και H_X μετατρέπονται σε απλές.

Για να εφαρμοσθεί αυτό το είδος της τεχνικής, απαιτείται, εκτός της βασικής πηγής ραδιοσυχνοτήτων με την οποία είναι εφοδιασμένο κάθε NMR όργανο, μία δεύτερη πηγή ραδιοσυχνότητας (double irradiation), με την οποία θα γίνει η ακτινοβολήση του πρωτονίου H_A ή H_X . Δεδομένου ότι γίνεται ταυτόχρονη χρήση δύο πηγών ραδιοσυχνοτήτων, αυτή η τεχνική λέγεται διπλός συντονισμός (double resonance) ή διπλή ακτινοβολήση. Άλλος τρόπος έκφρασης αυτής της τεχνικής είναι ο όρος

αποσύζευξη των σπιν (spin decoupling) και αυτό, γιατί κατά την στιγμή της ακτινοβολίας των πυρηνικών σπιν, αυτά δεν συζευγνύονται με τα γειτονικά πρωτόνια. Αυτή η τεχνική απλοποίησης είναι επιτυχής μόνο, αν οι δύο απορροφήσεις των συζευγνυομένων πρωτονίων βρίσκονται τουλάχιστον σε μία απόσταση 20 Hz μεταξύ τους.

Ισοτοπική ανταλλαγή (δευτερίωση): Οι δύο τεχνικές απλοποίησης ενός πολύπλοκου φάσματος, οι οποίες ήδη αναφέρθηκαν, δηλαδή η χρήση υψηλού πεδίου και ο διπλός συντονισμός έχουν περιορισμένη εφαρμογή σε σύγκριση με τη μέθοδο της δευτερίωσης. Κατά τη μέθοδο αυτή η προσθήκη δευτεριωμένου νερού, D_2O , σε διάλυμα οργανικών μορίων έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των υδρογόνων των συνδεδεμένων με ετεροάτομο από το δευτέριο. Τα υδρογόνα, που είναι χαλαρότερα συνδεδεμένα με ετεροάτομο ανταλλάσσονται εύκολα από το δευτέριο (exchangeable protons).

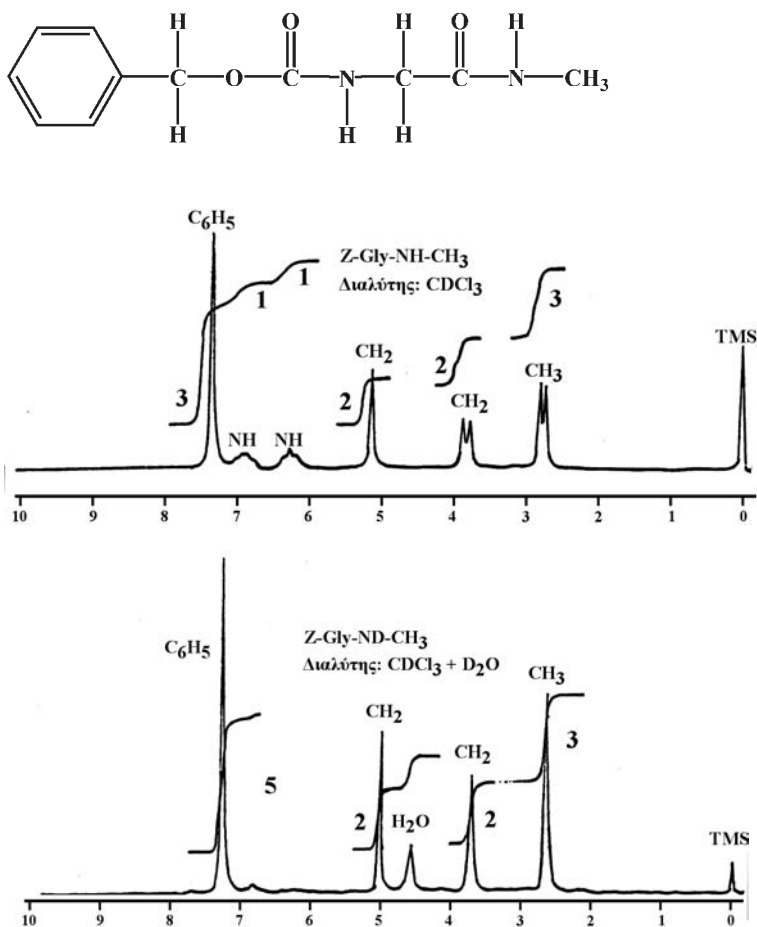


Επειδή το δευτέριο έχει μικρότερη μαγνητική ροπή από το πρωτόνιο, η σταθερά σύζευξης του δευτερίου με ένα γειτονικό πρωτόνιο είναι πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη σταθερά σύζευξης πρωτονίου-πρωτονίου. Επιπρόσθετα, οι πολύ μικρής έντασης αναμενόμενες απορροφήσεις των πυρήνων δευτερίου δεν παρατηρούνται στο φασματογράφο, που είναι συντονισμένος για τη λήψη φάσματος 1H . Επομένως, η αντικατάσταση κάθε πρωτονίου από δευτέριο, έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της απορρόφησης του, ενώ συγχρόνως απλοποιεί την απορρόφηση των γειτονικών πρωτονίων. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την άμεση διαπίστωση της ύπαρξης ή όχι υδρογόνων συνδεδεμένων με ετεροάτομο ($-OH$, $-SH$, $-NH_2$ ή $-NHR$). Αυτό γίνεται φανερό στο 1H NMR φάσμα του N-καρβοβενζοξυ-γλυκίνο-μονομεθυλαμιδίου, το οποίο έχει ληφθεί στην αρχή μέσα σε διάλυμα $CDCl_3$ και μετά μέσα σε διάλυμα $CDCl_3 + D_2O$ (Σχ. 6.1.4).

Πριν τη δευτερίωση, το 1H NMR φάσμα του N-καρβοβενζοξυ-γλυκίνο-μεθυλαμιδίου εμφανίζει δύο διπλές κορυφές, που συντονίζονται στα $\delta=2,75$ ppm και $\delta=3,8$ ppm. Η διπλή κορυφή στα $\delta=2,75$ ppm οφείλεται στα πρωτόνια της μεθυλομάδας, τα οποία συζευγνύονται με το γειτονικό $-NH$ πρωτόνιο, που εμφανίζεται στα $\delta=6,2$ ppm. Η άλλη διπλή κορυφή στα $\delta=3,8$ ppm οφείλεται στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας $-CH_2$ τα οποία συζευγνύονται με το γειτονικό πρωτόνιο $-NH$ που εμφανίζεται

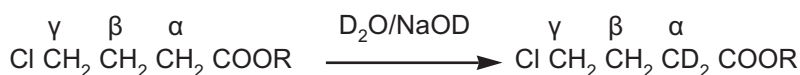
στα $\delta = 6,8$ ppm. Μετά τη δευτερίωση, οι απορροφήσεις στα $\delta = 6,2$ ppm και $\delta = 6,8$ ppm έχουν εξαφανισθεί, ενώ οι διπλές κορυφές έχουν μετατραπεί σε απλές.

Ο σπουδαιότερος περιορισμός, για τη χρησιμοποίηση αυτής της τεχνικής, είναι η δυσκολία στη σύνθεση δευτεριωμένων παραγώγων. Η δυσκολία είναι μεγαλύτερη στη σύνθεση παραγώγων στα οποία θα πρέπει να γίνει αντικατάσταση υδρογόνων συνδεδεμένων με άνθρακα (C-H) με δευτέριο (C-D).



Σχήμα 6.1.4. ¹H NMR φάσμα του N-καρβοβενζοξυ-γλυκίνο-μεθυλαμιδίου σε (α) CDCl₃ και (β) σε CDCl₃ + D₂O.

Η σύνθεση δευτεριωμένων παραγώγων σε μόρια που διαθέτουν καρβονυλομάδα ή νιτρομάδα ($-\text{NO}_2$) είναι ευκολότερη. Τα πρωτόνια του ατόμου άνθρακα, που συνδέεται με μία από τις ομάδες αυτές, αντικαθίστανται εύκολα από δευτέριο σε αλκαλικό περιβάλλον. Ο εστέρας $\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOR}$ μπορεί να μετατραπεί σε $\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CD}_2-\text{COOR}$ με απλή ανάμιξη με δευτεριωμένο νερό σε αλκαλικό περιβάλλον.



Το φάσμα του αρχικού εστέρα αποτελείται από μία τριπλή για τα α πρωτόνια, μία πολλαπλή για τα 3 πρωτόνια και μία τριπλή για τα γ πρωτόνια. Το φάσμα του δευτεριωμένου παραγώγου θα εμφανίζει μία τριπλή για τα 3 πρωτόνια, μία τριπλή για τα γ πρωτόνια, ενώ δεν θα υπάρχει πλέον απορρόφηση για τα α πρωτόνια μετά την αντικατάσταση τους από δευτέριο.

Αντιδραστήρια τα οποία επιδρούν στη χημική μετατόπιση (shift reagents): Πολύ ευρεία είναι η χρήση παραμαγνητικών συμπλόκων των ιόντων λανθανιδίων σε διαλύματα οργανικών μορίων, των οποίων το NMR φάσμα είναι δεύτερης τάξης και χαρακτηρίζεται από απορροφήσεις, οι οποίες μπορούν να αλληλεπικαλύπτονται.

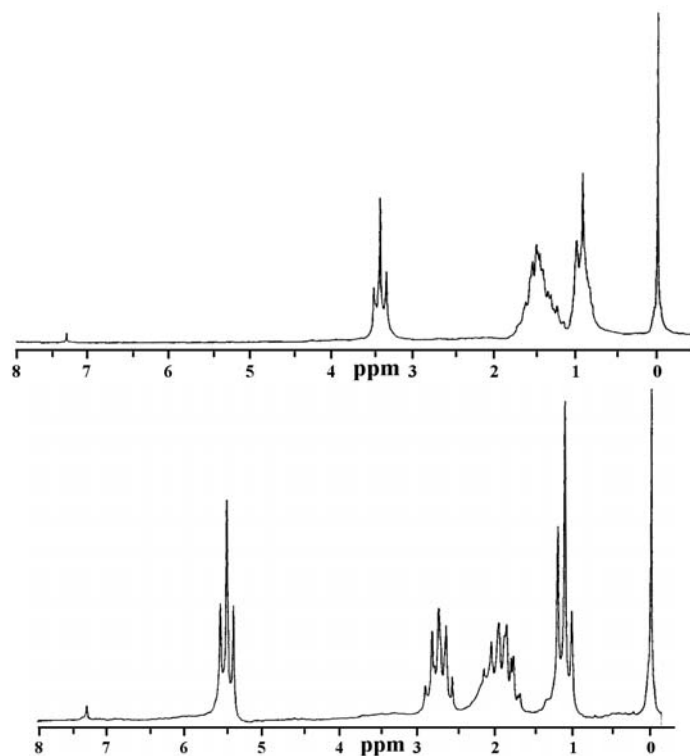
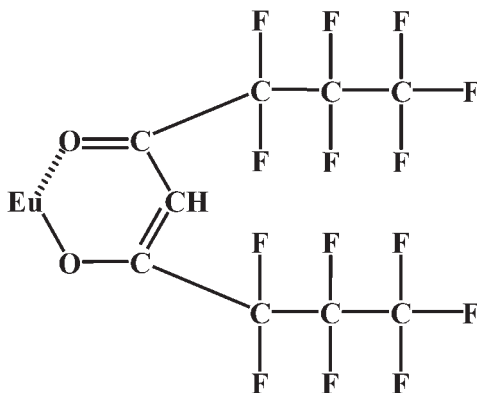
Το παραμαγνητικό ιόν του λανθανιδίου σχηματίζει σε διάλυμα σύμπλοκο με το οργανικό μόριο. Η παρουσία ασύζευκτων ηλεκτρονίων, προκαλεί ισχυρή χημική μετατόπιση των κορυφών απορρόφησης του μορίου προς ασθενέστερο πεδίο, έτσι ώστε να έχουμε διαχωρισμό των αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών και απλοποίηση του φάσματος. Προϋπόθεση για τον σχηματισμό συμπλόκου, είναι η παρουσία δραστικών ομάδων στο οργανικό μόριο όπως $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{CN}$, οι οποίες να διαθέτουν μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων. Από τα λανθανίδια χρησιμοποιείται περισσότερο το 2,2-διμεθυλο-6,6,7,7,8,8,8επτάφθορο-3,5-οκτανεδιόνη-ευρώπιο, $\text{Eu}(\text{fod})_3$ επειδή έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα στους κοινούς μη πολικούς διαλύτες, όπως CHCl_3 και CCl_4 .

Παράδειγμα 6.1.2.

Δίνεται το φάσμα της n-εξανόλης με την παρουσία ή την απουσία συμπλόκου του ευρωπίου. Η μετατόπιση της τριπλής κορυφής παρουσία συμπλόκου του ευρωπίου είναι ιδιαίτερα αισθητή. Η πολλαπλότητα

των κορυφών μεταξύ 1-2 ppm –απουσία συμπλόκου– είναι δύσκολο να ερμηνευθεί.

Παρουσία συμπλόκου του ευρωπίου η περιοχή αυτή επεκτείνεται μεταξύ 1-3 ppm και η πολλαπλότητα των κορυφών είναι εύκολο να ερμηνευθεί. Μπορείτε να ταυτοποιήσετε τα φάσματα με τις μέχρι τώρα γνώσεις που αποκτήσατε;



Σχήμα 6.1.5. (άνω) Φάσμα ^1H NMR n-εξανόλης χωρίς προσθήκη και (κάτω) με προσθήκη συμπλόκου ευρωπίου.

6.2. Ετεροπυρηνική σύζευξη

Η σύζευξη μπορεί να είναι ομοπυρηνική, αλλά και ετεροπυρηνική. Ας δούμε μερικά παραδείγματα ετεροπυρηνικής σύζευξης.

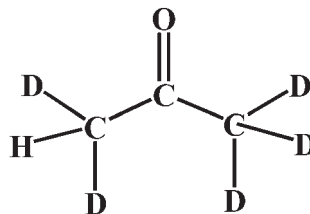
Παράδειγμα 6.2.1.

Το μόριο του διφθωρομεθανίου (CH_2F_2) περιέχει δύο ισοδύναμα πρωτόνια και φθόρια. Το φάσμα ^1H NMR θα περιέχει μία τριπλή κορυφή, της οποίας οι αποστάσεις θα αντανakλούν στην $^2J_{\text{HF}}$. Αυτό είναι ένα παράδειγμα ετεροπυρηνικής σύζευξης δύο δεσμών.

Το φάσμα ^{19}F NMR θα αποτελείται όμοια από μία τριπλή κορυφή, της οποίας οι αποστάσεις θα προσδιορίζουν την απόσταση $^2J_{\text{HF}}$.

Παράδειγμα 6.2.2.

Η CD_3COCD_3 χρησιμοποιείται ως δευτεριωμένος διαλύτης στο NMR. Αυτή περιέχει και ποσότητες CD_3CO CD_2H όπως δείχνεται και σχηματικά παραπλεύρως. Ας δούμε από τι θα αποτελείται το φάσμα ^1H NMR της δευτεριωμένης κετόνης $\text{CD}_3\text{COCD}_2\text{H}$.



Το πρωτόνιο συζευγνύεται με τα δύο δευτέρια που έχουν $I=1$. Επομένως, θα παρατηρηθούν $2nI+1=2 \cdot 2+1=5$ κορυφές με ένταση 1:2:3:2:1 και η σύζευξη θα είναι $^2J_{\text{HD}}$. Η πολλαπλότητα των κορυφών επεξηγείται στο ακόλουθο σχήμα.

Στην πρώτη γραμμή υπάρχει μόνο ένας συνδυασμός ($-1-1=-2$) όπου δύο, $M = -2$. Στη δεύτερη γραμμή υπάρχουν δύο συνδυασμοί $M = -1$ ($-1+0$, $0-1$).

Στην τρίτη γραμμή υπάρχουν τρεις συνδυασμοί όπου $M = 0$ ($-1+1$, $1-1$, $0+0$).

Στην τέταρτη γραμμή υπάρχουν δύο συνδυασμοί ($1+0$, $0+1$) και στην

πέμπτη γραμμή όπου $M = 2$ ένας συνδυασμός ($1+1$).

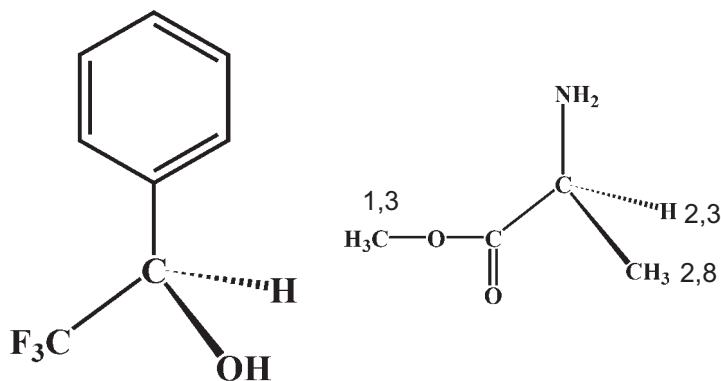
↓	↓				$M = -2$
↓	→	→	↑		$M = -1$
↓	↑	↑	↑	→ →	$M = 0$
↑	→	→	↑	→	$M = 1$
↑	↑				$M = 2$

6.3 Εναντιομερικά αντιδραστήρια

Εναντιομερικά αντιδραστήρια είναι αυτά που χρησιμοποιούνται για να μετρηθεί η διαφορά χημικών μετατοπίσεων εναντιομερών ενώσεων. Εναντιομερικά καθαροί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για να διαχωρισθούν εναντιομερή. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για να προσδιορισθούν ποσοτικά οι σχετικές αναλογίες των δύο εναντιομερών σ' ένα μίγμα. Τέτοιες μετρήσεις μπορούν να γίνουν επίσης με πολωσιμετρία.

Παράδειγμα 6.3.1.

Η πιο κάτω αλκοόλη περιέχει ασύμμετρο άτομο άνθρακα και έχει απόλυτη στερεοχημεία R. Χρησιμοποιήθηκε για να διαφοροποιηθούν οι χημικές μετατοπίσεις των εναντιομερών του αμινοεστέρα. Οι αριθμοί δείχνουν τις διαφορές σε Hz των χημικών μετατοπίσεων των σημάτων, που παρατηρήθηκαν στα εναντιομερή του αμινοεστέρα.



6.4. Ετεροπυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός μίας διάστασης

Εκτός από τον πυρήνα ^{13}C , που μελετήσαμε σε ειδικό κεφάλαιο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι πολλοί άλλοι πυρήνες βρίσκουν ευρείες εφαρμογές. Τρεις είναι οι κύριες δυσκολίες, που υπάρχουν στην χρήση αυτών των πυρήνων για τη λήψη ετεροπυρηνικού φάσματος.

α) Η μικρή μαγνητική ροπή των περισσότερων ετεροπυρήνων και το μικρό ποσοστό της φυσικής τους αφθονία.

β) Τα μεγάλα εύρη των κορυφών σε πυρήνες με τετραπολική ροπή και

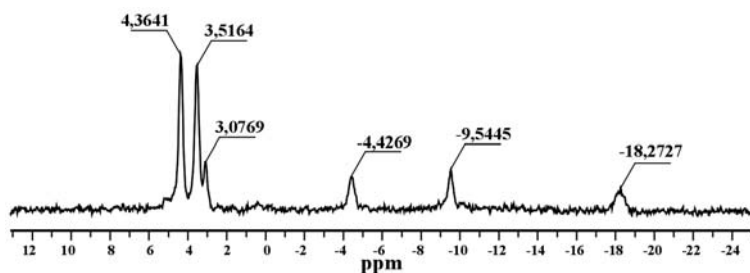
γ) Οι μεγάλοι χρόνοι εφησυχασμού.

Το μεγάλο εύρος των χημικών μετατοπίσεων, που απαντώνται σε αυτούς τους πυρήνες πολλές φορές απαλείφει τα αναφερθέντα μειονεκτήματα για τη λήψη ετεροπυρηνικού φάσματος. Έτσι, για τους πυρήνες ^{15}N , ^{29}Si και ^{57}Fe οι οποίοι έχουν μεγάλους χρόνους εφησυχασμού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιδραστήρια χημικής μετατόπισης, που τους ελαττώνουν.

Ενδεικτικά θα αναφερθούμε σε μερικούς σημαντικούς πυρήνες και μερικές από τις κυριότερες εφαρμογές τους.

Κάθε πυρήνας μπορεί να αποτελέσει ξεχωριστό κεφαλάιο ή ακόμη καινούργιο βιβλίο. Η ενδελεχής ανάλυση ξεφεύγει από τους στόχους του εκπαιδευτικού αυτού βιβλίου.

Πυρήνας ^{31}P . Ο πυρήνας ^{31}P ευρίσκει ευρείες εφαρμογές στη Βιοχημεία και για αρκετές βιολογικές ενώσεις και υγρά. Ένα τυπικό φάσμα φώσφορου-31 αίματος το οποίο έχει ληφθεί αμέσως μετά την αιμοδοσία και αφού τοποθετήθηκε σε αντιπηκτικό, φαίνεται στο σχήμα 6.4.1. Το φάσμα αποτελείται από δύο υψηλής έντασης κορυφές, οι οποίες συντονίζονται στα +3,0 ppm και +4,0 ppm. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα οι κορυφές, αυτές οφείλονται στον 3P και 2P ορθοφωσφορικές μονοεστερικές ομάδες του 2,3 διφωσφογλυκερικού οξέος (2,3-DPG).



Σχήμα 6.4.1. Φάσμα ^{31}P αίματος του συγγραφέως Θ. Μαυρομούστακου.

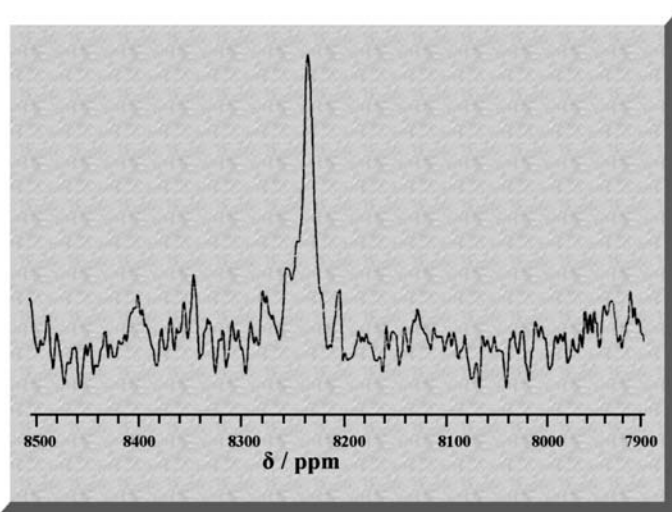
Μια μικρής έντασης κορυφή στα +2,9 ppm οφείλεται στο ανόργανο φωσφορικό οξύ (Pi). Η κορυφή αυτή ανάλογα από το δόση, παρατηρήθηκε ότι ποικίλλει σε ένταση. Είναι γνωστόν από τη βιβλιογραφία ότι ο σχετικός διαχωρισμός της κορυφής Pi και των 2P του 2,3-DPG εξαρτά-

ται από το pH. Μια μικρής έντασης κορυφή στο 0 ppm είναι επίσης έκδηλη.

Η κορυφή αυτή προέρχεται από τη σφιγγομελίνη και τα άλλα φωσφολιπίδια. Οι τρεις κορυφές του φάσματος μεταξύ 4,0 -19,5 ppm αντιστοιχούν στους α, β και γ φώσφορους τους αδενοσινοτριφωσφορικού οξέος. Συγκεκριμένα οι διπλές κορυφές στα 7,0 ppm και 9,5 ppm αντιστοιχούν στους γ και α φωσφόρους ενώ η τριπλή κορυφή στα 19,4 ppm στο β φώσφορος. Η κυρτή που ταυτοποιείται ως β φώσφορος του ATP είναι ιδιαίτερα πλατειά λόγω των ιόντων Mg^{2+} , που υπάρχουν στο βιολογικό υγρό. Τα ιόντα μαγνησίου επιφέρουν αποθωράκιση και μετατοπίζονται σε μεγαλύτερη χημική μετατόπιση (εκφρασμένη σε ppm), συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται στο νερό.

Ο πυρήνας ^{31}P έχει φυσική αφθονία 100% και 1/2 και μπορεί να συζευχθεί με το πρωτόνιο. Οι κανόνες σύζευξης είναι οι ίδιοι με το πρωτόνιο και οι σταθερές σύζευξης είναι μεγαλύτερες από αυτές που παρατηρούνται μεταξύ πρωτονίων $J_{H-P} \approx 200-700$ Hz και $J_{H-C-P} \approx 20$ Hz. Οι συζεύξεις που παρατηρούνται είναι μέχρι τουλάχιστον τεσσάρων δεσμών.

Πυρήνας ^{57}Fe : Ο πυρήνας ^{57}Fe βρίσκει ευρείες εφαρμογές στους μηχανισμούς δράσεων των αιμοσφαιρινών. Ένα φάσμα ^{57}Fe της μονοοξυμογλοβίνης.



Σχήμα 6.4.2. Φάσμα ^{57}Fe της μονοοξυμογλοβίνης.

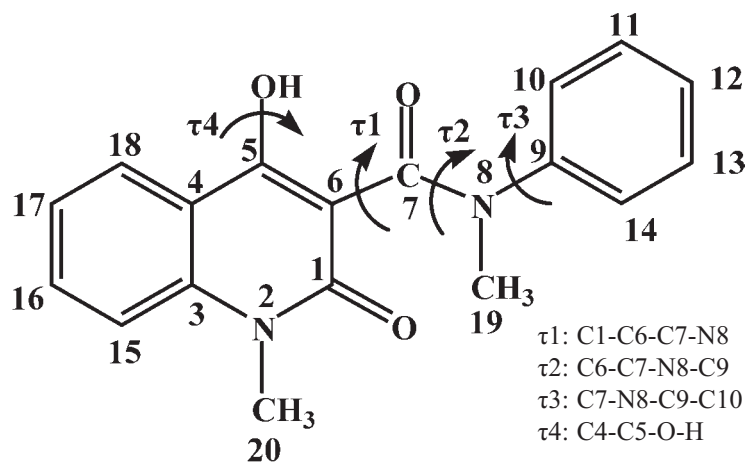
ξυμογλοβίνης εμπλουτισμένης κατά 90% με ισότοπο του ^{57}Fe παραστάναται πιο πάνω.

Άλλοι πυρήνες: Παραδείγματα άλλων πυρήνων και χρήσεις τους είναι τα κάτωθι: Οι πυρήνες ^{13}Al και ^{29}Si ($I=3/2$) βρίσκουν πολλές εφαρμογές στους ζεόλιθους και στα σύμπλοκα. Ομοίως, ο κασσίτερος (^{117}Sn , ^{119}Sn) ($I=1/2$) και το κάδμιο (^{111}Cd , ^{113}Cd) ($I=1/2$) σε σύμπλοκα με οργανικούς υποκαταστάτες. Ο πυρήνας δευτέριο βρίσκει εφαρμογές στη Χημεία Τροφίμων και θα επεξηγηθεί σε αντίστοιχο κεφάλαιο.

6.5. Ταυτοποίηση και μελέτη διαμόρφωσης βιοδραστικών μορίων

Στις επόμενες ενότητες θα μιλήσουμε για την ταυτοποίηση και διαμόρφωση βιοδραστικών μορίων με χρήση φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων. Ένα μόριο, που θα μας απασχολήσει, είναι η λινομίδη.

Η θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας και άλλων αυτοάνοσων ασθενειών, βασίζεται σε ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Όμως η χρήση τέτοιων φαρμάκων, δεν στερείται διαφόρων παρενεργειών. Επιπρόσθετα, διακοπή της θεραπείας έχει ως αποτέλεσμα την επάνοδο των κλινικών συμπτωμάτων.



Σχήμα 6.5.1. Μοριακή δομή της λινομίδης (Linomide). Στο σχήμα φαίνονται επίσης οι διέδρες γωνίες, που προσδιορίζουν τη διαμόρφωση της. Για τη σπουδαιότητα των διέδρων αυτών γωνιών θα ασχοληθούμε σε μεταγενέστερο κεφάλαιο.

Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές προσεγγίσεις στη θεραπεία των αυτοάνοσων ασθενειών, που βασίζονται σε θεωρίες, οι οποίες αφορούν τη σπουδαιότητα των ανοσολογικών δικτύων για τη διατήρηση «υγιούς οντότητας».

Η λινομίδη (Pharmacia, Sweden, LS-2616) (Σχ. 6.5.1) είναι μία δραστική ένωση, που διεγείρει διάφορες λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος και αντιπροσωπεύει ένα ελκυστικό φάρμακο στη θεραπεία των διαφόρων αυτοάνοσων ασθενειών.

Η λινομίδη έχει επίσης αντιιικές ιδιότητες, γιατί αποτρέπει τόσο την άμεση θνησιμότητα όσο και δευτερευόντως, την ανάπτυξη της αυτοάνοσου ασθένειας μυοκαρδίτιδας, όταν ο οργανισμός μολύνεται από τον ιό του coxsackie.

Η ένωση αυτή, εμποδίζει επίσης τη μετάσταση σε πρότυπους καρκίνους και απαλύνει τα συμπτώματα του συνδρόμου του λύκου.

Η δράση της λινομίδης έχει μελετηθεί με την πρότυπο αυτοάνοσο ασθένεια του εγκεφαλομυελίτη (EAE) και άλλων προτύπων, όπως: της πειραματικής αυτοάνοσου ασθένειας, της βαρείας μυασθένειας (Myasthenia Gravis) και του τύπου I αυτοάνοσου διαβήτη. Τα σπουδαιότερα αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές είναι:

α) η λινομίδη μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα με πολύ καλή ανοχή,

β) είναι δραστική στον αυτοάνοσο εγκεφαλομυελίτη όταν δίνεται σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας, μετά την εμφάνιση των πρώτων κλινικών σημείων,

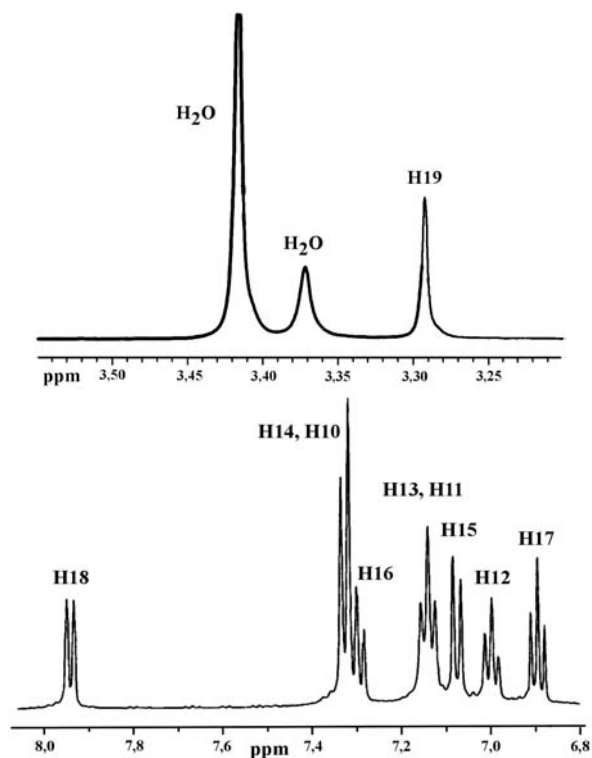
γ) εμποδίζει ολοκληρωτικά την ιστολογική βλάβη του οργάνου στόχου και,

δ) δεν συνοδεύεται με χρόνιες παρενέργειες των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων.

Το Σχ. 6.5.2. παριστάνει φάσμα ^1H NMR της λινομίδης σε διαλύτη DMSO που έχει ληφθεί με χρήση πειράματος ενός παλμού.

Ας δούμε ποια υδρογόνα μπορούν να ταυτοποιηθούν στο μόριο. Τα δύο μεθύλια $\text{H}-19$ και H_2O εμφανίζονται ως απλές κορυφές αφού δεν συζευγνύονται με γειτονικά πρωτόνια. Είναι όμως δύσκολο να ταυτοποιηθούν. Θα χρειασθούν άλλες τεχνικές, που θα αναλυθούν στις επόμενες ενότητες για να το επιτύχουμε αυτό.

Από τα αρωματικά υδρογόνα η τριπλή κορυφή που συντονίζεται στα $-7,2$ ppm και οφείλεται σε δύο ισοδύναμα πρωτόνια, πρέπει να αντιστοιχεί



Σχήμα 6.5.2. Φάσμα πρωτονίου λινομίδης. Κάτω δείχνεται η αρωματική περιοχή και άνω τα πρωτόνια των δύο μεθυλενομάδων.

στα συμμετρικά σε *m*-θέση H-11 και H-13. Οι άλλες δύο τριπλές κορυφές, που συντονίζονται στα $\approx 7,0$ ppm, θα πρέπει να οφείλονται πιθανά στα πρωτόνια H-12, H-16 ή και H-17. Είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν απόλυτα τα αρωματικά αυτά πρωτόνια με μόνο τα δεδομένα ^1H NMR. Δυσκολίες στην ταυτοποίηση παρουσιάζουν επίσης τα H-10, H-14, H-16 και H-18. Είναι σαφές από την ανάλυση αυτή ότι χρειάζονται και άλλα δεδομένα για την πλήρη ταυτοποίηση του φάσματος ^1H NMR της λινομίδης.

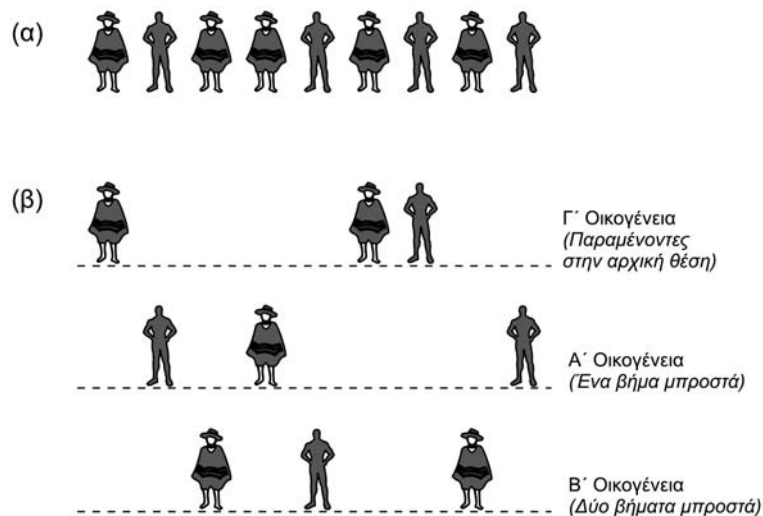
Στο προηγούμενο κεφάλαιο είδαμε επίσης ένα πλήρες αποσπασμένο φάσμα της λινομίδης και φάσματα DEPT. Από τις μεθοδολογίες, που έχουν αναφερθεί, καμία δεν μπορεί να βοηθήσει στην πλήρη ταυτοποίηση του μορίου. Επομένως, καθίσταται αναγκαία η χρήση φασματοσκοπίας δύο διαστάσεων. Ας δούμε λοιπόν πώς η φασματοσκοπία δύο διαστάσεων θα βοηθήσει στην ταυτοποίηση του μορίου της λινομίδης.

6.6 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων

6.6.1. Η αναγκαιότητα της δεύτερης διάστασης

Συνοψίζοντας, είδαμε ότι η χρήση υψηλού πεδίου παράγει φάσματα υψηλής διαχωριστικότητας, τα οποία αποτελούνται από πληθώρα κορυφών. Όλες αυτές οι κορυφές περιέχουν την επιθυμητή πληροφορία. Πολλές φορές όμως, αυτή η πληροφορία είναι αδύνατο να εξαχθεί, γιατί οι πολλαπλές κορυφές αλληλοεπικαλύπτονται (παράδειγμα αποτελεί το μόριο της λινομίδης). Η διάκρισή τους, λοιπόν, καθίσταται αναγκαία. Ένας τρόπος, να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα, είναι να χωρίσουμε τα σήματα σε περισσότερες από μία διαστάσεις όπου θα παρέχουν άλλες χρήσιμες πληροφορίες. Θ' αρκεστούμε στη χρήση μίας δεύτερης διάστασης επειδή αυτή είναι επαρκής για το μέγεθος των μορίων που μελετούνται στο βιβλίο αυτό. Στη μελέτη μακρομορίων, όπως τις πρωτεΐνες, η εισαγωγή ανωτέρων διαστάσεων είναι αναγκαία.

Η αναγκαιότητα της δεύτερης διάστασης στη Φασματοσκοπία NMR μπορεί να κατανοηθεί με το παράδειγμα του σχήματος 6.6.1.1. Στο άνω σχήμα φαίνονται άνθρωποι ταξινομημένοι σε σειρά κατά αυξανόμενη ηλικία από τα αριστερά στα δεξιά. Γνωρίζουμε ότι αυτοί ανήκουν σε



Σχήμα 6.6.1.1: Διαχωρισμός ανθρώπων σε τρεις οικογένειες που ταξινομούνται κατά σειρά αυξανόμενης ηλικίας από τα αριστερά στα δεξιά

τρεις οικογένειες. Πώς θα βρούμε ποιοι ανήκουν σε ποιες οικογένειες; Απλούστατα λέμε: Οι άνθρωποι που ανήκουν στην πρώτη οικογένεια ασ κάνουν ένα βήμα μπροστά. Αυτοί που ανήκουν στην δεύτερη οικογένεια ασ κάνουν δύο βήματα μπροστά. Όπως καταλαβαίνετε με τον τρόπο αυτό έχουμε επιλύσει το πρόβλημα διάκρισης τους σε οικογένειες.

Κάτι ανάλογο επιτυγχάνεται και με τη φασματοσκοπία δύο διαστάσεων. Στο πείραμα μιας διάστασης λαμβάνονται οι συντονισμοί των προς μελέτη πυρήνων. Η δεύτερη διάσταση θα μας πληροφορήσει ποιοι από αυτούς συνδέονται μέσω δεσμού ή μέσω εγγύτητας στο χώρο.

Τα πειράματα δύο διαστάσεων, όπως αναφέραμε ήδη, είναι σημαντικά για την ταυτοποίηση μιας ένωσης. Η ακριβής σειρά των πειραμάτων που θα ακολουθηθεί για να ταυτοποιηθεί μία χημική ένωση εξαρτάται από:

- α) το είδος του μορίου
- β) τη βιβλιογραφική πληροφορία, που παρέχεται για μόρια-παράγωγα του προς μελέτη μορίου,
- γ) από την εμπειρία και ικανότητα του ερευνητή να επιλέξει τα καταλληλότερα πειράματα, που θα δίνουν την περισσότερο πρόσφορη πληροφορία για την επίλυση δομής του μελετούμενου μορίου.

Εδώ θα αναφερθούμε περιληπτικά στα κυριότερα είδη και στις πληροφορίες, που παρέχει ένα φάσμα δύο διαστάσεων. Λεπτομερής ανυσματική ανάλυση θα αποφευχθεί, μια και στόχος του βιβλίου αυτού είναι κυρίως η πρακτική εφαρμογή των πληροφοριών που παρέχουν τα φάσματα.

6.6.2. Θεωρία φασμάτων δύο διαστάσεων

Σε ένα φάσμα δύο διαστάσεων NMR (two dimensional NMR, 2D-NMR), υπάρχει καταγραφή δύο διαφορετικών πληροφοριών σε δύο διαφορετικές διαστάσεις ή σε δύο διαφορετικούς άξονες συχνοτήτων F_2 και F_1 . Στον ένα άξονα F_2 καταγράφονται συνήθως οι απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα (^1H ή ^{13}C) ενός οργανικού μορίου, ενώ στον άλλο άξονα F_1 καταγράφονται άλλες πληροφορίες, όπως η σταθερά σύζευξης ή οι απορροφήσεις άλλων πυρήνων που σχετίζονται ή αλληλεπιδρούν με αυτούς του άξονα F_2 . Τρεις είναι οι κύριες κατηγορίες 2D-NMR φασμάτων.

- α) 2D-J NMR ή 2D-NMR φάσματα ανάλυσης σταθεράς σύζευξης J (2D J- resolved NMR).

β) COSY-NMR (Correlated Spectroscopy) ή 2D NMR φάσματα συσχέτισης -πυρήνων .

γ) NOESY-NMR (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) ή 2D NMR φάσματα συσχετισμού αλληλεπίδρασης πυρήνων με NOE μέσω του χώρου.

Στην κατηγορία των 2D-J φασμάτων NMR, ο ένας άξονας F_2 του φάσματος περιέχει τις απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα (π.χ. ^1H ή ^{13}C), ενώ ο άλλος άξονας F_1 περιέχει τη σταθερά σύζευξης J . Η σταθερά σύζευξης μπορεί να αναφέρεται σε ομοπυρηνική σύζευξη (homonuclear J), δηλαδή σύζευξη με ίδιο γειτονικό πυρήνα (π.χ. ^1H - ^1H , ή ^{13}C - ^{13}C) ή σε ετεροπυρηνική σύζευξη, δηλαδή σε σύζευξη με διαφορετικό γειτονικό πυρήνα (heteronuclear J) (π.χ. ^1H - ^{13}C) και προσδιορίζεται από τη μεταξύ απόσταση των απορροφήσεων στον άξονα F_1 .

Όπως προαναφέρθηκε, στην κατηγορία των COSY φασμάτων ανήκουν τα 2D φάσματα NMR συσχέτισης (correlation NMR spectroscopy). Η συσχέτιση των πυρήνων είναι αποτέλεσμα της σύζευξης των μέσω δεσμών με μια σταθερά σύζευξης J . Και οι δύο άξονες F_2 και F_1 του COSY φάσματος NMR περιέχουν συχνότητες. Στα ομοπυρηνικά φάσματα COSY και οι δύο άξονες F_2 , F_1 περιέχουν απορροφήσεις του ίδιου πυρήνα, όπως ^1H - ^1H ή ^{13}C - ^{13}C . Στα ετεροπυρηνικά COSY φάσματα ο ένας άξονας F_2 περιέχει απορροφήσεις του ενός πυρήνα, συνήθως ^1H , ενώ ο άλλος άξονας F_1 περιέχει απορροφήσεις του άλλου πυρήνα π.χ. ^{13}C . Οι ισοϋψείς καμπύλες (contour plot) που εμφανίζονται στη διαγώνιο ενός COSY φάσματος είναι η προβολή των απορροφήσεων και των δύο αξόνων στη διαγώνιο του φάσματος 2D NMR. Η σύζευξη και αλληλεπίδραση δύο τυχαίων πυρήνων του μορίου, είναι δυνατόν να εντοπιστεί στο φάσμα 2D NMR από τα συμμετρικά σημεία εκτός της διαγωνίου τα οποία συνδέουν τις απορροφήσεις των δύο συζευγμένων πυρήνων. Συμπερασματικά, ένα φάσμα COSY παρέχει πληροφορίες για τις υπάρχουσες συζεύξεις, μέσω δεσμών του οποιουδήποτε πυρήνα του μορίου και επομένως για τη δομή του μορίου.

Ειδικά πειράματα COSY (COSY Phase Sensitive) είναι κατάλληλα και για προσδιορισμούς των σταθερών συζεύξεων.

Έτσι, τα πειράματα 2D COSY χρησιμοποιούνται συχνότερα συγκριτικά με τα πειράματα 2D-J γιατί δίνουν δύο ειδών πληροφορίες σε ένα φάσμα, τις συσχετίσεις μέσω δεσμού και τις σταθερές συζεύξεως.

Στην τρίτη κατηγορία των NOESY φασμάτων, όπως και στα COSY

φάσματα, υπάρχουν απορροφήσεις ομοειδών ή ετεροειδών πυρήνων στους άξονες F_2 και F_1 .

Τα συμμετρικά σημεία όμως που εμφανίζονται σε ένα NOESY φάσμα και τα οποία συνδέουν τις απορροφήσεις δύο πυρήνων στους δύο άξονες, μας παρέχουν πληροφορίες για τη χωρική αλληλεπίδραση των δύο πυρήνων.

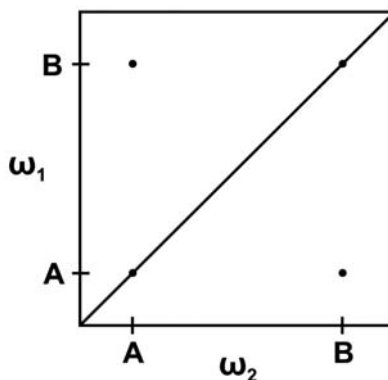
Η αλληλεπίδραση αυτή είναι **Σχήμα 6.6.2.1.** Σύζευξη πυρήνων A και B. δυνατή, όταν οι δύο πυρήνες είναι πολύ κοντά ($<5 \text{ \AA}$), έτσι ώστε να υπάρχει NOE αποτέλεσμα μέσω του χώρου κατά τη διέγερση και αποκατάσταση των πυρήνων. Ειδικότερα, ένα φάσμα NOESY παρέχει πληροφορίες για τις ενδομοριακές επιδράσεις των πυρήνων του μορίου και επομένως για τη διαμόρφωση των πυρήνων. Με το φαινόμενο NOE θα ασχοληθούμε στο επόμενο κεφάλαιο.

Ένα φάσμα δύο διαστάσεων (contour plot), με δύο πυρήνες A και B που συζευγνύονται, παριστάνεται στο σχήμα 6.6.2.1 Στη διαγώνιο παριστάνονται οι χημικές μετατοπίσεις τους. Οι εκτός διαγωνίου κορυφές παρέχουν πληροφορίες για τη σύζευξη των πυρήνων A και B μέσω δεσμού ή μέσω χώρου. Για να εντοπισθούν οι συζεύξεις αυτές φέρνουμε παράλληλο από τον A πυρήνα προς τον άξονα F_2 (ω_2). Στη συνέχεια, αφού συναντήσει το B πυρήνα φέρνουμε ξανά παράλληλο προς τον F_1 (ω_1). Τότε θα συναντήσει την άλλη κορυφή της διαγωνίου B. Εάν υπάρχει συμμετρική κορυφή της εκτός διαγωνίου κορυφής με τη διαγώνιο, η οποία βρίσκεται ακολουθώντας την ίδια διεργασία, συνάγεται ότι οι πυρήνες A και B συζευγνύονται μέσω δεσμού ή χώρου.

6.6.3. Στάδια διεξαγωγής ενός πειράματος δύο διαστάσεων

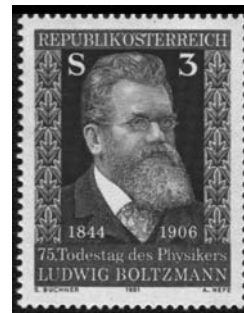
Η όλη πορεία μαγνητικών επιδράσεων για ένα πείραμα 2D-NMR περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

- α) προετοιμασία των σπιν (preparation)
- β) εξέλιξη των σπιν και μαγνήτισης (evolution) (t_1)
- γ) ανάμιξη των σπιν (mixing) και
- δ) ανίχνευση (detection) του σήματος



α) Προετοιμασία (Preparation)

Στο στάδιο της προετοιμασίας, οι πυρήνες του μορίου ευρίσκονται εντός μαγνητικού πεδίου σε μία κατάσταση ισορροπίας, που καθορίζεται από τη στατιστική κατά Boltzmann. Σε αυτή την κατάσταση τα διάφορα σπιν έχουν τη φυσική τους μαγνήτιση, όπου για ένα τύπο πυρήνα μπορεί να υπάρχουν τυχαίοι προσανατολισμοί σπιν (κορεσμός), ενώ για άλλο τύπο πυρήνα του ίδιου μορίου υπάρχει θερμική ισορροπία, δηλαδή μικρό περίσσειμα σπιν στη βασική κατάσταση έναντι της διηγερμένης στον άξονα z. Στην αρχή της περιόδου προετοιμασίας των αυτοστροφορμών, στην οποία υπάρχει διέγερση με μία σειρά πειραμάτων, όλοι οι πυρήνες αποκτούν μία θερμική ισορροπία και ένα βαθμό μαγνήτισης. Στο τελικό στάδιο της περιόδου προετοιμασίας με την εφαρμογή της κατάλληλης μαγνητικής επίδρασης τα ανύσματα των μαγνητίσεων M των διαφορετικών πυρήνων τοποθετούνται στην ορθή τους θέση σε σχέση με τη διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου B_0 . Αυτό το στάδιο της περιόδου προετοιμασίας έχει μεγάλη σημασία, προκειμένου να διακριθούν οι χημικά διάφοροι πυρήνες με βάση το διαφορετικό ρυθμό περιστροφής τους.



Boltzmann Ludwig
(1844-1906)

β) Εξέλιξη (Evolution)

Εξέλιξη της μαγνήτισης M για ένα πυρήνα, αναπτύσσεται σε ένα καθορισμένο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον του πυρήνα και για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα t_1 .

Το μέγεθος του ανύσματος της μαγνήτισης M για κάθε πυρήνα, είναι καθορισμένο και εξαρτάται από το μαγνητικό περιβάλλον του πυρήνα και τον χρόνο t_1 .

γ) Ανάμιξη δευτέρου παλμού (Mixing)

Στο τέλος της περιόδου εξέλιξης με εφαρμογή ενός δεύτερου παλμού επιτυγχάνεται ανακατανομή των πυρηνικών σπιν. Στην περίοδο της ανάμιξης και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, λαμβάνει χώρα επικοινωνία των σπιν.

Ο μηχανισμός που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάμιξη και την επικοινωνία των σπιν θα καθορίσει και το είδος των πληροφοριών που θα λη-

φθούν. Τέτοιες πληροφορίες είναι η σταθερά σύζευξης J , και συζεύξεις μέσω δεσμών ή χώρου.

δ) Ανίχνευση σήματος (*Detection*)

Η ανίχνευση του σήματος γίνεται μετά τη συλλογή της FID από το δέκτη (t_2).

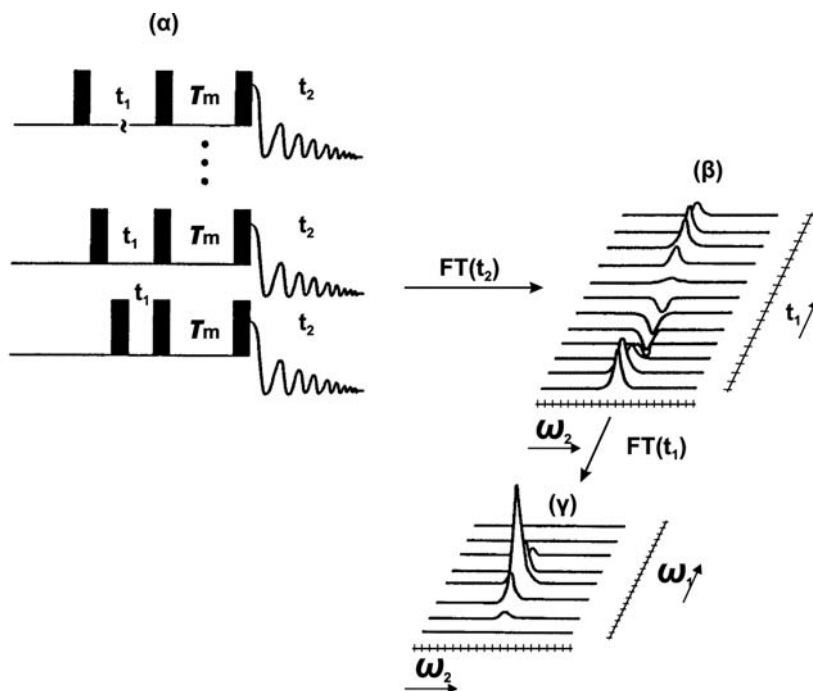
6.6.4. Μέτρηση φάσματος NMR δύο διαστάσεων

Στο πείραμα DEPT, που συζητήσαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, το ενδιαμέσο χρονικό διάστημα t μεταξύ δύο παλμών λαμβάνει μεταβλητές τιμές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική φάση και το διαφορετικό μέγεθος των κορυφών απορρόφησης. Το μέγεθος του ανύσματος της μαγνήτισης M που θα ανιχνευθεί στον άξονα ψ εξαρτάται από τη μαγνήτιση του, πριν από την ανίχνευση. Συμπερασματικά είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μία σειρά πειραμάτων, όπου το χρονικό διάστημα t μεταξύ δύο παλμών να ποικίλλει ($t_1^1, t_1^2, t_1^3, t_1^4, \dots, t_1^v$). Αν τα φάσματα μιας διάστασης που θα προκύψουν τοποθετηθούν το ένα δίπλα στο άλλο και με ένα παράλληλο τρόπο, τότε προκύπτει ένα διάγραμμα δύο διαστάσεων, όπου οι πληροφορίες (ύψη απορροφήσεων) που προέρχονται από τις χρονικές στιγμές $t_1, t_1^2, t_1^3, \dots, t_1^v$ να συσχετίζονται (Σχ. 6.6.4.1).

Στο Σχ. 6.6.4.1. παρατηρείται μία ημιτονοειδής μεταβολή του ύψους μιας κορυφής απορρόφησης με μεταβολή του ενδιαμέσου χρονικού διαστήματος t_1 .

Αν η μεταβολή αυτή υποβληθεί σε μετασχηματισμό Fourier, τότε θα ληφθεί μία νέα συνάρτηση του ύψους της απορρόφησης με τη συχνότητα ν , η οποία εκφράζεται σε μία δεύτερη διάσταση. Τα φάσματα του διαγράμματος (Σχ. 6.6.4.1) παριστάνουν την μεταβολή του ύψους της απορρόφησης και της φάσης, όταν μεταβάλλεται ο χρόνος t_1 .

Το πρώτο φάσμα του διαγράμματος είναι το σύνηθες φάσμα απορροφήσεων, που λαμβάνεται με μετασχηματισμό Fourier στη φασματοσκοπία μίας διαστάσεως (1D NMR spectrum). Το μέγιστο ύψος της απορρόφησης (κανονική ή αντεστραμμένη) παρατηρείται, όταν η συλλογή γίνεται στον άξονα των $+\psi$ και $-\psi$. Μηδενικό ύψος παρατηρείται, όταν η συλλογή της FID γίνεται στον άξονα των $+z$ ή $-z$. Ο άξονας t_1 , είναι ο χρόνος μεταξύ δύο διαδοχικών μαγνητικών επιδράσεων και ονομάζεται περίοδος εξέλιξης (evolution period).



Σχήμα 6.6.4.1. Σειρά μαγνητικών επιδράσεων σε ένα πείραμα δύο διαστάσεων. Η μεταβολή του t_1 παράγει πολλά φάσματα των οποίων η ένταση μίας κορυφής αποτελεί συνάρτηση του t_1 , για να δημιουργήσει ένα άλλο φάσμα στη δεύτερη διάσταση.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η μεταβολή του ύψους της κορυφής με το χρόνο t_1 , που αποτελεί την περίοδο ανάπτυξης της μαγνήτισης, είναι μία ημιτονοειδής συνάρτηση συχνότητας ν . Όταν αυτή η ημιτονοειδής συνάρτηση, που εκφράζει τα ύψη μιας απορρόφησης σε αντίστοιχα χρονικά διαστήματα $t_1, t_1^2, t_1^3, \dots, t_1^v$, υποβληθεί σε ανάλυση Fourier, εμφανίζονται στο λαμβανόμενο φάσμα συχνότητες η διαφορά των οποίων εκφράζει το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης.

6.6.5. Κατηγορίες φασμάτων NMR δύο διαστάσεων συσχέτισης πυρήνων μέσω δεσμών

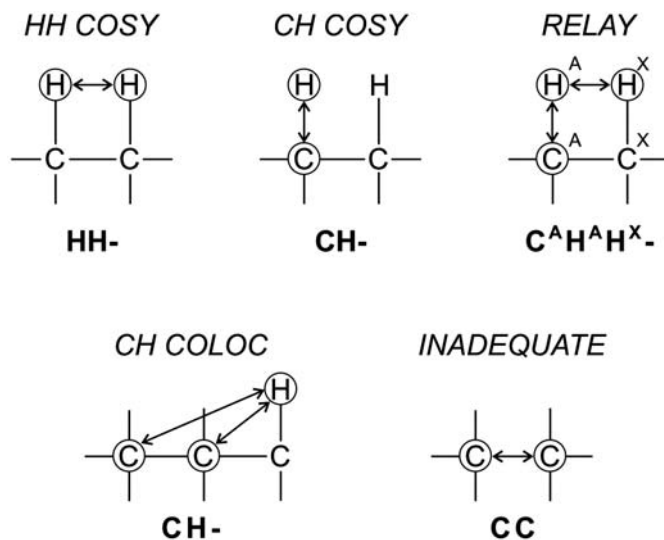
1. HH COSY (C**O**rr**e**lation S**P**ectrosc**O**p**Y**). Ομοπυρηνικό φάσμα συσχέτισης δύο γειτονικών πυρήνων H,H.

2. CH COSY. Ετεροπυρηνικό φάσμα συσχέτισης δύο γειτονικών πυρήνων C, H.

3. $C_A H_A H_X$ RELAY (RELAYed Correlation Spectroscopy). Είναι συνδυασμός του **HH COSY** και **CH COSY** και επιτρέπει την ταυτοποίηση των πυρήνων της ομάδας $C_A H_A C_X H_X$ όταν είναι γνωστή η απορρόφηση ενός μόνο από τους τέσσερις πυρήνες. Το πείραμα αυτό είναι γνωστό ως πείραμα «Μεταφοράς της Μαγνήτισης (RELAY)».

4. $C_A C_X H_X$ COLOC (CORrelation via LONG range COUPLING). Επιτρέπει τη συσχέτιση πυρήνα H_X με απομακρυσμένο άτομο C_A .

5. $C_A C_X$ INADEQUATE (INCredible NATural ABundance DOUBLE QUAntum TRANSFER EXPERIMENT). Ομοπυρηνικό πείραμα συσχέτισης δύο γειτονικών πυρήνων $^{13}C_A$ και $^{13}C_X$ (Σχ. 6.6.5.1).



Σχήμα 6.6.5.1. Κατηγορίες φασμάτων δύο διαστάσεων συσχέτισης πυρήνων.

6.6.6 Ομοπυρηνικό πείραμα COSY

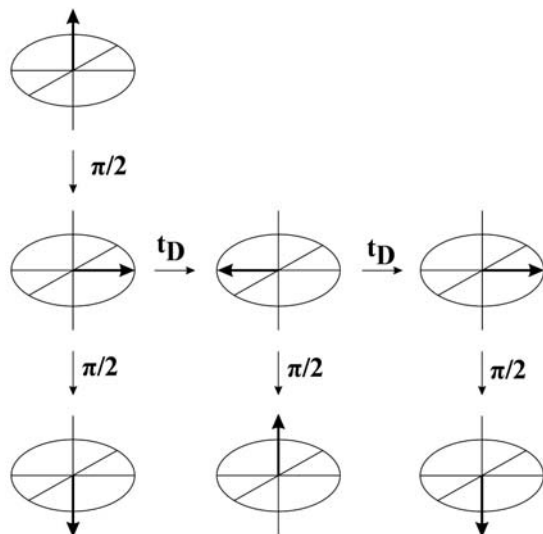
Η βασική ακολουθία παλμών σε ένα πείραμα COSY είναι $\pi/2-t_1-\pi/2$ -λήψη.

Στο σχήμα 6.6.6.1 απεικονίζεται η συμπεριφορά του ανύσματος του πρωτονίου με συχνότητα ν στην πιο πάνω ακολουθία παλμών. Παρακάτω επιχειρείται μία σύντομη περιγραφική επεξήγηση των παρατηρούμενων κορυφών με την εφαρμογή της παλμικής αλληλουχίας, η οποία εφαρμόζεται σε ένα COSY πείραμα.

Μετά την εφαρμογή του πρώτου $\pi/2$ παλμού, το μαγνητικό άνυσμα του πρωτονίου φέρεται στο επίπεδο $x\psi$ με συχνότητα ν , που εξαρτάται από τη χημική του μετατόπιση δ και τις συζεύξεις τους. Εάν ο χρόνος ανάπτυξης t_1 είναι ν_1^{-1} τότε στο τέλος του χρόνου αυτό το άνυσμα θα προσανατολισθεί στον άξονα ψ . Ο δεύτερος παλμός 90° θα περιστρέψει το άνυσμα στον $-z$ άξονα. Το τελικό αποτέλεσμα θα είναι αναστροφή της κατανομής των πληθυσμών για το ζεύγος των ενεργειακών σταθμών και για όλες τις μεταπτώσεις με τις οποίες συνδέεται το πρωτόνιο. Στην πραγματικότητα, η επίδραση μίξης του δεύτερου παλμού $\pi/2$ εξασφαλίζει ότι οι πληθυσμοί των σπιν όλων των μεταπτώσεων για όλα τα άλλα συζευγμένα πρωτόνια, διαταράσσονται.

Εάν t_1 είναι $(2\nu_1)^{-1}$ το άνυσμα θα περιστρέφεται γύρω από τον άξονα $-\psi$, πριν να επιστρέψει στον άξονα z με την εφαρμογή του δεύτερου παλμού. Αυτό αντιστοιχεί στην κανονική κατανομή πληθυσμού των σπιν.

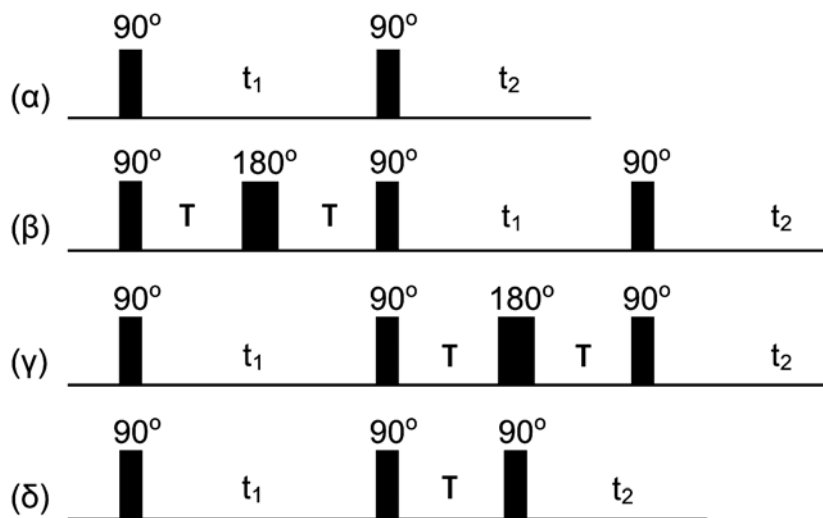
Η συχνότητα ν_1 θα μεταβληθεί κατά τη διάρκεια του χρόνου εξέλιξης t_1 , λόγω των μεταπτώσεων των πρωτονίων, των συνδεδεμένων μέσω δεσμού. Επαναλαμβάνοντας πολλά πειράματα με αυξανόμενο t_1 λαμβάνεται μία σειρά φασμάτων με κανονικές χημικές μετατοπίσεις και συζεύξεις στην ν_2 , αλλά κάθε κορυφή θα περιέχει κωδικοποιημένη πληρο-



Σχήμα 6.6.6.1. Ανυσματικό διάγραμμα στο πείραμα COSY.

φορία για τις συχνότητες όλων των άλλων κορυφών, στις οποίες συζευγνύονται. Ο δεύτερος μετασχηματισμός κατά Fourier, δίνει ένα φάσμα με τις χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων σε κάθε διάσταση. Το φάσμα μίας διάστασης βρίσκεται στη διαγώνιο, γιατί η ένταση κάθε μετάπτωσης ταλαντώνεται σε ν_1 κατά τη διάρκεια t_1 και γιατί η ανιχνευόμενη του συχνότητα σε t_2 είναι επίσης ν_1 . Οι εκτός διαγωνίου κορυφές παριστούν τις συζεύξεις μέσω χημικών δεσμών, γιατί η ένταση μετάπτωσης ν_1 τροποποιείται κατά τη διάρκεια t_1 από όλες τις μεταπτώσεις, που συνδέεται.

Η παλμοσειρά COSY και άλλων σημαντικών πειραμάτων NMR δύο διαστάσεων παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα 6.6.6.2.



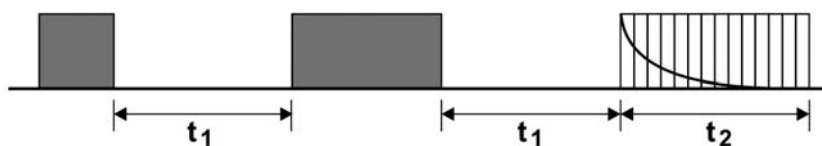
Σχήμα 6.6.6.2. Σημαντικές παλμοσειρές σε πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού δύο διαστάσεων: (α) COSY (β) DQF (Double Quantum Filter) (γ) RELAY (δ) NOESY.

6.6.7. Στάδια ετεροπυρηνικού πειράματος δύο διαστάσεων, όπου παρατηρείται σύζευξη μεταξύ ^{13}C και πρωτονίου

Η όλη πορεία ενός 2D-J NMR πειράματος στο σύστημα $-\text{CH}$ περιλαμβάνεται στο σχήμα 6.6.7.1.

Στην αρχή της περιόδου t_1 που μεσολαβεί μεταξύ των παλμών 90° και 180° , τα σπιν προσανατολίζονται και η μαγνήτιση των πυρήνων ^{13}C

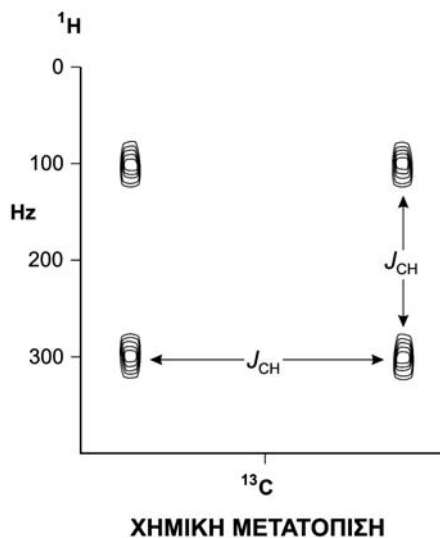
προετοιμάζεται για την περίοδο ανάπτυξης. Στη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης της μαγνήτισης (μέσο και τέλος του διαστήματος t_1), το μέγεθος του ανύσματος της μαγνήτισης στον άξονα των ψ , θα εξαρτάται από το χρόνο που προηγήθηκε, πριν ο δέκτης και αποσυζεύκτης των πρωτονίων τεθούν σε λειτουργία. Το διάστημα εκείνο κατά το οποίο συλλέγεται η FID, δηλαδή τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων των σπιν, ονομάζεται χρόνος t_2 . Η FID, που προκύπτει από έναν αριθμό μαγνητικών επιδράσεων, χρησιμοποιώντας ένα συγκεκριμένο χρόνο ανάπτυξης t_1 , υφίσταται μετασχηματισμό Fourier. Αποτέλεσμα αυτού



Σχήμα 6.6.7.1. Παλμοσειρά σε ένα ετεροπυρηνικό πείραμα, όπου παρατηρείται σύζευξη ^{13}C και πρωτονίου.

του μετασχηματισμού είναι το μονοδιάστατο φάσμα συχνοτήτων NMR, που χαρακτηρίζεται ως F_2 .

Στο φάσμα αυτό λαμβάνεται μία απλή κορυφή, της οποίας το μέγεθος (ύψος) εξαρτάται από την ορισμένη τιμή του χρόνου ανάπτυξης t_1 . Ο μετασχηματισμός Fourier της νέας συνάρτησης δίνει ένα νέο φάσμα συχνοτήτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού σε μία άλλη διάσταση και σε ένα άξονα που χαρακτηρίζεται ως F_1 . Σε αυτό το φάσμα λαμβάνονται δύο κορυφές. Η μεταξύ τους απόσταση δίνει τη σταθερά σύζευξης J των δύο συνδεδεμένων μέσω δεσμού πυρήνων ^{13}C



Σχήμα 6.6.7.2. Ετεροπυρηνική σύζευξη μεταξύ άνθρακα-13 και πρωτονίου στο χλωροφόρμιο.

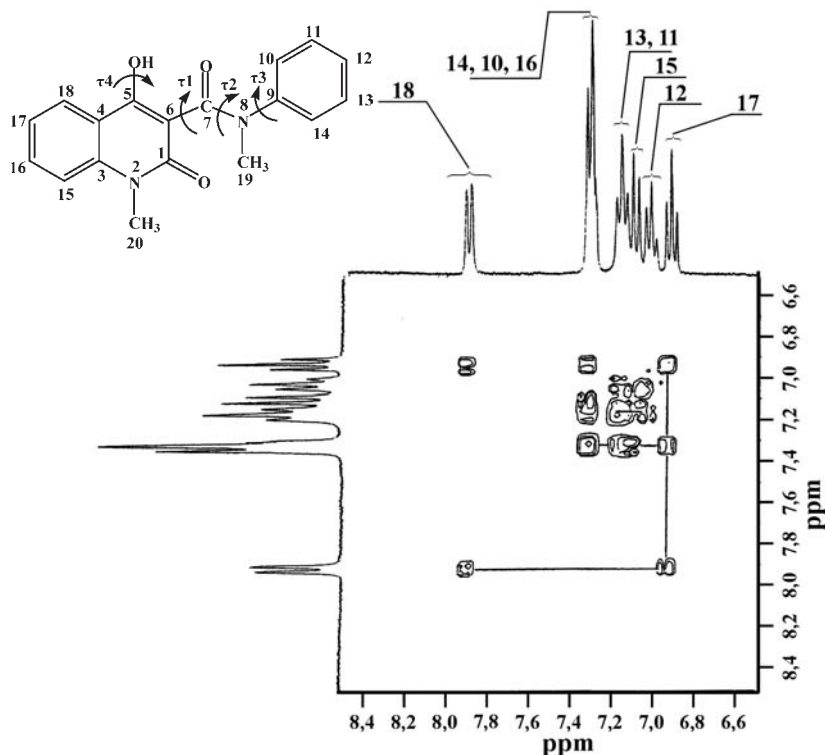
και πρωτονίου. Επομένως, στο πείραμα αυτό καταγράφονται σε δύο άξονες οι χημικές μετατοπίσεις. Στο παράδειγμα αυτό η χημική μετατόπιση του πυρήνα ^{13}C και η σταθερά συζεύξεως J .

Συμπερασματικά, οι απορροφήσεις των πυρήνων ^{13}C ενός οργανικού μορίου είναι τοποθετημένες στον άξονα F_2 . Οι σταθερές σύζευξης των πυρήνων ^{13}C και πρωτονίου των ομάδων CH_X ($X=1,2,3$) προκύπτουν από τις αποστάσεις των κορυφών, που είναι τοποθετημένες στον άξονα F_1 . Ένα παράδειγμα σύζευξης ^{13}C και ^1H στο χλωροφόρμιο (CHCl_3) απεικονίζεται στο Σχ. 6.6.7.2.

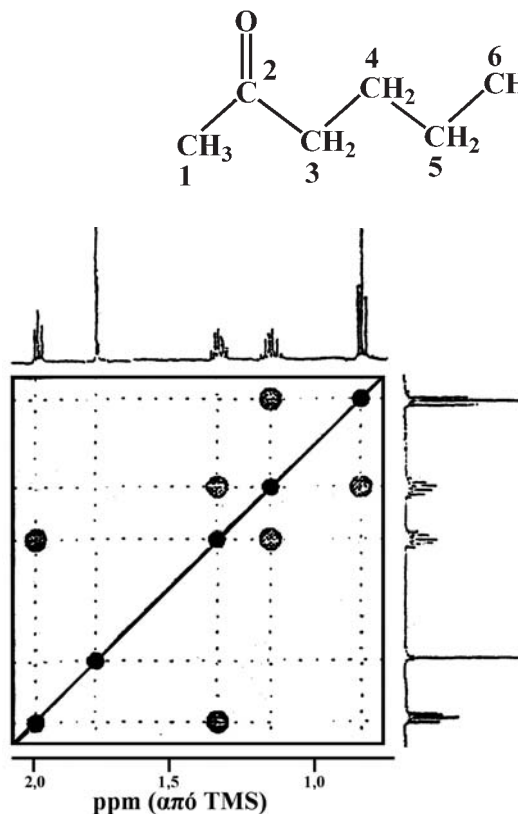
6.6.8. Παραδείγματα φασμάτων δύο διαστάσεων

Ακολουθούν παραδείγματα από τις πιο πάνω κατηγορίες πειραμάτων συσχετισμού δύο διαστάσεων NMR.

Στο Σχ. 6.6.8.1 παρουσιάζεται ένα ομοπυρηνικό πείραμα COSY της



Σχήμα 6.6.8.1. Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της αρωματικής περιοχής της λινομίδης.



Σχήμα 6.6.8.2. Φάσμα δύο διαστάσεων COSY της 2-εξανόνης.

αρωματικής περιοχής της λινομίδης. Με το πείραμα αυτό, το μόριο της λινομίδης κατέστη δυνατόν να ταυτοποιηθεί πλήρως εκτός των πρωτονίων H-19 και H-20, που ταυτοποιήθηκαν με πείραμα NOESY.

Θυμίζουμε ότι το φάσμα ^1H NMR δεν μπόρεσε να μας βοηθήσει σημαντικά, παρά μόνο στην ταυτοποίηση των πρωτονίων H-11, H-13 και H-17. Ας δούμε πως το πείραμα COSY βοηθάει στην πλήρη ταυτοποίηση των αρωματικών πρωτονίων. Τα H-11, H-13 θα έχουν συσχετισμούς μέσω δεσμού με τα H-10 και H-14, καθώς και το H-12. Το H-12 ταυτοποιείται ως τριπλή κορυφή που συντονίζεται στα ≈ 7 ppm. Επομένως η κορυφή στα $\approx 7,3$ ppm η οποία οφείλεται στο συντονισμό τριών

πρωτονίων περιέχει τα H-10 και H-14. Η τριπλή κορυφή λόγω συντονισμού στα $\approx 6,9$ ppm, πρέπει να αντιστοιχεί στο H-17 (προασπίζεται λόγω του φαινομένου της μεσομέρειας). Αυτή συσχετίζεται μέσω δεσμού με το H-16 και H-18. Λόγω του φαινομένου της μεσομέρειας το H-18 είναι το λιγότερο προασπισμένο και εμφανίζεται να συντονίζεται στα ≈ 8 ppm. Το H-16 συντονίζεται στα $\approx 7,3$ ppm.

Ας δούμε ένα παράδειγμα απλούστερης οργανικής ένωσης, όπου αποδεικνύεται η δυνατότητα ταυτοποίησης της ένωσης με μόνο οδηγό το πείραμα COSY. Το φάσμα COSY της 2-εξανόνης φαίνεται στο σχήμα 6.6.8.2.

Η κορυφή στα $\sim 1,8$ ppm αντιστοιχεί στο $-\text{COCH}_3$. Είναι απλή κορυφή και δεν συνδέεται μέσω δεσμού με κανένα άλλο πρωτόνιο. Η τριπλή κορυφή στα ~ 2 ppm αντιστοιχεί στην $-\text{C}(6)\text{H}_3$ της αλκυλικής αλυσίδας. Είναι τριπλή κορυφή γιατί υπάρχουν σε αυτή δύο γειτονικά πρωτόνια. Η $-\text{C}(6)\text{H}_3$ συνδέεται μέσω δεσμού με τη μεθυλενομάδα $-\text{C}(5)\text{H}_2$ που εμφανίζεται ως πολλαπλή (συζευγνύεται με πέντε υδρογόνα).

Αντίστοιχα τα ταυτοποιημένα πρωτόνια της μεθυλενομάδας $-\text{C}(5)\text{H}_2$ συσχετίζονται μέσω δεσμού με πρωτόνια της μεθυλενομάδας $-\text{C}(4)\text{H}_2$ και δίνουν επίσης μια πολλαπλή κορυφή (συζευγνύονται συνολικά με τέσσερα γειτονικά πρωτόνια).

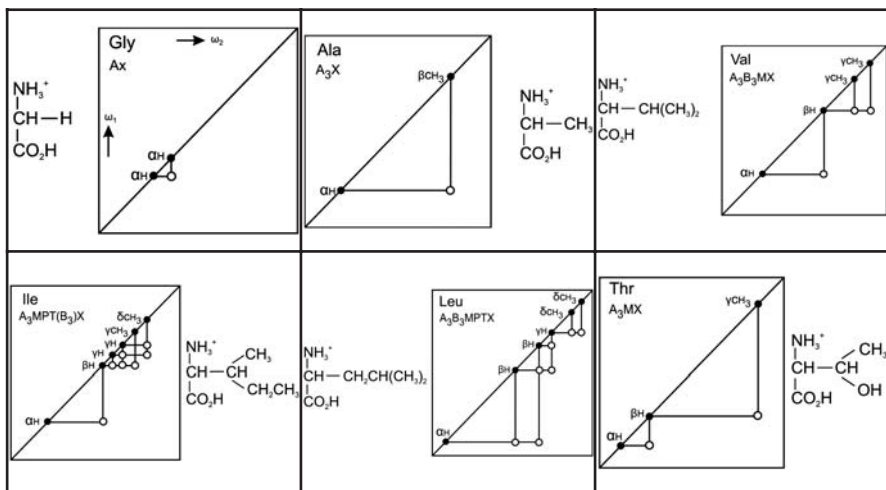
Συνοπτικά η ακολουθία συσχετισμού είναι: $\text{C}(1)\text{H}_3-\text{C}(6)\text{H}_3-\text{C}(5)\text{H}_2-\text{C}(4)\text{H}_2-\text{C}(3)\text{H}_2$.

Γενικά, πριν την ταυτοποίηση, καλό είναι να εντοπισθεί το πλέγμα συσχετίσεων και να εφαρμοσθεί η στρατηγική ταυτοποίησης με βάση το πλέγμα αυτό. Στην περίπτωση αυτή η στρατηγική, που θα έπρεπε να εφαρμοσθεί για το μόριο της 2-εξανόνης είναι η εξής. Αρχικά γίνεται ταυτοποίηση του $\text{C}(1)\text{H}_3\text{CO}$. Μετά να ακολουθήσει η ταυτοποίηση του $\text{C}(6)\text{H}_3$, η οποία θα οδηγήσει σε αναμφισβήτητη ταυτοποίηση των $\text{C}(5)\text{H}_2-\text{C}(4)\text{H}_2-\text{C}(3)\text{H}_2$. Η στρατηγική αυτή συντομογραφικά παριστάνεται ως: $1 \rightarrow 6 \rightarrow 5 \rightarrow 4 \rightarrow 3$

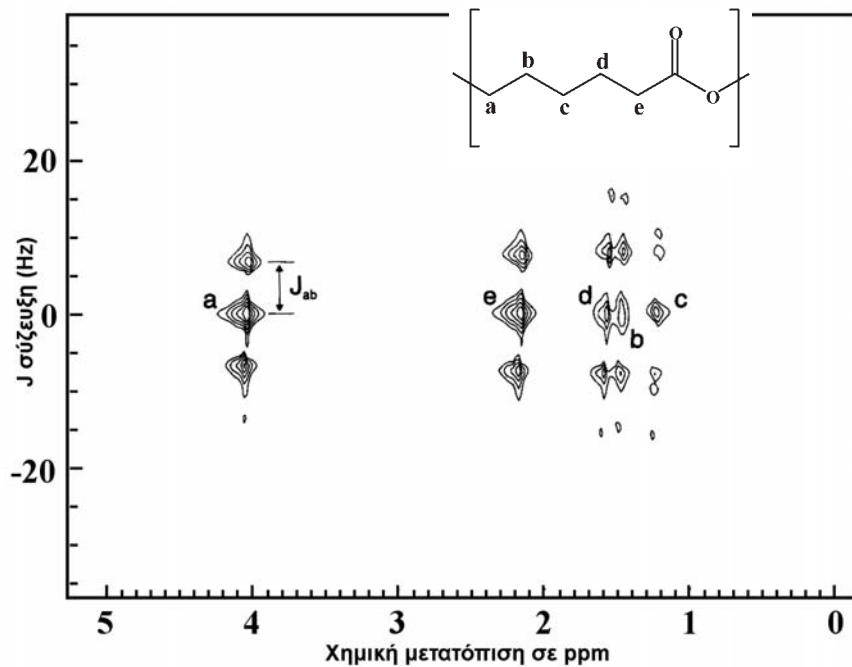
Παραδείγματα δύο διαστάσεων COSY μερικών αμινοξέων εμφανίζονται στο Σχ. 6.6.8.3.

Ας δούμε ένα παράδειγμα φάσματος 2D J-σύζευξης του πολυμερούς της πολυκαπρολακτόνης όπου το φάσμα 2D J-σύζευξης μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση του (Σχ. 6.6.8.4).

Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 500 MHz. Παρατηρείται ότι ο F_2 άξονας παριστάνει τις χημικές μετατοπίσεις των διαφόρων πρω-



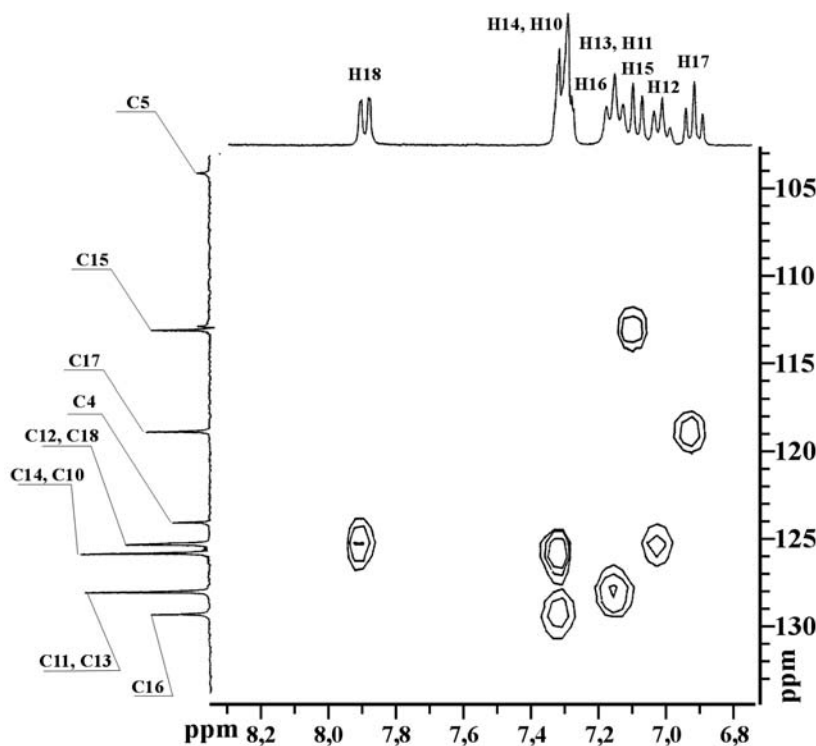
Σχήμα 6.6.8.3. Φάσματα COSY δύο διαστάσεων αμινοξέων. Οι συζεύξεις δείχνονται με συνεχείς γραμμές. Στις συσχετίσεις φαίνονται μόνο τα α, β, γ, και δ υδρογόνα φαίνονται μόνο και όχι τα όξινα υδρογόνα των -NH₂ και -COOH.



Σχήμα 6.6.8.4. Φάσμα 2D J-σύζευξης του πολυμερούς της πολυκαπρολακτόνης.

τονίων, που απαρτίζουν το μόριο (a,b,c,d,e) και ο F_1 άξονας τη J σύζευξη. Στο φάσμα φαίνεται η σύζευξη J_{ab} . Για τα δύο πρωτόνια a παρατηρείται τριπλή κορυφή, γιατί τα γειτονικά τους πρωτόνια είναι δύο b, τα οποία είναι ισοδύναμα. Μπορείτε να δικαιολογήσετε τις παρατηρούμενες υπόλοιπες πολλαπλότητες κορυφών;

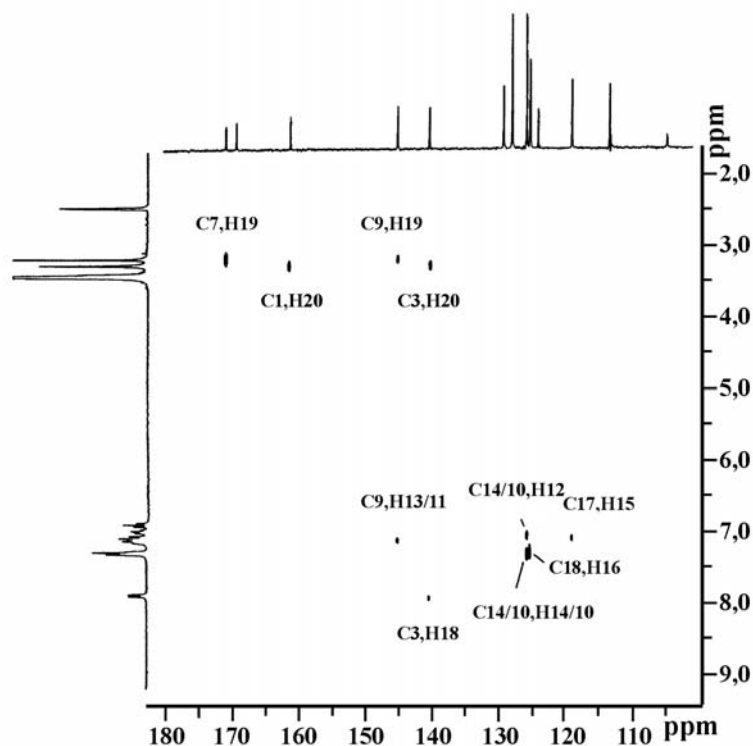
Στο Σχ. 6.6.8.5. εμφανίζεται ένα ετεροπυρηνικό πείραμα $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (HSQC-Hetero-nuclear Single Quantum Coherence) της αρωματικής περιοχής της λινομίδης. Με το πείραμα αυτό, ταυτοποιήθησαν οι άνθρακες, που συνδέο-



Σχήμα 6.6.8.5. Ετεροπυρηνικό πείραμα $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ δύο διαστάσεων της αρωματικής περιοχής του μορίου της λινομίδης.

νται με πρωτόνια. Συγκεκριμένα, είδαμε την ταυτοποίηση των αρωματικών πρωτονίων μέσω του φάσματος 2D COSY. Επομένως, οι αντίστοιχοι άνθρακες που είναι συνδεδεμένοι μέσω δεσμού με τα πρωτόνια, θα ταυτοποιηθούν με το ετεροπυρηνικό πείραμα HSQC δύο διαστάσεων.

Ένα πείραμα COLOC (αντικαταστάθηκε από το HMBC- Heteronu-



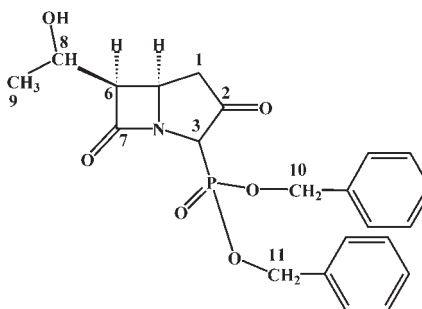
Σχήμα 6.6.8.6. Πείραμα δύο διαστάσεων ^{13}C - ^1H COLOC του μορίου της λινομίδης.

clear Multiple-Bond Correlation), επίσης του μορίου της λινομίδης, δείχνεται στο Σχ. 6.6.8.6. Με το πείραμα αυτό ταυτοποιήθηκαν οι τεταρτοταγείς άνθρακες του μορίου της λινομίδης. Στο πείραμα αυτό παρατηρούνται ^2J και ^3J συσχετισμοί ανθράκων με πρωτόνια. Εύκολα ταυτοποιούνται και οι υπόλοιποι άνθρακες όταν είναι γνωστές οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των συνδεδεμένων με αυτά ^{13}C (^{13}C - ^1H). Ο C1 στο πείραμα αυτό συσχετίζεται με το H-7 και ο C-7 συσχετίζεται με το H-19. Έτσι επιβεβαιώνονται οι χημικές μετατοπίσεις των C-1 και C-7. Επίσης, ο C-9 συσχετίζεται με το H-19 και επομένως ταυτοποιείται ο C9. Ο C3 ταυτοποιείται μέσω του συσχετισμού με τα πρωτόνια H-20 και H-18. Με τον τρόπο αυτό ταυτοποιήθηκαν όλοι οι άνθρακες του μορίου.

Με τη χρήση, λοιπόν, συνδυασμού ομοπυρηνικών και ετεροπυρηνικών πειραμάτων μίας και δύο διαστάσεων, κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων και ανθράκων της λινομίδης. Θα

δούμε στο επόμενο κεφάλαιο πώς γίνεται η επιβεβαίωση ταυτοποίησης των H-19 και H-20.

Το τελευταίο παράδειγμα αναφέρεται στην ταυτοποίηση των μη αρωματικών ανθράκων της παρακάτω ενώσεως και αφορά τη συμπλήρωση του πίνακα 6.6.8.1. Οι πολλαπλότητες στον πίνακα 6.6.8.1 αναφέρονται σε συζεύξεις C-H.



Πίνακας 6.6.8.1. Χημικές μετατοπίσεις και πολλαπλότητα των παρατηρούμενων κορυφών συντονισμού του μορίου, το οποίο είναι σχεδιασμένο δεξιά.

Χημικές μετατοπίσεις	Σχόλια
21,9 q	
41,3 t	
51,8 d	
61,0 d	$J_{cp}=161$ Hz
65,8 d	ο άνθρακας είναι συνδεδεμένος με ^1H το οποίο συντονίζεται στη χημική μετατόπιση $\delta=4.19$ ppm (qd=6.5 Hz)
68,5 d	ο άνθρακας είναι συνδεδεμένος με ^1H το οποίο συντονίζεται στη χημική μετατόπιση 4.01 ppm (dt, 2 και 7 Hz)
69,0 t	$J_{cp}=7$ Hz
69,3 t	$J_{cp}=7$ Hz
173,2 s	
207,3 s	

Πίνακας 6.6.8.2. Πίνακας προς συμπλήρωση.

Άνθρακες	Χημικές Μετατοπίσεις
C-1	
C-2	
C-3	
C-5	
C-6	
C-7	
C-8	
C-9	
C-10, 11	

Λύση:

Ο C-9 ανήκει σε μεθύλιο και θα δώσει τετραπλή κορυφή. Εύκολα λοιπόν ταυτοποιείται. Είναι επίσης ο πιο προασπισμένος και συντονίζεται στα 21,9 ppm.

Ο C-3 συνδέεται με δεσμό με φώσφορο και με ένα υδρογόνο. Επομένως, θα δώσει διπλή κορυφή. Συντονίζεται στα 61,0 ppm.

Οι C-10 και C-11 συνδέονται, επίσης, μέσω οξυγόνου με το φώσφορο. Θα δώσουν τριπλές κορυφές γύρω στα 69,0 ppm.

Ο C-1 δεν συνδέεται με το φώσφορο και δίνει τριπλή κορυφή στα 41,3 ppm.

Ο C-7 θα συντονίζεται στα 173,2 ppm λόγω της προάσπισης από το άζωτο.

Ο καρβονυλικός άνθρακας C-2 θα συντονίζεται στα 207,3 ppm.

Ο C-5 δίνει διπλή κορυφή και συνδέεται με άνθρακες που φέρουν ένα υδρογόνο και δύο υδρογόνα. Το πρωτόνιο του σχάται σε dt (διπλή-τριπλή).

Ο C-8 δίνει διπλή κορυφή και συντονίζεται στα 51,8 ppm.

Ο άνθρακας C-6 δίνει διπλή κορυφή και είναι συνδεδεμένος με ^1H , το οποίο συντονίζεται σε χημική μετατόπιση $\delta=4,19$ ppm και δίνει $q_d=6,5$ Hz.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρέχονται στον Πίνακα 6.6.8.3.

Πίνακας 6.6.8.3. Αντίστοιχος πίνακας ο οποίος φέρει συμπληρωμένες τις τιμές των χημικών μετατοπίσεων.

Άνθρακες	Χημικές Μετατοπίσεις
C-1	41,3 t
C-2	207,3 s
C-3	61,0 d
C-5	68,5 d
C-6	65,8 d
C-7	173,2 s
C-8	C-8 d
C9	21,9 q
C-10, 11	69,0 και 69,3 t

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ- ΑΣΚΗΣΕΙΣ

Ερωτήσεις

1. Ποιες μεθοδολογίες υπάρχουν για την απλοποίηση πολυπλόκων φασμάτων;
2. Γιατί από τις μεθοδολογίες αυτές, η φασματοσκοπία δύο διαστάσεων είναι η πιο διαδεδομένη;
3. Ποιες είναι οι κύριες κατηγορίες 2D-NMR φασμάτων;
4. Ποια διαδικασία ακολουθείται, για να βρεθούν οι συζεύξεις (μέσω δεσμού ή χώρου) μεταξύ δύο πυρήνων A και B;
5. Ποια είναι τα στάδια διεξαγωγής ενός πειράματος δύο διαστάσεων;
6. Τι σημαίνουν τα ακρωνύμια (α) COSY (β) DQF-COSY (γ) COLOC (δ) RELAY και (ε) HNADEQUATE;
7. Να εξηγήσετε πως δημιουργείται ένα φάσμα δύο διαστάσεων.
8. Να επεξηγήσετε την παλμοσειρά, που ακολουθείται σε ένα πείραμα COSY.
9. Ποια είναι η σημασία ενός ετεροπυρηνικού πειράματος δύο διαστάσεων;

Ερωτήσεις πολλαπλής επιλογής

1. Σε ένα φάσμα δύο διαστάσεων το στάδιο ανάπτυξης:
 - α) προηγείται του σταδίου της ανάμιξης
 - β) έπεται του σταδίου της ανάμιξης
 - γ) έπεται του σταδίου της ανίχνευσης
 - δ) κανένα από αυτά
2. Η παλμοσειρά σε ένα πείραμα COSY είναι:

α) $90^\circ-t_1-90^\circ-t_1$	β) $90^\circ-t_1-90^\circ-t_1-90^\circ$
γ) $90^\circ-t_1-90^\circ-t_2$	δ) $90^\circ-t_1-90^\circ-t_2-90^\circ$
3. Η παλμοσειρά COSY
 - α) περιλαμβάνει ένα παλμό 90°
 - β) περιλαμβάνει δύο παλμούς 90°
 - α) δεν περιλαμβάνει παλμό 90°
 - δ) περιλαμβάνει μόνο παλμούς 180°

4. Να αντιστοιχήσετε:

DEPT	Διάκριση -CH από -CH ₃ σε μια οργανική ένωση
COSY	Γειτονικές συζεύξεις στο χώρο
SPIN-ECHO	Γειτονικές συζεύξεις μέσω δεσμών
NOESY	Λήψη κορυφών με έντονο σήμα

5. Ο αριθμός των συζεύξεων μέσω δεσμών (να λάβετε υπόψη όλες τις δυνατές συζεύξεις) είναι για το μόριο της 2-υδροξυ-βουτανόλης:

- α) 6 β) 5 γ) 4 δ) 7

6. Ο αριθμός ²J συζεύξεων μεταξύ ανθράκων-πρωτονίων σε ένα ετεροπυρηνικό πείραμα δύο διαστάσεων για το μόριο της 2-υδροξυ-βουτανόλης είναι:

- α) 2 β) 3 γ) 4 δ) κανένα από τα α, β ή γ

7. Ο αριθμός των ³J συζεύξεων στο α-μεθυλο-βουτανικό οξύ, που παρατηρούνται σε ένα ετεροπυρηνικό πείραμα δύο διαστάσεων είναι:

- α) 2 β) 3 γ) 4 δ) κανένα από τα α, β ή γ

8. Η δευτερίωση χημικών ουσιών επιτρέπει

- α) την επίλυση προβλημάτων ταυτοποίησης ουσιών
 β) μελέτη βιοχημικών αντιδράσεων
 γ) μελέτη μηχανισμών οργανικών αντιδράσεων
 δ) όλα τα παραπάνω

Να απαντήσετε με Σ, αν η πρόταση είναι σωστή ή με Λ, αν είναι λανθασμένη.

1. Η φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων είναι ομοπυρηνική, αν συσχετίζονται όμοιοι πυρήνες και ετεροπυρηνική, αν συσχετίζονται διαφορετικοί πυρήνες μέσω δεσμού ή χώρου.

2. Η φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων δεν χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων, γιατί αυτά αποτελούν πολύπλοκες χημικές δομές.

3. Η συσχέτιση τριών πυρήνων αποτελεί αντικείμενο της τρισδιάστατης φασματοσκοπίας.

4. Η φασματοσκοπία ^{15}N - ^1H είναι χρήσιμη στην ταυτοποίηση πεπτιδίων γιατί αυτά πάντα περιέχουν άζωτο στη δομή τους.

5. Κάποιος ισχυρίζεται, ότι αν το εύρος των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων ήταν 1000 ppm, η φασματοσκοπία NMR θα μπορούσε να εφαρμοσθεί στην ταυτοποίηση της αλληλουχίας αμινοξέων μεγάλης μοριακής μάζας πρωτεϊνών.

6. Υπάρχει ένα πρωτόκολλο το οποίο παρέχει πληροφορίες για τη σειρά των πειραμάτων που πρέπει να ακολουθηθούν για να ταυτοποιηθεί ένα οργανικό μόριο.

7. Σε ένα φάσμα δύο διαστάσεων NMR υπάρχει καταγραφή δύο διαφορετικών πληροφοριών σε δύο διαφορετικές διαστάσεις ή σε δύο διαφορετικούς άξονες συχνοτήτων F_2 και F_1 .

8. Σε ένα φάσμα δύο διαστάσεων στον άξονα F_1 καταγράφονται πληροφορίες, όπως η σταθερά σύζευξης ή οι απορροφήσεις πυρήνων που σχετίζονται ή αλληλεπιδρούν.

9. Σε ένα ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων ^{13}C - ^1H στον άξονα F_2 καταγράφονται συνήθως οι χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων.

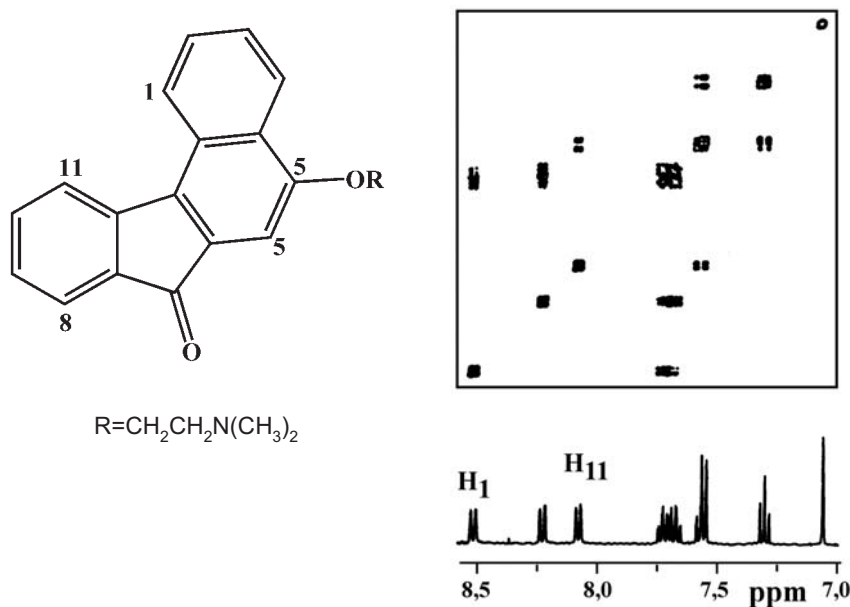
10. Στο αμινοξύ της γλυκίνης ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) θα παρατηρηθεί ένας συσχετισμός COSY των δύο διδύμων πρωτονίων της αCH_2 .

11. Στο αμινοξύ της αλανίνης ($\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$) θα παρατηρηθεί ένας συσχετισμός COSY των αCH και βCH_3 .

Ασκήσεις

1. Να παραστήσετε και να αιτιολογήσετε το φάσμα COSY του αμινοξέος της βαλίνης.

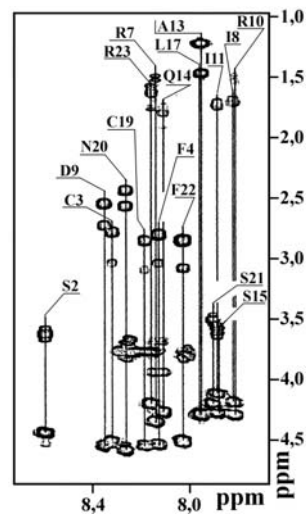
2. Δίνεται η αρωματική περιοχή COSY της ενώσεως 5-(2-διμεθυλαμινοεθόξυ)-7-οξο-7H-βεζο[c]-φλουρένιο και το φάσμα με επισημασμένα τα υδρογόνα H1 και H11. Μπορείτε να ταυτοποιήσετε τα υπόλοιπα αρωματικά υδρογόνα στο φάσμα; Λάβετε επίσης υπόψη ότι τα πρωτόνια H4 τα οποία συντονίζονται στα 8,23 ppm και H8, το οποίο συντονίζεται στα 7,57 ppm, έχουν ταυτοποιηθεί με πείραμα INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization).



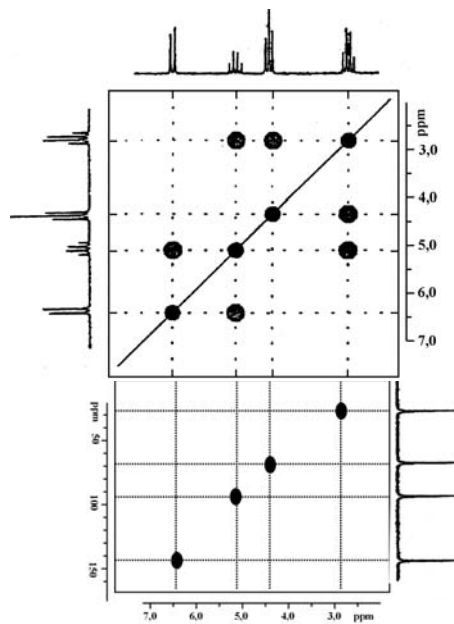
Σχήμα ΑΣ6.1. Φάσμα COSY αρωματικής περιοχής της ένωσης Α.

3. Ένα παράδειγμα πειράματος RELAY δείχνεται στο παρακάτω σχήμα για το κοιλιακό διουρητικό παράγοντα νατρίου του αρουραίου (ANF-atrial natriuretic factor). Οι γραμμές του σχήματος συνδέουν NH με α-CH ή β-CH για το κάθε αμινοξύ. Να το μελετήσετε.

Σχήμα ΑΣ 6.2. RELAY φάσμα του κοιλιακού διουρητικού παράγοντα νατρίου.

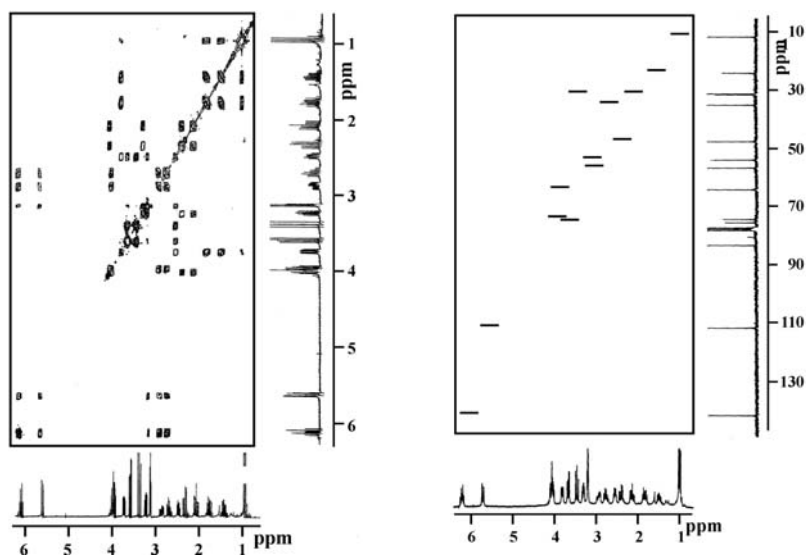
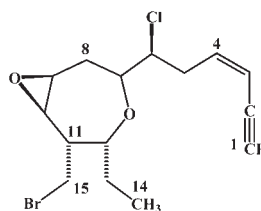


4. Να εξηγήσετε πώς με χρήση των COSY και ^{13}C - ^1H φασμάτων θα ταυτοποιήσετε τις φασματικές κορυφές συντονισμού των κορυφών, που παρατηρούνται σ' αυτά για το μόριο του 2,3-διυδροφουρανίου.



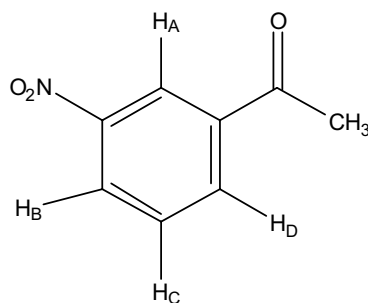
Σχήμα ΑΣ 6.3. COSY (άνω) και HSQC ^{13}C - ^1H (κάτω) φάσματα του μορίου του 2,3 διυδροφουρανίου.

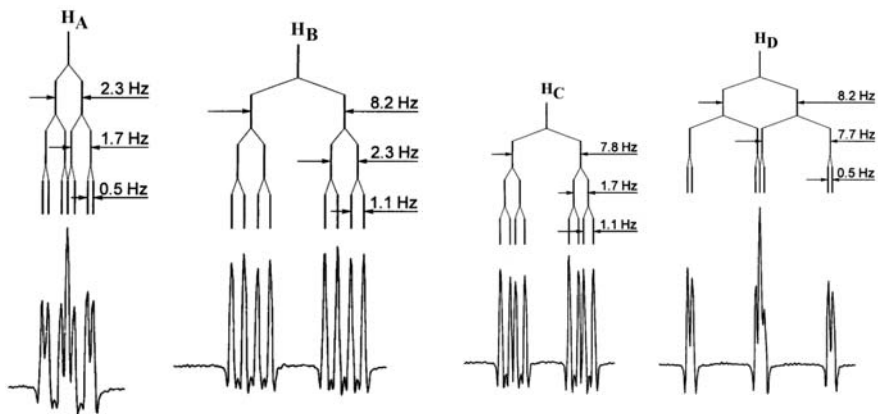
5. Να χρησιμοποιήσετε το COSY και το φάσμα δύο διαστάσεων ^{13}C - ^1H για να ταυτοποιήσετε τα πρωτόνια και τους άνθρακες της Rogiolenyne A.



Σχήμα ΑΣ 6.4. COSY και ^{13}C - ^1H φάσματα της Rogiolenyne A.

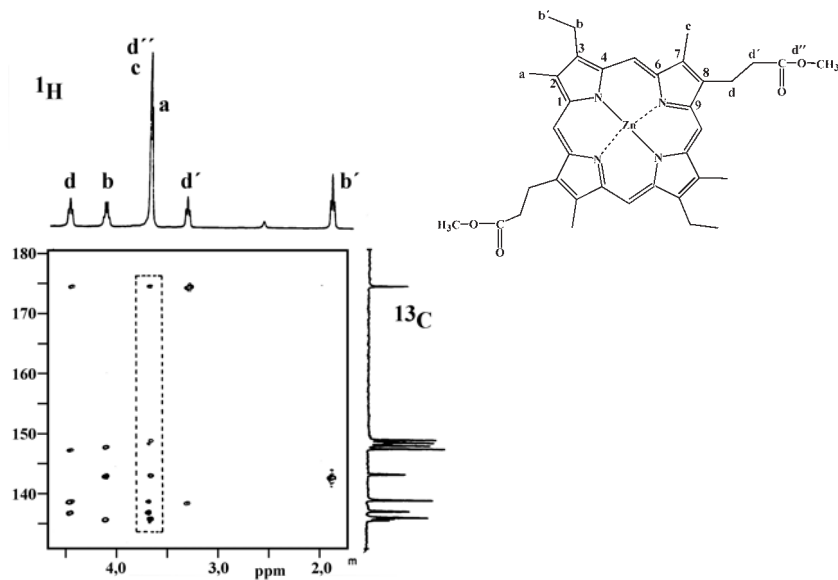
6. Δίνεται η παρακάτω ένωση και το φάσμα πρωτονίου της. Στο επόμενο σχήμα αιτιολογήστε τις συζεύξεις των πρωτονίων A, B, C και D.





Σχήμα Α5 6.5. Συζεύξεις πρωτονίων της μετα-βιτρο-ακετοφαινόνης.

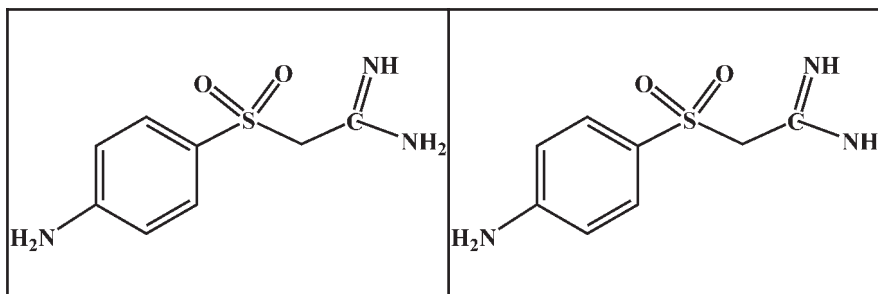
7. Στο ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων C-H της πορφυρίνης παρατηρήθηκαν 2J και 3J συζεύξεις. Να χρησιμοποιήσετε τις συζεύξεις αυτές για να ταυτοποιήσετε τους τεταρτοταγείς άνθρακες. Η ταυτοποίηση των πρωτονίων αναγράφεται πάνω από τις κορυφές του φάσματος 1H NMR.



Σχήμα Α5 6.6. Ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων C-H της πορφυρίνης με χρήση φασματογράφου 400 MHz.

Οι πολλαπλές κορυφές στα 136 ppm οφείλονται στην πυριδίνη-d5. Μόνο η περιοχή συντονισμού των τεταρτοταγών ανθράκων δείχνεται στην διάσταση F_1 . Οι συσχετισμοί των πρωτονίων των μεθυλίων (μέσα στο ορθογώνιο) είχαν πολύ ισχυρότερη ένταση και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν μόνο υψηλού επιπέδου ισοϋψείς καμπύλες.

8. Έχουν προταθεί οι δύο παρακάτω δομές της σουλφογουανιδίνης. Κάποιος ερευνητής πρότεινε ότι η φασματοσκοπία ^{15}N NMR θα μπορούσε να διευκρινίσει ποια από τις δύο δομές είναι η πραγματική με το πιο κάτω σκεπτικό. Αν η δεξιά δομή είναι η πραγματική, τότε το φάσμα θα περιέχει δύο τριπλές κορυφές. Αυτό δεν θα παρατηρηθεί φυσικά αν η δομή είναι αυτή που παριστάνεται στα αριστερά. Συμφωνείτε με το σκεπτικό του; Να θεωρήσετε ότι το άζωτο, το οποίο έχει $spin=1/2$ ακολουθεί κανόνες πρώτης τάξεως.



9. Να αναγράψετε τρία μόρια τα οποία παρέχουν φάσματα COSY, των οποίων οι χ_i συζεύξεις μέσω δεσμού λαμβάνουν αντίστοιχα τις τιμές:

$$\alpha) 3 < \chi_i < 8 \quad \beta) \chi_i > 8 \text{ και} \quad \gamma) \chi_i < 3.$$

10. Να αποφανθείτε για τη χρησιμότητα λήψης φάσματος COSY στις ακόλουθες ενώσεις.

