

Az NMR spektroszkópia alapjai

Elméleti háttér: P.W. Atkins: *Fizikai kémia*

Gyakorlat típusa: páros.

A gyakorlat célja: Az NMR spektroszkópia gyakorlati alapjainak elsajátítása, beleértve egy modern asztali NMR készülék beállítását, használatát és folyadékfázisú NMR minták készítését. A gyakorlat további célja az NMR relaxációs folyamatok alapjainak megismerése.

1. Bevezetés

1.1. Az NMR spektroszkópia alapjai

A mágneses magrezonancia spektroszkópia (angolul Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) az egyik legelterjedtebben használt műszeres analitikai technika. Segítségével mind minőségi, mind pedig mennyiségi analízisre lehetőség nyílik, ezért elterjedten használják a vegyipar számos területén, így például a gyógyszeriparban és a szerves szintetikus iparban.

Az NMR spektroszkópia segítségével azon atommagok és ezek kémiai környezete vizsgálható, melyek 0-tól eltérő impulzusmomentummal (\mathbf{I}) rendelkeznek. NMR-aktívak azok a magok, melyekben vagy a protonok, vagy a neutronok, vagy mindkettő száma páratlan, mint például a ^1H vagy a ^{13}C .

A mag impulzusmomentuma matematikailag az elektronspinnel analóg módon kezelhető. Így mind ez, mind a mágneses térben kialakuló, az impulzusmomentummal párhuzamos mágneses momentum is egy vektor jellegű mennyiség, aminek nagysága és iránya van. A mag mágneses momentumának – szintén a spinnel analóg módon – a tér egy kitüntetett irányában kvantált számú, $2\mathbf{I}+1$ vetülete lehet. Mágneses tér hiányában ezen kvantumállapotok degeneráltak, energiájuk megegyezik. Mágneses tér jelenlétében azonban már eltér ezen szintek energiája a következő egyenlet szerint:

$$E_m = \gamma m \hbar B_0 \quad (1)$$

ahol γ az adott magra jellemző giromágneses állandó, \hbar a redukált Planck állandó ($\hbar = h/2\pi$), B_0 a külső mágneses tér erősségét jellemző vektor jellegű mennyiség, a mágneses indukció, m értéke pedig $-I, -I+1, \dots, I-1, I$ lehet (ebből adódik a $2I+1$ különböző energiaállapot). Egy $I=1/2$ mágneses momentumú atommagra 2 energiaszint alakul ki (Zeeman felhasadás):

$$E_{1/2} = \frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (2)$$

$$E_{-1/2} = -\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (3)$$

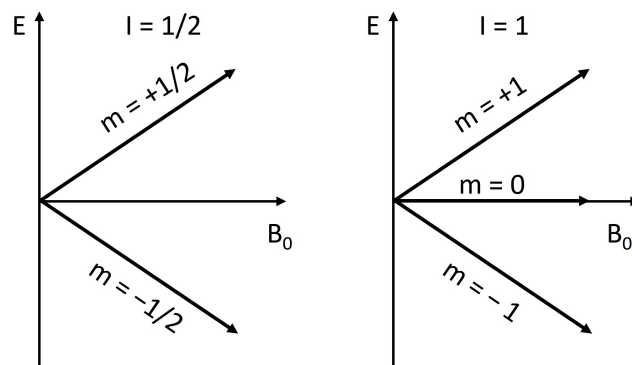
Ezek között az energiakülönbség:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (4)$$

Egy ilyen mag gerjesztéséhez a (4) egyenletnek megfelelő energiát kell befektetnünk elektromágneses sugárzás formájában. Mivel az elektromágneses sugárzás energiája $h\nu$ formában adható meg, a gerjesztésre a következő egyenletet írhatjuk fel:

$$\begin{aligned} h\nu_0 &= \gamma \hbar B_0, \\ 2\pi\nu_0 &= \gamma B_0 \end{aligned} \quad (5)$$

Ahogy az 1. ábrán is látható, az állapotok közötti energiakülönbség (felhasadás) a mágneses térerő növelésével növelhető. Mivel ezen átmenetek viszonylag kis energiájúak (a MHz-es frekvenciájú, így a méteres



1. ábra. Különböző mágneses momentumú magok mágneses térbe helyezésekor kialakuló különböző energiaszintek – a Zeeman-felhasadás.

hullámhosszúságú sugárzás, rádióhullám energiájával egy nagyságrendbe esők), még viszonylag nagy mágneses tér alkalmazása esetén is kis különbség alakul ki az egyes energiaszintek betöltöttségében. A technika érzékenységének növeléséhez a felhasadás növelésére van szükség, amit a mágneses tér növelésével lehet tehát elérni. A kutatásban elterjedt készülékekben így tipikusan nagy mágneses teret (10–20 Tesla közötti mágneses indukció) létrehozó elektromágneseket alkalmaznak erre a célra. Ez teszi az NMR spektroszkópiát költséges technikává, ugyanis a megfelelően homogén mágneses tér kialakításához az elektromágneseket cseppfolyós héliummal kell hűteni. A felhasadás mértéke, ezáltal a módszer érzékenysége ezen kívül még a vizsgált mag típusától, annak giromágneses állandójától, illetve az NMR aktív izotóp arányától függ. Ez utóbbi miatt a ^1H NMR spektroszkópia jelentősen érzékenyebb, mint a szénatomok NMR vizsgálata, utóbbi esetben ugyanis a csupán 1%-os természetes előfordulású ^{13}C az NMR aktív.

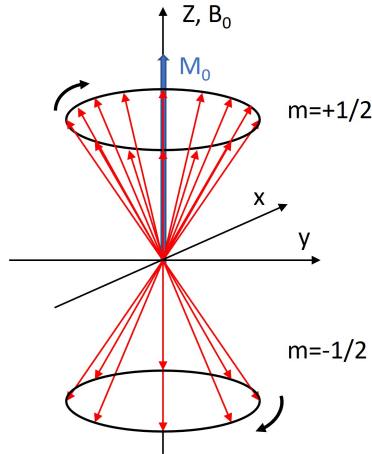
1.2. Az NMR jel kialakulása

Az NMR jel kialakulásának megértéséhez a következő megfontolásokat kell tennünk, a teljesség igénye nélkül. Mágneses tér jelenlétében a korábban elmondottak alapján a mag mágneses momentuma csak bizonyos irányokba állhat be. Egy z-tengely irányába mutató mágneses tér esetén ez azt jelenti, hogy a mágneses momentum vektorok egy a tengely körüli kúp palástján fognak elhelyezkedni, véletlenszerű xy-elrendezésben (2. ábra). Valamivel több impulzusmomentum vektor mutat a mágneses tér irányába (az ábrán felfelé), de a kis energiakülönbség miatt a különböző energiaszintek betöltöttségében nagyon kicsi a különbség. Ennek eredményeképp egy z-tengely irányába mutató eredő mágnesezettség alakul ki (M_0). A mágneses indukció (B_0) és a hozzá képest egy bizonyos szögben álló egyedi mágneses momentum vektorok között fellépő erőhatás miatt azok a körpalást mentén egyenletes sebességgel haladnak körbe – ezt nevezzük Larmor-precesszióknak (2. ábra). A precesszió sebessége:

$$v_{\text{Larmor}} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (6)$$

ahol v_{Larmor} a (gerjesztési frekvenciával megegyező) Larmor-frekvencia. Fontos hangsúlyozni, hogy a mágneses impulzus vektor nem csak a mágneses térrel párhuzamos irányba, hanem az impulzusmomentum kvantáltóságának megfelelő irányokba állhat be. A mintát kivéve a mágneses térből az impulzusmomentumok elhagyják a kúppalástot (az energiaszintek ismét degeneráltakká válnak), majd rövid időn belül 0-vá válik az eredő mágnesezettség.

Az NMR jel rögzítéséhez egy B_1 tekercsre van szükségünk, amelyet a B_0 térre merőlegesen helyezünk el a készülékben. A gerjesztő energiaforrás így egy váltakozó áram által kiváltott oszcilláló elektromágneses sugárzás (rádióhullám). Amikor a gerjesztő frekvencia és az átmenet kiváltásához szükséges frekvencia megegyezik, létrejön az NMR rezonancia (gerjesztés), ami az NMR mérés alapja. Ekkor az eredő mágnesezettség vektor az xy-síkba fordul (egy általános 90° -os pulzust példaként véve, amely hatására a két energiaszint betöltöttsége kiegyenlítődik), és továbbra is precesszál a z-tengely körül. A gerjesztés másik



2. ábra. A magspinek beállása mágneses térben, és a Larmor precesszió.

fontos hatása, hogy a spinek "összetorlódnak" a kúppalástok mentén, szemben a gerjesztés előtti egyenes elhelyezkedésükkel. A gerjesztést megszüntetve a rendszer a precesszáls során relaxál, és visszaáll az eredeti z-irányú mágnesezettség. Az xy-síkra eső, úgynevezett transzverzális mágnesezettség csökkenését egy megfelelően elhelyezett tekercs segítségével detektálhatjuk (a jegyzetben I-vel jelöljük a mért jelintenzitást) – ez a relaxációs görbe adja majd az NMR-jelét. Ez az időben oszcilláló jel a FID (Free Induction Decay – szabad indukciós lecsengés), ami néhány másodperc (egyes esetekben perc) alatt exponenciális burkológörbék között csökken nullára (3. ábra).

1.3. Relaxációs folyamatok az NMR spektroszkópiában, és az ezek mérésére alkalmazott pulzus-szekvenciák

Más pulzusokat, vagy esetleg pulzussorozatokat alkalmazva elérhető, hogy a mágnesezettség vektor ne 90°-kal forduljon el, hanem gyakorlatilag bármilyen tetszőleges szöggel. A modern NMR mérések során különböző pulzusprogramok alkalmazásával számos szerkezeti információt nyerhetünk ki.

Az energiaszintek kis különbsége (kis hajtóerő) miatt az NMR relaxáció gyakran igen sokáig, akár percekig is eltarthat, szemben a más spektroszkópiai technikáknál megszokott szinte pillanatszerű folyamatokkal. Ez egyrészt mérés-technikai korlátot jelent, mivel a mérést a relaxációs idő vége előtt ismételve torzul a jelalak. Másrésztől ez a lassú relaxáció teszi lehetővé a különböző pulzusok alkalmazását, mivel az ezek során alkalmazott mikro- és milliszekundumos várakozási idők bőven "beleférnek" a gerjesztett állapot élet-tartamába. Ez képezi az összes bonyolultabb pulzusszekvenciával elvégzett NMR mérés alapját, így kiemelt fontosságú például a klinikai MRI vizsgálatok során is. A relaxációs idők ismerete ezért a mérések tervezésekor elengedhetetlen fontosságú.

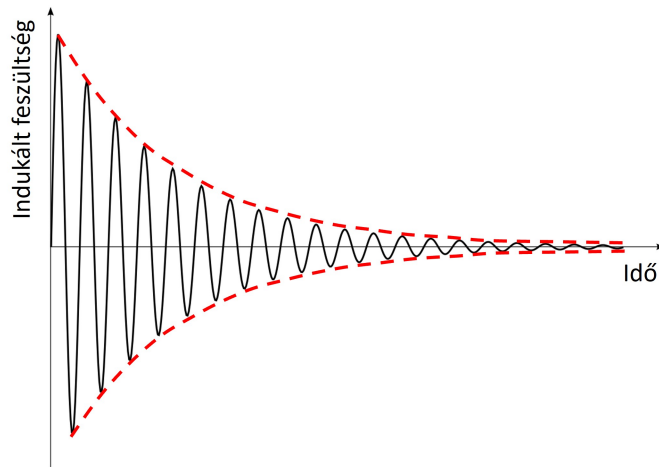
A relaxáció alapvetően két mechanizmus alapján történik:

- Longitudinális vagy spin–rács relaxáció (T_1), azaz a mágnesezettség z-irányú komponensének visszaállása. T_1 értékét a következő exponenciális kifejezés alapján számolhatjuk:

$$I(t) = I_0 \left(1 - 2e^{-\frac{t}{T_1}} \right) \quad (7)$$

- Transzverzális vagy spin–spin relaxáció (T_2), azaz a mágnesezettség xy-irányú komponensének eltűnése. T_2 értékét a következő exponenciális kifejezés alapján számolhatjuk:

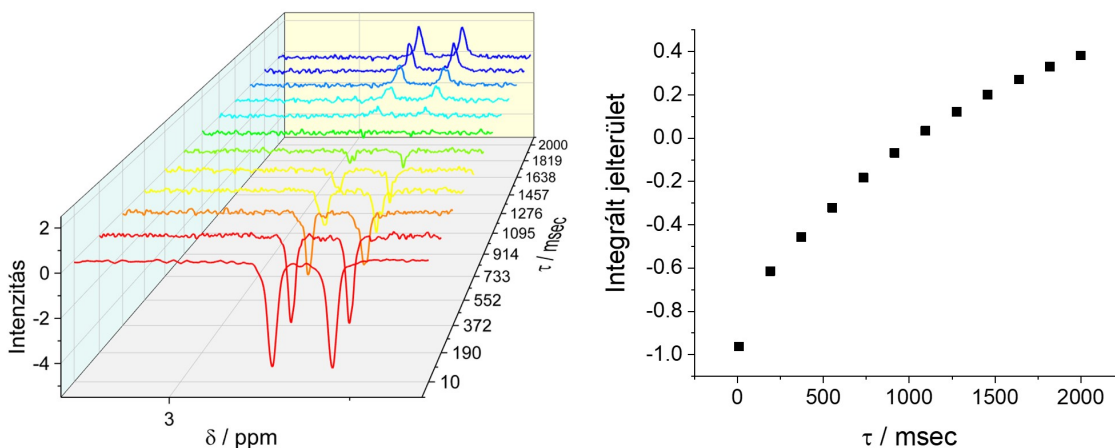
$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (8)$$



3. ábra. Egy tipikus NMR mérés során rögzített FID jel.

A T_1 és T_2 idők meghatározásához két eltérő pulzusszekvencia alkalmazására van szükség. T_1 esetében ez tipikusan egy 180° -os impulzust jelent, azaz a mágneszettség teljes átfordítását. Ezt követően a rendszer relaxációja során a z-irányú mágneszettség kiolvasása változtatott várakozási időt (τ) követően egy 90° -os impulzus segítségével történik az xy-síkban elhelyezett tekercs segítségével.

A könnyebb elképzelhetőség érdekében a 4. ábra egy tipikus T_1 relaxációs idő meghatározására végzett mérés eredményét mutatja be. Jól látható, hogy a 180° -os impulzus után kis várakozási időket alkalmazva negatív jeleket mérünk. Ezek a várakozási idővel fokozatosan csökkennek, majd pozitívba fordulva nőnek, egy végső mérethez közelítve. Megjegyzendő, hogy itt nem csak egy proton, hanem az összes mintában található proton egyidejű gerjesztése történt, így minden protonra megfigyelhetjük a relaxációt. A relaxációs idők egy adott molekula különböző kémiai környezetű protonjai között is eltérők lehetnek. Egy adott protonhoz (vagy több kémiai azonos protonhoz) tartozó jelcsoport alatti terület a T_1 mérés során ismertett összefüggés alapján változik a késleltetési idővel. A jel terület- τ adatsorra illesztve a (7) egyenlet alapján határozhatjuk meg T_1 értékét.



4. ábra. Egy tipikus T_1 NMR mérés során rögzített adatsor és az abból származtatott ábra.

A T_2 mérése tipikusan egy 90° -os impulzussal kezdődik. Ezt követően egy adott várakozási idő jön, ami alatt megkezdődik a spinek "szétterülése" az xy-síkban. Ezt egy 180° -os impulzus követ, ami után megkezdődik a spinek re-fókuszálása. Ugyanakkora várakozási időt követően áll össze a "visszhang", aminek a lecsengését időben követve határozhatjuk meg T_2 értékét. Ez az úgynevezett spin-visszhang (spin-echo) kísérlet.

A relaxációs idők a vizsgált molekula mellett számos kísérleti paramétertől, valamint az oldatösszetételtől

is nagyban függenek. Paramágneses anyagok jelenléte a mintában például nagyon felgyorsítja a relaxációt. Ennek oka a paramágneses anyag spinje és a vizsgált mag között kialakuló dipoláris kölcsönhatás.

1.4. A kémiai eltolódás skála

Az NMR spektroszkópia elterjedésének oka – azon kívül, hogy egy adott atom jelenlétét igazolhatjuk/kizárhatjuk – az, hogy a kémiai környezetéről is információt kapunk. Ennek oka, hogy egy vegyületben lévő adott atom-magra ható mágneses teret a környezetében lévő egyéb atommagok árnyékolhatják, így az a B_0 -tól eltérő nagyságú mágneses teret "érzékel". Ennek a mágnesnek a gerjesztéséhez továbbra is a (5) egyenletnek kell teljesülnie, amelyben azonban a B_0 helyét az effektív mágneses térerő ($B_{\text{effektív}}$) veszi át:

$$B_{\text{effektív}} = B_0(1 - \sigma_x), \quad (9)$$

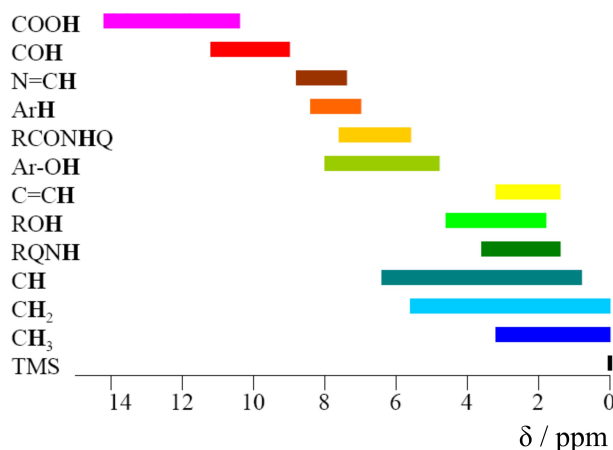
ahol σ_x az adott "X"-el jelölt atommag (pl. proton) kémiai környezetére jellemző mértékegység nélküli árnyékolási állandó. Az árnyékolásnak köszönhető, hogy egy adott vegyületben található két azonos atommag is eltérő frekvencián gerjeszthető, így azok megkülönböztethetők. Az árnyékolás mértéke számos forrásra vezethető vissza, amelyek részletes tárgyalása nem célja a laborgyakorlat elméleti bevezetőjének. Azt azonban általánosan megjegyezzük, hogy a vizsgált atommagok közelében lévő elektronszívó csoportok csökkentik azon az elektronsűrűséget és a mag nagyobb effektív térerősséget érez. Emiatt a felhasadás mértéke is nagyobb lesz, így ehhez a protonhoz nagyobb gerjesztési energia (frekvencia) tartozik. Elektronküldő csoportok közelségében az elektronsűrűség megnő a vizsgált magon, így az kisebb térerőt érez. A felhasadás mértéke, így a rezonancia frekvencia is kisebb lesz ebben az esetben.

Az NMR készülékekkel kapcsolatban fontos észrevétel, hogy azok teljesítményét az elsősre logikusnak tűnő mágneses térerősség helyett egy frekvenciával jellemezzük (pl. 600 MHz). Ez a frekvencia a mintára ható mágneses térben a szabad hidrogén atom gerjesztéséhez szükséges frekvencia. Mivel a különböző készülékek eltérő térerőjű mágneseket alkalmaznak, egy adott vegyület adott atommagja eltérő frekvencián ad jelet. A különböző készülékeken mért eredmények így nehezen lennének összehasonlíthatóak. Ennek kiküszöbölésére vezették be a kémiai eltolódást (δ). Egy adott X mag kémiai eltolódása a következő képlettel számolható:

$$\delta_X(\text{ppm}) = \frac{\nu_X - \nu_{\text{ref}}}{\nu_0} 10^6 \quad (10)$$

ahol ν_0 a mérés (készülék) frekvenciája, ν_X az adott mag rezonancia frekvenciája a vizsgált anyagban, ν_{ref} pedig ugyanazon mag rezonancia frekvenciája egy referenciaként választott vegyületben. Az azonos, de eltérő kémiai környezetben lévő magok gerjesztéséhez szükséges energia általában csak nagyon kicsit tér el. A kémiai eltolódás számolásakor ezért szorzunk 10^6 -al, hogy ne nagyon kicsi számokkal kelljen dolgozni. Innen származik a ppm mértékegység, ami a milliommódrész (**p**arts **p**er **m**illion) angol rövidítése. A kémiai eltolódások használatával már egyszerűen összehasonlíthatóvá válnak a rögzített spektrumok.

Referencia anyagként a ^1H , a ^{13}C és a ^{29}Si NMR mérések során TMS-t, azaz tetra-metil-szilánt (SiMe_4) használnak. Ennek oka, hogy a TMS-ben 12 proton található, ami mind kémiaiilag ekvivalens, így intenzív és éles jelet ad. Ezen kívül a központi Si atom erős elektronküldő hatása miatt a TMS protonok erősen árnyékolnak. Ez azt okozza, hogy a TMS 0 ppm kémiai eltolódásnál lévő protonjainál a legtöbb proton jele nagyobb δ értékeknél jelenik meg (a kisebb árnyékolás miatt nagyobb térerőt éreznek, ami nagyobb felhasadást okoz). A 5. ábra néhány tipikus funkciós csoportban található proton kémiai eltolódását mutatja be a reference TMS-hez, mint 0 ponthoz viszonyítva. Fontos megjegyezni, hogy az oldat összetevői és az egyéb kísérleti paraméterek változtathatnak ezeken az értékeken. Az NMR spektrumok értelmezésekor ugyanakkor minden esetben az első lépések közé tartozik a kémiai eltolódások analízise, és annak valószínűsítése, hogy ezek milyen funkciós csoporthoz tartozhatnak.



5. ábra. Különböző funkciós csoportok tipikus ^1H NMR eltolódásai.

1.5. Jelfelhasadás az NMR spektroszkópiában

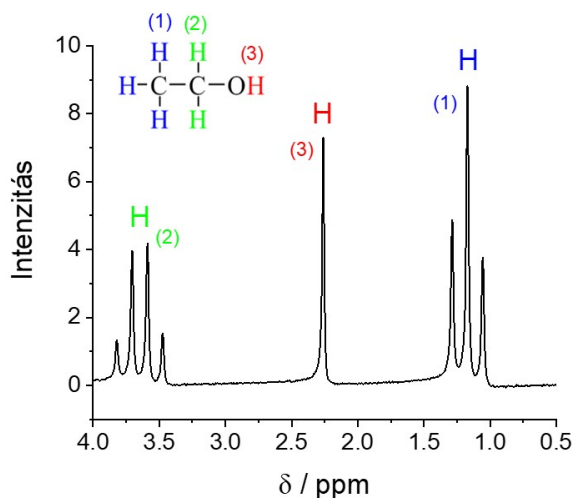
Még egyszerű szerves anyagok proton NMR spektrumán is gyakran megfigyelhető a jelek felhasadása, és különböző jelcsoportok megjelenése. Ennek oka megint az egyes magok által érzékelt effektív mágneses tér nagyságában keresendő, melyet a kémiai környezetük befolyásol. Két egymáshoz közel elhelyezkedő, de kémiaiilag nem ekvivalens $I=1/2$ -es atommagot véve példaként, azok kölcsönösen hatnak egymásra. Mágneses térben az A és B magspinje is orientálódhat mind a mágneses térrel azonos, mind pedig azzal ellentétes irányba. Ez a kétféle orientáció kihat a közelben lévő magok által érzékelt lokális mágneses térre ami így szintén kétféle lehet. Ez az érintett magok jelének felhasadásához vezet, ami a közelben lévő felhasadást okozó magoktól és azok számától is függ, ezért különböző jelcsoportok kialakulásához vezethet. A felhasadásból ezért következtethetünk a felhasadást okozó kémiaiilag azonos atomok számára is. Erre egy példát láthatunk a 6. ábrán. Látható, hogy a baloldali szénatomon három, kémiaiilag azonos proton helyezkedik el, amik emiatt egy NMR jelként jelennének meg. Ez a jel azonban felhasad a szomszédos szénatomon található, egymással szintén kémiaiilag azonos protonok hatására ($n+1$ szabály). Hasonlóképpen a másik szénen lévő két proton is egy jelet adna csak, ami egy kvartetté hasad fel a szomszédos szénen lévő 3 proton hatására. Az alkoholcsoportban található hidrogénhez szingulett jel tartozik, ez ugyanis már 3 kötési távolságra található a legközelebbi protonoktól is, és a csatolás ilyen távolságban már tipikusan túl gyenge a jel felhasadásához. Az NMR spektrum és a molekula szerkezete között egy ilyen egyszerű molekula esetében tehát egyszerűen megtaláljuk a kapcsolatot. Bonyolultabb molekulák esetén ez a hozzárendelés már nem ilyen egyszerű, de ennek részletes tárgyalása nem célja ennek a laboratóriumi gyakorlatnak.

A ^1H NMR spektrumok kapcsán fontos azt is megemlíteni, hogy az egyes jelcsoportok alatti terület az azokhoz rendelhető protonok számával is korrelál, ami tovább segíti a spektrum értelmezését. A példaként bemutatót a 6. ábrán balról jobbra haladva 2:1:3 arányban vannak a jelcsoportok területei, az azokhoz tartozó protonok számával összhangban. Ismeretlen anyagok azonosításakor a jelcsoportok területének integrálása a kémiai eltolódások megvizsgálása mellett az egyik fontos kiértékelési lépés.

2. A gyakorlat során végrehajtandó kísérletek

A gyakorlat célja az NMR spektroszkópia gyakorlati alapjainak elsajátítása, valamint a korábban szerzett elméleti ismeretek elmélyítése. Ennek érdekében a hallgatók elvégezzék:

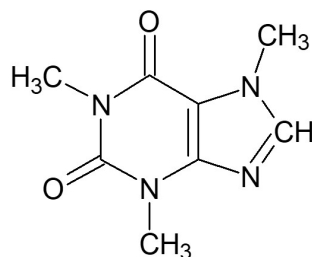
- Egy kvalitatív mérést, az NMR spektrumok értelmezésének alapjainak elsajátítását segítő. A hallgatók rögzítik néhány egyszerű szerves vegyület ^1H NMR spektrumát. Ezeket értelmezve, valamint a lehetséges kiadott anyagok listáját alapul véve meghatározzák, hogy melyik vegyületek NMR spektrumait rögzítették.



6. ábra. Az etanol molekula ^1H NMR spektruma a gyakorlat során használt készüléken rögzítve.

- Egy kvantitatív mérésről, aminek célja az NMR relaxációs folyamatok és az alkalmazott pulzus-szekvenciák megértése. Egy egyszerű modellvegyület (koffein) alkalmazásával vizsgálják az NMR relaxációs folyamatokat, így meghatározzák a T_1 és T_2 időket.

A 7. ábra a koffein molekula szerkezeti képletét mutatja be. Ezen megfigyelhető, hogy a molekulában 3 metilcsoport és egy további hidrogén található. A metilcsoportok kémiai környezete eltér, így összesen 4 jelcsoport várható a ^1H NMR spektrumon.



7. ábra. A koffein molekula szerkezeti képlete.

2.1. Oldatkészítés és az NMR csövek megtöltése

Mivel a víz protonjai is NMR aktívak, az ezekhez tartozó jel vizes oldatokban nagyon nagy, ami zavarja a többi proton mérését is. Ennek kiküszöbölésére két megoldás van: vagy folyamatos gerjesztésben tartjuk a víz protonjait, ezáltal megszüntetjük azok jelét az NMR spektrumon, vagy vízmentes oldószereket alkalmazunk. A gyakorlat során ez utóbbi megoldást választjuk, és a méréseket H_2O helyett D_2O alkalmazásával hajtjuk végre. A gyakorlat során a következő oldatok NMR spektrumait fogják rögzíteni, ezeket kell elkészíteni:

- **I. oldat:** $c = 70$ mM koffein oldat D_2O oldószerben,
- **II. oldat:** $c = 70$ mM koffein oldat D_2O oldószerben, amely $500 \mu\text{l}$ -éhez $10 \mu\text{l}$ kobalt(III)-acetilacetonát $0,09$ mM-os oldatát adják ,
- **III. oldat** $c = 70$ mM koffein oldat D_2O oldószerben, amely $500 \mu\text{l}$ -éhez $10 \mu\text{l}$ gadolinium(III)-klorid $0,09$ mM-os oldatát adják.

Mivel a D_2O drága vegyszer, és a méréshez nem is szükséges nagy oldattérfogat, így az oldatokból minden esetben kb. $V=1000 \mu\text{l}$ -t készítsenek. Ehhez a szilárd anyagot tiszta és száraz Eppendorf csövekbe mérjék

analitikai mérlegen, majd ehhez adják hozzá pipettával az 1000 μl oldószert. Az oldat sűrűségének eltérése a tiszta oldószertől valamelyest torzíja a koncentrációt, de ez a minimális eltérés a gyakorlat szempontjából nem okoz gondot.

Az oldatok elkészítése után azok 500 μl -es részleteit külön-külön, új, vagy tiszta, 5 mm-es átmérőjű NMR csövekbe kell tölteni, majd azokat le kell zárni a csövekhez tartozó műanyag kupakkal. Fontos ügyelni arra, hogy az NMR csövek viszonylag vékony falúak, így azokat könnyű eltörni. A kupakot ezért a mellékelt műanyag csőbe helyezett NMR csövekre óvatosan nyomják rá. Az NMR csövek töltésekor ügyeljenek arra, hogy a minta oldat alatt ne szoruljon be a levegő! Ennek elkerülésére érdemes az automata pipettából az NMR cső belső falán végigfolyatni az oldatot. Az oldatok készítésénél fokozottan ügyeljenek a gyors (de ugyanakkor pontos) munkára! A D_2O hosszabb levegővel való érintkezés során annak páratartalma miatt H_2O -ban feldúsulhat, ami rontja az NMR mérést. A D_2O ezen kívül drága vegyszer, így csak annyit használjanak el, amennyi szükséges. Ebben az esetben közvetlenül mérhetik ki az oldószert a folyadéküvegből, egy tiszta mérőeszköz (pl. pipetta) segítségével. Az NMR csövekbe töltött mintákat tegyük az NMR készülék mellett elhelyezett előmelegítő egységbe és tartsuk abban közvetlenül az adott mérés megkezdéséig. Ez biztosítja, hogy a minta hőmérséklete a készülékkel megegyező, és homogén legyen.

A mérendő oldatot tartalmazó csövet ezt követően helyezték a készülék tetején található nyílásba. Ügyeljenek arra, hogy a csöveket egészen a mérőtér aljáig nyomják, de ne túl erősen, nehogy eltörjék azokat. A méréseket ezt követően az 1. Mellékletben leírtak alapján állítsák be és indítsák el.

A készülék kalibrálásához és a shimelés elvégzéséhez rendelkezésre áll egy sztenderd, D_2O – H_2O minta, amely egy kék dugóval leforrasztott végű NMR csőben található. A készülékkel való munka végeztével minden esetben ezt a mintát hagyják a mintatérben. A shimelés elvégzéséhez szintén ezt a mintát kell a készülékbe helyezni.

2.2. Elvégzendő kísérletek

1. A készülék működésének elsajátítása (a gyakorlatvezető segítségével és az 1. Melléklet alapján) után vegyünk fel az I. oldat ^1H NMR spektrumát 8 spektrum átlagolásával, a spektrumok között 5 másodperces várakozási idővel. Ehhez az 1D mérési eljárást válasszák ki. A spektrumot 0–12 ppm kémiai eltolódás tartományon vegyünk fel. Ehhez a spektrum közepét 6 ppm-re, a szélességet 12 ppm-re kell állítanunk.
2. Ezt követően helyezték a készülékbe a kék végű sztenderd oldatot, majd végezzük el a készülék térhomogenizálását (angol szóval shimelés).
3. Ezt követően ismét vegyünk fel az I. oldat 1D ^1H NMR spektrumát! Hasonlítsuk össze a két spektrumot!
4. Végezzük el az egyes NMR csúcsok azonosítását a koffein molekula NMR spektrumán! Ehhez például a J. Chem. Educ. 2019, 96, 786-791 cikkben található segítséget. Ez a közlemény egyetemi hálózatról elérhető, ingyenesen letölthető. Saját otthoni számítógépről az SZTE-s eduID-vel való bejelentkezéssel szintén elérhető (<https://u-szeged.hu/cc/eduid>).
5. A készülék használati utasítása (1. Melléklet) alapján végezzük el a spektrum kiértékelését (fázis és alapvonal korrekció) és integrálják az egyes jelcsoportok területét. Az integrálást csak a metilcsoportokhoz tartozó protonokra végezzük el (3 jelcsoport). A készülék az ekkor kijelölt jelcsoportokat megjegyzi, az ezt követő relaxációs mérések (T_1 és T_2) során ezen integrálok változását fogja kiértékelni.
6. Végezzünk T_1 mérési kísérletet! Először egy szélesebb tartományon, 10–5000 ms között változtassuk a késleltetési időt (τ), 12 ponton mérve. A programban csak a tartományt és a pontok számát kell megadni, a pontos késleltetési időket ezek alapján határozza meg a készülék a kért lineáris/logaritmikus skálán egyenletesen elosztatva. Csak 1–1 spektrumot rögzítsünk minden késleltetési időnél. A mért

eredmények alapján pontosítsuk a késleltetési idő tartományt úgy, hogy az csak az exponenciális változást tartalmazza, az azt követő állandósult spektrumalakot (integrált) ne. Ismételjük meg a mérést szintén 12 különböző késleltetési időnél, de már a pontosított tartományon, 8 spektrumot rögzítve minden pontban.

7. Végezzünk T_2 méréseket az előző pontban írottakhoz hasonlóan, az ott vázolt kezdeti paraméterek mellett! A helyes időtartomány megtalálása után szintén 12 különböző késleltetési idő esetén 8 spektrumot rögzítve végezzenek mérést.
8. Ismételjék meg a 3–7 lépéseket a II.-III. oldatokra is (a csúcsok azonosítását természetesen elég egyszer megcsinálni)!
9. A gyakorlat végén vegyék fel a kiadott ismeretlenek ^1H NMR spektrumát a korábban alkalmazott mérési körülmények között.
10. A mérési eredményeket exportálják egy hordozható adattárolóra JCAMP-DX formátumban.
11. A mérés végén a készülék mágneses terének homogenizálásához használt kék végű mintát helyezték a mérőtérbe.

3. A mérési eredmények értékelése

A mérési eredmények kiértékeléséhez használjuk a MestreNova szoftvert! Ez ugyan egy fizetős program, de regisztrációt követően kérhető egy 45 napos kiértékelő licenz, amivel a gyakorlat kiértékelése elvégezhető. A programot a <https://mestrelab-store.myshopify.com/> honlapról tölthetik le. Az ingyenes próba licenz kérvényezésekor kérjék az összes NMR modul aktiválását.

- Ábrázolják a koffein 1D ^1H NMR spektrumát és végezzék el az egyes jelcsoportok azonosítását a molekulaszervezet alapján! Hasonlítsák össze az egyes jelcsoportok területét, és próbálják a jelcsoportokhoz rendelhető protonok számával összevetni! Hasonlítsák össze a készülék mágneses terének homogenizálása nélkül és az azután felvett NMR spektrumokat! Magyarázzák meg az esetleges különbségeket!
- Egy tetszőleges szoftver felhasználásával számítsa ki és ábrázolja a koffein molekula NMR spektrumát, 400 MHz-es készüléket feltételezve. Hasonlítsa össze a rögzített NMR spektrummal. Egy lehetséges ingyenes szoftvert a <https://web.chemdoodle.com/demos/simulate-nmr-and-ms#customize-template> webcímen érhet el.
- Ábrázolják az I. oldatra a már optimalizált késleltetési idő-tartományon (a 6. mérési pontban meghatározott tartomány) és spektrumszámmal felvett T_1 és T_2 mérések során rögzített spektrumsorozatot! Értékeljék a spektrumon látható változásokat, és értelmezzék azokat a mérés során alkalmazott pulzusszekvencia alapján!
- A T_1 és T_2 mérések során a program egy külön csv file-ba gyűjti az egyes jelcsoportok területének változását a késleltetési idő függvényében. Egy adott jelcsoportra ábrázolják egy közös ábrán a 3 különböző oldatban a T_1 kísérlet során mért területeket! Ezt végezzék el mind a 3 jelcsoportra, így összesen 3 ábrát kell készíteni a T_1 kísérletekből. Illesszék meg az adatokat a (7) egyenletnek megfelelően és határozzák meg a T_1 időket! Az illesztett görbéket tüntessék fel az ábrákon!
- Egy adott jelcsoportra ábrázolják egy közös ábrán a 3 különböző oldatban a T_2 kísérlet során mért területeket! Ezt végezzék el mind a 3 jelcsoportra, így összesen 3 ábrát kell készíteni a T_2 kísérletekből. Illesszék meg az adatokat az (8) egyenletnek megfelelően és határozzák meg a T_2 időket! Az illesztett görbéket tüntessék fel az ábrákon!

- Gyűjtsék táblázatba a mért eredményeket (T_1 és T_2 relaxációs idők a különböző oldatokban, minden metilcsoport jelét külön-külön).
- Értelmezze a T_1 és T_2 relaxációs idők változását a komplexek hozzáadásának hatására! Mi lehet a változás oka?
- Ábrázolja, majd elemezze az ismeretlen anyagokra rögzített NMR spektrumokat. Próbálja meghatározni az egyes jelcsoportokhoz tartozó protonok számát (a jelcsoportok alatti területek meghatározása, akár manuális numerikus integrálással, akár a MestreNova szoftver használatával) és az azok környezetében lévő protonok mennyiségét (amik az esetleges felhasadást okozzák)! Az alábbi listából válassza ki, hogy melyik ismeretlen melyik egyszerű szerves molekulát takarhatja:

- | | | | |
|---------------|----------------|-------------|----------|
| – etil-acetát | – 2-propanol | – 1-butanol | – toluol |
| – etanol | – etil-bromid | – aceton | |
| – 1-propanol | – 2-brómpropán | – benzol | |

Ellenőrző kérdések

1. Mi az NMR spektroszkópia alapja, és milyen magok vizsgálhatók a technika használatával?
2. Mi a kémiai eltolódás? Hogyan függ a kémiai eltolódás az atommag kémiai környezetétől?
3. Mi a Zeeman felhasadás? Mitől függ az NMR gerjesztéshez szükséges energia nagysága?
4. Milyen atommagok vizsgálhatók NMR spektroszkópia segítségével? Írjon fel néhány példát!
5. Mi az oka, hogy az NMR sokkal érzékenyebb protonok mérésére, mint szénatomok vizsgálatára? Hogyan tudnánk növelni utóbbi érzékenységét?
6. Mi a spin-rács relaxáció? Milyen kísérletekkel lehetne meghatározni ennek sebességét, és milyen összefüggés alapján számolhatnánk ennek időállandóját?
7. Mi a spin-spin relaxáció? Milyen kísérletekkel lehetne meghatározni ennek sebességét, és milyen összefüggés alapján számolhatnánk ennek időállandóját?
8. Hogy néz ki az etanol molekula ^1H NMR spektruma? Magyarozza meg az egyes jelcsoportok alakját, és azok egymáshoz viszonyított elhelyezkedését a kémiai eltolódás skálán!
9. Rajzolja fel a koffein molekula szerkezeti képletét! Hány és milyen jelcsoportot vár a molekula NMR spektrumán?
10. Hogy néz ki a benzol (C_6H_6) ^1H NMR spektruma? Magyarozza meg a jelcsoportok számát és azok alakját!
11. Miért alkalmazunk D_2O oldószert a gyakorlat során? Hogyan lehetne ezt elkerülni?

Melléklet 1.: A Nanalysis 60Pro készülék használata

A Nanalysis 60Pro (8. ábra) egy asztali NMR készülék, ami a nagyobb teljesítményű elektromágnes helyett egy permanens mágneset tartalmaz, amit nem szükséges hűteni. Ugyanakkor a szobahőmérsékletet szabályozni kell, maximum 24 °C-ra.



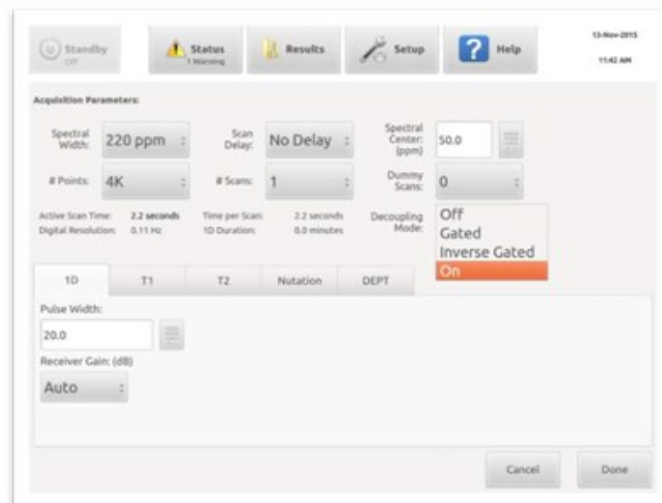
8. ábra. A gyakorlaton használt NMR készülék fényképe.

A készülék folyamatosan be van kapcsolva, így a gyakorlat végén azt **nem szabad kikapcsolni**. A készülék kijelzője érintőképernyő, így vagy annak megnyomásával, vagy a csatlakoztatott egerrel lehet navigálni a menüpontok között. A készüléken a következő ablak fogadja a hallgatókat:



9. ábra. Az NMR készülék programjának főmenüje.

A Settings felirat alatti 4 gombbal választhatjuk ki, hogy milyen mérést szeretnénk végezni. Az első gomb a vizsgálandó magot jelöli ki, ez általában protonra van állítva – ebben az esetben ne is módosítsuk. A második gombon állíthatjuk be, hogy milyen mérést akarunk végezni. A gyakorlat során itt kell beállítani a használni kívánt mérési eljárásokat, így az 1D, T₁ és T₂ méréseket. A "Solvent" menüben az oldószert kell kiválasztanunk – esetünkben ez a D₂O lesz. A "Scan" menüben a mérés során átlagolt spektrumok számát állíthatjuk be. A különböző mérések paramétereinek beállításához a Settings gombot kell megnyomnunk. Ez a következő menüt hozza elő:



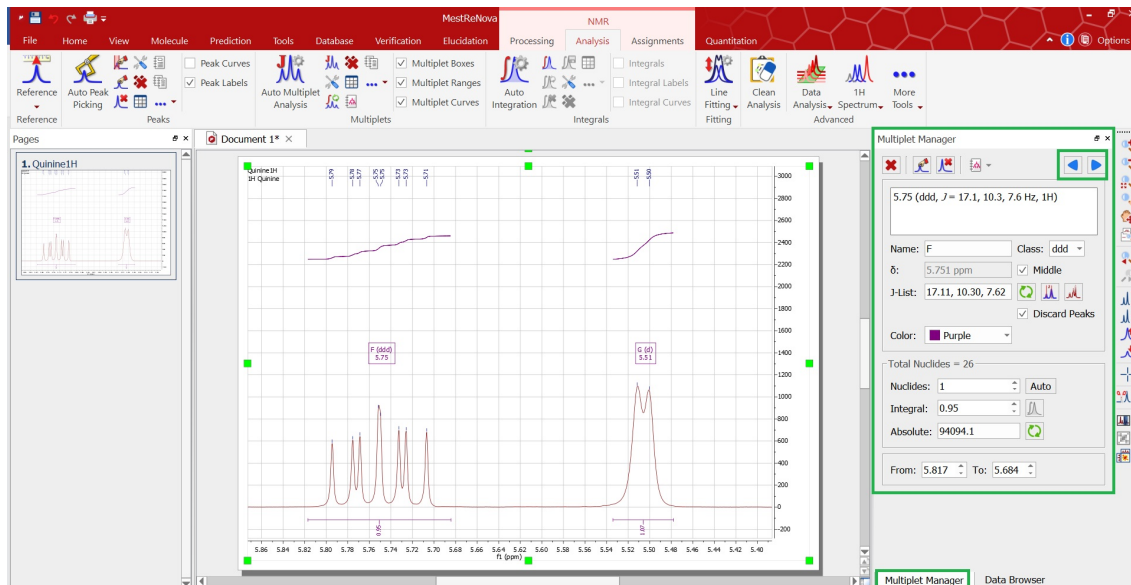
10. ábra. A mérési paraméterek beállítási menüje.

Itt a különböző mérések között navigálva beállíthatjuk a mérési paramétereket, mint például a kémiai eltolódás tartományt, a késleltetési időket stb. A beállításokat követően a menüből a Done gomb megnyomásával juthatunk vissza a főmenübe.

Az első mérést a hallgatók a készülék mágneses terének homogenizálása (shimmelése) nélkül végzik el. Ezt követően a felső gombsor Status gombjára kattintva végezhetik el az automatikus shimmetést. Ehhez helyezték a készülékbe a kék forrasszal lezárt sztenderd oldatot. Ezt követően végezzük teljes shimmetést.

A shimmetést követően felvett 1D NMR spektrumon automatikus alapvonal korrekciót, majd automatikus fáziskorrekciót kell végezni. Ezt követően a kijelölt csúcsokat integráljuk a manuális integrálás funkció használatával. Ez előtt az automatikusan integrált csúcsokat törölnünk kell. Ezt követően mentse el a mérési eredményt és haladjon tovább a T_1 és T_2 mérésekkel.

Melléklet 2.: A MestReNova program használata



11. ábra. A MestReNova program felhasználói felülete.

A mérési fájlokat JCAMP-DX formátumban kell exportálni. Ezek ezt követően egyszerűen megnyithatók az oktatási szint gépén állandó licensszel telepített, vagy a 45 napos próba licensszel saját gépén telepített MestReNova programmal. A file-ok megnyitásához azokat vagy egyszerűen be kell húzni a programba ("drag and drop"), vagy a File menü "Open file" parancsával kell behívni. A betöltött fájlokból a program ábrát készít. Amennyiben szebb ábrákat szeretnénk készíteni (és a jegyzet írójának egyértelműen ez a javaslata), úgy az adatokat a File menü "Save as" parancsával kimenthetjük például .csv formátumban. Ezt bármilyen adatkezelő programba be tudjuk hívni és szerkeszteni. A T_1 és T_2 mérések során rögzített spektrumok eltolását a MestReNova program automatikusan elvégzi, de ha átvisszük az adatokat egy másik szoftverbe, úgy ezt az eltolást abban a programban kell megvalósítani.

A T_1 és T_2 mérések exportálása során egy .csv adatfájl is generál a készülék. Ez a kijelölt csúcsok integrált területeit tartalmazza a különböző várakozási időknél. Ezek azok az értékek, melyekre az exponenciális illesztést el kell végezni a kiértékelés során.