

# Как разгадать «химический кроссворд»

**ДУБИННЫЙ Максим  
Анатольевич**

к.ф.-м.н., н.с  
лаборатории  
биомолекулярной ЯМР  
спектроскопии

ИБХ РАН, Москва

[maxim@nmr.ru](mailto:maxim@nmr.ru)

+7(905)511-57-71

рисуем формулу  
вещества по ЯМР и  
масс-спектрам

# Зачем разгадывать «химические кроссворды»?

- **Контроль химического синтеза**  
положение защитных и реакционных групп,  
идентификация продуктов реакций
- **Установление химических формул**  
новых природных соединений при  
«нулевых» исходных данных
- **Промышленный шпионаж :)**  
То же самое, но для «рукотворных»  
соединений

# Как разгадывать «химические кроссворды»?

- **Масс-спектры**

- $m/z$  молекулы
- $m/z$  фрагментов
- **Брутто-формула:**

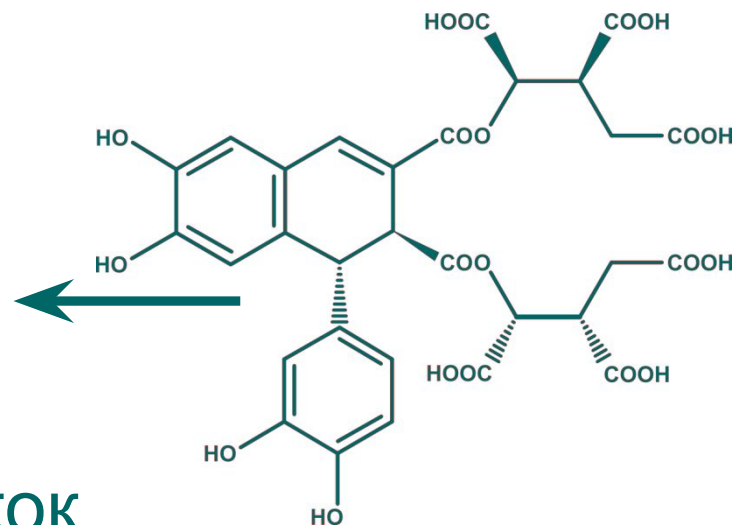


Совпало?

Возьми с полки пирожок

- **ЯМР спектры**

- Спиновые системы
- Формулы фрагментов
- **Химическая формула:**

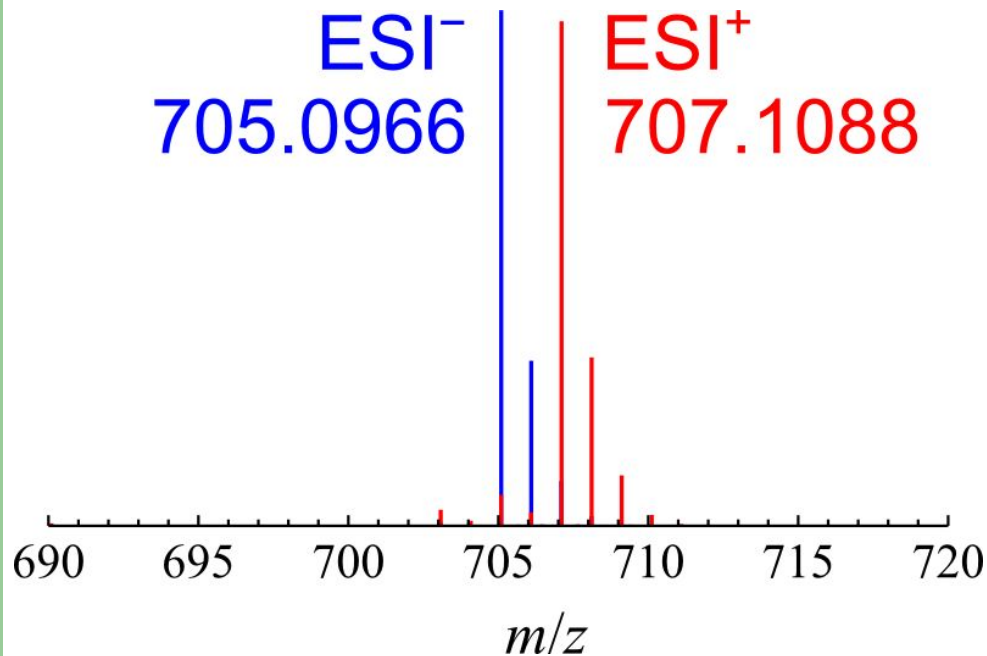


# Современный масс-спектрометр

Agilent 6210: ВЭЖХ — времяпролетный масс-спектрометр с электроспрей-ионизацией  
([en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org))



# Масс спектр



C 12.000000

H 1.007825

O 15.994915

e 0.000549

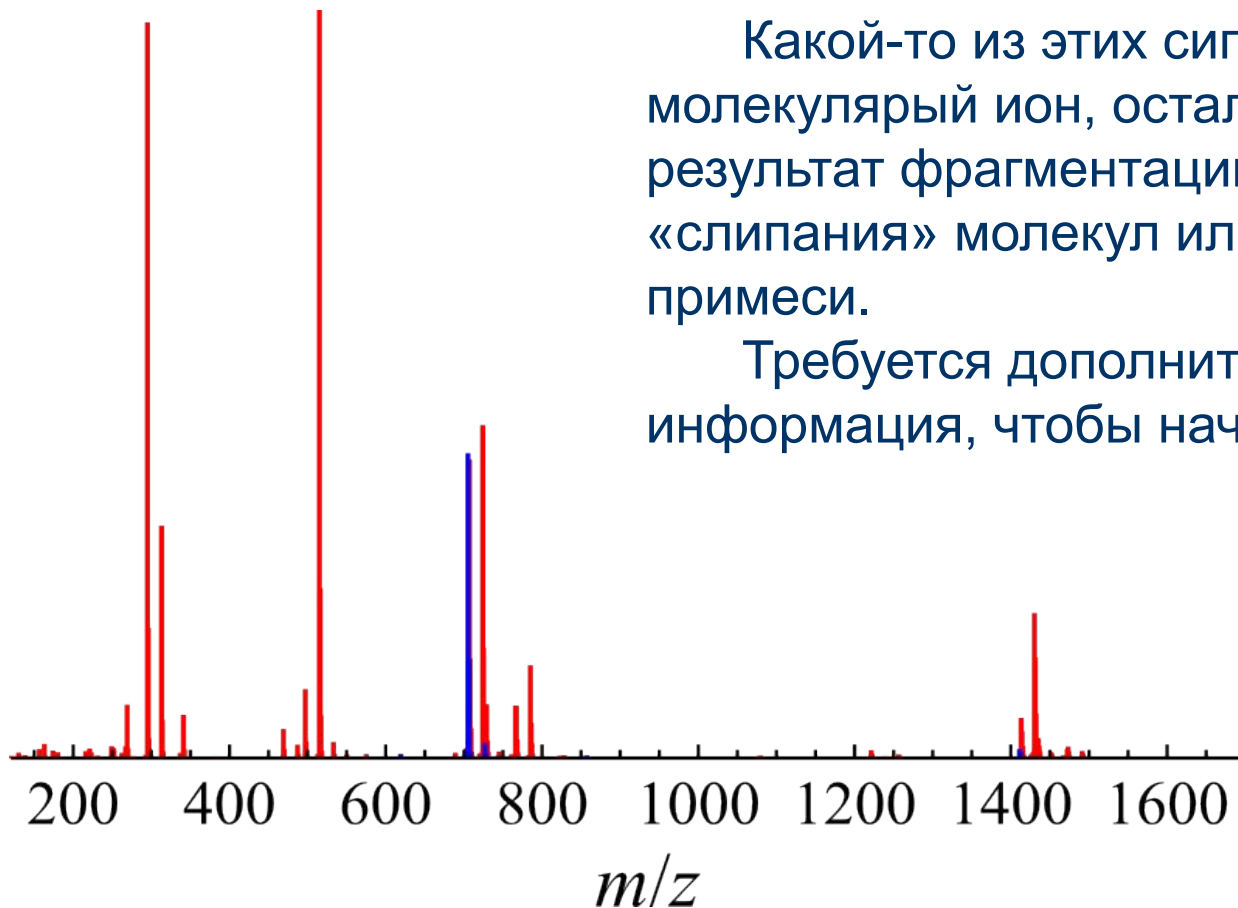
MH<sup>-</sup> 705.094474

MH<sup>+</sup> 707.109026

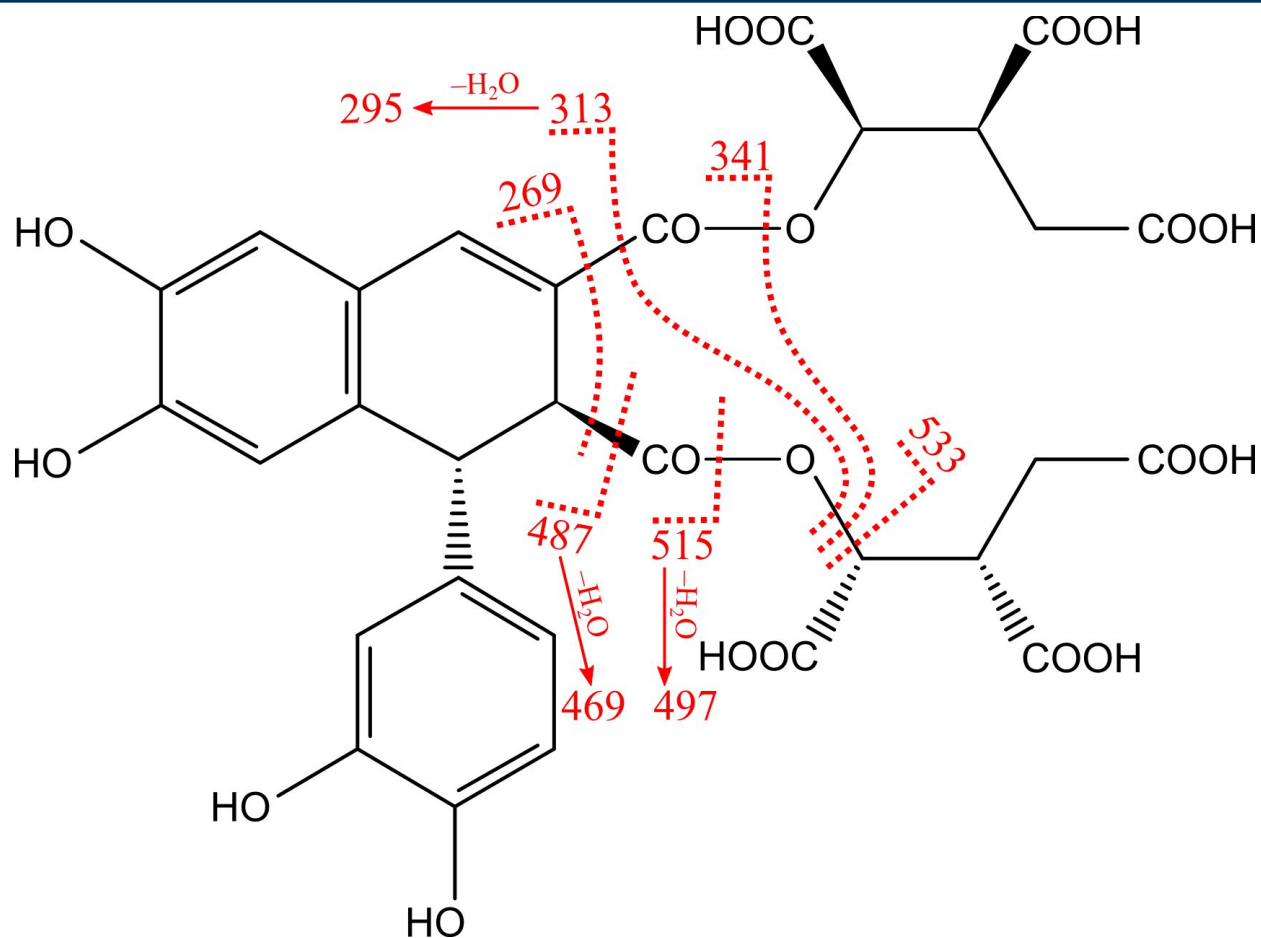
# На самом деле :(

Какой-то из этих сигналов – молекулярный ион, остальные – результат фрагментации, «слипания» молекул или просто примеси.

Требуется дополнительная информация, чтобы начать анализ.



# Если известна формула



# Современные ЯМР спектрометры



Лаборатория Биомолекулярной ЯМР спектроскопии  
ИБХ РАН, Москва



# На чем снимаем?

Ядро	Спин	Естественное содержание	Резонансная частота (600 МГц)	Относительная чувствительность (в сравнении с $^{13}\text{C}$ )
$^1\text{H}$	$+1/2$	99.98%	600.1 МГц	$5.87 \times 10^3$
$^2\text{H}$	+1	0.02%	92.1 МГц	$6.52 \times 10^{-3}$
$^{13}\text{C}$	$+1/2$	1.07%	150.9 МГц	1.00
$^{15}\text{N}$	$-1/2$	0.364%	60.8 МГц	$2.23 \times 10^{-2}$
$^{31}\text{P}$	$+1/2$	100.0%	242.9 МГц	$3.91 \times 10^2$
$^{19}\text{F}$	$+1/2$	100.0%	564.7 МГц	$4.89 \times 10^3$

# Что снимаем?

Имея **1-10 мг** вещества с MW 100-1000:

- **Одномерный  $^1\text{H}$  спектр**  
от секунд до минут
- **Двумерные  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (гомоядерные) спектры**  
от 30 минут до 12 часов
- **Двумерные  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (гетероядерные) 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, используемых 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 спектроскопии: $\text{H}_2\text{O}$

- $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$ . Используется для расчета структур белков в естественном окружении, а так же для съемки спектров любых соединений, растворимых в воде.
- **Сигнал растворителя:**  $^1\text{H} = 4.7$  м.д.
- **Присутствуют**  $^1\text{H}$  сигналы:  $\text{NH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}_3^+$ .
- **Отсутствуют**  $^1\text{H}$  сигналы:  $\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{PO}_{3-4}\text{H}$ ,  $\text{SO}_{3-4}\text{H}$
- **Съемка спектров:** любых, кроме НМВС. Искажены величины интегралов из-за подавления растворителя

# Растворители для ЯМР спектроскопии: $D_2O$ ( $D=^2H$ )

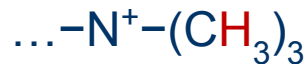
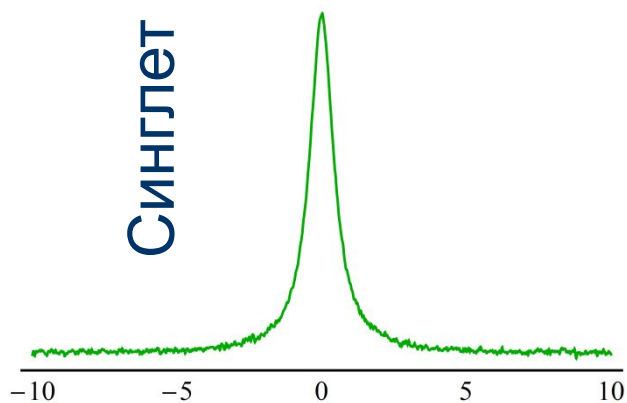
- Хорошо подходит для образцов, не содержащих  $NH$ ,  $NH_2$  групп. Для белков медленная скорость обмена  $NH \leftrightarrow ND$  говорит о наличии водородной связи.
- **Сигнал растворителя:**  $^1H = 4.7$  м.д.
- **Отсутствуют**  $^1H$  сигналы: те же, что и в  $H_2O + NH$ ,  $NH_2$ ,  $NH_3^+$
- **Съемка спектров:** любых

# Другие растворители

Формула	<sup>1</sup> H, м.д. (мультиплетность)	<sup>13</sup> C, м.д. (мультиплетность)	Сигнал HOD	Примечания
Метанол-d <sub>3,4</sub>	4.78(1) <b>3.31(5)</b>	<b>49.15(7)</b>	4.9	Протонный, гидрофильный
DMSO-d <sub>6</sub>	<b>2.50(5)</b>	<b>39.51(7)</b>	3.3	Апротонный, гигроскопичный
CDCl <sub>3</sub>	<b>7.24(1)</b>	<b>77.23(3)</b>	1.5	Апротонный, Гидрофобный
Этанол-d <sub>5,6</sub>	5.19(1) 3.56(1) 1.11(m)	56.96(5) 17.31(7)	5.3	Протонный, гидрофильный
Ацетон-d <sub>6</sub>	2.05(5)	29.92(7) 206.68(1)	2.8	Апротонный
Цикло- гексан-d <sub>12</sub>	1.38(1)	26.43(5)	0.8	Апротонный, гидрофобный

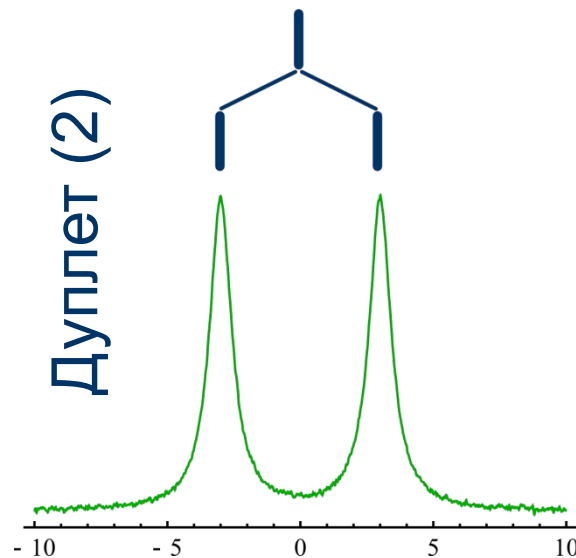
# Мультиплетность сигналов $^1\text{H}$

Синглет (1)

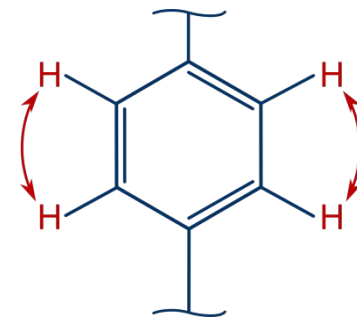


Отсутствуют другие  
**неэквивалентные**  
протоны в пределах 3х  
химических связей

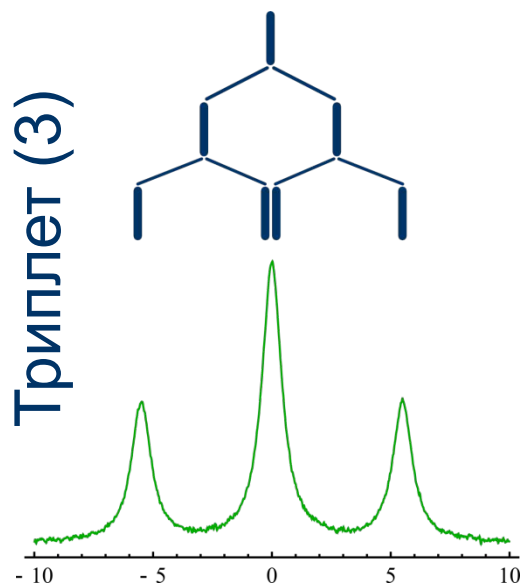
Дуплет (2)



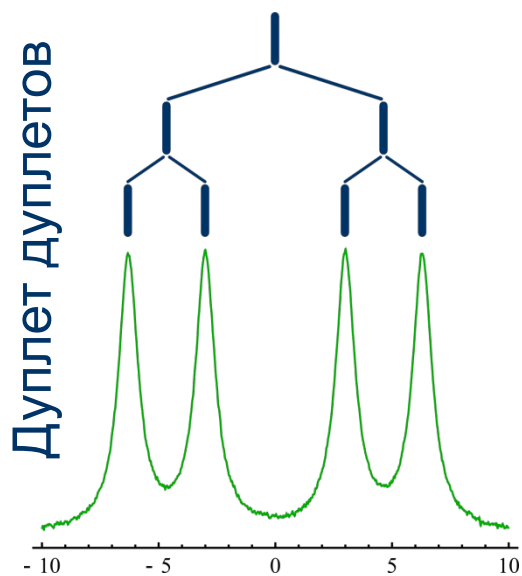
Один протон в  
пределах 3х  
связей



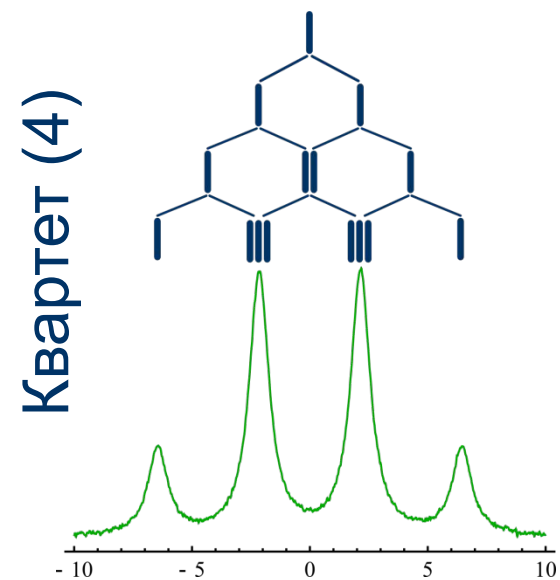
# Мультиплетность сигналов $^1\text{H}$



Два эквивалентных  
соседа



Два **НЕ**эквивалентных  
соседа



Три соседа



# 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.

# 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.

# Виды 2D ЯМР спектров,

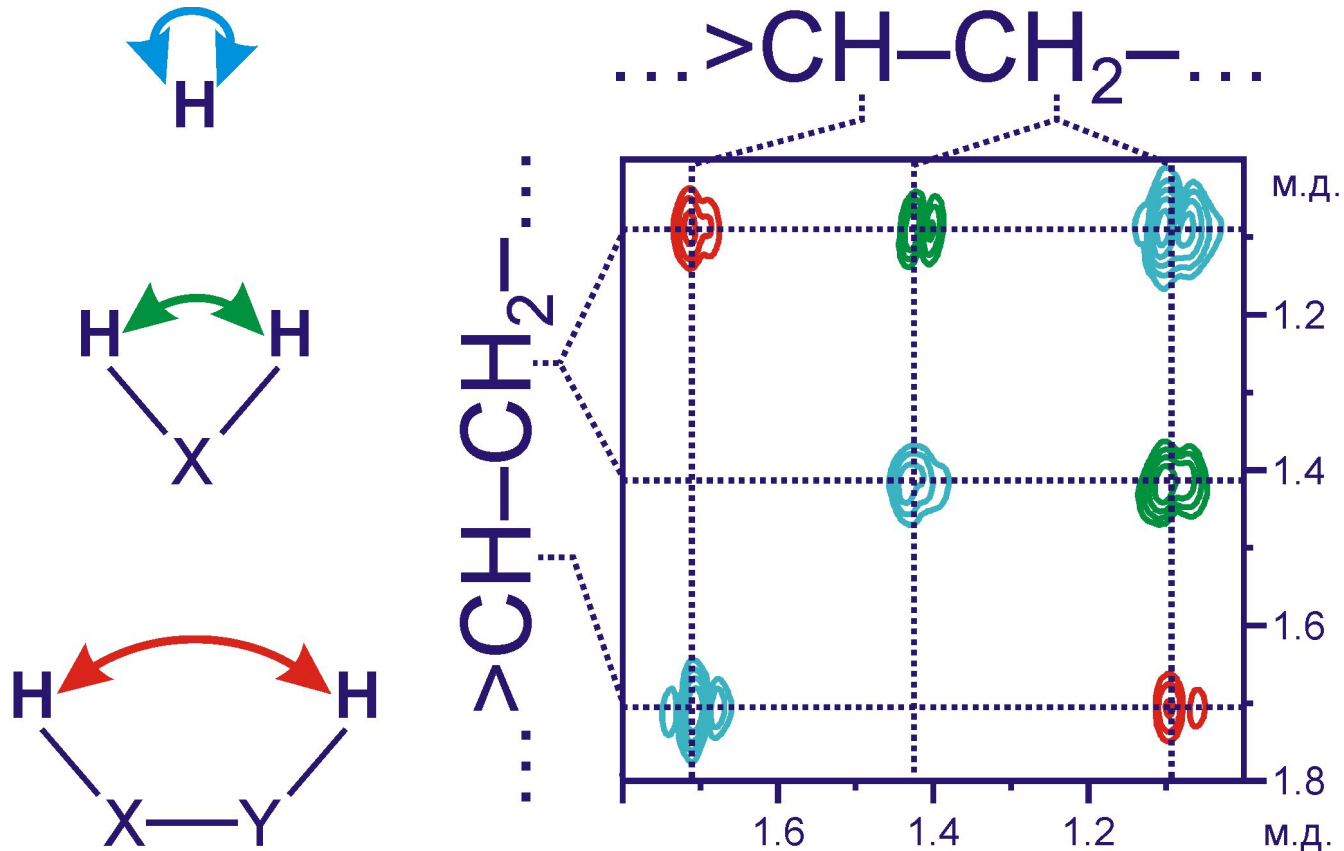
используемые для определения строения молекул

- 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 HMBC**

# Гомоядерная спектроскопия

## 2D COSY

(**C**ORRELATION **S**pectroscop**Y**)



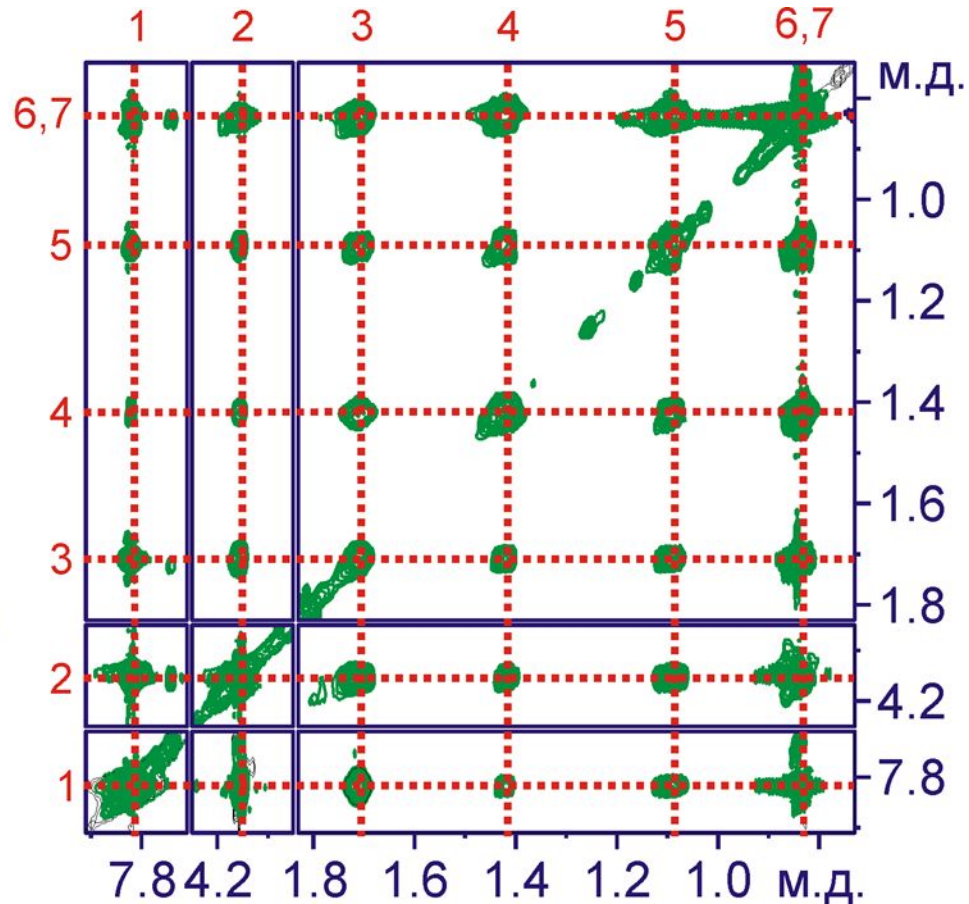
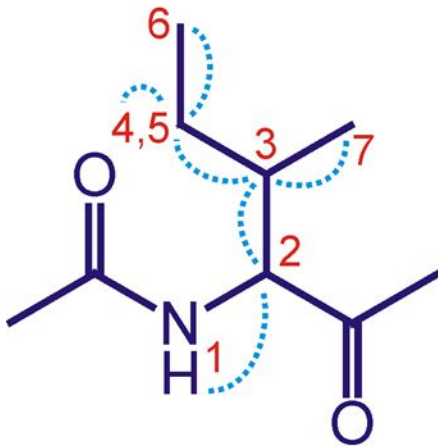
# Гомоядерная спектроскопия

## 2D TOCSY

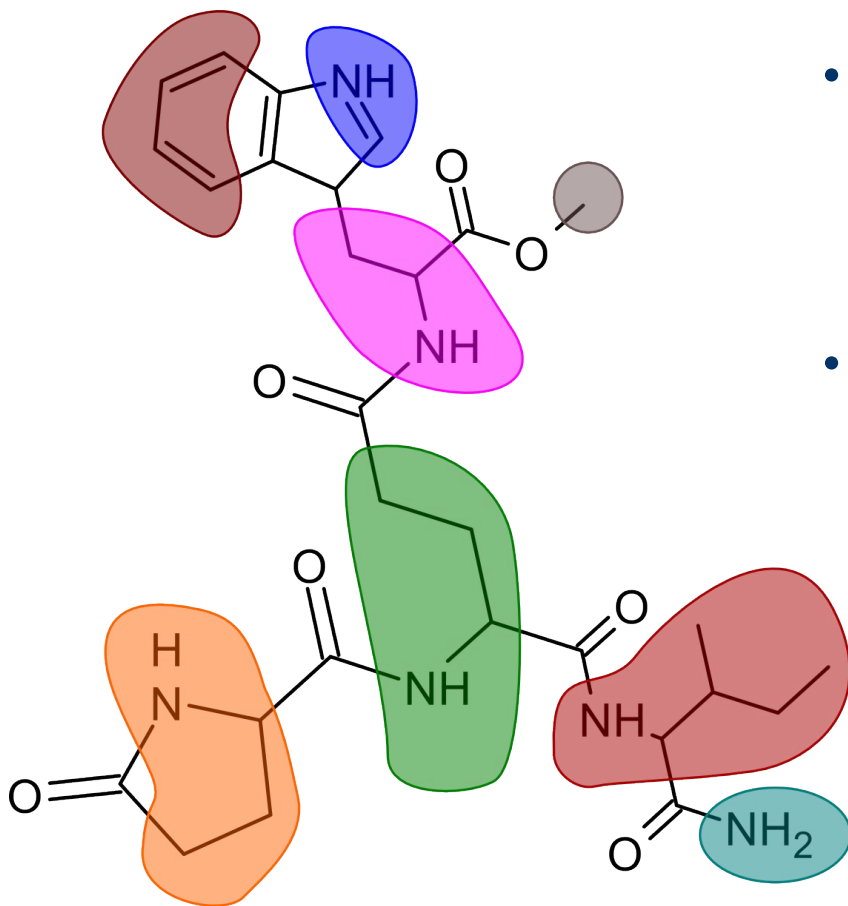
(**T**otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**)

..... COSY контакты

TOCSY контакты - с  
любого атома 1-7 на  
любой атом 1-7



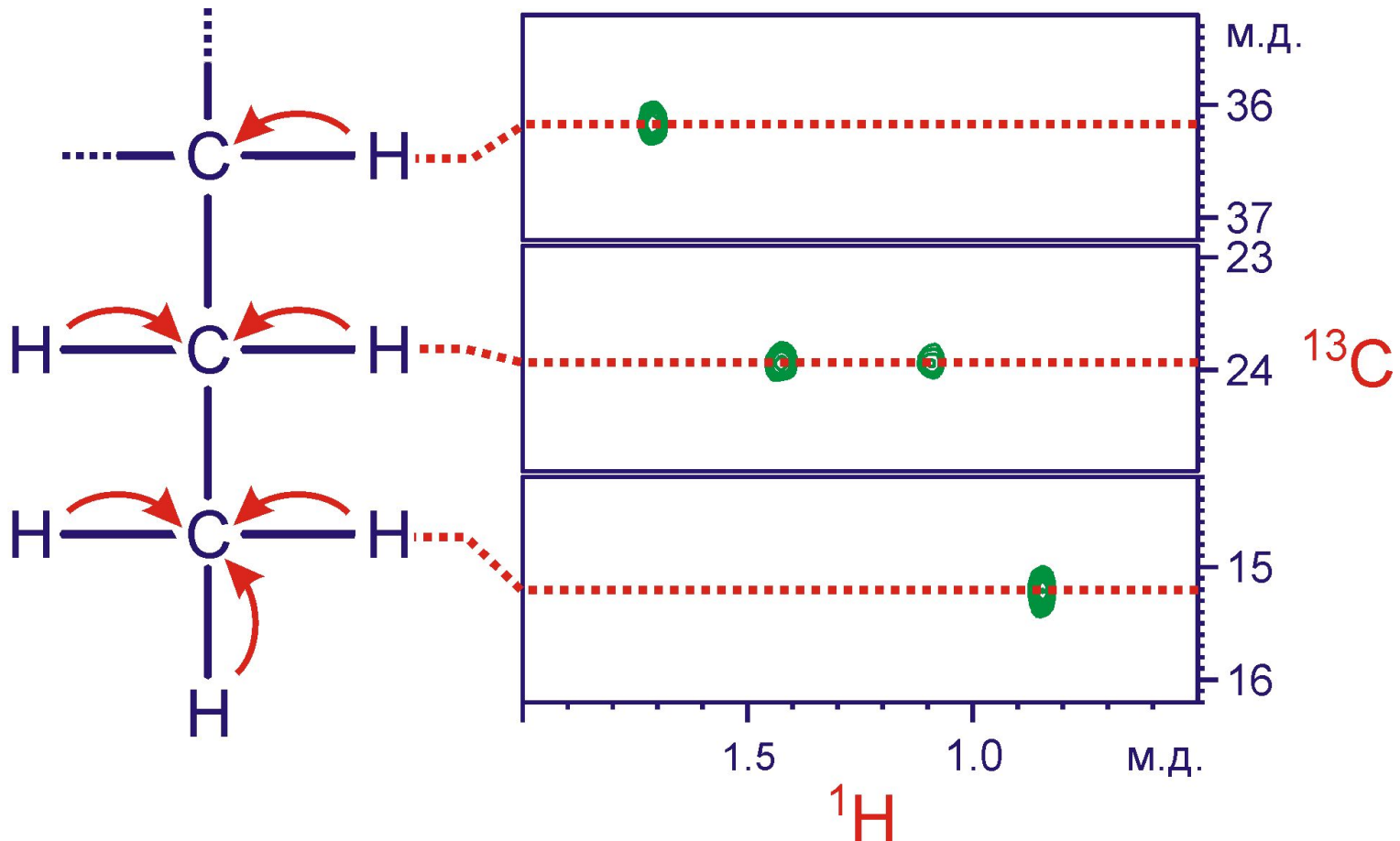
# TOCSY/COSY спектры позволяют выделить **спиновые системы**



- Протоны внутри спиновой системы связаны друг с другом по спектрам COSY/TOCSY
- Спиновые системы отделены друг от друга атомами углерода/азота/кислорода/серы, пр. *без протонов*
- Гомоядерная спектроскопия не позволяет связать спиновые системы между собой

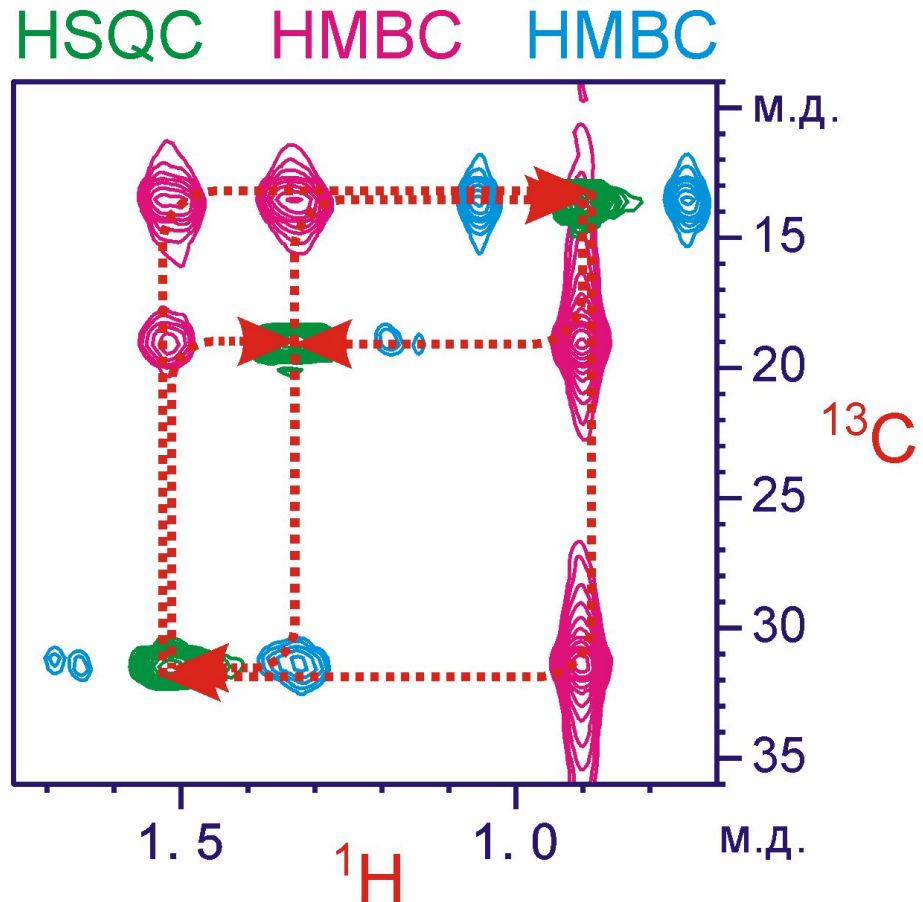
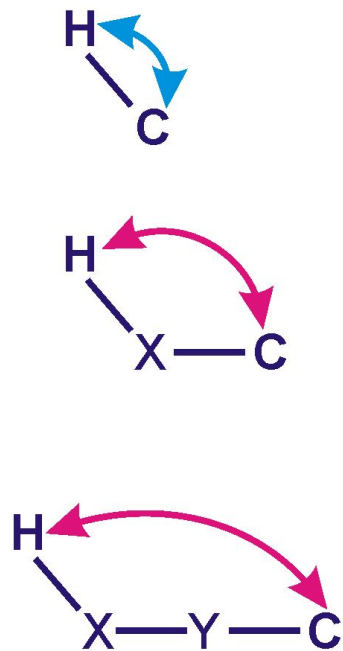
# Гетероядерная спектроскопия

## 2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)



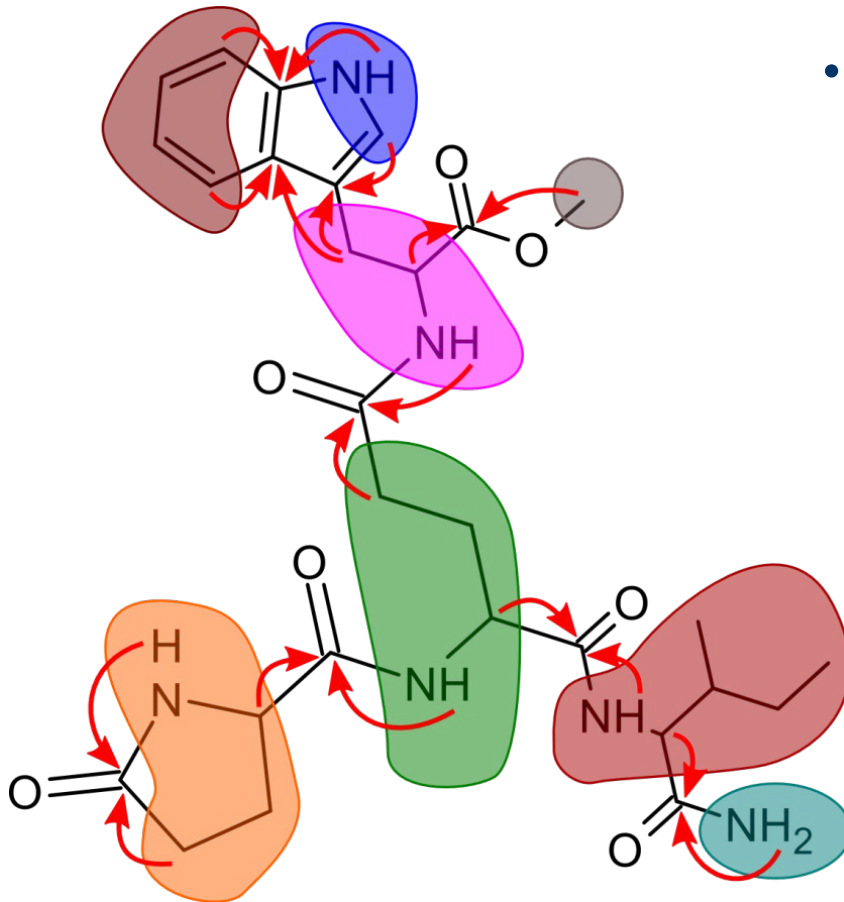
# Гетероядерная спектроскопия

## 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)



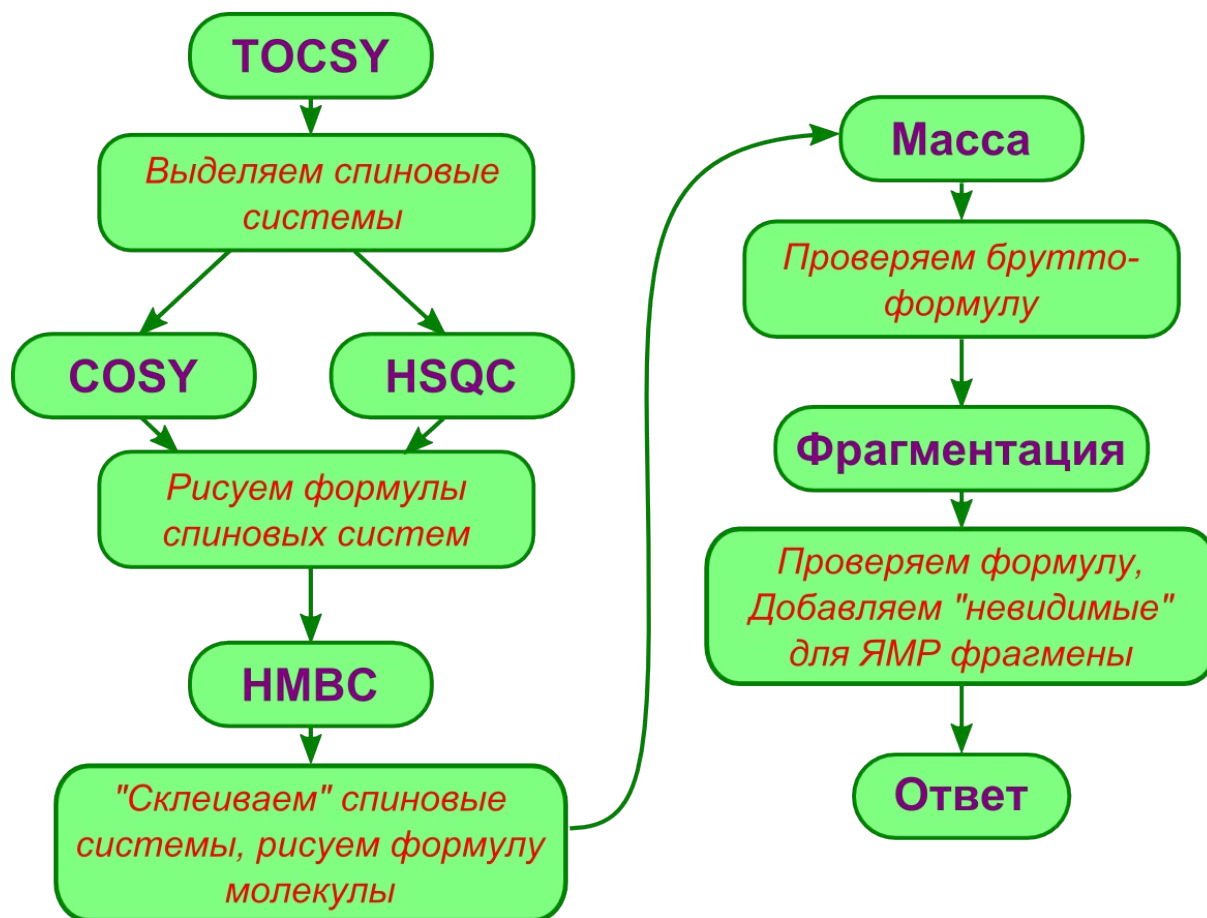


## HMBC связывает спиновые системы друг с другом



- Каждый кросс-пик в HMBC за пределы спиновой системы показывает «новые» спины
- Если один и тот же спин виден из разных спиновых систем, то мы можем «связать» их друг с другом, собрав молекулу из отдельных фрагментов

# Порядок действий



# Благодарности

В лекции были использованы образцы и фрагменты спектров, предоставленные:

- **Абдильданова Асель Абаевна**, Алматы, Казахстан, Институт химических наук им. А.Б. Бектурова
- **Болдырев Иван Александрович**, ИБХ РАН, Лаборатория химии липидов
- **Дейгин Владислав Исаакович**, ИБХ РАН, Лаборатория биофармацевтики
- **Кемельбеков Улан Сатыбалдыулы**, Кокшетау, Казахстан, КГУ им. Ш. Уалиханова, Лаборатория инженерного профиля ЯМР-спектроскопии.
- **Константинова Ирина Дмитриевна**, ИБХ РАН, Лаборатория биотехнологии
- **Осмаков Дмитрий Игоревич**, ИБХ РАН, Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов
- **Саблина Марина Александровна**, ИБХ РАН, Лаборатория углеводов
- **Ямпольский Илья Викторович**, ИБХ РАН, Лаборатория биофотоники