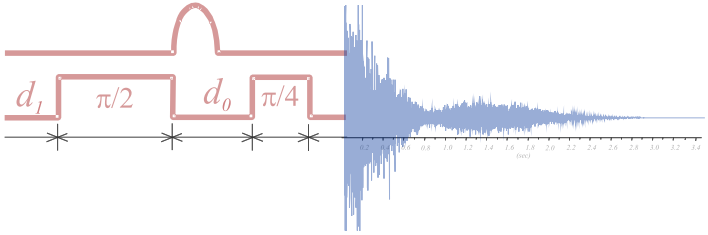
Филипп Владимирович Тоукач

д.х.н., вед. н.с., лаб. 21 ИОХ РАН, профессор НИУ ВШЭ

Спектроскопия ЯМР в органической химии



[идентификация и контроль] **[ЯМР высокого разрешения]** [твердотельный ЯМР] [томография]

Сайт курса: **http://toukach.ru/rus/nmrcours.htm**

Контакты: e-mail: **phyl@toukach.ru**
тел.: **+7 916 172-4710** **(13:00-22:00 MSK)**
ИОХ: **к. 432** **(главный корпус)**

ver 3.0

Общая информация

Занятия один раз в неделю по средам с 15:00 до 17:00-17:30.
Пропуска делаете сами. Не опаздывать!

Всего ~12 лекций, 2 семинара, 1 консультация, 1 тест, 1 экзамен, 1 пересдача.
Слайды желательно распечатать и делать пометки прямо на них.

Вопросы можно задавать:

- во время лекции (лучше всего),
- на перерыве и после занятия,
- в контакте или по e-mail,
- по телефону (только оргвопросы)

Программа, книги и методические материалы,
копии слайдов, вопросы к экзамену, задачи для самопроверки:

http://toukach.ru/rus/nmrcours.htm

Дополнительная литература:

- Э. Дероум «Современные методы ЯМР для химических исследований»
- A. Claridge «Modern NMR techniques in Organic Chemistry»
- E.D. Becker «High resolution NMR. Theory and practical applications»
- Х. Гюнтер «Введение в спектроскопию ЯМР»
- Н.М. Сергеев «Спектроскопия ЯМР для химиков-органиков»

Контрольные мероприятия

Ответы на семинарах:

- объяснить (с моей помощью) решение того или иного примера *N*5 баллов*

Тест (120 мин, автоматизирован):

- 40 вопросов на время, выбор <u>всех</u> правильных из 5-10 приведенных вариантов ответа *100 баллов*
  (требуется ноутбук или планшет с интернетом - Windows, Android, Linux)

Экзамен (180+ мин, письменно):

- объяснить каждую линию в сигналах в спектре ЯМР ^{1}H известной структуры *10 баллов*
- установить структуру (~30 атомов) по спектрам ЯМР ^{1}H, DEPT-135 и брутто-формуле *40 баллов*
- установить, каким образом связаны известные остатки в структуре из трех остатков, по спектрам ЯМР ^{1}H, DEPT-135, COSY, HSQC, NOESY *50 баллов*

Альтернативный экзамен:

- подготовить лекцию по выбранной теме в рамках ЯМР (~5 векторных слайдов), апробировать ее на студентах, довести до совершенства с учетом моих вопросов (процесс итеративный).

Результаты нормируются с учетом среднего уровня группы.

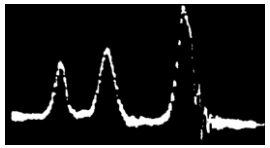
Пересдать тест нельзя, он проводится ОДИН раз.

Пересдача (устная беседа по всему курсу + другие задачи), как правило, не результативна.

Ядерный магнитный резонанс

взаимодействие радиоизлучения с атомными ядрами в магнитном поле зависит от структуры вещества

История



1946	наблюдение явления ЯМР	Bloch, Purcell
1953	взаимодействие через пространство (NOE)	Overhauser
1966	связь частотных и временных данных (Фурье-спектроскопия)	Ernst, Anderson
1975	двумерная спектроскопия ЯМР	Jeener, Ernst
1980	ЯМР-установление пространственного строения белка	Wüthrich
~1988	изотопные метки и 3D ЯМР	Bax, Ikura, Kay et al.
~1997	ЯМР биополимеров (100+ kDa)	Pervushin et al.
2015	курс ЯМР для аспирантов ИОХ :)	Toukach

1944 (физика)	Rabi [резонансный метод записи магнитных состояний ядер]
1952 (физика)	Bloch, Purcell [открытие ЯМР]
1991 (химия)	Ernst [развитие методологии ЯМР]
2002 (химия)	Wüthrich [установление 3D структуры с помощью ЯМР]
2003 (медицина)	Lauterbur, Mansfield [магнитнорезонансная томография]

Karplus, 1963 одна из самых цитируемых статей в химии
[зависимость наблюдаемых параметров ЯМР от торсионного угла между атомами]

Применение ЯМР в органической химии

- Доказательство строения синтетических соединений
  (Fingerprint; “не противоречит”, “доказывает”)
- Установление строения природных соединений
  (*первичная и вторичная структура, абсолютные конфигурации, стехиометрия компонентов*)
- Конформационные исследования
- Исследование обменных процессов
- Исследование путей реакций

☺ чувствительность к изменениям в структуре и конформации
применимость к смесям
недеструктивность
миллиграммовые количества

☹ ограничения на агрегатное состояние или растворимость
невозможность автоматического анализа сложных спектров

Что мы будем изучать?

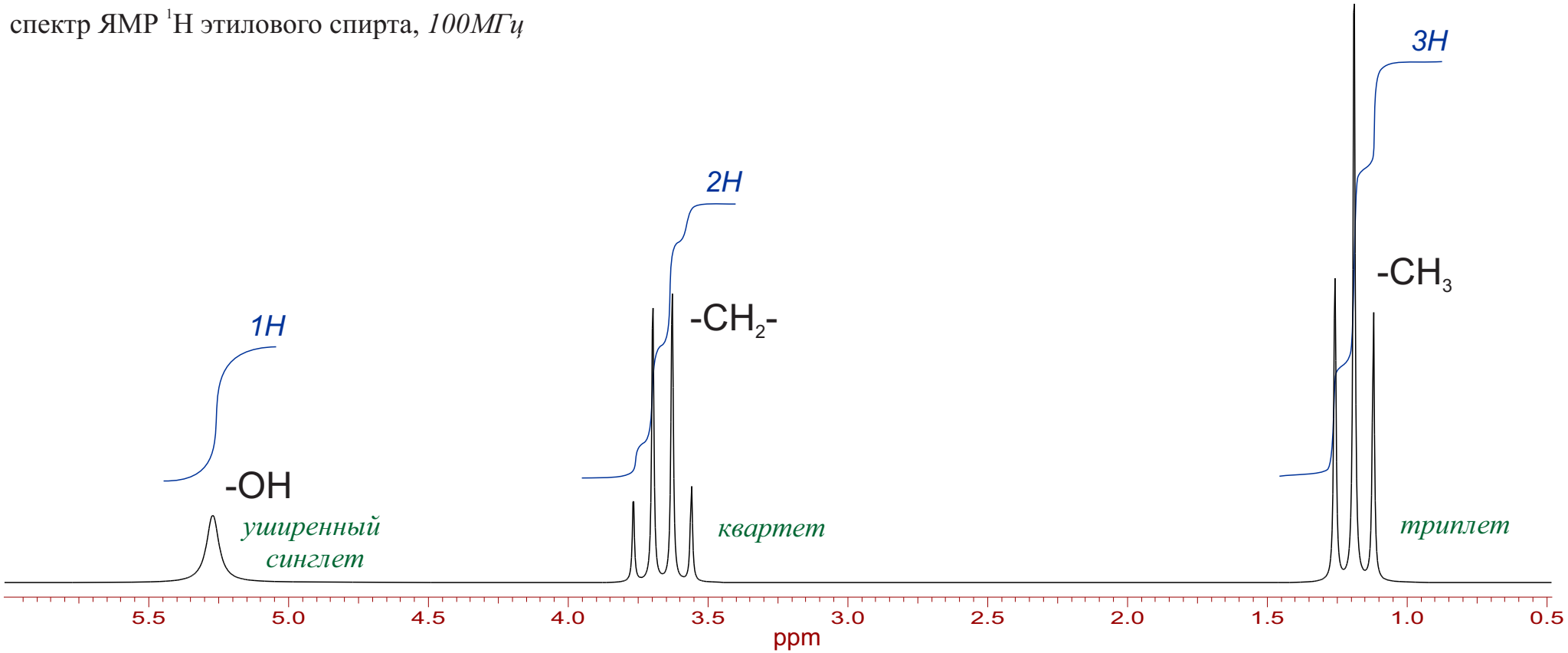
- общая информация о методе
- химический сдвиг
- спин-спиновое взаимодействие
- корреляция структура-спектр *
- примеры структурных исследований *
- основы импульсного ЯМР
- практическая реализация ЯМР
- ядерный эффект Оверхаузера
- корреляционные эксперименты

** много и долго*

Основные характеристики спектра ЯМР

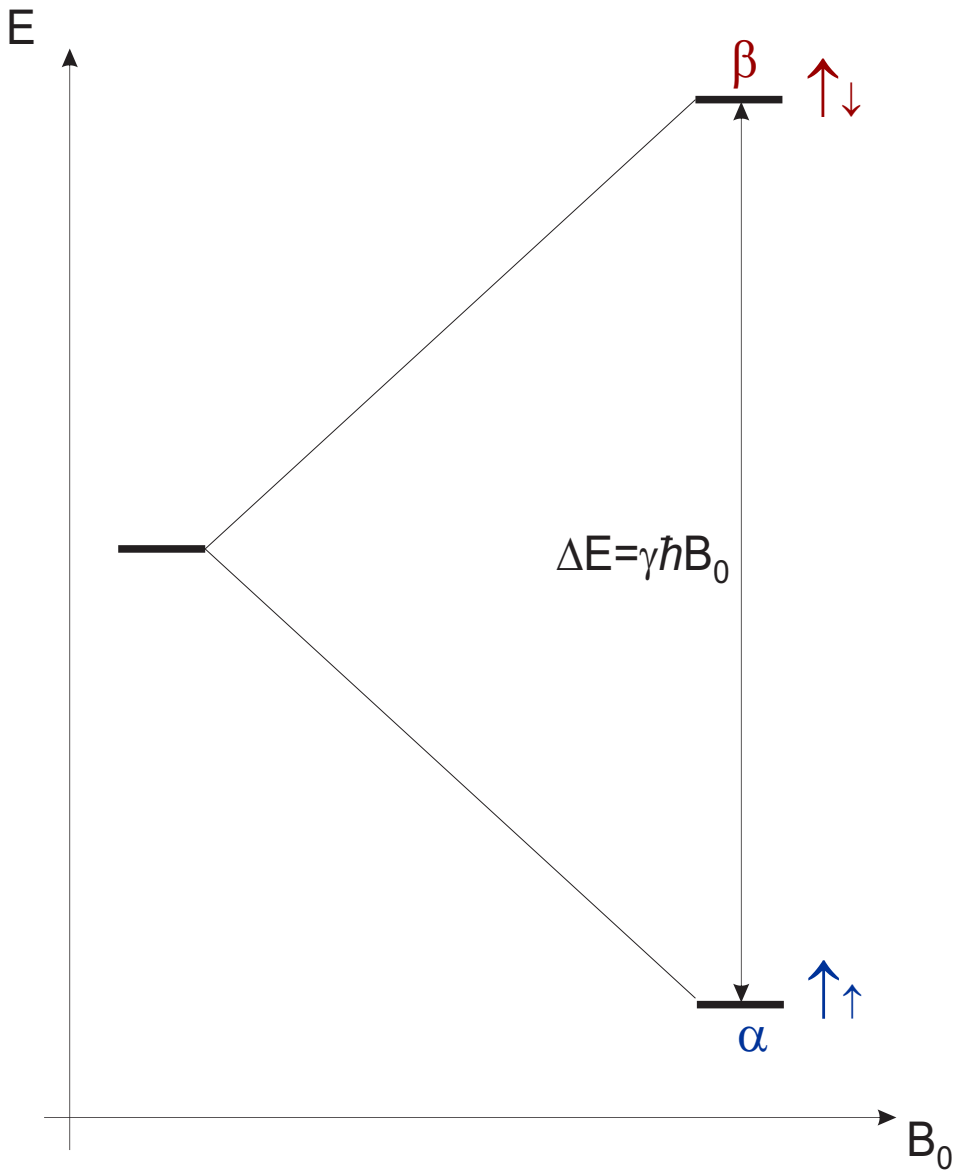
- количество сигналов $\Rightarrow$ *количество неэквивалентных ядер данного типа*
- положение сигналов (химический сдвиг) $\Rightarrow$ *распределение электронной плотности по молекуле*
- форма сигналов (спиновое расщепление) $\Rightarrow$ *тип и количество соседних ядер, конформация, обмен*
- площадь сигналов $\Rightarrow$ *количество эквивалентных ядер, давших сигнал*

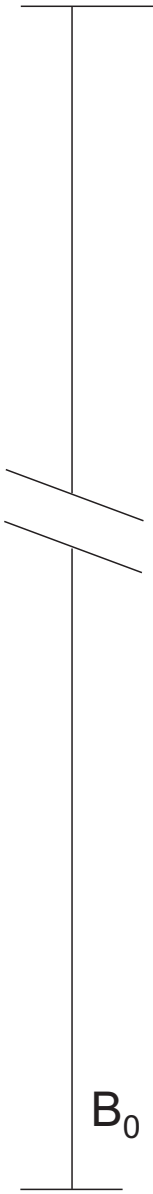
спектр ЯМР ^{1}H этилового спирта, *100МГц*



Ядра в магнитном поле

спиновые состояния ядра
с гиромагнитным отношением γ:





экранирование электронами

$B=B_0(1-\sigma)$

экранирование электронами
других ядер

$\sigma=\sigma_d+\sigma_p$

парамагнитный вклад в константу экранирования зависит от химического окружения

⇩

магнитное поле, в котором находится ядро, зависит от структуры соединения

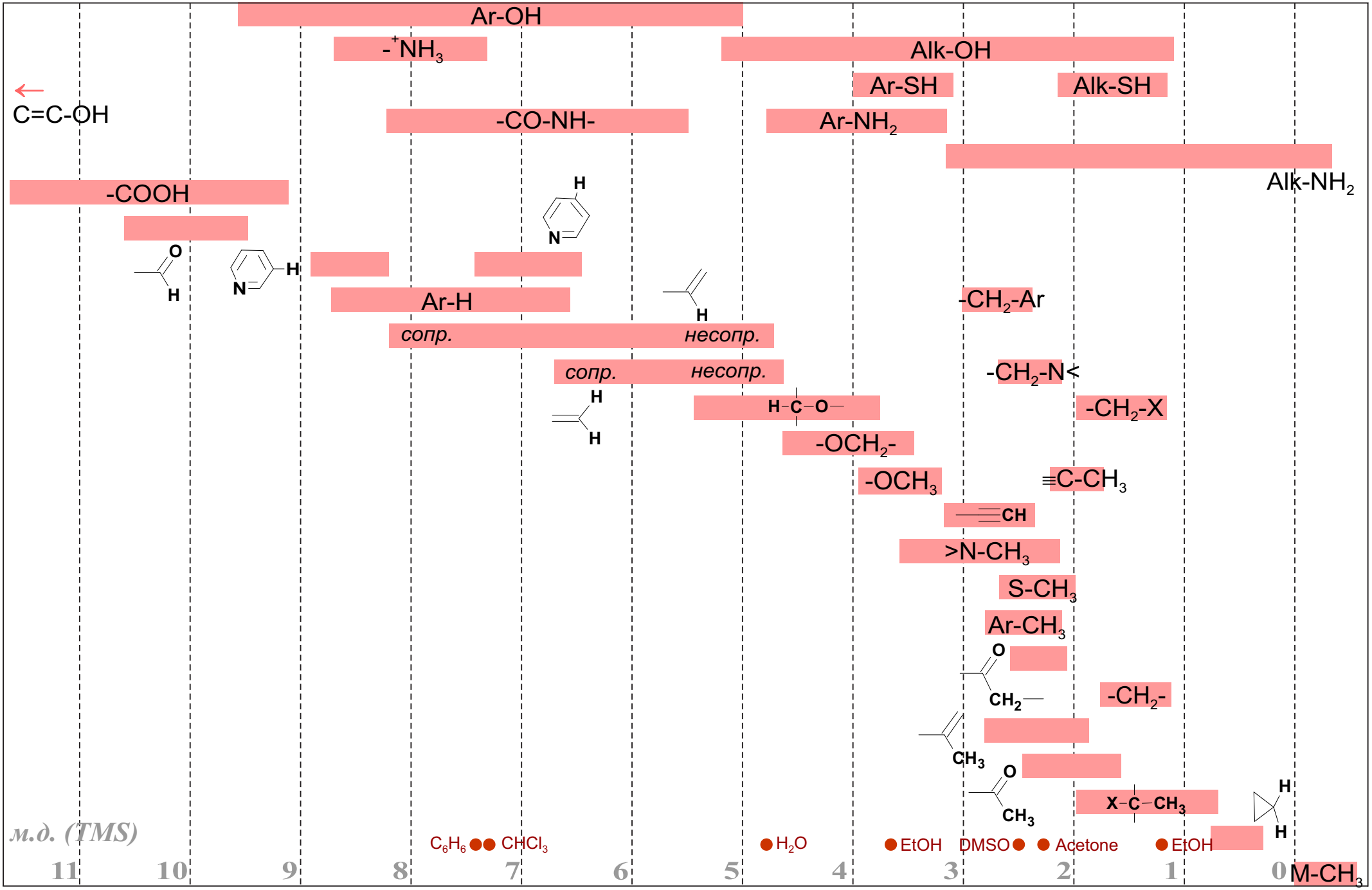
химический сдвиг

степень ослабления поля
(=уменьшения резонансной частоты)
относительно какого-л. стандарта

$$\delta = \frac{\nu-\nu_{эталон}}{\nu_0}$$

измеряется в м.д. (=ppm)

Химические сдвиги ^1H



Ф. Тоукач: слайд 4

Некоторые магнитно-активные ядра

ядро	природное содержание, %	чувствительность		спин	диапазон химических сдвигов, м.д.	стандарт	ларморова частота (МГц) при B_0=7.05 Тл
		относительная	абсолютная				
^{1}H	99.98	1.00	1.00	½	18..-1	$SiMe_4$ (TMS)	300.0
^{2}D	0.015	$9.65*10^{-3}$	$1.45*10^{-6}$	**1**	18..-1	$SiMe_4$-*d12*	46.05
^{11}B	80.42	0.17	0.13	**3/2**	100..-120	$BF_3 \cdot Et_2O$	96.25
^{13}C	1.108	$1.59*10^{-2}$	$1.76*10^{-4}$	½	240..-10	$SiMe_4$ (TMS)	75.43
^{14}N	99.63	$1.01*10^{-3}$	$1.01*10^{-3}$	**1**	1200..-500	$MeNO_2$	21.67
^{15}N	0.37	$1.04*10^{-3}$	$3.85*10^{-6}$	- ½	1200..-500	$MeNO_2$	30.40
^{17}O	0.037	$2.91*10^{-2}$	$1.08*10^{-5}$	**- 5/2**	1400..-100	H_2O	40.67
^{19}F	100.0	0.83	0.83	½	100..-300	$CFCl_3$	282.23
^{29}Si	4.70	$7.84*10^{-3}$	$3.69*10^{-4}$	- ½	100..-400	$SiMe_4$ (TMS)	59.60
^{31}P	100.0	$6.63*10^{-2}$	$6.63*10^{-2}$	½	230..-200	H_3PO_4	121.44

чувствительность ($\sim\gamma^3$; $S/N \sim B_0^{3/2}\gamma^{5/2}$) : абсолютная = относительная × природное содержание

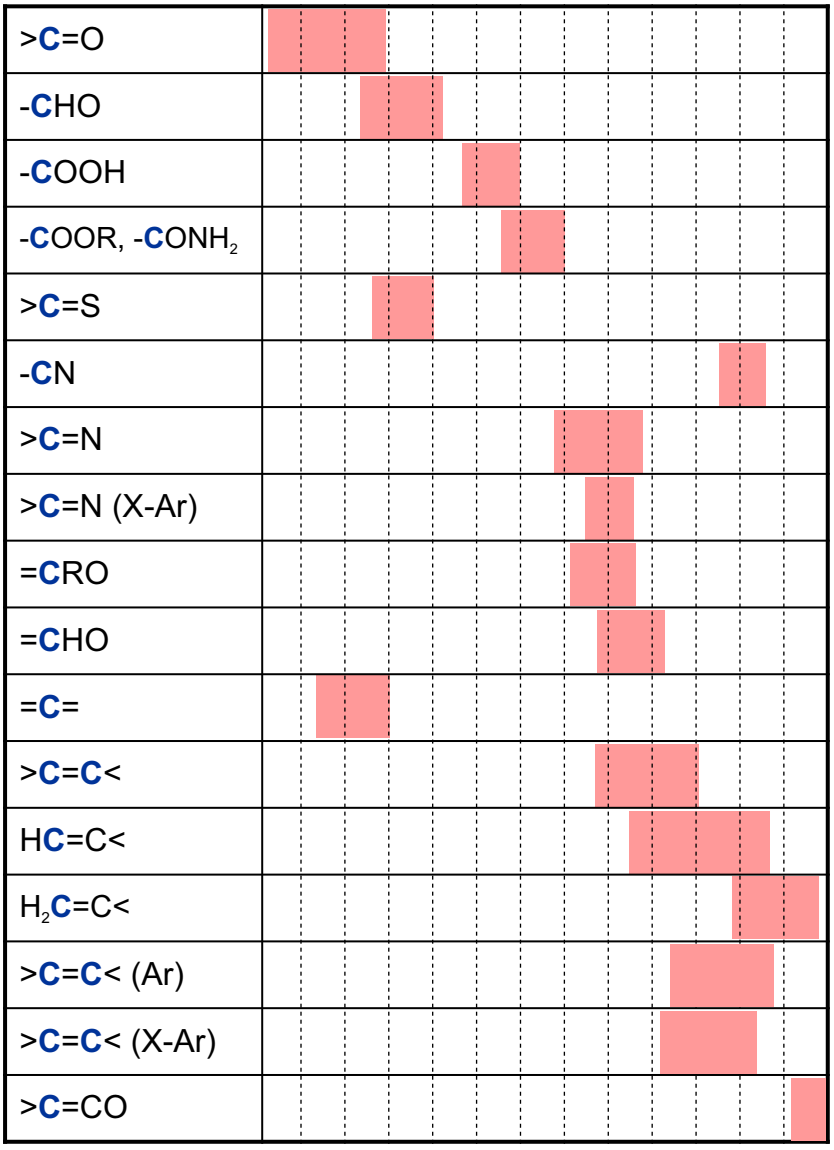
квадрупольные ядра - быстрая релаксация, широкие линии (для ^{33}S, Br, Cl, ... - сверхширокие)

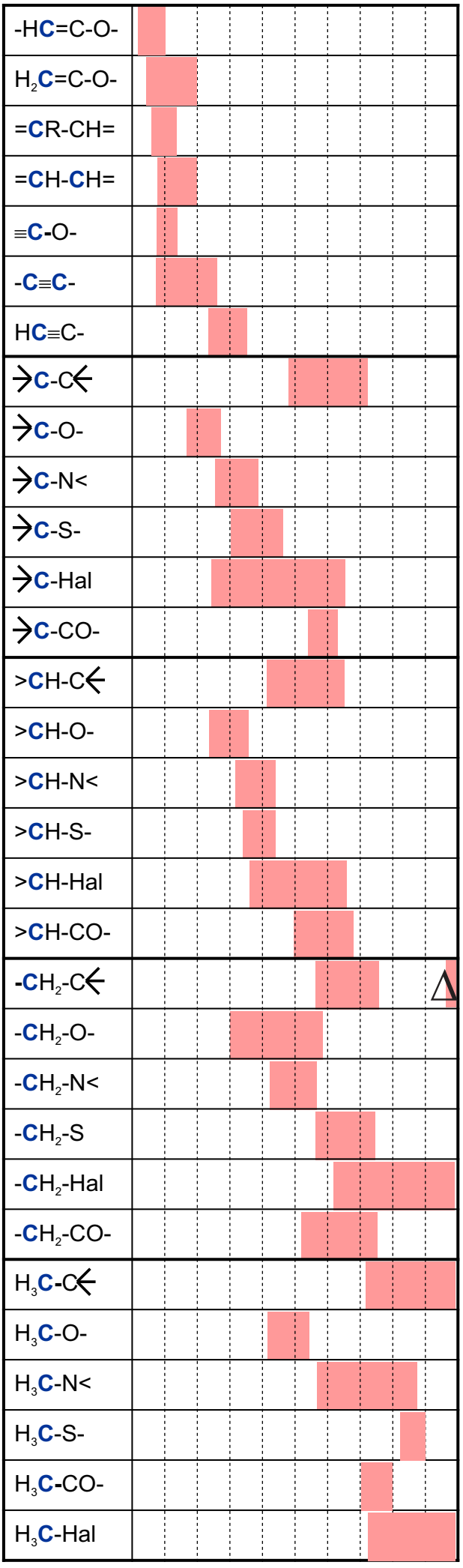
стандарты:
внешние, внутренние, SR

DSS $Me_3Si-(CH_2)_3-SO_3H$:
водорастворимый, δ_H=0, δ_C=1.6

Химические сдвиги ^{13}C

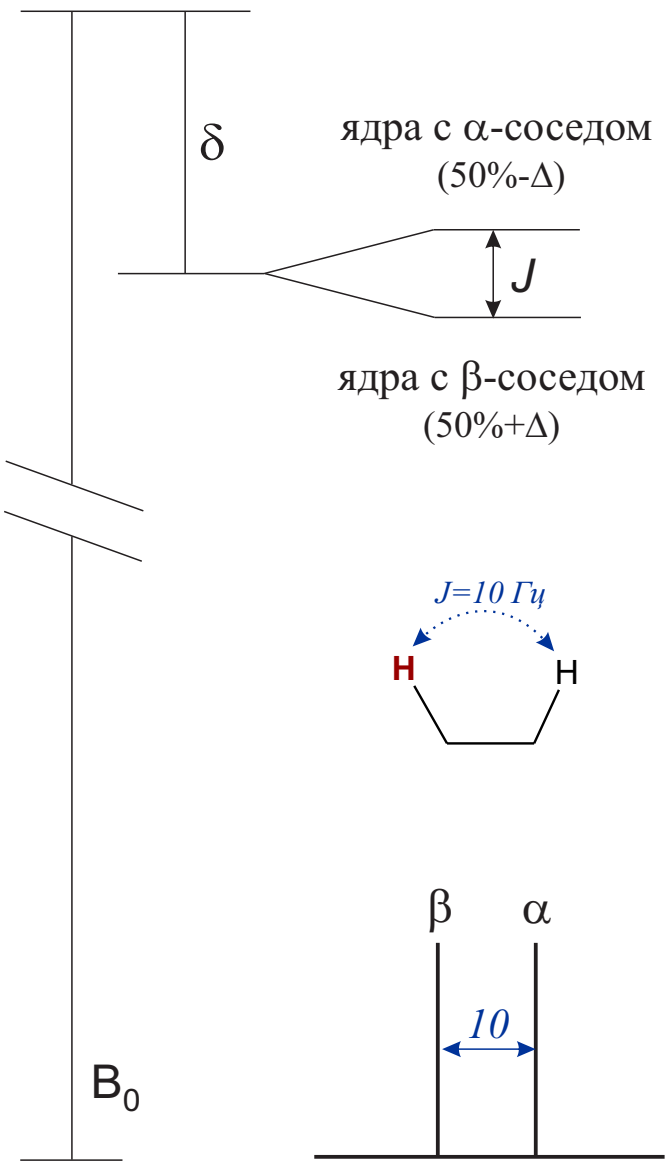
- *в отличие от протонных химических сдвигов характеристичны*
- *поддаются расчету по аддитивным схемам*





Спин-спиновое взаимодействие

один сосед



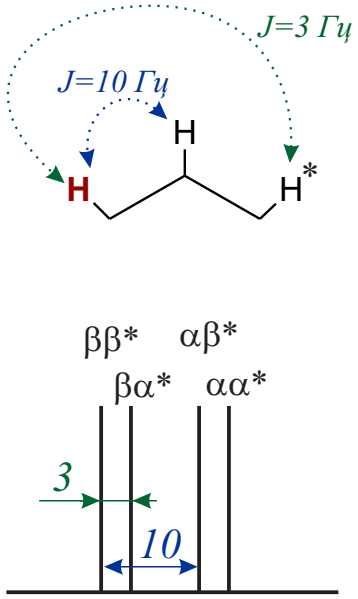
несколько одинаковых соседей

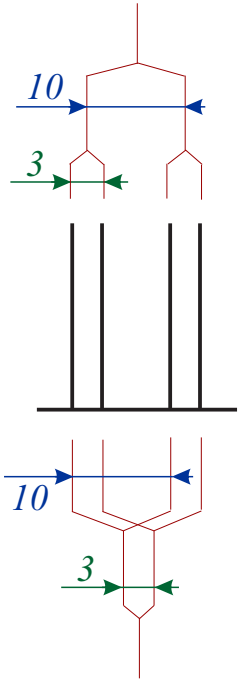
n (I=½)

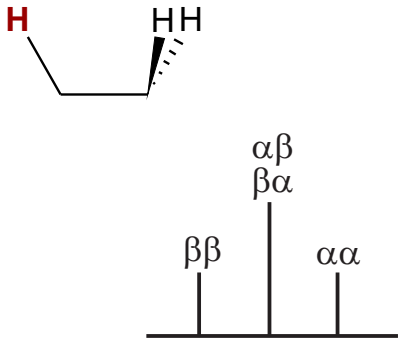
0				1				S
1			1		1			D
2		1		2		1		T
3	1		3		3		1	Q
4		1		4		6		Qn
5	1		5		10		5	Sx
6	1	6	15	20	15	6	1	Hp

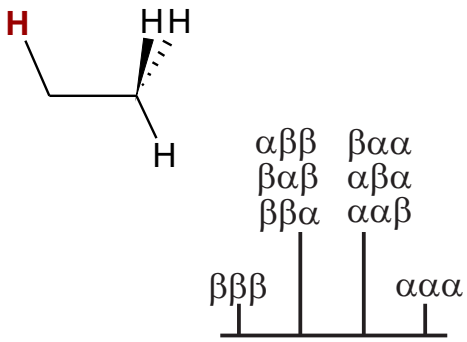
число линий = 2nI+1

два разных соседа

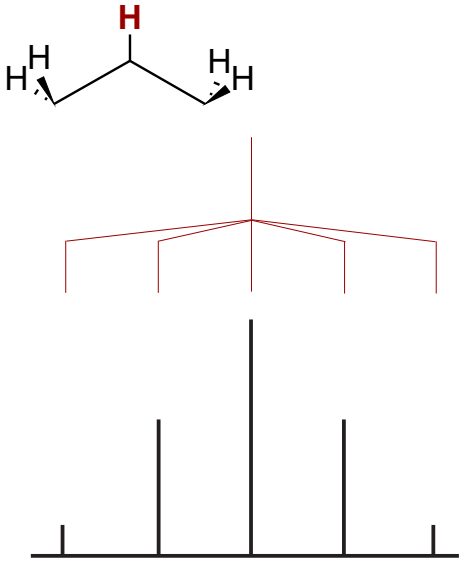


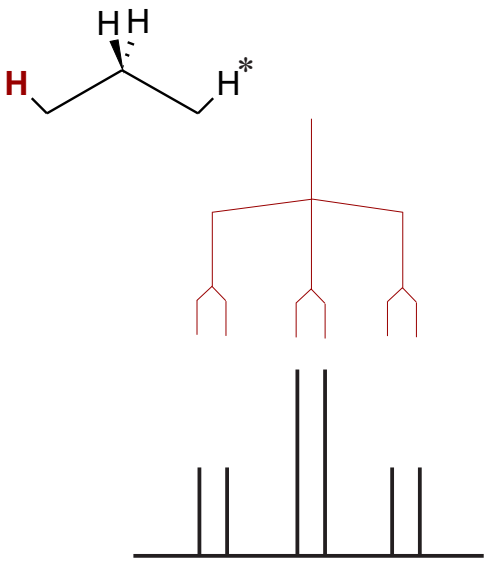


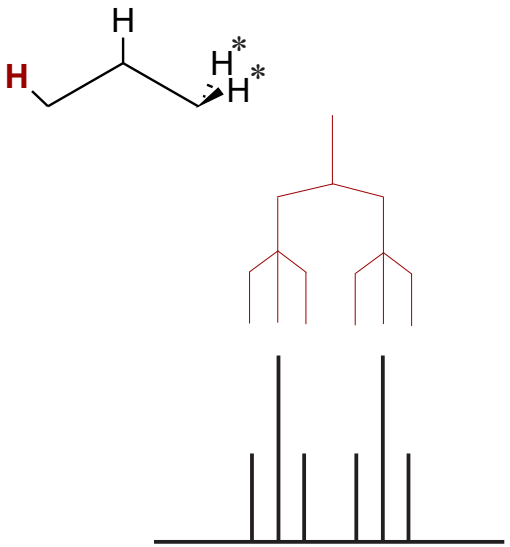




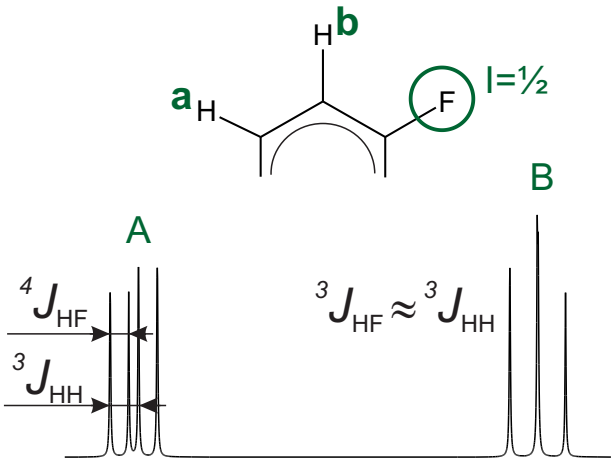
Другие примеры спинового расщепления

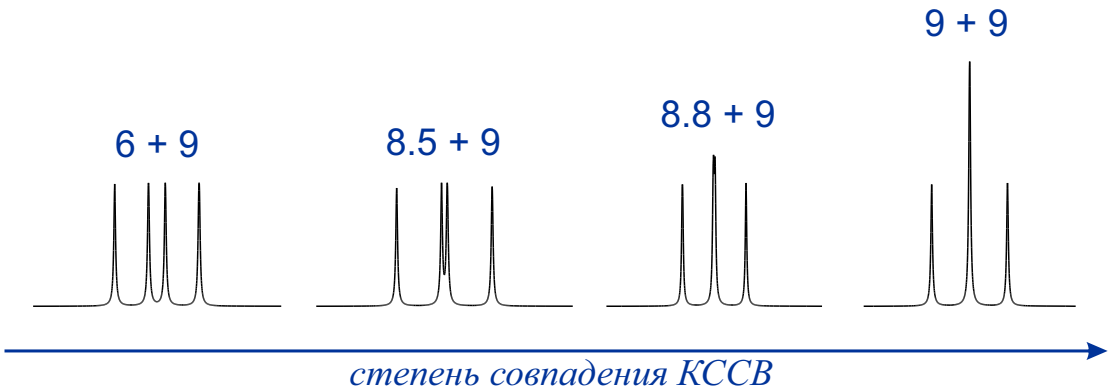




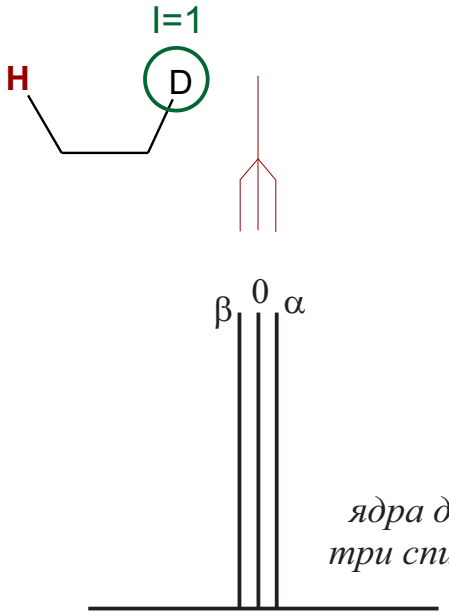


Вырождение дуплета дуплетов в триплет

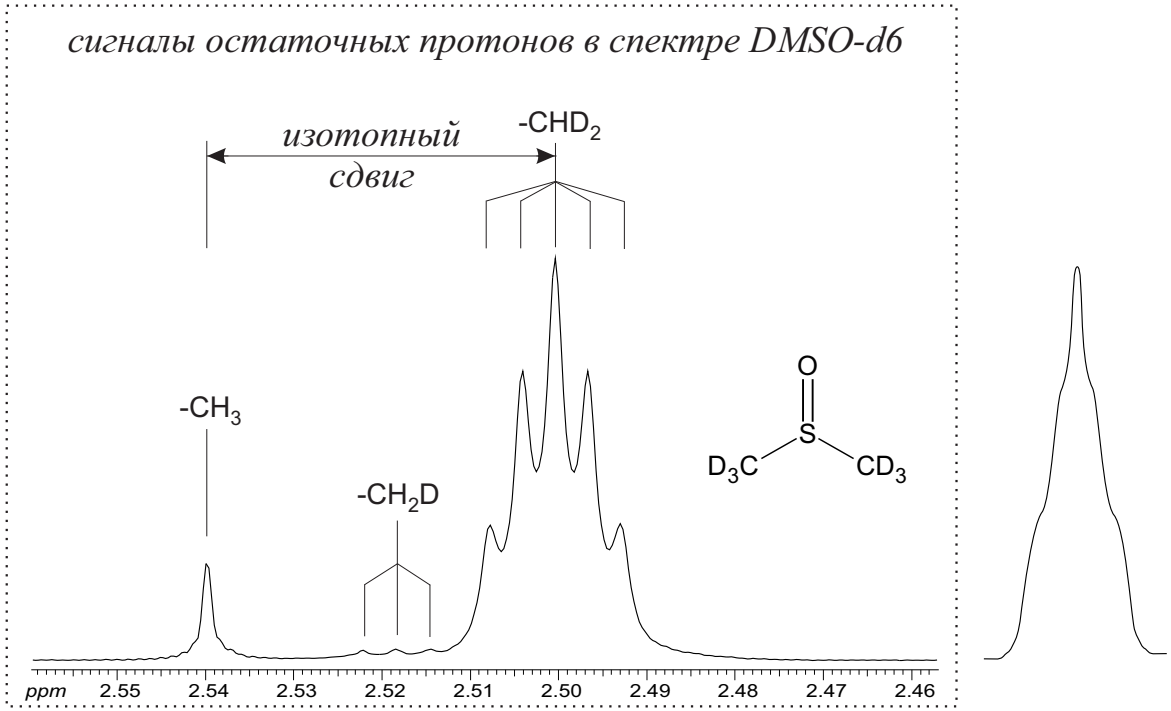


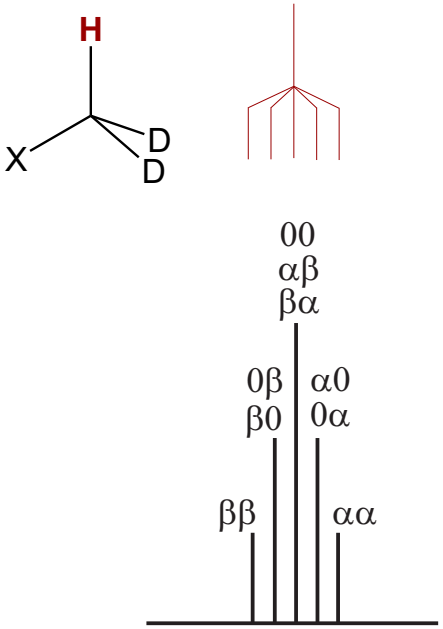


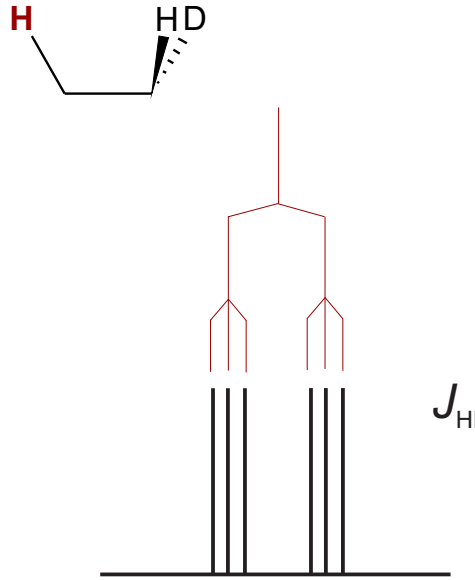
Спиновое расщепление на ядрах со спином 1

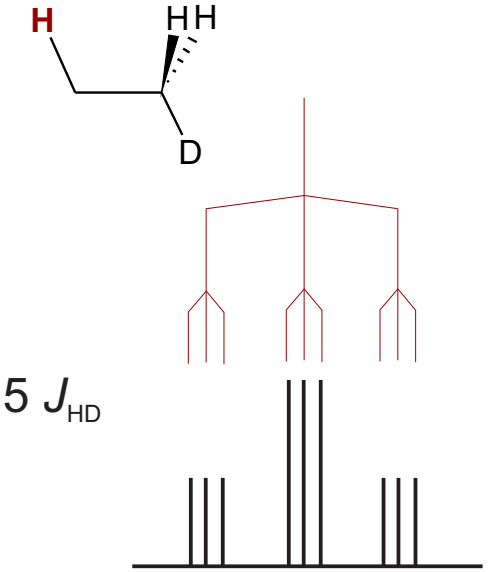


ядра дейтерия имеют три спиновых состояния



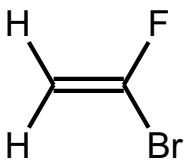






$$J_{HH} = (\gamma_H/\gamma_D)\, J_{HD} = 6.5\, J_{HD}$$

Эквивалентность атомов

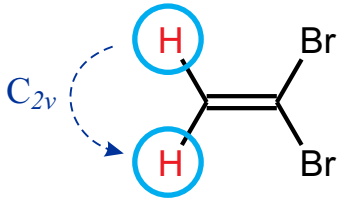


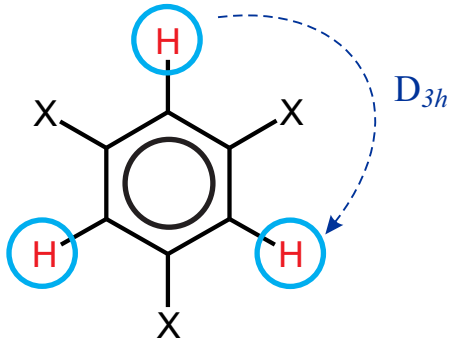
неэквивалентные

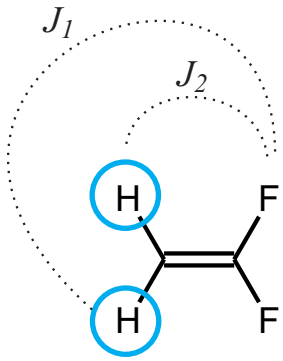
химически-эквивалентные (одинаковые расстояния до соседей):

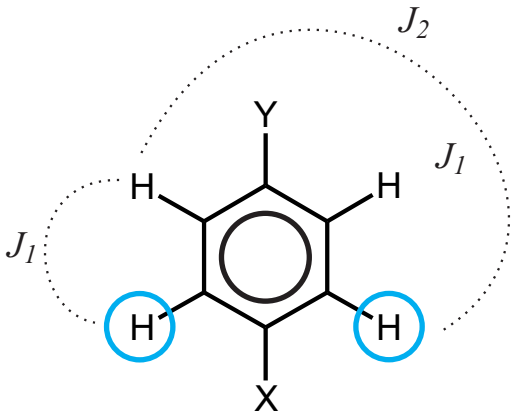
- гомотопные (переводятся друг в друга вращением)
- энантиотопные (переводятся друг в друга отражением)

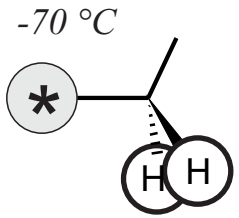
магнитно-эквивалентные (одинаковые КССВ с соседями)



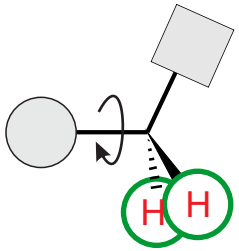


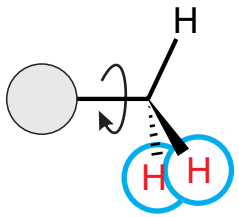




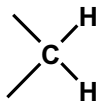
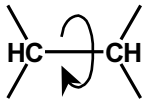
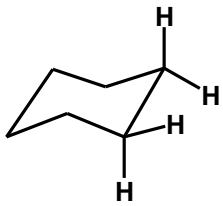
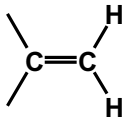
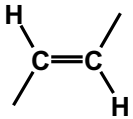
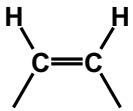
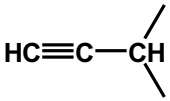


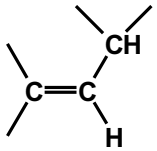
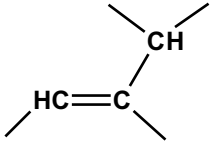
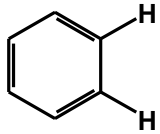
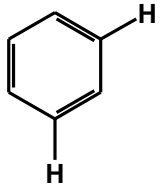
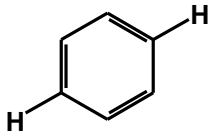
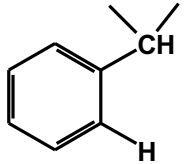
диастереотопны





Основные протон-протонные КССВ

фрагмент структуры	$J_{H\text{-}H}$, *Гц*			
	знак	характерная величина	интервал значений	
	–	12-15	0-30*	2: геминальные
	+	7	0-9*	3: вицинальные
	+ + + –	9 (*a-a*) 3 (*a-e*) 1 (*e-e*) *12 (гем-)*	6-14 1-6 0-4 11-13	
		2	0-3	
	+	15	12-18	
	+	7	4-12	
	–	2.5	2-3	4: аллильные 5: гомоаллильные

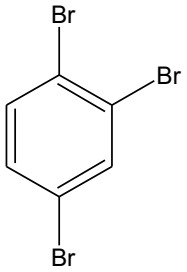
фрагмент структуры	$J_{H\text{-}H}$, *Гц*		
	знак	характерная величина	интервал значений
	+	6	4-8
	–	2	1-2.5
	+	8	6-10
	+	2	1-4
	+	0.5	0-1.5
	±	0	0-0.5

* *зависит от плоского или торсионного угла*

подробная таблица: E.D. Becker "High resolution NMR," 3rd ed., 2000, 5:124

Зависимость спектров от рабочей частоты спектрометра

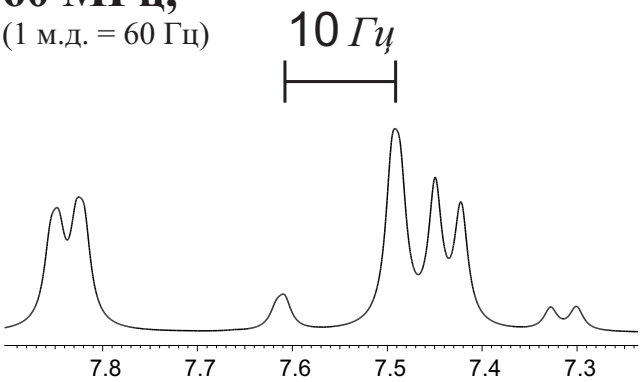
1,2,4-трибромбензол



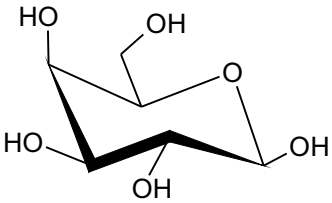
химический сдвиг,
измеряемый в м.д.,
не зависит от рабочей частоты

КССВ,
измеряемая в Гц,
не зависит от рабочей частоты

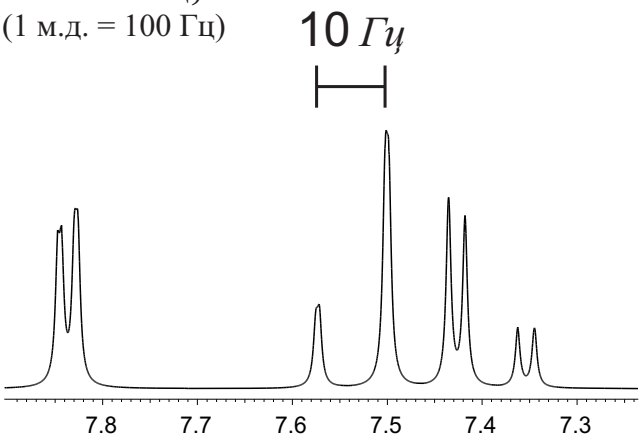
60 МГц,
(1 м.д. = 60 Гц)



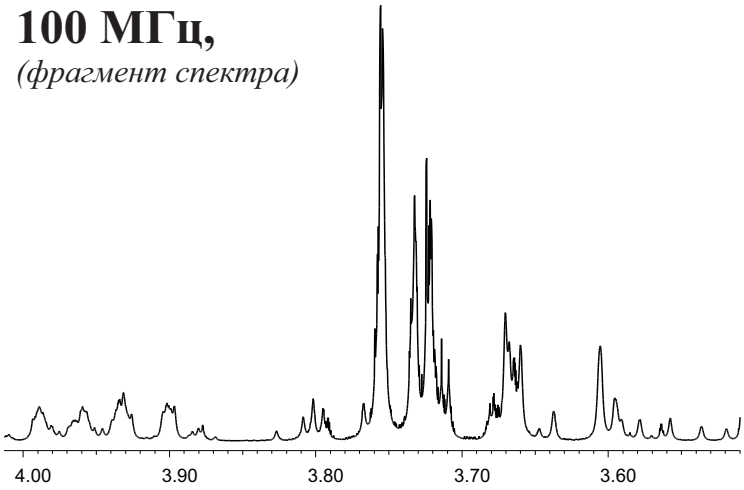
β-D-*галактопираноза*



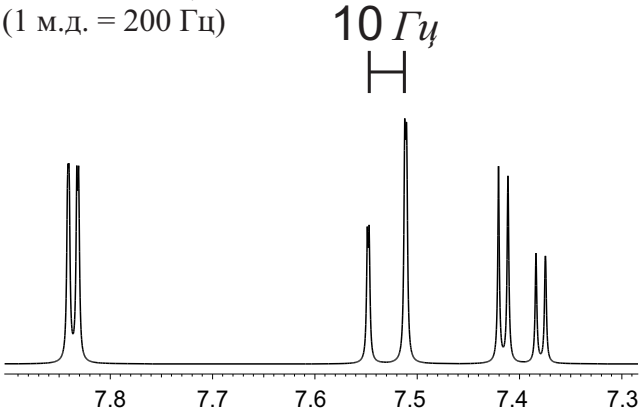
100 МГц,
(1 м.д. = 100 Гц)



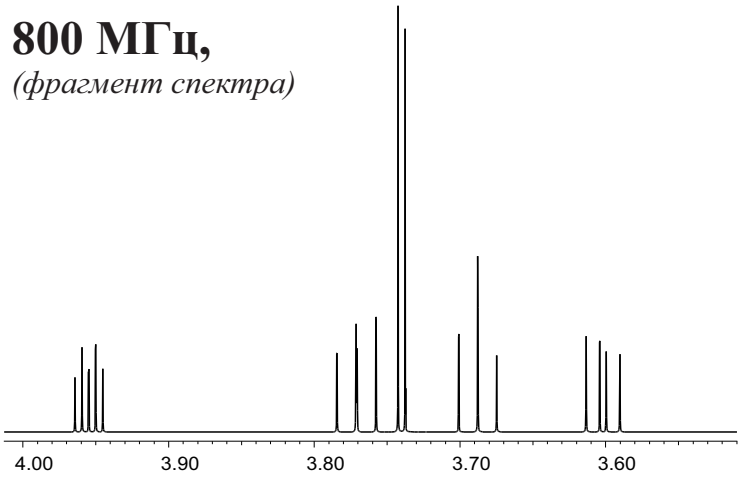
100 МГц,
(фрагмент спектра)



200 МГц,
(1 м.д. = 200 Гц)

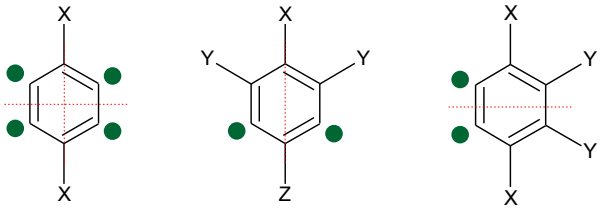


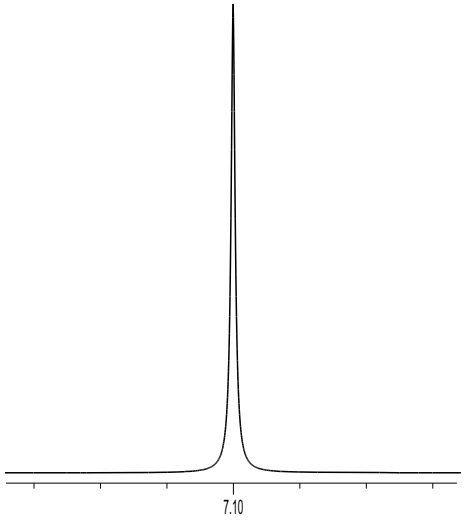
800 МГц,
(фрагмент спектра)

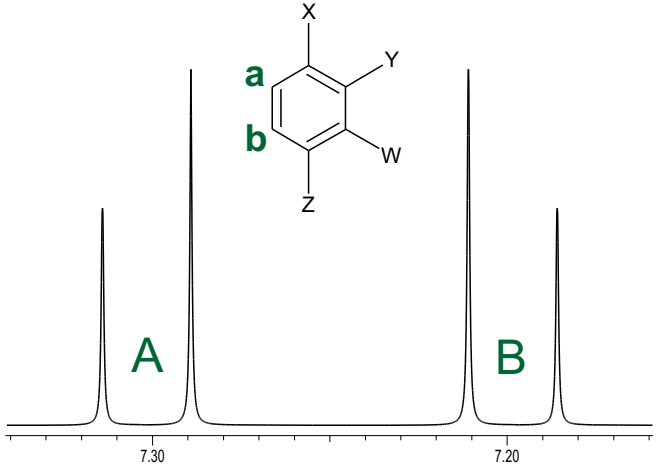


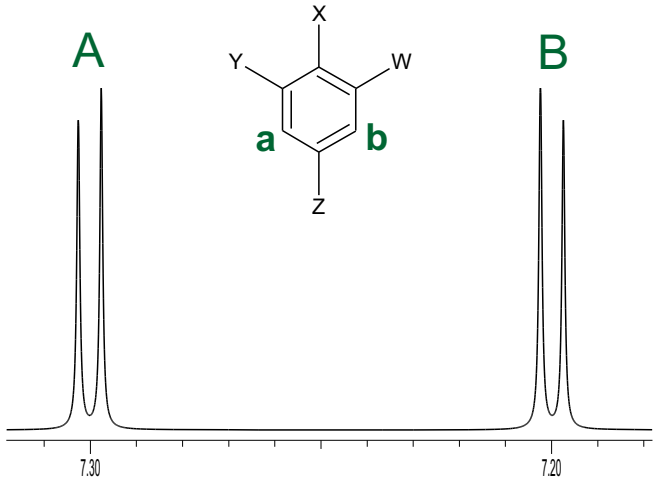
Сигналы протонов замещенного бензола *(простые случаи)*

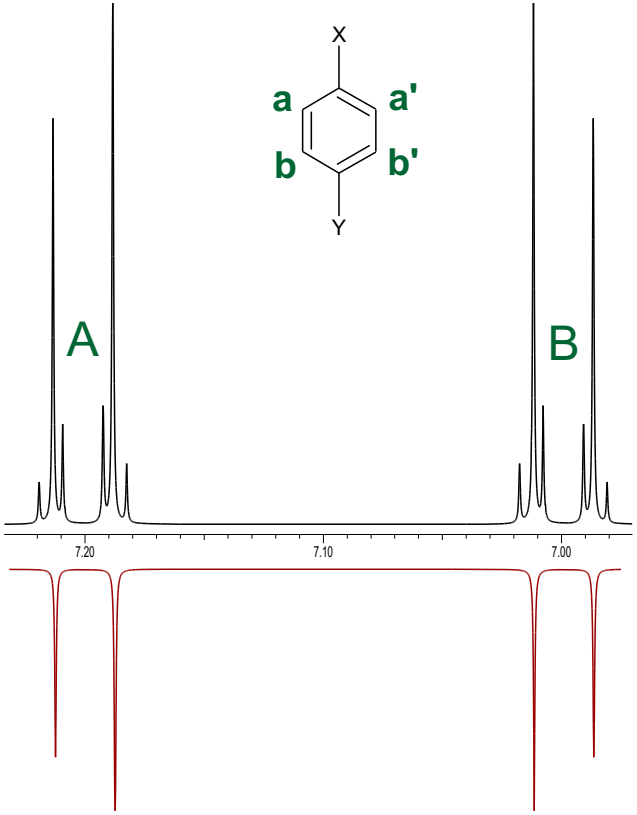
один тип протонов:



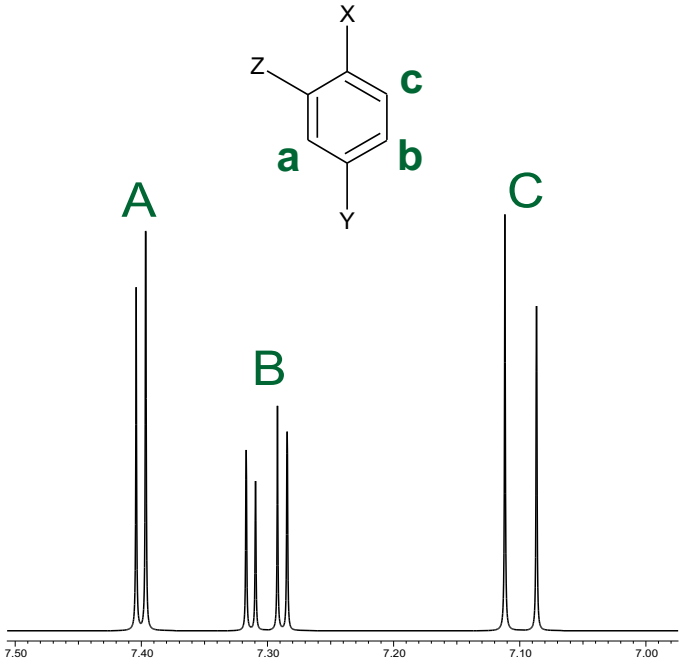


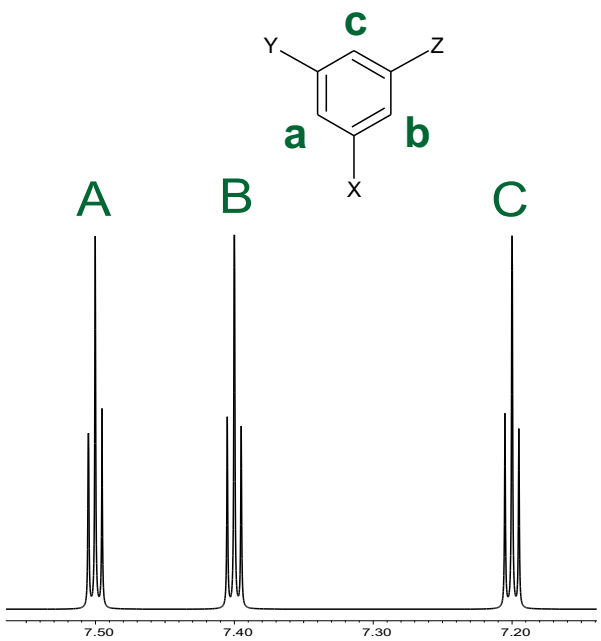


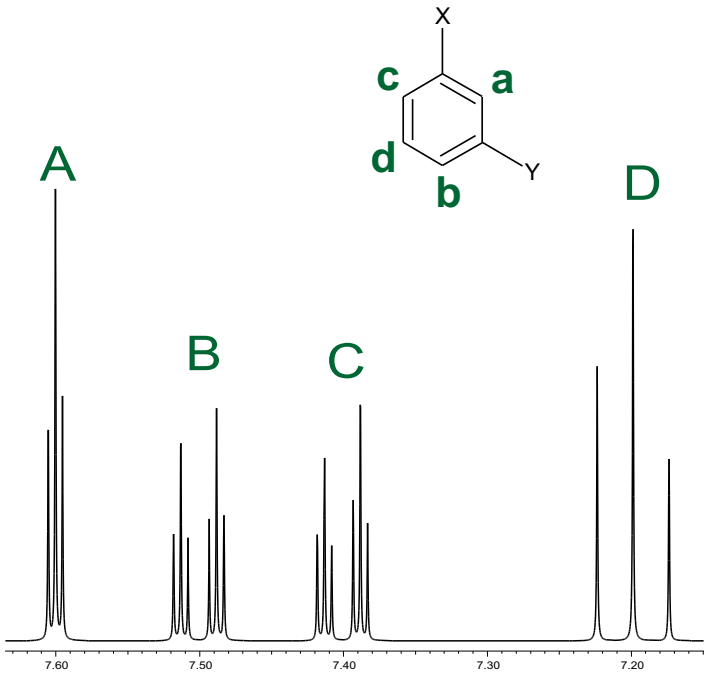


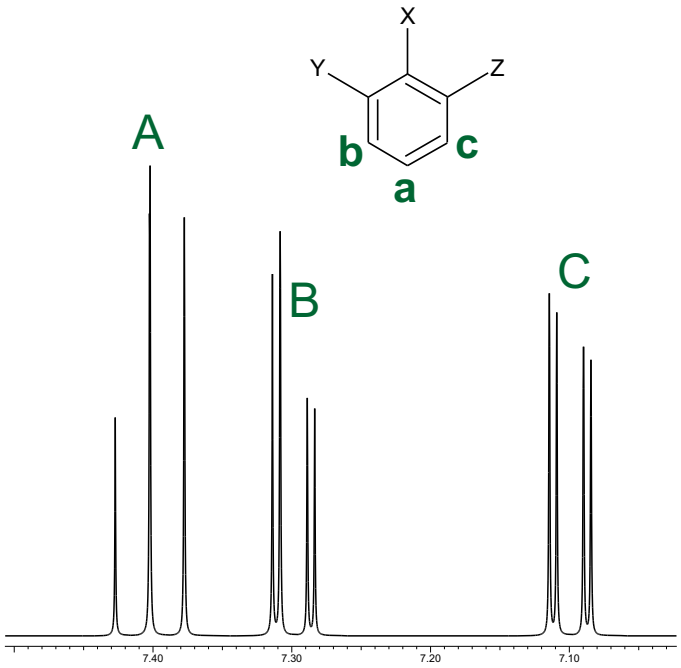


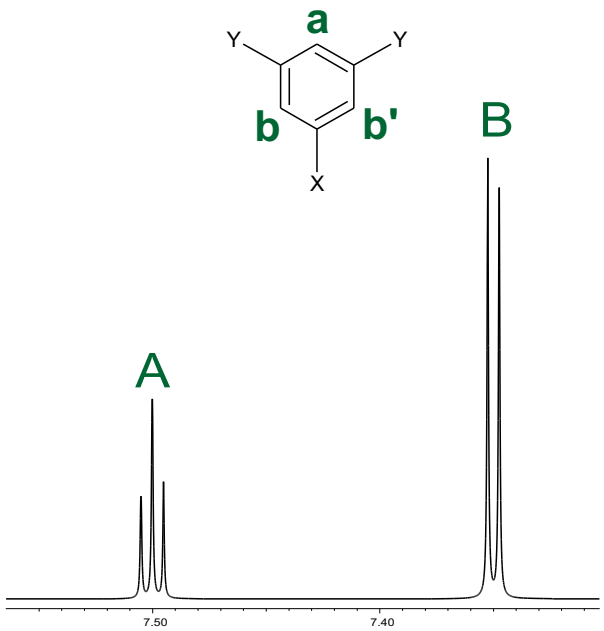
Сигналы протонов замещенного бензола *(сложные случаи)*

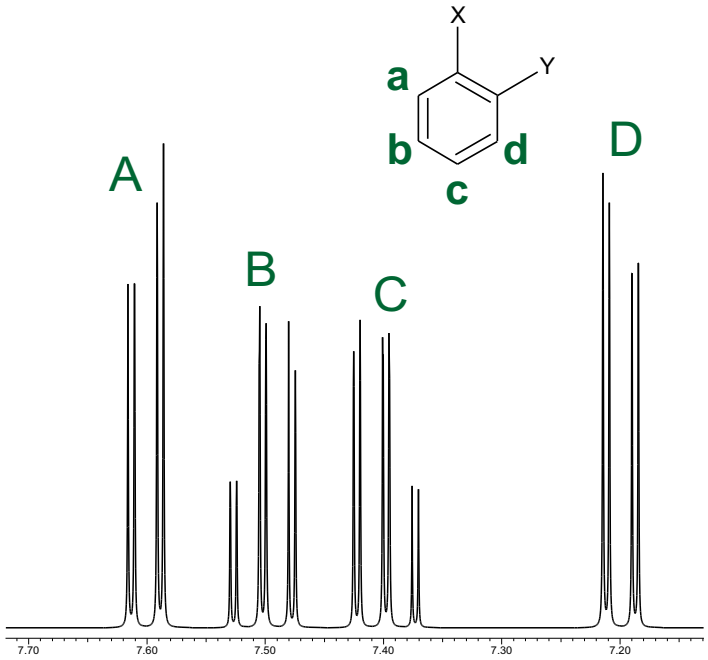








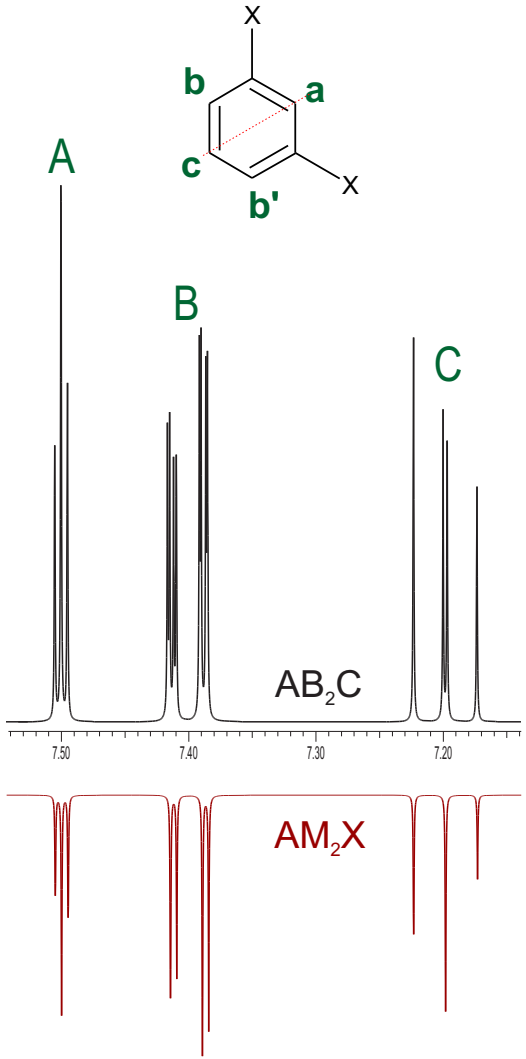


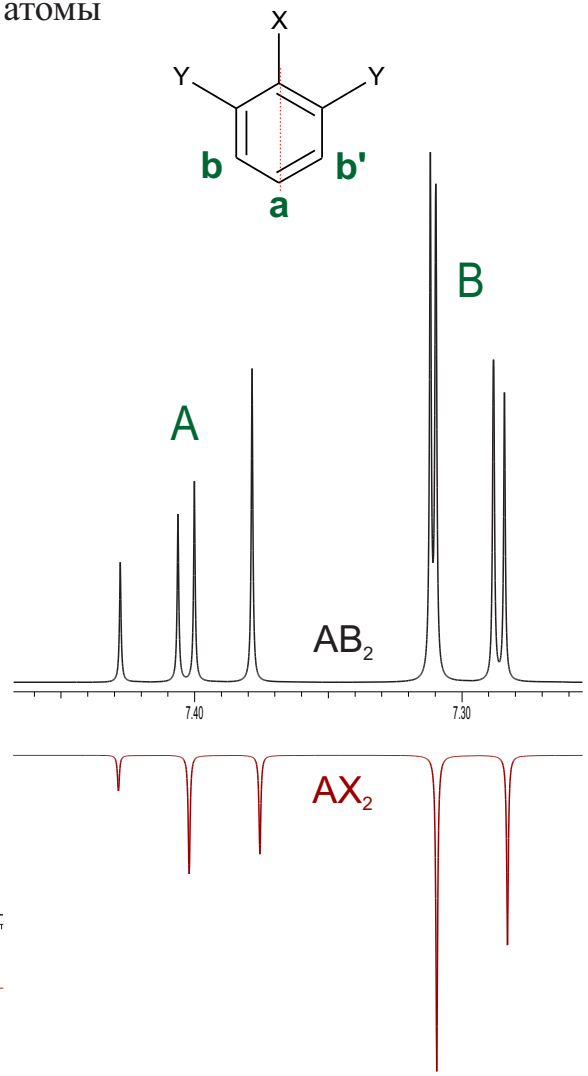


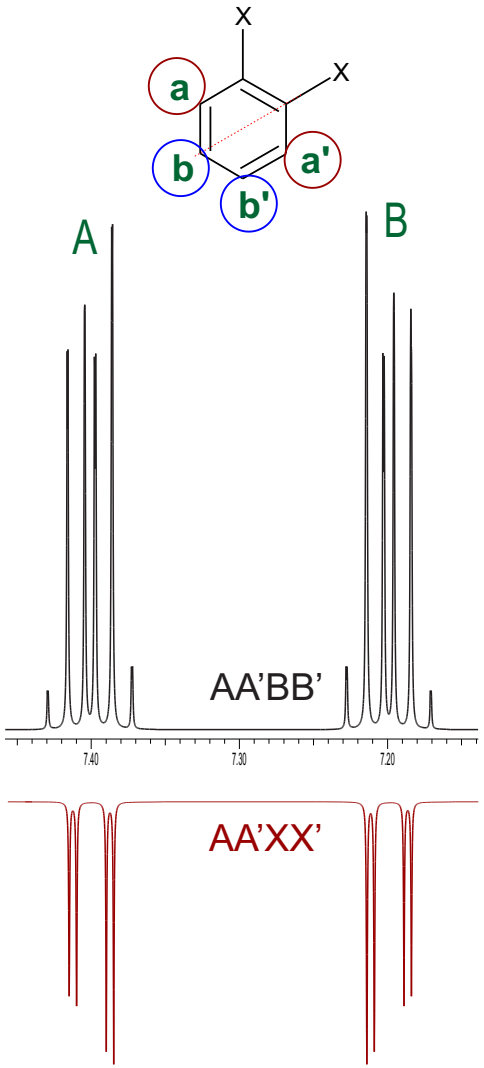
Сигналы протонов замещенного бензола

(спектры не первого порядка при симметричном замещении)

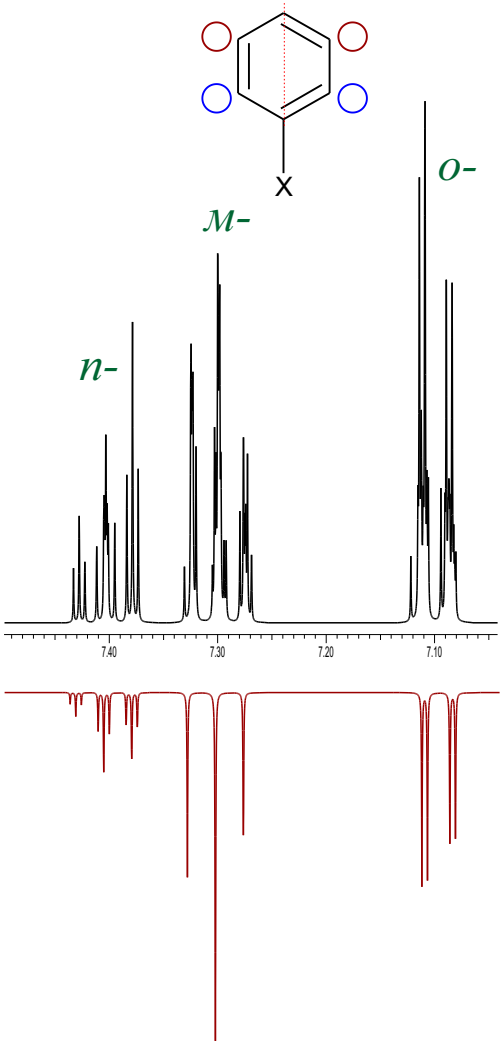
○ химически-эквивалентные, но магнитно-неэквивалентные атомы





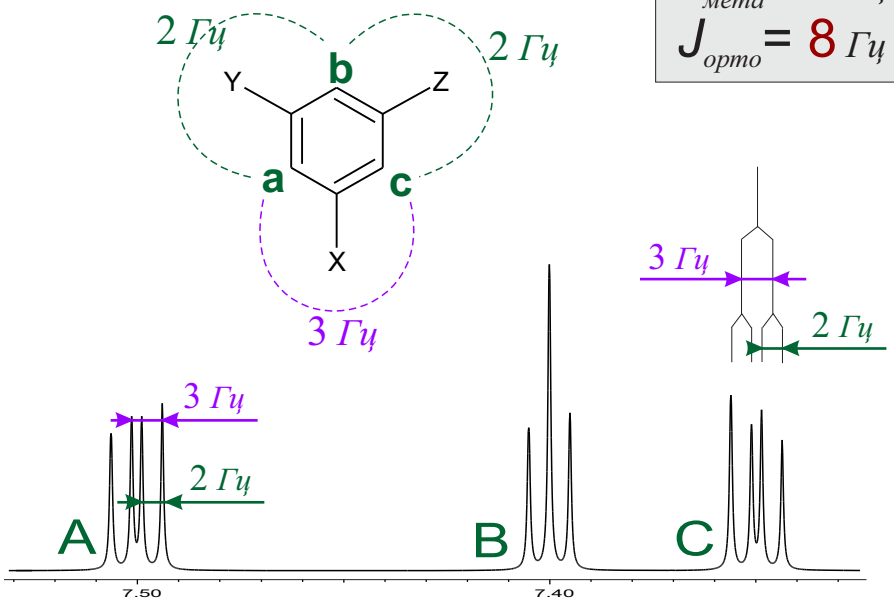


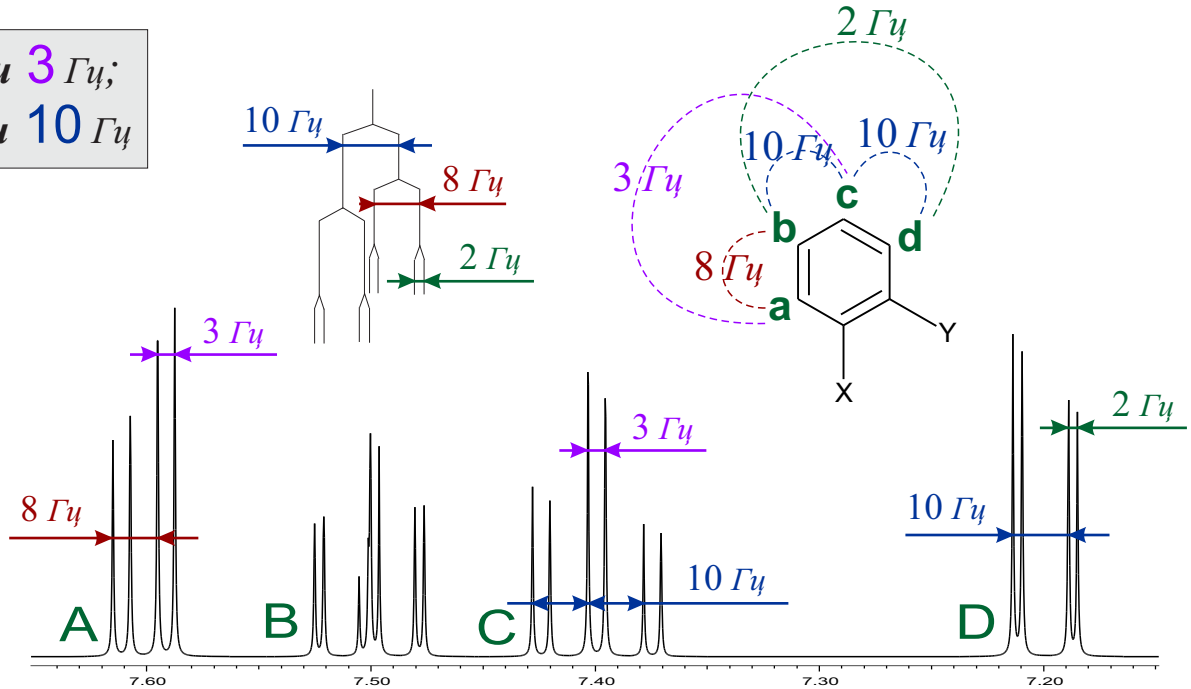
монозамещенный бензол:
сильносвязанная система AA'BB'C



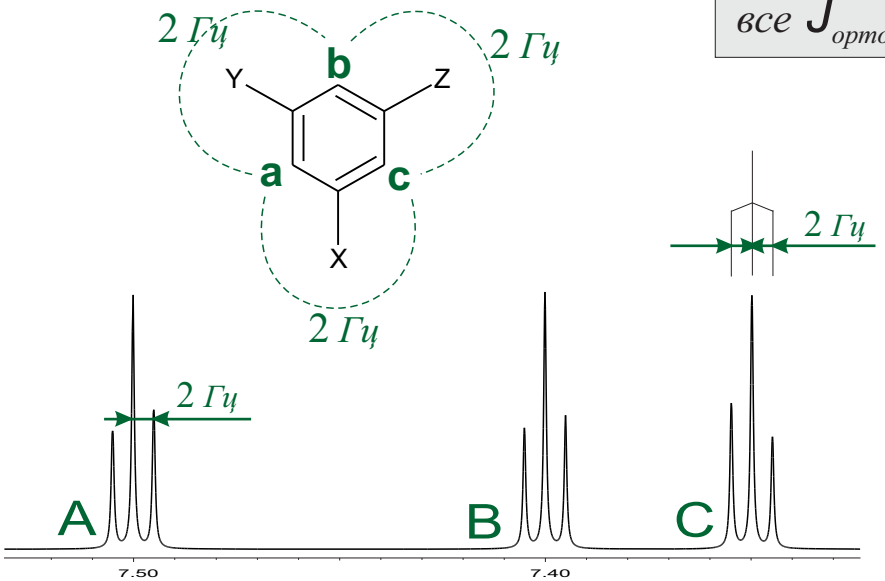
Сигналы протонов замещенного бензола *(примеры несовпадения КССВ)*

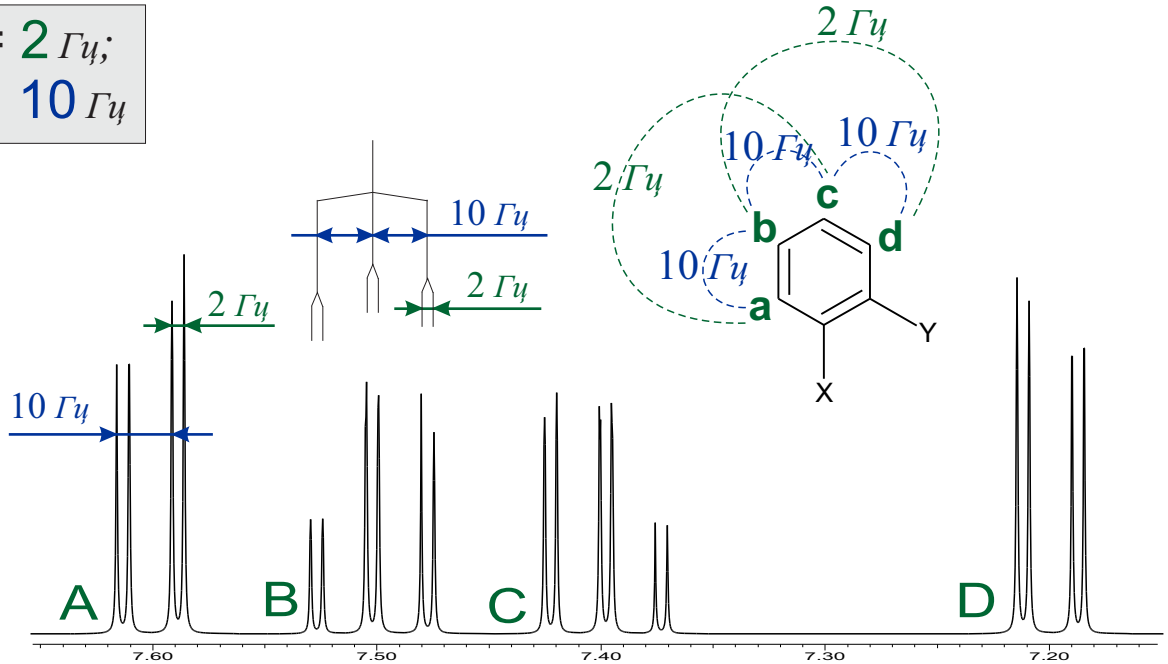
$J_{мета}$ = 2 *Гц* **и** 3 *Гц*;
$J_{орто}$ = 8 *Гц* **и** 10 *Гц*



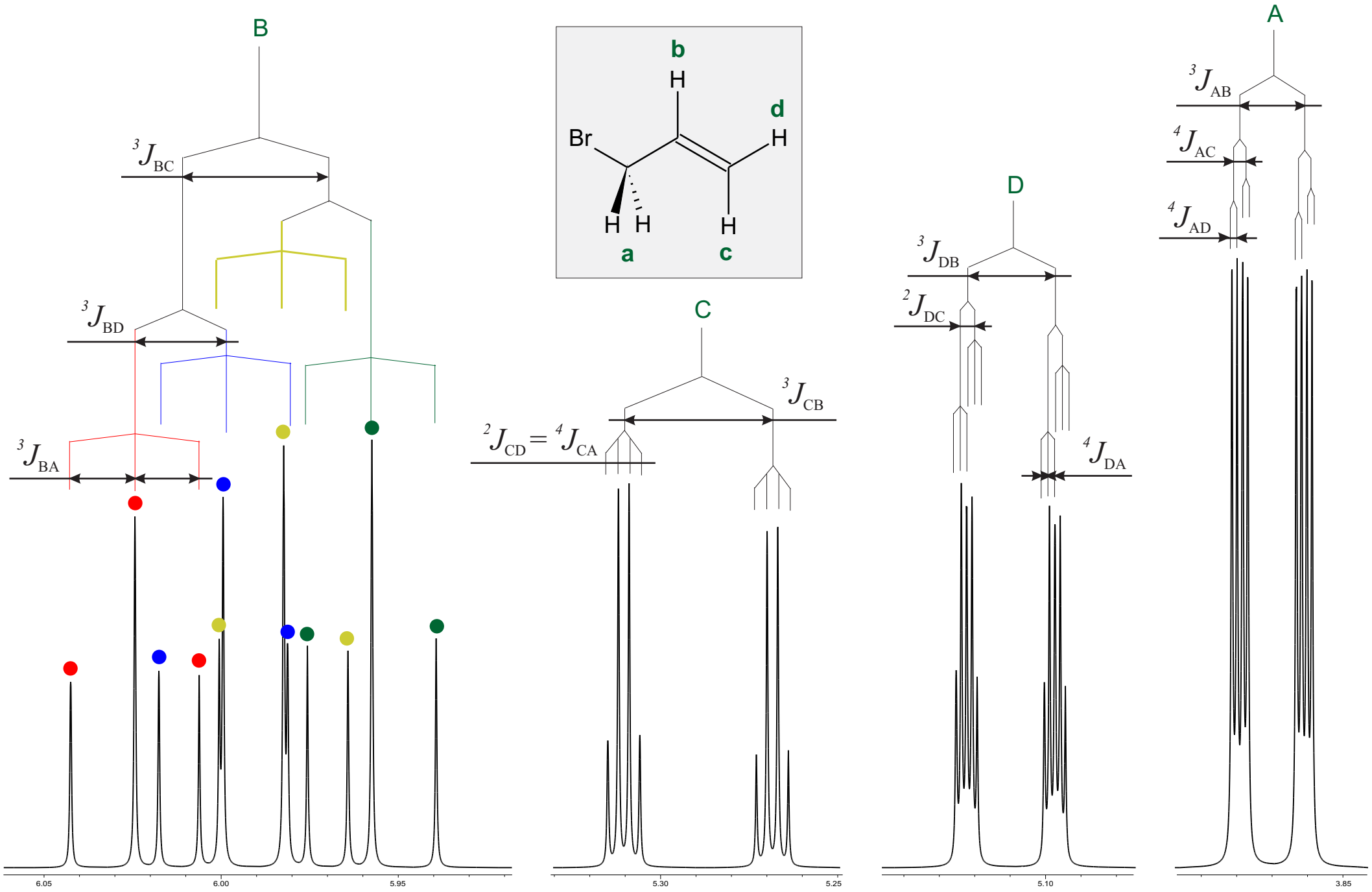


все $J_{мета}$ = 2 *Гц*;
все $J_{орто}$ = 10 *Гц*



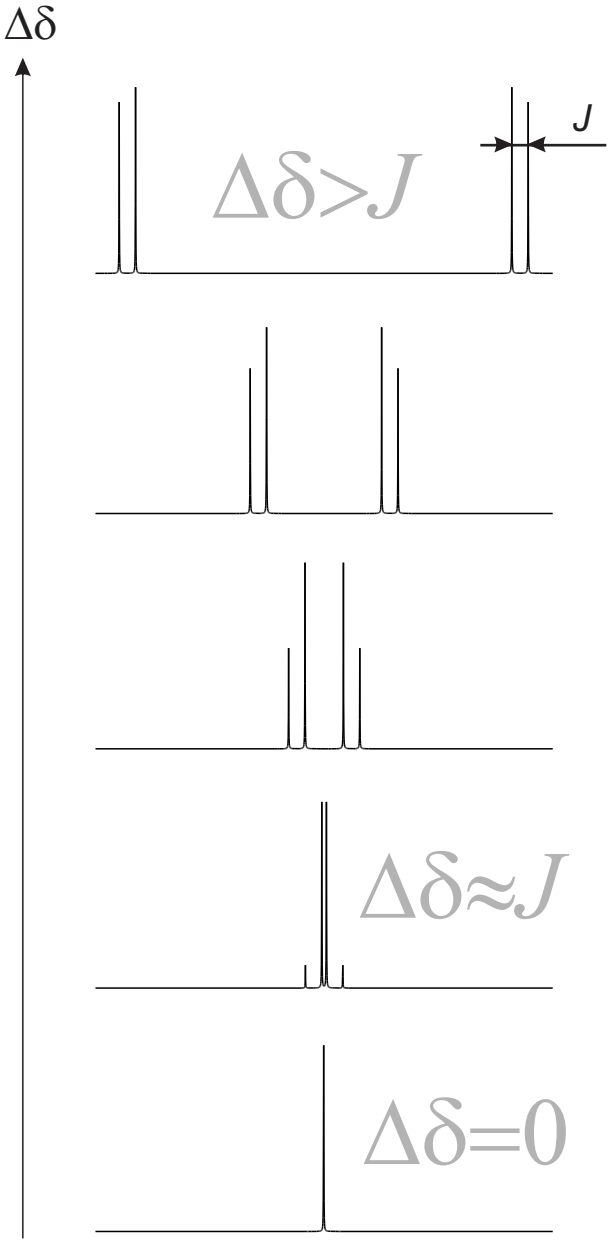


Теоретический спектр ЯМР ^{1}H аллилбромида *(рабочая частота 400 МГц, ширина линии 0.2 Гц)*

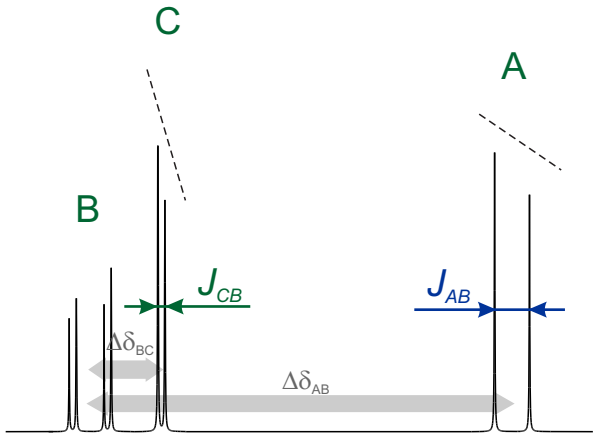


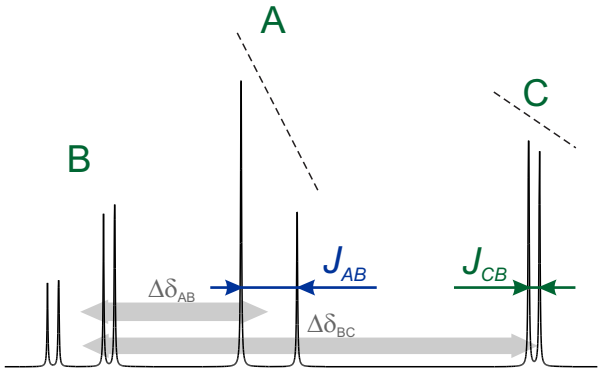
Эффект крыши

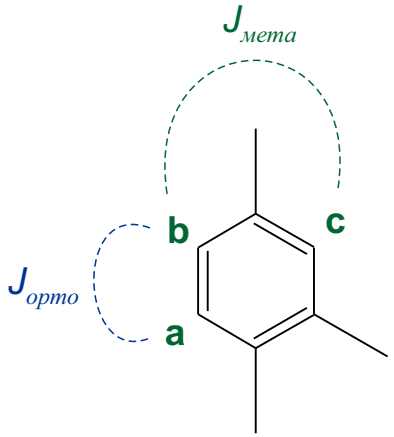
система из двух протонов



разные случаи системы из трех протонов
в 1,2,4-замещенном бензоле



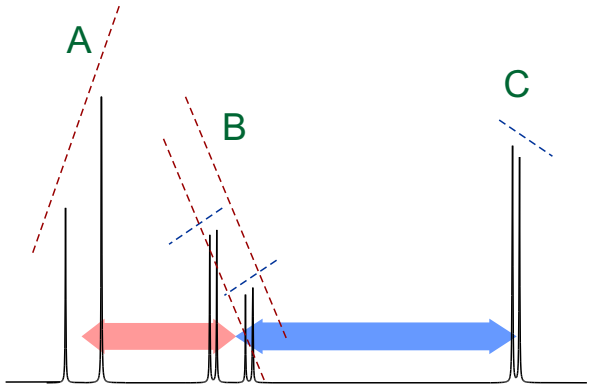




$\Delta\delta_{AB}$ мала, $\Delta\delta_{BC}$ велика

⇩

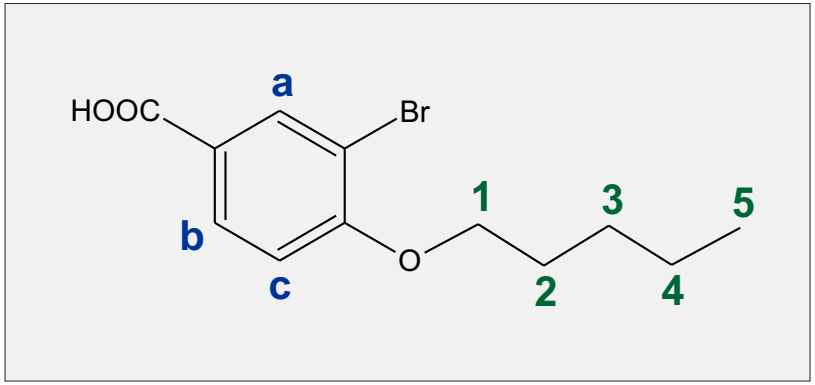
A-B : крутая крыша,
B-C : пологая крыша

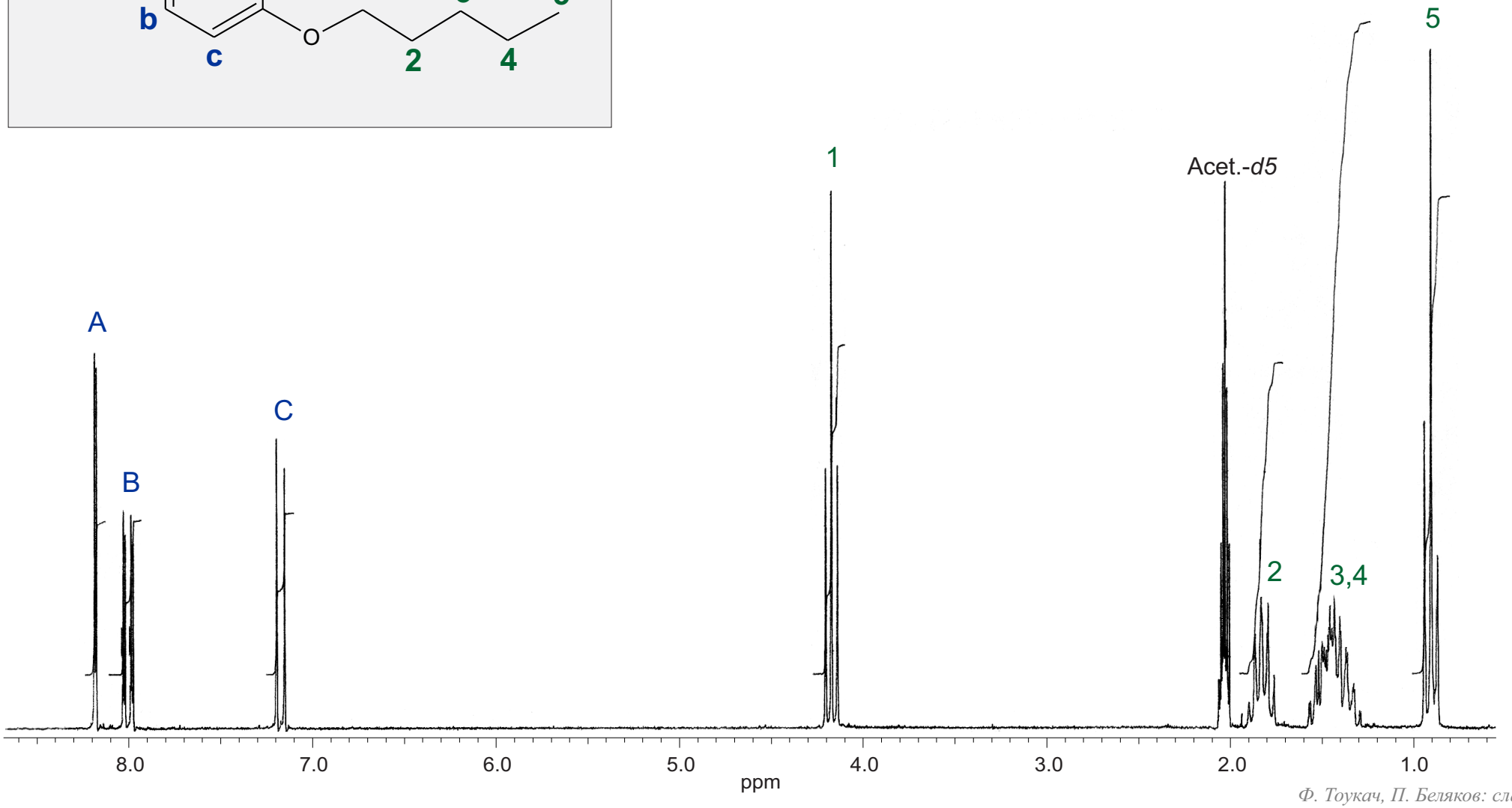


объяснение: E.D. Becker "High resolution NMR," 3rd ed., 2000, гл. 6.8

Ф. Тоукач: слайд 18

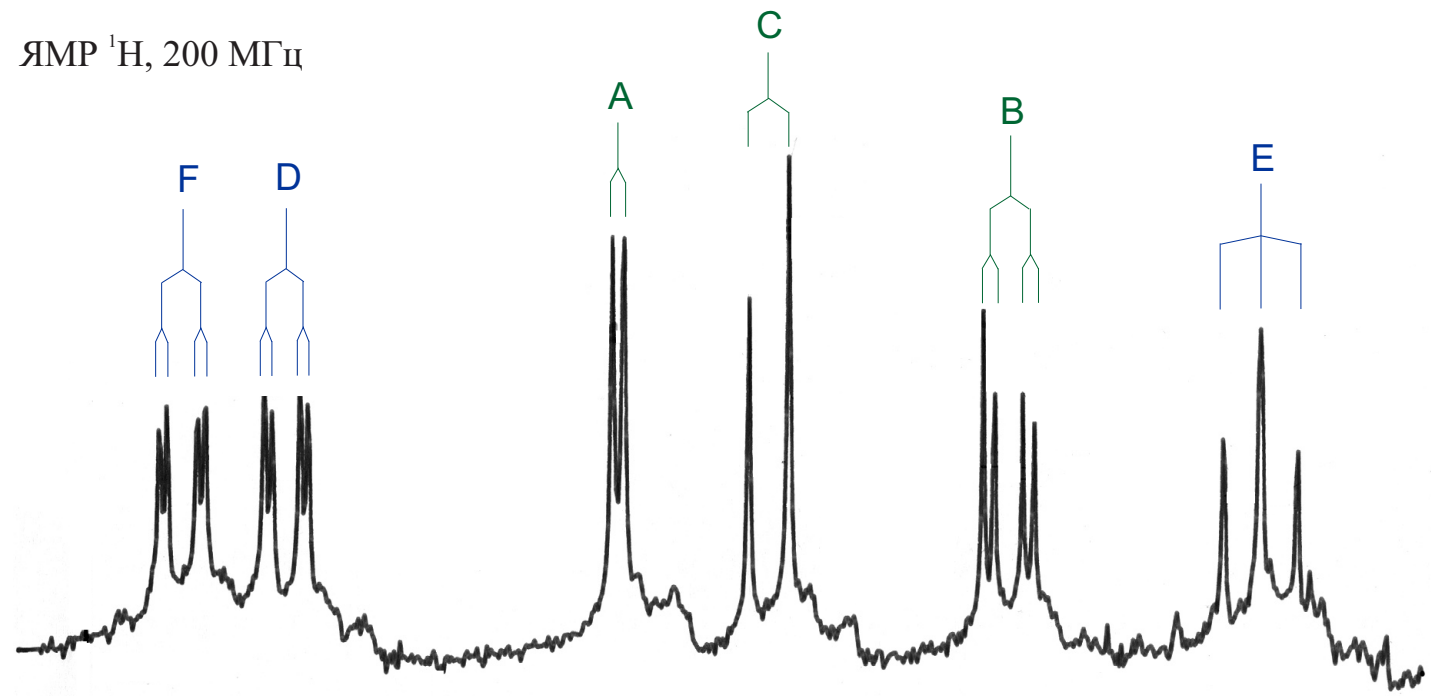
ЯМР ^{1}H, 200 МГц

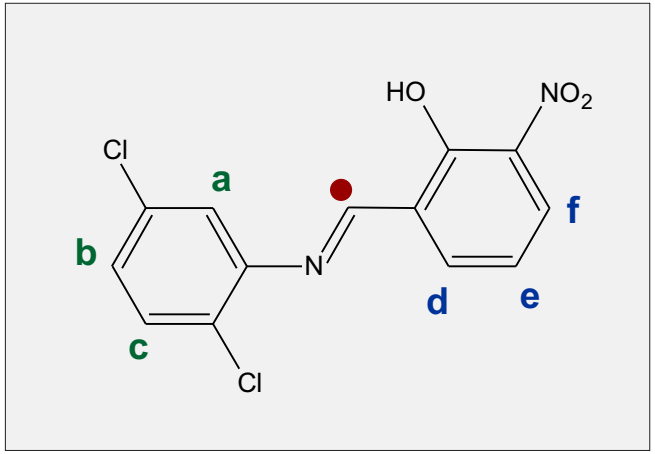


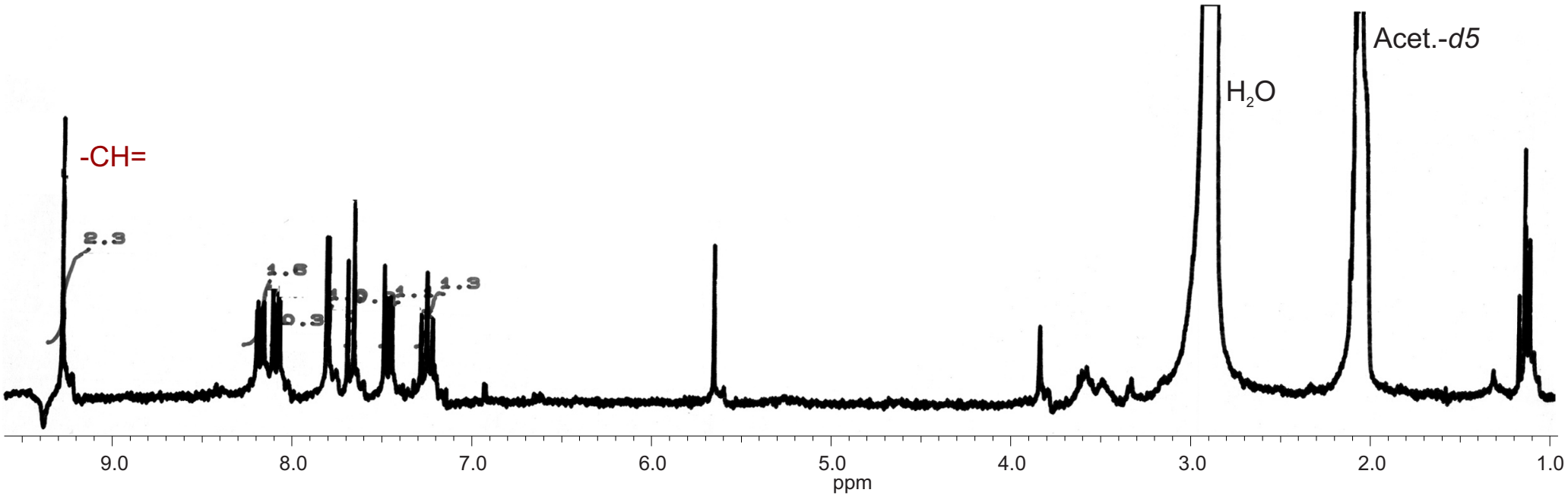


R #02

ЯМР ^{1}H, 200 МГц



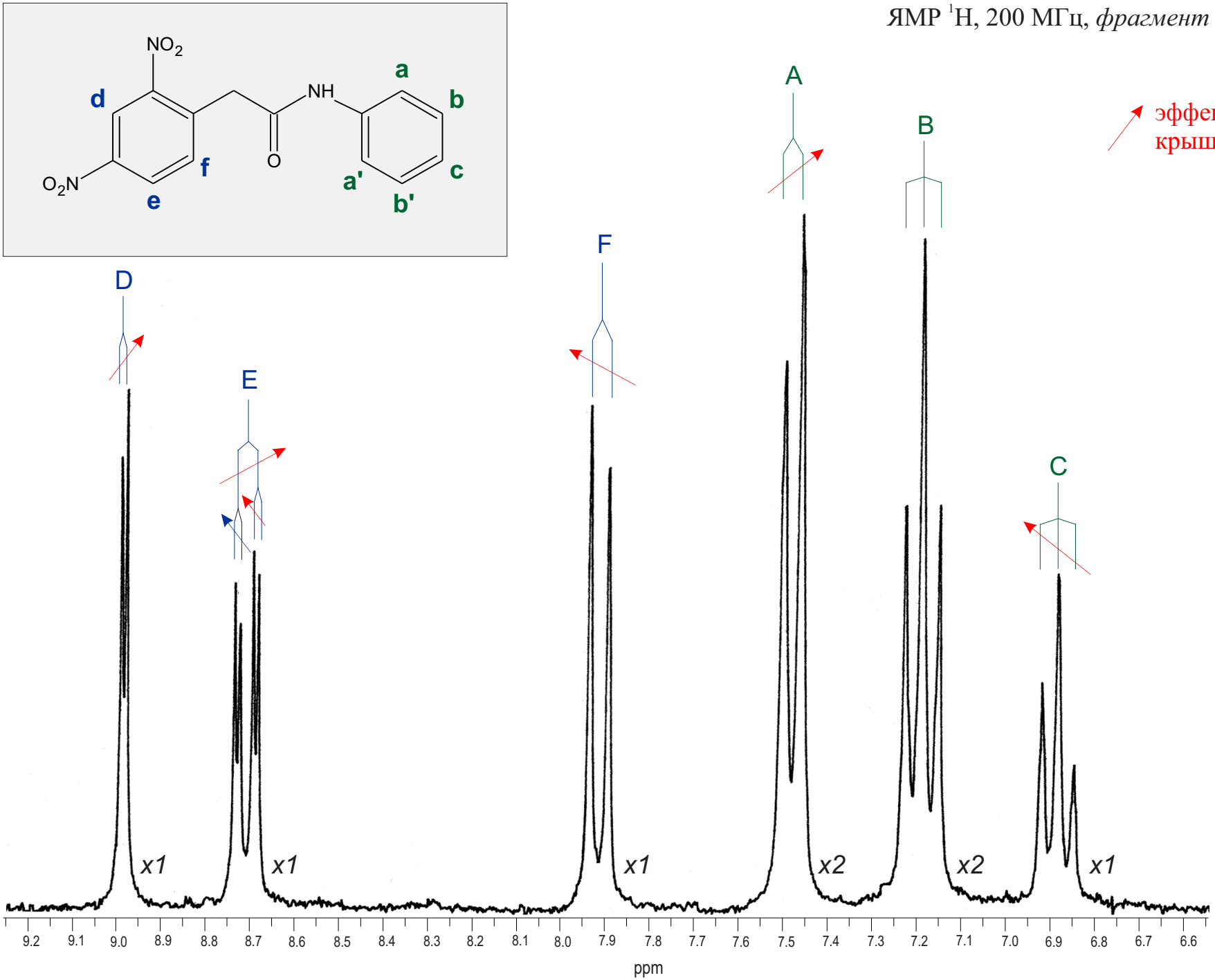




Ф. Тоукач, П. Беляков: слайд 20

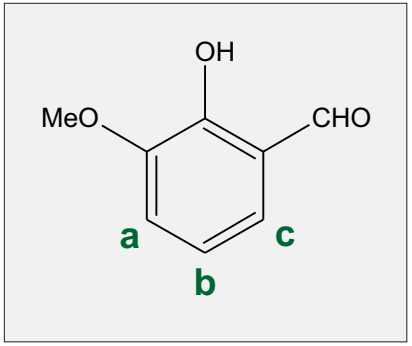
R #03

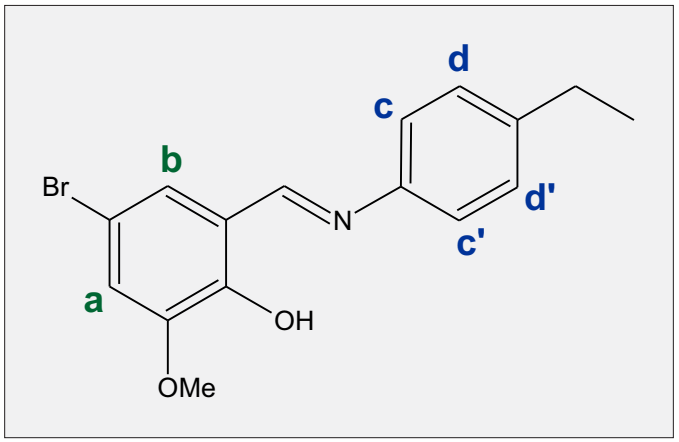
ЯМР ^{1}H, 200 МГц, *фрагмент*

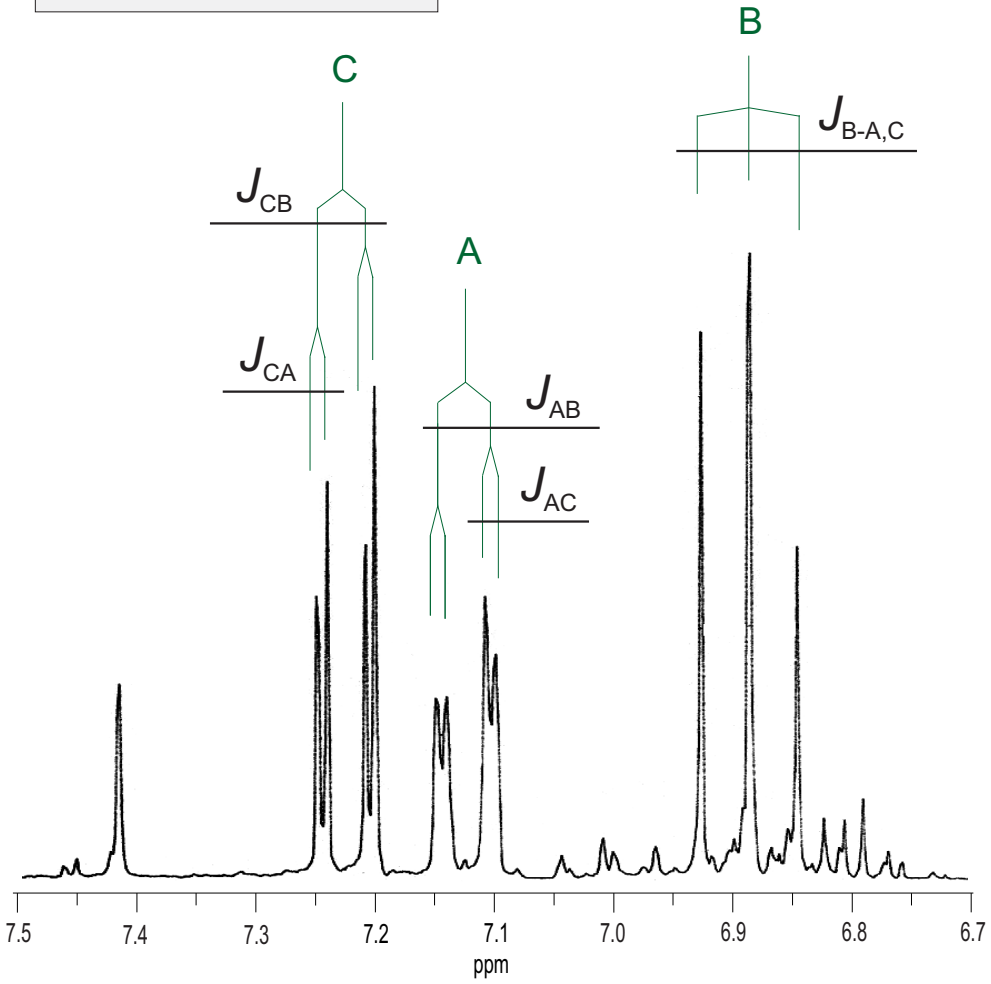


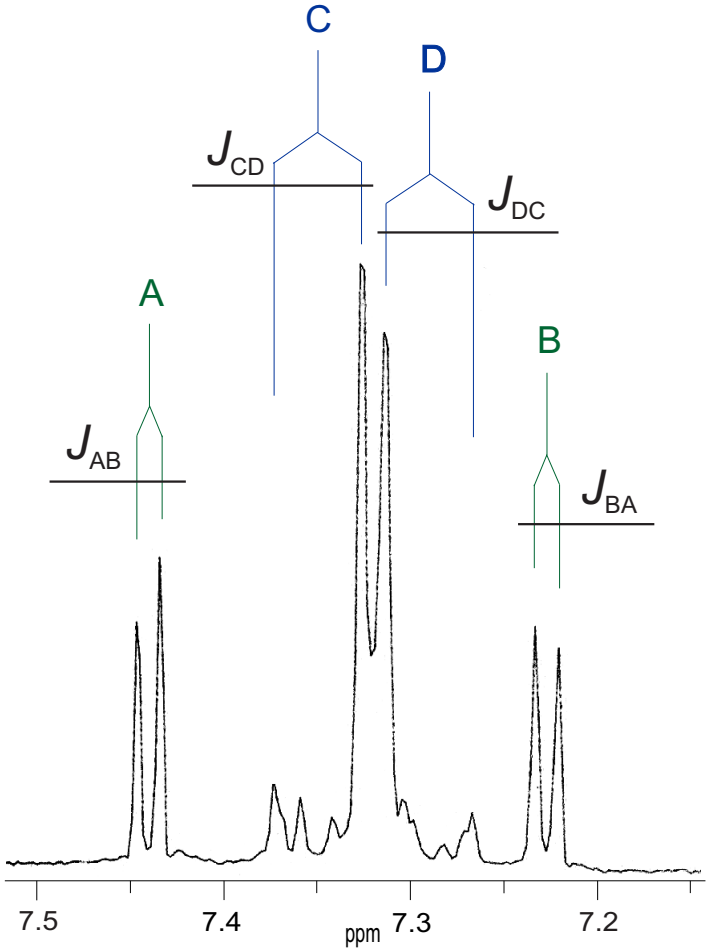
ЯМР ^{1}H, 200 МГц, *фрагменты*

R #04



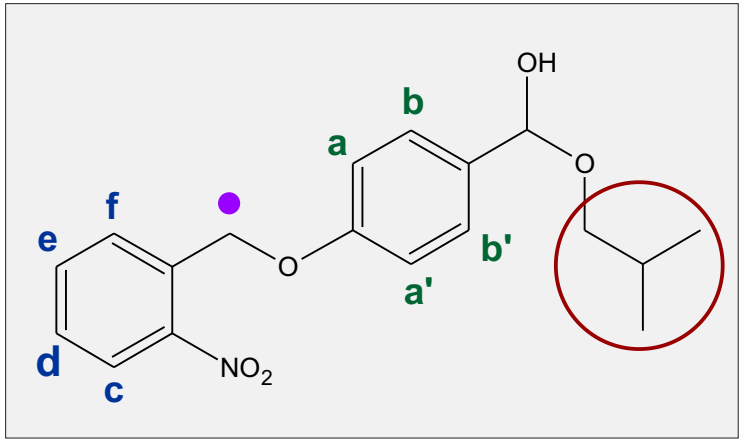


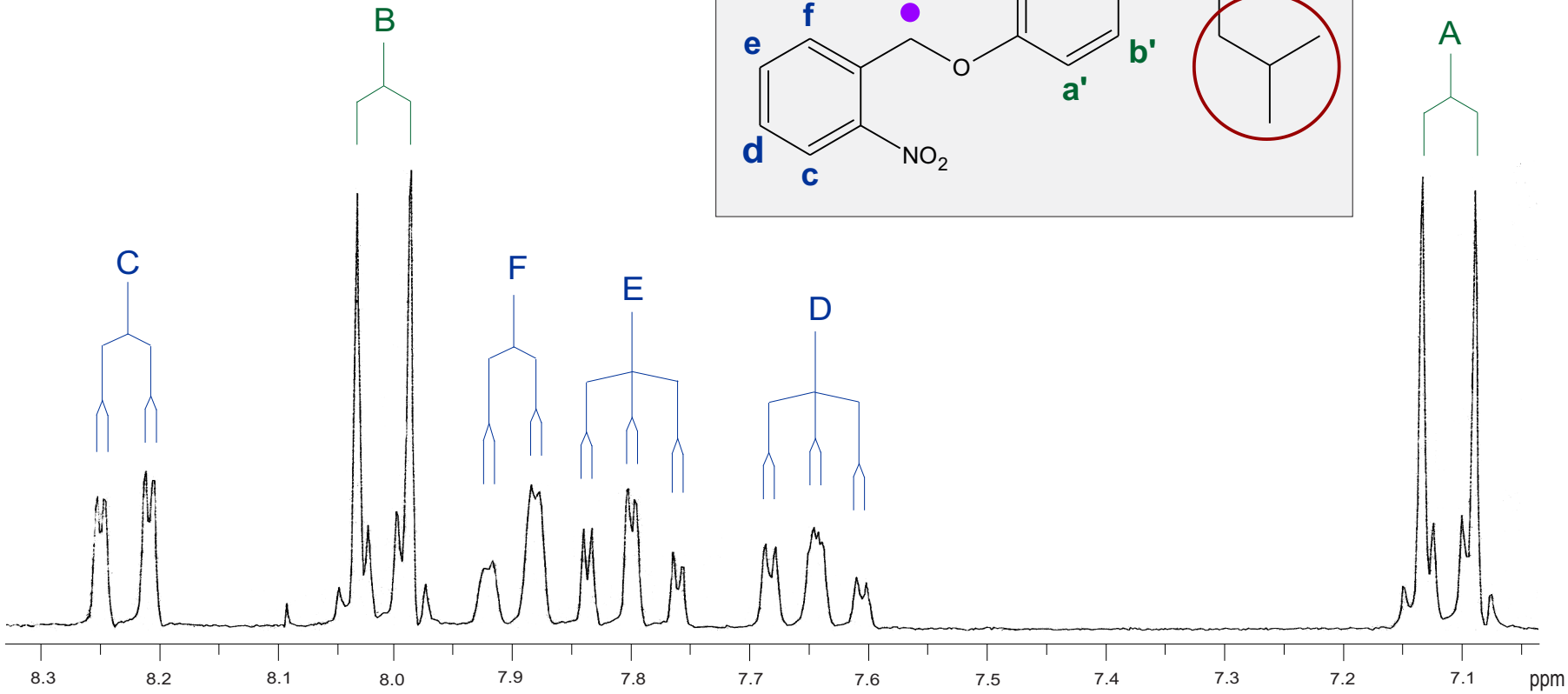


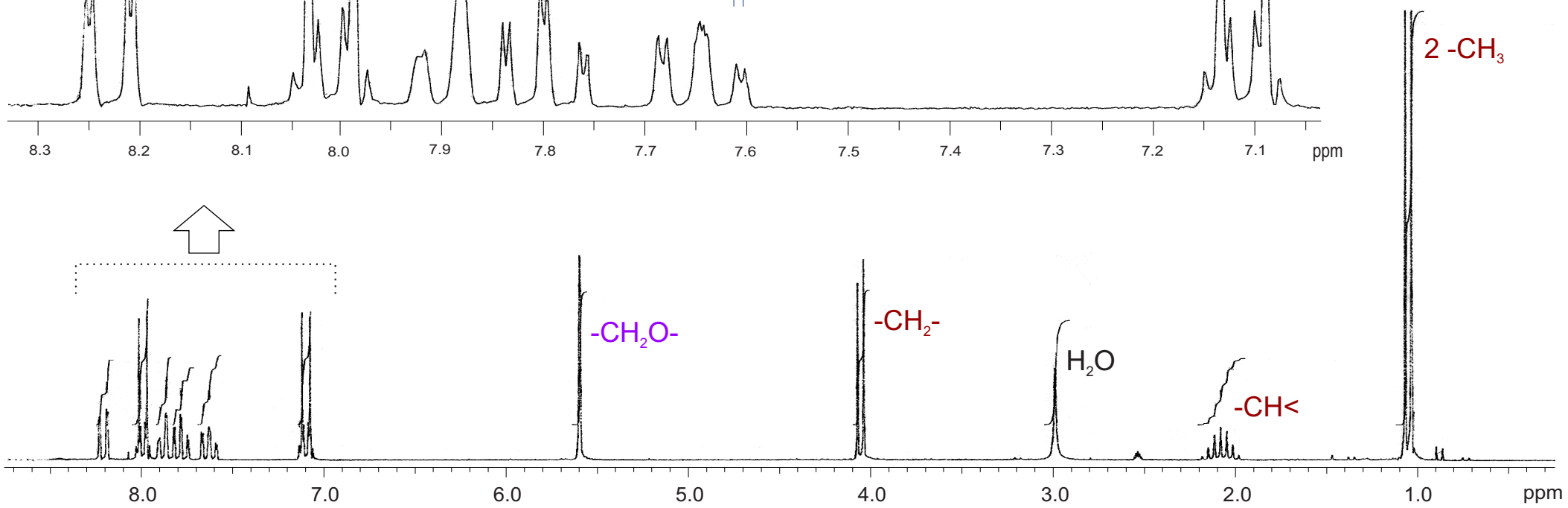


ЯМР ^{1}H, 200 МГц

R #05



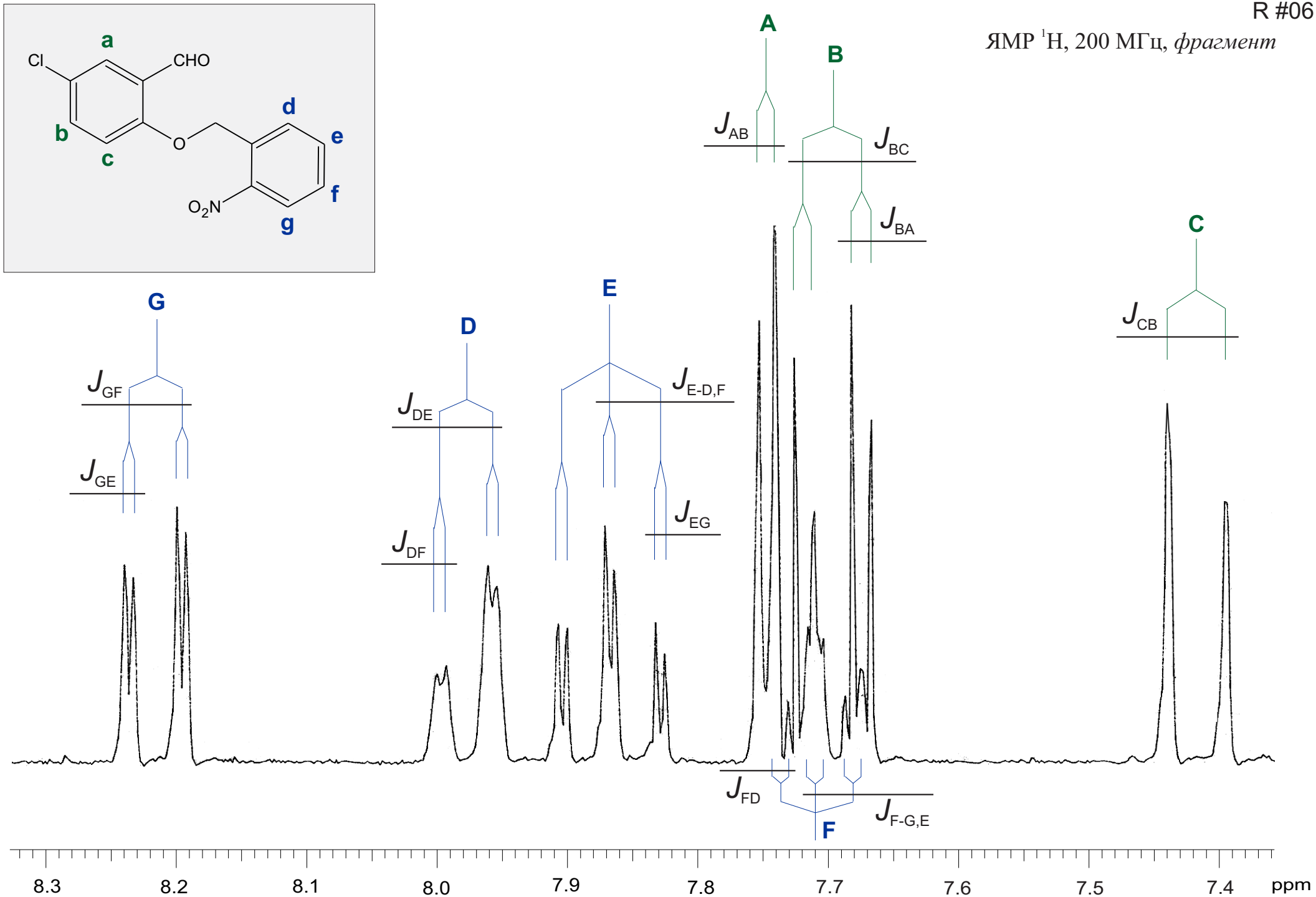




Ф. Тоукач, П. Беляков: слайд 23

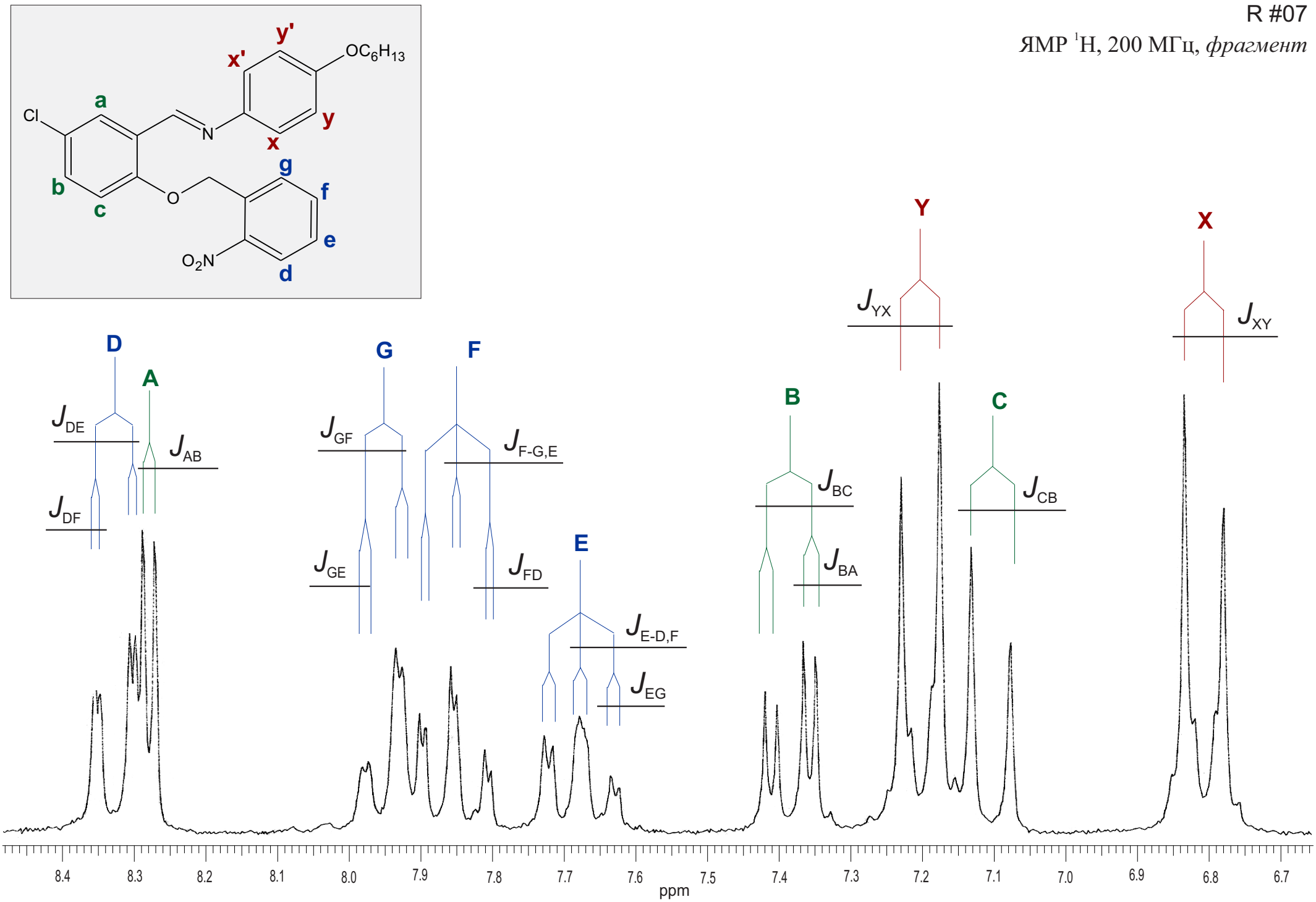
R #06

ЯМР ^{1}H, 200 МГц, *фрагмент*



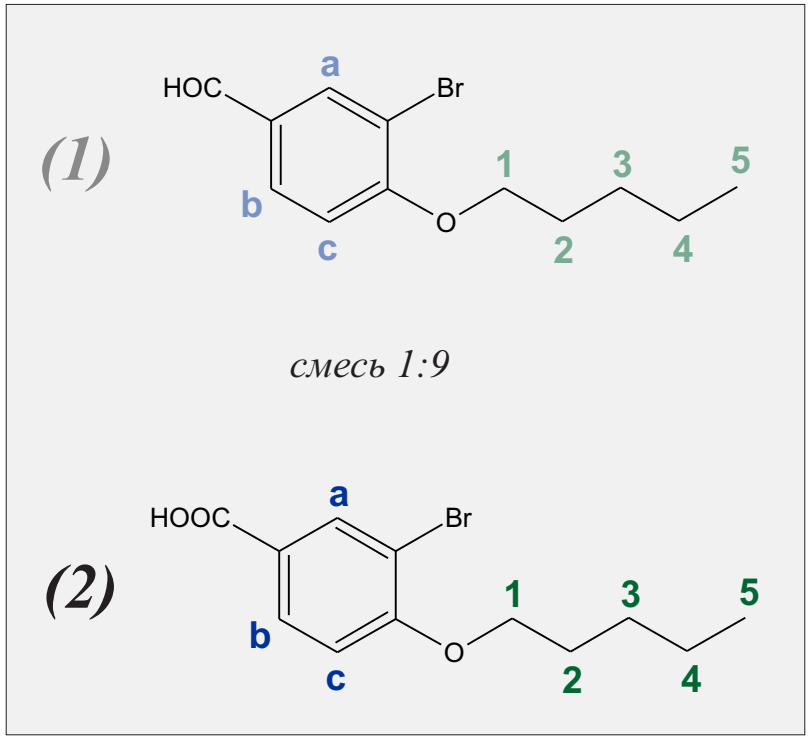
R #07

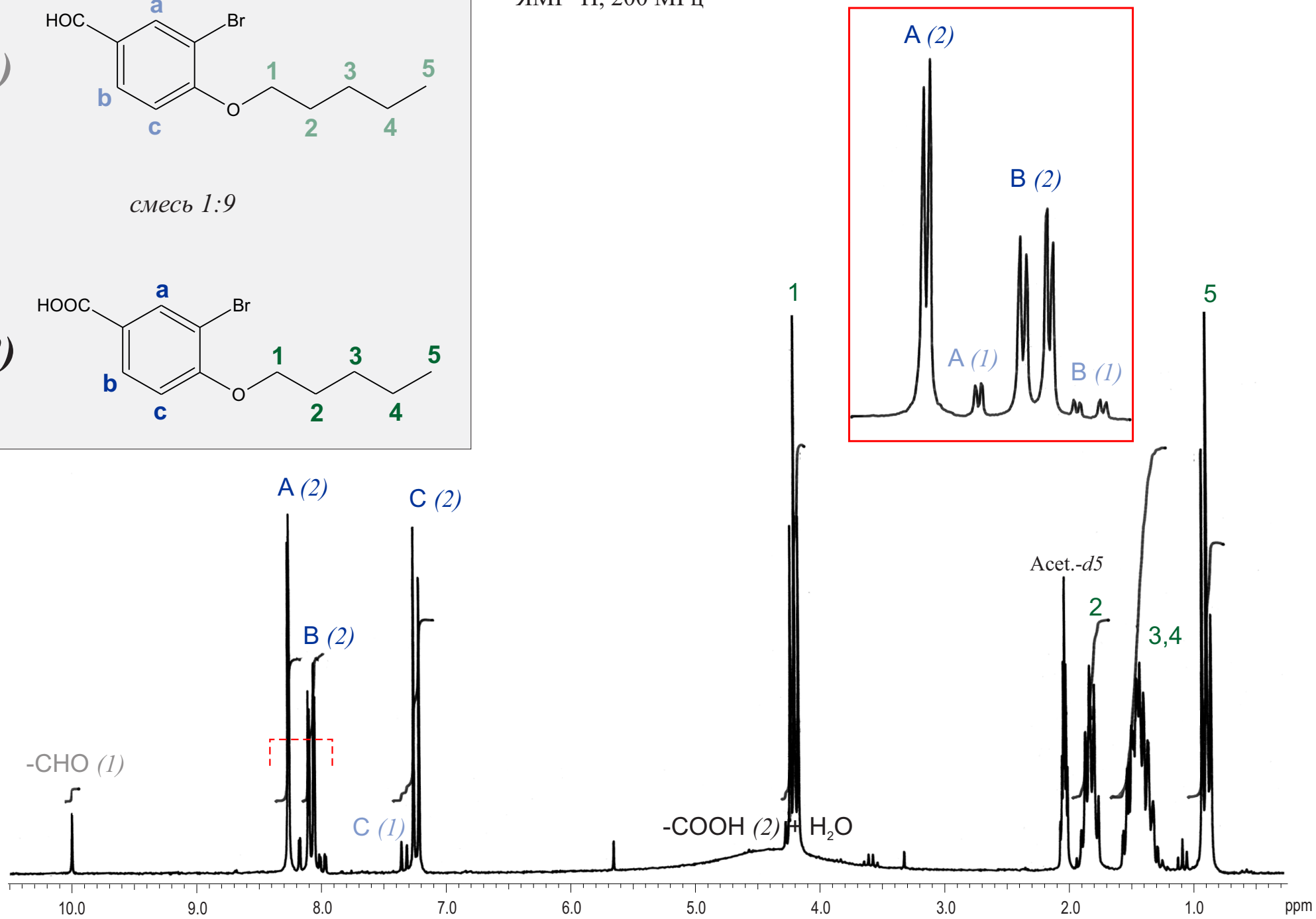
ЯМР ^{1}H, 200 МГц, *фрагмент*



Ф. Тоукач, П. Беляков: слайд 25

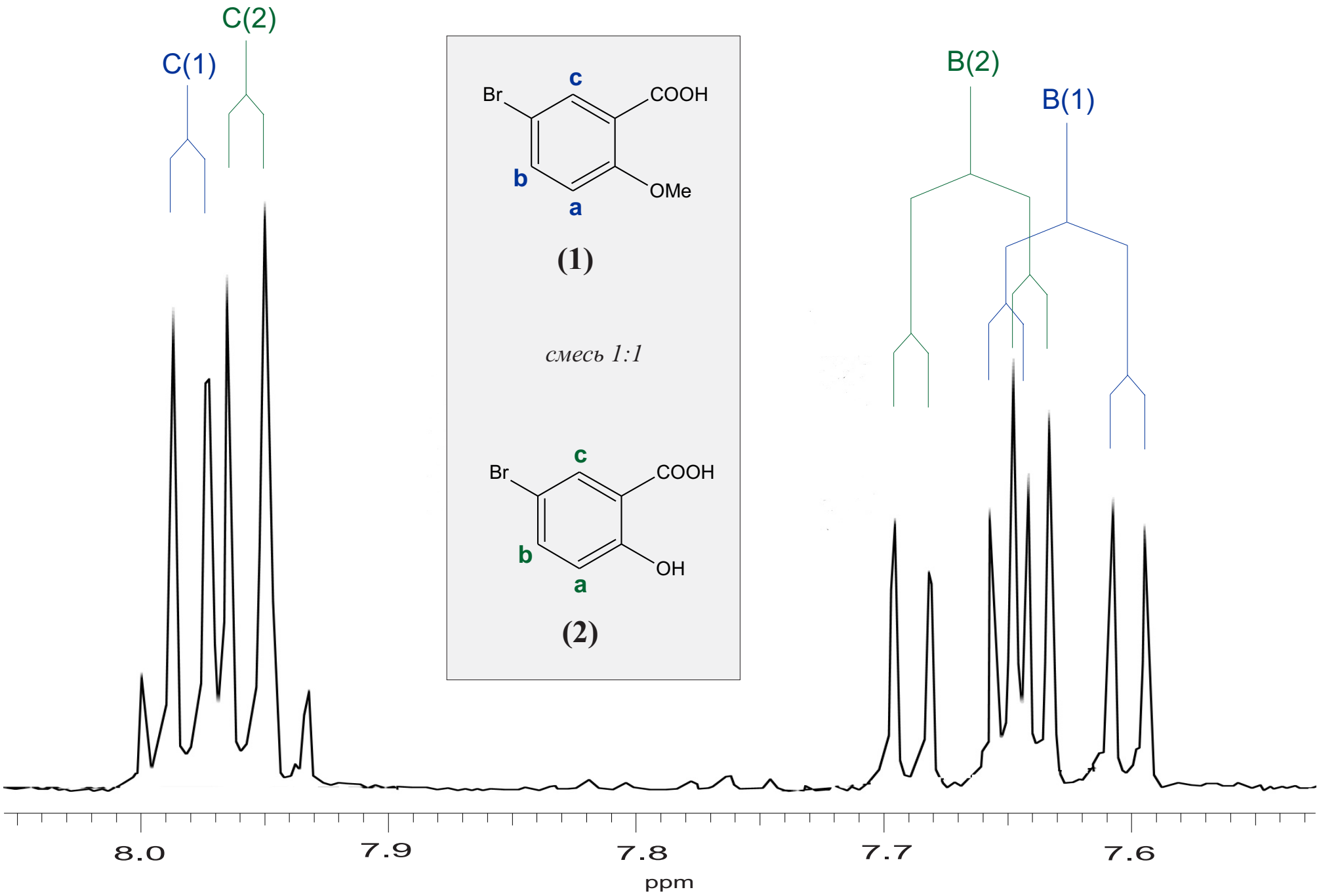
ЯМР ^{1}H, 200 МГц

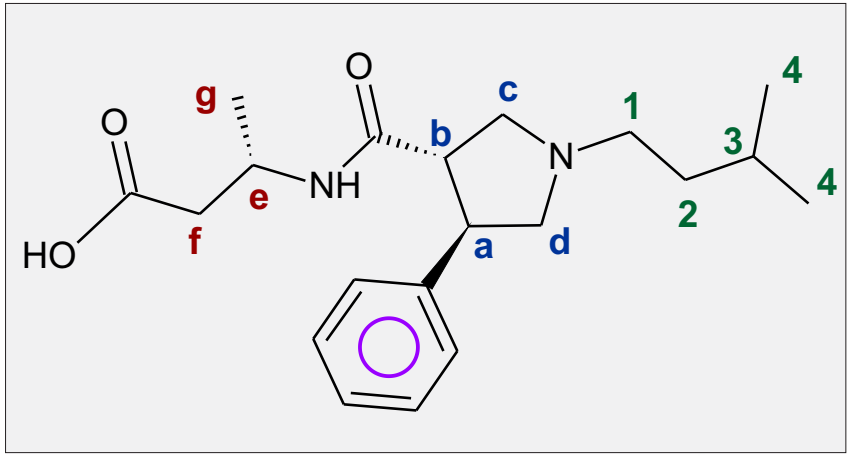




ЯМР ^{1}H, 200 МГц,
фрагмент

R #12

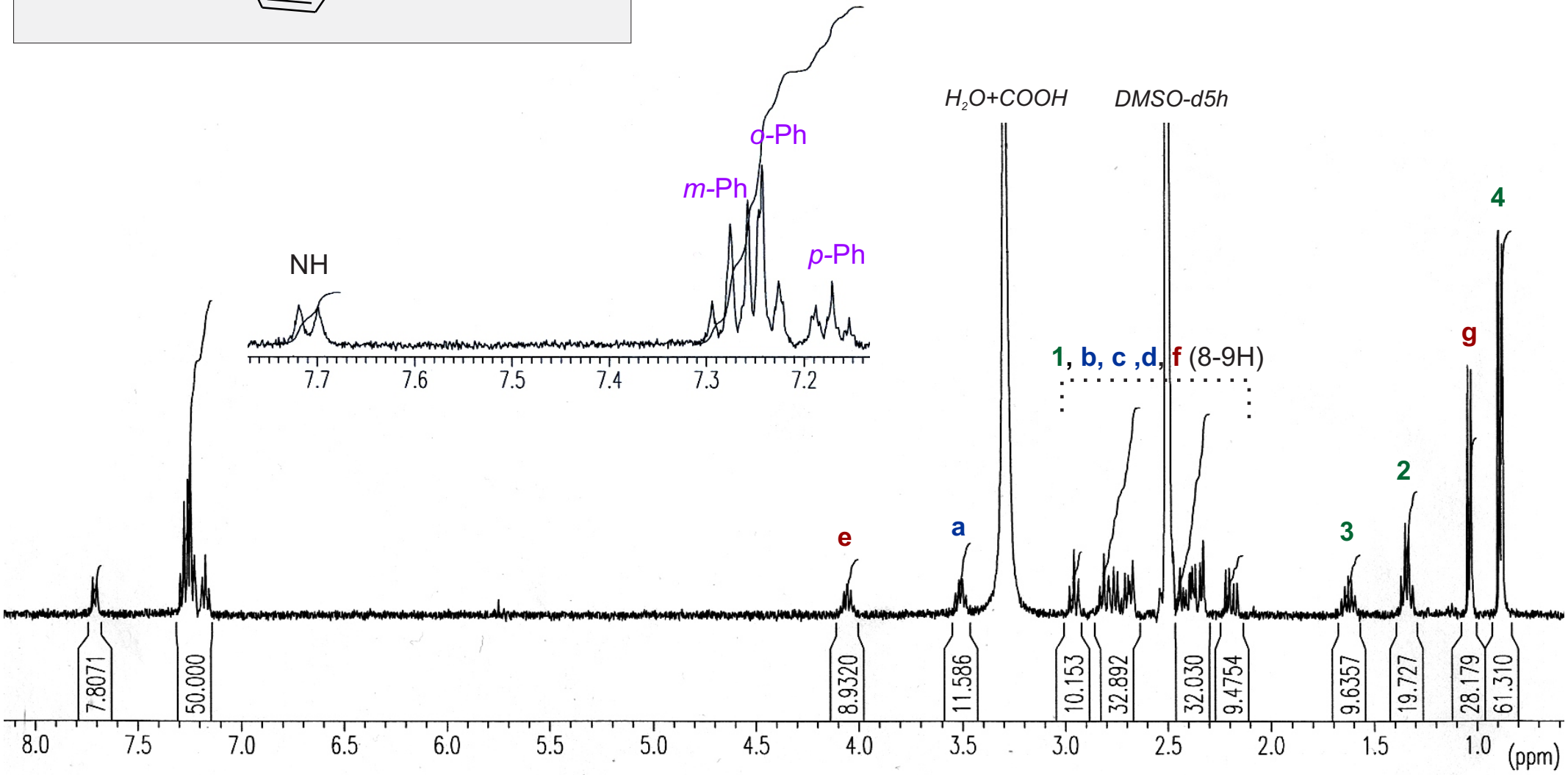




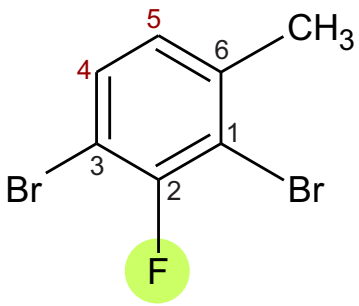
спектр не противоречит структуре,
но не доказывает ее

R #16

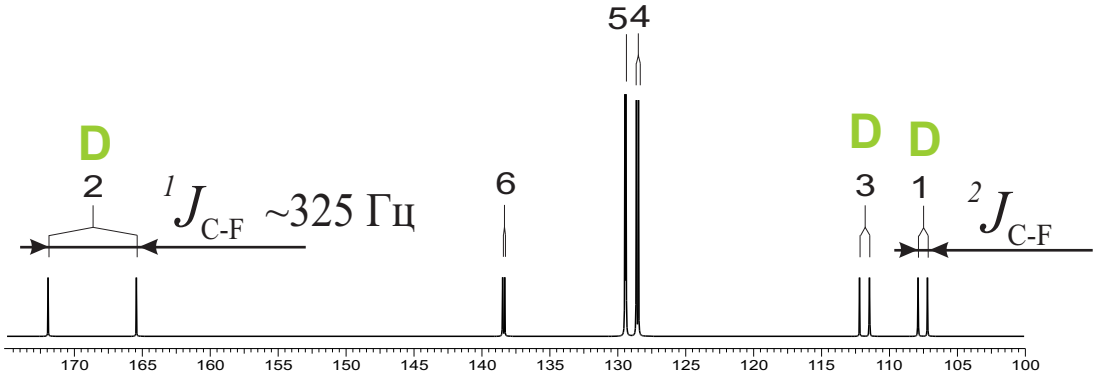
ЯМР ^{1}H, 400 МГц



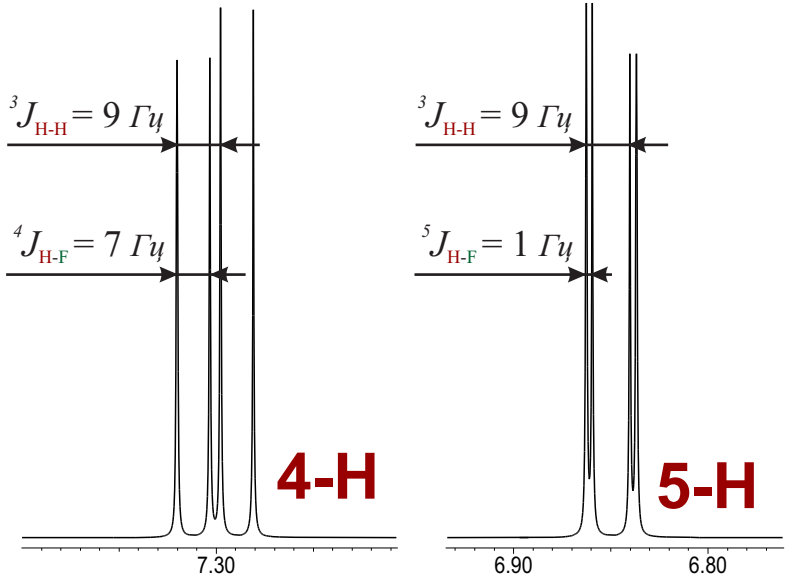
Гетероядерное спин-спиновое взаимодействие



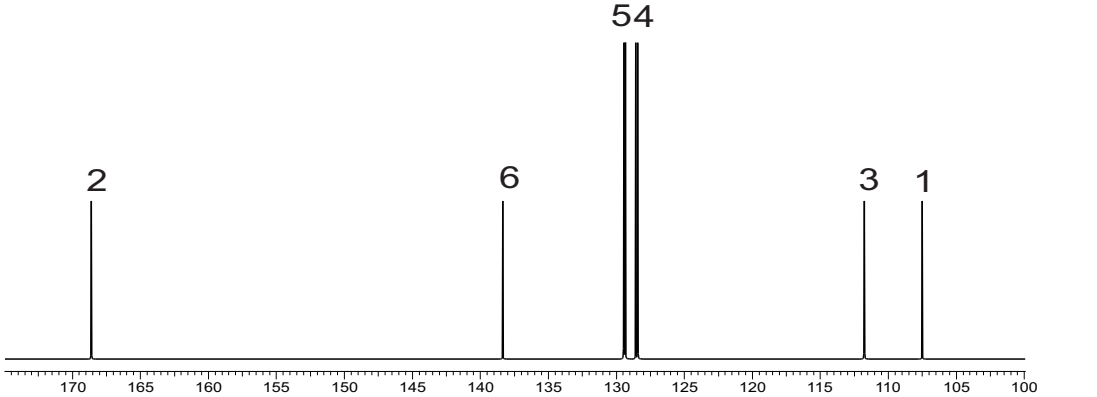
ЯМР ^{13}C с развязкой от ядер ^{1}H
(фрагмент)



ЯМР ^{1}H *(фрагмент)*



ЯМР ^{13}C с развязкой от ядер ^{1}H и ^{19}F
(фрагмент)



Основные протон-углеродные КССВ

тип КССВ	фрагмент структуры	$J_{C\text{-}H}$, *Гц**
прямые	sp^3**C-H**	125..135
	sp^2**C-H**	155..172
	*sp***C-H**	248..251
геминальные	sp^3**C**-sp^3*C*-**H**	-2..-5
	sp^3**C**-sp^2*C*-**H**	0..5 (C=C), 26..30 (C=O)
	sp^2**C**-sp^3*C*-**H**	-6 *(толуол)*
	sp^2**C**-sp^2*C*-**H**	1..3
	*sp***C**-sp^3*C*-**H**	-11..-9
	*sp***C**-sp^2*C*-**H**	32..36 (C=O)
	-**C**≡*C*-**H**	50..55
вицинальные	**C**-*C*-*C*-**H**	0..8 **
	C-*C*=*C*-**H**	5..11
	C=*C*-*C*-**H**	4..10
	C-*C*≡*C*-**H**	3..4
	C-*X*-*C*-**H**	3..5

*

в отсутствие электроотрицательных заместителей

**

зависят от торсионного угла

подробная таблица: Lambert JB, Mazolla EP "NMR Spectroscopy", Pearson Education Inc., 2004, Tables 4-1 (^1J), 4-4 (^2J, ^3J)(pp. 119-121)
по другим ядрам: Lambert JB, Mazolla EP "NMR Spectroscopy", Pearson Education Inc., 2004, Tables 4-1 (^1J), 4-5 (^{15}N) (pp. 119-121)

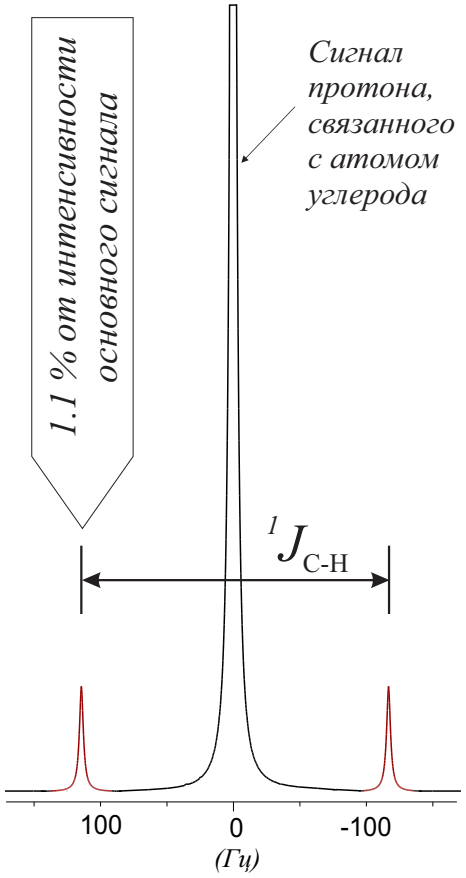
Спин-спиновое взаимодействие: особые случаи

Квадрупольные ядра

Быстрая релаксация ^{14}N ⇒ протон NH видит среднее по времени из возможных спиновых состояний ^{14}N ⇒ нет спинового расщепления

T ↑ , симметричное окружение ^{14}N ⇒ подавление квадрупольной релаксации ⇒ измерение КССВ J_{NH} (если нет химического обмена)

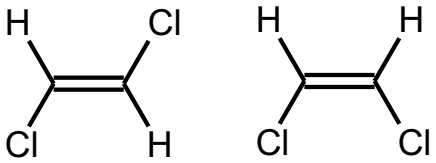
T ↓ усиление квадрупольной релаксации ⇒ нет возмущающего эффекта ^{14}N (уширения линий) в спектрах ^{1}H

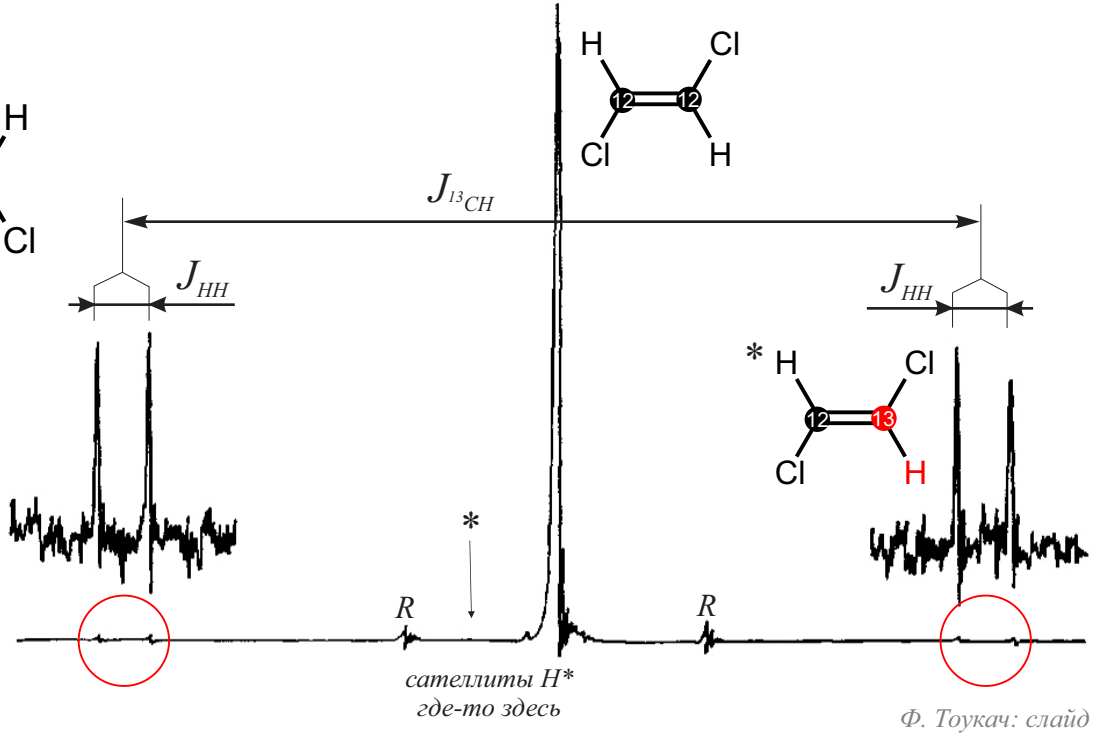


Сателлиты ^{13}C

КССВ между магнитно-эквивалентными ядрами проявляются в сателлитах ^{13}C:

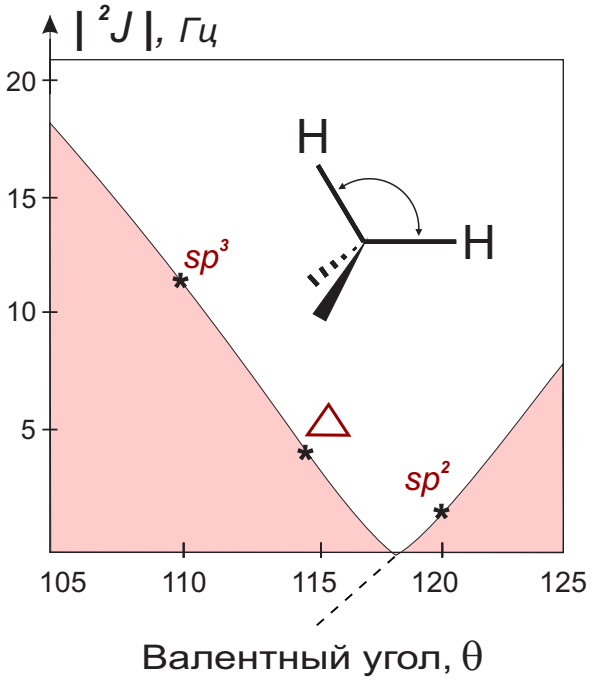
J_{HH} *(trans)* ≠ J_{HH} *(cis)*





Зависимость КССВ от структуры

Геминальные
(через 2 связи)

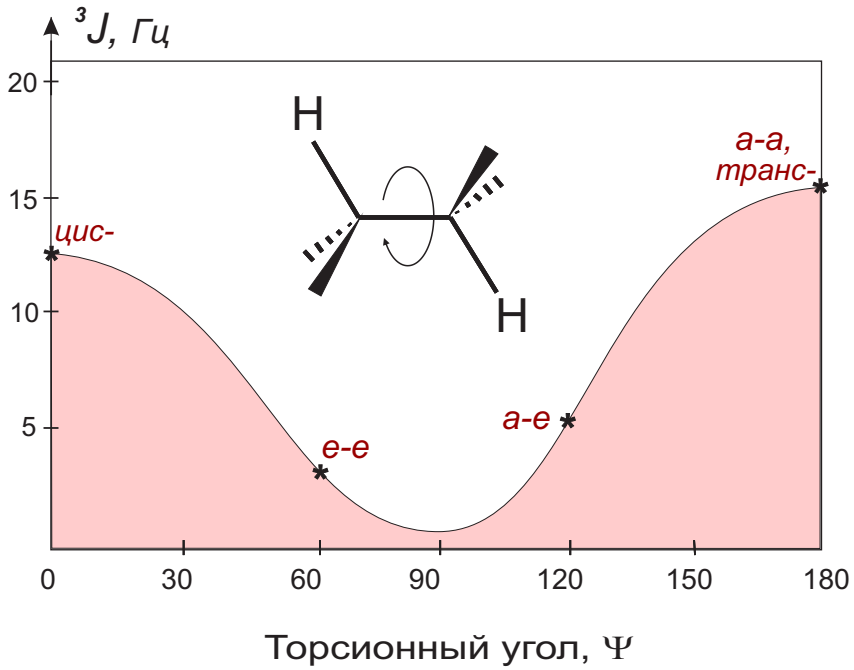


^2J ↑ электроотрицательные заместители в α-положении, особенно для sp^2. Для sp^3 $|J|$ ↓.

^2J ↓ электроотрицательные заместители в β-положении, особенно для sp^2. Для sp^2 J проходит через 0.

π-электроны по соседству, особенно если π-орбиталь лежит в плоскости CH_2-фрагмента. Для sp^3 $|J|$ ↑.

Вицинальные
(через 3 связи)

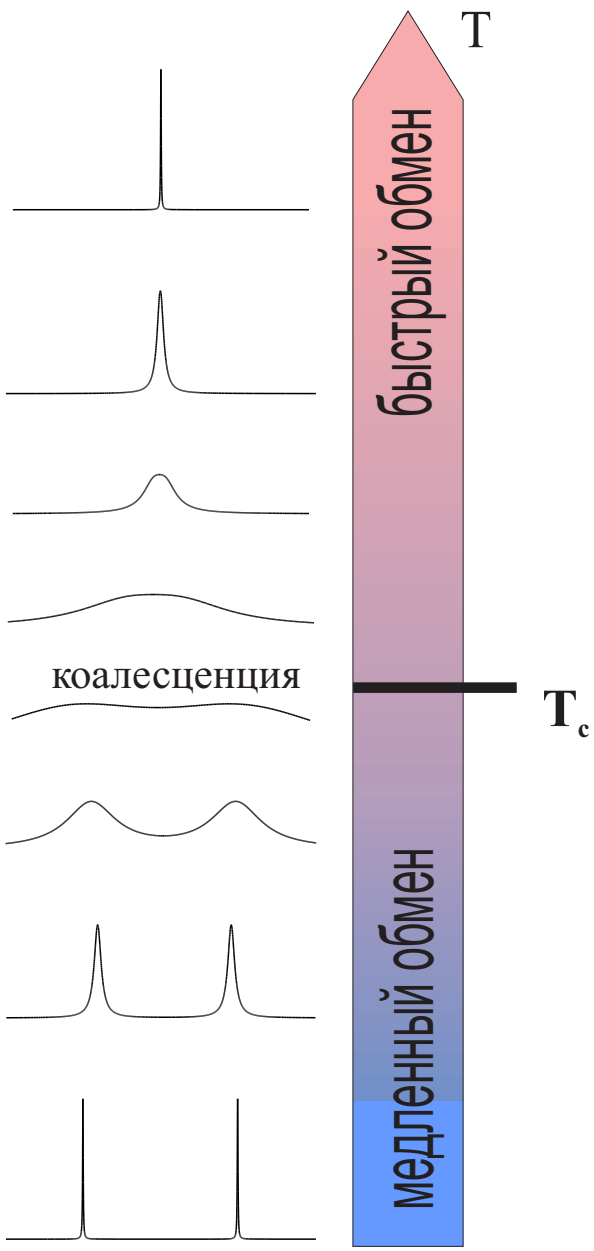


^3J ↑ короткие связи X-X:
|C=C| < |C—C| < |C—X|

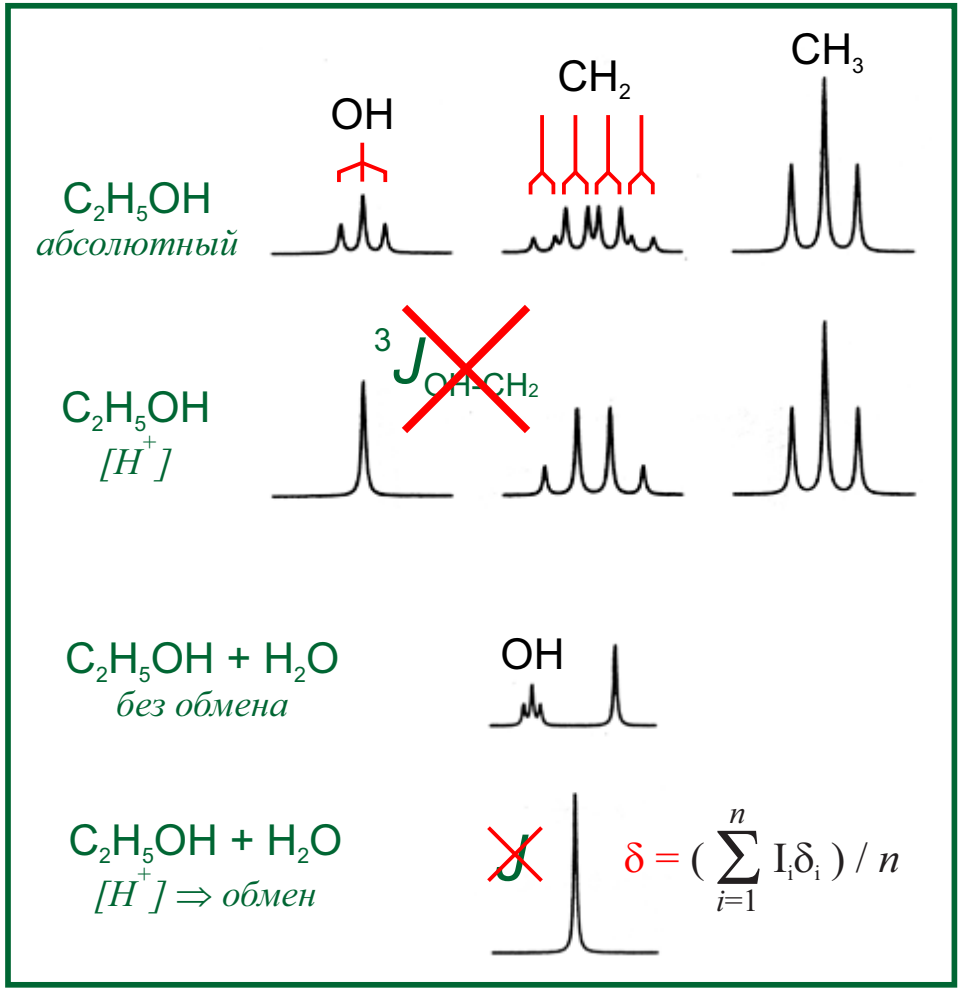
^3J ↓ электроотрицательные заместители

$^3J = A+B*\cos(\theta)+C*\cos(2\theta)$ *[формула Карплуса]*

Обменные явления в ЯМР

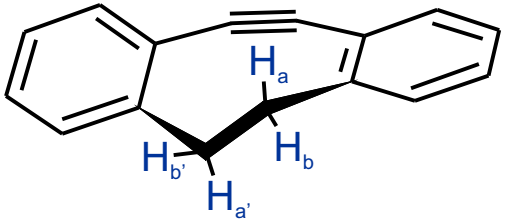


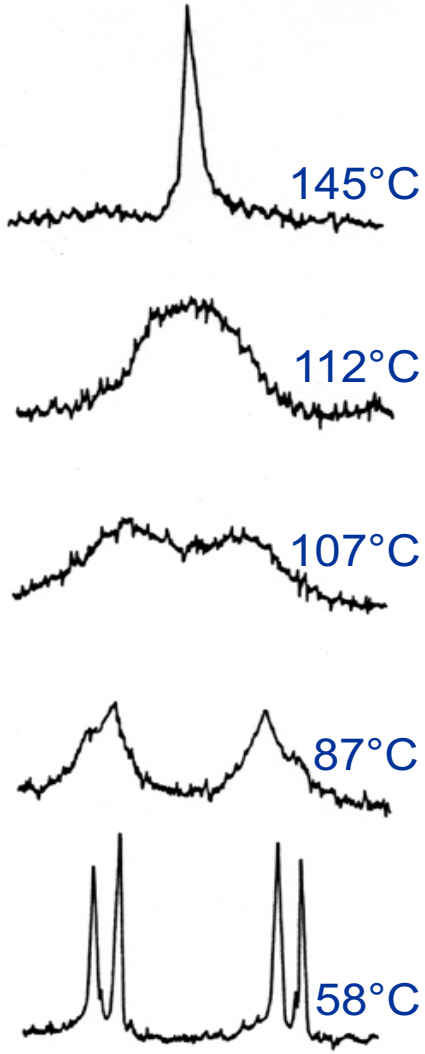
Межмолекулярный обмен



$$\Delta G^{\#} = R T_c \ln \frac{R T_c \sqrt{2}}{\pi N_A h |\nu_a - \nu_b|}$$

Внутримолекулярный обмен

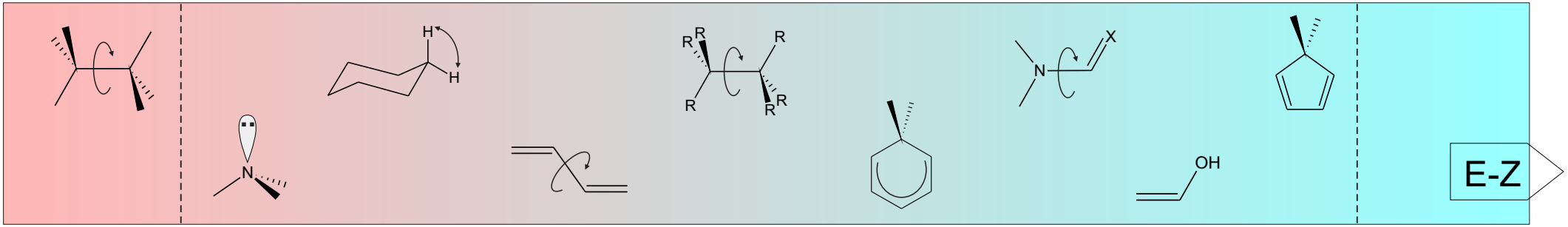




Ф. Тоукач: слайд 33

Процессы на шкале времени ЯМР

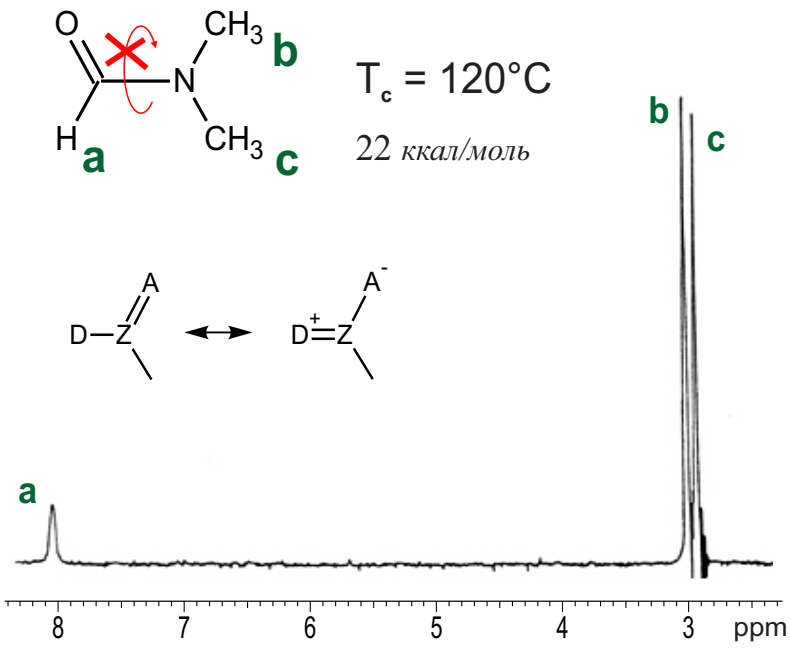
свободное вращение | инверсии | затрудненное вращение | таутомерия | миграции

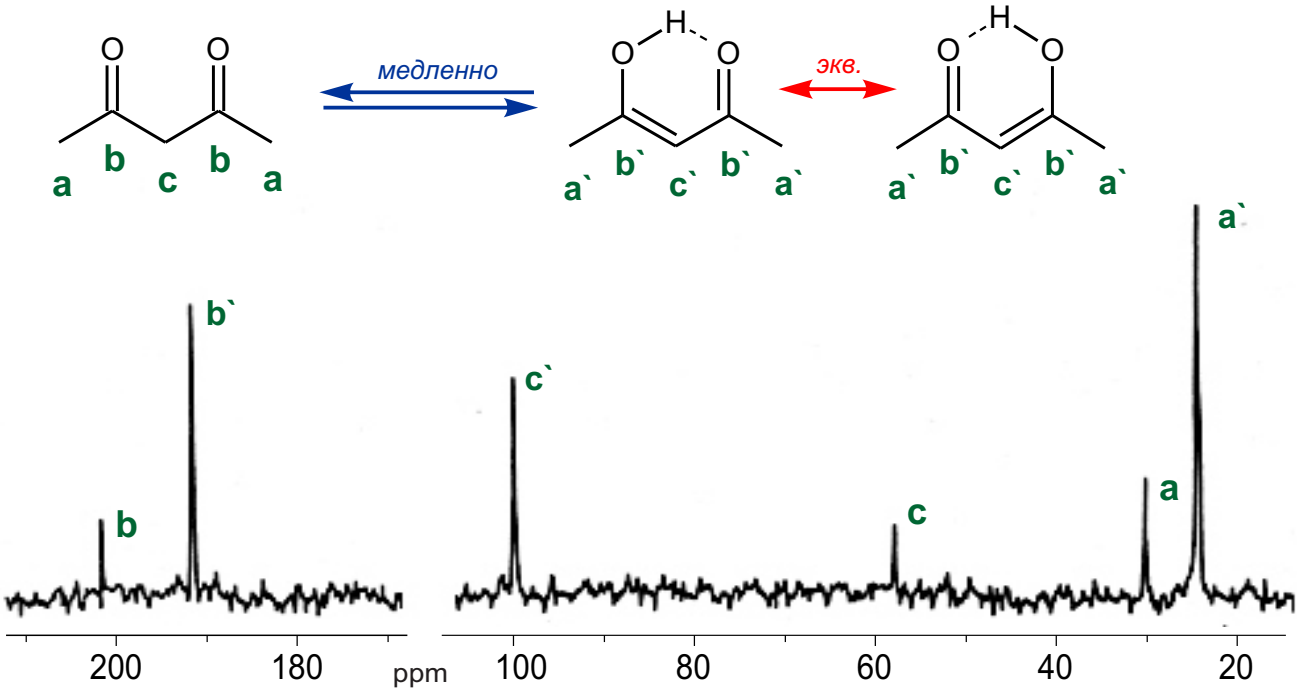


E_a, ккал/моль

1 сигнал 3 *процессы “во временном масштабе ЯМР” при t=20°C* 25 *N сигналов*

характеристическое время ЯМР ~ 1 *мс*



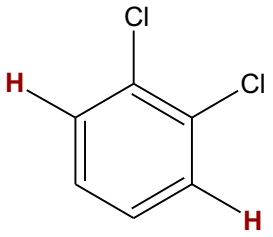


Ф. Тоукач: слайд 34

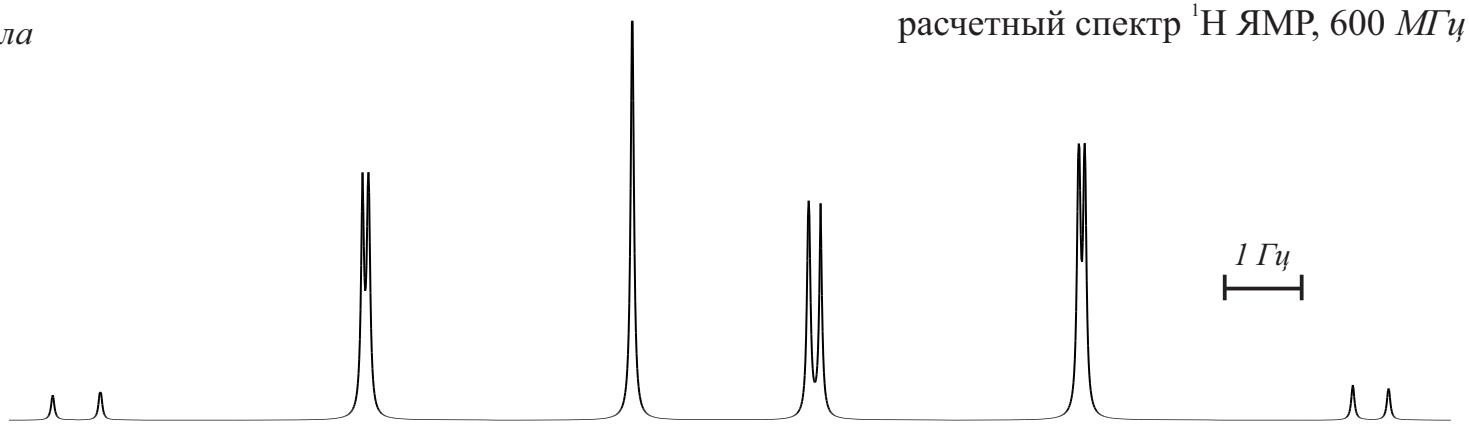
Спектры не первого порядка

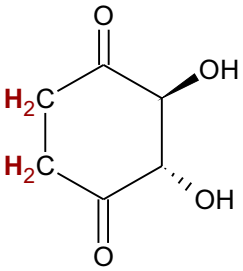
сигналы сближены $(\Delta\delta \approx J)$ или химически эквивалентны, но магнитно неэквивалентны $(H_2C{=}CF_2)$

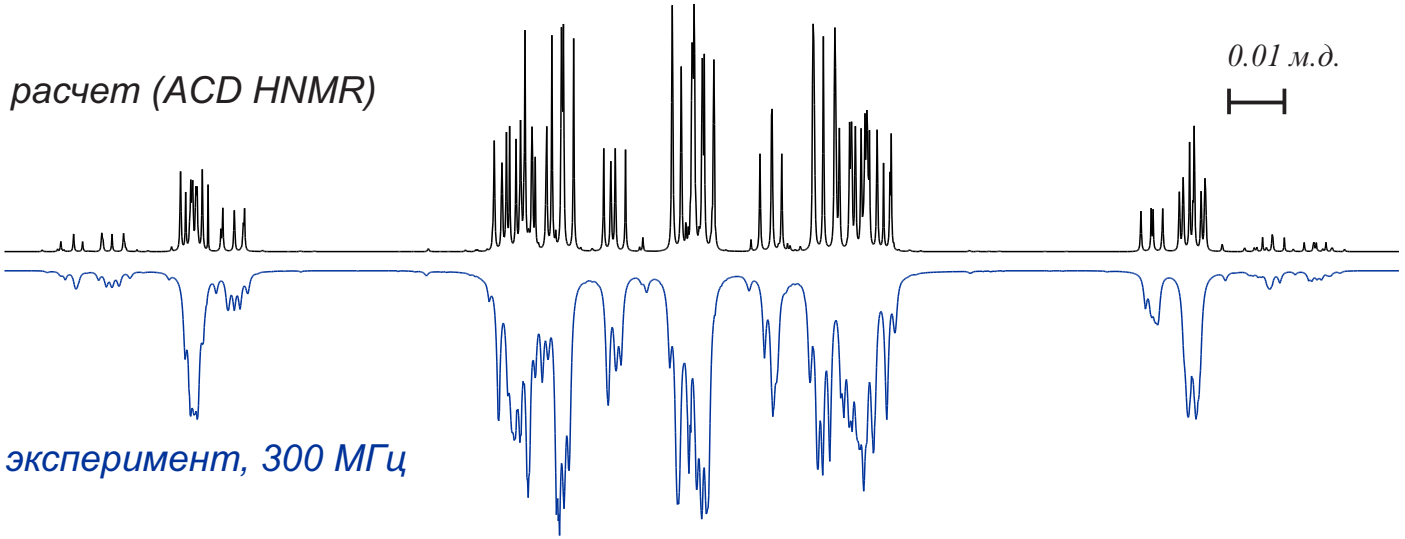
сигнал орто-протонов 1,2-дихлорбензола используется для оценки разрешения



расчетный спектр ^{1}H ЯМР, 600 *МГц*





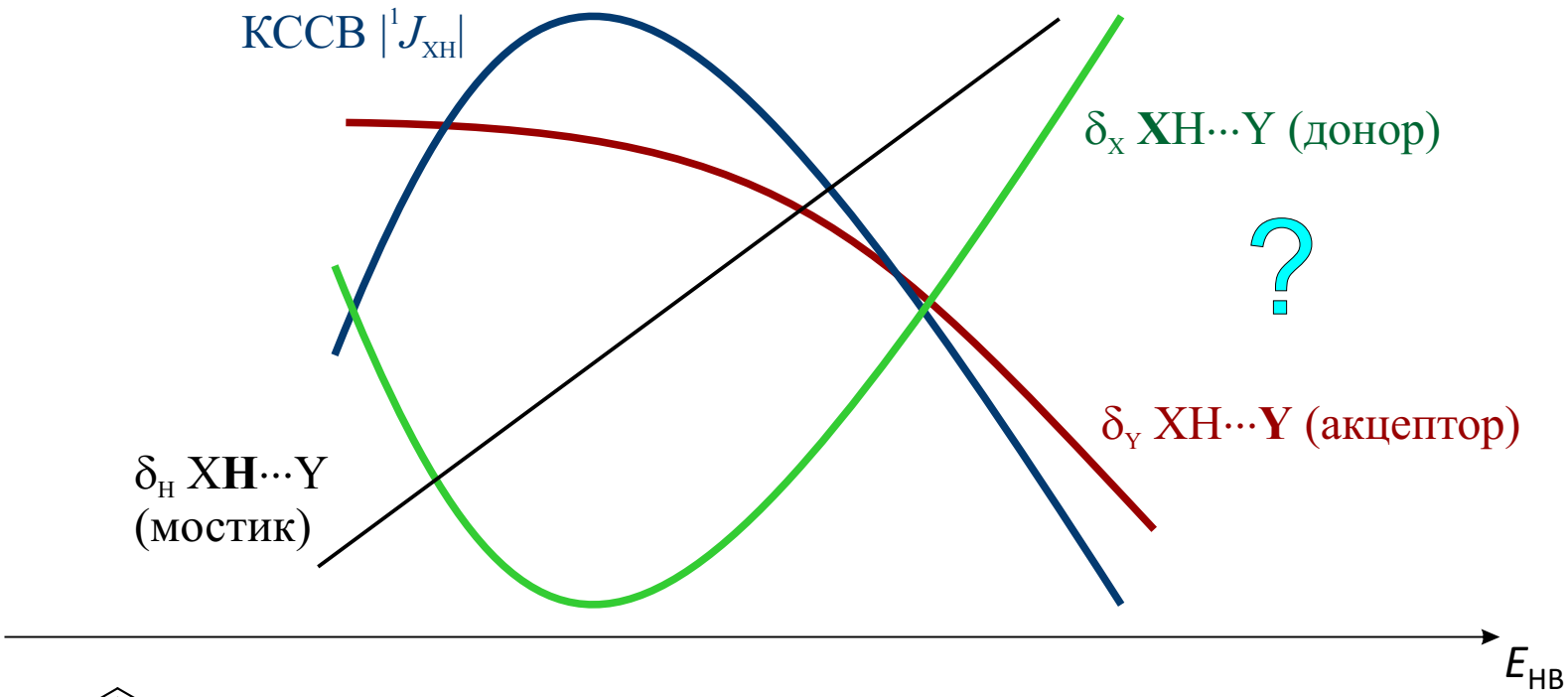


спектры сильносвязанных систем можно предсказать на основании квантомеханических расчетов

матричная алгебра (метод спин-гамильтониана):
дополнительные линии в сильносвязанных системах, отсутствие расщепления на эквивалентных атомах, эффект крыши

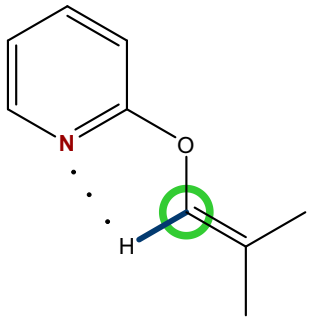
Водородные связи

влияют на ХС всех трех атомов и могут вызвать КССВ через водородную связь



$$^2J_{XY} = C_1 e^{-C_2 r(XY)}$$

$\Delta\delta_H$ (м.д.)
~
E_{HB} (ккал/моль) - 0.4

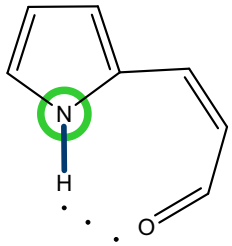


ΔJ_{CH} = +4 Гц

$\Delta\delta_N$ = -33 м.д.

$\Delta\delta_C$ = -3 м.д.

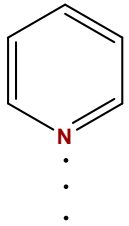
$\Delta\delta_H$ = +0.6 м.д.



ΔJ_{NH} = -5 Гц

$\Delta\delta_N$ = +16 м.д.

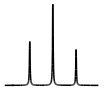
$\Delta\delta_H$ ~ +15 м.д.



HOC(O)CF3

$\Delta\delta_N$ = -128 м.д.

EtO**H** в абс. DMSO-*d*6



δ_H 4.33 м.д.
J_{HH} = 5 Гц

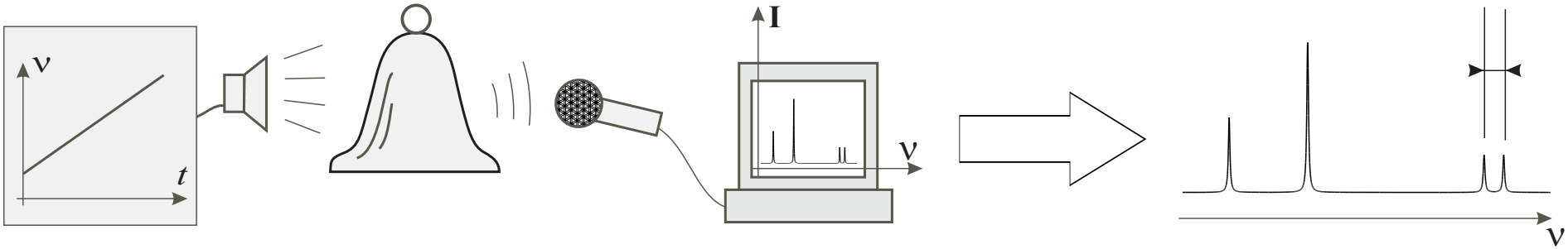
EtO**H** в $CDCl_3$

δ_H 2.55 м.д.

Классический и импульсный ЯМР

непрерывная развертка

скорость развертки
$\Delta\nu$=1 *Гц* $\Rightarrow$ ΔE=h *Дж* $\Rightarrow$ Δt > 1 *сек*

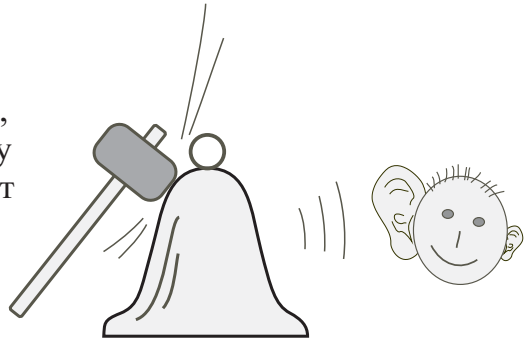


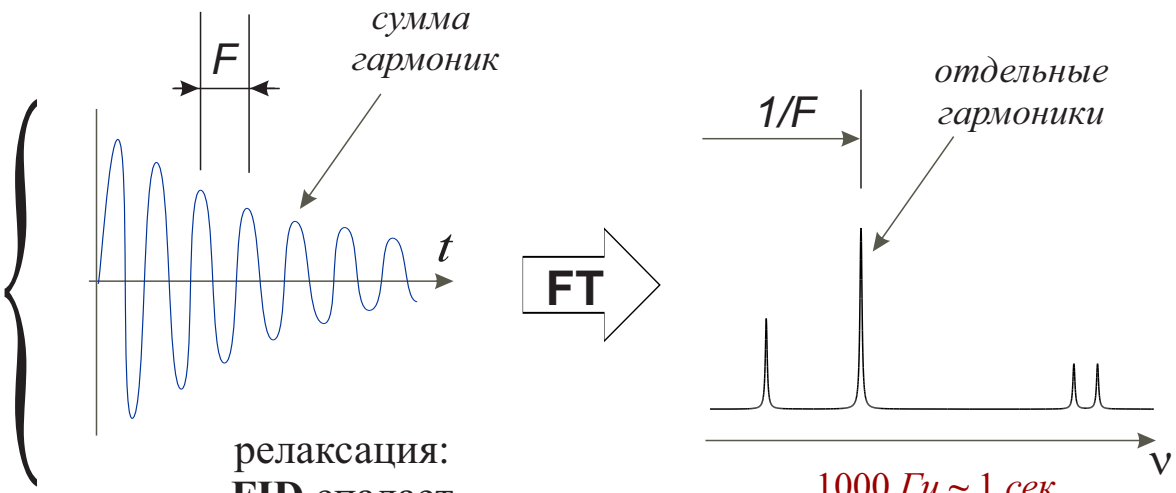
1000 *Гц* ~ 1000 *сек*

импульсный метод

чем короче импульс,
тем большую полосу
частот он возбуждает

Гейзенберг $\Delta E \Delta t \sim h$
$\Downarrow$
$\Delta\nu = \Delta E/h \sim 1/\Delta t$

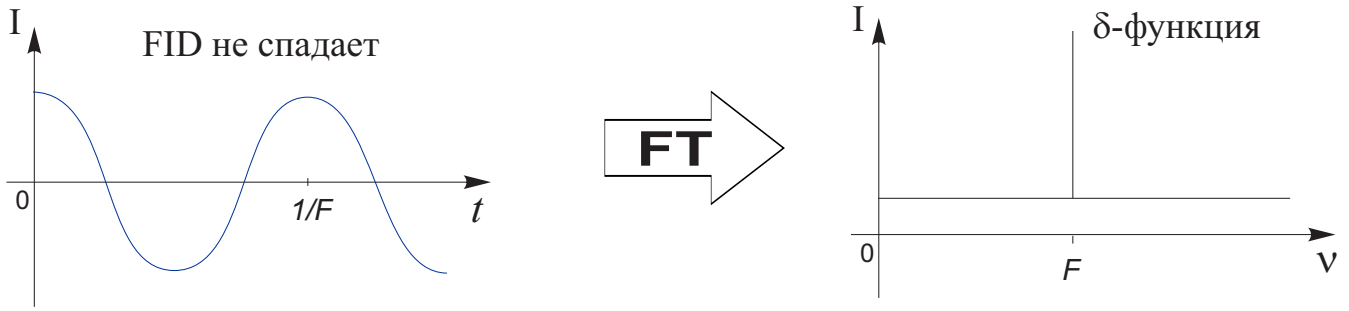


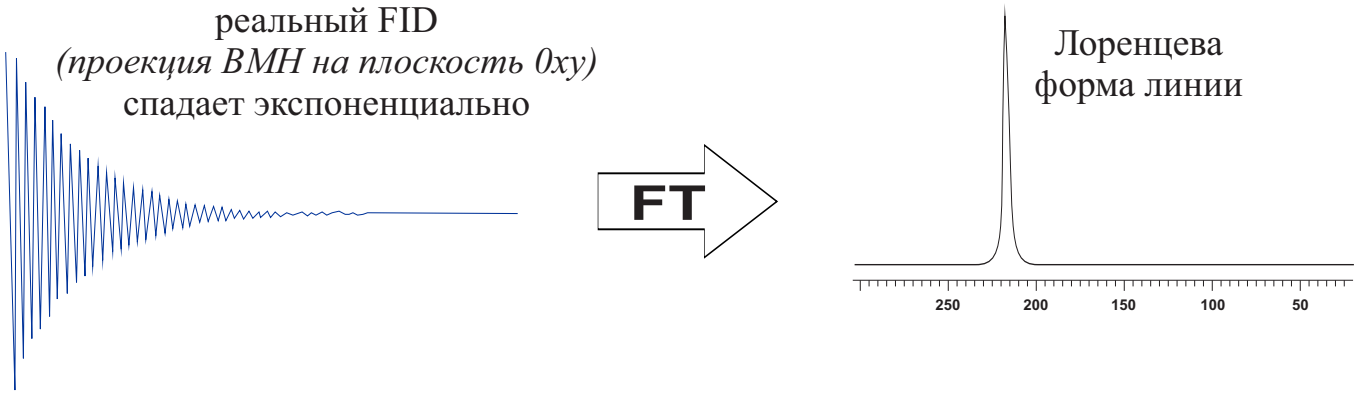


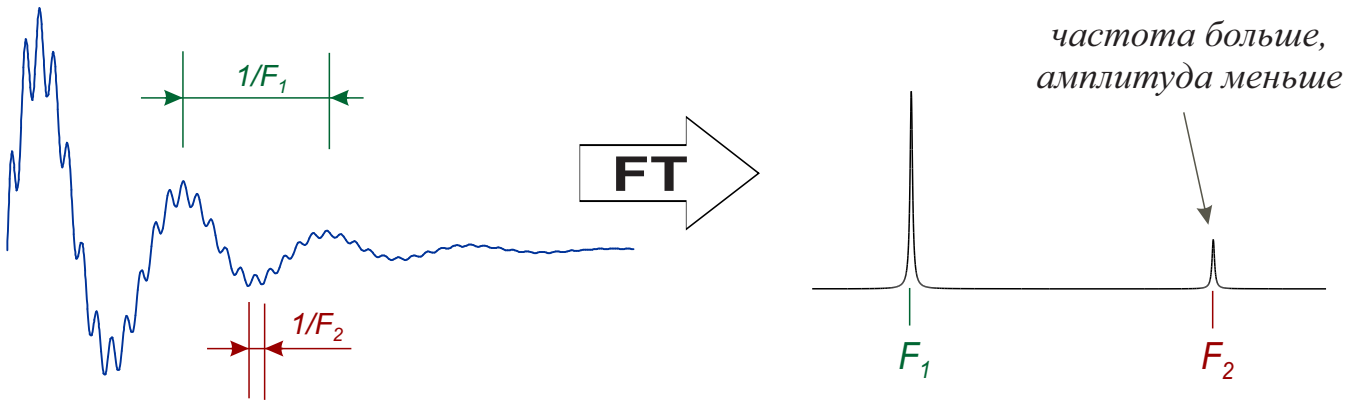
релаксация:
FID спадает
экспоненциально

1000 *Гц* ~ 1 *сек*
(на накопление FIDa)

FID и спектр ЯМР





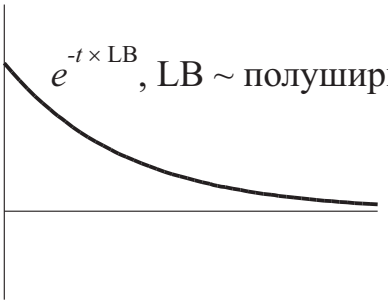


$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{i\omega t} dt$$

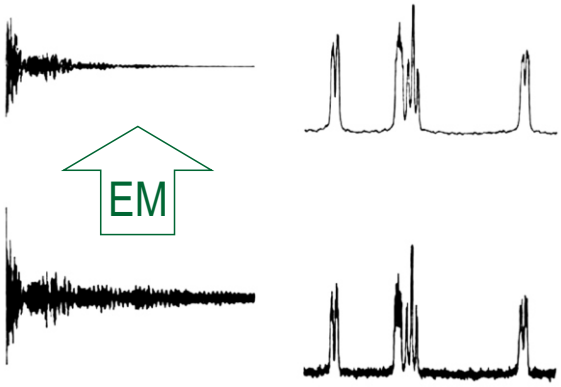
преобразование Фурье (**FT**)

Операции с FID до преобразования Фурье

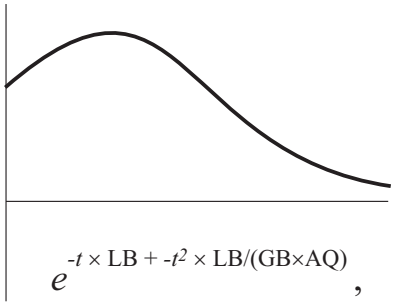
Умножение на экспоненту -
улучшение S/N за счет разрешения



$e^{-t \times LB}$, LB ~ полуширина сигнала

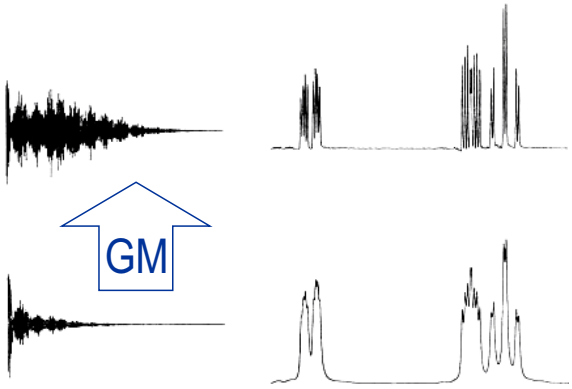


Гауссово умножение -
изменение формы линии за счет S/N

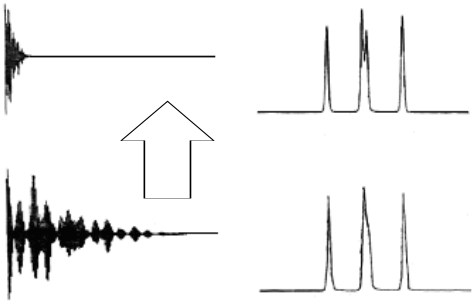


$e^{-t \times LB + -t^2 \times LB/(GB \times AQ)}$,

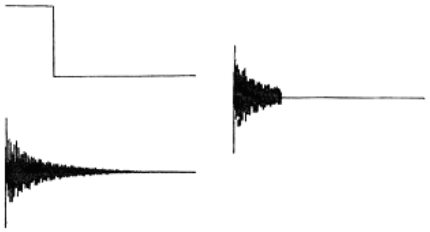
LB ~ расположение максимума



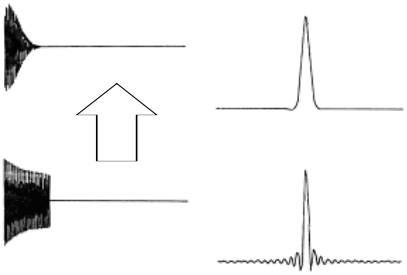
Дополнение нулями
(точек становится больше, а шум не добавляется)



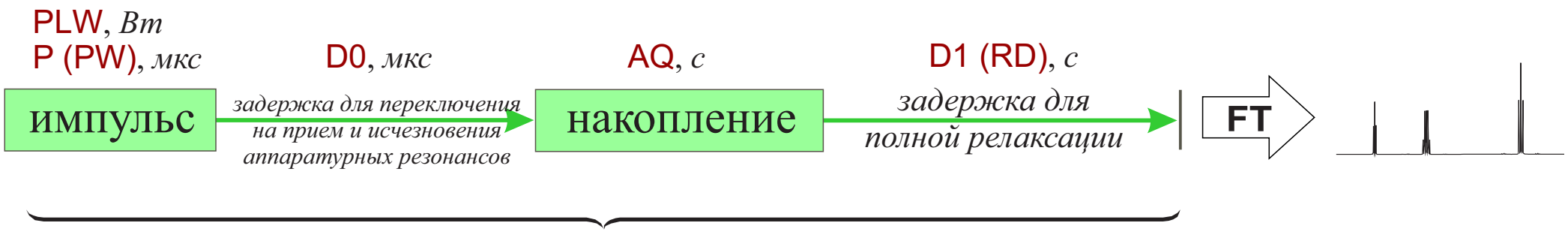
Обрезание
(экономия времени)



Аподизация
(сглаживание "ступеньки")

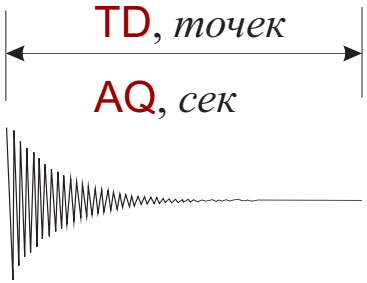


Простейший эксперимент ЯМР



"скан", повторяется NS раз

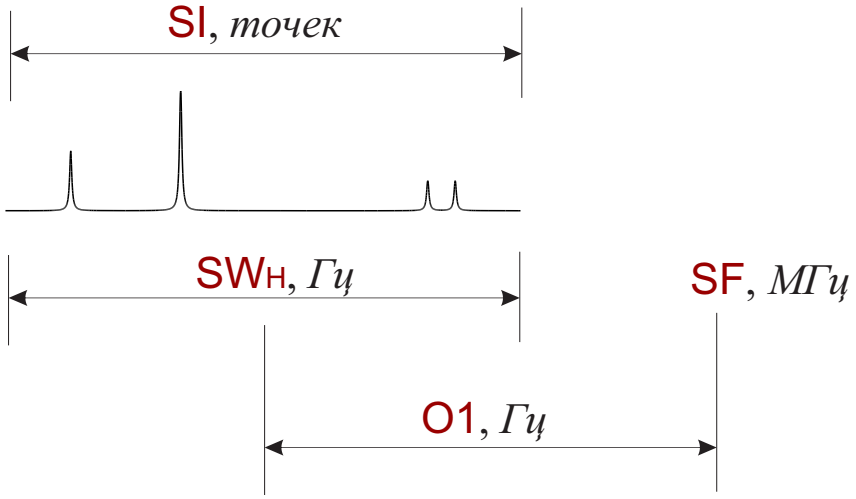
$$S \sim NS,\ N \sim \sqrt{NS} \ \Rightarrow\ S / N \sim \sqrt{NS}$$

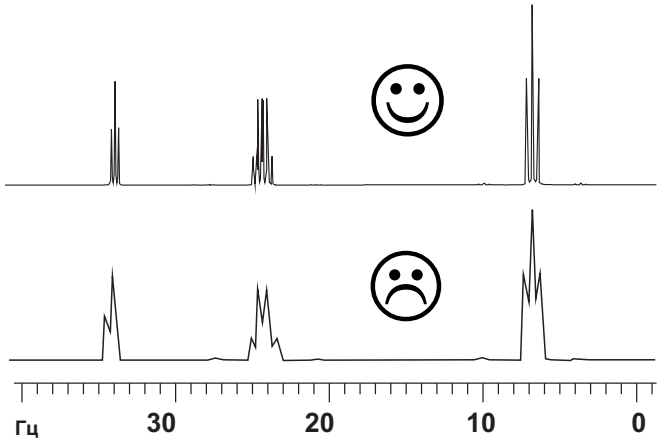


Естественное разрешение = 1/AQ

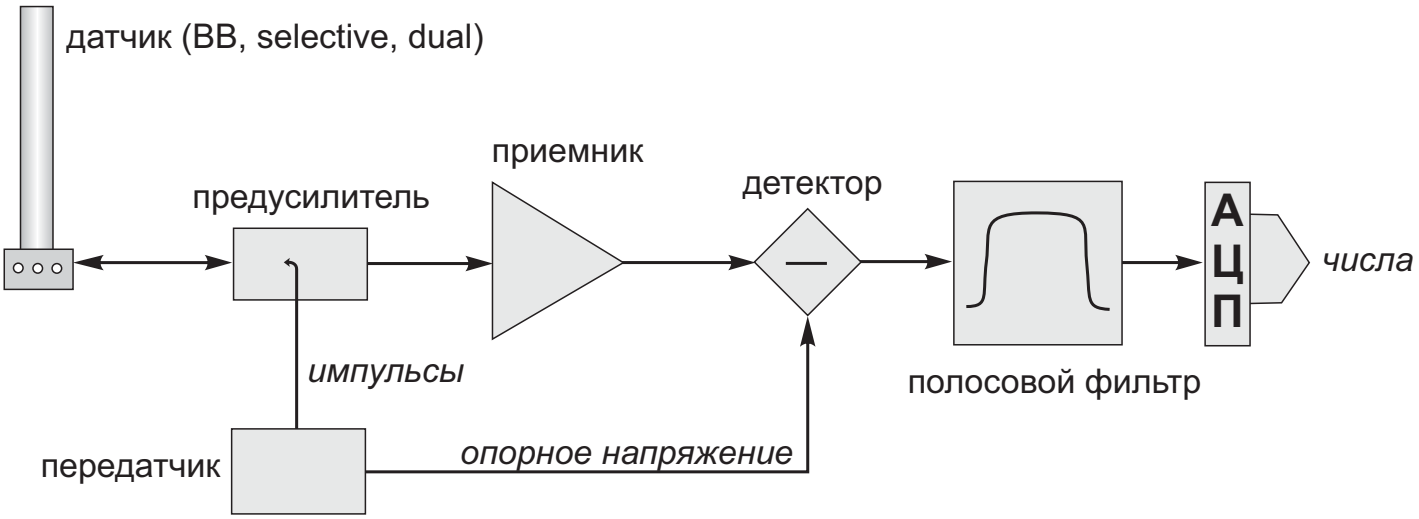
(при условии, что релаксация не происходит быстрее, чем AQ, т.е. линии достаточно узкие)

Цифровое разрешение = SI / SW

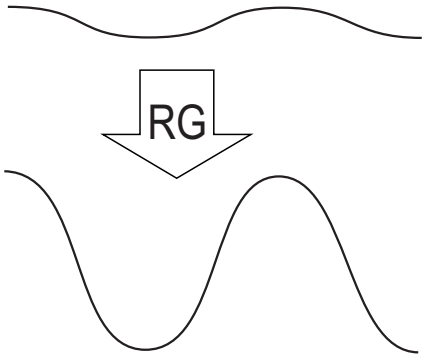




Оцифровка сигнала ЯМР

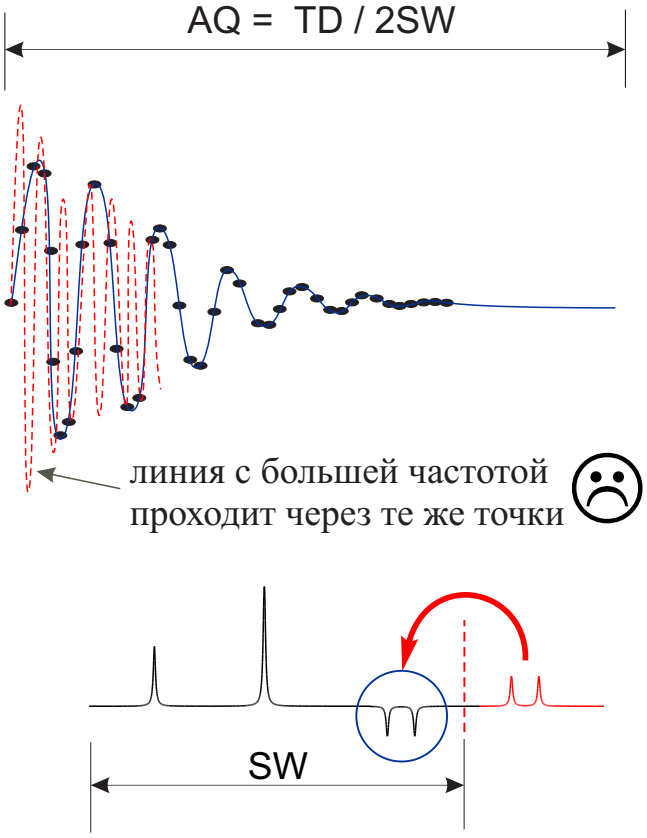


аналоговый сигнал

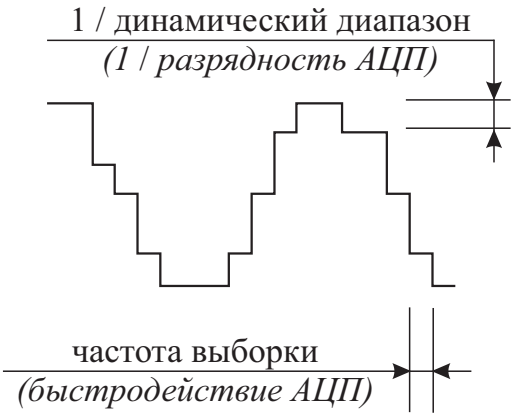


RG↓ - потеря маленьких сигналов в шумах

RG↑ - зашкал АЦП, искажения базовой линии



цифровой сигнал



Критерий Найквиста

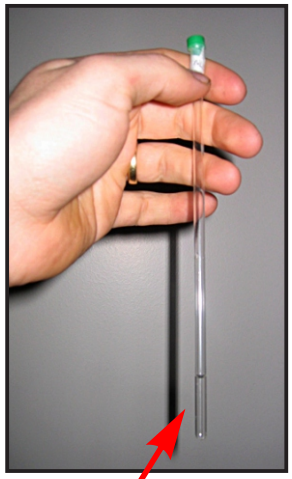
Для оцифровки <u>всех</u> частот скорость выборки должна быть 2*SW.

Частоты, не попадающие в SW, присутствуют в спектре в виде отраженных сигналов с противоположной фазой.

К этим частотам относится и шум ⇒ необходим полосовой фильтр.

ЯМР аппаратура в картинках

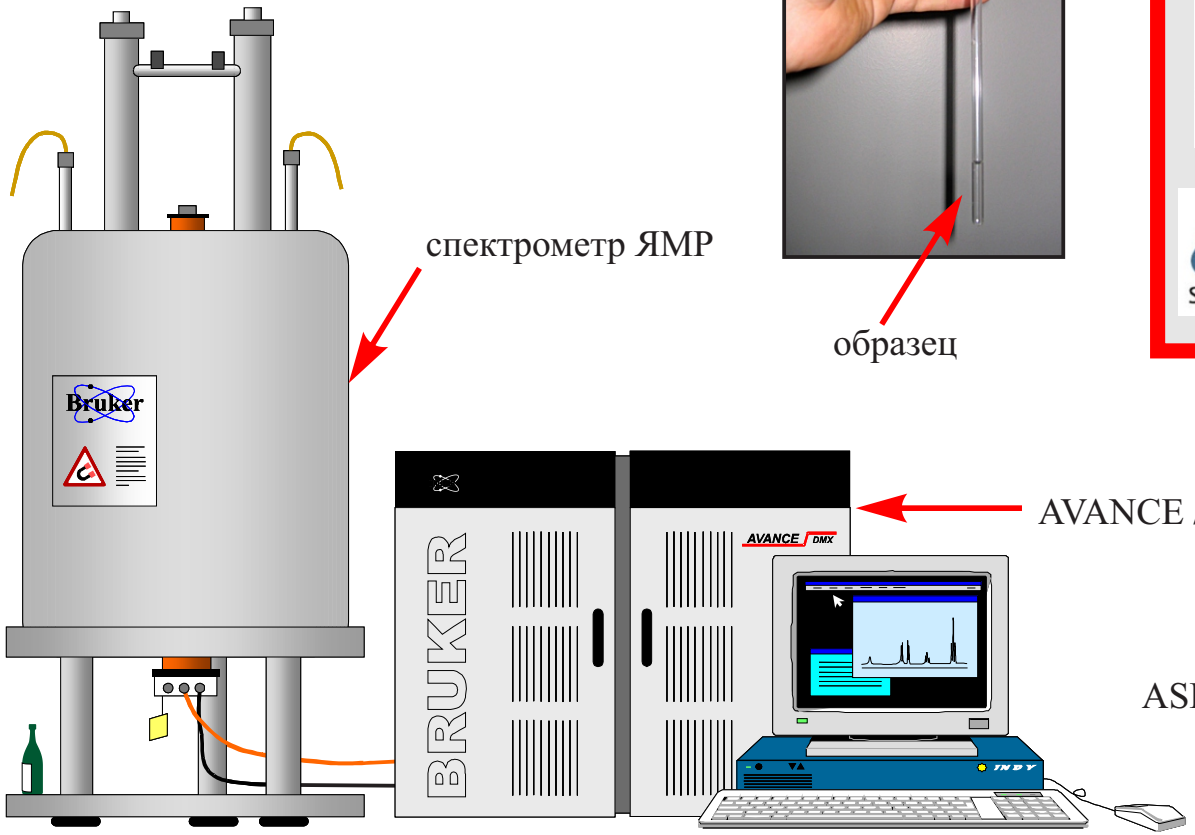
датчик ЯМР



образец

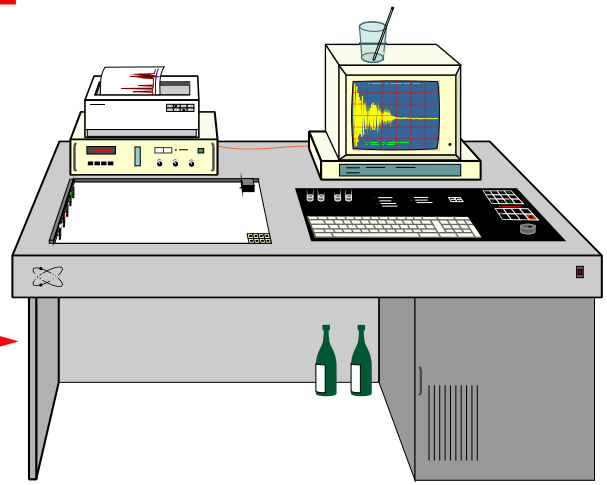
монстр

спектрометр ЯМР



AVANCE / SG / IRIX

ASPECT / ADAKOS

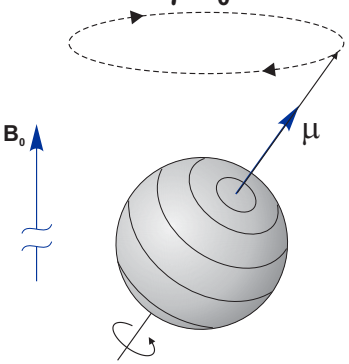


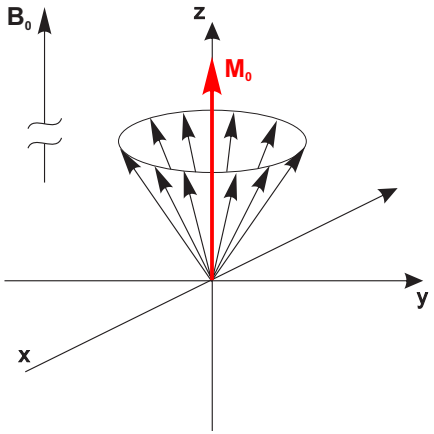
Ф. Тоукач: слайд 42

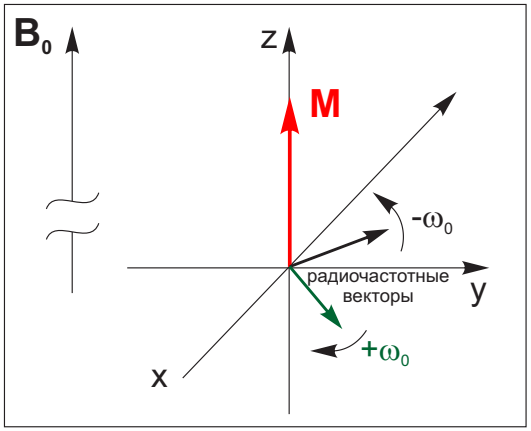
Основные понятия импульсного ЯМР

Магнитный момент ядра и вектор макроскопической намагниченнсоти

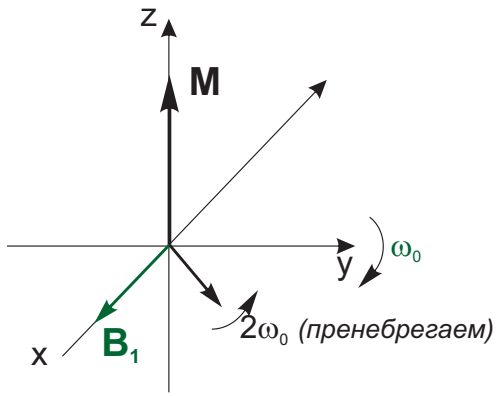
$\nu = \gamma B_0 / 2\pi$







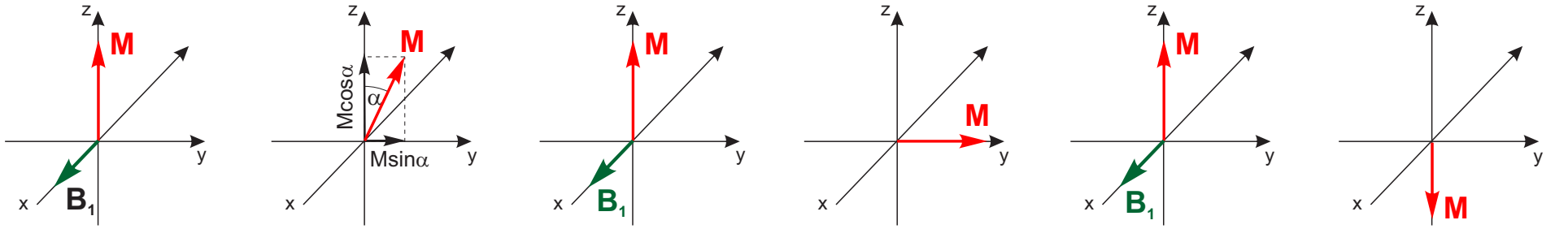
лабораторная система координат

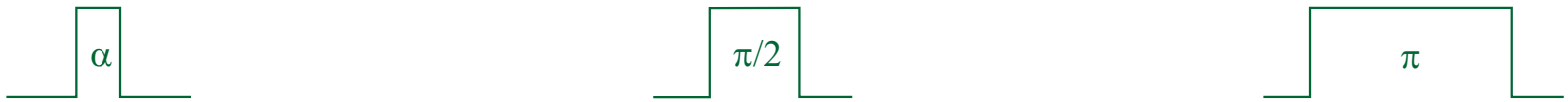


вращающаяся система координат

заселенность ↑↑ *больше, чем* ↑↓ $\Rightarrow$ *z(ВМН)>0*

виды импульсов

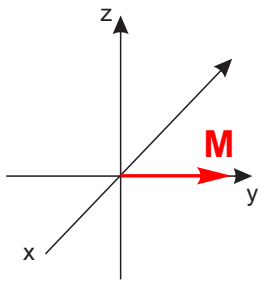




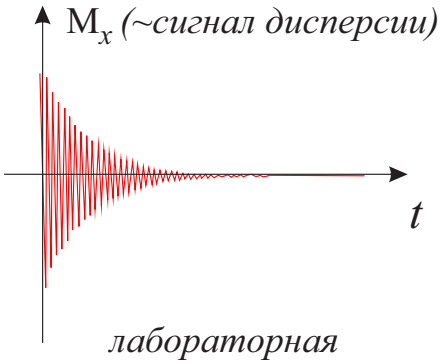
радиочастотное поле

Ф. Тоукач, А. Дероум: слайд 43

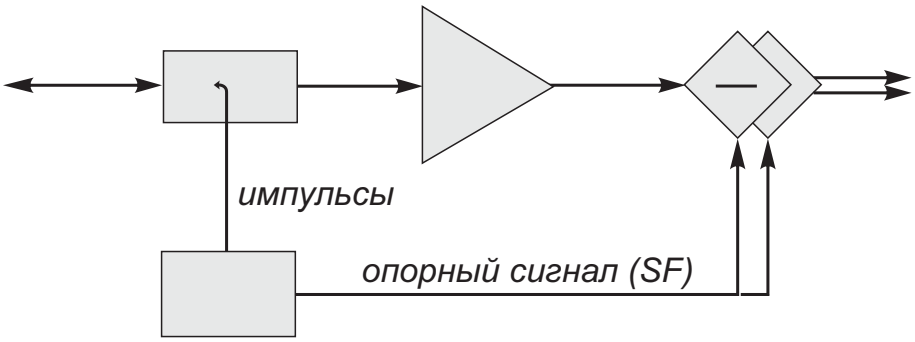
FID и фаза сигналов



вращающаяся после π_x



лабораторная



меняя фазу опорного сигнала при вычитании SF,
можно получить сигнал поглощения, либо сигнал дисперсии

Квадратурное детектирование (2 приемника с отличающейся на 90° фазой опорного сигнала) позволяет поместить SF+O1 в центр спектра и разделять отрицательные и положительные частоты (снизить требования к АЦП в два раза).

☺ чувствительность ☹ сигналы (<1%), отраженные от центра спектра

фазовые сдвиги между частотами в FID и несовпадение фаз импульса и опорного сигнала

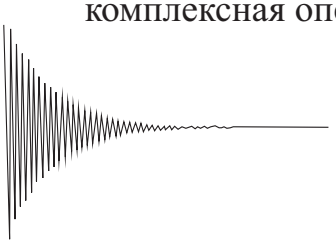
⇓

смешивание Re- и Im- частей Фурье-образа

⇓

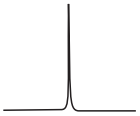
разделяются численно:

Преобразование Фурье - комплексная операция



FT ⇒

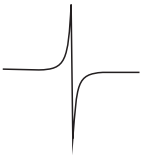
Re:



соответствует сигналу поглощения

$$\mathrm{Re}[f(\omega)] = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)\cos(\omega t)\,dt$$

Im:

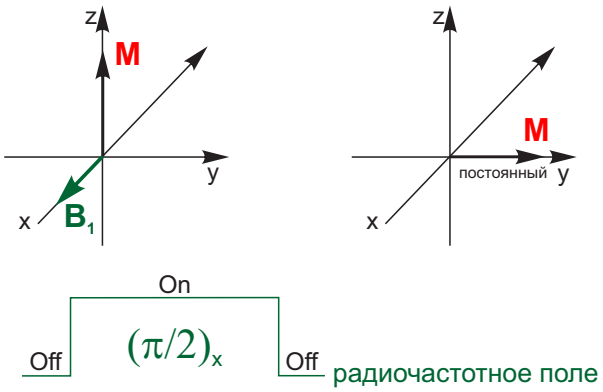


соответствует сигналу дисперсии

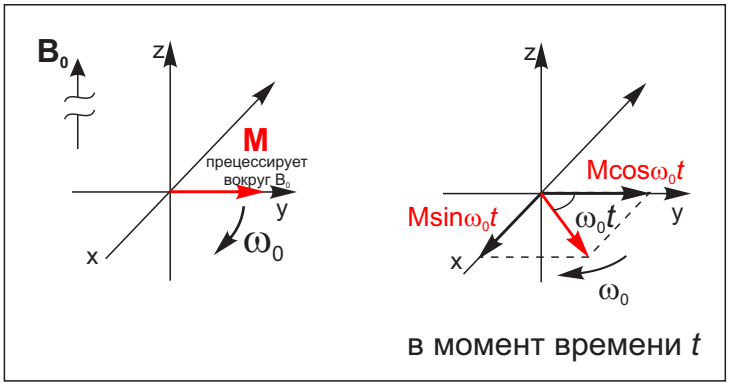
$$\mathrm{Im}[f(\omega)] = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)\sin(\omega t)\,dt$$

Воздействие импульса на образец

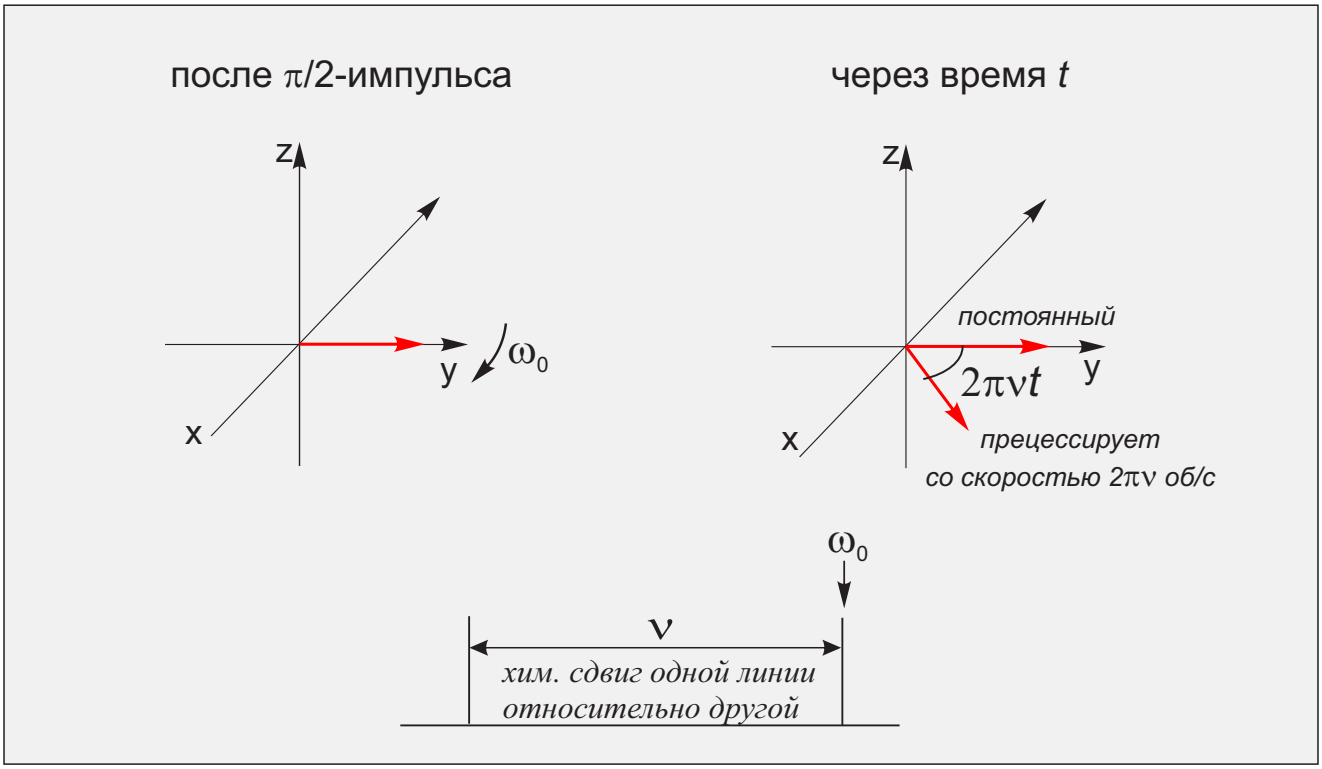
вращающаяся система координат

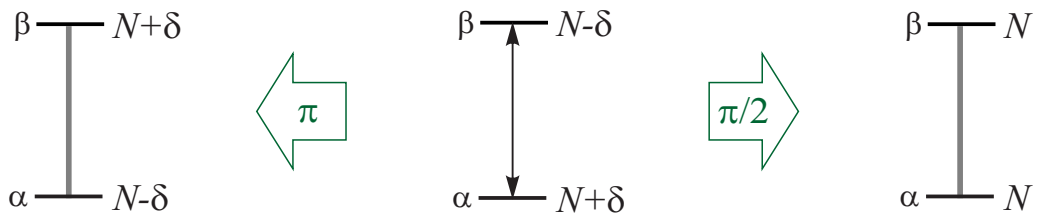


лабораторная система координат



детектирование двух линий (одна из них не попадает точно в резонанс):



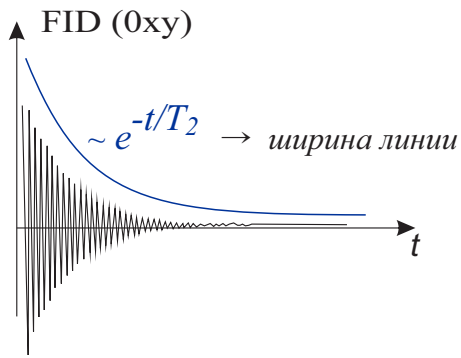


z(ВМН)<0,
заселенности инвертированы
(против поля направлено больше спинов)

равновесие

z(ВМН)=0,
заселенности выровнены

Релаксация



T_1 : продольная релаксация
(восстановление намагниченности на 0z за счет обмена энергией)

$M=M_0(1-e^{-t/T_1})$
T_1 зависит от структуры и может быть разным для разных линий.
$T_1 \uparrow$ *(быстрая релаксация)* - низкая температура, вязкость, парамагнитные примеси.

T_2 : поперечная релаксация
(спад намагниченности в 0xy из-за размазывания ВМН в связи с неоднородностью поля)

Общий спад поперечной намагниченности включает ее переход на ось z. В идеальных условиях $T_1=T_2$.

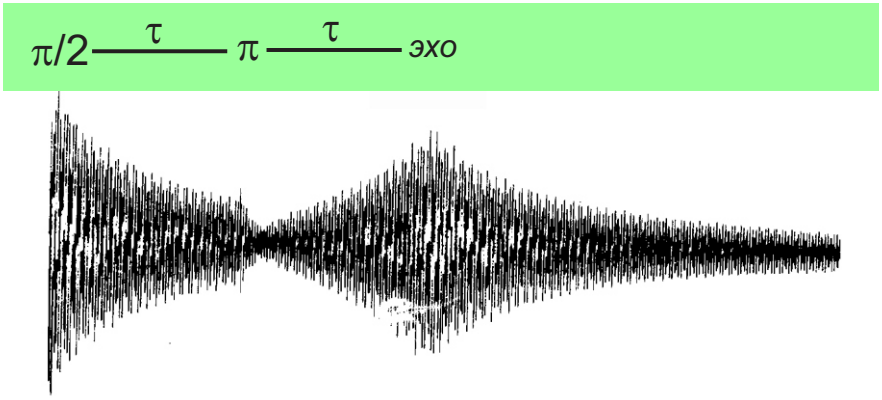
В протонных экспериментах угол импульса выбирается так, чтобы за время выборки ВМН успел полностью релаксировать.

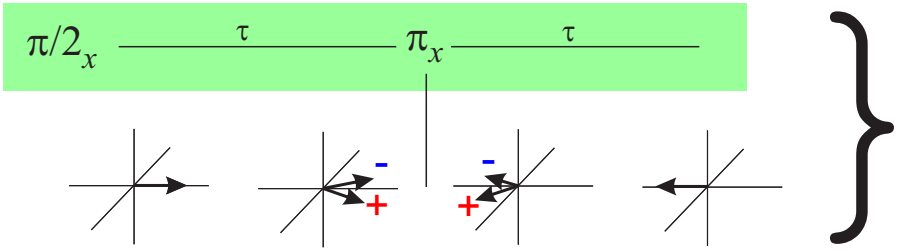
Угол Эрнста: $\alpha_E = arccos\,(e^{-(AQ+RD)\,/\,max(T_1)})$ $\Rightarrow$ динамическое равновесие, наилучшее S/N

Измерение T_1: варьирование задержки и сравнение амплитуды сигнала (”инверсия-восстановление”)

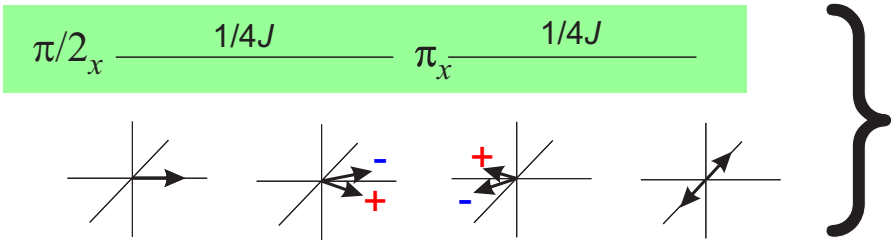
π ———— *задержка* ———— $\pi/2$ ———— *выборка*

Спиновое эхо





химический сдвиг,
неоднородность поля,
гетероядерное
спин-спиновое
взаимодействие



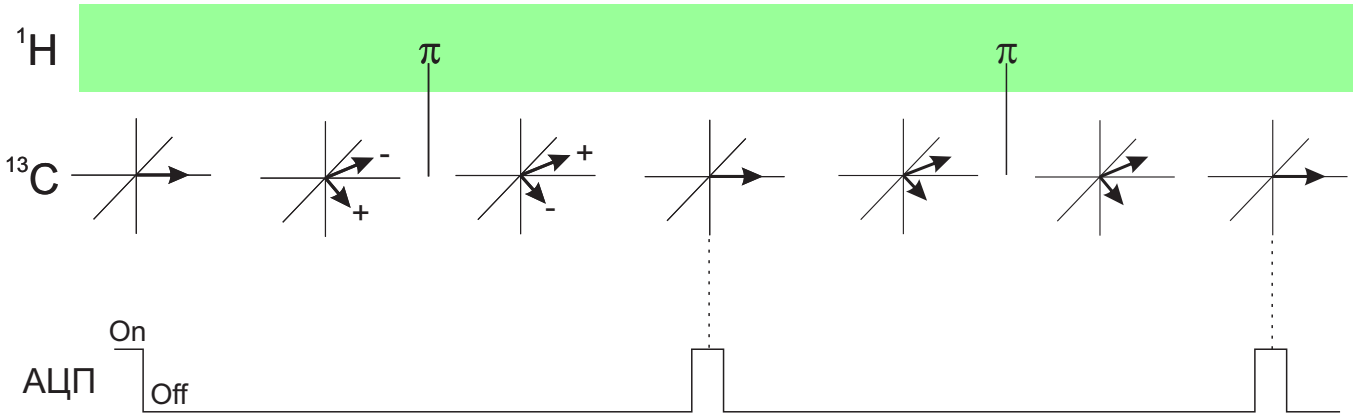
гомоядерное
спин-спиновое
взаимодействие

сосед тоже испытал π–импульс:

α–сосед (⇒опережающая компонента дублета)

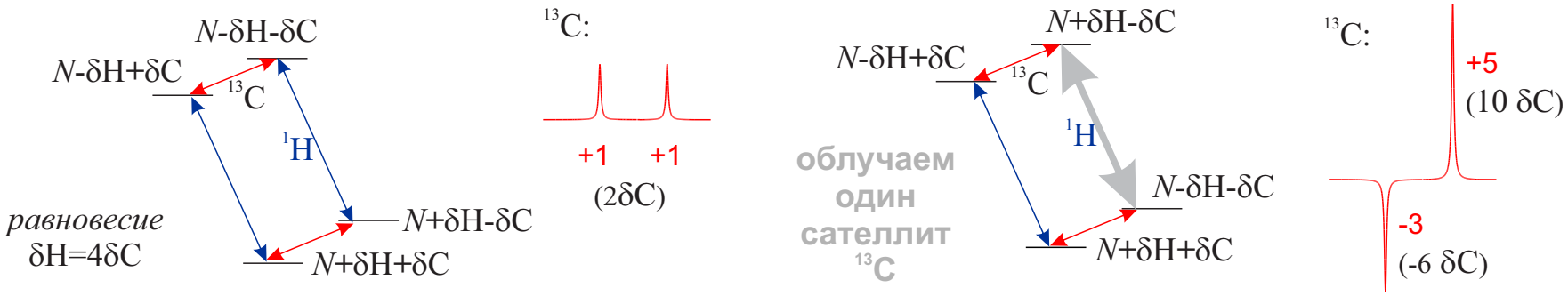
стал β–соседом (⇒запаздывающая компонента дублета)

широкополосная развязка



Перенос поляризации

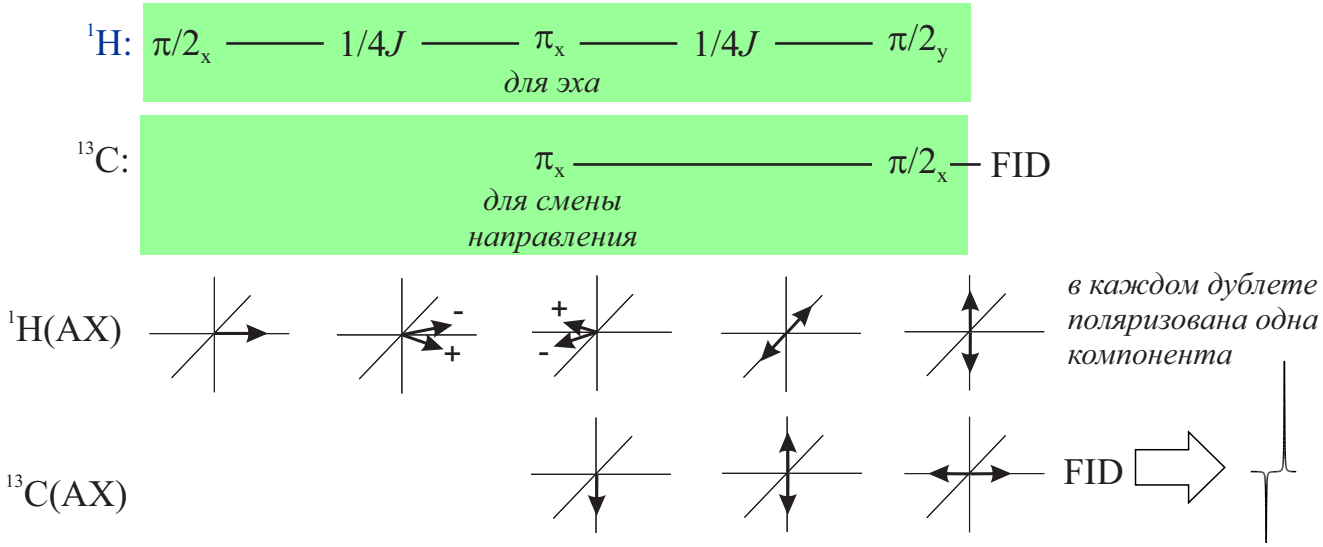
SPI:



чувствительность увеличивается в γ_1/γ_2 раз,

зависимость от γ становится лишь квадратичной

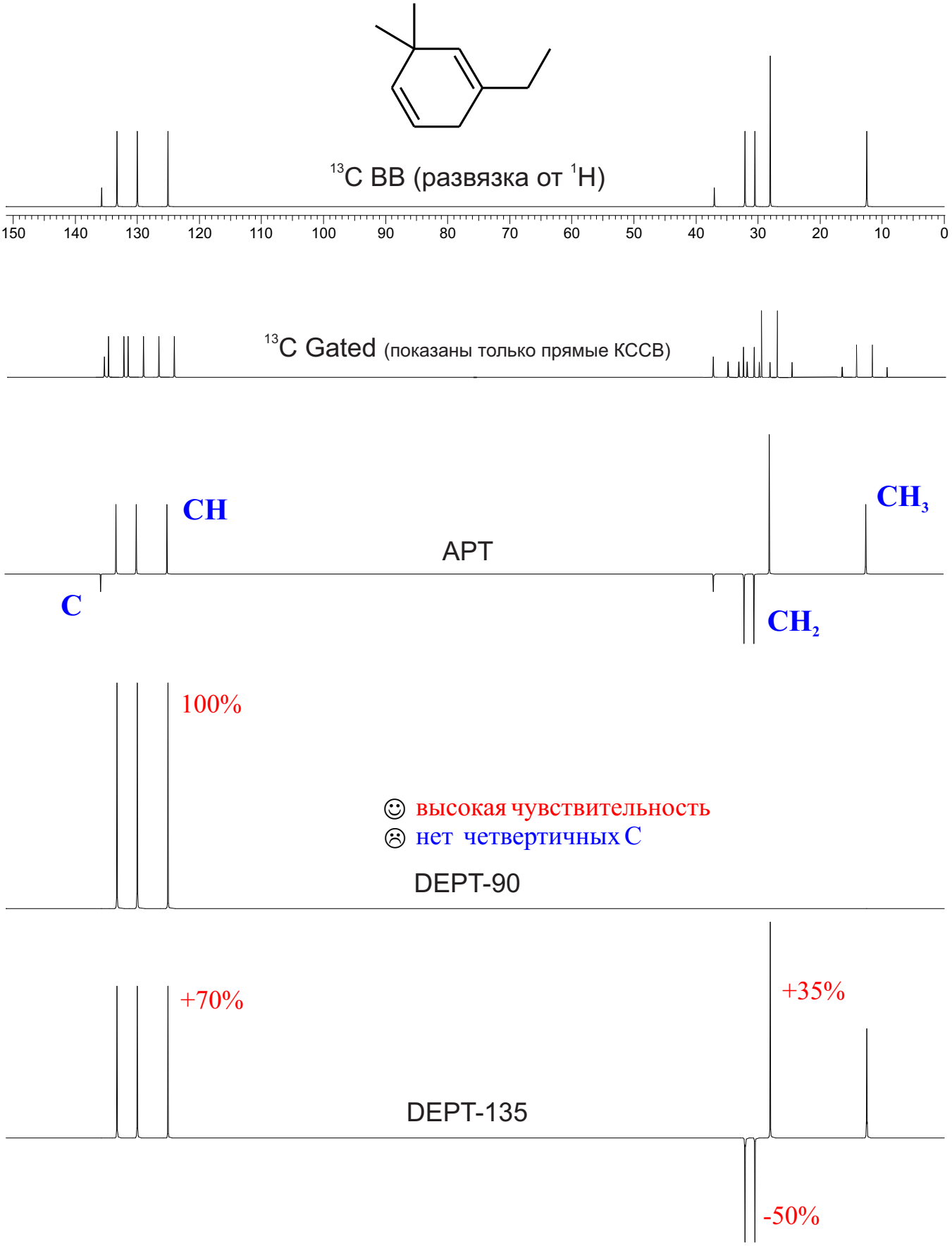
INEPT поляризует по одной линии из *каждого* дублета с КССВ *J*:



INEPT с рефокусировкой и развязкой:

- варьируем фазу третьего H-импульса с +y на -y ⇒ компоненты меняются местами; -3:+5 и -5:+3 усредняется в фазовом цикле в -4:+4
- перед выборкой добавляем задержку $\Delta=1/2J$ и π-импульсы (H & C) в ее середине ⇒ компоненты дублета рефокусируются за счет спинового эха и уже не имеют противоположных фаз ⇒ можно использовать развязку от протонов во время накопления
- для разных мультиплетов Δ должна быть разной ⇒ можно отдельно копить подспектры с разной мультиплетностью сигналов (APT)
- частота прохождений INEPT не зависит от T_1 гетероядра ⇒ INEPT особенно эффективен для ядер с отрицательным γ (отрицательный максимальный ЯЭО ⇒ неэффективность простой развязки) и большим T_1, напр. ^{15}N и ^{29}Si

Информативность и чувствительность (^{13}C)

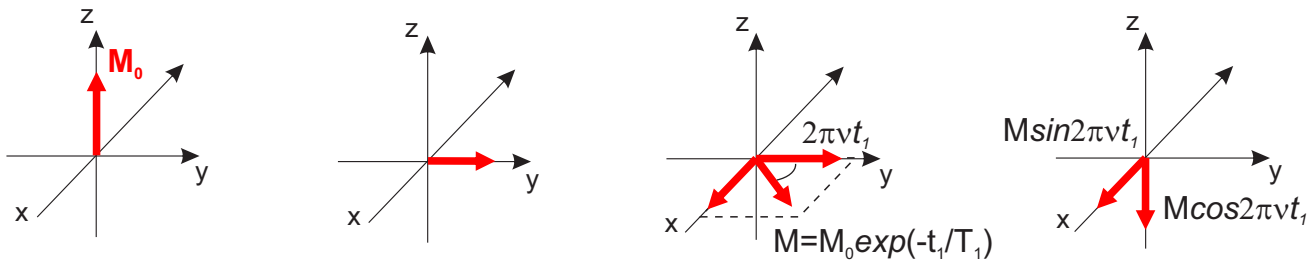


DEPT - аналогично INEPT, но с синфазными сигналами (не нужна вторая рефокусировка). Функции задержки Δ выполняет H- импульс переменной длительности θ.

^{1}H: $\pi/2_x$ —— $1/2J$ —— π —— $1/2J$ —— $\theta_{\pm y}$ —— $1/2J$ —— decoupling

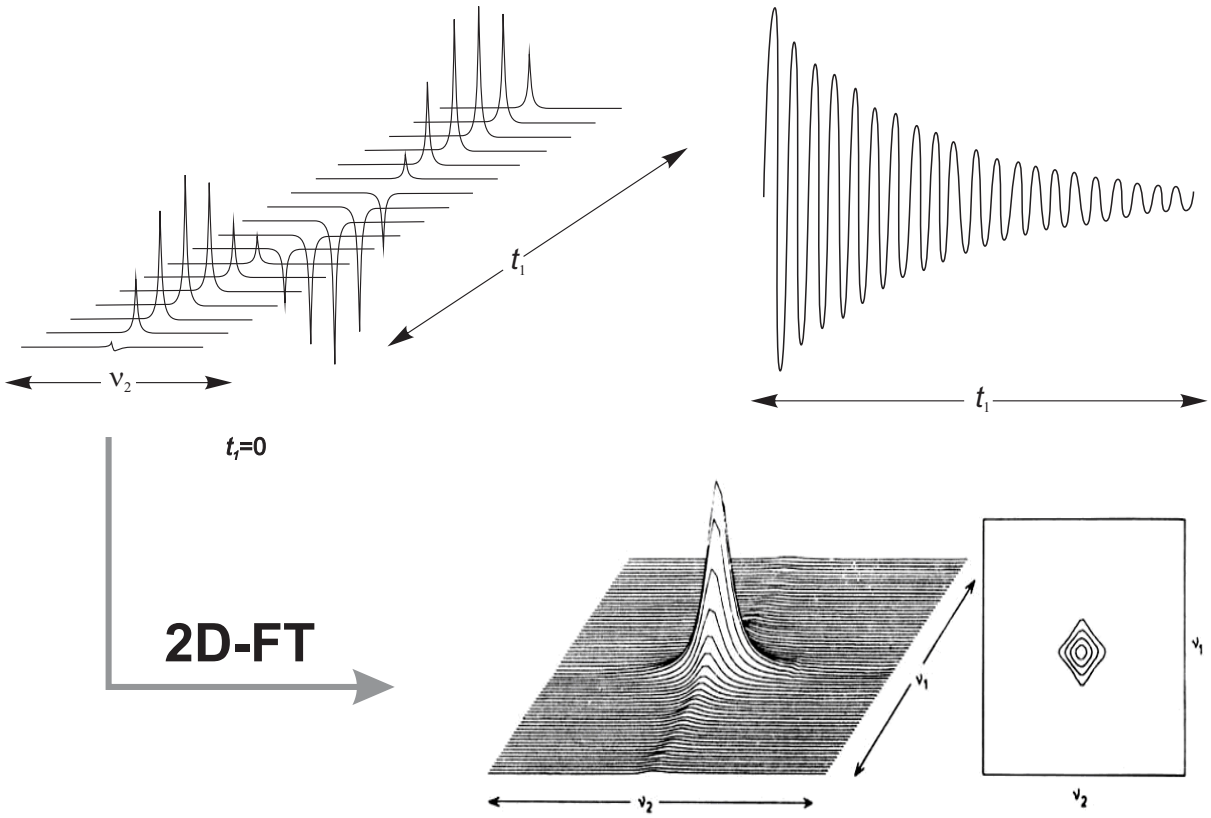
^{13}C: $\pi/2_x$ —————— π —————— $FID_{\pm x}$

Эксперимент COSY



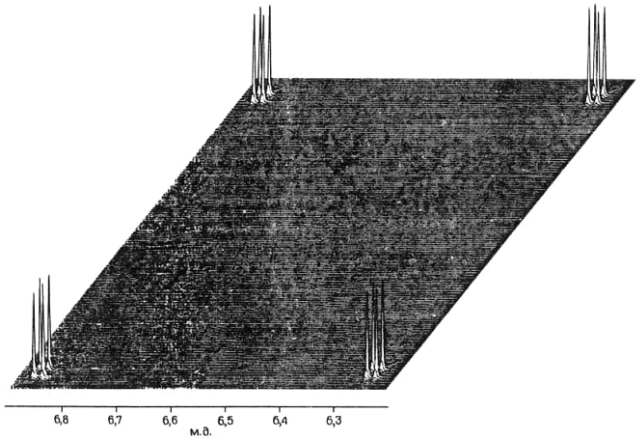
$(\pi/2)_x$ ——— t_1 ——— $(\pi/2)_x$ ——— *выборка* (t_2)

[$(\pi/4)_x$ для COSY-45]



Ф. Тоукач, А. Дероум: слайд 50

Кросс-пики



Спиново-связанные ядра - **когерентные переходы** (соответствующие им компоненты ВМН вращаются с фиксированной разностью фаз).
Облучение одного перехода влияет на заселенность связанных с ним переходов, перенося тем самым когерентность
$\Rightarrow$ FID, накопленный по t_2, модулируется на частотах переходов, выявляемых по t_1
$\Rightarrow$ кросс-пики в 2D-эксипериментах между теми сигналами, между которыми возможен перенос когерентности.

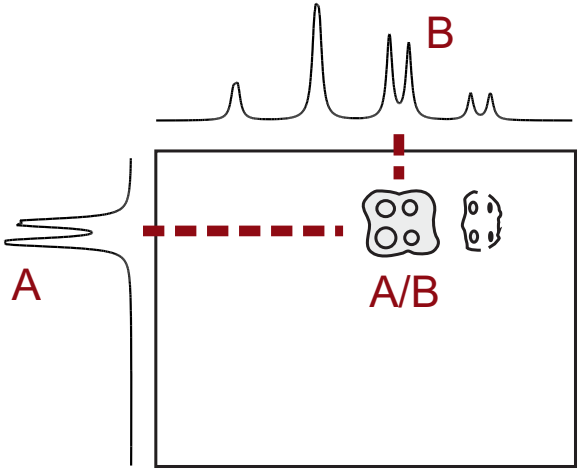
Двумерный корреляционный спектр

импульсная последовательность с переменной задержкой (t_1)

намагниченость претерпевает РАЗНЫЕ эволюции вдоль t_1 и t_2

$\Downarrow$

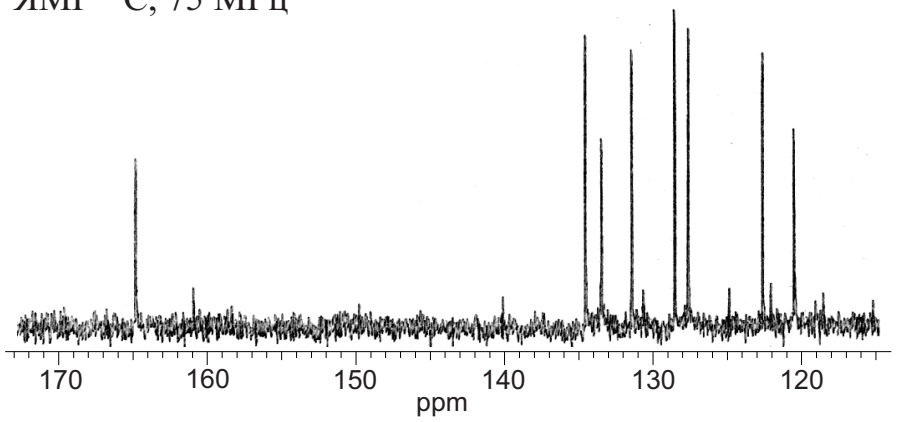
кросс-пики (взаимодействие между сигналами)

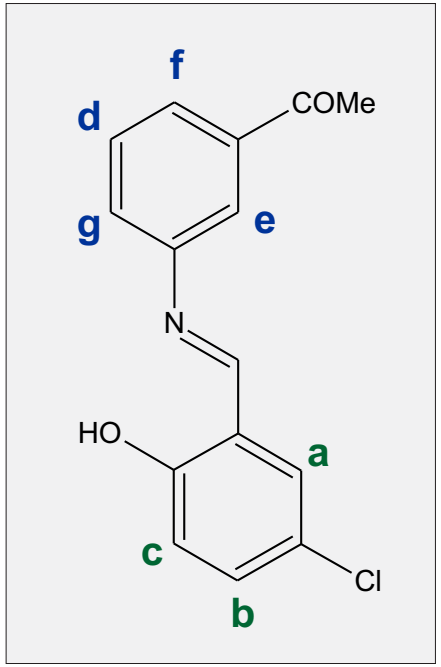


Продольная релаксация во время $t_1 \Rightarrow$ после второго импульса появляется компонента ВМН на другой горизонтальной оси. Она не прецессировала в течении $t_1 \Rightarrow$ появляются "аксиальные" кросс-пики с частотой 0 по одной из осей (крест или линия в центре спектра из-за КД). Варьируя на 180° фазу второго импульса, можно взаимоуничтожить эти сигналы фазовым циклом, попутно усилив полезные сигналы.

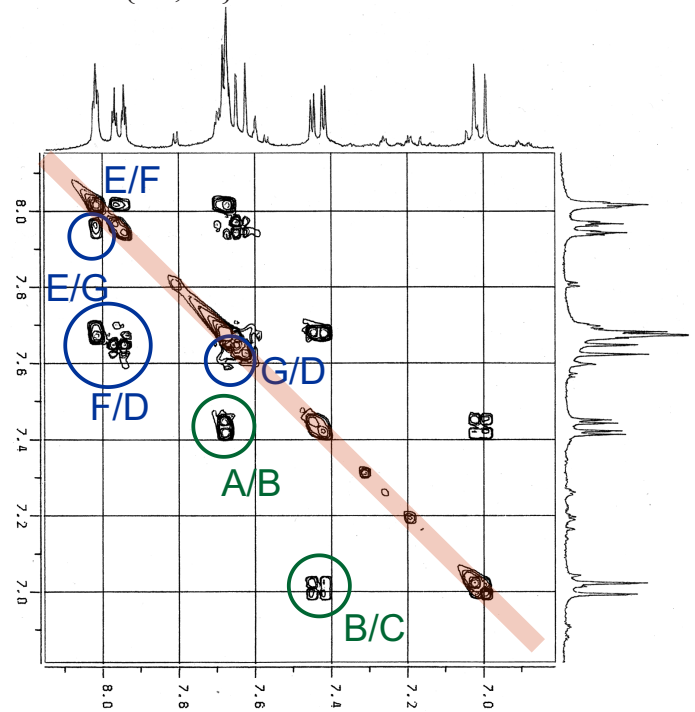
R #08

ЯМР ^{13}C, 75 МГц

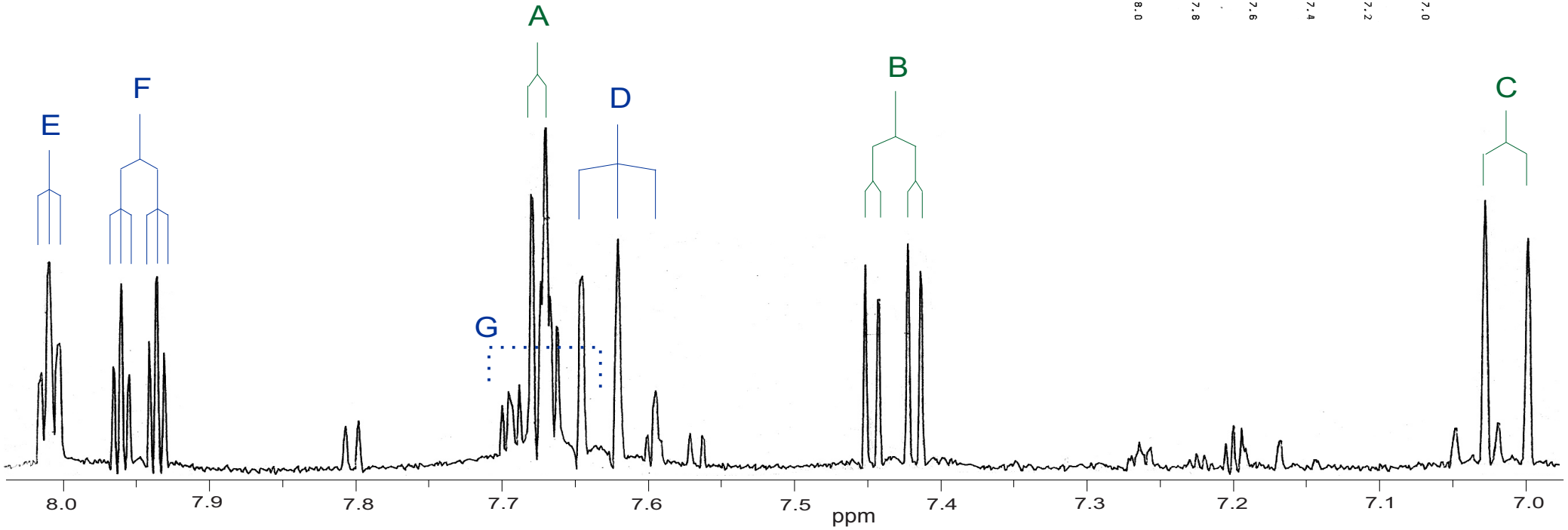




{^{1}H,^{1}H} **COSY**

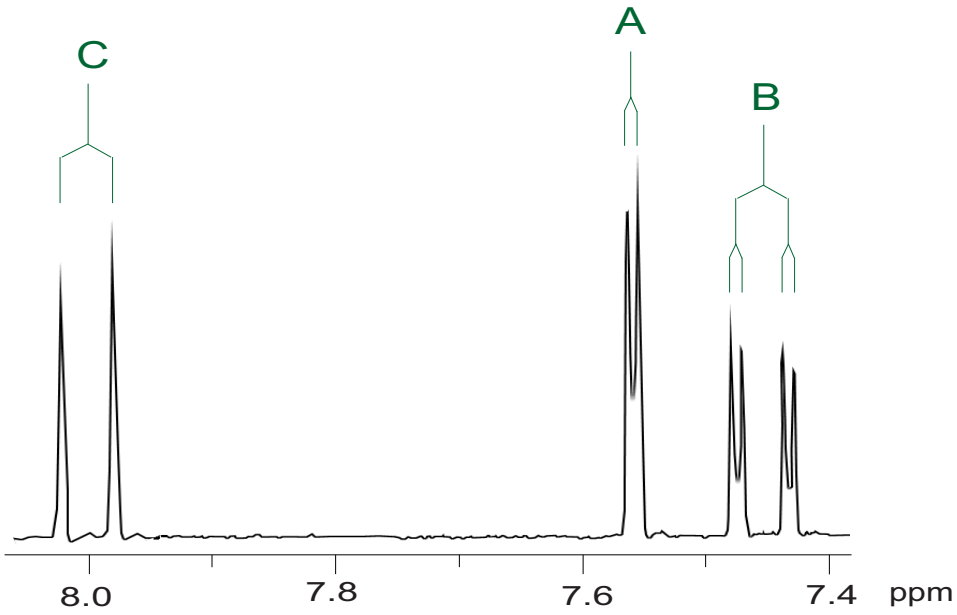


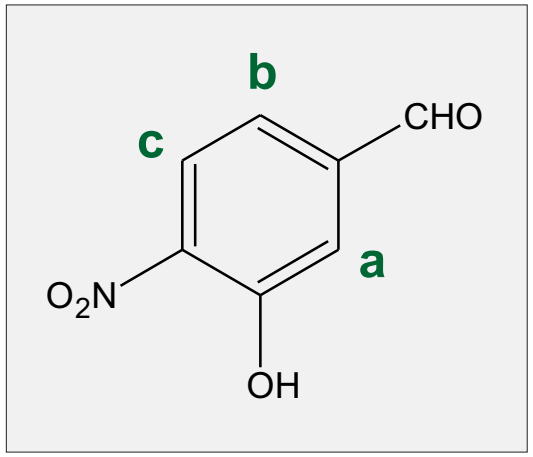
ЯМР ^{1}H, 300 МГц



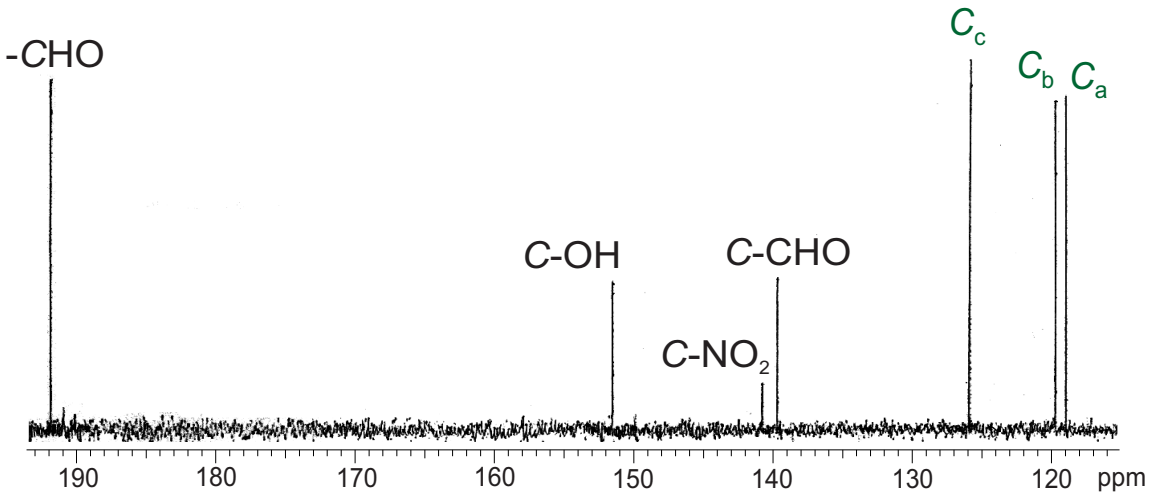
Ф. Тоукач, П. Беляков: слайд 52

ЯМР ^{1}H, 200 МГц, *фрагмент*

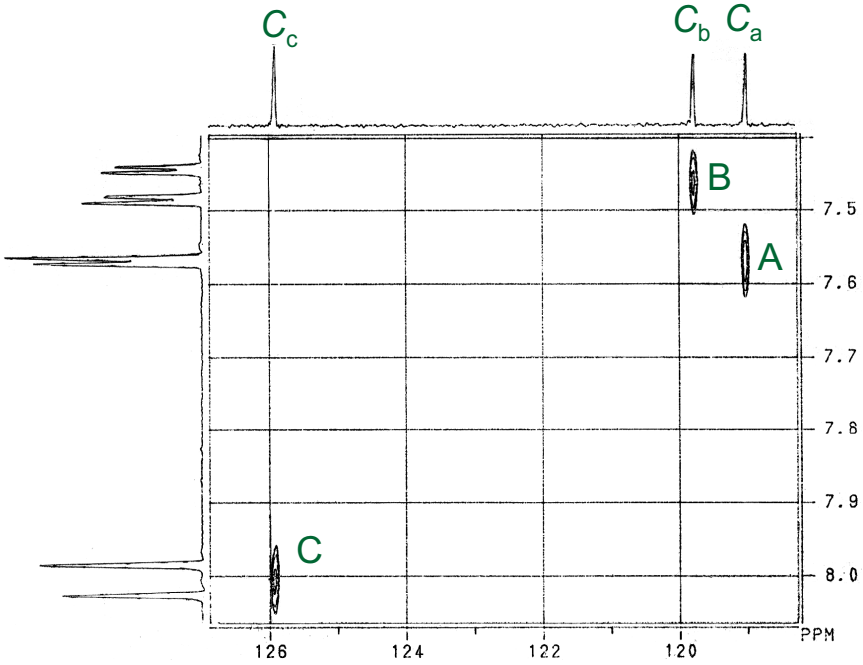




ЯМР ^{3}C, 75 МГц

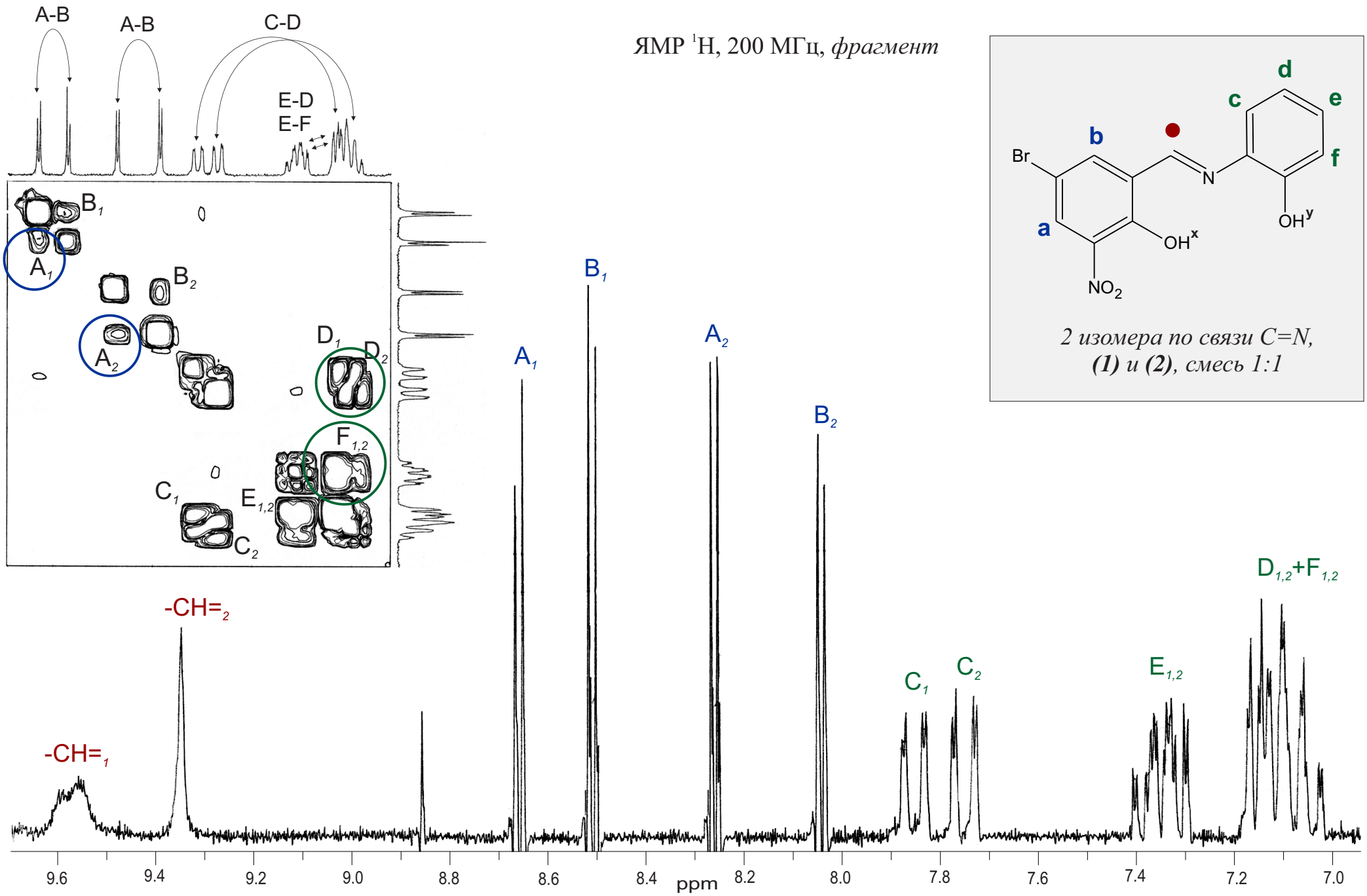


{^{13}C,^{1}H} COSY (HETCOR)



{^{1}H,^{1}H} **COSY**

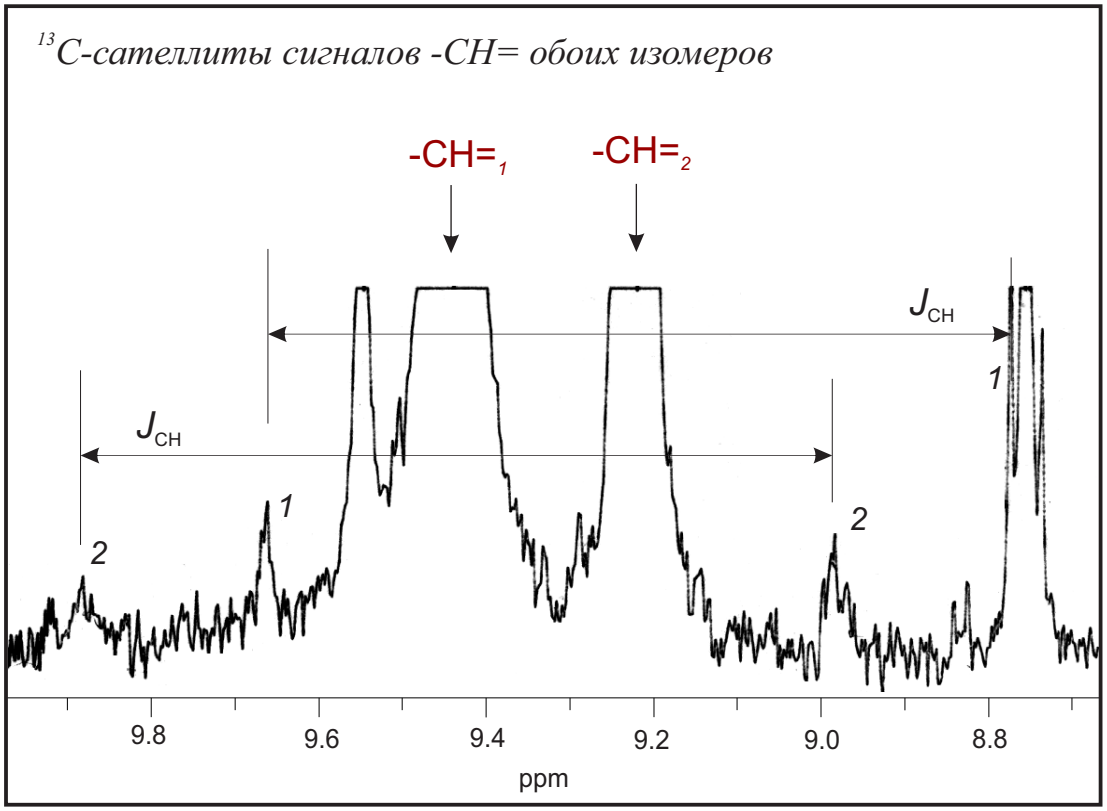
ЯМР ^{1}H, 200 МГц, *фрагмент*

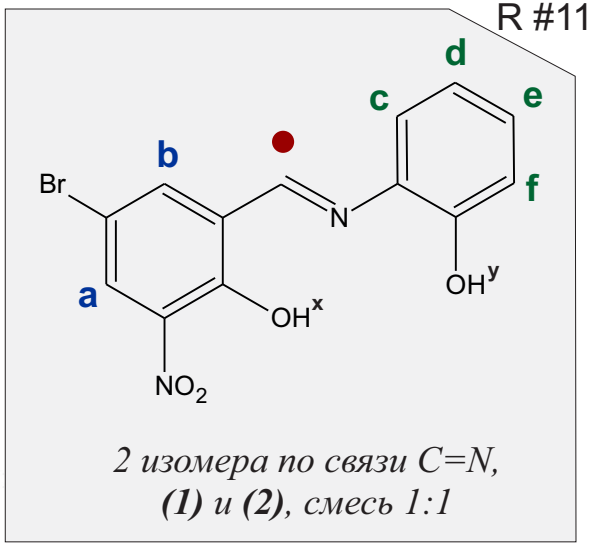


2 изомера по связи C=N,
***(1)** и **(2)**, смесь 1:1*

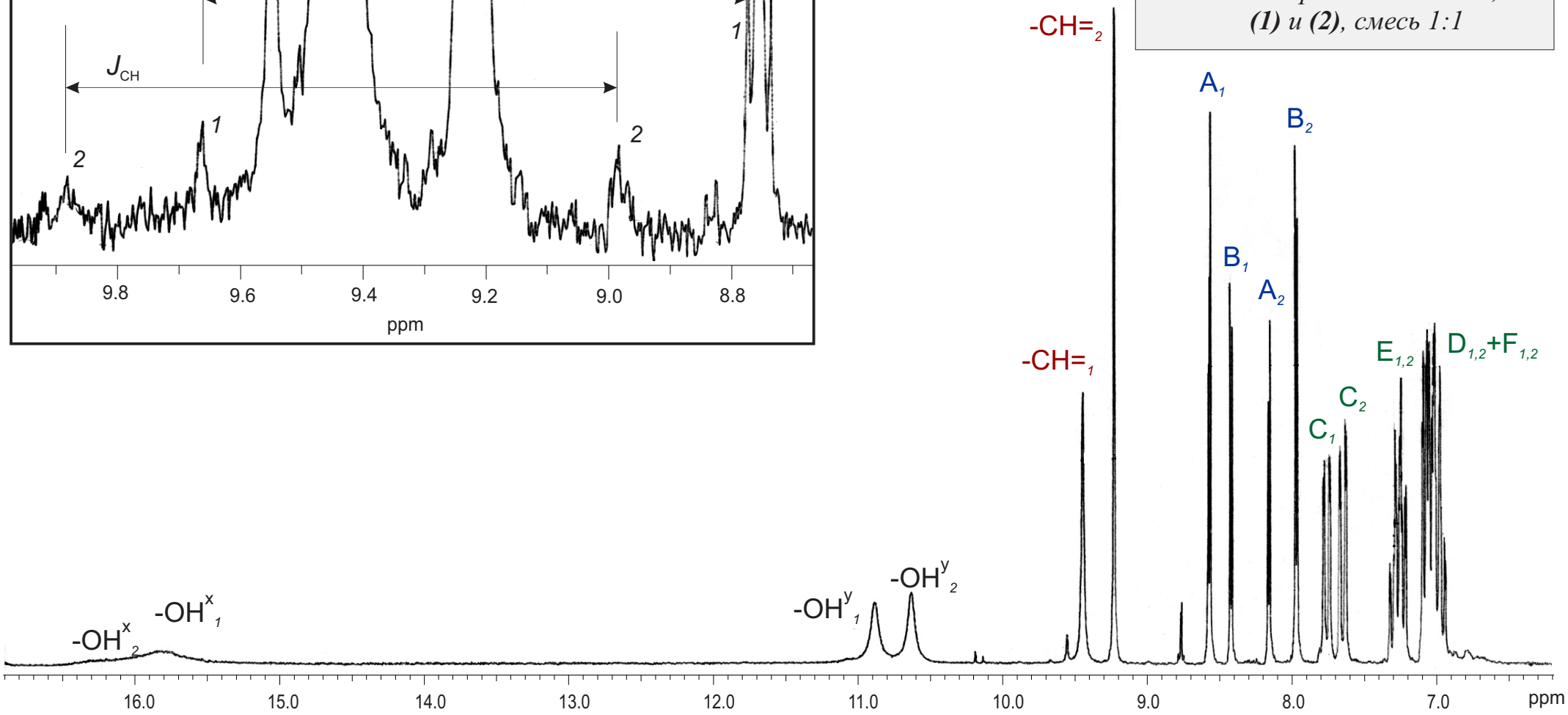
ЯМР ^{1}H, 200 МГц

R #11'



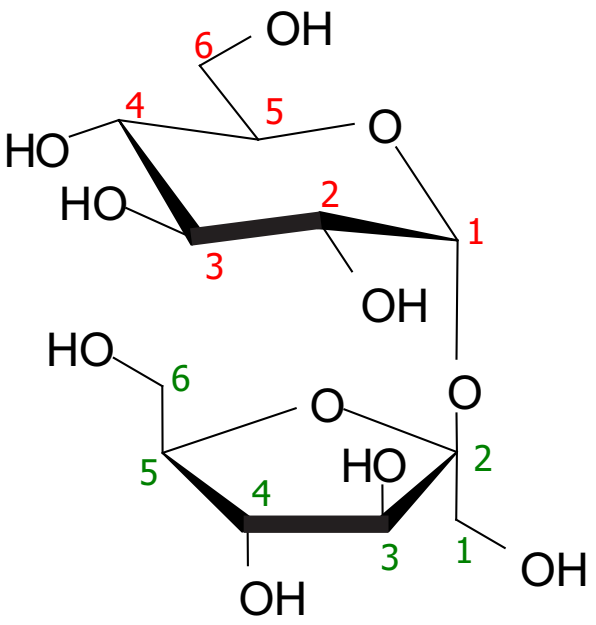


2 изомера по связи C=N,
***(1)** и **(2)**, смесь 1:1*



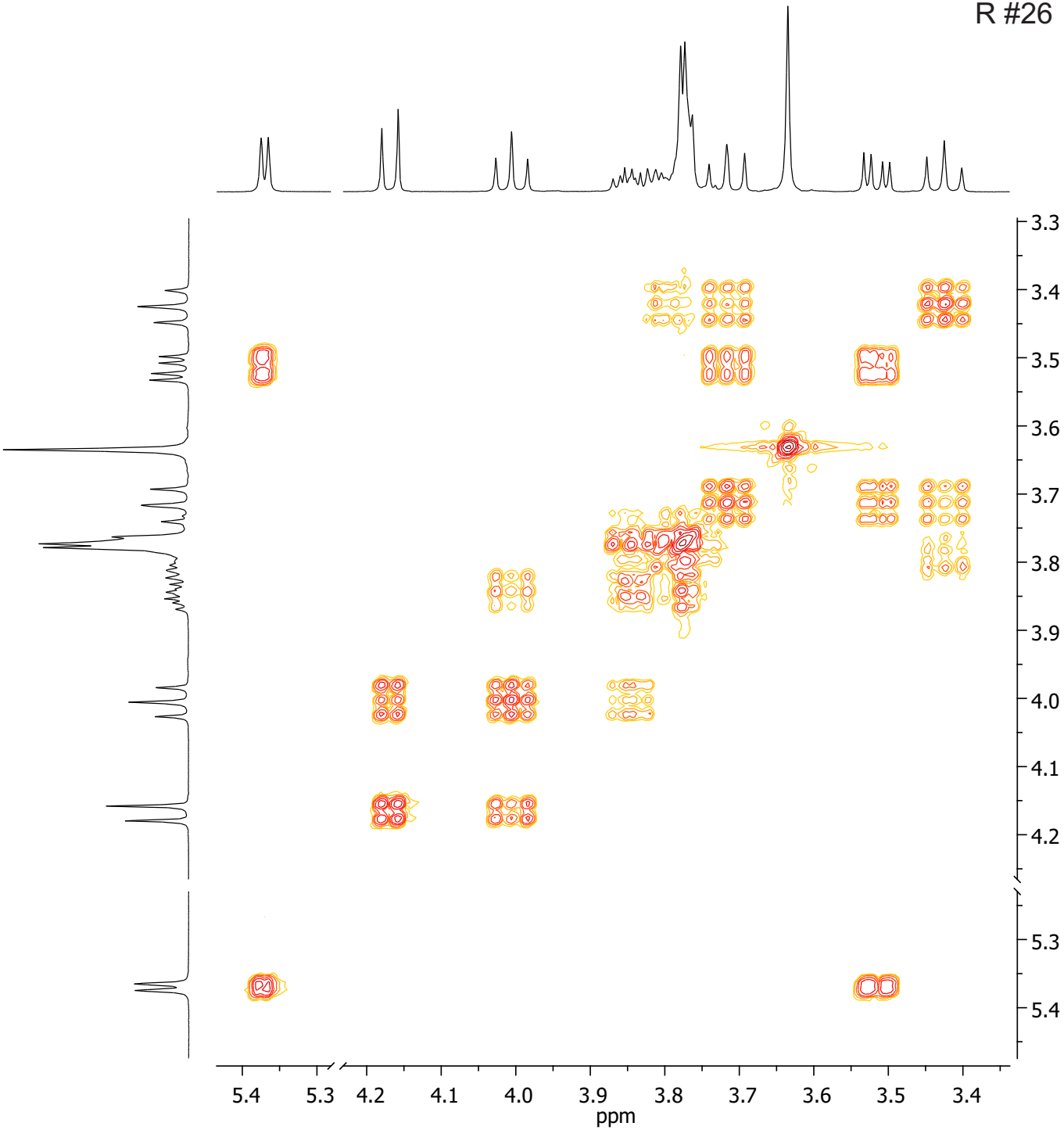
{^{1}H,^{1}H} **COSY**, 400 МГц, D_2O

R #26

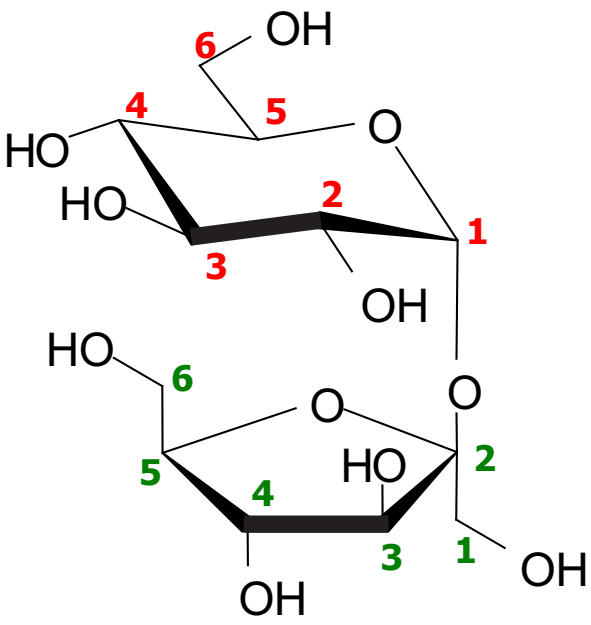


α-D-Glc*p*-(1→2)-β-D-Fru*f*

(сахароза)

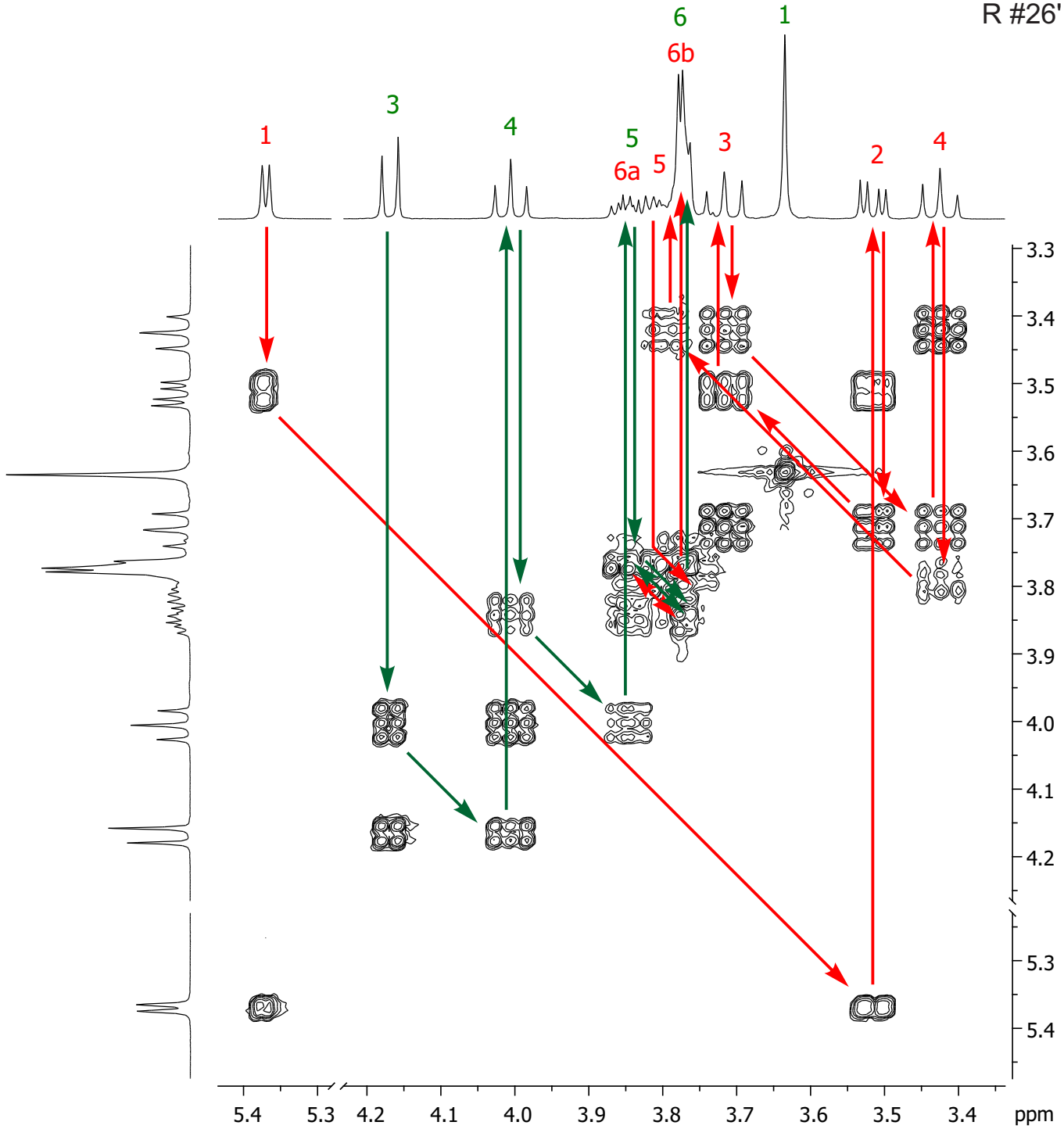


{^{1}H,^{1}H} **COSY**, 400 МГц, D_2O



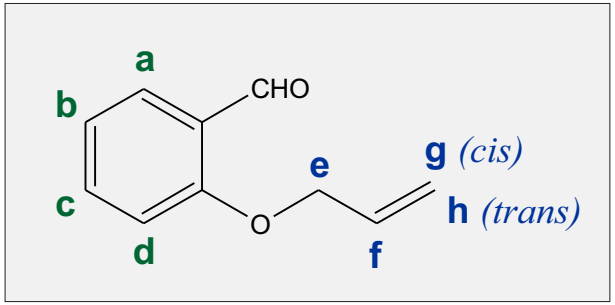
α-D-Glc*p*-(1→2)-β-D-Fru*f*

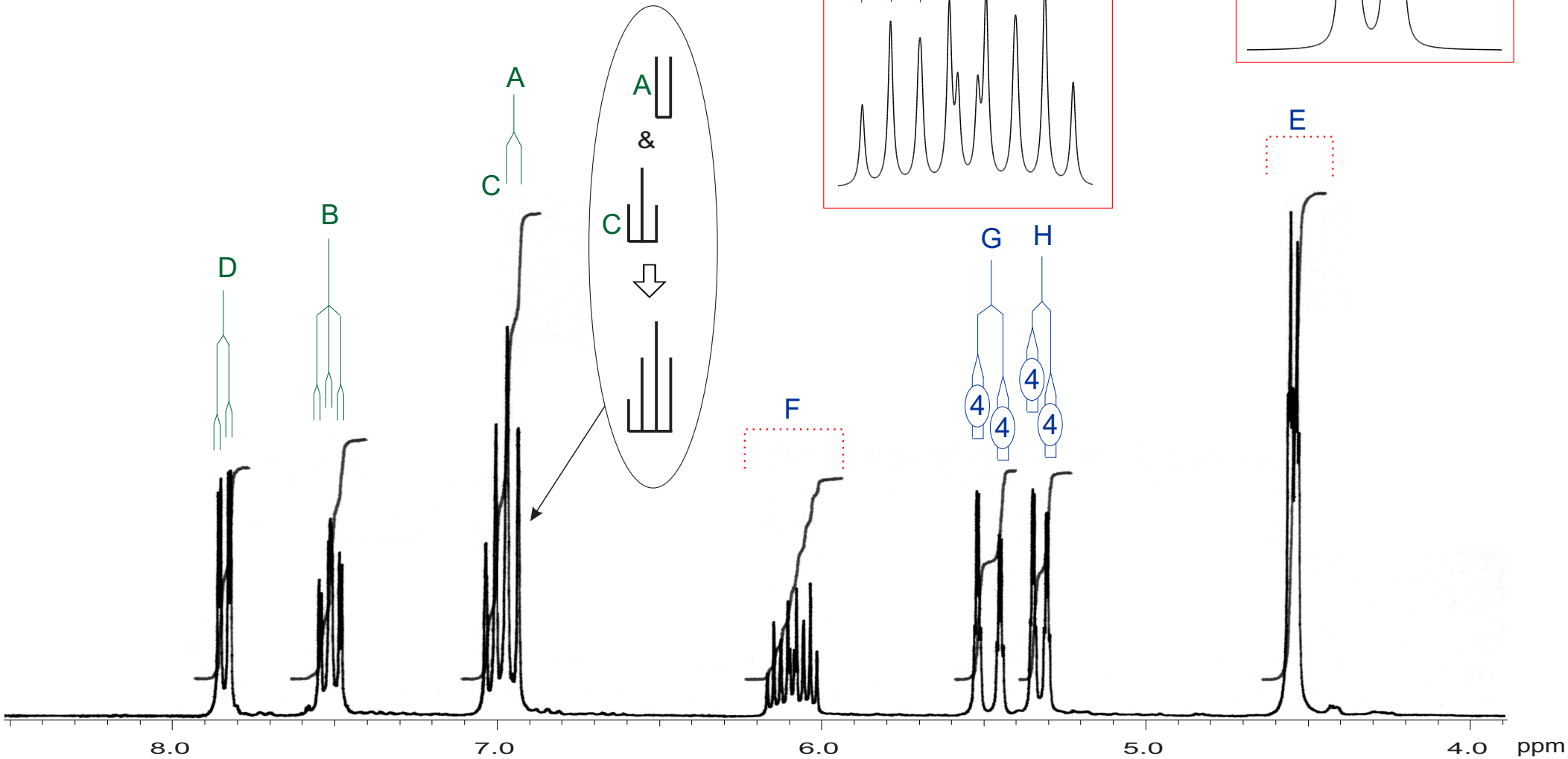
(сахароза)



ЯМР ^{1}H, 250 МГц, *фрагмент*

R #15

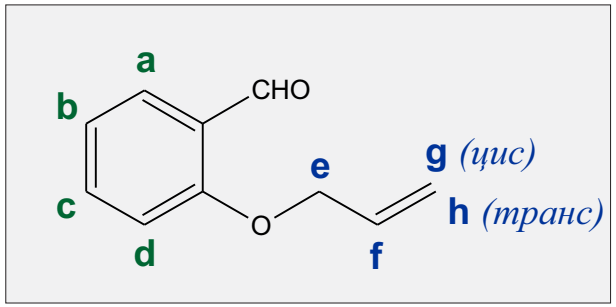


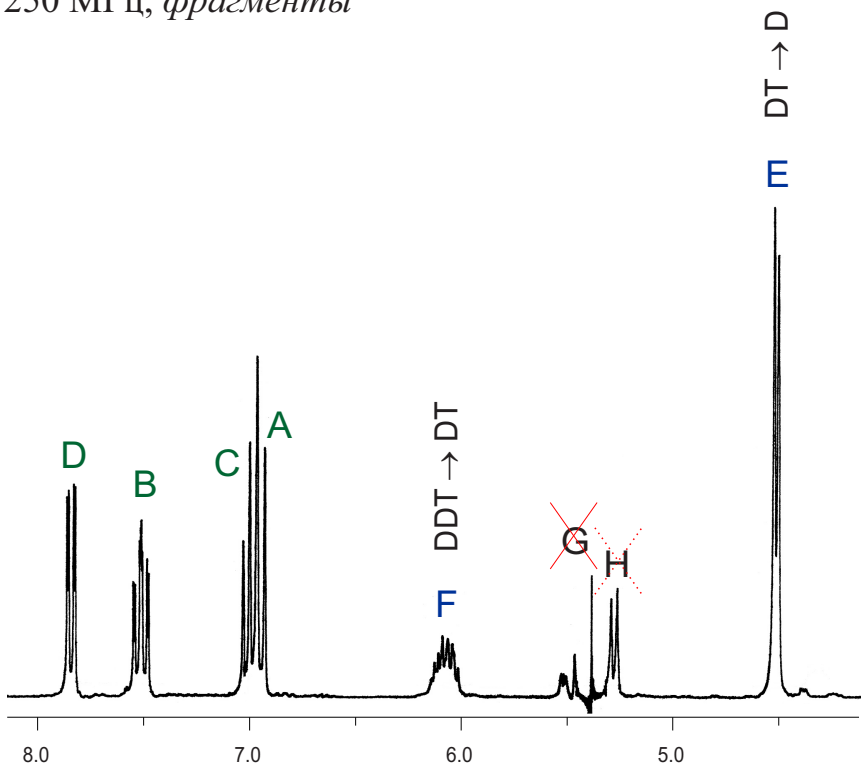


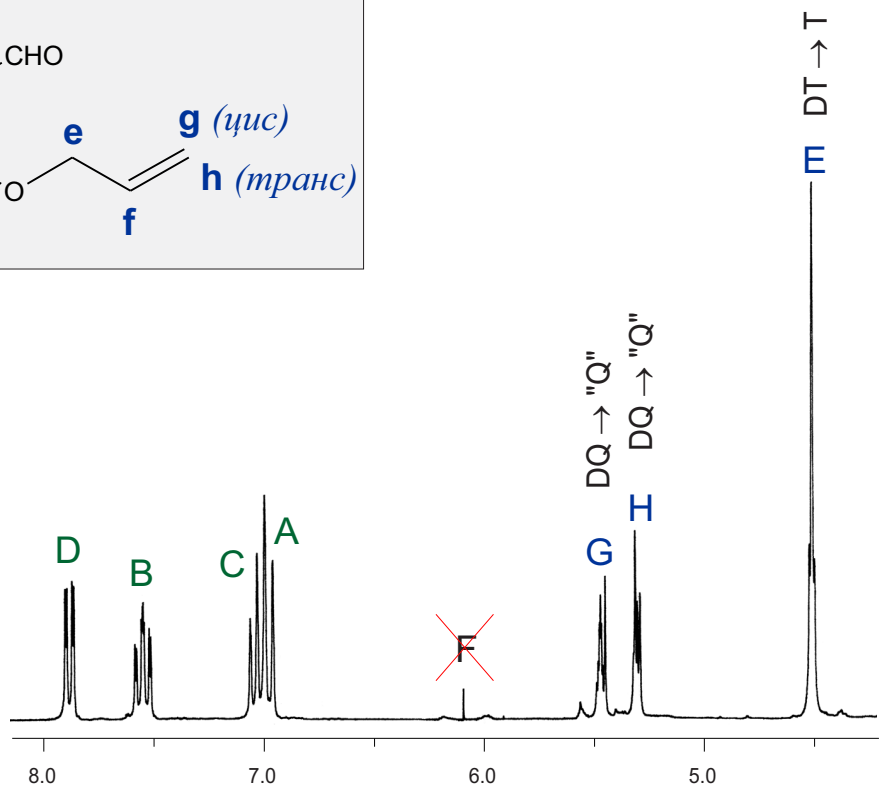
Ф. Тоукач, П. Беляков: слайд 58

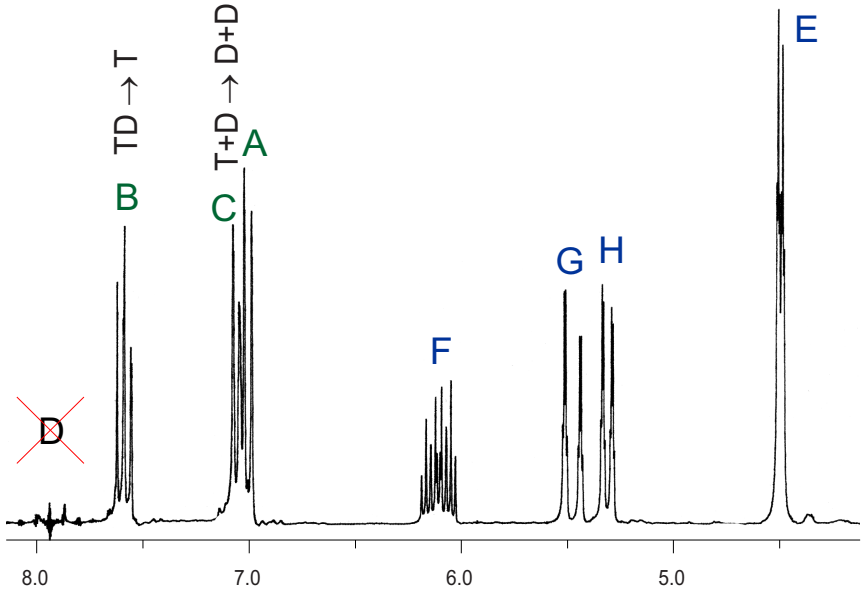
ЯМР ^{1}H спектры двойного резонанса,
250 МГц, *фрагменты*

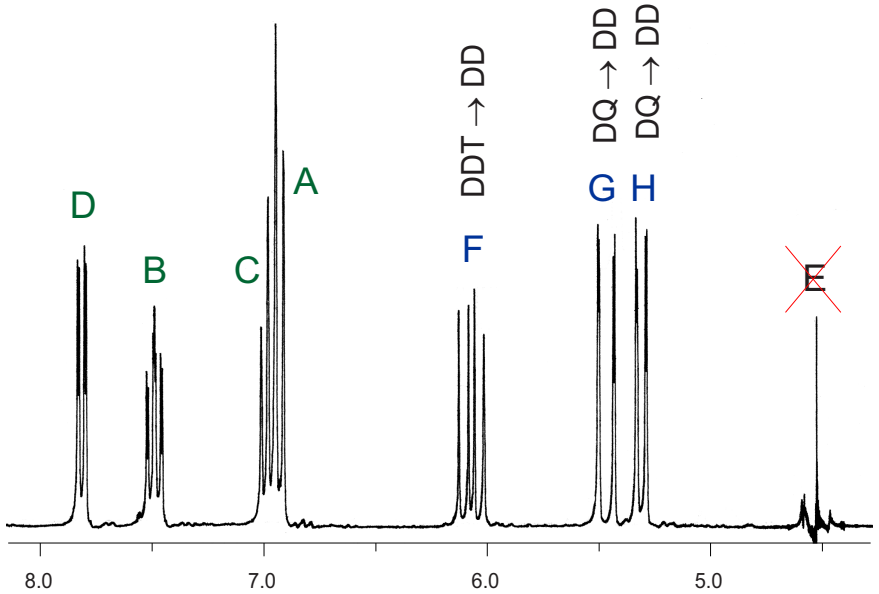
R #15'





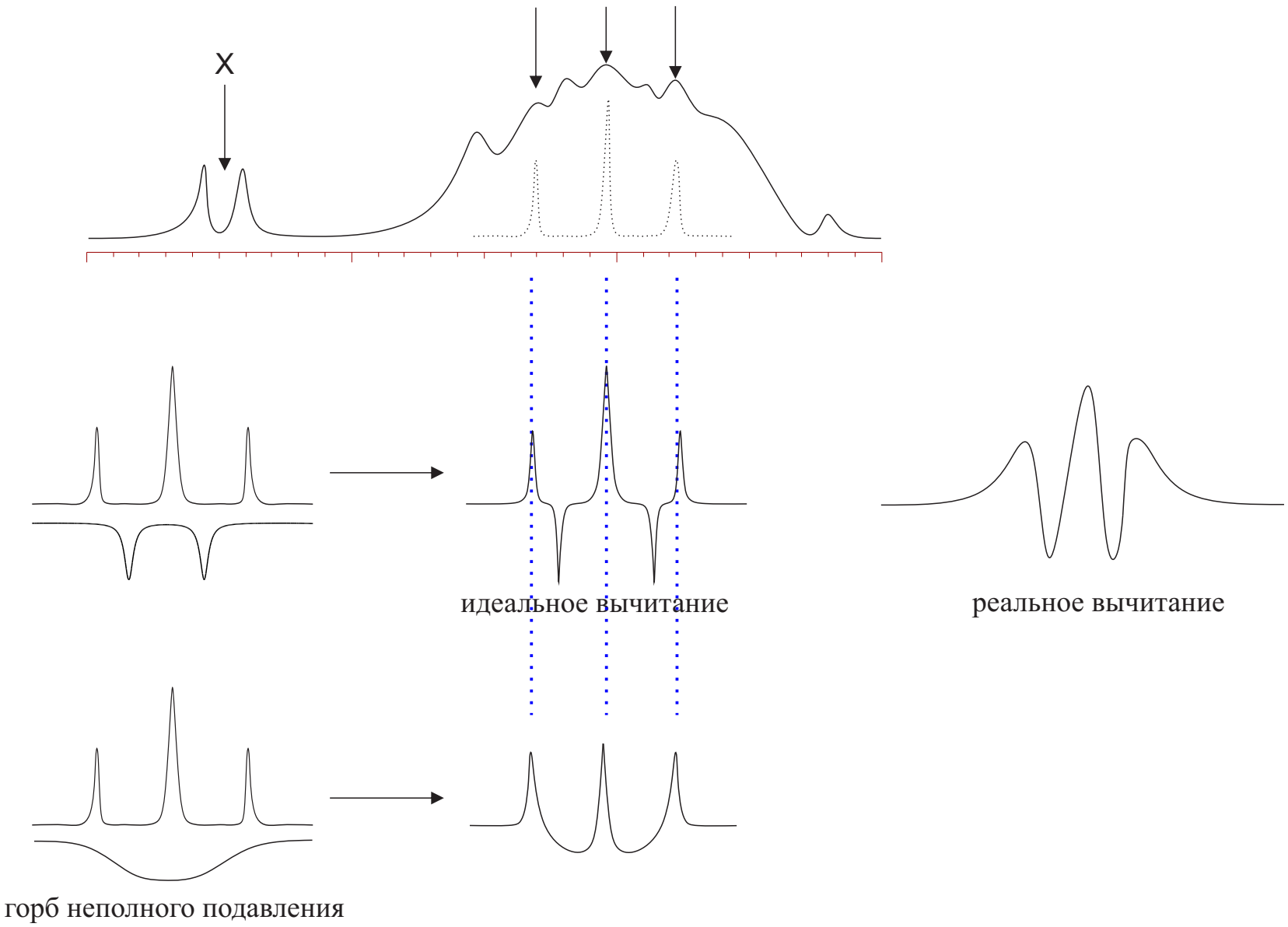






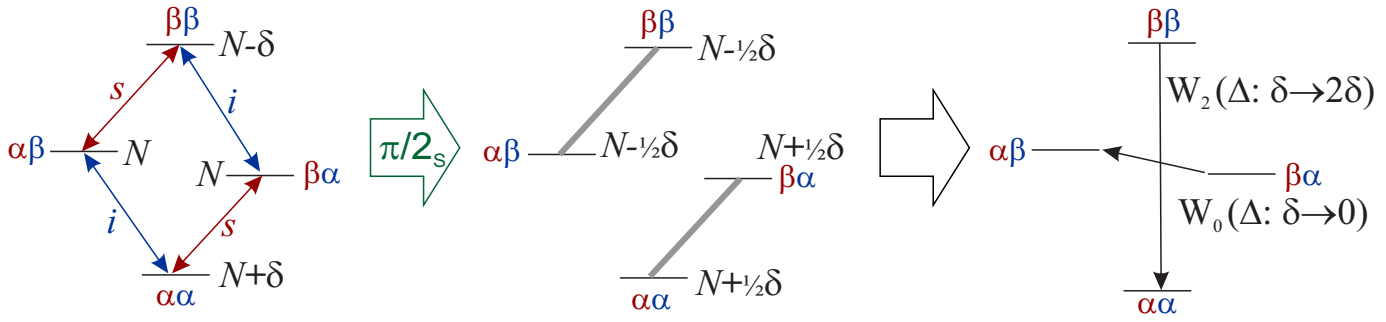
Ф. Тоукач, П. Беляков: слайд 59

Разностный двойной резонанс с неполной развязкой



Ядерный эффект Оверхаузера

система из двух спиново-несвязанных ядер: ***i*** (наблюдаемое) и ***s*** (облучаемое)



равновесие *кросс-релаксация*

$$\text{NOE на ядре } \boldsymbol{i} = \frac{W_2 - W_0}{2W_1^i + W_2 + W_0}$$

- NOE >**0** для небольших молекул, NOE <**0** для макромолекул
- *max* NOE = ½ γ_s / γ_i
- NOE ~ $1/r^6$ (наблюдается при r < 3Å)
- NOE достоверен лишь в сравнительном аспекте
- длительное насыщение ⇒ равновесный NOE,
  селективный π-импульс (в 1D) ⇒ неравновесный NOE
  (для небольших молекул величина в 1D H-H ≤ 38.5%)
- косвенный NOE, переданный с другого протона ($H_s \to H \to H_i$), имеет другой знак. Он возникает позже, чем прямой NOE
  (их можно разделить в неравновесных экспериментах).

Применение NOE

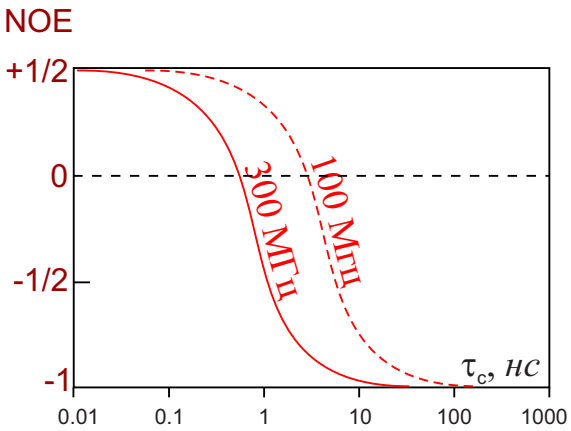
- изучение пространственных контактов (NOEDIFF, NOESY)
- увеличение интенсивности сигналов гетероядер за счет NOE от протонов (если не нужна спиновая развязка, облучение выключается перед накоплением)

Эксперимент NOESY

$(\pi/2)_x$ —— t_1 —— $(\pi/2)_x$ —— t_m —— $(\pi/2)_x$ —— *выборка* (t_2)

За время смешивания t_m ($<T_1$) возникает переход неравновесной намагниченности на 0z за счет релаксации (NOE), который переводится в 0xy третьим импульсом и накапливается по t_2.

При химическом обмене ядро, модулируемое при одном химическом сдвиге по t_1, переходит в другое положение и имеет другой химический сдвиг в течение t_2
$\Rightarrow$ Подобрав t_m, можно вместо NOE наблюдать обменные кросс-пики (EXSY).



Фаза кросс-пиков NOESY:

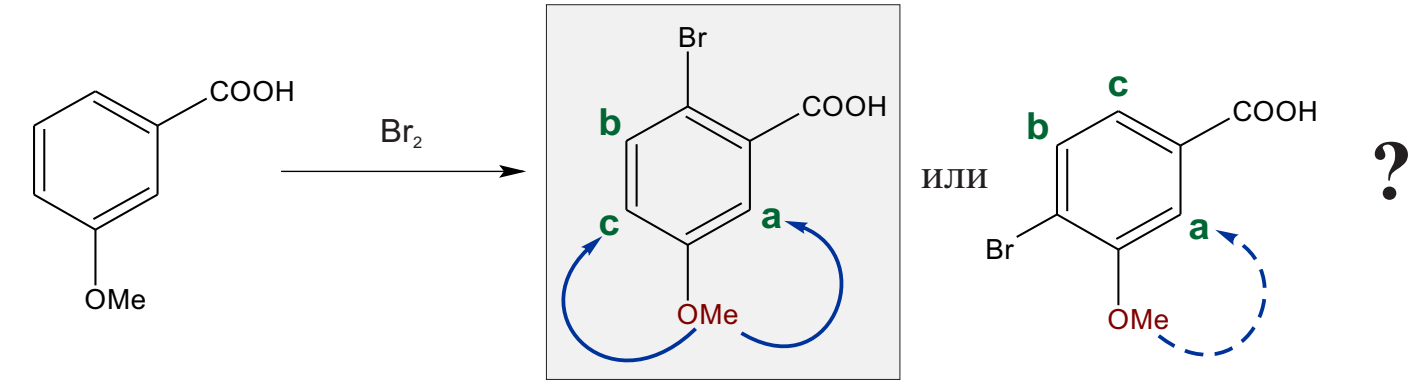
- диагональные - вверх
- химический обмен - вверх
- COSY-артефакты- вверх
- NOE - для небольших молекул вниз, для больших - вверх

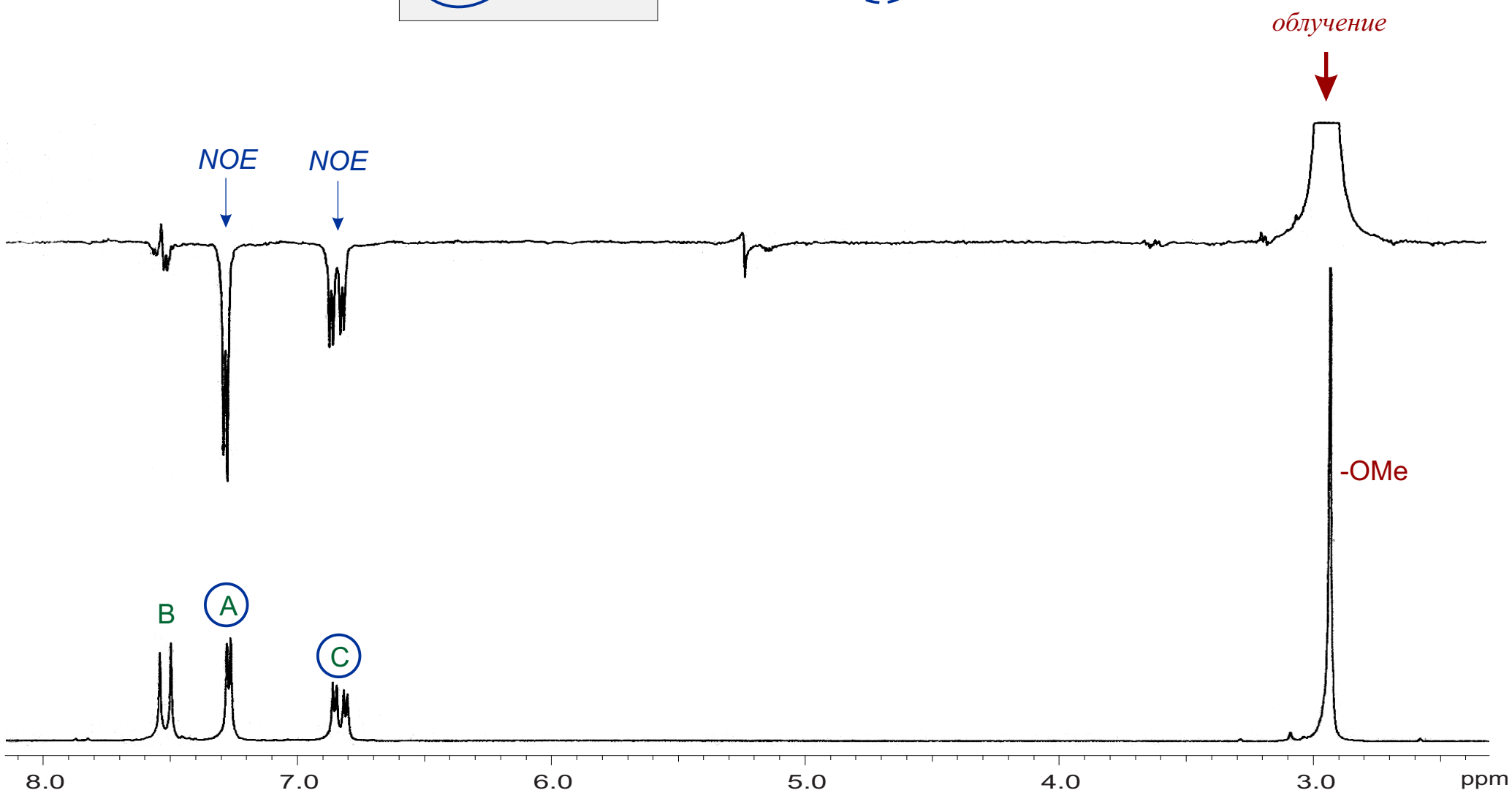
В ROESY (аналог TOCSY с малой мощностью spin-lock):

- диагональные - вверх
- химический обмен - вверх
- TOCSY-артефакты - вверх
- NOE - всегда вниз

R #13

^{1}H **NOE difference**, 200 МГц

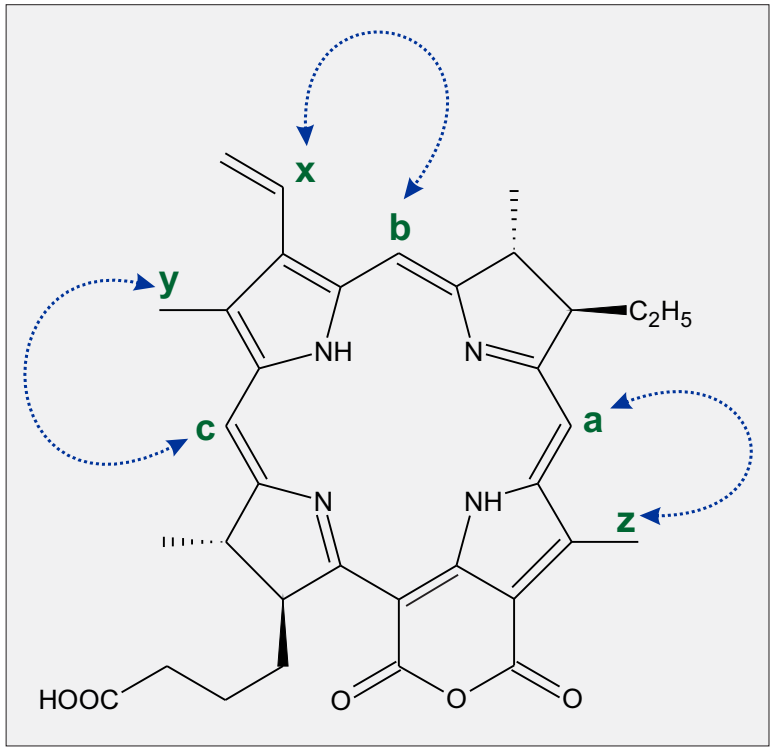


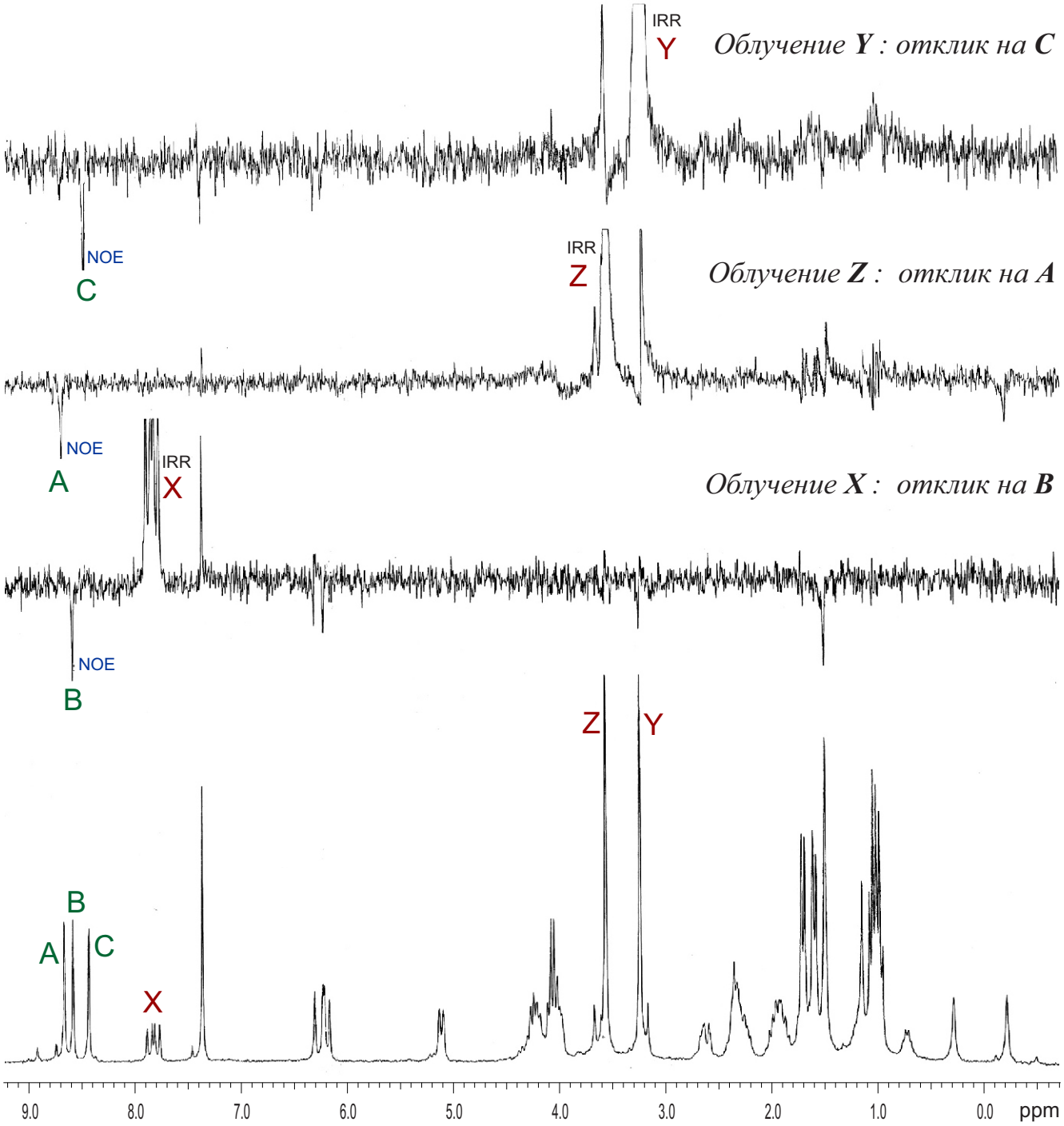


Ф. Тоукач, П. Беляков: слайд 63

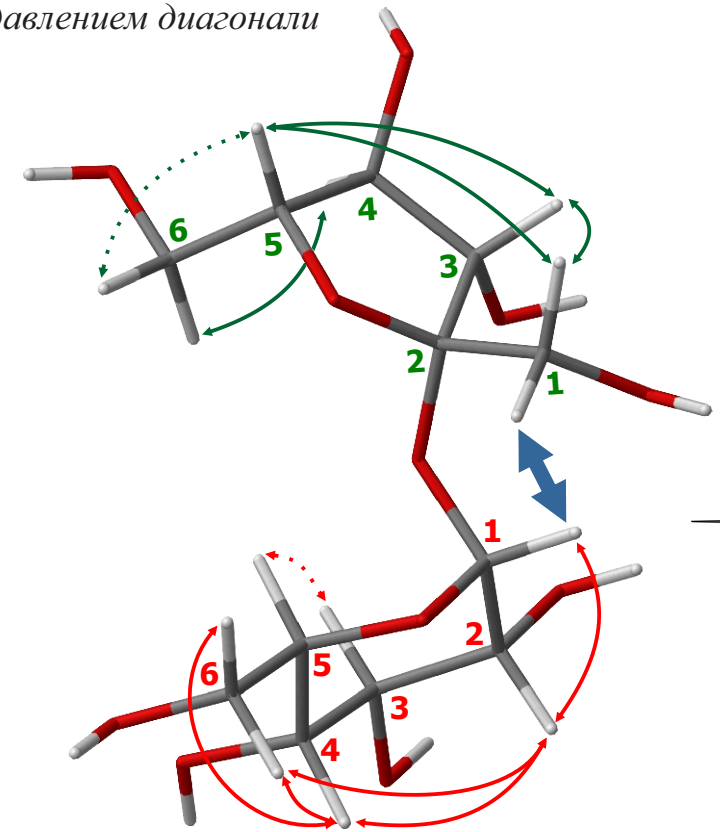
^{1}H **NOE difference**, 250 МГц

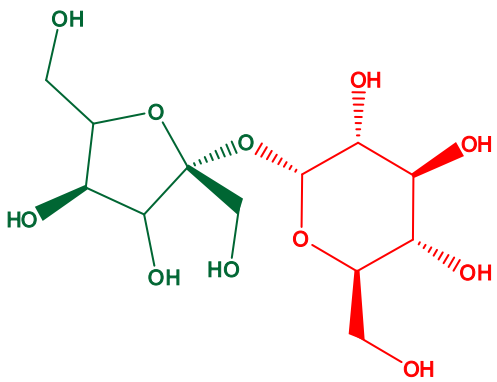
*Выявленные пространственные контакты **Y-C**, **X-B** и **Z-A** позволили сделать отнесение сигналов экзо-протонов **a**, **b** и **c**. Контакт **X-B** определил ориентацию винильной группы.*



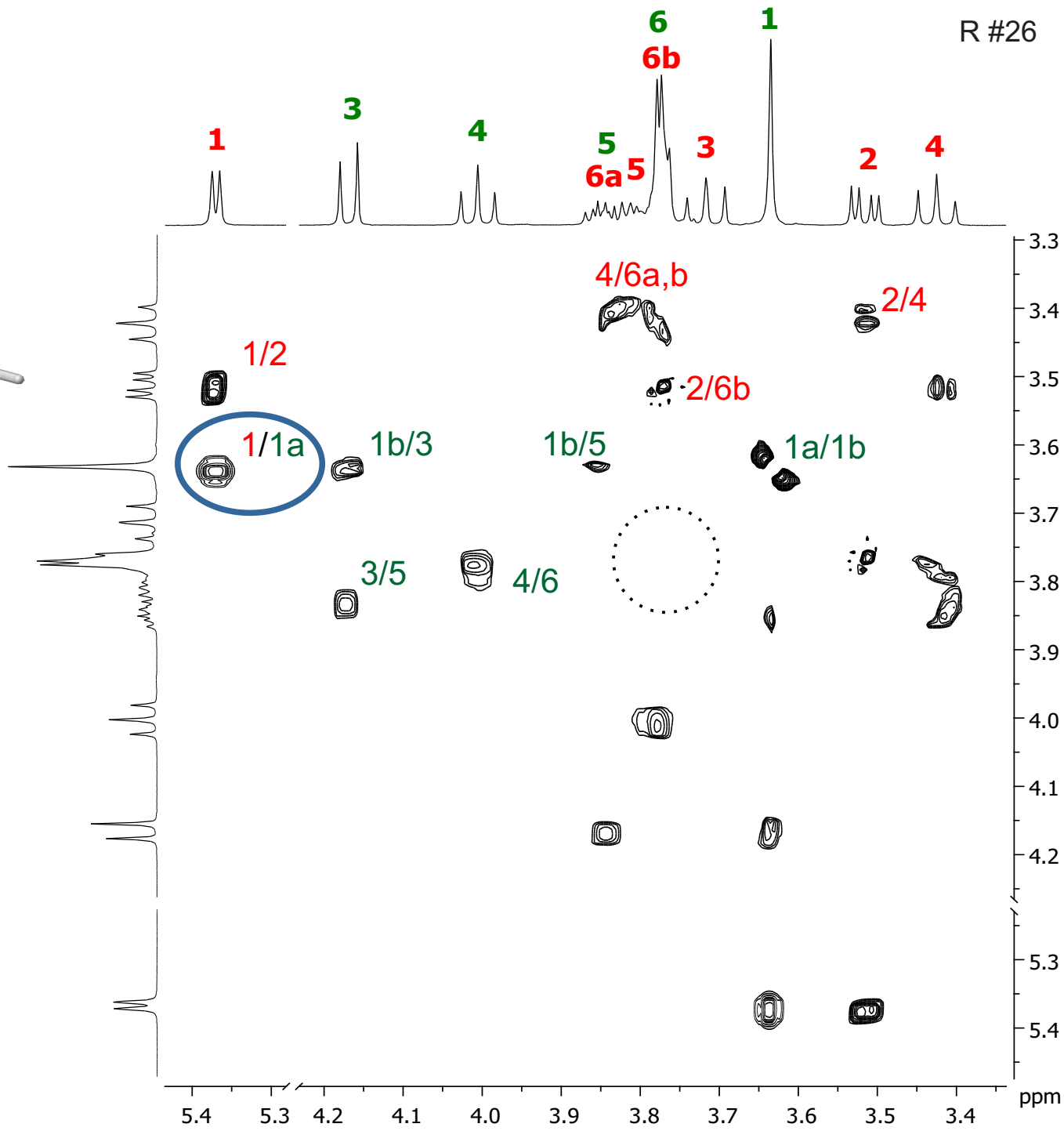


NOESY, 400 МГц, D_2O
с подавлением диагонали





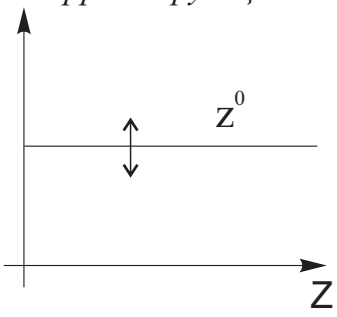
α-D-Glc*p*-(1→2)-β-D-Fru*f*
(сахароза)



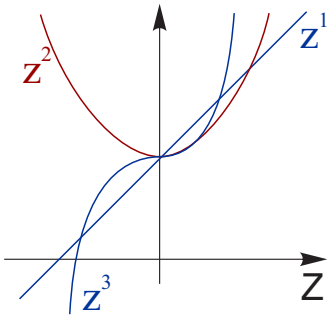
Стабилизация условий резонанса

в пространстве

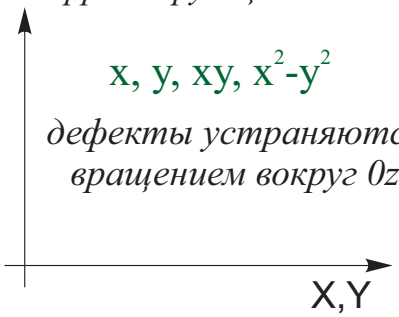
корректирующее поле



корректирующее поле



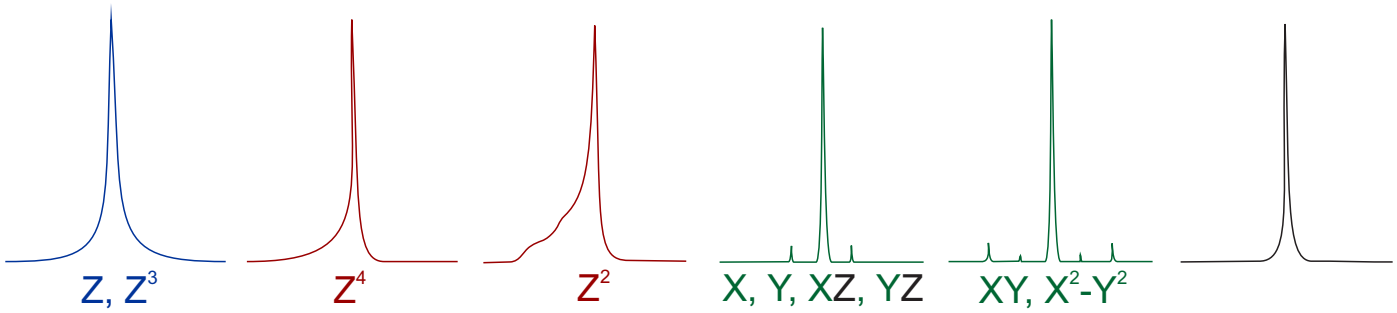
корректирующее поле



x, y, xy, x^2-y^2

дефекты устраняются вращением вокруг 0z

возможные ошибки:



Z, Z^3	Z^4	Z^2	X, Y, XZ, YZ	XY, X^2-Y^2	правильно
(симметричные искажения)	(несимметричные искажения)	(несимметричные искажения)	(боковые полосы 1-го порядка)	(боковые полосы 2-го порядка)	

критерии разрешения:

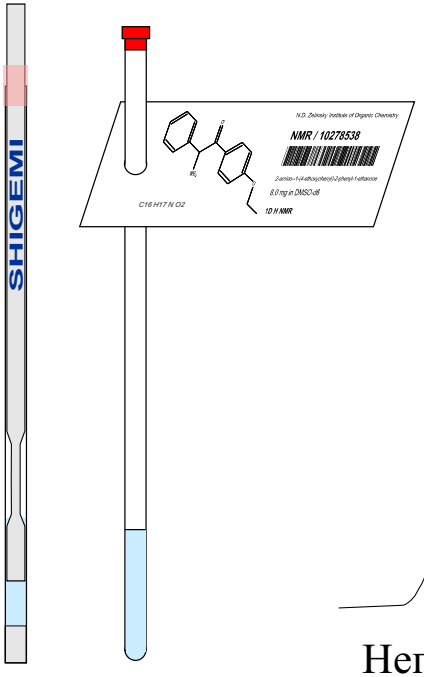
- высота сигнала дейтерия (при той же площади)
- площадь FID
- форма линии

во времени

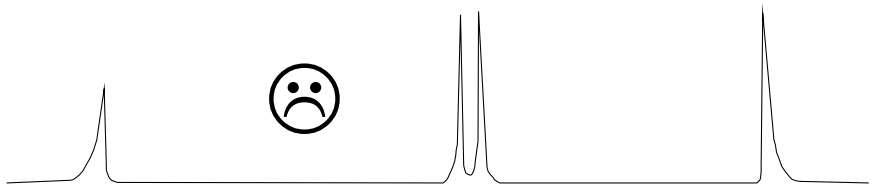
LOCK: Параллельно с основным ядром все время накапливается сигнал ядер ^2D, частота сравнивается с запомненной и производится подстройка поля

- LOCK Phase - *фаза опорного сигнала*
- LOCK Power - *мощность облучения* ^2D
  (должна быть такой, чтобы образец успевал ее рассеять)
- LOCK Gain - *усиление приема в канале LOCK*

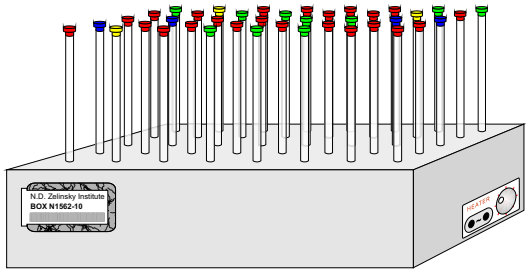
Приготовление образца



∅ 10 *мм* - чувствительность ↑, однородность поля ↓
∅ 5 *мм* - стандарт, рабочая область ≥20 мм (=0.4 мл)
Шигеми - вставка из спецматериала (для конкретного растворителя)



Непрогретые образцы и образцы с твердыми частицами имеют градиент концентрации



печка

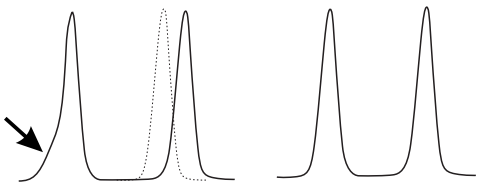
Выбор растворителя

- *положение сигналов остаточных протонов*
- *наличие примесей, в первую очередь воды*
- *способность к химическому обмену с –OH, –NH_2*
- *температуры кипения и замерзания, температурные изменения растворимости*
- *способность к образованию водородных связей и «утягиванию» сигналов*
- *мольная доля дейтерия (качество LOCK)*
- *вязкость (разрешение)*
- *цена (стандарт – DMSO-d6, ~2000 $/кг)*

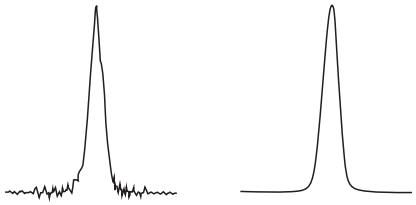
Растворители, используемые в ЯМР *(в порядке распространенности)*

растворитель	$t_{пл.}$, C°	$t_{кип.}$, C°	химический сдвиг, м.д.		~цена, $ / грамм	примечания
			^{1}H (остаточные)	^{13}C		
диметилсульфоксид-*d6*	18.5	189.0	2.50	39.5	1.8	вязкий, очень гигроскопичный
ацетон-*d6*	-94.7	56.3	2.05	206.0; 29.8	1.8	«хороший» сигнал ^{2}D
хлороформ-*d1*	-63.5	61.1	7.27	77.0	0.4	слабый сигнал ^{2}D
вода-*d2*	0	100.0	4.63	---	0.6 (99.8%)	содержит подвижный протон, гигроскопична
метанол-*d4*	-97.7	64.7	3.31	49.0	5.5	содержит подвижный протон
этанол-*d6*	-114.1	78.3	3.7; 1.2	57.3; 17.9	8.0	содержит подвижный протон
бензол-*d6*	5.5	80.1	7.16	128.0	2.4	вязкий, изменяет химические сдвиги
уксусная кислота-*d4*	16.7	117.9	11.53; 2.03	178.4; 20.0	2.8	
толуол-*d8*	-94.9	110.6	7.09; 7.00; 6.98; 2.09	137.5; 128.9; 128.0; 125.2; 20.4	3.0	изменяет химические сдвиги
пиридин-*d5*	-109	66	8.74, 7.58, 7.22	150.3, 135.9, 123.9	6.2	изменяет химические сдвиги
метиленхлорид-*d2*	-97.0	40.0	5.32	53.8	6.0	
ацетонитрил-*d3*	-44.0	81.6	1.95	118.2; 1.3	3.0	
тетрагидрофуран-*d8*	-66.0	66.0	3.58; 1.73	67.4; 25.2	20	
циклогексан-*d12*	6.6	80.7	1.38	26.4	17	
диметилформамид-*d7*	-60.4	153.0	8.01; 2.91	167.7; 35.2	12	вязкий

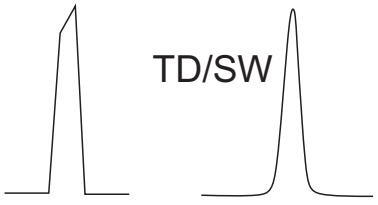
Количественные измерения



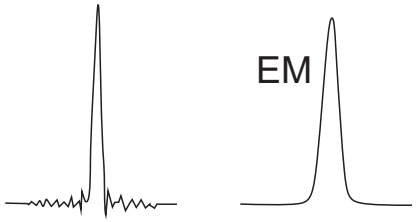
термостатирование,
устранение конвекции



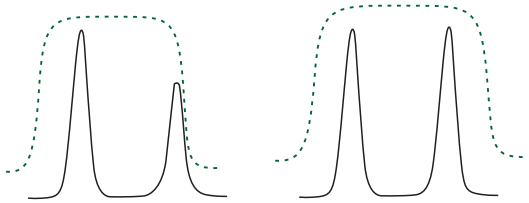
S/N > 250



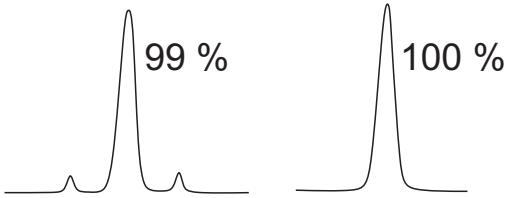
цифровое разрешение
> 5 точек / сигнал



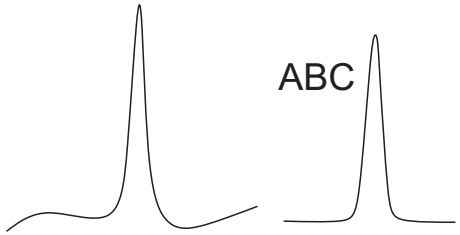
умножение на экспоненту



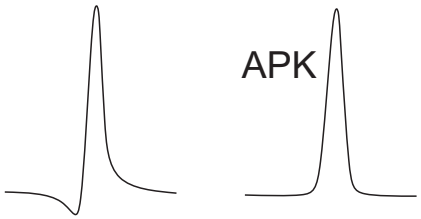
SW < 0.25/PW (все сигналы -
в области однородного облучения)



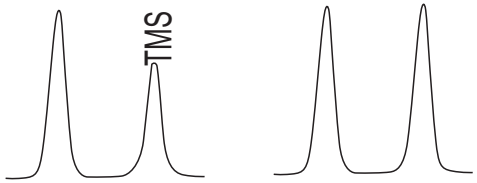
развязка от ^{13}C
(устранение сателлитов)



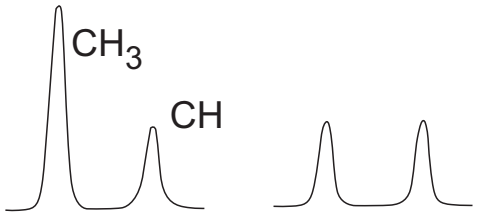
коррекция базовой линии



тщательная фазировка



AQ+RD > 6 * *max*(T_1)
полная релаксация за время цикла;
у стандарта м.б. T_1>10 сек.



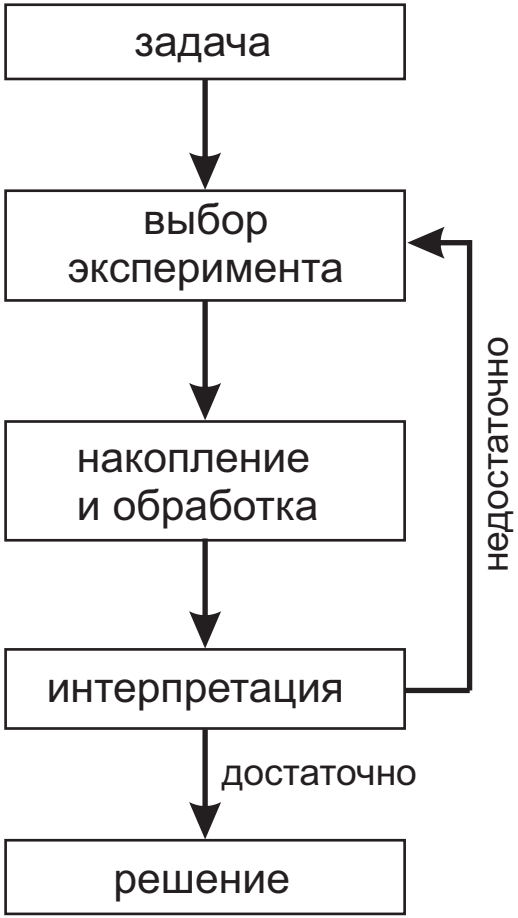
inv-Gated: на гетероядрах
исключить NOE от протонов

количественное измерение NOE (особенно в 2D):

- подбор времени смешивания
- максимизировать долю диполь-дипольного взаимодействия -
  вязкий раствор (поступательное и вращательное движения становятся малозначимыми)
- выравнивание базовой плоскости
- NOESY, но не ROESY (корреляция NOE с межатомным расстоянием)
- равновесный vs. неравновесный NOE:
  значение ЯЭО ~ наклон кривой зависимости NOE от времени облучения
- облучение быстро-релаксирующих протонов и наблюдение NOE на прочих,
  а не наоборот (напр., $CH_3 \rightarrow CH$)
- расчет расстояний - только с нормировкой: $r_{unknown} = r_{known} * (NOE_{known} / NOE_{unknown})^{1/6}$
- влияние концентрации
- обезгаженные образцы (удаление •O_2•)

Некорреляционные эксперименты ЯМР

1D 2D

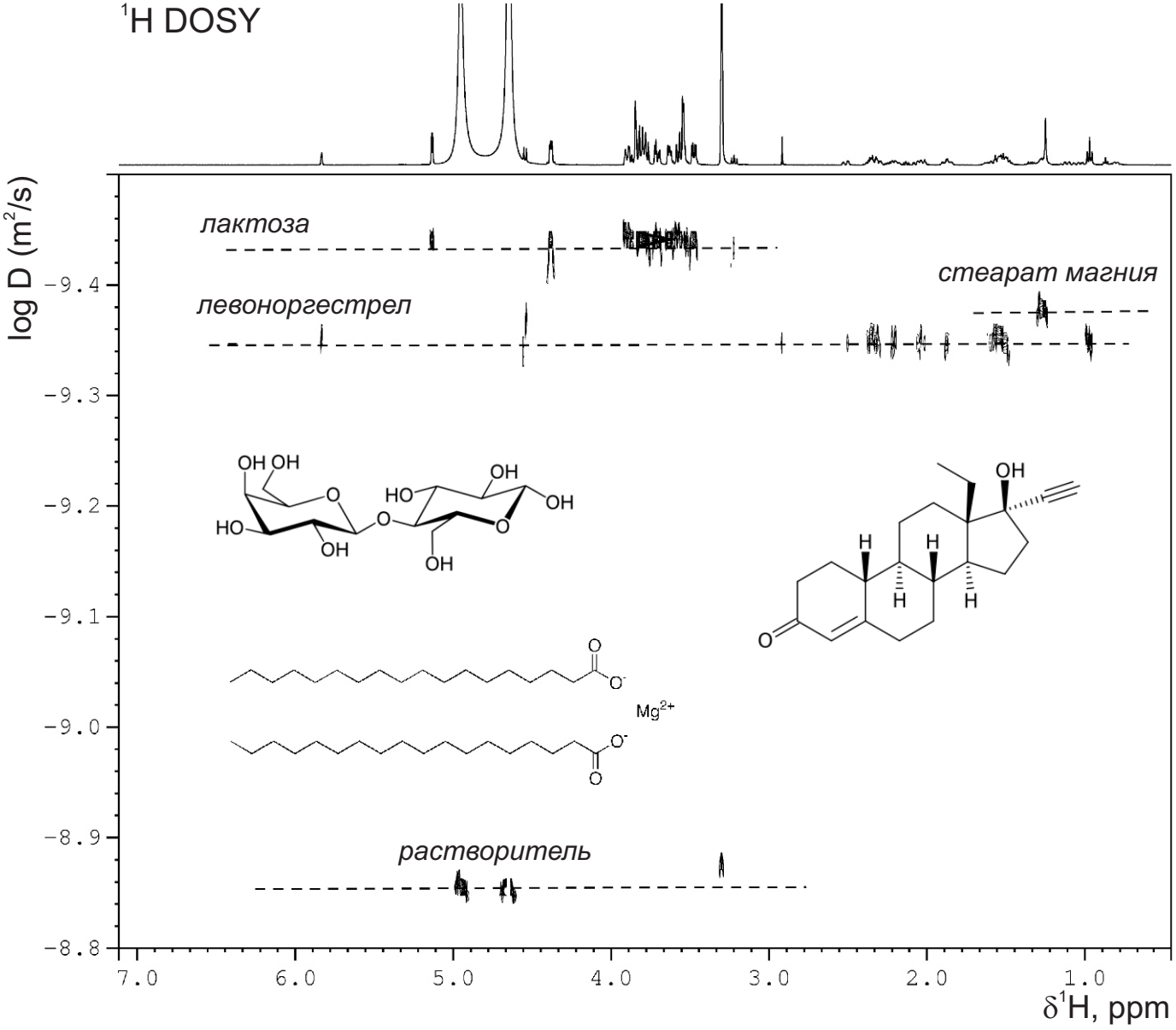


^{1}H	одномерный протонный спектр - *измерение гомоядерных КССВ, общая информация, идентификация остатков, базис для отнесения углеродного спектра*
^{13}C BB	одномерный углеродный спектр с широкополосной развязкой от протонов - *детальная информация, идентификация остатков, позиции замещения*
^{31}P BB, ^{15}N BB	одномерные спектры с широкополосной развязкой от протонов - *дополнительная информация*
APT, DEPT	отредактированный углеродный спектр - *выявление CH_2-групп*
^{13}C Gated, ^{31}P Gated	одномерные спектры без развязки от протонов - *измерение гетероядерных КССВ, выяснение аномерной конфигурации, изучение конформаци*
HH J-res	развертка протонного спектра по мультиплетности - *измерение гомоядерных КССВ, общая информация, идентификация остатков,*
DOSY	развертка протонного спектра по времени корреляции молекулы - *разделение спектра на подспектры компонентов смеси или подспектры фрагментов с разной подвижностью*

интерпретация спектров НЕ является последовательным алгоритмом

Диффузионная спектроскопия (DOSY)

Если за время между двумя градиентными импульсами молекула сместилась в пространстве, детектируемый сигнал ослабляется в зависимости от пройденного ей расстояния. Обработка ⇒ корреляция ХС со коэффициентом диффузии D. Поскольку каждый сигнал в молекуле связан с одним и тем же коэффициентом диффузии, их можно разнести в диффузионном измерении спектра DOSY.



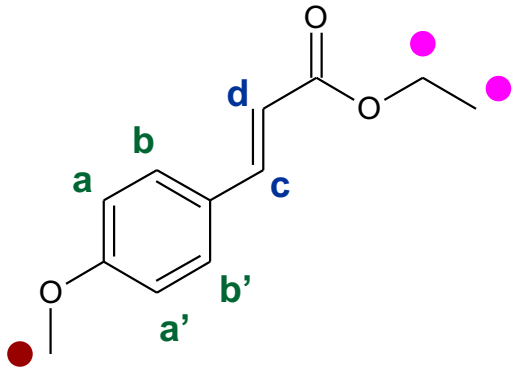
- добавление мелкодисперсного силикагеля изменяет скорости диффузии компонентов в сторону большей разницы
- термостатирование и вставки в ампулу устраняют конвекцию
- при соотношении < 1:100 минорные компоненты обычно не расходятся
- $CDCl_3$ - оптимальный растворитель (в слишком вязких (DMSO) нет диффузии; в слишком текучих (CD_3CN) все диффундирует быстро).

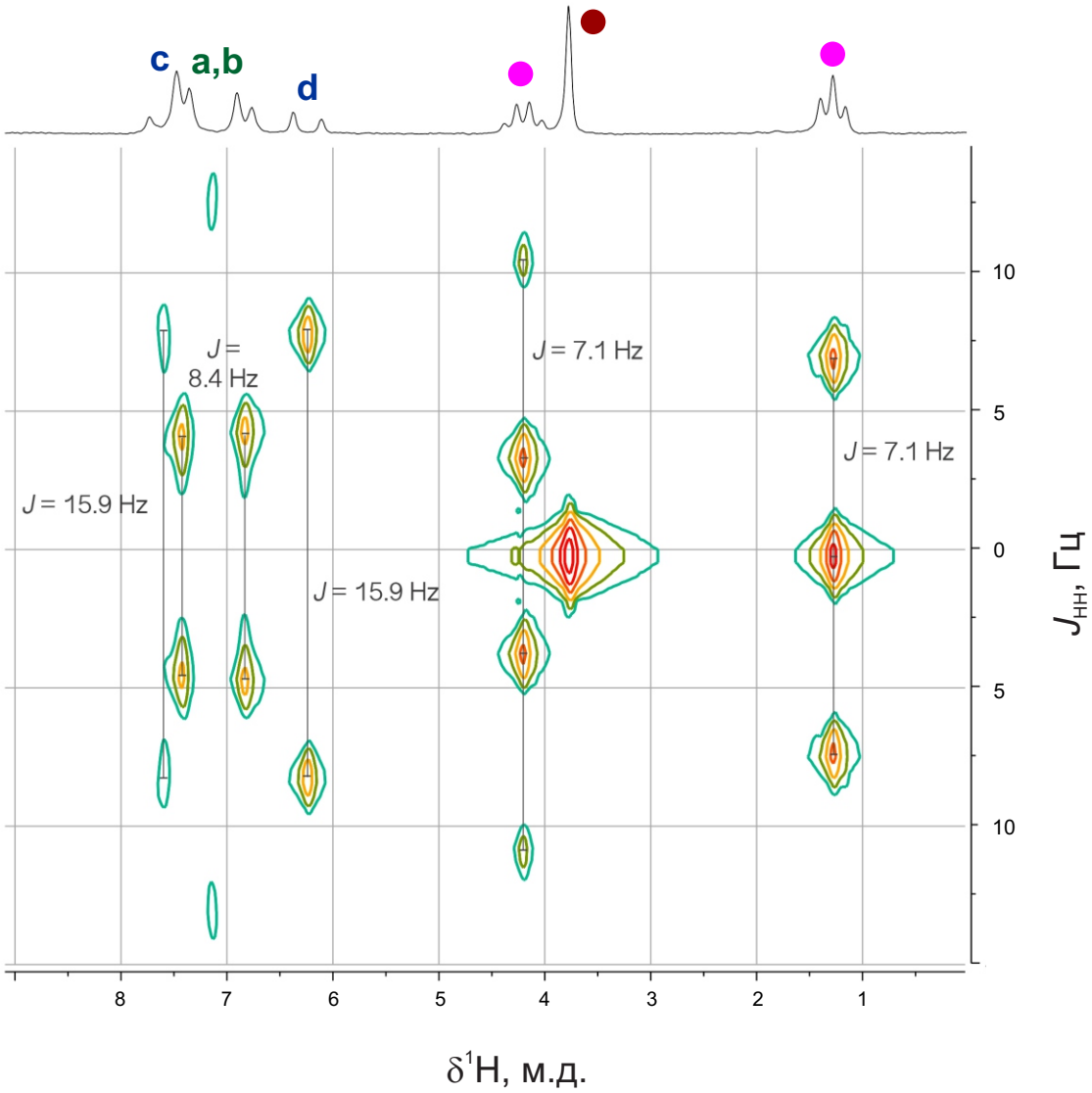
Ф. Тоукач: слайд 71
спектр: 10.1371/journal.pone.0095353.g005

Эксперимент J-resolved

$(\pi/2)_x$ —— $t_1/2$ —— $(\pi)_x$ —— $t_1/2$ —— *выборка* (t_2)

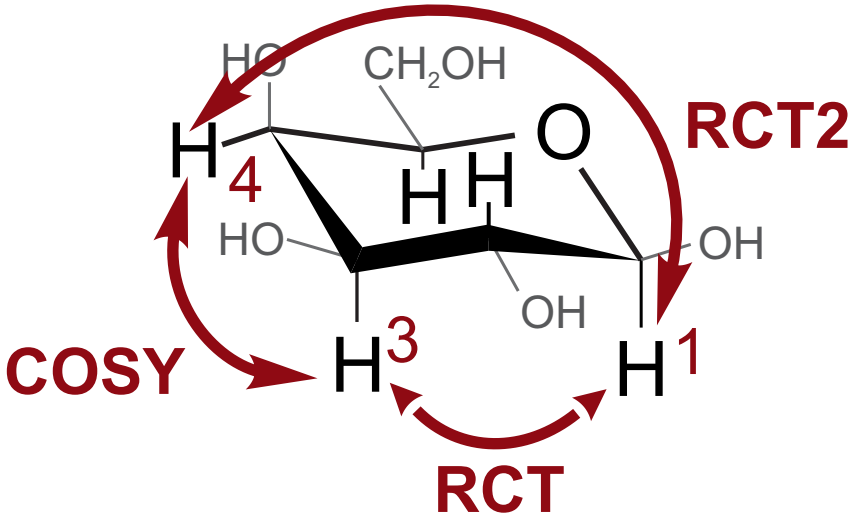
Обе задержки инкрементируются. За время второй задержки химические сдвиги (но не КССВ) рефокусируются. J-resolved используется, в основном, в гомоядерном варианте (протон-протонные КССВ).

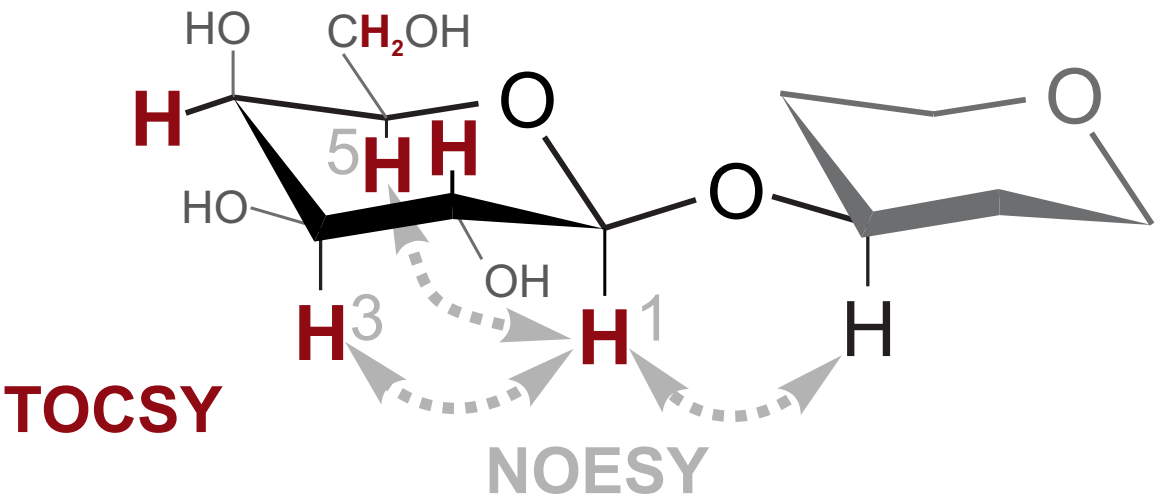




Гомоядерные спиновые корреляции

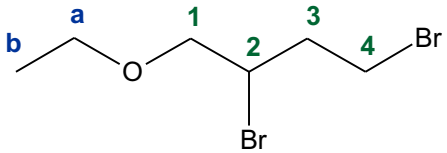
1D 2D



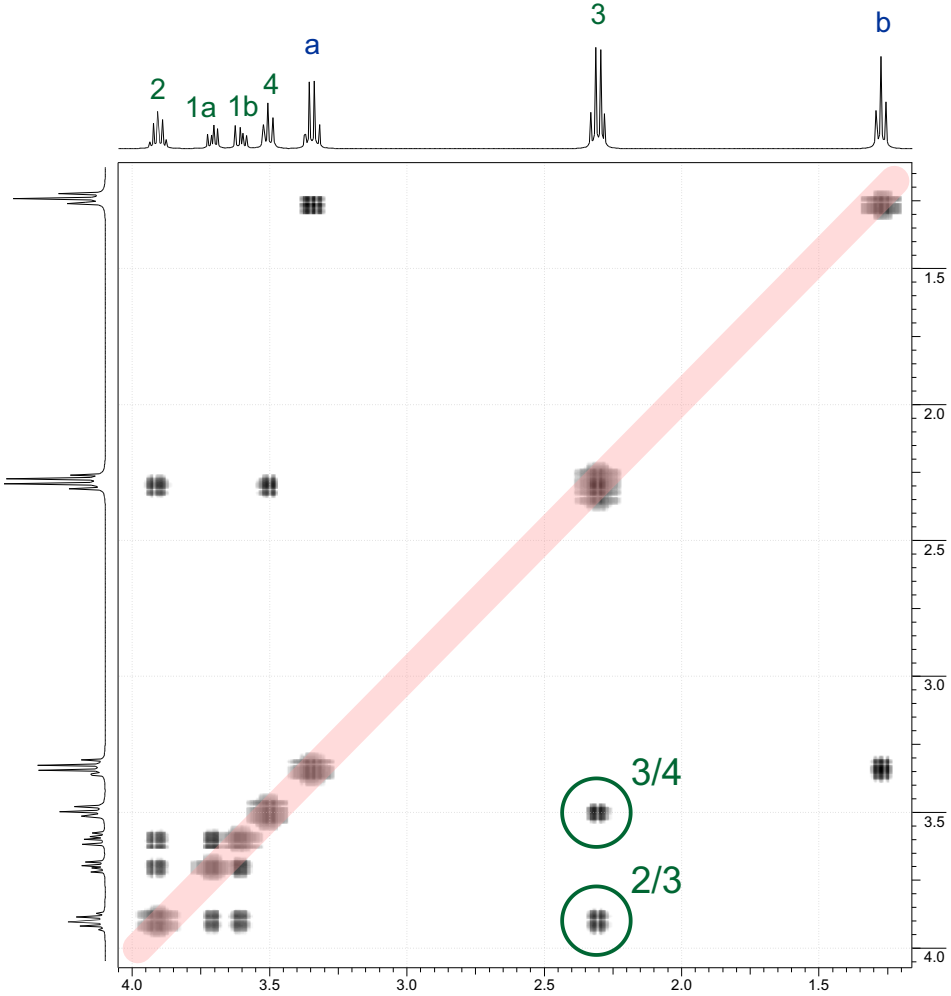


COSY	спиновая корреляция между вицинальными протонами - *отнесение протонного спектра*
COSY-45	COSY с «диагональной» структурой кросс-пиков (⁘ ⇒ •. ; ⁙ ⇒ ⁘.) - *отнесение близколежащих сигналов + информация о знаке КССВ*
RCT, RCT2	спиновые корреляции по цепочке вицинальных КССВ - *отнесение протонного спектра*
DQF COSY	COSY, разрешенный вблизи диагонали за счет фазы - *отнесение близколежащих сигналов*
^{1}H HD dif	разностный селективный двойной резонанс - *выявление формы линии H2*
TOCSY (НОНАНА)	спиновая корреляция со всеми протонами спиновой системы - *разделение спиновых систем*
1D TOCSY	TOCSY для одного сигнала - *выявление спиновой системы остатка*

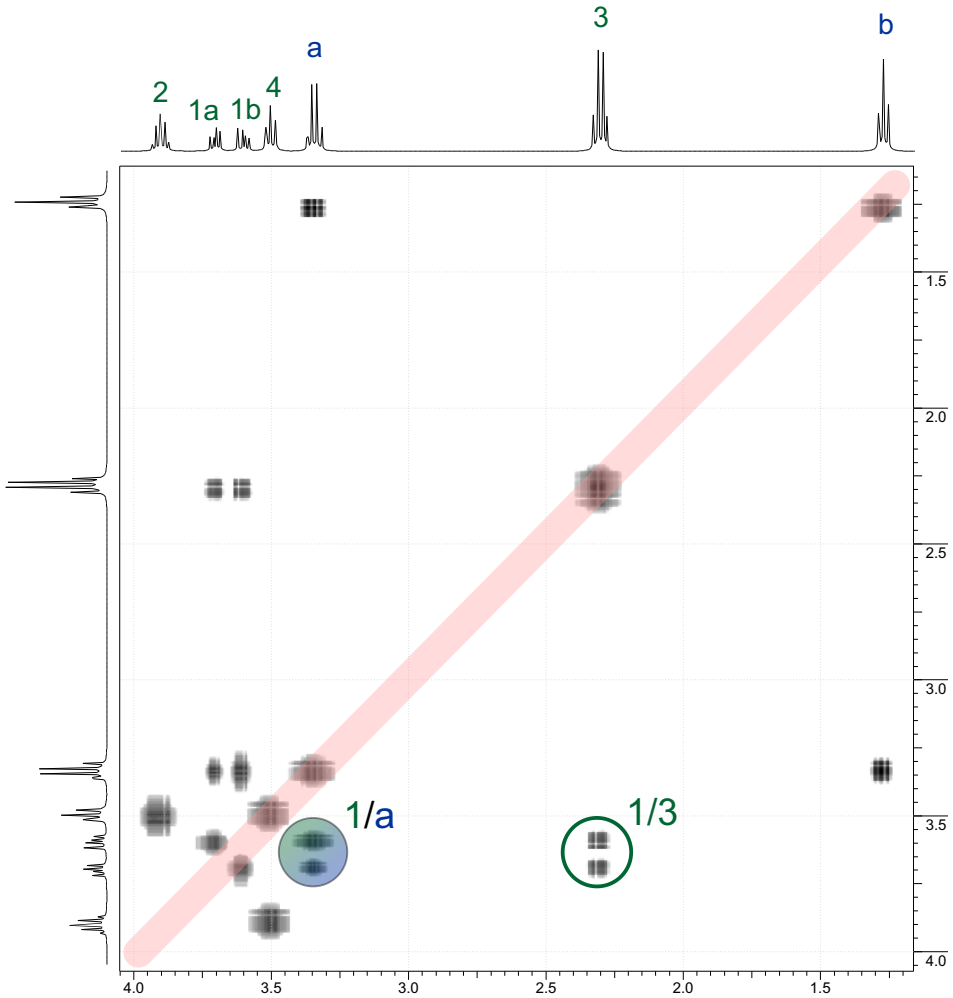
Гомоядерные двумерные спектры модельного соединения



COSY 400МГц



NOESY 400МГц

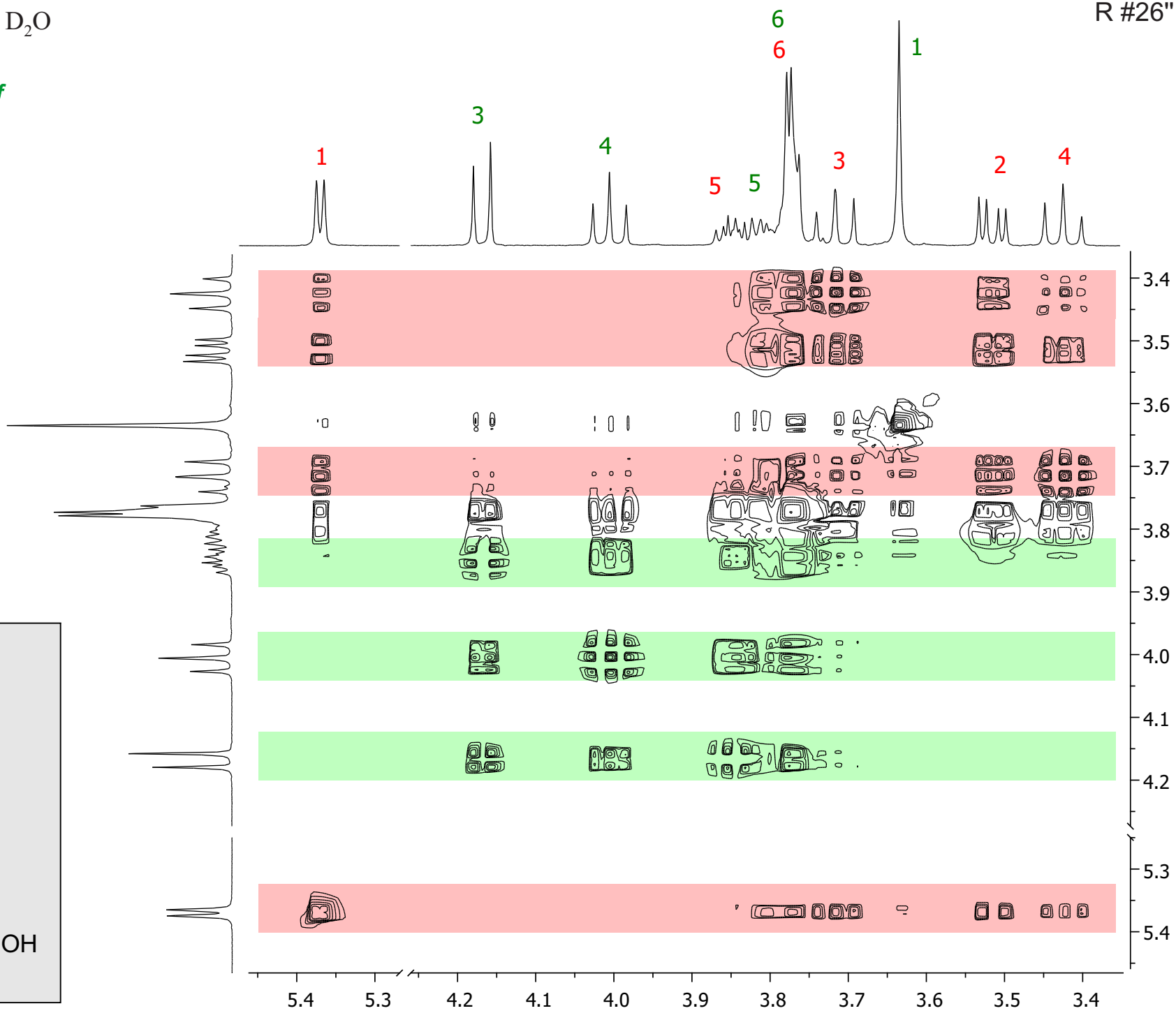


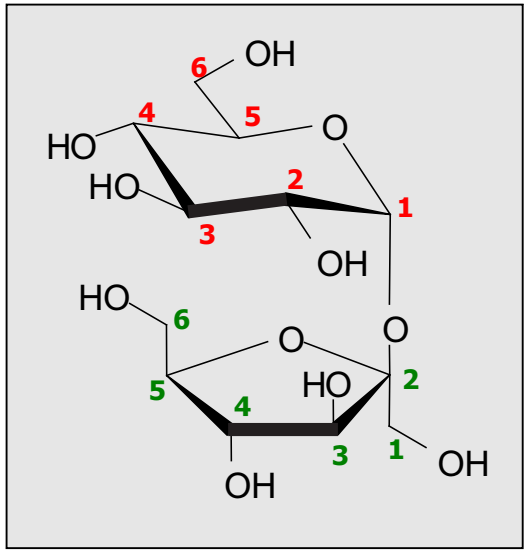
{^{1}H,^{1}H} **TOCSY**, 400 МГц, D_2O

R #26"

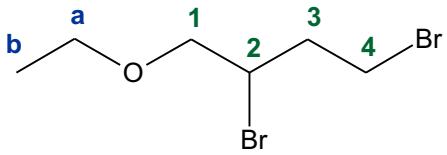
α-D-Glc*p*-(1→2)-β-D-Fru*f*

(сахароза)

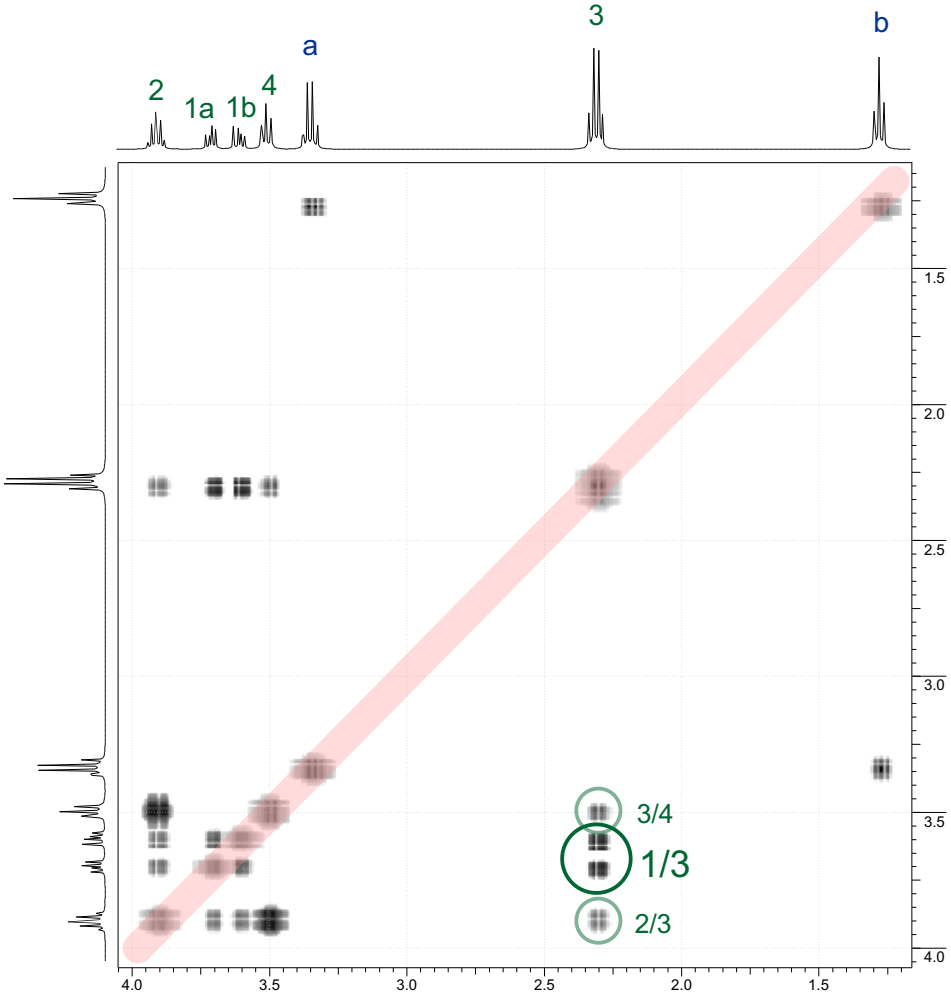




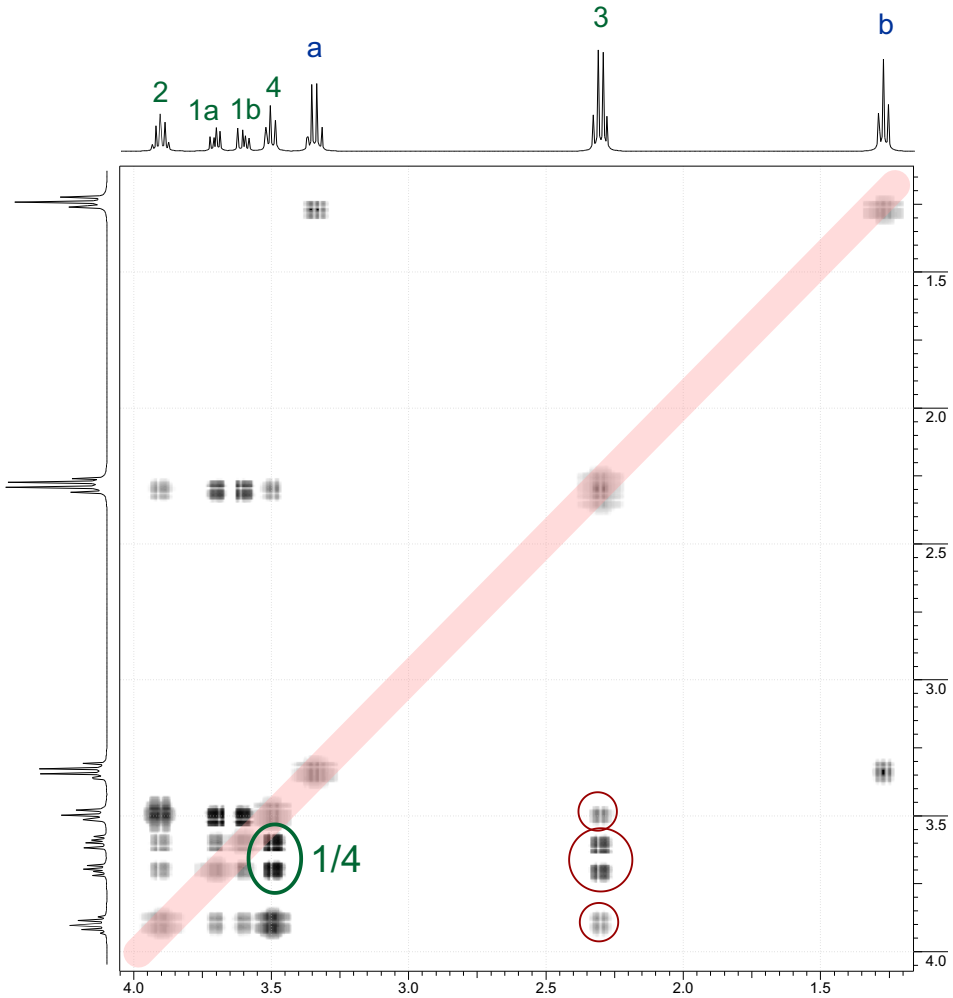
Гомоядерные двумерные спектры с переносом когерентности



COSY RCT 400МГц



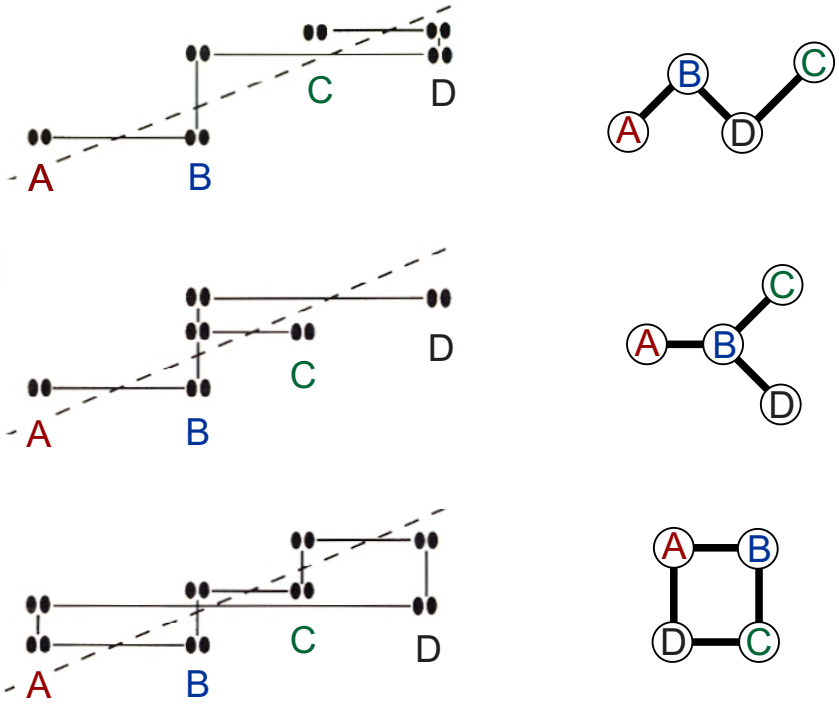
COSY RCT2, TOCSY 400МГц

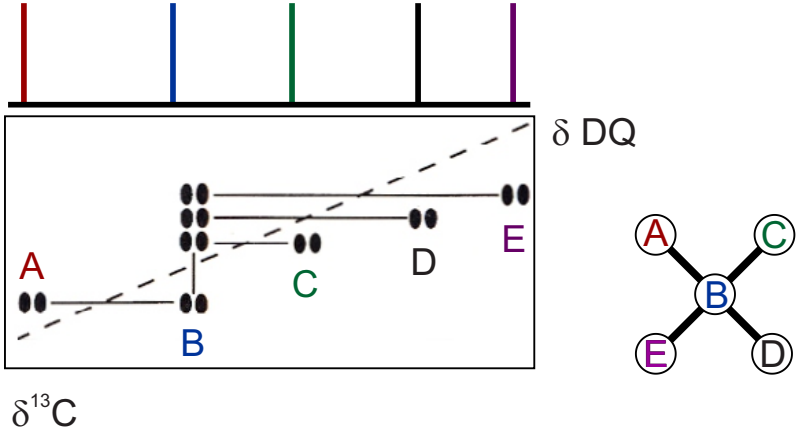


Эксперимент INADEQUATE

^{13}C: $\pi/2_x$ —— $1/4J_{CC}$ —— π_x —— $1/4J_{CC}$ —— $\pi/2_x$ —— t_1 —— $\pi/2_x$ —— $FID_{\pm x}$

^{1}H: decoupling ——

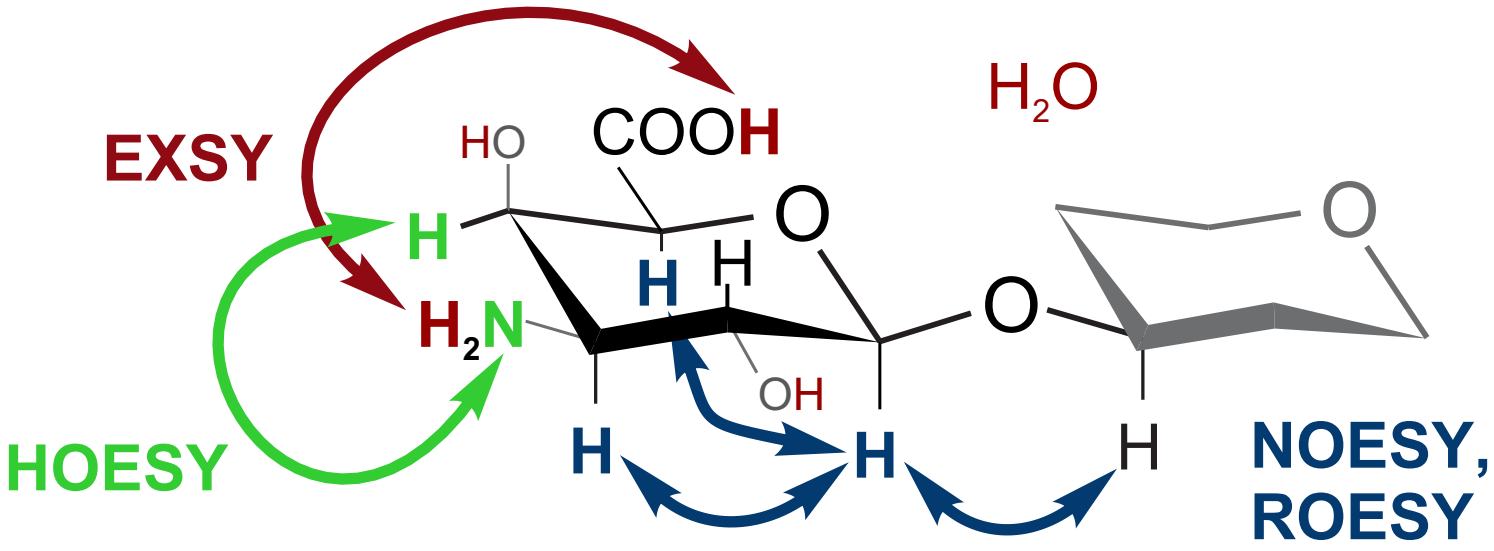




- требуется большая концентрация (>100мг) или обогащенный образец (>10% ^{13}C)
- на оси DQ - сумма коррелирующих частот
- ^{1}H-^{1}H INADEQUATE можно использовать для HH-корреляций, которые в COSY находятся вблизи диагонали

Прямые корреляции через пространство

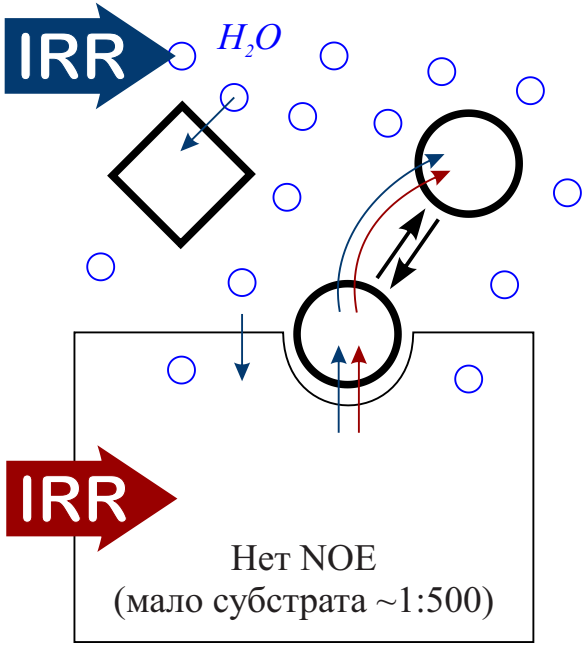
1D 2D

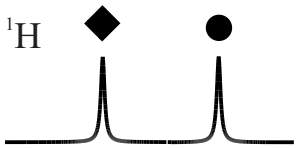


^{1}H NOE dif	разностное селективное измерение ЯЭО - *изучение пространственных контактов*
NOESY	пространственная корреляция - *выяснение последовательности остатков, конформации*
ROESY	пространственная корреляция - *исследование высокомолекулярных соединений*
{^{1}H,X} 1D NOE	измерение гетероядерного NOE - *исследование конформации*
HOESY	гетероядерная корреляция через пространство (NOE) - *исследование связывания*
EXSY	наблюдение обменных кросс-пиков - *исследование химического обмена и миграций*

NOE и перенос намагниченности

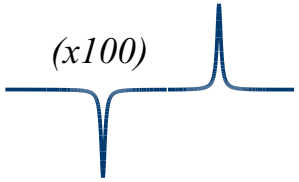
1D 2D



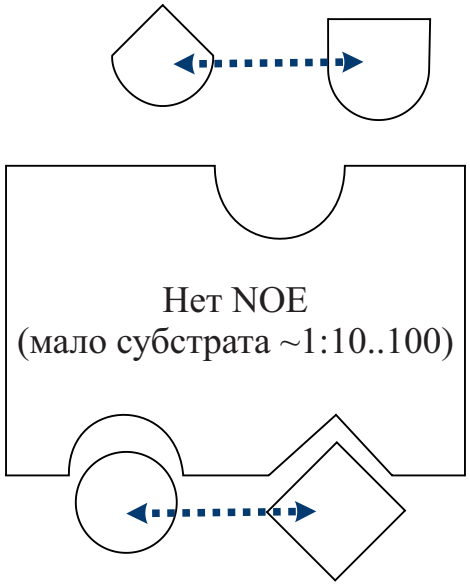


STD

WaterLOGSY



INPHARMA



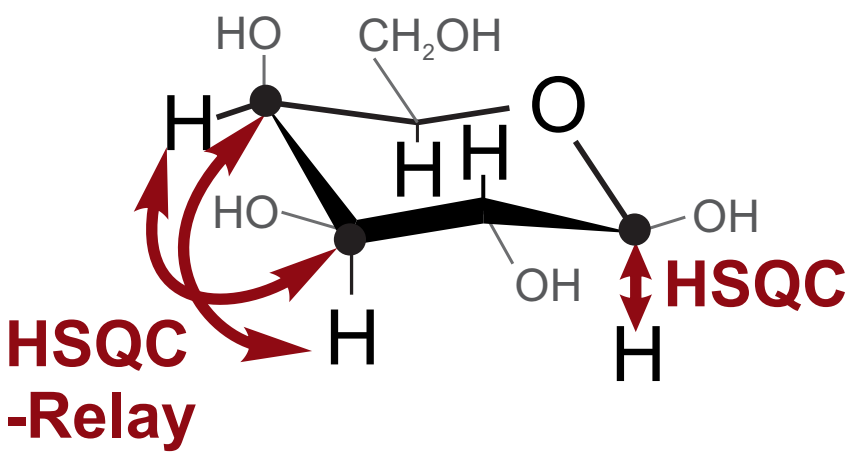
ILOE

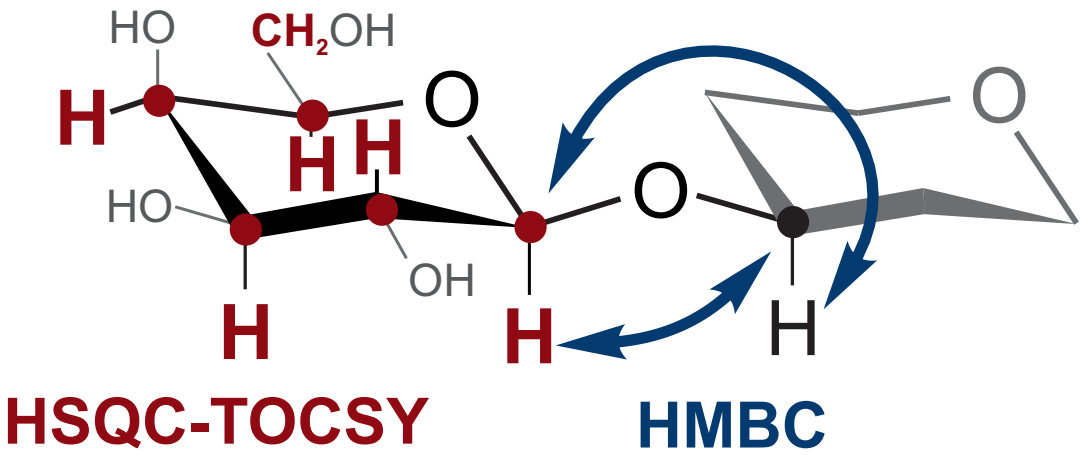
STD	при насыщении сигналов субстрата меняются сигналы только тех лигандов, которые могут связываться с ним - *скрининг связывания на смеси субстрата с множеством лигандов*
WaterLOGSY	при насыщении воды NOE со свободными и связанными лигандами имеет разный знак (передача через тяжелый субстрат или напрямую) - *скрининг связывания*
ILOE	отрицательный NOE между лигандами, связанными с ферментом в соседних положениях - контакты лиганд-лиганд
INPHARMA	если лиганды поочередно связываются с одним и тем же сайтом субстрата, между ними возникает NOE (передача через субстрат) - *локализация сайтов связывания*

Для наблюдения только одного типа NOE требуется правильный подбор времени смешивания (INPHARMA < NOESY; ILOE > NOESY) и сопоставимые временные характеристики связывания.

Гетероядерные корреляции

1D 2D



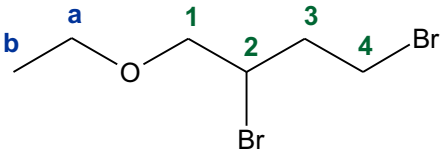


HETCOR	прямая углерод-протонная спиновая корреляция - *отнесение углеродного спектра*
{^{1}H,^{13}C} HSQC *	прямая протон-углеродная спиновая корреляция - *отнесение углеродного спектра*
{^{1}H,^{31}P} HSQC	протон-фосфорная спиновая корреляция - *локализация фосфатных групп*
{^{1}H,^{13}C} HMBC	дальняя протон-углеродная корреляция - *выяснение последовательности остатков*
{^{1}H,X} 1D HMBC	HMBC для одного сигнала - *выявление протонов в окружении гетероядра*
HSQC-Relay	углерод-углеродная корреляция через вицинальные протонные КССВ - *поиск соседних углеродных атомов*
HSQC-TOCSY	корреляция углеродов со всеми протонами спиновой системы (и наоборот) - *поиск C_n по H_{n+1} и аналогичные задачи*

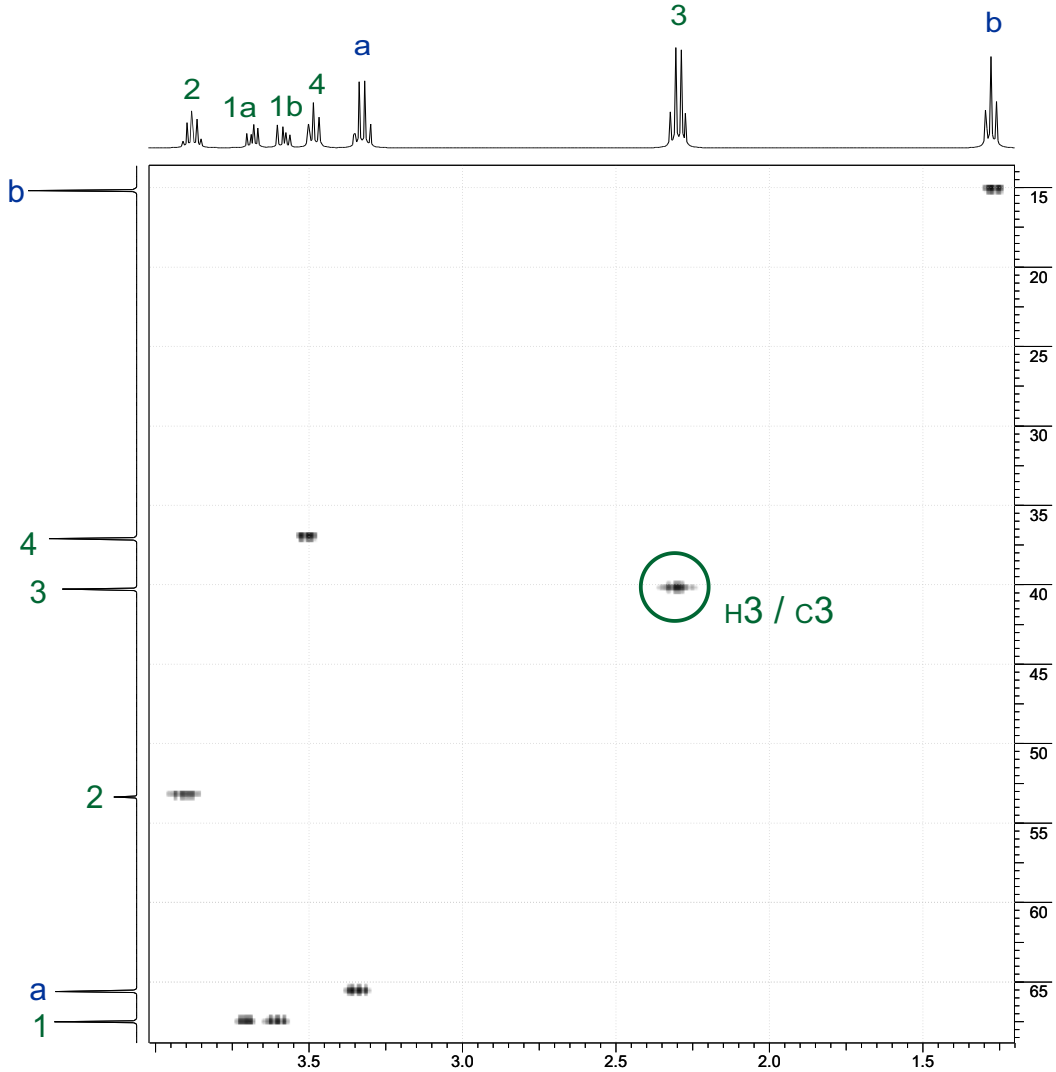
* отличия HMQC от HSQC: нефазочувствительный (шире пики по F1 + невозможно редактирование); толерантен к длине ^{13}C-импульса

Инверсные эксперименты - намагничивание передается с протона на другое ядро, и затем обратно на протон, накопление происходит по протонам (требуется специальный датчик).

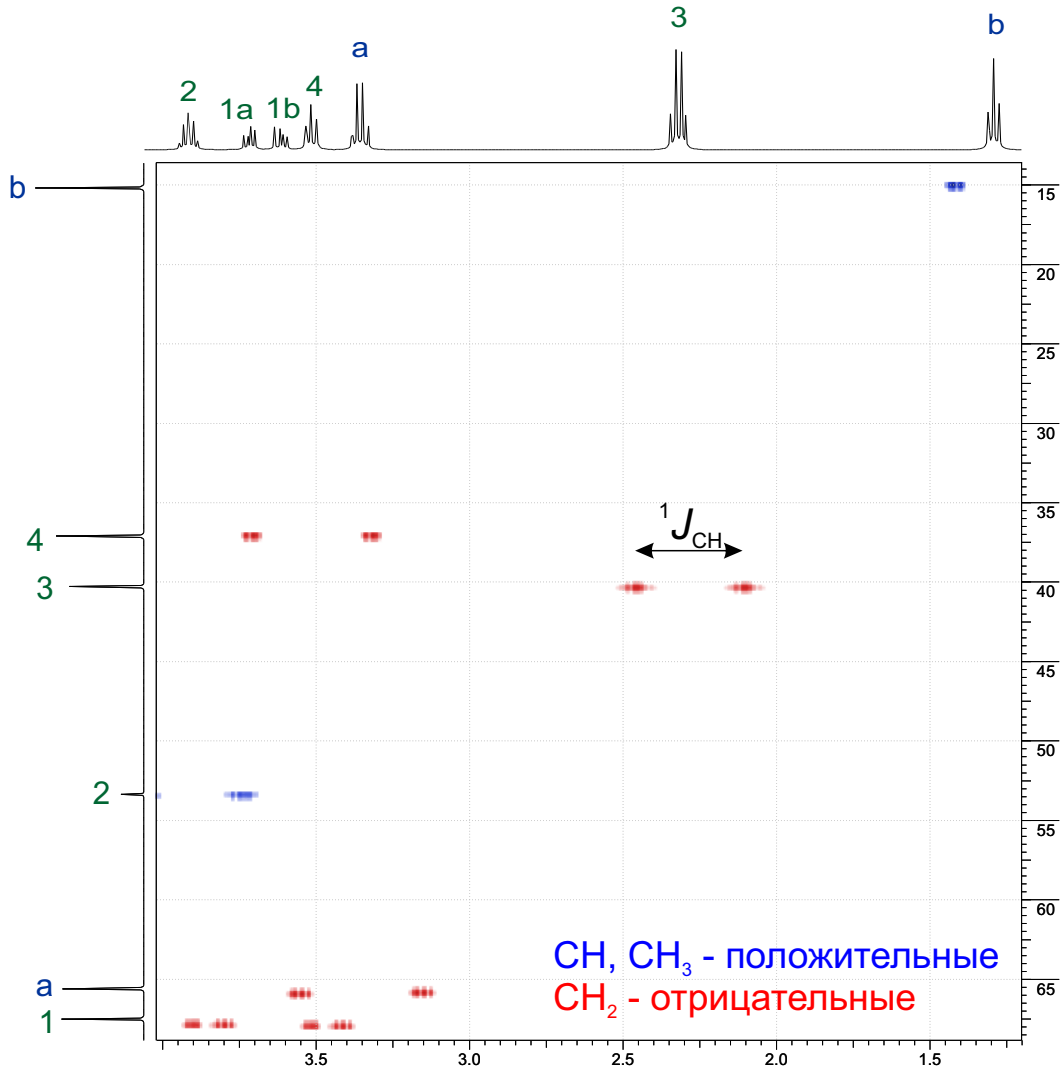
Гетероядерные двумерные спектры модельного соединения



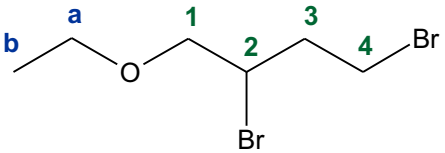
{^{1}H,^{13}C} HSQC 400МГц



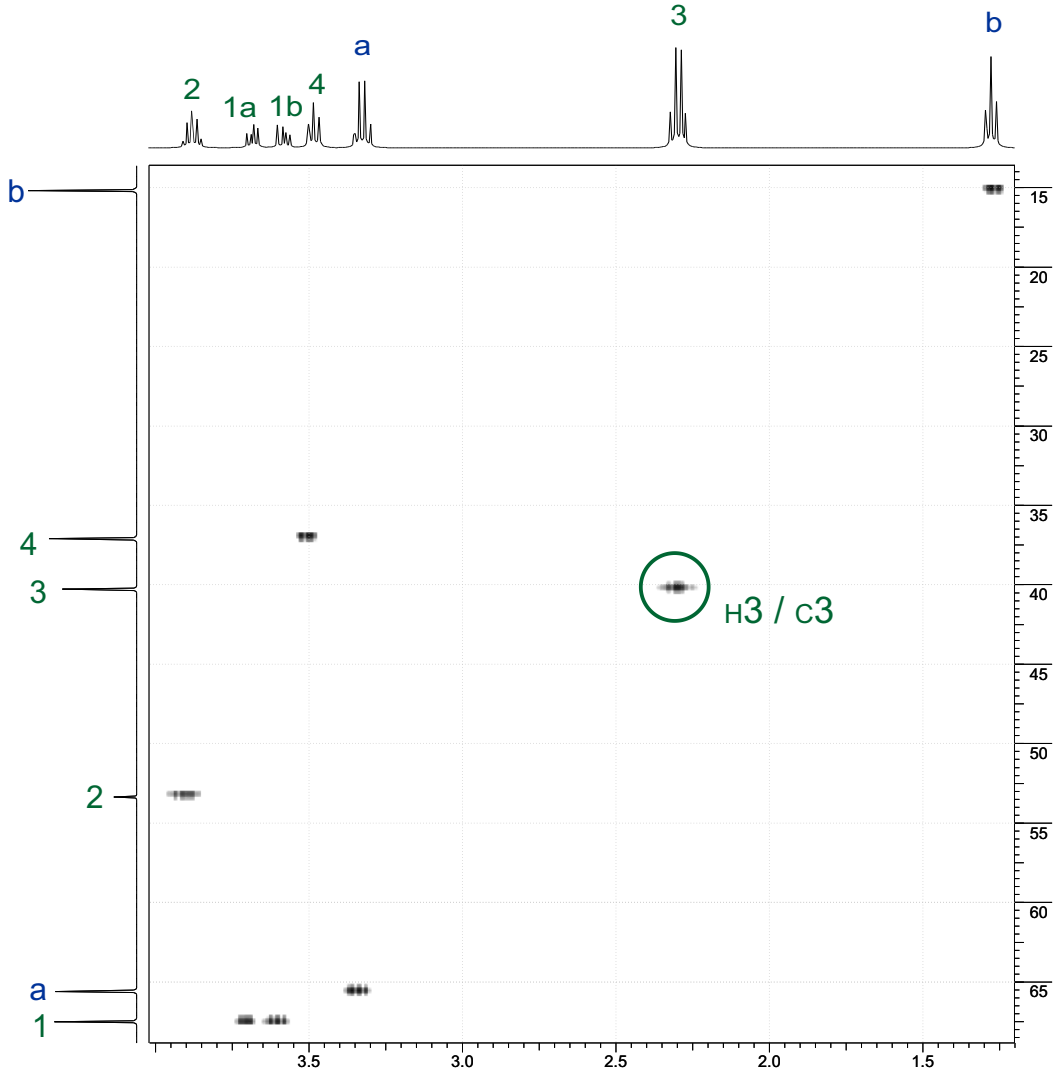
{^{1}H,^{13}C} ed-HSQC 400МГц без развязки от ^{1}H



Перенос когерентности в HSQC

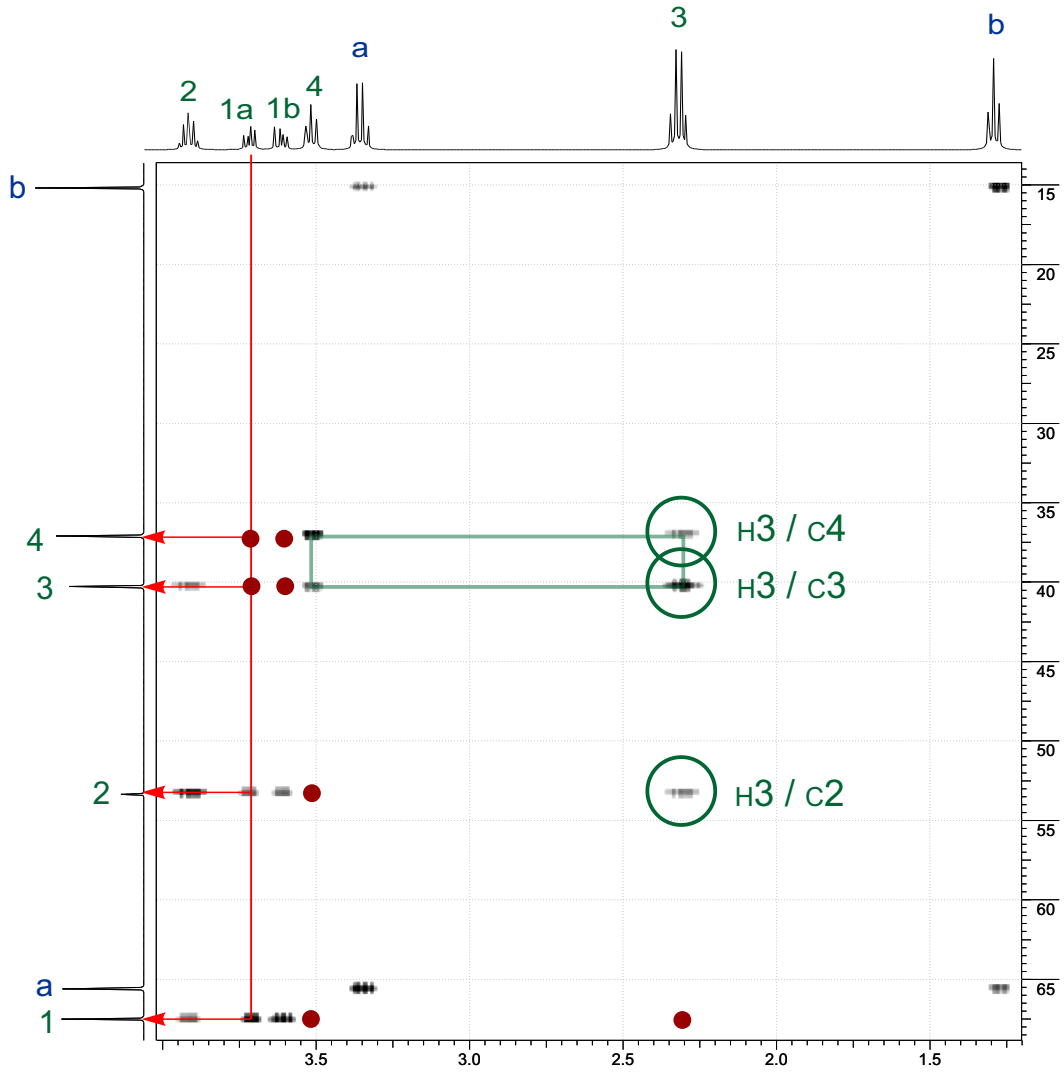


{^{1}H,^{13}C} HSQC 400МГц



{^{1}H,^{13}C} HSQC-relay 400МГц

● дополнительные кросс-пики в HSQC-TOCSY

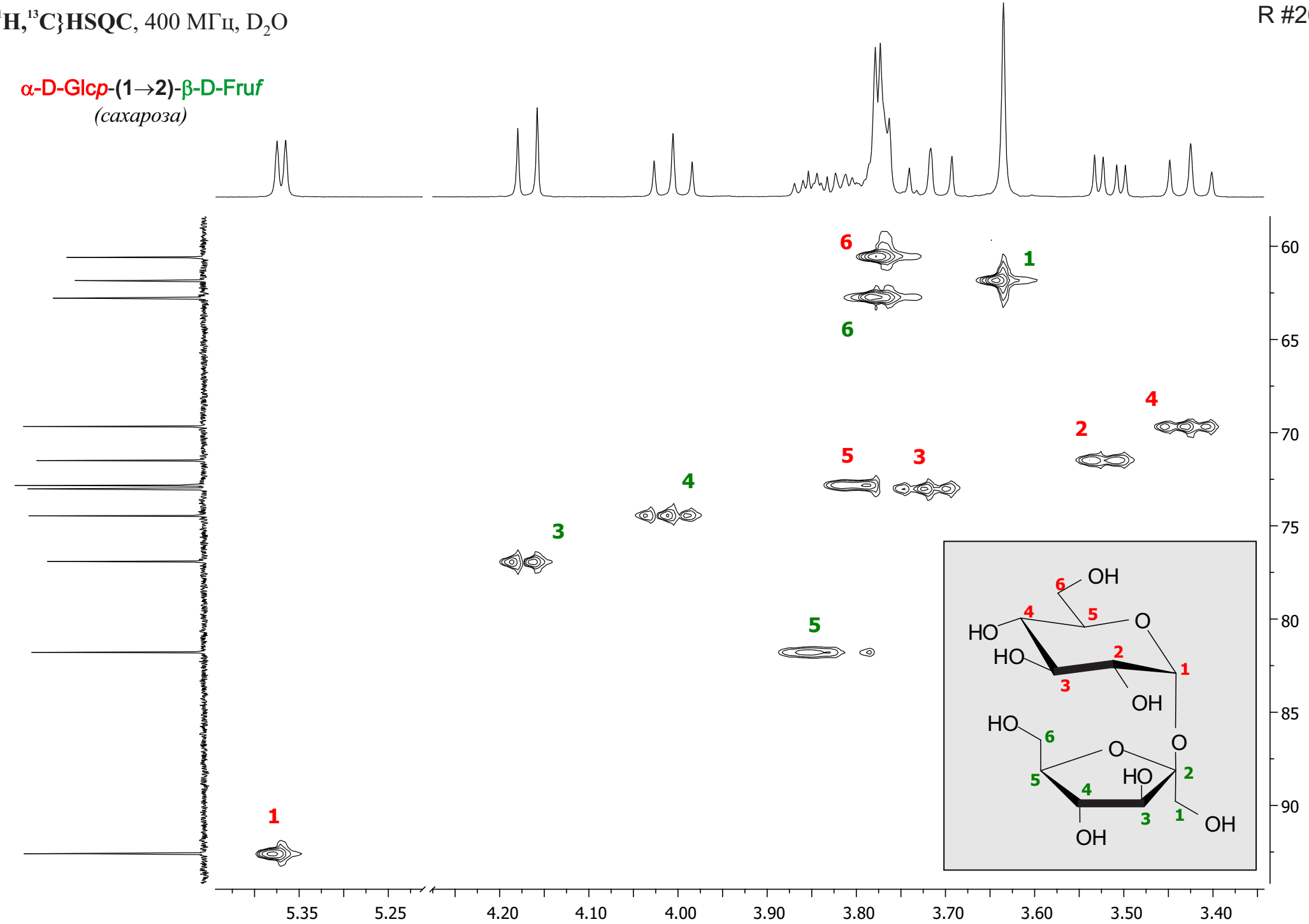


{^{1}H,^{13}C}HSQC, 400 МГц, D_2O

R #26'''

α-D-Glc*p*-(1→2)-β-D-Fru*f*

(сахароза)

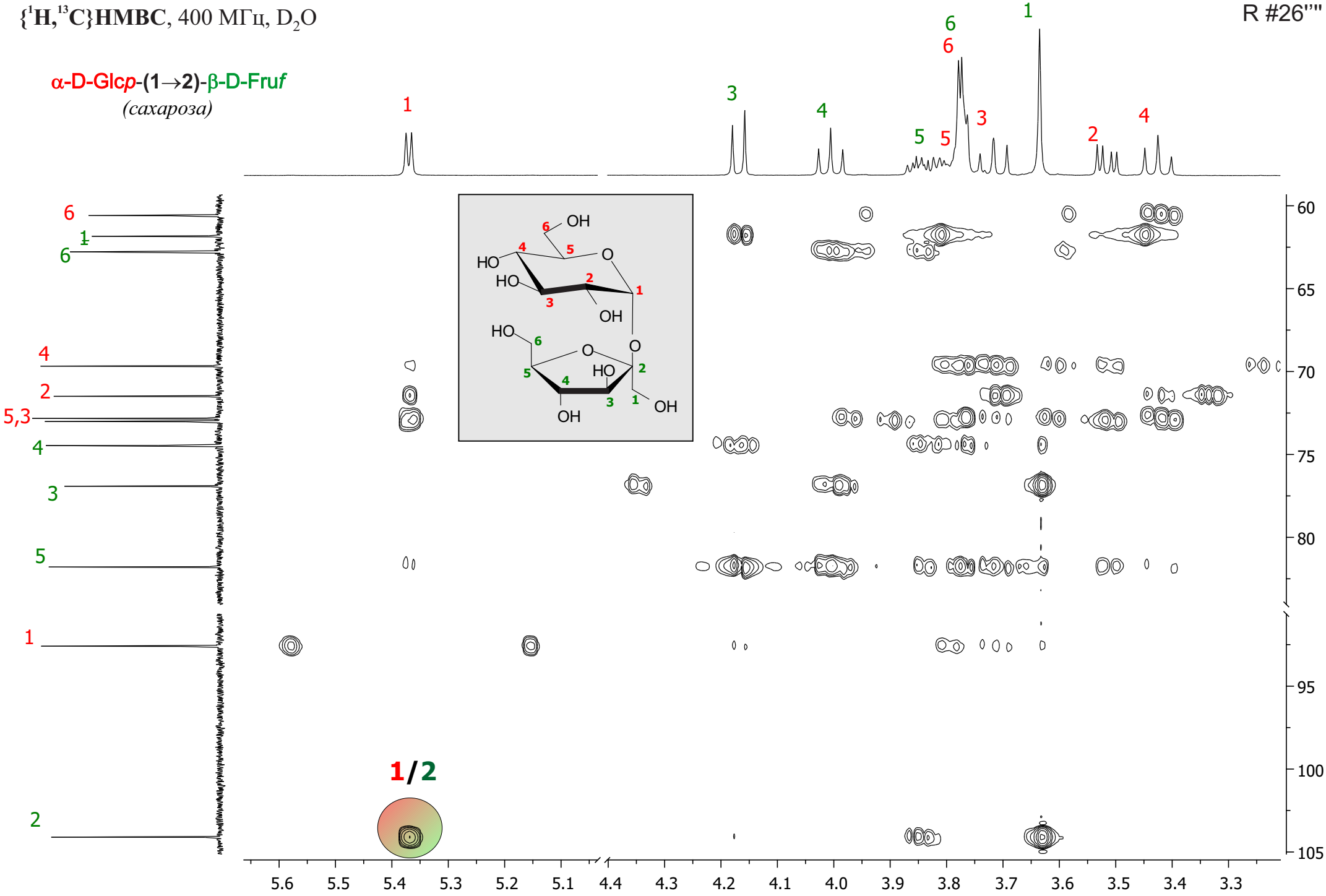


{^{1}H,^{13}C}HMBC, 400 МГц, D_2O

R #26'''

α-D-Glc*p*-(1→2)-β-D-Fru*f*

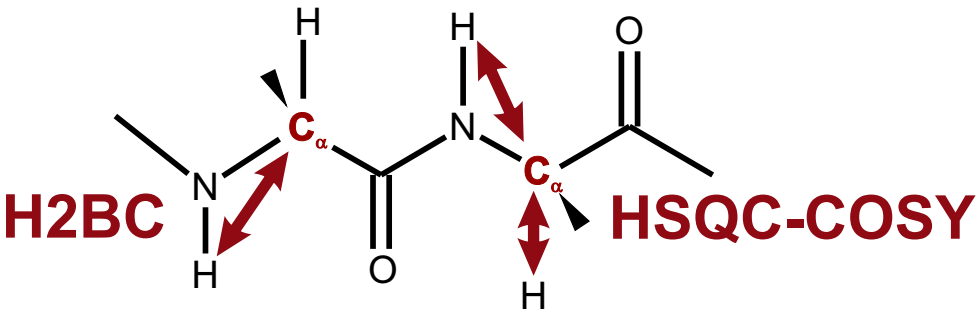
(сахароза)

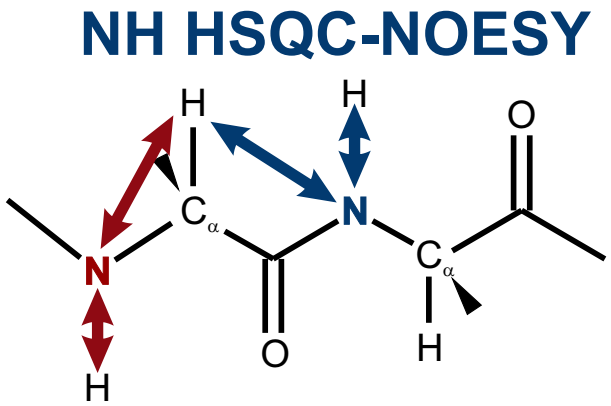


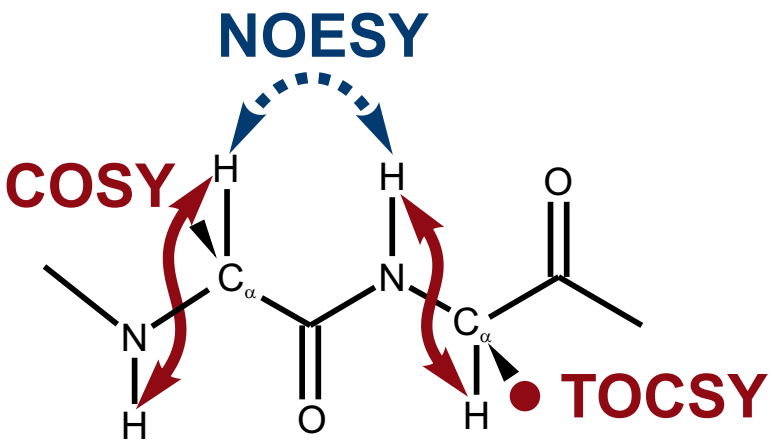
Ф. Тоукач, А. Фахрутдинов: слайд 84

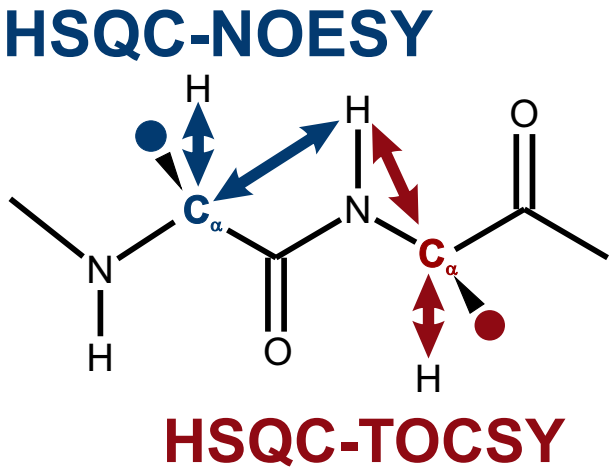
Комбинированные корреляции

2D





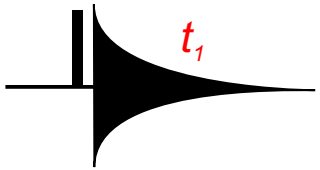


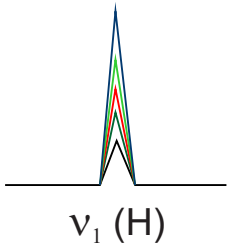


{^{1}H,^{13}C} HSQC-COSY	корреляция углеродов со своими и соседними протонами; H2BC - только с соседними
{^{1}H,^{13}C} HSQC-TOCSY	корреляция углеродов с протонами в том же остатке
{^{1}H,^{15}N} HSQC-TOCSY	корреляция гетероатомов с протонами в том же остатке
{^{1}H,^{13}C} HSQC-NOESY	корреляция углеродов с протонами, сближенными с его собственным С**H**
{^{1}H,^{15}N} HSQC-NOESY	корреляция гетероатомов с протонами, сближенными с его собственным X**H**

Трехмерные эксперименты

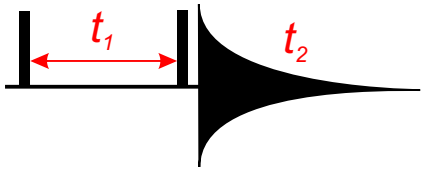
1D H

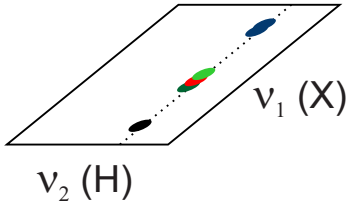




перекрывание: 6H

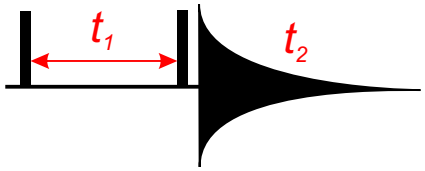
2D HX

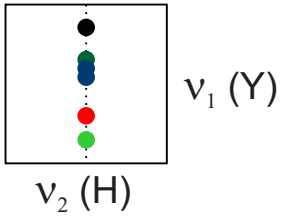




перекрывание: 3+2 H

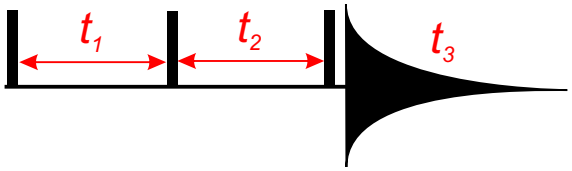
2D HY

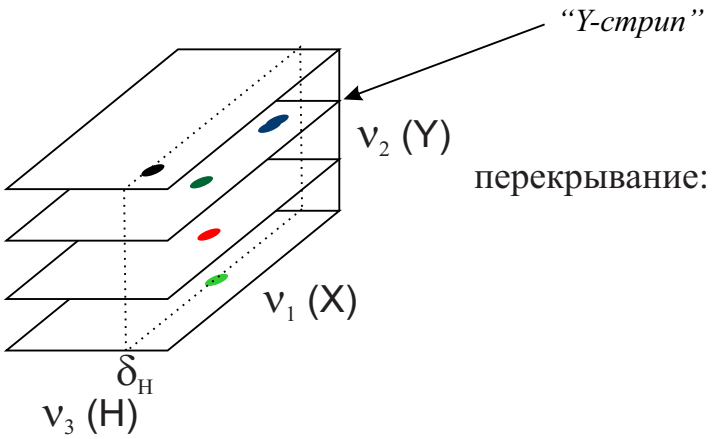




перекрывание: 3 H

3D HXY



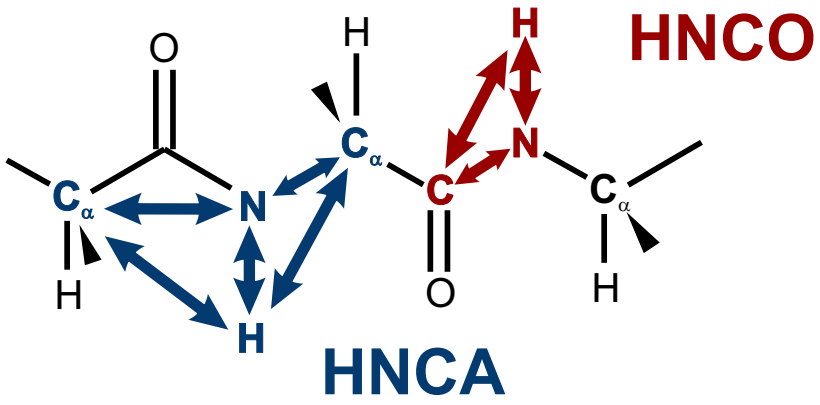


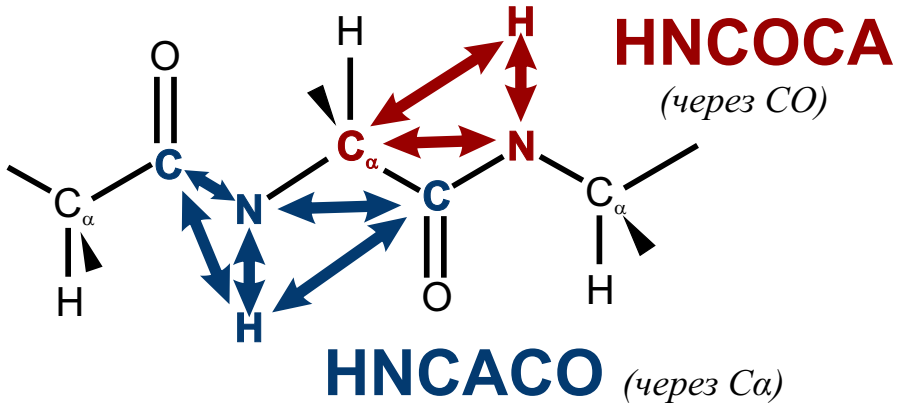
перекрывание: 2 H

Ф. Тоукач, Дж. Арамини: слайд 86

Корреляции {H,C,N} и {H,H,N}

3D





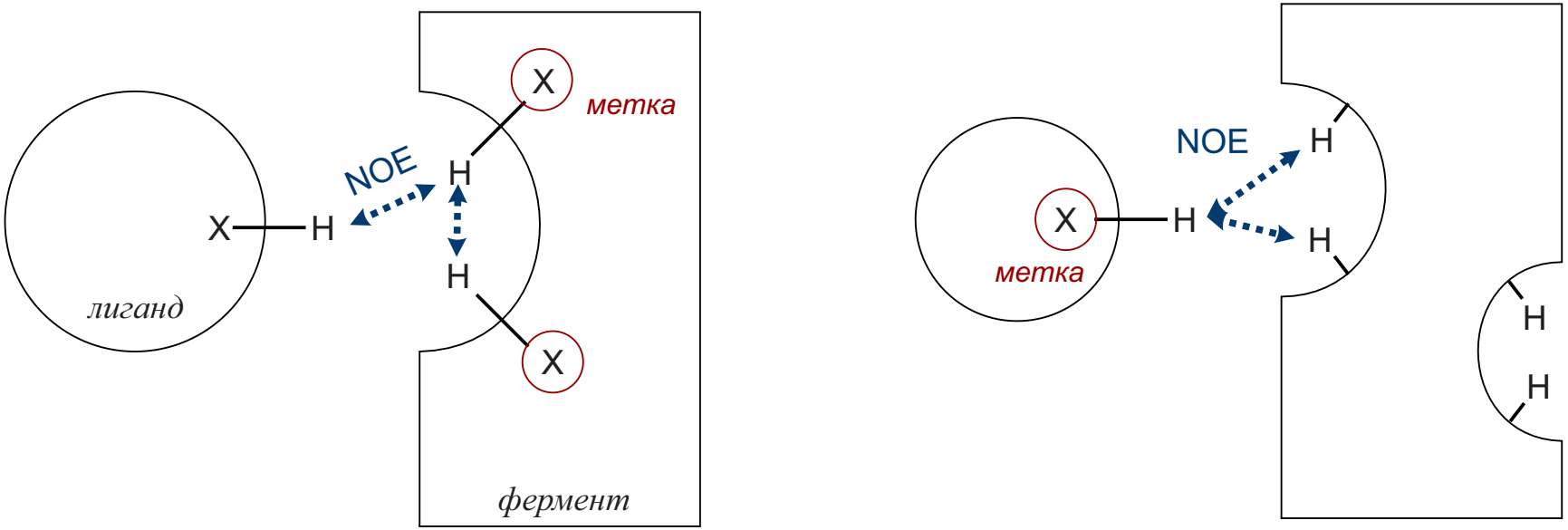
^{15}N ^{13}C	**HNCO**	настроена на прямые константы C-N (показывает протоны H-N-C, отнесение CO групп в белках)
	HNCA	настроена на прямые и геминальные константы C-N (показывает протоны H-N-Cα и H-N-C-Cα, секвенирование)
	HNCOCA	настроена селективно на прямые константы C-N и прямые C-C (показывает протоны H-N-C-Cα, секвенирование)
	HNCACO	настроена на прямые и геминальные константы C-N и прямые C-C (показывает протоны H-N-Cα-C своего и предшествующего остатков)
^{15}N	**^{15}N-edited HSQC-TOCSY**	добавление третьего измерения в H,H-корреляцию (в каждом N-стрипе - TOCSY своего остатка)
	^{15}N-edited HSQC-NOESY	добавление третьего измерения в H,H-корреляцию (в каждом N-стрипе - NOESY своего остатка)

обогащение

и другие эксперименты (вплоть до 7D) с последовательным переносом намагниченности с протонов на ядра определенного типа, и затем обратно на протоны для наблюдения

Редактирование и фильтрация по гетероядрам

2D 3D



Используется для изучения взаимодействия между субстратом и лигандом.
(X-меченый фермент, но не лиганд, можно получить биосинтетически, с помощью модифицированной *E. coli* и обогащенного сырья)

X-edited TOCSY	кросс-пики только между теми протонами из одной спиновой системы, хотя бы один из которых связан с ядром X
X-edited NOESY	кросс-пики только между теми сближенными протонами, хотя бы один из которых связан с ядром X
^{15}N-edited HSQC-TOCSY	по двум координатам - TOCSY, по третьей - ^{15}N. В каждом N-стрипе будут контакты только тех протонов, один из которых связан с этим азотом.
^{15}N-edited HSQC-NOESY	по двум координатам - NOESY, по третьей - ^{15}N. В каждом N-стрипе будут контакты только тех протонов, один из которых связан с этим азотом.

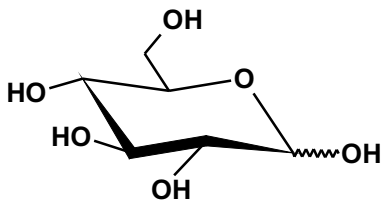
аналогично X-selected есть и X-filtered эксперименты, которые убирают из спектров, все, что связано с X

Пример структурной задачи *(дисахарид)*

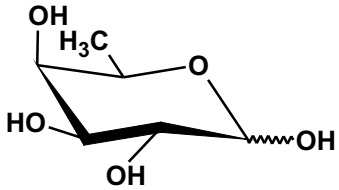
Необходимо определить способ связывания моносахаридных остатков, аномерные конфигурации и положение ацетилирования по спектрам ЯМР водного (D_2O) раствора.

Справочные данные - спектры ЯМР ^{13}C незамещенных остатков:

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α-D-Glcp	93.3	72.7	74.0	70.9	73.2	61.9
β-D-Glcp	97.1	75.4	77.0	70.9	77.2	62.1
α-D-Fucp	93.3	69.2	70.4	73.0	67.4	16.7
β-D-Fucp	97.3	72.8	74.0	72.5	71.9	16.7



D-глюкопираноза

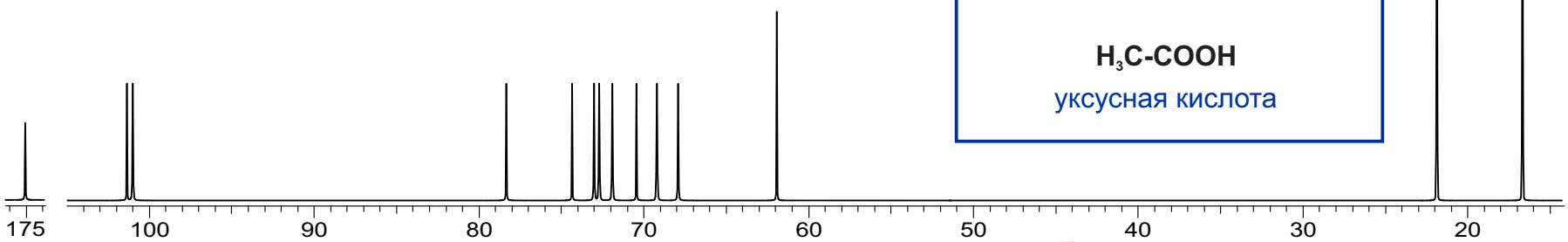


D-фукопираноза

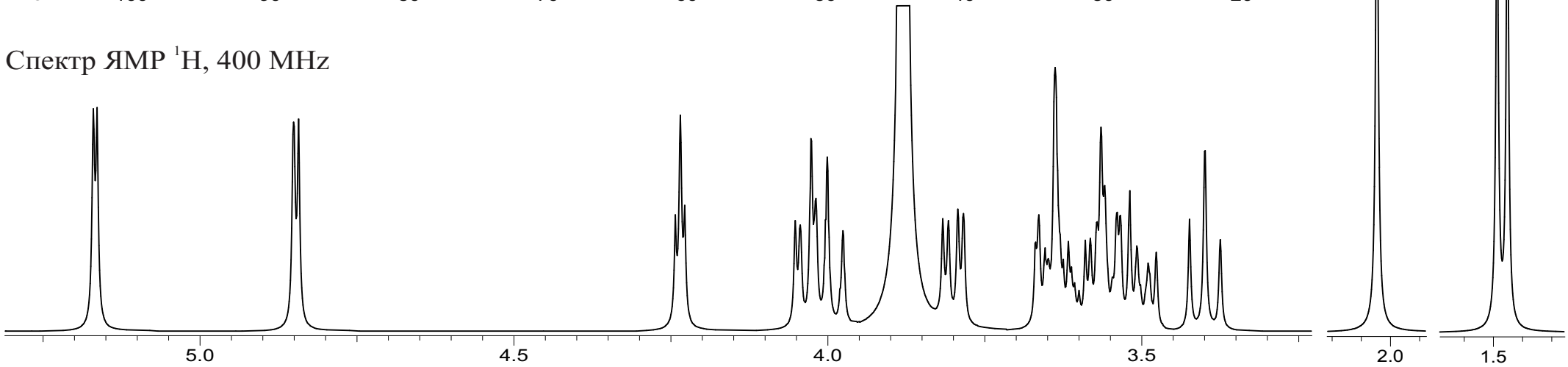
H_3C-COOH

уксусная кислота

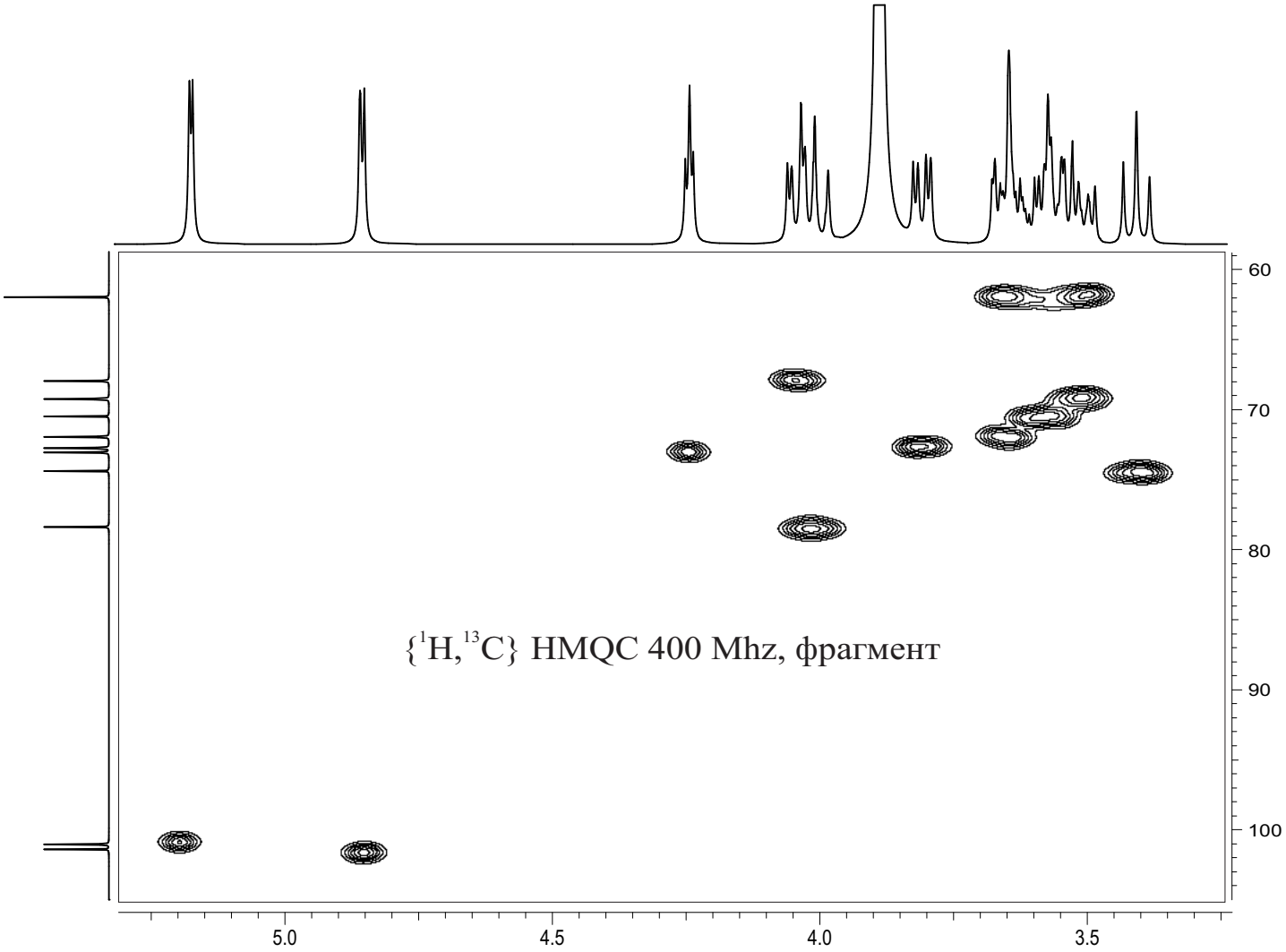
Спектр ЯМР ^{13}C, 100 MHz



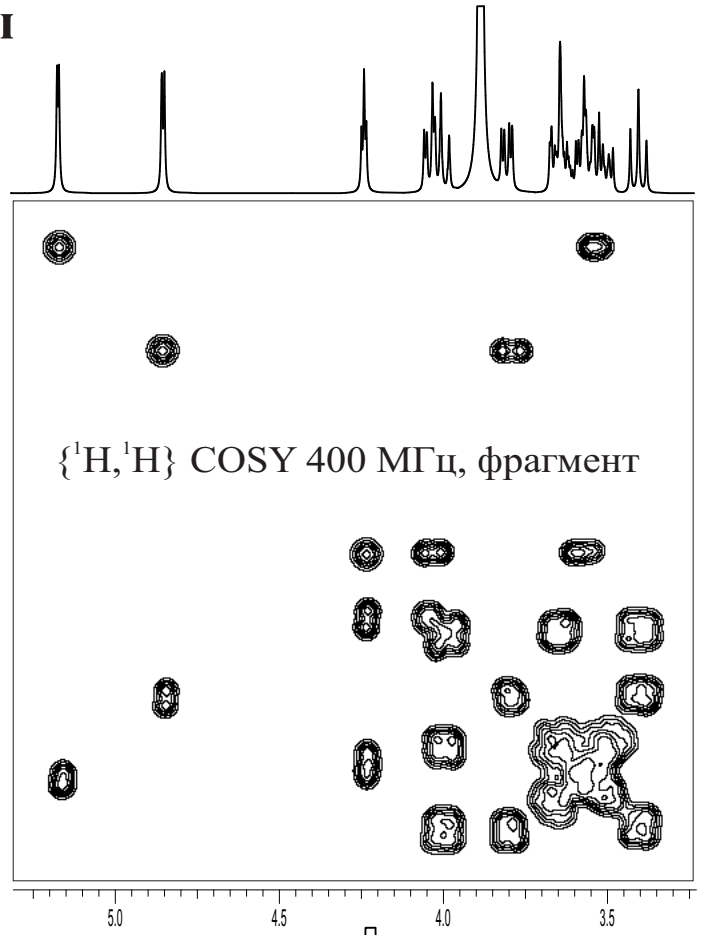
Спектр ЯМР ^{1}H, 400 MHz



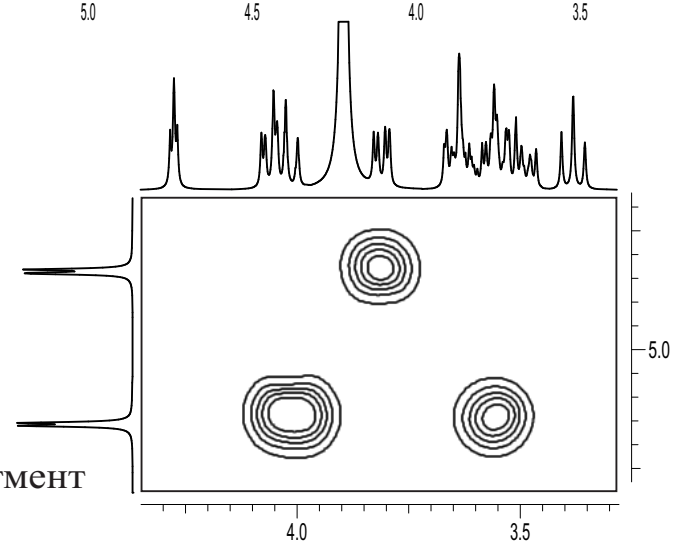
Дисахарид: двумерные спектры



{^{1}H,^{13}C} HMQC 400 Mhz, фрагмент



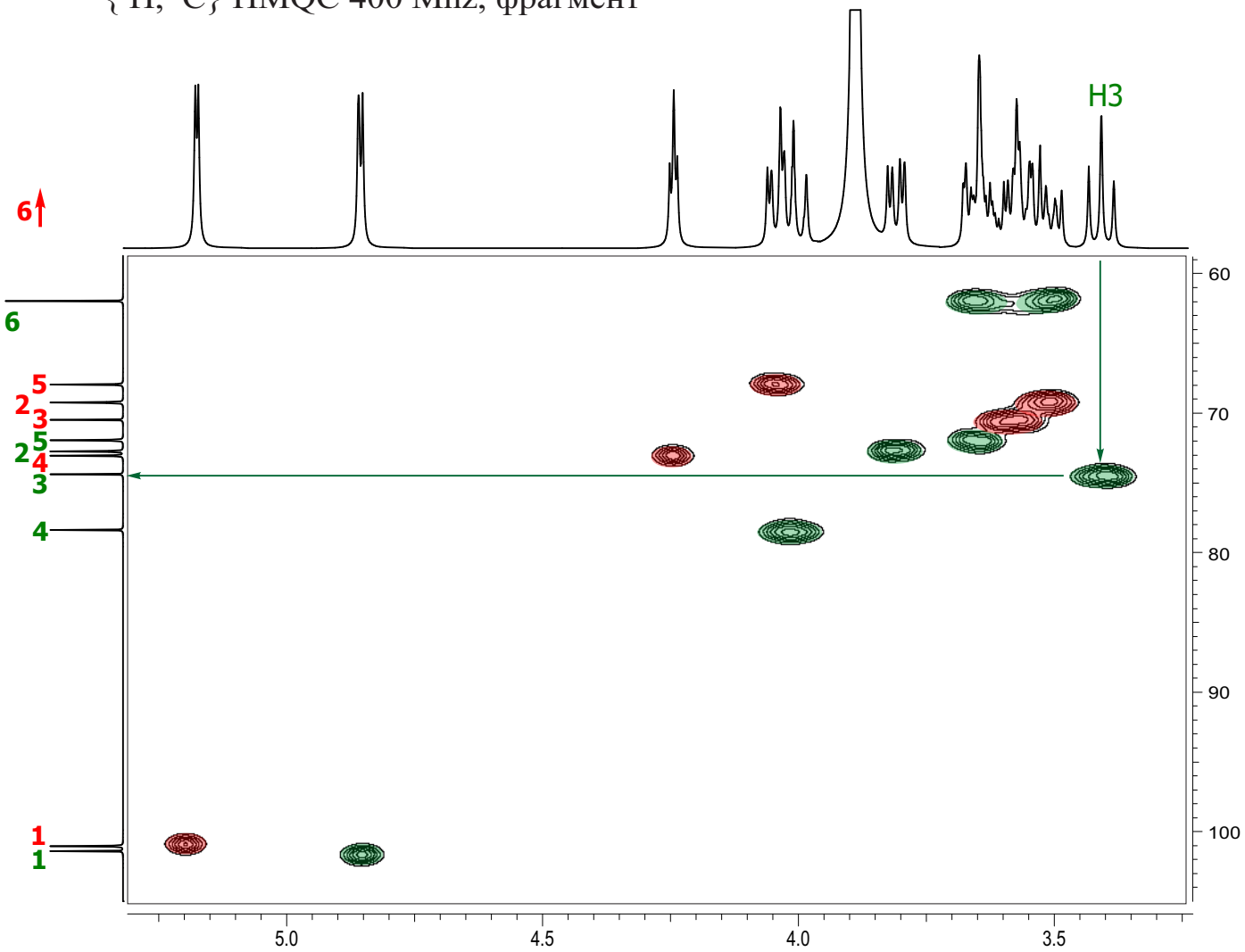
{^{1}H,^{1}H} COSY 400 МГц, фрагмент



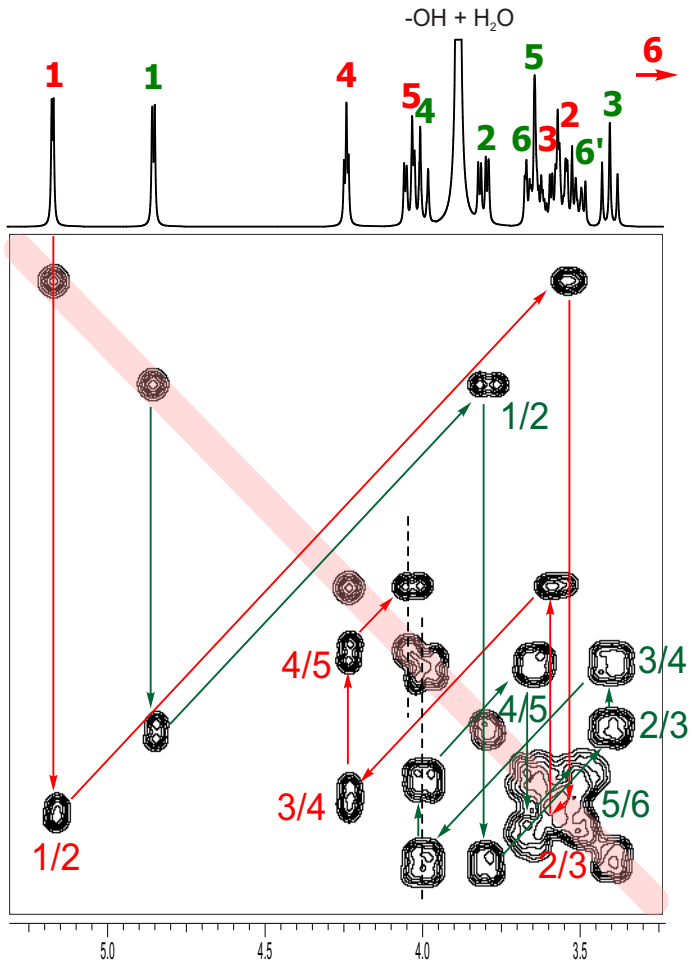
NOESY 400 МГц, фрагмент

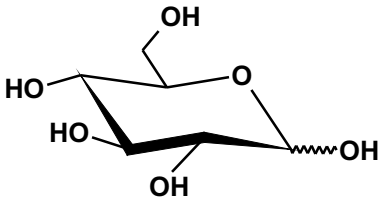
Дисахарид: отнесение спектров ^{1}H и ^{13}C

{^{1}H,^{13}C} HMQC 400 Mhz, фрагмент

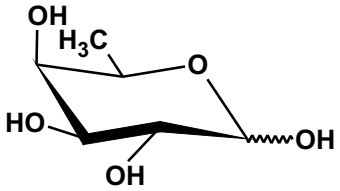


{^{1}H,^{1}H} COSY 400 МГц, фрагмент





D-глюкопираноза

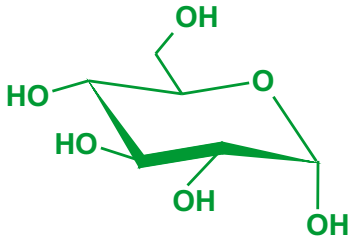


D-фукопираноза

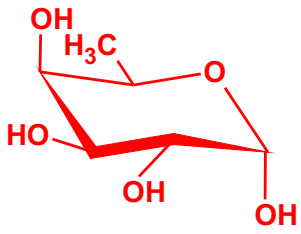
Дисахарид: выводы

Спектры ЯМР ^{13}C незамещенных остатков:

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α-D-Glc*p*	93.3	72.7	74.0	70.9	73.2	61.9
β-D-Glc*p*	97.1	75.4	77.0	70.9	77.2	62.1
α-D-Fuc*p*	93.3	69.2	70.4	73.0	67.4	16.7
β-D-Fuc*p*	97.3	72.8	74.0	72.5	71.9	16.7



α-D-глюкопираноза
(сигнал H3, δC6)



α-D-фукопираноза
(сигнал H4, δC6)

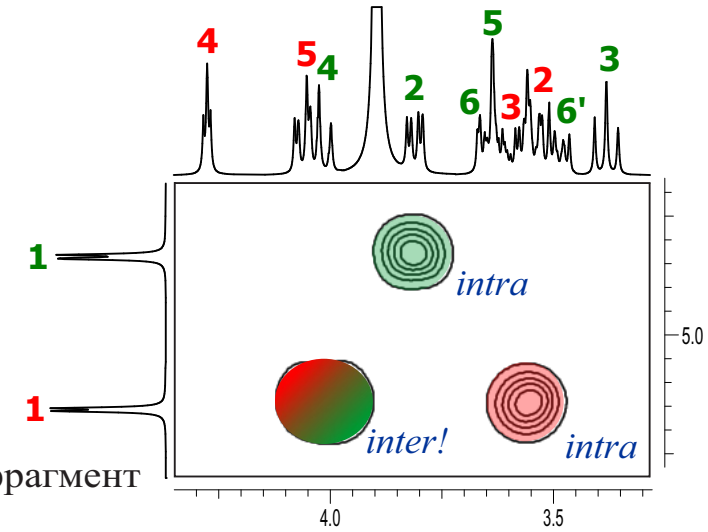
Отнесенные спектры:

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α-D-Glc*p*	101.5	73.2	74.4	78.4	72.0	62.0
α-D-Fuc*p*	101.2	69.3	70.6	73.0	68.0	16.8

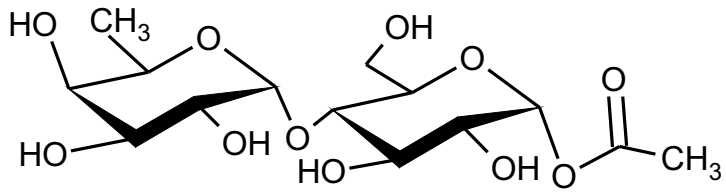
NOE: **1-2** **1-2** **1-4**

⇓

α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-D-Glc*p*-1-Ac

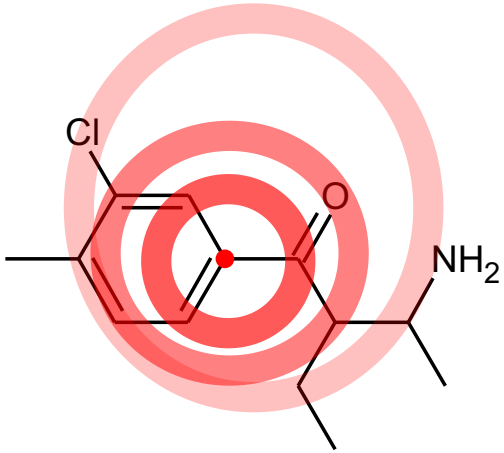


NOESY 400 МГц, фрагмент



Предсказание спектров ЯМР

эмпирическое



кодирование структуры:
3 сферы HOSE

1) ищем в базе данных фрагмент с теми же дескрипторами узлов
2) если найден, то переходим к следующей сфере, пока не кончится молекула
3) когда дальше идти некуда, берем усредненный хим. сдвиг

не нужно ничего, кроме большой базы данных,
не работает, если похожих фрагментов в базе мало

- узлами могут быть атомы, группы, остатки
- при поиске в базе структурам с той же стереохимией дается больший вес

полуэмпирическое

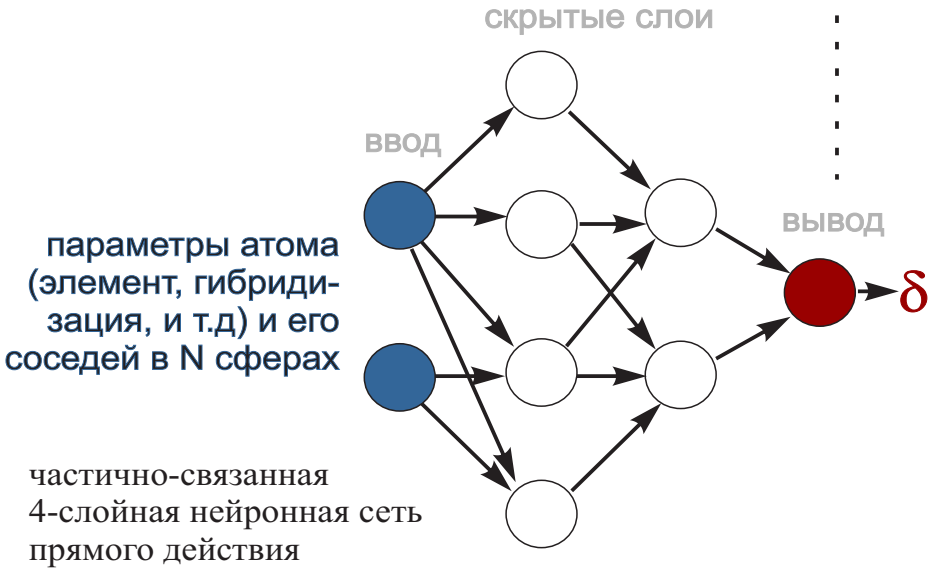
набор правил
структура↔хим. сдвиг,
параметризованный для каждого класса соединений (CHARGE, инкременты)

регрессионная модель: с помощью метода наименьших квадратов находится уравнение линейной регрессии, связывающее дескрипторы с предсказываемым значением

очень быстро,
требует мат. модель

нейронная сеть: каждый нейрон есть функция входы→выход; коэффициенты в ней и веса нейронов подбираются путем тренировки сети на модельной базе данных

универсально для любых классов,
требует обучения



частично-связанная
4-слойная нейронная сеть
прямого действия

ab initio

- ЯМР-параметры считаются квантомеханически (DFT GIAO и др.) для геометрии молекулы, полученной полуэмпирически (MM) или квантомеханически (MP2, DFT)
- силовые поля, уровни теории и базисные наборы параметризованы для больших классов соединений.

наиболее точно
сложно в параметризации,
медленно

CAST
SpecSurf
NMRShiftDB
ACDLabs
MG: MestreNova
MG: ChemOffice
HyperChem
Gaussian