

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.

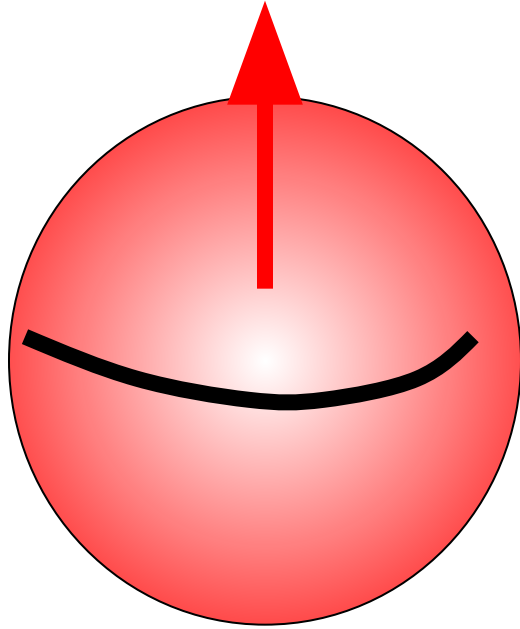
ЯМР среди других физических методов исследования:

- 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

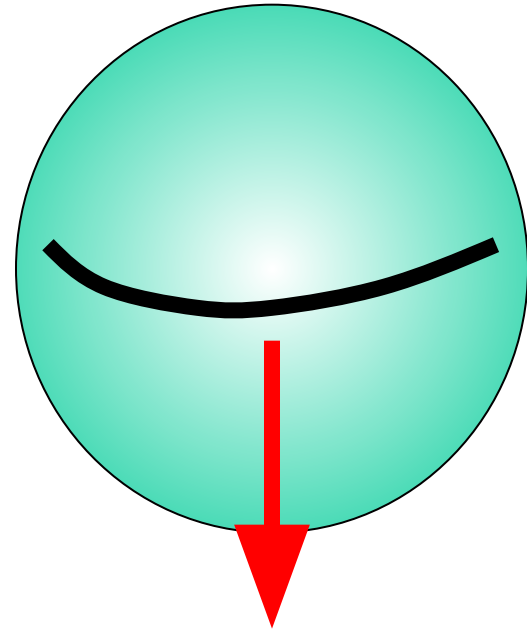
Важнейшие области применения спектроскопии ЯМР

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



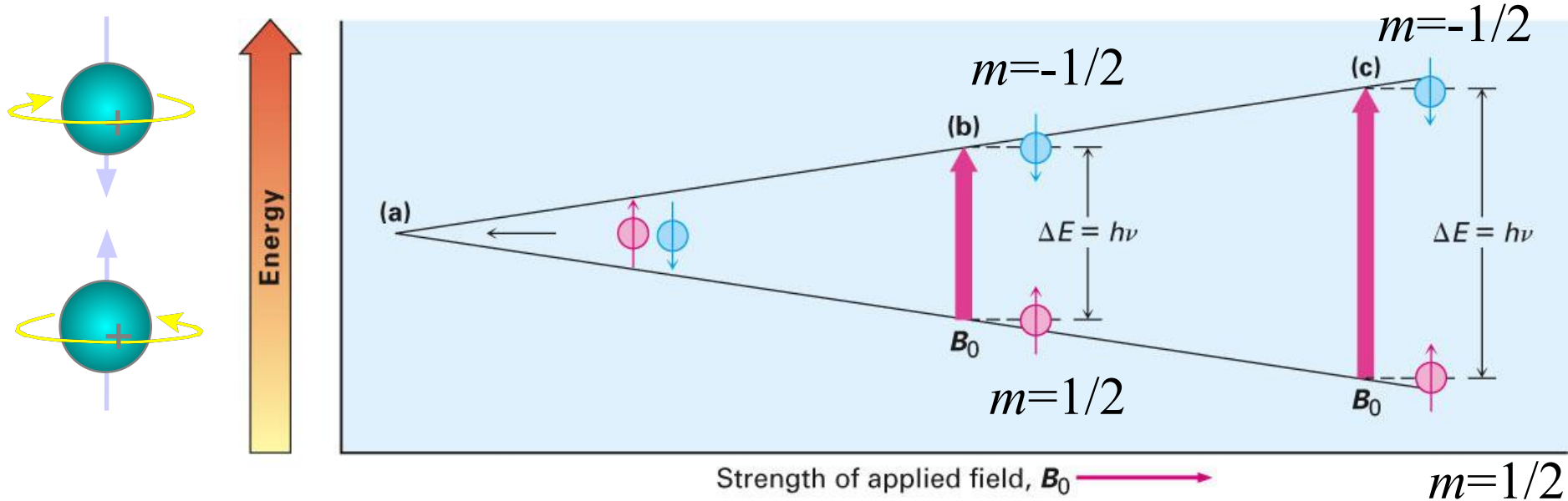
Spin down

- 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 $I = 1/2$
 ^1H , ^{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:

$$\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi$$

где: B_0 – 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 ($10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$)	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:

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

Для ядер ^1H при $T = 300\text{K}$ (23°C): $\frac{N_\beta}{N_\alpha} = 0.999999$
 $\gamma = 2.674 \times 10^8 \text{ c}^{-1}\text{Tл}^{-1}$, $B_0 = 1.4 \text{ Тл}$

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = 1.000001$$

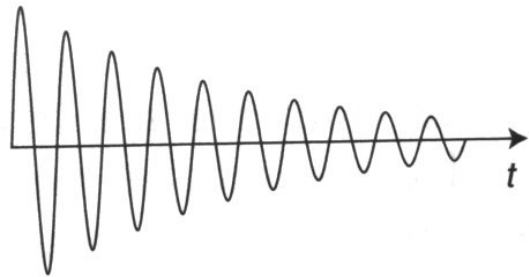
Из 2 000 010 ядер:

1 000 000 с $m_2 = -1/2$ (β) и

1 000 010 с $m_1 = 1/2$ (α),

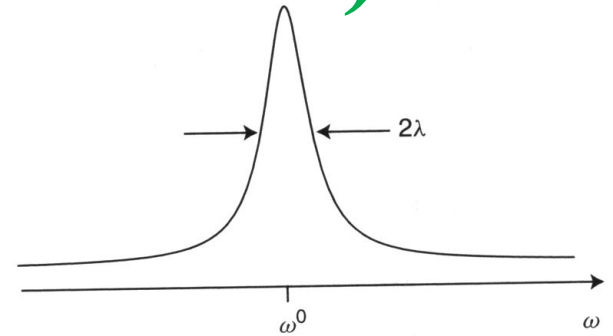
т.е. разница заселённости $10^{-3} \%$.

Наблюдение сигнала магнитного резонанса (Фурье-преобразование)



ЯМР-сигнал показывает зависимость интенсивности поглощения от времени

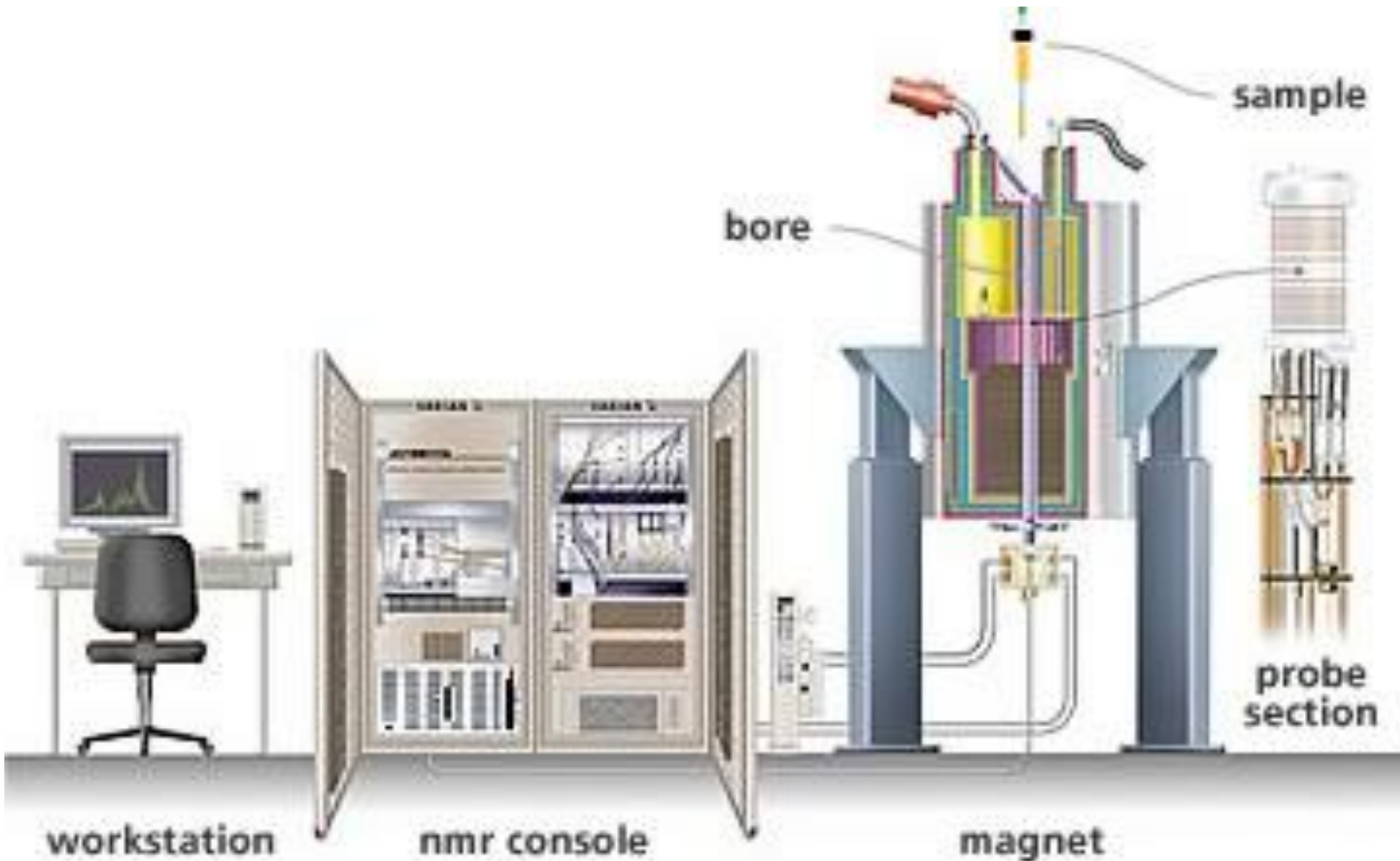
Фурье-преобразование



После преобразования показывает зависимость поглощения от резонансной частоты

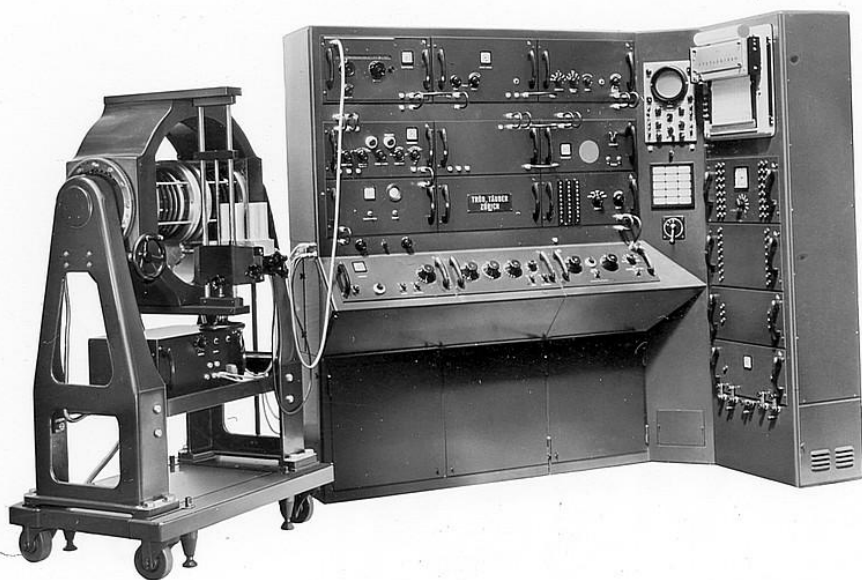
Резонансная частота (Ламорова частота) $\omega = -\gamma V$

Схема спектрометра ЯМР



С чего всё началось?

Сканирующая ЯМР-спектроскопия



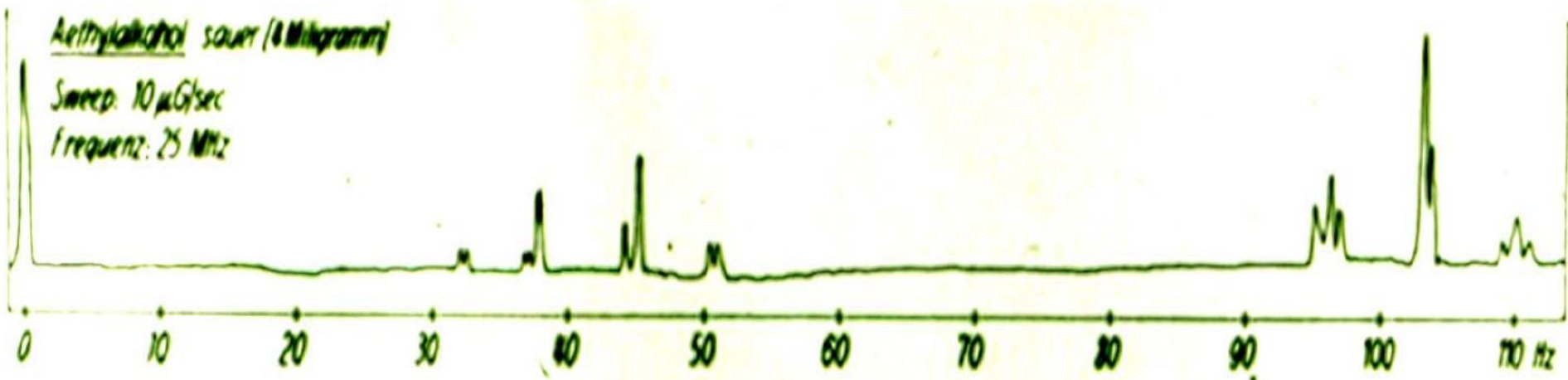
Одни из первых спектрометров ЯМР
фирмы Bruker



Современный спектрометр ЯМР на
электромагните

ЯМР в 1960-х

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

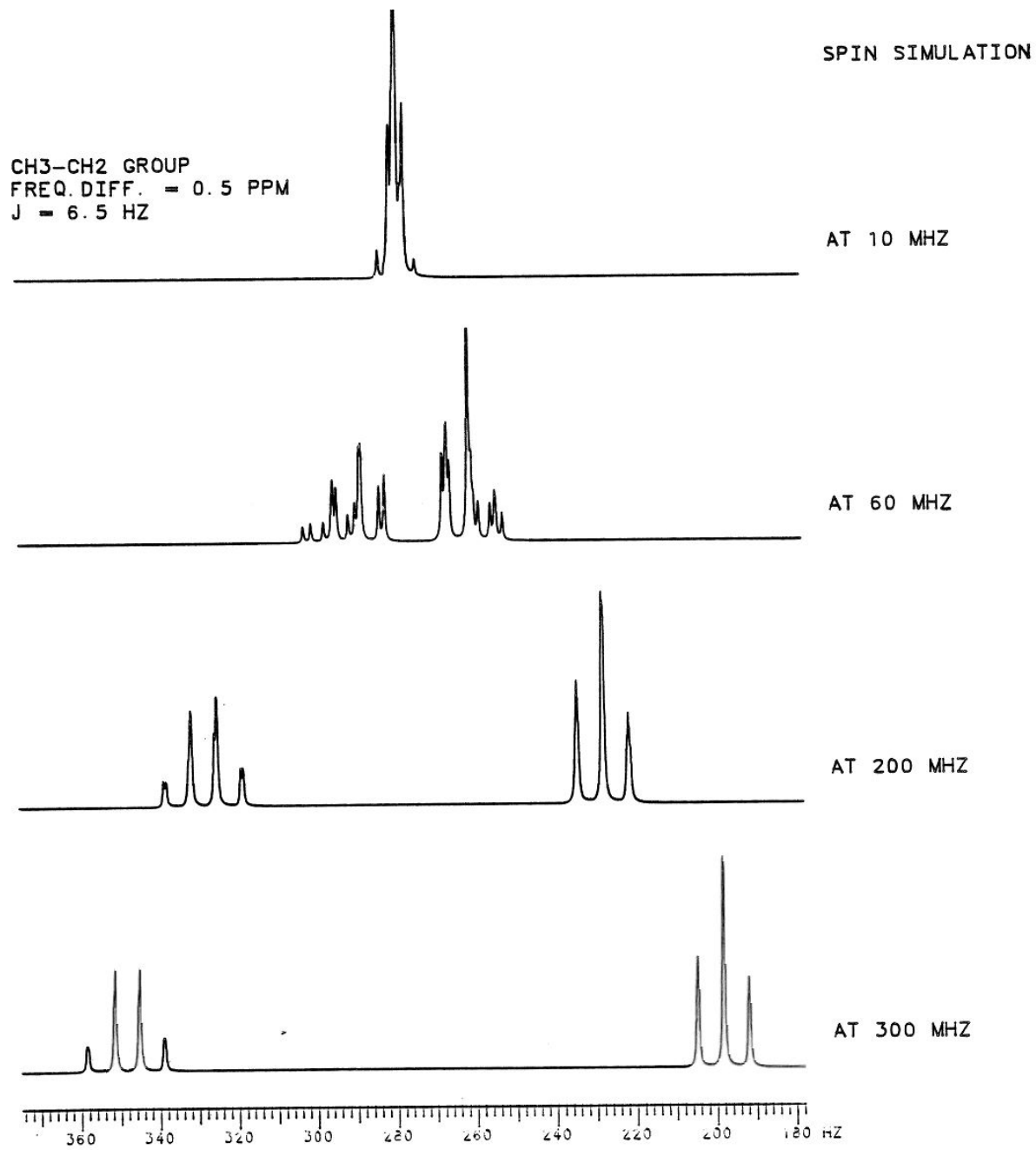


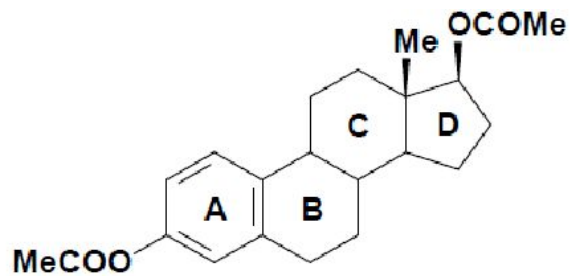
**СНИМАЮТ ДЕВОЧЕК НА
ПАНЕЛИ,**



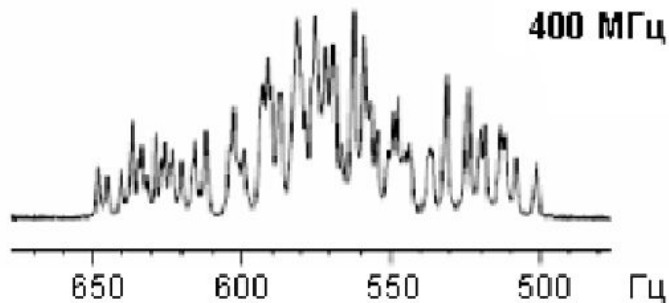
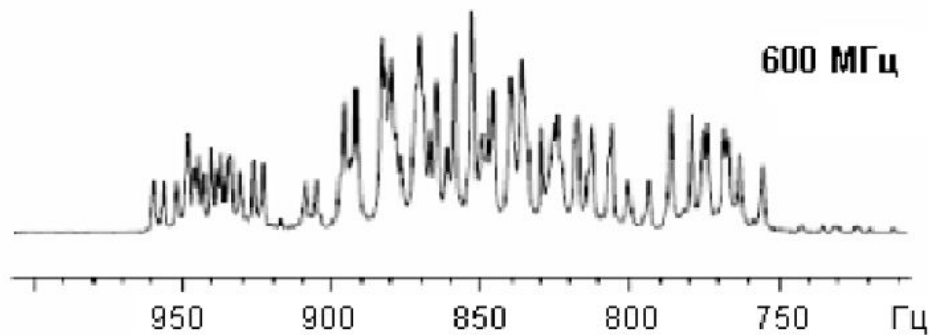
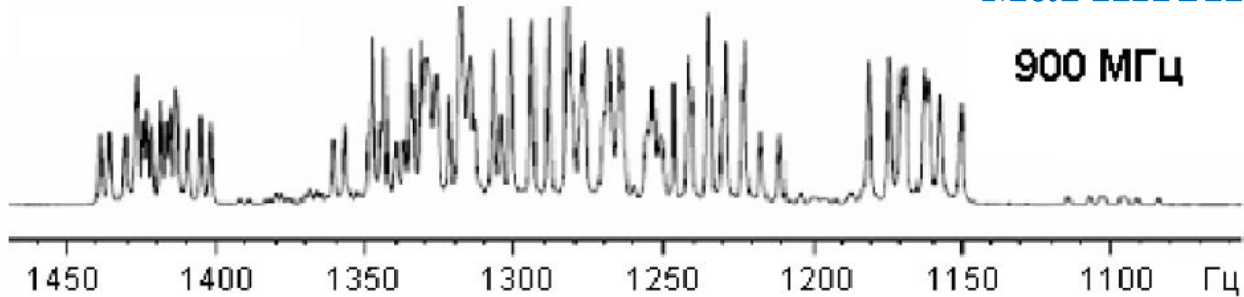
А СПЕКТРЫ ЗАПИСЫВАЮТ!

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



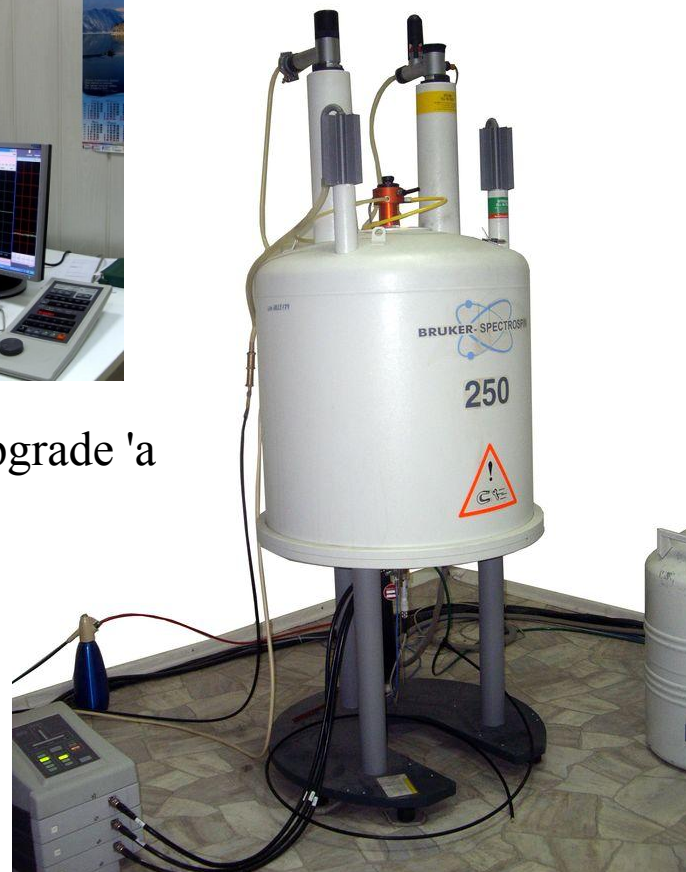
Самые мощные ЯМР спектрометры = 1.2 ГГц

- 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 'а



Современные приборы. Средний класс.

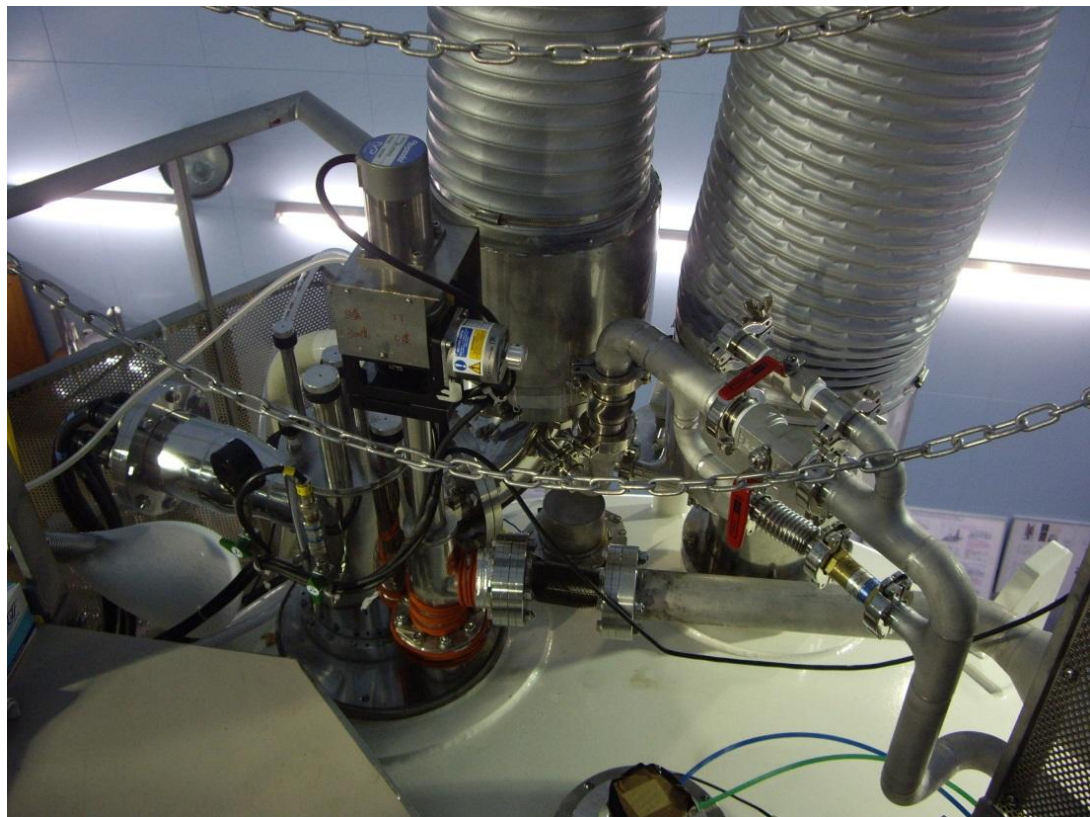


Фурье–ЯМР-спектрометр Bruker Avance III 500



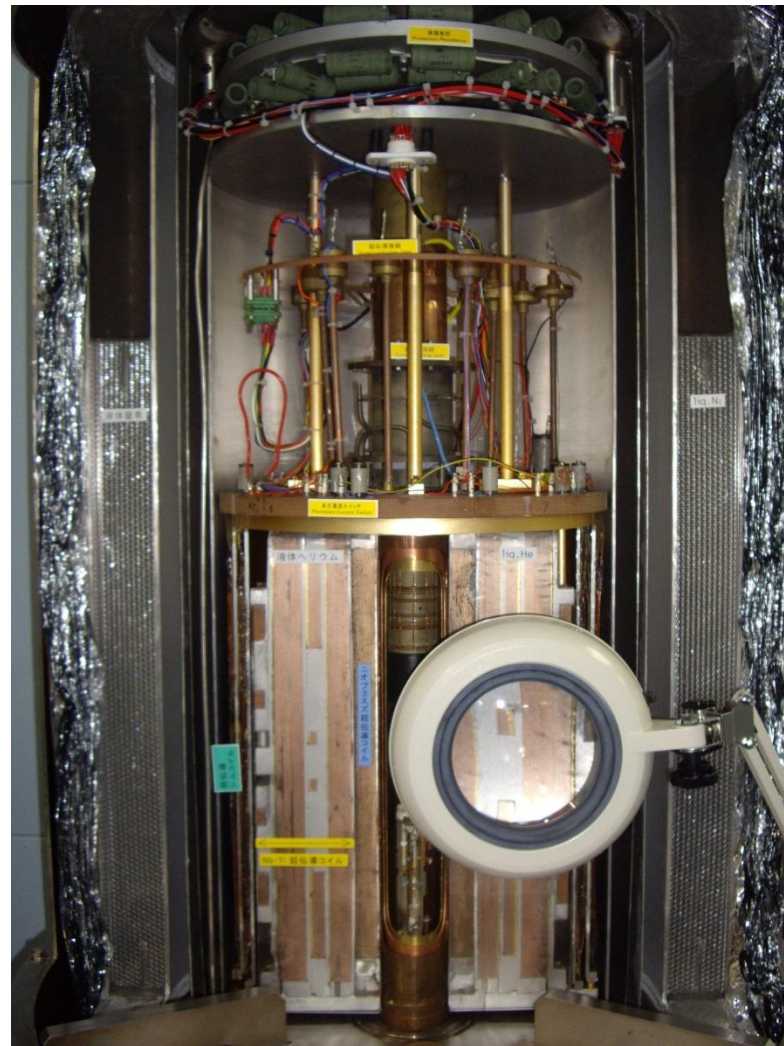
Устройство ЯМР-спектрометра

Магнит

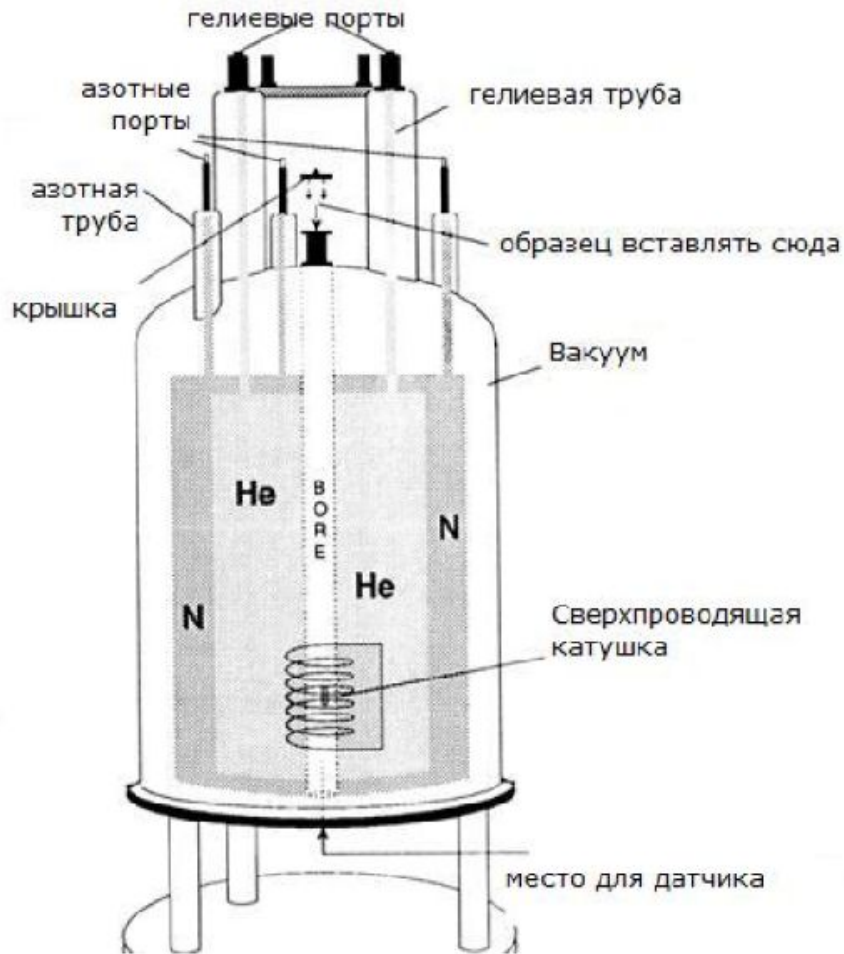


Устройство спектрометра

Магнит



На что похож магнит ?



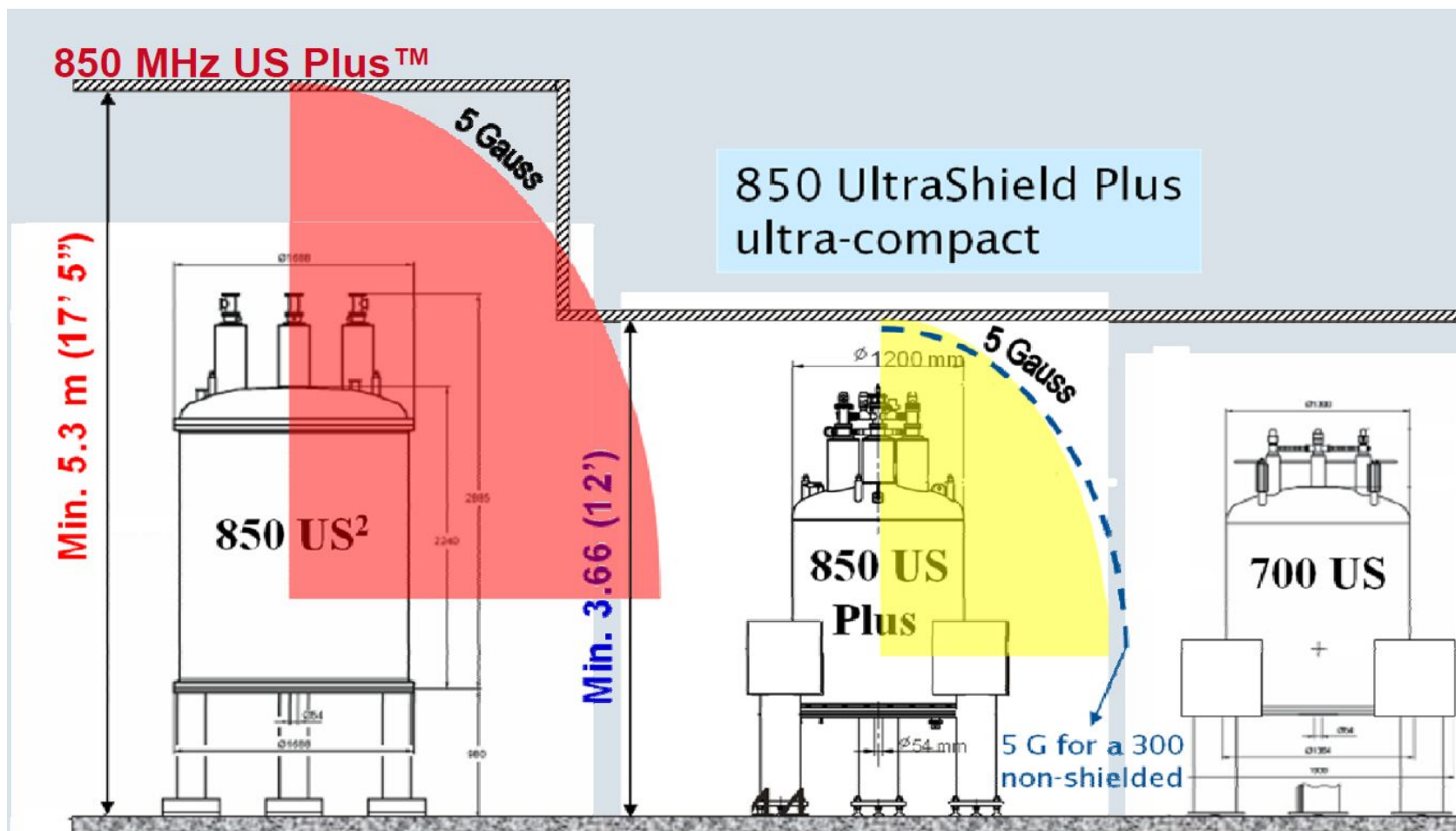
Очень давно в ЯМР использовались большие тяжелые электромагниты, а в виде спектра регистрировалось поглощение РЧ-мощности в зависимости от развертки поля.

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. $T_{\text{кип}} = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Литр жидкого азота, испаряясь и нагреваясь до $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, образует примерно 700 литров газа. Жидкий азот хранят и перевозят в сосудах Дьюара.

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



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

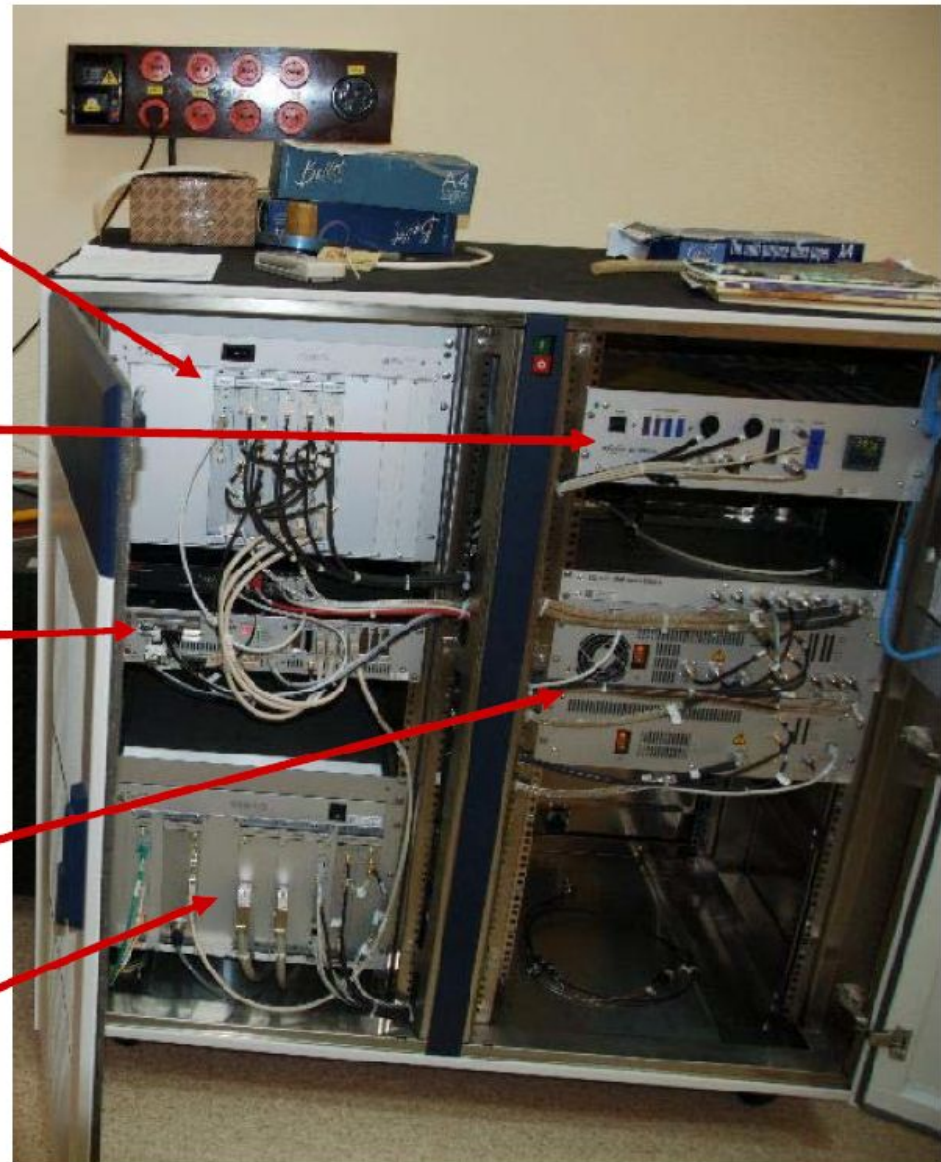
генераторы частоты
и приемник

температурная
приставка
-150 – +180°C

импульсный
программатор

усилители
частоты

стабилизация
по дейтерию



Аксессуары к спектрометру

Ампулы



Набор для пробоподготовки для жидкостного датчика:

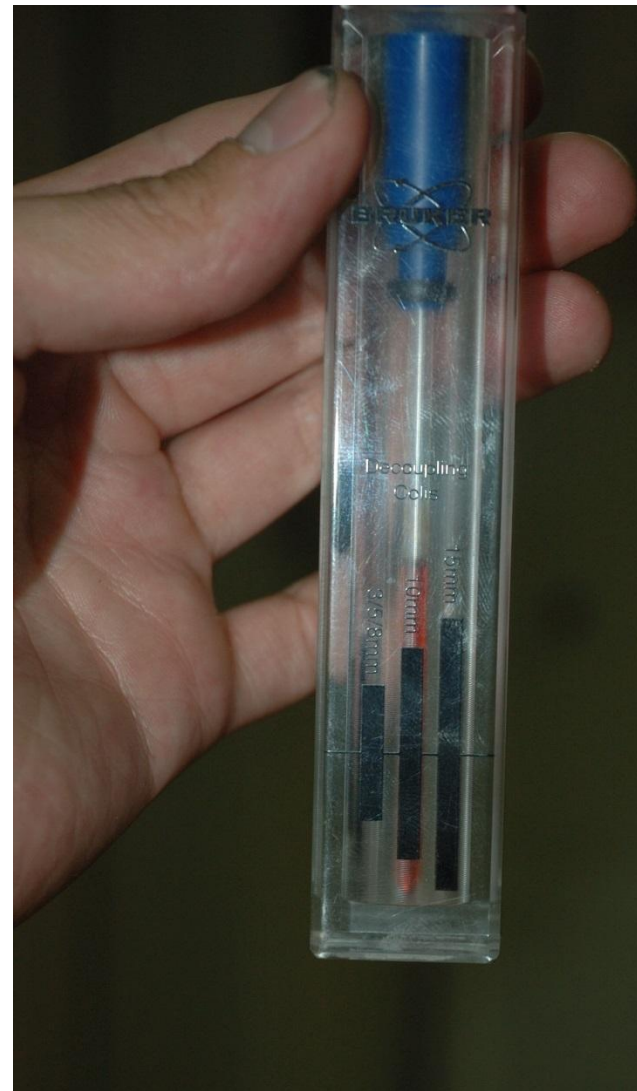
- дозаторы
- пипетка
- склянка с дейтерорастворителем
- ампулы 5 мм
- ампула 10 мм
- колпачки



Набор для пробоподготовки для твердотельного датчика:

- воронка
- ампула
- крышка
- экстрактор

Пробоподготовка



- Чистая ЯМР-ампула
- Объем раствора (15-17 мм)

- Однородный раствор
- Плотный 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 ^1H спектр**
от секунд до минут
- **Двумерные ^1H - ^1H (*гомо*ядерные) спектры**
от 30 минут до 12 часов
- **Двумерные ^1H - ^{13}C (*гетеро*ядерные) 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 ^1H спектров: до 0.1 мг
 - Для ^{13}C спектров: до 5-10 мг («видно глазом»)
 - Для ^{15}N спектров (только ^{15}N -НМВС): 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

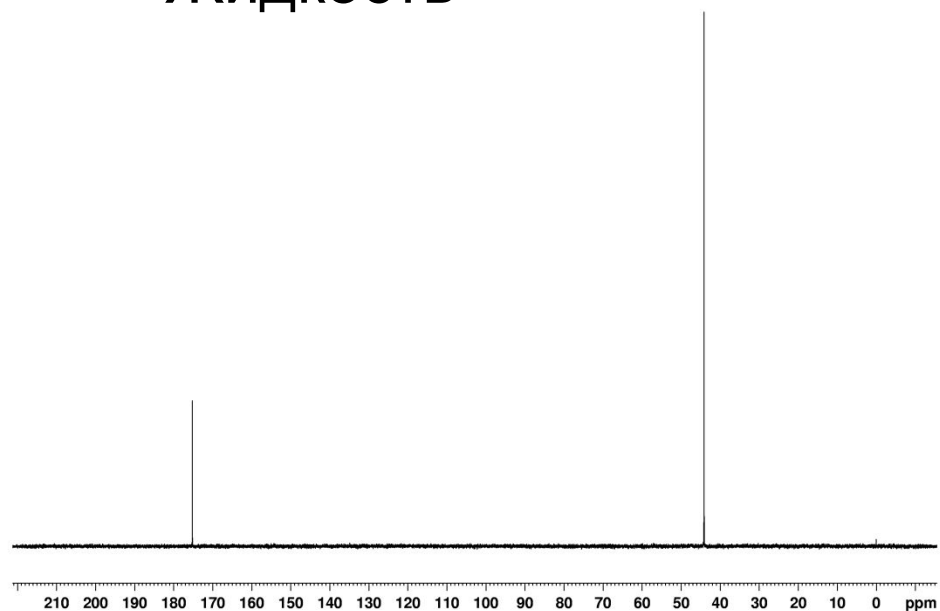
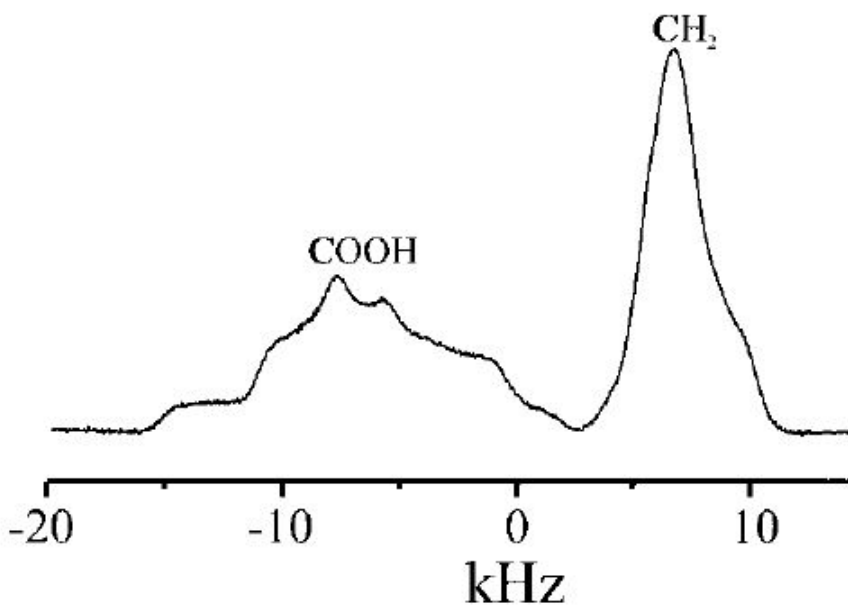
Растворитель	Т. кип. °С	Т. пл., °С	Цена* руб/г
Хлороформ-d	61,7	-114,5	11
Окись дейтерия (D ₂ O)	101,42	-1,8	18
Диметилсульфоксид-d ₆	189	11,8	40
Ацетон-d ₆	56,2	-95,4	48
Ацетонитрил-d ₃	81,6	-45,7	80
Бензол-d ₆	80,1	5,5	82
Метанол-d ₄	64,5	-126,6	157
Хлористый метилен- d ₂	40	-95,1	210
Диметилформаамид-d 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

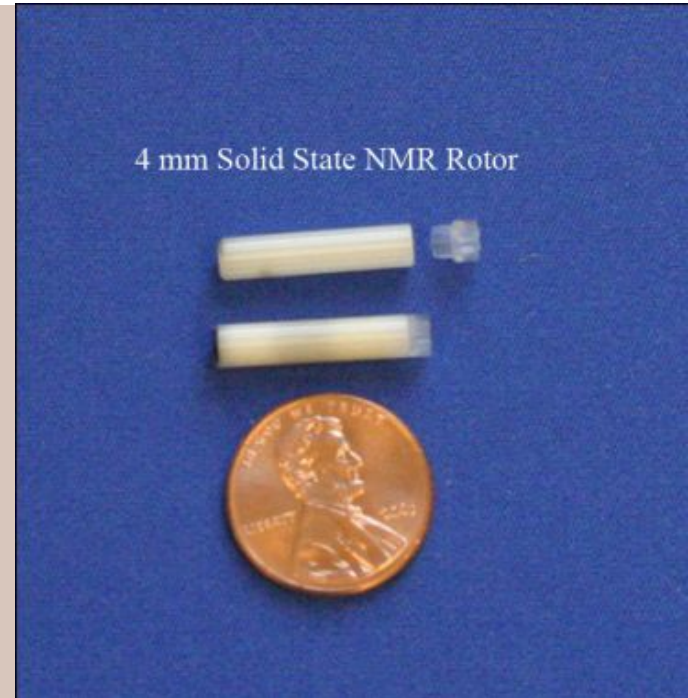
Жидкость

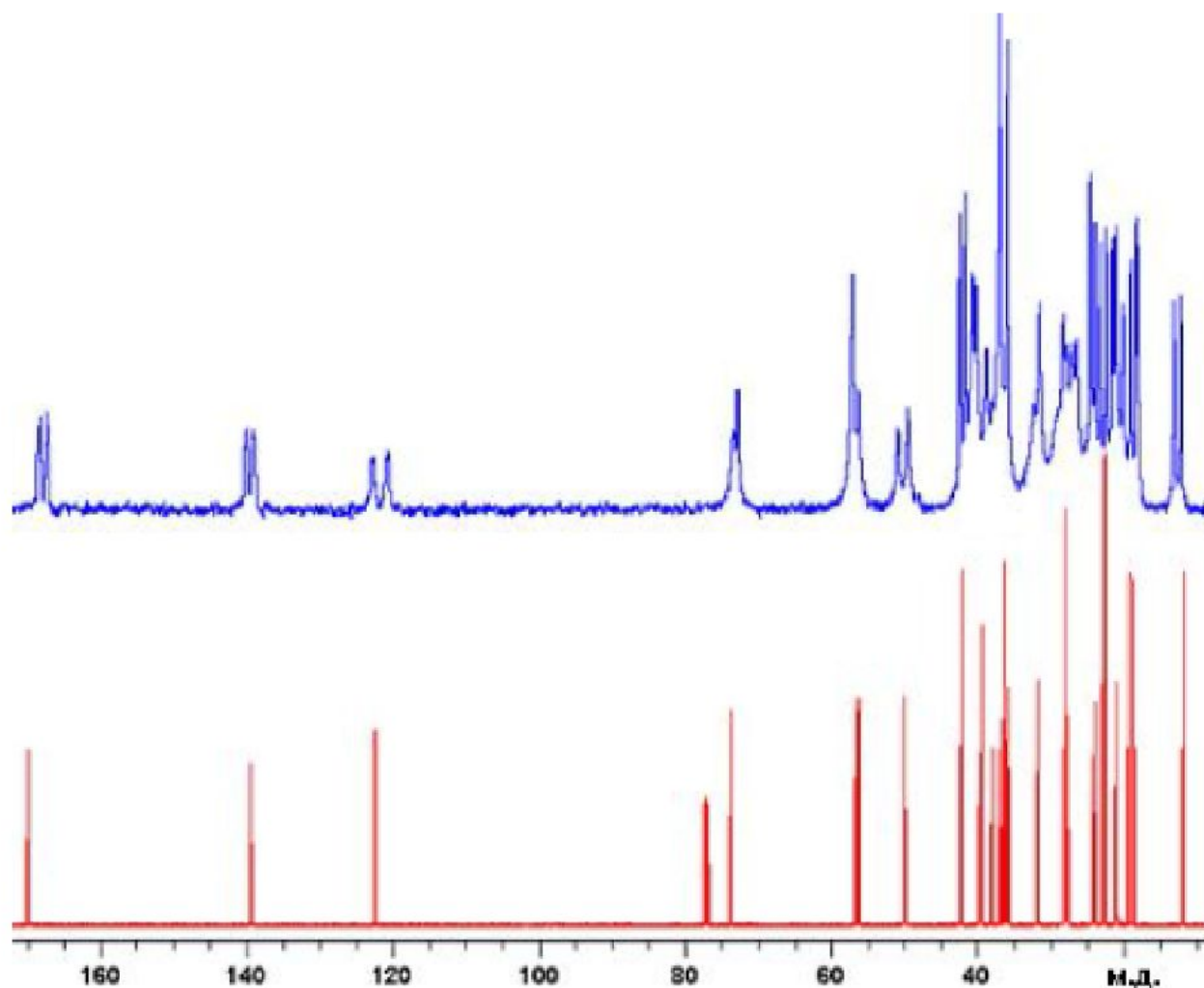
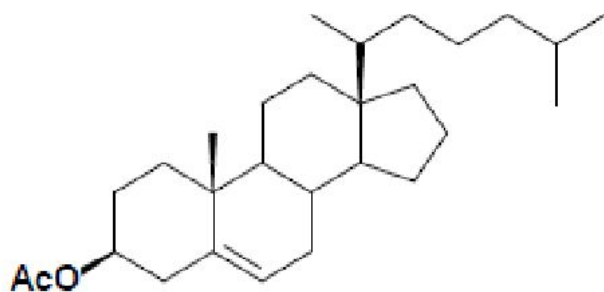


Регистрация ЯМР твёрдых тел (MAS NMR)

- Препятствие для ЯМР твердых тел - прямое диполь-дипольное взаимодействие ядерных спинов. Оно усредняется в жидкостях и газах до нуля броуновским движением.
- Решение: «магический угол» $\theta = 54,7^\circ$. 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 B_0 и вращается с помощью воздушной турбинки с очень высокой скоростью (до 35 тысяч оборотов в секунду и выше).

Вращение под магическим углом





Спектры $^{13}\text{C}-\{^1\text{H}\}$ -ЯМР

холестерилацетата:

Вверху – спектр твёрдого вещества,

записанный с вращением под

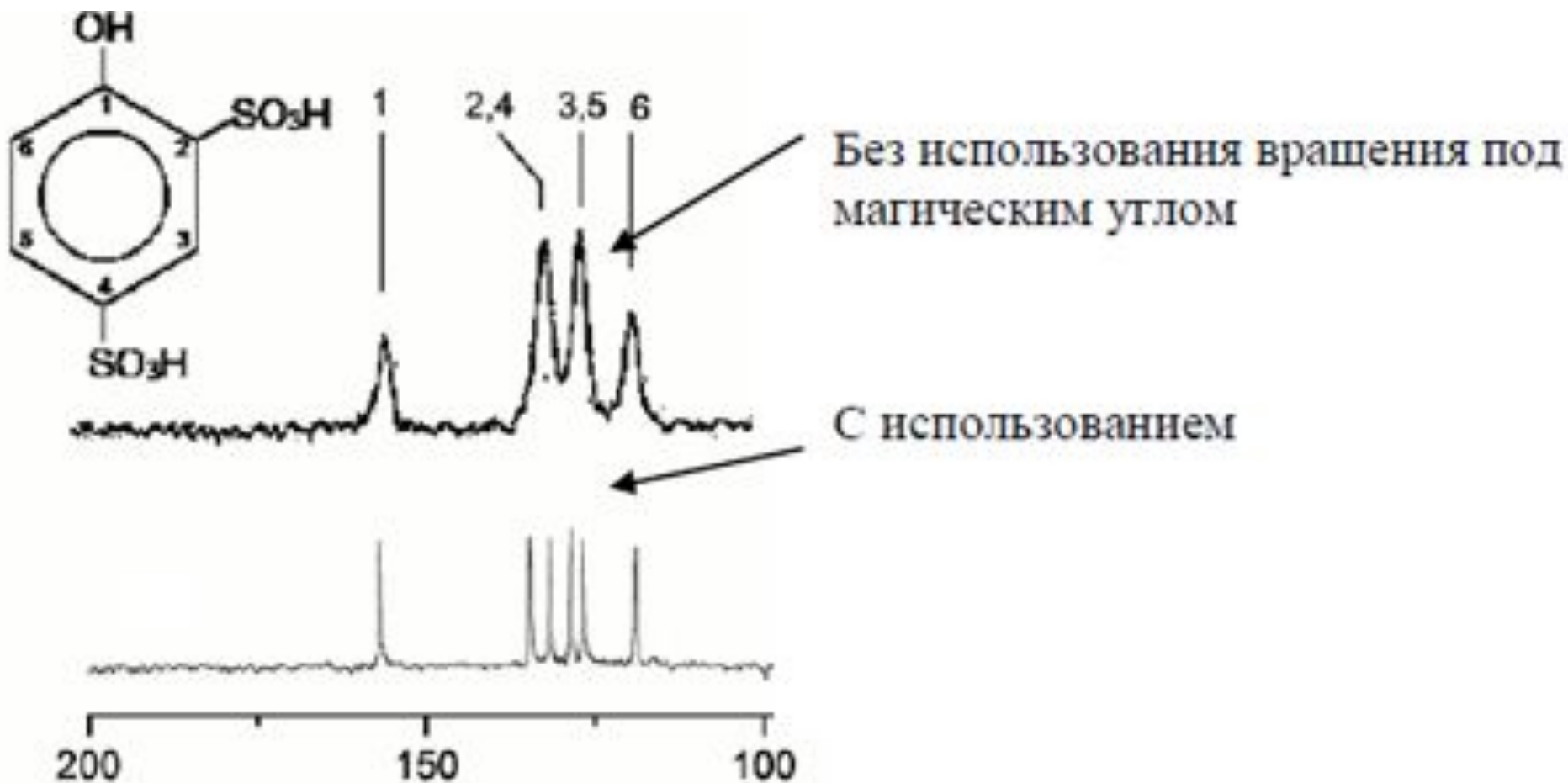
магическим углом с частотой 15 кГц.

Ширина линий –

15 Гц. Внизу – спектр того же

вещества в растворе CDCl_3 .

Вращение под магическим углом



Соотношение сигнал/шум

- Для улучшения соотношения обычно проводят несколько сканирований

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

S/N – соотношение сигнал/шум

N – количество ядер (концентрация)

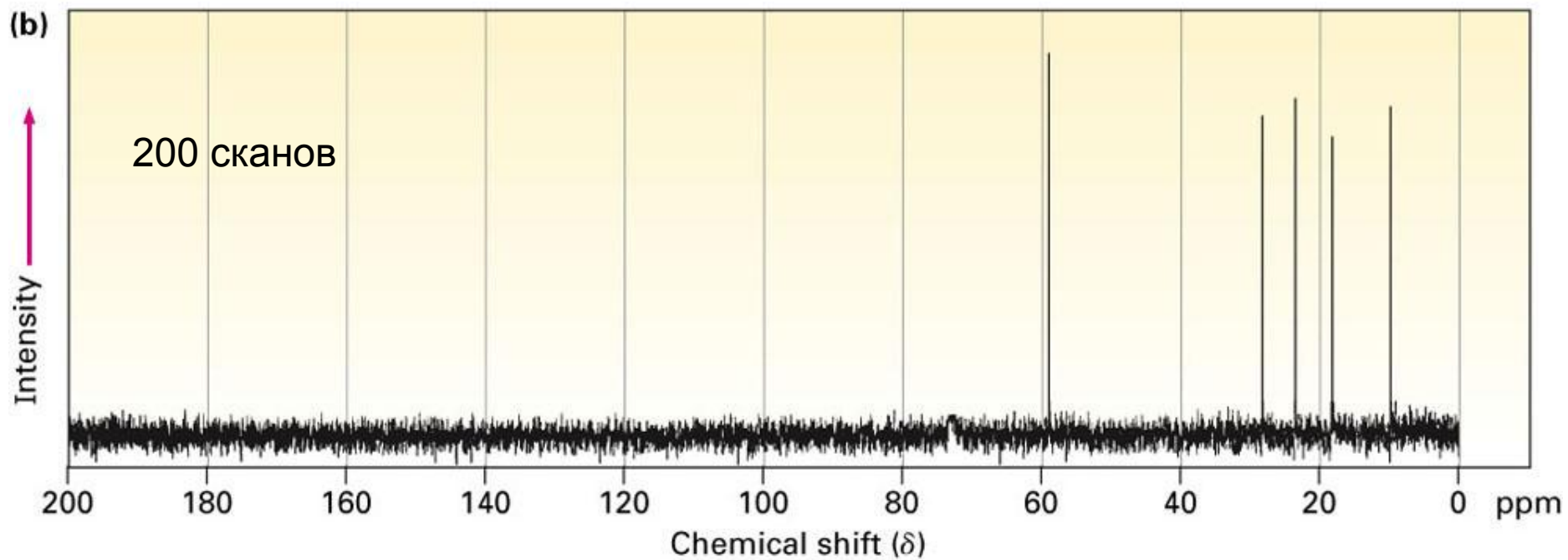
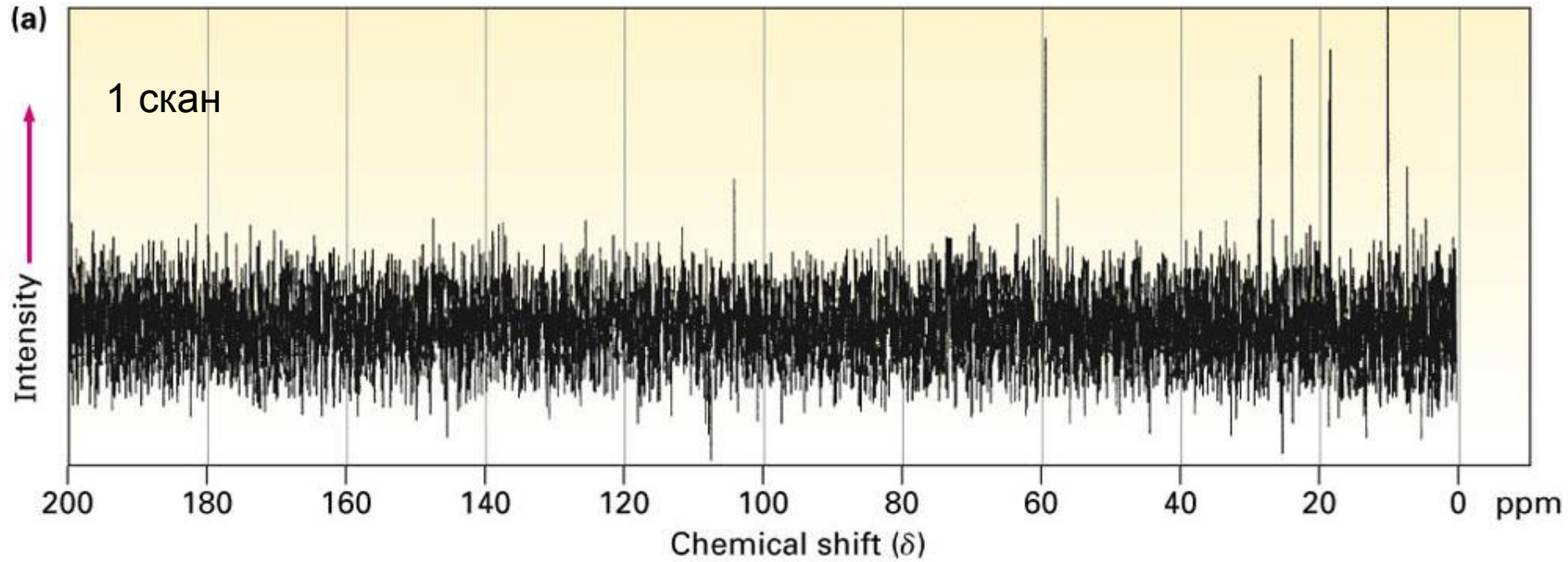
γ_{ex} – гиромагнитное отношение возбуждённых спинов

γ_{det} – гиромагнитное отношение детектируемых спинов

B_0 – напряжённость постоянного магнитного поля

NS – количество сканов

T_2 – время поперечной релаксации



Измеряемые параметры ЯМР

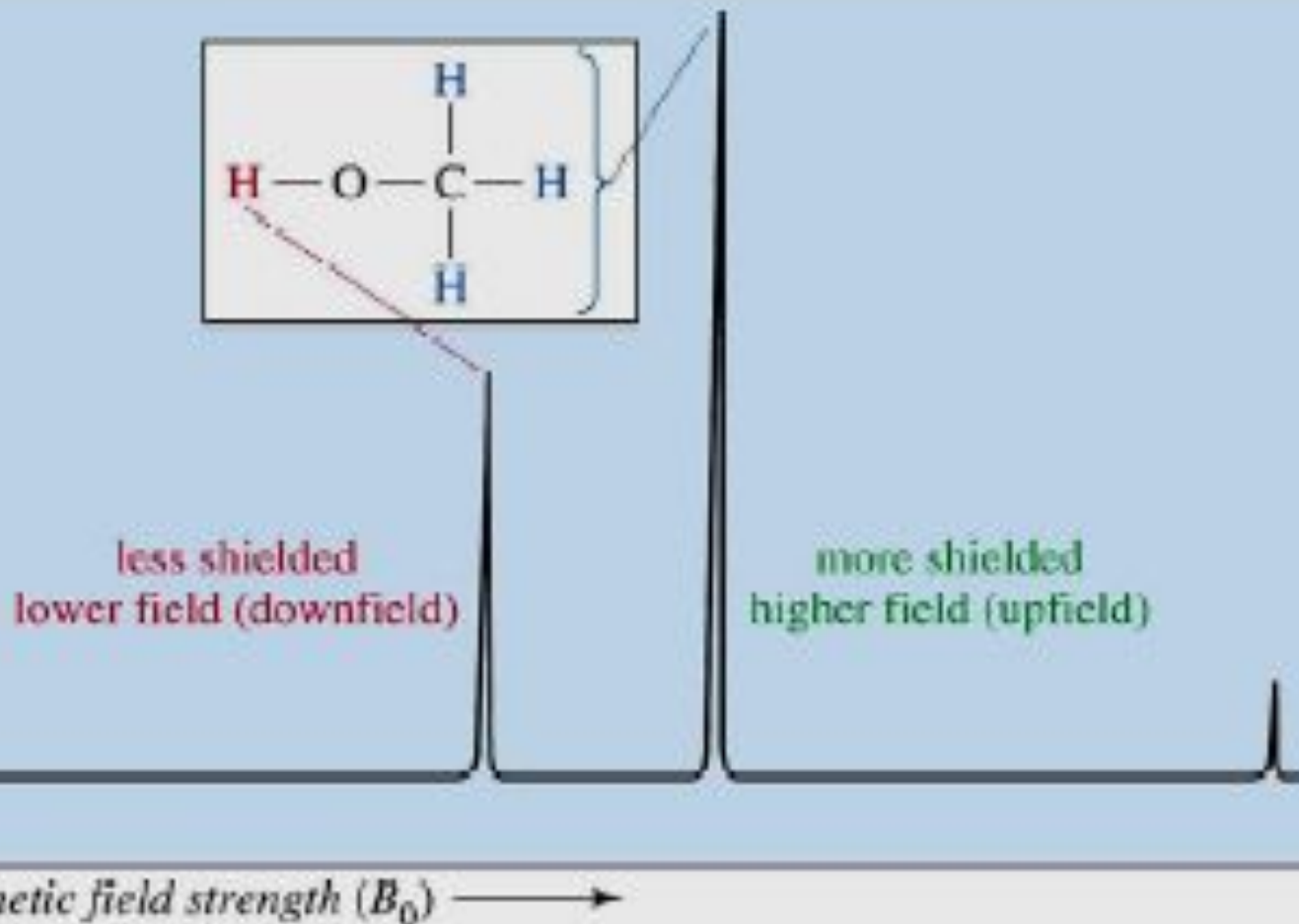
Наблюдаемые параметры

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 (1J и 2J), диэдральные углы (3J), 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 ($^1H - ^1H < 5A$), динамические характеристики ($^1H - ^{15}N$ и т.п.) |

Химический сдвиг

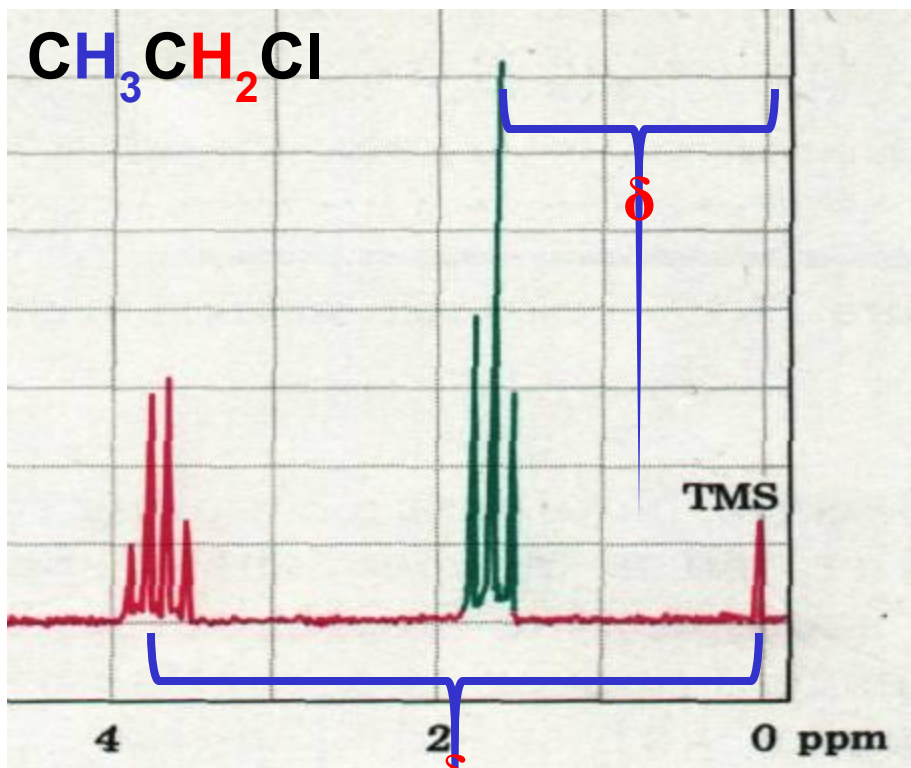
- Это смещение сигнала ЯМР в зависимости от химического состава вещества относительно сигнала эталона.



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

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

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

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

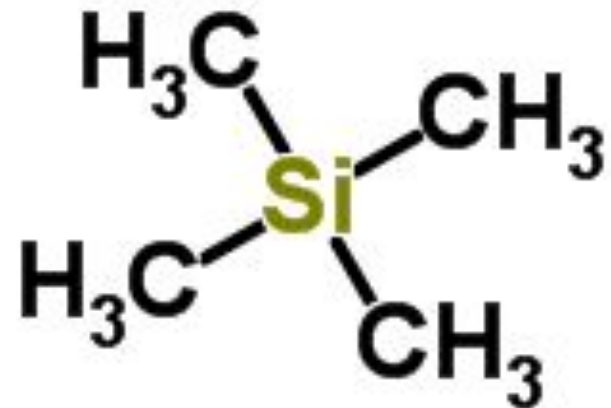
Стандарт для сравнения химических сдвигов

Характеристики:

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

TMS (Тетраметилсилан):

- Самый распространённый стандарт для ^1H , ^{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
- $T_{\text{кип.}} = 26.5\text{ }^\circ\text{C}$ - 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.

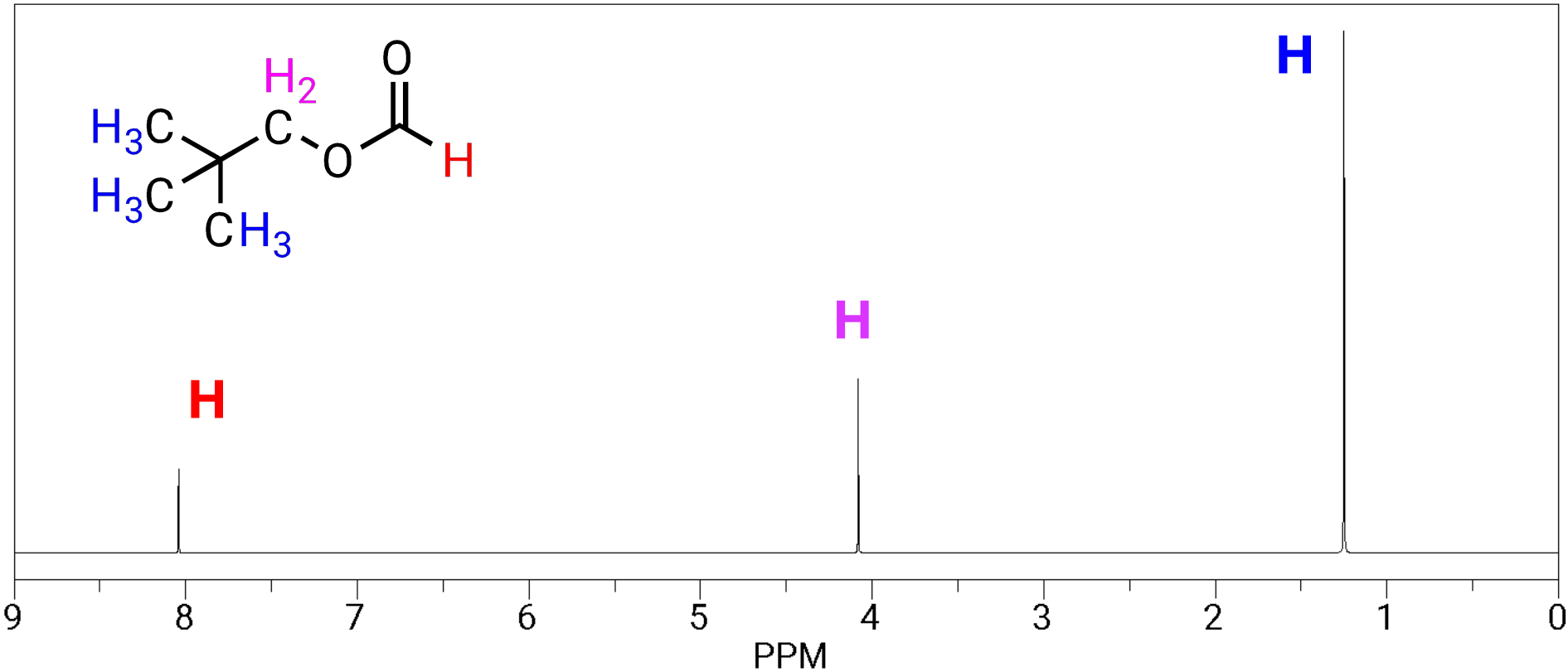
Способы описания химических сдвигов в ЯМР-спектрах



Химические сдвиги ^1H

- Метилы $\text{C}-\text{CH}_3$ 0÷1.5 м.д.
- Метилы $\text{N},\text{O}-\text{CH}_3$ 3–4 м.д.
- Метилены $\text{C}-\text{CH}_{1,2}$ 1–3 м.д.
- Метилены $\text{N},\text{O}-\text{CH}_{1,2}$ 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.

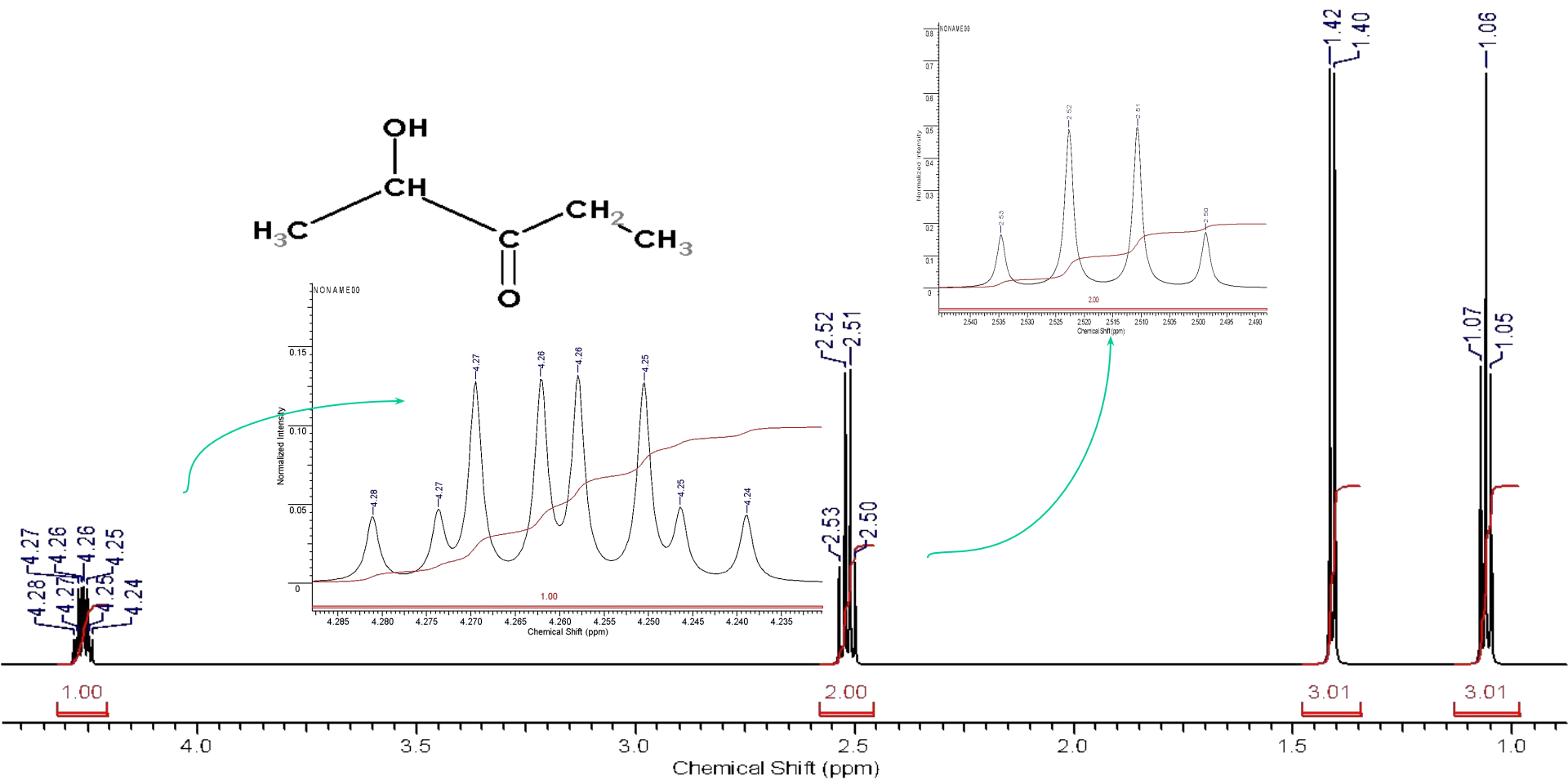
H₂ – протон, связанный с кислородом, являющимся электроакцептором, дезэкранирующим протон.

H₃ – протон, связанный с углеродом, который связан с другим углеродом одинарной связью. Дезэкранирование практически отсутствует.

Спектры ^1H ЯМР с КССВ

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

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



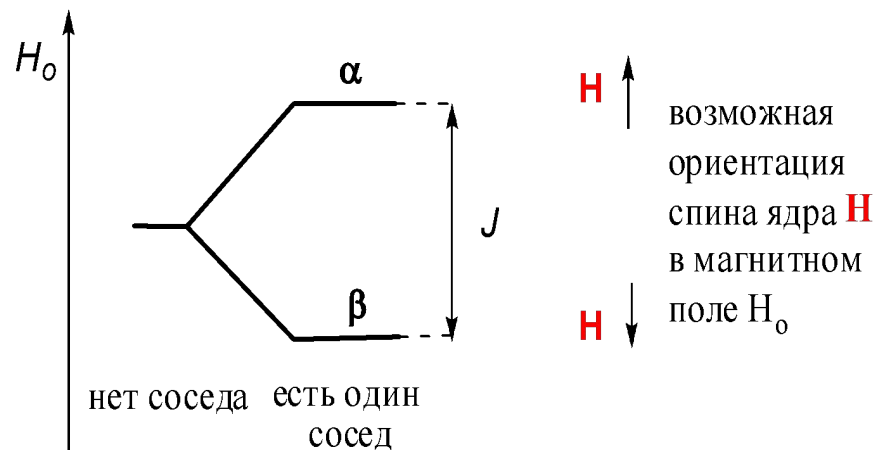
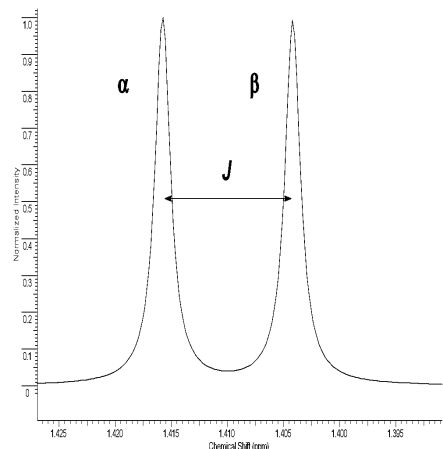
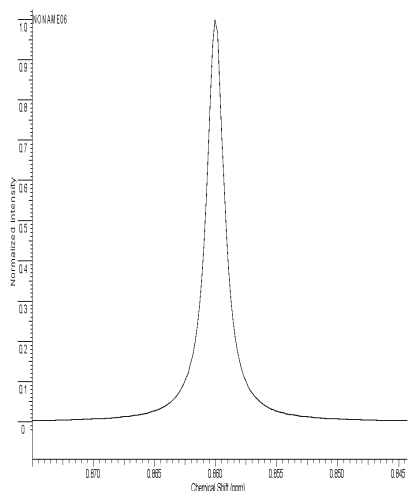
Спектры ^1H ЯМР с КССВ

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**.



расщепление энергетического уровня протона H в поле ядра H



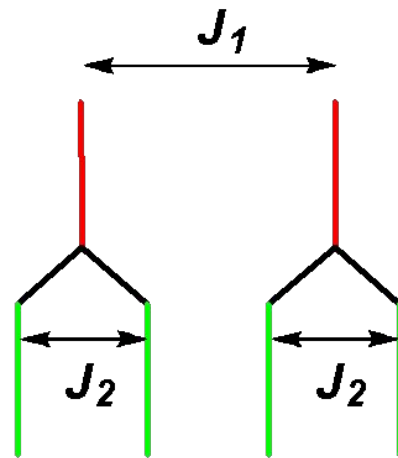
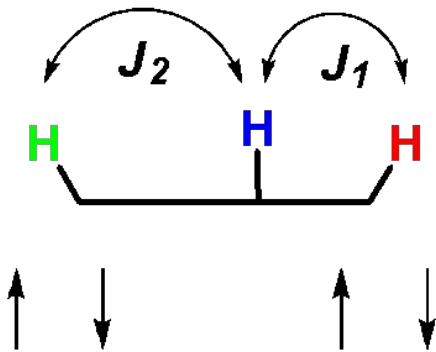
- На магнитное экранирование каждого протона оказывает влияние спин соседнего протона, который может быть различен и поэтому даёт два различающихся поля: одно увеличенное, другое – уменьшенное. С удалением ядер друг от друга эффект резко падает.

Спектры ^1H ЯМР с КССВ

Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

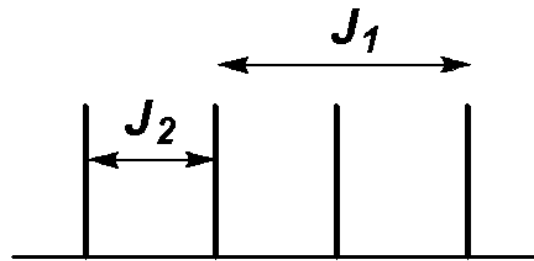
Расщепление сигнала протона **H** в присутствии двух неэквивалентных соседей **H** и **H**

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

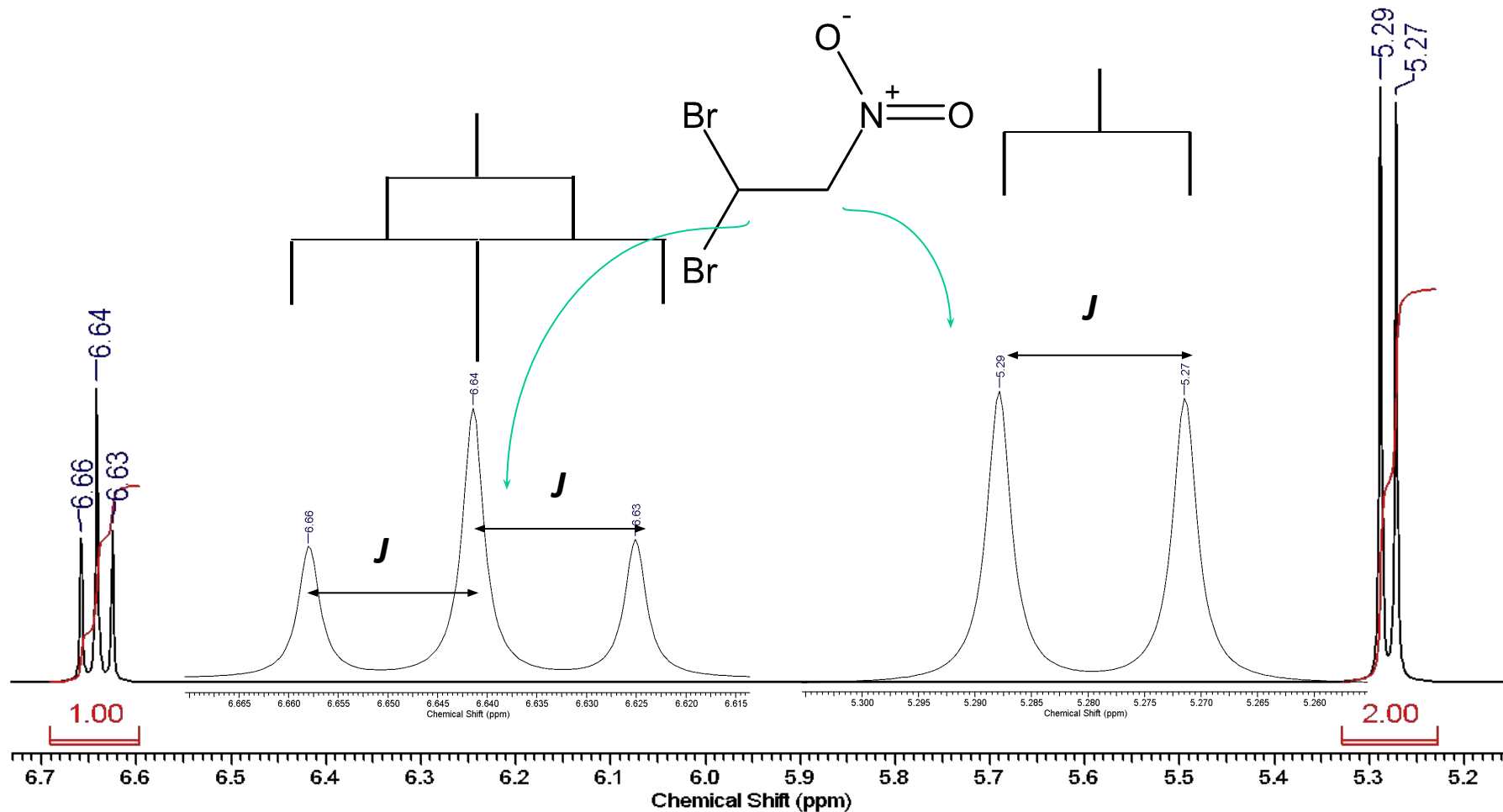


вид мультиплета протона **H** в спектре (дублет-дублетов)

Спектры ^1H 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: $^3J_{\text{A,B}} = 8.0 \text{ Hz}$.

Спектры ^1H ЯМР с КССВ

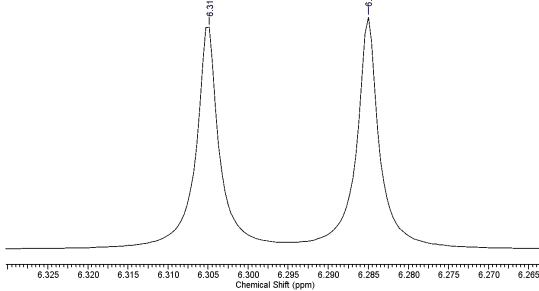
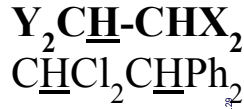
Вид простых мультиплетов в спектрах ^1H ЯМР

- 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.

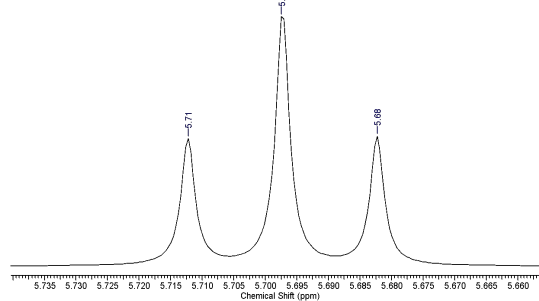
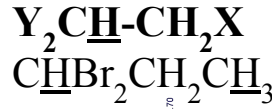
три

(реже, четыре, пять) связи друг от друга.

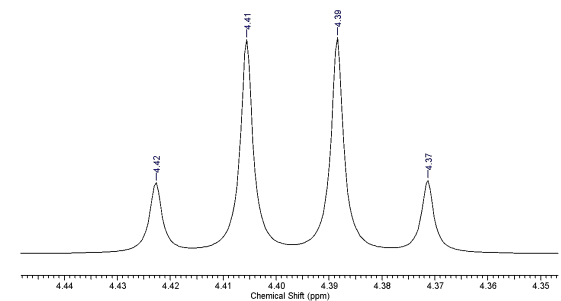
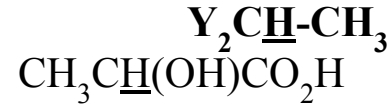
Дублет (один сосед)



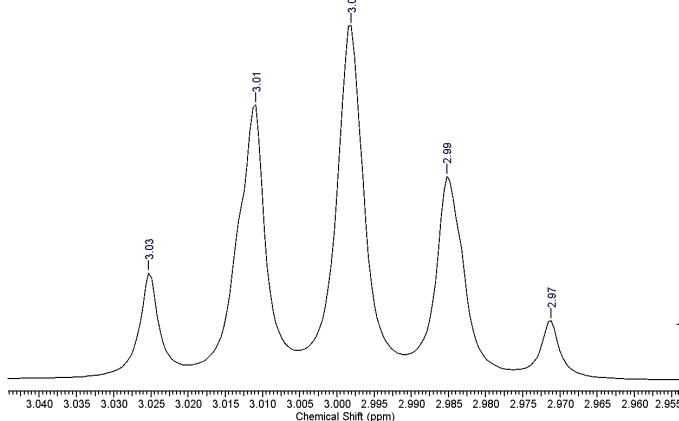
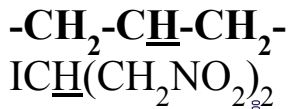
Триплет (два соседа)



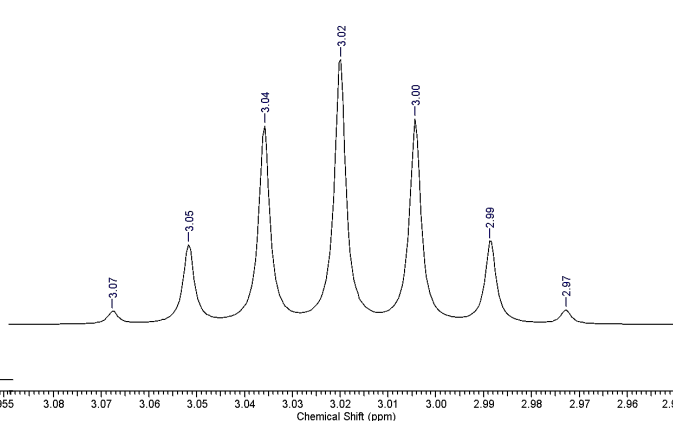
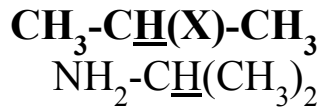
Квартет (три соседа)



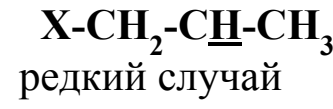
Пентет, квинтет (четыре соседа)



Септет (шесть соседей)



Секстет (пять соседей)



Нонет (восемь соседей) – не встречается.

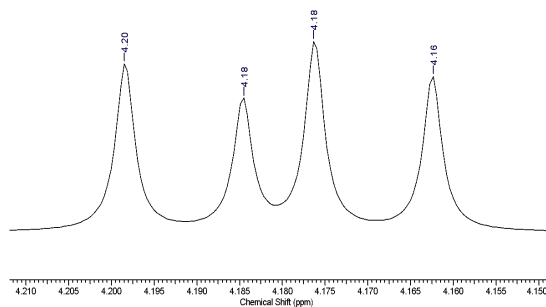
Децент наблюдается лишь в *трет-бутане*.

Спектры ^1H ЯМР с КССВ

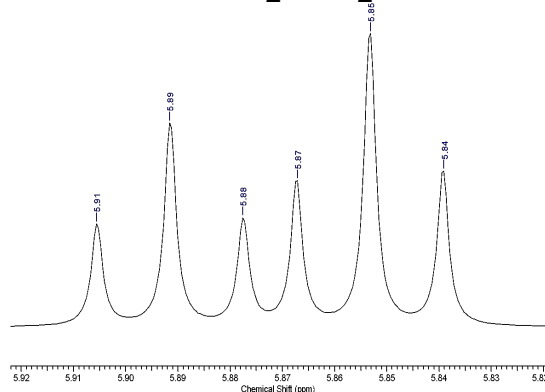
Вид простых мультиплетов в спектрах ^1H ЯМР

Если соседние протоны магнитно неэквивалентны, то мультиплеты усложняются.

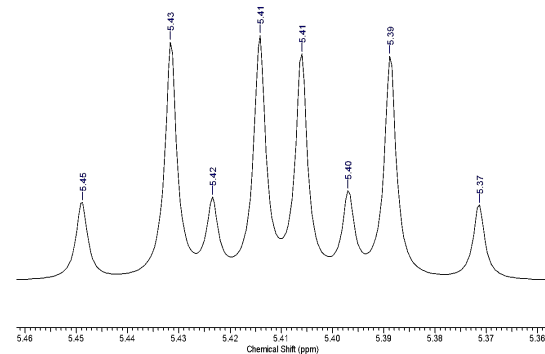
Дублет-дублетов
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CHY}-$
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{Z})-\text{CHY}-$



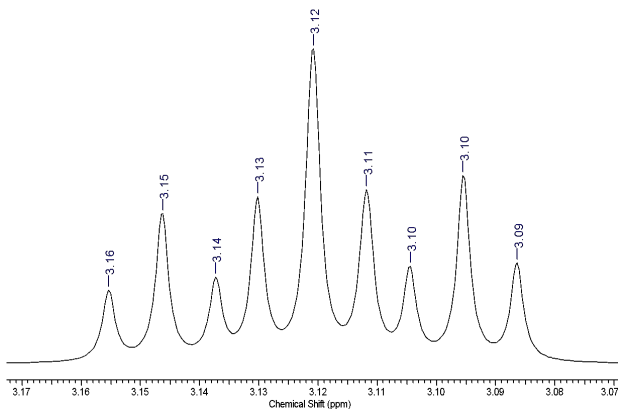
Дублет-триплетов
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2\text{Y}-$



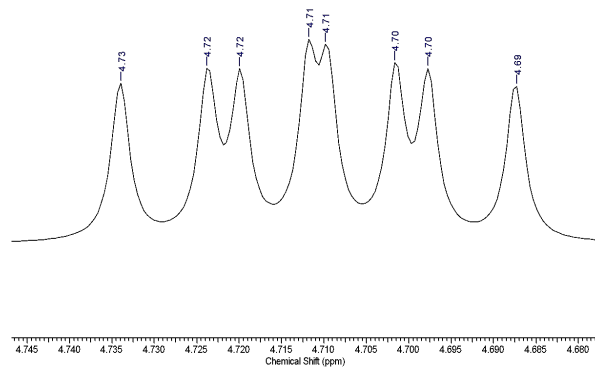
Дублет-квартетов
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$



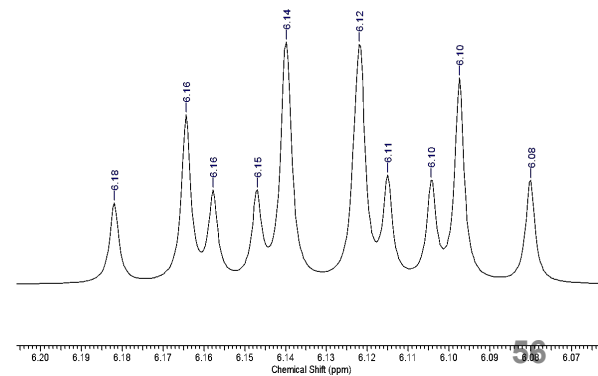
Триплет-триплетов
 $\text{XCH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2\text{Y}$



Дублет-дублетов-дублетов
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CHZ})-\text{CHY}-$



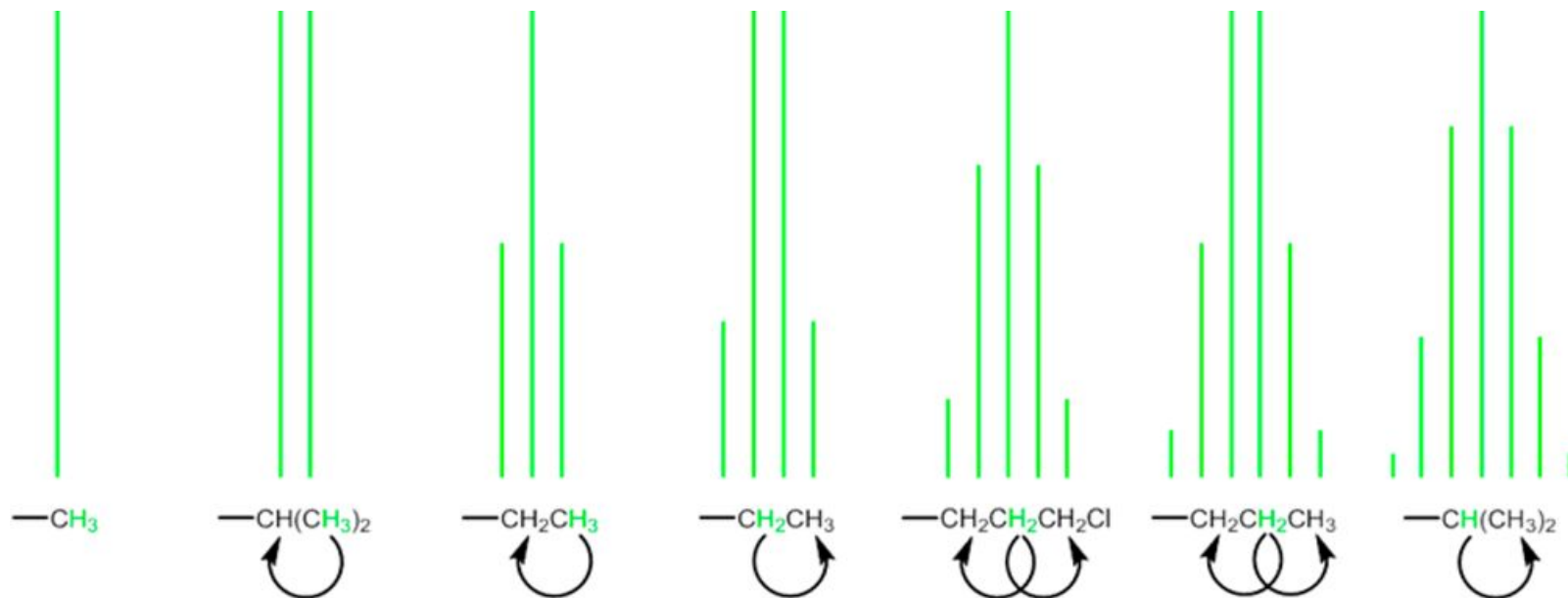
Дублет-дублетов-триплетов
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_2\text{Z})-\text{CHY}-$



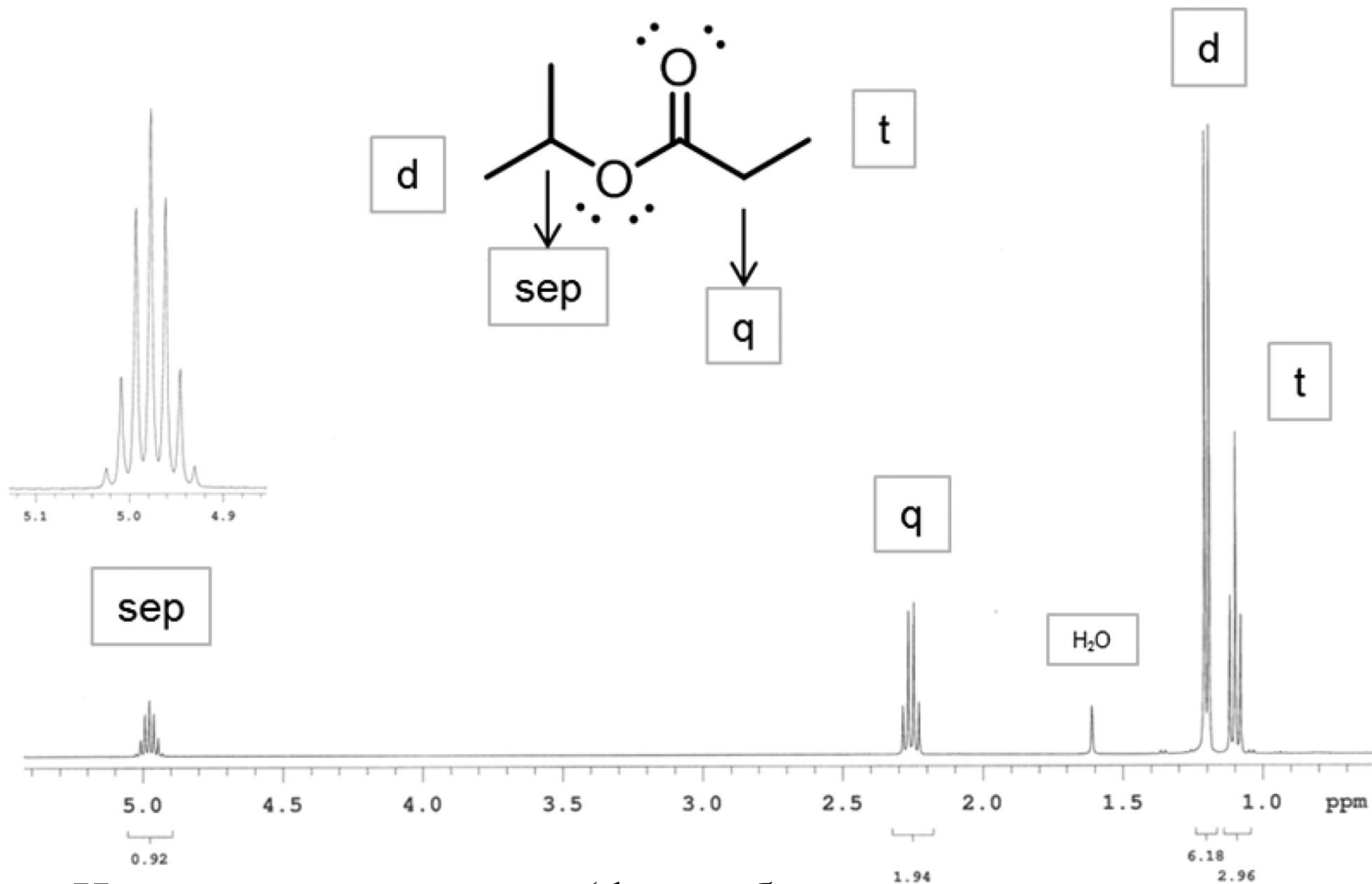
Спектры ^1H ЯМР с КССВ

- 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 ^1H ЯМР спектре

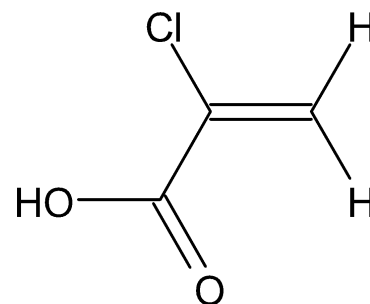
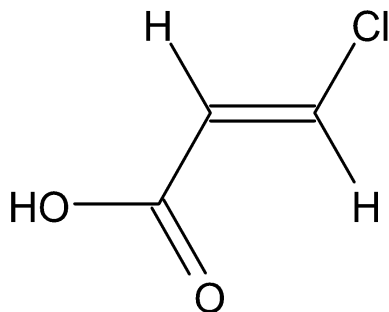
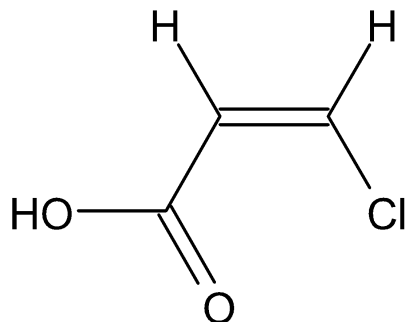


- Изопропил пропионат (d = дублет, sep = септет, q = кватрет, t = триплет)

Спектры ^1H ЯМР с КССВ

Наиболее характерные КССВ

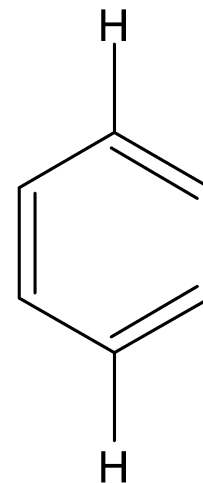
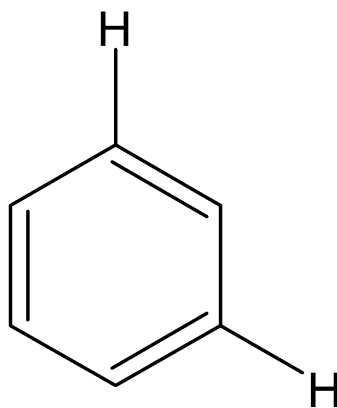
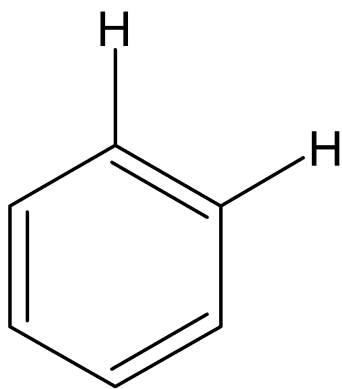
Алкены: $^3J_{\text{цис}} \sim 7\text{-}10 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{транс}} \sim 13\text{-}16 \text{ Hz}$; $^2J_{\text{гем}} \sim 1\text{-}2 \text{ Hz}$



Арены: $^3J_{\text{орто}} \sim 7\text{-}9 \text{ Hz}$;

$^4J_{\text{мета}} \sim 1\text{-}3 \text{ Hz}$;

$^5J_{\text{пара}} \sim 0\text{-}1 \text{ Hz}$



^{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 ^1H составляет **1.6%**
- Природное содержание изотопа ^{13}C составляет **1.1 %**
- Следовательно, относительная чувствительность ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C} \sim$ **5700/1**.
- Требуется в 10 раз больше количества вещества, чем в случае ^1H ЯМР (20 мг).

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

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

3. Рабочая частота прибора

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

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

- Вероятность перекрытия сигналов в углеродном спектре гораздо меньше, нежели в протонном. Облегчается интерпретация спектра.

5. Использование широкополосной развязки от протонов

- Удаляются прямые КССВ $^1J_{\text{H},^{13}\text{C}}$ и КССВ $^2J_{\text{H},^{13}\text{C}}$ 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, %	Для проведения эксперимента ЯМР ^{13}C используются дейтерированные растворители
^1H	99.98	
^{13}C	1.1	

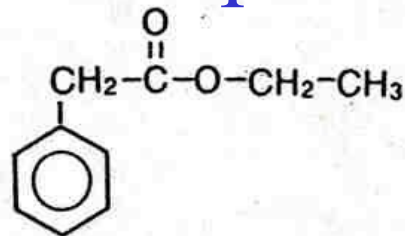
- Сигналы ЯМР ^{13}C наблюдают в виде одиночных пиков, для этого подавляют спин-спиновое расщепление с протонами.

- 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 .

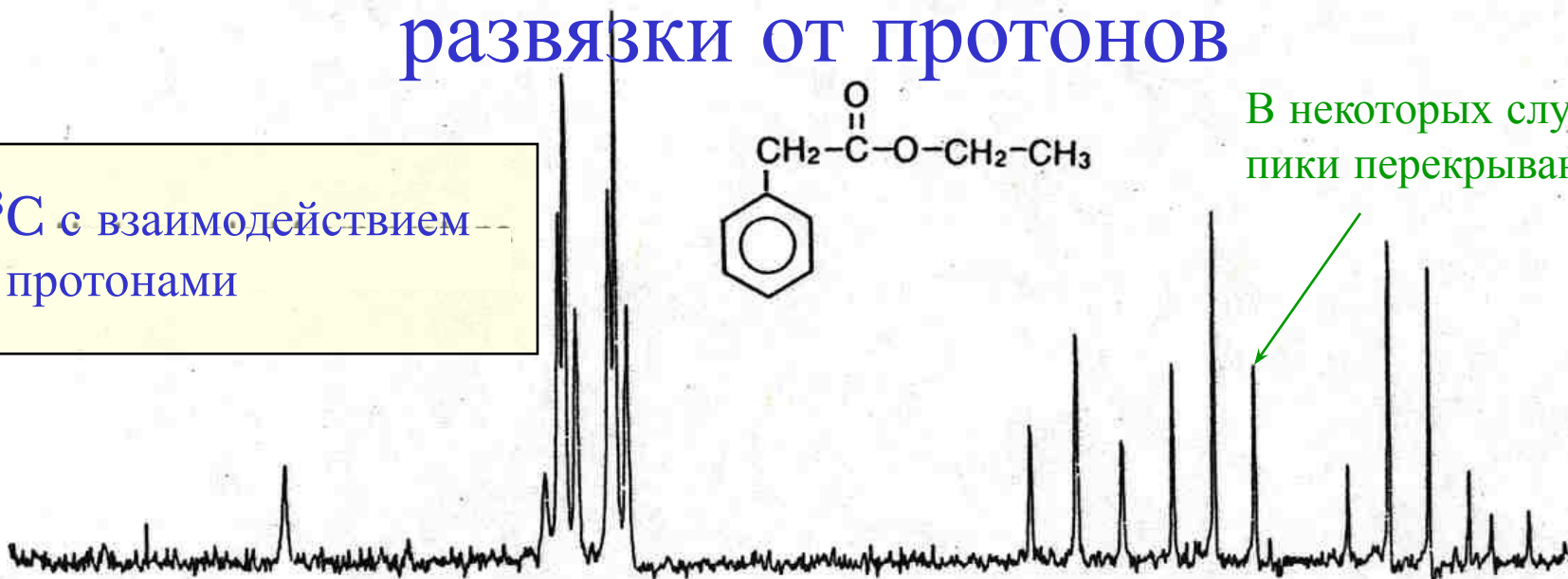
- Сигналы четвертичных атомов углерода менее интенсивны, чем сигналы атомов, связанных с атомами водорода.

Спектр этил фенилацетата с развязкой и без развязки от протонов

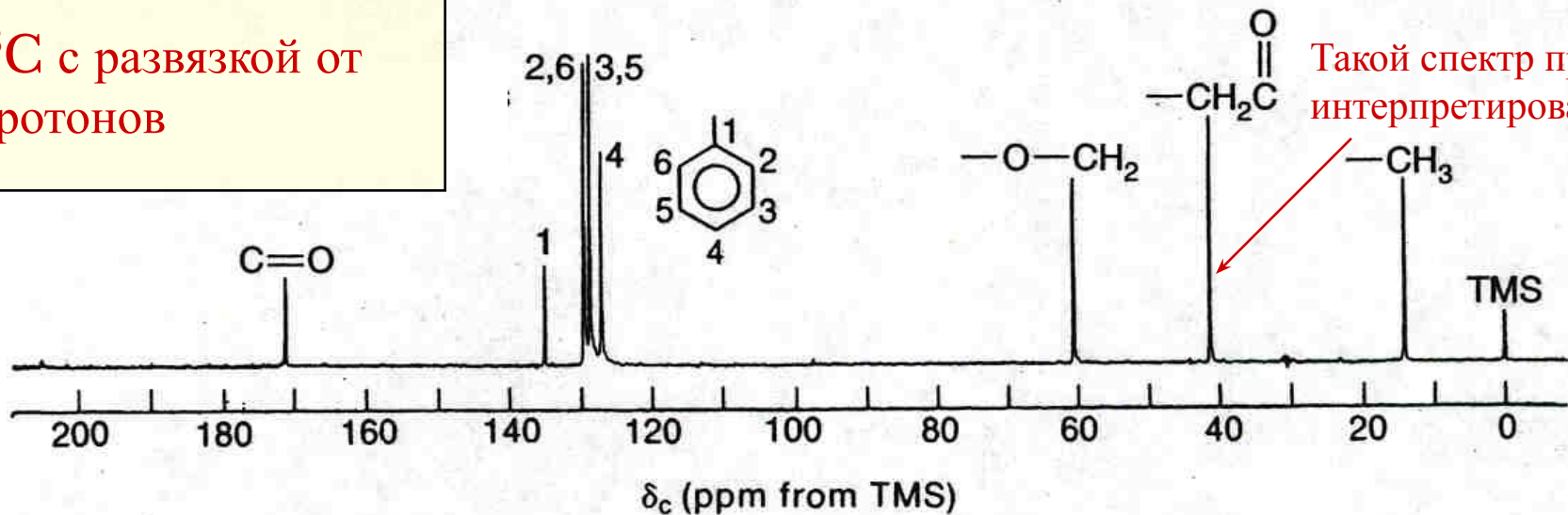
^{13}C с взаимодействием с протонами



В некоторых случаях пики перекрываются



^{13}C с развязкой от протонов

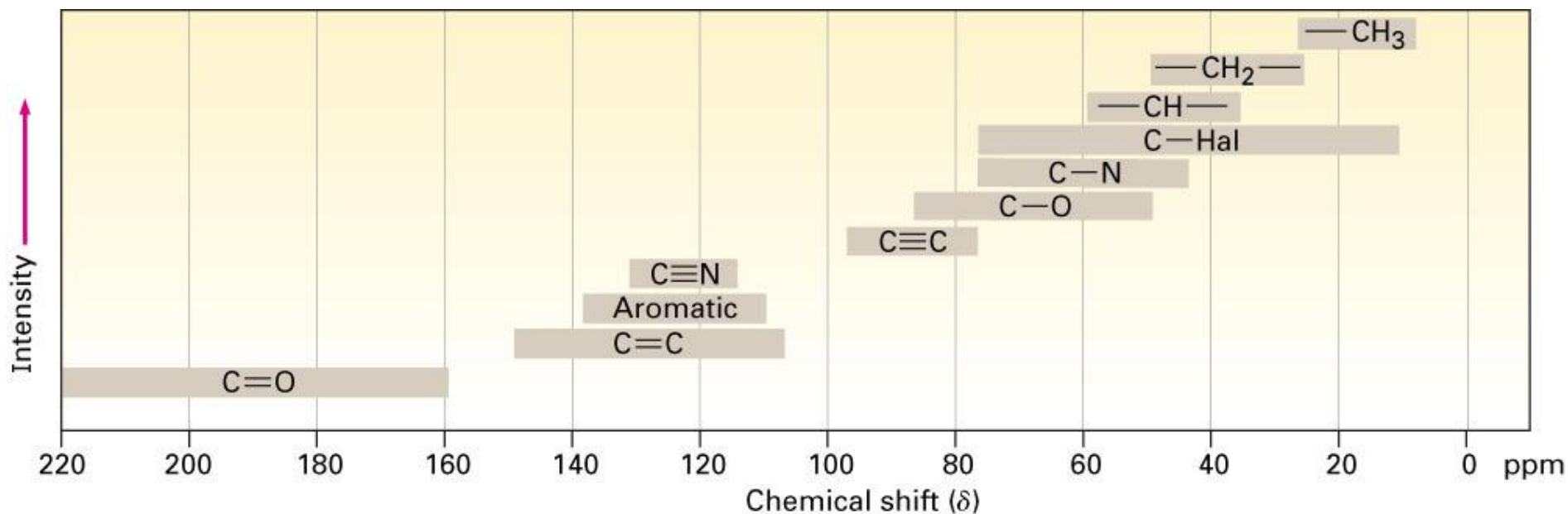


Такой спектр проще интерпретировать

Химические сдвиги ^{13}C

- Метилы $\text{C}-\text{CH}_3$ 5-15 м.д.
 - Метилены $\text{C}-\text{CH}_{1,2}$ 20-60 м.д.
 - Метилены $\text{O}-\text{CH}_{1,2}$ 60-90 м.д.
 - Ароматика, C, CH 100-150 м.д.
 - Олефины
 - Карбоксилы $\text{C}=\text{O}$ 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



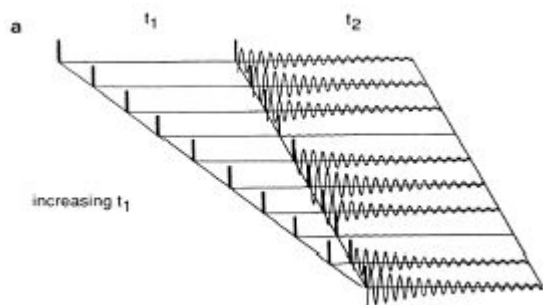
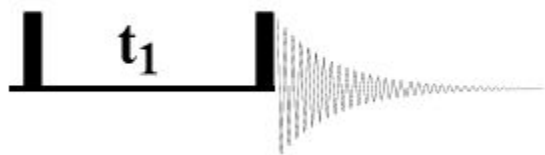
Области спектра ЯМР ^{13}C (шкала в м. д.)

Ненасыщенные атомы углерода, связанные с кис- лородом (C=O)	Ненасыщенные атомы углерода (C=C и ароматичес- кие)	Насыщенные атомы углерода, связан- ные с кислородом (CH₃O, CH₂O и т. д.)	Насыщенные атомы углерода (CH₃, CH₂, CH)
$\delta=150 - 200$	$\delta=100 - 150$	$\delta=50 - 100$	$\delta=0 - 50$

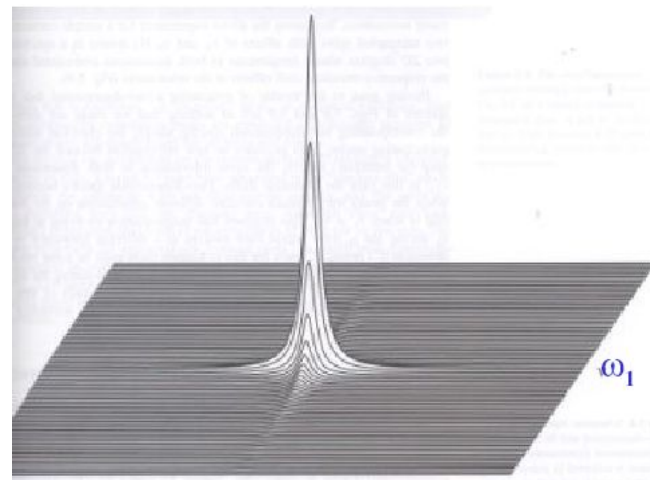
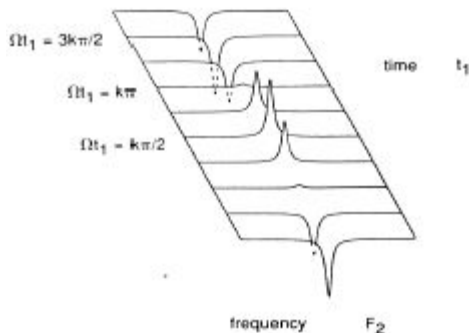
^{13}C ЯМР спектр этанола

^{13}C ЯМР спектр молочной кислоты

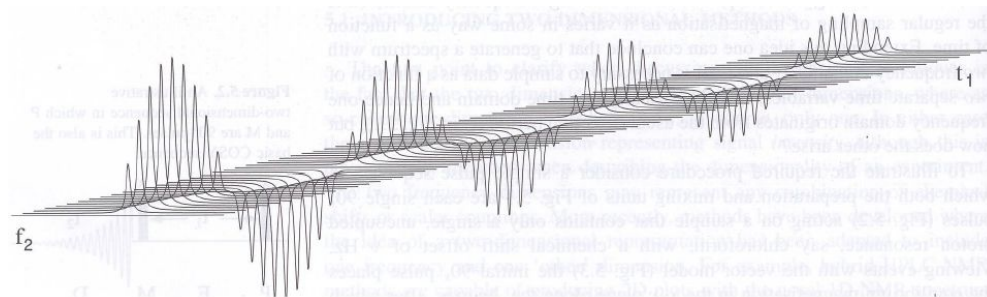
Двумерная спектроскопия ЯМР



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 (t_1 и t_2).

Одномерный спектр ЯМР – зависимость интенсивности поглощения от одной частоты (ν_1 - ^1H).

Двумерный спектр ЯМР – зависимость интенсивности поглощения от двух частот (ν_1 - ^1H и, например, ν_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 t_1 они подлежат детектированию и преобразованию.

Виды 2D ЯМР спектров, используемые для определения строения молекул

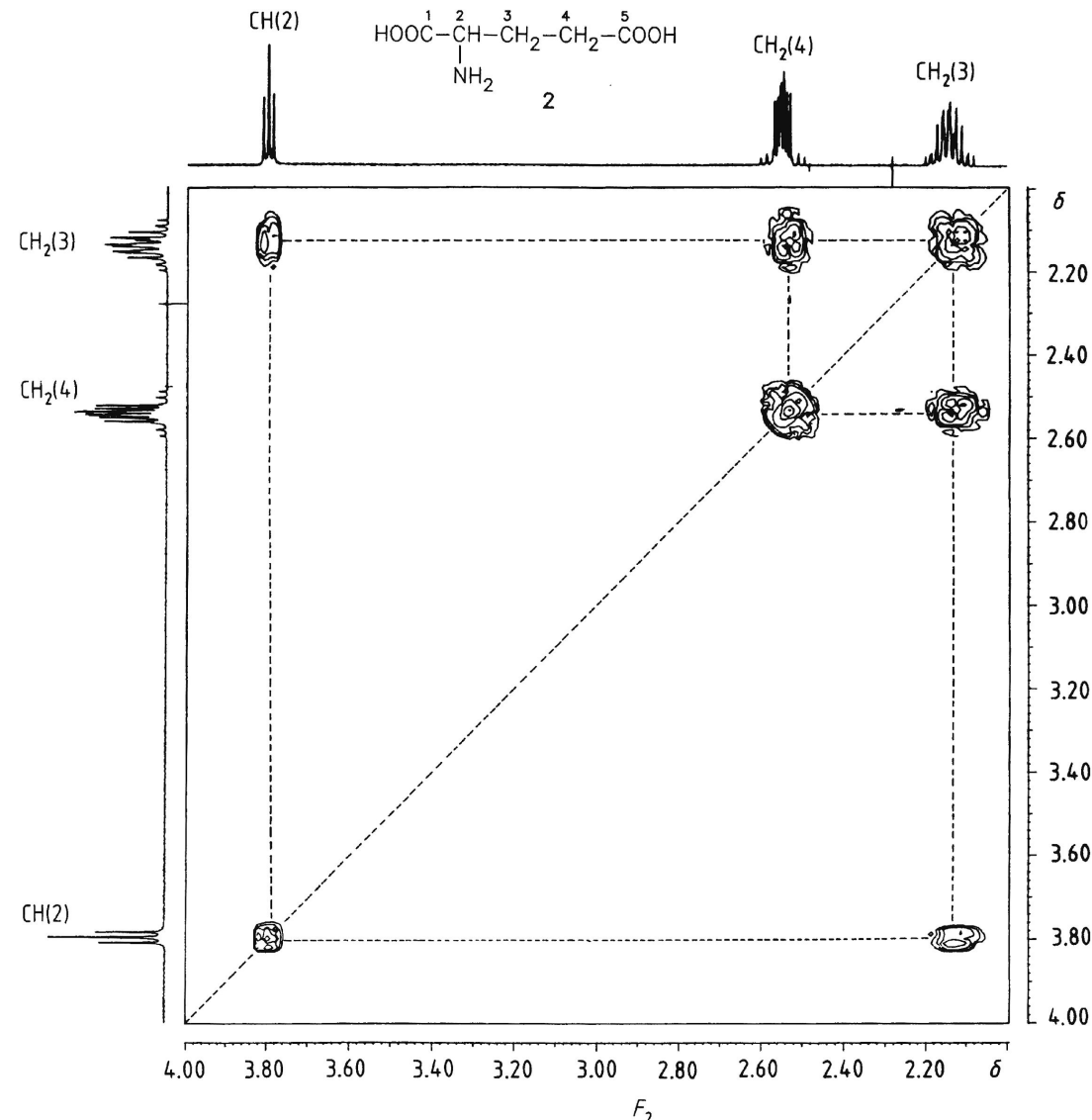
- Гомоядерная спектроскопия ($^1\text{H}-^1\text{H}$):
 - 2D COSY
 - 2D TOCSY
 - 2D NOESY
- Гетероядерная спектроскопия ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$ или $^1\text{H}-^{15}\text{N}$):
 - 2D HSQC
 - 2D HMBSC

Назначение ЯМР экспериментов

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

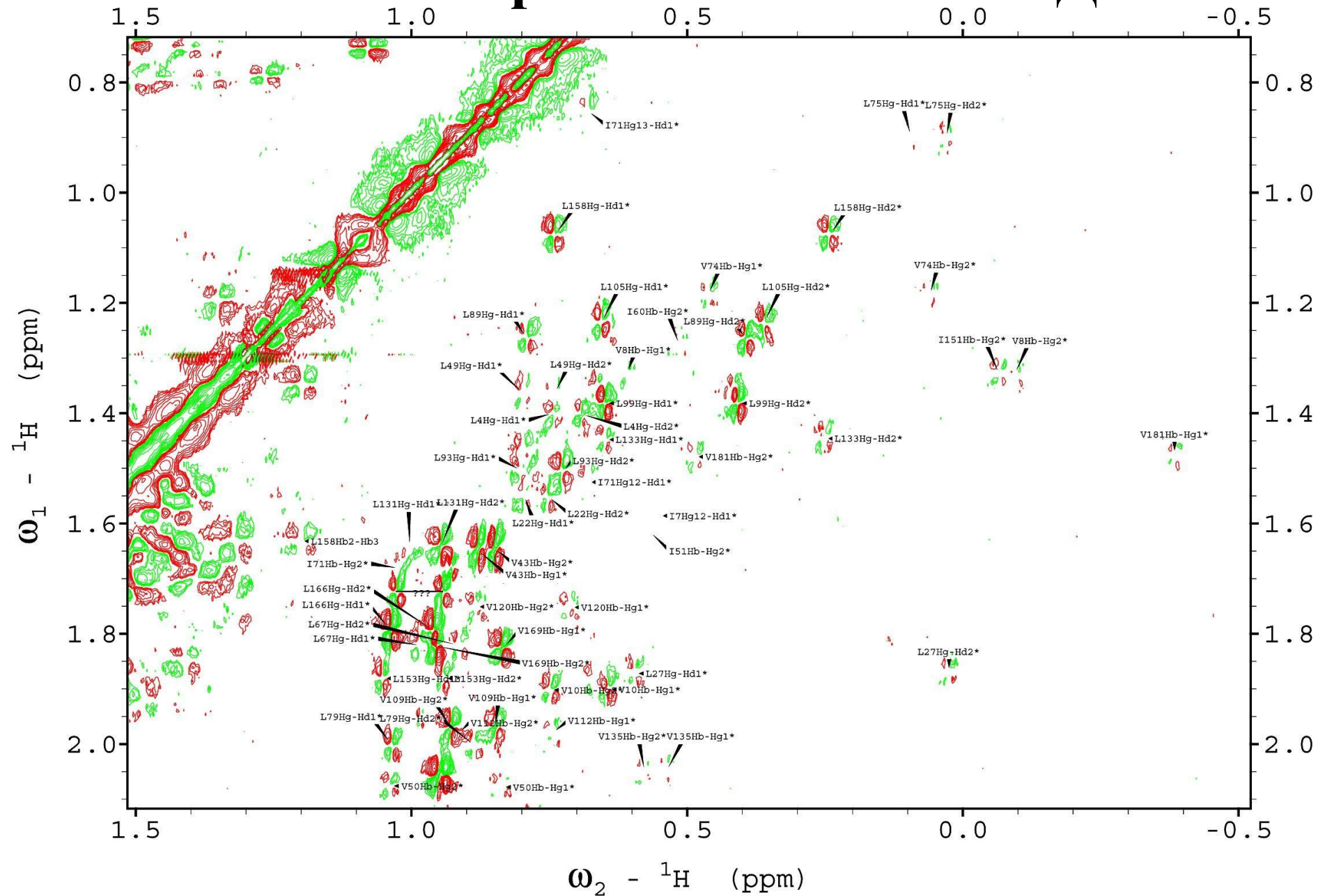
COSY – CORRELATED SPECTROSCOPY

- Спектры COSY представляют собой трехмерную поверхность с координатами (ν_1 , ν_2 , I), где ν_1 и ν_2 — 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.

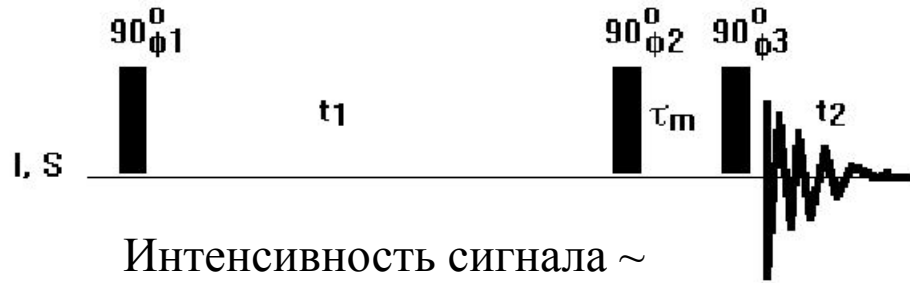


- В спектре COSY можно выделить два типа сигналов: диагональные сигналы и т.н. **кросс-пики**, Последние **располагаются вне диагонали** и указывают на взаимодействующие группы ядер: если провести через сигнал горизонтальную и вертикальную линию, то на одномерных проекциях мы увидим сигналы, соответствующие 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

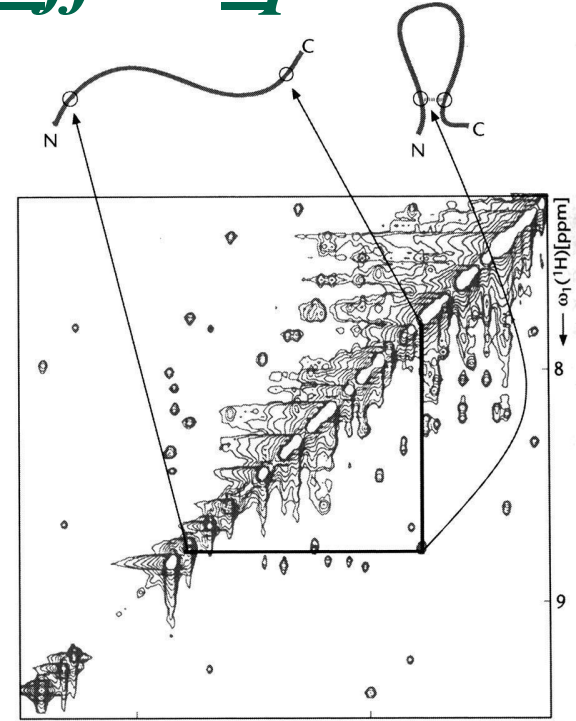


NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy



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

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.

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

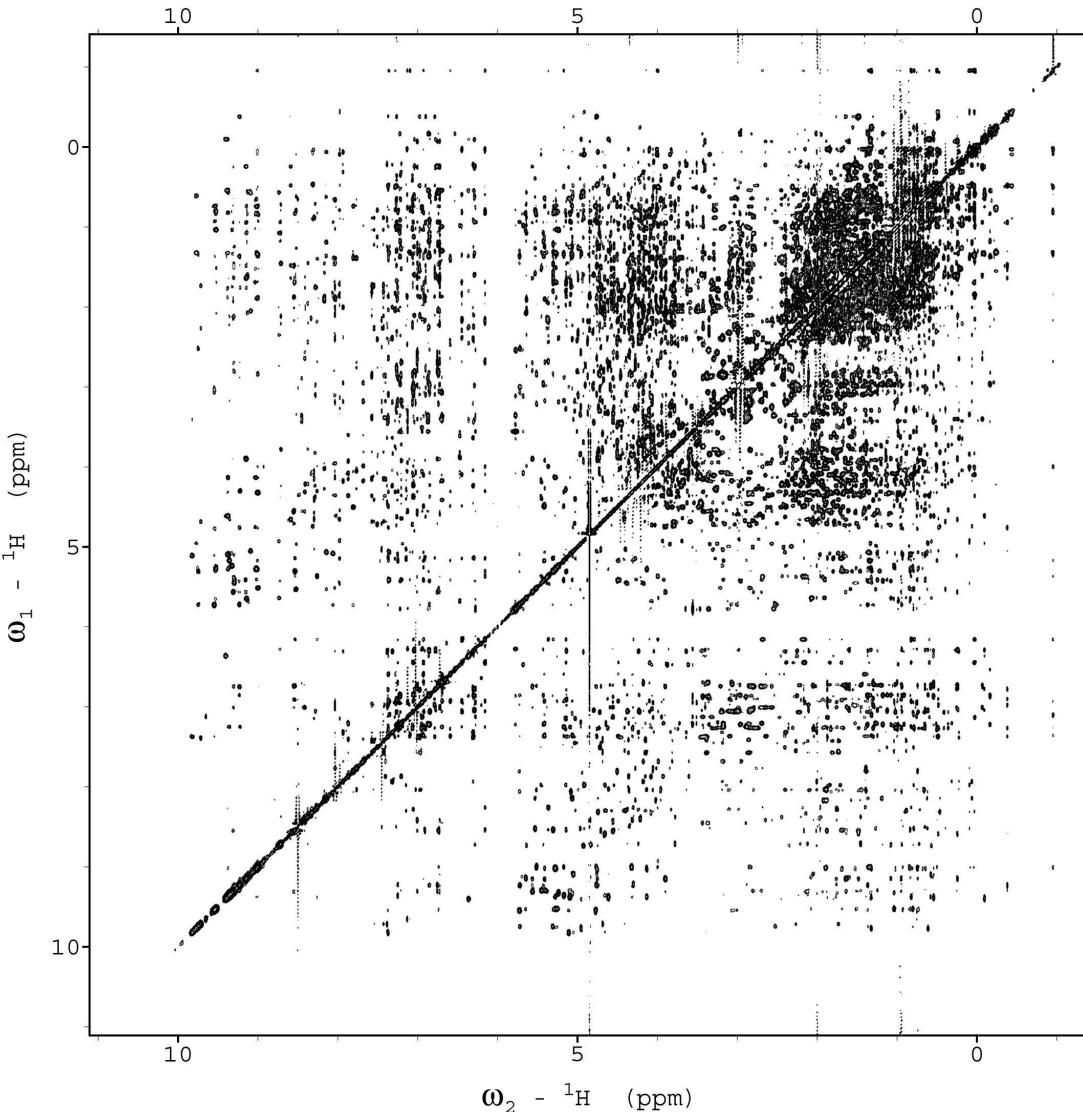
I_0 – равновесная интенсивность

I – интенсивность в присутствии ЯЭО

Теоретические максимальные усиления гетероядерного ЯЭО

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

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

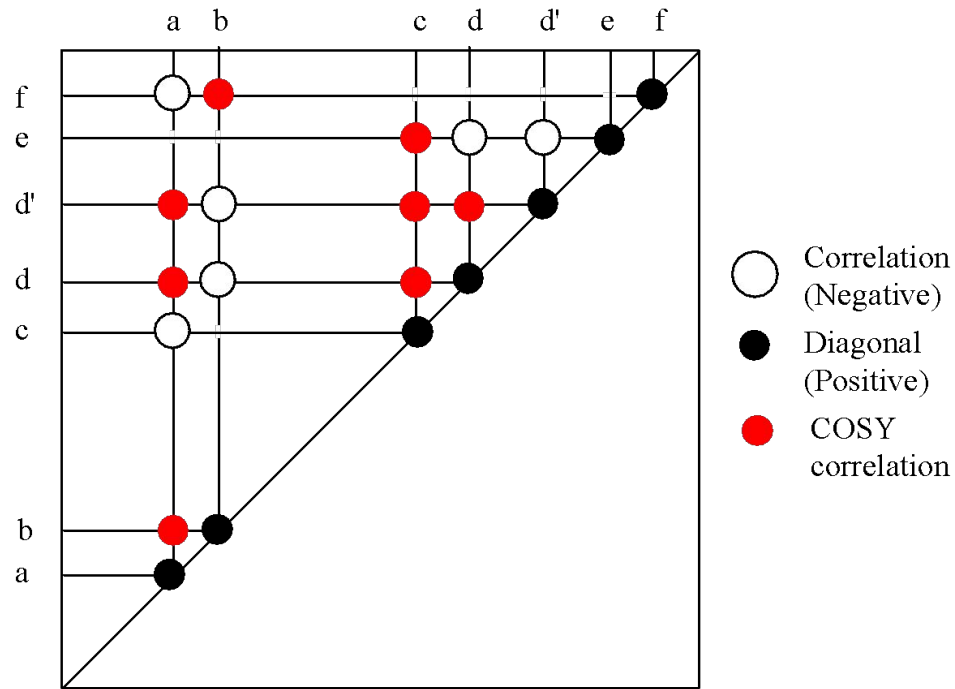


Спектр NOESY можно разделить на три «подспектра»:

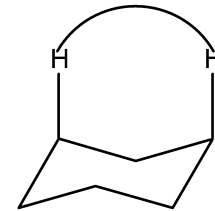
- сигналы, принадлежащие спектру COSY (поэтому результаты лучше анализировать, сравнивая два этих эксперимента);
- сигналы, демонстрирующие наличие химического обмена между различными группами атомов (например, если в молекуле есть группы $-NH$ и $-COOH$);
- и, наконец, сигналы, соответствующие именно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

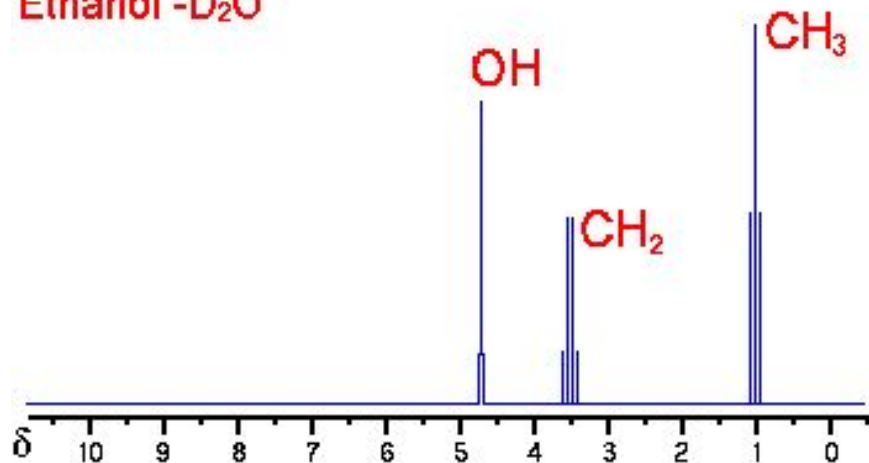


Стоимость ЯМР анализов

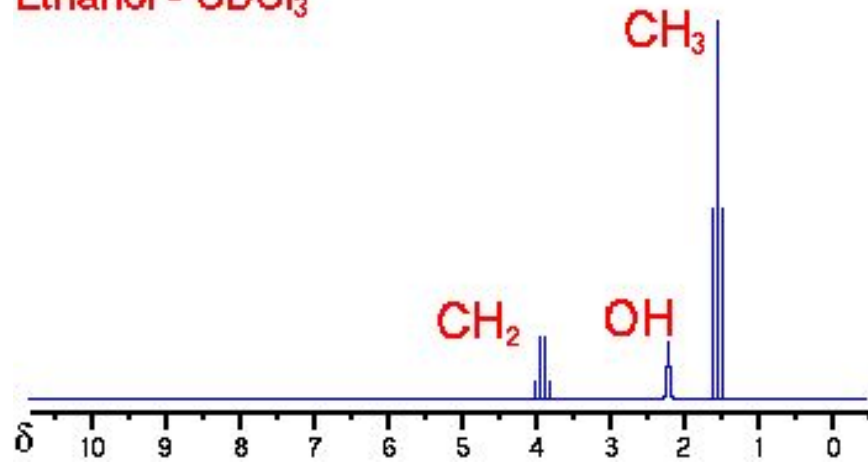
Вид анализа	Количество образца, мг	Цена дол.
H ¹	5	5
F ¹⁹	5	4.5
C ¹³	25	9
N ¹⁴	10	6.5
N ¹⁵	100	30
P ³¹	25	6.5
COSY	5	11
NOESY	10	13
HMQC, HSQC	25	20
COLOC, HMBC	25	26

Примеры ЯМР-спектров Этанол

Ethanol - D₂O

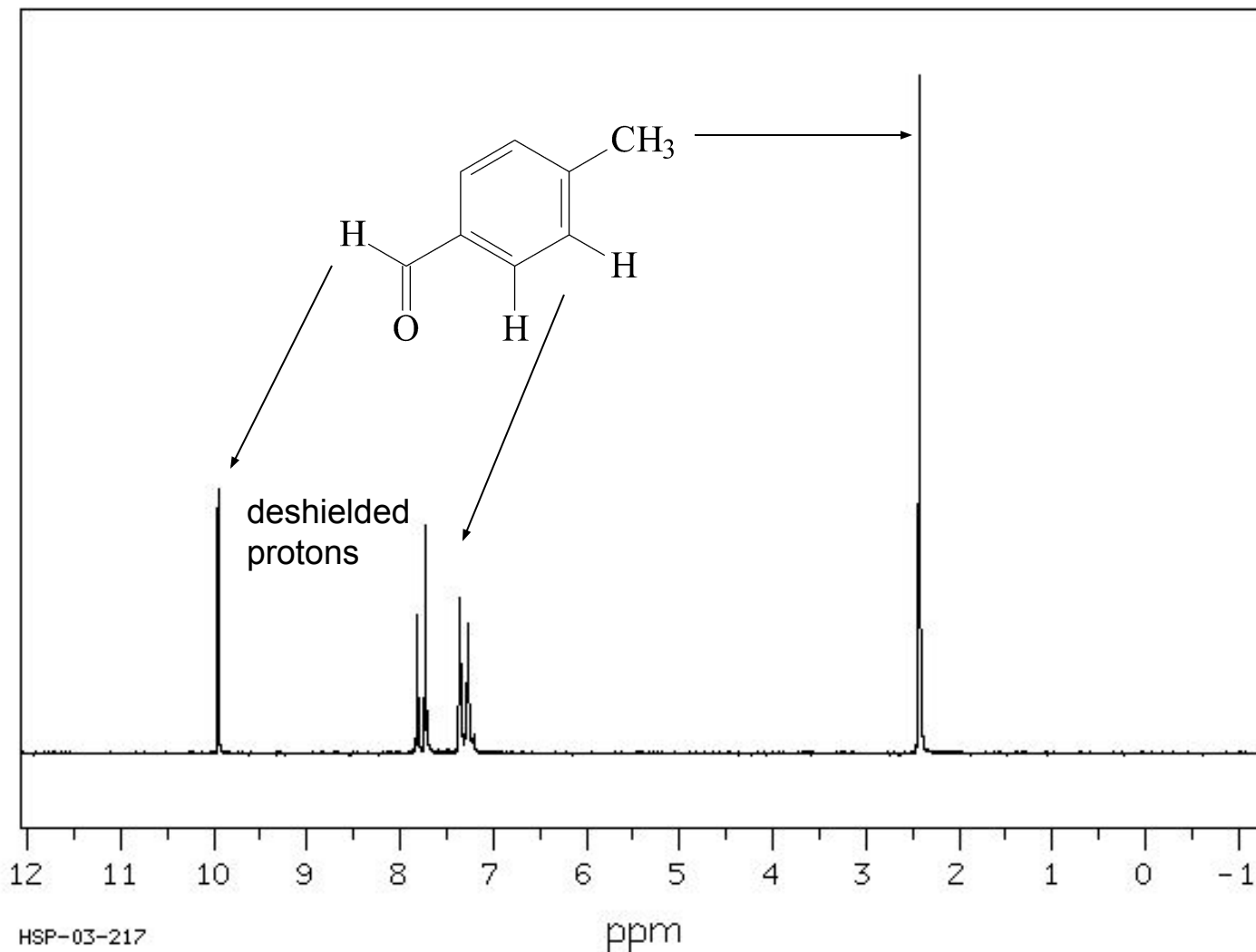


Ethanol - CDCl₃



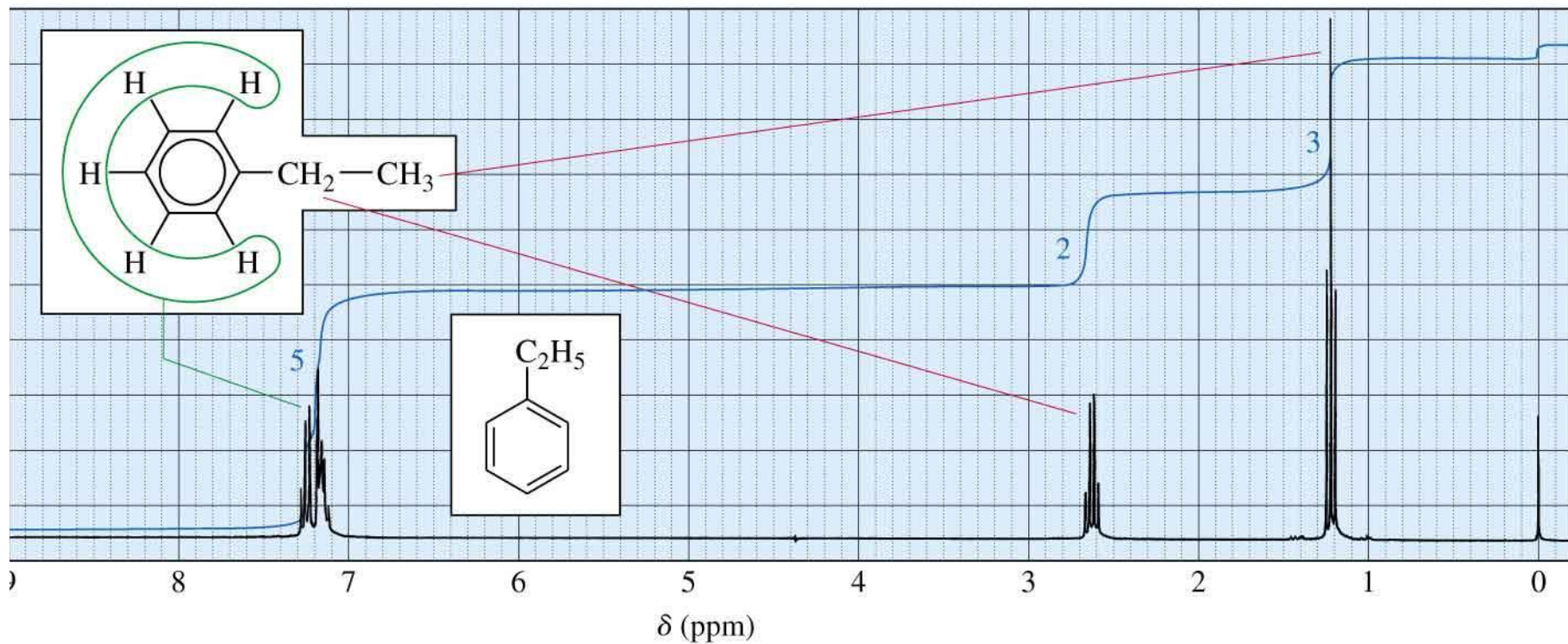
Примеры ЯМР-спектров

4-метилбензальдегид



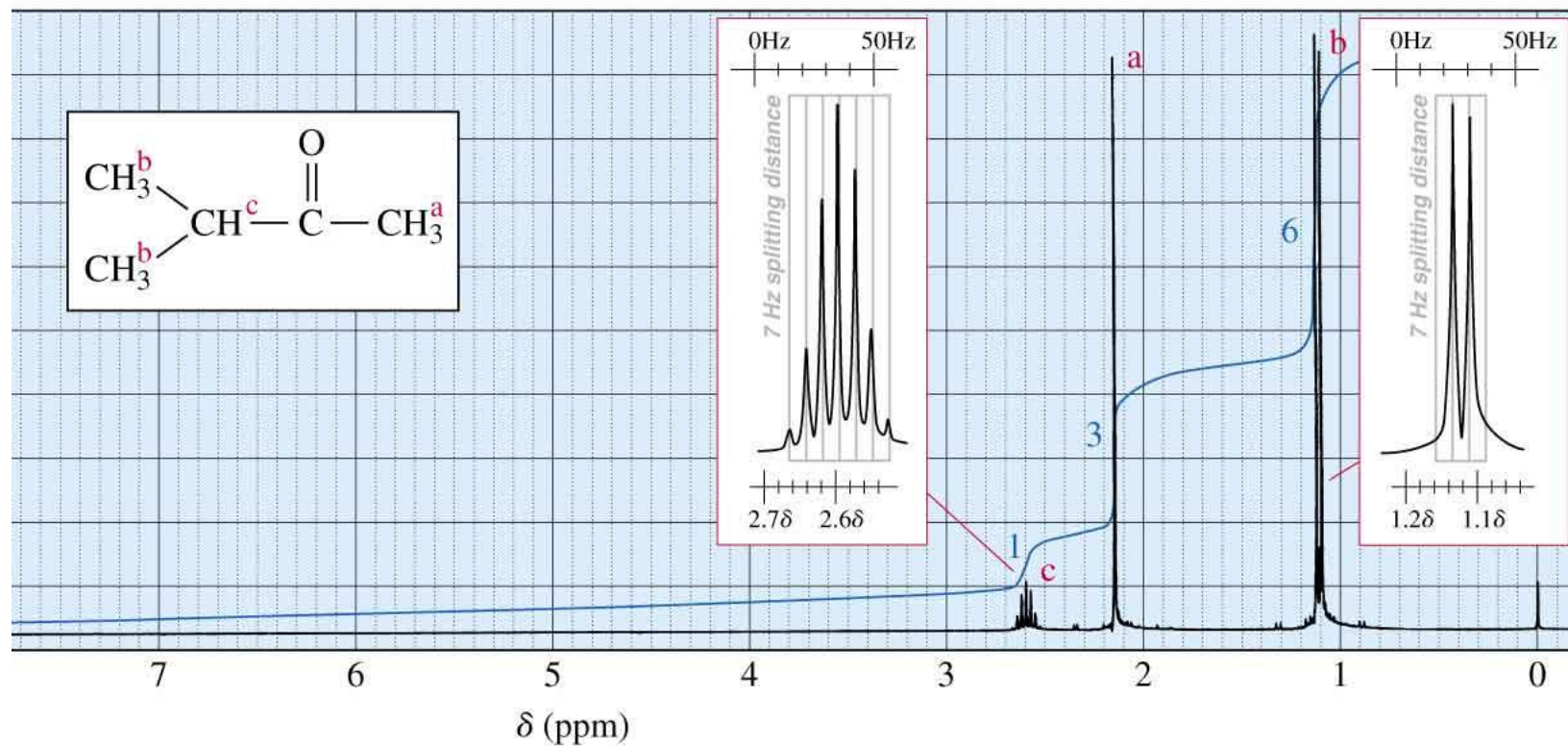
Примеры ЯМР-спектров

Этилбензол



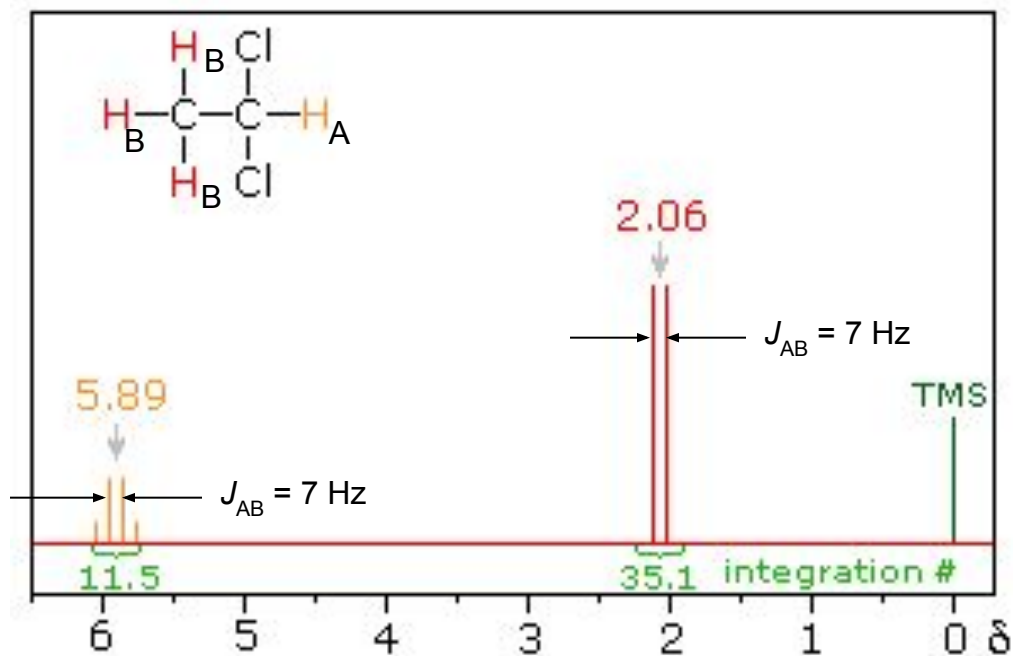
Примеры ЯМР-спектров

МЕТИЛИЗОПРОПИЛКЕТОН



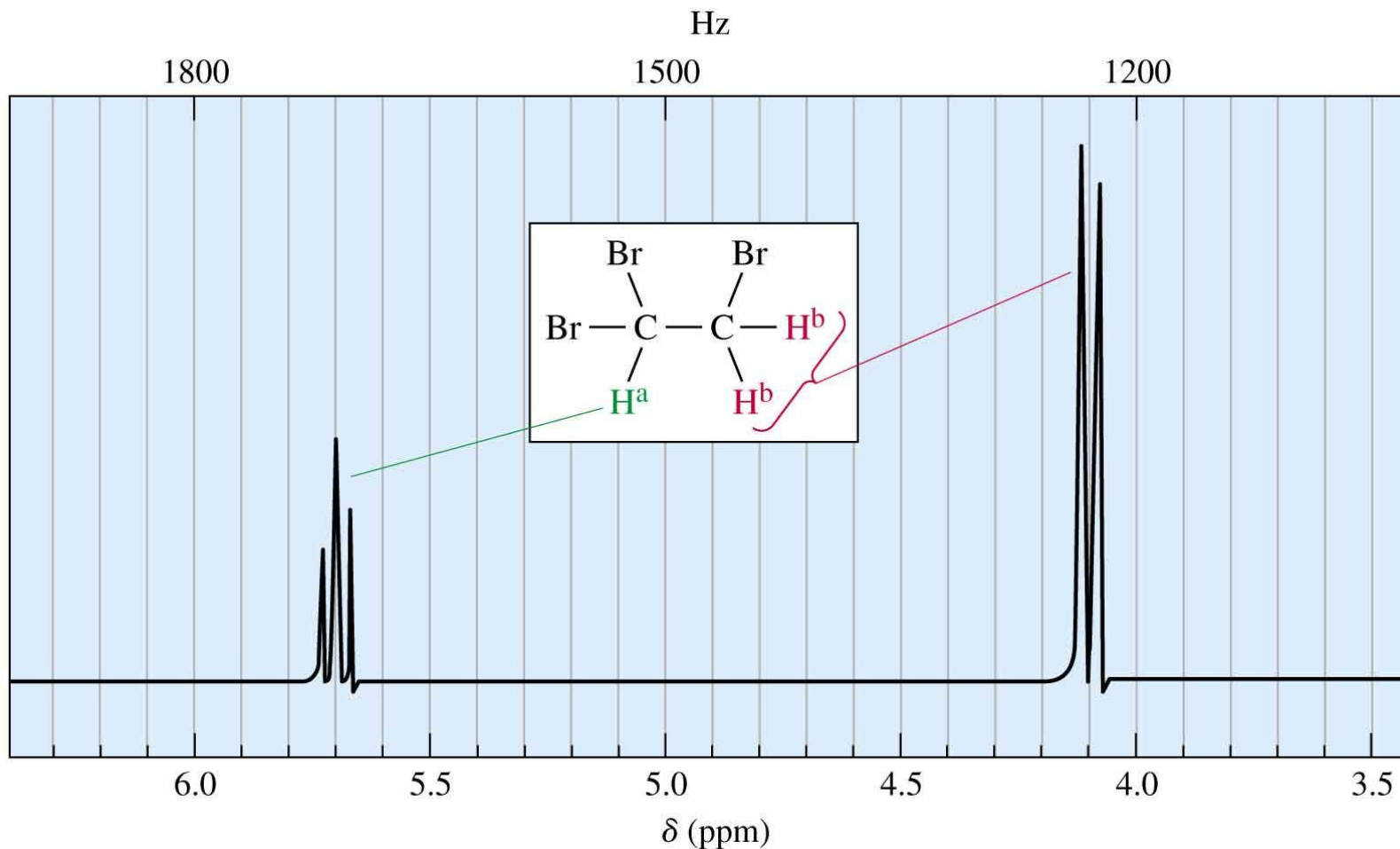
Примеры ЯМР-спектров

1,1-дихлорэтан

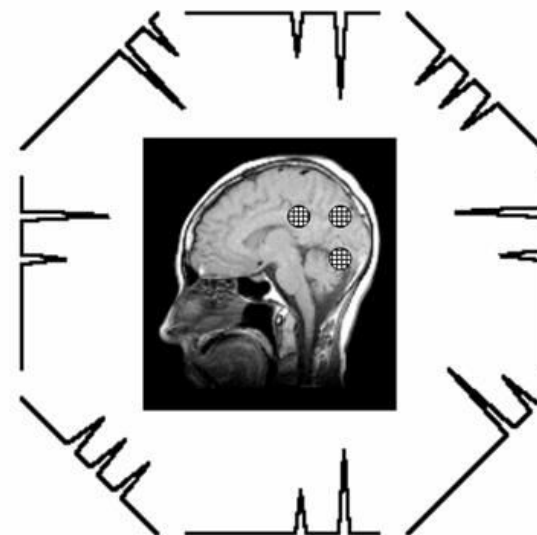
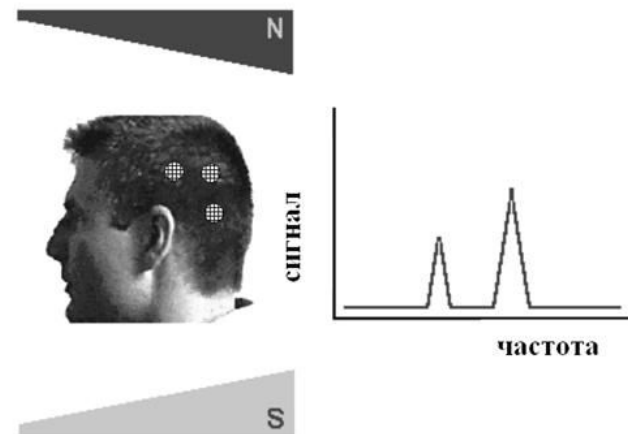
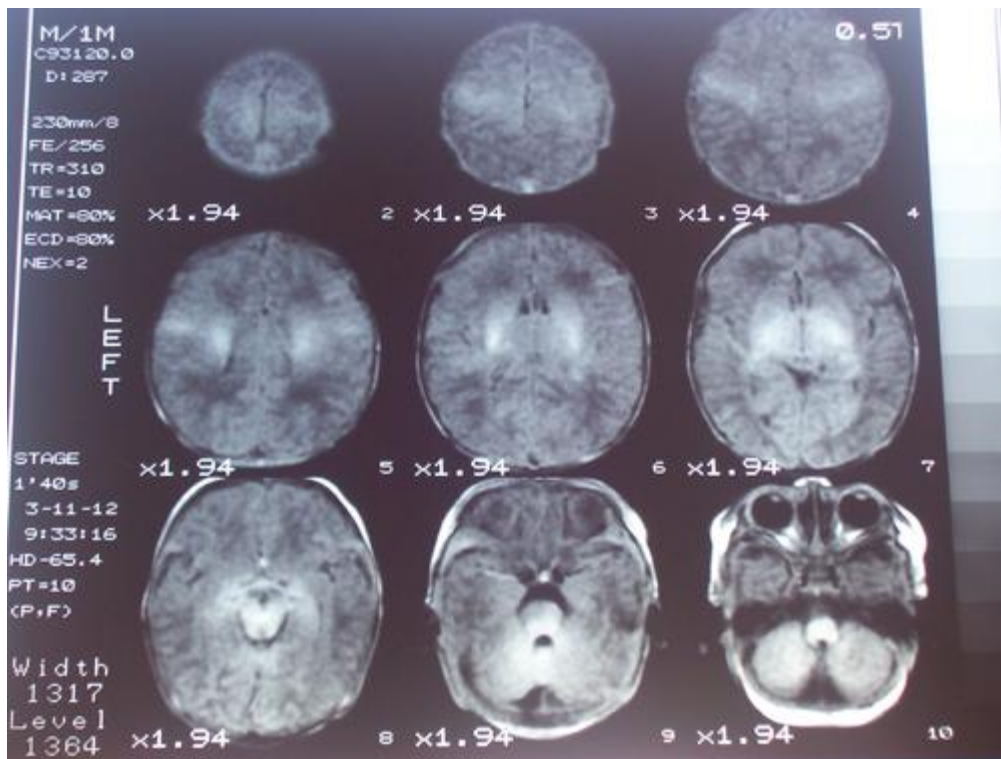


Примеры ЯМР-спектров

1,1,2-трибромэтан



МРТ – магнитно-резонансная томография



ЯМР – томография головного мозга

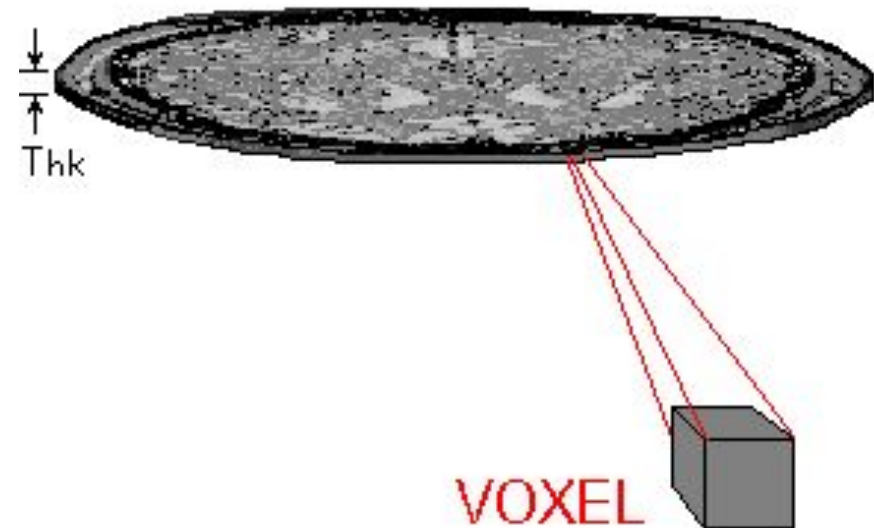
МРТ: информативный метод исследования и диагностики заболеваний центральной нервной системы, костно-мышечной и суставной систем человека.

МРТ

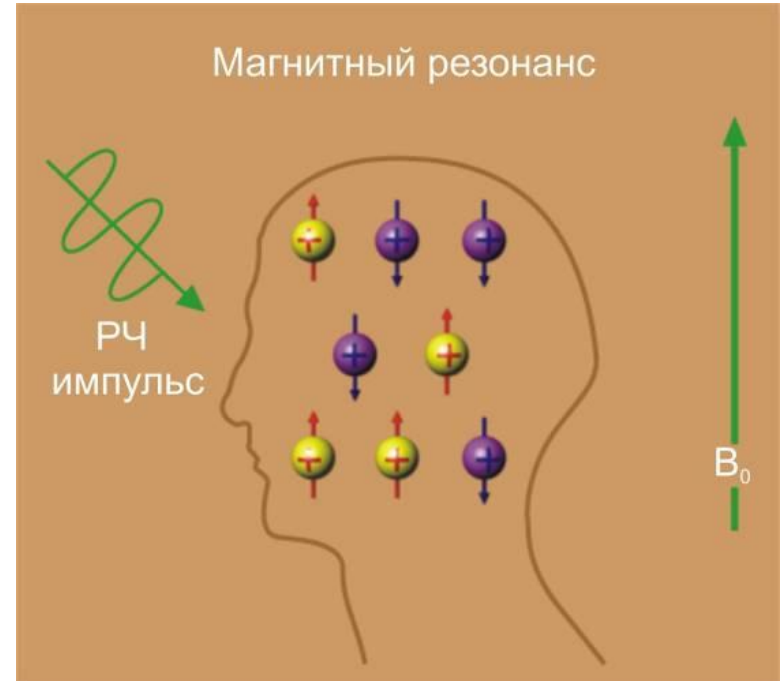
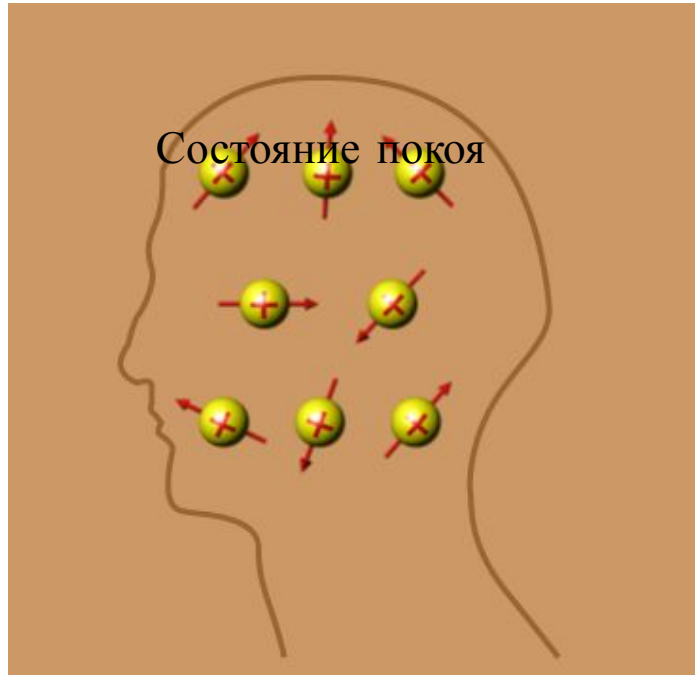
- Является одним из современных методов диагностики, позволяющим неинвазивно получать изображения внутренних структур тела человека.
- Важнейшим преимуществом МРТ по сравнению с другими методами лучевой диагностики является отсутствие ионизирующего излучения и, как следствие, эффектов канцеро- и мутагенеза, 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 исследования *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

