

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:**

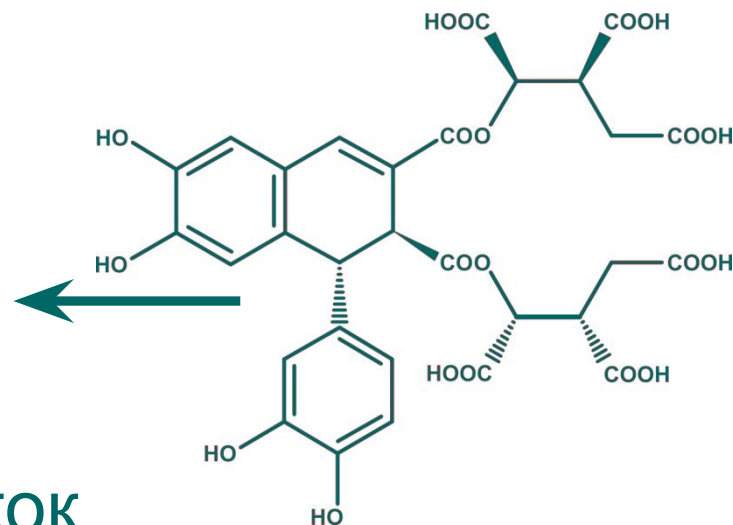


Совпало?

Возьми с полки пирожок

- **ЯМР спектры**

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

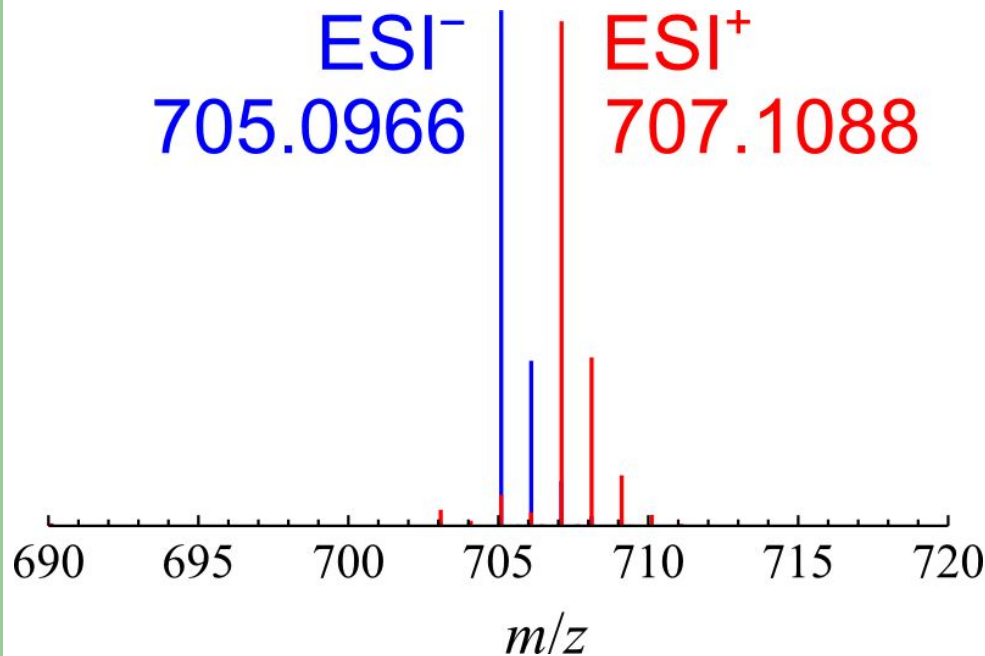


Современный масс-спектрометр

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



Масс спектр



C 12.000000

H 1.007825

O 15.994915

e 0.000549

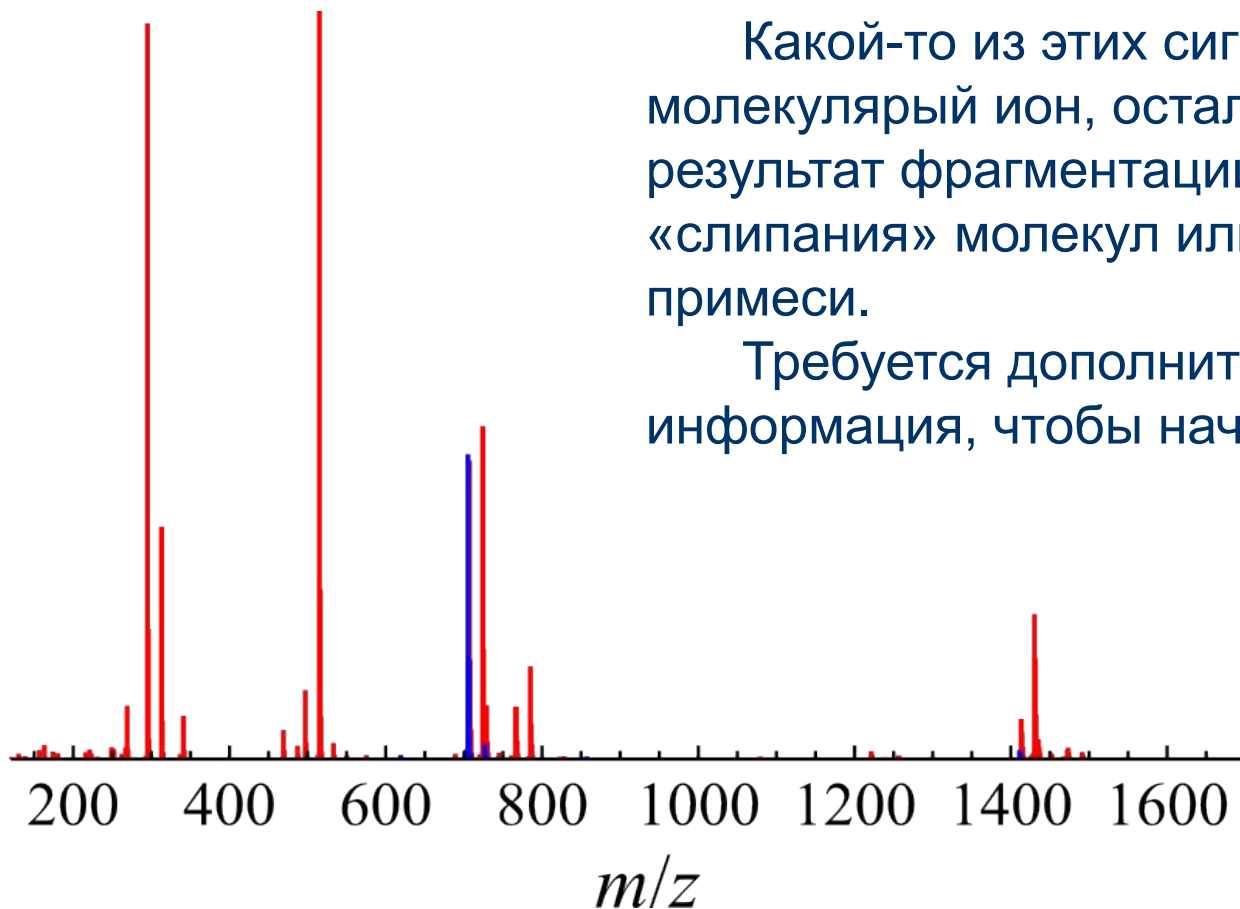
MH⁻ 705.094474

MH⁺ 707.109026

На самом деле :(

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

Требуется дополнительная информация, чтобы начать анализ.



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) |
|-----------------|--------|-------------------------|-------------------------------|---|
| ^1H | $+1/2$ | 99.98% | 600.1 МГц | 5.87×10^3 |
| ^2H | +1 | 0.02% | 92.1 МГц | 6.52×10^{-3} |
| ^{13}C | $+1/2$ | 1.07% | 150.9 МГц | 1.00 |
| ^{15}N | $-1/2$ | 0.364% | 60.8 МГц | 2.23×10^{-2} |
| ^{31}P | $+1/2$ | 100.0% | 242.9 МГц | 3.91×10^2 |
| ^{19}F | $+1/2$ | 100.0% | 564.7 МГц | 4.89×10^3 |

Что снимаем?

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

- **Одномерный ^1H спектр**
от секунд до минут
- **Двумерные ^1H - ^1H (гомоядерные) спектры**
от 30 минут до 12 часов
- **Двумерные ^1H - ^{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 ^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 спектроскопии: H_2O

- $\text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$. 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** ^1H сигналы: NH , NH_2 , NH_3^+ .
- **Отсутствуют** ^1H сигналы: OH , COOH , PO_{3-4}H , SO_{3-4}H
- **Съемка спектров:** любых, кроме НМВС. Искажены величины интегралов из-за подавления растворителя

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

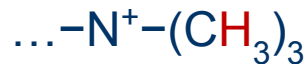
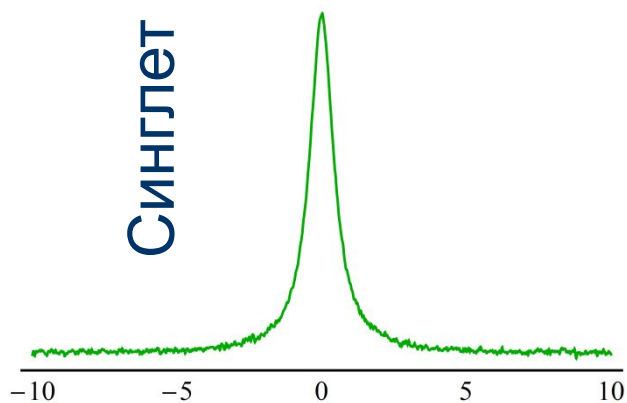
- Хорошо подходит для образцов, не содержащих NH , NH_2 групп. Для белков медленная скорость обмена $NH \leftrightarrow ND$ говорит о наличии водородной связи.
- **Сигнал растворителя:** $^1H = 4.7$ м.д.
- **Отсутствуют** 1H сигналы: те же, что и в $H_2O + NH$, NH_2 , NH_3^+
- **Съемка спектров:** любых

Другие растворители

| Формула | 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 |

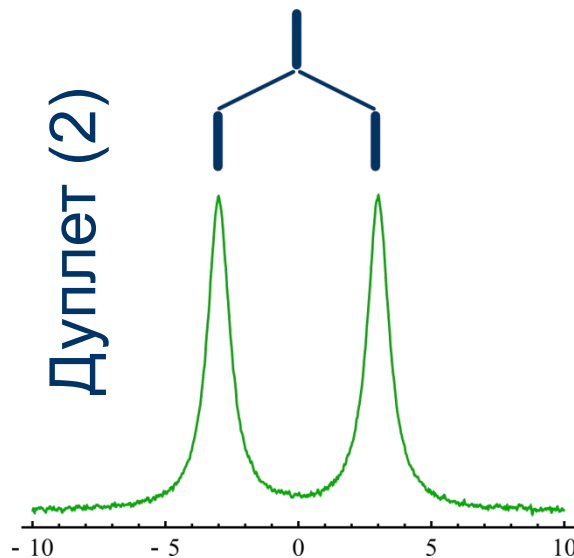
Мультиплетность сигналов ^1H

Синглет (1)

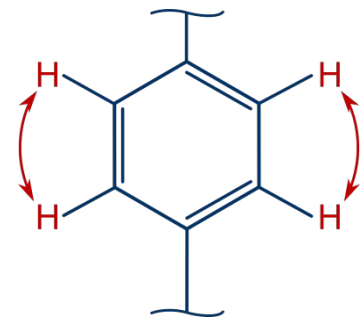


Отсутствуют другие
неэквивалентные
протоны в пределах 3х
химических связей

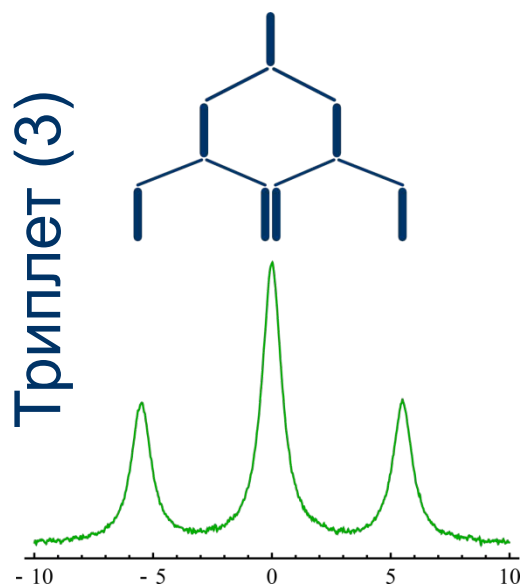
Дуплет (2)



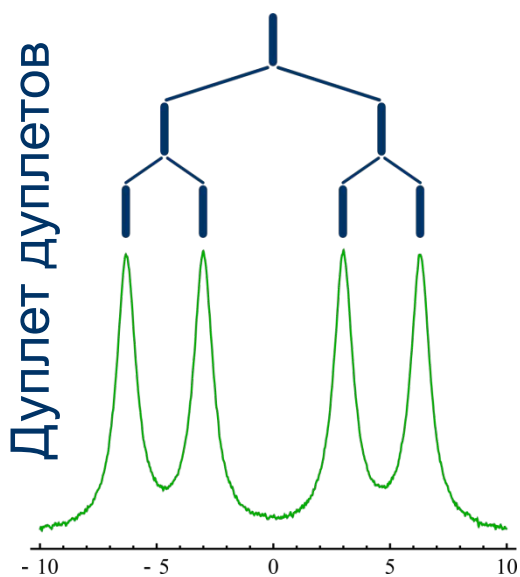
Один протон в
пределах 3х
связей



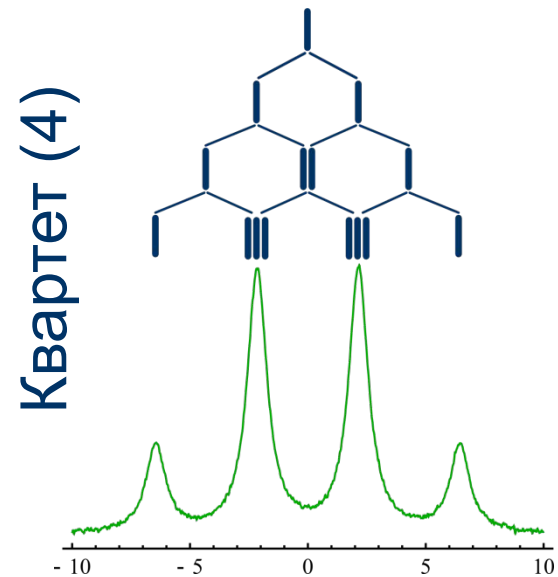
Мультиплетность сигналов ^1H



Два эквивалентных
соседа



Два **НЕ**эквивалентных
соседа



Три соседа

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.

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.

Виды 2D ЯМР спектров,

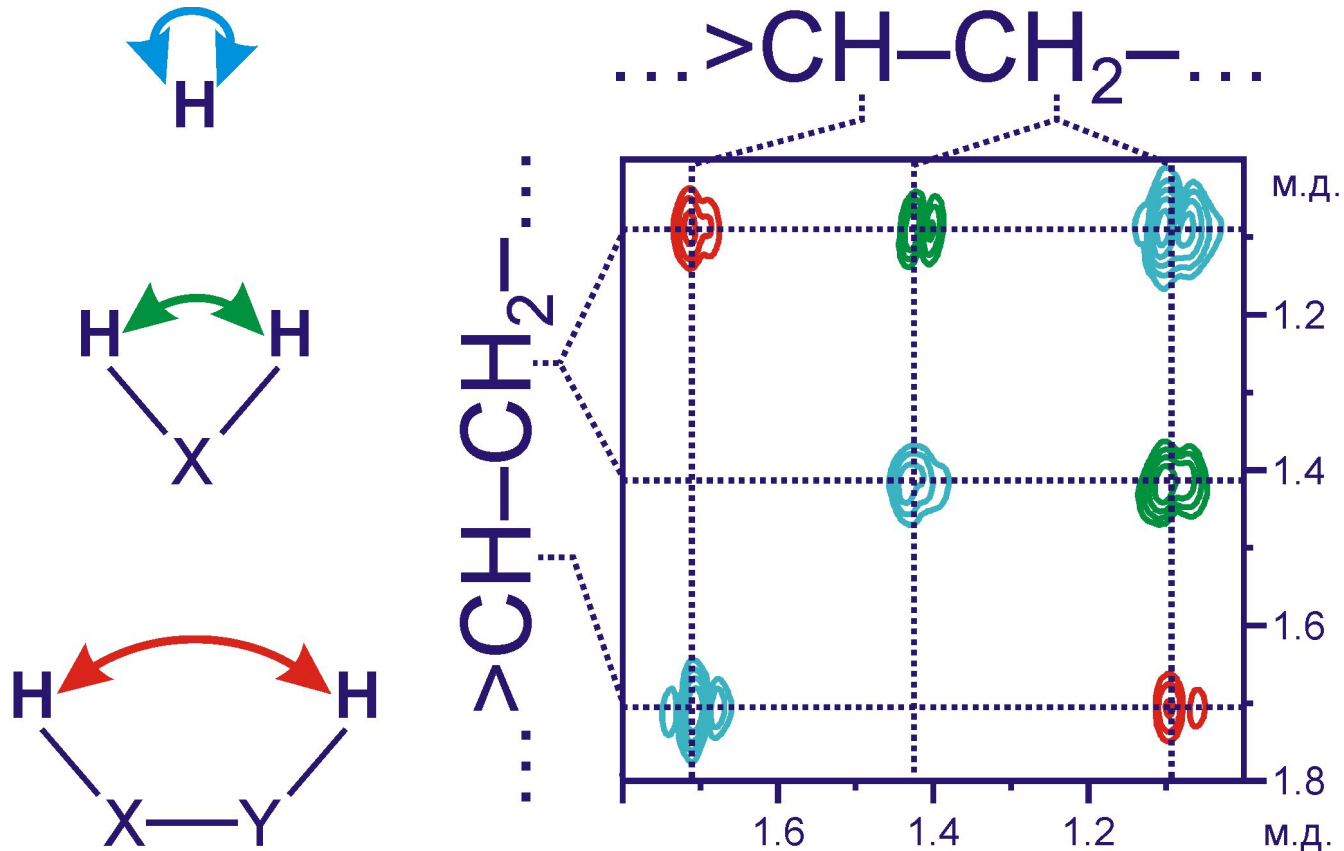
используемые для определения строения молекул

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

Гомоядерная спектроскопия

2D COSY

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



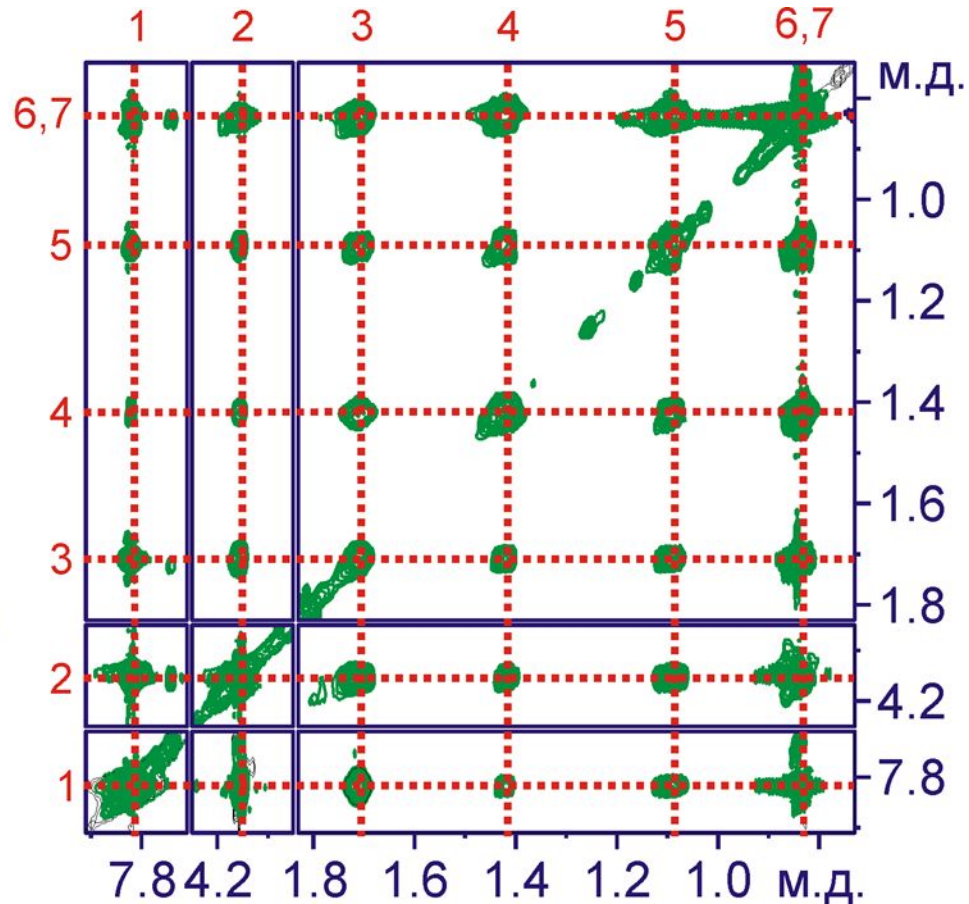
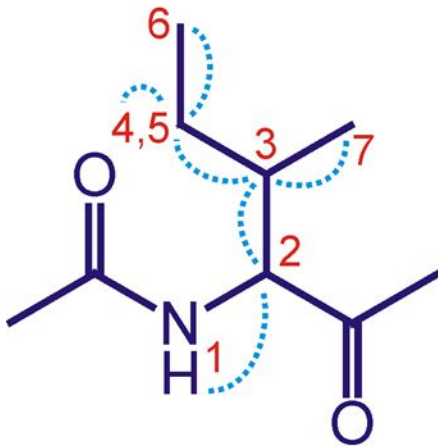
Гомоядерная спектроскопия

2D TOCSY

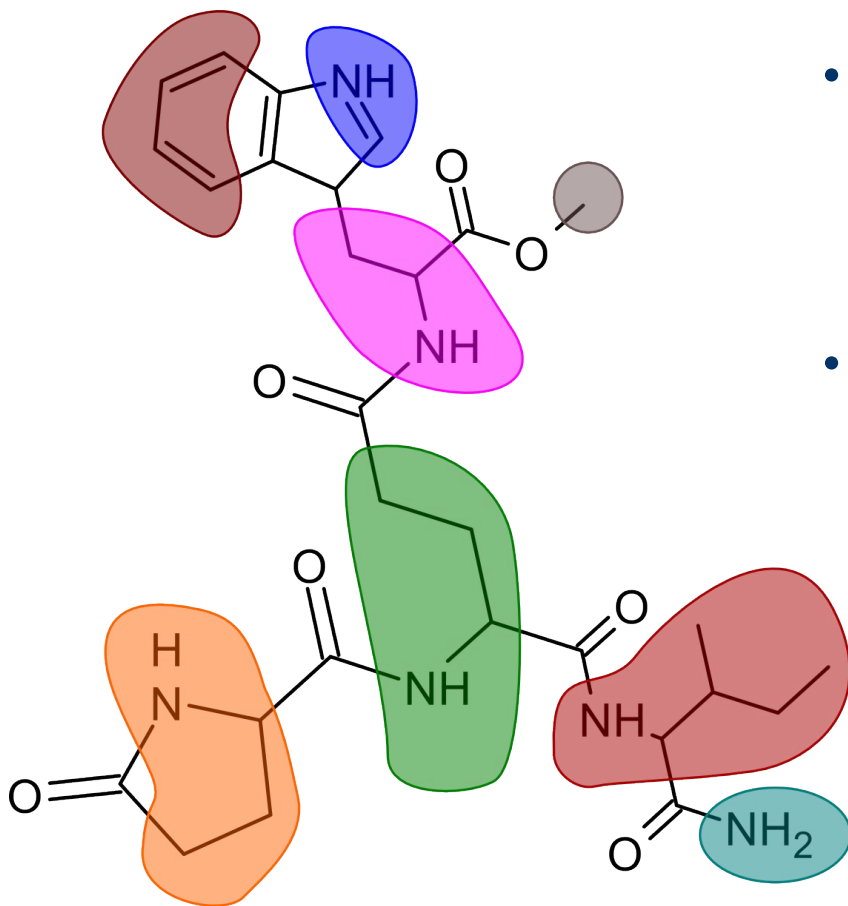
(**T**otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**)

..... COSY контакты

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



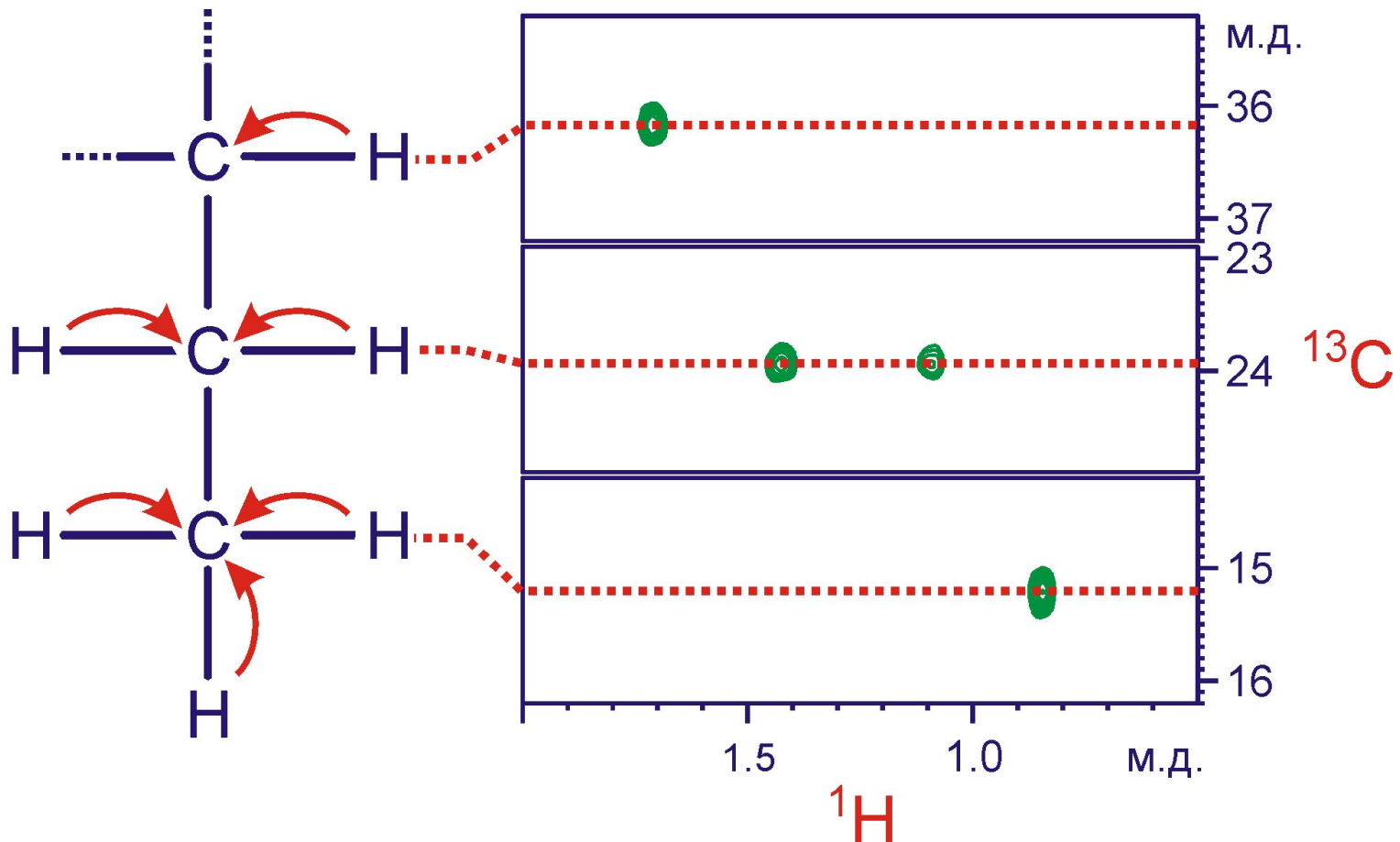
TOCSY/COSY спектры позволяют выделить **спиновые системы**



- 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

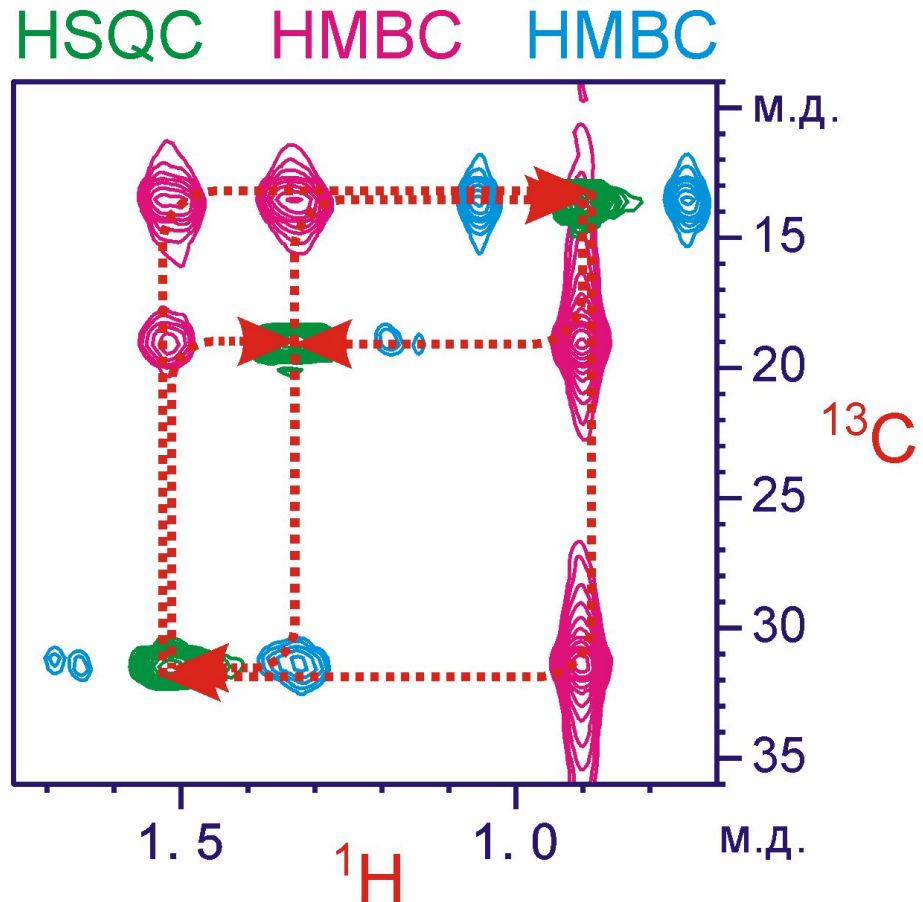
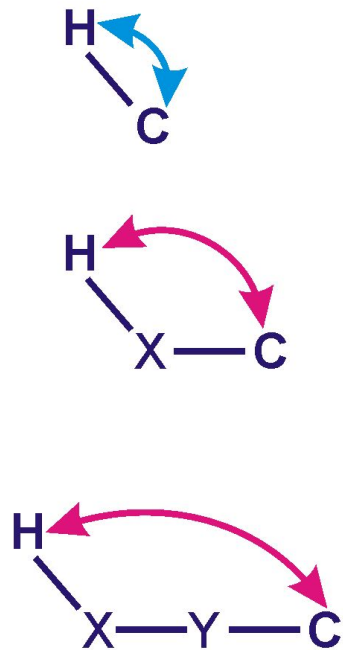
Гетероядерная спектроскопия

2D HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

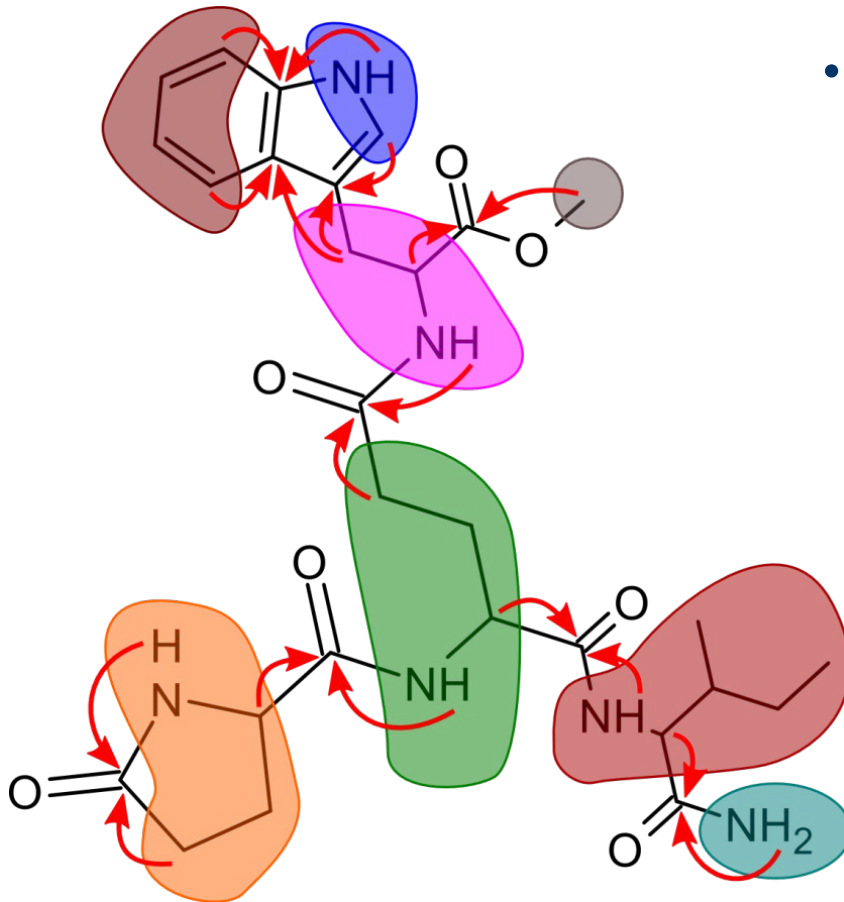


Гетероядерная спектроскопия

2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

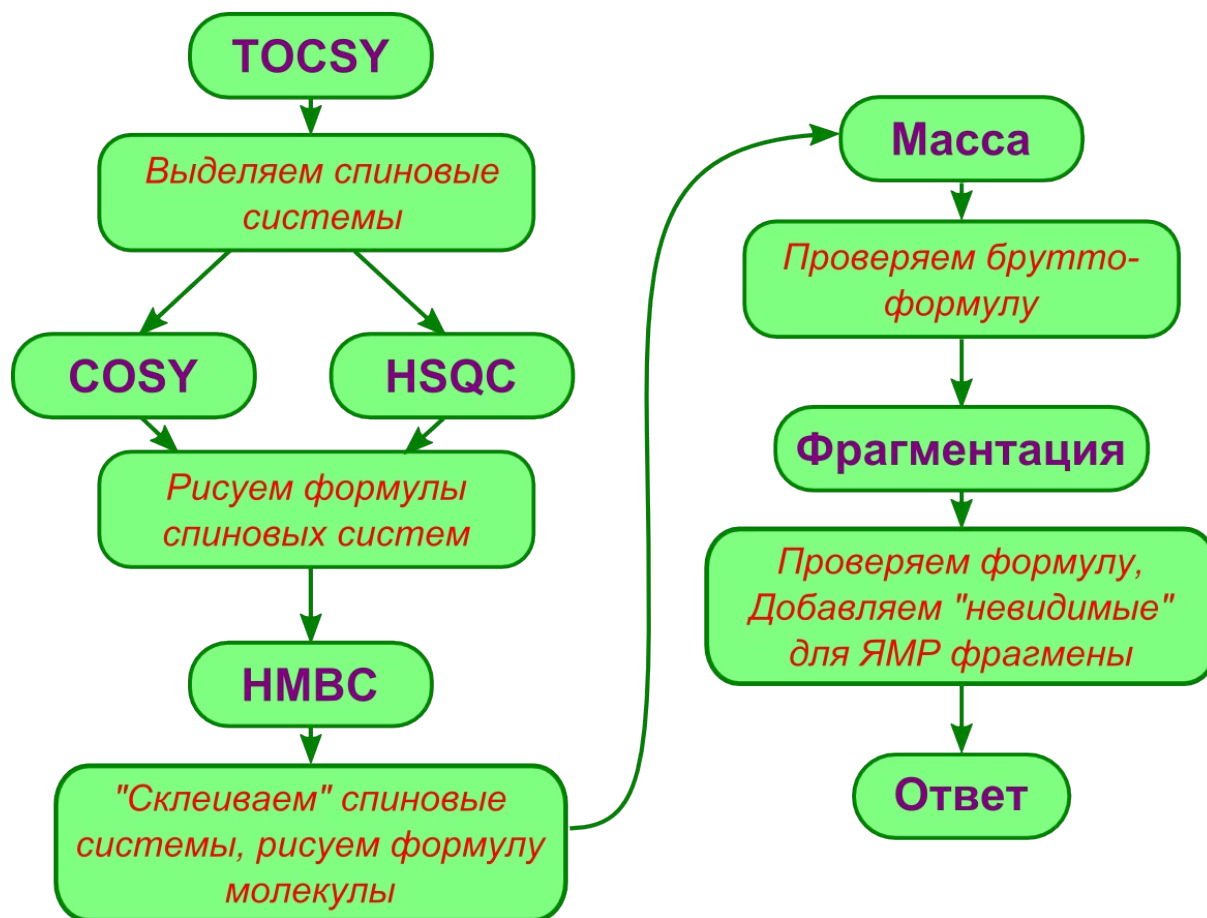


HMBC связывает спиновые системы друг с другом



- 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