

# 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.

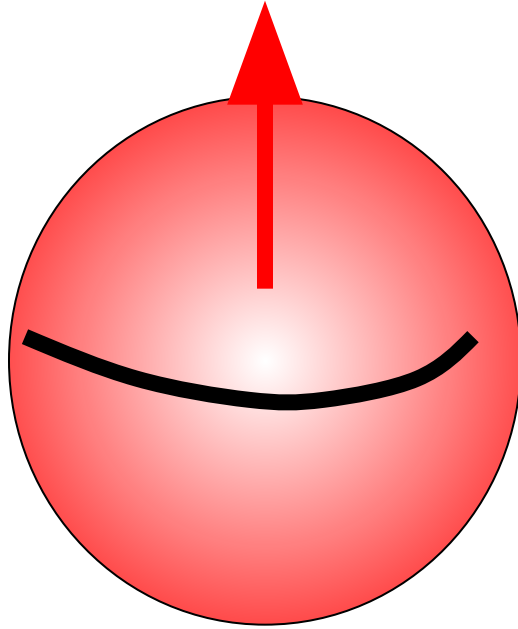
# ЯМР среди других физических методов исследования:

- 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

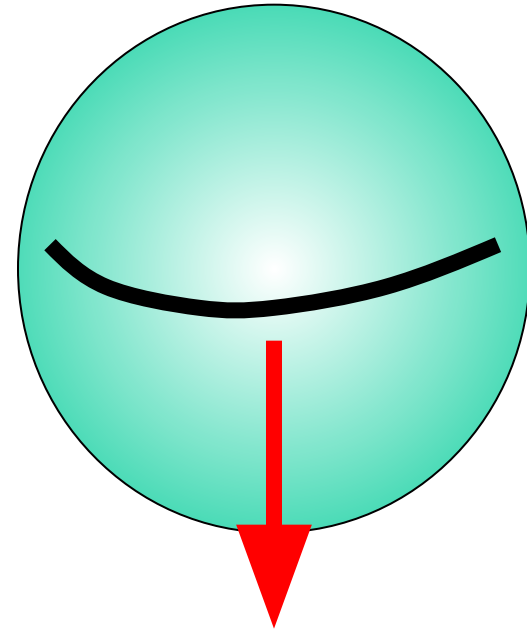
# Важнейшие области применения спектроскопии ЯМР

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**



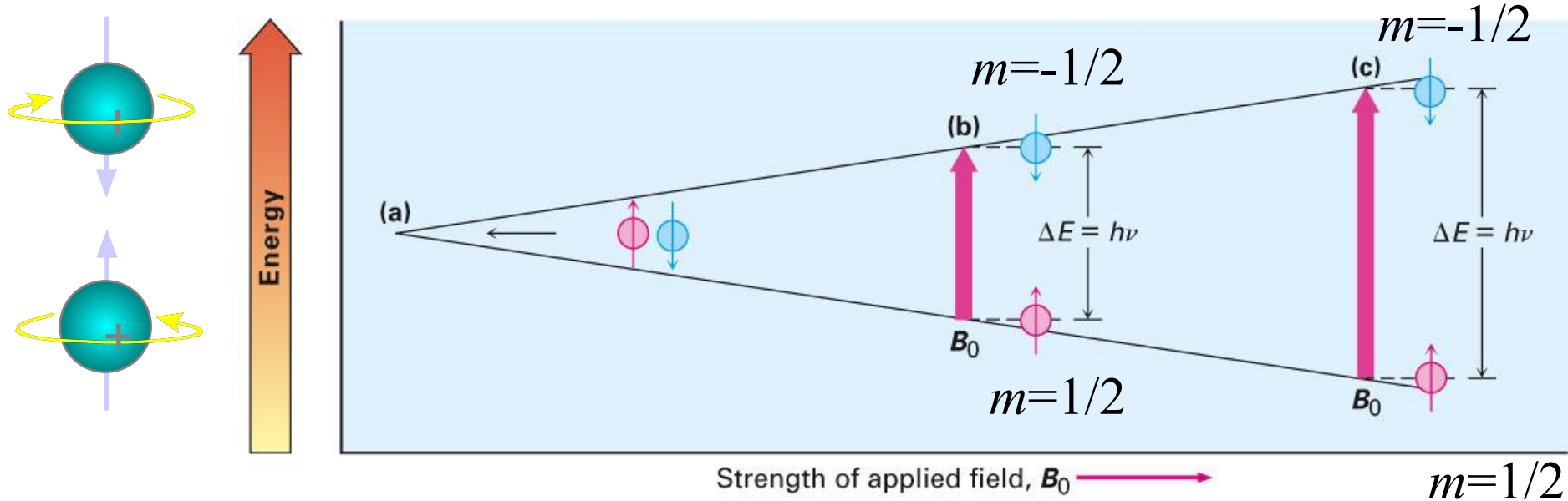
**Spin down**

- 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  $I = 1/2$   
 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{119}\text{Sn}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{199}\text{Hg}$ ...

# 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  $\Delta E$ , 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  
 $\gamma$  – гиромагнитное отношение

# Свойства некоторых важных ядер в ЯМР-спектроскопии

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

## Разница заселенностей уровней

с  $m_1 = +1/2$  ( $\alpha$ ) и  $m_2 = -1/2$  ( $\beta$ )

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

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

Из 2 000 010 ядер:

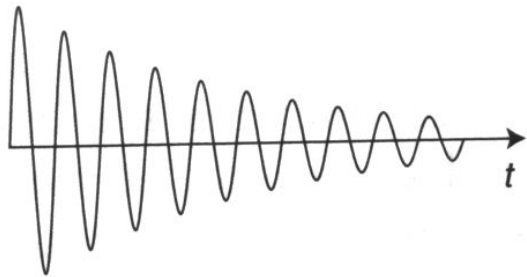
1 000 000 с  $m_2 = -1/2$  ( $\beta$ ) и

1 000 010 с  $m_1 = 1/2$  ( $\alpha$ ),

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

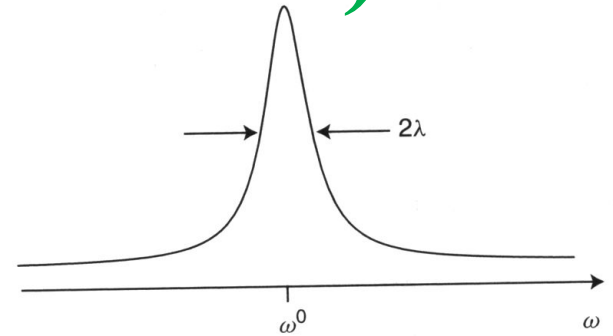


# Наблюдение сигнала магнитного резонанса (Фурье-преобразование)



ЯМР-сигнал показывает зависимость интенсивности поглощения от времени

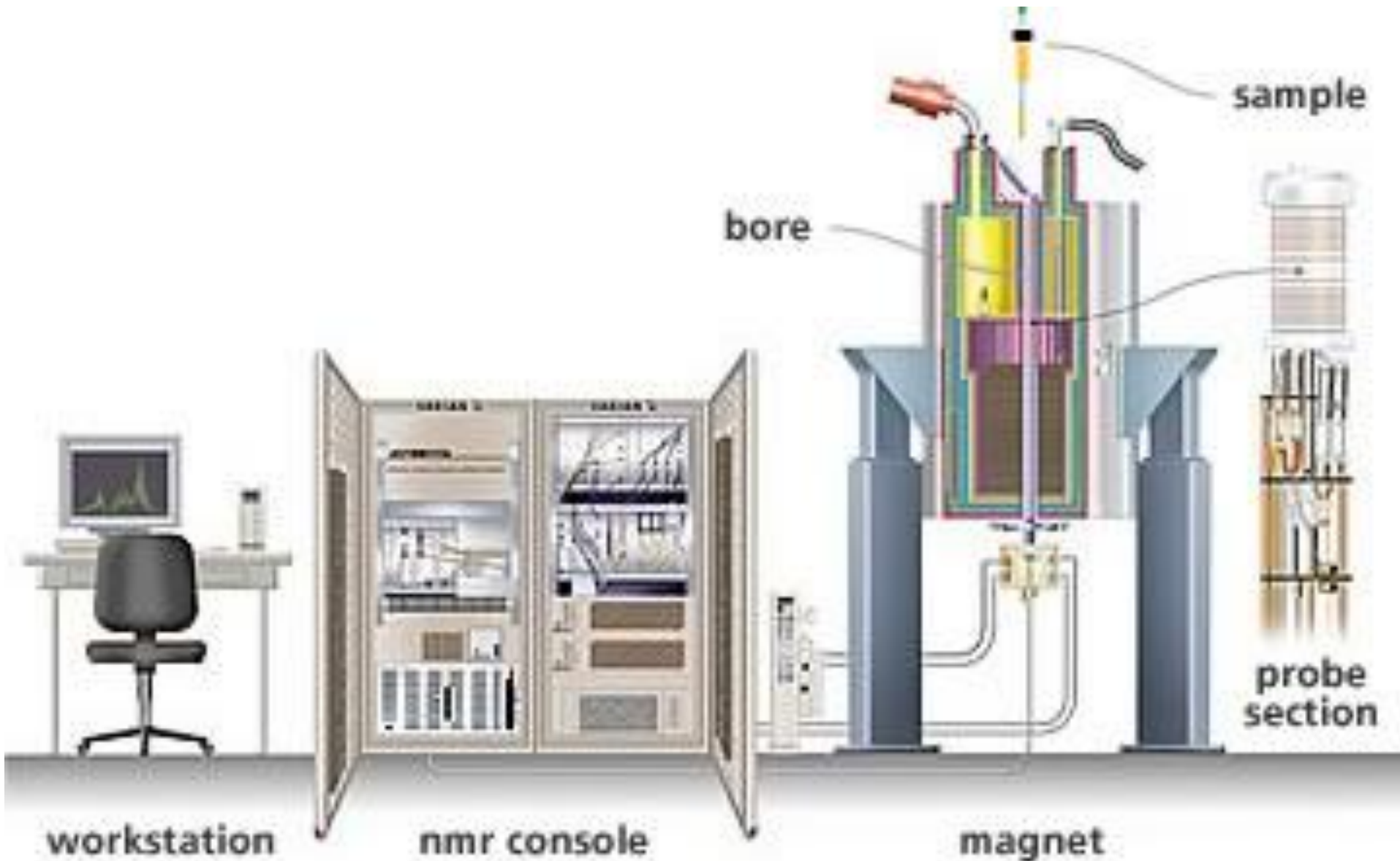
Фурье-преобразование



После преобразования показывает зависимость поглощения от резонансной частоты

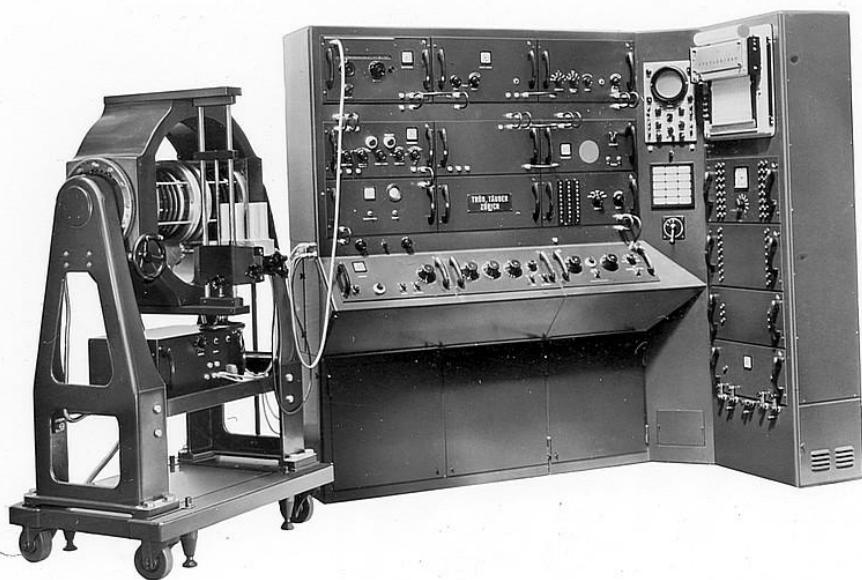
Резонансная частота (Ламорова частота)  $\omega = -\gamma V$

# Схема спектрометра ЯМР



# С чего всё началось?

## Сканирующая ЯМР-спектроскопия



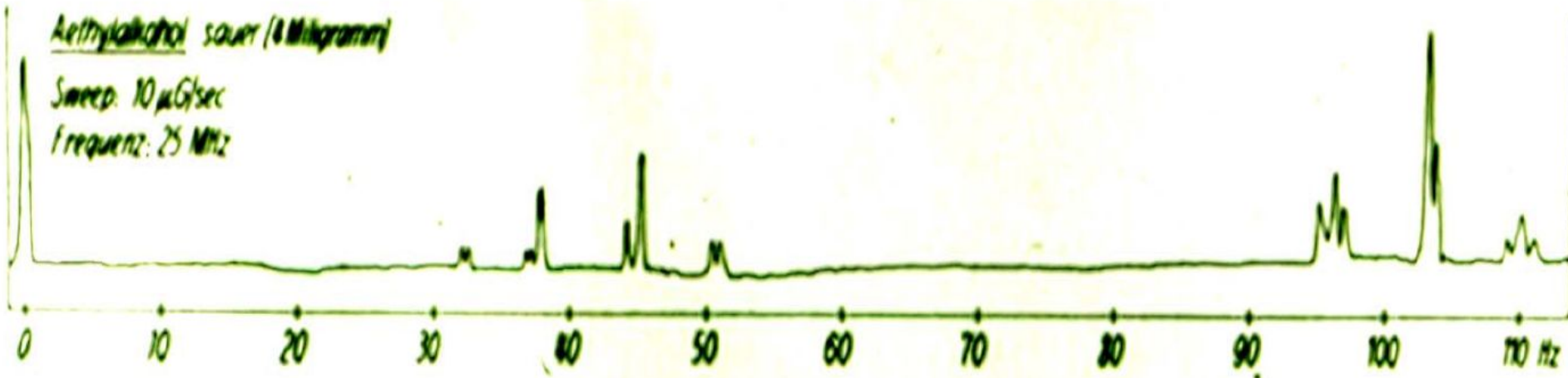
Одни из первых спектрометров ЯМР  
фирмы Bruker



Современный спектрометр ЯМР на  
электромагните

# ЯМР в 1960-х

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

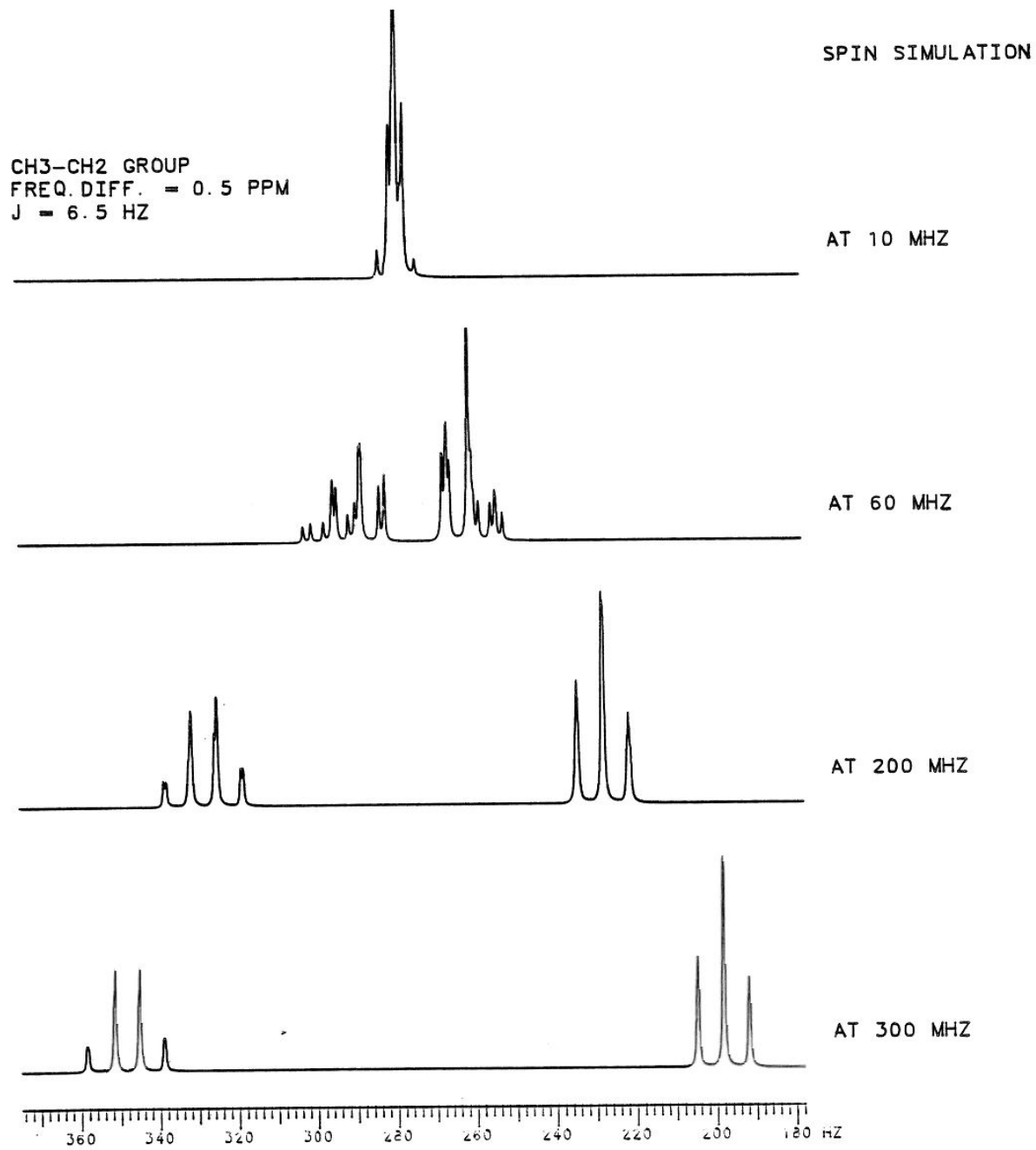


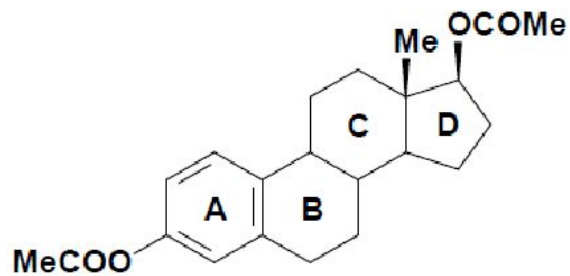
**СНИМАЮТ ДЕВОЧЕК НА  
ПАНЕЛИ,**



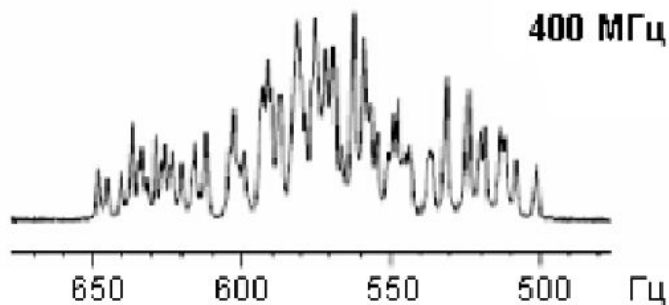
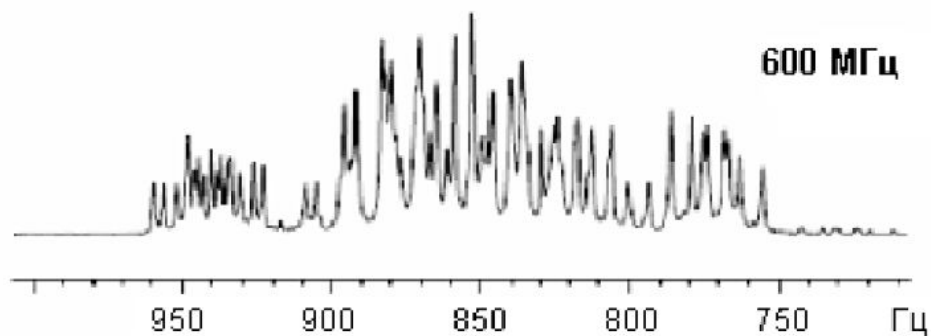
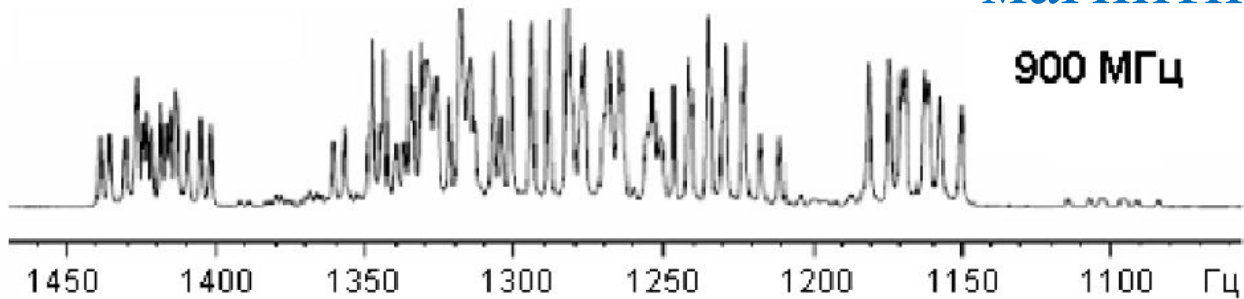
**А СПЕКТРЫ ЗАПИСЫВАЮТ!**

# 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





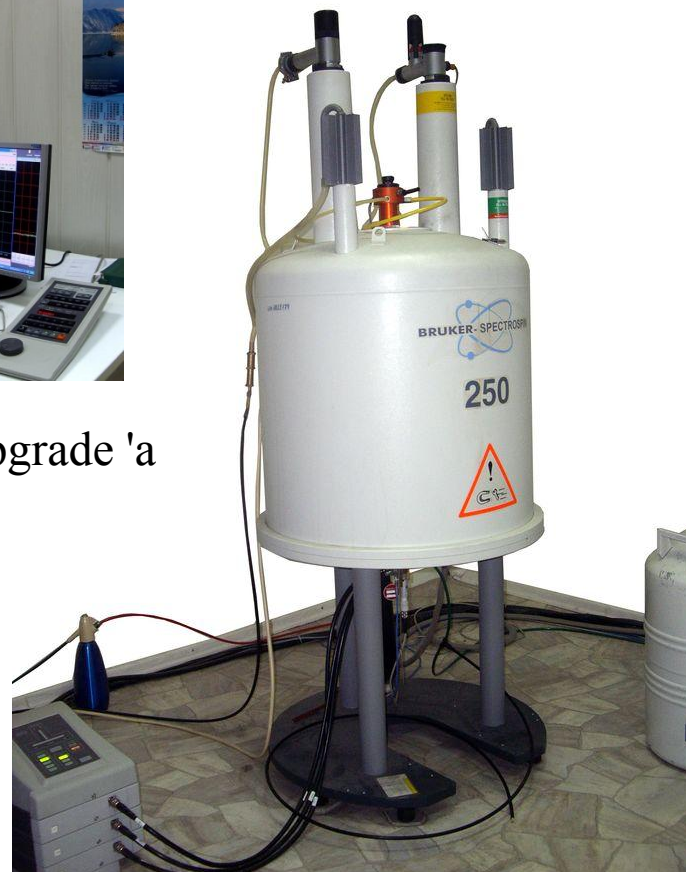
# Самые мощные ЯМР спектрометры = 1.2 ГГц

- 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  $1 \text{ см}^3$ , поддерживается чрезвычайно однородное магнитное поле на 99,99999999%.
- Вместо низкотемпературных суперпроводников (типа  $\text{Nb}_3\text{Sn}$ )

# Современные приборы. Средний класс.



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



# Современные приборы. Средний класс.

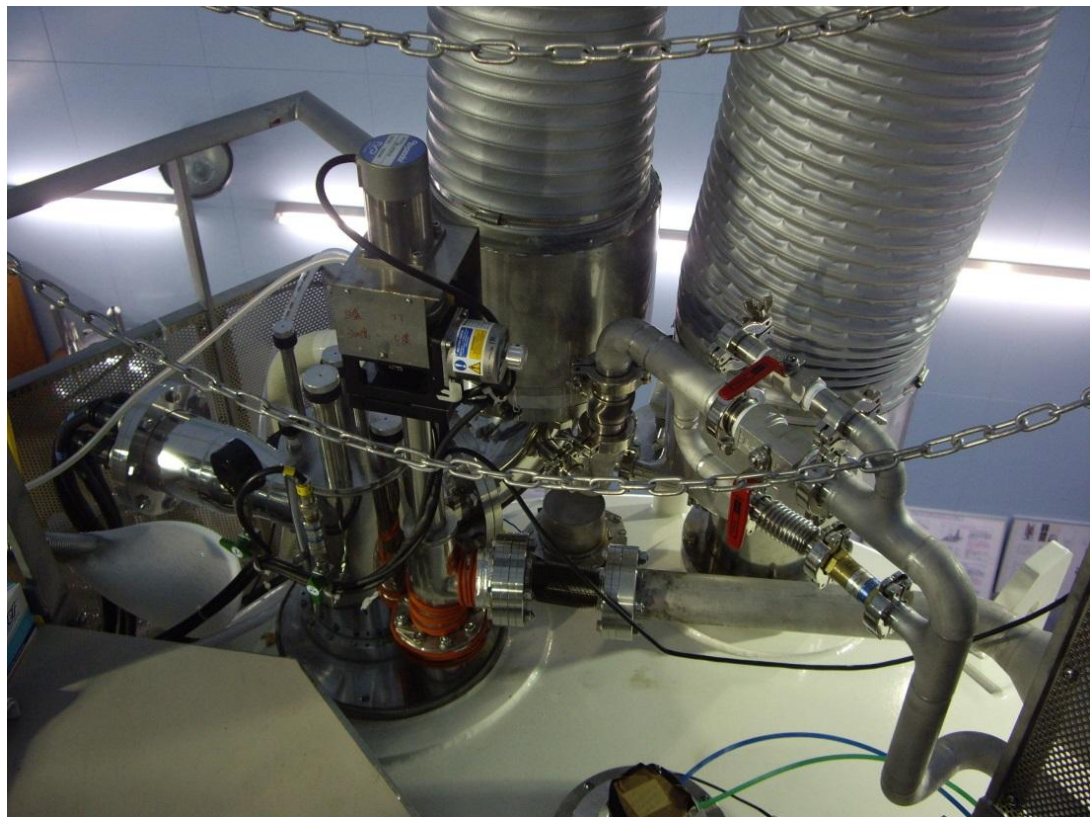


Фурье–ЯМР-спектрометр Bruker Avance III 500



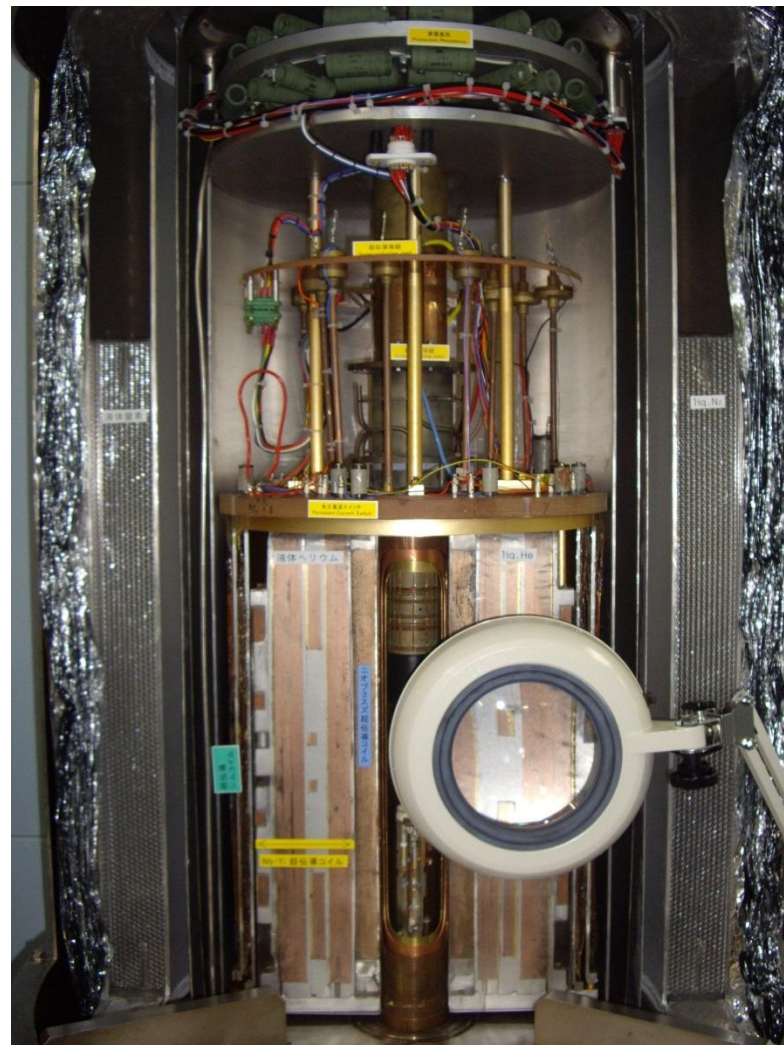
# Устройство ЯМР-спектрометра

Магнит

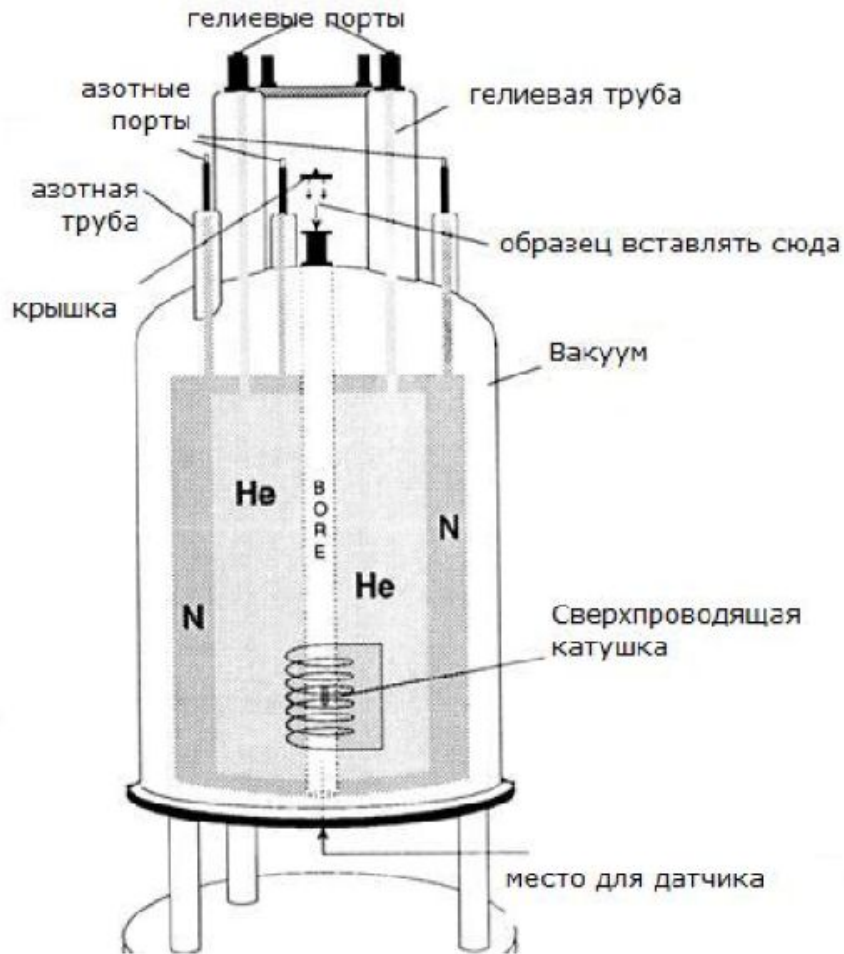


# Устройство спектрометра

Магнит



# На что похож магнит ?



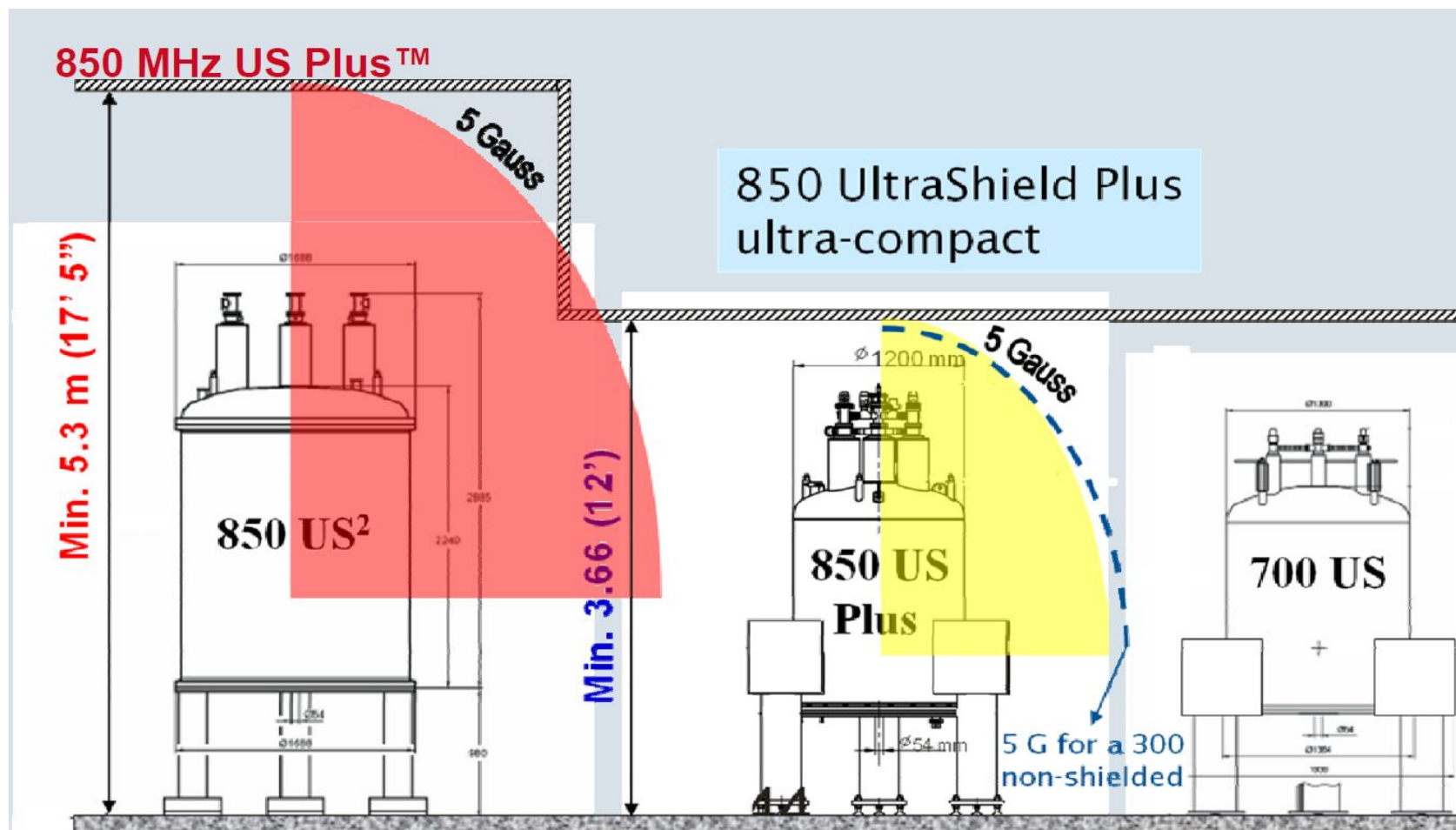
Очень давно в ЯМР использовались большие тяжелые электромагниты, а в виде спектра регистрировалось поглощение РЧ-мощности в зависимости от развертки поля.

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  $4.2\text{ K}$ .



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

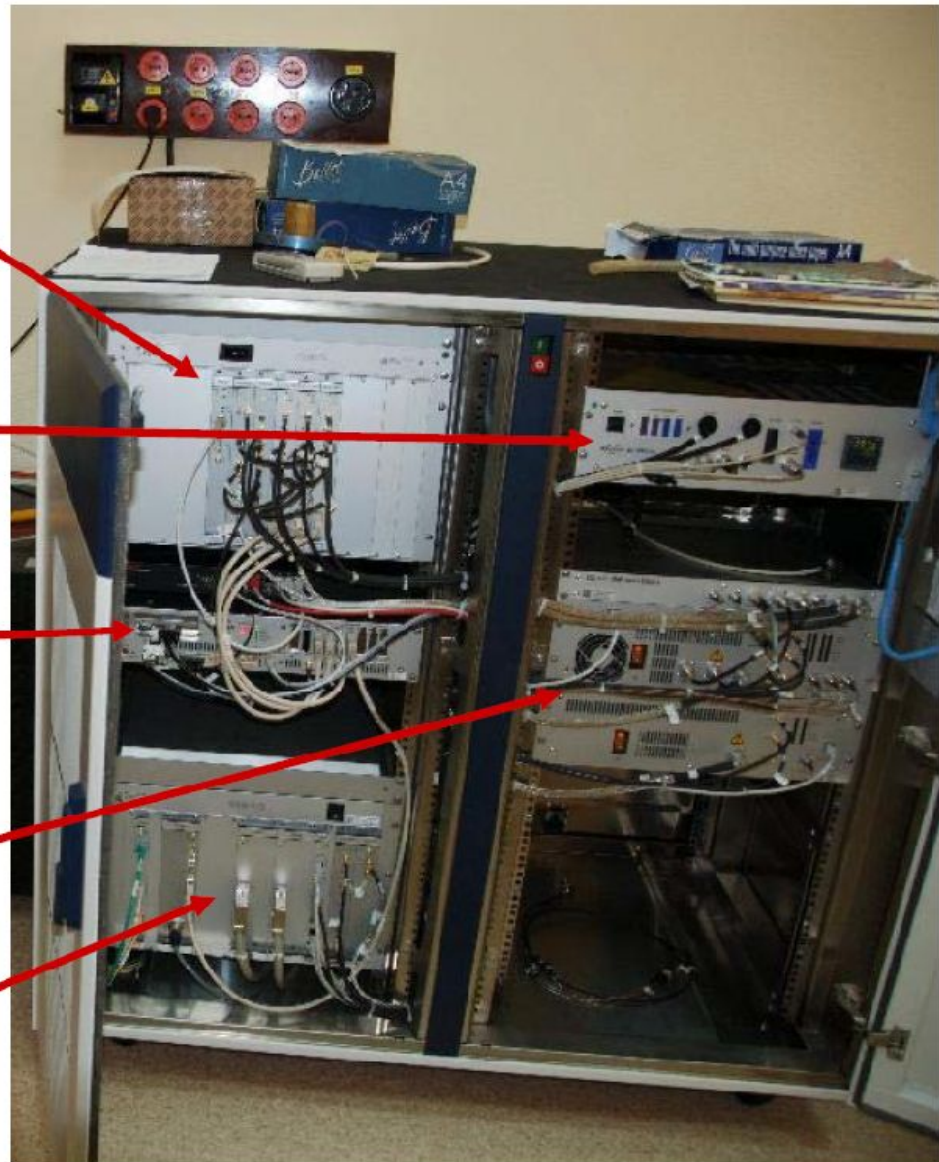
генераторы частоты  
и приемник

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

# Когда НЕ снимаем?

- *Когда не растворяется* ни в одном из растворителей, используемом в ЯМР.
- *Когда мало вещества:*
  - Для  $^1\text{H}$  спектров: до 0.1 мг
  - Для  $^{13}\text{C}$  спектров: до 5-10 мг («видно глазом»)
  - Для  $^{15}\text{N}$  спектров (только  $^{15}\text{N}$ -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

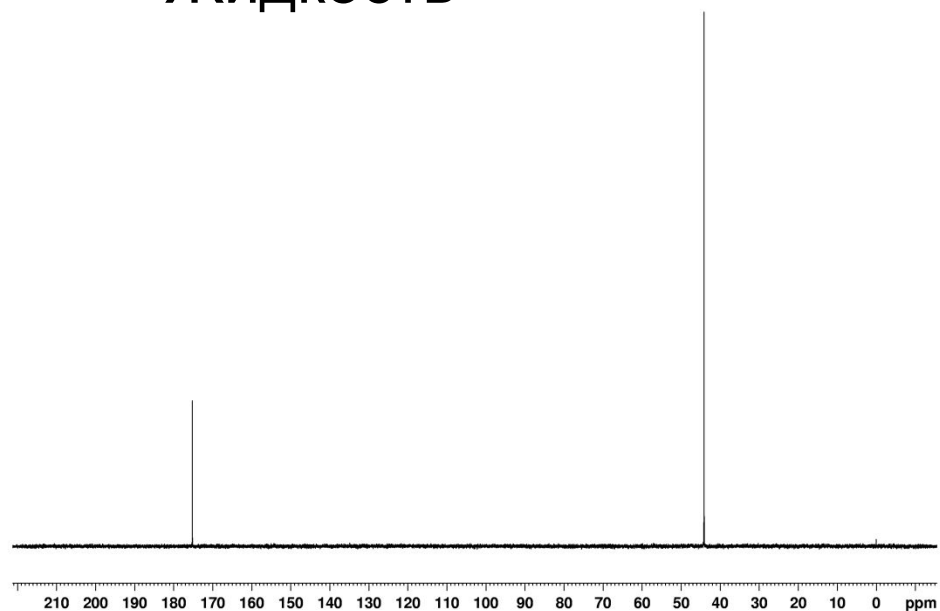
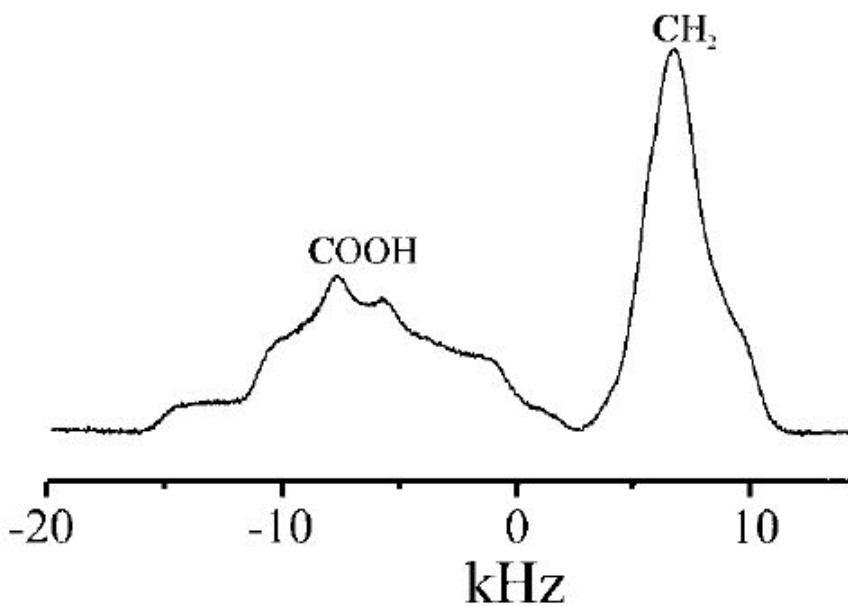
Растворитель	Т. кип. °С	Т. пл., °С	Цена* руб/г
Хлороформ-d	61,7	-114,5	11
Окись дейтерия (D <sub>2</sub> O)	101,42	-1,8	18
Диметилсульфоксид-d <sub>6</sub>	189	11,8	40
Ацетон-d <sub>6</sub>	56,2	-95,4	48
Ацетонитрил-d <sub>3</sub>	81,6	-45,7	80
Бензол-d <sub>6</sub>	80,1	5,5	82
Метанол-d <sub>4</sub>	64,5	-126,6	157
Хлористый метилен- d <sub>2</sub>	40	-95,1	210
Диметилформаамид-d <sub>7</sub>	152	-35	322
Циклогексан-d <sub>12</sub>	80,7		443
Тетрагидрофуран-d <sub>8</sub>	67	-1	600

\* Цены 2010 года, сейчас всё намного дороже

# Проблема ЯМР твёрдых тел

Порошок

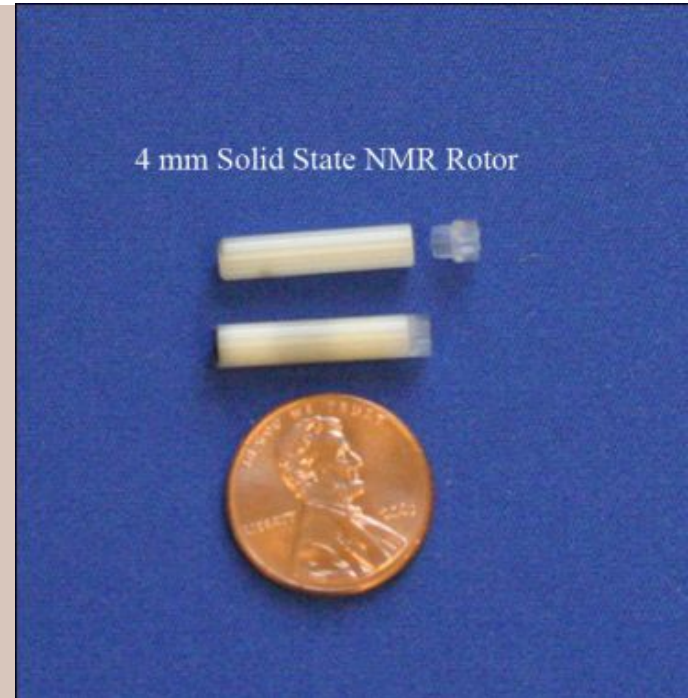
Жидкость

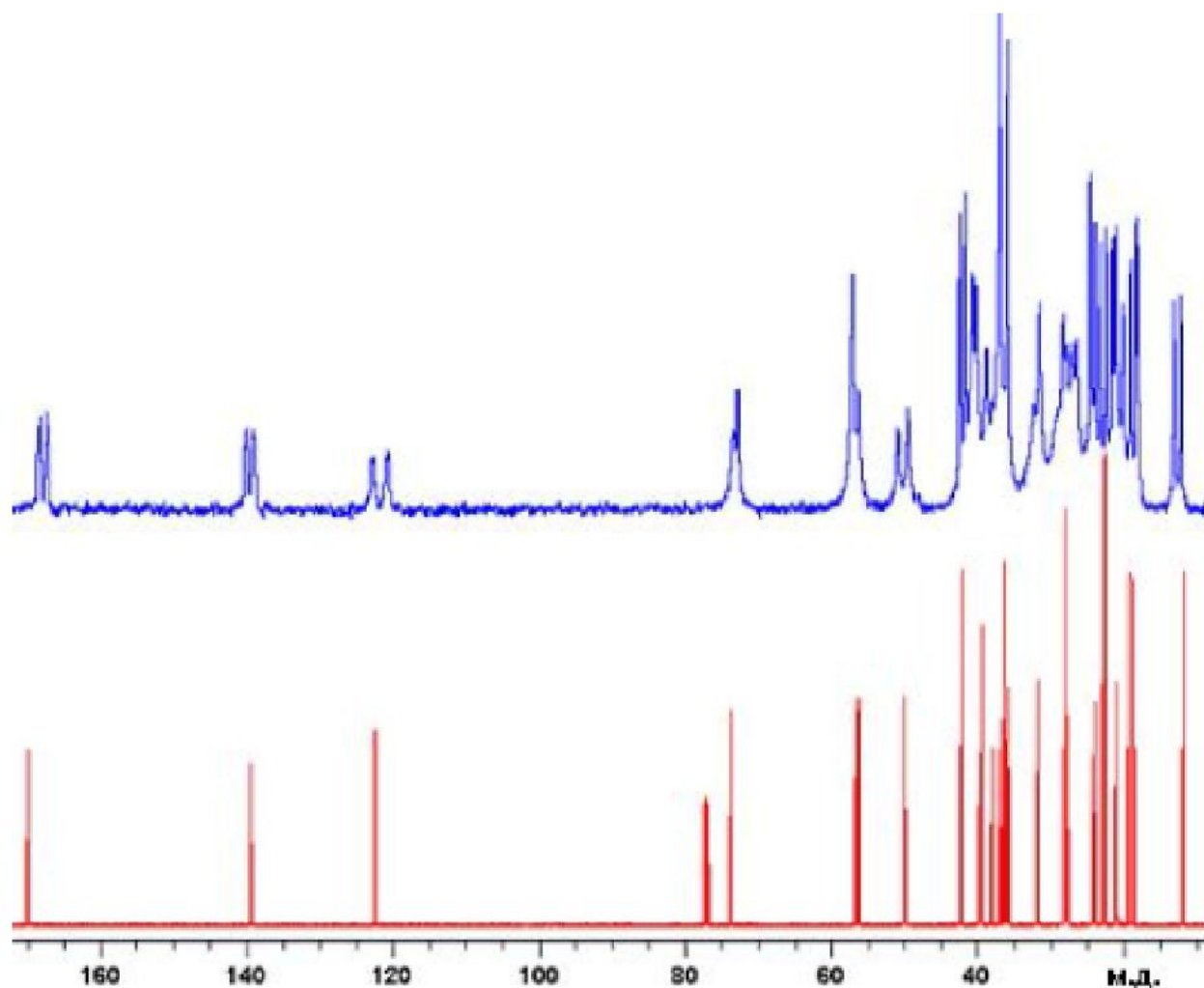
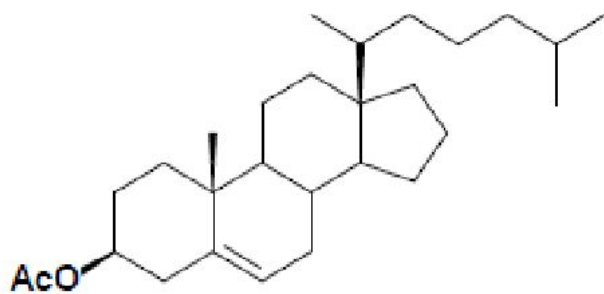


# Регистрация ЯМР твёрдых тел (MAS NMR)

- 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

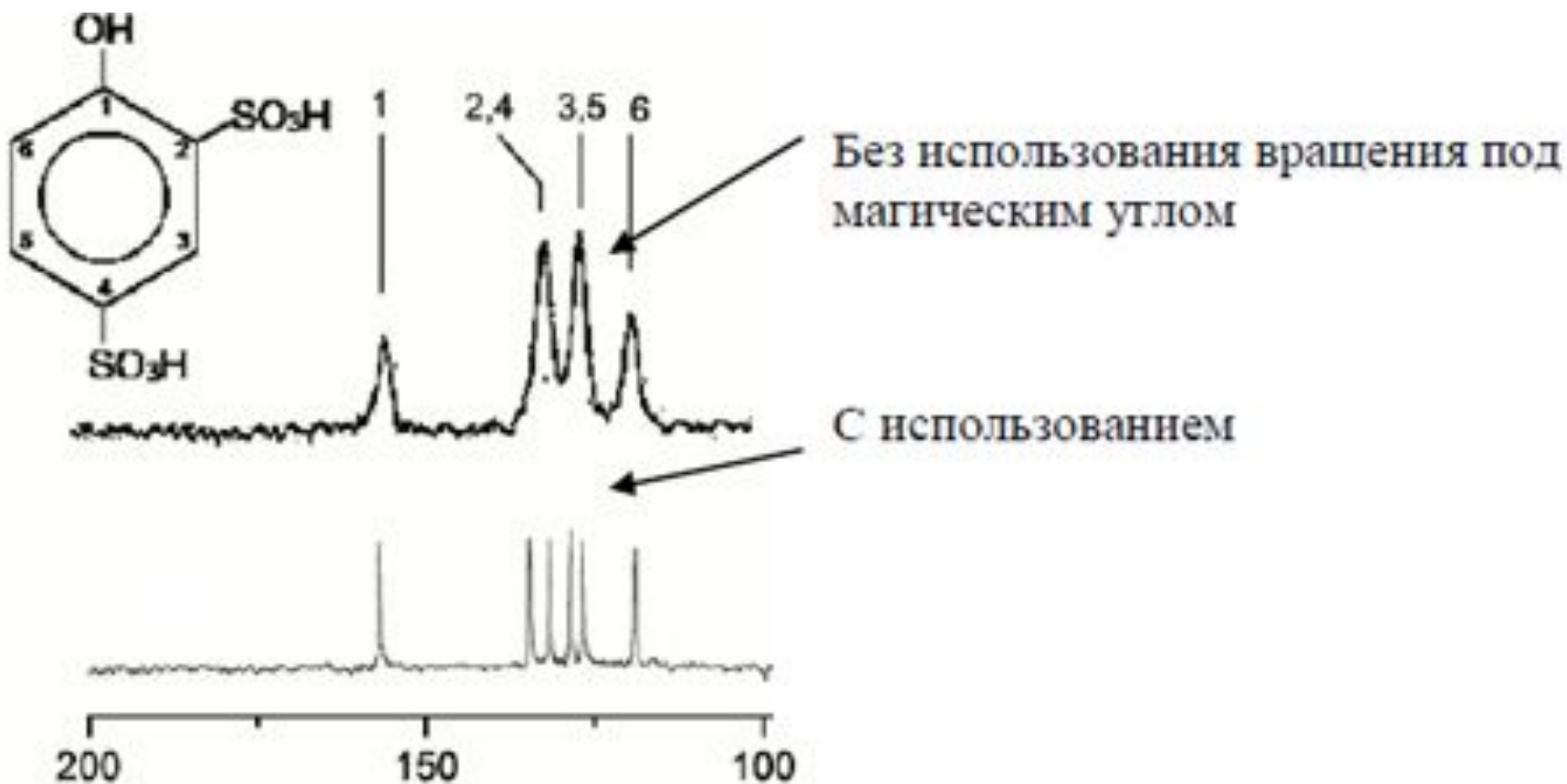
магическим углом с  
частотой 15 кГц.

Ширина линий –

15 Гц. Внизу –  
спектр того же

вещества в растворе  
 $\text{CDCl}_3$ .

# 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)

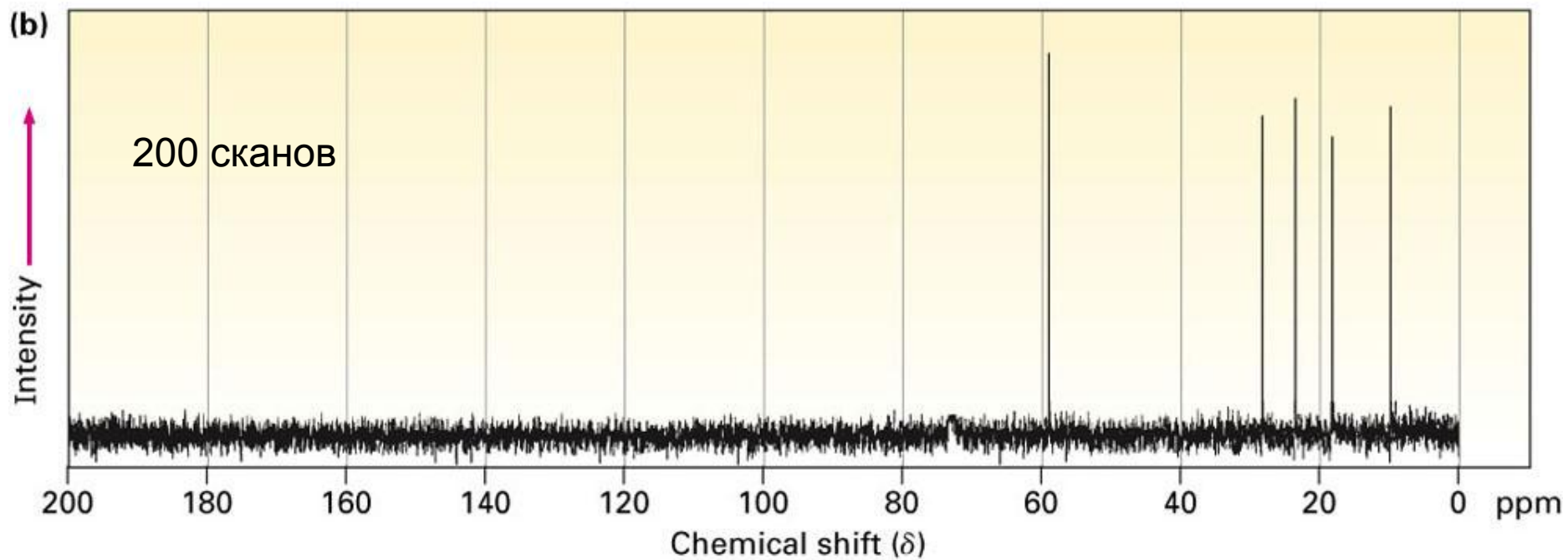
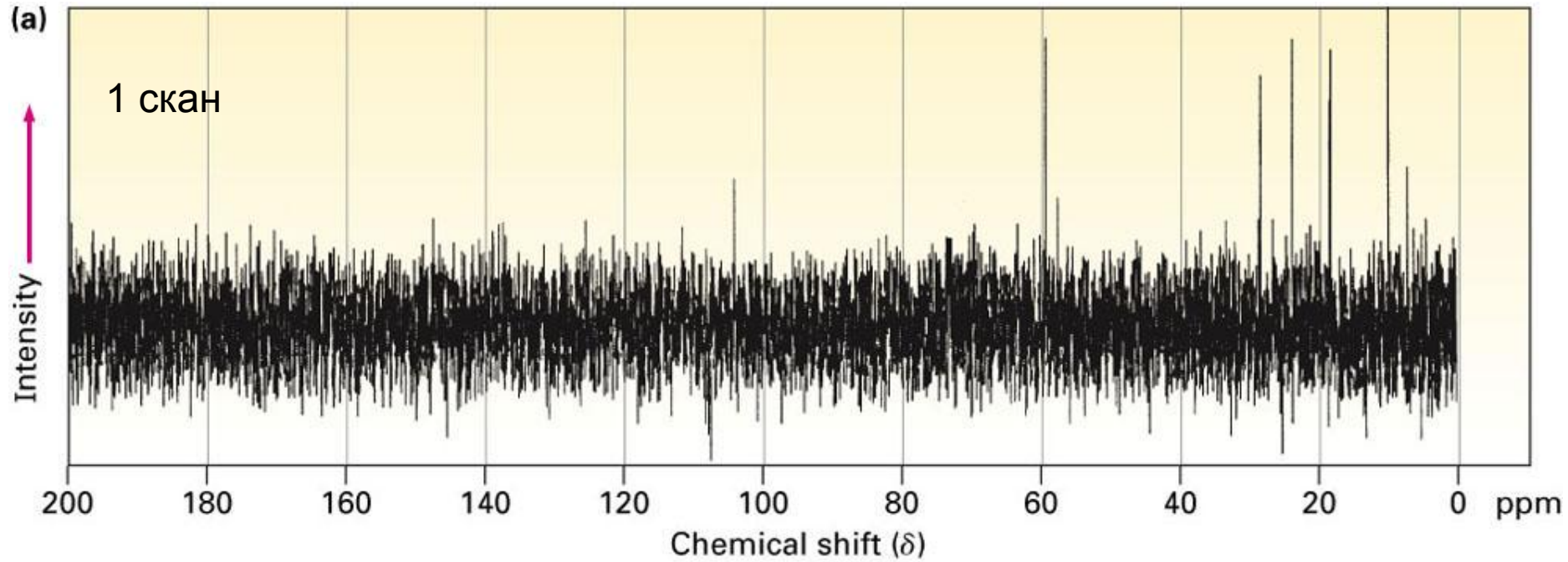
$\gamma_{\text{ex}}$  – гиромагнитное отношение возбуждённых спинов

$\gamma_{\text{det}}$  – гиромагнитное отношение детектируемых спинов

$B_0$  – напряжённость постоянного магнитного поля

$NS$  – количество сканов

$T_2$  – время поперечной релаксации





# Измеряемые параметры ЯМР

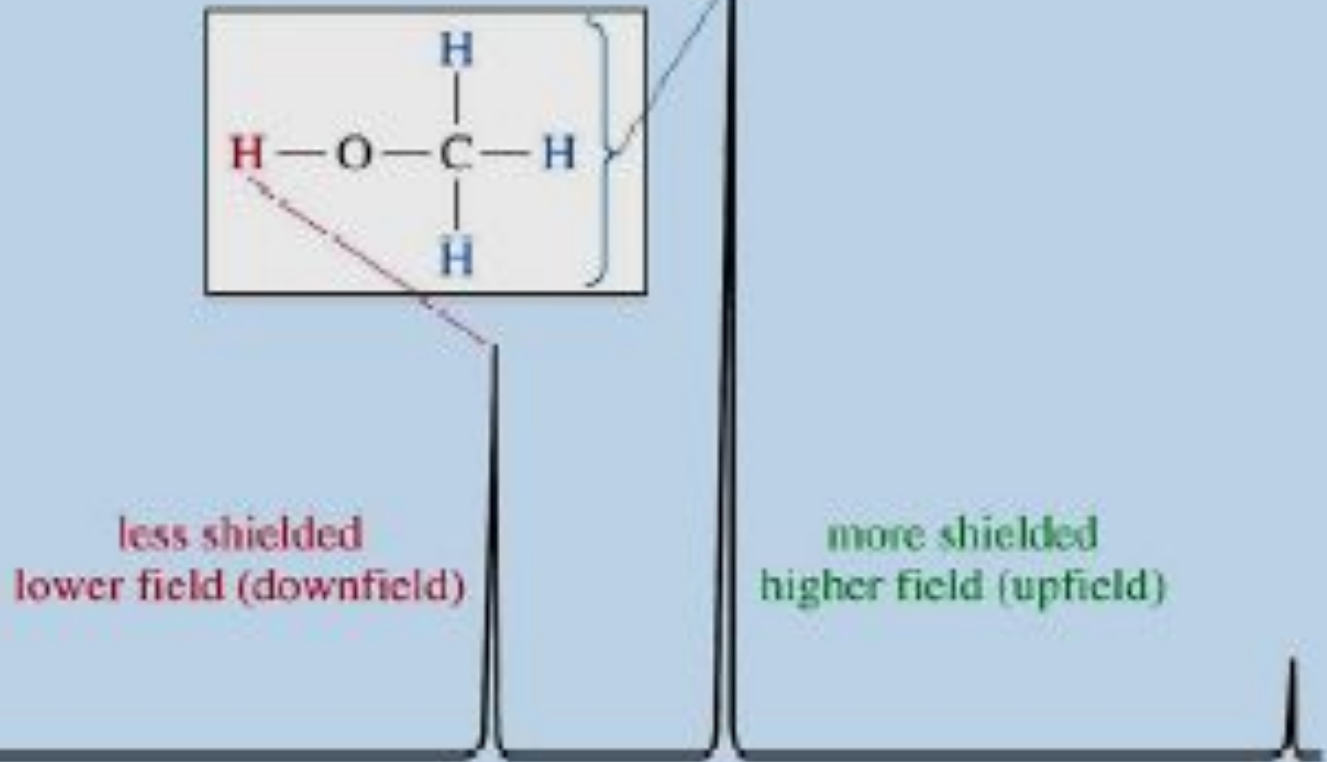
## Наблюдаемые параметры

## 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 ( $^2hJ$ и $^3hJ$ ) |
| 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.

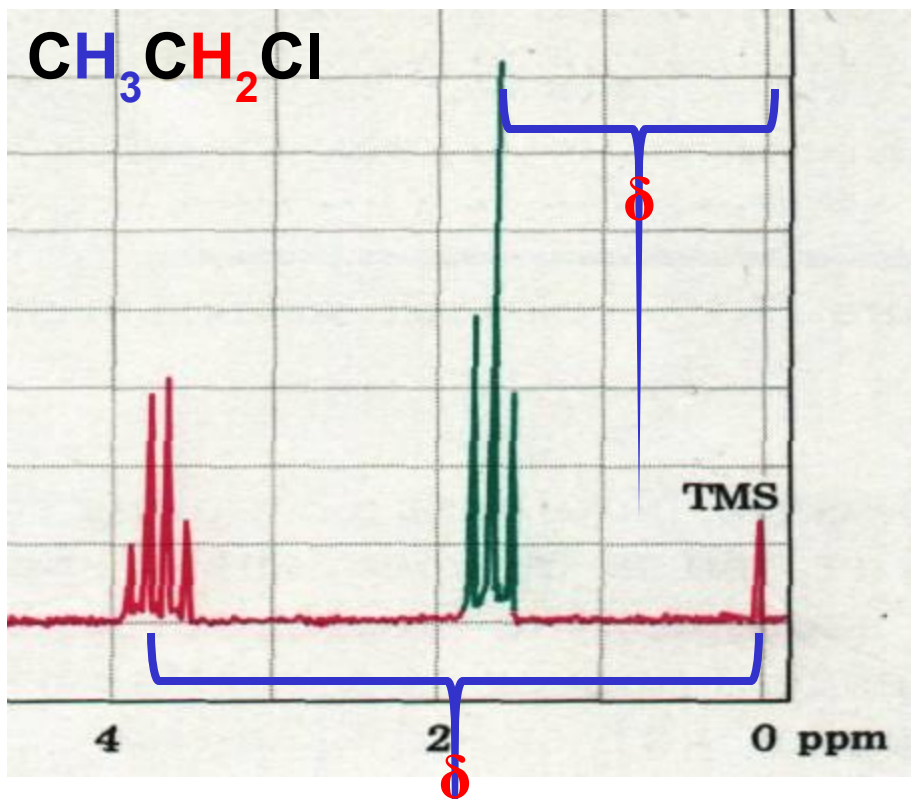


increasing magnetic field strength ( $B_0$ ) →

# 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:

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

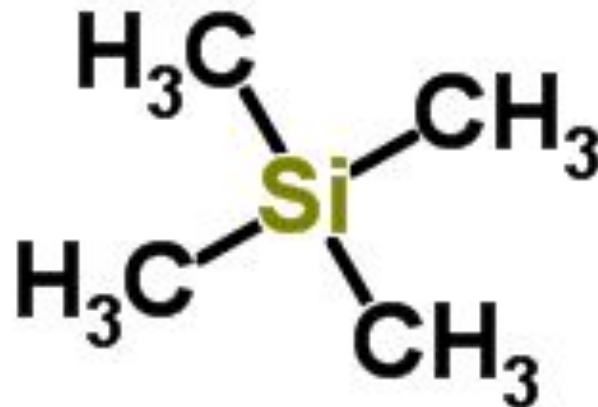
# Стандарт для сравнения химических сдвигов

## **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  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  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)  $\delta$** , 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



# $\delta$ - шкала хим. сдвигов

- В ЯМР-спектроскопии распространена так называемая  $\delta$  - 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

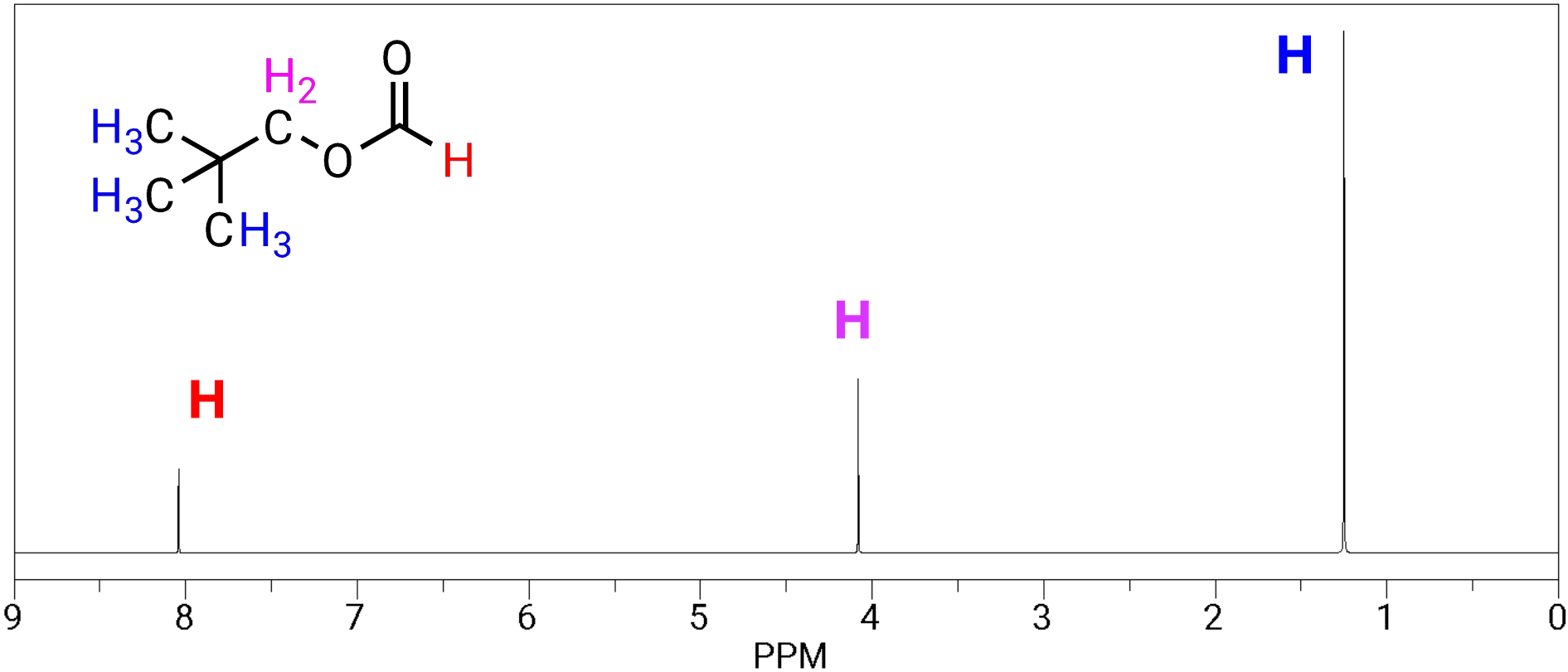




# Химические сдвиги $^1\text{H}$

- 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  $\text{CH}$  6–7 м.д.
- Амиды  $\text{NH},\text{NH}_2$  6–11 м.д.

# Эффекты экранирования в ЯМР



**H** – альдегидный протон. Очень сильно дезэкранирован.

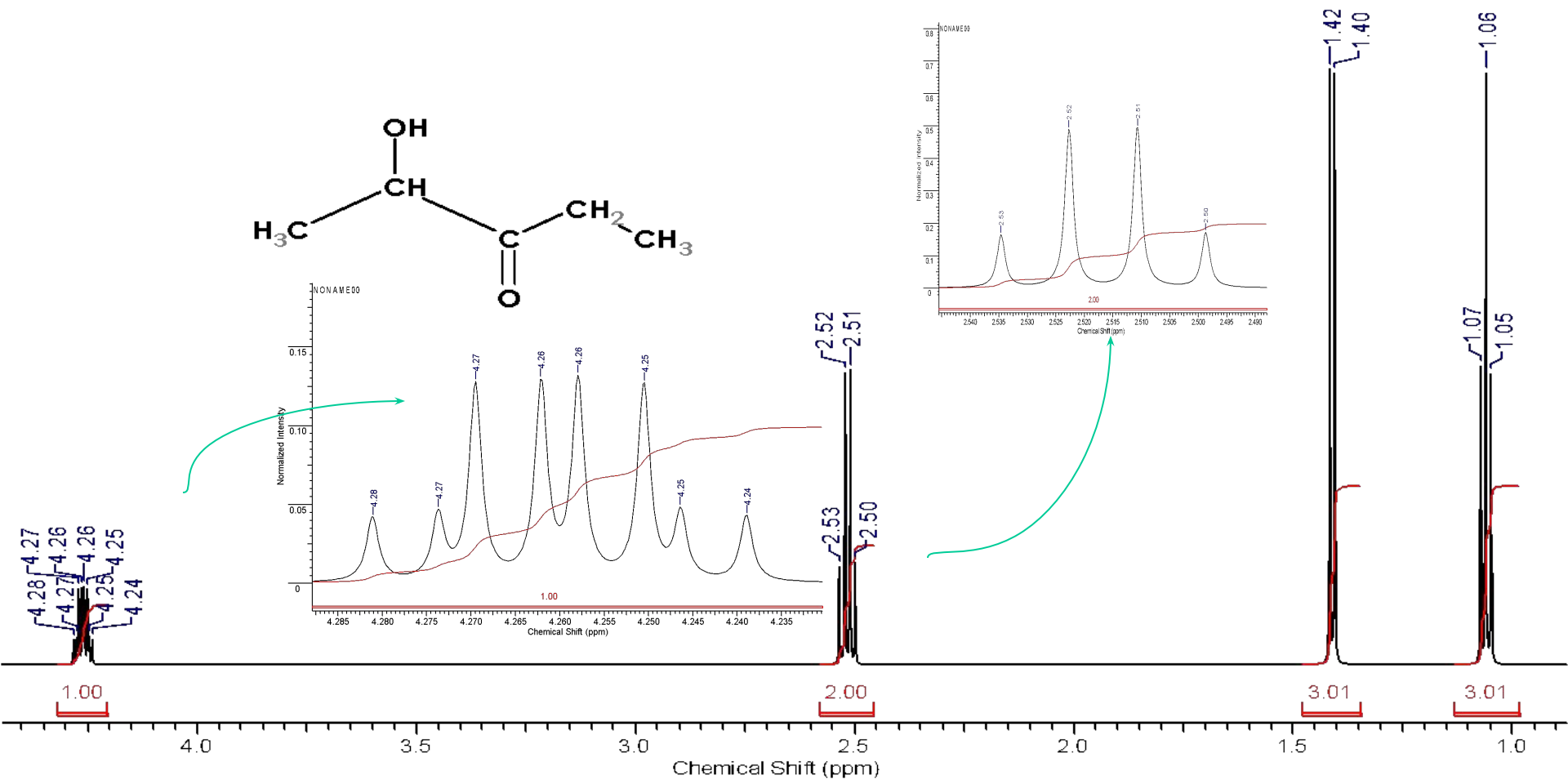
**H<sub>2</sub>** – протон, связанный с кислородом, являющимся электроакцептором, дезэкранирующим протон.

**H<sub>3</sub>** – протон, связанный с углеродом, который связан с другим углеродом одинарной связью. Дезэкранирование практически отсутствует.

# Спектры $^1\text{H}$ ЯМР с КССВ

## Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

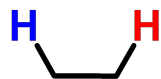
- В спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР сигналы протонов часто представляют набор компонентов (линий). Это вызвано спин-спиновым взаимодействием ядер магнитно-неэквивалентных протонов.



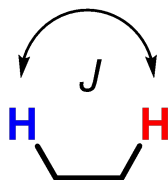
# Спектры $^1\text{H}$ ЯМР с КССВ

## Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

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

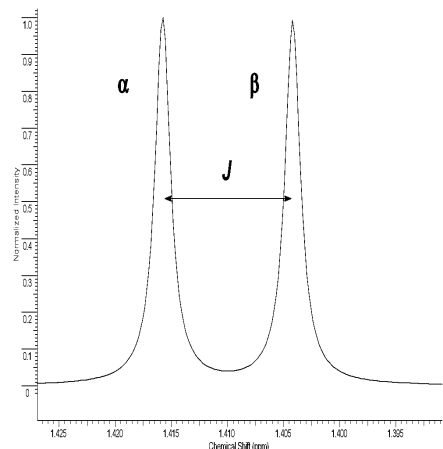
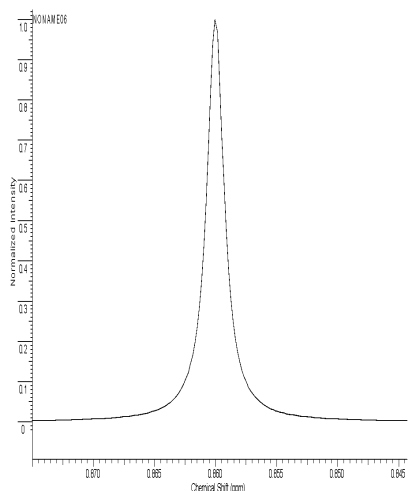


нет Спинового взаимодействия

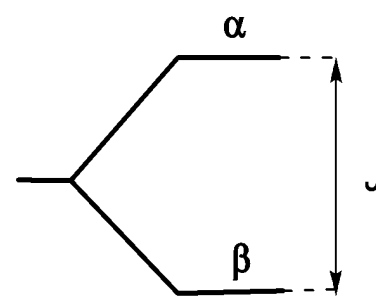


есть Спиновое взаимодействие

расщепление энергетического уровня протона  $\text{H}$  в поле ядра  $\text{H}$



$H_0$



$\text{H}$   $\uparrow$  возможная ориентация спина ядра  $\text{H}$  в магнитном поле  $H_0$   
 $\text{H}$   $\downarrow$

нет соседа    есть один сосед

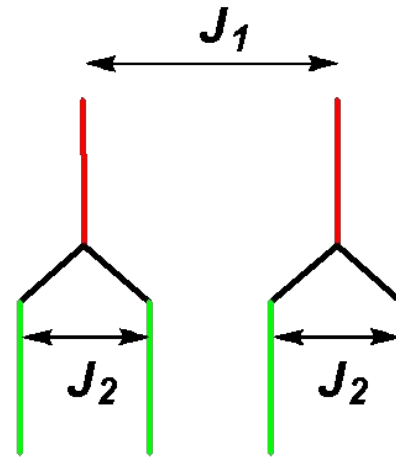
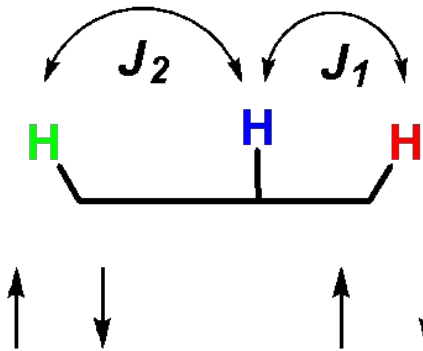
- На магнитное экранирование каждого протона оказывает влияние спин соседнего протона, который может быть различен и поэтому даёт два различающихся поля: одно увеличенное, другое – уменьшенное. С удалением ядер друг от друга эффект резко падает.

# Спектры $^1\text{H}$ ЯМР с КССВ

## Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)

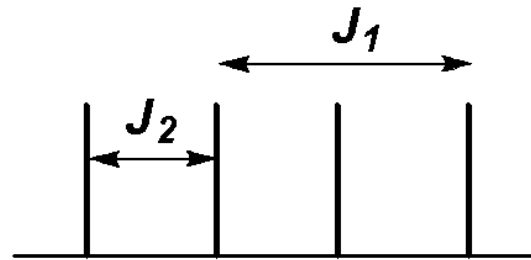
Расщепление сигнала протона **H** в присутствии двух неэквивалентных соседей **H** и **H**

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  $J_2$

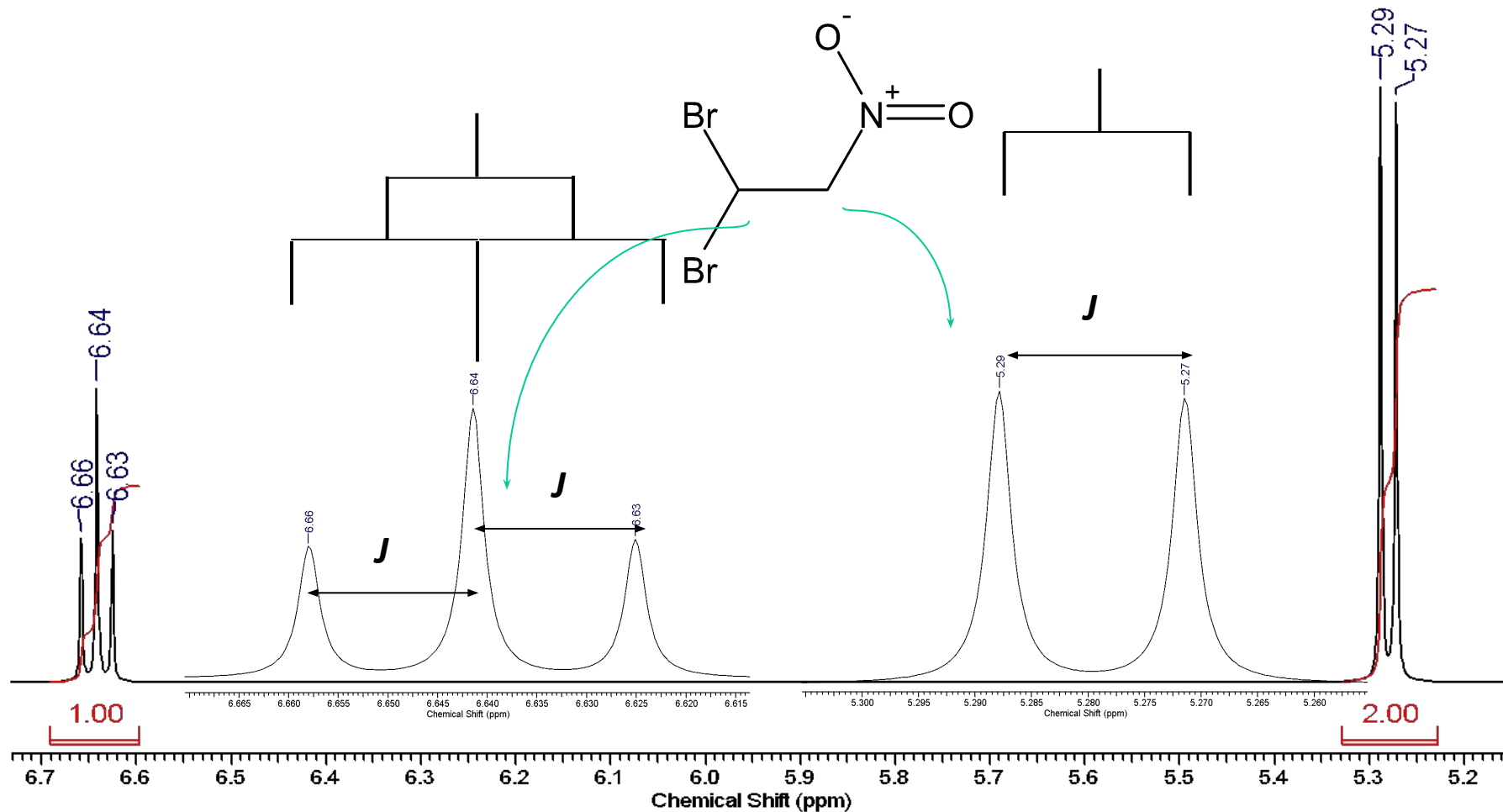


вид мультиплета протона **H** в спектре (дублет-дублетов)

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

# Спектры $^1\text{H}$ ЯМР с КССВ

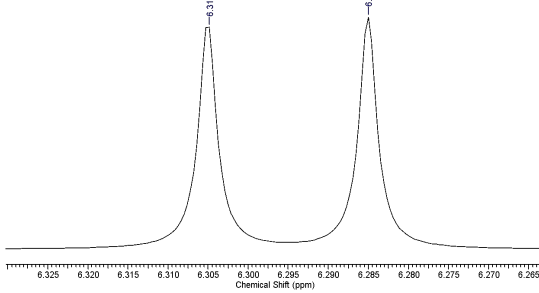
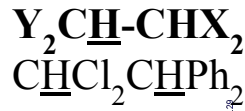
## Вид простых мультиплетов в спектрах $^1\text{H}$ ЯМР

- 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.

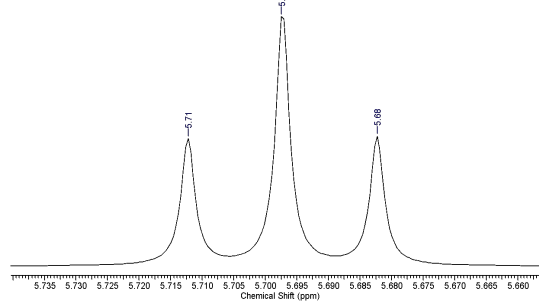
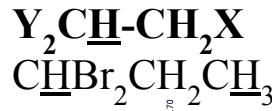
три

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

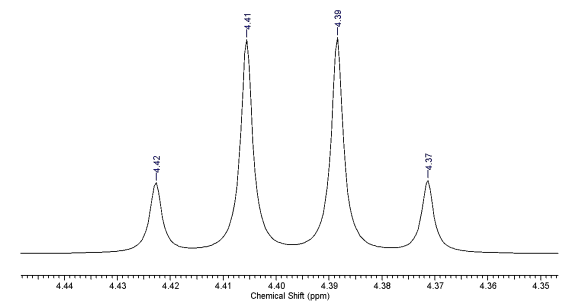
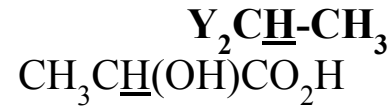
Дублет (один сосед)



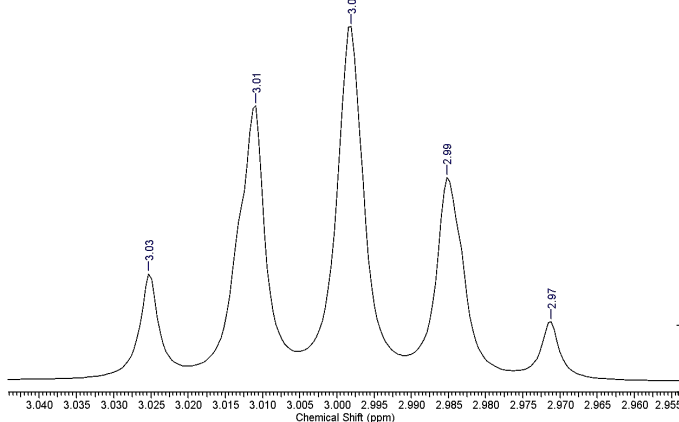
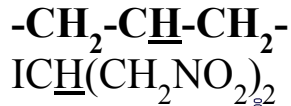
Триплет (два соседа)



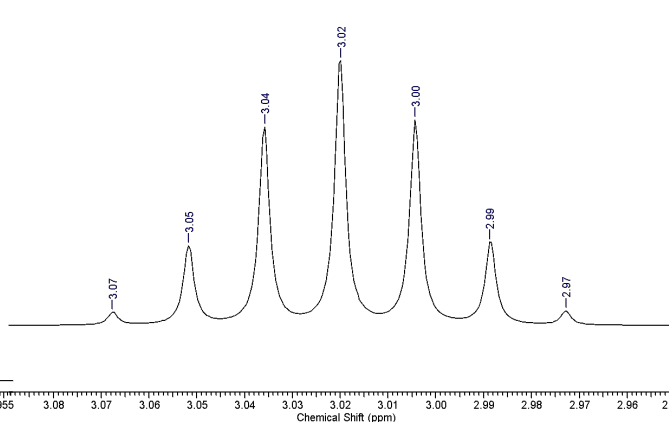
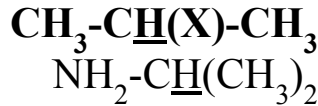
Квартет (три соседа)



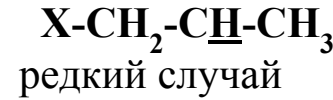
Пентет, квинтет (четыре соседа)



Септет (шесть соседей)



Секстет (пять соседей)



Нонет (восемь соседей) – не встречается.

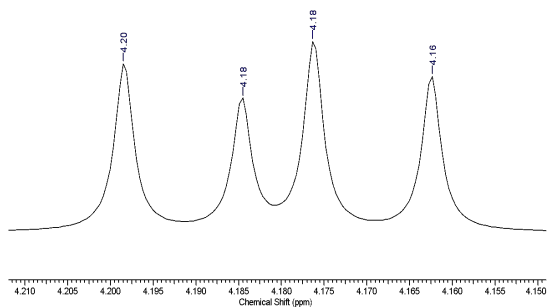
Децент наблюдается лишь в *трет-бутане*.

# Спектры $^1\text{H}$ ЯМР с КССВ

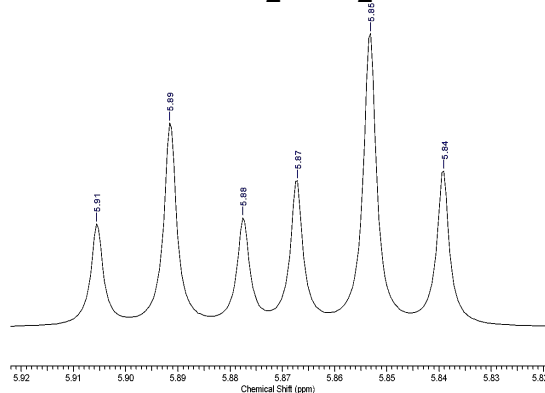
## Вид простых мультиплетов в спектрах $^1\text{H}$ ЯМР

Если соседние протоны магнитно неэквивалентны, то мультиплеты усложняются.

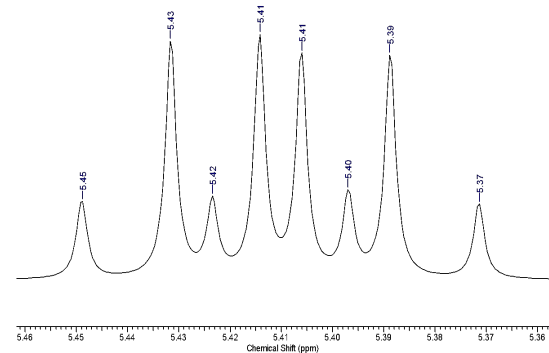
Дублет-дублетов  
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CHY}-$   
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{Z})-\text{CHY}-$



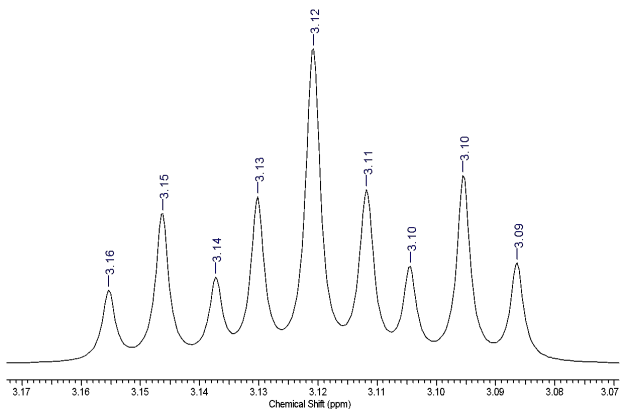
Дублет-триплетов  
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2\text{Y}-$



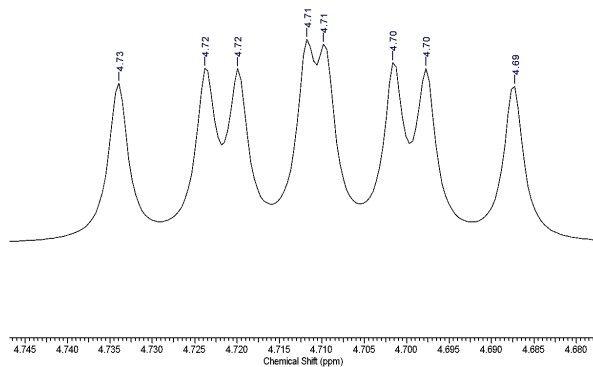
Дублет-квартетов  
 $-\text{XCH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$



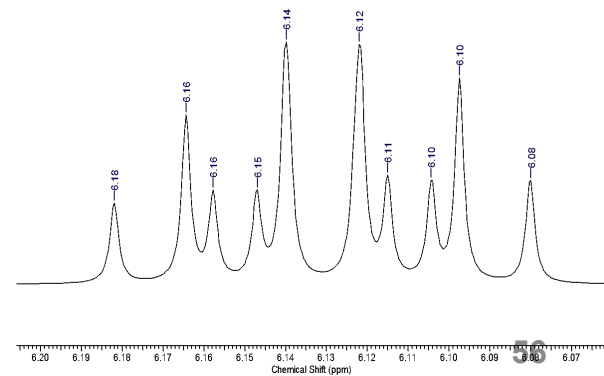
Триплет-триплетов  
 $\text{XCH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2\text{Y}$



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



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

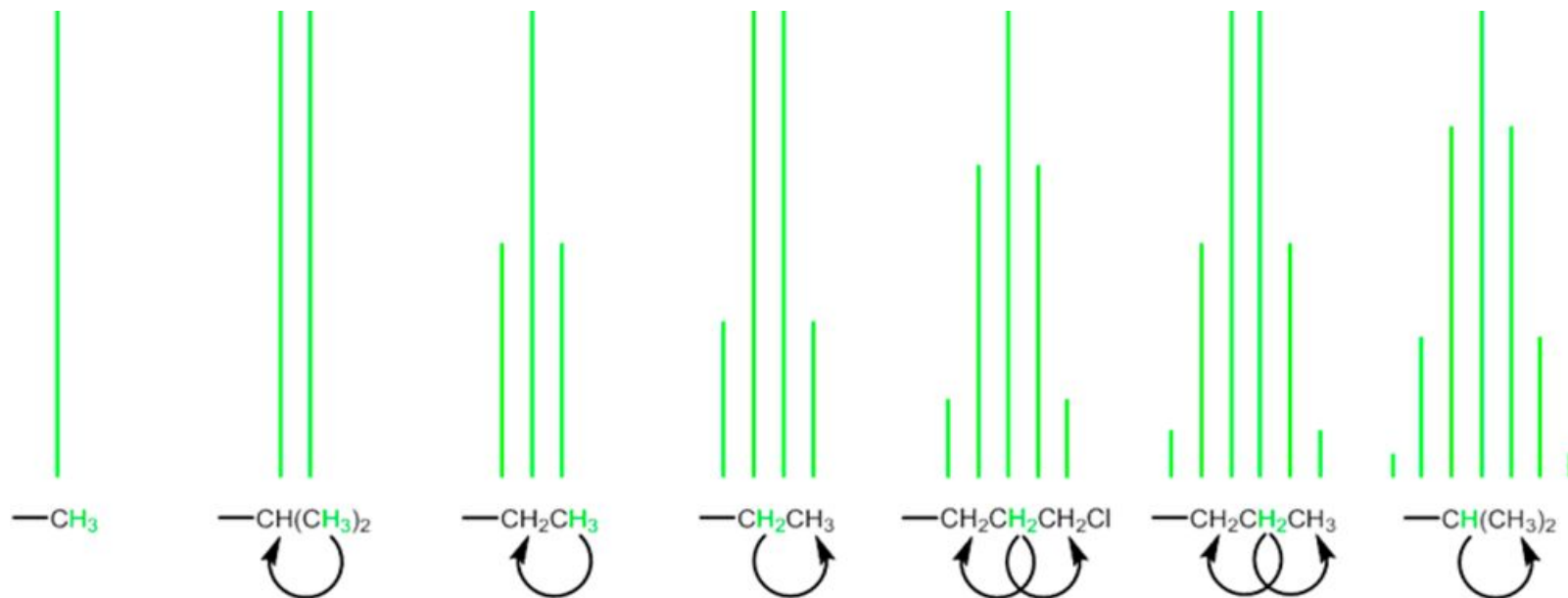




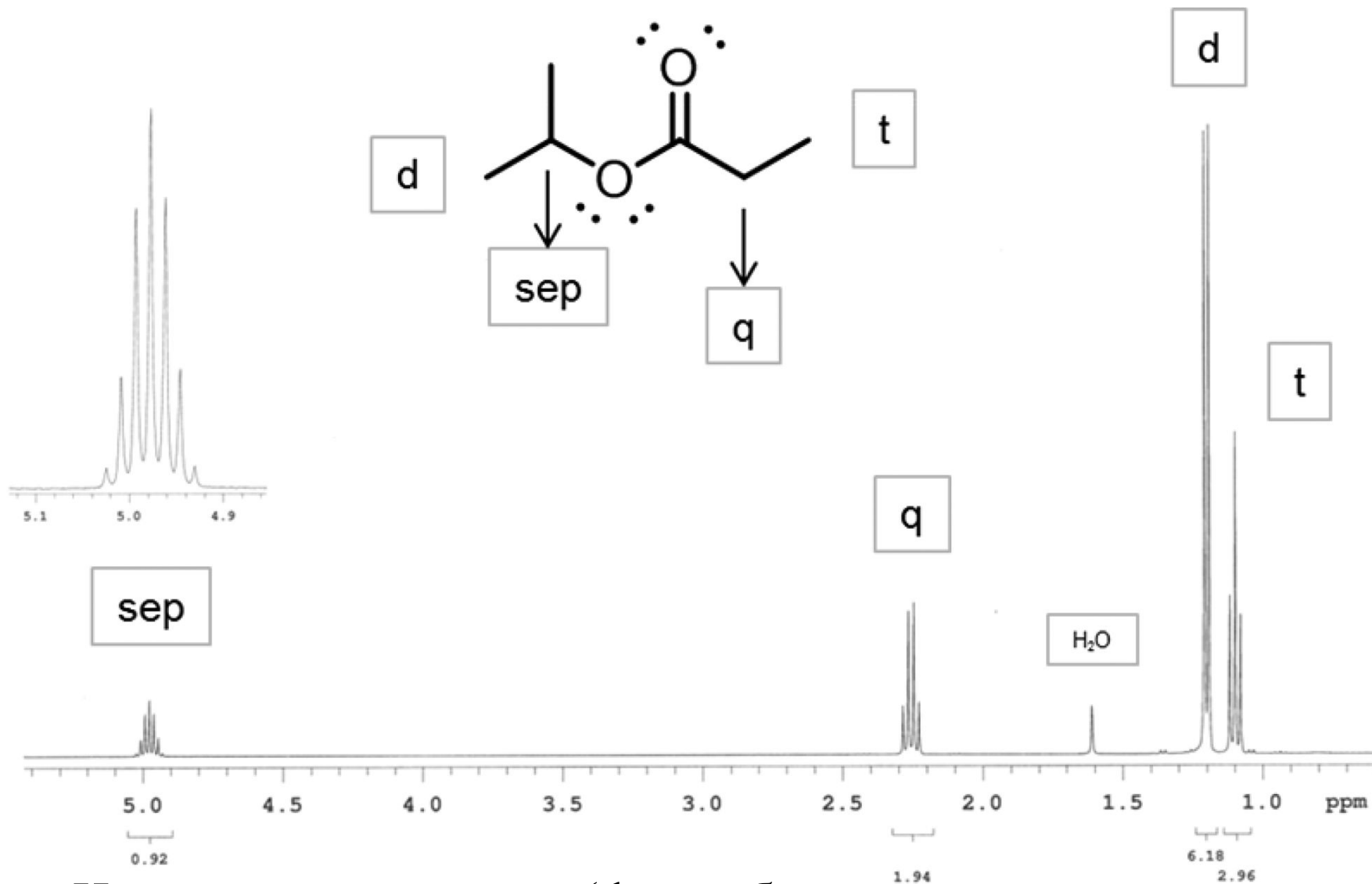
# Спектры $^1\text{H}$ ЯМР с КССВ

- 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 $^1\text{H}$ ЯМР спектре

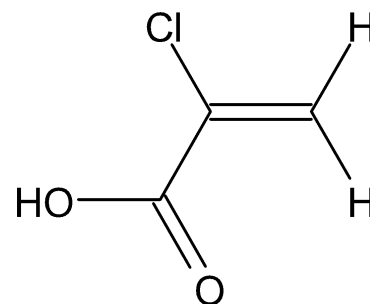
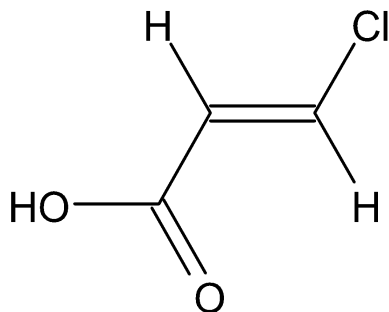
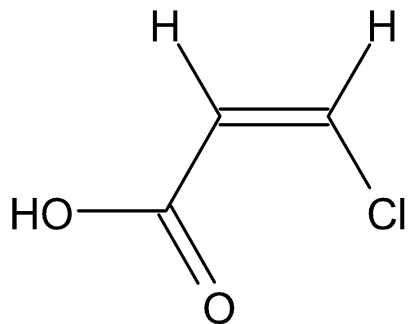


- Изопропил пропионат (d = дублет, sep = септет, q = квартет, t = триплет)

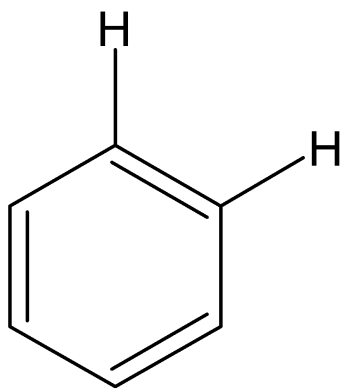
# Спектры $^1\text{H}$ ЯМР с КССВ

## Наиболее характеристичные КССВ

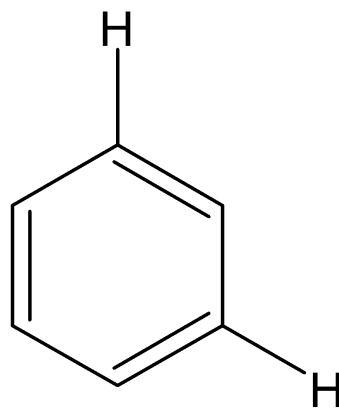
Алкены:  $^3J_{\text{цис}} \sim 7\text{-}10 \text{ Hz}$ ;  $^3J_{\text{транс}} \sim 13\text{-}16 \text{ Hz}$ ;  $^2J_{\text{гем}} \sim 1\text{-}2 \text{ Hz}$



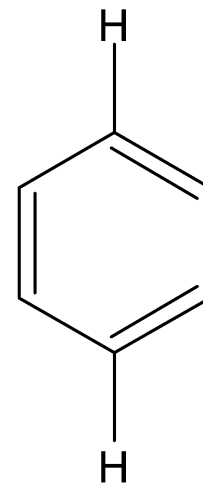
Арены:  $^3J_{\text{орто}} \sim 7\text{-}9 \text{ Hz}$ ;



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



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



# $^{13}\text{C}$ ЯМР спектроскопия

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

# Спектры $^{13}\text{C}$ ЯМР

## Основные представления

### 1. Интенсивность сигнала и чувствительность метода

- Относительная магнитная чувствительность ядра углерода  $^{13}\text{C}$  по сравнению с  $^1\text{H}$  составляет **1.6%**
- Природное содержание изотопа  $^{13}\text{C}$  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  $^1\text{H}$  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

- Гиромангнитные 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 $^{13}\text{C}$ (**0 – 220 м.д.**) в 10 раз больше, чем для $^1\text{H}$ (-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 $^{13}\text{C}$

Изотоп	Естественное содержание, %	Для проведения эксперимента ЯМР $^{13}\text{C}$ используются дейтерированные растворители
$^1\text{H}$	99.98	
$^{13}\text{C}$	1.1	

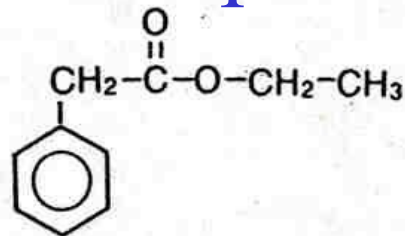
- Сигналы ЯМР  $^{13}\text{C}$  наблюдают в виде одиночных пиков, для этого подавляют спин-спиновое расщепление с протонами.

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

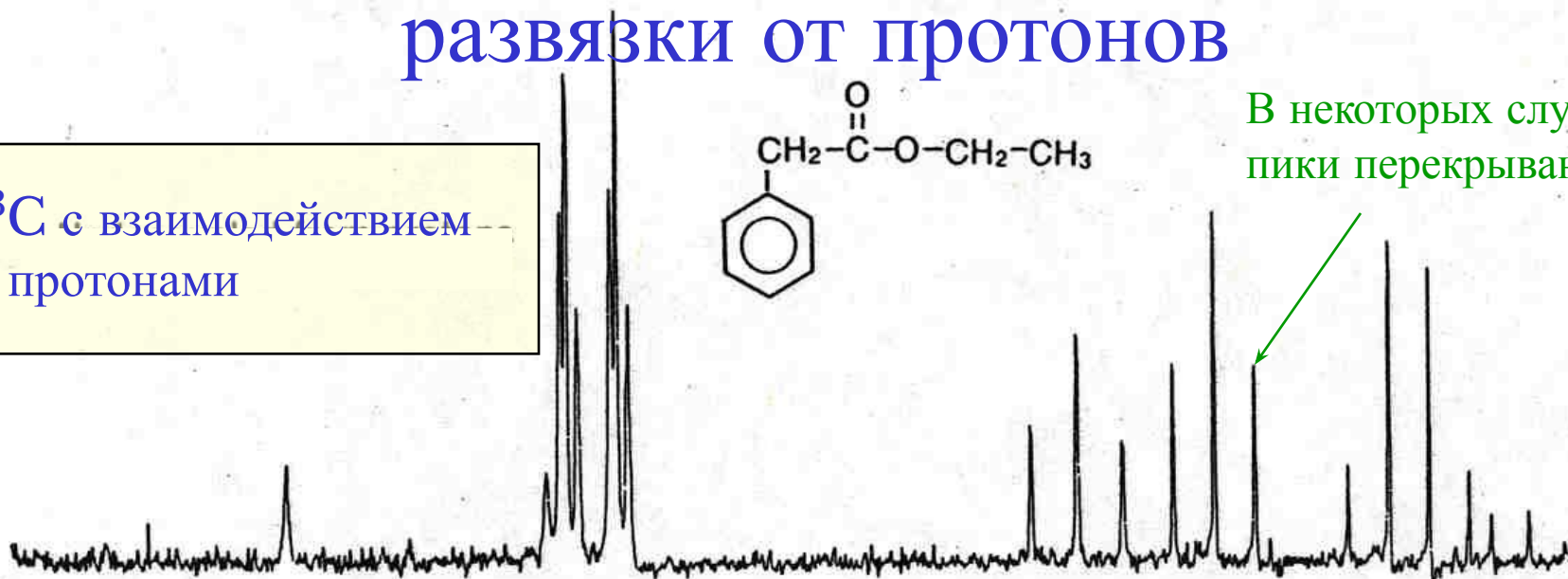
- Сигналы четвертичных атомов углерода менее интенсивны, чем сигналы атомов, связанных с атомами водорода.

# Спектр этил фенилацетата с развязкой и без развязки от протонов

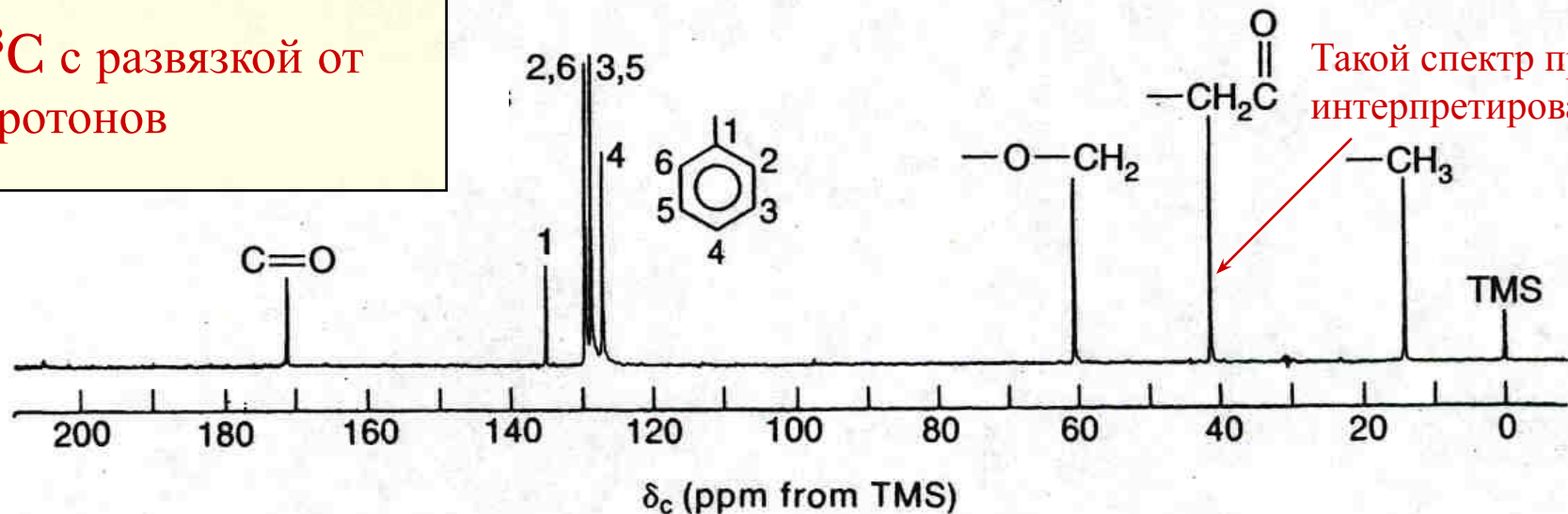
$^{13}\text{C}$  с взаимодействием с протонами



В некоторых случаях пики перекрываются



$^{13}\text{C}$  с развязкой от протонов



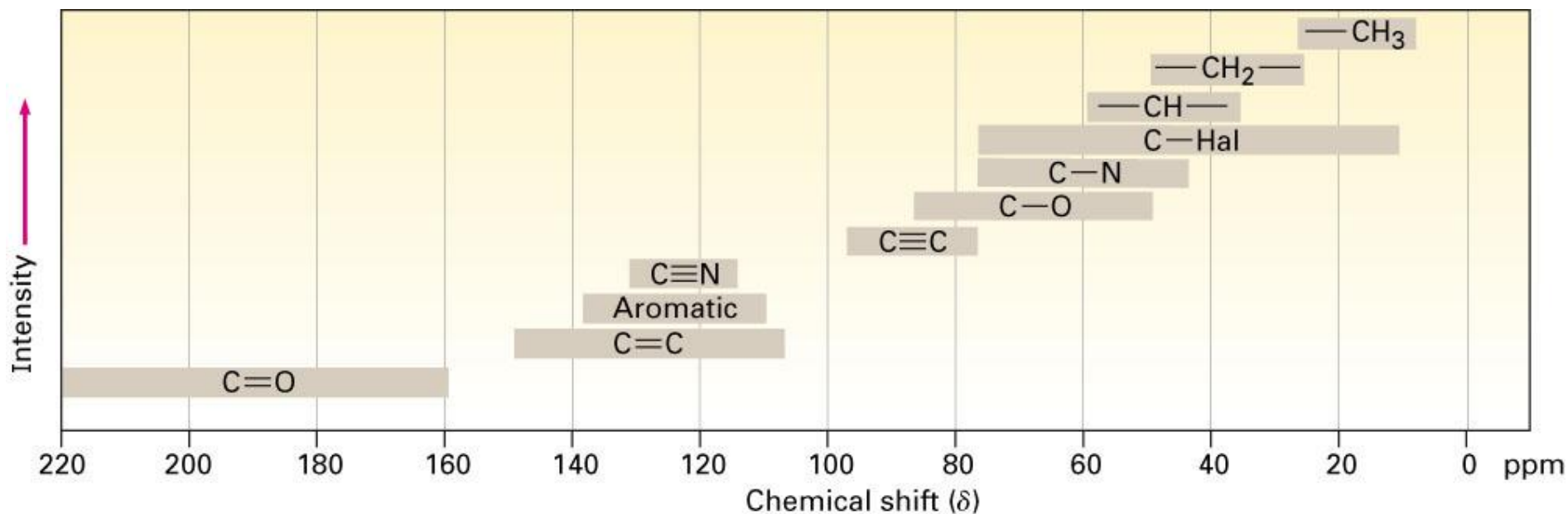
Такой спектр проще интерпретировать

# Химические сдвиги $^{13}\text{C}$

- 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,  $\text{C}, \text{CH}$  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 C;
  - б) Гибридизация C.
- Интенсивность каждого пика НЕ точно соответствует числу атомов углерода, дающих сигнал. Пики от атомов углерода, связанных с атомами водорода больше пиков атомов C, не связанных с водородом.



# Химические сдвиги $^{13}\text{C}$



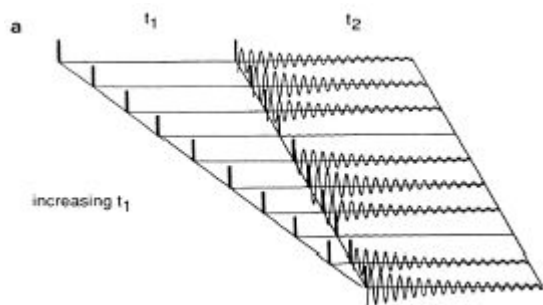
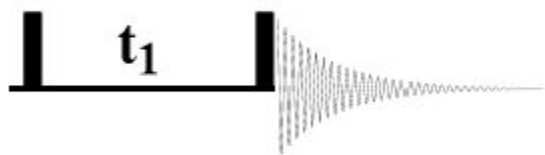
## Области спектра ЯМР $^{13}\text{C}$ (шкала в м. д.)

Ненасыщенные атомы углерода, связанные с кислородом (C=O)	Ненасыщенные атомы углерода (C=C и ароматические)	Насыщенные атомы углерода, связанные с кислородом (CH <sub>3</sub> O, CH <sub>2</sub> O и т. д.)	Насыщенные атомы углерода (CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> , CH)
$\delta=150 - 200$	$\delta=100 - 150$	$\delta=50 - 100$	$\delta=0 - 50$

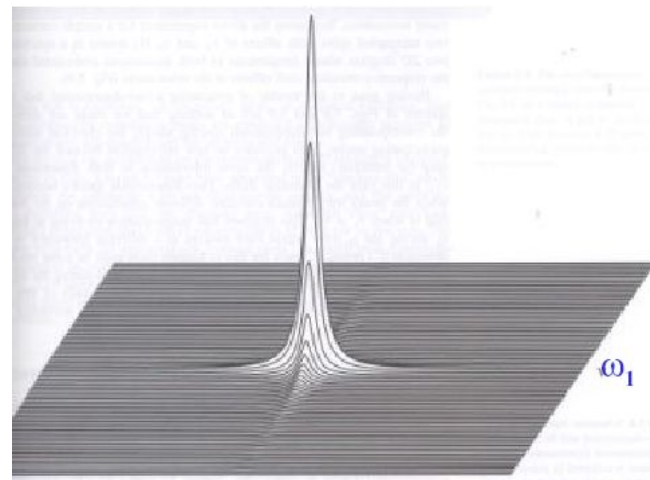
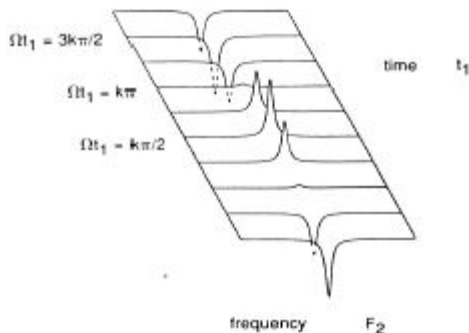
**$^{13}\text{C}$  ЯМР спектр этанола**

**$^{13}\text{C}$  ЯМР спектр молочной кислоты**

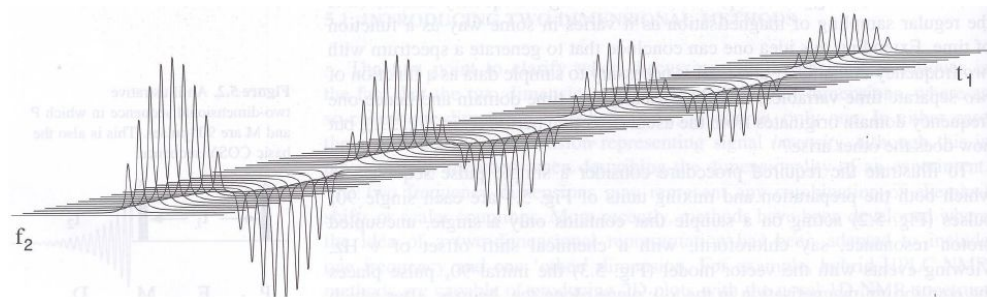
# Двумерная спектроскопия ЯМР



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 ( $\nu_1$ - $^1\text{H}$ ).

**Двумерный спектр ЯМР** – зависимость интенсивности поглощения от двух частот ( $\nu_1$ - $^1\text{H}$  и, например,  $\nu_2$ - $^{13}\text{C}$ ).

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  $90^\circ$ -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

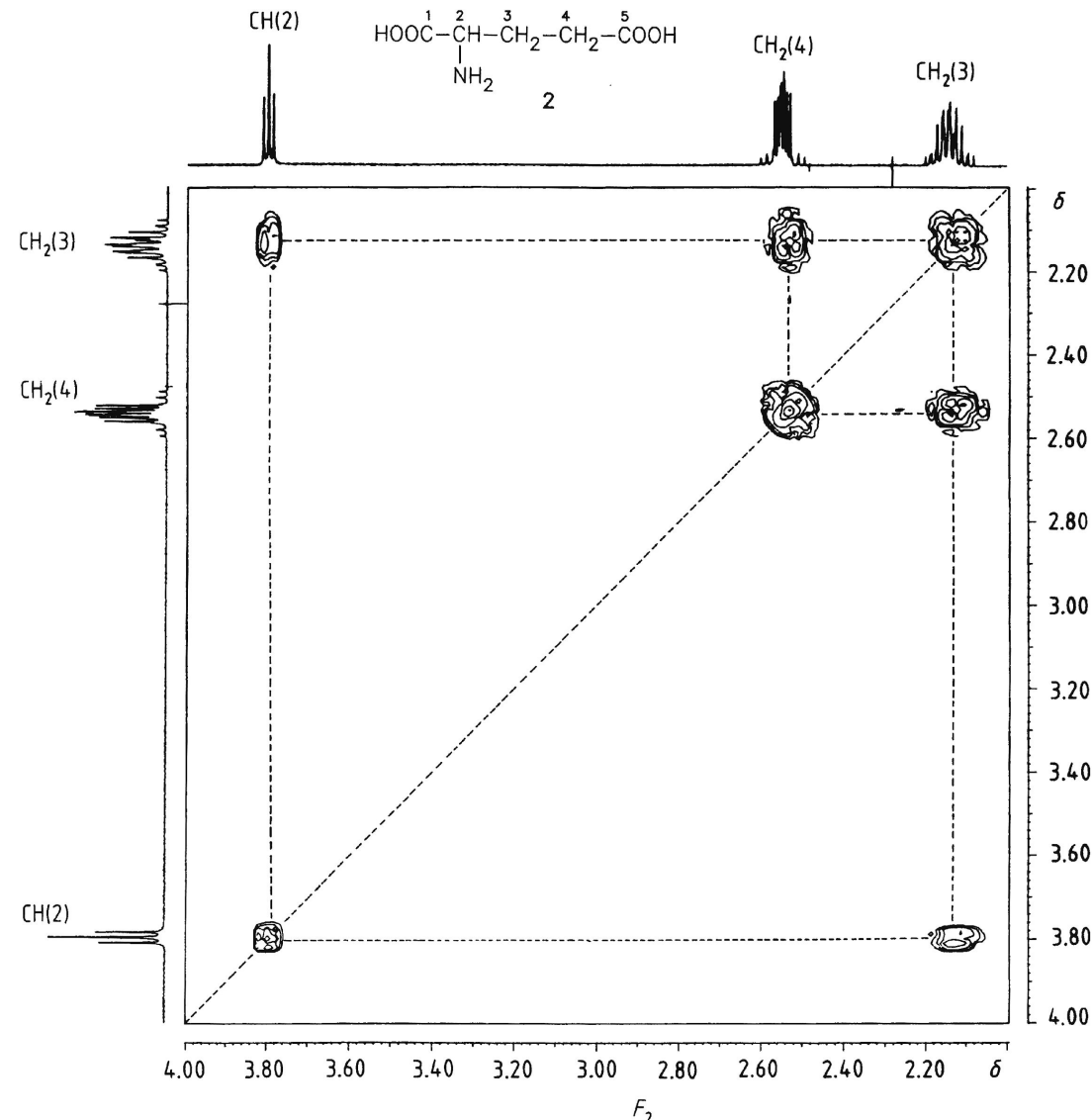
- Гомоядерная спектроскопия ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ):
  - 2D COSY
  - 2D TOCSY
  - 2D NOESY
- Гетероядерная спектроскопия ( $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  или  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ ):
  - 2D HSQC
  - 2D HMBSC

# Назначение ЯМР экспериментов

эксперимент		описание	§, 30мг
1D	$^1\text{H}$	одномерный протонный спектр – <i>общая информация</i>	3
	$^1\text{H}$ Homo	протонный двойной резонанс – <i>селективная блокировка спин-спинового взаимодействия</i>	10
	$^{13}\text{C}$ , $^{14}\text{N}$ , $^{19}\text{F}$ , $^{31}\text{P}$	одномерные спектры по другим ядрам – <i>дополнительная информация, “fingerprints”, позиции замещения</i>	5-20
	APT, DEPT	выявление количества протонов при углеродных атомах	15
	$^{13}\text{C}$ Gated	одномерный спектр $^{13}\text{C}$ без широкополосной развязки от протонов – <i>измерение гетероядерных КССВ</i>	20
	$^1\text{H}$ NOE diff., $^1\text{H}$ HOE diff.	измерение ядерного эффекта Оверхаузера – <i>пространственные контакты протонов с протонами и другими атомами</i>	10 25
2D $^1\text{H}$	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 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$	HMQC	гетероядерная спиновая корреляция – <i>отнесение спектра <math>^{13}\text{C}</math></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

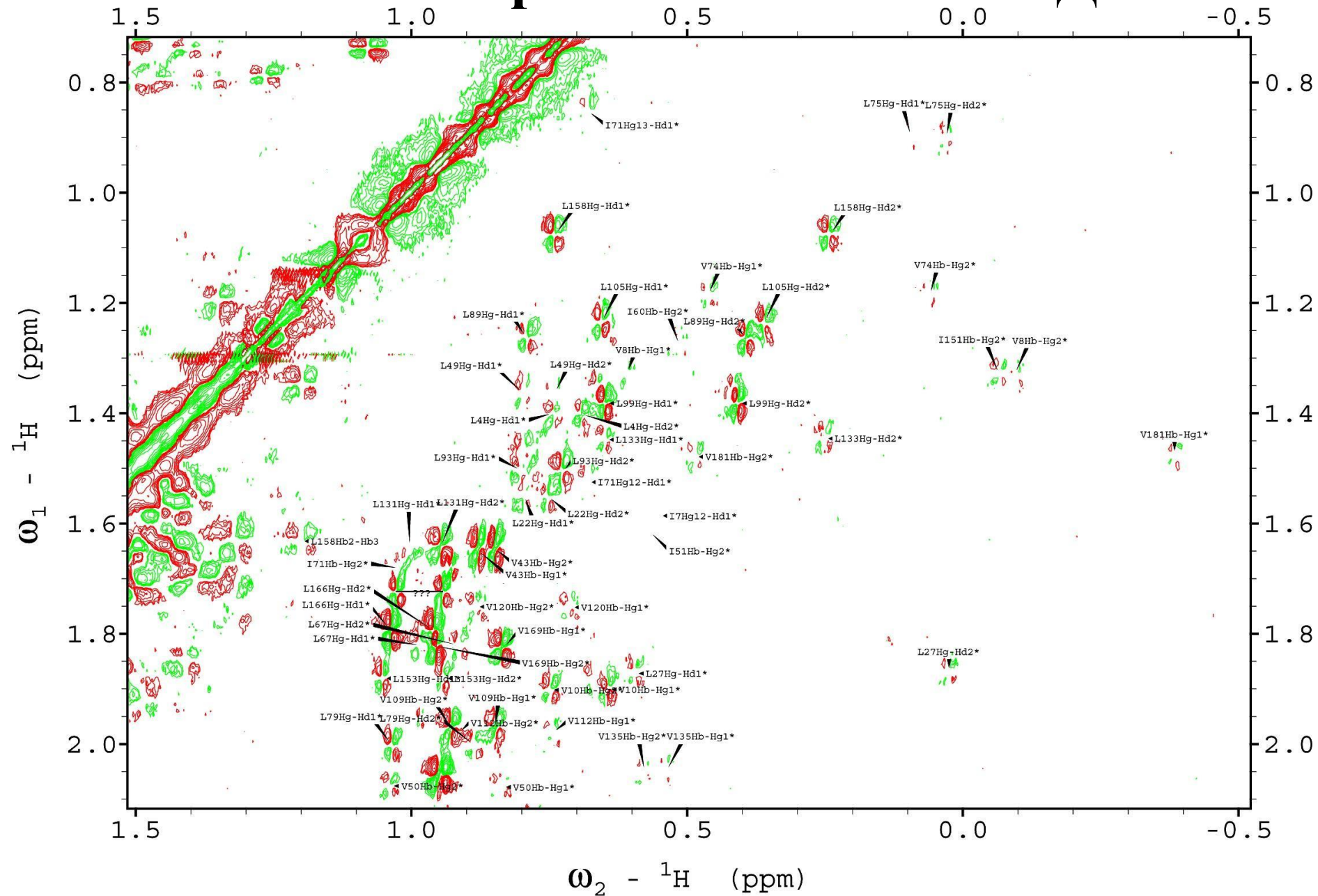
- Спектры COSY представляют собой трехмерную поверхность с координатами ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$ , I), где  $\nu_1$  и  $\nu_2$  — шкалы химических сдвигов (в м.д. или Гц), а I — интенсивность сигналов, являющаяся дополнительным параметром и не влияющая на размерность спектра. Для работы спектры приводятся как набор сечений поверхности вдоль оси I.



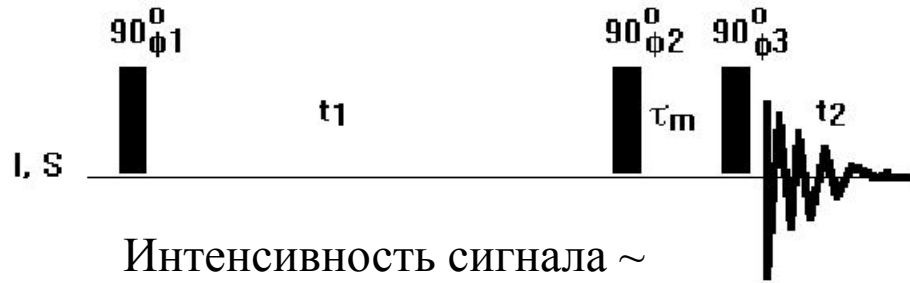


- В спектре COSY можно выделить два типа сигналов: диагональные сигналы и т.н. **кросс-пики**, Последние **располагаются вне диагонали** и указывают на взаимодействующие группы ядер: если провести через сигнал горизонтальную и вертикальную линию, то на одномерных проекциях мы увидим сигналы, соответствующие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

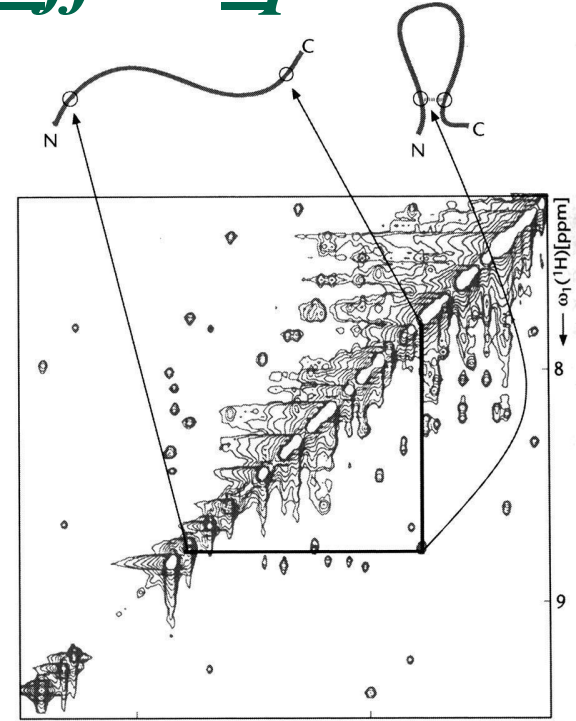


# ***NOESY – Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy***



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.

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

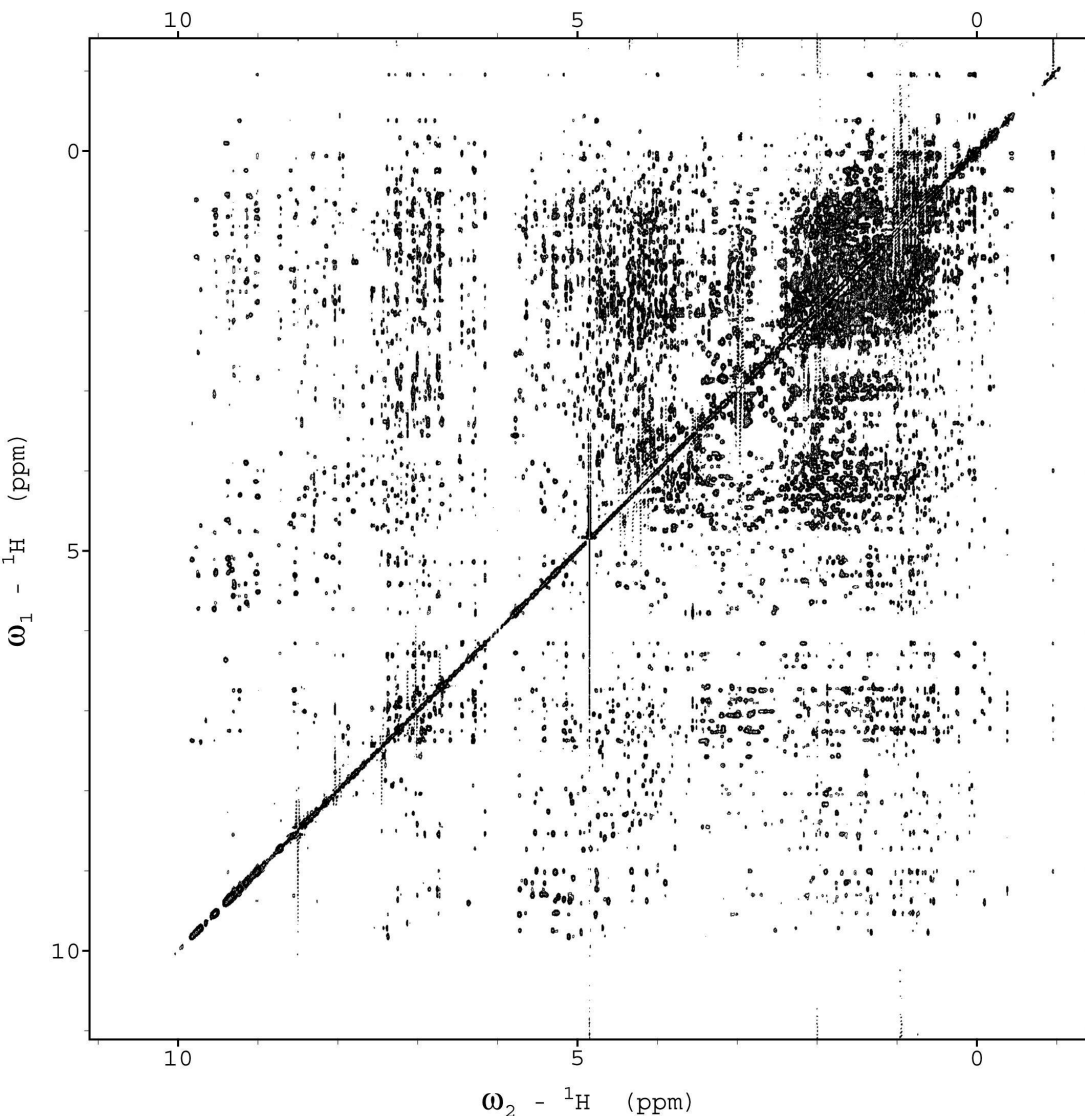
$I_0$  – равновесная интенсивность

$I$  – 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*

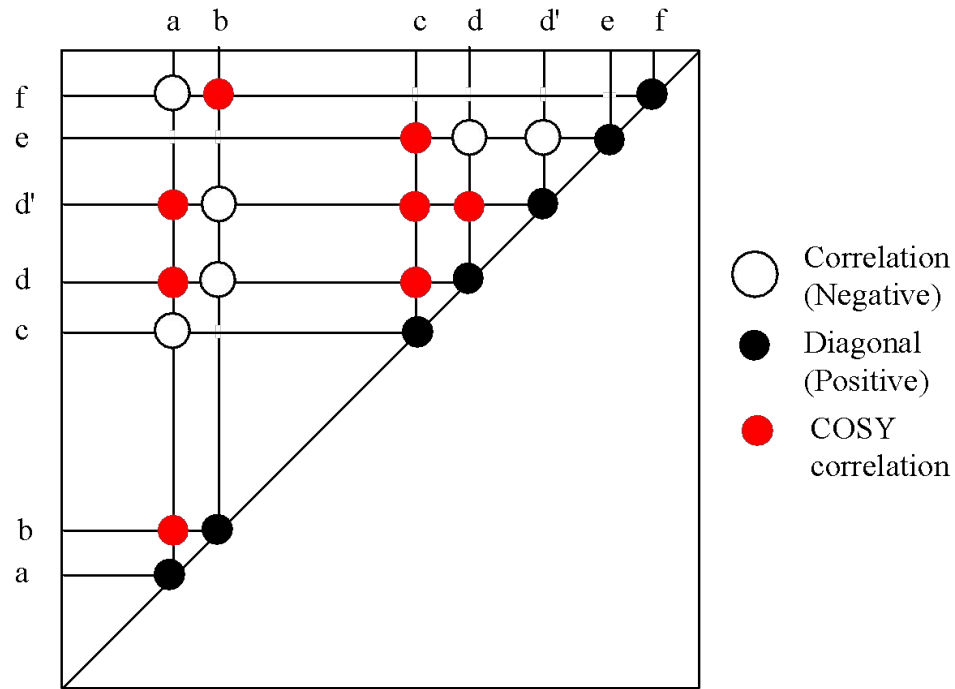


Спектр NOESY можно разделить на **три** «подспектра»:

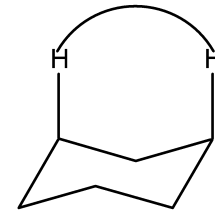
- сигналы, принадлежащие спектру COSY (поэтому результаты лучше анализировать, сравнивая два этих эксперимента);
- сигналы, демонстрирующие наличие химического обмена между различными группами атомов (например, если в молекуле есть группы –NH и –COOH);
- и, наконец, сигналы, соответствующие именно взаимодействию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

1 mM h-DHFR (Дигидрофолат-редуктаза) в D<sub>2</sub>O, 800 MHz

# NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)



Корреляции через пространство до 5 Å

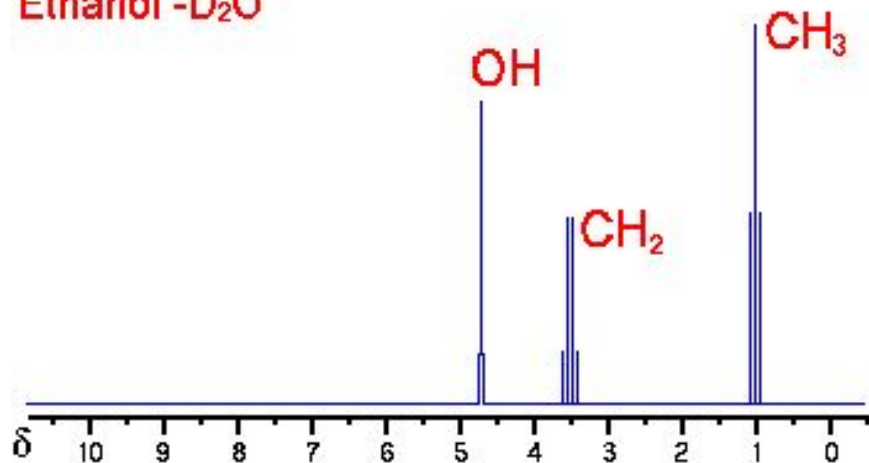


# Стоимость ЯМР анализов

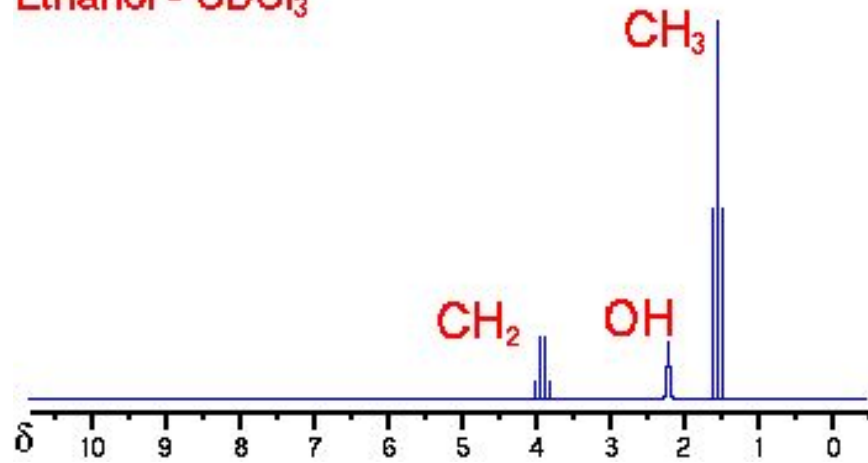
Вид анализа	Количество образца, мг	Цена дол.
H <sup>1</sup>	5	5
F <sup>19</sup>	5	4.5
C <sup>13</sup>	25	9
N <sup>14</sup>	10	6.5
N <sup>15</sup>	100	30
P <sup>31</sup>	25	6.5
COSY	5	11
NOESY	10	13
HMQC, HSQC	25	20
COLOC, HMBC	25	26

# Примеры ЯМР-спектров Этанол

Ethanol -D<sub>2</sub>O



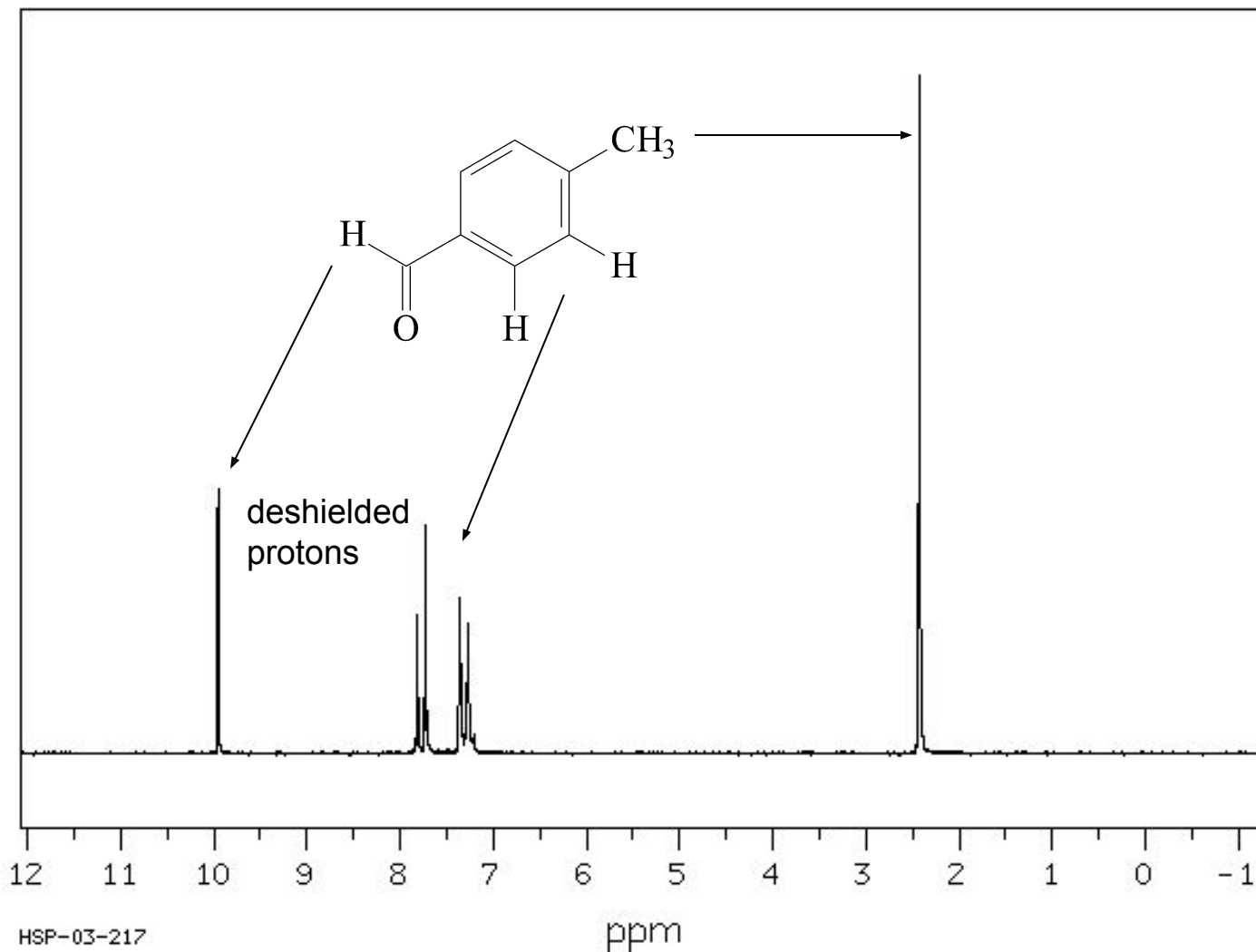
Ethanol - CDCl<sub>3</sub>





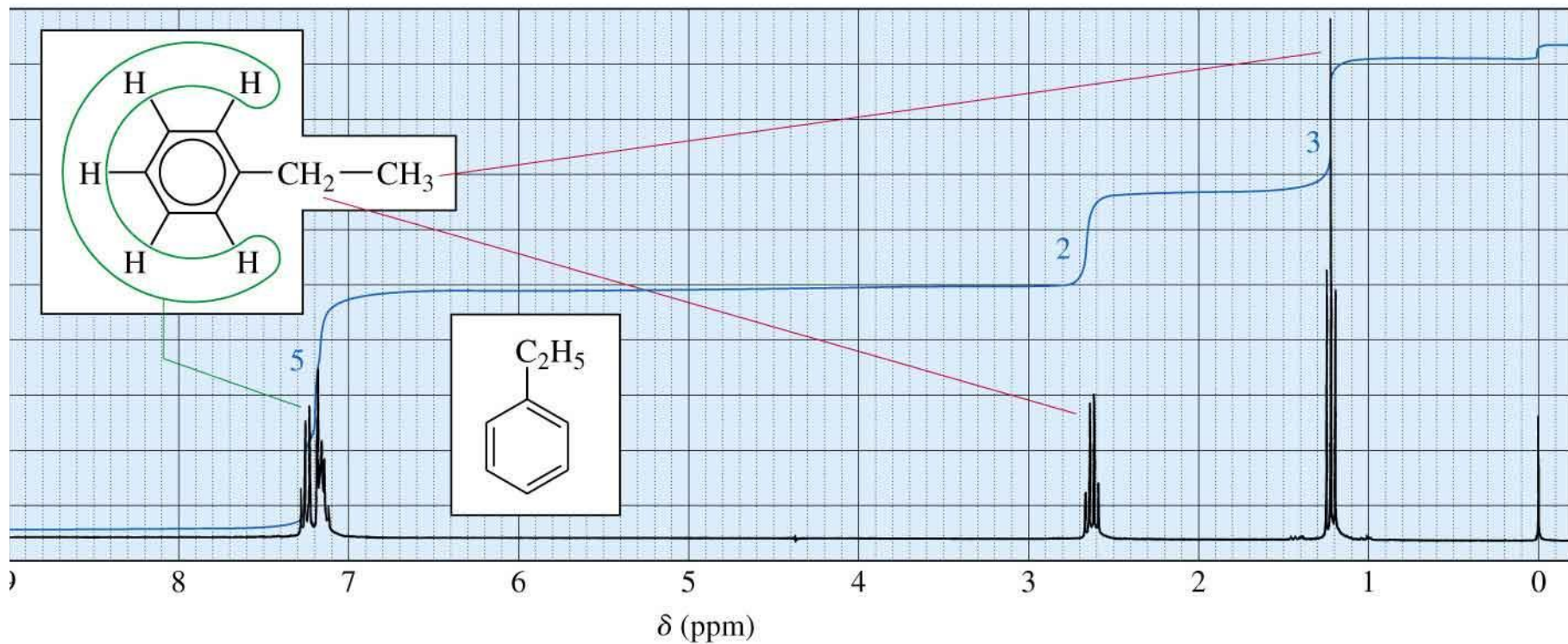
# Примеры ЯМР-спектров

## 4-метилбензальдегид



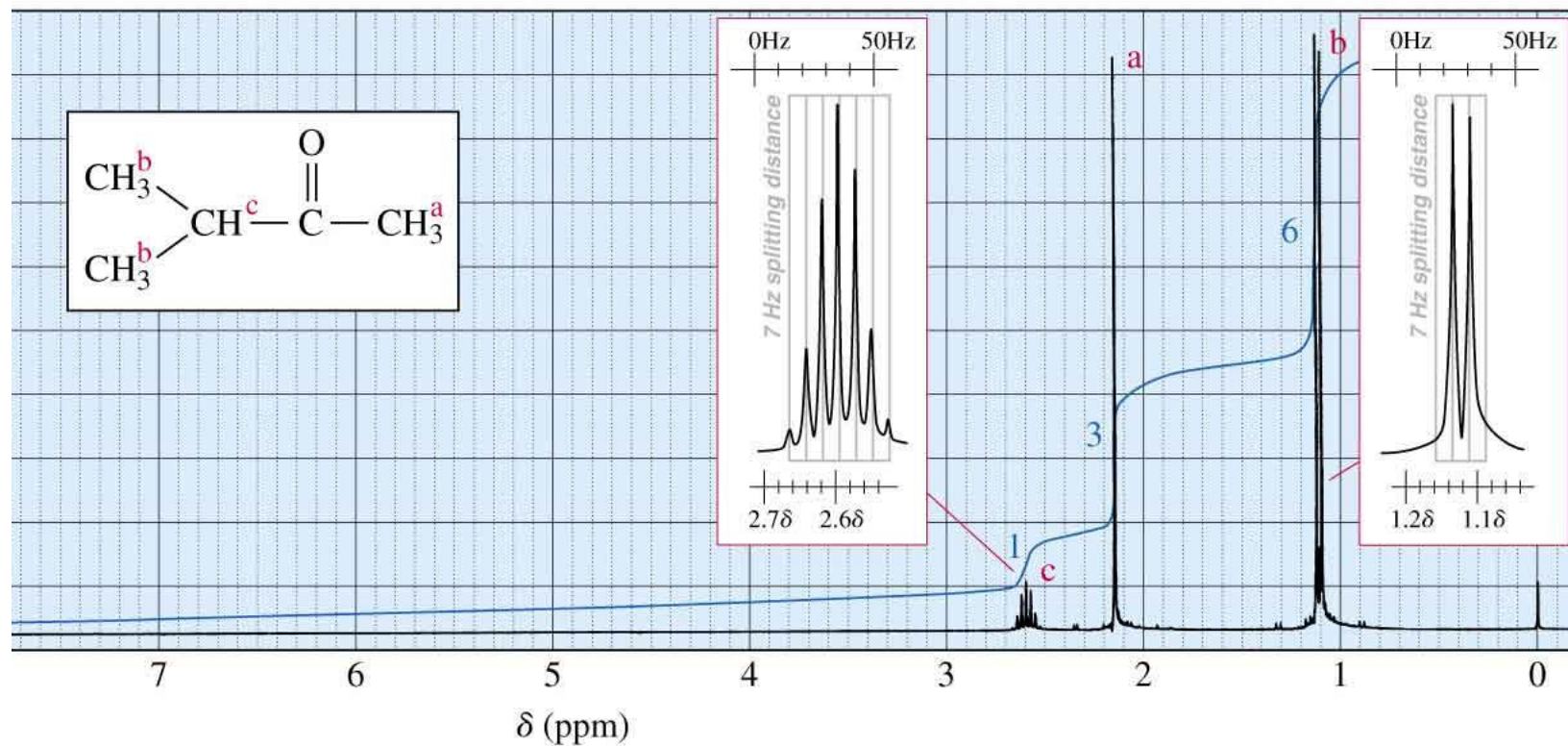
# Примеры ЯМР-спектров

## Этилбензол



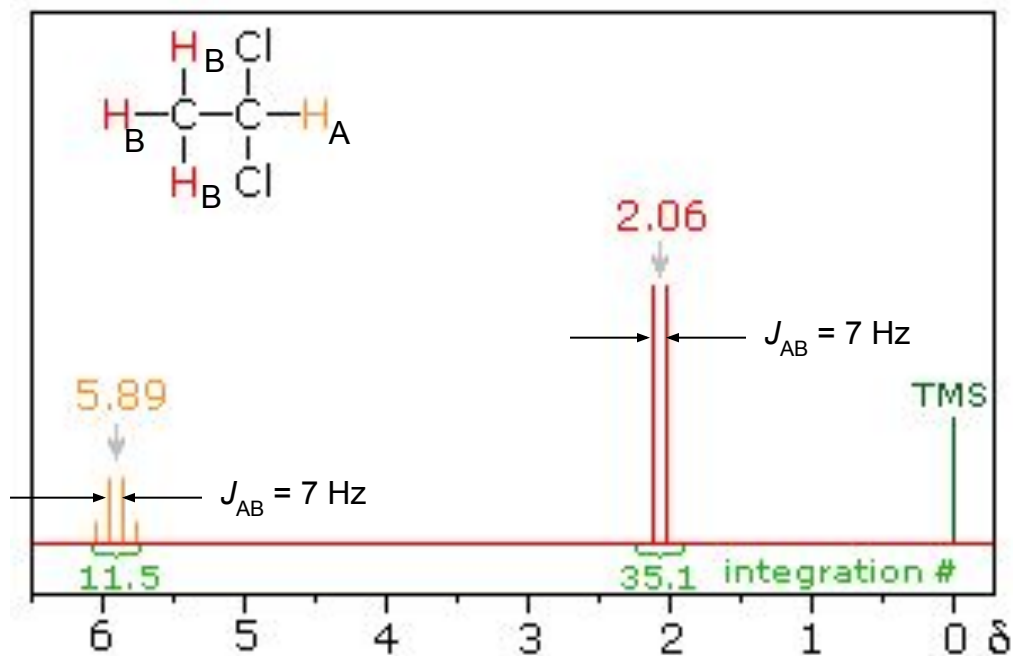
# Примеры ЯМР-спектров

## МЕТИЛИЗОПРОПИЛКЕТОН



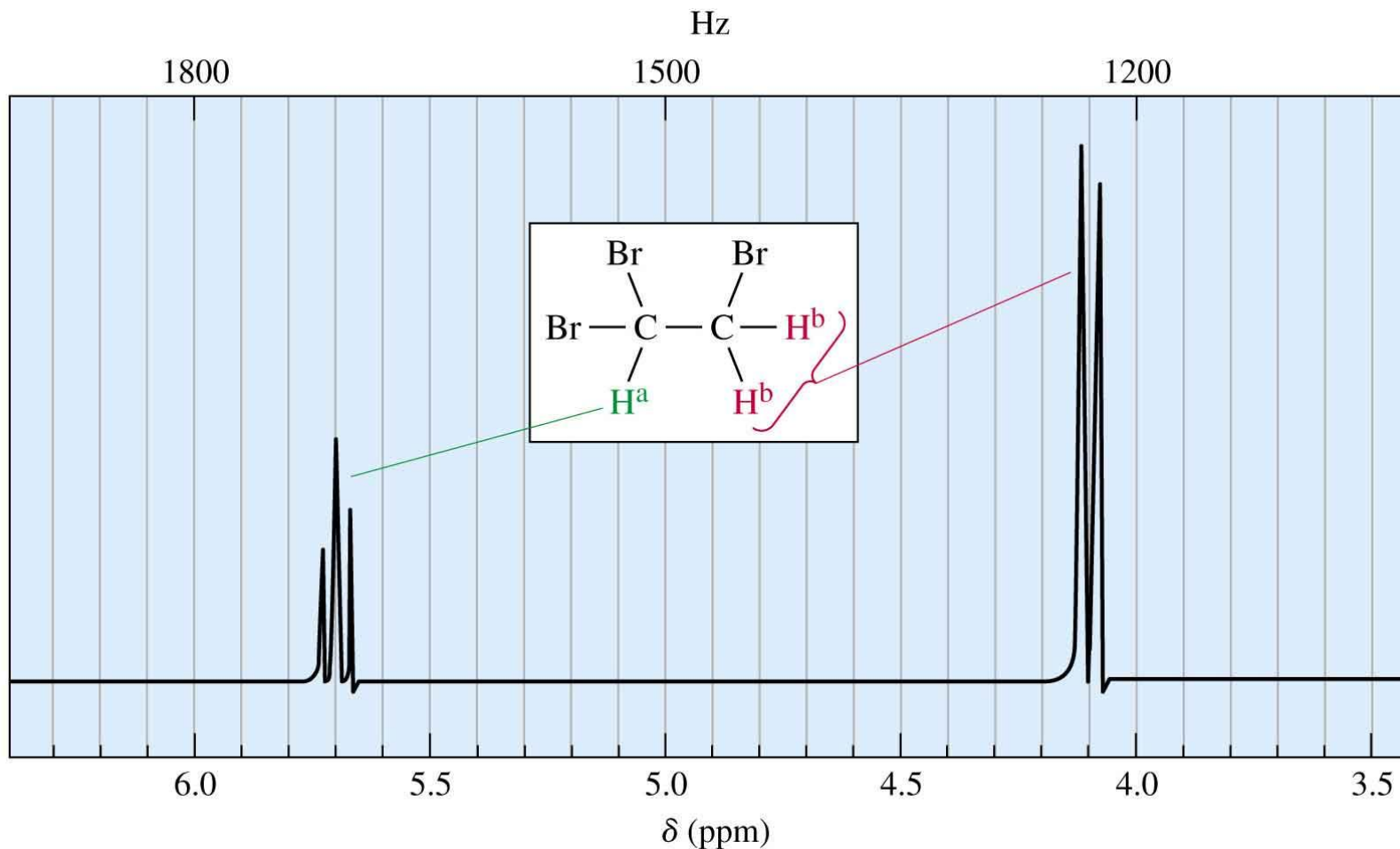
# Примеры ЯМР-спектров

## 1,1-дихлорэтан

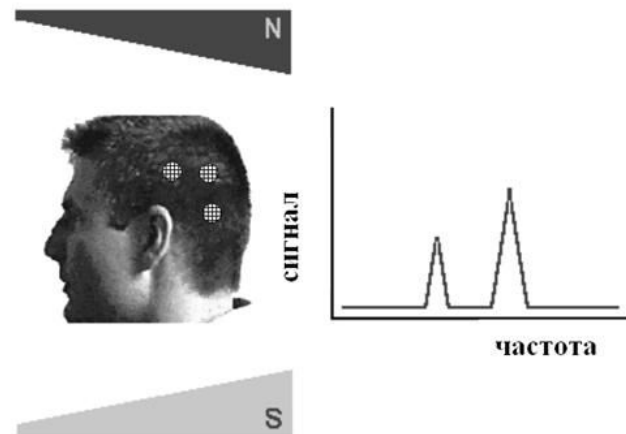
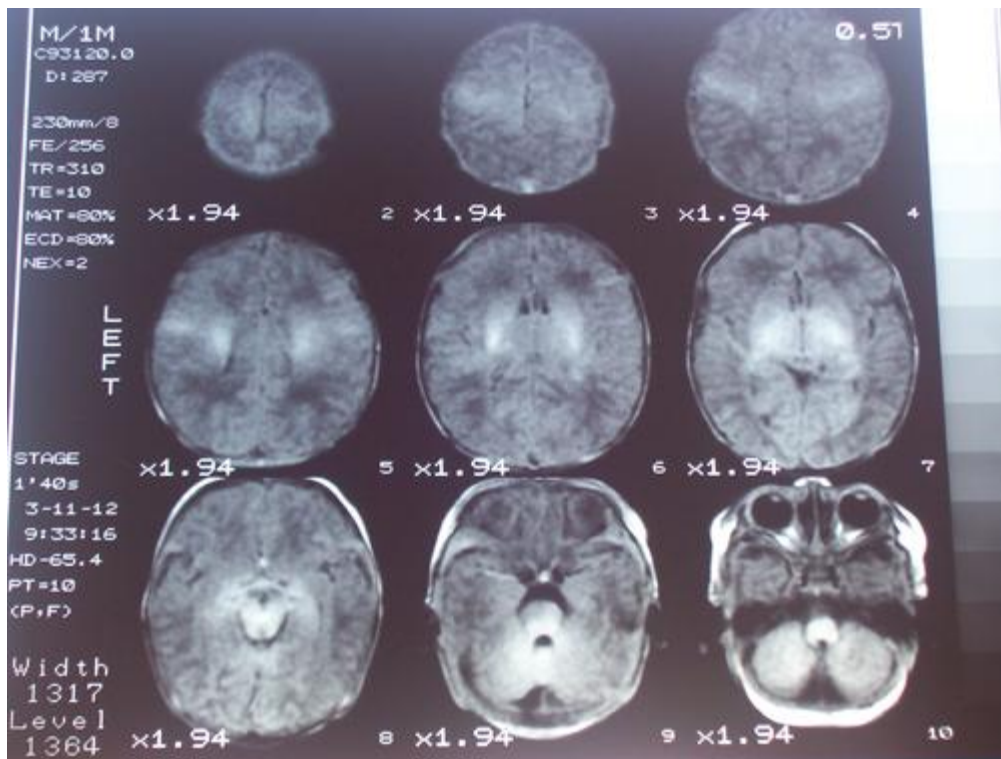


# Примеры ЯМР-спектров

## 1,1,2-трибромэтан



# МРТ – магнитно-резонансная томография



ЯМР – томография головного мозга

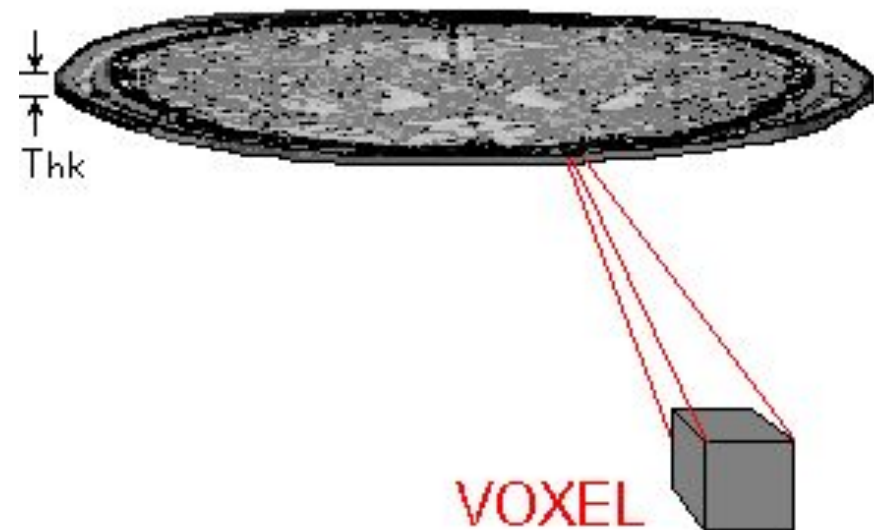
МРТ: информативный метод исследования и диагностики заболеваний центральной нервной системы, костно-мышечной и суставной систем человека.

# 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*.

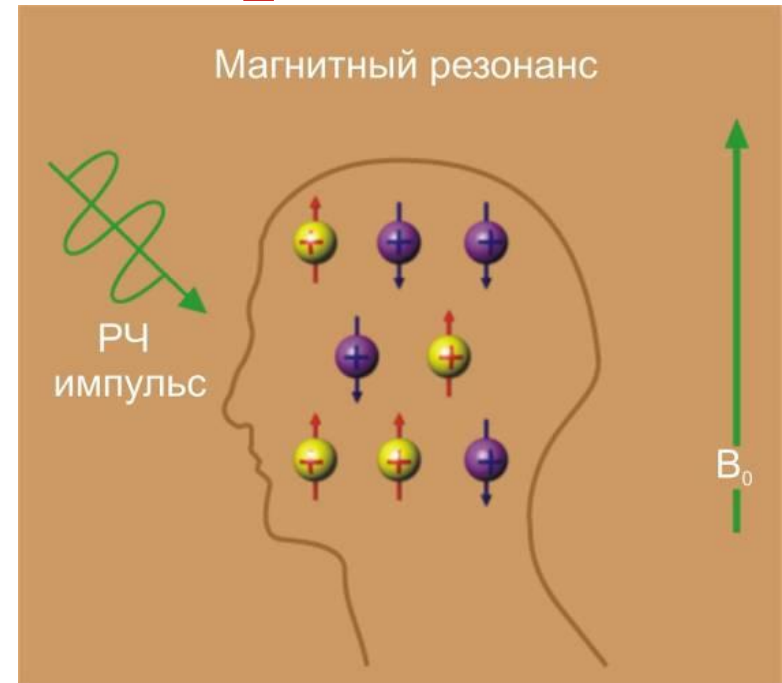
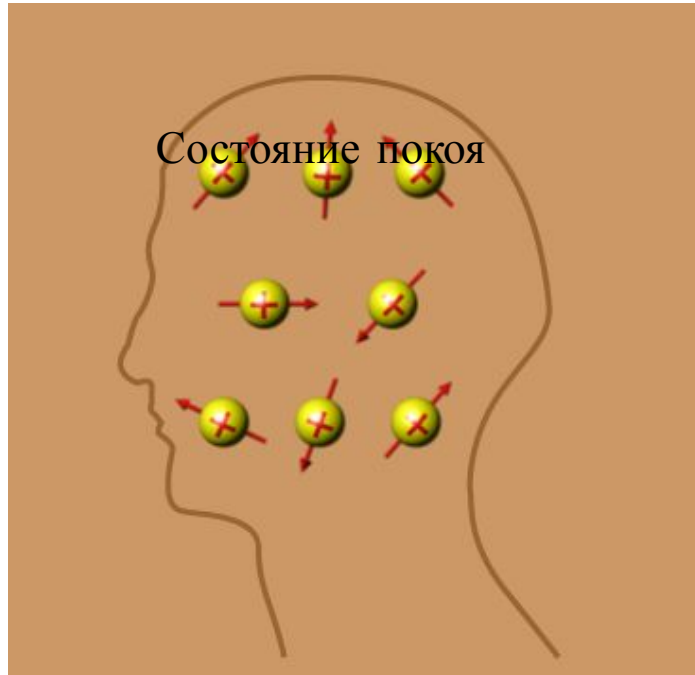
# Томографическое изображение

- Строится изображение человеческого тела по тонким слоям.
- Каждый слой состоит из вокселей (аналог пикселей для трехмерного пространства)
- Объём одного вокселя  $3 \text{ мм}^3$ .
- 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

