



HELLENIC REPUBLIC

**National and Kapodistrian
University of Athens**

— EST. 1837 —

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

Nuclear Magnetic Resonance

Διαλέξεις Εαρινού Εξαμήνου 2025

CHEM207

Lecture Spring/Summer 2025

Αντιγόνη Χείλαρη

Φαρμακοποιός, MSc, PhD

**Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών
Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ**

cheilarianti@pharm.uoa.gr

Antigoni Cheilari

Pharmacist, MSc, PhD

**Department of Pharmacognosy and Natural
Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, NKUA**

cheilarianti@pharm.uoa.gr



Θ. Μαυρομούστακος, Α. Τζάκος, Γ. Σπυρούλιας, Ε. Μικρός, Α. Κολοκούρης, Κ. Παπακωνσταντίνου, Ι. Γεροθανάσης, Ι. Ματσούκας. Εκδόσεις Συμμετρία 2019. ISBN 978-960-266-504-6.

Δρ. Δήμητρα Μπενάκη, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Δρ. Ανδρομάχη Τζάνη, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

William Reusch, <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/nmr/nmr1.htm>

Jianhan Chen, BIOCH590: Biomacromolecules, University of Massachusetts Amherst (Key References: Tinoco Chapter 10; van Holde Chapter 12;)

Josh Kurutz, at Northwestern University's IMSERC facility
(Integrated Molecular Structure Education and Research Center, imserc.chem.northwestern.edu)

Anne Gorham, MIT. <http://nmrwiki.org/wiki/images/b/b2/DCIF-IntroNMRpart1-theory-o07.pdf>

Prof. Weiguo Hu, University of Massachusetts <http://nmrwiki.org/wiki/images/0/04/NMRcourse2009.1.pdf>

Flemming M. Poulsen A brief introduction to NMR spectroscopy of proteins 2002

J. Keeler, Understanding NMR

University of Ottawa NMR Facility Blog <https://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/>

Μαρία Ζερβού, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Κωνσταντίνος Ποταμίτης, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών



NMR Core Facility

500 MHz / 11.7 T



Department of Chemistry

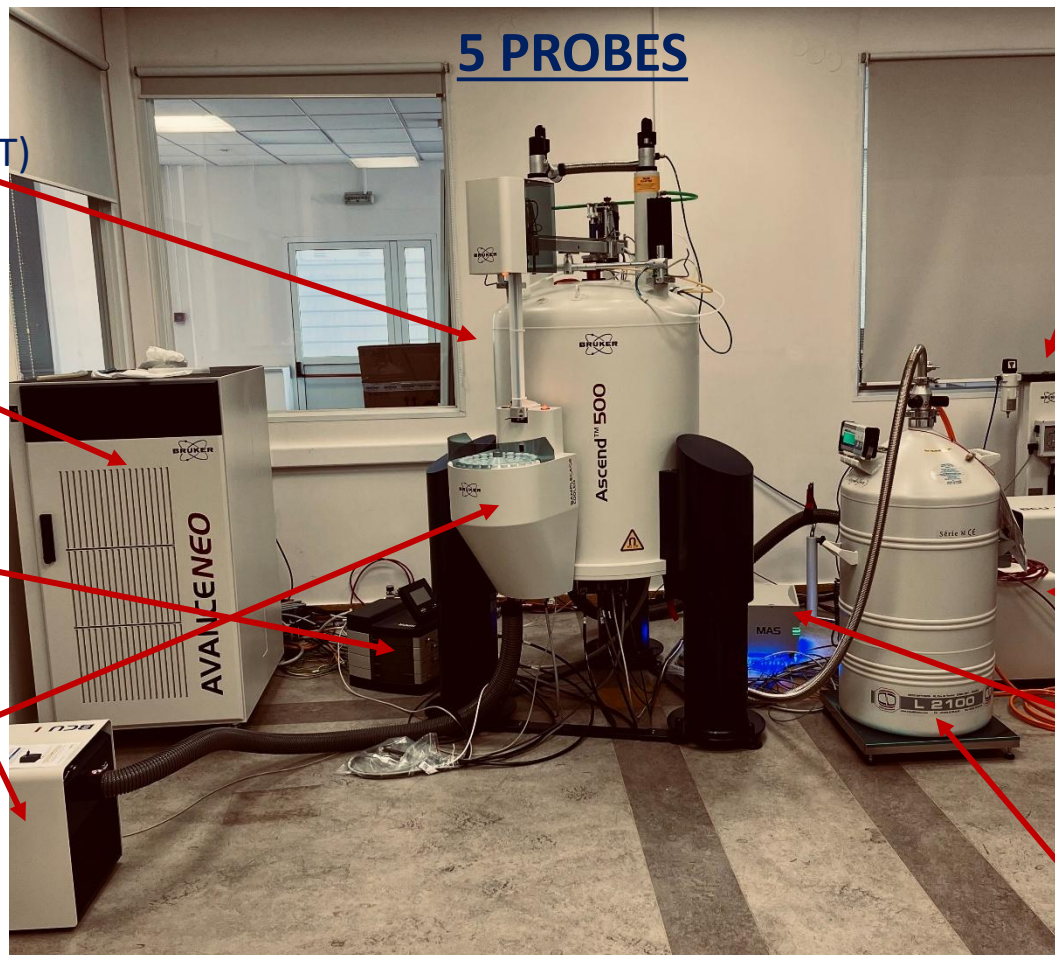
400 MHz / 9.4 T



Department of Pharmacy



AVNEO 500



5 PROBES

Ascend magnet (11.76 T)

Avance NEO console

Pre-amplifier

BCU I cooling unit for
SampleCASE Cooled
24

AD-SP dryer



BCU II cooling unit



Cryoplatfrom Prodigy
unit

MAS control unit

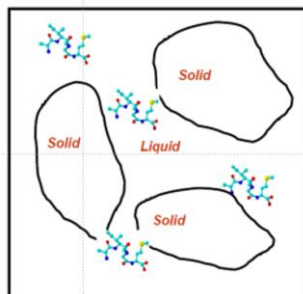


LN2 Prodigy dewar



Liquid State

- ✓ **Δομικός Χαρακτηρισμός**
 - Synthetic compounds (organic & inorganic)
 - Metal Complexes
 - Natural Products
- ✓ **Ποσοτικός προσδιορισμός qNMR**
 - Direct, non-invasive, accurate
 - Simultaneous characterisation of compound and matrix or API and excipients
- ✓ **Μεταβολομικές μελέτες**
- ✓ **Παρακολούθηση αντιδράσεων**



Solid and Semi-solid State

- ✓ **Χαρακτηρισμός κόνεων**
 - APIs, intermediates, excipients
 - ^{13}C , ^{27}Al , etc
- ✓ **Πολυμερή**
 - ^1H , ^{13}C in semi-solid state (2D experiments)
- ✓ **Αναγνώριση κρυσταλλικών και άμορφων μορφών APIs και τελικών προϊόντων**

- ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , (^7Li , ^{11}B , ^{23}Na , ^{27}Al , ^{29}Si , ^{33}S , ^{39}K , ^{77}Se , ^{89}Y , ^{109}Ag , ^{195}Pt); **Solid State:** ^{13}C , ^{15}N , (^{19}F , ^{27}Al , ^{29}Si , ^{31}P , ^{79}Br , ^{113}Cd , ^{119}Sn)
- **In collaboration with Bruker for NMR in Pharma: Application of Data Integrity Principles for NMR in GxP environments**



NMR related Nobel Prices

- Otto Stern, USA: [Nobel Prize in Physics 1943](#), "for his contribution to the development of molecular ray method and his **discovery of the magnetic moment of the proton**"
- Isidor I. Rabi, USA: [Nobel Prize in Physics 1944](#), "for his resonance method for **recording the magnetic properties of atomic nuclei**«
- Felix Bloch, USA and Edward M. Purcell, USA: [Nobel Prize in Physics 1952](#), "for their discovery of **new methods for nuclear magnetic precision measurements** and discoveries in connection therewith«
- Richard R. Ernst, Switzerland: [Nobel Prize in Chemistry 1991](#), "for his contributions to the **development of the methodology of high resolution nuclear magnetic** resonance (NMR) spectroscopy
- Kurt Wüthrich, Switzerland: [Nobel Prize in Chemistry 2002](#), "for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the **three-dimensional structure of biological macromolecules in solution**"
- Paul C. Lauterbur, USA and Peter Mansfield, United Kingdom: [Nobel Prize in Physiology or Medicine 2003](#), "for their discoveries concerning **magnetic resonance imaging**"





ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ

ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ

ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE



Φασματοσκόπια

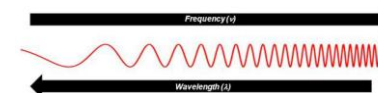
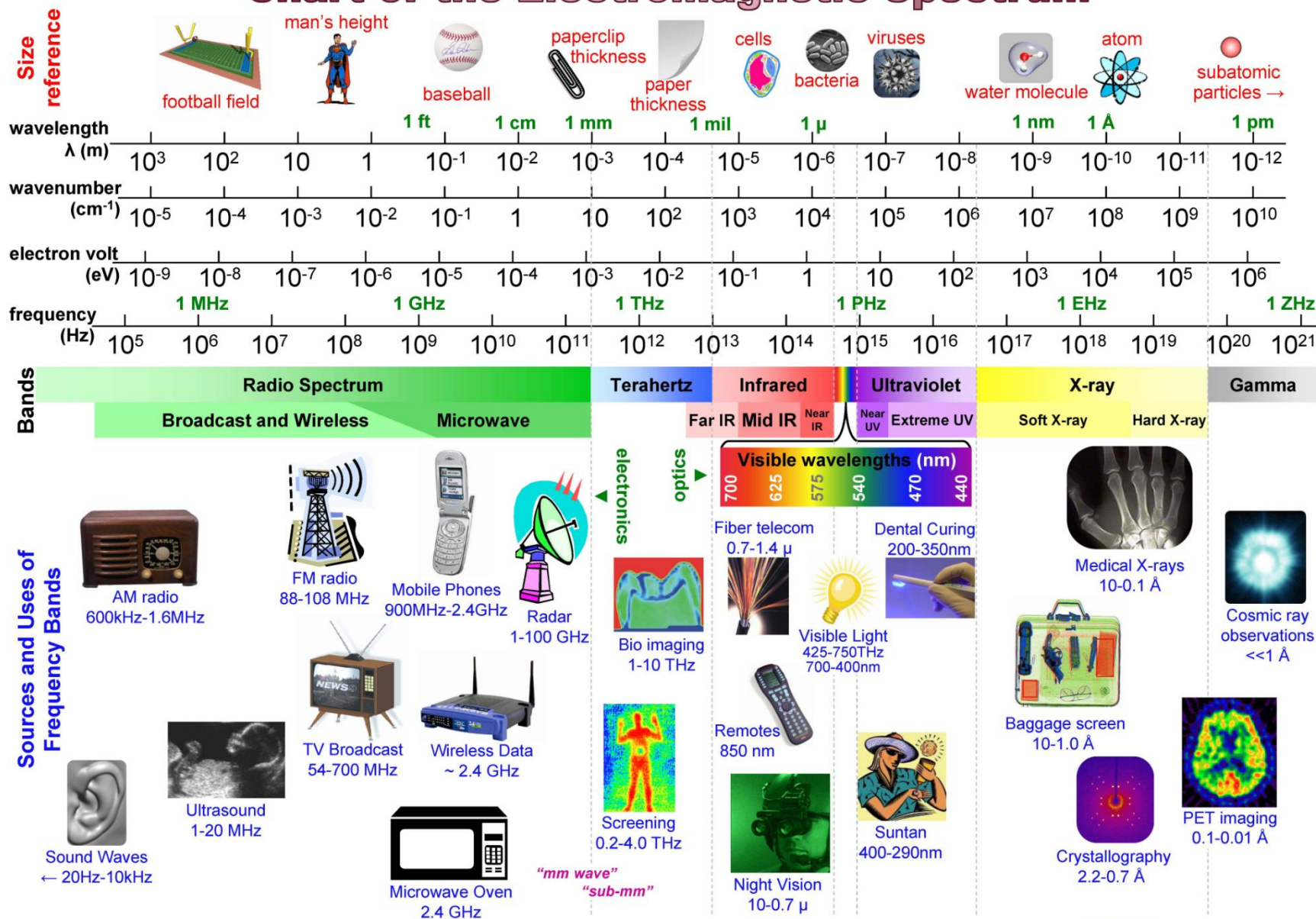


Chart of the Electromagnetic Spectrum



$$\lambda = 3 \times 10^8 / \text{freq} = 1 / (\text{wn} \times 100) = 1.24 \times 10^{-6} / \text{eV}$$



ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΥΛΗΣ

- **Απορρόφηση**

Μετάβαση σε υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο

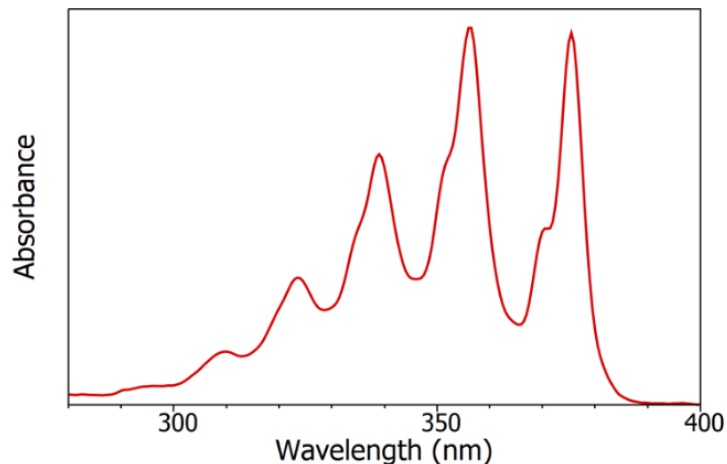
- **Εκπομπή**

Μετάβαση σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο

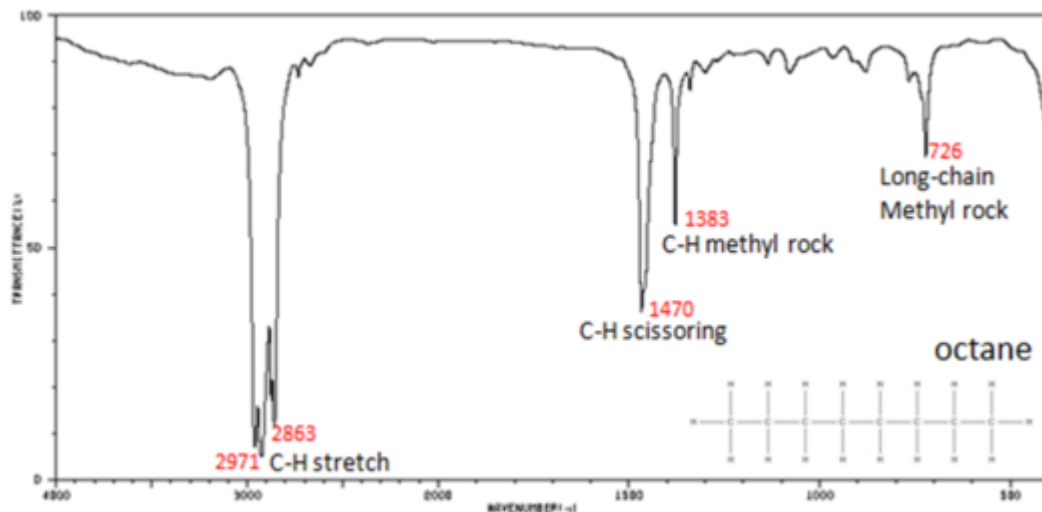
- **Σκέδαση**

Ελαστική ή ανελαστική με αλλαγή μήκους κύματος

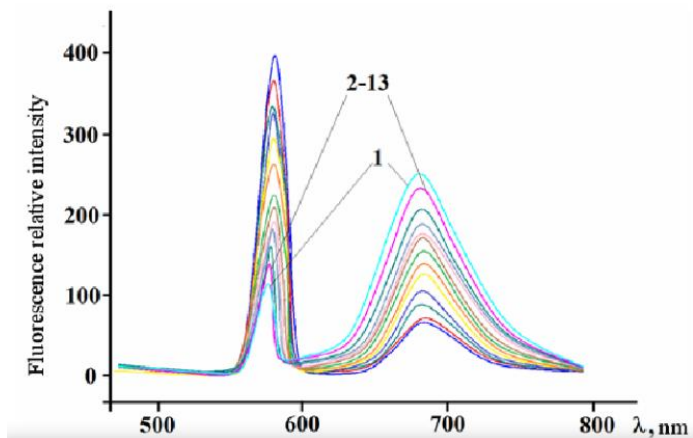
ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΥΛΗΣ



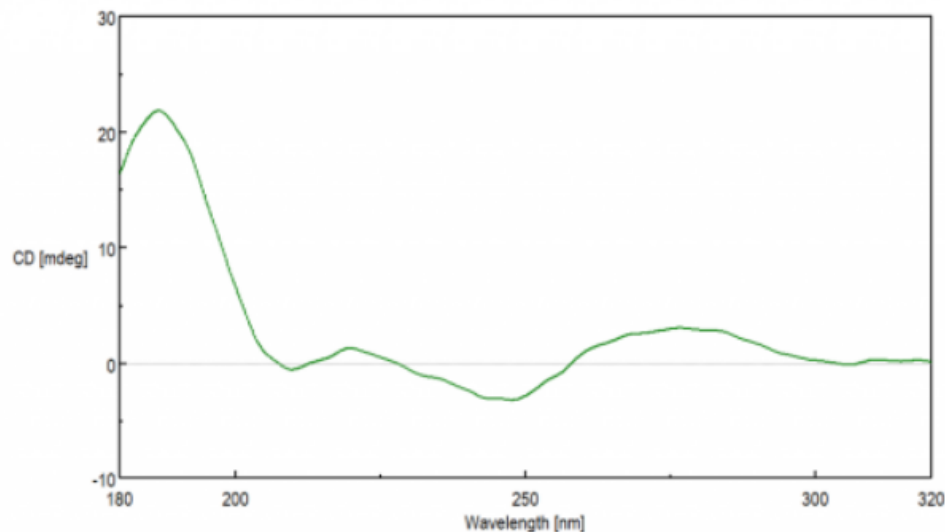
Absorption spectrum of anthracene in cyclohexane measured using the FS5 Spectrofluorometer. Experimental parameters: $\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$



IR spectrum of octane



Fluorescence spectra of pure Methylene Blue (MB, 1) and DNA-MB complexes (2-13). The curve 1 corresponds to fluorescence intensity spectrum of pure MB. The curves 2-13 correspond to fluorescence intensity spectra of DNA-MB complexes with the following concentrations



CD spectrum of DNA derived from bovine thymus



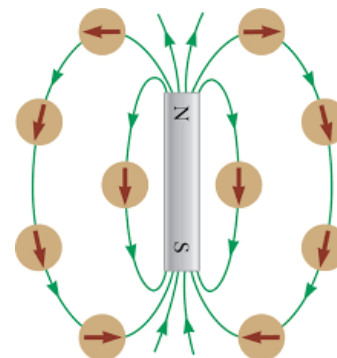
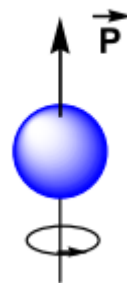
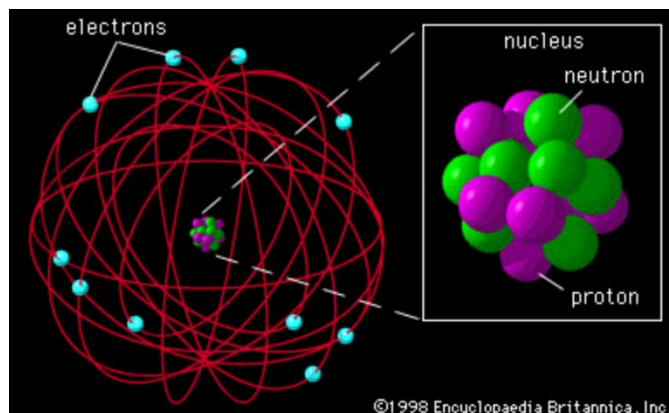
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ

ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ

ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

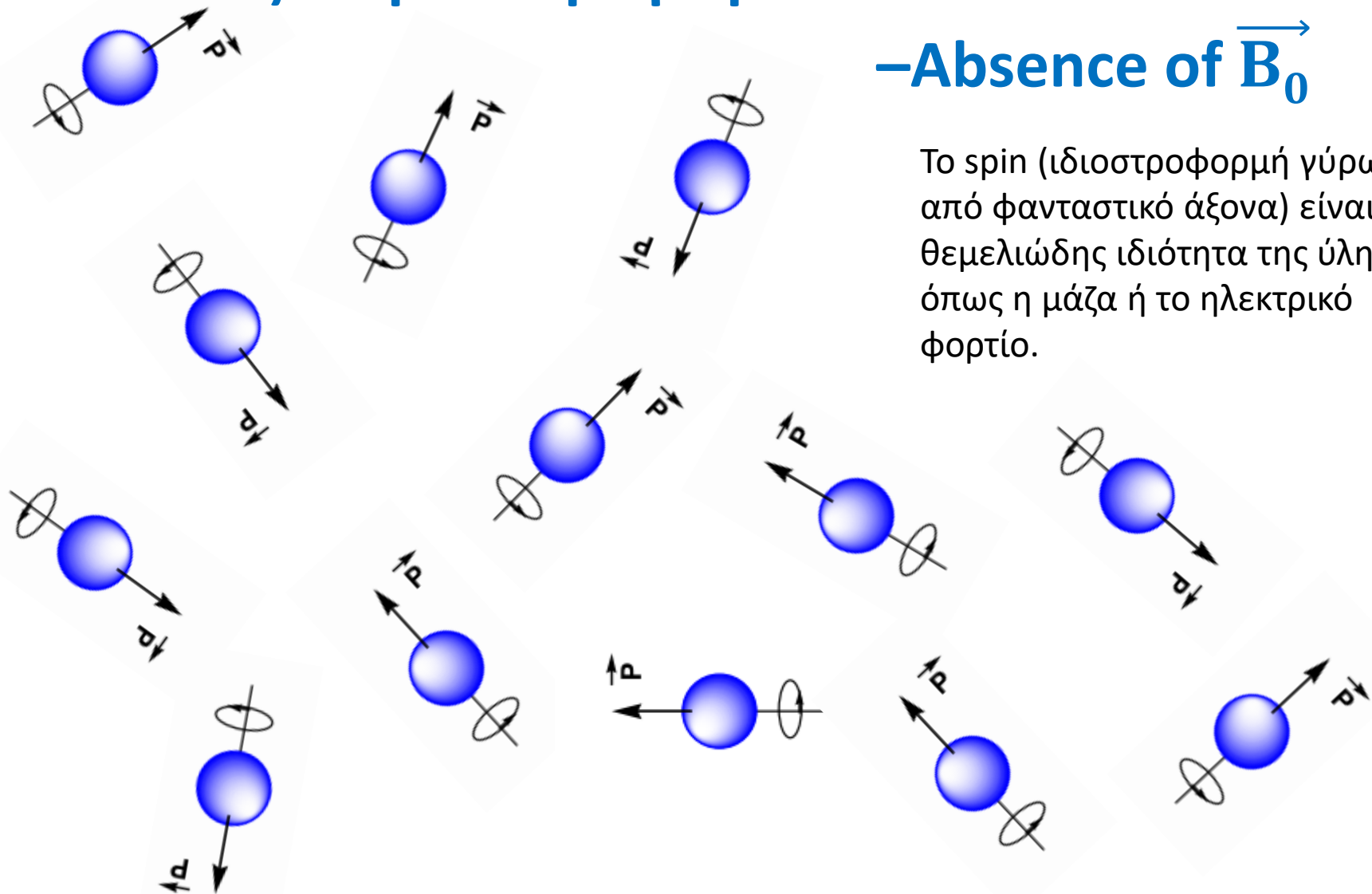




Απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου

–Absence of $\vec{B}_0$

Το spin (ιδιοστροφορμή γύρω από φανταστικό άξονα) είναι θεμελιώδης ιδιότητα της ύλης, όπως η μάζα ή το ηλεκτρικό φορτίο.



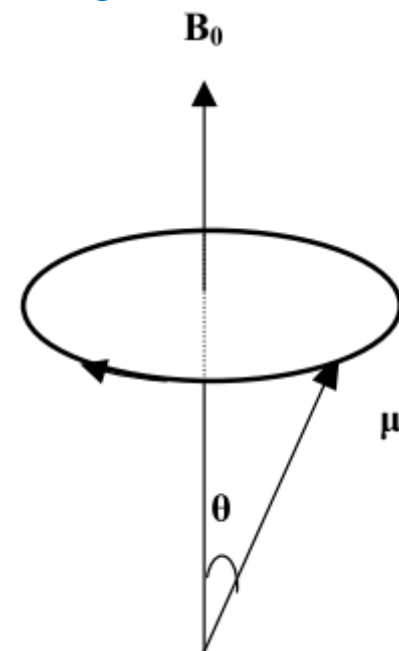
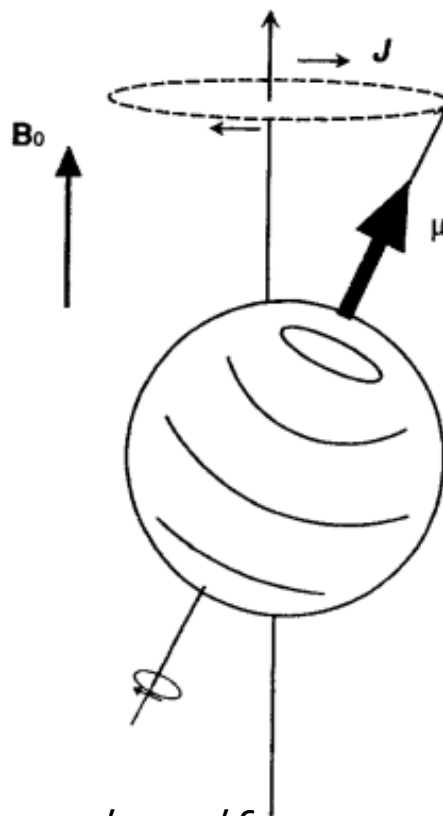
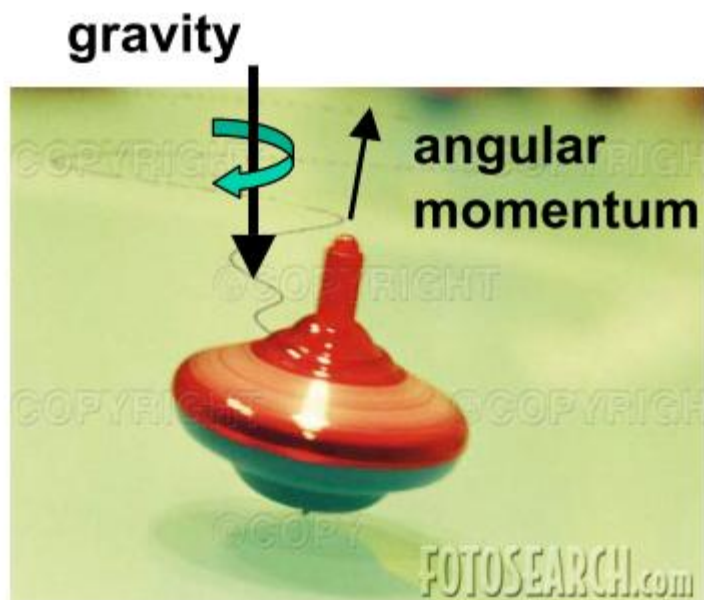
Μακροσκοπική μαγνήτιση $\vec{M}=0$

I (κβαντικός αριθμός spin) $\neq 0$ μαγνητικά ενεργοί πυρήνες



Παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου $\vec{B}_0$ applied $\vec{B}_0$

$$\frac{d\mathbf{J}}{dt} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0$$



B_0 : applied magnetic field;
 J : nuclear angular momentum;
 μ : magnetic dipole moment

Μεταπτωτική κίνηση του πυρήνα γύρω από τον άξονα του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0
αντίστοιχη με την κίνηση μίας σβούρας στο βαρυτικό πεδίο της Γης

Συχνότητα μετάπτωσης, Larmor frequency $\omega = \gamma B_0$

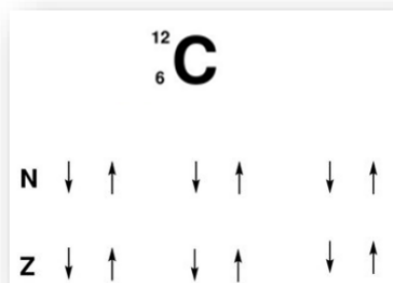


Κβαντικός Αριθμός Πυρηνικού spin (I)

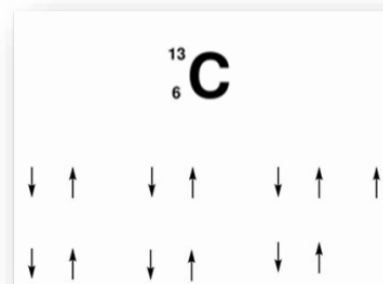
- ❑ I : Φυσική σταθερά χαρακτηριστική του ατόμου
- ❑ Προσδιορίζει τον προσανατολισμό της μαγνητικής ροπής του πυρήνα σε σχέση με το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο
- ❑ Για κάθε πυρήνα με $I=0$, ο αριθμός των καταστάσεων spin είναι 0
- ❑ Για κάθε πυρήνα με $I \neq 0$, τότε οι καταστάσεις spin είναι $2I+1$

$$I = \frac{1}{2} \times n \quad (n = 1, 2, 3, \dots, 6)$$

Θα μας απασχολήσουν
ΜΟΝΟ οι πυρήνες με
 $I=1/2$



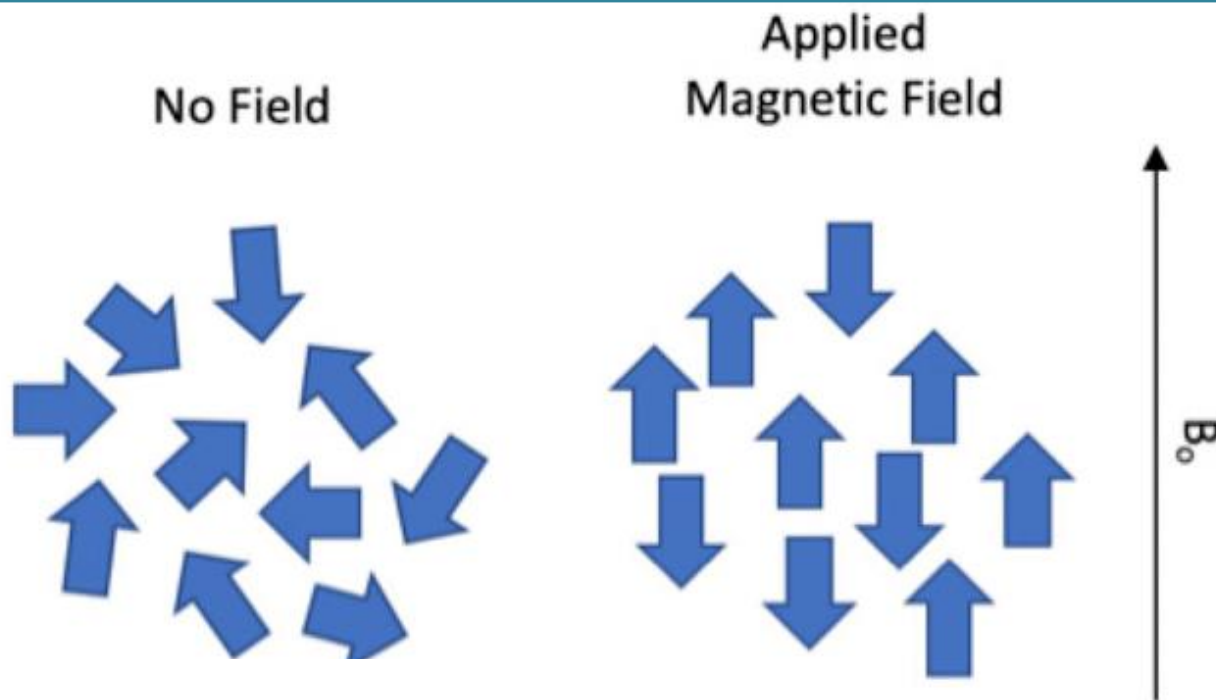
Για το άτομο ^{12}C , $I=0$.
Συνεπώς, **δεν** υπάρχει συνολική
στροφορμή και **δεν** υπάρχουν
καταστάσεις spin.



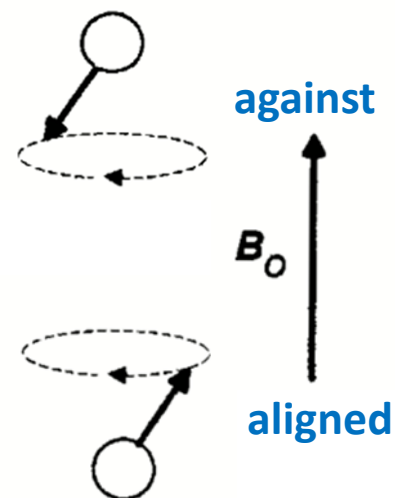
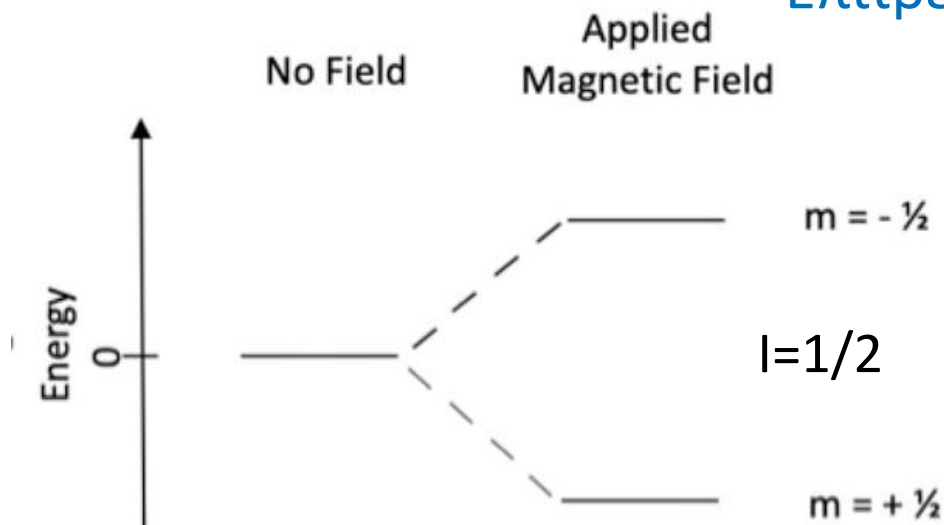
Για το ισότοπο ^{13}C , $I=1/2$.
Συνεπώς, υπάρχουν **2**
διαφορετικές καταστάσεις spin.



NMR



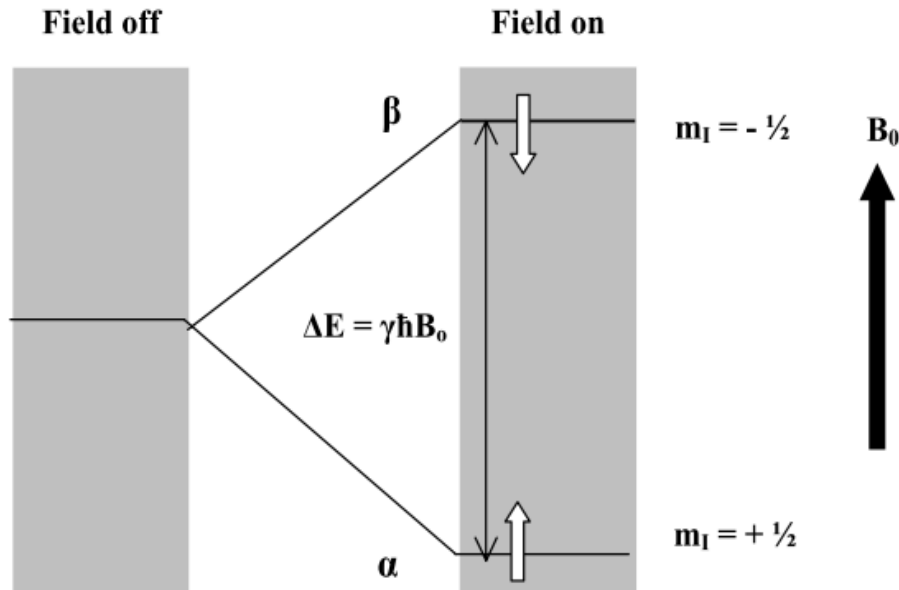
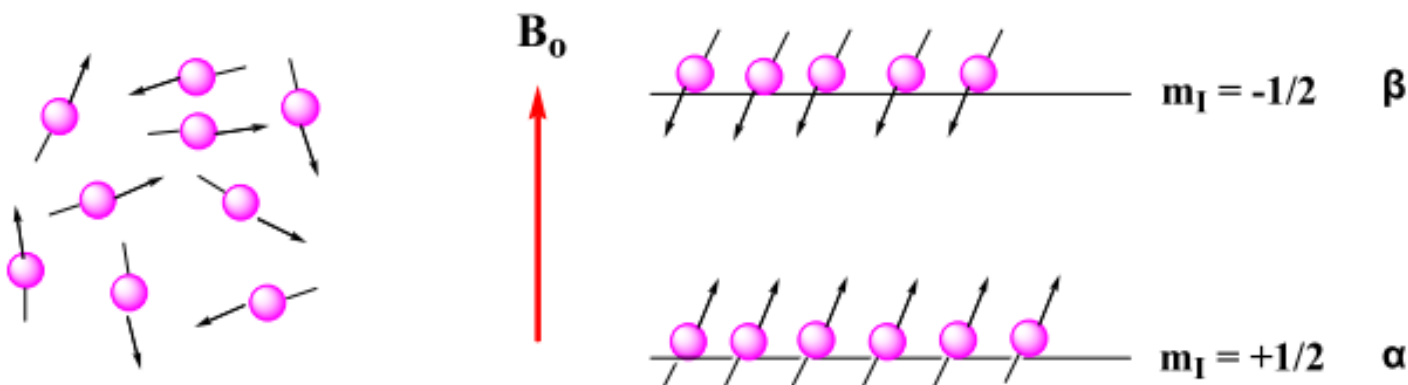
Επιτρεπόμενες καταστάσεις spin για ^1H
 $2I+1$



^1H ($I=1/2$), ^{13}C ($I=1/2$), ^{31}P ($I=1/2$), ^{15}N ($I=1/2$), ^2H ($I=1$)



Σύνολο πυρήνων και κατανομή Boltzmann



the Boltzmann equation:

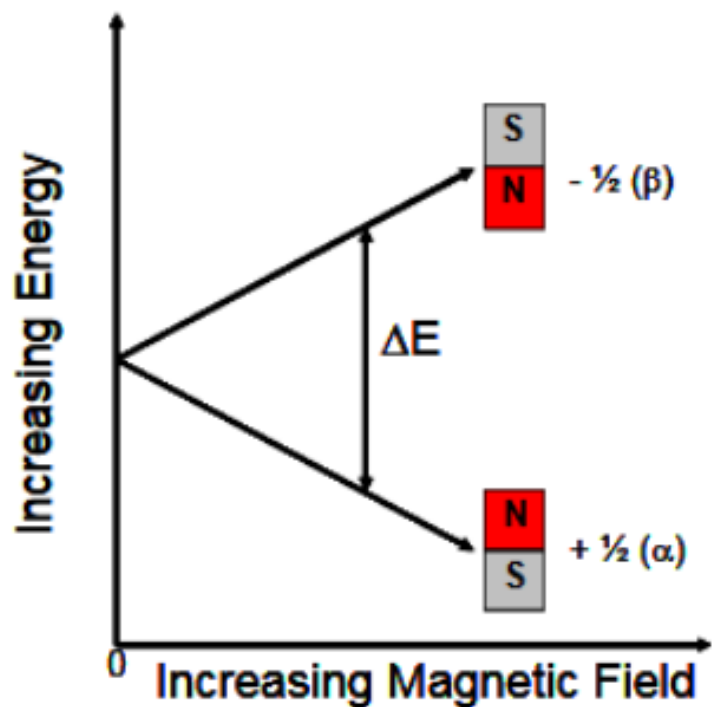
$$\frac{N_{upper}}{N_{lower}} = e^{-\Delta E / kT} = e^{-h\nu / kT}$$

FIGURE 4. The nuclear spin energy levels of a spin- $\frac{1}{2}$ nucleus in a magnetic field (Atkins, 1998).

about 1 in 10,000 for ^1H in an 11.74 T magnetic field



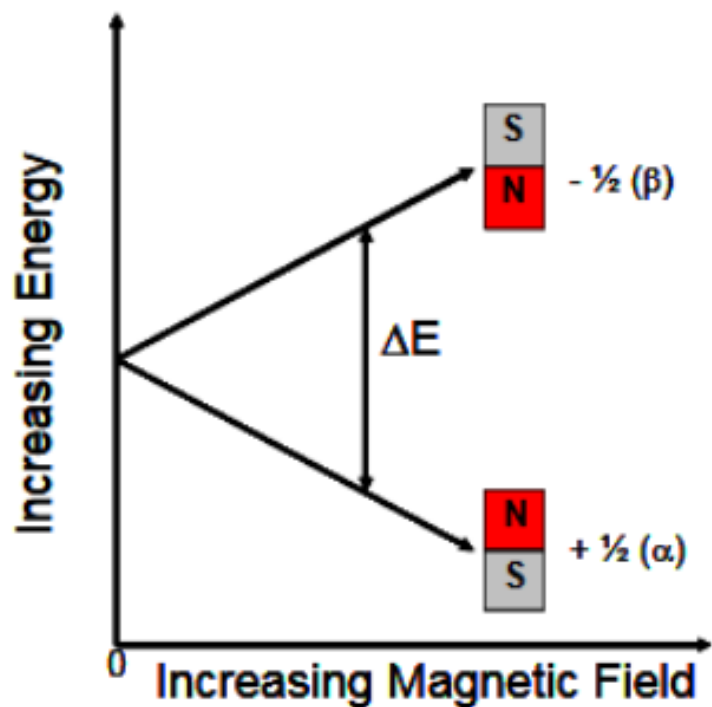
Σχετικοί πληθυσμοί – Κατανομή *Boltzman*



$$\Delta E = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi}$$



Σχετικοί πληθυσμοί – Κατανομή *Boltzman*



$$\Delta E = \frac{\gamma h B_0}{2\pi}$$

Element	Spin	Natural Abundance	Gyromagnetic Ratio γ ($10^7 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$)
Hydrogen	$\frac{1}{2}$	99.985%	26.7522128
Deuterium	1	0.0115	4.10662791
Carbon	$\frac{1}{2}$	1.07	6.728284
Nitrogen	$\frac{1}{2}$	0.368	-2.71261804
Fluorine	$\frac{1}{2}$	100	25.18148
Silicon	$\frac{1}{2}$	4.6832	-5.3190
Phosphorus	$\frac{1}{2}$	100	10.8394
Selenium	$\frac{1}{2}$	7.63	5.1253857
Cadmium	$\frac{1}{2}$	12.22	-5.9609155

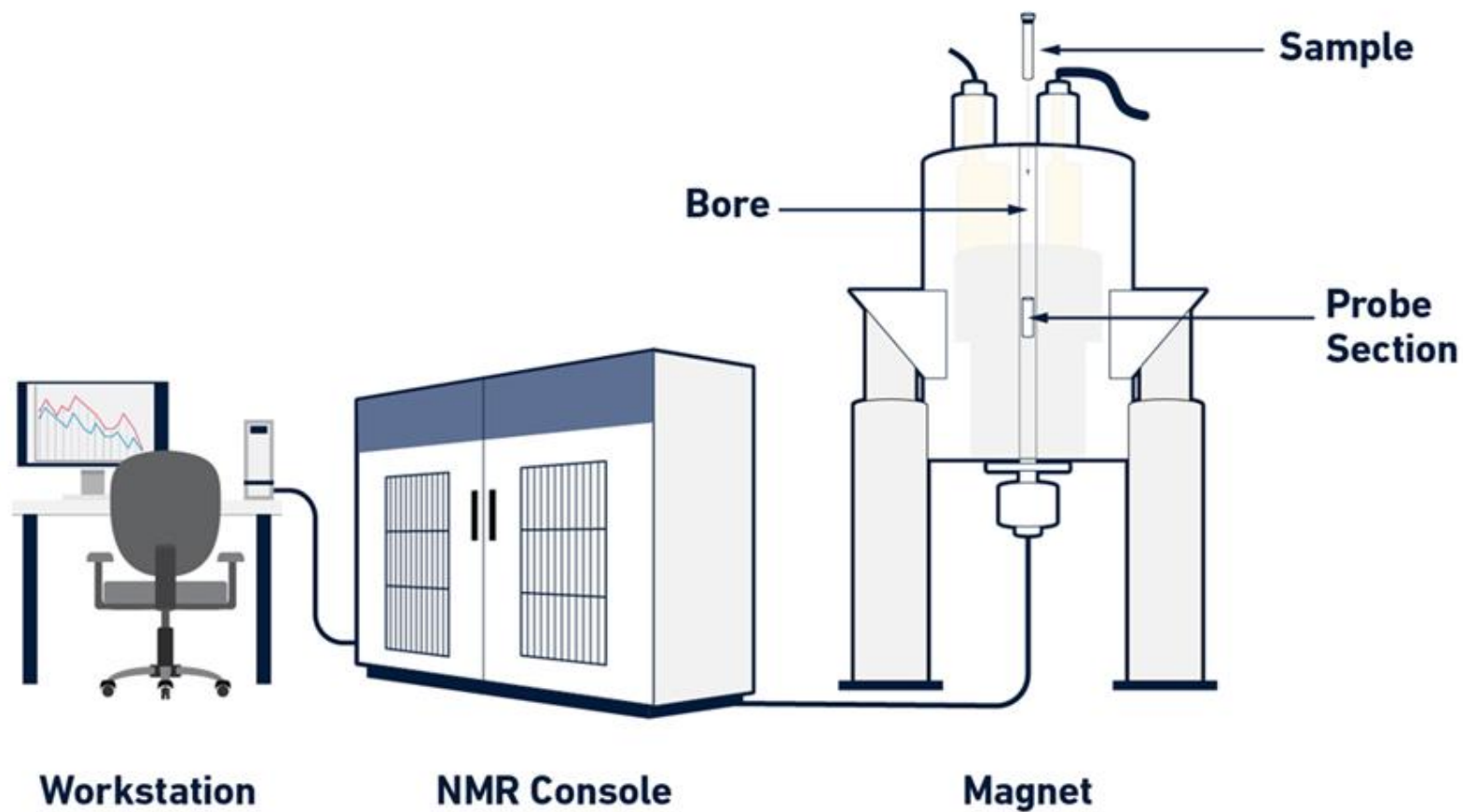
Η φυσική σταθερά γ για κάθε πυρήνα καλείται **γυρομαγνητικός λόγος** και συσχετίζεται με τη μαγνητική ροπή μ και το I

$$\gamma = \frac{2\pi \cdot \mu}{hI}$$

h = σταθερά Planck = $6.626 \times 10^{-34} \text{ Js}$

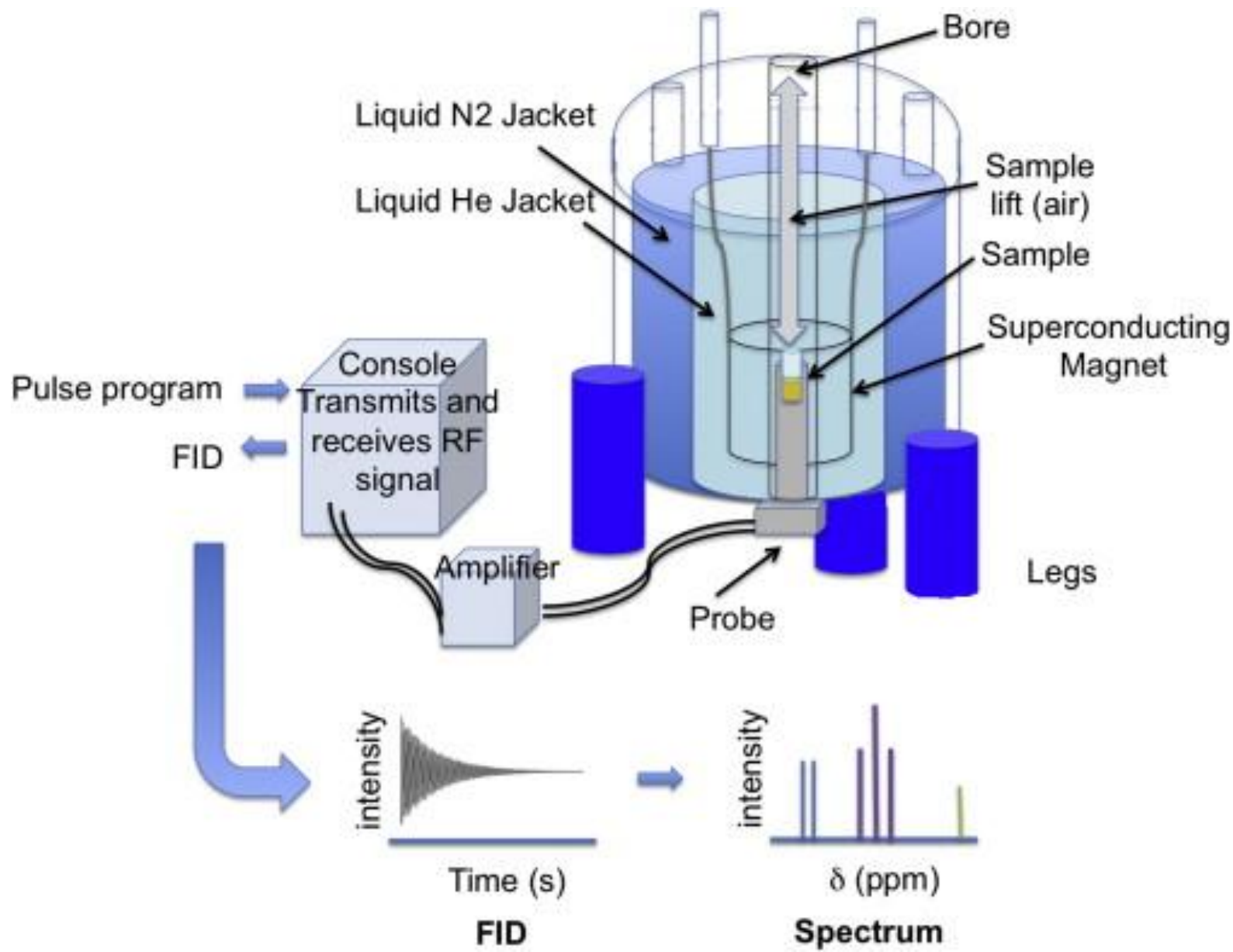


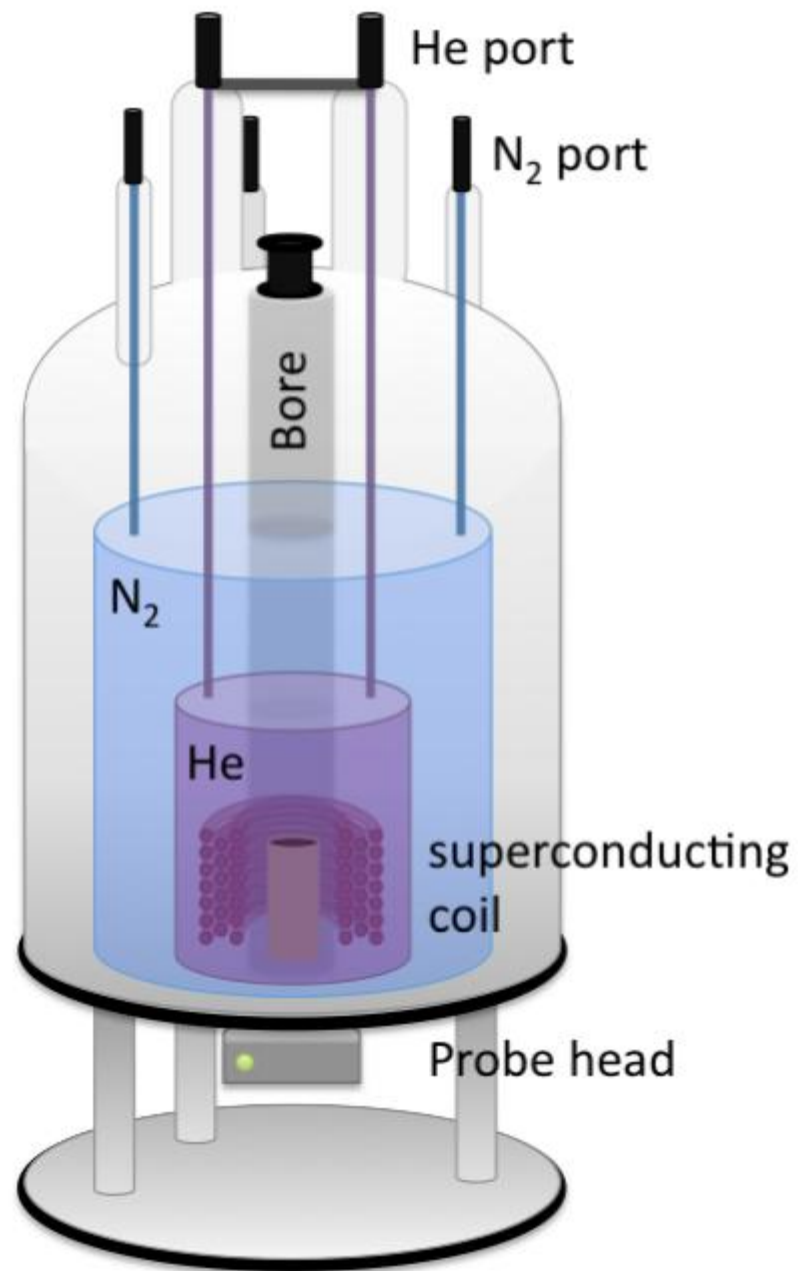
How it works





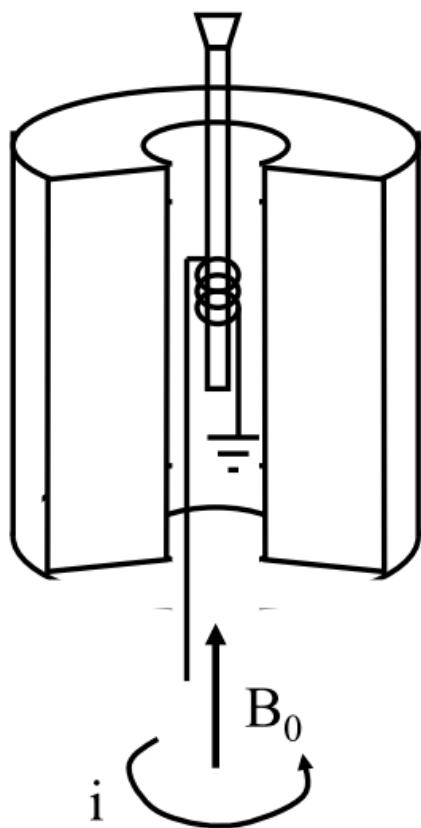
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ NMR ΣΧΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ







Modern NMR Magnets are Superconducting Solenoids

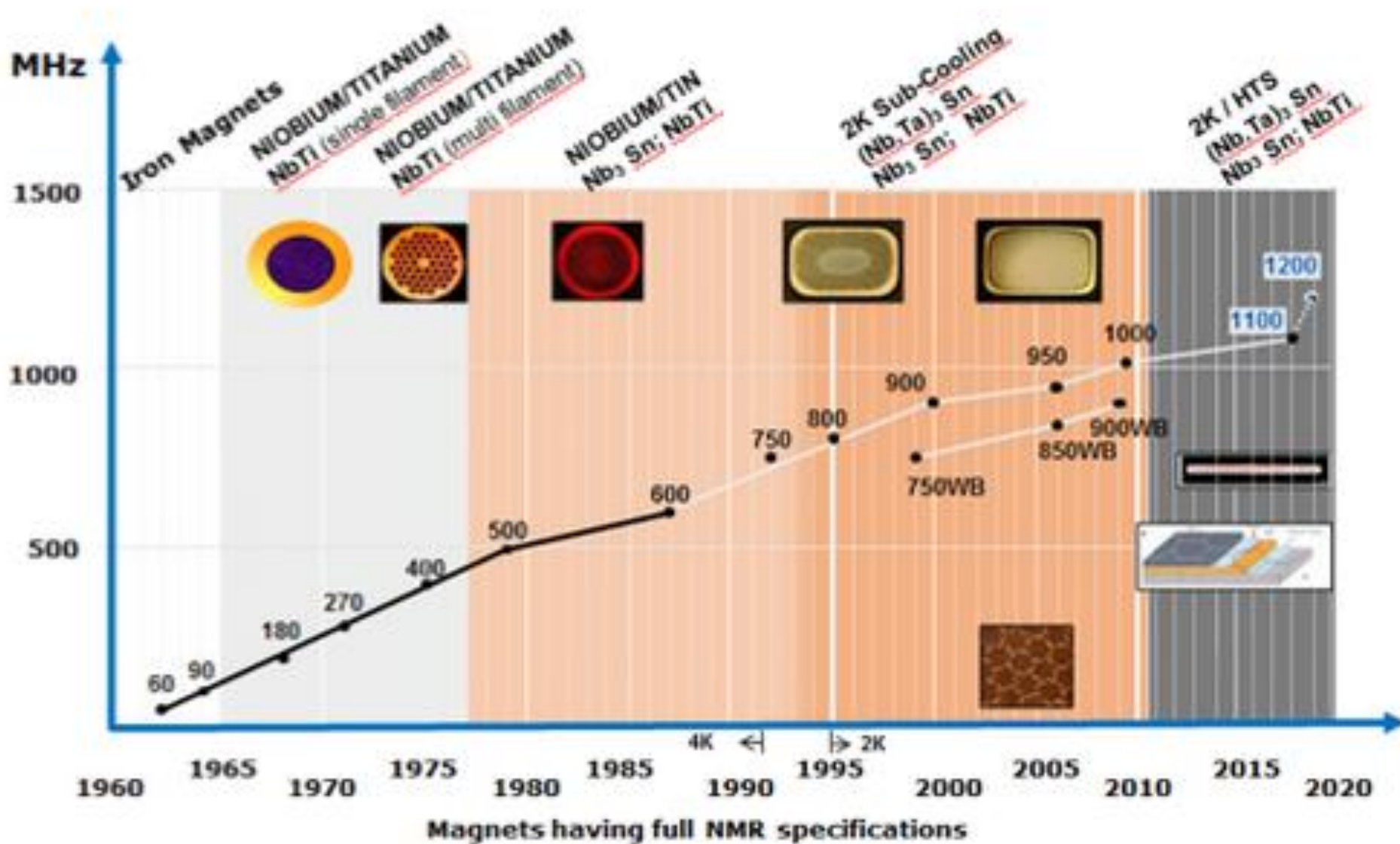


- **Advantages:**
 - high field
 - stability
 - homogeneity $> 1 : 10^9$
- **Materials:** NbTi $< 10\text{T}$, NbSn $> 10\text{T}$
- **Max Field (2015):** 24.0 T (1020 MHz)
- **New HTS alloys (2017?):** $\sim 35\text{T}$ ($\sim 1.5\text{ GHz}$)
- **Hybrid magnets:** 45T **



**<https://nationalmaglab.org/about/around-the-lab/meet-the-magnets/meet-the-45-tesla-hybrid-magnet>

Nb: Νιόβιο; ; Ta: Ταντάλιο; Sn: Κασσίτερος; Ti: Τιτάνιο

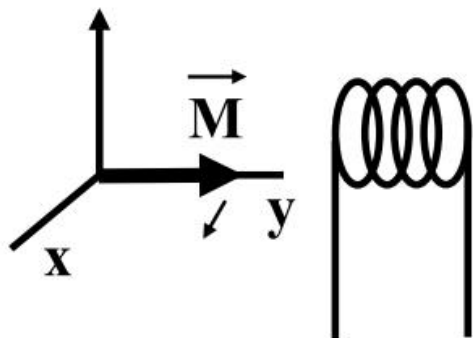


History of NMR Bo field along with technological milestones (courtesy of Bruker Biospin).



Probe Coils

- The probe coil serves a dual role:
 - to deliver the B_1 field pulse to the sample
 - and to detect the oscillating bulk magnetization (dM_y/dt)
- The coil is orientated *perpendicular* to B_0



Helmoltz coil:
-normal applications



solenoid coil:
-specialized applications





What does an NMR Probe Look Like?



This is for a 7T magnet – ^{13}C observe at 75 MHz

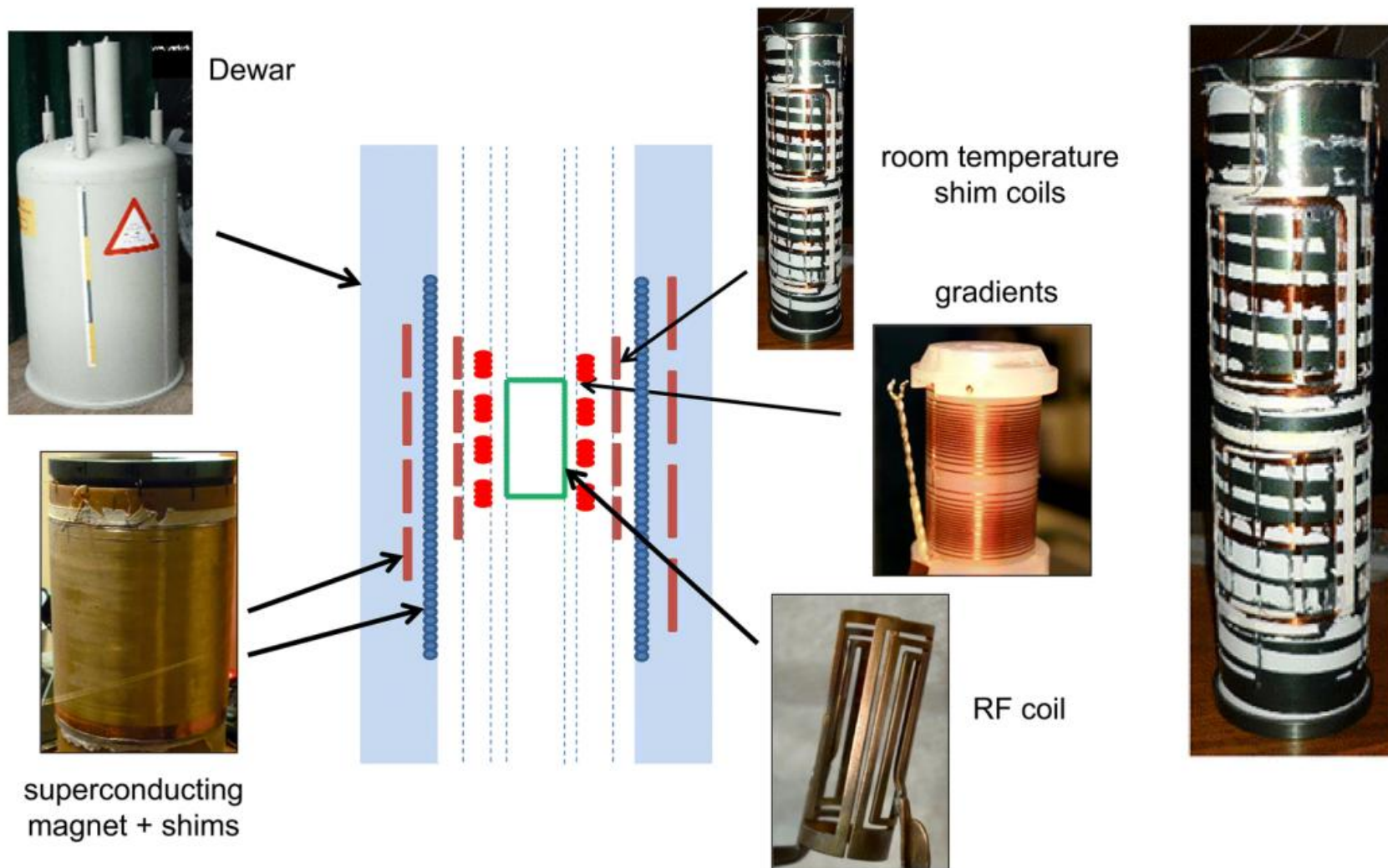


Probes are delicate – glass, teflon, ceramic, electronics





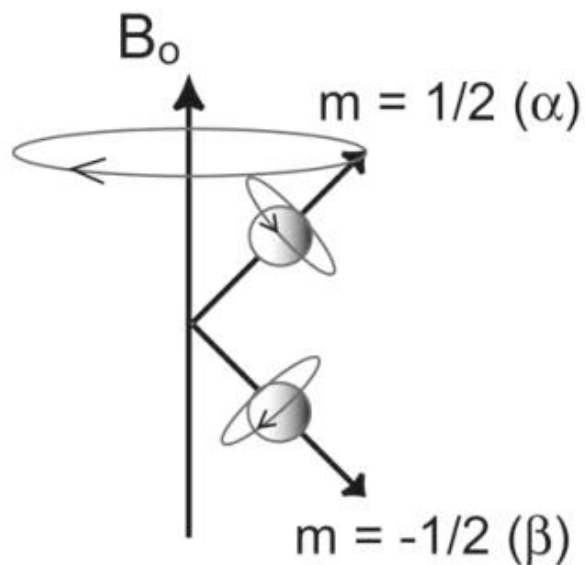
Shim Coils





Από πού προέρχεται η μαγνήτιση;

Ατομικό επίπεδο

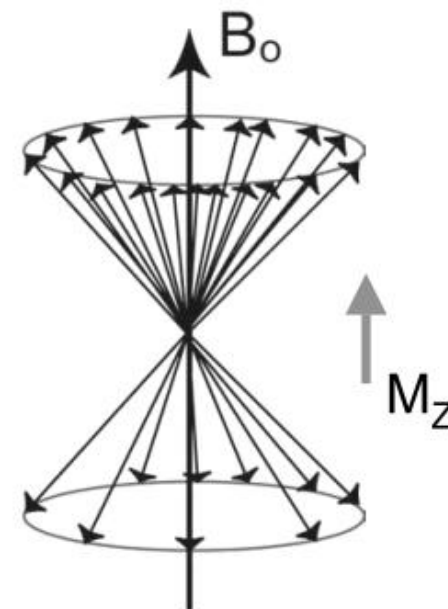


$$P_{\alpha} \propto e^{-E_{\alpha}/kT}$$

$$P_{\beta} \propto e^{-E_{\beta}/kT}$$

Κβαντική Θεώρηση

Μακροσκοπικό επίπεδο



Κλασσική Θεώρηση

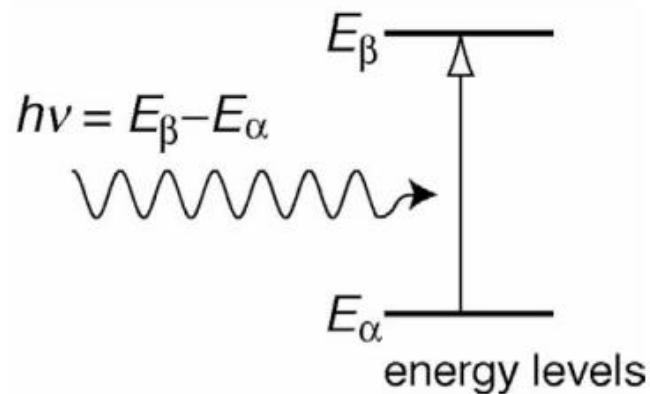
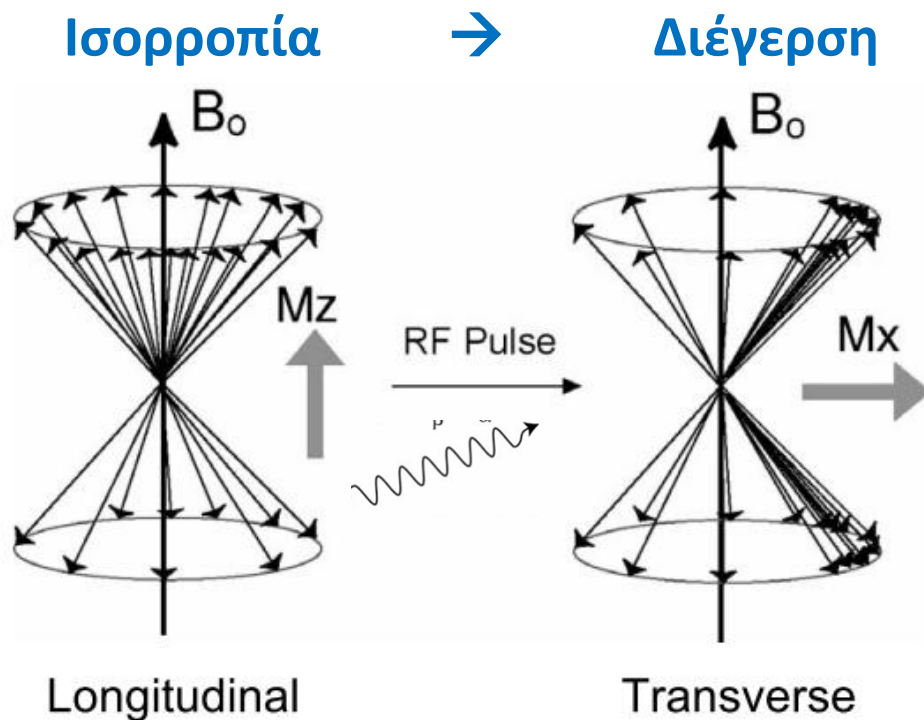
Boltzmann distribution

For a 11.7 Tesla field, or a 500 MHz spectrometer, the excess population is $\sim 0.01\%$ at room temperature.



Από πού προέρχεται το σήμα του NMR

*Με την εφαρμογή ενός παλμού
επιτυγχάνεται Συμφωνία Φάσης*



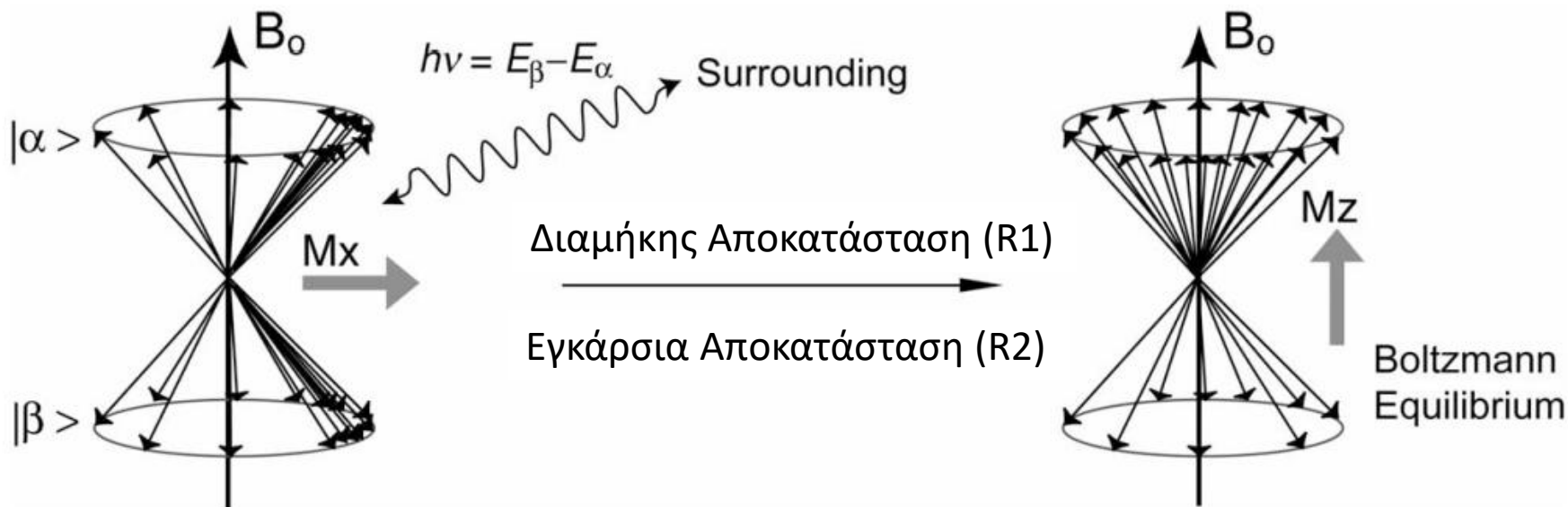


Αποκατάσταση

Η διαδικασία επαναφοράς των πυρηνικών σπιν στην ισορροπία που καθορίζεται από την κατανομή Boltzmann.

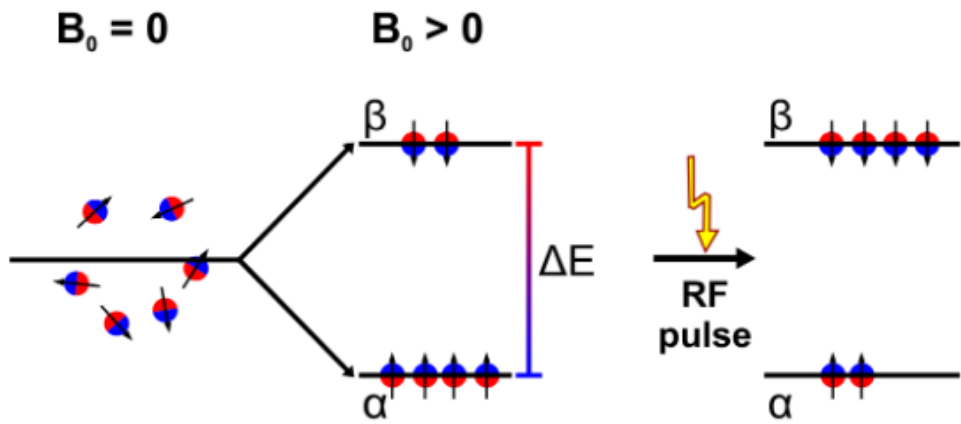
Δύο γεγονότα συμβαίνουν:

- (1) Μεταπτώσεις από την κατάσταση $|\beta\rangle$ στην $|\alpha\rangle$ ώστε να αποκατασταθεί η συνιστώσα M_z με ρυθμό **R1** και





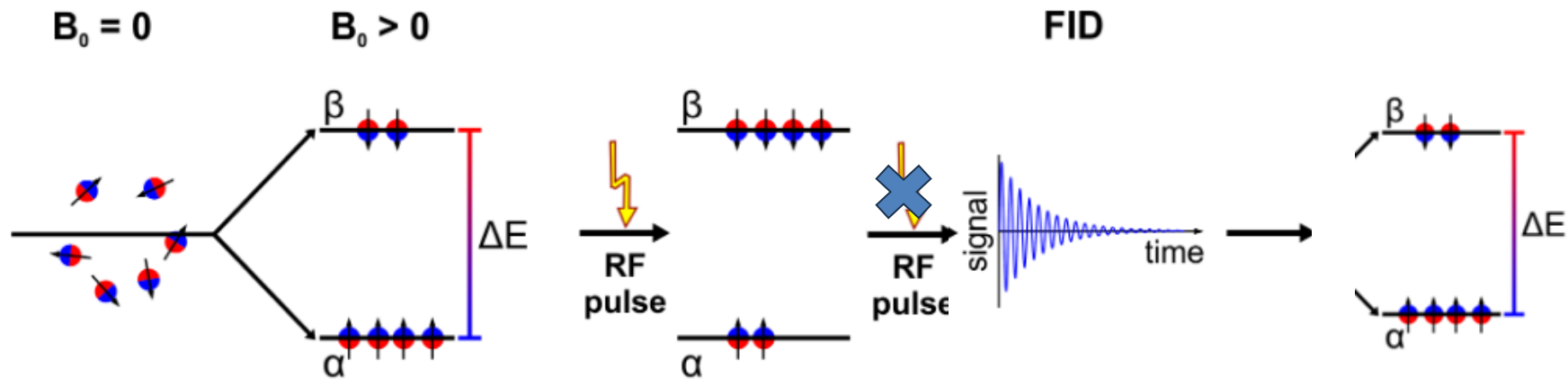
Ισορροπία → Διέγερση → Αποκατάσταση → Ισορροπία





NMR

Ισορροπία → Διέγερση → Αποκατάσταση → Ισορροπία

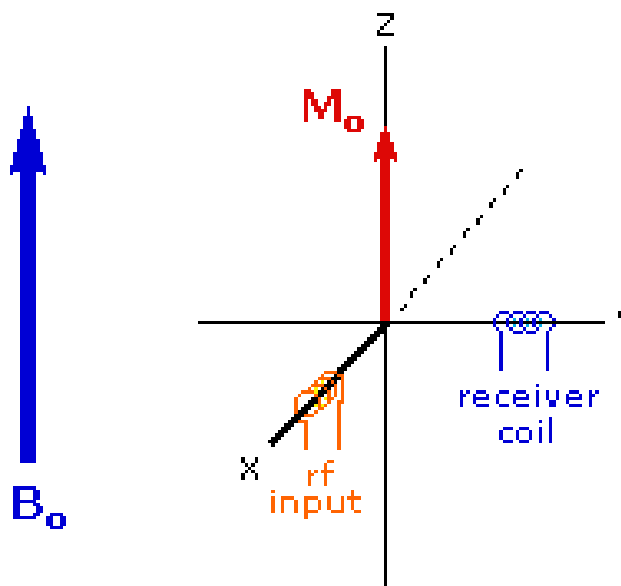
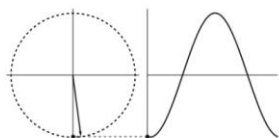
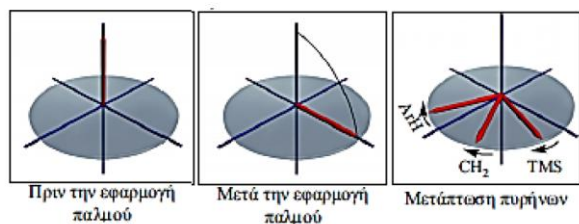
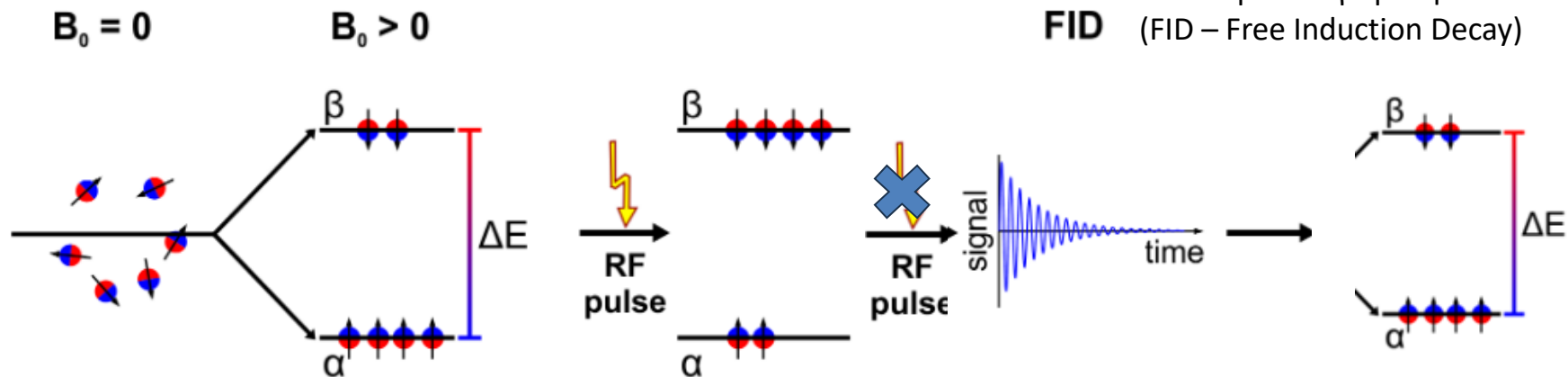




NMR

Ισορροπία → Διέγερση → Αποκατάσταση → Ισορροπία

Ελευθερα Επαγόμενη Αποκατάσταση
(FID – Free Induction Decay)





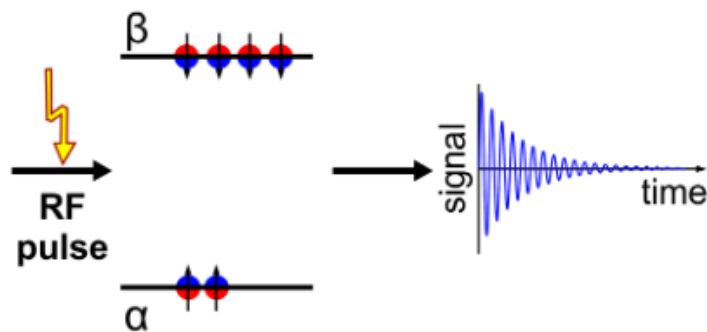
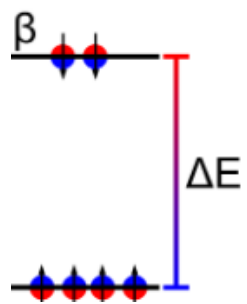
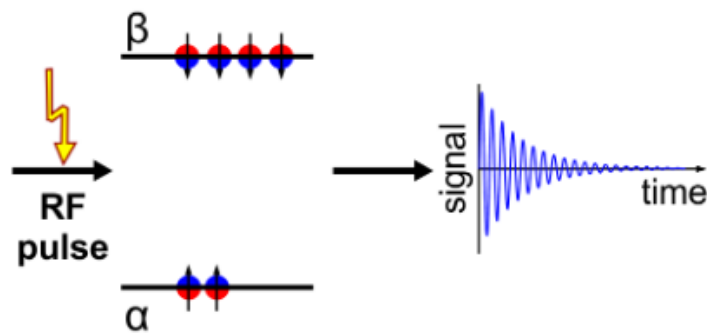
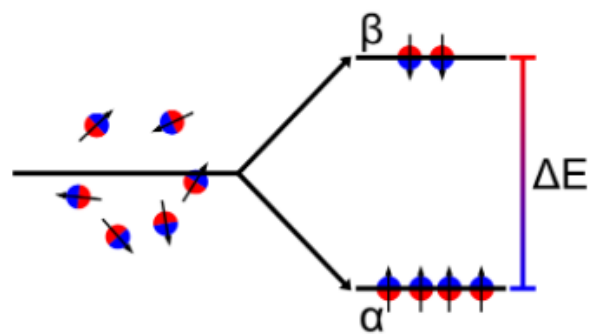
NMR

Ισορροπία → Διέγερση → Αποκατάσταση →

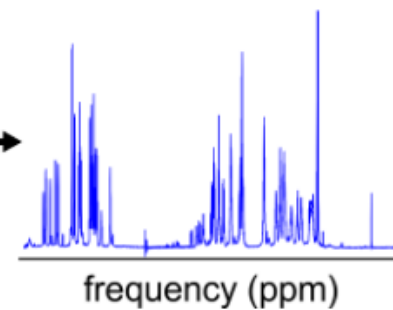
$B_0 = 0$

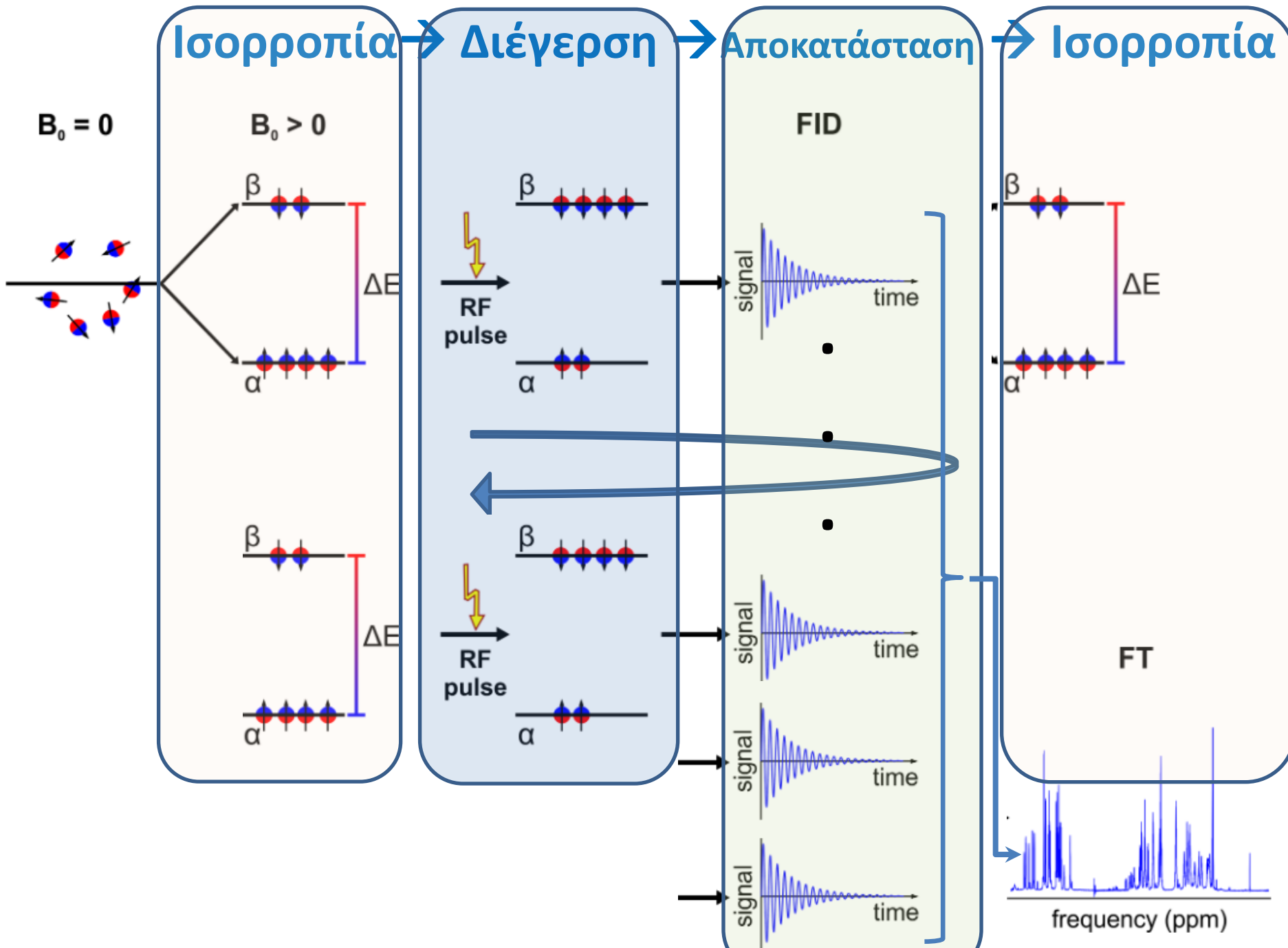
$B_0 > 0$

FID



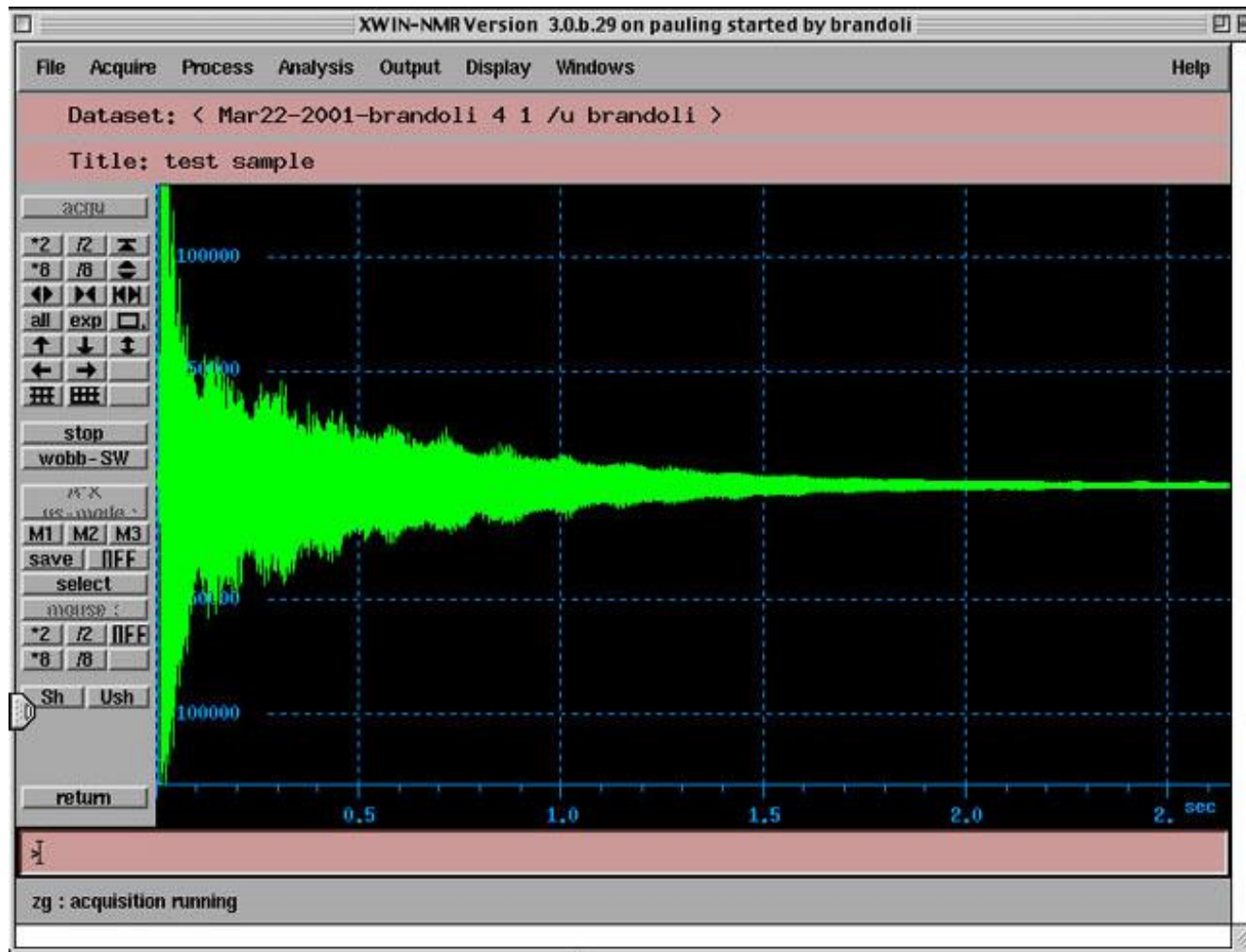
FT







σήμα NMR – NMR φάσμα



Χρόνος παρατήρησης
→
sec



Joseph Fourier is Still Transforming Science

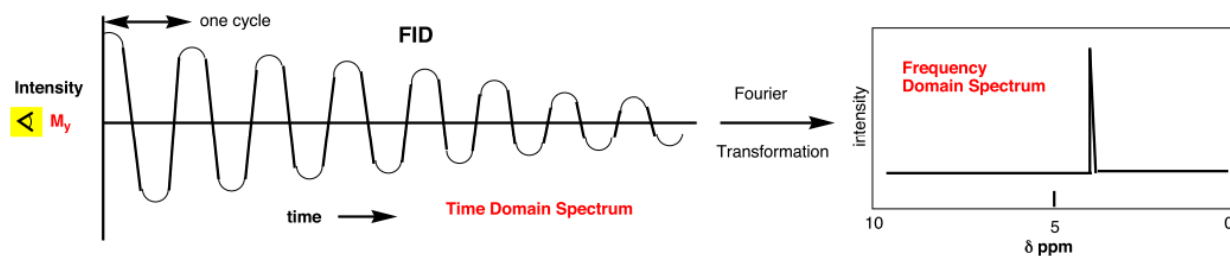
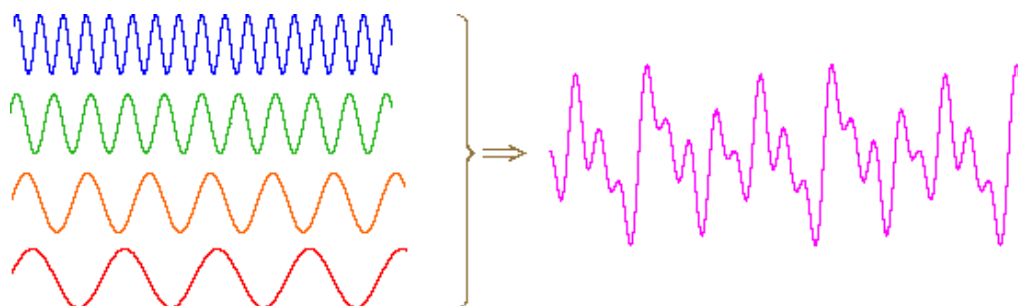
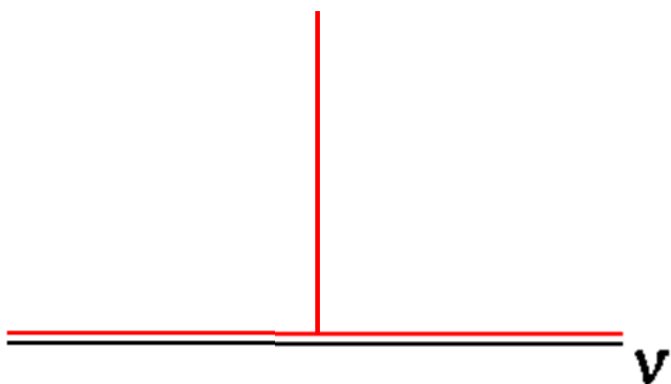
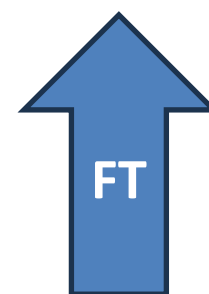
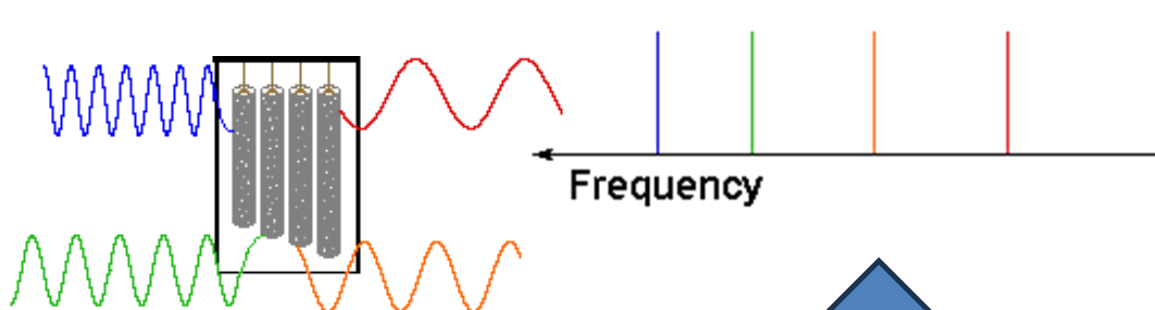
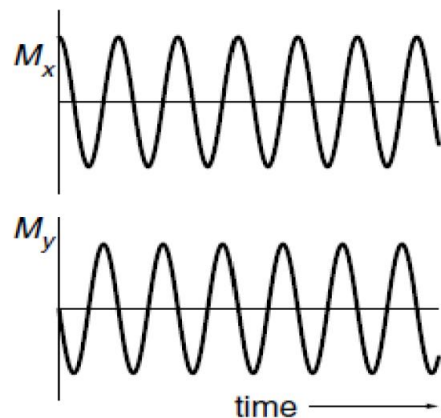
03.30.2018, by [Martin Koppe](#)



Print of the mathematician Jean Baptiste Joseph Fourier (1768-1830).



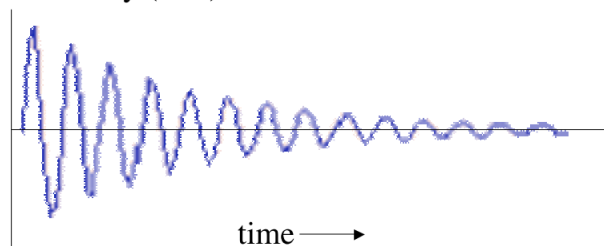
Fourier Transformation



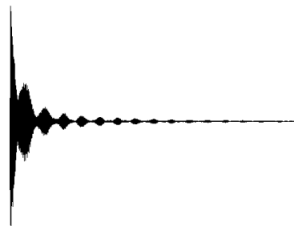
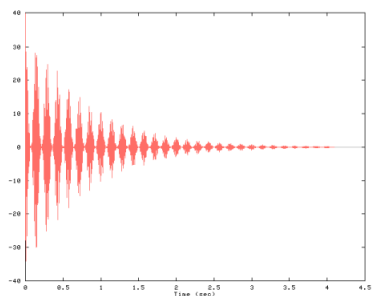


Fourier Transformation

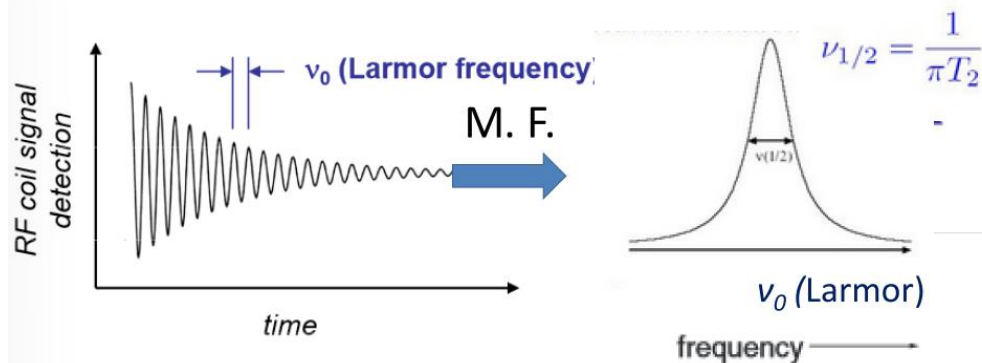
Free Induction Decay (FID)- time domain NMR



In pulse (FT) NMR, all nuclei are tipped at the same time and the FID's are superimposed.



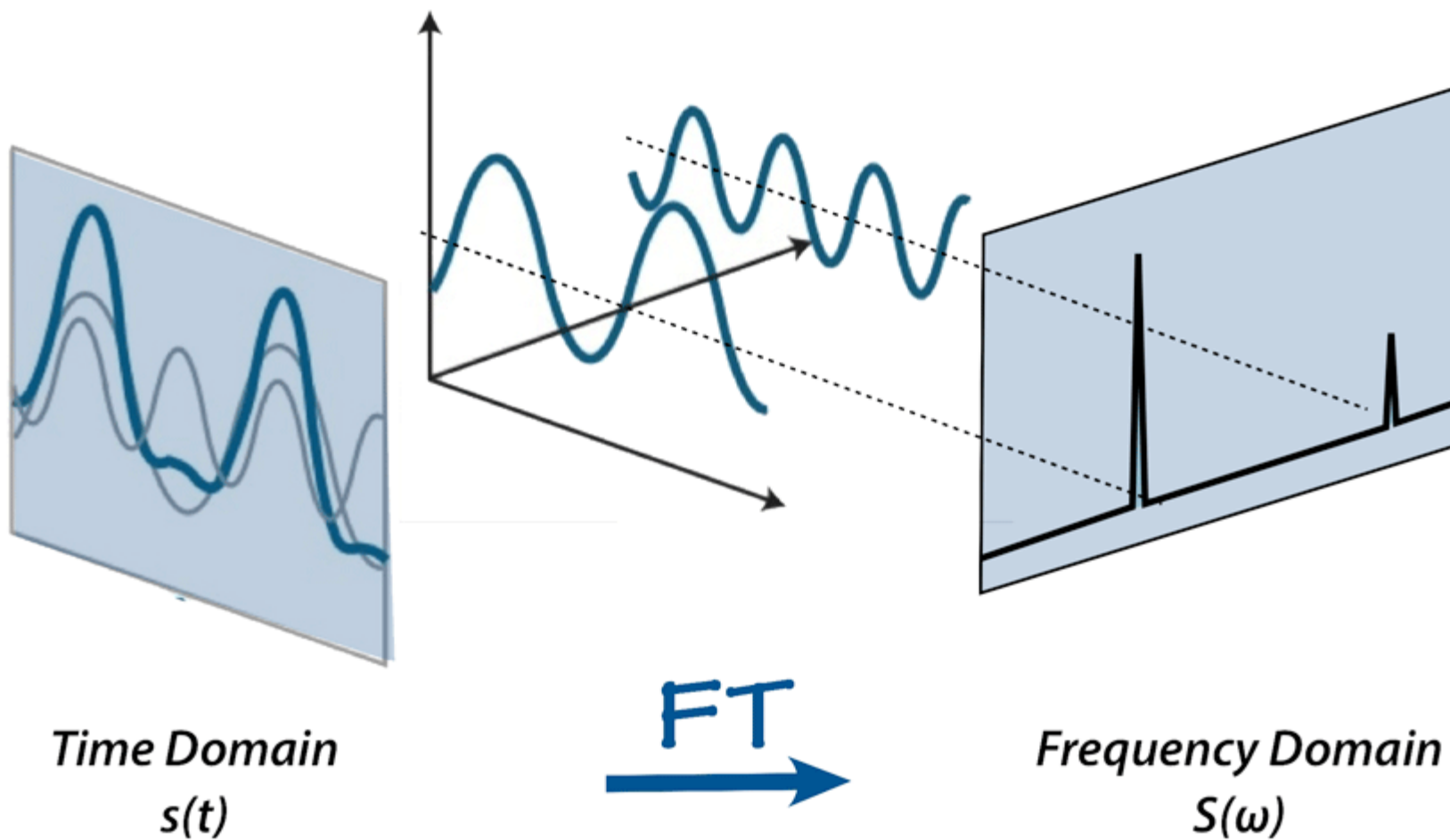
The Free Induction Decay



Μεγάλα βιομόρια $\tau_c \gg T_2 \gg$ άρα φασματικές γραμμές πολύ διευρυμένες
Μικρά μόρια $\tau_c \ll T_2 \ll$ άρα φασματικές γραμμές πολύ στενές

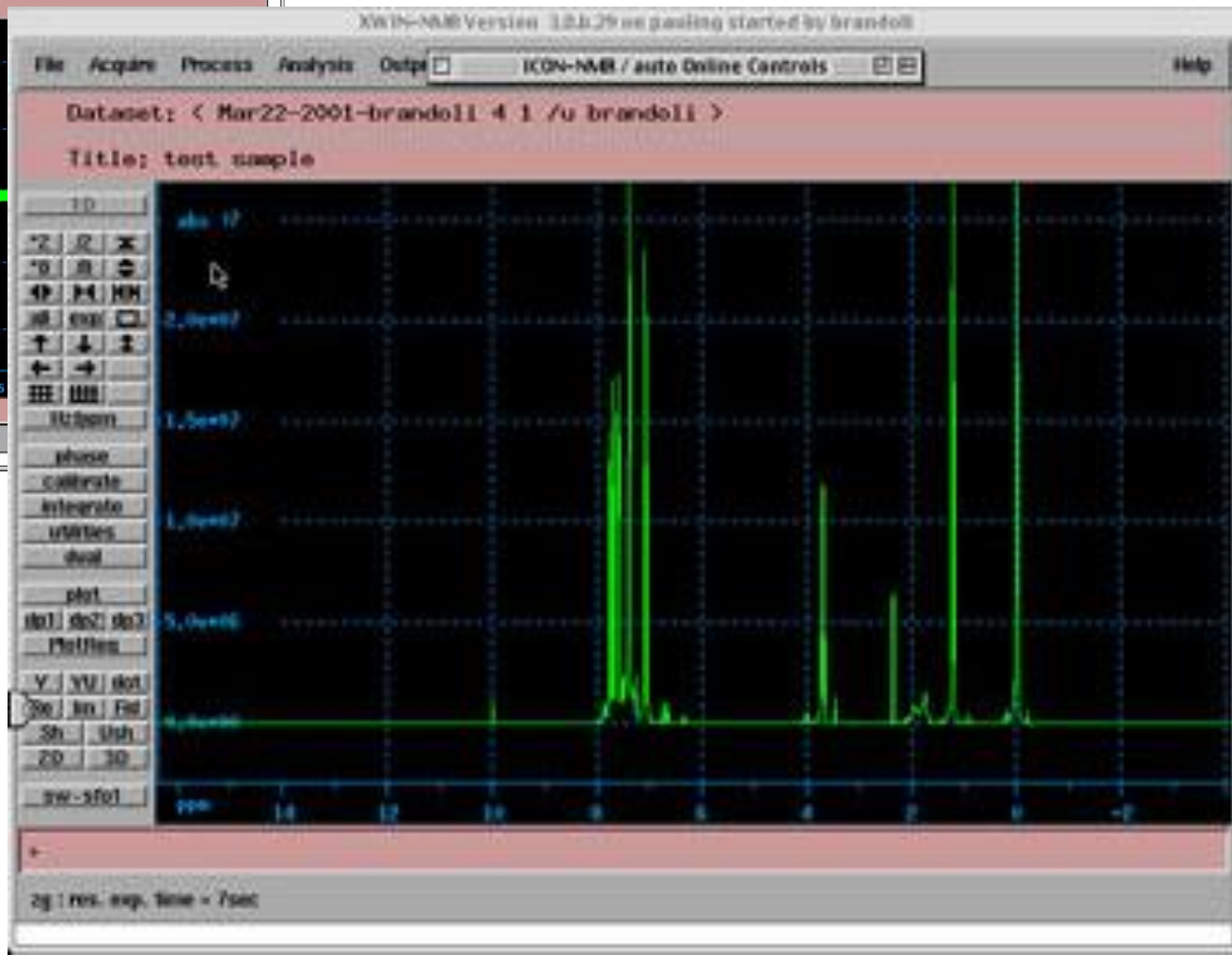
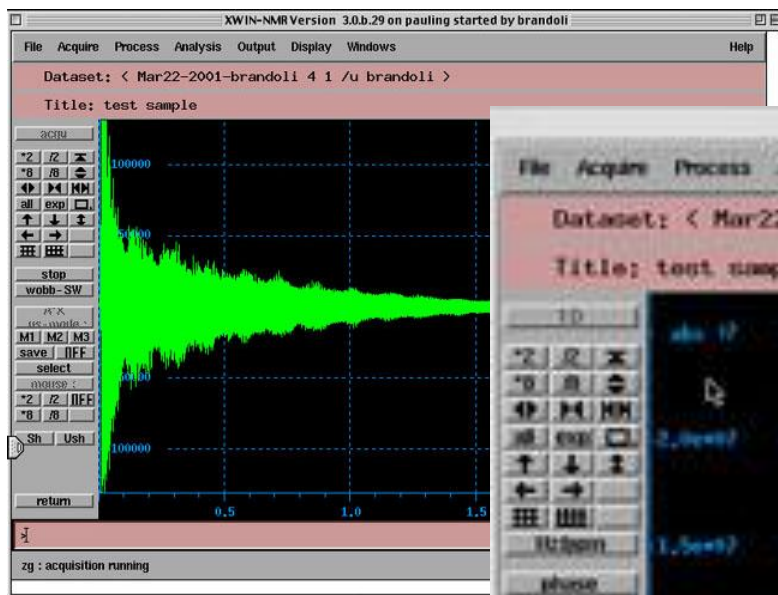


Fourier Transform





Pulsed Fourier Transform Spectroscopy





1. Chemical Shift δ (ppm) – Χημική Μετατόπιση δ (ppm)
2. Coupling Constant J (Hz) – Σταθερά Σύζευξης J (Hz)
3. Integrals – Εμβαδό κορυφών συντονισμού

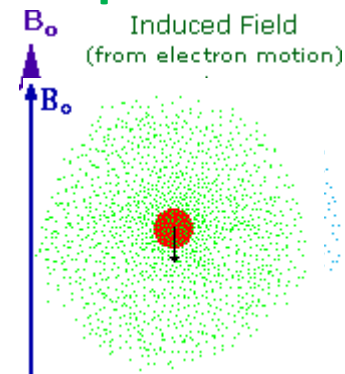




ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H NMR 1D

1. Θέση κορυφής συντονισμού στο φάσμα - Χημική μετατόπιση ΧΗΜΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

$$\delta(\text{ppm}) = \frac{\text{distance from DSS or TMS (Hz)}}{\text{frequency of the spectrometer (MHz)}}$$



Το τοπικό μαγνητικό πεδίο που «αισθάνεται» ο κάθε πυρήνας τροποποιείται από:

- Γειτονικούς πυρήνες και χημικές ομάδες
- Νέφος ηλεκτρονίων

$$B_{\text{πραγματικό}} = B_{\text{εφαρμοζόμενο}} - B_{\text{τοπικό}}$$

1α. Αριθμός των κορυφών συντονισμού → Διαφορετικά Είδη πυρήνων H

$$B_{\text{πραγματικό}} = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma)$$

σ : σταθερά προάσπισης



Οι συχνότητες συντονισμού των πυρήνων του ίδιου στοιχείου μέσα σε ένα μόριο επηρεάζονται με χαρακτηριστικό τρόπο από το **χημικό τους περιβάλλον**, δηλαδή από την **ηλεκτρονική πυκνότητα** που τα περιβάλλει και το **είδος των ατόμων** με τα οποία **συνδέονται**.

- Τοπική Διαμαγνητική Θωράκιση
- Μαγνητική Ανισοτροπία
- Επαγωγικό Φαινόμενο
 - δεσμοί υδρογόνου
 - η οξύτητα του διαλύματος,
 - φαινόμενα διαλυτότητας,
 - συγκέντρωσης, καθώς και
 - θερμοκρασίας

επηρεάζουν σημαντικά τη θέση των πυρήνων υδρογόνου στο φάσμα



Chemical shift

Κώνος θωράκισης

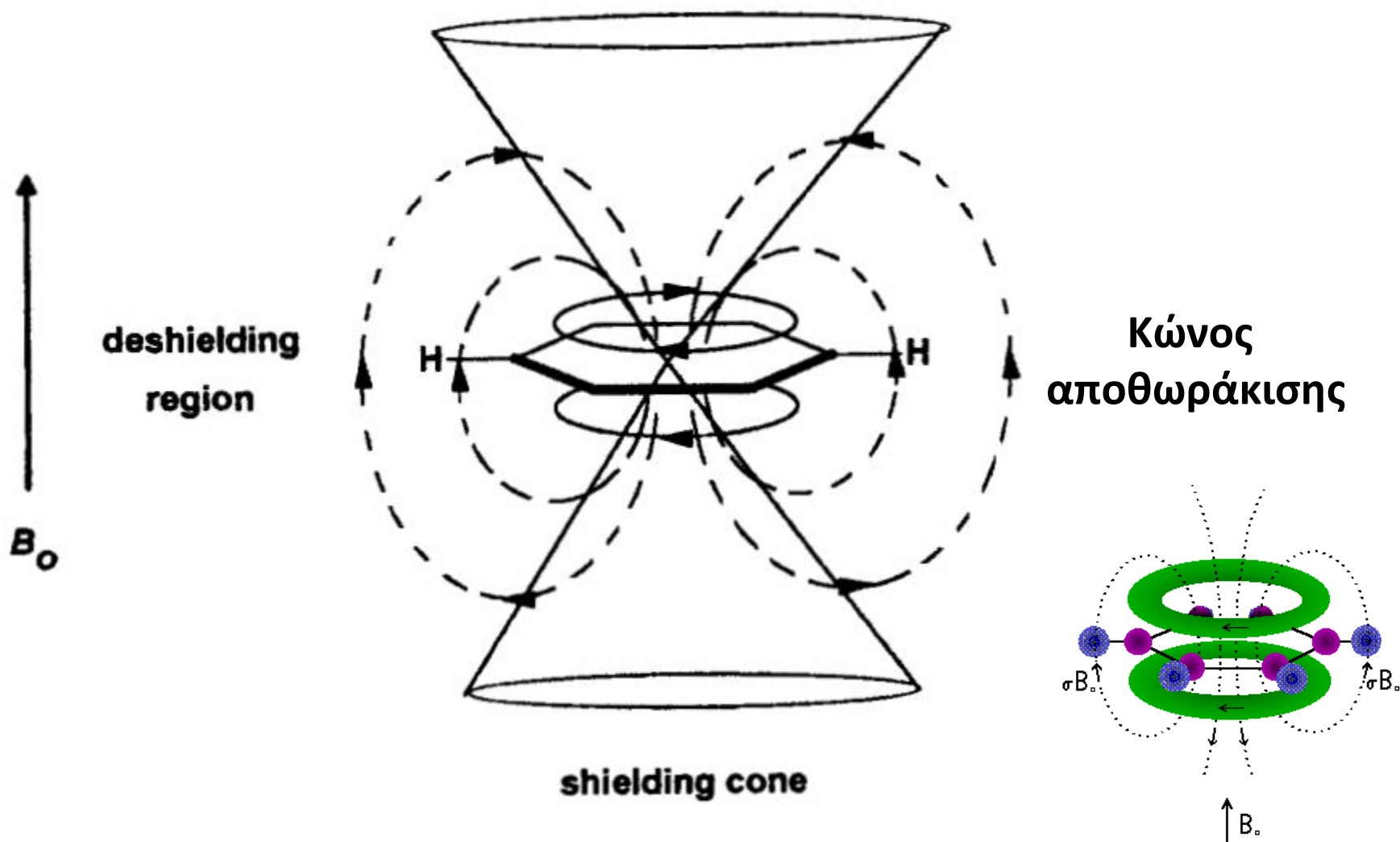


Figure 6.5. Anisotropic-induced magnetic field (dotted lines) in the proximity of an aromatic ring. The ellipses above and below the ring represent the ring current of π electrons.



Chemical shift

- Διαμαγνητική θωράκιση**

Συντονισμός σε $B = B_0 + B_1$

~ ηλεκτρονιακή πυκνότητα

- Μαγνητική ανισοτροπία**

~ Χημικών δεσμών

Επαγωγικά ρεύματα προς ορισμένες
διευθύνσεις.

Διαμαγνητικό ρεύμα - θωράκιση

Παραμαγνητικό ρεύμα - αποθωράκιση

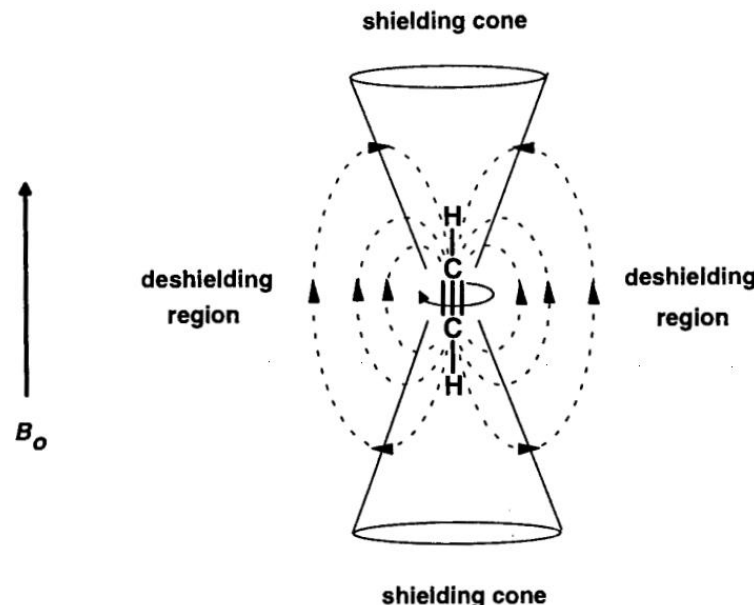
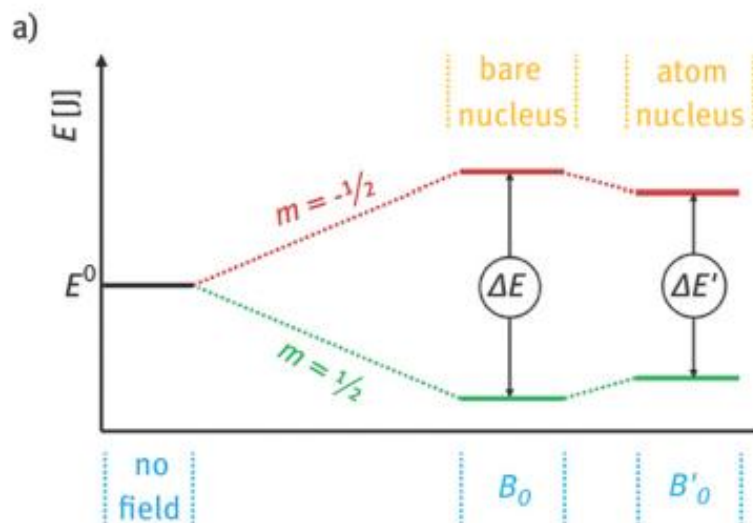


Figure 6.4 Anisotropic-induced magnetic field (dotted lines) in the proximity of a triple bond.



b)

Magnetic field perceived by a shielded nucleus

$$B'_0 = B_0 \cdot (1 - \sigma)$$

Resonance frequency of the shielded nucleus

$$\nu' = \nu \cdot (1 - \sigma)$$

Energy difference between states

$$\Delta E' = \Delta E \cdot (1 - \sigma)$$

Chemical shift

$$\delta_x [ppm] = \frac{\nu'_x - \nu'_{REF} [Hz]}{B_0 [MHz]}$$

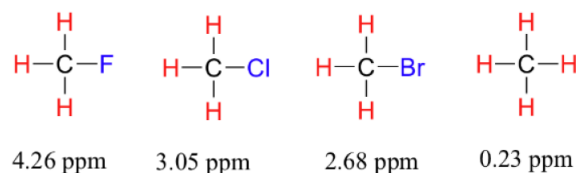
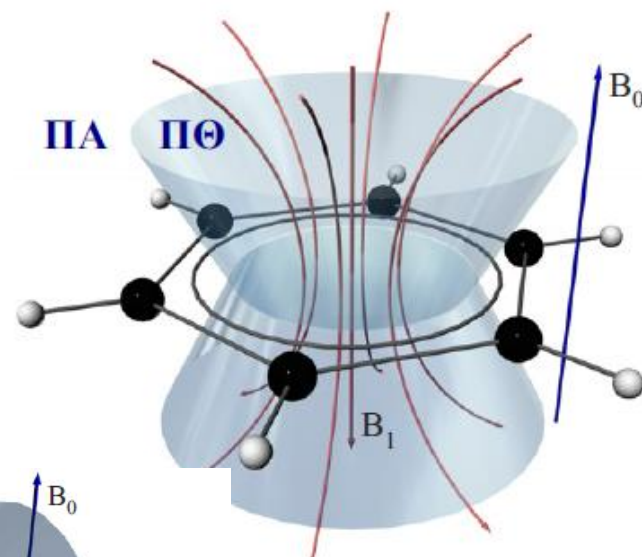
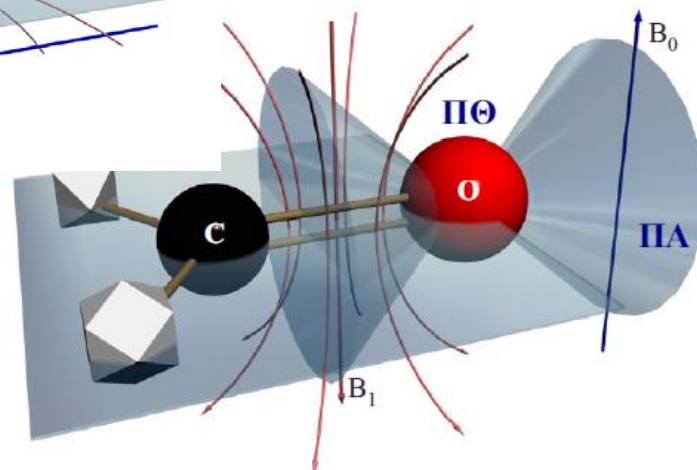
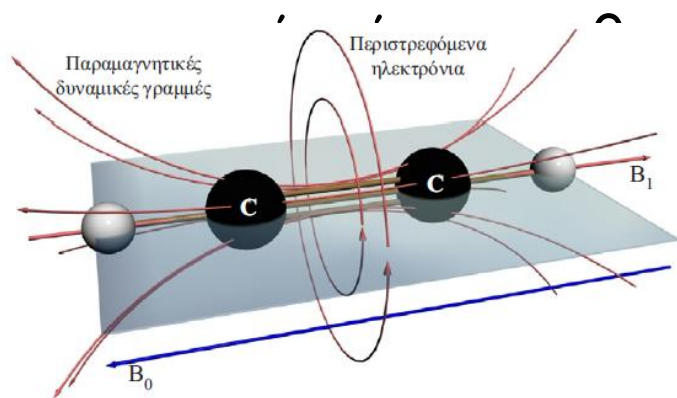


Chemical shift

Magnetic anisotropy

Επαγωγικά ρεύματα προς ορισμένες διευθύνσεις.

Διαμαγνητικό ρεύμα - θωράκιση



In the region where the field lines are antiparallel to the B_0 vector, the field is called **diamagnetic**.

When they are parallel, the field is called **paramagnetic**.



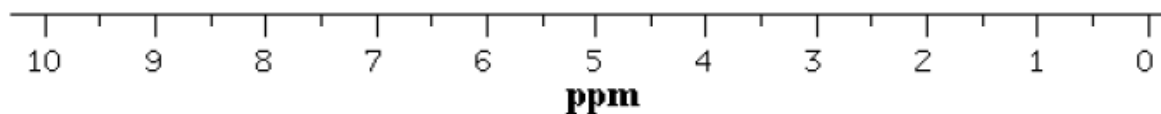
Chemical shift

The chemical shift is independent of the instrument used.

If the chemical shift were measured in Hz, then the chemical shift of a given proton would differ across various NMR instruments, because the **absorption frequency (ν)** is a function of the **magnetic field** strength (B_0).

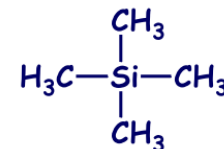
$$\nu = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| (1 - \sigma) B_0$$

$$\delta = \frac{\text{Vξεταζόμενου πυρήνα (Hz)}}{\text{Vοργάνου (MHz)}} \times 10^6$$



Ένωση αναφοράς (για μη υδατικά μέσα):
τετραμεθυλοσιλάνιο (**TMS**)
(συχνότητα συντονισμού TMS = 0 Hz)

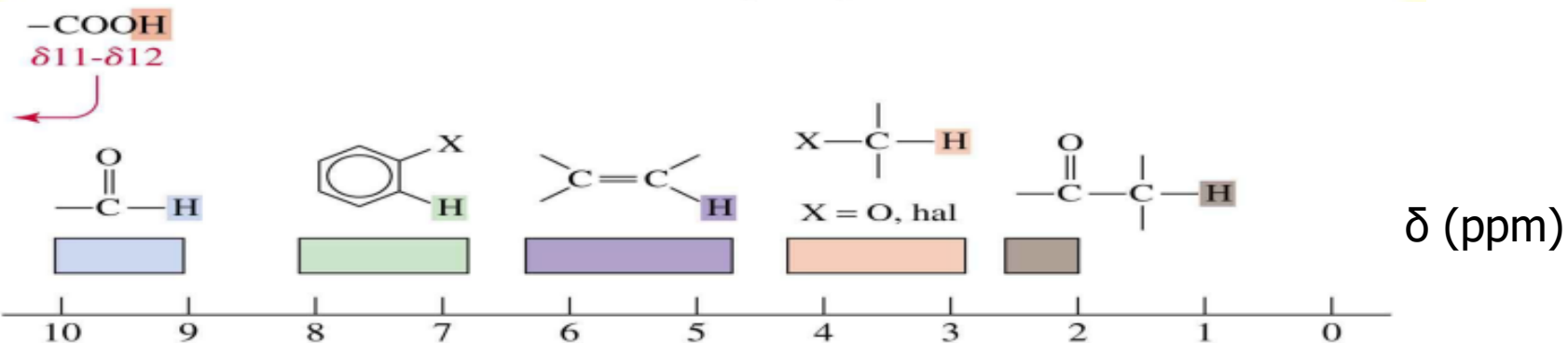
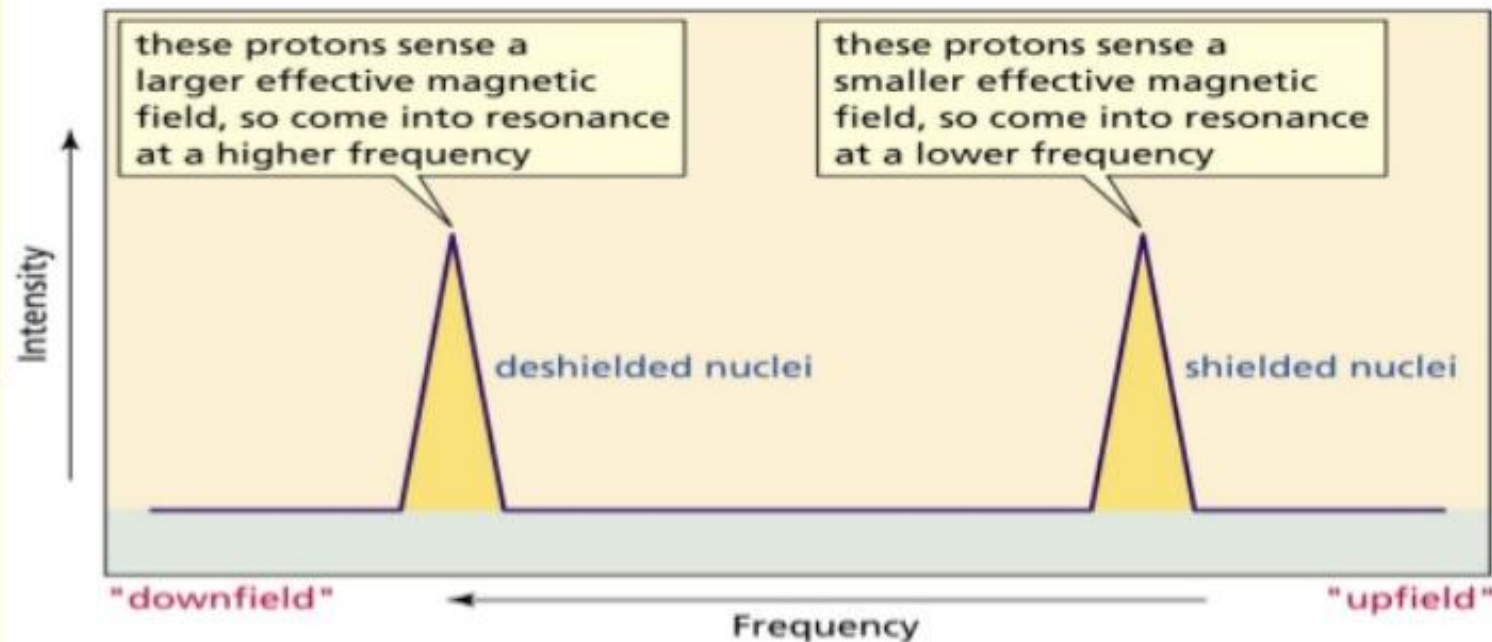
Τα πρωτόνια του TMS έχουν θωρακιστεί ισχυρά





Chemical shift

- The electrons surrounding a nucleus affect the effective magnetic field sensed by the nucleus.





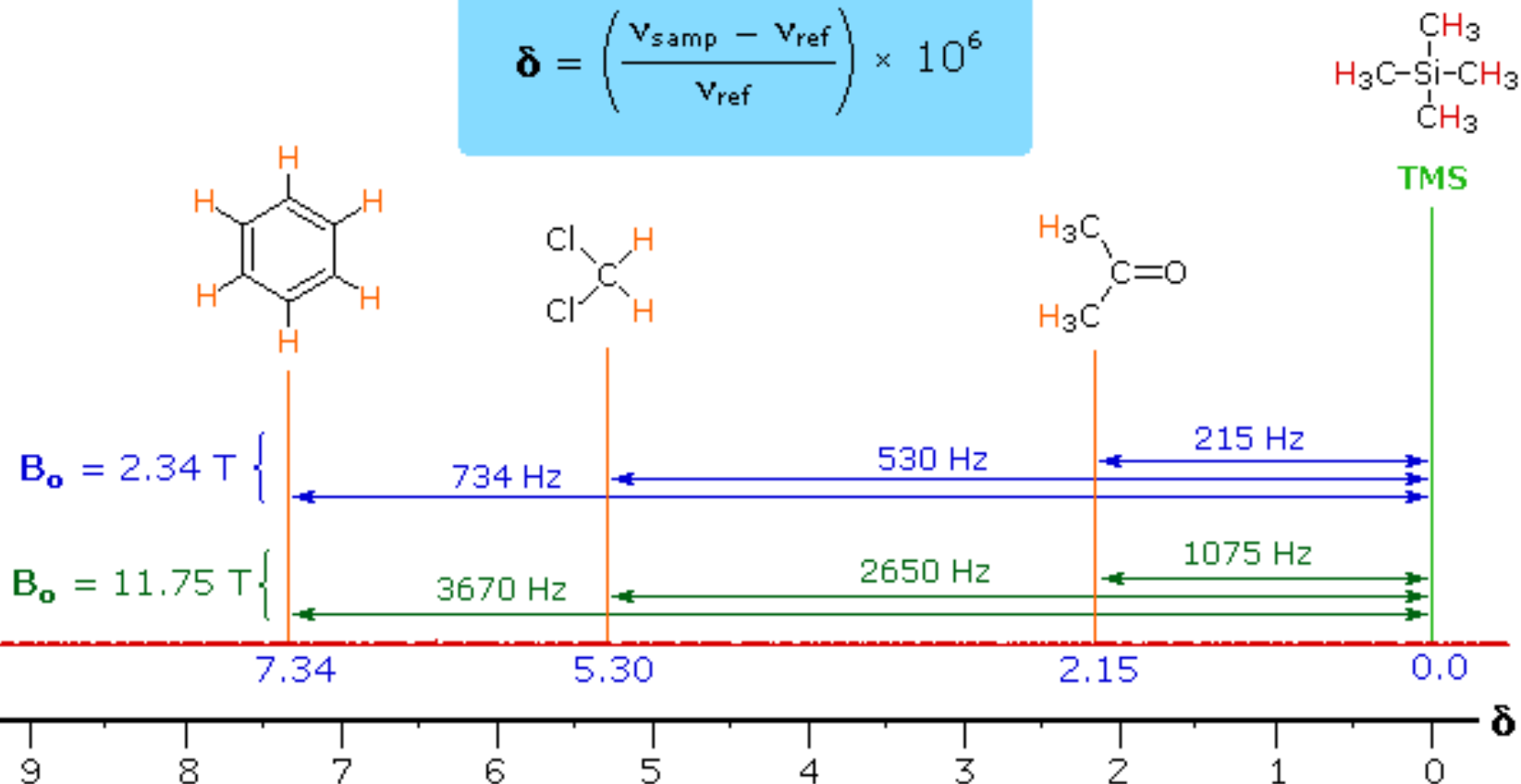
Chemical shift

— Increasing Magnetic Field at Fixed Frequency —→

← Increasing Frequency at Fixed Magnetic Field ←—

Chemical Shift

$$\delta = \left(\frac{\nu_{\text{samp}} - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} \right) \times 10^6$$

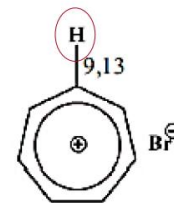
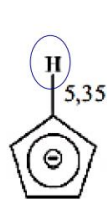
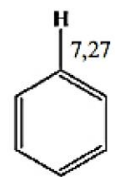
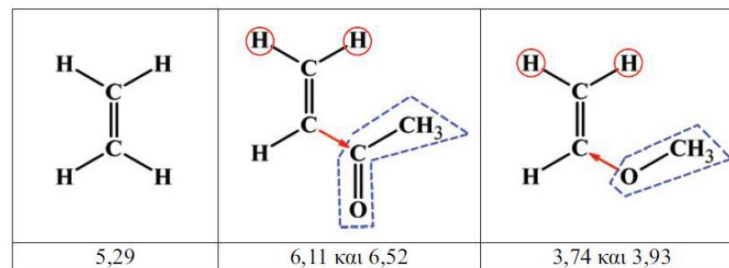


Τί τιμή χημικής μετατόπισης από το μόριο αναφοράς θα παρουσιάσει ένα συγκεκριμένο πρωτόνιο οργανικού μορίου, το οποίο συντονίζεται σε συχνότητα $\nu_i = 120\text{ Hz}$ σε ένα φασματογράφο 60 MHz; $\delta = \nu_i / \nu_0 = (120\text{ Hz} / 60\text{ MHz}) \times 10^6 = 2\text{ ppm}$

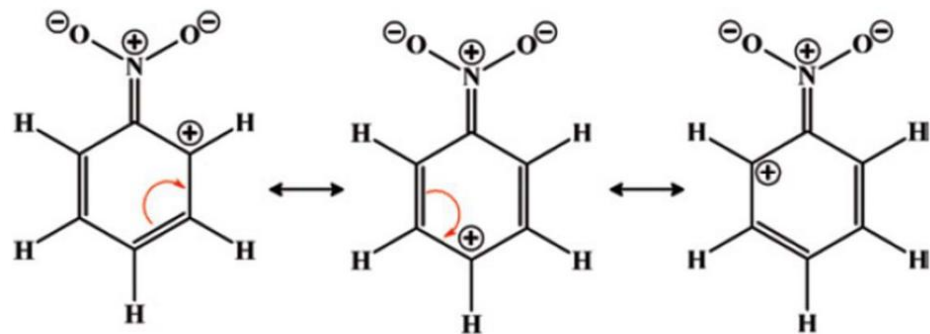
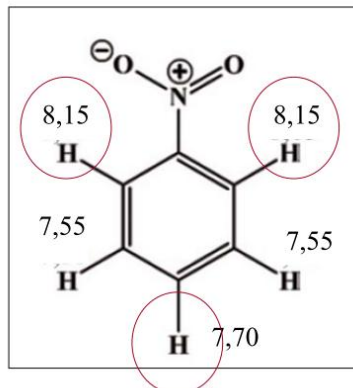
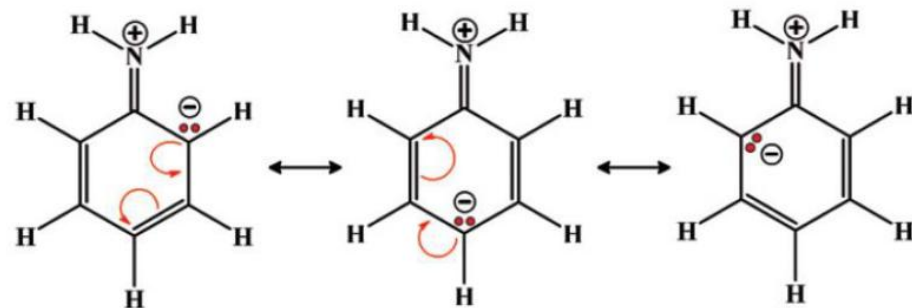
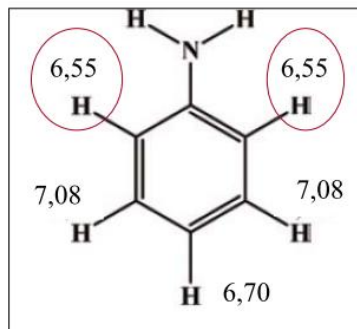


Chemical shift

Inductive effect



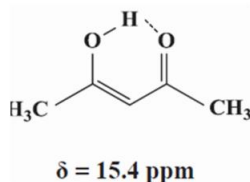
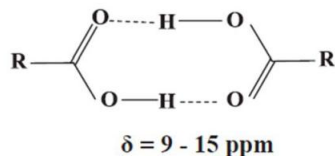
Resonance effect





Chemical shift

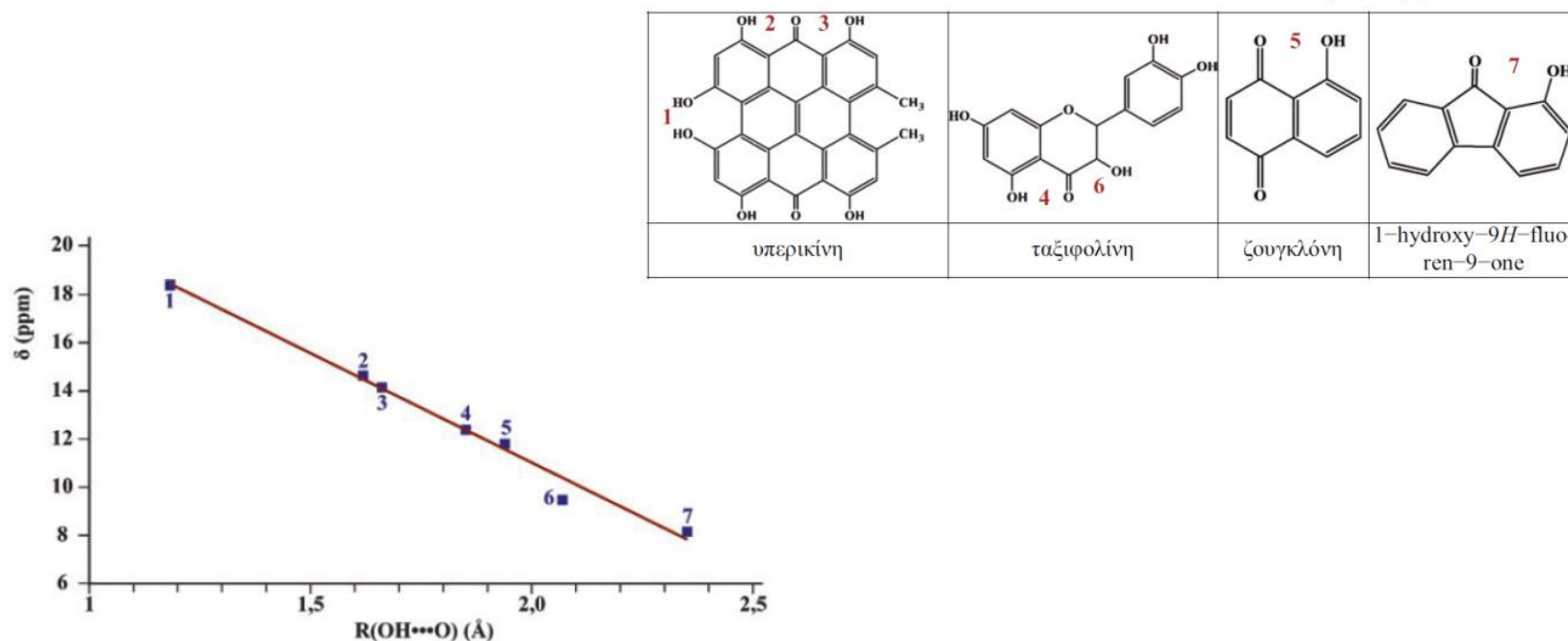
Hydrogen bonds



Proton center	Compound	δ/ppm
-OH	Alcohols	1-5
	Phenols	4-10
	Acids	9-13
	Enols	10-17
-NH	Amines	1-5
	Amides	5-6.5
	Amino groups in peptides	7-10

Intermolecular bonds → dependence on the concentration of the compound in the sample

Intramolecular bonds → independent of concentration or temperature



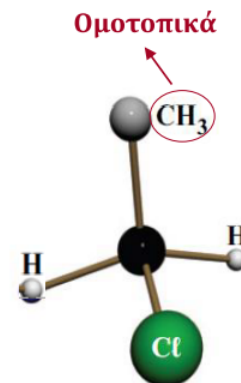
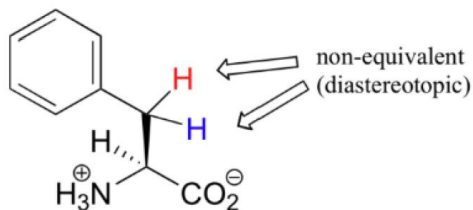


Chemical shift

Όταν δυο πρωτόνια σχετίζονται με **περιστροφική συμμετρία** και είναι **ισόχρονα** ονομάζονται **ομοτοπικά**
(αν αντικατασταθεί το ένα H με D δεν προκύπτει χειρικό κέντρο).

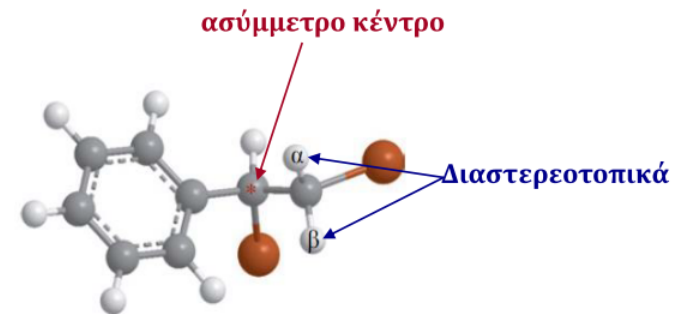
Όταν δυο πρωτόνια σχετίζονται με **ανακλαστική συμμετρία** και είναι **ισόχρονα** ονομάζονται **εναντιοτοπικά**
(αν αντικατασταθεί το ένα H με D προκύπτει ζεύγος εναντιομερών).

Όταν δυο πρωτόνια **δεν είναι ομοτοπικά ή εναντιοτοπικά** και είναι **ανισόχρονα** τότε τα πρωτόνια είναι **διαστερεοτοπικά**
[Π.χ πρωτόνια μεθυλενικής ομάδας δίπλα σε ασύμμετρο κέντρο (*)]



Αιθυλοχλωρίδιο

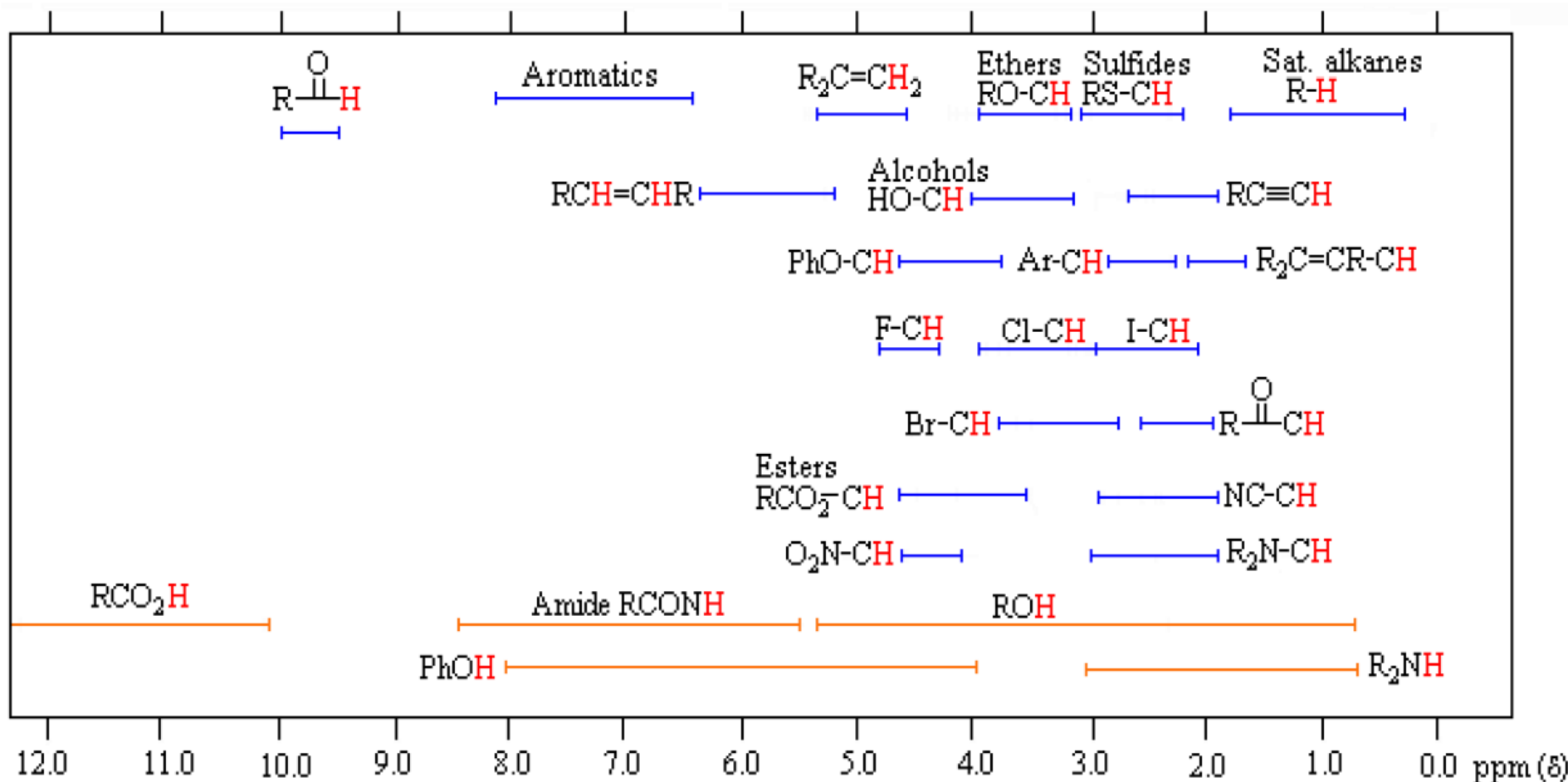
Εναντιοτοπικά
Δεν διακρίνονται με NMR



1,2-διβρωμο-1-φαινυλοαιθάνιο



Chemical shift



For samples in $CDCl_3$ solution. The δ scale is relative to TMS at $\delta=0$ ppm. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/orgpage/nmr.htm>



Chemical shift

Table 13.3 Correlation of ^1H Chemical Shift with Environment

Type of hydrogen		Chemical shift (δ)	Type of hydrogen		Chemical shift (δ)
Reference	$\text{Si}(\text{CH}_3)_4$	0	Alcohol	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \end{array}$	2.5–5.0
Alkyl (primary)	$-\text{CH}_3$	0.7–1.3	Alcohol, ether	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C}-\text{O}- \\ \end{array}$	3.3–4.5
Alkyl (secondary)	$-\text{CH}_2-$	1.2–1.6	Vinylic	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \end{array}$	4.5–6.5
Alkyl (tertiary)	$\begin{array}{c} \\ -\text{CH}- \\ \end{array}$	1.4–1.8	Aryl	$\text{Ar}-\text{H}$	6.5–8.0
Allylic	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}=\text{C}-\text{C}- \\ \end{array}$	1.6–2.2	Aldehyde	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{H} \end{array}$	9.7–10.0
Methyl ketone	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$	2.0–2.4	Carboxylic acid	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{C}-\text{O}-\text{H} \end{array}$	11.0–12.0
Aromatic methyl	$\text{Ar}-\text{CH}_3$	2.4–2.7			
Alkynyl	$-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$	2.5–3.0			
Alkyl halide	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C}-\text{Hal} \\ \end{array}$	2.5–4.0			

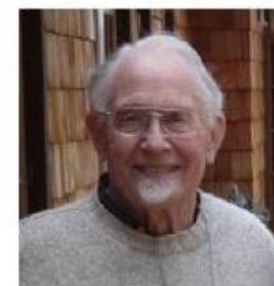
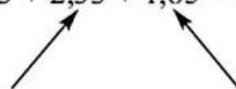


Chemical shift

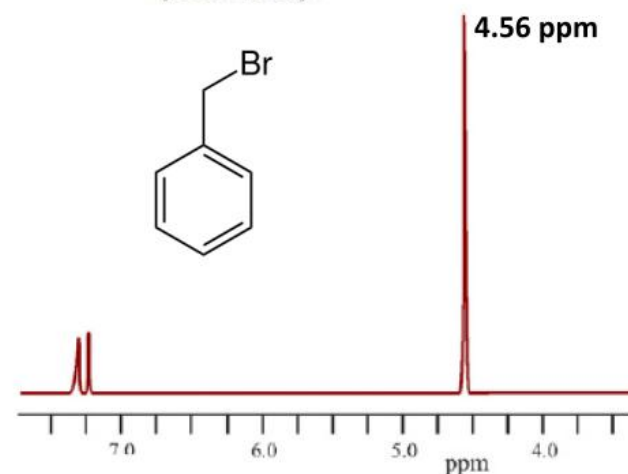
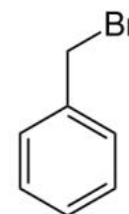
Υποκαταστάτες Y ή Z	Σταθερά Προ- άσπισης (ΣΠ)	Υποκαταστάτες Y ή Z	Σταθερά Προ- άσπισης (ΣΠ)
CH ₃	0,47	-OC(=O)R	3,13
C=C	1,32	-C(=O)R	1,70
C ₃ C	1,44	-C(=O)Ph	1,84
-Ph	1,85	-C(=O)OR	1,55
-CF ₂	1,21	-C(=O)NR ₂	1,59
-CF ₃	1,14	-C≡N	1,70
-Cl	2,53	-NR ₂	1,57
-Br	2,33	-NHC(=O)R	2,27
-I	1,82	N ₃	1,97
-OH	2,56	-SR	1,64
-OR	2,36	-OSO ₂ R	3,13
-OPh	3,23		

$$\delta_{\text{CH}_2} = 0,23 + \sum \Sigma \Pi_i$$

$$\delta_{\text{CH}_2} = 0,23 + 2,33 + 1,85 = 4,41 \text{ ppm}$$



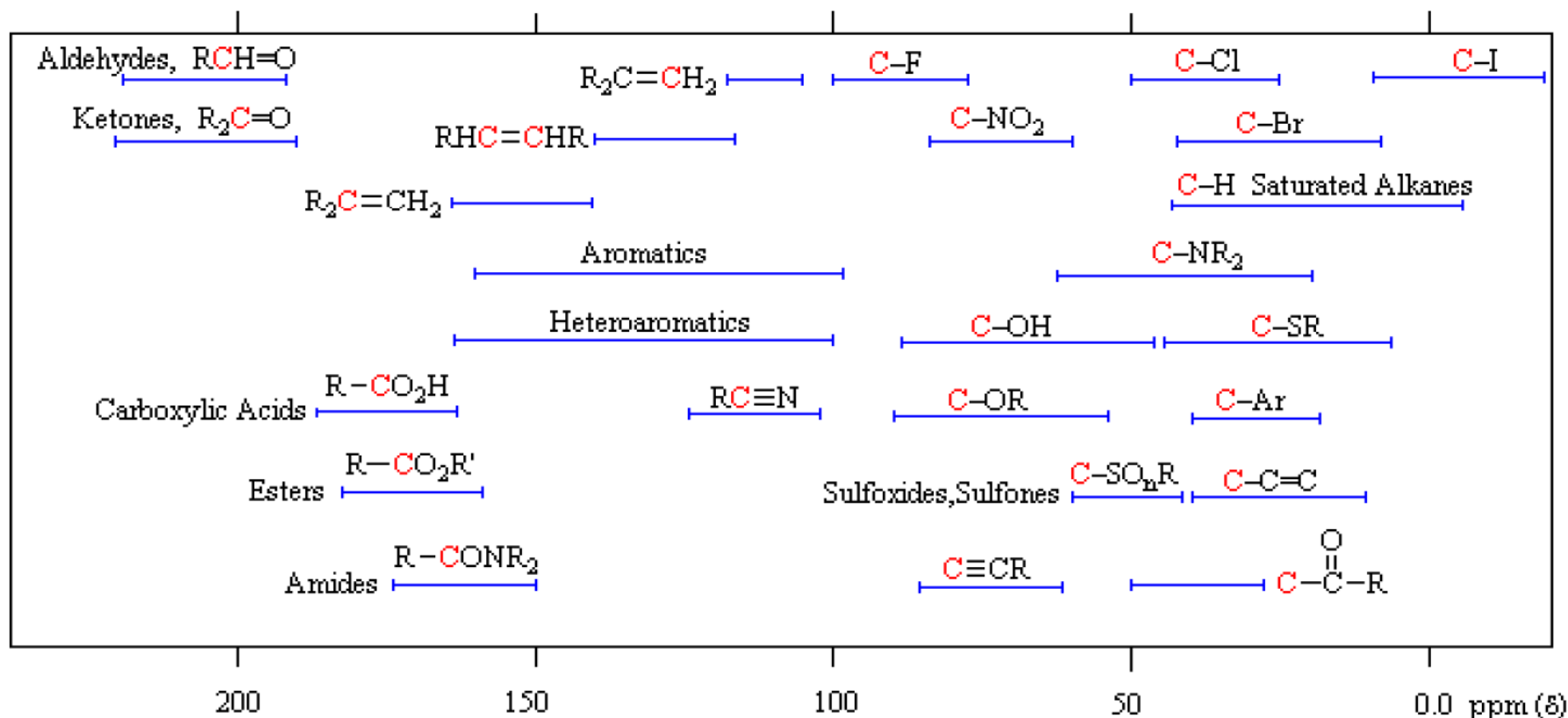
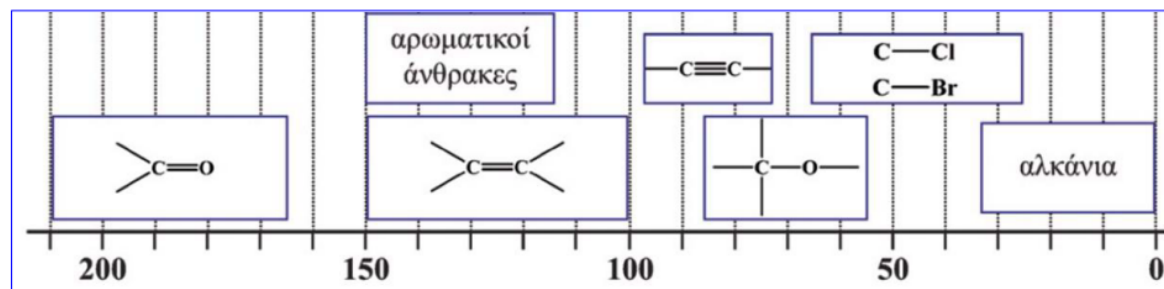
Shoorley James Nelson
(1925 - 2015)



Το φάσμα προσομοίωσης ¹H NMR
του μορίου C₆H₅CH₂Br.



^{13}C Chemical shift

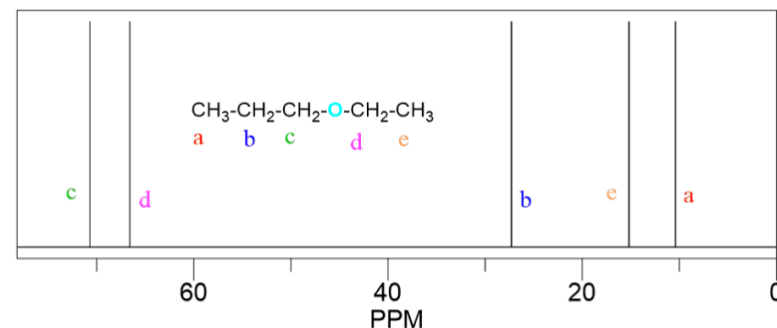




13C Chemical shift

- ❑ Το ισότοπο ^{13}C έχει πολύ μικρή φυσική αφθονία (1.1%), με αποτέλεσμα ο πυρήνας να είναι **400 φορές λιγότερο ευαίσθητος** στην παρατήρησή του με NMR.
- ❑ Εξαιτίας της χαμηλής φυσικής αφθονίας δεν παρατηρείται σύζευξη μεταξύ ^{13}C - ^{13}C .
- ❑ Τα συνηθισμένα φάσματα ^{13}C NMR λαμβάνονται με πλήρη αποσύζευξη (για να μην εμφανίζεται η σύζευξη μεταξύ ^1H - ^{13}C), οπότε σε αυτά τα φάσματα υπάρχουν **μόνο απλές κορυφές**.
- ❑ Ο αριθμός των κορυφών δείχνει τον αριθμό των ομάδων **χημικά ισοδύναμων ατόμων C**.
- ❑ Η κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων είναι **0-200 ppm**.
- ❑ Οι χημικές μετατοπίσεις επηρεάζονται από τους ίδιους παράγοντες όπως και στο φάσμα ^1H NMR.

Φάσμα ^{13}C NMR





¹³C NMR Spectroscopy

1. Low Natural Abundance (1.1%)

1. The ¹³C isotope constitutes only **1.1%** of natural carbon, making it **400× less sensitive** than ¹H NMR, *Consequence:* Requires **longer acquisition** times or **higher sample concentrations**.

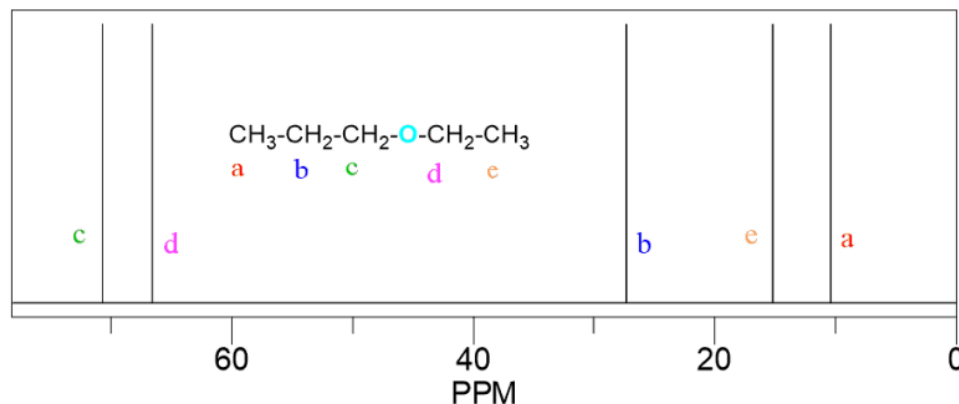
2. No ¹³C-¹³C Coupling

1. Due to the low abundance, the probability of two ¹³C nuclei being adjacent is negligible, so ¹³C-¹³C **splitting is absent** in spectra.

3. Proton Decoupling

1. Standard ¹³C spectra are recorded with **broadband ¹H decoupling** to eliminate ¹H-¹³C splitting (which would otherwise complicate spectra), yield **single peaks** for each chemically distinct carbon.

Φάσμα ¹³C NMR





^{13}C NMR Spectroscopy

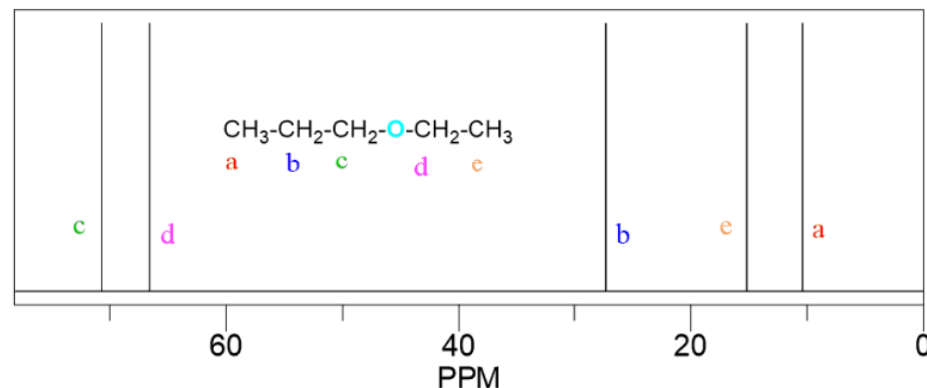
4. Number of Peaks = Number of Unique Carbons

- Each peak represents a **chemically equivalent carbon group**, *Example*: Acetone ($\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$) shows **two peaks** (one for the carbonyl, one for the methyl carbons).

5. Chemical Shift Range (0–200 ppm)

- Much broader than ^1H NMR (0–12 ppm), allowing better resolution of structurally similar carbons, **Sp^3 carbons**: 0–90 ppm (e.g., alkanes), **Sp^2 carbons**: 100–200 ppm (e.g., alkenes, carbonyls).

Φάσμα ^{13}C NMR

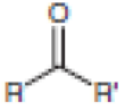
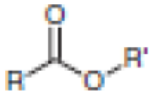
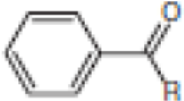
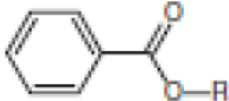
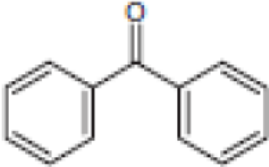
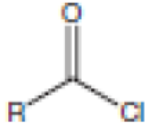
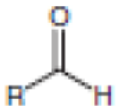
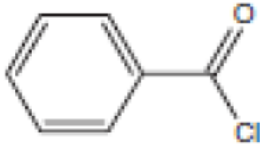
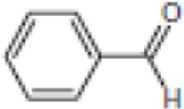
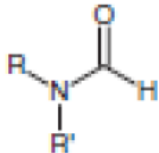
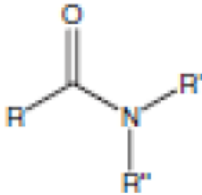
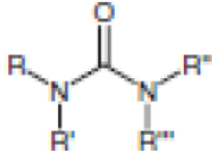
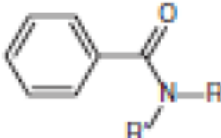
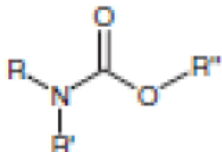


6. Factors Influencing Chemical Shifts

- Similar to ^1H NMR: (**Electronegativity** of nearby atoms, **Hybridization** (sp^3 vs. sp^2), **Ring strain**, **hydrogen bonding**, and **solvent effects**).



^{13}C Chemical shift

Type of carbonyl	Typical shift	Type of carbonyl	Typical shift
	205–210		170–180
	195–200		165–170
	~195		170–175
	196–202		~168
	190–195		160–165
	167–173		160–165
	165–172		153–160

Note: thio-carbonyl analogues generally absorb at considerably lower field – sometimes by as much as 40 ppm.

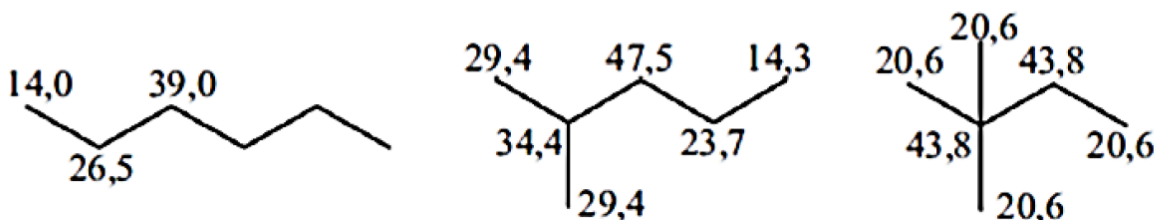


13C Chemical shift

Οργανική Ένωση	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Οργανική Ένωση	Χημική Μετατόπιση (ppm)
<u>Αλκάνια</u>		<u>Αλκυλαλογονίδια</u>	
Κυκλοπροπάνια	0-8	CH ₃ X	5-25
Κυκλοαλκάνια	5-25	RCH ₂ X	5-38
R-CH ₃	5-25	R ₂ CHX	30-62
R-CH ₂ -R	22-45	R ₃ CX	35-75
R ₂ CH-R	30-58		
R ₃ C-R	28-50		
<u>Αλκένια</u>	100-143	<u>Καρβοξυλικά οξέα</u>	
(>C=C<)		R-COOR	160-177
		R-COOH	162-183

Ισομερή εξανίου

- Εσωτερικοί 1^{ταγεις} και 2^{ταγεις} C : 25-45 ppm
- Τελικές μη διακλαδισμένες ομάδες: πολύ προστατευμένοι C



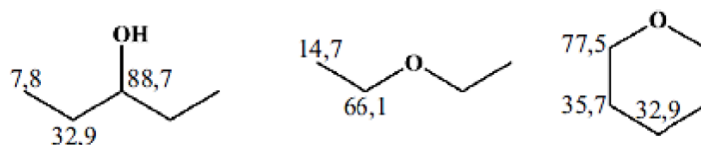


^{13}C Chemical shift

^{13}C NMR chemical shifts influenced by electronegative atoms (oxygen/halogens)

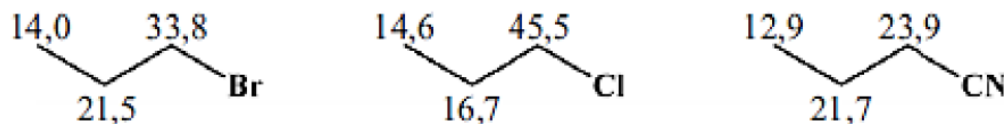
1. Oxygen (O)

The presence of an electronegative oxygen atom **deshields the α -carbon**, shifting its resonance to **65–90 ppm**.



2. Halogens (F, Cl, Br, I)

- Unpredictable effects:** Halogens exhibit complex electronic interactions (inductive vs. resonance effects).
- Directly bonded carbons:** Shifted to **30–50 ppm** due to deshielding.
Example: Chloromethane ($\text{CH}_3\text{-Cl}$) has its carbon at ~ 35 ppm.
- Non-additive interactions:** Multiple halogens cause **non-linear shifts** (not a simple sum of individual effects).



3. Shielding in Multiple Substitutions

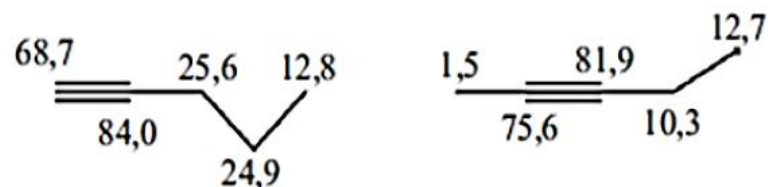
- In **polyhalogenated compounds**, steric crowding or electron delocalization may lead to unexpected **shielding** (upfield shifts).
1. Example: In CFCl_3 , the carbon appears at ~ 110 ppm (unusually downfield due to cumulative electronegativity).



^{13}C NMR Characteristics of Alkynes

1. Chemical Shift Range:

1. The **sp-hybridized carbons** of alkynes resonate at **65–85 ppm** (*Example:* The terminal carbon of 1-hexyne ($\equiv\text{CH}$) appears at ~ 67 ppm, while internal alkynes (e.g., $\text{RC}\equiv\text{CR}'$) appear at ~ 75 –85 ppm.



2. Strong Shielding Effect:

1. Alkynes **shield adjacent carbons** (α -carbons) due to the **cylindrical π -electron cloud** of the triple bond, which circulates to oppose the external magnetic field and move α -carbons **upfield** (lower ppm) compared to alkenes or alkanes.

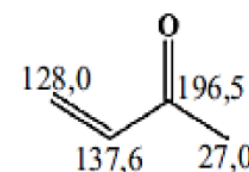
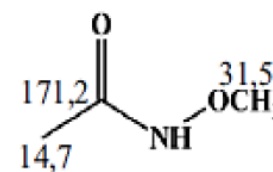
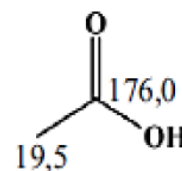
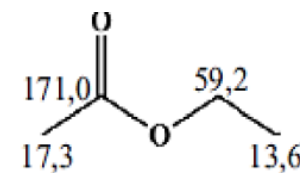
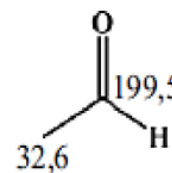
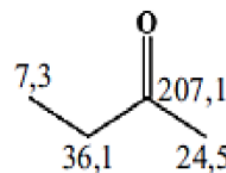


^{13}C Chemical shift

^{13}C NMR of Carbonyl Groups ($\text{C}=\text{O}$)

1. Deshielded Chemical Shift:

1. Carbonyl carbons are highly **deshielded** due to the strong electron-withdrawing effect of the oxygen.
2. They resonate in the range **170–210 ppm**, depending on the type of carbonyl:
 1. **Aldehydes/Ketones**: ~190–210 ppm
 2. **Esters/Amides**: ~160–180 ppm
 3. **Carboxylic Acids**: ~170–185 ppm



2. Weak Signal Intensity:

1. Carbonyl carbons typically show **lower peak intensity** in standard ^{13}C NMR spectra because:
 1. They lack directly attached protons (H), which are crucial for the **Nuclear Overhauser Effect (NOE)**—a mechanism that enhances signal intensity in ^1H -coupled spectra.
 2. Their **long relaxation times (T_1)** reduce sensitivity.



^{13}C NMR of Aromatic Carbons

1. Chemical Shift Range:

1. Aromatic carbons typically resonate in the **120–140 ppm** region.

2. *Substituent Effects*:

1. **Electron-withdrawing groups**

(e.g., NO_2 , COOH) shift carbons **downfield** (higher ppm).

2. **Electron-donating groups** (e.g., OCH_3 , CH_3) shift carbons **upfield** (lower ppm).

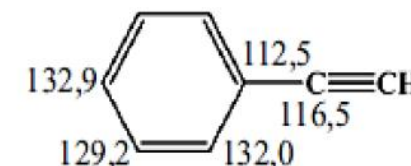
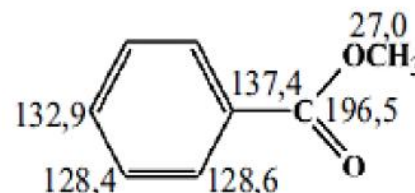
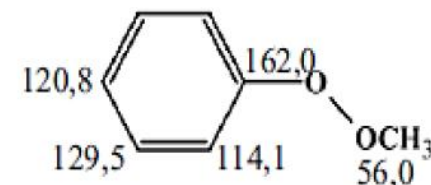
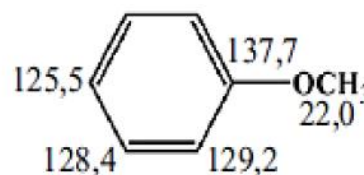
2. Signal Intensity Differences:

1. **Substituted carbons** (directly bonded to a substituent) often show **lower intensity** due to:

1. **Lack of attached protons** (reduced NOE enhancement).

2. **Longer relaxation times (T_1)** compared to unsubstituted carbons.

2. **Unsubstituted carbons** (with attached protons) appear stronger.





DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

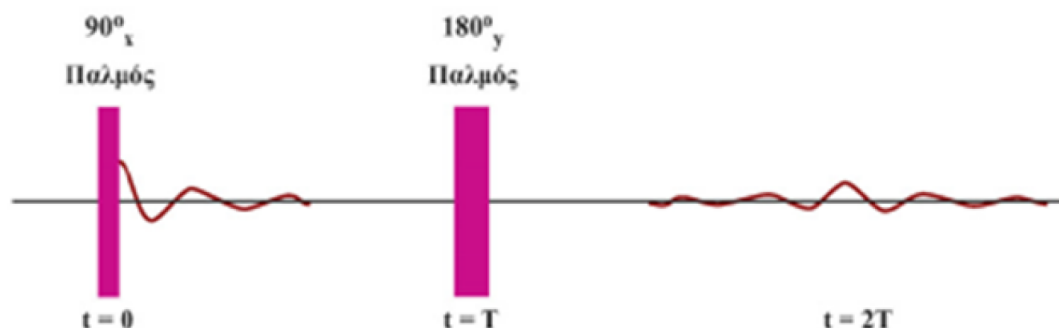
A Powerful Tool for Carbon-Type Differentiation

Principle of DEPT

- **Purpose:** Distinguish **CH₃**, **CH₂**, **CH**, and **C_q (quaternary)** carbons in a single experiment.
- **Mechanism:** Uses **polarization transfer** from ¹H to ¹³C via carefully timed RF pulses, enhancing sensitivity and editing signals based on protonation.

Pulse Sequence & Spin Echo

- **¹H Excitation:** Initial pulse creates coherence.
- **Polarization Transfer:** J-coupling transfers magnetization to ¹³C.
- **Variable ¹H Pulse Angle (θ):**
 - $\theta = 45^\circ$: All CH_n signals appear (CH, CH₂, CH₃).
 - $\theta = 90^\circ$: Only **CH** peaks visible.
 - $\theta = 135^\circ$: **CH/CH₃** ↑ (positive), **CH₂** ↓ (negative).
- **Spin Echo:** Refocuses chemical shifts, removes artifacts.





DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) A Powerful Tool for Carbon-Type Differentiation

DEPT Mode

DEPT-135

DEPT-90

DEPT-45

Visible Carbons

CH/CH₃ (+) , CH₂ (-)

CH only

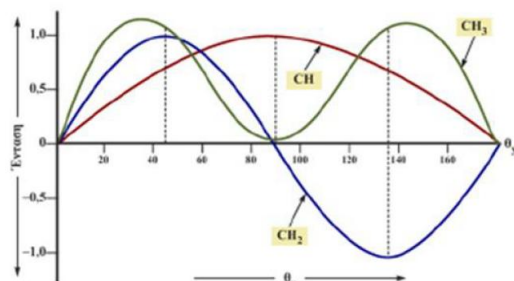
CH, CH₂, CH₃

Peak Phase

Mixed

Positive

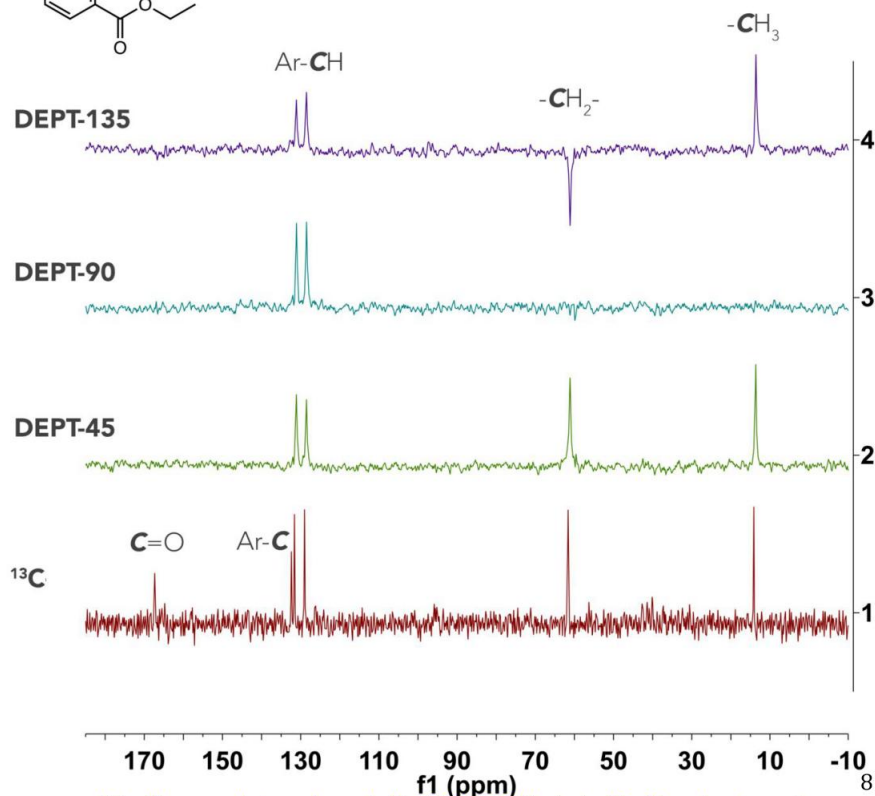
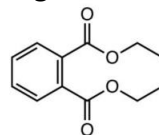
All positive



DEPT C-13 NMR Spectra

(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT Spectroscopy))

Type	C	CH	CH ₂	CH ₃
135°	0	+	-	+
90°	0	+	0	0
45°	0	+	+	+
Normal	+	+	+	+

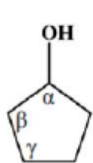




13C Chemical shift

Άσκηση

1) Με χρήση των πινάκων Π1 και Π2, να προβλέψετε τη χημική μετατόπιση των ανθράκων της κυκλοπεντανόλης.



Σύμφωνα με τους πίνακες	Παρατηρούμενες
$\delta(\alpha) = 25,6 + 41 = 66,6$	73,3
$\delta(\beta) = 25,6 + 8 = 33,6$	33,6
$\delta(\gamma) = 25,6 + (-5) = 20,6$	20,6

¹³C Χημικές μετατοπίσεις ορισμένων αλκανίων και κυκλοαλκανίων.

Όνομα	C1	C2	C3
μεθάνιο	-2,3		
αιθάνιο	5,7		
προπάνιο	15,8	16,3	
βουτάνιο	13,4	25,2	
πεντάνιο	13,9	22,8	34,7
εξάνιο	14,1	23,1	32,2
κυκλοπροπάνιο	-3,5		
κυκλοβουτάνιο	22,4		
κυκλοπεντάνιο	25,6		
κυκλοεξάνιο	26,9		
κυκλοεπτάνιο	28,4		
κυκλοοκτάνιο	26,9		

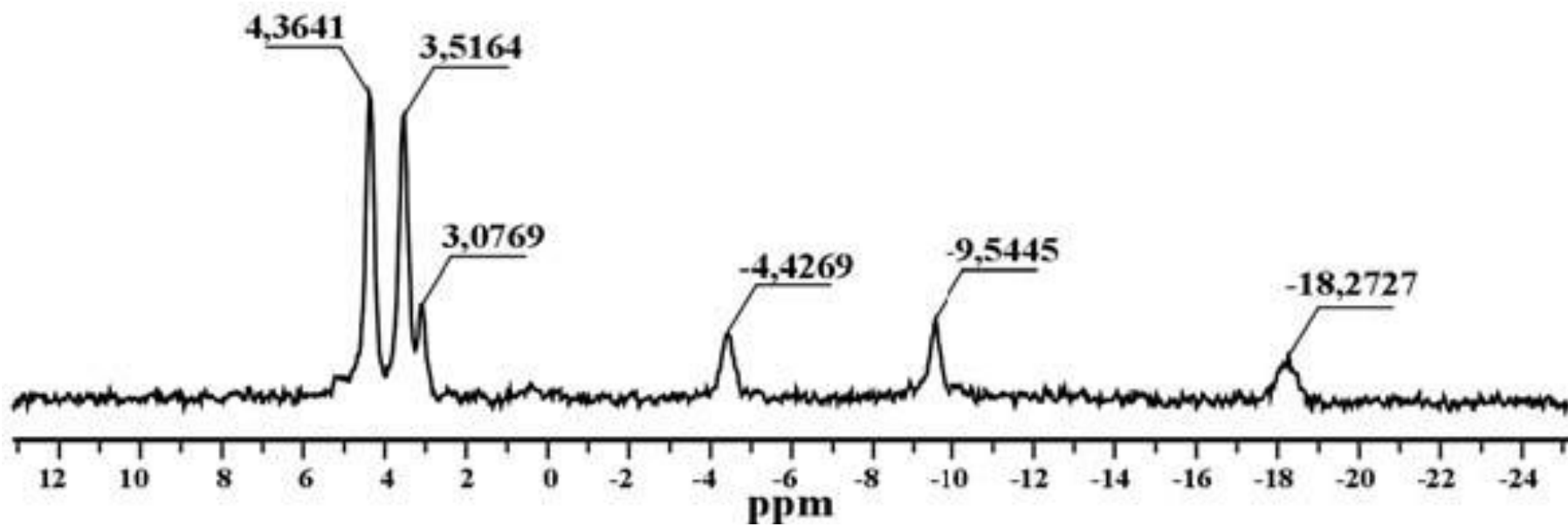
¹³C Χημικές μετατοπίσεις σε συνάρτηση με τον υποκαταστάτη.

X	Τελικός X X-Cα-Cβ-Cγ			Εσωτερικός X Cα-Cβ-Cα(X)-Cβ-Cγ		
	α	β	γ	α	β	γ
-F	68	9	-4	63	6	-1
-NO ₂	63	4		57	4	
-OR	58	8	-4	51	5	-4
-OC(=O)R	51	6	-3	45	5	-3
-OH	48	10	-5	41	8	-5
-NR ₂	42	6	-3			
-NHR	37	8	-4	31	6	-4
-C(=O)Cl	33			28	2	
-Cl	31	11	-4	32	10	-4
-C(=O)H		31	-2	0		-2
-C(=O)R	30	1	-2	24	1	-2
-NH ₂	29	11	-5	24	10	-5
-NH ₃ ⁺	26	8	-5	24	6	-5
-C(=O)O-	25	5	-2	20	3	-2
-φαινυλ	23	9	-2	17	7	-2
-C(=O)NH ₂	22		-0,5	2,5		-0,5
-C(=O)OH	21	3	-2	16	2	-2
--CH=CH ₂	20	6	-0,5			
-C(=O)OR	20	3	-2	17	2	-2
-Br	20	11	-3	25	10	-3
-SR	20	7	-3			
-SH	11	12	-4	11	11	-4
-CH ₃	9	10	-2	6	8	-2
-CoCH	4,5	5,5	-3,5			
-C=N	4	3	-3	1	3	-3
-I	-6	11	-1	4	12	-1



31P Chemical shift

Chemical shifts positive and negative scale





1. Chemical Shift δ (ppm) – Χημική Μετατόπιση δ (ppm)
2. Coupling Constant J (Hz) – Σταθερά Σύζευξης J (Hz)
3. Integrals – Εμβαδό κορυφών συντονισμού





ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H NMR 1D

2. Αριθμός γειτονικών πυρήνων ^1H

ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ ΚΟΡΥΦΗΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ-Σταθερά σύζευξης J

Κανόνας n+1

TABLE 8.1 Pascal's Triangle (Coefficients of the Binomial Distribution)

<i>n</i>	<i>n</i> +1	Intensity Ratio	Multiplicity	Multiplet
0	1	1	1	Singlet
1	2	1 1	2	Doublet
2	3	1 2 1	3	Triplet
3	4	1 3 3 1	4	Quartet
4	5	1 4 6 4 1	5	Quintet
5	6	1 5 10 10 5 1	6	Sextet



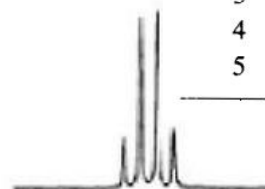
singlet



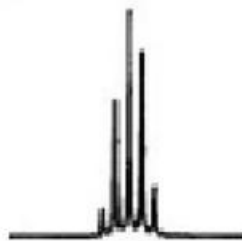
doublet



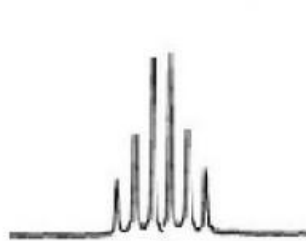
triplet



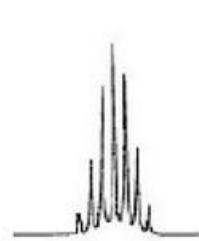
quartet



quintet



sextet



septet



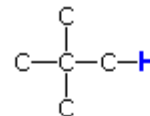


Σταθερά σύζευξης πυρηνικών spin (J)

Multiplicity

Relative Line Intensity

No Coupled
Hydrogens



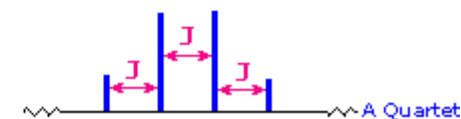
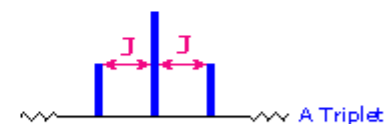
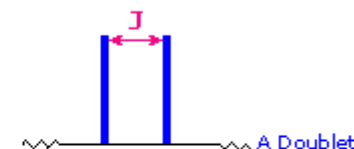
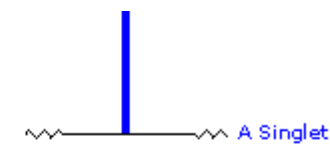
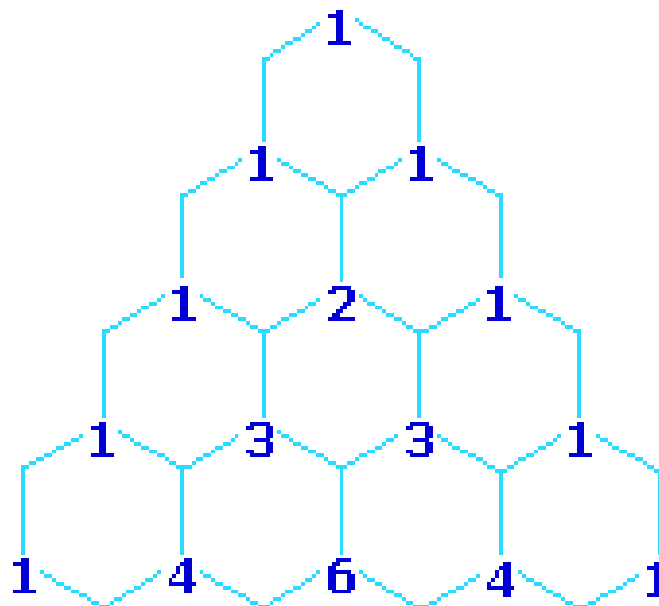
singlet

doublet

triplet

quartet

quintet



Spin-spin coupling

The interaction (coupling) between the spins of neighboring magnetic nuclei, which is transmitted through the spins of the bonding electrons, is called *spin-spin coupling* and is expressed by the **coupling constant J** (in Hz).

The intensities of the peaks are not random — they relate to the number of hydrogens.

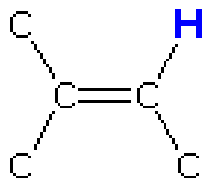
They are described by **Pascal's triangle**.



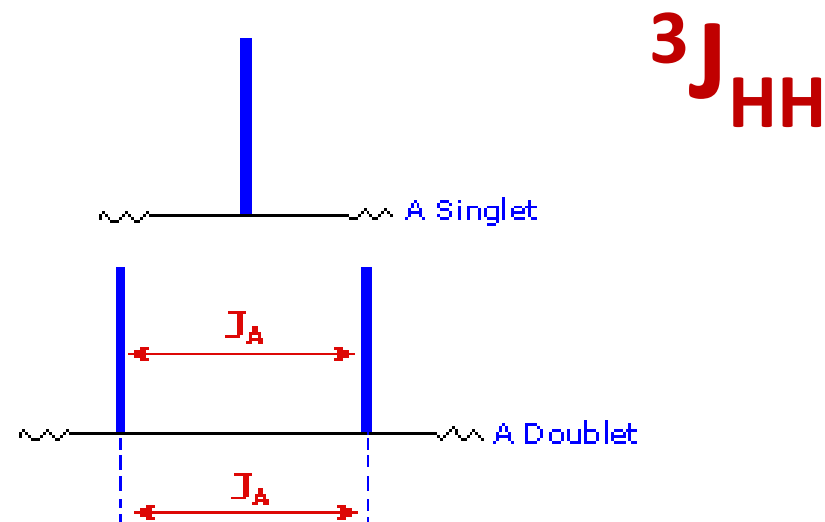
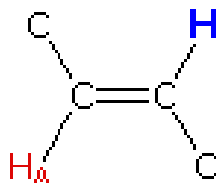
Coupling Constant J

Σύζευξη πυρηνικών spin / Σχάση / Spin-spin coupling

No Coupled
Hydrogens

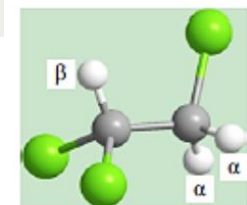


One Coupled
Hydrogen



H_A is affected by:

- B_0
- a smaller magnetic field due to proximity to the H_B (H_B nuclei parallel and antiparallel of B_0 , doublet)



H_B is affected by:

- B_0
- a smaller magnetic field due to proximity to the H_A (H_A nuclei parallel and antiparallel of B_0 , triplet)



Σύζευξη πυρηνικών spin / Σχάση / Spin-spin coupling

Through-Bond Interaction (J-Coupling):

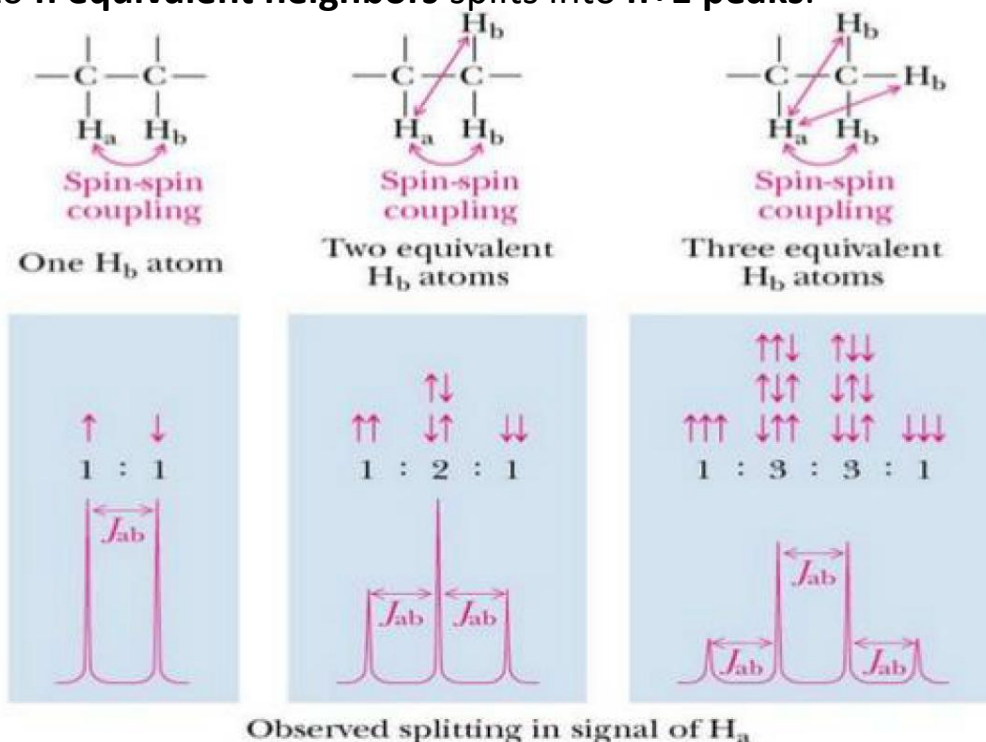
Nuclei (e.g., ^1H or ^{13}C) with spins aligned **with/against** the magnetic field alter the electron distribution in intervening bonds, creates slight shifts in the effective field sensed by neighboring nuclei, causing **peak splitting**

Distance Dependence:

1. ^1H - ^1H Coupling: Strongest over **3 bonds** (e.g., vicinal coupling in $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$).
2. **Long-range coupling** (≥ 4 bonds) is weak but observable in rigid systems (e.g., aromatics).

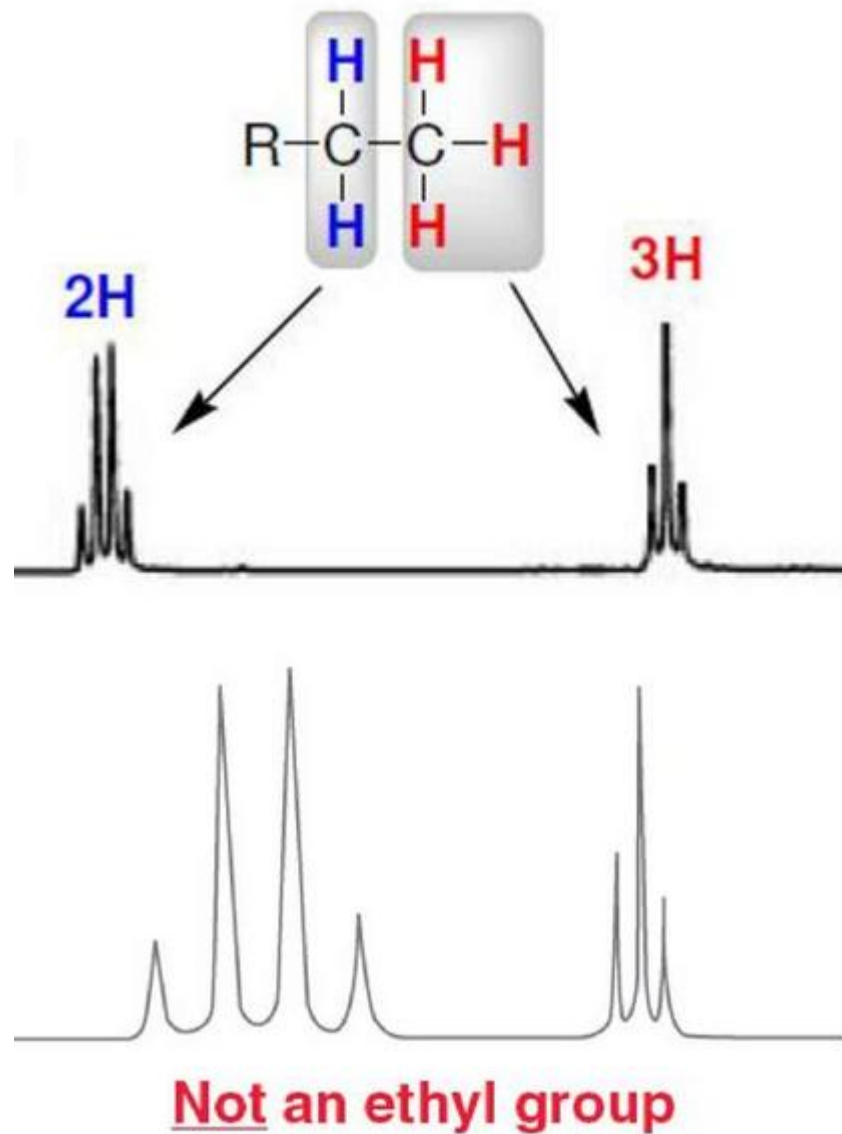
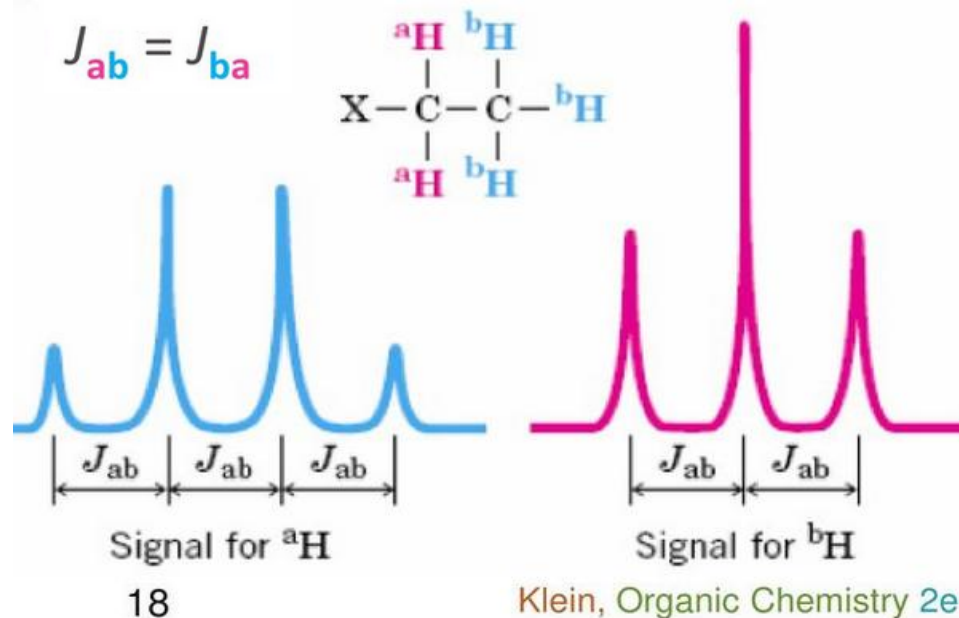
n+1 Rule:

A nucleus coupled to **n equivalent neighbors** splits into **n+1 peaks**.



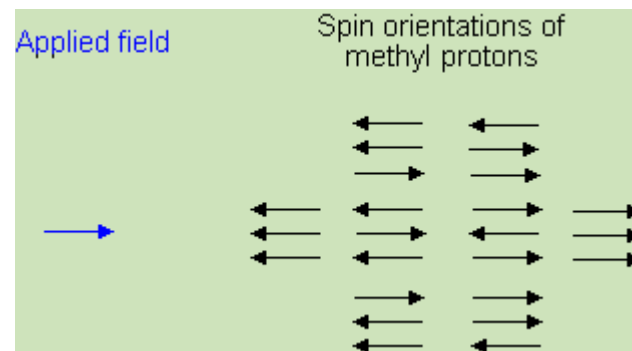
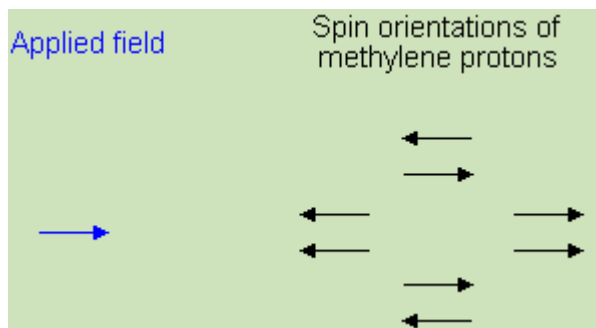
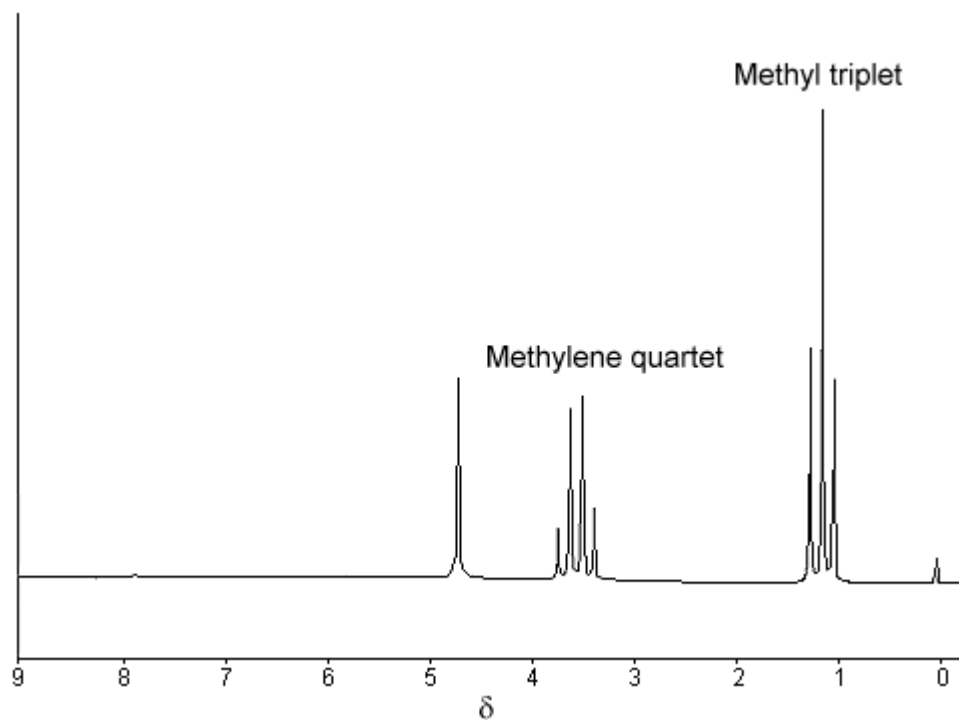


Coupling Constant J





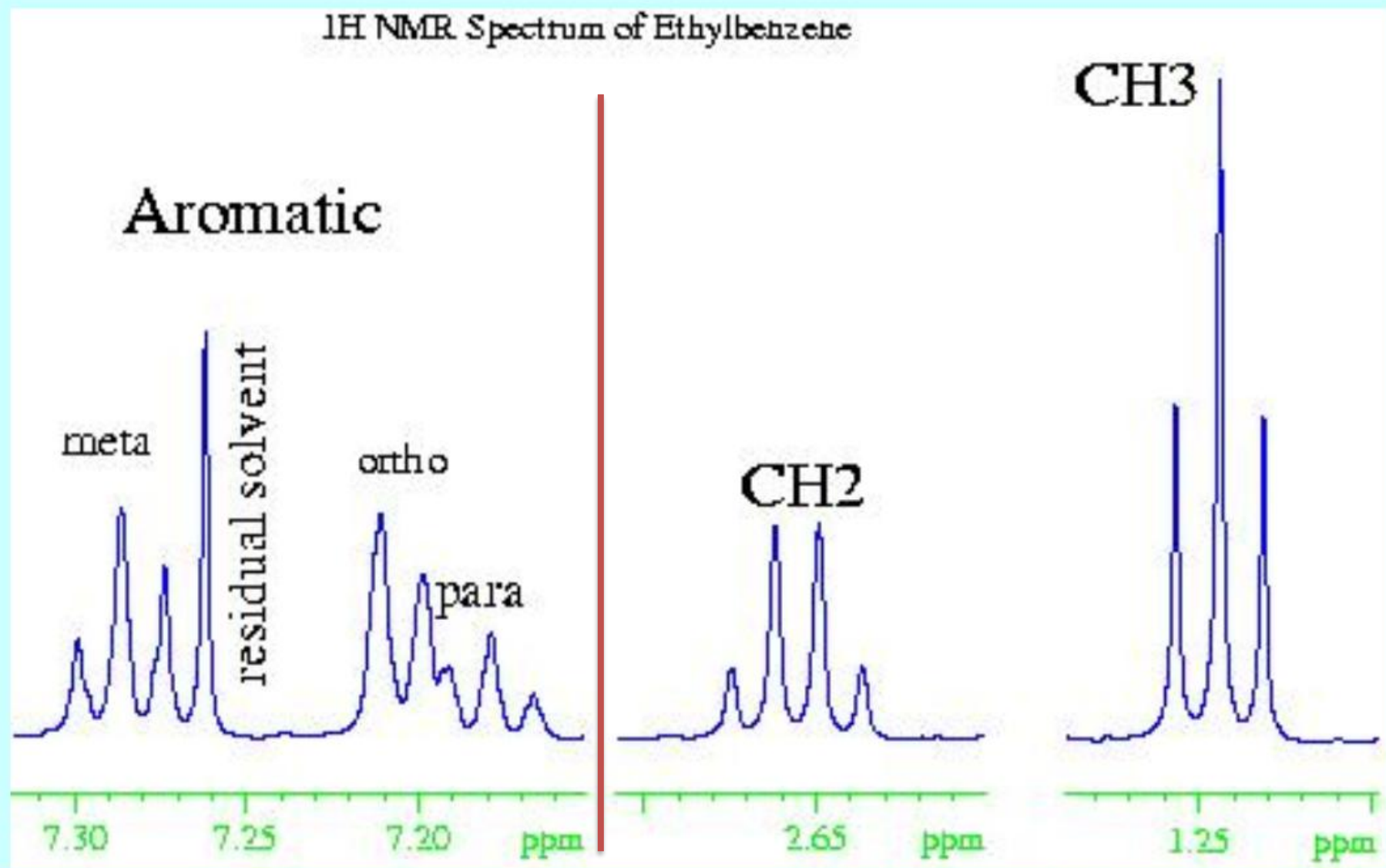
Coupling Constant J





Coupling Constant J

Fig. 6. Couplings in the ethylbenzene spectrum



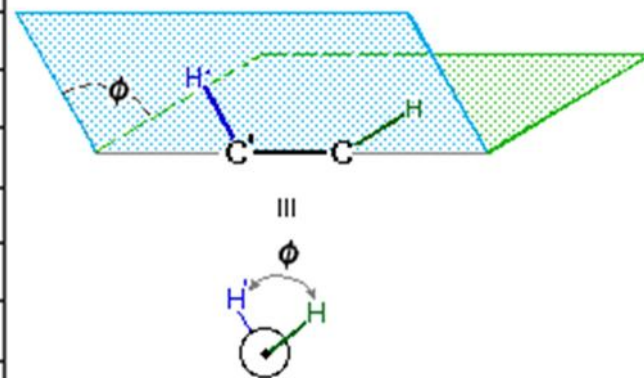
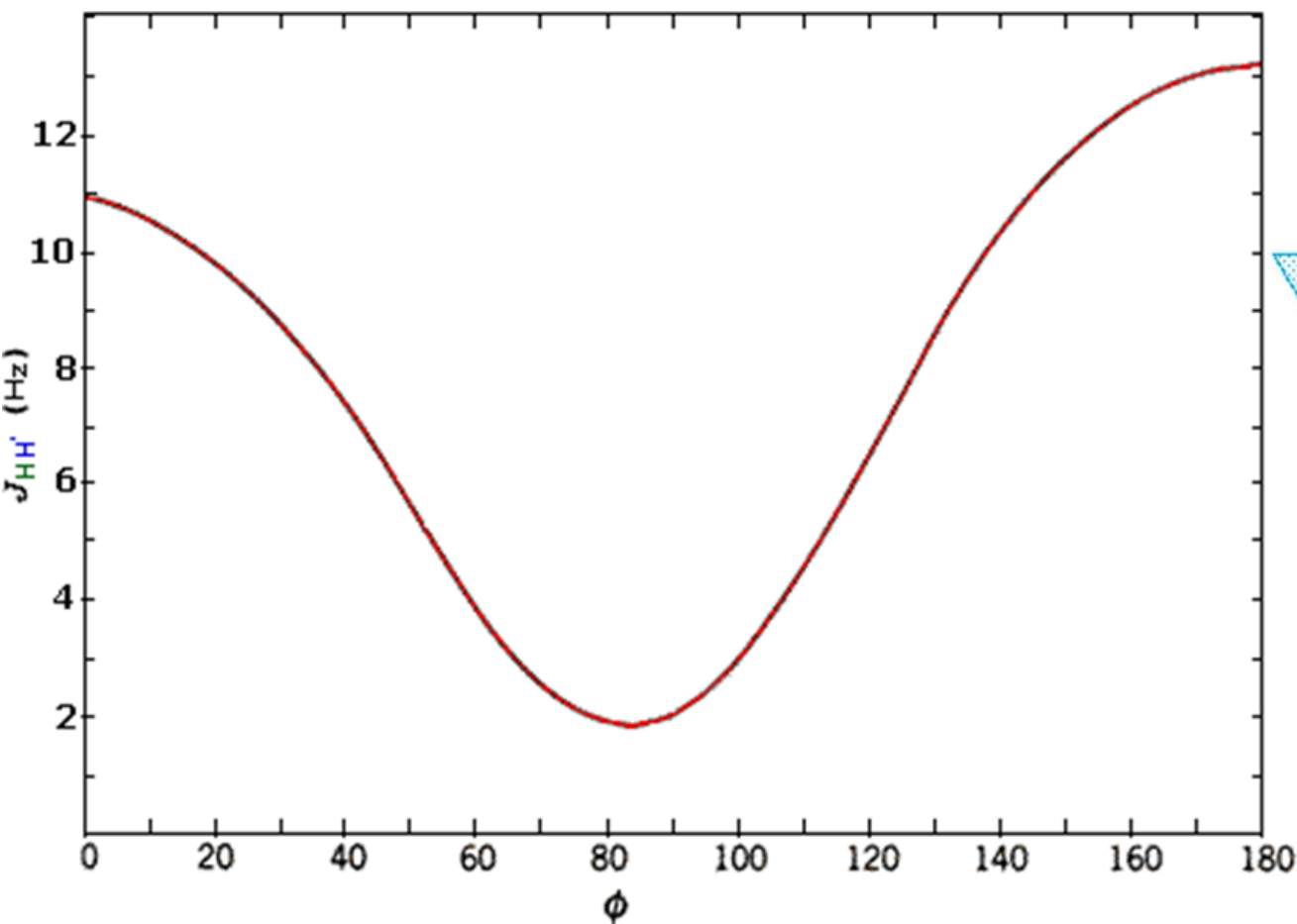


Coupling Constant J

The coupling constant provides information about the geometry of the molecule, such as the dihedral angle

$$J = A + B\cos\varphi + C\cos 2\varphi$$

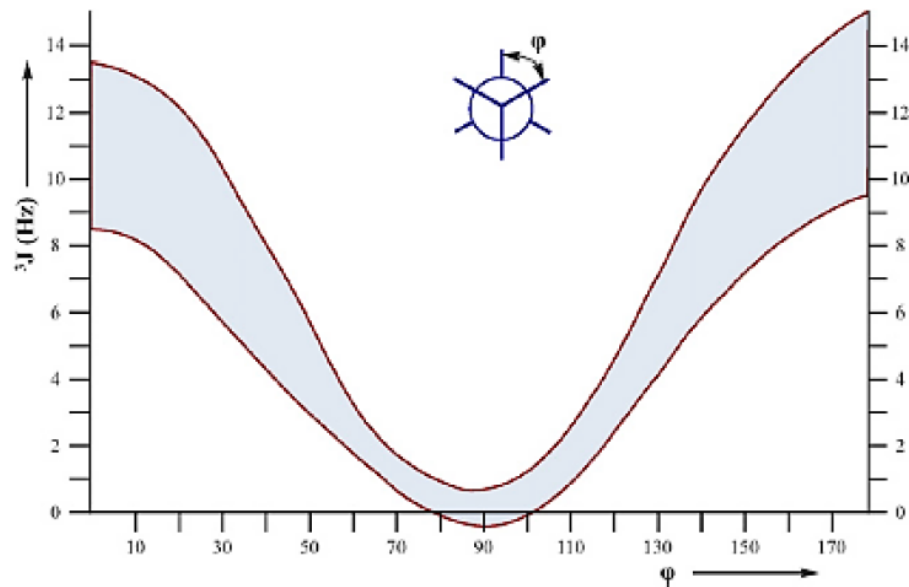
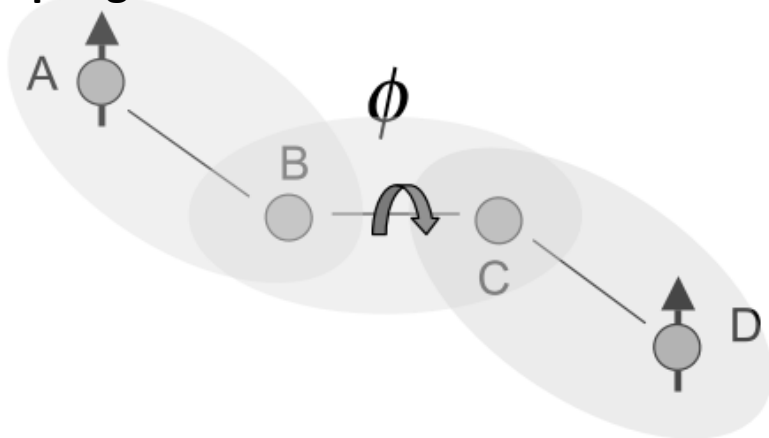
Karplus Equation





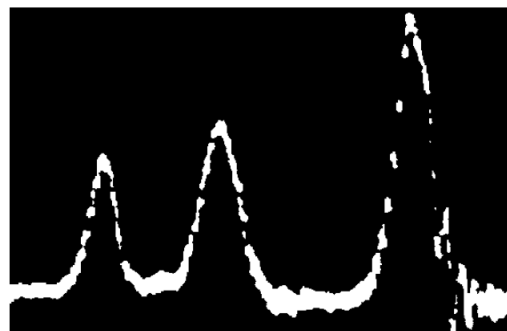
Coupling Constant J

- A dihedral angle of **0° or 180°** typically results in a **large coupling constant**.
- A dihedral angle of **90°** results in a **small coupling constant**.



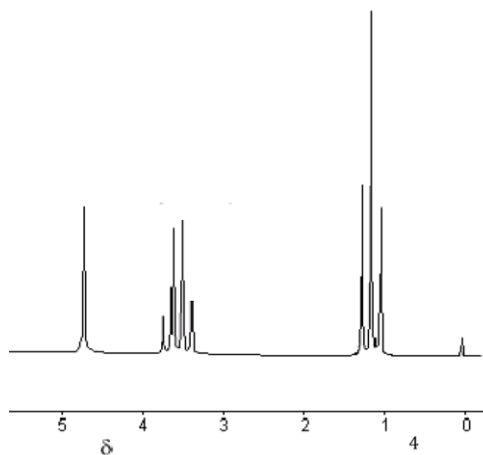
$$^3J = A \cos^2(\phi) + B \cos(\phi) + C$$

Karplus equation



CH₃CH₂OH

Φάσμα ¹H NMR της αιθανόλης (40 MHz)



High Resolution NMR!!!



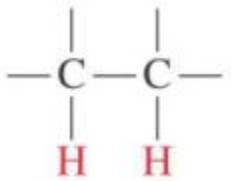
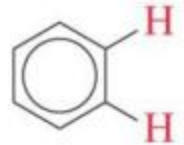
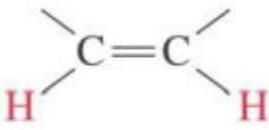
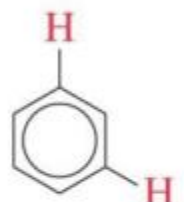
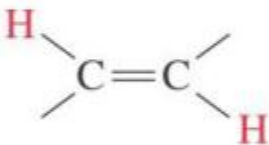
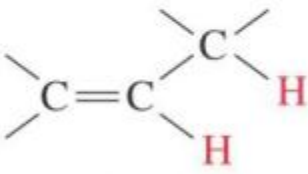
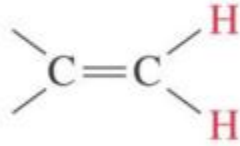
Coupling Constant J

- Nuclear spin-spin coupling constant (J):**

The distance between the peaks of the signal

It is measured in Hz (typically 0-18).

It depends on the stereochemistry of the molecule

<u>Approx. J</u>			<u>Approx. J</u>		
	(free rotation)	7 Hz ^a		(ortho)	8 Hz
	(cis)	10 Hz		(meta)	2 Hz
	(trans)	15 Hz		(allylic)	6 Hz
	(geminal)	2 Hz			

^aThe value of 7 Hz in an alkyl group is averaged for rapid rotation about the carbon-carbon bond. If rotation is hindered by a ring or bulky groups, other splitting constants may be observed.

Copyright © 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

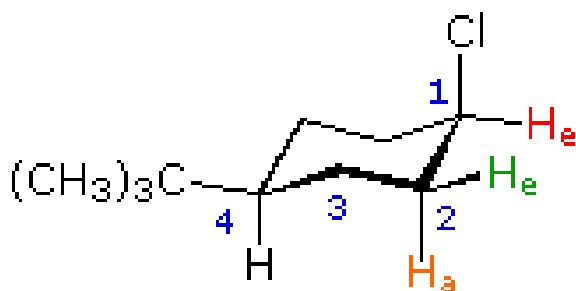
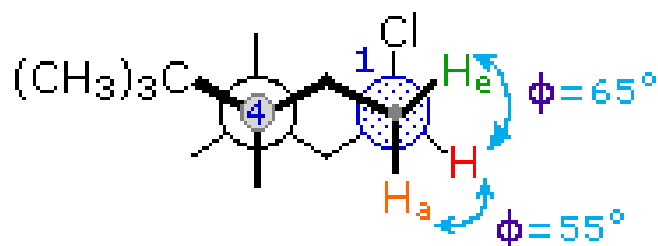


Coupling Constant J

The coupling constant provides important information about the **stereochemistry** of the molecule, such as:

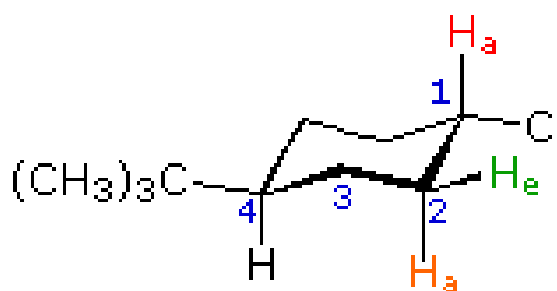
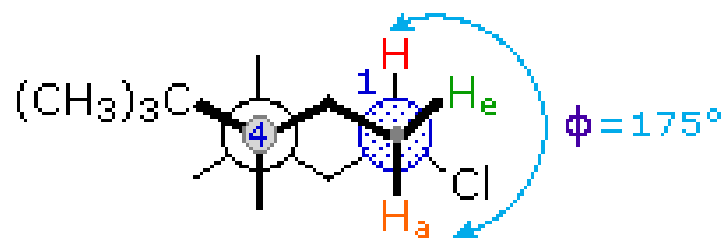
- The **dihedral angle** between coupled protons (via the Karplus equation).
- The **number of bonds** between the coupled nuclei (e.g., geminal, vicinal, or long-range coupling).
- The **electronic environment** around the coupled nuclei.

Thus, **J** is a powerful tool for determining the **3D structure** and **conformation** of molecules.



$$J_{ee} = 3.5 \text{ Hz} \quad J_{ea} = 4.0 \text{ Hz}$$

cis-4-tert-butyl-1-chlorocyclohexane



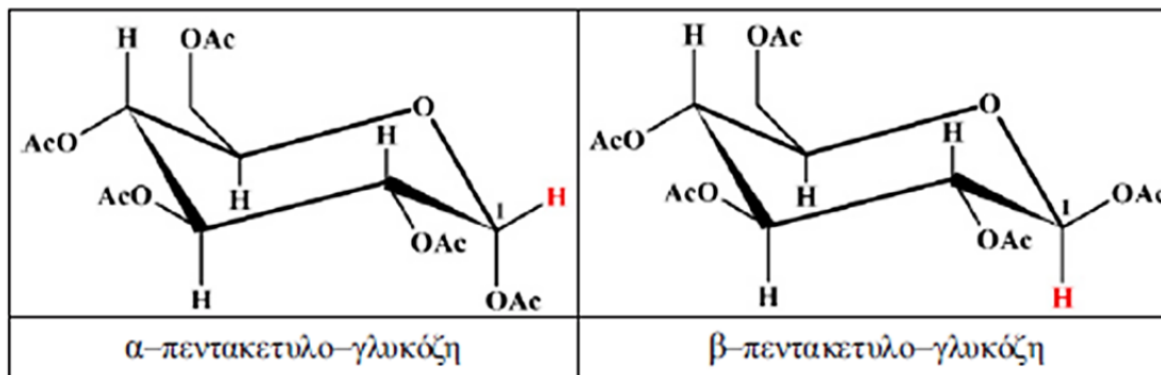
$$J_{aa} = 12.0 \text{ Hz}$$

trans-4-tert-butyl-1-chlorocyclohexane



Coupling Constant J

1 αξονικό και ένα
ισημερινό H



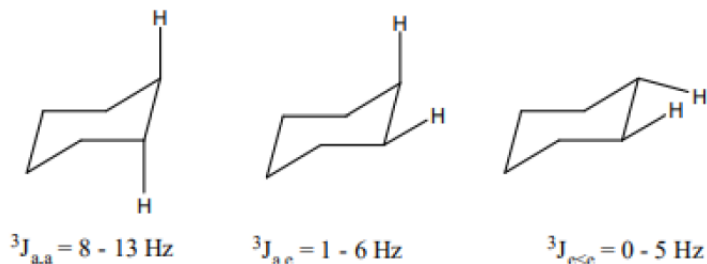
2 αξονικά H

$$J = 3.2 \text{ Hz}$$

Gauche θέση

$$J = 8 \text{ Hz}$$

Anti θέση

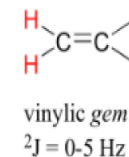
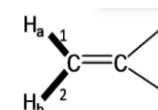
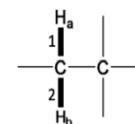




Coupling Constant J

❖ Δίδυμη σύζευξη (geminal coupling)
requires that the two hydrogens are
magnetically non-equivalent (restricted
rotation or asymmetric carbon adjacent to the
examined group)

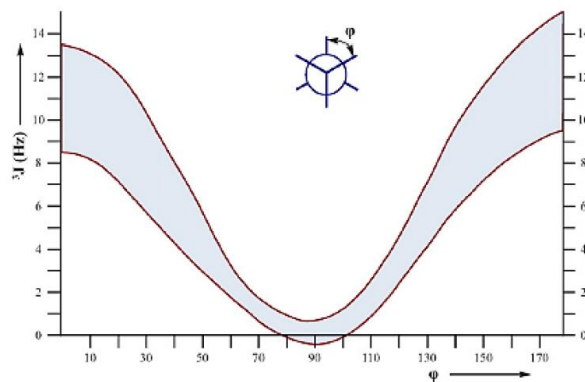
$$^2J_{sp_1} > ^2J_{sp_2} > ^2J_{sp_3}$$



- The two non-equivalent hydrogens on the same carbon ($H_a'-C-H_a$), which are separated by only **two bonds** (2J). The magnitude of the J value (in Hz) depends on the H-C-H angle ($105-125^\circ$)

❖ Γειτονική σύζευξη (vicinal: vic coupling)

- Refers to the **spin-spin interaction** between nuclei (typically protons) that are separated by **three bonds** (3J). (e.g., $H-C-C-H$). Often observed in **alkenes** (e.g., $H-C=C-H$) and **saturated systems** (e.g., $H-C-C-H$ in alkanes).



$$J(\phi) = \Gamma(\cos 2\phi) + B(\cos \phi) + A$$



$$\Theta = 0^\circ$$

$$^3J = 7-11 \text{ Hz}$$



$$\Theta = 60^\circ$$

$$^3J = 2-5 \text{ Hz}$$



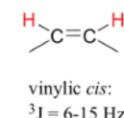
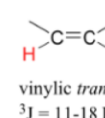
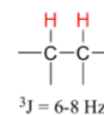
$$\Theta = 90^\circ$$

$$^3J = 0-2 \text{ Hz}$$



$$\Theta = 180^\circ$$

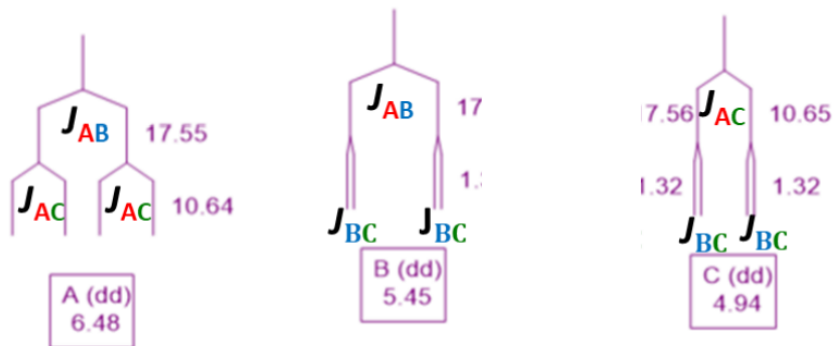
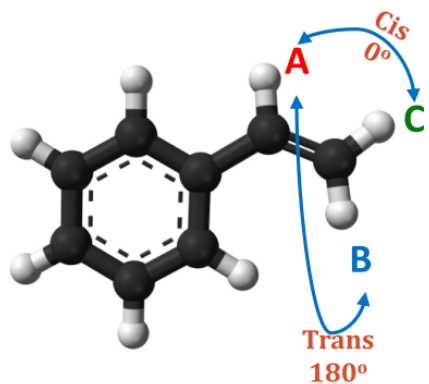
$$^3J = 8-15 \text{ Hz}$$





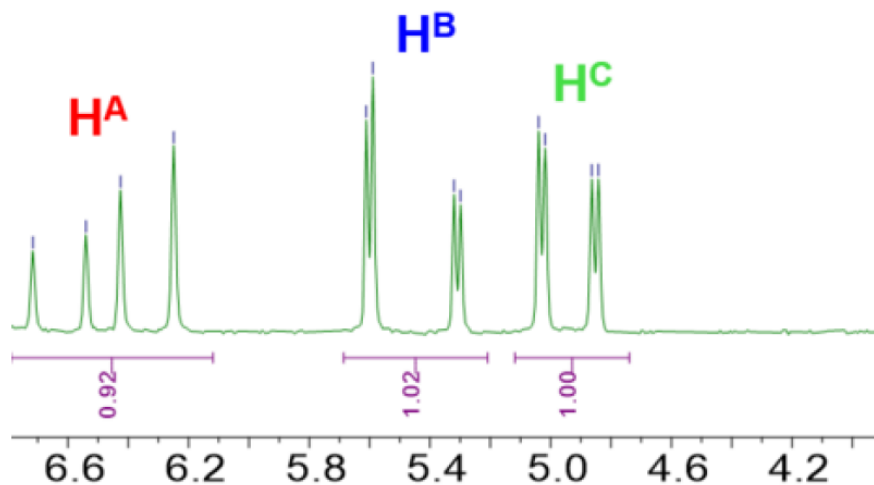
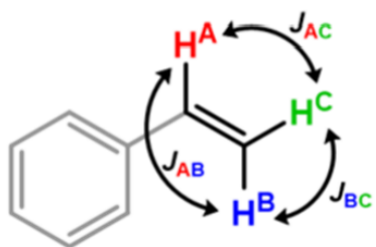
Coupling Constant J

Reality



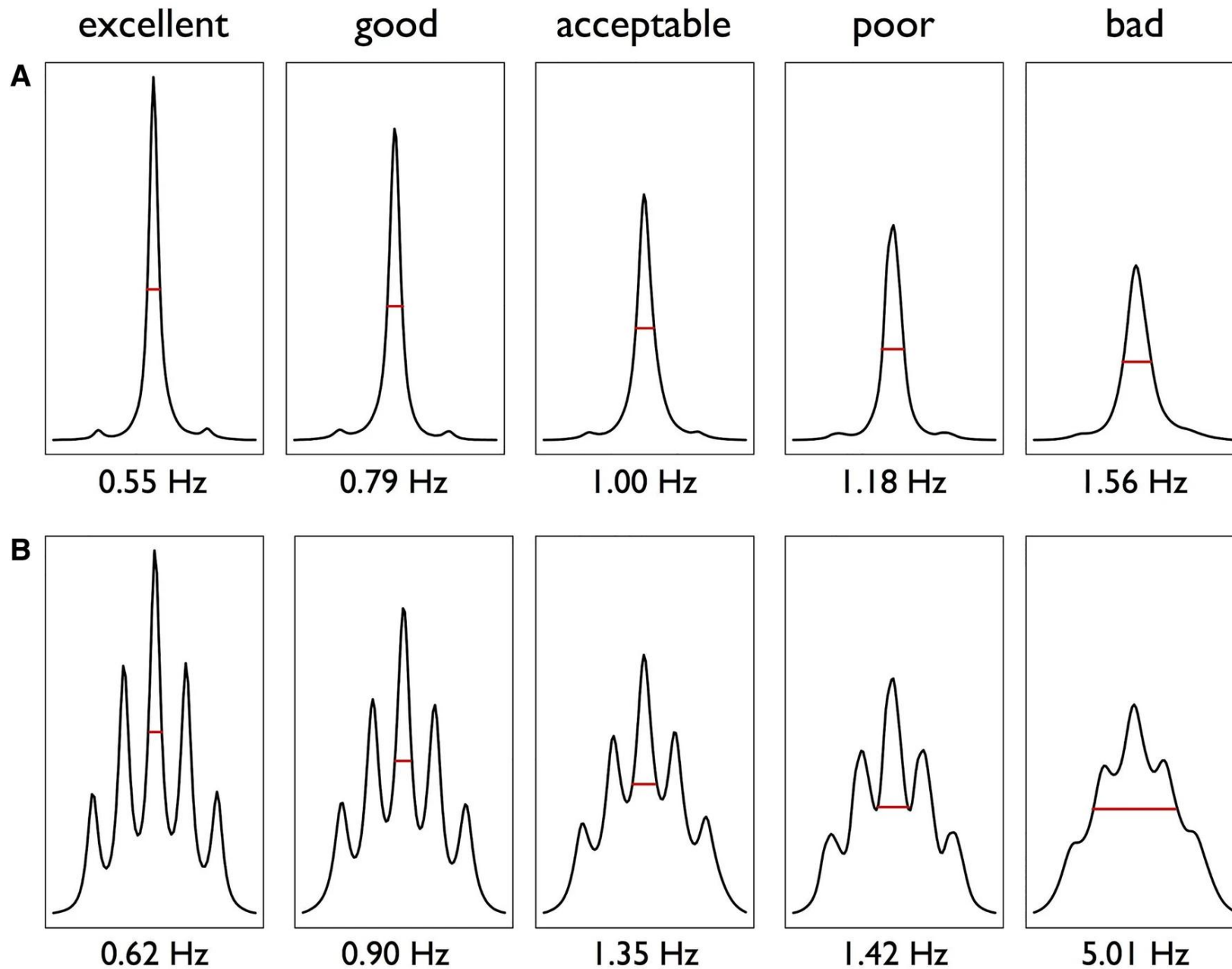
$$J_{AB} = 17 \text{ Hz}$$

$$J_{BC} = 1,4 \text{ Hz}$$





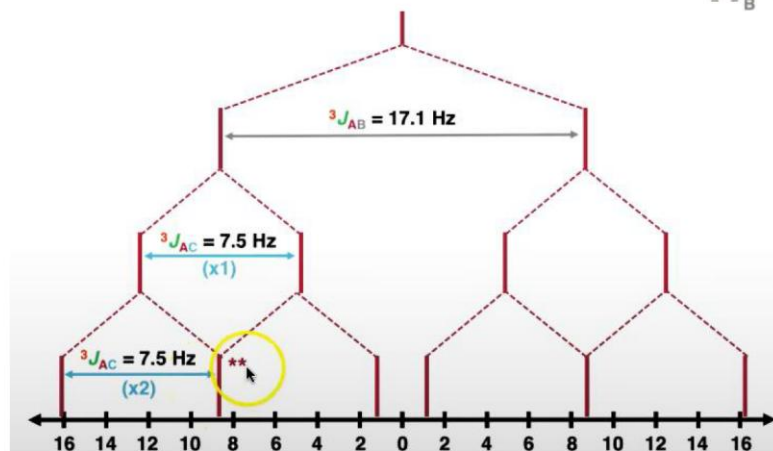
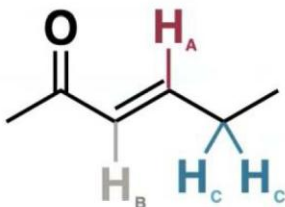
Coupling Constant J



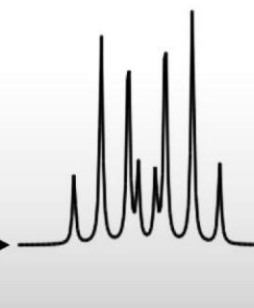
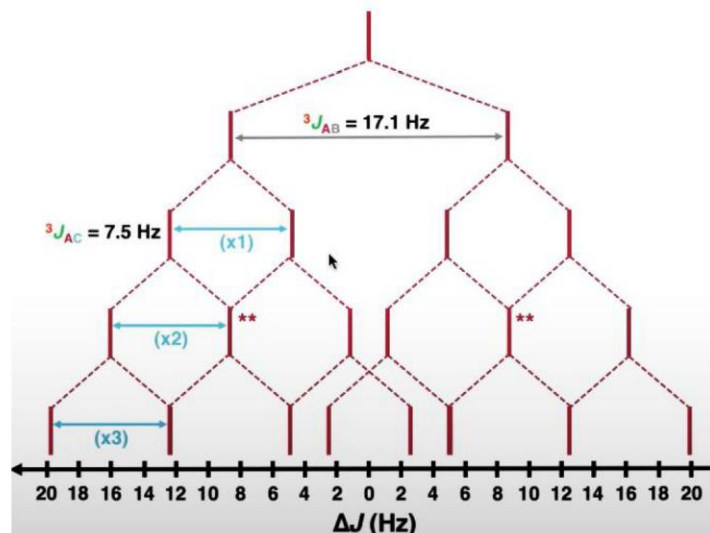
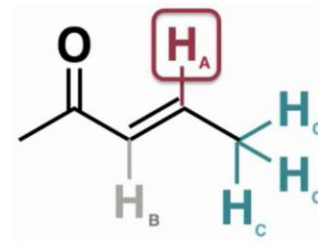


Coupling Constant J

H_A : δ_H 6.82 (1H, dt, $^3J_{AB} = 17.1$ Hz, $^3J_{AC} = 7.5$ Hz)

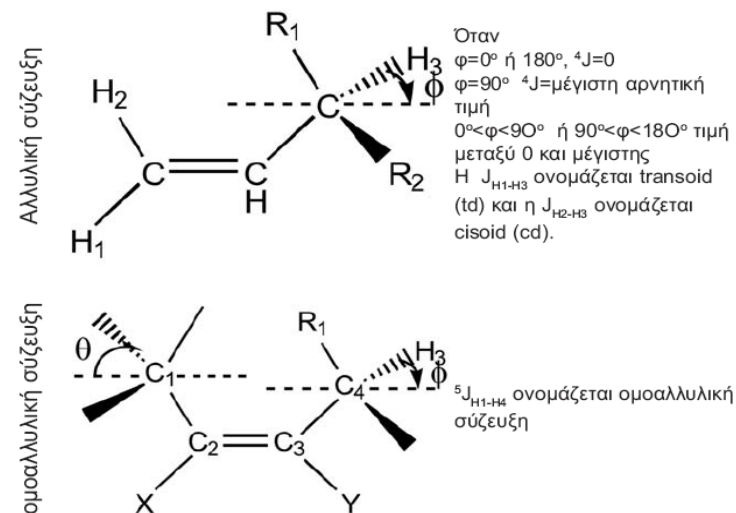
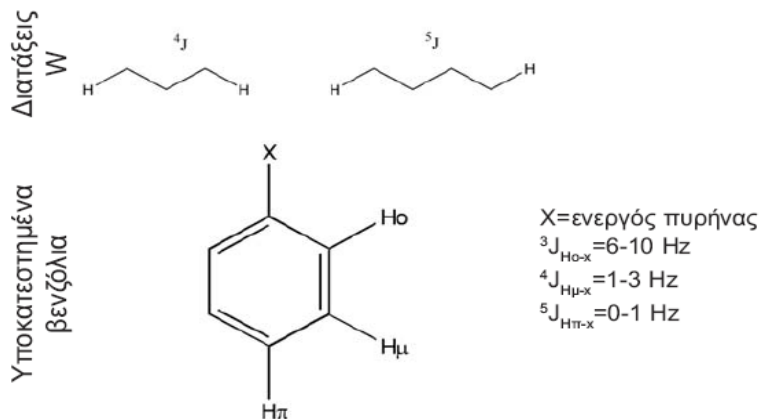


H_A : δ_H 6.82 (1H, dt, $^3J_{AB} = 17.1$ Hz, $^3J_{AC} = 7.5$ Hz)





Long range couplings 4J , 5J , W



1. Types of Long-Range Coupling

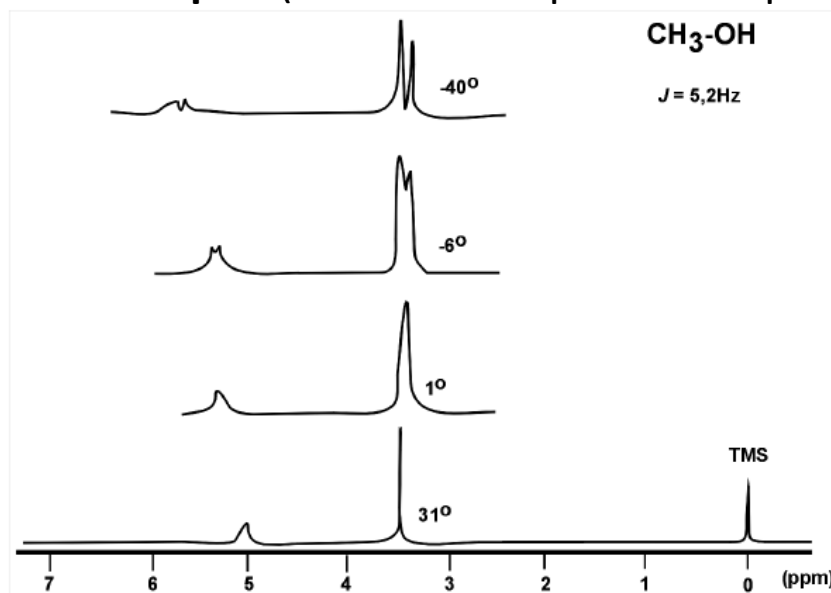
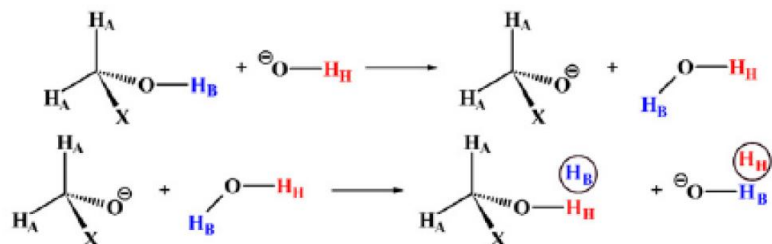
Coupling Type	Bonds Separated (nJ)	Typical Magnitude (Hz)	Structural Insight
4J (Allylic)	4 bonds (H-C=C-C-H)	0-3 Hz	Conformation of alkenes/rings
5J (Homoallylic)	5 bonds (H-C-C=C-C-H)	<1 Hz	Extended π -systems or rigid scaffolds
W-Coupling	4 bonds (H-C-C-C-H, W-shaped)	1-5 Hz	Stereochemistry of saturated rings (e.g., cyclohexanes)



Temperature and chemical exchange

The **-OH proton signal** in alcohols appears as:

- **A single, broad peak in impure solutions** (fast exchange).
 - **Proton hopping:** The -OH proton rapidly exchanges with protons from **water or other protic impurities**, averaging the spin environments.
 - **Result:** A single broad peak (lifetime too short to resolve coupling).
- **A triplet in ultra-pure, anhydrous samples** (slow exchange).
 - **No exchange:** The -OH proton remains on the alcohol molecule long enough to "see" the spin states of adjacent protons (e.g., -CH₂- in ethanol).
 - **Spin-spin coupling:** The -OH signal splits into a **triplet** (n+1 rule: couples to 2 equivalent -CH₂ protons).



Σχήμα 3.2.2. ¹H NMR φάσματα καθαρής μεθανόλης σε διάφορες θερμοκρασίες ($J_{\text{CH}_3\text{-OH}} = 5.2 \text{ Hz}$).



Coupling Constant J

Figure 1. Common ^1H NMR Peaks

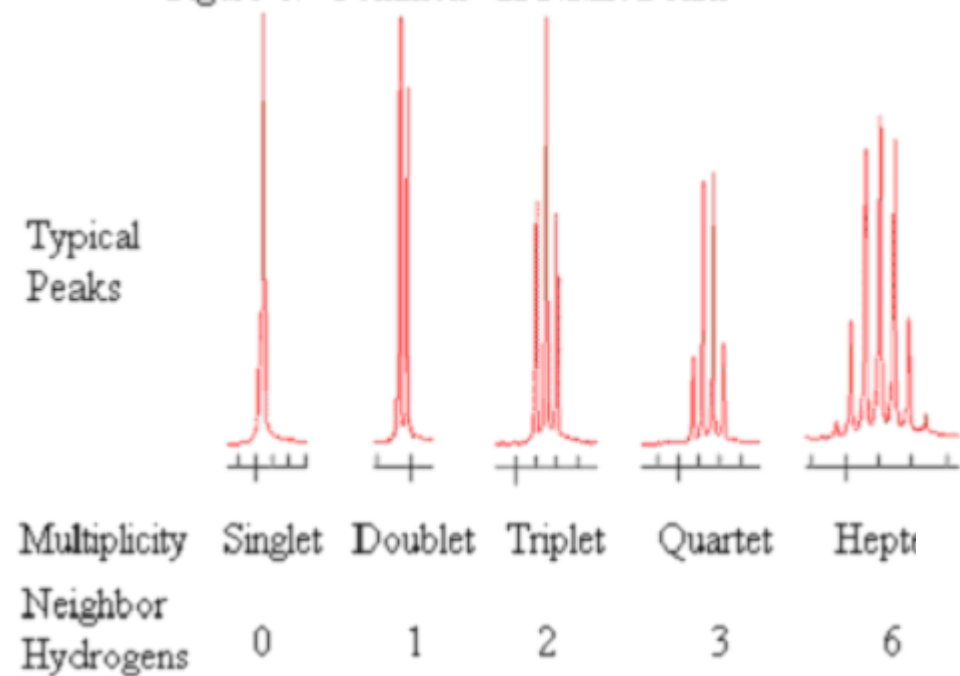
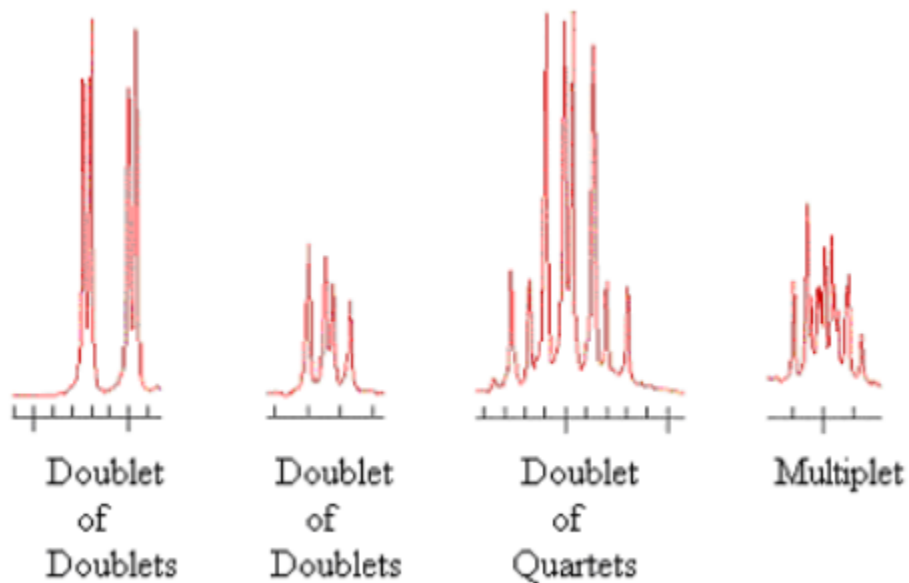


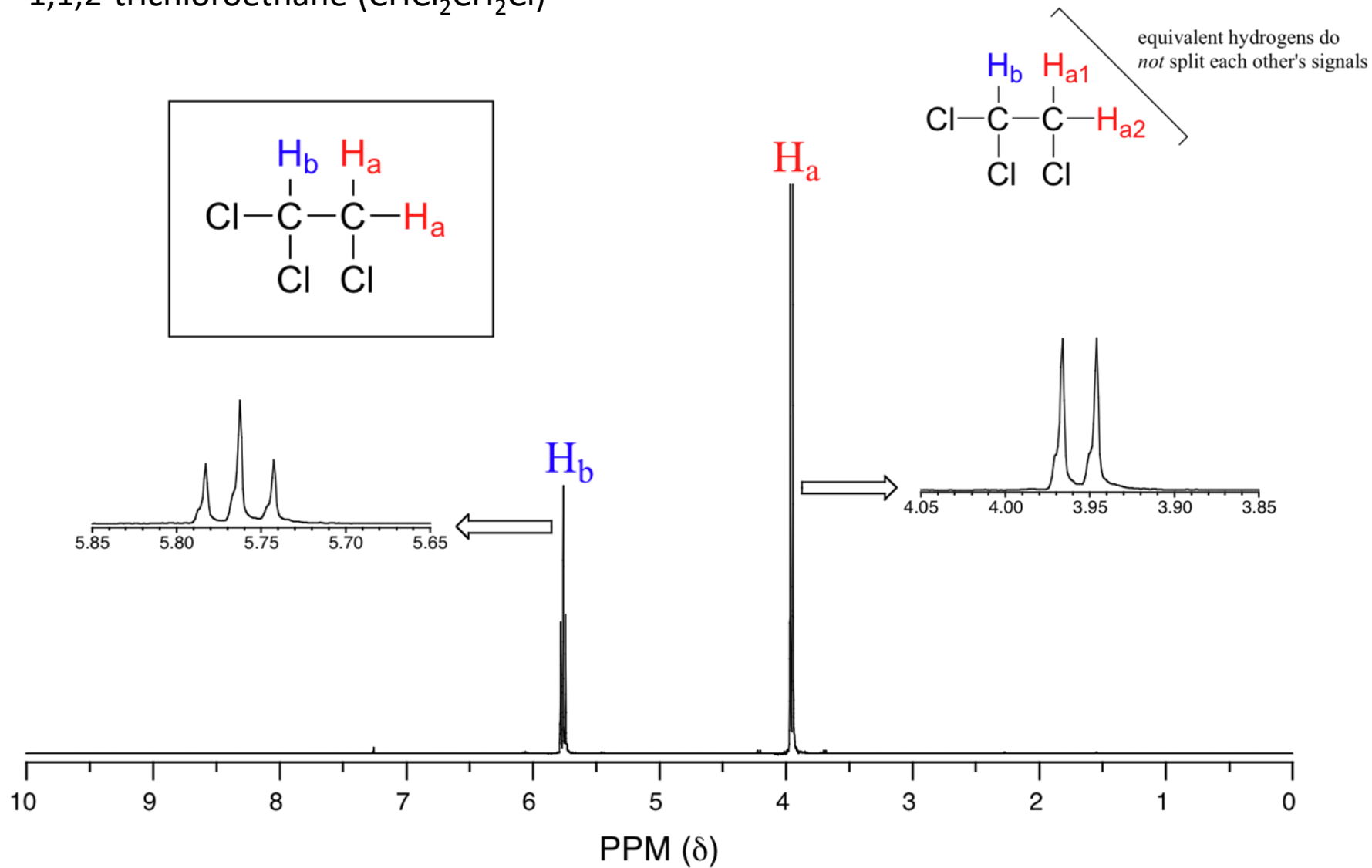
Figure 2. Some Complex Splitting Patterns





Coupling Constant J

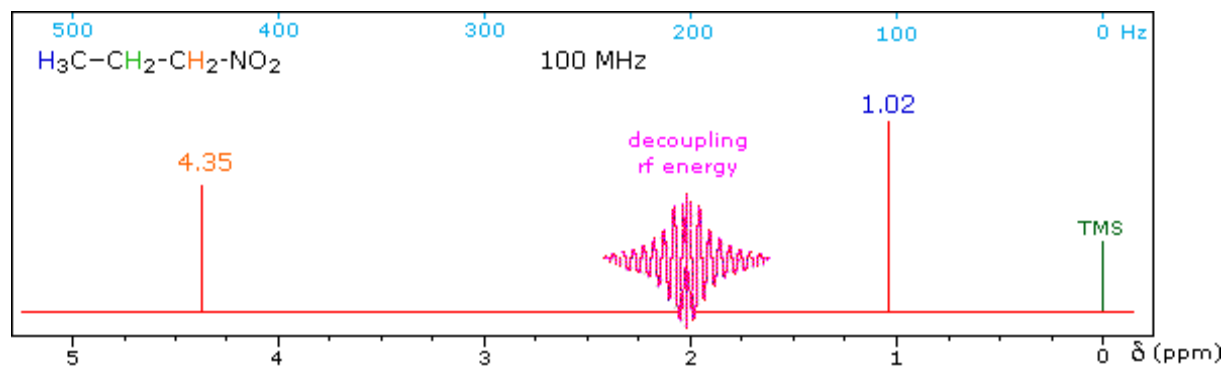
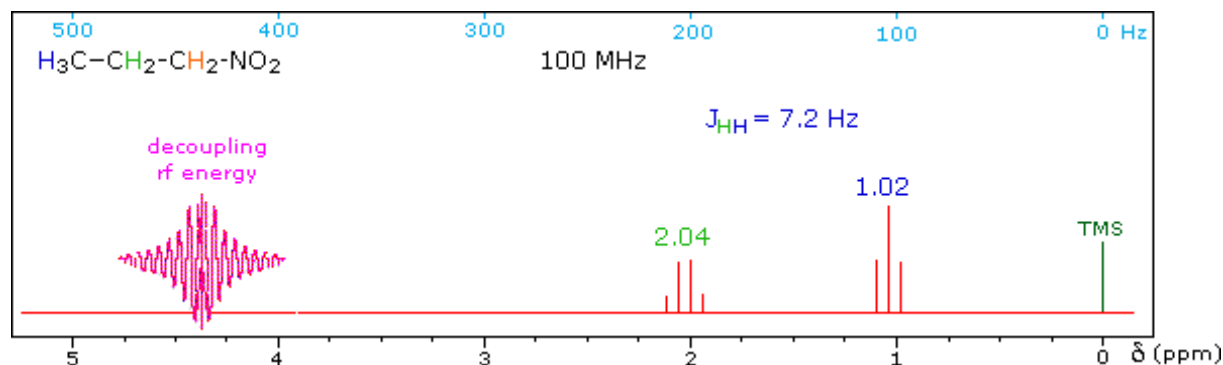
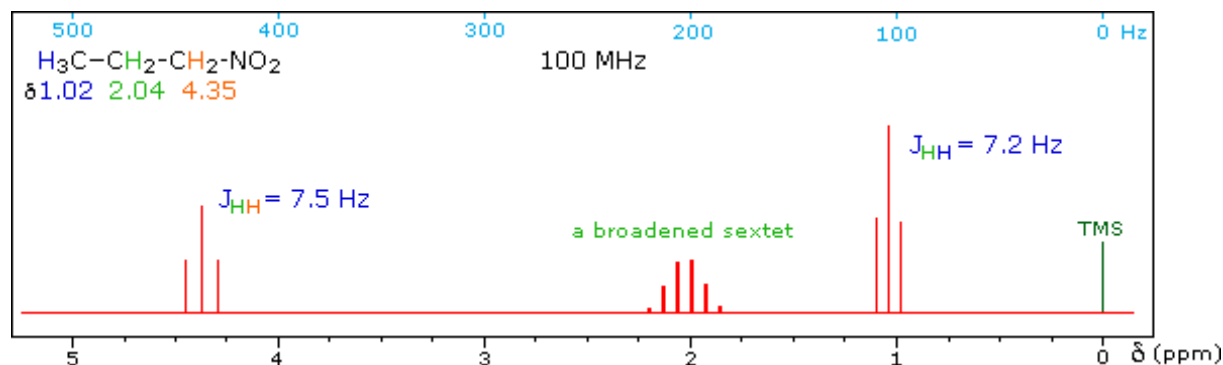
1,1,2-trichloroethane ($\text{CHCl}_2\text{CH}_2\text{Cl}$)





Coupling Constant J

Σύζευξη – Αποσύζευξη (decoupling) πυρηνικών spins (J)

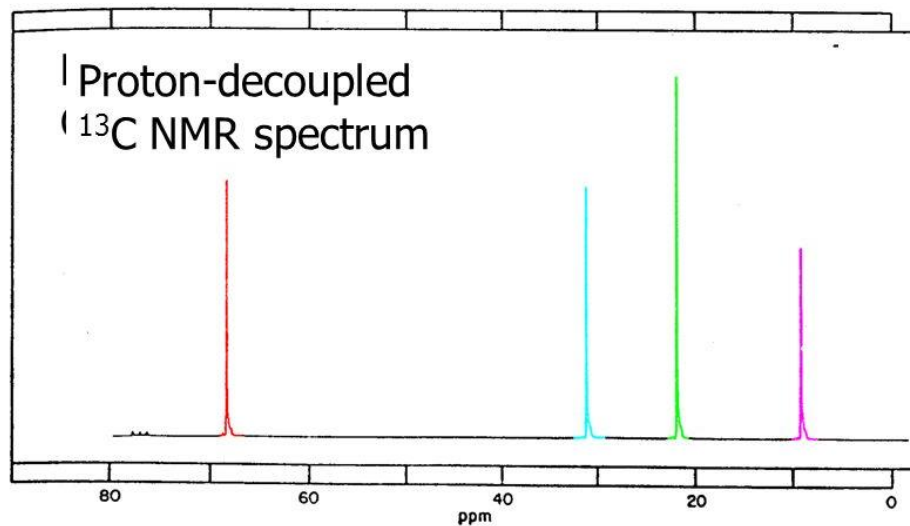
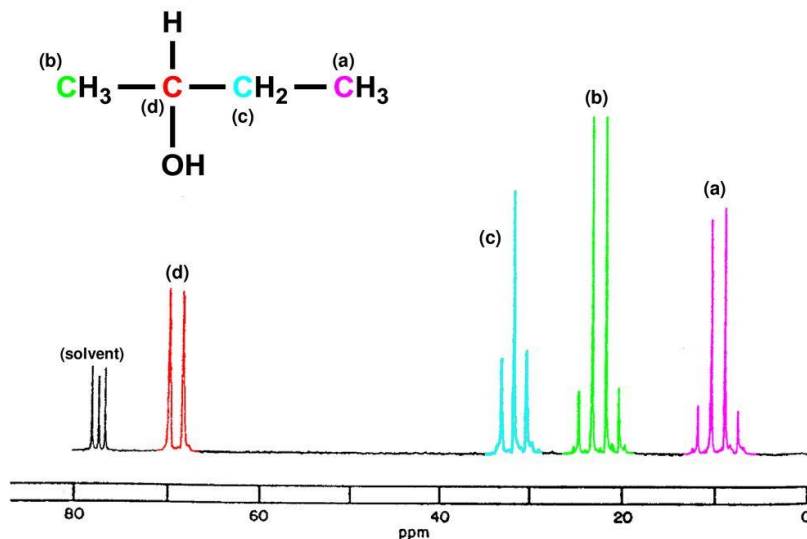




Coupling Constant J

Σύζευξη – Αποσύζευξη (decoupling) πυρηνικών spins (J)

2-Butanol “Proton Coupled” ^{13}C NMR





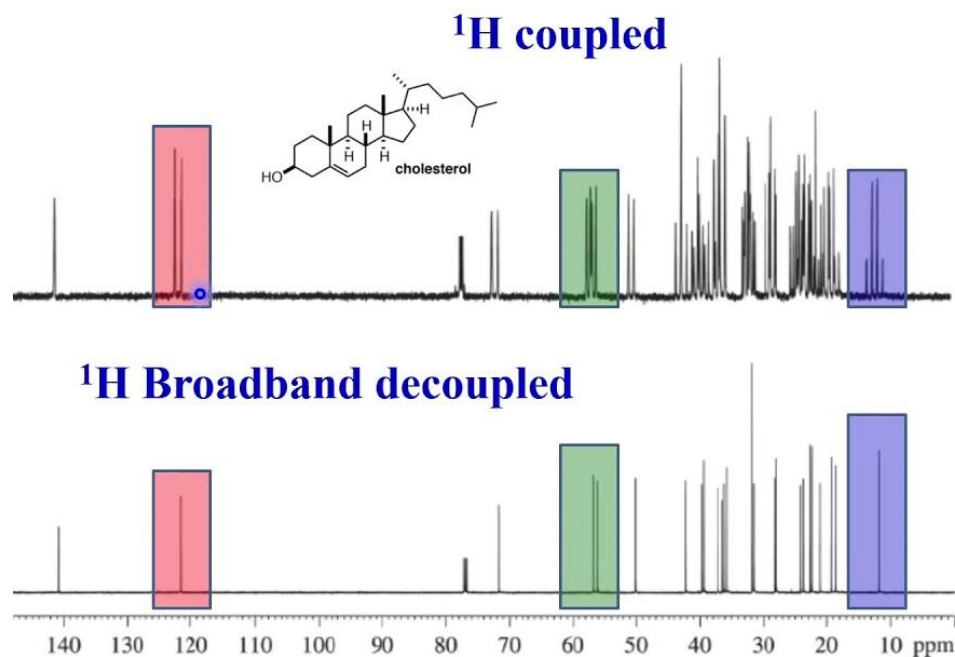
Σύζευξη – Αποσύζευξη (decoupling) πυρηνικών spins (J)

Coupling in ^{13}C NMR

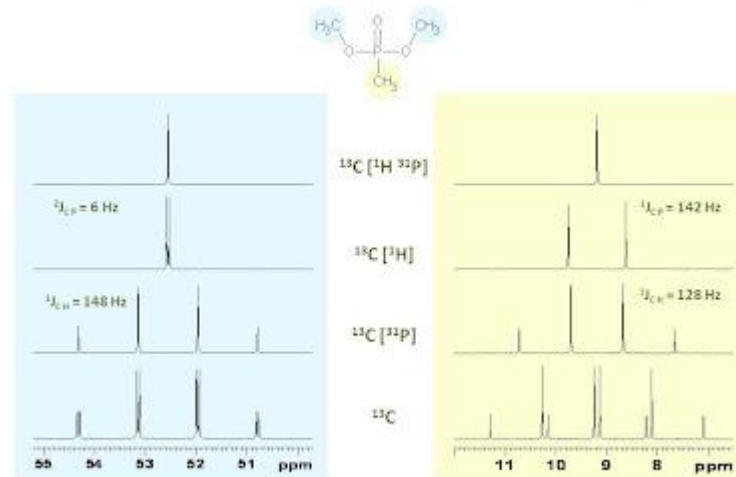
^1H - ^{13}C Coupling ($^1J_{\text{H-C}}$):

- Observed in **coupled spectra** (no decoupling).
- Range:** 110–320 Hz (depends on hybridization: $\text{sp}^3 \sim 125$ Hz, $\text{sp}^2 \sim 160$ Hz, $\text{sp} \sim 250$ Hz).
- Example:* Methane (CH_4) shows a **doublet** ($^1J_{\text{H-C}} = 125$ Hz).

• **Complexity:** Coupled spectra are crowded due to overlapping multiplets (e.g., CH_2 groups $\rightarrow$ triplets).



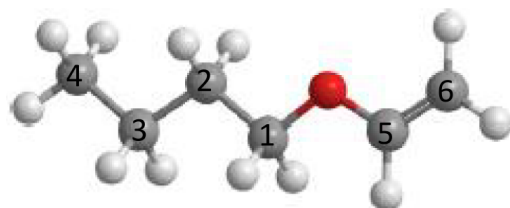
^{13}C NMR with ^1H and ^{31}P Decoupling



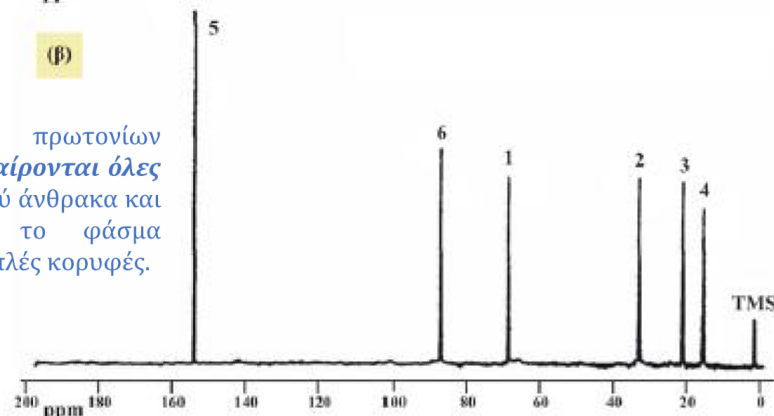
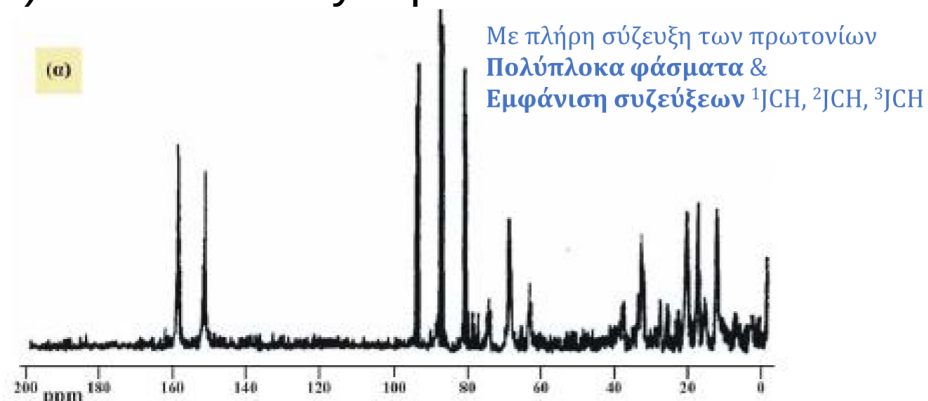
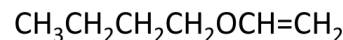


Σύζευξη – Αποσύζευξη (decoupling) πυρηνικών spins (J)

- **Non-decoupled ^{13}C spectra** show multiplets for each carbon:
- **CH** → Doublet ($^1J_{\text{H-C}}$). 110–320 Hz
- **CH₂** → Triplet ($^1J_{\text{H-C}}$). 0–60 Hz
- **CH₃** → Quartet ($^1J_{\text{H-C}}$). 0–15 Hz
- **Quaternary C (Cq)** → Singlet (no attached H).
- **Overlap:** Multiple couplings (e.g., $^1J + ^2J$) create "messy" spectra



n-βουτυλικός βινυλαιθέρας



Σχήμα 5.1.1. Φάσμα ^{13}C του n-βουτυλικού βινυλαιθέρα: (άνω) συζευγμένο, (κάτω) αποσυζευγμένο.



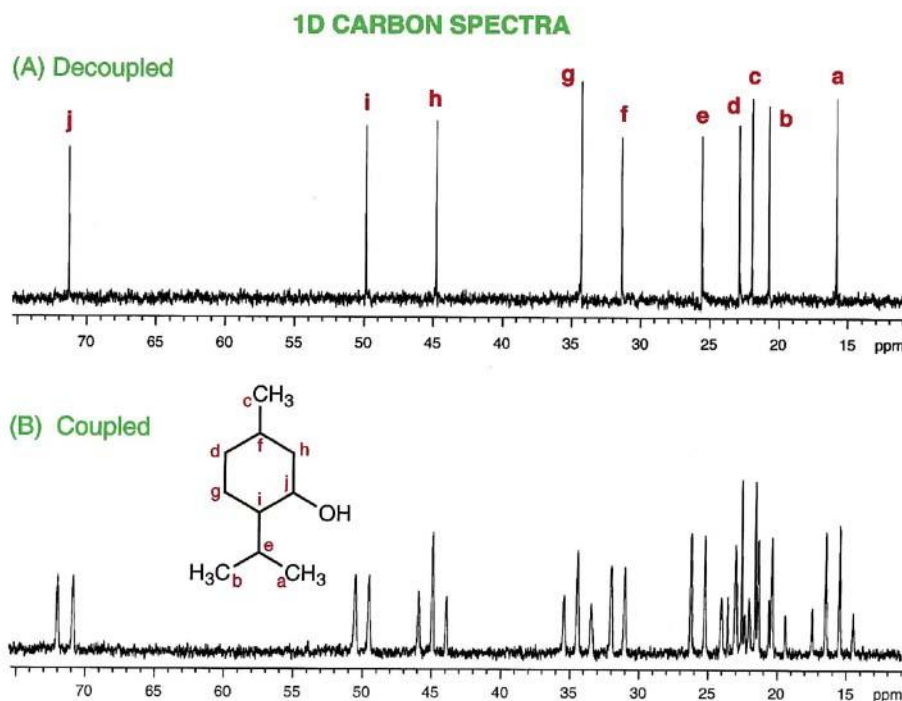
Σύζευξη – Αποσύζευξη (decoupling) πυρηνικών spins (J)

Practical Challenges

- **Low sensitivity:** Coupling further reduces signal intensity (vs. decoupled spectra). Decoupling increases ^{13}C signal intensity via the Nuclear Overhauser Effect (NOE).
- **Broad peaks:** Overlapping multiplets complicate analysis.

When to Use Coupled ^{13}C NMR?

- To measure $^1J_{\text{H-C}}$ for hybridization studies (e.g., sp^2 vs. sp^3 carbons).
- To detect **long-range couplings** (2J , 3J) in rigid systems (e.g., cyclic compounds).





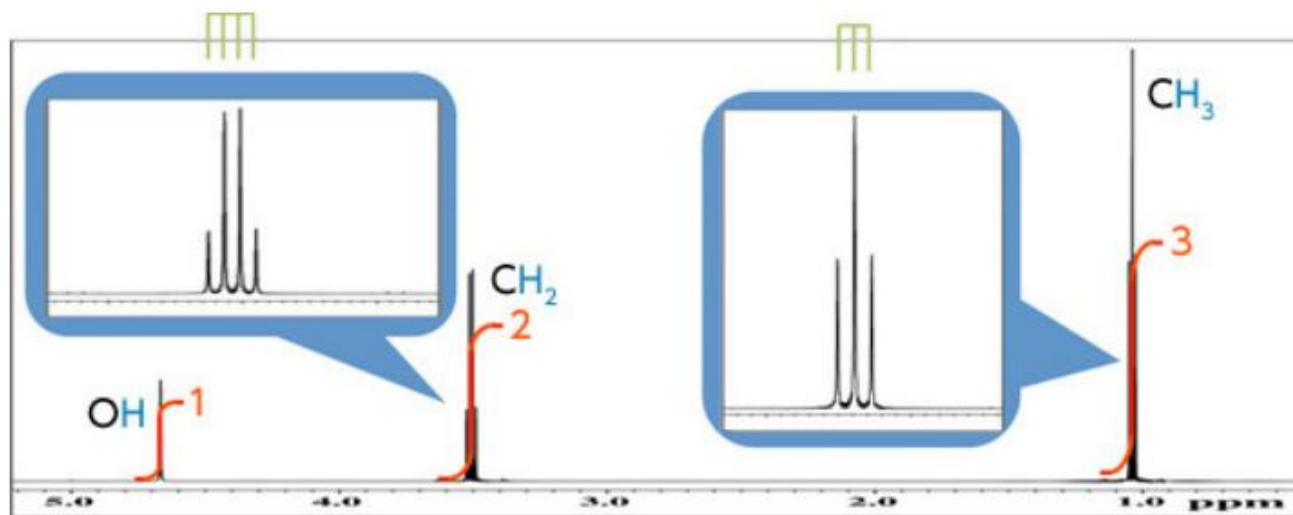
1. Chemical Shift δ (ppm) – Χημική Μετατόπιση δ (ppm)
2. Coupling Constant J (Hz) – Σταθερά Σύζευξης J (Hz)
3. Integrals – Εμβαδό κορυφών συντονισμού





ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΑΠΟ ΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H NMR 1D

3. **INTEGRAL of a resonance** corresponds to the **area under the peak**, which is directly proportional to the **number of hydrogen nuclei (protons)** contributing to that signal
- quantitative information** about the relative number of protons in different environments within the **same molecule**.



NMR spectrum of the hydrogen nuclei of ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)



NMR is a **primary** standard for quantification of organic substances

$$\frac{\text{Signal}}{\text{Noise}} = n \gamma_{EXC} \gamma_{DET}^{3/2} B_0^{3/2} \frac{\sqrt{NS}}{T} T_2$$

NMR signal scales linearly with the number of spins in the active volume

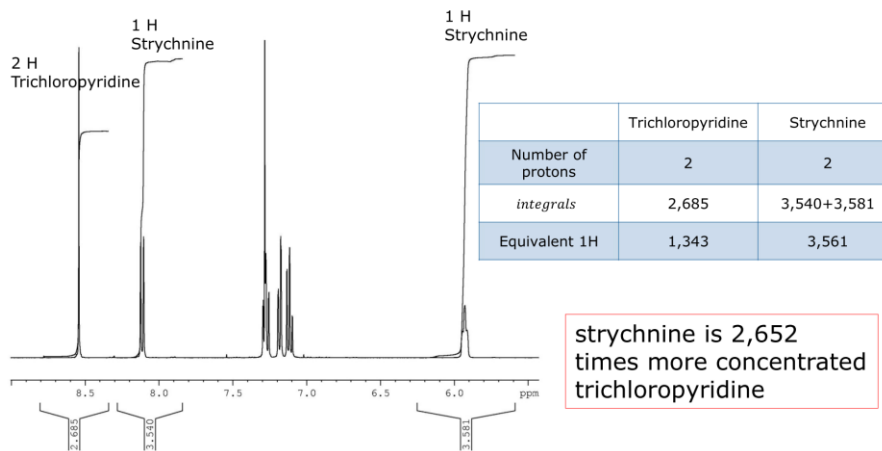
Between different molecules, we obtain information about the ratios in a mixture

- **relative intensities** (areas)
- must be under the **same experimental conditions** (e.g., same solvent, temperature, and instrument settings)
- **relaxation times** of the nuclei should be similar, or appropriate corrections must be applied to ensure accurate quantification

Quantification without standard
(relative quantification)

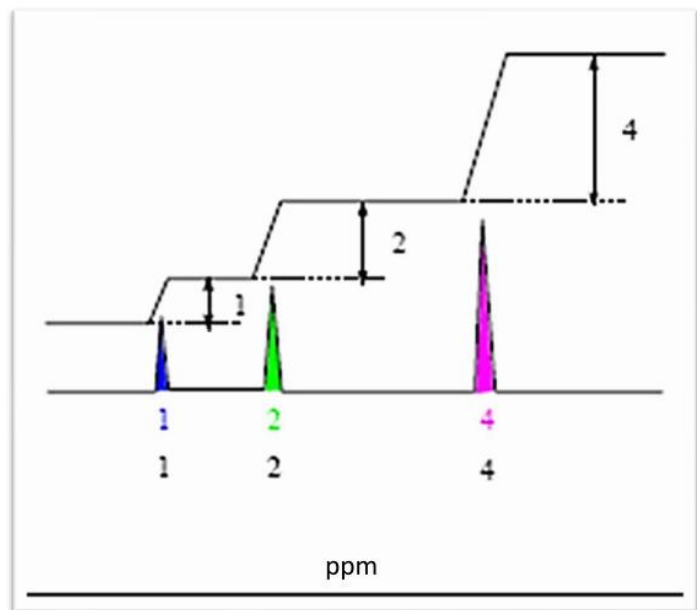


- Example

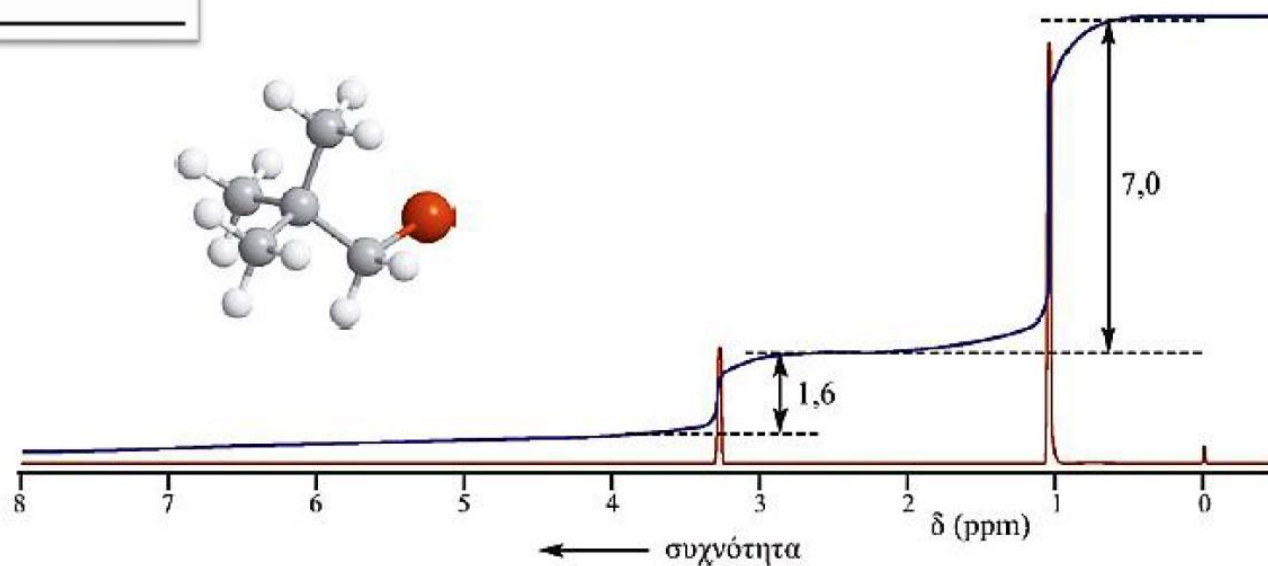




Integrals



The areas of the integrated peaks are recorded on the spectrum as a stepped line, where the height of each step is proportional to the area of the peak



Ολοκλήρωση των απορροφήσεων, οι οποίες παρατηρούνται σε φάσμα ^1H NMR του 2,2-διμεθυλο-προπανοβρωμιδίου



Integrals

$$C_A = P_{ref} \times C_{ref} \frac{A_A}{A_{ref}} \frac{N_{ref}}{N_A}$$

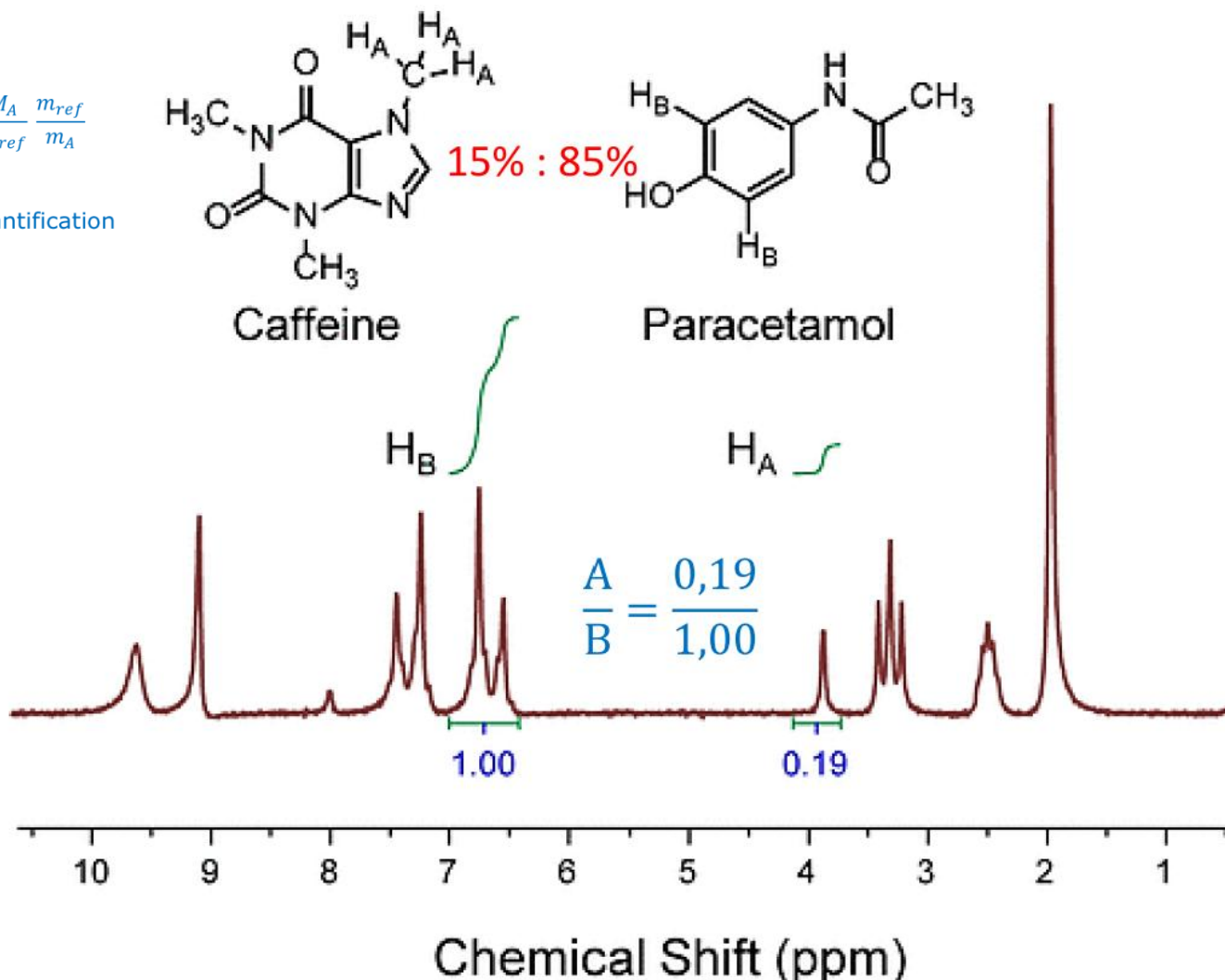
HB → 2 protons

HA → 3 protons

- A_A : integral of the peak used for the quantification
- N_A : number of spins giving the peak
- C_A : concentration of A

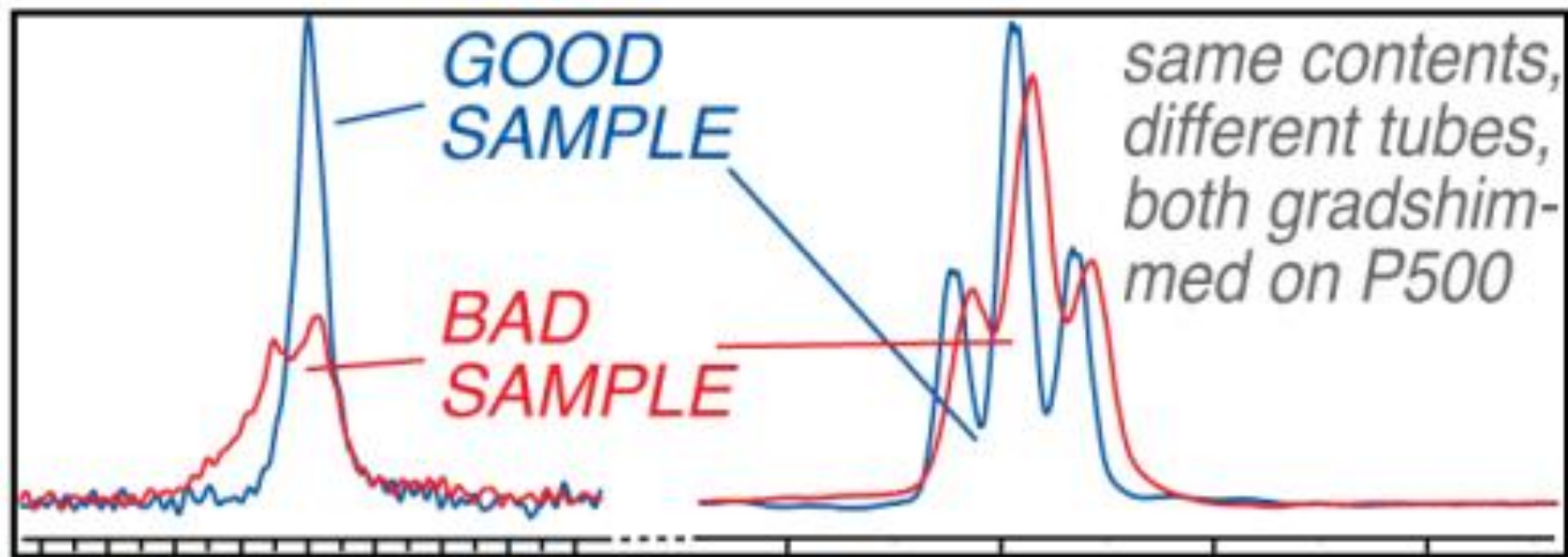
$$P_A = P_{ref} \times \frac{A_A}{A_{ref}} \frac{N_{ref}}{N_A} \frac{M_A}{M_{ref}} \frac{m_{ref}}{m_A}$$

- A_A : integral of the peak used for the quantification
- N_A : number of spins giving the peak
- M_A : molar mass of compound A
- m_A : weight mass of A





Sample Preparation





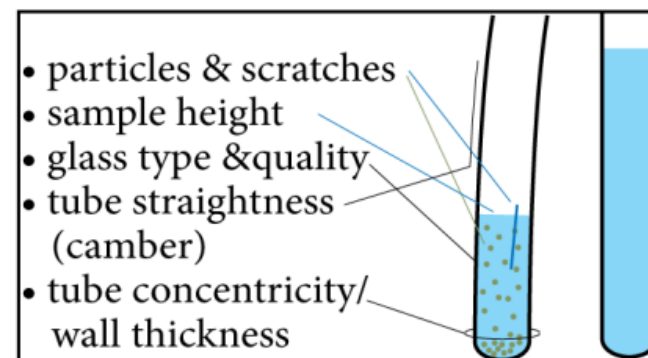
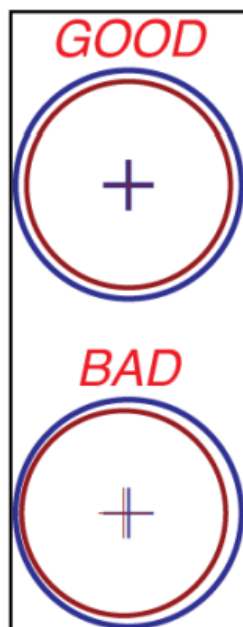
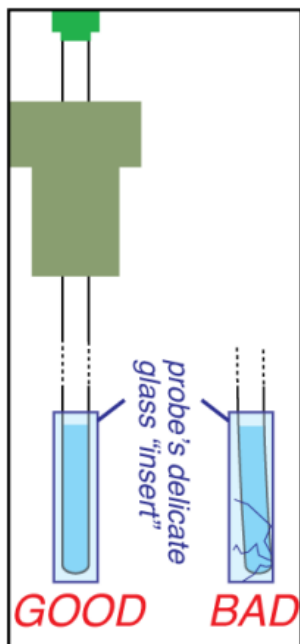
Parameters

Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του δείγματος (Factors Affecting Sample Quality)

1. Περιέκτες (NMR tubes)

- ✓ Ειδικά Σωληνάρια από Χαλαζία (Special Quartz Tubes- SiO_2 -high/low temperatures)
- ✓ Χωρίς ατέλειες στην επιφάνεια (Free from surface imperfections- minimizes field distortions)

Χαραγές, καμπυλότητα (No scratches, no curvature)





Sample Preparation

Parameters

Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του δείγματος (Factors Affecting Sample Quality)

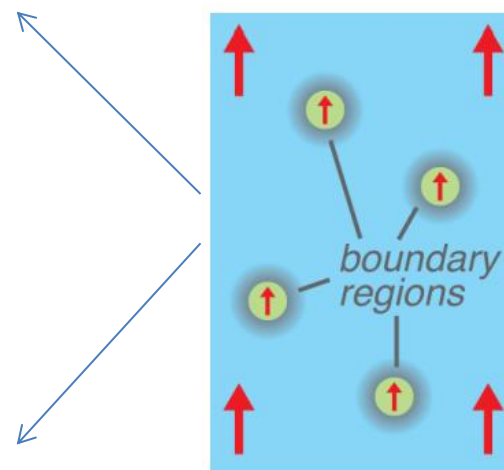
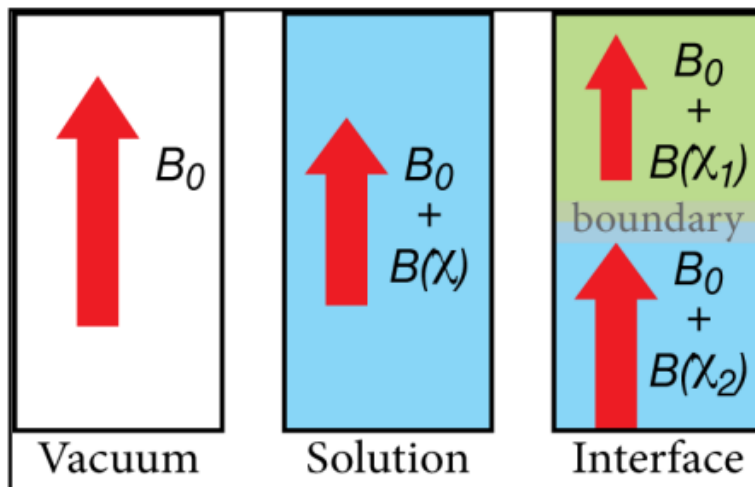
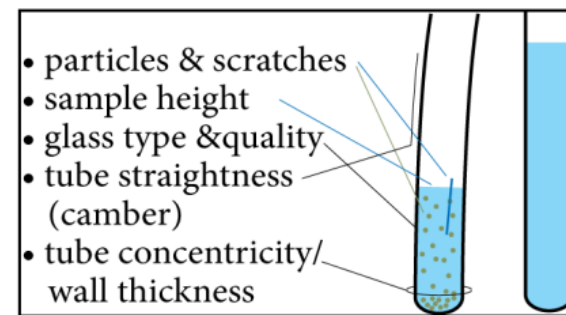
2. Διάλυμα Δείγματος (Solution-must be homogenous and free of particles)

✓ Δευτεριωμένοι Διαλύτες (Deuterated solvents-lock)

✓ Διαυγή Διαλύματα (clear solutions-avoid broad signals)

Κατάλληλος Δ/της, Φιλτράρισμα (solvent choice, filtering)

✓ Όγκος Διαλύματος (sample volume-500-600 μL)





Sample Preparation

Parameters

Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του δείγματος (Factors Affecting Sample Quality)

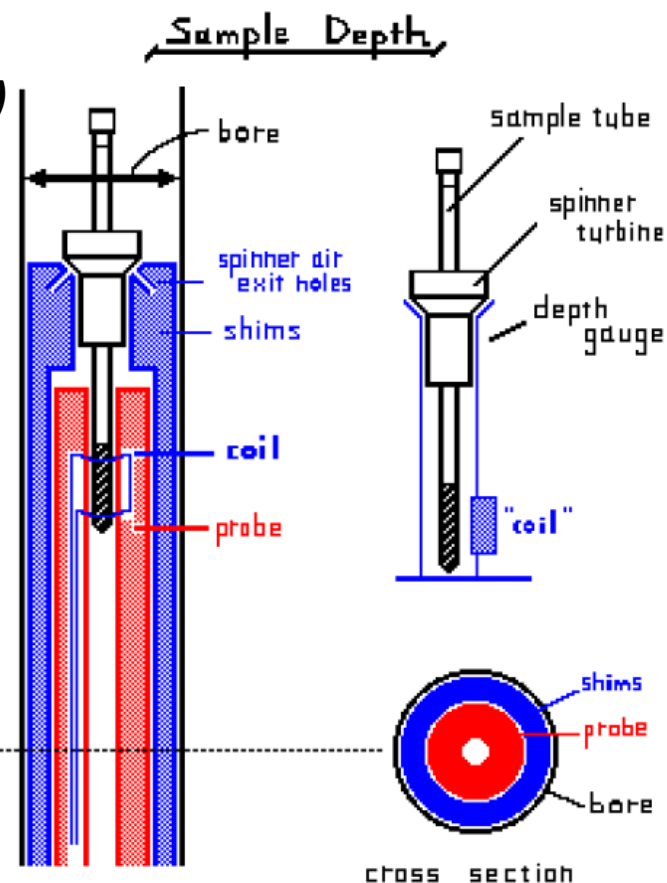
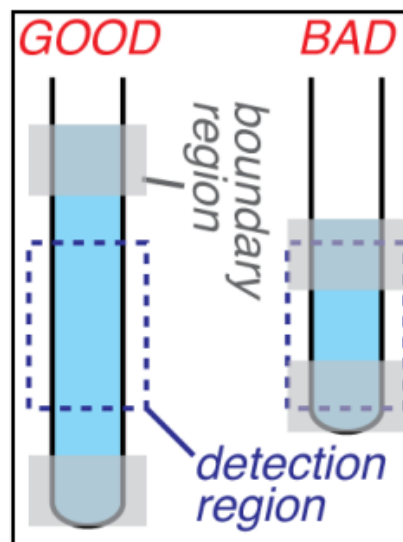
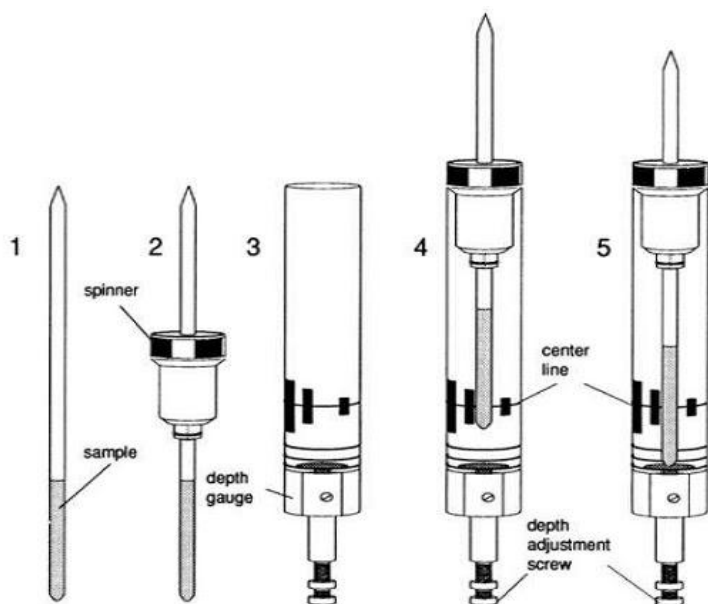
2. Διάλυμα Δείγματος (Solution)

✓ Δευτεριωμένοι Διαλύτες (Deuterated solvents)

✓ Διαυγή Διαλύματα (clear solutions)

Κατάλληλος Δ/της, Φιλτράρισμα (solvent choice, filtering)

✓ Όγκος Διαλύματος (sample volume)



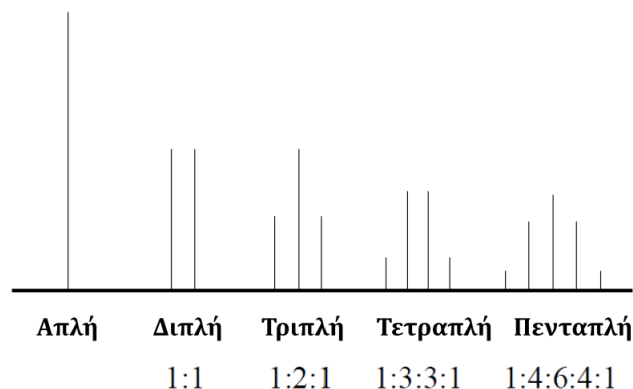


1. Chemical Shift δ (ppm) – Χημική Μετατόπιση δ (ppm)
2. Coupling Constant J (Hz) – Σταθερά Σύζευξης J (Hz) extras
3. Integrals – Εμβαδό κορυφών συντονισμού





Coupling Constant $J(\text{Hz})$ – spin-spin σύζευξη/σταθερά σύζευξης $J(\text{Hz})$



Pascal Blaise
(1623 - 1662)

$n+1$ rule

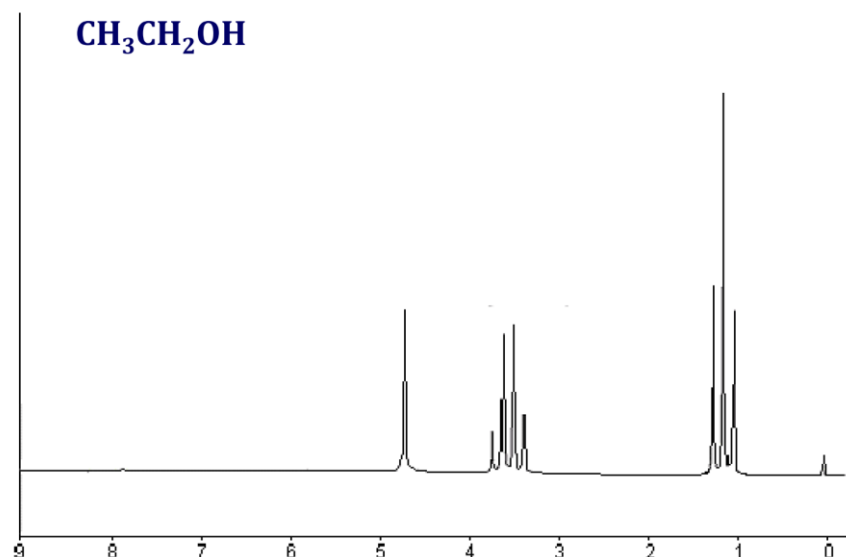
Διπλή	1 1	$(\alpha + \beta)^1 = 1 \cdot \alpha + 1 \cdot \beta$
Τριπλή	1 2 1	$(\alpha + \beta)^2 = 1 \cdot \alpha^2 + 2 \cdot \alpha\beta + 1 \cdot \beta^2$
Τετραπλή	1 3 3 1	$(\alpha + \beta)^3 = 1 \cdot \alpha^3 + 3 \cdot \alpha^2\beta + 3 \cdot \alpha\beta^2 + 1 \cdot \beta^3$
Πενταπλή	1 4 6 4 1	
Εξαπλή	1 5 10 10 5 1	
Επταπλή	1 6 15 20 15 6 1	

Bond count:

- Geminal (2J , H–C–H)
- Vicinal (3J , H–C–C–H)



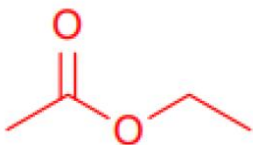
CH3CH2OH



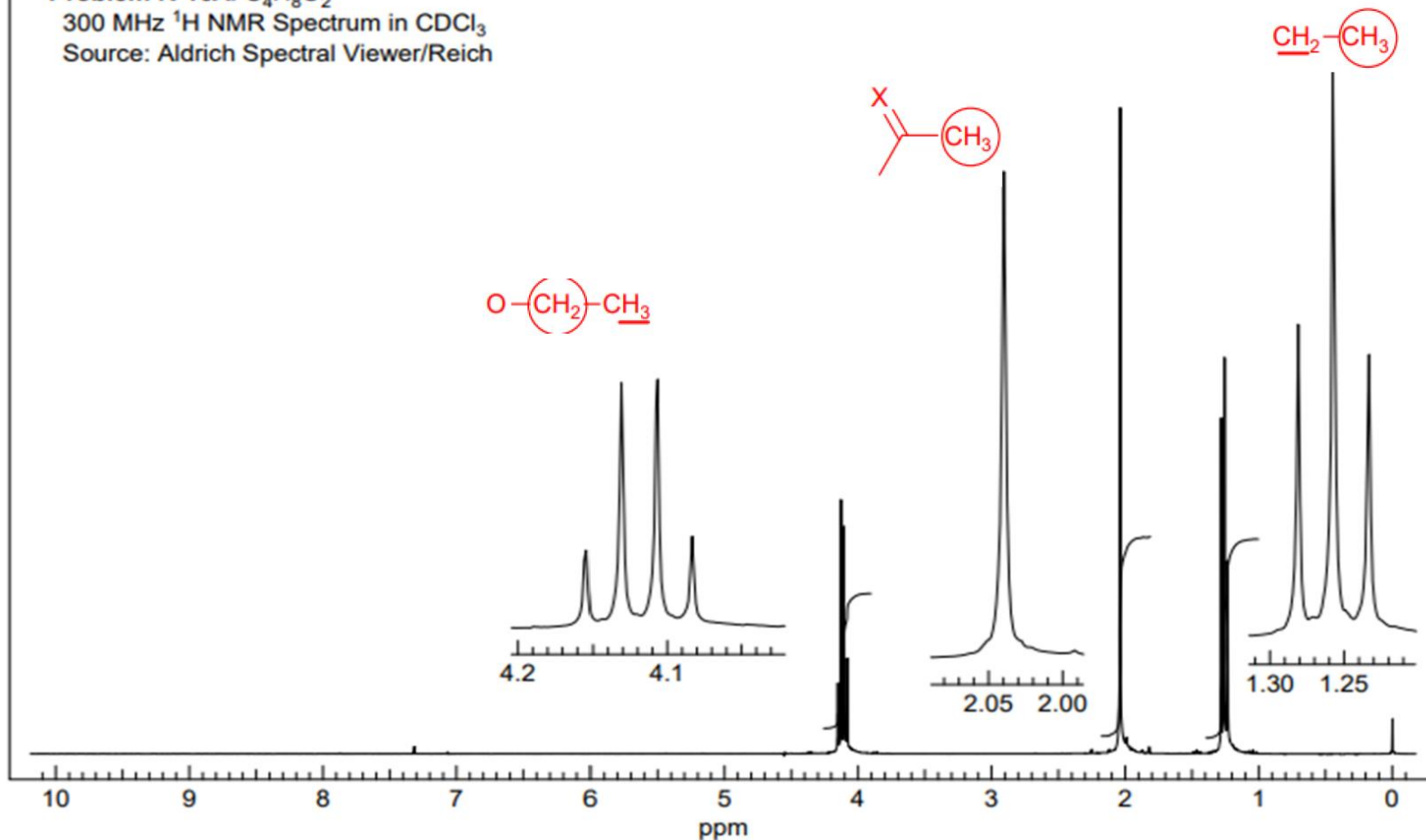
CH3CH2OH



Άσκηση



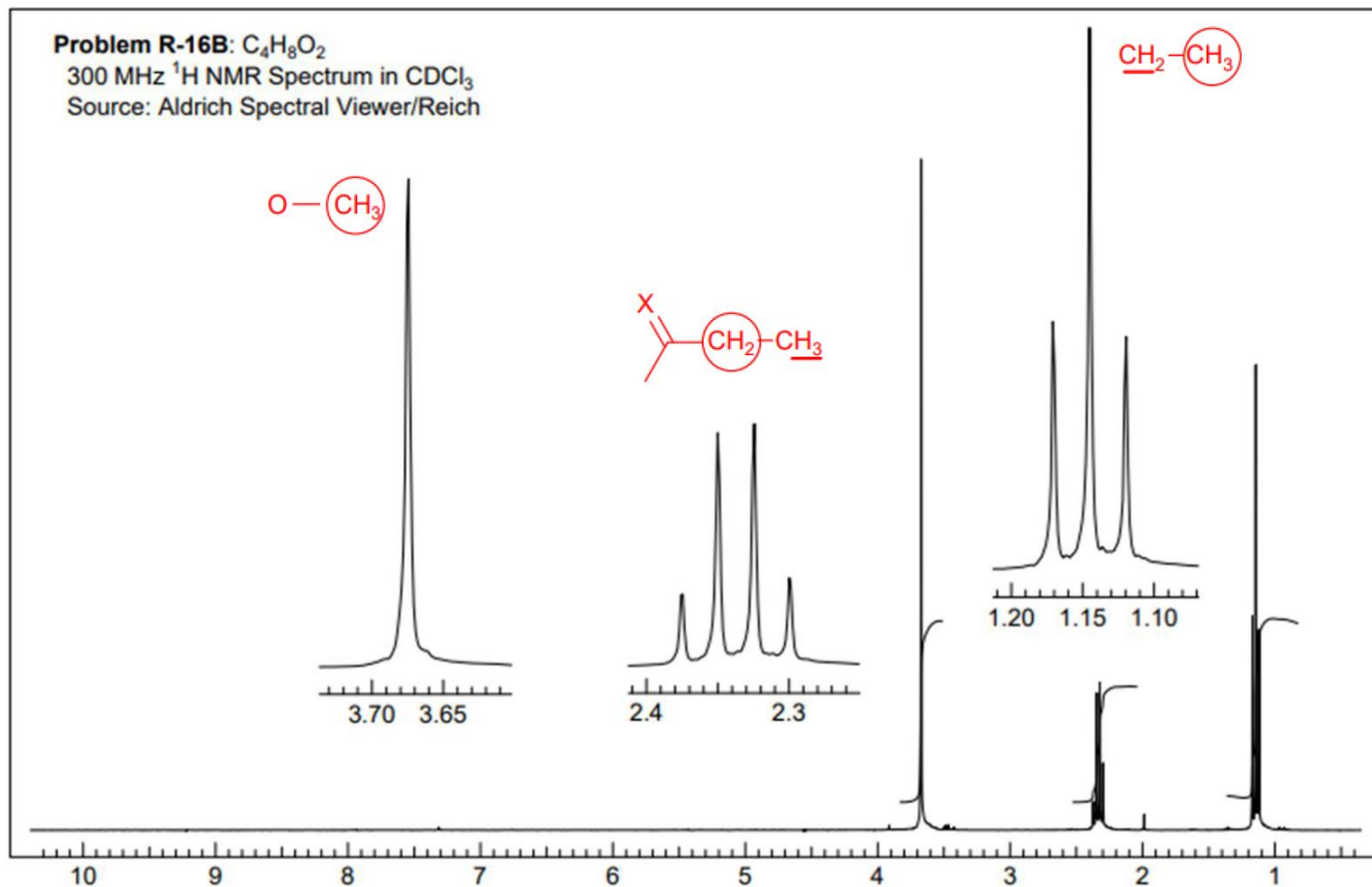
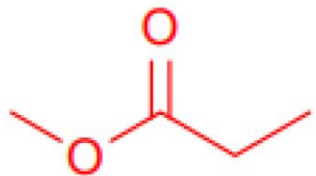
Problem R-16A: $C_4H_8O_2$
300 MHz 1H NMR Spectrum in $CDCl_3$
Source: Aldrich Spectral Viewer/Reich



$$\text{Βαθμός Ακορεστότητας} = F = \sum \{\text{πολλαπλοι δεσμοι} + \text{δακτύλιοι}\} = \frac{2m+2-(n-r-s)}{2}$$



Άσκηση





Coupling Constant J

When the n+1 Rule Fails: The Branching Method for Non-Equivalent Protons

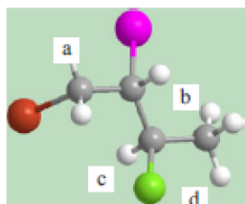
The **n+1 rule** assumes:

- **Magnetically equivalent protons** (same chemical shift and identical coupling to all neighbors).
- **First-order coupling** ($\Delta\nu \gg J$).

When it fails:

- Protons on the **same carbon** (e.g., $-\text{CH}_2-$) become **non-equivalent** due to:
 - **Restricted rotation** (e.g., in cyclic compounds or double bonds).
 - **Adjacent chiral centers** (asymmetric carbons).
- Results in **complex splitting patterns** (e.g., AB, ABX systems).

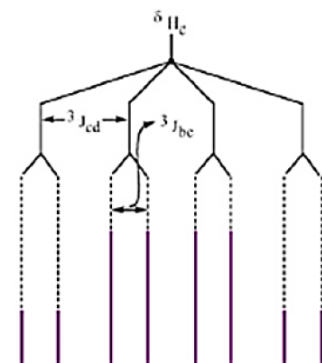
$$\text{Για } I = 1/2: L = (n_a+1)(n_b+1)\dots = \prod(n_i+1)$$



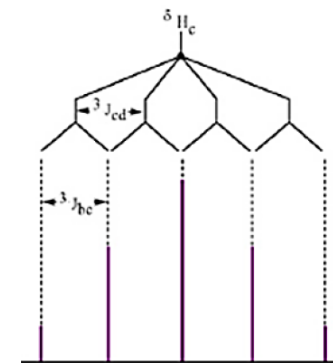
Ολική Πολλαπλότητα

Για το H_c : $L = (n_b+1)(n_d+1)\dots = \prod(n_i+1)$

$L = (1+1)(3+1) = 8$ φασματικές κορυφές



Τετραπλή κορυφή επί διπλή κορυφή
για $J_{bc} \neq J_{cd}$



Πενταπλή κορυφή για $J_{bc} = J_{cd}$

$$\text{Για } I \neq 1/2: L = (2n_a I_a + 1)(2n_b I_b + 1)\dots = \prod(2n_i I_i + 1)$$

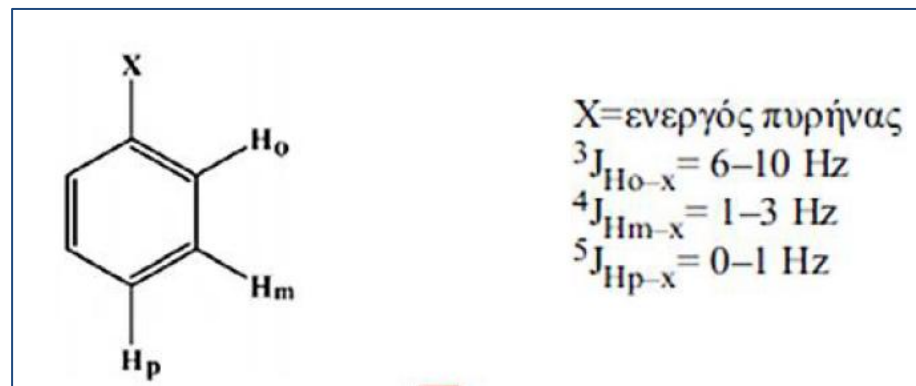
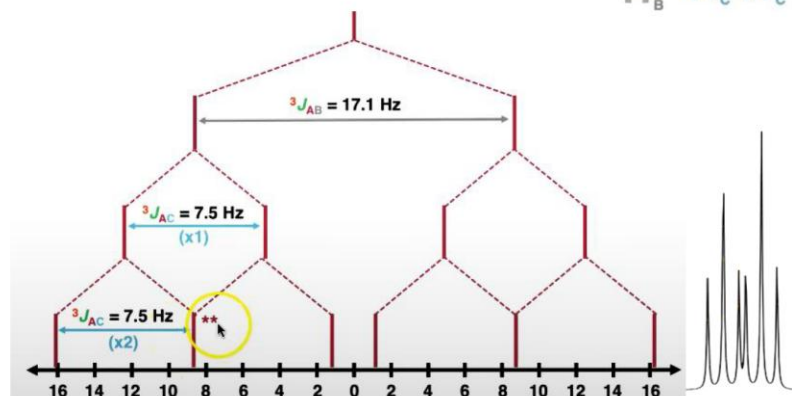
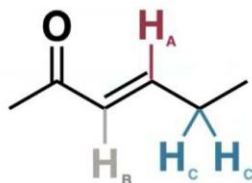


Coupling Constant J

Common Cases of Non-Equivalent Protons

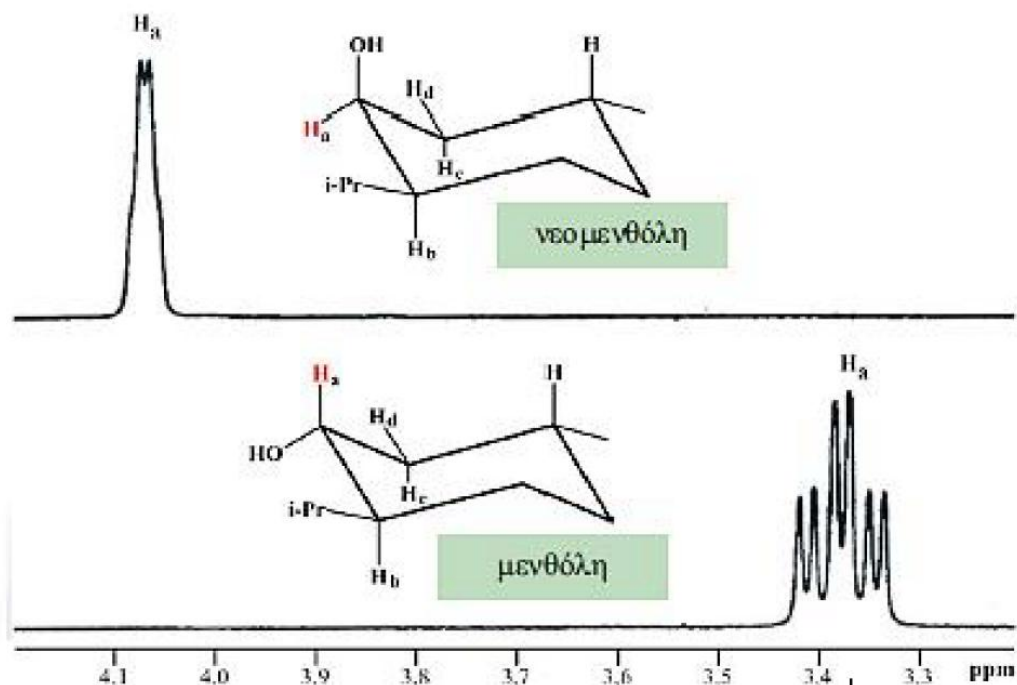
Cases	Example	Splitting Pattern
Geminal protons ($-\text{CH}_2-$)	$\text{H}_\alpha-\text{C}-\text{H}_\beta$ in a rigid ring	AB system (leaning doublets)
Adjacent to chiral center	CH_2 in $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CHX}-\text{R}'$	Two distinct dd ($\text{H}_\alpha \neq \text{H}_\beta$)
Double bonds (cis/trans)	$\text{H}_\alpha-\text{C}=\text{C}-\text{H}_\beta$	Depends on stereochemistry

$\text{H}_\text{A} : \delta_\text{H} \text{ 6.82 (1H, dt, } ^3J_{\text{AB}} = 17.1 \text{ Hz, } ^3J_{\text{AC}} = 7.5 \text{ Hz)}$



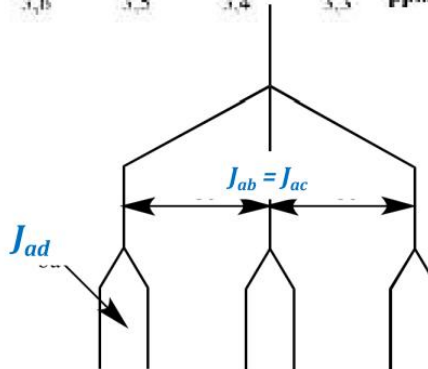


Παράδειγμα 5



Η μενθόλη βρίσκεται στα αιθέρια έλαια της πιπερώδους μέντας.

Το ισημερινό πρωτόνιο συντονίζεται σε υψηλότερη τιμή ppm συγκριτικά με το αξονικό πρωτόνιο

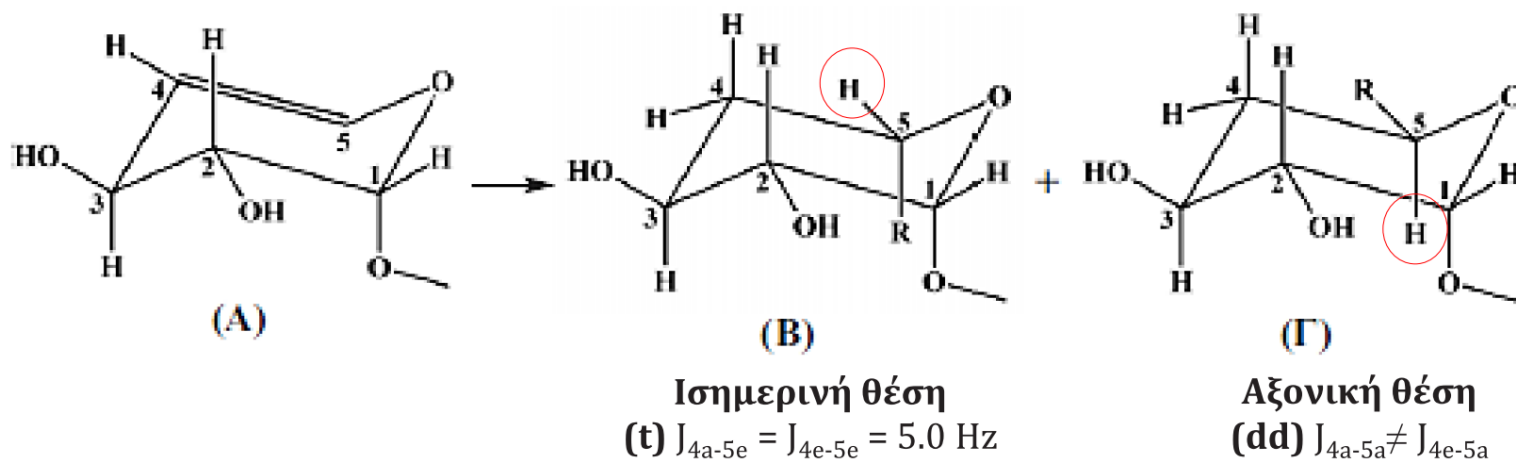




Άσκηση 1

Η καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης (Α) μπορεί να δώσει τα προϊόντα (Β) και (Γ). Το πρωτόνιο στη θέση (5) μπορεί να καταλάβει **ισημερινή** ή **αξονική** θέση. Στο φάσμα ^1H NMR, η κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο H-5 αποτελείται από **μια τριπλή κορυφή 1^{ου} βαθμού**. Το πρωτόνιο είναι αξονικό ή ισημερινό;

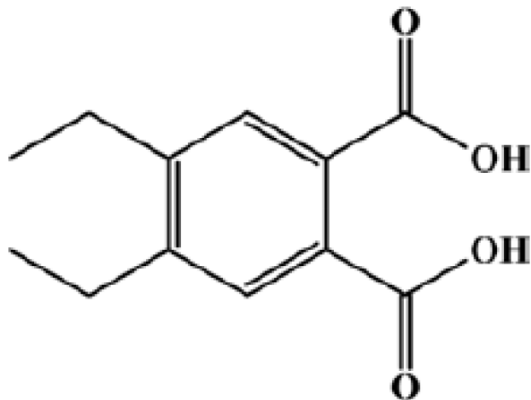
$$\begin{aligned} \text{Δίνεται ότι: } J_{4a-5e} &= J_{4e-5e} = 5.0 \text{ Hz} \\ J_{4a-5a} &> J_{4e-5a} \end{aligned}$$





Άσκηση 4

Μια αρωματική ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_{14}O_4$ είναι τετραυδροϋποκατεστημένη με 2 όμοιους υποκατάστατες να είναι σε **-όρθο υποκατάσταση** μεταξύ τους. Στην μη αρωματική περιοχή εμφανίζεται μια **τριπλή κορυφή** και μια **τετραπλή κορυφή**. Προσδιορίστε την ένωση.



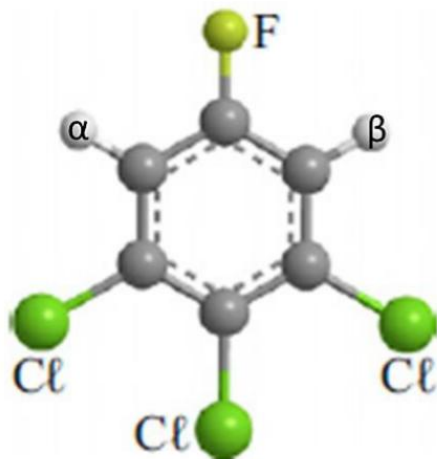


Coupling Constant J

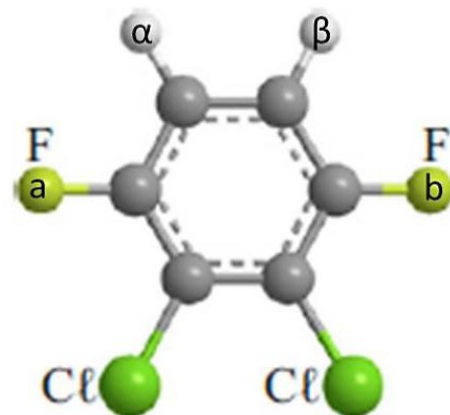
Magnetically Non-Equivalent Nuclei: Definition and Consequences in NMR

- **Chemically equivalent** (same chemical shift, $\nu_\alpha = \nu_\beta$), **but**
- **Couple differently** to other active nuclei in the molecule ($J_{\alpha\gamma} \neq J_{\beta\gamma}$), they are termed **magnetically non-equivalent**.

Όταν δύο πυρήνες α και β , **είναι χημικά ισοδύναμοι**, δηλαδή $\nu_\alpha = \nu_\beta$, αλλά παρουσιάζουν **διαφορετική σταθερά σύζευξης με άλλους ενεργούς μαγνητικούς πυρήνες** στο μόριο $J_{\alpha\gamma} \neq J_{\beta\gamma}$, τότε λέμε ότι οι πυρήνες αυτοί είναι **Μαγνητικά ΜΗ Ισοδύναμοι** είναι



A: 1-φθορο-3,4,5-
τριχλωρο-βενζόλιο



B: 1,4-διφθορο-2,3-
διχλωρο-βενζόλιο

$$J_{H_\alpha F_a} \neq J_{H_\beta F_b}$$

-ορθο -μετα



Coupling Constant J

Chemical vs. Magnetic Equivalence in NMR

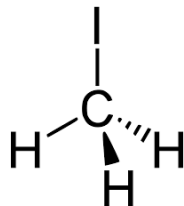
•Chemically Equivalent Nuclei:

- Same chemical shift (δ).
- Same molecular environment (e.g., methyl protons in CH_3 - groups).

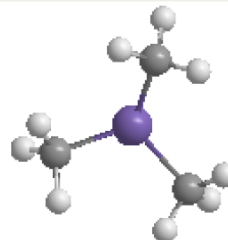
•Magnetically Equivalent Nuclei:

- Same chemical shift **and** identical coupling to all other nuclei in the molecule.

Αν **όλοι** οι πυρήνες είναι **χημικά ισοδύναμοι** σε ένα μόριο, είναι **και μαγνητικά ισοδύναμοι**

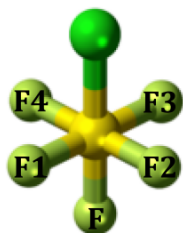
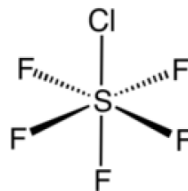


Μεθυλο-ιωδίδιο



Τριμεθυλοσιλάνιο
(TMS)

Δεν είναι απαραίτητο όλοι οι πυρήνες να συζευγνύονται ισοδύναμα μεταξύ τους για να είναι μαγνητικά ισοδύναμοι



$$J_{F1-F3} = J_{F2-F4} \text{ (trans)}$$

$$J_{F1-F2} = J_{F2-F3} = J_{F3-F4} = J_{F4-F1} \text{ (cis)}$$

$$J_{F1-F} = J_{F2-F} = J_{F3-F} = J_{F4-F}$$

•Magnetically equivalent nuclei: Produce simple spectra (follow $n+1$ rule).

•Magnetically non-equivalent nuclei: Create complex patterns (AA'BB' , ABX systems).



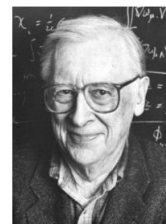
Coupling Constant J

Pople's Notation for NMR Spectra Classification

(A System to Categorize Spin Systems Based on Complexity)

- **First-order** (simple, follows n+1 rule).
- **Second-order** (complex, violates n+1 rule).

[Nobel Prize in Chemistry 1998](#) "for his development of computational methods in quantum chemistry"



(1925 - 2004)

[John A. Pople](#)

Πυρήνες υδρογόνου, των οποίων οι αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις απέχουν τόσο, ώστε να είναι ευδιάκριτοι μεταξύ τους, αναφέρονται με τα γράμματα **A, M, X**.

Αν οι απορροφήσεις των πρωτονίων που συζεύγουν είναι αρκετά κοντά και η πολλαπλότητα δεν ερμηνεύεται από τον κανόνα n+1, τότε τα συστήματα αυτά ονομάζονται **AB** ή **ABX** και εκφράζουν φάσματα **2^{ης} τάξης**.

Feature	First-Order (AX, AMX)	Second-Order (AB, ABC)
$\Delta\nu/J$ Ratio	$\Delta\nu/J \geq 6$	$\Delta\nu/J < 6$
Peak Shape	Symmetric, n+1 multiples	Asymmetric





Coupling Constant J

Πυρήνες υδρογόνου, των οποίων οι αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις απέχουν τόσο, ώστε να είναι ευδιάκριτοι μεταξύ τους, αναφέρονται με τα γράμματα **A, M, X**.

$$\text{Spectral Simplicity} \propto \frac{\Delta\nu}{J}$$

- $\Delta\nu$: Chemical shift difference (Hz).
- J : Coupling constant (Hz).

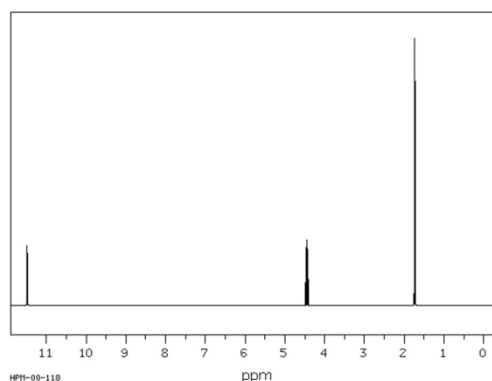
Impact of $\Delta\nu/J$ Ratio on NMR Spectral Resolution

The clarity of NMR spectra depends on the **ratio of the chemical shift difference ($\Delta\nu$) to the coupling constant (J)** between two nuclei:

- **Large $\Delta\nu/J$ → First-order spectra** (clean, symmetric peaks, follows $n+1$ rule).
- **Small $\Delta\nu/J$ → Second-order spectra** (complex, asymmetric peaks, violates $n+1$ rule).



$A_\alpha X_\chi$ ή $A_\alpha M_\mu X_\chi$ συστήματα, όπου οι δείκτες α, μ, χ δηλώνουν τον αριθμό των ομοειδών πυρήνων.



$$\frac{\Delta\nu}{J} > 6$$

Temperature changes
can modify $\Delta\nu/J$ ratios



Coupling Constant J

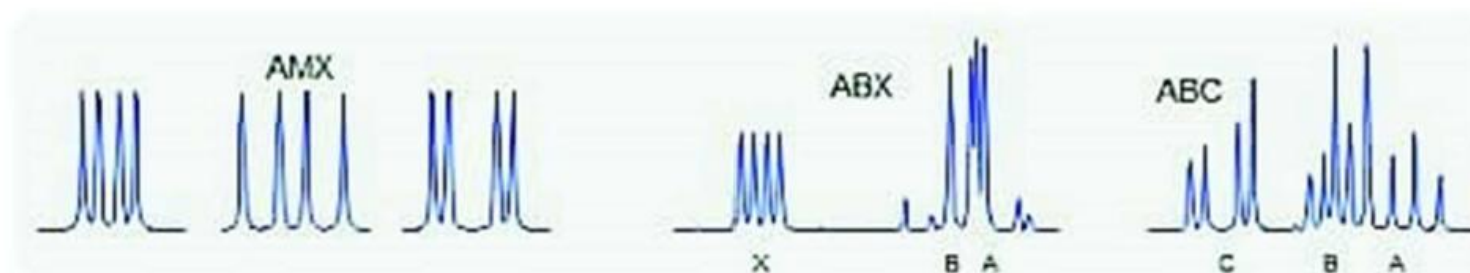
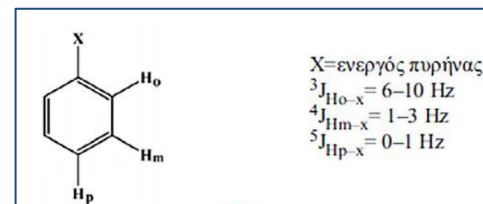
Αν οι απορροφήσεις των πρωτονίων που συζεύγουν είναι αρκετά κοντά και η πολλαπλότητα δεν ερμηνεύεται από τον κανόνα n+1, τότε τα συστήματα αυτά ονομάζονται **AB** ή **ABΓ** και εκφράζουν φάσματα **2^{ης} τάξης**.

$$0 < \frac{\Delta\nu}{J} < 6$$

Aromatic Systems and Second-Order NMR Spectra

Aromatic systems most frequently exhibit **second-order spectra** because:

- 1. Chemical shifts** of aromatic protons are often **very close** (small $\Delta\nu$).
- 2. Coupling constants (J)** between them are **relatively large**.



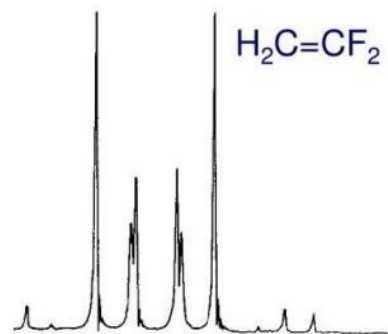
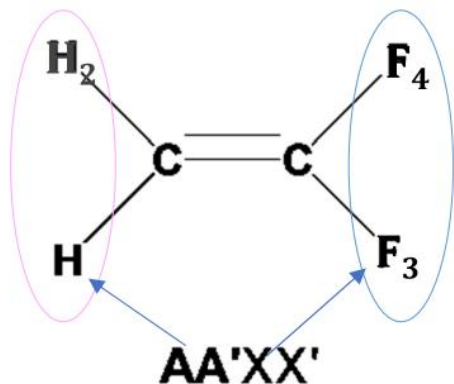
Label	Condition	Example
A, B, C...	Chemically similar ($\Delta\nu/J < \sim 6$)	AB system
X, Y, Z...	Chemically distant ($\Delta\nu/J \gg 6$)	AX system

- Use **A, B, C** for nuclei with *similar shifts* ($\Delta\nu \approx J$).
- Use **X, Y, Z** for nuclei with *large shift differences* ($\Delta\nu \gg J$).



Coupling Constant

2nd Order: People's Notation for Chemically Equivalent but Magnetically Non-Equivalent Nuclei



Why Magnetic Non-Equivalence Arises

- **Restricted rotation:** rings or double bonds
- **Chiral environments:** Adjacent stereocenters create non-identical coupling
- **Symmetry breaking:** Isotopes

$\text{AA}'\text{XX}'$

Two pairs of chemically equivalent but magnetically non-equivalent nuclei.

H_1 & $\text{H}_2 \Rightarrow$ ίδια χημική μετατόπιση: Χημικά ισοδύναμα Ομοτοπικά

$$^3J_{\text{H}_1\text{F}_4} \neq ^3J_{\text{H}_2\text{F}_4}$$

$$^3J_{\text{H}_1\text{F}_4} \rightarrow \text{CIS}$$

$$^3J_{\text{H}_2\text{F}_4} \rightarrow \text{TRANS}$$

Τα δύο πρωτόνια συνδέονται με τους ίδιους πυρήνες με διαφορετική σύζευξη! Μαγνητικά μη ισοδύναμα



Coupling Constant

Practical Implications

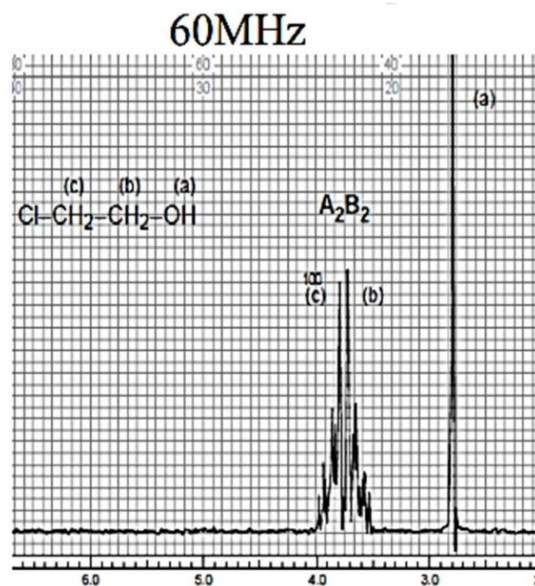
1. High-Field NMR Magnets (Converts AB $\rightarrow$ AX systems (e.g., 600 MHz vs 300 MHz)

2. When $\Delta\nu \approx J$:

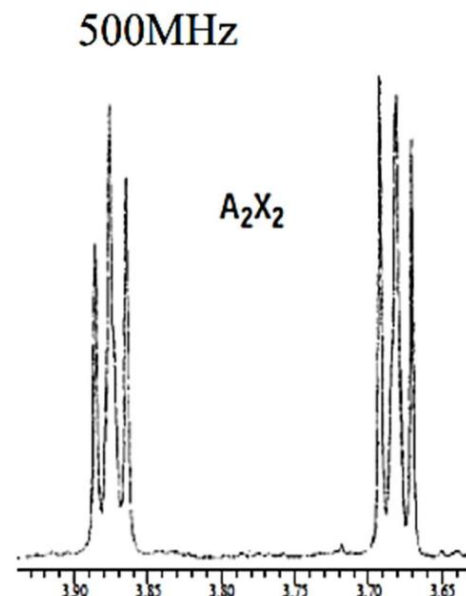
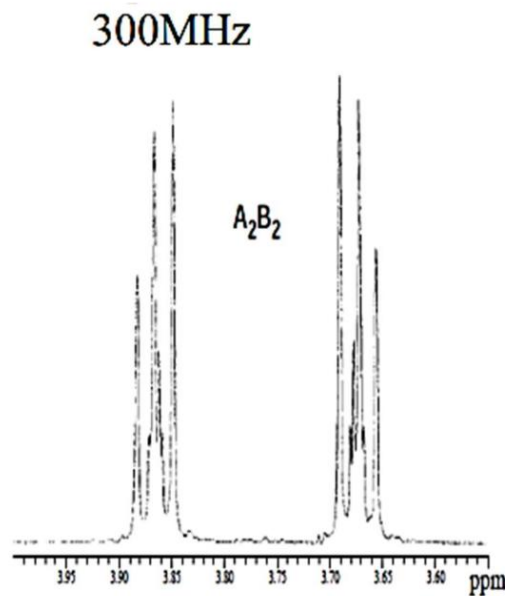
1. Use quantum mechanical simulations to interpret spectra.

3. When $\Delta\nu \gg J$:

1. Apply the $n+1$ rule



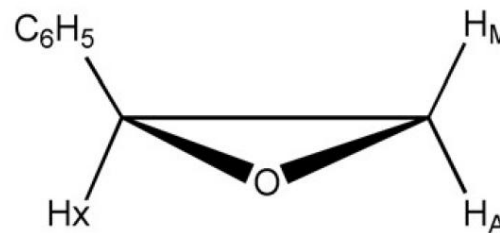
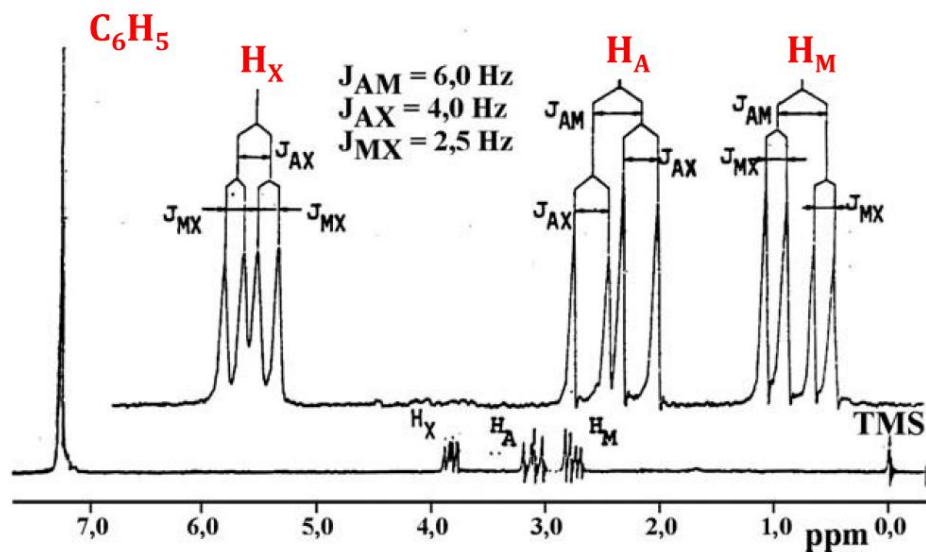
2-chloroethanol





Coupling Constant

Το NMR φάσμα του εποξειδίου του στυρενίου αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός **AMX** συστήματος.



Τα πρωτόνια H_A και H_M του ίδιου ατόμου άνθρακα είναι **μαγνητικά μη ισοδύναμα**.



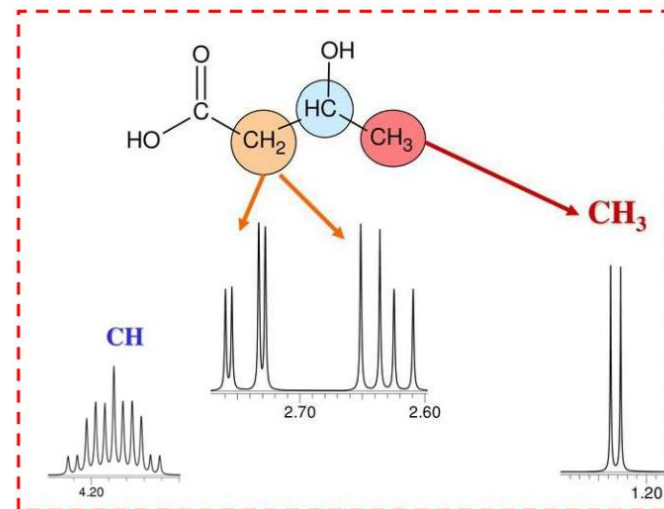
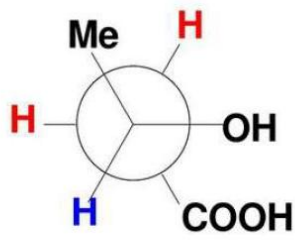
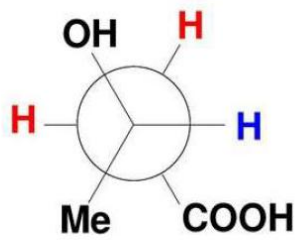
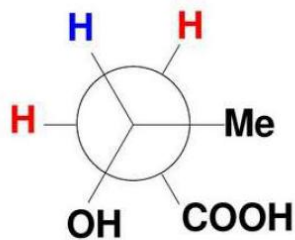
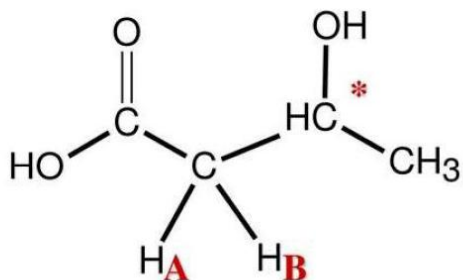
Coupling Constant

Σε ποιο συστήματα spin αντιστοιχεί η παρακάτω ένωση;

ABX

Όταν δυο πρωτόνια δεν είναι ομοτοπικά ή εναντιοτοπικά και είναι ανισόχρονα τότε τα πρωτόνια είναι και ονομάζονται διαστερεοτοπικά

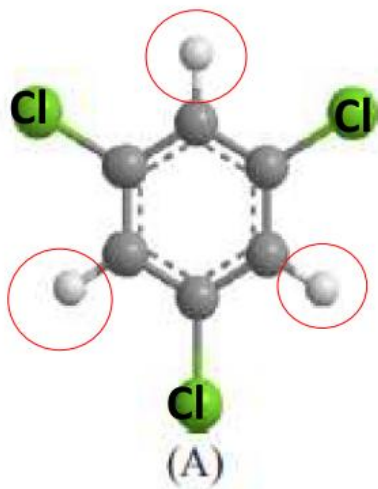
[Π.χ πρωτόνια μεθυλενικής ομάδας δίπλα σε ασύμμετρο κέντρο (*)]





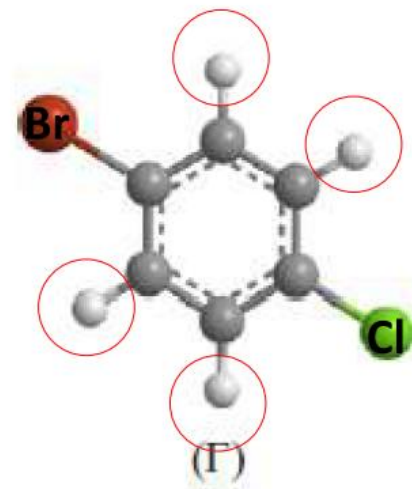
Coupling Constant

Σε ποια συστήματα spin αντιστοιχούν οι παρακάτω ενώσεις;



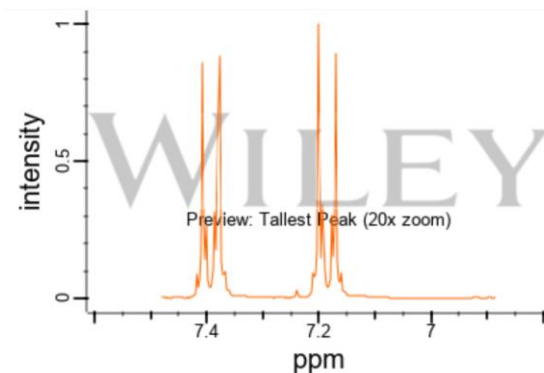
Χημική και
Μαγνητική
ισοδυναμία

A_3



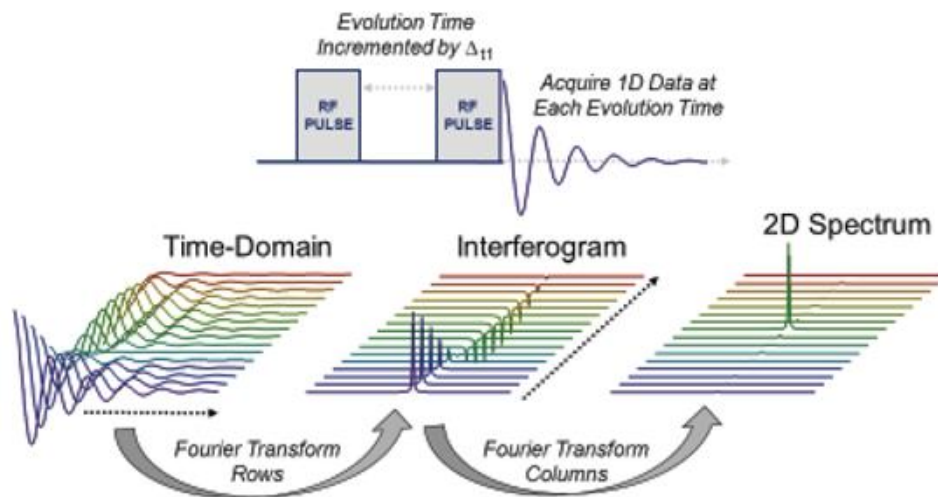
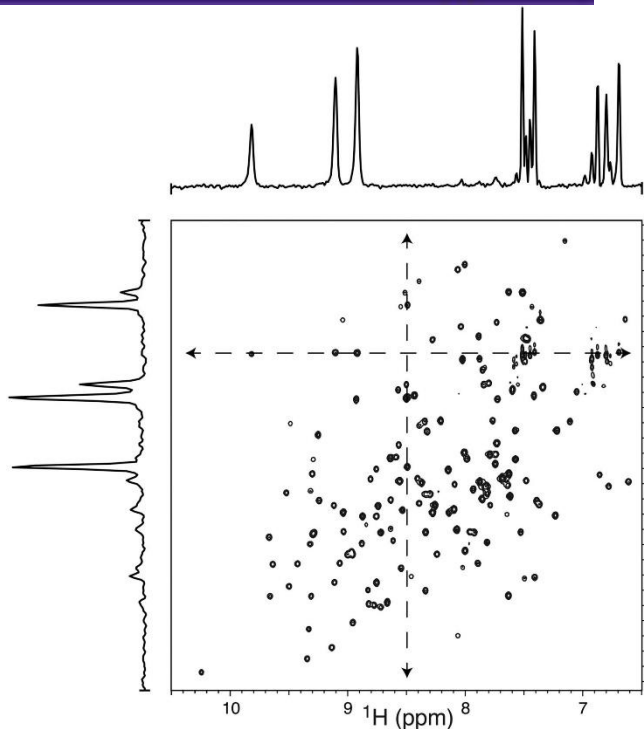
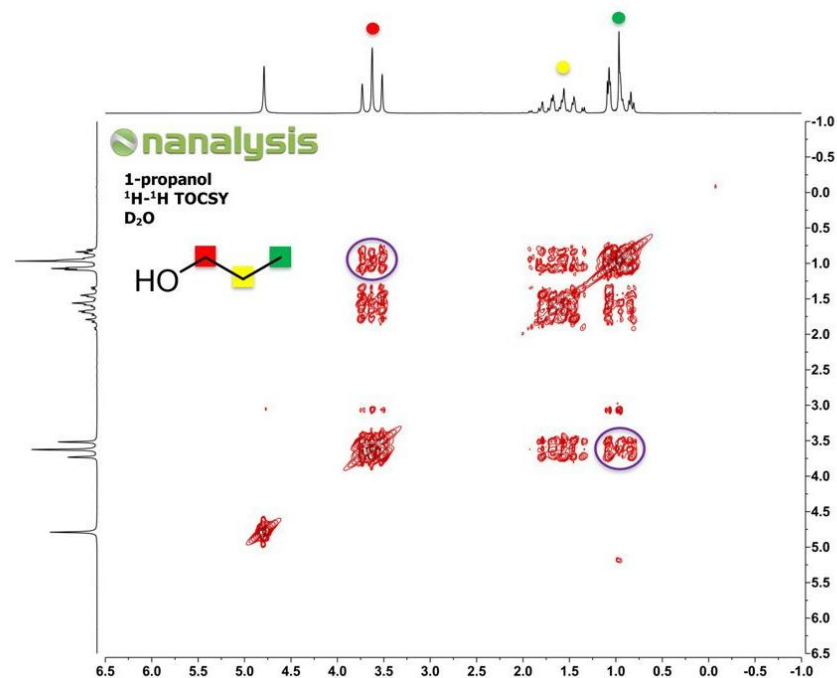
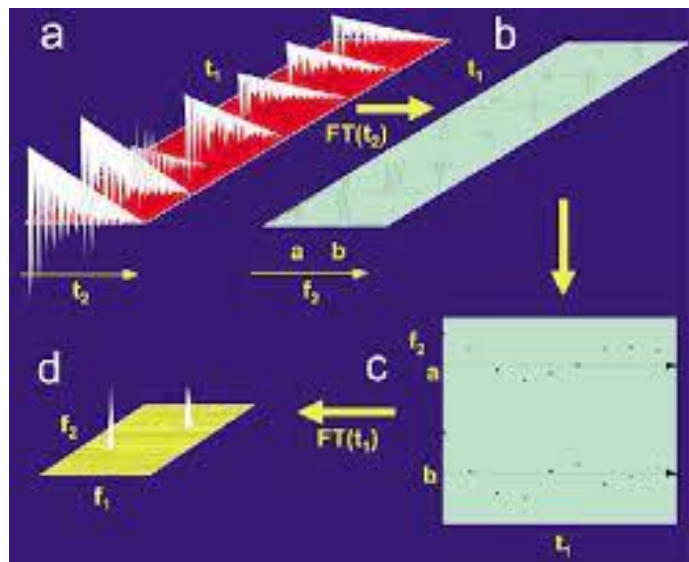
Μαγνητική μη
ισοδυναμία

$AA'BB'$



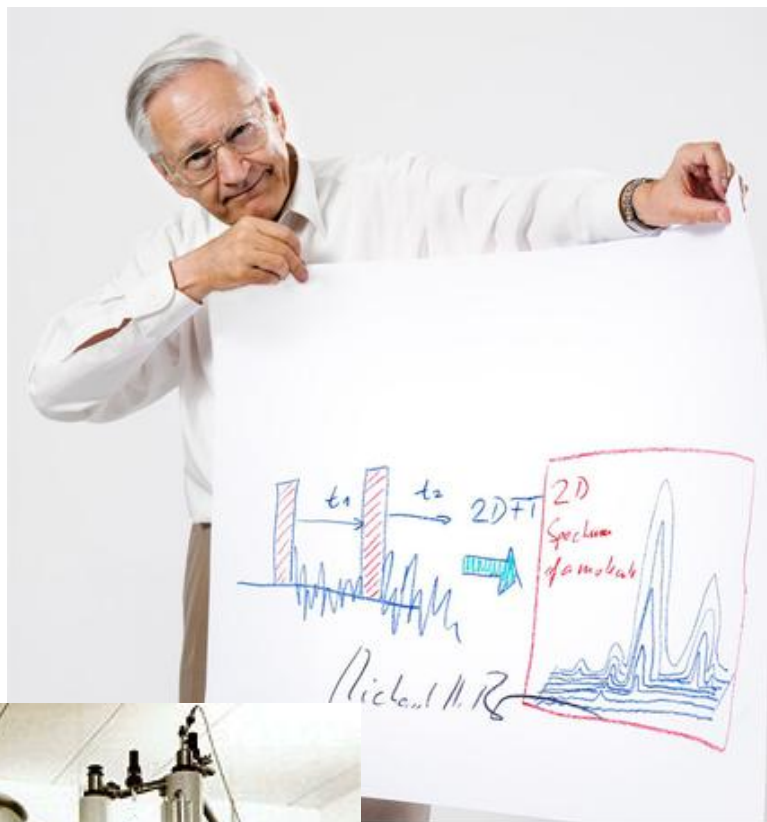


2D NMR



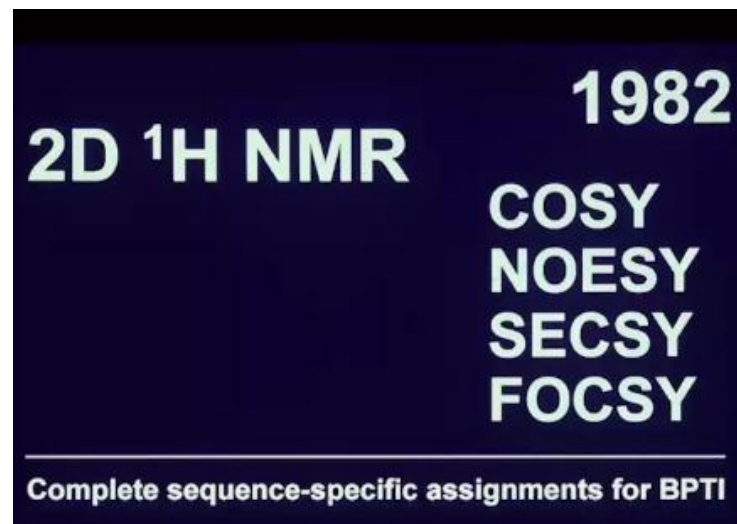


2D or higher-dimensional NMR



Richard Robert Ernst

(1933 - June 4th 2021) was among the **developers of Fourier transform NMR** spectroscopy, and later extended this to **two- and higher-dimensional NMR spectroscopy**. His work laid the foundations for present-day use of NMR spectroscopy as a universal tool to investigate materials and chemically or biologically relevant molecules.

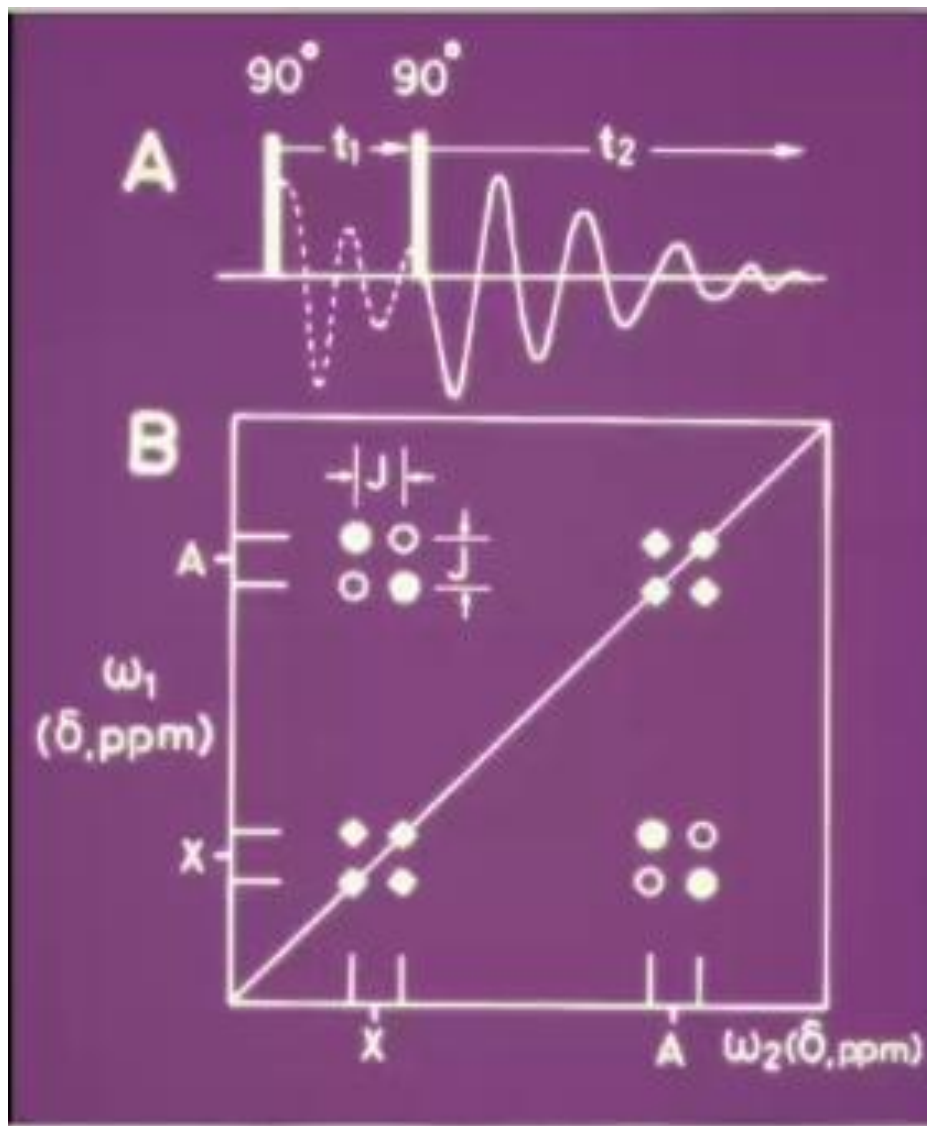


<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.202109253>



2D or higher-dimensional NMR

An artificially 2nd dimension of time is created

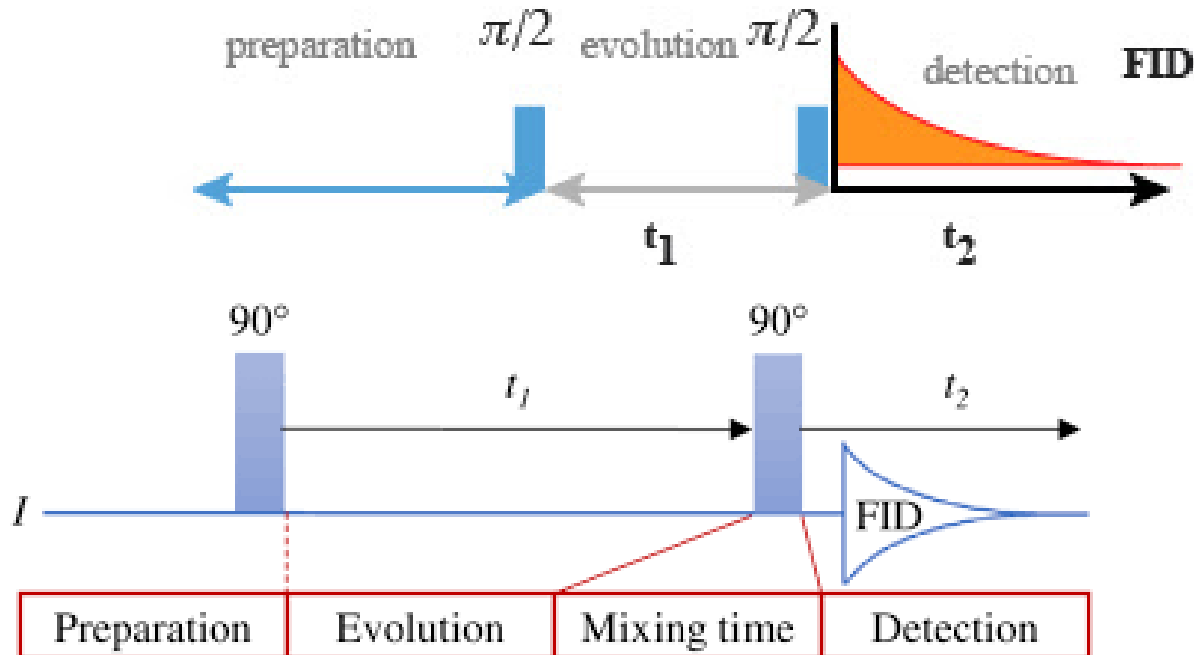




2D or higher-dimensional NMR

An artificially 2nd dimension of time is created

COSY pulse sequence

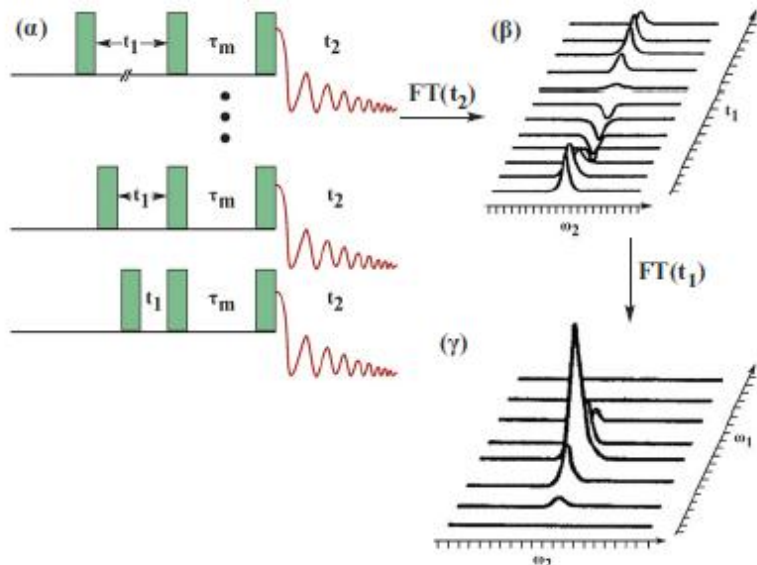


Η όλη πορεία μαγνητικών επιδράσεων για ένα πείραμα 2D-NMR περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

- α) προετοιμασία των σπιν (**preparation**)
- β) εξέλιξη των σπιν και μαγνήτισης (**evolution**) (t_1)
- γ) ανάμιξη των σπιν (**mixing**) και
- δ) ανίχνευση (**detection**) του σήματος (t_2)

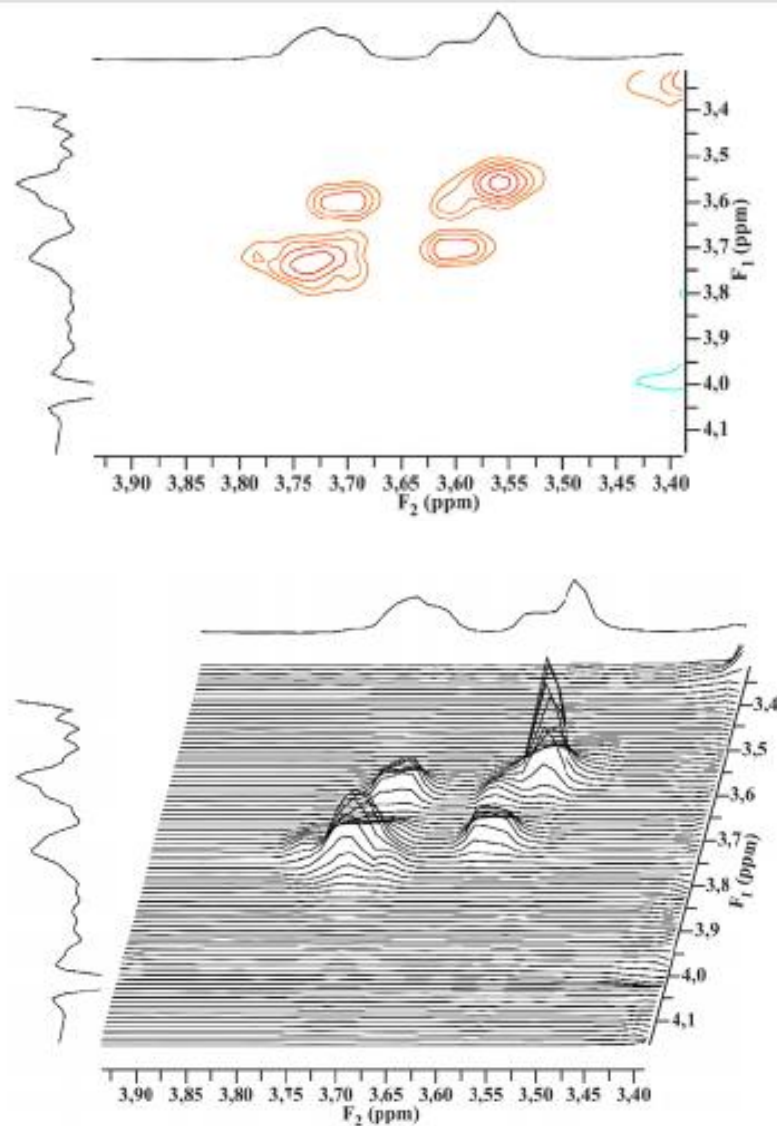


2D or higher-dimensional NMR



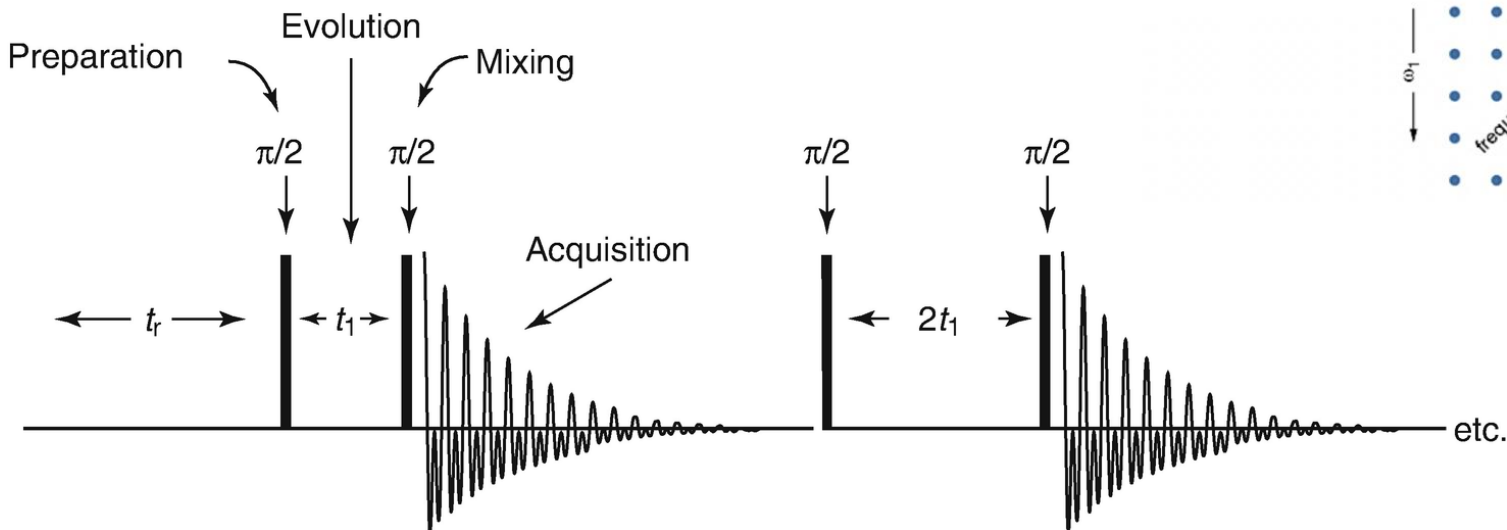
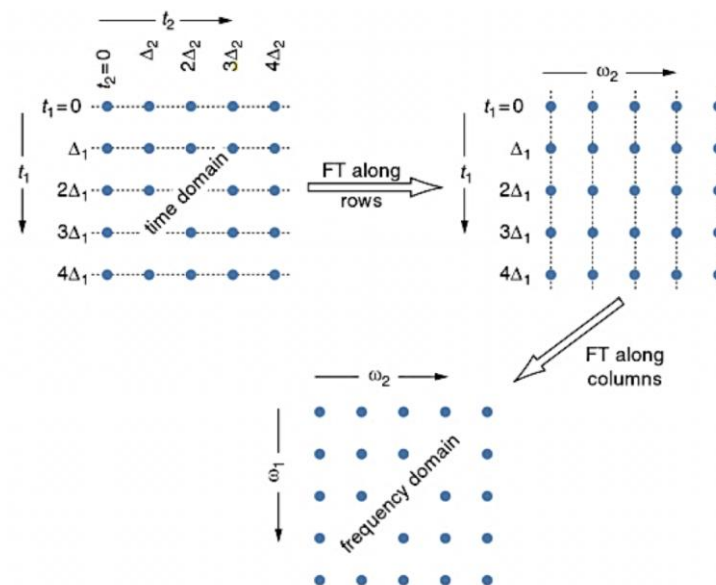
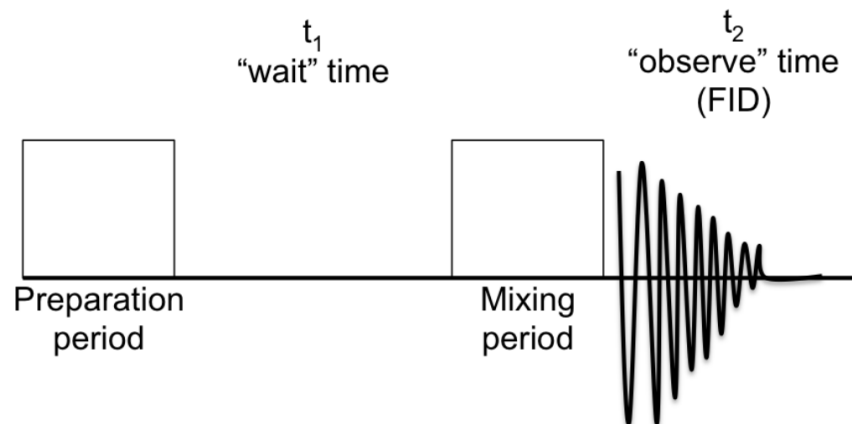
Σχήμα 6.6.4.1. Σειρά μαγνητικών επιδράσεων σε ένα πείραμα δύο διαστάσεων. Η μεταβολή του t_1 παράγει πολλά φάσματα των οποίων η ένταση μίας κορυφής αποτελεί μία συνάρτηση του t_1 , για να δημιουργήσει ένα άλλο φάσμα στη δεύτερη διάσταση.

Παραστάσεις φασμάτων δύο διαστάσεων





2D or higher-dimensional NMR

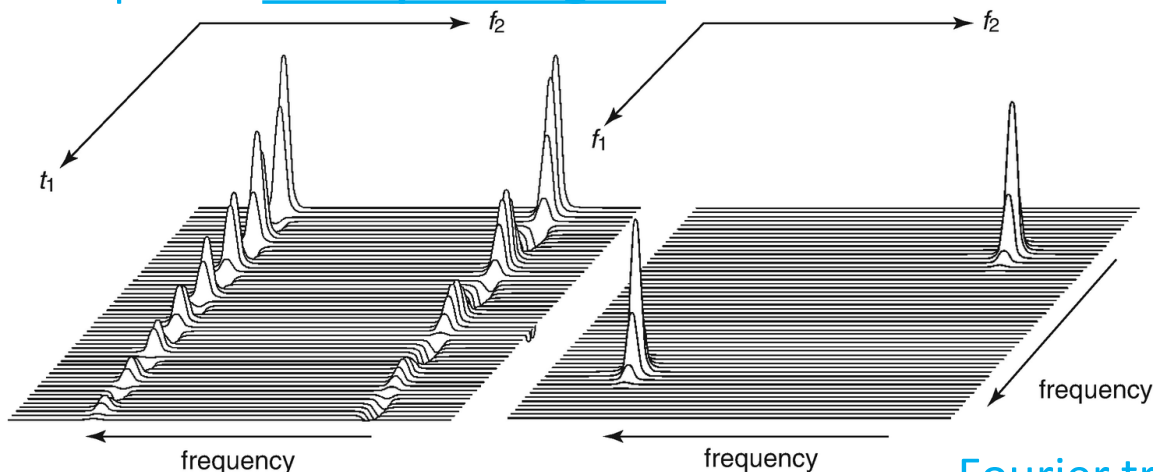


- α) προετοιμασία των σπιν (preparation)
- β) εξέλιξη των σπιν και μαγνήτισης (evolution) (t_1)
- γ) ανάμιξη των σπιν (mixing) και
- δ) ανίχνευση (detection) του σήματος (t_2)



2D or higher-dimensional NMR

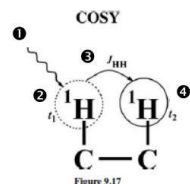
Fourier transformation in two dimensions
for a pair of uncoupled singlets



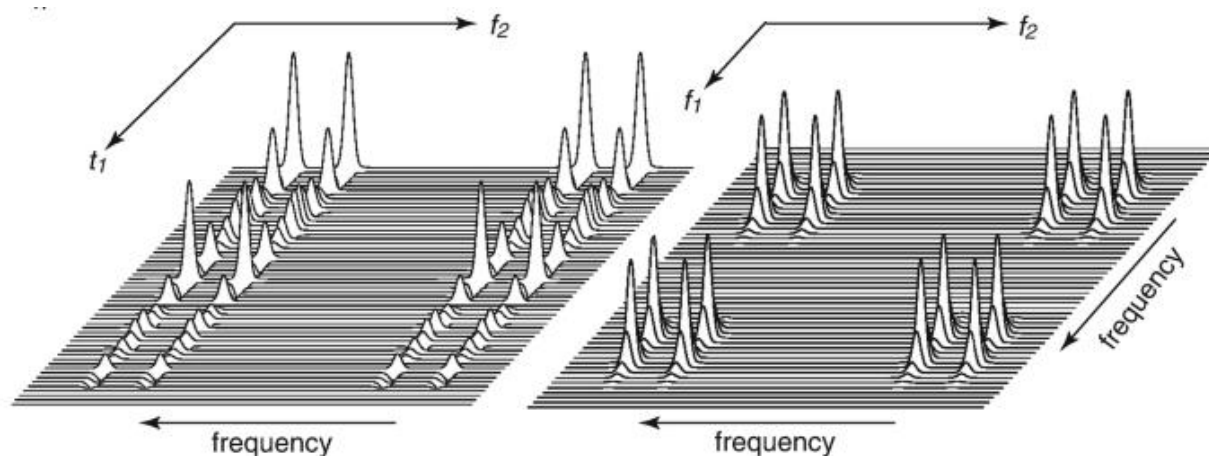
Fourier transformation in two dimensions
of a coupled set of peaks in a COSY

Anatomy of the COSY pulse sequence

^1H : ① $90^\circ x'$ - t_1 - $90^\circ x'$ - AQT(t_2)

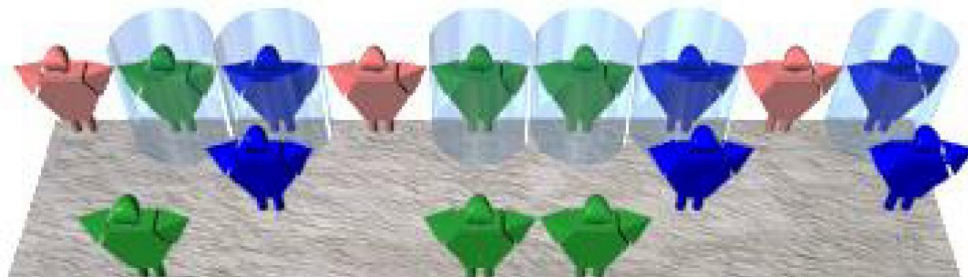


(from: Jacobsen, *NMR Spectroscopy Explained*)



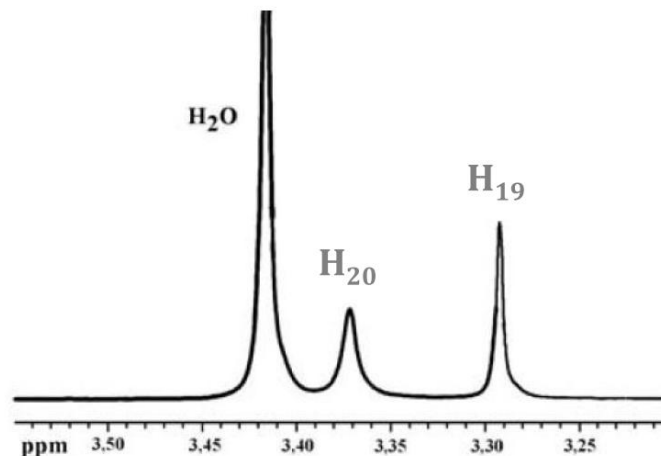
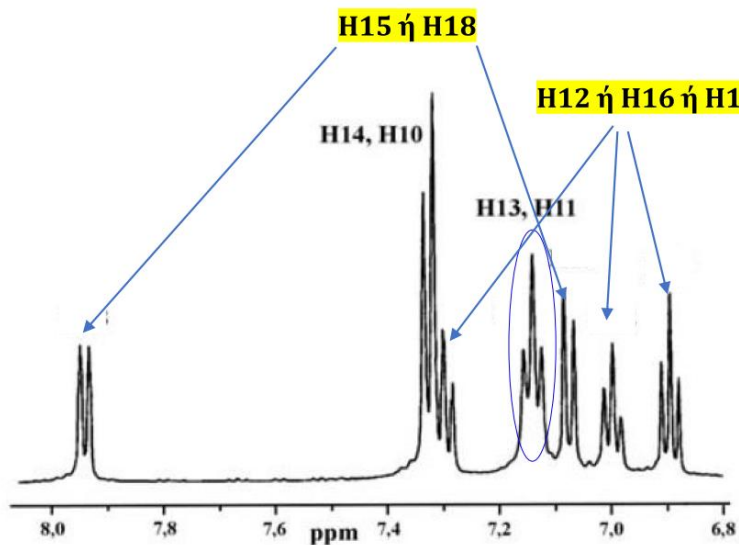
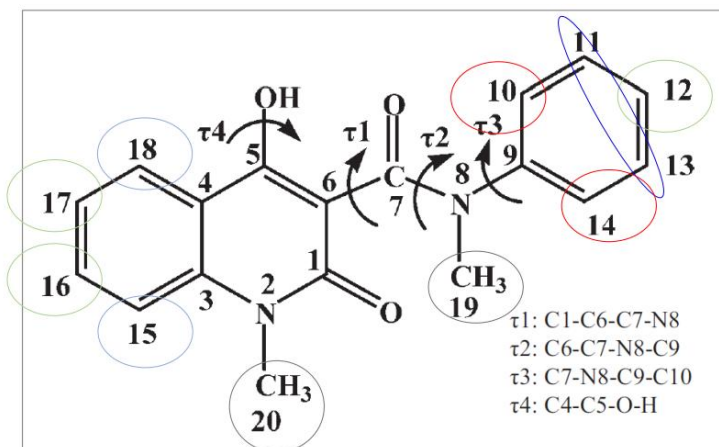


Why do we need 2D spectra?



στ) φασματοσκοπία δύο ή περισσότερων διαστάσεων

Λινομίδη (Linomide): Δραστική ένωση, που διεγείρει διάφορες λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος και αντιπροσωπεύει ένα ελκυστικό φάρμακο στη θεραπεία των διαφόρων αυτοάνοσων ασθενειών

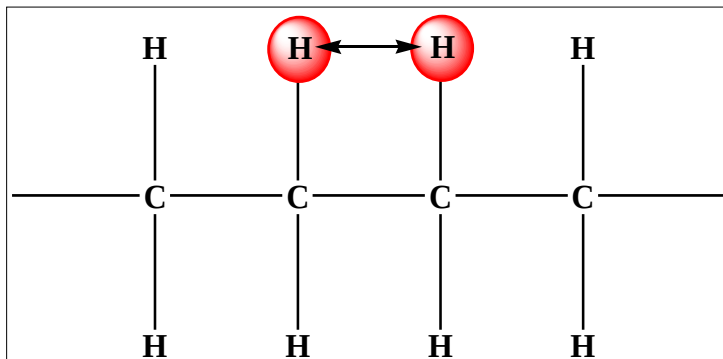




α) Ομοπυρηνικά / Homonuclear

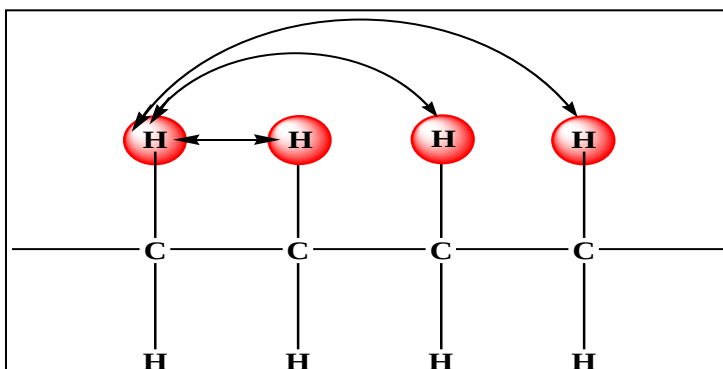
COSY

COrrrelation
SpectroscopY



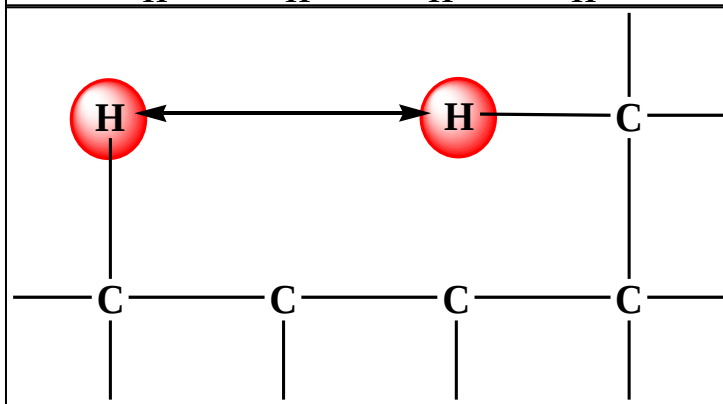
TOCSY

TOtal COrrrelation
SpectroscopY



NOESY

Nuclear Overhauser
Effect SpectroscopY



COSY

^1H - ^1H (2-3 bonds)

Spin systems in small
molecules

TOCSY

^1H - ^1H (whole system)

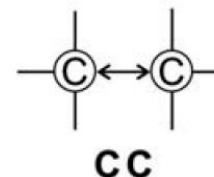
Sugar rings, peptides

NOESY

^1H - ^1H (through-space)

3D structure,
conformation

INADEQUATE



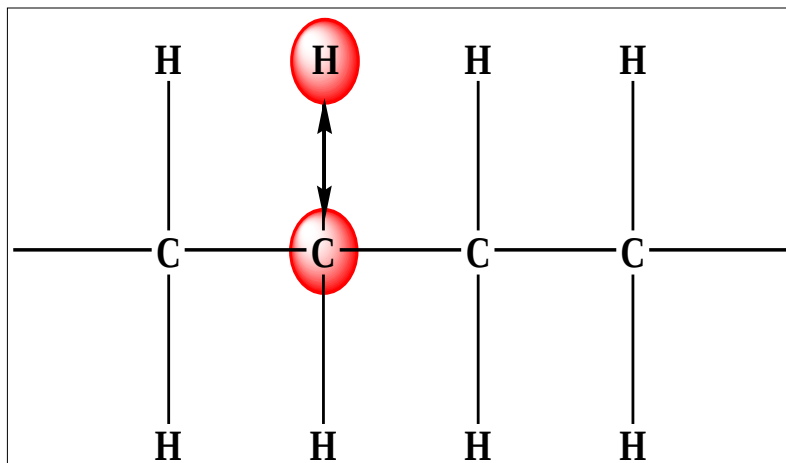
Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment



β) Ετεροπυρηνικά / Heteronuclear

HSQC

Heteronuclear
Single Quantum
Coherence

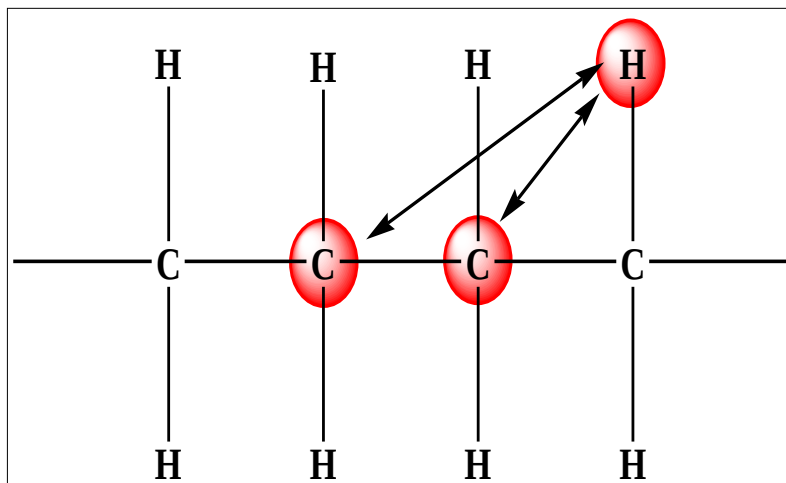


HSQC ^1H - ^{13}C (1-bond) Direct C-H assignments

HMBC ^1H - ^{13}C (2-4 bonds) Quaternary carbons, connectivity

HMBC

Heteronuclear
Multiple Bond
Correlation





α) Ομοπυρηνικά / Homonuclear

Κύριες Κατηγορίες NMR:

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

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

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

a) 2D-J NMR (J-Resolved NMR Spectroscopy)

- Used for analyzing **J-coupling constants** between nuclei.
- Separates **chemical shifts** and **J-couplings** into different dimensions, aiding spectral interpretation.

b) COSY-NMR (Correlated Spectroscopy)

- Detects **through-bond** correlations between coupled nuclei.
- Helps identify **spin systems** in molecules, commonly used for ^1H - ^1H correlations.

c) NOESY-NMR (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

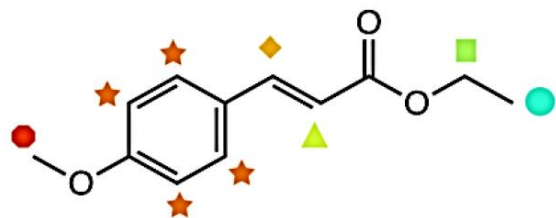
- Detects **through-space** interactions via the **Nuclear Overhauser Effect (NOE)**.
- Provides spatial information, crucial for **3D structure determination** of biomolecules.

(2 άξονες συχνότητων: **f2**-συνήθως απορρόφηση **f1**-άλλες πληροφορίες)



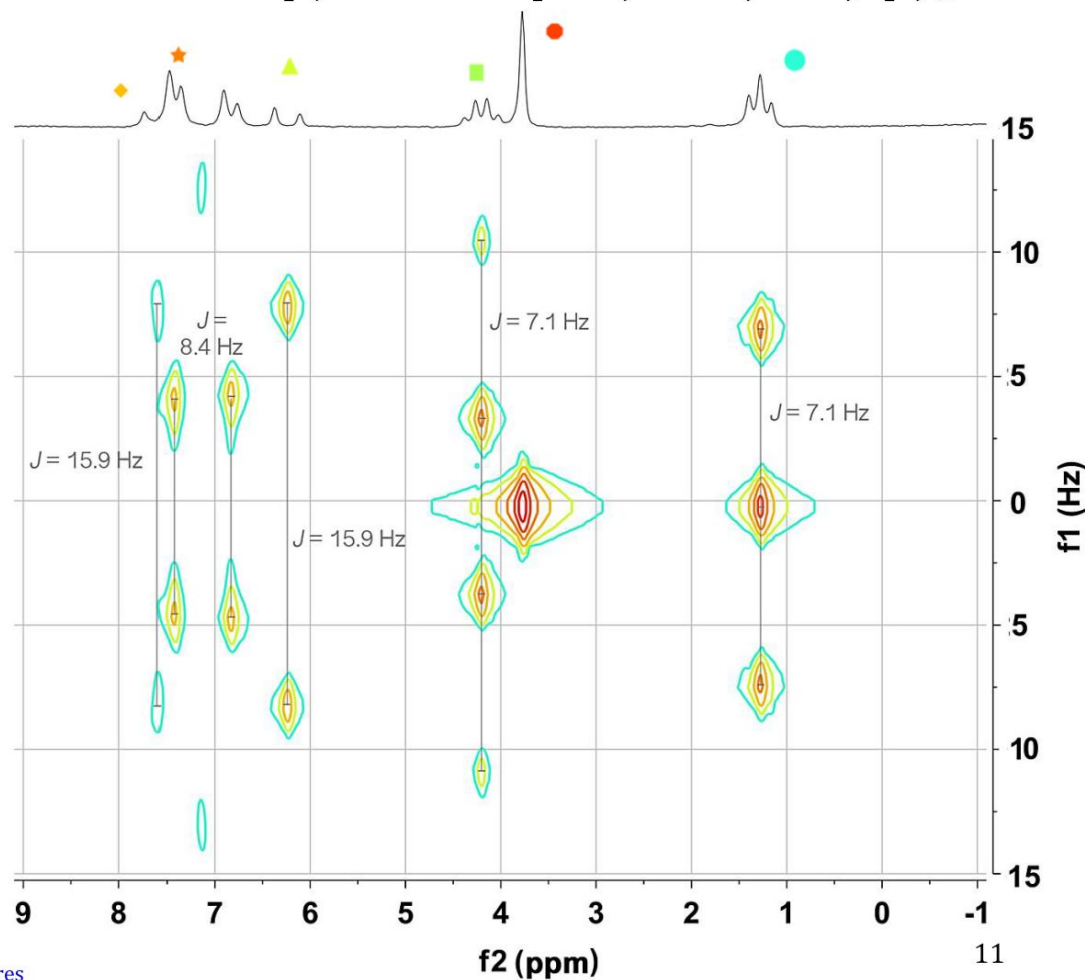
J-resolved (pseudo-2D)

A) 2D-NMR φάσματα ανάλυσης σταθεράς σύζευξης J



Άξονας f2: απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα

Άξονας f1: σταθερά σύζευξης (ομοποιρηνικής ή ετεροπυρηνικής)



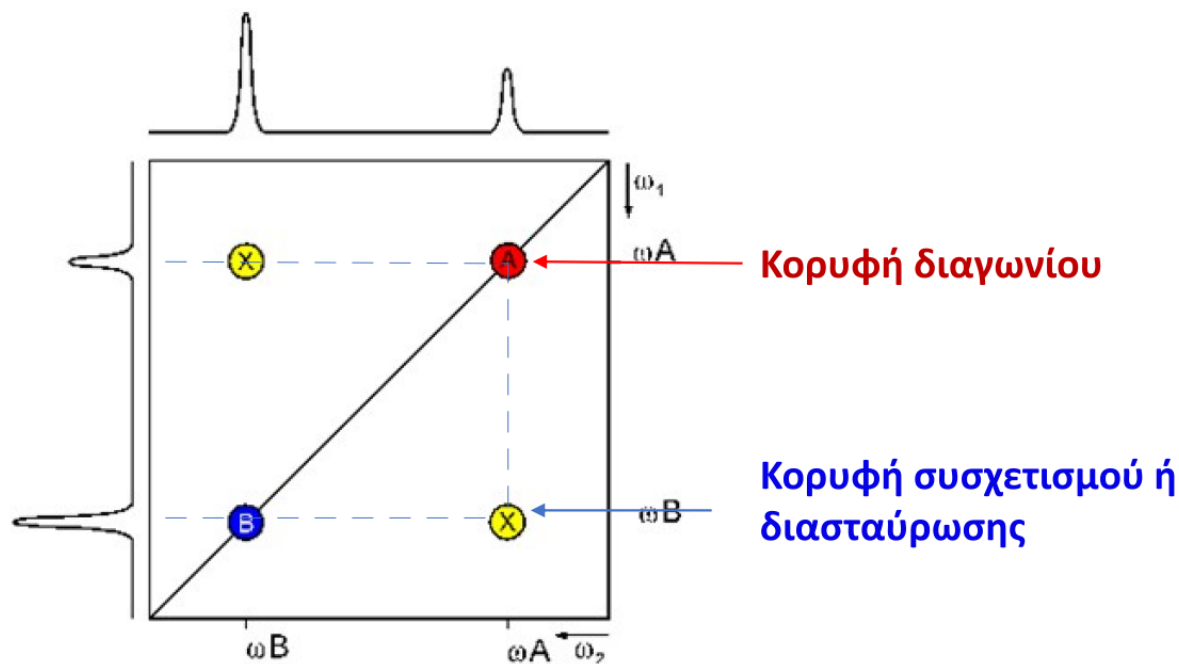


COSY-homonuclear COrrrelation SpectroscopY

Και οι δυο άξονες **f2** και **f1** του COSY φάσματος NMR περιέχουν **συχνότητες**.

- Στα **ομοπυρηνικά φάσματα COSY** και οι δύο άξονες f2, f1 περιέχουν απορροφήσεις του ίδιου πυρήνα, όπως ^1H - ^1H ή ^{13}C - ^{13}C .
- Στα **ετεροπυρηνικά φάσματα COSY** φάσματα ο ένας άξονας **f2** περιέχει απορροφήσεις του ενός πυρήνα, συνήθως ^1H , ενώ ο άλλος άξονας **f1** περιέχει απορροφήσεις του **άλλου πυρήνα** π.χ. ^{13}C .

2 πληροφορίες: συσχετίσεις & σταθερές σύζευξης



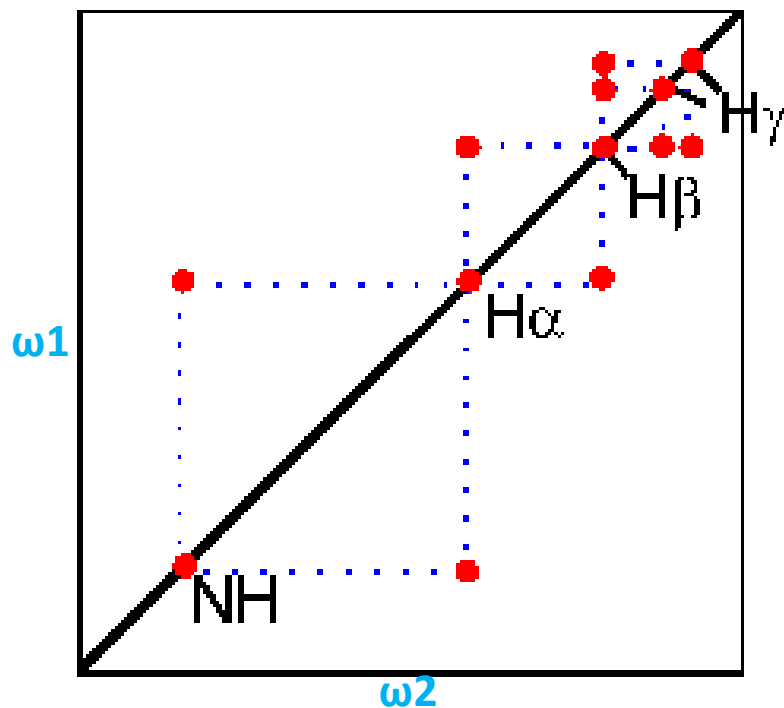
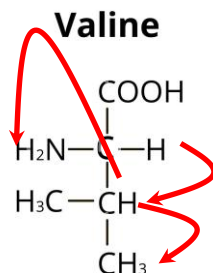
The **contour lines** that appear along the **diagonal** of a COSY spectrum **represent the projection of the absorptions** from both axes **onto the diagonal of the 2D-NMR spectrum**. The **coupling and interaction** between **any two nuclei of a molecule** can be identified in the **2D-NMR spectrum** from the **symmetric points off the diagonal**, which connect the absorptions of the **two coupled nuclei**.



2D ^1H - ^1H NMR

COSY

^1H - ^1H Correlation through 3J



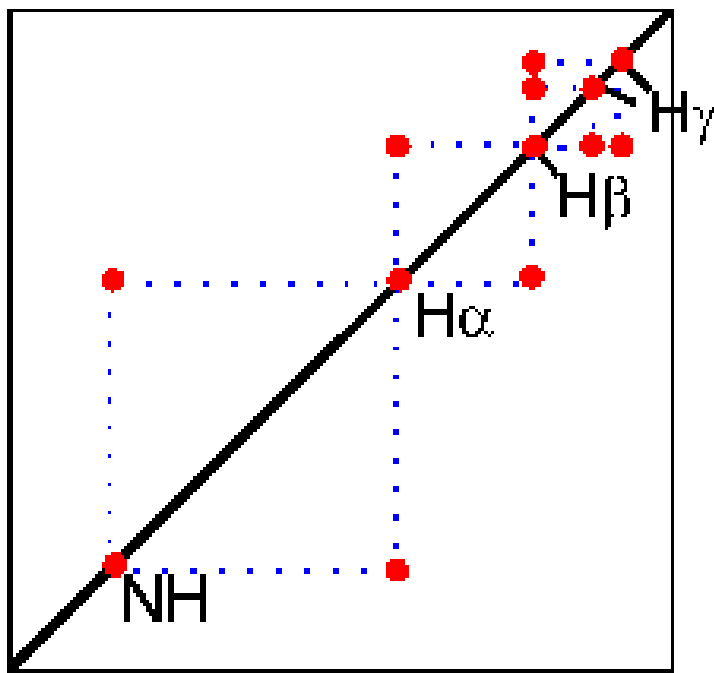
only signals of protons which are **two or three bonds** apart are visible in a COSY spectrum (red signals)



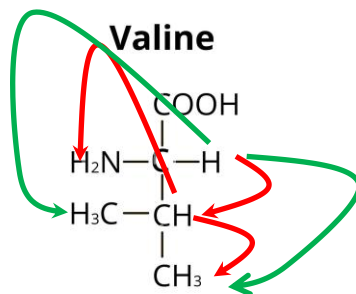
2D ^1H - ^1H NMR

COSY

^1H - ^1H Correlation through 3J

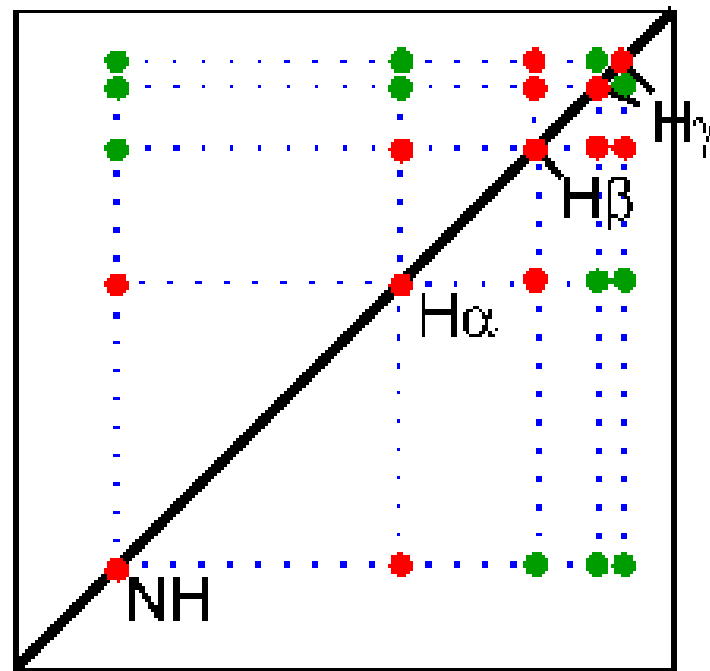


only signals of protons which are **two or three bonds** apart are visible in a COSY spectrum (red signals)



TOCSY

Correlation of the whole spin system



magnetization is dispersed over a **complete spin system** of an amino acid by successive scalar coupling



2D ^1H - ^1H NMR

COSY

^1H - ^1H Correlation through 3J

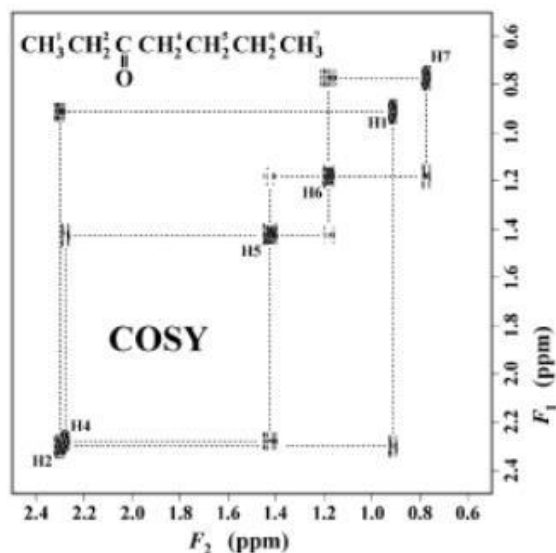


Figure 9.23

TOCSY

Correlation of the whole spin system

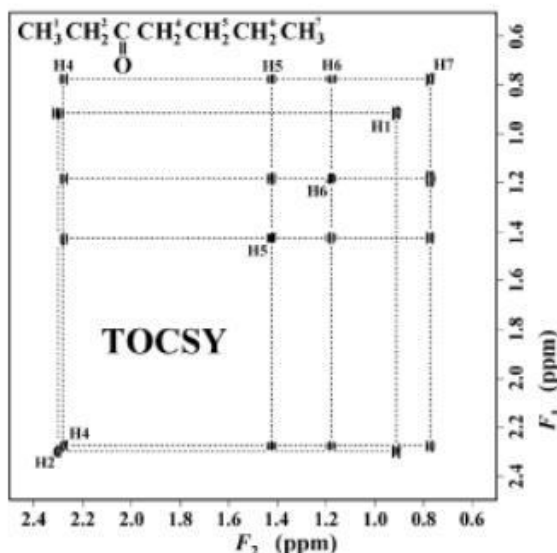


Figure 9.24

(from: Jacobsen, *NMR Explained*)

only signals of protons which are **two or three bonds** apart are visible in a COSY spectrum (red signals)

magnetization is dispersed over a **complete spin system** of an amino acid by successive scalar coupling



Παράδειγμα 1

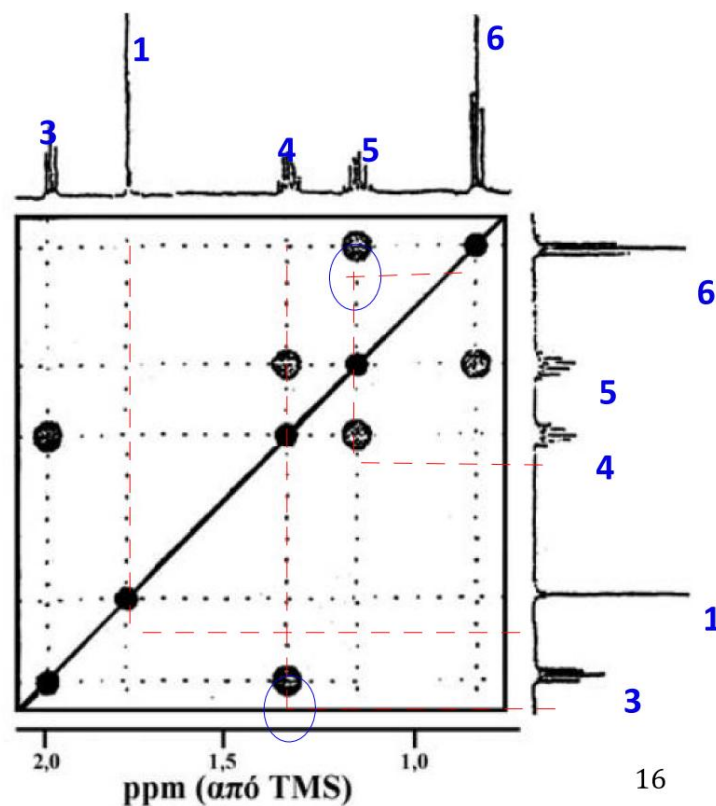
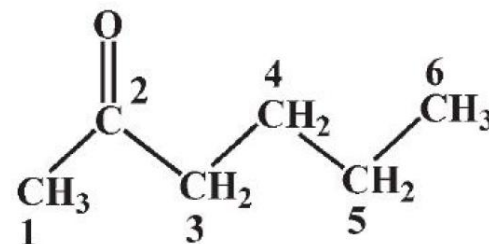
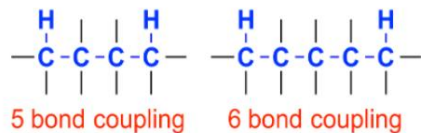
Ομοπυρηνικό φάσμα COSY της εξανόνης

COSY



1,6 → 5 → 4 → 3

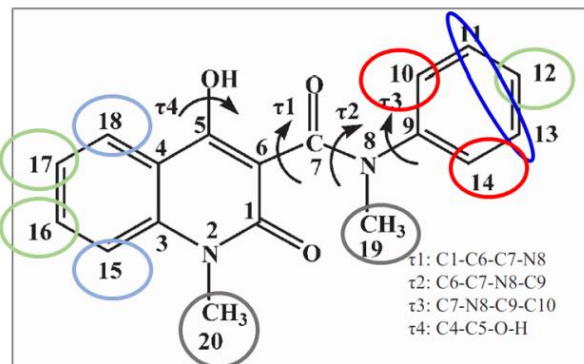
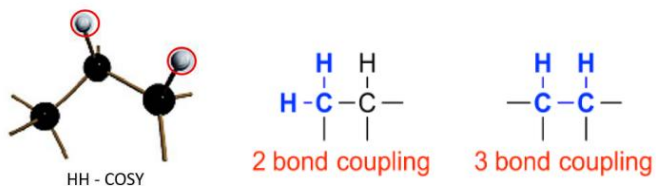
TOCSY



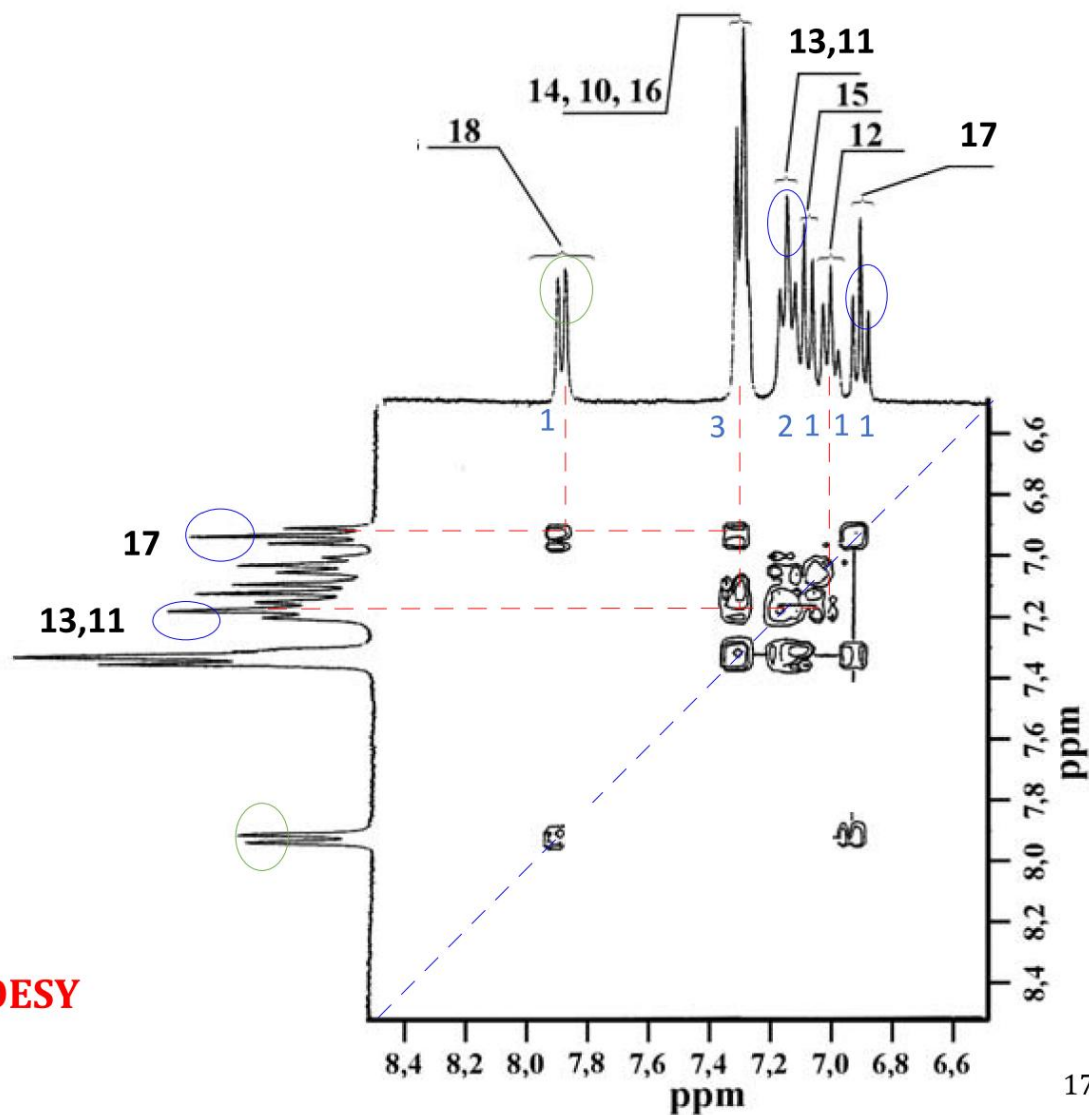


Παράδειγμα 2

Ομοπυρηνικό φάσμα COSY
της λινομίδης



Ταυτοποίηση των H19 & H20 με NOESY





Nuclear Overhauser Effect (NOE)

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

Η αλληλεπίδραση αυτή είναι δυνατή, όταν οι δύο πυρήνες είναι πολύ κοντά ($\leq 5,5 \text{ \AA}$), έτσι ώστε να υπάρχει NOE αποτέλεσμα μέσω του χώρου κατά τη διέγερση και αποκατάσταση των πυρήνων

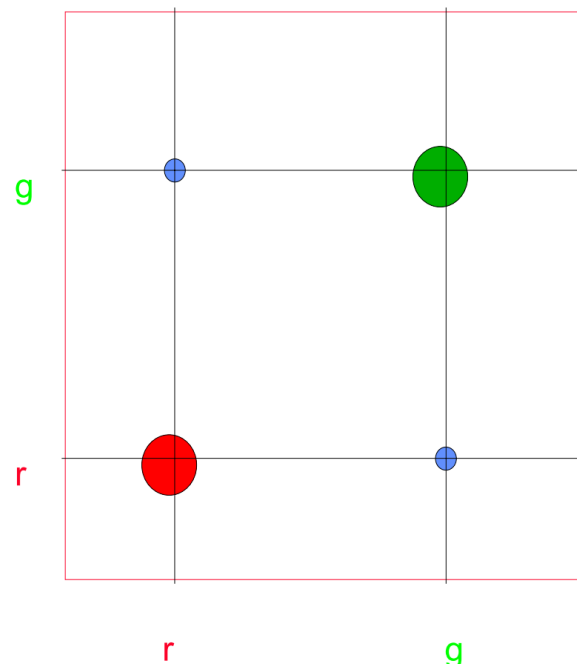
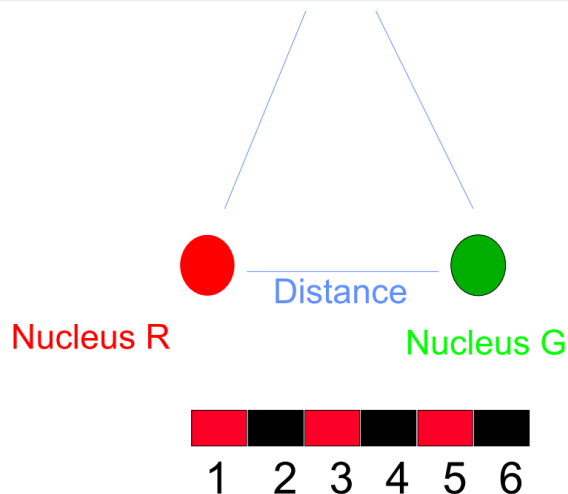


Figure 23. Schematic presentation of a two-dimensional NMR spectrum recording the Nuclear Overhauser effect between **nucleus R** and **nucleus G**. The effect is measured by the intensity of the blue cross peaks at $((r,g)$ and (g,r) .

The NOE Phenomenon

A change in the **intensity of one NMR signal** when another nearby spin is perturbed, due to **dipole-dipole interactions** through space (not bonds!). **Mechanism: Cross-relaxation** during spin-state transitions. Transmitted via **mutual flipping of spins** in the magnetic field.

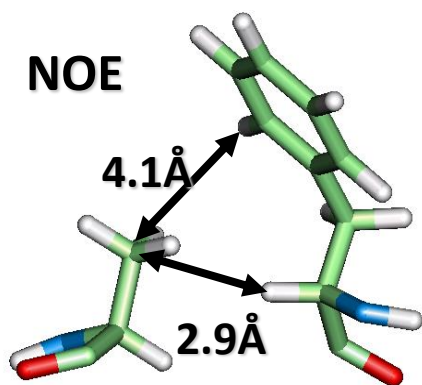
What NOESY Tells Us

1. **Intramolecular Interactions:** proton pairs closer than $5 \text{ \AA}$
2. **Molecular Conformation:** eg *cis* vs. *trans* isomers
3. **3D Structure**

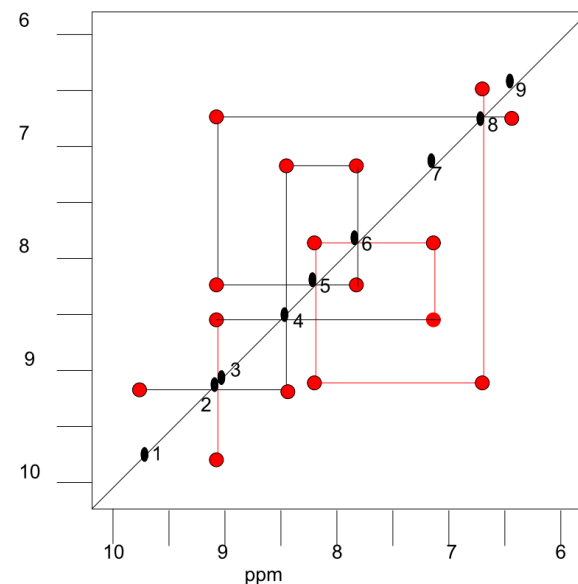


Nuclear Overhauser Effect (NOE)

- Dipole-dipole relaxation
- through space correlation ($<5\text{\AA}$)
 - stereochemistry and conformation of molecules



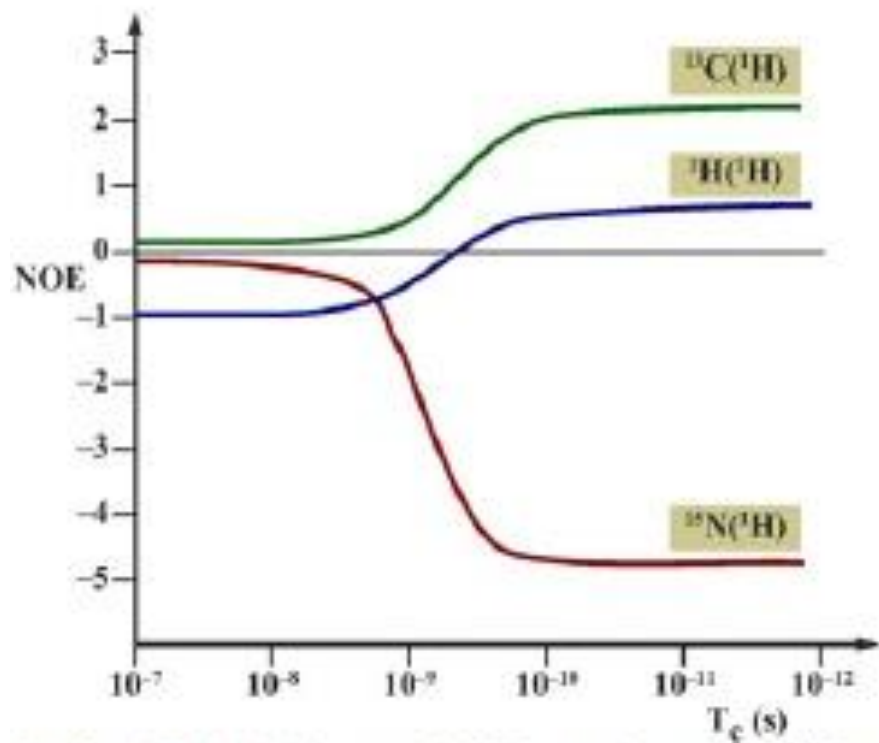
- Irradiate one nucleus
 - intensity of nuclei which are close in space change
 - magnitude change depends on nuclei type
 - depends on distance between nuclei



Η συνεισφορά του Overhauser Albert Overhauser (1925 - 2011) στη μελέτη διαμόρφωσης φαρμακευτικών ουσιών είναι ανεκτίμητη. Τέτοιες μελέτες προάγουν το σχεδιασμό και τη σύνθεση καινοτόμων φαρμακευτικών προϊόντων, τα οποία να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου.



Nuclear Overhauser Effect (NOE)



Σχήμα 7.4.1. Μέγιστο NOE πυρήνων ^1H , ^{13}C , ^{15}N , όταν ακτινοβολείται γειτονικός πυρήνας. Συνάρτηση του NOE από τον τ_c του μορίου.

$$\text{NOE}(n_{A(X)}) = \frac{I - I_0}{I_0}$$

Ένταση	$I > I_0$	$I < I_0$
NOE	+	-

$$\text{NOE}(n_{A(X)}) = \frac{1}{r^6} \cdot f(\tau_c)$$

$$\tau_c = \frac{4\pi n a^3}{3kT}$$

- r απόσταση μεταξύ των πυρήνων A και X.
- τ_c χρόνος συσχετισμού περιστροφής του μορίου (correlation time)



Η συνεισφορά του Overhauser Albert Warner (1925 - 2011) στη μελέτη διαμόρφωσης φαρμακευτικών ουσιών είναι ανεκτίμητη. Τέτοιες μελέτες προάγουν το σχεδιασμό και τη σύνθεση καινοτόμων φαρμακευτικών προϊόντων, τα οποία να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου.

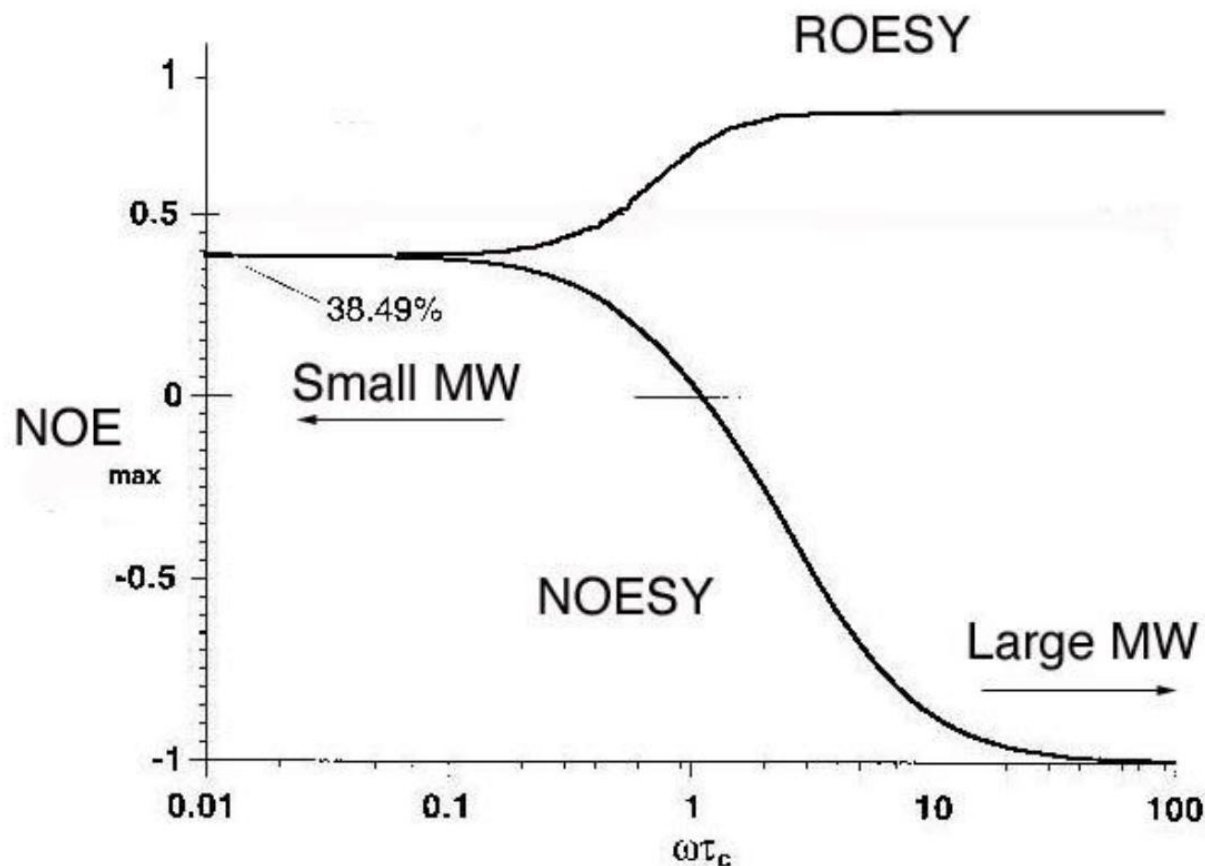
Distance Relationship

•NOE strength:

- **Example:** Methyl groups in a protein (2.5 Å apart) show **much stronger NOE** than distant protons (4–5 Å).



NOESY vs ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy)

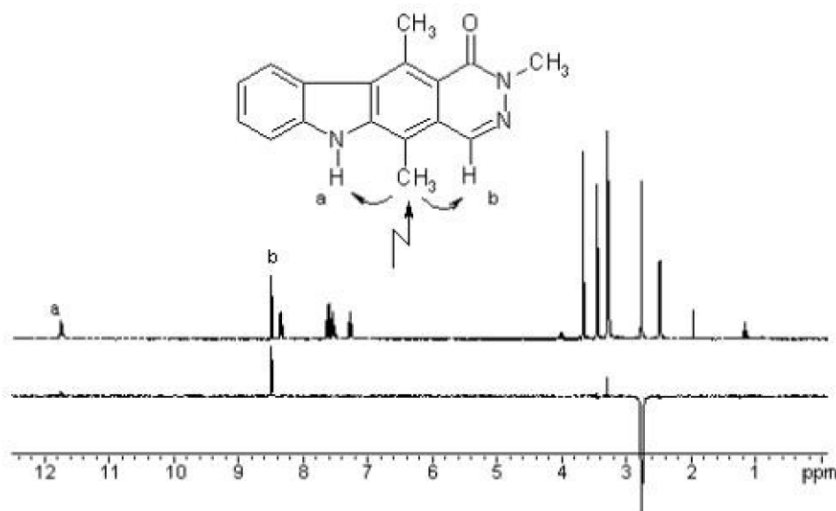


Κατάλληλο για μικρά/μεσαία μόρια που **δεν δείχνουν "κανονικό" NOE** (λόγω γρήγορης περιστροφής). **Πάντα θετικό NOE** (ακόμη και για μικρά μόρια).

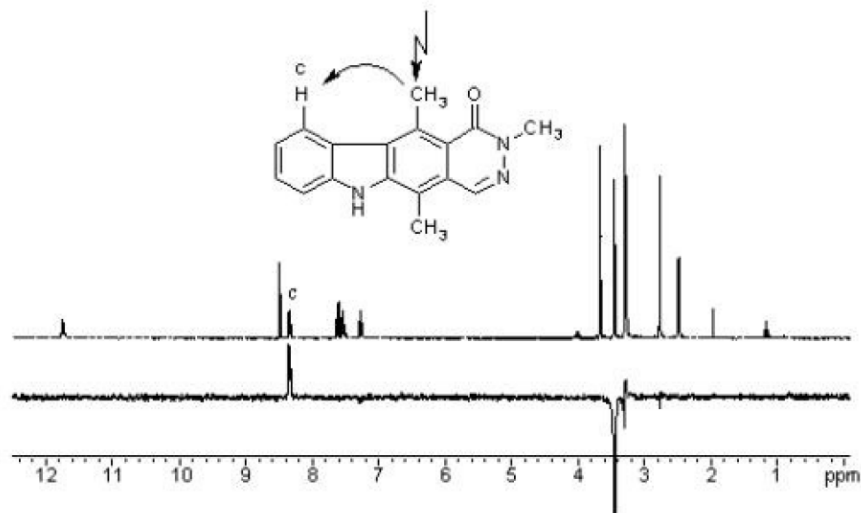
- Αποφεύγει το πρόβλημα του **μηδενικού NOE** σε γρήγορα περιστρεφόμενα μόρια



Nuclear Overhauser Effect (NOE)



1D NOE....

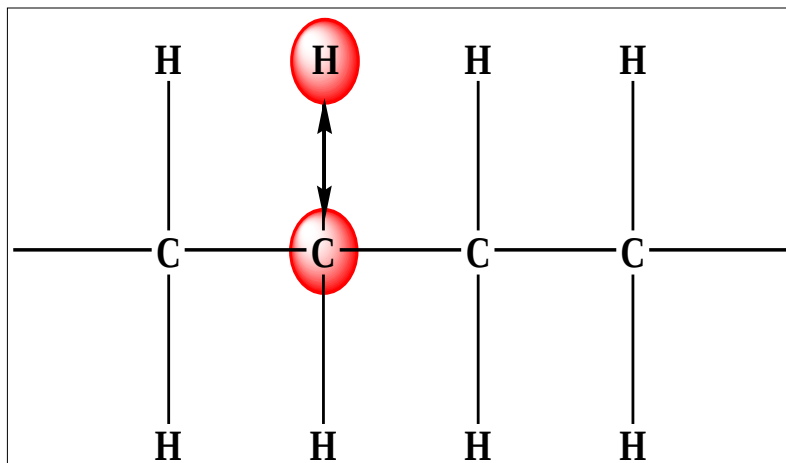




β) Ετεροπυρηνικά / Heteronuclear

HSQC

Heteronuclear
Single Quantum
Coherence

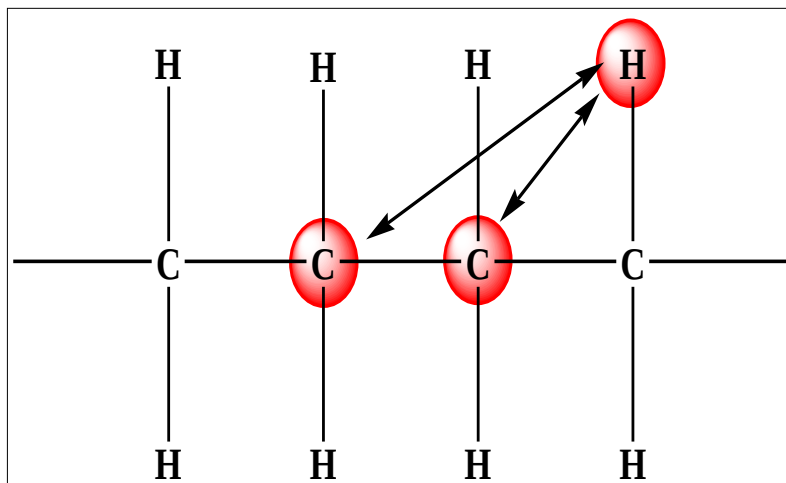


HSQC ^1H - ^{13}C (1-bond) Direct C-H assignments

HMBC ^1H - ^{13}C (2-4 bonds) Quaternary carbons, connectivity

HMBC

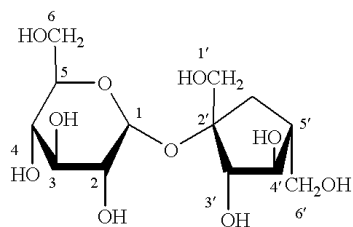
Heteronuclear
Multiple Bond
Correlation



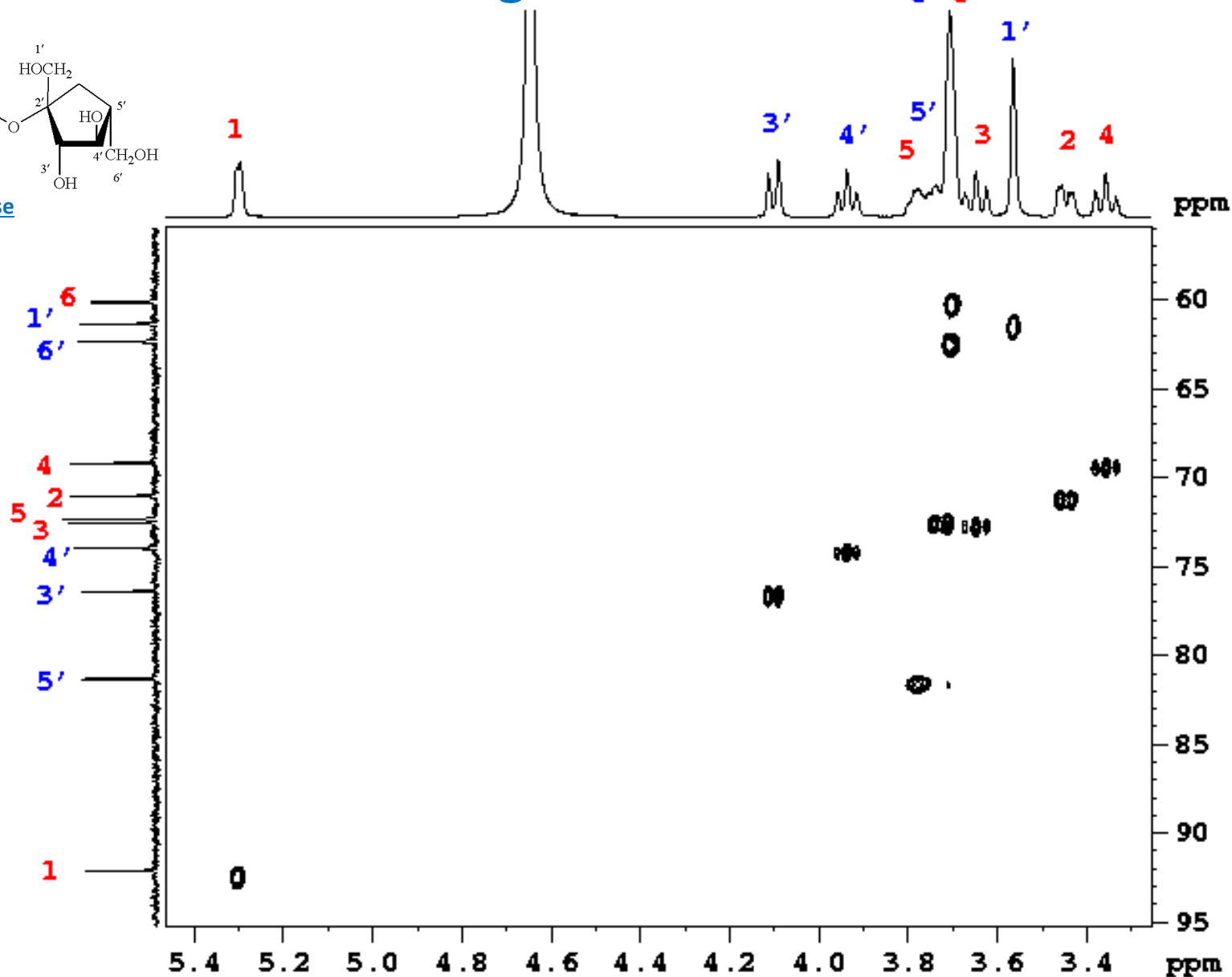


2D or higher-dimensional NMR

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence

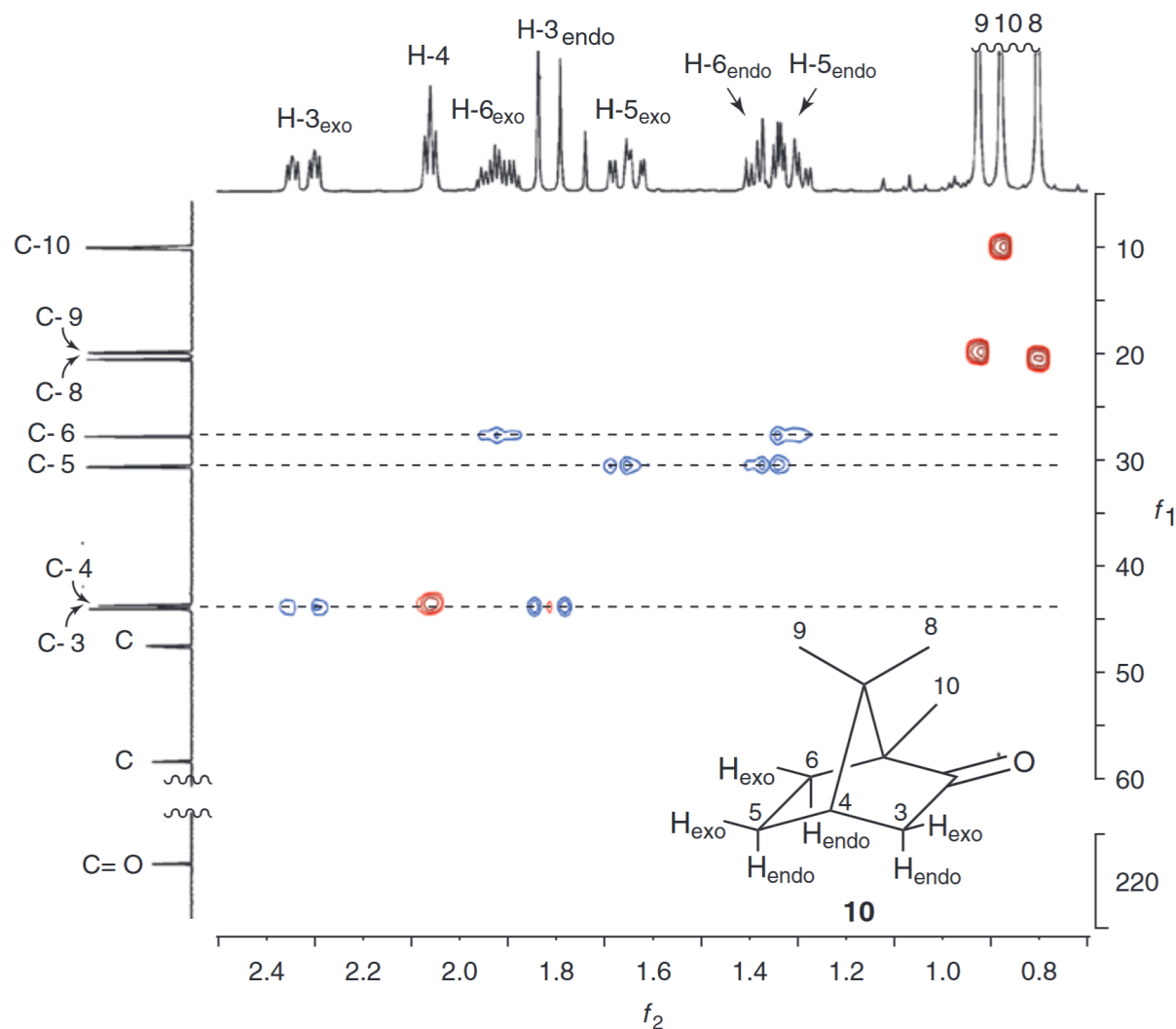


HSQC sucrose





HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence

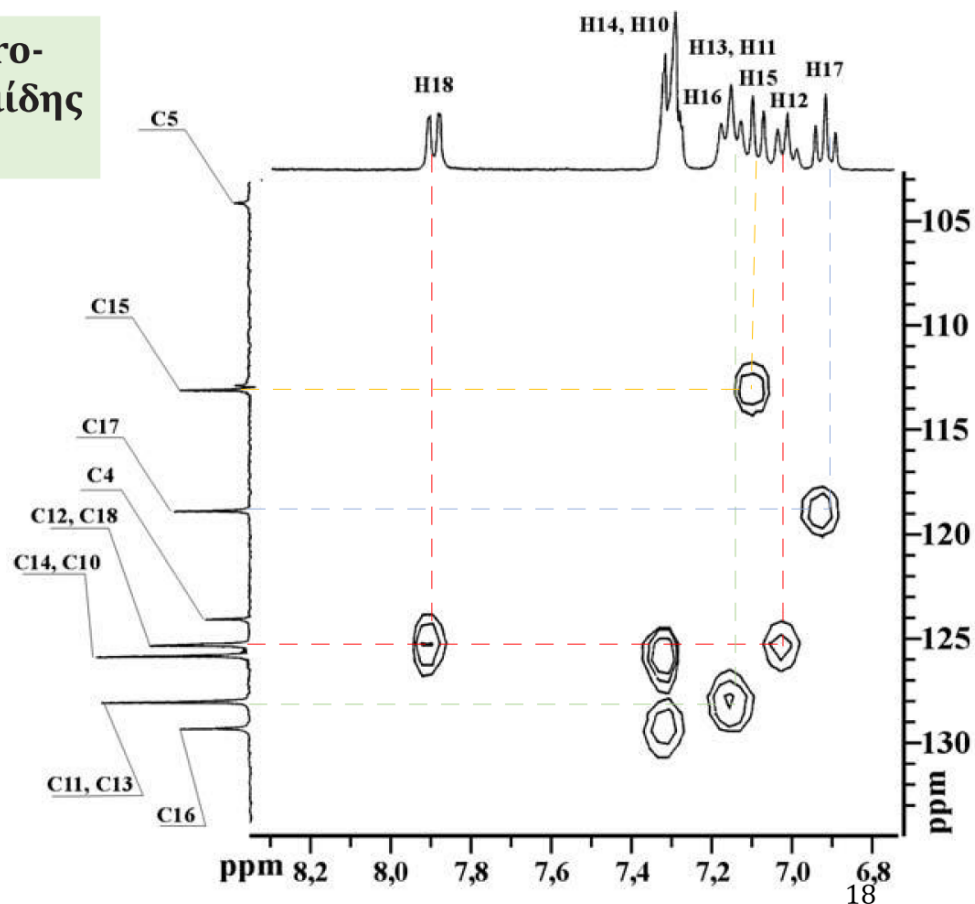
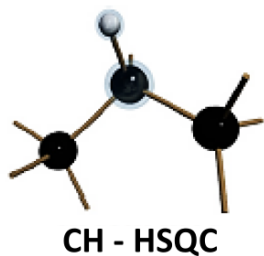
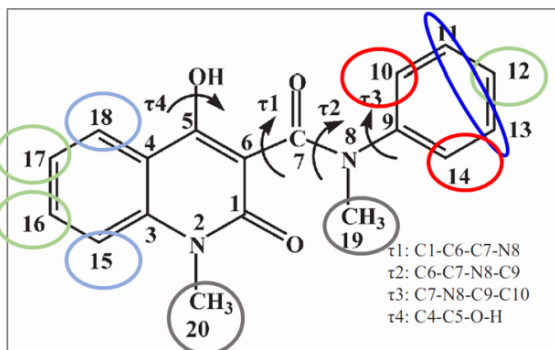


DEPT-edited HSQC spectrum of camphor in CDCl₃



Παράδειγμα 3

Ετεροπυρηνικό πείραμα ^{13}C - ^1H (HSQC Hetero-nuclear Single Quantum Coherence) της λινομίδης (αρωματική περιοχή)

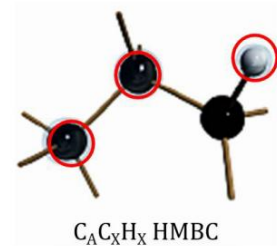
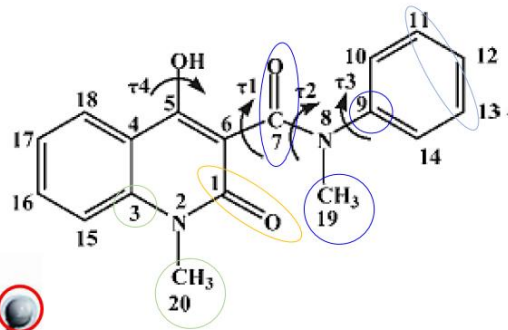
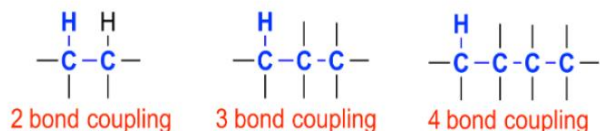




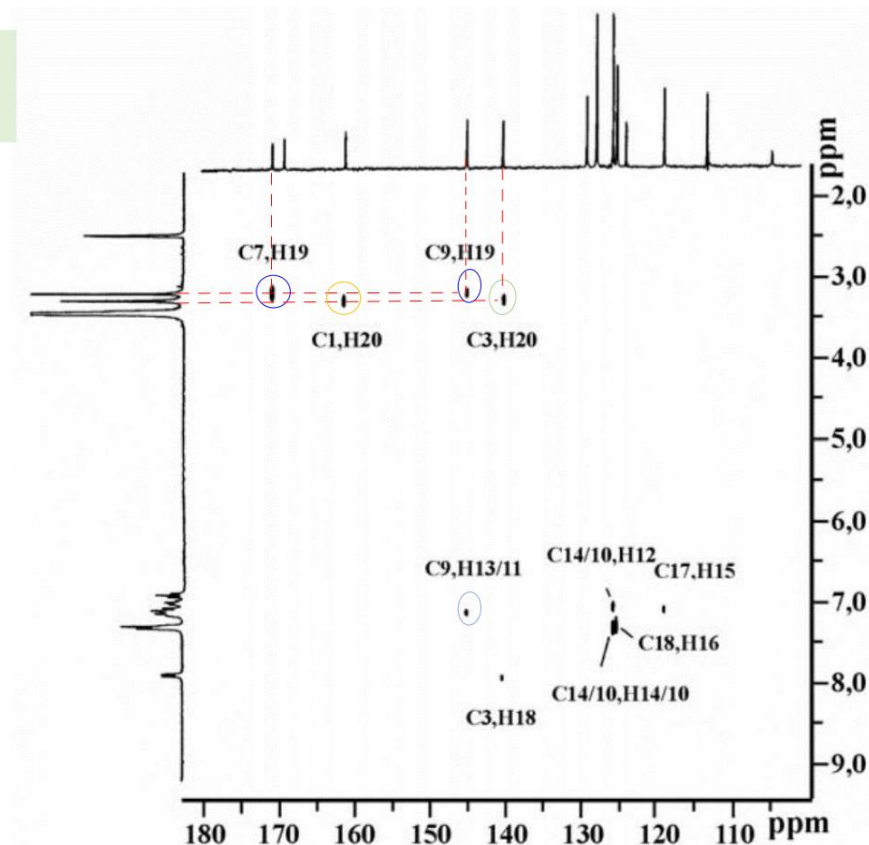
HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation

Detects **2-4 bond correlations** between protons (^1H) and carbons (^{13}C), revealing **non-directly bonded** relationships. **Key Feature:** "Sees through" heteroatoms (O, N) and quaternary carbons (C_q).

Ετεροπυρηνικό πείραμα HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) της λινομίδης



**Ταυτοποίηση τεταρτοταγών ανθράκων και
ανθράκων καρβονυλομάδων**





INADEQUATE - Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment

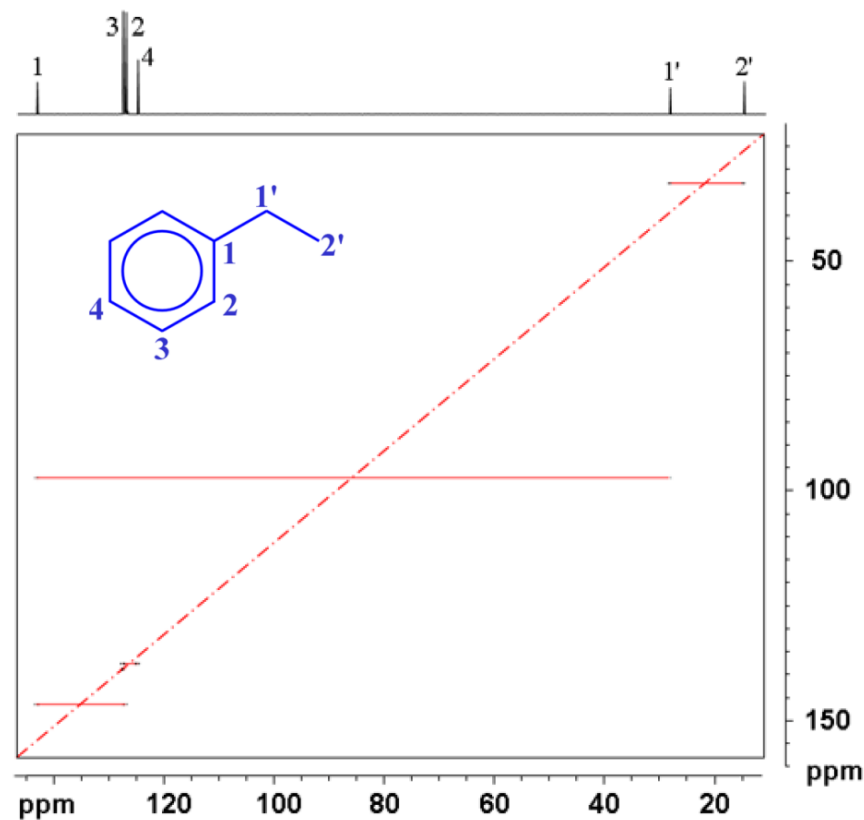
Παράδειγμα 5

Ομοπυρηνικό πείραμα INADEQUATE του
αιθυλοβενζολίου

Όταν το HSQC και HMBC δεν επικυρώνουν την
ταυτοποίηση ενός μορίου

2'-1'-1-2-3-4

- **CH HSQC** → 2 γειτονικά πρωτόνια C-H
- **C_AH_AH_X HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple-**B**ond **C**orrelation) → H_X με απομακρυσμένο C_A

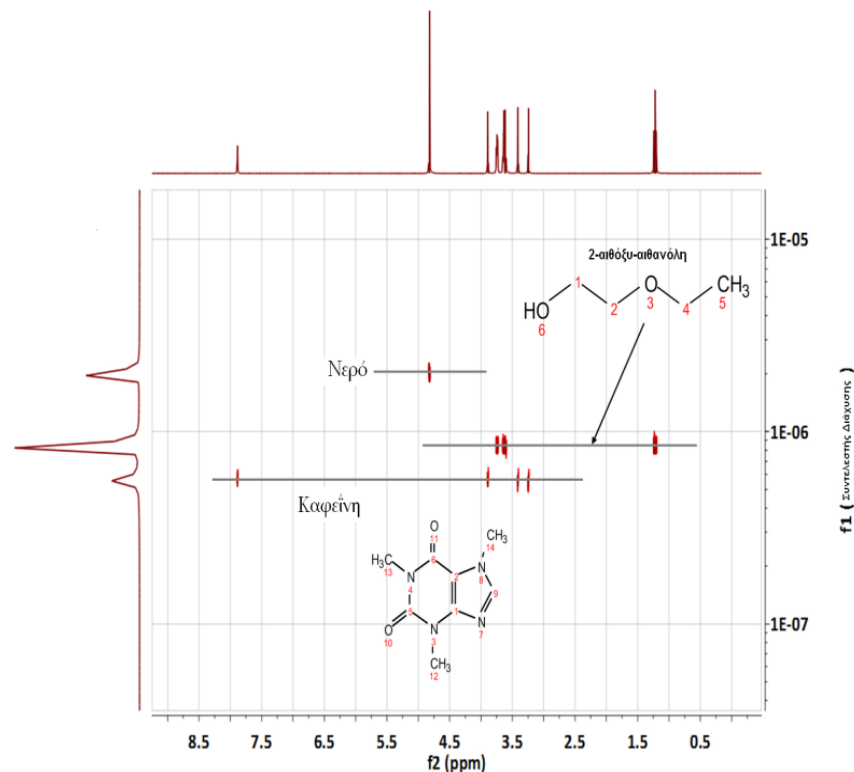
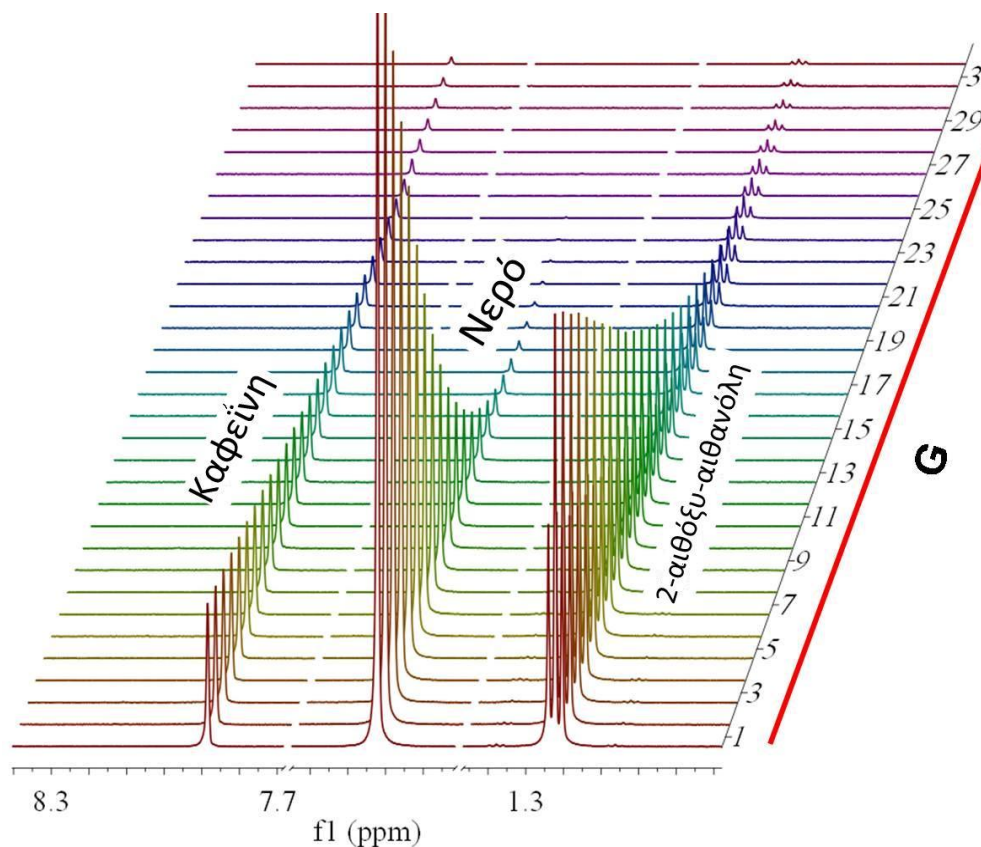




DOSY – Difusion Order Spectroscopy

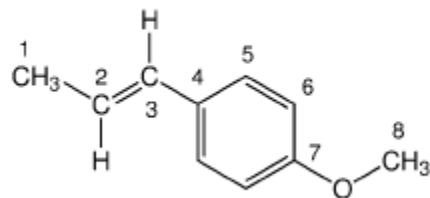
παρέχουν έναν τρόπο για να διαχωριστούν οι ενώσεις σε ένα μείγμα με βάση τους διαφορετικούς συντελεστές διάχυσης που εξαρτάται από :

- Διαφορές στο μέγεθος και το σχήμα του μορίου
- Ιξώδες
- Θερμοκρασία

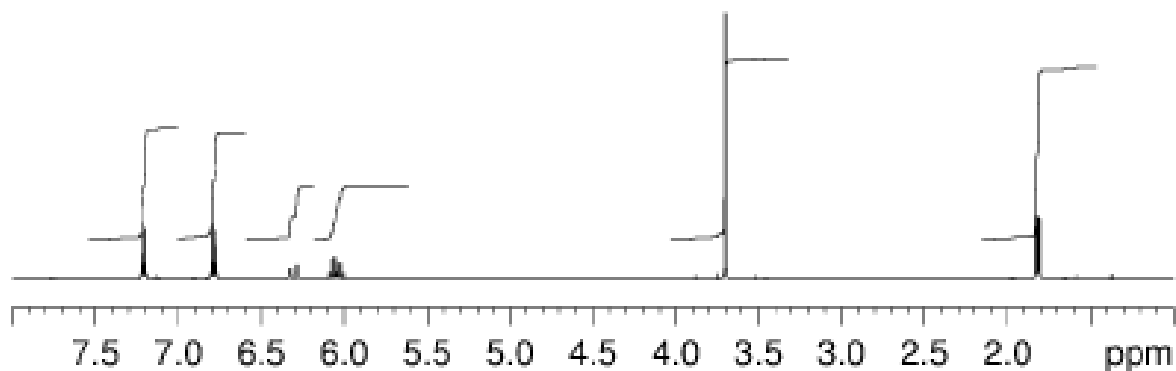




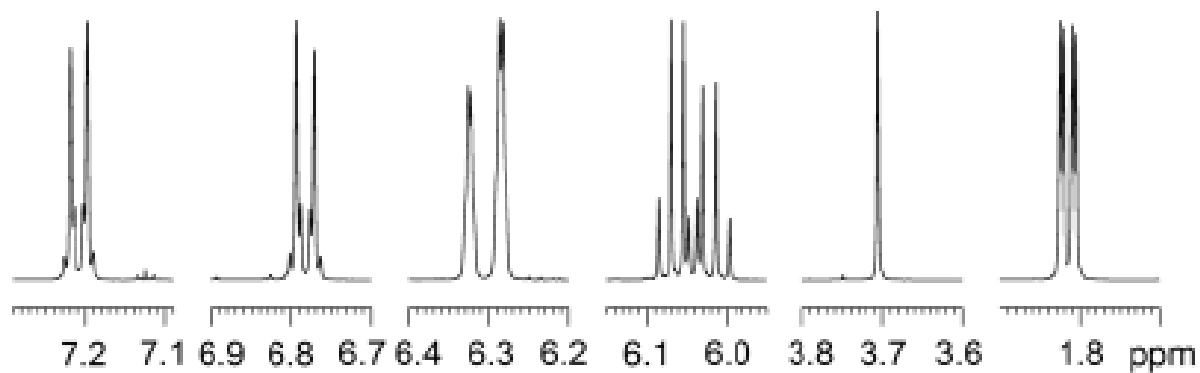
2D NMR



¹H NMR Spectrum
(CDCl₃, 400 MHz)

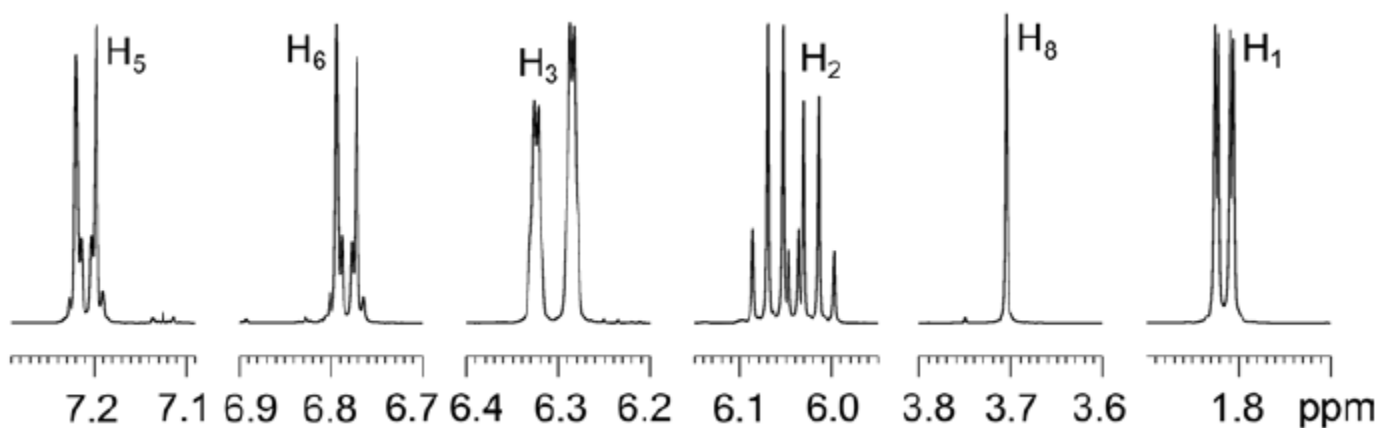
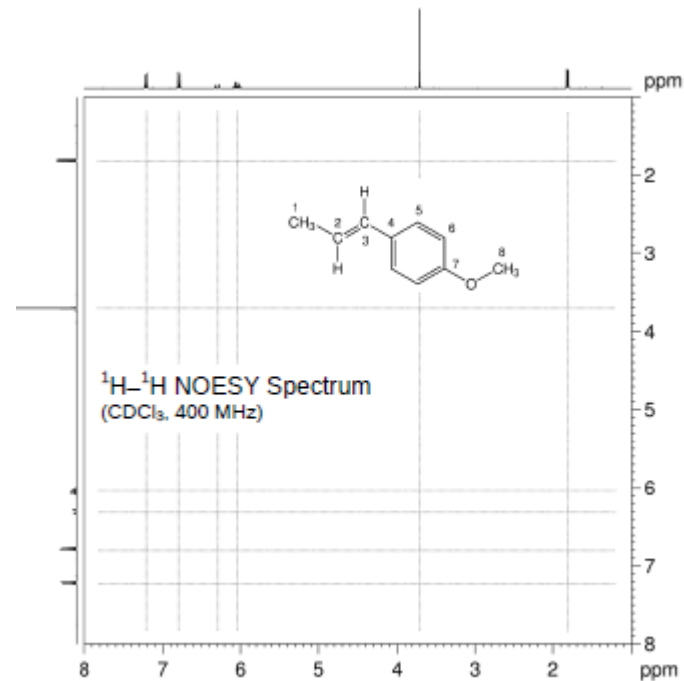
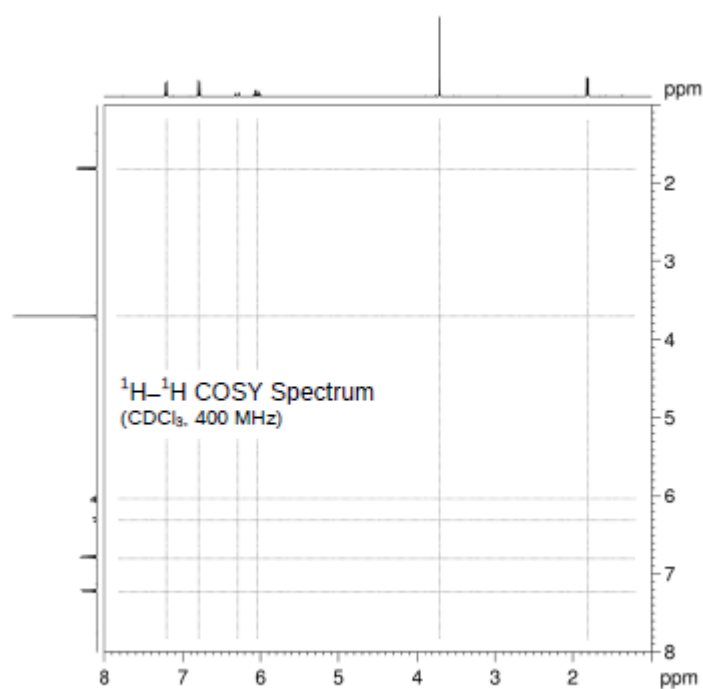


¹H NMR Expansion
(CDCl₃, 400 MHz)



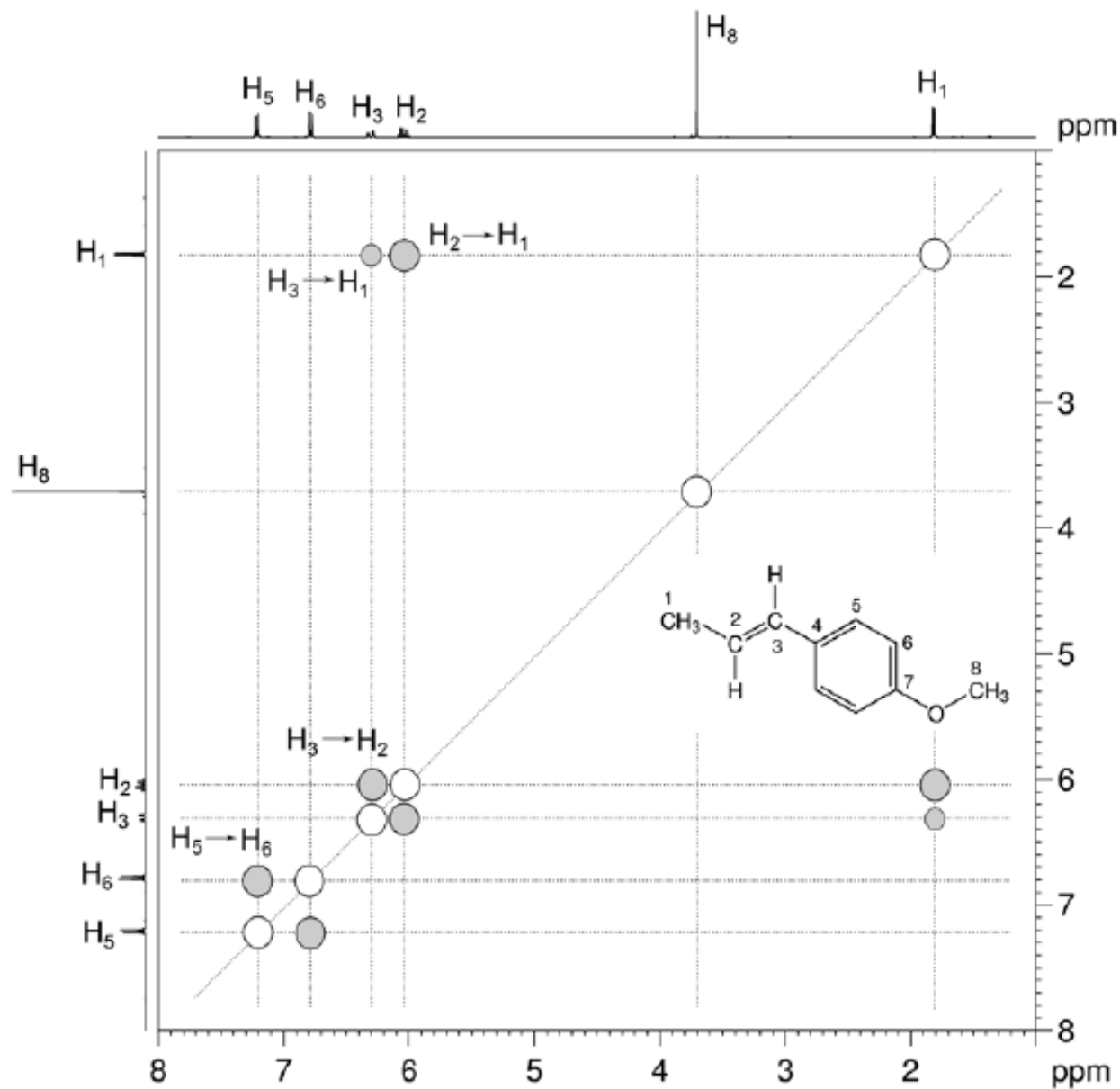


2D NMR



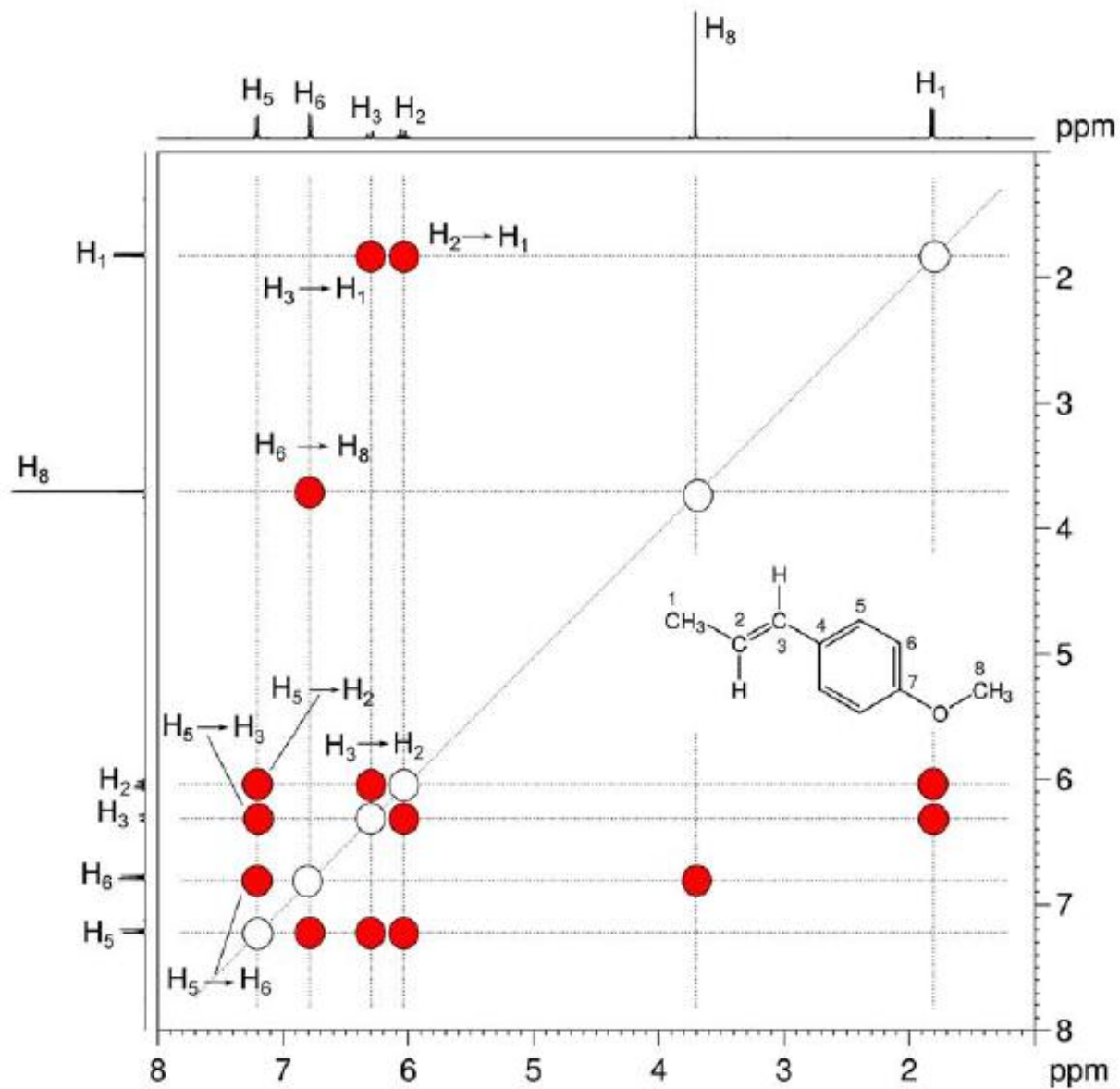


2D NMR



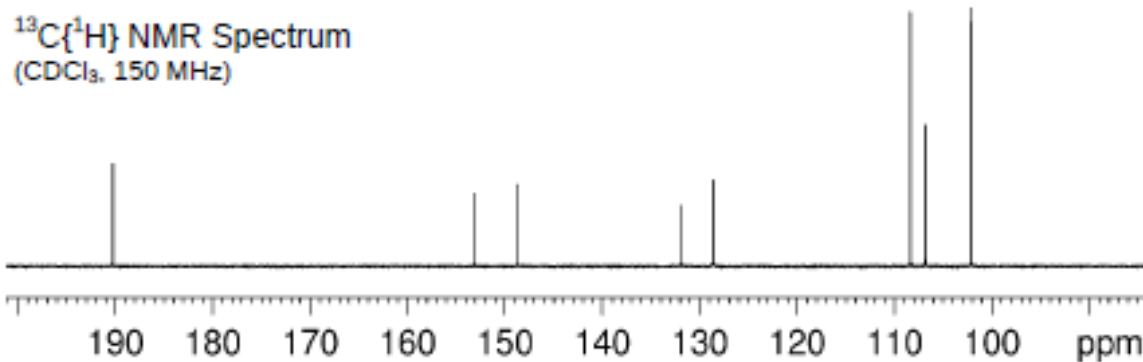
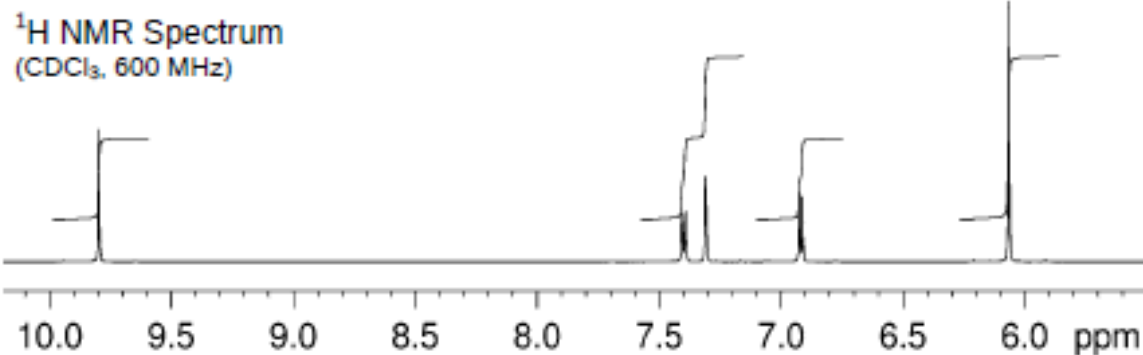
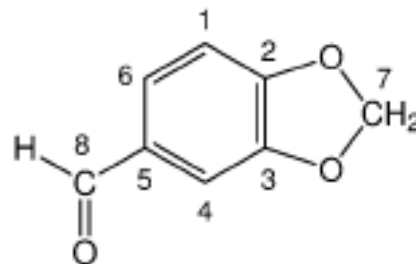


2D NMR



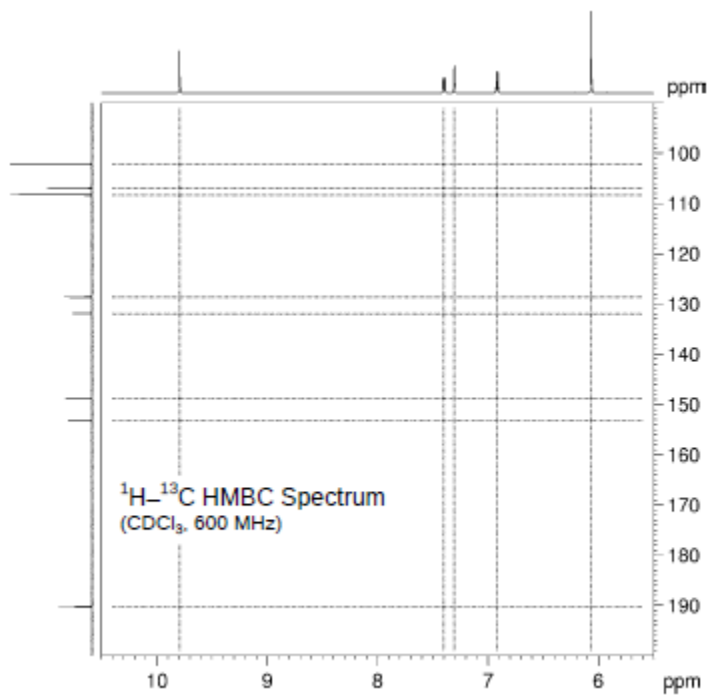
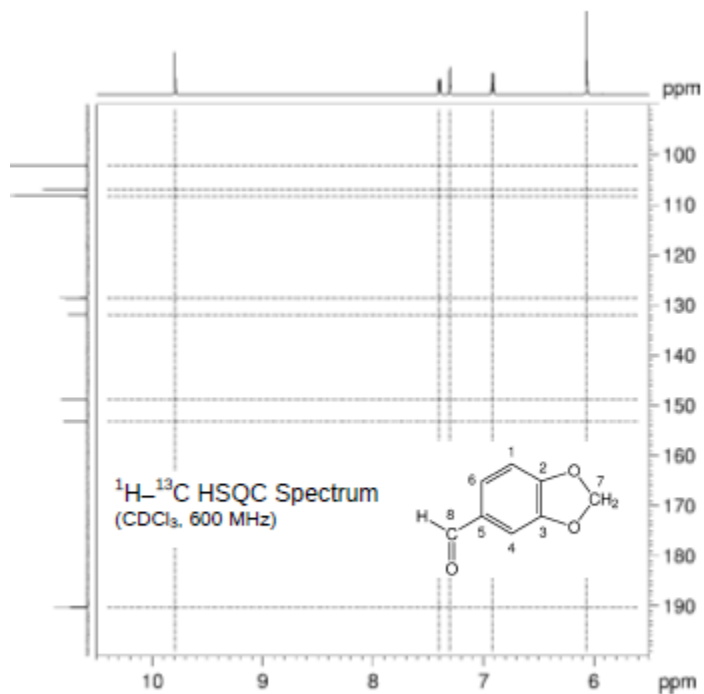


2D NMR



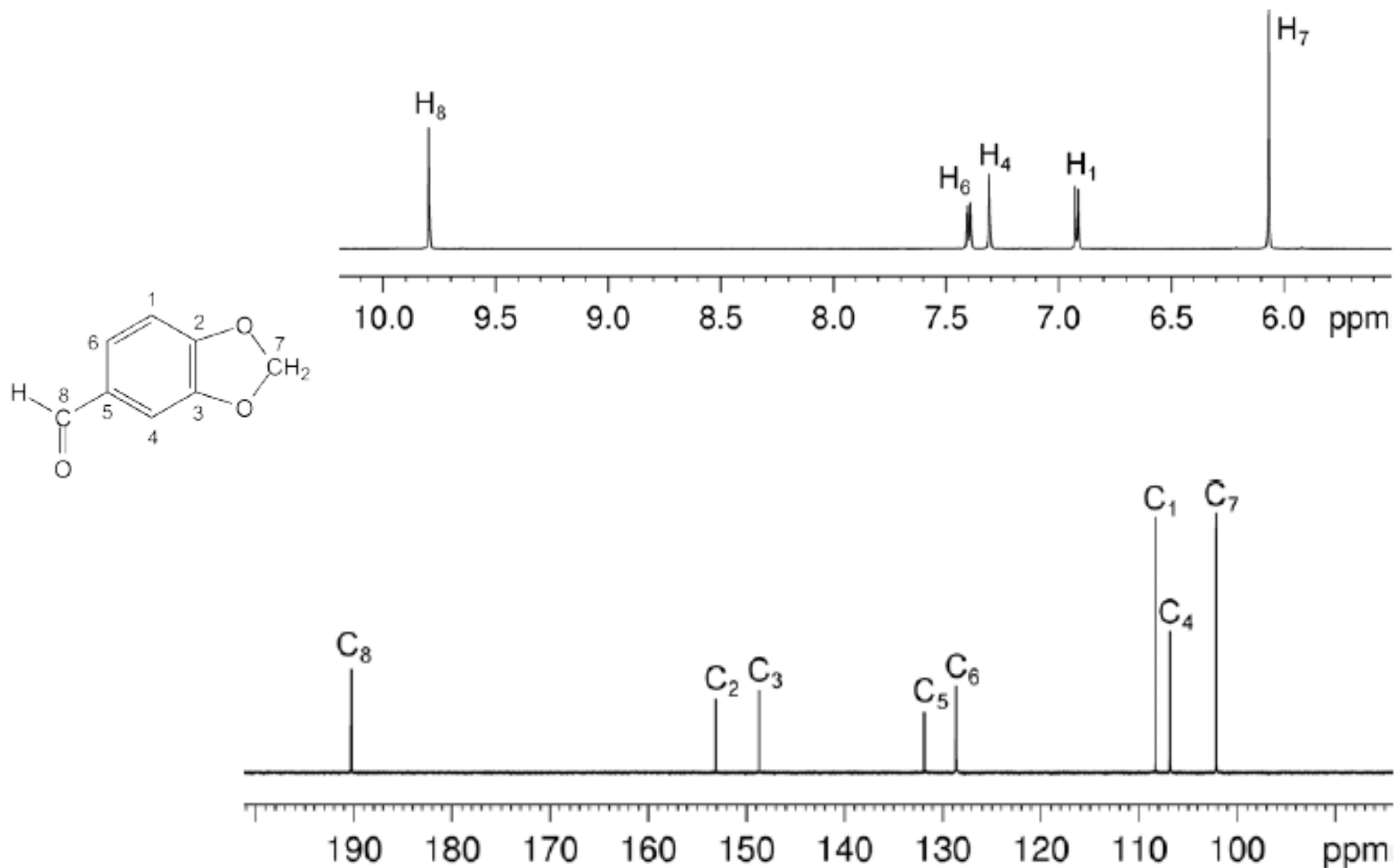


2D NMR





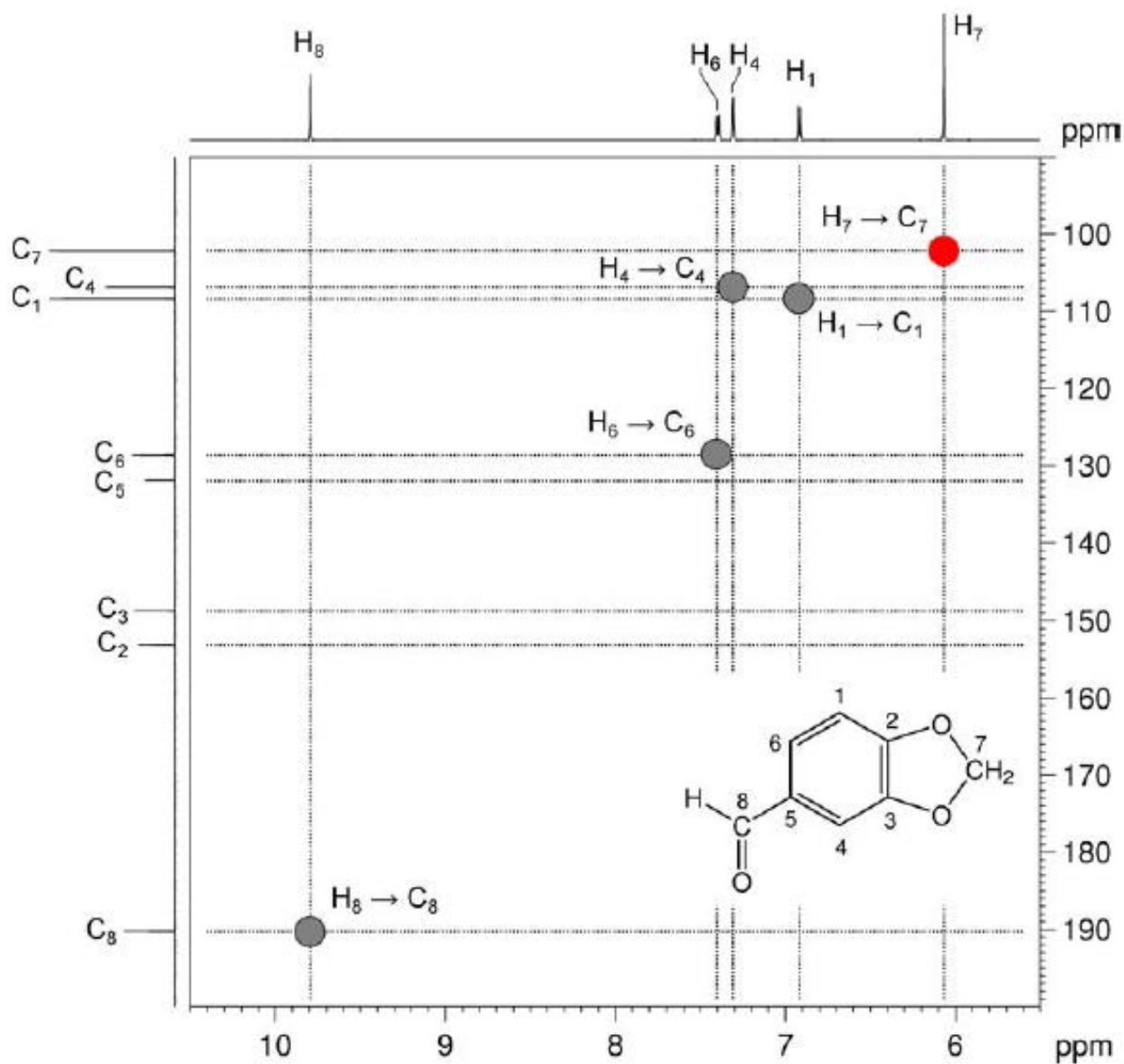
^1H NMR spectrum of piperonal (CDCl_3 , 600 MHz)





2D NMR

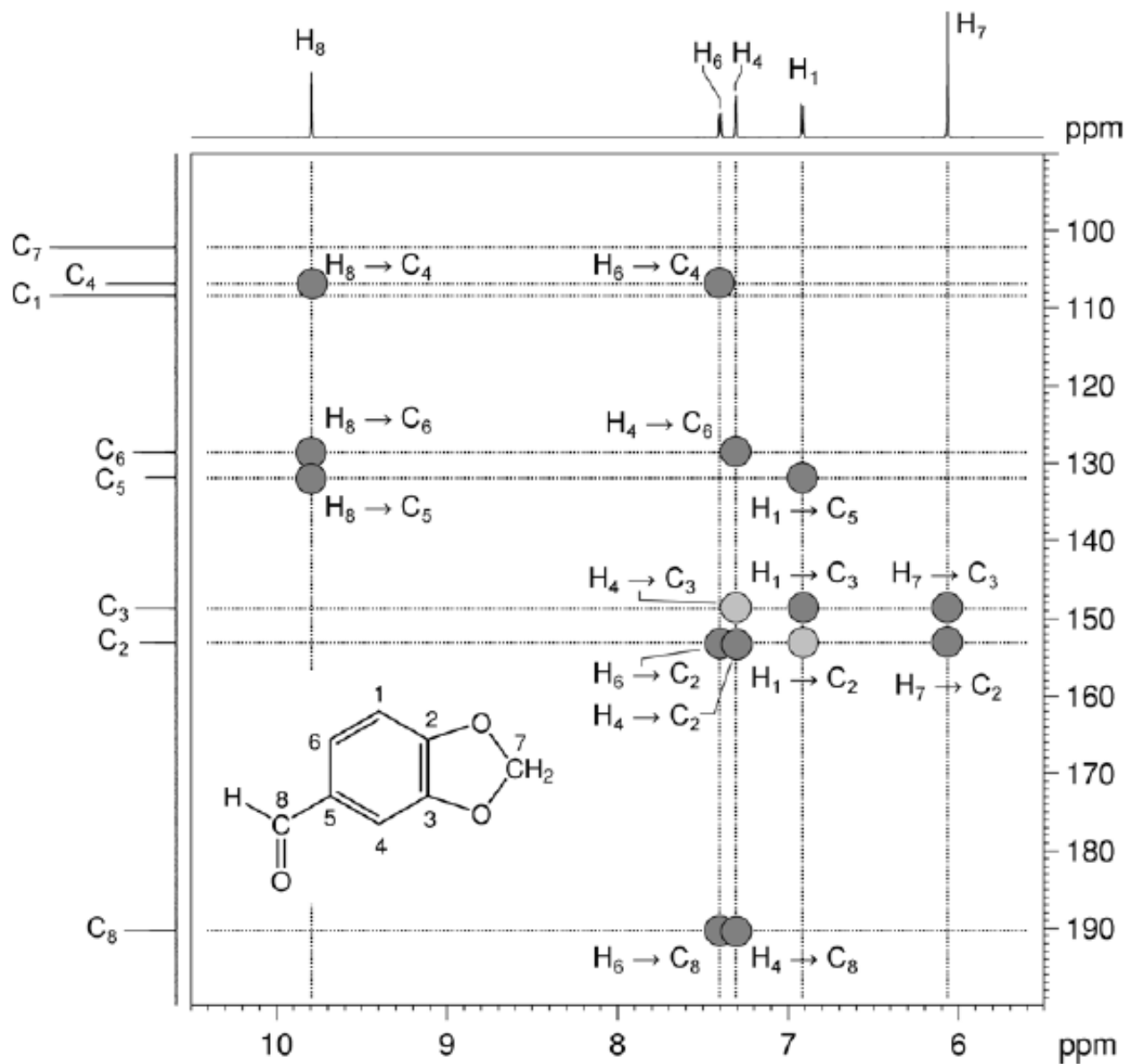
Predicted ^1H - ^{13}C me-HSQC spectrum of piperonal (CDCl_3 , 600 MHz)





2D NMR

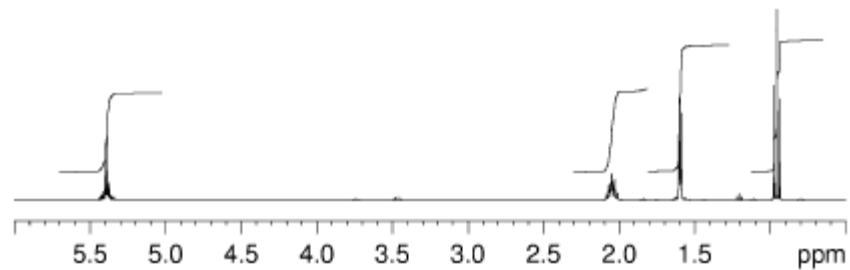
Predicted ^1H - ^{13}C HMBC spectrum of piperonal (CDCl_3 , 600 MHz)



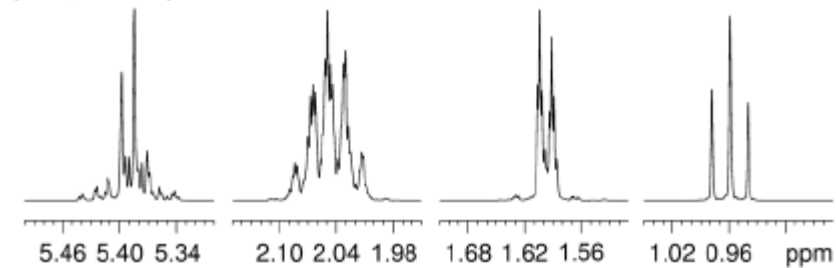


Άσκηση C_5H_{10}

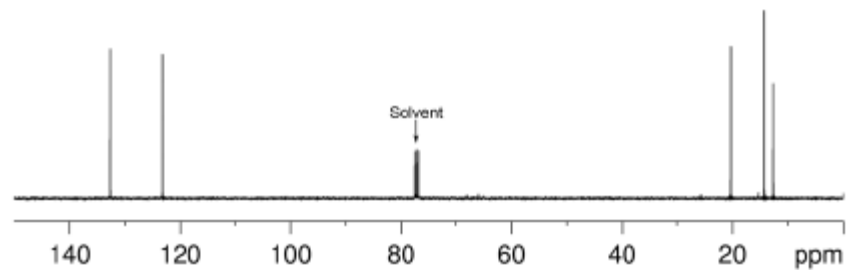
1H NMR Spectrum
($CDCl_3$, 400 MHz)



1H NMR Expansion
($CDCl_3$, 400 MHz)

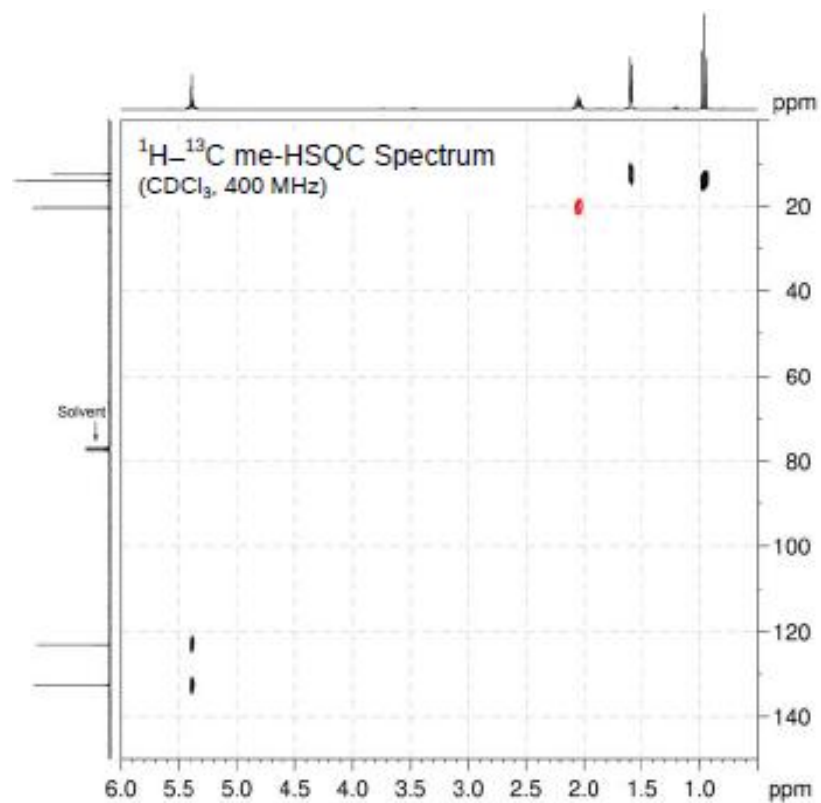
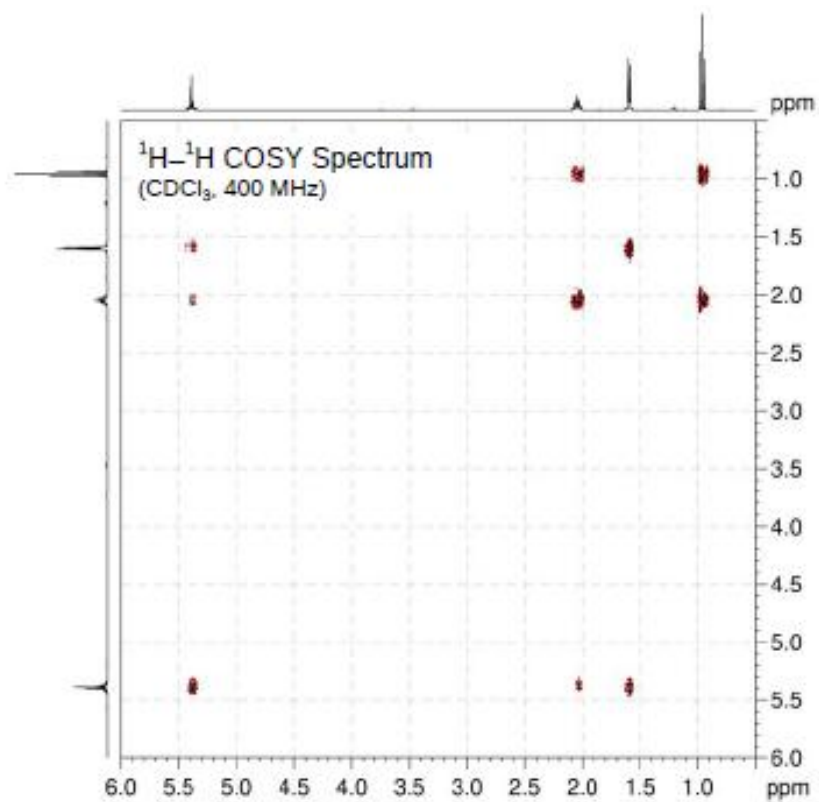


$^{13}C\{^1H\}$ NMR Spectrum
($CDCl_3$, 100 MHz)



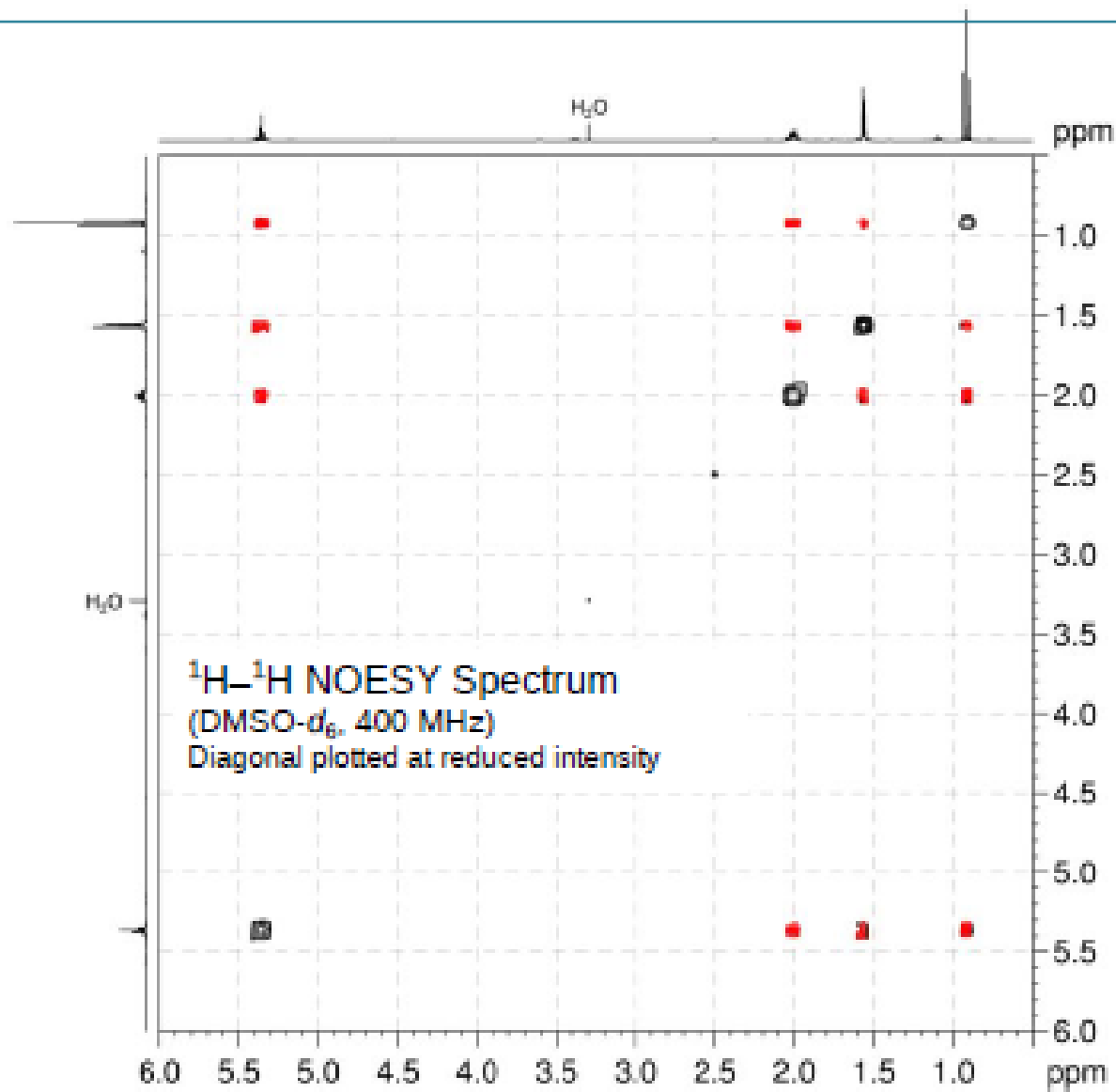


2D NMR





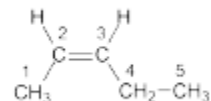
2D NMR



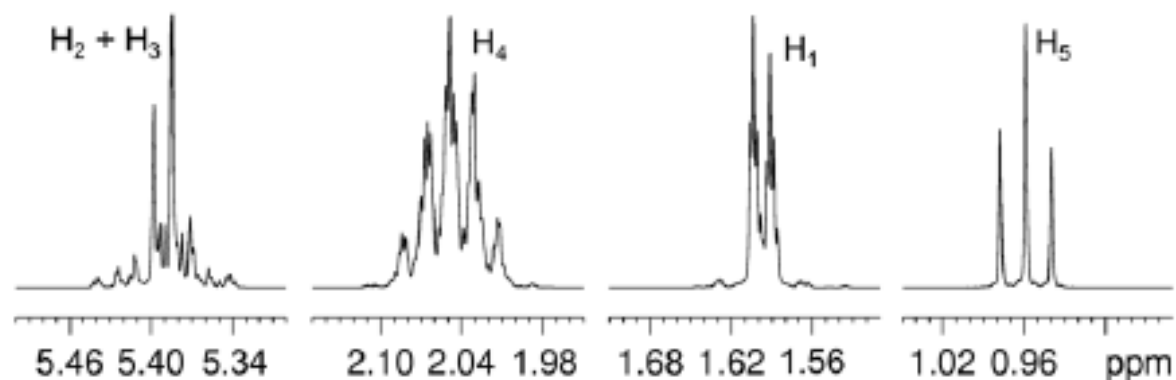


2D NMR

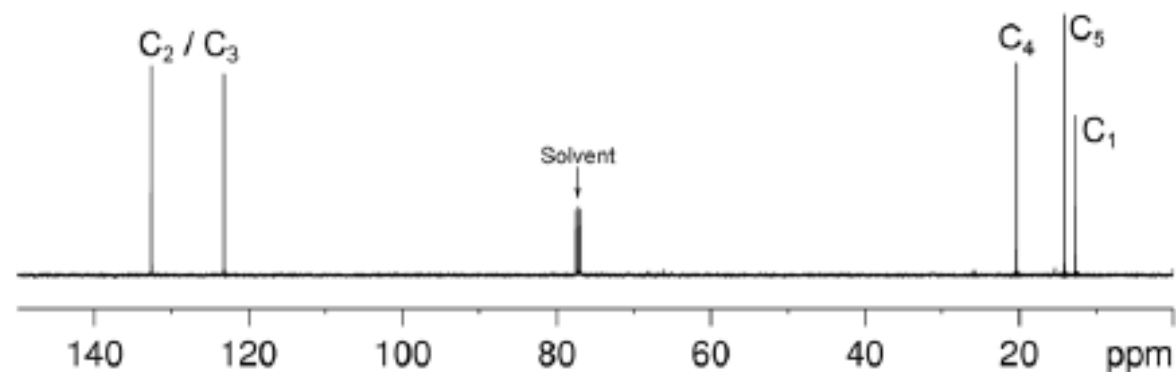
cis-2-Pentene



^1H NMR spectrum of *cis*-2-pentene (CDCl_3 , 400 MHz)



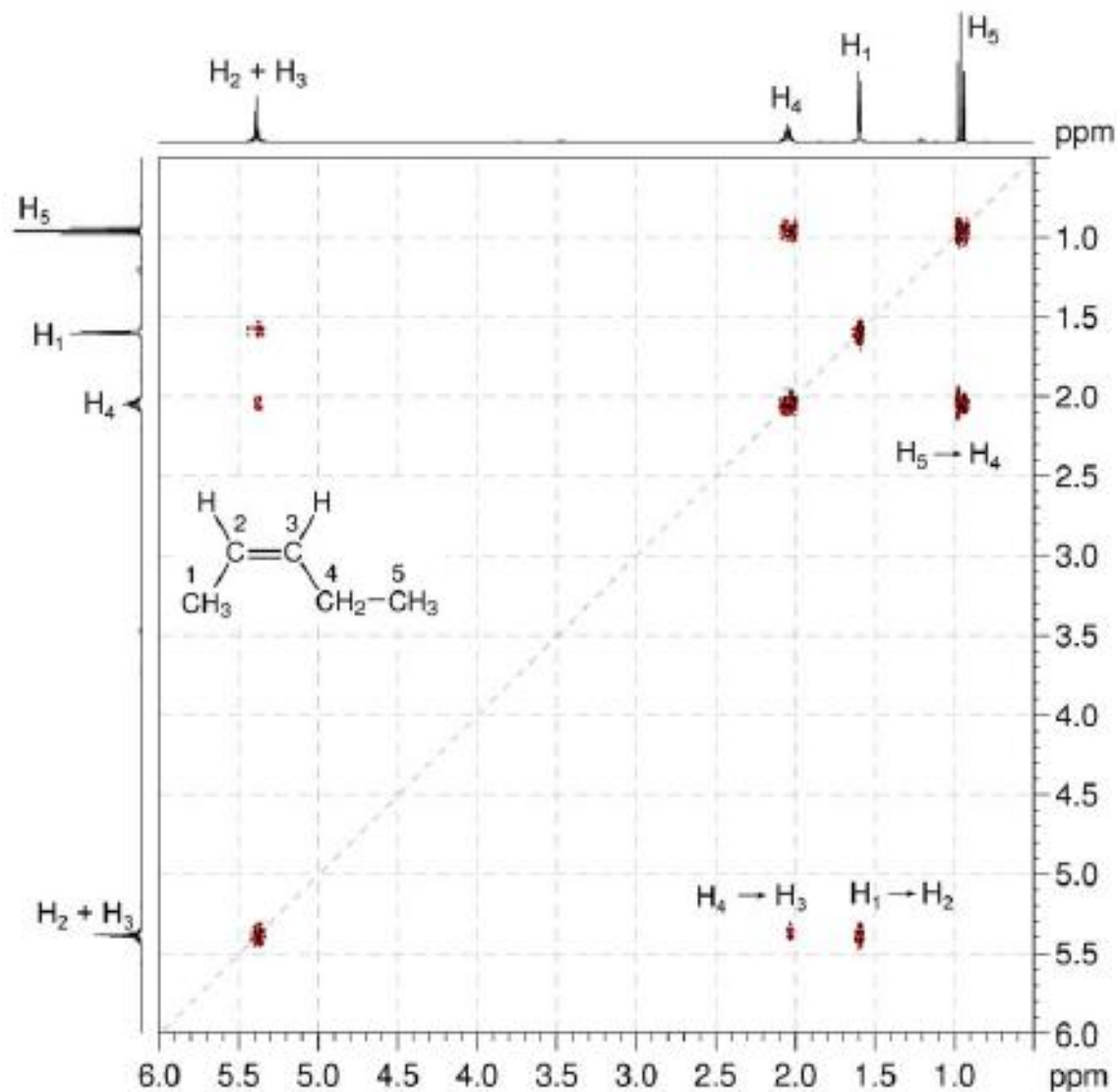
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of *cis*-2-pentene (CDCl_3 , 100 MHz)





2D NMR

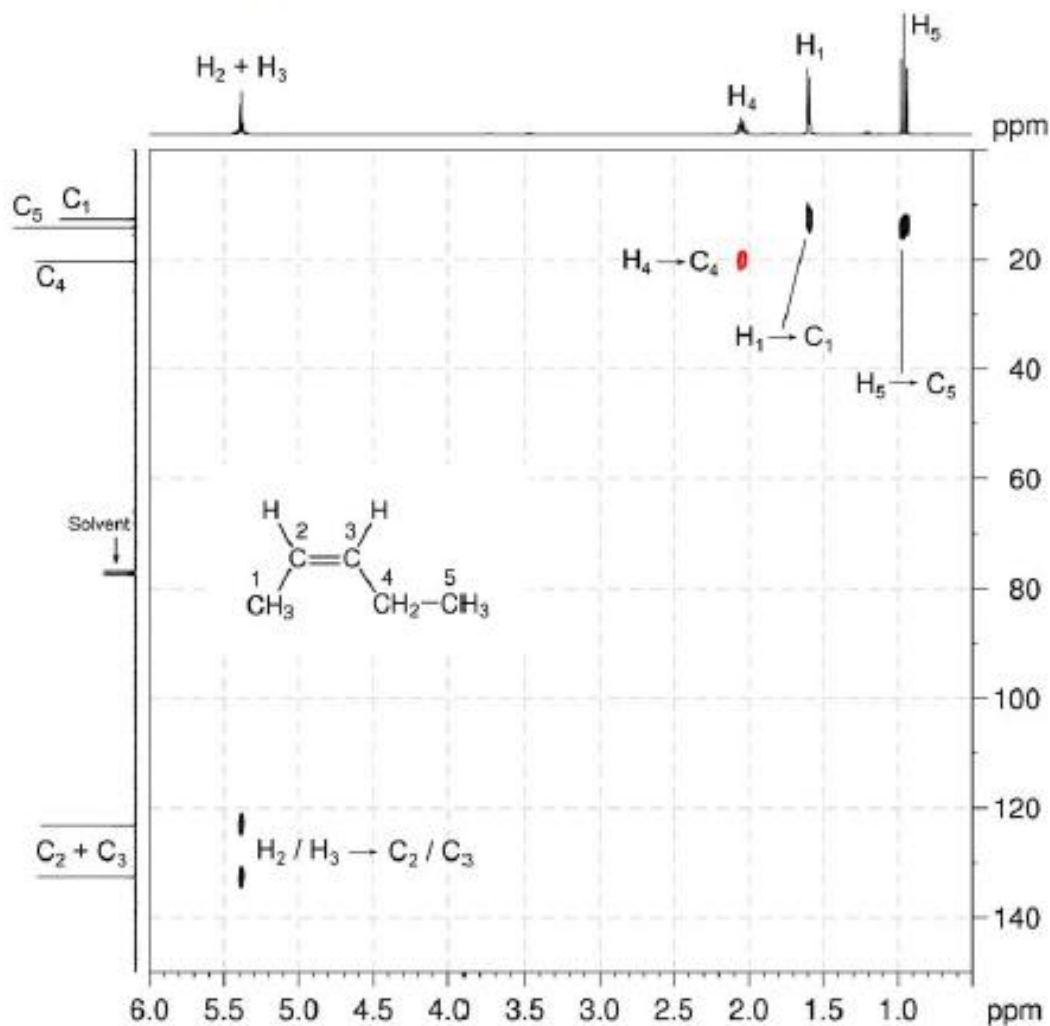
^1H - ^1H COSY spectrum of *cis*-2-pentene (CDCl_3 , 400 MHz)





2D NMR

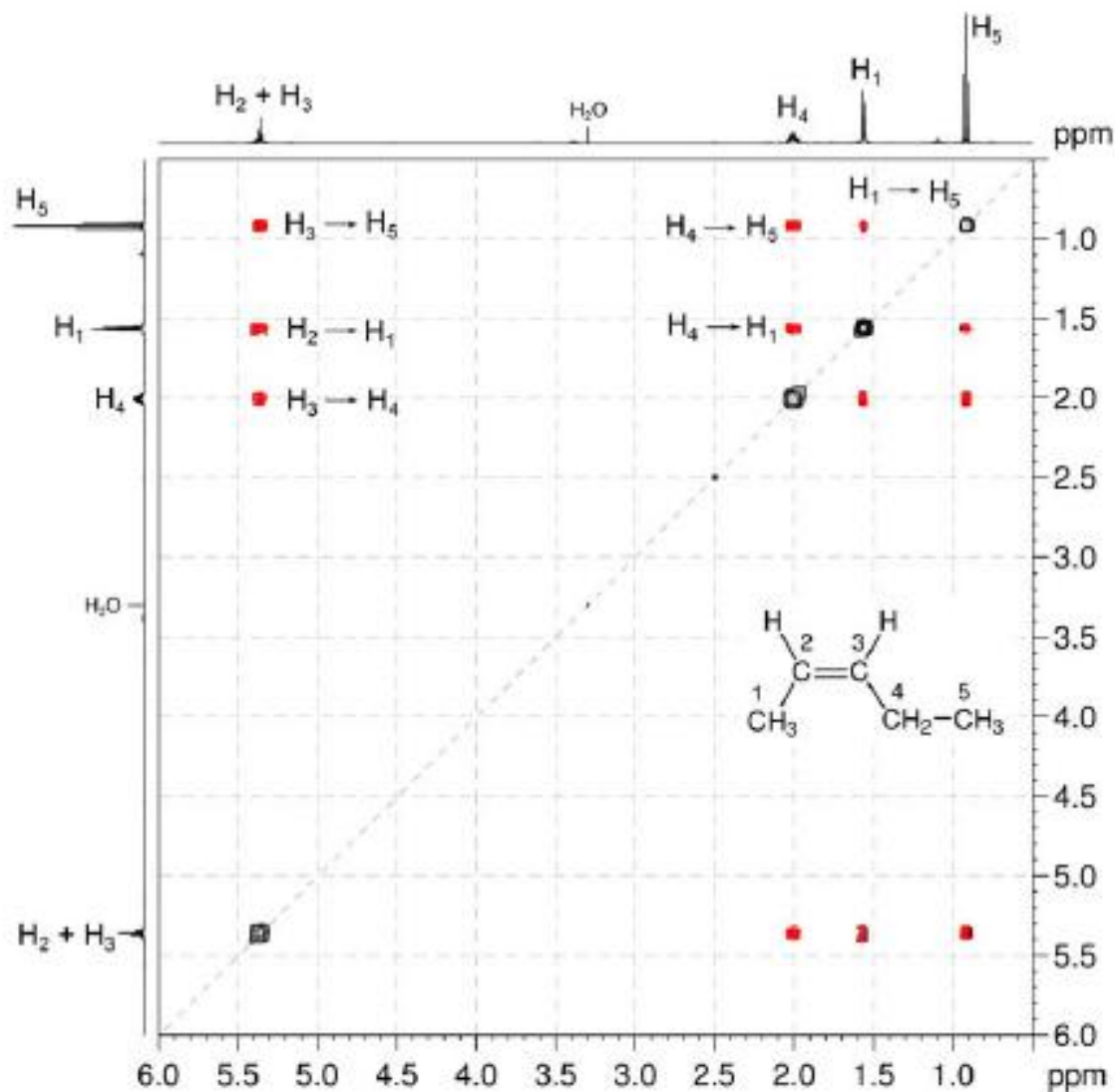
^1H - ^{13}C me-HSQC spectrum of *cis*-2-pentene (CDCl_3 , 400 MHz)





2D NMR

^1H - ^1H NOESY spectrum of *cis*-2-pentene (DMSO- d_6 , 400 MHz)





Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Ως Μη Εμπορική ορίζεται η χρήση:

- που δεν περιλαμβάνει άμεσο ή έμμεσο οικονομικό όφελος από την χρήση του έργου, για το διανομέα του έργου και αδειοδόχο
- που δεν περιλαμβάνει οικονομική συναλλαγή ως προϋπόθεση για τη χρήση ή πρόσβαση στο έργο
- που δεν προσπορίζει στο διανομέα του έργου και αδειοδόχο έμμεσο οικονομικό όφελος (π.χ. διαφημίσεις) από την προβολή του έργου σε διαδικτυακό τόπο

Ο δικαιούχος μπορεί να παρέχει στον αδειοδόχο ξεχωριστή άδεια να χρησιμοποιεί το έργο για εμπορική χρήση, εφόσον αυτό του ζητηθεί.