

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 ν_0 – так называемая ларморова частота, γ – 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» (α) или «вниз» (β) (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 α , в котором спин направлен по полю, будет энергетически более выгодно, чем состояние β . 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 (ΔE), и эта энергия связана с частотой электромагнитного излучения:

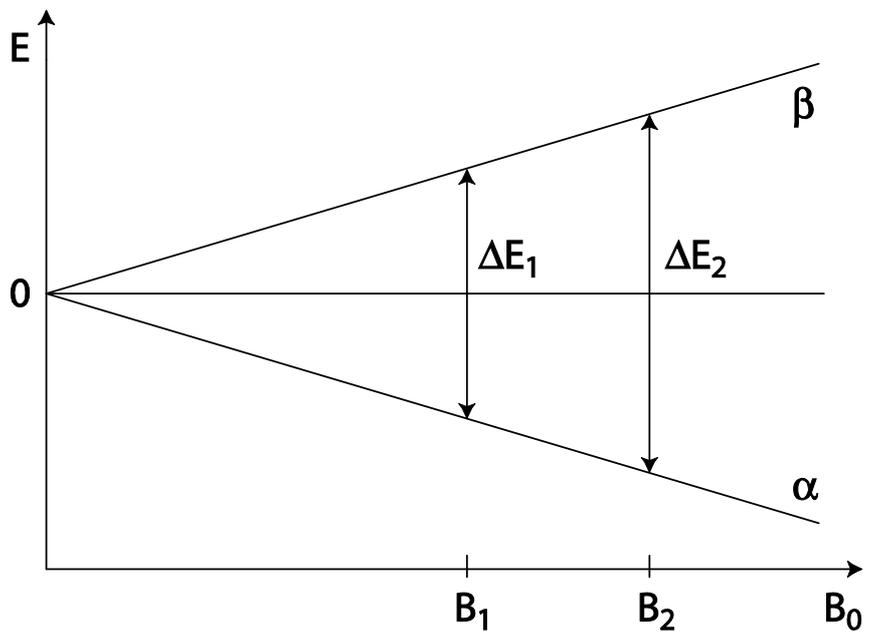


Рис. 1

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

Очевидно, что чем больше энергия расщепления уровней в магнитном поле ΔE , 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
^1H	100	1	600
^{13}C	1.1	0.016	150
^{15}N	0.37	0.001	60
^{19}F	100	0.83	564
^{31}P	100	0.066	242

Зависимость величины ΔE 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 небιологических 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 (δ). В качестве стандарта используют химический сдвиг тетраметилсилана (ТМС), химический сдвиг сигнала которого в спектрах ЯМР ^1H , ^{13}C и ^{29}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 ^1H и ^{13}C

Интерпретация спектров ЯМР невозможна без общего понимания закономерностей изменения химических сдвигов. Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}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 δ для ядер углерода ^{13}C (0 – 200 м.д.) значительно превышает таковой для протонов ^1H (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 $\text{CH} > \text{CH}_2 > \text{CH}_3$ (^1H : 0.8, 1.2, 1.6; ^{13}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. (^1H) и 50–85 (^{13}C) в случае связи $\text{C}-\text{O}$. Так же, как и в случае углеводородного окружения, при увеличении степени замещения углеродного атома наблюдаются аналогичные слабopольные сдвиги: $\text{CH}_3\text{O} < \text{CH}_2\text{O} < \text{CHO} < \text{C}_{\text{четв}}$ (в спектрах ^{13}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 CH_3 ,

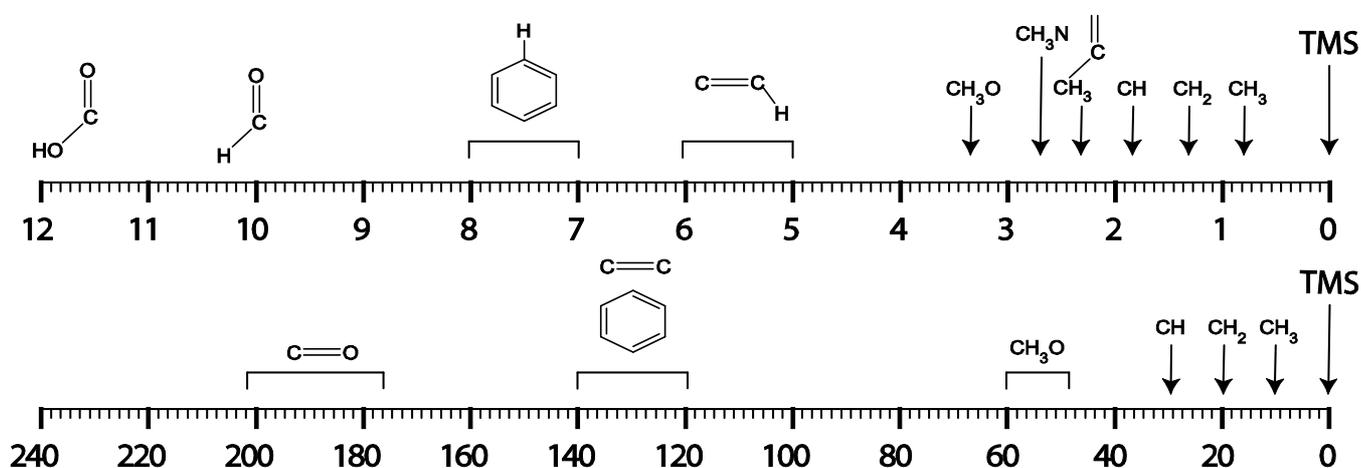


Рис. 2

расположенной рядом с карбонильной группой C=O, будет сдвинут в слабое поле на 30 и 2 м.д. в случае ЯМР ^{13}C и ^1H 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, δ которой составляет, приблизительно, 190 и 10 м.д. в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C соответственно. Тем не менее, существуют некоторые отклонения от указанной корреляции химических сдвигов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}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}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 ^1H 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 δ соответствующего атома углерода практически не изменяется.

Эквивалентность ядер

Ядра являются эквивалентными (характеризуются одним и тем же значением δ) либо в связи с симметрией молекулы (например, углероды метильных групп в молекуле ацетона CH_3COCH_3), либо в связи с быстрым вращением вокруг одинарной связи (например, три метильных протона в молекуле уксусной кислоты CH_3COOH). Интегральная интенсивность (площадь под пиком в спектре ЯМР, чаще называемая

просто *интегралом*) сигналов в спектрах ^1H ЯМР прямо пропорциональна числу эквивалентных ядер, к которым относится указанный сигнал. Например, интегральная интенсивность сигнала метильной группы CH_3 будет в три раза больше, чем интегральная интенсивность сигнала группы CH в той же молекуле. В случае анализа спектров ^{13}C интегральные интенсивности сигналов обычно не рассматривают, поскольку чаще всего они дополнительно зависят от числа протонов, связанным с атомом углерода.

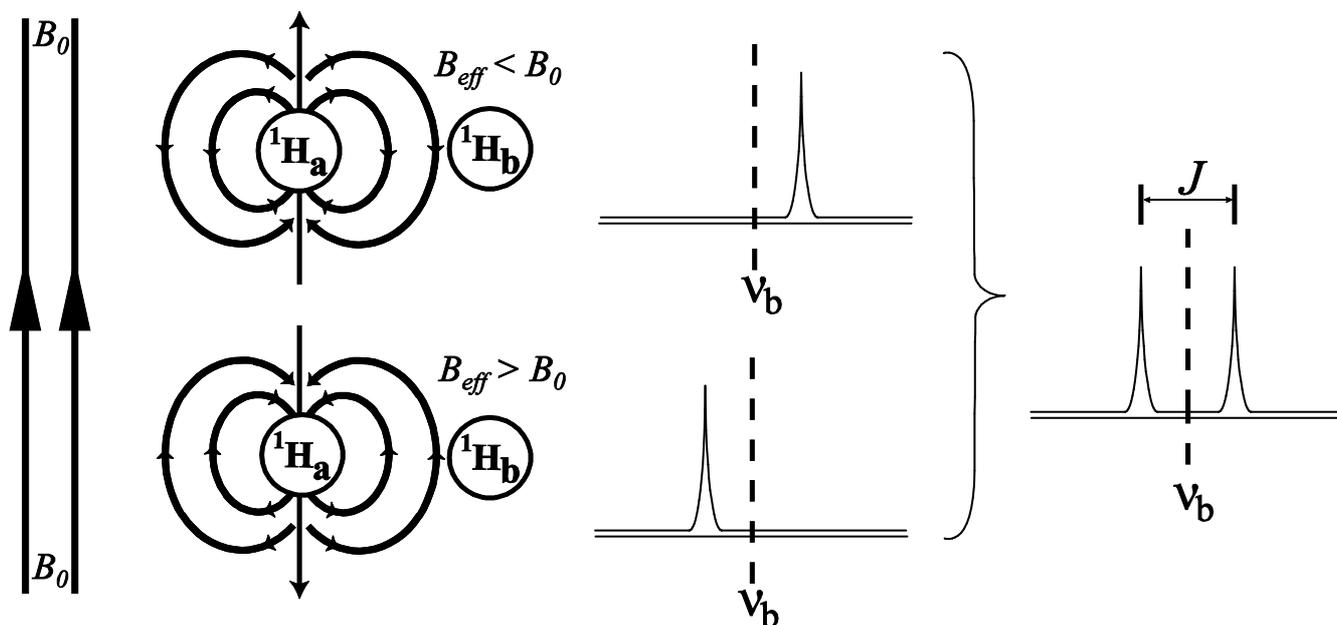


Рис. 3

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 H_b может быть направлен либо вдоль магнитного поля спектрометра («вверх»), либо в противоположную сторону («вниз», см. Рис. 3). Магнитный момент ядра H_b приводит к небольшому изменению эффективной магнитной индукции поля (B_{eff}) в месте расположения ядра H_a , либо увеличивая общее поле, либо уменьшая его в зависимости от ориентации магнитного момента ядра H_b . Поскольку резонансная

частота ядра всегда пропорциональна V_{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» (α), а второго – «вниз» (β), 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).

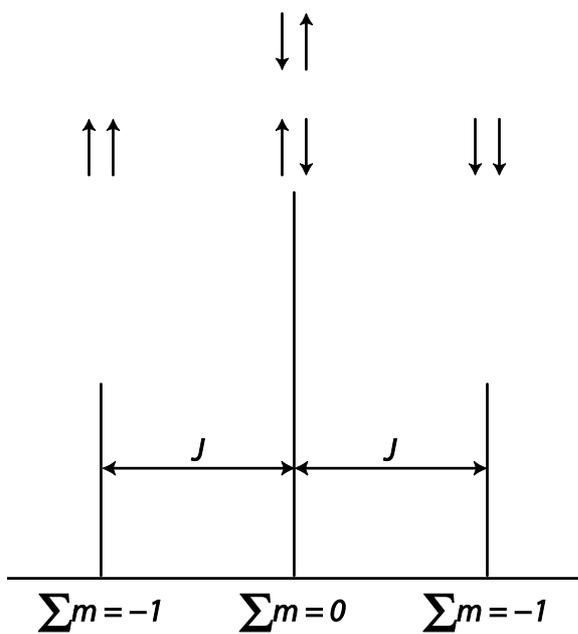
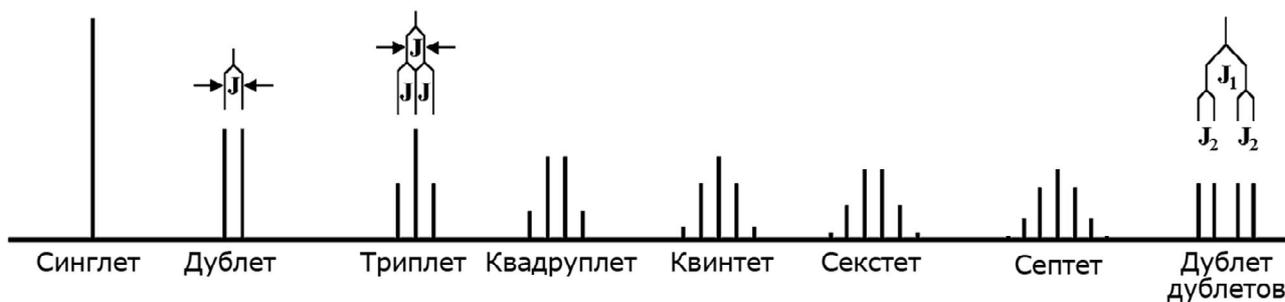


Рис. 4



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.

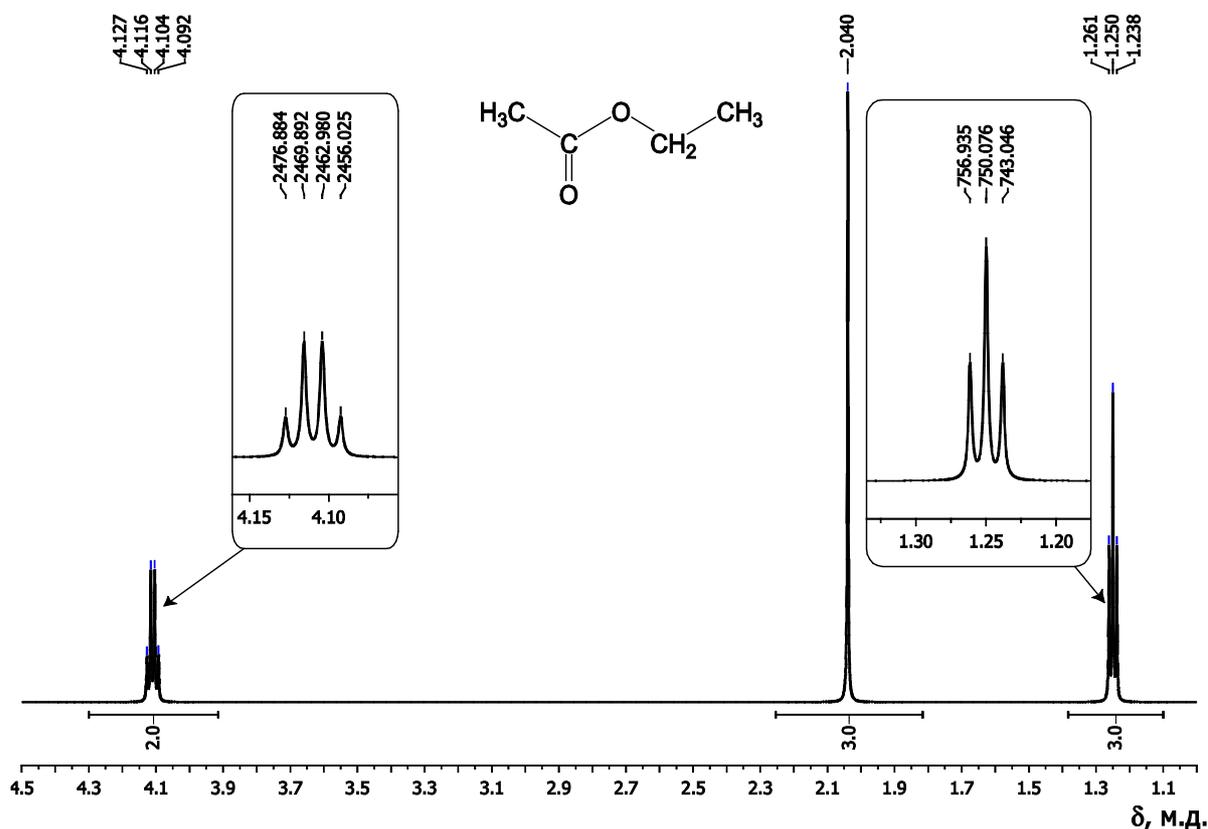
Гетероядерная спектроскопия ЯМР

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}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 ^1H

- 1. Число мультиплетов** в спектре ЯМР ^1H (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 CH_3 и 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 CH_3 сдвинуты в сильное поле по сравнению с протонами метиленовой группы CH_2 , а сигнал метильной группы, связанной с карбоксильным



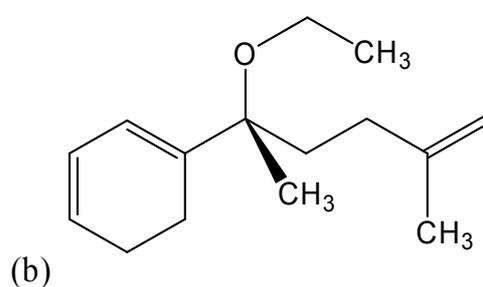
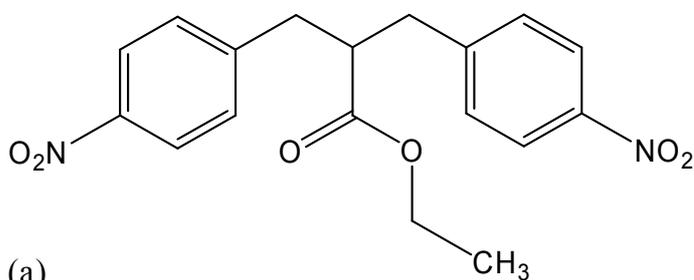
заместителем будет сдвинут в слабое поле по сравнению с метильной группой, входящей в состав этильного заместителя.

4. **Тонкая структура** каждого мультиплета позволяет сделать вывод о количестве протонов у соседних атомов углерода. Например, сигнал одной из метильных 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 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 (D_2O) 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 ^1H 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.

