Основы постановки научного эксперимента
Лекция №8 ЯМР-спектроскопия

"Why, Igvog! You've invented the wheel!"

Ядерный магнитный резонанс

- Ядра атомов, для которых числа протонов и нейтронов не являются одновременно чётными, обладают собственным магнитным моментом.
- Ядерный магнитный резонанс – *поглощение электромагнитного излучения ядрами, обладающими магнитным моментом, помещенными во внешнее магнитное поле* и обусловленное переориентацией магнитных моментов ядер.
- **Частота** поглощаемого излучения находится в радиочастотном диапазоне (60–1000 МГц), **определяется** свойствами ядра (изотопа), напряженностью внешнего магнитного поля (прямая пропорциональность) и **окружением ядра** – конфигурацией его электронной оболочки.
- Зависимость резонансной частоты от конфигурации электронной оболочки иона открывает возможность исследования структуры молекул посредством регистрации изменения частоты поглощения (резонансной частоты), обусловленного строением изучаемого вещества.

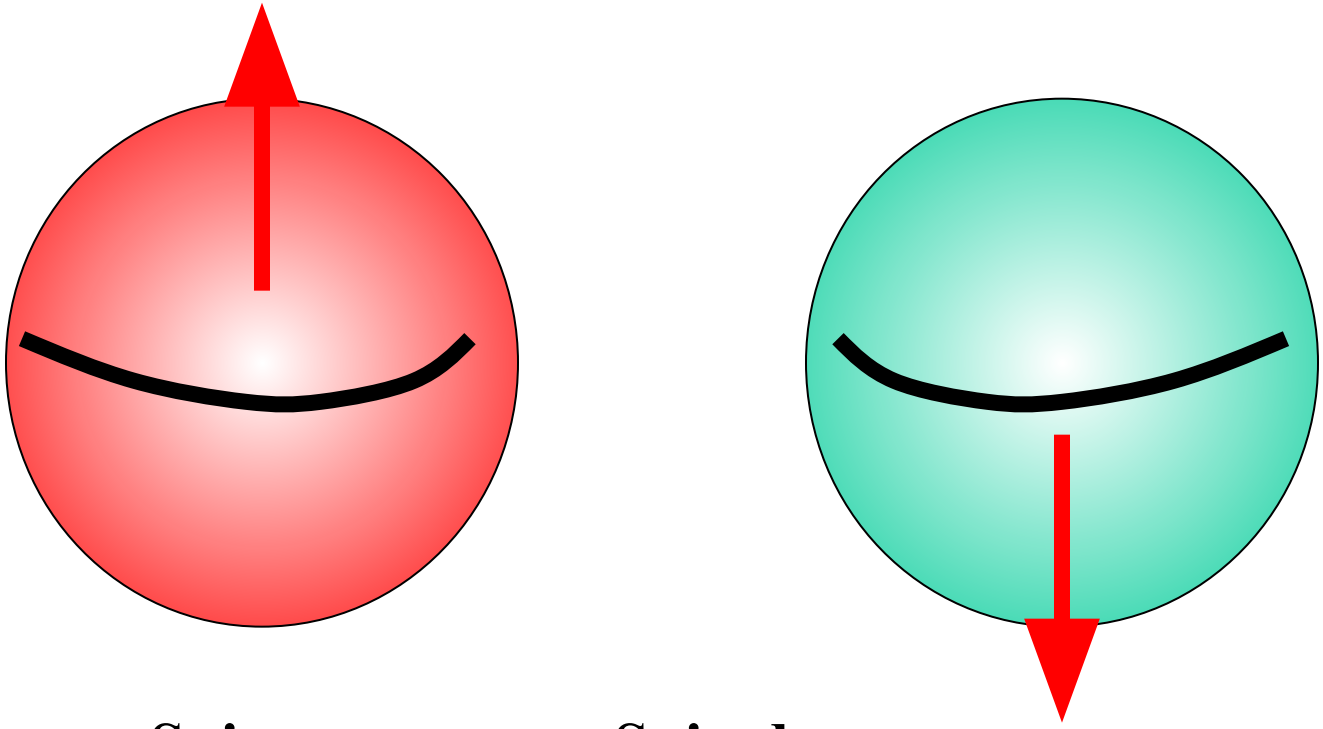
ЯМР среди других физических методов исследования:

- В отличие от масс-спектрометрии, ЯМР исследует саму молекулу, а не продукты её распада.
- В отличие от оптической спектроскопии (УФ, ИК), частицы, исследуемые методом ЯМР, находятся всегда в основном электронном состоянии и практически на нулевом колебательном уровне.
- В отличие от РСА (рентгеноструктурного анализа), исследующего кристаллические образцы, в ЯМР имеют дело с молекулами в растворе. Оба метода (если абстрагироваться от деталей) воздействуют электромагнитным излучением на ядра атомов, однако, в ЯМР рассматриваются не отклики ядер сами по себе, а влияние на них электронного окружения.
- ЯМР может применяться не только для изучения структуры молекул, но и для изучения химических реакций в динамике, причём воздействия в датчике ЯМР спектрометра никак не возмущают исследуемую систему.
- **Спектрометры ЯМР – самые дорогие, а чувствительность – низкая по**

Важнейшие области применения спектроскопии ЯМР

1. **Изучение строения и свойств органических соединений**
2. Определение структуры биомакромолекул
3. Изучение динамических свойств биомолекул
4. Изучение белок-лигандных взаимодействий (ЯМР-скрининг биологически активных соединений)
5. Визуализация объектов живой и неживой природы (ЯМР-томография)
6. Мониторинг процессов, происходящих в живом организме (*in-vivo* спектроскопия)
7. Исследование функциональной активности мозга (f-MRI)

Протоны (и многие другие ядра) имеют спин



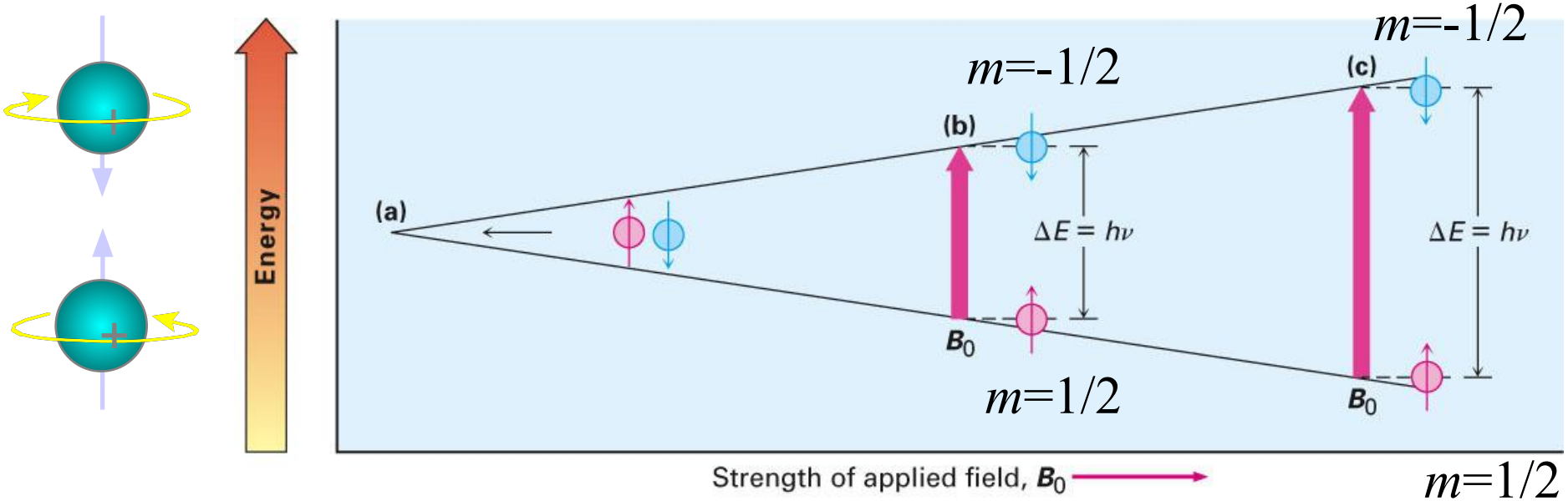
Spin up **Spin down**

- Спиновое квантовое число ядра I может принимать полуцелые и целые значения от 1/2 до 9/2.
- Спин определяет число возможных (разрешённых) ориентаций магнитного момента во внешнем магнитном поле: $N = 2I + 1$
- При исследовании строения молекул удобнее всего использовать ядра с $I = ½$

^{1}H, ^{15}N, ^{31}P , ^{13}C, ^{29}Si, ^{19}F, ^{119}Sn, ^{195}Pt, ^{199}Hg…

Ориентации спина в магнитном поле (Энергетические уровни)

- Частицы с магнитным моментом в магнитном поле имеют две ориентации – по полю и против него (для ядер с I =1/2)
- При поглощении фотона с определённой энергией, соответствующей **ΔE,** частица может переходить на более высокий энергетический уровень.



© 2007 Thomson Higher Education

Разница между двумя состояниями: $\Delta E = \gamma h B_o / 2\pi$

где: B_o – внешнее магнитное поле

h – постоянная Планка

γ – гиромагнитное отношение

Свойства некоторых важных ядер в ЯМР-спектроскопии

Isotope	Spin	Natural abundance (%)	Quadrupole moment Q (10^{-28} m^2)	Gyromagnetic ratio γ (10^7 rad s^{-1} T^{-1})	Sensitivity rel.[a]	abs.[b]	NMR-frequency (MHz) at a field (T) of 2.3488
^{1}H	1/2	99.98	—	26.7522	1.00	1.00	100.000
^{2}H	1	1.5×10^{-2}	2.87×10^{-3}	4.1066	9.65×10^{-3}	1.45×10^{-6}	15.351
^{3}H	1/2	0	—	28.5350	1.21	0	106.663
^{7}Li	3/2	92.58	-3.7×10^{-2}	10.3976	0.29	0.27	38.863
^{11}B	3/2	80.42	4.1×10^{-2}	8.5847	0.17	0.13	32.084
^{13}C	1/2	1.108	—	6.7283	1.59×10^{-2}	1.76×10^{-4}	25.144
^{14}N	1	99.63	1.67×10^{-2}	1.9338	1.01×10^{-3}	1.01×10^{-3}	7.224
^{15}N	1/2	0.37	—	−2.7126	1.04×10^{-3}	3.85×10^{-6}	10.133
^{17}O	5/2	3.7×10^{-2}	-2.6×10^{-2}	−3.6280	2.91×10^{-2}	1.08×10^{-5}	13.557
^{19}F	1/2	100	—	25.1815	0.83	0.83	94.077
^{23}Na	3/2	100	0.10	7.0704	9.25×10^{-2}	9.25×10^{-2}	26.451
^{25}Mg	5/2	10.13	0.22	−1.6389	2.67×10^{-3}	2.71×10^{-4}	6.1195
^{31}P	1/2	100	—	10.8394	6.63×10^{-2}	6.62×10^{-2}	40.481
^{35}Cl	3/2	75.53	-8.2×10^{-2}	2.6242	4.70×10^{-3}	3.55×10^{-3}	9.798
^{39}K	3/2	93.1	5.5×10^{-2}	1.2499	5.08×10^{-4}	4.73×10^{-4}	4.667
^{43}Ca	7/2	0.145	-5×10^{-2}	−1.8028	6.40×10^{-3}	9.28×10^{-6}	6.728
^{51}V	7/2	99.76	2.17×10^{3}	-5.2×10^{-2}	0.38	0.38	26.289
^{57}Fe	1/2	2.19	—	0.8687	3.37×10^{-5}	7.38×10^{-7}	3.231
^{75}As	3/2	100	0.29[u]	4.5961	2.51×10^{-2}	2.51×10^{-2}	17.126
^{77}Se	1/2	7.58	—	5.1214	6.93×10^{-3}	5.25×10^{-4}	19.067
^{113}Cd	1/2	12.26	—	−5.9609	1.09×10^{-3}	1.33×10^{-3}	22.182

Разница заселенностей уровней с m_1 = +1/2 (α) и m_2 = -1/2 (β)

По закону температурного распределения Больцмана:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E N_{ав}}{RT}} = e^{-\frac{h\nu N_{ав}}{RT}} = e^{-\frac{h\gamma B_0 N_{ав}}{2\pi RT}}$$

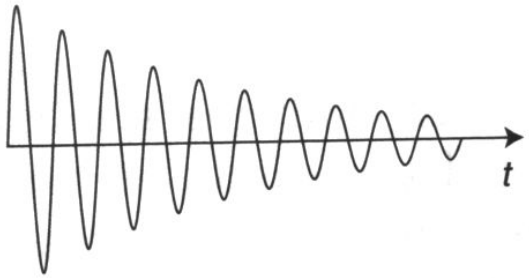
Для ядер ^{1}H при T = 300K (23°C):
$\gamma = 2.674\times10^8$ $c^{-1}Тл^{-1}$, B_0 = 1.4 Тл

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = 0.99999$$

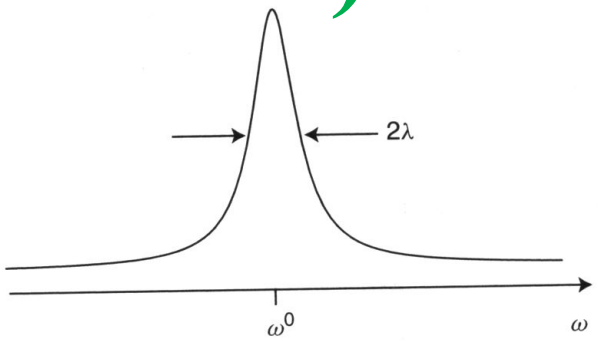
$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = 1.00001$$

Из 2 000 010 ядер:
1 000 000 с m_2 = -1/2 (β) и
1 000 010 с m_1 = 1/2 (α),
т.е. разница заселённости 10^{-3} %.

Наблюдение сигнала магнитного резонанса (Фурье-преобразование)



Фурье-преобразование

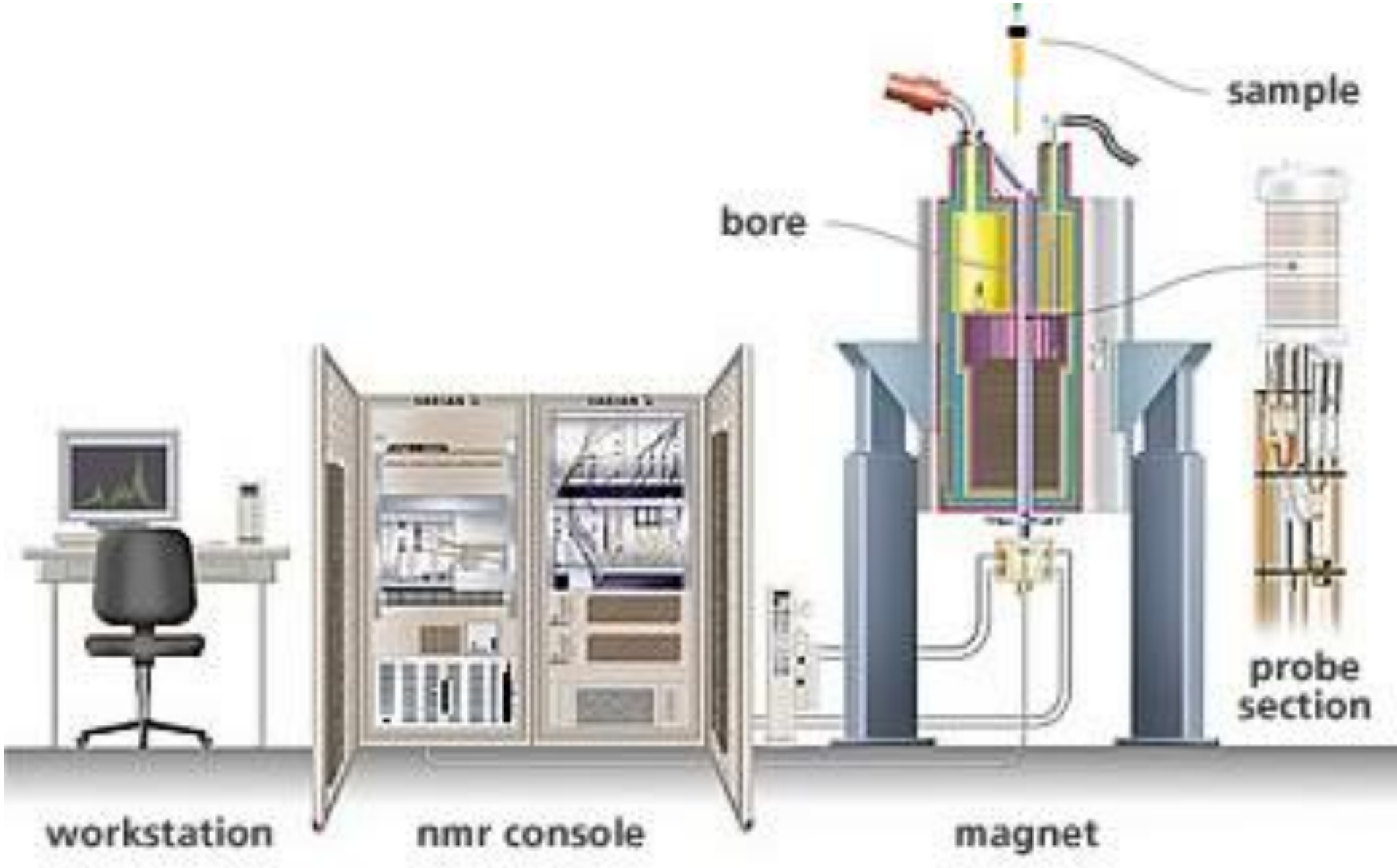


ЯМР-сигнал показывает зависимость интенсивности поглощения от времени

После преобразования показывает зависимость поглощения от резонансной частоты

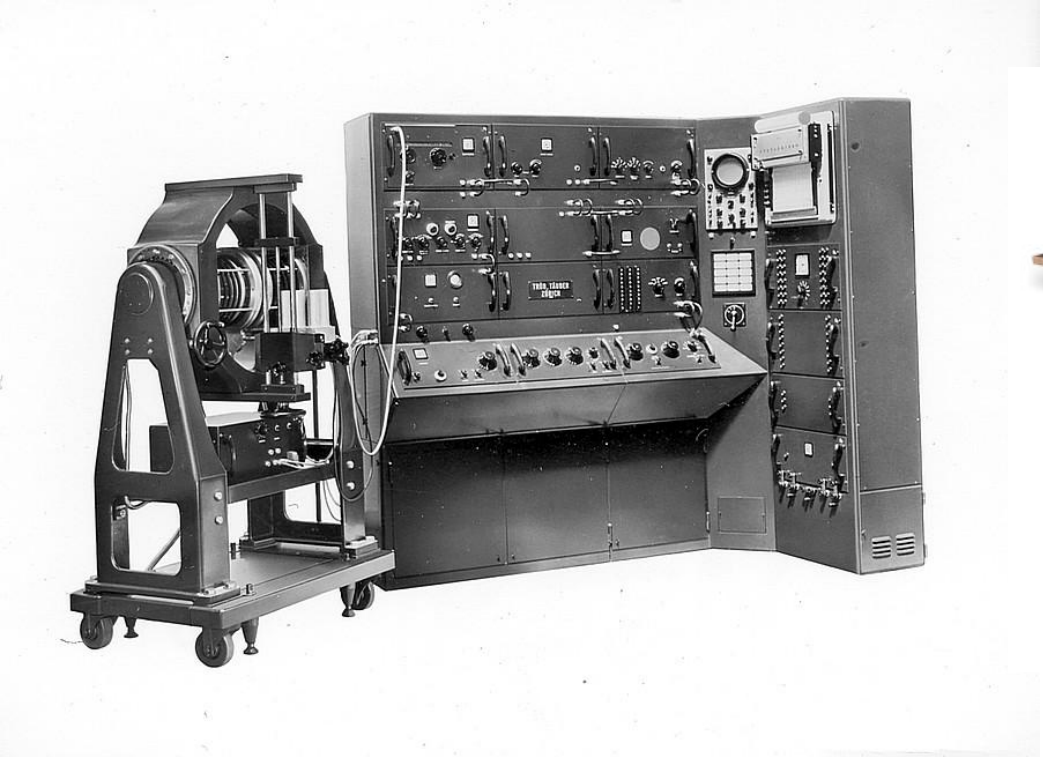
Резонансная частота (Ламорова частота) $\omega = -\gamma B$

Схема спектрометра ЯМР



С чего всё началось?

Сканирующая ЯМР-спектроскопия

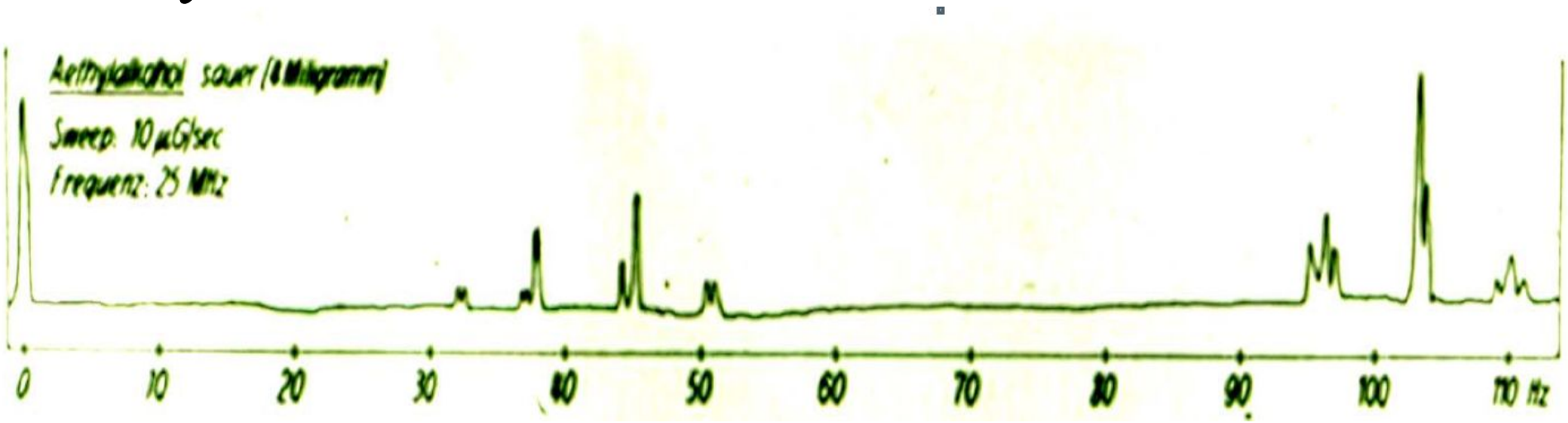


Одни из первых спектрометров ЯМР фирмы Bruker

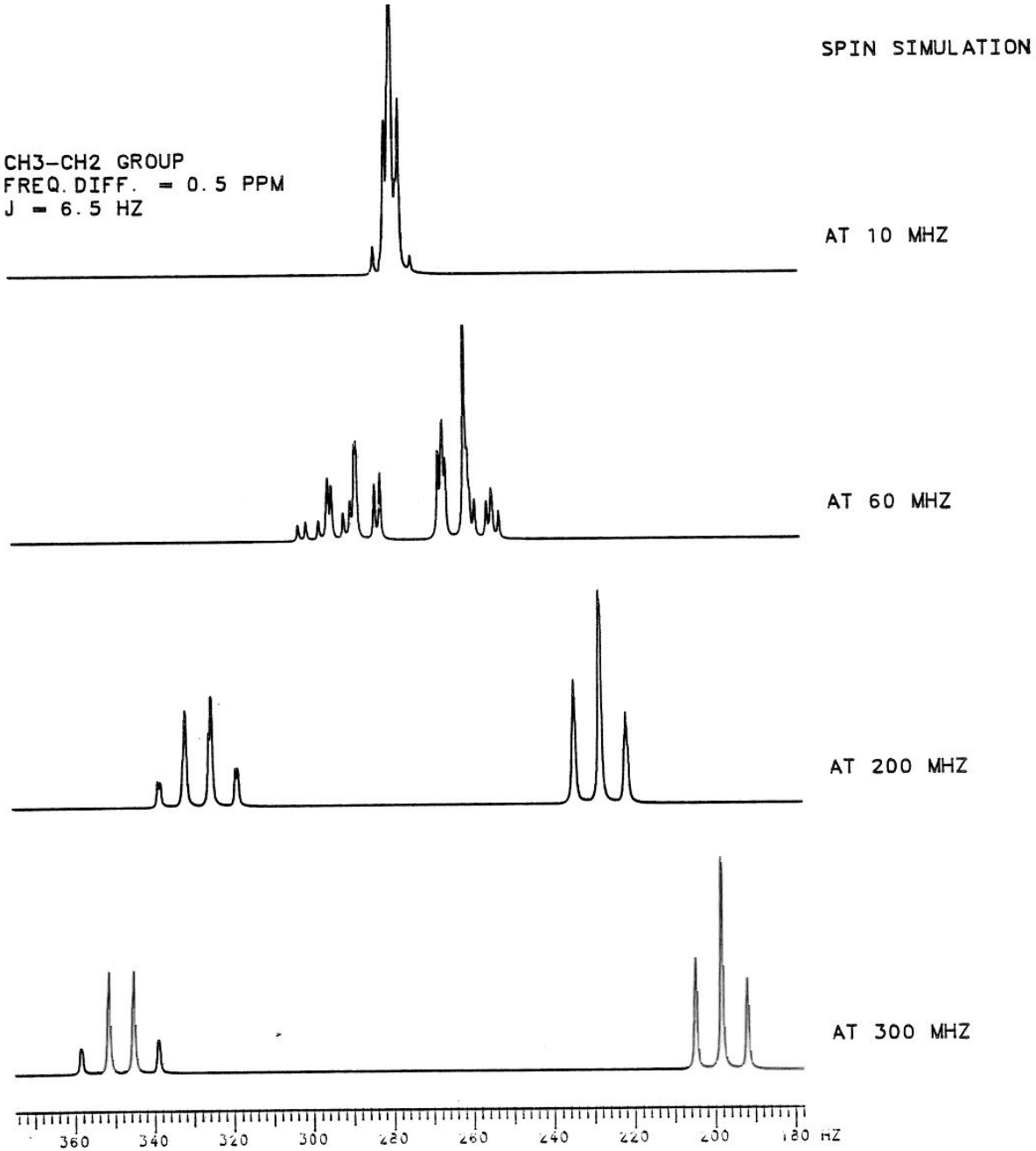
Современный спектрометр ЯМР на электромагните

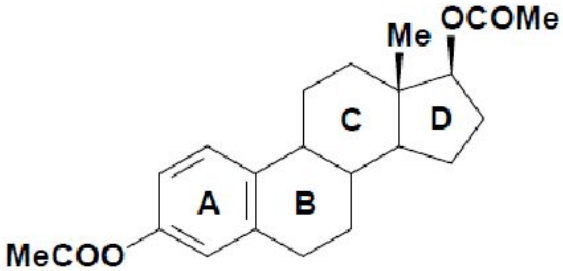
ЯМР в 1960-х

- Спектр записывали долго (до 12 часов), ночью, для уменьшения помех.

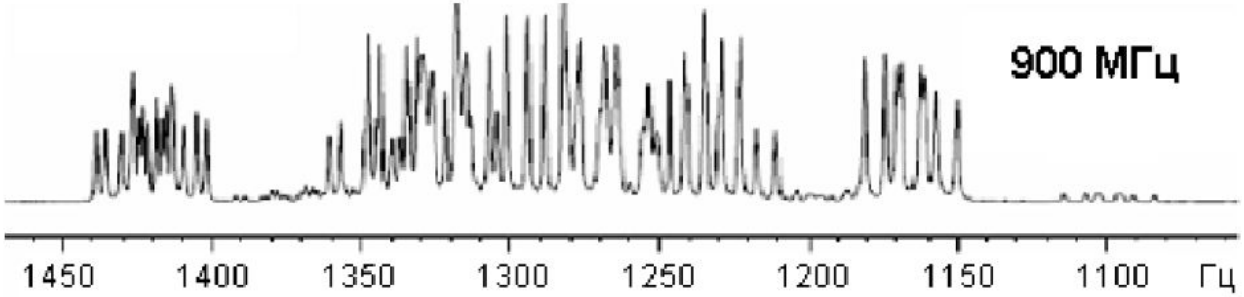


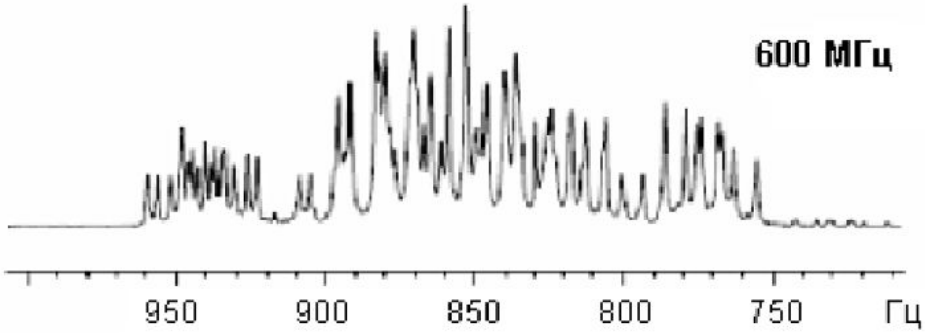
Влияние величины магнитного поля на вид спектра ЯМР

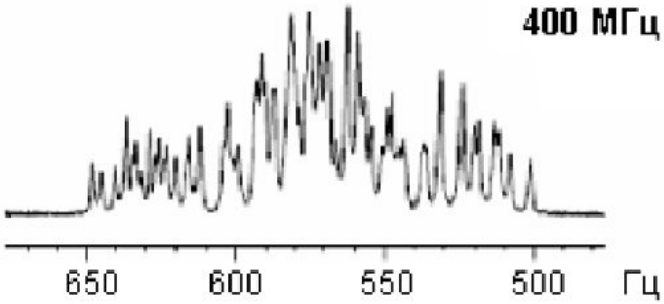




Фрагмент спектра эстрадиолдиацетата при разной величине магнитного поля







Bruker UHF Magnet Milestones

- 1992 First 750 MHz NMR magnet
- 1995 First 800 MHz NMR magnet
- 1998 First 750 MHz wide bore magnet
- 2001 First 900 MHz NMR magnet
- 2004 First 850 MHz WB shielded magnet
- 2004 First 900 MHz shielded magnet
- 2006 First 800 MHz compact shielded mag
- 2006 First 950 MHz shielded magnet
- 2009 First 900 MHz WB shielded magnet
- 2009 First 850 MHz compact shielded mag
- 2009 First 1000 MHz NMR Magnet

Современные приборы. Топ-модели.

Магнит спектрометра
ЯМР на 1000 МГц

Bruker

Германия

Магнит спектрометра
ЯМР на 900 МГц

Varian (Agilent)

США

Магнит спектрометра
ЯМР на 1020 МГц

Jeol

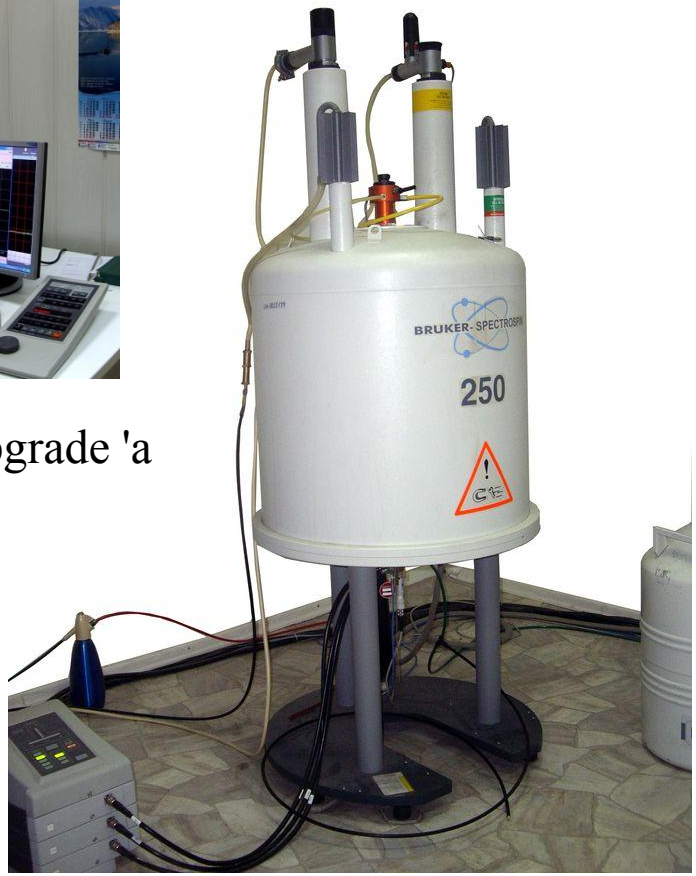
Япония

Самые мощные ЯМР спектрометры = 1.2 ГГц

- Производятся компанией Bruker.
- 28,2 тесла - почти в 600 000 раз сильнее, чем магнитное поле Земли.
- Весит восемь тонн.
- В настоящее время (начало 2021 г.) таких высокотехнологичных инструментов всего три. В Университете Флоренции, Высшей технической школе Цюриха, в Институте биофизической химии им. Макса Планка.
- Стоимость прибора составляет 12,5 миллиона евро.
- В активном объеме магнитов, в зоне всего около 1 см^3, поддерживается чрезвычайно однородное магнитное поле на 99,99999999%.
- Вместо низкотемпературных суперпроводников (типа Nb_3Sn)

Современные приборы. Средний класс.

Фурье–ЯМР-спектрометр Bruker DPX 250 после upgrade 'a

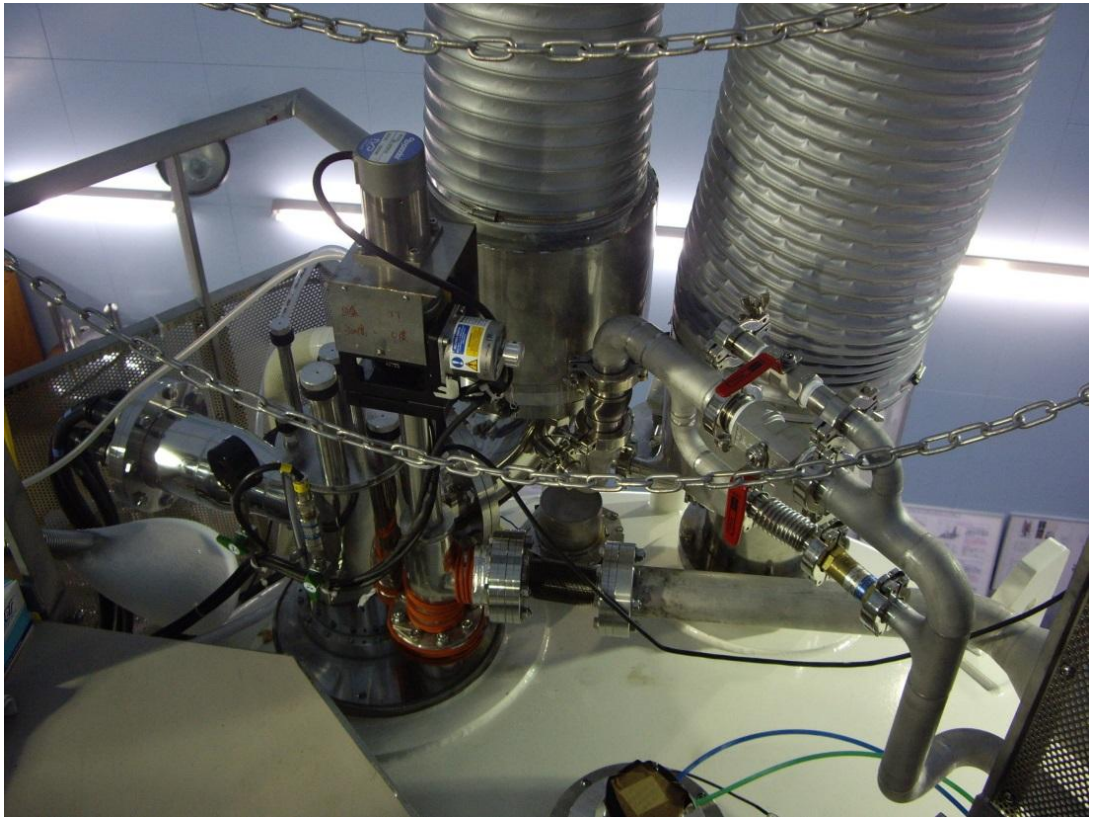


Современные приборы. Средний класс.

Фурье–ЯМР-спектрометр Bruker Avance III 500

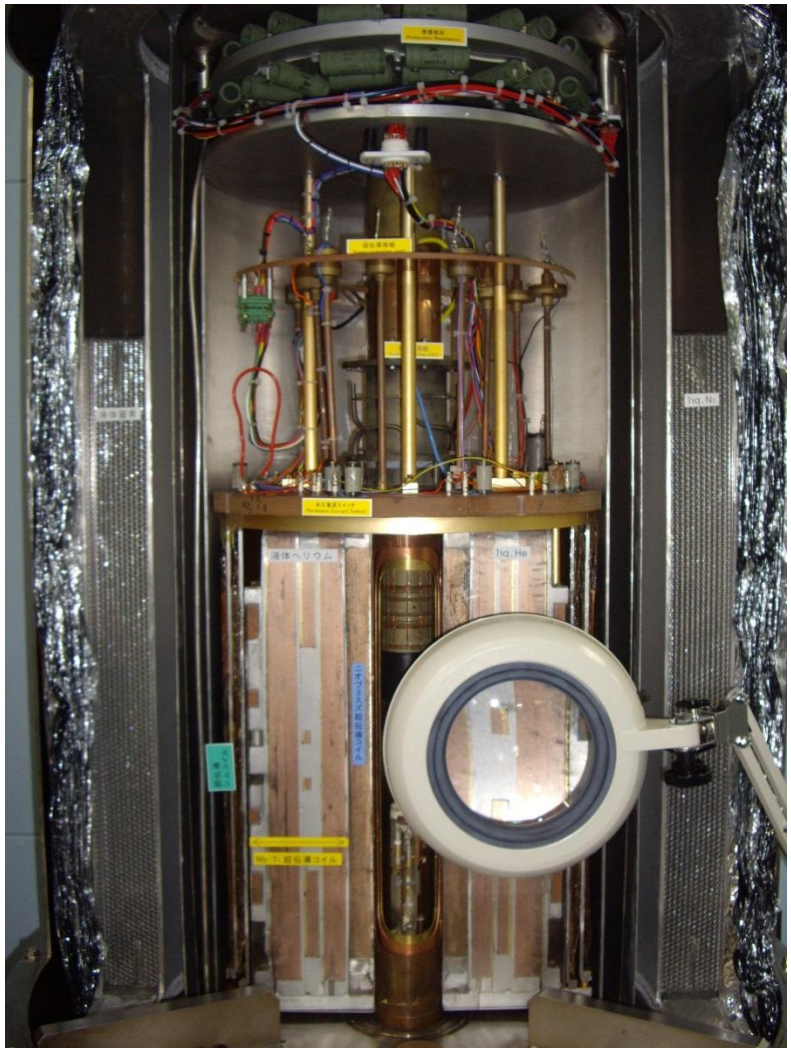
Устройство ЯМР-спектрометра

Магнит



Устройство спектрометра

Магнит



На что похож магнит ?

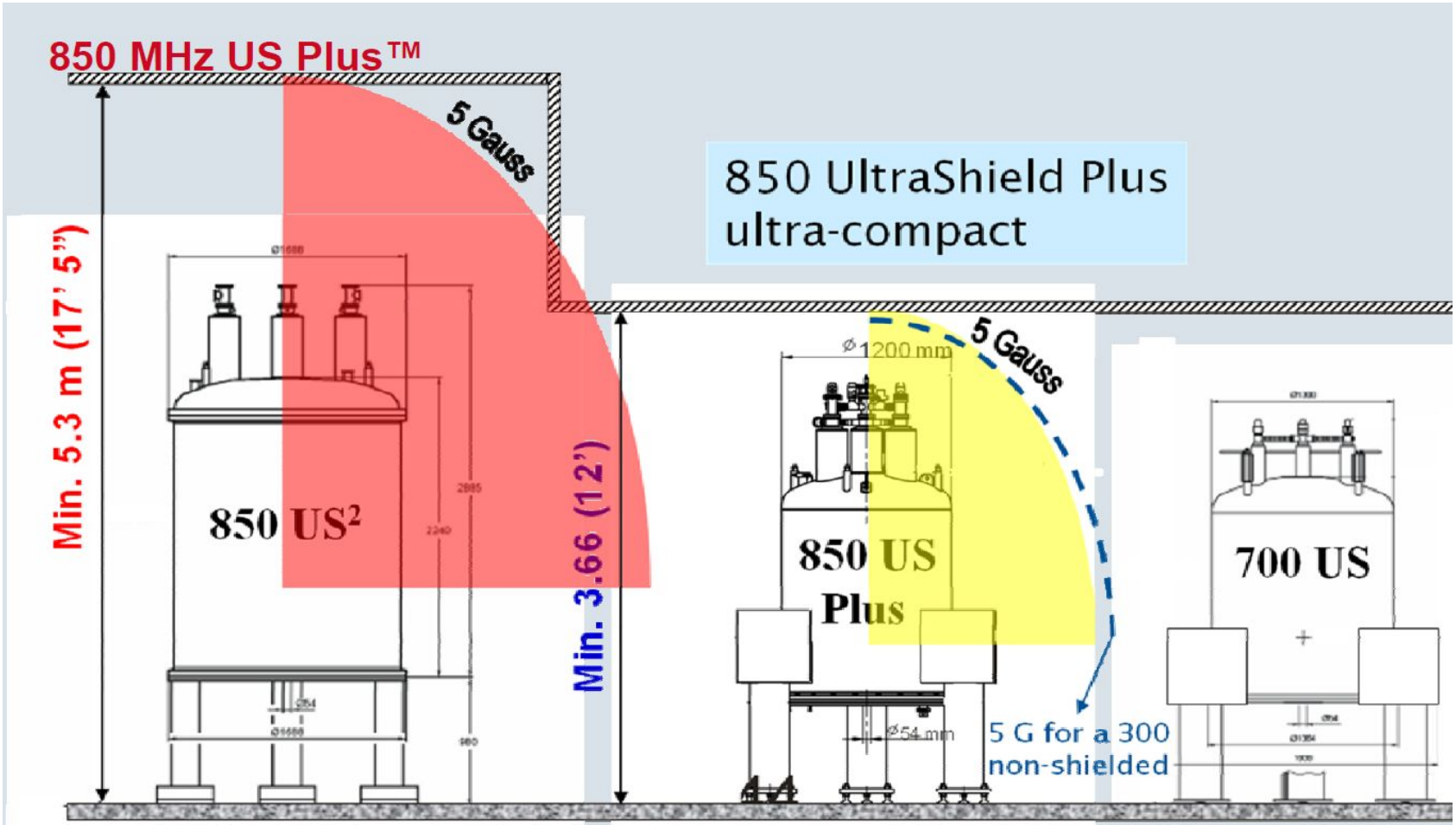
Очень давно в ЯМР использовались большие тяжелые электромагниты, а в виде спектра регистрировалось поглощение РЧ-мощности в зависимости от развертки поля.

Ни один современный ЯМР спектрометр так не работает. Используются сверхпроводящие магниты с неизменным полем, спектр получается в результате Фурье-преобразования интерферограммы (FIDa). Но выражения «ширина развертки», «сигналы в слабом поле» и т. п. остались в употреблении с тех пор.

Сверхпроводящий магнит один раз откачивается до высокого вакуума, охлаждается до температуры 4 К и заряжается электрическим током. После этого нужно только регулярно подливать туда жидкий гелий и жидкий азот. Вакуум без повторной откачки и поле без подпитки током могут сохраняться в хорошем криомагните в течение десятилетий.

Краевое магнитное поле

- К неэкранированному ЯМР-спектрометру нельзя подносить что-то электронное или магнитящееся ближе, чем на расстояние двойной гауссовой линии (величина магнитного поля 2 гаусса).
- Чем мощнее прибор, тем больше расстояние – мощные приборы располагают в отдельных помещениях.



- Для достижения сверхпроводимости в магните его помещают в сосуд Дьюара с сжиженными газами.

Жидкий азот — прозрачная жидкость. Т.кип = −196 °C. Литр жидкого азота, испаряясь и нагреваясь до 20 °C, образует примерно 700 литров газа. Жидкий азот хранят и перевозят в сосудах Дьюара.

Жидкий гелий — бесцветная прозрачная жидкость, кипящая при температуре 4.2 К.

NMR Oxford Superconducting magnet quench (Кипение жидкого гелия)

Устройство спектрометра

Консоль

- **Коммуникационные платы**
- **Платы установки и поддержания однородности поля (lock)**
- **Температурная приставка**
- **Генератор импульсов**
- **Прочие опциональные блоки (MAS, LC, GC etc.)**

«Кишки» спектрометра AV-600

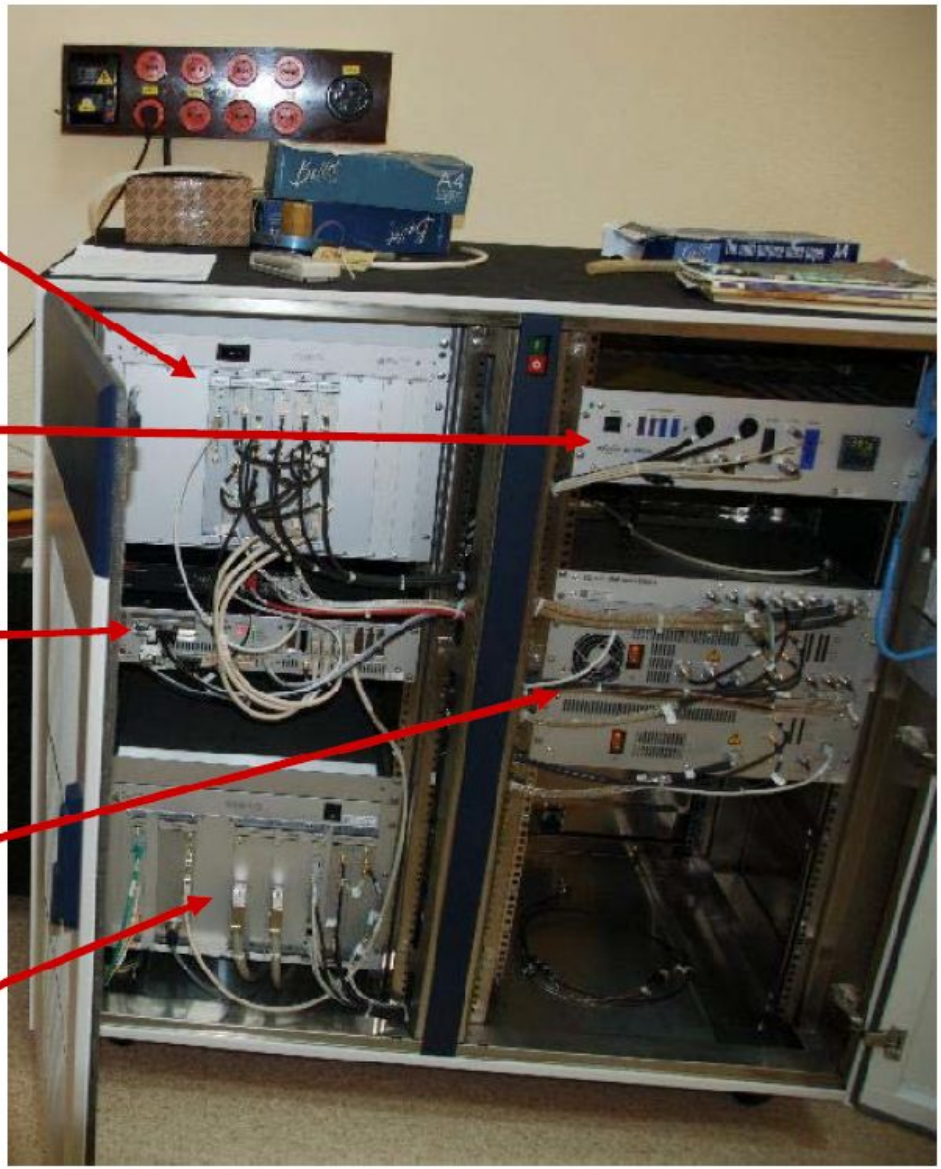
генераторы частоты
и приемник

температурная
приставка
-150 – +180°C

импульсный
программатор

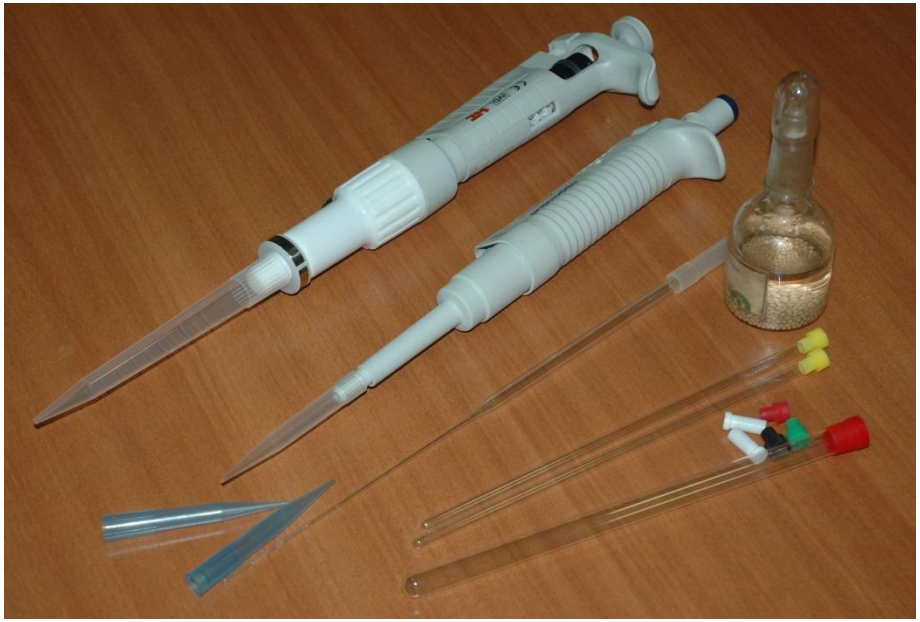
усилители
частоты

стабилизация
по дейтерию



Аксессуары к спектрометру

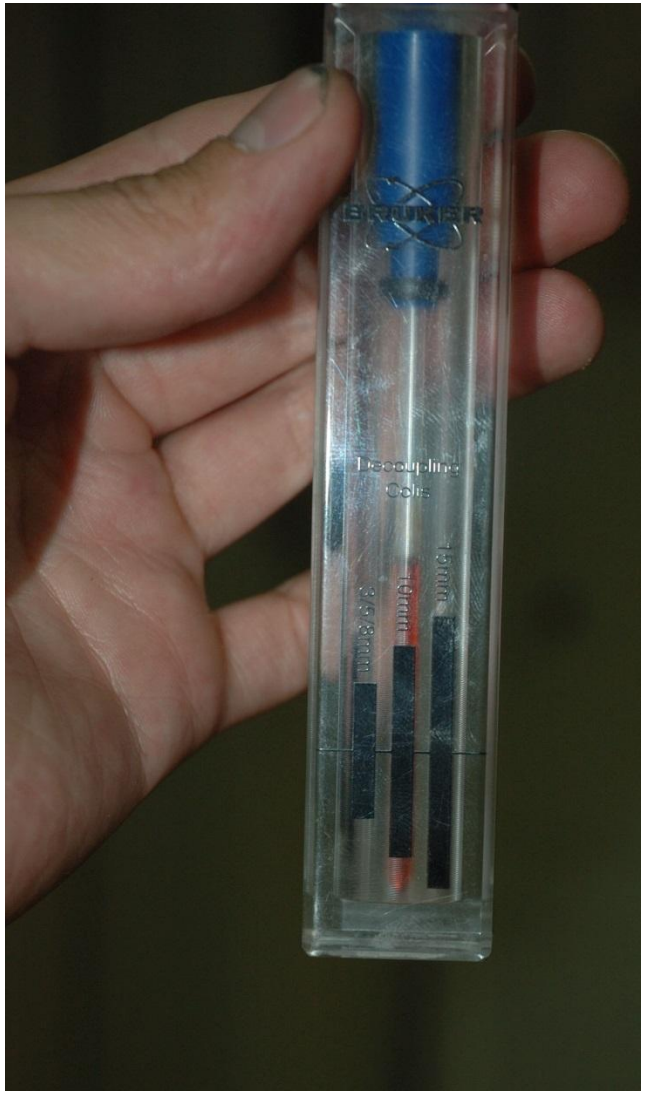
Ампулы



Набор для пробоподготовки для жидкостного датчика:
- дозаторы
- пипетка
- склянка с дейтерорастворителем
- ампулы 5 мм
- ампула 10 мм
- колпачки

Набор для пробоподготовки для твердотельного датчика:
- воронка
- ампула
- крышка
-экстрактор

Пробоподготовка



- Чистая ЯМР-ампула
- Объем раствора (15-17 мм)
- Однородный раствор
- Плотно надетый колпачок

Пробоподготовка

Стоимость ЯМР спектрометров

- «Золотое правило»: 1 Mhz = 1000 $

Действует для спектрометров до 600 Мгц

- Большую часть цены составляет магнит
- The Avance 1000 стоит € 11.7 млн (EUR), или $16 млн (USD)

Что снимаем?

Имея 1-10 мг вещества с молекулярной массой 100-1000:

- ***Одномерный ^{1}H спектр***
  от секунд до минут
- ***Двумерные ^{1}H-^{1}H (гомоядерные) спектры***
  от 30 минут до 12 часов
- ***Двумерные ^{1}H-^{13}C (гетероядерные) спектры***
  от 30 минут до 12 часов
- ***Одномерный ^{13}C спектр***
  от 10 минут до 12 часов
- + ***Другие спектры*** на ядрах ^{15}N, ^{31}P, ^{19}F и пр.

Когда НЕ снимаем?

- ***Когда не растворяется*** ни в одном из растворителей, используемом в ЯМР.
- ***Когда мало вещества:***
  - Для ^{1}H спектров: до 0.1 мг
  - Для ^{13}C спектров: до 5-10 мг («видно глазом»)
  - Для ^{15}N спектров (только ^{15}N-HMBC): до 20 мг
- ***Когда много примесей.*** В образце должно быть 1-2 основных компонента + растворитель, остальное – в концентрации в 5-10 раз меньше.

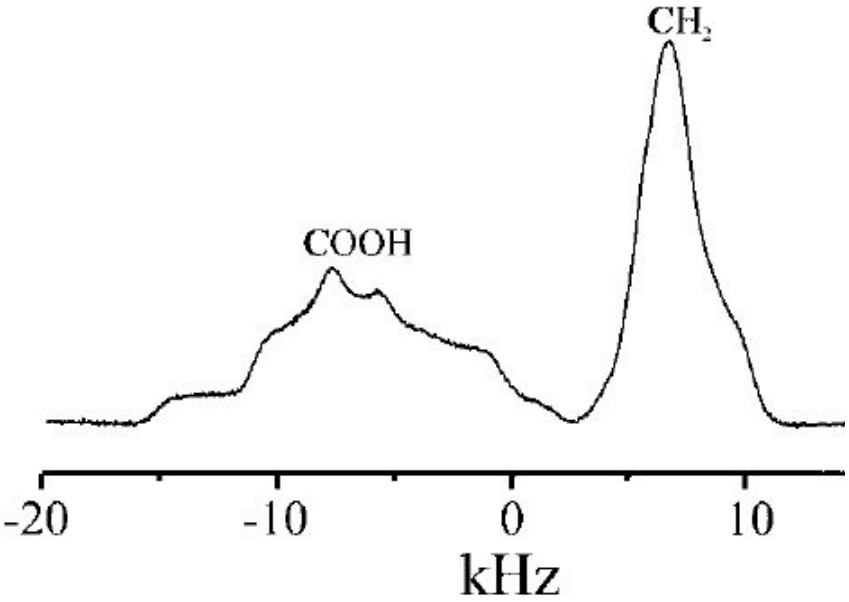
Растворители для ЯМР

Растворитель	Т. кип. °С	Т. пл., °С	Цена* руб/г
Хлороформ-d	61,7	-114,5	11
Окись дейтерия (D_2O)	101,42	-1,8	18
Диметилсульфоксид-d_6	189	11,8	40
Ацетон-d_6	56,2	-95,4	48
Ацетонитрил-d_3	81,6	-45,7	80
Бензол-d_6	80,1	5,5	82
Метанол-d_4	64,5	-126,6	157
Хлористый метилен- d_2	40	-95,1	210
Диметилформамид-d_7	152	-35	322
Циклогексан-d_{12}	80,7		443
Тетрагидрофуран-d_8	67	-1	600

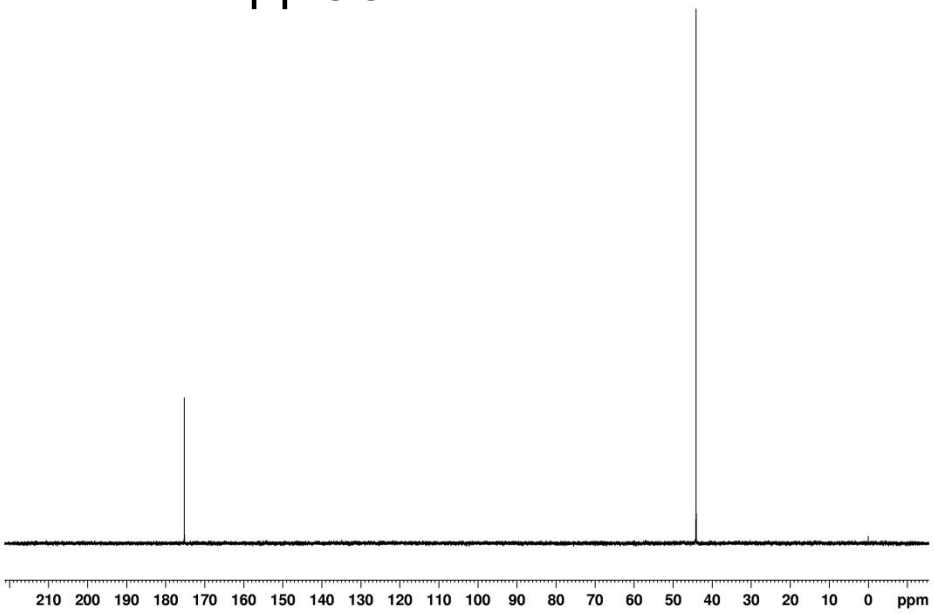
* Цены 2010 года, сейчас всё намного дороже

Проблема ЯМР твёрдых тел

Порошок



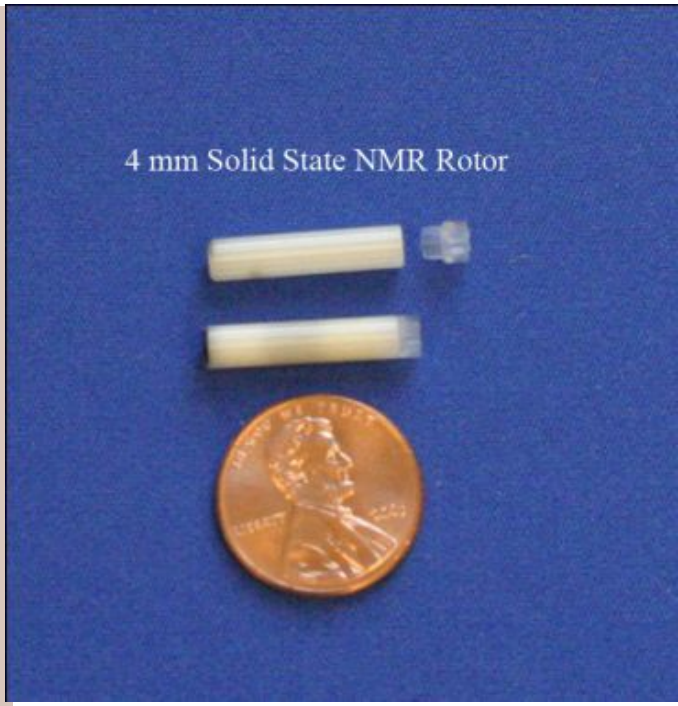
Жидкость

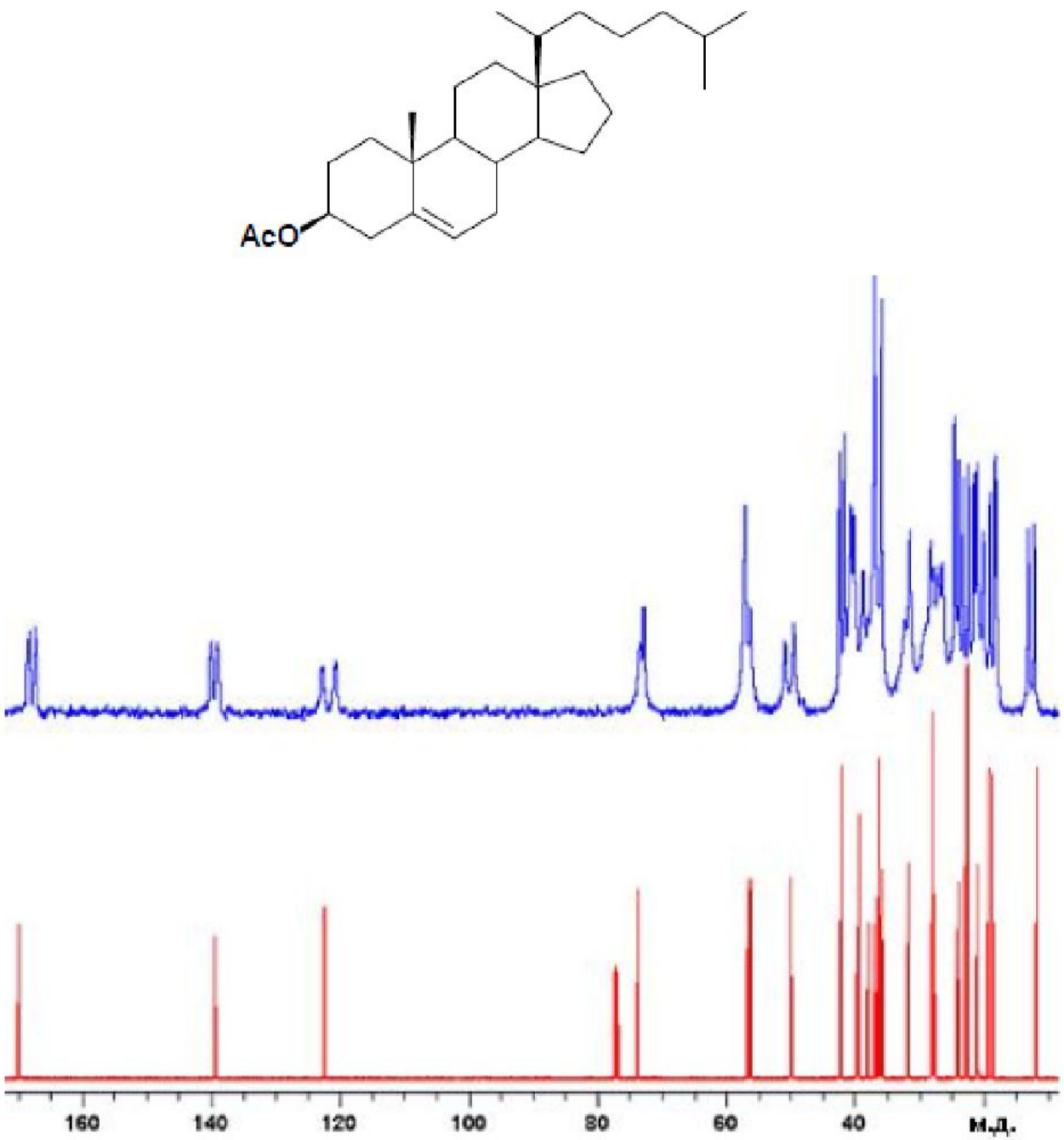


Регистрация ЯМР твёрдых тел (MAS NMR)

- Препятствие для ЯМР твердых тел - прямое диполь-дипольное взаимодействие ядерных спинов. Оно усредняется в жидкостях и газах до нуля броуновским движением.
- Решение: «магический угол» $\boldsymbol{\theta}$ = 54,7°. Это и используют для сужения резонансных линий в спектрах ЯМР твердых тел. Вещество в виде порошка помещают в специальный цилиндрический полый пенал диаметром 4 мм или 7 мм, сделанный из особо прочного материала. Обычно в качестве такого используют циркон (оксид ZrO_2) или нитрид бора. В специальном датчике он помещается под магическим углом по отношению к полю ***B0*** и вращается с помощью воздушной турбинки с очень высокой скоростью (до 35 тысяч оборотов в секунду и выше).

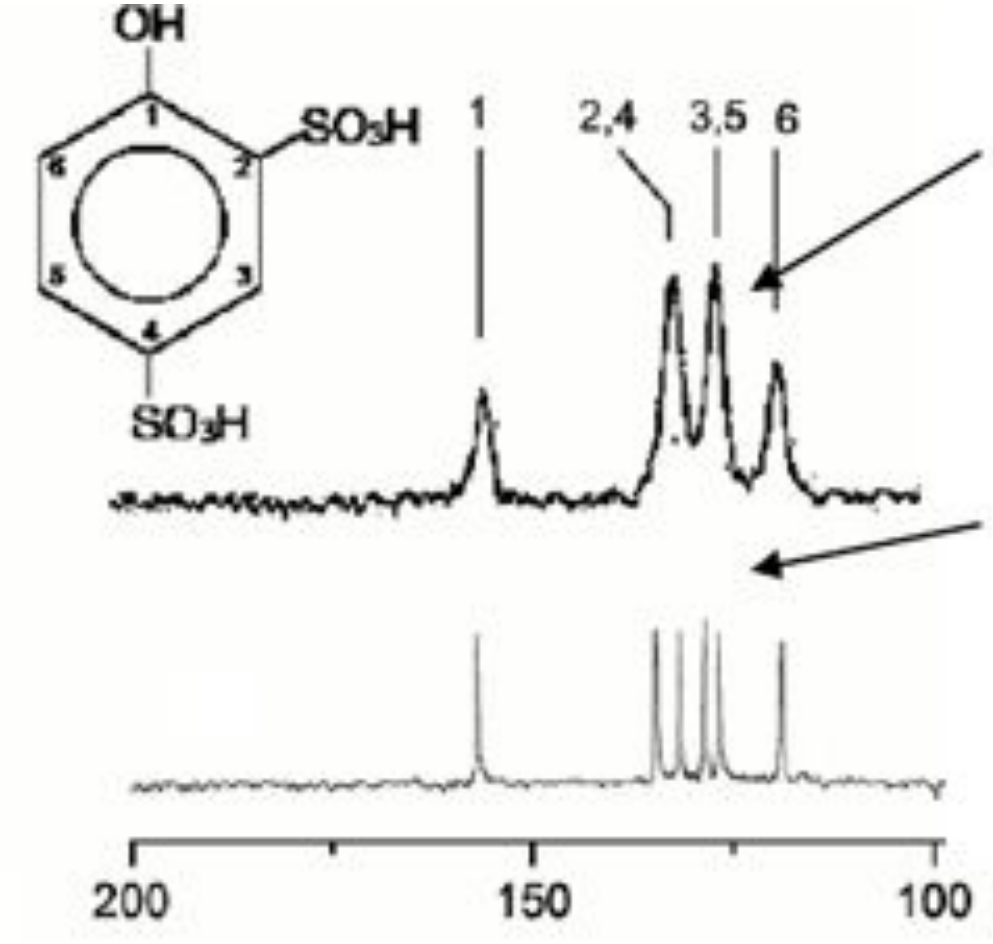
Вращение под магическим углом





Спектры ^{13}C-{^{1}H}-ЯМР холестерилацетата: Вверху – спектр твёрдого вещества, записанный с вращением под магическим углом с частотой 15 кГц. Ширина линий – 15 Гц. Внизу – спектр того же вещества в растворе $CDCl_3$.

Вращение под магическим углом



Без использования вращения под магическим углом

С использованием

Соотношение сигнал/шум

- Для улучшения соотношения обычно проводят несколько сканирований

$$S/N \sim N \times \gamma_{ex} \times \gamma_{det}^{3/2} \times B_0^{3/2} \times NS^{1/2} \times T_2^{1/2}$$

S/N – соотношение сигнал/шум

N – количество ядер (концентрация)

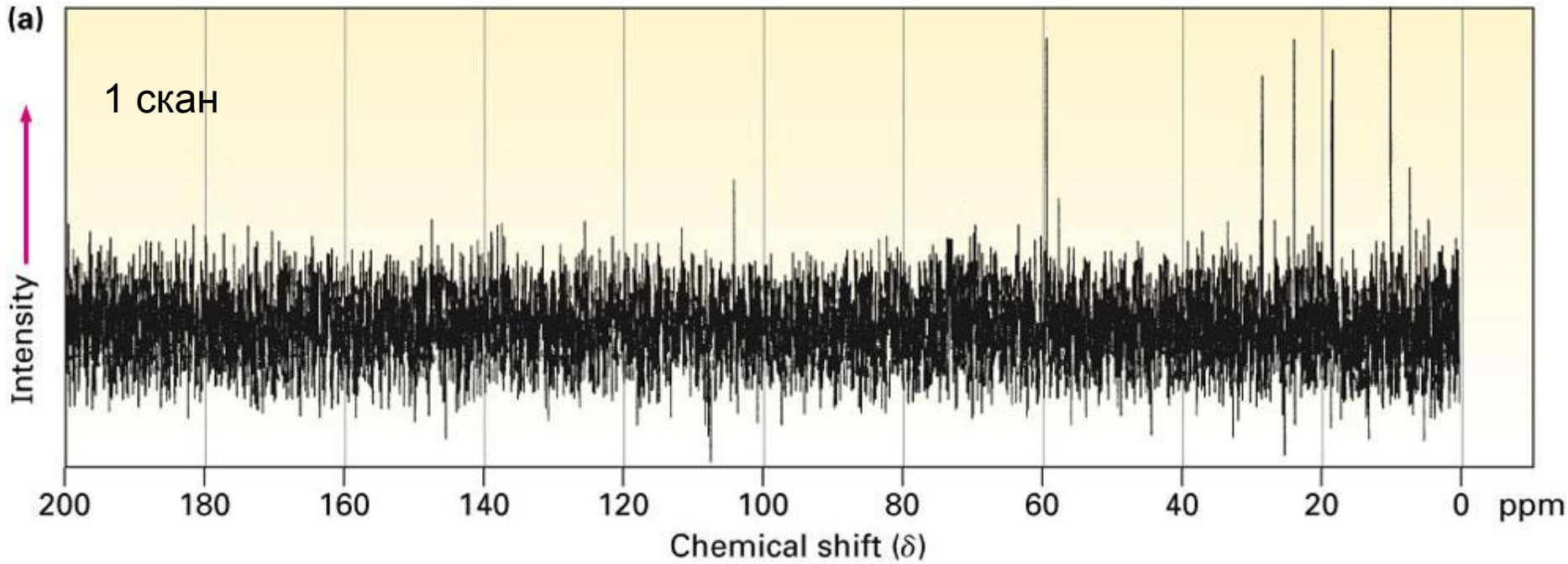
γ_{ex} – гиромагнитное отношение возбуждённых спинов

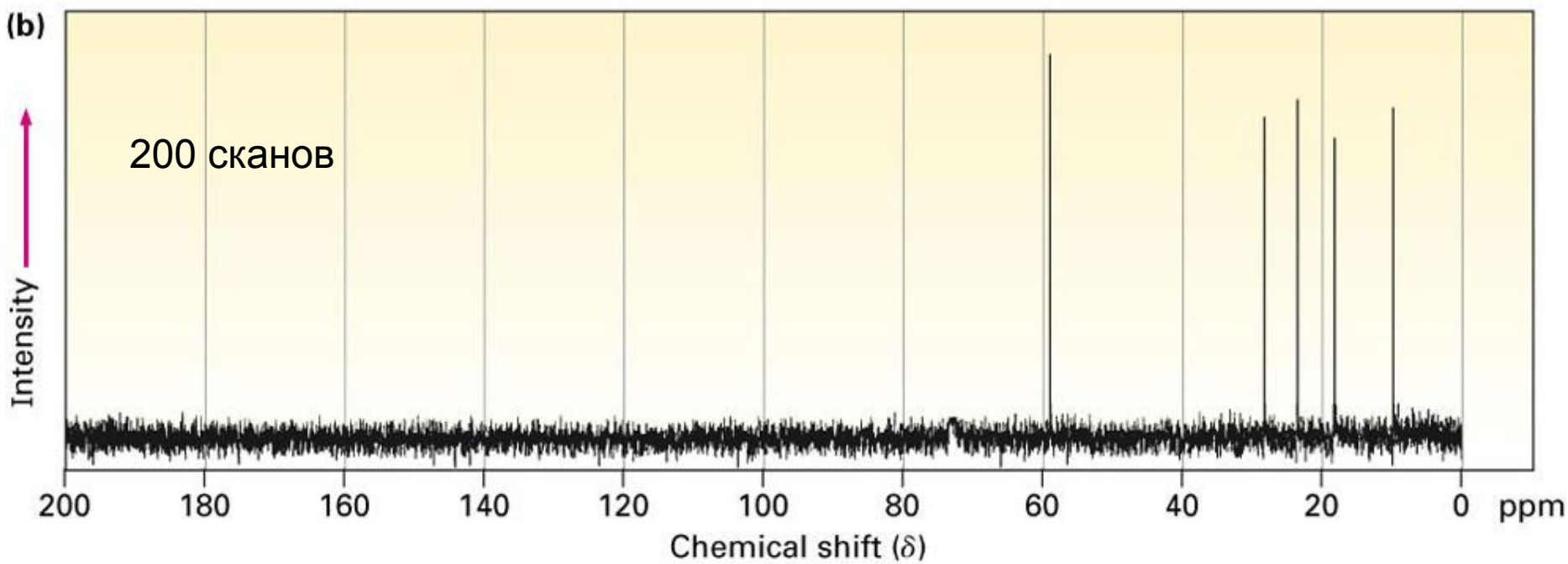
γ_{det} – гиромагнитное отношение детектируемых спинов

B_0 – напряжённость постоянного магнитного поля

NS – количество сканов

T_2 – время поперечной релаксации





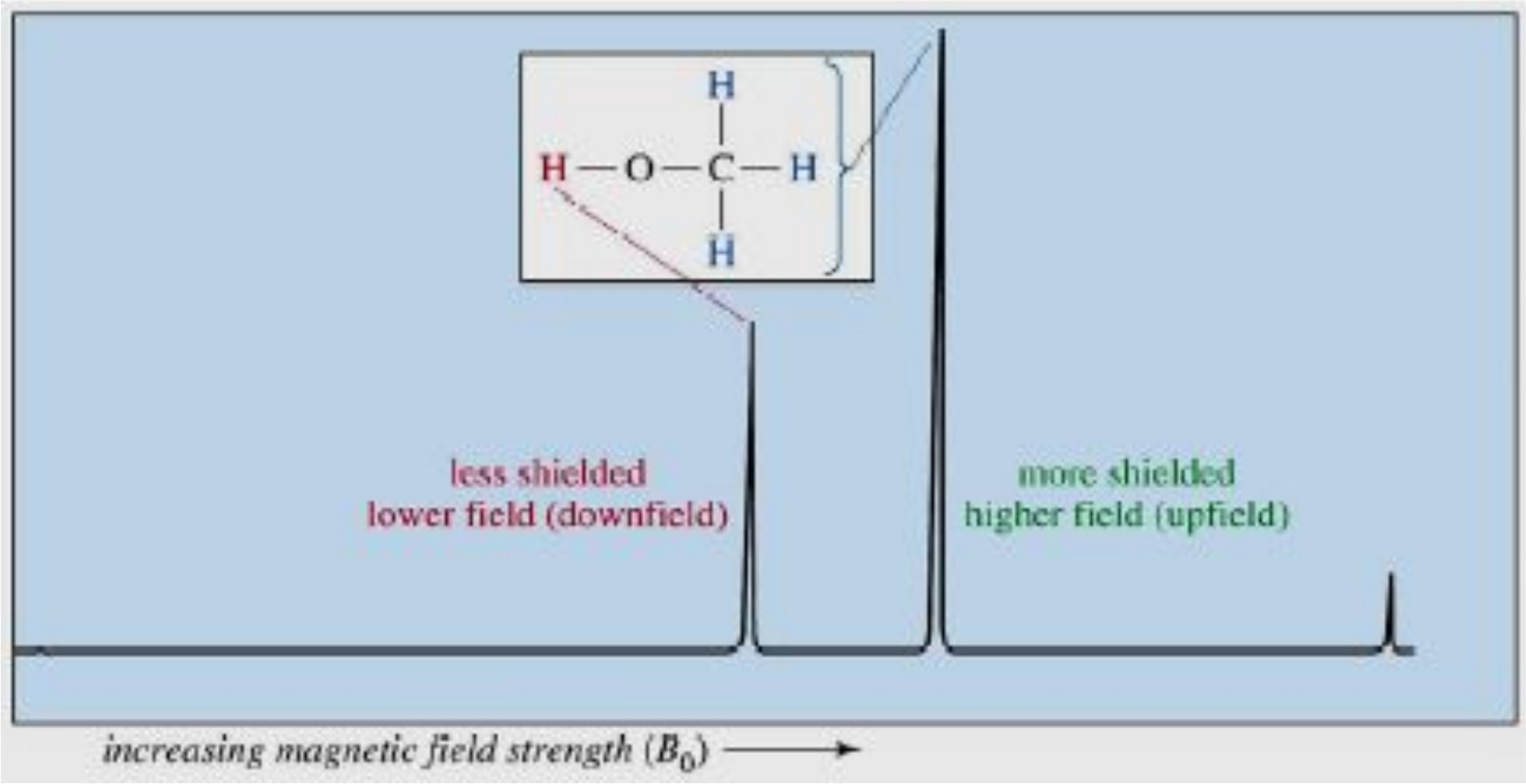
© 2007 Thomson Higher Education

Измеряемые параметры ЯМР

Наблюдаемые параметры	Получаемая из них информация
1) Количество сигналов	Количество неэквивалентных ядер данного типа
2) Положение сигналов (химический сдвиг)	Распределение электронной плотности в молекуле
3) Форма (мультиплетность) сигналов	Тип и количество соседних ядер, обмен
4) Константы спин-спинового взаимодействия (через химическую связь)	Характеристика хим. связей (^{1}J и ^{2}J), диэдральные углы (^{3}J), водородные связи (^{2h}J и ^{3h}J)
5) Площадь сигналов	Количество эквивалентных ядер, давших сигнал
6) Ядерные эффекты Оверхаузера (взаимодействия через пространство)	Расстояния между ядрами (^{1}H – ^{1}H < 5A), динамические характеристики (^{1}H – ^{15}N и т.п.)

Химический сдвиг

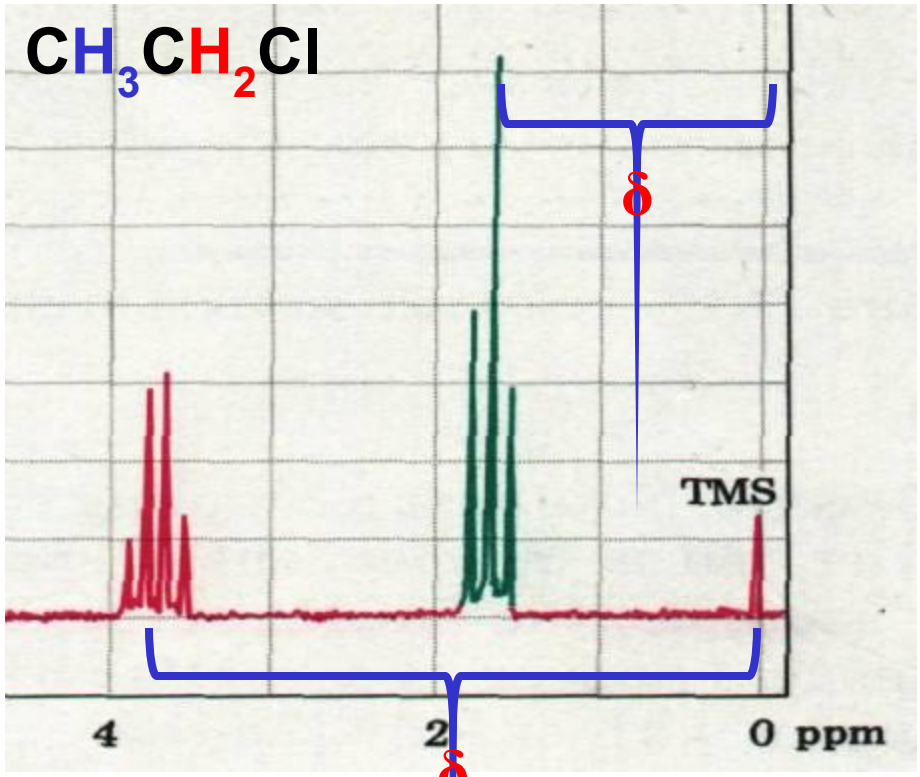
- Это смещение сигнала ЯМР в зависимости от химического состава вещества относительно сигнала эталона.



Химический сдвиг

- Электронные облака соседних атомов в молекуле (кристалле) изменяют резонансную частоту ядер. Это изменение называется *химическим сдвигом*.
- Химический сдвиг измеряется в *миллионных долях* (*parts per million*, *ppm*) – частных от деления сдвига на базовую частоту, умноженных на миллион.
- Химический сдвиг используется для получения структурной информации о веществе.
- Основными факторами, определяющими химический сдвиг, являются электроотрицательность соседних функциональных групп и анизотропия магнитного поля, наведенного электронными оболочками атома.

Химический сдвиг



Электроны, прецессируя вокруг вектора внешнего магнитного поля, создают дополнительный магнитный момент:

$$H' = s * H_0$$

H' – дополнительный магнитный момент,

H_0 – вектор внешнего магнитного поля,

s - константа экранирования

$$H_{эфф} = H_0 - H' = H_0 - \sigma H_0 = H_0(1-\sigma)$$

Химический сдвиг измеряется в относительных единицах, называемых «миллионными долями» (“ppm”) и вычисляется как:

$$\delta = \Delta\nu/\nu_0 * 10^6 = \Delta H/H^0 * 10^6$$

Стандарт для сравнения химических сдвигов

Характеристики:

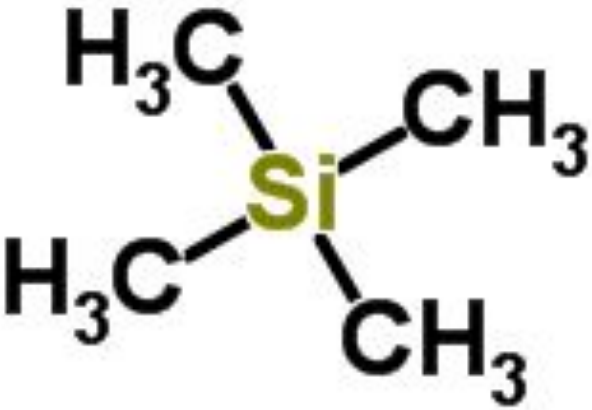
- Химическая инертность
- Магнитно нейтральный
- Дает одиночный узкий пик
- Смешивается с большинством растворителей
- Летучесть – способность удалить из ценных образцов

TMC (Тетраметилсилан):

- Самый распространённый стандарт для ^{1}H, ^{13}C, ^{29}Si в ЯМР

- TMS обычно используется в концентрации **0.5%**
- TMS имеет 12 протонов которые равномерно экранированы благодаря электронно-положительной природе кремния в центре
- 12 протонов дают один узкий пик при **0 (нуле) δ,** который требует максимального магнитного поля, по сравнению с большинством органических веществ
- Химически инертен и смешивается с большинством растворителей

- Т кип. = 26.5 ºC - летуч



δ - шкала хим. сдвигов

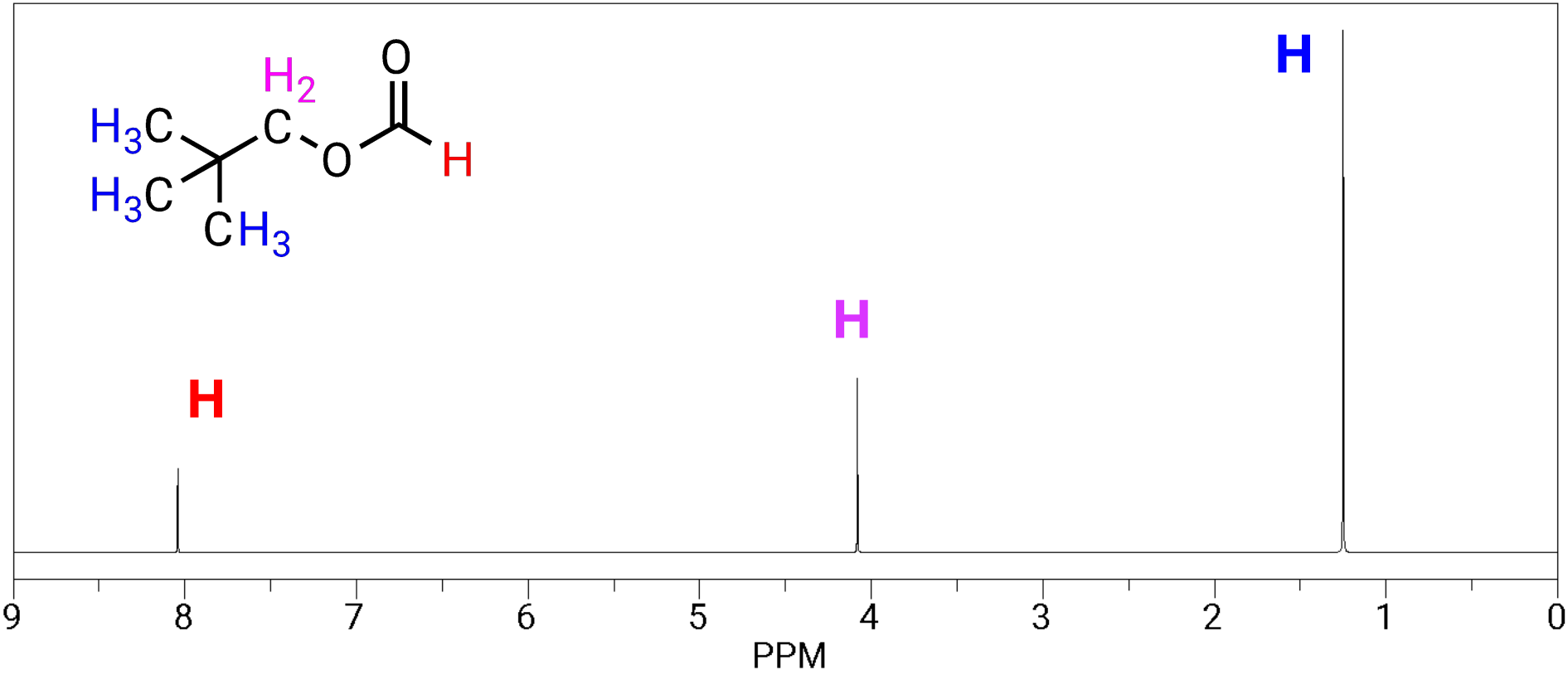
- В ЯМР-спектроскопии распространена так называемая δ - шкала химических сдвигов, по которой химические сдвиги измеряются в миллионных долях (м.д.) относительно эталонной линии ТМС. По этой шкале химический сдвиг ТМС принят равным нулю, а сдвигам ЯМР-сигналов приписывается положительный знак.

Способы описания химических сдвигов в ЯМР-спектрах

Химические сдвиги ^{1}H

- Метилы $C-CH_3$ 0÷1.5 м.д.
- Метилы $N,O-CH_3$ 3−4 м.д.
- Метилены $C-CH_{1,2}$ 1−3 м.д.
- Метилены $N,O-CH_{1,2}$ 3−6 м.д.
- Ароматика CH 6−7 м.д.
- Амиды NH,NH_2 6−11 м.д.

Эффекты экранирования в ЯМР



H – альдегидный протон. Очень сильно дезэкранирован.

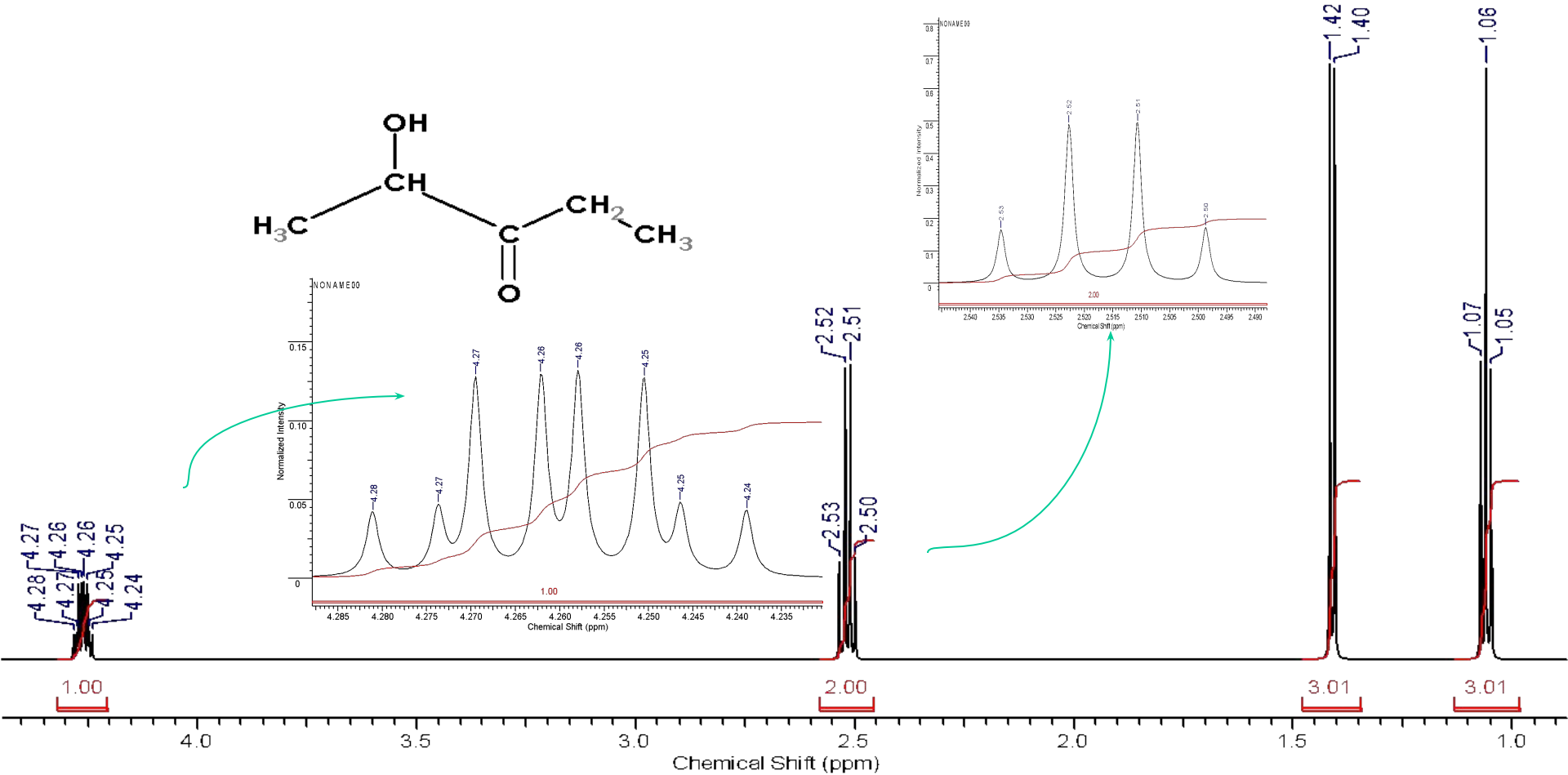
H – протон, связанный с кислородом, являющимся электроноакцептором, дезэкранирующим протон.

H – протон, связанный с углеродом, который связан с другим углеродом одинарной связью. Дезэкранирование практически отсутствует.

Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

- В спектрах ^{1}H ЯМР сигналы протонов часто представляют набор компонентов (линий). Это вызвано спин-спиновым взаимодействием ядер магнитно-неэквивалентных протонов.

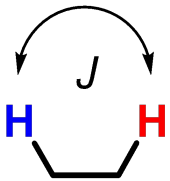


Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

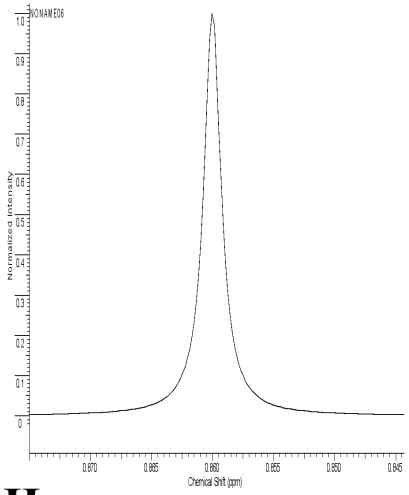
- Влияние на магнитное экранирование протона H спина другого неэквивалентного протона H, расположенного при соседнем атоме углерода, называется **спин-спиновым взаимодействием.**

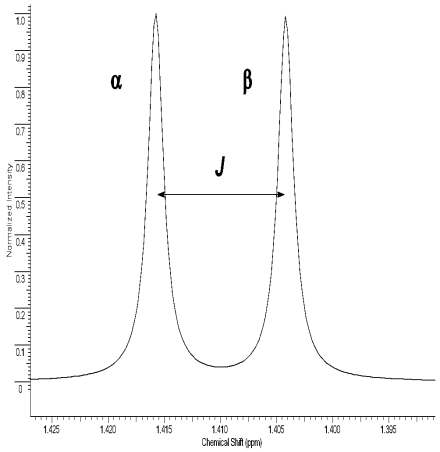
нет Спинового взаимодействия

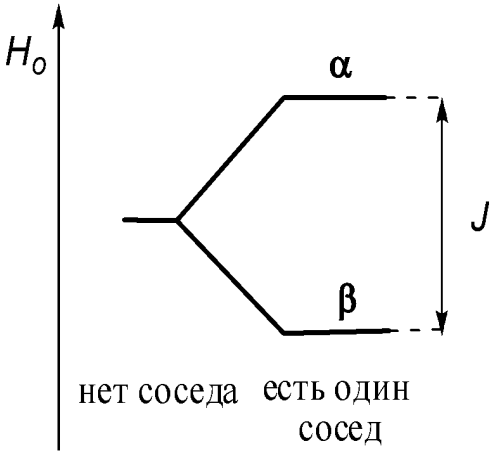


есть Спиновое взаимодействие

расщепление энергетического уровня протона **H** в поле ядра **H**







возможная ориентация спина ядра **H** в магнитном поле H_o

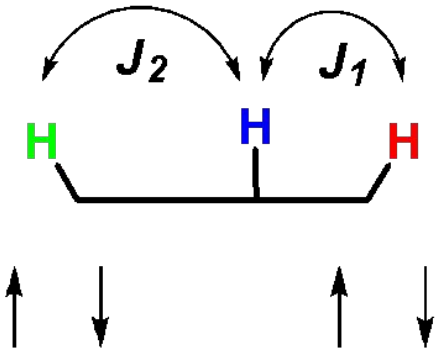
- **На магнитное экранирование каждого протона оказывает влияние спин соседнего протона, который может быть различен и поэтому даёт два различающихся поля: одно увеличенное, другое – уменьшенное. С удалением ядер друг от друга эффект резко падает.**

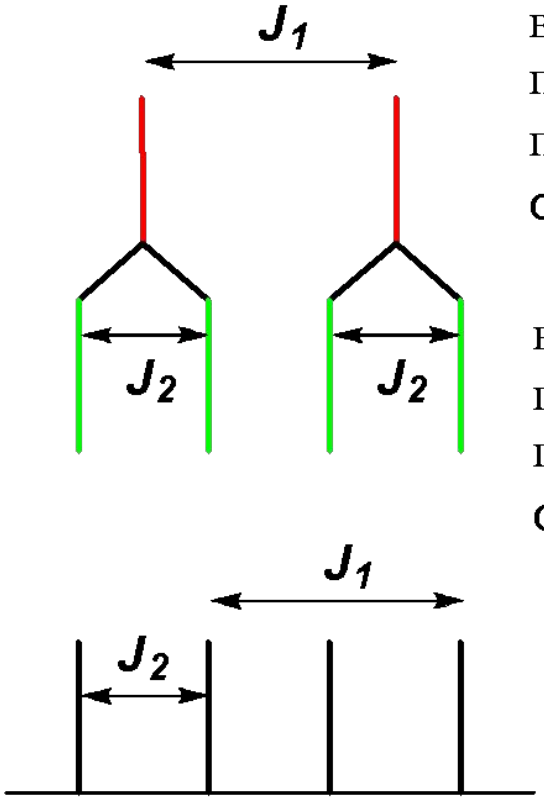
Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

Расщепление сигнала протона H в присутствии двух неэквивалентных соседей H и H

возможные распределения спиновых состояний магнитно-эквивалентных протонов H и H





вид мультиплета протона H после расщепления на H с КССВ J_1

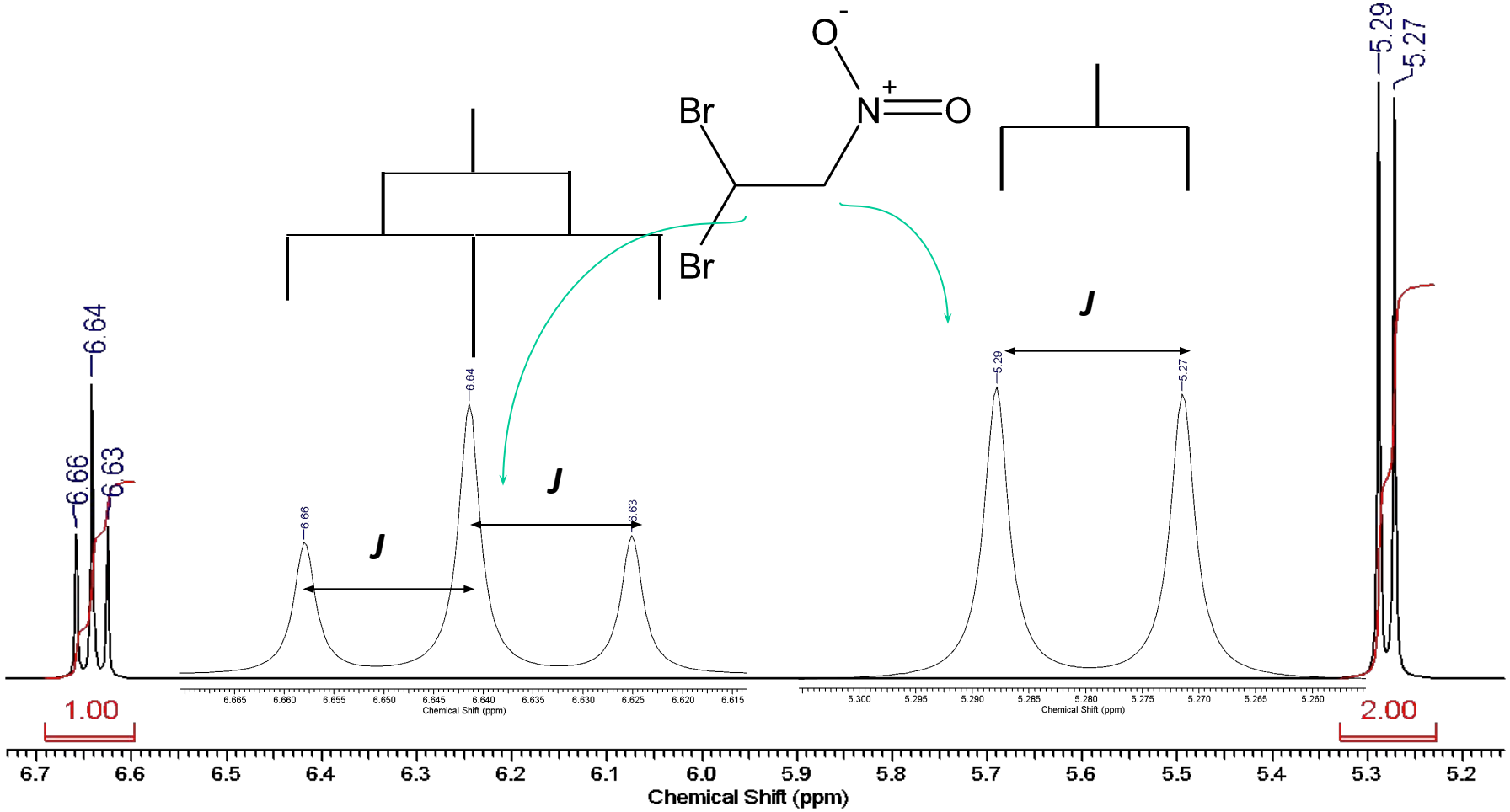
вид мультиплета протона H после расщепления на H и H с КССВ J_2

вид мультиплета протона H в спектре (дублет-дублетов)

Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

• В мультиплете каждая линия отстоит от соседней на одинаковое количество Гц.



- **Расстояние между пиками мультиплетов, измеренное в герцах, называют константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) и обозначают буквой *J*. Например: $^3J_{A,B}$ = 8.0 Hz.**

Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

Вид простых мультиплетов в спектрах ^{1}H ЯМР

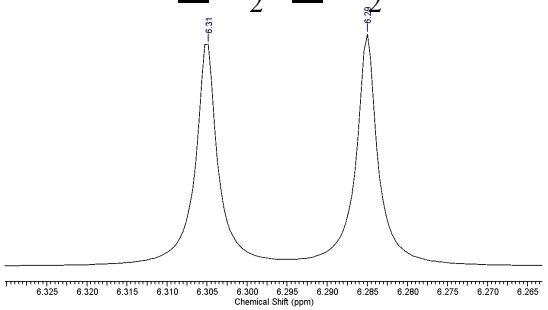
- **Как узнать форму сигнала протона в ЯМР спектре? Для взаимодействия спина А с N эквивалентными спинами X количество линий, на которые расщепляется сигнал спина А, равно N + 1.**

Возникают из-за спин-спинового взаимодействия протонов, находящихся через две, три (реже, четыре, пять) связи друг от друга.

Дублет (один сосед)

$Y_2C\underline{H}$-CHX_2

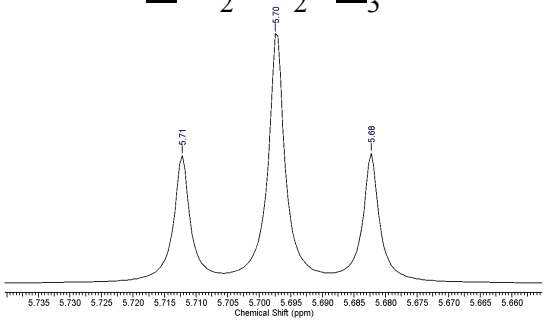
$C\underline{H}Cl_2C\underline{H}Ph_2$



Триплет (два соседа)

$Y_2C\underline{H}$-CH_2X

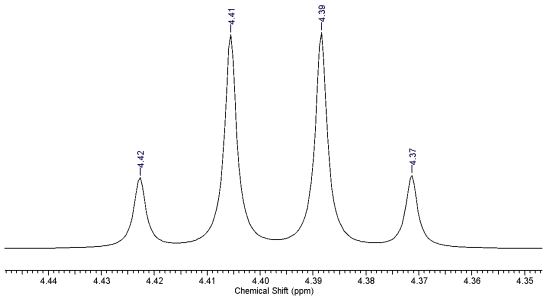
$C\underline{H}Br_2CH_2C\underline{H}_3$



Квартет (три соседа)

$Y_2C\underline{H}$-CH_3

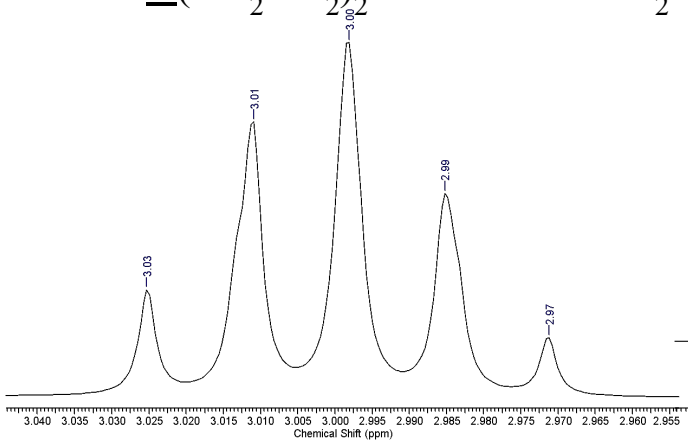
$CH_3C\underline{H}(OH)CO_2H$



Пентет, квинтет (четыре соседа)

$-CH_2$-$C\underline{H}$-CH_2-

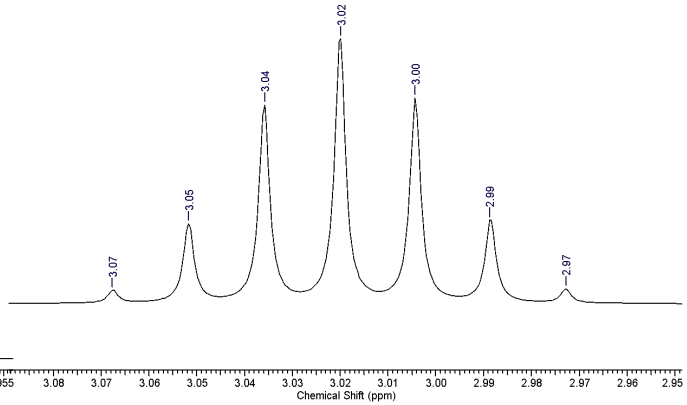
$IC\underline{H}(CH_2NO_2)_2$



Септет (шесть соседей)

CH_3-$C\underline{H}(X)$-CH_3

NH_2-$C\underline{H}(CH_3)_2$



Секстет (пять соседей)

X-CH_2-$C\underline{H}$-CH_3

редкий случай

Нонет (восемь соседей) – не встречается.

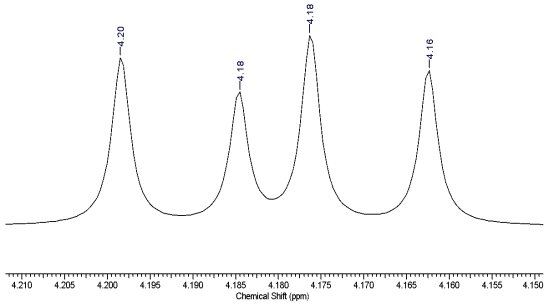
Децет наблюдается лишь в *трет*-бутане.

Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

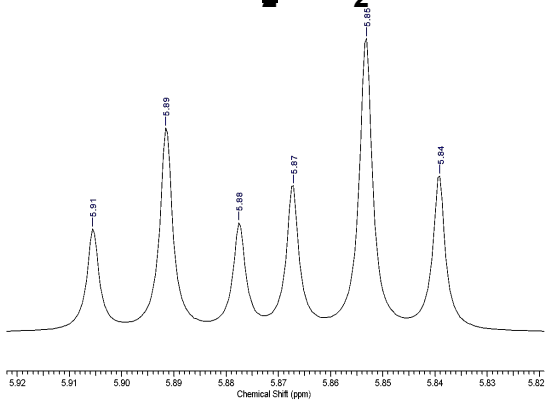
Вид простых мультиплетов в спектрах ^{1}H ЯМР

Если соседние протоны магнитно неэквивалентны, то мультиплеты усложняются.

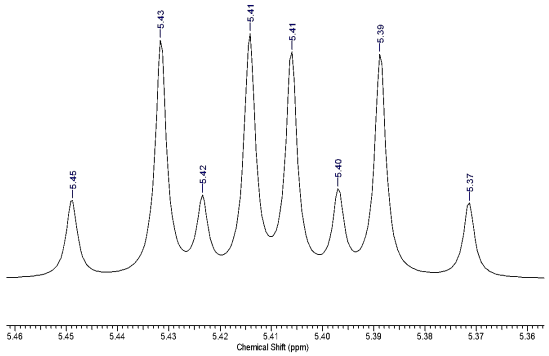
Дублет-дублетов
-XCH-C<u>H</u>$_2$-CHY-
-XCH-C<u>H</u>(Z)-CHY-



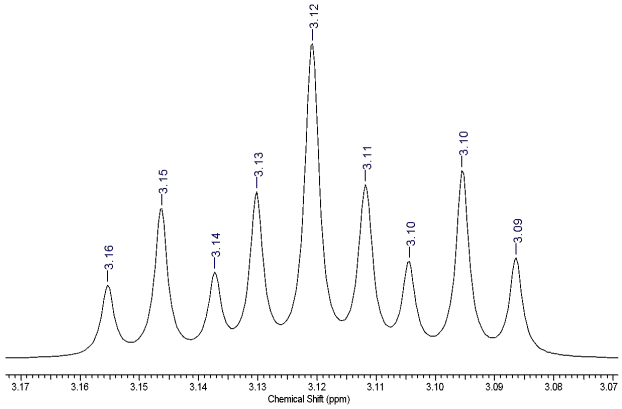
Дублет-триплетов
-XCH-C<u>H</u>$_2$-CH$_2$Y-



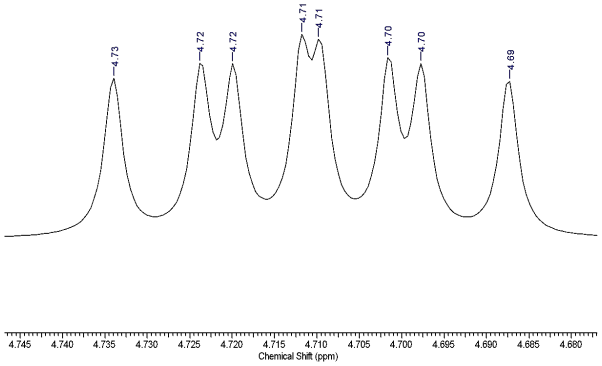
Дублет-квартетов
-XCH-C<u>H</u>$_2$-CH$_3$



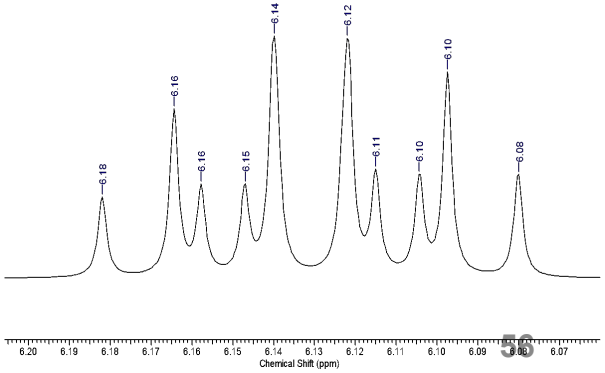
Триплет-триплетов
XCH$_2$-C<u>H</u>$_2$-CH$_2$Y



Дублет-дублетов-дублетов
-XCH-C<u>H</u>(CHZ-)-CHY-



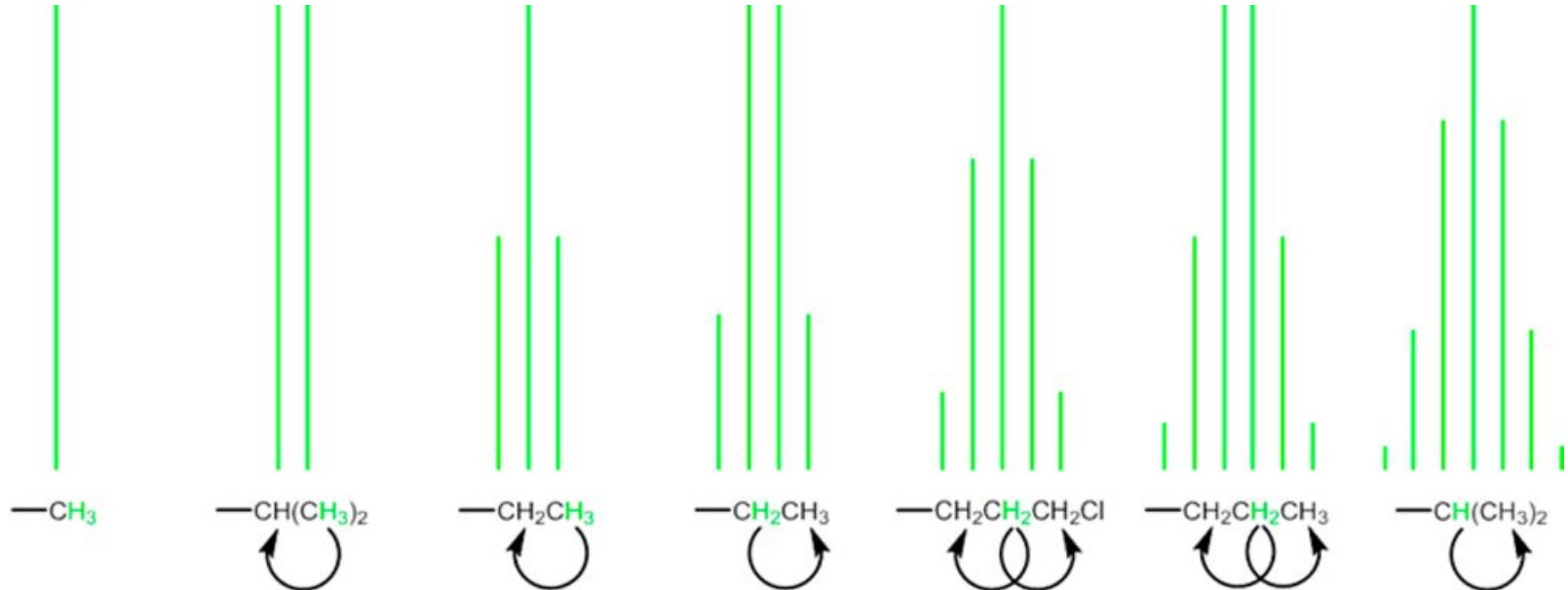
Дублет-дублетов-триплетов
-XCH-C<u>H</u>(CH$_2$Z)-CHY-



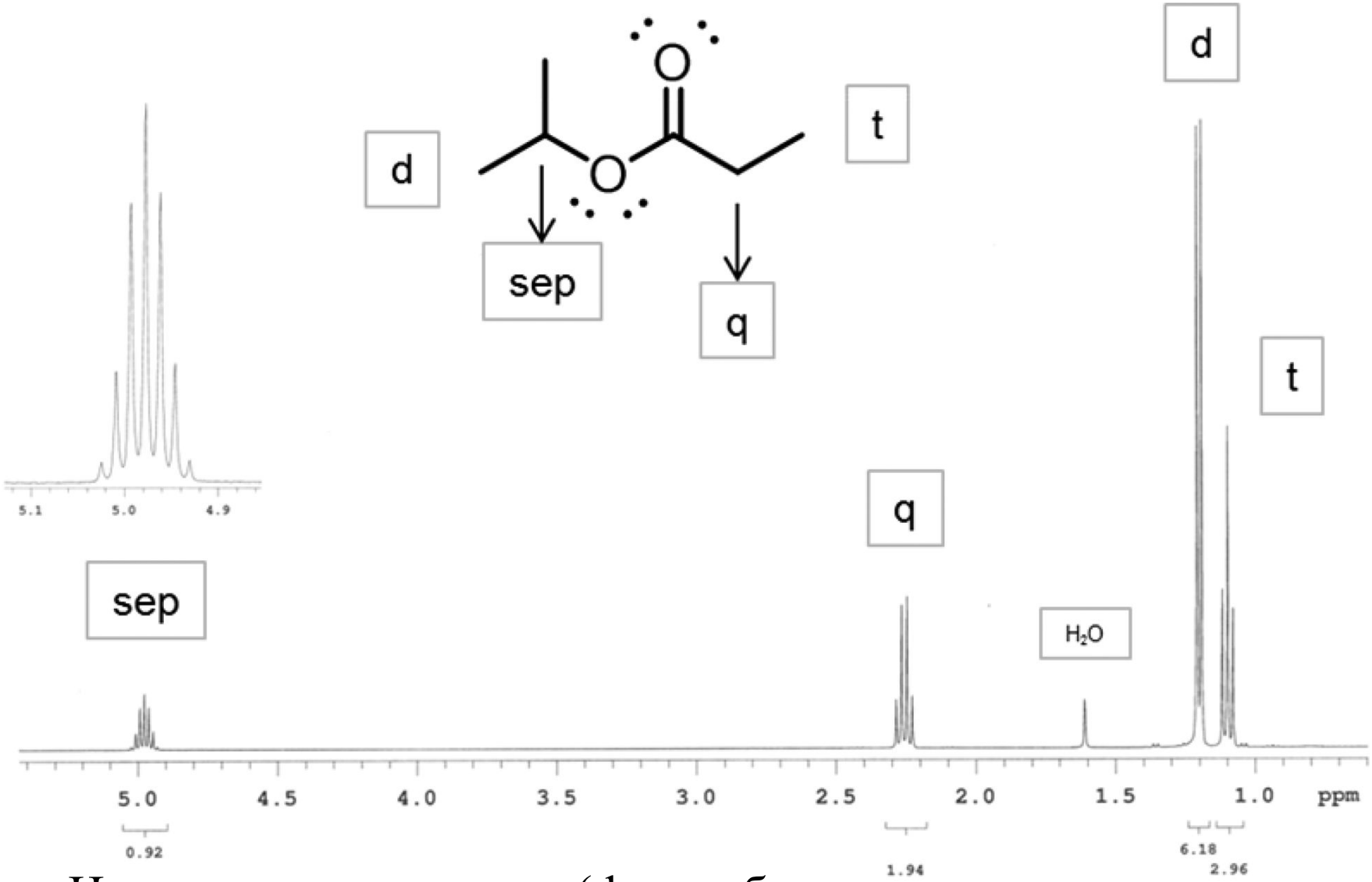
Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

- Интенсивность компонентов мультиплета подчиняется соотношению треугольника Паскаля

Число эквивалентных ядер, вызывающих расщепление	Мультиплетность наблюдаемого сигнала	Относительная интенсивность линий и их расположение в мультиплете
0	**синглет (с, s)**	**1**
1	**дублет (д, d)**	**1 1**
2	**триплет (т, t)**	**1 2 1**
3	**квартет (кв, q)**	**1 3 3 1**
4	**квинтет (пентет, p)**	**1 4 6 4 1**
5	**секстет**	**1 5 10 10 5 1**



Пример мультиплетности сигналов в ^{1}H ЯМР спектре

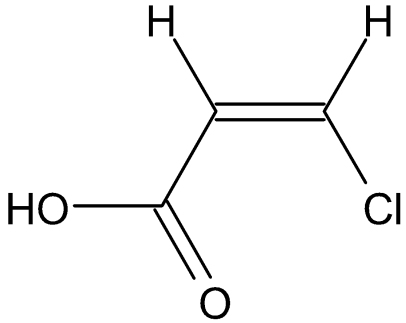


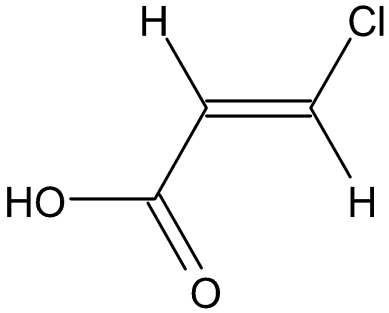
- Изопропил пропионат (d = дублет, sep = септет, q = квартет, t = триплет)

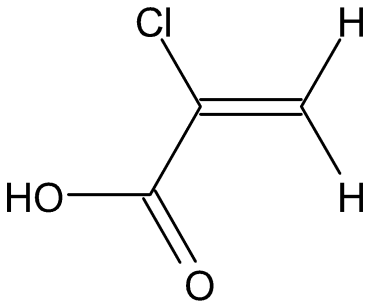
Спектры ^{1}H ЯМР с КССВ

Наиболее характеристичные КССВ

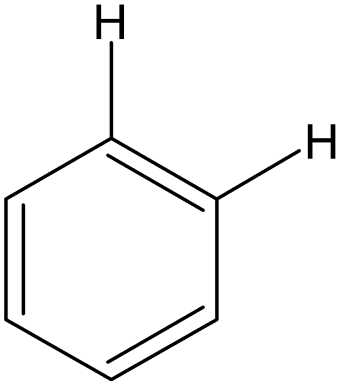
Алкены: $^3J_{цис}$ ~ 7-10 Hz; $^3J_{транс}$ ~ 13-16 Hz; $^2J_{гем}$ ~ 1-2 Hz

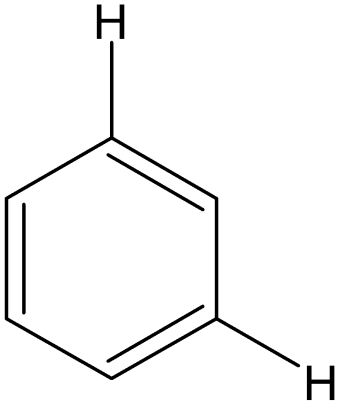


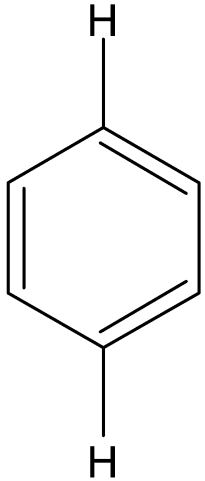




Арены: $^3J_{орто}$ ~ 7-9 Hz; $^4J_{мета}$ ~ 1-3 Hz; $^5J_{пара}$ ~ 0-1 Hz







^{13}C ЯМР спектроскопия

- Устанавливает количество магнитно неэквивалентных атомов углерода в соединении.
- ^{13}C резонанс наблюдается от 0 до 220 м.д. по отношению к ТМС (эталон).
- Химический сдвиг зависит от электроотрицательности рядом расположенных атомов.
- O, N, галогены уменьшают электронную плотность и экранирование, смещая сигнал в слабое поле.
- sp^3 C сигнал при δ 0 до 9; sp^2 C: δ 110 до 220.
- C(=O) слабое поле, δ 160 до 220.

Спектры ^{13}C ЯМР

Основные представления

1. Интенсивность сигнала и чувствительность метода

•Относительная магнитная чувствительность ядра углерода ^{13}C по сравнению с ^{1}H составляет **1.6%**

•Природное содержание изотопа ^{13}C составляет **1.1 %**

•Следовательно, относительная чувствительность ЯМР $^{1}H/^{13}C$ ~ **5700/1**.

•Требуются в 10 раз больше количества вещества, чем в случае ^{1}H ЯМР (20 мг).

2. КССВ ^{1}H-^{13}C и мультиплетность

•Наблюдаются прямые КССВ ^{1}H-^{13}C =120-250 Гц, а КССВ ^{13}C-^{13}C и ^{13}C-^{12}C – не наблюдаются (почему?)

3. Рабочая частота прибора

•Гиромагнитные отношения ядер $^{1}H/^{13}C$ различаются в четыре раза (**$\gamma^{1}H/\gamma^{13}C$ = 1/0.672 = 0.251**), следовательно, на приборе с рабочей частотой 600 МГц для протонов можно зарегистрировать углеродный спектр на частоте 600×0.251 = 150.6 МГц.

4. Диапазон химических сдвигов ^{13}C (0 – 220 м.д.) в 10 раз больше, чем для ^{1}H (-2 – 15 м.д.)

•Вероятность перекрывания сигналов в углеродном спектре гораздо меньше, нежели в протонном. Облегчается интерпретация спектра.

5. Использование широкополосной развязки от протонов

•Удаляются прямые КССВ $^{1}J_{1H,13C}$ и КССВ $^{2}J_{1H,13C}$ усложняющие вид спектра. Углеродный спектр приводится к “палочному” виду. При этом **в разы возрастает интенсивность** сигналов.

6. Отсутствие интегральных кривых в спектре. Трудности для количественного определения (проблематично установить число магнитно-эквивалентных ядер углерода, дающих резонансный сигнал).

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса ядер ^{13}C

Изотоп	Естественное содержание, %
^{1}H	99.98
^{13}C	1.1

Для проведения эксперимента ЯМР ^{13}C используются дейтерированные растворители

- Сигналы ЯМР ^{13}C наблюдают в виде одиночных пиков, для этого подавляют спин-спиновое расщепление с протонами.

- Химические сдвиги измеряют в м.д., по отношению к сигналу ТМС. При обычных условиях съемки спектров ЯМР ^{13}C площади сигналов не обязательно пропорциональны числу идентичных ядер ^{13}C.

- Сигналы четвертичных атомов углерода менее интенсивны, чем сигналы атомов, связанных с атомами водорода.

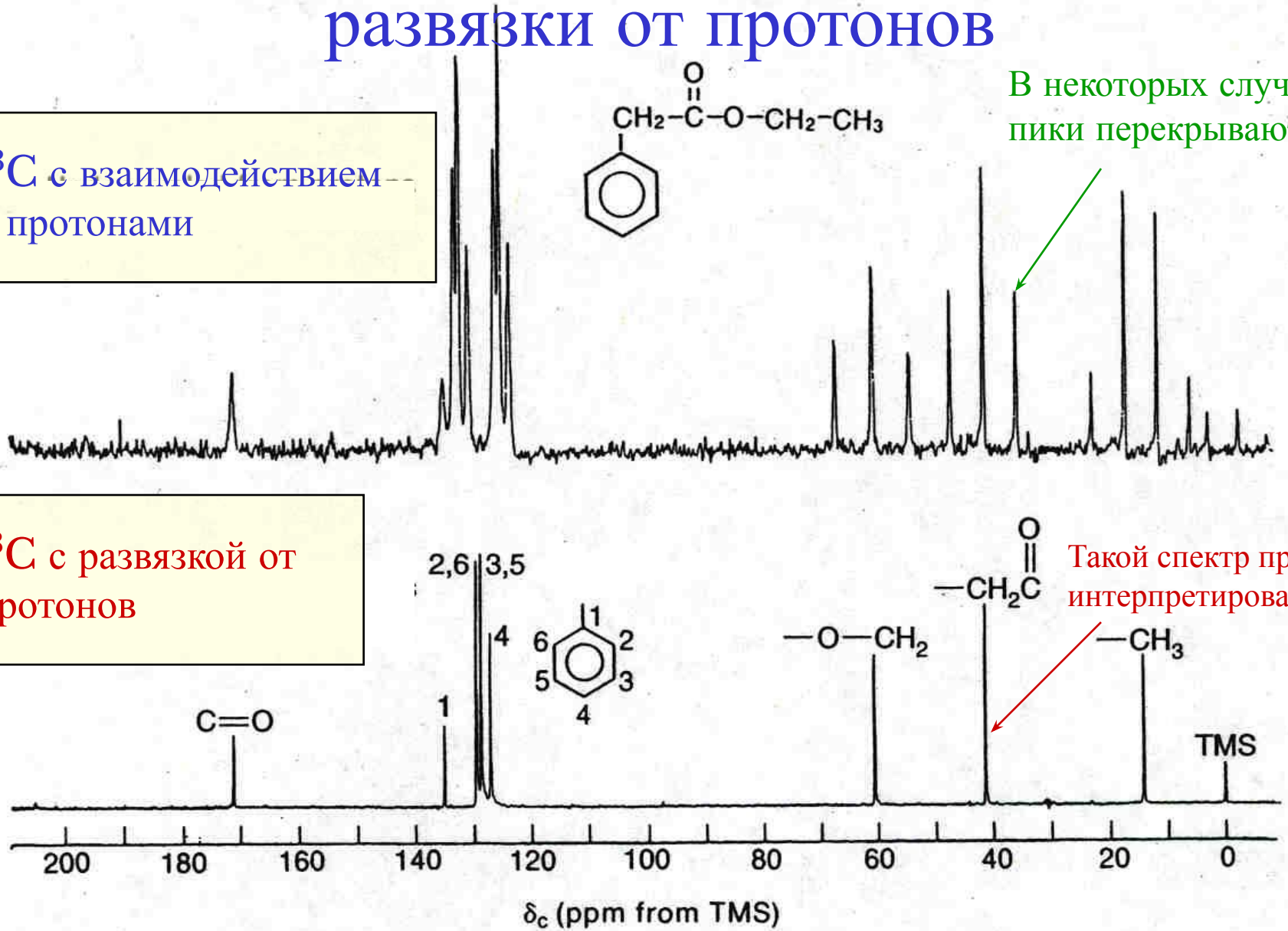
Спектр этил фенилацетата с развязкой и без развязки от протонов

^{13}C с взаимодействием с протонами

В некоторых случаях пики перекрываются

^{13}C с развязкой от протонов

Такой спектр проще интерпретировать



Химические сдвиги ^{13}C

- Метилы $C-CH_3$ 5-15 м.д.
- Метилены $C-CH_{1,2}$ 20−60 м.д.
- Метилены $O-CH_{1,2}$ 60−90 м.д.
- Ароматика, Олефины C,CH 100-150 м.д.
- Карбоксилы C=O 160-220 м.д.

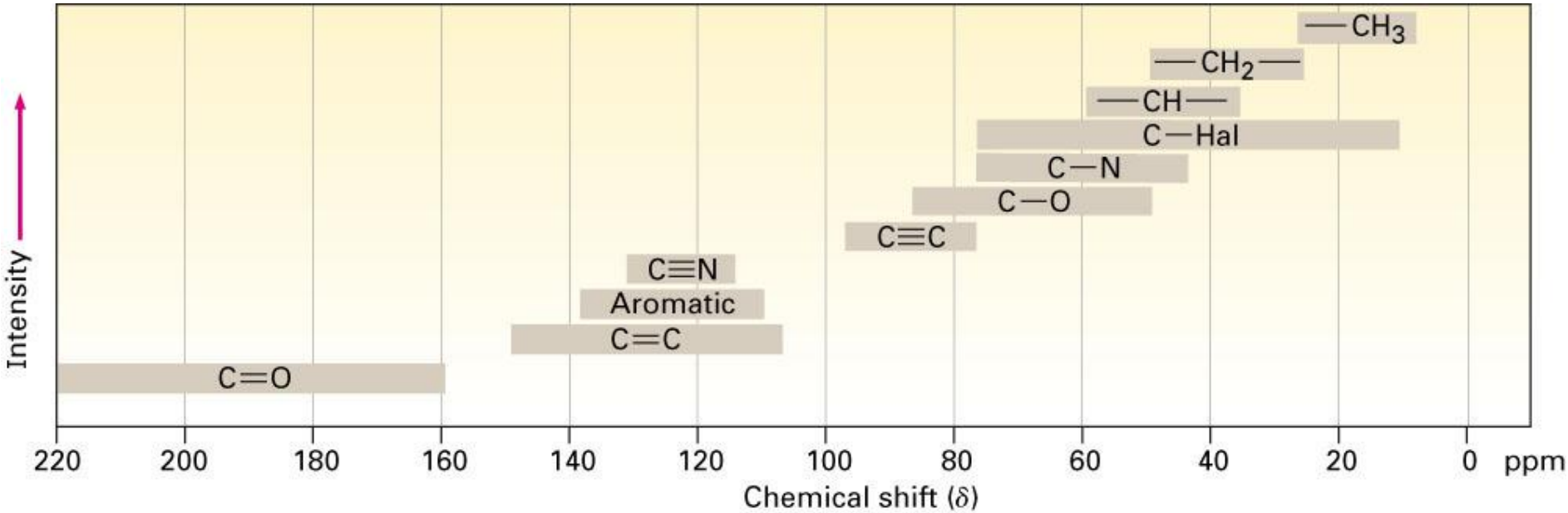
- Наиболее важные факторы, влияющие на величину сдвига:

а) Электроотрицательность группы, соединённой с С;

б) Гибридизация С.

- Интенсивность каждого пика НЕ точно соответствует числу атомов углерода, дающих сигнал. Пики от атомов углерода, связанных с атомами водорода больше пиков атомов С, не связанных с водородом.

Химические сдвиги ^{13}C



© 2007 Thomson Higher Education

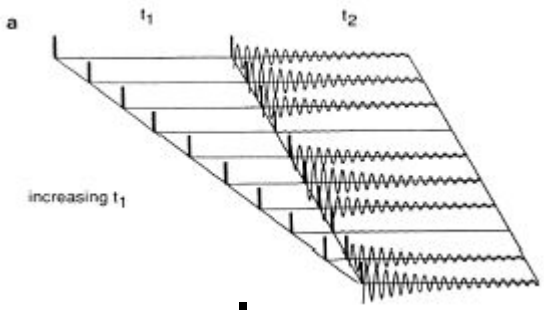
Области спектра ЯМР ^{13}C (шкала в м. д.)

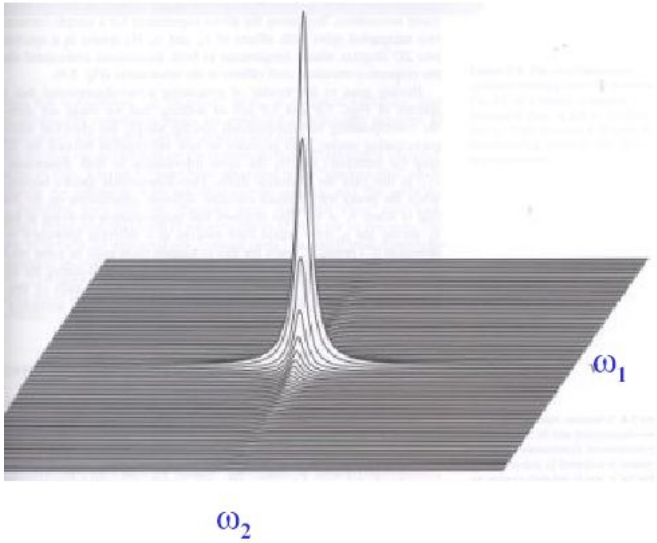
Ненасыщенные атомы углерода, связанные с кислородом (C=O)	Ненасыщенные атомы углерода (C=C и ароматические)	Насыщенные атомы углерода, связанные с кислородом (CH_3O, CH_2O и т. д.)	Насыщенные атомы углерода (CH_3, CH_2, CH)
δ=150 – 200	δ=100 – 150	δ=50 – 100	δ=0 – 50

^{13}C ЯМР спектр этанола

^{13}C ЯМР спектр молочной кислоты

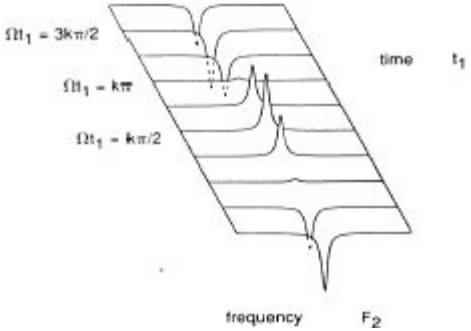
Двумерная спектроскопия ЯМР

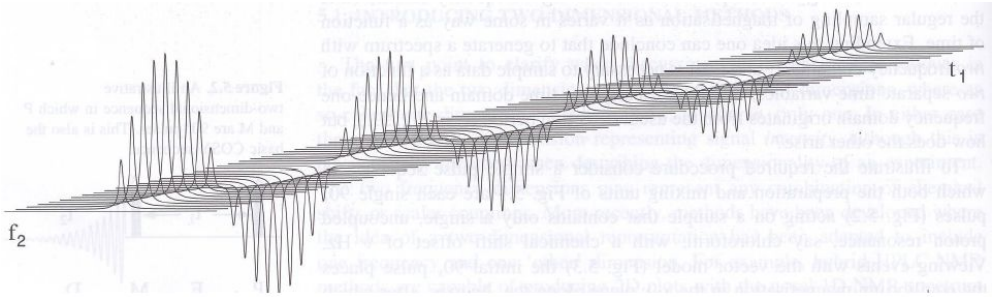




Фурье-преобразование по t_2

Фурье-преобразование по t_1





Основы 2D ЯМР

- Все 2D эксперименты представляют собою серию 1D экспериментов, записываемых с различным таймингом.
- 2D подразделяется на гомоядерные и гетероядерные эксперименты.
- Каждый тип может быть обусловлен взаимодействиями через связи (COSY-тип) или через пространство (NOESY-тип).
- 2D изображение частотных корреляций строится после Фурье трансформации в обоих измерениях (t1 и t2).

Одномерный спектр ЯМР – зависимость интенсивности поглощения от одной частоты (v_1-^{1}H).

Двумерный спектр ЯМР – зависимость интенсивности поглощения от двух частот (v_1-^{1}H и, например, v_2-^{13}C).

Основной 2D ЯМР-эксперимент можно схематически представить во временной области, разделив его на следующие 4 фазы: **подготовки, эволюции, смешивания и детектирования**. На фазе детектирования сигналы, как и в одномерном случае, регистрируются через равные промежутки времени t_2, затем они подвергаются оцифровке и накапливаются. Фаза подготовки, как правило, состоит из 90°-ного импульса, формирующего поперечную намагниченность. На протяжении фазы эволюции, длительность которой равна t, поперечная компонента намагниченности изменяется. Затем следует период смешивания, который в некоторых экспериментах может отсутствовать. Компоненты поперечной намагниченности связаны между собой разнообразными взаимодействиями. На протяжении интервала длительностью ti они подлежат детектированию и преобразованию.

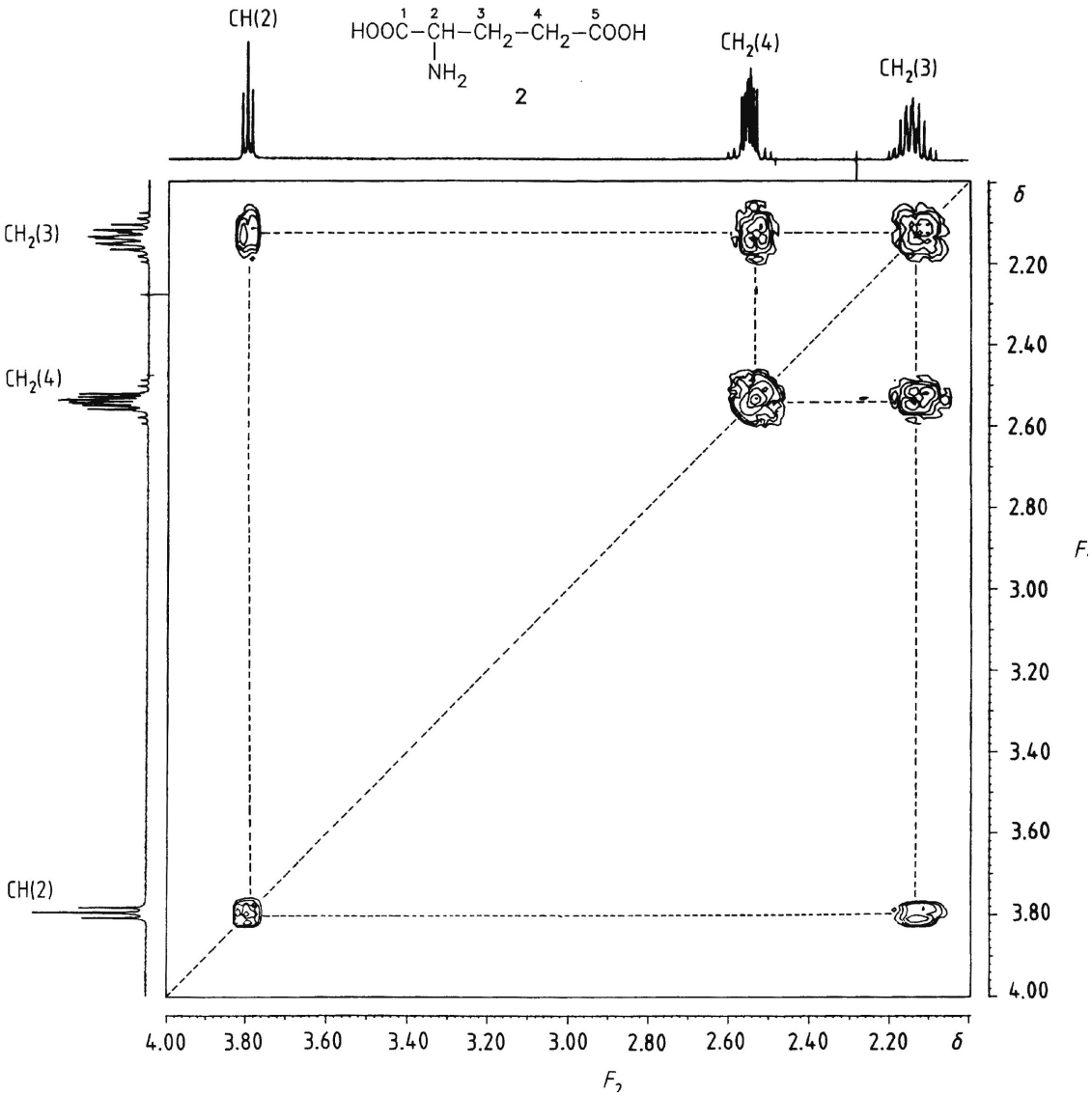
Виды 2D ЯМР спектров,
используемые для определения строения молекул

- Гомоядерная спектроскопия ($^{1}H-^{1}H$):
  - **2D COSY**
  - **2D TOCSY**
  - **2D NOESY**
- Гетероядерная спектроскопия (^{1}H-^{13}C или $^{1}H-^{15}N$):
  - **2D HSQC**
  - **2D HMBC**

Назначение ЯМР экспериментов

эксперимент		описание	$, 30мг
1D	^{1}H	одномерный протонный спектр – *общая информация*	3
	^{1}H Homo	протонный двойной резонанс – *селективная блокировка спин-спинового взаимодействия*	10
	^{13}C, ^{14}N, ^{19}F, ^{31}P	одномерные спектры по другим ядрам – *дополнительная информация, "fingerprints", позиции замещения*	5-20
	APT, DEPT	выявление количества протонов при углеродных атомах	15
	^{13}C Gated	одномерный спектр ^{13}C без широкополосной развязки от протонов – *измерение гетероядерных КССВ*	20
	^{1}H NOE diff., ^{1}H HOE diff.	измерение ядерного эффекта Оверхаузера – *пространственные контакты протонов с протонами и другими атомами*	10 25
2D ^{1}H	COSY, COSY-45	гомоядерная спиновая корреляция – *отнесение протонного спектра*	12
	COSY RCT, RCT2	гомоядерная спиновая корреляция с дальними протонами – *отнесение протонного спектра*	20
	DQF COSY	гомоядерная спиновая корреляция без диагональной линии – *отнесение близколежащих сигналов*	20
	TOCSY	гомоядерная корреляция со всеми протонами спиновой системы – *разделение спиновых систем*	15
	NOESY / ROESY	гомоядерная пространственная корреляция – *выяснение последовательности остатков, конформации*	20
	DOSY	разделение протонного спектра на подспектры компонентов смеси	40
2D ^{1}H-^{n}X	HMQC	гетероядерная спиновая корреляция – *отнесение спектра ^{13}C*	20
	HMBC	гетероядерная спиновая корреляция с дальними атомами - *выяснение последовательности остатков*	35
	HMQC Relay	комбинация HMQC и HH COSY – *контакты углеродов друг с другом (замена INADEQUATE для протонированных систем)*	40
	HMQC-TOCSY	комбинация HMQC и TOCSY – *поиск всех атомов другого типа в пределеах спиновой системы*	35
	HOESY	гетроядерная пространственная корреляция – *выяснение конформации*	50

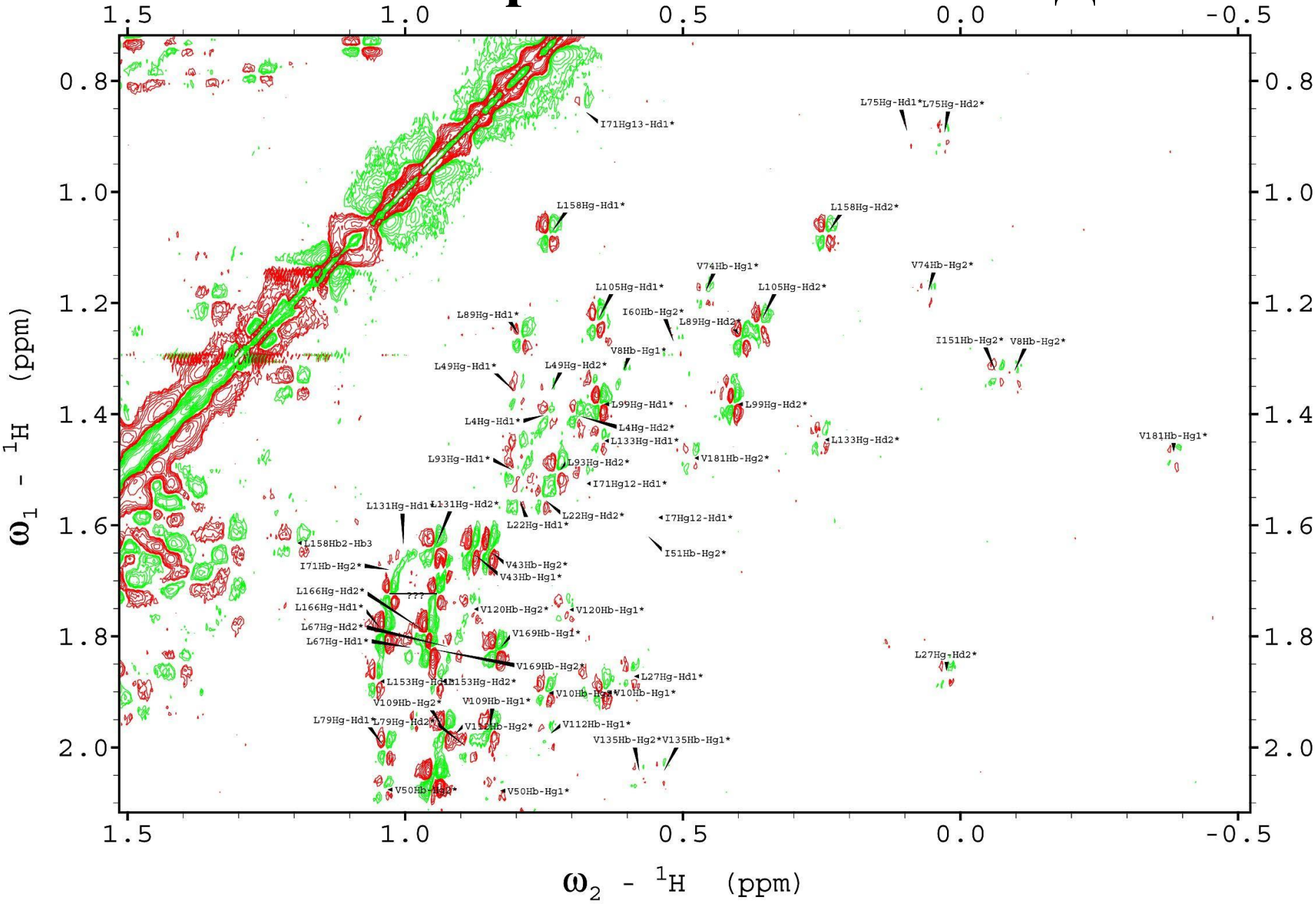
COSY – COrrelated SpectroscopY



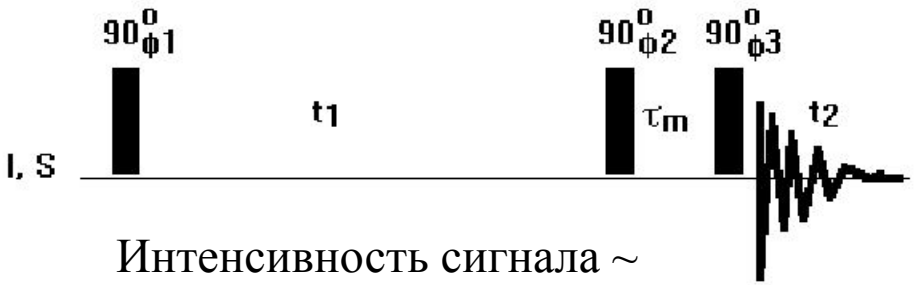
- Спектры COSY представляют собой трехмерную поверхность с координатами (ν1, ν2, I), где ν1 и ν2 – шкалы химических сдвигов (в м.д. или Гц), а I – интенсивность сигналов, являющаяся дополнительным параметром и не влияющая на размерность спектра. Для работы спектры приводятся как набор сечений поверхности вдоль оси I.

- В спектре COSY можно выделить **два** типа сигналов: диагональные сигналы и т.н. **кросс-пики**, Последние **располагаются вне диагонали** и указывают на взаимодействующие группы ядер: если провести через сигнал горизонтальную и вертикальную линию, то на одномерных проекциях мы увидим сигналы, соответствующие кросс-пику.
- Существуют методики COSY, показывающие взаимодействие протонов через 2-3 связи (вицинальное и геминальное), а есть методики, демонстрирующие взаимодействие и через большее количество связей (4-5). Их лучше всего использовать в паре, чтобы было проще отделять ближние и дальние взаимодействия.

2D спектр COSY белка ~ 20 кДа

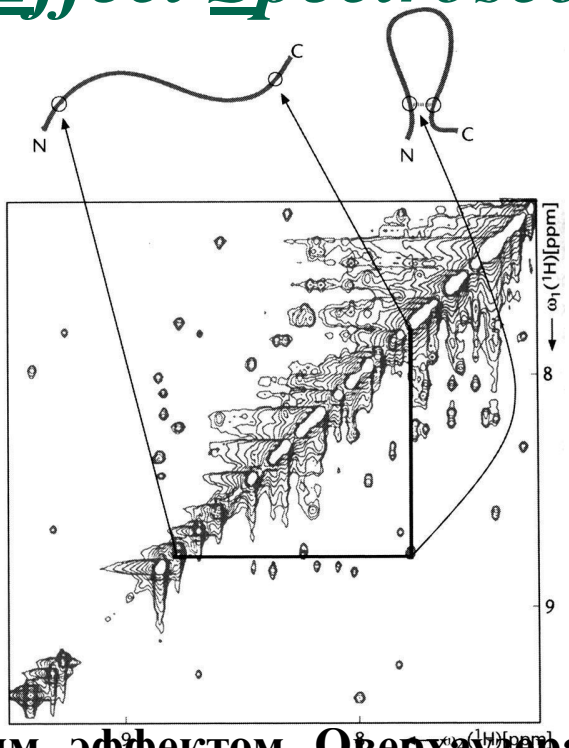


NOESY – Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY



Интенсивность сигнала ~
ЯЭО между протонами i и j
~ $1/r_{ij}^{6}$

NOESY - корреляционная спектроскопия, основанная на ядерном эффекте Оверхаузера. Данная методика позволяет находить группы ядер, взаимодействующие друг с другом через пространство. Причем по интенсивности сигнала мы можем судить об удаленности ядер друг от друга. Т.е. с помощью методики NOESY мы можем устанавливать пространственное строение макромолекул.



Ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО) называется явление резкого изменения интенсивности сигнала ЯМР при взаимодействии спинов разных ядер, например X и Y. Увеличение интенсивности сигнала ядер X при резонансном облучении ядер Y тем сильнее, чем больше вклад магнитного диполь-дипольного взаимодействия ядер X и Y в релаксацию

Ядерный эффект Оверхаузера (NOE)

- ЯЭО - изменение интенсивности одного резонанса, когда спиновые переходы другого некоторым образом выведены из равновесного состояния.

$$\eta\{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \bullet 100\%$$

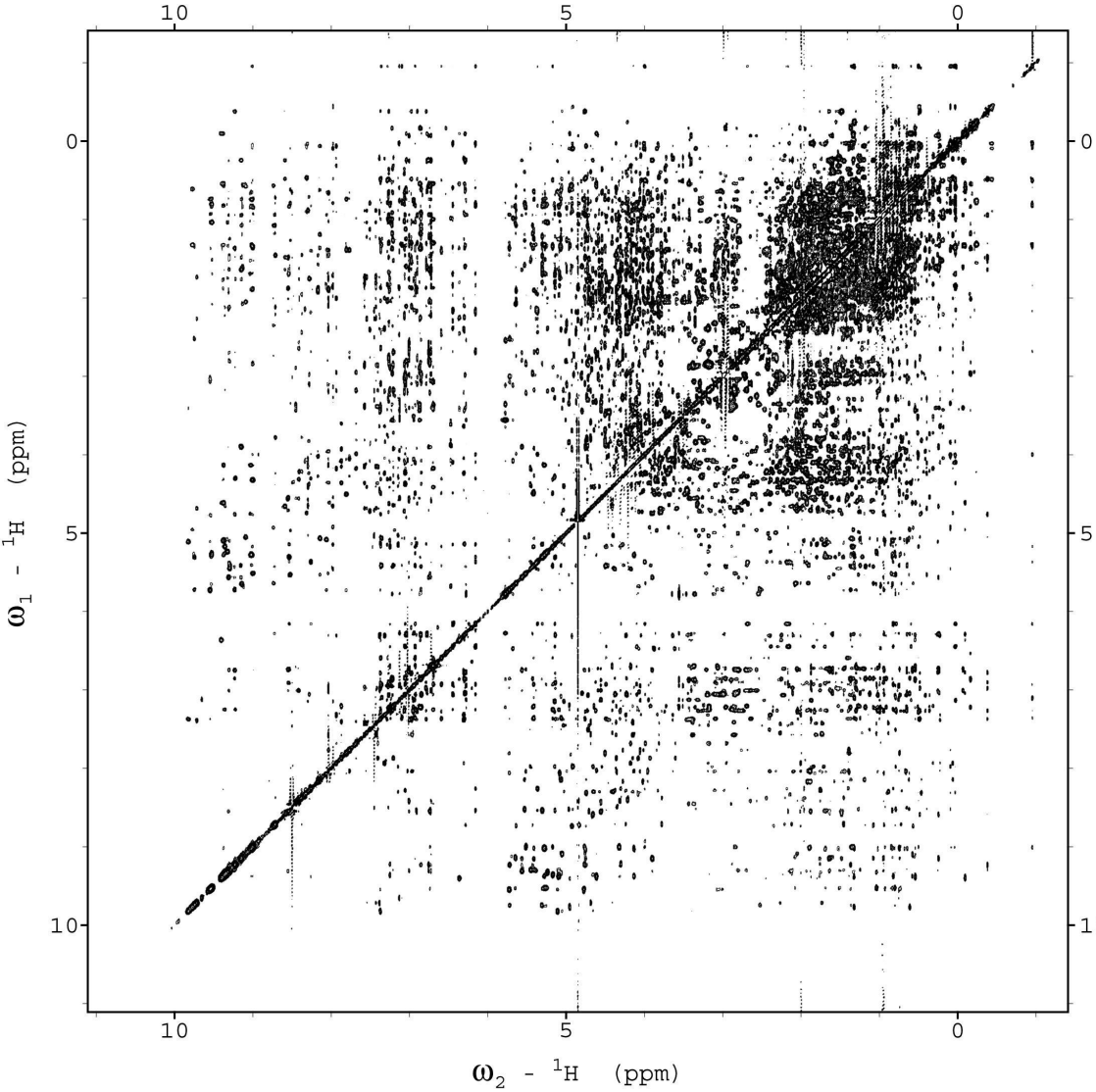
I_0 – равновесная интенсивность

I – интенсивность в присутствии ЯЭО

Теоретические максимальные усиления гетероядерного ЯЭО

X	^{6}Li	^{13}C	^{15}N	^{19}F	^{29}Si	^{31}P	^{103}Rh	^{109}Ag	^{183}W	^{195}Pt
$\eta_X\{^1H\}$ %	339	199	-494	53	-252	124	-1589	-1075	1202	233

NOESY – Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

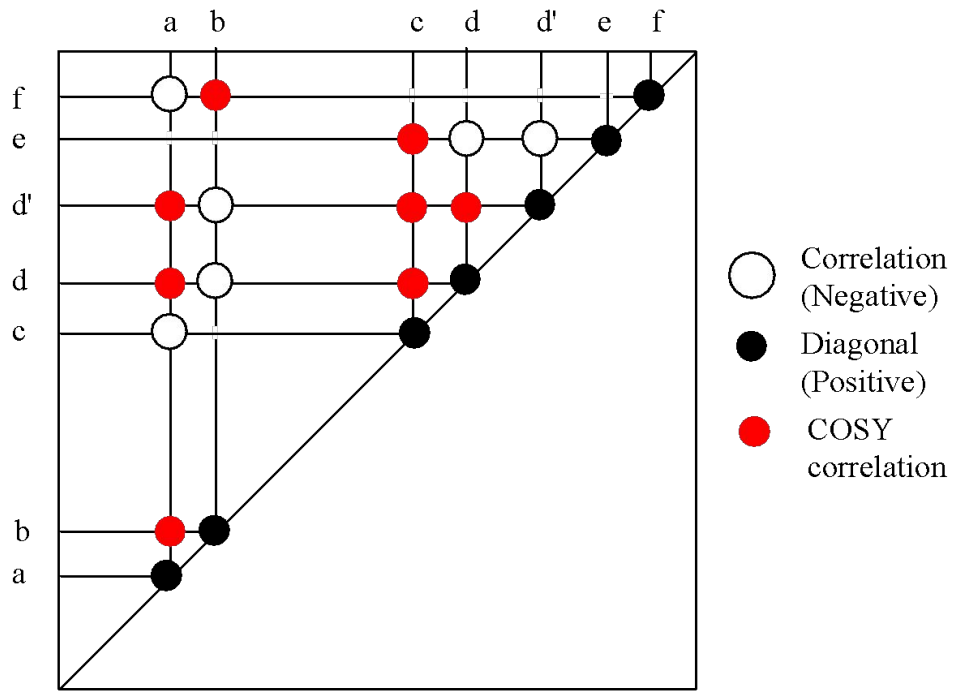


Спектр NOESY можно разделить на **три** «подспектра»:

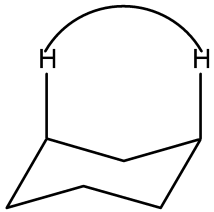
- сигналы, принадлежащие спектру COSY (поэтому результаты лучше анализировать, сравнивая два этих эксперимента);
- сигналы, демонстрирующие наличие химического обмена между различными группами атомов (например, если в молекуле есть группы –NH и –COOH);
- и, наконец, сигналы, соответствующие именно взаимодействию через пространство.

1 mM h-DHFR (Дигидрофолат-редуктаза) в D_2O, 800 MHz

NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)



Корреляции через пространство до 5 Å

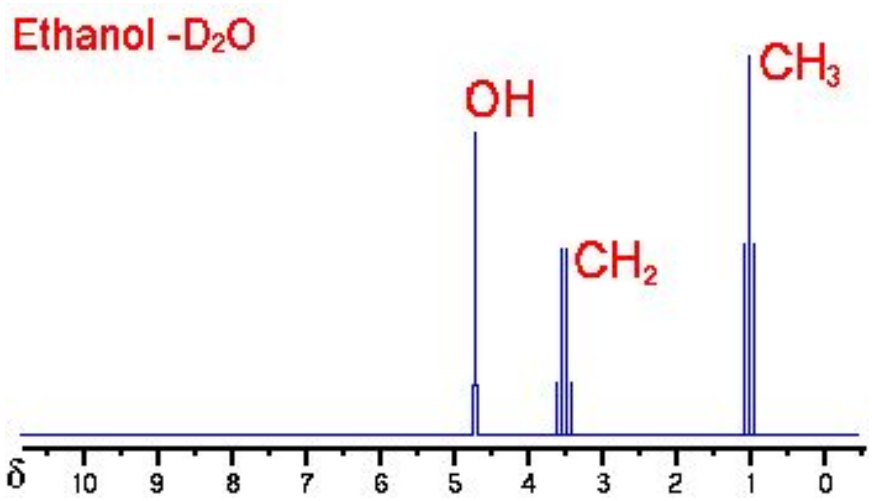


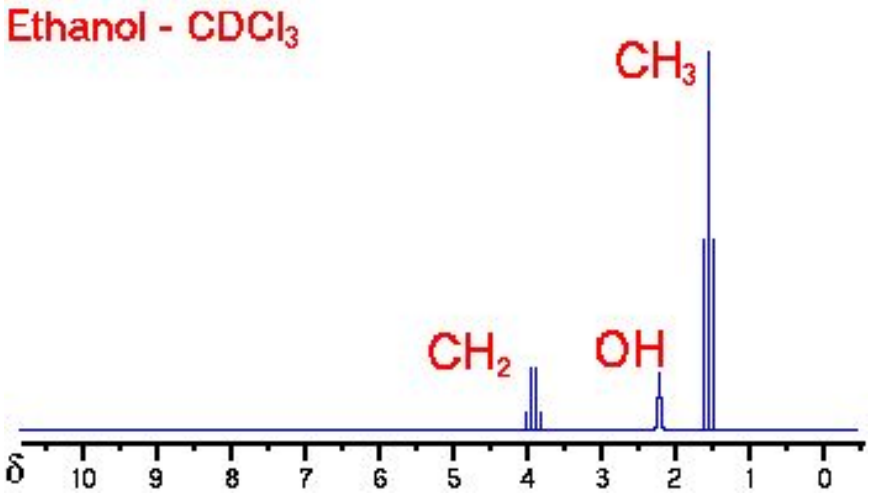
Стоимость ЯМР анализов

Вид анализа	Количество образца, мг	Цена дол.
H^{1}	5	5
F^{19}	5	4.5
C^{13}	25	9
N^{14}	10	6.5
N^{15}	100	30
P^{31}	25	6.5
COSY	5	11
NOESY	10	13
HMQC, HSQC	25	20
COLOC, HMBC	25	26

Примеры ЯМР-спектров

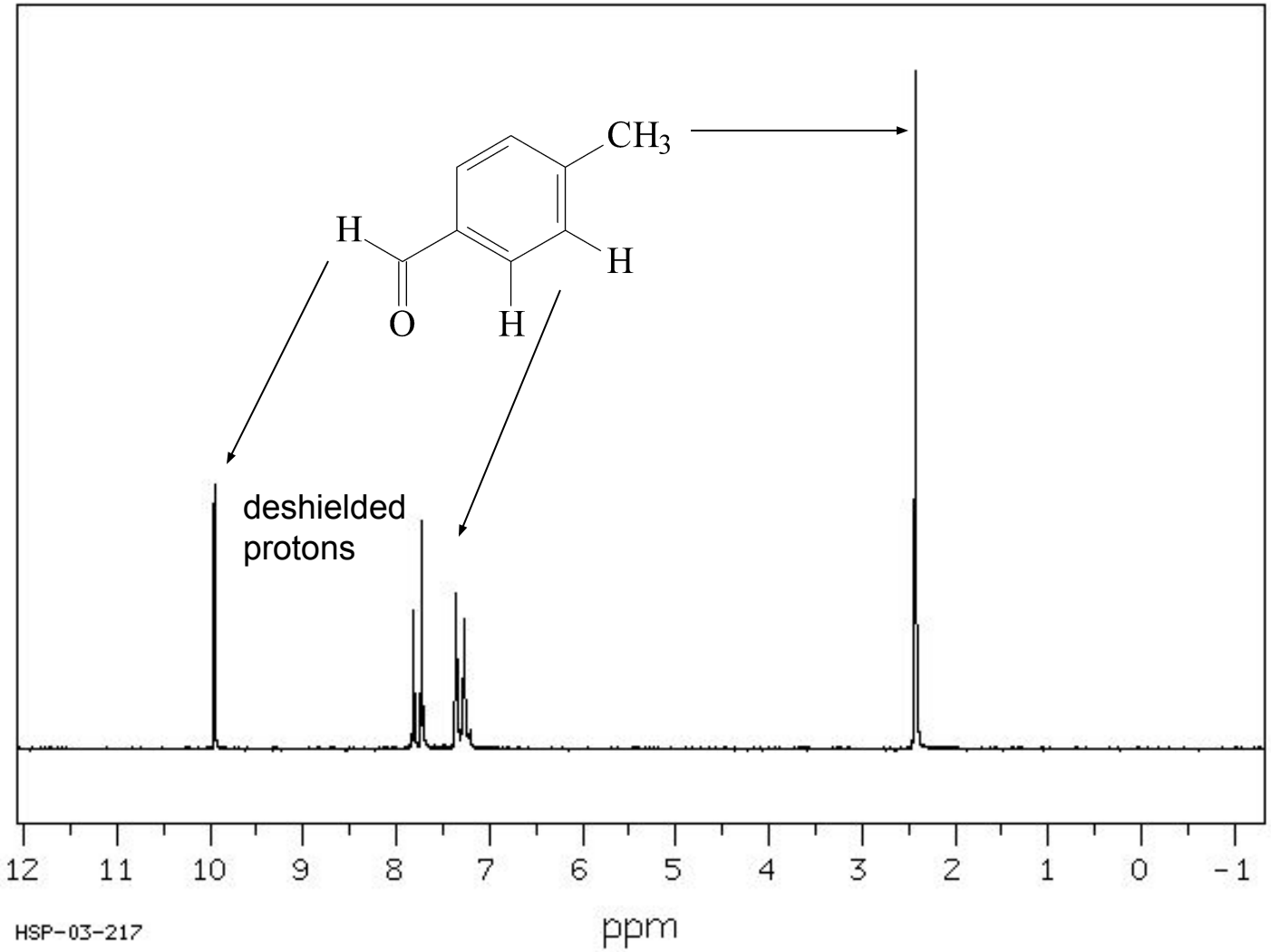
Этанол





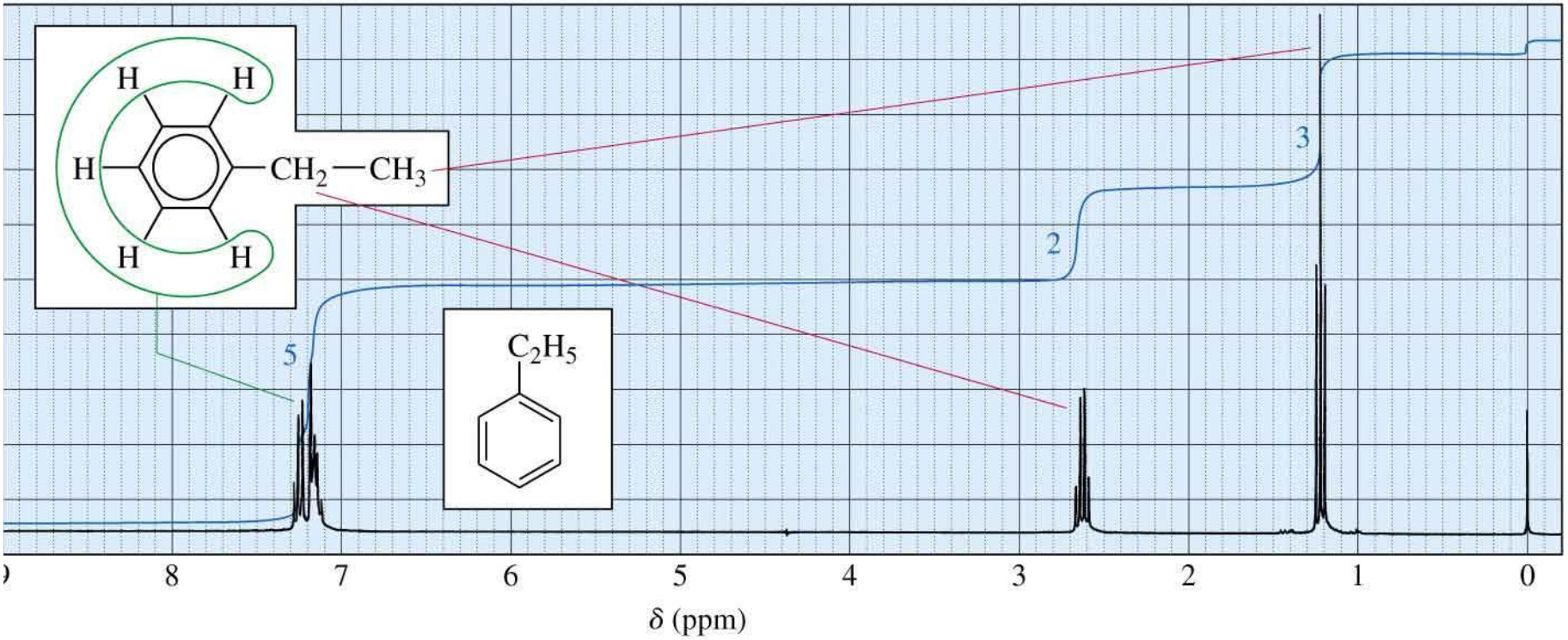
Примеры ЯМР-спектров

4-метилбензальдегид



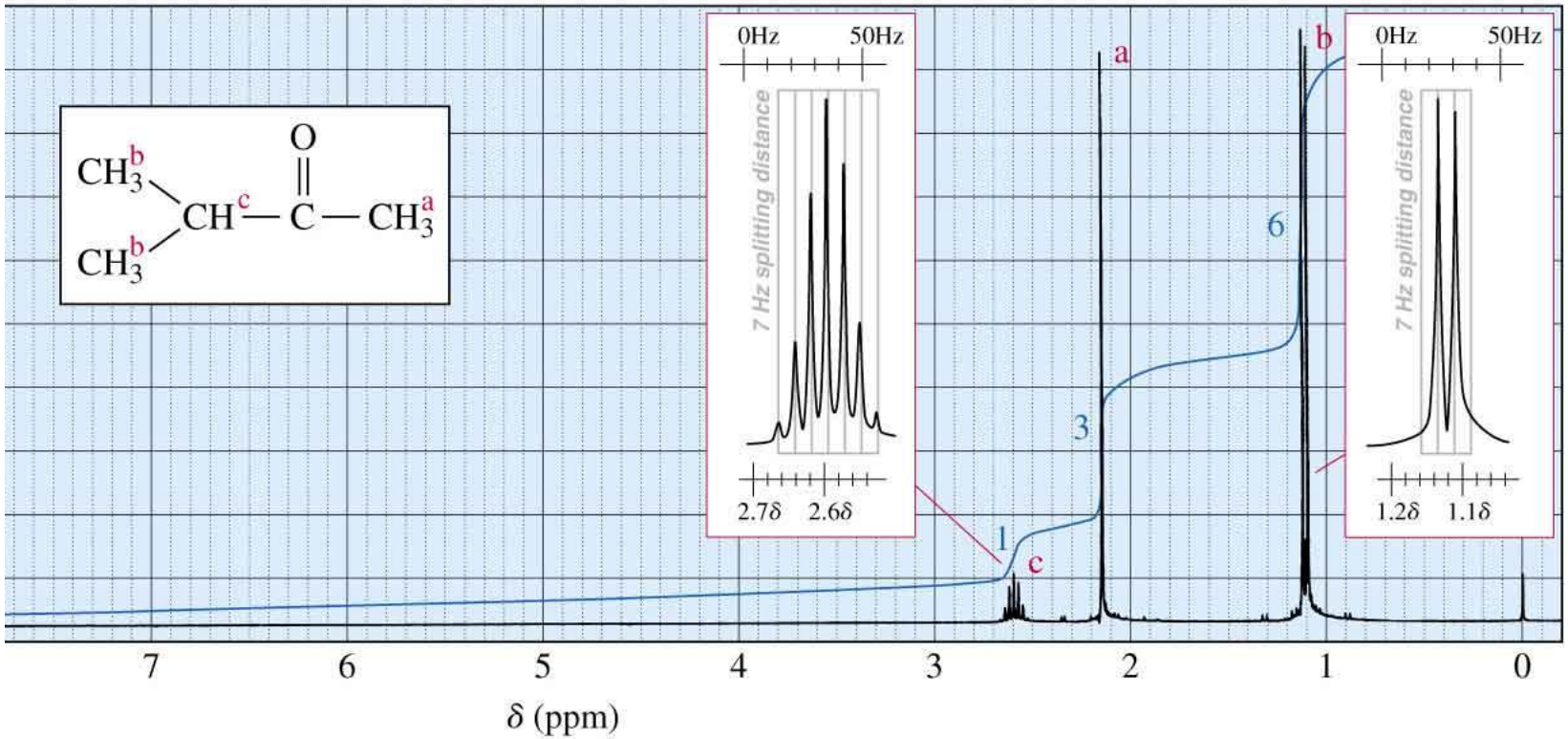
Примеры ЯМР-спектров

Этилбензол



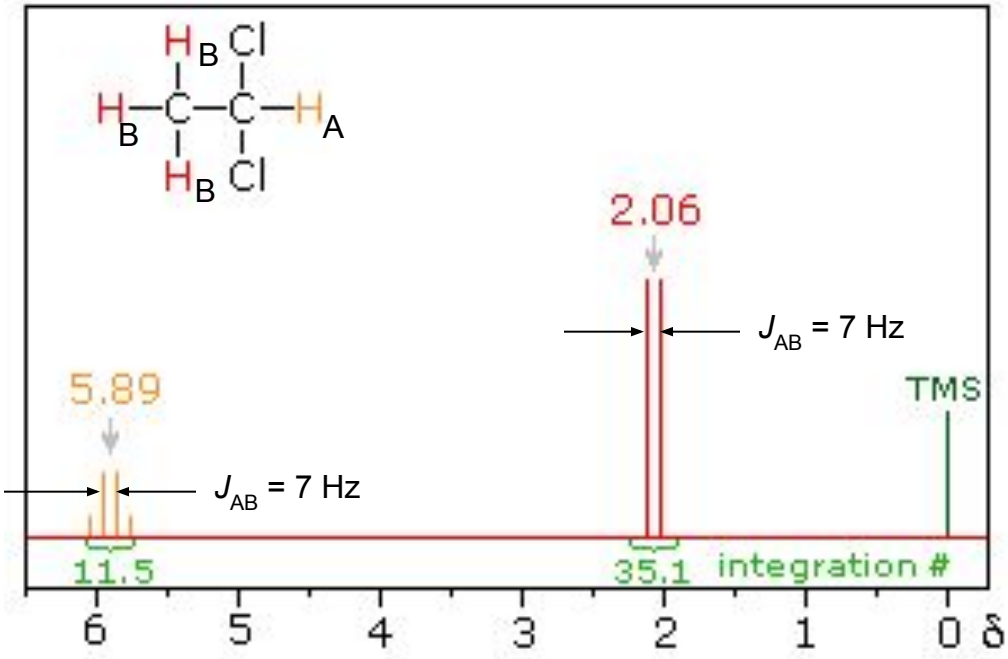
Примеры ЯМР-спектров

метилизопропилкетон



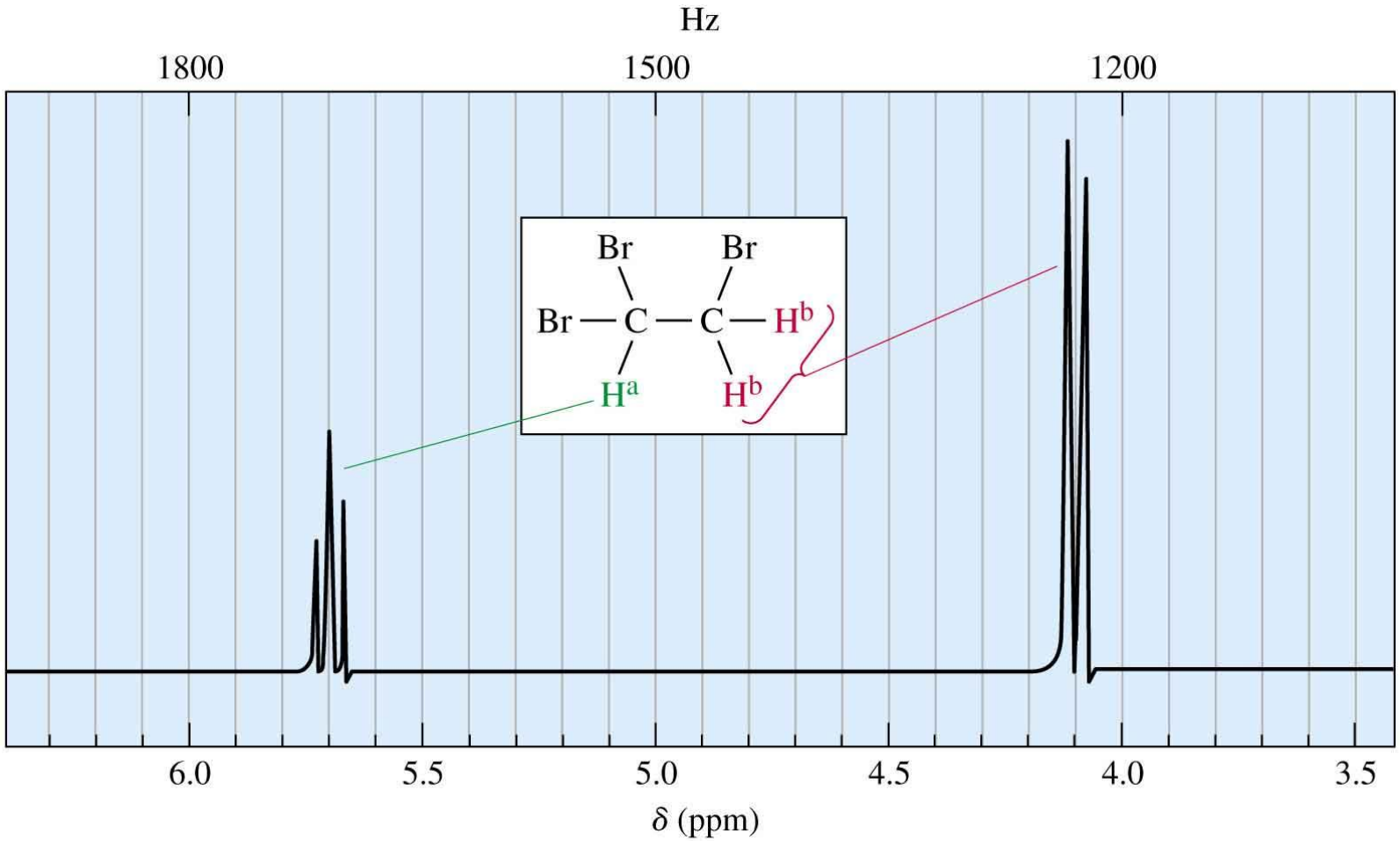
Примеры ЯМР-спектров

1,1-дихлорэтан

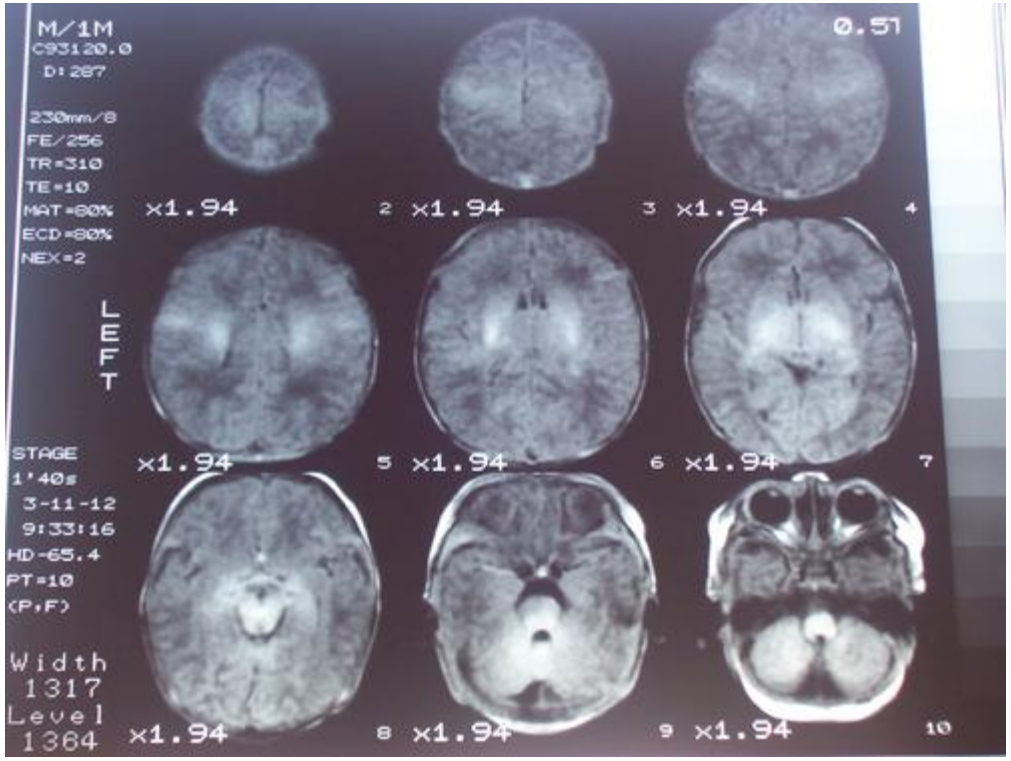


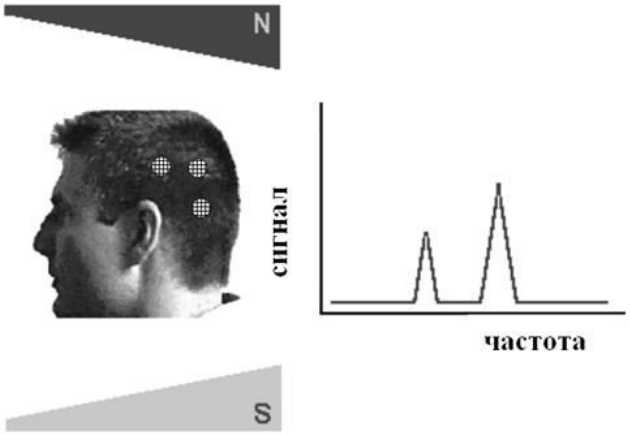
Примеры ЯМР-спектров

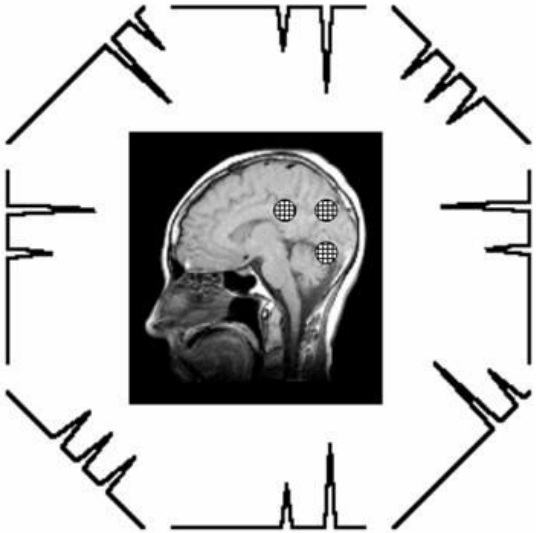
1,1,2-трибромэтан



МРТ – магнитно-резонансная томография







ЯМР – томография головного мозга

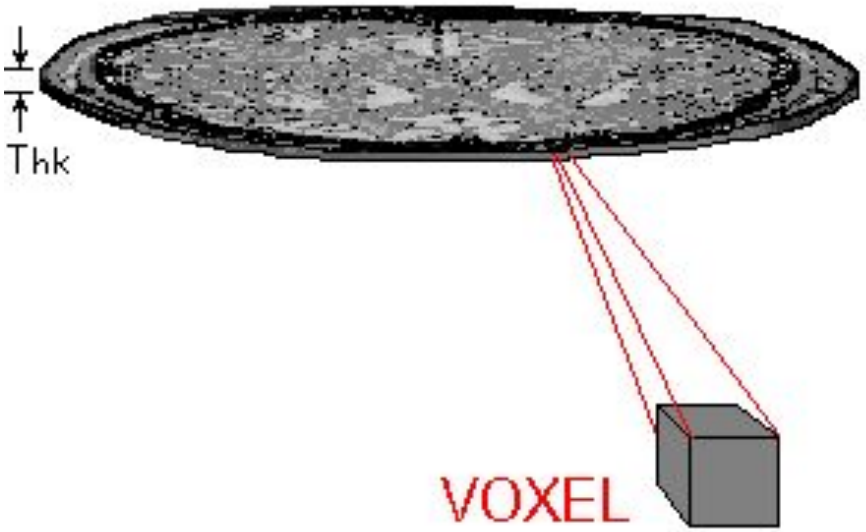
МРТ: информативный метод исследования и диагностики заболеваний центральной нервной системы, костно-мышечной и суставной систем человека.

МРТ

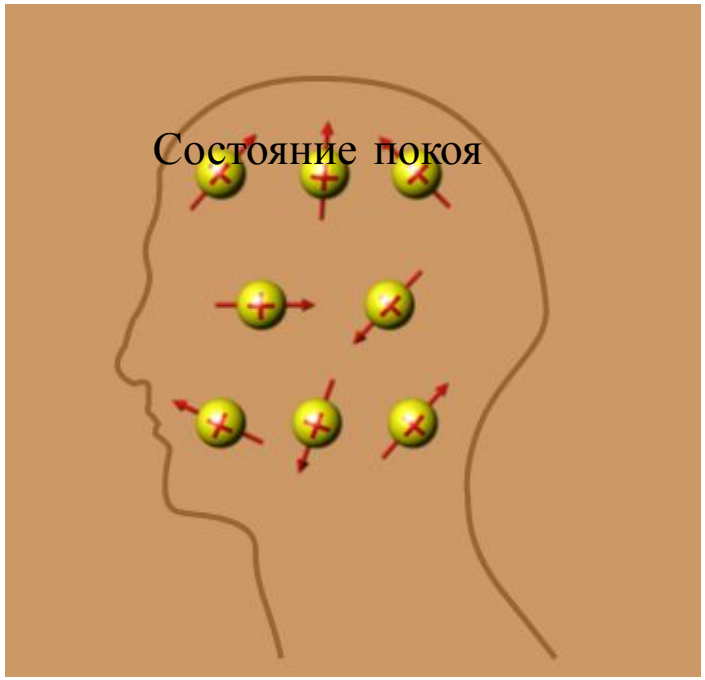
- Является одним из современных методов диагностики, позволяющим неинвазивно получать изображения внутренних структур тела человека.
- Важнейшим преимуществом МРТ по сравнению с другими методами лучевой диагностики является отсутствие ионизирующего излучения и, как следствие, эффектов канцеро- и мутагенеза, с риском возникновения которых сопряжено воздействие рентгеновского излучения.
- Устаревшее название метода «ядерно-магнитно резонансная томография» (ЯМРТ) в настоящее время не используется, чтобы избежать неправильных ассоциаций с ионизирующим излучением.
- Развитие МРТ является основой развития «молекулярной визуализации» и позволяет проводить гистохимические исследовании *in vivo*.

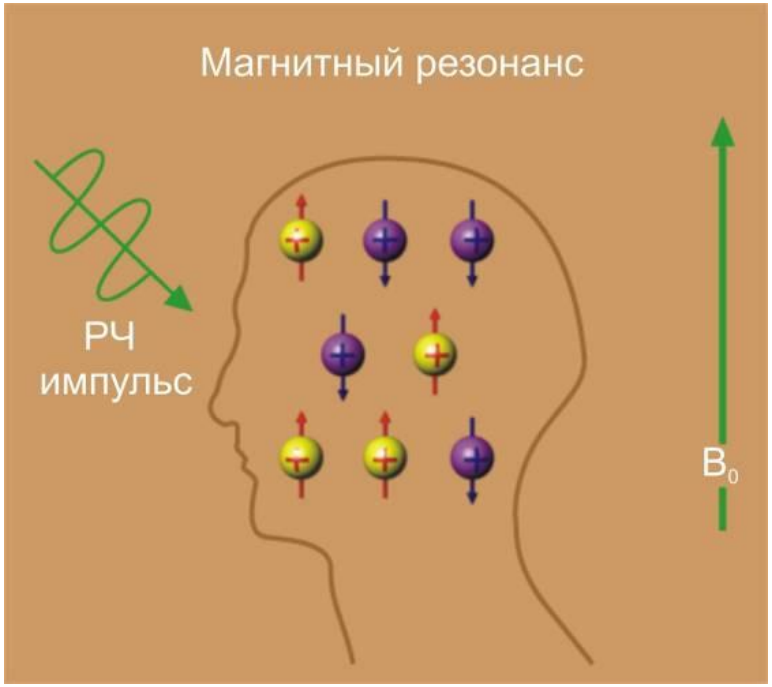
Томографическое изображение

- Строится изображение человеческого тела по тонким слоям.
- Каждый слой состоит из вокселей (аналог пикселей для трехмерного пространства)
- Объём одного вокселя 3 мм^3.
- Интенсивность каждого пикселя пропорциональна интенсивности ЯМР сигнала.



Феномен магнитного резонанса





- Основными компонентами человеческого тела являются вода и жир.
- Вода и жир имеют много атомов водорода (протонов).
- Совпадение частоты РЧ импульса и частоты вращения протонов обеспечивает передачу дополнительной энергии ядрам.
- При возврате на нижний энергетический уровень ядро отдаёт энергию - МР-сигнал, который можно зарегистрировать с помощью принимающей катушки.

Принцип МРТ

1. Помещение пациента в статическое магнитное поле

   - протоны ориентируются вдоль магнитного поля

2. Добавление переменного поля для выбора среза в теле пациента

3. Передача радиочастотного импульса

   - энергия импульса передается протонам

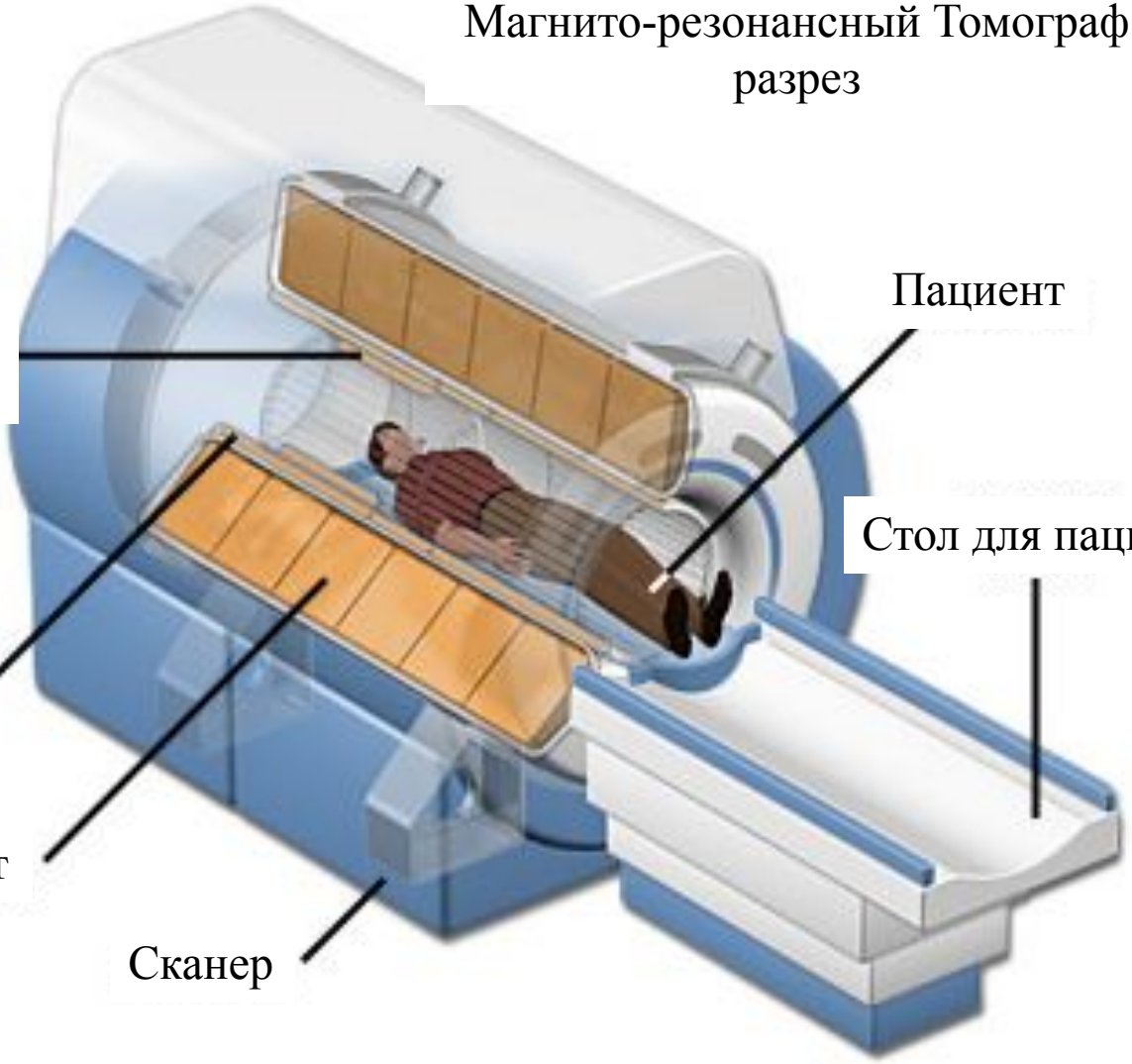
4. Протоны отдают полученную энергию

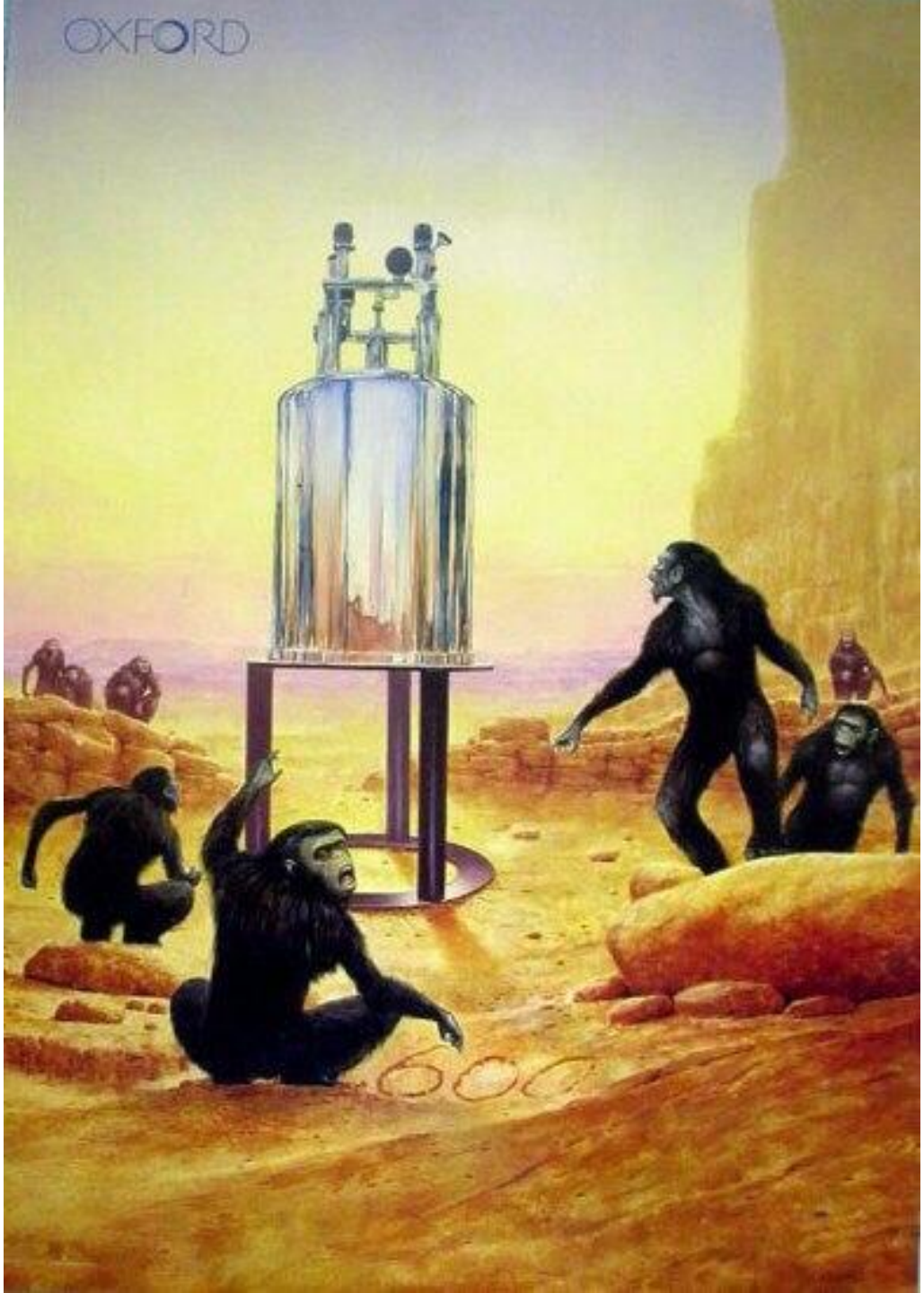
   - в приемных катушках индуцируется электрический ток

5. МР сигнал преобразуется компьютером и используется для построения изображений

“Мы начали заниматься темой магнито-резонансной томографии в 1972 году.”
Питер Мэнсфилд, Нобелевская Лекция, 2003

Магнито-резонансный Томограф
разрез




OXFORD
600