

Введение в ЯМР спектроскопию

Юльметов А. Р., Клочков В. В.

Область применения спектроскопии ЯМР

Область применения спектроскопии ЯМР

- ▶ Идентификация химического состава органических и биоорганических соединений в различных фазах.
- ▶ Изучение пространственного строения, конформационных свойств и внутримолекулярной подвижности органических и биоорганических соединений в различных растворителях и лиотропных жидкокристаллических средах.
- ▶ Исследование пространственного строения органических и биоорганических соединений в твердой фазе.



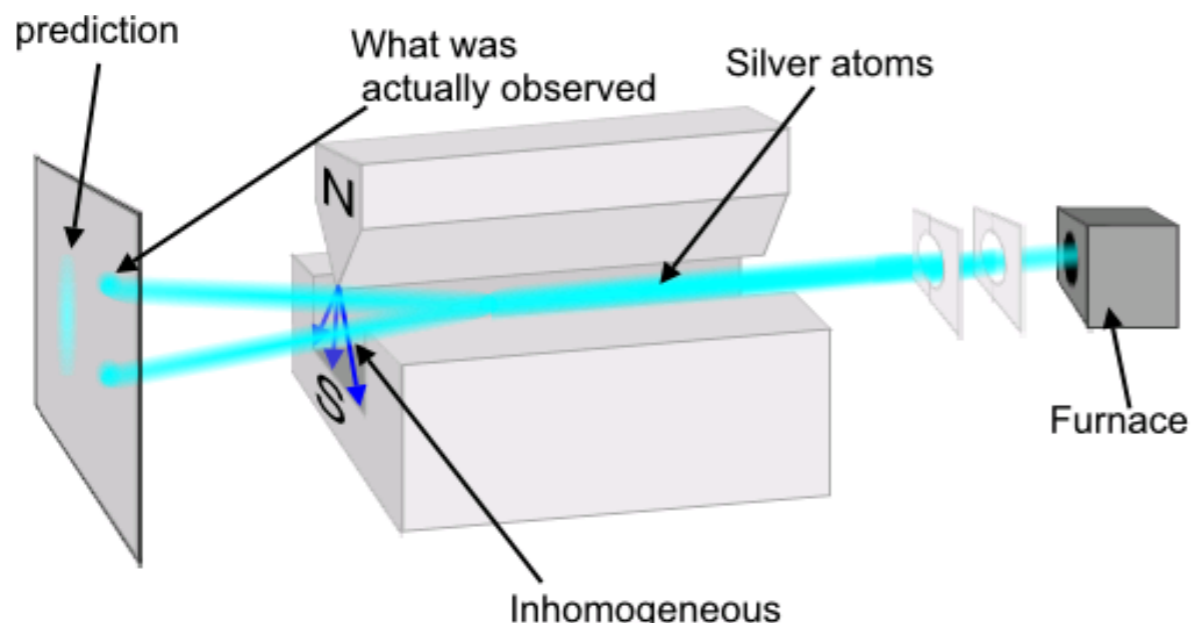
История ЯМР

Предистория



1922 — Опыт Отто Штерна и Вальтера Герлаха. Опыт подтвердил наличие у атомов спина и факт пространственного квантования направления их магнитных моментов.

1939 — Исидор Раби: резонансный метод измерений магнитных свойств атомных ядер. (Нобелевская премия по физике 1944 г.)



Открытие ЭПР

1944 — Евгений Константинович Завойский в Казанском университете впервые экспериментально наблюдал **электронный парамагнитный резонанс**.

Завойский наблюдал сигналы ЯМР в июне 1941 года, но результаты были плохо воспроизводимы. Начавшаяся вскоре война помешала продолжить исследования в этом направлении.



1945 – открытие ЯМР



Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid

E. M. PURCELL, H. C. TORREY, AND R. V. POUND*
*Radiation Laboratory, Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge, Massachusetts*

December 24, 1945

IN the well-known magnetic resonance method for the determination of nuclear magnetic moments by molecular beams,¹ transitions are induced between energy levels which correspond to different orientations of the

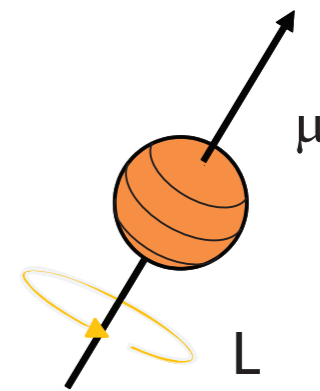
Две независимых группы – Феликс Блох (Станфордский университет) и Эдвард Миллс Пёрселл (Гарвардский университет). Блох наблюдал резонансное поглощение на протонах в воде, а Парселл добился успеха в обнаружении ядерного резонанса на протонах в парафине.

Нобелевская премия по физике за 1952 год.

Что такое ЯМР?

- ▶ Ядра обладают угловым моментом \vec{L} и магнитным моментом $\vec{\mu}$
- ▶ Если ядро с угловым моментом количества движения и магнитным моментом поместить в статическое магнитное поле, то возникнет его прецессия вокруг направления поля с частотой $\omega = \gamma B$
- ▶ В магнитном поле ядро обладает энергией $-\gamma \hbar B m_z$

$$\Delta E = 2\gamma \hbar B I$$

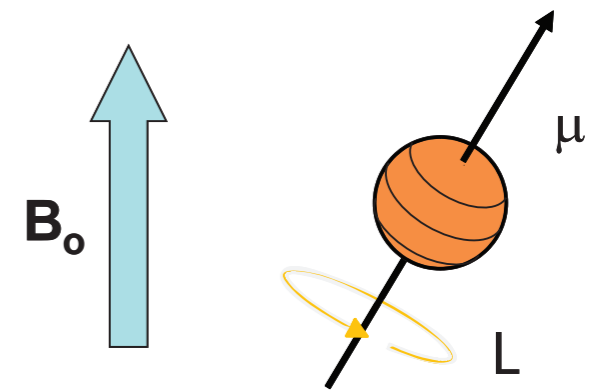


$$\begin{aligned}\vec{L} &= \hbar \sqrt{I(I+1)} \\ \vec{\mu} &= \gamma \hbar I \\ m_z &= -I, \dots, +I\end{aligned}$$

Что такое ЯМР?

- ▶ Ядра обладают угловым моментом \vec{L} и магнитным моментом $\vec{\mu}$
- ▶ Если ядро с угловым моментом количества движения и магнитным моментом поместить в статическое магнитное поле, то возникнет его прецессия вокруг направления поля с частотой $\omega = \gamma B$
- ▶ В магнитном поле ядро обладает энергией $-\gamma \hbar B m_z$

$$\Delta E = 2\gamma \hbar B I$$

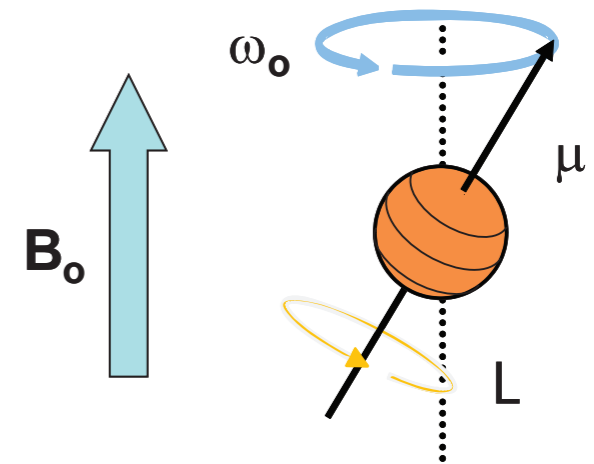


$$\begin{aligned}\vec{L} &= \hbar \sqrt{I(I+1)} \\ \vec{\mu} &= \gamma \hbar I \\ m_z &= -I, \dots, +I\end{aligned}$$

Что такое ЯМР?

- ▶ Ядра обладают угловым моментом \vec{L} и магнитным моментом $\vec{\mu}$
- ▶ Если ядро с угловым моментом количества движения и магнитным моментом поместить в статическое магнитное поле, то возникнет его прецессия вокруг направления поля с частотой $\omega = \gamma B$
- ▶ В магнитном поле ядро обладает энергией $-\gamma \hbar B m_z$

$$\Delta E = 2\gamma \hbar B I$$



$$\begin{aligned}\vec{L} &= \hbar \sqrt{I(I+1)} \\ \vec{\mu} &= \gamma \hbar I \\ m_z &= -I, \dots, +I\end{aligned}$$

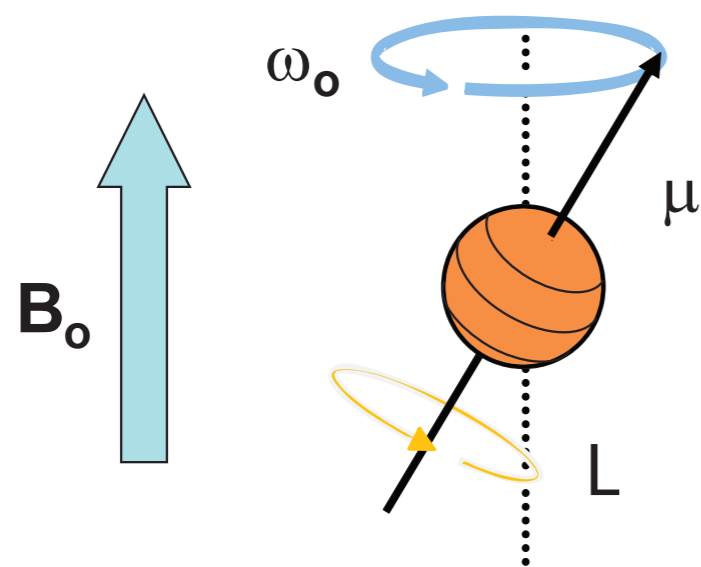
Что такое ЯМР?

- ▶ Ядра обладают угловым моментом \vec{L} и магнитным моментом $\vec{\mu}$
- ▶ Если ядро с угловым моментом количества движения и магнитным моментом поместить в статическое магнитное поле, то возникнет его прецессия вокруг направления поля с частотой $\omega = \gamma B$
- ▶ В магнитном поле ядро обладает энергией $-\gamma \hbar B m_z$

$$\Delta E = 2\gamma \hbar B I$$

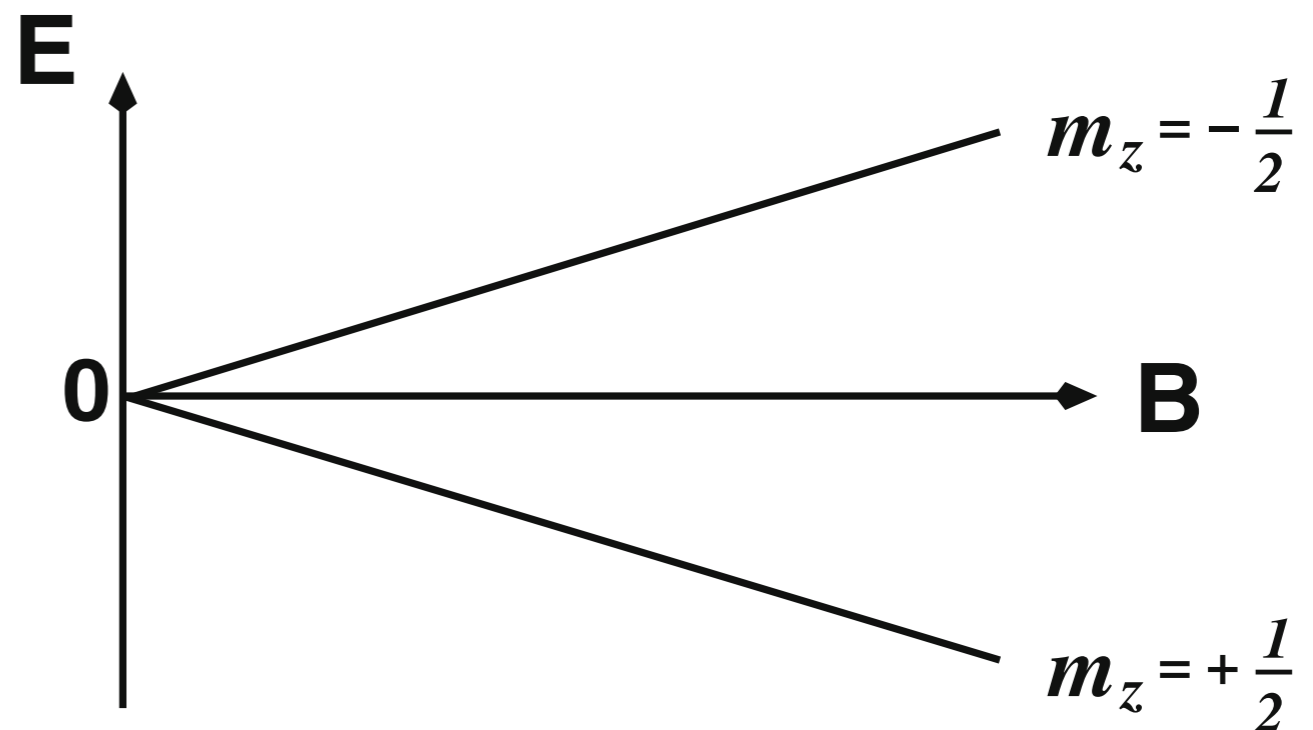
$$\begin{aligned}\vec{L} &= \hbar \sqrt{I(I+1)} \\ \vec{\mu} &= \gamma \hbar I \\ m_z &= -I, \dots, +I\end{aligned}$$

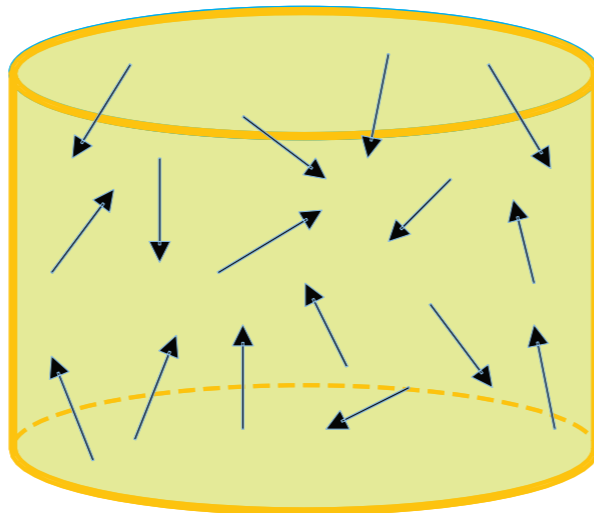
Что такое ЯМР?



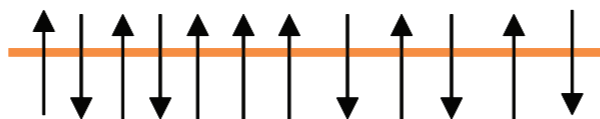
$$\Delta E = 2\gamma\hbar BI$$

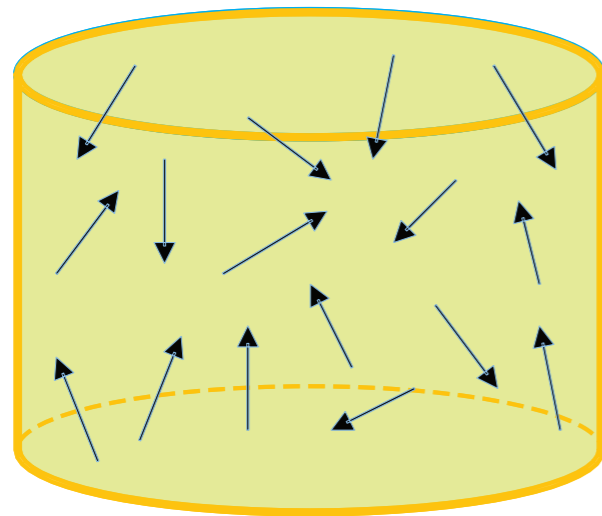
- ▶ Таким образом, в магнитном поле происходит расщепление энергетических уровней ядра



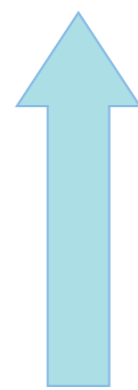
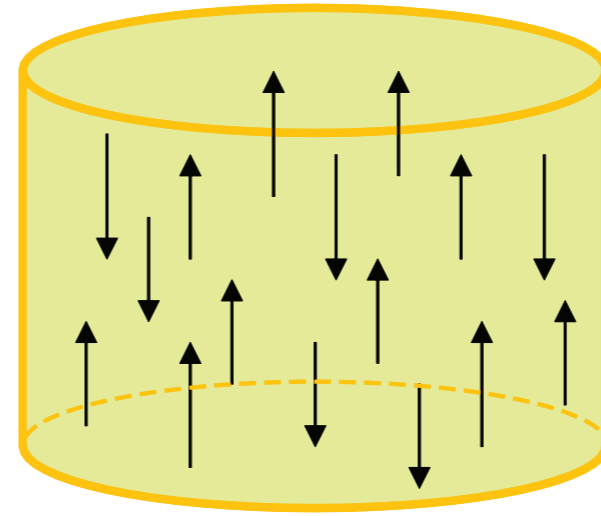
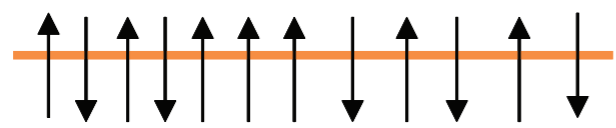


$$B_0 = 0$$



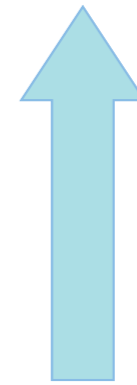
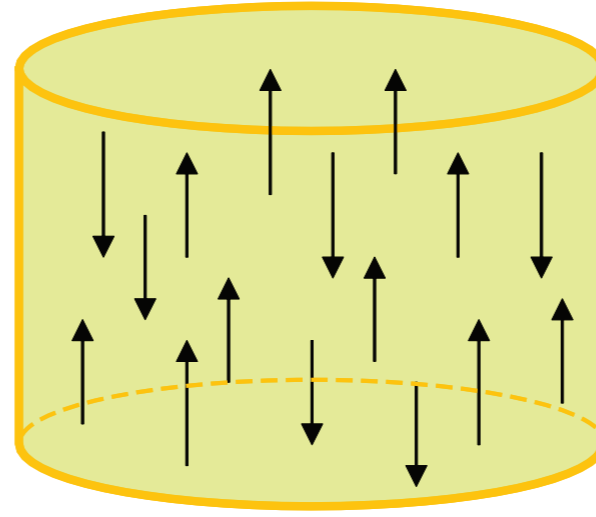
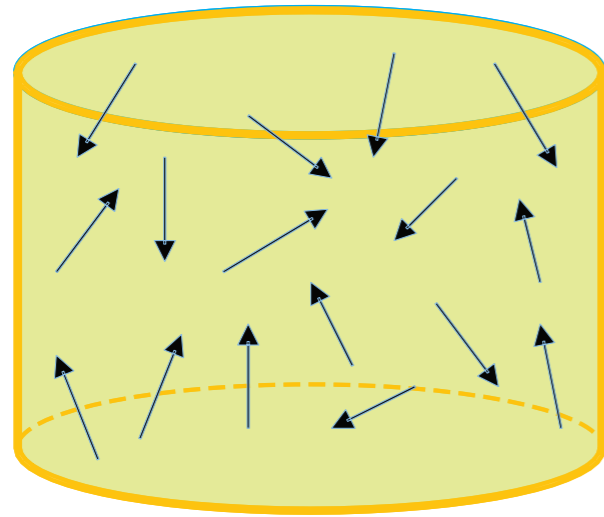


$B_0 = 0$



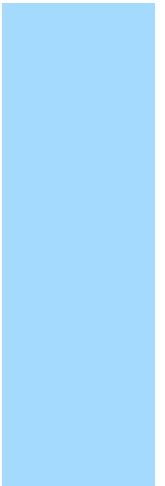
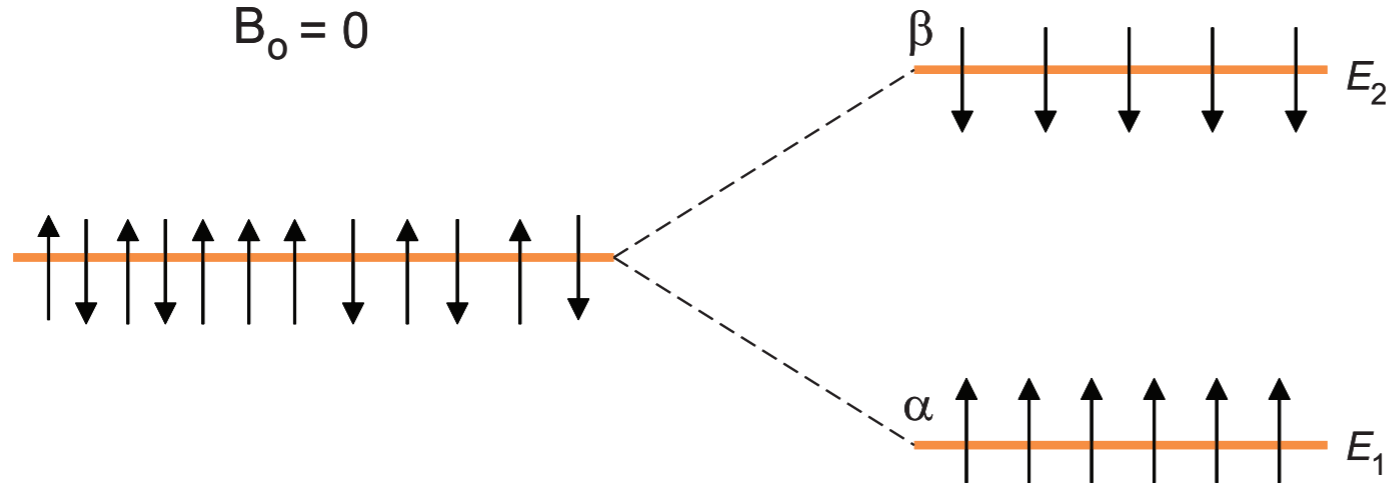
B_0

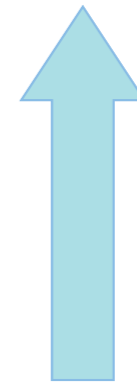
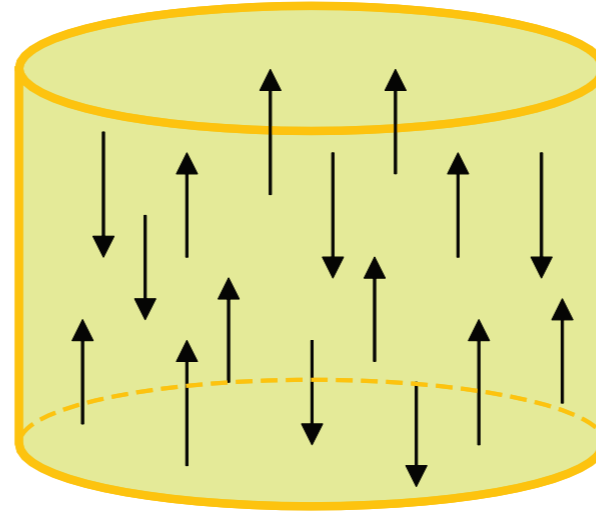
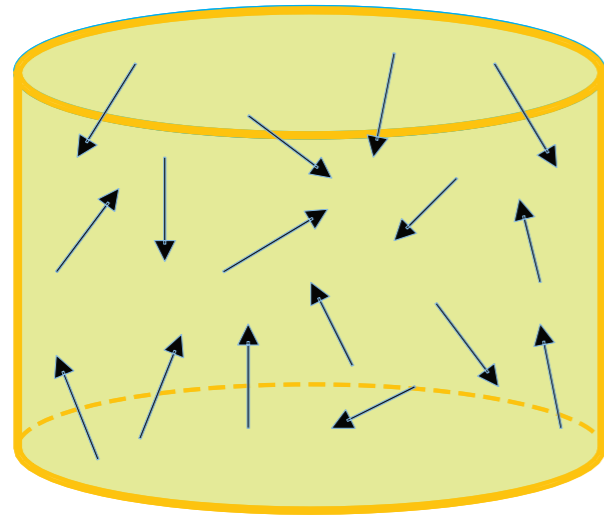




B_0

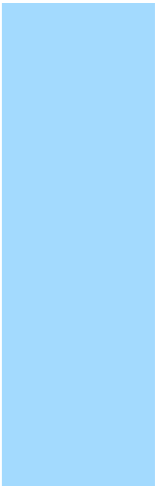
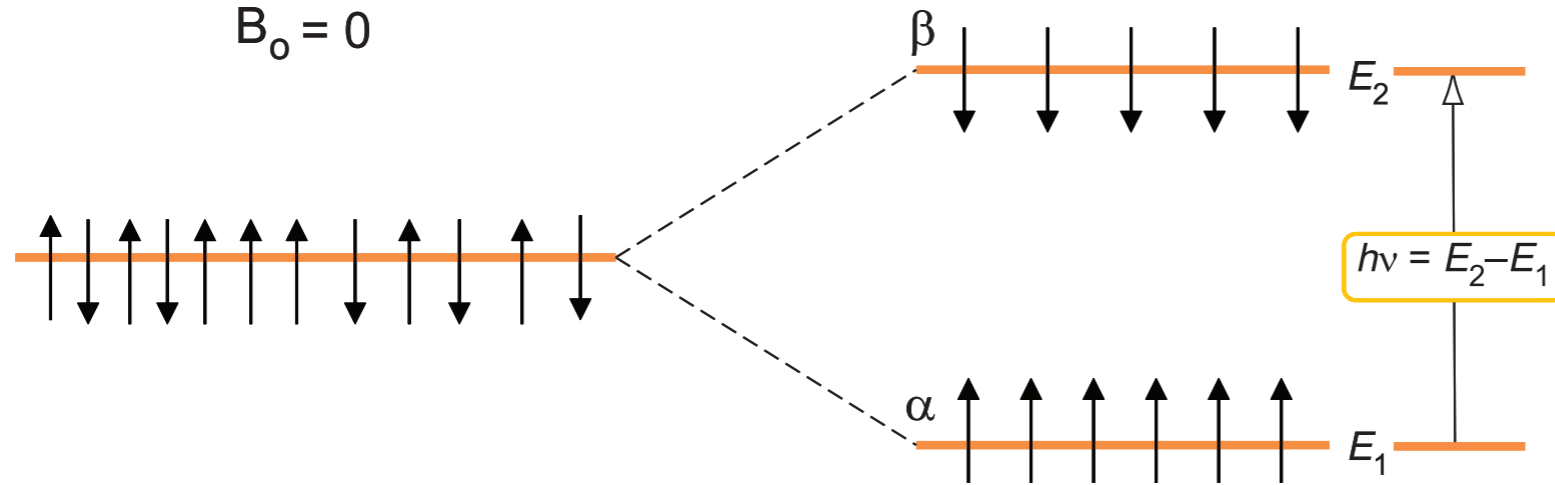
$B_0 = 0$

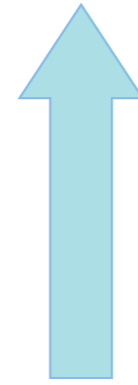
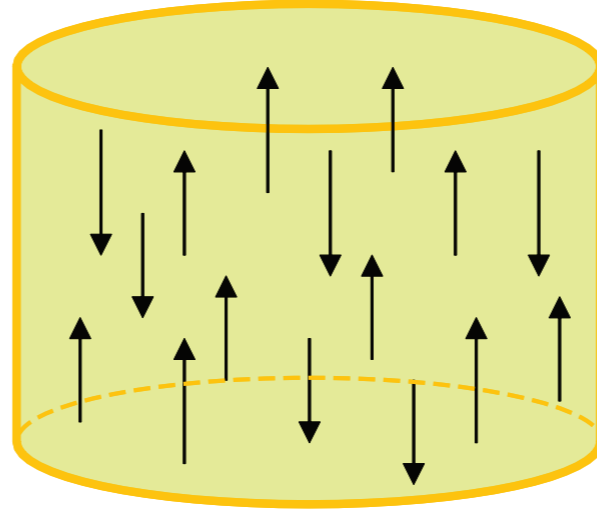
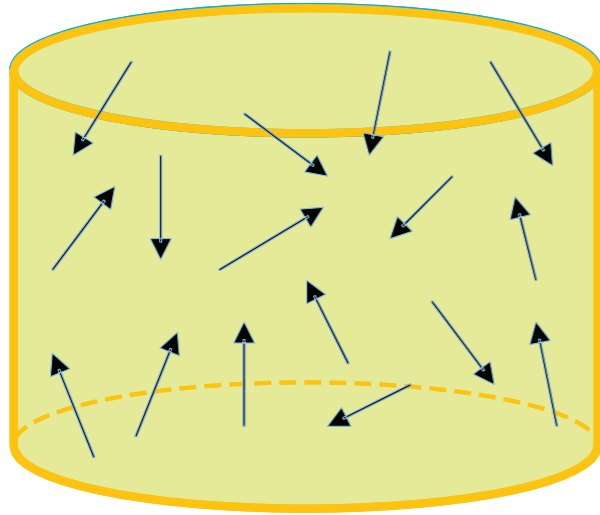




B_0

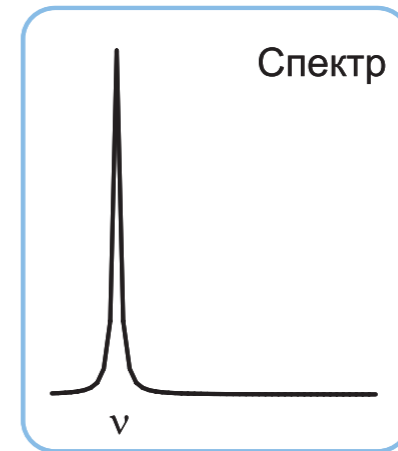
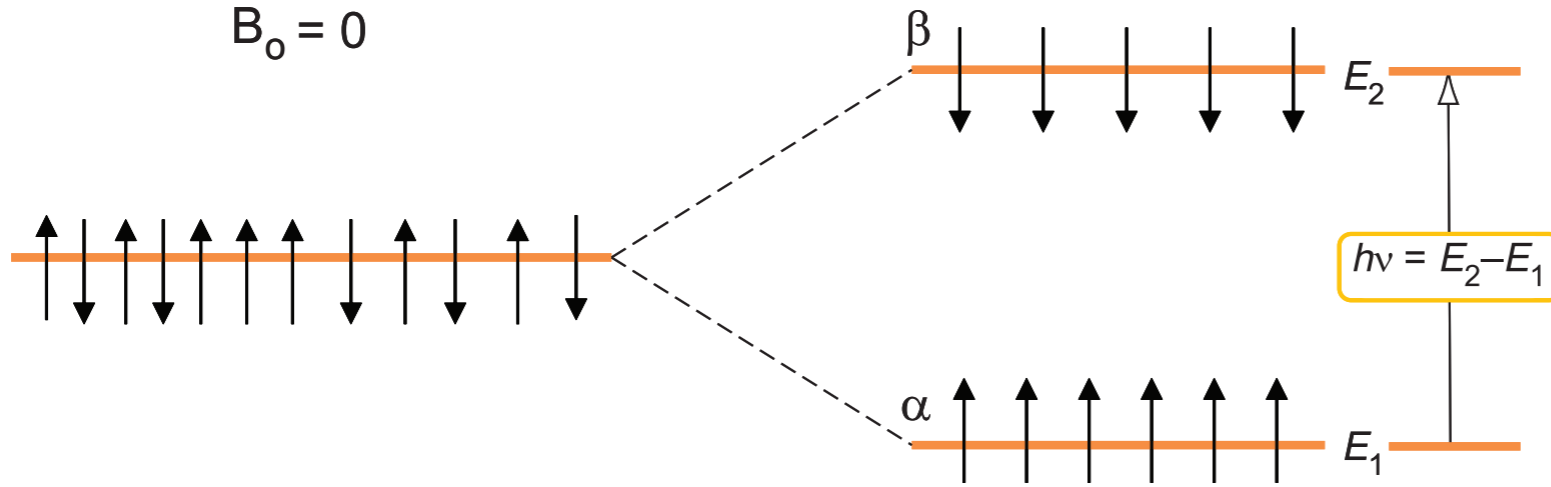
$B_0 = 0$

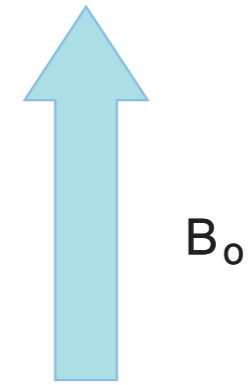
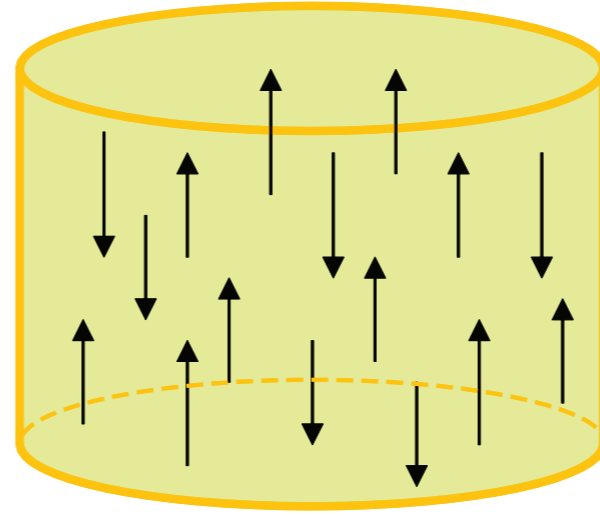
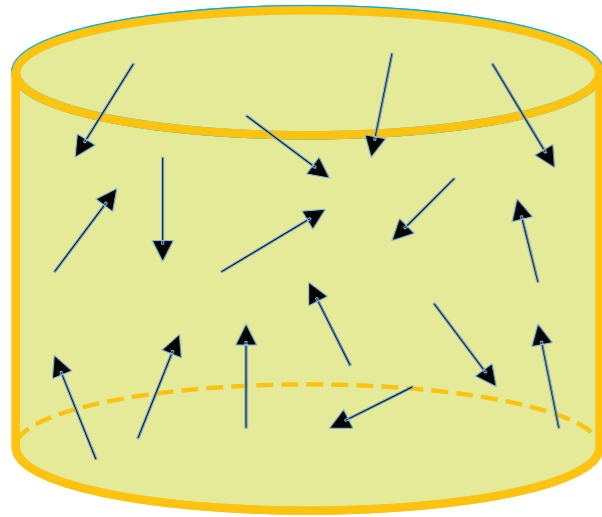




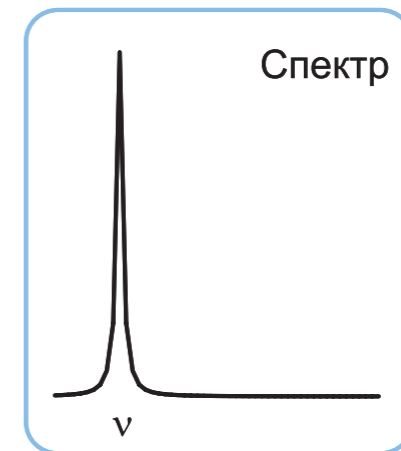
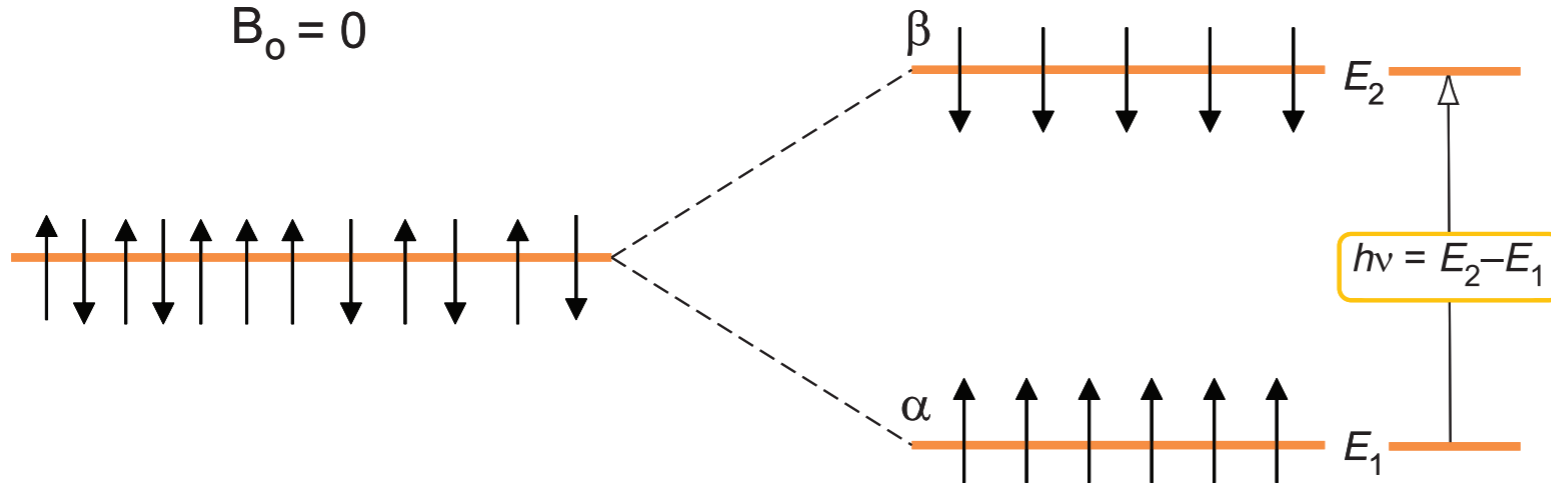
B_0

$B_0 = 0$





$B_0 = 0$

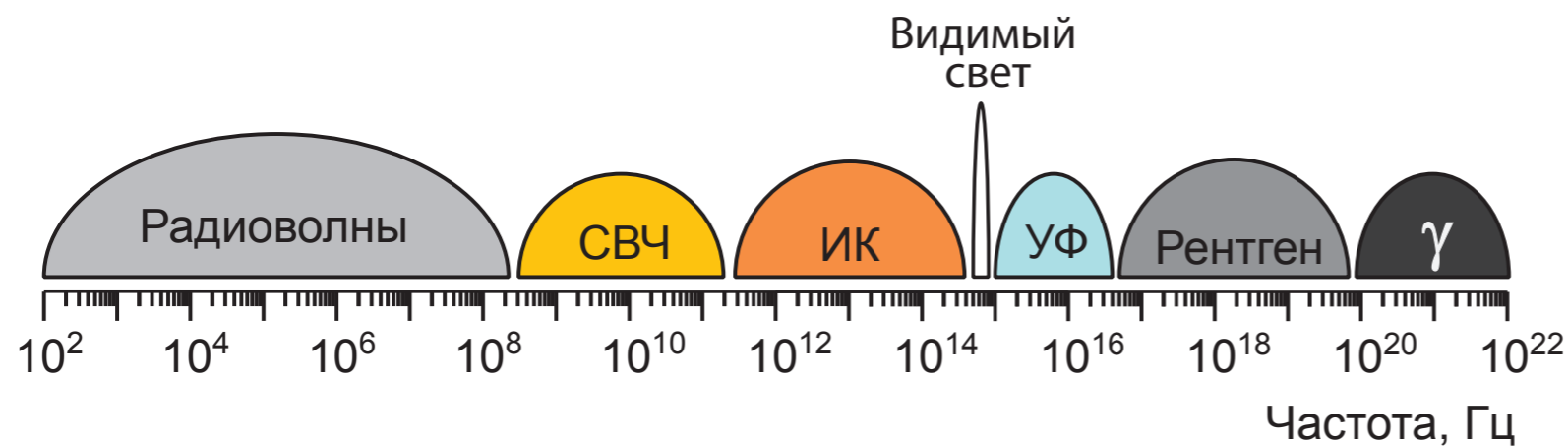


- ▶ Если вещество находится в магнитном поле то возможно резонансное поглощение электромагнитной энергии –
Ядерный Магнитный Резонанс

Ядерный магнитный резонанс

Что нужно, чтобы получить сигнал:

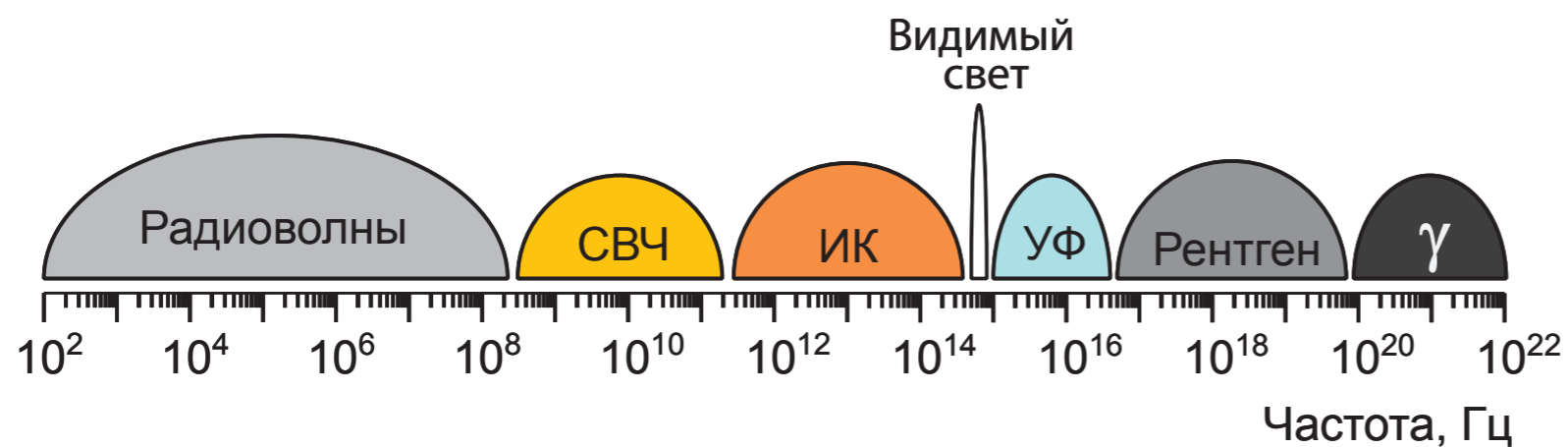
- ▶ 1) Ядро с магнитным моментом
- ▶ 2) Магнитное поле
- ▶ 3) Э/М излучение подходящей частоты



Ядерный магнитный резонанс

Что нужно, чтобы получить сигнал:

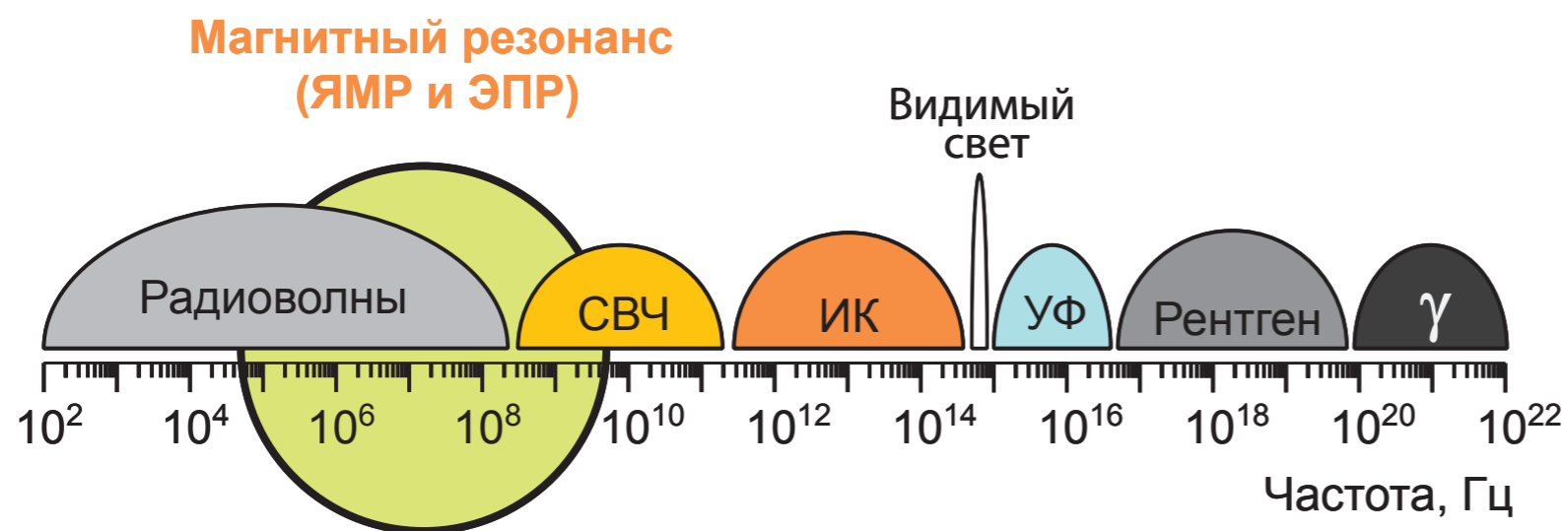
- ▶ 1) Ядро с магнитным моментом
- ▶ 2) Магнитное поле
- ▶ 3) Э/М излучение подходящей частоты



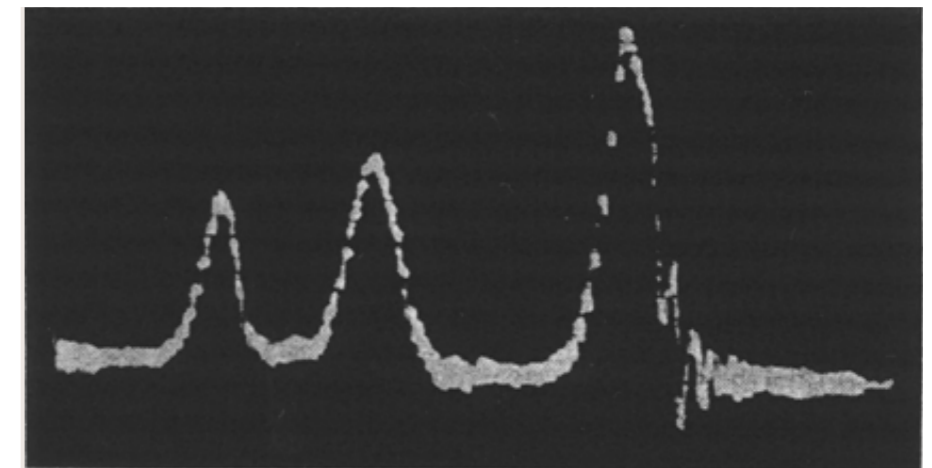
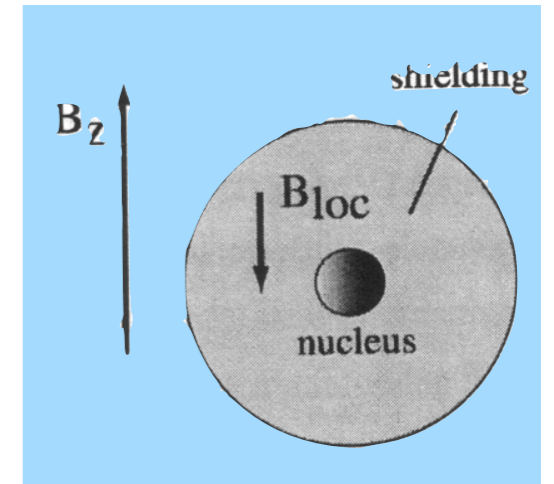
Ядерный магнитный резонанс

Что нужно, чтобы получить сигнал:

- ▶ 1) Ядро с магнитным моментом
- ▶ 2) Магнитное поле
- ▶ 3) Э/М излучение подходящей частоты



Развитие метода ЯМР



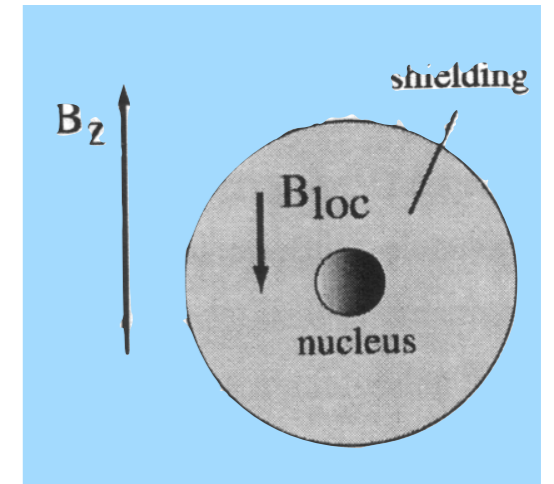
Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds*

J. T. ARNOLD, S. S. DHARMATTI, AND M. E. PACKARD
Department of Physics, Stanford University, Stanford, California
(Received February 5, 1951)

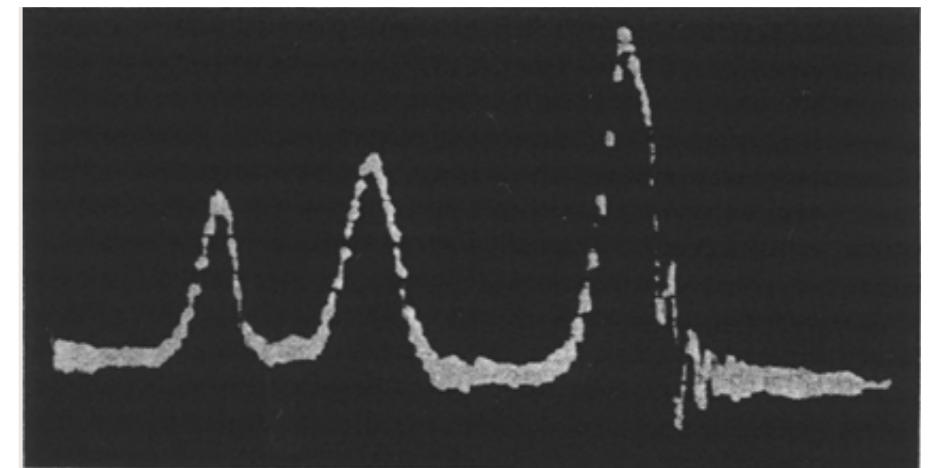
THE influence of the chemical compound upon the nuclear magnetic resonance frequency of a nucleus has been previously reported. Large chemical shifts have been observed¹ for some of the heavier elements, and a line structure has been seen in complex molecules containing the observed nuclei in regions of different magnetic shielding. Small shifts have been measured between several hydrogen compounds,² and there has been an indication of a fine structure in some organic liquids.³

The development of a nuclear induction apparatus with a resolution better than 1 part in 10^7 has enabled us to measure many such chemical shifts for hydrogen in gases and in organic liquids and to measure a fine structure in the lines of a large number of organic compounds.

Развитие метода ЯМР



► 1951 – химический сдвиг.



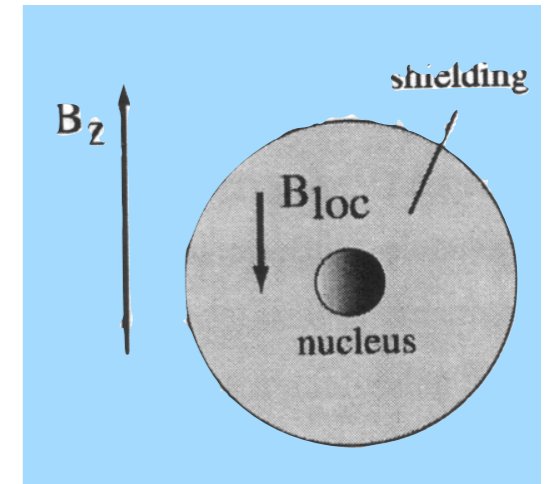
Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds*

J. T. ARNOLD, S. S. DHARMATTI, AND M. E. PACKARD
Department of Physics, Stanford University, Stanford, California
(Received February 5, 1951)

THE influence of the chemical compound upon the nuclear magnetic resonance frequency of a nucleus has been previously reported. Large chemical shifts have been observed¹ for some of the heavier elements, and a line structure has been seen in complex molecules containing the observed nuclei in regions of different magnetic shielding. Small shifts have been measured between several hydrogen compounds,² and there has been an indication of a fine structure in some organic liquids.³

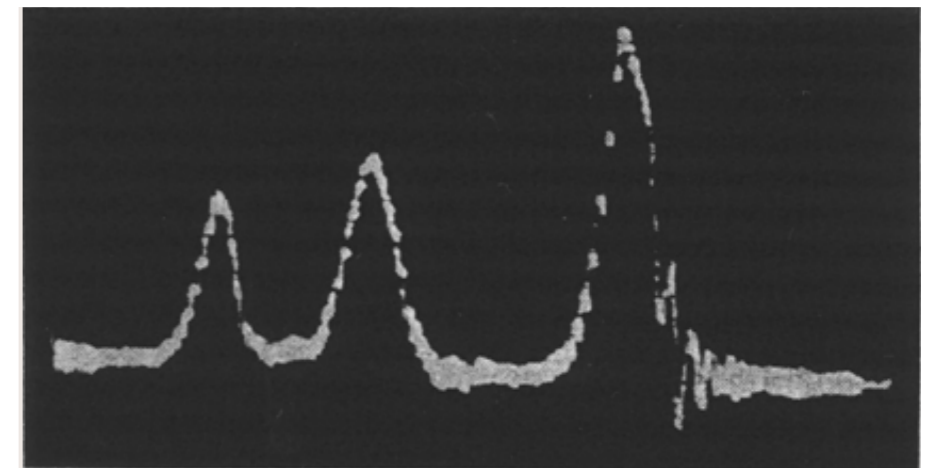
The development of a nuclear induction apparatus with a resolution better than 1 part in 10^7 has enabled us to measure many such chemical shifts for hydrogen in gases and in organic liquids and to measure a fine structure in the lines of a large number of organic compounds.

Развитие метода ЯМР



► 1951 – химический сдвиг.

Химическим сдвигом называется смещение сигнала в зависимости от химического окружения ядра.



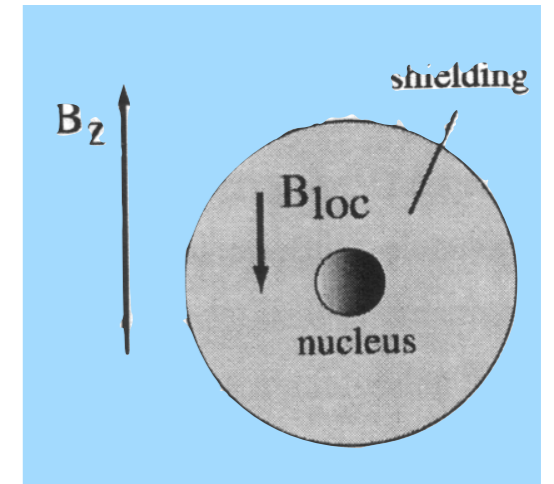
Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds*

J. T. ARNOLD, S. S. DHARMATTI, AND M. E. PACKARD
Department of Physics, Stanford University, Stanford, California
(Received February 5, 1951)

THE influence of the chemical compound upon the nuclear magnetic resonance frequency of a nucleus has been previously reported. Large chemical shifts have been observed¹ for some of the heavier elements, and a line structure has been seen in complex molecules containing the observed nuclei in regions of different magnetic shielding. Small shifts have been measured between several hydrogen compounds,² and there has been an indication of a fine structure in some organic liquids.³

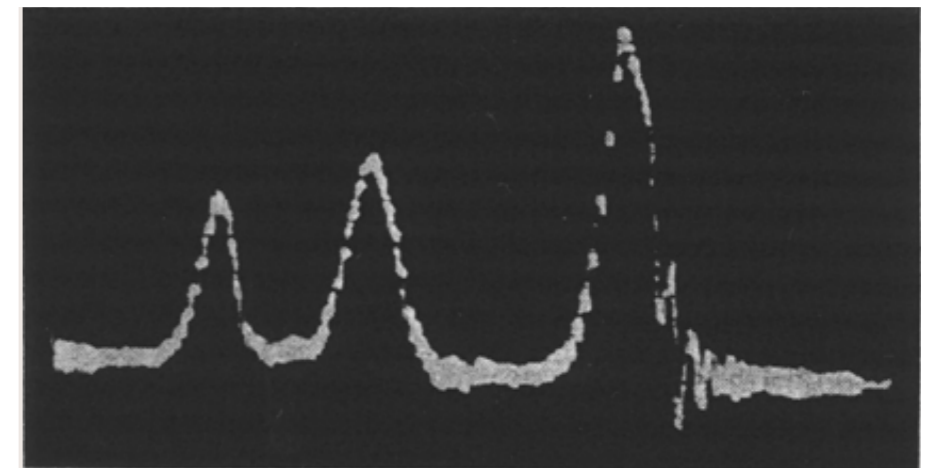
The development of a nuclear induction apparatus with a resolution better than 1 part in 10^7 has enabled us to measure many such chemical shifts for hydrogen in gases and in organic liquids and to measure a fine structure in the lines of a large number of organic compounds.

Развитие метода ЯМР



► 1951 – химический сдвиг.

Химическим сдвигом называется смещение сигнала в зависимости от химического окружения ядра.



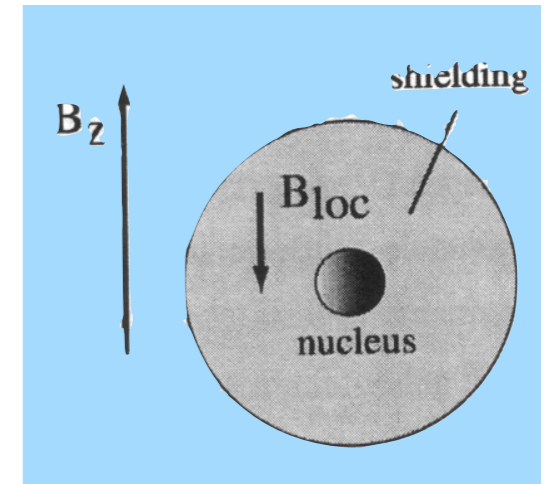
Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds*

J. T. ARNOLD, S. S. DHARMATTI, AND M. E. PACKARD
Department of Physics, Stanford University, Stanford, California
(Received February 5, 1951)

THE influence of the chemical compound upon the nuclear magnetic resonance frequency of a nucleus has been previously reported. Large chemical shifts have been observed¹ for some of the heavier elements, and a line structure has been seen in complex molecules containing the observed nuclei in regions of different magnetic shielding. Small shifts have been measured between several hydrogen compounds,² and there has been an indication of a fine structure in some organic liquids.³

The development of a nuclear induction apparatus with a resolution better than 1 part in 10^7 has enabled us to measure many such chemical shifts for hydrogen in gases and in organic liquids and to measure a fine structure in the lines of a large number of organic compounds.

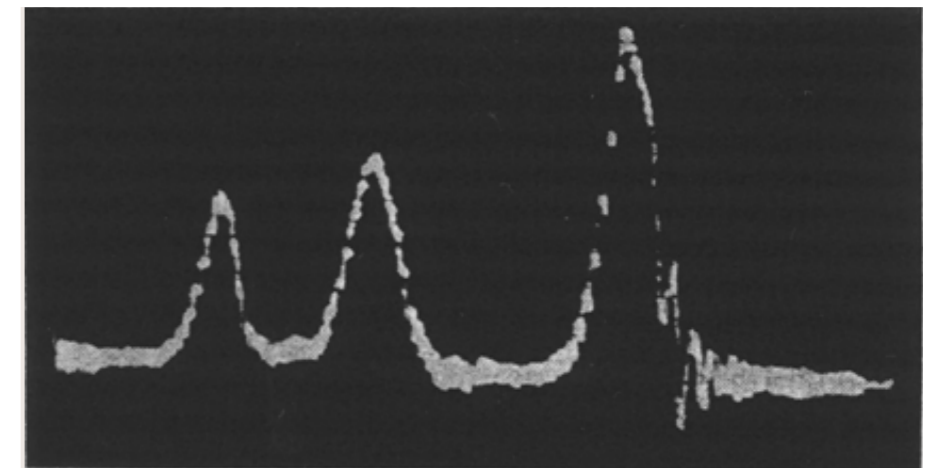
Развитие метода ЯМР



► 1951 – химический сдвиг.

Химическим сдвигом называется смещение сигнала в зависимости от химического окружения ядра.

С середины 50-х годов спектроскопии ЯМР становится массовым аналитическим методом



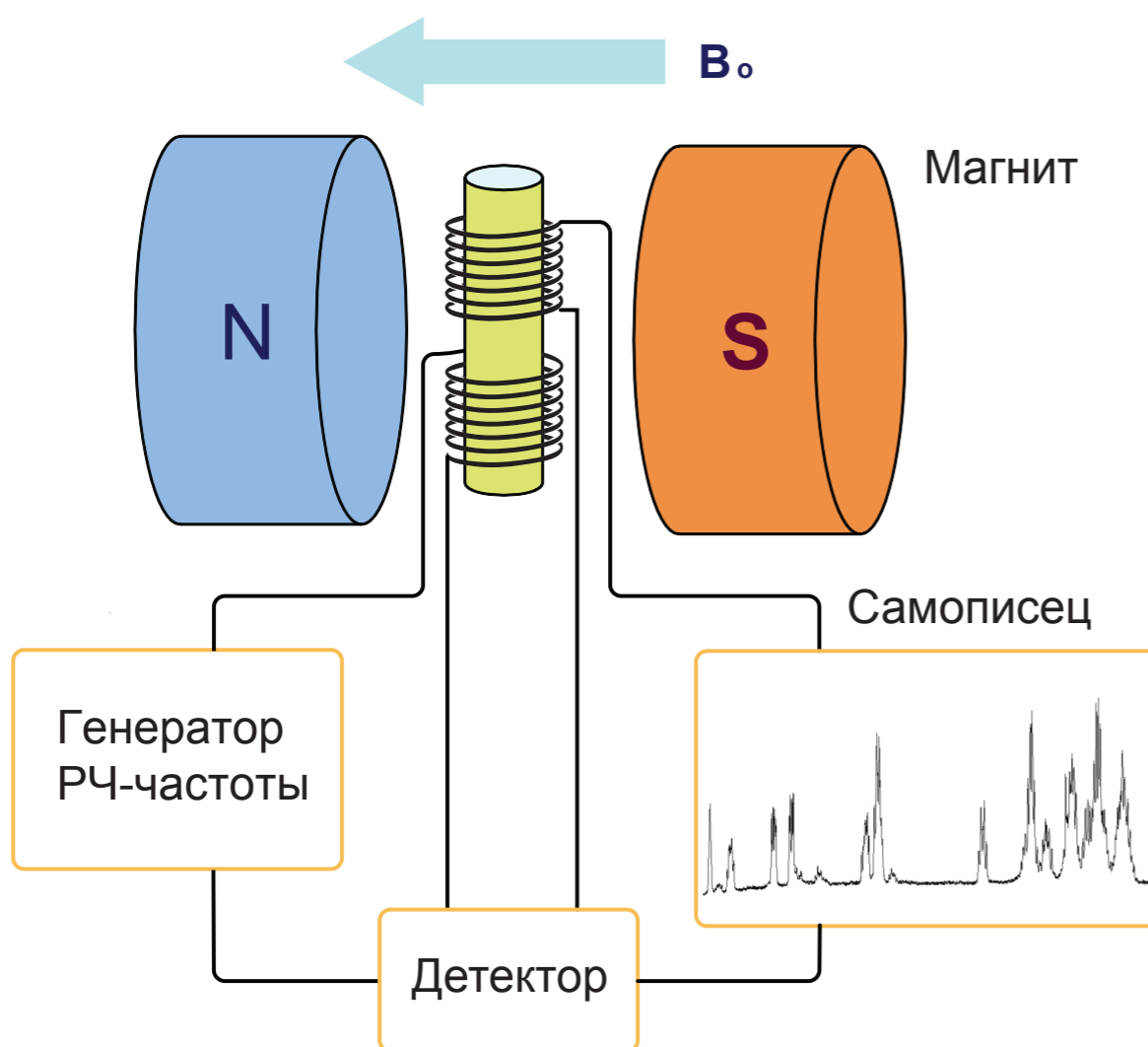
Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds*

J. T. ARNOLD, S. S. DHARMATTI, AND M. E. PACKARD
Department of Physics, Stanford University, Stanford, California
(Received February 5, 1951)

THE influence of the chemical compound upon the nuclear magnetic resonance frequency of a nucleus has been previously reported. Large chemical shifts have been observed¹ for some of the heavier elements, and a line structure has been seen in complex molecules containing the observed nuclei in regions of different magnetic shielding. Small shifts have been measured between several hydrogen compounds,² and there has been an indication of a fine structure in some organic liquids.³

The development of a nuclear induction apparatus with a resolution better than 1 part in 10^7 has enabled us to measure many such chemical shifts for hydrogen in gases and in organic liquids and to measure a fine structure in the lines of a large number of organic compounds.

ЯМР спектрометр



Первый серийный ЯМР спектрометр, фирма Varian, США, 1953 г.

(в Казани первый в России ЯМР спектрометр высокого разрешения – **1959**)

ЯМР спектрометр

Недостатки спектрометров с непрерывной развёрткой:

- ▶ Большое время записи спектра
- ▶ Низкая чувствительность



125 с
250 Гц

Фурье-спектроскопия

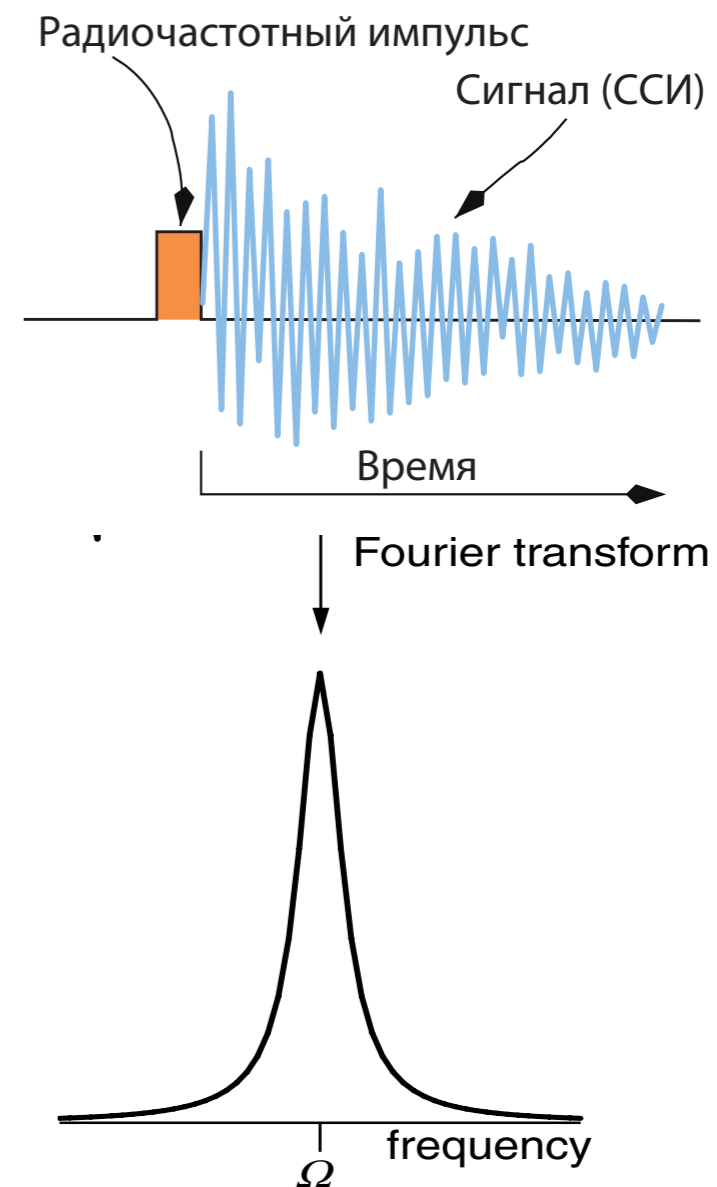


1976 — Ричард Эрнст:

Импульсный спектрометр:

- 1) Возбуждаем систему
- 2) Регистрируем ССИ
- 3) После Фурье-преобразования получаем спектр

Нобелевская премия по **ХИМИИ**
1991 года



Первый серийный ФТ-ЯМР спектрометр,
Bruker, Германия, 1967 г.



Фурье-спектроскопия

Современный спектрометр ЯМР

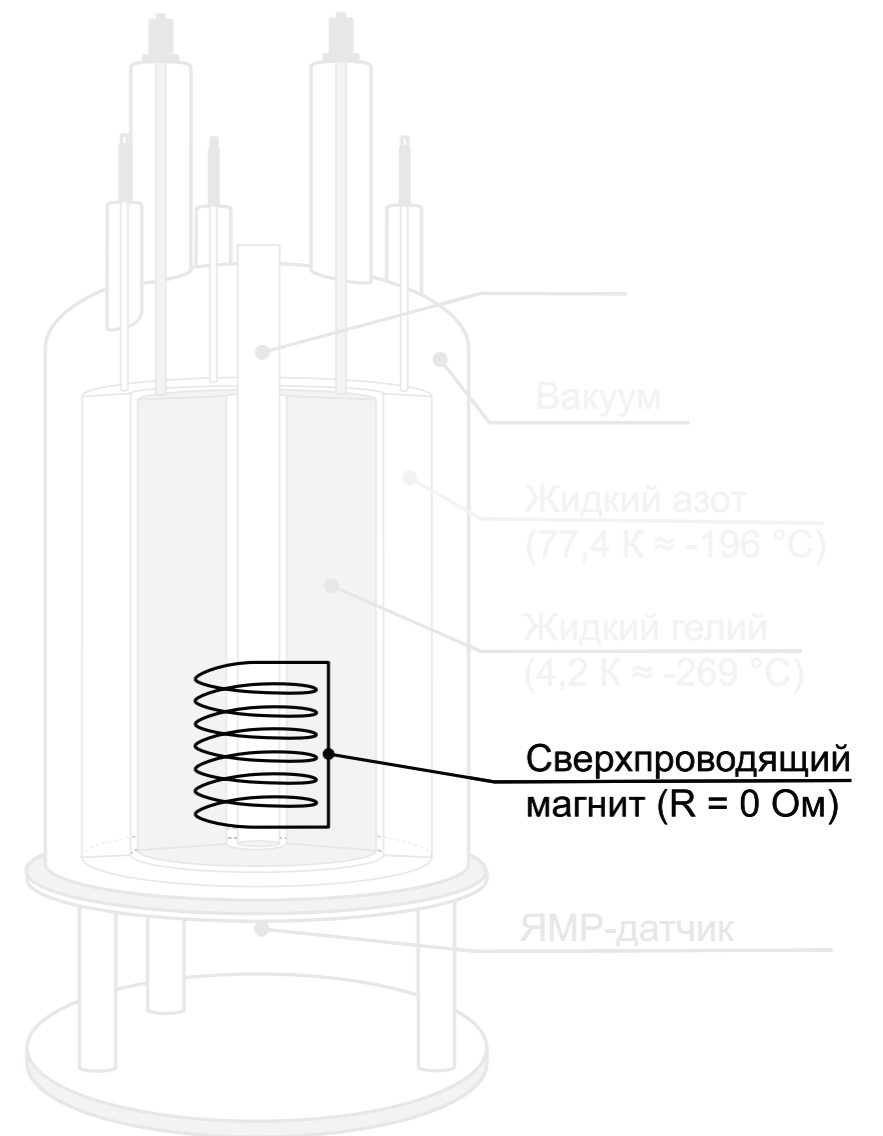


Образцы все сложнее и сложнее, значит нужно сильное магнитное поле (лучше чувствительность и разрешение)

Обычные электромагниты уже не годятся — нужны сверхпроводящие магниты.

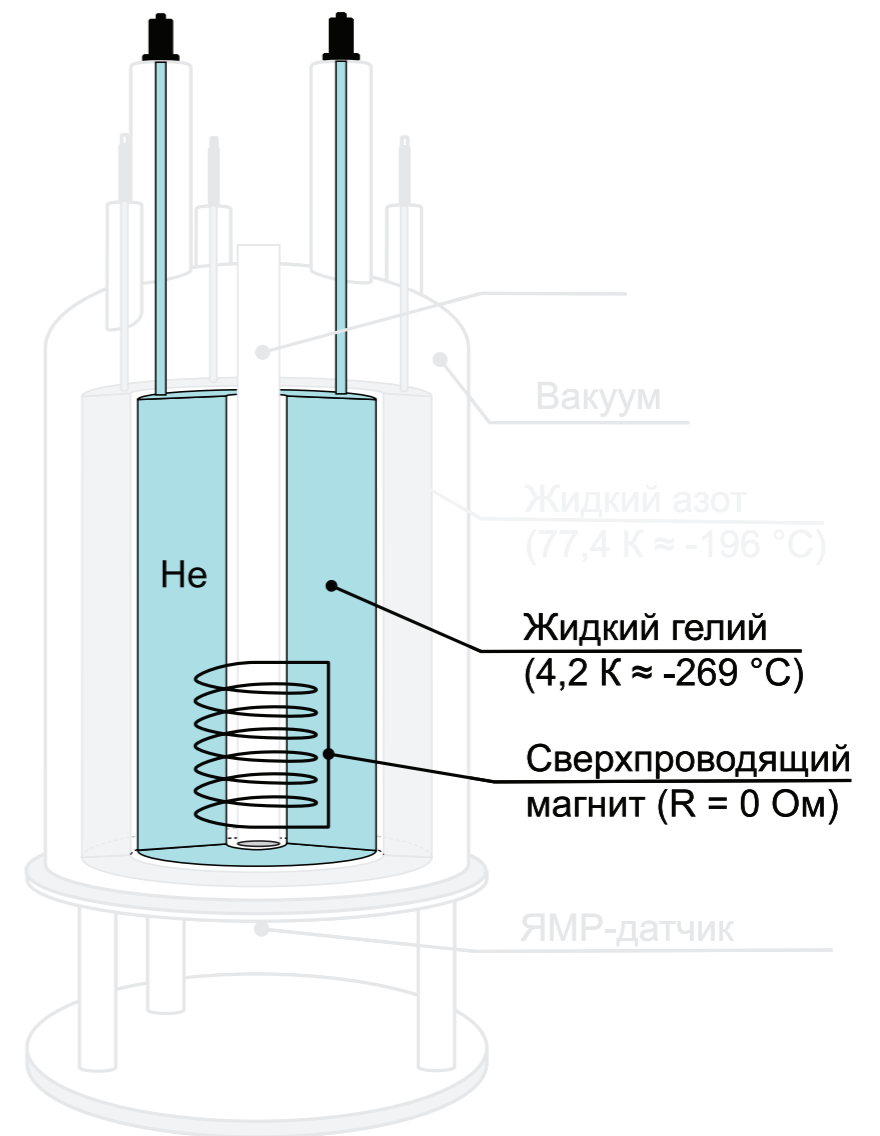
Сверхпроводящий магнит

- ▶ Не требует источника тока
- ▶ Высокая стабильность поля
- ▶ Требуется регулярная заливка жидким азотом и гелием
- ▶ Главный параметр - частота резонанса на ядрах ^1H
- ▶ Очень дорогой



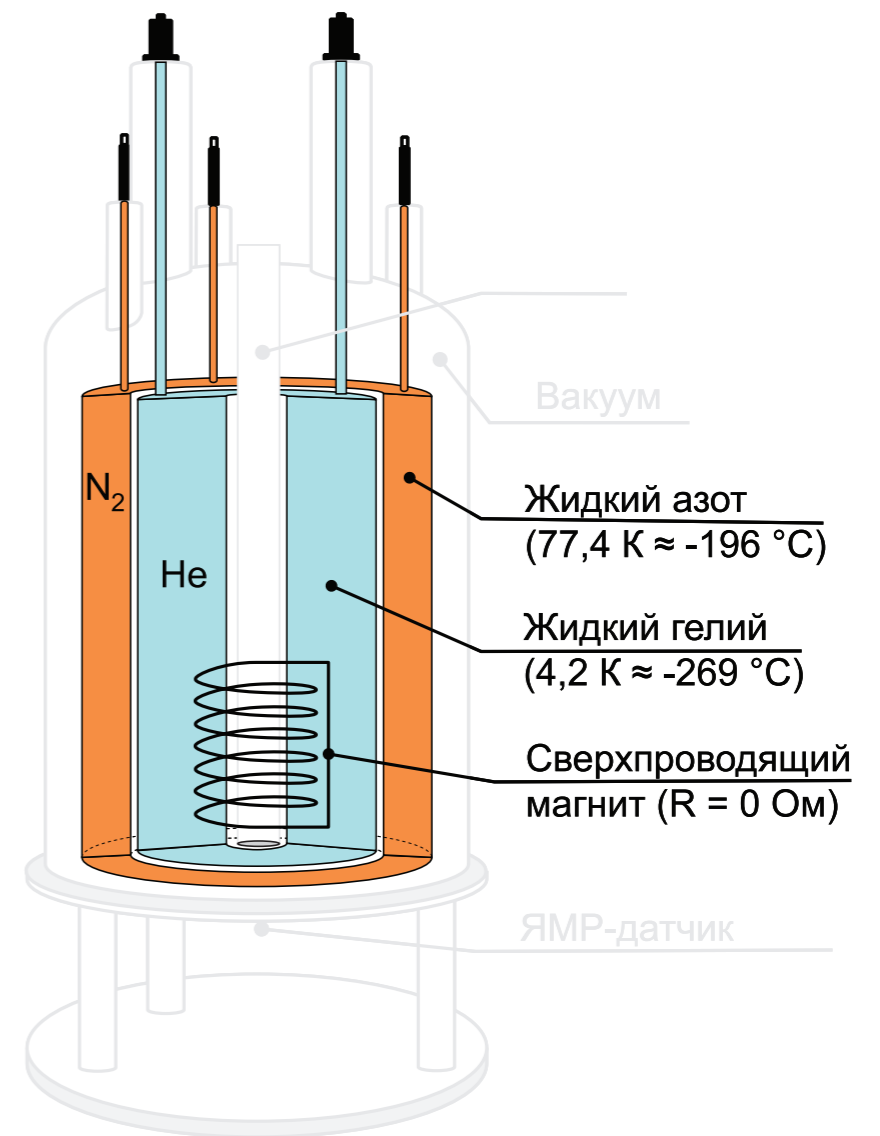
Сверхпроводящий магнит

- ▶ Не требует источника тока
- ▶ Высокая стабильность поля
- ▶ Требуется регулярная заливка жидким азотом и гелием
- ▶ Главный параметр - частота резонанса на ядрах ^1H
- ▶ Очень дорогой



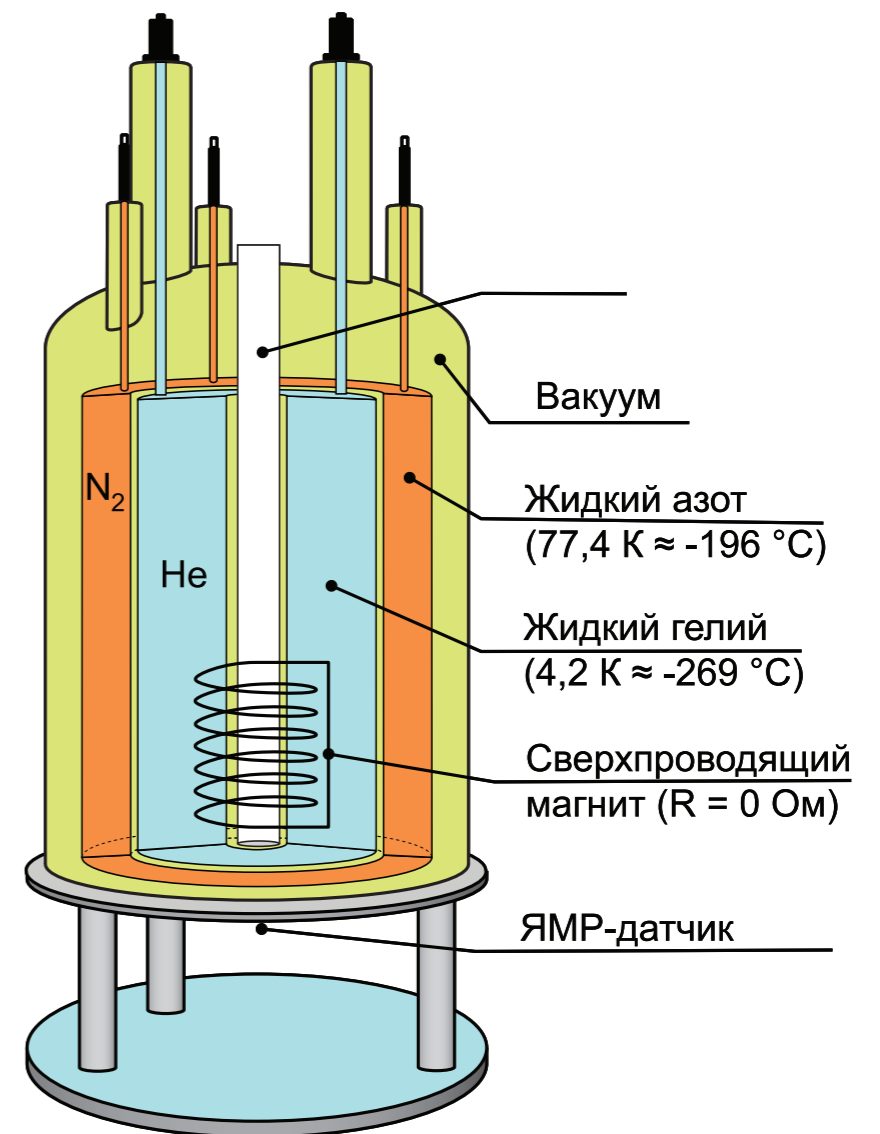
Сверхпроводящий магнит

- ▶ Не требует источника тока
- ▶ Высокая стабильность поля
- ▶ Требуется регулярная заливка жидким азотом и гелием
- ▶ Главный параметр - частота резонанса на ядрах ^1H
- ▶ Очень дорогой



Сверхпроводящий магнит

- ▶ Не требует источника тока
- ▶ Высокая стабильность поля
- ▶ Требуется регулярная заливка жидким азотом и гелием
- ▶ Главный параметр - частота резонанса на ядрах ^1H
- ▶ Очень дорогой

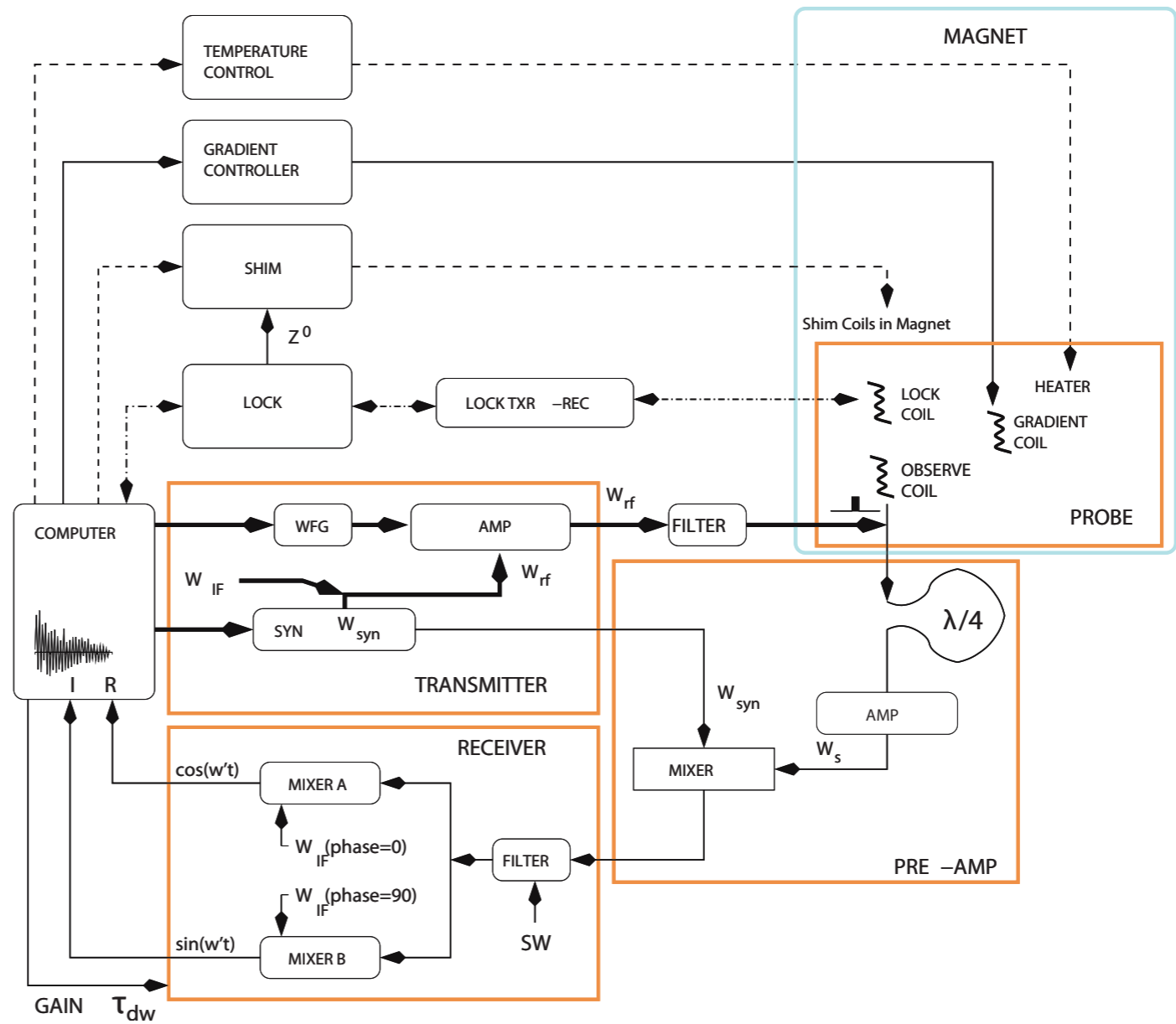


Датчик

Как правило позволяет регистрировать сигналы сразу от нескольких типов ядер

Ядро	Спин	Природное содержание, %	Частота ЯМР, МГц
^1H	1/2	99,98	500
^2H	1	0,016	76,77
^{12}C	0	98,9	-
^{13}C	1/2	1,108	125,75
^{15}N	1/2	0,37	50,69
^{17}O	5/2	0,037	67,8
^{19}F	1/2	100	470.592
^{31}P	1/2	100	202,45





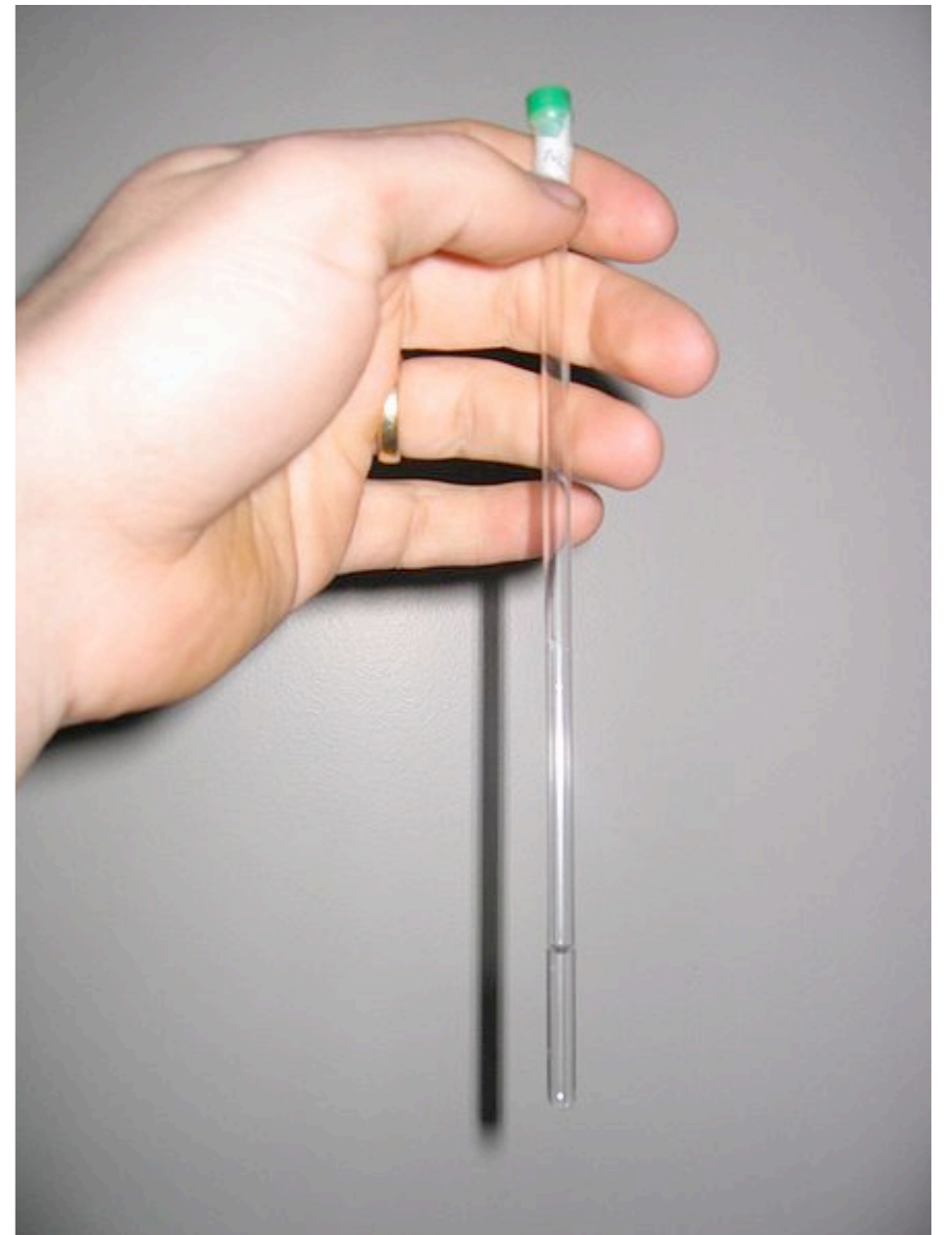
+ МНОГО ЭЛЕКТРОНИКИ



+ МНОГО ЭЛЕКТРОНИКИ

Образцы

- ▶ Необходимо использовать специальные ампулы
- ▶ Нужны дейтеро-растворители
- ▶ Объем – 0.6-0.7 мл
- ▶ Концентрация - 0.5 – 3 мМ
- ▶ Образец должен быть однородным



Проблема №1 – Однородность поля

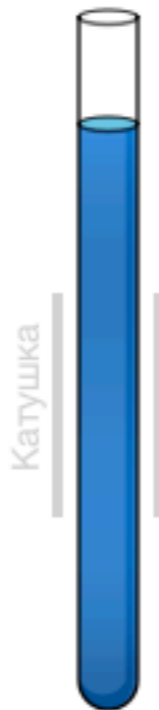
$$\omega = \gamma B$$

Если мы хотим
добиться ширины
линии в 0.5 Гц при
частоте резонанса
500 МГц то поле
должно быть
одинаковым с
точностью 10^{-9}

Проблема №1 – Однородность поля

$$\omega = \gamma B$$

Если мы хотим
добиться ширины
линии в 0.5 Гц при
частоте резонанса
500 МГц то поле
должно быть
одинаковым с
точностью 10^{-9}

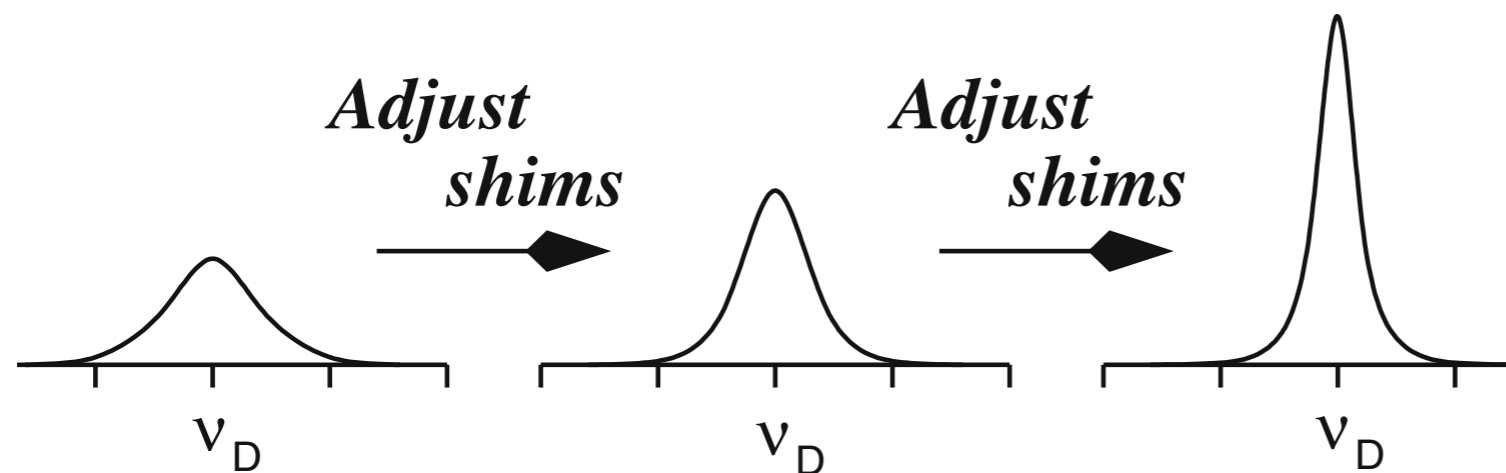
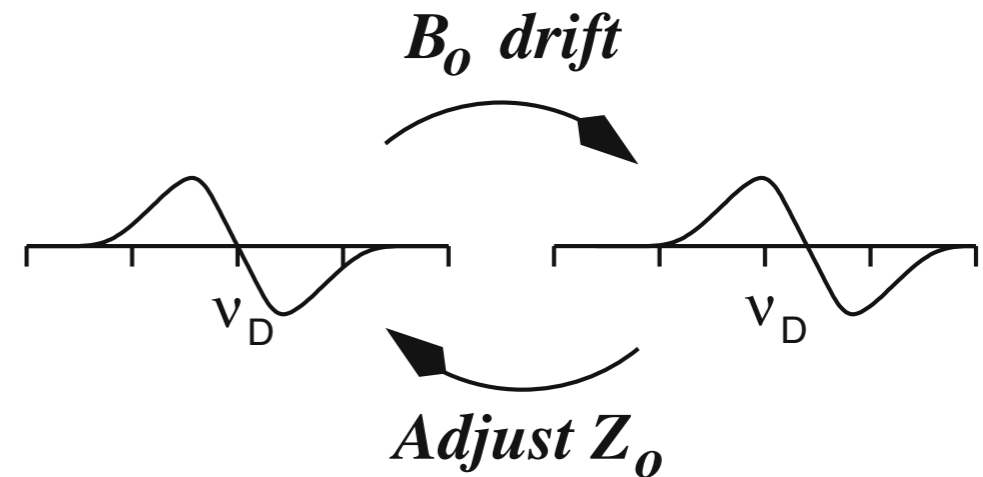


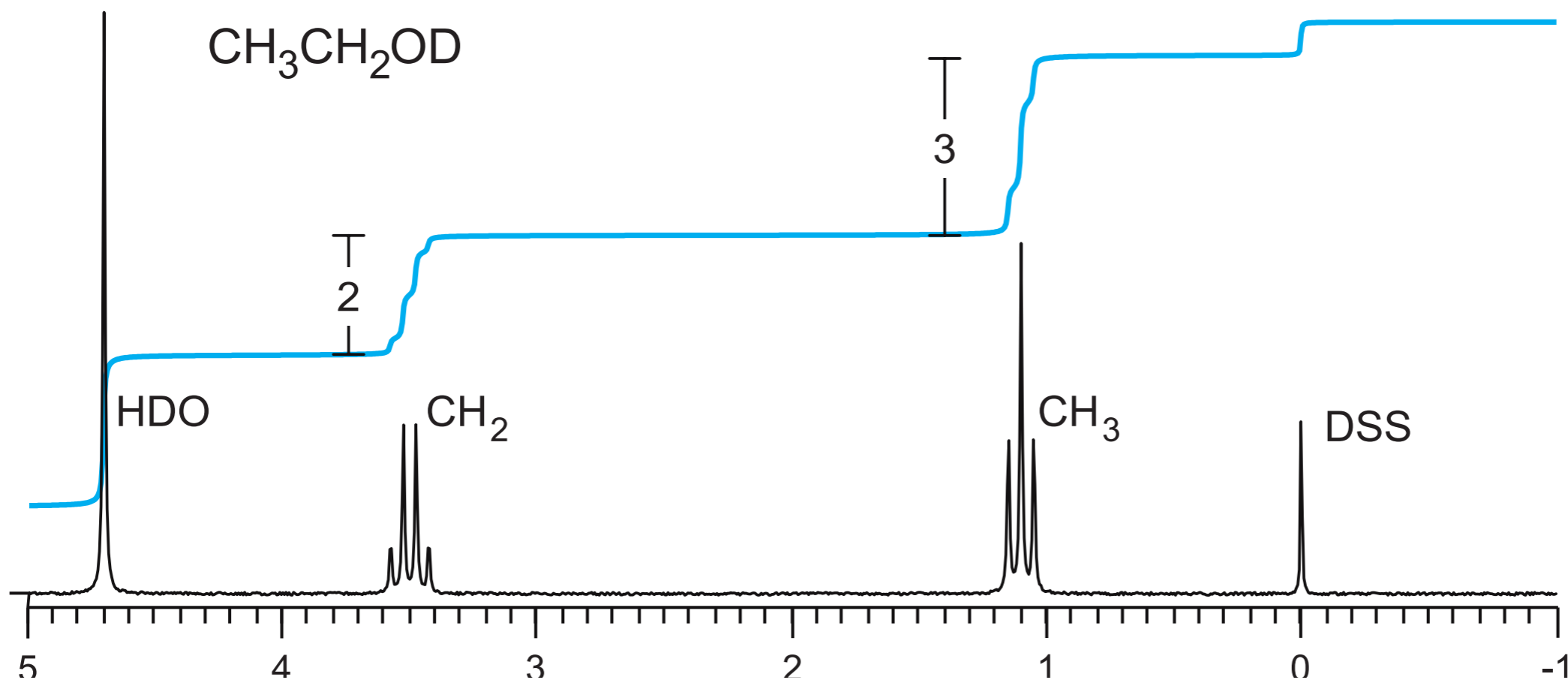
Суммарный сигнал

Проблема №1 – Однородность поля

Сигнал от ядер дейтерия 2H :

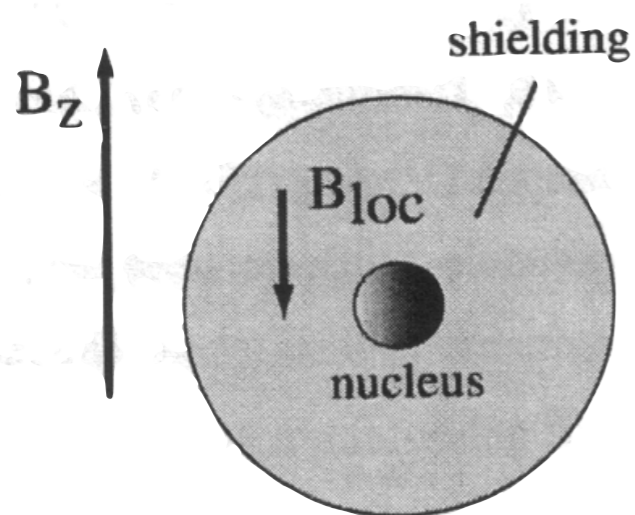
- настройка однородности
- стабилизация магнитного поля во время эксперимента





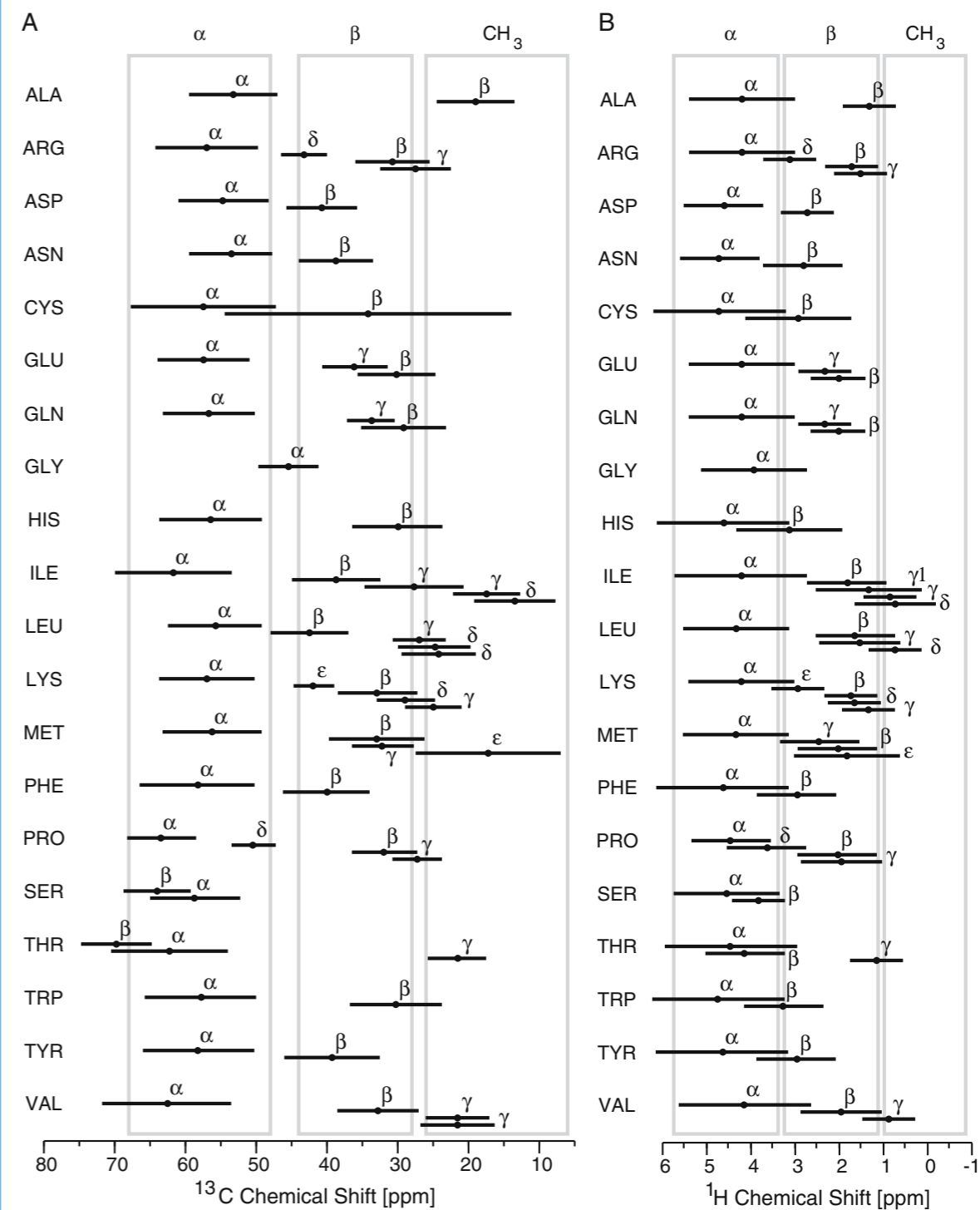
- Источники информации в спектре:
- 1) Химические сдвиги
 - 2) Константы КССВ
 - 3) Интегральные интенсивности

Химические сдвиги

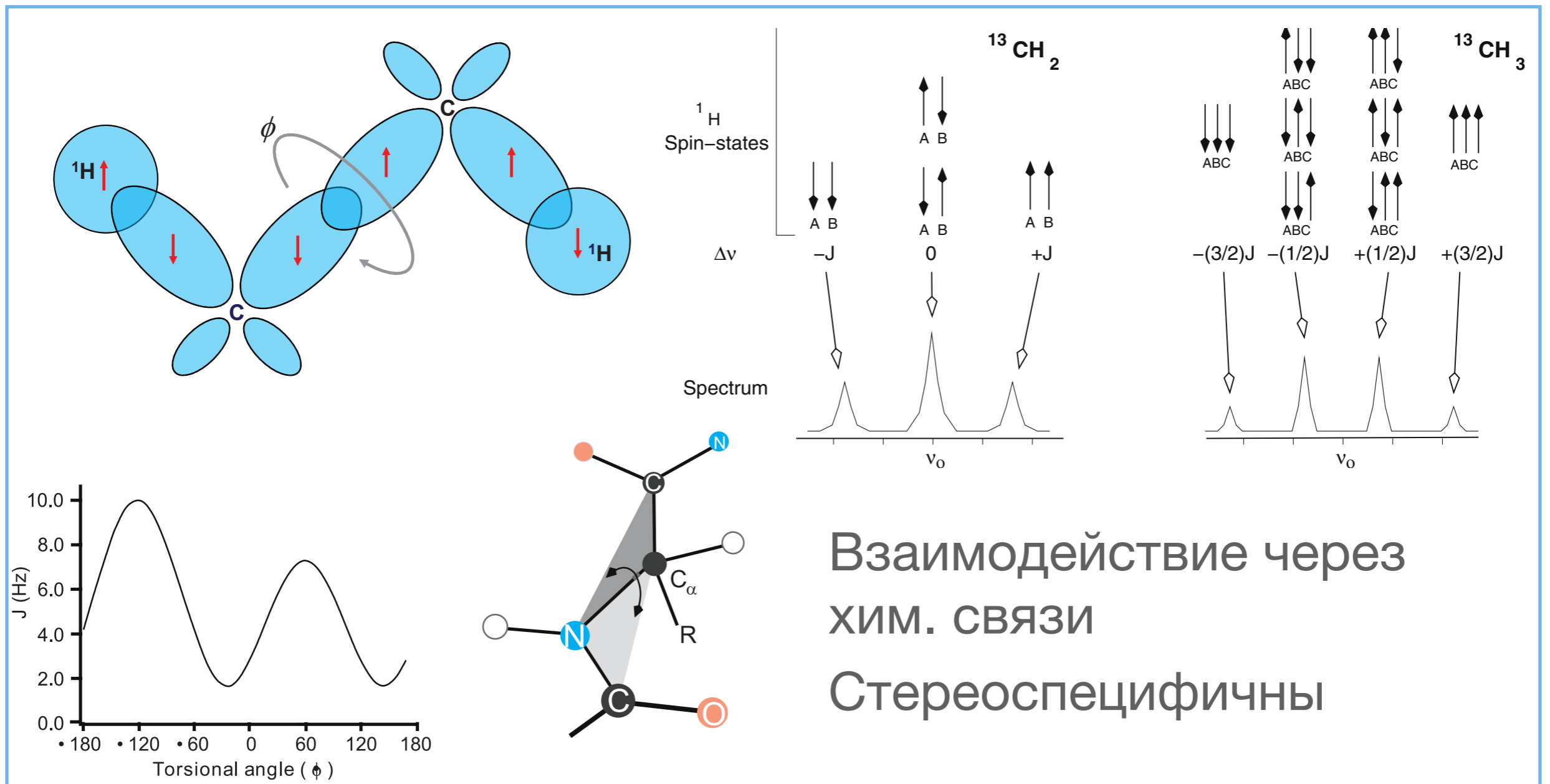


Для каждого химического окружения - свое характерное значение ХС

Слабо, но зависят от среды (растворителя, температуры и т. п.)



Константы КССВ



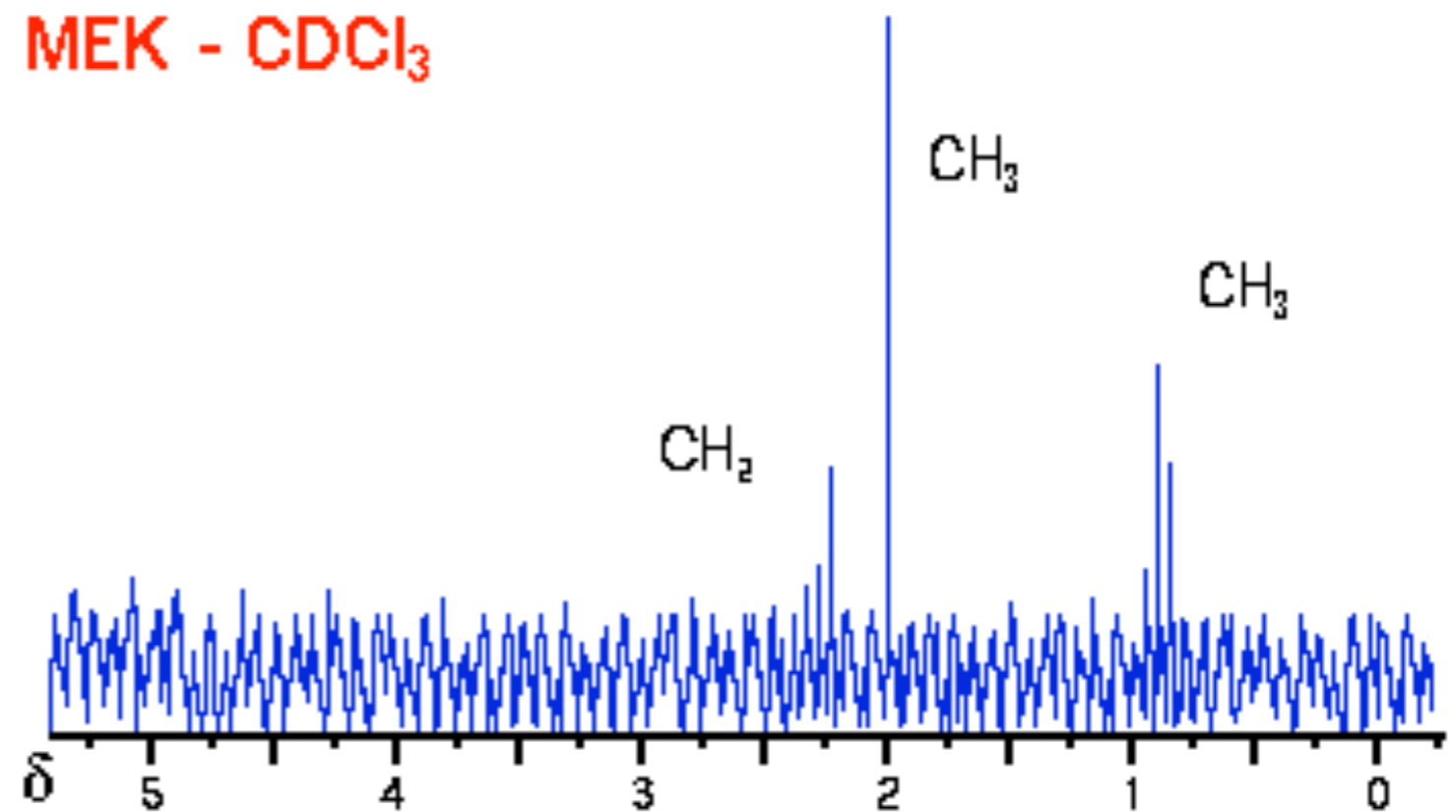
Взаимодействие через
ХИМ. СВЯЗИ
Стереоспецифичны

Проблема №2 – шум

Особенно важно
для редких ядер,
например ^{13}C

Решение -
многократное
накопление
сигнала

MEK - CDCl_3



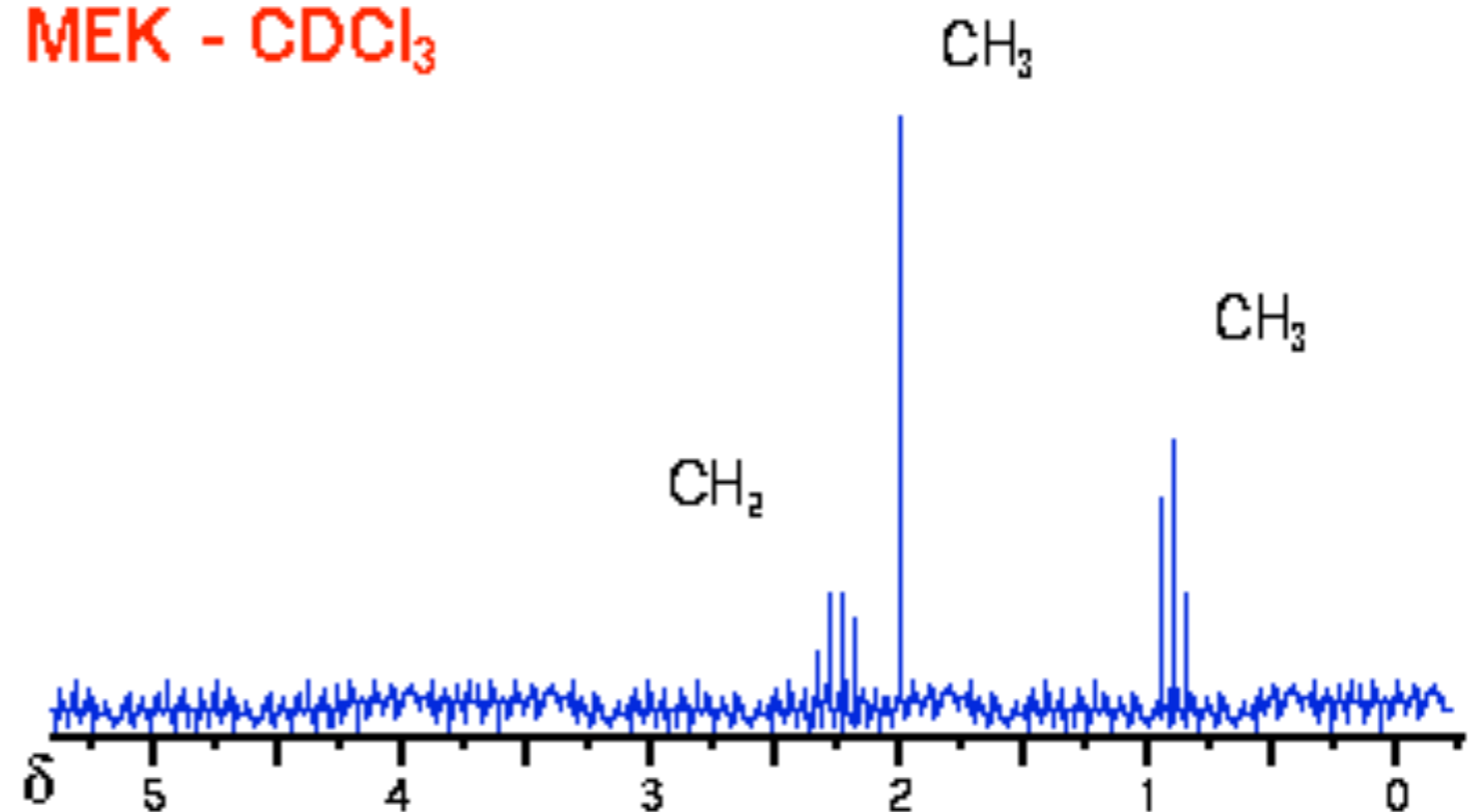
Сигнал/шум растет как квадратный корень
из числа накоплений

Проблема №2 – шум

Особенно важно
для редких ядер,
например ^{13}C

Решение -
многократное
накопление
сигнала

MEK - CDCl_3



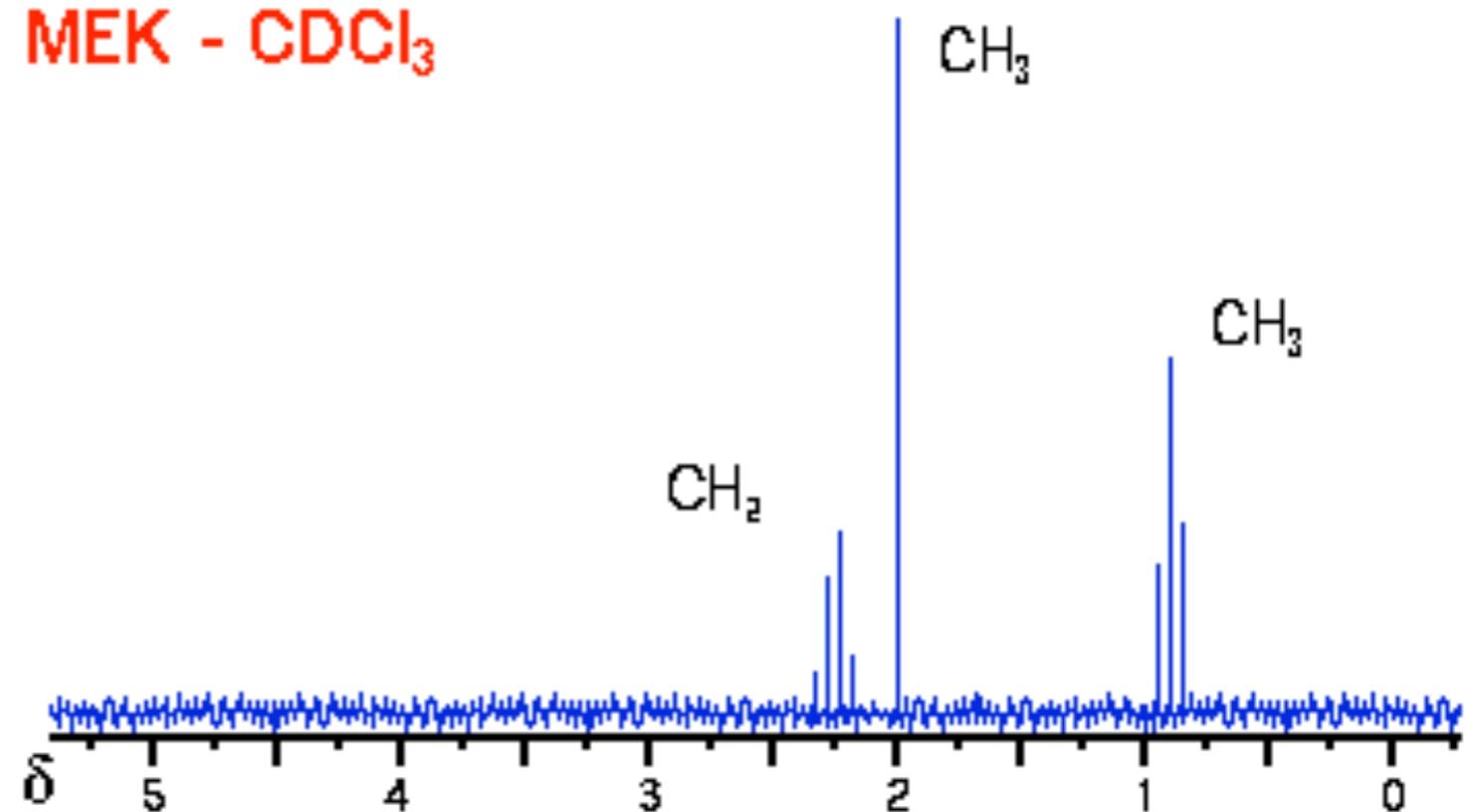
Сигнал/шум растет как квадратный корень
из числа накоплений

Проблема №2 – шум

Особенно важно
для редких ядер,
например ^{13}C

Решение -
многократное
накопление
сигнала

MEK - CDCl_3



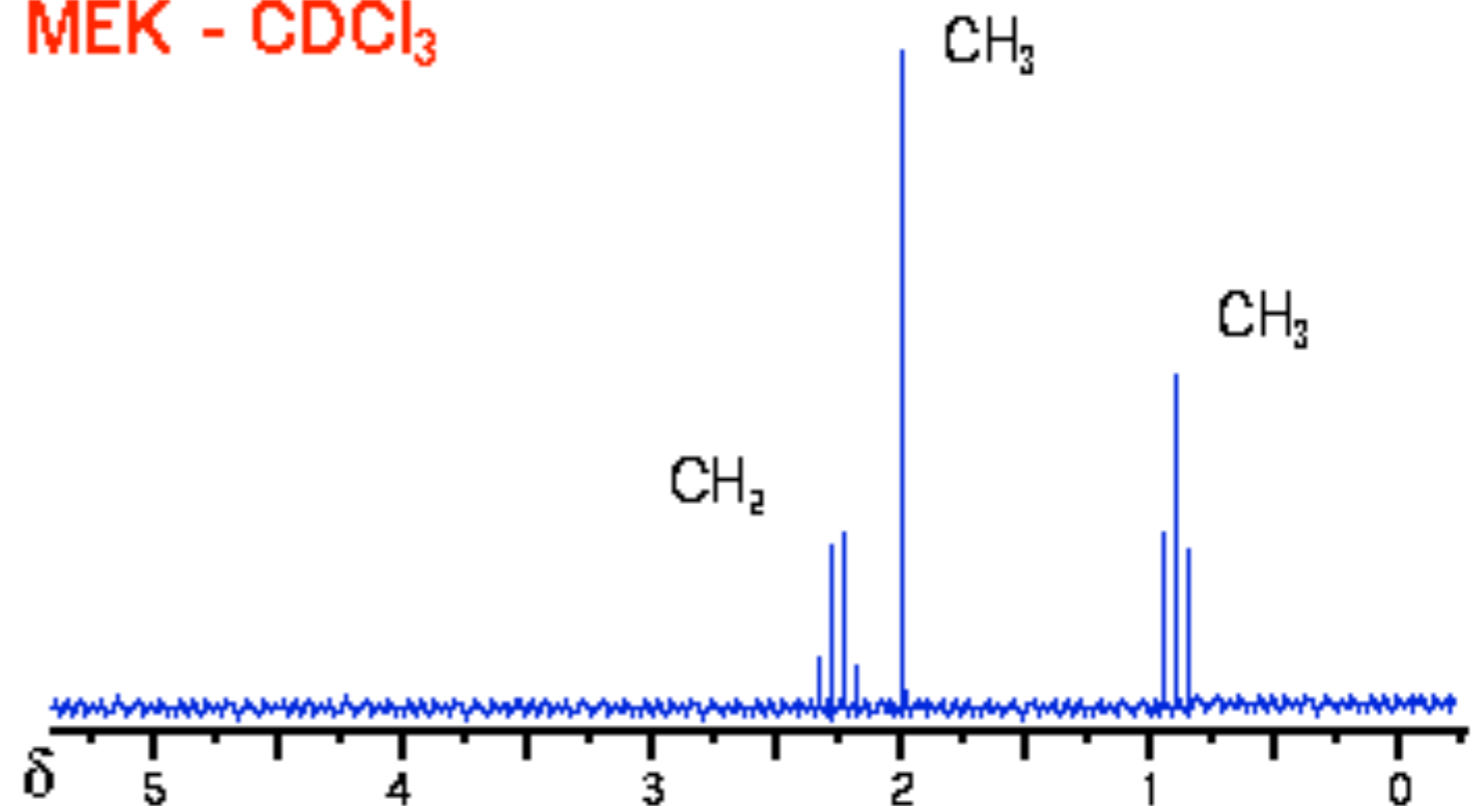
Сигнал/шум растет как квадратный корень
из числа накоплений

Проблема №2 – шум

Особенно важно
для редких ядер,
например ^{13}C

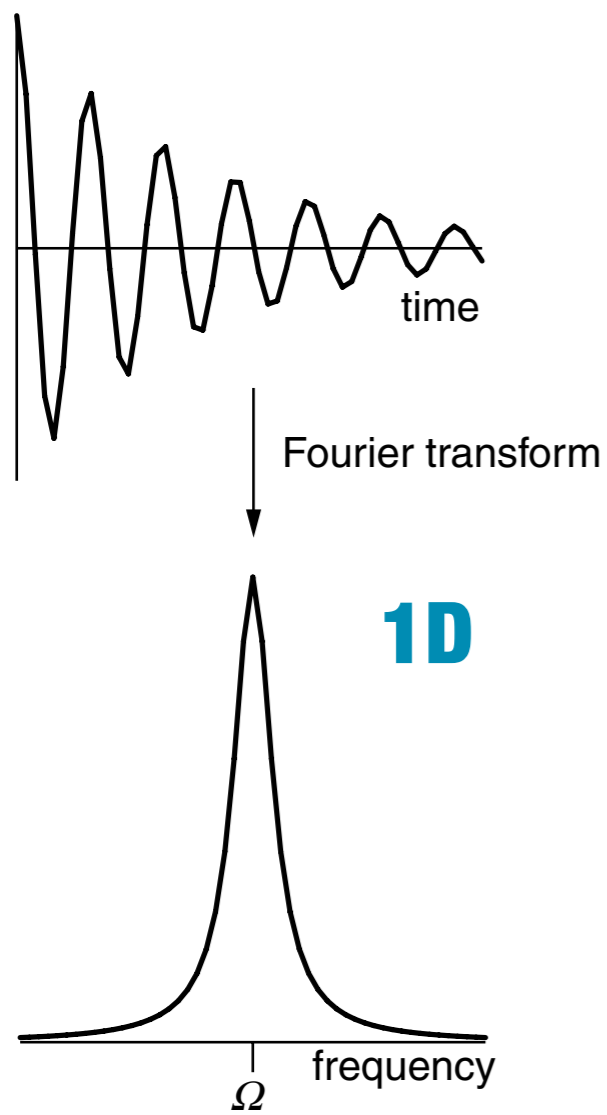
Решение -
многократное
накопление
сигнала

MEK - CDCl_3

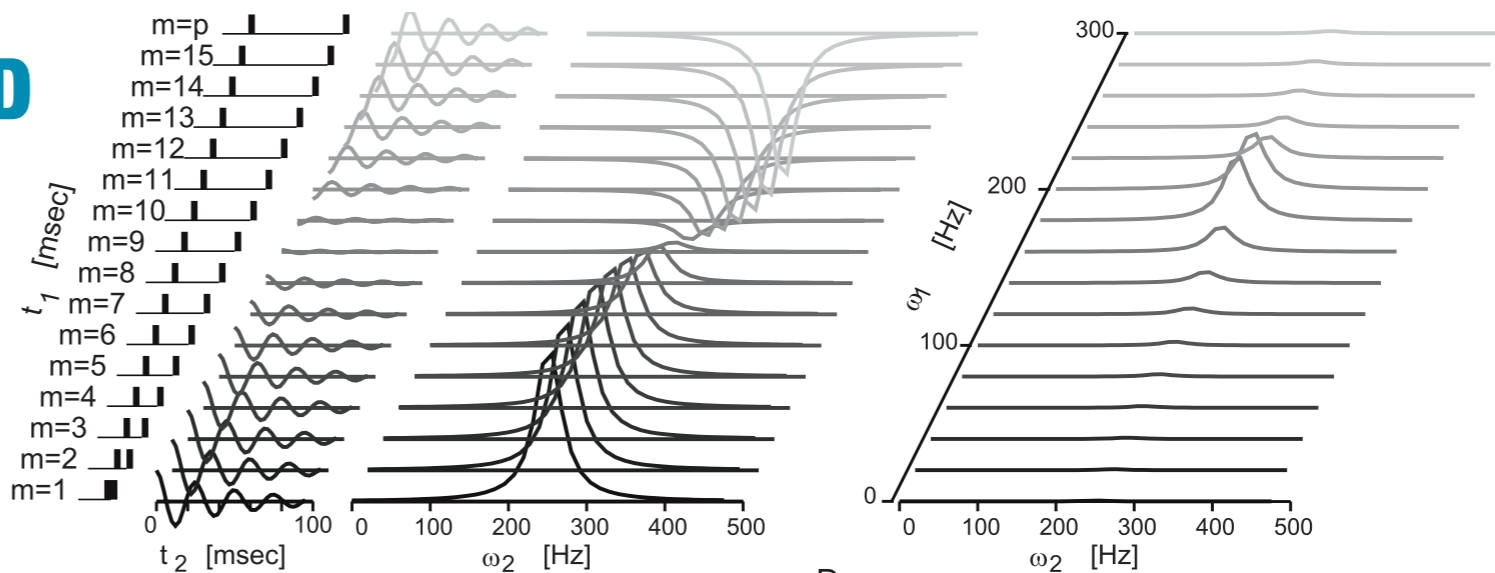


Сигнал/шум растет как квадратный корень
из числа накоплений

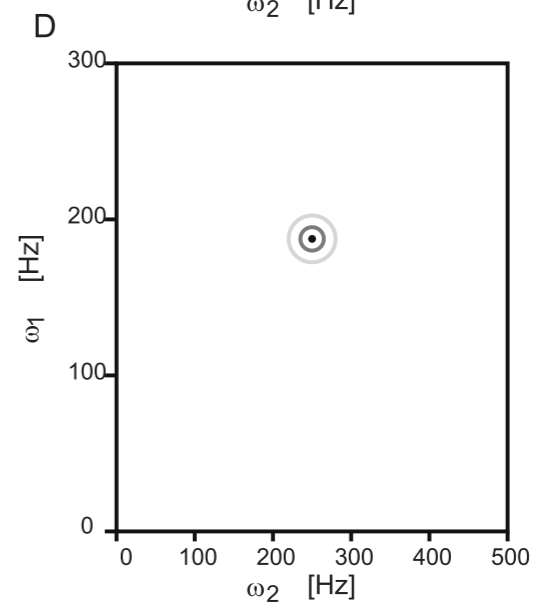
Двумерные спектры



2D



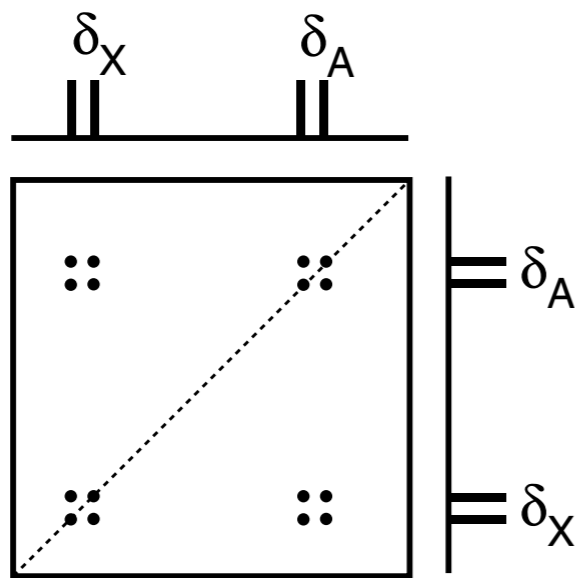
За счет усложнения эксперимента в 2D спектрах можно получить информацию о наличии взаимодействия между ядрами



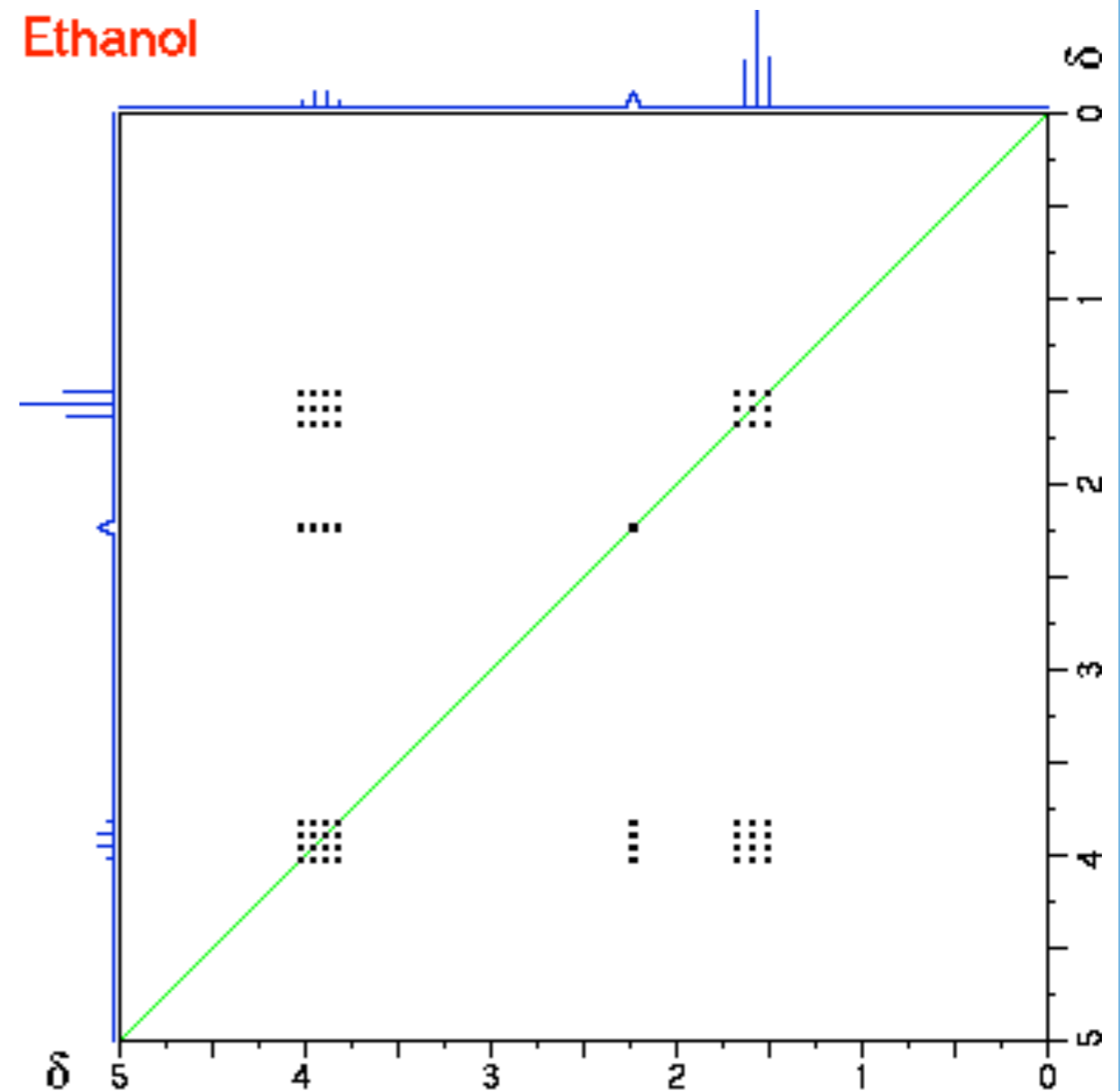
Correlation Spectroscopy

COSY

В спектрах COSY кросс-пики (сигналы вне диагонали) появляются при наличии спин-спинового взаимодействия



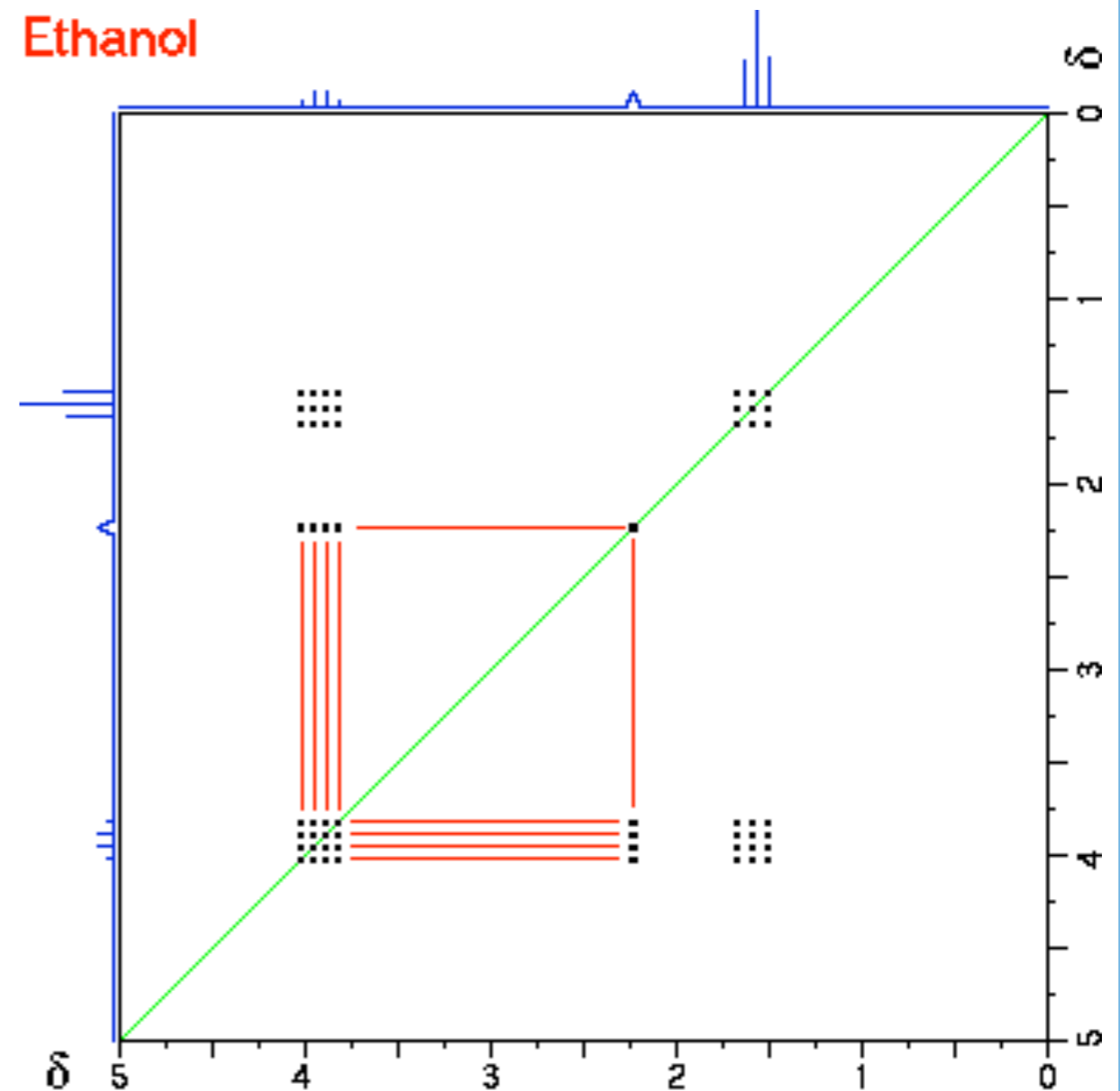
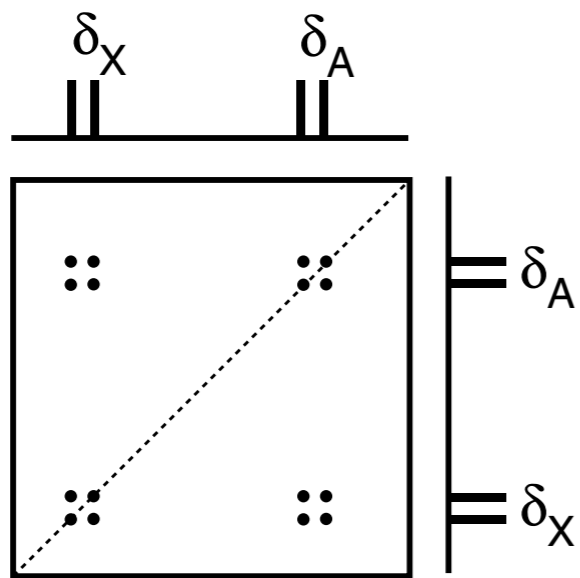
Ethanol



Correlation Spectroscopy

COSY

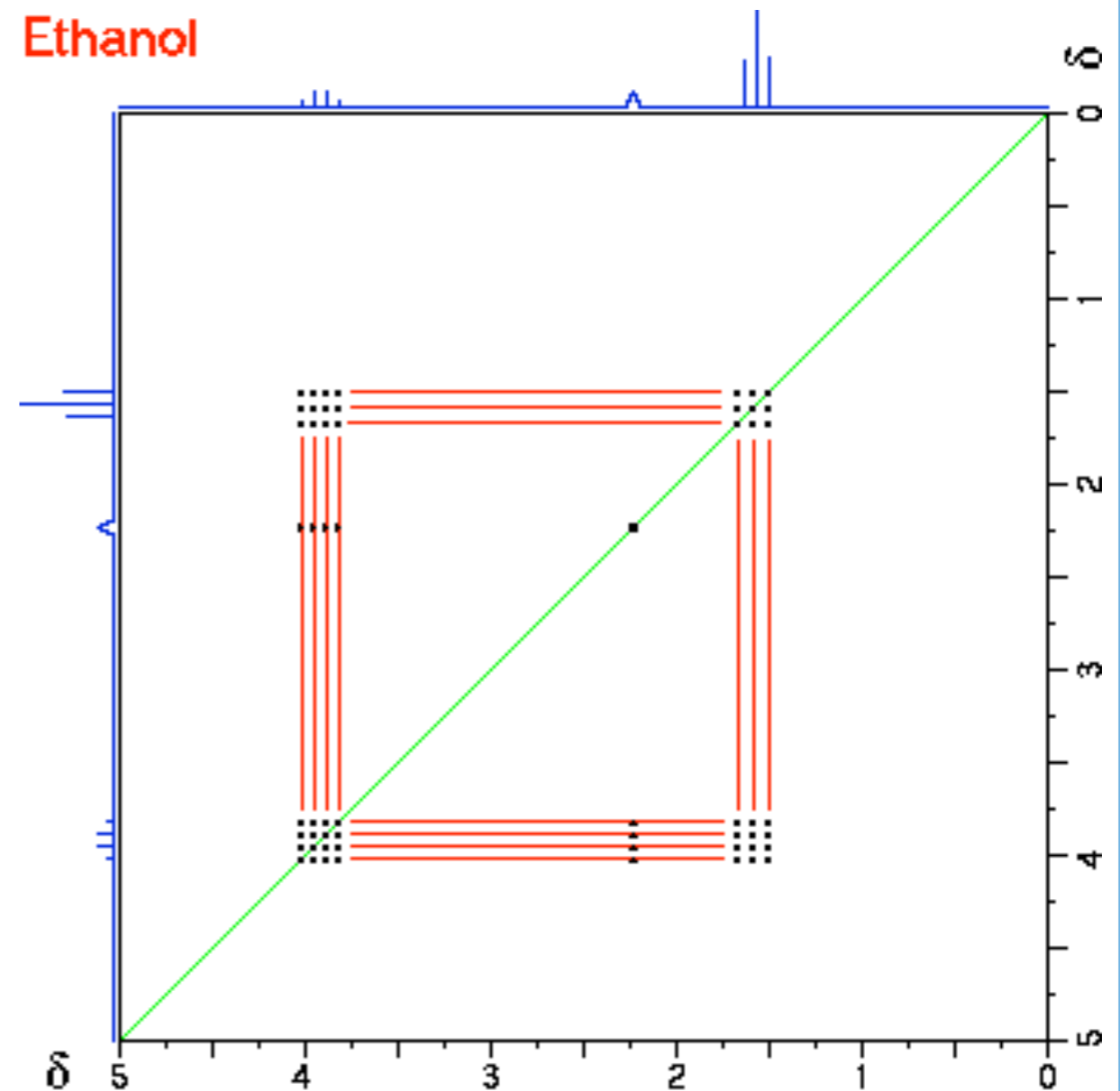
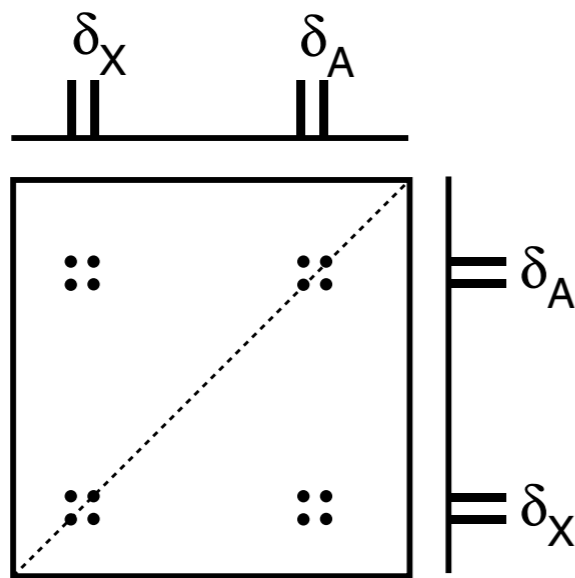
В спектрах COSY кросс-пики (сигналы вне диагонали) появляются при наличии спин-спинового взаимодействия



Correlation Spectroscopy

COSY

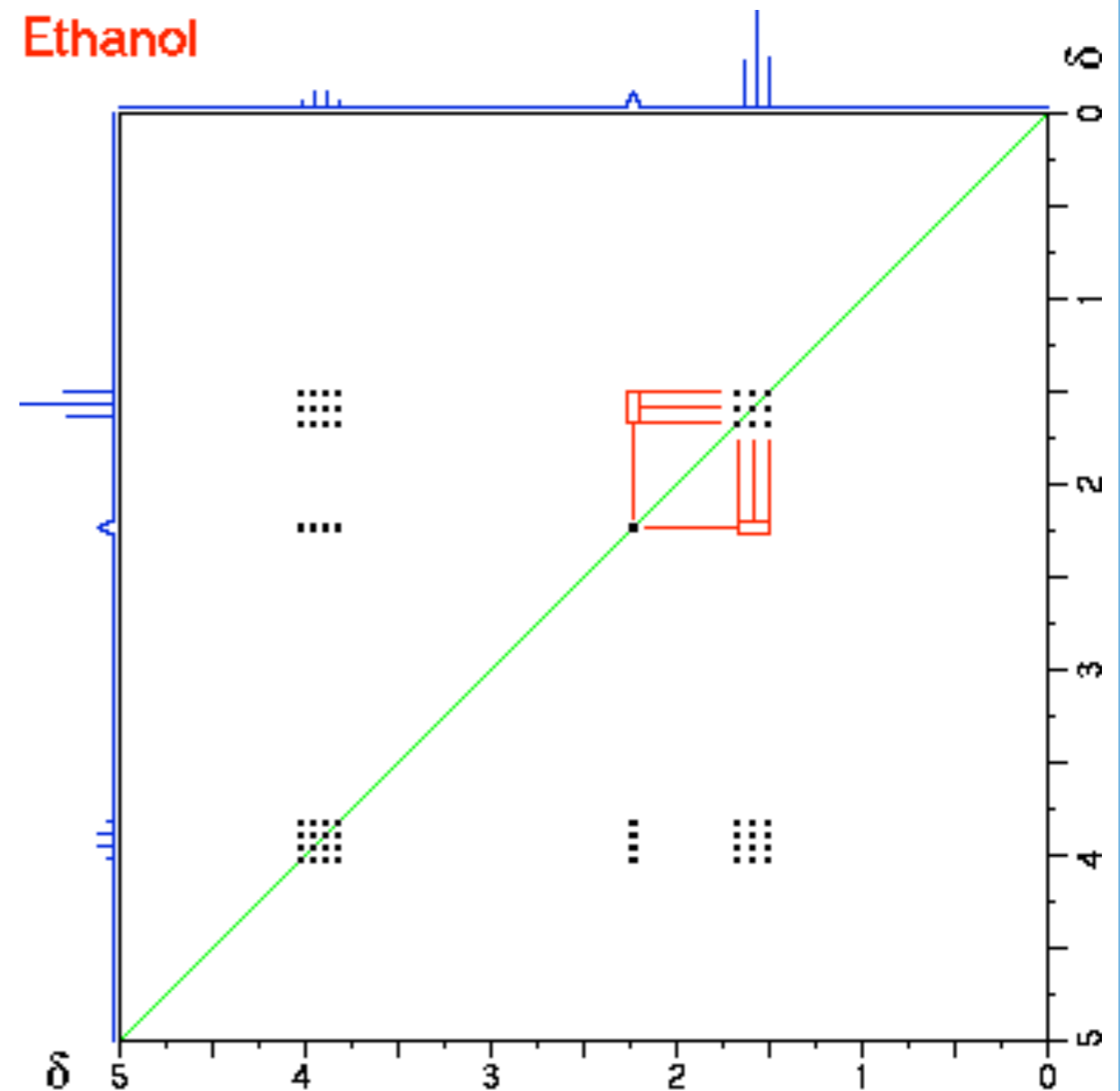
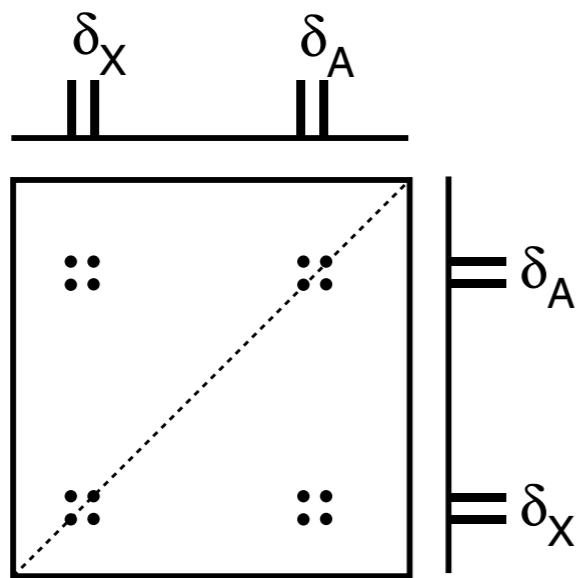
В спектрах COSY кросс-пики (сигналы вне диагонали) появляются при наличии спин-спинового взаимодействия



Correlation Spectroscopy

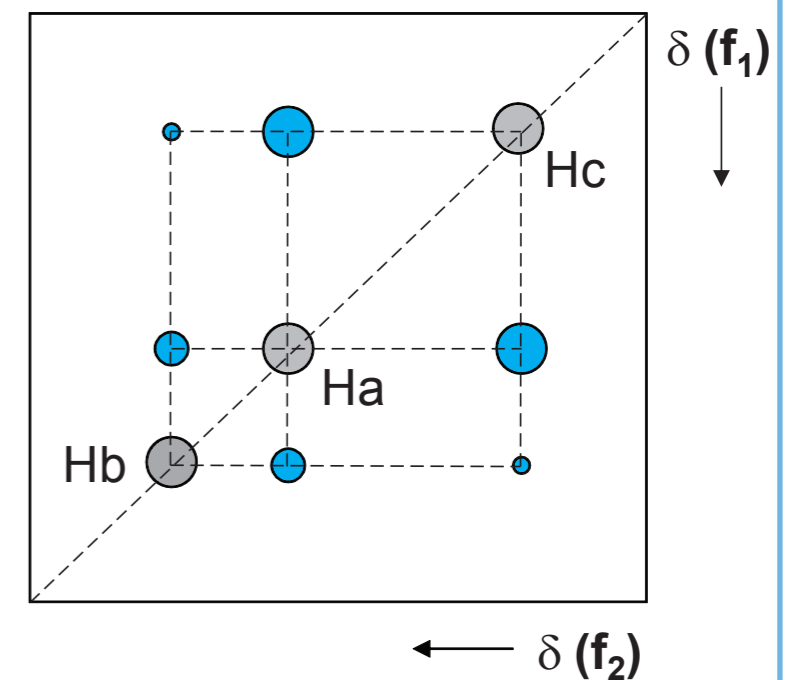
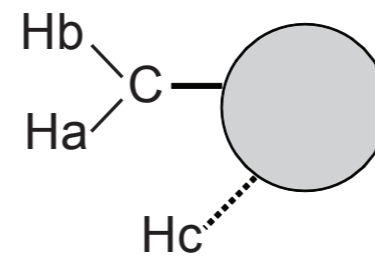
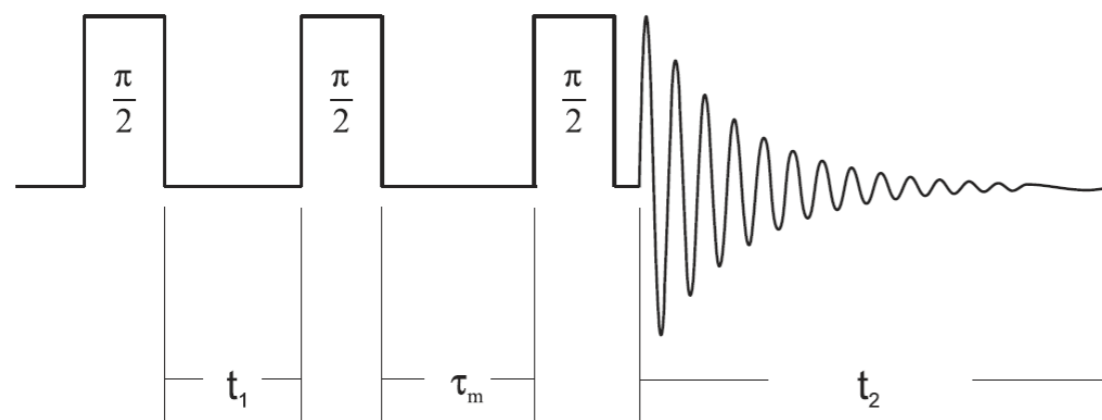
COSY

В спектрах COSY кросс-пики (сигналы вне диагонали) появляются при наличии спин-спинового взаимодействия



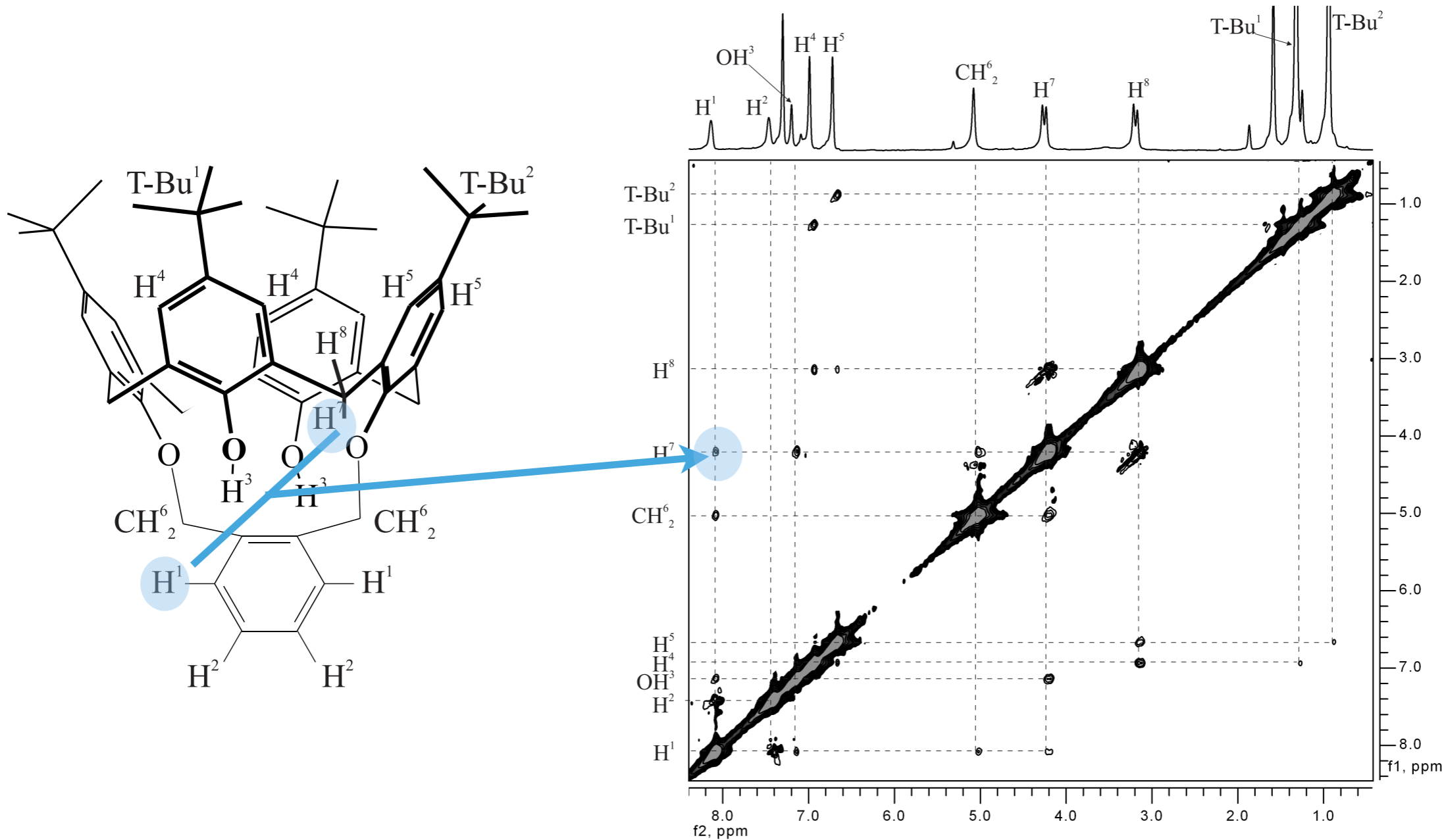
Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

NOESY



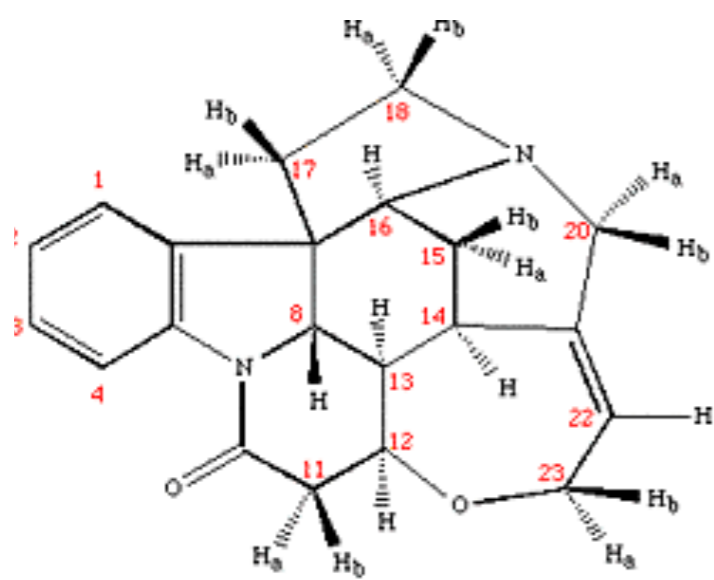
В спектрах NOESY кросс-пики появляются за счет взаимодействия через пространство при $r < 3\text{\AA}$

В спектрах NOESY кросс-пики появляются за счет взаимодействия через пространство при $r < 3\text{\AA}$



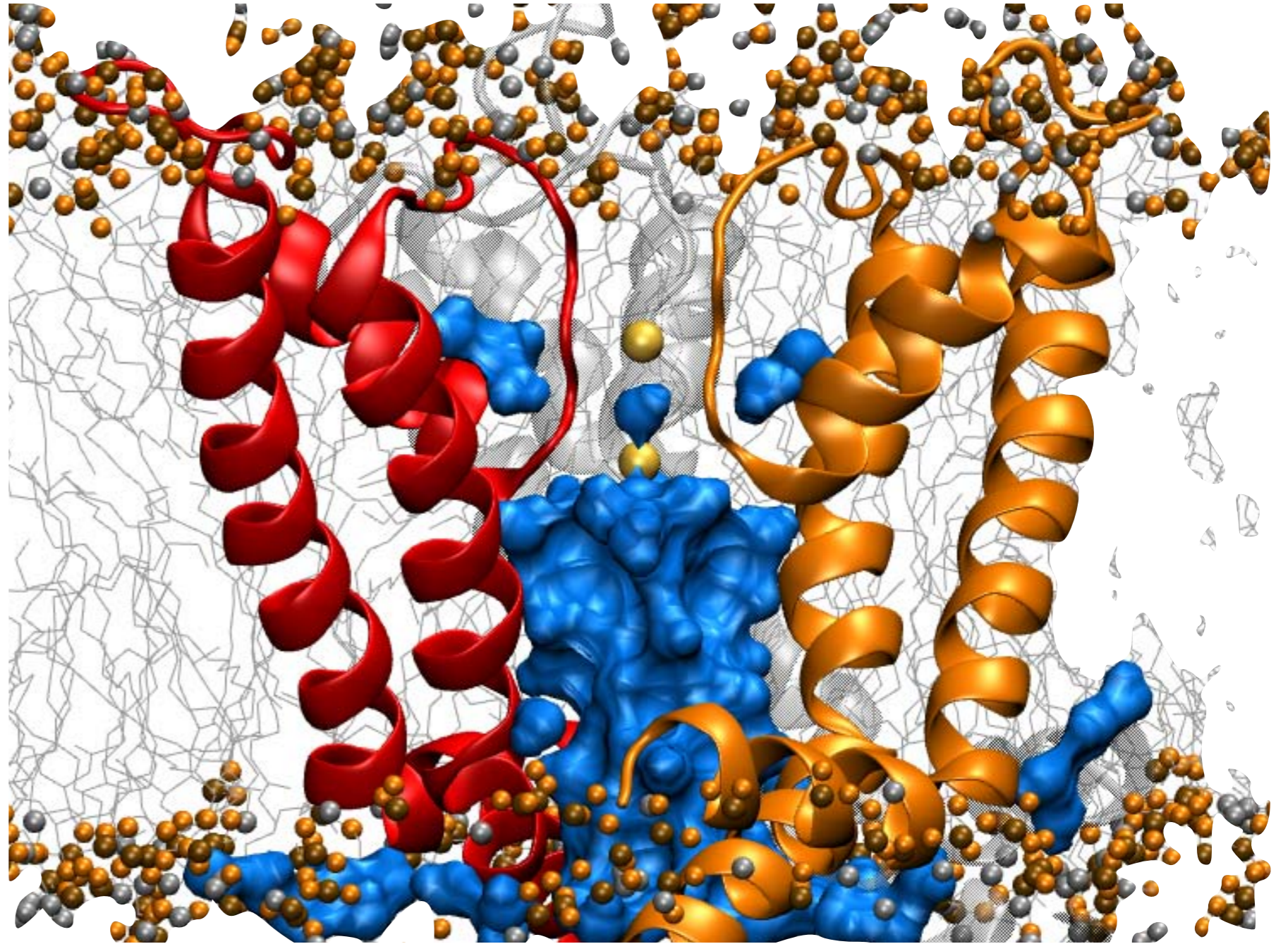
Гетероядерная корреляция

HSQC



Кросс-пики
появляются за счет
ССВ между
атомами ^1H и ^{13}C





Современные задачи

Современные задачи

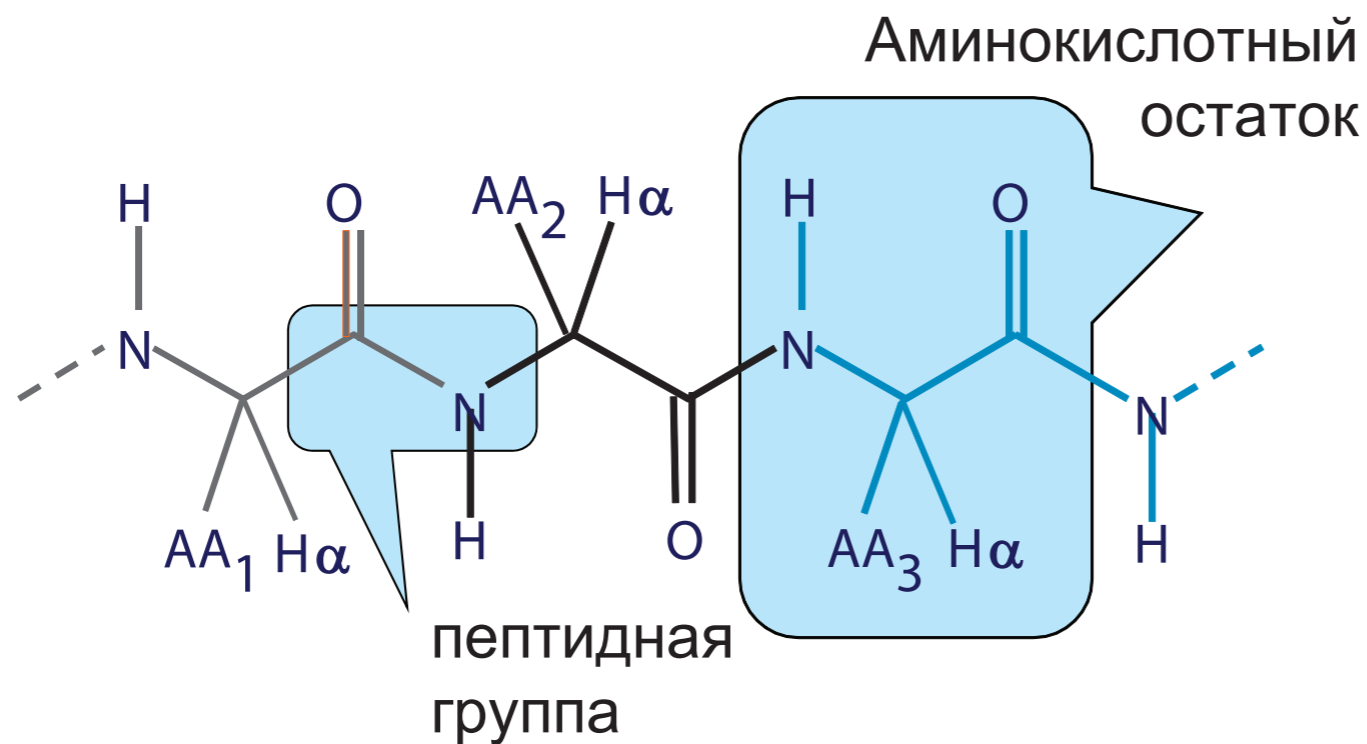


Курт Вютрих - Нобелевская премия по химии 2002 года

«За разработку применения ЯМР-спектроскопии для определения трехмерной структуры биологических макромолекул в растворе»

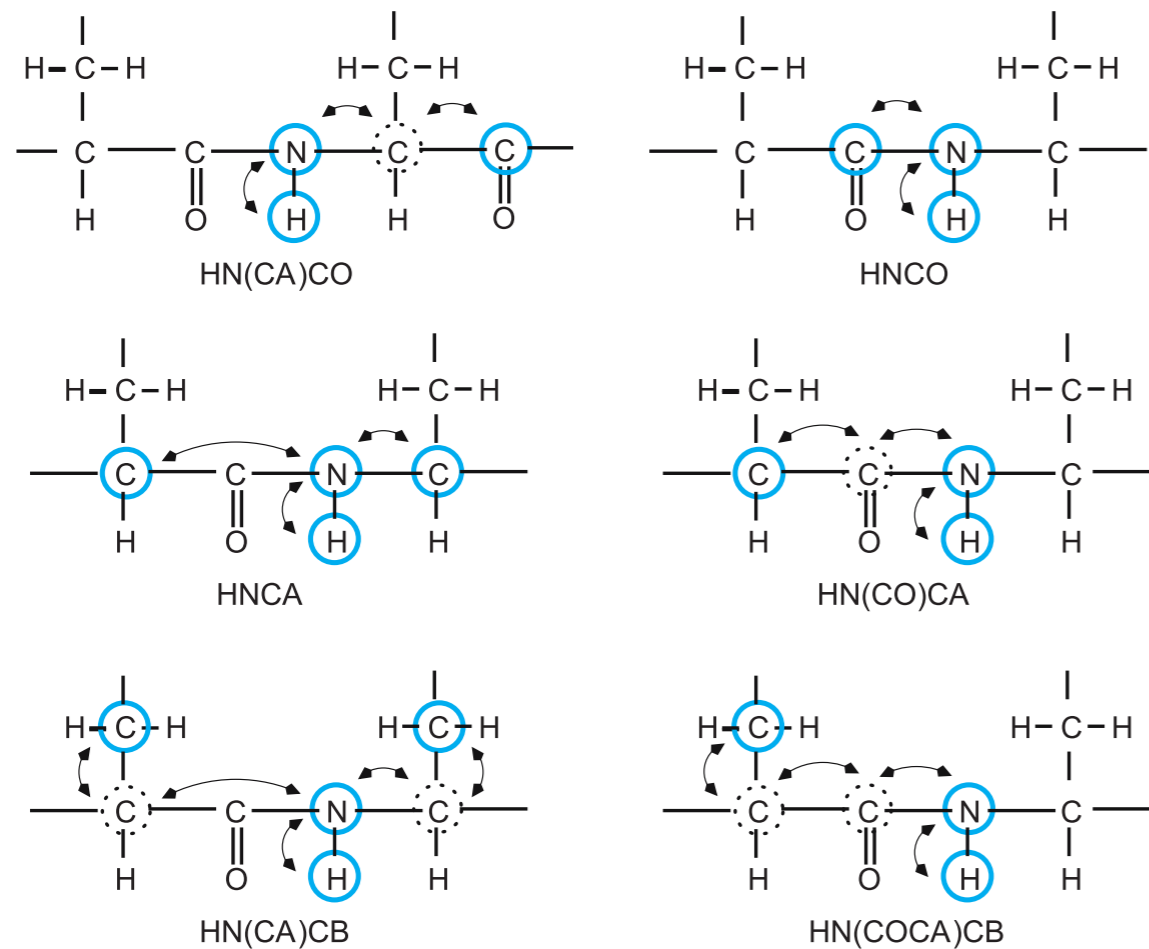
В последнее время метод ЯМР широко используется для определения пространственной структуры больших биологических молекул, в частности белков

Белки

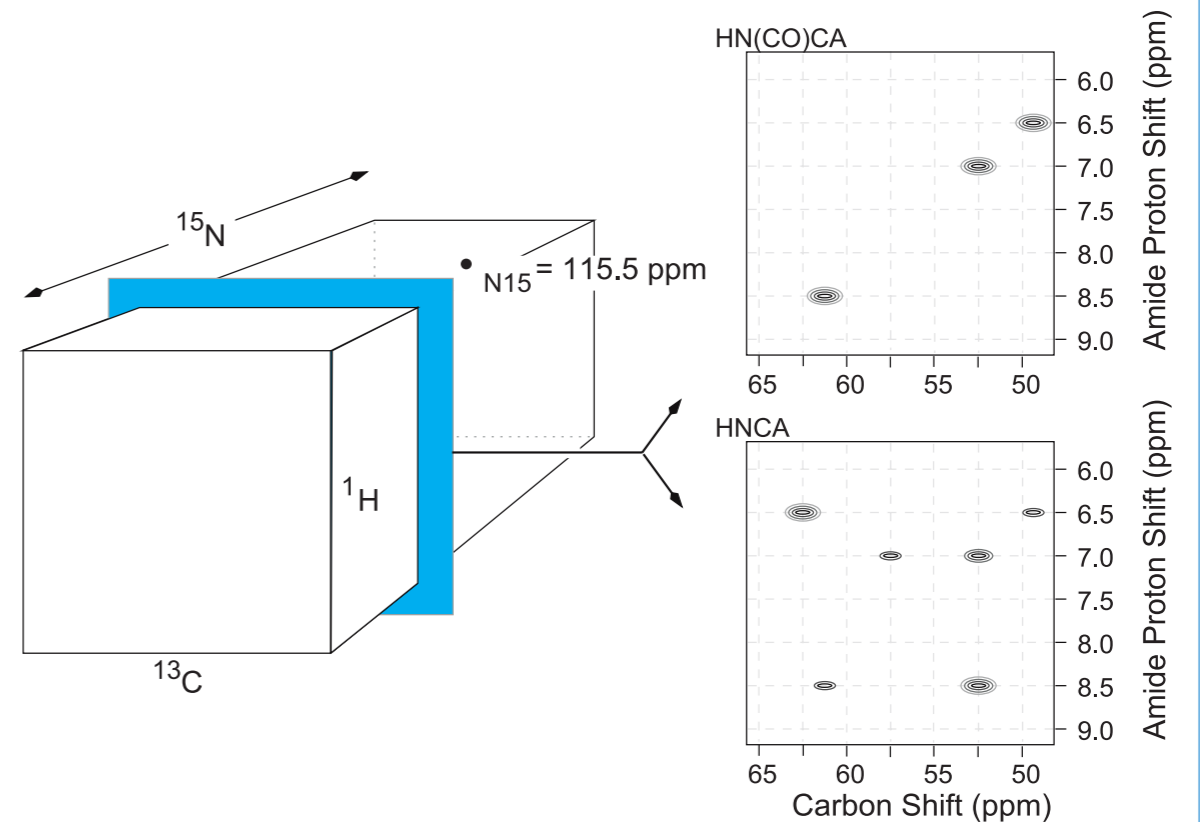


Функция белков напрямую связана с их пространственной структурой, а метод ЯМР — практически единственный способ определить эту структуру в растворе.

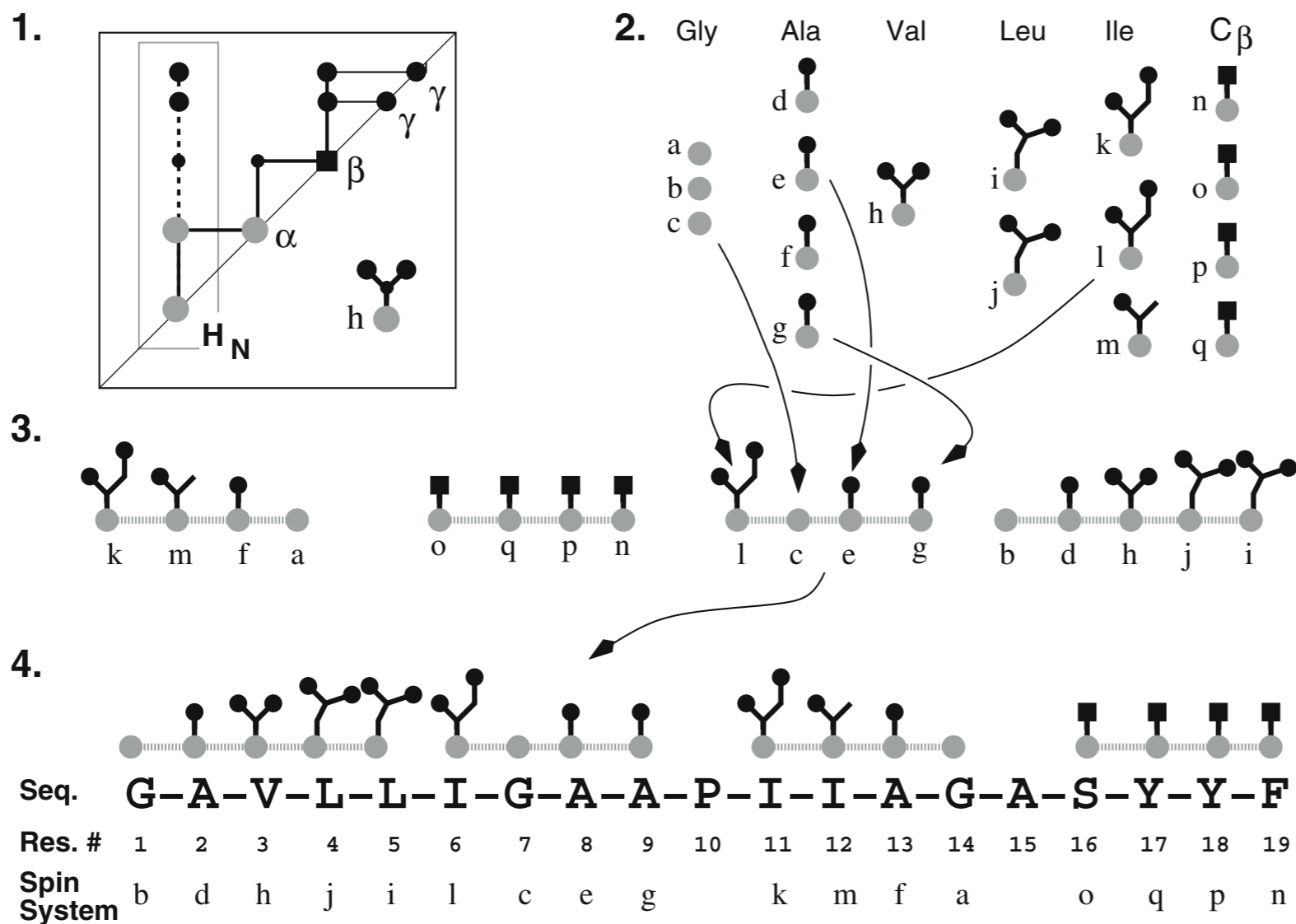
Трехмерные спектры



Позволяют получить информацию о взаимодействии трех связанных ядер



Требуются образцы, меченные изотопами ^{13}C и ^{15}N



1) Сбор спектральной информации (хим. сдвиги, КССВ).

Отнесение сигналов к соответствующим спиновым системам.

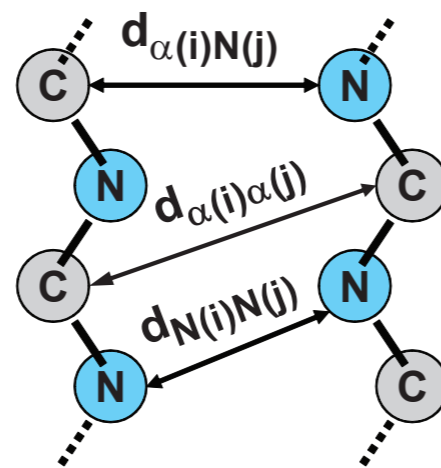
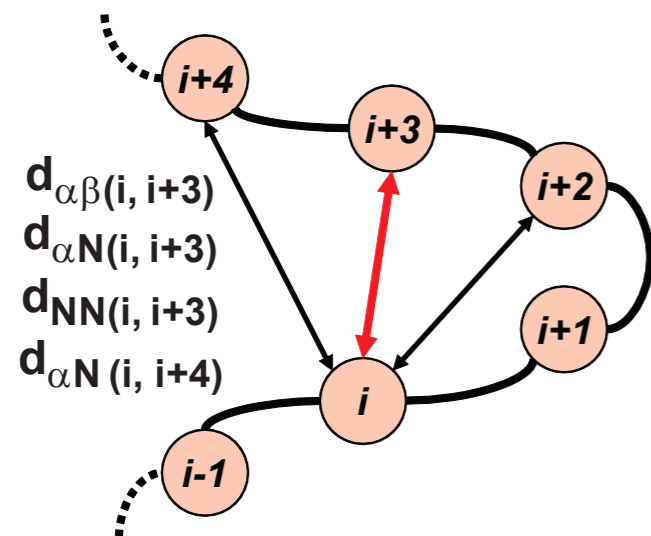
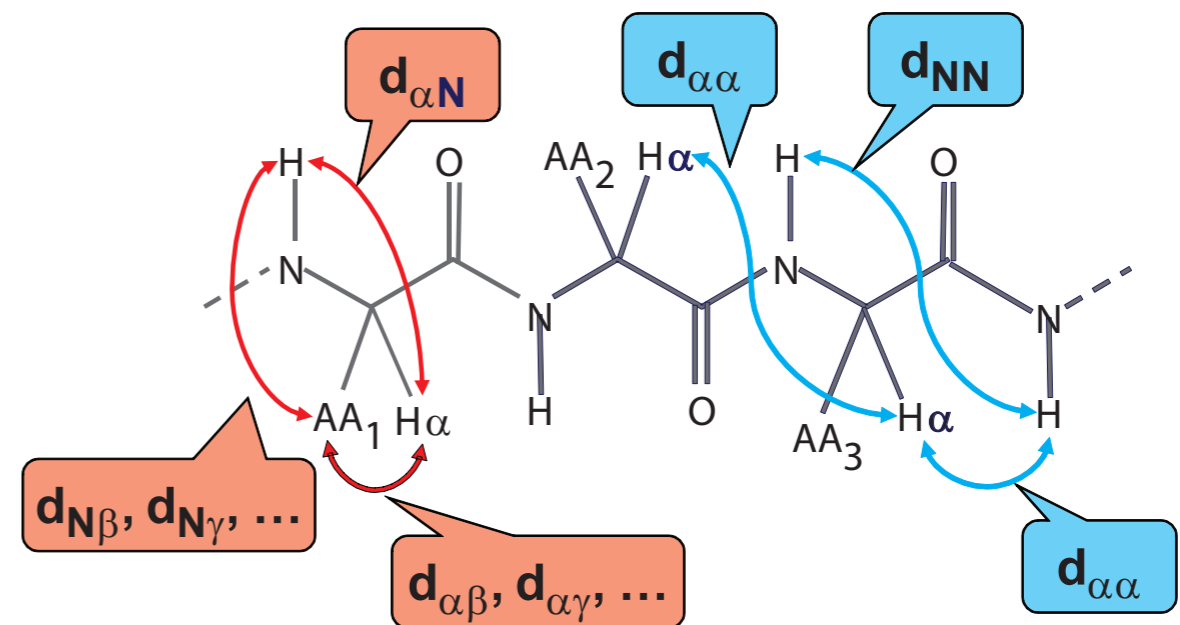
2) Предварительное приписание сигналов аминокислотам по их типу.

3) Анализ информации о взаимном расположении аминокислот.

4) Окончательное приписание сигналов по отдельным остаткам.

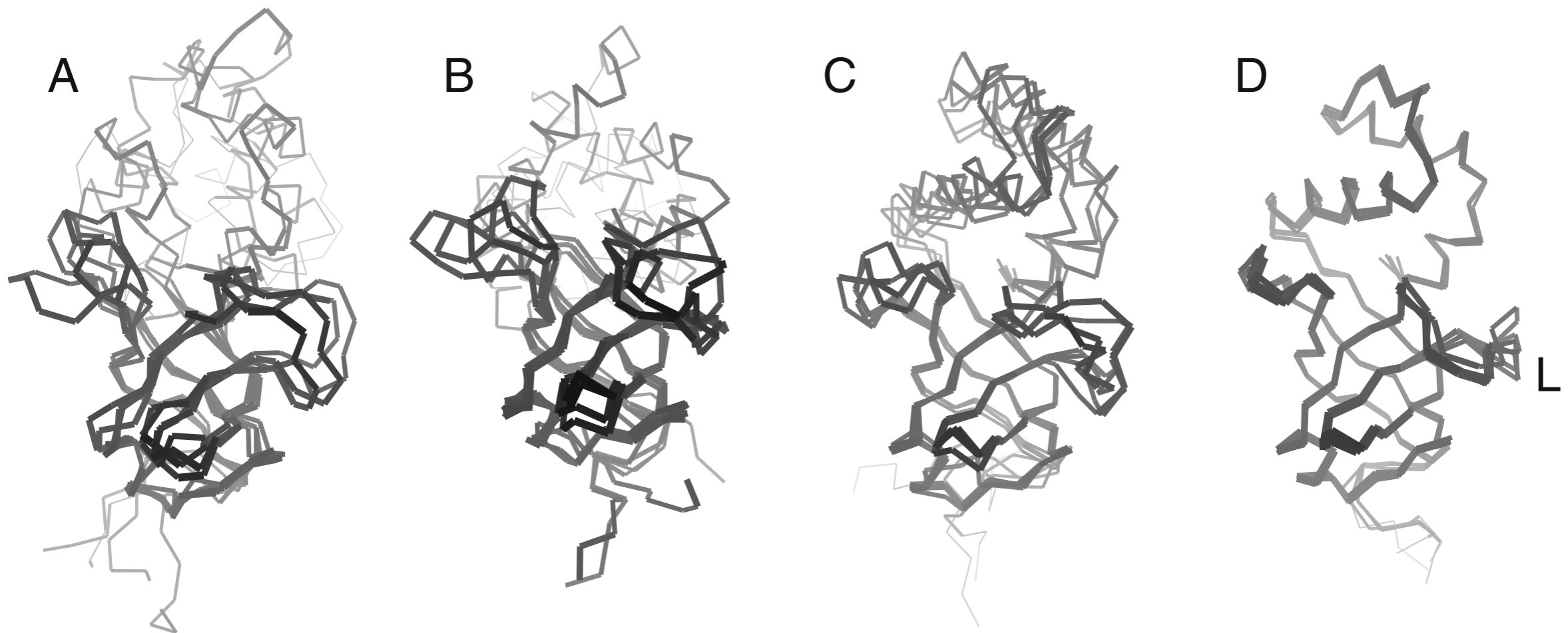
Получение трехмерной модели

Из спектров NOESY
можно получить
некоторые межзатомные
расстояния



Из анализа расстояний –
пространственную
структуру

Уточнение структуры



Чем больше информации можно извлечь из данных ЯМР – тем точнее структура