

УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПО ХИМИИ И ФИЗИКЕ ПОЛИМЕРОВ  
ИНСТИТУТ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ  
ИМ. А.Н. НЕСМЕЯНОВА

## Анализ спектров ЯМР высокого разрешения

МОСКВА – 2009

Составитель: к.х.н., н.с. В. В. Новиков

## Спектроскопия ЯМР высокого разрешения

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является распространенным аналитическим методом, находящим применение во многих областях современной науки, медицины и промышленности. Трудно переоценить роль ЯМР в фундаментальной и прикладной химии, в которых исследование любых систем, от простейших органических молекул до сложнейших макромолекулярных ансамблей, таких как белки, нуклеиновые кислоты и их комплексы, практически всегда базируется на данных, полученных при помощи спектроскопии ЯМР.

ЯМР представляет собой спектроскопический метод, основанный на изучении магнитных свойств атомных ядер. Некоторые ядра при помещении в сильное магнитное поле способны резонировать на характеристичных частотах в радиочастотном диапазоне электромагнитного спектра. Небольшие изменения указанной резонансной частоты предоставляют детальную информацию о молекулярной структуре исследуемых соединений.

Возможность регистрации спектров ЯМР основана на существовании у некоторых ядер ненулевого спина (собственного момента количества движения). Спин представляет собой чисто квантовую характеристику ядра, однако во многих случаях с целью упрощения рассмотрения основных принципов ЯМР пользуются классической векторной моделью, в рамках которой считают, что при помещении ядра с полуцелым спином в магнитное поле  $\mathbf{B}_0$  ядерный магнитный момент начинает прецессировать вокруг направления  $\mathbf{B}_0$  при ориентации оси прецессии либо параллельно, либо антипараллельно  $\mathbf{B}_0$ . При этом частота прецессии зависит от типа ядра, помещенного в магнитное поле, и от индукции магнитного поля:

$$\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi ,$$

где  $\nu_0$  – так называемая ларморова частота,  $\gamma$  – гиромагнитное отношение, которое является характеристичным для каждого ядра,  $B_0$  – индукция магнитного поля.

Рассмотрим поведение ядра с полуцелым спином ( $s = 1/2$ ), помещенного в магнитное поле. Наличие спина приводит к существованию двух квантовых состояний, которые часто представляют как соответствующие положению спина, направленного «вверх» ( $\alpha$ ) или «вниз» ( $\beta$ ) (Рис. 1). В отсутствие внешнего магнитного поля эти два состояния являются вырожденными и их заселенности равны. Помещение ядра в магнитное поле приводит к тому, что спиновое состояние  $\alpha$ , в котором спин направлен по полю, будет энергетически более выгодно, чем состояние  $\beta$ . Величина расщепления уровней будет пропорциональна силе внешнего магнитного поля. Таким образом, в равновесии в соответствии с распределением Больцмана заселенность состояния со спином, направленным по полю, будет выше заселенности состояния со спином, направленным «вниз». Как и во всех видах спектроскопии, ядро, находящееся в нижнем по энергии состоянии, может повысить свою энергию и перейти в менее энергетически выгодное состояние путем поглощения электромагнитного излучения. Энергия поглощенного кванта в этом случае должна в точности соответствовать энергии расщепления уровней в магнитном поле ( $\Delta E$ ), и эта энергия связана с частотой электромагнитного излучения:

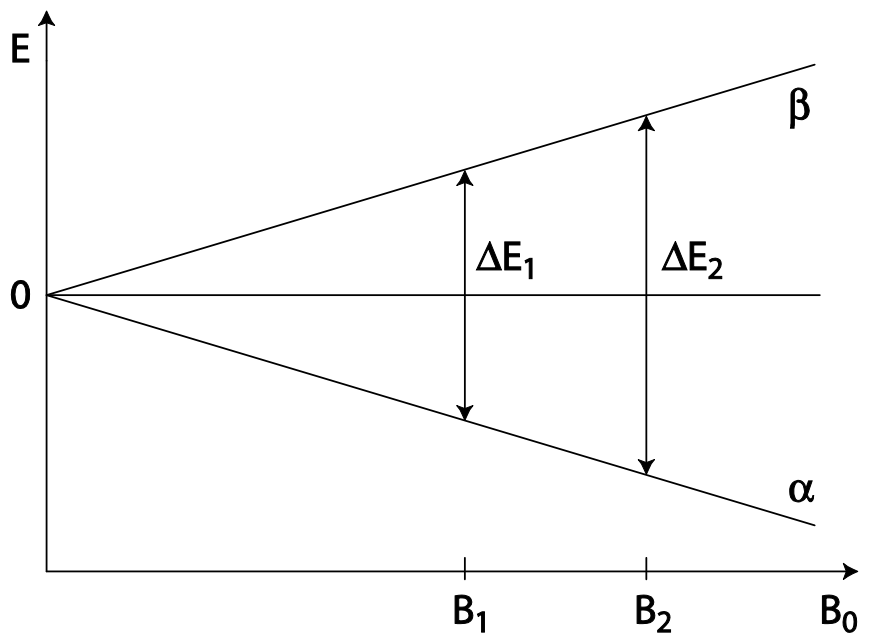


Рис. 1

$$\Delta E = h\nu_0 = h\gamma B_0 / 2\pi$$

Очевидно, что чем больше энергия расщепления уровней в магнитном поле  $\Delta E$ , тем больше будет разность заселенностей этих

уровней и, как следствие, количество поглощаемой энергии, от которого непосредственно зависит чувствительность метода. Таким образом, максимальная чувствительность будет достигаться в случае наибольшего (по модулю) гиромагнитного отношения ядра.

Наиболее важные ядра со спином  $s = \frac{1}{2}$ :

Ядро	Содержание изотопа (%)	Относительная чувствительность	Ларморова частота (МГц) в поле 14 Тл
$^1\text{H}$	100	1	600
$^{13}\text{C}$	1.1	0.016	150
$^{15}\text{N}$	0.37	0.001	60
$^{19}\text{F}$	100	0.83	564
$^{31}\text{P}$	100	0.066	242

Зависимость величины  $\Delta E$  от  $B_0$  магнитного поля показывает, что использование более сильного магнитного поля позволит увеличить чувствительность метода. В связи с этим в настоящее время для создания магнитного поля в спектроскопии ЯМР используются магниты на основе сверхпроводящих соленоидов, которые позволяют создать магнитное поле с индукцией до 23.5 Тесла. Чаще всего, однако, при описании магнита в спектроскопии ЯМР используют значение ларморовой частоты протонов, помещенных в поле указанного магнита. В этом случае максимальная частота доступных в настоящее время спектрометров достигает 1000 МГц (23.5 Тл), но для небиологических применений, как правило, используются магниты с частотами 300, 400, 500 и 600 МГц.

### **Химический сдвиг**

Резонансная частота ядра не только является характеристикой природы ядра, но также (хотя и в значительно меньшей степени) зависит от положения атома в молекуле («химического окружения»). Это связано с тем, что электроны химической связи создают дополнительное небольшое магнитное поле, которое приводит к

изменению эффективного магнитного поля на ядре. Действительно, ядро расположено в центре электронного облака и хорошо известно, что находящиеся неподалеку акцепторные и донорные группы могут изменять электронную плотность вокруг ядра. Это незначительное изменение, составляющее несколько миллионных долей от индукции основного магнитного поля, называется *химическим сдвигом* и предоставляет детальную информацию о структуре молекулы. Различные ядра, входящие в состав одной молекулы, могут быть идентифицированы по их химическим сдвигам на основе молекулярной симметрии и легко предсказуемых эффектов, оказываемых электроотрицательными атомами и ненасыщенными группами. Химический сдвиг измеряют в миллионных долях ларморовой частоты ядра (м.д.) и обозначают греческой буквой дельта ( $\delta$ ). В качестве стандарта используют химический сдвиг тетраметилсилана (ТМС), химический сдвиг сигнала которого в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{29}\text{Si}$  принимают за нуль:

$$\delta = \frac{\nu_{\text{вещ}} - \nu_{\text{ТМС}} (\text{Гц})}{\nu_{\text{ТМС}} (\text{МГц})}$$

Таким образом, спектр ЯМР представляет собой график зависимости интенсивности поглощения радиочастотного излучения от его частоты.

### **Обзор химических сдвигов ядер $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$**

Интерпретация спектров ЯМР невозможна без общего понимания закономерностей изменения химических сдвигов. Химические сдвиги ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ , в первую очередь, зависят от близости электроотрицательных атомов (O, N, Cl и т.д.) и ненасыщенных групп (C=O, C=C, ароматические фрагменты). Взаимодействие ядра с электроотрицательными группами сдвигает сигналы ЯМР, соответствующие данному атому, влево (в область так называемого «слабого поля»), т.е. увеличивает резонансную частоту. Наличие ненасыщенных групп сдвигает сигнал ядра в слабое поле в том случае,

когда ядро находится в плоскости ненасыщенной группы, но приводит к противоположному эффекту (сдвиг в сильное поле), если ядро расположено над или под указанной плоскостью.

Хотя обычный диапазон значений  $\delta$  для ядер углерода  $^{13}\text{C}$  (0 – 200 м.д.) значительно превышает таковой для протонов  $^1\text{H}$  (0 – 13 м.д.), существует некоторая корреляция между сдвигом протона и атома углерода, с которым данный протон связан (Рис. 2). В случае углеводородных заместителей при отсутствии поблизости электроотрицательных атомов или ненасыщенных групп химический сдвиг будет находиться у правой границы возможного диапазона (в сильном поле), причем увеличение степени замещения углеродного атома будет приводит к сдвигу его в слабое поле  $\text{CH} > \text{CH}_2 > \text{CH}_3$  ( $^1\text{H}$ : 0.8, 1.2, 1.6;  $^{13}\text{C}$ : 10, 20, 30 м.д.). Кислород приводит к большему сдвигу в слабое поле, чем азот, в связи с его большей электроотрицательностью: 3–4 м.д. ( $^1\text{H}$ ) и 50–85 ( $^{13}\text{C}$ ) в случае связи  $\text{C}-\text{O}$ . Так же, как и в случае углеводородного окружения, при увеличении степени замещения углеродного атома наблюдаются аналогичные слабопольные сдвиги:  $\text{CH}_3\text{O} < \text{CH}_2\text{O} < \text{CHO} < \text{C}_{\text{четв}}$  (в спектрах  $^{13}\text{C}$  приблизительно 55, 65, 75 и 85 м.д. соответственно).

Близость ненасыщенной группы приводит к сдвигу сигнала в слабое поле, поскольку, как правило, атом, находящийся под ее влиянием, лежит в плоскости этой группы. Сигнал метильной группы  $\text{CH}_3$ ,

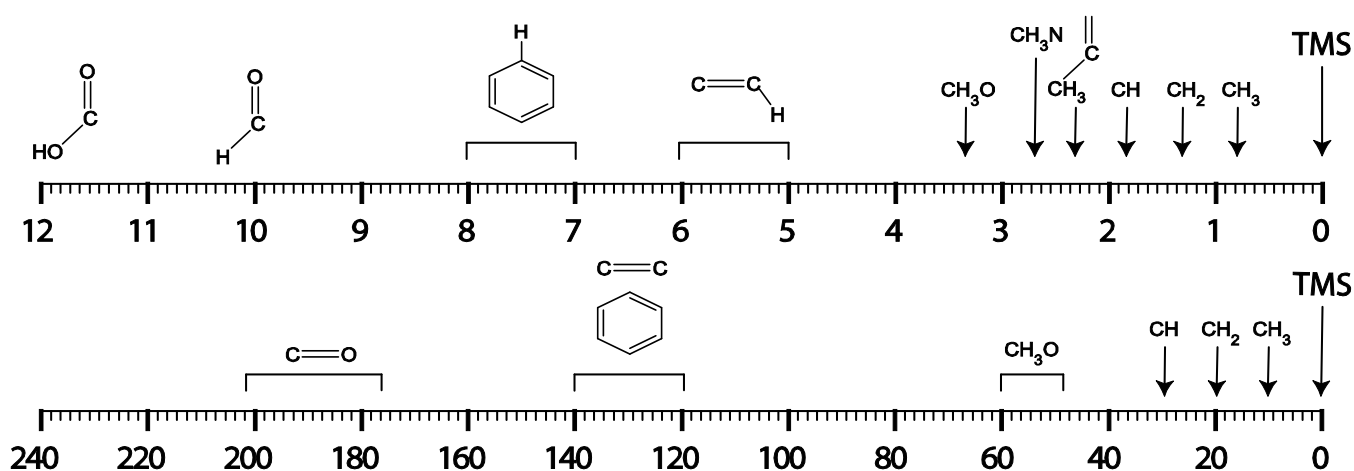


Рис. 2

расположенной рядом с карбонильной группой C=O, будет сдвинут в слабое поле на 30 и 2 м.д. в случае ЯМР  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  соответственно, в то время как двойная связь сдвинет сигнал той же метильной группы соответственно на 120-130 и 5-6 м.д.

Совместное влияние электроотрицательного и ненасыщенного заместителя хорошо заметно на примере альдегидной группы,  $\delta$  которой составляет, приблизительно, 190 и 10 м.д. в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  соответственно. Тем не менее, существуют некоторые отклонения от указанной корреляции химических сдвигов в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Например, протоны ароматических групп, как правило, попадают в диапазон от 7 до 8 м.д., в то время как олефиновые протоны дают сигналы в диапазоне от 5 до 6 м.д. В то же время химические сдвиги ароматических и олефиновых атомов углерода в спектрах  $^{13}\text{C}$  приблизительно равны.

Наличие нескольких заместителей у углеродного атома приводит к тому, что его химический сдвиг чувствителен к искажению валентных углов за счет стерических взаимодействий, причем в большинстве случаев стерическая напряженность ведет к слабopольным сдвигам. В случае протонов такого эффекта не наблюдается, однако протоны являются более чувствительными, чем ядра углерода, к эффектам, передающимся непосредственно через пространство. Например, в спектре  $^1\text{H}$  ЯМР сложного эфира (CH–OC(O)R) сигнал протона CH-группы сдвинут по сравнению со спектром исходного спирта (CH–OH) на величину от 0.5 до 1 м.д., в то время как значение  $\delta$  соответствующего атома углерода практически не изменяется.

### **Эквивалентность ядер**

Ядра являются эквивалентными (характеризуются одним и тем же значением  $\delta$ ) либо в связи с симметрией молекулы (например, углероды метильных групп в молекуле ацетона  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), либо в связи с быстрым вращением вокруг одинарной связи (например, три метильных протона в молекуле уксусной кислоты  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Интегральная интенсивность (площадь под пиком в спектре ЯМР, чаще называемая



просто *интегралом*) сигналов в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР прямо пропорциональна числу эквивалентных ядер, к которым относится указанный сигнал. Например, интегральная интенсивность сигнала метильной группы  $\text{CH}_3$  будет в три раза больше, чем интегральная интенсивность сигнала группы  $\text{CH}$  в той же молекуле. В случае анализа спектров  $^{13}\text{C}$  интегральные интенсивности сигналов обычно не рассматривают, поскольку чаще всего они дополнительно зависят от числа протонов, связанным с атомом углерода.

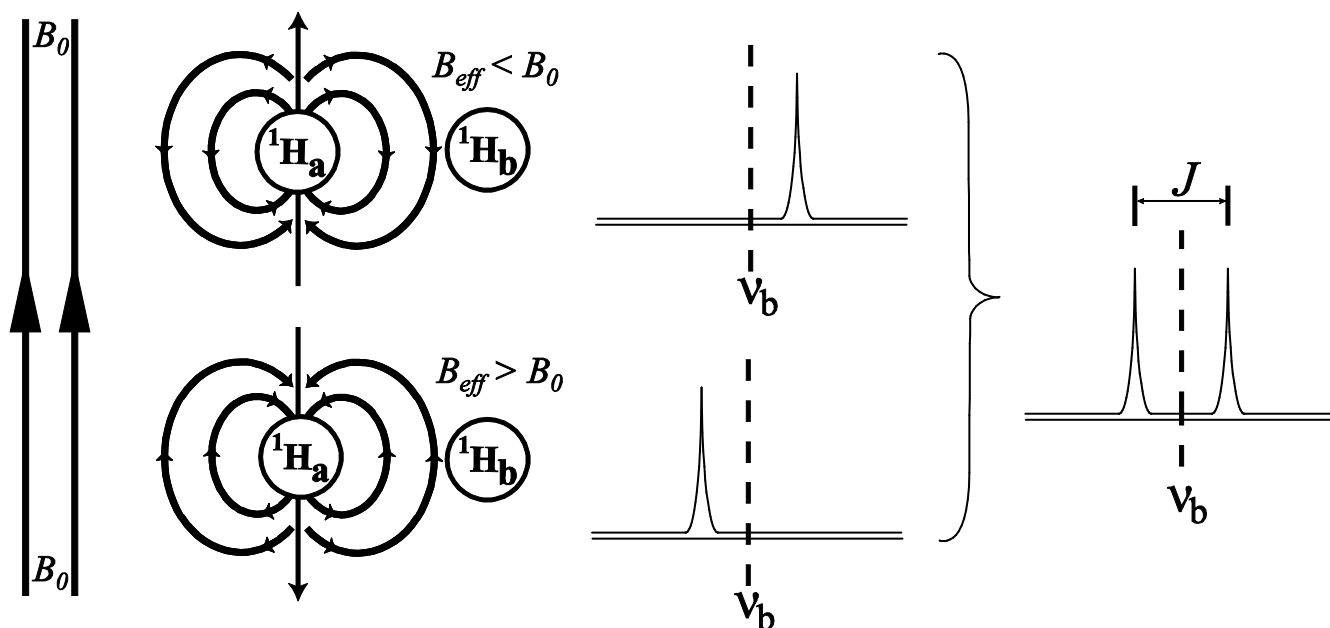


Рис. 3

### Спин-спиновое взаимодействие

Вторым важным источником информации о молекулярной структуре является так называемое спин-спиновое взаимодействие. Рассмотрим два протона, характеризующихся разными значениями химических сдвигов и связанных с двумя смежными атомами углерода ( $\text{H}_a\text{-C-C-H}_b$ ) в молекуле органического соединения. Магнитный момент ядра  $\text{H}_b$  может быть направлен либо вдоль магнитного поля спектрометра («вверх»), либо в противоположную сторону («вниз», см. Рис. 3). Магнитный момент ядра  $\text{H}_b$  приводит к небольшому изменению эффективной магнитной индукции поля ( $B_{\text{eff}}$ ) в месте расположения ядра  $\text{H}_a$ , либо увеличивая общее поле, либо уменьшая его в зависимости от ориентации магнитного момента ядра  $\text{H}_b$ . Поскольку резонансная

частота ядра всегда пропорциональна  $V_{\text{eff}}$  в месте расположения ядра, влияние ядра  $H_b$  изменяет резонансную частоту ядра  $H_a$  таким образом, что теперь ядро  $H_a$  резонирует на одной из двух близко расположенных частот.

Заселенности двух состояний ядра  $H_b$  приблизительно равны, поэтому сигнал ядра  $H_a$  будет расщеплен на два резонансных пика с одинаковой интенсивностью с расстоянием между ними в  $J$  герц, где  $J$  представляет собой так называемую *константу спин-спинового взаимодействия*. Аналогичным образом расщеплению с той же константой  $J$  подвергается сигнал ядра  $H_b$ . Данное взаимодействие передается по цепочке химических связей и, как правило, может быть обнаружено непосредственным образом в тех случаях, когда два ядра находятся на расстоянии трех или менее химических связей в молекуле.

В случае взаимодействия ядра с двумя и более протонами расщепление сигналов имеет значительно более сложный характер, так что число пиков превышает число эквивалентных протонов, на которых происходит расщепление, на единицу. Например, при наличии двух соседних эквивалентных протонов ( $H_a-C-CH_2$ ) протоны метиленовой группы могут находиться в четырех различных состояниях:  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\alpha$  и  $\beta\beta$  (Рис. 4). Если магнитный момент одного протона направлен «вверх» ( $\alpha$ ), а второго – «вниз» ( $\beta$ ), то в результате их взаимное (противоположное) влияние компенсируется, что приводит к отсутствию дополнительного сдвига ядра  $H_a$ . В том случае, когда магнитные моменты обоих ядер направлены «вверх», сигнал ядра  $H_a$  будет сдвинут в сильное поле на  $J$  Гц. Если оба ядра находятся в положении «вниз», то химический сдвиг ядра  $H_a$  будет больше на  $J$  Гц (слабопольный сдвиг).

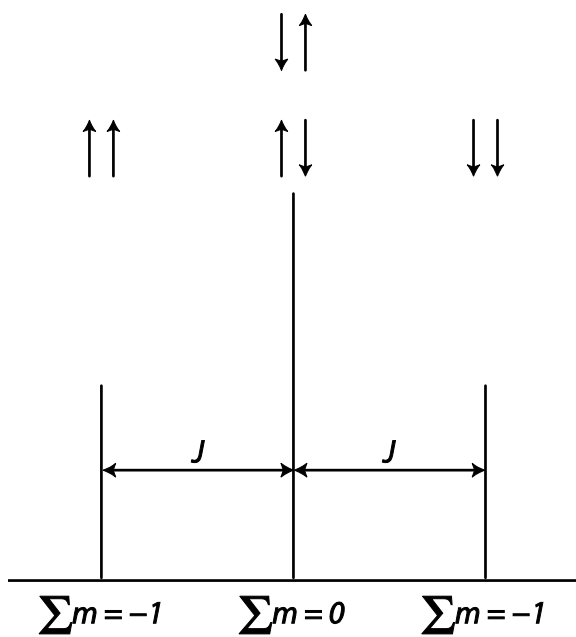
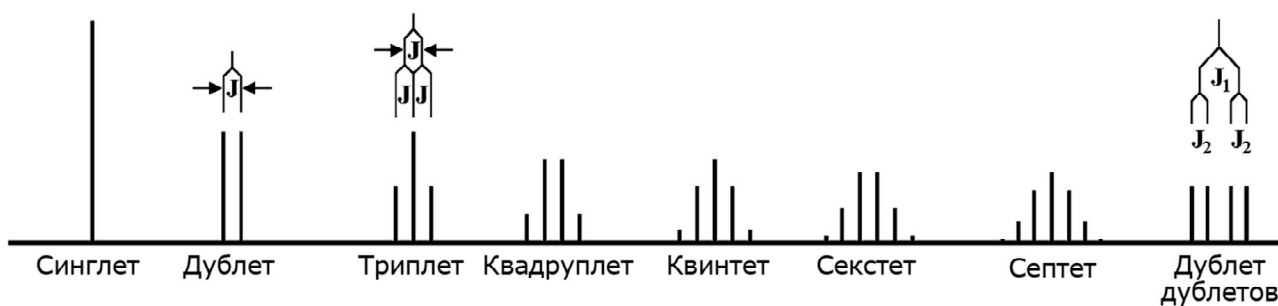


Рис. 4



синглет		1		нет соседних протонов					
дублет		1	1	один протон					
триплет		1	2	1	два протона				
квадруплет		1	3	3	1	три протона			
квинтет		1	4	6	4	1	четыре протона		
секстет		1	5	10	10	5	1	пять протонов	
септет		1	6	15	20	15	6	1	шесть протонов

Рис. 5

Поскольку вариант, при котором дополнительного сдвига центральной линии не происходит, может реализоваться двумя путями, интенсивность центральной линии будет в два раза выше, чем для других сигналов. В итоге это приведет к появлению «триплета» - трех линий, отстоящих друг от друга на  $J$  Гц, с соотношением интенсивности 1:2:1 (Рис. 5).

Аналогичное рассмотрение ситуации с большим числом соседних ядер приводит к общему случаю для  $n$  ядер, которые будут расщеплять сигнал данного ядра на  $n+1$  пиков с соотношением интенсивностей, определяемым в соответствии с *треугольником Паскаля* (Рис. 5).

Величина спин-спинового взаимодействия, измеренная по расстоянию между двумя компонентами мультиплета, зависит от двугранного угла  $H_a-C-C-H_b$ . Таким образом возможно получить информацию о стереохимии и конформации молекул в растворе. По причине зависимости констант  $J$  от геометрии молекулы часто

наблюдается ситуация, в которой ядро взаимодействует с несколькими неэквивалентными протонами, причем константы взаимодействия различаются. В простейшем случае взаимодействия с двумя неэквивалентными протонами в спектре будут наблюдаться четыре пика с равной интенсивностью, т.е. дублет дублетов (Рис. 5).

### **Ядерный эффект Оверхаузера**

Третий тип информации, предоставляемый спектроскопией ЯМР, связан с так называемым ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО). Данный эффект связан с взаимодействием двух ядер непосредственно через пространство (а не по цепочке связей, как это было в случае спин-спинового взаимодействия). Слабое радиочастотное облучение одного из ядер на его резонансной частоте приводит к выравниванию заселенностей в двухуровневой системе. Этот процесс приводит к изменению заселенностей уровней ядер, располагающихся вблизи облучаемого ядра. Этот эффект зависит исключительно от расстояния между двумя ядрами (интенсивность взаимодействия обратно пропорциональна расстоянию между взаимодействующими ядрами в шестой степени), даже если они удалены друг от друга по цепочке связей. Как правило, ЯЭО можно обнаружить в случае протонов, находящихся на расстоянии до 5Å. Измерение расстояний таким образом часто применяют для определения точных структур белков и нуклеиновых кислот в растворе.

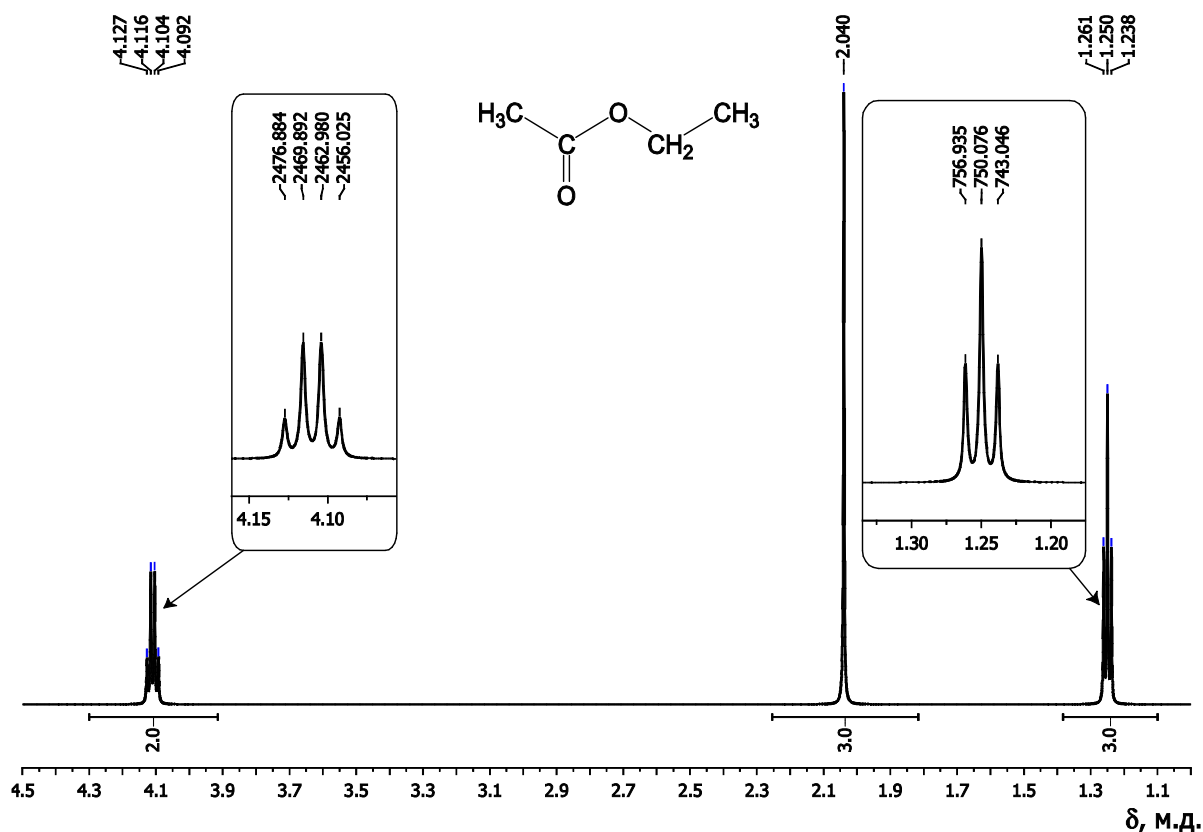
### **Гетероядерная спектроскопия ЯМР**

Хотя протон является наиболее предпочтительным ядром для исследования методом ЯМР в силу того, что его гиромагнитное отношение максимально среди химических элементов (за исключением трития), некоторые другие ядра также находят широкое применение в спектроскопии ЯМР. Как уже было указано, в первую очередь это ядро изотопа углерода  $^{13}\text{C}$ . Природное содержание этого изотопа составляет всего 1.1%, что вместе со сравнительно небольшим гиромагнитным отношением (в четыре раза меньше, чем у протона), сильно снижает

чувствительность метода. Одним решением проблемы является длительное накопление сигнала, при котором один и тот же спектр регистрируется сотни и тысячи раз подряд. При этом соотношение сигнал-шум в усредненном спектре растет как квадратный корень из числа зарегистрированных спектров. Тем не менее, даже при многочасовой регистрации не всегда удается достичь удовлетворительного качества спектров, поэтому с целью дополнительного улучшения соотношения сигнал-шум при помощи специальной импульсной последовательности добиваются подавления спин-спинового взаимодействия и увеличения интенсивности сигналов за счет эффекта Оверхаузера. При этом в зависимости от числа протонов, связанных с конкретным атомом углерода, может наблюдаться значительное увеличение интенсивности сигнала, что ограничивает использование значений интегральных интенсивностей сигналов для интерпретации спектра.

### **Алгоритм анализа спектра ЯМР $^1\text{H}$**

- 1. Число мультиплетов** в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  (за вычетом пиков, соответствующих растворителю и примесям) соответствует числу магнитно-неэквивалентных атомов водорода в молекуле. Например, в молекуле этилацетата  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  существуют три группы таких протонов, поэтому в спектре наблюдается три группы сигналов.
- 2. Интегральные интенсивности** каждого из мультиплетов соответствуют числу эквивалентных атомов водорода в составе каждой из групп. Например, в спектре этилацетата интенсивности пиков, соответствующих группам  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}_2$ , будут равны 3 и 2 соответственно.
- 3. Химические сдвиги** каждого мультиплета предоставляют информацию о химическом окружении каждой группы протонов. Например, сигналы протонов метильной группы  $\text{CH}_3$  сдвинуты в сильное поле по сравнению с протонами метиленовой группы  $\text{CH}_2$ , а сигнал метильной группы, связанной с карбоксильным



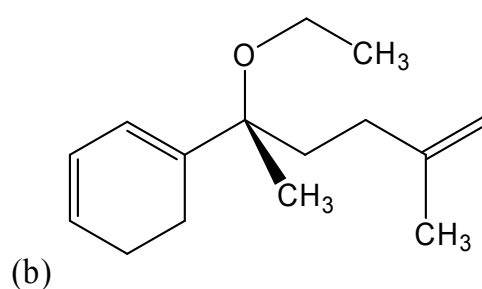
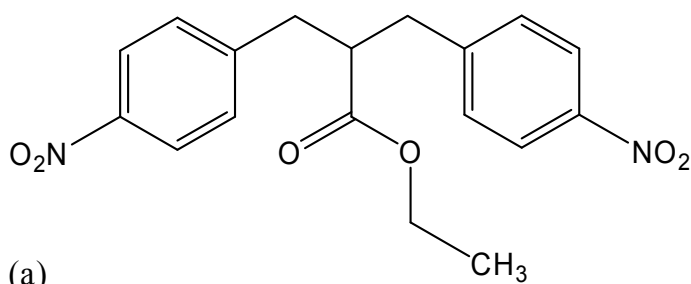
заместителем будет сдвинут в слабое поле по сравнению с метильной группой, входящей в состав этильного заместителя.

4. **Тонкая структура** каждого мультиплета позволяет сделать вывод о количестве протонов у соседних атомов углерода. Например, сигнал одной из метильных  $\text{CH}_3$  групп в случае этилацетата представляет собой триплет (три сигнала с распределением интенсивностей 1:2:1) вследствие спин-спинового взаимодействия с двумя эквивалентными протонами метиленовой  $\text{CH}_2$  группы.
5. **Величина констант спин-спинового взаимодействия  $J$**  позволяет сделать вывод о торсионных углах в молекуле. Например, в случае этилацетата константа взаимодействия протонов метильной и метиленовой группы составляет 7 Гц, что свидетельствует о быстром вращении вокруг связи  $\text{C} - \text{C}$  в этой молекуле.
6. Некоторые **динамические процессы**, происходящие в растворе, оказывают дополнительное влияние на форму спектра ЯМР. Так, при регистрации спектра раствора этанола в тяжелой воде ( $\text{D}_2\text{O}$ ) быстрый обмен протона гидроксильной группы на дейтерий

приведет к тому, что в спектре не будет наблюдаться сигнала гидроксильной группы.

### Задания для проверки:

1. Предскажите форму линии спектра ЯМР указанных соединения. Для каждого типа протонов укажите приблизительный химический сдвиг, интегральную интенсивность и мультиплетность сигнала. Учитывать только вицинальные и геминальные константы спин-спинового взаимодействия.



2. Для каждого соединения предложите структуру, которая согласуется с приведенными данными спектроскопии  $^1\text{H}$  ЯМР:

1) $\text{C}_6\text{H}_4\text{BrNO}_2$	8.1 (s, 1H)	3) $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{Br}$	2.3 (s, 3H)
	7.6 (d, 1H)		2.5 (t, 2H)
	7.3 (t, 1H)		2.6 (m, 2H)
	7.1 (d, 1H)		6.1 (m, 1H)
			6.0 (m, 1H)
2) $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$	2.1 (t, 2H)		5.9 (m, 1H)
	2.3 (t, 2H)		7.2 (d, 1H)
	4.8 (s, 2H)		7.4 (d, 1H)
	7.1-7.3 (m, 4H)		7.5 (s, 1H)

4) $C_7H_{13}Cl_3$	1.4 (septet, 1H)	6) $C_6H_{13}Cl$	1.0 (t, 6H)
	1.3 (m, 6H)		1.3 (q, 4H)
	3.2 (t, 6H)		1.1 (s, 3H)
5) $C_7H_{13}Cl$	1.2 (d, 3H)	7) $C_7H_{12}OCl_2$	1.0 (t, 3H)
	2.3 (s, 3H)		1.3 (s, 3H)
	2.4 (s, 3H)		1.5 (t, 2H)
	2.5 (m, 2H)		2.3 (t, 2H)
	4.3 (m, 1H)		2.4 (q, 2H)
	6.3 (t, 1H)		

3. На рисунке приведены четыре мультиплета и указаны частоты, соответствующие каждому пику, в герцах. Определите типы мультиплетов (квартет дублетов, триплет квинтетов и т.д.) и определите, с какой константой происходит каждое расщепление.

