Как разгадать «химический кроссворд»

ДУБИННЫЙ Максим Анатольевич

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

ИБХ РАН, Москва

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»?

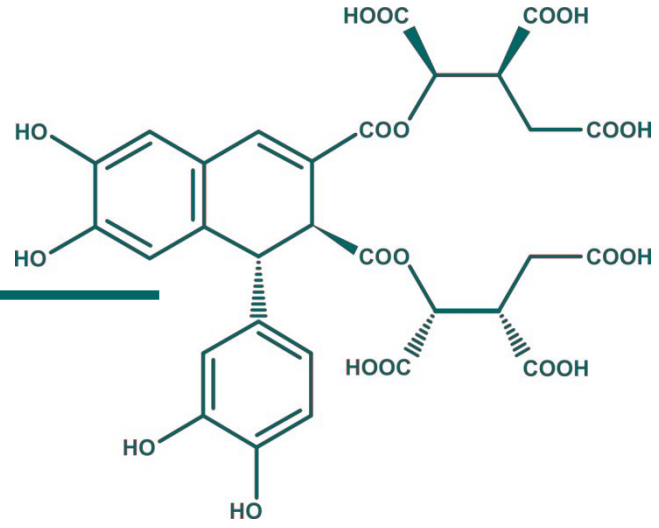
- **Масс-спектры**
  - *m/z* молекулы
  - *m/z* фрагментов
  - Брутто-формула:

$$C_{33}H_{26}O_{20}$$

Совпало?

Возьми с полки пирожок

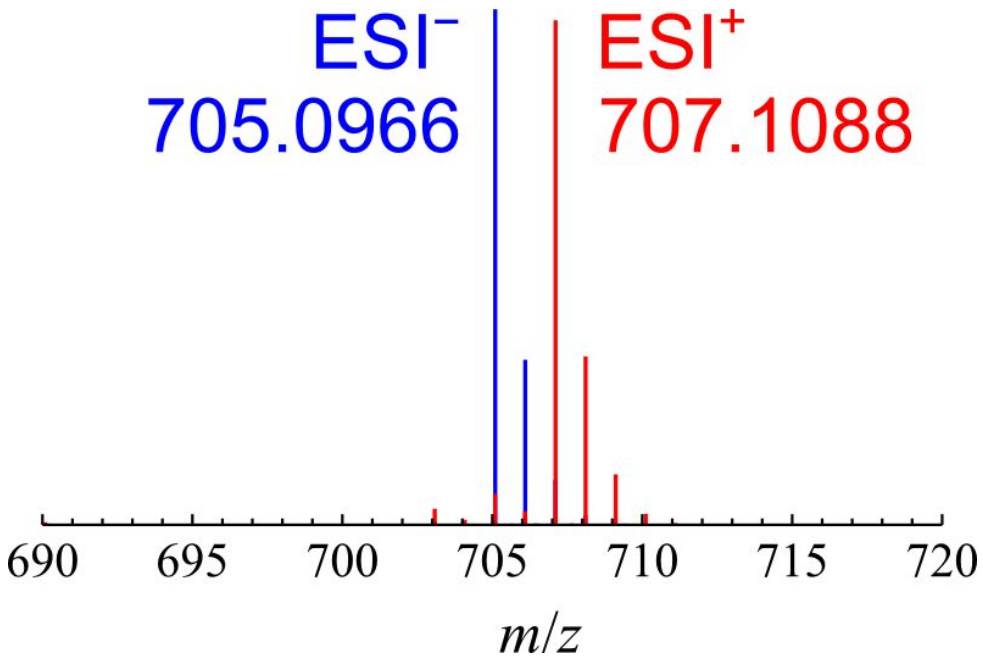
- **ЯМР спектры**
  - Спиновые системы
  - Формулы фрагментов
  - Химическая формула:



Современный масс-спектрометр

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

Масс спектр

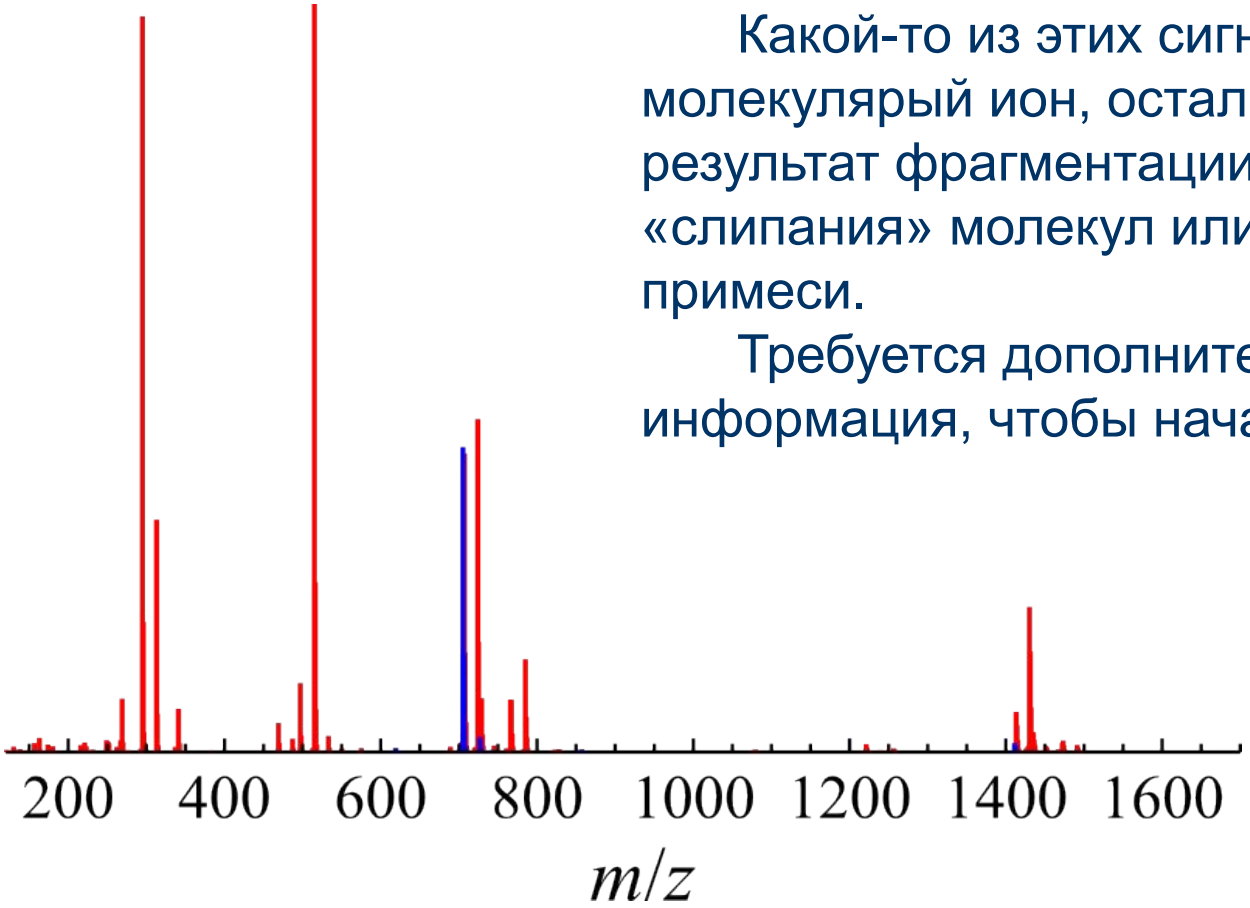


$C_{30}H_{26}O_{20}$:

C 12.000000
H 1.007825
O 15.994915
e 0.000549

MH- 705.094474
MH+ 707.109026

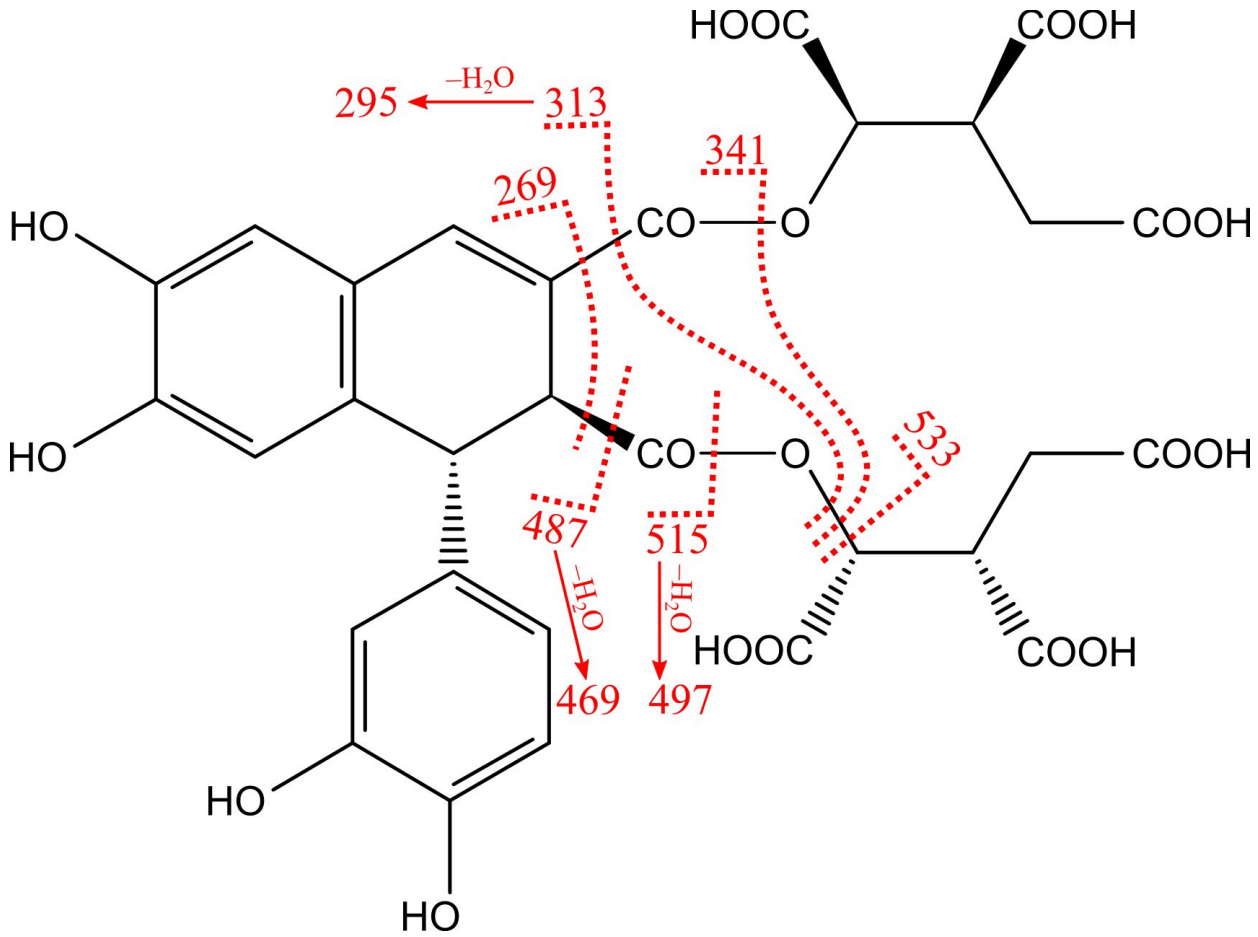
На самом деле :(



Какой-то из этих сигналов – молекулярый 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}C)
^{1}H	+½	99.98%	600.1 МГц	5.87×10^{3}
^{2}H	+1	0.02%	92.1 МГц	6.52×10^{-3}
^{13}C	+½	1.07%	150.9 МГц	1.00
^{15}N	−½	0.364%	60.8 МГц	2.23×10^{-2}
^{31}P	+½	100.0%	242.9 МГц	3.91×10^{2}
^{19}F	+½	100.0%	564.7 МГц	4.89×10^{3}

Что снимаем?

Имея 1-10 мг вещества с MW 100-1000:

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

Когда НЕ снимаем?

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

Растворители для ЯМР спектроскопии: H_2O

- **H_2O + 10% D_2O.** Используется для расчета структур белков в естественном окружении, а так же для съемки спектров любых соединений, растворимых в воде.
- ***Сигнал растворителя:*** ^1H = 4.7 м.д.
- ***Присутствуют*** ^1H сигналы: N**H**, N**H**$_2$, N**H**$_3^+$.
- ***Отсутствуют*** ^1H сигналы: O**H**, COO**H**, PO$_{3-4}$**H**, SO$_{3-4}$**H**
- ***Съемка спектров:*** любых, кроме HMBC. Искажены величины интегралов из-за подавления растворителя

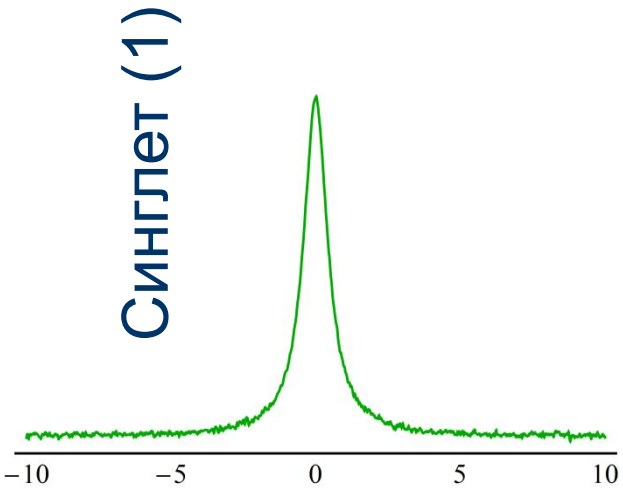
Растворители для ЯМР спектроскопии: D_2O ($D={}^2H$)

- Хорошо подходит для образцов, не содержащих N**H**, N**H**$_2$ групп. Для белков медленная скорость обмена N**H**↔N**D** говорит о наличии водородной связи.
- ***Сигнал растворителя:*** ^1H = 4.7 м.д.
- ***Отсутствуют*** ^1H сигналы: те же, что и в H_2O + N**H**, N**H**$_2$, N**H**$_3^+$
- ***Съемка спектров:*** любых

Другие растворители

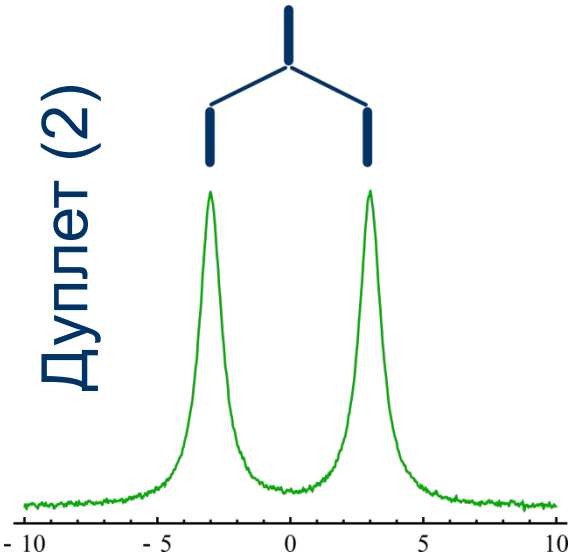
Формула	^{1}H, м.д. (мультиплетность)	^{13}C, м.д. (мультиплетность)	Сигнал HOD	Примечания
Метанол-$d_{3,4}$	4.78(1) **3.31**(5)	**49.15**(7)	4.9	Протонный, гидрофильный
DMSO-d_6	**2.50**(5)	**39.51**(7)	3.3	Апротонный, гигроскопичный
$CDCl_3$	**7.24**(1)	**77.23**(3)	1.5	Апротонный, Гидрофобный
Этанол-$d_{5,6}$	5.19(1) 3.56(1) 1.11(m)	56.96(5) 17.31(7)	5.3	Протонный, гидрофильный
Ацетон-d_6	2.05(5)	29.92(7) 206.68(1)	2.8	Апротонный
Цикло-гексан-d_{12}	1.38(1)	26.43(5)	0.8	Апротонный, гидрофобный

Мультиплетность сигналов ^1H

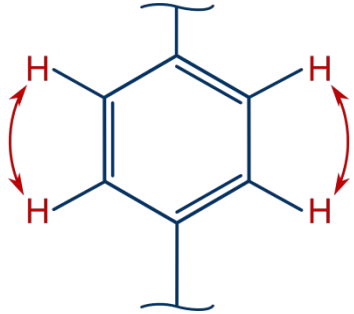


…−N^+−$(CH_3)_3$

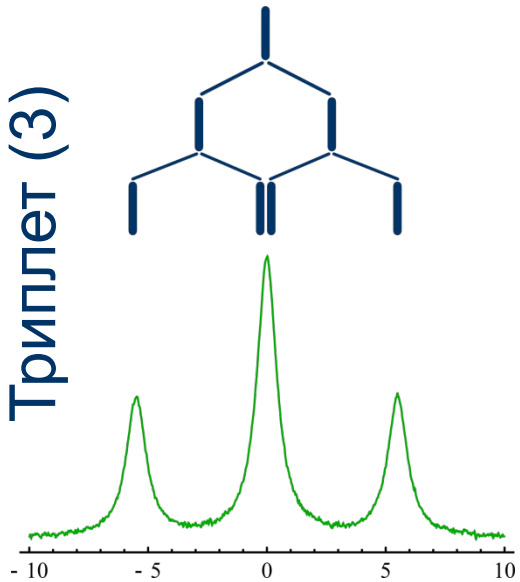
Отсутствуют другие ***неэквивалентные*** протоны в пределах 3х химических связей



Один протон в пределах 3х связей

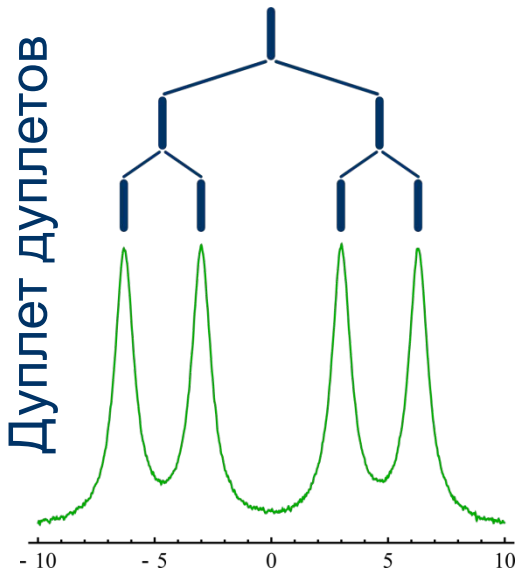


Мультиплетность сигналов ^1H



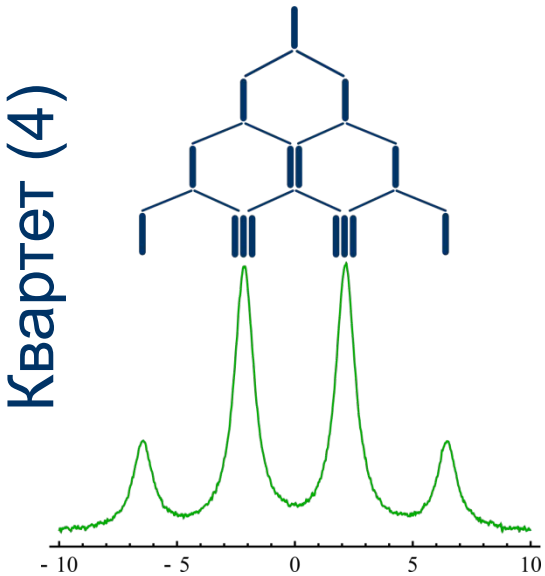
CH_3-CH_2- …

Два эквивалентных соседа



NH−CH−CHOH

Два **НЕ**эквивалентных соседа



CH_3-CH_2-O- …

Три соседа

Химические сдвиги ^1H

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

Химические сдвиги ^{13}C

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

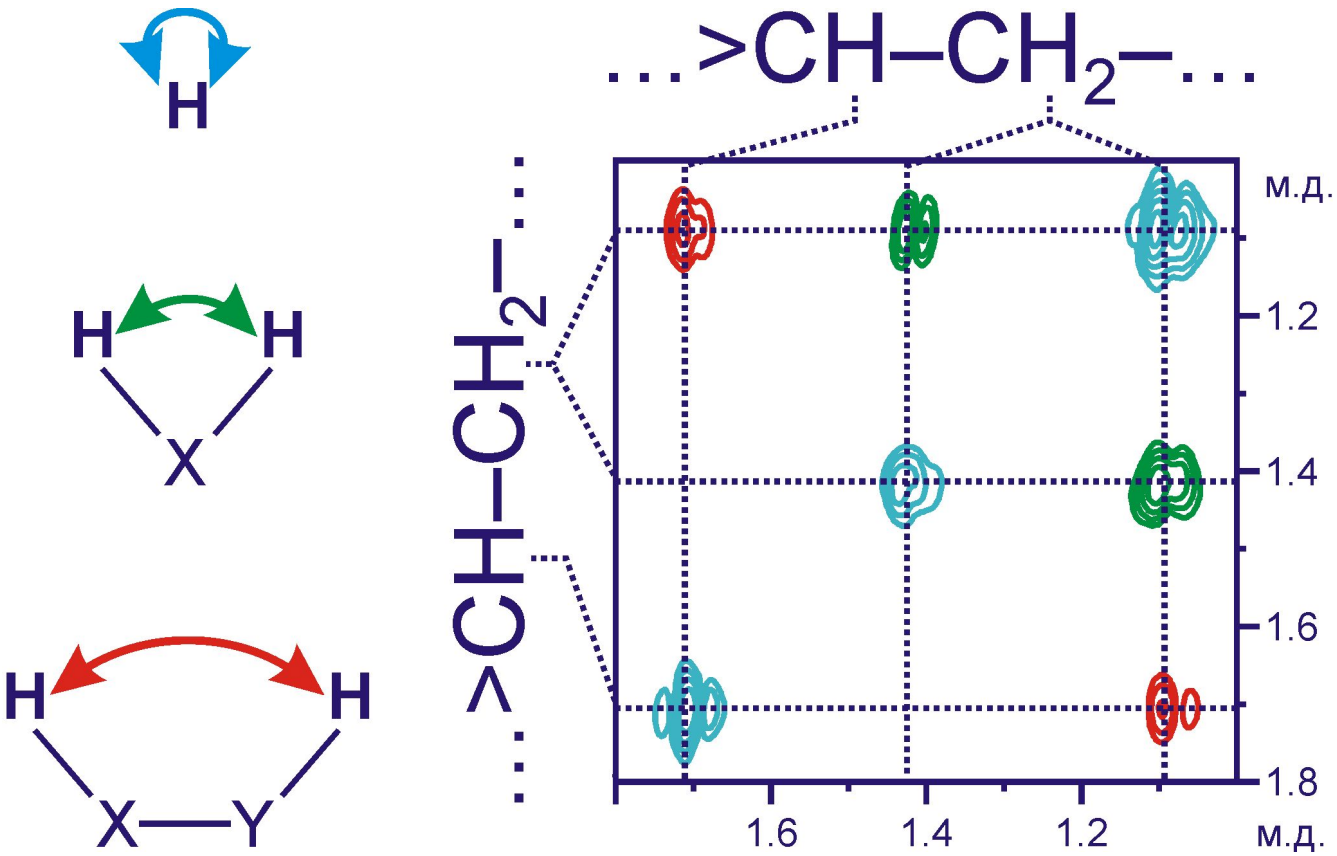
Виды 2D ЯМР спектров,

используемые для определения строения молекул

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

Гомоядерная спектроскопия

2D COSY
(COrrelation SpectroscopY)



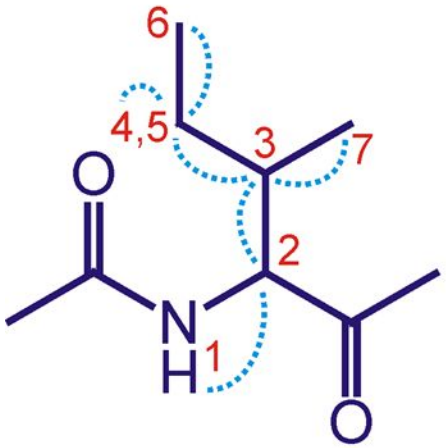
Гомоядерная спектроскопия

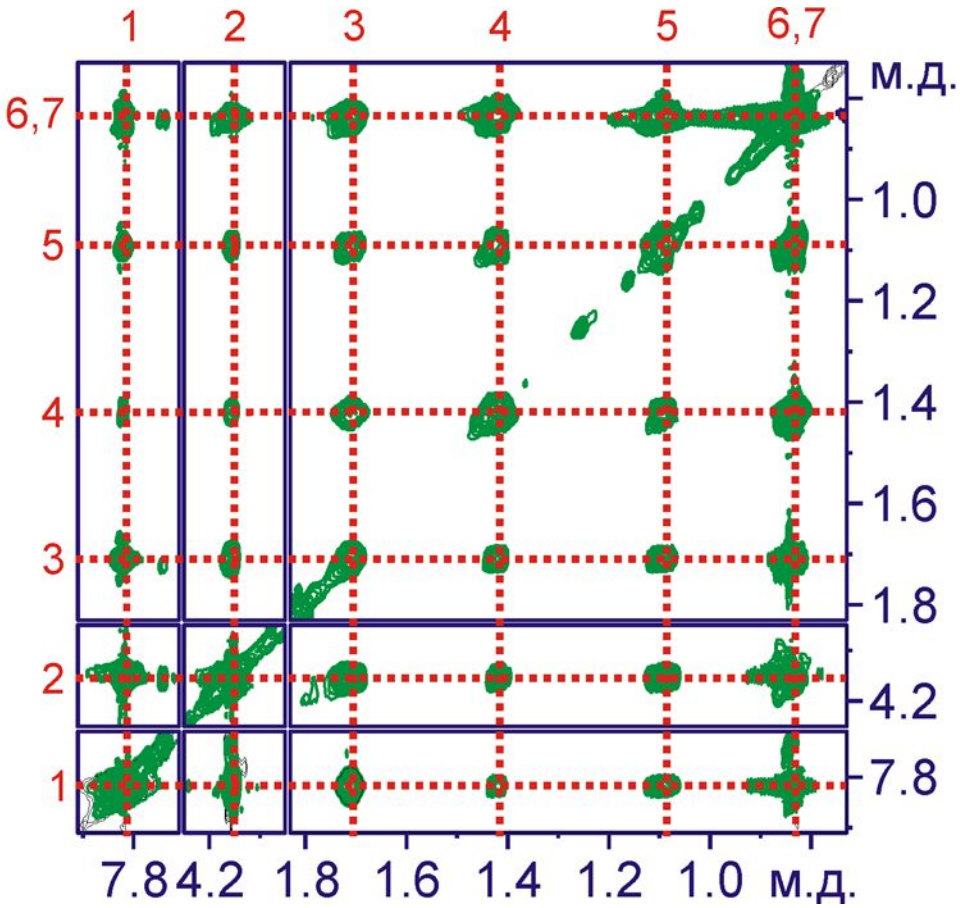
2D TOCSY

(TOtal Correlation SpectroscopY)

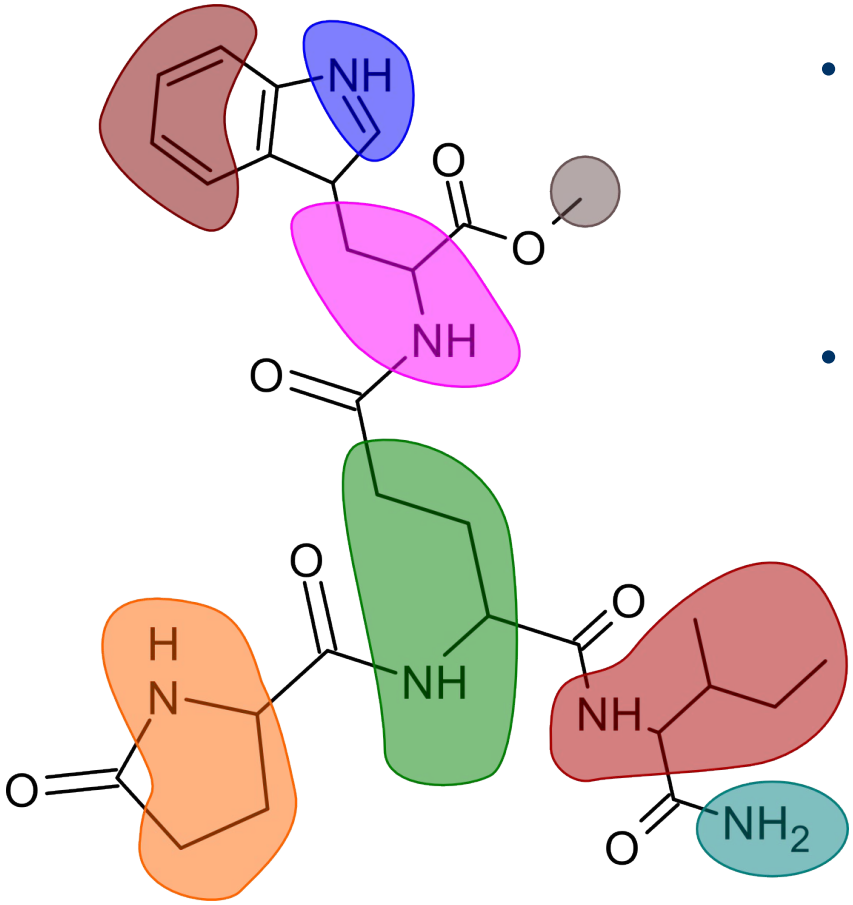
COSY контакты

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





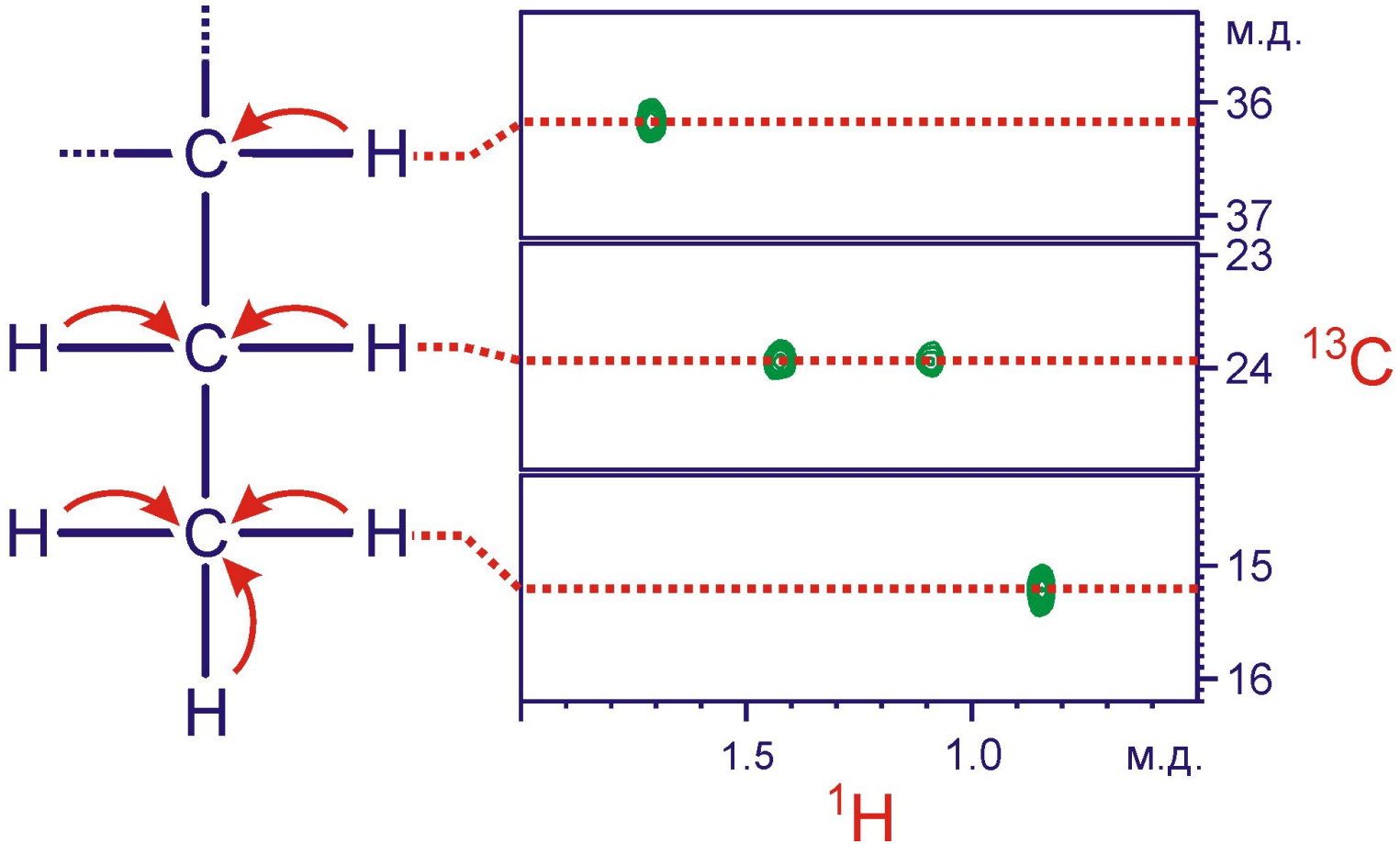
TOCSY/COSY спектры позволяют выделить *спиновые системы*



- 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

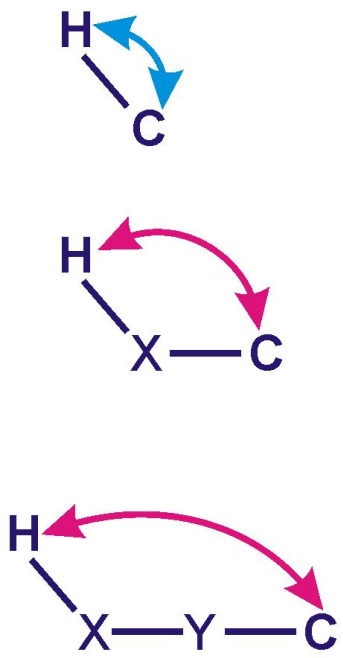
Гетероядерная спектроскопия

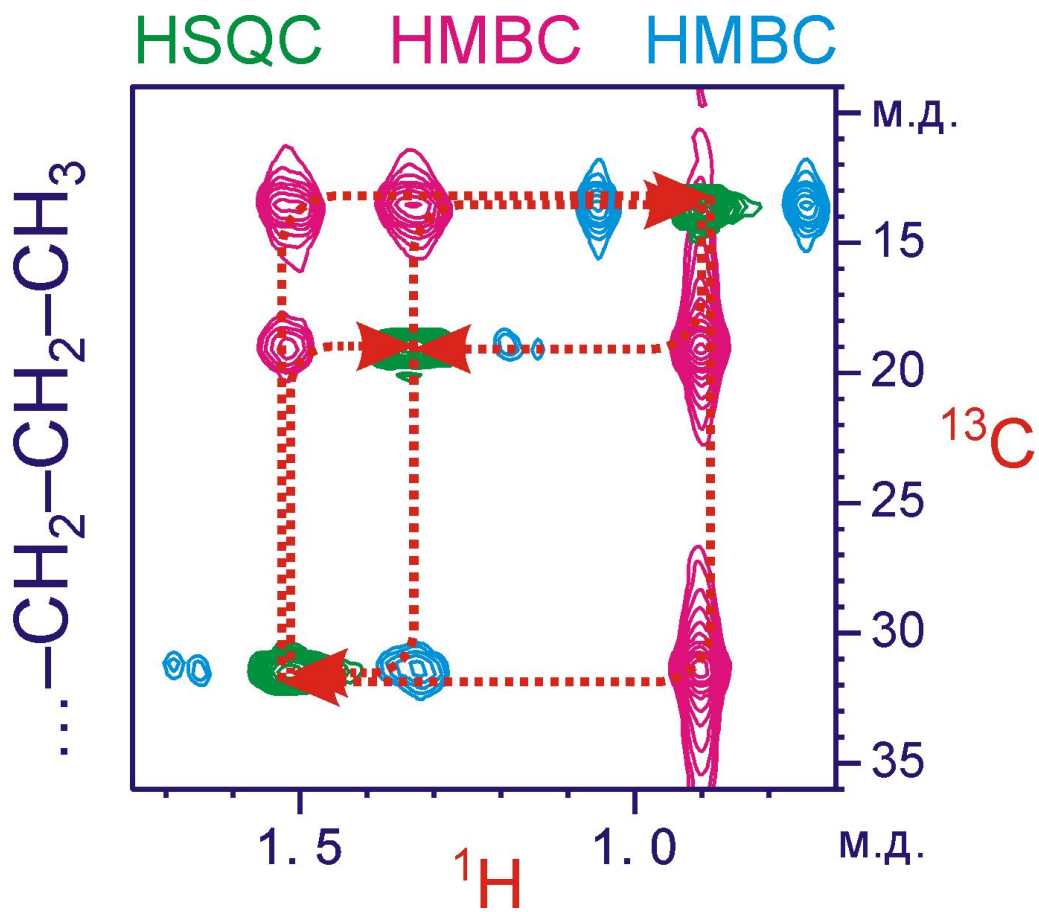
2D HSQC
(Heteronuclear Single Quantum Coherence)



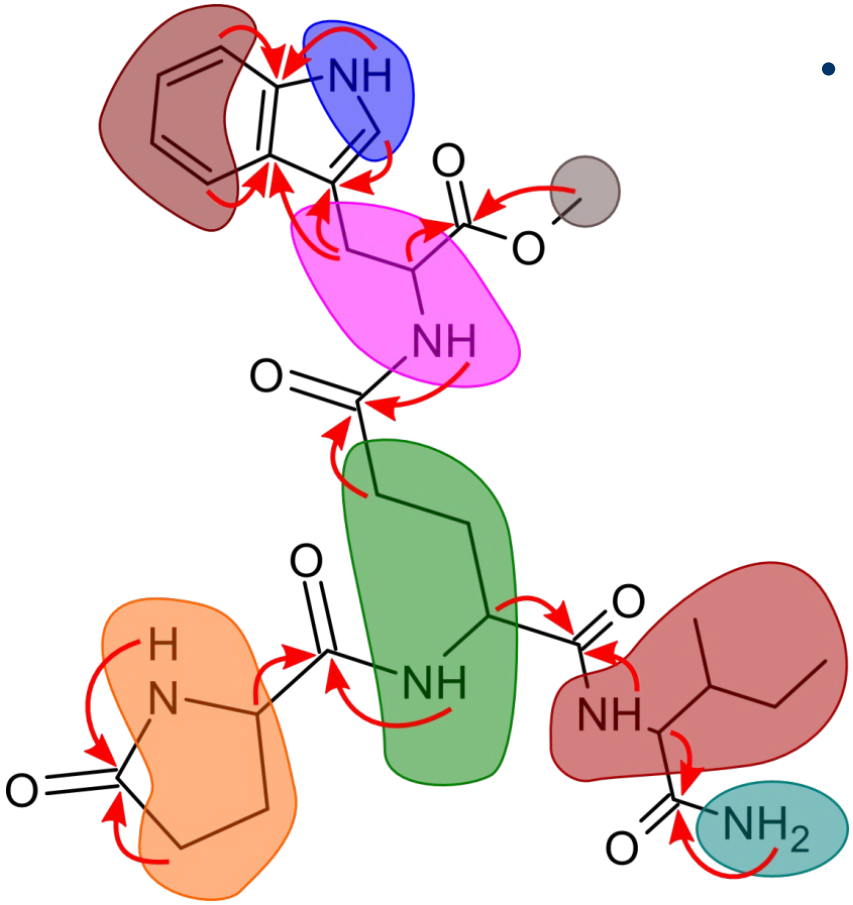
Гетероядерная спектроскопия

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