

INDICE

Premessa	pag. 2
Introduzione	pag. 15
Correlation Spectroscopy (COSY)	pag. 17
Coerenza e livelli di coerenza	pag. 20
Quadrature detection	pag. 21
Esperimenti phase sensitive	pag. 23
Artefatti	pag. 25
Sequenze di:	pag. 26
-Esperimenti COSY Multiple Quantum Filtered (MQF)	pag. 26
-COSY – Correlated Spectroscopy	pag. 28
-COSYPS – Phase Sensitive COSY	pag. 28
-COSY-RELAY	pag. 30
-HETCOR – Heteronuclear Chemical Shift Correlation	pag. 32
-NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	pag. 34
-HOM2DJ – Homonuclear J-Resolved 2D	pag. 35
-INADEQUATE- Double-Quantum transfer Experiment	pag. 36
-ROESY Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	pag. 37
Il formalismo degli operatori prodotto	pag. 39
-Norme sulla trasformazione degli operatori-prodotto	pag. 43
Trattazione dell' esperimento COSY con O.P.	pag. 44
La trasformata di Fourier	pag. 51
Abbreviazioni ed acronimi	pag. 56
Riferimenti bibliografici	pag. 62

Elementi di Spettroscopia NMR Multidimensionale

Premessa.-

L'approccio più semplice alla spettroscopia bidimensionale (NMR 2D) è quello di imparare prima ad interpretare i grafici e poi di occuparsi delle procedure di ottenimento.

Prima che la tecnica NMR 2D divenisse così diffusa, informazioni più dettagliate, ad esempio sull' accoppiamento dei segnali protonici, potevano essere ottenute registrando spettri monodimensionali in cui alcune risonanze venivano selettivamente irradiate a bassa potenza e con opportune frequenze. Questo metodo è tuttora in uso per lo studio di molecole di media complessità. Tale procedura consente di evidenziare la presenza di correlazioni tra la risonanza irradiata e i rimanenti segnali dello spettro. Le risonanze influenzate, infatti, perdono la loro struttura fine dovuta all'effetto dell' accoppiamento scalare. Questo tipo di irraggiamento selettivo di una risonanza è una tecnica di *doppia risonanza* nota come *spin decoupling*.

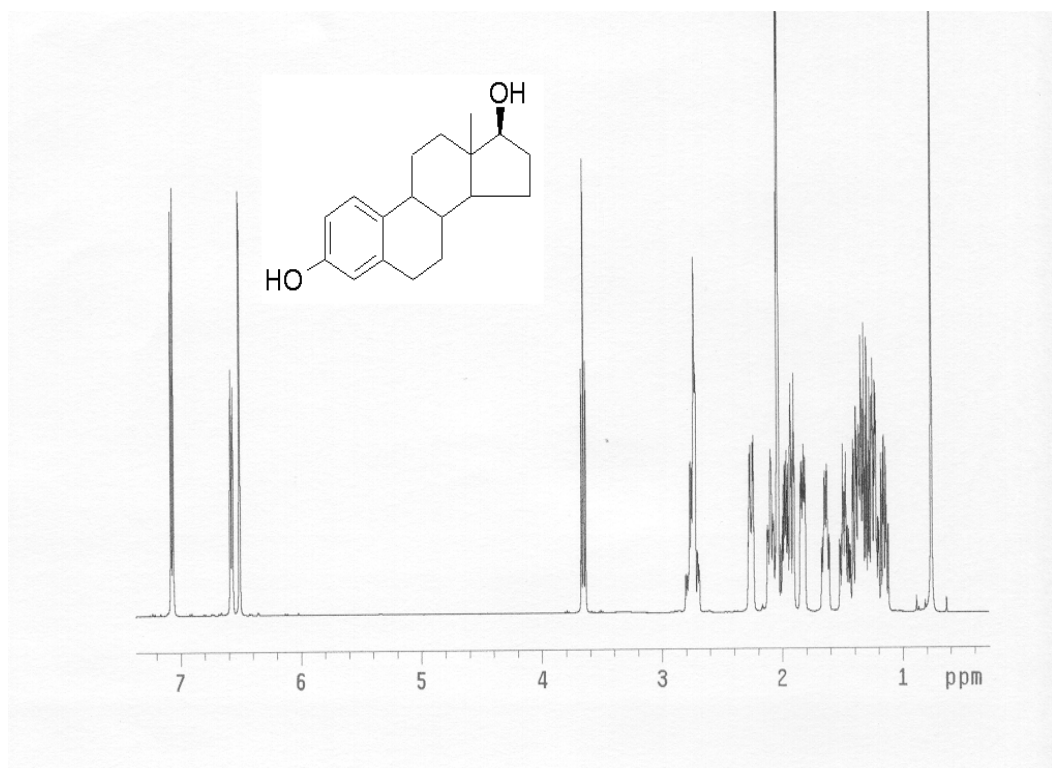


Figura 1.- Spettro ¹H dell'estradiolo

Nella figura 1 è mostrato lo spettro protonico dell'estradiolo, una molecola con formula bruta $C_{18}H_{24}O_2$, mentre in fig. 2 è riportata l'espansione dello stesso spettro ¹H ottenuto dopo irraggiamento selettivo sul picco a 3.65 ppm.

Le modifiche sullo spettro espanso di quest'ultima figura, mostrano delle evidenti perturbazioni nella zona compresa tra 0.5 e 3 ppm che, però, non sono sufficienti per consentire di operare significativamente delle attribuzioni a causa della complessità del sistema di spin della molecola. Sebbene la tecnica di *spin decoupling* consenta l'identificazione di segnali accoppiati in molecole semplici, per molecole più complesse come quella dell'esempio riportato, è inefficace. Oggigiorno la tecnica della doppia risonanza è stata soppiantata dalle tecniche spettroscopiche 2D di correlazione scalare, in grado di dare delle risposte più veloci e contemporaneamente su tutto l'intervallo delle frequenze in esame.

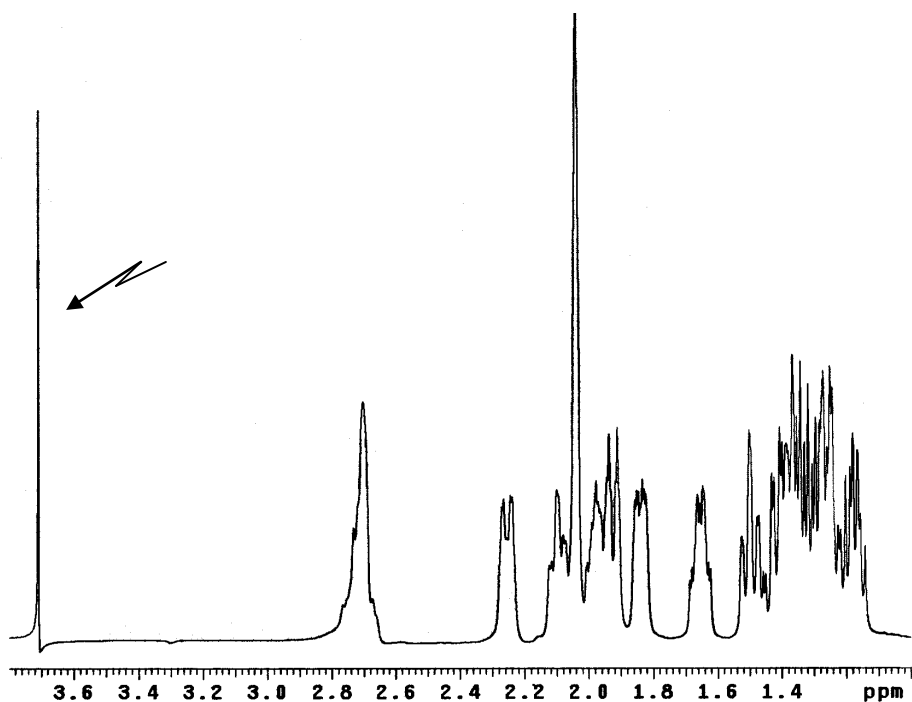


Figura 2.- Parte dello spettro ^1H dell'estradiolo irradiato a 3.65 ppm.

Utili informazioni sulla struttura si possono ottenere attraverso lo spettro di ^{13}C , che indica sia il numero dei carboni presenti nella molecola sia la loro natura. Ciò si ottiene da un spettro ^{13}C disaccoppiato dai protoni, utilizzando la tecnica di *spin decoupling* eteronucleare in modo da consentire l'irraggiamento dell'intera finestra spettrale del protone (*Broad Band Decoupling*). Per recuperare informazioni sulle costanti di accoppiamento $J_{\text{C-H}}$, si deve registrare uno spettro ^{13}C accoppiato. In tal caso, nello spettro, i segnali dei carboni presentano una molteplicità dovuta al numero dei protoni legati: ad esempio, doppietti, tripletti e quadrupletti si osservano rispettivamente per CH , CH_2 , CH_3 .

Nelle figure 3 e 4 sono riportati due spettri ^{13}C dell'estradiolo, uno accoppiato e uno disaccoppiato. Sovrapponendo i due spettri è possibile visualizzare immediatamente l'effetto che il disaccoppiamento ha prodotto.

Nello spettro accoppiato sono indicati, a titolo di esempio, i segnali dei gruppi CH, CH₂ e CH₃, mostrati rispettivamente come doppietti (d), tripletti (t) e quartetti (q).

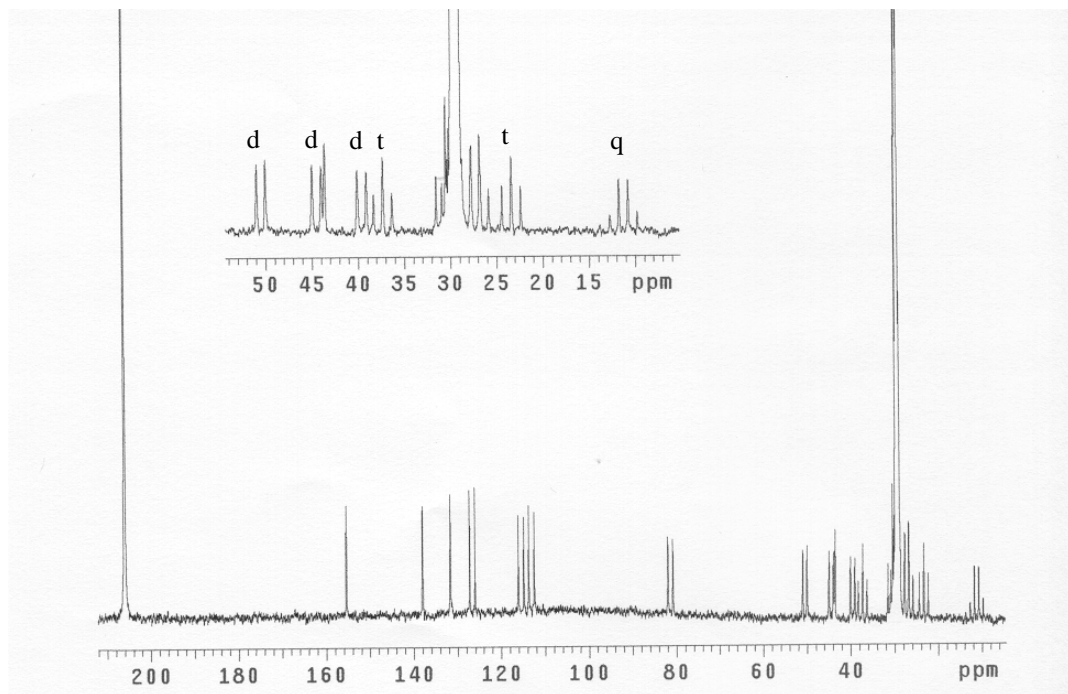


Figura 3.- Spettro ¹³C accoppiato dell'estradiolo

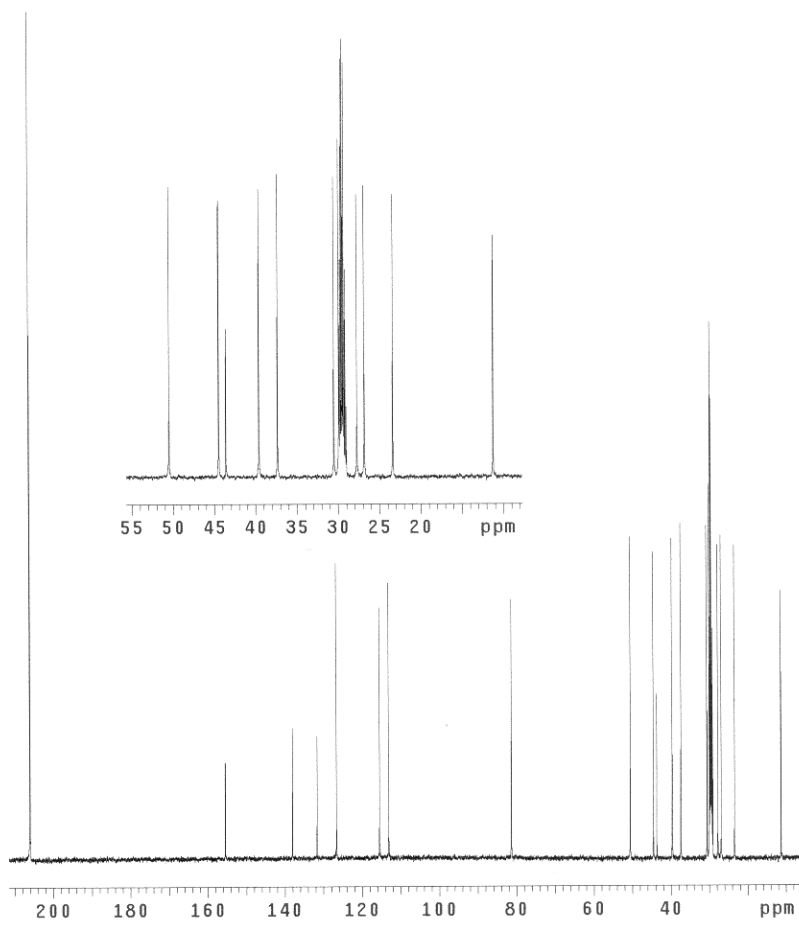


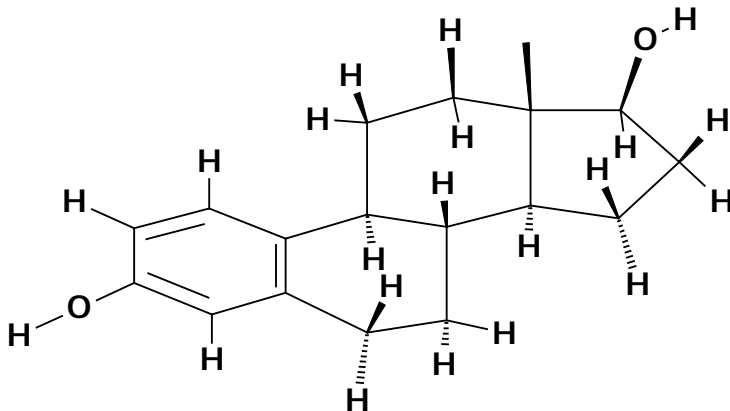
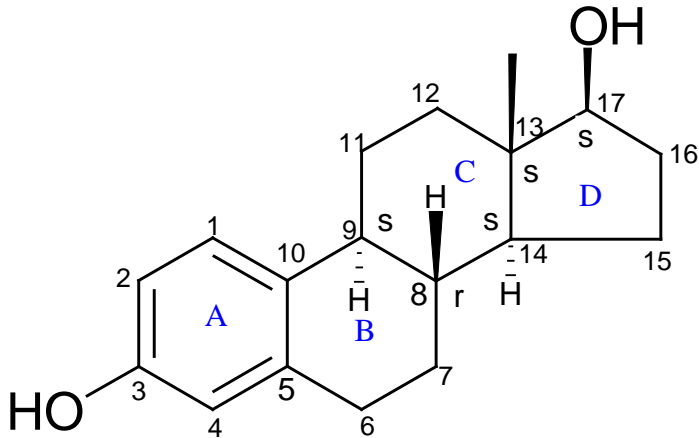
Figura 4.- Spettro ¹³C disaccoppiato dell'estradiolo

Altro metodo analitico utilizzabile è il DEPT, acronimo di Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer, in cui la sensibilità dell'esperimento viene esaltata per effetto del trasferimento di polarizzazione dal nucleo dei protoni accoppiati a quelli dei ¹³C meno sensibili.

La peculiarità di tale sequenza è caratterizzata da un impulso variabile sul protone che viene preimpostato a 45°, 90° o 135° in tre esperimenti separati. L'intensità del segnale dei tre diversi impulsi dipende dal numero dei protoni legati ad un particolare atomo di carbonio.

Lo spettro presenta i segnali di C legati ad un numero dispari di protoni (CH, CH₃) in opposizione di fase rispetto ai carboni con un numero pari di protoni (CH₂). I carboni quaternari, quindi, privi di protoni accoppiati, non vengono osservati nell'esperimento.

Lo spettro DEPT dell'estradiolo, la cui molecola è qui di seguito riportata, è mostrato nella fig. 5 dove, partendo da sinistra, sono visibili i segnali dei CH e dei CH₃ in positivo e i segnali dei CH₂ in negativo.



Formula dell'estradiolo con numerazione e nomenclatura degli anelli

Lo spettro protonico dell'estradiolo in cloroformio deuterato riportato in figura 1 mostra tre segnali ben distinti nella zona aromatica e numerosi segnali tra 0.7 e 3.7 ppm.

Sull'unica base delle nozioni di *chemical shift* solo pochi di essi possono essere assegnati, tra questi i segnali aromatici dove sono distinguibili il doppietto più a basso campo (7,1 ppm) in meta all'ossigeno, ossia in posizione 1, l'unico doppio doppietto (6,8 ppm), pertanto necessariamente un protone in posizione 2, e un terzo doppietto in posizione 4 (6,7 ppm) indicate con le frecce in fig. 8.

Altro segnale riconoscibile è il protone in 17 a circa 3.7 ppm ed i protoni benilici α e β a 2,8 ppm. Il restante spettro si presenta molto complesso da interpretare se non attraverso tecniche integrate di esperimenti mono e bidimensionali: spettro di ^{13}C accoppiato e disaccoppiato, spettri COSY, spettri di correlazione C-H diretta *long range*

A scopo illustrativo considereremo assegnato completamente il sistema aromatico e quindi le risonanze dei carboni e dei protoni come in fig. 8.

Il confronto tra i due spettri ^{13}C accoppiato e non, ci conferma che nella molecola, a parte i carboni aromatici, sono presenti 6 CH_2 e 3 CH. Da tale posizione si può attribuire l'assegnazione valutando i contatti *long range* (figura 7). Tale approccio consente di individuare il segnale tra i CH relativo al carbonio 9; tale segnale presenta infatti un contatto *long range* con il protone H1, e dal carbonio C9 si può quindi risalire al protone H9 dallo spettro eterocorrelato diretto (fig. 9) che lo individua a 2.1 ppm.

Partendo dal protone in 9, per successivi irraggiamenti, si potrebbero avere informazioni sui protoni in 8 ed in 11 ma, come visto, la complessità della struttura della molecola policiclica ed il relativo spettro non consentono alcun approccio se non attraverso l'esecuzione di uno esperimento COSY. In questo caso si osserva un debolissimo contatto con un segnale a 1.4 ppm che dalla correlazione CH diretta (Fig.8 e 9) prova di appartenere ad un CH. Il simultaneo contatto di tale carbonio con un altro segnale protonico a 2.3 ppm consente di assegnare il sistema CH_2 in 11. Il sistema CH in 8 si può assegnare verificando quale carbonio di tipo CH nello spettro DEPT dà contatto *long range* con il protone in 9. Da tale contatto si può assegnare il carbonio e quindi il suo protone a 1.35 ppm.

Come accennato, i protoni benilici in 6 sono stati riconosciuti a 2.8 ppm e dalla correlazione diretta (Figura 9) il loro carbonio ancora il COSY ci consente di superare la difficoltà dell'irraggiamento e di individuare i segnali del sistema CH_2 .

Fin qui abbiamo assegnato completamente i primi due anelli A e B del sistema. Procedendo ora da altri segnali noti, in particolare dall'alcol in 17 e dal metile, ricostruiremo la restante parte.

Iniziamo dai contatti COSY del 17H che sono forti con i protoni in 16 rispettivamente a 1.99 ppm ed 1.5 da cui per la correlazione diretta si assegna tutto il sistema CH₂ in 16. Il sistema CH₂ in 15 si può assegnare dai contatti *long range* (figura 7) del carbonio ancora con il protone in 17 e dallo spettro in correlazione diretta si risale ai due protoni. Infine dal CH₂ in 15 si assegna l'ultimo CH rimasto in 14 confermando indirettamente le precedenti assegnazioni dei CH.

Il carbonio che reca il metile è facilmente assegnato per differenza tra gli spettri ¹³C e DEPT e, da questo, per contatti *long range* è possibile assegnare i protoni in 12 ed in 11. Ciò è confermato dal fatto che il carbonio in 12 ha contatti *long range* con i protoni del metile, cosa che non si verifica per il carbonio in 11.

E' stato così dimostrato come, con l'ausilio delle tecniche NMR 2D, sia stato possibile assegnare tutte le risonanze ¹³C e ¹H di una molecola complessa come l'estradiolo.

Un esperimento di correlazione 2D consente di avere in un unico spettro tutte le informazioni ricavabili dall'acquisizione di una serie di spettri monodimensionali e ad avere, quindi, simultaneamente informazioni strutturali su tutti gli *spin* nella molecola.

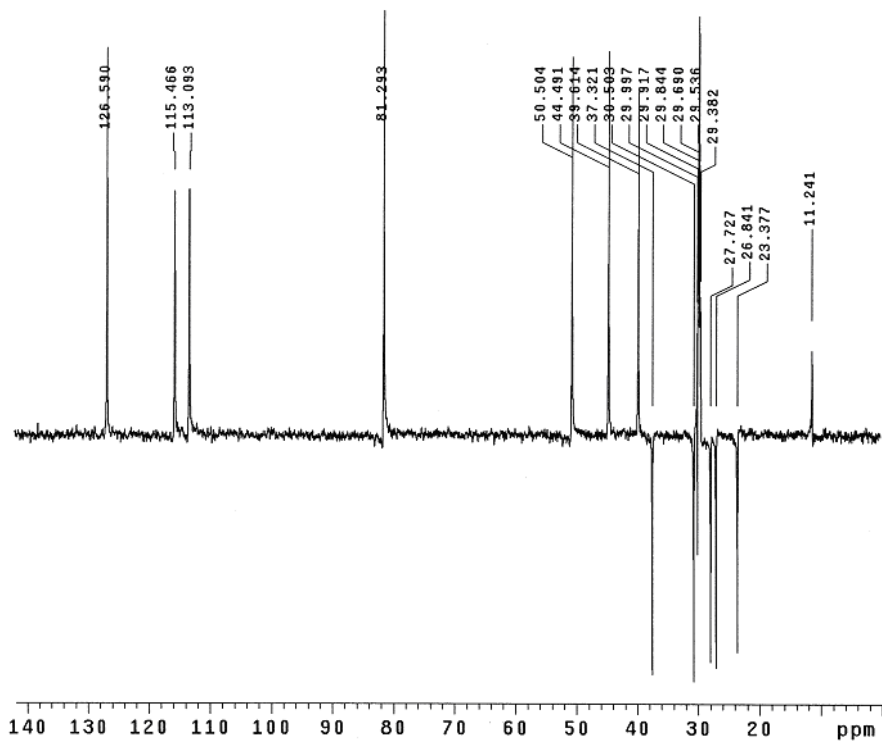


Figura 5.- Spettro DEPT dell'estradiolo

A titolo di esempio, nelle figure 6 e 7 sono riportati esperimenti COSY ed HETCOR in cui sono mostrate le assegnazioni H-H e H-C dell'estradiolo.

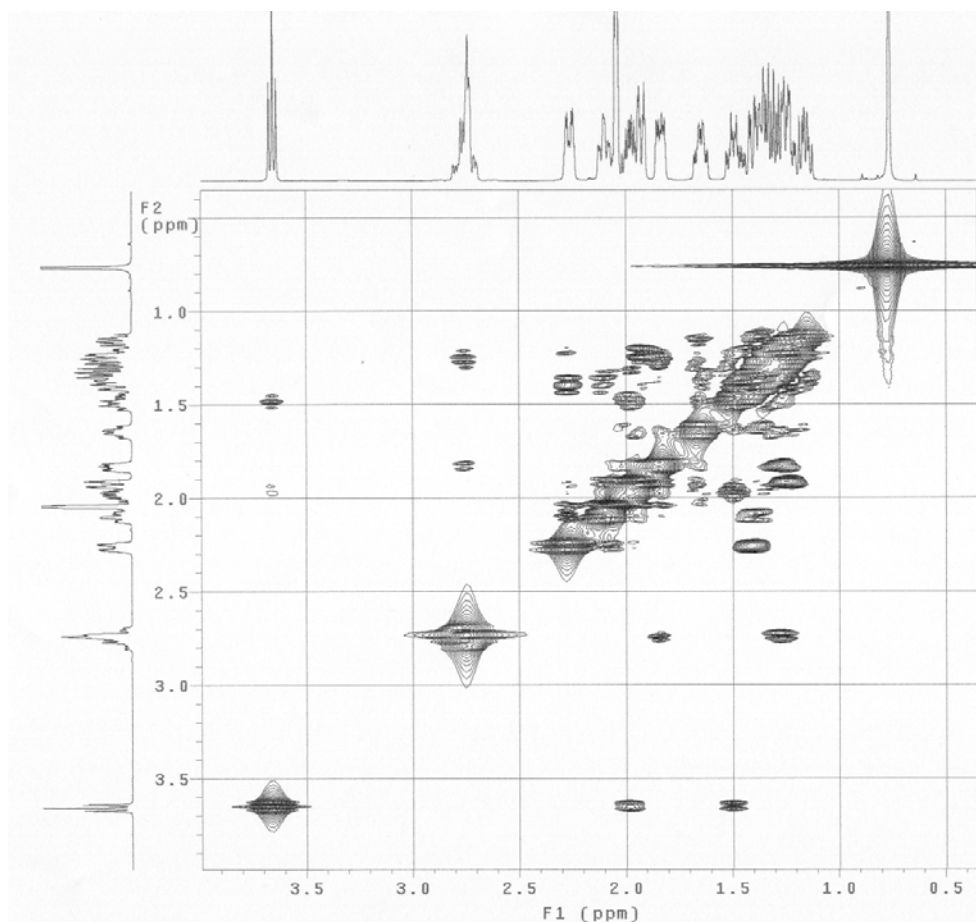


Figura 6.- Spettro COSY dell'estradiolo

In questo tracciato, con l'ausilio di una riga e di una squadretta, si possono mettere in relazione tutte le macchie dello spettro che sono sullo stesso asse e che corrispondono alle risonanze dei due spettri monodimensionali tracciati ai lati.

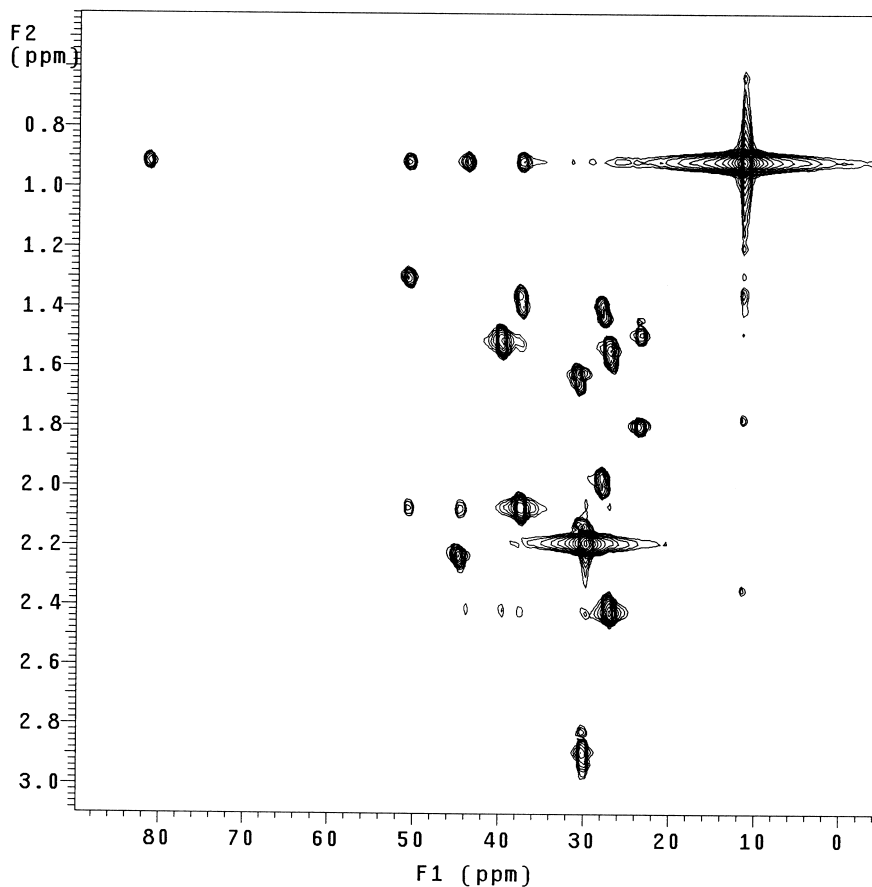


Figura 7.- Spettro eterocorrelato $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ dell'estradiolo di tipo *long range* (HMBC)

Esperimenti di eterocorrelazioni di tipo long-range (esempio HMBC, Heteronuclear Multiple bond correlation) forniscono informazioni su accoppiamenti scalari tra ^1H e ^{13}C separati da più di un legame (^nJ , $n > 1$). Essi sono importanti per completare l'assegnazione dell'intera molecola.

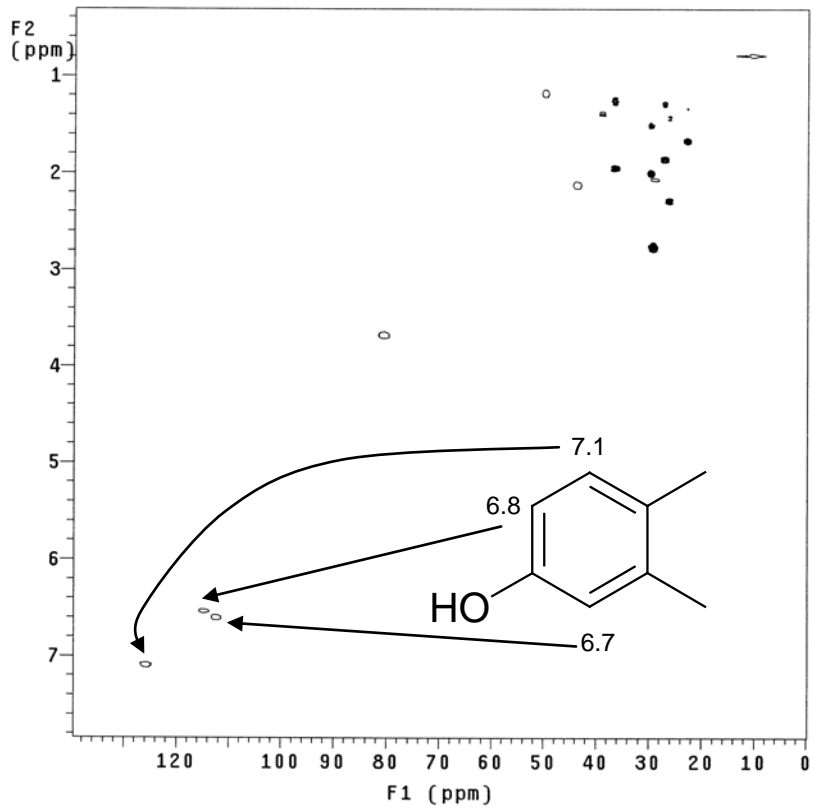


Figura 8.- Spettro HETCOR dell'estradiolo

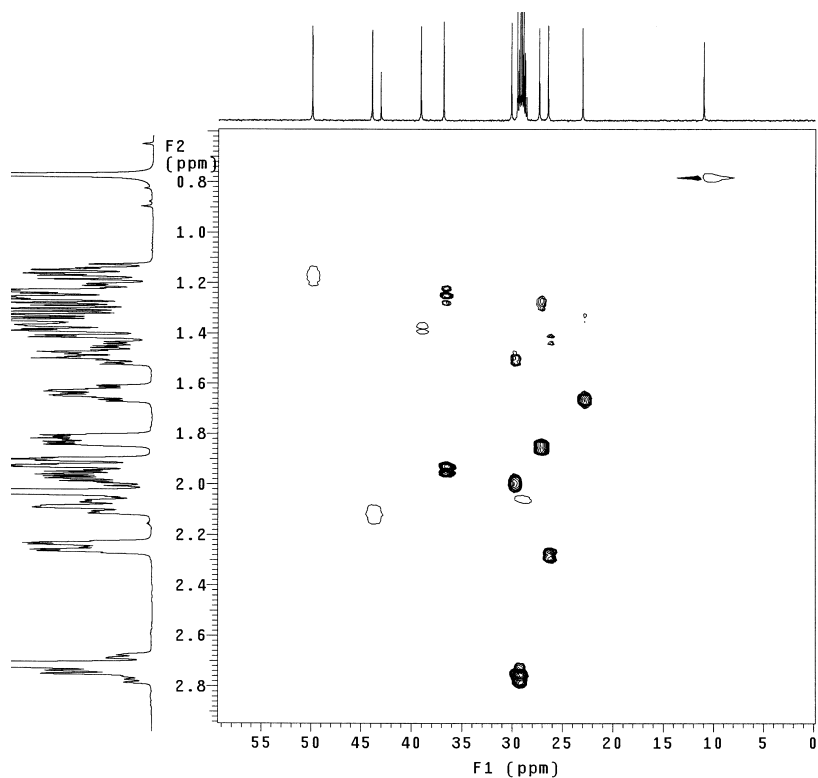


Figura 9.- Spettro HETCOR dell'estradiolo espanso

Quindi di particolare rilievo nella spettroscopia di risonanza magnetica nucleare sono gli esperimenti cosiddetti multidimensionali, in particolare bidimensionali, di cui queste pagine offriranno una presentazione di base.

Si è finora osservato come dal problema di individuare la reale presenza di un accoppiamento tra due protoni, si sia giunti alla possibilità di individuare tutti i protoni appartenenti ad un sistema di spin, ovvero tutti quei protoni per i quali sia possibile riconoscere una catena di accoppiamenti che li colleghi.

Introduzione.-

Il concetto di spettroscopia NMR a trasformata di Fourier bidimensionale risale a circa trent'anni addietro (1). Tecnica oggi routinaria nell'indagine spettroscopica moderna, non ebbe ai suoi albori una grande eco a causa della mancanza di adeguati mezzi per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati, di algoritmi altrettanto veloci per le trasformate di Fourier e di sufficienti memorie periferiche per la conservazione dei dati. L'innovazione tecnologica nel campo dell'elettronica ha dato in quest'ultimo decennio un deciso contributo per la gestione elettronica degli spettrometri e per la elaborazione computerizzata dei dati raccolti.

Come esposto nel precedente volumetto, un esperimento NMR monodimensionale si realizza dando un impulso di radiofrequenza, che crea magnetizzazione trasversale, registrando il suo decadimento nel successivo tempo t_2 detto di acquisizione (Fig. 10). Il segnale raccolto è una funzione del tempo $S(t_2)$ che contiene tutte le informazioni relative alle frequenze di risonanza del nuclide in esame. Per ottenere il segnale in funzione delle frequenze, ossia un normale spettro NMR, occorre sottoporre la funzione $S(t_2)$ a una trasformata di Fourier (FT).

$$S(t_2) \longrightarrow S(\omega)$$

Un esperimento bidimensionale 2D estremamente semplificato differisce da quello 1D perché i dati sperimentali sono raccolti in un tempo t_2 , che segue non un singolo impulso bensì più impulsi distanziati da un intervallo di tempo t_1 che viene incrementato progressivamente (Fig. 10 B). Il segnale raccolto è ora una funzione di due variabili temporali $S(t_1, t_2)$, che dovrà essere sottoposto a una doppia trasformata di Fourier per ottenere di nuovo uno spettro in funzione delle frequenze $S(\omega_1, \omega_2)$.

$$S(t_1, t_2) \longrightarrow S(\omega_1, \omega_2)$$

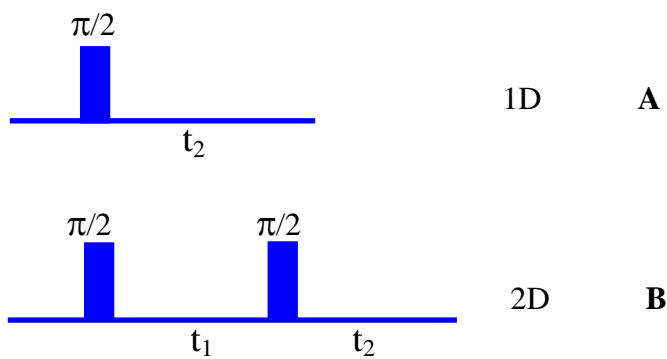


Figura 10.- A e B

Quindi, mentre un esperimento convenzionale 1D dà come risposta una intensità in funzione della frequenza di osservazione, un esperimento 2D ha a disposizione un secondo dominio di frequenze che apre una vasta gamma di contenuti informativi. La più comune rappresentazione grafica di uno spettro 2D NMR è una mappa bidimensionale a curve di livello, che sono indicative delle intensità dei segnali. Nel caso di un esperimento 2D omonucleare, sui due assi sono riportate le frequenze o *chemical shift* dello stesso nucleo, mentre in esperimenti eterocorrelati, le due frequenze corrispondono ai *chemical shift* di differenti nuclei.

Uno spettro 2D omonucleare, ad esempio, presenta dei picchi lungo la diagonale ($\omega_1 = \omega_2$) e dei picchi esterni detti cross-peak ($\omega_1 \neq \omega_2$) (Fig. 11).

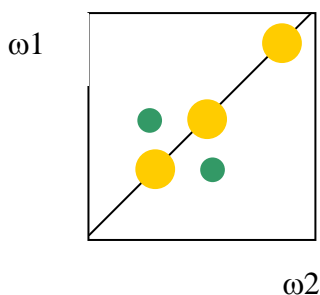


Figura 11.-

Gi esperimenti che si possono effettuare attraverso la tecnica 2D-NMR sono numerosissimi, ma suddivisibili in due principali categorie:

- a) *spettroscopia di correlazione scalare*
- b) *spettroscopia di correlazione dipolare.*

Entrambi si basano sul trasferimento di 'informazione' tra nuclei accoppiati sia scalarmente, ossia attraverso legami chimici, sia dipolarmente, ossia tra nuclei vicini nello spazio.

In tutti gli esperimenti 2D si possono riconoscere quattro intervalli base (fig. 12):



Figura 12.-

I periodi di preparazione, evoluzione ed acquisizione sono comuni a tutti gli esperimenti 2D, mentre il periodo di mixing si usa solo in esperimenti 2D con trasferimento di magnetizzazione longitudinale. Il periodo di preparazione t_p è normalmente un lungo ritardo usato per riportare il sistema all'equilibrio termico e saturare, se necessario, i nuclei del solvente. Esso è seguito da uno o più impulsi a radiofrequenza che perturbano gli spin, i quali successivamente evolvono per un tempo t_1 , che viene variato in modo sistematico negli esperimenti successivi. Alla fine del periodo di evoluzione, a seconda dell'esperimento scelto, la magnetizzazione può essere acquisita oppure trasferita, in modo da creare opportune correlazioni. Il mixing può essere costituito da uno o più impulsi, separati da intervalli che di solito hanno una durata fissa. Infine la magnetizzazione trasversale definitiva viene misurata nel tempo di acquisizione di t_2 .

Correlation Spectroscopy (COSY)

L'esperimento base nella sua forma più semplice, richiede l'applicazione di due impulsi di 90° separati da un periodo di evoluzione sistematicamente incrementato, t_1 , seguiti da un periodo di acquisizione t_2 (Fig. 13).

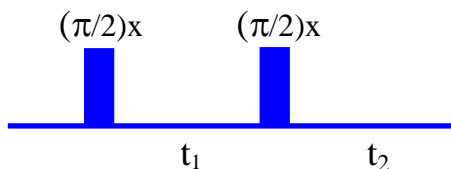


Figura 13.-

L'uso più generale di questo esperimento è la determinazione di quali *spin* siano accoppiati *scalarmente*. Sebbene la sequenza impiegata sia la più semplice, la rappresentazione vettoriale è insufficiente per descrivere il comportamento della magnetizzazione.

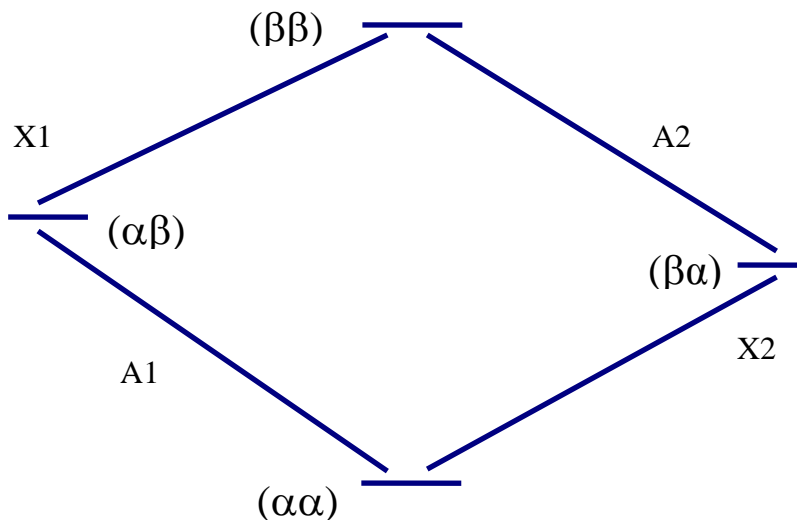


Figura 14.- Diagramma dei livelli energetici in un sistema AX

E' noto che un sistema accoppiato AX è caratterizzato da quattro livelli energetici e quattro transizioni, corrispondenti a quattro righe nello spettro NMR. Il primo impulso della sequenza, 90° dato lungo l'asse x, crea magnetizzazione trasversale per tutte le transizioni permesse (Fig. 14 e 15).

Durante t_1 le componenti dei doppietti relativi ad A ed a X, a causa dell'accoppiamento tra A ed X, si sfasano nel piano xy (Fig. 15) e l'angolo di sfasatura ϕ è determinato dalla costante di accoppiamento J_{AX} . I vettori precedono inoltre nel piano xy con frequenze ν_A e ν_X corrispondenti ai *chemical shift* di A e di X. Il secondo impulso, 90°_x , lascia invariate le componenti lungo x mentre ruota su z le componenti che prima erano lungo y. L'effetto di tale sequenza, in ultima analisi, è quello di ridistribuire la magnetizzazione dei nuclei accoppiati.

Questo significa anche che la magnetizzazione che precedeva con frequenza ν_A durante t_1 , precede con frequenza ν_X durante t_2 , originando così, dopo una doppia trasformazione di Fourier, un picco fuori diagonale con coordinate (ν_A, ν_X) .

La quantità di magnetizzazione che non è stata trasferita produce picchi in diagonale con coordinate (ν_A, ν_A) (ν_X, ν_X) .

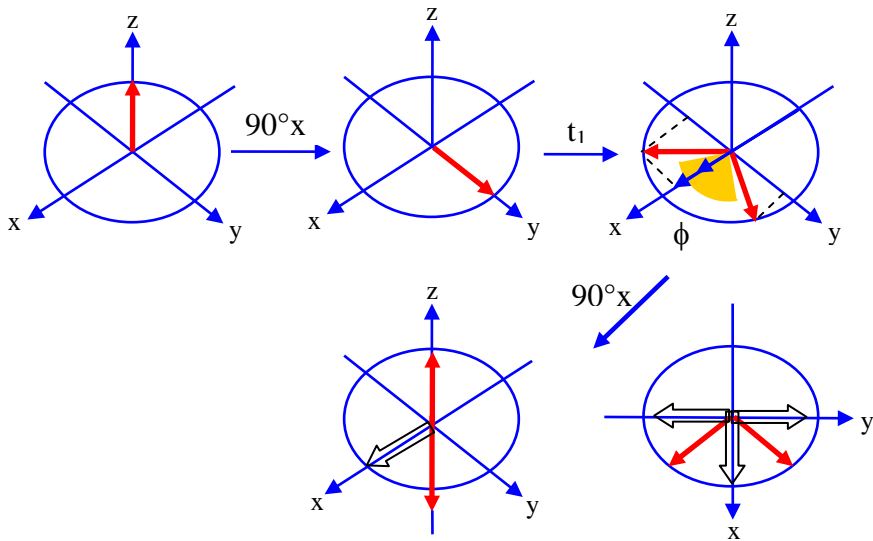


Figura 15

Così, lungo la diagonale si osserva praticamente lo spettro normale 1D, cioè due doppietti. Fuori diagonale si osservano picchi tra tutte linee che hanno in comune una costante di accoppiamento, vale a dire tra linee di uno stesso multipletto o di diversi multipli accoppiati. Le correlazioni importanti sono queste ultime, poiché sono diagnostiche di sistemi accoppiati (fig. 16).

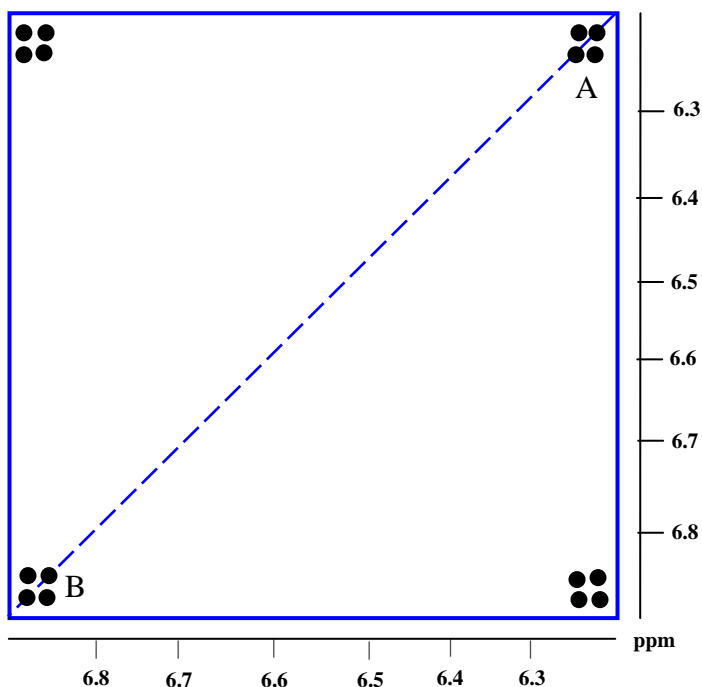


Figura 16.- Indica l'accoppiamento tra A e B

Il trasferimento di magnetizzazione da una transizione alle altre ci porta al concetto di trasferimento di coerenza, il fenomeno base su cui si fonda la spettroscopia a correlazione 2D.

I picchi fuori diagonale in un esperimento bidimensionale sono originati appunto dal trasferimento di coerenza da una transizione tra due stati a una transizione tra altri due stati.

Coerenza e livelli di coerenza.-

Il termine coerenza è una generalizzazione del concetto di magnetizzazione trasversale, che è quella normalmente osservata negli esperimenti NMR e indicata come coerenza quantica singola in esperimenti convenzionali, per i quali vale $\Delta m = \pm 1$.

Esistono altre coerenze, coinvolgenti più di un salto quantico: per esempio, coerenze a doppio quanto corrispondono a transizioni con $\Delta m = \pm 2$, e triplo quanto quelle con $\Delta m = \pm 3$, e così via. La coerenza zero quantica non corrisponde ad assenza di coerenza, ma a transizioni in cui $\Delta m = 0$.

Ad ogni fase di un esperimento è possibile definire i livelli di coerenza presenti, p . Ad esempio una coerenza tripla corrisponde al livello di coerenza ± 3 , mentre la magnetizzazione longitudinale corrisponde al livello di coerenza 0.

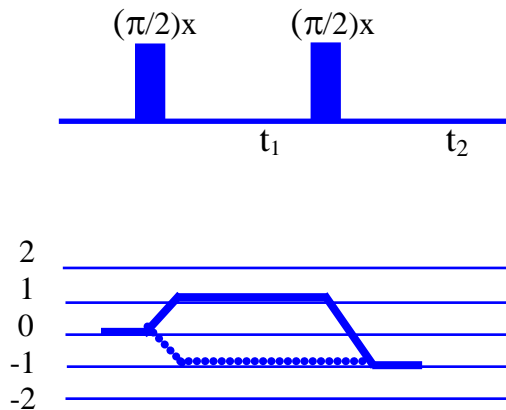


Figura 17.-

Un impulso a r.f. può far sì che una coerenza venga trasferita da un livello ad un altro, mentre la libera precessione conserva l'ordine di coerenza. I livelli di coerenza di un esperimento NMR possono essere rappresentati mediante un diagramma. Per esempio un esperimento COSY è rappresentato dal diagramma di figura 17. Il primo impulso crea coerenza quantica singola che evolve durante t_1 . Il cammino di coerenza parte dal livello 0, che corrisponde alla magnetizzazione longitudinale all'equilibrio. Il cammino finisce al livello -1 , che è l'unico livello che corrisponde alla magnetizzazione osservabile.

Quadrature detection.-

E' stato visto come si crea la quadrature detection in t_2 in esperimenti 1D (vedi volume sulle tecniche monodimensionali). Esiste la necessità di distinguere le modulazioni di frequenza positive e negative anche durante t_1 . In esperimenti 2D con quadrature detection solo in t_2 , la doppia trasformazione di Fourier rispetto t_2 e t_1 porta a dei picchi con coordinate $(\pm\Omega_1, \Omega_2)$ nelle due dimensioni.

La quadrature detection in t_1 presenta problemi diversi rispetto a quelli di t_2 poiché, non essendo i segnali acquisiti durante t_1 , non è possibile distinguere il segno della frequenza mediante un detector.

Abbiamo visto come si rappresenta il diagramma dei livelli di coerenza per un esperimento COSY, senza entrare nel merito della scelta di cammino di coerenza.

La coerenza singola quantica prodotta dal primo impulso corrisponde al livello di coerenza $+1$ o -1 . Il segno del livello diventa importante in esperimenti 2D, poiché dà il senso relativo di evoluzione di coerenza. Se il livello di coerenza è -1 , sia durante t_1 che durante t_2 , appare un tipico picco diagonale avente coordinate $\omega_1 = \omega_2 = +\Omega$ e la diagonale va da sinistra in basso a destra in alto; se il livello di coerenza è $+1$ durante t_1 e -1 durante t_2 , un picco appare con coordinate $\omega_1 = +\Omega$, $\omega_2 = -\Omega$ e la diagonale va in direzione opposta. Queste due possibilità sono considerate un modo per selezionare P-picchi o anti-echo, e N-picchi o echo, rispettivamente. Simili considerazioni si applicano anche ad altri ordini di coerenza.

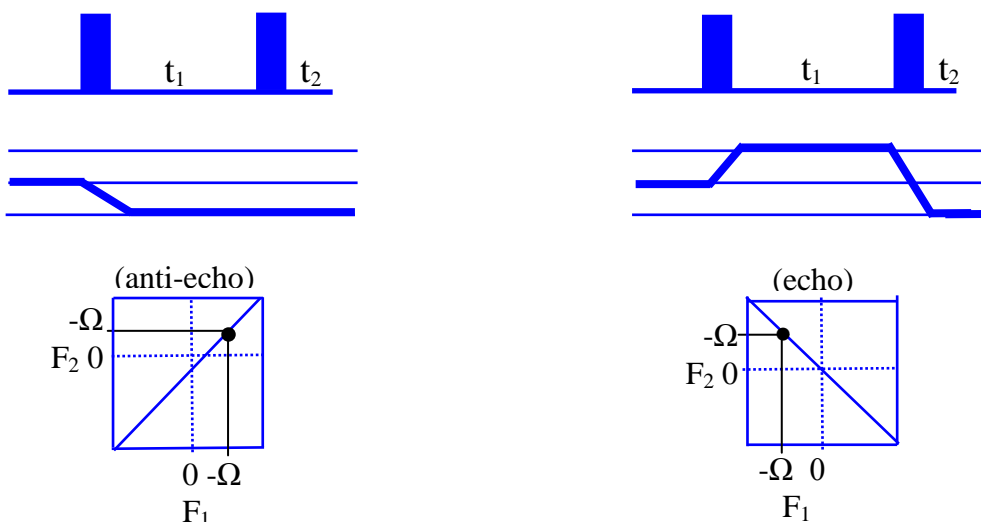


Figura 18.-

Un metodo per discriminare il segno è basato sul campionamento successivo di due FID, con uno shift di fase di 90° tra i due impulsi. In questo modo si ottengono dei segnali modulati come coseno e seno, che sommati o sottratti opportunamente nel ricevitore, dopo trasformazione di Fourier danno, nella parte reale dello spettro, un segnale con coordinate (Ω_1, Ω_2) in cui però ogni linea è la somma dei segnali di assorbimento e in

dispersione, e la cui forma è rappresentata in fig.19. Sezioni attraverso il centro dei picco sono semplici *Lorenziane* in assorbimento, ma come le sezioni sono prese lontano dal centro, il contributo in dispersione aumenta.

Per ovviare alla forma *phase twist* gli spettri vengono trasformati in *power mode*: $S^2(\omega_1, \omega_2) = R^2(\omega_1, \omega_2) + I^2(\omega_1, \omega_2)$ oppure nel suo modulo: $|S^2(\omega_1, \omega_2)| = \{R^2(\omega_1, \omega_2) + I^2(\omega_1, \omega_2)\}^{1/2}$. Il secondo modo è quello più usato (viene anche chiamato *magnitudo spectrum*); questo elimina la parte negativa, ma la forma di riga risultante ha una base molto larga e, nello spettro bidimensionale, la caratteristica forma a stella che è particolarmente fastidiosa in quanto le lunghe code dei picchi diagonale possono oscurare importanti picchi fuori diagonale Fig. 19.

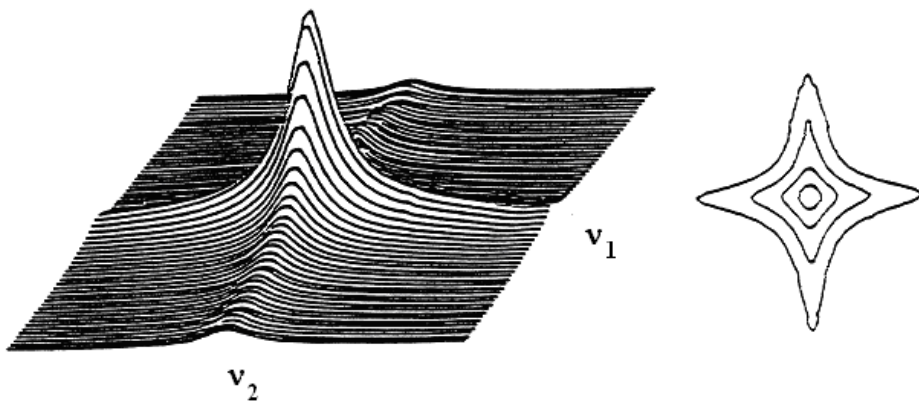


Figura 19.-

Esperimenti phase sensitive.-

Due metodi sono stati sviluppati da State et al. e da Marion e Wuthrich che permettono di discriminare il segno delle frequenze ω_1 , ottenendo spettri *phase sensitive*. Il metodo di State et al. genera due serie di

dati per ogni valore di t_1 . In una serie il segnale in t_1 è modulato come coseno, nell'altra come seno. Per ottenere questa modulazione basta variare alternativamente la fase del primo impulso e del ricevitore, o del secondo impulso di 90° , come indicato in fig. 20.

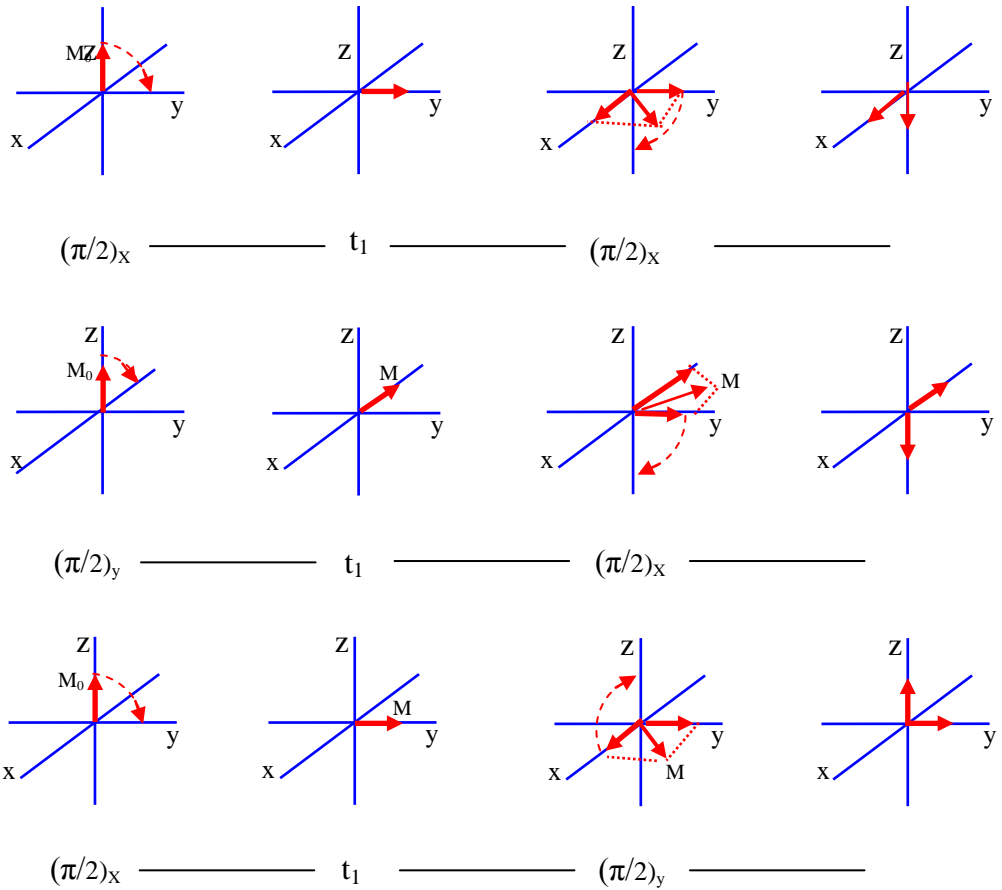


Figura 20.-

Ogni serie è separatamente sottoposta ad una trasformazione di Fourier complessa. La differenza delle due componenti, reale ed immaginaria, della trasformata di Fourier porta al risultato desiderato.

L'altro modo di realizzare esperimenti phase-sensitive, consiste nell'incrementare la fase del ricevitore in modo proporzionale rispetto a t_1 (TPPI: time proportional phase increment). Il campionamento in t_1 viene fatto ad una doppia velocità (incremento in $t_1=1/2SW_1$) e con un incremento di fase del ricevitore di 90° dopo ogni incremento di t_1 .

La differenza più significativa tra i due metodi è che quello di State usa la trasformata di Fourier complessa. In particolare, gli spettrometri Bruker utilizzano il TPPI, mentre quelli Varian utilizzano il metodo di State.

I due metodi richiedono che entrambi i livelli di coerenza $+p$ e $-p$ siano conservati durante t_1 . Come già detto l'impulso iniziale può creare solo coerenze di ordine $+1$ e -1 . Nel caso dell'esperimento COSY, il secondo impulso può produrre tutti gli ordini possibili, ma solo l'ordine -1 può essere misurato.

Un singolo cammino di trasferimento di coerenza (magnetizzazione) può essere selezionato utilizzando i cosiddetti cicli di fase che agiscono come un filtro, consentendo solo definiti salti di coerenza. Un ciclo di fase consiste nella somma di un numero definito di ripetizioni dello schema base di impulsi, in cui le fasi degli impulsi vengono opportunamente variate. Ne risulta un'esaltazione dei cammini desiderati e un annullamento di tutti gli altri.

Artefatti.-

Non abbiamo mai considerato fino ad ora gli effetti del rilassamento longitudinale, il quale origina artefatti che vanno eliminati.

Durante il tempo di evoluzione t_1 , parte del segnale si rilassa e compare magnetizzazione lungo l'asse z . A questo punto il secondo impulso, oltre ad avere gli effetti descritti di ridistribuire la magnetizzazione di tutte le transizioni, trasforma questa magnetizzazione longitudinale in magnetizzazione trasversale. Poiché questa è una componente della magnetizzazione che non ha sperimentato alcuna evoluzione durante t_1 poiché era allineata lungo z , darà luogo ad un segnale $\omega_1=0$. Questi picchi indesiderati vengono chiamati *picchi assiali*. In esperimenti con quadratura in t_1 , la frequenza ω_1 è proprio al centro dello spettro. Un modo per eliminare questi segnali è quello di registrare per ogni t_1 due FID cambiando la fase del secondo impulso di 180° , usando cioè un impulso di 90° lungo $-z$, e poi di sommarli. In questo caso il vettore lungo z viene portato lungo $-$

y, mentre le componenti lungo x non vengono influenzate dal fatto che il secondo impulso venga dato lungo x o $-x$. Quindi i picchi assiali verranno cancellati e i picchi desiderati verranno rinforzati. Naturalmente tutti gli artefatti che possono essere presenti nello spettro 1D, quali per esempio le immagini di quadratura, saranno presenti negli spettri 2D. Per eliminarli si applica un ciclo di fase detto CYCLOPS all'intero esperimento. Esso comporta un primo incremento di fase di 90° per eliminare le imperfezioni del ricevitore, ed un secondo incremento di 180° per eliminare altri segnali non coerenti

Esperimenti COSY Multiple Quantum Filtered (MQF).-

Il filtro *Multiple Quantum* permette di rimuovere selettivamente certe componenti di uno spettro COSY. In altri termini un esperimento multi-quantum seleziona coerenze multi-quantum attraverso la combinazione di sequenze di impulsi con fasi variabili (filtro multi-quantum). Per esempio, con l'eccezione di metili vinilici, i metili singoli generalmente forniscono una minima se non nulla informazione sulla connettività molecolare. D'altra parte le risonanze dei metili, a causa della loro intensità, molto spesso oscurano i multipletti, meno intensi, cosicché la possibilità di evidenziare questi segnali è spesso nulla. Lo stesso vale per segnali singoli derivanti dai solventi. Se alla fine di una sequenza COSY aggiungiamo un terzo impulso di 90° (Fig. 21) le coerenze quantiche multiple che esistono prima

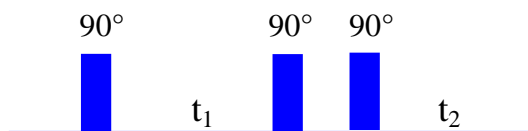


Figura 21.-

del terzo impulso possono essere convertite in magnetizzazione osservabile. Una opportuna scelta del ciclo di fasi può selezionare segnali derivanti da differenti ordini di coerenza quantica multipla

La coerenza DQ viene selezionata dal secondo impulso. Il Δp per il primo impulso è $+1$ o -1 , mentre per il secondo è $+1/-3$ o $+3/-1$, e per il terzo è $+1$ o -3 . Un approccio conveniente è quello di guardare i primi due impulsi come capaci di eccitare una coerenza *doppia quantica* a partire dal livello zero quantico.

Essi possono essere raggruppati insieme e considerati una singola unità capace di trasferire coerenza doppia (Fig. 22).

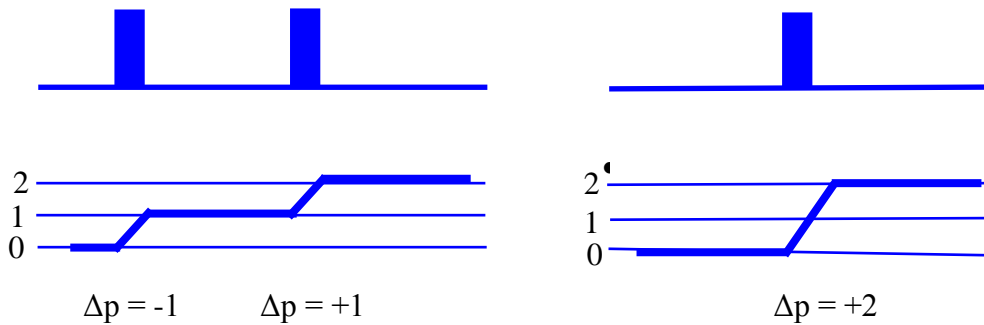


Figura 22.-

Nessun ciclo di fasi è necessario per il terzo impulso, poiché, sebbene molti cammini siano possibili dopo il terzo impulso, solo uno porta a magnetizzazione osservabile.

Un esperimento Double Quantum Filter COSY (DQF-COSY) presenta correlazioni scalari tra protoni accoppiati attraverso costanti di accoppiamento 2J e 3J , al pari di un COSY semplice. A differenza del COSY, uno spettro DQFCOSY:

- i. permette di misurare le costanti di accoppiamento dalla separazione delle componenti dei cross-peak
- ii. presenta una migliore risoluzione spettrale vicino alla diagonale
- iii. è caratterizzato da una minore sensibilità a causa del filtro doppio-quanto.

Di seguito sono descritti alcuni esperimenti multidimensionali di uso corrente. Le sequenze riportate sono state tratte dal manuale della ditta Varian.

COSY – Correlated Spectroscopy

La macro 'COSY' configura l'insieme dei parametri per un esperimento COSY.

Parametri:

$relay=0$, un normale *absolute value COSY* è impostato

$relay=1$, un *RELAY COSY* è impostato

$relay=2$, un *double-RELAY-COSY* è impostato

pw è l'impulso a 90°

$p1$ è l'impulso a 90° se il $relay$ non è uguale a 0, viceversa i picchi di diagonale possono essere

$d1$ è il delay impostato da 1 a 3 volte t_1

$d2$ è il tempo di evoluzione t_1

at è il tempo di acquisizione t_2

sw è la finestra spettrale ($sw1=sw$)

$v1, v2$ e $v5$ sono gli impulsi di fase. oph indica la fase del ricevitore

ni è il numero di incremento di t_1 (imposta $sw1/ni$) se è richiesta la velocità,

ni può essere ridotto

tau è il tempo di propagazione per il COSY long range ($relay=0$) e per il COSY relayed ($relay$ diverso da 0).

Impostazione dei parametri di acquisizione:

COSYPS – Phase Sensitive COSY

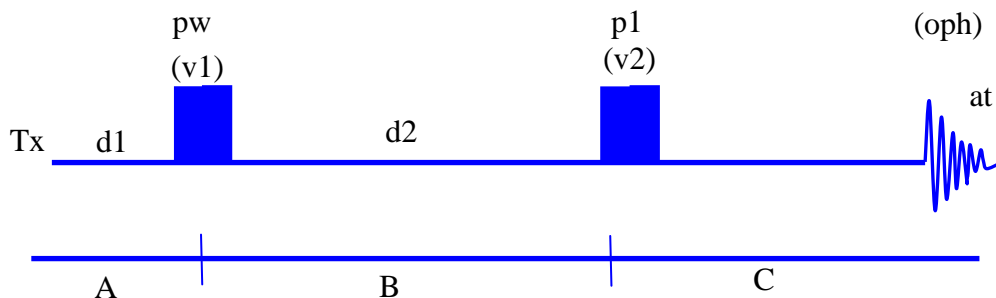


Figura 23.- Sequenza COSYPS

La macro 'COSYPS' configura una sequenza COSY phase sensitive come da diagramma in fig. 23.

Parametri PW è l'impulso a 90°

p1 è 90° se la fase non è zero; se la fase è zero impulsi superiori a 90° enfatizzano i picchi della diagonale in caso di selezione dei P-picchi .

d1 è impostato da una a tre volte il valore di T1

d2 è il tempo di evoluzione (periodo t_1)

at è il tempo di acquisizione (periodo t_2)

sw è la finestra spettrale (in genere SW1=SW, tranne per phase=3

ni è il numero di incrementi t_1 (per default SW/NI=12); può essere diminuito se la velocità di esecuzione è essenziale.

ss = *dummy scans* ossia scansioni che non vengono registrate e servono a stabilizzare il sistema prima dell' acquisizione (in genere *ss* = 8 o 16).

presat = 'y' per la soppressione del solvente per campioni in H₂O (*presat* = 'n' negli altri casi).

Phase =0, 1, 2 Sono valori suggeriti per i dati in esperimenti *phase sensitive*.

Phase =0 per i dati 2D sono nella schermata *av* (picchi di tipo P).

phase =1, 2 per dati 2D ipercomplessi (metodo di States –Haberhorn).

Phase =3 per dati 2D di tipo TPPI, in questo caso ricordarsi che $sw1=2*sw$

nt = multiplo di 8 (valore minimo in caso di *phase*=0) o multiplo di 4 (valore minimo per *phase* 1,2 o 3)

Nota: per tutti gli esperimenti TPPI lo spettro risultante appare doppio, pertanto si devono rappresentare e fasare solo la metà dei dati.

COSY-RELAY

La macro *relayh* richiama i parametri delle sequenze delle fig. 24 e 25 relative a tre diversi esperimenti COSY.

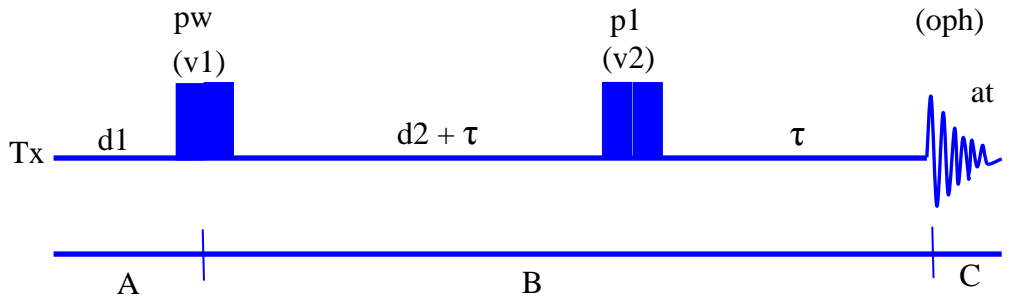


Figura 24.- Sequenza COSY Absolute-Value

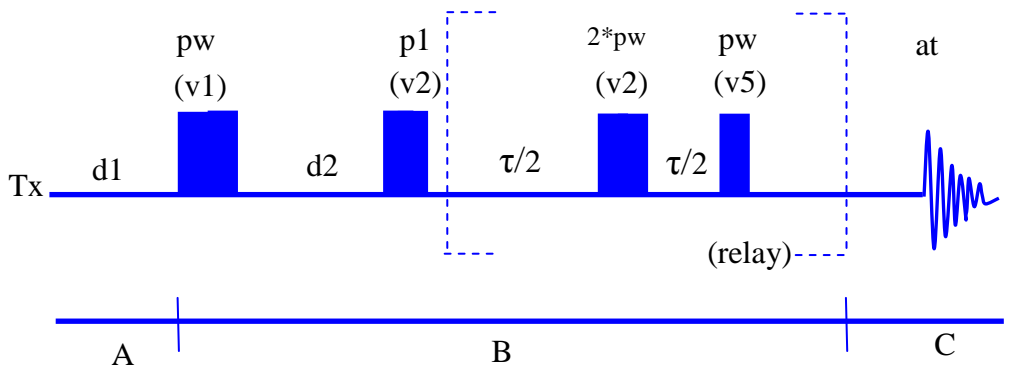


Figura 25.-Sequenza RELAY-COSY

Parametri:

relay=0, un normale *absolute value COSY* è impostato

relay=1, un *RELAY COSY* è impostato

relay=2, un *double-RELAY-COSY* è impostato

pw è l'impulso a 90°

$p1$ è l'impulso a 90° se il $relay$ non è uguale a 0 , viceversa i picchi di diagonale possono essere

$d1$ è il delay impostato da 1 a 3 volte t_1

$d2$ è il tempo di evoluzione t_1

at è il tempo di acquisizione t_2

sw è la finestra spettrale ($sw1=sw$)

$v1, v2$ e $v5$ sono gli impulsi di fase. oph indica la fase del ricevitore

ni è il numero di incremento di t_1 (imposta $sw1/ni$) se è richiesta la velocità,

ni può essere ridotto

tau è il tempo di propagazione per il COSY long range ($relay=0$) e per il COSY relayed ($relay$ diverso da 0).

HETCOR – Heteronuclear Chemical Shift Correlation

La macro *hetcor* richiama i parametri della sequenza di impulsi HETCOR riportata in fig. 28. La sequenza include l'opzione di presaturazione, per campioni in H₂O, impulsi compositi di 180° (2*pp), e impulsi simultanei sui canali del trasmettitore (Tx) e del disaccoppiatore (Dec).

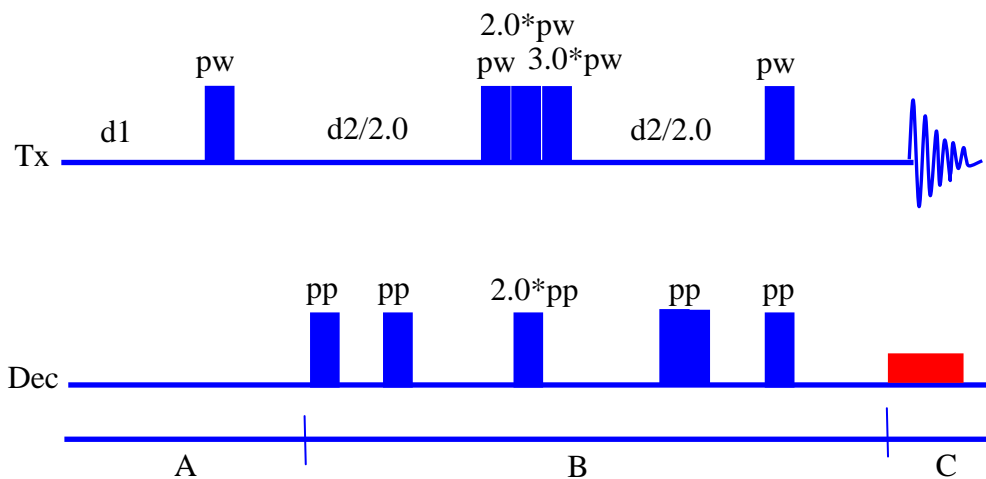


Figura 28.- Sequenza HETCOR

Parametri:

nt = multiplo di 4.

np = numero di punti usati in acquisizione t_2 (1024 - 2048).

ni = numero di incrementi usati in t_1 (64 - 256).

$d1$ = 1 o 2 volte T_1 protonico; non deve essere uguale a zero.

$j1xh$ = valore medio della costante di accoppiamento $^1J_{X-H}$.

$jnxh$ = valore medio della costante di accoppiamento $^2J_{X-H}$. o $^3J_{X-H}$ impostata solo se si vogliono osservare correlazioni *long-range* (in tal caso $hmult$ = 'y').

hmult = 'y' per osservare multipletti H-H; *hmult* = 'n' per discoppiare multipletti H-H.

pp = impulso di 90° sul protone H.

pw = impulso di 90° sul nucleo osservato X.

pplvl = potenza per l' impulso di 90° del protone sul canale del disaccoppiatore.

tpwr = potenza per l' impulso di 90° del nucleo X sul canale del trasmettitore.

swl = finestra spettrale protonica.

sw = finestra spettrale del nucleo X.

tof = posizione del trasmettitore nello spettro 1D del nucleo X.

dof = da impostare uguale al *tof* usato nello spettro 1D protonico.

presat = 'y' per la soppressione del solvente per campioni in H₂O (*presat* = 'n' negli altri casi).

Prima di impostare i parametri dell'esperimento bidimensionale è auspicabile registrare spettri 1D del protone H e del nucleo X per poter scegliere le opportune finestre spettrali e la corretta posizione di *dof* e *tof*.

Occorre sintonizzare il probe su entrambe le frequenze prima di calibrare gli impulsi di 90° di H e di X. Per campioni non marcati o non sufficientemente concentrati, si può far ricorso ai valori dell' impulso di 90° di X misurati sullo spettrometro con un campione standard.

Per avviare l'esperimento si digita *go*.

Per processare lo spettro si scelgono opportune funzioni di pesatura, si controlla il numero di punti con cui fare la trasformata; *fn* = *np* e *fn2* = *ni* (o maggiori mediante *zero-filling*), e si dà il comando:

wft2d.

Per impostare il valore di riferimento rispetto ad un segnale si digita:

rfl, *rfp* = ai valori di riferimento corrispondenti nello spettro 1D del nucleo X.

rfl1, *rfp1* = ai valori di riferimento corrispondenti nello spettro 1D protonico.

Per stampare lo spettro si può scegliere il numero di livelli, la loro spaziatura ed eventualmente le proiezioni sulle rispettive scale degli spettri 1D di H e di X, specificando il numero dell' esperimento in cui essi si trovano. Per es.

plhxcor (18, 1.2, 1, 2)

lo spettro HETCOR viene stampato con 18 contorni spazati di 1.2 e con le proiezioni degli spettri 1D che si trovano nell' esperimento 1 (protonico) e 2 (nucleo X).

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

La macro *noesy* richiama i parametri della sequenza di impulsi NOESY riportata in fig. 29. L' esperimento può essere effettuato in *absolute value (av)* o in modalità *phase-sensitive* con metodi TPPI o States-Haberhorn.

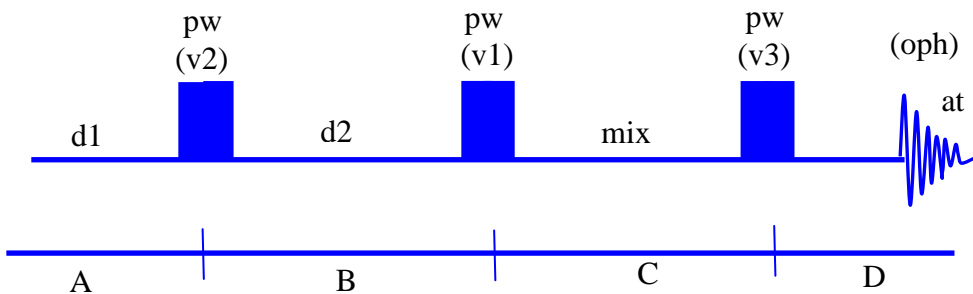


Figura 29.- Sequenza NOESY

Parametri:

pw = impulso di 90° sul nucleo osservato.

tpwr = potenza associata all' impulso di 90° sul canale del trasmettitore.

d1 = *relaxation delay* pari a 1 a 3 volte il valore di T_1 .

d2 = *evolution time* periodo t_1 . Si imposta uguale a zero.

at = *acquisition time* periodo t_2 .

sw = finestra spettrale del nucleo osservato (generalmente $sw1 = sw$ eccetto per *phase* = 3).

ni = numero di incrementi usati in t_1 (di default $sw1/ni = 12$).

mix = durata del mixing time (in s) per lo scambio di magnetizzazione.

phase = 1,2 per acquisire in modalità *phase-sensitive* con metodo States-Haberhorn (consigliato); *phase* = 3 per acquisire in modalità *phase-sensitive* con metodo TPPI; *phase* = 0 per acquisire in *av*.

$ss = \text{dummy scans}$ ossia scansioni che non vengono registrate e servono a stabilizzare il sistema prima dell' acquisizione (in genere $ss = 8$ o 16).

$nt =$ multiplo di 8 per esperimenti phase-sensitive; multiplo di 16 per esperimenti *av*.

$np =$ numero di punti usati in acquisizione t_2 (2048 - 4096).

$tof =$ posizione del trasmettitore.

Per avviare l'esperimento si digita *go*.

Per processare lo spettro si scelgono opportune funzioni di pesatura, si controlla il numero di punti con cui fare la trasformata; $fn = np$ e $fn1 = 512$ o 1024 e si dà il comando:

wft2da.

Per impostare il valore di riferimento rispetto ad un segnale si digita: $rfl, rfp =$ ai valori di riferimento corrispondenti nello spettro 1D del nucleo. $rfl1 = rfl$ e $rfp1 = rfp$.

HOM2DJ – Homonuclear J-Resolved 2D

La macro *hom2dj* richiama i parametri della sequenza di impulsi HOM2Dj riportata in fig. 30. L' esperimento viene effettuato in *absolute value (av)*.

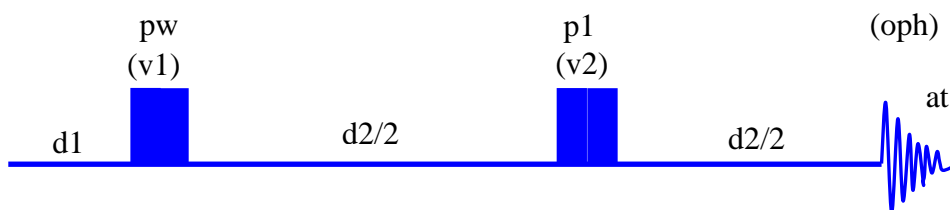


Figura 30.-Sequenza HOM2DJ

Parametri:

$pw =$ impulso di 90° sul nucleo osservato.

$tpwr =$ potenza associata all' impulso di 90° sul canale del trasmettitore.

$p1 =$ impulso di 180° sul nucleo osservato.

$d1 =$ relaxation delay pari a 1 a 3 volte il valore di T_1 .

$at =$ acquisition time periodo t_2 .

$nt =$ multiplo di 2 (minimo) fino ad un multiplo di 16 (raccomandato).

Per avviare l'esperimento si digita *go*. Per processare lo spettro si digita *wft2d*.

Dopo la trasformata di Fourier i dati sono ruotati di 45° . Per aggiustarli si digita *rotate (45, 0)*.

Per simmetrizzare i dati si digita *foldj*.

INADEQUATE – Double-Quantum Transfer Experiment

La macro *inadqt* richiama i parametri della sequenza di impulsi INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double-Quantum Transfer Experiment) riportata in fig. 31.

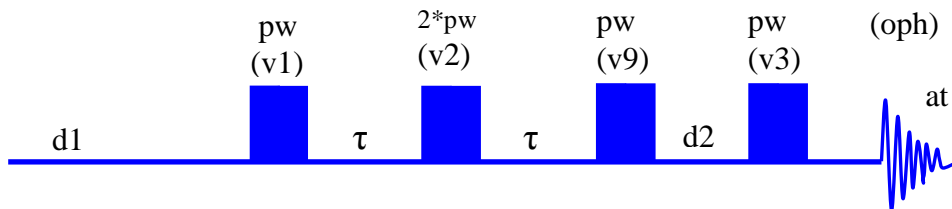


Figura 31.- Sequenza INADEQUATE

Parametri:

pw = impulso di 90° sul nucleo osservato (es. ^{13}C).

tpwr = potenza associata all' impulso di 90° sul canale del trasmettitore.

τ *tau* = $1/(4 \cdot J_{CC})$

jcc = valore medio della costante di accoppiamento tra i due eteronuclei (di solito $^1J_{X-X}$).

ss = *dummy scans* ossia scansioni che non vengono registrate e servono a stabilizzare il sistema prima dell' acquisizione.

nt = multiplo di 8 (minimo) fino a un multiplo di 128 (massimo) per esperimenti *av* con *phase* = 0; multiplo di 4 (minimo) fino a un multiplo di 64 (massimo) per esperimenti *phase-sensitive* *phase* = 1,2 o *phase* = 3.

phase = 1,2 per acquisire in modalità *phase-sensitive* con metodo States-Haberkmorn (consigliato); *phase* = 3 per acquisire in modalità *phase-sensitive* con metodo TPPI; *phase* = 0 per acquisire in *av*.

dm = 'y' per disaccoppiare i protoni da X.

dmm = 'w' modalità di disaccoppiamento con una sequenza WALTZ-16 (w).

dmf = modulazione di frequenza per disaccoppiare i protoni con una sequenza WALTZ-16 a una potenza settata da *dhp* o *dpwr* nella sequenza di impulsi.

hs = 'yn'.

hst = 0.01.

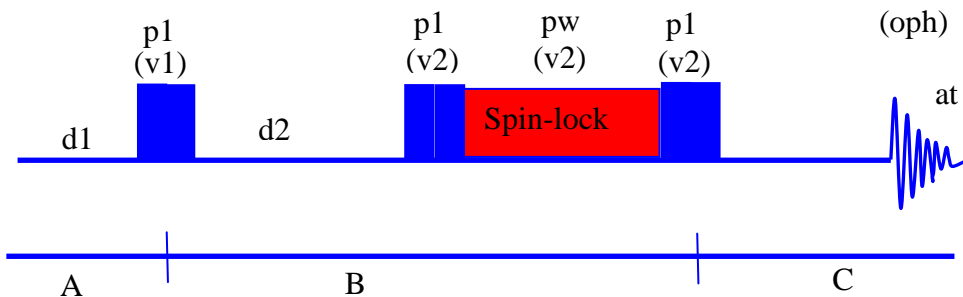
Per lanciare l'esperimento digitare *go*.

Si consiglia di registrare prima un esperimento 1D di ^{13}C da cui trarre i parametri (*sw*, *tof* etc.) da usare nella 2D.

ROESY Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

La macro *roesy* richiama i parametri della sequenza di impulsi ROESY riportata in fig. 32. L'esperimento può essere effettuato in *absolute value* (*av*) o in modalità *phase-sensitive* con metodi TPPI o States-Haberhorn.

Lo scambio di magnetizzazione avviene durante il *mixing time*, dove agisce un campo di spin-lock che può essere ad onda continua o pulsato a seconda del valore del parametro *ratio*.



Parametri: Figura 32.- Sequenza ROESY

p1 = impulso di 90° sul nucleo osservato.

p1lvl = potenza associata all' impulso di 90° sul canale del trasmettitore.

pw = impulso di x° (di default 30°) sul nucleo osservato alla potenza *soft tpwr*.

Se *ratio* = 0, lo spin-lock viene effettuato in onda continua a bassa potenza; se *ratio* è diverso da zero, lo spin lock viene effettuato con un treno

di impulsi pw separati da $delay$ pari a $ratio * pw$. La forza del campo effettivo di spin-lock B può essere calcolata dalla relazione:

$$B(\text{spin-lock}) = (x/360 * pw) / (ratio + 1)$$

dove x indica il *flip angle* relativo a pw .

mix = durata del mixing time (in s) per lo scambio di magnetizzazione.

$rocomp$ = 'y' per compensare offset di risonanze.

$d1$ = *relaxation delay* pari a 1 a 3 volte il valore di T_1 .

$d2$ = *evolution time* periodo t_1 . Si imposta uguale a zero.

at = *acquisition time* periodo t_2 .

sw = finestra spettrale del nucleo osservato (generalmente $sw1 = sw$ eccetto per $phase = 3$).

ni = numero di incrementi usati in t_1 (di default $sw1/ni = 12$).

$phase = 1,2$ per acquisire in modalità *phase-sensitive* con metodo States-Haberkorn (consigliato); $phase = 3$ per acquisire in modalità *phase-sensitive* con metodo TPPI; $phase = 0$ per acquisire in *av*.

ss = *dummy scans* ossia scansioni che non vengono registrate e servono a stabilizzare il sistema prima dell' acquisizione (in genere $ss = 8$ o 16).

nt = multiplo di 4 per esperimenti *phase-sensitive*.

np = numero di punti usati in acquisizione t_2 (2048 - 4096).

tof = posizione del trasmettitore.

Per avviare l'esperimento si digita *go*.

Per processare lo spettro si scelgono opportune funzioni di pesatura, si controlla il numero di punti con cui fare la trasformata; $fn = np$ e $fn1 = 512$ o 1024 e si dà il comando:

wft2da.

Il formalismo degli operatori prodotto.-

La descrizione accurata degli esperimenti NMR ad impulso è fornita dalla teoria della matrice densità. Un'approccio semplificato per la trattazione delle moderne tecniche NMR è rappresentato dal formalismo degli operatori prodotto (O. P.), che affonda le proprie radici nel formalismo dell'operatore densità.

Sebbene la matrice densità costituisca la rappresentazione più corretta del fenomeno fisico NMR, essa presenta però il grosso svantaggio di non fornire un'immagine intuitiva dell'evoluzione della magnetizzazione durante l'esperimento, oltre a richiedere dimestichezza con matrici che, per un sistema di N spin, raggiungono dimensioni di $2^N \cdot 2^N$.

Nel formalismo degli operatori prodotto (O.P.) non vengono utilizzate matrici per rappresentare gli operatori che descrivono lo stato del sistema di spin, ma gli operatori stessi. In tal modo la trattazione dei sistemi di spin risulta notevolmente semplificata anche se rappresenta una descrizione sufficiente solo per gli stati di spin debolmente accoppiati (costante di accoppiamento J piccola rispetto alla differenza di chemical shift).

Il concetto fondamentale che sta alla base della teoria degli operatori prodotto consiste nell'espansione dell'operatore densità come una combinazione lineare di operatori di base. Per un sistema ad N spin, un set completo di base è costituito da 4^N operatori prodotto di forma generica:

$$B_s = 2^{(q-1)} \prod_{k=1, N} (I_{kv})^{a_{sk}}$$

dove: N = numero totale di nuclei I nel sistema di spin
k = l'indice del nucleo
v = x, y, z
q = numero di operatori a singolo spin nel prodotto
 $a_{sk} = 1$ per q nuclei, = 0 per i rimanenti N-q nuclei.

Per quanto riguarda il significato degli operatori I_{kv} , questo è direttamente legato allo stato di magnetizzazione dei vari nuclei:

I_{kz} :magnetizzazione longitudinale dello spin k
 $I_{kx,y}$:magnetizzazione in fase x,y dello spin k
 $2I_{kx,y} I_{lz}$:magnetizzazione antifase x dello spin k rispetto a l
 $2I_{kz} I_{lz}$:ordine longitudinale a due spin di k e l
 $2I_{kx,y} I_{lx,y}$:coerenze a due spin degli spin k e l.

E' possibile seguire l'evoluzione dello stato di un sistema di spin sotto l'effetto di una sequenza di impulsi mediante le relative trasformazioni degli operatori prodotto.

Lo stato fondamentale in equilibrio termico è costituito da una combinazione lineare dei soli operatori a singolo spin che rappresentano magnetizzazione longitudinale. Per azione di un impulso di radiofrequenza caratterizzato da un "flip angle" β diretto lungo y , I_z , così come I_x , I_y si trasformano secondo le seguenti equazioni:

$$\beta I_y$$

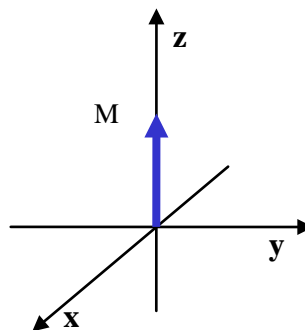
$$I_x \text{ -----} \rightarrow I_x \cos \beta - I_z \sin \beta$$

$$\beta I_y$$

$$I_y \text{ -----} \rightarrow I_y$$

$$\beta I_y$$

$$I_z \text{ -----} \rightarrow I_z \cos \beta + I_x \sin \beta$$



In tutte e tre le equazioni precedenti il termine a sinistra rappresenta lo stato di partenza del sistema di spin, mentre quello sulla destra costituisce lo stato finale dopo la "propagazione", ossia l'evoluzione sotto l'influenza del particolare operatore responsabile per quella specifica interazione (in questo caso l'impulso lungo l'asse y). Più in generale, il termine sulla freccia rappresenta la parte dell'Hamiltoniano sotto cui il sistema si evolve, per cui risulterà uguale a:

- $\beta I_{x,y}$ o in generale βI_φ per un impulso di radiofrequenza con un angolo di rotazione β intorno a un asse nel piano xy che forma un angolo φ con l'asse x
- $\Omega I_{1z}t$, per l'evoluzione di chemical shift Ω del nucleo 1 durante t
- $2\pi J I_{1z} I_{2z} t$, per l'evoluzione di accoppiamento tra lo spin 1 e lo spin 2 durante t .

Dalle espressioni precedenti risulta evidente che gli operatori Cartesiani I_x , I_y e I_z si trasformano come le corrispondenti magnetizzazioni sotto l'azione di un impulso di radiofrequenza con un "flip angle" β .

In un lavoro del 1990, Eggenberger e Bodenhausen hanno introdotto una descrizione grafica dell'evoluzione di sistemi di spin con gli O.P. (Eggenberger & Bodenhausen (1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29, 374-383).

In tale rappresentazione grafica ciascun operatore è indicato con un cerchio che contiene la componente a cui ci si riferisce, soprilineata se il segno è negativo.

Es.

$$I_x = \textcircled{x} \quad -I_y = \textcircled{\bar{y}}$$

Le trasformazioni per effetto di impulsi (β_y) sono indicate con frecce brevi:

continue se associate a termini seno \longrightarrow
 tratteggiate se associate a termini coseno $\cdots\cdots\longrightarrow$

Es. $\beta_y = 90^\circ$



Se si scrivono le equazioni per l'evoluzione di chemical shift:

$$I_x \xrightarrow{\Omega I_z t} I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t$$

$$I_y \xrightarrow{\Omega I_z t} I_y \cos \Omega t - I_x \sin \Omega t$$

$$I_z \xrightarrow{\Omega I_z t} I_z$$

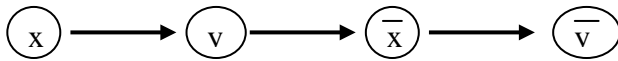
si vede che, anche in questo caso, gli operatori si comportano come le magnetizzazioni, per cui I_x corrisponde alla magnetizzazione lungo l'asse x, I_y alla magnetizzazione lungo y e I_z alla magnetizzazione lungo z. Per una particella di spin nucleare $1/2$ il formalismo degli operatori prodotto è allora del tutto equivalente a quello dei vettori.

Il termine sulla freccia $\Omega I_z t$ indica la parte dell'Hamiltoniano responsabile dell'evoluzione del sistema di spin per effetto del chemical shift Ω del nucleo in esame durante il tempo t.

Le trasformazioni per effetto di chemical shift Ω sono indicate con frecce lunghe:

continue se associate a termini seno \longrightarrow
 tratteggiate se associate a termini coseno $\cdots\cdots\longrightarrow$

Es. termini modulati come funzioni seno per effetto di Ω



Ai fini della rappresentazione delle risonanze in uno spettro bidimensionale, l'evoluzione del sistema di spin per effetto dell'accoppiamento tra i nuclei risulta sicuramente la trasformazione più importante. Alcuni esperimenti 2D infatti rappresentano proprio un trasferimento di coerenze per accoppiamento, in cui i "cross peak" corrispondono alle frequenze caratteristiche dei sistemi accoppiati. Esistono essenzialmente due tipi di interazioni spin-spin che possono determinare un trasferimento di coerenza:

- accoppiamento scalare attraverso i legami ("J-coupling")
- accoppiamento dipolare attraverso lo spazio.

Le equazioni che descrivono l'evoluzione del sistema di spin per accoppiamento scalare tra lo spin 1 e lo spin 2 in termini di operatori prodotto sono:

$$I_{1x} \xrightarrow{2\pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}} I_{1x} \cos \pi J_{12} t + 2 I_{1y} I_{2z} \sin \pi J_{12} t$$

$$I_{1y} \xrightarrow{2\pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}} I_{1y} \cos \pi J_{12} t - 2 I_{1x} I_{2z} \sin \pi J_{12} t$$

$$2 I_{1x} I_{2z} \xrightarrow{2\pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}} 2 I_{1x} I_{2z} \cos \pi J_{12} t + I_{1y} \sin \pi J_{12} t$$

$$2 I_{1y} I_{2z} \xrightarrow{2\pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}} 2 I_{1y} I_{2z} \cos \pi J_{12} t - I_{1x} \sin \pi J_{12} t$$

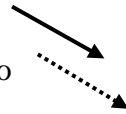
A differenza dell'evoluzione per chemical shift o per impulsi di radiofrequenza, quella per accoppiamento "crea" o "distrugge" operatori (ad

esempio $I_{1x} \rightarrow 2I_{1y}I_{2z}$ e $2I_{1x}I_{2z} \rightarrow I_{1y}$, il che significa che solo l'accoppiamento può coinvolgere altri nuclei nel cammino di trasferimento di coerenza. Ciò costituisce un punto molto importante dal momento che tale trasferimento di coerenza può avvenire solo quando un secondo spin è implicato nell'operatore prodotto.

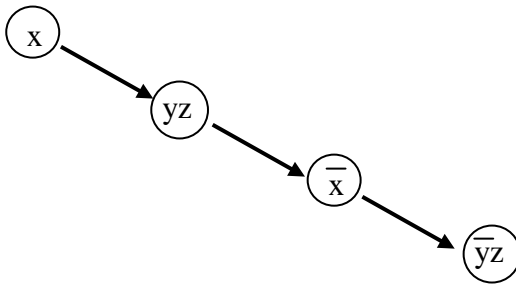
Il termine sulla freccia $2\pi J_{12}tI_{1z}I_{2z}$ indica la parte dell'Hamiltoniano responsabile dell'evoluzione del sistema di spin per effetto del accoppiamento scalare J tra i nuclei 1 e 2 durante il tempo t .

Le trasformazioni per effetto dell'accoppiamento scalare J sono indicate con frecce oblique:

continue se associate a termini seno
 tratteggiate se associate a termini coseno



Es. termini modulati come funzioni seno per effetto di J



Norme sulla trasformazione degli operatori-prodotto.-

- a. Un O. P. evolve sotto l'effetto del chemical shift o di impulsi in modo tale che ciascun operatore nel prodotto è trasformato separatamente.
- b. Operatori prodotto di due operatori trasversali o di due longitudinali non sviluppano mutuo accoppiamento.
- c. Accoppiamento scalare e chemical shift operano simultaneamente, ma, in caso di accoppiamento debole, l'evoluzione può essere considerata sequenziale.

Inoltre

- ❖ Solo O. P. con un solo operatore trasversale (I_x, I_y) sono osservabili.

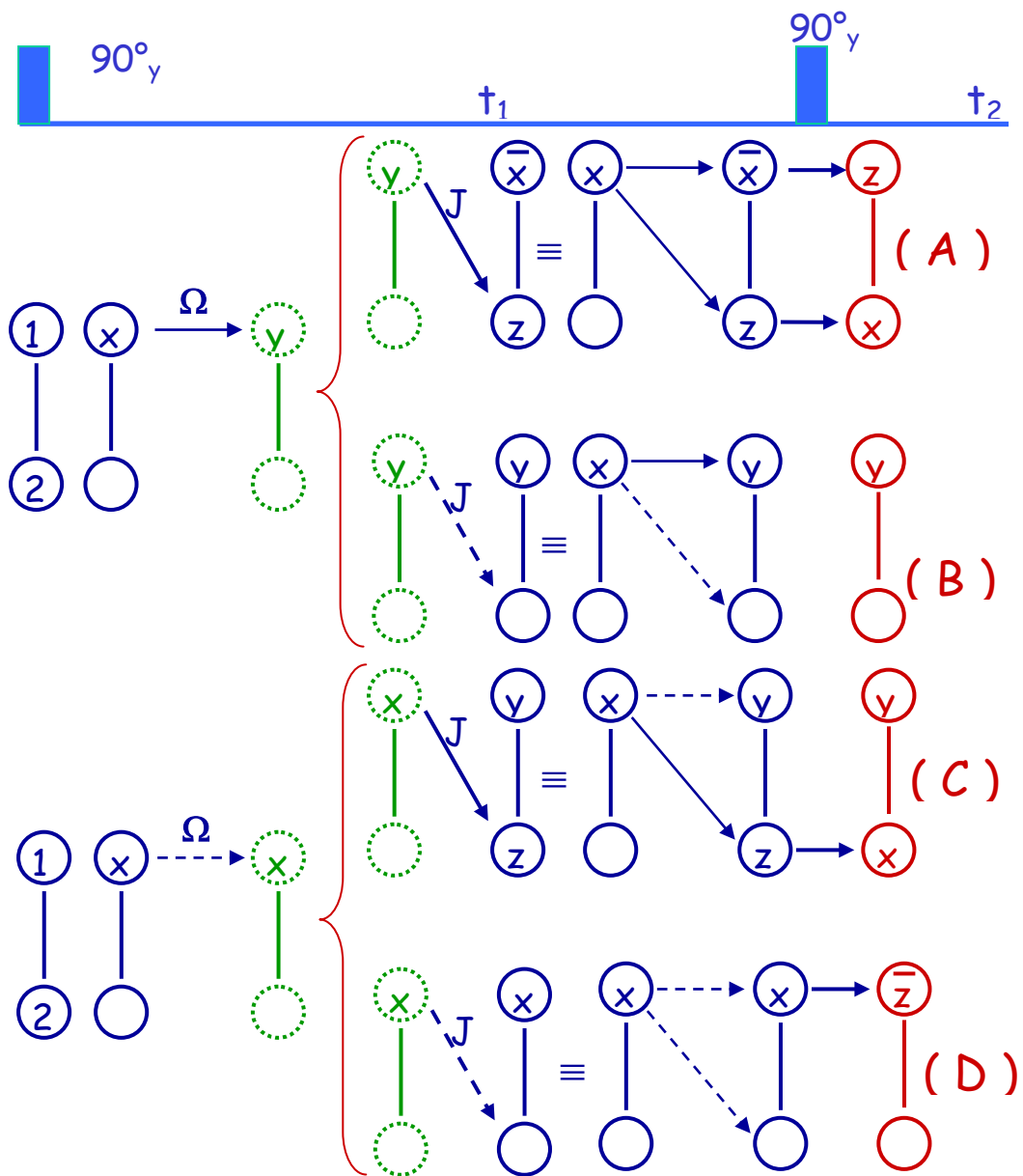
Nella successiva trattazione, in cui la descrizione grafica degli O. P. sarà adoperata per discutere l'esperimento COSY, per semplicità il ricevitore si riterrà collocato lungo x (*single phase detection*).

Trattazione dell' esperimento COSY (Correlation Spectroscopy) con O.P.

Per poter seguire come evolve la magnetizzazione in un esperimento COSY ed individuare quali sono i *pathway*, ossia i cammini di trasferimento di coerenza che portano alla comparsa di picchi diagonali e cross peak, è necessario ricorrere agli *operatori prodotto*. Si consideri un sistema semplice costituito da due *spin* (1 e 2) accoppiati scalarmente attraverso J e si immagini di partire da un sistema all'equilibrio, quindi da magnetizzazione longitudinale. Questa è rappresentata dagli operatori I_{1z} e I_{2z} . Si segua l'evoluzione della magnetizzazione a partire dallo *spin* 1 e quindi dal termine I_{1z} (ovviamente risultati simili si ottengono partendo dallo *spin* 2 e quindi I_{2z}). Un impulso di 90° lungo y ribalta I_z sull'asse x creando I_x .

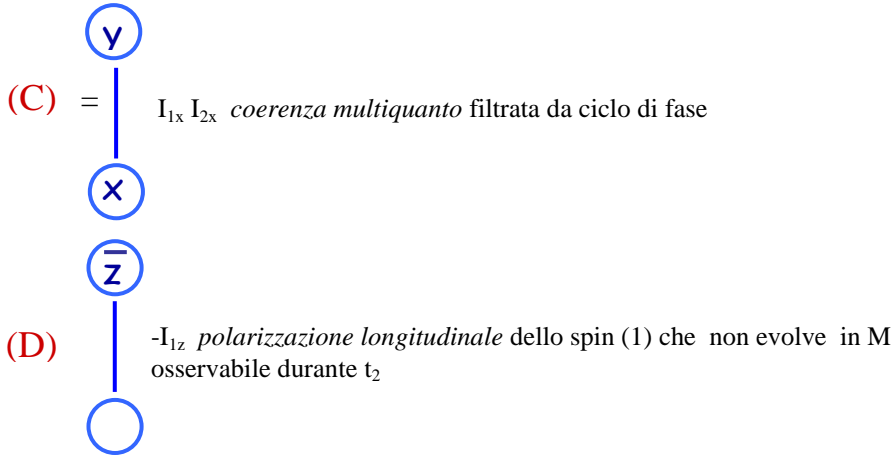
Nello schema grafico, per opportuna chiarezza, è mostrata l'evoluzione del sistema in maniera sequenziale, ossia è sviluppata prima l'evoluzione per *chemical shift* Ω e poi per *accoppiamento scalare* J.

I cerchi tratteggiati, quindi, indicano stati virtuali e lo schema sulla destra indica l'effetto complessivo dei due step separati. Questo sviluppo sequenziale è garantito in assenza di accoppiamento forte, condizione in cui gli operatori *chemical shift* e *accoppiamento scalare* commutano. Gli impulsi non commutano mai.



Schema 1.-

I possibili cammini di trasferimento di coerenza dopo il secondo impulso di 90° e prima dell'inizio di t_2 sono indicati nello schema grafico come (A), (B), (C) e (D). Seguiamo ora l'evoluzione di essi durante t_2 , iniziando con (C) e (D).

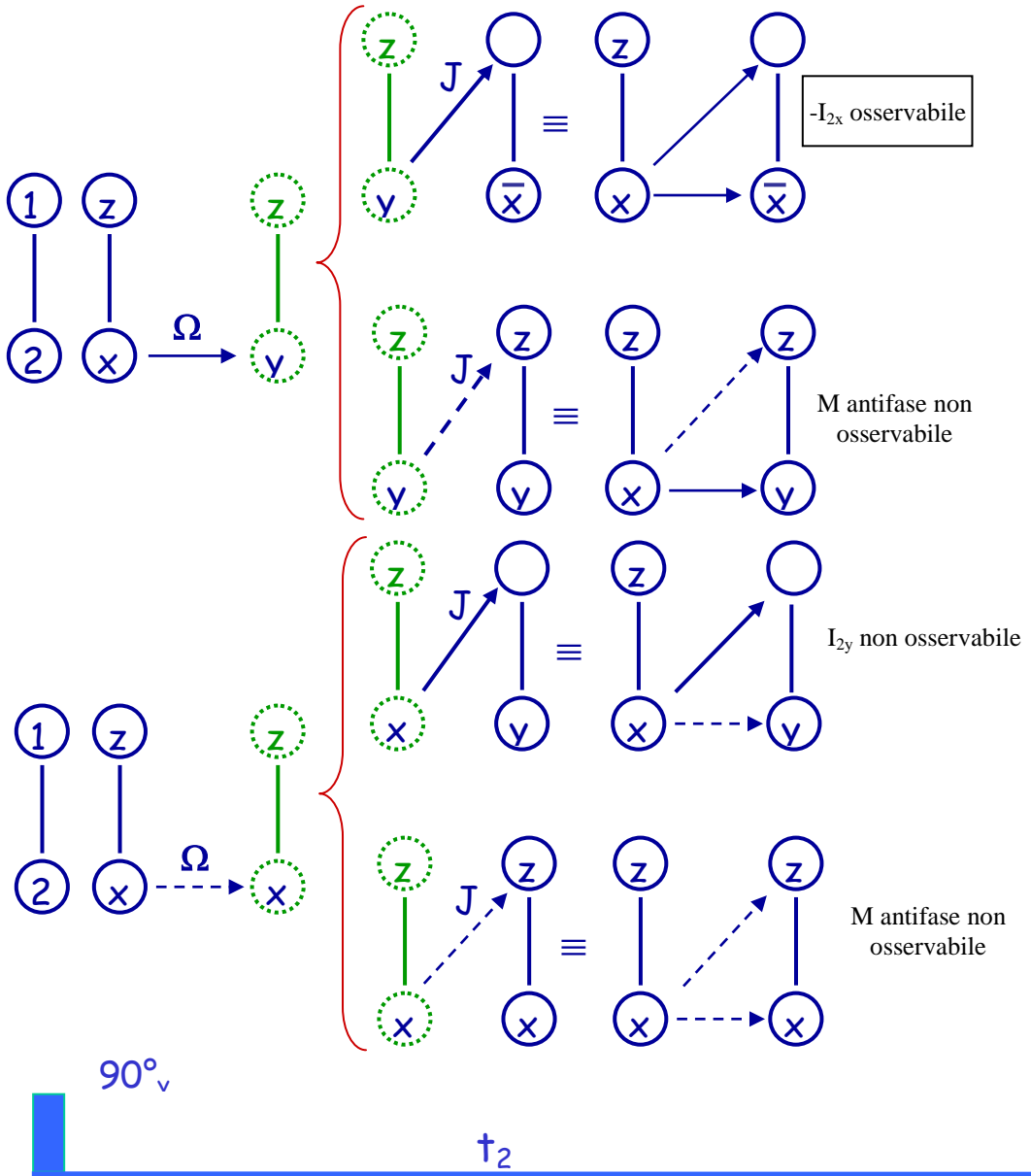


I cammini (C) e (D) non portano a segnali osservabili. I cammini (A) e (B) sono invece responsabili della comparsa dei cross-peak e dei diagonal-peak.

Il pathway (A) spiega la comparsa dei cross-peak. Come si è detto in precedenza, solo magnetizzazione trasversale può essere rilevata dal ricevitore e quindi solo cammini di trasferimento che terminano in un operatore trasversale sono associabili a segnali NMR.

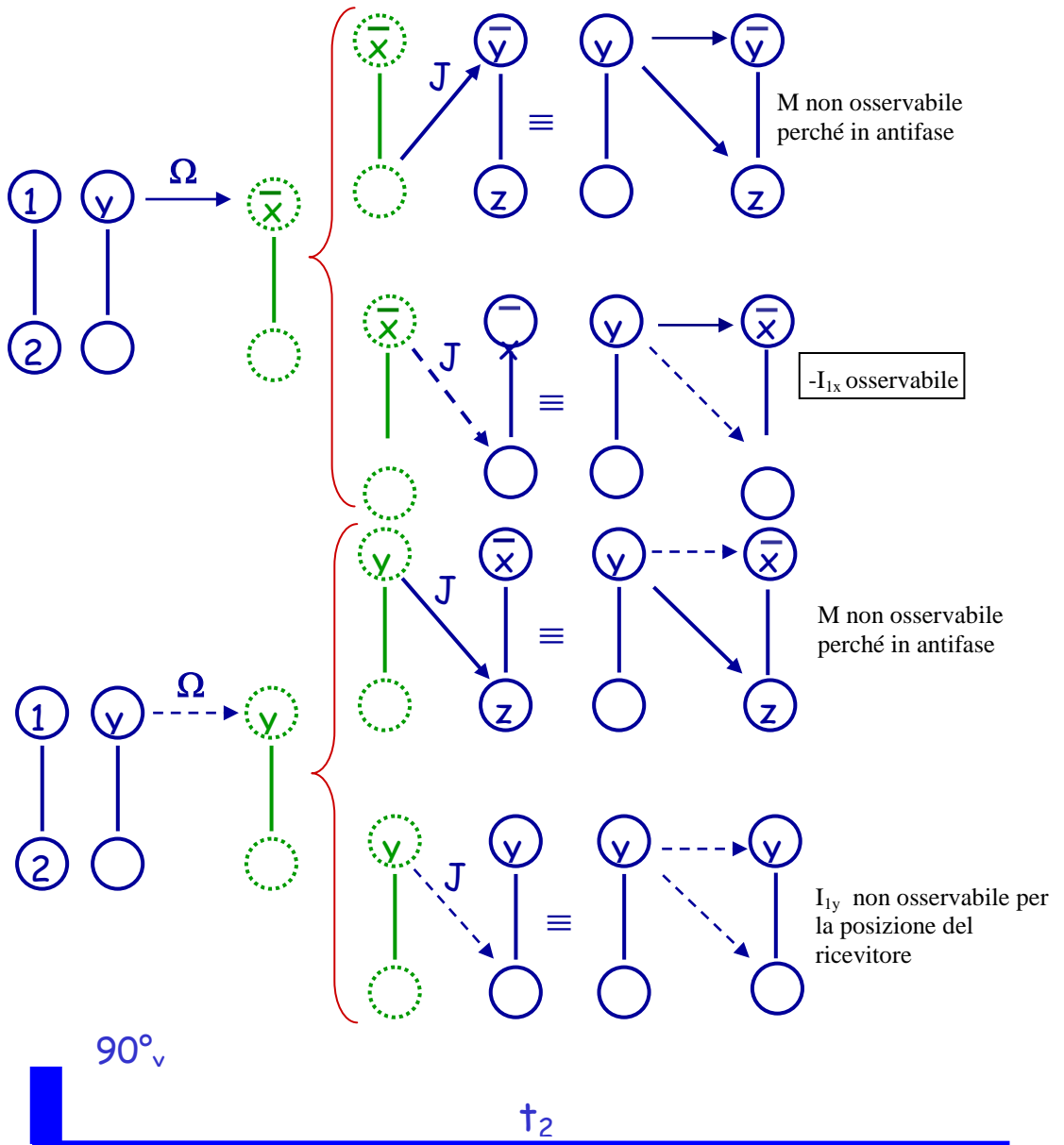
Se, inoltre, per convenzione collochiamo il ricevitore lungo x solo termini I_x sono osservabili (nella figura seguente solo $-I_{2x}$ è osservabile).

Quindi sia I_{1z2y} e I_{1z2x} che indicano magnetizzazione in antifase sia I_{2y} (M trasversale lungo y) non sono osservabili.



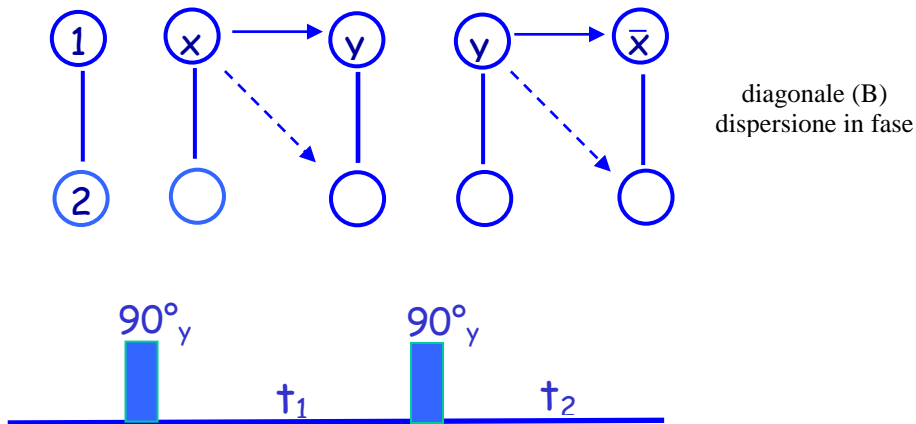
Schema 2.-

Il pathway (B) indicato è responsabile della comparsa dei *diagonal peak*.



Schema 3.-

Quindi, in sommario, il pathway responsabile della comparsa dei picchi diagonali è il seguente:



Schema 4.-

Si parte da magnetizzazione dello *spin* 1, che evolve per effetto dell'accoppiamento scalare J e del *chemical shift* Ω_1 in t_1 e in t_2 , e si termina in magnetizzazione dello *spin* 1. Poiché l'evoluzione per *chemical shift* avviene con Ω_1 sia in t_1 che in t_2 questo è un picco diagonale (Ω_1, Ω_1).

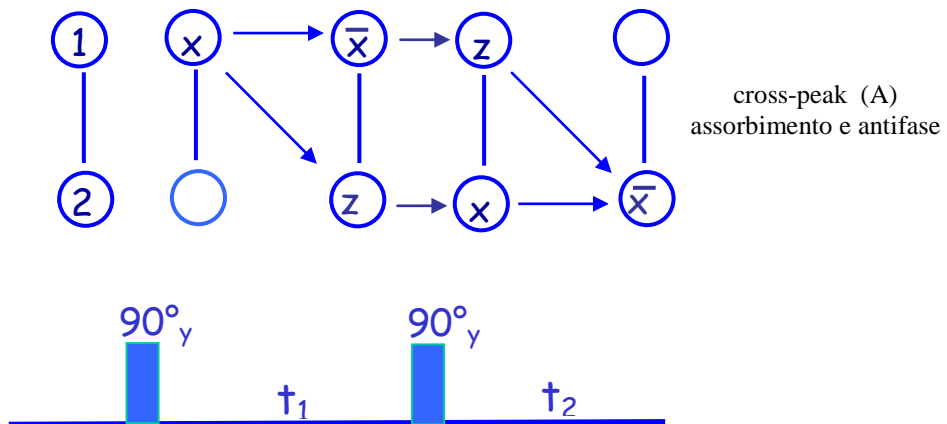
Il termine della matrice densità $\sigma(t_1, t_2)$ che descrive lo stato di *spin* al termine di t_2 si ricava facilmente osservando il grafico:

$$\sigma(t_1, t_2) = -I_{1x} \text{sen}(\Omega_1 t_1) \cos(\pi J t_1) \text{sen}(\Omega_1 t_2) \cos(\pi J t_2).$$

Dopo trasformata di Fourier in t_1 e in t_2 un segnale risulterà in assorbimento se c'è un numero pari di fattori modulati come seno sia durante t_1 che in t_2 (n° pari di linee solide nello schema grafico), mentre risulterà in dispersione se questo numero è dispari. Inoltre, un multipletto si presenta in fase se la costante di accoppiamento J è modulata come coseno, mentre risulta in antifase se J è modulata come seno.

Il segnale diagonale, quindi, è in dispersione (numero dispari di funzioni seno per ciascun intervallo di tempo) e in fase (J modulata come coseno).

Invece, in sommario, il pathway responsabile della comparsa dei cross-peak è il seguente:



Schema 5.-

Si parte da magnetizzazione dello *spin* 1, che evolve per effetto dell'accoppiamento scalare J e del *chemical shift* Ω_1 in t_1 e Ω_2 in t_2 , e si termina in magnetizzazione dello *spin* 2. Poiché l'evoluzione per *chemical shift* avviene con Ω_1 in t_1 e Ω_2 in t_2 questo è un picco diagonale (Ω_1, Ω_2).

Il termine della matrice densità $\sigma(t_1, t_2)$ che descrive lo stato di *spin* al termine di t_2 si ricava facilmente osservando il grafico:

$$\sigma(t_1, t_2) = -I_{2x} \text{sen}(\Omega_1 t_1) \text{sen}(\pi J t_1) \text{sen}(\Omega_2 t_2) \text{sen}(\pi J t_2).$$

Dopo trasformata di Fourier in t_1 e in t_2 il segnale del cross-peak risulterà in assorbimento (numero pari di funzioni seno per ciascun intervallo di tempo ossia n° pari di linee solide nello schema grafico) e in antifase (J modulata come seno).

La trasformata di Fourier.-

Per eseguire una trasformazione di Fourier basta ascoltare. L'orecchio esegue automaticamente un calcolo che il nostro intelletto può effettuare solo dopo anni di studio della matematica. L'orecchio infatti trasforma le onde di pressione del suono, che si spostano nel tempo e nello spazio, in uno spettro in cui il suono stesso è descritto come una serie di intensità (il volume) alle diverse frequenze (i toni). Analoghe operazioni possono essere eseguite per via matematica su qualsiasi fenomeno ondulatorio, dalle onde luminose alle maree e ai cicli solari.

Nel 1956 la trasformata di Fourier aprì la strada alle ricerche per la costruzione di immagini bidimensionali che dettero inizio a quella che oggi viene chiamata Tomografia Assiale Computerizzata (TAC). Successivamente, nel 1962, grazie alla tecnica di diffrazione a raggi X ed all'analisi di Fourier, fu scoperta la forma a doppia elica del DNA, e fu chiarita l'organizzazione di molte altre strutture complesse come quelle dei virus.

La trasformazione di Fourier, che indicheremo in seguito con l'acronimo FT, è divenuta uno strumento utilissimo in diversi domini della scienza tra cui astronomia, medicina, chimica.

Prima dell'avvento dei moderni calcolatori, la realizzazione di una trasformazione richiedeva moltissime operazioni aritmetiche con enorme dispendio di tempo. Il numero di operazioni dipendeva dal numero di punti utilizzati per descrivere l'onda. Il numero di addizioni era circa pari al numero di punti e quello delle moltiplicazioni era pari al quadrato del numero di punti. Per analizzare, quindi, un'onda formata da 1000 punti occorre circa mille addizioni e un milione di moltiplicazioni.

Per ridurre il numero di moltiplicazioni e il tempo di calcolo, si può far uso della trasformata veloce di Fourier (FFT), che prevede la divisione in un gran numero di segmenti uguali che formano l'onda. Se per trasformare una curva con 16 campionamenti sarebbero necessarie (16^2) , 256 moltiplicazioni, suddividendo la curva in due segmenti, ciascuno di 8 punti, le moltiplicazioni si riducono a 64, che addizionate a quelle dell'altro segmento assommano a 128, cioè la metà del numero precedente. Continuando a suddividere si arriva a 8 segmenti costituiti da 2 campionamenti. Per costruire la trasformata complessiva si devono combinare le trasformate parziali. Dapprima le trasformate dei pezzi con 2 punti vengono combinate in trasformate con 4 punti, poi in trasformate con 8 punti ed infine nella trasformata finale con 16 punti, per un totale di 48 moltiplicazioni, a fronte delle 256 iniziali. Complessivamente queste operazioni comportano una serie di calcoli la cui valutazione è necessaria per stabilire a quale livello interrompere la segmentazione.

Attualmente, con l'avvento di calcolatori superveloci è possibile effettuare un elevatissimo numero di operazioni in tempi brevi, per cui l'operazione di Fourier diventa utilizzabile anche in tutte quelle metodiche strumentali che richiedono velocità di calcolo.

La trasformazione di Fourier, una applicazione funzionale lineare che relaziona l'integrale improprio della funzione di due variabili $g(v,t)=f(t)e^{-ivt}$ con la funzione di una sola variabile $\phi(v)$ secondo l'espressione:

$$\Phi(v) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-ivt} dt$$

si colloca alla base della spettroscopia NMR detta ad impulso che prevede l'eccitazione del campione con una sola rf per un breve intervallo di tempo e la successiva registrazione del segnale dovuto all'interferenza delle rf emesse dai singoli nuclei nella fase di rilassamento, il FID.

Nel caso in cui il campione presenti un unico segnale, tarando la spirale generatrice di impulso alla corrispondente frequenza di Larmor il segnale registrato (FID) appare come in Fig 33a, corrispondente, ossia, ad un decadimento di primo ordine. Tuttavia la presenza nei campioni di nuclei non equivalenti, ciascuno con la propria frequenza di Larmor, e l'utilizzo di una unica rf per l'impulso, determinano il tipico aspetto di interferogramma del FID (Fig. 33 b) rappresentabile analiticamente da una funzione del tipo

$$s(t) = \sum_k f(t)(\cos(\nu_k - \nu')t - i \operatorname{sen}(\nu_k - \nu')t) \quad f(t) = e^{i\alpha_k t}$$

dove k indica il numero di componenti armoniche interferenti, ossia il numero di picchi nello spettro, α_k è il coefficiente che esprime il decadimento di primo ordine dovuto ai rilassamenti spin-spin e spin reticolo, ν' indica la frequenza caratteristica del ricevitore e i termini seno e coseno che si riferiscono alle componenti rispettivamente lungo x e y.

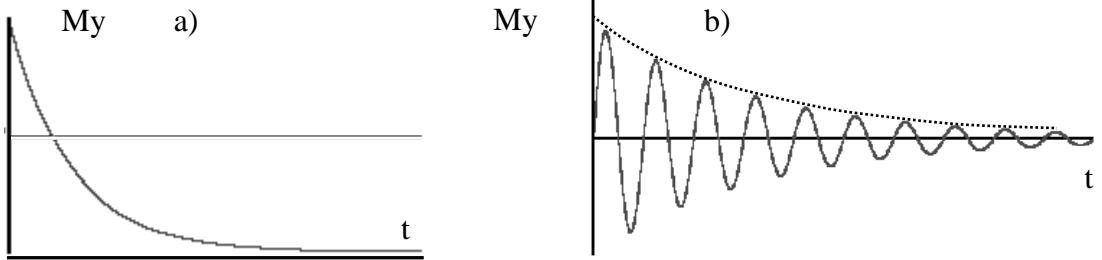


Figura 33.- Componente magnetica lungo y della radiofrequenza generata dalla precessione di un momento magnetico. Segnale dovuto ad un singolo nucleo e registrato da un ricevitore calibrato alla frequenza di Larmor del nucleo stesso (a), calibrato ad una generica frequenza (b).

Considerando le relazioni di Eulero (i, ii) tra le funzioni trigonometriche e l'esponenziale complesso, ed assumendo l'unità i a coefficiente della componente seno, il segnale registrato nella coordinata y , la funzione $s(t)$ può essere utilizzata per la trasformazione di Fourier secondo:

$$\mathbf{1) } S(\nu') = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) e^{-i2\pi\nu't} dt$$

$$\text{i) } e^{ix} = \cos x + i \sin x$$

$$\text{ii) } e^{-ix} = \cos x - i \sin x$$

dove per semplicità è stata presa in considerazione una sola componente armonica eliminando quindi l'operatore sommatoria.

Attraverso l'integrale improprio della **1** si realizza la trasformazione di Fourier della funzione di ν e t nella funzione della sola ν come esposto di seguito dove l'integrazione è ristretta da 0 a $3 \times T_2$ in quanto $f(t)$ è approssimabile a zero all'esterno di tale intervallo.

La trasformazione restituisce una funzione nella variabile ν' (una sommatoria di funzioni se si considerano tutte le componenti armoniche) costituita da una componente reale ed una immaginaria rispettivamente $R(\nu')$ e $I(\nu')$:

$$\sum_k R(\nu') = \frac{a}{\alpha} \frac{1}{1 + \left(\frac{2\pi(\nu_k - \nu')}{\alpha}\right)^2}$$

$$\sum_k I(\nu') = \frac{a}{\alpha} \frac{\frac{2\pi(\nu_k - \nu')}{\alpha}}{1 + \left(\frac{2\pi(\nu_k - \nu')}{\alpha}\right)^2}$$

La rappresentazione analitica della componente reale (ovvero della sommatoria) è costituita da funzioni pari con massimo in corrispondenza della frequenza ν (ovvero con massimi in corrispondenza delle ν_k) mentre le componenti immaginarie presentano un punto di flesso nei medesimi punti ν_k dovuto al cambiamento di segno del numeratore.

La rappresentazione della componente reale in funzione di ν' restituisce quindi lo spettro nella forma familiarmente nota (fig.34).

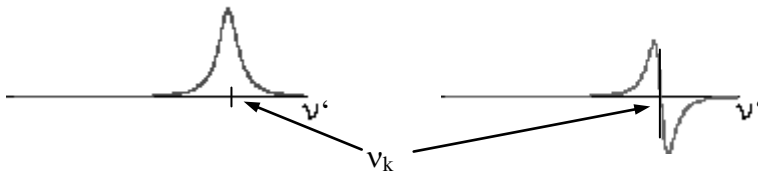


Figura 34

Negli spettrometri ad impulso un calcolatore provvede all'esecuzione dell'insieme delle operazioni descritte, dove l'immissione dei dati avviene in forma digitale a seguito della digitalizzazione del FID e l'integrazione è realizzata con metodi numerici. Si rende così possibile la registrazione simultanea di tutte le frequenze di risonanza di un determinato nucleo all'interno di un campione in un tempo inferiore ai $5 T_1$ necessari per la realizzazione di una nuova sequenza.

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche e spettroscopiche dei principali solventi per NMR

Solvente	Peso Molecolare	D_4^{20} (g/mL)	Pf ^a (°C)	Pe ^a (°C)	δ_H (molt) ^b	δ_C (molt) ^b
Acido acetico-d ₄	64.078	1.12	17	118	11.53 (1) 2.03 (5)	178.4 (sl)
Acetone-d ₆	64.117	0.87	-94	57	2.04 (5)	206.0 (13) 29.8 (7)
Acetonitrile-d ₃	44.071	0.84	-45	82	1.93 (5)	118.2 (sl) 1.3 (7)
Benzene-d ₆	84.152	0.95	5	80	7.15 (sl)	128.0 (3)
Tetracloruro di carbonio	153.81	1.59	-23	77		96.0 (1)
Cloroformio-d	120.384	1.50	-64	62	7.24 (1)	77.0 (3)
Cicloesano-d ₁₂	96.236	0.89	6	81	1.38 (sl)	26.4 (5)
Ossido di deuterio	20.028	1.11	3.8	101.4	4.63 ^c 4.67(Na ₃ PO ₄)	
Diglime-d ₁₄	148.263	0.95	-68	162	3.49 (sl) 3.40 (sl) 3.22 (sl)	70.7 (5) 70.0 (5) 57.7 (7)
Dimetilformammide-d ₇	80.138	1.04	-61	153	8.01 (sl) 2.91 (5) 2.74 (5)	162.7 (3) 35.2 (7) 30.1 (7)
Dimetil-solfossido-d ₆	84.170	1.18	18	189	2.49 (5)	39.5 (7)
p-Diossano-d ₈	96.156	1.13	12	101	3.53 (m)	66.5 (5)
Alcol metilico-d ₄	36.067	0.89	-98	65	4.78 (1) 3.30 (5)	49.0 (7)
Cloruro di metilene-d ₂	86.945	1.35	-95	40	5.32 (3)	53.8 (5)
Nitrometano-d ₃	64.059	1.20	-29	101	4.33 (5)	62.8 (7)
Piridina-d ₅	84.133	1.05	-42	116	8.71 (sl) 7.55 (sl) 7.19 (sl)	149.9 (3) 135.5 (3) 123.5 (3)
Tetraidrofurano-d ₈	80.157	0.99	-109	66	3.58 (sl) 1.73 (sl)	67.4 (5) 25.3 (sl)
Toluene-d ₈	100.191	0.94	-95	111	7.09 (m) 7.00 (sl) 6.98 (m) 2.09 (m)	137.5 (1) 128.9 (3) 128.0 (3) 125.2 (3) 20.4 (7)
Acido trifluoroacetico-d	115.030	1.50	-15	72	11.50 (1)	164.2 (4) 116.6 (4)

^a Punti di fusione ed ebollizione (°C) sono dei corrispondenti composti leggeri (ad esclusione dell'ossido di deuterio).

^b δ_H = chemical shift dei protoni residui; δ_C = ¹³C chemical shift (relativi al TMS). Molt = molteplicità del segnale (m = con struttura fine; sl = slargato, senza struttura fine).

^c Il TMS in quanto insolubile in acqua è sostituito da (CH₃)₃Si(CH₂)₃SO₃Na (DSS).

Abbreviazioni ed acronimi usati in NMR

ACCORDION	2 technique, simultaneous incrementing Of evolution and mixing times
ADA	Alternated Delay Acquisition
ADC	Analog to Digital Converter
ADEQUATE	Astonishingly Sensitive Double Quantum Transfer Experiment
ADLF	Adiabatic Demagnetization in the Laboratory Frame
ADRF	Adiabatic Demagnetization in the Rotaring Frame
AEE	Average Excitation Energy approximation
AJCP	Adiabatic J Cross Polarization
APT	Attached Proton Test
AQ	Aquire
ARP	Adiabatic Rapid Passage
ASIS	Aromatic Solvent Induced Shift
ASTM	American Society for Testing Materials
BB	Broadband, as in decoupling
BIRD	Bilinear Rotation Decoupling
BLEW	A windowless multiple-pulse decoupling sequence
BPP	Bloembergen/Purcell/Pound (theory)
R-24	Burum & Rhim (pulse sequence)
BURP	Bande selective Uniform Response
BWR	Bloch/Wangsness/Redfield (theory)
CAMELSPIN	Cross Relaxation Appropriate for Minimolecules Emulated by Locked SPINs
CCPPA	Coupled Cluster Polarization Propagator Approximation
CH-COSY	Carbon-Hydrogen Correlation Spectroscopy
CHESS	Chemical Shift Selective Imaging Sequence
CHF	Coupled Hartree-Fock molecular orbital calculation
CIDEP	Chemically Induced Dynamic Electron Polarization
CIDNP	Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization
COCONOESY	Combined COSY/NOESY
COLOC	Correlated Spectroscopy via Long Range Coupling
COSY	Correlated Spectroscopy
COSY-45	Cosy with 45° mixing pulse
COSYDEC	COSY with F ₁ Decoupling
COSYLR	COSY for Long-Range Couplings
CP	Cross Polarization
CPD	Composite Pulse Decoupling
CPMAS	Cross Polarization Magic-Angle Spinning
CPMG	Carr Purcell Meiboom Gill Sequence
CRAMPS	Combined Rotational and Multiple Pulse Spectroscopy
CRAZED	Correlated Spectroscopy Revamped by Asymmtric Z-gradient Echo Detection
CSA	Chemical Shift Anisotropy
CSCM	Chemical Shift Correlated Map
CSI	Chemical Shift Imaging

CT	Constant Time
CW	Continuous Wave
CYCLCROP	Cyclic Cross Polarization
CYCLOPS	Cyclically Ordered Phase Sequence
CYCLPOT	Cyclic Polarization Transfer
DAC	Digital-to-Analog Converter Excitation
DANTE	Delay Alternating with Nutation for Tailored
DAS	Dynamic Angle Spinning
CDNMR	NMR in Presence of an Electric Direct Current
DD	Dipole-Dipole
DECSY	Double-Quantum Echo Correlated Spectroscopy
DEFT	Driven Equilibrium Fourier Transform
DEPT	Distortionless Enhancement Polarization Transfer
DEPTH	Spin-echo for spatial localization
DFT	Discrete Fourier Transformation
DIGGER	Discrete Isolation from Gradient-Governed Elimination of Resonances
DIPSI	Composite Pulse Decoupling in the Presence of scalar interactions
DISCO	Differences and Sums within COSY
DLB	Differential Line Broadening
DNMR	Dynamic NMR
DNP	Dynamic Nuclear Polarization
DOPT	Dipolar Order Polarization Transfer
DOR	Double Orientation Rotation
DOUBTFUL	Double Quantum Transition for Finding Unresolved Lines
DQ	Double Quantum
DQC	Double Quantum Coherence
DQF	Double Quantum Filter
DQF-COSY	Double Quantum Filter COSY
DQSY	Double Quantum COSY
DQ/ZQ	Double Quantum/Zero Quantum Spectroscopy
DRESS	Depth Resolved Spectroscopy
DSA	Data Shift Acquisition
E.COSY	Exclusive Correlation Spectroscopy
EFG	Electric Field Gradient
EHT	Extended Huckel Molecular Orbital Theory
ELD	Energy Level Diagram
ENDOR	Electron nucleus Double Resonance
ENMR	Electrophenetic NMR
EOM	Equation of Motion
EPI	Echo Planar Imaging
ESR	Electron Spin Resonance
EXORCYCLE	4-step phase cycle for spin echoes
EXSY	Exchange Spectroscopy
FC	Fermi Contact or Field Cycling
FFT	Fast Fourier Transformation
FID	Free Induction Decay
FIDS	Fitting of Doublets Singlets

FIRFT	Fast Inversion Recovery Fourier Transform
FLASH	Fast Low-angle Shot Imaging
FLOPSY	Flip-Flop Spectroscopy
FOCSY	Foldover-Corrected Spectroscopy
FOV	Field of view
FPT	Finite Perturbation Theory
FT	Fourier Transform
FUCOUP	Fully Coupled Spectroscopy
FWHM	Full (line) Width at Half Maximum
GARP	Globally Optimized Alternating Phase Rectangular Pulse
GE	Gradient Echo
GES	Gradient Echo Spectroscopy
GIAO	Gauge Included Atomic Orbitals
GRASS	Gradient-Recalled Acquisition in the Steady State
GRASP	Gradient-Accelerated Spectroscopy
GRECCO	Gradient Enhancement Carbon Coupling
GROESY	Gradient Enhancement Selective 1D ROE measurements
GROPE	Generalized Compensation for Resonance Offset and pulse length error
GS	Gradient Spectroscopy
H,C-COSY	¹ H, ¹³ C Chemical shift correlation Spectroscopy
H,X-COSY	¹ H, X-nucleus chemical shift correlation spectroscopy
HECTOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HEHAHA	Heteronuclear Hartmann Hahn
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQ	Heteronuclear Multiquantum
HMQC	Heteronuclear Multiquantum Coherence
HNCO	Triple resonance experiment involving ¹⁵ N, ¹³ C and ¹ H
HOESY	Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy
HR	High Resolution
HRPA	Higher Random Phase Approximation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IDESS	Improved Dept Selective Single surface coil spectroscopy
IGLO	Individual Gauge for different Localized Orbitals
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment
INDO	Intermediate Neglect of Differential Overlap
INDOR	Internuclear Double Resonance
INEPT	Intensive Nuclei Enhanced by Polarization
INVERSE	H, X correlation via ¹ H detection
IR	Inversion Recovery
ISIS	Image-Selected in vivo Spectroscopy
JCP	J-Cross Polarization
JR	Jump end return sequence (90 _v -τ -90 _v)
LP	Linear Prediction
MAGROFI	Magnetization grid Rotarion-Frame Imaging
MARF	Magic Angle in the Rotating Frame
MAS	Magic Angle Spinning
MASS	Magic Angle Sempol Spinning

MEDUSA	Technique for the determination of Dynamic Structure
MEM	Maximum Entropy Method
MLEV	CPD sequence
MP	Multi Pulse
MQ	Multi Quantum
MQC	Multi Quantum Coherence
MQF	Multi Quantum Filter
MQS	Multi Quantum Spectroscopy
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRS	Magnetic Resonance Spectroscopy
MRSI	Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging
MRT	Magnetic Resonance Tomography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NQCC	Nuclear Quadrupole Coupling Constant
NQR	Nuclear Quadrupole Resonance
ODMR	Optically Detected Magnetic Resonance
PAR	Phase Alternated Rotation of Magnetization
PAS	Principal Axis System
P.COSY	Purged COSY
P.E.COSY	Primitive E. COSY
PENDANT	Polarization Enhancement During Attached Nucleus Testing
PFG	Pulsed Field Gradient
PGSE	Pulsed Gradient Spin Echo
PMFG	Pulsed Magnetic Field Gradient
POF	Product Operator Formalism
PPM	Parts per Million
PRE	Proton Relaxation Enhancement
PRESS	Point Resolved Spectroscopy
PRFT	Partially Relaxed Fourier Transform
PSD	Phase Sensitive Detection
PW	Pulse Width
QF	Quadrupole moment/Field Gradient
QPD	Quadrature Phase Detection
RARE	Rapid Acquisition Relaxation Enhanced
RCT	Relayed coherence Transfer
RE-BURP	Refocusing Band Selective Uniform Response Pure phase
RECSY	Multistep Relayed Coherence Spectroscopy
REDOR	Rotational Echo Double Resonance
RELAY	Relayed Correlation Spectroscopy
RF	Radio Frequency
RIDE	Ring Down Elimination
RODI	Rotating Frame Relaxation Dispersion Imaging
ROESY	Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy
ROTO	ROESY-TOCSY Relay
RPA	Random Phase Approximation

SC	Scalar Coupling
SD	Spin Dipolar
SDDS	Spin Decoupling Difference Spectroscopy
SE	Spin Echo
SECSY	Spin Echo Correlated Spectroscopy
SEDOR	Spin Echo Double Resonance
SEDUCE	Selective Decoupling Using Crafted Excitation
SEFT	Spin Echo Fourier Transform Spectroscopy
SELINCOR	Selective Inverse Correlation
SELIQUATE	Selective INADEQUATE
SEMUT	Subspectral Editing Using a Multi-Quantum Trap
SERF	Selective Refocussing SESAM
SESAM	Semi Selective Acquisition Modulated
SFORD	Single Frequency Off-Resonance Decoupling
SGSE	Steady-Gradient Spin Echo
SKEWSY	Skewed Exchange Spectroscopy
SL	Spin Lock Pulse
SLITDRESS	Slice Interleaved Depth Resolved Surface Coil Spectroscopy
SLOPT	Spin Locking Polarization Transfer
SNR or S/N	Signal to Noise/Ratio
SOPPA	Second Order Polarization Propagator Approach
SPACE	Spatial and Chemical Shift Encoded excitation
SPI	Selective Population Inversion
SPT	Selective Population Transfer
SQC	Single Quantum Coherence
SQF	Single Quantum Filter
SR	Saturation Recovery
SSFP	Steady State Free Precision
SSI	Solid State Imaging
STE	Stimulated Echo
STEAM	Stimulated Echo Acquisition Mode
TANGO	Testing for Adjacent Nuclei with a Gyration Operator
TART	Tip Angle Reduced T_1 Imaging
TCF	Time Correlation Function
TE	Time Delay between excitation and Echo maximum
TMR	Topical Magnetic Resonance
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOE	Truncated Noe
TORO	TOCSY-ROESY Relay
TOSS	Total Suppression of Sideband
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
TPPI	Time Proportional Phase Incrementation
TQ	Triple Quantum
TQF	Triple Quantum Filter
TR	Time for repetition of Excitation
TRCF	Tilted Rotating Coordinate Frame
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy

TSETSE	Double Resonance two-spin effect
UE	Unpaired Electron
VAS	Variable Angle Spinning
VOSING	Volume-selective Spectral editing
VOSY	Volume Selective Spectroscopy
WAHUHA	Waugh Huber Haeberlen Sequence
WALTZ	CPD sequence Containing the Element 1-2-3
WATERGATE	Water Suppression pulse sequence
WEFT	Water Eliminated Fourier Transform
WURST	Decoupling sequence using adiabatic pulses
XCORFE	H, X Correlation using a Fixed Evolution time
X-FILTER	Selection of ^1H - ^1H correlation when both H are coupled to X
X-HALF-FILT	Selection of 1H - 1H correlation when one H is coupled to X
Z-COSY	COSY with Z-Filter
Z-FILTER	Pulse Sandwich for Elimination of signal Components with dispersive phase
ZECSY	Zero-Quantum Echo-Correlation Spectroscopy
ZQ	Zero Quantum
ZQC	Zero Quantum Coherence
ZQF	Zero Quantum Filter
ZZ-Spectroscopy	Selection of Coherence involving ZZ or longitudinal two-spin order
β-COSY	COSY with small flip angle mixing pulse
Ψ-COSY	Pseudo COSY using increment frequency selective excitation

Prefazione.-

Questo libro nasce come supporto didattico per un corso sulle tecniche multidimensionali di NMR, organizzato dal Centro Interdipartimentale di Metodologie Chimico Fisiche (CIMCF) e dal Centro di Ateneo per l'Orientamento, la Formazione e la Teledidattica (SOF-Tel), destinato a laureati in discipline scientifiche dell'Ateneo Federico II. Quella fra il CIMCF ed il SOF-Tel è ormai una lunga e consolidata collaborazione che ha portato finora all'espletamento di quattro corsi di addestramento alle tecniche NMR di diverso livello, seguendo una formula di successo che vede coinvolti numerosi docenti dell'area chimica napoletana che svolgono la propria ricerca nel campo delle risonanze magnetiche.

Ritornando a questo libro, esso rappresenta uno strumento valido per quanti si avvicinino per la prima volta alle tecniche NMR multidimensionali che, in particolare negli anni più recenti, sono divenute indispensabili alla ricerca nei settori più disparati perché forniscono in tempi relativamente brevi numerose informazioni che molto spesso non sono affatto ottenibili con tecniche tradizionali. Per comprendere il grado di sofisticazione e l'importanza di queste tecniche di indagine basti pensare alle moderne applicazioni dell'NMR in campo chimico, alimentare, ambientale e nella diagnostica dei beni culturali. Il livello del testo è stato mantenuto volutamente nella dimensione di un manuale operativo, sfrondata, ove non indispensabili, le parti teoriche già bagaglio culturale dei partecipanti o trattate nelle lezioni frontali tenute durante il corso. La scelta di utilizzo di un ambiente prevalentemente legato ai software della Varian è stata dettata principalmente dalla possibilità, nell'ambito del CIMCF, di disporre di spettrometri della stessa ditta per la conduzione delle ore destinate al tirocinio pratico.

Il successo di questo corso, così come dei corsi precedenti, traccia un solco ben evidenziato nel quale far germogliare curiosità ed interessi di ricerca dei giovani.

Romualdo Caputo
Presidente del CIMCF

Riferimenti Bibliografici.-

1. A.Bax. *Two dimensional NMR in liquids*, Delft Univ. Press, Delft (1982)
2. K. Wuthrich. *NMR of proteins and nucleic acids*, Wiley, NY (1986)
3. JKM Sanders, BK Hunter. *Modern NMR Spettroscopy*, University Press Oxford (1987)
4. RR Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun. *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimension*, Clarendon, Oxford (1987)
5. G. Bodenhausen. *Prog in NMR Spettroscopy*, 14,137, (1980)
6. Varian NMR. *User Guide: Liquids NMR* (2000)
7. G. Barone, I. Giudicianni, A. Pezzella. *Elementi di spettroscopia di risonanza magnetica nucleare*. SOF-Tel (2003)

Si ringraziano tutti coloro che direttamente o indirettamente hanno contribuito alla stesura ed alla realizzazione di questo manuale. Tra questi Gaspare e Rosa per avere sempre sostenuto con passione iniziative di questo tipo; Livio e Marco per i preziosi consigli scientifici.

Il Direttore del CIMCF
Italo Giudicianni

