Казанский федеральный университет

Институт физики

Институт химии им. А.М.Бутлерова

Конспекты лекций

ЯМР высокого разрешения в органической и биоорганической химии

Клочков В.В.

Каратаева Ф.Х.

Казань - 2013

1. ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ВЫСОКОГОРАЗРЕШЕНИЯ

1.1. История открытия ЯМР

Явление *ядерного магнитного резонанса* (ЯМР) впервые обнаружено в 1945 году двумя группами американских физиков под руководством Ф. Блоха (Стандфордский университет) и Э. Парселла (Гарвардский университет). В 1952 году за это открытие они удостоены Нобелевской премии по физике.

1.2. Угловой момент количества движения ядер

Ядро, исходя из классической теории, может быть представлено в виде положительно заряженной сферы, вращающейся вокруг своей оси с *угловым моментом количества движения P*.

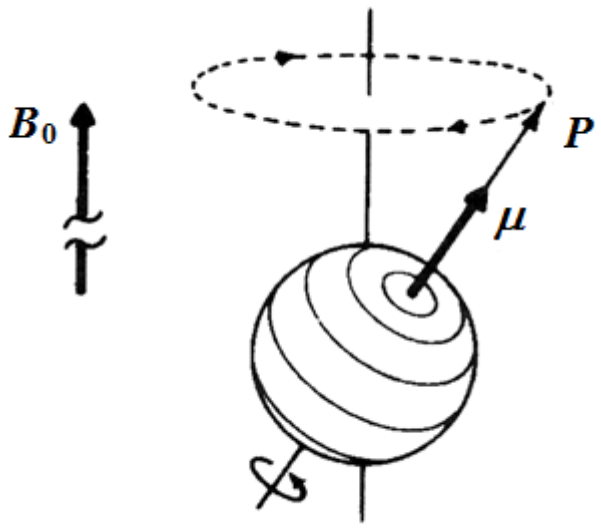


Рисунок 1-1.

$$P = \sqrt{I(I+1)}\hbar\,, \tag{1-1}$$

где $\hbar$ – константа Планка, I – *ядерный спин*, который может принимать значения 0, 1/2, 1, 3/2, 2… и до 6.

Вращающийся заряд создает *магнитный момент* μ:

$$\mu = \gamma P\,, \tag{1-2}$$

который, так же, как и угловой момент количества движения, *квантован:*

$$\mu = \gamma\sqrt{I(I+1)}\,\hbar \tag{1-3}$$

Таблица 1.1. Ядерные спины, природное содержание, резонансные частоты и величины гиромагнитных отношений.

Ядро	Спин	Природное содержание, %	Частота ЯМР (МГц) при B_0 =2.35 Т	Гиромагнитное отношение (γ)
^{1}H	1/2	99.98	100.000	26.7519
^{2}H	1	0.016	15.351	4.1066
^{12}C	0	98.9	-	-
^{13}C	1/2	1.108	25.144	6.7283
^{14}N	1	99.63	7.224	1.9338
^{15}N	1/2	0.37	10.133	-2.712
^{17}O	5/2	0.037	13.557	-3.6279
^{19}F	1/2	100	94.077	25.181
^{31}P	1/2	100	40.481	10.841

Ядра со спином $I = 0$ (^{12}C и ^{16}O) не обладают магнитным моментом (табл. 1.1) и их сигналы в экспериментах ЯМР *не наблюдаются*. Ядра со спином $I \geq 1$ называются квадрупольными.

1.3. Ядра в статическом магнитном поле

Если ядро с *угловым моментом* количества движения P и *магнитным моментом* μ поместить в статическое *магнитное поле* B_0, то возникнет его прецессия вокруг направления поля (рис. 1-1).

Направление поля B_0 совпадает с осью Z (рис. 1-2), то Z - компонента углового момента количества движения будет определяться следующим соотношением:

$$P_Z = m\hbar, \tag{1-4}$$

где m – *магнитное квантовое число*, которое принимает значения I, I-1, ..., $-I+1$, $-I$; m может принимать ($2I+1$) различных значений.

$$\mu_Z = m\gamma\hbar \tag{1-5}$$

Для ядер со спином I = 1/2 (например, ^{1}H и ^{13}C) m = +1/2 и –1/2, а для ядер с I =1 (^{2}H и ^{14}N) m = +1, 0 и –1 (рис. 1-2).

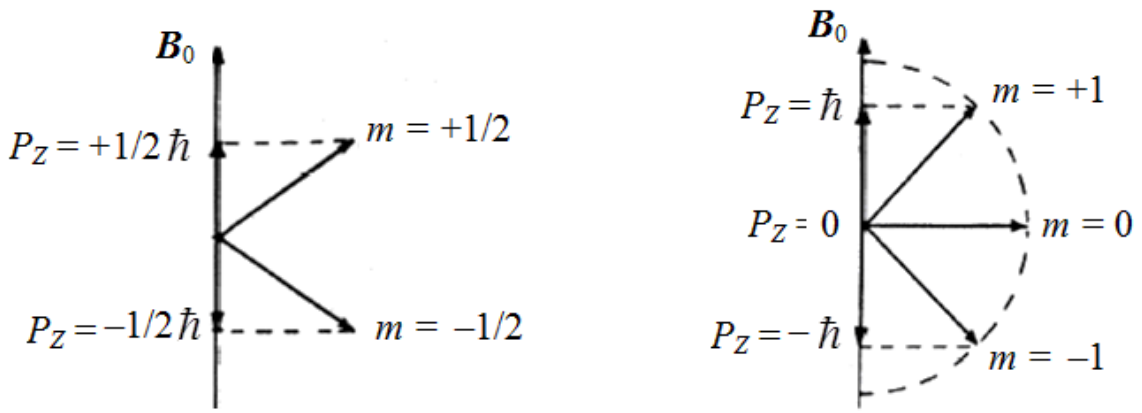


Рисунок 1-2.

С точки зрения квантово-механических представлений (в противоположность классическому описанию) разрешенными значениями угла прецессии Θ считаются те, при которых проекция

углового момента (спина) на ось *Z* имеет только целые или полуцелые значения *I*. Для ядер со спином *I* = 1/2 (^{1}H и ^{13}C) *угол прецессии равен 54^{0}44'* (рис. 1-3).

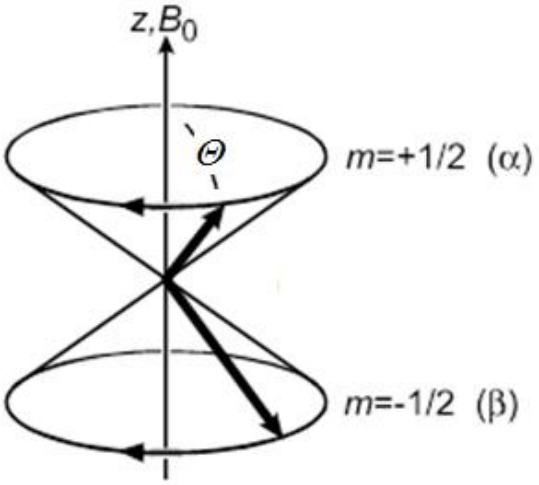


Рисунок 1-3. Прецессия ядерных диполей с *I* = 1/2; *m* = +1/2, *α*-состояние и *m* = –1/2, *β*-состояние.

Частота прецессии (вращения) ядерного диполя (ларморова частота) пропорциональна плотности магнитного потока:

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 \qquad (1\text{-}6)$$

1.4. Энергия ядер в магнитном поле

Магнитный диполь, помещенный в магнитное поле с плотностью потока B_0, обладает энергией, равной:

$$E = -\mu_Z B_0 \tag{1-7}$$

$$E = -m\gamma\hbar B_0 \tag{1-8}$$

Если m = +1/2, то компонента магнитного момента ориентирована вдоль поля $\boldsymbol{B_0}$ и является энергетически более предпочтительной, т.е. характеризуется меньшей энергией (рис. 1-4, а).

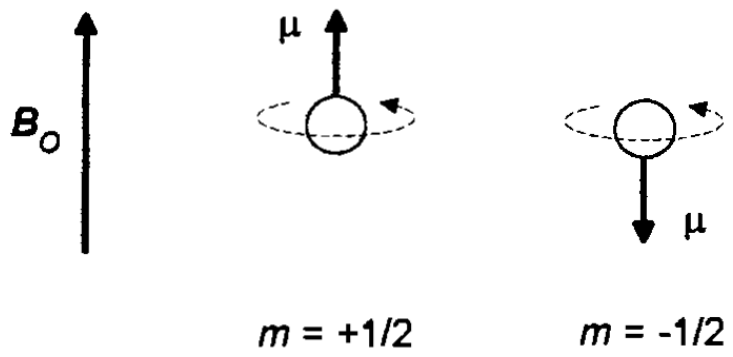


Рис. 1-4, а. Ориентации спина протона в магнитном поле $\boldsymbol{B}_0$.

Для ядер со спином I = 1/2 (^{1}H и ^{13}C) имеется два энергетических уровня. В квантовой механике состояние с m = +1/2 описывается спиновой функцией α (α -состояние), для m = –1/2 состояние описывается функцией β (β-состояние).

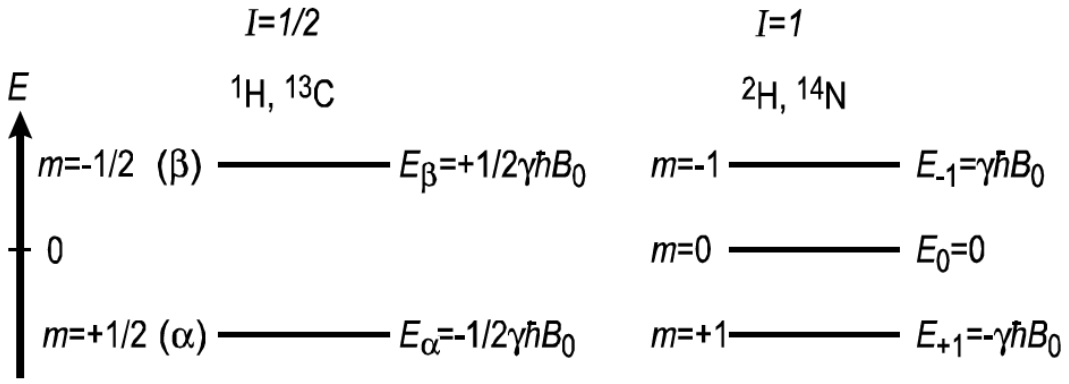


Рисунок 1-4, б.

Различие в энергиях между двумя соседними уровнями составляет:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \tag{1-9}$$

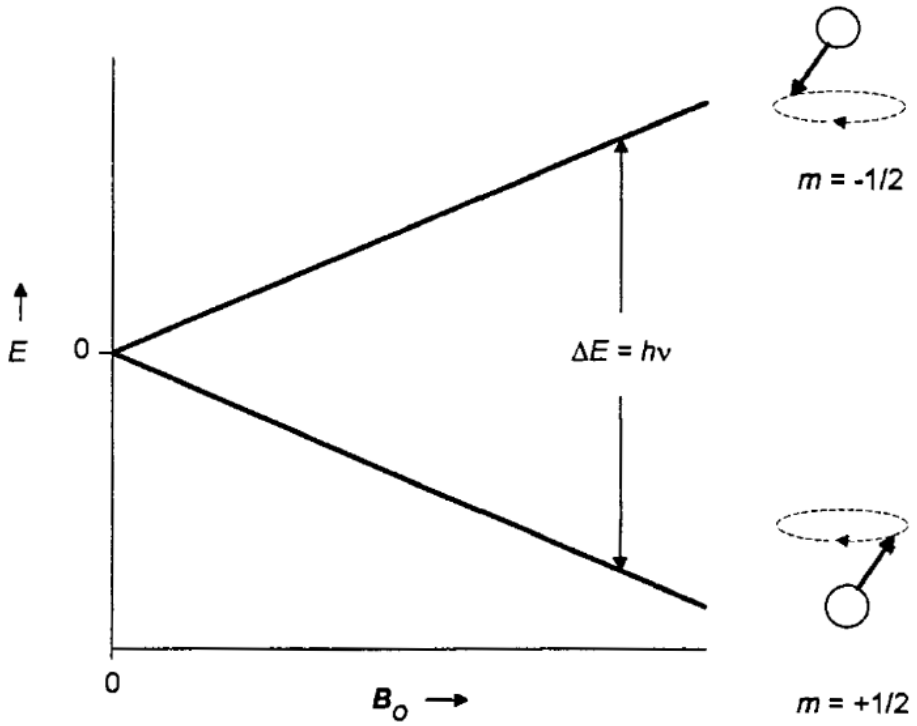


Рисунок 1-5.

1.5. Населенности энергетических уровней

Рассмотрим ядра со спином $I = 1/2$. Обозначим число ядер на верхнем энергетическом уровне N_β, а на нижнем уровне - N_α , тогда:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E / k_B T} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T}, \qquad (1\text{-}10)$$

где k_B - константа Больцмана, а T - абсолютная температура (в К).

При B_0 = 1.41 Т (резонансная частота $\nu_{рез}$ = 60 МГц) разность энергий (1-9), составляет $\Delta E = 2.4*10^{-2}$ Дж/моль (γ из табл. 1.1). При T = 300 К имеем соотношение $N_\beta = 0.9999904\ N_\alpha$. Для B_0 = 7.05 Т ($\nu_{рез}$ = 300 МГц) разность энергии увеличивается и избыток населенности на нижнем уровне растет $N_\beta = 0.99995\ N_\alpha$!

1.6. Макроскопическое намагничивание

Согласно классической теории, ядра с $I = 1/2$ прецессируют вокруг направления магнитного поля. Вокруг оси Z возникает макроскопическое намагничивание, *суммарный вектор* M_0 с учетом $N_\alpha > N_\beta$ будет располагаться вдоль положительного направления Z.

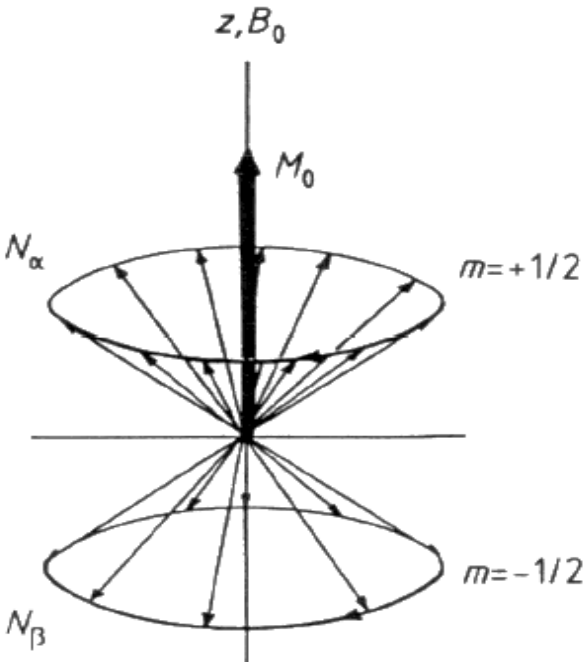


Рисунок 1-6.

1.7. Основные принципы эксперимента ЯМР

Условие резонанса реализуется тогда, когда для стимуляции переходов ядра облучают радиочастотным полем с частотой:

$$h\nu_1 = \Delta E \qquad (1\text{-}11)$$

Переходы с нижнего уровня на верхний соответствуют поглощению энергии, а с верхнего уровня на нижний – испусканию энергии. Из выражений (1-6), (1-9) и (1-11) получаем условие резонанса:

$$\nu_L = \nu_1 = \left|\frac{\gamma}{2\pi}\right| B_0 \qquad (1\text{-}12)$$

Квантовая механика разрешает только те переходы, в которых магнитное квантовое число меняется на единицу:

$$\Delta m = \pm 1 \qquad (1\text{-}13)$$

1.8. CW-спектрометр

Простейший способ наблюдения ЯМР поглощения и блок-схема спектрометра ЯМР - CW типа показаны ниже на рис. 1-7.

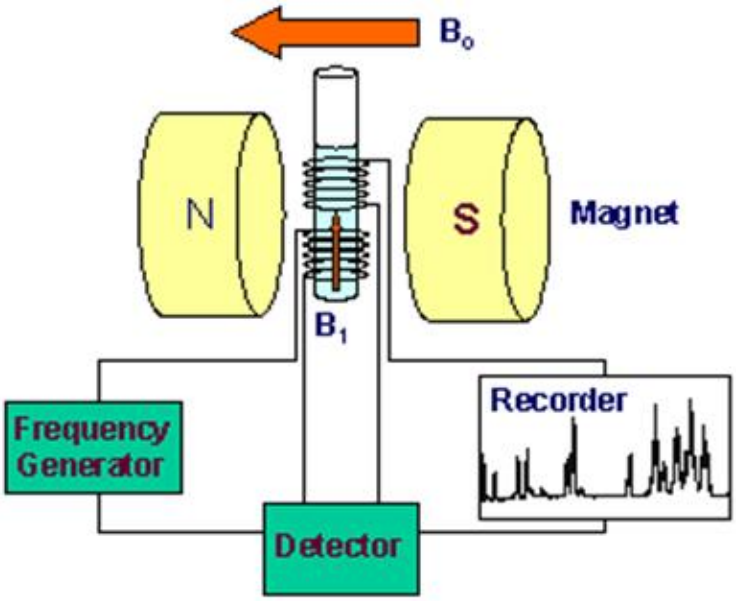
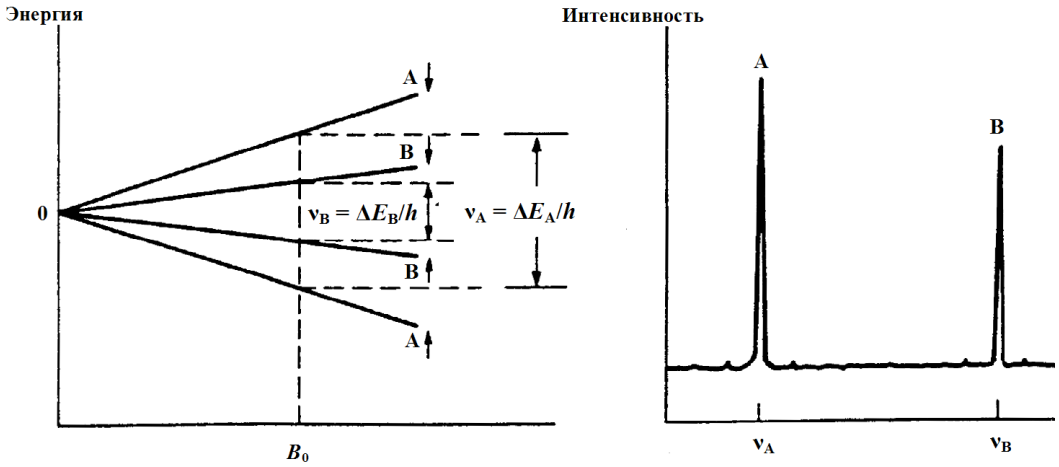
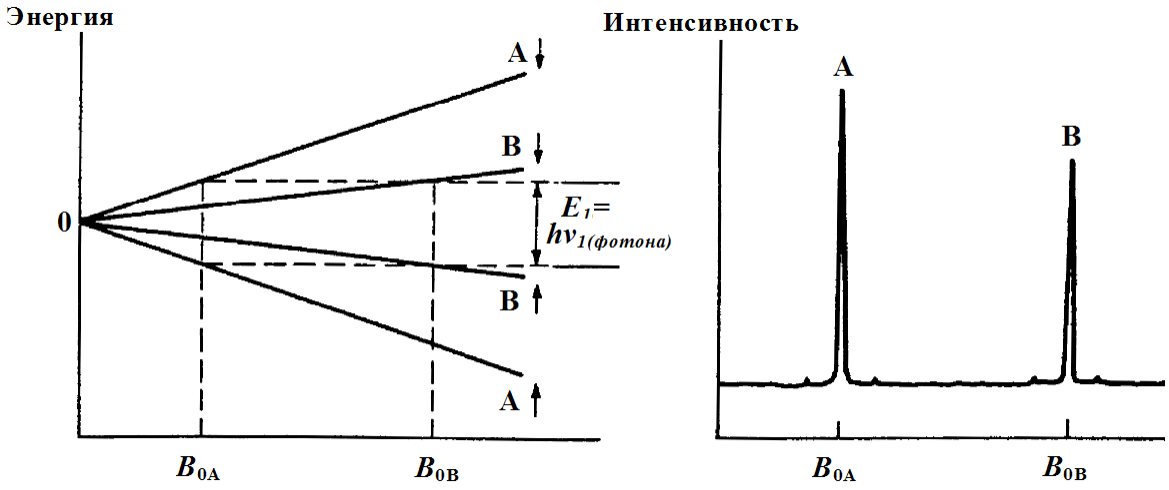


Рисунок 1-7.

Ампула с образцом; магнит; "свипирующие" катушки; приемная катушка; радиопередатчик; усилитель; осциллограф; самописец.



Эксперимент с «частотным» свипом. (а) Энергетическая диаграмма; (б) ЯМР спектр.



Эксперимент с полевым «свипом». (а) Энергетическая диаграмма; (б) ЯМР спектр.

Таблица 1.2. Резонансные частоты для ядер ^{1}H и ^{13}C при различных плотностях магнитного потока B_0 .

B_0, Т	Резонансные частоты, МГц	
	^{1}H	^{13}C
1.41	60	15.1
2.35	100	25.15
7.05	300	75.4
14.09	600	150.9

1.9. Импульсный метод ЯМР

В импульсном варианте, в отличие от CW-метода, возбуждение ядер осуществляют не "постоянной волной", а с помощью короткого импульса τ_p продолжительностью обычно несколько микросекунд (рис. 1-8).

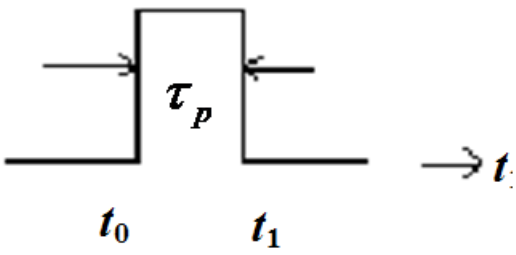


Рисунок 1-8.

Если среднее значение ν_1 выбрано правильно, то все частоты в регистрируемом спектре будут находиться в этой полосе (рис. 1-9).

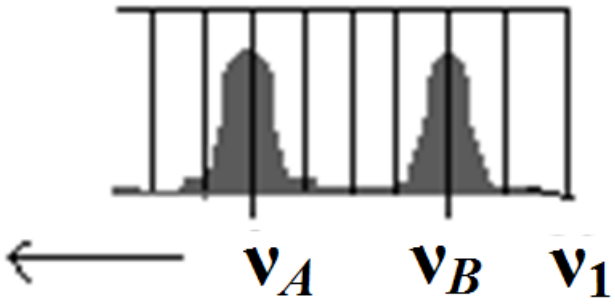


Рис. 1-9. Частотные компоненты импульса. Полоса находится в пределах от $\nu_1 - \tau_p^{-1}$ до $\nu_1 + \tau_p^{-1}$. ν_1 – частота генератора, ν_A и ν_B - резонансные частоты ядер А и В.

Амплитуды частотных компонент импульса уменьшаются с увеличением расстояния от ν_1. Так как желательно, чтобы все ядра облучались одинаково, необходимо использовать "жесткие импульсы", т.е. короткие импульсы большой мощности.

1.10. Фурье-преобразование

При регистрации данных после импульса измеряют то, как амплитуда развивается во времени. Преобразование Фурье (1-14) позволяет переходить от одного представления к другому и является методом анализа результатов импульсных экспериментов:

$$f(\omega) = f(t)\, e^{i\omega t} dt\,, \qquad (1\text{-}14)$$

где $f(t)$ соответствует спектру "временного представления" (спад свободной индукции), $f(\omega)$ - спектру "частотного представления".

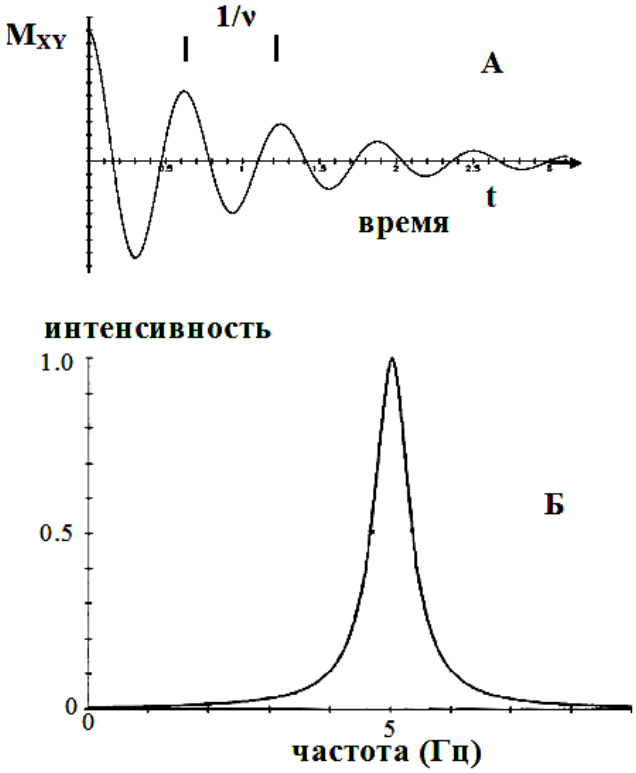


Рисунок 1-10. Спектр ЯМР ^{1}H CH_3I. А- "временное представление", Б- "частотное представление".

Спектр ЯМР ^{13}C для $^{13}CH_3OH$ (рис. 1-11) представляет собой типичную интерферограмму, содержащую интересующие нас резонансные частоты и интенсивности. А – временное представление; Б – частотное представление.

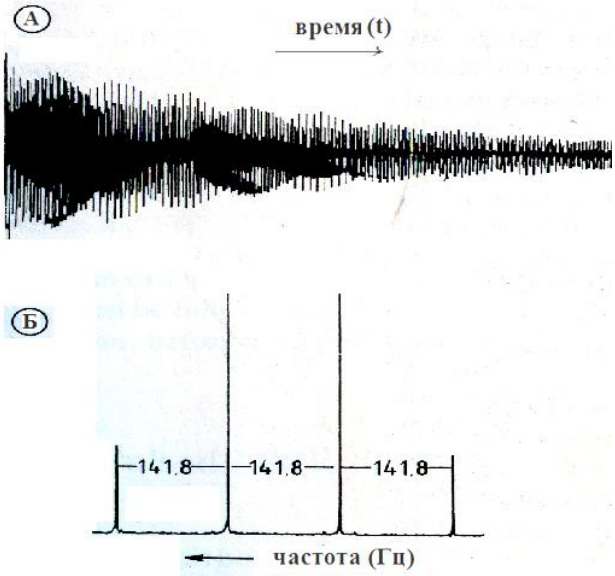
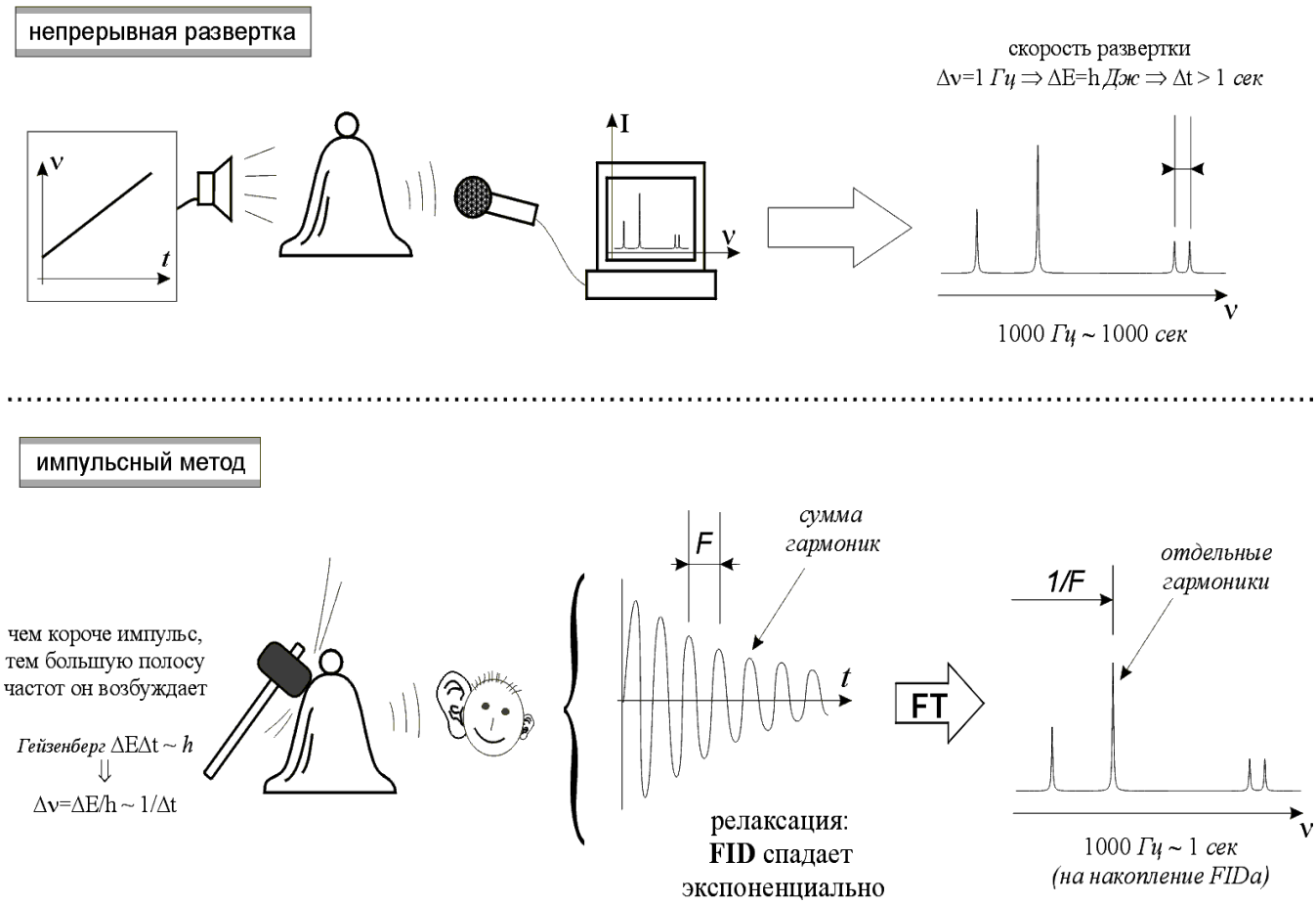


Рисунок 1-11.

Классический и импульсный ЯМР



1.11. Классическое описание импульсного эксперимента

Взаимодействующее с ядерными диполями радиочастотное поле B_1 можно представить в виде двух векторов, вращающимися в плоскости X-Y в противоположном направлении с частотой ν_L (сумма этих векторов = $2B_1$) (рис. 1-12). При этом:

$$\theta = \gamma B_i \tau_p \qquad (1\text{-}15)$$

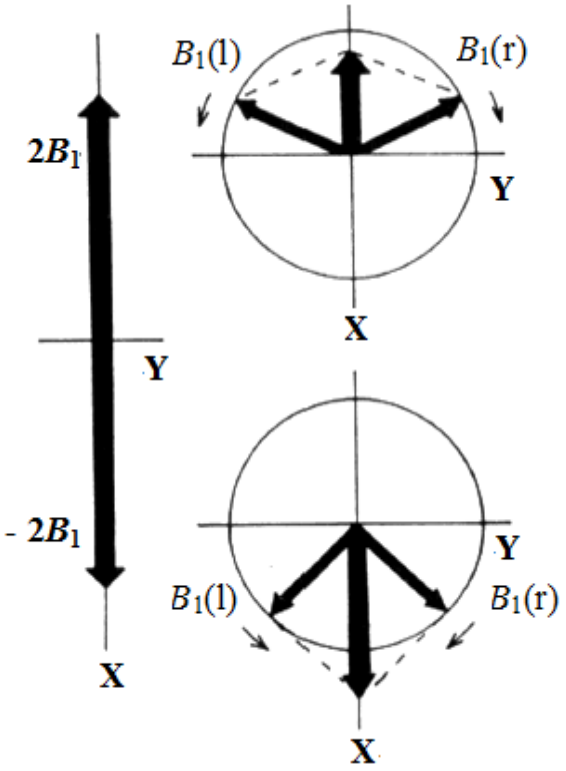


Рисунок 1-12.

Если напряженность поля B_1 велика, а продолжительность импульса τ_p настолько мала, что в течение импульса релаксационными процессами можно пренебречь, то действие поля B_1 сведется к повороту вектора намагниченности M на угол $\gamma B_1 \tau_p$. В большинстве импульсных методик используются $\theta = 90°$ и $180°$ (рис. 1-13).

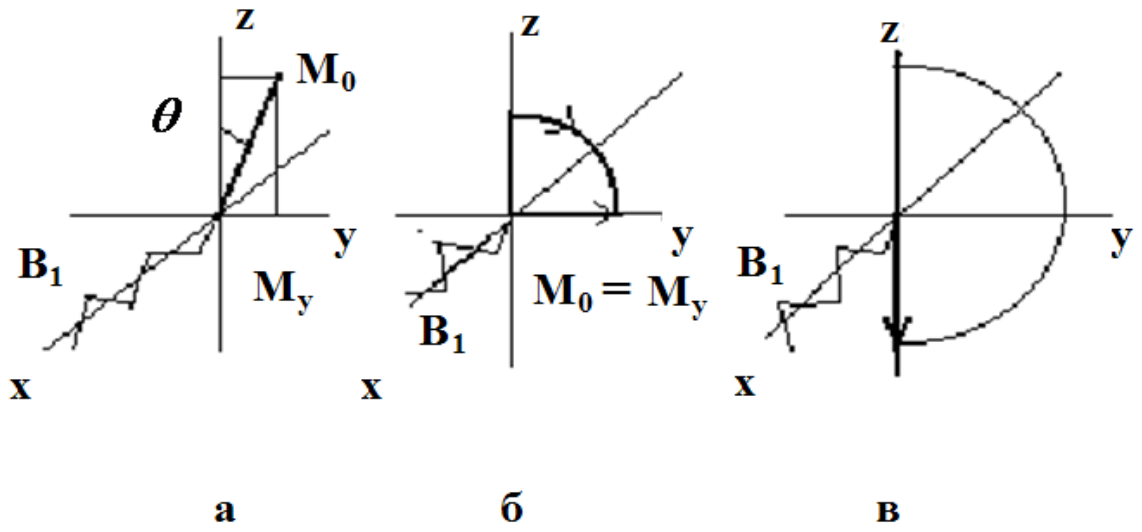


Рисунок 1-13. Ориентация вектора M_0 во вращающейся системе координат: после произвольного θ-градусного импульса (а); после π/2-импульса (б); после π-импульса (в).

1.12. Релаксация

Если постоянное магнитное поле B_0 однородно, то поведение вектора намагниченности M_0 после окончания действия импульса определяется *процессами релаксации*, т.е. спиновая система возвращается к равновесному состоянию посредством релаксации ($M_z \rightarrow M_0$, а M_x и $M_y \rightarrow 0$).

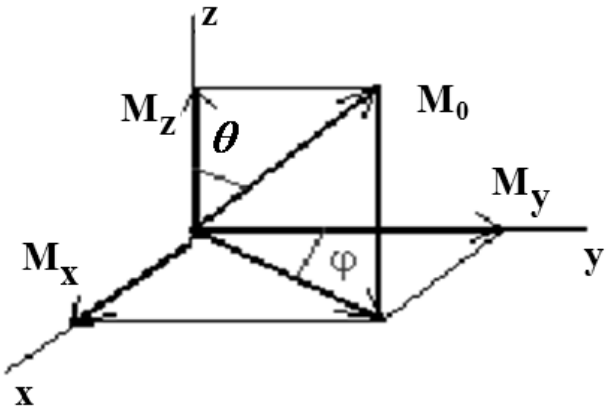


Рисунок 1-14.

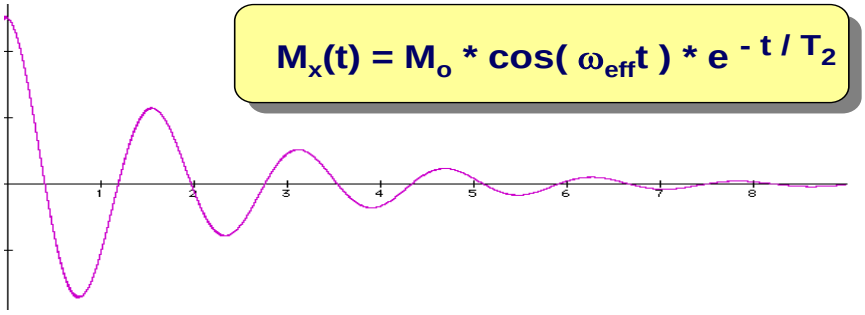
Блох показал, что релаксационные процессы имеют первый порядок и могут быть описаны двумя различными временами релаксации T_1 и T_2:

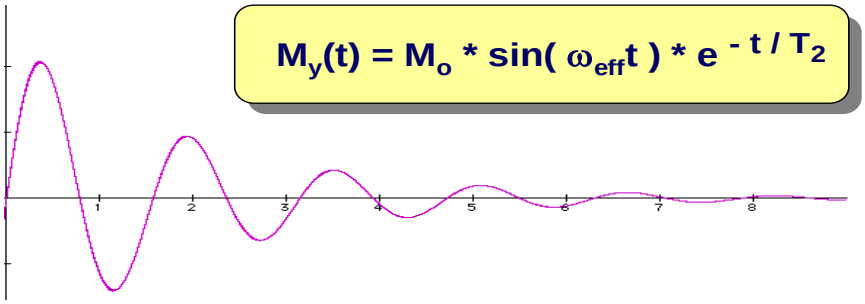
$$\frac{dM_Z}{dt} = -\frac{M_Z - M_0}{T_1}; \qquad (1\text{-}16)$$

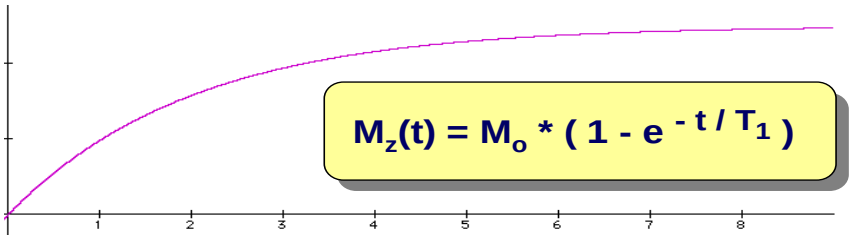
$$\frac{dM_{X'}}{dt} = -\frac{M_{X'}}{T_2} \text{ и } \frac{dM_{Y'}}{dt} = -\frac{M_{Y'}}{T_2}, \qquad (1\text{-}17)$$

где T_1 - *время спин-решеточной* или продольной релаксации, а T_2 - *время спин-спиновой* или поперечной релаксации.

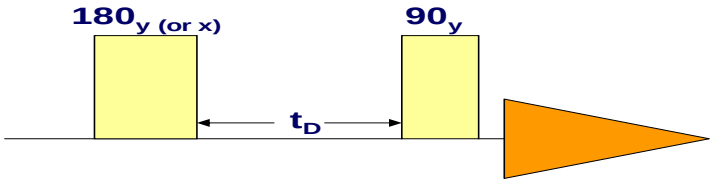
РЕШЕНИЯ УРАВНЕНИЙ БЛОХА

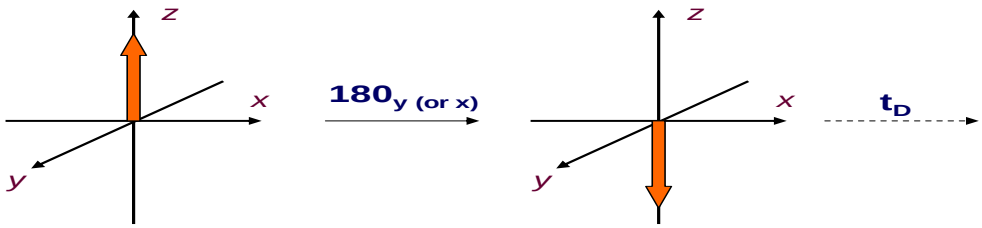


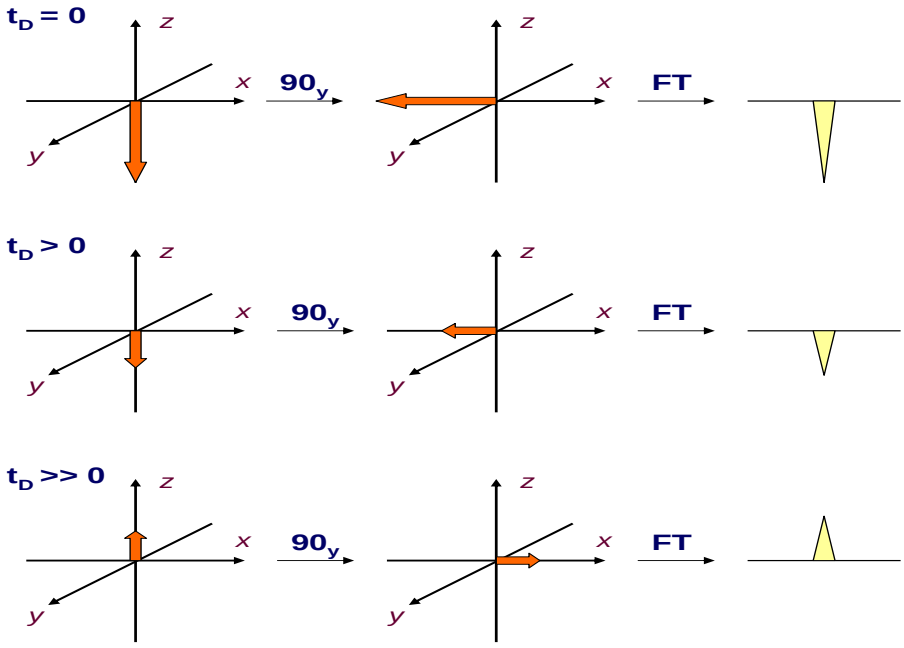




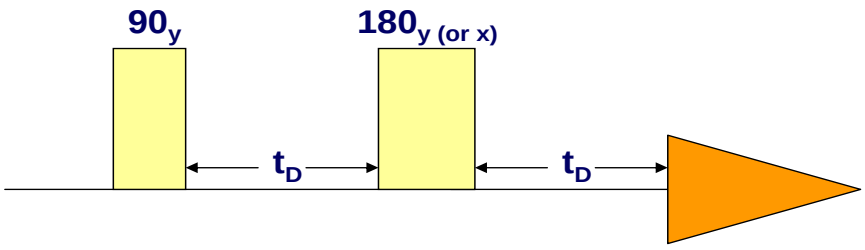
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СПИН-РЕШЕТОЧНОЙ РЕЛАКСАЦИИ T_1

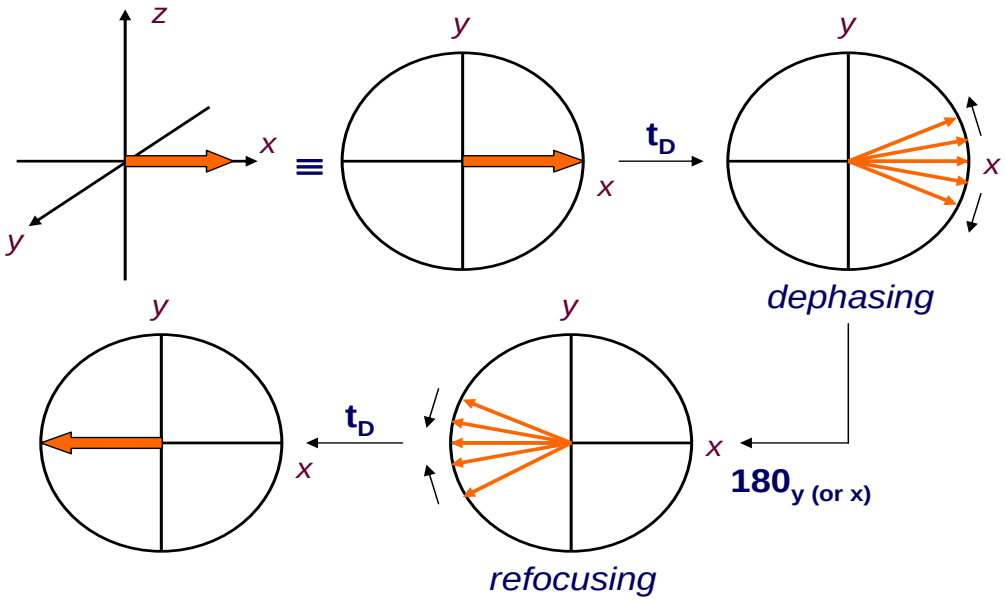






ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СПИН-СПИНОВОЙ РЕЛАКСАЦИИ Т2





Экспериментально время спин-решеточной или продольной релаксации T_1 измеряется с использованием последовательности импульсов $(180^0_{x'} - \tau - 90^0_{x'} - \text{ССИ})_n$ с различными значениями времени τ. Анализ зависимости изменения интенсивности сигнала от угла поворота равновесной намагниченности M_0 позволяет достаточно просто определить искомое время T_1.

Время T_2 - время спин-спиновой или поперечной релаксации определяется по аналогичному алгоритму, но с использованием иной последовательности импульсов, а именно: $(90^0_{x'} - \tau - 180^0_{x'} - \text{ССИ})_n$.

1.13. Зависимость амплитуды сигнала от угла θ.

В экспериментах Фриболина с образцом H_2O увеличивали τ_p с интервалом в 1 мкс, а B_i выдерживали постоянной. Из полученных результатов следует, что максимум амплитуды соответствует $\theta = 90°$, а там, где сигнал проходит через нуль, $\theta = 180°$ (рис. 1-15).

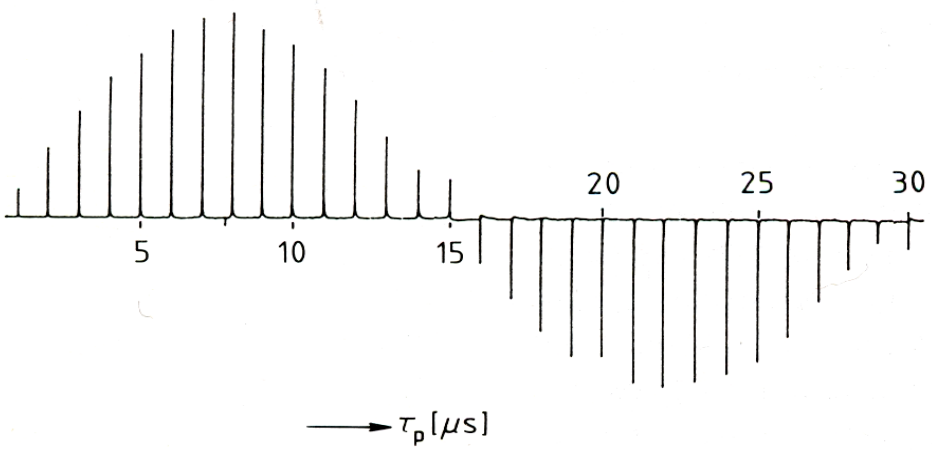


Рисунок 1-15.

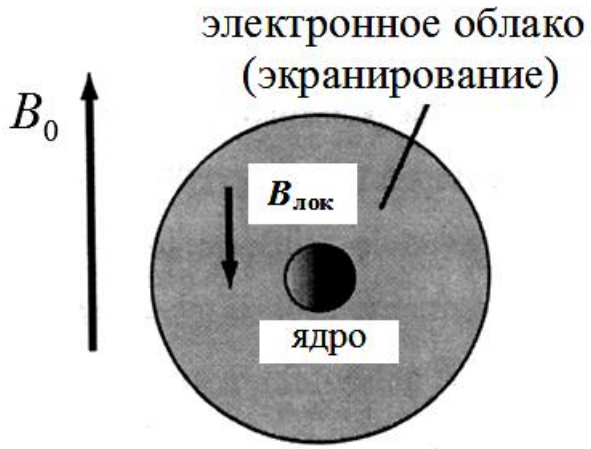
1.14. Накопление спектра

Накопление осуществляют для ядер с низкой чувствительностью и очень разбавленных растворов – ССИ импульсов суммируются в компьютере, а потом подвергаются преобразованию Фурье.

$$S : N \sim \sqrt{NS} \qquad (1\text{-}18)$$

2. ПАРАМЕТРЫ СПЕКТРОВ ЯМР

2.1. Определение химического сдвига



Схематическое представление возникновения вторичного магнитного поля $B_{лок}$.

$$B_{эф.} = B_0 - \sigma B_0 = (1-\sigma) B_0 \qquad (2\text{-}1)$$

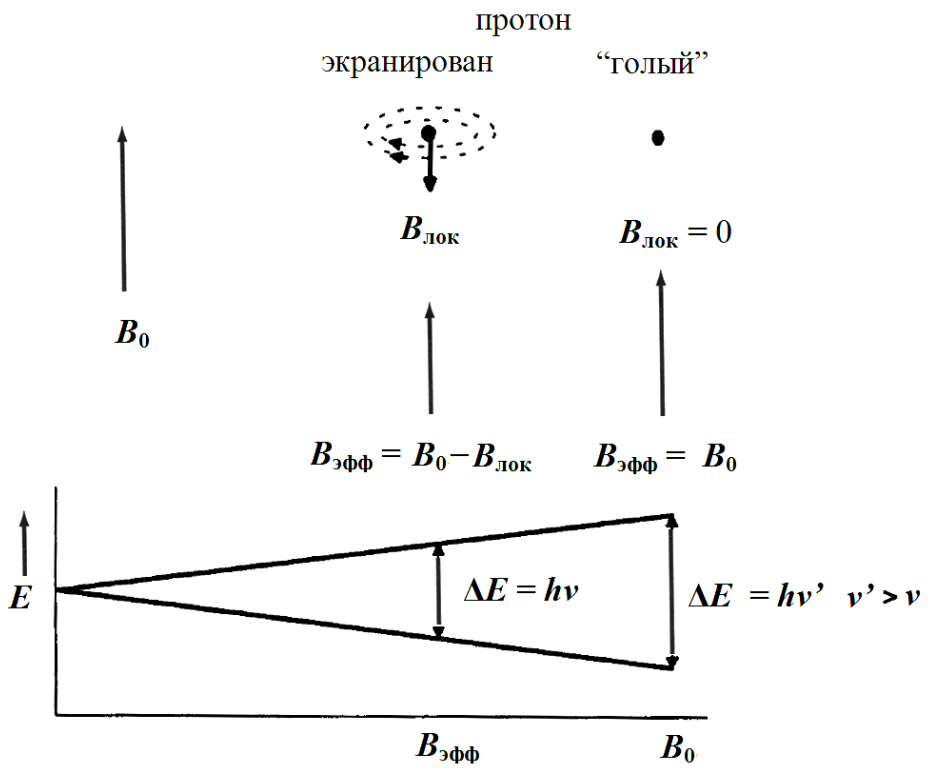


Рисунок 2-1, а. Эффект диамагнитного экранирования.

Константа экранирования σ - величина безразмерная. С учетом (2-1) уравнение (1-12) преобразуется в следующее:

$$\nu_1 = \left(\frac{\gamma}{2\pi}\right)(1 - \sigma)\, B_0 \qquad (2\text{-}2)$$

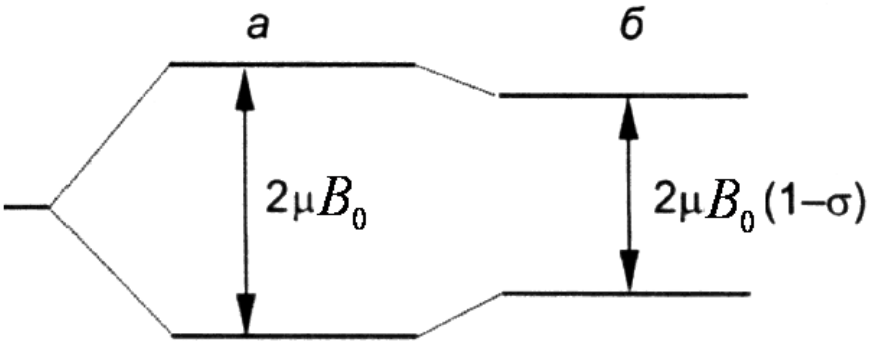


Рисунок 2-1, б.

Химическим сдвигом называется смещение сигнала в зависимости от химического окружения ядра, обусловленное различием в константах экранирования.

$$\delta = [(\nu_{обр} - \nu_{ст})/\ \nu_{ст}] * 10^6 \qquad (2\text{-}3)$$

За единицу химического сдвига принимается одна миллионная доля напряженности поля или резонансной частоты (*м.д.*). В зарубежной литературе этому сокращению соответствует *ppm* (*parts per million*).

Если в выражении (2-3) $\nu_{ст}$ заменить на ν_0, то получим:

$$\delta = (\Delta\nu / \nu_0) * 10^6 \qquad (2\text{-}4)$$

Здесь ν_0 - рабочая частота спектрометра, она обычно фиксирована. Для ТМС $\Delta\nu = 0$, поэтому

$$\delta\,(TMC) = 0 \qquad (2\text{-}5)$$

Таким образом, δ - *шкала* в спектроскопии ЯМР ^{1}H и ^{13}C основана на этом соединении.

На рис. 2-2 представлен спектр ЯМР ^{1}H смеси бромоформа ($CHBr_3$), метиленбромида (CH_2Br_2), метилбромида (CH_3Br) и тетраметилсилана (ТМС), снятый на спектрометре ЯМР с рабочей частотой 90 МГц.

Сигнал ТМС появляется точно на частоте 90 МГц, сигналы других соединений наблюдаются на частотах 90000237 Гц (CH_3Br), 90000441 Гц (CH_2Br_2), 90000614 Гц ($CHBr_3$).

$CHBr_3$ (6.82) > 4.90 (CH_2Br_2) > 2.63 (CH_3Br) > 0 (ТМС).

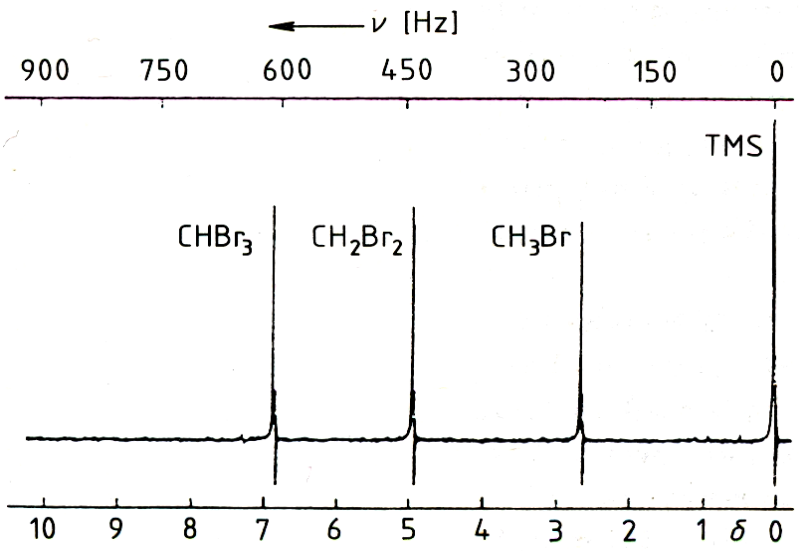


Рисунок 2-2.

Для объяснения эффектов экранирования и дезэкранирования проследим за изменением положения сигналов метильных групп толуола (δ 2.33 м.д.), тетраметилсилана Me_4Si (δ 0.00 м.д.) и литийметана CH_3Li (δ -2.10 м.д.) в спектре ЯМР ^1H (схема). Спектр содержит также сигналы ароматических протонов толуола при δ 7.17 м.д. и протонов метана (δ 0.23 м.д.).

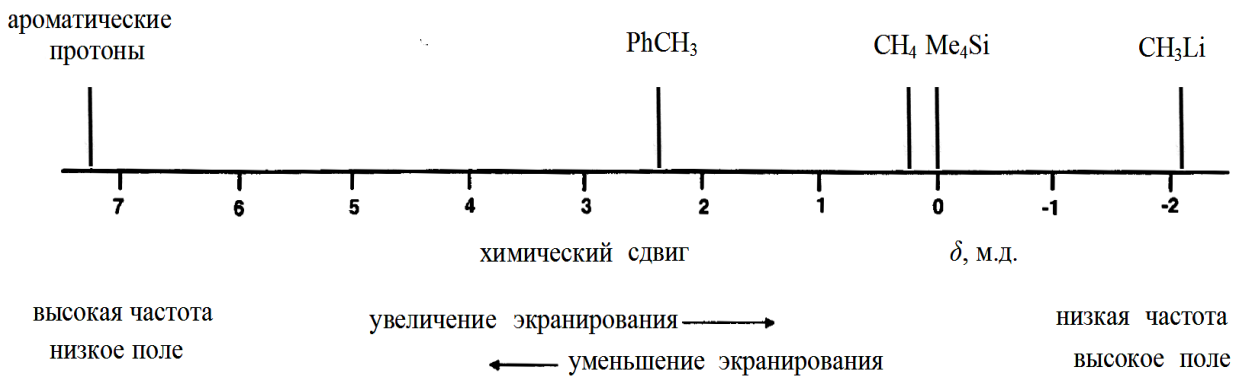
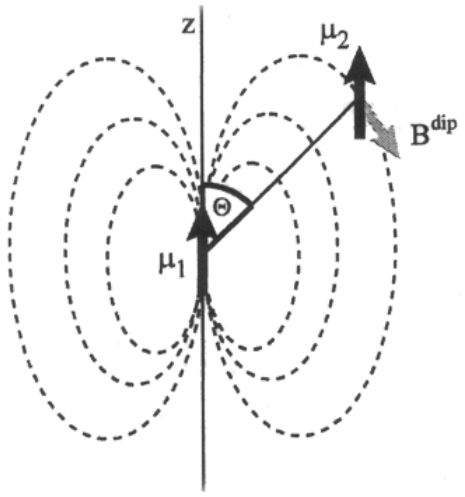


Схема. Примеры экранирования (дезэкранирования) метильных групп.

Наиболее экранированы (или наименее дезэкранированы) протоны группы CH_3 в CH_3Li благодаря соседству с электронодонорным атомом лития. Слабее экранирующее (или сильнее дезэкранирующее) влияние богатого протонами атома кремния, поэтому сигнал Me_4Si находится левее сигнала CH_3Li. И наименее экранированы (или наиболее дезэкранированы) протоны группы CH_3 в толуоле.

2.2. Спин-спиновое взаимодействие

2.2.1. Диполь-дипольное спин-спиновое взаимодействие



Z-компонента локального поля обусловленного магнитным моментом μ_1 в точке расположения μ_2 :

$$B_z^{dip} = \frac{\mu_1}{r^3}(3\cos^2\Theta - 1)$$

где μ_1 и μ_2 – магнитные моменты ядер 1 и 2, r – расстояние между ними, Θ – угол между межядерным вектором и осью z.

2.2.2. Скалярное спин-спиновое взаимодействие

В предыдущем примере спектр ПМР смеси четырех соединений состоит из синглетов (рисунок 2-2), т.к. каждое из соединений содержит только одну группу химически эквивалентных протонов. Для молекул, имеющих две или более групп неэквивалентных ядер, спектр может оказаться значительно сложнее.

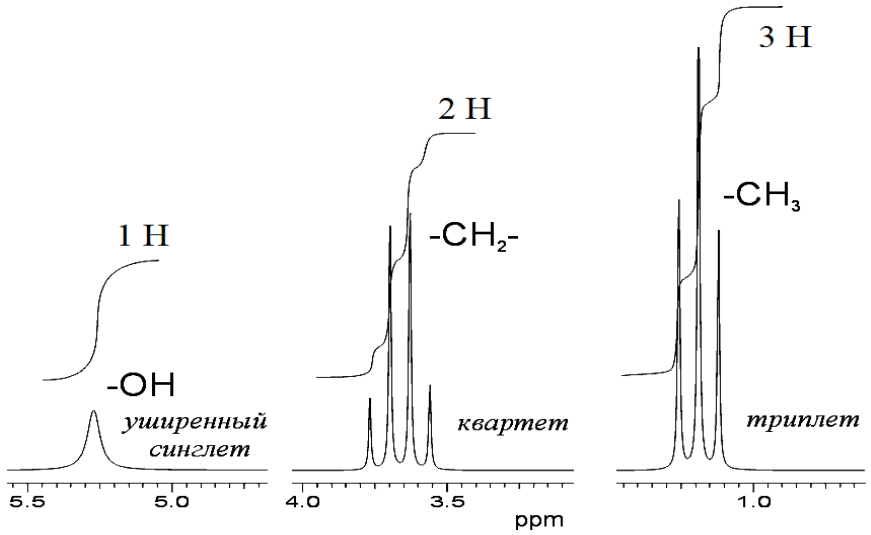


Рис. 2-3. Спектр ЯМР ^{1}H (90 МГц) этилового спирта CH_3-CH_2-OH

Например, спектр ЯМР ^{1}H этилового спирта, содержит сигналы групп -OH, $-CH_2-$ и $-CH_3$: слева направо наблюдаются соответственно уширенный синглет ($\delta \sim 5.3$ м.д.), квартет ($\delta \sim 3.7$ м.д.), триплет ($\delta \sim 1.2$ м.д.) с определенным соотношением интенсивностей в каждом из мультиплетов (химические сдвиги приведены относительно ТМС, $\delta = 0$ м.д.).

В простейшем случае двух неэквивалентных атомов А и Х, связанных ковалентной связью, как, например, в молекуле HF, сущность спин-спинового взаимодействия сводится к следующему. Взаимодействие одного из ядер (А) с его собственным электроном приводит к тому, что спин этого электрона ориентируется антипараллельно спину ядра А (рисунок 2-4). В ковалентной связи спины электронов антипараллельны, поэтому спин электрона во втором атоме (Х) становится параллельным спину первого ядра А. Наконец, вследствие магнитного взаимодействия между электроном и ядром второго

атома (X) спин последнего стремится стать антипараллельным спину первого ядра (A).

Как следствие этого, внешнее поле на втором ядре будет в зависимости от спинового состояния первого ядра либо возрастать, либо уменьшаться на одну и ту же величину. Таким образом, локальное магнитное поле, определяющее резонансную частоту второго ядра (X), изменится, и сигнал ЯМР расщепится в дублет. То же справедливо и для первого ядра (A).

Комбинация этих эффектов и образует спин-спиновое взаимодействие между двумя ядрами. Энергия этого взаимодействия может быть представлена в виде $J_{AX}\,I(A)I(X)$, где $I(A)$ и $I(X)$ – векторы ядерных спинов A и X, а J_{AX} – скалярная константа спин-спинового взаимодействия между ними.

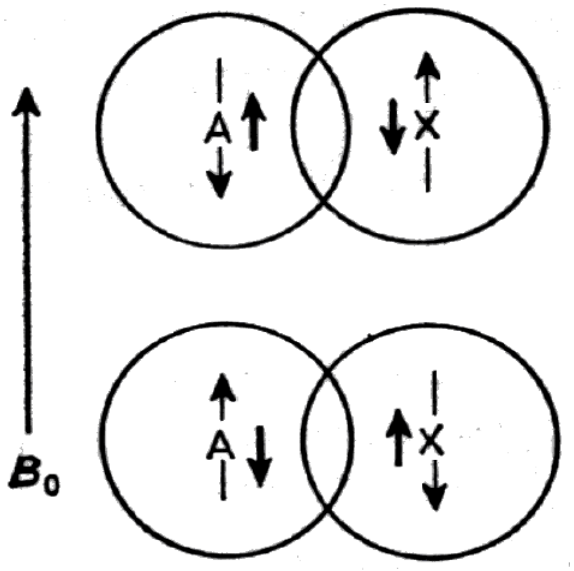


Рисунок 2-4. Схема ядерного спин-спинового взаимодействия посредством электронов связи в молекуле HF. Стрелками указаны направления магнитных моментов ядер и электронов связи.

2.3. Спиновая система АХ

Примерами двухспиновых систем АХ являются молекулы $^{1}H^{19}F$, $^{1}H^{13}CCl_3$, Ph-CH^{A}=CH^{X}-COOH. На рис. 2-5. представлена схема, объясняющая тонкую структуру в спектре спиновой системы АХ; ν_A и ν_X – резонансные частоты в отсутствие спин-спинового взаимодействия.

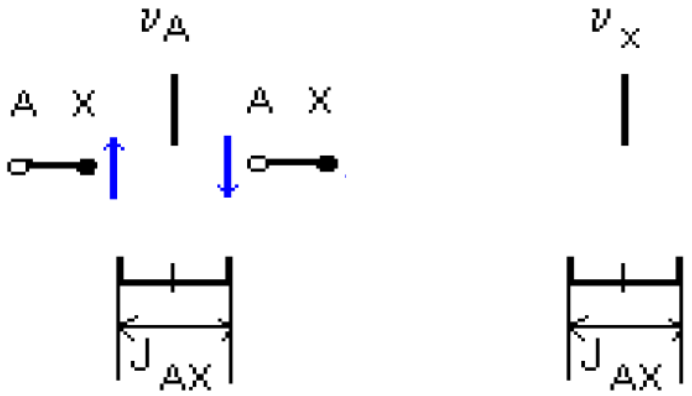


Рисунок 2-5.

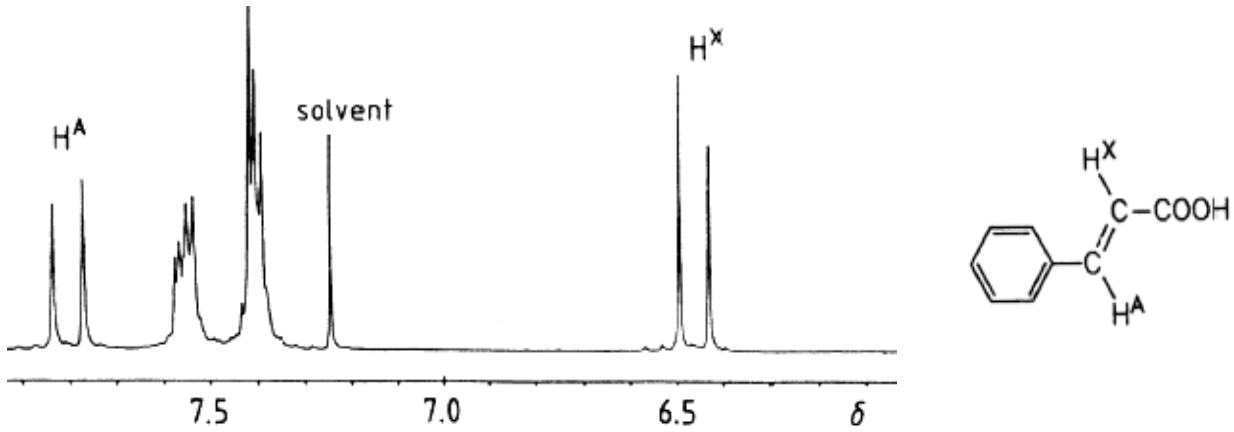


Рисунок 2-6.

В простейшем случае, когда константа $J_{AX} = 0$, полная энергия системы равна сумме энергий ядер А и Х, которые могут быть представлены в виде:

$$E_{A(\alpha,\beta)} = - m_A \gamma \hbar (1- \sigma_A) B_0$$

$$E_{X(\alpha,\beta)} = - m_X \gamma \hbar (1- \sigma_X) B_0 \qquad (2\text{-}6)$$

Поскольку оба ядерных магнитных момента могут быть ориентированы либо параллельно ($\alpha\alpha$, m=+1/2), либо антипараллельно ($\beta\beta$, m=-1/2) полю B_0, а также одно из них параллельно, другое антипараллельно полю ($\alpha\beta$) и наоборот ($\beta\alpha$), то энергии, характеризующие эти состояния, равны:

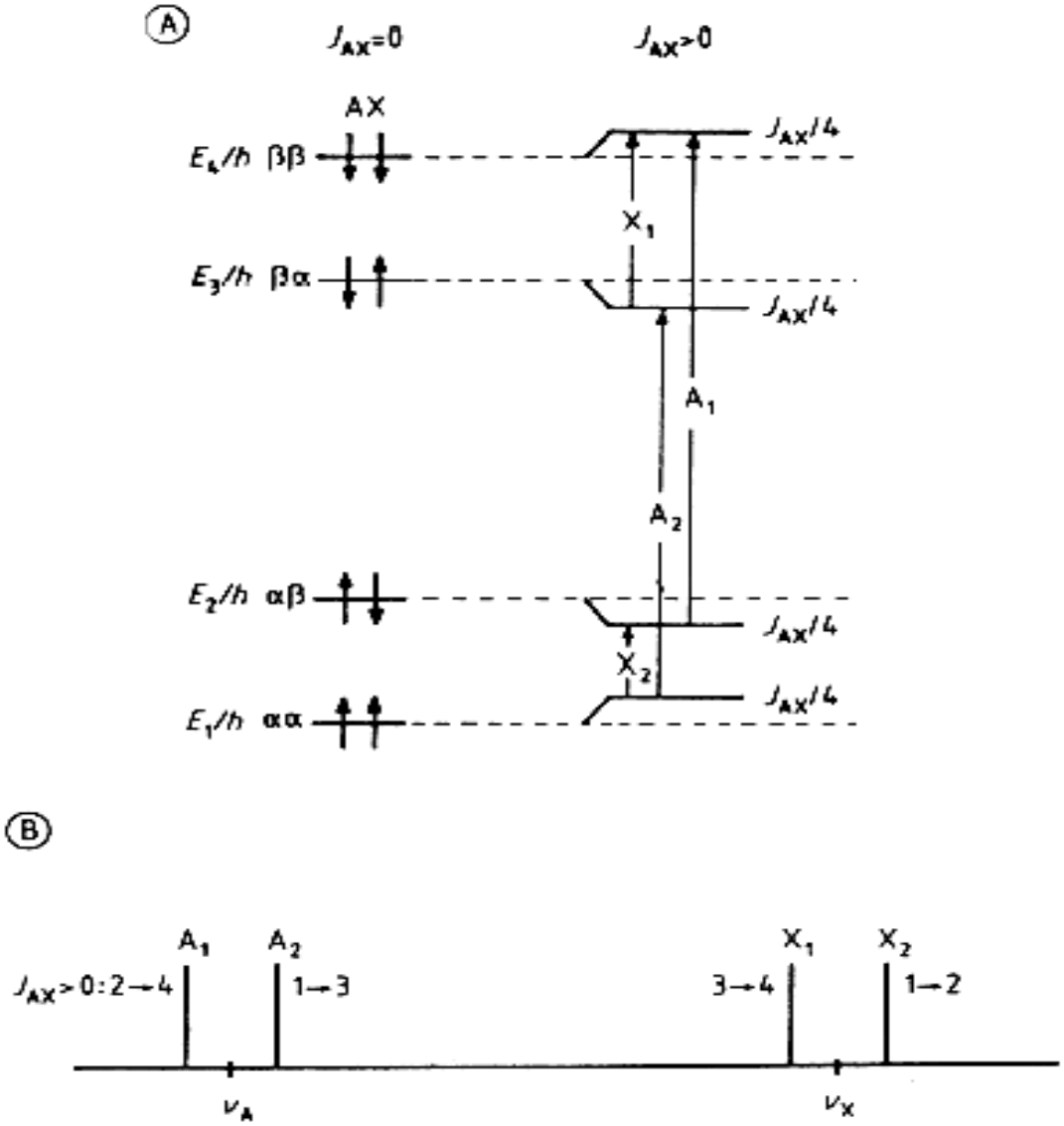


Рисунок 2-7. А: Схема энергетических уровней для двухспиновой системы АХ: без спин-спинового взаимодействия (J_{AX}=0) и при наличии спин-спинового взаимодействия с $J_{AX} > 0$. В: спектр ЯМР спиновой системы АХ.

$$\alpha\alpha : E_1 = E_{A(\alpha)} + E_{X(\alpha)} = -1/2\ \gamma\ \hbar\ (2 - \sigma_A - \sigma_X)\ B_0$$
$$\alpha\beta : E_2 = E_{A(\alpha)} + E_{X(\beta)} = -1/2\ \gamma\ \hbar\ (\sigma_X - \sigma_A)\ B_0$$
$$\beta\alpha : E_3 = E_{A(\beta)} + E_{X(\alpha)} = +1/2\ \gamma\ \hbar\ (\sigma_X - \sigma_A)\ B_0 \qquad (2\text{-}7)$$
$$\beta\beta : E_4 = E_{A(\beta)} + E_{X(\beta)} = +1/2\ \gamma\ \hbar\ (2 - \sigma_A - \sigma_X)\ B_0$$

Энергия спин-спинового взаимодействия равна:

$$E_{SS} = J_{AX}\ I(A)\ I(X) = J_{AX}\ m_A\ m_X\ h \qquad (2\text{-}8)$$

Для ядер со спином I=1/2 с учетом ориентации спинов (m= ± ½) получаем

$$E_{SS} = \pm\ 1/4\ J_{AX}\ h.$$

Тогда новые значения энергии равны:

$$E_1 + 1/4\ J_{AX}\ h$$
$$E_2 - 1/4\ J_{AX}\ h$$
$$E_3 - 1/4\ J_{AX}\ h \qquad (2\text{-}9)$$
$$E_4 + 1/4\ J_{AX}\ h$$

2.4. Спиновая система AX_2

Для двух ядер X_2 возможны 3 ориентации суммарного ядерного спина в магнитном поле: ($\uparrow\uparrow$: $\alpha\alpha$), ($\downarrow\downarrow$: $\beta\beta$) или ($\uparrow\downarrow$: $\alpha\beta$ или $\downarrow\uparrow$: $\beta\alpha$) (рис. 2-8). Как и в предыдущем случае, локальное магнитное поле, определяющее резонансную частоту ядра А, будет зависеть от состояний ядер X_2.

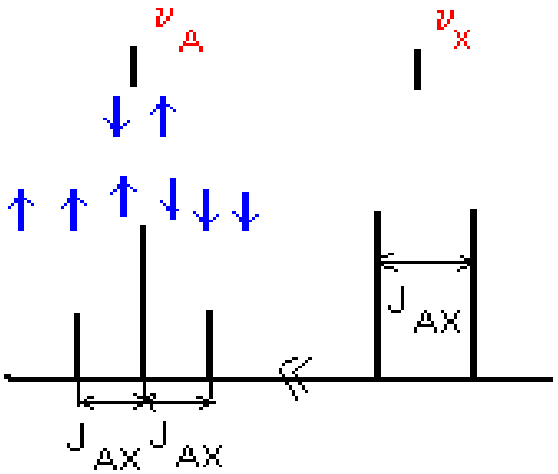


Рисунок 2-8.

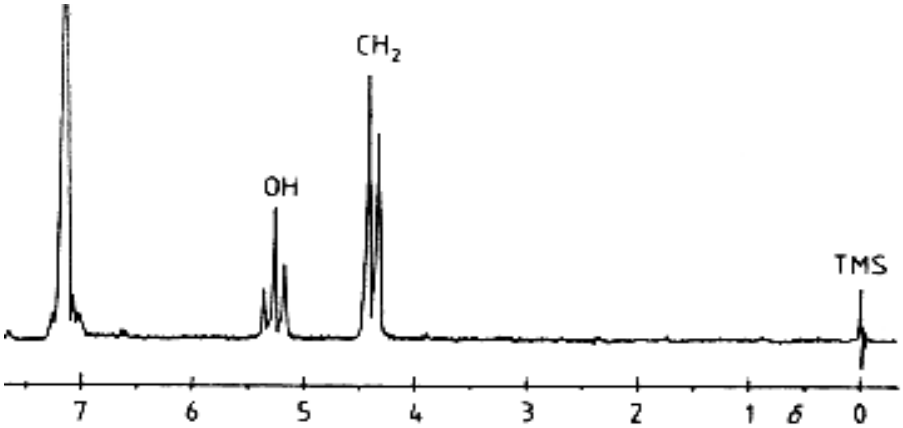


Рисунок 2-9. Спектр ЯМР ^{1}H (60 МГц) Ph-CH_2-OH.

2.5. Спиновые системы AX_n

Аналогичные, приведенным выше, рассуждения позволяют объяснить проявление сигнала ядра А в виде квартета, с соотношениями интенсивностей 1:3:3:1. Для протонов метильной группы наблюдается дублет, который определяется двумя возможными магнитными ориентациями спина ядра А.

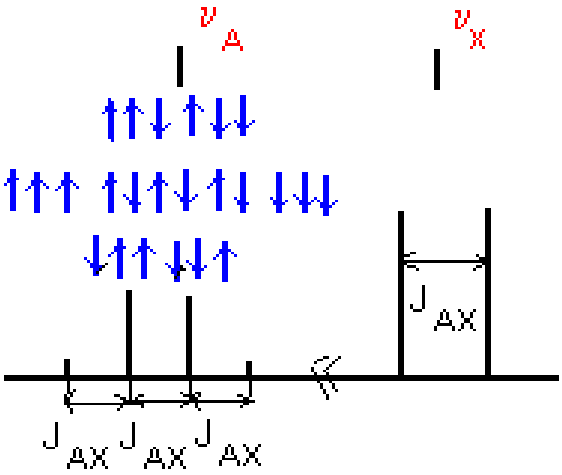


Рисунок 2-10.

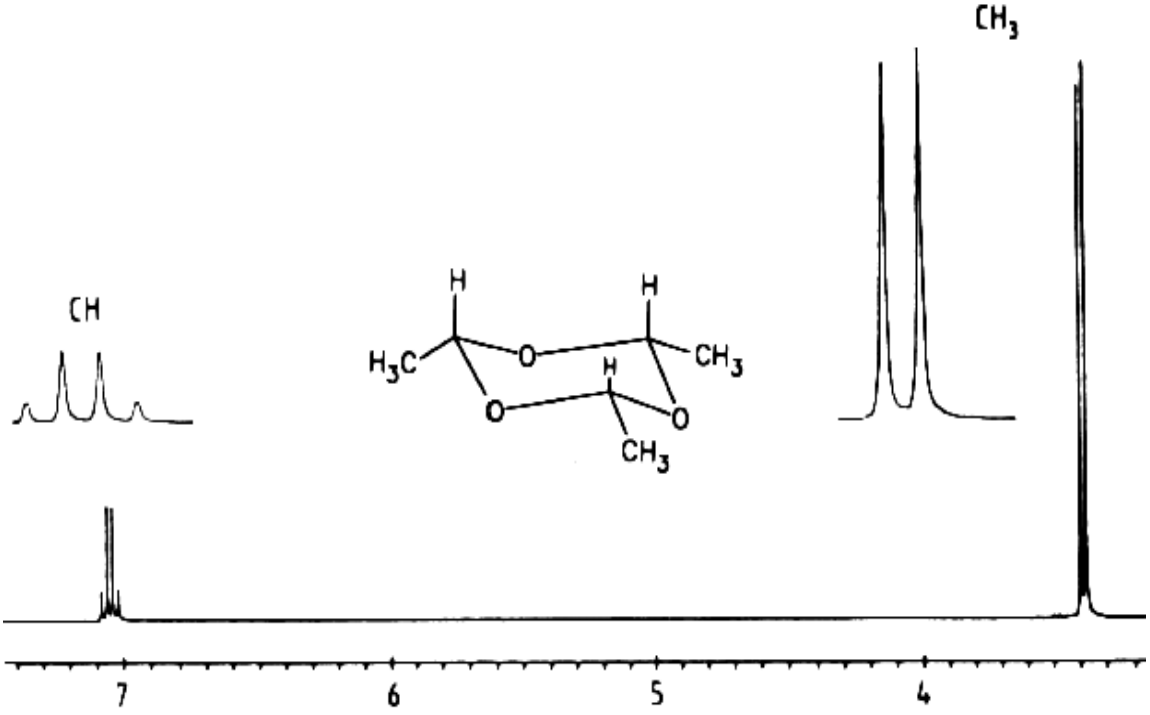


Рисунок 2-11.

2.6. Правила мультиплетности

Число компонент в мультиплете AX_n определяется уравнением:

$$M = 2nI + 1, \qquad (2\text{-}10)$$

где n - число соседних эквивалентных ядер. Для ядер со спином $I = 1/2$ уравнение (2-10) упрощается:

$$M = n + 1. \qquad (2\text{-}11)$$

В этом случае его часто называют правило $n + 1$.

Для ядер со спином $I = 1/2$ интенсивности компонент в мультиплете будут соответствовать биномиальным коэффициентам, которые могут быть получены из треугольника Паскаля:

n=0					1				
n=1				1		1			
n=2			1		2		1		
n=3		1		3		3		1	
n=4	1		4		6		4		1

2.7. Спиновая система AMX

Рассмотрим спектр ЯМР ^{1}H стирола (рис. 2-12 и 2-13). Сигналы винильных протонов H^A, H^M и H^X, которые образуют трехспиновую систему AMX.

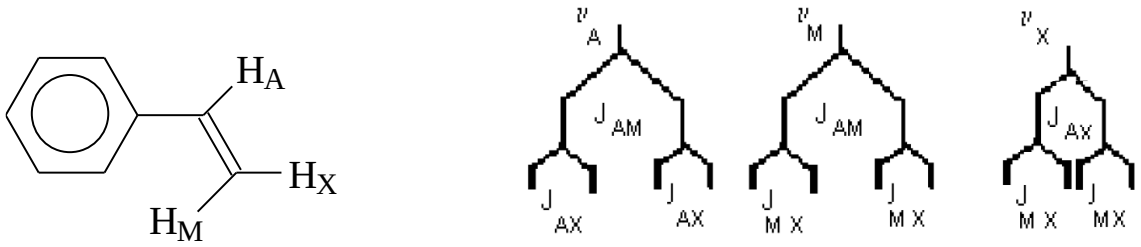


Рис. 2-12. Схематическое представление спин-спинового расщепления в трех спиновой системе AMX

Реальный спектр ЯМР ^{1}H винильных протонов стирола в растворе $CDCl_3$ (250 МГц) соответствует ожидаемому (рис. 2-13). Величины КССВ и химических сдвигов оказались следующими: J_{AM} = 17.6 Гц; J_{AX} = 10.9 Гц; J_{MX} = 1.0 Гц; (δ_A = 6.72 м.д.; δ_M = 5.75 м.д.; δ_X = 5.23 м.д.).

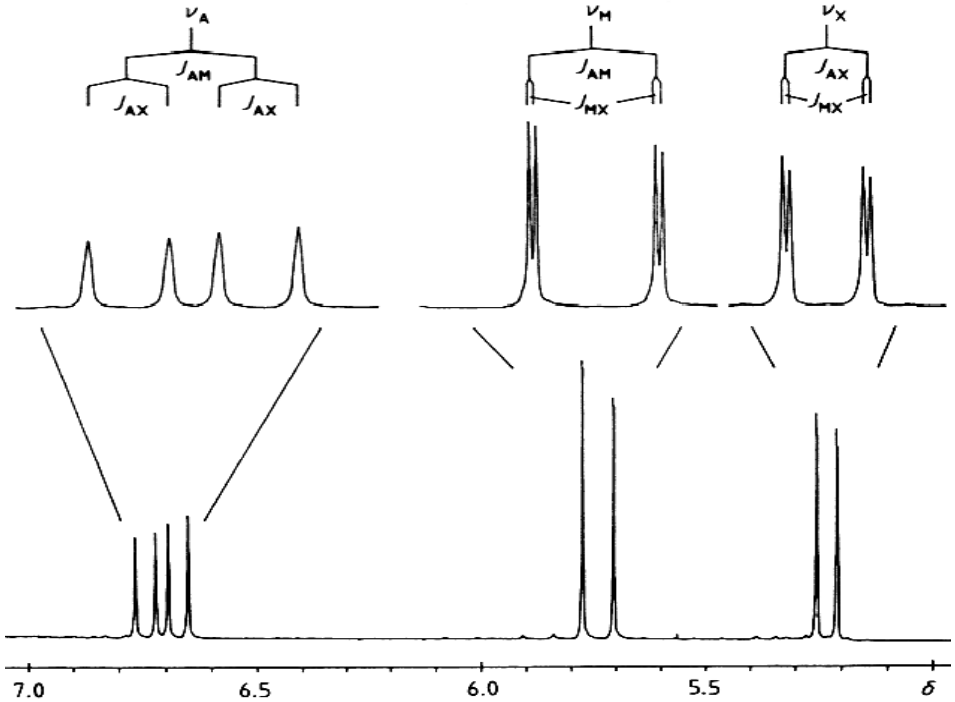


Рисунок 2-13.

2.8. Спиновые системы A_n

В таких молекулах, как H_2, CH_4, бензол, спин-спиновые взаимодействия между протонами наблюдать невозможно, поскольку ядра, входящие в состав этих молекул, являются магнитно эквивалентными (см. далее).

2.9. Интерпретация сверхтонкой структуры в спектрах ЯМР

1. Для ядер со спином $I = ½$ количество линий в мультиплетах равно n+1 (n – число ядер в соседней группе). Например, в молекуле стирола (рис. 2-13) каждое из трех ядер H^A, H^M и H^X имеет по два соседних ядра, имеющих различные химические сдвиги.

2. Расстояния между линиями мультиплета в герцах соответствуют константам спин-спинового взаимодействия.

3. Относительные интенсивности линий внутри мультиплета соответствуют коэффициентам биномиального ряда. Их можно определить из треугольника Паскаля (см. выше).

4. Абсолютная величина спин-спинового взаимодействия в общем уменьшается при возрастании числа связей между взаимодействующими ядрами.

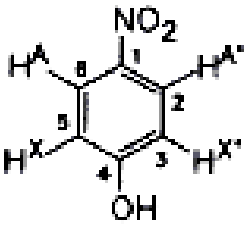
5. В тех случаях, когда в спин-спиновом взаимодействии участвует ядро, спин которого больше ½, мультиплетность и распределение интенсивностей отклоняются от вышеприведенных правил. Так, для спина дейтрона возможны три ориентации относительно внешнего поля B_0, а именно $m = +1$, 0 и –1.

2.10. Порядок спектра

Мы говорим о спектре первого порядка, если разница химических сдвигов (в Гц) будет существенно больше КССВ ($\Delta\nu >> J$). Примерами спиновой системы первого порядка являются рассмотренные выше системы AX, AX_n и AMX. Спектры более высокого порядка получаются при нарушении условия $\Delta\nu >> J$.

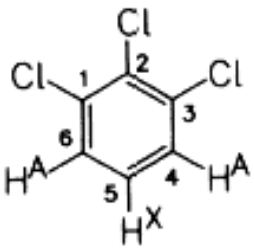
2.11. Номенклатура спиновых систем

Ядра с одинаковыми химическими сдвигами называют *химически эквивалентными ядрами*.



Например, в молекуле *p*-нитрофенола пары ядер H-2 и H-6 или H-3 и H-5 химически эквивалентны.

Магнитно эквивалентными называют *ядра*, которые имеют *одинаковый химический сдвиг и одинаковые константы спин-спинового взаимодействия* со всеми другими магнитными ядрами. В 1,2,3-трихлорбензоле протоны при атомах углерода C-4 и C-6 химически и магнитно эквивалентны, т.к. константы ^3J(H-4, H-5) и ^3J(H-6, H-5) равны.



В случае *p*-нитрофенола протоны H-2 и H-6 химически эквивалентны, но магнитно неэквивалентны, т.к. константы ^3J(H-2, H-3) и ^5J(H-6, H-3), а также ^3J(H-6, H-5) и ^5J(H-2, H-5) не равны.

Протоны в 1,1-дифторэтилене $F_2C{=}CH_2$, также как и два ядра фтора, химически эквивалентны, но магнитно неэквивалентны, поскольку для них наблюдаются две различные константы спин-спинового взаимодействия

$$J_{\mathrm{HF}}{}^{\textit{цис}} \neq J_{\mathrm{HF}}{}^{\textit{транс}}.$$

Для классификации систем магнитных ядер были введены *следующие обозначения*.

Неэквивалентные ядра одного изотопа, резонансные линии которых различаются по величине и имеющие КССВ, обозначаются близкими буквами алфавита A, B, C, D и т.д.; совокупность таких ядер называется базисной группой ядер.

Другие неэквивалентные ядра той же молекулы, сигналы которых отделены от спектра базисной группы большим химическим сдвигом, но между собой имеют близкие значения химсдвигов, обозначаются как X, Y, Z и т.д.

Магнитно эквивалентные ядра обозначаются одинаковыми символами, а число ядер в молекуле, имеющих одинаковый символ, обозначается нижним числовым индексом, например, спиновую систему метиленовых и метильных протонов в спектре ЯМР ^{1}H этилацетата (рис. 2-3) можно обозначить как систему A_2X_3.

Ядра с одинаковыми химическими сдвигами, но *магнитно неэквивалентные* обозначаются одинаковой буквой и отличаются друг от друга верхними штрихами (например, AA’BB’).

2.12. Спиновая система АВ. Системы АХ → АВ → A_2

Линия	Положение сигнала	Относительная интенсивность
1	$\nu_{ср} + C + ½J$	$1 – J/2C$
2	$\nu_{ср} + C - ½J$	$1 + J/2C$
3	$\nu_{ср} – C + ½J$	$1 + J/2C$
4	$\nu_{ср} – C - ½J$	$1 – J/2C$

где

$$\nu_{ср} = ½ (\nu_A + \nu_X),\ C = ½ [(\Delta\nu)^2 + J^2]^{1/2} \text{ и } \Delta\nu = \nu_A - \nu_B. \qquad (2\text{-}12)$$

На рис. 2-14 изображены теоретические спектры двухспиновых систем типа **АХ, АВ** и $\mathbf{A_2}$.

(а) Система **АХ**.

$C = ½ [(\Delta\nu)^2 + J^2]^{1/2} \approx ½ [(\Delta\nu)^2]^{1/2} = ½ \Delta\nu$, $\quad J/2C = J/\Delta\nu \approx 0$.

Линия	Положение сигнала	Относительная интенсивность
1	$\nu + ½\Delta\nu + ½J$	1
2	$\nu + ½\Delta\nu - ½J$	1
3	$\nu - ½\Delta\nu + ½J$	1
4	$\nu - ½\Delta\nu - ½J$	1

И так, спектр двухспиновой системы АХ представляет собой два равноинтенсивных дублета, что согласуется с правилом (n+1).

(б) Теоретический спектр системы **АВ** показан на рис. 2-14.

Два ее основных признака следующие: Спектр системы АВ симметричен относительно $\nu_{ср}$, причем внешние линии менее

интенсивны, чем внутренние. Центрами дублетов являются не ν_A и ν_B, а $\nu_{ср} \pm C$. (б).

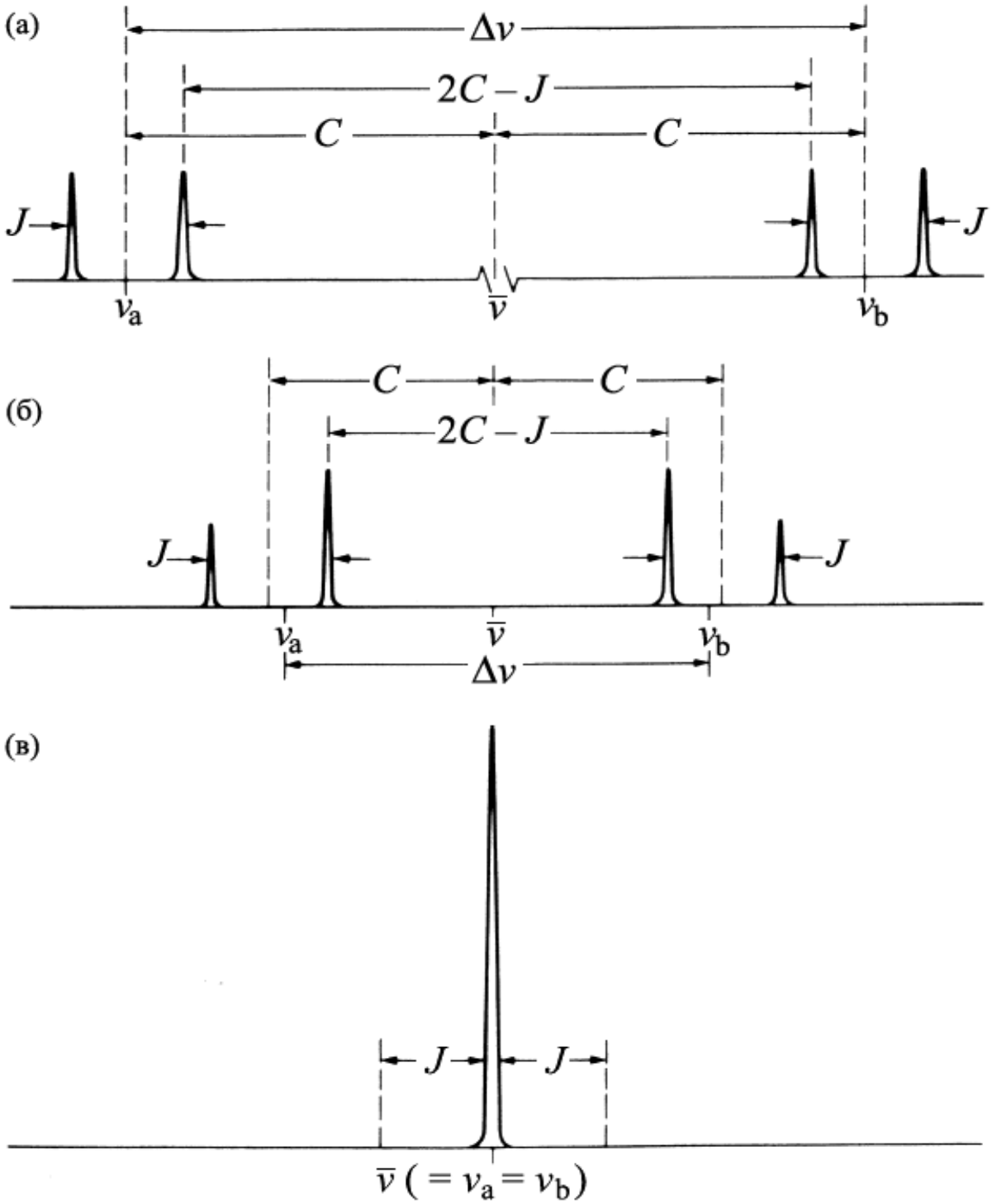
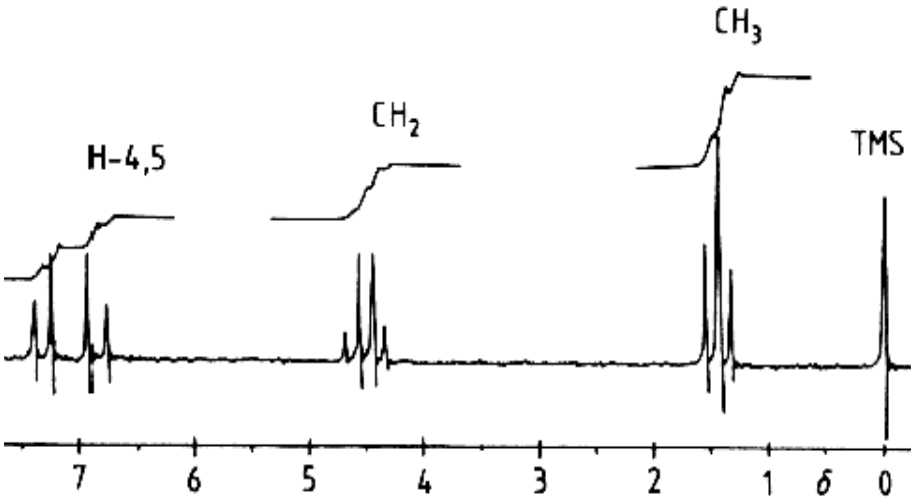


Рисунок 2-14. Спектр системы АВ, как функция отношения $\Delta\nu/J$: (а) $\Delta\nu/J > 10$; (б) $0 < \Delta\nu/J < 10$; (в) $\Delta\nu/J = 0$.

(в) Система **A_2.**

В этом случае: $C = ½ [(J)^2]^{1/2} = J/2$, $J/2C = 1$, а интенсивности линий равны:

Линия	Положение сигнала	Относительная интенсивность
1	$\nu_{ср} + J$	0
2	$\nu_{ср}$	2
3	$\nu_{ср}$	2
4	$\nu_{ср} - J$	0



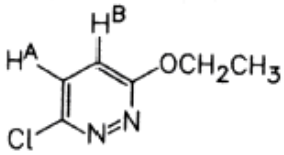


Рисунок 2-15.

2.13. Трехспиновые системы

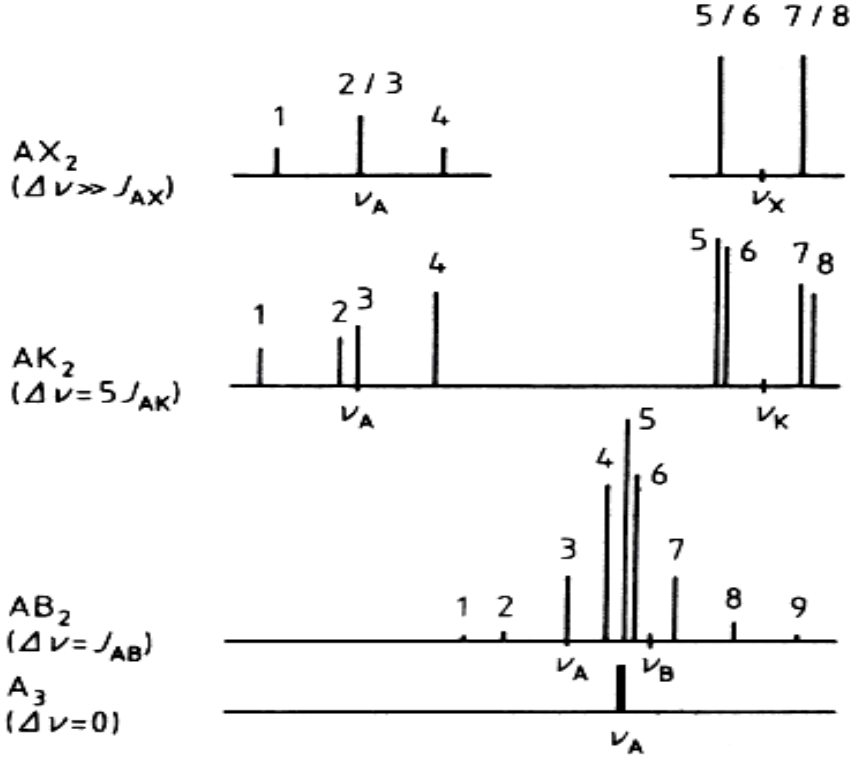


Рисунок 2-17. Спектры трехспиновых систем типа AX_2, AK_2, AB_2 и A_3; $J_{AX} = J_{AK} = J_{AB}$. В спектре AK_2 $\Delta\nu = 5J_{AK}$ и $\Delta\nu = J_{AB}$ в спектре AB_2.

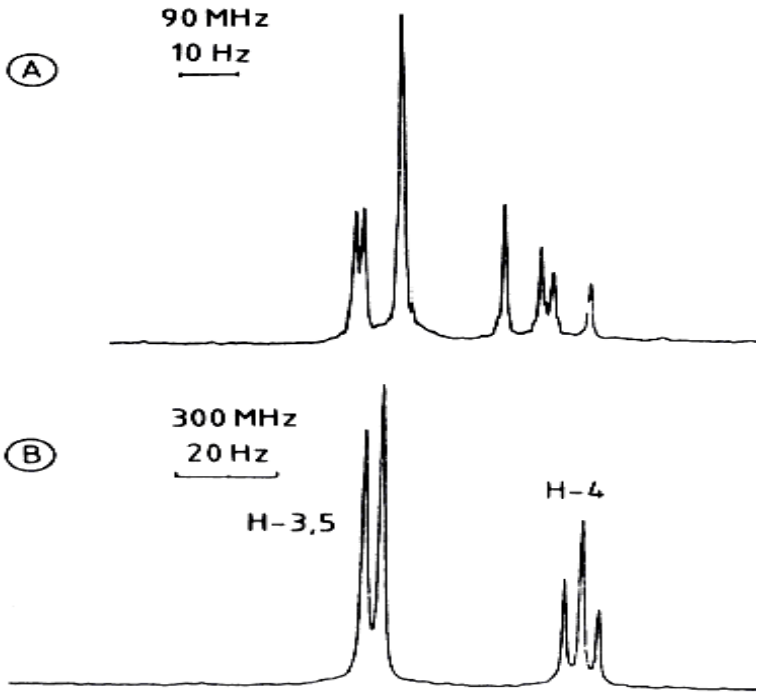
Анализ спектра AB_2. Пронумеруем линии в А-части спектра, где химический сдвиг сигнала А, соответствующий частоте ν_A, обозначим f_3. Сдвиг сигнала В соответствует ν_B, которая является средней между частотами f_5 и f_7:

$$\nu_A = f_3 \text{ и } \nu_B = ½ (f_5 + f_7) \qquad (2\text{-}13)$$

Величина константы J_{AB} вычисляется по формуле (2-14):

$$| J_{AB} | = ⅓ |(f_1 - f_4 + f_6 - f_8)| \qquad (2\text{-}14)$$

Интенсивности линий также зависят от величин $\Delta\nu/J$, но не так просто как в системе АВ.



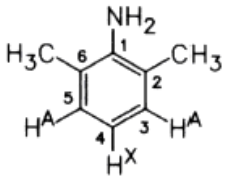
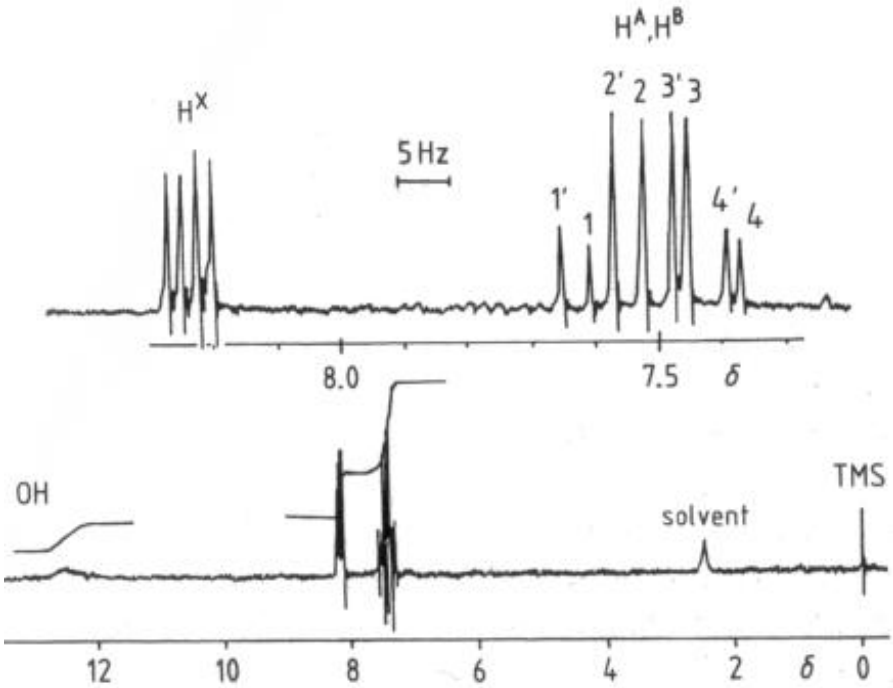


Рисунок 2-18.

2.13.1. Трехспиновая система ABX



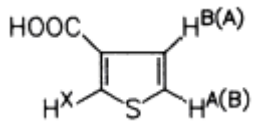


Рисунок 2-19.

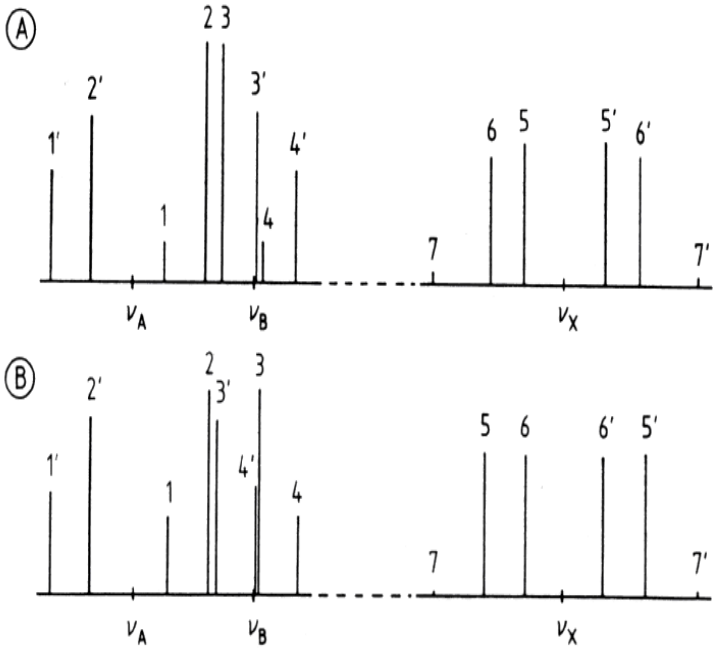


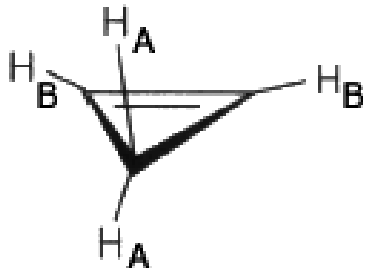
Рисунок 2-20. Два вычисленных спектра системы ABX:

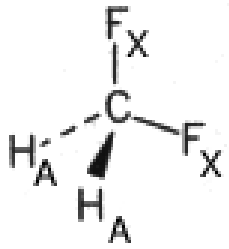
	Спектр (A):	Спектр (B):
$\nu_A - \nu_B$	= 6 Гц	6 Гц
J_{AB}	= 2 Гц	2 Гц
J_{AX}	= 6 Гц	6 Гц
J_{BX}	= -2 Гц	2 Гц

Линии двух подспектров AB-типа в AB-части спектра: 1, 2, 3, 4 и 1′, 2′, 3′, 4′. X-часть состоит из трех пар линий 5/5′, 6/6′ и 7/7′.

Четырехспиновые системы

Спиновые системы A_2X_2 и A_2B_2

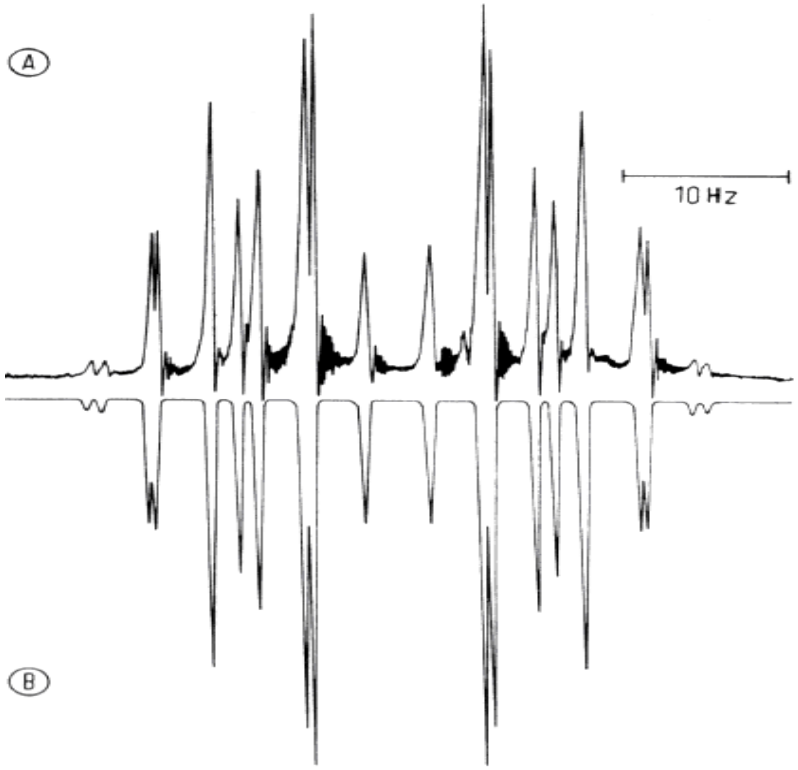




2.14.2. Спиновые системы AA´XX´ и AA´BB´

Спектры систем типа AA´XX´ (или $|AX_2|$) и AA´BB´ (или $|AB_2|$) наблюдаются для молекул, содержащих две пары протонов. В результате симметрии мы имеем : $\nu_A = \nu_{A'}$; $\nu_B = \nu_{B'}$ (химическая эквивалентность), $J_{AB} = J_{A'B'}$; $J_{AB'} = J_{A'B}$.

На рис. 2-21. приведен спектр ЯМР ^{1}H (90 МГц) *о*-дихлорбензола: (А) – наблюдаемый спектр; (В) – рассчитанный спектр. Спектр четырех спиновой системы AA´BB´.



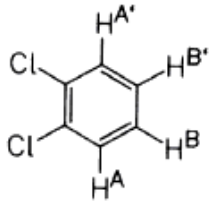


Рисунок 2-21.

2.15. Спин-спиновое взаимодействие протонов с другими ядрами

Для молекул, содержащих другое ядро, обладающее магнитным моментом и достаточным природным содержанием, в спектрах ЯМР ^{1}H можно наблюдать спин-спиновое взаимодействие между протонами и этим ядром. В этом случае всегда $\Delta\nu >> J$. На рис. 2-22. спектр ЯМР ^{1}H (250 МГц) хлороформа. Сателлиты ^{13}C получены 15-тикратным увеличением спектра. J ($^{1}H^{13}C$) = 209 Гц.

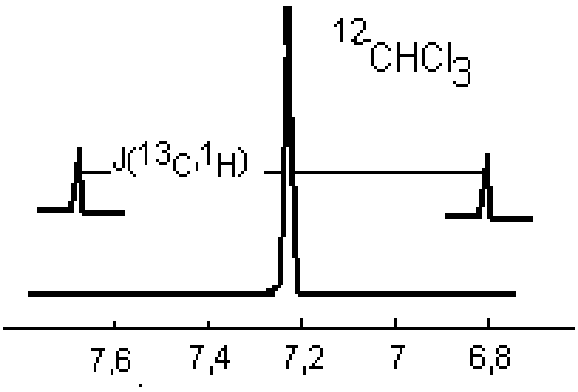


Рисунок 2-22.

2.16. Интенсивности спектров ЯМР ^{1}H

Важным параметром спектров ЯМР является интегральная интенсивность сигналов, которая определяется относительным содержанием групп, в состав которых входят данные ядра. Из спектра ЯМР ^{1}H бензилацетата Ph-CH_2-OC(O)-CH_3, получаем соотношение интегральных интенсивностей для протонов групп Ph, CH_2, CH_3 соответственно 5:2:3.

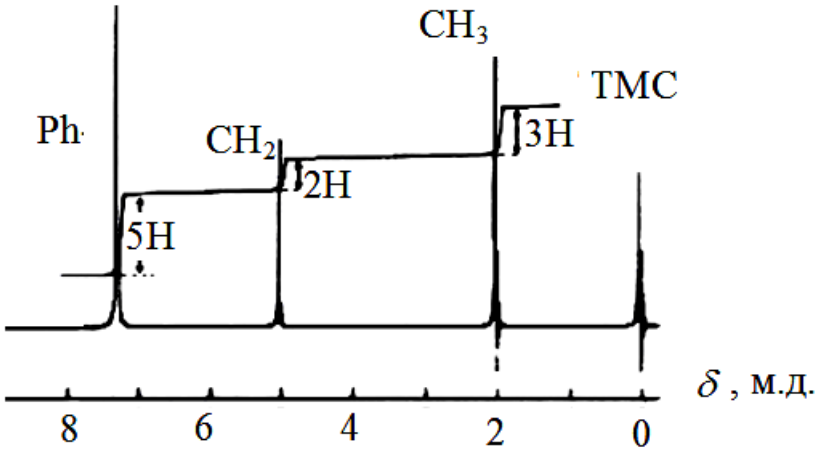


Рисунок 2-23.

2.17. Интенсивности сигналов ЯМР ^{13}C

Принципиального отличия при рассмотрении интегральных интенсивностей сигналов на тех или иных ядрах нет. Необходимо отметить, что в случае наблюдения сигналов на ядрах с малым естественным содержанием существуют проблемы технического характера.

3. ХИМИЧЕСКИЕ СДВИГИ ЯМР ^{1}Н И ^{13}С В ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ

В главе 2 было показано, что ядра в молекулах магнитно-экранированы, т.е. эффективное поле на ядре меньше, чем внешнее магнитное поле B_0. Этот эффект измеряется константой экранирования σ. Теоретически и экспериментально показано, что в уменьшение поля B_0, а также резонансной частоты основной вклад вносит электронная плотность вблизи ядра.

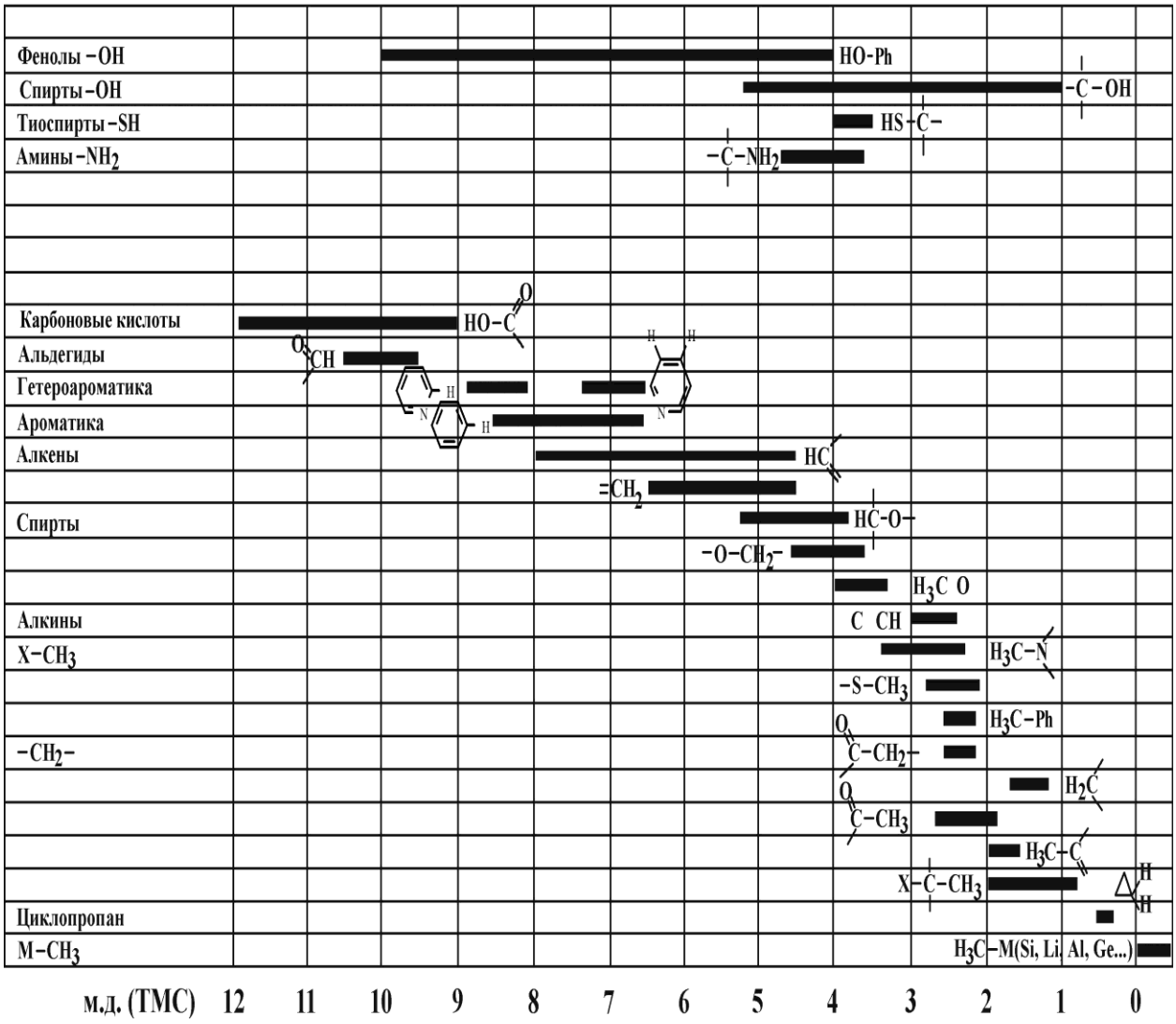


Рис. 3-1. Химические сдвиги ЯМР ^{1}Н в органических соединениях.

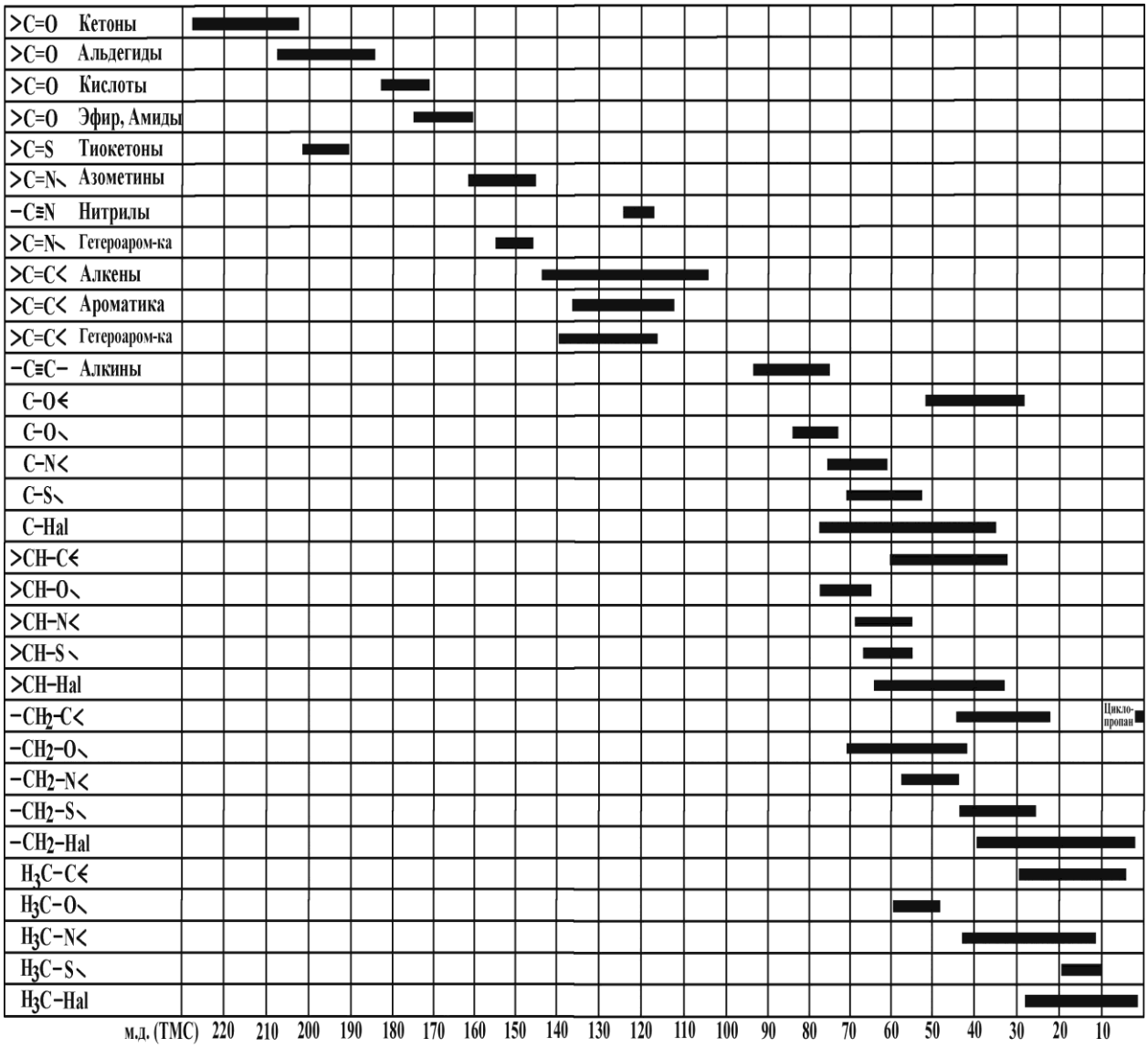


Рис. 3-2. Химические сдвиги ^{13}C в органических соединениях

3.1. Влияние зарядовой плотности на экранирование

Внешнее магнитное поле B_0 индуцирует электрический ток в электронной оболочке, который в свою очередь создает магнитное поле, противоположное по направлению B_0. Для атома водорода вклад в экранирование называют *диамагнитным экранированием* $\sigma_{диа}$, и он может быть рассчитан с использованием простой классической модели (формула Лэмба):

$$\sigma = (\mu_0 e^2/3m_e) \int r\rho(r)\, dr, \qquad (3\text{-}1)$$

где $\rho(r)$ – плотность электронов на расстоянии r от ядра, остальные параметры - известные константы. Интегрирование проводится от нуля до бесконечности.

Вклад диамагнитного экранирования для ядра ^{1}H, рассчитанный по формуле Лэмба, составляет $\sigma_{диа}$ (^{1}H) =17.8×10^{-6}. С увеличением количества электронов величина $\sigma_{диа}$ быстро растет, то для ядра ^{13}C она уже составляет $\sigma_{диа}$ (^{13}C) =260.7×10^{-6}. Попытки расчета $\sigma_{диа}$ даже для малых молекул дают неудовлетворительные результаты.

Для устранения расхождений между экспериментальными и вычисленными значениями σ был введен вклад парамагнитного экранирования $\sigma_{пара}$, учитывающий несферическое распределение заряда в молекуле ($\sigma_{диа}$ и $\sigma_{пара}$ имеют противоположные знаки).

3.2. Эффекты соседних групп

Из предыдущего обсуждения мы имеем, что

$$\sigma = \sigma_{диа} + \sigma_{пара} \qquad (3\text{-}2)$$

Однако для объяснения поведения химических сдвигов ядер в различных органических соединениях этих двух термов в экранирование недостаточно.

Различают дополнительные вклады в экранирование:

вклад от соседних магнитно-анизотропных групп (σ_N);

вклад кольцевых токов (σ_R);

вклад эффектов электрического поля (σ_e);

вклад от эффектов межмолекулярного взаимодействия (водородные связи) и эффекта растворителя (σ_I).

Основное уравнение для константы экранирования выглядит как:

$$\sigma = \sigma_{диа}(\text{лок}) + \sigma_{пара}(\text{лок}) + \sigma_N + \sigma_R + \sigma_e + \sigma_I \qquad (3\text{-}3)$$

где $\sigma_{диа}$(лок) и $\sigma_{пара}$(лок) отличаются от $\sigma_{диа}$ и $\sigma_{пара}$ в выражении (3-2) тем, что учитывают электронные вклады только в непосредственной близости от исследуемых ядер.

3.3. Магнитно-анизотропные эффекты соседних групп

Химические связи обычно магнитно анизотропны, т.е. они имеют различные восприимчивости вдоль трех осей системы координат. Соответственно, магнитные моменты, индуцированные внешним полем B_0, также не равны в различных направлениях. Для аксиально симметричного распределения заряда имеем две восприимчивости: перпендикулярную $\chi_\perp$ и параллельную χ_{II} относительно оси химической связи.

Вклад магнитной анизотропии соседних групп рассчитывается методом Мак-Коннелла:

$$\overline{\sigma_N} = \frac{1}{3r^3 4\pi}(\chi_\perp - \chi_{II})(1 - 3\cos^2\theta), \qquad (3\text{-}4)$$

где r - расстояние от центра диполя Z до рассматриваемого ядра, θ - угол между отрезком, соединяющим центр диполя Z и рассматриваемое ядро, и осью А, представляющую собой направление индуцированного магнитного момента (рис. 3-3).

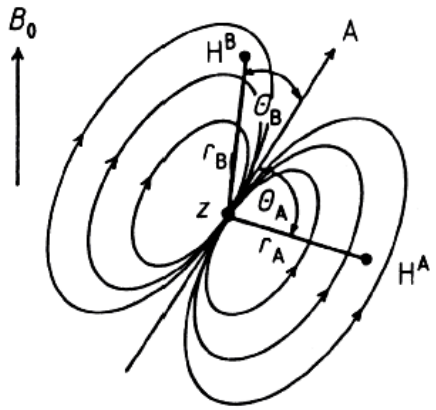


Рисунок 3-3.

3.4. Примеры магнитно-анизотропных эффектов

Среди кратных связей особенно сильной магнитной анизотропией обладают двойные связи C=C и C=O, и тройные связи C≡C и C≡N. Ацетилен представляет собой классический пример магнитно анизотропной группы, где протоны лежат вдоль оси связи C≡C. Как показано на рис. 3-4,а, внешнее магнитное поле $\boldsymbol{B_0}$ индуцирует электрический ток (циркуляция электронов вокруг тройной связи), который в свою очередь создает магнитное поле (изображенное на рис. 3-4, а пунктирными линиями), противоположное по направлению полю $\boldsymbol{B_0}$.

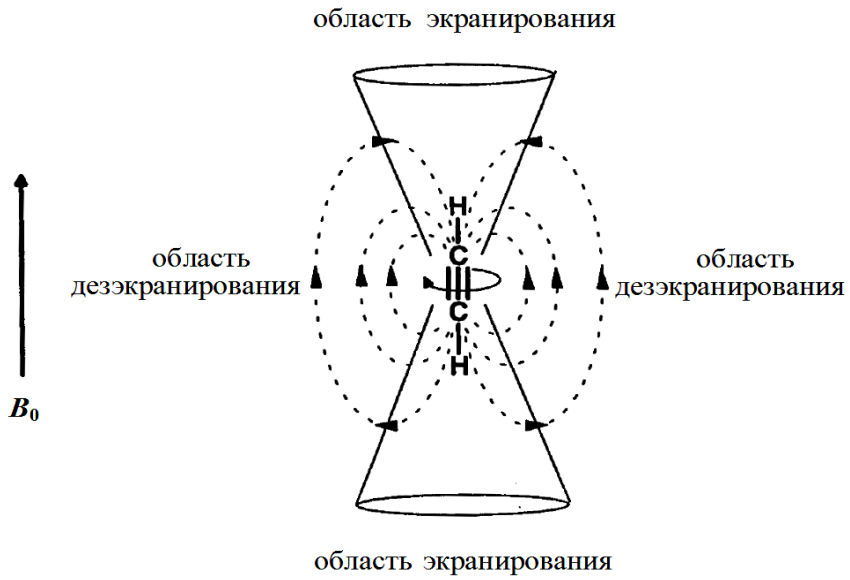
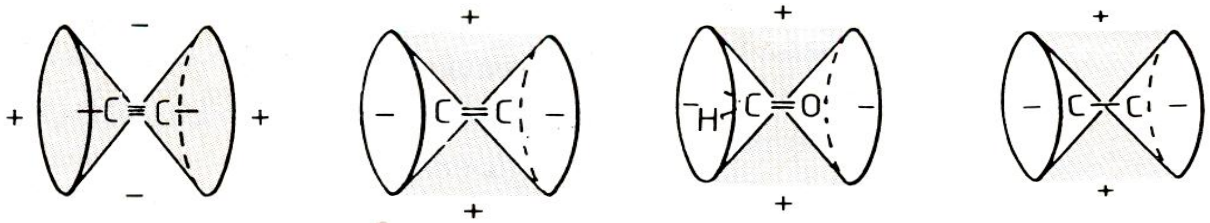


Рисунок 3-4, а. Эффект магнитной анизотропии тройной связи в ацетилене. Индуцированное магнитное поле изображено пунктирными линиями.

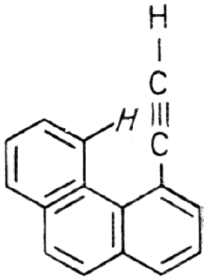
На рис. 3-4, б приведены схемы вкладов в экранирование, обусловленных анизотропией связей: а) тройной связью углерод-углерод; б) двойной связью углерод – углерод и в) углерод – кислород; г) одинарной связью углерод-углерод (циклогексан). Знак (+) означает зону увеличения экранирования, (-) – уменьшения.



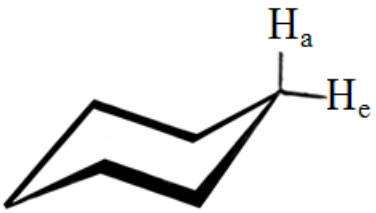
а) δ (^{1}H)=2.88 м.д. б) δ (^{1}H)=5.28 м.д. в) δ (^{1}H)=9-10 м.д. г) δ (^{1}H)=0.1-0.7 м.д.

Рисунок 3-4, б.

Наоборот, в областях, удаленных от оси тройной связи, ожидается дезэкранирующий эффект. Например, сигнал протона H^5 (δ 10.64 м.д.) в спектре ЯМР ^{1}H 4-этинилфенантрена сдвинут на 1.71 м.д. в слабое поле по сравнению с его положением в незамещенном фенантрене (8.93 м.д.).



Влияние связи С-С на экранирование протонов можно рассмотреть на примере циклогексана, находящегося в конформации кресла. Здесь разность химических сдвигов аксиальных и экваториальных протонов, измеренная при низких температурах, равна 0.1-0.7 м.д., причем протон H_a более экранирован, чем H_e.



Вклады магнитной анизотропии соседних групп одинаковы для разных ядер, но их относительная величина для тяжелых ядер, очевидно, меньше, чем для ^{1}H. Например, ядра ^{13}C занимают значительно больший диапазон химических сдвигов (> 200 м.д. для

органических молекул), чем протоны (~10-15 м.д.), поэтому роль анизотропного вклада в $\delta(^{13}C)$ относительно мала по сравнению с $\delta(^{1}H)$.

3.5. Эффект кольцевого тока

В ароматических соединениях существуют дополнительные межатомные (кольцевые) токи, которые текут в замкнутых сопряженных системах. Простейшей системой такого рода является молекула бензола, в которой имеется шесть подвижных протонов.

Эти электроны ведут себя подобно заряженным частицам, способным свободно перемещаться вдоль замкнутого витка (рис. 3-5). Если внешнее магнитное поле B_0 направлено перпендикулярно плоскости витка, то круговые токи генерируют дополнительное магнитное поле, направление которого противоположно внешнему полю B_0 (рис. 3-5).

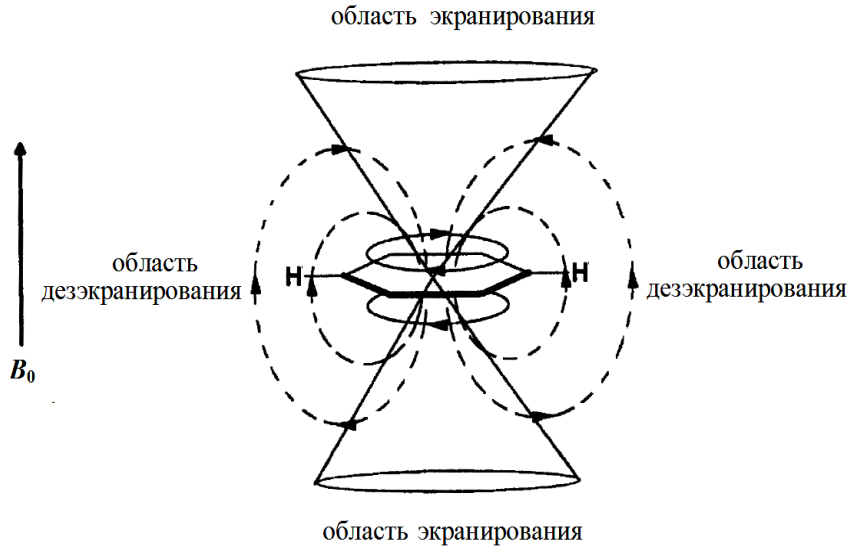
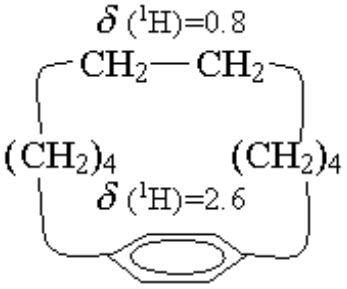


Рисунок 3-5. Схематическое представление возникновения круговых токов в аренах с зонами увеличения (+) и уменьшения (-) экранирования.

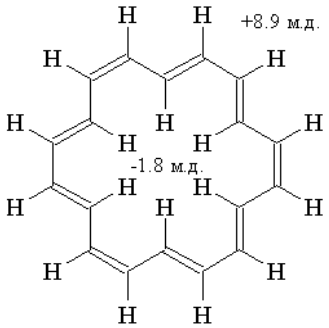
С позиции возникновения кольцевых токов за счет делокализации π-электронов объясняется меньшее экранирование протонов бензола [$\delta(^{1}H)$=7.27 м.д.] по сравнению с протонами этилена {$\delta(^{1}H)$=5.28 м.д.].

В 1,4-декаметиленбензоле метиленовые протоны в средней части углеводородной цепи расположены непосредственно над кольцом, следовательно, они находятся в магнитном поле кругового тока, направление которого противоположно направлению поля вблизи протонов бензольного кольца.

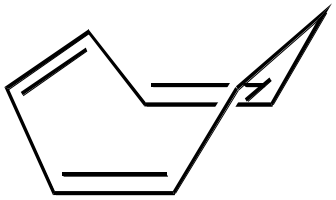


1,4-декаметиленбензол

Исследование спектров ЯМР циклических сопряженных систем – аннуленов подтвердило справедливость положений, обсужденных выше для бензола, также и для больших π-систем. Вместе с бензолом они составляют группу соединений с $4n+2$ π-электронами (n = 0, 1, 2, …), которые в соответствии с известным правилом Хюккеля обладают ароматическим характером.



[18]-аннулен



циклооктатетраен

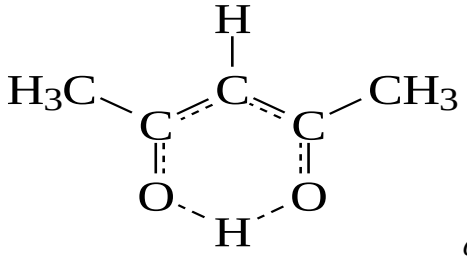
В спектроскопии ЯМР ^{13}C эффект кольцевых токов менее важен, так как составляет всего несколько процентов от общего экранирования.

3.6. Эффекты электрического поля

В молекулах, содержащих полярные группы, такие как карбонильные или нитрогруппы, существует внутримолекулярное электрическое поле. Это поле влияет на распределение электронной плотности в молекуле, а, следовательно, на экранирование рассматриваемых ядер.

3.7. Межмолекулярные взаимодействия: водородная связь и эффекты растворителей

Протоны, участвующие в образовании водородной связи, имеют низкое значение экранирования, что приводит к значительному сдвигу их сигналов в слабые поля. Во многих случаях величина химического сдвига $\delta(^1\text{H})$ составляет более 10 м.д. Так, для ацетилацетона химический сдвиг $\delta(^1\text{H})$ в енольной форме имеет аномально низкое значение (15.5 м.д.).



$\delta\,(^1\text{H}) = 15.5$ м.д.

Растворитель при взаимодействии с исследуемым веществом также меняет экранирование рассматриваемых ядер. Все эффекты, которые обсуждались до сих пор как внутримолекулярные, могут проявиться и на межмолекулярном уровне.

3.8. Изотопные эффекты

На рис. 3-6 представлен спектр ЯМР ^{13}C смеси 10% C_6H_6 и 90% C_6D_6. Синглет при δ = 128.53 м.д. принадлежит C_6H_6, а сигнал C_6D_6 показывает триплет из-за спин-спинового взаимодействия между ядрами ^{13}C и ^{2}D, которое не подавляется при широкополосной развязке от протонов (двойные резонансы в спектроскопии ЯМР ^{13}C будут обсуждаться ниже).

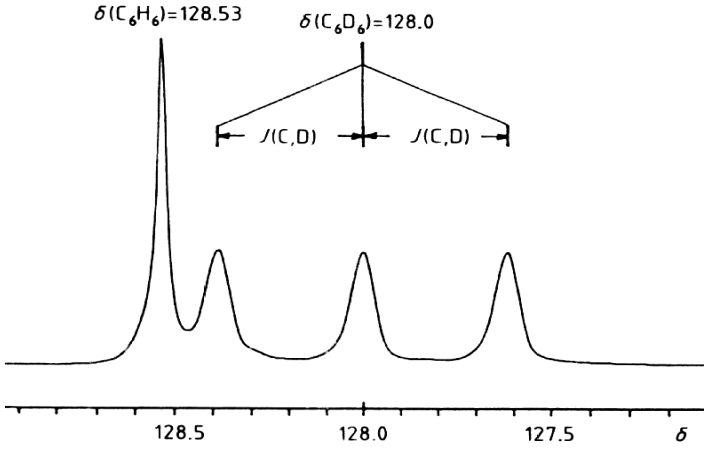


Рис. 3-6. Спектр ЯМР ^{13}C смеси 10% C_6H_6 и 90%C_6D_6

3.9. Химические сдвиги ^{1}H некоторых органических соединений

ЯМР ^{1}H спектроскопия органических соединений представляет интерес как с точки зрения строения молекул, так и теории ЯМР. Водород, являясь одним из наиболее распространенных элементов, входит в состав подавляющего большинства органических соединений.

3.9.1. Алканы и циклоалканы

н-Алканы: Основное влияние на химические сдвиги протонов в алканах оказывают заместители.

Таблица 3.1. Химические сдвиги ЯМР ^{1}H (δ, м.д.) метильных групп и величины электроотрицательности заместителей X.

X	Li	R_3Si	H	CH_3	NH_2	OH	I	Br	Cl	F
$\delta(XCH_3)$	-1	0	0.4	0.8	2.36	3.38	2.16	2.70	3.05	4.25
E_X [a)]	1.0	1.8 (Si)	2.1	2.5 (C)	3.0 (N)	3.5 (O)	2.5	2.8	3.0	4.0

[a)] E_x – *электроотрицательность* по Полингу.

Эффекты заместителей ослабевают с увеличением расстояния между заместителем и рассматриваемыми протонами:

	$C\mathbf{H}_3$-Cl	$C\mathbf{H}_3$–CH_2-Cl	$C\mathbf{H}_3$-CH_2-CH_2-Cl
δ (^{1}H), м.д.	3.05	1.42	1.04

Увеличение числа подобных заместителей аддитивно сказывается на величине химических сдвигов протонов:

	$C\mathbf{H}_4$	$C\mathbf{H}_3Cl$	$C\mathbf{H}_2Cl_2$	$C\mathbf{H}Cl_3$
δ (^{1}H), м.д.	0.23	3.05	5.33	7.26

Так как точные теоретические предсказания химических сдвигов $\delta(^1H, ^{13}C$ и др.) невозможны, то интерпретацию спектров часто проводят эмпирическим путем, используя различные эмпирические закономерности. Из многих таких правил выделим два:

Для данного заместителя X эффект экранирования уменьшается в ряду $XCH_3 > XCH_2 > XCH$, например:

	$(CH_3)_2C\mathbf{H}Cl$	$CH_3C\mathbf{H}_2Cl$	$C\mathbf{H}_3Cl$
δ м.д.	4.13	3.51	3.05

Для определения химического сдвига протонов метиленовой группы в соединениях типа $X–CH_2$-У с двумя заместителями X и У можно использовать правило Шулери:

$$\delta = 0.23 + S_x + S_y , \qquad (3\text{-}5)$$

где S_x и S_y - эффективные константы экранирования (таблицы эмпирических констант).

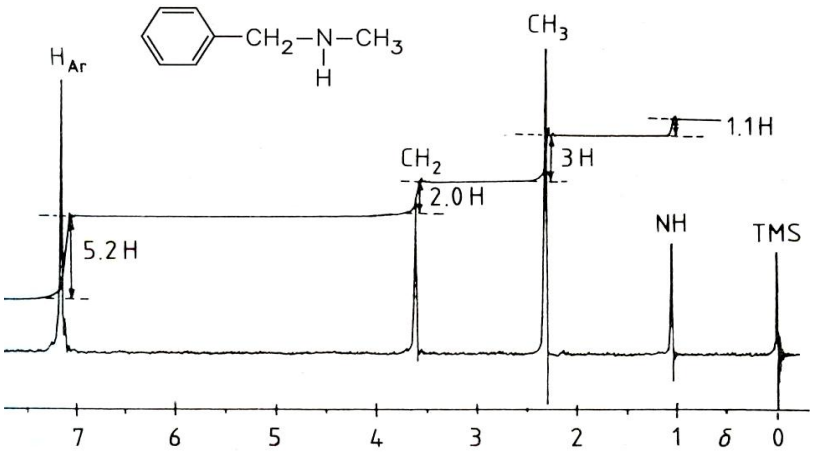


Рисунок 3-7.

Используя это правило, рассчитаем величину химического сдвига метиленовых протонов в N-бензометиламине ($Ph-CH_2-NH-CH_3$) и сравним ее с экспериментальным значением (рис. 3-7). В данном

случае S_{Ph} = 1.85; S_{CH_3NH} = 1.57. Получаем: $\delta(CH_2)$ = 0.23 + 1.85 + 1.57 = 3.65, что практически совпадает с экспериментом.

Циклоалканы: В циклоалканах химический сдвиг протонов зависит от размера цикла, конформационной подвижности и стерических эффектов.

Таблица 3.2. Химические сдвиги протонов (м.д.) метиленовых групп некоторых циклоалканов.

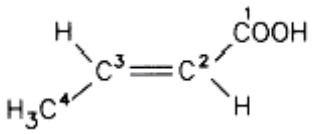
Соединение	$(CH_2)_3$	$(CH_2)_4$	$(CH_2)_5$	$(CH_2)_6$	$(CH_2)_7$	$(CH_2)_8$
δ (^{1}H)	0.22	1.94	1.51	1.44	1.54	1.54

3.9.2. Алкены

В табл. 3.3. собраны данные о химических сдвигах протонов в производных этилена, диапазон изменения которых составляет 4 ÷ 7.5 м.д. Эффекты замещения в этом случае определяются стерическими или индуктивными факторами.

Химические сдвиги производных этилена могут быть оценены с использованием правила Паскуаля-Мейера-Саймона:

$$\delta = 5.28 + S_{гем} + S_{цис} + S_{транс}, \qquad (3\text{-}6)$$



Пример. Транс-кротоновая кислота

δ (H-2) = 5.28 + $S_{гем}$(C(O)OH) + $S_{цис}$(CH_3) =

= 5.28 + 0.69 - 0.26 = 5.71 м.д. (эксп. 5.82 м.д.)

δ (H-3) = 5.28 + $S_{гем}$(CH_3) + $S_{цис}$(C(O)OH) =

= 5.28 + 0.44 + 0.97 = 6.69 м.д. (эксп. 7.04 м.д.)

Также вычислены: δ (CH_3) = 1.89 м.д.; δ (C(O)OH) ~ 12 м.д.

Табл. 3.3. Химические сдвиги протонов (в м.д.) в монозамещенных этиленах $XH^1C{=}CH^2H^3$; химический сдвиг протонов этилена равен 5.28 м.д.

X	CH_3	C_6H_5	F	Cl	Br	I	OCH_3	$OC(O)CH_3$	NO_2
δ (^{1}H) (*гем*)	5.73	6.72	6.17	6.26	6.44	6.53	6.44	7.28	7.12
δ (H^2) (*транс*)	4.88	5.20	4.03	5.39	5.97	6.23	3.88	4.56	5.87
δ (H^3) (*цис*)	4.97	5.72	4.37	5.48	5.84	6.57	4.03	4.88	6.55

3.9.3. Арены

В ароматических соединениях экранирование определяется смещением электронов π-связей под влиянием заместителя. Так, в анилине, содержащем электронодонорный заместитель NH_2, протоны в *орто* и *пара* положениях экранированы сильнее, чем *мета*-протоны (рис. 3-7).

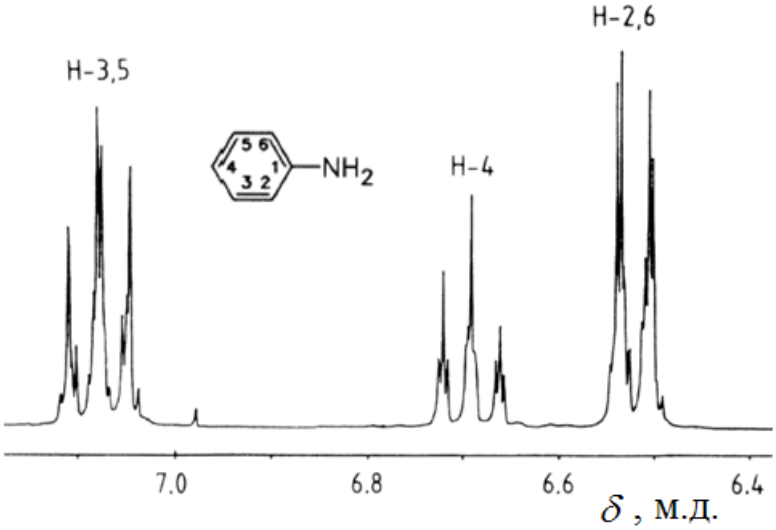


Рисунок 3-7.

В табл. 3.4 приведены данные о химических сдвигах протонов (в *орто*, *мета* и *пара* положениях по отношению к заместителю) в некоторых монозамещенных бензолах.

Таблица 3.4. Химические сдвиги ЯМР ^{1}H (в м.д.) в монозамещенных бензолах.

Заместитель	CH_3	OCH_3	CN	F	Br
δ ($H^{орто}$)	7.10	6.84	7.54	6.97	7.49
δ ($H^{мета}$)	7.18	7.18	7.38	7.25	7.14
δ ($H^{пара}$)	7.09	6.90	7.57	7.05	7.24

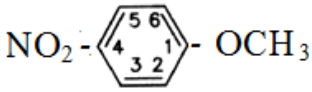
Для многих заместителей экспериментально найдены соответствующие вклады (инкременты), с помощью которых можно

предсказать химические сдвиги в производных бензола. Используется следующее эмпирическое выражение:

$$\delta\ (H) = 7.27 + \Sigma\ S \qquad (3\text{-}7)$$

Точка отсчета - *химический сдвиг бензола 7.27 м.д.* S_o, $S_м$ *и* S_p – *инкременты, соответствующие* орто, мета *и* пара *положениям заместителя.*

Пример: р-нитроанизол (O_2N-Ph-OCH_3)



δ (H-2,6) = 7.27 + S_0 (OCH_3) + $S_м$ (NO_2) =

= 7.27 – 0.43 + 0.17 = 7.01 м.д. (эксп. 6.88 м.д.),

δ (H-3,5) = 7.27 + S_0 (NO_2) + $S_м$ (OCH_3) =

= 7.27 + 0.95 - 0.09 = 8.13 м.д. (эксп. 8.15 м.д.).

Также: δ (OCH_3) = 3.9 м.д.

3.9.4. Алкины

Особенности экранирования протонов ацетилена уже детально обсуждались в разделе 3.4. Резонансная область $\delta(\equiv C^1H) \approx 2\text{-}3$ м.д. перекрывается с областями δ(H) многих других типов протонов. Рассмотрим спектр ЯМР ^{1}H пропинола (рис. 3-9).

Здесь сигналы ацетиленового протона и протона ОН представляют собой триплеты за счет спин-спинового взаимодействия через четыре и три связи соответственно с двумя магнитно-эквивалентными протонами метиленовой группы [^4J(HH)=2.4 Гц, ^3J(HOH)=5.8 Гц], а сигнал CH_2 – дублет дублетов из-за взаимодействия как с ацетильным протонов, так и с протоном группы ОН].

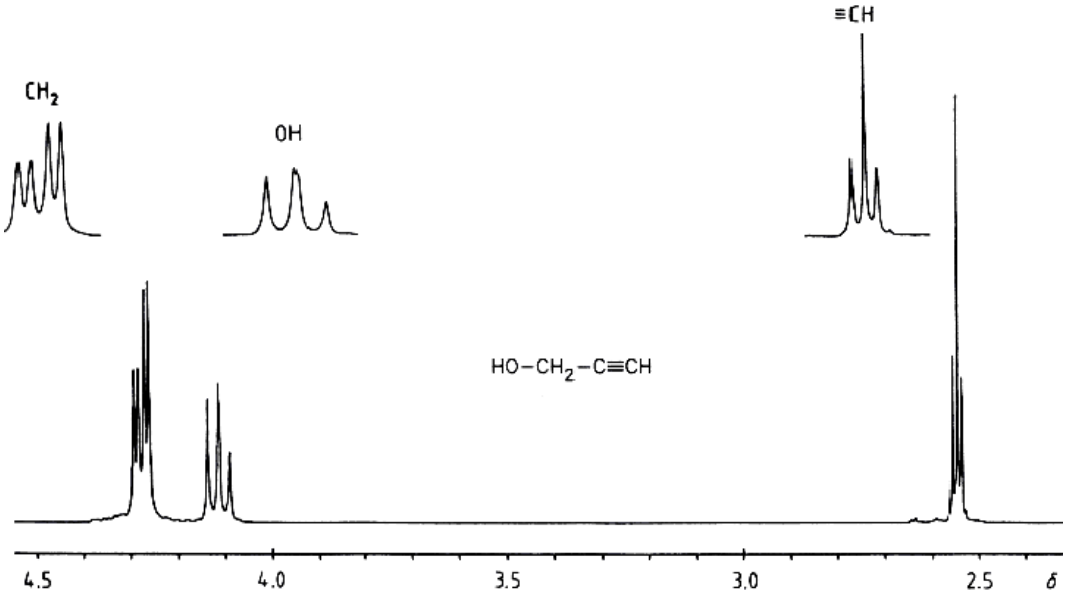


Рисунок 3-9.

Алкильная группа увеличивает экранирование, в то время как арильная группа его уменьшает:

	HC ≡ CH	**H**C ≡ C – CH_3	**H**C ≡ C – C_6H_5
δ, м.д.	2.36	1.8	3.0

3.9.5. Альдегиды

Сигналы альдегидных протонов RCHO легко идентифицируются по характерному химическому сдвигу в области δ = 9-11 м.д.

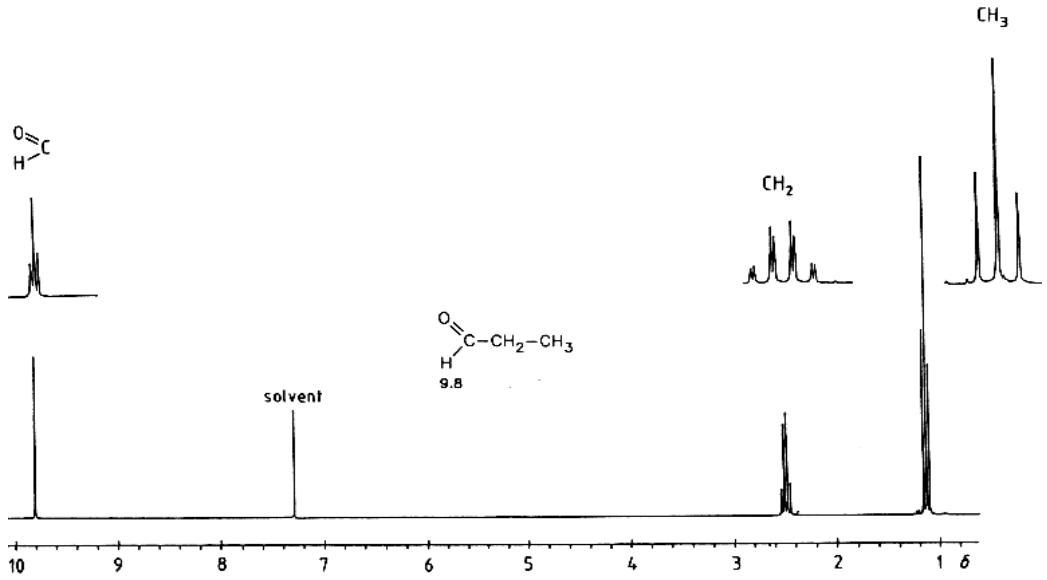


Рисунок 3-10. Спектр ЯМР ^{1}H (250 МГц) пропионового альдегида в $CDCl_3$.

Эффекты заместителя здесь невелики. Даже сопряжение со связью C=C или бензольным кольцом, как это показано ниже, не оказывает существенного влияния на величину химического сдвига:

	H(O)C – CH_3	**H**(O)C – CH = CH_2	**H**(O)C – C_6H_5
δ, м.д.	9.80	9.48	10.0

3.9.6. Химические сдвиги протонов OH, SH и NH групп

Химические сдвиги протонов в группах OH, SH и NH могут варьироваться в широких пределах (табл. 3.5) и зависят от концентрации вещества, температуры, вида растворителя и от присутствия примесей, таких как вода.

Таблица. 3.5. Химические сдвиги (м.д.) групп OH, SH и NH.

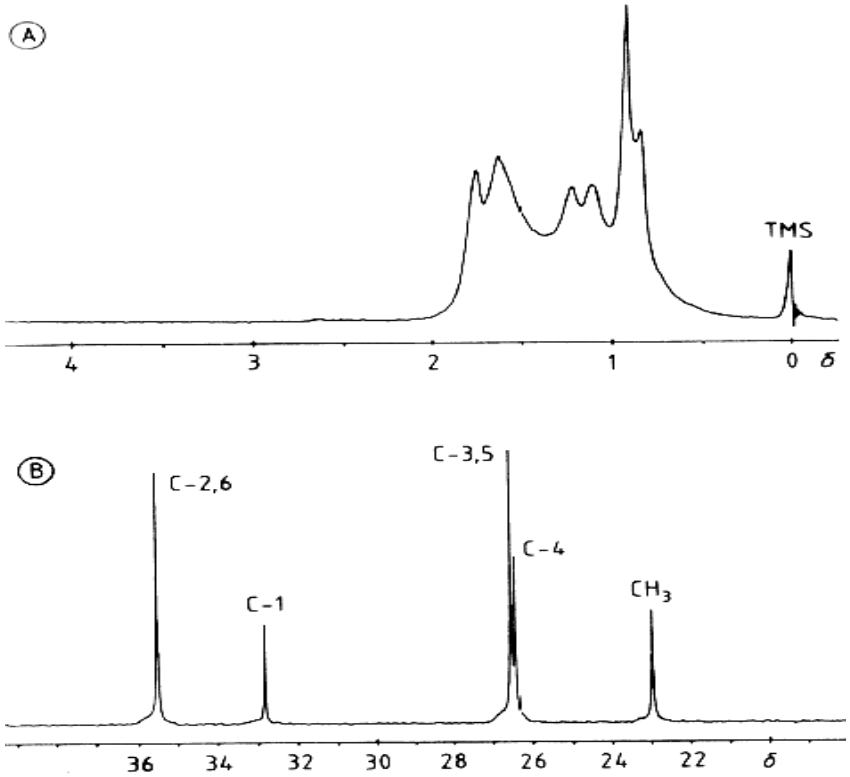
Группа	Тип соединений	δ (^{1}H)
-OH	*Спирты*	1 - 5
-OH	Фенолы	4 – 10
-OH	Енолы	10 - 17
-NH	Амины	1 – 5
-NH	Амиды	5 – 6.5
-NH	Полипептиды	7 - 10
-SH	Алифатические тиолы	1 – 2.5
-SH	Ароматические тиолы	3 - 4

3.10. Химические сдвиги ^{13}C некоторых групп органических соединений

Таблица. 3.6. Химические сдвиги ^{13}C (м.д.) некоторых растворителей

Растворитель	Протонсодержа-щее соединение	Дейтерированное соединение
Циклогексан	*27.5*	*26.1*
Ацетон (CH_3)	30.4	29.2
Диметилсульфоксид (CH_3)	40.5	39.5
Хлористый метилен	54.0	53.6
Хлороформ	77.2	76.9
Четырехлористый углерод	96.0	-

3.10.1. Алканы и циклоалканы



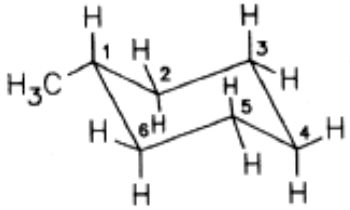


Рис. 3-11. А): Спектр ЯМР ^{1}H (250 Мгц) метилциклогексана. В): Спектр ЯМР ^{13}C (62.89 Мгц).

В *алканах* химический сдвиг ядра ^{13}C зависит от числа соседних атомов углерода, находящихся в α и β положениях по отношению к рассматриваемому ядру, а также от степени разветвленности углеводородной цепи.

Таблица. 3.7. Химические сдвиги ^{13}C (в м.д.) алканов

Соединение	$\delta(C^1)$	$\delta(C^2)$
CH_4	*-2.3*	
$H_3C\text{-}CH_3$	6.5	
$CH_2\ (CH_3)_2$	16.1	16.3
$(H_3C\text{-}CH_2)_2$	13.1	24.9
$CH(CH_3)_3$	24.6	23.3
$C(CH_3)_4$	27.4	31.4

Химические сдвиги ^{13}C для алканов можно предсказать путем расчета по аддитивной или инкрементной схеме, разработанной Грантом и Полем.

$$\delta_i = -2.3 + 9.1\, n_\alpha + 9.4\, n_\beta - 2.5\, n_\gamma + 0.3\, n_\delta + 0.1\, n_\varepsilon + \Sigma\, S_{ij}, \quad (3\text{-}8)$$

где: δ_i – химический сдвиг рассматриваемого атома углерода,
n – количество атомов углерода, находящихся в α, β, γ, δ и ε – положениях относительно рассматриваемого атома углерода,
S_{ij} – стерические поправки (или инкременты), учитывающие разветвление, даны в табл. 3.8.

Таблица 3.8. Стерические поправки S_{ij} для оценки химических сдвигов в разветвленных алканах.

j / i	Первичный	Вторичный	Третичный	Четвертичный
Первичный	0	0	-1.1	-3.4
Вторичный	0	0	-2.5	-7.5
Третичный	0	-3.7	-9.5	-15.0
Четверти-чный	-1.5	-8.4	-15.0	-25.0

Пример: Рассчитаем химические сдвиги δ(C) 2-метилбутана

$$H_3C^1–C^2H(CH_3)–C^3H_2–C^4H_3$$

	H_3C^1	$C^2H(CH_3)$	C^3H_2	C^4H_3
δ(C) м.д. (эксп.)	21.9	29.9	31.6	11.5

Для C^1: $n_\alpha = 1$ (C^2), $n_\beta = 2$ (CH_3 и C^3), $n_\gamma = 1$ (C^4)

Стерические поправки:

C^1 – первичный атом углерода: связан с третичным углеродом C^2 -1.1

S_{ij} = -1.1

Получаем $\delta(C^1) = -2.3 + (9.1 \times 1) + (9.4 \times 2) - (2.5 \times 1) - 1.1 = 22.0$ *м.д.*

Для C^2: $n_\alpha = 3$ (C^1, C^3 и CH_3), $n_\beta = 1$ (C^4)

Стерические поправки:

C^2 – третичный углерод: с первичными углеродами C^1, C^3 и $CH_3 \rightarrow 0$

с соседним вторичным $C^3 \rightarrow$ -3.7

S_{ij} = -3.7

Получаем $\delta(C^2) = -2.3 + (9.1 \times 3) + (9.4 \times 1) - 3.7 = 30.7$ *м.д.*

Для C^3: $n_\alpha = 2$ (C^2 и C^4), $n_\beta = 2$ ((C^1 и CH_3)

Стерические поправки:

C^3 – вторичный углерод: с третичным углеродом $C^2 \rightarrow$ -2.5

с соседними первичными C^2 и $C^4 \rightarrow 0$

S_{ij} = -2.5

Получаем $\delta(C^3) = -2.3 + (9.1 \times 2) + (9.4 \times 2) - 2.5 = 32.2$ *м.д.*

Для C^4: $n_\alpha = 1$ (C^3), $n_\beta = 1$ (C^2), $n_\gamma = 2$ (C^1 и CH_3)

Стерические поправки:

C^4 – первичный углерод: с вторичным углеродом $C^3 \rightarrow 0$

$S_{ij} = 0$

Получаем $\delta(C^4) = -2.3 + (9.1 \times 1) + (9.4 \times 1) - (2.5 \times 1) = 13.7$ *м.д.*

Таблица. 3.9. Химические сдвиги ЯМР ^{13}C (в м.д.) производных пропана

$$XC^{\alpha}H_2\text{-}C^{\beta}H_2\text{-}C^{\gamma}H_3$$

X	H	CH_3	NH_2	OH	NO_2	F	Cl	Br	I
δ (C^{α})	16.1	24.9	44.6	64.9	77.4	85.2	46.7	35.4	9.0
δ (C^{β})	16.3	24.9	27.4	26.9	21.2	23.6	26.0	26.1	26.8
δ (C^{γ})	16.1	13.1	11.5	11.8	10.8	9.2	11.5	12.7	15.2

Как видно из рассмотрения данных, замещение *протона* на *метильную* группу приводит как к уменьшению экранирования α- и β- углеродных атомов на величины 8.8 м.д. и 8.6 м.д., соответственно, так и к увеличению экранирования γ- углеродного атома на 3 м.д.

Эти эффекты носят *названия* α- и β- и γ- *эффектов*, соответственно.

α-Эффекты возрастают с увеличением электроотрицательности заместителя. β - Эффекты заметно слабее и всегда приводят к уменьшению экранирования. γ - Эффекты определяются, в основном, стерическми взаимодействиями.

Таблица 3.10. Химические сдвиги ЯМР ^{13}C (в м.д.) углеродных атомов метиленовых групп некоторых циклоалканов.

Соединение	$(CH_2)_3$	$(CH_2)_4$	$(CH_2)_5$	$(CH_2)_6$	$(CH_2)_7$
δ (^{13}C)	- 2.8	22.4	25.8	27.0	28.7

3.10.2. Алкены

Сигналы ЯМР ^{13}C атомов углерода, соединенных двойной связью, занимают область химических сдвигов 90÷150 м.д. В табл. 3.11 и 3.12 приведены данные химических сдвигов ^{13}C для некоторых производных этиленов.

Таблица 3.11 Хим. сдвиги $\delta(^{13}C)$ (м.д.) для производных алкенов.

Соединение	$\delta(C^1)$	$\delta(C^2)$	$\delta(C^3)$
$H_2C^1{=}C^2H_2$	123.5	-	-
$H_3C^3C^1H{=}C^2H_2$	133.4	115.9	19.9
$H_3CCH{=}CHCH_3$ (*цис*-)	124.2	124.2	11.4
$H_3CCH{=}CHCH_3$ (*транс*-)	125.4	125.4	16.8
$(H_3C)_2C{=}CH_2$	141.8	111.3	24.2
Циклогекс-1-ен	127.4		25.4; (C^4: 23.0)

Таблица 3.12. Химические сдвиги ЯМР ^{13}C (в м.д.) углеродных атомов в монозамещенных этиленах $XHC^1{=}C^2H_2$.

X	H	CH_3	$HC{=}CH_2$	C_6H_5	F	Cl	I	OCH_3
δ (C^1)	123.5	133.4	137.2	137.0	148.2	125.9	85.2	153.2
δ (C^2)	123.5	115.9	116.6	113.2	89.0	117.2	130.3	84.1

В табл. 3.12 собраны данные о химических сдвигах ЯМР ^{13}C в монозамещенных производных этилена. Замещение понижает экранирование ядра C^1 и увеличивает экранирование ядра C^2.

Химические сдвиги алкенов с общей формулой

$$C_\gamma - C_\beta - C_\alpha - C^1 = C^2 - C_\alpha, - C_\beta, - C_\gamma,$$

могут быть рассчитаны по формуле:

$$\delta(\text{C-1}) = 123.3 + 10.6\, n_\alpha + 7.2\, n_\beta - 1.5\, n_\gamma - 7.9\, n_{\alpha'} - 1.8\, n_{\beta'} + 1.5\, n_{\gamma'} + \Sigma S, \quad (3\text{-}9)$$

где: n-номер соседних атомов углерода каждого типа и S – стерические поправки (или инкременты), которые определяются так:

S = 0, если C_α и $C_{\alpha'}$ находятся в E – конфигурации (*αα', транс*-);

S = -1.1, если C_α и $C_{\alpha'}$ находятся в Z – конфигурации (*αα' ,цис*-);

S = -4.8 для двух алкильных заместителей при атоме C^1 (*αα*);

S = +2.5 для двух алкильных заместителей при атоме C^2 (*αα'*);

S = +2.3 для двух или трех алкильных заместителей при атоме C_β.

Рассчитаем химические сдвиги C^1 и C^2 для 2-метилбутил-1-ена

$$H_2C^1 = C^2\,(CH_3) – C^3H_2 – C^4H_3$$

	H_2C^1	$C^2\,(CH_3)$	C^3H_2	C^4H_3
δ(C) м.д. (эксп.)	109.1	147.0; 22.5	31.1	12.5

C^1: n_α, = 2, n_β, = 1, S = + 2.5

$\delta(C^1) = 123.3 – (7.9 \times 2) – (1.8 \times 1) + 2.5 = 108.2$ м.д.

C^2: $n_\alpha = 2$, $n_\beta = 1$, $S = - 4.8$

$\delta(C^2) = 123.3 + (10.6 \times 2) + (7.2 \times 1) - 4.8 = 146.9$ м.д.

3.10.3. Арены

Сигналы ЯМР ^{13}C атомов углерода в бензолах, алкилзамещенных бензолах, полициклических аренах и аннуленах лежат в пределах довольно широкого диапазона химических сдвигов 120÷140 м.д, что иллюстрируется примерами на схеме 1.

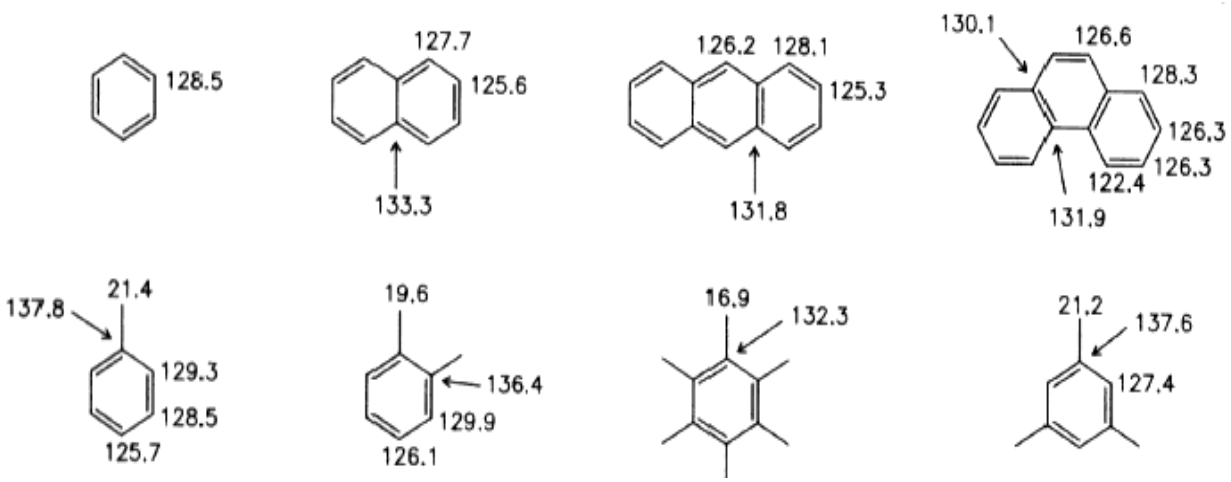


Схема 1

Введение заместителей расширяет область δ(C) до 100÷150 м.д.

Таблица 3.13. Химические сдвиги ЯМР ^{13}C атомов углерода (в м.д.) в монозамещенных бензолах.

Заместитель	H	Li	CH_3	C(O)OH	OH	NH_2	F	I
δ (C^1)	128.5	186.6	137.7	130.6	155.4	146.7	163.3	94.4
δ ($C^{2,6}$)	128.5	143.7	129.2	130.1	115.7	115.1	115.5	137.4
δ ($C^{3,5}$)	128.5	124.7	128.4	128.4	129.9	129.3	131.1	131.1
δ (C^4)	128.5	133.9	125.4	133.7	121.1	118.5	124.1	127.4

Экстремально слабопольный и высокопольный сдвиги по сравнению с бензолом наблюдаются для фениллития (δ_C 186.6 м.д.) и йодбензола (δ_C 94.4 м.д.).

Химические сдвиги ядер углерода в замещенных бензолах могут быть оценены в соответствии с выражением (3-11).

$$\delta_C = 128.5 + \Sigma S \qquad (3\text{-}10)$$

Точка отсчета – химический сдвиг бензола 128.5 м.д. Инкременты заместителей можно взять из таблиц.

Пример: р-нитрофенол *(O_2N-C_6H_4-OH)*

$\delta(C^1) = 128.5 + S_1(OH) + S_p(NO_2) =$

$= 128.5 + 26.9 + 6.1 = 161.5$ м.д. (эксп. 161.5 м.д.).

$\delta(C^2) = 128.5 + S_o(OH) + S_м(NO_2) =$

$= 128.5 - 12.8 + 0.9 = 116.6$ м.д. (эксп. 115.9 м.д.).

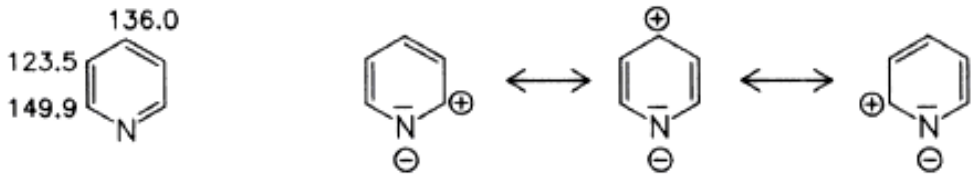
$\delta(C^3) = 128.5 + S_м(OH) + S_o(NO_2) =$

$= 128.5 + 1.4 - 4.9 = 125.0$ м.д. (эксп. 126.4 м.д.).

$\delta(C^4) = 128.5 + S_p(OH) + S_1(NO_2) =$

$= 128.5 - 7.4 + 19.9 = 141.0$ м.д. (эксп. 141.7 м.д.).

Гетероароматические системы. В ароматических гетероциклах на экранирование ядер углерода существенное влияние оказывает гетероатом. Типичным представителем этого класса соединений является пиридин.



Здесь ядра ^{13}C в α и γ положениях менее экранированы, чем в β положении.

3.10.4. Алкины

При сравнении величин $\delta(^{13}C)$ ацетилена (71.9 м.д.) и этилена (123.5 м.д.) мы видим, что ядра ^{13}C в ацетилене сильно экранированы.

Таблица 3.15 Хим. сдвиги ЯМР ^{13}C (м.д.) монозамещенных ацетиленов

$$H\text{-}C^1 \equiv C^2\text{-}X$$

X	δ C^1	δ C^2
H-	71.9	71.9
Алкил-	68.6	84.0
H-C≡C-	64.7	68.8
Фенил-	77.2	83.6
CH_3CH_2O-	23.4	89.6

В галогензамещенных ацетиленах эффект тяжелого атома чрезвычайно большой. Так, в молекуле C_4H_9 - $C^2 \equiv C^1$- I сигнал C^1 находится при δ = -3.3 м.д., тогда как сигнал C^2 - при δ 96.8 м.д.

3.10.6. Альдегиды и кетоны

Химические сдвиги атомов углерода ^{13}C производных альдегидов и кетонов приведены в табл. 3.16. Эти примеры показывают, что величины экранирования карбонильного углерода лежат в пределах ~190÷220 м.д. для альдегидов и кетонов.

Таблица 3.16. Химические сдвиги ^{13}C (в м.д.) альдегидов и кетонов.

Соединение	δ (C^1)	δ (C^2)	δ (C^3)	δ (C^4)
H_3C^2-$C^1H(O)$	200.5	31.2	-	-
H_3C-CH_2-$CH(O)$	202.7	36.7	5.2	-
$(CH_3)_2$-CH-CH(O)	204.6	41.1	15.5	-
$(CH_3)_3$-C-CH(O)	205.6	42.4	23.4	-
H_2C = CH-CH(O)	193.3	136.0	136.4	-
$CH_3C^2(O)$-C^1H_3	30.7	206.7	-	-
$C^4H_3C^3H_2C^2(O)C^1H_3$	27.5	206.3	35.2	7.0
$(CH_3)_2CHC(O)CH_3$	27.5	212.5	41.6	18.2
$(CH_3)_3CC(O)CH_3$	24.5	212.8	44.3	26.5
$(CH_3)_3CC^3(O)C^2(CH_3)_3$	28.6	45.6	218.0	-
Ph-C(O)-Ph	195.2	-	-	-
$Cl_3C^1C^2(O)CCl_3$	90.2	175.5	-	
H_2C^1 = C^2H-$C^3(O)CH_3$	128.0	137.1	197.5	25.7

3.10.7. Карбоновые кислоты

Экранирование атома углерода карбоксильной группы в монокарбоновых кислотах больше, чем атома ^{13}C карбонильной группы в кетонах и альдегидах ($\delta_{C(O)OH}$ 150÷180 и $\delta_{C=O}$ ~190÷220 м.д. соответственно). Сигналы соответствующих анионов сдвигаются приблизительно на 5-7 м.д. в более слабое поле.

Таблица 3.17. Хим. сдвиги ЯМР ^{13}C (м.д.) карбоновых кислот.

Соединение	δ (C^1)	δ (C^2)	
$C^2H_3C^1(O)OH$	176.9	20.8	(pH 1.5) [a)]
CH_3 $C(O)O^-$	182.6	24.5	(pH 8.0) [a)]
$CH_3C(O)N(CH_3)_2$	170.4	21.5	CH_3: 35.0 и 38.0
$CH_3C(O)Cl$	170.4	33.6	-
$CH_3C(O)OCH_3$	171.3	20.6	OCH_3: 51.5
$(CH_3C(O))_2O$	167.4	21.8	-
$CH_3C(O)SH$	194.5	32.6	

Растворитель: D_2O.

3.11. Спектры ЯМР и молекулярная структура соединений

3.11.1. Эквивалентность, симметрия и хиральность

Известны два правила: химически эквивалентные ядра имеют совпадающие резонансные частоты; спин-спиновое взаимодействие между эквивалентными ядрами не наблюдается в спектрах ЯМР.

Исходя из этих правил, можно сделать качественные выводы о молекулярной структуре химических соединений.

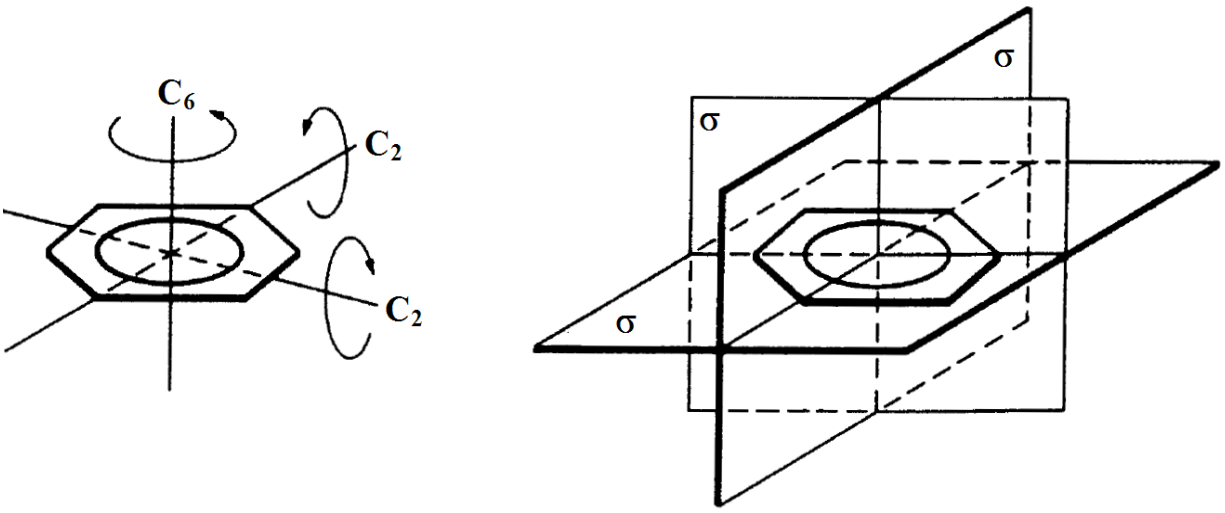


Рисунок 3-12, а. Некоторые элементы симметрии молекулы бензола.

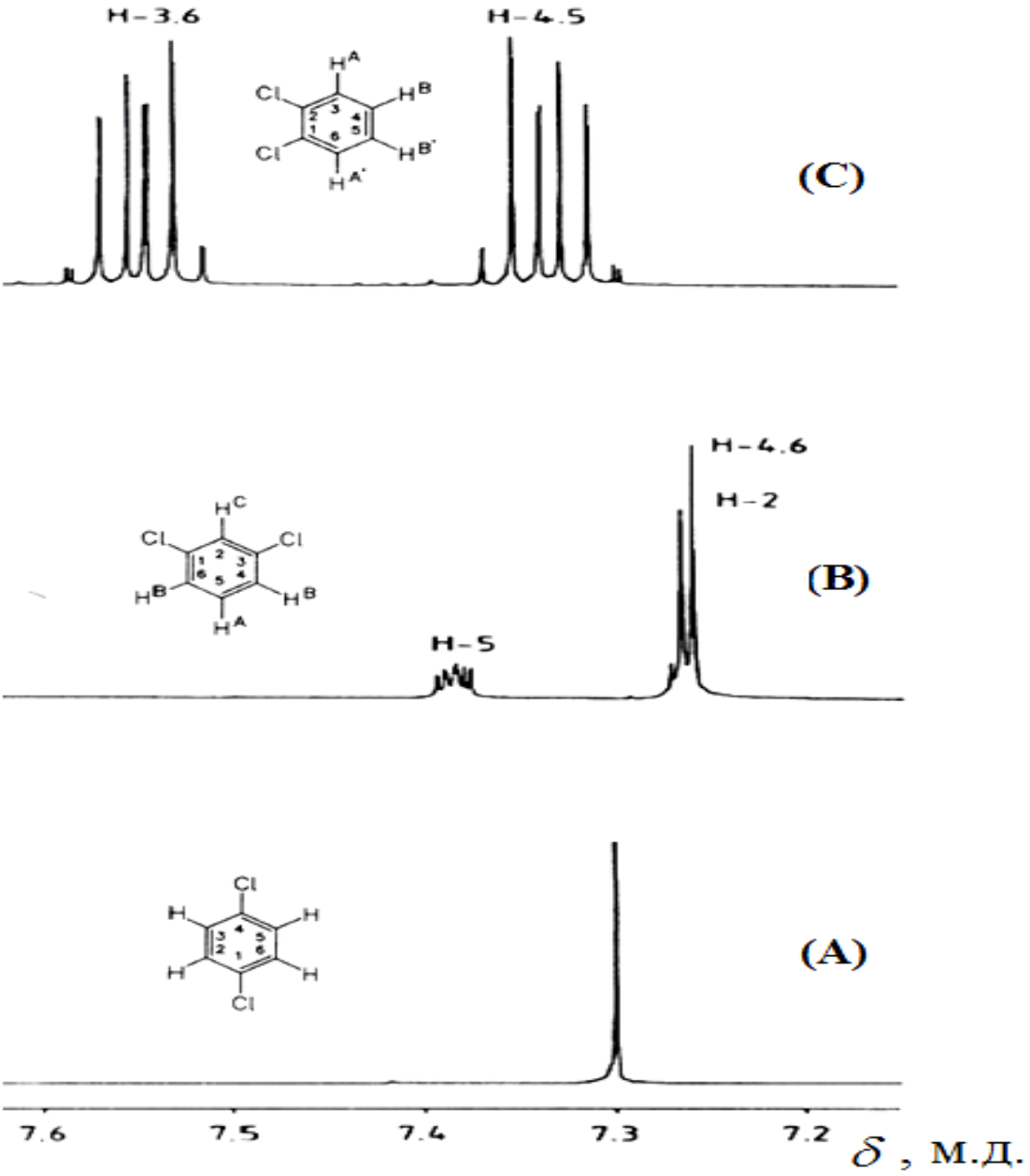
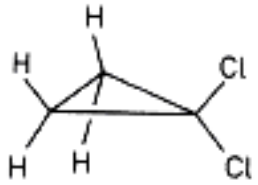


Рисунок 3-12, б

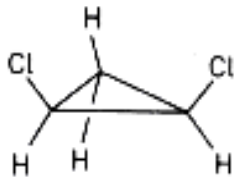
Рассмотрим в качестве примера спектры ЯМР ^{1}H дизамещенных бензолов, а именно: *п*-дихлорбензола (А), *м*-дихлорбензола (В) и *о*-дихлорбензола (С) (рис 3-12).

Для дихлорциклопропана, существующего в виде трех изомеров [1,1- (А), -*цис*-1,2- (В) и *транс*-1,2- (С)], нельзя только на основе ЯМР ^{13}C корректно идентифицировать соответствующие изомеры, поскольку во всех случаях наблюдается два сигнала с соотношением интегральных интенсивностей 2:1.

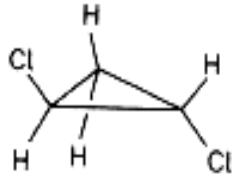
Спектры ЯМР ^{1}H позволяют однозначно, исходя из правил симметрии, соотнести эти изомеры.



1,1-дихлор
циклопропан (A)



цис-1,2-дихлор-
циклопропан (B)

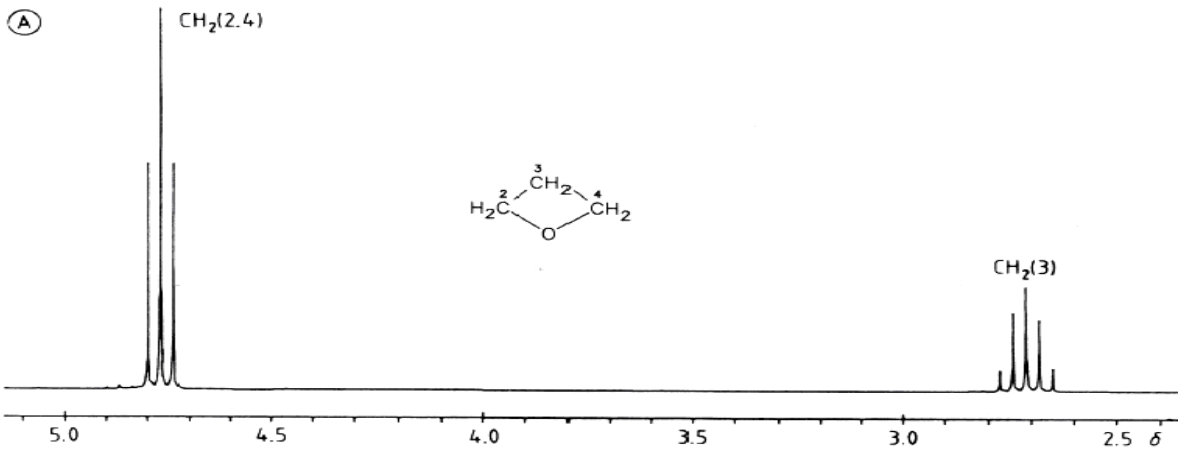


транс-1,2-дихлор-
циклопропан (C)

Цис-изомер (B) имеет плоскость симметрии, и, соответственно, в этом случае имеется три сорта протонов, образующих спин-спиновую систему типа ABC_2. *Транс*-изомер (C) имеет ось симметрии второго порядка и в молекуле имеется два сорта протонов, образующих спин-спиновую систему AA'BB'.

Следующий пример – спектры ЯМР ^{1}H аллилового спирта, пропиленоксида и триметиленоксида (рис. 3-13).

Все три соединения являются структурными изомерами и имеют общую молекулярную формулу C_3H_6O. Спектры этих соединений сложны, однако могут быть достаточно просто идентифицированы с учетом элементов симметрии и эквивалентности протонов в каждой из молекул.



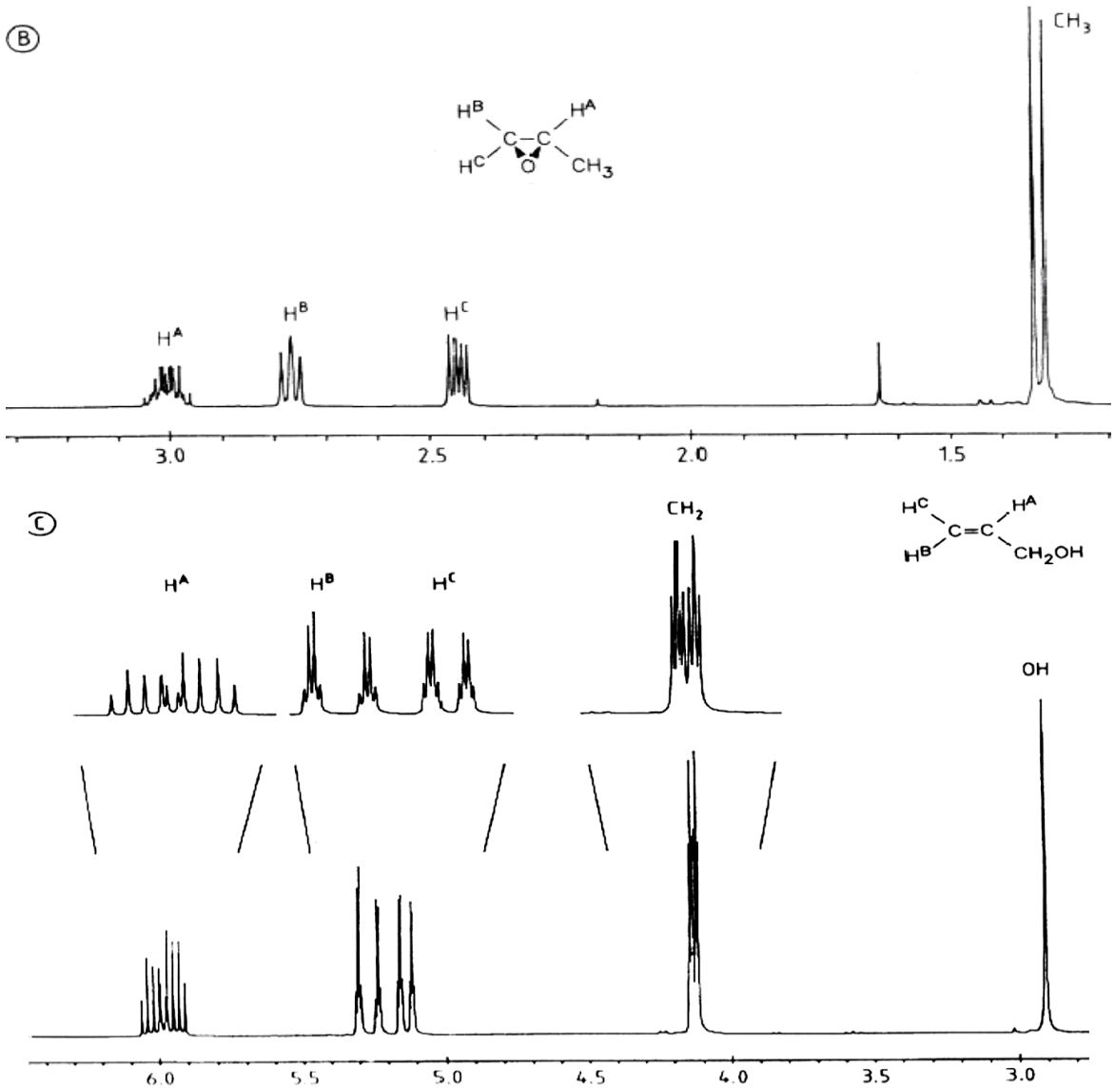

B
CH3
HB
HA
HC
C
C
O
CH3
HA
HB
HC
3.0
2.5
2.0
1.5
C
CH2
HC
HA
HB
C=C
CH2OH
HA
HB
HC
OH
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0

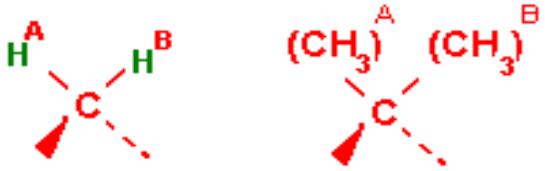
Рисунок 3-13.

3.11.2. Гомотопные, энантиотопные и диастереотопные группы

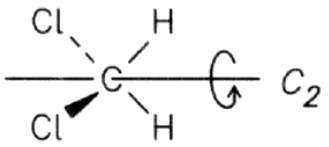
Для *хиральных* или *асимметричных* молекул спектры ЯМР обеих *энантиомерных* форм (*оптических* изомеров) абсолютно одинаковы.

Чтобы эти формы различить, необходимо получить спектры ЯМР соответствующих *диастереомеров*. Диастереоизомеры – устойчивые, изолируемые в индивидуальном состоянии изомеры, различающиеся физическими свойствами, и спектрами ЯМР.

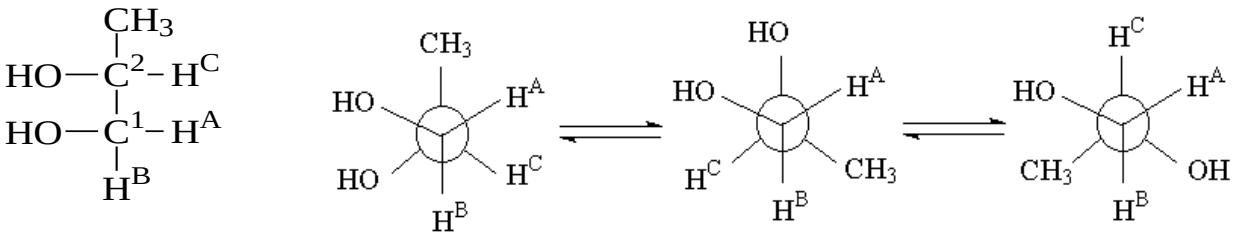
Наиболее часто встречающимися *диастереотопными* группами являются метиленовые протоны и протоны гемдиметильной группировки.



Гомотопные протоны эквивалентны и в спектрах ЯМР ^1H показывают один сигнал, если группа CH_2 изолирована, как, например, в метиленхлориде CH_2Cl_2, молекула которого имеет ось симметрии второго порядка (C_2).



В 1,2-пропандиоле углеродный атом C^1 - прохиральный центр, поэтому протоны H^A и H^B всегда неэквивалентны (даже при быстром вращении вокруг связи C^1–C^2) и в спектре ЯМР ^1H показывают раздельные сигналы. Данное соединение существует в растворе в виде трех ротамеров.



(I) (II) (III)

Оценка вкладов в экранирование протонов H^A и H^B:

H^A: (δ_1) OH,CH_3/H,H; (δ_2) OH,OH/H,CH_3; (δ_3) OH,H/H,OH;

H^B: (δ_4) H,H/OH,OH; (δ_5) H,CH_3/OH,H; (δ_6) H,OH/OH,CH_3;

При быстром вращении (при комнатной температуре) вокруг связи С-С величины химических сдвигов $\delta(H^A)$ и $\delta(H^B)$ усредняются во времени и будут равны:

$$\overline{\delta_A} = \chi_I\delta_1 + \chi_{II}\delta_2 + \chi_{III}\delta_3;\ \overline{\delta_B} = \chi_I\delta_4 + \chi_{II}\delta_5 + \chi_{III}\delta_6 \qquad (3\text{-}11)$$

Даже если мольные доли этих ротамеров будут равны между собой $\chi_I = \chi_{II} = \chi_{III} = 1/3$, то значения химических сдвигов δ для протонов H^A и H^B не будут одинаковыми.

3.11.3. Некоторые примеры диастереотопии

- В молекуле валина группы CH_3 диастереотопны из-за наличия асимметрического центра - атома углерода C(2) и в спектре ЯМР ^{1}H каждая из них проявляется в виде дублета (рис. 3-14).

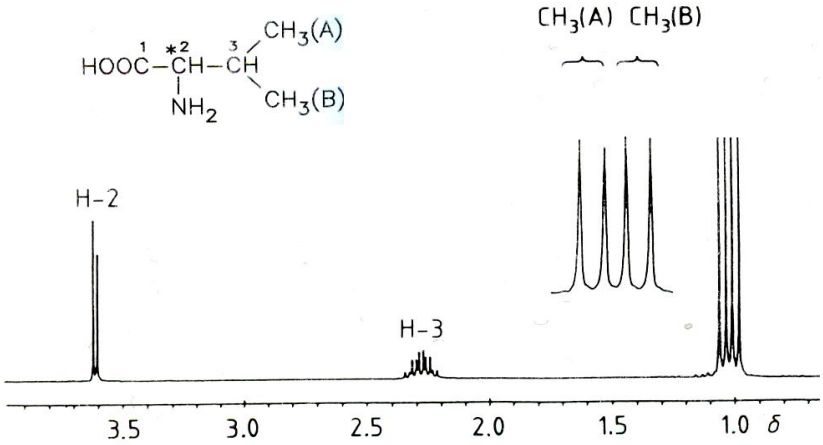


Рисунок 3-14. Спектр ЯМР ^{1}H (250 МГц) валина в дейтерированной воде.

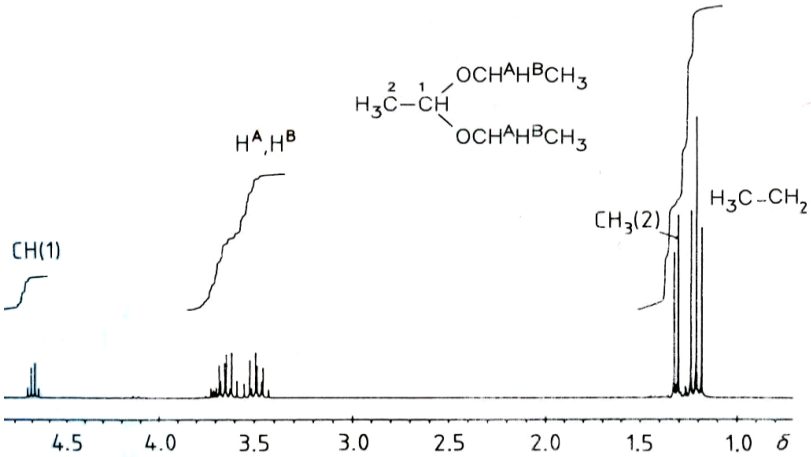


Рисунок 3-15. Спектр ЯМР ^{1}H (60 МГц) диэтилацеталя ацетальдегида в растворе $CDCl_3$.

- Классическим примером является ацетальдегиддиэтилацеталь, в котором два метиленовых протона в каждой из этильных групп диастереотопны. И, как следствие, спектр ЯМР ^{1}H метиленовых

групп значительно сложнее, нежели в обычных случаях (рис. 3-15). Здесь протоны каждой из этильных групп образуют спин-спиновую систему типа ABX_3. В этом случае C(1) – прохиральный центр.

- В спектре ЯМР ^{1}H производного бифенила имеется два сигнала при δ = 1.42 и 1.65 м.д., принадлежащих протонам двух метилов изопропильной группы (рис. 3-16). В этом случае группы CH_3 диастереотопны из-за хиральности молекулы бифенила, вследствие заторможенного вращения вокруг центральной связи C-C (конформеры).

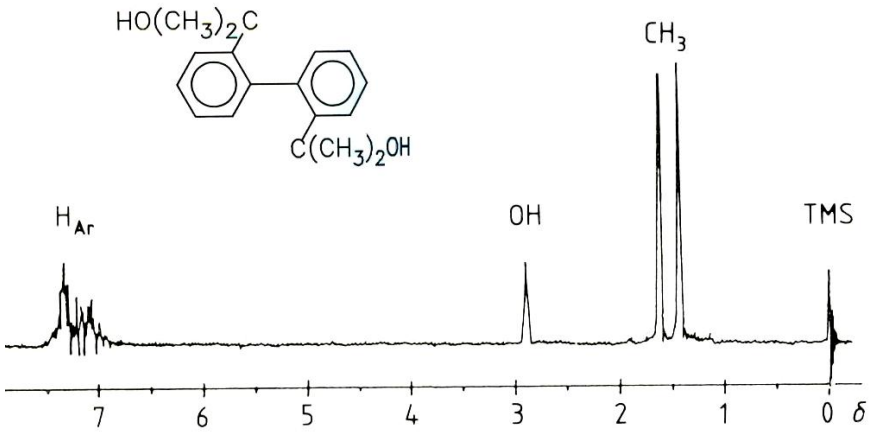


Рисунок 3-16. Спектр ЯМР ^{1}H (60 МГц) производного бифенила в $CDCl_3$.

4. СПИН-СПИНОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И СТРОЕНИЕ МОЛЕКУЛ

4.1. Предварительные сведения

Для органической химии большой интерес представляют порядок величин и знаки констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) между ядрами ^{1}H и ^{1}H, ^{1}H и ^{13}C, ^{13}C и ^{13}C. Константы спин-спинового взаимодействия между протонами будем обозначать как J_{HH}, между протонами и ядрами изотопа ^{13}C как J_{HC}, а между ядрами изотопа ^{13}C как J_{CC}. Число связей, разделяющие эти ядра, обозначим цифрой слева вверху знака константы. Так, ^{1}J означает взаимодействие между ядрами, разделенными одной связью (прямые константы), ^{2}J – двумя (геминальное взаимодействие), ^{3}J - тремя (вицинальное взаимодействие) и ^{3+n}J - более чем тремя (дальнее взаимодействие) связями.

Факторы, влияющие на величину КССВ:

а) гибридизация атомов углерода, участвующих в ССВ;

б) углы между связями и торсионные углы; в) длины связей;

г) наличие соседних π-связей; д) эффекты соседних неподеленных электронных пар; е) эффекты заместителей.

В таблице 4.1 суммированы величины и знаки КССВ между соответствующими ядрами, разделенными одной, двумя, тремя и более химическими связями.

Таблица 4.1. Величины и знаки КССВ между протонами J_{HH}, между протонами и ядрами изотопа ^{13}C J_{HC} и между ядрами изотопа ^{13}C.

	J_{HH}, Гц	Знак	J_{CH}, Гц	Знак	J_{CC}, Гц	Знак
^{1}J	276	+	125-250	+	30-80	+
^{2}J	0-30	-	-10 +20	+/-	< 20	+/-
^{3}J	0-18	+	1-10	+	0-5	+
^{3+n}J	0-7	+/-	< 1	+/-	< 1	+/-

4.2. Геминальные константы спин-спинового взаимодействия

Если протоны в метиленовой группе химически неэквивалентны, то между ними может наблюдаться геминальное спин-спиновое взаимодействие.

В результате анализа большого числа экспериментальных данных было установлено, что геминальные КССВ $^2J_{HH}$ зависят от:

а) угла между связями H-C-H;

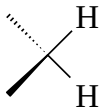
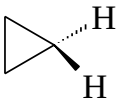
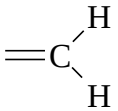
б) гибридизации атома углерода;

с) соседних по отношению к рассматриваемой паре ядер заместителей.

Эти константы обычно имеют отрицательный знак, т.е. $^2J_{HH} < 0$ (встречаются исключения).

Зависимость геминальных КССВ от угла между связями C-H рассмотрим на примере метана, циклопропана, этилена, а также их производных (табл. 4.2).

Таблица 4.2. Значения геминальных КССВ (Гц) в ряду соединений метан, циклопропан и этилен, а также их производных

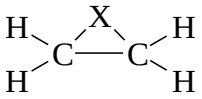
			
ϕ =∠H-C-H	109º	120º	120º
Примеры	метан (-12.4)	циклопропан (-4.5)	этилен (2.5)
$^2J_{HH}$, Гц	-11 ÷ -14 Гц	-2 ÷ -5 Гц	+3 ÷ -3 Гц

Эффекты заместителя. В насыщенных соединениях электроотрицательные заместители в α-положении дают положительный вклад в геминальное взаимодействие.

Таблица 4.3. Геминальные КССВ (Гц) в ряду производных метана.

Соединение	CH_4	CH_3OH	CH_3Cl	CH_3F	CH_2Cl_2	CH_2O
$^2J_{HH}$, Гц	-12.4	-10.8	-10.8	-9.6	-7.5	+41.0

Таблица 4.4. Геминальные КССВ (Гц) в трехчленных циклах

	X = CH_2	X = S	X = NR	X = O
$^2J_{HH}$, Гц	-4.5	(±0.4)	+2.0	+5.5
Электроотрицательность по Полингу	2.5	2.5	3.0	3.5

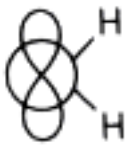
Данные табл. 4.5 на примере рассмотрения величин КССВ в монозамещенных этиленах демонстрируют эффект изменения геминальных КССВ при смене соседних по отношению к рассматриваемой паре ядер заместителей.

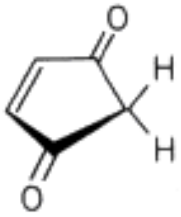
Таблица 4.5. Значения геминальных КССВ (Гц) в монозамещенных этиленах

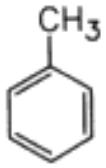
$CH_2 = CHX$	X = Li	X = H	X = Cl	X = OCH_3	X = F
$^2J_{HH}$, Гц	+7.1	+2.5	-1.4	-2.0	-3.2
Электроотрицатель-ность по Полингу	1.0	2.2	3.0	3.5	4.0

В производных этилена электроотрицательные заместители (например, фтор) в β-положении вносят отрицательный вклад в величину геминальной константы, в то время как электроположительные заместители (такие, как литий) – положительный (табл. 4.5).

Влияние соседних π-связей. Соседство с π-электронами оказывает негативное влияние на величину $^2J_{HH}$. Такая стереохимическая ситуация реализуется в циклопентен-1,4-дионе, для которого $^2J_{HH}$ = -22.0 Гц. Этот эффект выявлен также для толуола, где метильные протоны имеют геминальную константу –14.4 Гц , т.е. только на 2 Гц меньше, чем для метана.







4.3. Вицинальные константы спин-спинового взаимодействия

Таблица 4.6. Возможные интервалы и типичные значения вицинальных констант $^3J_{HH}$ для некоторых соединений и фрагментов соединений (в Гц).

Соединение	Геометрия	Интервалы значений [б)]	Типичное значение [б)]
Циклопропан	*цис / транс*	6-10 / 3-6	8 / 5
Циклобутан	*цис / транс*	6-10 / 5-9	-
Циклогексан	*а,а / а,е / е,е*	6-14 / 3-5 / 0-5	9 / 3 / 3
Бензол	*орто*	6-10	9
Пиридин	2,3 / 3,4	5-6 / 7-9	5 / 8
H-C-C-H		0-12	7
=CH-CH=		9-13	10
-CH=CH_2	*цис / транс*	5-14 / 11-19	10 / 16
>CH-CHO		1-3	3
=CH-CHO-		5-8	6
CH-NH[а)]		4-8	5
CH-OH[а)]		4-10	5
CH-SH[а)]		6-8	7

[а)] В отсутствии обмена; [б)] Все величины положительны.

В результате анализа опытных данных было установлено, что вицинальные КССВ $^3J_{HH}$ зависят от:

а) торсионных и двугранных углов;

б) соседних по отношению к рассматриваемой паре ядер заместителей;

в) расстояния между атомами С-С;

г) угла между связями С-Н и С-С [∠(Н-С-С)].

4.3.1. Зависимость вицинальной константы от двугранного угла

Из всех типов констант спин спинового взаимодействия вицинальная константа (константа через три связи) наиболее полно определяет пространственное положение атомов в молекуле. Чтобы понять это, введем новый термин – *двугранный угол*.

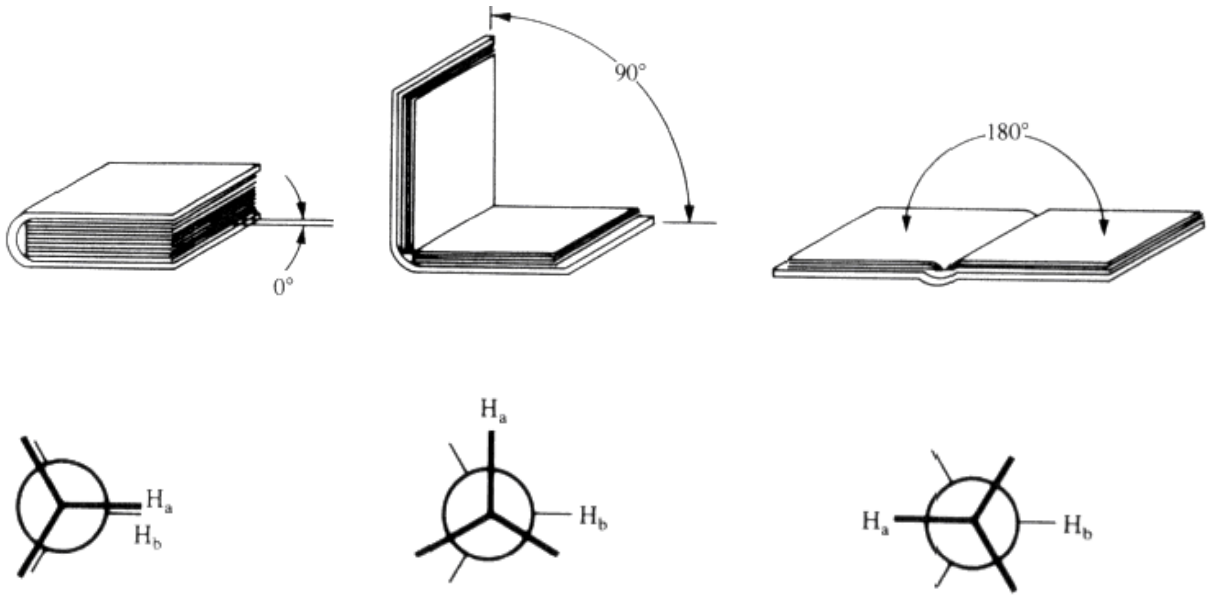


Рис. 4-1. Двугранные углы ø.

Двугранный угол – угол между двумя плоскостями.

Соотношение между величиной $^3J_{HH}$ и двугранным углом описывается уравнением Карплуса и Ботнер-Бая (4-1):

$$^3J_{HH} = (\ 7 - \cos ø + 5\ \cos 2ø)\ \text{Гц} \qquad (4\text{-}1)$$

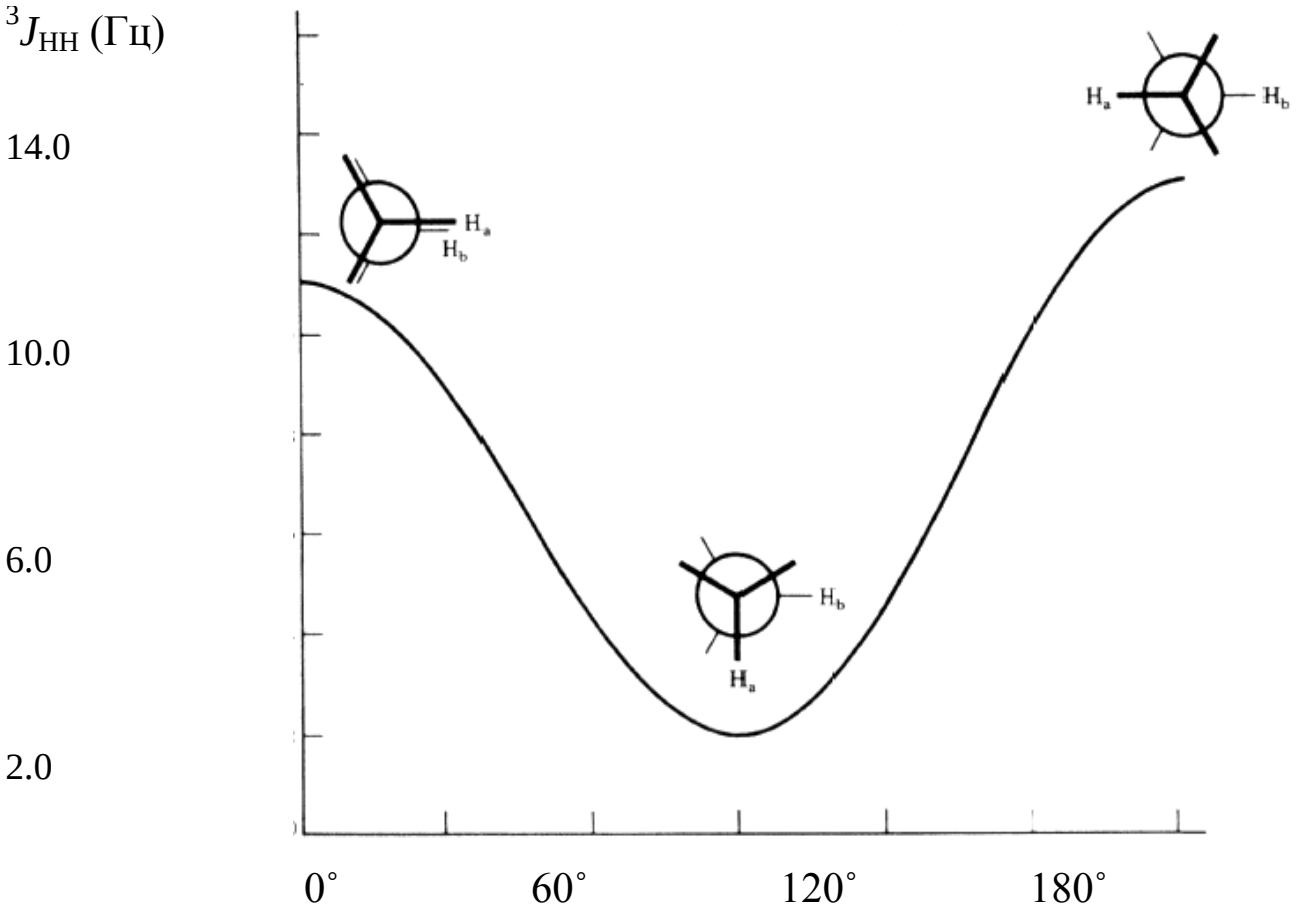
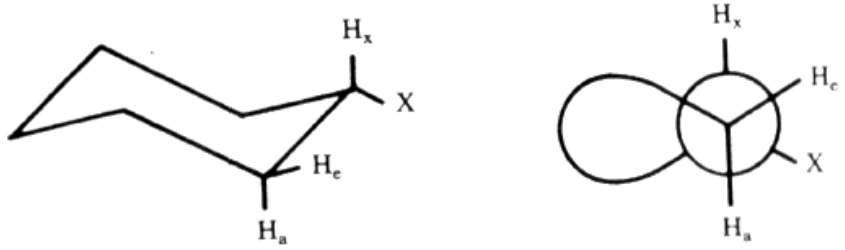


Рис. 4-2. Кривая Карплуса Ботнер-Бая.

Графическое решение уравнения Карплуса (4-1) представлено на рис. 4-2, откуда видно, что величина $^3J_{HH}$ достигает максимума при углах 0˚ (11 Гц) и 180˚ (13 Гц) и минимума при угле 90˚ (2 Гц).

Пример. Циклогексан и его производные имеют неплоскую конформацию, где протоны занимают аксиальное (*a*) и экваториальное (*e*) положения.

Рассчитать величины $^3J_{H(x)H(e)}$ и $^3J_{H(a)H(x)}$.



Решение. Из структурной диаграммы (рис. 4-2) следует, что двугранный угол ø H_x-C-CH_e равен 60˚, а угол ø H_x-C-C-H_a равен 180˚. Из уравнения (4-1) находим:

$$^3J_{H(x)H(e)} = 7 - \cos 60^\circ + 5 \cos 120^\circ = 4 \text{ Гц},$$
$$^3J_{H(x)H(a)} = 7 - \cos 180^\circ + 5 \cos 360^\circ = 13 \text{ Гц}.$$

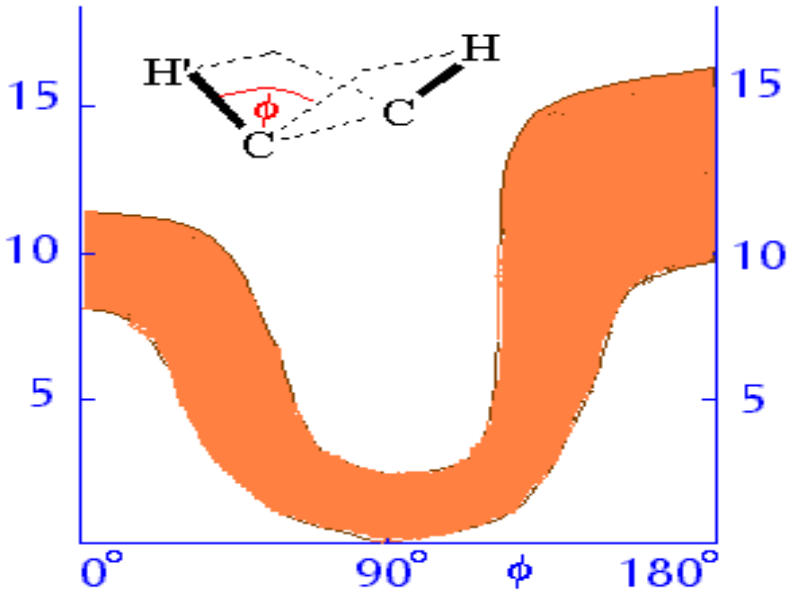
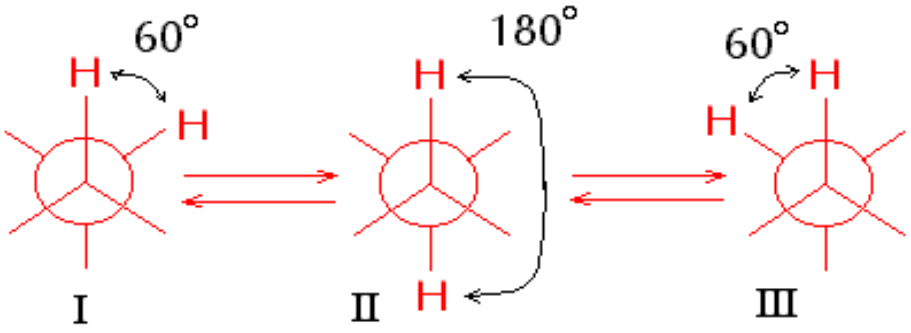


Рис 4-3. Области наблюдаемых вицинальных КССВ

Производные этанов. Наблюдаемые значения констант $^3J_{HH}$ в замещенных этанах в большинстве случаев близки к 7 Гц и соответствуют усредненной величине между соответствующими константами для трех ротамеров (I) – (III):



В *гош*-ротамерах (I) и (III) двугранные углы близки к $\phi = 60°$. В соответствии с Карплусовой зависимостью величины КССВ будут

равны $^3J_{гош} \approx$ 3-5 Гц. В *транс*-ротамере (II) $\phi = 180°$, $^3J_{транс} \approx$10-16 Гц . В условиях равновесия доли ротамеров равны (P[I] = P[II] = P[III]) и наблюдаемая константа определяется из следующего соотношения:

$$^3J = \tfrac{1}{3}(2\,^3J_{гош} + ^3J_{транс}) \approx 7 \text{ Гц.}$$

Еще один пример использования кривой Карплуса. На рис. 4-4 приведен спектр ЯМР ^{1}H глюкозы, которая в растворе D_2O находится в состоянии равновесия форм α- и β-. Из соотношения интегральных интенсивностей дублетов получаем: доля α-глюкозы составляет 40%, а β-глюкозы – 60%.

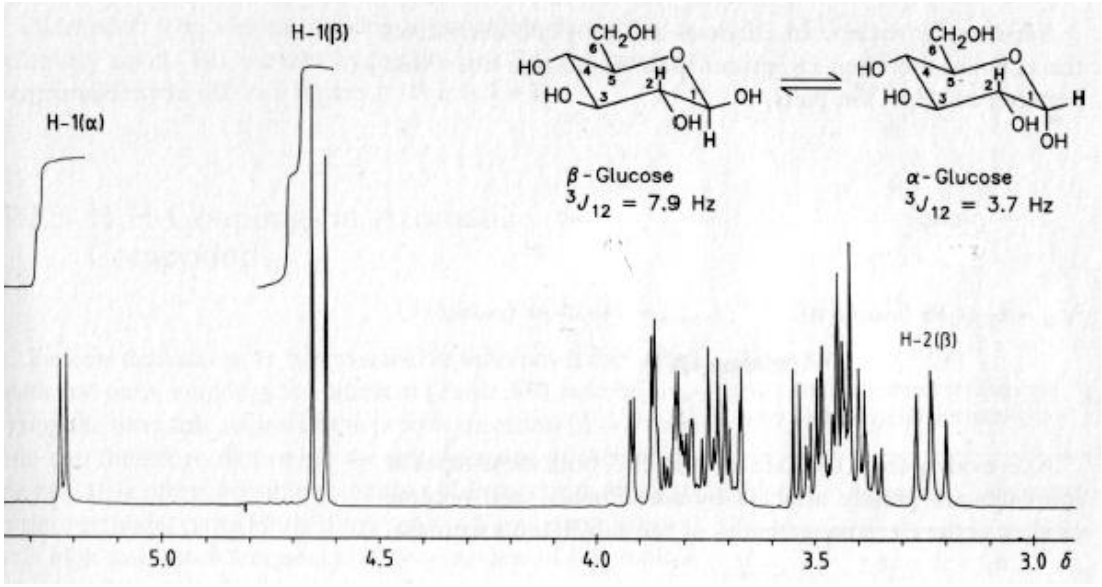


Рис. 4.4. Спектр ЯМР ^{1}H (250 МГц) глюкозы в растворе D_2O.

4.3.2. Эффекты заместителей

Насыщенные соединения, алканы: основная тенденция изменения величин вицинальных констант здесь следующая (табл. 4.7): *электроотрицательные* заместителями уменьшают величину константы, но этот эффект мал.

Соотношение между вицинальными КССВ и разностью электроотрицательностью заместителя E_X и протона E_H описывается простым эмпирическим уравнением (4-2):

$$^3J_{HH} = 8.0 - 0.8\,(E_X - E_H) \qquad (4\text{-}2)$$

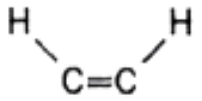
Однако мы должны помнить, что из-за вращения вокруг связи С-С обычно наблюдается усредненная вицинальная константа.

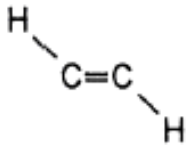
Таблица 4.7. Значения вицинальных констант $^3J_{HH}$ в монозамещенных этанах X-CH_2-CH_3.

X	$^3J_{HH}$, Гц	E_X [a)]
Li	8.4	1.0
H	8.0	2.2
CH_3	7.3	2.5
Cl	7.2	3.0
OR	7.0	3.5

E_X [a)] – электроотрицательность заместителя по Полингу.

Производные этилена: здесь константа между парой *цис*-протонов меньше, чем между парой *транс*-протонов.





$^3J_{HH}$ (*цис*) = 6.0 – 14.0 Гц $^3J_{HH}$ (*транс*) = 14.0 – 20.0 Гц

Из данных табл. 4.8 следует, что все вицинальные константы подвержены сильному влиянию заместителя и с увеличением электроотрицательности заместителя уменьшаются.

Таблица 4.8. Значения вицинальных констант $^3J_{HH}$ в монозамещенных этиленах X-CH=CH_2.

X	$^3J_{HH}$(*цис*), Гц	$^3J_{HH}$(*транс*), Гц	E_X [a)]
Li	19.3	23.9	1.0
H	11.6	19.1	2.2
Cl	7.3	14.6	3.0
OCH_3	7.1	15.2	3.5
F	4.7	12.8	4.0

E_X [a)] – электроотрицательность заместителя по Полингу.

Зависимость величин *цис*-, *транс*-констант от электроотрицательности заместителя описывается уравнением (4-3):

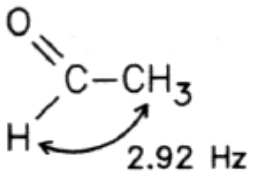
$$^3J_{цис} = 11.7 - 4.7\,(E_X - E_H); \quad ^3J_{цис} = 19.0 - 3.3\,(E_X - E_H) \quad (4\text{-}3)$$

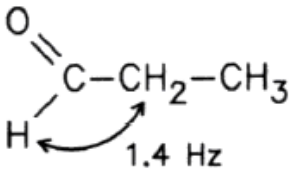
Циклоалкены: в малых напряженных циклах величина *цис*-константы существенно меньше, чем можно было бы ожидать (табл. 4.9). Только в семичленном цикле величина $^3J_{цис}$ достигает 10 Гц. Здесь, очевидно, важную роль играет угол H-C-C.

Таблица 4.9. Значения вицинальных констант $^3J_{HH}$ в циклоалкенах.

Соединение	$^3J_{HH}$ (*цис*), Гц
Циклопропен	1.3
Циклобутен	3.0
Циклопентен	5.0
Циклогексен	9.0
Циклогептен	10.0

Альдегиды: вицинальная константа с альдегидным протоном относительно мала. Для ацетальдегида она равна 2.9 Гц, а для пропиональдегида 1.4 Гц.





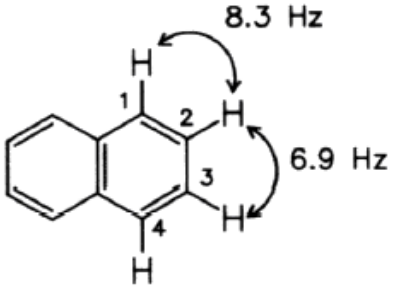
4.3.3. Константы $^3J_{HH}$ в ароматических соединениях

Производные бензола: в производных бензола *орто- мета-* и *пара-* константы различны (табл. 4.10).

Таблица 4.10. Значения констант в бензоле и его производных (Гц).

J_{HH}	Бензол	Производные бензола
$J_{орто}$	7.5	7-9
$J_{мета}$	1.4	1-3
$J_{пара}$	0.7	< 1

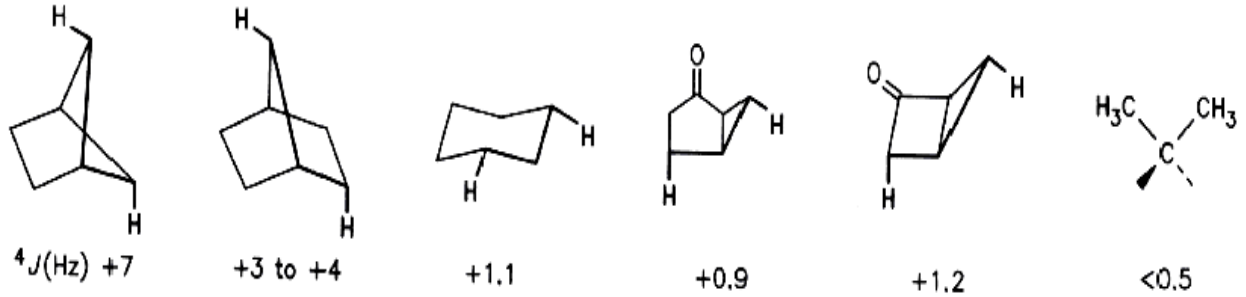
Для нафталина найдены две *орто*-константы: $^3J_{H(1)H(2)}$ = 8.3 Гц и $^3J_{H(2)H(3)}$ = 6.9 Гц ($^3J_{H(1)H(3)}$ = 1.2 Гц и $^3J_{H(1)H(4)}$ = 0.7 Гц). Разница между *орто*-константами вероятнее всего обязана разнице в длинах связей.



Гетероароматика: Здесь величины $^3J_{HH}$ зависят от электроотрицательности гетероатома, длины связи и распределения заряда в молекуле.

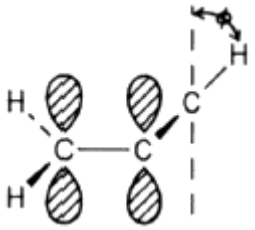
4.4. Дальние константы спин-спинового взаимодействия

Дальними константами в спектроскопии ЯМР называются константы через четыре, пять и более связей. В насыщенных системах дальние константы чаще всего менее 1 Гц. Однако они могут оказаться существенно больше в молекулах, где взаимодействующие связи образуют стерическую конфигурацию «W».



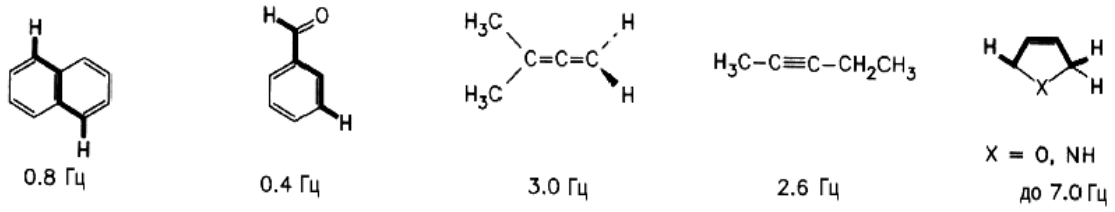
Константы $^4J_{HH}$ в конфигурации «W» всегда положительны.

Константы через пять связей в аллильных соединениях могут быть очень большими. Они сильно зависят от угла между связями С-Н и осью π-орбитали двойной связи и всегда отрицательны.



ø = 0°: $^4J_{HH}$ = - 3 – Гц (максимум), ø = 90°: $^4J_{HH}$ = - 0.5 – Гц (минимум)

Константы через пять связей и более проявляются в спектрах достаточно хорошо. Исключением являются зигзагообразные системы в ненасыщенных соединениях – в нафталине, бензальдегиде, алленах и алкинах.



4.5. Прямые константы спин-спинового взаимодействия

Наиболее часто встречающейся и используемой константой спин-спинового взаимодействия через одну связь является константа $^{1}J_{CH}$. Знаки всех прямых констант положительны, а величины зависят от природы орбитали, соединяющей два ядра.

Таблица. 4.12. Влияние гибридизации атома углерода на величину $^{1}J_{CH}$.

Структура	Форма углерода	∠C-C-H	Гибридизация углерода	$^{1}J_{CH}$ (Гц)
Этан	тетрагональная	109.5°	sp^3	125
Этилен	тригональная	120°	sp^2	156
Этинил	плоская линейная	180°	sp	249

Таблица 4.13. Некоторые прямые константы спин-спинового взаимодействия

Тип константы	$^{1}J_{CH}$ (Гц)
^{1}H-^{1}H	280
^{13}C-^{1}H	110-260
^{31}P-^{1}H	200-700
^{13}C-^{19}F	-280 ÷ 350
$^{13}C \equiv ^{13}C$	170
>P-P<	100-500
F-P(O)<	1000

5. ДИНАМИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР

5.1. Введение в динамическую спектроскопию ЯМР. Общие положения

Если ядра в результате вращения одной части молекулы относительно другой обмениваются химическими окружениями, то это может быть зафиксировано в спектрах ЯМР. Проиллюстрируем это на примере диметилформамида (ДМФА). Температурные спектры ЯМР ^{1}H ДМФА в резонансной области протонов метильных групп представлены на рис. 5-1.

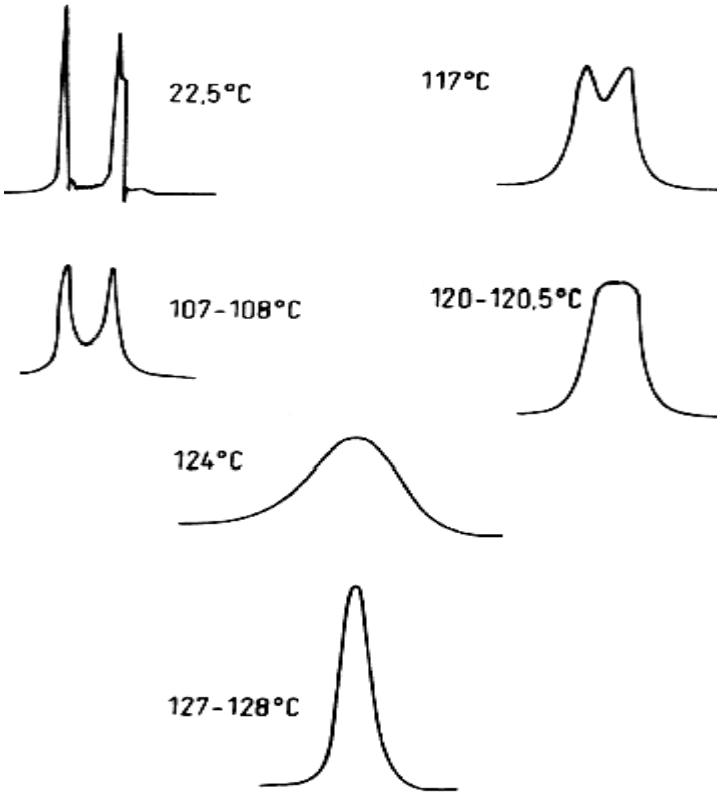
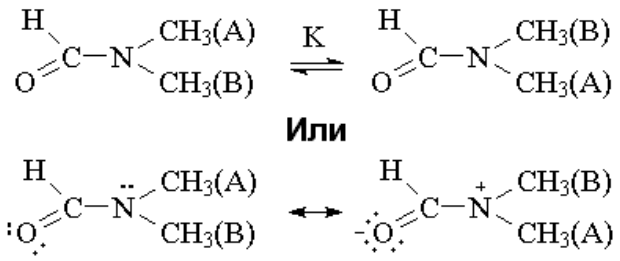


Рисунок 5-1.

Причиной этого является частично двойной характер связи C-N, приводящий к заторможенному вращению вокруг нее. При этом формально одинаковые метильные группы A и B оказываются в неодинаковом магнитном окружении:



При нагревании раствора до определенной температуры вращение вокруг связи C-N становится достаточно быстрым в шкале времени ЯМР, и сигналы сливаются.

$$\nu_{ср} = (\nu_A + \nu_B) / 2.$$

Вышеописанный динамический процесс иллюстрирует *обратимую реакцию первого порядка,* которая описывается двумя константами скорости. Переход I → II описывается константой скорости K_I, а обратный переход - константой K_{II}:

$$I\ (K_I) \rightleftarrows II\ (K_{II}),$$

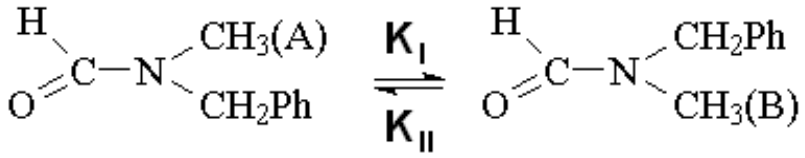
причем $K = K_I = K_{II}$, так как *оба ротамера энергетически эквивалентны*.

Для *температуры коалесценции* ($T = T_C$) константа скорости вращения вокруг связи C-N определяется выражением

$$K_C = 2.22\ \Delta\nu, \qquad (5\text{-}1)$$

где $\Delta\nu$ – разница в Гц между двумя сигналами ЯМР в отсутствие обмена.

Если один из протонов метильной группы заместить фенильной группой, то два ротамера будут отличаться друг от друга по энергии.



При медленном вращении (К = 0) интенсивности сигналов протонов метильных и метиленовых групп будут пропорциональны относительному содержанию ротамеров в растворах. При достижении температуры коалесценции T_C (*быстрый позиционный обмен*) сигналы сольются в один, а положение этого сигнала определяется, как:

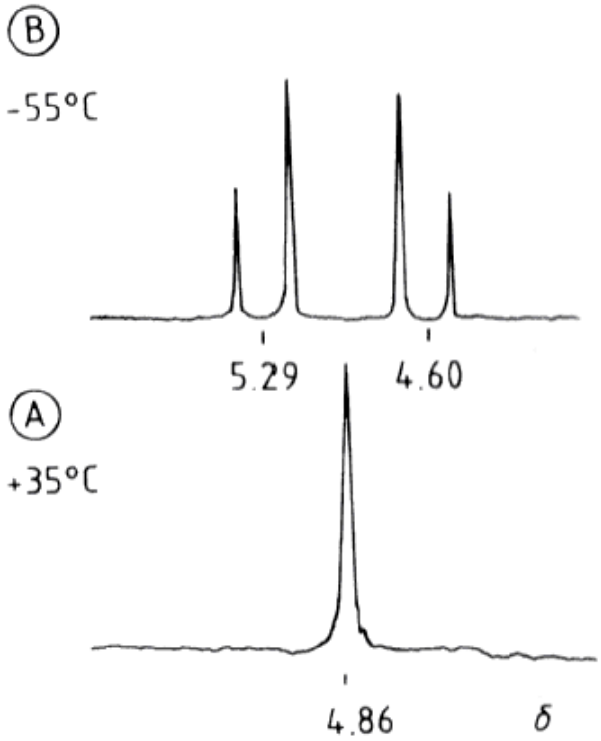
$$\nu = \chi_I \nu_A + \chi_{II} \nu_B,$$

где χ_I и χ_{II} – молярные доли ротамеров.

Рассмотрим случай, когда обменивающиеся химическими положениями ядра имеют спин-спиновое взаимодействие друг с другом. На рис. 5-2 представлена резонансная область ЯМР ^{1}H метиленовых протонов H_A и H_B 1,2-дифенилдиазетидинона.

Константа скорости K_C с учетом спин-спинового взаимодействия при температуре коалесценции (T_C) описывается уравнением (5-2):

$$K_C = 2.22\sqrt{\Delta\nu^2 + 6J_{AB}^2} \qquad (5\text{-}2)$$



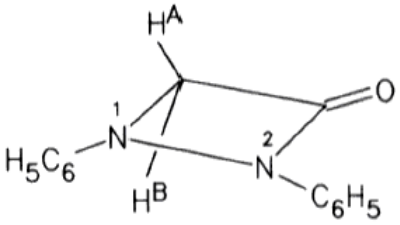
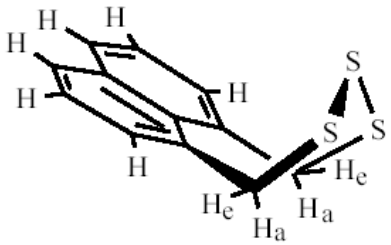
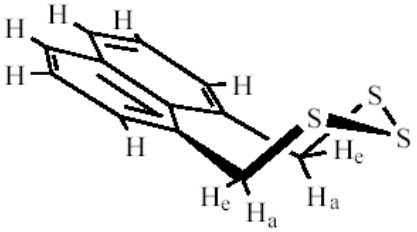


Рисунок 5-2.

На рис. 5-3 представлен спектр ЯМР ^{1}H метиленовых протонов трисульфид 4H, 8H-нафто [1,8-ef]1,2,3-тритиоцина в $CDCl_3$, записанный при различных температурах раствора. При комнатной температуре наблюдаются спектры ЯМР (АВ квартеты метиленовых протонов) двух конформеров:



конформация ванна



конформация кресло

С повышением температуры в спектре ЯМР наблюдаются два процесса: ванна-ванна инверсия, а при высоких температурах во внутримолекулярную динамику включается процесс интерконверсии кресло-ванна. Спектр ЯМР при этом сложен и для интерпретации этих изменений и получения информации о кинетических параметров этих процессов здесь необходим, так называемый анализ формы линии ЯМР.

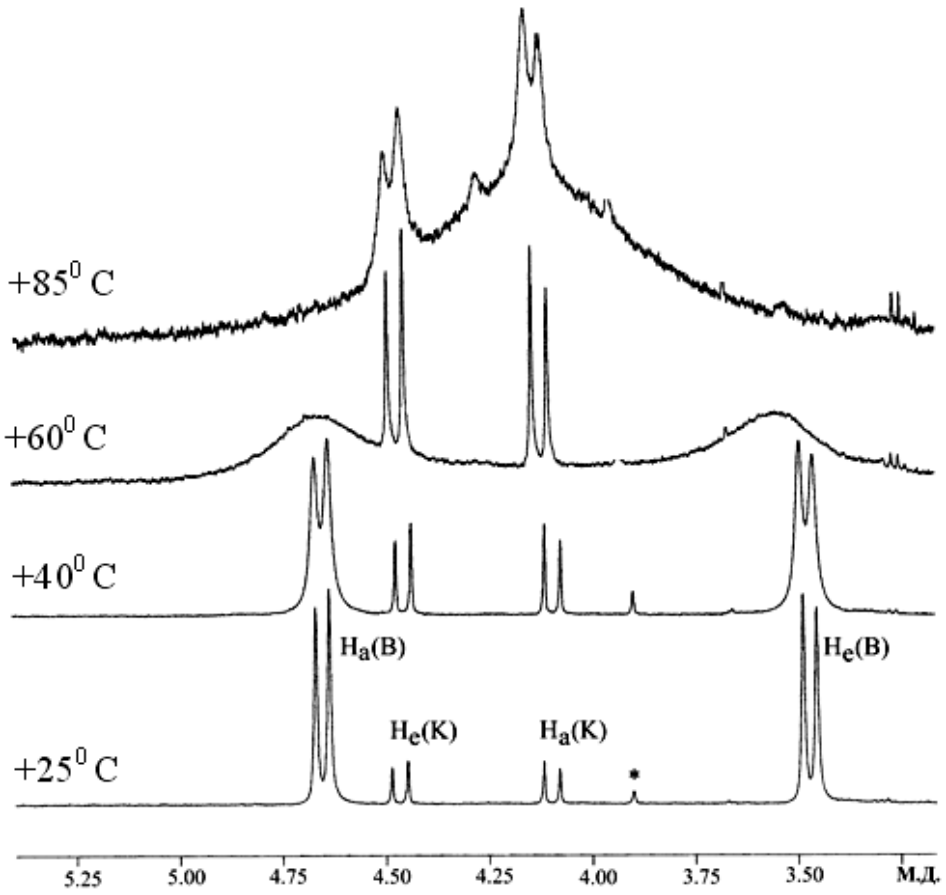


Рис. 5-3. Спектр ЯМР ^{1}H метиленовых протонов (700 Мгц) трисульфид 4H, 8H-нафто [1,8-ef]1,2,3-тритиоцина в $CDCl_3$, записанный при различных температурах раствора.

В общем случае химического обмена между самыми разнообразными спиновыми системами можно получить функцию, описывающую форму линии ЯМР поглощения, которая зависит от нескольких переменных:

$$Y = Y(c_0, \nu_{ri}, T_{2ri}^{*}, J_{ij}^{(r)}, P_r, K_{rs}) \qquad (5\text{-}3)$$

Предполагается, что константы скорости K_{rs} в уравнения (5-3) являются взаимно независимыми.

На рис. 5-4 в качестве примера сложного многопозиционного химического обмена, приведены формы сигналов ЯМР ^{1}H метиленовых протонов, как функции констант скоростей вращения метиленовой группы, которая может находиться в трех различных

химических окружениях. В двух случаях химическое окружение протонов H_A и H_B одинаково, но в результате вращения они обмениваются положениями; третье химическое окружение характеризуется эквивалентностью метиленовых протонов (H_C).

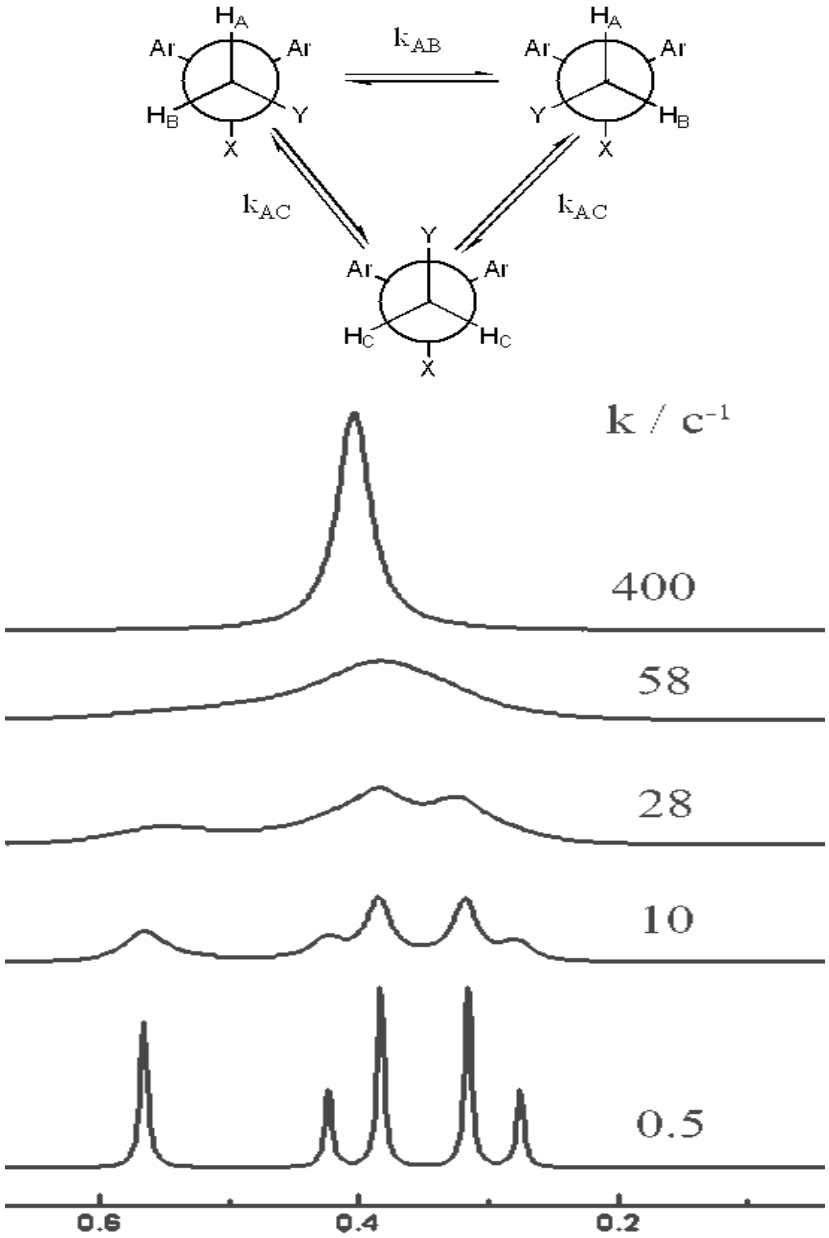


Рис. 5-4. Формы сигналов ЯМР ^{1}H метиленовых протонов, как функция константы скорости вращения метиленовой группы.

Нужно отметить, что динамическая спектроскопия ЯМР позволяет изучать реакции с константами скоростей от 10^{-1} до 10^4 сек$^{-1}$, что соответствует значениям свободной энергии активации ($\Delta G^{\#}$) от 5 до 25 ккал/моль.

5.2. Параметры активации

Энергия активации. Используя уравнение Аррениуса (5-4), можно графически определить энергию активации E_A для изучаемого динамического процесса.

$$K = K_0 \exp(-E_A/RT), \text{ или } \ln K = \ln K_0 - E_A/RT, \qquad (5\text{-}4)$$

где T – температура в Кельвинах (К); K_0 – частотный фактор в единицах K; R – универсальная газовая постоянная = 1.9872 кал/(К·моль); или = 8.3144 Дж/(К·моль).

Так как $\ln K = \ln K_0 - E_A/RT$, то зависимость $\ln K$ от 1/Т будет прямой линией с градиентом E_A/R.

Свободная энергия активации. Из уравнения Эйринга (5-5) можно определить свободную энергию активации

$$K = x\,[(k_b \cdot T)/h]\exp(-\Delta G^{\neq}/RT), \qquad (5\text{-}5)$$

$$\Delta G_C^{\neq} = 4.58\, T_C\,[10.32 + \log(T_C / K_C)] \text{ кал/моль}, \qquad (5\text{-}5a)$$

где k_b – константа Больцмана = $3.299 \cdot 10^{-24}$ кал · Т $^{-1}$;

x – трансмиссионный коэффициент (обычно принимается равным 1);

h – постоянная Планка = $1.5836 \cdot 10^{-34}$ кал · сек.

Для вычисления свободной энергии активации $\Delta G_C^{\neq}$ нужна только одна величина K и одна температура.

Уравнение (5-6) дает соотношение между величинами свободной энергии активации $\Delta G^{\neq}$, энтальпии активации $\Delta H^{\neq}$ и энтропии активации $\Delta S^{\neq}$.

$$\Delta G^{\neq} = \Delta H^{\neq} - T\Delta S^{\neq} \qquad (5\text{-}6)$$

Рассмотрим случай, когда в динамическом равновесии участвуют два изомера I и II, имеющие равные энергии, но неравные доли (χ_I и χ_{II}). Теперь можно вычислить разность ΔG_0 свободных энтальпий двух изомеров:

$$\Delta G_0 = - RT \ln (\chi_I \ / \ \chi_{II}) \qquad (5\text{-}10)$$

5.3. Оценка предельных ошибок

Возможными источниками ошибок являются неточности при измерении следующих параметров:

- частотной разницы $\Delta\nu$;
- констант спин-спинового взаимодействия J;
- ширины линии $\Delta\nu_{1/2}$;
- абсолютной температуры;
- температуры коалесценции.

Реальные параметры, представленные в данном разделе, обсуждаются с учетом следующих ошибок измерения:

K и K_C : 25% (или больше);

$\Delta G^{\neq}$: ± 0.2 ккал/моль или ± 0.8 кДж/моль;

$\Delta H^{\neq}$ и E_A: ± 1 ккал/моль или ± 4.2 кДж/моль;

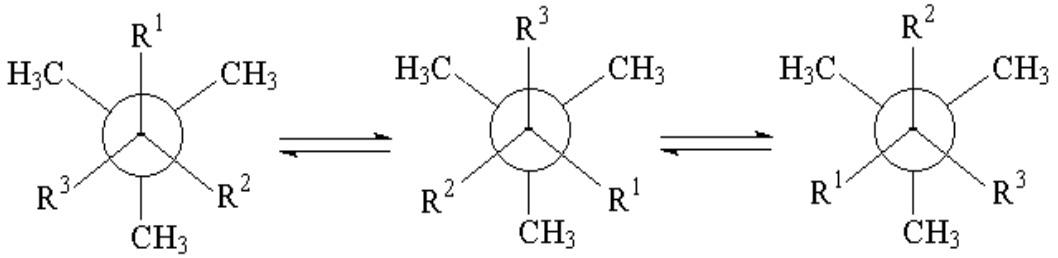
$\Delta S^{\neq}$: ± 2 кал/(моль К) или ± 8.4 Дж/(моль· К).

5.4. Практическое применение динамической спектроскопии ЯМР

Примеры, описанные в данном разделе, раскрывают широкие возможности применения динамической спектроскопии ЯМР для решения сложных задач органической химии.

5.4.1. Вращение вокруг одинарных связей С-С

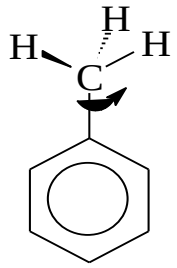
Связи типа $C(sp^3)$-$C(sp^3)$. Типичным примером молекул с вращением вокруг одинарной связи С-С такого рода являются этан и его производные.

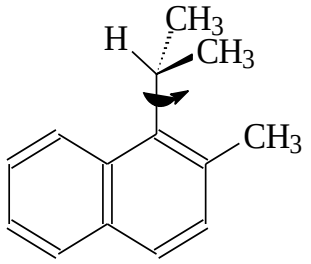


Так, для молекул со стерически объемными заместителями температура коалесценции обычно ниже -50°С.

Связи типа $C(sp^2)$-$C(sp^3)$.

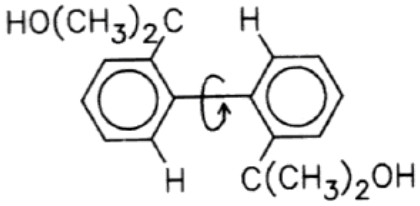
Для метилизопропилнафталина, содержащего объемные группы, удалось измерить барьер вращения. Определены температура слияния сигналов T_c = 228^{0}С и $\Delta G^{\#}_{228}$ = 12.7 ккал/моль.



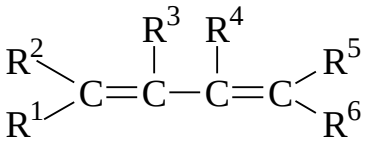


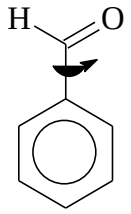
Связи типа $C(sp^2)$-$C(sp^2)$.

Заторможенное вращение вокруг подобной связи наблюдалось в хиральных производных бутадиена (раздел 3.11.3, рис. 3-15), где диастереотопные группы CH_3 показывают в спектре индивидуальные сигналы.



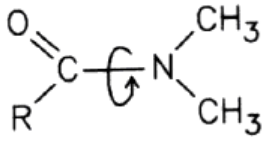
Барьеры вращения для данного типа соединений определяются не только стерическими, но и электронными эффектами заместителя и лежат в пределах $\Delta G^{\#}$ = 15 - 25 ккал/моль. Для незамещенного бензальдегида барьер вращения вокруг подобной связи $\Delta G^{\#}$ = 7.9 ± 2 ккал/моль.





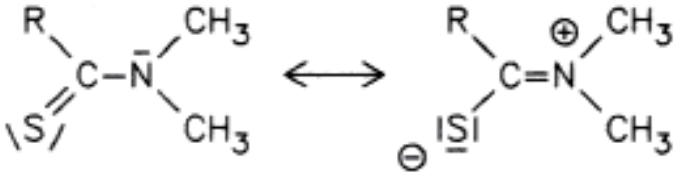
5.4.2. Вращение вокруг частично двойных связей

Вращение вокруг связи C-N в амидах уже рассматривалось, существует много других молекул - производные тиоамидов, енаминов, амидины и аминобораны – все эти соединения проявляют себя в спектрах ЯМР аналогично ДМФА.

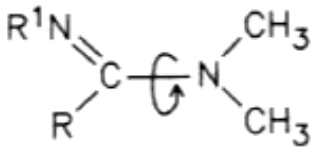


Амиды. Введение заместителя вместо формильного водорода в ДМФА приводит к снижению барьера вращения. Так, для R=C_6H_5 $\Delta G^{\#}_{298}$ = 15.0 ккал/моль, а для R = *t*-C_4H_9 величина $\Delta G^{\#}_{298}$ уменьшается до 12.2 ккал/моль.

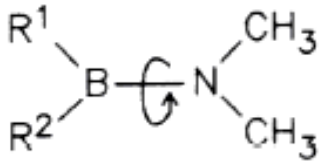
Тиоамиды. В тиоамидах значения $\Delta G^{\#}$ на 2 – 4 ккал/моль выше, чем в амидах с теми же заместителями, что объясняют вкладом диполярных форм, в которых перекрывание 2*p*- и 3*p*-орбиталей менее эффективно, чем 2*p*-2*p* в амидах.



Амидины. В амидинах барьер вращения вокруг связи C-N$(CH_3)_2$ намного меньше, чем в амидах (12-14 ккал/моль), что объясняется уменьшением мезомерной стабилизации основного состояния.

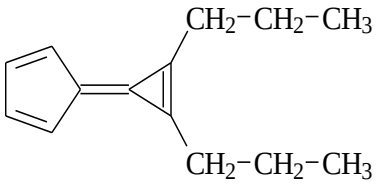


Амидобораны. Здесь связь N-B имеет высокую степень двойственного характера. Величины $\Delta G^{\#}$ ~ 12-23 ккал/моль (60-100 кДж/моль) существенно больше, чем в амидах.



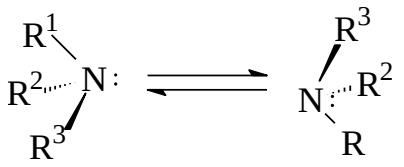
5.4.3. Вращение вокруг двойных связей C=C

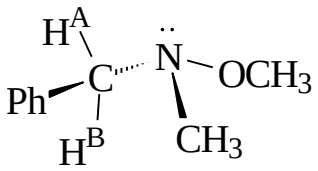
Обычно вращение вокруг связи C=C обнаружить не удается, т.к. барьер вращения слишком высок. В соединении, приведенном ниже, величина вращения вокруг двойной связи $\Delta G^{\#}$ = 18 ккал/моль.



5.5. Инверсия атомов азота и фосфора

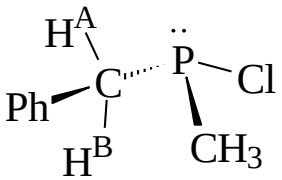
Амины.





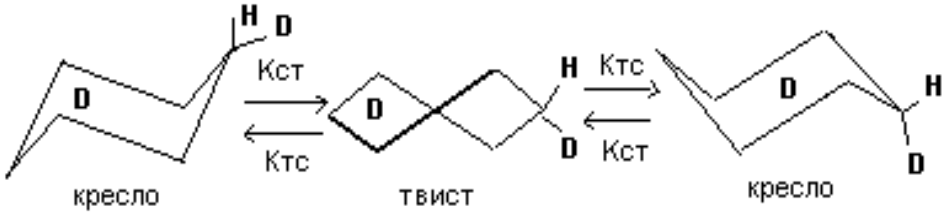
Азотные соединения с тремя заместителями имеют пирамидальную структуру связей; барьер инверсии пирамиды связей в этом случае равен $\Delta G^{\#}_{257} = 12.7 \pm 0.2$ ккал/моль.

Фосфины. Инверсия трехвалентного фосфора гораздо более медленная, чем для азота. Если ввести в молекулу атом хлора, то спектр ЯМР при высоких температурах указывает на инверсию (инверсия Вальдена).

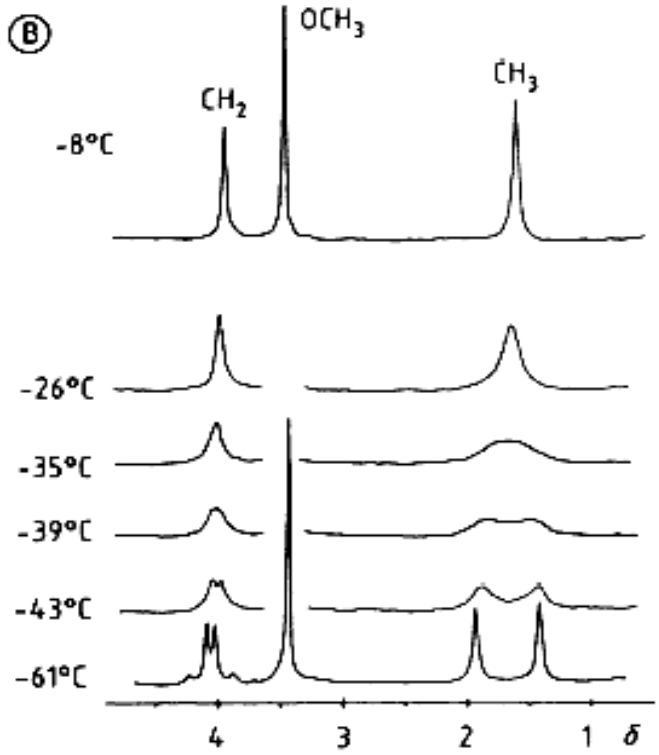


5.6. Инверсия циклов

Одним из первых исследований - исследование конформационных превращений в циклогексане.



На рис. 5-5 приведены спектры ЯМР ^{1}H диметоксибензо-2,4-детиепина, снятые при различных температурах растворов.



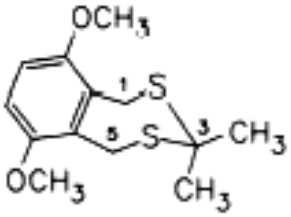
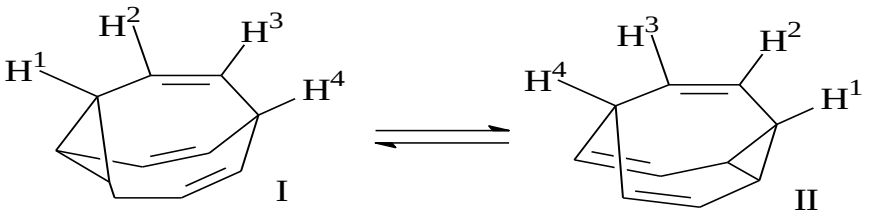


Рисунок 5-5.

Наблюдаемые спектры позволяют из трёх теоретически возможных конформаций: “кресло”, “ванна” и “твист-ванна”, сразу же исключить конформацию "твист-ванна", поскольку ее симметрия (C_2) предполагает эквивалентность CH_3–групп.

5.7. Валентная таутомерия



Классический пример валентной таутомерии это процесс, протекающий в бульвалене. В спектре ЯМР ^{1}H при +120^0 С наблюдается один узкий сигнал с δ = 4.5 м.д. При охлаждении раствора до -60^0 С образуется 2 мультиплета: первый при $\delta \approx 2$ м.д. с относительной интенсивностью 4, второй - при $\delta \approx 5.6$ м.д. с относительной интенсивностью 6.

6. ЭКСПЕРИМЕНТЫ ДВОЙНОГО РЕЗОНАНСА

Для большинства пользователей метода спектроскопии ЯМР эксперимент двойного резонанса есть синоним упрощения спектров ЯМР за счет подавления спин-спинового взаимодействия с другими ядрами.

Гомоядерная "развязка", которая используется в основном в спектроскопии ЯМР ^{1}H для подавления спин-спинового взаимодействия между протонами.

Гетероядерная "развязка", используемая, главным образом, в спектроскопии ЯМР ^{13}C для подавления спин-спинового взаимодействия между протонами и ядрами ^{13}C, на которых ведется наблюдение сигналов.

Эксперименты по двойному резонансу широко используются также:

а) для определения схем энергетических уровней и знаков КССВ;

б) в методе "переноса селективной поляризации", используемом в одномерной спектроскопии ЯМР (1D-NMR) с применением последовательностей импульсов;

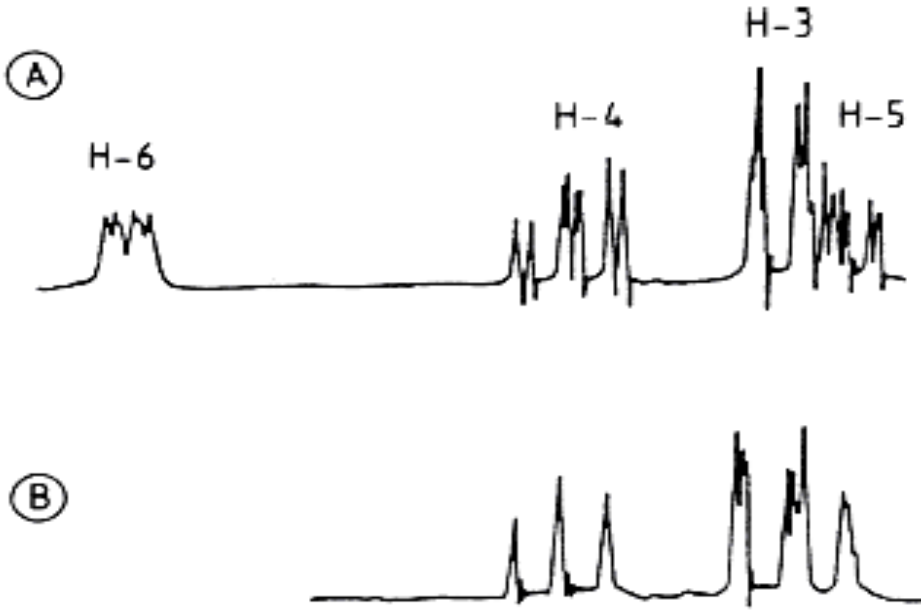
в) для увеличения интенсивности сигналов вследствие ядерного эффекта Оверхаузера;

г) в "динамическом ЯМР" для измерения констант скоростей обменных процессов с использованием подхода "переноса насыщения".

6.1. "Развязывание спина" в спектроскопии ЯМР ^{1}H

Поскольку спин-спиновое взаимодействие (ССВ) приводит к расщеплению сигнала только тогда, когда ядра сохраняют ориентацию спинов в поле B_0 на период времени, более длинный, чем $\tau_1 = 1/J$ то в экспериментах двойного резонанса τ_1 уменьшают одновременным облучением на частоте ν_2, точно равной резонансной частоте ядра, с которым нужно "развязать" интересующие нас ядра - метод "щекотания спинов" (spin tickling).

На рисунке 6-1. спектр ЯМР ^{1}H (100 МГц) 2-хлорпиридина. А) - нормальный спектр, записанный в CW режиме; В) - спектр, в условиях развязки спин-спинового взаимодействия с протоном H^6.



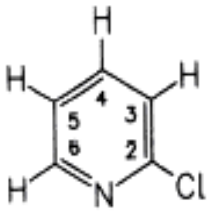


Рисунок 6-1.

6.2. Подавление сигнала растворителя

Применение воды (даже D_2O) приводит к существенному перекрыванию сигнала H_2O или HDO (δ = 4 – 5 м.д.) с интересующими нас сигналами растворенного вещества. Поскольку время продольной релаксации воды T_1 равно 3 сек (для протонов в органических молекулах оно порядка 1 сек), то для подавления сигналов H_2O и HDO нужно использовать ту же последовательность импульсов, что и для измерения самого времени спин-решеточной релаксации T_1, а именно, $(180^0_{x'} - \tau - 90^0_{x'} - ССИ)_n$.

6.3. "Развязывание спинов" в спектроскопии ЯМР ^{13}C

Спектры ЯМР ^{13}C сложны из-за спин-спинового взаимодействия ядер углерода с протонами, что сильно затрудняет анализ спектров.

При подавлении спин-спинового взаимодействия с протонами спектр упрощается, т.е. мультиплеты становятся синглетами, если только в молекуле нет «других» ядер, например, фтора, фосфора.

"Развязка" от протонов реализуется с использованием генератора (“декаплер”), обеспечивающего широкую полосу частот во всем диапазоне спектра ЯМР ^1H.

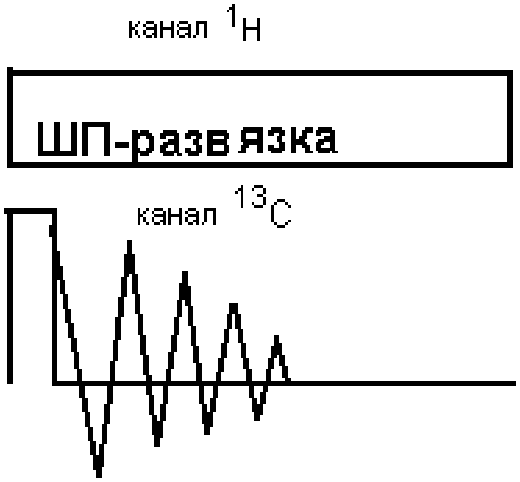


Рисунок 6-2.

На рис. 6-3 показан спектр ЯМР ^{13}C (22.63 МГц) кротоновой кислоты CH_3 –CH=CH-COOH в $CDCl_3$. А) – без развязки от протонов (с константами ^{13}C-^{1}H); В) – с широкополосной (полной) развязкой от протонов.

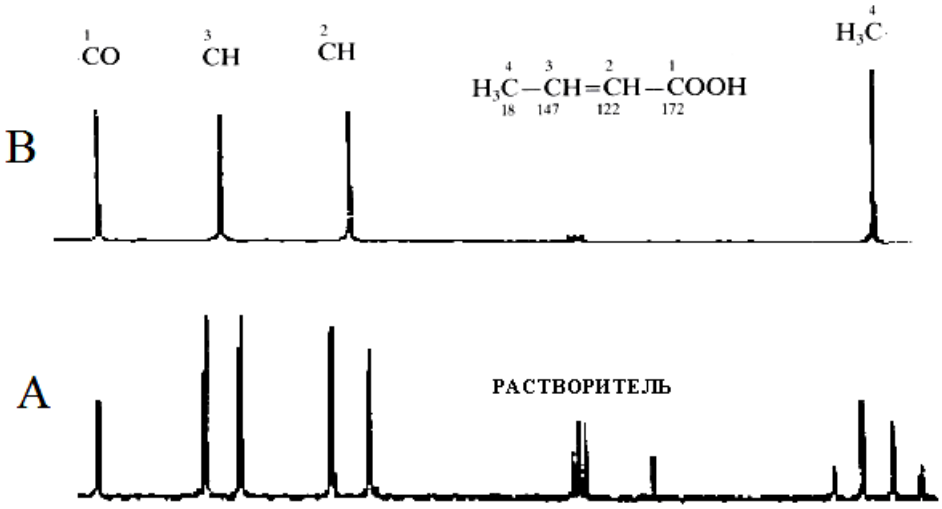
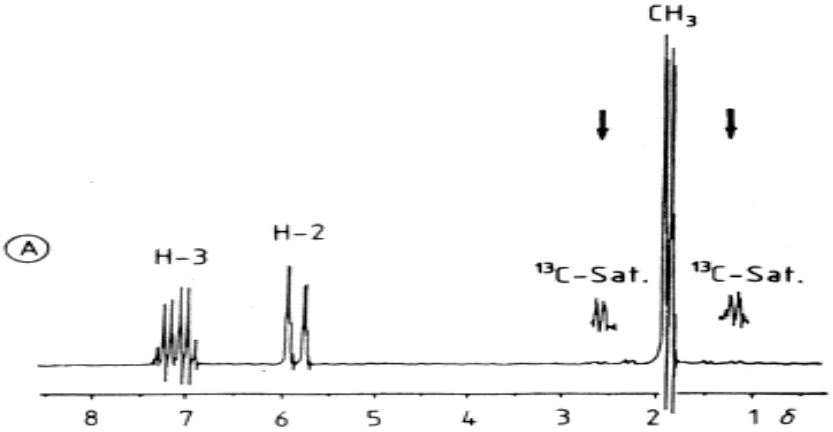


Рисунок 6-3.

6.4. Частичная развязка от протонов."^{1}H - off-resonance"

При анализе спектров ЯМР ^{13}C в условиях полной развязки от протонов часто возникают трудности при отнесении сигналов, поскольку остается только один спектральный параметр – химический сдвиг. Для получения информации о числе атомов водорода был развит метод, в котором используется меньшая мощность "декаплера". На рис. 6-5. спектры ЯМР ^{13}C CH_3–CH=CH-COOH в $CDCl_3$: B) – без C-H - "развязки"; C) – селективная "развязка" от CH_3-протонов; D) – "^{1}H-off-resonance" с приложением ν_2 в область δ= 8 м.д.; E) – "^{1}H-off-resonance" с ν_2 в области δ= 1 м.д.



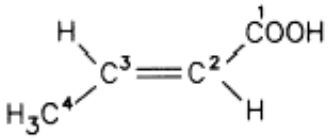


Рисунок 6-4.

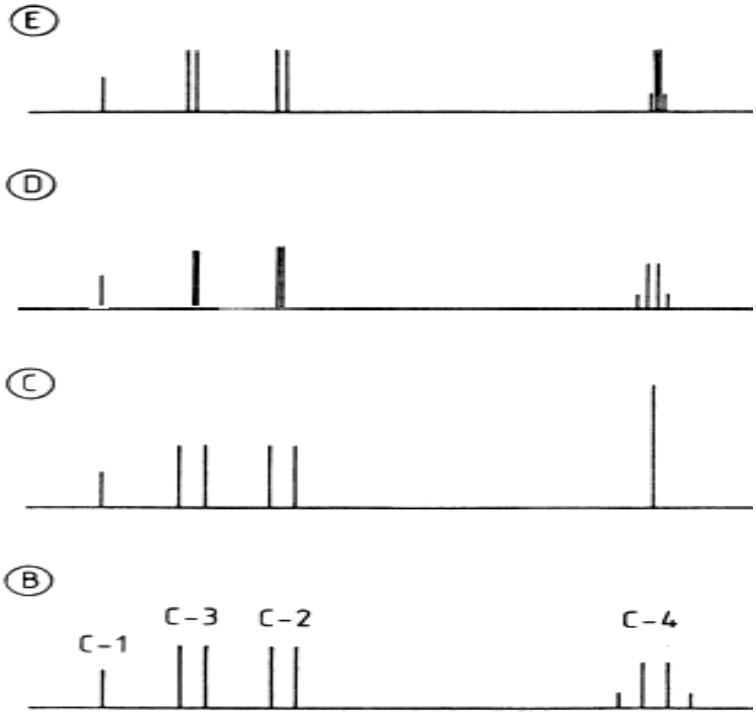


Рисунок 6-5.

6.5. "Развязка с выключением" (Gated Decoupling)

Для сохранения информации о числе протонов ^{1}H, связанных с ядром ^{13}C, и, с другой стороны, увеличения интенсивности сигналов ЯМР ^{13}C за счет ядерного эффекта Оверхаузера разработана методика, в которой "декаплер" на время импульса для возбуждения спектра и снятия информации по каналу ^{13}C выключается. При выключении "декаплера" сразу же восстанавливается спин-спиновое взаимодействие с протонами, но заселенности уровней к своим равновесным значениям возвращаются очень медленно, что контролируется временем продольной релаксации T_1, которое обычно больше, чем время, необходимое для снятия информации (рис. 6-6).

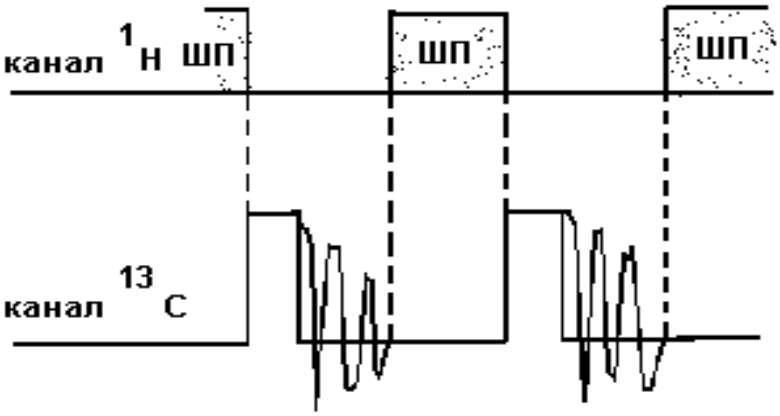


Рисунок 6-6.

6.6. "Обратная развязка с выключением" (Inverse Gated Decoupling)

Эта развязка разработана для получения спектров ЯМР ^{13}C с корректными интенсивностями сигналов. В этой методике "декаплер" включается только на период импульса возбуждения ^{13}C и снятия информации (рис. 6.7).

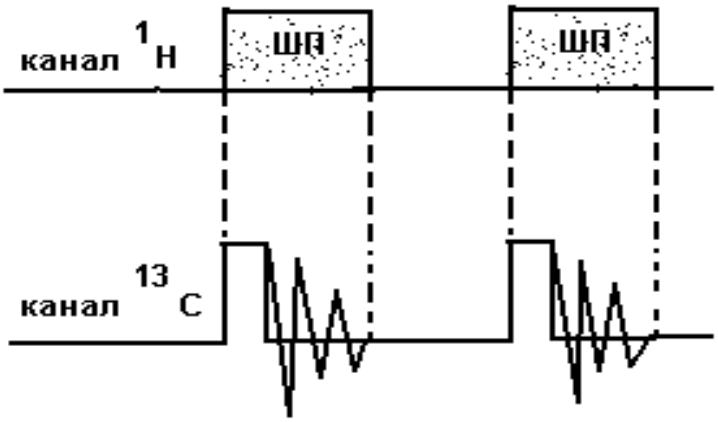


Рисунок 6-7.

6.7. Ядерный эффект Оверхаузера

Для понимания физических основ ЯЭО рассмотрим сначала систему энергетических уровней двухспиновой системы АХ (рис. 6-8) в предположении, что J_{AX}=О, то есть ядра А и Х проявляются в спектре ЯМР в виде синглетов.

Переходы между уровнями 1 и 3, 2 и 4 принадежат ядру А, а между уровнями 1 и 2, 3 и 4 - ядру Х. Например, если облучается переход (выравнивание заселенностей) $N_1 - N_3$ ядра А, то с учетом некоторого избытка ядер Δ на нижнем уровне N_1 новые заселенности уровней будут: $\alpha\alpha - \frac{1}{2}\Delta$ и $\beta\alpha + \frac{1}{2}\Delta$.

За счет этого перераспределения заселенностей ранее неразрешенные нуль- (W_0 или $\alpha\beta - \beta\alpha$, суммарный спин равен нулю) и двух - квантовые (W_2 или $\alpha\alpha - \beta\beta$, суммарный спин равен двум) переходы становятся разрешенными, т.к. на уровне N_3 имеется некоторый избыток ядер, а на уровне N_1 такой же дефицит ядер.

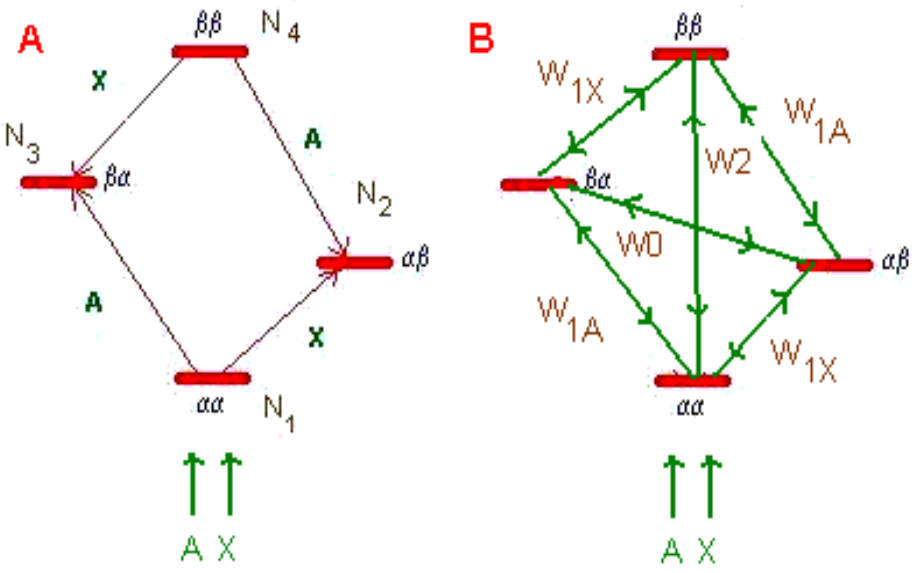
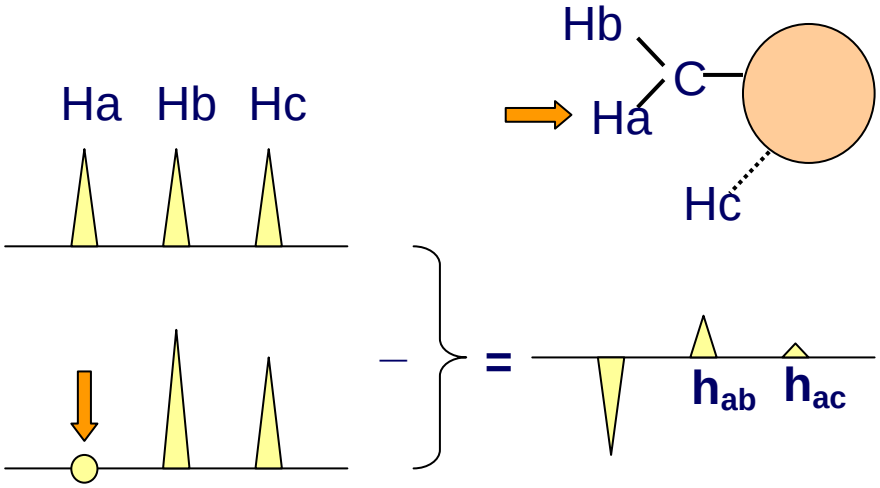
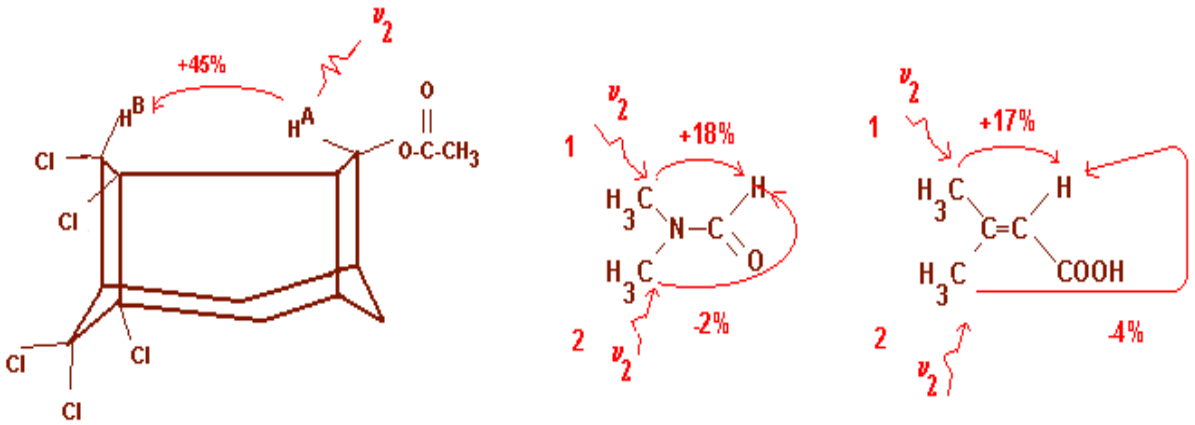


Рисунок 6-8.



ЯЭО при "насыщении" перехода одного из ядер приводит к изменению заселенностей уровней, и система пытается восстановить равновесие за счет спин-решеточной релаксации, имеющей *диполь-дипольный* механизм.

Рассмотрим примеры ЯЭО для гомоядерных систем, в данном случае для протонных систем, не имеющих спин-спинового взаимодействия между ядрами (рис. 6-9).



A B C

Рисунок 6-9.

Необходимо отметить, что релаксационный переход W_2 доминирует в случае малых молекул с короткими временами корреляции τ_c, в результате чего и наблюдается *положительный ЯЭО*. Для

макромолекул с длинными временами τ_c наибольший вклад дает релаксационный переход W_0, что и определяет наблюдение *отрицательного ЯЭО*.

6.8. Факторы увеличения интенсивностей сигналов ЯМР

В предположении, что ядра претерпевают быструю реориентацию (короткое время корреляции τ_c) и что их релаксация происходит исключительно по диполярному механизму, теория дает дробное увеличение интенсивности сигнала η, как показано в уравнении (6-1):

$$\eta = \gamma_a / 2\,\gamma_x\,, \qquad (6\text{-}1)$$

т.е. "насыщается" переход А, наблюдается переход Х.

Итоговая интенсивность сигнала определяется выражением (6-2):

$$I = (1 + \eta)\, I_0 \qquad (6\text{-}2)$$

где I_0 –первоначальная интенсивность до облучения перехода.

Рассмотрим несколько примеров.

а) Определим величину η для сигналов ЯМР ^{13}C в условиях широкополосной развязки от протонов, зная, что γ (^{1}H) ≈ 4 γ (^{13}C). Следовательно, $\eta \approx 2$, т.е. интенсивность сигналов ЯМР ^{13}C возрастет от 1 до 3 или на 200%.

б) При наблюдении сигналов ЯМР ^{1}H в условиях "насыщения" на резонансной частоте ядра ^{13}C (такой эксперимент на ядре ^{13}C можно осуществить практически только на обогащенном образце) мы получим (при 100% обогащении) $\eta \approx 0.125$, т.е. интенсивность сигнала возрастёт лишь на 12,5%.

7. ДВУМЕРНАЯ (2D) СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР

Идея применения двумерного (2D) преобразования Фурье в спектроскопии ЯМР впервые была предложена Джинером в 1971 г. Бурное развитие этого метода началось после опубликования в 1976 г. работы Эрнста и сотрудников, в которой было проведено теоретическое описание двумерных ЯМР экспериментов с преобразованием Фурье.

7.1. Гетероядерная 2D-J,δ-спектроскопия ЯМР ^{13}C

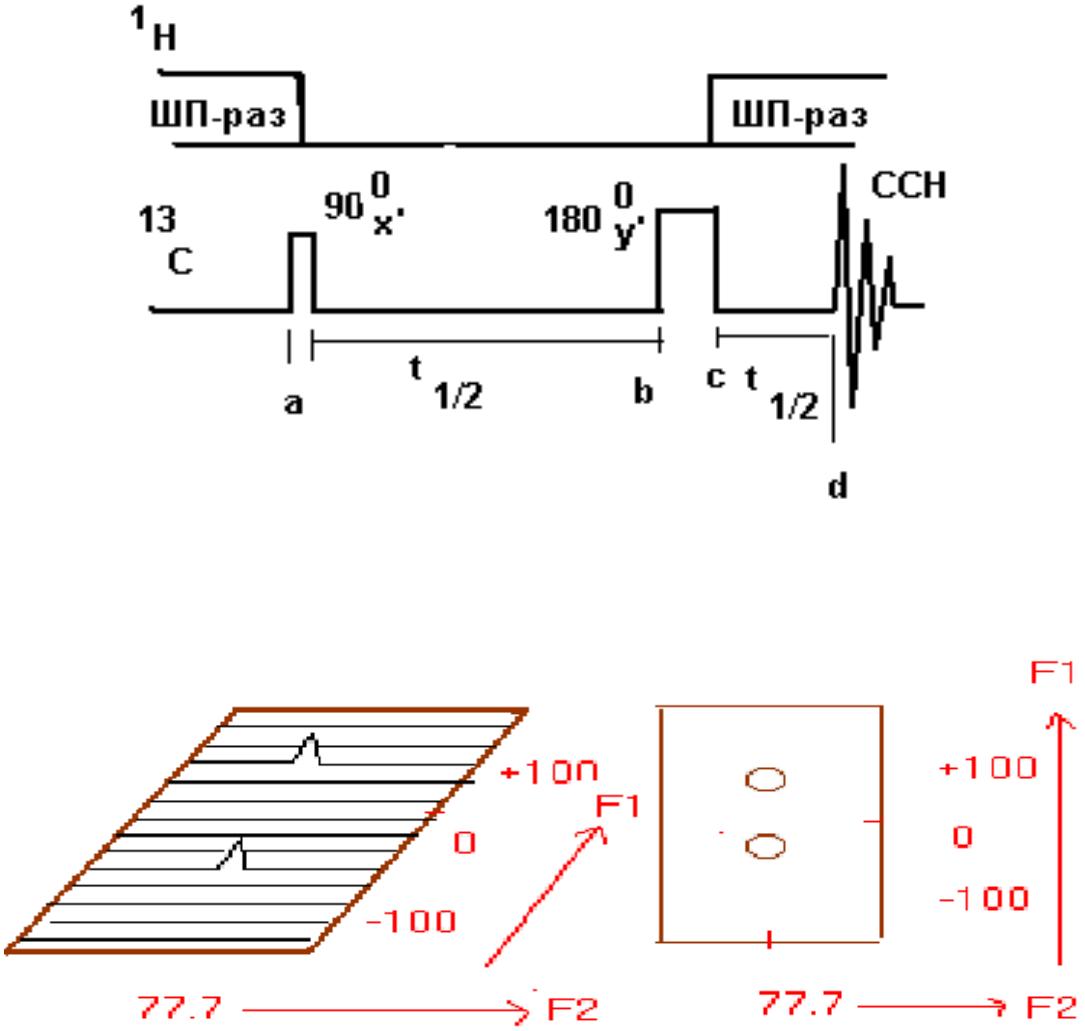


Рисунок 7-1. Последовательность импульсов для гетероядерной 2D-J,δ-спектроскопии ЯМР ^{13}C $^{13}CHCl_3$. (Два способа представления двумерного спектра: “поленичный” и “контурный”.)

Рассмотрим применение этой методики на примере $^{13}CHCl_3$. После $90^0{}_{x'}$ импульса (a) в середине фазы "эволюция и смешение" присутствует $180^0{}_{y'}$ (b-c) импульс и включена широкополосная развязка во второй половине этой фазы. Второе Фурье-преобразование относительно t_1 дает дублет вдоль направления оси F_1 с расщеплением J(C,H)/2, так как система претерпевала "эволюцию" не t_1, а $t_{1/2}$. Пример гетероядерного 2D-J,δ-спектра ЯМР ^{13}C хлороформа ($^{13}CHCl_3$) приведен на рис. 7-1.

7.2. Гомоядерная (^{1}H, ^{1}H) 2D -корреляционная спектроскопия (COSY) ЯМР

Рассмотрим импульсную последовательность двумерной гомоядерной H,H-корреляционной спектроскопии (COSY) (рис. 7-2.) и ее воздействие на макроскопическую ядерную намагниченность $\boldsymbol{M_0}$, создаваемую системой протонов, входящих в состав соединения (протоны хлороформа $CHCl_3$) (рис. 7-3.).

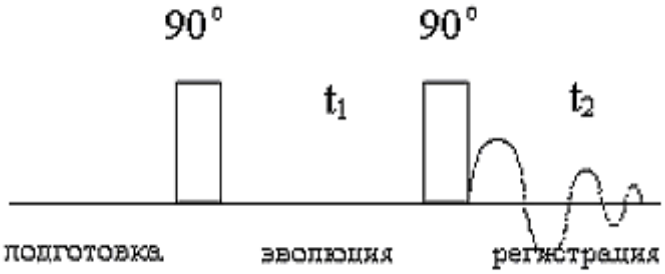


Рисунок 7-2. Импульсная последовательность двумерной гомоядерной корреляционной спектроскопии COSY.

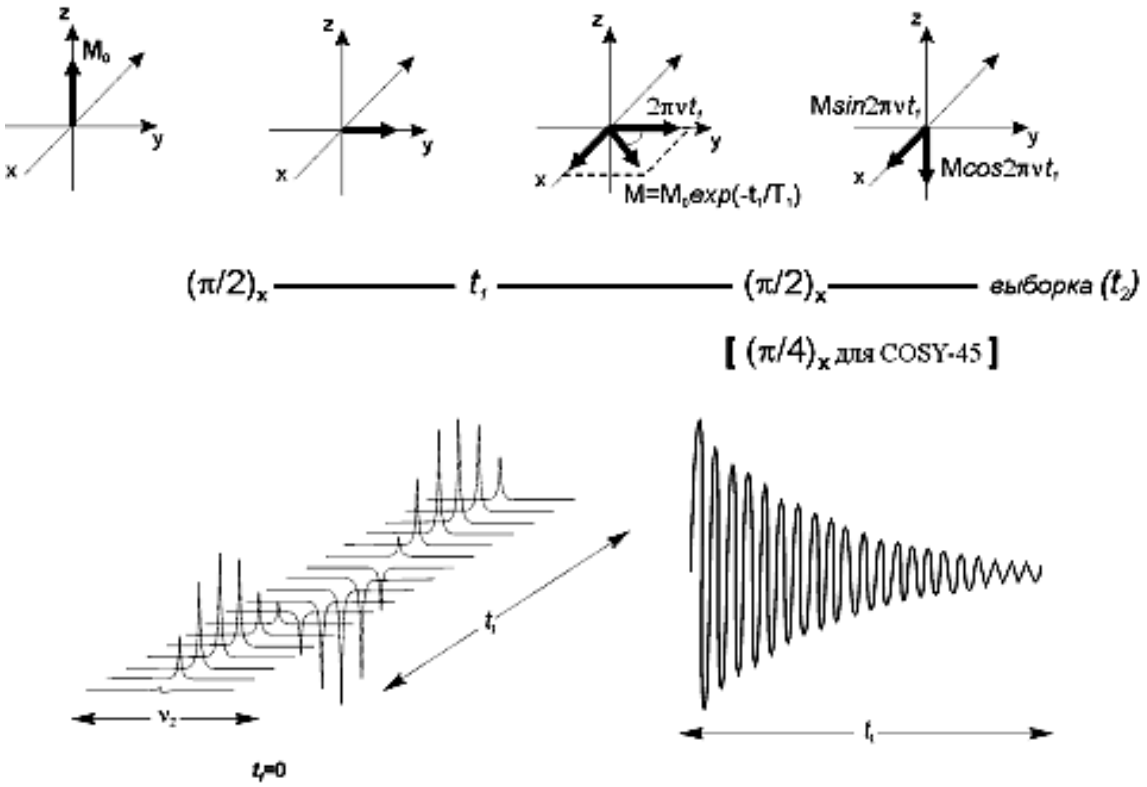


Рисунок 7-3.

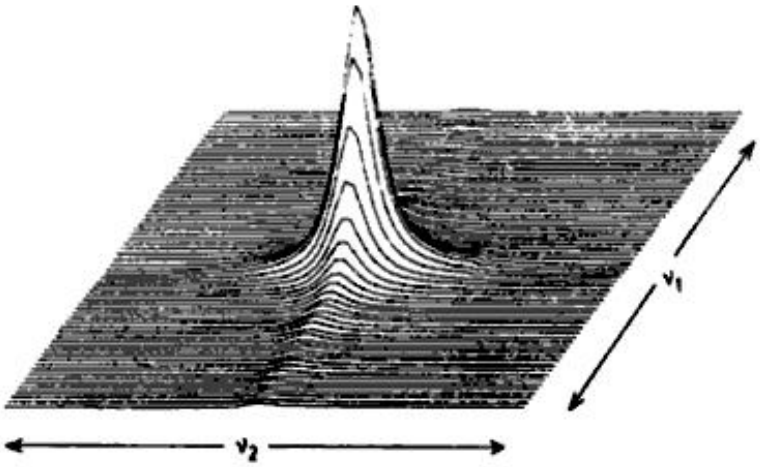


Рисунок 7-4.

Проанализируем действие импульсной последовательности COSY на двухспиновую AX-систему, где A и X - это протоны с константой взаимодействия *J*(A,X). После Фурье-преобразования относительно времен t_2 и t_2 дают четыре линии в спектре типа AX с частотами:

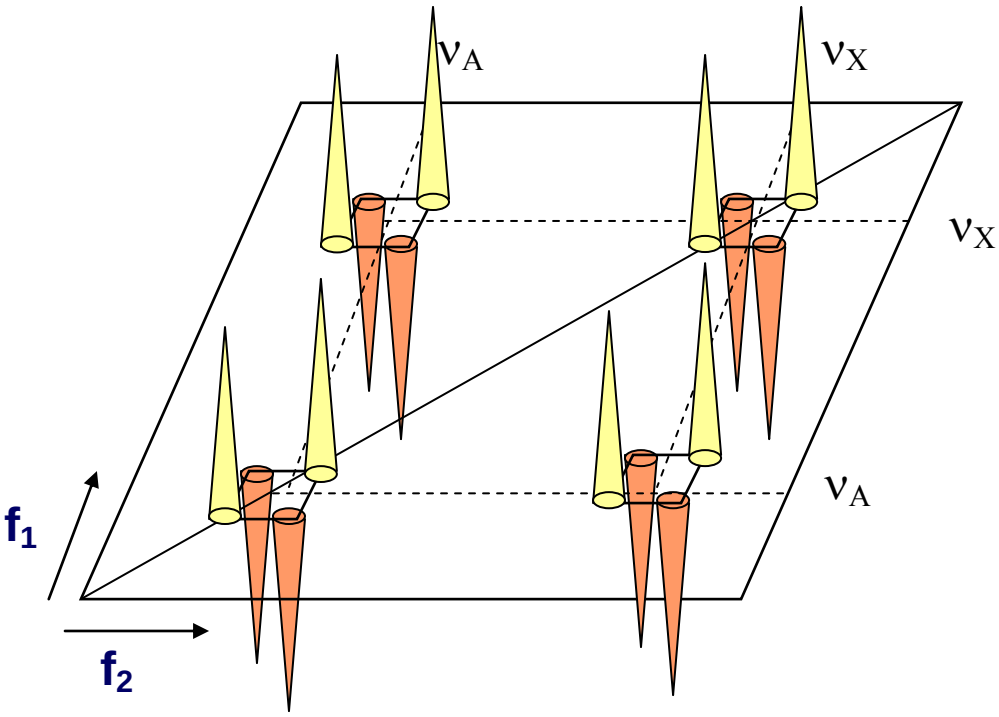


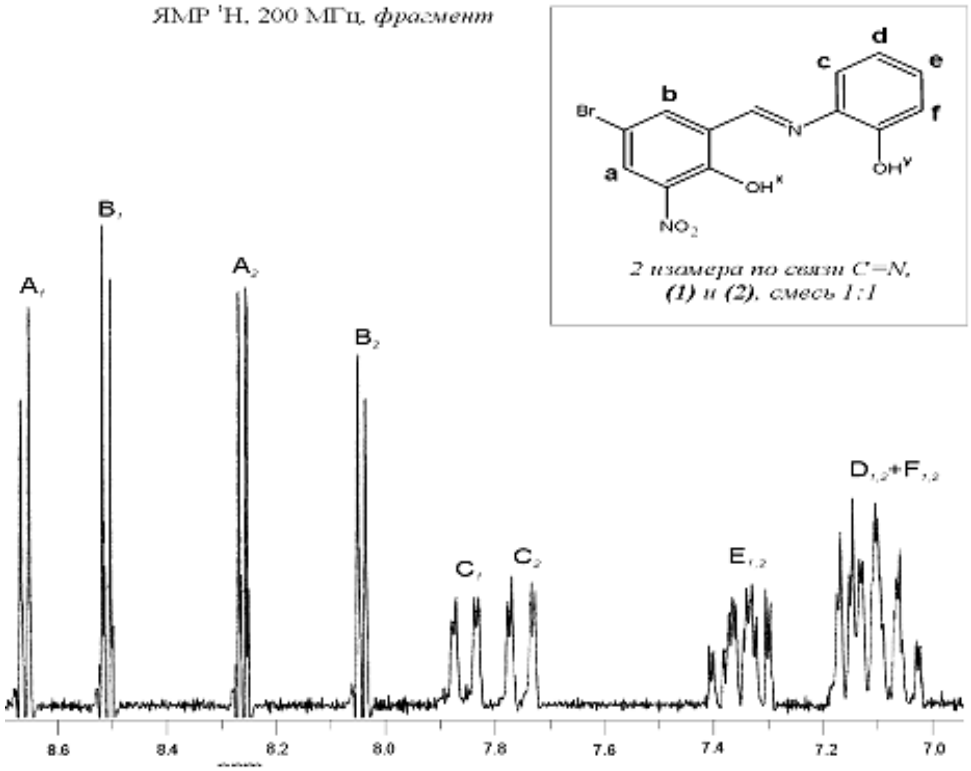
Рисунок 7-5. Ожидаемый двумерный гомоядерный H,H-корреляционной спектр COSY спиновой системы AX

$$\nu_A + \frac{1}{2}J(A,X) \quad (A_1) \qquad \nu_A - \frac{1}{2}J(A,X) \quad (A_2)$$

$$\nu_X + \frac{1}{2}J(A,X) \quad (X_1) \qquad \nu_X - \frac{1}{2}J(A,X) \quad (X_2)$$

Две из этих групп располагаются вокруг позиций (ν_A,ν_A) и (ν_X,ν_X) и называются диагональными пиками, а другие две располагаются вокруг (ν_A, ν_X) и (ν_X,ν_A) и называются кросс-пиками.

Пример:



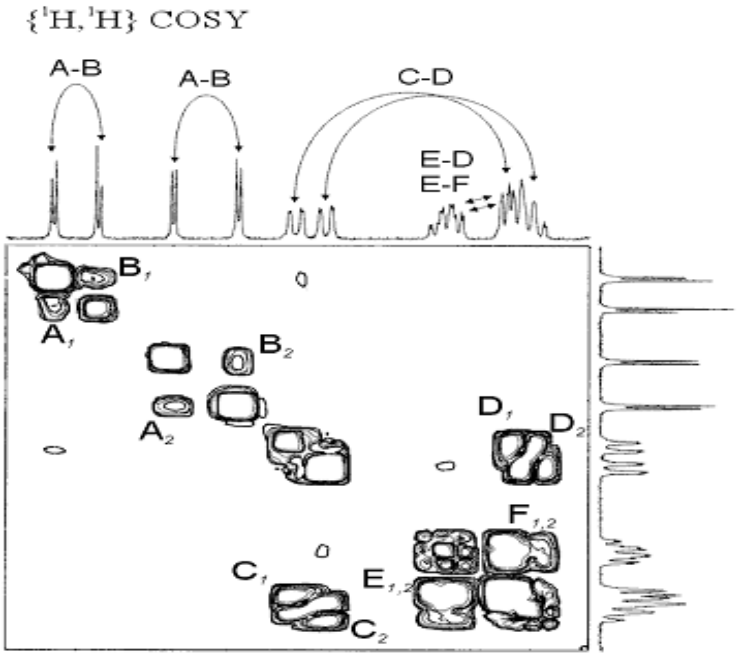


Рисунок 7-6.

7.3. Гетероядерная (^{13}C, ^{1}H) 2D -корреляционная спектроскопия (HETCOR) ЯМР

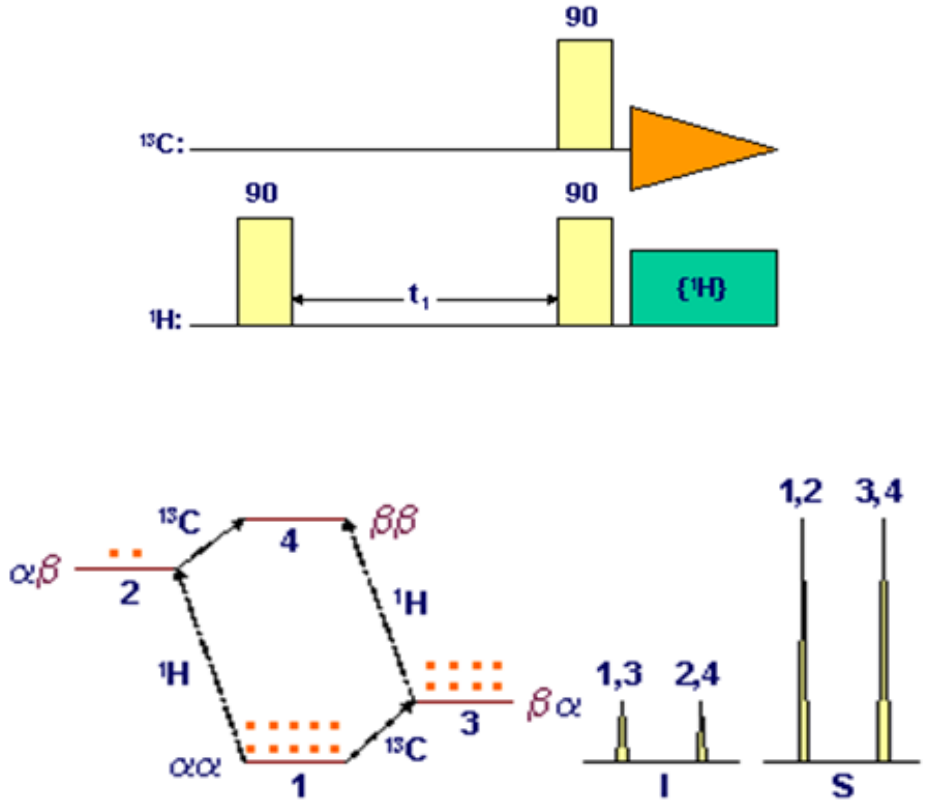


Рисунок 7-7.

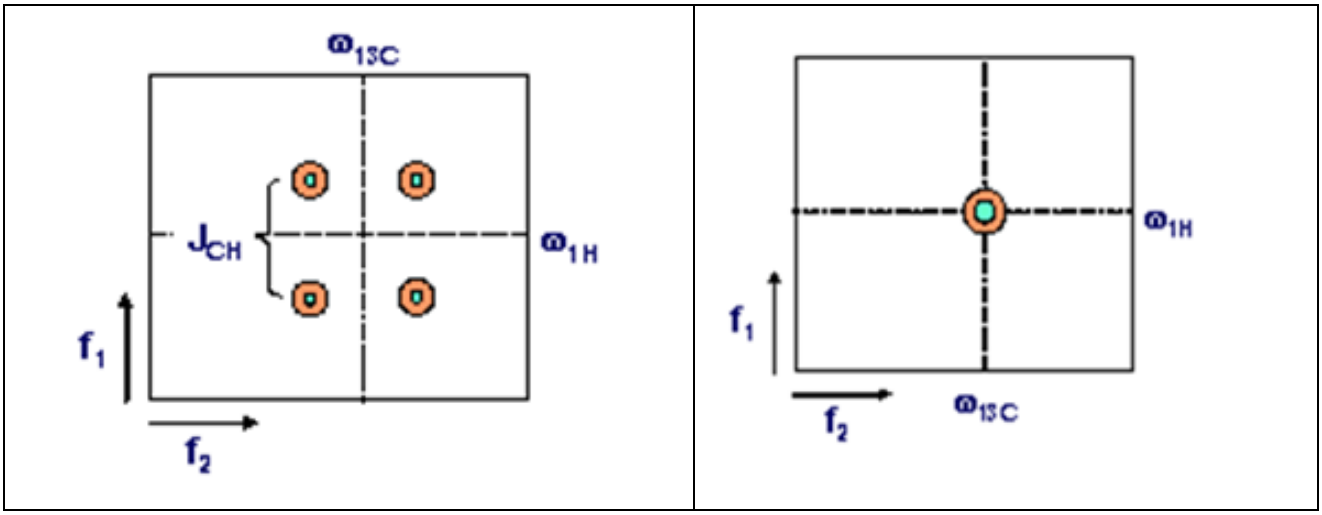


Рисунок 7-8.

Пример:

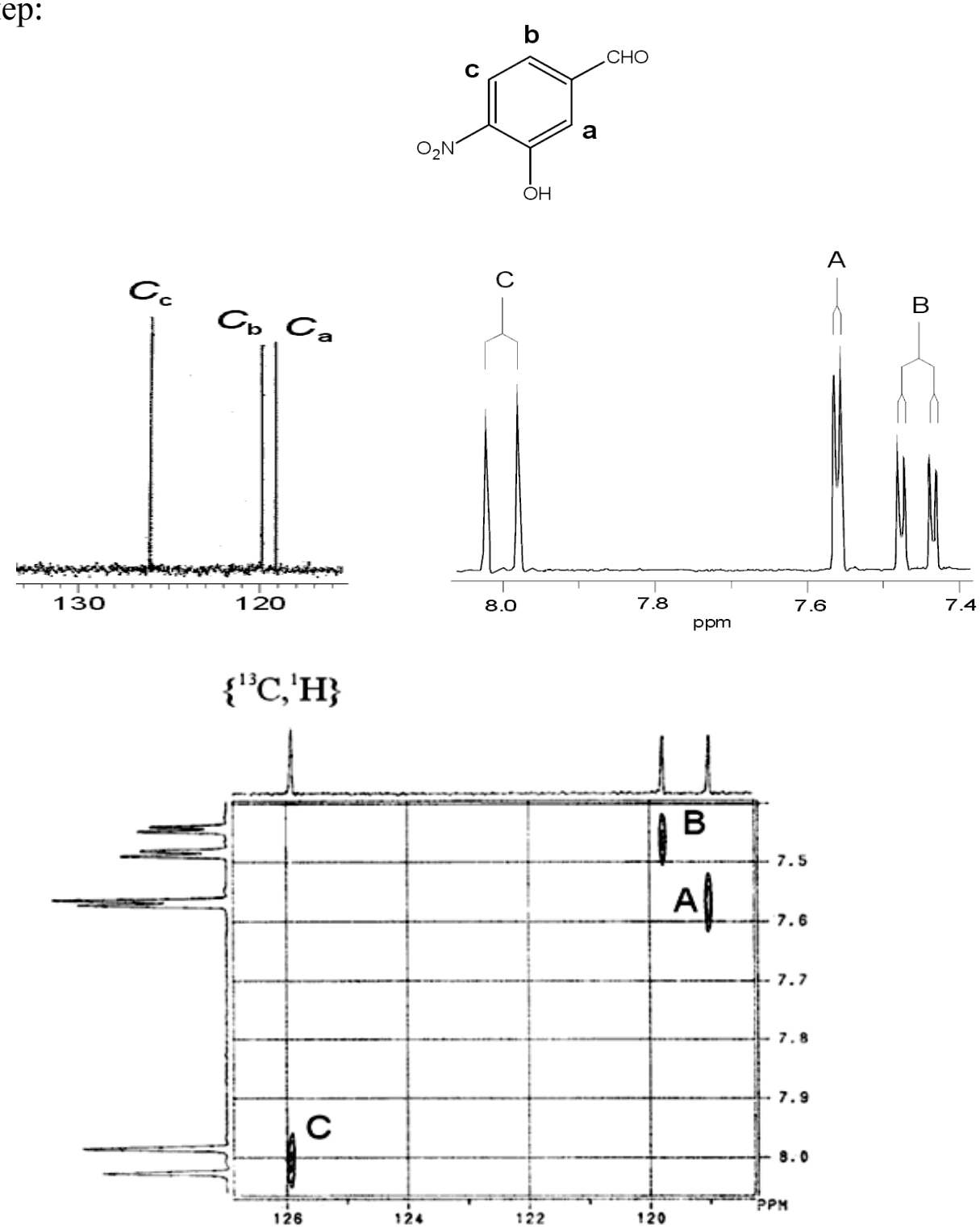


Рисунок 7-9.

Необходимо отметить, что гомоядерная H,H-корреляционная ЯМР спектроскопия COSY, равно как и двумерные гетеро-корреляционные модификации (HETCOR, HSQC и HMBC) используются лишь *для отнесения сигналов* в спектрах ЯМР.

7.4. Двумерная ЯМР (^{1}H, ^{1}H) спектроскопия (NOESY)

Идея использования 2М-спектроскопии для изучения таких процессов как химический обмен, кросс-релаксация и спиновая диффузия была предложена также группой Эрнста. Предложенный алгоритм эксперимента и соответствующая импульсная последовательность (рис. 7-10.) получили название NOESY (Nuclear Overhauser Exchange Spectroscopy- спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера и обмена).

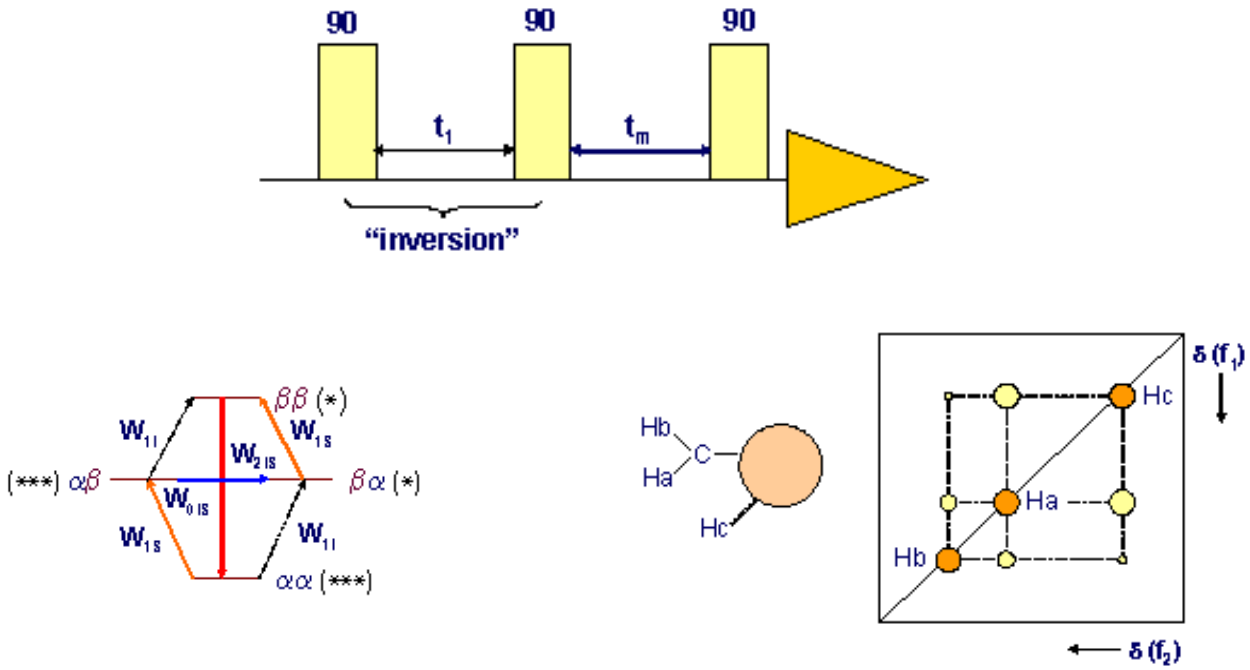


Рисунок 7-10.

На рисунке 7-11 представлен результат воздействия NOESY последовательности на 2-х спиновую систему.

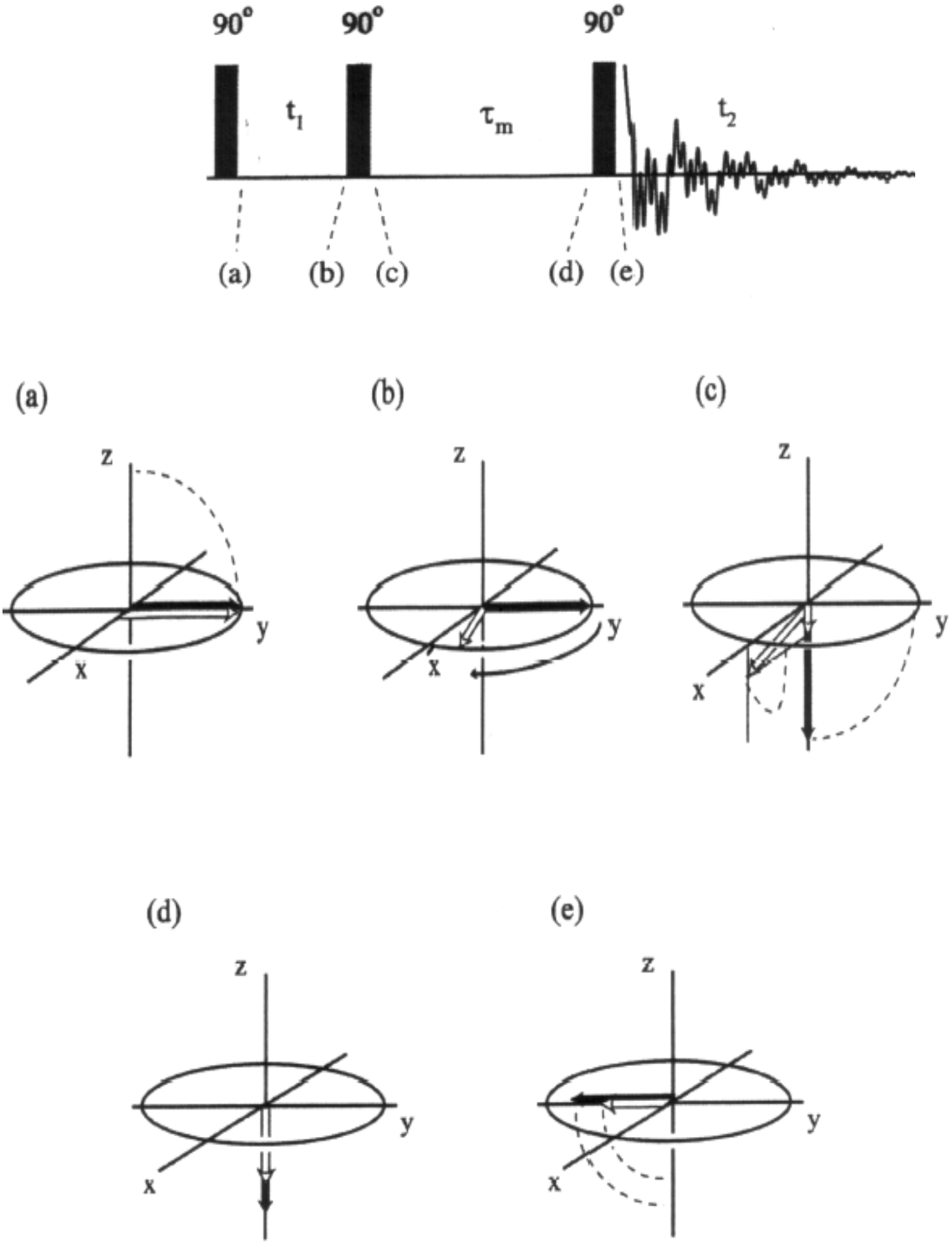
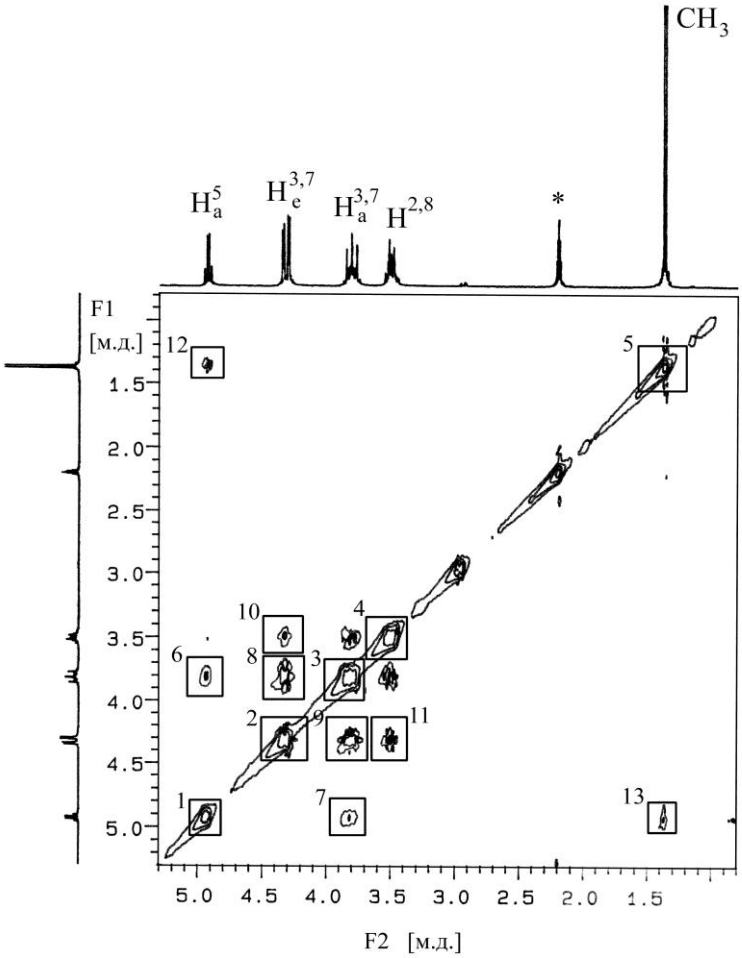
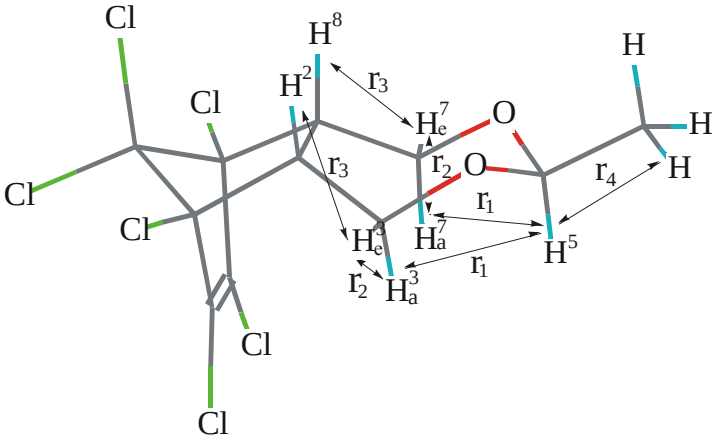


Рисунок 7-11.





C(3)Ha - C(5)Ha = 2.14 Aº

C(3)Ha - C(3)He = 1.78 Aº

C(2)H - C(3)He = 2.43 Aº

Рисунок 7-12. Двумерный NOESY ЯМР спектр соединения, представленного выше и определенные с помощью этого эксперимента некоторые внутримолекулярные расстояния.

8. ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ПРОТЕИНОВ

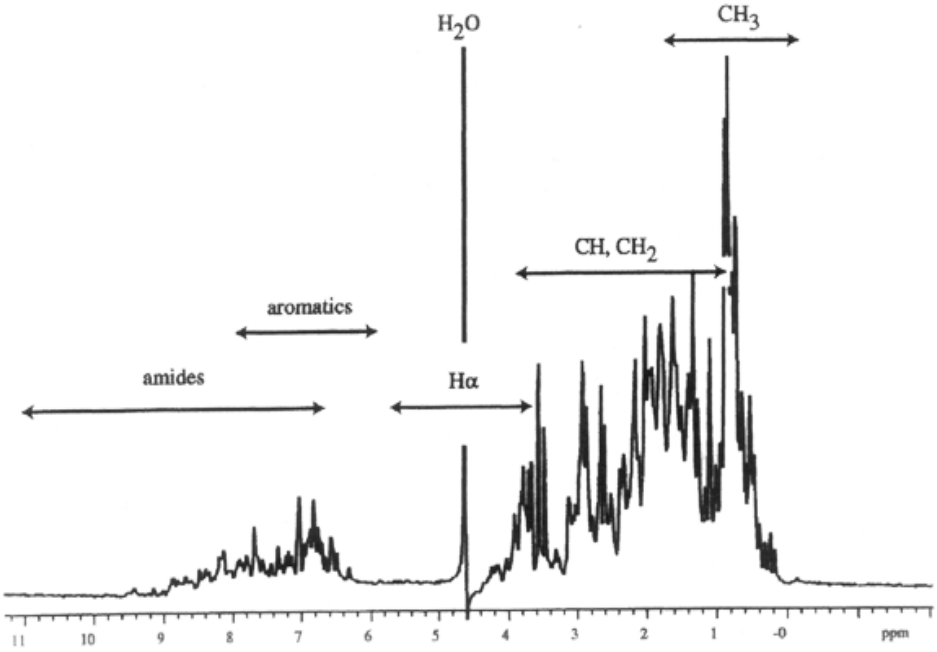
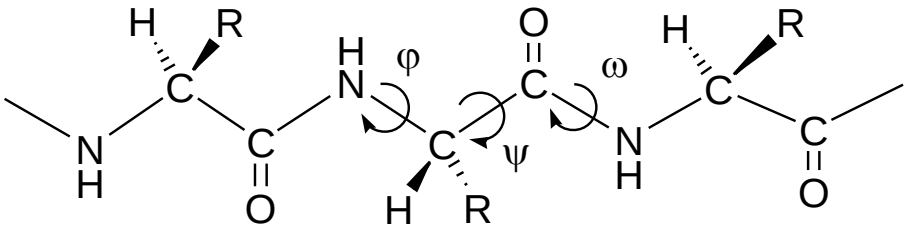
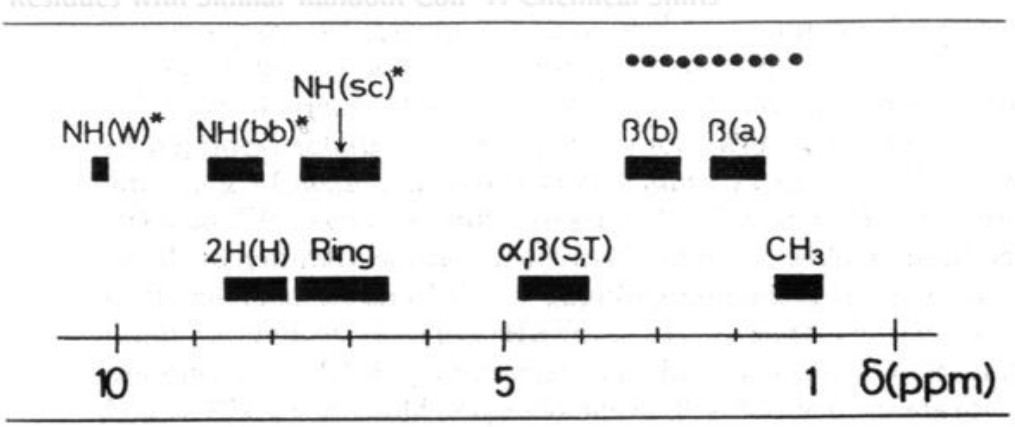


Рисунок 8-1. Типичный ЯМР ^{1}H спектр протеина в растворе D_2O.

8.1. Химические сдвиги ^{1}H в аминокислотных остатках

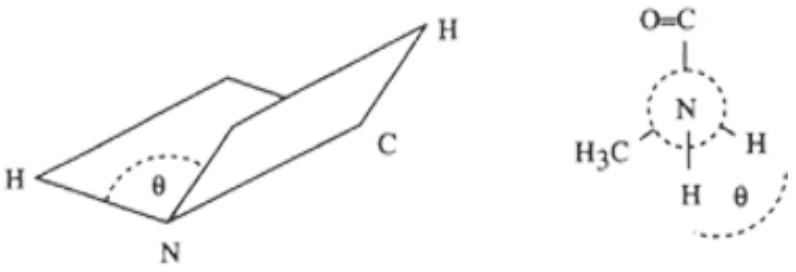




Code	δ (ppm)	Comments
CH_3	0.9-1.4	
β(a)	1.6-2.3	βH of V,I,L,E,Q,M,P,R,K
β(b)	2.7-3.3	βH of C,D,N,F,Y,H,W
••••	1.2-3.3	Other Aliphatic CH
α,β(S,T)	3.9-4.8	All αH, βH of S and T
Ring	6.5-7.7	Aromatic CH of F,Y,W; 4H of H
2H(H)	7.7-8.6	2H of H in the pH range 1-11
NH(sc)*	6.6-7.6	Side Chain NH of N,Q,K,R
NH(bb)*	8.1-8.8	Backbone NH
NH(W)*	10.2	Indole NH of W

8.2. Зависимость *вицинальной константы от двугранного угла* в аминокислотных фрагментах

$$^{3}J_{HNH} = 6.51 \cos^{2}(ø - 60) - 1.76 \cos(ø - 60) + 1.60 \text{ Гц}$$



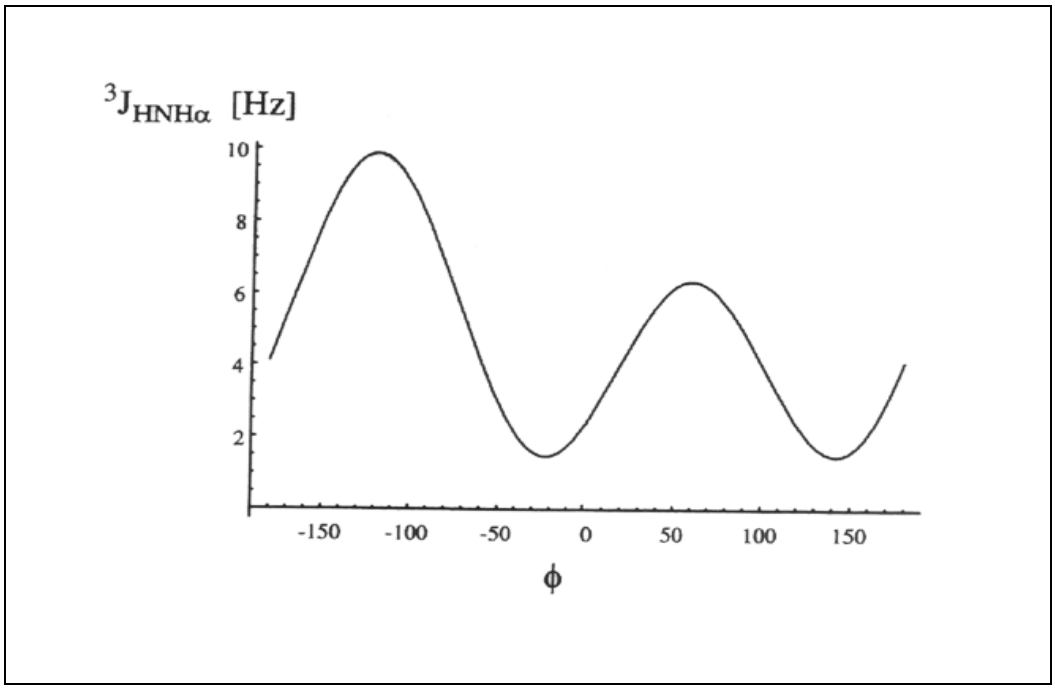


Рисунок 8-2. Зависимость *вицинальной константы от двугранного угла* в аминокислотных фрагментах

8.3. Двумерная ЯМР спектроскопия в исследованиях пространственного строения пептидов

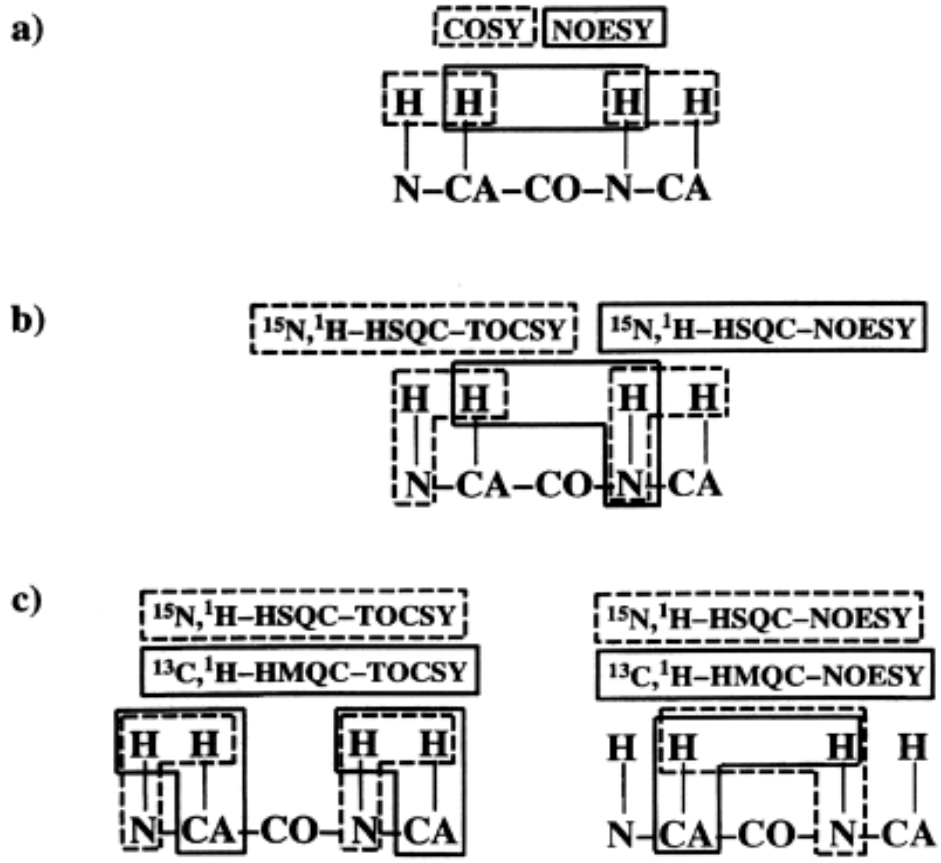


Рисунок 8-3. Приемы описания первичной структуры полипептидов (13C или 15N замещенные) методами 2М ЯМР спектроскопии: a) отнесение основано на знании величин химических сдвигов Hα (i) протонов соответствующих аминокислот; b) дополнительно в третьем измерении идентифицируется гетероядра 15N или c) 13C.

Эксперимент COSY (*Correlation spectroscopy*).

Импульсная последовательность двумерного эксперимента ЯМР COSY приведена на рисунке 7-2:

Из спектра в эксперименте ЯМР COSY можно определить химические сдвиги цепочки спинов, связанных скалярным спин-спиновым взаимодействием. На рисунке 8-4 приведено

схематическое изображение спектра COSY. В спектре присутствуют два вида пиков: *кросс-пики* (светло-серого цвета) и *диагональные пики* (темно-серого цвета). Кросс-пики имеют разные частоты по ω_1 и ω_2. Наличие пика с частотами $\omega_1=\Omega_A$, $\omega_2=\Omega_B$ указывает на взаимодействие спина с химически сдвигом Ω_A и спина с химическим сдвигом Ω_B.

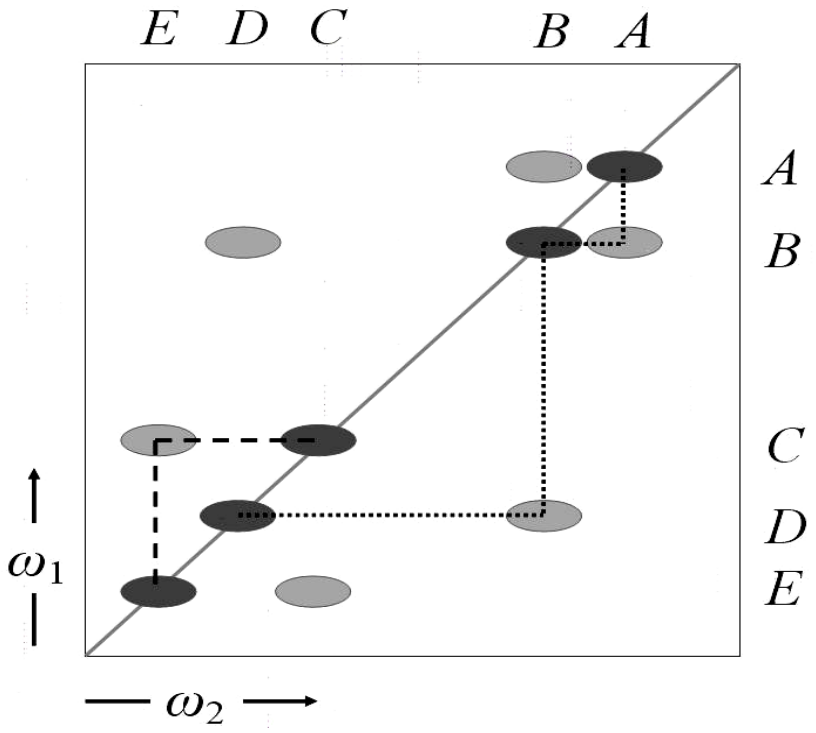


Рисунок 8-4. Схематическое изображение спектра в эксперименте ЯМР COSY.

Из спектра COSY можно получить информацию о цепочке спинов связанных спин-спиновым взаимодействием.

Эксперимент TOCSY (*Total correlation spectroscopy*)

Данный эксперимент как и в эксперименте COSY позволяет регистрировать наличие спин-спинового взаимодействия, однако в TOCSY (рисунок 8-5) наблюдаются кросс-пики между спинами, которые связаны неразрывной цепочкой взаимодействий. Т.е. если спин *A* связан со спином *B* и спин *B* связан со спином *C*, то в спектре TOCSY будет кросс-пик между спинами *A* и *C*, даже если между ними нет прямого взаимодействия.

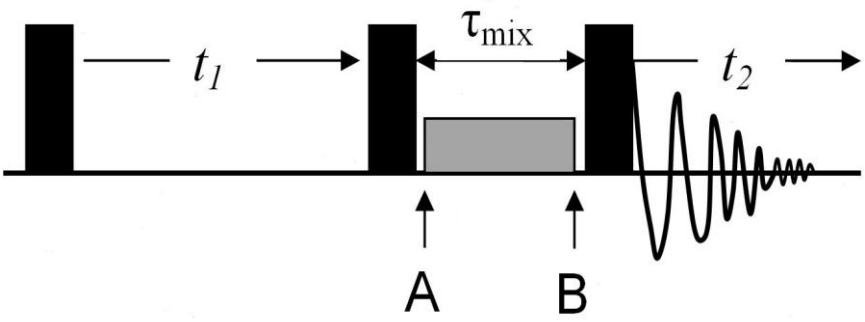


Рисунок 8-5. Импульсная последовательность ЯМР эксперимента TOCSY.

На рисунке 8-6 приведено схематическое изображение спектра TOCSY. Данный гипотетический спектр приведен для той же спиновой системы, что и в эксперименте COSY на рисунке 8-4.

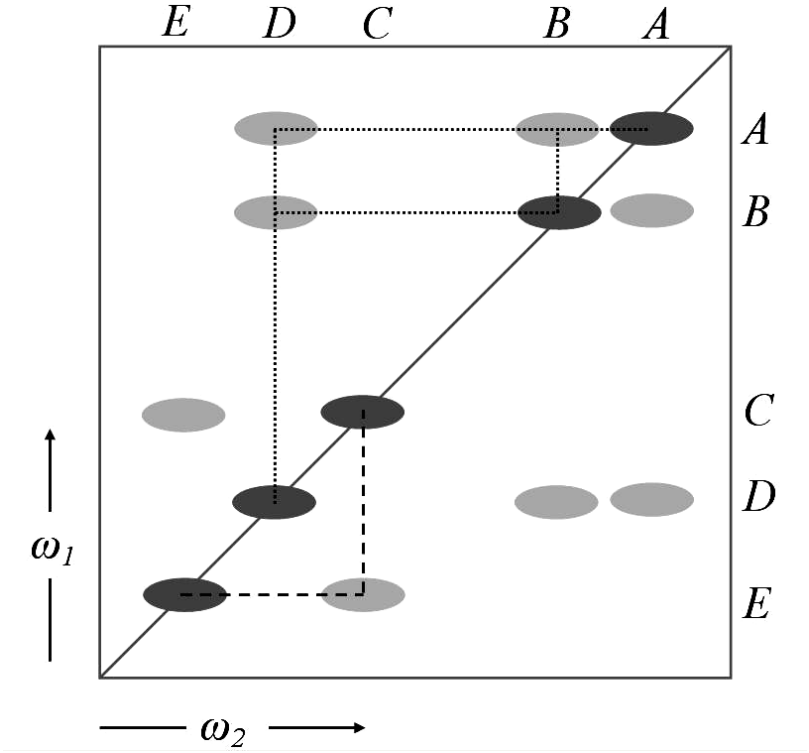


Рисунок 8-6. Схематическое изображение спектра эксперимента TOCSY.

Эксперименты HMQC (*Heteronuclear multiple-quantum correlation*) *и HMBC* (*Heteronuclear multiple-bond correlation*)

Для наблюдения корреляций между разными ядрами удобны двумерные эксперименты, в которых по одной оси отложены химические сдвиги ядер одного типа (например, протонов), а по другой оси химические сдвиги ядер другого типа (например, ^{13}C), которые связаны взаимодействиями с первыми.

Регистрация сигнала в ЯМР эксперименте может производиться как по низкочувствительным ядрам (например, ^{13}C, ^{15}N) так и по сильночувствительным ядрам (протонам).

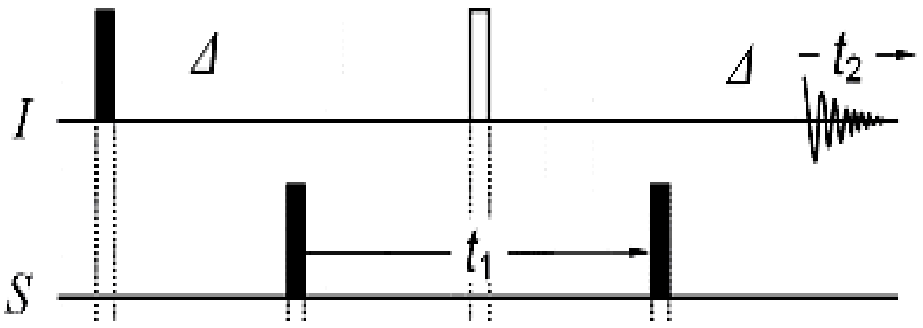


Рисунок 8-7. Импульсная последовательность HMQC: темные прямоугольники соответствуют 90^0 импульсам, светлые 180^0. Задержка $\Delta=1/(2J_{12})$.

Рассмотрим эксперимент по гетероядерной мульти-квантовой корреляции HMQC (*Heteronuclear multiple-quantum correlation*). Импульсная последовательность приведена на рисунке 8-7.

В результате воздействия этой импульсной последовательности, получаем двумерный ЯМР спектр, где по оси частот ν_1 будет наблюдаться дублет с положительной фазой, соответствующий сигналам ядер 1 (*I*), и по частоте ν_2 - пик, соответствующий сигналам ядер 2 (*S*). Схематический вид спектра приведен на рисунке 8-8:

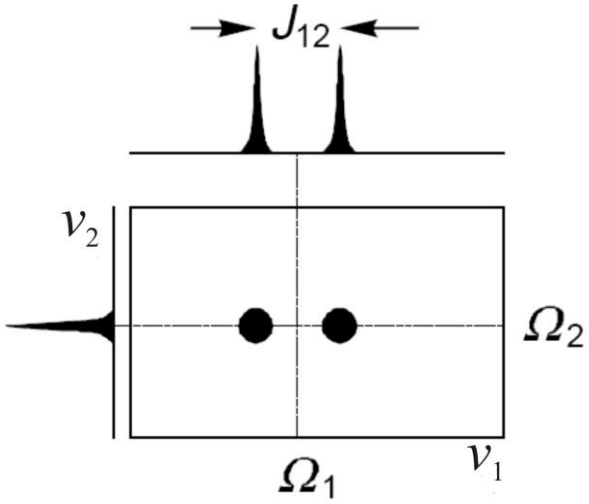


Рисунок 8-8. Схематический HMQC спектр для двух связанных спинов

Для ядер ^{13}C и протонов взаимодействие через одну связь, наиболее интенсивное, по сравнению с взаимодействиями через большее количество связей. Выбор задержки $\Delta=1/(2J)$ не дает ни каких других корреляций, кроме как корреляций через одну связь. Для наблюдения корреляции через большее количество связей, необходимо увеличить время задержки с тем, чтобы компоненты этих сигналов стали противофазными. Такой эксперимент получил название HMBC (*Heteronuclear multiple-bond correlation*).

Эксперимент HSQC (*Heteronuclear single-quantum correlation*)

Использование градиентов магнитного поля является еще одним инструментом для выделения взаимодействия ядерных спинов. Градиентами можно селективно расфокусировать не интересующие нас спины и оставить для наблюдения сигналов ЯМР лишь необходимые. Рассмотрим импульсную последовательность HSQC (*Heteronuclear single-quantum correlation*) (рисунок 8-9). Эта импульсная последовательность приводит к тем же результатам в спектре, что и последовательность HMQC. Несмотря на то, что импульсная последовательность HSQC более громоздкая, чем HMQC, она имеет ряд преимуществ для регистрации спектров высокомолекулярных соединений (например, протеинов).

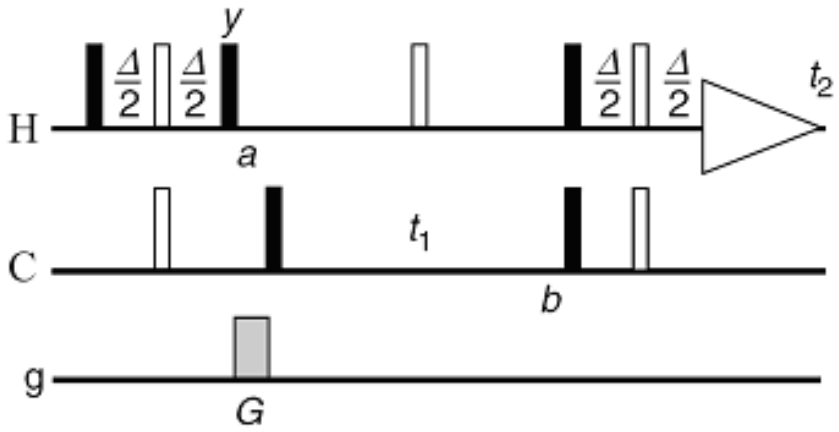


Рисунок 8-9. Импульсная последовательность HSQC: темные прямоугольники соответствуют 90^0 импульсам, светлые 180^0. Задержка $\Delta=1/(2J_{12})$. Все импульсы приложены вдоль оси x, за исключением третьего 90^0 импульса по ^{1}H, который приложен вдоль оси y.

В результате в спектре будет наблюдаться дублет с положительной фазой по оси ν_2 соответствующий сигналу протонов, и эти пики будут иметь сигналы по оси частот ν_1 соответствующие сигналам ядер *S*. Схематически вид спектра будет иметь такой же вид, что и спектр HMQC (рисунок 8-8).

Двумерная ЯМР (^1H, ^1H) спектроскопия (NOESY - Nuclear Overhauser Exchange Spectroscopy)

Импульсная последовательность в эксперименте NOESY представлена на рисунке 7-10.

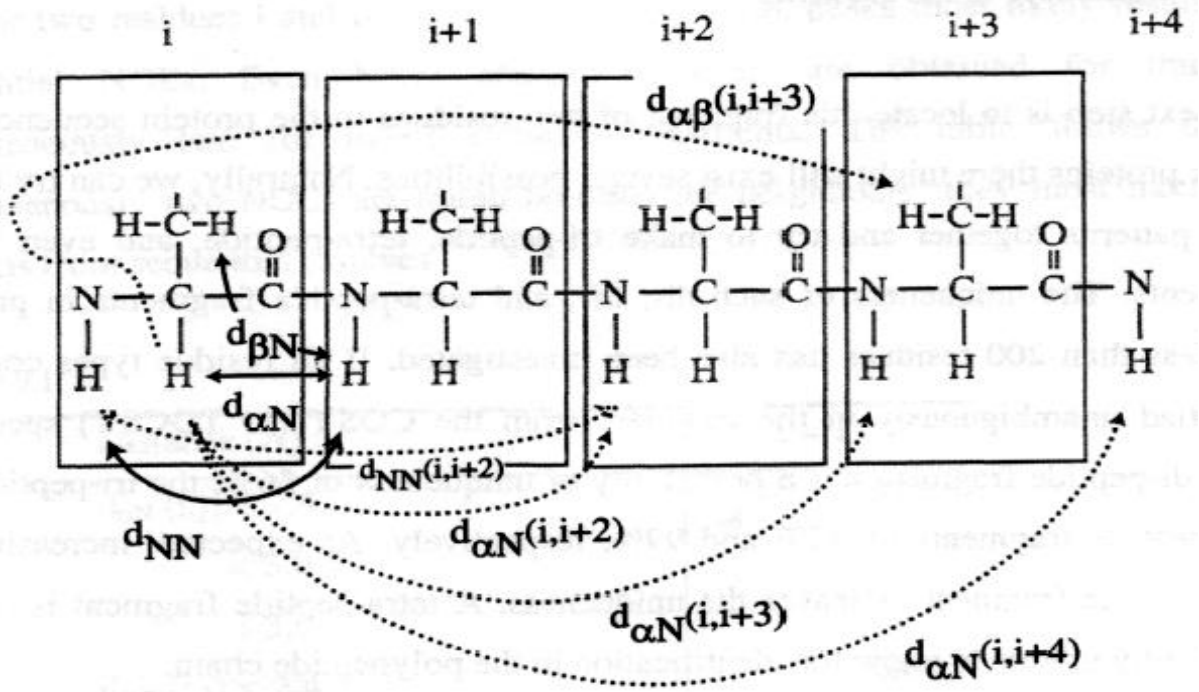


Рисунок 8-10. Возможные пути передачи NOE –эффектов и общепринятые обозначения этих эффектов в цепи протеинов.

8.4. Пространственное строение бета-амилоида $a\beta_{10-35}$ (фрагмента бета-амилоида $a\beta_{1-40}$) (*как пример*)

Бета-амилоид
$A\beta_{1-40}$ - H-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-**Try--Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val**-Gly-Gly-Val-Val-OH .

В однобуквенном обозначении **бета-амилоид $a\beta_{10-35}$** выглядит следующим образом:

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Y	E	V	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	G	A	I	I	G	L	M

Структура бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в растворе

Бета-амилоид $A\beta_{10-35}$ растворен в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) при pH = 7.3 и T = 293°K, спектр ЯМР ^1H приведен на рисунке 8-11. Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР ^1H использовался подход, основанный на совместном использовании TOCSY и NOESY методик. На рисунке 8-12 представлена NH-HA область TOCSY спектра для бета-амилоида $A\beta_{10-35}$.

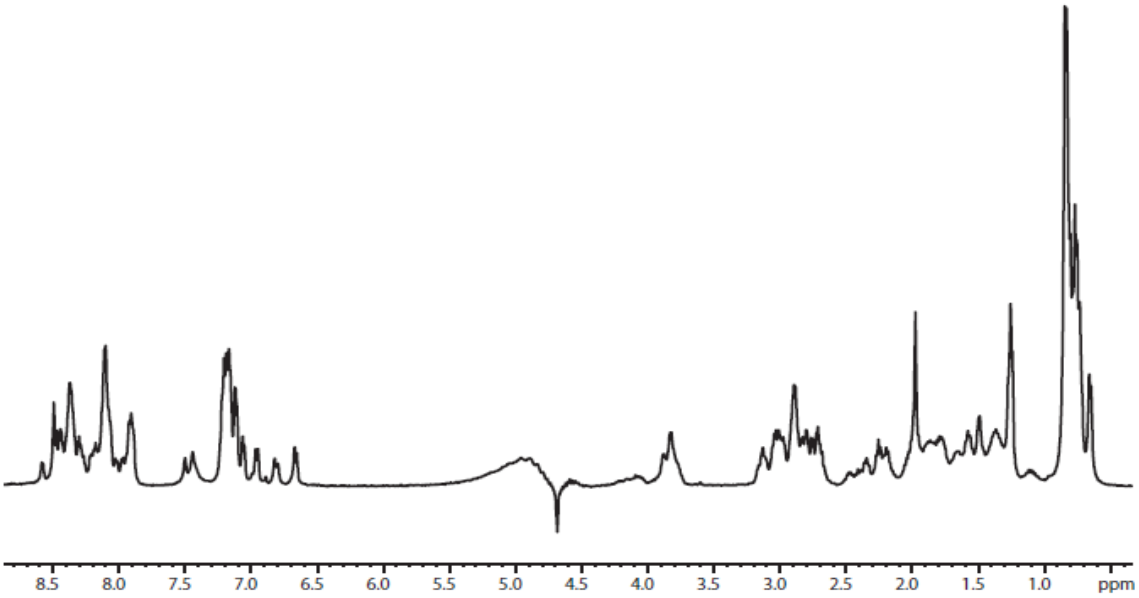


Рисунок 8-11. ЯМР ^1H спектр (500 МГц) бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) при pH = 7.3 и T = 293°K.

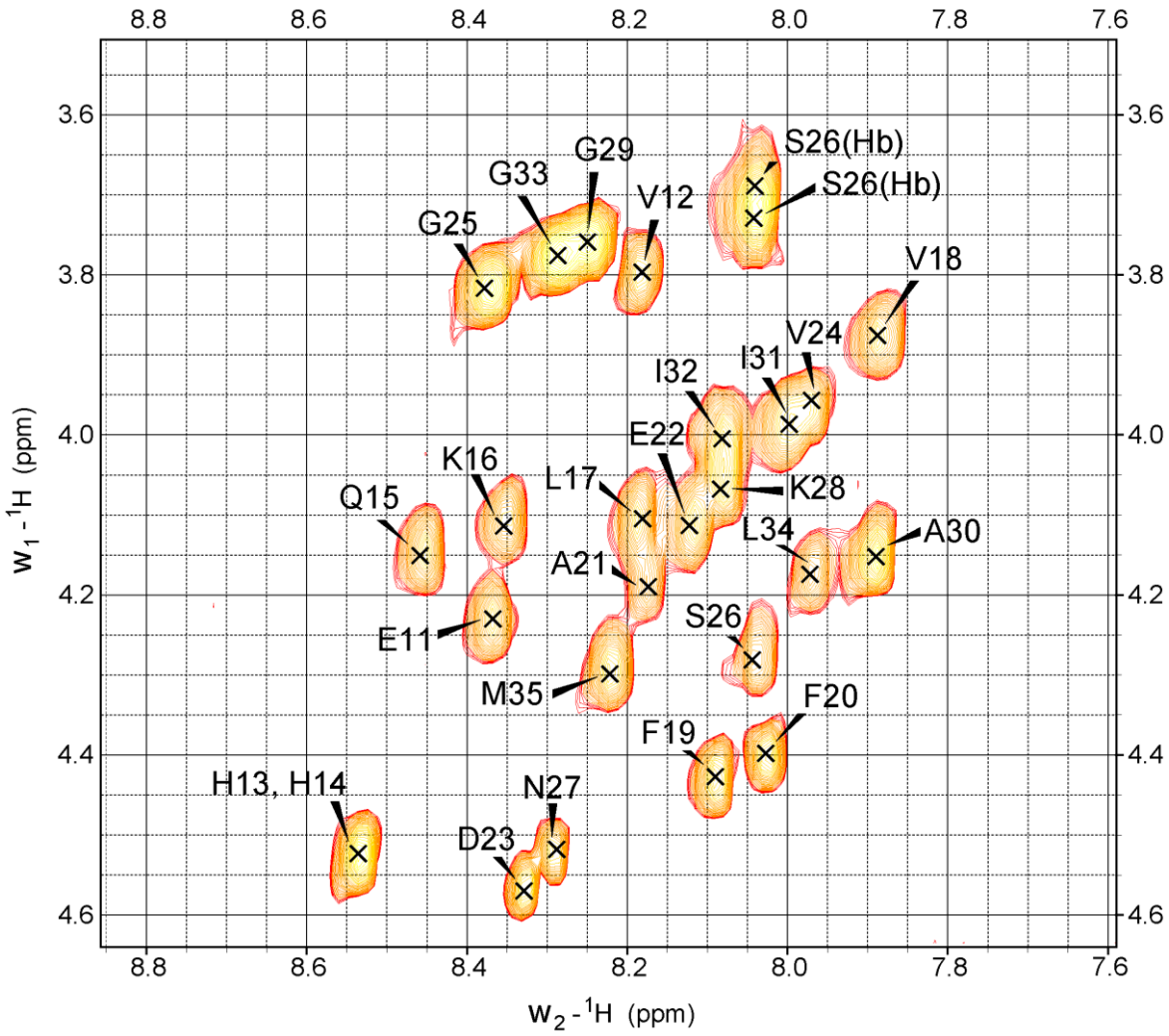


Рисунок 8-12. Область ^{1}H-^{1}H TOCSY спектра ЯМР (500 МГц) бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) при pH = 7.3 и T = 293°K.

С помощью 2D NOESY спектров ЯМР (рисунок 8-13) с вариацией времени смешивания τ_m (75, 100, 120, 200 мс) были определены межпротонные расстояния для аминокислотных остатков бета-амилоида. В качестве калибровочного использовался кросс-пик между протонами 2/6 и 3/5 ароматической группы фенилаланина, это расстояние равнялось 2.49 Å.

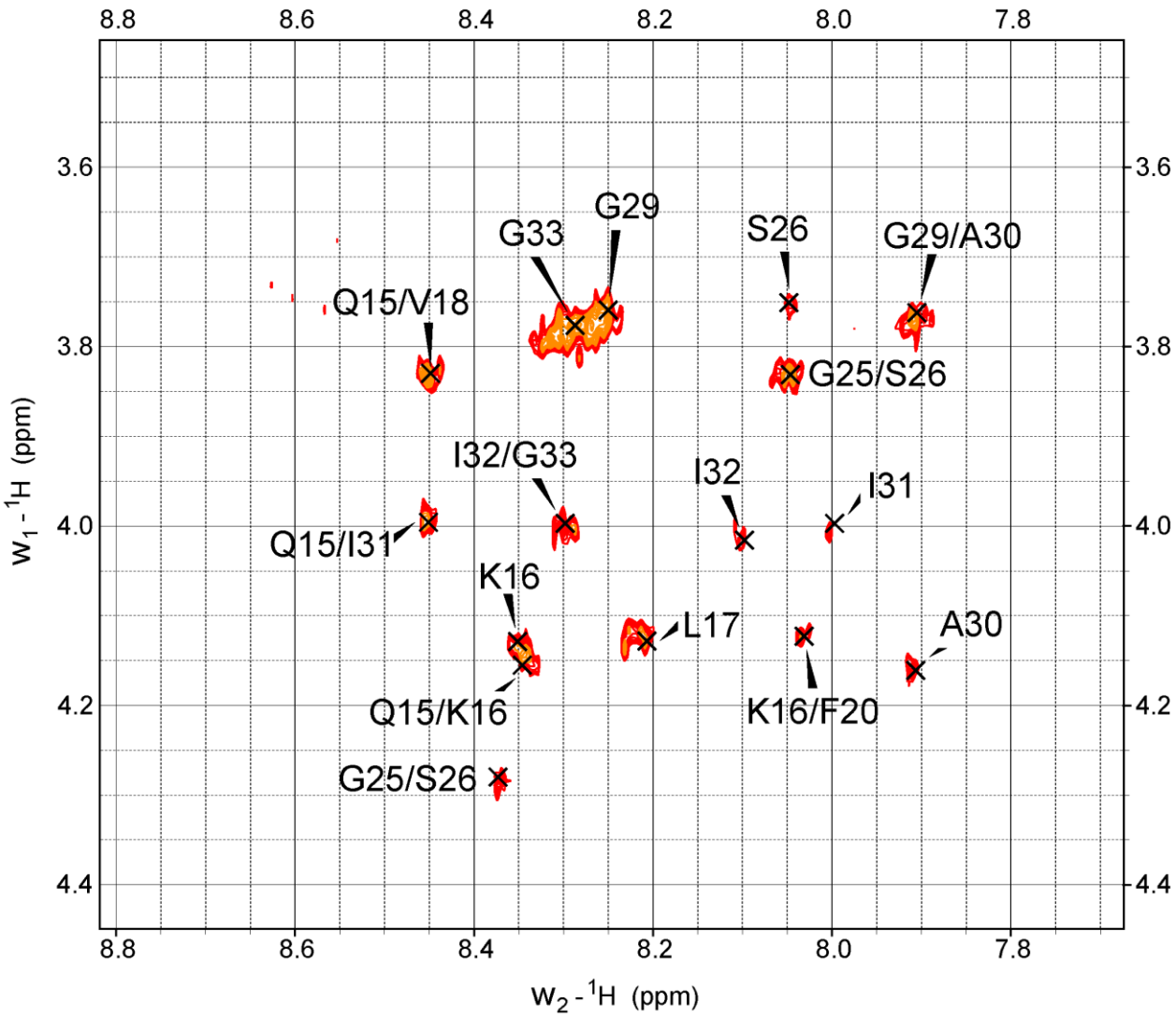


Рисунок 8-13. Область ^{1}H-^{1}H NOESY спектра ЯМР (500 МГц) бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) при pH = 7.3 и T = 293°K.

К сожалению, для однозначного расчета пространственной структуры бета-амилоида из 26-ти аминокислотных остатков полученных 16 расстояний недостаточно. Поэтому подход, основанный на использовании спектроскопии ЯЭО, в данном случае является не эффективным. Для повышения качества расчетов структуры исследуемого пептида было решено использовать методику, основанную на анализе констант остаточного ДДВ.

ХС ядер ^{13}C бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в водном растворе были отнесены с помощью двумерного ^{1}H-^{13}C HSQC эксперимента (рисунок 8-14)

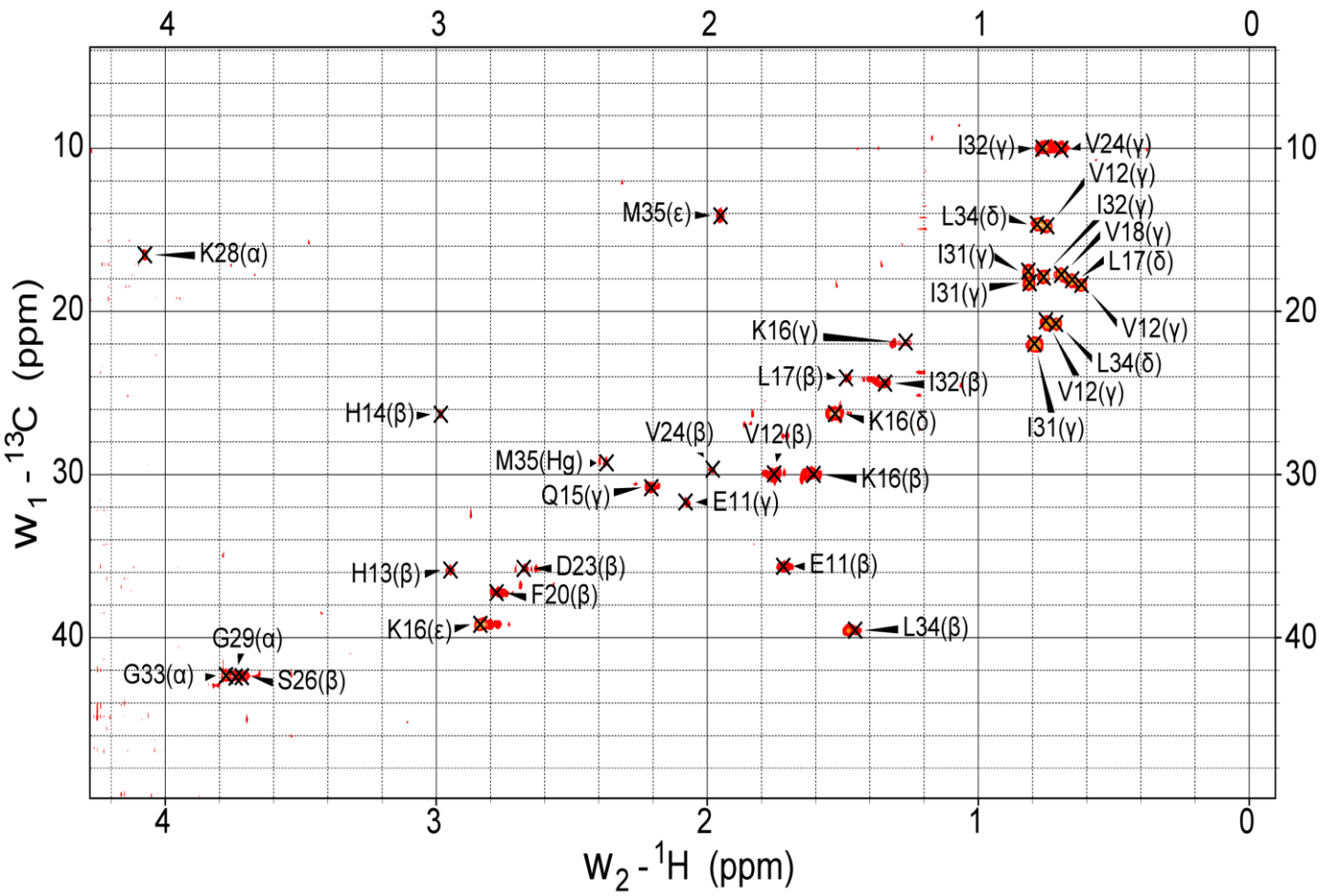


Рисунок 8-14. 2D ^{1}H-^{13}C HSQC спектр ЯМР бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) при pH 7.3 и T = 293°K.

После того, как было произведено отнесение сигналов ЯМР по ядрам ^{13}C, с помощью двумерного ^{1}H-^{13}C HSQC-HECADE эксперимента были получены данные о прямых КССВ ($^1J_{CH}$) для бета-амилоида в $A\beta_{10-35}$ в водном растворе.

Затем бета-амилоид был растворен в жидкокристаллической лиотропной системе представляющей собой смесь n-алкил-поли(этилен)гликоля ($C_{12}E_5$), нормального спирта (гексанол) и исходного водного раствора, и с помощью двумерного ^{1}H-^{13}C HSQC-HECADE эксперимента были получены прямые КССВ в данной среде ($^1J_{CH}$ +$^1D_{CH}$) (рисунок 8-15).

Анализируя полученные экспериментальные данные прямых ($^1J_{CH}$ +$^1D_{CH}$) КССВ в жидкокристаллической лиотропной среде и в исходном водном рарстворе, получаем константы остаточного диполь-дипольного взаимодействия ($^1D_{CH}$).

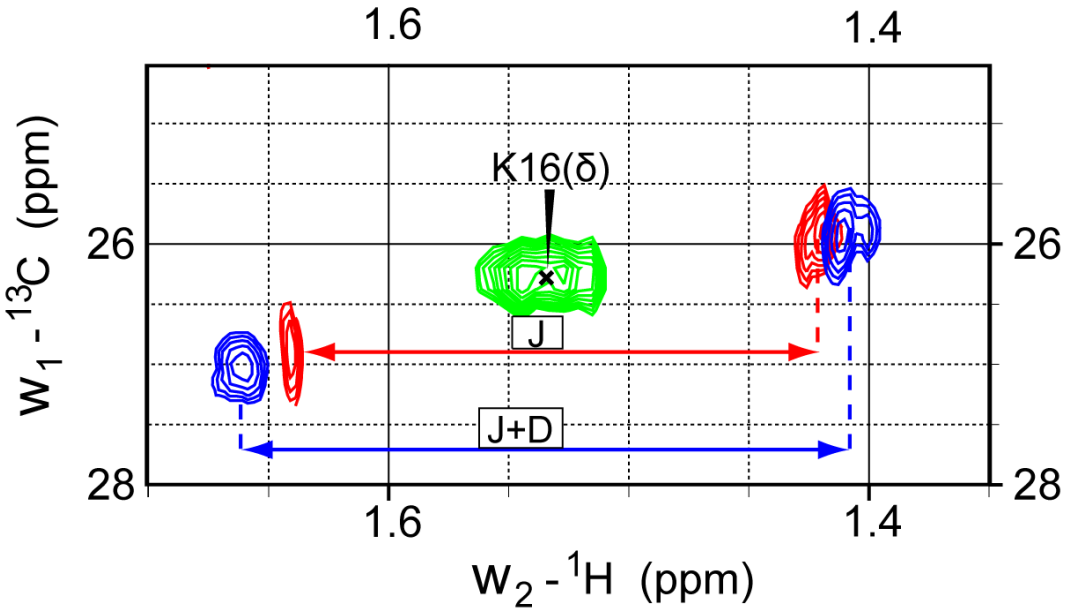


Рисунок 8-15. Суперпозиция областей $^{1}H–^{13}C$ 2D спектров ЯМР бета-амилоида $A\beta_{10-35}$: $^{1}H-^{13}C$ HSQC спектр $A\beta_{10-35}$ в растворе фосфатного буфера (центральный кросс-пик); $^{1}H-^{13}C$ HSQC-HECADE спектр ЯМР $A\beta_{10–35}$ в растворе фосфатного буфера (2 внутренних пика); $^{1}H-^{13}C$ HSQC-HECADE спектр ЯМР $A\beta_{10–35}$ в смеси n-алкил-поли(этилен)гликоля ($C_{12}E_5$), нормального спирта (гексанол) и исходного фосфатного буфера (2 внешних пика).

Полученные константы остаточного ДДВ для исследуемого бета-амилоида в $A\beta_{10-35}$ приведены в таблице 8.1:

Экспериментально полученные межпротонные расстояния и константы остаточного ДДВ использовались в качестве входных параметров для расчетов методом молекулярной динамики в программе XPLOR.

Данная программа позволяет связывать значения наблюдаемых констант и пространственное расположение межъядерных векторов относительно внешнего магнитного поля в рамках известной конформации исследуемой молекулы.

Таблица 8.1. Экспериментальные данные констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия бета-амилоида $A\beta_{10-35}$

Амино-кислотный остаток	$^1D_{CH}$ (Гц)				
	$C_\alpha H$	$C_\beta H$	$C_\gamma H$	$C_\delta H$	$C_\varepsilon H$
G11		15.2			
V12	12.0		12.6		
Q15			18.0		
K16				12.0	14.0
L17				8.0	
V18			9.6		
V24			6.3		
G29	4.0				
I31	8.0		7.2		
I32			9.6		
G33	8.0				
L34				8.0	

Критерием соответствия между рассчитанной и реальной структурами является линейная корреляция между наблюдаемыми и рассчитанными значениями остаточных величин диполь-дипольного взаимодействия. Оптимизация исходной конформации бета-амилоида, путем поворота отдельных фрагментов молекулы относительно других, позволила выбрать единственную пространственную структуру, для которой наблюдалась линейная корреляция между наблюдаемыми и рассчитанными величинами $^1D_{CH}$ (рисунок 8-16).

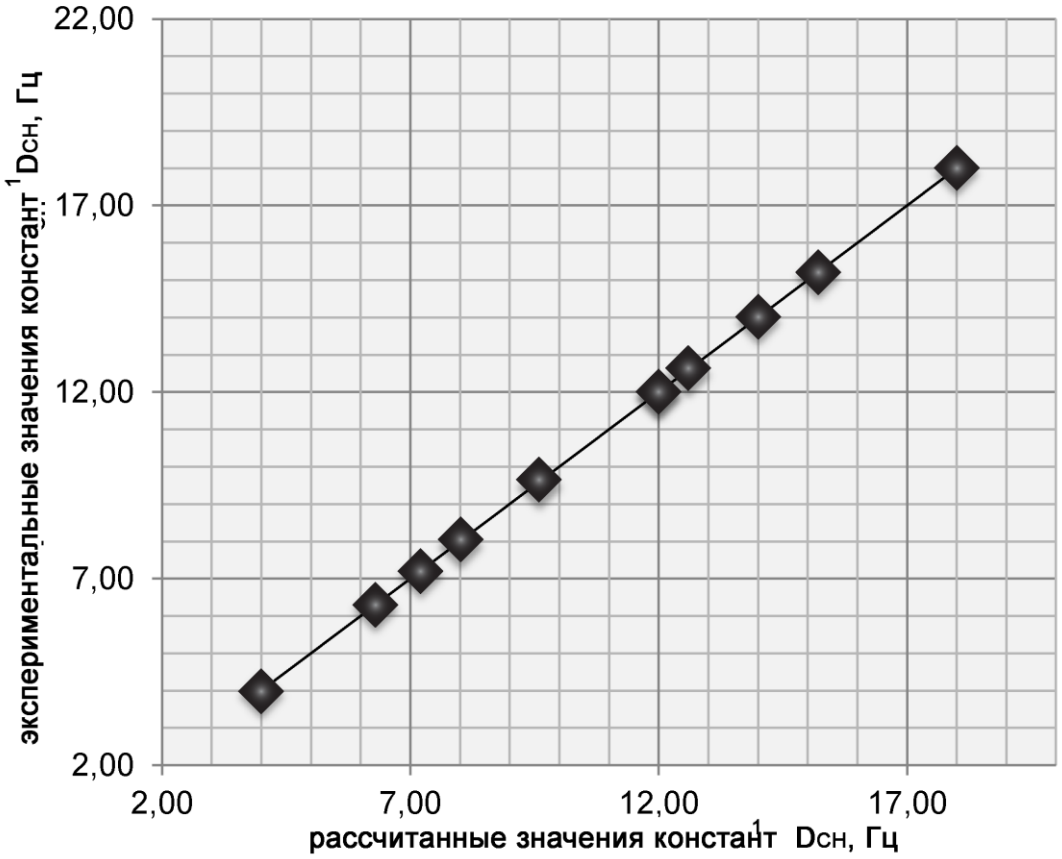


Рисунок 8-16. График корреляции между наблюдаемыми и рассчитанными значениями констант остаточного ДДВ $^{1}D_{CH}$ определенные для бета-амилоида $A\beta_{10\text{-}35}$.

Рассчитанная структура бета-амилоида $A\beta_{10\text{-}35}$ в водном растворе при pH = 7.3, для которого наблюдалась лучшая корреляция между наблюдаемыми и рассчитанными значениями межпротонных расстояний и констант остаточного диполь-дипольного взаимодействия приведена на рисунке 8-17.

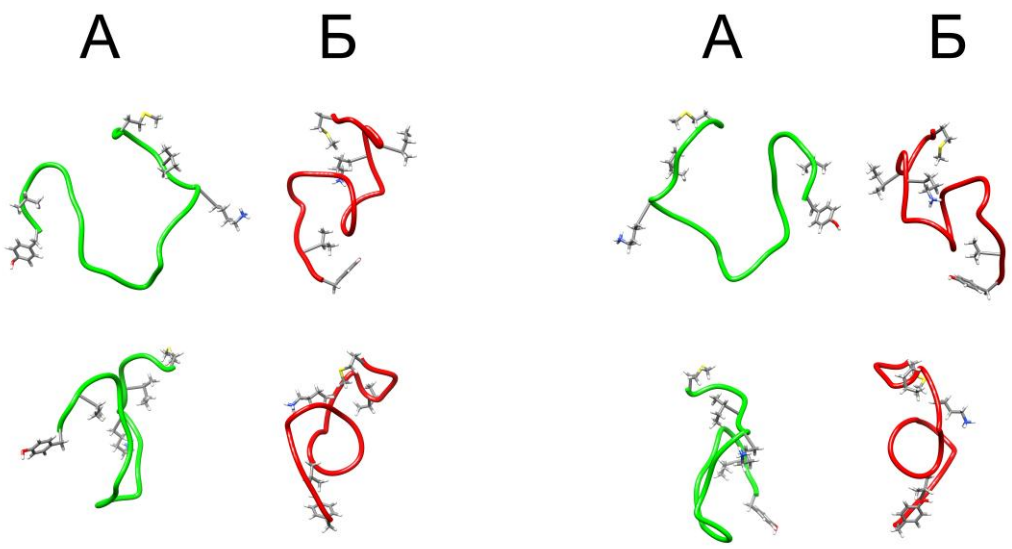


Рисунок 8-17. Приведены четыре проекции вращения на угол 90° структуры бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в растворе (А) и при pH = 5.6 [Zhang]; (Б). В обоих случаях аминный конец молекулы находится снизу, карбоксильный - сверху. Поворот на 90° осуществляется вдоль вертикальной оси, начиная с верхнего левого рисунка, затем влево вниз, вправо вверх и вправо вниз.

Структура бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в комплексе с мицеллами ДСН

Особое значение для биохимических исследований представляет структура бета-амилоидов в комплексе с модельными биологическими мембранами. Для этого бета-амилоид $A\beta_{10-35}$ был исследован в мицеллярном растворе ДСН, мицеллы которого широко используются в качечтве модели биологической мембраны..

Отнесение ХС протонов проводилось с помощью совместного использования NOESY и TOCSY методик. В отличие от NOESY спектров ЯМР бета-амилоида $A\beta_{10-35}$ в растворе, в мицеллярном растворе ДСН наблюдалось большое количество ЯЭО контактов, как между протонами внутри аминокислотных остатков, так и между различными аминокислотными остатками (рисунки 8-18 и 8-19).

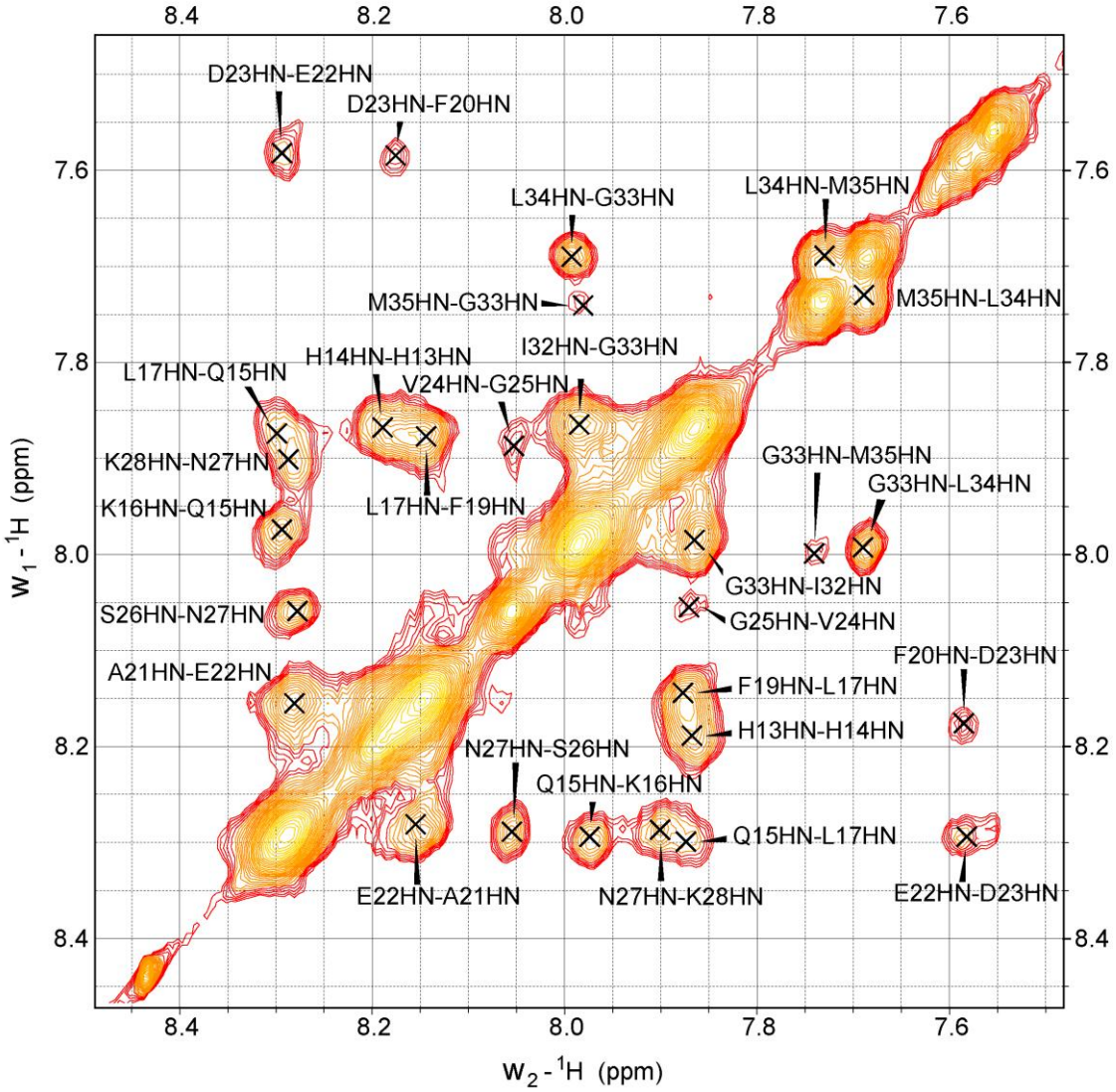


Рисунок 8-18. NH–NH область 2D ^{1}H–^{1}H NOESY спектра ЯМР бета-амилоида $A\beta_{10–35}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с мицеллами ДСН. Время смешивания t_m=0.5 с.

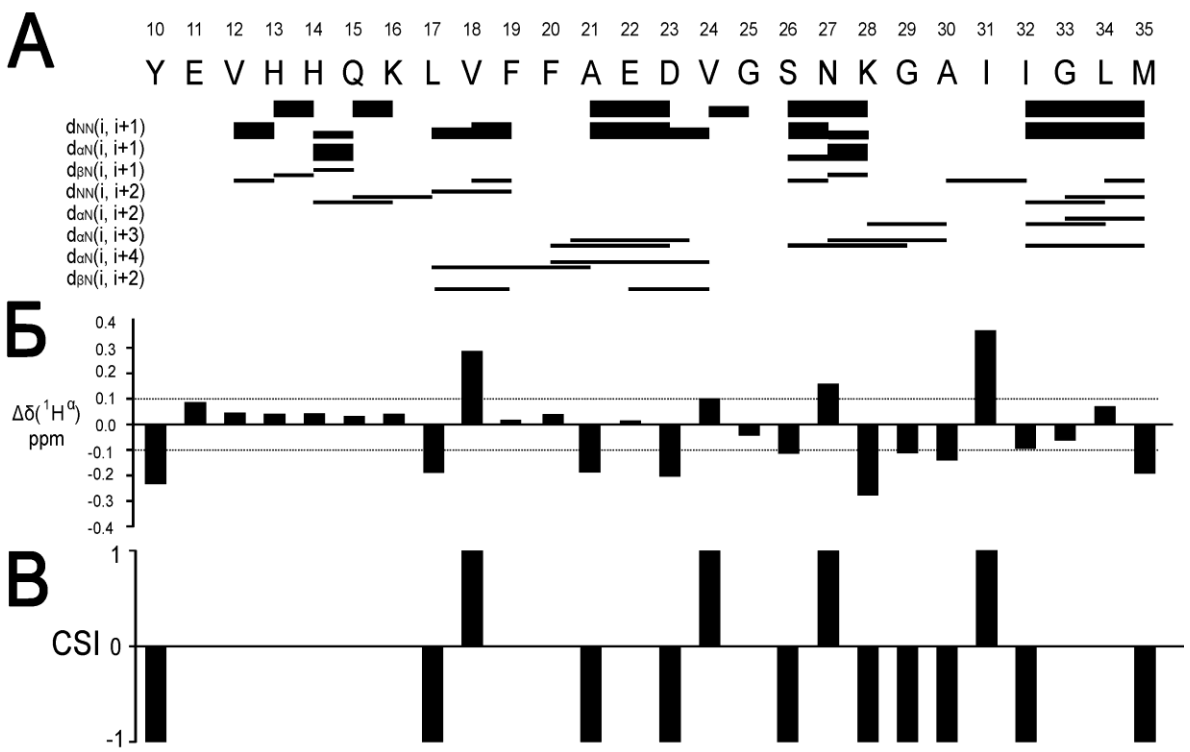


Рисунок 8-19. Данные ЯМР для бета-амилоида $A\beta_{10–35}$ в растворе с мицеллами ДСН: (А) Межпротонные контакты ЯЭО. Часть ЯЭО контактов не приведена вследствие перекрывания и уширения сигналов; (Б) Вторичный ХС $\Delta\delta$ ядер $^1H^\alpha$ (определялся как разность наблюдаемых ХС и значений ХС для структуры случайного клубка; (В) Индекс ХС (CSI) (определяется как разность наблюдаемых ХС αH и значений ХС для структуры случайного клубка. Значение индекса −1 или +1 означает отклонение наблюдаемого ХС от ХС случайного клубка более чем на 0.1 м.д., если отклонение было меньше на 0.1 м.д., индекс равнялся 0. Группа из четырех и более подряд индексов со значением −1 указывает на наличие спирали. Группа из трех и более подряд индексов со значением +1 указывает на наличие складчатой структуры. (Wishart *et al*., 1992).

Экспериментально полученные 151 межпротонные расстояния использовались для определения структуры бета-амилоида. Большое количество ЯЭО контактов среднего диапазона позволяет рассчитать методом молекулярной динамики 3D структуру бета-амилоида $A\beta_{10\text{-}35}$ в растворе мицелл ДСН. (рисунок 8-20).

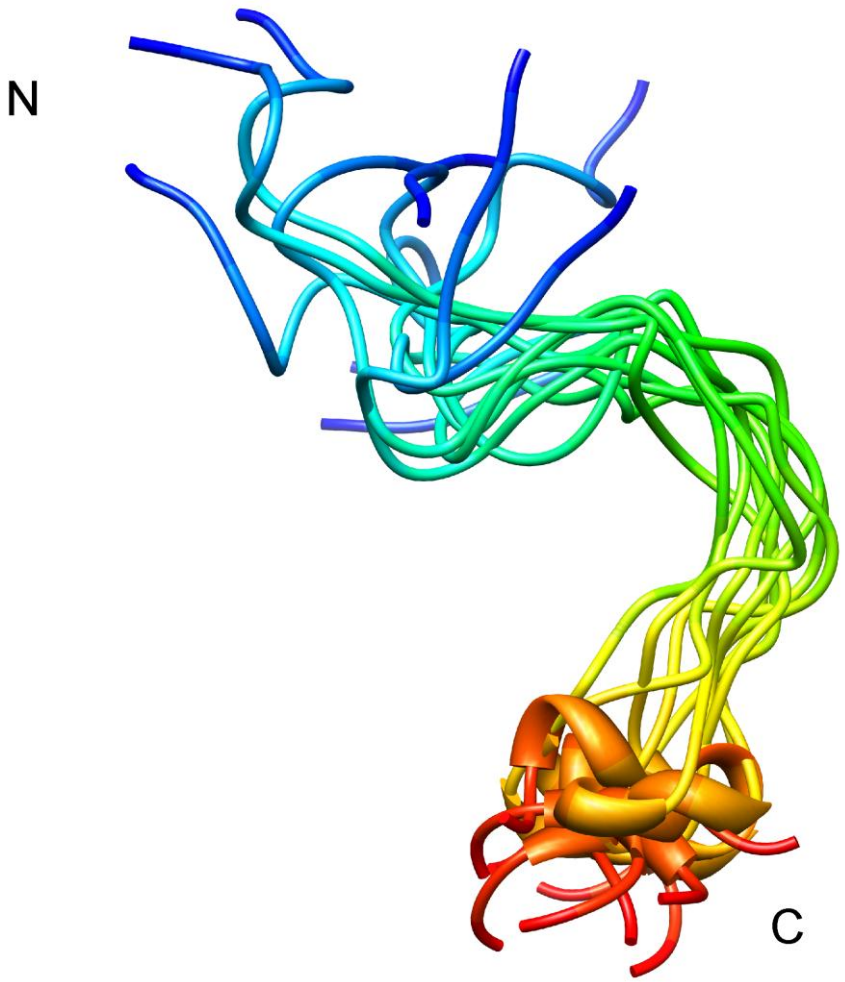


Рисунок 8-20. Структура бета-амилоида $A\beta_{10\text{-}35}$ в водном растворе (90% H_2O + 10% D_2O) с ДСН, находящемся в мицеллярном состоянии.

Для данного бета-амилоида в растворе с мицеллами ДСН наблюдалось наличие спиральной конформации на участке от G29 до M35. Также наблюдались две гидрофобные области (аминокислотные остатки 17-20 и 29-35) и была определена структура комплекса «бета-амилоид $A\beta_{10–35}$ – мицелла ДСН» (рисунок 8-21).

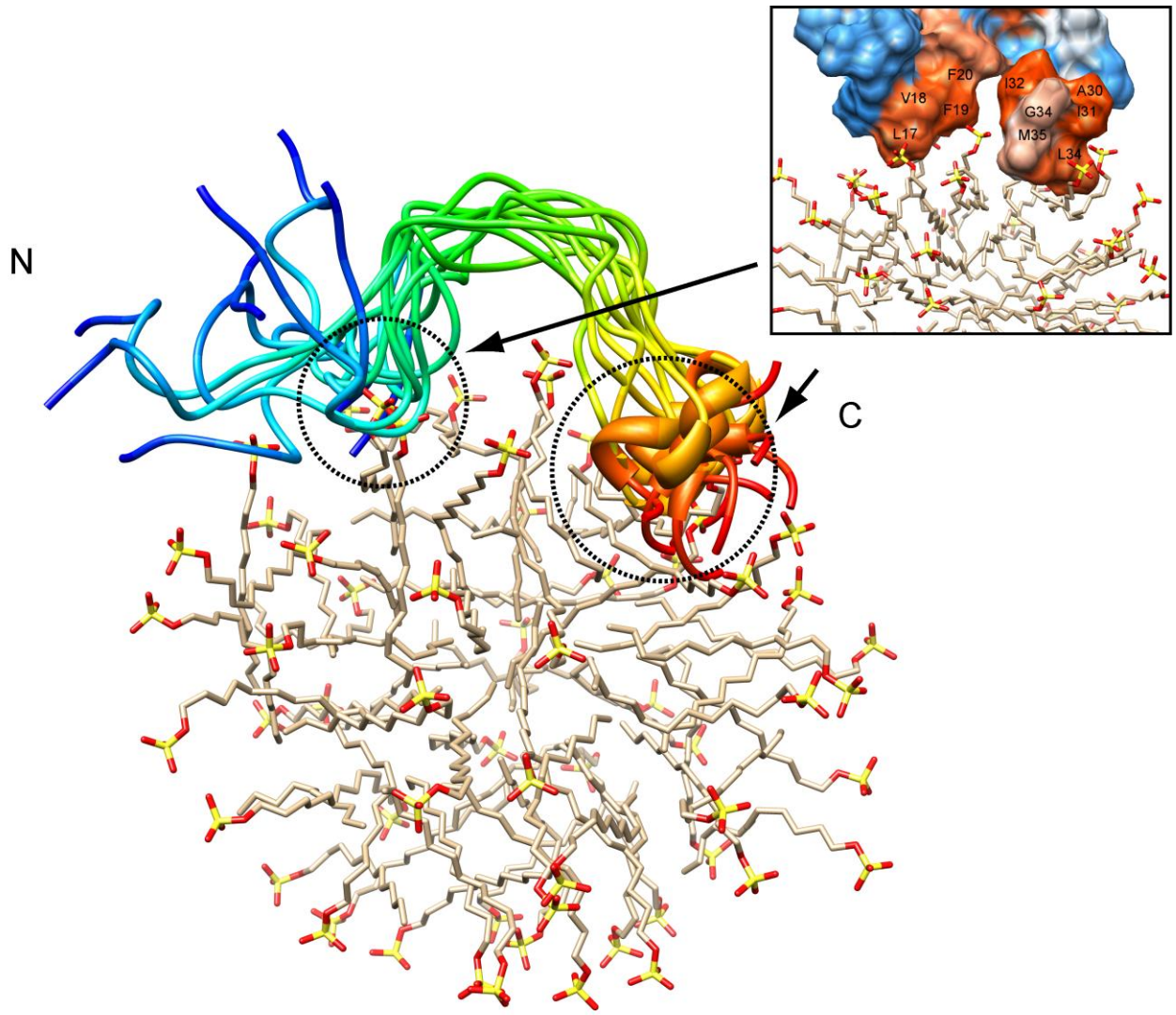


Рисунок 8-21. Строение комплекса бета-амилоид $A\beta_{10-35}$ – мицелла на основе ДСН. В правом верхнем углу указаны гидрофобные области (аминокислотные остатки 17-20 и 29-35) ориентированные на поверхности мицеллы ДСН.

Определено, что бета-амилоид $A\beta_{10-35}$ взаимодействует с поверхностью мицеллы двумя областями, в которые входят аминокислотные остатки 17-20 и 29-35.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ионин Б.И., Ершов Б.А., Кольцов А.И. ЯМР-спектроскопия в органической химии. - Л.: Химия, Л/О, 1983. - 269 С.

2. Сергеев Н.М. Спектроскопия ЯМР. - М.: Изд-во МГУ, 1981. - 279 С.

3. Леви Г., Нельсон Г. Руководство по ядерному магнитному резонансу углерода-13 для химиков органиков. - М.: Мир, 1975. - 295 С.

4. Гюнтер Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР. - М.: Мир, 1984. - 478 С.

5. Самитов Ю.Ю. Анализ спектров ЯМР пространственных изомеров. Т. 1(2). - Казань. Изд-во КГУ, 1978 (1983).

6. Jackman L.M., Cotton F.A. (eds.): Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, part I, p. 660. New York: Academic Press 1975.

7. Breitmaier E., Woelter W. ^{13}C NMR spectroscopy. Methods and application in organic chemistry. - Weinheim, N.Y.: Verlag Chemie, 1978. - 322 P.

8. Wehrli E.W., Wirthlin T. Interpretation of ^{13}C NMR spectra. - London, N.Y., Rhein: Heyden, 1976. - 310 P.

9. Macomber R.S. NMR Spectroscopy. New York, London: HBJ 1988. – 209 P.

10. Ernst R.R., Bodenhausen B., Wokaun A.: Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions, Oxford: Oxford University Press 1987. – 610 P.

11. Friebolin H. Basic One- and Two Dimensional NMR Spectroscopy. Weinheim; Basel; New York: Wiley-VCH 1991. – 344 P.

12. Berger S., Braun S. 200 and More NMR Experiments. Wiley-VCH, Weinheim, 2004. – 834 P.

13. Каратаева Ф.Х., Клочков В.В. Спектроскопия ЯМР ^{1}H и ^{13}C в органической химии. Казань: Издательство Казанского государственного университета, 2007. – 154 с.

14. . Usachev, K.S. Spatial structure of heptapeptide Ав16-22 (beta-amyloid Ав1-40 active fragment) in solutions and in a complex with a biological membrane model [text] /K.S. Usachev, S.V.Efimov, A.R.Yulmetov, A.V.Filippov, O.N.Antzutkin, S. Afonin, V.V.Klochkov // Magnetic Resonance in Chemistry. 2012. V.50., N 12. – P. 784-792.