

Стенограмма видеозаписи курса
«ЯМР в (био)органической химии» (Ф.В. Тоукач)

Черновик

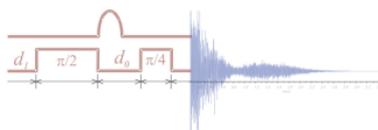
(работа идет...)

#N Так обозначены моменты смены слайдов (номер слайда см. в нижнем правом углу изображения; копия слайда находится на текущей или следующей странице). Нумерация соответствует набору слайдов 2022-го года, использованному для видеозаписи. **Синим шрифтом** обозначены слова, при произнесении которых лектор показывает соответствующий материал указкой на слайде. Не проговариваемые, но подразумеваемые слова помещены в [квадратные скобки]. Так же обозначены указания, на что именно смотреть на слайде, когда лектор применяет указку, например: «Посмотрим на **этот сигнал [3.5]**» (*обсуждается сигнал при 3.5 м.д.*). Несущественные обсуждения, диалоги со студентами, огрехи дикции и т.д. заменены на (...). Выявленные ошибки в лекциях пояснены в сносках¹.

Филипп Владимирович Тоукач

*д.х.н., профессор НИУ ВШЭ
вед.н.с., лаб. химии углеводов ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН*

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 мск)
ИОХ: к. 432 (главный корпус)
: vk.com/toukach

¹ При подготовке стенограммы обнаружено около ста неточностей, оговорок, неочевидных выводов. Если Вы заметите другие подобные «ляпы», сообщите, пожалуйста, автору (netbox@toukach.ru)

Общая информация

Занятия один раз в неделю по пятницам в к. 213 с 15:00 до 18:00 (две пары).
+еще два дня. Консультации после занятия.

Всего ~9 лекций x4, 3 семинара x2, N консультаций x2, 1 тест x3, 1 экзамен x4, 1 пересдача x1.
Слайды желательно распечатать и делать пометки прямо на них.



Вопросы можно задавать:

- во время лекции (лучше всего),
- на перерыве и на консультации (после занятия),
- в «Контакте» или по e-mail,
- по телефону (только орг. вопросы)

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»
- X. Гюнтер «Введение в спектроскопию ЯМР»
- Н.М. Сергеев «Спектроскопия ЯМР для химиков-органиков»

Контрольные мероприятия

(разрешено пользоваться любыми источниками информации, кроме общения)

Ответы на семинарах:

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

Тест (120 мин, автоматизирован):

- 40 вопросов на время, выбор **всех** 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 ^1H известной структуры 10 баллов
- установить структуру (~30 атомов) по спектрам ЯМР ^1H , DEPT-135 и брутто-формуле 40 баллов
- установить, каким образом связаны известные остатки в структуре из трех остатков, по спектрам ЯМР ^1H , 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 и максимума 200.

Пропустившие (по любой причине) тест или экзамен оцениваются на основании устной пересдачи.

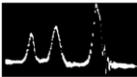
Повторно написать тест нельзя, он проводится один раз.

Пересдача для повышения оценки (беседа по всему курсу + 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		Vax, 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 (>103K)
[зависимость наблюдаемых параметров ЯМР от торсионного угла между атомами]

Ф. Тоукач: слайд 0

#0

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

Ф. Тоукач: слайд 1

Лекция 1 [NMR Lec1s.mp4](#)

#1 Что мы будем изучать в рамках этого курса? Применение ядерного магнитного резонанса в органической химии. Применяется этот метод для следующих задач (написаны **в верхней части слайда**).

Первое – самое простое – это доказательство строения синтетических соединений. Кто-то что-то синтезирует, и ему нужно доказательство, что он синтезировал именно то, что было задумано. Для этого чаще всего используется именно ЯМР. Эта задача может быть решена на трех уровнях сложности и, соответственно, трех уровнях достоверности. **Вот они кратко здесь перечислены.**

Самый простой – это *fingerprint*, т.е. сличение спектра соединения со спектральной базой данных. Обычно это делается по отношению к спектрам по ядрам ^{13}C , но можно делать и для более

распространенных спектров по протонам, т.е. по ядрам водорода. Если в базе данных уже есть такое соединение, и для него там есть спектр, и спектр полностью совпал, то почти наверняка можно утверждать, что у нас именно то соединение. Почему почти, а не вообще наверняка? Потому что в химии ни один вопрос не имеет ответа, верного со стопроцентной вероятностью. В каких-то тривиальных случаях, когда спектр очень простой, возможны ситуации, когда два разных соединения будут иметь если не одинаковые, то очень похожие спектры. Такие соединения не так часто встречаются, обычно они все-таки немного сложнее, спектр у них сложнее, и если спектр есть в базе данных, соединение можно идентифицировать. Это, естественно, не работает для новых соединений, и не работает для старых соединений, которых, тем не менее, нет в базе данных вместе с их спектрами, накопленными в тех же условиях.

Следующая задача, это когда эксперт, анализирующий спектр (или вы как химик-заказчик), делает вывод, что **спектр не противоречит структуре**. Подчеркиваю, что “не противоречит” еще не означает, что он доказывает структуру, но, как правило, этого бывает достаточно. У вас есть какие-то представления о том, что там должно быть: результаты элементного анализа, еще чего-то, соображения о пути реакции, в результате которой получилось это соединение – и если вы видите, что спектр не имеет противоречий со структурой, в большинстве случаев в рутинной работе в органической химии можно сделать условный вывод, что это то, что нужно. Если вы делаете соединение на продажу в фармацевтическую компанию, им, как правило, тоже этого достаточно. То есть они требуют спектр и отметку эксперта: “противоречит”/“не противоречит”. Если же вам нужно именно **доказать** строение, включая стереохимию всех оптически активных центров, эта задача может оказаться намного более сложной, в том числе и для ЯМР. Тем не менее, она не является нерешаемой. Просто ее решение будет стоить раз в десять дороже, чем решение задачи на уровне “спектр не противоречит структуре”. Поэтому, как правило, ограничиваются **этим** вариантом. Если у вас новые соединения, тогда уже, конечно, нужно устанавливать и доказывать. Что нас приводит к следующей задаче.

Установление строения неизвестных соединений. “Неизвестных”, в первую очередь, означает “природных”. Тут тоже два варианта. Или вы что-то синтезировали, но толком сами не знаете, что: есть предположение хотя бы на уровне класса соединения и примерной молекулярной массы, но нет четкого понимания того, куда пошла реакция, и какая получилась структура. В таком случае вам нужно установление строения соединения. Оно может оказаться новым, а может оказаться и не новым, но вы это выясните только после того, как установите его структуру. На этапе постановки задачи оно для вас новое. То же самое касается и установления строения природных соединений (именно то, где ЯМР нечем заменить). То есть у вас есть образец – как правило, его мало, но, тем не менее, для ЯМР хватает, и, применяя последовательно различные эксперименты ЯМР, вы приближаетесь к структуре. К сожалению, этот процесс не алгоритмизируется, и нельзя написать схему, по которой вы однозначно будете работать («снять такой-то спектр, посмотреть в нем то-то – если это, то снять такой спектр, а если не это, снять другой спектр»). Вариантов получается слишком много, и чаще всего работа со спектрами природных соединений похожа на складывание «пазла»: сначала вы набираете данные, смотрите на все спектры одновременно, что-то проверяете (какие-то гипотезы), и в какой-то момент картинка складывается вся сразу.

Что такое «установление строения»? Применительно к природным соединениям это, естественно, первичная структура (в первую очередь) - связность атомов, и иногда вторичная структура, т. е. какую конформацию принимают подвижные связи в первичной структуре, и как в связи с этим складывается в пространстве вся молекула. Третичной структурой тоже занимаются с помощью ЯМР, но это отдельная задача, которой мы в рамках этого курса касаться не будем.

Следующий момент – это абсолютные конфигурации. Если у вас молекула оптически активна, ее зеркальное отражение даст точно такой же спектр, как и спектр оригинала. Например, у вас был трипептид из трех L-аминокислот и, если вы его отразите в зеркале, получится такой же трипептид, только из трех D-аминокислот. Так вот, ЯМР-спектры у этих двух соединений будут абсолютно одинаковыми. Тем не менее, решение существует: нужно создать оптически активное окружение. В простейшем случае поместить этот трипептид в оптически активный растворитель, и тогда спектры будут разными, потому что две формы будут по-разному взаимодействовать с оптически активным компонентом. С растворителем это не всегда удастся сделать, и в таком случае стоит применить какую-то химическую модификацию: «повесить», к примеру, еще одну аминокислоту (про которую заведомо известно, что она – L), и тогда уже энантиомеры превращаются в диастереомеры, которые отличаются в спектре.

Следующий момент – это стехиометрия. Не путать со стереохимией. Стехиометрия – это когда у вас [есть] какой-то полимер, состоящий из повторяющихся звеньев (одинаковых), но в некоторых (не во всех) звеньях есть боковой компонент. Стехиометрия – это информация о том, как он распределен по звеньям (в сложном случае), а в простейшем случае – сколько его там. Например, 5% или 10%. Эту информацию тоже можно выявить из спектров ЯМР. Почти во всех природных соединениях есть нестехиометрические компоненты, кроме, разве что, белков. Как правило, это метилирование или ацетилирование по случайному паттерну, который, тем не менее, влияет на биологические свойства соединения. Поэтому это тоже нужно устанавливать.

Следующее – это **конформация**. Так-то она связана с вторичной структурой, но я это говорил применительно к природным соединениям. Тем не менее, конформацию можно исследовать и применительно к синтетическим соединениям. И применительно к соединениям, купленным за деньги в магазине или взятым с полки, если целью вашего исследования является именно работа с конформацией. Причем это можно делать как в статике, так и в динамике. Исследование чего-либо, в том числе конформации, в динамике с помощью ЯМР называется исследованием обменных процессов (любых): как химических, так и физических, происходящих в образце. Это можно сделать, если скорость процесса сопоставима со скоростью, с которой ЯМР воспринимает данные. Для ЯМР это приблизительно одна миллисекунда. То есть процессы, у которых характеристическое время ~ 1 мс, мы можем видеть в ЯМР и как усреднение, и как разные состояния в зависимости от того, как мы поставим эксперимент. Процессы, которые происходят быстрее, скорее всего, мы будем видеть в усредненном виде, а процессы, которые происходят медленно, мы будем видеть как суперпозицию нескольких состояний.

И, наконец, последнее – **исследование путей реакции**. Можно провести реакцию прямо в ампуле ЯМР внутри спектрометра и посмотреть, как во времени меняется спектр, что происходит, какие интермедиаты появляются и исчезают, как меняются конформации и так далее.

Плюсы и минусы [ЯМР] по сравнению с другими методами. Основной плюс – это очень высокая чувствительность к малейшим изменениям структуры. Если у вас есть молекула, в которой 124 протона, и для одного из них вы поменяли пространственное расположение, сделав его, к примеру, аксиальным вместо экваториального, спектр у вас изменится. Это значит, что даже небольшие на фоне размера молекулы изменения отражаются в спектре ЯМР. И начиная с некоторого порога сложности, который составляет буквально десяток атомов, каждое соединение имеет уникальный спектр ЯМР. А если мы говорим о наборе спектров ЯМР, то вообще любое соединение имеет разный набор спектров, включая и простейшие тривиальные случаи.

Следующий плюс – это то, что необязательно разделять компоненты смеси, можно поставить ЯМР-эксперимент прямо на смеси. Спектр смеси будет суперпозицией спектров отдельных компонентов. Причем их относительные площади будут соответствовать концентрациям этих компонентов. Это может быть применимо в случае, когда вы работаете со своими синтетическими (относительно простыми) соединениями. То есть можно снимать [=снимать спектр] смесь и сразу, не разделяя ее, независимо устанавливая структуру всех компонентов. Для природных соединений эта схема не работает, поскольку и так спектры очень сложные, не всегда их можно разобрать за разумное время, а если это еще и смесь будет, тогда задача еще более усложняется. Особенно это касается случаев, когда концентрации компонентов отличаются очень сильно. Допустим, 99% одного и только 1% другого. Тогда в суперпозиции спектров спектр того компонента, которого мало, будет плохо виден на фоне спектра того компонента, которого много. Поэтому работа со смесями все-таки, в основном, относится к первой группе задач.

Следующий плюс – это **недеструктивность**. После ЯМР-исследования можно упарить растворитель и получить обратно ваше соединение. Даже если соединение не очень ценное, ценным может быть растворитель, поскольку используются дейтерированные растворители, которые стоят денег. Сейчас это уже не настолько уже актуально (большинство лабораторий может позволить себе дейтерированные растворители), но в каких-то отдельных случаях может оказаться, что нужен какой-то специфический растворитель, который стоит много, в наличии его мало, и возможность его регенерировать – тоже фактор, который может иметь значение при выборе способа исследования в пользу ЯМР. **Вот эти миллиграммовые количества...** это еще вопрос, какой «смайл» поставить рядом, потому что хорошо это или плохо, зависит от того, с чем сравнивать. Так что это просто информация, что для простого ЯМР-исследования достаточно от 0.1 мг до 5 мг. В зависимости от того, насколько у вас хороший прибор, насколько «криворукий» оператор и от всяких случайных факторов. Для сложного исследования, которое требует съемку спектров по разным ядрам, в том числе двумерных, типичная масса образца со средней молекулярной массой – 20-30-40 мг. Можно и на 10 мг сделать, но понадобится снимать спектр дольше, или требования к оператору будут более серьезными. Если же у вас есть, к примеру, 100 мг, то можно сделать любой эксперимент, в том числе и те эксперименты, для которых обычно применяется обогащение по каким-то изотопам. Если у вас есть 100 мг, и это растворится в объеме ампулы, можно без обогащения [проводить] практически любые ЯМР эксперименты. Шкала количества вещества: я здесь говорю про миллиграммы, но при этом называю это количеством, но это в предположении, что у вас молярная масса ~100..1000 (в этом диапазоне), просто в миллиграммах обычно удобнее измерять навеску. Итак, 10 мг – стандарт, 1 мг – минимально необходимое для простого протонного эксперимента, 0.1 мг – это минимальная навеска, с которой еще хотя бы как-то можно работать. Все, что меньше [подразумевает] специальные прецизионные эксперименты, для которых требуется отдельная пробоподготовка и специальный оператор.

Следующее – это **минусы**. Минус состоит в том, что для того, чтобы получить хорошо разрешенный спектр, для которого можно сделать экспертизу в контексте молекулярной структуры, вам нужен жидкий образец. То есть он должен либо сам быть жидким, либо он должен растворяться в чем-то (как правило, естественно, [имеет место] второй случай). Ваше соединение требуется растворить в подходящем растворителе для ЯМР. А если оно ни в чем не растворяется, тогда с ЯМР есть некоторые сложности. Или вам нужно эксперимент поставить с низкой чувствительностью. Допустим, нужно чтобы вещества в образце было много, а его растворимость не позволяет сделать так, чтобы его было много. Тогда нужны какие-то ухищрения: подбор другого растворителя,

повышение температуры, еще что-то придумать, но так, чтобы, тем не менее, образец для ЯМР был жидким.

Второй минус – это невозможность автоматического анализа (я здесь написал «сложных спектров», но вообще даже и простых). То есть задача автоматического анализа простых спектров кое-как решена в частном виде для определенных классов соединений, если известны структурные ограничения. Но для произвольного соединения автоматически не удастся проанализировать даже простые спектры. Ситуация осложняется тем, что попытки это сделать очень быстро превращаются в коммерческий софт, и для того, чтобы проверить, действительно ли он может установить структуру по спектру, этот софт надо купить. Поскольку этот софт редкий, «кряков» для него не существует – это очень специфическая область, в которой софт невыгодно ломать. А цены совершенно зверские. ACD Labs [structure elucidator], наиболее известная программа для установления структуры по спектру, стоит около 100,000\$, и trial-версии нет. Поэтому, даже очень богатые лаборатории задумаются, а стоит ли пробовать, если потом окажется, что для нашего класса соединений она дает неточные предсказания. И поэтому, оказывается и для лабораторий дешевле, и для ученых понятнее обучать людей, которые способны интерпретировать спектры. Это и является целью нашего курса. Меня очень часто спрашивают, а не нужно ли еще и самому уметь снимать спектры, но я вам точно могу сказать, что вам самим это, скорее всего, не нужно. Несмотря на то, что раньше (особенно на постсоветском пространстве) у нас иногда включали людей в соавторы статьи только за то, что они сняли спектр, сейчас от этого постепенно отходят и этих людей не включают, как не включают водителей, которые возят завлаба на работу, и уборщиц, которые моют пол в лаборатории. То есть съемка спектра – это техническая работа для вспомогательного персонала, хотя она и высококвалифицированная, но это все же обслуживающая работа, не требующая квалификации [ученого] и диплома *исследователя*. Ваша же задача – научиться ставить корректную задачу для ЯМР-сервиса (для этого вспомогательного персонала) и оценивать то, что они сделали.

Здесь кратко [перечислено], что мы будем изучать, но я думаю, что и так видно, что написано, в зачитывании особого смысла нет. Это краткая разбивка нашего курса по темам. На сайте курса каждая из этих тем снабжена подробностями, а именно подтемами с номерами слайдов. Номера слайдов **вот здесь** внизу указаны. Вам во время лекций они не нужны, но в ваших материалах вы можете пользоваться этими номерами для того, чтобы быстро сделать reference: “А вот там у вас на слайде 36 написано что-то, что противоречит слайду 73” и так далее.

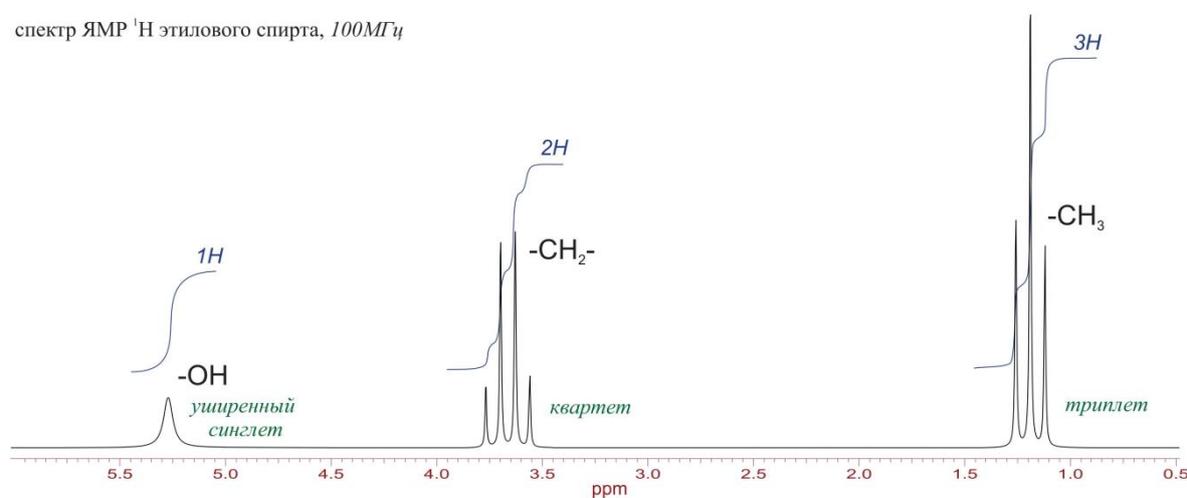
#2 Теперь посмотрим на самый **простой спектр**. Я решил начать не с теоретических основ и общих правил, а с примера. Это одномерный протонный спектр этанола. Что значит одномерный? Это значит, что у нас одна ось по горизонтали и другая ось – интенсивность сигнала – по вертикали. То есть, по сути, это график функции одной переменной. Что за единицы здесь, я потом расскажу. Теперь, что значит протонный? Протоны – это ядра водорода, поскольку ядерный магнитный резонанс имеет дело с ядрами, ядра водорода все называют протонами (по имени ядер, а не атомов). **Вот это обозначение** («протонный спектр»), означает, что мы видим различные протоны, присутствующие в этой молекуле. Существуют спектры и по другим ядрам, которые дают информацию о химических и конформационных различиях других ядер [здесь, = атомов]. Но мы начинаем с самого простого. Протонные спектры легче всего снимать, они для заказчика стоят дешевле всего, и в силу того, что так сложились природные явления, они весьма просты для интерпретации, потому что протонные спектры предоставляют исследователю тонкое расщепление линий сигнала, которое тоже является информацией о структурном окружении. **В этом спектре** можно выделить следующие характеристики. Во-первых, **мы видим некие «всплески»** над базовой линией – они называются сигналами. Каждый сигнал соответствует какому-то одному типу атомов в

молекуле, поскольку спектр протонный - одному типу протонов. В молекуле этанола три типа протонов: **такой, такой и такой**. Почему эти два протона – это один тип и, следовательно, один сигнал? Потому, что существует вращение вокруг одинарных связей в этаноле (вокруг С-С связей), и в результате этого вращения **протоны в рамках метиленовой группы** (так же, как и протоны в рамках метильной группы) переходят друг в друга. Причем делают это при комнатной температуре достаточно быстро - быстрее, чем ЯМР успевает фиксировать. Поэтому ЯМР увидит не три отдельных протона в метильной группе, а **один сигнал**, который будет означать метильные протоны. Итак, количество сигналов в спектре – это количество (...) эквивалентных атомов. Эквивалентность бывает разная, но мы к этому еще вернемся позже.

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 ^1H этилового спирта, 100МГц



Следующий фактор – это положение сигналов, обозначено красным, а здесь красным нарисована шкала. Одни сигналы [расположены] правее, другие – левее. (...) Эта величина [на шкале] называется «химический сдвиг». Почему химический и почему сдвиг, вы увидите на следующем слайде или через один [слайд]. А пока что для вас важно то, что сигналы появляются в спектре, и место, в котором они появляются, коррелирует с распределением электронной плотности по молекуле. Наиболее общее правило состоит в том, что чем беднее электронами атом, тем он оказывается левее (если с вашей стороны смотреть) - его химический сдвиг больше. Химический сдвиг отсчитывается от некоего условного стандарта, о котором мы поговорим позже, и в спектрах шкала традиционно записывается справа налево. То есть с левой стороны – это бедный электронами атом с большим химическим сдвигом. Существуют огромные справочники, а также программы, которые могут предсказывать химические сдвиги атомов в разном химическом окружении. Это предсказание приблизительно, но какие-то характерные закономерности, тем не менее, можно выявить (они тоже через пару слайдов будут). Пока что основной вывод – положение сигнала коррелирует с распределением электронной плотности.

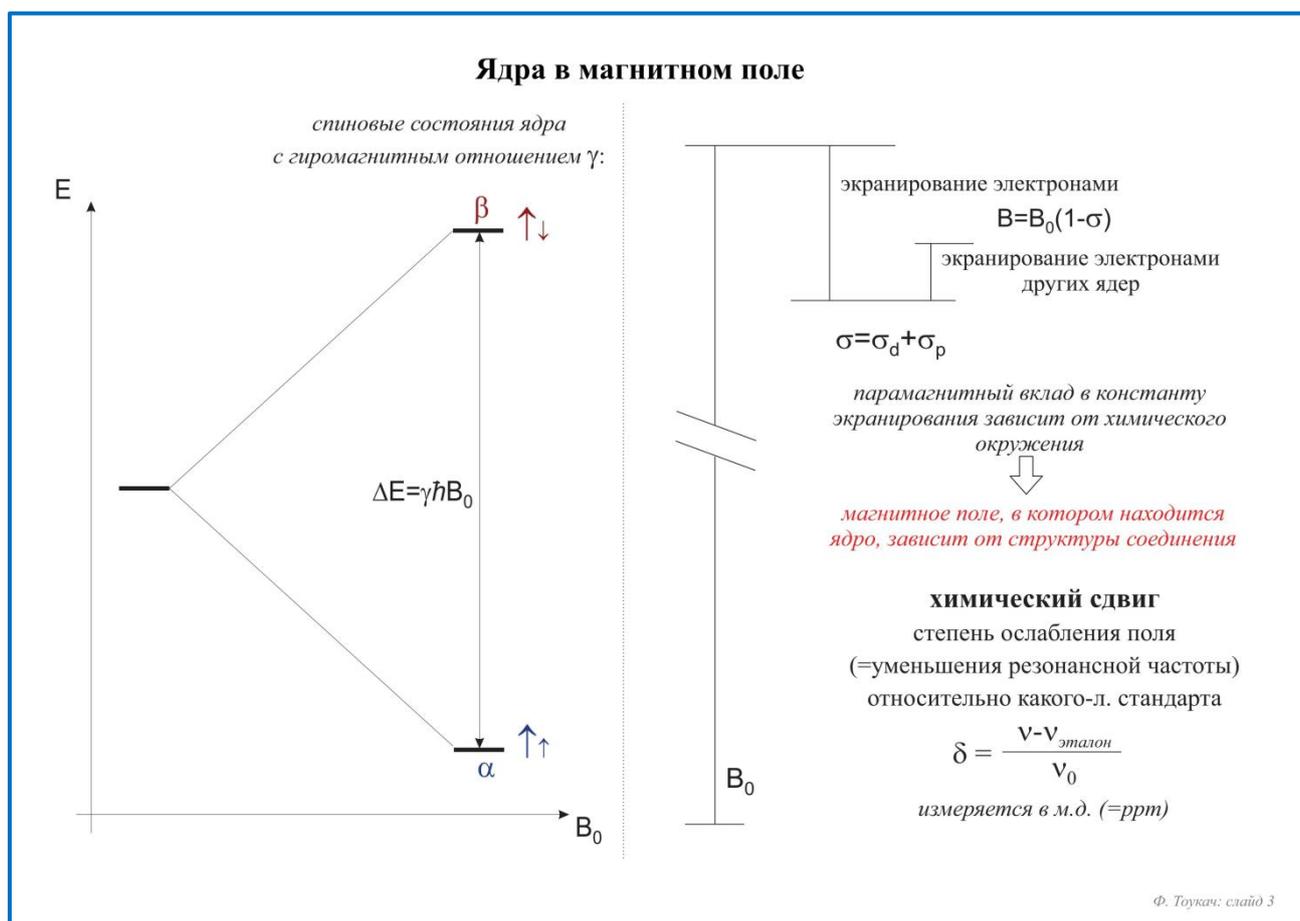
Следующее – это **форма сигнала**. Различные атомы, находясь в молекуле не очень далеко друг от друга, [взаимодействуют]. Причем, когда я говорю «далеко», я имею в виду не расстояние в пространстве по прямой, а количество связей, которые нужно преодолеть, чтобы перейти от одного атома к другому. Такие [атомы] мы будем называть близкорасположенными. Если атомы располагаются в пределах трех или четырех связей, они друг на друга влияют, и это влияние выражается в спектрах в виде различной формы линии. Примеры: одна линия – синглет, четыре линии с определенным соотношением интенсивности – квартет. Здесь зеленым [подписана] форма сигнала. Сигнал из трех линий называется триплет (**вот такой сигнал**), и так далее. Их много видов существует; вы научитесь их через некоторое время предсказывать в зависимости от химического окружения (какую форму будет иметь сигнал), и решать обратную задачу – по форме сигнала выявлять химическое окружение атома, который дал этот сигнал. И в отличие от приблизительного параметра «химический сдвиг», который варьируется от очень многих факторов и не подлежит точному предсказанию, форму линии можно предсказать абсолютно точно. Поэтому если вы ожидаете, к примеру, для какой-то группы атомов квартет, а в спектре вместо этого видите, к примеру, триплет, это значит, что ваше представление о структуре неверно (или о связи структуры со спектром) – и нужно думать дальше.

И наконец, четвертый параметр одномерных спектров, коррелирующих со структурой, это **площадь сигналов**. Здесь синие «кривульки» нарисованы, это кривая, которая получится, если спектр проинтегрировать и в каких-то точках сделать сброс кривой на ноль. **Отсюда досюда** – это относительная величина, показывающая площадь под кривой. (У вас же, несмотря на то, что ВУЗ химический, наверное, «матан» на этом уровне был, я правильно понимаю? Я могу пользоваться интегралами, производными, вы знаете, что это такое?.. Прекрасно.) Раньше, когда не было автоматических интеграторов, и спектрометр был оборудован различными механическими устройствами, рисующими спектры, управляющими усилителями и так далее, а не компьютерами как сейчас, спектр рисовали на бумаге, а потом ножницами вырезали сигналы и взвешивали их. Это было по сути то же самое интегрирование. Но теперь у нас есть кривые. Так вот, эти кривые соответствуют числу атомов, давших сигнал, причем не абсолютному, а именно относительному. Например, **такой протон** в этаноле один, **таких** два, а **таких** три. Соответственно, как 1:2:3 соотносятся и площади этих сигналов. Площадь сигнала может иметь абсолютное значение. Если предположить, что у нас в образце есть еще одно вещество, и его количество точно такое же, как количество этанола, площади сигналов того вещества можно сравнивать с площадями сигналов этанола. Если же его количество другое, но оно нам известно, можно нормировать по количеству вещества. А это значит, что, сравнивая площади сигналов, мы можем узнать, насколько вещество чистое или грязное. Допустим, **здесь** появляется сигнал примеси какой-то, которая нам не нужна. Мы знаем, что там, к примеру, один протон должен быть в этом сигнале (формула примеси нам известна), тогда мы сравниваем площадь примесного сигнала с площадью другого сигнала, в котором тоже один протон, и на основании этого делаем вывод о мольной доле примеси в образце.

Итак, четыре характеристики одномерного спектра. Теперь, когда вы самую общую информацию об одномерном спектре знаете, мы эти характеристики постепенно рассмотрим более подробно. А именно: откуда они берутся, почему они получаются такие, а не другие, как из них извлечь структурную формулу.

#3 Начнем с химического сдвига, то есть с положения сигнала по горизонтали в одномерном спектре. Этот график показывает, что происходит с ядрами в магнитном поле. Каждое ядро имеет несколько характеристик (квантовых чисел), одна из которых – это его спин. Как и у электрона, у ядра тоже есть спиновое квантовое число, и применительно к протонам (мы пока все на примере

протонов рассматриваем) это число равно $\frac{1}{2}$, что означает, что ядро может находиться в двух состояниях, которые условно обозначаются α и β (можно их обозначать, естественно, как угодно). Энергии этих спиновых состояний ядер практически одинаковы, но лишь до тех пор, пока не возникает внешнее воздействие в виде магнитного поля. Это связано с тем, что спин (ядра) создает собственный магнитный момент ядра. Магнитный момент – это вектор в пространстве, который имеет какое-то скалярное значение и какое-то направление. Так вот получается, что если собственный магнитный момент ядра сонаправлен с направлением внешнего магнитного поля, это выгодно, то есть энергия этого состояния меньше. А если он противоположен, это невыгодно, то есть энергия этого состояния больше. (Поскольку я вашего background не знаю, снова спрошу: у вас квантовая механика в самом базовом варианте присутствовала? Связь энергии с частотой, что такое спин и т.д.?.. ОК). У меня здесь все тоже очень просто, но если что-то окажется непонятным, не стесняйтесь поднять руку и спросить. Хотя на какие-то вопросы у меня ответов не будет, поэтому каким-то выкладкам придется просто поверить, чтобы не грузить себя сложной математикой. Но то, что можно объяснить просто на пальцах, я объясню. Итак, когда мы поместили ядро, имеющее ненулевой спин, в магнитное поле, его спиновые состояния приобрели разницу в энергии. То есть одно стало **выгодным (низкоэнергетическим)**, другое – **невыгодным (высокоэнергетическим)**. И сразу подчеркиваю, что это ядро, имеющее спин. Не все ядра имеют спин. У некоторых ядер это квантовое число равно нулю, таких примерно половина. Этих ядер для ЯМР как бы не существует. Нам повезло, что самое распространенное в органической химии ядро - протон - имеет спин, как раз очень удобный для ЯМР, равный $\frac{1}{2}$. Из чего следует, что оно будет находиться в двух состояниях, которые будут иметь разную энергию. Чем больше **напряженность внешнего магнитного поля**, тем больше разница в энергии между спиновыми состояниями ядер.



Вот формула для этой разницы в энергии. Здесь три составляющих. Начнем с конца: B_0 – это напряженность внешнего магнитного поля. Чем она больше, тем больше разница в энергии, и тем

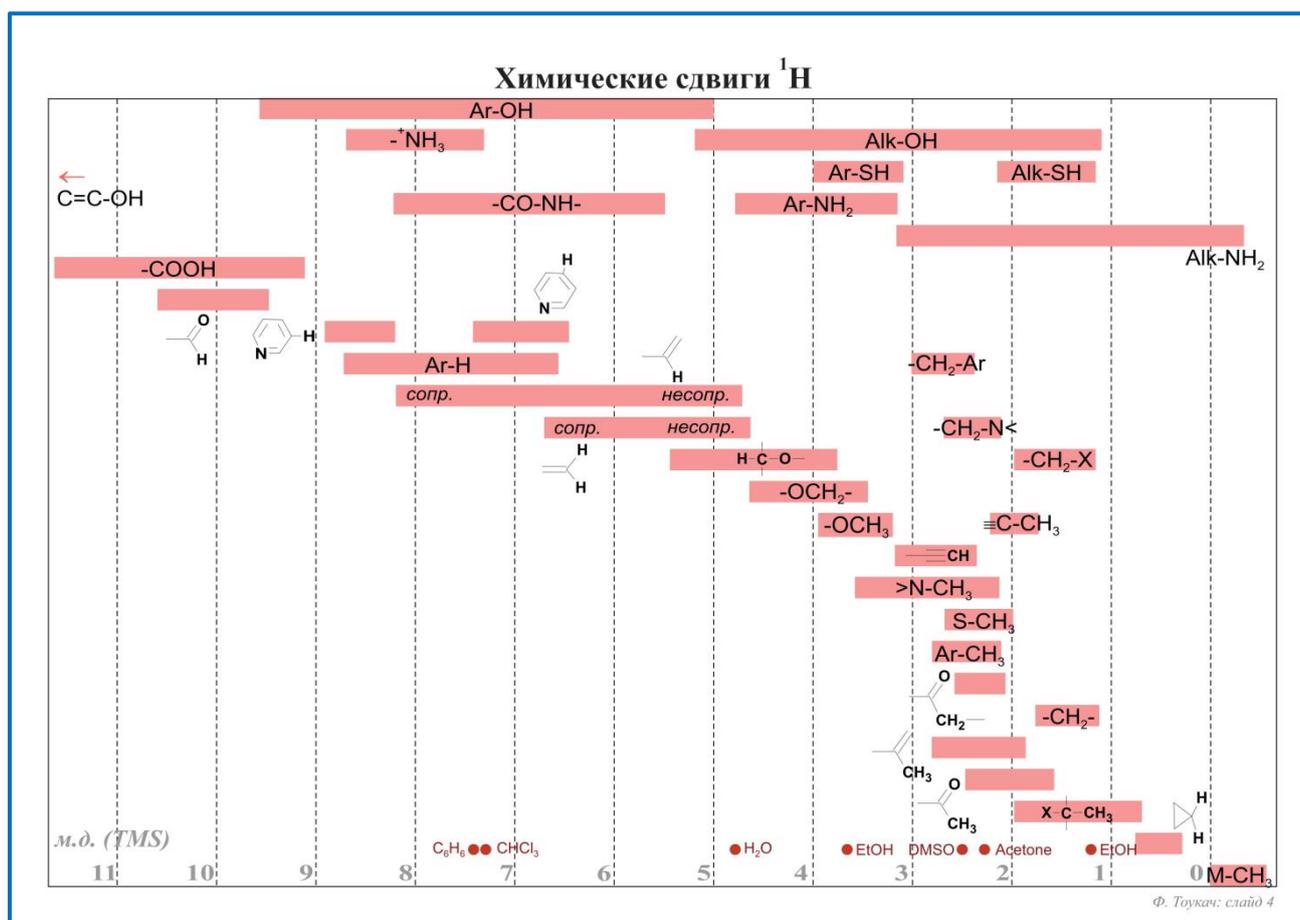
легче поймать явление ЯМР. Поэтому производители спектрометров стремятся сделать внешнее магнитное поле, которое окружает образец, как можно больше, но при этом оно еще должно быть стабильно, поэтому это обходится достаточно дорого. Нынешние спектрометры имеют поля ~20 Тл.² Не знаю, есть ли у вас, с чем сравнивать; потом, когда будем об аппаратуре спектрометров говорить, мы еще вернемся к величинам магнитных полей. Пока что вам нужно знать, что чем больше, тем лучше. Второе – это постоянная Планка. А вот это γ – это гиромагнитное отношение – некая константа, которая описывает природу ядра, то насколько сильно расходятся [по энергии] его спиновые состояния в одном и том же внешнем магнитном поле. Чем оно больше, тем это ядро лучше подходит для ЯМР. Называется «гиромагнитное отношение», оно у нас будет несколько раз в разном контексте в пределах курса всплывать. Эти стрелочки как раз и означают то, что я сказал: красные – высокоэнергетическое состояние, где внешнее магнитное поле (большая стрелка) и собственное магнитное поле ядра направлены в противоположную сторону. Одна стрелочка в два раза больше другой, но это для наглядности, на самом деле она в миллионы раз больше. Итак, чем это хорошо (то, что два спиновых состояния имеют разную энергию)? Всегда, когда есть энергетический зазор, можно подобрать какую-то частоту. Как вы, наверное, знаете, частота соответствует энергии с точностью до постоянной Планка. И если есть какая-то разница в энергиях, можно подобрать соответствующую ей частоту и, облучая образец этой частотой (электромагнитным полем с этой частотой), получить поглощение или последующее выделение энергии в виде [излучения] этой частоты. Но если бы все ограничивалось только этим, мы в спектрах всегда имели бы один сигнал. Мы поместили образец в магнитное поле, возникла эта разница в энергиях, далее мы обучаем разными частотами, и в какой-то момент происходит резонансное поглощение. Что такое резонанс? Это совпадение чего-то с чем-то³. В данном случае совпадение частоты, которой мы облучаем наш образец, и вот этой энергетической разницы, обусловленной внешним магнитным полем. Но, оказалось, что не только внешнее магнитное поле влияет на магнитное поле, в котором окажется ядро. [Локальное] магнитное поле, в котором находится ядро, следовательно, и энергетическая разница, и его резонансная частота, а, следовательно, и положение сигнала на шкале частот зависят от химического окружения ядра.

Эта зависимость выражается следующим образом. У нее три компонента. Это – ноль, это внешнее магнитное поле. Здесь разрыв сделан, потому что нужно где-то на миллион умножить (это очень большая величина по сравнению с остальными [величинами] на этом слайде). Следующий фактор – внешнее магнитное поле ослабляется электронами, находящимися вокруг ядра. У одного и того же ядра электронная картина обычно одна и та же, поэтому, если мы говорим о протонах, этот фактор тоже всегда одинаковый. Нам интереснее всего третий фактор – (экранирование ядра) или дезэкранирование, то есть влияние на экранирование электронами других ядер. А вот оно уже зависит от того, сколько этих других ядер, какие они, как они расположены относительно ядра, про сигнал которого мы говорим, и так далее. Фактически это влияние – это влияние химического окружения. Именно оно называется “химический сдвиг”. Химический, потому что зависит от химического окружения, а сдвиг – это сдвиг вот этой величины [отсчитываемый] от рабочего поля спектрометра. Когда я говорю «поле», можно, имея в виду то же самое, говорить «частота». Допустим, частота 300 МГц по протонам. Это значит, что в том поле, которое способен создать спектрометр ЯМР, энергетические состояния протонов расходятся настолько, что резонансная частота составляет примерно 300 МГц. Но у разных протонов в молекуле [она] немножко разная,

² 20 Тл (~860 МГц по ¹H) – одни из лучших. Промышленно производятся спектрометры с полями 1.5..23 Тл, из них массово – 9..14 Тл.

³ появление или непропорциональное усиление явления в следствие совпадения неких характеристик

потому что они в разном химическом окружении. Так вот, отличие этой частоты от 300 МГц и называется “химический сдвиг”⁴. Причём это величина сделана относительной, вот такой. Химический сдвиг обозначается всегда буквой δ , по крайней мере, в англоязычной литературе. Вот абсолютная частота сигнала, из нее мы вычитаем абсолютную частоту какого-то эталона, выбранного определенным образом (для протонов сигнал тетраметилсилана за ноль берется), и делим все это на рабочую частоту спектрометра, то есть на те самые 300 МГц. Этот член внизу, рабочая частота, нужен для того, чтобы химические сдвиги получались одинаковыми вне зависимости от того, спектрометр с какой частотой мы используем для регистрации спектров. То есть для одной и той же молекулы этанола химический сдвиг этого сигнала [метиленовой группы] - 3.6. Измеряется он в миллионных долях, это означает 3.6 м.д. от рабочей частоты спектрометра. То есть шкала химических сдвигов – это частотная шкала, но измеряется она не в герцах, хотя это тоже можно делать, а в относительных единицах (безразмерных), чтобы не зависеть от рабочей частоты спектрометра. Подытоживая, химический сдвиг – это степень ослабления поля, что то же самое, что уменьшение резонансной частоты относительно какого-то заранее выбранного стандарта. И он для нас важен, потому что он зависит от химического окружения ядра.



#4 Сейчас - первый из тех слайдов, которые вы видели в рамках этого курса, который имеет справочный характер. Ими можно пользоваться не только во время лекций (можно и нужно). С одной стороны, ту же самую информацию можно найти в учебниках, в интернете и в справочниках, но таких слайдов будет несколько, и здесь у нас [все] собрано в рамках одного документа или одной веб-страницы, поэтому рекомендую пользоваться этим [материалом]. Это - приблизительные диапазоны химических сдвигов, характерных для разных функциональных групп и протонов в разном окружении. Каждая из этих «молекул» – не молекула, а структурный фрагмент. Если бы это

⁴ в данном случае – абсолютный химический сдвиг

была конкретная молекула, химический сдвиг (этого протона) имел бы конкретное значение, то есть точку [, а не диапазон]. Такие **здесь тоже есть внизу** – это химические сдвиги распространенных растворителей. Они обозначены точками, потому что речь идет о конкретных молекулах. Для некоторых из них точек больше одной – я надеюсь, вы уже, имея в виду первый слайд, понимаете, почему – потому что в них больше одного типа протонов. А у структурных фрагментов (**здесь, здесь, здесь и так далее**) могут быть разные заместители, и поэтому мы видим диапазон химических сдвигов – красную полосу «от и до». **Вот шкала от 0 до 11**. Некоторые из них оказались меньше нуля. Когда выбирали стандарт в ЯМР, никто не снимал металлоорганику, и не знали, что некоторые химические сдвиги окажутся меньше этого стандарта, подумали, что все будут больше. А потом стандарт менять уже не стали, поэтому сейчас протонные химические сдвиги лежат в диапазоне -2..20 м.д. (приблизительно). Самые кислые протоны - это где-то ~20 м.д., а самые, наоборот, электронобогатые – меньше нуля. Когда я говорю «кислые протоны», может оказаться даже так, что этот кислый протон не в самой молекуле, а уже оторвался. К примеру, карбоксильный протон - кислота диссоциирует, и протон локализован не на молекуле вещества, а [находится] где-то в растворе в виде голого ядра. Тем не менее, мы его сигнал тоже видим, но он будет очень сильно слева. Вот этот случай: енол и «левый край» кислоты. Они находятся **где-то здесь**, то есть за пределами этого слайда. Поскольку [такие] случаи редки, я решил основное внимание **этой** области уделить. Что касается кислоты, то чем в большей степени протон диссоциирован (чем он кислее), тем он окажется левее, то есть будет иметь больший химический сдвиг.

Какие основные закономерности стоит запомнить (потому что при анализе спектров желательно, чтобы вы сразу видели несоответствия)? Допустим, есть у нас ароматический протон, он должен быть где-то от 6.5 до 9 в зависимости от заместителей. И если ваше предположение о структуре таково, что ароматический протон дает сигнал в другом месте, это повод задуматься и сделать вывод, что, наверное, вы что-то не угадали на предыдущем шаге и структура не та. Но в отдельных редких случаях бывают аномальные химические сдвиги. Если вы видите аномальный химический сдвиг, а все остальное складывается (к примеру, весь спектр хорошо соотносится со структурой, но вот ароматический протон оказался вот здесь, допустим, на 4.5), недостаточно просто сказать, что «ну значит это аномалия!» - надо понять, откуда она взялась. Это не только на экзамене, но и в любой статье, которую вы будете готовить с использованием данных ЯМР. То есть любые аномалии должны быть объяснены. А то, что попадает в красные области – это не аномалии. Вы начнете работать, будете постоянно сверяться с этим слайдом (или с каким-то аналогичным) и постепенно запомните. Пока что для вас самое главное, что чем больше протонов при атоме углерода, тем у этих протонов химический сдвиг меньше. Дефицит протонов сдвигает [сигнал] влево, электроотрицательные соседи сдвигают влево, что вполне понятно – они «вытаскивают» электронную плотность протона на себя, на протоне остается меньше, экранирование уменьшается, химический сдвиг увеличивается. То есть протоны при кислороде, азоте и т.д. будут где-то слева, а протоны при углероде будут где-то справа. Дальше **двойные связи**, двойные и тройные. Чем они ближе к протону, тем больше его химический сдвиг. То есть, протон при двойной связи находится левее (...), чем аналогичный протон при одинарной связи. Ну и наконец, **ароматика**. Ароматика сдвигает влево, это много кратных связей рядом, двойных или полуторных.

Это очень приблизительное рассуждение. Иногда может оказаться, что пространственная структура молекулы очень сильно влияет на экранирование или дезэкранирование, и протон, который оказался между двумя бензольными кольцами, будет иметь из-за этого аномальный химический сдвиг. Но пока что для вас достаточно этих диапазонов. Естественно, это все приблизительно. То есть если вы ожидаете, что протон попадает, **к примеру, вот в эту область**

(сопряженные или несопряженные при двойной связи), а он оказался [вот здесь](#), не нужно считать с точностью до сотых [= 1/100 м.д.] химические сдвиги, чтобы проверить, попадает он в эту красную полосу или нет. Более того, химические сдвиги в протонных спектрах зависят от очень многих факторов, и влияние заместителей зачастую нельзя предсказать точно. То есть 3.6 и 3.7 это, по сути, одно и то же. Один и тот же структурный фрагмент в зависимости от каких-то дальних заместителей в молекуле может иметь расхождение в несколько десятых. Поэтому если вы предсказываете химический сдвиг, например, в программе, и он не соответствует тому, что вы видите, на одну десятую, это не показатель. Это значит, что он более или менее соответствует. То есть химический сдвиг параметр приблизительный. Далее, вы предсказываете в уме или с помощью программы последовательность, в которой расположены сигналы, и между ними разница в одну десятую. Фактически это означает, что вы ничего не предсказали, потому что они могут поменяться [местами] в зависимости от очень малозначимых со структурной точки зрения факторов. Но вот если у вас разница в две целых [м.д.], это уже разница, статистически значимая для [химических сдвигов] протонов.

Теперь, как вам еще могут эти точки понадобиться? Когда у вас шкала проставлена под спектром, это произошло потому, что оператор откалибровал спектр, то есть нашел сигнал с известным хим. сдвигом, приписал ему этот хим. сдвиг, и все остальные хим. сдвиги (остальных сигналов) выставились правильно. Как правило, это или стандарт, или молекулы растворителя. Стандарт – это чуть дороже, и не все [кто готовит пробы] вспоминают, что его имеет смысл добавить в образец, поэтому очень часто – по хим. сдвигам растворителя. И вы, наверное, так же будете [делать]. Прежде, чем начать анализировать спектр, хорошо бы найти сигнал растворителя и исключить его из дальнейшего рассмотрения, чтобы он не мешал вам анализировать структуру соединения. Для этого надо знать, где он находится. Вот самые распространенные растворители, и где находятся их сигналы. В случае с водой тут плюс-минус две целых как раз, потому что вода может образовывать водородные связи с соединением, какие-то сольваты, и кроме этого, ее химический сдвиг еще и зависит от температуры – примерно 0.1 ppm / 10°C. Поэтому вода «плавает»⁵, и вода в смеси с хлороформом и вода в смеси с этанолом дает сигналы в совершенно разных местах. [Вот это, по-моему, чистая вода](#). То есть к воде нужно осторожно относиться (к ее хим. сдвигу), потому что [он] очень сильно варьируется.

#5 Теперь попробуем чуть вознестись над одномерными протонными спектрами и посмотреть на другие ядра. Протоны – это не единственные ядра, которые видны в спектрах ЯМР, что открывает некоторые дополнительные возможности. Это справочная таблица тоже вам может понадобиться при ответах на какие-то вопросы. Например, в соединении есть фтор, вы хотите знать, можно ли это как-то использовать в ЯМР. Вы открываете эту таблицу и видите, что как минимум фтор в ней есть. Это значит, что у него ненулевой спин. То есть можно снимать спектры по фтору, (во-первых), во-вторых, атомы фтора будут влиять на форму линии [сигналов] других атомов, в том числе протонов – в протонном спектре вы будете видеть влияние фтора не только через химический сдвиг и электроотрицательность, а и напрямую на форму линии протонных сигналов. [Здесь перечислены](#) самые востребованные в органической химии магнитно-активные ядра. Магнитно-активные – то есть их спин не равен нулю. [Спин указан вот здесь](#). Самые удобные – это ядра со спином 1/2, а ядра, спин которых больше 1/2 (они еще «квадрупольными» называются, [здесь они синим показаны](#)) обладают рядом недостатков. Во-первых, они очень сильно «щепят» другие сигналы, потому что множество энергетических состояний, много вариантов энергетических переходов получается. Во-вторых, они [часто бывает] быстро релаксируют. Что значит «релаксируют»? Возвращаются к исходному

⁵ = сигнал воды меняет положение

состоянию после облучения радиочастотой. А что происходит, когда они быстро релаксируют? Это значит – есть высокая определенность по времени, то есть возбужденное состояние ядра существует короткое время. А время связано с частотой через принцип неопределенности (я потом подробнее поясню). Частота связана через постоянную Планка с энергией, а энергия и время – это два параметра, произведение неопределенностей по которым примерно равно постоянной Планка⁶. Это из Гейзенберга следует - нельзя *быстро* и [при этом] *точно* померить энергию. Это значит, что любое измерение на частотной шкале, чтобы оно было точным, должно быть достаточно длительным. А если ядро релаксирует быстро, сигнал существует в течение очень короткого времени, все измерения частоты (напоминаю, что химический сдвиг – это, по сути, частота) получаются неточными, сигналы широкие. Чем быстрее происходит релаксация, тем шире сигналы. Это [верно] не только в ЯМР, а вообще в любом физическом процессе, связанном с измерением сигналов во времени. Поэтому по возможности, если можно обойтись ядрами со спином $\frac{1}{2}$, лучше так и делать⁷. Спектры на квадрупольных ядрах снимать сложнее, дороже, меньше чувствительность, то есть больше требования к пробоподготовке, и из них можно получить меньше информации. Но иногда бывает, что, тем не менее, это небольшое количество информации оказывается незаменимым для структуры. Допустим у вас какая-то структура, насыщенная азотами, в которой вообще нет протонов, без азотных спектров не обойтись⁸.

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				
^1H	99.98	1.00	1.00	$\frac{1}{2}$	18..-1	SiMe_4 (TMS)	300.0
^2D	0.015	$9.65 \cdot 10^{-3}$	$1.45 \cdot 10^{-6}$	1	18..-1	SiMe_4 -d12	46.05
^{11}B	80.42	0.17	0.13	3/2	100..-120	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	96.25
^{13}C	1.108	$1.59 \cdot 10^{-2}$	$1.76 \cdot 10^{-4}$	$\frac{1}{2}$	240..-10	SiMe_4 (TMS)	75.43
^{14}N	99.63	$1.01 \cdot 10^{-3}$	$1.01 \cdot 10^{-3}$	1	1200..-500	MeNO_2	21.67
^{15}N	0.37	$1.04 \cdot 10^{-3}$	$3.85 \cdot 10^{-6}$	$-\frac{1}{2}$	1200..-500	MeNO_2	30.40
^{17}O	0.037	$2.91 \cdot 10^{-2}$	$1.08 \cdot 10^{-5}$	- 5/2	1400..-100	H_2O	40.67
^{19}F	100.0	0.83	0.83	$\frac{1}{2}$	100..-300	CFCl_3	282.23
^{29}Si	4.70	$7.84 \cdot 10^{-3}$	$3.69 \cdot 10^{-4}$	$-\frac{1}{2}$	100..-400	SiMe_4 (TMS)	59.60
^{31}P	100.0	$6.63 \cdot 10^{-2}$	$6.63 \cdot 10^{-2}$	$\frac{1}{2}$	230..-200	H_3PO_4	121.44

чувствительность ($\sim \gamma^3$; $S/N \sim B_0^{3/2} \gamma^{5/2}$): абсолютная = относительная \times природное содержание
квадрупольные ядра - быстрая релаксация, широкие линии (для ^{33}S , Br, Cl, ... - сверхширокие)

стандарты:
 внешние, внутренние, SR DSS $\text{Me}_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3\text{H}$:
 водорастворимый, $\delta_{\text{H}}=0$, $\delta_{\text{C}}=1.6$

Ф. Тоукач: слайд 5

Посмотрим на природное содержание. У каждого ядра есть разные изотопы, и только один или два из них могут быть магнитно-активными, а другие - магнитнонеактивные. То есть это характеристика конкретного изотопа. Например, в случае протонов нам, опять же, повезло, что его

⁶ в соответствии с формулой Гейзенберга точно равно, не примерно

⁷ корректнее – если можно обойтись ядрами с достаточно длительными временами релаксации, с учетом их структурного окружения

⁸ однако есть неквадрупольное ядро изотопа ^{15}N

магнитно-активный изотоп ^1H составляет почти 100% природного содержания, [в нем] лишь небольшая примесь дейтерия и трития, а значит - высокая чувствительность. А в случае с какими-то другими ядами все не так хорошо. Второе по значимости для органической химии – это ядро углерода. Самый распространенный изотоп ^{12}C магнитнонеактивен. А магнитно-активный изотоп – это ^{13}C , его примерно 1% (природное содержание). Это значит, что уже в силу этого, чувствительность по ^{13}C примерно в сто раз меньше чем по протонам, потому что самих ядер в сто раз меньше. То есть спектр ЯМР по ядрам углерода [^{13}C] дает только 1% молекул (по каждому ядру [независимо]).

Кроме этого, у ядер разные гиромагнитные отношения, поэтому при одной и той же рабочей частоте спектрометра получается (в одном и том же поле) разная разница в энергии между спиновыми состояниями. Чем она больше, тем ее легче поймать. Поэтому, чем больше гиромагнитное отношение, тем больше чувствительность этих экспериментов, а, следовательно, меньше затраты времени и денег на то, чтобы получить спектры. Зависимость кубическая, чувствительность пропорциональна кубу гиромагнитного отношения. Самое большое гиромагнитное отношение – у протона. Другое хорошее ядро с большим гиромагнитным отношением – это фтор, поэтому исторически первые спектры снимались на протонах, а потом (лет через двадцать) на фторе. Чувствительности не хватало, и были доступны эксперименты только на тех ядрах, у которых большое гиромагнитное отношение и высокое природное содержание магнитно-активного изотопа. Но если с природным содержанием можно бороться путем обогащения, то с недостаточным гиромагнитным отношением бороться можно только путем покупки более дорогостоящих спектрометров. Итак, вот здесь значения чувствительности, чтобы вы их примерно представляли. Абсолютная чувствительность – это то, с чем вы непосредственно столкнетесь: произведение относительной чувствительности на природное содержание магнитно-активного изотопа. Если вы здесь видите 10^{-4} , это значит, что по сравнению с протонами примерно в 10 000 раз меньше чувствительность. У протонов чувствительности достаточно, можно даже сказать избыточно, поэтому накопление одномерного протонного спектра можно меньше, чем за минуту, провести, а при применении определенных экспериментальных техник можно и за секунду. А вот с ^{13}C этого не происходит, потому что с одного накопления сигнал получается слишком слабым из-за недостатка чувствительности, поэтому нужно проводить многократные накопления и суммировать результаты, что иногда негативно сказывается на качестве линий. Линии могут получиться широкими из-за того, что магнитное поле немного изменяется во времени. Проехал, к примеру, трамвай, магнитное поле чуть-чуть изменил: изменилась резонансная частота, сигнал съехал. При следующем накоплении какой-то другой фактор сработал. То есть сигнал будет немножко «ездить». Тем не менее, ^{13}C – второе по значимости ядро.

Следующее [ядро], которое используется в ЯМР органических соединений – это азот. Здесь есть особенность. Распространенный изотоп ^{14}N имеет спин 1, дает широкие сигналы, его энергетические состояния быстро обмениваются друг с другом и спектроскопия ^{14}N очень неудобна. Нужны специальные методики, чтобы увидеть сигнал ^{14}N ; сигналы получаются широкие и малоинформативные. Чего не скажешь об ^{15}N . У ^{15}N сигналы узкие, но там проблемы природного содержания – его всего 0.3%. Тем не менее, сейчас, когда чувствительность приборов стала достаточно высокой, те, кому нужны спектры по азоту, стараются работать с ядром ^{15}N . Когда мы будем рассматривать двумерные эксперименты, я расскажу про различные ухищрения, которые позволяют перенести чувствительность с протонов на другие ядра и получить какую-то дополнительную информацию. Тем не менее, третье по значимости ядро.

Все остальное используется реже, то есть в специфических задачах. Фосфор – для природных соединений, если это какие-то фрагменты ДНК или тейхоевые кислоты или фосфолипиды (там фосфор есть). А в синтетической органической химии не так часто используются. Фторорганика – это тоже очень специфическая область, но зато в ней ЯМР можно использовать очень эффективно, потому что [фтор -] высокочувствительное⁹ ядро с хорошим гиромагнитным отношением.

Теперь посмотрим на **диапазоны химических сдвигов**. Для разных ядер они разные. Поскольку [у них] разные гиромагнитные отношения, величины «зазоров» [тоже] разные; влияние соседних атомов разное на разные ядра, [в результате] получаются **вот такие значения**. Но пока что для нас важны протоны и ¹³C. ¹³C – это в пределах 200 (от 0), а протоны – это что-то в пределах 20-ти. Встает вопрос, а что такое ноль? Самый удобный ноль – это тетраметилсилан. В нем есть три атома, и все магнитно-активные: и кремний, и углерод, и протоны. Поэтому он используется как стандарт спектроскопии по протону, по углероду и по кремнию (если нужно). Но есть и недостаток. Недостаток состоит в том, что он не смешивается с водой, точнее очень плохо смешивается и в ней не растворяется. А многие соединения, наоборот, ни в чем кроме воды не растворяются. Особенно это касается природных полимеров. И тут встает вопрос: как, собственно, стандартизировать [шкалу химических сдвигов]? Природные полимеры - обычно [используют сигнал воды] или [добавляют] ацетон – дают образцу «понюхать» ацетон, то есть даже не добавляют [жидкий ацетон], а добавляют в образец с помощью шприца пары ацетона, и появляется сигнал ацетона с известным химическим сдвигом. Он тоже с водой не очень-то хорошо смешивается, но когда это только пары, в этом объеме его можно использовать. Тем не менее, оказалось, что химические сдвиги с примесью ацетона в некоторых природных соединениях другие, хоть и немного, но отличаются, особенно в ¹³C. И в одни базы данных попали химические сдвиги в чистой воде, в другие – в воде с ацетоном, и оказалось, что это не одно и то же. Потом лаборатории разделились на два лагеря: одни делали с ацетоном, другие добавляли тетраметилсилан как внешний стандарт¹⁰. Что значит «внешний стандарт»? Это значит, что ТМС не непосредственно в воду добавляется, а внутрь основной ампулы вставляется еще одна более тонкая ампула, наполненная тетраметилсиланом, и стандарт изолирован стеклом от образца. В этом случае влияние стандарта на химические сдвиги точно исключено. Это неудобно, поскольку требует специальной ампулы, более сложной подготовки образца (в каких-то случаях оно может быть не оправдано, особенно, когда нужно много спектров делать). В результате получилось так, что в природных соединениях, растворимых в воде было два стандарта. Каждая лаборатория в статьях отстаивала свой стандарт и делала базу данных в соответствии со своим стандартом. Поэтому использовать наработки разных лабораторий в одном исследовании было невозможно (если это база данных). А если это [исследование] - расчет вручную, нужно было все нормировать и корректировать в соответствии с этими поправками¹¹. Поэтому через какое-то время был предложен другой стандарт – для водных растворов DSS, **вот он нарисован**¹². (...) Оно образует соли, в связи с этим хорошо растворяется в воде (поэтому его используют как стандарт). Но проблема с ним иная: что его использовали как стандарт для протонных спектров, совершенно позабыв о том, что для ¹³C тоже нужен стандарт. Но оказалось, что в ¹³C его углерод [сигнал атома углерода] не на нуле находится, а на 1.6 м.д. То есть, если вы используете этот стандарт и хотите работать все-таки в стандартной шкале (которую понимают все читатели научных статей), вам нужно вычитать 1.6 из

⁹ здесь в значении «с высоким природным содержанием магнитно-активного изотопа»

¹⁰ Внешний стандарт в лекции ошибочно назван внутренним (внутренний – это стандарт, смешиваемый с образцом, а стандарт в отдельной ампуле внутри основной ампулы - внешний).

¹¹ с разницей в стандартах

¹² Sodium trimethylsilylpropanesulfonate.

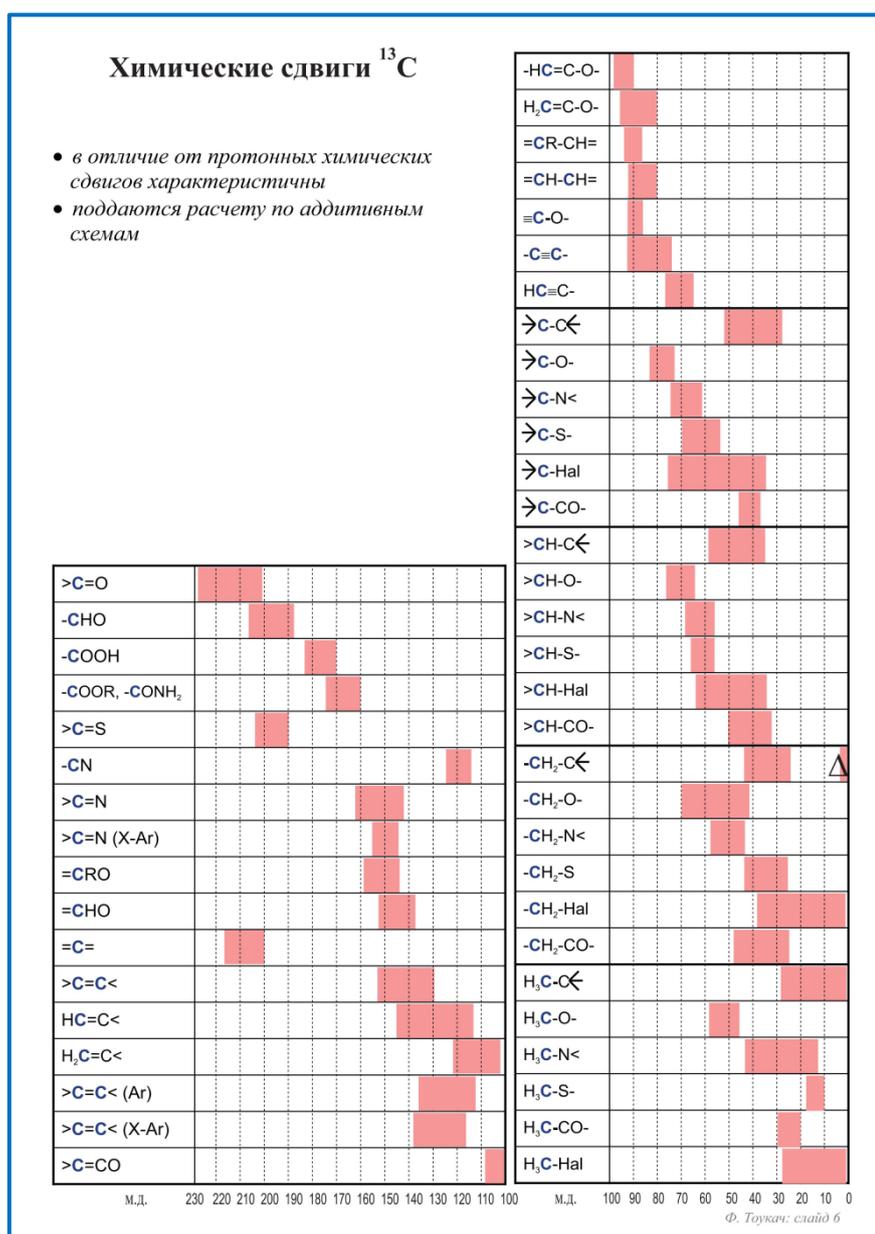
углеродных химических сдвигов. Но в экспериментальной части написать, что калибровка сигналов была сделана по DSS с учетом того, что его химический сдвиг [по углероду] был принят за 1.6, что то же самое, что сделать [калибровку] по TMC и принять его за ноль. Разница между углеродом в DSS и углеродом в TMC составляет 1.6. Если вы будете сами готовить образцы, советую подумать о стандарте заранее, чтобы потом не пришлось переснимать [спектры]. Если растворитель апротонный, например, ацетон, хлороформ или ДМСО, можно использовать остаточный сигнал растворителя как стандарт, поскольку их [сигналов растворителей] хим. сдвиги известны. Если же у вас растворитель - вода, то его лучше не использовать как стандарт, а добавить туда что-то еще, например, тот же самый ацетон или DSS. Итак, **вот стандарты для разных ядер**. Например, если вы видите, что химический сдвиг в статье написан для азота, то подразумевается, что это химический сдвиг относительно сигнала азота в нитрометане, если в явном виде не указано обратное. К сожалению, некоторые из этих стандартов обладают активностью, например, фосфорная кислота. Мало того, что она может прореагировать с образцом (если ее добавить), даже если она этого не делает, за счет того, что это кислота, она меняет pH раствора, а pH раствора влияет на положение сигналов групп, способных к химическому обмену или диссоциации. Если у вас там есть карбоксил, и вы добавите фосфорную кислоту, то с высокой вероятностью сигнал карбоксильного протона вы вообще не увидите, а сигналы OH-групп и, к примеру, NH_2 -групп, которые могут, как противоион, «зарядиться» с фосфорной кислотой, куда-то «уедут». Поэтому надо иметь в виду, что, если вы используете внутренний стандарт (тот, который вы смешиваете непосредственно с образцом), он может не только путем своей реакционной способности, но и путем влияния на pH или сольватации повлиять на химические сдвиги. Если ничего другого не остается, используйте внешний¹³ стандарт. К примеру, у вас вода, и DSS вам по какой-то причине недоступен. Тогда можно взять одну ампулу внутри другой, во внутреннюю поместить TMC, а во внешней будет ваше соединение. Когда я говорю «поместить», это не обязательно означает, что вы будете это делать сами. Вы можете отдать это на откуп оператору спектрометра. Но, по крайней мере, вы должны сказать ему, что вы от него ждете. Допустим, «используйте внешний стандарт TMC». Если скажет «не хочу», напомним, что это его работа, и что он деньги за это получает (возможно, денег добавить придется, но это уже у кого как).

#6 Теперь посмотрим на химические сдвиги ^{13}C . **Это - те**, которые в левой половине [шкалы], **а это - те**, которые в правой половине. Чем они хороши по сравнению с протонными [хим. сдвигами]? Они тоже не очень точные, то есть сдвиг на 0.1 м.д. сложно предскажем¹⁴ и мало о чем говорит. Но зато 0.1 м.д. в протонах – это примерно 1/200 от шкалы, а 0.1 в углеродах – это уже 1/2000 от шкалы, потому что диапазон химических сдвигов у углерода в десять раз больше. И на фоне этих 200 м.д. [типичный диапазон углеродных ХС] разница в одну десятую [м.д.] практически не видна. Поэтому можно сказать, что с учетом размера своей шкалы, углеродные химические сдвиги намного более репрезентативны в плане молекулярной структуры. Маловероятно, что случайные сдвиги на одну или несколько десятых приведут к тому, что сигналы, к примеру, поменяются местами или наложатся друг на друга. А в «протонах» [в спектрах по протонам] это происходит сплошь и рядом по двум причинам. Во-первых, потому что [в протонных спектрах] короткая шкала, и сигналы все рядом находятся, поэтому даже небольшие изменения химических сдвигов приводят к тому, что сигналы наезжают друг на друга, меняются местами, и начинаются прочие эффекты не первого порядка, связанные с изменением формы линии. А в углероде этого не происходит, потому что, во-

¹³ в лекции ошибочно назван внутренним

¹⁴ Тем не менее, при точном учете всех параметров (температура, pH, концентрация), протонные химические сдвиги воспроизводятся точно.

первых, широкая шкала, а во-вторых, сигналы узкие. А узкие они, потому в «углероде» [в углеродных спектрах] редко применяется анализ мультиплетности, и углеродные спектры специально снимаются в таком режиме, чтобы все сигналы были синглетами. С одной стороны, мы теряем какую-то информацию, потому что мы не можем проанализировать различия в форме линии и сопоставить ее с атомарным окружением (то, что вокруг этого углерода находится). Но с другой стороны, синглеты (сигналы, состоящие из одной линии) тоже имеют преимущества. Они узкие за счет того, что там только одна линия, поэтому вероятность их наложения и пересечения друг с другом меньше. Кроме этого, раз они узкие, это значит, что при той же площади, определяемой количеством ядер, они высокие, а высокие лучше видно на фоне шумов. То есть это еще и способ увеличить чувствительность. Поэтому в «протонах» мы смотрим в основном на форму линии, чтобы сопоставить спектр со структурой, а в «углероде» мы смотрим в первую очередь на химический сдвиг, то есть на положение сигналов.



Описанная мной ситуация с большой шкалой позволяет использовать предсказания химических сдвигов, и эти предсказания хотя бы имеют какой-то практический смысл (не только теоретический) в отличие от предсказаний протонных химических сдвигов, которые на фоне типичной разницы между положением сигналов оказываются очень неточными. Здесь же (в «углеродах») типичная разница между сигналами – больше одной миллионной доли, поэтому ошибка 0.1 м.д. не так критична. Это значит, можно использовать базы данных, предсказывать спектры и сравнивать химические сдвиги [сигналов] с химическими сдвигами [атомов] углерода в ваших молекулах. И если там окажется разница в пять м.д., значит, скорее всего, это не то. Предсказания [по углероду] можно использовать в своих статьях как вполне достоверную научную информацию - в отличие от протонов. Эти химические сдвиги (характеристичные), кроме того,

поддаются расчету по простым правилам. Простое правило – это, в первую очередь, аддитивная схема. Что такое аддитивная схема? Мы, к примеру, знаем, что в бензоле углерод [имеет] химический сдвиг такой-то, а дальше мы смотрим, какие есть заместители. Для каждого заместителя есть справочные таблицы, что в *орто*-положении он привносит, допустим, поправку в две

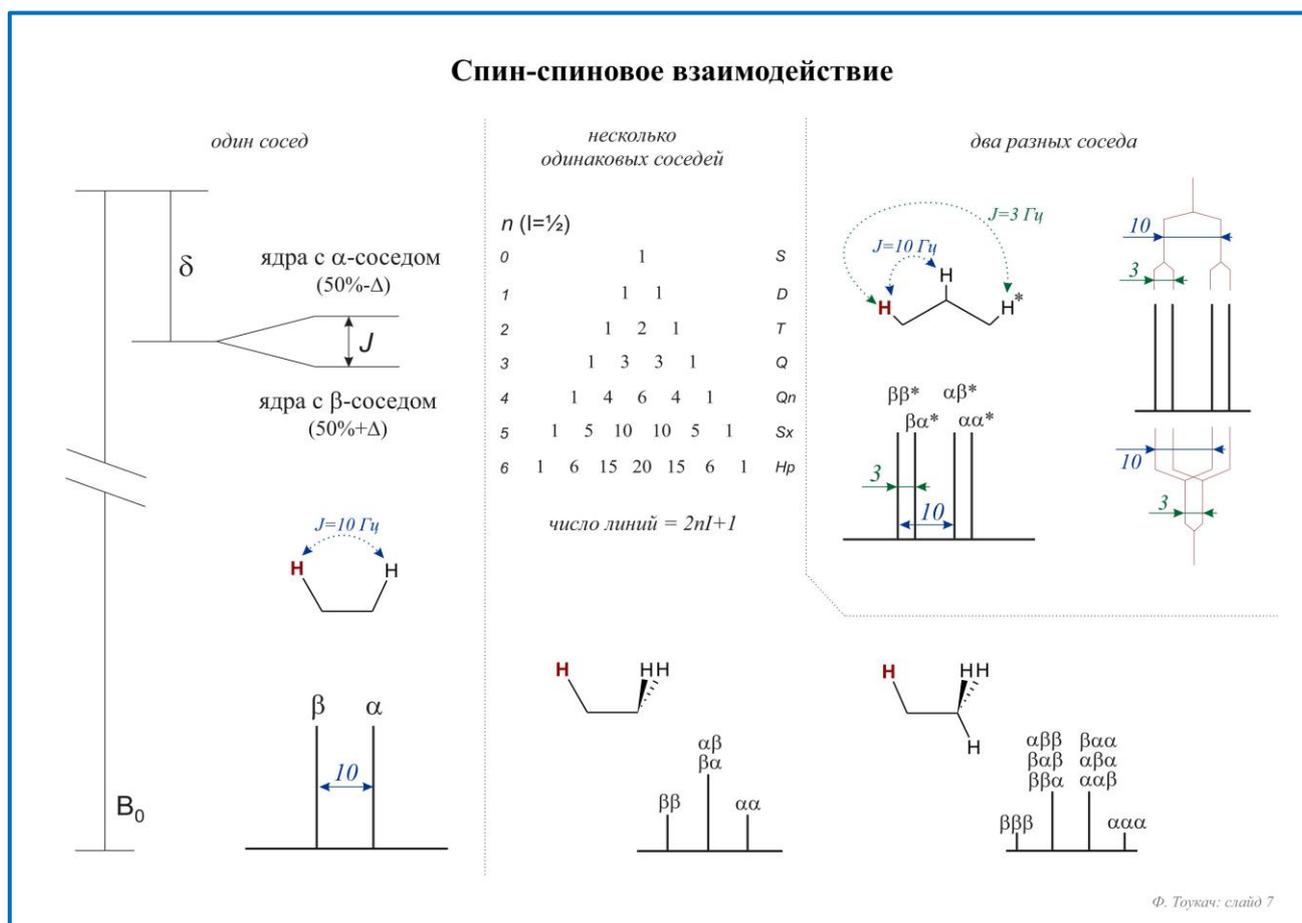
миллионных доли, в *para*-положении - 0.7 миллионные доли, и так далее. То есть каждый заместитель с учетом своего положения относительно того углерода, для которого нам нужно предсказать химический сдвиг, вносит определенную поправку. А аддитивность означает, что все эти поправки можно суммировать. Значит, когда мы просуммируем поправки от двух или трех заместителей, у нас будет достоверная, воспроизводимая информация, то есть они (эти поправки) в первом приближении не влияют друг на друга. Раз есть аддитивность, не нужно все возможные комбинации заместителей заранее просчитывать и сводить в базы данных; достаточно свести поправки для каждого заместителя по отдельности, что на два-три порядка уменьшает количество вариантов, снижает трудоемкость этой работы до разумного уровня. Следовательно, появляются базы данных, в которые эти поправки сведены, и простейшая арифметическая программа, которая их суммирует. К сожалению, для каждого класса соединений формула своя¹⁵, не говоря уже о том, что величины поправок тоже свои, но хотя бы эти формулы существуют. И если вы работаете с определенным классом соединений, вы для этого класса пороетесь в литературе, узнаете какие-то закономерности, и будете использовать предсказания химических сдвигов ¹³C, а также [эту справочную таблицу](#). Здесь примерно те же общие закономерности, что и в «протонах». Чем ближе гетероатомы, чем более они электроотрицательны и чем их больше, тем они больше смещают сигнал углерода влево. Чем больше протонов при углероде, тем, наоборот, [сигнал] больше смещен вправо. То есть СН₃ справа, СН слева, СН, рядом с которым находится азот или кислород, еще левее, а СН с двойной связью еще левее¹⁶. Если [при углероде находится] два кислорода, эффект не совсем суммируется, но по крайней мере увеличивается, что мы можем видеть на примере карбоксильных групп. Это справочная таблица, учить наизусть ее не нужно. Когда начнете работать, будете к ней обращаться, и постепенно основные вещи [значения и закономерности] запомнятся.

#7 Это было введение в понятие «химический сдвиг». Следующий фактор – форма линии, от положения сигнала переходим к форме сигнала. Опять же, для начала на протонных спектрах. Физическое явление, которое лежит в основе того, что сигналы имеют разную форму, называется спин-спиновым взаимодействием. Эти слова отражают то, что каждое ядро, для которого мы наблюдаем сигнал, определенным образом видит, в каких спиновых состояниях находятся соседние ядра в молекуле (поэтому это взаимодействие - «спин-спиновое»). Одно слово [“спин”] относится к наблюдаемому ядру, а другое – к соседнему ядру, а «взаимодействие» значит, что они видят друг друга. Почему это происходит? [Это - упрощенная картинка химического сдвига](#) с одного из предыдущих слайдов. Здесь химический сдвиг уже суммарный. Там [на слайде 3] было экранирование собственными электронами и экранирование электронами соседних ядер по отдельности, а здесь это сведено в одно понятие [«химический сдвиг»](#) (δ). Теперь предположим, что у нас есть молекула [с вот таким фрагментом](#) (красный протон – наблюдаемый, то есть тот сигнал, который мы рассматриваем, а [черный](#) в этом случае - какой-то протон, находящийся по соседству). Пока для простоты предположим, что он один, и других соседей нет (это изолированный фрагмент молекулы, где нет других магнитно-активных соседей). Итак, есть наблюдаемое ядро и его сосед. [Энергетическая] разница спиновых состояний в магнитном поле (α и β) в абсолютном выражении очень маленькая, и тепловое движение намного больше этой разницы. Поэтому, если мы попытаемся оценить заселенность, она тоже окажется примерно 50/50. Как связана заселенность с энергией, вы представляете? (...) Чем меньше энергия, тем больше заселенность, тем более выгодное состояние. Но когда разница энергий на фоне теплового движения почти нулевая – а это именно так в случае с ЯМР – заселенности будет примерно поровну: половина в одном состоянии, половина – в другом. Но

¹⁵ С учетом удаленности и расположения заместителей относительно точки предсказания.

¹⁶ Исправлено в стенограмме; лектор перепутал местами СН с двойной связью и СН с гетероатомом.

все-таки не строго 50%, а в одном чуть-чуть больше, например, 50.00002, а в другом чуть меньше, потому что энергии у них все же разные. Но пока можем считать, что половина **этих протонов** находится в состоянии α , а половина – в состоянии β .



Теперь вспоминаем, что каждое спиновое состояние характеризуется собственным магнитным моментом ядра, которое может быть [направлено в пространстве] по [внешнему] полю или против поля. Значит, когда у нас **у этого (соседнего) протона** его собственный магнитный момент направлен туда же, куда и внешнее магнитное поле, внешнее магнитное поле немного усиливается вокруг этого протона за счет его собственного магнитного «моментика». А когда он направлен в противоположную сторону, наоборот, внешнее магнитное поле вокруг этого протона ослабляется. **А вот этот (наблюдаемый)** как раз попадает в зону вокруг **этого [соседнего] протона**. То есть то магнитное поле (локальное), в котором находится наблюдаемый протон, зависит от спинового состояния соседнего протона, и эти спиновые состояния, в случае если протон один, соотносятся, примерно, как 50/50. Поэтому вместо одной линии **для этого протона** мы увидим две. В одной половине молекул [линия] будет сдвинута чуть-чуть в одну сторону от химического сдвига этого протона, а в другой половине молекул - в другую сторону. Такой сигнал называется дублет, **вот он здесь нарисован**. И вот эта разница, выраженная в герцах на частотной шкале, как раз соответствует разнице в энергии между спиновыми состояниями соседнего протона. **Это – одна половина молекул, это – другая половина. Здесь - ядра с α -соседом, здесь - ядра с β -соседом**. Вместо одной большой линии мы получаем две линии поменьше, ровно в два раза, потому что суммарная площадь должна остаться той же самой, так как количество протонов не изменилось. Итак, дублет; **вот эта величина** характеризует то, насколько хорошо один протон «видит» другой протон. Она называется «константа спин-спинового взаимодействия» и измеряется в герцах. В миллионных долях ее неудобно измерять, потому что тогда она, в отличие от химического сдвига, будет зависеть от рабочей частоты спектрометра. **Вот это число 10** – это 10 Гц. Как соотносятся герцы с миллионными долями, мы еще

отдельно проговорим. А пока что для вас важно знать, что **это - дублет** (две линии), и что дублет возникает, когда [рядом находится] один магнитно-активный сосед - в данном случае протон, а в общем случае любой магнитно-активный сосед со спином $\frac{1}{2}$, например, ядро фтора. И то, насколько это взаимодействие сильное, определяет то, насколько линии в дублете далеко разойдутся друг от друга, и численно это называется «константа спин-спинового взаимодействия».

Теперь рассмотрим случай немного более сложный, когда мы наблюдаем у протона **двух одинаковых соседей**. Что значит одинаковых? Одинаковых значит, что они дают один сигнал, например, они переводятся друг в друга операцией вращения (либо молекулы, либо вокруг одинарных связей). Как в этаноле CH_2 -группа - это, по сути, [с точки зрения ЯМР] один протон, представленный в двух экземплярах. В данном рассмотрении это будет означать двух одинаковых соседей (здесь важно именно то, что они одинаковые). Что такое для ЯМР – а точнее для этого протона – одинаковые соседи? Это значит, с ними одинаковая КССВ. То есть **этот протон** видит **этот** ровно так же, как **этот протон** видит **этот**. Для него эти соседи одинаковые. Каждый из этих соседей может находиться в состоянии α или β , а поскольку они одинаковые, насколько α «тянет» [линию наблюдаемого протона] в одну сторону, настолько же β от другого соседа тянет в другую сторону. Поэтому комбинации $\alpha\beta$ и $\beta\alpha$ получаются вырожденными. Это означает, что первый сосед тянет влево, а второй сосед - вправо. **А здесь**, наоборот, первый сосед тянет вправо, а второй сосед - влево, но поскольку соседи одинаковые, они тянут на одну и ту же величину, поэтому линия никуда не смещается. Вот эти два варианта состояния соседей дают нам суммарно одну линию ровно в том же месте, где она была бы, если бы соседей не было вообще.

Но есть еще два состояния - когда оба соседа β или оба соседа α . А вот тут уже то, куда они тянут сигнал наблюдаемого протона, складывается. То есть $\beta\beta$ [тянет] одну сторону, $\alpha\alpha$ - в другую. Соотношение вероятностей [в процентах]: **25:25:25:25**. То есть всего четыре комбинации, примерно равновероятные по причине небольшой разницы в энергии, но две из них вырожденные, поэтому в результате **этот протон** даст нам сигнал из трех линий с соотношением интенсивности 1:2:1. Такой сигнал называется «триплет» и обозначается буквой Т. Эти буквы я вам сразу напишу, сверху вниз: S, D, T, Q. Для квинтета обозначения нет, поскольку он тоже на Q начинается, а Q уже занято квартетом. Дальше уже не важно, дальше «мультиплет». Вот основные буквы, обозначающие мультиплеты: синглет, дублет, триплет и квартет (некоторые называют «квадруплет»). А дальше уже квинтеты, секстеты, они уже редко встречается, поэтому их в статьях пишут словами. Потом вы эти буквы комбинировать друг с другом начнете, а пока мы рассматриваем простые мультиплеты. Простые – это значит, что все соседи одного типа, и, соответственно, и мультиплеты вот такие: **дублет, триплет**.

Вот это рассуждение, я надеюсь, вы уже по аналогии сможете сделать сами. То есть: взять трех одинаковых соседей. Каждый из них может быть α или β , и всего у нас получается восемь комбинаций (два состояния и три соседа – 2^3 комбинаций), **вот они здесь написаны**. Если вы проведете аналогичное рассуждение сами, вы получите соотношение интенсивности линий в **квартете**, то есть в мультиплете, который получается от протона, у которого **три одинаковых соседа**. Это соотношение будет 1:3:3:1. Это как раз метиленовые протоны в этаноле. Его соседи – это метильная группа, гидроксил он не «видит» как соседа по определенной причине. «Не видит» в ЯМР означает, что константа спин-спинового взаимодействия в данном случае равна нулю. А вот между метиленовыми и метильными протонами она равна какой-то [ненулевой] величине, в случае этанола 7 Гц. И поэтому метиленовый протон в этаноле будет за счет трех соседей иметь **вот такой вид сигнала (квартет)**. Теперь, где на нем вот эта константа [КССВ]? КССВ – это расстояние между

ближайшими линиями. То есть **вот здесь 7 Гц**, **вот здесь 7Гц** и **вот здесь**, равны [друг другу] в пределах одного мультиплета, если он правильный.

Следующий важный момент – спин-спиновое взаимодействие коммутативно. То есть, если протон А видит протон В с константой x , то это автоматически означает, что и протон В видит протон А с той же самой константой x . Спин-спиновое взаимодействие действует в обе стороны, и константа будет одна и та же. В статьях константа спин-спинового взаимодействия называется *spin-coupling*, обозначается буквой J . Пример: ${}^3J_{AB}$ (...). J – это обозначение спин-спинового взаимодействия, константа. **Вот эта трешка** означает, что через три связи. **А это - два протона**, между которыми она имеет место. То есть, если у вас на структурной формуле один протон подписан как А, а другой как В, **вот это J_{AB}** будет означать константу [спин-спинового взаимодействия] между ними.

От чего зависит, насколько хорошо одни протоны «видят» других? В первую очередь, от числа химических связей между ними¹⁷. Даже если они в пространстве находятся близко, но для того, чтобы перейти от одного к другому, нужно преодолеть четыре или пять химических связей, это означает, что они «видят» друг друга плохо, и константа будет маленькой. А если они находятся близко в смысле связей, то константа будет большой. Кроме этого, есть множество других факторов, к которым мы вернемся позже. А пока для понимания того, каким образом соседи влияют на форму линии, посмотрим на другие примеры. Но прежде, чем перейти к случаю с двумя разными соседями, попробуем выявить общее правило в соотношении интенсивности линий. Люди посмотрели на разные мультиплеты, измерили соотношение интенсивности линий и заметили, что даже если не знать этих физических основ ЯМР, интенсивности укладываются в некое математическое правило. Оно называется «треугольник Паскаля». **Здесь оно в графической форме нарисовано**. Это правило (еще раз напоминаю) работает для случая, когда все соседи одинаковы, других соседей нет, и эти одинаковые соседи имеют спин $\frac{1}{2}$. Здесь количество соседей - **по вертикальной оси**, а **вот здесь – относительные интенсивности линий** в мультиплете и их количество. Вот это – **синглет**, одна линия, **дублет** – соотношение 1:1, **триплет** – соотношение 1:2:1, и так далее. Каждое число здесь – это сумма чисел, находящихся над ним. Например, нам нужно предсказать [форму мультиплета] для четырех соседей. У нас есть для трех соседей «**формация**» 1:3:3:1. В результате [получаем] **мультиплет из пяти линий**, соотношение интенсивности которых соотносится по **такому закону – 1:4:6:4:1**. **Общее число линий** – это число соседей, умноженное на спин и еще на два, плюс один ($2nI+1$), оно следует из этого треугольника путем простейших математических действий. А запомнить легко, потому что, если у вас простой мультиплет, число линий на единицу больше числа соседних протонов. Один сосед – две линии, два соседа – три линии и так далее.

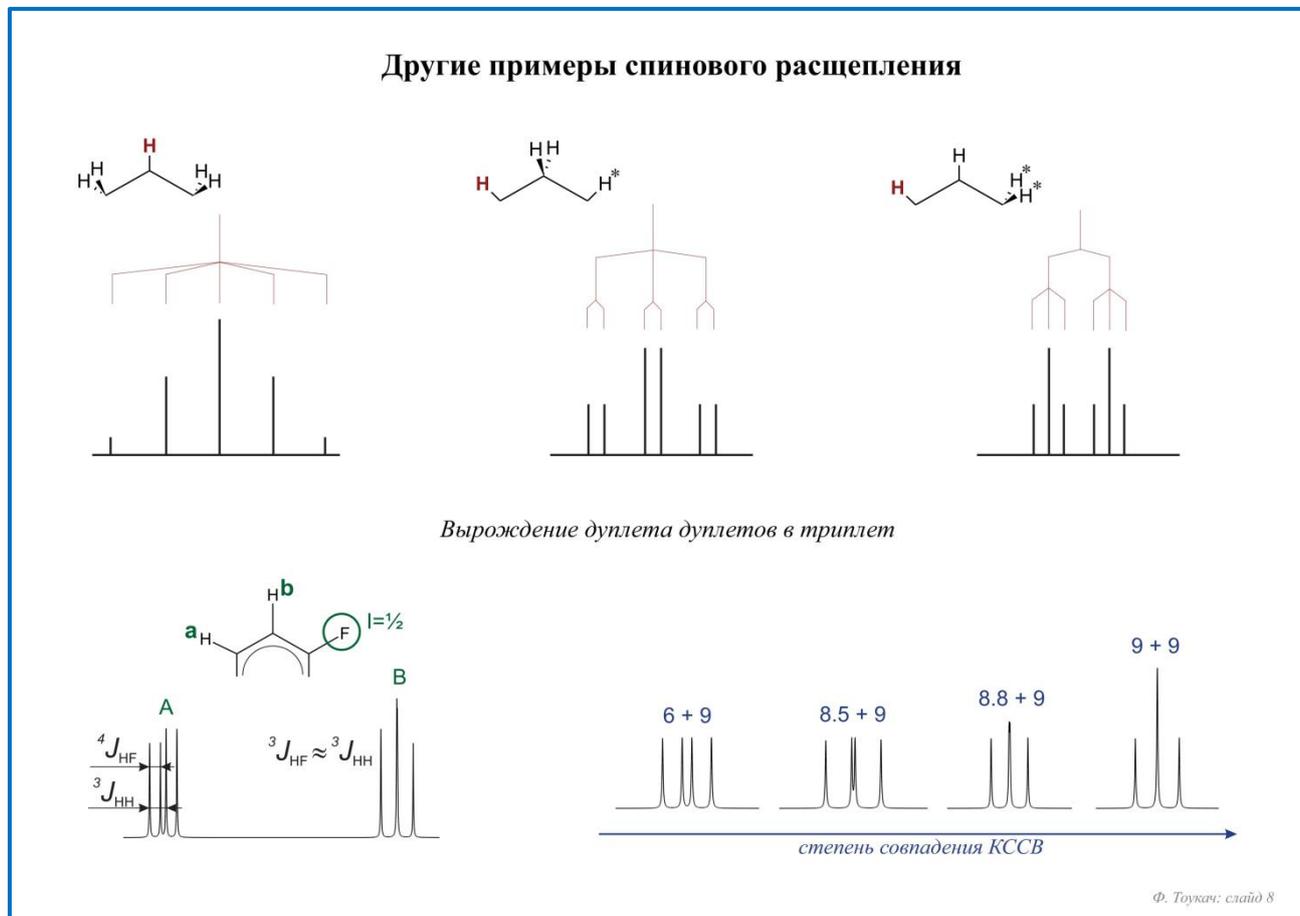
Теперь перейдем к случаю чуть сложнее, но не менее распространенному в органической химии – когда соседи разные. Начнем опять же с самого простого: **два соседа, каждый из которых представлен единственным протоном**, но они уже разные. Что значит «разные» для наблюдаемого протона? До одного **три химических связи**, а до другого – **четыре**. Поэтому тот, до которого четыре, будет «виден» наблюдаемому протону в меньшей степени, у него будет меньше константа спин-спинового взаимодействия. Здесь я для примера написал [КССВ]: **это константа 10 Гц**, а **это константа 3 Гц**, отличается в три раза. И что произойдет? Один [протон], дальний, **обозначим звездочкой**, чтобы не путать его с ближним. **Здесь** [в предыдущем примере] мы их могли путать как угодно, поскольку они были одинаковые, а **здесь** (поскольку они разные) у нас то, насколько α -состояние **этого** [одного из них] смещает наблюдаемый, и то, насколько α -состояние **этого** [другого из них] смещает наблюдаемый протон [его линию в сигнале], это уже разные величины. То есть **эTOT**

¹⁷ Топологически (а не на соединяющей их прямой).

тянет сильнее, потому что константа больше, а этот тянет слабее в ту же сторону. Поэтому эти два состояния $\beta\alpha^*$ и $\alpha\beta^*$ уже перестают быть вырожденными, как было здесь, потому что «звездочки» смещают линию на 3 Гц, а состояния без звездочек смещают на 10 Гц. В результате мы получаем мультиплет из четырех одинаковых по интенсивности линий с соотношением 1:1:1:1. Здесь в нем можно видеть две константы: 3 Гц – либо вот это, либо вот это, и 10 Гц – от первой до третьей линии – то же самое, что от второй до четвертой линии. (...) Каждый раз писать α и β со звездочками – это очень муторное занятие, поэтому нужны простые легкозапоминаемые мнемонические правила для предсказания [формы] мультиплетов. Здесь [в этом примере], конечно, можно написать [$\alpha\beta^*$ и т.д.], а когда у вас будет три соседа одного типа, два соседа другого типа и еще один сосед третьего типа, вы просто запутаетесь в этих звездочках, решеточках и греческих буквах. Но оказалось, что, если у наблюдаемого протона есть более одной константы спин-спинового взаимодействия (то есть разные соседи), можно расщепить этот сигнал последовательно. Сначала так, как будто был только один сосед, а потом каждую из получившихся линий так, как будто есть только другой сосед. Причем, в какой последовательности это делать, не имеет значения. Можно сначала на одном, потом на другом, а можно сначала на другом, потом на первом – результат будет один и тот же. Это рассуждение показано вот такими деревьями. Вот это – сигнал наблюдаемого протона. Чтобы предсказать его форму линии, то есть получить эти четыре линии, что мы должны сделать? Вот исходный химический сдвиг, то есть, как если бы соседей не было. Дальше у него есть один сосед с константой 10 Гц, один сосед [расщепляет линию в] дублет. Разделяем эту линию на две, получаем дублет с константой 10 Гц. Теперь вспоминаем, что у него есть еще один сосед с константой 3 Гц, и каждую из получившихся линий расщепляем еще раз в дублет с константой 3 Гц. Получается такое дерево расщепления, которое и дает нам этот сигнал. Но нам необязательно начинать от большего к меньшему, то есть последовательность может быть любой. В данном случае вот такой: сначала одну линию расщепили на 3 Гц, получили узкий дублет, а потом каждую из получившихся линий расщепили на 10 Гц, и пришли к тому же самому – вот к такому сигналу. И называется он – дублет дублетов, потому что два раза [имеем] дублетное расщепление, но разное (разные соседи = разные константы). Обозначается он (как вы помните дублет – это d) – дублет дублетов – dd, соответственно. И точно то же самое можно сделать и при всех остальных комбинациях [соседей]. Постепенно вы научитесь, глядя на структуру, определять сколько разных соседей [у наблюдаемого протона], как [сигнал] расщепляется и, как минимум, писать форму мультиплета (ddqd, к примеру – дублет дублетов квартетов дублетов). Потом можно перемножить все и посчитать, сколько всего будет линий. Зная соотношение интенсивностей каждой из этих линий [d простых мультиплетах], вы после умножения получите соотношение интенсивностей в более сложном мультиплете. Потом перейдете к решению обратной задачи – глядя на мультиплет, выявить, что это такое. Глядя на дублет, легко выявить, на триплет тоже, а если это какой-нибудь дублет квартетов триплетов, это уже не всегда легко выявляется. Но мы потренируемся.

#8 Начнем эту тренировку со случаев более сложных, чем дублет дублетов, но более простых, чем то, что вам встретится в реальных спектрах. Здесь [показаны] три случая с двумя типами соседей, но эти случаи разные. Нет, прошу прощения, здесь один тип соседей, это четыре одинаковых соседа. Почему они одинаковые? Потому что здесь [есть] вращение вокруг этой связи, а здесь – вокруг этой связи, и весь этот фрагмент перевернуть тоже можно. Как это нарисовано, они вообще химически одинаковые. А если разные заместители здесь и здесь [справа и слева], то за счет вращения [вокруг C-C] связей все равно константы с ними усредняются. То есть критерием одинаковости соседей является равенство констант спин-спинового взаимодействия. Если предположить, что ваша молекула такова, что взаимодействие этого протона со всеми этими четырьмя одинаково, то они будут для него четырьмя одинаковыми соседями. Например, это

середина длинной алифатической цепи – некая СН-группа, у нее с одной стороны CH_2 и с другой стороны CH_2 . Где-то могут быть дальше различия, но поскольку цепь не жесткая, происходит усреднение, и все **четыре протона** из двух метиленовых групп для **этого протона** (СН) одинаковые. Не обращайте внимания, что не нарисовано, что еще есть у этого углерода. Может быть, **здесь** еще один протон, но это никак не повлияет на спектр, кроме как в контексте площади [его сигнала]. А может быть, здесь какой-то другой заместитель, но это сейчас не важно. Четыре соседа, пять линий, вспоминаем, (...) **вот они, пять линий – 1:4:6:4:1**.



А теперь посмотрим, [что будет,] если соседи разные. [На слайде] нарисованы молекулярные фрагменты. **Здесь два соседа близко, и один сосед далеко**. Анализ констант вам тоже, наверное, лучше проводить в терминах «близко-далеко» по связям, то есть не нужно считать десятые доли герц; скорее это не повлияет на ваше решение о структуре молекулы, за исключением особых случаев. Вы знаете, что близко – константа большая, далеко – константа маленькая, средне – константа средняя. Как раз (...) «большая-маленькая-средняя» – достаточный уровень точности для сравнения численных величин констант спин-спинового взаимодействия. Что здесь важно? Два [соседа] близко, значит большая константа, широкий триплет¹⁸ (...). И один [сосед] далеко: «один» - значит дублет, «далеко» - значит константа маленькая, то есть узкий дублет. Вам нужно скомбинировать широкий триплет и узкий дублет. Здесь нарисована **графическая схема**, как вы это будете комбинировать. Берете триплет и каждую его линию расщепляете в узкий дублет. Получаем – **вот дублетная составляющая** в этом сигнале, а **вот триплетная составляющая**. В триплетной составляющей средняя линия вдвое выше чем крайняя. Потому что соотношение интенсивности - 1:2:1, как мы знаем из предыдущего слайда. Традиционно это называется триплет дублетов. Почему триплет дублетов, а не дублет триплетов? Можно было бы и наоборот сказать, но

¹⁸ Лектор ошибся, сначала сказав «дублет»

как-то сложилось, что сначала называют большие константы, а позже - маленькие. То есть **дублет триплетов – вот это**, а **триплет дублетов – вот это**. Различаются они только численно, и можно было бы сначала расщепить одну линию на узкий дублет, а потом каждую на широкий триплет, и получилось бы то же самое. Теперь этот случай – **два далеко, один близко**. Один близко: один – дублетное расщепление, «близко» – широкий дублет. **Следующее два [соседа] - далеко**. «Два» значит «два, одинаковые между собой» – триплетное расщепление; с маленькой константой, значит, триплеты узкие. Вот они – маленькая константа **между первой и второй линией**, а вот большая, к примеру, **между второй и пятой**. Таким образом, дублет триплетов [характеризует] **вот такое** сочетание соседей.

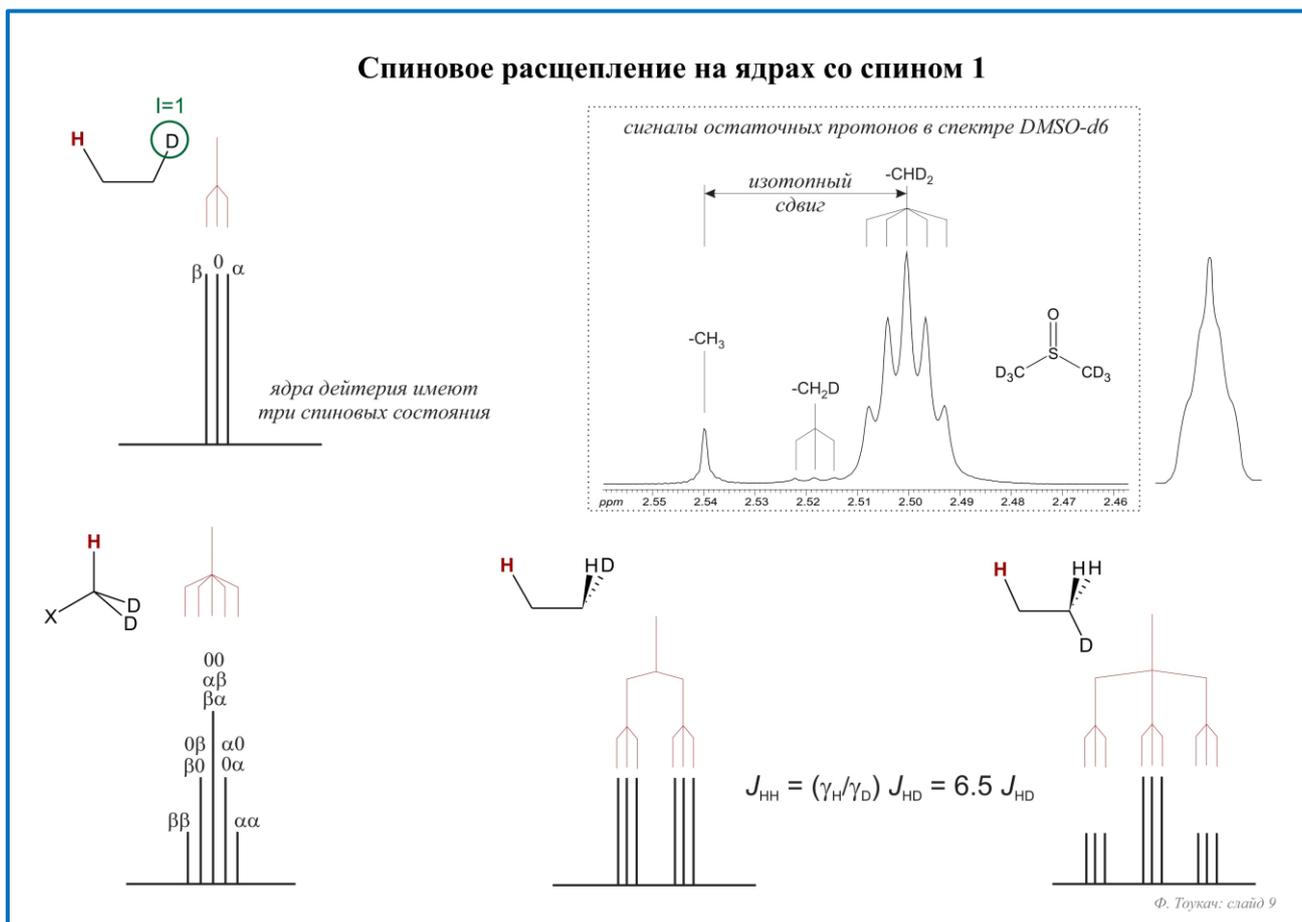
Это были просто палочки на тех местах, где будут линии, а в реальных спектрах линии - не палочки, а сигналы лоренцевой формы¹⁹, то есть имеющие ненулевую ширину – у основания они пошире, на вершине – поуже, в середине – что-то среднее, в идеале примерно **вот такие**. А что это значит, раз у них ненулевая ширина? Что произойдет, если константа [КССВ] окажется меньше половины ширины линии? Линии у нас сольются, причем они могут слиться вообще полностью, встать, по сути, друг над другом - мы будем их видеть как одну линию большей интенсивности. Происходит это следующим образом. Рассмотрим **такой фрагмент структуры** и, к примеру, протон А. У него два магнитно-активных соседа: протон близко и фтор далеко. Но фтор, как правило, влияет сильнее [демонстрирует при прочих равных условиях бóльшие КССВ], чем протоны, поэтому величины констант спин-спинового взаимодействия между А и В и между А и фтором оказываются не настолько драматически разными, как можно было бы ожидать, если бы здесь были одни протоны. То есть несмотря на то, что фтор находится дальше, это – фтор, и константа с фтором приблизительно равна константе с протоном. Спин у фтора тоже $\frac{1}{2}$, то есть характер расщепления будет такой же, как на протонах. В результате мы имеем **сигнал протона А – это дублет дублетов**, но вторая и третья линии находятся близко друг к другу, потому что величины констант примерно равны друг другу. Получится вот что: **вот один дублет, а вот другой**. Примерно равные константы **здесь и здесь**, и **эти линии** [вторая и третья] из-за этого оказываются близко. Как раз это мы здесь и видим. Здесь, наверное, 9 Гц и 7 Гц, примерно такое соотношение. Тогда расстояние между второй и третьей линиями (**вот здесь - маленькое**), будет 2 Гц, между первой и второй будет 7, между первой и третьей – 9. Эти две константы подписаны на спектре. 7 Гц - константа с фтором через четыре связи, и 9 Гц - с другим протоном (**вот с этим**) через три связи. Естественно, это все в предположении, что молекула несимметрична. Потому что, если **вот здесь вдруг тоже фтор**, во-первых, это магнитно-активный сосед, который внесет свое влияние на форму линии. А, во-вторых, если молекула будет симметричной, А и В могут оказаться одинаковыми протонами, потому что мы перевернем [молекулу], и они самосовместятся. А «одинаковые» - значит, у них будет одинаковый химический сдвиг, и щепиться они друг на друге не будут. Это первое утверждение, которое имеет смысл принять на веру (что одинаковые атомы не щепятся друг на друге). Оно имеет объяснение, но не на пальцах. Для вас важен результат. То есть, чтобы происходило расщепление и, соответственно, наличие константы спин-спинового взаимодействия, протоны должны быть магнитно разными. Что такое «магнитно разными» и чем это отличается от «химически разные», будет чуть попозже, в конце сегодняшней лекции.

А пока что посмотрим на то, что будет с **этим сигналом** (дублетом дублетов), в зависимости от численного значения констант. **Здесь** они хоть и близки, но все-таки достаточно разные, чтобы разница между средними линиями была заметна. Если у нас заместители в молекуле или конформация или что-то еще так повлияло на константы, что они оказались ближе друг к другу – 8.5

¹⁹ Или формы, чем-то напоминающей Лоренцеву.

и 9.0, то **эти две линии** окажутся еще ближе друг к другу, между ними уже полгерца. А полгерца не на всех спектрах заметно, уже надо спектр снимать достаточно хорошо (с хорошим разрешением), и по естественным причинам линии должны быть достаточно узкими, чтобы разница в полгерца оказалась заметной. Поскольку, если сами линии будут шириной 1 Гц, а разница между ними - полгерца, они сольются в один горб. Что мы и наблюдаем **вот здесь**. Разница уже 0.2, еще меньше (8.8 Гц и 9.0 Гц). И разницы в 0.2 Гц в стандартном эксперименте уже не видно. **Эта средняя линия** – это сумма **этих двух линий**, но по высоте, она, тем не менее, не в два раза выше чем боковые компоненты (а по площади она в два раза больше). Все-таки не полностью совпали химические сдвиги (на 0.2 Гц отличаются), поэтому она [суммарная линия] широкая. За счет того, что она широкая, она не такая высокая при той же площади. То есть **эта линия** шире, а не выше.

А это предельный случай – две константы совпали полностью, 9.0 и 9.0 Гц. Две средние линии в этой схеме попадут строго в одно и то же место. Можно умозрительно сказать, что они встали друг над другом, получилась **одна линия в два раза выше**. Не правда ли, напоминает триплет? По мере приближения констант спин-спинового взаимодействия друг к другу дублет дублетов превратился в триплет. То есть, картина, характерная для двух разных соседей, превратилась в картину для двух одинаковых соседей. Что подтверждает тезис о том, что одинаковость соседей как раз и определяется одинаковостью констант спин-спинового взаимодействия с ними. В ЯМР даже если соседи химически разные, но с ними одинаковая константа спин-спинового взаимодействия, для наблюдаемого ядра они будут выглядеть одинаковыми, что мы здесь и видим. По мере приближения друг к другу констант спин-спинового взаимодействия, дублет дублетов выродился в **триплет**, то есть соседи стали псевдо-одинаковыми.



#9 Все предыдущие рассуждения делались в предположении, что все соседи (те соседи, которых мы рассматриваем, магнитно-активные) имеют спин $\frac{1}{2}$. Однако это может быть и не так. Я здесь

привел пример с дейтерием, потому что (...) [в ЯМР] используются дейтерированные растворители, а если их молекулах попадают протоны (а они всегда попадают в какой-то концентрации в дейтерированных соединениях), эти протоны дают сигналы в протонном спектре, и щепятся на магнитно-активных соседях – [ядрах] дейтерия. [Щепление на] ^{13}C я не рассматриваю, потому что вероятность того, что у протона окажется сосед-углерод именно в виде изотопа ^{13}C равна природному содержанию ^{13}C , то есть 1%. Это значит, что в 99% молекул протон не будет щепиться на своем углероде, потому что он ^{12}C (магнитнонеактивный). И только из 1% молекул получится дублет за счет расщепления на магнитно-активном изотопе ^{13}C . (...) В дейтерированных растворителях содержание дейтерия близко к 100%, хоть и не 100%. Что мы будем видеть в молекулах дейтерированных растворителей или вообще дейтерированных соединений? Вот случай, когда [у протона] один сосед-дейтерий. У [ядра] дейтерия спин равен 1, значит, у него три спиновых состояния: по полю, против поля, и «ни туда, ни сюда». Они обозначаются как α , β и 0. То есть число спиновых состояний равно... сами посчитаете. Это не принципиально. Для спина 1 их три, для $3/2$ - четыре, соответственно, добавление каждой половинки к спине добавляет одно спиновое состояние, начиная от двух состояний для спина $1/2$. Итак, спин 1, три состояния. Они примерно равновероятны, поэтому протон с таким соседом даст **три линии**. Правда, это не называется триплетом, потому что триплет – это когда соотношение 1:2:1, а это просто три линии, и расстояние между первой и второй из них это будет как раз константой спин-спинового взаимодействия между протоном и дейтерием через три одинарных связи.

Два одинаковых соседа-дейтерия. Это как раз распространенный случай, потому что в дейтерированных растворителях есть метильные группы CD_3 и, если один протон не заместился, получаются группы CHD_2 , то есть это метил, в котором один протон обычный, а вместо двух протонов дейтерий. Как раз **вот такой случай**. Здесь, если мы напишем такое же дерево для α , β и нулей, мы увидим, что средние линии трижды вырождены – это, когда два нуля, $\alpha\beta$ или $\beta\alpha$ (три комбинации). **Вот эти две** - дважды вырожденные, и [еще две] просто обычные линии; всего получается **пять линий в соотношении 1:2:3:2:1** по площадям. Такой сигнал имеет характерный вид, его вы должны научиться распознавать как образ в спектре, потому что это сигнал ДМСО- d_6 , а ДМСО – это самый распространенный растворитель для ЯМР. Распространенным он стал, потому что, во-первых, он дешевый, во-вторых, его можно регенерировать, в-третьих, он растворяет почти всю низкомолекулярную органику. И наконец, он не особо склонен взаимодействовать с молекулами вашего образца. То есть это очень удобный растворитель. И если у вас раствор в ДМСО, то вы будете наблюдать **что-то вот такое**. Соотношения могут быть другие, потому что в разных ДМСО разная степень дейтерированности: может быть разное соотношение **монопротонированной** метильной группы, **дипротонированной** и **полностью протонированной**. Это особенность получения дейтерированных соединений. Схемы промышленного синтеза таковы, что в них [в продуктах] всегда есть примесь протонированных аналогов, не полностью дейтерированных. Больше всего, естественно, **вот такого – ДМСО- d_5** , то есть пять дейтериев и один протон на одном из его концов. Он дает как раз **такой сигнал**. Константа в нем составляет 1.8 Гц. 1.8 Гц – это пограничный случай. Если оператор хороший, вы увидите эти пять линий, как здесь нарисовано, а если оператор плохой и разрешение спектра недостаточное, вы вместо этого увидите что-то вот такого типа [на доске - рисунок уширенного синглета со ступеньками]. То есть эти линии не разойдутся полностью. (...) Если оператор совсем криворукий или, к примеру, у вас раствор очень вязкий, или какие-то другие причины существуют, то это вообще может в один горб слиться, потому что 1.8 Гц – достаточно хорошее разрешение, которого нужно еще достичь.

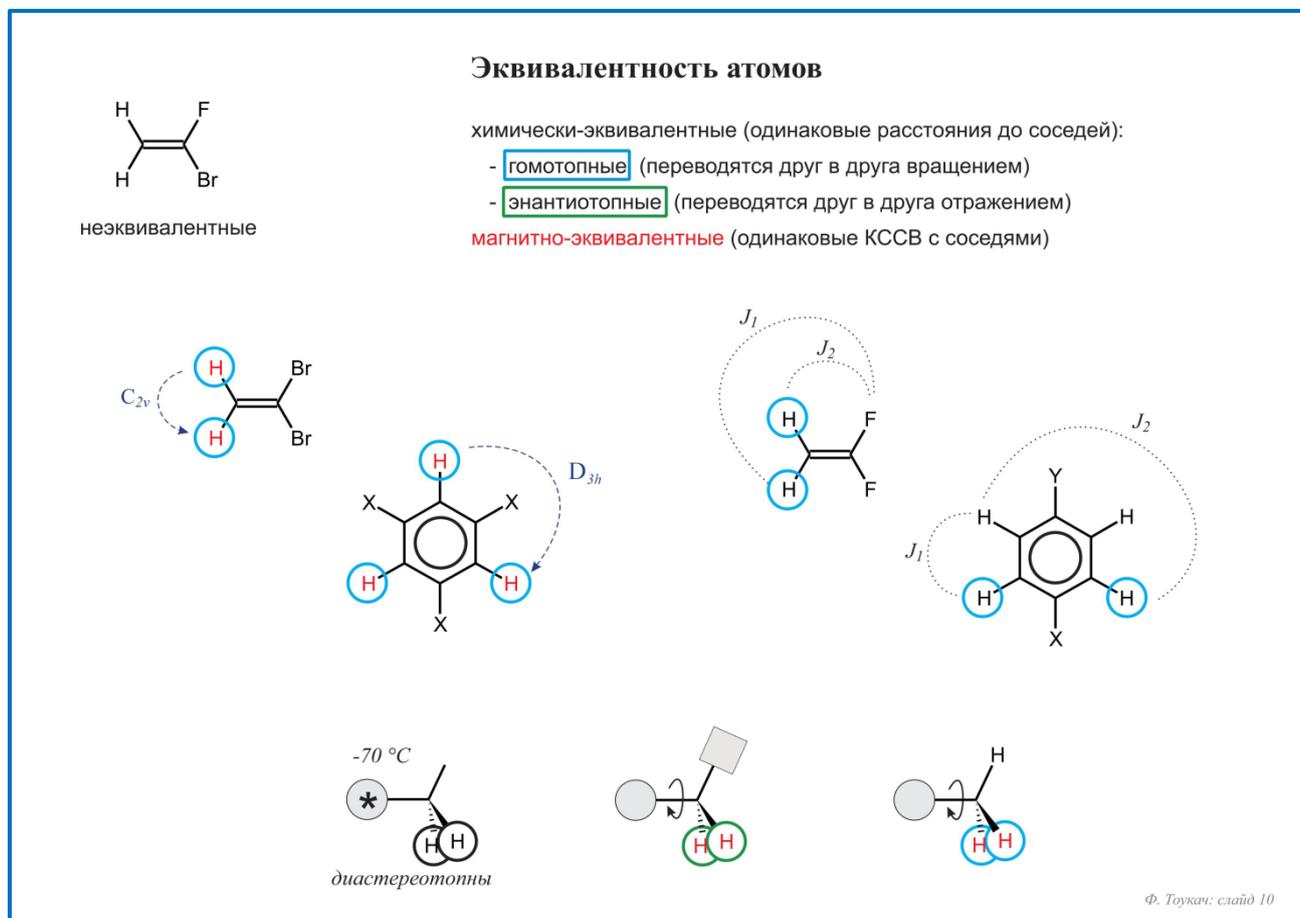
Вернемся к нашим молекулам. А именно к молекуле ДМСО, самый распространенный растворитель. Здесь еще другие сигналы есть, в частности едва заметный триплет. Если не знать, что это триплет, можно его за шум принять. Но мы знаем, во-первых, что в ДМСО есть какая-то очень небольшая примесь молекул с группой CH_2D (в дейтерированном ДМСО, естественно), и **это как раз тот случай, вот он здесь**. Может также возникнуть вопрос, а почему, собственно, химический сдвиг разный (у **этих** протонов и у **этих**). Называется это явление «изотопный сдвиг». Небольшие отличия в электроотрицательности соседей (протона и дейтерия) все-таки есть, у них неодинаковая электроотрицательность. Поэтому химические сдвиги наблюдаемого протона тоже получаются разными. Как правило, чем тяжелее изотоп, тем меньше электроотрицательность²⁰, и тем правее сигналы. Что подтверждается также и **этим случаем**, когда метильная группа (нормальная метильная, не дейтерированная), присутствует в каком-то количестве в дейтерированном ДМСО. Наверное, может возникнуть вопрос, а почему он больше, чем **вот этот** [триплет]. Ведь по идее такого фрагмента должно быть меньше, чем этого. Если это дейтерированный ДМСО, вероятность того, что все три протона останутся протонами, а не дейтериями, [меньше]. Но на самом деле он не больше, просто кажется, что он больше, потому что это синглет - он при той же площади высокий и, возможно, он немного уже. А, может быть еще, что кто-то мыл посуду обычным ДМСО от дейтерированного, и там осталось [немного обычного ДМСО]. Для того, чтобы там **такой сигнальчик** появился (имеющий примерно такое соотношение площадей с остаточным сигналом растворителя), даже достаточно, чтобы рядом кто-то просто открыл соединение, не обязательно даже заливать его в ампулу [с образцом]. Или кто-то брался пальцами, открывал сначала обычный ДМСО, а потом этими же пальцами (даже не обязательно, что ими он ими лазил прямо внутрь) взялся за ампулу, и вот такой сигнал у вас появится; это очень маленький сигнал. Если у вас 10 мг соединения, такие маленькие сигналы для вас не важны. Если у вас 1 мг соединения, тогда они будут важны, потому что они [примеси] уже будут сопоставимы [по количеству] с тем веществом, которое представляет для вас интерес. Поэтому если вещества мало, нужно следить за тем, чтобы ампула была чистая, не хватать ее руками. Поскольку то, что находится снаружи на стенке ампулы, тоже попадает в рабочую область спектрометра и, соответственно, будет давать сигналы. Я здесь нарисовал еще **вот эту молекулу** – это та молекула, которой больше всего в дейтерированном ДМСО, то есть ДМСО-d₆. На всякий случай напоминаю тем, кто недостаточно хорошо воспринял материал курса аналитики, что здесь нет протонов, поэтому в протонном спектре эта молекула сигнала не дает. Она даст сигналы в дейтериевом спектре, но это уже другой эксперимент. Дейтериевый и протонный спектры не пересекаются.

Другие комбинации, когда есть и протоны, и дейтерий. Например, **один сосед-протон и один сосед-дейтерий**. Один сосед-протон расщепляет линию в дублет, а один сосед-дейтерий, так же как здесь, расщепляет линию в три линии. Перемножая одно на другое, получаем шесть линий, одинаковых. Но тут еще можно заметить следующее: константа спин-спинового взаимодействия при прочих равных, с разными изотопами оказалась совершенно разная. То есть с дейтерием она примерно в пять раз меньше, чем с таким же протоном, поэтому это разные соседи для него [наблюдаемого протона]. А здесь [соседи -] **два протона и один дейтерий**. Два протона - триплетное расщепление с большой константой, один дейтерий - расщепление в три линии с маленькой константой. Итого, получаем **1-1-1-2-2-2-1-1-1**.

#10 Предыдущие рассуждения опирались на понятие того, одинаковые атомы или нет. Во-первых, одинаковые с точки зрения КССВ – это те, с которыми одинаковые константы (они будут одинаковыми соседями для наблюдаемого). А на этом слайде показана, скажем так, «абсолютная»

²⁰ Это утверждение следует проверить.

одинаковость. То есть те атомы, которые одинаковы в молекуле, будут давать один сигнал и не будут цепиться друг на друга. Они не будут видеть друг друга как соседей, у них будут одинаковые химические сдвиги [сигналов]. Для того, чтобы предсказывать спектры, вам нужно будет научиться легко, в автоматическом режиме (в уме), выявлять одинаковые атомы. У тех, у кого есть опыт структурной органической химии, возможно, этот навык уже есть, а у кого-то - в меньшей степени. Поэтому на всякий случай этот слайд я сделал и считаю, что его нужно очень хорошо понять - так, чтобы не возникало проблем в воспроизведении этой картинки самостоятельно.



Что такое «одинаковые»? Во-первых, химически эквивалентные. Это значит, что у них те же самые связи вокруг находятся, и они имеют одинаковые расстояния до всех других атомов в молекуле. Например, **вот эти химически неэквивалентны**, потому что у одного «в цисе» фтор, а у другого «в транс». **А вот эти химически эквивалентны**, потому что от любого из них расстояния до других атомов одинаковы. При этом химическая эквивалентность бывает двух типов: гомотопные [атомы] и энантиотопные. Самый распространенный случай – это гомотопные - те, которые переводятся друг в друга вращением. Вращение здесь это не вращение вокруг связи, а вращение молекулы целиком, то есть операция симметрии. Они здесь подписаны (названия этих операций), наверное, вы из теории групп можете их знать или из предыдущей математики. Но даже если и не знаете, как они называются, просто можете представить, что эту молекулу можно вот так перевернуть [вокруг горизонтальной оси], и один атом перейдет в другой. Это значит, они переводятся друг в друга операцией вращения этой молекулы. Вращение не обязательно на 180°. Например, **здесь - это вращение на 120°** вокруг оси, перпендикулярной доске. Эти атомы переводятся друг в друга операцией симметрии третьего порядка, и поэтому являются гомотопными. Гомотопные атомы, как правило, для ЯМР выглядят как одинаковые, то есть дают один сигнал. За исключением некоторых особенностей. Другой вариант – это энантиотопные, которые переводятся друг в друга операцией отражения в плоскости. Это два атома при каком-то центре (**здесь** что-то оптически

активное висит, [здесь](#) какой-то другой заместитель). [Здесь](#) нарисована стрелочка, чтобы показать, что еще возможно вращение вокруг этой связи, но для энантиотопности это непринципиально. Но поскольку для спектра ЯМР важна магнитная картина, следует посмотреть еще и на магнитную эквивалентность. Строго говоря, одинаковыми для ЯМР являются именно магнитно-эквивалентные атомы, просто химически эквивалентные чаще всего бывают и магнитно-эквивалентными, но не всегда. Если химически разные, это значит, что они заведомо магнитнонеэквивалентны, то есть точно разные в любом контексте. Если же они химически эквивалентны, например, гомотопны, то они в каких-то случаях могут быть магнитнонеэквивалентными, и ЯМР будет их видеть как два разных сигнала, которые щепятся друг на друге. Критерий: одинаковость констант спин-спинового взаимодействия со всеми соседями. Причем каждый сосед рассматривается по отдельности. Например, [вот эта молекула](#) отличается от этой, потому что фтор магнитно-активен, а бром магнитнонеактивен. Со фтором есть константа спин-спинового взаимодействия. Возьмем [один конкретный фтор \(вот этот\)](#) - у одного протона одна константа с ним, потому что через *цис*-, а у другого другая – через *транс*-. Поэтому эти протоны магнитнонеэквивалентны. Но при этом химически они эквивалентны, потому что есть операция симметрии, переворот этой молекулы, [в результате которой] они друг с другом самосовместятся. Химически эквивалентные, значит, у них одинаковый химический сдвиг [сигналов], магнитнонеэквивалентные – они могут щепиться друг на друге, даже несмотря на один химический сдвиг, выглядеть как два разных сигнала, симметричных относительно какой-то линии. Они, естественно, очень близко будут [располагаться в спектре] и будут наезжать друг на друга, но тем не менее, это два сигнала. А в действительности будут два-в-один «слившиеся». Это уже от каждой конкретной молекулы зависит, как повезет. Я вам советую рассматривать эти атомы с точки зрения химической эквивалентности, а если вдруг у вас что-то не сходится [- анализировать далее]. Например, у вас есть CH_2 -группы – это химически эквивалентные атомы, если там нет двойных связей рядом – но почему-то два сигнала, которые щепятся друг на друге. Тут вам нужно заподозрить: наверное, в этом случае магнитная неэквивалентность проявляется. Ну и наконец, [энантиотопные атомы](#) в оптически-несимметричном окружении тоже могут стать разными. То есть энантиотопные, в отличие от гомотопных, иногда бывают одинаковыми, а иногда разными. Одинаковы они тогда, когда рядом нет ничего несимметричного, а разными они могут стать, а могут и не стать тогда, когда рядом есть что-то несимметричное. Например, предположим, что [здесь](#) нет вращения, и отсюда торчит [в направлении] на нас какой-то фрагмент молекулы. Они с ним взаимодействуют по-разному, становятся разными.

Что еще следует помнить? Что кроме операции молекулярной симметрии, то есть перевода атомов друг в друга, есть еще вращение вокруг связей. Быстрое вращение вокруг связей тоже делает атомы одинаковыми, если они при вращении совмещаются друг с другом. [Вот классический пример](#). Здесь они и так одинаковые, но даже если предположить, что они были бы разными, уже хотя бы за счет вращения вокруг связей усредняются все константы между ними. А что значит, константы усредняются? [Что они теперь] магнитно-эквивалентны. То есть друг на друге не щепятся и всегда дают один сигнал. Если же мы такую молекулу охладим, к примеру, до $-70\text{ }^\circ\text{C}$ и сможем снять спектр (здесь что-то оптически активное [в этой звездочке](#)), то эти атомы уже не только магнитную, но и химическую эквивалентность потеряют, потому что у них будут разные расстояния до каких-то других соседей. То есть их замещение будет давать два диастереомера. Диастереомеры для ЯМР - разные как на магнитном, так и на химическом уровне.

Вот еще один пример – химически эквивалентные, но магнитнонеэквивалентные. Химически эквивалентные, потому что эту молекулу можно перевернуть [вот так \(вокруг вертикальной оси\)](#) на 180° , а магнитнонеэквивалентные, потому что есть, к примеру, [вот этот протон](#), и с ним у этих двух

разные константы спин-спинового взаимодействия. Случай, когда атомы химически эквивалентны или близки, но при этом магнитнонеэквивалентны - это плохой случай для «интерпретабельности» спектров, потому что это вызывает так называемые эффекты не первого порядка. Мы их потом рассмотрим поподробнее, а пока для вас эффекты не первого порядка означают, что мультиплетность линий и соотношение интенсивности не будет соответствовать простым схемам, которые можно получить, комбинируя α и β [спиновые состояния соседей]. То есть формы мультиплетов будут очень сложными, и вы их в уме не сможете предсказать. Это как раз признак – (эффекты не первого порядка) того, что у вас константы спин-спинового взаимодействия оказались сопоставимы или даже меньше, чем разница в хим. сдвигах: тот случай, когда есть магнитная неэквивалентность при наличии химической эквивалентности. И тогда, если вам нужно обязательно разобрать этот сигнал не первого порядка, остается «скормить» его какой-нибудь программе, которая может применить квантовомеханический расчет и сделать предсказание формы линии с учетом эффектов не первого порядка. Иногда (правда, не всегда) [предсказание и эксперимент] точно совпадают. Выглядит это, примерно, как отражение спектра в воде с легкой рябью. То есть он [спектр] вроде как похож, но если вы попытаетесь совместить их строго, они не совместятся. Где-то линии другое соотношение интенсивности имеют, а где-то еще и хим. сдвиги не совсем точно предсказаны. То есть, если «квантами» по идее форму линии еще можно предсказать точно даже в случае эффектов не первого порядка, то хим. сдвиг точно вообще ничем нельзя предсказать. Это все [приблизительные] эмпирические схемы, основанные или на нейронных сетях, или на анализе баз данных²¹.

Лекция 2 [NMR Lec2s.mp4](#)

Краткое содержание предыдущей серии. Химический сдвиг и спин-спиновое взаимодействие – то, как [они] проявляются в одномерных спектрах. Глядя на одномерные спектры, вы пытаетесь проанализировать, что в молекуле находится рядом с тем ядром, сигнал которого вас интересует, какие соседи, сколько их, какие из них одинаковые, какие разные, и на основании этого предсказываете форму линии. А потом пытаетесь эту форму линии найти на спектре. Мы будем рассматривать конкретные примеры в следующий раз, сначала я, а потом вы в виде семинара. (...) На первом семинаре формула всегда будет нарисована, просто сначала будет подписано, какой сигнал какому атому соответствует, надо будет только объяснить, а потом не будет, значит, надо будет найти [соответствие], сделать mapping. По возможности решить задачу и в ту, и в другую сторону – от спектра к структуре и от структуры к спектру.

#11 Сегодня мы рассмотрим более подробно те же самые вопросы, а именно величину расщепления и характерные примеры, какую форму приобретают сигналы разных молекул. Характерных величин констант [КССВ] очень много (для разных молекулярных фрагментов), но здесь я собрал только самые важные, и, наверное, хотя бы половину из них имеет смысл запомнить, чтобы каждый раз не лазить в справочник. Поначалу вы будете смотреть на эту таблицу, которая у вас, возможно, есть, а потом общие закономерности у вас запомнятся. Сейчас вкратце каждый случай разберу.

Первые два случая мы будем подробно рассматривать отдельно, потому что величина спин-спинового взаимодействия, то есть то, насколько далеко линии в мультиплетах находятся друг от друга, зависит **в данном случае** от валентного угла, а **в данном случае** – от торсионного угла.

²¹ Которые, как и квантовомеханические, не обладают абсолютной точностью.

Характер этой зависимости - чуть позже, а пока что характерные величины. Для sp^3 -гибризованного углерода такая константа через две связи называется «геминальной», характерное значение чуть больше 12 Гц. 12 Гц – это в любом, даже плохо разрешенном спектре, хорошо видимая константа, даже если у вас спектр полностью записан на листе бумаги А4 и напечатан на принтере, вы эту константу разглядите. Почему я говорю, записан на бумаге? ЯМР-сервис может вам выдать спектр в виде распечатки. Если у вас на эту распечатку (на длину листа А4) приходится диапазон, к примеру, от 0 до 15 миллионных долей, то константу в 2 Гц, вы там просто не увидите, потому что она примерно соответствует толщине линии, которой прорисован спектр. Вот 12 Гц – это в терминах «большая-средняя-маленькая» – большая. Здесь [в таблице] еще есть колонка “знак”. В одномерных спектрах знак константы вы не видите. Вы видите расстояние между линиями – это ее модуль, но вы не знаете, какая из линий α , а какая β . То есть могут линии так стоять [знак V на пальцах ладонью назад], а если константа имеет отрицательную величину, то они будут так стоять [знак V ладонью вперед]. Но для одномерного протонного спектра, что -5, что 5, эквивалентно, разница только в некоторых двумерных спектрах.

Основные протон-протонные КССВ

фрагмент структуры	J_{H-H} , Гц		
	знак	характерная величина	интервал значений
	-	12-15	0-30*
	+	7	0-9*
	+	9 (a-a)	6-14
	+	3 (a-e)	1-6
	+	1 (e-e)	0-4
	-	12 (gem-)	11-13
		2	0-3
	+	15	12-18
	+	7	4-12
	-	2.5	2-3

2: геминальные

3: вицинальные

4: аллильные
5: гомоаллильные

* зависит от плоского или торсионного угла

фрагмент структуры	J_{H-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
	\pm	0	0-0.5

подробная таблица: E.D. Becker High resolution NMR, 3rd ed., 2000, 5:124
Ф. Тоукач: слайд 11

Торсионные углы. Вот эта величина – 7 Гц – это для С-С связей при условии свободного вращения. В обычной алифатике в каких-нибудь длинных алкильных группах за счет вращения вокруг С-С связей взаимодействие между протонами усредняется, и мы получаем константу 7 Гц. А так она для одинарных связей от 0 до 9 Гц. Такая константа через три связи называется «вицинальной», вот здесь подписано.

Зависимость от угла можно продемонстрировать на конкретных примерах. Это не циклогексан, это что-то, в основе чего лежит циклогексановый цикл. Почему не годится сам циклогексан? Он слишком быстро делает вот так [волна руками]. Все эти углы постоянно меняются, поэтому вы константы не увидите. То есть это какой-то замещенный циклогексан, в котором есть

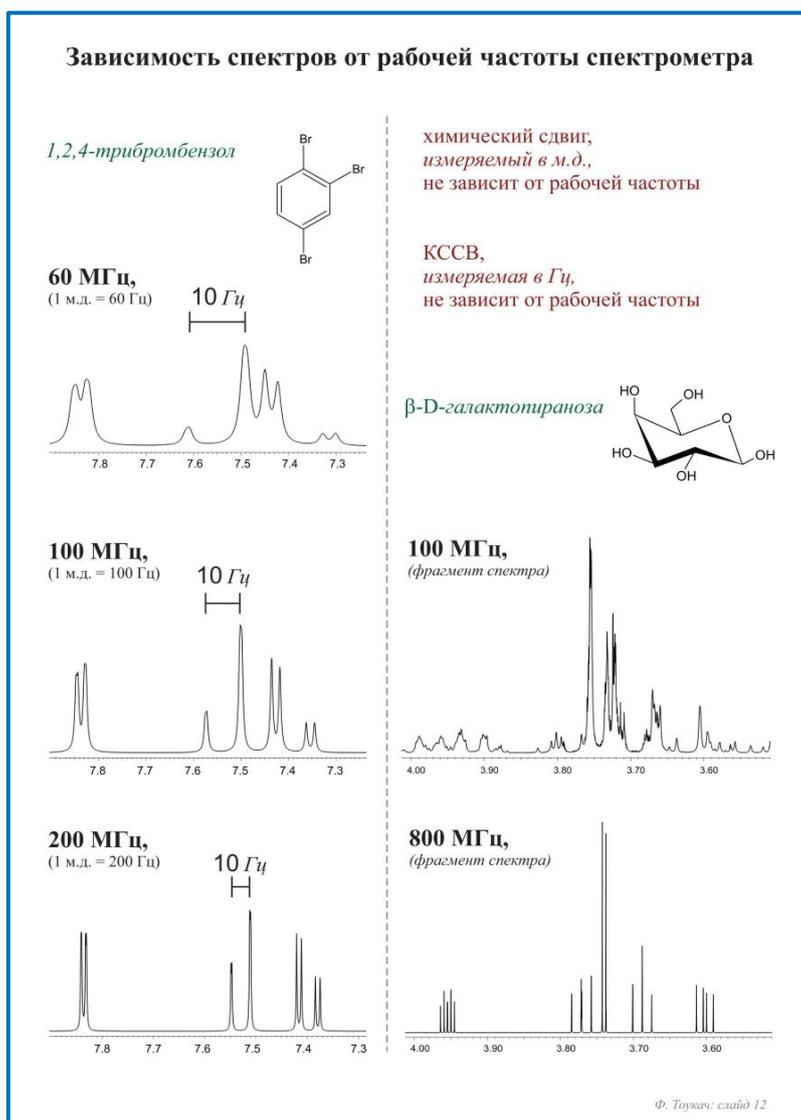
такой фрагмент. Во-первых, заместители делают эти протоны неэквивалентными, так что они начинают цепиться друг на друга, а, во-вторых, фиксируют углы. Итак, **вот случай** через две связи, то же самое, что и **это** – примерно 12 Гц. И три характерных варианта вицинальных констант: аксиальный-аксиальный, аксиальный-экваториальный и экваториальный-экваториальный. Самые маленькие константы – это тогда, когда торсионный угол равен 90° , то есть **вот так**. А самые большие – когда **антиперипланарное положение**, то есть вот так. Ну и в таком случае [синперипланарное] тоже достаточно большие. Общий смысл: когда [связи] стоят перпендикулярно – угол маленький, это как раз случай экваториальный-экваториальный. **Аксиальный-экваториальный** – это чуть больше, градусов 30 или 60 – среднее [значение КССВ]; **аксиальный-аксиальный** (антиперипланарное положение) – эти два протона друг с другом взаимодействуют сильнее всего, дают константу от 8 до 10 Гц. Хотя нет, даже от 6 до 14 Гц в зависимости от конформации.

Теперь три близких случая с двойной связью. Большая [константа] в *транс*, средняя константа в *цис* (порядка 7 Гц в зависимости от наличия заместителей), и неожиданно маленькая (несмотря на то, что она через две связи) константа при sp^2 -гибризованном углероде. Зависимость от валентного угла проявляется так, что в случае 120° ее значение – небольшое, вы ее можете и не увидеть. В целом, можно выявить закономерность – чем меньше связей между протонами, тем больше константа, но иногда это не работает. Иногда через пять [связей] [КССВ] может быть больше, чем через четыре, особенно, если эти пять [связей] расположены как латинское W. Это не такой частый случай; вы сможете всегда обратиться к табличке. И вот, что еще интересно. Вот **эта константа** – 6 Гц, как раз тот случай, когда через три связи получилось больше, чем через две связи. Сравниваем **этот фрагмент с этим фрагментом**. Взаимодействие передается через тот же самый углерод при двойной связи. Но здесь константа маленькая через две связи (...). В случае, когда есть влияние торсионного угла (...) может оказаться, что через три связи константа больше, чем через две, хотя логично было бы ожидать наоборот.

Эти три случая лучше запомнить сразу, поскольку у нас будет много примеров. Это в замещенном бензоле *орто*-протон, *мета*- и *пара*-. Большая константа (между средней и большой) – для *орто*-, маленькая – для *мета*-, и почти незаметная для *пара*-. Я ее, тем не менее, упоминаю здесь. 0.5 Гц – это среднее значение, иногда бывает ее видно, но чаще всего не видно. В спектрах с обычным разрешением расщепление в бензольном кольце через пять связей не происходит. 0.5 Гц – достаточно маленькая величина, чтобы скрыться под полушириной линии. А в случае, если мы еще одну алифатическую связь добавляем, то практически никогда не видим этого взаимодействия, [КССВ] равна нулю. То есть взаимодействие бензольного кольца и заместителя, если мы только не ставим какой-то специальный прецизионный эксперимент, считается, что не проходит. **Этот** протон не видит **этого** как соседа, между ними слишком много связей. Вот когда здесь чисто двойная, не ароматическая, тогда еще как-то видит (вот этот случай). **А эту связь** условно можно считать полуторной, через полуторную и три одинарных уже взаимодействия нет.

#12 Это сравнение спектров, снятых на спектрометрах с разной рабочей частотой. Сначала смотрим на левую половину слайда. Как раз относительно простой случай. И смотрим на нижнюю часть левой половины. Частота спектрометра большая, спектр хорошо разрешенный. У нас здесь есть две константы: *орто*- – между **протонами** и *мета*- – **между этим и этим**. Рассмотрим, к примеру, **этот протон [H3]**. У него один сосед в *мета*-положении. В таблице на предыдущем слайде было написано 2 Гц (через четыре связи). Вот этот сигнал – дублет, потому что один сосед (вот этот). Дальнего соседа в *пара*-положении он не видит, то есть для этого протона сосед только один, значит, дублет с маленькой константой, узкий. Теперь посмотрим **на этот протон [H6]**. У него тоже один сосед только константа больше, потому что через три связи. Того, который к нему в *пара*-положении, он не видит,

слишком далеко. Значит, один сосед, стало быть дублет с константой уже порядка 10 Гц. Вот он. Теперь смотрим [сюда \[H5\]](#). У него два соседа, которых он видит: один в орто-положении, один в мета-положении. Каждый сосед привносит дублетное расщепление, поскольку их два разных, мы наблюдаем дублет дублетов или четыре линии, в которых можно видеть две константы – большую и маленькую.



Это было вступление. Теперь посмотрим на шкалу. Вот здесь между цифрами - 0.1 м.д. Что такое 200 МГц? Рабочая частота спектрометра. Одна миллионная доля – это 0.000001 от рабочей частоты спектрометра. Это значит, что если спектрометр у нас имеет рабочую частоту 200 МГц, одна миллионная доля – это 200 Гц, а 0.1 миллионной доли – 20 Гц. Таким образом, сигнал шириной в 10 Гц (вот этот) занимает у нас примерно 0.05 миллионной доли. А теперь представим, что у нас прибор подешевле и похуже, и у него частота меньше, например, ровно в два раза, 100 МГц. Та же одна миллионная доля здесь уже равна 100 Гц, и поэтому тот же самый сигнал, который имеет те же самые 10 Гц между линиями, на шкале миллионных долей будет занимать уже не 0.05, а 0.10 миллионной доли. То есть, поскольку у нас шкала в миллионных долях, получается, что сигналы становятся как бы шире. То же самое количество герц приходится на большее количество миллионных долей. А что это значит?

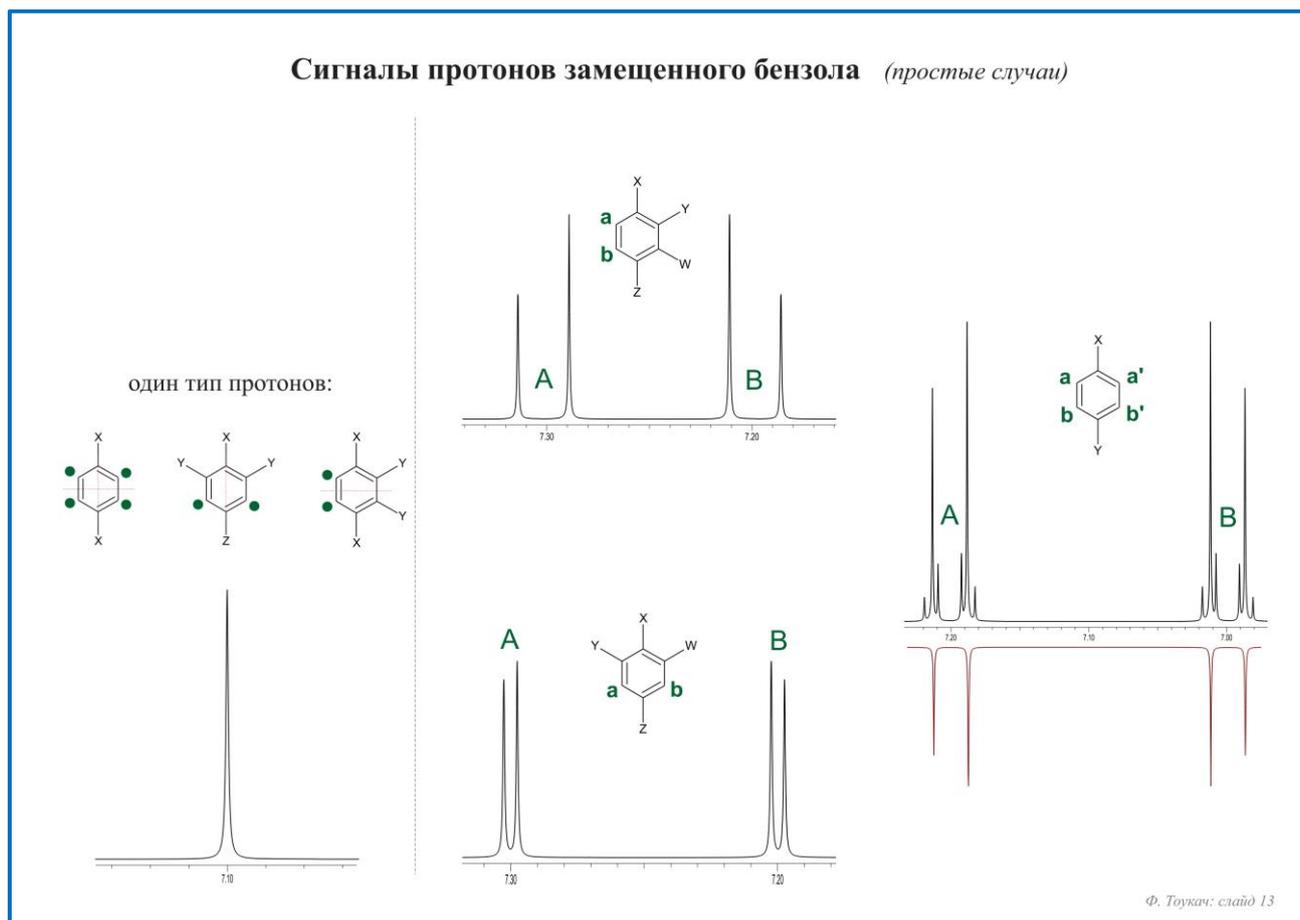
Сигналы становятся шире, и в какой-то момент их ширина превышает расстояние между ними, поскольку расстояние между ними не меняется – что здесь химический сдвиг был, что здесь он 7.5. Во-первых, они начинают пересекаться друг с другом. Во-вторых, возникают различные эффекты не первого порядка, которые как раз характерны для случаев, когда разница между положениями сигналов сопоставима или меньше, чем размеры самих сигналов (чем величины их КССВ). Здесь эти два сигнала еще не пересеклись, но уже оказались достаточно близко, чтобы мы наблюдали сильные искажения. Например, здесь по логике эти две линии должны быть одинаковой интенсивности (в дублете), а мы видим, что они разной интенсивности. Это как раз влияние вот этого сигнала. Называется оно “эффект крыши”, мы чуть позже будем разбирать закономерность. А сейчас пока вам важно знать, что чем ближе взаимодействующие сигналы друг к другу, тем сильнее их «скособочивает». И может скособочить так, что вы уже дублет в этом сигнале не распознаете. Вот, собственно, как раз такой случай. Еще меньше частота - 60 МГц. Сигналы на этой же шкале миллионных долей стали еще шире, как и сами линии стали шире, и расстояния между ними стали больше в миллионных долях. Здесь правая часть одного сигнала наехала на левую часть другого

сигнала. И если тут [100 МГц] довольно легко, глядя на спектр, сразу сказать, что вот дублет, а вот дублет дублетов, то, глядя вот на это [60 МГц], уже нужен тренированный глаз, чтобы выявить в этом спектре такую мультиплетность, потому что сигналы сильно перекошены, и кроме того они друг с другом пересекаются, непонятно, где интегралы мерить. Отсюда вывод: чем больше частота спектрометра, тем лучше и тем меньше требований к вам как интерпретатору спектров. Но, с другой стороны, чем больше частота спектрометра, тем они дороже и сами, и в обслуживании. Если в случае с трибромбензолом даже на самом заурядном спектрометре в 60 МГц можно разобрать, что это такое, и сопоставить спектр со структурой и даже, наверное, структуру из спектра получить, то в случае более сложной молекулы эта разница может стать критической. Здесь [слева] всего лишь возросли требования к квалификации ЯМР-эксперта, но задача осталась решаемой, а здесь (в правой половине слайда), я привел пример, в котором разница уже принципиальная. Спектрометр на 100 МГц и 800 МГц, спектр β -галактоперанозы, в нем больше сигналов, и их химические сдвиги ближе друг к другу. Если здесь [800 МГц] мы видим отдельные сигналы, форма которых поддается предсказанию на пальцах в соответствии с теми же правилами, которые были на прошлой лекции, то здесь [100 МГц] из-за пересечений, наложений сигналов и эффектов не первого порядка мы видим трудно-интерпретируемый набор бугров и холмов. Если у нас нет другого какого-то спектра, то не то что структуру установить, а даже и сопоставить, какие атомы дали какие сигналы, мы уже не сможем. В реальной жизни, наверное, разница будет не такой существенной (в восемь раз), потому что таких [спектрометров на 100 МГц] вообще мало осталось (обычно с 200 МГц начинается в институтах), а 800 МГц – это, наоборот, почти самый «high-end» и передний край, их, наверное, в России не больше десятка. А то, с чем вы будете иметь дело: 200, 300, 400, 500, иногда 600, как-то так, между 200 и 600 МГц. Разница будет не такой заметной, но все же она будет. И если вы либо знаете из литературы, что у вас много сигналов в небольшом диапазоне химических сдвигов, либо вы сняли пробный спектр и увидели что-то подобное, то это повод задуматься, а не стоит ли попробовать снять то же самое на спектрометре с большей рабочей частотой. Общий вывод, точнее два общих вывода, которые можно сделать из этого слайда: химический сдвиг, если он традиционно измеряется в миллионных долях, не зависит от рабочей частоты. Константа, если она измеряется в Гц, тоже не зависит от рабочей частоты. Именно поэтому мы наблюдаем эту разницу. А если мы константу будем измерять в миллионных долях, она уже будет зависеть от рабочей частоты. Соответственно, если и химический сдвиг будем измерять в герцах (так иногда делают), он тоже будет зависеть рабочей частоты. Но в обычном случае константы – в герцах, химические сдвиги – в миллионных долях, численные значения – одинаковые на любом спектрометре, а вот вид и интерпретируемость спектра будут разными.

#13 Задача следующих трех или четырех слайдов – приспособить мозги к полуавтоматическому решению простых примеров, чтобы потом, когда у вас будет более сложный пример, вы этот более сложный пример автоматически в своей голове разбили на простые, для которых у вас будут готовые решения. Всегда можно вернуться к этим слайдам и проверить себя. Итак, все на примере замещенного бензола, чтобы молекулы были похожими, только положения заместителя меняются. Химические сдвиги. На них пока не обращайте внимания, это всё спектры, предсказанные в программе предсказания спектров – могут быть такие, могут быть немного другие, но они все между 6 и 9 (ХС протонов в бензольном кольце). Нам сейчас важен характер расщепления.

Первый случай: два одинаковых заместителя в пара-положении. Эту молекулу можно и так перевернуть [вокруг горизонтальной оси], и так перевернуть [вокруг вертикальной оси], и все четыре зеленых точки при этих операциях совместятся друг с другом, поэтому это четыре одинаковых протона. Для ЯМР это означает один протон, представленный в четырех экземплярах. Друг на друге

они не щепятся и естественно имеют одинаковые химические сдвиги, поскольку у них одинаковое химическое окружение, значит, [их сигнал -] синглет. Одну ось симметрии убираем, добавив заместители. Эту молекулу можно так перевернуть [вокруг вертикальной оси] – то же самое [что в предыдущем примере], только два протона, обозначенных точками - тоже синглет. Если мы их [молекулы из первого и второго примеров] смешаем в мольном соотношении 1:1, синглет от **этих двух** [протонов] будет вдвое меньше чем **этот**, потому что **этих** два, а **этих** четыре. Аналогичный случай - тоже два протона – **эти заместители [X]** одинаковые, и **эти заместители [Y]** одинаковые, то есть молекулу можно перевернуть вот так [вокруг вертикальной оси]. По сути это один и тот же протон, соседними друг для друга они не являются, химически (и в данном случае магнитно-) эквивалентны. Естественно я считаю, что все X, Y, Z – магнитнонеактивные заместители и там нет каких-нибудь фторов или чего-то еще, что эти протоны увидят как соседей, и что может усложнить картину расщепления. Во всех этих трех случаях один сигнал, но химический сдвиг будет разный (здесь для одного случая написан 7.1 м.д., но нам важна форма линии).

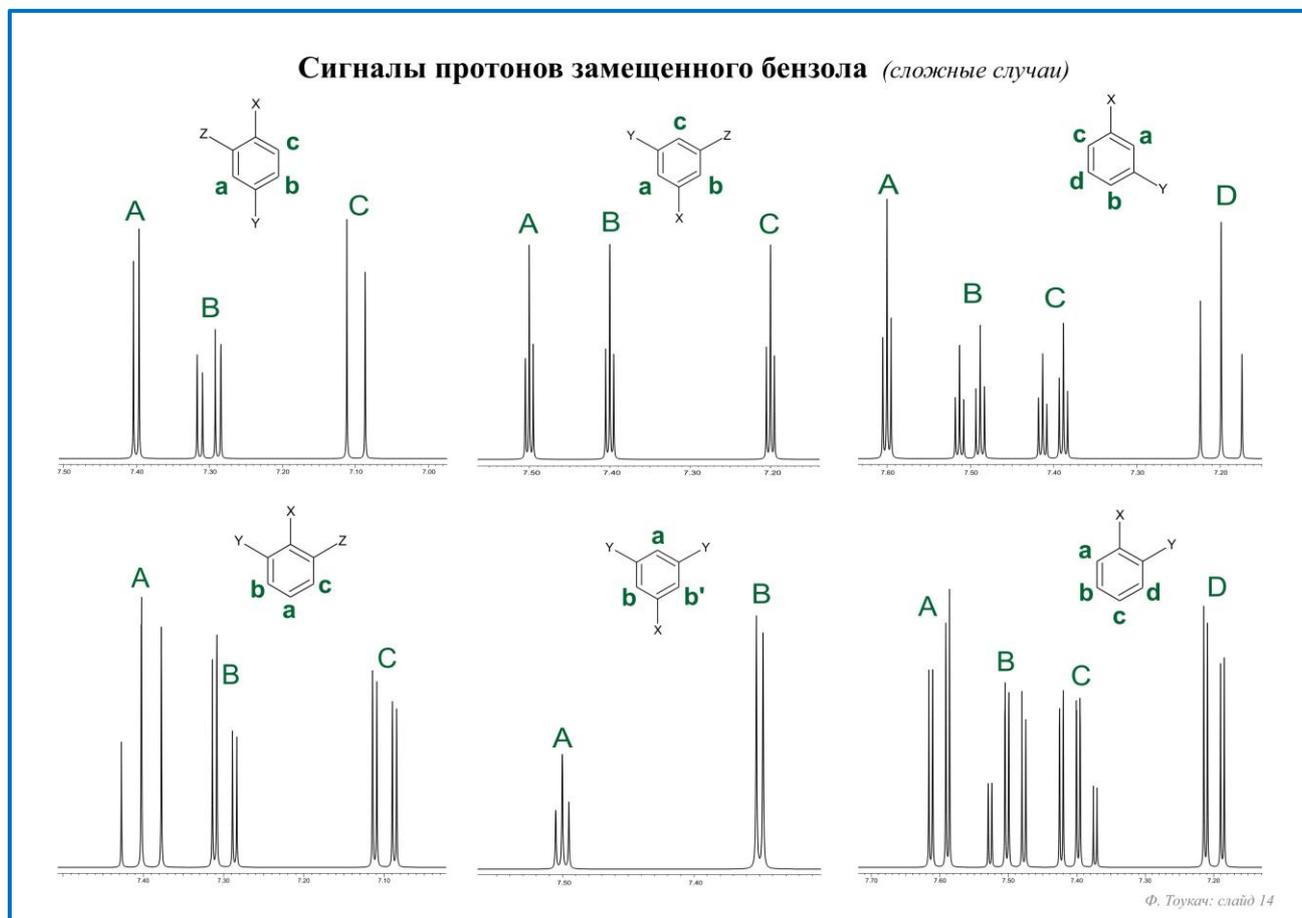


Следующий вариант – **заместители все разные**, переворачивать молекулу больше нельзя, поскольку она не самосовместится – здесь X, а здесь Z. Протоны становятся неэквивалентными, **a** видит соседа **b**, **b** видит соседа **a**, и между ними есть константа спин-спинового взаимодействия – около 10 Гц. Мы ее видим как в сигнале A, так и в сигнале B. Напоминаю, что спиновое взаимодействие коммутативно, то есть если **a** видит **b** с константой x , это означает, что и **b** видит **a** ровно с той же константой x . Теперь **случай с двумя протонами**, только между ними не три связи, а четыре. Те же самые **два дублета**, но только константы уже поменьше, они нарисованы в одном масштабе. То есть, если **здесь** было 10 Гц, то **это расстояние** 2 Гц, поскольку [протоны -] дальше друг от друга, через четыре связи.

А вот этот случай уже не такой простой. Исходя из общих правил расщепления, что мы здесь видим? К примеру, протон a у него есть такой же a' , на котором он не должен щепиться, поскольку эту молекулу можно перевернуть **вот так (вокруг вертикальной оси)**, у него есть сосед b , с которым большая константа, и сосед b' , который в *para*-положении очень далеко (a его не видит). Таким образом, мы для a ожидаем дублет. Аналогичное рассуждение для b , другой дублет. То есть мы можем предсказать такую картину: **красный спектр**, который смотрит вниз (я его перевернул, чтобы он с **этим** [черным] не пересекался). В действительности мы увидим более сложную картину. Это происходит тогда, когда есть магнитная неэквивалентность при наличии химической эквивалентности. То есть a и a' - химически эквивалентны, но магнитно неэквивалентны. Химически эквивалентны, значит, химический сдвиг у них одинаковый, а магнитная неэквивалентность выражается в дополнительных, минорных (небольшого размера) компонентах, которые нельзя предсказать, комбинируя α и β [спиновые состояния соседей]. Такие случаи встречаются не очень часто. Во-первых, они бывают не всегда [в таких структурах]. Во-вторых, эти дополнительные линии находятся рядом с основными, причем в районе основания, а основание обычно более широкое, чем верхняя часть сигнала. И во многих случаях основание главной линии, которое соответствует предсказанной, наезжает на эти минорные линии и скрывает их под собой, поэтому в реальном спектре мы можем увидеть и **такую картину [черный спектр]**, и **такую картину [красный спектр]**, и что-то среднее между ними, то есть сигнал, у которого имеются какие-то образования в районе основания, по бокам. **Это [черный спектр]** – предельный случай, когда они [дополнительные линии] четко видны - очень хорошее разрешение, и так подобрали заместитель, что они далеко «уехали». Заниматься предсказанием их величин мы не будем, поскольку это требует более сложной математики, и проще этот конкретный случай запомнить. Алгоритм работы у вас будет такой: вы предсказываете простой спектр, как нарисован **здесь [красный]**, а потом, если вы видите, что в целом сигнал, ожидаемый вами для такого-то атома, похож на этот, но есть небольшие дополнительные линии, вы смотрите, нет ли здесь случая более сложной симметрии с магнитной неэквивалентностью. Если он есть, открываете слайд, находите там этот случай, смотрите на спектр с эффектами не первого порядка и сравниваете его со своим спектром. Если там что-то похожее среди этих небольших линий, вы говорите, что «да, это тот самый случай», дополнительные линии уже вас не смущают. Все эти случаи для бензольного кольца у нас будут в качестве примеров. В основном, они проявляются именно в системах типа бензольного кольца, когда есть жесткий скелет и нет возможности вращений [вокруг связей].

#14 Теперь снова перейдем к случаям, когда нет эффектов не первого порядка. **Это [слева сверху]** - то же самое, что трибромбензол, который был на слайде со сравнением рабочих частот спектрометров. Рассмотрим другие случаи. **Три разных заместителя, несимметричная молекула [по центру сверху]**, три разных протона a , b и c . У каждого из них - два соседа. Например, рассмотрим сигнал протона a . Эти два соседа химически разные. То есть мы могли бы здесь ожидать дублет дублетов, но константы AC и AB примерно одинаковы, поэтому для a соседи b и c являются псевдо-одинаковыми. Расщепление происходит как на двух одинаковых соседях - в триплет с маленькой константой. Если бы эти константы были большими, вполне возможно, что две ближних линии не совпали бы, и мы вместо одной центральной линии увидели бы две близко расположенных линии - это был бы дублет дублетов. Допустим, одна константа 10 Гц, а другая 9 Гц. Они близки, но все же разницу в 1 Гц при хорошем разрешении вы увидите, то есть будет не триплет, а дублет дублетов, в котором средние линии, ближние друг к другу, будут располагаться на расстоянии 1 Гц. Но в случае, если это две маленьких константы, абсолютная разница между ними получается еще меньше. Маленькие это что? Допустим, одна из них 2.0 Гц, а другая 2.2 Гц. Разница между ними всего 0.2 Гц, а притом, что у нас ширина линий порядка полгерца, понятно, что разницу в 0.2 Гц мы

не заметим. И линии, отстоящие друг от друга на 0.2 Гц, у нас сольются, как раз и будет вот эта центральная линия триплета. То есть, *b* и *c* для *a* выглядят, как одинаковые. Этот эффект проявляется тем чаще [= с большей вероятностью], чем меньше величина константы, связывающей *a* с каждым из них. Для *b* и *c* рассуждение абсолютно аналогичное, отличается только химическим сдвигом. Сразу могу сказать, что порядок, в котором они идут, может быть любой, поскольку X, Y, и Z – не реальные заместители, а просто *какие-то* заместители. В зависимости от того, какие они, могут быть разные химические сдвиги и разный порядок сигналов, но форма их будет именно такой.



Вот это [справа сверху] довольно часто встречается. [Протоны] расположены таким образом, как нарисовано на слайде (...). Этот *a* находится в таком же химическом окружении, как и *этот a* [предыдущий пример], следовательно, и сигнал у него такой же – триплет с небольшой константой. У него два соседа, каждый из них на расстоянии четырех связей, две маленьких примерно одинаковых константы *b* и *c*. Теперь посмотрим на *d*. У него тоже два соседа, поскольку до *a* слишком далеко, а *b* и *c* для него примерно одинаковые. Поэтому [имеем] расщепление на двух одинаковых соседях в триплет. Но видим, что **средняя линия несколько ниже**, чем мы ожидаем. Это, наверное, потому что триплет неидеальный, константы DC и DB совпали не полностью, линия получилась немного шире, поскольку она из двух состоит. А раз она шире, значит, при той же площади она будет ниже. Что мы здесь и наблюдаем, соотношение не 1:2:1, а что-то типа 1:1.5:0.8. **Эти [правая и левая линии]** разные из-за эффекта крыши, к которому мы еще вернемся. Вы могли заметить, что я начинаю рассмотрение с простых [сигналов] протонов, оставляя сложные на потом. Когда вы будете разбирать спектры, я советую делать так же, потому что, может быть, вам повезет, и какой-то сложный, который вы не можете проинтерпретировать на основании [формы] линии, вы соотнесете со структурой методом исключения. И когда будете знать, какому атому он соответствует, вам будет легче объяснить его форму линии. Теперь еще **два сигнала одинакового вида**. К примеру, *c*. У этого *c* - два протона далеко и один протон близко. Те, которые далеко, для

него с точки зрения спинового взаимодействия одинаковы, поэтому они для него как два псевдо-одинаковых соседа (триплетное расщепление с небольшой константой). А один у него близко, один сосед – дублетное расщепление с большой константой. В результате имеем **дублет триплетов, вот он**. Для **b** - рассуждение аналогичное.

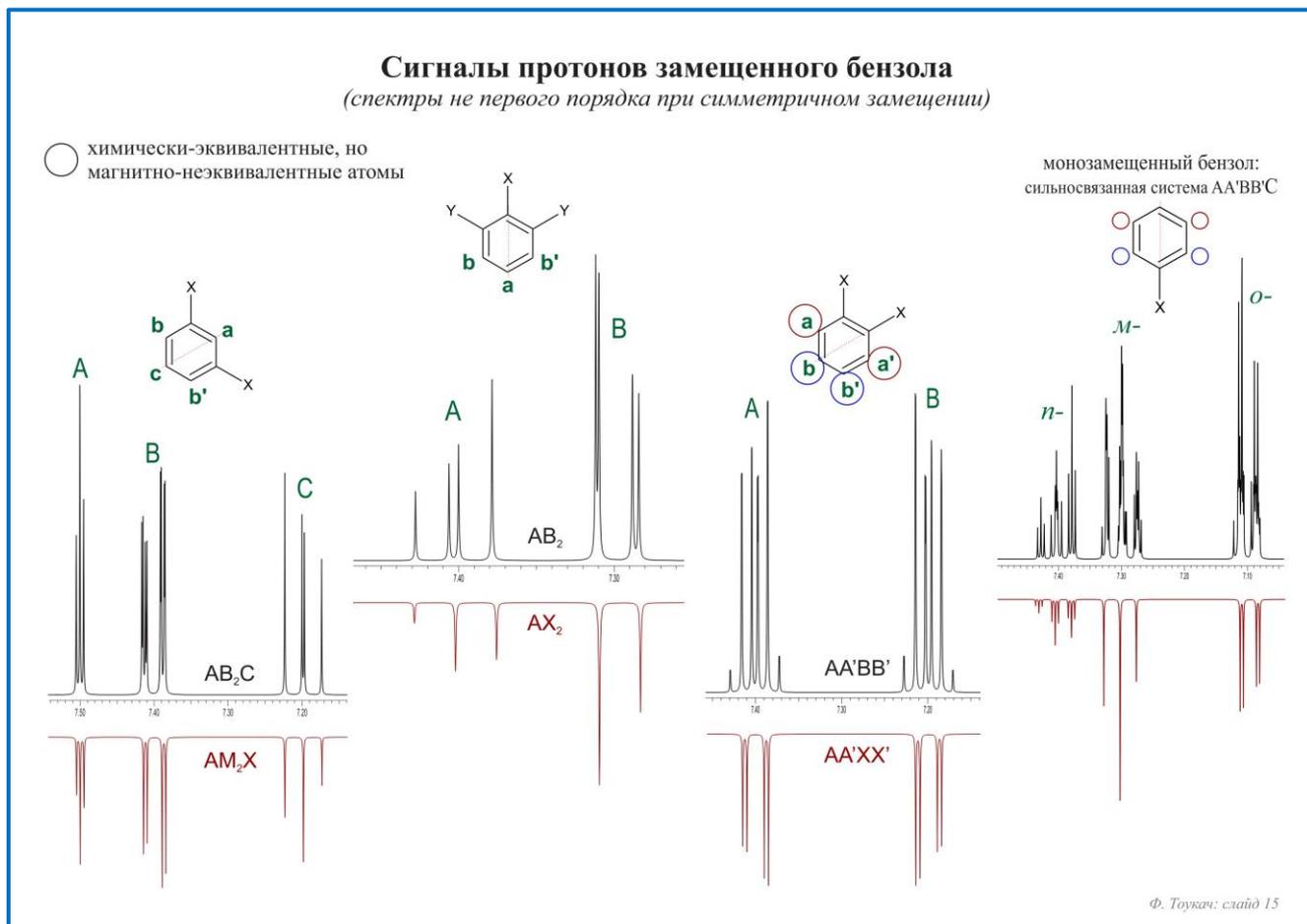
A, b, c - друг за другом несимметрично [слева внизу]. Здесь для **a** случай похож на случай **d** [из предыдущего примера], только мы видим, что средняя линия еще меньше. Видимо, разница констант АВ и АС оказалась достаточной для того, чтобы средняя линия почти разошлась на две. (...) Об этом говорит то, что она низкая; это значит, она широкая. Если чуть добавить разницы констант, у нее сверху появится ямка, а если еще добавить разницы констант - она разойдется на две близкорасположенные линии. Для протона **b** картина такая же, как и для протона **b** **здесь [слева сверху]**. Одна большая константа с **a** и одна маленькая константа с **c**. **Дублет дублетов**, в котором есть и маленькая [КССВ] – между первой и второй линией, и большая – между первой и третьей. Для **c** рассуждение аналогично рассуждению для **b**.

Единственный случай симметрии [по центру внизу]. Он отличается от всех прочих тем, что сигналы в нем - разные по интенсивности. Здесь [в других примерах] интегралы не подписаны, но и так видно, что все сигналы примерно одинаковые по площади. А **вот здесь** один явно больше другого. Это потому что протонов **b** - два, а протон **a** - один. Почему протонов **b** два? Это один протон, присутствующий в двух экземплярах. Поскольку два заместителя [Y] одинаковые, молекулу можно переворачивать вокруг вертикальной оси - совмещается **b** и **b'** и получается, что друг на друге **b** и **b'** не щепятся, дают один сигнал и расщепление только на протоне **a** с *meta*-константой около 2 Гц. Протон **a**, в свою очередь, видит **двух соседей**, здесь они уже не псевдо-одинаковые, а истинно одинаковые, поэтому имеем чистый классический триплет. Если мы измерим площади **этого и этого** сигналов, они будут соотноситься как 1:2, потому что **этих** протонов - один, а **этих** протонов - два.

Последний из этой серии примеров [справа внизу]. У крайних [протонов] **a** и **d** - один сосед близко, один далеко и один очень далеко (в *para*-положении). Того, который очень далеко, они не видят, получается по два соседа с разными константами, то есть **дублет дублетов, например, для d**. А в случае **b** это два соседа близко (**a** и **c**), и один сосед далеко. Два близко – это триплет с большой константой, один далеко - дублет с маленькой константой. В результате [имеем] **триплет дублетов**, но сильно перекошенный, как раз за счет взаимодействия между **b** и **c**. По идее, **эти две линии** должны быть вдвое ниже. Так и было бы, если бы сигналы располагались далеко друг от друга на шкале химических сдвигов. Поскольку здесь они близко, и константа [спин-спинового взаимодействия] связывает их именно друг с другом, мы наблюдаем перекос – внутренние ближние друг к другу линии увеличиваются, внешние уменьшаются.

#15 Это как раз те случаи, когда есть дополнительные линии. В принципе, они могли бы и здесь [по центру снизу на предыдущем слайде] возникнуть, но не возникли. **Вот похожий случай [второй слева]** - тоже два химически эквивалентных и один другой, только здесь константа больше, и поэтому всякие непонятности сильнее проявились. Мы видим, что, во-первых, сигналы перестали быть симметричными. Предсказанная картина – это красный спектр, который смотрит вниз, то есть триплет от протона **a** и дублет от протонов **b**. Такое, сразу скажу, наблюдается редко. Это некий предельный случай наибольшего несоответствия между предсказанной и реальной картиной. А реальная картина может быть чем-то средним между черным и красным спектром. Но с точки зрения простых правил такого спектра [черного] вообще не может быть, потому что каждая константа должна присутствовать как минимум в двух сигналах за счет своей коммутативности. А здесь мы видим, что, например, **это расстояние** между линиями [1 и 2 в сигнале В] больше нигде в спектре не проявляется, оно слишком маленькое, все остальные больше. Из этого мы делаем вывод, что это не

константа спин-спинового взаимодействия, а какой-то эффект не первого порядка. И, конечно, в каком-то другом случае (не в этой молекуле) можно было бы предположить, что это два синглета, находящиеся рядом. (...).



Другие примеры симметричных молекул. [Здесь \[слева\]](#), если с не очень хорошим разрешением снять [спектр], мы именно это и увидим. Черные и красные спектры очень похожи друг на друга, и разница только в том, что вот константа CB и CB' получилась как бы разной. На самом деле она одинаковая, но из-за симметрии и магнитной неэквивалентности спектр выглядит так, будто $[KCCB]$ CB и CB' - разные (но очень ненамного). Это значит, что при реальном разрешении, когда линии будут шире, мы как раз будем наблюдать именно [это \[красный спектр\]](#). В таких случаях эффекты не первого порядка чаще всего не видны невооруженным глазом, [видны,] только если специальный эксперимент ставить.

[Здесь \[второй справа\]](#) тоже пара химически эквивалентных, но магнитно неэквивалентных атомов обведены кружочками соответствующего цвета. [Это \[B\]](#) - сигнал от синих кружочков, а [это \[A\]](#) - сигнал от красных кружочков. Ожидание – внизу, реальность – вверху. Во-первых, изменились расстояния между линиями и появились дополнительные линии. Это значит, что если нам в статье нужно написать константу спин-спинового взаимодействия, придется ее мерять каким-то более хитрым образом, поскольку вытащить ее [отсюда \[черный спектр\]](#) будет нельзя. Признаком этого являются дополнительные линии. Мы видим, что есть химическая эквивалентность, как, например, между b и b' (есть ось симметрии, переворачиваем [молекулу вокруг нее], одно переходит в другое, значит атомы химически эквивалентны). Но в то же время существует хотя бы один атом, с которым у b и у b' разные константы спин-спинового взаимодействия, например, атом a . Это значит, что они магнитно неэквивалентны. Это случай наличия химической [эквивалентности] при отсутствии магнитной, как раз причина появления эффектов не первого порядка, признаком которых являются

дополнительные линии. Что, если вам нужно охарактеризовать этот сигнал? Он симметричный, поэтому за химический сдвиг вполне можно взять его середину (вам, скорее всего, не нужна точность до тысячных, а с точностью до сотых берете середину). А вот как померить константу [спин-спинового взаимодействия]? Для вас, как для химиков, проще всего сделать так: нарисовать фрагмент молекулы в предсказателе спектров, который умеет предсказывать мультиплеты, задать руками какое-нибудь значение констант и посмотреть, что получится, а потом варьировать эти значения. Допустим, между a и b и между a и b' , и смотреть, как будет меняться спектр. Если ваша программа использует квантовомеханические расчеты или иные более сложные, чем умозрительные, представления, она вам предскажет **вот такую картину [черный спектр]**. А дальше вы, изменяя константы, постепенно подгоните то, что она предсказывает, под эту [наблюдаемую] форму линий и посмотрите, при каких величинах констант это получилось. Соответственно, наложите одно на другое, и напишете, что был сделан fitting, и вы получили предсказанную форму линий при таком-то значении константы спин-спинового взаимодействия. Но конкретно для этой молекулы проще константы в справочнике найти, конечно, а то, что я сказал - это для молекулы, которой в справочнике нет.

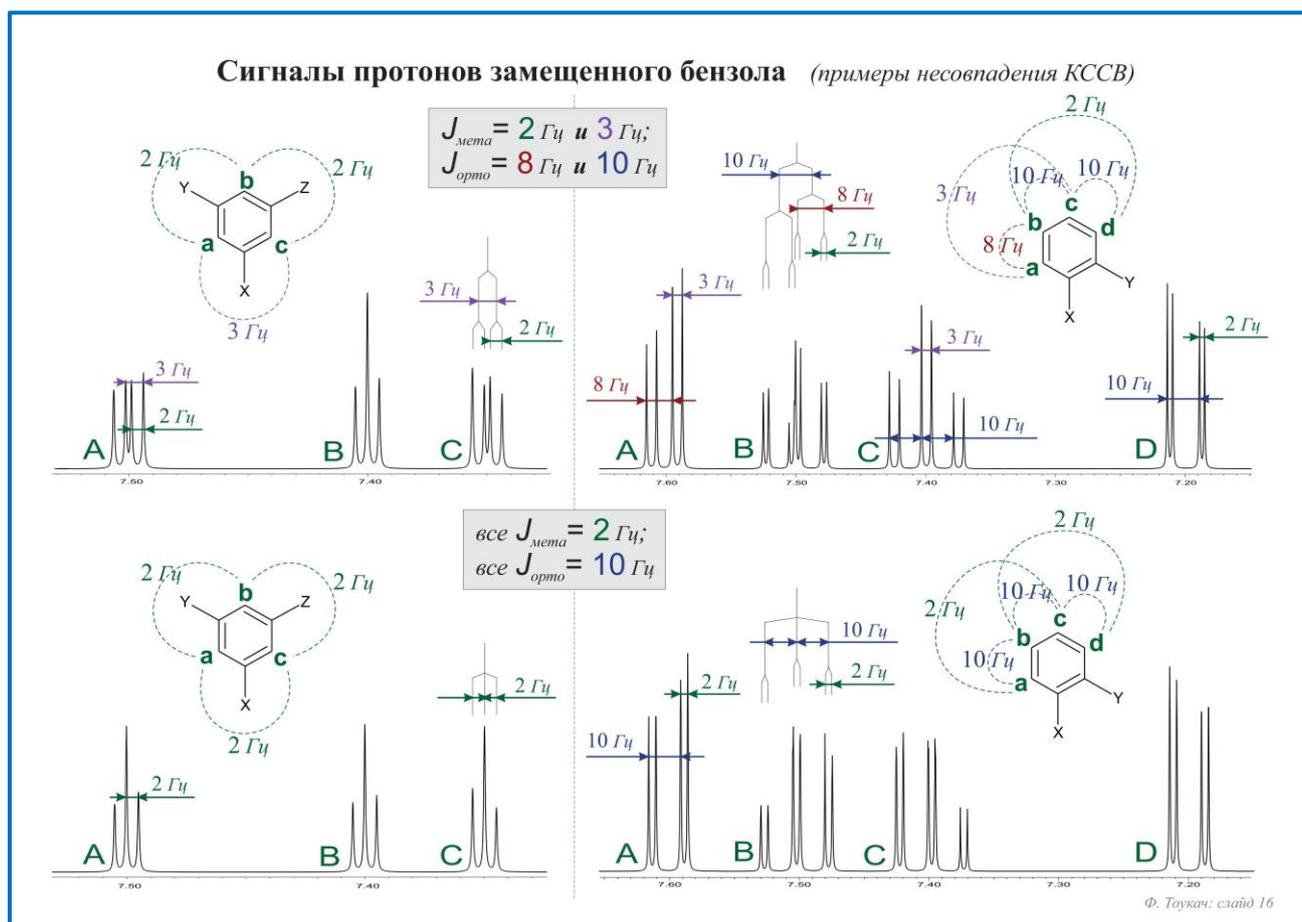
[ответ на вопрос про программы] ACD Labs; там есть что-то типа multiplicity prediction или multiplete simulation. ACD Labs – это большой пакет программ, их там пара десятков. (...) Для формы мультиплетов есть отдельная какая-то программа, но она тоже в этом пакете. И, по-моему, в программе Mestre Nova тоже есть эта возможность, называется что-то типа “simulate spin system”. Там задается просто количество атомов (молекулы рисовать не обязательно), и какие из них какими константами связаны с другими, и она предсказывает форму линии.

Ну и наконец **вот этот случай [справа]** часто встречается, поэтому отдельно рассмотрим – монозамещенный бензол. Здесь три типа атомов: красный, синий и вот этот, который в пара- к заместителю. Их, во-первых, можно по интегралу отличить друг от друга – **этот [п-] маленький, а эти два - большие**, потому что **тут** один протон, а **тут** по два. Этот случай сильной связанности (так называется эта система - $aa'bb'c$) выражается в большом количестве дополнительных линий, но если через слегка прищуренные глаза посмотреть это, мы увидим, что **это [черный спектр]** примерно то же самое, что и **вот это [красный спектр]**. Эффект недостаточного разрешения в реальном спектре как раз вам сведет **эту картину к этой**. *Мета*-константы вы с высокой вероятностью можете вообще не увидеть. Особенно, если это спектр в вязком растворителе типа ДМСО. То есть **вот это [сигнал п-]** будет тремя бугорками. И **вот это [сигнал м-]** если нарисовать, увеличив полуширину линии до 0.5 Гц или до 1 Гц, тоже будет тремя бугорками. Бывает и хуже – настолько что мы *орто*-константу иногда можем не увидеть. Если у нас есть очень быстро релаксирующий атом²², то вот это все [сигналы п- и м-] может слиться в одно такое образование, в котором не видно даже *орто*-константы за счет того, что есть еще *мета*-константы (линии широкие получаются, настолько широкие могут быть, что [ширина окажется] больше, чем половина *орто*-константы). То есть, у нас **эта группа сольется с этой группой**. В реальном спектре может быть что-то вот такое [рисунок на доске]. Не очень аккуратно нарисовал, но смысл понятен. А может быть, будет что-то вот такое [рисунок на доске]. Таким образом, **это [на слайде]** – идеально разрешенная картина, симулированная, это – [на доске] реальная со средним разрешением, это [на доске] – реальная с плохим разрешением.

#16 Во всех предыдущих примерах мы предполагали, что все *мета*-константы равны друг другу, и все *орто*-константы равны друг другу. Однако в каких-то случаях это может быть и не так.

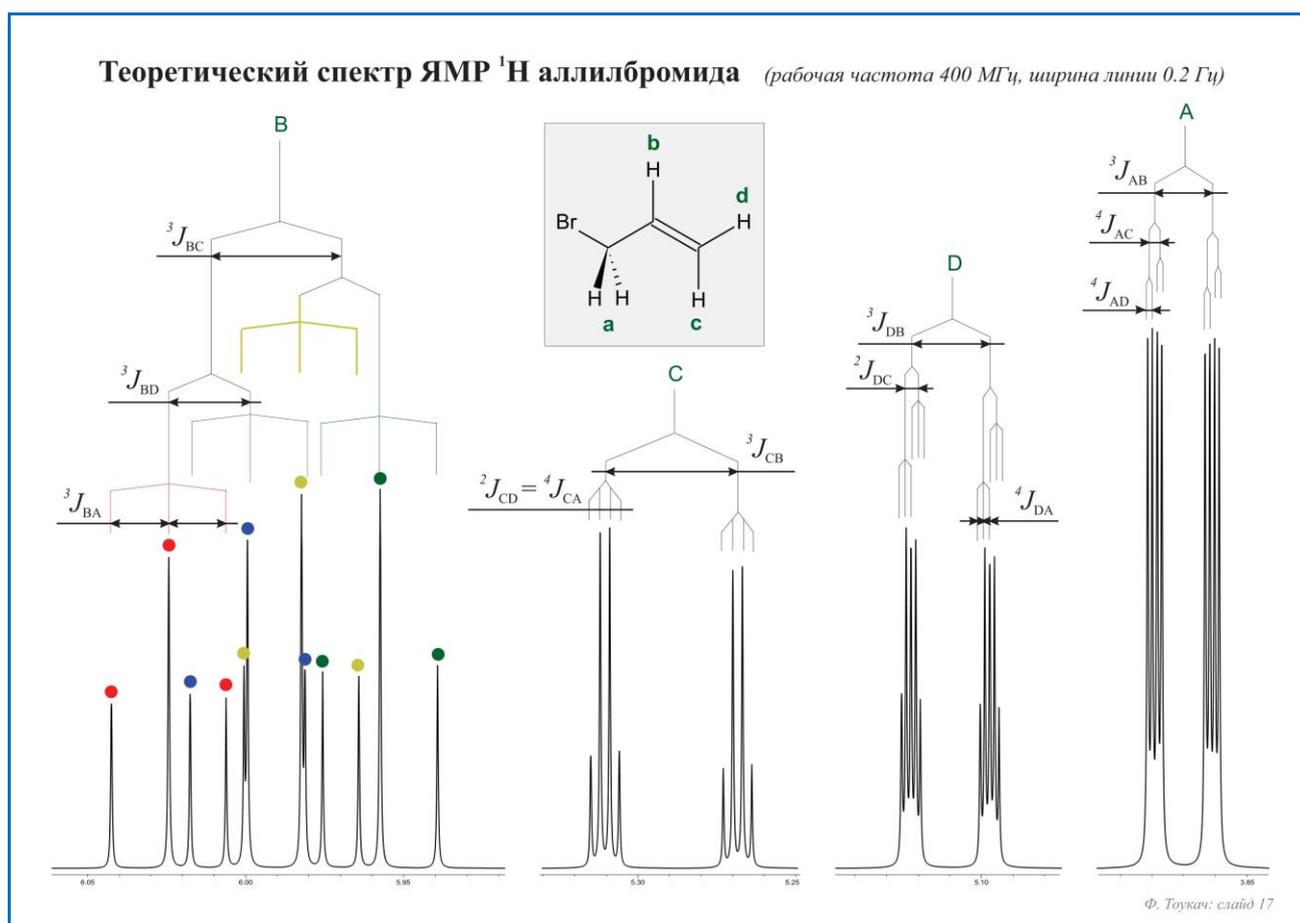
²² Наиболее вероятная причина здесь - не уширение сигнала за счет быстрой релаксации, а усложнение и наложение сигналов за счет близости их химических сдвигов.

Предположим, что заместители в тех же бензольных кольцах подобрались таким образом, что это условие нарушается. Внизу – те примеры, которые мы уже рассматривали. (...) Эти **пунктирные линии** связывают протоны друг с другом, и над ними подписаны величины констант спин-спинового взаимодействия, маленькие – зеленым, большие – синим. Повторять не буду, то же самое [что было два слайда назад]. А сверху – случаи, когда они [KCCB] не равны друг другу. Допустим, то, что с **левой стороны**. Вот эти **три протона**, и между **a** и **c** одна из *мета*-констант по какой-то причине, связанной с заместителями, оказалась больше, например, 3 Гц против обычных 2 Гц. Это значит, что для протона **a** соседи **b** и **c** уже перестают быть одинаковыми, потому что он их видит с разной силой: 2 Гц с **b**, и 3 Гц с **c**. Два разных соседа, это **дублет дублетов**, в котором можно померить константы 2 и 3 Гц, **вот они подписаны**. Для **b** ничего не изменилось: что здесь было 2 Гц, что здесь сигнал такой же. Еще есть **c**. Для него рассуждение аналогично рассуждениям для **a**, одна константа 3 Гц, другая – 2 Гц. То есть, когда все константы были одинаковыми, дерево расщепления выглядело **так [внизу]**, когда они стали разными – дерево расщепления выглядит **так [вверху]**. Можно поменять местами [порядок расщепления] – сначала на 2 Гц, а потом на 3 Гц – все равно получатся те же самые четыре линии в тех же самых местах. То есть два триплета превратилось **в дублеты дублетов**.



Еще один пример [справа], здесь изменились все сигналы, кроме **d**. **D** находится в таком же окружении с точки зрения констант спин-спинового взаимодействия [как и внизу слайда], поэтому его сигнал остался таким же. Что изменилось, к примеру, для **a**? У него тоже два соседа, один далеко, один близко, только **здесь** константы в пять раз отличались, а **здесь** в два с небольшим. То есть было 2 и 10 Гц, а стало 3 и 8 Гц. Характер расщепления не изменился, тот же самый **дублет дублетов** **здесь** и **здесь**. Но изменилась его количественная характеристика, то есть расстояние между линиями. Эти расстояния здесь подписаны, где 10, где 2, где 8 и где 3. Я надеюсь, что в дополнительных комментариях это сравнение не нуждается. Теперь посмотрим на **c**. У него тоже изменения только количественные, большая константа осталась той же, а маленькая изменилась. **Это расстояние**, узкое

дублетное расщепление стало не таким узким, теперь здесь 3 Гц. Самое интересное произошло с сигналом В. У него добавилась дополнительная линия, но не две, как мы ожидаем, а одна. Было шесть линий, классический **триплет дублетов**. (...) ²³ Одна [большая КССВ] осталась 10 Гц, а другая стала 8 Гц. То есть теперь у него [протона **b**] ближние соседи стали разными **a** и **c**, а дальний сосед **d** так и остался с константой 2 Гц. Теперь [у протона **b**] три разных соседа, это трехкратное дублетное расщепление, то есть **сигнал DDD, дублет дублетов дублетов**. Должны наблюдаться восемь линий. Но здесь их семь, а семь их, потому что, одна константа оказалась суммой двух других, такое иногда бывает. Всегда, когда у вас одна константа в пределах того же мультиплета является суммой двух других, это значит, что (...) какие-то линии совпадут. Вот **нарисовано дерево расщепления**, и четвертая и пятая линии совпали, в данном случае полностью. Поэтому вместо двух маленьких видим одну большую [линию] посередине. **Вот эта, которая справа от нее**, вообще-то должна быть тоже маленькой. Но в реальном спектре я бы сказал, что шум мог попасть в это место, а в этом, видимо, такой хитрый эффект крыши в сторону [сигнала] С.



#17 На этом примере мы попробуем не только перейти от молекулы к мультиплетности сигналов, но и сделать наоборот. Сначала решим прямую задачу, то есть, глядя на молекулу, предскажем мультиплетность сигналов и сопоставим ее со спектром. Самый сложный и интересный, конечно, **вот этот [слева]**, мы его оставим напоследок. Итак, смотрим на молекулу. Здесь четыре типа протонов. Вот эти два одинаковые (во-первых, симметрия [относительно плоскости], во-вторых, вращение вокруг **этой связи**). Этот сигнал будет в два раза больше [каждого из остальных] по площади, и на нем [остальные] будут щепиться как на двух соседях. (...) Большой сигнал, восемь примерно одинаковых линий. Тут сомнений быть не может, восемь одинаковых линий – это DDD. В общем, одна константа явно большая, между **этой группой и этой**, и одна маленькая и одна совсем

²³ Удалено ошибочное рассуждение

маленькая. Посмотрим, соответствует ли это молекуле. Относительно большая - это через три связи, алифатическая константа порядка 7 Гц, усредненная за счет вращения. А дальше две маленьких через двойную связь (...), через четыре связи. Видимо, совсем маленькая – это та, которая идет через *цис*-, а та, которая чуть побольше - это та, которая через *транс*-. Здесь, правда, наоборот написано – может быть, это или ошибка на слайде, или какой-то непредсказуемый эффект из программы ACD Labs. Когда программа ACD Labs предсказывает мультиплетность, там иногда тоже в конкретных молекулах бывают ляпы, баги и глюки. То есть предсказание нельзя рассматривать как истину в последней инстанции, и если у вас есть реальный спектр, он, конечно, более достоверен. Здесь я бы ожидал, что это AD, а это AC. Ну, может быть, или в этой конкретной молекуле какой-то химический эффект, про который знает ACD Labs и не знаю я, либо это просто ошибка в предсказании, либо это ошибка при оформлении слайда (перепутаны буквы C и D) - одно из трех.

Смотрим дальше, *d*. У него есть один геминальный (при sp^2 это маленькая константа), один вицинальный через двойную связь «в цисе», это около 10 Гц (вот она - J_{DB}), самая большая из них, и один дальний – раз *a* щепился на *d*, то и *d* щепится на *a* с этой маленькой константой. Причем на *a* у него щепление триплетное, потому этих двое, всех остальных соседей по одному, поэтому на них щепление дублетное. Таким образом, сигнал называется DDT, дублет дублетов триплетов. Но он не совсем чистый, в каждой половинке третья и четвертая линии совпадают друг с другом, потому что похоже, что константы между *d* и *b* и между *d* и *c* отличаются примерно в два раза. Значит правая компонента одного триплета совпадет с левой компонентой другого триплета и вместо двух линий единичной интенсивности мы увидим одну линию двойной интенсивности. Поэтому здесь не шесть линий как мы ожидаем – 1:2:1:1:2:1, а пять – 1:2:2:2:1. Во второй половине, соответственно, столько же. Если здесь [A], глядя на сигнал, сразу можно сказать, что это DDD, то здесь [D] уже это не столь очевидно.

Если у нас нет [структурной формулы] молекулы, нам нужно решить обратную задачу. Или есть молекула, но нет вот этой подписи здесь – а ее, естественно, в реальной жизни не будет. Нам нужно понять, чему может соответствовать этот сигнал. Что первое стоит сделать? Сделать отнесение более простых сигналов, чтобы они не мешались. Так у вас меньше вариантов для выбора останется. Более простые – этот и этот - там, где по форме линии [отнесение] очевидно. Останется два сложных. Для начала [имеет смысл] выявить самую большую константу, померить ее и посмотреть, чему она может соответствовать в молекуле. Мы померим, получится ~10 Гц. Кроме этого мы уже знаем, что этот сигнал – это A, и большая [KCCB] в нем может быть только одна - вот эта алифатическая ~7 Гц. Это значит, что вот это – это либо геминальная при sp^3 -углероде, либо вицинальная (через три связи) через двойную связь. Первого случая, исходя из нашего структурного предположения, нет в молекуле, зато второй есть. Есть двойная связь, и есть две константы через нее – через *цис*- и *транс*-. А дальше смотрим на справочный слайд и видим, что вот это 10 Гц это больше соответствует *цис*-. Но пока еще это недоказанное предположение. Если потом противоречий не будет, где-то еще мы найдем *транс*-константу – она должна быть больше – и если она действительно больше, значит предположение было правильным. Таким образом, этот сигнал - это один из протонов при двойной связи, у которого есть как минимум *цис*-сосед за счет наличия этой константы [10Гц]. А вот это [сигнал слева] разбирать, исходя из формы линии, уже не так просто. Если опыт есть, который позволяет увидеть дублет дублетов триплетов в этом [сигнале] – хорошо, а если нет, то просто это откладываете и переходите к более простому сигналу. Потом, может быть, это и не придется разбирать, потому что вы придете к тому же самому с другой стороны. К примеру, вот этот [более простой]. Здесь сразу виден дублет квартетов, он достаточно простой. Вспоминаем, откуда может взаться дублет, да еще и с такой большой константой? Померим ее – ~15 Гц, это в данной

молекуле может быть только *транс*- через двойную связь. Значит, это тоже один из протонов при двойной связи, у которого есть *транс*-сосед: или *c*, или *b*. Но *b* должен еще иметь многочисленные [проявления] больших констант с *a* (~7 Гц), а здесь таких нет, здесь все остальные маленькие. То есть у этого протона три каких-то примерно одинаковых соседа, но трех эквивалентных соседей здесь нет ни в одной группе. Это значит, где-то константы совпали. Так и получилось, что константа через две связи при sp^2 -углероде примерно равна константе через четыре связи через двойную связь, ~2 Гц. Для протона *c* один протон *d* и два протона *a* выглядят как одинаковые соседи. В сумме их три (псевдо-одинаковых), на одну линию больше получается (квартет), и дублетное расщепление за счет *b*.

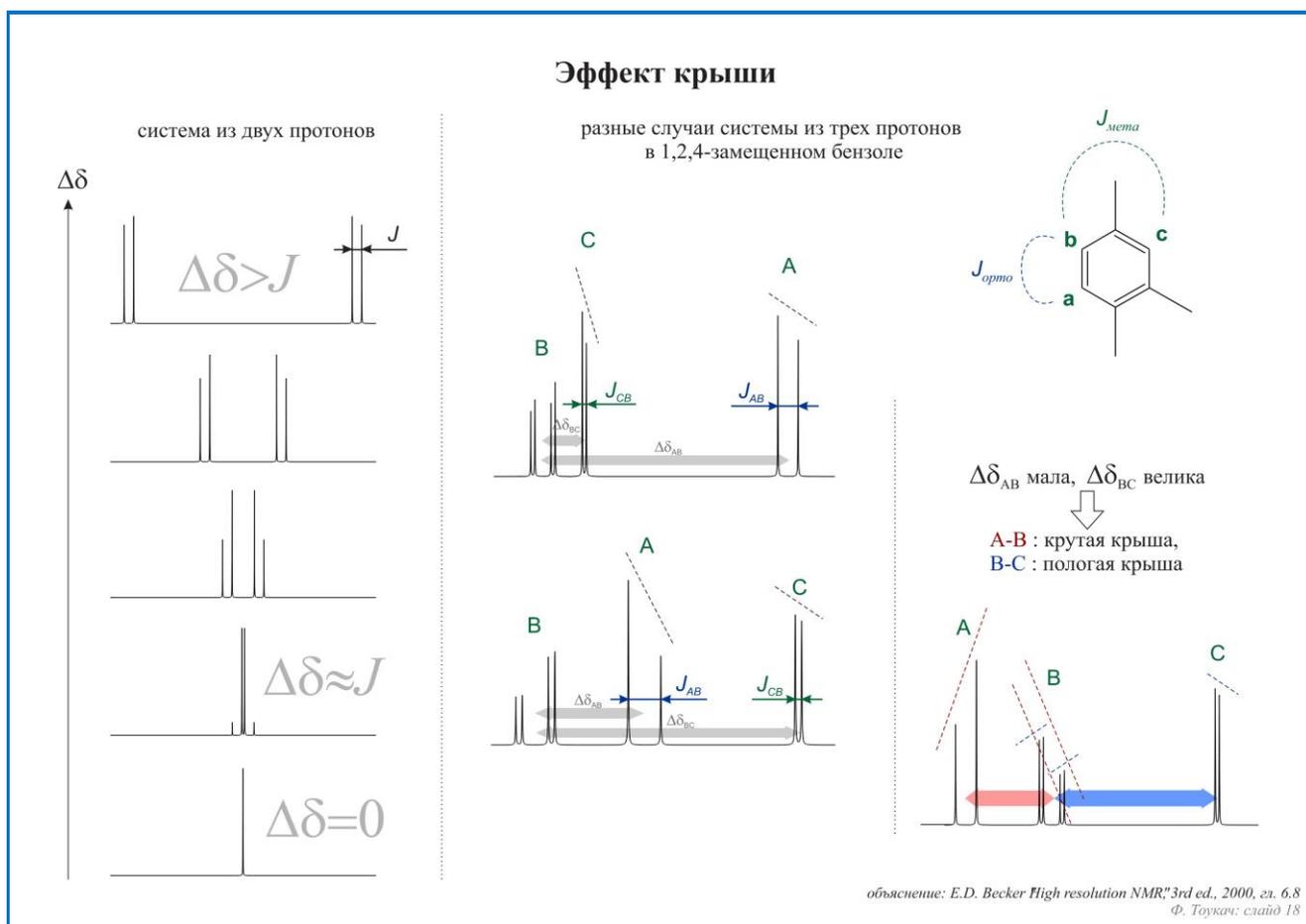
Этот [слева] уже можно было бы методом исключения [отнести], но допустим, у нас что-то не сложилось с этим [C], и как минимум стоит проверить. Когда такое дерево нарисовано, проверяется все очень легко. Но его не всегда легко нарисовать. Давайте предположим, что оно еще не нарисовано, и попытаемся выявить мультиплетность в этом наборе линий. Для начала их хотя бы просто посчитать можно, получится 12 штук. 12 штук – это как раз DDT, $2 \times 2 \times 3$, а, может, еще как-то 12 может получиться²⁴. Но уже можно предположить, что там есть дублетное, еще одно дублетное и триплетное расщепление. Маленьких констант здесь нет, потому что вот, например, у нее [у крайней линии] ближайшая [линия] находится вот здесь, на расстоянии ~7 Гц. Наз нет маленьких констант, значит атом, который дал этот сигнал, не имеет видимых соседей на расстоянии, к примеру, четырех связей через двойную связь. Уже, исходя только из этого, можно сказать, что это *a*, но лучше все-таки проверить по остальным признакам. Мы видим здесь большие линии и маленькие. Причем большие отличаются от маленьких примерно в два раза. Это тоже повод тоже заподозрить триплетное расщепление, в котором соотношение интенсивности 1:2:1. А теперь посчитаем большие и маленькие и получим еще один фактор в пользу наличия триплетного расщепления. Больших – 4, а маленьких – 8. Получается, что это по сути четыре триплета. Четыре откуда берется? Четыре – это их середины, вот они. То есть, если предположить, что большие линии – это центры триплетов, то дальше, глядя на большие, мы уже, вот это все закрывая, видим дублет дублетов и можем померить константы и сопоставить их с молекулярной структурой. Здесь они померены и подписаны. А дальше проверим, что у каждой большой [линии] действительно есть две маленькие на одном и том же расстоянии [справа и слева]. Берем первую пару, откладываем то же расстояние с другой стороны, и действительно видим, что здесь есть маленькая линия. Обозначаем ее какой-нибудь иконкой или цветом или чем-нибудь еще. Три красных точки, один триплет. Потом первая с левой стороны незадействованная линия – синяя. Смотрим расстояние до ближайшей большой, оно оказывается таким же, какое было здесь [у красных]. Это то же самое триплетное расщепление. Потом от нее откладываем в эту сторону, и здесь действительно есть маленькая линия. А дальше осталась в левой половине сигнала только одна, желтая, это та же, которая была синей, с другой стороны. То есть, если мы начнем с той стороны идти [справа], будет то же самое. Достаточно дойти до середины, поскольку сигнал симметричный, как и должен быть. И уже с этими соображениями мы можем нарисовать вот такую картину и в ней померить константу. Дублет, дублет, триплет. Большой дублет – это *транс*- через двойную связь, средний дублет – *цис*- через двойную связь (...). Средний триплет – это алифатический, расщепление на двух соседях *a*.

Теперь, если этого рассуждения у нас бы еще не было, как можно понять, что это за атомы в молекуле? Во-первых, нет маленьких констант, а, во-вторых, есть и очень большая, которая может быть только *транс*- через двойную связь, и вот такая, которая очень похожа на *цис*- через двойную связь. В молекуле только один атом, у которого есть и *цис*-сосед, и *транс*-сосед, и это атом *b*. Во

²⁴ Триплет квартетов или дублет секстетов.

всех остальных – либо тот [цис-], либо другой [транс-], либо случай А. То есть, исходя из этого рассуждения, можно было бы сделать отнесение этого сигнала. Отнесение – это сопоставление с молекулой: «написать здесь букву В».

Ваша задача на экзамене будет чем-то такого типа, может линий побольше, только не будет подписей. Будет молекула, вам нужно будет сопоставить сигналы с атомами и написать, откуда берется каждая линия. Наиболее простой и понятный способ это сделать – нарисовать **такое дерево**, в принципе из него все понятно (если оно правильное). На тот случай, если вы неправильно нарисуете, можно будет еще подписать константы, которые позволят разобраться, что именно неправильно, и есть ли в ваших рассуждениях что-то правильное. То есть идеальный ответ должен выглядеть так же, как этот слайд. А неидеальный может, например, включать, только дерево или только подпись «В». Но только за подпись будет только треть баллов за задачу.



#18 Вы могли бы заметить, что даже на симулированных спектрах сигналы перекошенные. А возможно, кто-то знает или заметил закономерность: чем ближе друг к другу сигналы, между которыми есть спиновое взаимодействие, тем сильнее они перекошены. Этот эффект называется “эффект крыши”; я вам его дам только эмпирически, на примерах, которые можно запомнить и, глядя на спектр, применить. Объяснения не будет, поскольку объяснение выходит за рамки разумного для такого краткого курса. Оно считается из «квантов», но вот из соображений комбинирования спиновых состояний оно так легко не предсказывается. Итак, почему крышей называется? Смотрим на левую часть слайда. Есть, к примеру, система из двух протонов, взаимодействующих между собой. Они не просто щепятся на ком-то, а щепятся именно друг на друге, вот **один дублет**, вот **другой дублет**. Верхний случай – расстояние между ними на шкале химических сдвигов существенно превышает величины констант спин-спинового взаимодействия, то есть они в терминах спектров находятся далеко друг от друга и напоминают классические дублеты с

соотношением интенсивности 1:1. Что же происходит, если в силу химических особенностей сигналы будут [располагаться] ближе друг другу, то есть их химические сдвиги будут близки? По мере того, как они приближаются, мы замечаем, что внутренние линии увеличиваются, а внешние уменьшаются. Если через них провести [прямую], **соединить вершины линий**, то получится что-то похожее на крышу, поэтому и называется – “эффект крыши”. Чем они [сигналы] ближе, тем крыша более крутая. Идеальная крыша симметрична, то есть что с левой, что с правой стороны она имеет одинаковый угол, а реальная [крыша] далеко не всегда бывает симметричной.

Что может произойти дальше? **Вот случай [второй снизу]**, когда разница химических сдвигов примерно равна константе спин-спинового взаимодействия. Здесь внешние линии почти исчезли, а внутренние линии почти совпали. Причем может быть два варианта: здесь может быть **вот это один сигнал [линии 1 и 2]**, а **вот это другой сигнал [линии 3 и 4]**. Этот случай похож на то, что **вы видите здесь [на один пример выше]**. (...) А может быть и не совсем так. Вот, к примеру, **один сигнал [линии 1 и 3]**, а **вот другой сигнал [линии 2 и 4]**. То есть средние линии уже заехали друг за друга и сигналы пересеклись. Что именно реализовалось в этом случае мы не знаем, но результат выглядит примерно одинаково. Теперь встает вопрос: как, собственно, измерить химический сдвиг? Химический сдвиг – это середина мультиплета только в том случае, если мультиплет симметричен. А здесь он уже очень несимметричен. Химический сдвиг **этого сигнала** будет где-то **здесь**, то есть ближе к большей линии. Если вам нужно его померить точно, вы интегрируете и то, и другое [обе линии по отдельности] и сравниваете площади; химический сдвиг должен оказаться «по центру масс». То есть разделяете сигнал так, чтобы справа и слева оказалась одинаковая площадь. Сейчас я нарисую реальную форму линии. Вот здесь, к примеру, провели [разделение] здесь, площадь с левой стороны равна площади с правой стороны [рисунок на доске]. Черная линия – это и будет химический сдвиг, то есть «центр масс» сигнала. Тогда, когда линии примерно одинаковы, это и есть его середина. В данном случае уже нет.

Теперь **предельный случай [внизу]** – химические сдвиги совпали полностью. Эффект крыши в этом случае тоже имеет предельную величину: внешние линии полностью исчезли, а внутренние линии увеличились. Здесь они имеют одинаковый химический сдвиг, то есть они друг с другом тоже совпали. По сути это означает, что атомы стали эквивалентными, [и их сигналы] перестали друг на друге щепиться.

Теперь посмотрим на более сложный случай, когда крыш несколько. Один сигнал может «щепиться» на двух соседях или на трех или еще на скольких-то. И тогда с каждым из них у него будет своя крыша. Вот случай «ABC» - классическая система ABC с одной большой и одной маленькой константой. В зависимости от того, какие химические сдвиги у этих сигналов, может наблюдаться три варианта. К примеру, они расположились **вот в такой последовательности [по центруверху]**. Посмотрим на сигнал А (**на этот широкий дублет**). Он находится далеко от остальных (важно, что он находится далеко от В, потому что на С он не щепится), и поэтому крыша у него пологая. А сигнал С, который тоже щепится на В (**вот этот, с маленькой константой**), находится близко к сигналу В, и крыша у него более крутая.

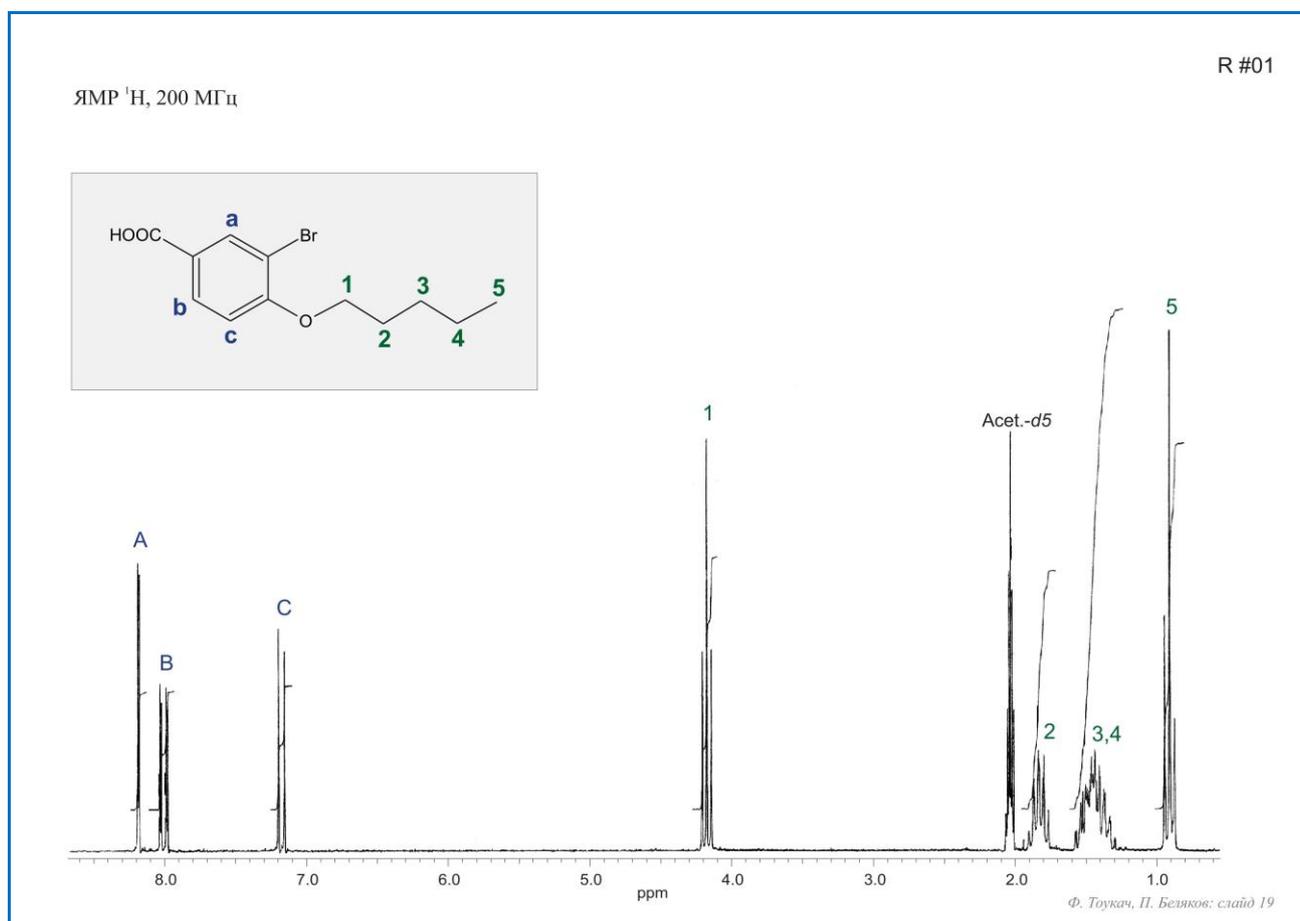
Если мы в данном случае поменяем А и С местами, то **все будет наоборот [по центрувнизу]**. То есть, **это** отличается от **этого** тем, что химические сдвиги А и С поменялись местами. Но **здесь [вверху]** у А пологая крыша, а у С – крутая, а **здесь [внизу]** – у А крутая, а у С – пологая. **Эта крыша** - широкая и крутая, а **эта** - узкая и пологая. Понятно, откуда берется узкая-широкая, а откуда крутая-пологая? Будем надеяться... Некоторые, кажется, сквозь доску смотрят, судя по фокусировке. Скоро перерыв сделаем.

Ну и самое интересное – это посмотреть на В. Вот **здесь [по центру вверху]** у В две крыши – в сторону С и в сторону А, но поскольку сигналы С и А находятся по одну сторону от сигнала В, обе эти крыши направлены в одну сторону. Только та крыша, которая узкая, то есть которая связана с расщеплением в 2 Гц, вот здесь имеет большую крутизну. А широкая крыша – это между первой и третьей линией, та, которая связана с большой константой между В и А, имеет более пологую величину, не настолько сильный перекося. А **здесь [по центру внизу]**, наоборот, сигнал, с которым широкое дублетное расщепление, находится близко, поэтому между первой и третьей [линиями] (она же между второй и четвертой) крыша крутая, а между первой и второй [линиями] крыша пологая, такая же как здесь. Но и в этом, и в этом случае **[по центру сверху и снизу]** обе крыши сигнала В направлены вправо, а **в этом случае [справа]**, когда В оказался между сигналами А и С, крыши у него направлены в разные стороны. Смотрим: красная, широкая, крутая – это с А. Сигнал А находится близко, поэтому она крутая, константа здесь большая, поэтому здесь широкое расщепление ~10 Гц, (такое же как здесь), это между первой и третьей линиями. Здесь **два красных пунктира** проведено – это красная крутая крыша, направленная влево. Теперь другая крыша за счет взаимодействия В и С: она узкая, потому что *мета*-константа²⁵, между первой и второй линиями, она же между второй и четвертой. Сигнал находится относительно далеко, поэтому она более пологая, и сигнал находится справа, поэтому направлена крыша **сюда [вправо]**. Поэтому в сигнале В у тех пар линий, которые связаны друг с другом большой константой, левая линия - высокая, правая - низкая. А у тех пар линий, которые связаны маленькой константой (например, первая и вторая), наоборот, левая низкая, правая высокая. Все это умозрительно отображается **вот этими пунктирами** – синяя крыша смотрит вправо, красная крыша смотрит влево, в сторону сигнала, с которым произошло взаимодействие. Если в реальном спектре у вас крыша или несимметричная, или, к примеру, на одной паре линий в пределах сигнала она есть, а на другой нет - в принципе, ничего страшного, поскольку достаточно **в этом месте** появиться шуму, и соотношение [высот] **с этой линией** может измениться. Но вот если крыша закономерная, то есть более или менее правильная, и при этом смотрит не в ту сторону, в которую вы ожидаете, это уже подозрительно. Такое бывает редко, и это повод задуматься, а правильно ли вы думаете насчет того, на чем он [рассматриваемый сигнал] щепится. Может быть, [он щепится] на чем-то с другой стороны в спектре.

#19 Следующая серия примеров – реальные спектры, полученные со спектрометра, а не “синтезированные” в программе симуляции спектров, кроме этого [примеры содержат] меньшее количество подписей. Тем не менее, подписи пока есть на уровне сигналов. Здесь будут подписи разных цветов, они обозначают спиновые системы. Спиновая система (применительно к интерпретации спектров) – это группа протонов, в пределах которой можно перейти от любого протона к другому по константам спин-спинового взаимодействия. Например, в этой молекуле их три: зеленая, синяя и еще одна, состоящая из единственного протона при карбоксильной группе. Почему синяя и зеленая – разные спиновые системы? Потому что мы ни от одного синего [протона] ни к одному зеленому по константам [КССВ] перейти не можем. От *c* до *1* слишком много связей, и еще есть гетероатом, там константа [КССВ] близка к нулю, [спинового] взаимодействия нет. А вот, например, от *1* до *5*, так же, как и между любыми другими [протонами, обозначенными] числами зеленого цвета, мы можем перейти, двигаясь по константам спин-спинового взаимодействия. У *1* есть [КССВ] с *2*, у *2* с *3*, у *3* с *4*, у *4* с *5*. Значит, от *1* мы можем перейти, к примеру, к *5*. То есть все их можем покрасить в один цвет. Это удобно делать и в низкомолекулярной органике ([выделять] изолированные части молекулы, между которыми чаще всего находится гетероатом), так и в природных соединениях, где один [каждый] остаток - аминокислота, моносахарид, нуклеотид и т. д.

²⁵ *Орто* – ошибка лектора; между атомами *b* и *c* – *мета*-КССВ.

– это, чаще всего, одна спиновая система. На этих слайдах спиновые системы обозначены цветом или не обозначены никак, если они очень маленькие. Например, **этот** [атом] не обозначен, кроме того, его [сигнала] и на спектре нет. Почему его нет на спектре? Несмотря на то, что это ацетон²⁶, а протонный растворитель, обычно не содержащий примесной воды и не склонный к обмену [протонами], и мы должны, по идее, наблюдать сигнал -COOH, может быть, оператор просто «прозевал» ту область спектра, где он находится²⁷, и записал спектр только **досюда**. Сигнала карбоксильной группы [в спектре] не оказалось, или он где-то **здесь** находится, и его просто не заметили, когда записывали спектр, или его специально обрезали, чтобы остальной спектр был в лучшем масштабе, или он оказался очень широкий (настолько широкий, что при своей фиксированной площади, оказался очень низким и слился с какими-то дефектами базовой линии), и поэтому его не заметили. Так или иначе, «кислый» протон иногда вообще отдельно от молекулы в растворе может плавать в силу диссоциации, поэтому отсутствие сигнала карбоксильных (и вообще очень кислых) протонов в протонном спектре вас смущать не должно. Если только вашей целью не является наблюдение именно этих сигналов (вы их специально ищете, то есть создаете условия, при которых они должны быть видны), но тем не менее вы их не находите. Вот тогда это уже подозрительно. В обычных [протонных] спектрах можно считать, что карбоксилатов нет.



Итак, синяя и зеленая спиновые системы. «Синяя» спиновая система повторяет то, что у нас уже было на примерах. Это 1,2,4-замещенное бензольное кольцо. Но здесь уже не так легко увидеть, что это дублет [сигнал А] в этом масштабе. На бумаге, на А4, может быть, немного лучше будет видно, но и константа [KCCB] может оказаться меньше и разрешение хуже, поэтому это [сигнал А] может выглядеть как синглет. Сначала смотрите по большим константам. Здесь одна большая есть

²⁶ Образец растворен в ацетоне

²⁷ >10 м.д.

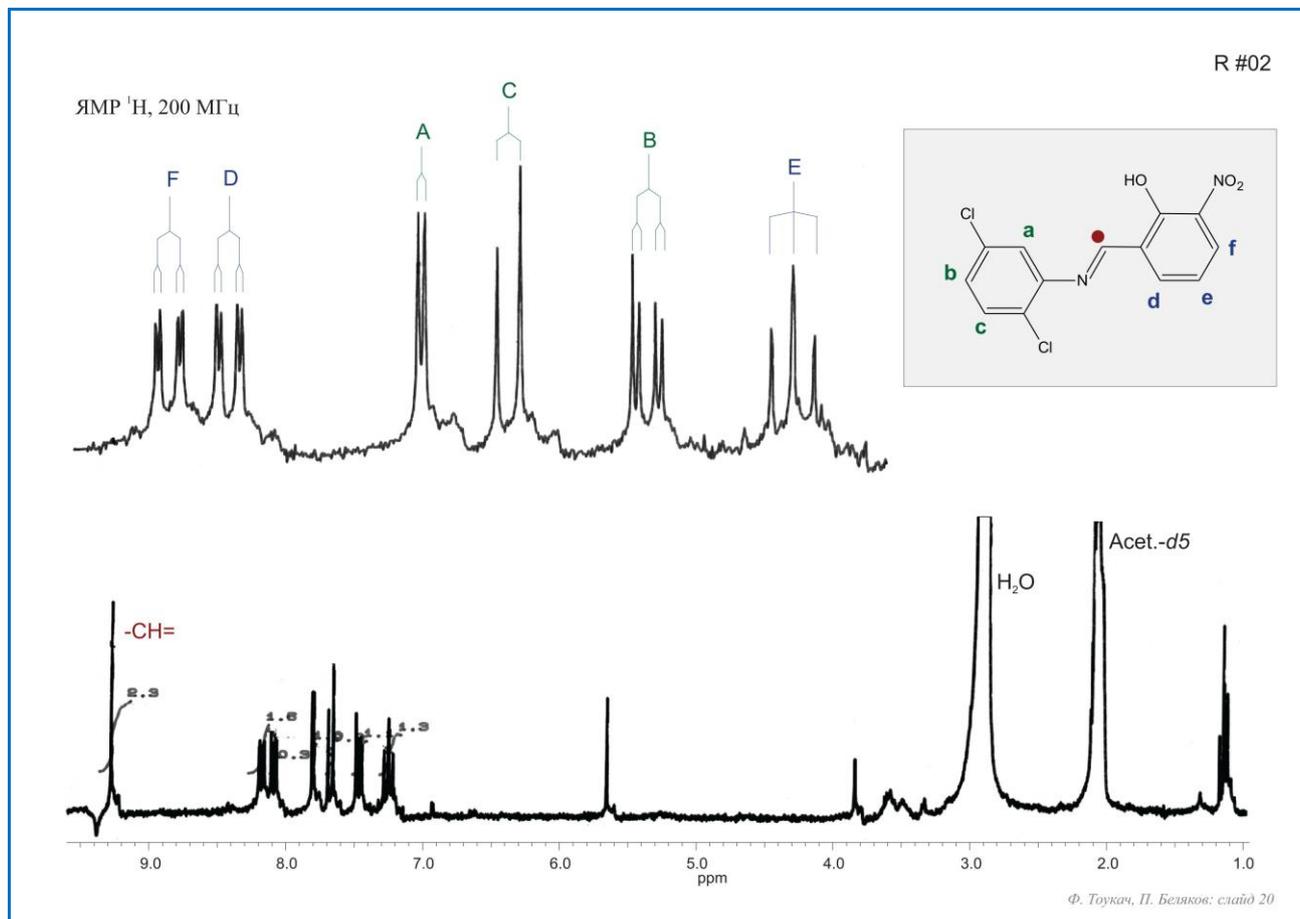
между В и С, и вот она в двух местах присутствует – **дублет и дублет дублетов**. Здесь, глядя на расщепление, (поскольку маленькие константы все же видно), можно сразу сказать, кто есть кто. Для этого не требуется привлекать соображения о химических сдвигах. А иногда бывает, что и нельзя [привлечь]. Тогда нужно посмотреть на [химическое] окружение и прикинуть, соответствуют химические сдвиги ожиданиям или нет. Похоже, что бром дает **в этом положении** электроны. Я думаю, вы сами сопоставите индуктивные и мезомерные эффекты и примерно увидите, где больше электронная плотность, а где меньше. Где меньше, сигналы уедут влево. Но не всегда это можно точно предсказать, а главное, что если у вас разница [между химическими сдвигами сигналов] - 0.2 м.д., то это значение вообще не принципиально, и на основании этого делать выводы о структуре не стоит. **Вот эта разница между 7.2 и 8.0** - уже достаточно большая. То есть можно по разнице в хим. сдвигах предсказать, кто есть кто, если есть сомнения. **А при такой разнице** [между 8.0 и 8.2] предсказание не будет иметь [предсказательной] силы. Но в данном случае все видно по характеру расщепления. По крайней мере мы знаем, что заместители находятся в положениях 1,2,4 друг относительно друга. А вот *кто где* находится, мы из этого спектра сказать не можем. Если бром и карбоксил поменять местами, в принципе, спектр будет очень похожий – это та же самая система ABC [с протонами] в положениях 1,2,4. Химические сдвиги как-то поменяются, конечно, но у нас же нет образца (с чем сравнивать), поэтому, если нам нужно точно знать, где какие заместители находятся, а не только то, что они в [относительных] положениях 1,2,4, нужны какие-то дополнительные эксперименты. Но чаще всего такая задача не стоит. Потому что молекула простая, кто-то ее из чего-то синтезировал, есть представления об исходниках. А если их нет, то [надо] попытаться снять спектр исходника и посмотреть (когда одного заместителя, к примеру, не будет), где там будет что. Если этого исходника нет, тогда подумать, какие еще эксперименты помогут выявить одну из нескольких структурных гипотез. А пока что вы знаете только два эксперимента: одномерный протонный спектр и одномерный углеродный спектр. Так что в направлении экспериментов пока не думаем, пока пытаемся получить максимум из характера расщепления. По крайней мере, здесь видно, что спектр не противоречит структуре.

Теперь смотрим на «зеленую» спиновую систему. А, еще интегралы! Вот эти хвостики – это отрезанные куски интегральной кривой. Они все примерно одинаковы, что говорит о том, что **здесь** один протон, **здесь** один и **здесь** один. Но это [можно сказать], глядя на молекулу. А если не глядя на молекулу, может быть два, два и два [протона] (то же самое соотношение). Что делать, если они не кратны друг другу? В коммерческом ЯМР 10-15% считается допустимым отклонением площадей сигналов. То есть, если [отклонение] больше, эксперт обязан оставить какое-то предупреждение, что [спектр] может не соответствовать [структуре]. Но в обычных, не стандартизованных спектрах, [отклонение площадей] бывает и больше (до полутора раз), в зависимости от того, сколько [в спектре] шумов, насколько хороша форма линии вблизи основания [сигнала], и т. д.

Теперь смотрим на «зеленую» [спиновую систему]. Во-первых, **вот этот сигнал** с маленькой константой около 2 Гц - это ацетон, он здесь специально подписан. Обычно вы знаете в каком растворителе у вас образец, поэтому сигнал растворителя найти можете. И **здесь** тоже видно, что есть хорошо разрешенный сигнал с небольшой константой, которой, в принципе, не должно быть в этом соединении, находящийся именно там, где мы ожидаем увидеть ацетон (на 2.05 м.д.). Напоминаю, что это дейтерированный ацетон с одним протоном. Остается – раз, два, три, четыре сигнала на пять протонов, нужно соотносить их друг с другом [сигналы с атомами]. Например, можно «зайти» со стороны интегралов – соотношение 2:2:4:3. Три – это, понятное дело, **метил**, а остальные, видимо, по два, [из них две пары] **совпали друг с другом** - получилось четыре. Кроме этого и химический сдвиг у метила мы тоже ожидаем самый малый (сигнал справа), потому что [при его углероде] три [а не

один или два] протона. Дальше остается только проверить мультиплетность, соответствует или нет [количеству и расположению соседей]. Есть два протона СН₂-группы [4]; через четыре связи до третьих [3] через одинарные связи взаимодействие не дойдет. То есть у пятых [5] только два одинаковых соседа [4] - это должен быть триплет, что мы здесь и наблюдаем. Химический сдвиг соответствует, мультиплетность соответствует, интеграл соответствует, поэтому мы пишем [здесь 5](#), остается уже меньше [сигналов]. Теперь [сигнал] с другой стороны [1], самый простой. Во-первых, простая форма – триплет, во-вторых химический сдвиг сильно отличается. В этом алифатическом хвосте сильно он может отличаться только [у этого](#) [протона], потому что у него рядом кислород. И этот кислород его «утягивает» влево. Собственно, как у метоксилов и пр. - тоже примерно между 3 м.д. и 4.5 м.д. Уже на основании этого можно было бы сказать, что это - 1. По интегралу он тоже соответствует – два протона, и единственные из оставшихся «зеленых» протонов, у которых два соседа [2]. Оба этих соседа обозначены цифрой 2; два соседа – триплет. Теперь остаются 2, 3 и 4. Сначала прикинем, как они должны выглядеть. 2 и 3 должны выглядеть одинаково. У них в силу свободного вращения вокруг С-С связей одинаковое окружение, у каждого по четыре одинаковых соседа. То есть химически эти соседи разные, но, поскольку все вращается, константы [KCCB] с ними одинаковые, около 7 Гц. То есть у 2, что с [этими](#) двумя [1], что с [этими](#) двумя [3] - 7 Гц. Четыре одинаковых соседа – это пять линий. То есть 2 должен дать нам квинтет (так же, как и 3) с интегральной интенсивностью два. [Один квинтет](#) я здесь вижу, это или второй, или третий, исходя из наших соображений. И остаются еще два [две СН₂-группы], которые между собой пересеклись почти полностью, линии наложились. Понятно, что разбирать [вот это](#) особого смысла нет в данной задаче, поскольку уже и по интегралу, и по химическому сдвигу понятно, что спектр не противоречит структуре. Но на всякий случай посмотрим. 4 имеет другое количество линий, потому что у него пять соседей – два 3 и три 5 (два [отсюда](#) и три [отсюда](#)). Всего пять соседей, то есть должно быть шесть линий, секстет. Но мы этот секстет не видим, поскольку он, видимо, [вот здесь](#). Почему я решил, что [вот это](#) именно 2, а не 3? Потому что, если бы [это](#) был 3, то [здесь](#) было бы пересечение 2 и 4. Я это решил на основании того, что 2 все-таки «чувствует» наличие кислорода и должен находится левее, чем 3, а для 3 и 4 уже эта разница не существенна, они далеко от кислорода, и у них примерно одинаковые химические сдвиги. Наверное, 4 еще чуть-чуть левее [, чем 3], поскольку метил к нему ближе, а кислород от него дальше, но здесь уже разница [между 3 и 4] не существенная. А [вот эта разница](#) в 0.4 м.д. – это как раз ожидаемая разница между 2 и 3. То есть [наблюдается] влияние кислорода, но [когда атом О] не вблизи, а чуть-чуть дальше.

Вывод: спектр не противоречит структуре, или спектр соответствует структуре. Но вывод, что спектр *доказывает* структуру сделать нельзя, потому что, например, смена местами двух заместителей даст такой же по характеру расщепления спектр, отличающийся только химическими сдвигами. Для простых молекул расчет в ACD Labs может помочь [сделать такой выбор]. То есть эта разница в химических сдвигах - большая, и можно посмотреть в ACD Labs, посчитать, поменять местами заместители и посмотреть, что станет с химическими сдвигами. Если отличия предсказания от реальности на 1 м.д. или больше (для какого-то сигнала), это значит, что, скорее всего, вы нарисовали не ту молекулу, которая дала этот спектр. И так методом исключения [, меняя порядок заместителей,] можно перебрать [все подходящие изомеры]. Но иногда интересно себе поставить такую задачу: возможны ли другие изомеры с той же самой *брутто*-формулой, которые дали бы такой же спектр или нет? Иногда получается, что возможны – редко, но бывает.



#20 Еще один пример с отдельными подписями. Я снял этот спектр, когда еще в школе учился, судя по тому, что нарисован он фломастером, зажатом в зажим графопостроителя - тогда, когда еще лазерных принтеров не было, и возможность сохранять спектры в памяти тоже была ограниченной. Тем не менее, [использован] хороший на то время прибор на 200 МГц; [в спектре] «разумное» количество шумов, хотя форма линии не очень хорошая. Что здесь видно? Во-первых, часть спектра нарисована в крупном масштабе, чтобы маленькие константы [КССВ] можно было разглядеть – **вот этот кусок** [7.1-8.3 м.д.]. **Здесь** снизу подписаны интегралы. Не напрягайте глаза, **это примерно все** 1:1:1:1:1, хотя есть и отличия. Теперь смотрим сначала на спектр в целом и на молекулу. Я вижу здесь четыре спиновых системы, которые [три из них] обозначены тремя цветами, и одна не обозначена (-ОН). Фенольный -ОН должен находиться где-то в районе 6 м.д. и, в отличие от алифатического -ОН, он не так склонен к обмену. Такой сигнал здесь действительно есть, интеграл я на него, видимо, забыл подписать, поскольку посчитал, что и без этого ясно, что это фенольный -ОН. Дальше есть еще **красная точка**, это еще один изолированный сигнал, у него нет соседей, с которыми могла бы быть хорошая константа [КССВ]. Но это я говорю, уже видя спектр, потому что теоретически **вот эта двойная связь** с бензольным кольцом сопрягается, там через π-систему что-то передаваться будет, и через четыре связи в принципе могла бы проявиться константа между красным и **d**. Но кандидат на то, чтобы быть красным, **здесь только один** по химическому сдвигу, и он синглет, значит, этой константы нет. Потом можно себя дополнительно проверить, когда мы найдем сигнал D, и убедиться, что у него нет дополнительного щепления на чем-то еще кроме «синих» сигналов. Из этих рассуждений следует то, что не всегда сразу можно сказать, одна спиновая система [соответствует рассматриваемым сигналам] или две. Здесь их оказалось две, **в этом кольце** [включая сопряженные заместители], не считая -ОН: «красная» и «синяя». Но если бы мы **здесь**, к примеру, увидели дублет с маленькой константой, тогда они все были бы «синими», включая **вот этот** (-CH=).

Что еще здесь есть? Есть **растворитель** и **вода**, и по размеру [их сигналов] видно, что вещества там мало. То есть, когда [только] «вода» большая, это еще можно объяснить неаккуратностью при приготовлении образца. Допустим, оставили на воздухе, и он «набухался» воды из воздуха, обычной (не дейтерированной), и она [большой сигнал] появилась, и в ней растворились алифатические -ОН. Но здесь и сигнал растворителя - апротонного, не склонного смешиваться с водой - достаточно большой. Это значит, что было мало вещества. А что это значит, что мало вещества (кроме того, что [большие] шумы). Это значит, что какие-то посторонние сигналы могут быть. Когда вещества мало, все незначительные примеси вылезают, потому что на фоне небольшого количества вещества их оказывается много. Я думаю, что ампулы мыли спиртом, потому что **вот здесь** триплет, которого не должно быть в молекуле, это похоже на алифатический метильный хвост. Чаще всего это этанол. Его CH_2 где-то **здесь**, и **здесь** еще что-то, может быть, жирные пятна с пальцев на ампуле. **Здесь** есть триплет, этот триплет – это вполне может быть метильная группа этанола, а **это** [синглет] может быть метильной группой метанола. Так или иначе, при небольшой концентрации [подобные сигналы] можно объяснить примесями. Если вы такое соединение сдаете в фармкомпанию, то вам его «завернут». Скажут, что вот у вас лишний сигнал, необъясненный. А здесь, поскольку для Химического лица снималось, что школьники синтезировали, интересно было посмотреть, что еще есть в спектре.

Теперь самая интересная часть – соответствие бензольных колец. Для начала нужно их хотя бы пересчитать. Шесть атомов и шесть сигналов **здесь**. Соответствует на первом уровне. Кроме этого, посмотреть на интегралы **вот этих** [8.0-8.3] и понять, то ли это один сигнал из восьми линий, то ли это два сигнала, каждый из которых - из четырех линий. Если посчитать, что это два сигнала из четырех линий, то, во-первых, количество сигналов соответствует [предполагаемой структуре], а, во-вторых, интеграл **здесь** ~1.6 и какой-то **довесок** ~0.3 - видимо, в сумме как раз два протона. То есть с учетом того, что мы ожидаем от этой молекулы, это все-таки два разных сигнала. Дальше смотрим на *мета*-константы, какие здесь есть. Мы видим, что **здесь** [8.1] и **здесь** [8.2] - практически одинаковые, то есть, скорее всего, *мета*-щепление у них друг на друге. Значит это два протона, находящиеся в *мета*-положении друг к другу. А вот у **этого** [7.5] константа явно больше (маленькая *мета*-KCCB), похоже, что **это** 3 Гц, а **это** - 2 Гц или что-то около того. То есть **вот это** [7.5] щепится не на **этом** [8.0-8.3], зато есть **вот такой** [7.8], у которого *мета*-константа соответствует **вот этой** [7.5]. Этот [7.8] в *мета*-положении к этому [7.5] находится. Теперь смотрим, кто может в *мета*-положении друг к другу находиться? Ну это или А и В, или D и F. Дальше... мы еще не знаем, что это А и В. Мы увидели вот это расстояние, и это похоже с учетом общего масштаба на что-то около 2.5 Гц или 3.0 Гц. Это как раз *мета*-константа. То есть мы знаем, что **этот сигнал** щепится на ком-то с константой, соответствующей *мета*-константе в бензоле. Поскольку у нас здесь есть бензольные кольца, а других кандидатов на такую маленькую константу нет, мы предполагаем, что это [пришло] именно из бензольного кольца. Ну и естественно нужно найти его counterpart, то есть то, на чем он щепится. И **вот хороший кандидат**. Почему именно А, а не **вот это**? Потому что **здесь** [иное] расстояние между этими линиями, даже невооруженным глазом видно, что оно меньше, чем **здесь** или **здесь**. То есть **здесь**, похоже, что меньше 2 Гц, а **здесь** больше 2 Гц. Поэтому мы делаем вывод, что **этот** [8.1] связан с **этим** [8.2], а **этот** [7.5] связан с **этим** [7.8]. Но связаны именно через *мета*-константы - **этот** протон в *мета*-положении к **этому**, а **этот** протон в *мета*-положении к **этому**. Теперь остается понять, кто из них пара А-В, а кто из них пара D-F. Мы видим, что они разные – **узкий дублет** только один, а дальше смотрим: из **a, b, d** и **f** кто может быть узким дублетом? Может быть только **a**. Это методом исключения. У **a** один сосед, он может быть узким дублетом. **b** не может быть, потому что у него должно быть более широкое расщепление на **c**. **d** и **f** тоже не могут быть, потому что у них есть сосед **e**, в котором должно быть широкое расщепление, поскольку он через три

связи в *орто*-положении - широкий дублет. Значит, остается кандидатом вот [на этот сигнал \[7.8\]](#) только *a*. Раз это *a*, значит, это – *b*, потому что *a* находится в *мета*-положении к *b*, и они связаны через *мета*-константу друг с другом. [Это](#) методом исключения получается F и D. Теперь как понять, кто из них F, а кто D? Кто-нибудь может предположить? Теоретически, да, но правильный ответ здесь – никак, глядя на этот спектр, потому что слишком небольшая между ними разница в 0.1 м.д. То есть я написал F и D [в таком порядке] потому, что у *f* нитрогруппа поближе вроде как, она его должна сильнее «утянуть» влево. Но если это даже окажется наоборот, на решение задачи это не повлияет, потому что [будет] такой же примерно спектр, такое же расщепление. И говорить о том, что это именно так, а не наоборот, нельзя потому что разница в химических сдвигах не репрезентативна. Но мы и без химических сдвигов по форме линии можем сделать отнесение, то есть [это](#) – F (D), а [это](#) – D (F). Если нужно точно определить [отнесение сигналов D и F], тогда можно уже какие-то другие эксперименты сделать.

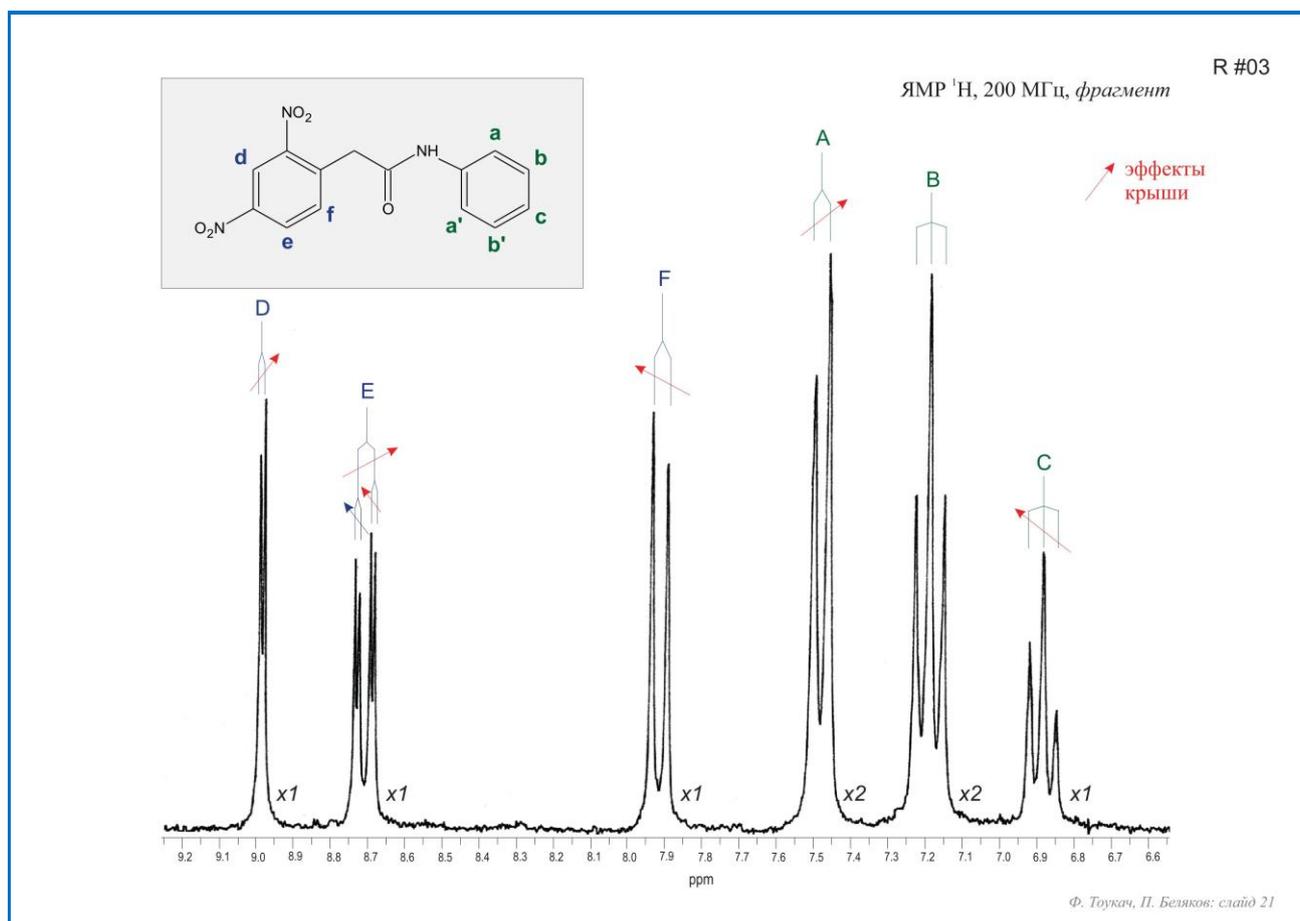
Теперь осталось еще [два сигнала C и E](#), у которых большие константы. Понять, кто из них C, а кто E, довольно просто, поскольку один из них дублет, а другой триплет. Смотрим на C, у него только один сосед в *орто*-положении, значит должно быть широкое дублетное расщепление. А у E два соседа в *орто*-положении, это или дублет дублетов, или триплет. Ну дублет дублетов будет такой, что у него вторая и третья линии будут очень близко друг к другу. [Здесь это](#) – триплет, значит, это E.

Таким образом, количество сигналов, характер расщепления и их площадь соответствует структуре. Но здесь даже в рамках этой первичной структуры можно увидеть, как минимум, несколько пространственных изомеров. Потому что есть двойная связь, может быть *цис*- или *транс*-, и кроме этого, [вот эти одинарные связи](#) с точки зрения структурной изомерии тоже, скорее всего, ведут себя как двойные, потому что неподеленная пара [на азоте] и [вот эта связь](#) сопрягаются с [этой π-системой](#) и с [этой π-системой](#). Я бы предположил, что эта молекула достаточно жесткая, и нет вращения вокруг [этой связи \[Ar-N\]](#) и вокруг [этой связи \[Ar-CH\]](#). Поэтому²⁸ спектр не противоречит первичной структуре, но и не доказывает ее. Можно, например, -ОН и -NO₂ местами поменять, и будет такой же спектр с точностью до небольших [различий] химических сдвигов. Можно один хлор переместить в *пара*-положение к этой связи, тоже будет 1,2,4-ABC. То есть тоже узкий дублет, широкий дублет и дублет дублетов. Может быть, там какие-то сигналы очень сильно изменятся по химическим сдвигам. Это надо уже в программе считать и смотреть, если изменение на 1 м.д. или больше, тогда по химическим сдвигам можно сделать выбор, но только глядя на спектр - нельзя. Структурные изомеры возможны, но это результат синтеза, люди синтезировали [молекулу] из чего-то, структуру чего они знают, поэтому они, скорее всего, исключают другие структурные изомеры, и для них ответа в форме “спектр не противоречит структуре” достаточно. Но хороший ЯМР-щик здесь заметит возможность еще и пространственных изомеров и уже может предупредить химика, что либо у вас [вот эта связь \[C=N\]](#) как-то дергается и усредняется (глядя на химию этой молекулы, я бы предположил, что маловероятно, хотя, может быть, я и ошибаюсь), либо здесь строго один изомер по этой двойной связи, но какой из них [E или Z], мы не знаем. Какой из них [присутствует в образце], можно было бы узнать, померив, например, гетероядерную константу между [этим углеродом \[-CH=\]](#) и [этим протоном \[-CH=\]](#). Она будет зависеть от того, [эта связь \[C-N\]](#) в *цис*- идет от [этой \[Ar-N\]](#) или в *транс*-. Но, во-первых, эту зависимость надо найти еще где-то, чтобы было с чем сравнивать, а во-вторых, из этого спектра ее [KCCB ¹J_{CH}] померить нельзя. То есть, если человек что-то синтезировал, он в статье рисует [вот это](#), но с тем же успехом это может оказаться и *цис*- вокруг

²⁸ В контексте положения заместителей «сверху» или «снизу» при фиксированном торсионном угле вокруг связей Ar-N и Ar-CH.

этой связи [C=N]. Поэтому здесь нужно быть осторожным и с точки зрения ЯМР-щика - предупредить заказчика. А с точки зрения заказчика (и вас как заказчиков ЯМР-сервиса) – предугадать, что возможна изомерия по двойной связи.

Кроме этого возможны еще ротамеры по этой связи [Ar-N] и по этой связи [Ar-CH]. То есть в какую сторону «торчит» ближний хлор (вверх, а дальний – вниз, или наоборот). И здесь то же самое. Это кольцо может так встать, а может так²⁹. Но это уже не настолько важно, это все-таки не цис-транс изомерия с большим барьером перехода. А здесь, может быть, [достаточно] нагреть, и они начнут переходить друг в друга. А, может, охладить, снять спектр и посмотреть, не развалится ли спектр [каждого кольца] на два подспектра, очень похожих, но, тем не менее, отличающихся в хим. сдвигах. Из этого уже можно будет сделать вывод о ротамерах, есть они или нет. Ну и, конечно, [необходимость такого исследования] зависит от исходной задачи.



#21 Этот пример я привел для того, чтобы продемонстрировать эффект крыши. Красными и синими стрелками [он] здесь обозначен. Здесь, наверное, не весь спектр приведен, потому что **вот еще** есть CH₂. Мы видим, что здесь [шкала] от 6.5 до 9.0 м.д. - только ароматика, потому что она интересна с точки зрения эффекта крыши. **Вот эти x** – это интегральные интенсивности вместо кривой. Так понятнее будет – два сигнала по два протона и четыре сигнала по одному протону. Вспоминаем картину, которая была с фенильной группой, там, где эффекты не первого порядка, и часто бывают не видны *meta*-константы. Собственно, здесь мы как раз эту картину и наблюдаем. **Маленький триплет, большой триплет и большой дублет**. Исходя из того, что это экспериментальный спектр, мы делаем вывод, что *meta*-константы в этой зеленой системе «не прошли». То, что мы могли бы ожидать для А – дублет дублетов, правильно? Потому что у него есть соседи **b** и **c**, до **b'** не доходит – далеко, а на **a'** не щепится, потому что это тот же самый тип протонов. Но константа

²⁹ Показано ладонью, переворачиваемой на 180 градусов.

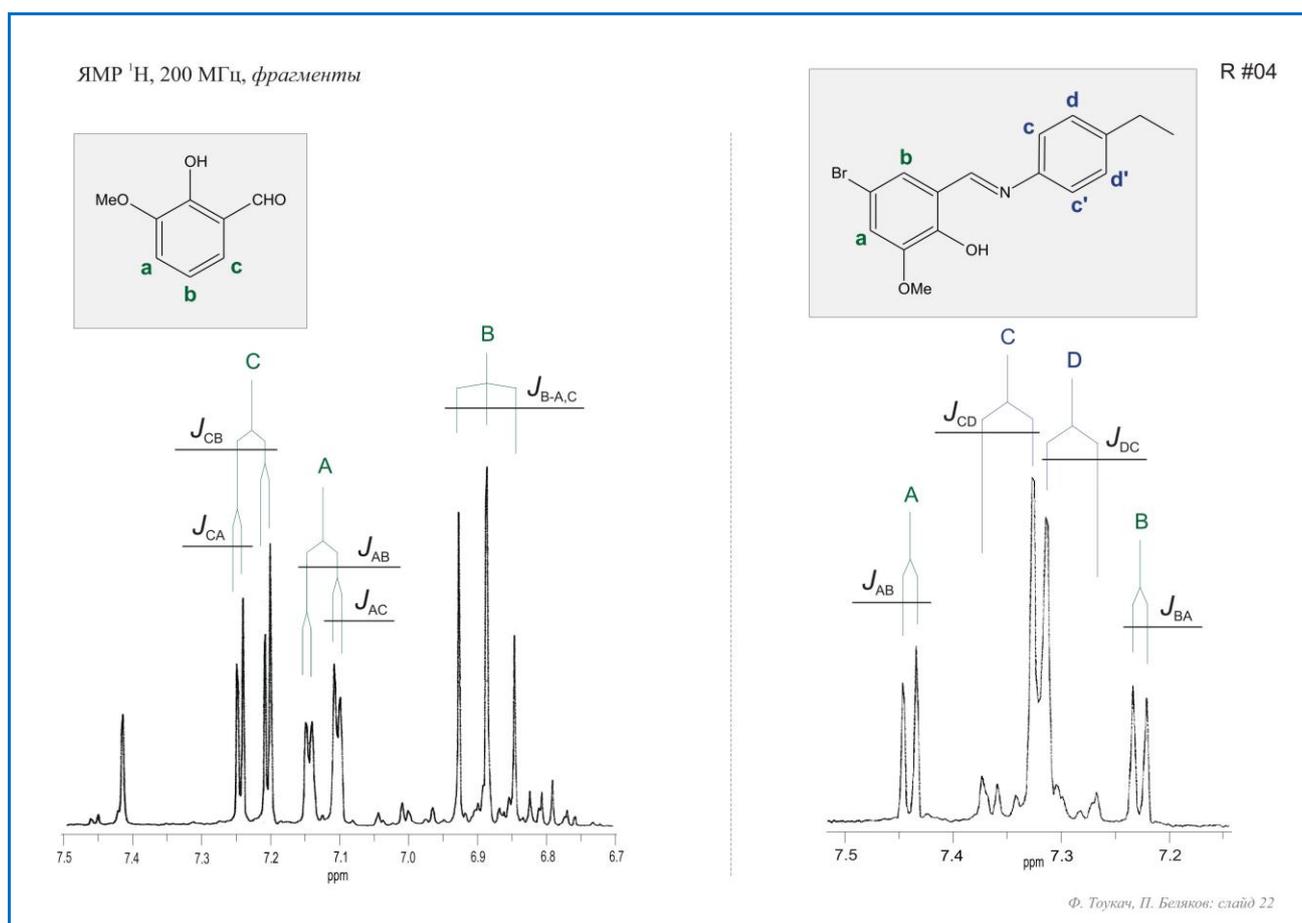
между А и С как мы видим, в спектре не проявляется. Кроме этого, и линии достаточно широкие, и константа маленькая, (там [есть] влияние NH-группы), а может, так сняли спектр, что не видно, а может быть, сочетание этих двух факторов. Раз ее нет на А, то, соответственно, ее нет и на С. **Здесь** у нас не триплет триплетов, а просто триплет с большой константой. Так или иначе здесь противоречий нет, маленькие константы могут быть не видны. А вот здесь в этой системе D-E-F они видны. Может быть, в силу того, что молекула дольше релаксирует этой своей частью, линии **уже** получились, поэтому на фоне более узких линий мы видим маленькие константы. А, может быть, и сами величины констант отличаются, **здесь**, допустим, 2 Гц, а здесь 1 Гц. Нет, 1 Гц мы уже не видим.

Теперь посмотрим на «крышу» – для чего, собственно, этот слайд и был сделан. Здесь как раз случай, когда у E (дублет дублетов, широкий здесь и узкий здесь) две крыши направлены в разные стороны. Крыша ED обозначена синей стрелкой, направлена влево в сторону сигнала D и является довольно крутой, хотя ее крутизна разная в **этом [линии 1 и 2]** случае и в **этом [линии 3 и 4]**, но это уже экспериментальные неточности. В случае D она тоже направлена, куда надо, и является крутой, потому что сигналы D и E находятся рядом. В случае с F – «красная» крыша (**здесь [линии 1 и 2]** красная стрелка, а вот **эта стрелка [линии 3 и 4]** должна быть синей, потому что это тоже крыша в сторону D). Другая красная стрелка, направленная вправо, это эффект крыши, возникший из-за взаимодействия между E и F, то есть **этот и этот** сигналы связаны друг с другом большой *орто*-константой спин-спинового взаимодействия, между первой и третьей линией или между второй и четвертой, здесь она в **эту** [в правую] сторону. Она должна быть более пологой, чем **эта [«синяя»]**, потому что сигналы [находятся] дальше друг от друга, но она здесь не выглядит более пологой. Такое бывает; скорее всего, это связано с тем, как распределились шумы. Если вы видите в спектре шумы невооруженным глазом (а здесь мы их видим), (...) крутизна и пологость крыши - не очень репрезентативный параметр. То есть какой-то всплеск в шумах попал, к примеру, в **это** место, и поэтому она более крутая. Ну и разница [хим. сдвигов] здесь трехкратная – [эффект крыши] может быть, а может и не быть. (...) [разница между E и F -] 0.8 м.д., крыша достаточно явно проявляется.

Теперь на **эти [A-B-C]** крыши тоже посмотрим. У С, понятно, она может быть только влево, потому что оба сигнала у него слева. У А она может быть только вправо, а у В крыши нет, но на самом деле это две крыши друг друга скомпенсировали. Потому что одна у него в сторону А, а другая в сторону С, и та, и та связана с *орто*-константой. Значит, одна направлена вправо, другая – влево, в результате они сложились, и мы получили правильный сигнал, в котором крыши нет. И крутизна, опять же, одинаковая, потому что расстояния **здесь [A-B]** и **здесь [B-C]** примерно одинаковы.

#22 Это уже фрагменты спектров. Чем интересен **этот [слева]** фрагмент? Ароматическая система. Он интересен тем, что в рамках одной и той же системы одна и та же константа J_{AC} проявила себя по-разному в сигналах А и С. Если мы точно замерим расстояние между вершинами, оно должно оказаться строго одинаковым. Но **здесь [С]** мы видим, что первая и вторая линия разошлись почти до низа, а **здесь [А]** только вершины. При условии, что величины констант одинаковы – а иначе и быть не может – это значит, что ширины линий разные. То есть в сигнале А линии более широкие, и та же самая константа на фоне более широких линий не так заметна. А ширина линий зависит от скорости, с которой разные атомы рассеивают энергию после электромагнитного импульса. Этот процесс называется релаксацией, и мы позже (лекции через две) об этом будем говорить. Так или иначе, релаксация разных атомов происходит с разной скоростью, и от этого зависит ширина [линии]. Чем более атом изолирован от других, тем меньше у него возможностей «пересечься» и войти в какое-то взаимодействие с другими атомами в своей или другой молекуле, и тем медленнее он релаксирует, и **уже** его сигналы. Но возможны еще и другие эффекты. Чтобы это проверить, логично было бы точно

измерить константы (в программе открыть, растянуть и посмотреть). Вдруг вы измерите, и они окажутся разными? Сейчас я покажу наиболее распространенную причину такого явления. Если они окажутся разными, то это скорее всего связано с тем, что **вот это** - реальная линия³⁰ (не очень аккуратно получается пером рисовать, но тем не менее). Стоит помнить, что в компьютере мы имеем дело с оцифрованной линией, и она может оказаться ломаной, где **вот это** расстояние – это шаг оцифровки. Не очень понятно, что я изобразил здесь, наверное... Между соседними точками ничего нет, потому что квантификация в компьютере происходит с **таким** шагом. И тогда **эта вершина [оцифрованная]** может не соответствовать точному положению **этой вершины [реальной]**. Поэтому если вам нужно точно измерить константы, особенно маленькие, нужно помнить о том, что оцифровка может влиять [на результаты измерений]. Либо оператору обратить внимание на это, чтобы он оцифровал, и там было достаточное количество точек, либо самим посмотреть в том, что он вам прислал на компьютере, сколько там точек и [есть ли] влияние этих ломаных линий (не начинается ли у вас влияние [углов] ломаных линий на положения максимумов). **Здесь**, мне кажется, как раз тот самый случай.



Так теперь **здесь [справа]**. Этот случай интересен двумя вещами. Во-первых, сильнейшим эффектом крыши, например, C и D. То есть внешние линии практически исчезли, а внутренние стали очень высокими. Где они находятся, следует из того, что нарисовано **вот здесь**. Но такую картину и такое расщепление можно и не заметить, глядя на спектр. Тут просто нужно сопоставлять, может быть, интегралы измерить. Это A и B, они уже более привычно выглядят. Как можно было бы выявить **такое**, если бы это не было нарисовано? Начинаем с края. Смотрим: **вот это [A]** - какая-то *мета*-константа. А дальше смотрим: может быть, **вот это** от нее «кусоч», но тогда, получается,

³⁰ Рисунок реальной и оцифрованной линии стилусом на экране.

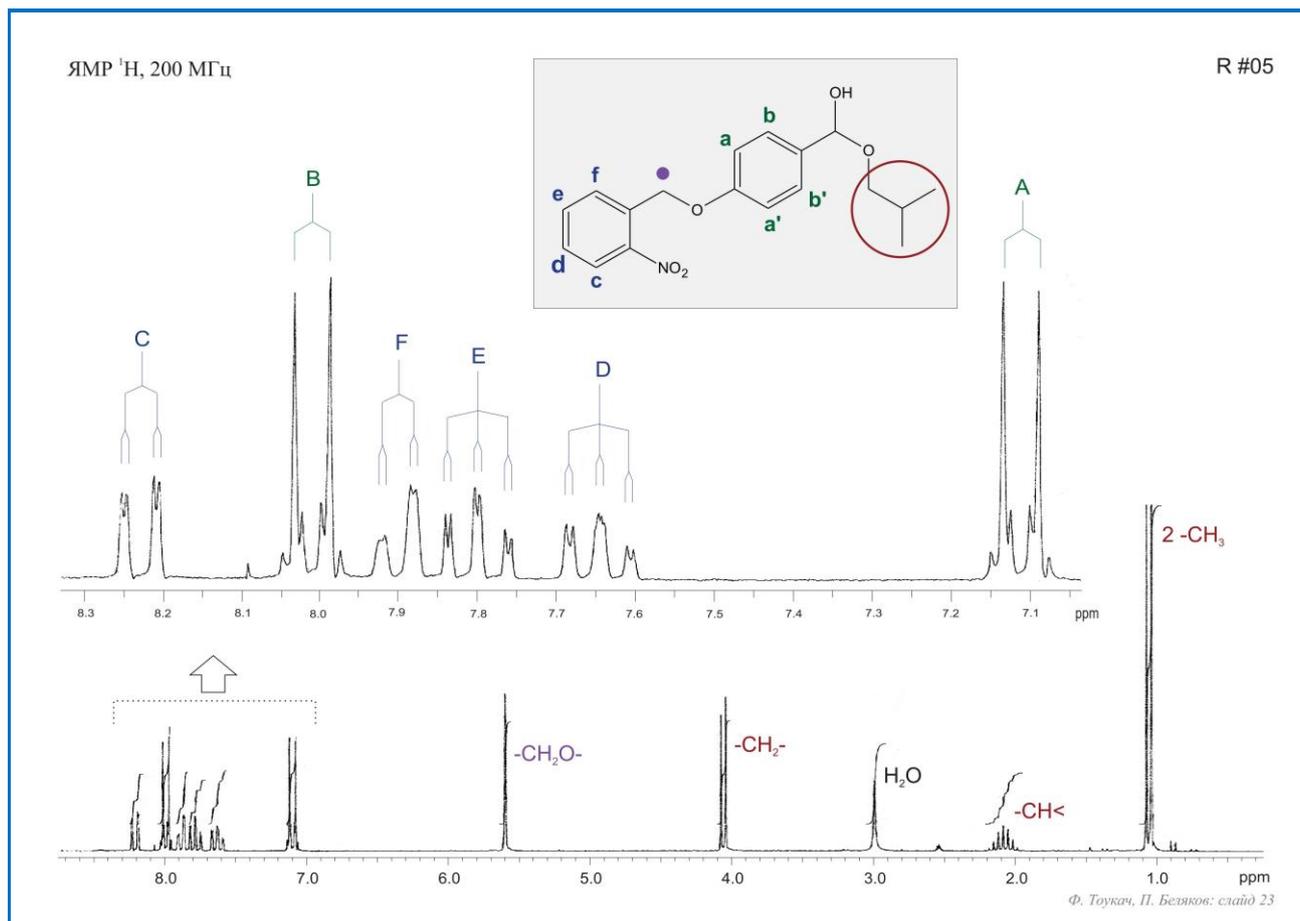
крыша направлена в никуда (там нет других сигналов), *орто*-крыша, большая. Значит, видимо, **это** - не вторая половина **этого** сигнала.

Дальше предположение: может быть, **это [по центру]** - узкий дублет, и у него вообще нет второй половины. Но это маловероятно по интегралу. Слишком маленькая площадь, потому что площадь **этого** намного больше, чем половинки. Значит, скорее всего, у него есть где-то вторая часть. Нет, у него как раз ее нет, прошу прощения. Это один протон, а **здесь** два. То есть мои предыдущие рассуждения об интеграле - ошибочные предположения, не обращайтесь на них внимания. Просто я посмотрел дальше и увидел, что неправильно сказал. Можно было бы что предположить? Если это часть дублета дублетов, где его вторая часть? Вот **это** слишком далеко, такой большой константы [KCCB] не может быть. **Этот** тоже не годится, потому что «крыша» не в ту сторону. А **это** не годится, потому что расстояния **здесь** и **здесь** - все-таки разные, а должны быть одинаковыми, если это части одного мультиплета. То есть предполагаем, что **вот это** – просто дублет, исходя из этих трех соображений. Где может быть просто дублет с небольшой *мета*-константой? А или В. Кто из них А, а кто В - и не принципиально, и нельзя однозначно сказать. Может быть, и можно, посчитав электронные эффекты. Так или иначе, у него есть другая сторона (В), **вот она здесь**. И остается **что-то [центральная часть]**, в чем по интегралу получается больше протонов, чем в **этом [А]** и в **этом [В]** суммарно, причем в два раза. Как раз можно предположить, что это протоны **отсюда [«синие»]**. Но **это [расстояние между двумя высокими линиями в центре]** не может быть *мета*-константой, потому что все *мета*-константы в этой молекуле, которые мы видим, уже задействованы. Мы уже нашли для них сигналы. Значит, это – не *мета*-константа, а просто расположенные рядом линии. А дальше начинаем прикидывать, какая должна быть *орто*-константа в бензоле – порядка 10 Гц. Либо по шкале посчитаем с учетом рабочей частоты спектрометра, либо просто **это [мета-константу А]** возьмем и умножим примерно на пять. И увидим, что, может быть, **это [7.37]**, а может быть, и **это [7.36]**. Ну и в том, и другом случае структурный вывод все равно один и тот же. Таким образом, в простейшем случае должно быть два широких дублета – от С и от D, очень сильно перекошенные, поскольку они находятся практически рядом. Ну, допустим, **вот это - один**, а **вот и вот - другой**, как здесь нарисовано. Или пересеклись немного [левая высокая линия относится к правому дублету и наоборот]. Но есть еще лишние линии. (...) Вспоминаем самый первый случай с симметричной системой. Они находятся как раз в тех местах, где [на рисунке в первой лекции находились] эти дополнительные линии, и система та же самая – бензол, замещенный разными заместителями в *пара*-положениях. Каждую из маленьких линий объяснять нет необходимости, но мы можем хотя бы убедиться, что их примерное расположение и величина не противоречат тому примеру, который был на слайде, который я сейчас показывал. Большие линии объяснили с точки зрения констант, маленькие линии не противоречат. Этого достаточно, чтобы сделать вывод о том, что спектр не противоречит структуре. Естественно, из части спектра сказать, что [спектр] доказывает [структуру] нельзя, поскольку здесь другие структурные элементы есть, для которых сигналы не приведены. Но этот фрагмент спектра я привел именно для того, чтобы показать, каким сильным может быть эффект крыши, если сигналы находятся близко друг к другу.

Возможно, будут слайды, на которых спектр не соответствует структуре (чуть позже), или, может быть, соответствует, а, может, не соответствует [явных противоречий нет, но для однозначного вывода мало данных].

#23 Здесь уже много спиновых систем, четыре из них обозначены цветами, а одна - не обозначена. Но **здесь [>CH-OH]**, я даже не знаю, что обозначать, потому что в зависимости от того, как повезет с эффектами растворителя и примесной водой, вот этот ОН может присутствовать в спектре, а может и отсутствовать, а если он есть, щепление на нем может быть, а может и не быть. Поэтому **эти два**

атома СН и ОН могут быть как одной спиновой системой, так и двумя. Если они друг на друга не щепятся, это две разные спиновые системы, а если щепятся, то части одной.



Посмотрим хотя бы на те [спиновые системы], которые обозначены. Алифатика, как правило, легко выявляется, поскольку не так много распространенных вариантов. Что здесь у нас есть? Во-первых, есть сигнал, у которого огромное количество соседей. Здесь все крутится вокруг связей [C-C], поэтому все соседи у этого -CH< одинаковы: три отсюда, три отсюда и два отсюда. Всего их восемь, значит, мы ожидаем девять линий. Но крайние линии по сравнению со средней очень маленькие, соотношение интенсивности я не помню, но в этом мультиплете из девяти линий что-то вроде 1:35³¹. Поэтому если сигнал не очень большой (а он, естественно, будет низким, потому что в нем много линий, и вся его площадь распределяется по этим линиям) вполне вероятно, что мы крайние линии вообще не увидим и вместо девяти увидим семь. А, может быть, даже и по две крайних не увидим, и тогда вместо девяти увидим пять. Похожий на это сигнал, да еще и примерно в этой области, здесь только один. Ну вот я вижу раз, два, три, четыре... Так, я вижу семь, ну, в принципе, если его увеличить, там какие-то бугорки есть, то есть на самом деле это девять, но крайние очень маленькие, поэтому мы их не видим. Делаем вывод, что это СН. Сразу можно откалибровать интегралы, потому что мы знаем, что есть один протон.

А это значит, что мы можем посчитать, сколько их находится здесь [1.0-1.1], убедиться, что их шесть, и понять, что это две метильных группы. Вот такой сигнал в районе метильных групп – две больших линии – может быть или двумя синглетами (метилы часто бывают синглетами, если они ни с чем не связаны), или одним дублетом, если эти две метильных группы эквивалентны. Здесь они эквивалентны, потому что есть вращение вокруг связей. Все эти протоны переходят друг в друга, то есть вот эти шесть протонов [на концах цепи] – это [для ЯМР] один протон, представленный в шести

³¹ для этого сигнала (нонет) – 1:70

экземплярах и дающий один сигнал. У него один сосед – вот этот [-CH<], поэтому этот [1.0-1.1] сигнал имеет форму дублета, а площадь этого сигнала - шесть единиц, потому что в нем шесть протонов.

Дальше где-то еще должен быть [атом,] ближний к кислороду. Помним, что у нас был предыдущий спектр, там, где в алифатическом амильном хвосте был триплет от CH₂-группы, связанной с кислородом. Здесь примерно в том же месте должен быть, только это будет не триплет, а дублет, поскольку *здесь* один атом (один сосед) - вот эти два протона щепятся на единственном соседе, получается дублет, там же на четырех [м.д.]. Таким образом, красную систему расписали.

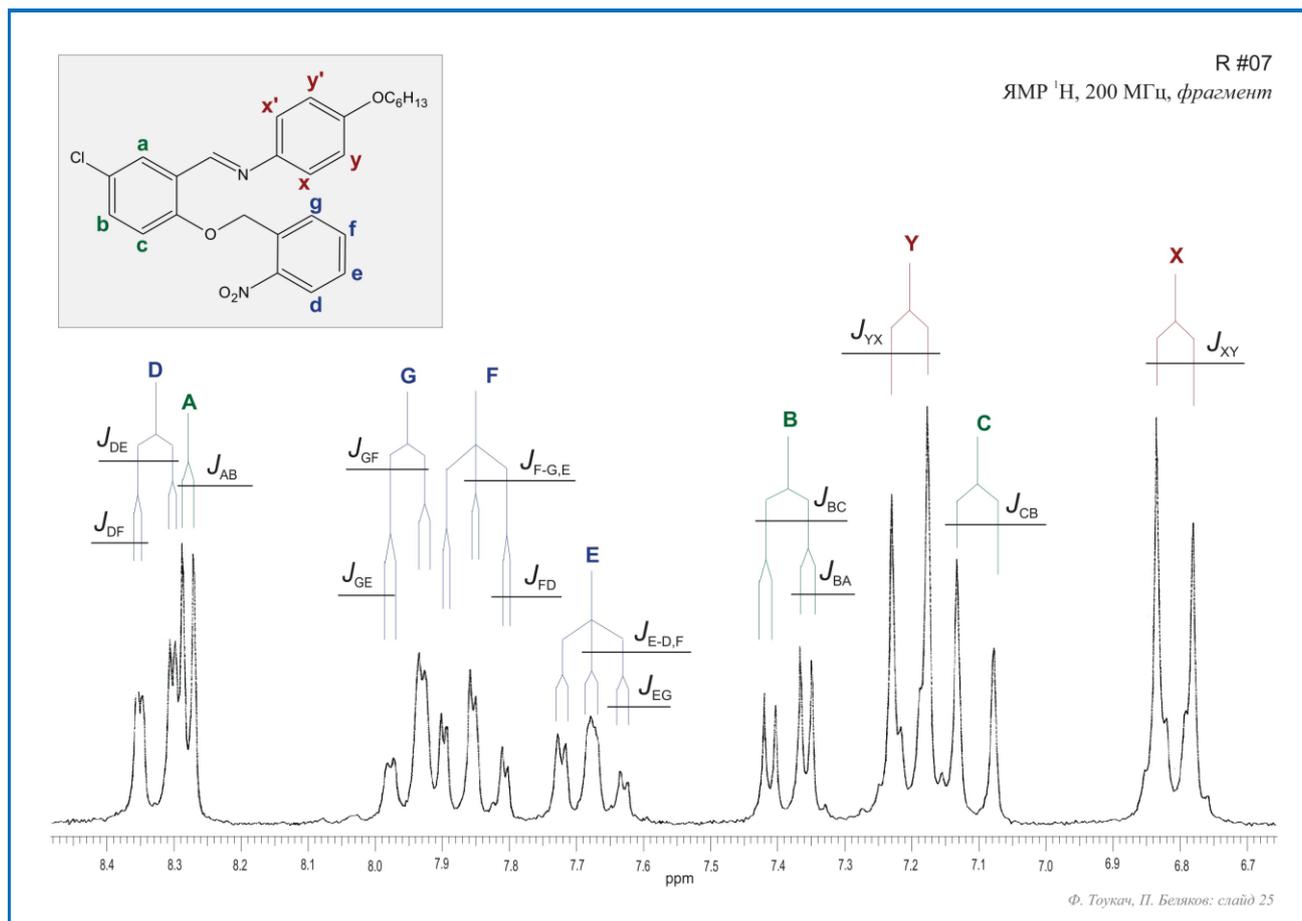
Нашли здесь маленький сигнал ДМСО на 2.5 м.д. ДМСО со своей гигроскопичностью втянул из воздуха воду, поэтому сигнал воды большой. Я здесь написал H₂O, а не HDO, поскольку дейтерированной воде там неоткуда взяться. Это примесь обычной воды, которая почти всегда есть в ДМСО.

Теперь остается левая часть спектра. Ароматическая область отдельно расписана, и *вот еще один сигнал* по химическому сдвигу как раз соответствует алифатике, связанной с кислородом. И у нас есть кандидат сюда – *вот эта CH₂-группа*. Два одинаковых протона ни на чем не щепятся, поэтому синглет с интегральной интенсивностью два, такой же, *как у этого*. Теперь ароматика. Достаточно скомбинировать те два примера, которые вы уже видели. Один пример – это CDEF, крайние – дублеты дублетов, *один и второй*, и средние – *триплеты дублетов*. Теперь, почему буквы расставлены именно так, а не иначе?³² Видимо, один С выбран на основании того, что у него рядом есть электроотрицательные нитрогруппы, поэтому его химический сдвиг больше. Это мог быть С или F по расщеплению, но из-за близости нитрогруппы, наверное, это С. F и D выбраны, исходя из того, что вот у С более глубокие впадины в *мета*-константах, чем у F, и *у этих двух* тоже – у одного [E] более глубокие, у другого [D] менее глубокие. Здесь я сделал предположение, хотя оно и не абсолютное, но в качестве рабочей гипотезы может рассматриваться: что С (*этот сигнал*), связан маленькой *мета*-константой именно с *этим* [7.8], а не с *этим* [7.65], потому что *мета*-расщепление более похоже. *Этот* [7.8] находится в *мета*-положении к С, то есть это именно E, а не D. Но вообще-то, конечно, E и D здесь могли бы и наоборот быть. Но даже если подписать наоборот, на вывод о том, что спектр не противоречит структуре это не повлияет, поэтому можно условно написать так [как на слайде] (или поменять местами).

Теперь вот эти большие. Во-первых, они больше (по ним сразу видно) и выше. Можно предположить, что их площадь больше. Интегралы не подписаны *здесь [на фрагменте]*, но нарисованы *здесь [на обзорном спектре]*. И, действительно, вот эти отрезки интегральной кривой у *этого* [8.0] сигнала в два раза больше, чем *у этих* [7.6-7.9], *у этого тоже* [7.1]. То есть здесь по два протона. Поскольку у нас есть структурное предположение, легко найти эти два протона, а дальше вспомнить, что в таких системах в *пара*-замещенном бензоле могут появляться дополнительные линии, как на том первом слайде. И эти дополнительные линии, действительно, здесь есть, причем именно с таким соотношением интенсивностей по отношению к основным линиям и между собой, которые мы и ожидаем, исходя из правильно нарисованного спектра системы AA'BB'. Далее смотрим на константу [KCCB], она примерно соответствует нашим ожиданиям для *орто*-константы в бензоле, и получается, что спектр соответствует структуре и имеет незначительные примеси *вот этого*. Они настолько незначительные, что сказать, что это, вряд ли возможно. То есть, возможно,

³² ACDLabs предсказывает сигналы в той же последовательности, но различие между хим. сдвигами С и E не существенно.

еще где-то какие-то сигналы от них есть, скрывшиеся [вот здесь где-нибудь](#) или [вот здесь](#). Но похоже, что [их мольная доля -] в пределах 3%, в органической химии это допустимое количество примесей.



#25 Этот один [пример] лучше [рассмотрим] в этот раз, поскольку он похож на предыдущий. То есть «синяя» система такая же, тоже есть AA'BB', которые обозначены здесь X и Y, чтобы с этими [зелеными] не путать, и есть еще хорошо знакомая нам 1,2,4-замещенная система ABC. Когда все подписано, оно, наверное, в комментариях не нуждается. Но интересно было бы проследить, не имея этих подписей, как действовать, сопоставляя спектр со структурой. Во-первых, на что можно обратить внимание? Сначала на самые характерные, резко отличающиеся от остальных сигналов особенности. Два больших сигнала [X и Y]. Вот это [X] однозначно идентифицируется как дублет, причем дублет откуда-то отсюда, поскольку у него вот эти боковые линии тоже есть. Здесь [7.05-7.25] теоретически, может быть - вот это был бы дублет (к примеру, эта линия [7.18] и эта [7.13], с большой константой). Но, во-первых, эта константа [на X] должна быть где-то (это может быть вот [7.2], может быть вот [7.1], поскольку если это [6.8] - X, то Y тоже должен быть дублетом, а если это [6.8] Y, то X тоже должен быть дублетом). Этот [7.1] - вряд ли [подходит], потому что у него «крыша» смотрит влево, а у сигнала из этой системы должна смотреть в сторону этого [6.8] сигнала. Вот [7.2], значит, хороший кандидат, он как раз и по площади соответствует, и у него есть боковые линии, которые есть у этого [6.8]. То есть похоже, что вот этот дублет [7.1] и вот этот [6.8] – из одной системы, и в силу наличия боковых линий и [анализа] интегралов можно сказать, что это - вот это [«красное»] кольцо.

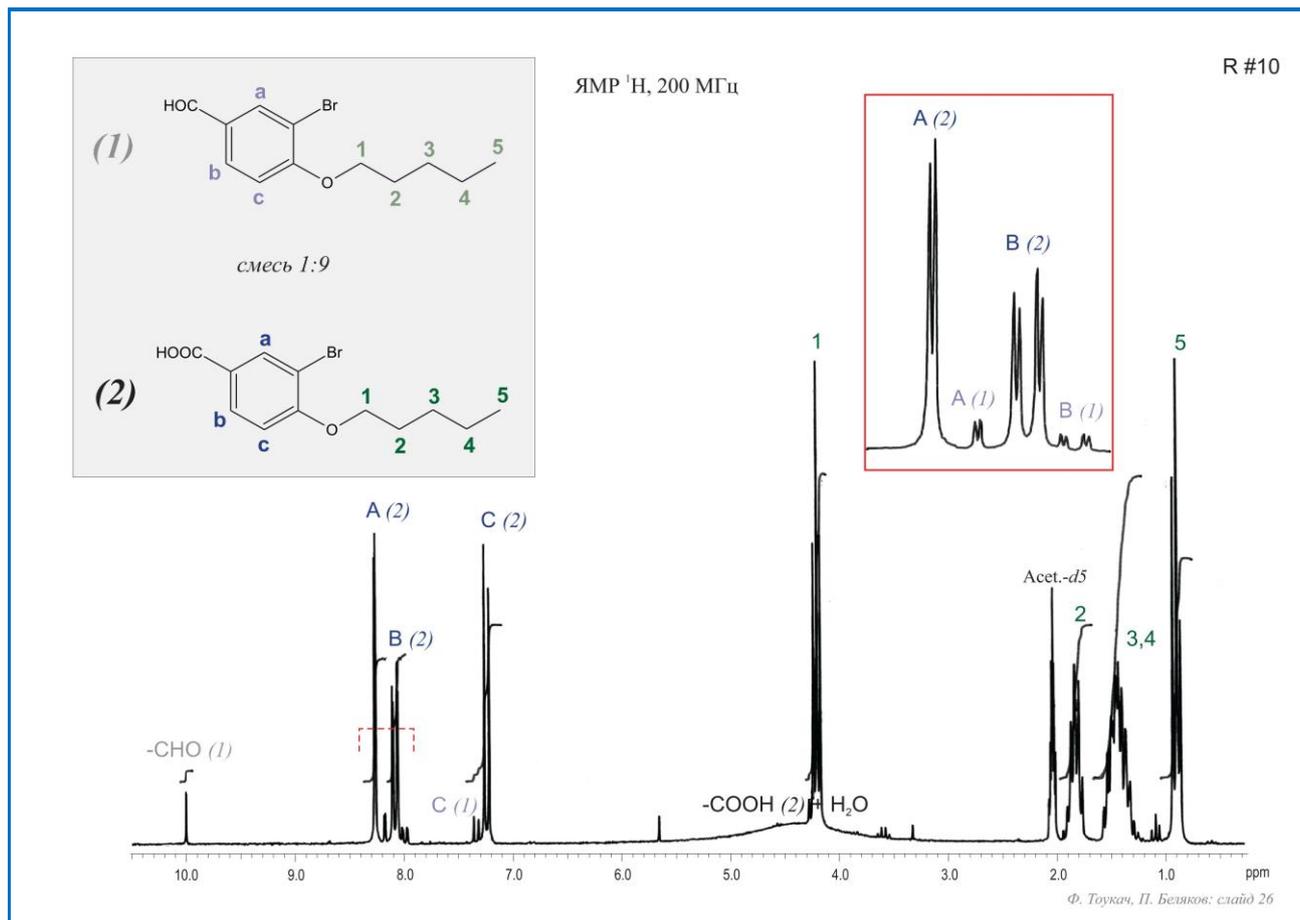
Теперь еще какой-то один широкий дублет есть [7.1]. И других широких дублетов в спектре нет, значит, можно на этом основании попытаться его найти. Просматриваем, у кого нет мета-констант из оставшихся [атомов]. Только у c, у всех остальных кто-то есть в мета-положении, значит, должна быть маленькая константа, значит, это C. Крыша его смотрит туда [влево], и она

достаточно крутая, значит, то, на чем [сигнал] щепится (В), где-то не очень далеко от него находится. Смотрим на атом **b**, видим, что у него есть *мета*-сосед и *орто*-сосед, значит, должен быть дублет дублетов с большой и с маленькой константами. Таких здесь... очевидный кандидат [здесь \[7.4\]](#). Во-первых, он близко, крыша крутая, то есть похоже, что это действительно В. Во-вторых, у него *мета*-константа достаточно большая и, значит, она должна еще на А проявляться. Другие возможные кандидаты в дублеты дублетов дальше находятся, то есть крыша не была бы такой крутой, и у них маленькие величины *мета*-констант. То есть похоже, что взаимодействие G-E и взаимодействие F-D происходит с маленькими *мета*-константами (меньше 2 Гц условно), а взаимодействие А-В, как у нас уже было на одном из предыдущих примеров (*мета*- через хлор), дает большую константу. То есть рабочая гипотеза, что [это \[7.4\]](#) - В. Его «маленькая» крыша смотрит снова влево, то есть где-то с левой стороны должен быть дублет от А [вот с такой](#), маленькой в принципе (но большой по сравнению с другими маленькими), константой [3 Гц]. И, действительно, тут такой есть, [вот он \[8.27\]](#). Он частично наложился на другой сигнал, но тем не менее, все равно видно две этих торчащих вверх линии, расстояние между ними как раз соответствует [вот этому \[J_{ВА} в сигнале В\]](#). Только у него, к сожалению, «крыша» смотрит в другую сторону, но здесь уж точно можно сказать, что крыша нерепрезентативна, поскольку эта линия (левая) наложилась на кусок [вот этого \[8.33\]](#) сигнала и по этой причине стала выше. Поэтому здесь «крышу» мерить бесполезно, она заведомо будет не туда смотреть. Таким образом, мы нашли еще и А.

Остается еще четыре сигнала, два из которых должны быть дублетами дублетов, а два триплетом дублетов. Если вычесть [вот эти две идентифицированные линии \[А\]](#) из [этой «кучи» сигналов \[8.2-8.4\]](#), останется как раз дублет дублетов с маленькой *мета*-константой. Ему должен соответствовать триплет дублетов. Ну вот [здесь какой-то один есть \[7.68\]](#) и в [этой «куче» \[7.8-8.0\]](#). Что именно [из этого \[7.8-8.0\]](#) - триплет дублетов? Может быть – раз, два, три – три линии [7.8-7.9], они соответствуют. У них и крыша туда, куда надо смотрит, и они на одинаковом расстоянии, [это \[левая группа\]](#) от [этой \[центральная\]](#) и [это \[центральная\]](#) от [этой \[правая\]](#). Других вариантов я здесь не вижу, потому что, если предположить, что [это - левая компонента \[7.98\]](#), а [это - центральная компонента \[7.93\]](#), то где-то должна быть еще правая компонента. [Это \[7.90\]](#) - слишком близко, а [это \[7.86\]](#) - слишком далеко. То есть правая где-то между ними должна оказаться. Это уже противоречие, поскольку здесь мы не видим [линий] на том же расстоянии. Значит, расщепление, триплет дублетов - это именно [вот эти три группы линий, вот так нарисованные \[F\]](#). Теперь кто из них F, а кто E? Тот же самый вопрос. Здесь, опять же, аналогичные соображения, что [эта константа \[J_{FD}\]](#) вроде бы поменьше, чем [эта \[J_{EG}\]](#). (..) Тут уже так точно, может быть, и нельзя измерить с учетом оцифровки, но опять же, если я ошибся, и F и E поменяются местами, на вывод о том, соответствует ли структура спектру, это уже не повлияет, поскольку оно и так соответствует, и эдак. Значит, делаем вывод, что это F и E *как-то* расположены, скорее всего, [именно так](#) (из-за *мета*-констант), а [это \[8.33 и 7.95\]](#) - D и G. Изначально дискриминация между D и G была сделана на основании хим. сдвига. У D рядом нитрогруппа, индуктивный эффект которой значителен, она влияет на D сильнее, чем на G, поэтому D находится [здесь \[левее\]](#). Но если это исследование важное, и нужно однозначно подписать [сигналы], стоило бы еще, наверное, проверить и посчитать в какой-нибудь программе электронные эффекты, потому что иногда бывает, что что-то мезомерное перевешивает, и соображения только на основании электроотрицательности оказываются неверными. Но, опять же, в данном случае даже если мы их и перепутаем местами, все равно эти четыре протона дают такие четыре сигнала: [эти три и этот один](#). Поэтому вывод о соответствии – «соответствует».

Лекция 3

NMR Lec3s.mp4



#26 Сегодня будет чуть поинтереснее - тем, что нарисовал синтетик. Оказалось, что оно не полностью соответствует тому, что увидел интерпретатор спектров. Предположение было, насколько я понимаю, **вот это, обозначенное цифрой (1)**. Здесь уже ответ написан, этот ответ родился в результате рассмотрения спектра. Итак, поступаем аналогичным образом: выявляем спиновые системы, то есть те группы протонов, в рамках которых можно перейти от одного к другому, двигаясь по константам спин-спинового взаимодействия, обозначаем их разными цветами ([протоны -] буквами или цифрами), получаем три штуки - «зеленую», «синюю» и единичный протон. Все эти системы по отдельности у вас уже были на предыдущих слайдах, но напоминаю, что в алкильном хвосте **3** и **4** (так же, как и четыре слайда назад) частично совпали. **Этот сигнал [1.4]** не поддается интерпретации с точки зрения мультиплетности, но мы видим, что он находится примерно в том месте, где мы ожидаем протоны **3** и **4**, что у него двойной интеграл по сравнению с **2**, к примеру, и делаем вывод, что это **3** и **4** вместе. Аналогично предыдущим рассуждениям **квинтет - 2** с интегральной интенсивностью два. Где-то должен быть **1**, **вот он [4.2]**. Его интегральная интенсивность больше двух, но это не должно нас смущать, потому что **здесь [3.5-5.0]** мы видим горб. Даже если мы не знаем, что это за горб, все равно ясно, что какая-то часть площади **этого [1]** сигнала приходится на горб, поэтому его интегральная интенсивность больше, чем ожидается. И классическое полтора по отношению **к этому [2]**, три протона - это триплет в сильнополюсной области с хим. сдвигом около единицы, что мы уже теперь легко можем приписать метильной группе, обозначенной здесь как **5**. Теперь горб. Во-первых, можно предположить, что это вода. Чаще всего вода проявляет себя именно так, но не всегда бывает такой широкой. А широкой она бывает в присутствии кислоты. В то же время мы здесь видим альдегид, и уже можем предположить, что,

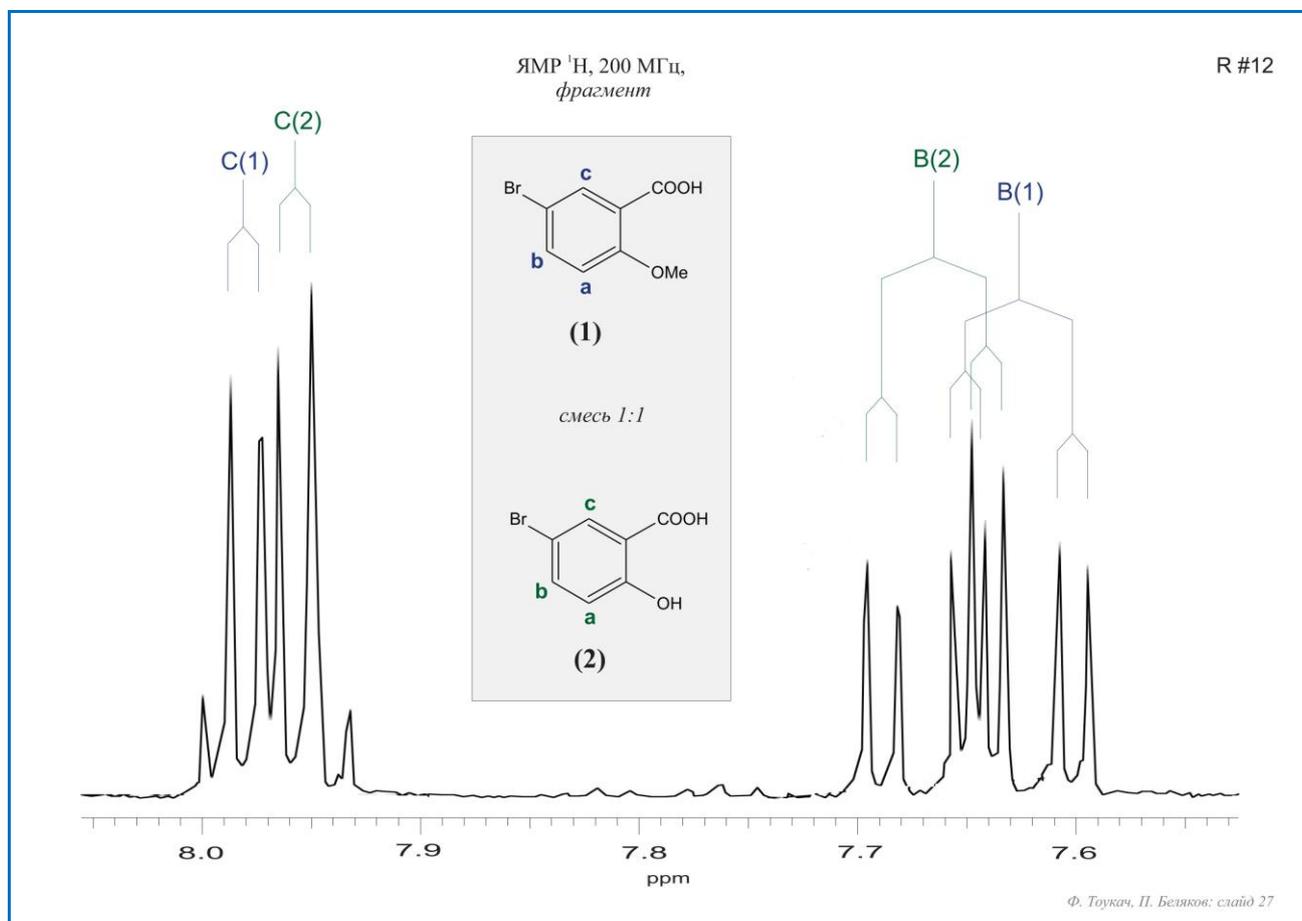
наверное, бромировали **такое [(1) на вставке]** соединение, и альдегидная группа окислилась в части молекул. За счет присутствия кислоты протон (кислоты) смешался с протоном воды, они друг с другом обмениваются (меняются местами). И в ЯМР мы видим усредненный сигнал, который имеет **вот такую форму** за счет того, что происходит обмен. Почему он именно такой широкий, мы чуть попозже рассмотрим, а сейчас – пока что [перед нами -] характерная форма сигнала смеси воды с карбоксилем или с другим подвижным протоном. Но подвижных протонов здесь нет, поэтому для начала попробуем соотнести остальное.

Систему ABC, расположенную таким образом, как здесь нарисовано, вы уже видели: дублет, дублет дублетов и широкий дублет. Здесь **эта ее часть** увеличена для того, чтобы [можно было] рассмотреть маленькие константы спин-спиновой взаимодействия. А вот сопоставимого по величине сигнала альдегидной группы мы не видим. Этот протон не подвижный, то есть он не «отрывается» в водном растворе, поэтому должен быть классический синглет (**где-то здесь**) с интегралом около единицы. Вместо этого мы видим синглет с интегралом около 0.1 - это, в принципе, может быть альдегид из нужной нам молекулы, но его слишком мало. Если есть такая молекула в таком небольшом количестве, то должны быть и остальные сигналы [атомов] в таком же количестве³³. Если мы присмотримся к большим сигналам, у их оснований мы увидим их копии: **дублет, дублет дублетов и широкий дублет здесь**. Они выглядят так же, как и большие сигналы, но немного смещены относительно них. При этом, если померить интеграл (можно на **этом** примере увидеть), мы увидим, что **этот интеграл** и **этот** [альдегидный] примерно равны. То есть можно предположить, что сигнал альдегидной группы относится к той же молекуле, к которой относятся уменьшенные копии сигналов. Эти копии есть и в алифатической части - **вот, например**. Я не знаю, **это [1.1]** или примесь этанола, или копия **этого [0.9]** сигнала. Я думаю, что, скорее всего, это примесь этанола. Во-первых, потому что есть квартет **еще здесь [3.6]**, который как раз по площади хорошо соотносится как 2:3 **с этим [1.1]**. А, во-вторых, потому что, если бы было такое большое расстояние между основным сигналом и копией, то и у **этих [-CH₂-]** должны бы были быть такие же [копии], а мы их здесь не видим. То есть отличия маленьких сигналов от больших по химическому сдвигу в этой области несущественны. Это как раз и соответствует **такому** структурному предположению: «зеленый хвост» далеко от этих изменений, поэтому там химические сдвиги маленьких сигналов и больших практически совпали. Они отличаются, может быть, на пару сотых [м.д.], но это меньше, чем ширина линии, поэтому мы их здесь не видим. **Вот какое-то плечо сбоку торчит**, это, возможно, частичное совпадение. А в той спиновой системе, которая находится близко к тому месту, где произошло изменение, сигналы съехали сильнее, причем в разные стороны. Это вполне может быть так из-за электронных эффектов. Таким образом, предположение: большая часть того, что находится в образце – это окисленная форма, в которой нет сигнала альдегида (а все остальное есть), зато есть **вот этот горб [3.5-5.3]**, взявшийся из воды и карбоксила; и небольшое количество целевого продукта, в котором есть альдегидная группа, и из которого берутся **эти маленькие сигналы**. Если мы теперь посчитаем отношение **этого [A(1)]** интеграла и **этого [A(2)]**, мы увидим, что это 1:9. И наш ответ себе (если мы сами синтезировали), или синтетику (если не мы), будет такой: это смесь, в которой 10~11% желаемого, а остальное окисленное. Я уже не помню, эффекты замещения какие должны быть у карбоксильной и алкоксильной групп. Кто-нибудь из вас помнит, при бромировании куда должен «сесть» бром, кроме того положения, которое нарисовано на доске? В 11 классе это было на органической химии, какой заместитель куда ориентирует при замещении в бензольное кольцо. Если не помните, имело бы смысл или посмотреть в Википедии эффекты ориентации в бензольном кольце, или в школьном учебнике органической химии посмотреть, есть ли другие варианты, куда

³³ В значении «близкие по площади»

еще бром мог пойти. Если их нет, остается единственный вариант. Мы видим, что другого паттерна замещения в спектре нет, поскольку, если бы были еще и изомеры с бромом, расположенном в другом месте, то было бы большее количество сигналов, а здесь по расположению брома только один [вариант].

Когда смесь - не в соотношении 1:1, по интегралам сигналов довольно легко понять, кто есть кто. Самый сложный случай – это когда соотношение 1:1, и на основании сравнения площадей сигналов невозможно понять, какой сигнал относится к какому компоненту смеси.



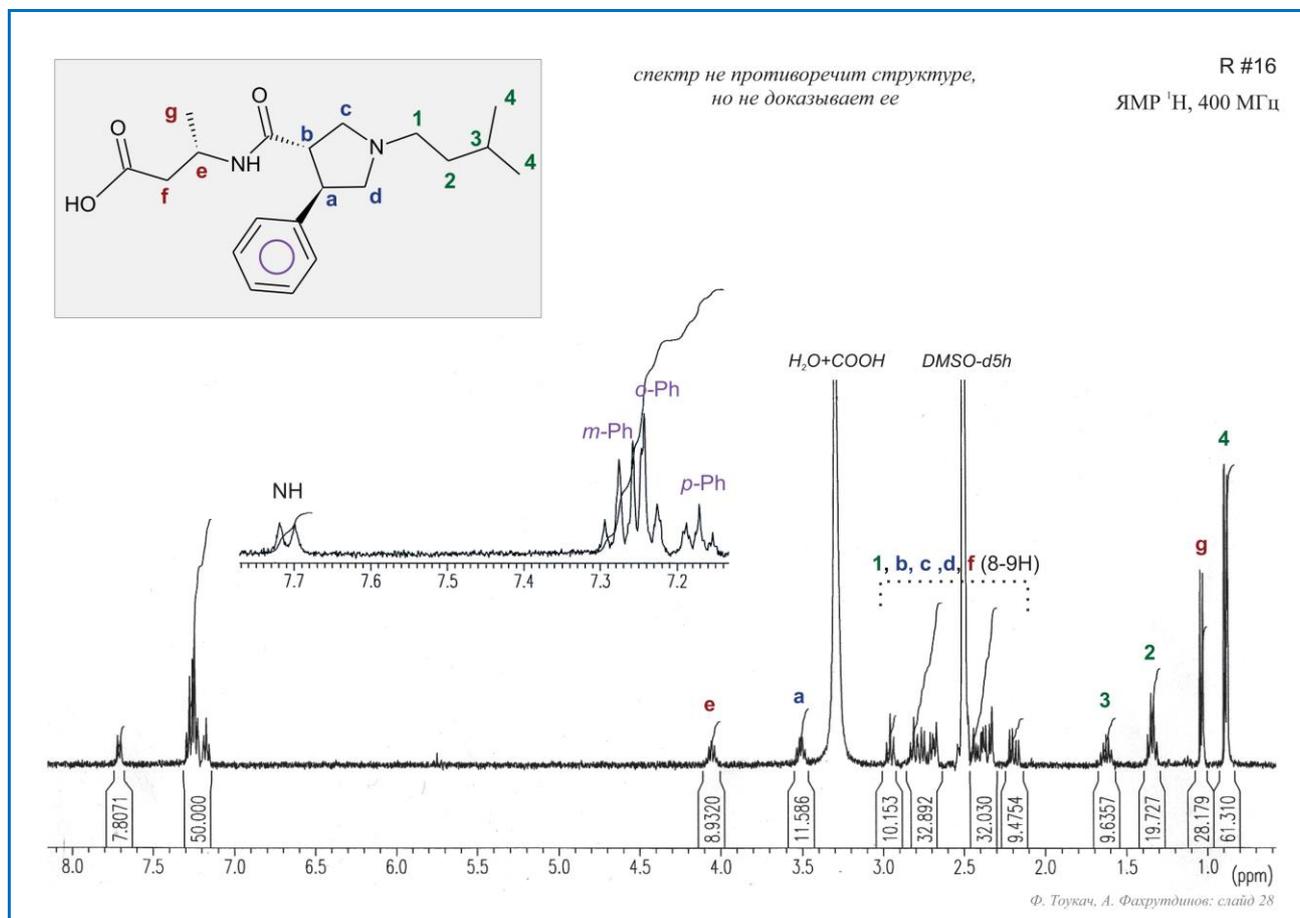
#27 Здесь как раз такой случай, но не все сигналы приведены, а только интересные с этой точки зрения С и В. Они находятся рядом, и, наверное, [отнесение] С случайным образом приписывается, а дальше мы или точно измеряем константы, или смотрим на эффекты крыши, или еще на что-нибудь, чтобы понять, какой из **этих** В(1), а какой В(2). Так, в чем разница [между молекулами]? Разница в наличии **вот этого** (-ОН) протона. То есть немного изменились хим. сдвиги, больше, в принципе, ничего не поменялось. Константа [KCCB] между С и В могла поменяться на 0.1 Гц или 0.2 Гц, а могла в пределах погрешности измерения остаться той же самой. Варианты как определить, кто с кем связан [, перечисляю далее:]. Первое: точно измерить константы, и, может быть, будет [заметна] эта разница в 0.1 или 0.2 Гц. Второе: точно измерить интегралы. Этот спектр не очень хорошо подходит для точного измерения интегралов. Я это вижу по тому, как выглядит основание линии. Оно довольно узкое, и видимо, здесь применялась специальная технология (к которой мы еще вернемся через пару недель), как сделать сигналы более узкими, но при этом проиграть в отношении сигнал/шум. Эта технология называется “взвешивающая функция, умножение на гауссиану”, и она приводит к тому, что в спектре улучшается разрешение за счет отношения сигнал/шум. Но чем хуже отношение сигнал/шум, тем менее достоверными получаются интегралы. Поэтому, если нам нужно точно мерить площади, эту взвешивающую функцию применять не надо. А здесь, судя по форме

основания линии, она как раз была применена, поэтому, наверное, здесь и я не нарисовал интеграл. С другой стороны, взвешивающая функция применяется к уже полученному со спектрометра набору данных, поэтому, если вам оператор присылает исходные данные – они на языке ЯМР-щиков называются FID (free induction decay) – вы вольны сами выбрать, какую взвешивающую функцию применять, чтобы получить спектр. Если вам нужно, как в данном случае, точно измерить интегралы, вы берете FID, открываете его у себя на компьютере, выбираете взвешивающую функцию в соответствии с теми знаниями, которые вы получите через две недели, и получаете точное измерение интегралов. Здесь сейчас я уже не могу сказать, на основании чего, **это** – «зеленое» В, а **это** – «синее» В, а не наоборот. Может быть... нет, не может быть. Хотел сказать, что здесь «крыша» инвертирована у одного сигнала («смотрит» не в ту сторону), и возможно, **здесь** была какая-то инвертированность, но здесь все крыши более или менее правильные (то есть «смотрят» туда, куда надо – в сторону сигнала С). За исключением **этой [линии 1 и 2 сигнала В(1)]**, но здесь это, скорее всего, связано с тем, что две линии находятся близко, и в районе основания они пересеклись, поэтому **эта [линия 2]** оказалась выше, чем мы ожидаем. Поэтому направленность этой крыши в другую сторону не должна мешать вам сделать вывод о том, что, тем не менее, **это сигнал В**, взаимодействующий с сигналом С **отсюда [слева]**.

Основная идея этого слайда – самый сложный для вас как для интерпретатора спектров случай – это смесь, в которой все компоненты находятся примерно в одинаковом молярном соотношении. То есть 1:1:1:1, если их много. И поэтому нельзя однозначно на основании интегралов сказать, какой сигнал относится к какой молекуле. Для того, чтобы такую ситуацию «разрешишь», существуют специальные эксперименты ЯМР, к которым мы еще вернемся, когда будем изучать, какие бывают эксперименты.

#28 Этот случай мне лет пять назад прислал студент, из своей реальной работы. Я решил тоже его включить, поскольку здесь уже не столь однозначное соответствие спектра и структуры. Во-первых, спектр, как и в предыдущих случаях, не доказывает структуру, а, во-вторых, нельзя даже однозначно сказать, что он ей соответствует, поскольку в **этой области [2.0-3.0]** сложно понять (соответствует или нет). Но, с другой стороны, спектр и не противоречит структуре. На основании чего сделан такой вывод? Во-первых, те сигналы, для которых удастся рассмотреть мультиплетность, имеют именно ту мультиплетность, которая должна быть, исходя из этой молекулы. То есть здесь противоречий нет. Во-вторых, остальные сигналы, мультиплетность которых не удалось рассмотреть, находятся примерно в тех местах, где мы их ожидаем (химические сдвиги - в нужном диапазоне), и их суммарные интегралы соответствуют тому числу протонов, которое там должно быть. Почему суммарные? Потому что в **этой куче** понять, где кончается один сигнал и начинается другой, не всегда возможно, поэтому их проинтегрировали вместе. Здесь получилось – **отсюда [2.85] досюда [2.65]** – три протона, и в молекуле оставалось как раз три. Поэтому мы и говорим, что явных противоречий в спектрах не видим, но и явного соответствия тоже не видим. Давайте более подробно посмотрим на сигналы. **Вот [7.1-7.3] ароматическая система**. Из таблицы с химическими сдвигами можно вспомнить, что ароматика [дает сигналы] где-то между 7 и 9 м.д. И действительно, **здесь** есть какие-то сигналы. Если посмотреть на эту область – **вот здесь она [увеличена]** – то **здесь** по интегралу как раз пять протонов получается, один из которых – это отдельно стоящий триплет, именно то, что мы ожидаем для протонов в *para*-положении. А другие – здесь должен быть дублет и триплет – действительно пять линий. Поскольку они [находятся] рядом и взаимодействуют друг с другом, эффект крыши - очень сильный, [сигналы] перекошены друг в сторону друга. Я вижу здесь **[7.28] триплет с большой константой**, а **вот [7.25] - дублет с такой же константой**, и очень крутая крыша по направлению друг к другу. Это - *орто*- и *мета*- протоны, каждого по два экземпляра.

Кроме этого, на этих сигналах не особо видно, только намеки какие-то, а на **этом пара-[протоне, 7.17]** видна еще *meta*-константа между **этим [пара-]** и **двумя этими [орто-]**. Она [КССВ] здесь не очень четко видна, тем не менее, видно, что это не “одна линия”, а одна линия, имеющая более тонкую структуру. То есть, в принципе, **вот это [7.17]** можно назвать триплетом триплетов. А **здесь** эта константа потерялась из-за ширины линии, хотя тоже какие-то плечи у сигналов есть. Вполне можно сказать, что **эта группа сигналов** как по химическому сдвигу, так и по мультиплетности и по интегралу, соответствует фенильной группе («фиолетовой» спиновой системе).



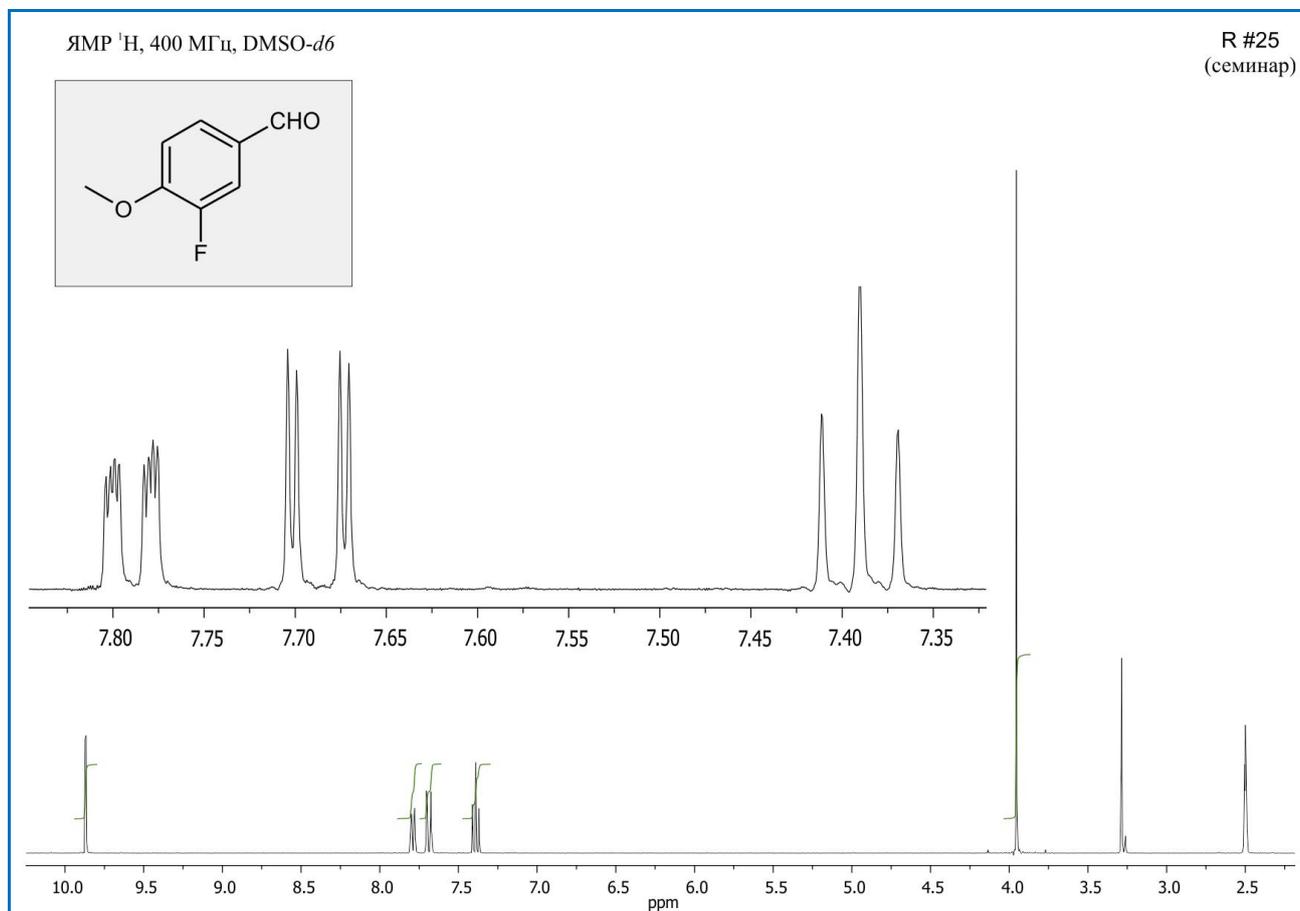
Здесь есть **еще один сигнал [7.7]** очень далеко, по химическому сдвигу это ничем иным, кроме NH, быть не может [в этой молекуле, из оставшихся протонов]. Здесь редкий случай, когда NH щепится на чем-то, находящимся рядом с ним. В данном случае это только протон *e* может быть. Весьма часто (более чем в половине случаев) бывает, что сигнал NH предстает в виде пологого горба с широкими линиями, на фоне которых не видно щепление. Но видимо, этот NH не склонен к обмену с водой, которая неизбежно присутствует в качестве примеси в ДМСО. Даже с учетом того, что растворитель заранее не был подписан, **здесь два сигнала**, которые явно больше остальных и они находятся как раз в характерных областях для ДМСО и воды. Я даже не смотрю здесь на форму линии, ее скорее всего и не видно (маленькую константу в 1.8 Гц). Но, во-первых, сигнал на 2.5 м.д. именно там, где бывает ДМСО. Во-вторых, он очень большой - можно предположить, что это растворитель; явно он не из той же молекулы, что и все остальное, то есть **этих [ДМСО]** молекул намного больше чем **этих [целевого вещества]**. И в нем присутствует очень типичная для ДМСО примесь воды, которая тоже явно не из этой молекулы (по интегралу).

Теперь смотрим на алифатический хвост, такой хвост у нас тоже уже был на одном из предыдущих слайдов. **Один протон [3]** с большим количеством соседей и с маленьким интегралом – линии, наверное, вы уже сами можете посчитать, но здесь вы их не все увидите, а только большие.

Маленькие по сравнению с центральной имеют небольшую площадь и на данном спектре тонут в шумах. Дальше **два четвертых [4]** – это один протон, присутствующий в шести экземплярах, потому что есть вращение вокруг связей, у них один сосед **3**, поэтому **4** представляет собой дублет. Где-то еще **2** должен быть, два “вторых” в виде **квартета, вот они**. Почему квартет? **Здесь два [1]** и **здесь один [3]**, три одинаковых соседа. Их одинаковость обеспечивается свободным вращением вокруг **этих** связей и усредненной константой спин-спинового взаимодействия в 7 Гц, поэтому [наблюдается] квартетное расщепление; интеграл - два протона. Где-то еще должна быть метильная группа в этом районе. Метильная группа **g**, у которой один сосед, следовательно, это дублет. Отсюда я уже вижу, что это действительно дублет, причем количественно ровно вдвое меньше, чем **4**. Если бы мы не знали, какой из них какой (что вполне возможно, потому что и у того, и у другого константы порядка 7 Гц, если точно их не измерять), только что **здесь** дублет и **здесь** дублет [, то рассуждаем так:] **этот дублет [0.9]** вдвое больше **этого [1.0]**, а мы знаем, что **здесь [4]** две метильных группы эквивалентных, а **здесь [g]** одна. На основании этой разницы делаем вывод, кто из них - **4**, а кто - буква **g**, красная. Аналогично поступаем со всеми отдельно стоящими сигналами, их не так много остается, в основном **вот** и **вот еще**. Так, **e**. Соседей много, **здесь три**, **здесь два** и **здесь один**. Какой-то сложный мультиплет с большим количеством линий. А **a** по химическому сдвигу можно предположить (что это он), и проверить мультиплетность. Один сосед **здесь [b]**; и **здесь [d]** скорее всего, два разных, потому что один «в цисе» к **a**, а другой «в транс» к **a**. Вращения нет вокруг **этой** связи, потому что [геометрию фиксирует] цикл, поэтому соседи **d** для **a** будут разными, а уж насколько разными - уже, исходя из формы мультиплета, можно будет судить. Но, если исходить из того, что я эти мелкие сигналы не стал рисовать в увеличенном виде, как ароматику, [мультиплетность не интерпретируется]. Можно предположить, что я это для себя нарисовал, посмотрел и понял, что никаких выводов сделать нельзя, то есть много шумов и пересечений. Единственное, мы можем по химическому сдвигу предположить, что это он, а **здесь** уже ничего не интерпретируется. Сигналы разных протонов могут быть одинаковыми, могут быть и разными в зависимости от того как изогнулся этот цикл, действительно ли он плоский или, может быть, это конвертик, уголок которого обегает все положения за определенное время. Причем это время может быть быстрее [=меньше] времени фиксации ЯМР – тогда мы будем видеть усредненную картину, как если бы цикл был плоский. А может быть и медленнее [=больше] – тогда мы будем видеть отдельные состояния. В любом случае, что здесь остается сделать, не имея других экспериментов – так это посчитать, сколько осталось неотнесенных протонов, и посчитать суммарный интеграл **здесь [2.1-3.0]**, исключая, конечно, ДМСО. И если это будет совпадать с точностью до 10%, сделать вывод, что спектр не противоречит структуре, хотя и не доказывает ее. Дальше все будет зависеть от того, насколько точное вам нужно отнесение. Если это одно из тридцати синтезированных соединений в вашей статье, точное отнесение может и не понадобиться. Просто пишете, что там суммарно девять протонов в области от 2.0 до 3.0 м.д., и перечисляете, какие эти протоны (**вот они здесь перечислены**). А если ваша статья посвящена, к примеру, биологической активности в зависимости от конформации этого соединения, вам уже нужно точное отнесение, и тогда вам понадобятся дополнительные эксперименты ЯМР, чтобы узнать, что **в этой куче** чему соответствует (...).

семинар R#25 Прежде чем перейти к следующей теоретической части, которая будет после перерыва, мы посмотрим на аналогичные задачи, в которых ответ не подписан. У вас очень небольшая доля суммарной оценки приходится на активность на семинарах, поэтому эта деятельность - по желанию. Если кто-то чувствует себя в силах объяснить, то есть, сказать какой атом какому сигналу соответствует, можете попробовать. Хуже себе вы этим не сделаете. Если ваша оценка будет равна нулю, мы ее просто не будем учитывать. А если сделаете правильно, потом это вам в итоговой оценке даст какую-то прибавку, небольшую. Если желающих нет, то тоже ничего

страшного, я это сделаю за вас. Поэтому, когда видите следующую задачу, если желаете попробовать, поднимайте руку, а если нет, я буду пробовать за вас. В интернете это есть на моей странице. [диалог со студентами:] Какой презентации? Это не презентация, это PDF-файл. Нет, там только лекции. Это семинар. То есть сейчас у нас вставка размером в полтора часа, семинарское занятие, разбор примеров. Все, кто отвечает, потом в перерыве подойдите ко мне, скажите фамилию, чтобы я вам не забыл бонус зафиксировать. Указка очень электропрожорливая, поэтому постарайтесь нажимать только тогда, когда это нужно, не держать все время включенной. (...).



Вы лучше объясняйте, почему, потому что это Вам понятно, а может быть, не всем [понятно]. Давайте сейчас [я дам] некую вводную информацию, потому что, возможно, не все это видят в молекуле. Действительно, три протона, у каждого интеграл по единице, но здесь еще есть фтор. Вспоминаем первую или вторую лекцию, фтор - магнитно-активный атом, у него спин $\frac{1}{2}$, то есть сам он в протонных спектрах в виде сигнала присутствовать не будет, поскольку это другое ядро, но расщепление на нем будет иметь такой же характер, как на протонах. Численно могут быть другие константы спин-спинового взаимодействия, но качественно характер расщепления такой же, поскольку что у протонов, что у фтора спин равен $\frac{1}{2}$. Итак, смотрим у кого сколько соседей, включая фтор, и прикидываем, какие будут формы линии. А почему триплет? Вспоминаем, что такое триплет. Это два соседа. Какие два соседа? Итак, через этот слишком далеко - четыре связи, если среди них нет двойных, их константа если и будет, она будет очень маленькой, а здесь маленьких констант нет, здесь только большие. Есть две каких-то больших константы либо два одинаковых соседа. (...) Неправильно. Потому что вспоминаем таблицу с константами спин-спинового взаимодействия: через *мета*-положение, через четыре связи - маленькие константы, *орто*- - большие, но это протон-протонные, а про протон-фторные там ничего не сказано. Но в любом случае, если бы это был этот протон, у него есть сосед в *мета*-положении, значит, там должна быть хотя бы одна маленькая константа. Маленькая - это вот, например [7.7], и здесь где-то [7.8] она присутствует. Здесь же [7.4]

маленькой константы нет, но можно предположить: а, может быть, мы в этом спектре вообще маленькую константу не видим? Тогда ее, конечно, не будет. Но смотрим на **эти сигналы [7.7 и 7.8]** и понимаем, что все-таки маленькие константы мы видим. Это значит, что если у протона в *мета*-положении есть другой протон, то [у его сигнала] должна быть маленькая константа. У **этого** протона сосед в *мета*-положении есть, а в сигнале маленькой константы нет. Значит, это заведомо не этот. Значит, **какой-то из них**. Ну очевидно, что здесь есть *мета*-константа, и здесь она тоже присутствует среди прочих констант. Значит, **вот эти два [7.7 и 7.8]** в *мета*-положении друг к другу должны быть. Исходя из этого, можно теперь посмотреть методом исключения – [найти] единственный протон, у которого нет *мета*-соседа протона. (...) Правильно, у **него [протон рядом с метоксилом]** нет *мета*-соседа-протона. У него, правда, есть *мета*-сосед-фтор. Но, исходя из той информации, которая была на слайдах, вы не знаете, какова протон-фторная КССВ в *мета*-положении. Можно в интернете просто погуглить «spin coupling of fluorine with hydrogen through four bonds», к примеру. И найти, что она как раз порядка 8 Гц. То есть примерно равна протон-протонной константе через три связи. И тогда получается, что протон, находящийся в *орто*-положении, и фтор, находящийся в *мета*-положении, имеют примерно одинаковую силу спин-спинового взаимодействия и, значит, выглядят для наблюдаемого протона как условно одинаковые соседи несмотря на то, что это даже два разных ядра. Получается **вот такой триплет [7.4]**. То есть здесь в чем «фишка»? *Мета*-константа с фтором совпала с *орто*-константой с протоном. Решая эту задачу, у вас не было доступа к информации о величине *мета*-константы с фтором. Единственное, что вы могли предположить, это что она, скорее всего, больше [чем протон-протонная] - так бывает. И там, где вы для протон-протонного случая ожидали 2 Гц, здесь может быть 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 Гц. А дальше, если этого недостаточно, можете уже найти справочник и там посмотреть величину этой константы, и увидеть, что она действительно 9 Гц или что-то около того. Теперь давайте [рассмотрим] **эти [7.7 и 7.8]**. Давайте прикинем, сколько **здесь [7.8]** линий? Это не настолько сложный мультиплет, чтобы не посчитать. Я вижу **восемь** (...). И все примерно одинаковые, восемь одинаковых линий. Раз одинаковые, значит, там только дублетное расщепление. Потому что, если бы были триплетные, [линии] были бы разными по высоте. Восемь одинаковых – это 2^3 , то есть DDD, дублет дублетов дублетов. Это что-то, у чего есть три соседа, каждый из этих соседей один, и на нем [сигнал] щепится с какой-то своей константой. Одна из них **большая [между линиями 1 и 5]**, одна из них - *мета*- **[между линиями 1 и 3]** (такая же как **здесь [7.7]**), и одна - **совсем маленькая [между линиями 1 и 2]**. Совсем маленькая, это может быть *пара*- к фтору, а может быть еще какая-то фторная константа. Тут просто надо посмотреть, вариантов не так много осталось. Да, может быть такое. Это, скорее всего, так и есть [*пара*- с фтором], по крайней мере пока я противоречий не вижу. Кроме того, мы видим вот это - *орто*-константа между двумя протонами, она же *мета*- с фтором. И даже «невооруженным взглядом» видно, что вот **здесь [7.7, линии 1 и 3]** расстояние между линиями больше, чем вот **здесь [7.4, линии 1 и 2]** на ~20%. То есть, **вот это [7.7, линии 1 и 3]** - не протон-протонная *орто*-константа. Потому что, если бы она была протон-протонной, она была бы такая же как **вот здесь [7.4]**. Она здесь больше. Можно предположить, что это *орто*-константа между фтором и протоном. Тогда (...) получается, **вот это [7.7]** относится к протону, который в *орто*-положении к фтору. И теперь остается только проверить, нет ли противоречий **здесь [7.8]**, и если их нет, посчитать, что ароматическая часть для нас «сложилась». Мы уже знаем, что за пределы бензольного кольца константы не выходят. Это у нас в справочной таблице было, там ноль. Мы знаем, что у **этого оставшегося протона [на рисунке сверху]** есть *орто*-сосед, *мета*-сосед, и еще есть фтор в *пара*-положении. Протон-протонные константы в *пара*-положении не видны, слишком маленькие. А протон-фторные мы не знаем, но вполне возможно они больше, чем протон-протонные, и, возможно, [в *пара*-положении] они все-таки есть. И здесь есть **одна орто-константа, одна мета-** между первой и

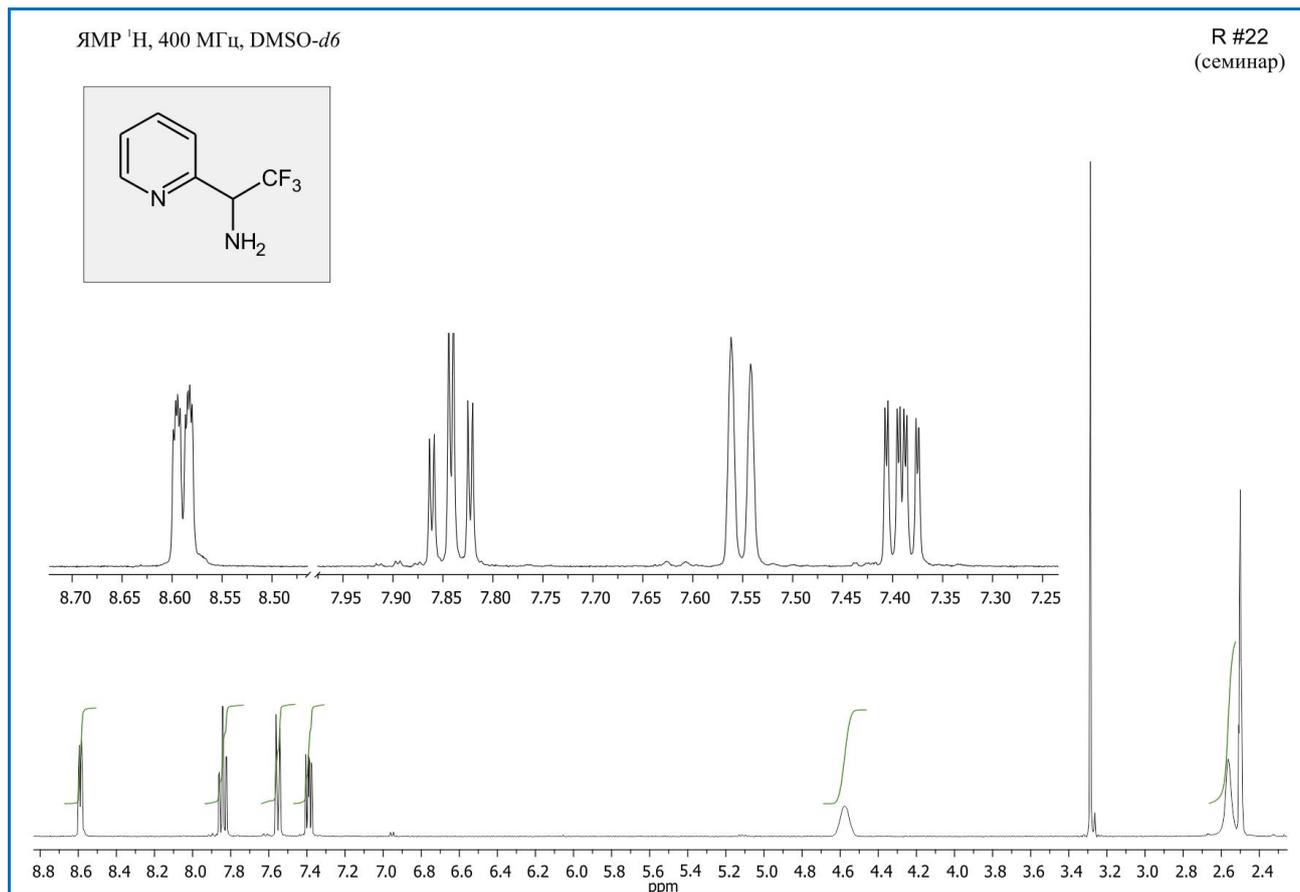
третьей [линиями], такая же как [здесь \[7.7\]](#), и еще одна какая-то очень маленькая. Что это такое очень маленькое, как по-вашему? Все правильно. Это константа через пять связей по ароматике в пара-положении между фтором и протоном. Другим фактором в пользу того, чтобы сделать такое суждение является следующее: эта самая маленькая константа между первой и второй линиями, ее больше нигде в спектре нет. Если бы она была протон-протонной, то она должна была бы и у другого протона тоже быть. А этого другого протона здесь [в спектре] нет, значит, эта константа на фторе. То есть, если мы накопим спектр по ядрам фтора, там будет один сигнал, и в нем будет, в том числе, и [вот такая](#) константа, но и другие константы будут, поскольку другие протоны в этой молекуле тоже есть. Если нужно совсем точно подтвердить, то имело бы смысл поставить другой эксперимент – одномерный спектр по ядрам фтора. Мы ожидаем там увидеть один сигнал, тоже DDD, поскольку три соседа протона есть с разными константами, ну и как-то бы он выглядел.

Да, метоксильные (...). Метильная была бы около 1 м.д., если она с углеродом связана, а с кислородом связанная - около 4 м.д. и по интегралу соответствует. А это что? Кто из них? Да, это вода. Очень редко бывает, что ДМСО без воды, поскольку [ДМСО -] чрезвычайно гигроскопичная жидкость, стоит только открыть его, и вода из воздуха попадает в ДМСО. Вода бывает горбиком тогда, когда ей есть с чем обмениваться, а здесь ей обмениваться не с чем. То есть если бы, к примеру, здесь был карбоксил в молекуле, она была бы широкой и низкой, а так... Но вообще вода бывает по-разному – там и от температуры зависит и еще от чего-то. Ну постепенно, если вы используете один и тот же ДМСО, сами готовите образцы, сигнал воды со временем растет, растет, становится около основания шире, и может начать вам мешать, закрывая остальные сигналы. Тогда ДМСО нужно осушить. Ваши химические знания позволяют вам предположить, как осушить ДМСО? Что нужно сделать? Как бы вы эту задачу решали? Вот у вас есть ДМСО с примесью воды, и сигнал воды вам мешает в спектрах. Но ДМСО - дейтерированный растворитель, дорогой, поэтому просто слить его и купить новый - не является хорошим решением. (...) Да, самый простой способ – это молекулярные сита на 4Å, если они есть. А если нет, и попросить не у кого, еще такой кустарный способ существует: ДМСО замерзает при 18°C, а вода при нуле, поэтому, если его охладить, к примеру, до 10°C, ДМСО замерзнет, а капелька воды останется, после этого эту капельку надо слить, разморозить, снова заморозить и так несколько раз повторить, и можно ДМСО выморозить, сливая воду. Полностью от нее избавиться нельзя таким способом, но хотя бы уменьшить сигнал до размеров, сопоставимых с сигналом ДМСО, можно.

семинар R#22 (...) Я не помню все эти задачи. Соответствие в них есть, здесь не будет такого, что спектр не соответствует структуре, но что чему соответствует, я не помню, вместе с вами могу посмотреть. Еще желающие есть? Не видно. Попробую разобраться так.

Начинаем с самого простого - с сигналов, стоящих отдельно от других. ДМСО (в нем даже расщепление видно - это пять линий с небольшой константой) и воду сразу исключаем, остальные сигналы – это четыре [протона] в ароматической области, еще один [протон при 4.6] и еще два [протона при 2.6] здесь. Для начала имеет смысл посчитать протоны в молекуле. Действительно, четыре в ароматической области, один [здесь \[CH\]](#) и два [здесь \[NH2\]](#). Хотя это, конечно, странно. Почему? Необычный химический сдвиг для группы при гетероатоме. Но это единственный сигнал, где у нас два протона, и единственные два эквивалентных протона могут быть только здесь. С NH₂-группами так иногда бывает, их химический сдвиг очень сильно варьируется от эффектов не только в пределах одной молекулы, но и от эффектов, связанных со взаимодействием между молекулами. Иногда химические сдвиги NH₂-группы так же, как и NH, бывают атипичными; здесь, видимо, тот самый случай. Сигнал уширенный, именно такой, какой мы ожидаем у NH₂ в присутствии воды, он соответствует по интегралу, а химический сдвиг NH₂ предсказать очень

сложно, поскольку там диапазон значений от 0 до 10. Ну чаще где-то около пяти бывает, а здесь как раз в другой части диапазона. Таким образом, можно предположить, что это NH_2 .



Дальше алифатические – единственное, что по химическому сдвигу может подходить – это **вот этот [CH]**. Никакой тонкой структуры в нем нет, по всей видимости это связано с тем, что слишком много [факторов уширения]. Во-первых, рядом NH_2 , способный к обмену. Если есть щепление этого протона на NH_2 , а NH_2 обменивается, то это повлияет и на уширение линий во взаимодействующем с ним сигнале. Во-вторых, еще три соседа-фтора с алифатической константой (не помню, какая она между протонами и фтором через три связи; предполагаю, что ~ 10 Гц), но здесь сигнал очень широкий и видимо компоненты этого мультиплета тоже широкие, их много, они сильно пересеклись, и разрешение в этой области спектра оказалось недостаточным, чтобы увидеть тонкую структуру. Так или иначе, это может быть сглаженный квартет. Если убрать впадины между линиями, то как раз получится **что-то такого типа**. По интегралу соответствует, по химическому сдвигу соответствует.

Теперь смотрим, что **вот здесь [7.4-8.6]** осталось. Здесь явно какие-то *мета*-константы есть, а каких-то других [*мета*-констант] при этом нет. По крайней мере, на одном сигнале их не видно. Такое случается, когда [протон] находится близко к азоту. Ну можно предположить, что **вот этот [7.55]** – это **вот этот [орто- к азоту]**, в нем константа [*мета*-KCCB] есть, но мы ее не увидели из-за того, что линии широкие. **Вот здесь [7.4]** какие-то очень маленькие константы присутствуют, и **здесь [8.6]** тоже какие-то очень маленькие [KCCB] есть. Судя по масштабу, это меньше 1 Гц. А **вот здесь [7.55]**, вполне возможно, что есть такая константа, но сами линии шире, чем 1 Гц, поэтому этой впадины наверху не замечаем. **Здесь [7.4]** восемь линий, и **здесь [8.6]** восемь линий. То есть у каждого из этих сигналов по три разных соседа, причем [как минимум] один из них в *орто*-положении (тут это явно просматривается). Большая константа, **вот она [8.6]**, а **здесь [7.4]** - две

больших (...): между первой группой линий и второй и между первой группой линий и третьей. То есть отсюда можно сделать вывод, что у [этого \[7.4\]](#) два *орто*-соседа, а у [этого \[8.6\]](#) один *орто*-сосед.

Теперь смотрим [сюда \[7.85\]](#). Здесь такая же ситуация, как была у нас на слайдах – триплетное расщепление с большой константой, два *орто*-соседа. Только в данном случае *орто*-константы совпали, поэтому - триплетное расщепление, а в [данном \[7.4\]](#) случае *орто*-константы немного отличаются, поэтому - дублет дублетов. И в том, и другом случае есть еще *мета*-константы. [Здесь \[7.85\]](#) – маленькая, а [здесь \[7.4\]](#) – очень маленькая. Теперь, кто есть кто [атомы], на основании вышеизложенного? Определенно центральные, у которых по два *орто*-соседа - [этот и этот \[7.85 и 7.40\]](#), боковые – [этот и этот \[7.55 и 8.6\]](#). Видимо, стоит предположить, что это рядом с азотом [этот находится \[8.6\]](#), этот методом исключения – [вот этот \[7.55\]](#), а дальше надо понять: большая *мета*-константа, которая проявляется [тут и тут](#), где она присутствует? (...) [Вот \[7.4\]](#) она порядка 1 Гц, а [вот здесь \[7.85\]](#) она ~2 Гц (*мета*-константа). А [здесь \[8.6\]](#) они обе есть: и один, и два [Герца]. У кого такая может быть? Ни у кого. Есть предположения? Так, третий, [этот? \[7.4\]](#). Так, он может быть, да, два *орто*- и один *мета*-, [вот этот](#). Больше у него нет других [соседей]. Тогда, получается, [вот эта константа 1 Гц](#). Значит, она должна быть, вот она [здесь еще](#) присутствует, получается, [этот \[сигнал\] – вот этот \[атом\]](#), вроде тоже соответствует. Теперь смотрим [вот этот](#) методом исключения. У него две *орто*-константы и одна - [вот эта мета](#)-, которая побольше. Но тогда [вот эта \[2 Гц\]](#) константа, которая побольше, она должна быть вот у этого [мета-соседа]. Здесь мы ее не видим. Но это, допустим, может быть из-за ширины линии. Но ее не должно быть [у этого](#), а она есть. Вот это уже явное противоречие, с которым надо что-то делать. Значит, наше предположение, что 1 Гц и 2 Гц – это две разных *мета*-константы, неверно. А что может быть верно? Что здесь еще может быть? Вспоминаем таблицу по константам в бензоле. *Пара*-константа от 0 до 0.5 Гц (я не могу точно сказать, 1 Гц она [в спектре] или, может, 0.5 Гц, но можно точно посчитать по шкале). Получается, что следующее предположение, которое нам нужно проверить – что [вот эта маленькая константа \[1 Гц\]](#) – это *пара*-константа. *Пара*- здесь может быть только одна. Она проявляется в [этом сигнале \[7.4\]](#) и в [этом \[8.6\]](#). Тогда получается, что [этот и этот \[7.4 и 8.6\]](#) – это крайние, но [этот \[7.55\]](#) не может быть ни одним из средних, да? Потому что у каждого из средних должно быть, как минимум, две *мета*-константы. Значит, что-то еще. Можно предположить, что какая-то очень маленькая константа дошла до фтора. Но это уже самое последнее предположение. Сейчас мы сделаем перерыв, я подумаю, и вы подумаете. Выслушаю ваши предположения после перерыва и озвучу свое.

Я могу вам дать ключевую подсказку. Самая маленькая константа [1 Гц]... мы предполагали, что это одна и та же, а на самом деле это [две] разные. В одном сигнале одна, в другом сигнале – другая. Просто они так совпали, что мы увидели, что они близки по значению и пошли по ложному пути, думая, что это одно и то же взаимодействие. Мне интересен ход рассуждений. Если мы здесь перепутали две стороны системы местами, то на характер расщепления это не повлияет, просто все будет не из точки А в точку В, а из точки В в точку А (те же самые рассуждения с точностью до направления). Но здесь у нас вообще не сходилось. То есть получалось, что если три сигнала сходятся, то в четвертом сигнале [появляется] лишняя константа. Посмотрев во время перерыва на этот спектр, я сделал еще одно предположение: ошибка была в том, что [эта \[8.6\]](#) самая маленькая константа и [эта \[7.4\]](#) самая маленькая константа – это одно и то же, связывающее протоны, находящиеся в *пара*-положении друг к другу. На самом деле оказалось, что это разные константы, которые в силу каких-то случайностей имеют близкие значения, поэтому на спектре проявляются похожим образом. Вот [здесь \[7.55\]](#) тоже есть какие-то другие константы – маленькие и очень маленькие, но из-за иных причин просто мы их не видим на этом конкретном сигнале, поэтому у нас константы непарные. И несмотря на то, что [здесь](#) есть очень маленькая, и [здесь](#) есть очень

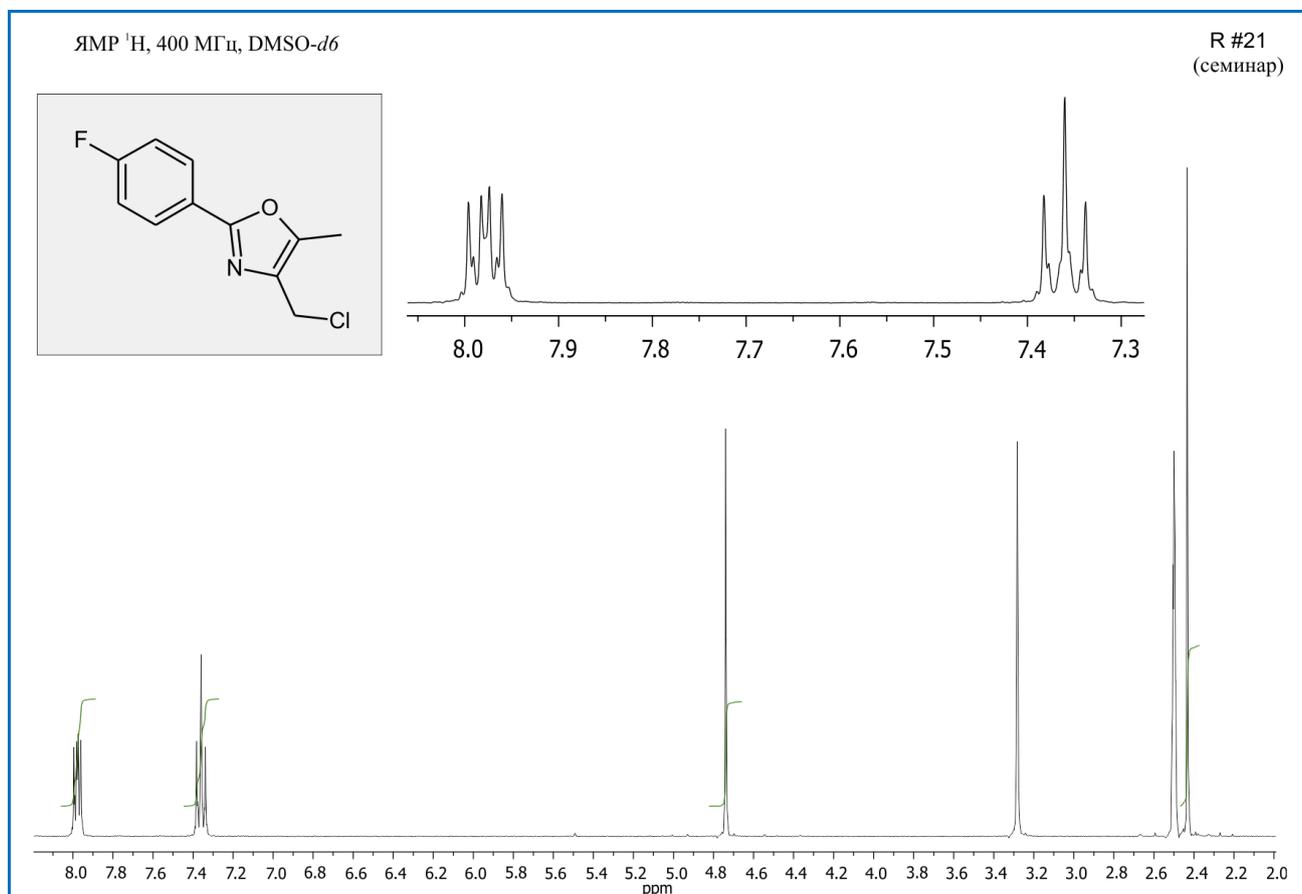
маленькая, они не являются парой друг к другу, и если сделать такое предположение, все встает на свои места. А именно: **это [7.55 и 8.6]** – крайние (какой из них какой пока не принципиально, потом на химические сдвиги посмотрим и поменяем местами, если нужно). (...) У **него [8.6]** есть *орто*-константа, *мета*-константа и *пара*-константа, самая маленькая. *Пара*-константа у него **с этим [7.55]**, но **здесь** мы ее не видим из-за ширины линии или какого-то возмущающего эффекта, связанного с азотом. (...) *Орто*-константы [в спектре] есть большая и маленькая, тоже [как и в случае с *мета*-КССВ] побольше и поменьше. Это ясно из того, что **здесь [7.4]** не чистый триплет, а дублет дублетов. Маленькая из них (из *орто*-констант) - **вот она же, здесь [8.6]** проявляется. То есть, можно предположить, что **вот это [8.6]** *орто*- к **этому [7.4]**. То есть *орто*-сигнал [к сигналу 8.6] – **вот этот [7.4]**. У него две *орто*-константы (поменьше и побольше) и одна *мета*-, **вот сюда [7.55]**. То есть вот эта, самая маленькая – это на самом деле *мета*- между **этим [7.4]** и **этим [7.55]**. А эта [8.6] самая маленькая – это *пара*- между **этим [8.6]** и **этим [7.55]**. Нам так «повезло», что они имеют близкие значения, но это не одно и то же. Остается еще **вот этот [7.85]**. У него *орто*-константы, в отличие **от этого [7.4]**, одинаковые, поэтому триплет. И одна *мета*-константа – **вот эта [между первой и второй линиями]**; из тех, которые *мета*-, она побольше. Она проявляется **здесь [7.85]** и **здесь [8.6]**. То есть вот эта *мета*-, условно говоря, 2 Гц, **здесь и здесь**. Другая *мета*- 1 Гц - она **здесь [7.4]** и скрыта **здесь [7.55]**, мы ее не видим. И еще одна *пара*-константа между **этим и этим [крайние атомы]**, которая по случайному стечению обстоятельств почти совпала по значению с **этой мета**-константой, что нас и сбilo с толку в самом начале.

Таким образом, общий принцип: начинаем как-то разбирать [спектр] от простого к сложному, и если в какой-то момент больше других вариантов не осталось, а единственный (последний) сигнал имеет противоречие (например, константу, которой там не должно быть, или неправильный характер расщепления), отходим назад. Сначала чуть-чуть (до последней развилки в размышлениях), и идем по другому пути. Если там опять противоречие, отходим еще дальше назад. Здесь нам почти до самого начала пришлось отойти.

Теперь [направление]. Вы предположили, что **этот [орто- к заместителю]** на самом деле **здесь [7.55]**. То есть все то же самое, только наоборот, в другую сторону. На чем это было основано? Это вы по химическому сдвигу судите? Вспоминаем электронные эффекты... Вот вы мне и напомните. Неподделенная пара азота куда «дает» [электронную плотность] сильнее? Вообще в какие положения азот «дает» электроны (мезомерный эффект)? (...) К тому же здесь еще индуктивный эффект накладывается, который этот сигнал [атома в *орто*-положении к азоту] утягивает левее. Почему я сначала предположил, что **вот это [7.55]** находится рядом с азотом? Из-за исчезновения маленьких констант. То есть по какой-то причине атом, связанный с **этим сигналом [7.55]**, демонстрирует быструю релаксацию. Почему это **здесь [в орто-положении к заместителю]** может происходить? Мне не приходит в голову. А почему это **здесь [в орто-положении к азоту]** может происходить? Все-таки близость азота может повлиять. С другой стороны, ваши рассуждения [об электронных эффектах] говорят о противоположном. Стало быть, вывод на данном этапе: и так, и эдак может быть, мы не знаем точно. Но и в том, и в другом случае соответствие соединения спектру будет наблюдаться. Просто в одном случае отнесение вот в **таком [по часовой стрелке]** порядке идет, а в другом – в **таком порядке [против часовой стрелки]**. Если нам нужно выяснить точно, можно попробовать посчитать химические сдвиге в какой-нибудь программе, например, в ACD Labs. Все-таки разница между ними довольно существенная (1 м.д.), и можно ожидать, что этот расчет даст нам ответ, на основании которого мы выберем одно из двух предположений. Кроме того, это не такое редкое соединение. Можно **вот это [заместитель]** чем-нибудь другим заменить и просто в базе данных поискать. Например, поставить сюда какой-нибудь хлорэтил вместо **всего этого хвоста** и

найти такое соединение в базе данных (в любой; просто в «Гугле» набрать: NMR spectrum какого-нибудь такого). И там тоже будут похожие сигналы где-то, главное, что их будет четыре, у них будут химические сдвиги, там будет отнесение, и можно будет посмотреть и выбрать: то ли ABCD в таком порядке, а... Ну, в общем, понятно в каком, не буду считать. То ли с одной стороны, то ли с другой.

Вот, собственно, ответ. ...В какой программе посчитали? (...) Да, это два разных алгоритма, основанные на разных предположениях, и если вам обе эти программы выдали одинаковые ответы, этого вполне достаточно, чтобы сказать, что мои предположения о релаксации здесь неверны, а ваши предположения об электронных эффектах верны. (... далее - аналогичные рассуждения в формате диалога ...).



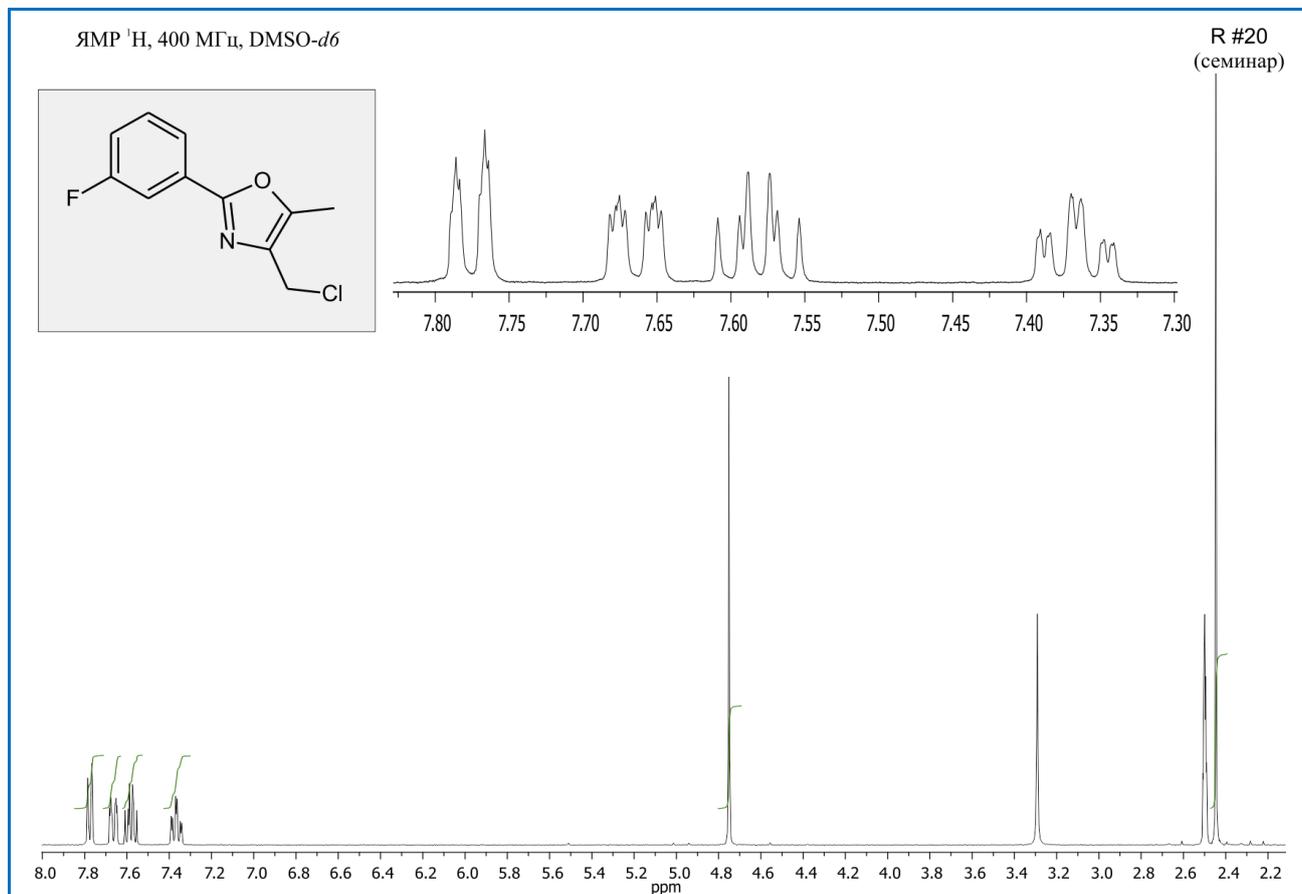
семинар R#21 Эта [задача] - попроще, для закрепления знаний. Два изолированных протона [метильная и метиленовая группы], друг до друга у них [спиновое взаимодействие] не доходит; здесь пять связей, и только одна из них двойная. Если константа [KCCB] и будет, она будет <1Гц. Поэтому и здесь, и здесь мы ожидаем синглеты в соотношении 2:3. Действительно, вот эти два синглета [2.4 и 4.7] - те, на которых интегралы прописаны. Это два алифатических; здесь [в пятичленном цикле] протонов нет, а здесь [в бензольном кольце] у каждого [сигнала] по два [атома], по интегралу. Смотрим на них в увеличенном виде и видим, что у одного - два соседа условно одинаковые, а у другого два соседа разные, но тоже оба в орто-положении, то есть обе константы большие. Вот одна - отсюда досюда [между первой и второй линиями], а другая между первой и третьей линией. Из предыдущих слайдов мы знаем, что мета-константа с фтором может быть по численному значению сопоставима с орто-константой с протонами, видимо, это тот самый случай. То есть здесь [8.0] есть орто-константа большая с протоном и мета-константа поменьше с фтором. А здесь [7.4] две одинаковых - орто-константа с фтором и орто-константа с протоном оказались примерно одинаковыми. Посмотрим, может ли быть наоборот, если этот [протон в орто-положении к фтору] [дает сигнал] здесь [8.0]. Это значило бы, что орто-константа с протонами точно равна мета-

константе с фтором. То есть для этого [протон в *мета*-положении к фтору], вот этот [соседний протон] и вот этот [фтор] оказываются одинаковыми соседями, поэтому триплет. Оставшийся этот [протон в *орто*-положении к фтору] – [имеет] *орто*-константу с протоном и *орто*-константу с фтором, и, видимо, с фтором [КССВ] больше. Так тоже может быть. То есть по характеру расщепления оба варианта отнесения (и так, и наоборот) проходят. Значит, нам остается посмотреть на химический сдвиг, вспомнить о сильном индуктивном эффекте фтора и на основании этого выбрать, что тот, который ближе к фтору – вот этот [8.0].

Сначала мы посмотрели, в нужной ли они [сигналы] области, сравнили интегралы, противоречий не нашли. Потом попробовали объяснить константами с учетом того, что мы точно не знаем значение константы между протоном и фтором. Здесь поставили x , здесь – y , (...) по расщеплению подходит. Наоборот (если это – x , а это – y), тоже по расщеплению подходит. Есть две гипотезы. Смотрим, чем еще эти сигналы отличаются. Они отличаются химическим сдвигом. Индуктивным эффектом можно объяснить, что по химическим сдвигам больше похоже, что ближний к фтору – этот сигнал [8.0]. То есть здесь вывод [сделан] на основании разных химических сдвигов, поскольку мультиплетность и в том, и в другом случае соответствует [структуре]. (...) Но даже если мы здесь и ошиблись, и в том, и другом случае можно сделать вывод, что спектр не противоречит структуре. (... диалог об электронных эффектах ...) Я бы вам советовал всегда анализировать мультиплетность и только в таком случае как здесь (если окажется, что мультиплетность не дает однозначного ответа) привлекать электронные эффекты. А если электронные эффекты не получается привлечь, тогда привлекать какую-нибудь базу данных. Можно взять соединение попроще с похожим фрагментом, найти его и просто посмотреть, какие там химические сдвиги. Но для решения задач (как на экзамене, так и в реальной жизни) это, скорее всего, не будет иметь значения, поскольку финальный ответ одинаковый и в том, и в другом случае: «спектр соответствует структуре». Ваша задача как синтетика решена и так, и эдак.

семинар R#20 Про эту часть [пятичленный цикл и алифатика] я уже не буду говорить, все то же самое [что было на предыдущем слайде]. Здесь немного другая картина в ароматическом кольце. Во-первых, есть триплет дублетов [7.6], у которого нет маленьких констант. То есть там и дублетное (один сосед) и триплетное (два соседа) [расщепления], [оба] происходят с большими константами. Что это может быть? Это протон, у которого нет других протонов в *мета*-положении, правильно? Если бы они были, была бы хотя бы одна маленькая *мета*-константа, а здесь все [КССВ] большие. Вы видите, что это триплет дублетов? [нет,] Значит, смотрим. Вот одна константа [между линиями 3 и 4] – это дублетное расщепление, где один сосед, и вот другая побольше [между линиями 1 и 3] – это триплет. Такой [протон] тут только один [вверху цикла], вот этот, правильно? У всех остальных есть протоны в *мета*-положении. А у этого фтор в *мета*-положении, видимо, эта константа [между линиями 3 и 4] – это *мета*-константа с фтором. Значит, остается три [сигнала], уже легче.

(...) Поскольку у этого [7.4] есть триплетное расщепление с большой константой, значит, у него, как минимум, два *орто*-соседа. Или один *орто*-сосед протон и *мета*-сосед фтор. Но *мета*-сосед фтор у нас уже занят, этот протон [атом вверху цикла, сигнал 7.6] – единственный, у кого фтор в *мета*-положении. Значит, у этого [7.4] оба его ближайших соседа – это протоны в *орто*-положении. ...А такого тут нет. Значит, один из них все-таки фтор. Получается, что этот [сигнал 7.4] – это вот этот [атом над фтором]. У него есть один *орто*-сосед и другой *орто*-сосед фтор, и еще он «видит» какую-то из *мета*-констант. Пока это рабочая гипотеза.

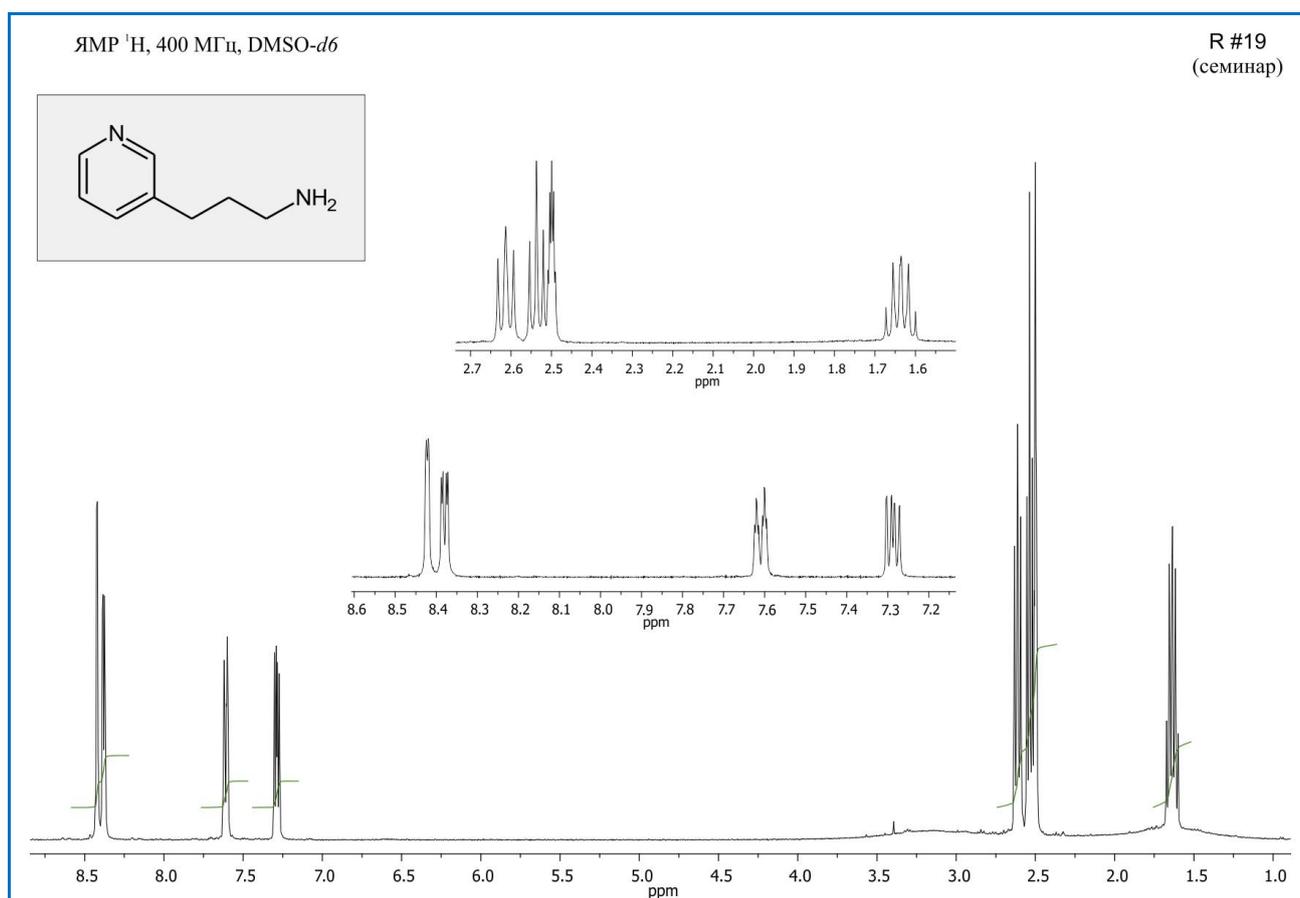


Теперь давайте с более простого начнем. У **этого [протона внизу цикла]** два *мета*-соседа, примерно одинаковых, и один сосед фтор (= большая константа). Может быть и **этот [7.65]**, и **этот [7.8]**. В случае, если *мета*-константы совпали, [ему соответствует] **этот сигнал [7.8]**, дублет триплетов. А в случае, если *мета*-константы с **этим [справа сверху]** и с **этим [слева сверху]** - разные, это будет **вот этот [сигнал 7.65]**, DDD. То есть пока что, **этот нижний [атом]** - может быть и **этот [7.65]**, и **этот [7.8]**.

Методом исключения можно теперь вот **этот [правый верхний протон]** попробовать [соотнести]. Что это может быть? (...) У него два *мета*- и один *орто*- [сосед], должен быть дублет триплетов или DDD. (...) Остается единственный незанятый [сигнал] – **этот [7.8]**. Наше первое предположение, что **это [атом внизу]** – это **вот это [сигнал 7.8]**, подтвердилось «с другого конца». Мы разными способами пришли к одному и тому же выводу. В каждом из этих случаев этот вывод нельзя было бы считать абсолютно обоснованным, но когда мы, двигаясь разными путями, пришли к одному и тому же, это уже вполне подтвержденная рабочая гипотеза. (...) Что касается *мета*-констант, видимо, одна из них - большая, а другая - маленькая. Мы **здесь [7.4]** видим большую и какой-то намек на маленькую. У **этой линии [1-й или 5-й]** (если к ней присмотреться) вершина слегка расщепленная. То есть, одна *мета*-константа здесь порядка 3 Гц, а другая порядка 1 Гц. И на самом деле это не TD, а TDD, просто самая последняя буква D – очень незначительное расщепление, которое проявляется только на вершинах [некоторых] линий в данном разрешении. Таким образом, у **этого [атома слева сверху цикла]** две совпадающие большие константы и две несовпадающие маленькие константы, одна с **этим [протоном справа сверху]**, другая с **этим [протоном внизу]**. (...) Смотрим на **них [сигналы 7.65 и 7.8]** и пытаемся понять, в чем их отличие. Отличие в том, что в одном случае две *мета*-константы - разные, а в другом случае две *мета*-константы одинаковы. И мы знаем, исходя из **этого [сигнала 7.4]**, что **эти *мета*-константы [слева направо и слева вниз]** - разные.

Где-то должны быть одинаковые (еще две) - то ли [слева направо и справа вниз], то ли [слева вниз и справа вниз]. (...)

У каждого [из ближайших к циклическому заместителю] есть один сосед в *орто*-положении, (соседи разные: у одного фтор, у другого протон), и два соседа в *мета*-положении. Сравнить *мета*-константы здесь проблематично, сказать, у кого одинаковые, у кого разные. Но есть еще один способ: померить *орто*-константу. Мне кажется, что *эта орто-константа [7.65, линии 3 и 7]* больше, чем *эта [7.8, линии 2 и 5]*. И [полезно] сравнить их с *этими [у двух других сигналов]*. И, видимо, одна из них – это *орто*-константа с фтором, другая – это *орто*-константа с протонами. Можно предположить, что с фтором она больше, поэтому вот этот – это тот, который в *орто*-положении к фтору находится. Точно измерять не буду, но мне кажется, что *эта [у сигнала 7.65] больше*³⁴. И, соответственно, *здесь где-то [между сигналами 7.4 и 7.6] тоже эта разница проявится*. (...) Как правило, к любому подобному выводу можно прийти несколькими путями. Чем у вас больше информации (больше разных спектров, больше сигналов), тем больше возможностей разными путями прийти к одному и тому же результату. Каждый результат желательно подтвердить двумя способами, а если двумя подтверждено, дальше уже нет смысла искать третий и четвертый.



семинар R#19 Здесь у нас нет фтора, но есть такая же система, осложненная наличием азота. Исходя из предыдущего опыта этого семинара, мы знаем, что когда в цикле есть азот, то, во-первых, могут проявиться *para*-константы, которые в обычном бензоле мы не видим, и [во-вторых] какие-то сигналы могут оказаться уширенными, и мы не увидим в них маленьких констант. Имея это в виду, посмотрим отдельно на алифатическую и ароматическую части (они сверху нарисованы).

Давайте сначала [посмотрим] на более простую алифатическую. **Сигнал ДМСО**, достаточно хорошо разрешенный, даже отдельные линии в нем видны. Больше этой константы [в спектре] нет.

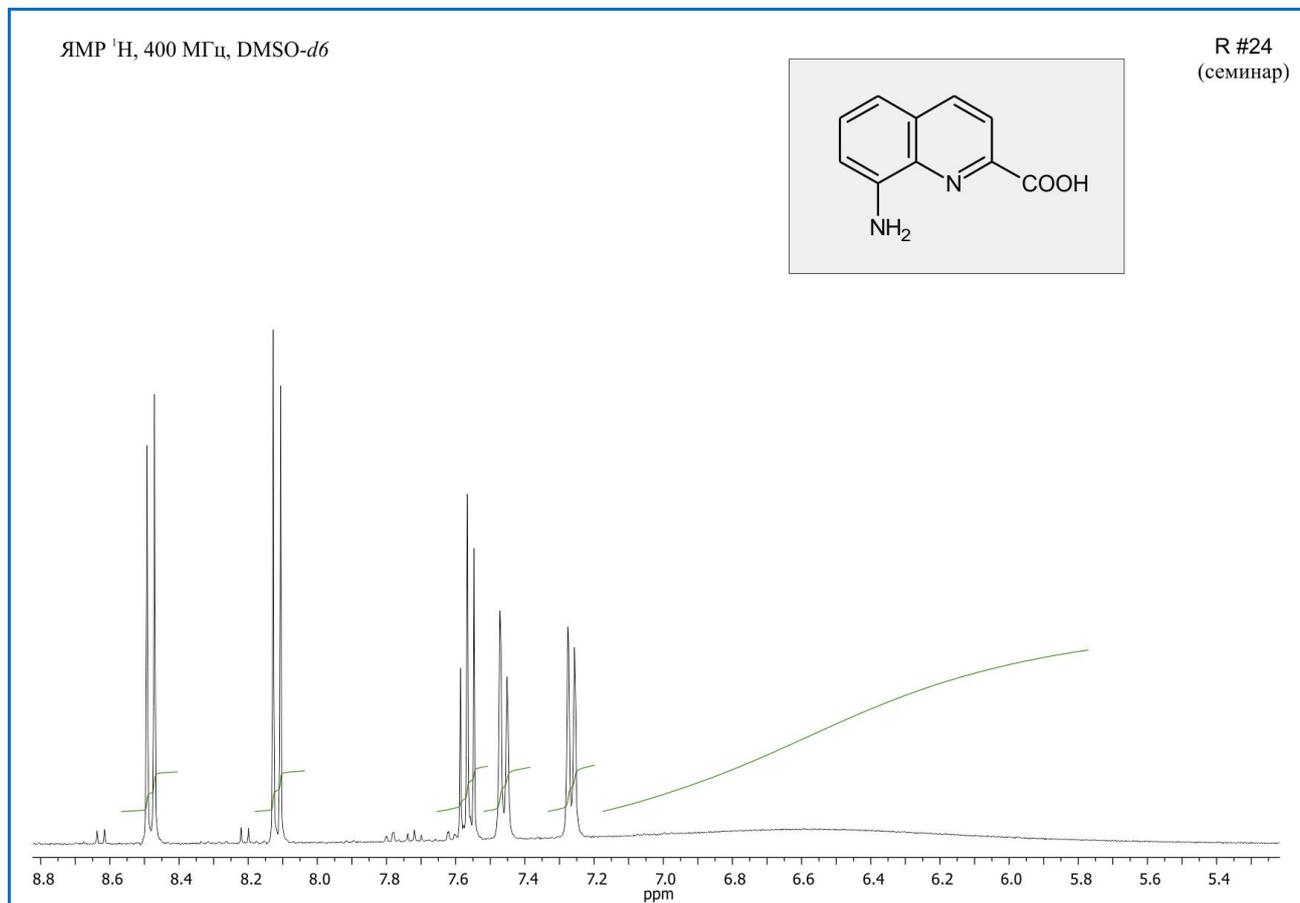
³⁴ Измерения спектра показывают, что так и есть: *орто*-KCCB равны 7 Гц и 10 Гц, соответственно.

Здесь [в ароматике], конечно, есть что-то похожее, но по крайней мере в алифатической части ее нет. Мы знаем, что это ДМСО, мы видим характерный сигнал, и у него точный хим. сдвиг [2.50]; его из рассмотрения сразу вычеркиваем. Остается два триплета и один квинтет. Смотрим теперь сюда [на молекулу] и видим примерно то же самое. Вот у этого [средний в цепи] четыре соседа, должен быть квинтет. Квинтет и есть [1.6], правда, средняя линия какая-то подозрительно низкая, но она видимо и шире. Может быть, не абсолютно точное совпадение констант в [левую] сторону и в [правую], поэтому квинтет не совсем идеальный, не с правильным соотношением отдельных линий, а вот такой немного «разъехавшийся» посередине. И у каждого из этих [левый и правый в цепи] двое соседей в этом [среднем в цепи] положении. То есть, каждый из них будет триплетом. Какой из них какой, здесь абсолютно невозможно сказать, они находятся очень близко друг к другу, но это для нас и не принципиально. Также из вида этого спектра следует, что щепление между этим [правым в цепи] и этим [-NH₂] отсутствует. То есть через гетероатом (несмотря на то, что это три связи) оно не прошло, как чаще всего и бывает. Иногда бывают исключения, но чаще всего через кислород и азот мы константы не видим. Это значит, что где-то еще должен быть NH₂, ни с чем не взаимодействующий. Но, имея в виду, что это ДМСО³⁵ и что мы не видим узкого сигнала воды можно предположить, что этот NH₂ очень хорошо обменивается, превращается в NH₃⁺ (какую-то часть времени существует в состоянии NH₃⁺, какую-то в состоянии NH₂), поэтому он полностью «смешался» с водой, и за счет химического обмена с ней появились, видимо, эти два горба [0.5-2.0 и 2.5-3.5]. То есть, если бы обмена не было, это были бы отдельно стоящий узкий сигнал воды и отдельно стоящий узкий сигнал NH₂ (в предположении, что все -NH₂ одинаковые, и между собой не обмениваются). А в этой молекуле энергетическая характеристика обмена такова, что они полностью не слились, но явно хотят это сделать. То есть они оба уширились (потому что площадь должна остаться той же самой), и за счет этого понизились. Вот эти два горба – вода и NH₂. Если мы попробуем снять [спектр] при большей температуре, мы увидим, что они полностью исчезают, и появляется один усредненный сигнал между ними, тоже горб. Еще дальше нагреем – и этот горб будет становится все уже и уже. Это явление называется «коалесценция», и на следующей лекции у меня будут более конкретные примеры.

Теперь смотрим на оставшиеся четыре протона этой [ароматической] спиновой системы. Вот четыре сигнала, каждый из них [имеет интегральную интенсивность] по единичке. (...) Это [8.42] не синглет, это дублет, но в любом случае это единственный сигнал, у которого нет большой константы, то есть у которого нет ни одного орто-соседа. Что здесь логично предположить? Два мета-соседа [у единственного протона без орто-соседей, справа от азота] - это триплет должен быть, а здесь дублет. Как раз, видимо, через азот не проходит константа через четыре связи. А через ту часть, где азота нет, проходит. Поэтому верхнего соседа [слева от азота], который рядом с азотом, для этого [атома справа от азота] как бы нет, а есть только один мета-сосед, который снизу.

Это [7.3] - единственный сигнал, у которого две больших константы. И это [в мета-положении к азоту] - единственный атом, у которого два орто-соседа. (... диалог со студентами ...) Исходя из того, что этот [сигнал 8.42] был дублетом, а не триплетом, мы сделали вывод о том, что мета-константа через азот не проходит, поэтому у одного из них [у левого верхнего, но не у нижнего] только одна мета-константа, и вот она [в сигнале 8.38], дублетное расщепление, маленькая. А у другого [нижнего в цикле] два мета-соседа, потому что и к тому, и к другому [можно пройти] не через азот, и поэтому здесь [7.6] триплет[ное расщепление] с маленькой константой. Тут все сложилось с первого раза.

³⁵ Гигроскопичный ДМСО чаще всего имеет примесь воды.

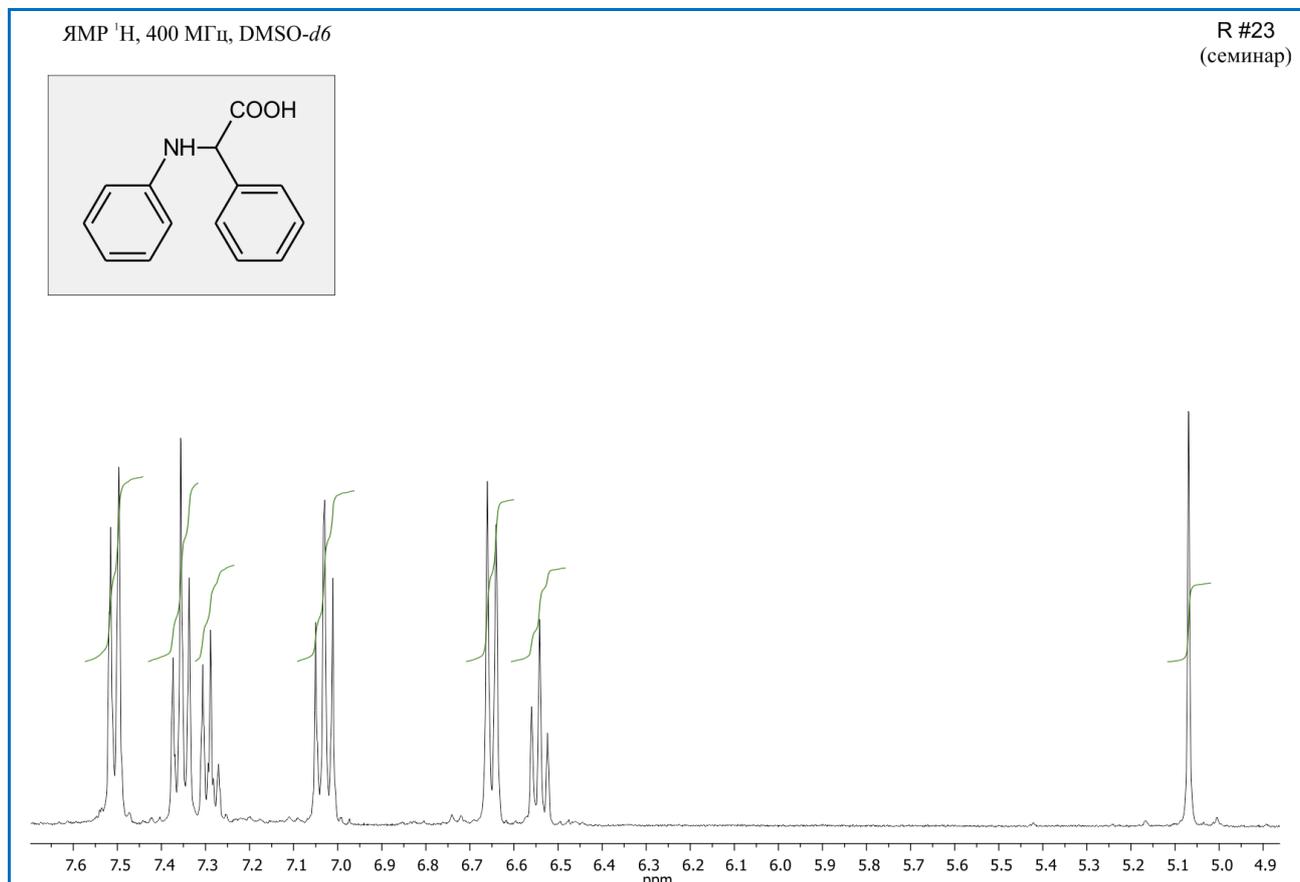


семинар R#24 Вот интересный случай, где вообще нет ни одной *мета*-константы. Точнее, в силу каких-то эффектов в молекуле, получилось, что мы не видим *мета*-констант. Я думаю, что это может связано с образованием цвиттер-иона. Вы же понимаете, что в действительности в этой молекуле *здесь* будет COO^- , а *здесь* NH_3^+ , и какое-то динамическое равновесие. Так, теперь попробуем понять [отнесение сигналов], основываясь только на *орто*-константах (соответствуют пять атомов этим пяти сигналам или нет). По идее, *эти два* [протона в цикле справа] изолированы от *этих трех* [протонов в цикле слева], потому что *здесь четыре* [связи между протонами вверху циклов] – [спиновое взаимодействие] - то же самое, что и *мета*-константа в ароматической сопряженной системе, но поскольку *мета*-констант здесь нет, то получается, что *это* [пиридиновый цикл] – одна спиновая система из двух протонов, которые щепятся только друг на друге и дают два дублета, а *это* [бензольный цикл] – другая, в которой три протона. Естественно, первое, что можно предположить, что *два дублета* [8.1 и 8.5] – *это* [протоны в пиридиновом цикле], у них как раз крыша [направлена] друг в сторону друга. Если у *этого* [8.5] крыша в любом случае вправо, поскольку все сигналы [расположены] справа от него, то у *этого* [8.1] крыша [, направленная] влево говорит о том, что щепление *этого* [сигнала 8.1] произошло именно *на этом* [8.5], а не на *каком-то из этих* [7.2-7.6]. [это объясняют] Два признака: *крыша* [8.1] *в эту сторону* [влево]; и у *этого* [8.1], и у *этого* [8.5] - довольно крутая крыша, значит, сигналы находятся близко. Если бы *этот* [8.5] щепился бы на *каком-то из этих* [7.2-7.6], то, наверное, у него крыша была бы более полой. А она как раз симметрична, соответственно, *здесь* [8.1] соответствует тому, что *здесь* [8.5]. И оба сигнала высокие, то есть, видимо, они *уже*, чем в *этой группе* [7.2-7.6], поэтому можно предположить, что *эти два дублета* [8.5 и 8.1] – *этот и этот* [протоны в пиридиновом цикле].

Остается *два дублета* *отсюда* [от протонов в *орто*- и *пара*-положениях к аминогруппе] по сторонам и триплет *отсюда* [от протона в *мета*-положении к аминогруппе]. У этого триплета как раз крыша смотрит вправо, то есть оба дублета, которые с ним взаимодействуют, находятся справа от

него. Здесь хорошо демонстрируется эффект крыши. У того, **который ближе [7.4]**, она круче, а у **того, который дальше [7.2]**, она положе. То есть здесь все более или менее соответствует.

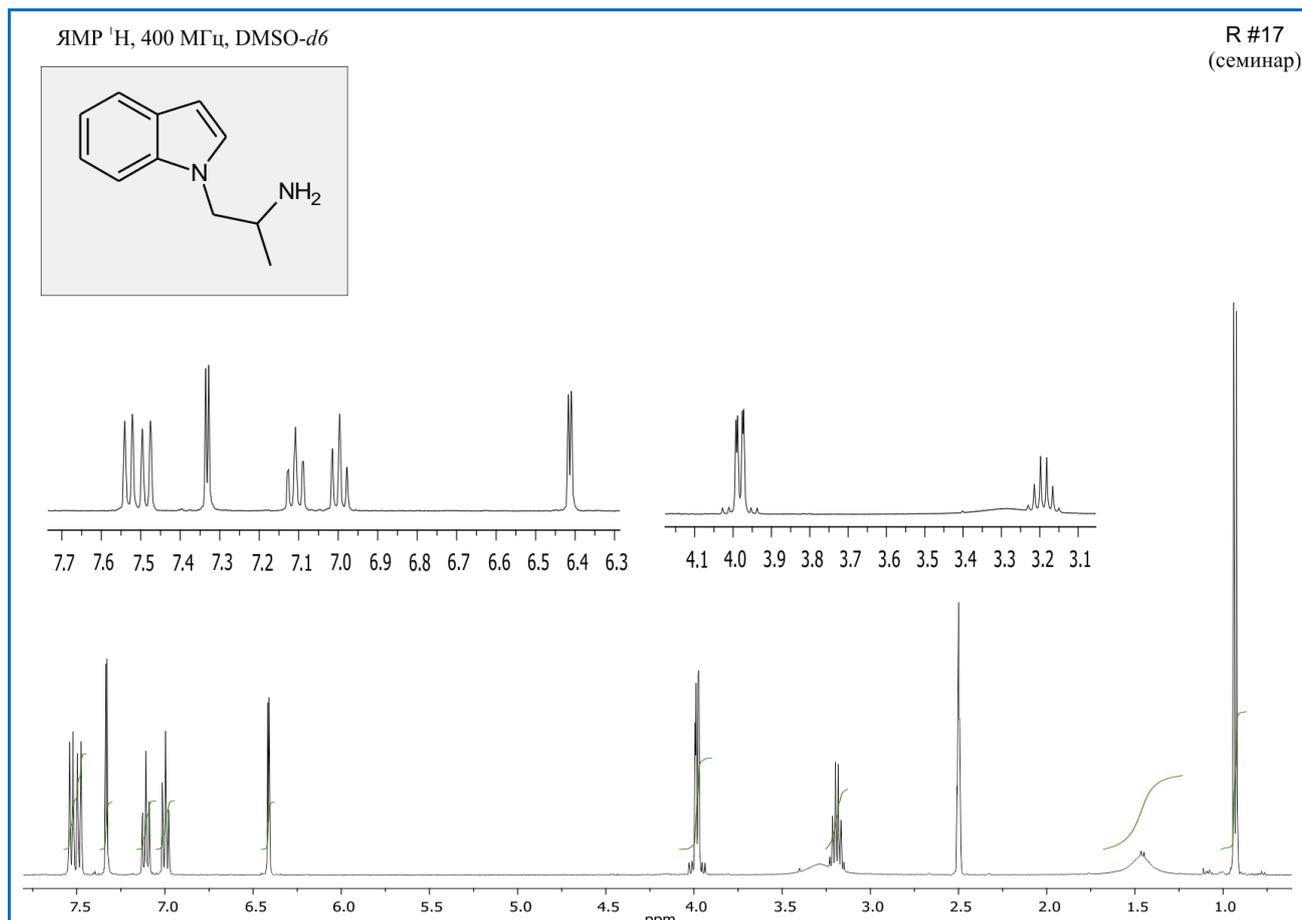
Еще вот **эти три протона [аминогруппа и карбоксил]**: последнее, что нужно сделать – измерить этот интеграл [5.8-7.2]. Он [кривая между точками обнуления] по высоте - как раз, как три **этих [7.2]**. То есть NH₂ и карбоксил – **вот этот горб [5.8-7.2]**, который интегрально «дает» три протона.



семинар R#23 Это, наверное, не весь спектр - во-первых, потому что здесь тоже есть NH и карбоксил (где-то должна быть «гора»). Из алифатических я вижу **только один [сигнал, 5.1]**. А здесь [d ароматической области], я думаю, уже не нужно ничего пояснять. Тоже нет *meta*-констант; [есть] две фенильных группы, у нас такие случаи уже были. Сначала можно предположить, что вот это, к примеру, **одна [7.2-7.6]**, а это, к примеру, **другая [6.5-7.1]**. Но может быть, какие-то из них местами поменялись. Для того, чтобы это выяснить, здесь можно посмотреть на эффект крыши. Понятно, что электронные эффекты здесь не так просто будет посчитать. У **этого [7.0]** крыша вправо, значит, маленький триплет и большой дублет должны находиться справа от него. Справа здесь только два сигнала, поэтому, скорее всего, **этот и этот [6.5-6.7]** относятся к одному фенильному кольцу, а **эти [7.3 и 7.5]**, соответственно, к другому, вот их крыша как раз **сюда [на триплет 7.4]** направлена. Такие задачи, я надеюсь, к настоящему времени вы уже можете самостоятельно решить. Поэтому здесь пояснять не буду, попробуйте сами дома сделать. Задачи находятся на странице этого курса, в разделе “Задания для самопроверки”. Если их там не окажется, пишите.

семинар R#17 Есть ли здесь что-то, чего еще не было на предыдущих слайдах? Ароматическую часть, наверное, уже... нет, давайте рассмотрим. **Вот эта часть ABCD [шестичленный цикл]**. Это A, B, C, D [в порядке расположения протонов, **сигналы 7.55, 7.1, 7.0, 7.5**]. A и D можно местами поменять, и эти [B и C] можно местами поменять (это не принципиально), *meta*-констант здесь тоже нет, система похожа на предыдущие. А интересна здесь **эта система**

[пятичленный цикл], в которой есть только *мета*-константы³⁶, причем крыша здесь [6.4] почему-то «смотрит» в другую сторону - видимо, так что-то совпало. Важно, что вот сигнал [6.4] и вот сигнал [7.3].

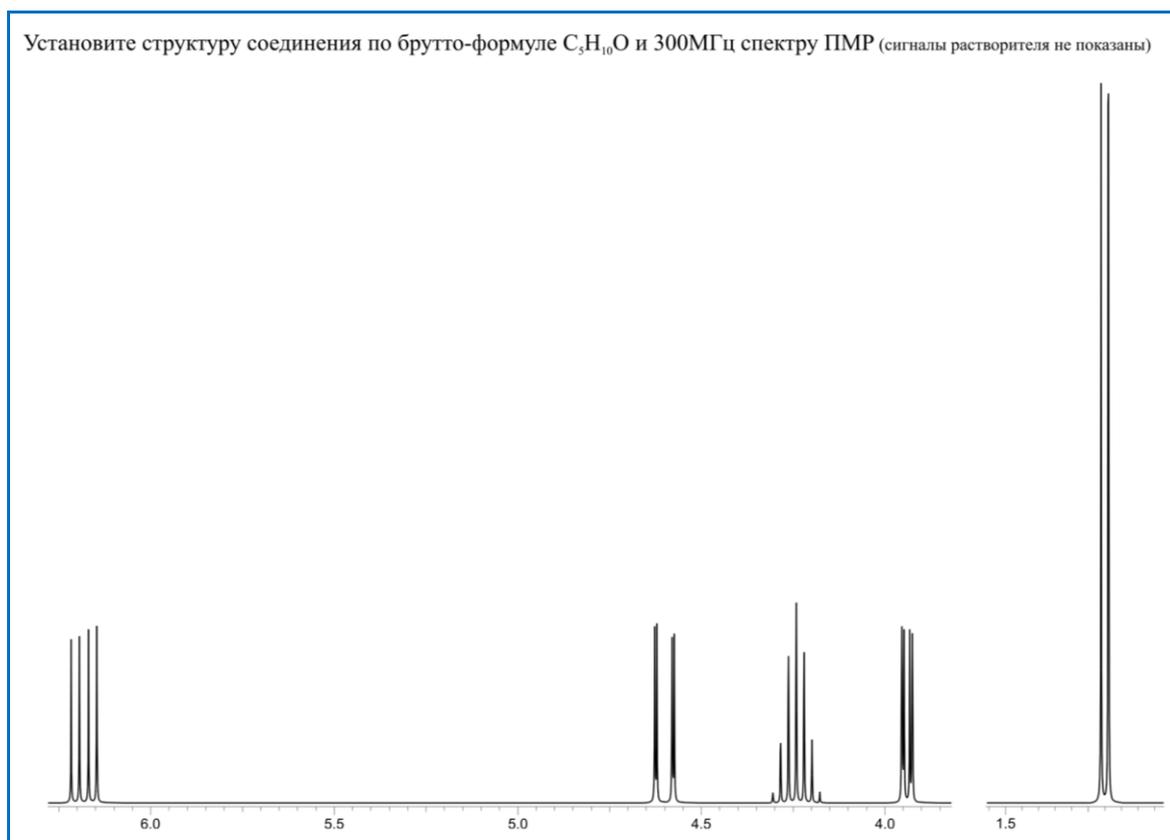


В этой [алифатической] части интересен очень сильный эффект крыши вот здесь [4.0]. В этом сигнале два протона (см. интеграл), а в этом [3.2] – один протон, и еще есть метильная группа [0.9]. (...) Хотя бы просто по интегралу можно прикинуть [отнесение]. Примерно соответствует хим. сдвиг, соответствует общее число сигналов, соответствуют интегралы - поэтому мы предполагаем, что это [4.0], где два протона, - вот это [протоны метиленовой группы при азоте]. Но у него странная форма, которую не так просто объяснить. (...) Здесь, по всей видимости, произошло следующее: эти два протона неэквивалентны. Видимо, этот [пятичленный] цикл не «играет»³⁷. Азот же не плоский у нас; это тетраэдрический азот, у него еще есть неподеленная пара еще есть – поэтому эта связь [экзоциклическая N-C] смотрит или за плоскость доски, или на нас (из плоскости доски), и, скорее всего, вокруг нее затруднено вращение. Мы получаем, что эти два протона [метиленовой группы] - разные и щепятся друг на друга. В этом сигнале [3.2] [их различие] не проявляется, поскольку здесь [вокруг связи C-C], видимо, есть вращение, и для этого протона [>CH-] эти два [-CH₂-] хоть и химически разные, но константы [KCCB] с ними одинаковые, поэтому этот сигнал щепится на них как на двух одинаковых (и, естественно, и на этих трех [-CH₃] тоже). То есть всего пять соседей, шесть линий, вот они здесь [4.0] четко видны. А вот эти [4.0], в сумме два [сигнала], щепятся еще и друг на друга. Во-первых, у них есть большая константа с этим одним [>CH-], дублетное расщепление. А во-вторых, еще большая константа между собой, порядка 12 Гц. То есть это два сигнала, каждый из которых представляет собой дублет дублетов. Поскольку с доской здесь

³⁶ Эту оговорку следует понимать, как «орто-константы, по своим значениям похожие на *мета*-»

³⁷ = не происходит инверсии конфигурации атома азота

сложности, [спрашиваю:] видите ли вы эти два дублета дублетов, находящиеся рядом, с сильнейшим эффектом крыши друг в сторону друга? Если кто-то не видит, я вам сейчас в Photoshop нарисую, и вы увидите на экране. Ладно, вроде значит, видите: раз [линия 1], два [линия 2], три, правый из них [линия 4], четыре, правый из них [линия 6]. И другой [сигнал] с этой стороны [справа налево, аналогично]: раз, два, левый из этих и левый из этих. Они своими большими компонентами заехали друг на друга, и левая часть правого сигнала оказалась с левой стороны относительно правой части левого сигнала. То есть они частично пересеклись. А то, что внутренние линии намного выше внешних, это потому, что они очень близко, и поэтому [наблюдается] сильнейший эффект крыши. То есть эти две [высокие линии 4 и 6] – это правая половина дублета дублетов, а эти две [низкие линии 1 и 2] – это левая половина дублета дублетов. И рядом с ним - другой такой же сигнал [линии 3,5,7,8], но уже перекошенный в другую сторону. То есть здесь два протона, частично наехавших друг на друга, у каждого из них две константы, 12 Гц между собой и 7 Гц с этим [$>CH$].



семинар В#1

Теперь перейдем к более сложным задачам - где [химической] структуры нет, и ее нужно нарисовать. Считается, что элементный анализ, в принципе, можно сделать. В реальности это не всегда так, точнее в реальности не всегда понятно, какая [должна быть] брутто-формула, исходя из элементного анализа. Но для целей обучения пока предположим, что у нас есть возможность получить брутто-формулу путем, к примеру, сжигания: $C_5H_{10}O$. Задача – нарисовать структуру, глядя на спектр и брутто-формулу.

Первое, что следует понять – это сколько [в молекуле] двойных связей или циклов, то есть выяснить степень ненасыщенности. Я думаю, что это у вас было года три назад в школе, а, может, у кого-то и не было. Но так или иначе наверняка вы знаете, что в алканах (в полностью насыщенных), количество протонов – $2n+2$, правильно? Пока еще можете следить за мыслью? Что-то ответ неочевиден... ОК. Формулу бутана представляете? C_4H_{10} , 4 – это n, а 10 – это как раз $2n+2$. То есть в полностью насыщенном соединении, в котором нет двойных связей и циклов, число протонов по

отношению к количеству углерода³⁸ – $2n+2$. Любые двухвалентные атомы, например, кислород можно как бы вставить в связь между любыми другими, и при этом количество протонов не изменится. То есть кислород, сера и все прочее, что имеет валентность 2, не повлияет на степень ненасыщенности. Вот азот повлияет, но когда он у нас будет, тогда и дойдем до этого. Здесь смотрим: кислород не влияет, пять углеродов, значит, должно быть двенадцать протонов как в пентане, а здесь десять, не хватает двух. Что это значит? Значит, что там есть двойная связь или цикл. Одна двойная связь убирает два протона. Один цикл убирает два протона. Одна тройная связь действует как две двойных - убирает четыре протона. То есть здесь у нас пять углеродов, и либо цикл, либо двойная связь.

Дальше начинаем комбинировать и перебирать изомеры. Но понятно, что изомеров здесь, наверное, больше тысячи возможно с такой формулой. Ну или как минимум несколько сотен³⁹. Поэтому имеет смысл посмотреть на спектр. Кто-то хочет посмотреть на спектр и сделать какие-то выводы о том, что есть в этой структуре? Вы - единственный, кто эти задачи заранее решил. Тогда тем интереснее будет. (...) Вы сначала смотрите на спектр, прикидываете, какие характерные группы там есть, выписываете эти группы, помня, что есть один цикл и одна двойная связь. Когда у вас несколько групп, их останется уже комбинировать разными способами и смотреть, что получается, соответствует это спектру или нет. (... обсуждение расположения сигналов на слайде ...) Для начала (самое первое) - количество сигналов. Пять сигналов на десять протонов приходится, их надо как-то разделить. Определенно не в каждом [сигнале] по два [протона], потому что [этот \[1.2\]](#) заметно больше, ну и кроме этого он находится в той части шкалы, где обычно бывают метильные группы, то есть я бы предположил, что 1) или здесь две метильных группы (это уже шесть протонов) и еще четыре оставшихся по одному [протону] на каждый сигнал 2) или если здесь одна метильная группа, тогда остается семь [протонов] на четыре примерно одинаковых по площади сигнала, вот это уже маловероятно. Поэтому можно предположить, что [это \[1.2\]](#) - две метильных группы. То ли это дублет, то ли два синглета рядом расположены, это мы дальше выясним.

(...предположение студента о винильном фрагменте...) Винильный фрагмент здесь действительно есть. Из чего может быть [сделан] такой вывод? [Здесь \[4.6\]](#) мы видим очень большую константу [KCCB], которая может быть только через двойную связь. Здесь специально написано - 300 МГц, [на спектре] есть шкала, и если вы посчитаете⁴⁰, вот это [\[расстояние между линиями 1 и 3 в сигнале 4.6\]](#) будет ~15 Гц. Через одинарную связь такой большой [KCCB] не может быть, скорее всего. Мы предполагаем, что это *транс*-константа через двойную связь. И как раз мы знаем из степени ненасыщенности, что [в молекуле] есть двойная связь. То есть можно предположить, что есть фрагмент, содержащий двойную связь, где протоны [расположены] в *транс*-друг к другу. Для того, чтобы точно убедиться, измерим большую константу [здесь \[4.6\]](#) и сравним ее с большой константой [здесь \[6.2\]](#). Они окажутся равны, и больше ни в одном другом сигнале такой константы нет. Отсюда делаем вывод, что это и это – два протона, которые находятся «в транс» друг к другу относительно двойной связи. (... обсуждение рисунка на доске...) Можно также видеть, что у [этого \[4.6\]](#) есть еще и маленькая константа, а с кем у него может быть маленькая? Вспоминаем про sp^2 -углерод. Геминальная константа при sp^2 -углероде - около 2 Гц, она действительно здесь есть, [вот она \[между линиями 1 и 2 сигнала 4.6\]](#). Ищем в спектре, где она еще есть. Вот эта маленькая константа [\[между линиями 1 и 2 сигнала 3.9\]](#). Мы уже знаем, что вот это – это вот этот протон [при

³⁸ к числу атомов углерода

³⁹ По данным генератора Molgen, структурных изомеров оказалось 74 (без учета стереохимии).

⁴⁰ Зная, что рабочая частота спектрометра - 300МГц, получаем что на 0.01 м.д. приходится 3 Гц. Это отношение позволяет легко сопоставить деления шкалы с расстояниями между линиями в герцах.

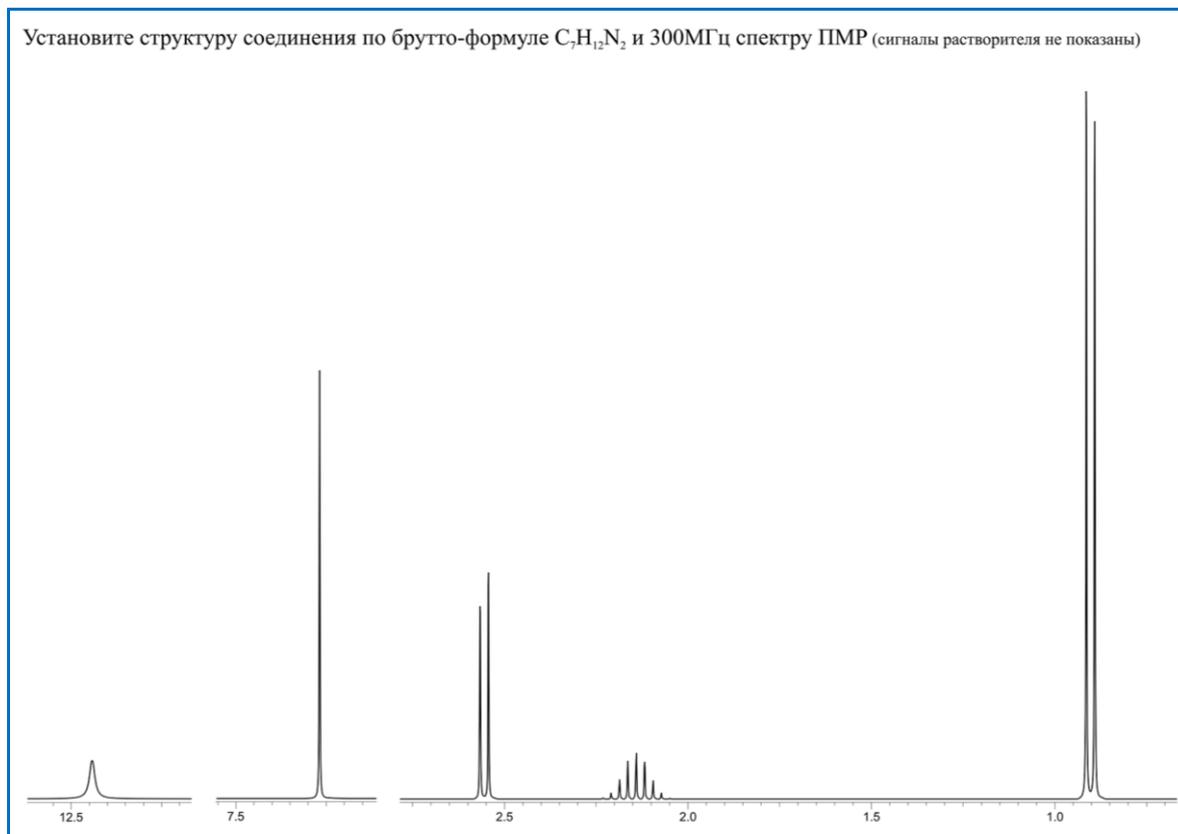
двойной связи на рисунке винильного фрагмента на доске]. Есть ли здесь [при том же атоме] еще один протон, мы не знаем, но мы знаем, что есть маленькая константа, это как раз будет геминальная [КССВ] при sp^2 -[углероде]. То есть можно предположить, что это вот этот [при том же атоме, что и протон, давший сигнал 4.6]. И на нем, действительно, есть маленькая КССВ (через две связи при sp^2 -углероде), и есть средняя КССВ.

Средняя здесь действительно должна быть. Это *цис*-[КССВ] через двойную связь. Но лучше себя проверить: посмотреть на эту константу [между линиями 1 и 3 сигнала 3.9] и увидеть, что она такая же, как меньшая из этих [в сигнале 6.2]. То есть у этого протона, у которого есть один «в цисе» и один «в транс», как раз одна большая с тем, с которым так [на пальцах - антиперипланарно], и одна поменьше, с которым эдак [на пальцах - синперипланарно]. Таким образом, у нас сигналы: один, один, еще один [6.2, 4.6, 3.9]. Очень похоже на винильную группу.

Нарисовали пока винильную группу и смотрим, сколько атомов осталось от *брутто*-формулы. (...) Да, но вы как-то очень быстро «проскочили», возможно, не всем понятно. Более подробно: *брутто*-формула была $C_5H_{10}O$, вычитаем из нее C_2H_3 , получается C_3H_7O . Куда «O» вставить, потом можно решить. Дальше смотрим на метилы [1.2]. Химические сдвиги у них такие, что явно это не метоксил. То есть кислород находится не рядом с метилом. Это метилы, связанные с какой-то С-группой. У нас осталось еще три углерода. Вне зависимости от того, одинаковые эти метилы или разные, два углерода приходится сюда [на сами метильные группы]. Значит, где-то, находится еще один углерод; при нем наверняка есть протоны. Смотрим на этот сигнал [единственный оставшийся – 4.2]. У него, сколько [линий]? Семь [линий], шесть⁴¹ одинаковых соседей. Помним, что одно из наших первых предположений было, что там две метильных группы. Это как раз шесть одинаковых соседей. Получается, что от этого протона [4.2] до этого [1.2] три связи. То есть это [4.2] щепится на этом [1.2] [с вицинальной алифатической КССВ], а это щепится на этом [наоборот], и больше они не щепятся ни на ком. Тут уже складывается такая картина: это два метила, связанных через $-CH<$. Ну а дальше остается только вставить куда-то кислород и соединить это вместе, и здесь это можно сделать уже единственным способом. Потому что, если бы мы кислород сюда вставили [со стороны метильных групп от $-CH<$], то химический сдвиг был бы другим и метилы были бы разными. Таким образом, это [1.2] - не два синглета, а именно дублет из шести протонов двух метильных групп, и получается единственный вариант – винилизопропиловый эфир.

семинар В#2 (...) ~12, ~7, ~2.5, ~2 и 1. Это химические сдвиги, здесь разрыв. *Брутто*-формула – $C_7H_{12}N_2$. Теперь, как поступить с азотом и вообще с трехвалентными атомами с точки зрения ненасыщенности? Нужно представить их частью NH_2 -групп и просто-напросто заменить NH_2 -группы на протоны. Степень ненасыщенности будет та же самая. То есть вот это [$C_7H_{12}N_2$] – это у нас [может быть представлено как] $C_7H_8(NH_2)_2$, правильно? Теперь NH_2 – это группа в целом одновалентная, то есть из нее «торчит» одна валентность, поэтому степень ненасыщенности будет такая же, как у C_7H_{10} . Смотрим, что такое C_7H_{10} . В насыщенном [алкане] должно быть C_7H_{16} ($2n+2$), а у нас десять [протонов], т.е. не хватает шести протонов. Вот наша степень ненасыщенности. Что такое шесть протонов? Это варианты: три двойных связи, две двойных связи и цикл, одна двойная связь и два цикла, три цикла, тройная связь и двойная, тройная и цикл (такие возможны комбинации). Сейчас лишнее сразу уберем (... обсуждение разных вариантов ненасыщенности с отсечением маловероятных вариантов...).

⁴¹ Лектор по ошибке сказал «семь». Правильно: семь линий, шесть одинаковых соседей.



Здесь не очень много сигналов, всего пять штук на двенадцать протонов. Есть очень слабополюный⁴² сигнал, это что-то находящееся или в ароматике или рядом с азотом. Есть синглет при семи, но начинать, наверное, все-таки лучше будет с алифатического конца, который явно здесь тоже есть. У нас [здесь \[0.9\]](#) то же самое, что было на предыдущем слайде: две больших линии - то ли два синглета рядом, то ли один дублет с константой 7 Гц. Но имея в виду, что похожее расстояние между линиями есть еще [здесь \[2.2\]](#) и [здесь \[2.5\]](#), можно предположить, что это все алифатическая цепь. Она и по химическим сдвигам примерно соответствует и по величине константы (~ 7 Гц). Считаем линии [здесь \[2.2\]](#). Их то ли семь, то ли девять (какие-то бугорки еще по бокам есть). Можно предположить, что девять, но самых маленьких мы не видим. Но может быть и семь. Если это семь, тогда получается, что у нее [у группы атомов, давших сигнал 2.2] рядом две метильных группы. Это значит, что [вот это \[2.2\]](#) щепится только на метилах, поскольку шесть одинаковых соседей исчерпывают количество линий (семь). Тогда [вот это \[2.5\]](#), получается, уже не может быть дублетом - для него нет тогда пары. Значит, это [0.9] только двумя синглетами может быть, но по интегралу похоже, что это все-таки дублет, потому что вот у нас есть синглет. Ну и логично предположить (первое, что бросается в глаза), что [вот это \[между линиями дублета 2.5\]](#) - все-таки константа с [этим \[2.2\]](#), а еще две маленьких линии мы не видим. (...) То есть на самом деле [здесь \[2.2\]](#) девять линий. Девять линий значит восемь соседей, из которых шесть - это два метила. И, значит, есть еще два, как раз CH_2 -группа. И эта CH_2 -группа должна быть дублетом, потому что у нее один сосед, [вот этот \[2.2\]](#). То есть, глядя на эти три сигнала, мы можем сложить вполне определенный алифатический хвост. И это для нас хорошо, потому что он забирает на себя значительную часть атомов, и в нем нет циклов и двойных связей, то есть у нас остается очень мало атомов, и много факторов ненасыщенности. Это значит, там будет не так много комбинаций [как в случае насыщенных изомеров]. Так, смотрим [лектор рисует изобутил-радикал], $-C_4H_9$. Остается $C_3H_3N_2$, и из этого должна «торчать» одна валентность, которая соединится [вот с этим \[изобутилом\]](#). То есть у

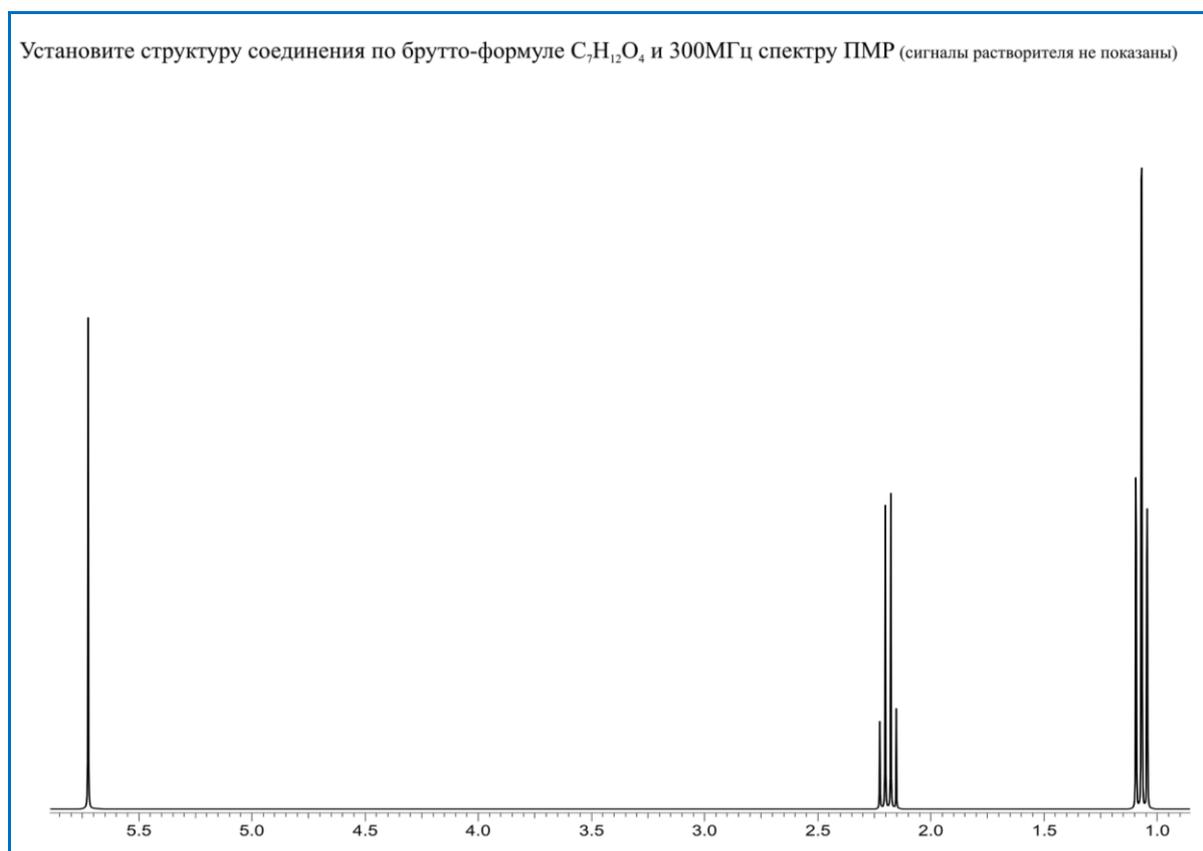
⁴² Сильнополюный - оговорка. Правильно: слабополюный (=с большим химическим сдвигом).

нас есть такой фрагмент [изобутил], и есть такой фрагмент [C₃H₃N₂], на который приходится всего два сигнала. Причем оба синглеты, ничто ни на чем не щепится. И в этом фрагменте должно быть что-то из этого [показывает на доске варианты ненасыщенности].

Здесь дальше чистая комбинаторика уже без применения знаний ЯМР, а просто знания органической химии. Начинаем думать, что это может быть. Смотрите, тяжелых атомов - всего пять, как сюда вставить три двойных связи? Это что-то [высоко]энергетическое получается. И, судя по хим. сдвигам, у нас присутствует ароматичность. Я бы предположил пятичленный цикл с двумя двойными связями. Это даст нам ароматичность, то есть вот этот сигнал [7.3]. Ну а на это [12.5] потом посмотрим. Естественно, можно подобрать и другие варианты, но нам еще нужно сделать так, чтобы эти три протона давали два сигнала. Похоже, вот этот [7.3] больше, а этот меньше [12.5]. То есть здесь [7.3] два одинаковых (эквивалентных) протона, а здесь [12.5] еще один. По химическому сдвигу он на >NH очень похож, но, может быть, и нет, в ароматике [с азотом] может и что-то еще туда попасть. Можно предположить пятичленный цикл и дальше расставлять протоны. У кого какие идеи есть? Или, может быть, какой-то другой вариант реализовать. Я так думаю, что обычно (если такая задача вам попадет на экзамене) минут за десять можно перебрать все варианты (пять атомов при такой большой ненасыщенности), там не так много изомеров. Рисуем пятичленный цикл, рисуем торчащую из него палочку [связь], к которой нам нужно вот это [изобутил, на доске] присоединить. И что еще здесь можно сказать? Вот этот атом, 2.5: если бы он был связан с азотом, он бы уехал дальше. Значит он связан с углеродом. То есть на этом месте [, где присоединена связь,] находится С [углерод]. Дальше, судя по тому, что сигналов мало, система должна быть симметричной. Если она не будет симметричной, оставшиеся протоны нельзя будет повесить так, чтобы два из них оказались одинаковыми. Для симметрии здесь я только вижу одну возможность [рисует ось, совпадающую с направлением внешней связи], правильно? И где-то есть два протона. И нужно сюда поставить два азота. Давайте попробуем. Допустим, сначала сюда [рядом с внешней связью по обе стороны], чтобы они были симметричны [друг другу]. Теперь, что у нас с двойными связями? Есть здесь возможность расположить двойные связи? К примеру, так [как в имидазоле]. Сразу скажу, что при этом углероде [образующем внешнюю связь] нет протонов, иначе щепился бы вот этот [сигнал 2.5] на протоне, поэтому двойная связь здесь [от точки присоединения к атому азота]. Оставшаяся двойная связь или сюда попадает [C=C] или сюда [C=N к другому азоту]. Давайте попробуем [решить структуру] перебором вариантов. Значит, вот один вариант [имидазол, на доске], а вот другой вариант [4H-имидазол, на доске]. А дальше «повесим» сюда протоны на недостающие валентности и посмотрим, будет ли соответствовать спектр [структуре]. Вот здесь [в варианте 4H-имидазола] получается два протона [-CH₂-], а здесь один [-CH=]. И они будут щепится друг на друга, потому что между ними три связи. А у нас синглет, значит, этого быть не может. Теперь смотрим на этот вариант [имидазол]. Протон [-CH=], протон [=CH-] и здесь протон [>NH]. Вот эти два [-CH=CH-] строго говоря разные, потому что тут двойная связь [>C=N-], а здесь [C-NH-] ее нет. Но вспоминаем про уже не ядерный магнитный, а химический резонанс. Что такое резонансные структуры? Наверняка у вас было что-то типа метода валентных связей [на 1-м курсе]. И в рамках этого метода мы должны понимать, что здесь не одинарные и двойные связи, а все эти связи одинаковые, поскольку эта структура имеет химический резонанс с вот этой структурой. То есть здесь и здесь нарисовано одно и то же [резонансные структуры имидазола, на доске]. Это даже не переходящие друг в друга [таутомерные] формы, а просто одно и то же, именно в силу ароматичности. Поэтому эти два протона [-CH=CH-] все-таки одинаковые, потому что на самом деле это – и не это, и не это, а вот это [рисунок ароматического имидазола с полуторными связями]. Два протона здесь [на -CH=CH-], и один протон делокализован между двумя азотами, он «бегает». (... обсуждение того, проходили ли студенты метод валентных связей на других курсах ...). То есть здесь [между углеродами] двойная

связь есть в любом случае, эти две $[=C-N]$ в любом случае одинарные, а эти [между атомами азота и точкой связывания] - обе полуторные, и протон равномерно распределен между этим и этим азотом. Вот и получается, что вот эти два [протона $-CH=$] эквивалентны, потому что симметрия есть, их два, вот они в этой области как раз, **синглет** [7.3]. А вот протон, висящий на двух азотах, на каждом по «половинке» связи, и **вот этот NH** [12.5]. То есть, если бы резонанса не было, **эти $[-CH=CH-]$** были бы не эквивалентны, потому что с одной стороны есть протон [при азоте], а с другой нет. Но химический резонанс имеет место, как и в любой подобной структуре, поэтому вот такая структура. Теперь соответствует ли она этому [показывает на вариант ненасыщенности с одним циклом и одной двойной связью]? Цикл есть, две двойные связи есть; вот эти две полуторные $[C-N]$ в сумме как одна двойная, потому что в каждой из резонансных структур здесь одна двойная и одна одинарная.

Вопросы есть? В том числе по химии можно задавать. Наверное, нет. Полуторные связи, я думаю вы понимаете, это как в бензоле. Отсюда вывод. Вот нарисован [1-изобутилимидазол]⁴³. Я не знаю, как здесь протон принято рисовать, может, его просто вот так рисуют [в центре цикла], показывая что он [«висит»] на двух азотах. В чем «прикольность» этой задачи? Нужно догадаться про химический резонанс. То есть, рисуя каждую из этих [резонансных структур], вы такой спектр не получите, но в сумме они дадут как раз именно то, что нужно.



семинар В#3

Это очень простой спектр - сигналов мало, а атомов много. Уже можно сразу сказать, что молекула «высокосимметрична». Три сигнала: синглет около 6, квартет около ~2 и триплет ~1. Формула $C_7H_{12}O_4$; кислороды не влияют на ненасыщенность, [в алканах] C_7 должно дать H_{16} , значит, здесь не хватает четырех протонов. Варианты: две двойные связи, двойная связь и цикл, два цикла, тройная связь. На двенадцать протонов приходится всего три сигнала. Интеграл здесь не

⁴³ Следует заметить, что аналогичный спектр (с незначительным отличием в химических сдвигах) будет иметь и другой вариант симметричного пятичленного заместителя с двумя резонансными структурами: пиразол (в предположении, что КССВ между протонами в фрагменте $-HN-CH=$ не наблюдается).

дан, было бы вообще слишком просто, поэтому обойдемся без него. (...) Если вы помните самый первый спектр, который я вам показал, [вы помните, что] и химические сдвиги, и мультиплетность в этаноле были точно такие же. Этильную группу вам хорошо бы сразу из спектров «вычленивать», поскольку она очень характерная. Квартет и триплет именно **в этих местах**, соотношение 2:3. Других щеплений нет, значит, это - этильные группы, изолированные от других соседей. Теперь попробуем вычлест этильную группу вот из этого [C₇H₁₂O₄]. Останется C₃H₇O₄ и один синглетный сигнал на «Н₇», который явно не [тянет на] семь⁴⁴ протонов. Значит, [в молекуле] что-то еще есть. Вспоминаем, что этильные группы в целом могут быть эквивалентны друг другу, если их больше одной. И здесь как раз, видимо, тот самый случай. Потому что, если она всего одна в этой молекуле, то никак не могут семь [оставшихся] протонов дать один сигнал. Значит, две этильных группы. Вычитаем еще одну. (... обсуждение и исправление допущенной ранее ошибки вычитания...) Остается C₃H₂O₄, и из этого [фрагмента структуры] «торчат» две валентности, на которых находятся две этильные группы. Причем раз этильные группы дают только два сигнала, они получаются эквивалентны, то есть где-то в молекуле есть симметрия. Теперь остается понять, что такое C₃H₂O₄, чтобы это было, во-первых, симметрично, а, во-вторых, соответствовало [спектру]. При этом оба этих протона [H₂] должны быть эквивалентны, ну потому что **это [сигнал 5.7]** синглет. (...) 6 м.д., это значит, что там ароматики, наверное, уже не может быть, но два кислорода рядом могут быть, тогда [хим. сдвиг] получится как раз ~6. А этилы не изолированы через кислород, потому что если бы это был О-этил, [химический сдвиг квартета] был бы не 2.5 м.д., а около 4 м.д. То есть этил (...) связан с углеродом, при котором нет других протонов. Рисуем [на доске]. Этил, углерод [с одной стороны], здесь [с другой стороны] этил, углерод. А что значит нет других протонов? Значит [свободные валентности] только кислородом можно занять. С₃ [в *брутто*-формуле] - значит, где-то еще должен быть «С» [атом углерода]. Раз молекула симметрична, этот «С» должен быть посередине. Все углероды нарисовали; вот здесь [в центре симметрии] где-то - середина. Протоны, скорее всего, тоже должны быть посередине, потому что их два, и они одинаковые. Если они были бы как-то разнесены... нет, в принципе, они могут быть разнесены, просто здесь их уже не к чему будет присоединять. Имея в виду, что есть симметрия, скорее всего, [искомая группа -] CH₂, вот здесь посередине. И вот это «Н₂» – это **как раз синглет [5.7]**. По его химическому сдвигу очень похоже, что у него рядом кислорода есть, две штуки. [Если рядом] один кислород – [сигнал] был бы ~4 м.д., [если] два кислорода - ~6 м.д.

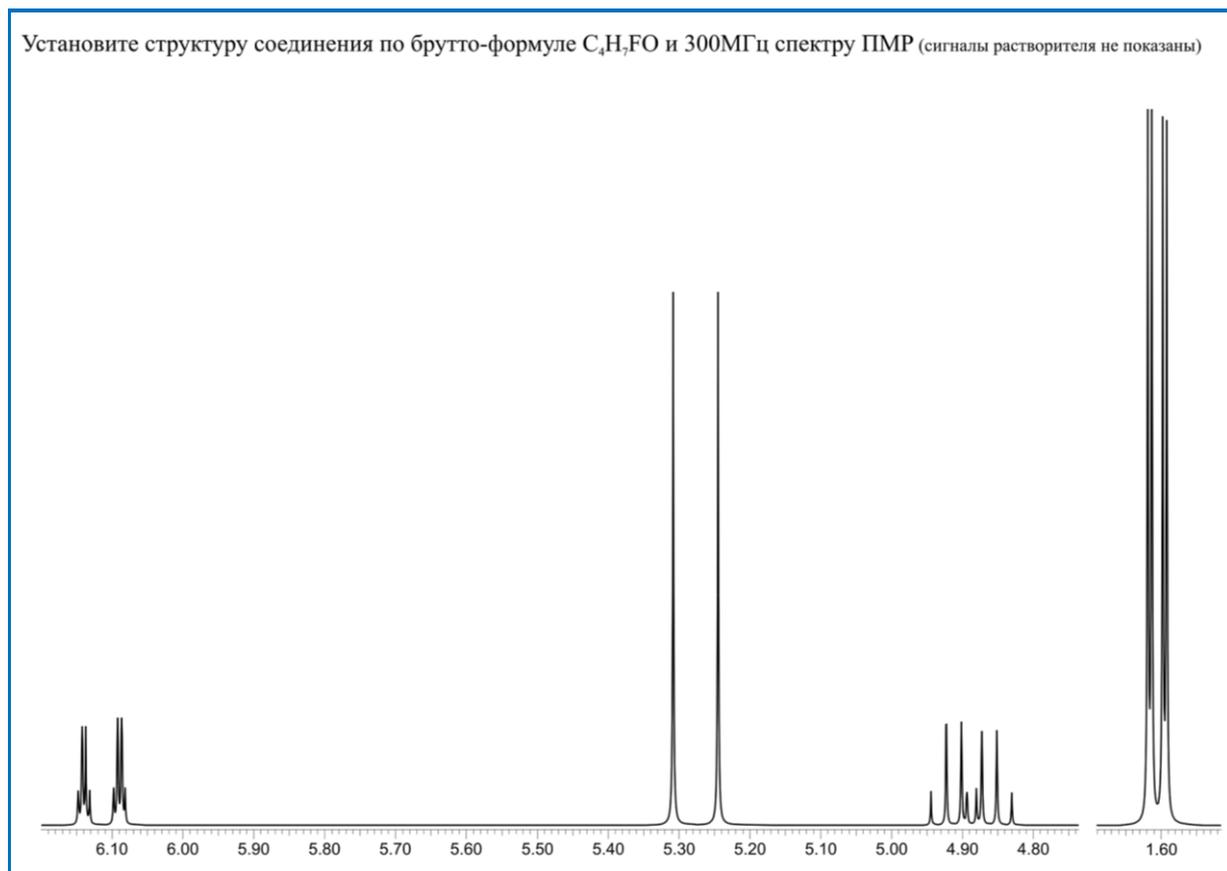
Теперь ненасыщенность. Симметричные варианты – это либо два цикла, либо две двойные связи⁴⁵. Но два цикла уже здесь некуда вставить, значит, еще где-то две двойные связи. Нам нужно куда-то «всунуть» два кислорода и две двойные связи и при этом сохранить симметрию. То есть с каждой стороны [от центра будет] еще один кислород и двойная связь. Я вижу только один вариант [структуры]: [рисует метиленидипропионат], то же самое, соответственно, с другой стороны. Такой вот симметричный сложный эфир. Возможно, здесь могут быть другие варианты, пока их не нашли, поскольку изомеров немало. Если кто-то найдет альтернативное решение, и оно не будет противоречить спектру, это будет хороший бонус в плане оценки и в плане совершенствования заданий.

семинар В#4 Еще одна [задача], последняя на сегодня. Мы сейчас четыре задачи с *брутто*-формулой рассмотрим, а в заданиях в интернете их восемь – четыре этих и еще четыре. Я вам советую остальные попробовать сделать самостоятельно, поскольку на экзамене одна из задач будет как раз такого типа. Может быть, там еще будут другие спектры, но ее основой будет как раз

⁴⁴ Вместо «семь» лектор в этом отрывке ошибочно говорит «девять».

⁴⁵ С учетом того, что в центре симметрии находится группа –CH₂–

брутто-формула и протонный спектр. Если у вас четыре других [задачи] получится решить, значит, к этой части работы вы готовы. (... обсуждение позиционирования слайда на экране ...)



Итак, смотрим. Здесь [6.1] дублет кватетов, дублетное расщепление большое, кватетное очень маленькое. Дублет, а, может быть, два синглета, не знаем пока. Дублет кватетов с двумя константами. Вот это [линии 1 и 2] – кватетная, а вот это [линии 2 и 6] – дублетная. И дублет дублетов [1.6]. Маленькая и большая [КССВ]. [Всего] четыре сигнала. Теперь брутто-формула – C_4H_7FO . В наличии фтор; вспоминаем, что на нем тоже [сигналы] должны щепиться.

Степень ненасыщенности. Это то же самое, что C_4H_8 , правильно? То есть этот [фтор] - одновалентный, кислород (двухвалентный) не влияет; C_4H_8 значит или одна двойная связь, или один цикл ([для насыщения] не хватает двух протонов). Так, у нас семь протонов, четыре сигнала. Надо как-то попытаться их проинтегрировать. [Сигнал] 1.60 очень похож на метильную группу, значит, здесь три протона. Если это метильная группа, то остается еще четыре [протона]. По всем признакам: один [6.1], два [5.3] и один [4.9], по высоте линий. То есть здесь [6.1 и 4.9] - по одному протону, здесь [5.3] - два протона (может быть два синглета, а может быть дублет), здесь [1.6] - метильная группа (три протона).

Смотрим дальше. Метильная группа явно не с кислородом связана⁴⁶, со фтором она по понятной причине тоже не может быть связана (чтобы молекула не развалилась), значит, у нас она связана с углеродом. И в ней есть две константы. Одна большая, одна маленькая. Большая как раз на 7 Гц похожа, но лучше измерить поточнее. А пока предположим, что это алифатическая [КССВ]. Где она еще есть, вот эта большая [КССВ между линиями 1 и 3 сигнала 1.6]? Она еще есть вот здесь [между линиями 2 и 3 сигнала 4.9]. Причем здесь это кватетная константа, то есть щепление на трех соседях. А в метиле как раз три соседа. Значит, можно сделать вывод, что через большую константу

⁴⁶ исходя из химического сдвига 1.6

этот сигнал [4.9] связан с этим сигналом [1.6]. Значит, здесь [при углероде, соседнем с метильной группой] есть протон, вот этот один [рисунок на доске]. Наличие больших констант объяснили.

(...) Здесь еще что-то «привесить» надо будет. У этого метила есть дальняя константа, через большее⁴⁷ количество связей. Что это может быть? Во-первых, это может быть [КССВ] через четыре связи с фтором. Во-вторых, здесь может быть задействована двойная связь. Мы помним, что через четыре одинарных [связи] константа [КССВ] почти никогда не «проходит». (... комбинирование фрагментов структуры на доске и их обсуждение...) [Сигнал 6.1 имеет] квартетное расщепление на трех метилах и большую константу на каком-то другом протоне. Видимо, как раз *транс*-[КССВ] через двойную связь. Если мы здесь померим, она как раз получается [подходящей по значению] (если это [между линиями 2 и 3 сигнала 4.9] ~7 Гц, то это [между линиями 2 и 6 сигнала 6.1] ~15 Гц).

Теперь где вот этот [протон на другом конце двойной связи]? У него должна быть маленькая константа с метилом и большая константа с этим [в *транс*-положении к нему] протоном. И, действительно, тут [6.1] такой [сигнал] есть. Маленькая константа – квартетное расщепление, большая константа – дублетное расщепление. Посмотрим, соответствует ли это расстояние [между линиями 2 и 6 сигнала 6.1] вот этому [между линиями 2 и 6 сигнала 4.9]. Более или менее [одинаковые]. Если потом придем к противоречию, значит будем идти по другому пути. В качестве рабочей гипотезы: [показывает протоны при двойной связи в метилэтиленовом фрагменте].

Теперь посмотрим, складывается ли так, чтобы осталось два синглета⁴⁸. Вот этот [вышеуказанный фрагмент] - C₃H₅, да, вроде бы? Значит, остается C₁H₂FO (или CH₂FO). И константами [КССВ] эта [CH₂FO] часть не связана с этой [C₃H₅], потому что иначе у этого [сигнала 5.3] были бы еще какие-то константы. Посмотрим на хим. сдвиг. У этого - ~6 м.д. Не могу сказать, наверное, здесь кислород (скорее всего, по химическому сдвигу), но ~6 м.д. может быть и само по себе из-за двойной связи. Но в любом случае, если бы здесь был углерод (а больше у нас двойных связей и циклов нет), к нему нужно было бы присоединить что-то еще, а протонов здесь быть не может. (...)

CH₂FO - тут все одновалентное; по-моему, вообще только один вариант может быть без двойных связей, каким образом это можно соединить. И этот один вариант – вот он [фрагмент -O-CH₂F]. По крайней мере, мне других в голову не приходит. Теперь посмотрим, получится ли этот сигнал [5.3], если мы вот это [-O-CH₂F] соединим с этим [-CH=CH-CH₃]. Этот [-CH=] [дает сигнал] ~6 м.д. - может быть, если кислород рядом. Остается вот этот один [-CH₂-], у которого два протона - одинаковые за счет вращения, и рядом находится фтор. Во-первых, кислород и фтор суммарно сильным индуктивным эффектом тянут [сигнал] влево относительно [сигнала] «обычного» CH₂, действительно, он в ~5 м.д. может «уйти». Во-вторых, оба этих протона щепятся на фторе с большой геминальной константой через две связи. Мы помним, что геминальная протон-протонная для sp³-гибризованного углерода - около 12 Гц, и можно предположить, что со фтором она еще больше. Мы знаем, что *транс*-[КССВ] через двойную связь – это ~15 Гц, а это [между линиями дублета 5.3], кажется, уж точно не меньше. То есть это 15+, как раз вполне может быть геминальной константой между фтором и любым из этих двух протонов. Тогда получается, что это дублет, за счет щепления на фторе с константой 15-17 Гц, в нем как раз два эквивалентных протона, и вроде все сложилось.

Единственное, остается теперь понять (...), какой изомер - *цис*- или *транс*-. Характер расщепления одинаковый, отличается только количественно – константа между этим [6.1] и этим

⁴⁷ больше, чем три

⁴⁸ или один дублет

[4.9]. В случае *транс*- – порядка 15 Гц, в случае *цис*- – порядка 10 Гц. Ну даже имея в виду, что здесь нет шкалы в герцах, мы знаем, что «усредненное алифатическое» – это 7 Гц (вот здесь [1.6] между первой и третьей [линиями]), и мы знаем, что константа между двумя протонами – это вот [между линиями 2 и 6 сигнала 6.1]. Это намного больше похоже на 15 Гц, чем на 10 Гц, то есть в два раза больше этой [~7 Гц]. Значит, они два протона [при двойной связи] находятся в «трансе» друг к другу. То есть вот такой изомер [*транс*-1-метил-2-фторметоксилэтилен]. Если бы это соображение нельзя было применить, мы смотрим, что в условии задачи написано: спектрометр 300 МГц (где-то наверху). 300 МГц, это значит, 1 м.д. = 300 Гц, 0.1 м.д., стало быть, 30 Гц. А дальше линейкой измеряем это расстояние, сопоставляем с 30 Гц по пропорции и получаем численное значение константы в герцах, а дальше сравниваем со справочной таблицей. То есть для решения таких задач, если у вас спектр на бумаге нарисован, вам нужна линейка с делениями, по которой через рабочую частоту спектрометра вы сможете перевести значение в миллионных долях в значение в герцах. И на основании различий сделать, например, такой вывод (о *цис*- или *транс*-).

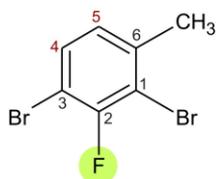
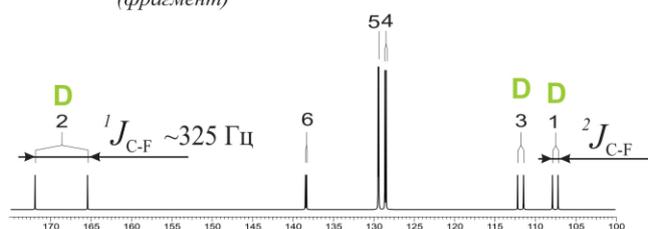
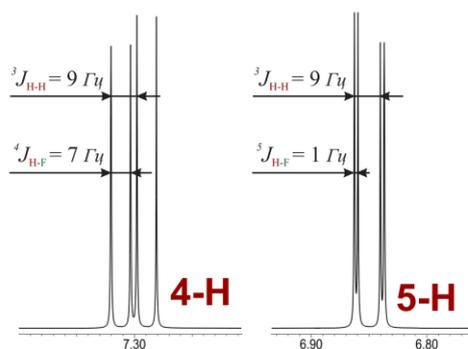
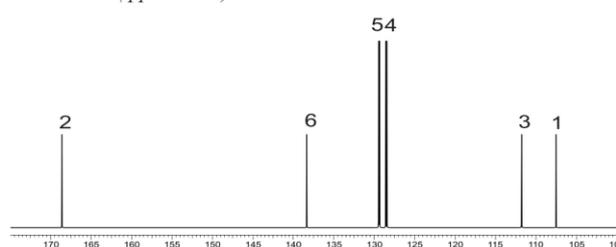
Итак, что мы сегодня сделали? Рассмотрели несколько задач, где нужно было сопоставить спектр и структуру и сделать вывод “соответствует или не соответствует”. Для этого подписать атомы в молекуле и сигналы в спектре. И рассмотрели четыре задачи, где у вас есть спектр и *брутто*-формула. Но эти спектры я специально подобрал так, чтобы сигналы были хорошо разрешенные, не пересекающиеся друг с другом, и выводы можно сделать, не перебирая тысячи изомеров. Предполагается, что вы подобные задачи сможете решать самостоятельно. Проверить это вы можете, скачав задания для самопроверки с сайта курса. Попробуйте решить оставшиеся задачи на *брутто*-формулы. Если не найдете, напишите, я вам укажу точно, где они находятся. И в следующий раз, как минимум, покажете структуру, а я скажу правильно или неправильно. Если вы получили структуру сами, и она совпала с правильным ответом, больше проверять нечего, скорее всего, вы все сделали правильно, а если она не совпала, я вам укажу, почему она не совпала.

Лекция 4 ► [NMR Lec4s.mp4](#)

Продолжим рассмотрение некоторых особенностей одномерных спектров, на примере протонных спектров, которые выходят за рамки уже рассмотренных нами. Пример [реального спектра] здесь, скорее всего, не понадобится, но если что-то будет непонятно, я его найду.

#29 Напоминаю, что расщепление линий в протонных спектрах связано со спин-спиновым взаимодействием между наблюдаемым ядром и ядрами-соседями, в том числе протонами. Однако спин-спиновое взаимодействие не исчерпывается гомоядерным взаимодействием; существует также и гетероядерное. То есть [сигналы] протонов (в протонном спектре) будут «видеть» всех магнитно-активные соседей, не только протоны. На слайде - несколько примеров гетероядерного спин-спинового взаимодействия. Примеры с фтором вам уже знакомы. Вот протонный спектр этой молекулы. У вас в прошлый раз были ситуации, когда ядро фтора находилось в *мета*- или *орто*-положении к наблюдаемому протону, на нем происходило щепление, как правило, с большой константой. И часто бывает, что *мета*-константа с фтором примерно равна *орто*-константе с протоном. Что же касается *пара*-констант, то протоны друг друга в *пара*-положении «не видят», но протоны «видят» фтор. Вот пример: константа [КССВ] через пять связей (здесь написано через четыре, это ошибка на слайде. *Пара*-положение – это пять связей, здесь [5-Н] должно быть ⁵J). Так или иначе, эта константа есть – 1 Гц. То, что мы не видим в протон-протонном случае, мы видим в протон-фторном случае. Если мы снимем спектр по ядрам фтора, там эта константа также будет наблюдаться.

Гетероядерное спин-спиновое взаимодействие

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

Ф. Тоукач: слайд 29

Теперь посмотрим на спектр ^{13}C [верхний]. Спектр ^{13}C , как правило, снимается в режиме подавления спин-спинового взаимодействия с протонами для того, чтобы все сигналы были синглетами, было легко измерить химические сдвиги, и они [сигналы] были достаточно высокими на фоне шумов. Однако развязка от ядер фтора по умолчанию не включена, поэтому спектр будет иметь такой вид. D – это в данном случае не дейтерий, а дублеты (за счет взаимодействия с фтором). Углерод, ближайший к фтору, расщепился на нем с очень большой константой, порядка 150 или 200 Гц⁴⁹. Здесь 8 м.д. долей между двумя половинами дублета⁵⁰. Миллионная доля в протонном спектре и миллионная доля в углеродном спектре – это разное число герц. «Абсолютная» миллионная доля (это единица относительная) – это 0.000001 от рабочей частоты спектрометра. Поскольку рабочая частота спектрометра по протонам и по углероду разная и отличается в четыре раза в соответствии с разницей гиромангнитных отношений этих ядер, в углеродных спектрах (если рабочая частота по протонам 100 МГц) она будет 25 МГц. Соответственно, и 1 м.д. – это в четыре раза меньше герц, чем в протонном случае. Здесь частота прибора не указана, поэтому точную величину константы я не могу сказать, но для вас важно, что она очень большая. То есть, не зная, что это константа [спин-спинового взаимодействия], легко перепутать и принять это за два отдельных сигнала. Она такая большая, какая никогда не наблюдается в гомоядерном случае, потому что между атомами [C и F] всего одна связь. Протон-протонных констант через одну связь по понятным причинам не бывает.

Другие углероды тоже как-то расщепились. Вот первый [C1] и третий [C3] имеют величину константы спин-спинового взаимодействия приблизительно одну или половину миллионной доли, то

⁴⁹ В предположении, что симуляция проведена для рабочей частоты по протонам 200 МГц, КССВ $^1J_{\text{C}_2\text{-F}_2}$ на приведенном спектре составляет 325 Гц, что примерно соответствует типичным прямым константам C-F в производных бензола.

⁵⁰ Точно - 6.5 м.д.

есть десятки герц⁵¹. Сигналы C4 и C6 тоже расщепленные, но в этом масштабе расщепления не видно. Поскольку шкала занимает на этом отрезке спектра ~80 м.д., масштаб такой, что константы, к примеру, в 7 Гц будет незаметны. Но если вы этот спектр растяните по горизонтали, вы увидите, что **эти сигналы [C4 и C6]** - «дубленые» на концах. А на **пятом [C5]**, видимо, она совсем маленькая. Логично ожидать, что она будет больше, чем с протоном в 5-м положении, но с протоном была 1 Гц, а это, к примеру, 3 Гц - в таком масштабе ее не видно. Чтобы упростить спектр или хотя бы иметь возможность сосчитать число сигналов, можно применить специальный эксперимент, точнее специальный режим снятия спектра ¹³C - сделать развязку не только от протонов (как это обычно делается), но и от всей области резонанса атомов фтора. Слово “развязка” означает, что мы подавляем спин-спиновое взаимодействие с широким диапазоном частот, в который укладывается весь возможный диапазон частот сигналов ядер определенного типа, например, фтора. Тогда в спектре ¹³C исчезает взаимодействие с фтором (то, что щепилось на фторе, перестает на нем щепиться). Если в молекуле нет других магнитно-активных атомов, кроме фтора и протонов, [в спектре] ¹³C **с развязкой от фтора и протонов [нижний]** все сигналы будут в виде синглетов, что мы здесь и наблюдаем.

Почему одни [сигналы] больше других? Большая часть [из вас], наверное, не знает, но мы к этому еще вернемся, сейчас это вас не должно смущать. В спектрах ¹³C в отличие от протонов, как правило, разная высота сигналов лишь косвенно связана с количеством эквивалентных углеродных атомов. В первую очередь она связана с количеством соседей-протонов.

Основные протон-углеродные КССВ

тип КССВ	фрагмент структуры	J_{C-H} , Гц*
прямые	sp^3C-H	125..135
	sp^2C-H	155..172
	$spC-H$	248..251
геминальные	sp^3C-sp^3C-H	-2..-5
	sp^3C-sp^2C-H	0..5 (C=C), 26..30 (C=O)
	sp^2C-sp^3C-H	-6 (толуол)
	sp^2C-sp^2C-H	1..3
	$spC-sp^3C-H$	-11..-9
	$spC-sp^2C-H$	32..36 (C=O)
	$-C\equiv C-H$	50..55
вицинальные	$C-C-C-H$	0..8 **
	$C-C=C-H$	5..11
	$C=C-C-H$	4..10
	$C-C\equiv C-H$	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 (²N)(pp. 119-121)
Ф. Тоукач: слайд 30

#30 Раз мы перешли к гетероядерному спин-спиновому взаимодействию логично, что есть и справочная таблица. Здесь только самые основные [КССВ] для того, чтобы [можно было] понять

⁵¹ В данном примере ~50 Гц.

закономерность. Это протон-углеродные константы спин-спинового взаимодействия. Кроме геминальных и вицинальных, которые были у нас в протон-протонном случае, и в целом подчиняются тем же самым закономерностям, добавляются еще прямые, то есть через одну связь. Чем менее гибридизован атом углерода, тем больше константа спин-спинового взаимодействия. Собственно, это легко видеть из этих двух колонок. Эта таблица при решении задач может вам понадобиться.

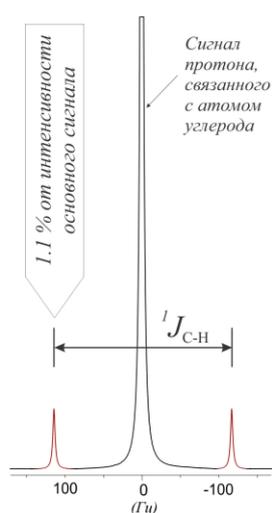
Спин-спиновое взаимодействие: особые случаи

Квадрупольные ядра

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

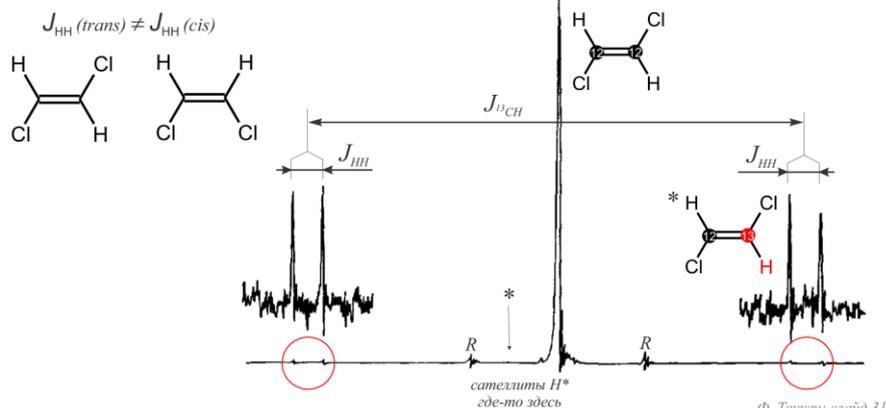
$T \uparrow$, симметричное окружение ^{14}N \Rightarrow подавление квадрупольной релаксации \Rightarrow измерение КССВ J_{NH} (если нет химического обмена)

$T \downarrow$ усиление квадрупольной релаксации \Rightarrow нет возмущающего эффекта ^{14}N (уширения линий) в спектрах ^1H



Сателлиты ^{13}C

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



#31 Теперь посмотрим на другие особые случаи, связанные со спин-спиновым взаимодействием. Во-первых, это спиновое взаимодействие с ядрами, спин которых отличен от $\frac{1}{2}$. Они менее удобны для ЯМР в силу ряда причин. Называются такие ядра квадрупольными. Самое распространенное из них – ^{14}N . Оно распространено как в органической химии, так и в том смысле, что магнитно-активный изотоп, имеющий спин 1, составляет большую часть природного содержания азота. Ядро ^{14}N очень быстро релаксирует, поэтому протоны, которые находятся непосредственно на азоте, «видят» усреднение во времени из всех спиновых состояний. При релаксации спиновые состояния меняются, получается усредненная картина, и спиновое расщепление на ^{14}N мы не видим, в отличие от ^{15}N . ^{15}N имеет спин $\frac{1}{2}$, но [этого изотопа] его мало. В протонных [спектрах] за счет низкого природного содержания ядра ^{15}N мы не будем наблюдать щепления на ^{15}N , но если мы специальный эксперимент делаем, который выясняет, например, корреляции между хим. сдвигами ^{15}N и протонов, то там мы ^{15}N будем видеть, и принципы работы с ним в общих чертах те же самые, что и принципы работы с ядрами ^{13}C . Это [технически] сложнее, потому что [у азота] меньше гиромангнитное отношение, то есть при тех же внешних магнитных полях меньше частоты резонанса и меньше чувствительность (как по этой причине, так и в силу меньшего природного содержания изотопа ^{15}N).

Но здесь сейчас мы говорим про ^{14}N [, взаимодействия с которым не наблюдается в протонных спектрах]. Можно изменить некоторые экспериментальные условия, чтобы выявить это

взаимодействие. Во-первых, это повышение температуры (оно положительно сказывается на подавлении квадрупольной релаксации), а, во-вторых, это симметричное окружение⁵² ядра ^{14}N . Симметричное окружение – это довольно редкий случай, какой-нибудь тетраметиламмоний или просто аммоний. То есть когда у азота тетраэдрическое окружение и во всех углах тетраэдра находится одно и то же. Если в вашей молекуле такое есть, можно измерить константы спин-спинового взаимодействия с азотом. Но это, конечно же, при условии, что нет химического обмена. Я специально это здесь подчеркиваю, потому что протоны при азоте бывают часто склонны к химическому обмену. То есть протон находится с какой-то вероятностью при азоте, а с какой-то вероятностью где-то еще. Миграция протона сильно снизит спин-спиновое взаимодействие с ядром азота, потому что локализован протон уже не на азоте, а где-то в пространстве.

И наоборот, если температуру понизить, квадрупольная релаксация усилится, и возмущающий эффект за счет усреднения пропадет. Поэтому сигналы NH протонов в спектре станут более узкими. Чем это может помочь? Если у нас много NH-протонов (допустим, это пептид, и в нем двадцать аминокислот, у каждой есть NH протоны), и они [сигналы] все находятся в узкой области. Нам нужно их различить для каких-то структурных целей. В этом случае бывает так, что сигналы NH из-за химического обмена или еще из-за чего-то уширены, а много широких сигналов, находящихся в узком диапазоне химических сдвигов, не позволяют получить достаточно разрешенную картину, чтобы отличить эти сигналы друг от друга. Поэтому можно понизить температуру, сигналы NH протонов станут более узкими, [как и сигналы] любых протонов, связанных с квадрупольными ядрами. В органической химии это в первую очередь ^{14}N . Что вам нужно знать о квадрупольных ядрах? Кратко [подытожено на слайде](#): симметричное окружение и влияние температуры.

Следующий интересный момент – это как магнитно-активные ядра, природное содержание которых мало, отражаются на спектрах⁵³. Если мы сильно увеличим сигнал протона, связанного с углеродом (к примеру, [в \$\text{CHCl}_3\$, вот он](#)), мы увидим по бокам от него [два небольших сигнала](#). Чтобы их увидеть, естественно, в спектре должно быть достаточно мало шумов. Это увеличение очень сильное, приблизительно в сто раз, и только при таком увеличении мы видим эти маленькие сигналы. Если концентрация достаточна, шумов мало и сигналы достаточно узкие, чтобы основание [здесь \[у основного сигнала\]](#) не «расплывалось», по бокам от основного сигнала мы видим два сигнала, которые называются сателлитами ^{13}C . Их суммарная площадь по отношению к площади основного сигнала составляет 1.1%. Это как раз природное содержание изотопа ^{13}C . Берутся они именно отсюда. [Этот \[основной\] сигнал](#) [дают] те молекулы, в которых углерод, находящийся рядом с этим протоном представлен изотопом ^{12}C , 1% молекул [дают] [эти два сигнала](#), у них углерод представлен изотопом ^{13}C . Он магнитно-активен (спин $1/2$), значит, [на нем будет] щепление в дублет с прямой константой ~ 200 Гц⁵⁴. Естественно, точное значение этой константы зависит от того, что за молекула, какая гибридизация [атома] углерода, какие заместители и так далее.

Чем это может быть полезно? Может быть полезно, например, тем, что величина константы $^1J_{\text{CH}}$ зависит от конфигурации двойных связей рядом с этим узлом. К примеру, если это СН-протон, при двойной связи с азотом, то в зависимости от того, *цис*- или *транс*- эта двойная связь $\text{C}=\text{N}$, величина [вот этой](#) константы между углеродом и его протоном будет разной. Иногда это бывает единственным способом установить *цис*-*транс* изомерию по двойной связи $\text{C}=\text{N}$.

⁵² Хотя это и не экспериментальное условие :)

⁵³ На протонных спектрах, в лекции оговорка.

⁵⁴ В хлороформе – 209 Гц.

Кроме этого, можно проверить, есть ли у этого протона какие-либо углероды. Если этих сигналов нет, значит, [на расстоянии одной связи] углеродов нет, то есть протон связан с чем-то еще [магнитно-неактивным]. Как правило, у большинства протонов, поскольку они связаны с углеродами, эти сигналы есть.

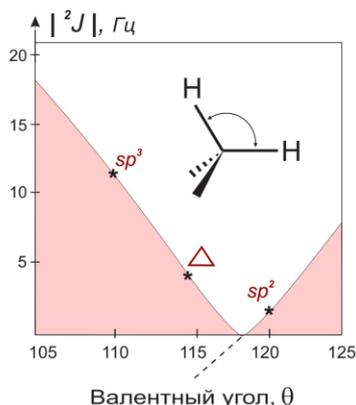
Иногда сателлиты ^{13}C позволяют решить очень необычные задачи. Например, в этих сателлитах проявляются константы спин-спинового взаимодействия между магнитно-эквивалентными ядрами. Если ядра магнитно-эквивалентны, они друг на друге не щепятся в протонном спектре, и поэтому мы константы спин-спинового взаимодействия между ними измерить не можем. Но в случае с ^{13}C эти константы проявятся. Вот пример: такая молекула [дихлорэтилен], у которой возможно два цис-транс изомера по двойной связи. Хлор магнитно не активен. Здесь [в транс-изомере] эти протоны эквивалентны, потому что молекулу можно повернуть так [вокруг вертикальной оси] и так [вокруг горизонтальной оси]. Они [протоны] самосовместятся, [их сигнал] будет одним синглетом. Здесь [в цис-изомере] протоны тоже эквивалентны, потому что можно повернуть молекулу вот так [вокруг вертикальной оси]. То есть тоже один сигнал в форме синглета. Как же отличить, какой изомер? Для этого как раз имеет смысл посмотреть на сателлиты ^{13}C . Вот молекула, которой наибольшая часть в образце, где оба углерода представлены изотопом ^{12}C . У нее протоны дают синглет. Теперь посмотрим на молекулу, в которой один из углеродов представлен изотопом ^{13}C . Таких, соответственно, 1%. И здесь уже этот протон, находящийся при этом углероде [^{13}C , красный], даст дублет дублетов. Почему дублет дублетов? Во-первых, большая константа щепления на ^{13}C , вот она. А, во-вторых, маленькая константа щепления на этом протоне [при другом атоме углерода]. Поскольку они перестают быть и магнитно, и химически эквивалентными, эту молекулу уже нельзя повернуть так, чтобы протоны самосовместились. Поэтому эти протоны разные, начинают друг на друге щепиться. И этот протон, кроме константы на углероде (большой), имеет константу на другом протоне через три связи. Вот эта константа. Получился дублет дублетов. А мы знаем, что вицинальная константа при двойной связи зависит от того, цис- она или транс-, поэтому, измерив это значение [между крайними линиями], мы можем узнать, цис-изомер или транс-изомер. Напоминаю, что эти сигналы очень маленькие, потому что [площадь] нужно как минимум делить на сто из-за содержания ^{13}C . Они здесь едва видны [в красных кругах]. А это увеличение в сто раз. Что здесь есть еще? Во-первых, есть еще сателлиты вот от этого протона [H^*], потому что этот протон кроме того, что щепится на этом [при ^{13}C], еще и через две связи щепится на этом углероде ^{13}C . Но константа спин-спинового взаимодействия (гетероядерная) будет уже меньше, не 200 Гц, а к примеру, 20, 30 или 40 Гц⁵⁵. Дублет дублетов от этого протона [при ^{12}C] где-то здесь находится, но при этом увеличении его не видно. Картинка просканирована из учебника, может, автор учебника забыл про них, а, может быть, по какой-то иной причине не видно, но, так или иначе, они должны быть где-то в этой области. Еще здесь есть две подозрительные линии [R] на одинаковом расстоянии от основного сигнала. Но если мы померяем расстояние между ними, мы увидим, что оно не подходит ни к одной известной константе спин-спинового взаимодействия. Такие линии тоже не должны вас пугать и мешать вам разбирать спектры, поскольку если вы замерите это значение, а потом спросите у оператора, с какой частотой вращался образец в спектрометре, вы увидите, что эти значения совпадают. То есть это - артефакты, связанные с вращением образца, и расстояние между ними в герцах – как раз и есть частота вращения.

#32 Теперь переходим к расшифровке первых двух строк той таблицы, где были характерные значения протон-протонных констант спин-спинового взаимодействия. Там для геминальных и вицинальных констант было написано “зависит от структуры”. И зависит она следующим образом.

⁵⁵ В действительности, $^2J_{\text{CH}}$ равна 16 Гц в цис-дихлорэтилене и 0.8 Гц в транс-дихлорэтилене.

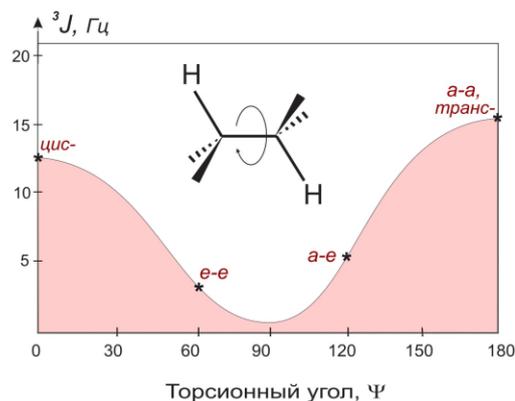
Зависимость КССВ от структуры

Геминальные
(через 2 связи)



- ${}^2J \uparrow$ электроотрицательные заместители в α -положении, особенно для sp^2 . Для sp^3 $|J| \downarrow$.
- ${}^2J \downarrow$ электроотрицательные заместители в β -положении, особенно для sp^2 . Для sp^3 J проходит через 0.
- π -электроны по соседству, особенно если π -орбиталь лежит в плоскости CH_2 -фрагмента. Для sp^3 $|J| \uparrow$.

Вицинальные
(через 3 связи)



- ${}^3J \uparrow$ короткие связи X-X:
 $|C=C| < |C-C| < |C-X|$
- ${}^3J \downarrow$ электроотрицательные заместители
- ${}^3J = A + B \cdot \cos(\theta) + C \cdot \cos(2\theta)$ [формула Карплуса]

Ф. Тоукач: слайд 32

Начнем сначала с геминальных, то есть через две связи. Эта константа [КССВ] зависит от валентного угла, и когда валентный угол маленький, она имеет отрицательное значение где-то вот здесь [ниже оси абсцисс слева] на этом графике. Наверное, вам понятно, что это [значения абсциссы] - валентный угол, а по вертикали - величина константы. Она пересекает ноль вот здесь [118°]. То есть, когда угол - 118°, константа спин-спинового взаимодействия отсутствует. А когда угол близок к этому значению, константа получается маленькой. И как раз поэтому sp^2 -гибридизованный углерод при двойной связи создает условия для маленькой константы спин-спинового взаимодействия между присоединенными к нему протонами несмотря на то, что между ними всего две связи; это будет вот эта точка [sp^2]. В одномерном спектре мы наблюдаем модуль константы, то есть, если она была, к примеру, -10, расстояние между линиями для нас все равно будет выглядеть как 10, поскольку мы не знаем, какая из линий какая [α -сосед или β -сосед], так они стоят или так [показывает пальцами]. (...) Вот график для этого модуля. То есть та часть, которая была здесь [снизу от оси абсцисс, пунктир], проецировалась сюда [наверх]. Характерные точки: тетраэдрический углерод [sp^3], треугольный углерод [sp^2] и углерод в циклопропане для примера. Там он и не треугольный, и не тетраэдрический, а средний из-за напряжения. Общая картина - вот такая, с пересечением нуля где-то здесь [118°]. А влияющие факторы перечислены снизу.

Первый [из них] - электроотрицательные заместители. Если они находятся в α -положении, то есть здесь [при связях вне плоскости доски], константа будет увеличиваться. Но увеличиваться будет именно константа, а не ее модуль, то есть мы будем идти по графику отсюда [слева] сюда [направо, вдоль пунктира]. Это значит, что наблюдаемая величина в одномерных спектрах (модуль) будет сначала уменьшаться, а потом увеличиваться. То есть, если у нас молекула находилась в этой области [sp^3], спин-спиновое взаимодействие в одномерном спектре будет уменьшаться. А если в этой области [sp^2], то есть, если речь идет про sp^2 -гибридизованный углерод, мы будем двигаться по

графику [отсюда](#) [слева] [сюда](#) [направо, вдоль сплошной линии] при увеличении электроотрицательности заместителей в α -положении, и, следовательно, спиновое взаимодействие будет возрастать. Если двойная связь - [вот здесь](#) [на месте жирной связи], и мы что-то присоединяем туда, во-первых, меняется угол (и через угол меняется положение точки на этой кривой), а во-вторых, меняется характер зависимости (на качественном уровне). В зависимости от заместителей все это может быть выше или ниже, с точностью до умножения на константу (или прямую). Итак, модуль для sp^2 растет, для sp^3 - уменьшается, приближается к циклопропану.

Наоборот, если электроотрицательные заместители находятся в β -положении, то есть дальше от [этого центра](#), то все с точностью до наоборот – константа уменьшается, и мы двигаемся [в этом направлении](#) [справа налево]. Для sp^3 линии становятся дальше друг от друга, потому что увеличивается модуль константы, а для sp^2 константа проходит через ноль, то есть модуль константы уменьшается до нуля и начинает снова расти.

Что еще [влияет на величину геминальной КССВ]? π -электроны по соседству, особенно если π -орбиталь лежит в плоскости [этих трех атомов](#) [CH_2], тоже приводят к уменьшению геминальной константы спин-спинового взаимодействия. Значит, где-то может пройти через ноль, и модуль снова начнет расти. На качественном уровне для интерпретации спектров этого, скорее всего, достаточно.

Теперь вицинальные константы, то есть через три связи. Они зависят от торсионного угла. Зависимость, как и все, что зависит от угла вращения в природе, имеет синусоидальную форму и отличается для разных молекул, типов заместителей и прочих условий только количественно. То есть высотами [вот этих](#) [0° и 118°] плечей. Они здесь разной высоты, обращаю ваше внимание. Кривая называется «кривая Карплуса» по имени ее первооткрывателя. Здесь тоже есть несколько характерных точек – *син*-перипланарное⁵⁶ и *анти*-перипланарное положение. «*Син*-перипланарное», прошу прощения, *цис*- – это когда двойная связь. *Син*- и *анти*-. Но для случая двойной связи это тоже работает, потому что двойная связь тоже может иметь два положения, и они тоже укладываются [сюда](#) [0°] и [сюда](#) [118°]. Вот эти *e-e*, *a-e* – это в циклогексаноподобных циклах, экваториально-экваториальные и аксиально-экваториальные взаимодействия. Знаете эти термины? Что это значит? Вроде кивают, да? Два соседних аксиальных [протона] как раз находятся в *анти*-перипланарном положении, то есть попадают [вот сюда](#) [*a-a*]. Это самая большая величина этой константы. А в *син*-перипланарном [положении] тоже большая, но чуть поменьше. А когда они стоят под 90° друг к другу, [вот так](#) [показывает на пальцах], величина константы минимальная, попадаем мы [сюда](#) [*e-e*], это ~ 1 Гц, но часто может и не наблюдаться вообще.

Так же, как и в случае с двумя связями, абсолютная величина спин-спинового взаимодействия через три связи зависит не только от [торсионного] угла, но и от молекулярного окружения. Во-первых, чем короче связи, тем больше константы спин-спинового взаимодействия. (... *обсуждение длин связей* $C=C$, $C-C$ и $C-X$...) Чем короче связи, тем лучше соседи-протоны (или не-протоны, кто угодно), «видят» друг друга. Это значит, что через двойную связь [спин-спиновое взаимодействие передается] лучше всего, через одинарную – похуже, а через одинарную через гетероатом – [КССВ] еще меньше. Но если в случае с двойной связью геометрия молекулы зафиксирована, то в случае с одинарной связью она не обязательно зафиксирована. Она *может* быть зафиксирована, если там цикл имеется или двойные связи по соседству, а может быть и лабильна. И в случае, если она не зафиксирована, эта связь все время меняет свою конформацию, и в соответствии с тем, какие углы более выгодны и какое время она находится в этих состояниях, будет получаться усредненная картина спин-спинового взаимодействия. Физический смысл предсказания величины [КССВ] может

⁵⁶ «*Цис*-перипланарное» - оговорка.

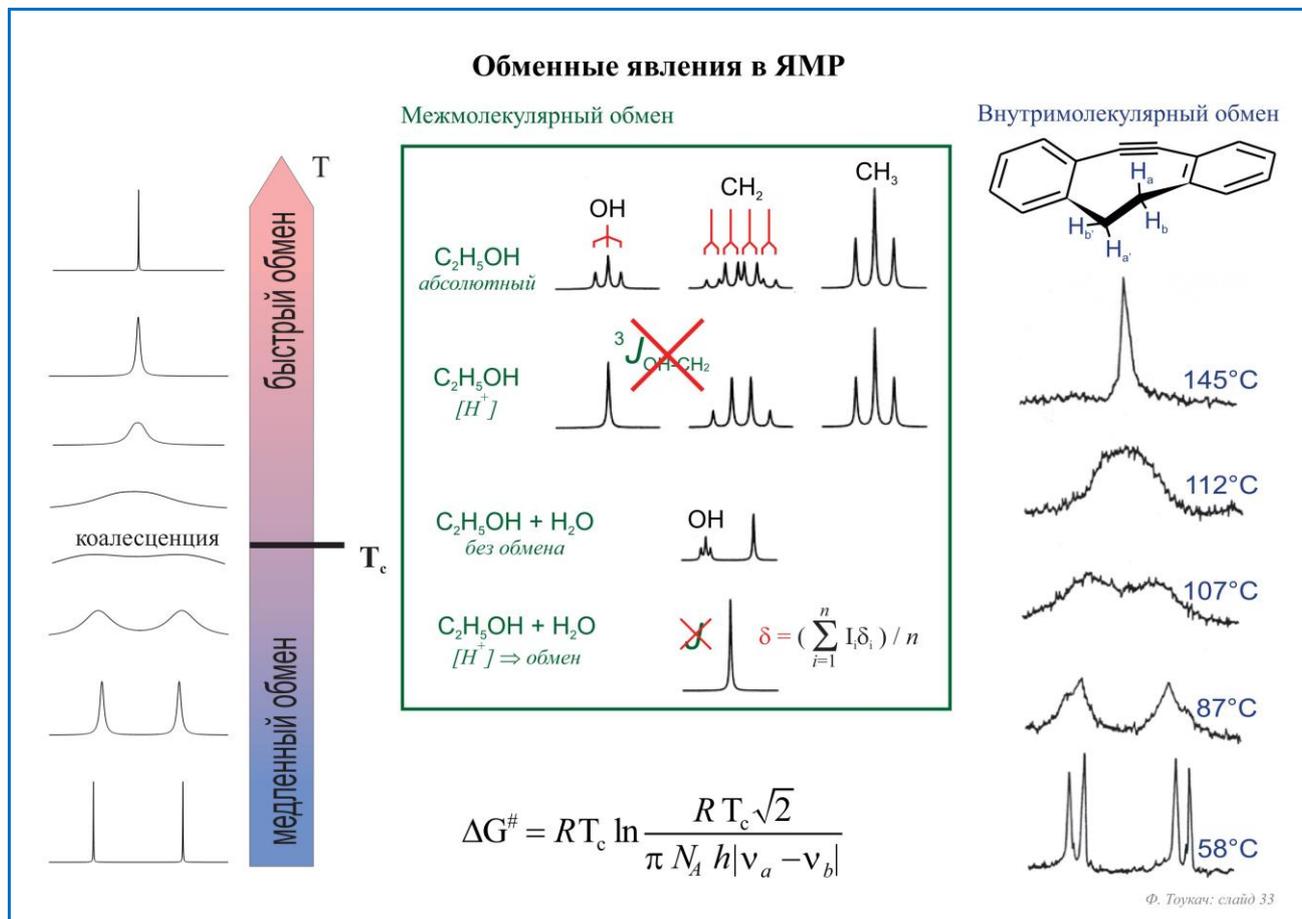
быть таким: надо посмотреть, сколько времени молекула находится в каждом состоянии (то есть имеет каждый торсионный угол), для этого конкретного торсионного угла прикинуть, какая будет константа спин-спинового взаимодействия, потом так как энергии состояния мы знаем, мы можем усреднить [KCCB] с применением распределения Больцмана. А энергии мы знаем, если мы знаем, сколько времени молекула находится в том или ином состоянии. Это величина, связанная простой математической формулой с энергиями состояний. Чем меньше энергия, тем больше времени молекула находится в этом состоянии, поскольку оно более выгодно. Здесь можно и через время «зайти», то есть из траектории молекулярной динамики вытащить эти данные. А можно «зайти» через энергии, то есть для разных углов посчитать энергию молекулы, оптимизированной исходя из конкретного торсионного угла.

Теперь электроотрицательность заместителей. [При их наличии вицинальные] константы всегда уменьшаются. То есть электроотрицательный заместитель утягивает электронную плотность из этой области [между центральными атомами], и соседние протоны «видят» друг друга хуже. [Умозрительно] чем электронное облако плотнее, тем лучше атомы «видят» друг друга через него. Как получить конкретные значения? Для этого нужно залезть в справочник или «погуглить» по словам “кривая Карплуса для...”, а дальше поставить название вашего класса соединений. В зависимости от того, какие заместители находятся при этой связи, будут разные коэффициенты в этой формуле. $2\sin\varphi + \cos 2\varphi$ что-то, скорее всего, формула имеет примерно такой вид⁵⁷. А конкретные коэффициенты в этой формуле выяснены для большого количества классов соединений и сведены в справочные таблицы.

#33 Следующее, на что имеет смысл обратить внимание в спектрах, в первую очередь в протонных - это возможность перехода протонов из одних состояний в другие. Она может быть связано как с миграцией, так и с изменением конформации или еще с чем-то. Общая картина сигналов обменивающихся атомов приведена в левой части слайда. Если обмен происходит медленно (на шкале времени ЯМР⁵⁸ можно сказать, что он не происходит), мы видим два разных состояния – это два сигнала [внизу]. Допустим, мы начали нагревать образец, и произошло увеличение скорости обмена. Если эти протоны могут (между собой) обмениваться, скорость обмена будет увеличиваться с температурой, и спектр будет меняться вот таким образом. Сначала сигналы станут шире, потом они станут еще шире; площадь у них должна остаться той же самой, поэтому они станут ниже. В какой-то момент [по мере роста температуры] середина между ними начнет подниматься, поскольку внутренние края сигналов напользут друг на друга. И далее при нагреве эти сигналы исчезнут, а посередине возникнет один сигнал, который по мере дальнейшего увеличения скорости обмена будет становиться уже и в конце концов придет к такому виду [вверху]. Вот этот момент [перехода, T_c] называется «коалесценция», а температура, при которой она происходит - температурой коалесценции. Эта температура однозначно связана с энергией обмена. Вот формула для энергии Гиббса обмена, в которой присутствует температура коалесценции и различные [физические] константы. Обозначения - стандартные для химии. Нестандартны могут быть эти [ν_A и ν_B] – частоты этих сигналов а и b, а это [$|\nu_A - \nu_B|$] – модуль разности их частот (в герцах). Все остальное, я надеюсь вы знаете, R, N_A , π и h. Все знают, что это такое? Это еще в школе, наверное, проходили. Если не знаете, спросите лучше сразу.

⁵⁷ Формула Карплуса: $^3J = A + B \cdot \cos(\theta) + C \cdot \cos(2\theta)$ или $^3J = A \cdot \cos(\theta) + C$ для $\theta \in [0, 90^\circ]$ | $^3J = A \cdot \cos^2(\theta) + C$ для $\theta \in [90^\circ, 180^\circ]$.

⁵⁸ Процессы с периодом $\sim 1 \text{ мс}^{-1}$



Таким образом: [постепенно] нагреваем образец [], снимая спектры, смотрим, при какой температуре произошла коалесценция, из нее получаем энергию Гиббса обменного процесса. И по энергии обменного процесса химики, в том числе в вашем лице, смогут сделать какой-то вывод о динамике исследуемой молекулы. Сразу обращаю ваше внимание, что [по мере нагрева] сигналы не съезжаются. Они исчезают в одном месте и возникают в другом, но при этом их химические сдвиги не меняются. Теперь, всегда ли [сигнал] возникнет посередине? Нет, не всегда. Он возникнет в центре масс **этих сигналов [внизу]**. То есть, если сигналы имеют одинаковую площадь, обменный сигнал усредненного состояния возникнет посередине. Однако, если эти сигналы имеют разную площадь в силу каких-то причин, усредненный сигнал будет смещен в сторону большего. Те же самые правила действуют и тогда, когда обменивающихся сигналов более двух. (...) Например, вы снимаете углеводы в водном растворе (не в D_2O , а в обычной H_2O). Происходит тотальный обмен всех гидроксильных групп, которых в углеводах очень много, с молекулами воды. То есть все десять, двадцать или тридцать сигналов гидроксильных групп, которые у вас есть, как-то смешаются и возникнет усредненный сигнал по центру масс всего этого набора сигналов, включая сигнал, собственно, воды.

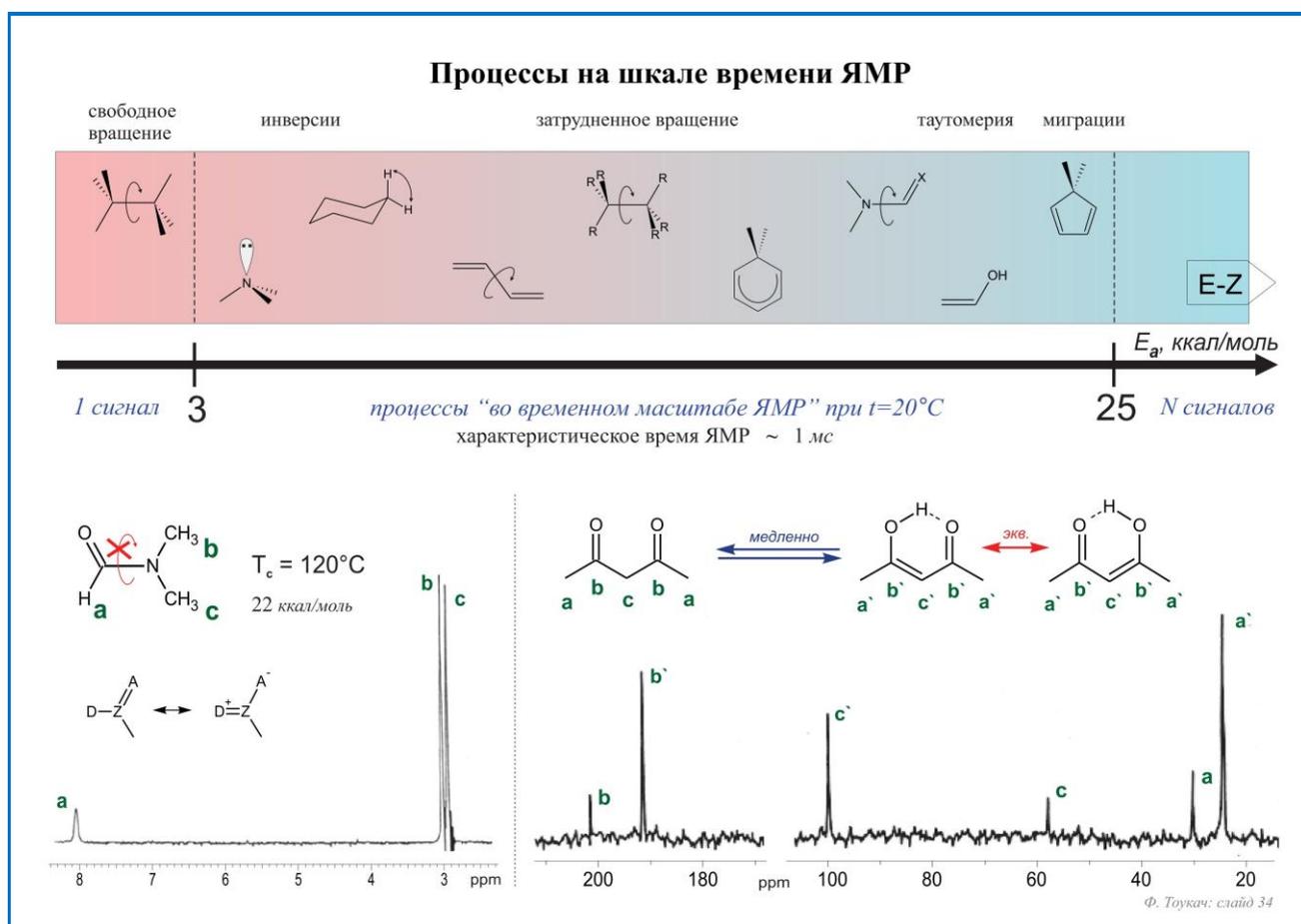
Это был теоретический пример [слева], **а это [справа]** - реальный пример. Обмен в данном случае внутримолекулярный. Здесь есть два вида протонов: аксиальные и экваториальные (на «мостике» в буйвалене). В зависимости от температуры спектр меняется очень показательно. При высокой температуре волнообразные движения мостиком [показывает руками] в буйвалене происходят быстро, и поэтому в ЯМР мы видим усредненную картину, один протон. Так, как если бы буйвален был плоским. А при комнатной или даже чуть более высокой температуре мы видим два сигнала в разных местах, которые щепятся друг на друга, поэтому являются дублетами. Один из них – от двух аксиальных протонов, а другой от экваториальных.

Обмен не обязан быть внутримолекулярным. Собственно, пример межмолекулярного обмена с углеводами и водой у вас уже был. Возможен межмолекулярный обмен как между молекулами образца (между собой), так и с растворителем. Вот пример (в зеленой рамке) того, как будут выглядеть спектры этанола в разных условиях. Вверху – абсолютный этанол. В нем нет обмена; обмен между гидроксильными группами катализируется даже небольшим количеством (кислых) протонов $[H^+]$ в растворе. Если нет кислых протонов, «все на всем щепится», в том числе $>CH_2$ на $-OH$ и наоборот, мы наблюдаем такие сигналы [первый спектр сверху]. Теперь, что произойдет, если мы чуть-чуть подкислим [раствор]? Тем самым мы катализируем межмолекулярный обмен между протонами гидроксильных групп. Исчезнет константа $[K_{ССВ}]$ между $-OH$ и $>CH_2$, будет вот такой спектр [второй сверху]. В обычных условиях мы такой спектр чаще всего и видим. Теперь дальше. Это [третий сверху] - гипотетический случай, но тем не менее его можно воспроизвести в реальности: нет обмена, но при этом есть вода. У нас будет отдельный сигнал воды и отдельный сигнал $-OH$, и, естественно, остальные сигналы. Как вы думаете, как это можно сделать, чтобы не было обмена, но была вода? (В воде же есть ионное произведение H^+ на OH^- , которое отлично от нуля, то есть всегда есть такая «примесь» $[H^+]$ в воде, и она катализирует обмен). Итак, как сделать, чтобы вода была, а обмена не было? У кого есть идеи? (...) Надо налить воду в тонкую ампулу и вставить ее внутрь толстой ампулы, а между стенками налить этанол, чтобы они [жидкости] чисто механически не могли смешаться друг с другом, но обе попали в рабочую область датчика. Тогда мы будем наблюдать такой спектр [третий снизу]. Там вода и этанол физически разделены в пространстве стеклянной стенкой. А обычный случай - это когда они смешаны [четвёртый сверху], и обмен есть, и константа на OH -группе нет, поэтому мы наблюдаем один сигнал. Вот он у нас по отношению к этим [изолированным] где-то посередине. Естественно, где именно он будет [находиться], зависит от соотношения [воды и этанола]. Если больше воды, он будет ближе к тому месту, где была вода. Если больше этанола, ближе к тому месту, где был этанол. Вот это формула для химического сдвига; это то же самое, что я уже словами говорил, что результирующий химический сдвиг окажется в условном «центре масс» всех участвующих сигналов.

#34 Для того, чтобы использовать эти знания в контексте определения структуры молекул, хорошо бы представлять энергии различных обменных процессов, и где они находятся на шкале времени ЯМР. Эти энергии приведены ниже. Слева «горячие» процессы, то есть быстро протекающие, с низкой энергией [перехода], а справа – «холодные», медленные, высокоэнергетические. Для того, чтобы происходил высокоэнергетический обмен, нужно сильно нагревать [образец]. Вся шкала обменных явлений в ЯМР лежит в диапазоне от 3 до 25 ккал/моль. То есть 3 ккал/моль – это, по сути, свободное вращение, практически нет барьера [между ротационными]. А 25 ккал/моль – это уже очень большой барьер, мы не сможем так нагреть, чтобы его преодолеть. То есть молекула раньше развалится, или растворитель выкипит, или что-то еще произойдет. Поэтому процессы, интересные нам с точки зрения анализа обменных явлений – это процессы лежащие в этом диапазоне [3-25 ккал/моль].

Что это за процессы? Инверсия азота – из легко происходящих обменов (инверсия азота и инверсия циклогексанового кольца). Здесь это не сам циклогексан, а какое-то замещенное [производное]. Если он не замещенный, он скорее в эту область [<3 ккал/моль] попадет, туда же, куда и свободное вращение. В обычном циклогексане один сигнал, это значит, что для ЯМР он плоский. То есть, он так быстро меняет свою конформацию, что ЯМР видит усредненную картину - плоский шестичленный цикл (хотя в действительности он, конечно же, не плоский). Следующее – это уже заметные барьеры, например, одинарная связь, расположенная между двумя двойными. Две двойные [связи] чаще всего сопрягаются друг с другом, и поэтому вращение вокруг

этой [одинарной] связи затруднено, и мы видим два изомера. То же касается обычной одинарной связи с объемными заместителями. Здесь они «цепляются» друг за друга и не дают этой связи проворачиваться. Так, что еще есть? То же самое, только с азотом⁵⁹. Два вида миграций [протона] в полуароматических системах: в шестичленном цикле полегче, а в пятичленном цикле потяжелее, но тем не менее, они происходят. Вот этот протон обегает все кольцо, точнее даже не обегает, а просто делокализован, с некоторой вероятностью находится при каждом атоме углерода. Но, играя с заместителями и температурой, можно зафиксировать эту пару протонов [вверху цикла] в каком-то одном положении и увидеть спектр [этого таутомера] как индивидуального соединения. Ну и наконец, кето-енольная таутомерия. Если в молекуле в равновесии присутствуют обе формы, то и в ЯМР мы чаще всего видим обе. Но барьер не настолько велик, чтобы нельзя было понять, два это разных сигнала или две разные формы (кетон и енол). Что для этого можно сделать? Нагреть и посмотреть, меняется ли спектр. Если он меняется, то те сигналы, которые меняются - это сигналы обменивающихся протонов. Вот этого протона [-ОН] в данном случае. А если не меняются, значит, эти сигналы принадлежат чему-то другому. Если нам нужно упростить спектр – нагреваем [образец], и видим равновесное состояние. А уж до какой температуры нагревать придется, уже зависит от того, смотря какое соединение. Итак, при комнатной температуре переходная область – вот эти процессы [от 3 до 25], а характеристическое время, связанное с энергией этих процессов – 1 мс. То, что происходит быстрее, чем один раз в миллисекунду, мы чаще всего видим, как среднее. А то, что происходит медленнее, мы видим, как разные состояния. То есть как равновесную систему, в которой в определенных концентрациях присутствуют спектры молекулы в разных состояниях.

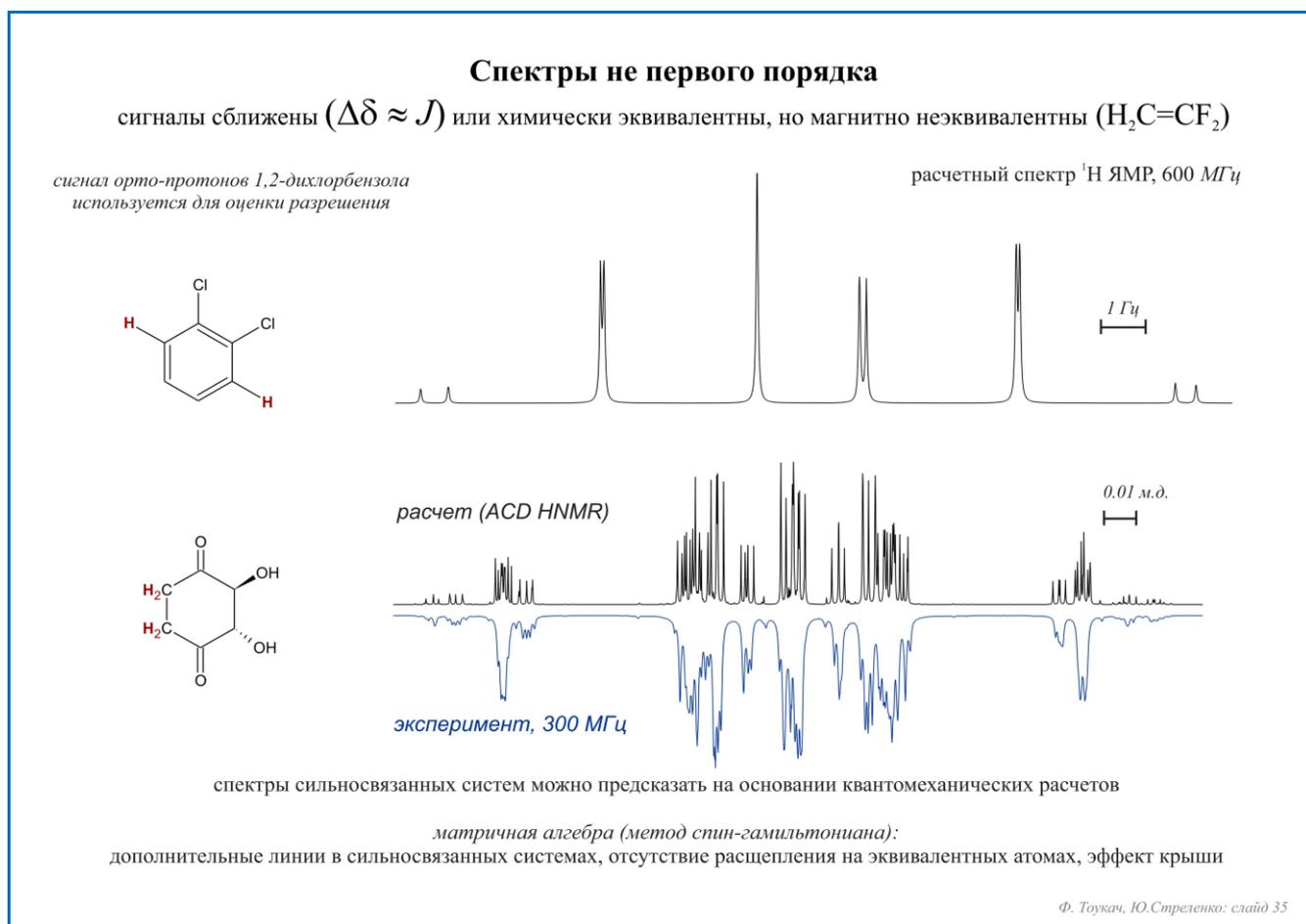


Опять же сверху – теория, снизу – практический пример. Вот такой диметилформамид, распространенная молекула. Равновесие в ней написано вот здесь (то, что с ней происходит

⁵⁹ Имеется в виду сопряжение двойной связи с неподеленной парой электронов на атоме азота.

[миграция заряда]). Барьер довольно высокий, вращения вокруг этой связи нет, неподеленная пара азота сопрягается со связью C=O. Я говорю «высокий», потому что здесь написано, что температура коалесценции – 120 °С. Значит его надо очень сильно нагреть, чтобы увидеть усредненную картину. В усредненной картине будет два сигнала: *a* и объединенный сигнал метильной группы. А при комнатной температуре сигналы *b* и *c* представляют собой отдельные синглеты. ...Я смотрю, что вы все время улыбаетесь, и думаю, что то ли на слайдах что-то не то, то ли на мне.

Другой пример. Вот такой дикетон, в котором тоже возможна кето-енольная таутомерия - как по одной группе, так и по другой. Причем эти две молекулы [по сторонам красной стрелки] – это одно и то же, можно их переворачивать [вокруг вертикальной оси для перехода друг в друга]. И резонансные структуры медленно переходят вот в такое состояние [слева]. Причем в отличие от диметилформамида здесь равновесные концентрации этих состояний не соотносятся как 1:1, что видно в спектре ¹³C из отношений высот сигналов. Вот эти нештрихованные буквы, концевые [*a*], средний [*c*] и два углерода *b*. Это маленькие сигналы, обозначены как *a*, *b* и [*a*]. А в этих состояниях [справа] атомы обозначены штрихами. Во-первых, эти два [состояния] одинаковы, потому что имеется химический резонанс (резонансные структуры) (...). Поэтому эти две молекулы [справа] дают нам один набор сигналов, и таких в равновесии явно больше, поэтому сигналы выше, и кроме этого они [сигналы] находятся в других местах [по отношению к нештрихованным]. Особенно «не повезло» сигналу *c*. Он съехал аж на 40 м.д., и поэтому это хороший пример, на котором видно, что равновесные состояния, обусловленные обменом, могут отличаться друг от друга очень сильно.



#35 Первая часть курса завершается двумя слайдами, один из которых - это пример очень сложного спектра, а другой - про водородные связи. В какой-то момент вашей работы вы можете столкнуться со спектрами не первого порядка, основной причиной возникновения которых является близость разницы химических сдвигов к величинам констант спин-спинового взаимодействия.

Другой вариант – это когда мы имеем химически эквивалентные, но магнитнонеэквивалентные ядра. Пример простейшей молекулы, в которой такой случай реализуется, написан в скобках в углу слайда. Но здесь я специально привел пример молекулы, у которой абсолютно непредсказуемый спектр, далеко не первого порядка. Эта молекула [*орто*-дихлорбензол], благодаря своему необычному спектру, используется для калибровки спектрометров и настройки разрешения. Когда продают спектрометр, к нему прилагается запаянная ампула с этим соединением, и в идеале, если все настроено абсолютно идеально, то должен получиться такой спектр [вверху]. Предсказать его на пальцах, исходя из расщепления, невозможно. Здесь ни одно из расстояний между парами линий не равно [какому-либо] другому, как должно быть в спектре первого порядка. И сигналов явно больше, чем нужно [в спектре первого порядка]. То есть это все, по сути - один сигнал очень сложной формы, которую можно только квантово-механическими методами⁶⁰. Здесь для [случая] идеального разрешения идеального образца нарисован расчетный спектр [вверху]. Обратите внимание, что масштаб - 1 Гц. Естественно, в реальном образце мы это [любая группа близкорасположенных линий] увидим как одну линию (вот эти три составляющих), поскольку это [расстояние между соседними линиями] - меньше 0.1 Гц. А вот такие [правая и левая группы из двух линий], у которых расстояние между линиями ~1 Гц, скорее всего, на этом специальном техническом образце мы увидим, поскольку он текучий и специально «обезгаженный» (то есть из него удалены газы, которые ускоряют релаксацию, в первую очередь парамагнитный кислород). Он релаксирует медленно, и если эксперимент поставить правильно, на нем можно видеть очень высокое разрешение и узкие линии.

Значит был технический пример. А это [внизу, черным] - реальный пример, тоже чем-то похожий. Здесь я посчитал спектр в ACD Labs⁶¹, и он получился весьма сложным даже в расчетном виде. Не ясно, имеет ли смысл [пытаться] интерпретировать такую картину. С другой стороны [внизу, синим] - экспериментальный спектр, снятый с реальным разрешением, в реальном растворе. Вот он смотрит вниз. Если поставить один над другим и посмотреть «как бы издали», то видно, что один - практически как отражение другого в неспокойной воде. То есть, каждый отдельный сигнал не интерпретируется с точки зрения структуры, но в целом даже невооруженным глазом видно, что расчет подтверждается экспериментом, поскольку группы сигналов [находятся] примерно в тех же местах, имеют примерно те же площади (а что касается тонкой структуры - здесь повлияли эффекты, связанные с шириной линий). Наверняка существует математическая метрика, с помощью которой можно два этих спектра сравнить⁶². То есть, этот [нижний] перевернуть, каждый квантизировать с какой-то частотой, в каждой точке посмотреть разницу по вертикали, а потом [эту разницу] усреднить⁶³. Что-то такого типа в MATLAB'е можно сделать, но это было опубликовано именно в таком виде, здесь даже и не понадобилось математического подтверждения того, что эти две картинки похожи, поскольку это и так ясно.

Итак, что делать, если у вас такая молекула, и вы наблюдаете очень сильно связанную систему, в которой много атомов, все они взаимодействуют друг с другом, находятся в близких областях химических сдвигов, и поэтому получается спектр не первого порядка? Тогда, собственно, возьмите вот этот ACD ¹H NMR, посчитайте и посмотрите. Оно может с высокой вероятностью не совпасть, тогда нужно подкорректировать химические сдвиги. Химические сдвиги вы можете [для симуляции спектра] указать в явном виде, исходя из того, что вы здесь [в экспериментальном

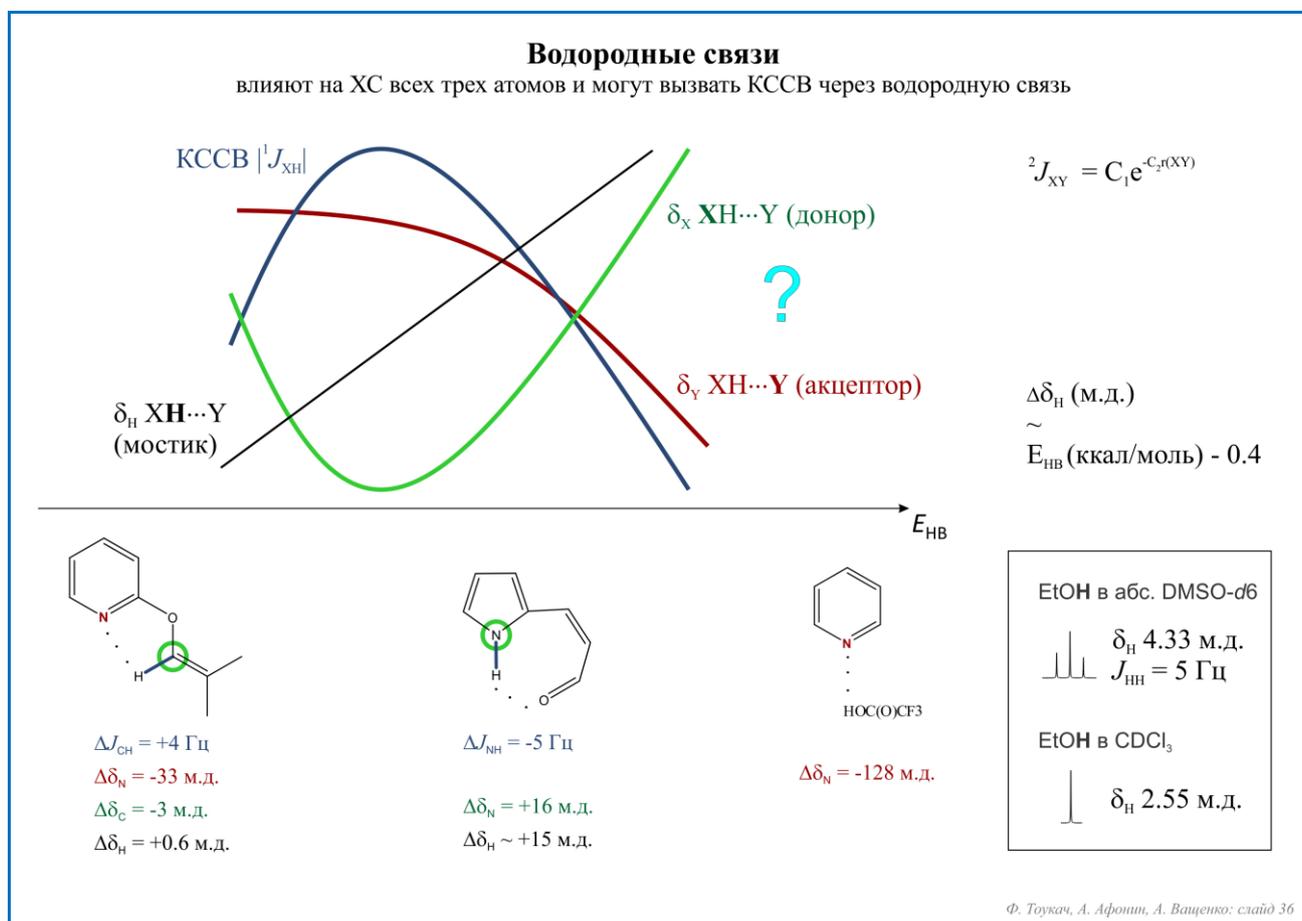
⁶⁰ Методом спин-гамильтониана (матричная алгебра) - тоже можно.

⁶¹ ACD Labs ¹H NMR Predictor, версия 12

⁶² деконволюция + вычитание

⁶³ перед сравнением потребуется еще нормализовать амплитуду

спектре] наблюдаете. Просто даже если вы не знаете, какой протон в какой области находится, здесь их не так много, и можно перебрать несколько вариантов, в таблице [сигналов] в ACD Labs «поиграться», подобрать химические сдвиги так, чтобы было совпадение. Если хотя бы при каком-то значении химических сдвигов у вас получится **вот такая совпадающая картинка [внизу на слайде]**, значит, форма линий, предсказанная теоретически, примерно соответствует эксперименту. То есть спектр соответствует структуре. Метод, которым она [программа-симулятор из пакета ACD Labs] это делает, называется «метод спин-гамильтониана». Это слово может понадобится вам только для того, чтобы идентифицировать, подходит софт или не подходит. Если там это слово есть, то для предсказания формы линии сигналов сильно связанных систем софт подходит. А если нет, то как повезет.



#36 Наконец последнее, что касается корреляции одномерных спектров со структурой - это влияние водородных связей. Здесь я попытался подытожить основные закономерности. Их пять: **четыре графика** и **формула**. Вот **это [синий график]** - **прямая константа [КССВ]** между протоном и гетероядром, участвующем в образовании водородной связи. Она сначала растет, а потом уменьшается. По горизонтали – энергия водородной связи. Как предсказывать эту энергию, глядя на молекулу, я честно говоря, не знаю. Но, во-первых, это можно сделать с помощью программ, а во-вторых, если вы часто работаете с водородными связями, вы запоминаете, в каких случаях она более высокоэнергетическая, а в каких - менее.

Теперь следующее, химические сдвиги. Химический сдвиг мостикового [атома] водорода прямо **линейно зависит [черный график]**. Чем выше энергия водородной связи, тем больше химический сдвиг. А в случае с химическими сдвигами **донора [зеленый]** и **акцептора [красный]** зависимости противоположные (почти). Только с некоторой вероятностью (как мне кажется, ~0.1) я

мог перепутать их местами, поэтому на всякий случай я поставил знак вопроса. Если ваши знания позволяют вам подтвердить или опровергнуть это предположение, сделайте это. (...)

Эту формулу [справа вверху] я нашел в учебнике. Это константа через две связи (одна из которых – обычная, а другая – водородная) между участвующими в образовании водородной связи атомами X и Y. $r(XY)$ – расстояние между ними. Здесь величина константы спин-спинового взаимодействия однозначно зависит от расстояния. Но, естественно, величины коэффициентов C_1 и C_2 находятся в зависимости от того, какие атомы [расположены] на местах X и Y, и что вокруг них находится. Может быть, (...) будет полезно одно эмпирическое наблюдение [справа по центру], которое даже формулой назвать нельзя. То насколько «съедет» протон в результате образования водородной связи по отношению к своему положению, когда он находится на одном из этих атомов, примерно равно (в миллионных долях) энергии водородной связи в ккал/моль минус 0.4. Естественно, это не формула, поскольку размерности у этих величин разные, но численные значения примерно равны, и для самой грубой оценки вам это наблюдение может подойти.

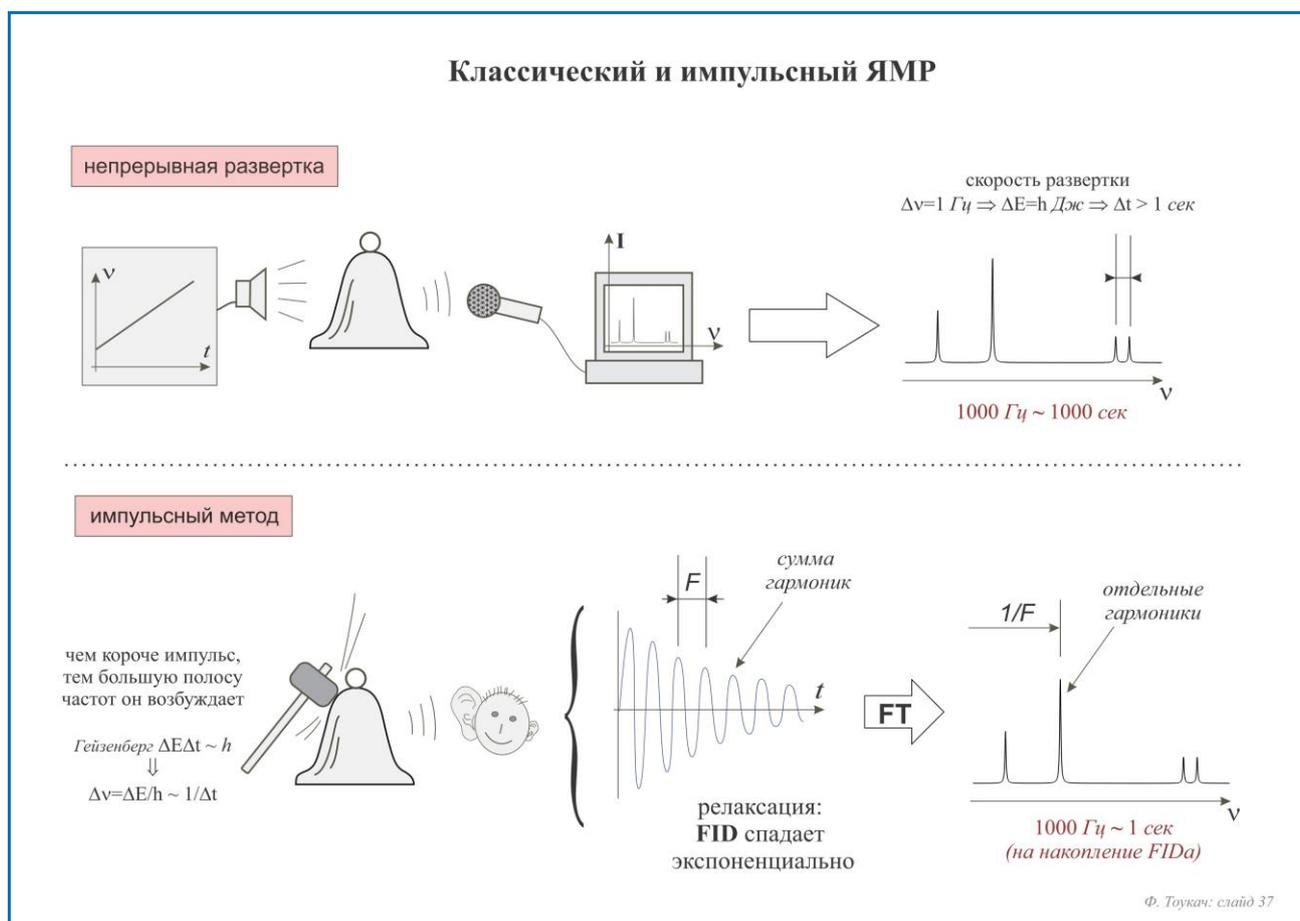
А можно воспользоваться примерами, то есть посмотреть, на что больше всего похожи ваши молекулы, из того что вы найдете в справочниках или на этом слайде. И прикинуть, как изменится. [Рассмотрим] образование водородной связи в данном случае [слева внизу]. Они довольно далеко находятся (СН-протон и азот). Вот эта [синяя связь] константа спин-спинового взаимодействия увеличилась на 4 Гц, и протон «съехал» на 0.6 м.д. В общем-то, не так уж и много, и углерод [зеленый] тоже ненамного «съехал» (на -3 м.д.), зато азот [красный] «съехал» прилично, уменьшился на 33 м.д. Это в спектре по ^{15}N . А в каких-то других случаях химический сдвиг протона может очень сильно измениться, если этот атом [акцептор водородной связи] подойдет к нему близко. Причем это, строго говоря, даже необязательно должно происходить в пределах одной молекулы. Но чаще всего, конечно, внутримолекулярное. Этот протон [пример по центру внизу] «уехал» на 15 м.д. И наконец, межмолекулярный пример [пиридин и трифторуксусная кислота], когда водородная связь связывает между собой две разных молекулы. Здесь им геометрия молекулы не мешает подойти настолько близко, насколько позволяют электронные облака. Поэтому [здесь] очень сильны изменения химического сдвига при азоте, но это случай как раз крайний, чаще всего [изменение] будет меньше.

Опять же мой любимый пример, этиловый спирт [справа внизу]. Эти значения вам, скорее всего, могут попасться в реальных спектрах, поскольку примесь этанола бывает часто, особенно если [продукт реакции] сушат из этанола или ампулы им моют (...). В абсолютном ДМСО, где проявляется константа спин-спинового взаимодействия, химический сдвиг [гидроксильного протона] вот такой [4.33]. А в CDCl_3 - вот такой [2.55]. Так, секундочку... ладно, вопрос, почему это синглет, мы оставим на будущее, пока нет ответа⁶⁴.

Теперь у нас начинается вторая из трех частей курса. Первая часть – это были одномерные спектры и их связь с молекулярной структурой. Вторая – это физические основы, плавно переходящие в идеи двумерных экспериментов. И третья – это интерпретация двумерных спектров, опять же в контексте молекулярной структуры. Вторая часть (две лекции или около того) - это то, откуда берутся ЯМР-спектры, какие физические явления служат причинами их появления, и как их регистрировать. Все это я постараюсь [объяснить] более или менее «на пальцах», без математики. Там, где мы будем упираться в необходимость применения сложных математических выкладок,

⁶⁴ Потому, что хлороформ не абсолютный, и примесь воды катализирует обмен гидроксильных протонов, приводящий к исчезновению спин-спинового взаимодействия.

будем заменять [рассуждения] на слова «отсюда очевидно следует, что»... А как именно это следует, вы сможете прочитать в учебнике. Но и вопросов, для [ответов на которые] нужно читать учебник, на экзамене не будет. То есть для вас главное – чтобы было общее понимание, представлять, какие величины друг с другом связаны, что такое магнитные и электрические поля, как они участвуют во всем этом, как ведет себя намагниченность образца на качественном уровне, и так далее.



#37 Итак, у нас есть образец, помещенный в магнитное поле, и какие-то частоты, на которых происходит резонанс. Самый простейший и очевидный способ получить спектр – это поместить образец в магнитное поле и облучать его в некотором диапазоне частот, соответствующим интересующему нас ядру, все возрастающей радиочастотой. И в какой-то момент, когда частота облучения будет совпадать с резонансными частотами спиновых переходов, мы будем наблюдать поглощение энергии и регистрировать его в виде «всплеска». Теперь посмотрим, что произойдет, если мы эту развертку по частоте сделаем слишком быстро. Допустим, у нас есть **две линии**, между которыми расстояние - 1 Гц. Для того, чтобы они в спектре разрешились, нам нужно **этот спектральный диапазон [между стрелками справа вверху]** пройти не быстрее, чем за одну секунду. Почему так происходит? Потому что разница в частоте в 1 Гц, это разница в энергии в $h \text{ Дж}$ ⁶⁵ ($E=h\nu$), а энергия и время – две величины, связанные принципом Гейзенберга. То есть увеличение неопределенности по времени приводит к уменьшению неопределенности в энергии и наоборот. Их нельзя одновременно измерить точно (так же как координаты и скорость в микромире). Поэтому для получения разрешения в 1 Гц в частотном спектре, нам нужно каждый одногерцевый интервал в развертке пройти за одну секунду или медленнее. И это накладывает ограничения на скорость (на время эксперимента). Поскольку, например, 1 м.д. – это, при частоте прибора 100 МГц, равно 100

⁶⁵ Постоянная Планка

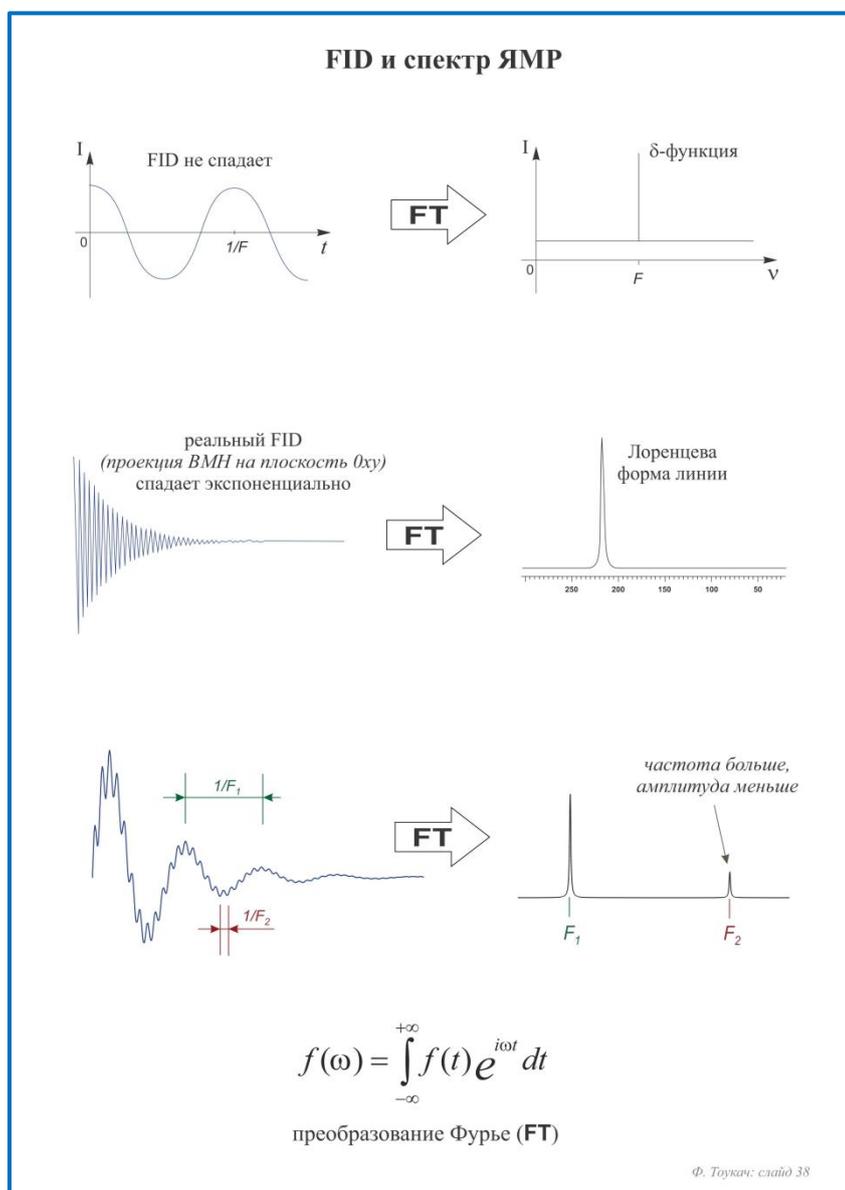
Гц.⁶⁶ Значит, 10 м.д. (характерная величина спектрального окна для протонов) – это 1000 Гц. И значит, чтобы получить протонный спектр с разрешением 1 Гц, нам нужно делать эту развертку не менее тысячи секунд. То есть >15 минут на один скан. В случае протонов это еще ничего, одного скана может быть достаточно для получения спектра, а если это ¹³C, где чувствительность в десять тысяч раз меньше (абсолютная - за счет гиромангнитного отношения; и [относительная] за счет природного содержания), то с одного скана мы уже не получим хорошее отношение сигнал/шум. Вообще сигналов можем не увидеть, то есть сканов нужно будет делать много. А если каждый [скан] занимает 15 минут, то [эксперимент] растянется на очень длительное время. За это время или поле уедет, или образец разложится, или оператор умрет, или что-то еще произойдет, и спектр мы в результате не получим. Поэтому делают иначе.

Для того, чтобы продемонстрировать то, как это делают, я приведу пример из Дероума. Резонансные частоты в образце – это некие колебания магнитного поля, которых в одной молекуле присутствует много. И попытка получить спектр – это фактически попытка узнать, на каких «нотах» эта молекула «звучит», то есть какие частоты являются для нее характерными. Та же самая задача возникает и при настройке колоколов – звуковых, я имею в виду. Колокол – это некое устройство, в котором тоже есть различные частоты. Для того, чтобы его правильно настроить, с него срезают бока или еще какие-то куски и слушают, на каких частотах он звенит. Но метод с **непрерывной разверткой [верхняя часть слайда]**, про который я говорил пару минут назад, это то же самое, что если мы с одной стороны поставим динамик и будем постепенно повышать на нем высоту тона, а с другой стороны поставим микрофон. И когда частота излучения совпадет с какой-то из нот, на которой способен звучать колокол, он откликнется, микрофон этот отклик «увидит», и у нас будет сигнал. Но ни один настройщик колоколов так, естественно, не делает. Если он не лишен музыкального слуха, он делает **вот так [нижняя часть слайда]**. Бьет по колоколу кувалдой и слушает. И все частоты слышит одновременно, как-то ему это удается сделать. То есть должен существовать способ, непоследовательно получать отклики, а одновременно. Такой способ действительно есть. И сводится он к записи амплитудно-частотной характеристики. Звучание колокола – это постепенно затухающий сигнал, который является суммой синусоид; каждая синусоида соответствует одной ноте. Но ноты имеют частотные выражения в частотном спектре, а на временной шкале **это что-то вот такое [символический FID по центру внизу]**, только здесь я одну [синусоиду] нарисовал для примера, а на самом деле их много. И **вот это все** - сумма синусоид. И у **этого слухача** в голове на самом деле происходит преобразование Фурье - математическая операция, которая переводит данные из временной шкалы в частотную, то есть позволяет по звуку услышать ноты. То же самое [происходит и] в электромагнитном контексте. Образец откликается всеми электромагнитными частотами на **это** воздействие, а после мы [его отклик] оцифровываем и подвергаем Фурье преобразованию, переводя данные во временной шкале в данные в частотной шкале. Ограничение на одну секунду для разрешения в 1 Гц здесь все равно сохраняется, но нам не нужно все одnogерцевые интервалы проходить последовательно, поскольку мы накапливаем все частоты одновременно. Это ограничение выражается лишь в том, чтобы **этот сигнал [FID]** существовал и был накоплен не меньше, чем за 1 сек - тогда мы получим разрешение 1 Гц.

Теперь, что такое аналог удара кувалдой по колоколу? Это облучение мощным электромагнитным импульсом, который возбуждает широкую полосу частот. Для того, чтобы эта полоса частот была достаточно широкой и включала в себя все возможные сигналы атомов этого типа, импульс должен быть коротким. По той же самой причине (по принципу неопределенности

⁶⁶ Лектор ошибся ровно в 10 раз, но смысла рассуждения это не меняет. Величины в тексте исправлены и приведены в соответствие друг с другом.

Гейзенберга), чем короче импульс, тем больше определенность по времени, и значит, меньше определенность по частоте, то есть шире диапазон частот, который этот импульс возбудит в образце. Итак, мы пришли к идее импульсного метода: 1) Кратковременное облучение мощным электромагнитным импульсом для возбуждения всех сигналов одновременно; 2) Наблюдаем, как образец релаксирует, испуская эти частоты в виде колебаний электромагнитного поля. Мы их записываем с помощью катушек и оцифровываем; 3) Полученный массив чисел подвергаем преобразованию Фурье, и на выходе получается то же самое, что было бы [здесь \[спектр справа вверху\]](#), только в тысячу раз быстрее. За эту идею господин Эрнст получил «Нобелевку»⁶⁷, придумав [импульсный ЯМР] в середине 70-х годов.



#38 Для лучшего понимания связи между сигналом во времени и спектром по частоте [рассмотрим], во-первых, некоторые определения. Вот это слово «FID» – это как раз и есть этот сигнал [во времени], free induction decay или по-русски «спад свободной индукции». Это то, что связано Фурье преобразованием со спектром ЯМР. Существует операция обратного Фурье преобразования, то есть из спектра можно обратно получить FID, и это тоже происходит однозначно. [\[В верхней части слайда показан\] гипотетический случай](#), когда FID имеет одну синусоиду (один сигнал), и он не спадает во времени. Этот случай - действительно гипотетический, поскольку любой образец после поглощения энергии импульса постепенно рассеивает эту энергию, то есть происходит релаксация, и интенсивность колебаний, так же, как и в колоколе, постепенно затухает. В реальном образце FID всегда спадает, [вот как здесь нарисовано \[по центру\]](#). Причем спадает он экспоненциально (как и все спадающие процессы в природе,

по-моему). Если провести линию [по этим вершинам](#) (она называется «оггибающая»), то она будет [описываться формулой] «e в степени минус что-то». Так вот, если FID не спадает, то его Фурье-образом является [δ-функция](#) (нули-нули-нули и в одной точке бесконечность). Но поскольку FID всегда спадает, получается [Лоренцева форма \[линии; по центру справа\]](#) – линия имеет ненулевую ширину. [Вот это \[δ-функция\]](#) - фактически линия с нулевой шириной, а [это \[Лоренцева\]](#) - линия с ненулевой шириной. Чем быстрее FID спадает, тем линия получается шире. Это как раз и отражает

⁶⁷ по химии в 1991-м году.

физическую природу сигнала и того, как в его формировании участвует принцип неопределенности. Если FID спал быстро, значит, у нас есть определенность во времени, значит, после Фурье преобразования будет неопределенность по частоте, то есть широкие сигналы. Поэтому, чтобы иметь узкие линии, нам нужно по возможности сделать так, чтобы FID спадал медленно. Это не всегда можно сделать, поскольку [скорость спада свободной индукции] зависит от природы вещества (от скорости релаксации), но нужно хотя бы не прерывать накопление, пока FID не спал до нуля сам (хотя в каких-то случаях это можно делать; мы отдельно это рассмотрим).

Теперь что такое FID в физическом смысле? Образец в приборе (в ампулах), «стоит» вертикально, а магнитное поле – векторная величина, которую создает прибор, у нее есть направление и напряженность. Направление у [этого вектора] всегда от пола к потолку. То есть прибор конструктивно так сделан, что вектор магнитного поля смотрит вверх. А FID – это колебания намагниченности образца в горизонтальной плоскости, то есть в плоскости, перпендикулярной вектору (внешнего) магнитного поля. Как превратить эти колебания магнитного поля в сигнал? Вы, наверное, из курса физики 8-го класса знаете, что если разместить рядом с изменяющимся магнитным полем проводник, то в нем будет наводиться переменный ток. А если магнитный момент вращается (имеет «вращающуюся» природу), (наведенный) переменный ток будет представлять собой синусоиду⁶⁸. Переменный ток (колебания напряжения во времени) можно записать и оцифровать. Это, собственно, и будет FID. А геометрически эти проводники расположены относительно образца так, что записываются именно колебания намагниченности образца в горизонтальной плоскости. То есть проекция намагниченности на ось X или на ось Y. **Вот это слово** - не «би-эм-эйч», а **вектор макроскопической намагниченности**. Чуть-чуть попозже я расскажу, что это такое, а на данном этапе вам нужно знать, что это собственная намагниченность образца, которая возникла в нем после импульса. Она как-то колеблется, меняется, двигается в пространстве, и с помощью электрических катушек мы наблюдаем проекцию этой намагниченности на горизонтальную плоскость и записываем ее в виде FIDa.

Вот еще пример [внизу слайда]. Здесь две частоты. Один сигнал имеет большой период (низкую частоту) и большую амплитуду, **вот эта** составляющая, большая волна. **Вот он после Фурье преобразования [F₁]**, его частота меньше, амплитуда больше⁶⁹. А другой сигнал (**вот его период**) - это частая «гребенка» (высокая частота) и «гребенка» невысокая, то есть амплитуда меньше. **Вот получился сигнал [F₂]**. Амплитуда меньше, значит, меньше сигнал, а частота больше, значит, на частотной шкале он находится где-то в другом месте. (...)

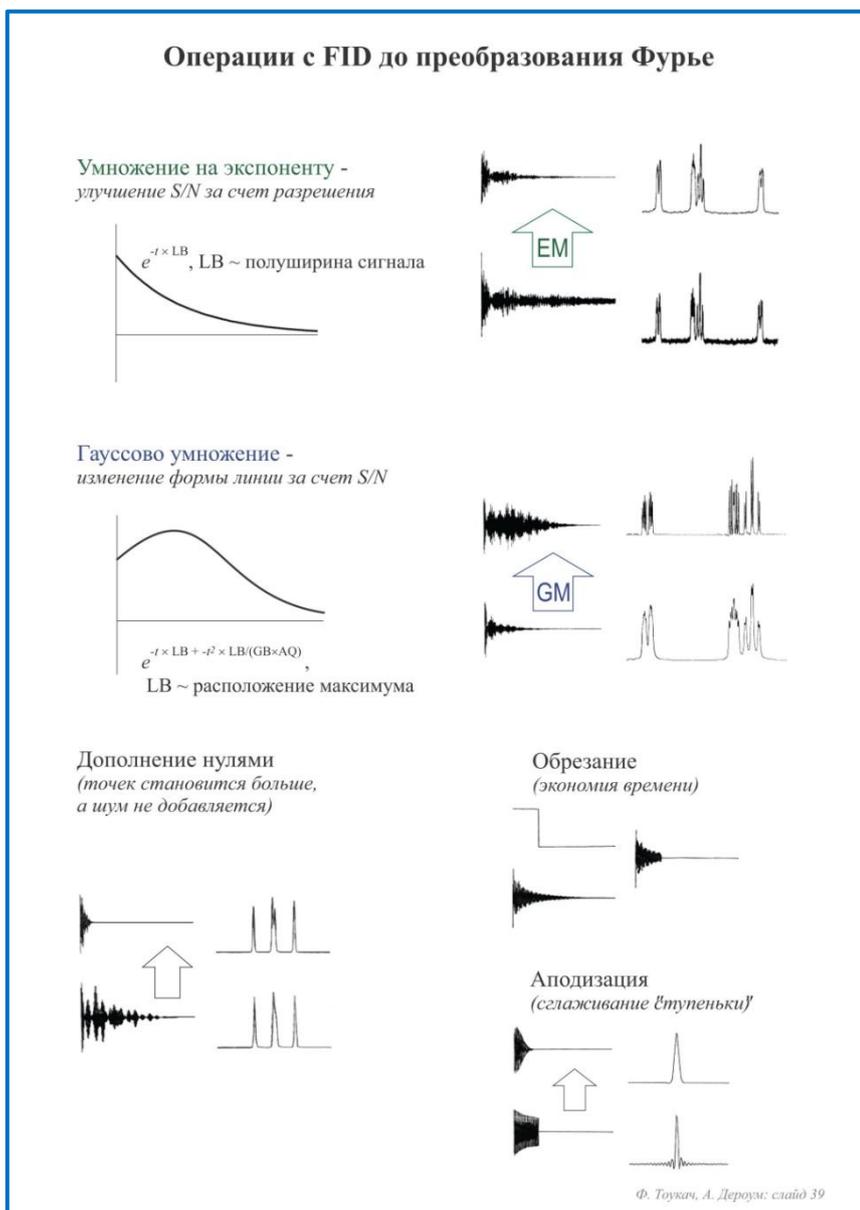
Само Фурье преобразование – это очень простая операция. И кажется даже, что оно было открыто не применительно к процессам происходящим в природе, а просто как математическая операция (возможно, она как-то связана с Фурье :)⁷⁰. Вот для него формула написана, но формула вам не понадобится, поскольку она больше относится к курсу математического анализа. Она была написана в незапамятные времена, по-моему, века два с половиной назад.⁷¹

⁶⁸ следует понимать, как «будет описываться синусоидальной зависимостью разности потенциалов от времени»

⁶⁹ Ось частоты здесь направлена слева направо (не так, как принято на спектрах ЯМР).

⁷⁰ кроме того, что названа в его честь. В 1821 г. Фурье доказал, что любую функцию можно представить, как серию синусоид, основанное на этом преобразование Фурье было применено для гармонического анализа физических сигналов позже.

⁷¹ в конце XIX века



#39 Перед тем, как делать Фурье-преобразование для получения спектра из FIDa, можно с ним [с FIDом] провести различные «фокусы» для того, чтобы спектр больше соответствовал задачам, которые требуется решить. Три основных «фокуса» перечислены здесь; они называются «взвешивающими функциями»⁷².

Это что-то, на что мы умножаем FID перед тем, как делать Фурье преобразование. Первый пример – это **умножение на экспоненту [EM]**. Вот она **нарисована**, у нее один параметр, который традиционно называется LB. Что будет, если мы умножим FID на экспоненту? Мы повысим вклад начала FIDa и понизим вклад хвоста FIDa. В начале FIDa сигналы больше (больше их амплитуда), а в хвосте - меньше. А шумы имеют случайную природу, поэтому интенсивность шумов одинаковая, что в начале, что в хвосте. Значит, в начале FIDa, то есть ближе к нулевому моменту времени отношение сигнал/шум будет лучше.

И постепенно, по мере прохождения времени оно будет все ухудшаться, вместе с затуханием FIDa. Поэтому, повысив вклад начала FIDa, мы можем улучшить отношение сигнал/шум. Но за это придется платить. По сути у нас будет тот же самый эффект, как если бы FID спадал быстрее. Если мы умножили на спадающую экспоненту, получается, что **сигналы уменьшаются [и исчезают] быстрее [FID и спектр над стрелкой EM]**. То есть мы тем самым эмулируем быструю релаксацию, что приведет к уширению линии по причинам, рассмотренным на предыдущем слайде. Итак, если мы умножим FID на экспоненту этой операцией (она называется «exponential multiplication»), мы получим улучшение отношения сигнал/шум и ухудшение разрешения. Как правило, это оправданно в спектрах ¹³C, где отношение сигнал/шум важно, а разрешение не важно.

Раз можно **сделать так [EM]**, значит, можно сделать и наоборот – умножить FID на возрастающую функцию, повысив вклад хвоста. Тогда у нас, наоборот, FID станет как бы длиннее, то есть мы эмулируем медленную релаксацию, линии станут уже. Но при этом за счет увеличения вклада хвоста FIDa в результирующий сигнал мы получим ухудшение отношения сигнал/шум. Это называется «gaussian multiplication» [GM]. Но не просто на возрастающую, а на **возрастающую и потом спадающую** для того, чтобы в конце не было ступеньки. Потому что если мы просто умножим

⁷² В зависимости от программы: Weighting functions или Window functions.

FID на возрастающую функцию, то **вот здесь [в конце]** будет ступенька, и после Фурье преобразования из ступеньки получится, все сигналы будут **вот такие [справа внизу]**. Причем величины этих виглей могут быть очень большие. (...). Может быть, математически не точно, но примерно произведение Фурье-образов похоже на Фурье-образ произведения⁷³. (...) Это значит, что если мы умножим FID на ступеньку, а потом сделаем Фурье преобразование **вот такой [справа в блоке «обрезание»] функции**, мы получим примерно тот же самый спектр, как если бы мы, наоборот, сделали Фурье преобразование этого отдельно, этого отдельно, а потом их перемножили. Поскольку Фурье-образом ступеньки является $\sinh()$ (интегральный синус), это примерно **такая волна**. В силу этой «псевдокоммутативности» все сигналы будут похожи на [график] функции интегрального синуса⁷⁴ и иметь вигли у основания. Иногда настолько большие, что из-за них мы не сможем понять, где заканчивается один сигнал и начинается другой, поэтому ступенек надо избегать. Для этого их сглаживают, умножая FID на функцию вот такого типа [показывает рукой ниспадающую волну]. Для того, чтобы скомбинировать это с умножением на возрастающую функцию, применяем **эту формулу [под графиком в блоке «гауссово умножение»]**; здесь не видно, но это экспонента – здесь $-t$ с одним коэффициентом и $-t^2$ с другим коэффициентом (t – это время). Получается в результате **вот такая функция, похожая на гауссиану**. Гауссово умножение приводит к уменьшению ширины линии, особенно внизу (на полувысоте она остается такой же) и к ухудшению отношения сигнал/шум. Это как раз хорошо в протонных спектрах, где важно разрешение, но в силу высокой чувствительности не так важно отношение сигнал/шум.

Таким образом, две этих взвешивающих функции [EM и GM] имеют противоположное действие. На что еще это влияет? Еще это влияет на точность интегралов. **Вот эта функция [GM]** ухудшает точность интегралов, поскольку основания линий перестают быть лоренцевыми. А **верхняя функция [EM]** улучшает отношение сигнал/шум, и, следовательно, улучшает точность интеграла. Если нам нужны и точные интегралы, и разрешение, мы можем снять FID, то есть снять [данные] один раз, получить сигнал [спада свободной индукции], а потом отдельно его умножить на **эту функцию [EM]** и сделать Фурье-преобразование (получить один спектр с хорошими интегралами), потом умножить **на эту [GM]**, тоже сделать Фурье преобразование (получить спектр с хорошим разрешением для какого-то его фрагмента). К примеру, укрупненные «растяжки» интересующих нас областей обрабатывать в **этом режиме [GM]**, чтобы видеть тонкую структуру линий, а общий обзорный спектр обрабатывать в **этом режиме [EM]**, чтобы иметь достоверные интегралы. Возможна ситуация: один FID – множество спектров с разными взвешивающими функциями. Все эти Фурье преобразования и умножения на взвешивающие функции вы можете делать сами у себя на компьютере. Для этого не требуется ни спектрометр, ни образец, ни оператор. Если он уже получил FID, то дальше с FIDом можно работать самостоятельно.

Следующее, что можно сделать. Иногда бывает, что нам не хватает точек. Число точек в FIDе определяется возможностями аналого-цифрового преобразователя прибора. И может оказаться так, что за то время, пока существует сигнал, у нас получилось [недостаточное для хорошего разрешения] количество точек (мы его не можем бесконечно увеличивать). И после Фурье преобразования у нас не хватит плотности точек для того, чтобы достоверно описать форму линии. Таким образом, нам нужно увеличить число точек. Что здесь можно сделать? Можно **дополнить FID нулями**, то есть по сути сделать его длиннее. При этом, во-первых, отношение улучшится сигнал/шум, потому что в

⁷³ Графики имеют визуальное сходство в случае FID и взвешивающих функций, но математически преобразование Фурье и умножение не коммутативны. Фурье-преобразование произведения функций является сверткой Фурье-преобразований этих функций. Вроде бы...

⁷⁴ Точнее будет похожа базовая линия по обе стороны от сигналов.

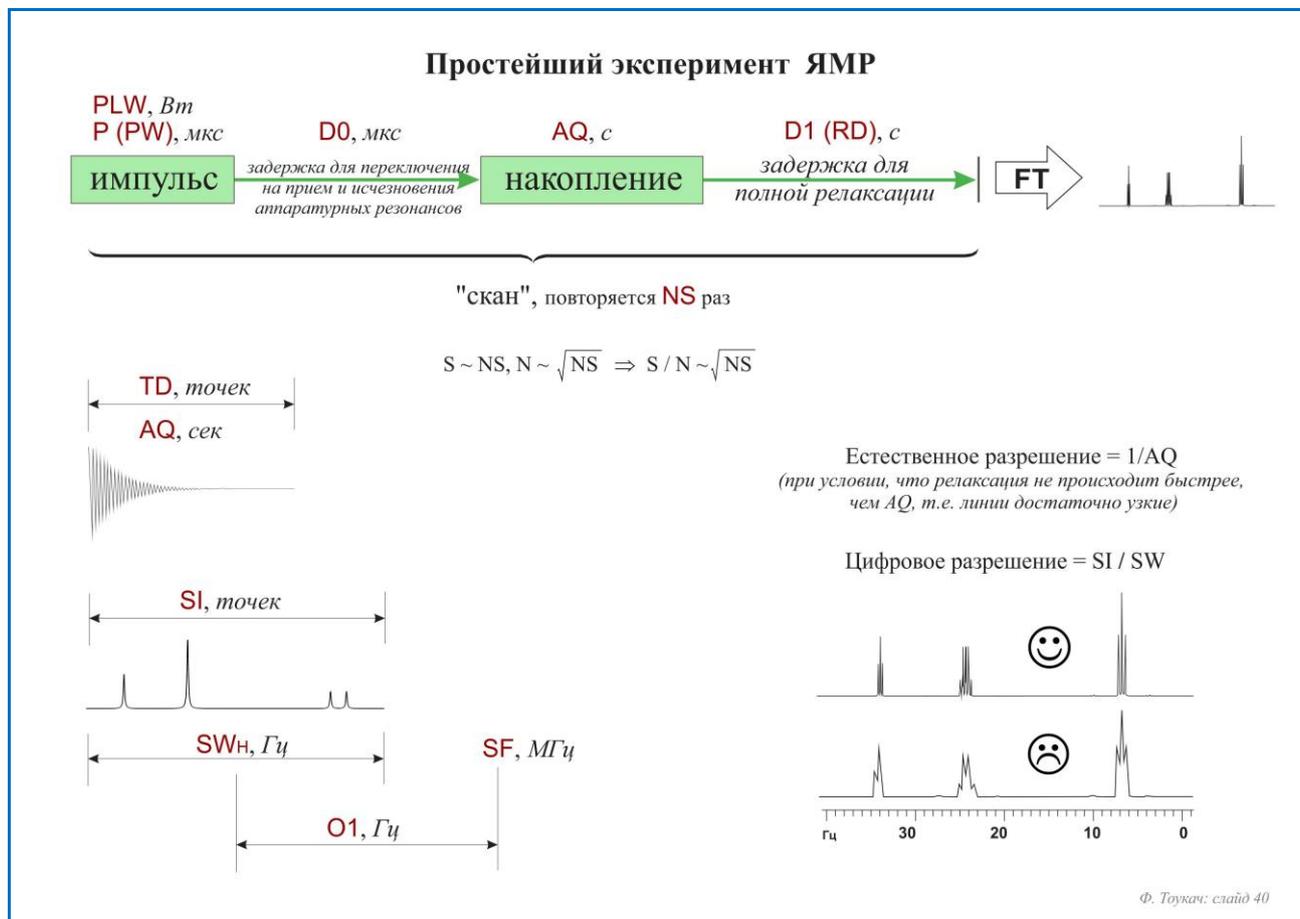
этой дополненной нулями области шумов вообще нет (это просто одни сплошные нули), а, во-вторых, цифровое разрешение увеличится, потому что точек будет больше, при этом линии шире не станут. Это [два FIDa] не в одном масштабе нарисовано. Вот эта штука [верхний FID] по отношению к этой [нижний] на самом деле длинная, и вот эта ее левая часть – это как раз вот это [исходный FID]. То есть мы не заставляем FID затухать быстрее, мы просто после того, как он уже затух сам по себе почти до нуля, дополнили его длинной вереницей нулей, увеличив тем самым количество точек. И спектр улучшился, здесь [внизу] бугор какой-то был, а здесь [вверху] появились впадины между линиями.

Обрезание и аподизация – это просто для того, чтобы вы знали, что есть такие термины, поскольку они могут встретиться вам в программах или в книгах. Причем в некоторых программах это все [весь слайд] называется «аподизацией», но на самом деле аподизация – это сглаживание ступеньки в буквальном смысле слова. Но где-то это называется «weight functions», а где-то «apodization». И под слово apodization попадает все, что находится на этом слайде. А обрезание – это, по сути, и есть умножение на ступеньку, которую потом придется сгладить. И нужно это для следующего. Иногда бывает, что FID существует слишком долго, то есть нам не нужны настолько тонкие линии, нас бы вполне устроило, если бы FID спадал быстрее, но он существует, допустим, 10 секунд, а нам хочется провести один скан за одну секунду, чтобы сэкономить время с учетом большого числа сканов. Поэтому в какой-то момент мы прерываем накопление, и вместо накопления этой [правого] части FIDa записываем здесь нули. Получается ступенька, которую нужно сгладить с помощью аподизации. Но зато [накопление] занимает одну секунду вместо десяти, то есть мы экономим время эксперимента. Когда я говорю «время эксперимента», разница между 1 сек и 10 сек не принципиальна, но если нам нужно этот эксперимент для увеличения чувствительности повторить десять тысяч раз, то эта разница между одной и десятью секундами станет колоссальной. Итак, на слайде были [показаны основные] взвешивающие функции.

#40 Сейчас мы подошли к идее одномерного спектра, который вы уже видели, только уже с точки зрения физических действий с образцом. Что здесь происходит? Эта схема называется «импульсная последовательность». Они бывают разные, [в том числе] сложные, с десятками «блоков», но эта – самая простая. Она состоит из четырех частей. Первая часть – это импульс, то есть возбуждение переходов в образце. Вторая... пока к третьей перейдем. Третья – это накопление, то есть импульс прекращается, образец релаксирует, намагниченность колеблется [вектор намагниченности колеблется в пространстве], и мы записываем этот сигнал. Но делается облучение [образца] и снятие сигнала одной и той же катушкой, и ей нужно ненулевое время для переключения на прием, поэтому вот здесь [D0, вторая часть] есть еще одна задержка. Эта задержка также служит и для другой цели. После импульса возбуждается, к сожалению, не только образец, но и все, что находится рядом, то есть ампулы, катушки, металл спектрометра и т.д. Все это мешает [получению хорошего спектра] после Фурье преобразования. Но в твердых телах кристаллическая решетка быстро рассеивает энергию, поэтому релаксация происходит очень быстро, и сигналы твердых тел в отличие от [сигналов] жидкостей быстро исчезают. Как раз эта задержка нужна в том числе и для того, чтобы за это время успели исчезнуть все аппаратные резонансы и не мешали нам потом в спектре, проявляясь там в виде сигналов⁷⁵. Сам импульс – это время порядка микросекунд, это [D0] тоже порядка микросекунд, а накопление для разных ядер разное [по длительности], для протонов это порядка 1-3 секунд. Дальше не надо забывать, что это все [PW+D0+AQ] имеет смысл повторять много раз для улучшения отношения сигнал/шум. Поэтому может еще оказаться так, что к моменту

⁷⁵ Успевший за это время исчезнуть полезный сигнал можно накопить позже, воспользовавшись спиновым эхом.

окончания этого цикла образец не успеет полностью релаксировать, то есть FID не спадет до нуля. И на следующем шаге у нас будут другие исходные условия и, следовательно, другой спектр. Чтобы этого не происходило иногда имеет смысл немного подождать, это – **задержка [RD]** для полной релаксации. В принципе, можно и накопление продлить **досюда [до конца RD]**. Потом мы [весь скан] повторяем **какое-то количество раз [NS]**, после этого делаем **Фурье-преобразование [FT]** и получаем спектр.



На этом слайде (как и на последующих) есть двухбуквенные аббревиатуры. Здесь они все [показаны] красным. Они в ЯМР, к счастью, стандартные. То есть вне зависимости от производителя прибора одни и те же величины обозначаются одними и теми же аббревиатурами (в большинстве случаев). В книгах по ЯМР вы увидите те же самые аббревиатуры. В тестах я постараюсь это словами называть, но удобнее думать аббревиатурами. Я вам сейчас их расшифрую. Все, что начинается с P – это pulse, то есть импульс. Вот **это [PLW]** – его мощность в ваттах. От Length, наверное, не знаю, что такое L. А это его время – просто P. Количество энергии, переданное импульсом – это произведение мощности импульса на время, в течение которого он включен. Все задержки начинаются с D – delay (D0, D1, в двумерных экспериментах вплоть до D9). Вот это **[D1(RD)]** еще может быть названо «relaxation delay». Вот **это [AQ]** – от слова «acquisition», то есть это acquisition time, измеряется в секундах. А **NS** – это **number of scans**, то есть сколько раз мы повторяем эту последовательность. **Здесь [под фигурной скобкой]** написано, как будет расти отношение сигнал/шум в зависимости от NS. Я не буду рассказывать, почему; может быть у вас был «теорвер» или статистика (задача о пьяном матросе, который делает шаг случайным образом вправо или влево, и нужно узнать за сколько шагов он приблизится к дому). Дрейф пьяного матроса от кабака равен [квадратному] корню из числа шагов. То есть отношение сигнал/шум растет как корень из NS. Сигнал растет пропорционально [числу шагов], а шум растет как корень [из числа шагов];

одно на другое делим, корень сокращается, и остается тоже корень. То есть, чтобы получить в десять раз большее отношение сигнал/шум, нам нужно сделать в сто раз больше сканов.

Далее, после того, как мы получили FID, его надо оцифровать: **этот временной отрезок** AQ секунд записать в какое-то количество точек. Это называется time dimension⁷⁶ или **ось времени [TD]**. То есть число точек [в которые будет записан сигнал за время накопления]. Чаще всего это степень двойки и в подавляющем большинстве одномерных экспериментов это 16К. (...У вас информатика была? У всех? Что такое «К» нужно объяснять? Шестнадцать тысяч приблизительно.).

Далее происходит Фурье-преобразование, которое так и обозначается – **FT (Fourier transformation)**. Но там число точек уже может быть другим. Например, если мы дополнили FID нулями, добавилось еще какое-то количество точек, и получился такой параметр, как **size (SI)**, число точек [данных], над которыми происходит Фурье-преобразование. После [преобразования Фурье]

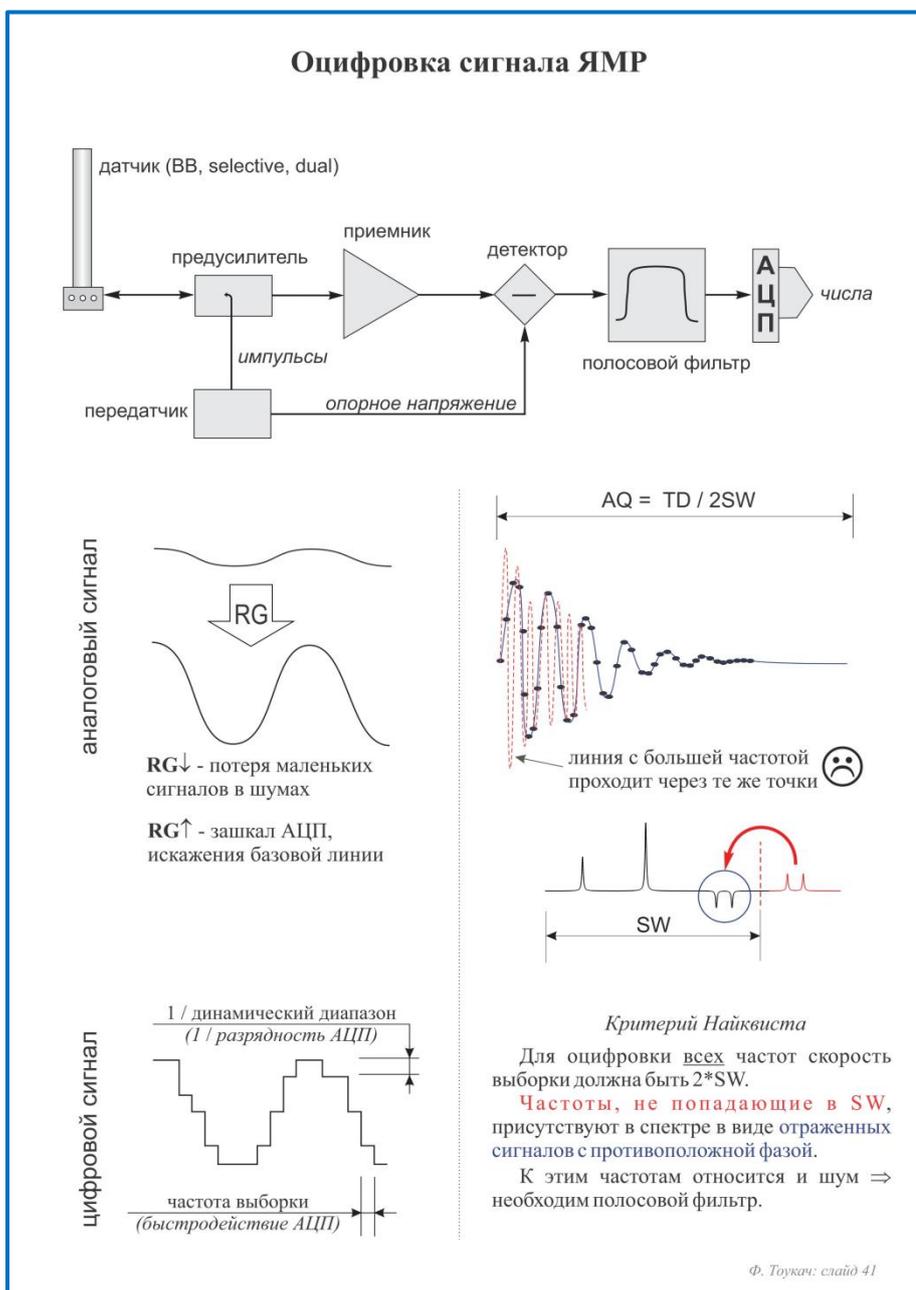
получается спектр.

[Одномерный] спектр [(его границы)] определяется двумя параметрами: шириной и положением. Естественно, ширину и положение нельзя

менять после Фурье-преобразования, поскольку от этого зависит то, как настроить прибор, чтобы получить нужный FID.

Но после Фурье преобразования эти параметры приобретут вид в единицах частоты: **spectral width⁷⁷ (SW)** - ширина спектрального окна в Гц, и **O1** (от слова offset) - смещение середины спектрального окна от рабочей частоты спектрометра, **spectrometer frequency [SF]**.

Что произойдет, если точек недостаточно? Произойдет **вот это [справа под грустным смайликом]**. То есть сигнал вроде бы есть, но правильно оцифровать мы его не можем, потому что после Фурье преобразования, на интересующее нас число герц приходится слишком мало точек (условно, пикселей). Получается не плавная кривая, а **ломаная**



⁷⁶ Возможно, TD = Time Domain. Смысл – количество точек в направлении оси времени.

⁷⁷ В других источниках – sweep width.

линия. Если здесь **квартет** еще можно рассмотреть, то вот здесь, например, **триплет превратился в скособоченный дублет** именно из-за нехватки числа точек. Цифровое разрешение – это отношение числа точек SI к ширине спектра в герцах [SW]. Но если мы сделаем достаточное число точек, это еще не значит, что у нас будет хорошее разрешение, потому что есть и естественные причины. Если FID слишком быстро спадает до нуля, или если мы взяли слишком короткое время накопления, то есть, так или иначе, создали слишком высокую определенность по времени, у нас будет неопределенность по частоте, то есть широкие линии. Это естественное разрешение, которое определяется **обратной величиной от времени существования [и накопления] сигнала [1/AQ]**.

Мы как раз и подошли к оцифровке [сигнала ЯМР]. Сначала посмотрим на нижнюю часть слайда. FID и спектр – это данные уже оцифрованные, то есть существующие в памяти компьютера в виде массива чисел, с которыми мы работаем с помощью софта. А колебания магнитного поля – это процесс непрерывный, имеющий аналоговую природу. Нужно одно в другое перевести, и желательно не потерять при этом никаких сигналов. Отличие аналогового сигнала от цифрового (на тот случай, если кто-то не знает) показано на слайде. **Аналоговые сигналы** изменяются непрерывно, **цифровые сигналы** изменяются ступенчато⁷⁸. Как аудиокассета и компакт-диск в музыке⁷⁹. Оцифровка сигнала имеет два параметра: насколько точно она происходит в «горизонтальном» направлении [время] и в «вертикальном» [амплитуда]. В горизонтальном направлении, то есть вдоль оси времени – это частота выборки или **ширина ступеньки**. Чем более дорогой и быстродействующий у нас аналого-цифровой преобразователь (АЦП), тем короче эта ступенька, то есть тем лучше ступенчатая линия приближает реальную. А вдоль другой оси, амплитудной, это параметр, связанный с динамическим диапазоном. Динамический диапазон – это способность [регистрирующей] системы одновременно наблюдать как большие, так и маленькие сигналы. «Отношение»⁸⁰ больших к маленьким это и есть динамический диапазон, чем он больше, тем лучше (только там не прямое отношение, а через степень). Измеряется этот параметр чаще всего в битах. Допустим, 3 бита. Что это значит? Это значит, что, возможно 2^3 (то есть 8) градаций по амплитуде, т.е. самый сильный сигнал может отличаться от самого слабого максимум в восемь раз. (...) Если мы настроимся на сильный сигнал, то мы потеряем сигналы, которые слабее, чем $1/8$ от него, потому что они сольются с нулем. Если мы настроимся на слабый сигнал, мы потеряем большие сигналы, которые более чем в 8 раз сильнее. Восемь, это я для примера привел. В современных АЦП битность - на уровне 12, 16 и т.д. Что такое «шестнадцать»? Это 64К [= 2^{16}], то есть примерно 65.5 тысяч раз есть [максимально регистрируемая] разница между минимальным и максимальным сигналом.

По сравнению с органами чувств человека это не так уж и много, но для оцифровки колебаний магнитного поля чаще всего достаточно. Тем не менее, оператору (или автоматике спектрометра) всегда нужно подбирать усиление [записываемого сигнала], **вот этот процесс [RG, receiver gain]**. Существующий сигнал на что-то умножается так [на скаляр RG], чтобы после Фурье преобразования самый большой сигнал как раз полностью исчерпал возможности динамического диапазона, но не превысил их. Что произойдет, если этого не сделать? Если будет слишком маленькое усиление, то

⁷⁸ Как пример цифрового, на слайде показан дискретно-непрерывный сигнал (в промежутках между точками выборки сигнал существует в виде горизонтальной линии). В строгом смысле дискретный (цифровой) сигнал – это только точки.

⁷⁹ В звукозаписи, аудиокассета (а также виниловый диск и кассета VHS) - аналоговое хранилище данных, а компакт-диск (а также оцифрованный звук на любом компьютерном носителе) – цифровое.

⁸⁰ «Отношение» взято в кавычки, так как эта зависимость традиционно выражается не коэффициентом пропорциональности, а в логарифмических единицах.

мелкие сигналы просто исчезнут из-за недостатка динамического диапазона, либо скроются под шумами. Если взять слишком большой, будет искажение базовой линии, особенно вблизи больших сигналов. Чаще всего это сигнал растворителя. Если вы около сигнала растворителя после Фурье-преобразования видите базовую линию, которая напоминает синусоиду, постепенно затухающую по мере удаления от сигнала, это верный признак того, что [установлено] слишком большое усиление в канале приема, и не хватило динамического диапазона АЦП для того, чтобы правильно оцифровать эту линию [сигнал растворителя]. В этом случае оператору надо об этом сказать. В одномерных спектрах чаще всего [подбор коэффициента усиления (RG)] делается автоматически и довольно точно, но в двумерных спектрах это иногда нужно делать руками, и [неправильное RG] - частая операторская ошибка. Что такое синусоидальная базовая линия в двумерных спектрах? Это будет уже не линия, а синусоидальные бугры, колебания базовой плоскости вблизи больших сигналов.

Итак, взяли аналоговый сигнал, усилили его, оцифровали. Получили какую-то величину вертикальной ступеньки (чем больше разрядность или динамический диапазон, тем эта ступенька будет меньше), и какую-то частоту выборки. Частота выборки определяется технологическими ограничениями. Для «протонов» [спектроскопии по ядрам ^1H] это ограничение не очень принципиально, поскольку мал диапазон химических сдвигов. То есть частоты, которые нужно детектировать, лежат в диапазоне от 0 до 10 миллионных долей, то есть условно от 0 до 1000 Гц. 1000 Гц – это не такая большая частота⁸¹. А вот у других ядер бывают очень большие диапазоны химических сдвигов, [следовательно, будет] высокая нагрузка на АЦП, поскольку за время существования сигнала нужно успеть пройти все эти герцы. То есть ступенька по горизонтали должна быть маленькой. Был выработан критерий, с какой [минимально допустимой] скоростью нужно производить выборку точек для того, чтобы не потерять сигналы. Критерий [Найквиста] - **вот он [справа посередине]**, а **вот [справа внизу]** он написан словами. Для оцифровки всех частот скорость выборки должна как минимум вдвое превышать самую высокую частоту в спектре. Пример нарисован **здесь**. **Черные точки** – это моменты выборки, они по горизонтали идут друг от друга на равных расстояниях, определяемых быстродействием АЦП. **Черная линия** – это реально существующий сигнал. Но здесь я провел еще **красный пунктир** – это другой сигнал, который мог бы существовать. В нем частота больше, но он проходит через те же самые черные точки. Это значит, что этих черных точек (плотности их следования = частоты выборки) достаточно для оцифровки черной линии, но недостаточно для оцифровки красной линии. Что произошло бы в методе ЯМР с непрерывной разверткой (в том, который тысячу секунд занимал на слайде 37)? Там мы начинаем от какой-то частоты и идем до какой-то частоты, и все сигналы, которые не попали в эту область, просто будут отсутствовать в спектре. Но в случае с импульсным методом произойдет **именно это [справа посередине]**: сигнал, который не попал в спектральное окно, определяемое частотой следования черных точек, все равно проходит через эти же черные точки, поэтому в спектре он появится, но появится он не в том месте [, в котором должен,] и не с той фазой. И после преобразования это будет выглядеть **вот так [спектр с отраженным сигналом]**. **Вот красный сигнал**, попавший за пределы спектрального окна. Его частота оказалась больше, чем двукратная частота выборки. Он в спектре тоже появится, окажется **вот здесь [обведен синим кругом]** и при этом будет перевернут. Это называется «отраженный сигнал». То есть сигнал «отразился» от **края спектра [красный пунктир]**, на том же расстоянии оказался **здесь**, и при этом его фаза изменилась на 180° (т.е. если он **здесь** вверх «смотрел», то **здесь** будет «смотреть» вниз). Если это произошло один раз, то

⁸¹ 1000 Гц приведено для диапазона в 10 м.д. по ядрам ^1H для спектрометра с частотой 100 МГц. В новейших спектрометрах ЯМР 20 м.д. по ядрам ^1H могут составлять до 20КГц, но и этот диапазон не является проблемой для современных АЦП.

такое отражение легко детектировать по сигналу с обратной фазой, и понять, что мы неправильно выбрали спектральный диапазон (надо подвинуть [или расширить] его, чтобы в него все сигналы попали). Но тут возможно несколько видов «подстав». Первое: вот он «смотрит» вниз. А если на этом же месте есть другой сигнал, который «смотрит» вверх? Они как-то сложатся и в худшем случае взаимоуничтожатся, и мы вообще не увидим сигнал. А второй вариант – это то, что **этот сигнал [исходный]** мог находится и **здесь [справа за пределами слайда]**. Он отразится от **этого [правого]** края и пойдет **вот сюда [слева от спектра]**, за другой край, потом снова отразится от **этого [левого]** края. Фаза поменяется два раза, то есть [сигнал] сначала один раз перевернется, а потом перевернется обратно и попадет **сюда [в спектральное окно]**, и при этом смотреть будет всё-таки вверх. То есть фаза сигнала окажется той же самой, которая наблюдается у остальных сигналов спектра, и поэтому по фазе его нельзя будет отличить от остальных. Но, тем не менее, он будет отражен, а это значит, у него неправильный химический сдвиг. Таким образом, детектирование отраженных сигналов не всегда очевидно. К счастью, их пытаются подавить, чтобы их интенсивность была меньше. Но это не всегда удается, особенно эта проблема актуальна тогда, когда у нас узкие спектральные области (мы не весь обзорный спектр, а нас интересуют, к примеру, два сигнала). В одномерных спектрах это делается редко, поскольку эксперимент быстрый и ничто не мешает накопить весь спектр. А вот в двумерных спектрах, которые копятя намного медленнее, неправильно копить лишнее. То есть желательно границы спектрального диапазона и по той, и по другой оси⁸² задать так, чтобы туда попадало все, что нужно, и не было ничего лишнего (чтобы эксперимент прошел быстрее). И вот здесь проблема отраженных сигналов проявляется довольно сильно, поскольку если спектральный диапазон узок, наверняка, есть какие-то сигналы за его пределами. Их нужно детектировать, подавить, или расширить спектральный диапазон так, чтобы они в него попали. (...). Кроме этого, все вышесказанное действует не только на полезные сигналы, но и на шумы. Эти шумы многократно отражаются от границ спектра и все равно попадают в спектры, причем **полосовой фильтр**, который подавляет эти отражения, идеально работает в середине спектрального диапазона, но плохо работает ближе к краям⁸³, поэтому шумы в спектре тоже увеличиваются ближе к краям, то есть в середине спектра шумов меньше, а вблизи границ спектра их больше.

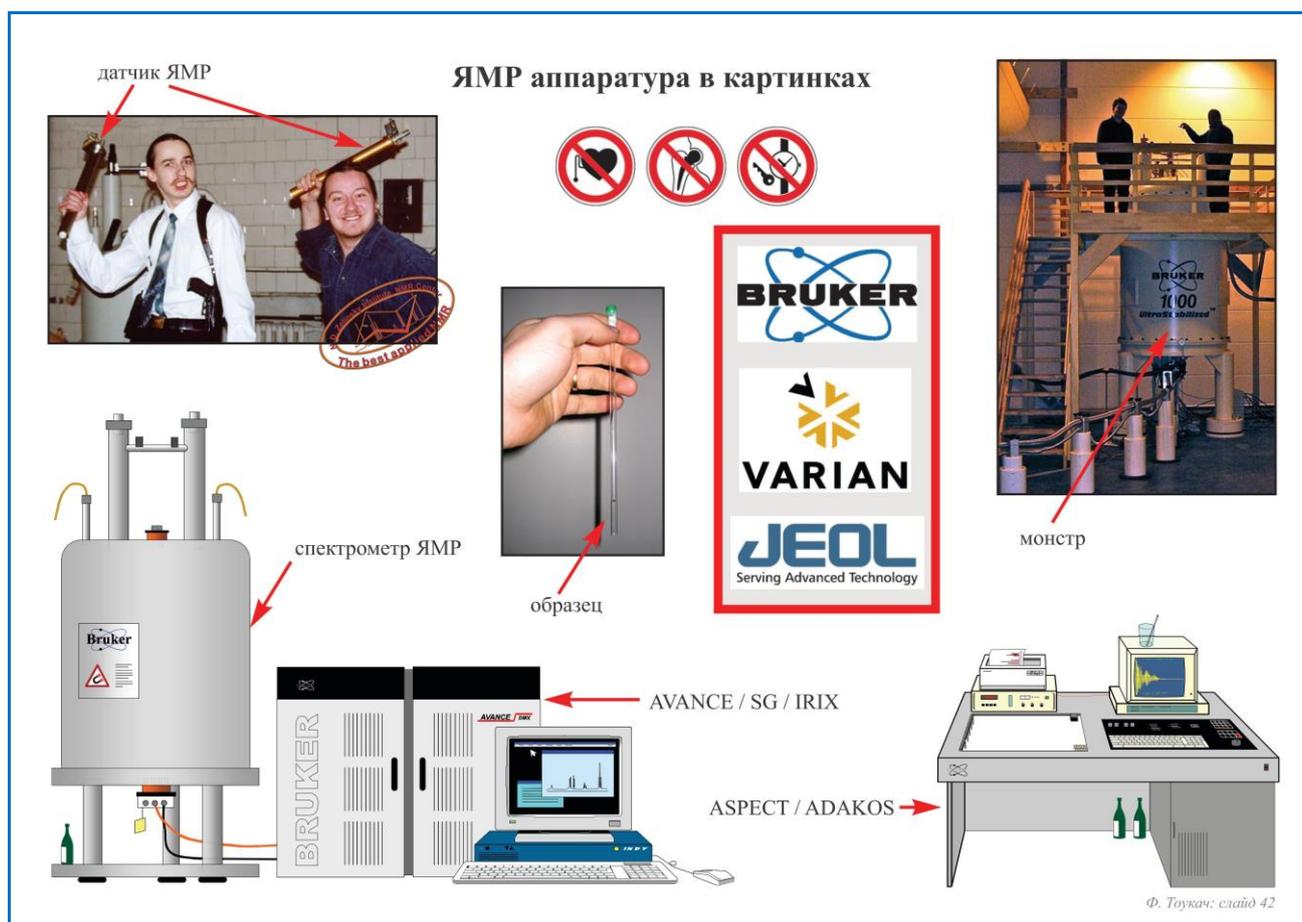
Теперь мы подошли к **физической реализации спектрометра [на слайдеверху]**. Что здесь есть? Во-первых, датчик. Датчик – это устройство, в которое попадает образец, когда мы помещаем его в спектрометр. В датчике находятся катушки для передачи различных магнитных моментов путем изменения электрических токов в этих катушках и для съема магнитной картины вокруг и в образце за счет модуляции токов в этих же катушках. Сигналы усиливаются в предусилителе, попадают в приемник, и дальше в устройство, называемое «детектор». Оно нужно для следующего. С учетом [оцифровки и реально существующих частот] у нас есть какие-то частоты: это частота спектрометра плюс около нее еще химический сдвиг. То есть около 500 МГц на современном приборе. Но весь спектральный диапазон – это 5000 Гц⁸⁴, и нет необходимости оцифровывать сигналы с частотой 500 МГц, поскольку это потребует очень сложного и дорогого АЦП. Но можно попытаться вычистить [частоту] опорного сигнала из реальных сигналов. Максимальная разница составит как раз диапазон химических сдвигов. То есть за ноль надо взять не математический ноль, а, к примеру, частоту спектрометра [SF] или частоту спектрометра плюс 01 так, чтобы существенно (в

⁸² В двумерных экспериментах две оси времени.

⁸³ Спектрометры с цифровым полосовым фильтром лишены этого недостатка.

⁸⁴ Ошибка в лекции (1000 Гц). Важно, что и 1000 Гц и 5000 Гц – на два порядка меньше рабочей частоты спектрометра.

миллионы раз⁸⁵) снизить требования к быстродействию АЦП. Для этого импульсы во время облучения образца, вот **отсюда, с помощью передатчика** одновременно идут [не только в образец, но и] в детектор, и детектор, по сути, вычитает частоты. То есть опорная частота (синусоида с частотой SF+O1), вычитается из частот сигналов, и получается, что самая большая разница частот в спектре – это условно 5000 Гц, от одного края спектра до другого. Или примерно столько же, если мы от рабочей частоты спектрометра работаем. Кроме этого, фаза опорного сигнала может отличаться от фазы импульса, тогда при вычитании возникают фазовые сдвиги, которые можно использовать в свою пользу (покажу на следующем слайде). После этого аналоговый сигнал попадает на полосовой фильтр для подавления отраженных сигналов – это, по сути, умножение вот на такую [колоколообразную] функцию для того, чтобы снизить интенсивность отраженных сигналов. На современных «цифровых» спектрометрах она уже прямоугольная, но все равно работает не идеально – вблизи границ спектра отраженные сигналы, тем не менее, присутствуют. А на спектрометрах, у которых весь вот **этот тракт** аналоговый, [функция] куполообразная. И получается, [полное] подавление отраженных сигналов в центре спектра и близко к нему, но их присутствие ближе к краям. После этого [происходит] **оцифровка [АЦП]** и работа с числами в памяти компьютера.



#42 Давайте перед перерывом посмотрим на то, как это выглядит [в прямом смысле], чтобы ваши мозги немного отдохнули после оцифровки, и чтобы вы примерно представляли, как выглядит ЯМР-спектрометр. **Вот это [с желтой этикеткой] – нижняя часть датчика.** Датчик – это трубка **примерно вот такой длины**, они в руках у людей на фотографии. Это вторая по цене деталь после сверхпроводящего магнита, который создает внешнее магнитное поле. **Все это [«бочка»] – это термостат, который создает условия для сверхпроводимости.** Внутри намотан медно-ниобиевый проводник, который охлаждается жидким гелием, который в свою очередь охлаждается жидким

⁸⁵ С учетом характерного диапазона химических сдвигов протонов (0-10 м.д.) в ~100,000 раз.

азотом. Двойной «стакан» с жидкими газами как раз **все место** и занимает. Но образец, а вместе с ним и датчик в классических спектрометрах находятся при комнатной температуре, а при температуре сверхпроводимости находится только основной магнит, создающий постоянное магнитное поле. Чем это магнитное поле больше [по напряженности], тем больше рабочая частота спектрометра, и тем он дороже. Некоторые современные спектрометры имеют криодатчики, находящиеся в зоне температуры сверхпроводимости. Это позволяет уменьшить аппаратные наводки, различные шумы и т.д. Вся схема с предусилителями, детекторами, полосовыми фильтрами и прочей электроникой находится в **неком компьютере [шкаф с надписью Bruker]**, у которого есть **интерфейс [синяя консоль с монитором]**. Интерфейс на большинстве приборов – это рабочая станция Silicon Graphics. Я не знаю, как на Varian'ах, Varian сейчас уже отдельно не существует, но на Bruker'ах, по крайней мере, это Silicon Graphics. Постепенно они выходят из строя, ломаются, запчасти дорогие, и наши умельцы заменяют их на персональные компьютеры. Здесь это не сводится к простому перекоммутированию кабелей; где-то что-то надо паять, какие-то платы придумывать, но, тем не менее, задача вполне решаемая.

Вот **три фирмы [в красной рамке]**, которые производили спектрометры. Сейчас, по-моему, осталась только **эта одна [Bruker]**, и то в России теперь и ее нет уже два месяца как⁸⁶. Varian тоже делала спектрометры высокого разрешения для аналитической химии; по-моему, сейчас она поглощена Bruker'ом, если я не ошибаюсь. А Jeol больше специализировалась на спектрометрах низкого разрешения для более дешевого решения простых задач, например, настольный спектрометр с электромагнитом, работающим при комнатной температуре. Там нет сверхпроводимости, магнитное поле из-за этого намного слабее, но зато он и во много раз дешевле. Потому что, во-первых, он сам дешевле [в производстве и в продаже] - нет всей крио-обвязки, а, во-вторых, он дешевле в обслуживании, потому что его не надо заправлять жидким гелием и жидким азотом (в отличие от **этого спектрометра высокого разрешения**). Чем больше разрешение, тем больше выделяющейся паразитной энергии [из-за несовершенства сверхпроводников], потому что по суперкону идет больший ток, и, следовательно, жидкий гелий надо заправлять чаще. Как правило, гелий доливают раз в полгода или раз в год (если спектрометр в хорошем состоянии), а жидкий азот доливают раз в неделю в наружный «стакан». К сожалению, нельзя выключить спектрометр [на время простоя] и избавиться себя от необходимости долива жидких газов. Потому что при выключении постепенно испарится среда, создающая температуру сверхпроводимости, и из-за потери сверхпроводимости начнется тепловыделение на суперконе, который в свою очередь нагреет жидкий гелий, который, вскипев, потеряет теплопроводность, что еще больше нагреет суперкон, и дальше процесс пойдет в разнос. Это в ЯМР называется «quench». Если это происходит, то рекомендуется сразу спрятаться **за этот компьютер** и не высовываться оттуда, пока процесс не дойдет до конца (или сразу убежать в ближайшую дверь⁸⁷). После того, как это происходит, требуется не просто снова залить жидкий гелий и азот, а заново все настроить и откалибровать. Своими силами это почти невозможно сделать на современных спектрометрах, поэтому это предполагает вызов сервисного инженера с последующей оплатой порядка 20,000 \$ за восстановление после «квенча». Поэтому «квенч» – это явление крайне нежелательное.

Теперь **эти три символа [запрещающие знаки]**. Если вы будете когда-либо приносить образцы непосредственно в то место, где стоит спектрометр, или общаться с оператором, который другой рукой и одним глазом одновременно снимает спектры, на всякий случай имейте в виду, что в этой

⁸⁶ С весны 2022-го года.

⁸⁷ Исходя из рекомендаций, второй вариант предпочтительнее, так как интенсивно расширяющиеся газы из спектрометра могут привести к обморожению и/или вытеснить из помещения кислород.

комнате - сильное магнитное поле, поэтому если у вас есть какие-либо железки в организме, лучше туда не заходить. Самые распространенные типы железок обозначены на двух первых значках – кардиостимулятор и имплантаты в костях⁸⁸. Кроме этого, механические часы останавливаются, и легкие металлические предметы летят не к центру земли, как им положено, а по некой замысловатой траектории, которая в худшем случае заканчивается [вот здесь \[низ датчика\]](#). Это примерно в радиусе пары метров. От двери изменение направления полета металлических деталей уже не так заметно, а вблизи это заметно очень сильно. Некоторые деятели умудрялись упустить внутрь что-то металлическое, а поскольку внутри магнитное поле очень сильное, оно [упущенное] зависало там «намертво», и вытолкнуть его оттуда было проблематично. Оставалось только какие-то крючки из немагнитных материалов делать и пытаться вытаскивать. Когда я учился в школе, экранирование приборов было хуже, и магнитное поле [снаружи прибора] было сильнее. Это приводило к тому, что для демонстрации нам показывали двухметровую веревку с ключами, которая в этой комнате стояла горизонтально, а не висела вниз, как она должна. Самые высокочастотные спектрометры – это спектрометры с рабочей частотой около 1 ГГц, или чуть больше. Они и по размеру больше, выглядят [примерно так \[справа вверху\]](#). А спектрометр с рабочей частотой 200-300 МГц – это вот такая «бочка» примерно такой [1.5-2.0 м] высоты. Также обращаю внимание на [эти «моменты» \[черные подушки внизу\]](#). Это виброразвязка от пола; эта аппаратура довольно чувствительна к вибрации, поэтому ее стараются изолировать от вибраций и размещают, как следствие, в подвалах. Во-первых, там меньше вибраций, связанной с жесткостью здания, а, во-вторых, это все еще довольно тяжелое, и чтобы оно никуда не провалилось, чаще всего находится в подвале. Хотя сейчас, вроде бы, уже есть подвижки в сторону лучшей виброразвязки и возможности размещать [спектрометр], где угодно. Кроме этого, [на размещение] влияет наличие магнитных полей рядом. В ИОХе, когда еще трамвай ходил по Ленинскому проспекту, проход трамвая сопровождался сигналом на ЯМР-спектрометрах, не из-за вибраций, а из-за того, что рядом проехала большая гора железа, изменилась магнитная картина, чуть «съехало» поле и, следовательно, частотный резонанс всех сигналов.

То, с чем вы непосредственно будете иметь дело - это ампула с образцом, для масштаба она [нарисована в руке](#). Ее высота 18 см, а диаметр 5 мм. Бывают и пошире, но сейчас почти все виды ампул вытеснены именно такими, пятимиллиметровыми. Делать их самим не рекомендуется, поскольку в спектрометре они вращаются. Если вы из капилляра сделаете такую ампулу, есть две опасности. Во-первых, если она будет немного кривая, то при вращении дисбаланс может привести к тому, что она там разобьется. А, во-вторых, стекло тоже бывает разным. Эти делаются из стекла, в котором гарантированно нет магнитных примесей. А в каких-то стеклах они могут быть, они вам испортят спектр. Но если еще тридцать лет назад достать эти ампулы было чрезвычайно сложно, а разбить чрезвычайно легко, то сейчас достать их стало легко (хотя... в конце февраля снова стало сложно). Ну я надеюсь, что с ампулами как-то разберутся. У нас в стране их не производят: и стекла нет, и технологий таких нет, потому что они [ампулы] очень точно центрированные, ну и никто ради таких небольших объемов не будет «заморачиваться». А так одна ампула 5-10 \$ стоит⁸⁹, с пластмассовой крышечкой.

⁸⁸ Титановые имплантаты тоже имеют магнитные примеси, кроме того если в магнитном поле снаружи спектрометра появится переменная составляющая, поле будет наводить ток в любом проводнике.

⁸⁹ На 2023-й год: до 50\$.

Основные понятия импульсного ЯМР

Магнитный момент ядра и вектор макроскопической намагниченности

$v = \gamma B_0 / 2\pi$

заселенность $\uparrow \uparrow$ больше, чем $\uparrow \downarrow \Rightarrow z(BMH) > 0$

лабораторная система координат

вращающаяся система координат

виды импульсов

α

$\pi/2$

π

радиочастотное поле

Ф. Тоукач, А. Дероум: слайд 43

#43 На всякий случай: тема «Поведение намагниченности образца в условиях воздействия на него импульсами» рассмотрена также в методичке “Введение в импульсный ЯМР”, которую можно скачать с сайта этого курса. Теперь попробуем рассмотреть, что происходит с намагниченностью образца (которая потом превращается в спектр) при воздействии на него [электромагнитными] импульсами. [Здесь](#) [слева вверху] условно нарисовано одно ядро и его собственный магнитный момент, называемый спином. Естественно, эту словную картинку не надо понимать буквально. Итак, если у ядра есть ненулевой спин, у него есть собственный магнитный момент (векторная величина) – **маленький вектор $[\mu]$** . Если мы поместим образец, в котором есть такое ядро, во внешнее магнитное поле (**вот оно нарисовано $[B_0]$**), произойдет взаимодействие двух магнитных моментов. По правилу, известному вам из уроков природоведения (оно то ли левой руки, то ли правой ноги⁹⁰), если есть два магнитных момента, один начинает вращаться вокруг другого в определенную сторону. «Правило буравчика», в каких-то классах оно могло под таким названием быть. Поскольку положение вектора внешнего магнитного поля зафиксировано аппаратурой спектрометра, вращаться будет маленький вектор – **собственный магнитный момент ядра $[\mu]$** . Это вращение называется прецессией, и происходит оно **вот с такой скоростью [формула слева вверху]**. Здесь γ - **гиромагнитное отношение ядра** (определяется природой ядра), оно постоянно для каждого типа ядер; B_0 - **напряженность внешнего магнитного поля**; это - 2π , а **это $[v]$** - соответственно, частота вращения. Все ядра одного типа вращаются (прецессируют) с одинаковой скоростью. При этом в тот момент, когда образец оказался во внешнем магнитном поле, или в тот момент, когда мы включили внешнее магнитное поле, исходное положение ядра было случайным. То есть фаза этого вращения тоже случайна. **Эти**

⁹⁰ Правило правой руки, оно же правило буравчика, определяет направление векторного произведения: «Если нарисовать векторы так, чтобы их начала совпадали и вращать первый вектор-сомножитель кратчайшим образом ко второму вектору-сомножителю, то буравчик (винт), вращающийся таким же образом, будет завинчиваться в направлении вектора-произведения».

черные стрелочки – это множество таких ядер (на самом деле их там квинтиллионы⁹¹), здесь [для наглядности] нарисовано 10 штук. За счет того, что фазы прецессии случайны, если мы эти черные стрелочки [векторно] просуммируем, суммарная намагниченность образца будет направлена строго вверх. Здесь она обозначена **красным вектором [M₀]** и называется она макроскопической намагниченностью образца. **Это [любая черная стрелка]** и оно же, к примеру, **это [любая другая черная стрелка]** – это микроскопическая намагниченность на уровне ядра. Просуммировавшись, они дают нам **макроскопическую намагниченность**, наблюдаемую на уровне образца.

Чтобы вы понимали, что такое фаза: синусоидальный сигнал, который появляется, когда в природе что-либо вращается, имеет три параметра. Это 1) период, он же обратная величина от частоты (сжимаем разжимаем синусоиду вдоль оси времени); 2) амплитуда, то есть [величина синусоиды] по вертикали; 3) фаза – сдвиг всей синусоиды вправо или влево. В случае с вращающимся магнитным моментом период, или обратная величина от частоты, связан со скоростью, с которой он вращается, амплитуда связана с длиной этого вектора (его скалярной величиной), а фаза – с положением **на этом круге [слева сверху]**. Если какие-то два вектора вращаются синфазно, то есть имеют фиксированную разность фаз, но не совпадают друг с другом (вот так вместе вращаются [показывает пальцами]), они называются когерентными, как в ЯМР, так и в любой другой области физики. Все **эти вектора** друг другу когерентны, и за счет случайности фазы **их сумма направлена строго вверх**.

Вектор макроскопической намагниченности – это как раз то, что мы будем наблюдать в виде FIDa. Почему он «смотрит» вверх? На самом деле вот этот конус, «смотрящий» вверх - это только те спины, которые направлены по полю, а есть еще спины, направленные против поля, в случае, если спин ядра равен ½. То есть, существует точно такой же конус, направленный вниз, и тоже какой-то магнитный момент от тех ядер [спины которых направлены против поля]. Но поскольку заселенность **этого состояния [синие сонаправленные стрелки]**, немного более выгодного, больше, чем **этого состояния [красные противонаправленные стрелки]**, то просуммировавшись, эти два вектора, верхний и нижний, дают нам макроскопическую намагниченность, направленную вверх. Напоминаю, что большая стрелка – это внешнее магнитное поле, а маленькая стрелка – это собственное магнитное поле. **Вот эта z(BMH)** – это проекция на ось z вектора макроскопической намагниченности; она больше нуля. То есть образец, помещенный в магнитное поле, при условии отсутствия импульсов имеет собственную намагниченность, которая «смотрит» вверх.

Что произойдет, если мы – **давайте вот отсюда начнем [слева внизу]** – облучили образец импульсом? А что это значит: «облучили импульсом»? Значит, где-то включили переменный ток в катушке около образца и подобрали частоту этого переменного тока так, чтобы она совпадала **вот с этой частотой [ν]**. Эта частота еще называется Ларморовой, по имени⁹². Это скорость прецессии ядер данного типа в данном конкретном внешнем магнитном поле. Так вот, импульс с Ларморовой частотой, что это значит? У нас с этой частотой происходят колебания электрического поля, а колеблющееся электрическое поле создает колеблющийся магнитный момент. Значит, если электрическое - синусоидальное, его, по сути, это можно представить, как вращающийся магнитный момент, и скорость его вращения будет определяться частотой переменного тока в катушке. Подберем эту скорость так, чтобы скорость вращения создаваемого этим магнитным полем момента совпадала **с Ларморовой частотой⁹³**. Дальше будет удобно рассматривать все во вращающейся системе координат. **Вращающаяся система координат [справа сверху]** – это система координат,

⁹¹ Порядка числа Авогадро

⁹² Дж. Лармор открыл явление прецессии магнитного момента вокруг внешнего магнитного поля.

⁹³ Здесь и далее, термин «скорость» применяется в смысле «угловая скорость» (частота вращения).

которая вращается вокруг вертикальной оси. Опять же, с Ларморовой частотой - то есть, **импульс** в ней будет неподвижен. Вот он **обозначен зеленой стрелкой и назван B_1** . В лабораторной системе координат импульс B_1 – это вращающийся магнитный момент, вот так вокруг оси z [показывает указкой]. Во вращающейся системе координат этот магнитный момент неподвижен. В лабораторной системе координат присутствует **поле B_0** (внешнее магнитное поле, направленное вверх). Оно является причиной возникновения прецессии [спиновых магнитных моментов ядер] и причиной вращения системы координат. Поэтому во вращающейся системе координат его нет, а наличие внешнего магнитного поля представлено самим фактом вращения системы координат. Таким образом, [на слайде справа сверху показано] **одно и то же** в лабораторной и во вращающейся системе координат (**здесь есть** поле B_0 , **здесь нет** поля B_0). Импульс во вращающейся системе координат – это **неподвижный вектор, направленный вбок**. Вообще, куда он направлен, зависит от [пространственной] конфигурации катушек. Но нас интересует вектор, направленный, например, вдоль оси x – он так и называется: «импульс вдоль оси x ». И макроскопическая намагниченность – вот она **здесь [в лабораторной системе координат]**, и она никуда не делась **здесь [во вращающейся системе координат]** - это вектор, «смотрящий» вверх.

Что представляет собой импульс в лабораторной системе координат? Можно представить его, как один вращающийся момент, а можно как два вращающихся в разные стороны – это не принципиально, с точностью до умножения на два. Итак, смотрим теперь **во вращающейся системе координат [слева внизу]**. Что произойдет с намагниченностью образца? Здесь есть **импульс [B_1 , зеленый]**, и здесь есть **намагниченность (красный)**. [Применяем] то же самое правило буравчика. **Этот вектор [B_1]** в этой системе координат зафиксирован, поэтому вращаться будет **этот**: красный вращается вокруг зеленого с постоянной скоростью. Эта скорость определяется скалярным произведением [векторов импульса и намагниченности]. Поскольку величина **этого вектора [BMN]** определяется природой вещества⁹⁴, скорость вращения намагниченности образца будет определяться мощностью **этого импульса [B_1]**. То есть тем, длинный или короткий зеленый вектор. Вот мы включили импульс. За какое-то время **намагниченность (красный вектор) повернулась [на угол она рисунке]**. Напоминаю, что поворачивается она во вращающейся системе координат. То есть во вращающейся системе координат она просто поворачивается, а в лабораторной системе координат она повернулась и крутится вот так [показывает указкой] в повернутом состоянии. Если она повернулась на 90° , крутится в плоскости Oxy . Поэтому если мы подождем, пока намагниченность образца повернется ровно на 90° , то есть ляжет на плоскость Oxy , и в этот момент выключим импульс, у нас будет следующее: во вращающейся системе координат - **направленная вбок намагниченность [рисунок по центру внизу]**. Поскольку система координат вращается вокруг вертикальной оси, это значит, что в лабораторной системе координат, в которой находятся катушки, **это [BMN после импульса]** будет магнитный момент, вращающийся в горизонтальной плоскости. А раз есть магнитный момент, вращающийся в горизонтальной плоскости, им наводятся переменные токи в этих катушках. И мы можем прочесть проекцию магнитного момента на ось x или y и записать ее в виде FIDa.

Если мы используем **90-градусный импульс**, (он же $\pi/2$), то есть импульс, поворачивающий макроскопическую намагниченность на 90° , амплитуда сигнала будет максимальной, поскольку проекция на горизонтальную плоскость максимальна. Но зато долго будет происходить релаксация. Поэтому обычно используют обычно **30-градусные импульсы** (примерно). Мы потом еще к этому вернемся. **Вот три вида импульсов**. Импульс α – это значит импульс, который в данных условиях с данной мощностью поворачивает намагниченность образца на угол α во вращающейся системе

⁹⁴ и внешним магнитным полем, естественно.

координат. 90-градусный импульс поворачивает на 90°, а π-импульс (он же 180-градусный) поворачивает макроскопическую намагниченность «наоборот» [, до положения «вниз»]. **Сигнал здесь [справа внизу]**, как не сложно догадаться, снова исчезает, потому что отсутствует проекция на горизонтальную плоскость.

FID и фаза сигналов

М_x (~сигнал дисперсии), М_y (~сигнал поглощения)

лабораторная

вращающаяся после π_x

импульсы

опорный сигнал (SF)

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

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

Im: соответствует сигналу дисперсии

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

Ф. Тоукач: слайд 44

#44 (...) Теперь стоит вспомнить, что преобразование Фурье – это комплексная операция. На выходе у нее получаются мнимые и действительные части. Вы знаете, что это такое, да (комплексные числа. Ортогональные)? Вот для них формулы: это - **действительная часть [Re:]**, а это - **мнимая часть [Im:]**. Отличаются они только тем, что это здесь косинус, а здесь синус, то есть они сдвинуты по фазе относительно друг друга, как синусоида и косинусоида⁹⁵. И как раз получается, что после Фурье-преобразования действительная часть соответствует сигналу поглощения **такой формы**, а мнимая часть соответствует сигналу дисперсии **такой формы**. По фазе они отличаются на 90°.

После Фурье-преобразования фаза сигналов выглядит вот так [на доске]. Вот это примеры: 0; отличие на 90° [как на слайде Im:]; отличие на 180° – сигнал «смотрит» вниз. А

это, для примера фаза, которая на *сколько-то* отличается: один край сигнала поднят, а другой опущен. Фазу сигнала можно поправить математически уже после Фурье-преобразования. Но, как правило, для всех сигналов одновременно. Если все сигналы фазируются нормально, а один, к примеру, «смотрит» вниз, то есть имеет фазу, отличающуюся на 180°, значит здесь [присутствует] какой-то иной фактор кроме фазировки, например, отраженный сигнал.

Итак, Фурье-преобразование дает мнимую и действительную части, которые отличаются по фазе на 90°. Что это значит? Что, по сути, одна из них – это проекция намагниченности на ось 0x, а другая – на ось 0y. Или наоборот, что не принципиально. Мы можем этот фактор использовать. Во-

⁹⁵ На 90°

первых, копить либо то (сигнал поглощения), либо другое (сигнал дисперсии). Во-вторых, фазу опорного сигнала, который идет в детектор для вычитания из детектируемых частот, тоже можно менять. И использовать два детектора, у которых будет разность фаз 90° , тем самым накапливать и мнимую, и действительную часть. Это позволяет снизить требования к аналого-цифровому преобразователю еще в два раза. Это делается так: $SF + O1$, то есть частота спектрометра плюс смещение спектрального окна относительно него, помещается в центр спектра, и за счет наличия двух детекторов, отличающихся по фазе на 90° , можно разделять отрицательные и положительные частоты. Это значит, требование к максимальной частоте уменьшается в два раза. То есть у нас [диапазон частот] был, к примеру, от нуля до 1000 герц, а так получается от нуля до 500 герц, и отдельно детектируется знак. То же самое, что от -500 до +500. Это повышает чувствительность, но приводит к отражению сигналов от центра спектра. Это [явление] научились «давить» достаточно хорошо, поэтому такие отраженные сигналы составляют не более 1% интенсивности от основных. Называется [описанный подход] – «квадратурное детектирование», аппаратное ухищрение, позволяющее еще больше снизить требования к АЦП и, следовательно, увеличить максимальный

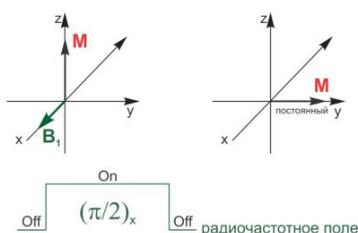
размер спектрального окна, которое мы можем записать.

#45 В верхней части слайда и показана ситуация во вращающейся системе координат. Здесь ошибка: написано «после π_x », то есть импульс вдоль оси x – только он не π , а $\pi/2$. Потому что π перевернет намагниченность вниз, а $\pi/2$ положит его на горизонтальную плоскость. А в лабораторной системе координат, во-первых, происходит вращение [намагниченности с проекций в виде] синусоид с какой-то частотой, а во-вторых, затухание, то есть постепенно эта проекция уменьшается, и намагниченность образца переходит из плоскости Oxy обратно на ось Oz за счет рассеяния энергии и возвращения образца к исходному состоянию.

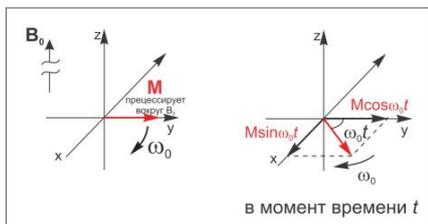
Все, сказанное до этого, говорилось в предположении, что в спектре всего одна линия, которая находится точно на частоте $SF+O1$, то есть

Воздействие импульса на образец

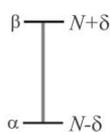
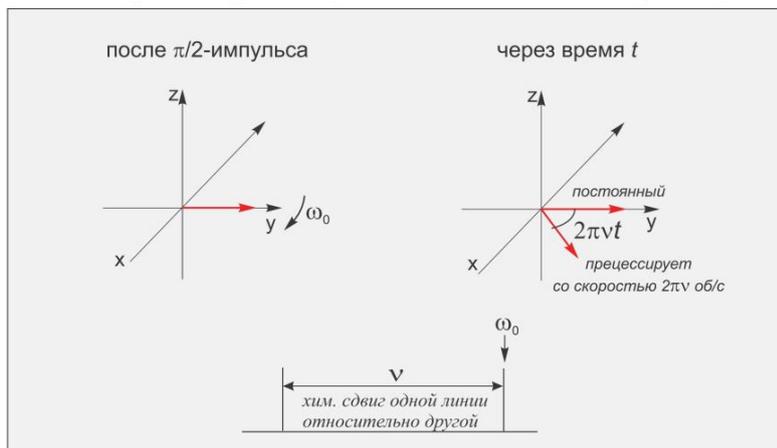
вращающаяся система координат



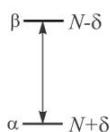
лабораторная система координат



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



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



равновесие



$z(BMН) = 0$,
заселенности выровнены

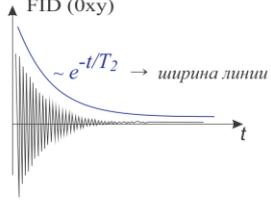
попадает точно в резонанс. Это значит, что после попадания на горизонтальную плоскость во вращающейся системе координат макроскопическая намагниченность не двигается более в горизонтальной плоскости. Иными словами, в лабораторной системе координат она вращается с той же самой Ларморовой частотой, совпадающей с частотой вращения системы координат. Поэтому [со временем] во вращающейся системе координат она только поднимается обратно на ось Oz за счет релаксации. Но сигналов в спектре много, и даже если один попал точно в резонанс, другой точно в резонанс не попадет. Поэтому происходит следующее: после того, как намагниченность образца повернулась в горизонтальную плоскость, она начинает в зависимости от своих частот либо обгонять систему координат, либо наоборот запаздывать относительно нее. Поэтому во вращающейся системе координат намагниченность тоже поворачивается [вокруг оси Oz]. Далее вспомним, что любой вектор может быть представлен как сумма других векторов. И общая намагниченность образца – это сумма намагниченностей от каждого сигнала. То есть если у нас есть сигналы, имеющие разную частоту, соответствующие им компоненты вектора макроскопической намагниченности [(векторной суммы сигналов)] вращаются немного с разной скоростью. И разность этих скоростей – это как раз разница в хим. сдвигах, этих линий. Поэтому во вращающейся системе координат они тоже будут «дрейфовать» – поворачиваться в горизонтальной плоскости с определенной скоростью. Вот пример: спектр, в котором **две линии** (два сигнала). Допустим, одна из них – это эталон, а другая – это линия, имеющая какой-то хим. сдвиг относительно первой. Эти линии по прошествии какого-то времени после импульса начнут расходиться⁹⁶. Здесь для простоты скорость вращения одной из них соответствует скорости вращения системы координат. То есть скорость вращения системы координат подобрана так, чтобы соответствовать эталону. И тогда линия, соответствующая эталону, **будет оставаться неподвижной** во вращающейся системе координат. А **другая линия** [(соответствующая ей компонента ВМН)] будет поворачиваться в горизонтальной плоскости со скоростью 2π [умножить] на частоту вращения; t – это ось времени. То есть через какое-то время компоненты, соответствующие разным сигналам, аналогично, разойдутся в горизонтальной плоскости. Нетрудно предугадать, что они потом снова сойдутся обратно, когда **эта линия** совершит полный оборот. Разница скоростей вращения – это и есть разница частот в спектре, то есть, по сути, химический сдвиг.

На все это можно посмотреть не только с точки зрения положения вектора макроскопической намагниченности, но и **с точки зрения заселенности** [спиновых состояний]. Это два умозрительных формализма, которые позволят нам предсказывать результаты различных [импульсных] последовательностей. Что происходит с точки зрения заселенности? [Внизу по центру] было ядро, у которого - **два спиновых состояния**. Вот оно, равновесное состояние – в **верхнем**, менее выгодном состоянии немного меньше половины $[N-\delta]$, а в **нижнем** немного больше половины $[N+\delta]$ ядер. После $\pi/2$ -импульса заселенности этих состояний выравниваются. Что это значит? Вспомните картинку с конусом. Конус, который «смотрит» вниз, будет иметь столько же микроскопических компонентов, как и конус, который смотрит вверх. Это как раз и соответствует исчезновению проекции вектора макроскопической намагниченности на ось Oz . То есть [произошло] выравнивание заселенностей нижнего и верхнего энергетического состояния, исчезновение намагниченности на вертикальной оси. Теперь, вдвое более длинный импульс, **180-градусный, или π -импульс**. Он переворачивает намагниченность вниз. Это соответствует тому, что верхняя часть становится более заселенной (менее выгодная), а нижняя часть, более выгодная, становится менее заселенной. То есть конус, «смотрящий» вниз, становится больше конуса, «смотрящего» вверх - произошла инверсия

⁹⁶ Точная формулировка: во вращающейся системе координат расходятся соответствующие этим линиям компоненты векторной суммы, представляющей собой ВМН.

заселенности. То есть **вот это было равновесное состояние**, после π -импульса заселенности инвертировались (перевернулись). Импульс мы отключили, и постепенно – что **отсюда [слева внизу]**, что **отсюда [справа внизу]** – система вернется за счет релаксации **в свое равновесное состояние**.

Релаксация

T₁ : продольная релаксация
(восстановление намагниченности на 0z за счет обмена энергией)

$$M = M_0(1 - e^{-t/T_1})$$

T₁ зависит от структуры и может быть разным для разных линий.
T₁ ↑ (*быстрая релаксация*) - низкая температура, вязкость, парамагнитные примеси.

T₂ : поперечная релаксация
(спад намагниченности в 0xy из-за размывания ВМН в связи с неоднородностью поля)

Общий спад поперечной намагниченности включает ее переход на ось z. В идеальных условиях T₁=T₂.

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 T₁: варьирование задержки и сравнение амплитуды сигнала ("инверсия-восстановление")

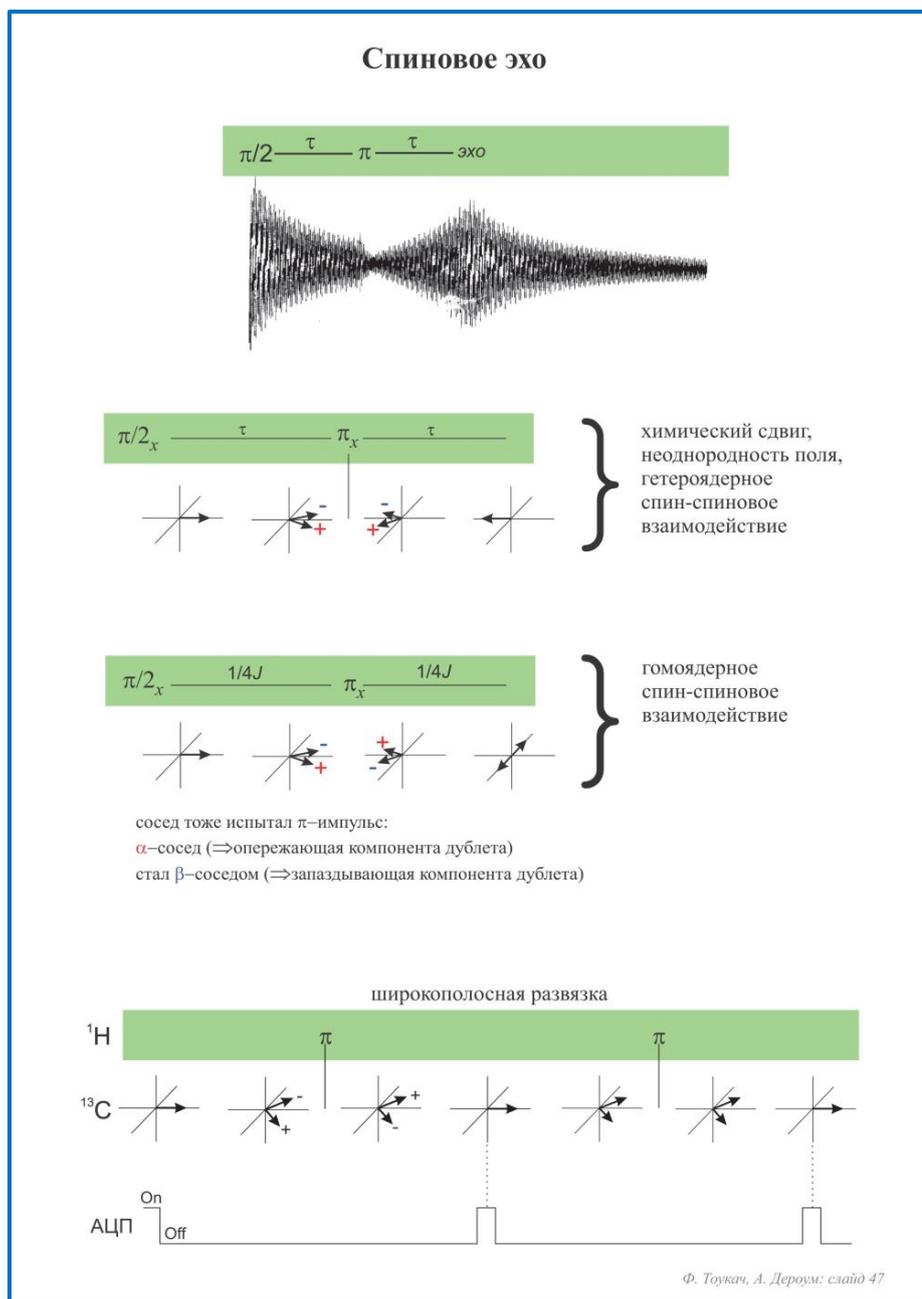
π ————— задержка ————— $\pi/2$ ————— выборка

Ф. Тоукач: слайд 46

#46 Происходит это следующим образом. Вот вращающаяся система координат, в ней есть **макроскопическая намагниченность**, которая после $[\pi/2]$ -импульса находится в горизонтальной плоскости и тем самым создает FID. В процессе релаксации она по экспоненциальному закону возвращается обратно на ось 0z. Но, оказывается, она из плоскости 0xy исчезает быстрее, чем появляется на оси 0z. Это происходит за счет того, что не только естественные процессы в образце приводят к исчезновению FIDов, то есть проекций намагниченности на горизонтальную плоскость, но и разные технологические явления. Например, неоднородность магнитного поля или еще что-то. Поэтому различают два вида релаксации, которые обозначаются T₁ и T₂. T₁ – это продольная релаксация, то есть восстановление намагниченности на вертикальной оси за счет обмена энергии между ядрами и возвращения образца к своему равновесному состоянию. А T₂ – это поперечная релаксация, которая по всем причинам, включая и процессы, происходящие в образце, приводит к исчезновению намагниченности в горизонтальной плоскости. Если у нас абсолютно идеальный спектрометр, скорости этих двух процессов одинаковы. Но в реальном спектрометре T₂ происходит быстрее, чем T₁. Нам же, с химической точки зрения, (затрагивающей то, что как-то коррелирует с химической структурой соединения), интересно именно T₁.

И нужен способ измерить T₁. Вот этот способ нарисован **здесь внизу [импульсная последовательность «инверсия-восстановление»]**. Что можно сделать? Сначала облучаем образец π -импульсом. Заселенности инвертируются и намагниченность образца «смотрит» вниз после π -импульса. Ее горизонтальные компоненты отсутствуют, то есть FIDа мы не наблюдаем. После этого мы ждем какое-то время (оно будет варьироваться в этом эксперименте). За это время

намагниченность начинает постепенно возвращаться обратно, то есть вот это ноль [показывает пальцами], и она уменьшается, уменьшается снизу, проходит через ноль и начинает расти вверх. То есть из состояния “красная стрелка вниз” она переходит в состояние “красная стрелка вверх”. Как это померить? После задержки по прошествии какого-то времени, когда этот процесс частично прошел, мы даем уже $\pi/2$ -импульс, переводя остаток намагниченности на оси Oz в горизонтальную плоскость. И давая тем самым возможность его измерения. После этого мы делаем выборку и замеряем амплитуду. Потом мы это все повторяем уже с другой задержкой. И смотрим, в какой момент намагниченность пройдет через ноль. Когда это произойдет, у нас FIDa не будет. (...) В момент время прохода через ноль она отсутствует и в вертикальной плоскости, и в горизонтальной. То есть 90-градусному импульсу (вот этому) поворачивать нечего. И если задержка такова, что к этому моменту намагниченность равна нулю, то в выборке ничего не будет, поскольку не создается горизонтальный проекции. И вот мы таким образом узнали, за какое время намагниченность из перевернутого состояния исчезает, потом она дальше снова расти вверх начнет. Берем это время, умножаем на два и получаем время полной релаксации⁹⁷. Ну то есть до нуля она дойдет за половину времени, а за полное время она вернется обратно в такое положение. Это называется «инверсия-восстановление», то есть способ измерения T_1 , или времени релаксации. Время релаксации коррелирует с молекулярной структурой, то есть существуют некие зависимости, [используя которые] можно на основании этого параметра оценить экранированность атомов другими атомами. Чем более атом изолирован, тем дольше он релаксирует.



горизонтальный проекции. И вот мы таким образом узнали, за какое время намагниченность из перевернутого состояния исчезает, потом она дальше снова расти вверх начнет. Берем это время, умножаем на два и получаем время полной релаксации⁹⁷. Ну то есть до нуля она дойдет за половину времени, а за полное время она вернется обратно в такое положение. Это называется «инверсия-восстановление», то есть способ измерения T_1 , или времени релаксации. Время релаксации коррелирует с молекулярной структурой, то есть существуют некие зависимости, [используя которые] можно на основании этого параметра оценить экранированность атомов другими атомами. Чем более атом изолирован, тем дольше он релаксирует.

#47 Теперь уже я не помню, почему я угол Эрнста поместил на слайд с релаксацией... Наверное, он просто не влез на предыдущий слайд. Угол Эрнста

⁹⁷ Неточность: релаксация происходит нелинейно, а в первом приближении экспоненциально, поэтому если принять скалярную величину ВМН за единицу, то для получения T_1 надо умножить время t_0 , когда сигнал исчезает, не на два, а на ~ 1.44 ($T_1 = -t_0 / \ln(1/2) \approx 1.44 * t_0$).

– это как раз тот самый угол α , оптимальный для накопления протонного спектра. Наилучшее отношение сигнал/шум получается, когда мы используем не 90-градусный импульс, а импульс немножко меньший. Вот он этот угол, он связан как раз с временем накопления, задержкой для релаксации, и (...) с максимальным T_1 . Что значит максимальный? Это максимальный среди всех сигналов, то есть среди всех атомов, которые есть у нас в молекуле. В зависимости от того, какие присутствуют самые медленно релаксирующие атомы, оптимальный угол будет отличаться. Как правило, это около 30°.

С тем, что происходит с намагниченностью, напрямую связаны эксперименты по развязке, то есть «блокировке» спин-спинового взаимодействия, и по наблюдению спинового эха.

Начнем сначала с более простого – **спинового эха**. $\pi/2$ -импульс – это тот же импульс, с которого начинается простейший эксперимент по накоплению одномерного спектра без развязки. Этот импульс повернул намагниченность на 90° – **появился сигнал**. Дальше это сигнал постепенно спадает за счет релаксации. И в какой-то момент – **когда он почти до нуля спал**, мы снова облучаем образец **уже π -импульсом**. Что при этом происходит? π -Импульс [дается] вдоль той же самой оси, вдоль которой был $\pi/2$. **Вот первый импульс**. Вот намагниченность повернулась, прошло время T_1 . **Вот это [синий минус и красный плюс]** - два ее компонента (предположим, там две линии – это могут быть два разных сигнала или две линии в пределах одного дублета. Так или иначе, как-то число линий. Реально их, конечно же, больше, но для рассмотрения нам не принципиально, сколько их – главное, что больше одной, поэтому для упрощения считаем, что их две). Скорость вращения системы координат выбираем так, чтобы одна из [этих линий] запаздывала, а другая опережала с одинаковой скоростью. **Вот эти две линии [вторая диаграмма]**. Одна обозначена минусом, она вращается «от нас», за плоскость доски⁹⁸, во вращающейся системе координат. А другая – плюсом, она опережает систему координат. То есть вращается «к нам», перед плоскостью доски. И вот в этот момент, когда эти две компоненты разошлись, мы даем вдоль оси x уже 180-градусный импульс. Он эти две линии перевернул вокруг себя на 180°. Теперь они смотрят **вот сюда [третья диаграмма, верхний ряд]**. Но эта [«плюсовая»] продолжает двигаться **вот сюда [по часовой стрелке при взгляде сверху]**, а **минусовая** продолжает двигаться **вот сюда [против часовой стрелки при взгляде сверху]**. То есть направление их вращения не изменилось. Это значит, что через какое-то время они снова сойдутся в одну линию, и проекция на горизонтальную плоскость будет максимальна, то есть исчезнет размазывание за счет разности частот вращения этих линий. Это [явление] называется «спиновое эхо». Вот оно на FIDe, **выглядит вот так [вверху]**. И дальше все повторяется, то есть снова пошла релаксация уже **отсюда**. Зачем вообще это нужно? Мерить [FID] как раз имеет смысл **вот отсюда [от эха]**, потому что в самом начале присутствуют аппаратные помехи – результаты от возбуждения импульсом твердых компонентов спектрометра, материала ампулы и прочего. Как электромагнитное облучение произошло, в течение <1 мкс все «звенит», то есть испускает собственные магнитные колебания. И раз это происходит, то в самом начале FIDa, где очень большая амплитуда этих колебаний, это будет мешать нашим сигналам, накладываясь на них, и портить их. В жидкостях, наверное, это не очень важно, поскольку время накопления там большое, и на фоне большого времени накопления аппаратные резонансы исчезают очень быстро. А вот, например, в ЯМР твердых тел это чрезвычайно важно. Поскольку там длина FIDa – уже не секунды, а миллисекунды и микросекунды, и там аппаратные резонансы будут очень сильно мешать. Поэтому их [FIDы] наблюдают в рамках спинового эха – тогда, когда аппаратные резонансы уже успокоились, а собственная магнитная картина соединения повторяется, начиная **отсюда**. То же самое нам понадобится и в двумерных экспериментах для рефокусировки разных линий.

⁹⁸ Не забывайте, что эта «доска» в лабораторной системе координат тоже вращается.

Но происходит эхо не для всех вариантов пар линий. То, про что я сейчас сказал, действует на линии, образованные следующими причинами: химический сдвиг, неоднородность поля и гетероядерное спин-спиновое взаимодействие. 1) Химический сдвиг – это просто две линии с разными химическими сдвигами: понятно, что они «крутятся» с разной скоростью (во вращающейся системе координат). Здесь скорость вращения системы координат подобрана как среднее между их химическими сдвигами. 2) Неоднородность поля – это технологическое несовершенство спектрометра – тут тоже происходит некое размазывание [частот]. Например, в одной части образца поле чуть сильнее – линии все крутятся быстрее, а в другой [где поле слабее] – медленнее. Кроме этого, поле может быть неоднородным и во времени. И 3) гетероядерное спин-спиновое взаимодействие. Это когда две эти линии – это две компоненты, к примеру, дублета за счет щепления на соседях другого типа. К примеру, протон «щепится» на фторе. Или углерод на протонах. Тогда скорость вращения системы координат на этой схеме подобрана как химический сдвиг этого дублета, то есть среднее между его двумя линиями. Но что произойдет, если это спин-спиновое взаимодействие – гомоядерное, например, щепление одного протона на другом протоне? Все то же самое ровно вот **до этого момента [третья диаграмма, нижний ряд]**. Когда мы облучили образец вторым 180-градусным импульсом, сосед, на котором происходило щепление, тоже испытал воздействие того же самого импульса, поскольку этот импульс – на той же частоте протонов. То есть не только наблюдаемое ядро испытало π -импульс, но и его сосед, на котором он [сигнал этого ядра] «щепится». А что это значит? – Что в соседе тоже перевернулись заселенности, инвертировались – и альфа-сосед стал бета-соседом, и наоборот. То есть опережающая компонента дублета превратилась в запаздывающую, и наоборот – за счет инверсии [заселенностей] соседнего ядра. А это значит, что не только теперь **эти черные вектора** «смотрят» влево, а не вправо, но и знаки поменялись местами. Направление их вращения изменилось на противоположное. И по прошествии еще одного отрезка времени (**вот такого [1/4J]**), эти две линии встанут **в такое положение [четвертая диаграмма, нижний ряд]**. То есть такой рефокусировки, какую мы наблюдаем **здесь [четвертая диаграмма, верхний ряд]**, не произойдет. Это значит, что спиновое эхо приводит к рефокусировке – увеличению амплитуды FIDa – только для линий, разность частот которых обусловлена факторами, перечисленными **здесь [вверху]**, но не обусловлена одним фактором [гомоядерным спин-спиновым взаимодействием], перечисленным **здесь [внизу]**.

Рассмотрев формализм поведения намагниченности образца в условиях спинового эха, мы подошли к идее широкополосной развязки, то есть «выключения» спин-спинового взаимодействия со всеми ядрами определенного типа. Здесь [она проиллюстрирована] на примере широкополосной развязки от области резонанса протонов при съемке спектра ^{13}C . Эта импульсная последовательность имеет как бы две половины: то, что происходит на протонах, и то, что происходит на ядрах ^{13}C . **Вот это [прямоугольники АЦП=On]** – накопления, они происходят на частоте ^{13}C . Мы копируем сигналы на частоте спектра, а импульсы даем на частоте протонов, т.е. воздействуем на протонную намагниченность. Это было бы то же самое, как **здесь [гомоядерное спин-спиновое взаимодействие]**, только **здесь [гетероядерная развязка]** π -импульс [на частоте протонов] уже селективно **поменял знаки местами**, но не поменял направления **черных векторов**, потому что эти черные вектора – на частоте ^{13}C ⁹⁹, а знаки – то, что относится к соседу. Здесь у нас сосед – это протон, а наблюдаемое ядро – ^{13}C . Вот, к примеру, две компоненты дублета, за счет щепления ^{13}C на своем протоне – по прошествии какого-то времени они разошлись. Одна запаздывающая, одна опережающая. Мы даем π -импульс. Этот π -импульс мы делаем на частоте протонов, то есть он не влияет на компоненты намагниченности соответствующего углерода, поэтому эти вектора не переворачиваются обратно.

⁹⁹ Ошибка в лекции («... на частоте протонов»); правильно – как написано в стенограмме: «... на частоте ^{13}C »

Но на соседей, на которых происходит щепление, этот π -импульс влияет, поскольку соседи – это как раз протоны. Поэтому у нас меняются знаки – точно так же, как [здесь \[при гомоядерном спин-спиновом взаимодействии\]](#), и линии начинают снова сходиться, и через какой-то момент сходятся обратно (этот момент как раз связан с величиной КССВ J_{CH}^{100}). И в этот момент мы включаем накопление. И что получается? Вместо дублета мы видим синглет. Мы как бы исключили протоны из молекулы, убрав щепление на них: вместо мультиплетов углеродные сигналы проявляются как синглеты. Это называется “широкополосная развязка” – широкополосная, потому что спин-спиновое взаимодействие выключается со всеми протонами одновременно. То есть этот импульс - достаточно мощный и короткий, чтобы закрыть собой всю область резонанса протонов вне зависимости от того, какой у них химический сдвиг.

Аналогично этому можно сделать развязку и от любого другого типа ядер при наблюдении ^{13}C или какого-то иного ядра. Например, развязка от фтора в протонном спектре. Что это значит? π -импульс [на частоте] фтора, а накопление FIDa - на частоте протонов. Таким образом, теперь мы знаем следующие эксперименты: обычный одномерный протонный спектр, одномерный спектр по любому ядру и одномерный спектр по ядру А с развязкой от ядер типа В. Например, самый распространенный случай – углеродный спектр с развязкой от протонов. Кроме этого, вы познакомились с экспериментами по измерению времени релаксации T_1 с помощью инверсии-восстановления и экспериментами по спиновому эху.

Лекция 5 [▶ NMR Lec5s.mp4](#)

Окончание предыдущей «серии»: спиновое эхо, как частный случай того, что происходит с намагниченностью образца при воздействии на образец импульсов при условии его нахождения в магнитном поле (каким образом это можно детектировать). Напоминаю, что мы остановились на эксперименте по широкополосной развязке, которая «выключает» спиновое взаимодействие между ядрами определенных типов.

#48 Теперь рассмотрим технологию, важную для увеличения чувствительности экспериментов и поговорим об экспериментах, которые рождаются на основании этой технологии. Она называется «перенос поляризации». Поляризация – это то, насколько сильно расходятся энергетические уровни тех или иных ядер при помещении в магнитное поле. В соответствии с разницей гиромангнитных отношений у протонов поляризация большая, а у гетероядер - маленькая. Хотелось бы как-то использовать большую поляризацию протонов¹⁰¹ при накоплении спектров по гетероядрам. Оказалось, что можно это сделать.

[Здесь \[слева вверху\]](#) нарисовано четыре спиновых состояния. Это, к примеру, протон, связанный с углеродом. Углеродные переходы показаны **красными**, а протонные переходы - **синими** стрелками. Энергетическая разница [верхнего и нижнего уровней] у синих в 4 раза больше, чем у красных. Это соответствует тому, что гиромангнитное отношение протонов в 4 раза больше, чем у углерода. Поэтому частота резонанса в том же магнитном поле у протонов в 4 раза выше.

¹⁰⁰ ..., что открывает путь к раздельному накоплению сигналов с разными КССВ/мультиплетностью.

¹⁰¹ Больше поляризация => больше разность заселенностей => больше сигнал ЯМР

Перенос поляризации

SPI:

13C:

13C:

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:

1H: $\pi/2_x$ — $1/4J$ — π_x — $1/4J$ — $\pi/2_y$
для эха

13C: π_x — $\pi/2_x$ — FID
для смены направления

1H(AX)

13C(AX)

FID \Rightarrow

в каждом дублете поляризована одна компонента

INEPT с рефокусировкой и развязкой:

- варьируем фазу третьего Н-импульса с +у на -у \Rightarrow 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 (Н & С) в ее середине \Rightarrow компоненты дублета рефокусируются за счет спинового эха и уже не имеют противоположных фаз \Rightarrow можно использовать развязку от протонов во время накопления
- для разных мультиплетов Δ должна быть разной \Rightarrow можно отдельно копить подспектры с разной мультиплетностью сигналов (АРТ)
- частота прохождение INEPT не зависит от T_1 гетероядра \Rightarrow INEPT особенно эффективен для ядер с отрицательным γ (отрицательный максимальный ЯЭО \Rightarrow неэффективность простой развязки) и большим T_1 , напр. ^{15}N и ^{29}Si

Ф. Тоукач: слайд 48

Теперь посмотрим на заселенности этих состояний в равновесии. N – это одна четверть от всех ядер (некое большое число). А **дельты** – небольшие различия, связанные с разницей энергий этих уровней. Вы можете заметить, что заселенность состояний, разделенных синей стрелкой, отличается на $2\delta H$, то есть вот **здесь [верхний уровень]** на δH меньше, а **здесь [нижний уровень]** на δH больше в соответствии с тем, что энергия нижнего состояния меньше. То же самое можно сказать и про **эти два состояния [правая пара]**. Состояния, разделенные красными стрелками, отличаются на $2\delta C$, т.е. δ – это некая условная величина, которая показывает, насколько более выгодное энергетическое состояние более заселено, чем менее выгодное.

Итак, написали все дельты. Теперь смотрим на спектр ^{13}C . **Этот сигнал** - дублет, у него есть один сосед-протон. Условно обозначим интенсивности его компонентов как две единицы: **+1 и +1**. И помним, что в соответствии с разницей¹⁰² гиромагнитных отношений, а, следовательно, и энергии, δH и δC соотносится **вот так: 1:4 [формула слева]**. Теперь селективно облучаем π -импульсом один сателлит ^{13}C в протонном спектре. Напоминаю, что сателлиты ^{13}C - это маленькие сигналы по бокам от основного, которые образуют дублет за счет присутствия в молекуле одного процента ядер ^{13}C . Вот, к примеру, **этот переход [серая стрелка]**: один протонный сателлит ^{13}C в протонном спектре. π -Импульс инвертирует заселенности энергетических состояний, как я говорил в начале предыдущей лекции. Следовательно, там, где было $-\delta H$, станет $+\delta H$ и наоборот. Что же касается δC , то все остается без изменений, поскольку это импульс на частоте протонов, и он связан именно с энергией протонного перехода, то есть **вот с этой энергией [серая стрелка]**.

Что в результате получилось? **Эти два [диаграмма в центре, синяя стрелка]** остались, как были, поскольку мы селективно облучали только один сателлит ^{13}C , а в заселенности **этих состояний [серая стрелка]** инвертировалась протонная составляющая. Теперь посмотрим, какая получилась

¹⁰² Слово «разница» употреблено в значении «отношение одного к другому», в четыре раза.

разница между этими [нижний уровень слева] и этими [нижний уровень справа] заселенностями. То, что было (...) $2\delta C$, теперь получилось $2\delta C$ и еще $2\delta H$, потому что здесь [в равновесии, левая диаграмма] δH были одинаковыми, они никакой разницы не привносили, а здесь [диаграмма в центре] они стали разными, т.е. разница заселенностей этого и этого [нижние уровни на диаграмме в центре] состояний стала $2\delta H + 2\delta C$. Теперь вспоминаем, что $\delta H = 4\delta C$. Подставляем эту формулу сюда и получаем разницу заселенностей между этим и этим [нижние уровни на диаграмме в центре] - $10\delta C$. δ - это у нас половина [разницы заселенностей в равновесии], значит 10δ - это, по сути, увеличение сигнала в 5 раз. Вот здесь [слева] было $2\delta C$, а здесь [по центру] стало $10\delta C$, т.е. одна компонента дублета [правая] в спектре ^{13}C увеличилась в 5 раз. Теперь посмотрим на другую компоненту, вот эту [верхние уровни на диаграмме в центре]. (...) Она увеличилась в три раза и поменяла знак. Совершенно аналогичные рассуждения: здесь $-\delta H + \delta C$ [левый верхний уровень], здесь $+\delta H - \delta C$ [правый верхний уровень]¹⁰³, подставляем вот это [формула $\delta H = 4\delta C$] вот сюда [разница заселенностей верхних уровней] и получаем разницу в $-6\delta C$.

В результате, если мы снимали спектр ^{13}C без развязки от протонов, мы видели дублет с интенсивностями 1:1 за счет наличия протона рядом с атомом, который дал этот сигнал, а после селективного облучения одного сателлита мы видим вот такой сигнал [-3:+5]. Во-первых, компоненты дублета «смотрят» в разные стороны, а во-вторых, одна из них в 3, а другая в 5 раз больше [, чем в спектре ^{13}C без развязки]. Это может быть очень полезно с точки зрения чувствительности. После такой операции чувствительность конкретно по этому сигналу увеличится вот в такое число раз [4, в формуле слева], а это – отношение гиромагнитных отношений протонов и углерода. Мы помним, что оно равно 4, за счет этого чувствительность увеличится в 4 раза. И зависимость интенсивности сигнала (чувствительности) от гиромагнитного отношения, которое в норме кубическое, становится квадратичным.

Но этот эксперимент не очень удобен. Во-первых, он влияет только на один сигнал. Во-вторых, не очень удобно с точки зрения фазировки, что одна линия «смотрит» вверх, а другая вниз. Поэтому этот эксперимент называется SPI - Selective Polarisation Inversion, скорее всего. Есть и более универсальный эксперимент, который, во-первых, воздействует на все сигналы, а во-вторых, помогает добиться одинаковой фазы. Вот его импульсная последовательность. Сразу скажу, называется эта группа экспериментов – INEPT. Incredible Natural Abundance... Enhancement By Polarization Transfer, наверное, или что-то в этом роде¹⁰⁴. Начинается с Incredible, PT - это Polarisation Transfer, а E – не уверен. Но общий смысл такой - невероятное увеличение чувствительности за счет переноса [поляризации] с протонов на гетероядро. Что здесь происходит? Здесь показана импульсная последовательность, она состоит из двух составляющих: то, что происходит на частоте протонов, и то, что происходит на частоте углерода. А здесь [ниже последовательности] показаны составляющие намагниченности образца, опять же - протонная намагниченность [вверху] и углеродная намагниченность [внизу]. Не буду подробно останавливаться на том, из чего она состоит, поскольку это написано на экране; здесь подписано, для чего какой импульс нужен. π -Импульс посередине последовательности на частоте протонов нужен для возникновения спинового эха – вспоминаем последний слайд предыдущей лекции. То есть для рефокусировки компонент. А импульс вдоль той же самой оси на частоте углерода нужен для смены направления, то есть чтобы эти + и – поменялись местами. В то же время π -импульс на частоте углерода переворачивает углеродную составляющую намагниченности вниз, дальше она начинает постепенно релаксировать и в какой-то (последний) момент переводится в горизонтальную плоскость $\pi/2$ -импульсом для создания проекции на

¹⁰³ В лекции перепутаны знаки δC , в стенограмме исправлено.

¹⁰⁴ Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer

горизонтальную ось. Ключевое отличие **этого эксперимента [INEPT]** от **этого [SPI]** – то, что в каждом дублете поляризована одна компонента, вот мы можем посмотреть на **протонный спектр [протонный ВМН]**, увидеть эти компоненты и [понять, что] поляризована только одна. Поэтому мы будем видеть вот такую картину уже не для одного сигнала ^{13}C , сателлит которого мы селективно облучаем, а для *всех* сигналов в углеродном спектре.

Существуют и дополнительные улучшения, которые можно провести с этим экспериментом. Во-первых, у **третьего импульса по протонам** можно менять фазу. То есть, когда я говорю « π -импульс вдоль оси u », предполагается, что он [вектор импульса во вращающейся системе координат] «смотрит» в каком-то направлении, допустим, положительном направлении оси u , а можно его направить и в отрицательном [направлении] вдоль той же оси u . Это будет тот же самый импульс, но с фазой, смещенной на 180° . Это приведет к тому, что компоненты **в этих сигналах [несимметричных дублетах]** будут меняться местами, то есть $-3:+5$ и $-5:+3$ в зависимости от того, куда направлен третий протонный импульс. Что это значит? Это значит, что можно проводить накопления попеременно. В одном накоплении давать $\pi/2_u$, а в другом $\pi/2_{-u}$. И тогда после каждой пары накоплений эти интенсивности будут усредняться. Получаться будет $-4:+4$, то есть они перестанут быть разными по интенсивности. В целом эта идея [усреднения по накоплениям] называется «фазовый цикл». Когда мы меняем фазы различных импульсов, и у нас получаются немного разные спектры, которые при накоплении усредняются. Это делается не только для изменения интенсивности сигналов, но и для взаимоуничтожения различных ошибок, которые могут накапливаться в приборах. Самый распространенный цикл составляет 8 сканов. Там, видимо, не один импульс меняется, а что-то еще.¹⁰⁵

Дальше, можно добавить перед выборкой еще одну задержку и дополнительный импульс в середине. Это нужно для того, чтобы исправить противоположные фазы. Подробно не буду разбирать, что происходит с намагниченностью, да вам это и не понадобится, вам только нужно знать, что добавление этого импульса приведет к тому, что **эти две компоненты [-4:+4]** не будут иметь противоположных фаз, и можно будет соединить этот эксперимент с протонной развязкой. То есть одновременно использовать импульсную последовательность, связанную с развязкой от протонов во время накопления. Что это значит? Это значит, что **такие сигналы [мультиплеты]** у нас превратятся в синглеты. Во-первых, их будет легче идентифицировать, во-вторых, за счет синглетности они в два раза выше получатся, т.е. мы дополнительно увеличим чувствительность.

Теперь, здесь упоминаются некие задержки между импульсами, например, написано $1/4J$, а J – это в данном случае [прямая] КССВ между протоном и углеродом. (*поправка:* не $1/4 J$, а «1 разделить на $4J$ »; J – это величина константы спин-спинового взаимодействия, измеряем ее в герцах. Обратная величина от герца – это единицы времени, миллисекунды). Эксперимент будет работать наилучшим образом, если подобрать эти задержки так, чтобы они соответствовали [КССВ], но есть проблема: у разных сигналов эти константы могут быть разными. Тем не менее, если мы возьмем усредненную константу взаимодействия между углеродом и его протоном, то этот эксперимент тоже будет как-то работать. Возможно, не так идеально с точки зрения чувствительности, но чувствительность будет увеличиваться примерно на эти величины, то есть в 4 раза, и если превращаем [дублет] в синглет, то в 8 раз.

Следующий важный момент в этих экспериментах. **Вот эта третья задержка**, которая составляет единицу на две КССВ... ее оптимальное значение – разное для разных мультиплетов. То есть, меняя эту задержку, можно отдельно копировать сигналы с разной мультиплетностью. А что такое

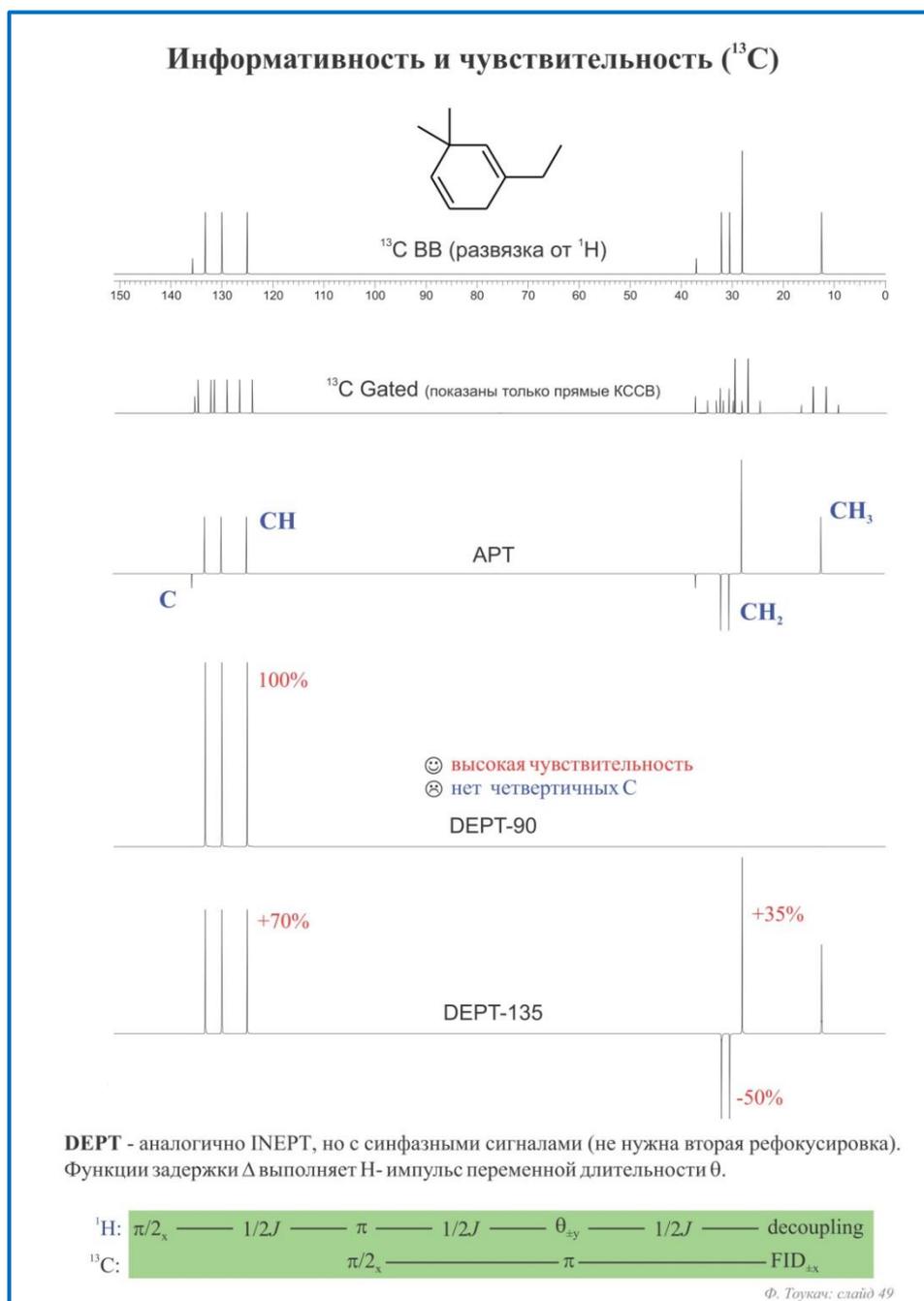
¹⁰⁵ Оси и фаза с шагом 90° : 0-90-90-0-180-270-270-180. Фазы импульса и приемника меняются когерентно.

разная мультиплетность ^{13}C применительно к прямым КССВ? Фактически это означает число протонов, которые присоединены к данному атому углерода. Значит, варьирование третьей задержки позволяет разделить и накопить по отдельности триплеты, дублеты, квартеты и синглеты. То есть отдельно получить спектр CH_2 -групп, отдельно CH_3 -групп, отдельно CH -групп.

И наконец, последняя особенность экспериментов с переносом поляризации. В эксперименте INEPT частота, с которой можно делать сканы, не зависит от времени релаксации гетероядра. То есть мы можем проводить сканы чаще, чем гетероядро успевает полностью релаксировать, поскольку спектр определяется временами протонной релаксации. Отсюда вывод: особенно этот INEPT будет эффективен для ядер с большим временем релаксации, а это в органической химии ^{15}N и кремний. То есть наибольшее увеличение чувствительности эксперимент INEPT дает на ядрах ^{15}N и ^{29}Si . Кроме этого, он эффективен для ядер с отрицательным гироманнитным отношением, у тех у которых спиновые состояния α и β поменяны местами. Этого вы пока не знаете (почему он эффективен), но возможно сегодня или на следующей неделе я расскажу про некий эффект, который тоже позволяет

увеличить чувствительность (называется он «ядерный эффект Оверхаузера»). И вот он как раз не работает на ядрах с отрицательным гироманнитным отношением. То есть он имеет отрицательную величину, и поэтому использование другого способа увеличения чувствительности малоэффективно, и остается только INEPT (...).

#49 [Вышеизложенные] физические основы приводят к следующим экспериментам. Сейчас я их сравню (спектры ^{13}C , полученные в результате разных экспериментов). Это [^{13}C ВВ] - самый распространенный спектр ^{13}C , (суффикс ВВ означает Broad Band, то есть широкополосная развязка от области резонанса протонов). Здесь спектры нарисованы в одном и том же масштабе по вертикали, чтобы показать разницу в чувствительности. Конкретно это [^{13}C ВВ] - предсказанный спектр этой молекулы. Итак, в этом спектре есть некие



синглеты. ^{13}C Gated – это спектр ^{13}C , снятый без развязки от протонов, в нем сигналы ^{13}C представляют собой мультиплеты, за счет чего они - ниже, потому, что [у них] больше линий в рамках одного сигнала. Здесь показаны только прямые КССВ, но в реальности картина еще более сложная, поскольку каждая из этих линий щепится с небольшими (по сравнению с этими) константами за счет наличия в молекуле взаимодействия через 2 и через 3 связи между протонами и углеродами. Здесь для упрощения интерпретации я нарисовал мультиплеты, учитывающие только прямые константы. Допустим, **этот углерод (метильный)**, имеет три протона (три соседа), вот он представлен **квartetом**. А в эксперименте ВВ это синглет.

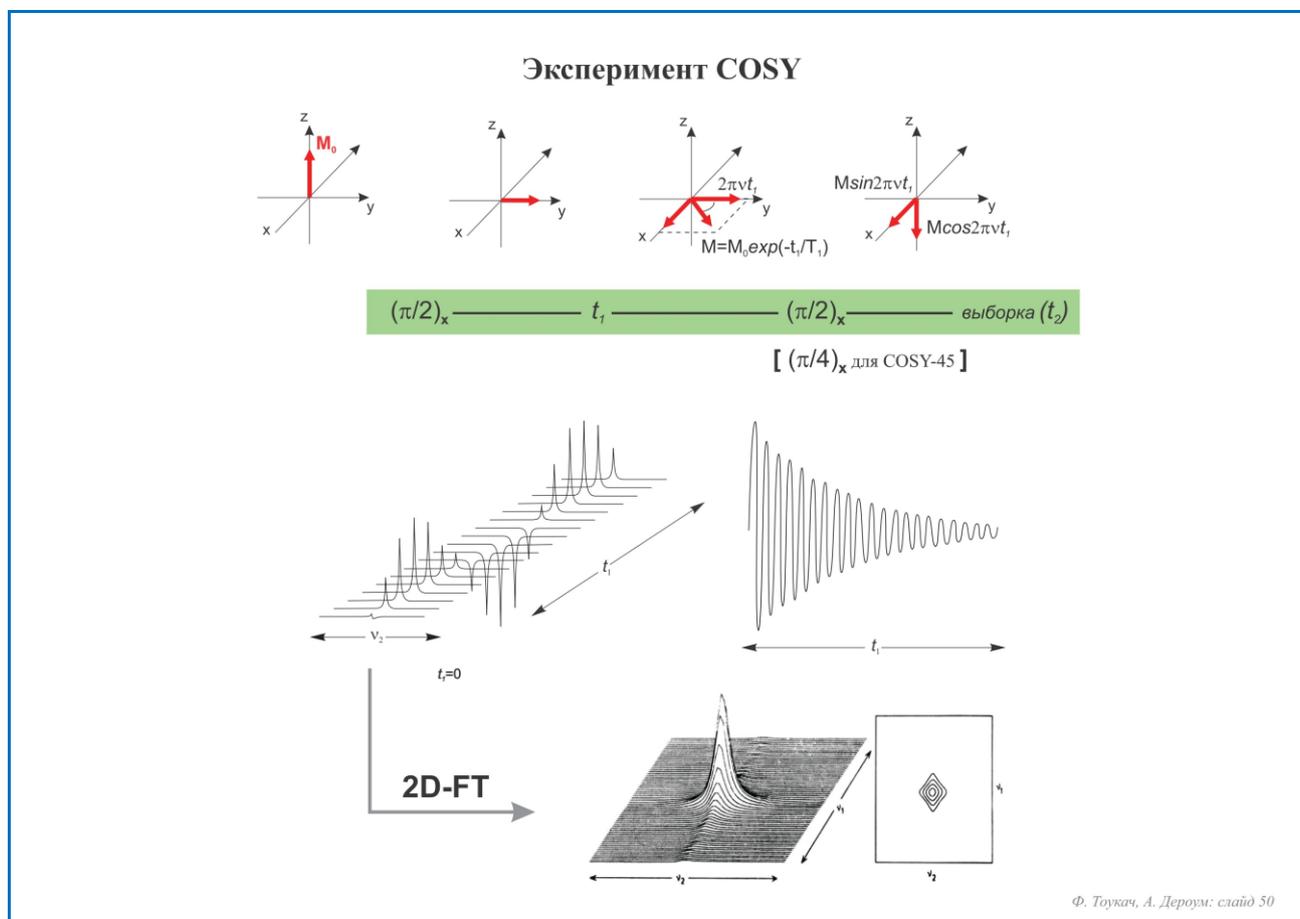
Способ накопления с помощью INEPT увеличивает сигналы [атомов] углерода, связанных с протонами. Как правило, этот эксперимент снимается так, чтобы разделить сигналы углеродов с четным и с нечетным числом протонов за счет фазы. Получается **что-то вот такое [три нижних спектра]**. Здесь эксперимент - не INEPT, а DEPT-135¹⁰⁶, это что-то того же типа (немного другая импульсная последовательность). Вот она **здесь приведена [внизу слайда]**, основана она на тех же принципах [, что INEPT]. Вам конкретно что в ней есть, запоминать не надо; если вам это понадобится, вы всегда можете на слайде посмотреть, а главное – понять, что получается в результате. А в результате мы видим, что [сигналы] CH_3 и CH «смотрят» вверх, а CH_2 «смотрят» вниз. При этом их интенсивность по сравнению с обычным DEPT имеет **вот такие значения [70%, 50%, 35%]**. То есть интенсивность сигналов нужно нормировать, если мы хотим ее сравнивать. Во-первых, она больше приблизительно в 4 раза, чем интенсивность сигналов в обычном спектре ^{13}C , а во-вторых, больше всего растет интенсивность CH . Несколько в меньшей степени CH_3 , и посередине между ними - CH_2 . Преимущества этого спектра – высокая чувствительность (мы видим небольшие сигналы на фоне шумов) и разделение углеродов, имеющих четное и нечетное число протонов. Также вы могли заметить, что в нем отсутствуют сигналы четвертичных углеродов, что вполне понятно: у них нет протона, с которого можно было бы перенести поляризацию, мы их здесь не видим. Если нам нужны четвертичные углероды, нужно копить обычный ^{13}C , но и там мы с высокой вероятностью их не увидим, поскольку они очень маленькие. Четвертичные углероды не имеют ядерного эффекта Оверхаузера, к которому мы вернемся чуть позже, их интенсивность не возрастает за счет близости протонов (поскольку у них нет протонов), и эти сигналы всегда малы. Если нам нужны именно четвертичные углероды, и мы хотим увидеть их на фоне шумов, скорее всего, это означает, что при средних значениях молекулярных масс нам нужно будет >30 мг образца (т.е. достаточно высокая концентрация) либо очень длительное накопление. Можно взять и 10 мг, на современном приборе сделать несколько сотен тысяч накоплений, что займет около суток, и тогда постепенно появятся сигналы четвертичных углеродов.

Есть также некий средний эксперимент, я не знаю его импульсную последовательность, но ее наверняка можно найти в справочниках; называется он **Attached Proton Test**. В нем сохраняется редактирование по мультиплетности, то есть четное и нечетное число протонов приводит к разной фазе сигналов, при этом нет увеличения чувствительности, но зато есть четвертичные углероды. То есть это, по сути, тот же спектр ^{13}C ВВ (с той же чувствительностью) с той лишь разницей, что «голые» C и CH_2 «смотрят» вниз, а CH и метилы «смотрят» вверх. Если у нас много вещества, выгодно снимать **вот это [АРТ]**, дополнительная информация [будет] за счет того, что [сигналы направлены] вверх и вниз. Если вещества мало, то, может быть, имеет смысл пожертвовать четвертичными углеродами, которых мы, скорее всего, не увидим при разумных временах накопления и увеличить чувствительность - снять DEPT-135. Если же у нас в молекуле [интересны] только CH , есть вариант **DEPT-90**, в котором видны только CH углероды. Во-первых, у них еще

¹⁰⁶ Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer

больше чувствительность, примерно треть больше, чем в этом эксперименте [DEPT-135], а во-вторых, если по какой-то причине вы не можете различить СН и СН₃, (допустим, хим. сдвиги нестандартные, и их нельзя разделить по хим. сдвигу), тогда, сняв и то, и другое, мы сможем узнать [путем вычитания спектров, какие сигналы СН, а какие – СН₃]. Те, которые в этом эксперименте [DEPT-90] остались – это СН, а те, которые исчезли и были в эксперименте DEPT-135 – это СН₃.

Эти числа, 90 и 135 – это углы одного из импульсов (90° и 135°), не помню, какого именно. Вот этого [θ], наверное¹⁰⁷. Но и для вас это не очень важно, как для химиков.



#50 Мы рассмотрели, что происходит с намагниченностью образца [во время импульсной последовательности] и как это влияет на спектры для нескольких одномерных экспериментов. Сейчас мы логически подошли к двумерным экспериментам. Самый простой из них называется COSY – COrrelation SpectroscopY. Correlation она называется потому, что этот эксперимент позволяет прокоррелировать химические сдвиги (и сигналы) протонов, между которыми есть спин-спиновая «связь». Я начну с физических принципов, потом покажу спектр и расскажу о соответствии [сигналов], и о том какие «структурные» выводы можно сделать из этого спектра.

Вот исходное состояние [слева], вращающаяся система координат. Намагниченность образца смотрит вверх. Мы поворачиваем ее на 90° 90-градусным импульсом вдоль оси X, вот текущее состояние [вторая диаграмма слева], дальше ждем некоторое время [t₁]. В соответствии с разницей между химическим сдвигом¹⁰⁸ этой линии и скоростью вращения системы координат линия начинает дрейфовать в [вращающейся] системе координат. ν – это химический сдвиг, и через время t₁ [линия

¹⁰⁷ В разных вариантах DEPT варьируется третий импульс по протонам. Кроме DEPT-90 и DEPT-135, есть также вариант DEPT-45 (сигналы четвертичных углеродов отсутствуют, остальные положительные).

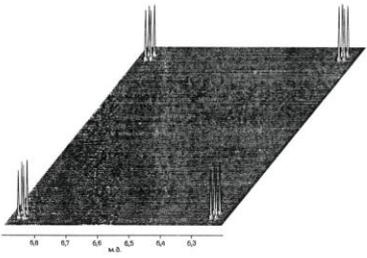
¹⁰⁸ Здесь речь идет про «абсолютный» химический сдвиг (от частоты спектрометра, а не от сигнала эталона).

M] успела как-то повернуться. Соответственно, если сигналов много, то компоненты, соответствующие каждому из них, поворачиваются с разной скоростью. Здесь не три вектора, а, по сути, **один вектор [M]**, но он представлен также и двумя проекциями: **на ось X и на ось Y**. Кроме этого, [за время t_1] произошла релаксация (небольшая), то есть абсолютное значение [вектора M] тоже уменьшилось по отношению к тому, что было **здесь [на второй диаграмме]**. После этого мы облучаем образец **еще одним 90-градусным импульсом**, который переводит на вертикальную ось ту компоненту, которая не успела повернуться (осталась на оси Y), а та проекция, которая возникла **[на оси X]** за время t_1 , остается в горизонтальной плоскости и после этого накапливается с помощью **выборки**. То есть мы для каждого сигнала накапливаем только ту часть [намагниченности], которая успела за время t_1 перейти на другую горизонтальную ось (с оси Y на ось X).

Что при этом произойдет? Предположим, в спектре был всего один сигнал. Это - **частотная шкала [ось ν_2]**, химический сдвиг, а **это – ось t_1** , то есть величина задержки между импульсами. Вот что получится: [при изменении t_1] сигналы будут изменяться: **уменьшаться, проходить через ноль, снова уменьшаться и так далее**. То есть будет изменяться интенсивность **этого [единственного] сигнала** в зависимости от того, в какой момент мы дали второй 90-градусный импульс. Если $t_1=0$, компонента на оси X еще не успела возникнуть, **этот вектор [BMH]** практически [направлен] **сюда [вправо]**; после второго 90-градусного импульса он весь окажется на вертикальной оси смотрящим вниз, а **эта компонента [на оси X на правой диаграмме]** не появится. То есть в FIDe не будет этого сигнала (**вот этот случай [спектр в стеке, ближний к зрителю]**). Дальше эта компонента [OX] постепенно появляется. При таком времени t_1 , за которое намагниченность успевает повернуться на четверть оборота, сигнал будет **максимальный**, потом 180° (пол-оборота) – **[сигнал] снова исчезает**, и так далее. А теперь посмотрим сбоку **на эти сигналы**, точнее, на их вершины. И увидим **вот что [синусоида справа]**: синусоидальное изменение интенсивности сигнала, при этом оно еще и уменьшается по амплитуде. То есть, если мы смотрим вдоль оси t_2 , вершина сигнала описывает **такую кривую**. Это, наверное, напоминает вам FID, и неспроста, поскольку с этим сигналом (с этой линией) тоже можно провести преобразование Фурье. И после того, как мы проведем Фурье преобразование, окажется, что возникнет сигнал как раз **на той же самой частоте [ν_1 , равной ν_2]**, и он будет иметь тот же химический сдвиг.

На самом деле можно преобразование Фурье провести вдоль двух осей одновременно, это называется «двумерное преобразование Фурье», и приводит оно уже не к одномерному спектру сигнала вдоль одной оси, а к двумерному, у которого есть две оси частоты. **Частота ν_2** , полученная из **оси времени [t_2]** (время выборки), и **частота ν_1** , полученная **из этой оси времени [t_1]** (время задержки). Здесь у нас две временных переменных (в импульсной последовательности) и после двумерного Фурье-преобразования получаются две частотных переменных, то есть два химических сдвига. Если это единственный сигнал, который ни с чем не взаимодействует, спектр не очень информативен, поскольку в нем присутствует **вот такой** (единственный) горб, который не привносит никакой новой информации по сравнению с одномерным экспериментом. Рисуют такие спектры обычно в виде контурной карты: **вот это [проекция справа внизу] – вид сверху на это [трехмерная картина]**. Контурные карты вы, наверное, встречали в школе, так **вот это [спектр] – контурная карта этого «рельефа»**.

Кросс-пики

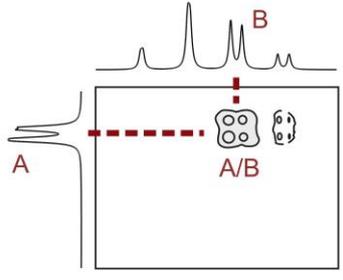


Спиново-связанные ядра - **когерентные переходы** (соответствующие им компоненты ВМН вращаются с фиксированной разностью фаз).
Облучение одного перехода влияет на заселенность связанных с ним переходов, перенося тем самым когерентность
 ⇒ FID, накопленный по t_2 , модулируется на частотах переходов,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



Двумерный корреляционный спектр

импульсная последовательность с переменной задержкой (t_1)
 намагниченность претерпевает РАЗНЫЕ эволюции вдоль t_1 и t_2
 ↓
кросс-пики (взаимодействие между сигналами)



Продольная релаксация во время t_1 ⇒ после второго импульса появляется компонента ВМН на другой горизонтальной оси. Она не прецессировала в течении t_1 ⇒ 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.

Ф. Тоукач, А. Дерюмов: слайд 51

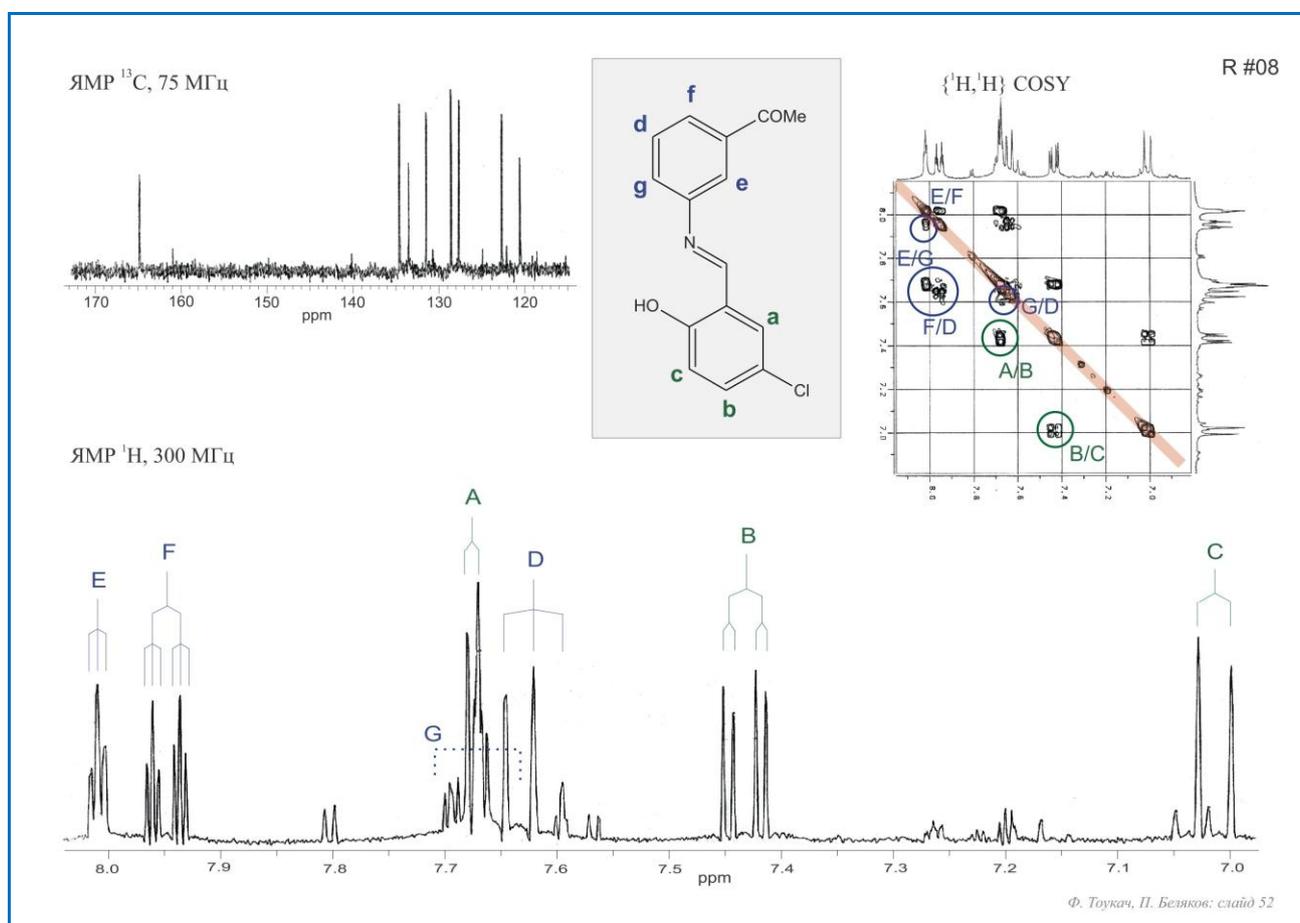
#51 Но самое интересное начинается тогда, когда у нас есть несколько (напр., два) протонов, связанных спин-спиновой «связью». Что значит «связаны спин-спиновой связью»? Это значит, что те компоненты намагниченности, которые соответствуют [их сигналам], вращаются (в т. ч. во вращающейся системе координат) с одной скоростью, то есть с фиксированной разностью фаз. Они не обязательно должны совпадать, но вращаться они будут вместе. Такое явление фиксированной разности фаз в физике вообще и в ЯМР в частности называются «когерентностью». Спиново-связанные ядра имеют когерентные переходы. А что это значит? Значит, их частоты связаны, и облучение одного перехода повлияет не только на него, но и на заселенность состояний, связанных с другим переходом, который когерентен облучаемому. Это называется «**переносом когерентности**». И вот как раз перенос когерентности проявляется в двумерных спектрах, поскольку FID, накапливаемый вдоль второй оси времени (t_2), модулируется на частотах переходов, проявляющихся вдоль первой оси времени (t_1). Результат получается вот такой **[двумерный спектр с кросс-пиками]**. Это спектр COSY системы из двух дублетов (два протона, которые щепятся друг на друге). Мы здесь видим четыре сигнала. Давайте сразу привыкать смотреть в виде **контурной карты [справа]**. (...) На ней есть кросс-пики между теми сигналами, между атомами которых возможен перенос когерентности. **Здесь [левый нижний кросс-пик]**, к примеру, хим. сдвиг - не вижу сколько там, шесть, допустим¹⁰⁹; он же - и здесь **[по другой оси]** шесть. Это - неинформативная составляющая. Такой пик называется диагональным, потому что **здесь [от левого нижнего угла к верхнему правому]** можно провести диагональ. А вот **этот кросс-пик [в левом верхнем углу]** имеет разные хим. сдвиги по двум разным осям **[6.2 и 6.9]**, это хим. сдвиг первого и второго взаимодействующих протонов. Поэтому, имея протонный спектр и спектр COSY, мы можем проследить, какие именно протоны взаимодействуют с интересующим нас сигналом. То есть, имея

¹⁰⁹ 6.9 м.д.

отнесение одного протона, перейти к отнесению другого протона, который мы по каким-то причинам не можем сделать из одномерного спектра.

Общая концепция такого подхода называется «корреляционная спектроскопия», а **вот это – обобщенный корреляционный спектр**. Здесь мы видим **одномерные спектры**¹¹⁰. Это может быть как один и тот же одномерный спектр, например, протонный, так и разные, если корреляция гетероядерная. Здесь, для примера, это один и тот же, но нарисованы его разные части (это не весь двумерный спектр, а вырезанный из него кусок, в котором мы видим два сигнала). Что означает этот **кросс-пик А/В**? Он означает что есть взаимодействие между сигналом А и сигналом В в одномерных спектрах, а какое именно это взаимодействие - зависит от конкретного корреляционного эксперимента. В эксперименте COSY это спин-спиновое взаимодействие с величинами КССВ ~10 Гц, то есть через три связи.

Итак, общая идея: импульсная последовательность, в которой есть переменная задержка, создает вторую ось времени. Намагниченность образца претерпевает разные эволюции вдоль реальной оси времени и оси времени, связанной с этой задержкой, что после двумерного преобразования Фурье дает нам кросс-пики, у которых 2 химических сдвига (А и В в этом примере). Два химических сдвига показывают, что сигналы с этими химическими сдвигами взаимодействуют. (...).



#52 Теперь посмотрим, как это можно применить в реальном структурном исследовании. Здесь протонный спектр, спектр ^{13}C (не знаю зачем он здесь приведен, может, потом понадобится) и спектр COSY. В спектре COSY красным я показал диагональ. Диагональ – это взаимодействие сигналов как

¹¹⁰ Их часто называют «проекциями», хотя это в данном случае не одномерные проекции двумерного спектра, а отдельные спектры, полученные из одномерного эксперимента.

бы «самих с собой», то есть сигналы, расположенные на диагонали, имеют одинаковые хим. сдвиги по одной и по другой оси. Поэтому они для нас не важны. Для нас важны именно те сигналы, которые лежат вне диагонали. Например, вот есть какой-то **сигнал здесь [В/С]**. Он говорит, что **этот дублет [7.0]** и **этот дублет дублетов [7.4]** в одномерном спектре имеют спин-спиновую связь. То есть, по сути, эти протоны находятся при соседних атомах углерода. Вы могли заметить, что одномерные спектры **здесь [по краям двумерного]** одинаковые. Как правило, одномерные спектры рисуют около одной или обеих сторон двумерного для облегчения визуальной интерпретации, чтобы сразу можно было **провести линию от кросс-пика, посмотреть, куда она приходит**, и найти сигнал в одномерном спектре.

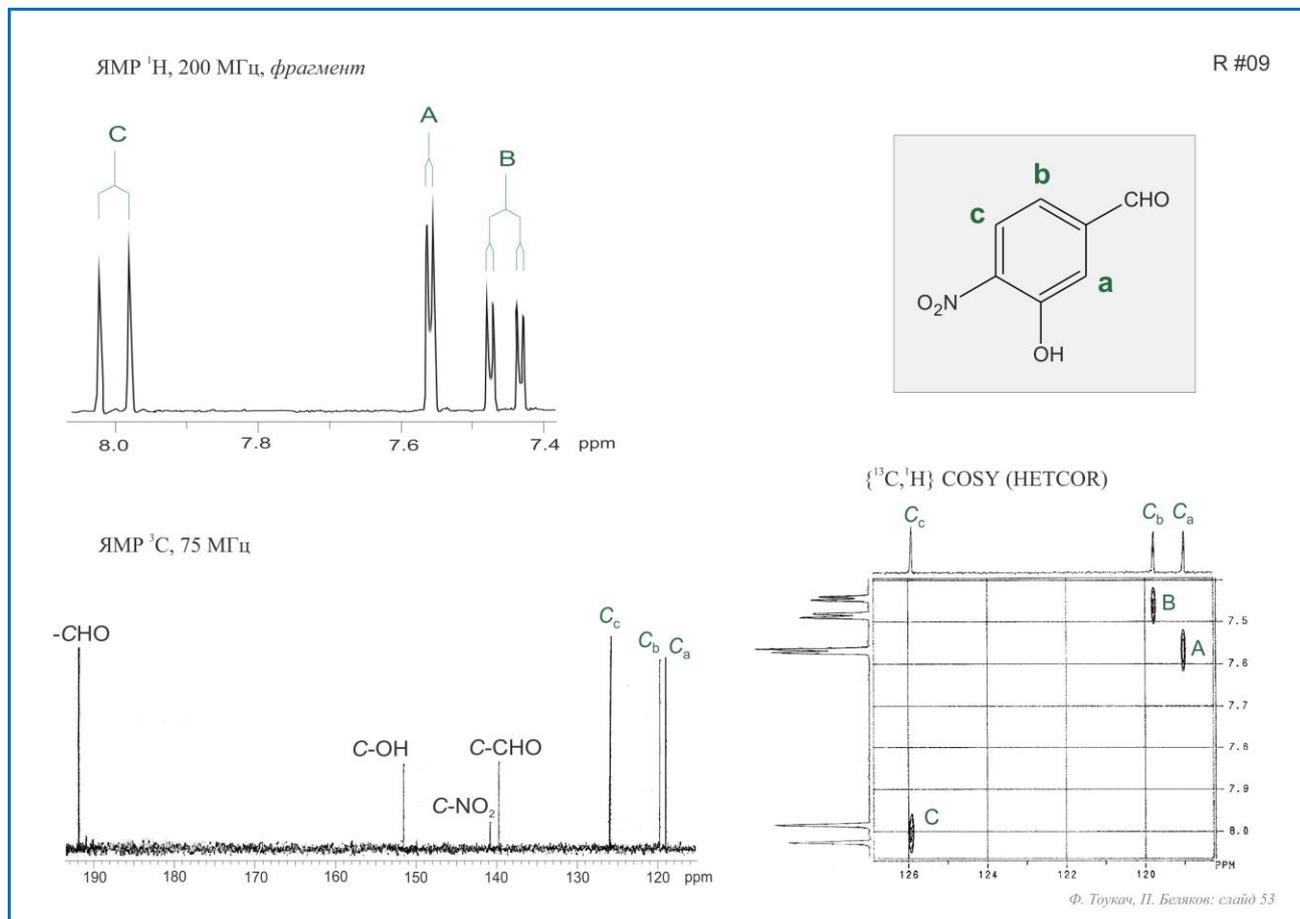
Вот тот же самый **одномерный спектр**. Система ABC вам уже знакома, ее выявить достаточно легко: большой дублет, узкий дублет, и дублет дублетов. Но выявление сигнала А уже может быть не таким легким, поскольку он пересекается с остальными [сигналами]. Но можно попробовать свою догадку подтвердить с помощью COSY. Раз есть спин-спиновая связь между сигналами С и В и сигналами А и В, мы должны видеть кросс-пики в COSY. Но оптимальную чувствительность COSY показывает именно на константах [~ 10 Гц]... на больших КССВ, то есть порядка КССВ между С и В. Поэтому кросс-пик А и В, скорее всего, будет меньше, но **здесь его тем не менее видно**, даже не уверен, что он здесь меньше. Интенсивность кросс-пиков по «контурной карте» оценить можно не всегда, поскольку широкий, но низкий пик может быть не виден в спектре COSY, несмотря на то, что он имеет тот же самый объем [, что и узкий высокий пик]. Объем в двумерном эксперименте — это аналог площади под сигналом в одномерном эксперименте.

Итак, к примеру, дублет дублетов в этой молекуле может быть **только один [В]**. (... *ошибочное рассуждение про F ...*) значит, мы можем на основании этого найти сигнал В и приписать его («сделать отнесение»). **Вот он** в этом спектре, смотрим, с чем он взаимодействует. У него **два недиагональных кросс-пика**. Как раз у него должно быть две константы спин-спинового взаимодействия, с С и А. Вот **один недиагональный кросс-пик** (с этой стороны диагонали), он же **с другой стороны** диагонали, а вот еще один – с **этой** стороны и с **этой** стороны. То есть можно сделать так: чтобы найти всех соседей **этого сигнала [атома]**, идем от него **вниз [вдоль 7.4]**, потом переходим **[под 45°]** на другую сторону диагонали и **идем вверх [вдоль 7.7]**, попадаем в **эту кучу [7.6-7.7]**. Здесь, если приложить линейку, мы увидим, что **этот кросс-пик [А/В]** точно вот **к двум самым высоким линиям** приходит, то есть **вот сюда [А]**. Отсюда можно сделать вывод, что сигнал А — это именно **эти две линии [7.67]**, а не, например, **эти [чуть правее с тем же расстоянием между ними]**.

То же самое с сигналом С, но здесь, в общем-то, и без COSY все ясно¹¹¹. **Вниз, на другую сторону** диагонали и **вверх**, пришли **вот к этому сигналу [С]**. То есть **этот сигнал [С]** взаимодействует с сигналом В (те же самые рассуждения). В данном простом случае можно, наверное, обойтись без двумерного спектра, сделать [отнесение], только рассматривая одномерный [спектр] и анализируя мультиплетность. Но в более сложных случаях это будет уже не так просто сделать, и эксперимент COSY будет являться незаменимым при отнесении протонного спектра. То есть, когда у нас есть цепочка углеродов, при каждом из которых есть протоны, и мы смогли идентифицировать, (напр., на основании мультиплетности или химического сдвига) только один из них [сигналов протонов], все остальные мы можем найти, двигаясь последовательно по цепочке констант спин-спинового взаимодействия.

Другие кросс-пики, которые здесь можно наблюдать: вот, например, **кросс-пик между F и D [7.95/7.60]**. И действительно, если **здесь - F**, то **здесь - D**. Но сейчас более хороший пример найдем.

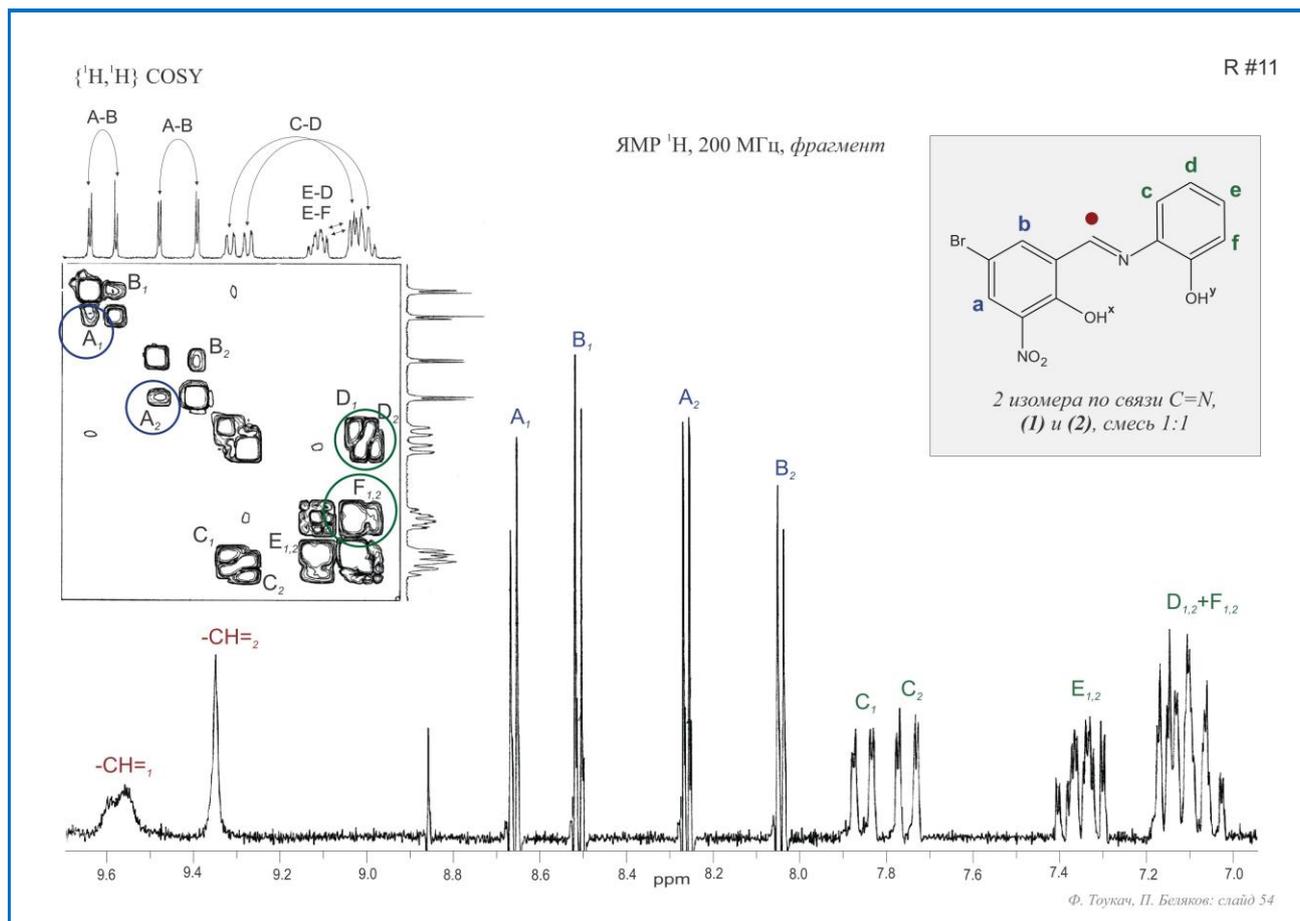
¹¹¹ По «эффекту крыши» сигнала В.



#53 Следующее применение. Эксперимент COSY существует и в гетероядерном варианте. Сейчас он в таком виде почти не используется, поскольку он вытеснен более чувствительным экспериментом HSQC, который дает ту же самую информацию. Но, тем не менее, одно преимущество у него есть – это очень узкие сигналы вдоль углеродной оси, и если у нас множество углеродных сигналов находятся близко, то более современные высокочувствительные эксперименты по гетероядерным корреляциям (типа HSQC, к которому мы еще вернемся), не дают нам достаточное разрешение по углеродной оси, чтобы однозначно сделать отнесение углеродного спектра. А гетероядерный вариант COSY такое разрешение дает, **вот так в нем выглядят кросс-пики**. Это **протонный спектр** (его часть в данном случае), это - **часть углеродного спектра**. Остальные сигналы можно отнести на основании химического спектра и интенсивности, а вот сигналы протонированных углеродов отнести можно было только с помощью этого эксперимента.

Это нужно для следующего. Вот есть **протонный спектр**, он легко относится по мультиплетности, то есть можно понять, кто А, кто В, а кто С, но нет уверенности в структуре. Такой протонный спектр говорит нам только о том, что два протона находятся близко, и один в *мета*-положении к одному из них. А, например, если поменять нитрогруппу и гидроксил местами, то протонный спектр качественно будет точно такой же, и мы не сможем отличить, эта ли структура, или в ней $-\text{NO}_2$ и $-\text{OH}$ поменяны местами. Но отличить можно, посчитав химические сдвиги ^{13}C . Протонные химические сдвиги близки, их расчет не будет информативным, а вот расчет [химического] сдвига ^{13}C , который отличается в данном случае, по крайней мере, на 10 м.д. (а ближайшие – на 1 м.д.), будет эффективным. Но для того, чтобы этот расчет имел смысл (чтобы было с чем сравнивать эксперимент), нам нужно отнесение спектра ^{13}C , то есть понять, кто А, кто В, а кто С «в углеродах», и вот это сделать без гетероядерной корреляции было бы вообще невозможно. А здесь, имея отнесение протонов (**вот оно**), мы с помощью **этих кросс-пигов** переходим к **отнесению углеродов**. И, сделав это отнесение, делаем расчет для одного и для другого варианта,

сравниваем с экспериментом, считаем среднеквадратичное отклонение, и если оно получилось существенно разным, из двух вариантов делаем выбор в пользу одного.



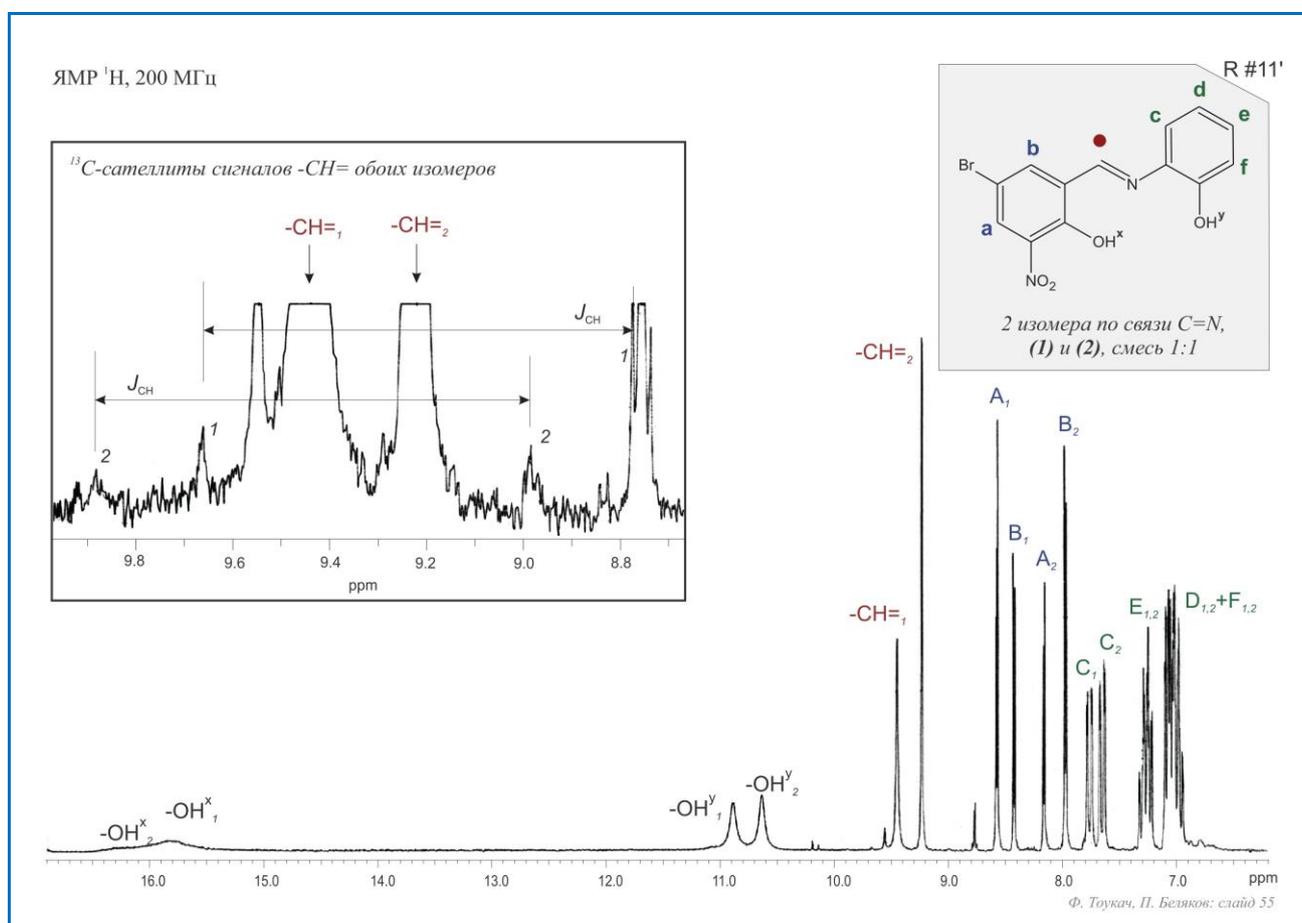
#54 Что еще можно сказать про протонный COSY (на следующем слайде он тоже есть). Он существует в нескольких вариантах, самые распространенные из них – COSY-90 и COSY-45. Это [число -] угол поворота намагниченности после второго импульса. Понятно, что 90-градусный COSY более чувствительный, поскольку мы создаем большую проекцию на горизонтальную плоскость при повороте намагниченности на 90° , а COSY-45 менее чувствительный, но в COSY-45 есть свое преимущество: кросс-пики в нем имеют «скособоченную» форму. В COSY-90 это что-то вот такого типа [рисунок на доске: $\bullet\bullet$]; взаимодействуют два дублета, один — вот здесь [сверху], другой — вот здесь [сбоку]. Вот это кросс-пик, идеальный, из 4-х отдельных компонентов. В COSY-45 он будет выглядеть вот так: маленькие здесь и большие здесь [рисунок на доске: $\bullet\bullet$]. То есть он будет иметь собственную диагональ, и в какую сторону она повернута, соответствует знаку константы спин-спинового взаимодействия. То есть вот это расстояние – это величина K_{CCB} , а так она расположена [] или так [] в COSY-45 – это знак K_{CCB} . То есть COSY-45 дает нам дополнительную информацию о том, отрицательная или положительная K_{CCB} [соответствует каждому кросс-пику]. Дальше можно сравнить знаки K_{CCB} с табличными значениями и делать какой-то вывод о структуре. COSY-45 – получаем знак константы, а также лучше разрешение вблизи диагонали, а COSY-90 – получаем лучше чувствительность.

Существуют и другие варианты COSY, к которым мы чуть позже вернемся, в частности возможность снять спектр без диагонали¹¹². Это иногда может быть очень полезно, потому что близко расположенные сигналы имеют кросс-пики вблизи диагонали и, накладываясь на

¹¹² Эксперимент COSY DQF (double quantum filtered).

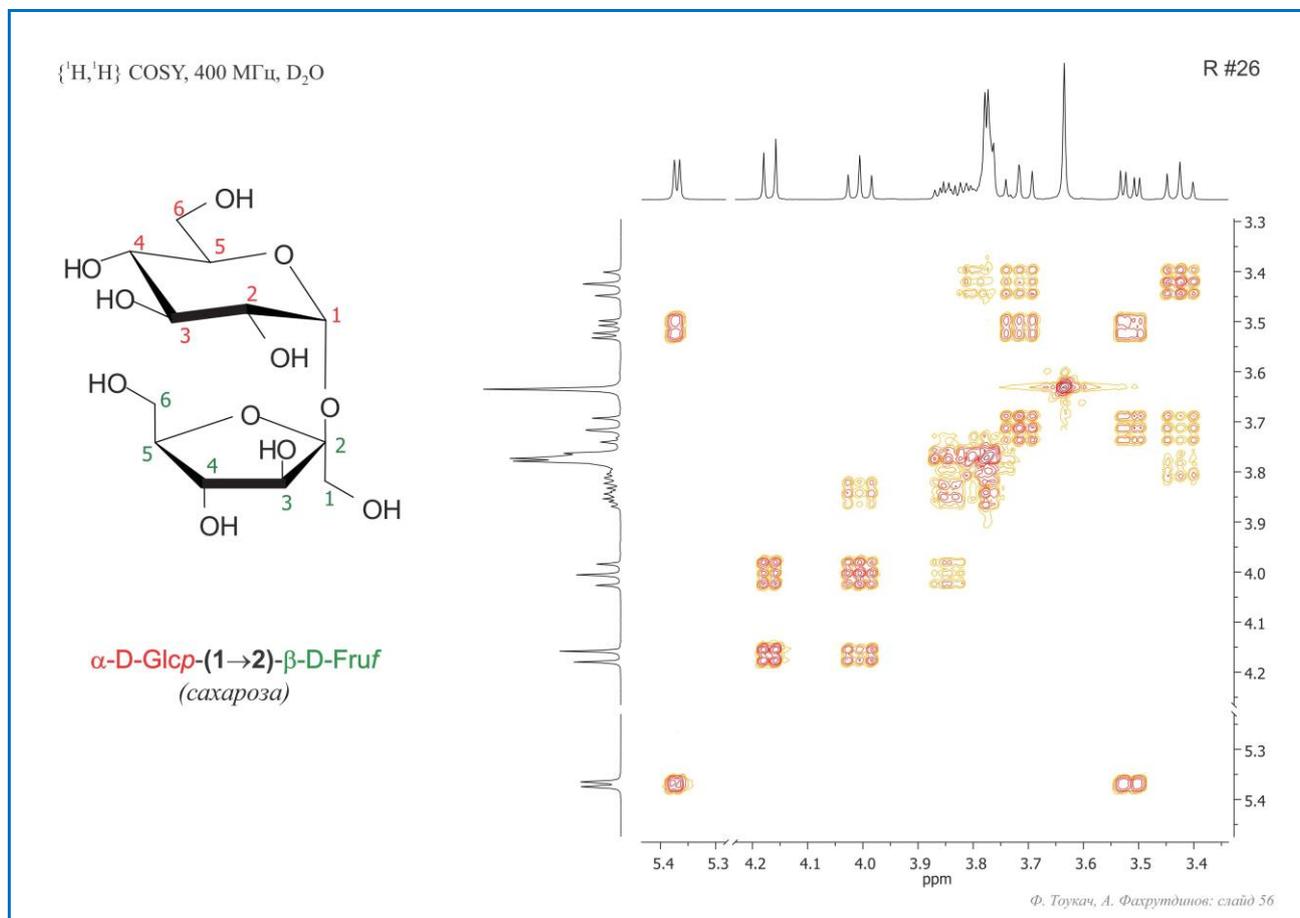
диагональные сигналы, это кросс-пики дают трудно интерпретируемую мешанину в спектре COSY, а если диагонали нет, эти сигналы можно различить.

Еще один пример. Вот такая молекула, в ней есть, кроме ОН-групп, три спиновые системы, и оказалось, что здесь смесь изомеров? причем в самом неприятном соотношении (1:1), не позволяющем сделать [раздельное] отнесение сигналов по компонентам смеси, сравнивая интенсивность, поскольку они все примерно одной высоты. Но здесь отнесение уже написано. То есть вот, например, A_1 и A_2 – это сигналы протона a из одной молекулы и из другой. Но как понять из этих четырех дублетов, какие из них из одной молекулы, какие из другой, и какие из них А, а какие В. В этом как раз может помочь спектр COSY: здесь мы видим недиагональное взаимодействие (вот оно), которое связывает этот сигнал [A_1] с этим [B_1], но отсутствует взаимодействие в этой области, которое связывало бы любой из этих двух сигналов [A_1 и B_1] с любым из этих двух [A_2 и B_2]. Отсюда можно сделать вывод, что эти два дублета принадлежат одной молекуле, а эти два дублета – другой. То есть при соотношении компонентов 1:1 разделить спектр на подспектры компонентов. То же самое касается и других взаимодействий. Вот здесь эти взаимодействия, выявленные с помощью COSY, показаны гнутыми стрелками над одномерными спектрами.



#55 Но спектр COSY с одномерными [проекциями] так и не дал нам ответа на то, как какие сигналы какой молекуле соответствуют. Возможность изомерии, я вижу здесь [$\text{C}=\text{N}$] – это цис-транс-изомерия по двойной связи. И есть два сигнала: CH -протоны, красные. Поскольку они – синглеты, из COSY мы ничего для этих сигналов не получим. Но можно посмотреть на их спутники ^{13}C . Вот основания этих двух сигналов при большом увеличении [врезка], и где-то на расстоянии, примерно соответствующем половине прямой КССВ, мы видим дополнительные сигналы [1 и 2]. Но в случае

этого [1] удалось только один найти [левый], а второй с чем-то пересекался. Тем не менее, эти расстояния можно померить. То есть здесь оказалось достаточно вещества и достаточно чувствительности эксперимента, чтобы, несмотря на допотопный прибор, получить сателлиты ^{13}C и измерить константу¹¹³ между ними, оказалось, что они разные. Это как раз и говорит о том, что вот этот протон, и, соответственно, эта связь [CH] «смотрят» в разные стороны относительно неподделенной пары азота в двух изомерах. Это была моя курсовая работа в 10-м классе химического лица.



#56 Если предыдущие примеры, имея натренированный взгляд, еще можно как-то «разобрать» [по одномерным спектрам], то подобный пример без двумерной спектроскопии выглядит уже более сложным для интерпретации. Это «синтезированный» (предсказанный) спектр COSY очень распространенной молекулы. На этой молекуле я стараюсь давать все примеры. [Это вещество] - дешевое, его много, можно легко приготовить образец и снять с него самые разнообразные спектры, а затем сравнить их с предсказанными. Итак, что мы здесь имеем? Остаток глюкозы я обозначил красными цифрами, и остаток фруктозы – зелеными. Число – это номер атома. Так принято нумеровать [атомы] в химии углеводов. Сразу скажу, **шестых [протонов]** - две штуки, и они неэквивалентны, а у **второго [углерода]** (зеленого), протона нет (четвертичный углерод).

И вот **такую картину мы наблюдаем в COSY**. Она дает довольно много полезной информации по сравнению лишь с одномерным спектром. Например, **здесь - триплеты [3.4, 3.7, 4.0]**; все эти триплеты выглядят примерно одинаково. Хим. сдвиги у них тоже не настолько сильно отличаются, чтобы, глядя на молекулу, сказать, кто из них кто. Ну, например, что может быть триплетом? Например, может быть третий красный: у него два соседа (второй и четвертый), оба находятся в антиперипланарном положении, с ними одинаковая КССВ порядка 10 Гц. Поэтому это триплет с

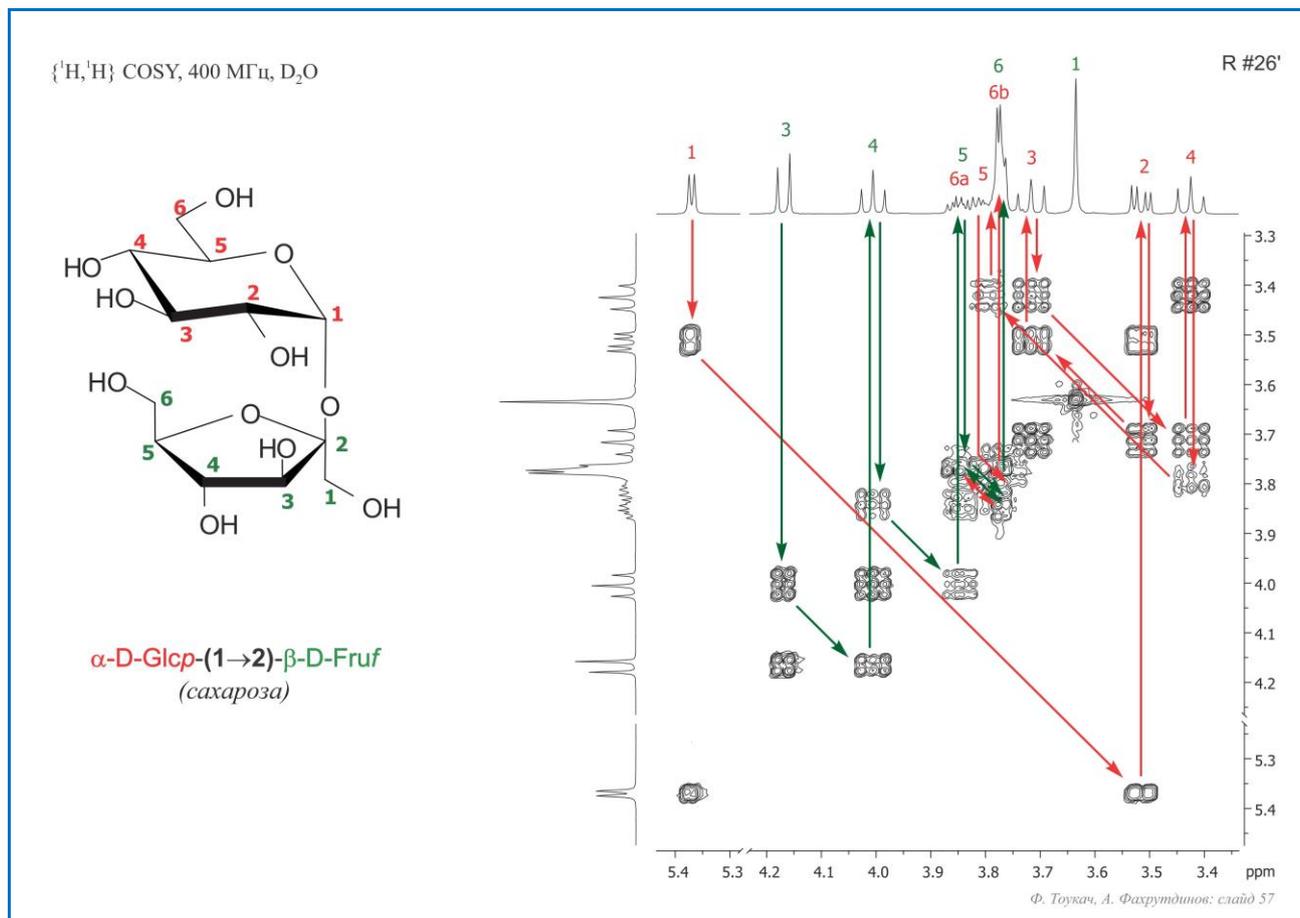
¹¹³ КССВ $^1J_{\text{CH}}$ отличаются в зависимости от конфигурации двойной связи во фрагменте $-\text{CH}=\text{N}-$.

константой 10 Гц. И то же самое можно сказать и про четвертый [красный], и то же самое, наверное, можно сказать про четвертый зеленый, у него тоже третий «в транс», и пятый «в транс» по отношению к нему. У всех примерно одинаковые константы.

Как узнать, кто из них кто? Это можно сделать, проследив взаимодействие. Для этого нам достаточно раскрасить какой-то один пик, который легко идентифицируется, а дальше, пользуясь COSY, двигаться от него к остальным. Как его выбрать? Во-первых, можно выбрать тот, у которого единственный недиагональный кросс-пик, например, [вот этот \[5.4\]](#). То есть если мы выберем, к примеру, [вот этот \[4.2\]](#), у него [будет] два недиагональных кросс-пика, и надо будет еще как-то понять, какой из них к одному соседу относится, а какой к другому. А в случае, если он [кросс-пик] один, рассуждения проще. Во-вторых, этот же сигнал имеет сильно отличающийся хим. сдвиг 5.4, а следующий за ним - уже 4.2, то есть [меньше] на целую миллионную долю. [Самый левый \[5.4\]](#) – очевидно тот, у которого два кислорода рядом, а такой в этой молекуле только один, это красный-1. То есть это протон углерода, который связан с двумя кислородами. За счет электроотрицательности химический сдвиг максимален, поэтому можно сказать, что это он. Дальше смотрим на его константу спин-спинового взаимодействия. Она маленькая (здесь масштаб такой – [это \[4.2\]](#) - большая, а [это \[5.4\]](#) - маленькая), ~3 Гц. И в молекуле действительно так и есть, в остатке α -глюкозы второй [протон] - аксиальный, а первый - экваториальный, поэтому между ними [торсионный] угол $\sim 120^\circ$, и получается маленькая константа. То есть [вот этот сигнал \[5.4\]](#), как по константе, так и по хим. сдвигу можно найти, а самое главное, что в спектре не так много дублетов, их всего два. А дублеты – это крайние в цепочке, потому что если взять из середины цепи, то у всех них по два, а у некоторых и по три соседа. А по одному соседу (чтобы дублет получился) только у двух протонов, у первого красного и у третьего зеленого. Поэтому [этот дублет \[5.4\]](#) - или красный-1, или зеленый-3 (...). Но у зеленого-3 не будет такого химического сдвига, поскольку его углерод связан только с одним кислородом, и кроме этого, у него больше константа, [вот он \[зеленый-3 в молекуле\]](#). Это можно выявить, потому что [этот \[зеленый-3\]](#) смотрит вниз, а [четвертый \[зеленый-4\]](#) (единственный сосед), смотрит вверх. Значит, антиперипланарное положение, большая КССВ. То есть [этим \[сигналом на 5.4\]](#) он уже быть не может. Итак, на основании их крайнего положения в спиновой системе и величин констант можем написать красную единичку [здесь \[5.4\]](#) и зеленую трешку [здесь \[4.2\]](#), а дальше с помощью COSY раскрутить все остальные. На следующем слайде, по-моему, показано [как это сделать].

#57 Да, точно, вот последовательность рассуждений. Эти [две цифры \[красный-1 и зеленый-3\]](#) мы приписали. Естественно, цвет можно было по-другому выбрать, особенно если нам структура неизвестна. Находим [единственный кросс-пик красного-1](#). Переходим [через диагональ](#). Диагональ здесь [вот так идет \[из левого нижнего в правый верхний угол\]](#), вот он, [поднимаемся наверх](#), видим другой сигнал, [дублет дублетов \[3.5\]](#). Ну это может быть только красный-2, потому что у красного-1 он - единственный сосед. Дальше от второго идем вниз, вот эта диагональ, [это - корреляция с первым](#), а вот - [еще одна корреляция \[3.5/3.7\]](#). Она может быть только с третьим, с первым уже занято, а других соседей нет. Вот эта [корреляция 2-3](#). Переходим через диагональ, поднимаемся вверх, можем приписать [сюда \[3.7\]](#) красную тройку. То есть, [этот триплет \[3.7\]](#) – это красный-3. Дальше у него есть взаимодействие [со вторым \[3.7/3.5\]](#), [диагональ \[3.7/3.7\]](#) и еще один кросс-пик, который, ([этот \[3.7/3.4\]](#)) есть ни что иное как взаимодействие с четвертым. Снова переходим на другую сторону диагонали, поднимаемся [наверх](#), и находим [красный-4](#). От четвертого аналогично переходим к [пятому](#), но здесь уже [отнесение] не так очевидно [из-за наложения сигналов]; от пятого к шестому уже перейти будет сложно. Смотрим, что есть еще на уровне пятого, вот [4-5-корреляция](#) и какая-то [«куча» здесь \[~3.8\]](#), в которой все смешалось, и диагональный кросс-пик, и видимо, оба

шестых тоже попали сюда. Но у шестых хим. сдвиг может быть одинаковым, а может быть и разным, поскольку вращение вокруг связи [C5-C6] затруднено. Мы здесь видим два кросс-пики, которые могут быть взаимодействием между красными шестыми (между собой). И каждый из них взаимодействует еще и с пятым. Но все они [сигналы красных пятого и шестых] находятся близко [друг от друга], потому что [здесь \[на вертикали ~3.8\]](#) лишних кросс-пииков нет.



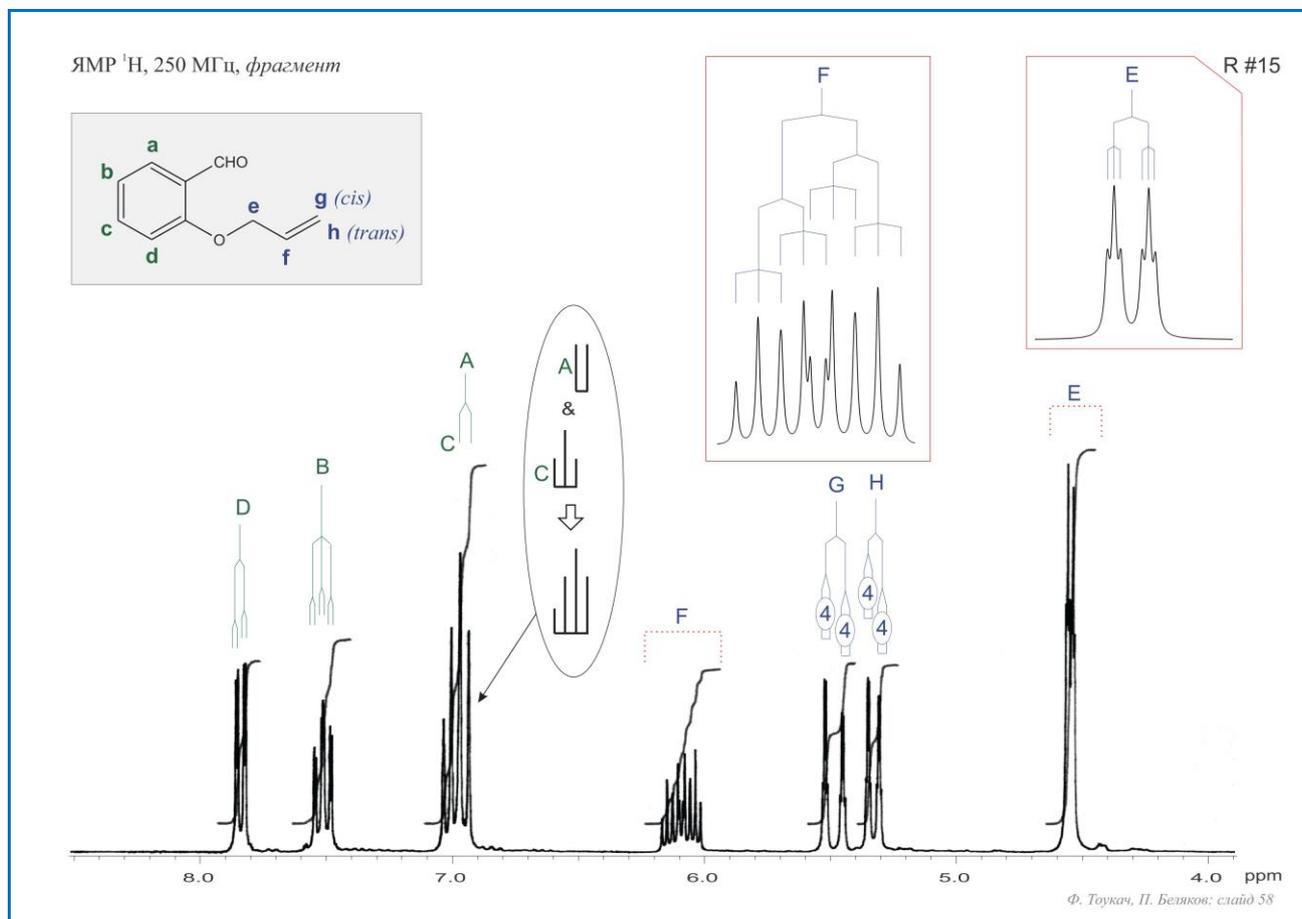
Теперь повторяем то же самое для зеленых. От третьего переходим к **четвертому**, от него к **пятому**, и здесь тоже шестой нельзя выявить однозначно. Ясно только, что он где-то в этой «куче», но поскольку здесь много сигналов перекрывается, найти зеленый-6 не получится. Но хотя бы все остальные, кроме шестых, мы смогли найти с помощью этого эксперимента. Также напоминаю, что здесь не участвует зеленый-1, поскольку у него нет соседей-протонов, следовательно, нет констант спин-спинового взаимодействия, и в COSY у него нет кросс-пииков, а есть только диагональный пик, ([вот он \[3.65\]](#)), но этот сигнал тоже легко выявить на спектре, потому что это единственный синглет. Строго говоря, зеленые-6, если совпадут, тоже будут синглетом, но здесь поскольку (...путаница...) он [3.65] отдельно стоящий, мы делаем вывод, что **это** - первый, а **это [~3.8]** - шестой, а потому что если бы это [3.65] был шестой, то у зеленого-5 были бы с ним кросс-пики [где-то здесь \[3.8/3.6\]](#), а их здесь нет.

Итак, спектр COSY - способ отнесения протонного спектра, то есть [способ] найти, кто с кем находится на расстоянии 3-4 связей.

Очевидный плюс двумерных экспериментов - мы сразу получаем информацию о взаимодействиях. Но есть и минус - они намного менее чувствительны, чем одномерные. Поэтому для накопления [спектра] двумерного эксперимента требуется более длительное время. И раньше можно было еще сказать, что более квалифицированный оператор, но применительно к таким простым двумерным экспериментам как COSY, сейчас уже квалификации любого оператора

достаточно. Поскольку чувствительность там маленькая, ошибки оператора, неточность настройки разрешения, отраженные сигналы и прочие артефакты, которых не должно быть, могут привести к тому, что спектр «свалится» за границу интерпретабельности. То есть, если его качество будет низким, накладываясь на низкую чувствительность, это даст нам плохо интерпретируемый спектр. Поэтому от оператора в случае с COSY требуется больше, чем в случае снятия обычного протонного спектра, поэтому съемка COSY стоит дороже. На относительно старых приборах, которых еще много осталось в институтах, протонный спектр снимается минуты за четыре, а COSY снимается минут за 40, то есть примерно в 10 раз [дольше]. Сейчас же существуют различные модификации импульсной последовательности COSY, которые используют дополнительные возможности современных градиентных датчиков для [новых] приборов, и такие спектры COSY можно снимать за 5-10 минут, то есть тоже очень быстро.

Тем не менее, иногда не хватает концентрации, или еще по каким-то причинам двумерные эксперименты становятся невыгодными. Тогда [стоит вспомнить, что] для каждого двумерного эксперимента существует его одномерный аналог. Что такое одномерный аналог, к примеру, COSY? Это срез на уровне химического сдвига какого-то одного сигнала. То есть одномерный аналог COSY, который называется «двойной резонанс», покажет нам спин-спиновые взаимодействия одного конкретного интересующего нас сигнала. Не всех, с кем [все сигналы] взаимодействуют, а только одного, который мы целенаправленно облучаем.



#58 На этом слайде представлен протонный спектр, а на следующем мы увидим спектр двойного резонанса, но, чтобы его понять, смотрим сначала на протонный. Здесь у нас есть **ароматическая часть ABCD**, которая вам уже знакома. В ней мы на двух сигналах (В и D) **видим мета-константы**, а на сигналах А и С мы их не видим. Причем, они [сигналы А и С] очень интересно здесь совпали, вот два сигнала, **дублет и триплет**, и левая линия А точно совпала с правой линией С, поэтому

получилась такая картина [четыре линии 1:2:3:2]. Вот эта картина в реальном спектре [7.0], а здесь [в эллипсе] объяснение того, как она получается.

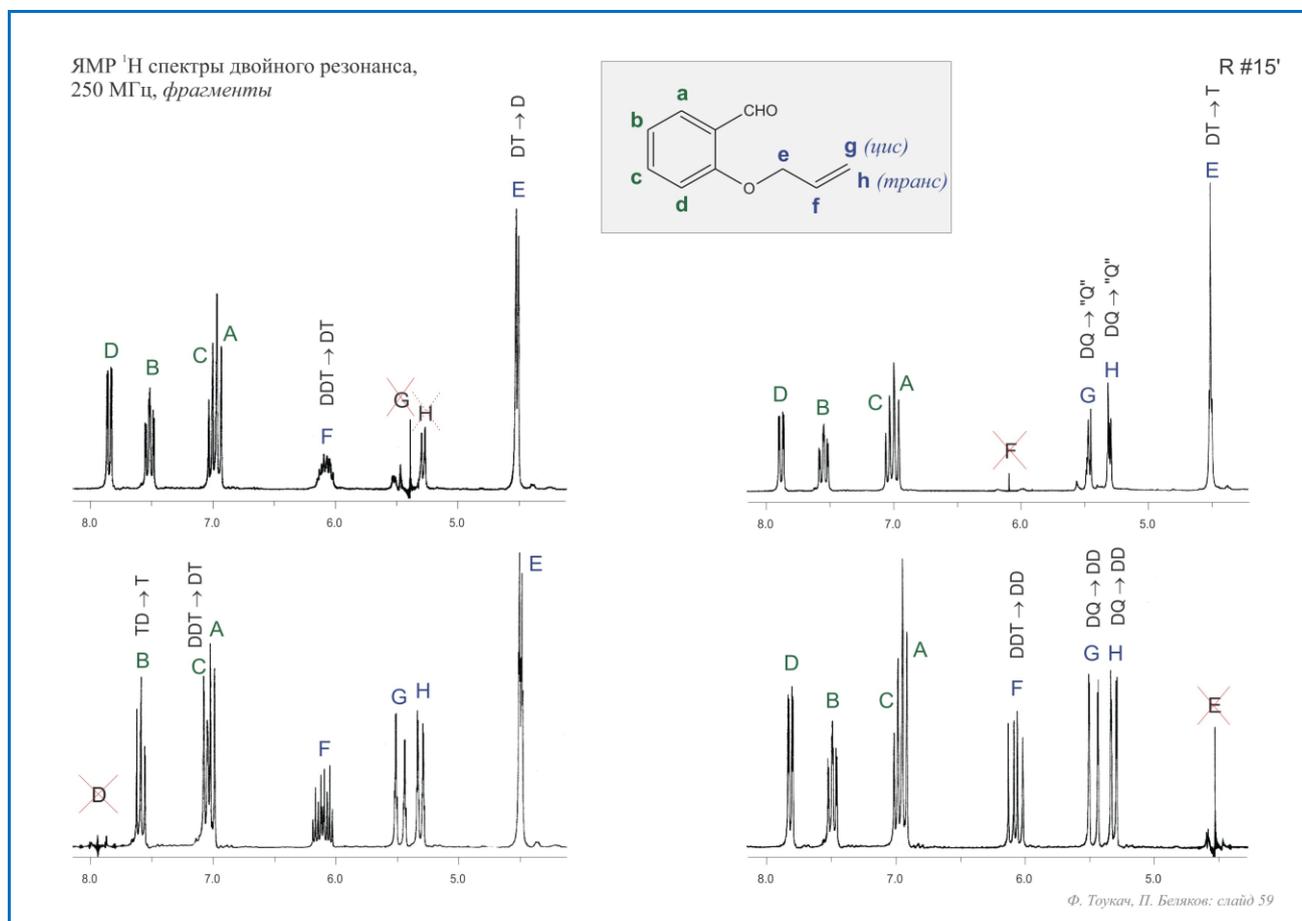
А в алифатическом «хвосте» что у нас есть? Во-первых, E. У него один сосед близко и два соседа с маленькой константой спин-спинового взаимодействия. Несмотря на то, что один «в цисе», а другой «в транс», их константы [с E] приблизительно равны (~2 Гц), поэтому G и H выглядят для E, как два одинаковых [соседа], а F - как один другой [сосед]. Щепление E на F - дублетное, а щепление на G и H - триплетное, вот этот сигнал [E] увеличен. Теперь посмотрим на G и H. Каждый из них имеет большую КССВ с F (в одном случае совсем большую, в другом случае немного меньше), и примерно одинаковые константы со всеми остальными, то есть G с H и двумя E - все по ~2 Гц (как и H с G и то же с двумя E). То есть три дальних соседа и один ближний и у того, и у другого, поэтому мы имеем дублет и квартет (так я квартет обозначил [(4)]). Самый интересный - F, вот такое сложное расщепление [F], все три константы разные, причем самая большая – это с G, вот эта, чуть поменьше – это с H, и самая маленькая – FE, она триплетная, потому что E - две штуки. То есть это сигнал DDT, при увеличении он дает такую картину: дублетное расщепление, еще одно дублетное расщепление и триплетное расщепление на E.

Это достаточно легко говорить, когда оно уже подписано, и когда об этом знаешь. А предположим, что у вас стоит такая структурная задача, и есть предположение о формуле, и такой спектр. Здесь понять, что [есть] дублеты, а что - триплеты, за счет того, что некоторые линии пересекаются, не так просто. И здесь нам поможет как раз двойной резонанс. В принципе, наверное, и COSY мог бы помочь, но COSY кое-какую информацию не дает. А конкретно - из COSY очень трудно выявлять мультиплетность, поскольку идеальный кросс-пик действительно будет состоять из отдельных компонентов, а реальный кросс-пик – это неясная «блямба» на двумерном поле, и из нее иногда невозможно понять, триплет это или дублет, тем более, когда речь идет о маленьких *мета*-константах. А вот двойной резонанс, который как бы «выключает» один сигнал из спектра (и все спин-спиновые взаимодействия с ним), сохраняет мультиплетность, поэтому его можно применить для отнесения, которое я показывал на предыдущем слайде.

#59 Здесь у нас четыре разных эксперимента по двойному резонансу. Показан крестом тот сигнал, который мы облучаем (это *селективный* двойной резонанс). Это, по сути, та же самая «развязка», только сделанная не от всей области резонанса протонов, а от одного конкретного сигнала. Та же самая импульсная последовательность, но импульс узкополосный, то есть маломощный и за счет этого длинный по времени, имеющий высокую неопределенность на временной оси и, следовательно, высокую определенность на частотной шкале. Диапазон частот, возбуждаемый этим импульсом, «накрывает» не всю область, а один конкретный выбранный нами сигнал, в данном случае сигнал D [спектр слева внизу]. Мы еще можем не знать, A это или D, но так или иначе, зная то, как меняются остальные сигналы при исключении из спектра какого-то одного сигнала, мы можем сделать вывод о том, кто с кем взаимодействует. Вот, к примеру, убрали (облучили) сигнал D, что произошло? У B исчезла *мета*-константа, он был триплетом дублетов, а стал просто триплетом. Сравнивая необлученный (по сигналу D) спектр с облученным, мы можем сделать вывод, что этот сигнал [8.0] взаимодействует с этим [7.6] и не просто взаимодействует, а именно через *мета*-константу, поскольку маленькое щепление в дублет исчезло отсюда [7.6] (триплет дублетов превратился просто в триплет). Кроме этого, изменение коснулось и сигнала C, только здесь подписано неправильно (...). Сигнал C у нас был триплетом, а стал дублетом, вот этот триплет, вот дублет. Вот на это [DDT→DT] не обращайте внимания, здесь ошибка¹¹⁴. Вернемся обратно. Вот был

¹¹⁴ Должно быть “T→D”

сигнал С, **вот такой триплет**, который точно совпал с другим дублетом, и дал очень непонятную картину, несимметричный мультиплет. И догадаться, что именно в этом причина, сразу было сложно. Зато после двойного резонанса мы четко видим **здесь [~7.0]** четыре линии, и можно предположить, что это два дублета. Если бы в молекуле вместо **d** был бром¹¹⁵, то сигналы А и С были бы **вот такие**, то есть С стал бы дублетом. Отсюда вывод, что у него «не прошла» *мета*-константа, а дублет у него [получился] за счет единственного оставшегося соседа **b**. Но это часть, связанная с бензольным кольцом. А теперь начинается интересная часть, где были сложные мультиплеты, связанные с аллильной группой.



Начинать облучение имеет смысл с того сигнала, который можно легко идентифицировать. Здесь можно легко **идентифицировать Е**, потому что у него химический сдвиг сильно отличается. У него нет двойной связи рядом, **вот он - самый правый**¹¹⁶. Кроме того, этот сигнал стоит отдельно, и облучая его, мы не рискуем «зацепить» находящиеся рядом сигналы. Итак, **вот этот сигнал**, **вот спектр двойного резонанса на частоте сигнала Е [спектр справа внизу]**. [Строго говоря,] сигнал Е должен вообще исчезнуть, но иногда из-за малейшего несовпадения частоты сигнала и частоты импульса появляются артефакты, и вместо сигнала на этом месте остается какой-то **непонятный «всплеск»**. Так или иначе, мы знаем эту частоту (знаем, что выбрали именно этот сигнал для облучения), поэтому на него мы не смотрим, а смотрим на то, что меняется в спектре. Ароматическая часть ожидаемо не меняется, поскольку она далеко. Зато сигнал F, **вот этот**, самой сложной формы, который был DDT, становится очень простым: четыре линии, в которых четко видно дублет дублетов. То есть DDT превратился в DD. Значит, **этот сигнал [6.0]** щепился в триплет **на этом [4.5]** причем с достаточно большой константой. То есть можно сделать вывод, что это, скорее всего, F. А

¹¹⁵ Или любой другой магнитно неактивный заместитель.

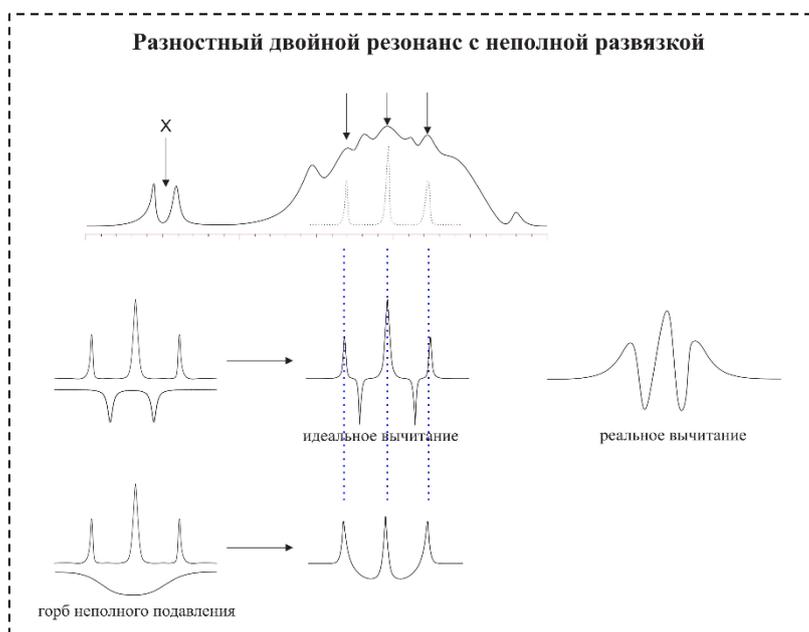
¹¹⁶ Ошибка в лекции, вместо «самый левый» должно быть «самый правый».

осталось у него два соседа (после «выключения» E) – G и H. Два соседа - **дублет дублетов**, поскольку они [соседи] разные.

Теперь, зная где F, можно попробовать **облучить F [спектр справа вверху]**. Мы действительно увидим отклик на всех остальных. E из дублета триплетов **превратится в триплет**. То есть дублетное расщепление сигнала E с большой константой было именно за счет взаимодействия с **этим сигналом [F]**. В какие-то изменения произойдут с G и H. Здесь плохо видно, поэтому не буду говорить.

И, наконец, последнее – это если мы попытаемся облучить G или H. Но они находятся рядом по химическим сдвигам, и сделать это раздельно вряд ли получится, поэтому лучше дать более мощный импульс, чтобы он «накрыл» и тот, и другой одновременно. То есть мы выключаем сразу эти оба [сигнала], выбрав импульс (частоту) между ними. Очевидно, что изменятся F и E. Если мы «выключили» оба этих сигнала [G и H], то F будет щепиться только на E, **превратится в триплет (точнее, должен превратиться в триплет)**, а E будет щепиться только на F, **превратится в дублет**. Но с F этого не произошло. Почему это имеет место? **Здесь [6.0]** мы видим сложный мультиплет, вот таким был исходник **[F на спектре слева внизу]**, а **здесь [слева вверху]** что-то непонятное. Скорее всего, у нас был колоколообразный импульс¹¹⁷ (гауссиана), он не полностью «накрыл» G и H, получилось неполное подавление этих сигналов, то есть какое-то взаимодействие с ними осталось. То есть, здесь мы получили нарушенную форму мультиплета (...) и на основании конкретно этого эксперимента по изменению формы сигнала F судить [о взаимодействиях] нельзя, здесь только по E, но зато по трем другим [экспериментам двойного резонанса] все более или менее понятно.

Что можно еще сделать? Можно этот эксперимент провести в разностном варианте. То есть сделать один скан с облучением интересующего нас сигнала, а один без облучения, а потом вычесть одно из другого. Причем, лучше сделать это сразу [после двух сканов, перед следующей парой], чтобы все ошибки, которые не успели накопиться между двумя сканами, тоже вычлись. И тогда у нас все сигналы, которые не претерпели изменений, взаимоуничтожатся при вычитании, а те сигналы, которые изменились, получат измененную форму. (...)



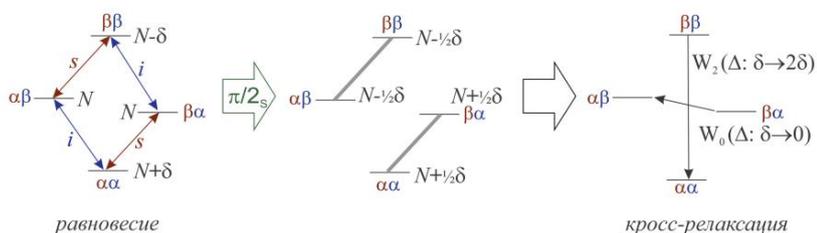
К примеру, был триплет, а после развязки от какого-то другого сигнала он стал дублетом (мы убрали одного соседа). После вычитания это будет что-то вот такое [рисунок на доске: $\text{---} \text{---} \text{---}$]. Но это в идеале, когда нет шумов, и когда достаточно хорошее разрешение. А в реальном спектре это будет выглядеть как-то вот так [рисунок на доске: $\text{---} \text{---} \text{---}$]. И вот тут уже понять форму линии исходного сигнала будет невозможно. Мы ее отчетливо видим, только если этот сигнал ни с чем не пересекается, а ведь может быть иная ситуация: вот какой-то сигнал [рисунок на доске: отдельный сигнал], который мы облучаем, и нам нужно найти связанный с ним [сигнал], а он в какой-то «горе» находится из множества пересекающихся сигналов. Тогда, если мы сделаем двойной резонанс вот по этому [отдельно-стоящему] сигналу, то после вычитания у нас как раз что-то вот такого типа [$\text{---} \text{---} \text{---}$] и

¹¹⁷ Что особенно характерно для спектрометров с аналоговым синтезатором частоты.

получится. При условии, конечно, что другие сигналы здесь не затронуты. Но здесь еще видно, что это триплет, то есть можно провести условные линии и среди этих линий найти то, что нас интересует, и сказать, что да, к примеру, второй [сигнал] в этой цепочке имеет такой-то хим. сдвиг, имеет форму триплета и так далее. Но если мы видим что-то такое [сигнал], форму линий отследить сложно. Поэтому делаем следующее. Вот этот сигнал [отдельно-стоящий] «выключают», но не полностью, то есть снимают [спектр двойного резонанса] с низкой мощностью импульса и с неполным подавлением. И тогда у нас на выходе в «развязанном» спектре получается не дублет, а какой-то «горбик», и после вычитания на фоне этого горбика мы хорошо можем увидеть форму исходного триплета [рисунок на доске: ]. И от него уже провести вверх [к референсному спектру] линии, упереться в интересующую нас группу сигналов и найти, что именно из них - наш второй сигнал, взаимодействующий с первым [облучаемым]. Такой эксперимент называется «разностный двойной резонанс с неполным подавлением спин-спинового взаимодействия». Разностный, потому что применяется вычитание, а с неполным подавлением - именно ради того, чтобы эти две компоненты [отрицательный дублет] не мешали оценить форму исходной линии.

Ядерный эффект Оверхаузера

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



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

- NOE >0 для небольших молекул, NOE <0 для макромолекул
- $\max \text{NOE} = \frac{1}{2} \gamma_s / \gamma_i$
- $\text{NOE} \sim 1/r^6$ (наблюдается при $r < 3 \text{ \AA}$)
- NOE достоверен лишь в сравнительном аспекте
- длительное насыщение \Rightarrow равновесный NOE, селективный π -импульс (в 1D) \Rightarrow неравновесный NOE (для небольших молекул величина в 1D H-H $\leq 38.5\%$)
- косвенный NOE, переданный с другого протона ($H_s \rightarrow H \rightarrow H_i$), 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)

Ф. Тоукач: слайд 60

#60 Теперь обещанный ранее ядерный эффект Оверхаузера. Это эффект изменения [интенсивности] одних сигналов при воздействии на другие сигналы, атомы которых сближены в пространстве с наблюдаемыми. Ключевое отличие от того, что было раньше: раньше у нас все взаимодействие происходило через связи и называлось спин-спиновым. ЯМР может выявлять и другой тип взаимодействия (не спин-спиновое), которое распространяется по прямой через пространство. Происходит это следующим образом: к примеру, у нас есть два ядра, не связанные друг с другом константой спин-спинового взаимодействия: **синее** – наблюдаемое, и **красное** – облучаемое. Что значит облучаемое? Облучаемое – это значит, мы частоту этого ядра «накрываем» селективным узкополосным импульсом, по

аналогии с тем, как это происходило в двойном резонансе. Вот **диаграмма заселенности этих ядер [слева вверху]**. Здесь видно, что красные и синие переходы примерно равны [по разности энергий], то есть речь идет о ядрах одного типа; допустим, они все - протоны. Их спиновые состояния **обозначены здесь $[\alpha]$ и $[\beta]$** , заселенности [этих состояний] **обозначены как примерно одинаковые $[\sim N]$: этот $[N-\delta]$ чуть меньше на некую «дельту», этот $[N+\delta]$ чуть больше.** «Красные» **переходы [красные стрелки]** – это переходы облучаемого ядра. Мы, к примеру, даем селективный 90-градусный импульс на частоте облучаемых ядер (**на этой частоте $[s]$**), облучаем обе компоненты [оба состояния системы, отличающиеся спином наблюдаемого ядра]. 90-градусный импульс обнуляет разницу заселенности. Напоминаю: $\pi/2$ – обнуляет, π - инвертирует. Что это значит? Это значит, что заселенности **этого и этого уровней [соединенных серыми линиями на диаграмме в центре]** должны быть выровнены, а поскольку общее число ядер не меняется, (механизм рассмотрения тот же самый, что и в случае INEPT), эта «дельта» распределяется равномерно между **этим и этим [нижним и верхним] состояниями**. То есть **здесь [состояние $\alpha\beta$] получается $N-(\delta/2)$ и здесь [состояние $\beta\beta$] - тоже $N-(\delta/2)$** . То же самое здесь **$[\alpha\alpha]$ и $[\beta\alpha]$** , только с плюсами, эта $+\delta$ распределилась равномерно между **этим $[\alpha\alpha]$ и этим $[\beta\alpha]$** . Далее мы импульс выключаем, и система релаксирует, то есть стремится вернуться в такое **равновесное состояние [левая диаграмма]**.

Что при этом происходит **вот с этими «синими» переходами?** Если **здесь $[\beta\alpha]$ стало $N+(\delta/2)$, а было N , это состояние $[\beta\alpha]$ будет стремиться уменьшить свою заселенность, то есть перейти **вот в такое**. **Отсюда $[\beta\alpha]$ будет происходить миграция куда-то еще**. **Здесь $[\beta\beta]$ у нас тоже было $-\delta$, а стало $-\delta/2$** , то есть здесь ядер больше, чем нужно в таком состоянии, значит, в процессе релаксации их доля будет уменьшаться. То есть будет происходить миграция из **этого $[\beta\alpha]$ и из этого $[\beta\beta]$ состояний** в другие состояния. Для нас интересен тип релаксации, называемый **кросс-релаксацией [правая диаграмма]** – это миграция **отсюда сюда [сверху вниз] и отсюда сюда [справа налево]** за счет рассеивания и обмена энергией. **Эта $[W_2]$ называется двух-квантовая, а эта $[W_0]$ - ноль-квантовая**, потому что **здесь $[W_2]$ [суммарное изменение спина] как бы на два перехода происходит, а здесь $[W_0]$ - на ноль**. То есть вот эти два релаксационных процесса, приводящие к тому, что система будет из **этого состояния $[\beta\beta]$ переходить в это $[\alpha\alpha]$, а из этого $[\beta\alpha]$ – в это $[\alpha\beta]$** , будут приводить к изменению разности [заселенностей] между **этим и этим состояниями [соединенными синими стрелками на левой диаграмме]**, то есть к [изменению] интенсивности сигнала синих (наблюдаемых) переходов (...).**

Итак, два типа релаксации, называется «кросс-релаксация», потому что [диаграмма справа] на крест похожа. По крайней мере, мое объяснение такое, другого я не нашел. Изменение разницы этих заселенностей, то есть уменьшение заселенности этих состояний **$[\beta\beta]$ и $[\beta\alpha]$** и увеличение заселенности этих двух состояний **$[\alpha\alpha]$ и $[\alpha\beta]$** может происходить с разной скоростью (в зависимости от того, что происходит быстрее - **этот путь $[W_2]$ или этот $[W_0]$**), и изменение разницы [заселенностей] «синих» переходов в какой-то момент времени будет или больше нуля, или меньше, смотря какой тип релаксации обгонит другой тип релаксации. **Формула - вот такая [в центре слайда]**. NOE – это Nuclear Overhauser Effect, то есть в процентном отношении то, насколько изменилась интенсивность сигнала ядра i («синие» переходы). И здесь мы видим, что внизу [в знаменателе] [присутствует] некий общий член, а вверху разность. То есть в зависимости от того, что происходит быстрее, оно [NOE] пойдет или в сторону увеличения, или в сторону уменьшения [наблюдаемого сигнала]. И если нам так не повезет, что эти два пути происходят примерно с одинаковой скоростью, то изменения разности заселенности [переходов наблюдаемого ядра] (по синим стрелкам) не будет происходить, следовательно, сигналы меняться не будут, и этот эффект наблюдаться не будет.

Чем хорош этот эффект? Тем, что этот тип релаксации зависит от того, насколько близко ядра находятся в пространстве, причем зависимость вполне четкая, $1/r^6$. Это значит, что ядра, расположенные близко (на качественном уровне), будут иметь этот эффект, а ядра, расположенные далее 3Å , практически не будут иметь наблюдаемого NOE. Этот эффект имеет несколько особенностей, которые делают его полезным для исследования информации и пространственной структуры молекул, а также для подтверждения первичной структуры. Во-первых, это соотношение скоростей кросс-релаксации: для небольших молекул NOE положительный, то есть преобладает **этот путь [W₂]**. А для макромолекул и биополимеров преобладает **этот путь [W₀]**. Почему, я не могу сказать, наверное, есть какое-то объяснение в толстых книгах по ЯМР, но для вас важен только вывод: для макромолекул NOE отрицательный. К сожалению, для молекул с определенной молекулярной массой он получается равен 0, мы к этому слайду еще вернемся, а сейчас - **вот эта зависимость [временно показан следующий слайд]**.

Если вы в формулу подставите максимально возможные значения, у вас получится максимальный NOE +50%, а минимальный -100%. Вот кривая, как этот NOE меняется, он зависит от некоего параметра - времени корреляции молекулы. Это численный параметр, показывающий ее [молекулы] подвижность, для больших молекул – большое, для маленьких – маленькое, измеряется в секундах. И **здесь [абсцисса]** логарифмическая шкала, и в ней это или половина синусоиды или половина гауссианы¹¹⁸, в общем, **что-то вот такого типа [график]**. Но к счастью, эта кривая смещается вправо-влево в зависимости от частоты спектрометра, поэтому если для нашей конкретной молекулы молекулярная масса такова, что все NOE у нее равны 0 (или хотя бы интересующие нас), можно попробовать снять [спектр] на другом приборе (с другой рабочей частотой).

Теперь возвращаемся к другим особенностям этого эффекта [Оверхаузера, предыдущий слайд]. Максимальный NOE составляет $\frac{1}{2}$ (если **сюда [в формулу для max NOE]** подставить [гироманнитные отношения] и сократить). $\frac{1}{2}$ - это при условии, что и наблюдаемое и облучаемое ядра – это ядра одного типа. Но само явление NOE не ограничено ядрами одного типа. То есть существует и гетероядерный NOE, существующий на основе тех же самых принципов. Его максимальное значение будет зависеть от соотношения гироманнитных отношений. **Здесь [в формуле для max NOE]** (S – это Saturated, облучаемое, I – это Irradiated, наблюдаемое¹¹⁹) в знаменателе наблюдаемое, а в числителе насыщаемое. По этой причине, чтобы NOE получился большим, выгодно облучать протоны, а наблюдать углероды. Если мы сделаем наоборот, максимальный NOE будет очень небольшим, мы его почти не заметим. А когда вот это гироманнитное отношение протонов к углероду¹²⁰... когда мы облучаем протоны, а наблюдаем углерод, **эта часть [γ_s/γ_i]** равна 4, следовательно, максимальный NOE равен двум, то есть 200%, или в два раза.

Следующее – это зависимость от расстояния, про это я уже сказал.

И, к сожалению, NOE достоверен лишь в сравнительном аспекте. То есть, если мы наблюдаем NOE, это еще не значит, что ядра сближены. Если мы не наблюдаем NOE, это тоже не значит, что

¹¹⁸ Похоже лишь внешне. Зависимость описывается уравнением Липари-Жабо.

¹¹⁹ Строго говоря, облучаются они оба, но одно (s) в рамках насыщения, а другое (i) в рамках возбуждения для наблюдения.

¹²⁰ Когда это отношение есть частное от деления гироманнитного отношения протонов на гироманнитное отношение углерода. Непонятность формулировок связана с тем, что слово «отношение» означает и математическую операцию деления, и является частью названия параметра «гироманнитное отношение», присутствующего как в числителе, так и в знаменателе.

ядра не сближены. А вывод можно сделать, только если мы для одной пары наблюдаем, а для другой не наблюдаем. Бывает так, что при неправильном подборе [параметров] эксперимента мы вообще не увидим NOE, то есть его как бы нет. Но это не говорит о том, что все ядра - далеко друг от друга. При другой ошибке в подборе параметров эксперимента у нас будет NOE всех [ядер] со всеми, следовательно, наличие NOE не будет говорить о том, что ядра сближены. А выводы можно сделать тогда, когда для каких-то [пар ядер] NOE есть, а в этом же самом спектре для каких-то других [пар ядер] NOE нет - вот тогда можно сказать, что те не сближены, а эти сближены. То есть те, у которых NOE есть - сближены, а те, у кого NOE нет - не сближены. Поэтому – «в сравнительном аспекте».

Теперь, следующий момент - весь этот процесс [формирования NOE] происходит во времени, в частности **эти миграции [W_2 и W_0]**. [Их скорости] меняются, и NOE, соответственно, меняется вместе с ними в зависимости от того, сколько прошло времени с момента облучения. Поэтому, если мы обучаем что-то селективными импульсами, то мы получаем, скажем так, неравновесный NOE, чувствительный к задержкам. А если перед этим мы производим длительное насыщение, то мы получаем классический или равновесный NOE. [В этом эксперименте] облучение мы не выключаем, и через какое-то время эти скорости «устаканиваются», и NOE фиксируется на какой-то определенной величине. То есть перестает далее меняться. Обычно, если не говорится иного, речь идет про равновесный NOE. Что еще хорошо? Если мы выключим облучение, то эти процессы останутся не сразу, потому что система еще какое-то время будет находиться **в этом возбужденном состоянии [средняя диаграмма]**, и какое-то время релаксировать. То есть после выключения развязки, которая приводит в том числе и к NOE, спин-спиновая связь «включится» сразу, а NOE еще будет существовать. (...путаница...¹²¹) Если в это время сделать накопление, мы увидим спектр со спиновым расщеплением, но с повышенной чувствительностью за счет NOE. То есть можно использовать то, что NOE существует еще несколько секунд после окончания облучения (использовать этот момент и «сыграть» в пользу увеличения чувствительности). Я, наверное, не очень корректно выразился, потому что у меня у самого в голове перепуталось, поэтому я еще раз более ясно скажу. Если, к примеру, у нас есть развязка от протонов на углеродах, то существует и NOE, и подавление спин-спинового взаимодействия. Если мы развязку выключили, подавление спин-спинового взаимодействия исчезло сразу, то есть [сигналы] углеродов начали щепиться на протонах сразу, а NOE существует еще несколько секунд. Если мы в эти несколько секунд проведем накопление, мы получим как информацию о спин-спиновом взаимодействии (через мультиплетность сигналов), так и повышение чувствительности за счет NOE.

И, наконец, последняя особенность NOE. Этот эффект передается по цепочке протонов. То есть, если есть **три таких протона [$H_A-H_B-H_C$]** (первый близок в пространстве ко второму, а второй — к третьему, но первый к третьему уже не близок), то мы, облучая один, получим NOE не только на втором, но и на третьем. То есть этот эффект [Оверхаузера] последовательно передается по цепочке протонов или других ядер, сближенных в пространстве. Но при этом каждая такая передача меняет знак NOE. Он будет альтернировать: **здесь [H_A]** будет положительный, **здесь [H_B]** будет отрицательный, затем снова положительный, и так далее. Что тоже можно использовать для выявления того, где протоны расположены в пространстве. При этом, это передача [NOE] тоже занимает какое-то время. То есть при облучении первого протона возникает NOE на втором протоне, и только через какое-то время переданный наведенный NOE на третьем протоне (позже, чем на втором). Это значит, что если у нас эксперимент неравновесный, то есть мы проводим не длительное

¹²¹ Исправляя свою ошибку, лектор сделал другую. Правильно так, как написано в стенограмме: после выключения развязки (облучения) спиновая связь с облучаемыми ядрами «включится» сразу, а NOE с ними «выключится» не сразу.

насыщение, а в какие-то моменты даем насыщающие импульсы, то в этих неравновесных экспериментах, варьируя задержки между импульсами, можно разделить прямой NOE, NOE, переданный через один шаг, через два шага, и так далее (получить эти подспектры по отдельности).

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

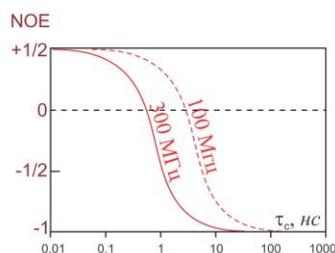
⇒ Подобрать t_m , можно вместо NOE наблюдать обменные кросс-пики (EXSY).

Фаза кросс-пигов 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



Ф. Тоукач: слайд 61

#61 Как и в случае со спин-спиновой связью эксперименты по наблюдению NOE существуют не только в виде одномерного эксперимента с селективной или неселективной развязкой, но и в виде двумерного эксперимента. Этот эксперимент очень похож на COSY, но здесь добавляется еще один импульс и одна задержка. Эта вторая задержка [t_m] называется «время смешивания». Она подбирается оператором, исходя из собственного видения, а если этого видения нет – исходя из литературы. За это время происходит релаксация образца, которая, собственно, приводит к появлению NOE. Вектор макроскопической намагниченности за это время как-то меняется, постепенно переходит на вертикальную ось $0z$. Это порядка сотен миллисекунд, т.е. в диапазоне от 0.1 сек до 0.5 сек. Раз происходит релаксационный период намагниченности на ось $0z$, значит, мы можем с помощью третьего 90-градусного импульса снова перевести этот переход в горизонтальную плоскость и измерить. Так выглядит импульсная последовательность эксперимента NOESY.

Но есть еще одна особенность. В молекуле может быть химический обмен, протоны меняются друг с другом местами. В течение времени смешивания [обменные] переходы точно также смешиваются, как переходы в случае с классическим NOESY. Значит, спектры NOESY будут нам показывать кросс-пики не только между атомами, сближенными в пространстве, но и между атомами, которые меняются друг с другом (т.е. их положение в пространстве взаимно меняется). Но, к счастью, для того, чтобы получить максимальную чувствительность в случае классического NOE, когда атомы стоят на своих местах и в случае обменного явления, нужны разные оптимальные времена смешивания. Поэтому, если четко подобрать время смешивания, мы можем получить либо классические кросс-пики NOE, либо обменные кросс-пики. Во втором случае такой эксперимент

называется **EXSY** (в разговорной речи, конечно, всегда SEXY). А NOESY расшифровывается как Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy.

Что еще про это можно сказать? У сигналов в NOESY есть фаза. Они могут «смотреть» вверх, и они могут «смотреть» вниз. Естественно, это зависит как от абсолютного значения [и знака] NOE, так и от фазочувствительности эксперимента. Обычно в спектре NOESY для небольших молекул NOE смотрит вниз, а для больших – вверх, как раз потому, что он проходит через ноль. При этом там могут быть и другие кросс-пики, а именно: во-первых, диагональные. В гомоядерных двумерных экспериментах почти всегда есть диагональные кросс-пики. Также, как и в COSY есть диагональ, она есть и в NOESY. Диагональ «смотрит» вверх. То есть, если молекула небольшая, мы можем на «контурной карте» нарисовать только те кросс-пики, которые «смотрят» в сторону, противоположную диагонали. Это и будут интересующие нас кросс-пики NOE между теми атомами, которые сближены в пространстве. Дальше [во-вторых], химический обмен. Если время смешивания, использованное в этом эксперименте, допускает химический обмен, он тоже будет давать кросс-пики, и они будут, и как диагональные, «смотреть» вверх. То есть в сторону, противоположную NOE. Ну и, наконец [в-третьих], есть еще такая вещь, как COSY-артефакты. Эксперимент – это импульсная последовательность, она очень похожа на COSY, и, если неправильно подобрать время смешивания (то есть, если оператор сделает распространенную ошибку), мы в спектре NOESY получим сигналы COSY. Возможно, не все, а только некоторые. Они, конечно, будут нам мешать, перекрывая полезные сигналы. Они тоже «смотрят» вверх. В принципе, можно записать только нижнюю половину спектра, то, что от базовой плоскости «смотрит» вниз. Это для небольших молекул будет [адекватный структуре] NOESY. Ну тут возможна «подстава»: если между двумя сигналами существует и спиновая связь, и связь через пространство, и при этом оператор ошибся и допустил COSY-артефакт, что произойдет? У нас в каком-то месте спектра NOESY будет кросс-пик, «смотрящий» вниз, и в этом же самом месте за счет [спиновой] связи будет COSY-артефакт, «смотрящий» вверх. При самом неблагоприятном стечении соотношений интенсивности они просто исчезнут, друг друга взаимно уничтожат. В этом месте будет фрагмент базовой плоскости, так, как будто там вообще ничего нет. Это, конечно, не очень хорошо, поэтому нужно стараться проверять как минимум отсутствие COSY-артефактов. А как максимум – внимательно присматриваться к тем сигналам, атомы которых, кроме того, что сближены в пространстве, еще и сближены по числу связей, то есть могут иметь константу спин-спинового взаимодействия.

Теперь, что для больших молекул? Для больших молекул NOE будет «смотреть» вверх (там все кросс-пики «смотрят» вверх). Поэтому для больших молекул NOESY не очень удобен. Но ту же самую информацию можно получить и из другого эксперимента, в котором совершенно другой принцип. Даже не буду писать импульсную последовательность. Просто скажу, что такой эксперимент есть, называется он ROESY. Это Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy. Почему в название вставлено, что это вращающаяся система координат – мне непонятно; название не очень информативное, его только запомнить остается. А отличие от NOESY... отличий два. Во-первых, NOE всегда «смотрит» вниз, его знак не меняется в зависимости от молекулярной массы. Во-вторых, там будут уже не COSY-артефакты, а TOCSY-артефакты. Это TOtal Correlation Spectroscopy, то есть артефакты из спектра TOCSY. А спектр TOCSY – это аналог COSY, с передачей [корреляции] по цепочке. В TOCSY кросс-пики возникают между сигналами, находящимися в пределах одной спиновой системы, даже если непосредственно между ними КССВ нет. Например, в сахарозе все «красные» будут взаимодействовать в TOCSY друг с другом, а все зеленые – друг с другом. В ROESY из-за ошибок иногда встречаются TOCSY-артефакты, там этих артефактов [может быть] больше [, чем COSY-артефактов в NOESY]. (...) К TOCSY мы еще

вернемся потом. А пока что для вас - NOESY и ROESY. Казалось бы, а почему тогда все время ROESY не снимать, если в нем проблемы [разнознаковых] NOE нет? А потому, что у него чувствительность меньше, чем у NOESY, он занимает больше времени. Поэтому, если молекулярная масса не очень большая... Для современных частот [спектрометров], вот это время корреляции [, где NOE проходит через ноль] соответствует ~500 г/моль - самая неудачная масса. Если [мол. вес] меньше, имеет смысл снимать NOESY, если больше – то ROESY.

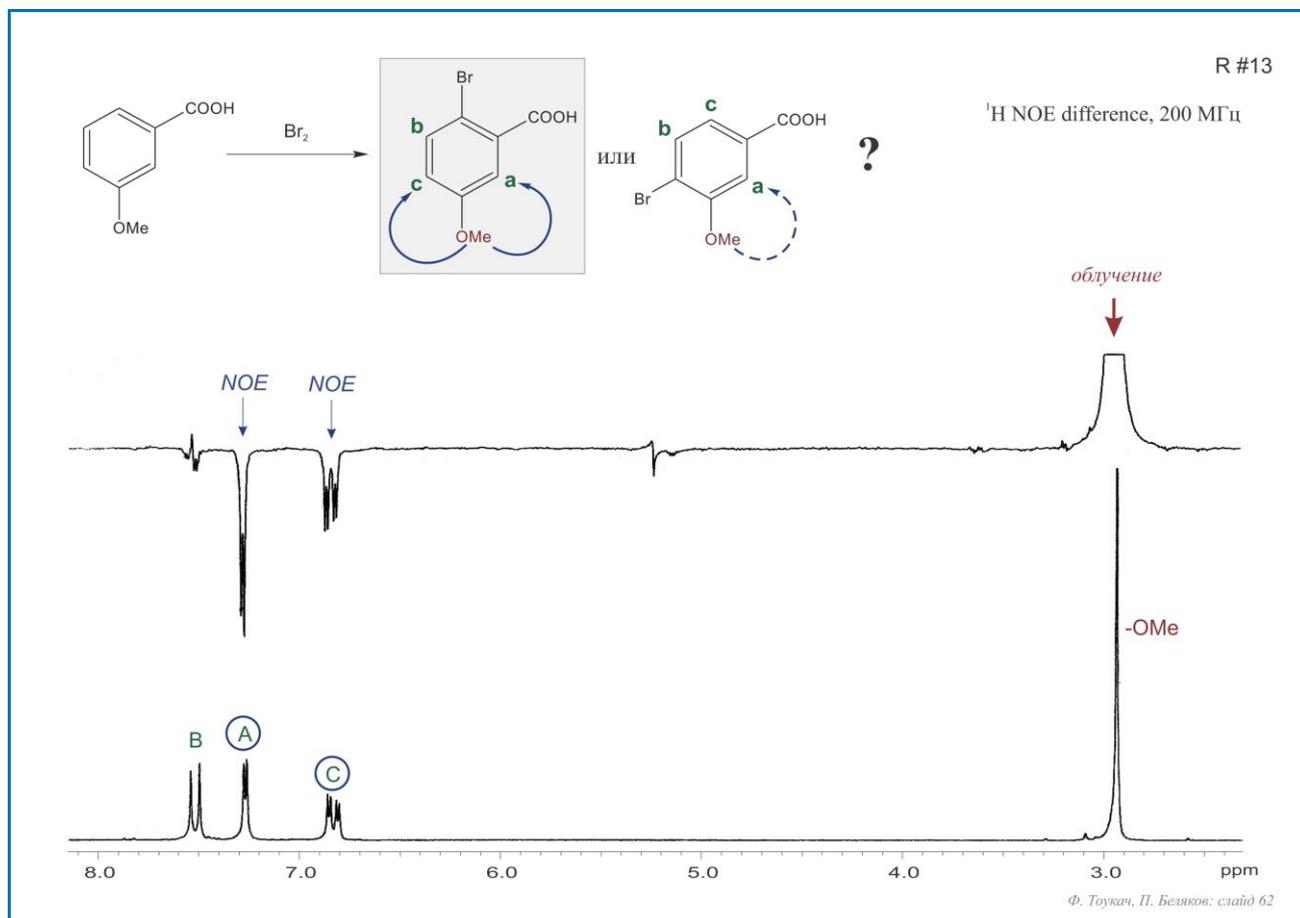
Теперь, если вы заказываете такой эксперимент, и вам приходит спектр, в котором слишком много пространственных корреляций. Вы видите кросс-пики между теми протонами, которые, исходя из вашего понимания структуры, не могут быть сближены. Это повод сказать оператору, что он выбрал слишком большое время смешивания. А если вы видите одни шумы, и нет кросс-пигов даже между теми протонами, которые, по вашей логике, должны быть близко — это повод сказать оператору, что он выбрал слишком короткое время смешивания. А вообще, для каждого класса соединений лучше посмотреть в литературе, снимали ли ранее NOESY или ROESY, и какое там использовали время смешивания. В «экспериментальной части», там, где написана частота прибора, температура, растворитель и так далее, если имело место «двумерное наблюдение» ядерного эффекта Оверхаузера, «правильные» авторы напишут, какое было время смешивания, чтобы их последователи не ломали голову. Если же вам не удалось найти такой информации, не исключена ситуация, что придется перебрать несколько вариантов. Менять их, увеличивая в два раза на каждом этапе, начиная от разумного значения ~100 мс, к примеру, сначала вверх, потом вниз, и смотреть, какие спектры получаются. А потом для аналогичных соединений, можно будет использовать аналогичные [времена смешивания].

#62 Как и COSY в случае с двойным резонансом, NOESY имеет свой одномерный аналог. Это «срез»¹²² двумерного эксперимента на уровне какого-то одного сигнала. Мы можем селективно облучить один сигнал, получить отклики NOE, и во время постановки эксперимента вычесть одно из другого так, чтобы не изменившиеся сигналы взаимоуничтожились, а изменившиеся сигналы показали нам какую-то картину. **Вот пример** структурной задачи, которая эффективнее всего решается именно таким способом. Бромировали некоторую «штуковину», в результате которой получилась одна из двух молекул. И мы не знаем какая. И в той, и в другой молекуле протоны образуют систему ABC, то есть широкий дублет [B], узкий дублет [A] и дублет дублетов [C]. Но располагаются эти заместители по-разному. Пробромироваться оно могло и **сюда [в -орто к карбоксилу]**, и **сюда [в -пара к карбоксилу]**, в соответствии с эффектами ориентации в кольце. Но разница тут как раз в ядерных эффектах Оверхаузера. Находим отдельно стоящий протон [сигнал]. Это три метильных протона, поскольку происходит вращение [вокруг связей Ar-O и O-Me], и для NOE они тоже все эквивалентны. И облучаем его [сигнал метоксильной группы]. **Вот это - исходный спектр [внизу]. А это [верху]** - во много раз увеличенная разница между спектром с развязкой от **этих [-OMe] протонов** и без нее.

(...) **Сюда [-OMe]** мы не смотрим, потому что это точка облучения, и здесь никакой информации мы не получим. Зато здесь у нас есть сигналы A, B и C, отнесенные на основании формы линии. Мы видим, что у **двух из них [A и C]** интенсивность изменилась, а у **одного из них [B]** практически ничего не изменилось. **Этот «всплеск» [7.5]** - артефакт вычитания. Не ровная прямая линия получилась, а какое-то такое образование. Важно, что здесь мы не наблюдаем большого сигнала. То есть мы можем применить «сравнительный аспект»: раз где-то NOE проявляется, а где-то не проявляется, значит эта информация будет достоверной. Из-за этого мы делаем вывод, что **ЭТОТ**

¹²² Одномерная проекция

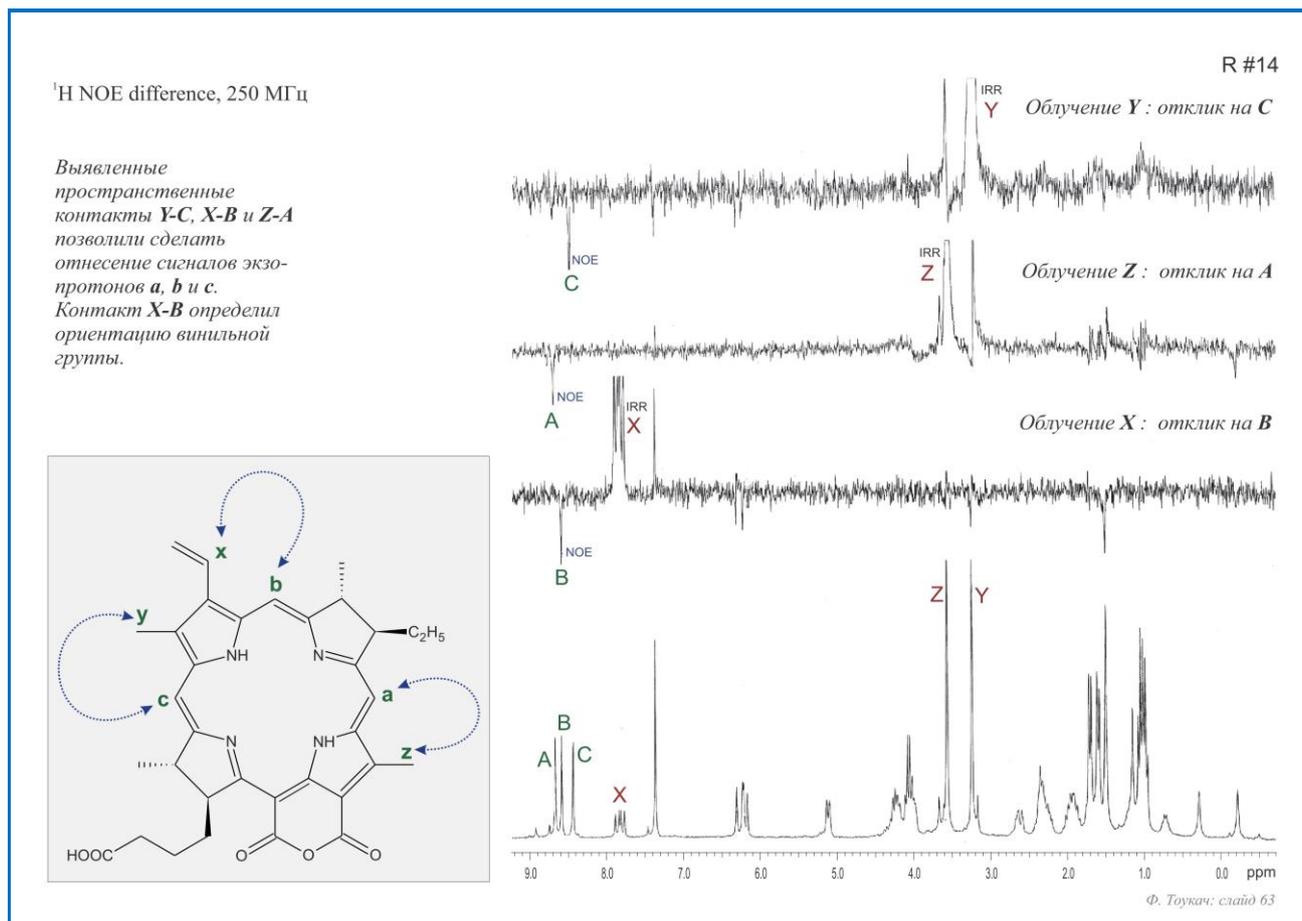
протон [b] не сближен с метильной группой, а эти два [a и c] – с ней сближены. Смотрим, что это за эти два [в структуре]? В этой молекуле [в рамке] действительно a и c сближены с метилом, а в этой [справа от рамки] – сближен только a. Отсюда делаем вывод, что здесь эта молекула [в рамке]. Если была бы эта молекула [справа от рамки], то вот здесь, на сигнале C, NOE бы не было. (...) Это простой пример, который показывает, что иногда, чем разбирать сложное спин-спиновое взаимодействие, проще поставить дополнительный эксперимент, облучить какой-то сигнал и посмотреть, какие [атомы] к нему [исследуемому атому] близки в пространстве.



Также подчеркиваю, что здесь речь идет об экспериментах при нормальной температуре. Поскольку, если метоксильная группа перестанет вращаться, от кислорода [связь O-Me] пойдет в какую-то одну сторону или вообще перпендикулярно кольцу, тогда эти протоны [OMe] могут оказаться сближены только с одним из этих [a и c]. Но когда есть свободное вращение, мы наблюдаем, что их два. То есть, если [наблюдается NOE] с двумя, то точно это [в рамке]. А если с одним, то, скорее всего, это [за рамкой], или заторможенное это [в рамке]. Поскольку тут два, то однозначно в пользу этого [варианта структуры в рамке].

#63 Чуть более сложный пример. Здесь стояла промежуточная задача сделать отнесение так называемых мезо-протонов. Это три синглета, очень близкие по химическим сдвигам. Их ни по форме линии, ни по химическому сдвигу отличить друг от друга невозможно. Но для каких-то дальнейших точных исследований требовалось отнесение этого [фрагмента спектра]. А что было? Во-первых, было отнесение Z и Y (эта метильная группа [z] и эта метильная группа [y]), оно было известно из литературы. Между ними разница химических сдвигов уже чуть больше. Эти метильные сигналы консервативны, то есть они уже не двигаются в зависимости от волнообразных движений молекулы. Поэтому на основании литературы посчитали, что уже можно сделать такое отнесение [Z и Y]. И кроме этого, отнесение сигнала X – это сигнал [-CH=] винильной группы – тоже очевидно по

форме линии, так как примерно хим. сдвиг соответствует, и это - дублет дублетов с двумя очень большими КССВ через двойную связь (...).



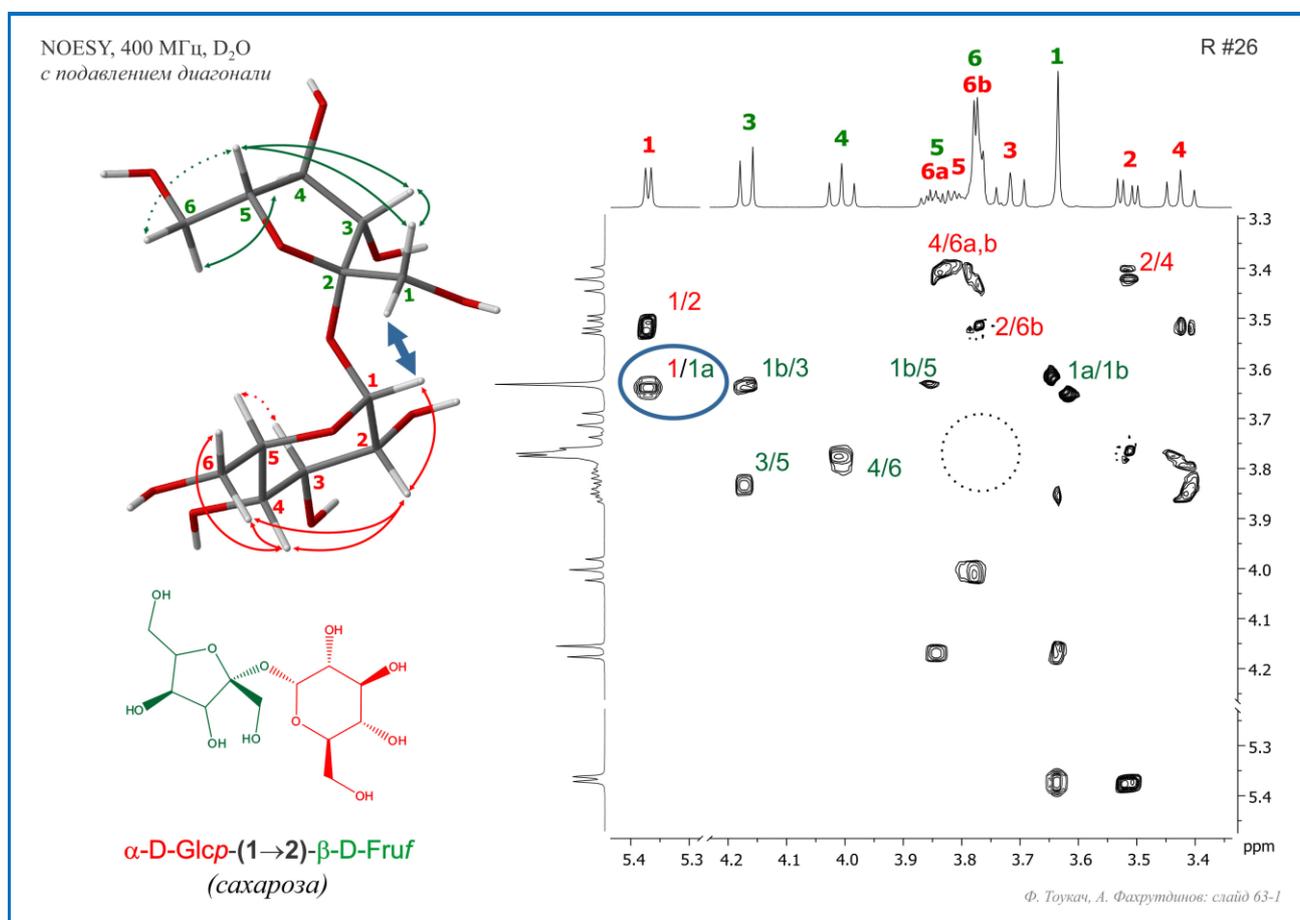
Теперь задача. Имея отнесение X, Z и Y перейти к отнесению A, B и C. Это как раз можно сделать с помощью трех экспериментов NOE. Вот **здесь мы облучаем X [нижний спектр из трех NOEdiff], вот в этом месте [X]**. И видим, что **из этих трех синглетов [A,B,C] отреагировал только один [B]**. Это значит, что вот этот [атом], который отреагировал (**средний [сигнал]**), в пространстве сближен с атомом X. Кроме этого, еще и некоторые другие сигналы отреагировали. Там, наверное, еще что-то может быть¹²³. Большие сигналы после вычитания тоже иногда могут как-то проявляться. Но мы видим, что здесь сигнал был маленький, а разница – большая. А здесь сигнал был большой, а разница – маленькая, и вот это [второй случай] - скорее всего, артефакт. **А этот [сигнал 7.3] – просто рядом с зоной облучения находится, поэтому мы его слегка зацепили.** Это вообще сигнал растворителя, но его интенсивность тоже изменилась, потому что импульс был близко к нему. Для нас важно, что **из этих трех [A,B,C] отреагировал только один.** Во-первых, это говорит о том, что из всех отреагировавших отреагировал только B. А, во-вторых, это дает нам полезную информацию о том, что двойная связь повернута именно в ту сторону, что и на рисунке. Поскольку, если бы она была повернута **в эту сторону [вправо]**, то протон находился бы **здесь [слева]** и в пространстве был бы далеко от протона **b**, «торчащего» вверх. Там уже ангстрем пять получилось бы, NOE бы не было между ними. А раз NOE между ними есть, то как раз **этот [x] сюда смотрит [вправо]**, а этот [**b**] – сюда [вверх]. И между ними как раз расстояние – приблизительно как в шестичленном цикле длина одной связи.

Теперь посмотрим на Z и Y. **Облучая Z [средний спектр NOEdiff], мы находим отклик на одном из них [трех], на самом левом [A].** А облучая Y [верхний спектр NOEdiff], наблюдаем отклик

¹²³ Напр., один из протонов на конце винильной группы, тот, что в цис-положении к x.

на самом правом [C]. Но при этом, здесь еще небольшой отклик есть на другом [A]. Видимо, эти сигналы [Z и Y] были не так далеко друг от друга, и поэтому один «попал» на другой, т.е. произошло частичное возбуждение Z при облучении Y. Но, в основном, можно сказать, что облучение прошло достаточно селективно, поскольку *сильно* отреагировал в каждом случае только один сигнал. Эти сигналы разные: в этом случае - *левый* [A], а в этом случае – *правый* [C]. На основании этого, мы можем сказать, что это A, а это C, а не наоборот. Таким образом, выводы из серии трех одномерных разностных NOE: во-первых, конформация винильной группы, во-вторых, отнесение сигналов A, B и C.

Теперь, чего все это стоит? Разностные эксперименты чувствительны к градиентам различных параметров в образце, в первую очередь, температуры. Поэтому, чтобы [такой эксперимент] хорошо получился, образец должен быть термостатирован. То есть его надо подержать в приборе какое-то время, хотя бы пять минут, чтобы конвекция «успокоилась», и [образец] был весь одной температуры. Во-вторых, вот эта величина [NOE] – это иногда проценты или даже доли процентов от величины общего [исходного] сигнала. Поэтому, чтобы это накопить, требуется сделать достаточно много сканов, 100 штук, 200. Это значит, что один такой эксперимент займет 10-20 мин. Каждый! Значит, соответственно, он будет дороже [, чем одномерный протонный спектр]. При оценке цены экспериментов время – не единственный параметр. «Длинный» эксперимент будет стоить непропорционально дороже, чем «короткий». Потому что это зависит не только от длительности самого эксперимента, но и от оператора. Возможно, оператору потребуется залезть в «мануал», чтобы вспомнить что-то.



#63-1 Теперь мой любимый пример, но уже нарисованный в трехмерном пространстве по результатам молекулярной механики. Та же самая сахароза. [Здесь \[внизу\]](#) она изображена со стереохимией, цвета остатков те же самые [, что на слайде с COSY сахарозы]. А [здесь \[вверху\]](#) то,

что получилось при минимизации в молекулярно-механическом силовом поле. Сами эти циклы довольно жесткие, по крайней мере, шестичленные. Они немного колеблются, но в данном случае из одной формации в другую они практически не переходят. Поэтому [конформация пиранозы] не особо интересна, это было исследовано еще лет 50 назад. А этот цикл [фуранозный], наоборот, быстро дергает краями и «выглядит» почти плоским. Фураноза – это, по сути конвертик, у которого четыре точки в одной плоскости, а один атом приподнят. Но какой именно приподнят – меняется во времени. То есть эти [пятичленные] циклы конформационно лабильны, и усредненная конформация тоже известна.

Для биомакромолекул, построенных из остатков (и для углеводов, в частности) интереснее всего с точки зрения получения пространственной структуры – конформация мостика между остатками, то есть два торсионных угла, вот этот [O – зеленый-2] и вот этот [O – красный-1]. Может быть, эта зеленая часть [остаток фруктофуранозы] развернута куда-нибудь в сторону. Такие задачи (и подобные таким) возникают часто: узнать конфигурацию конформационно нежесткого мостика между относительно консервативными блоками. NOE как раз может помочь в этом, потому что мы наблюдаем очень интересный кросс-пик [5.4/3.6]. Здесь есть NOE есть в двумерном варианте [NOESY], одномерный протонный спектр (его отнесение уже подписано, его мы сделали на основании COSY час назад), и здесь мы видим [спектр] NOESY без диагонали [с подавлением диагональных пиков]. Несмотря на то, что он без диагонали, он симметричен. То есть диагональ условно есть, каждый кросс-пик присутствует в двух экземплярах. Например, зеленый-3 [4.2/3.8]. Что это такое? Здесь написано 3/5. Сейчас посмотрим, куда смотрит H3 и куда смотрит H5 [в остатке фруктофуранозы]. H3 смотрит сюда [вверх], и H5 смотрит сюда [вверх], т.е. в одну сторону от цикла. Между ними как раз, наверное, 2.5-3.0 Å. То есть они соответствуют критерию возможности наблюдения NOE. Поэтому мы видим кросс-пик между H3 и H5 [4.2/3.8], и вот он же [по другую сторону диагонали]. Также мы видим кросс-пик между третьим и одним из первых зеленых, вот он обозначен [4.2/3.6], и это взаимодействие [H3-H1b]. В статьях при анализе NOE, как правило, тоже стрелками показывают те атомы, между которыми наблюдается NOE. Здесь только один из первых, 1b, потому что другой первый «смотрит» в другую сторону [вниз]. Что касается вращения вокруг этой связи [C2-C1 в кетофуранозе], по-моему, в сахарах этого, как правило, не происходит¹²⁴.

Теперь самое интересное. Интересны в двумерных спектрах NOESY те кросс-пики, в которых компоненты можно покрасить разными цветами, в данном случае, когда один из «красных» взаимодействует с одним из «зеленых». Мы уже знаем (отнесение у нас уже есть), что вот это - [5.4] красный-1, а вот это - [3.6] зеленый-1. (Вот, кстати, первые два: они одинаковые [магнитно-эквивалентные], поэтому это синглет, зато в NOESY они разошлись, *1a* взаимодействует с *1b*¹²⁵). На уровне этого сигнала [5.4] и на уровне этого сигнала [3.6] мы видим кросс-пик. Какой-то из первых зеленых взаимодействует с красным-1, а это значит, что конфигурация этих торсионных углов [O – зеленый-2 и O – красный-1] такова, что они [протоны] находятся по одну сторону [от гликозидной связи]. То есть предсказание, сделанное в ММЗ¹²⁶ [синяя стрелка], подтверждается этим экспериментом.

¹²⁴ Происходит, но не свободно; на энергетическом профиле присутствуют несколько минимумов.

¹²⁵ Это некорректное рассуждение, так как у них строго одинаковые хим. сдвиги. То, что представляется взаимодействием, возможно, определяется формой краев и фазировкой кросс-пика. Вопрос о наличии NOE-пиков на диагонали с фазой, противоположной диагональным кросс-пикам (и их потенциальном взаимоуничтожении при наложении на диагональный кросс-пик), остается для автора нерешенным.

¹²⁶ Молекулярно-механическое силовое поле, в котором оптимизировалась геометрия сахарозы.

Самого по себе предсказания недостаточно для установления трехмерной структуры (или *не всегда* достаточно), но если мы его можем подтвердить, это очень хорошо для валидации и для статьи. А подтвердить, если не растет кристалл, и нельзя снять рентген, можно двумя способами: 1) анализом точных значений величин констант спин-спинового взаимодействия, которые тоже от торсионных углов зависят. Например, между **этим протоном [зеленый-2]** и **этим углеродом [красный-1]** измерить гетероядерную [KCCB] - в зависимости от угла поворота вокруг этой связи она будет разной. Ну а более простой способ – 2) с помощью NOE: посмотреть в этой конформации, какое расстояние **между этими двумя атомами [трансгликозидными протонами]**, получится, к примеру, 2 Å, и мы знаем, что раз 2 Å, должен быть NOE, и он действительно здесь есть. Значит, эксперимент подтверждает расчет, можно делать вывод о трехмерной структуре.

Еще здесь обведено пунктиром место, где по идее должен быть сигнал. Но его там нет по какой-то причине. Сейчас посмотрим, что это за сигнал. Это 5-й с одним из шестых, как в случае красного, так и в случае зеленого. То есть они должны быть где-то здесь. В случае с зеленым это можно объяснить тем, что здесь нет вращения вокруг связи, и поэтому оба шестых смотрят в другую сторону относительно пятого. Поэтому нет NOE между 5-м зеленым и 6-м зеленым. Прошу прощения, пятый и третий красные. **Пятый и третий красные** должны иметь NOE друг с другом, тоже где-то здесь. (...). Но это еще предстоит объяснить, возможно, [причина -] как раз те самые COSY-артефакты. Что нам нужно делать, как исследователям, если спектр вроде бы правильный, но где-то есть кросс-пики, а где-то нет, и время смешивания подобрано правильно, но вот сигнала не оказалось [там, где мы его ожидаем]. Во-первых, надо попробовать слегка поварьировать время смешивания. Может быть, **эти [основные]** сигналы перестанут быть информативными, зато **здесь [в пунктирной области]** что-то появится. Тогда мы будем знать, релаксация конкретно этой пары [протонов] происходит так, что она проявляется при другом времени смешивания. Либо у нас там есть COSY-артефакты, которые при правильном подборе параметров эксперимента могут исчезнуть, и здесь появится сигнал.¹²⁷ То есть это остается под вопросом: почему нет 3/5. Почему нет 5/6, который тоже должен быть здесь, имеет структурное объяснение, вот оно прямо здесь нарисовано - они «смотрят» в разные стороны. А почему [пара] 3/5 не имеет кросс-пика – не имеет и структурного объяснения, и надо как-то объяснить это, иначе закономерным вопросом рецензента статьи будет «А почему у вас здесь нет сигнала?»

Но опять же, подытожу, самое главное для нас – **вот этот [5.4/3.6]** «разноцвет».

#64 Для того, чтобы спектры получались хорошими, как одномерные, так и двумерные, условия их съемки не должны меняться ни в пространстве (в объеме образца), ни во времени (пока идет эксперимент). Наверное, понятно, почему. Для этого в спектрометре есть специальная автоматика, которая стабилизирует условия резонанса, в первую очередь величину внешнего магнитного поля. Стабилизировать ее нужно в пространстве и во времени. Начнем с того случая, когда речь идет о стабилизации условий резонанса в пространстве. Что это значит? Если есть градиент магнитного поля, у нас в одной части образца будет одно внешнее поле, а в другой – другое, поскольку образец – это не бесконечно малая точка, а некий конечный объем. Это значит, что молекулы в одной части образца будут иметь одну резонансную частоту, а в другой – другую. То есть сигналы будут уширяться из-за неоднородности химического сдвига по объему образца. Чтобы этого избежать, нужно получить не просто сильное магнитное поле, но и сделать это поле максимально однородным. Если просто взять сверхпроводящий магнит, однородности поля будет недостаточно для ЯМР-

¹²⁷ Также возможна причина, что эти сигналы, находящиеся вблизи диагонали, исчезли при подавлении диагональных пиков или сложившись с ними, изменили знак фазы, из-за чего не попали на «контурную карту».

эксперимента, поэтому мощное поле от сверхпроводящего магнита корректируется небольшими полями, имеющими контролируемые градиенты. Они создаются отдельными электромагнитными катушками, которые так и называются – градиентные катушки, иногда вы можете еще услышать про шиммирующие катушки, поскольку по-английски процесс подбора [токов в] катушках называется «shimming». Что они собой представляют?

Стабилизация условий резонанса

в пространстве

корректирующее поле

Z^0

корректирующее поле

Z^1
 Z^2
 Z^3

корректирующее поле

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

дефекты устраняются вращением вокруг Oz

X, Y

возможные ошибки:

Z, Z^3
(симметричные искажения)

Z^4
(несимметричные искажения)

Z^2
(несимметричные искажения)

X, Y, XZ, YZ
(боковые полосы 1-го порядка)

XY, X^2-Y^2
(боковые полосы 2-го порядка)

правильно

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

Ф. Тоукач: слайд 64

Допустим, катушка Z^0 . Первая буква – это вдоль какой оси катушка создает поле, а вторая цифра – это в какой степени [проявляется] характер этой зависимости [от пространственной координаты]. В нулевой степени – это всегда единица, то есть зависимость [корректирующего поля от координаты] отсутствует, нет градиента [а есть постоянное слагаемое]. Просто константа добавляется к полю или убавляется, и все сигналы «съезжают» вправо или влево, вне зависимости от того, где они [молекулы] находятся в образце.

Но интересны нам другие, например, Z^1 . Корректирующее поле будет меняться от координаты Z по линейному закону и не будет зависеть от координат X и Y . Дальше, соответственно, Z^2 , Z^3 и так далее. Существуют и другие [градиенты], в том числе для других осей, но самое главное – это градиенты поля вдоль оси Z , потому что

градиенты поля вдоль горизонтальных осей устраняются вращением. Технологически вращение образца тоже происходит так [демонстрация на пальцах], вокруг оси OZ с частотой ~ 20 Гц. Но для некоторых экспериментов оно противопоказано, тогда ошибки в настройке токов в этих катушках [с зависимостью от координаты X или Y] (то, что делает оператор или автоматика спектрометра), будут проявляться в искажениях формы линии. Если же вращение есть, то ошибки в настройках этих градиентов (они называются «стоячими», потому что нет вращения), будут проявляться в боковых полосах. Там, где X или Y в первой степени, будет одна пара боковых полос [левый зеленый пример] на расстоянии от линии, равном частоте вращения. А где квадрат [X^2 или Y^2], будет две пары боковых полос [правый зеленый пример] на расстоянии частоты вращения и на расстоянии

удвоенной частоты вращения. Если вам нужны, например, сателлиты ^{13}C , эти линии могут вам помешать, накладываясь на сателлиты ^{13}C или мешая их наблюдению. Итак, если у вас эксперимент (...) с вращением, и вы видите эти боковые полосы, нужно или просить оператора лучше настроить стоячие градиенты, или изменить частоту вращения, чтобы они «съехали». Если они при изменении частоты вращения окажутся в других местах, значит, это артефакты, связанные с вращением, а не сигналы образца, то есть не сателлиты, которые вы ищете. А если они остались на своих местах при изменении частоты вращения, значит, это какие-то сигналы из образца, например, сателлиты ^{13}C . Возможен еще третий вариант: когда расстояние между основной линией и боковой равно 50 Гц. Кто-нибудь догадается откуда они берутся? Возможно, вы в школе проходили, что частота переменного тока [в электросетях России] - это как раз 50 Гц, а дальше ответ понятен - наводки от проводов.

Теперь посмотрим на Z . Чем больше степень, тем ближе к основанию линии проявляется искажение формы линии. «Нечетные» градиенты дают симметричные, а градиенты с четными степенями дают несимметричные искажения, то есть с одной стороны [линии]. Вот [такие искажения \(симметричные\) \[синий пример\]](#) выявить довольно сложно, потому что формы линий не портятся, но линия становится слишком широкой у основания. Это приводит к увеличению вероятности перекрытия близко расположенных сигналов. А [такие \[несимметричные, красные примеры\]](#) - довольно легко выявить, поскольку как бы вы ни фазировали спектр, [у сигналов] остается одно боковое плечо. Причем, [здесь \[пример \$Z^2\$ \]](#) мы видим некие перегибы линии, тут еще можно сказать, что это один сигнал с сильно испорченной формой. Но если вы применяли взвешивающую функцию (вспоминаем предыдущую лекцию), которая за счет увеличения уровня шумов делает линии более узкими, она может «детектировать» этот перегиб как два разных сигнала, и после применения взвешивающей функции у вас будет один сигнал и другой сигнал. То есть один сигнал превратился в два, что негативно сказывается на возможности интерпретации спектра. Но чтобы понять, действительно ли это два сигнала или это дефект съемки, надо посмотреть на остальные [сигналы]. Если у всех сигналов рядом есть какие-то боковые образования (плечи, горбы, отдельные линии на таком же расстоянии), это признак неправильной настройки градиентов с четными степенями, а конкретно Z^2 .

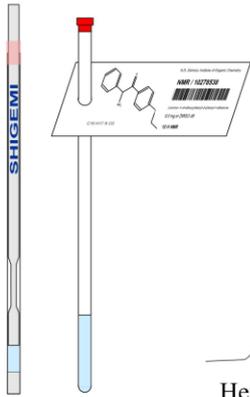
К сожалению, полностью автоматизировать настройку этих градиентов нельзя, поскольку оптимальное положение одних зависит от текущего положения других. То есть, если в них есть одни и те же координаты, они друг на друга влияют, большие на меньшие, например, Z^2 влияет на Z , а, к примеру, ZX влияет на X и на Z . Что получается? Всего их, наверное, десятка полтора или даже два, и все они взаимосвязаны. То есть найти оптимальное «положение» [значение] токов во всех этих катушках – это, по сути, найти глобальный экстремум на функции двадцати переменных. Это математически задача очень сложная, поэтому она не автоматизирована. Зато она решается при помощи интуиции оператора, и намного быстрее. Поэтому даже сейчас оператор настраивает токи хотя бы в самых главных, наиболее важных катушках вручную. Это получается не всегда точнее, чем автоматика, но всегда быстрее, причем быстрее зачастую на порядок. Если автоматика делает это за 20 минут, хорошо натренированный оператор может сделать за минуту. Но вы можете увидеть ошибки, поэтому вы должны быть готовы эти ошибки идентифицировать, понять, что это связано с неправильными настройками, и сказать оператору: «Снимите, пожалуйста, получше». Естественно, здесь эти все ошибки представлены по отдельности, в предположении, что один градиент настроен неправильно, а остальные правильно, но в реальном спектре они [дефекты формы линии] все будут смешаны в какой-то произвольной пропорции.

Что является критерием [качества настройки градиентов]? Основным критерием является **форма линии** – то, что мы сейчас рассматривали. Но если оператор будет каждый раз смотреть на форму линии, ему нужно будет каждый раз делать скан, делать Фурье преобразование, находить нужный сигнал, оценивать форму линии, подкручивать градиент, снова все это повторять, и это затянется до бесконечности. Поэтому существуют и более простые критерии: чем меньше ошибок, тем при той же площади сигнала линия будет **уже**, следовательно, она будет выше, поэтому можно отслеживать высоту какой-нибудь линии, и по этой высоте оценивать разрешение в сравнительном аспекте. То есть меняем токи в катушках и смотрим, растёт линия или уменьшается. Для этого есть специальная автоматика, и она отслеживает линию на частоте дейтерия, поскольку в ЯМР используются дейтерированные растворители. Дейтерий всегда есть в образце, он не пересекается с основными спектрами (дейтерий - для химии не очень интересное ядро), и автоматика настроена именно на него. То есть, ориентируясь **по высоте сигнала дейтерия**, оператор руками подбирает оптимальные токи в градиентных катушках. Наконец, еще один критерий – это **площадь FIDa**. Но FID – это линия, поэтому говорить про площадь не совсем корректно, это, конечно же, площадь под огибающей FIDa. То есть, если через вершины FIDa провести линию, это будет спадающая экспонента, под ней можно померить (интегрально) площадь, и чем она будет больше, тем сигнал существует дольше. То есть как бы медленнее релаксирует, значит линии будут **уже**.

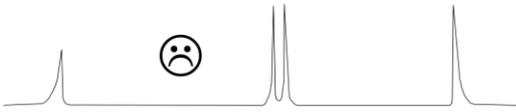
Следующий момент – это стабилизация условия резонанса **во времени**. Кроме того, что поле должно быть однородным в пространстве, оно не должно меняться в процессе эксперимента, чтобы у вас частота [резонанса] не «дрейфовала». Для этого существует специальная система, которая называется LOCK – она как бы «запирает» поле и не дает ему изменяться. Параллельно с основным спектром все время накапливается спектр на частоте дейтерия. Для этого во все датчики встроена еще одна катушка. Мы не можем использовать протонную катушку, потому что она нам нужна для протонных экспериментов, поэтому выбран дейтерий - то, что, скорее всего, заведомо не понадобится. [Снимается] спектр по дейтерию; как правило, там один сигнал - сигнал растворителя, спектрометр смотрит на положение этого сигнала в Гц и, если оно съехало, подстраивает градиент Z^0 , то есть просто увеличивает или уменьшает [опорную частоту]. На самом деле там не поле, а частота подстраивается, но это не принципиально, что именно меняется. Так как меняется условие резонанса так, чтобы сигналы никуда не съезжали. То есть [спектрометр] «смотрит» на сигнал дейтерия и делает так, чтобы он никуда не смещался. Для вас важно только название этой системы, но если вам когда-то понадобится снять спектр по дейтерию, вы просто попросите оператора эту систему отключить, чтобы она не мешала вашей работе, и снимите спектр по дейтерию. Если все линии [в обычном спектре] - широкие, это может быть признаком того, что или LOCK не работает, или оператор не смог настроить работу этой системы. А не смог он ее настроить по той причине, что вы забыли добавить в образец дейтерий, например, растворили [вещество] в CCl_4 , где нет остаточных протонов, и в образце вообще нет дейтерия - системе LOCK не за что зацепиться, она не работает, и вы получили намного худшее разрешение.

Поэтому, чтобы получить хорошее разрешение, образцы [готовьте] всегда в дейтерированных растворителях, а если растворитель не дейтерированный, или вам специально нужен обмен с протонным растворителем, например, с обычной водой, тогда нужно добавить какое-нибудь нейтральное соединение, содержащее дейтерий, именно для работы системы LOCK.

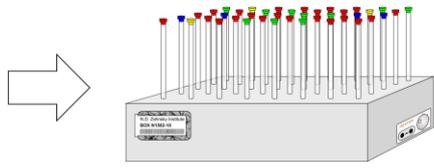
Приготовление образца



$\varnothing 10 \text{ мм}$ - чувствительность \uparrow , однородность поля \downarrow
 $\varnothing 5 \text{ мм}$ - стандарт, рабочая область $\geq 20 \text{ мм}$ (=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 $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$
- температуры кипения и замерзания, температурные изменения растворимости
- способность к образованию водородных связей и «утягиванию» сигналов
- молярная доля дейтерия (качество LOCK)
- вязкость (разрешение)
- цена (стандарт – DMSO- d_6 , ~2000 \$/кг)

Ф.Тоукач, слайд 65

#65 Мы как раз подошли к приготовлению образца. **Что это такое [ампула ЯМР]**, вы уже видели на том слайде, где были фотографии. Но вы будете выступать заказчиками для ЯМР-сервисов чаще, чем исполнителями, поэтому вам нужно будет выбрать ампулу, растворитель, желательную температуру, чтобы оператор не сам ее выбирал, и подготовить этикетку. Про важность этикетки отдельно хочу сказать, поскольку люди приносят такие этикетки, по которым не понятно не только предполагаемая структура, но и вообще, что требуется сделать. Какие-то каракули написаны, фамилия человека только. Какие спектры снимать, какой растворитель, с какого образца – ничего не ясно. Поэтому этикетки делайте нормально, не путайте их друг с другом, делайте так, чтобы они не потерялись. **Вот, собственно, пример [слева вверху]**. Желательно, если у вас много образцов, сразу договоритесь снабжать их QR-кодом, дальше оператор может «ридером» кодов прочитать все, что нужно, и у него сразу введется информация об образце. Самое важное для него [и для вас] – это информация о том, куда отправится файл со снятым спектром. Если это центр коллективного пользования, вы там, видимо, регистрируетесь, получаете логин, свою директорию где-то на FTP-сервере. И когда ваш спектр сняли, его FID попадает в эту директорию, откуда вы его потом скачиваете через Интернет. А для того, чтобы он туда попал, эта система должна иметь возможность вас идентифицировать, то есть ваш логин или какой-то другой идентификатор, полученный при регистрации, должен присутствовать на этикетке, ну или на коробке с образцами, если вы их много принесли.

Дальше, выбор ампул сводится к одному из трех. В 99% случаев – это 5-мм ампулы. Если вам очень не хватает чувствительности, например, вы снимаете [спектр] по редкому гетероядру, которого мало, у которого плохое гиромагнитное отношение, можно взять 10-мм ампулы. Такие же, только шире. Будет хуже однородность поля, то есть разрешение, но лучше чувствительность. Но при этом для них нужен другой датчик, с большим диаметром рабочей области, поэтому такие эксперименты

стоят дорого, потому что этот датчик должен быть, оператор должен его поменять, настроить, после вашего эксперимента его снова поменять обратно на пятимиллиметровый, опять настроить. То есть это [оправдано только] при крайней необходимости.

Сейчас стандарт - это 5 мм. Рабочая область для одномерных экспериментов – 20 мм от доньшка. Это чуть меньше, чем полмиллилитра [раствора]. Для экспериментов, в которых задействовано несколько катушек, например, для двумерных гетероядерных корреляций, желательно наливать больше. Во-первых, чтобы **эта граница [между жидкостью и воздухом]** не попала в рабочую область, а, во-вторых, чтобы эта граница, где происходит скачок магнитной восприимчивости, была по возможности дальше от рабочей области и не влияла на ее локальное поле. Но здесь есть и обратная сторона вопроса: чем больше вы налили [раствора], тем у вас меньше получилась концентрация. Потому что образца у вас не бесконечное количество. Если у вас есть 3 мг, то, налив слишком много растворителя, вы часть молекул вещества вообще выведете за пределы рабочей области, а в рабочую область попадет меньше, следовательно, будет меньше чувствительность.

Здесь существует комбинированное решение: **вот здесь посередине - рабочая область датчика**. Можно низ ампулы заполнить чем-нибудь магнитно-нейтральным, сделать вставку из специального стекла, которое подобрано так, чтобы у него были такие же магнитные свойства, как у стекла ампулы. И растворитель подобрать подходящий, чтобы не было сильного скачка магнитных свойств между стеклом и растворителем. То же самое сделать сверху: вставить какой-то цилиндр, чтобы граница была не с воздухом, а со специальным материалом, где не будет на границе этого скачка. Вставка сверху также решает и другую проблему: когда у вас ампула вращается вокруг вертикальной оси, за счет центробежной силы возникает мениск, то есть здесь не ровная поверхность будет, а изогнутая, и если растворитель текучий, а вращается быстро, то [жидкость] вообще может по стенкам размазаться, а эта воронка пойдет **вот сюда, в рабочую область**. Чтобы этого не происходило, сверху можно придавить столбик жидкости специальной вставкой.

Дальнейшее развитие этой идеи состоит в специальных ампулах. Они называются «ампулы Шигеми». Это ампулы из очень толстого стекла, посередине идет тонкий капилляр, и строго в рабочей области находится утолщение, в которое попадает образец. Таким образом, весь образец оказывается в рабочей области. Это позволяет повысить чувствительность, иногда в ~10 раз. При этом стекло – граница между стеклом и растворителем – оказывается в рабочей области, и чтобы там не было скачка магнитной восприимчивости, под каждый растворитель – свой тип ампул Шигеми, сделанных именно из того материала, который имеет те же магнитные свойства, что и растворитель. Как правило, они дорогие. Если обычные ампулы стоят долларов по десять, такие стоят ~300\$. Поэтому это оправдано только тогда, когда вы обычно все в одном растворителе снимаете - тогда именно под него можно купить ампулу Шигеми. А, во-вторых, когда у вас мало вещества, вам нужны какие-то «низкочувствительные» спектры, например, по гетероядрам. Наконец, если центр коллективного пользования очень богатый, можно их как-то «катализировать», чтобы они сами купили ампулы. В первый раз они, конечно, захотят, чтобы вы за них заплатили, но потом вы теоретически сможете ими пользоваться.

(...) Следующий момент – однородность образца в самой ампуле. Градиент любого параметра - магнитного поля, концентрации, еще чего-то - будет выражаться **вот так [спектр в центре слайда]**. Это – непрогретые образцы и образцы с градиентом концентрации. У них будут искажения формы линии, похожие на ошибки в настройке Z^2 , но они будут разные у разных сигналов. Причем как раз будет появляться градиент - по мере движения от одного края спектра к другому у вас плечо будет уменьшаться и потом появляться с другой стороны, ну или просто уменьшаться, если дойдет только до нуля. Если вы в спектре видите **такие сигналы**, то есть признаки того, что есть градиент

какого-то параметра, стоит проверить две вещи. Во-первых, что образец полностью растворился. Если осталась какая-то твердая частица, это как раз создает градиент концентрации, потому что она очень большая около этой частицы и очень маленькая далеко от нее. То есть надо хорошо перемешать. Во-вторых, убедиться в отсутствии твердых примесей, вдруг попало что-нибудь нерастворимое, стекло какое-нибудь. И, в-третьих, убедиться, что оператор снял вам образец, в котором не было градиента температуры. Как правило, образцы снимаются при слегка повышенной температуре, чтоб была больше текучесть. Общая практика – это когда образцов у оператора много, он **вот такую коробку** получает, а дальше, чтобы не ждать пока [образцы] термостатируются в приборе, он достает из нее ампулу, зажигалкой немного нагревает (в течении 5 секунд) и вставляет в прибор. Когда он нагревает, там происходит конвекция, то есть, во-первых, перемешивание, (устраняются градиенты концентрации), во-вторых, [образец] нагревается как раз примерно до той температуры, при которой [он] будет снимать, то есть $\sim 40^{\circ}\text{C}$. Но, имея в виду эту практику, во-первых, если образец нельзя греть, лучше напишите об этом на этикетке в явном виде: «не греть!». Во-вторых, если у вас там растворитель, который при нагревании имеет свойство вскипать или расширяться (легкокипящий растворитель), желательно обвести это фломастером там, где у вас на этикетке написан растворитель. Обвести, чтобы не грели. Поскольку, если вы дадите что-то в диэтиловом эфире, и он его зажигалкой нагреет, то у него пробка вылетит из ампулы, и если очень не повезет, то прямо в спектрометр, в отверстие для загрузки образца :). У меня такое было, [пробка] упала в работающий лазерный принтер, ее там намотало на барабан. Вероятность попадания в такое окошечко минимальна, тем не менее, это произошло. Так или иначе, если не греть, пишите в явном виде; если легкокипящий растворитель - пишите в явном виде.

Растворитель тоже всегда имеет смысл писать, потому что оператору будет легче настроить систему LOCK, если он сможет сообщить спектрометру, где примерно искать сигнал дейтерия. А это он будет знать, если будет знать, какой растворитель. Если вы работаете с большим количеством образцов, то имеет смысл **вот такую печку** или приобрести за большие деньги, или сделать, потратив час работы - взять кусок поролон, наткать в нем дырочек, а снизу подложить «попогрейку» для машины за 2000 р. И как раз пока оно будет стоять, оно будет нагреваться до небольшой температуры и перемешиваться. Готовое решение от фирмы Bruker будет стоить не 2000 рублей, а 2000 долларов, наверное, хотя это, по сути, то же самое.

Теперь, выбор растворителя. **Вот написаны критерии.** Очевидный критерий - положение сигналов [остаточных протонов и углерода], чтобы они не перекрывали сигналы вашего соединения, причем [важны] сигналы не только самого растворителя, но и сигналы характерных для него примесей. Характерные примеси – это чаще всего вода. Если растворитель гигроскопичен, он наберет воду из воздуха, и будет сигнал от примеси воды. И если сигналы в вашем соединении находятся там же, где и вода, вам придется или температуру подбирать, чтобы двигать сигнал воды, (чтобы он вам не мешал), или выбрать другой растворитель, не гигроскопичный, в котором не будет воды. Здесь я еще не написал про реакционную способность, но я думаю, что для химика должно быть очевидно, что ни растворитель, ни характерные примеси (например, вода) не должны реагировать с соединением – я это не стал писать. Но вот про химический обмен стоит упомянуть. Если вам нужны сигналы ОН- и NH₂-групп, склонных к обмену, вам нельзя использовать воду, метанол, этанол, спирты и ДМСО (последний - потому что ДМСО гигроскопичен, и в этой воде растворятся все сигналы). Вы их или не увидите, или они будут сильно уширенными. Но иногда это бывает даже наоборот полезно: например, в сахарах, где много ОН-групп, можно всех их убрать за счет химического обмена, исключив тем самым лишние сигналы и лишние спиновые расщепления, сделав спектры более понятными. Тогда как раз нужно взять дейтерированную воду взять – за счет

обмена с дейтерием вода уйдет из образца, на ее месте окажется дейтерий, [из-за обмена] расщепления не будет.

Температура кипения и замерзания и температурные измерения растворимости. Во-первых, если нужно нагревать, понятно, что растворитель должен пережить нагревание. А если нужно охлаждать, то это должен быть не ДМСО, который замерзнет при 18°C, и не вода. И лучше проверить, чтобы при интересующей вас температуре (если нужен эксперимент на холоде) вещество не выпало в осадок.

Водородные связи. Особенно ароматика с заместителями с гетероатомами: фенолы, анилины, пиридины и прочие. Они способны очень сильно менять химические сдвиги, в протонах до 2 м.д. Поэтому, если вы ориентируетесь на спектр в стандартных растворителях, не стоит растворять в пиридине. С другой стороны, многие классы соединений – гормоны, растительные гликозиды – вообще ни в чем, кроме пиридина, не растворяются. Поэтому вам придется их растворять в том, в чем они растворяются, то есть в пиридине, и искать отдельную литературу и отдельные базы данных по химическим сдвигам именно в пиридине.

Следующий критерий – это массовая¹²⁸ доля дейтерия: чем его больше, тем лучше будет LOCK. Но даже когда его не очень много, в принципе, LOCK тоже работает, но иногда возможны эксцессы. Поэтому плохим растворителем здесь является только CDCl₃ с этой точки зрения – там один дейтерий, и иногда LOCK за него «не зацепляется». Только, не массовую долю, а мольную долю, это ошибка на слайде (естественно, [на сигнал влияет] абсолютное количество [атомов]).

Вязкость. Чем она больше, тем хуже разрешение, но для некоторых экспериментов нужны вязкие растворы, например, [для экспериментов] по измерению коэффициента диффузии. К этому мы еще вернемся. То же самое касается NOE. NOE в очень текучих растворителях копится плохо, а в очень вязких растворителях плохое разрешение, поэтому для NOE нужны растворители со средней вязкостью. К примеру, диметилформамид нам не подходит.

И наконец, цена. Дейтерированные растворители на один, два, иногда на три порядка дороже недейтерированных аналогов, поэтому что угодно купить не получится, особенно в маленьких количествах. Если вам нужен какой-нибудь тетрагидрофуран, то, наверное, 20 долларов за полмиллилитра вы можете заплатить, но вы столкнетесь с тем, что продается он только литрами, и тут будет некоторая сложность.

#66 Это сводная таблица по растворителям – тут в том числе и **цены указаны** (приблизительная цена в долларах за грамм)¹²⁹. Диметилсульфоксид – на него цена может быть очень разной, поскольку его во многих институтах регенерируют. Вы можете образец, если он вам не нужен, просто отдать на регенерацию или сами перегонкой регенерировать. А если нужно выделить образец – как-то его выделить, а остатки растворителя потом очистить и использовать повторно. Там, где это умеют делать, цена на ДМСО поменьше будет, 0.5 \$/грамм. А там, где не умеют, там она где-то на таком уровне, но это данные пятилетней давности. Некоторые пертурбации возможны, но общие закономерности остались теми же самыми. Хлороформ и вода – очень дешевые растворители по сравнению с остальными, средняя цена – это распространенные ацетон и диметилсульфоксид, а все остальное, в основном, стоит дороже.

¹²⁸ Ошибка лектора, правильно - мольная доля.

¹²⁹ На начало 2010-х. Нынешние цены имеют примерно то же соотношение.

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

Ф. Тоукач: слайд 66

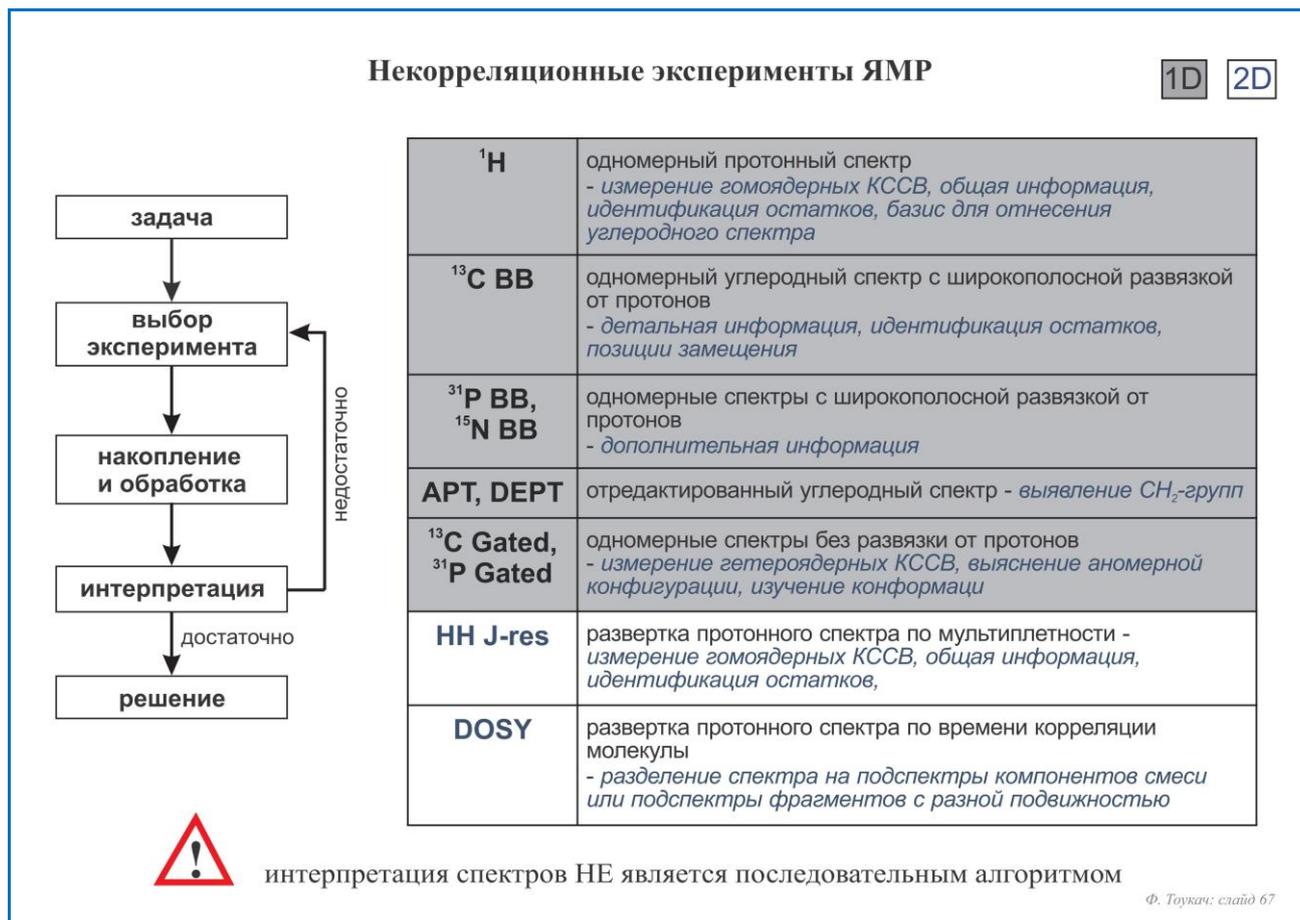
По остальному... это я комментировать не буду (**температура плавления и кипения и химические сдвиги**). Когда у вас возникает конкретный вопрос, подойдет ли этот растворитель, смотрите в таблицу, проверяете, что у вас температуры не выходят за границы, что сигналы находятся примерно там, где мешать не будут, и проверяете, есть ли в вашем институте такой растворитель. Естественно, от чистоты тоже зависит, то есть чем он чище и чем меньше в нем примесей недеитерированных, тем он будет дороже. Но небольшая примесь полезна, потому что ее можно использовать в качестве стандарта. Для воды стандартная чистота низкая, 99.8%, для всех остальных она выше, именно потому что вода – [в том числе] тяжелая вода – чрезвычайно гигроскопична, даже больше, чем ДМСО: стоит ее открыть, она из воздуха начнет набирать обычную воду, доля протонированной воды будет в ней расти. Поэтому ее абсолютной вообще «не бывает».

Особенности: вязкость (**она здесь указана**), **гигроскопичность** указана, спирты содержат подвижный протон, что нужно иметь в виду при анализе молекул с группами, способными к химическому обмену. И наконец, бензол, толуол и пиридин могут сильно изменить химические сдвиги. Итак, это была справочная таблица для выбора растворителя.

Лекция 6 [NMR Lec6s.mp4](#)

#67 Сегодня мы в виде обзора познакомимся с наиболее распространенными экспериментами ЯМР. Всего их (наиболее распространенных) - три или четыре десятка. С некоторыми из них вы уже сталкивались на предыдущих лекциях, с некоторыми столкнетесь сегодня. Сначала посмотрите на схему в левой части слайда. Она примерно показывает, как работает мозг исследователя при использовании этих экспериментов. У вас есть структурная задача, на основании этой задачи вы выбираете эксперимент, потом вы или другой человек (ЯМР-сервис или кто-то еще), этот

эксперимент проводит. Вы смотрите на результат. И, если данных достаточно, то задача решена, а если недостаточно – возвращаетесь к выбору эксперимента, который позволит уточнить полученные результаты и ответить на нерешенные вопросы.



Но в этой схеме есть недостаток. Вам придется каждый раз обращаться в ЯМР-сервис заново, вы «замучаете» оператора, он откажется с вами работать. С этой точки зрения выгоднее сразу прикинуть, какие нужны эксперименты, чтобы **этот шаг [накопление и обработка]** не включал повторное обращение в сервис. Здесь нужен баланс. Если вы сразу закажете 10 экспериментов, а для структурной задачи вам понадобится два, то получится, что восемь вы оплатили зря. А если вы закажете один, а потом еще один, а потом еще один, и так повторите 10 раз, то есть вероятность, что вас потом не пустят на порог этого ЯМР-сервиса. Здесь нужно примерно прикинуть, какие эксперименты требуются вам, исходя из предположений о молекуле, и сделать первую итерацию. Если первая итерация не помогла, посмотреть, не нужно ли изменить что-либо в образце. Например, концентрацию, pH, сделать химическую деградацию структуры, гидролизовать, приготовить новые образцы, подготовить еще раз пробы, и обратиться за следующим набором экспериментов. Оптимально является 1-5 экспериментов за раз.

STOP Кроме этого, если вы заказываете сразу несколько экспериментов, это какая-никакая гарантия того, что они будут проводиться в одинаковых условиях, поскольку *один* раз образец будет помещен в спектрометр, при одной и той же температуре и каких-то прочих параметрах, зависящих, к примеру, от дня недели, будут сняты все спектры. В этом случае их сравнение между собой будет более достоверным.

Следующий момент, касающийся этой схемы: это идеальный алгоритм, а в реальном... глядя на реальные спектры, не всегда можно представить последовательность действий по их

интерпретации в виде последовательности шагов. Вам нужно будет смотреть на спектры одновременно, и в какой-то момент структура «сложится».

Итак, что это могут быть за эксперименты? Как правило, исследование начинается с одномерного протонного спектра – самого простого, быстрого, дешевого и иногда наиболее информативного. Из него мы получаем общую информацию, идентифицируем структурные фрагменты, у которых есть характеристические химические сдвиги, измеряем протон-протонные КССВ, чтобы потом сделать выводы о конформации, и делаем отнесение протонного спектра, т.е. таблицу соответствия между сигналами в спектре и протонами в молекуле. При публикации вашего исследования эта таблица, скорее всего, будет обязательной: или в форме таблицы, или в форме текста, но так или иначе, если вы делаете исследование с помощью ЯМР, в экспериментальной части вы должны представить отнесение сигналов, как минимум, для протонного спектра.

Тем не менее, для получения более детальной информации о структуре, особенно если речь идет о больших молекулах, построенных из множества остатков, вам понадобится спектр ^{13}C . Как вы помните из предыдущей лекции, существует эксперимент по гетероядерной корреляции, который позволяет перейти от отнесения протонного спектра к отнесению углеродного спектра, приписать хим. сдвиги атомов и на основании изучения этих хим. сдвигов доказать или опровергнуть структуру, выявить конформацию и найти какие-то прочие закономерности, обращаясь к литературе и базам данных хим. сдвигов. Поэтому второй по значимости эксперимент – это одномерный спектр ^{13}C , дающий более детальную информацию о соединении. Для его отнесения нужны гетероядерная корреляция и отнесенный протонный спектр. **Аббревиатура ВВ** означает broad band, то есть спектр, снятый в режиме широкополосной развязки от области резонанса протонов. Напоминаю, что при этом все сигналы будут синглетными. Это значит, что будет лучше отношение сигнал/шум, чем в случае, если бы сохранялось щепление. [В таком спектре] легче измерить хим. сдвиги, и быстрее копится спектр.

Одномерные спектры существуют также и в вариантах по другим ядрам. Наиболее значимые в органической химии – это ^{31}P и ^{15}N , иногда еще ^{19}F (у того, кто работает с фторорганикой). Если в случае с фтором и фосфором это, за счет высокого природного содержания - высокочувствительные эксперименты, то в случае с ^{15}N , за счет низкого природного содержания, и низкого гиромагнитного отношения, эксперимент низкочувствительный. Поэтому его обычно заменяют на аналогичный азотный INEPT. Тем не менее такой эксперимент тоже может существовать и может вам понадобиться. Если у вас много вещества, или обогащенный образец, то эксперимент ^{15}N ВВ вполне оправдан.

Другие варианты одномерных спектров по углероду и гетероатомам:

1) эксперименты с переносом поляризации, т.е. вся группа экспериментов INEPT. А именно, [по углероду] Attached Proton Test и различные варианты DEPT. Это у нас в прошлый раз было. Напоминаю, что, во-первых, это высокая чувствительность по сравнению с обычным ВВ экспериментом, а во-вторых, в зависимости от количества присоединенных протонов сигналы будут «смотреть» вверх или вниз, что позволит вам разделить CH_2 группы и CH , к примеру.

2) Эксперименты без развязки, которые называются **Gated**, это фактически просто одномерный спектр по какому-либо ядру при отсутствии широкополосной развязки от протонов. Недостаток – низкая чувствительность. Преимущество - сигналы углеродов или других атомов являются мультиплетами, мы можем оценить количество соседей и измерить гетероядерные КССВ. И на основании этого сделать, например, выбор о том, *цис*- или *транс*-изомеры [в образце] или о каких-то других особенностях структуры.

Для этих экспериментов (кроме ^{13}C), нужны так называемые broad band датчики. Это датчики с возможностью перенастроить частоту катушки на какое-то определенное ядро. В идеале одна катушка заранее настроена на протоны, одна катушка настроена на углероды, еще одна для «лока» на дейтерий и четвертая катушка в этом датчике перестраиваемая. Двигая механические ползунки, оператор настраивает ее на определенное ядро. Такие датчики менее чувствительные, чем селективные (заранее настроенные на какое-то ядро), зато можно обойтись одним датчиком для всего диапазона ядер. Сейчас они (перестраиваемые датчики с четырьмя катушками) довольно популярны, несмотря на то, что они довольно дорогие. Это если сравнивать с селективным датчиком, у которого, допустим, будут дейтерий для лока, протоны и фтор (три катушки; он называется «селективный фторный датчик»). [Катушки для] протонов и дейтерия есть в любом датчике. Вот селективный датчик стоит, условно, ~5 тыс. долларов, а перестраиваемый датчик с четырьмя катушками – ~50 тыс. долларов, в десять раз больше. Но если в лаборатории, где стоит прибор, есть спрос на эксперименты по разным гетероядрам, а не только по углероду, окупаются эти затраты довольно быстро¹³⁰.

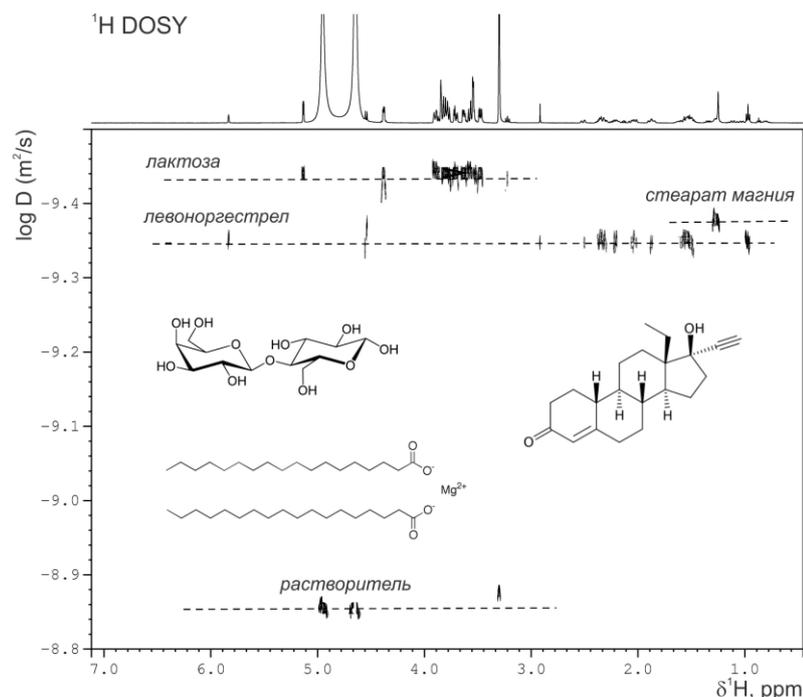
Особняком стоят два корреляционных эксперимента, но коррелируют они не химические сдвиги друг с другом, как большинство остальных корреляций, а химические сдвиги с иным параметром. Мы их рассмотрим подробнее на следующих слайдах, а пока что просто названия запомните: J-resolved – это корреляция величин констант спин-спинового взаимодействия с химическими сдвигами. Мультиплеты как бы разворачиваются на 90° , что уменьшает вероятность их пересечения. А DOSY – это корреляция химических сдвигов с подвижностью молекулы. По одному измерению в двумерном спектре у нас химические сдвиги, как в одномерном, а по другому – величина, связанная с коэффициентом диффузии. Молекулы, имеющие разный коэффициент диффузии, будут на разных срезах этого двумерного спектра. Тем самым мы разделяем спектр на подспектры компонентов смеси.

В этой таблице и во всех последующих: одномерные эксперименты [перечислены] на сером фоне, двумерные – на белом, трехмерные – на желтом.

¹³⁰ Не следует забывать, что для использования всех возможностей многокатушечных датчиков необходимо также достаточное число каналов синтезатора частоты и усилителя сигнала в управляющем блоке спектрометра, т.е. «апгрейд» старого прибора не сводится только к замене датчика.

Диффузионная спектроскопия (DOSY)

Если за время между двумя градиентными импульсами молекула сместилась в пространстве, детектируемый сигнал ослабляется в зависимости от пройденного ей расстояния. Обработка \Rightarrow 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 68
снскрп: 10.1371/journal.pone.0095353.g005

#68 Начнем как раз с двух последних экспериментов. Диффузионная спектроскопия – diffusion oriented, по-моему, spectroscopy... diffusion ordered. Изобретено относительно недавно – уже в этом веке, и суть здесь состоит в следующем. Появились датчики, которые могут создавать импульсы, не одинаковые во всем объеме образца. Такие датчики называются градиентными. Они использовались не только для этого. Но наличие возможности сделать градиент позволило [спроектировать] и этот эксперимент. Что такое градиентный импульс? Это импульс, амплитуда магнитного поля которого (то есть скалярная величина) зависит от координаты по оси OZ . То есть от [макроскопического] положения молекулы в образце, на которую воздействует этот импульс. И что можно сделать? Можно сделать два градиентных импульса и, если за время между ними молекула сместилась в пространстве, она подверглась [второму] импульсу другой напряженности генерируемого магнитного поля. И сигнал, после перевода его третьим импульсом в горизонтальную плоскость, изменит свою интенсивность в зависимости от пройденного молекулой расстояния. По сути [этот эксперимент] - предшественник томографии. Только в томографии не импульсы градиентные, а само магнитное поле имеет градиент в пространстве. Но идея та же самая. Что это значит, что интенсивность сигнала изменилась в зависимости от пройденного (молекулой) за фиксированное время расстояния? Это значит, что, чем молекула более подвижна (в химическом смысле... это фактически означает, что чем меньше ее молекулярный вес), тем сильнее изменится сигнал. Можно это изменение отследить, и с помощью математической обработки превратить в двумерный спектр. То есть сделать развертку по коэффициенту диффузии или по времени корреляции молекулы по одной оси, и по химическим сдвигам по другой оси.

Здесь мы видим пример. Это смесь **трех компонентов** (какой-то лекарственный препарат). И есть еще растворитель (...). Здесь мы видим следующее: разные молекулы дают кросс-пики на разных «линиях» **по этой [вертикальной] оси**. Причем близкие по молекулярной массе [вещества] оказываются близко, а чем молекулы сильнее отличаются, – **это на примере растворителя видно**, –

тем они оказываются дальше друг от друга. Внизу более подвижные, вверху менее подвижные. Этот эксперимент можно проводить и в гетероядерном, то есть не в гетероядерном, а... *не только в протонном* варианте. Например, сделать DOSY ^{13}C . Это, естественно, сложнее в силу меньшей чувствительности, зато меньше пересечений сигналов, следовательно, они здесь могут «разойтись» лучше. Но если протон-протонный DOSY уже много кто умеет делать, то DOSY ^{13}C – это пока еще что-то среднее между везением и искусством. Поэтому если вам нужен такой эксперимент, и вы понимаете, что вы без него не можете обойтись, вам нужно или как-то принимать участие, или договориться с человеком, который освоит эту технологию и попробует воспроизвести. И вы должны быть готовы к тому, что может и не получиться.

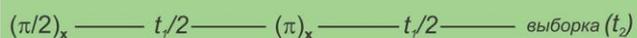
Почему может не получиться? Во-первых, может не получиться, если вязкость [раствора] не подходящая. В слишком вязких растворителях диффузии нет вообще, а в слишком текучих все диффундирует. И точно так же, как и в случае NOESY, может или не быть сигналов, или сигналы окажутся везде. Поэтому нужно подобрать оптимальную вязкость. Лучше всего начинать с хлороформа. Это растворитель со средней вязкостью, который считается хорошим первым приближением [к оптимуму] для эксперимента DOSY.

Следующая причина, по которой что-то здесь может пойти не так - это слишком большое отношение количества компонентов в смеси. Если оно больше, чем 100:1, скорее всего, мы минорные компоненты не увидим. Из-за особенностей математической обработки сигналы в DOSY разойдутся по *этой [диффузионной] оси*, если на оси химических сдвигов есть хотя бы небольшой перегиб [формы линии] между ними (даже не полностью разошедшийся сигнал, а *хотя бы что-то подобное [рисунок на доске: *). Если же сигналы совпали полностью... обработка там сделана так, что они, скорее всего, по вертикальной оси здесь тоже не «разойдутся». Это нужно иметь в виду, когда вы работаете с этими спектрами.

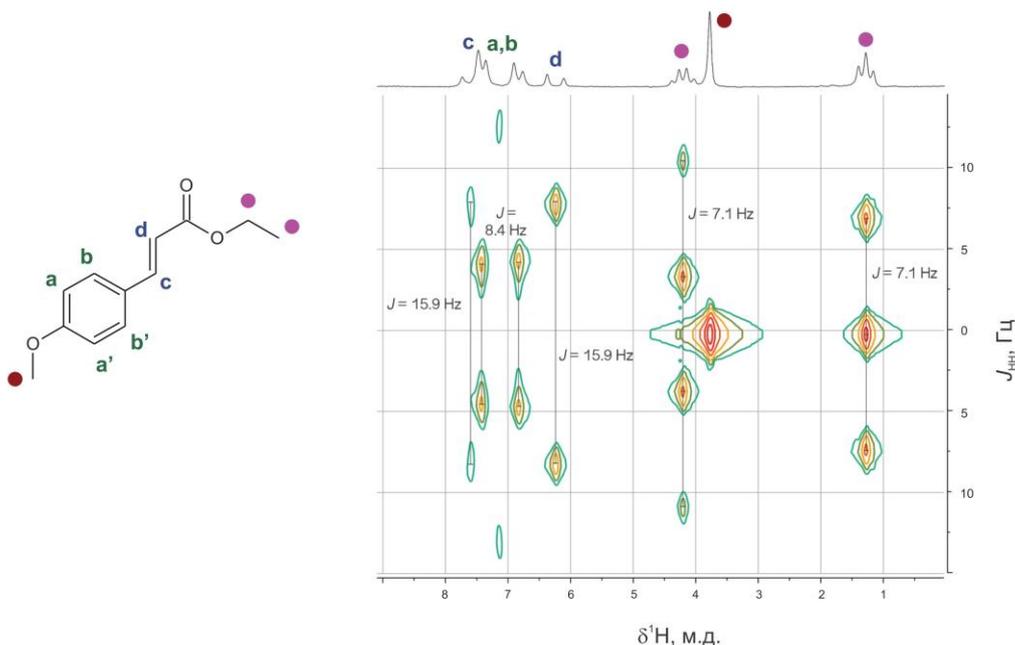
И, наконец, может быть конвекция. Конвекцию, правда, легко подавить, но не «бесплатно». Для этого нужны вставки в ампулу - что-то типа перегородок, разделяющих образец по вертикали. Но естественно, эти перегородки должны иметь такие же магнитные свойства, как растворитель, чтобы не было локального изменения магнитного поля. А это значит, что под каждый растворитель они должны быть свои. Используются они редко и в связи с этим стоят дорого.

Что еще можно сделать? Можно добавить в ампулу мелкодисперсный силикагель. С одной стороны, это сильно уменьшит разрешение, поскольку любое твердое тело в образце приводит к уширению линии (ускорению релаксации), но, с другой стороны, он сместит скорость диффузии – силикагель – в ту область, где эти значения (по вертикальной оси) будут больше отличаться друг от друга. Если у вас есть молекулы, у которых похожа подвижность, и вам нужно их разделить в этом спектре, можно попробовать пожертвовать разрешением и добавить силикагель. Никто не мешает приготовить другой образец без силикагеля для обычных спектров, чтобы там разрешение было хорошим. И уже имея его отнесение (вам больше хорошее разрешение не понадобится, теперь вам нужно оценить разделение компонентов смеси), добавляете силикагель и снимаете DOSY.

Эксперимент J-resolved



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



Ф. Тоукач: слайд 69

#69 Следующий эксперимент, который был в таблице полтора слайда назад, это J-resolved. Сейчас почему-то он мало используется. Возможно, потому что возросли частоты спектрометров, и зачастую можно, глядя на протонный спектр, разобраться, где какие константы и без этого эксперимента. Тем не менее бывают ситуации, когда сигналы расположены близко и вы не можете понять, что с чем пересекается, и где находятся отдельные линии в этих сигналах. Тогда применяется **этот эксперимент J-res**, очень похожий по своей импульсной последовательности на спиновое эхо. Суть его состоит в том, что там две задержки, обе они синхронно инкрементируются, то есть на каждом следующем прохождении имеют одинаковый инкремент. Вспоминаем спиновое эхо. За время второй задержки, вот здесь, химические сдвиги, но не КССВ, рефокусируются. И можно только оставшиеся константы перевести третьим импульсом в горизонтальную плоскость¹³¹ и накопить.

Вот пример того, что мы видим [в результате]. Для вас, естественно, важнее спектры и получаемая информация, а не импульсная последовательность. Здесь по вертикальной оси константа спин-спинового взаимодействия, посередине [оси] ноль. А по горизонтальной оси – обычный спектр, то есть хим. сдвиги. **Вот этот спектр.** Очень простая молекула, но здесь хим. сдвиги так совпали, что левая компонента **одного из двух дублетов А и В** совпадает с **правой компонентой дублета С**. Они здесь пересеклись, **вот эта большая линия [7.5]** – это точное совпадение правого края одного сигнала с левым краем другого сигнала. И, с учетом эффектов крыши, глядя на протонный спектр, может быть, вы и не сможете сказать, где здесь какие сигналы (какая линия кому принадлежит). И, следовательно, не сможете померить константы спин-спинового взаимодействия и определить мультиплетность. Имея же этот спектр [J-res], это сделать очень легко. Вот масштаб: **вот ноль, вот**

¹³¹ Третий импульс для этого не требуется, достаточно начать накопление в момент рефокусировки химических сдвигов.

10 Гц. Если в протонном спектре мы имеем дублет, то в этом спектре мы увидим **две его компоненты**, развернутые как бы на 90° . И расстояние между ними – это как раз величина константы спин-спинового взаимодействия. Вот она здесь измерена, 15.9 Гц.

Чем это хорошо? Рядом другой дублет, с большей константой (с *транс*-константой через двойную связь¹³²). (...) 8.4 Гц - это J_{AB} , а ~16 Гц – это J_{CD} . И вот **эти два сигнала [С и левый сигнал из группы АВ]**, находящиеся рядом, которые не разрешаются в протонном спектре, разрешаются **здесь**. Во-первых, отсюда мы видим, что и то, и другое является дублетом, во-вторых, мы можем измерить константу вот в этом [вертикальном] направлении, то есть мы исключили «пересечение КССВ», уменьшив проекцию каждого сигнала на ось химических сдвигов. Вот для сравнения **квартет [4.2]** и **синглет [3.7]**, находящийся на нулевой оси (...).

При этом, если замерить объем под этим двумерным пиком, соотношения объемов [компонентов квартета] будут такие же, как соотношения площадей в одномерном спектре: 1:3:3:1. *[ответ на вопрос:]* Вот сигнал **«смотрит на нас» [4.2]**. Это же «контурная карта»: вот тут сигнал, некий «сталактит», да? Если мы возьмем двумерный интеграл, то есть по сути замерим объем этого «сталактита», это как раз и будет количество спиновых состояний, давших эту линию. Мы помним, что в квартете соотношение площадей - 1:3:3:1, только площади – это в одномерном спектре, (одномерный интеграл), а в двумерном спектре – это объемы, то есть двумерный интеграл.

[ответ на вопрос про сигнал С:] **Вот этот, да**. Его **левая компонента вот**, его **правая компонента вот**. Правая компонента с чем-то пересеклась, поэтому ее здесь могли не идентифицировать. А видя этот спектр, мы ее легко идентифицируем. При этом **химический сдвиг, находящийся вот здесь** [линия между кросс-пиками] – это как раз какая-то точка между этими линиями [компонентами дублета], которая соответствует реальному химическому сдвигу сигнала. Поскольку из-за эффекта крыши линии в дублете не одинаковы по площади, то и химический сдвиг – это не середина между ними (не самое глубокое место «впадины»), а некий «центр масс». «Центр масс» высчитывать не всегда удобно, а здесь, кстати, мы сразу можем измерить [его положение]: провести через центры кросс-пиков вертикальную линию, и где она придет **на эту [горизонтальную] ось**, это будет точный хим. сдвиг.

¹³² Это и есть дублет С.

Гомоядерные спиновые корреляции

1D
2D

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

Ф. Тоукач: слайд 70

#70 Теперь переходим к классическим корреляционным экспериментам. То есть [к тем,] которые коррелируют химические сдвиги друг с другом по определенным законам. Пример углеводный: здесь показан один [моносахаридный] остаток, а здесь [справа] - структурный фрагмент из двух остатков. Стрелки соединяют те протоны, корреляции между которыми выявляют эксперименты, подписанные около стрелок. Допустим, COSY выявляет корреляцию четвертого с третьим (но, естественно, не только четвертого с третьим - здесь по одной [стрелке] для каждого примера) через три связи (...).

[COSY -] классическая корреляция – *correlation spectroscopy* – гомоядерная. Это спиновая корреляция, «заточенная» под константы порядка ~10 Гц. Лучше всего она выявляет вицинальные протоны, расположенные в трех связях друг от друга. Также она очень хорошо выявляет геминальные протоны при sp^3 -гибридизованных углеродах, то есть там, где КССВ ~12 Гц. А контакты, в которых КССВ составляют ~2-3 Гц (протоны, расположенные в четырех связях друг от друга, или протоны, расположенные в трех связях с торсионным углом около 90°, или протоны, расположенные в двух связях друг от друга при sp^2 -гибридизованном углероде, то есть при двойной связи) [имеют] маленькие константы. Такие константы COSY, как правило, не выявляет. Но если вещества много, копили долго и можно достигнуть хорошего отношения сигнал/шум, то мы увидим маленькие кросс-пики и для таких контактов тоже. Но все-таки основное – это через три связи. На примере углеводных молекул это контакт между, например, H3 и H2, или между H1 и H2, или между H3 и H4, как здесь стрелкой показано. То есть между соседними [протонами] в спиновой системе.

Следующий вариант этого эксперимента - COSY-45. Второй импульс (вместо 90°), используется 45-градусный. И кросс-пики в нем имеют диагональную структуру. Вот кросс-пик, допустим, дублета с дублетом [четыре точки]. А это кросс-пик дублета с триплетом [шесть точек]. Они в COSY-45 будут выглядеть вот так [скошенные две или четыре точки]. Наклон соответствует

знаку константы спин-спинового взаимодействия. Из COSY-45 можно «вытащить» знак [KCCB], и, кроме этого, сигналы около диагонали более узкие, меньше пересекаются. Поэтому если хим. сдвиги взаимодействующих протонов близки, то с помощью COSY-45 корреляцию между ними отследить проще, чем с помощью классического COSY. Минусом COSY-45 является примерно вдвое меньшая чувствительность по сравнению с COSY-90 (с обычным).

Следующий эксперимент [RCT]. Я не для всех [экспериментов] показывал вам спиновые последовательности, но на этом этапе это для вас и не важно, поскольку вам нужно знать, что такие эксперименты существуют, что вы можете поставить такую задачу перед оператором ЯМР-спектрометра, и это даст вам такой-то спектр, который вы определенным образом проинтерпретируете. Примеры этих спектров будут на следующих слайдах.

Итак, COSY с переносом когерентности (последовательно): **Relayed Coherence Transfer**, одноступенчатый. И **RCT2** – двухступенчатый. Этот эксперимент ставится так, что мы видим контакты через один протон по связям. То есть если есть, к примеру, вицинальные константы между H1 и H2, а также между H2 и H3, но нет хорошей вицинальной константы между H1 и H3, то в COSY с переносом когерентности мы увидим **контакт H1-H3**. Условиями для этого является наличие двух промежуточных констант, то есть протона H2, который близок [в аспекте числа связей] к каждому из них. Зачем такой эксперимент нужен? Мы можем сравнить его с COSY и как бы вычесть одно из другого в уме, и посмотреть, какие контакты - через один, а какие напрямую. Например, если у нас хим. сдвиги второго и третьего совпадают, нам будет сложно найти четвертый. А имея COSY-RCT, мы сможем проследить в нем четвертый от второго (от первого третий, и т.д.) и сопоставить друг с другом. Будет более понятно, когда на следующем слайде я покажу пример.

То же самое RCT2. Это двухступенчатый (хотя по сути он *двукратный*) перенос когерентности. Это то же самое, только через двух соседей. То есть если есть спиновые системы, в которых есть последовательные взаимодействия между протонами, то COSY RCT2 покажет взаимодействие, например, H1 с H4 или H2 с H5. К сожалению, подавить RCT-пики в RCT2 не всегда удается. Равно как и подавить COSY-пики в эксперименте RCT. То есть эксперименты с переносом когерентности добавляют кросс-пики более дальних контактов в придачу к ближним контактам. Поэтому проинтерпретировать такой эксперимент, не имея COSY, вряд ли получится. Зато если у вас есть COSY, ближние контакты вы уже знаете из него и можете их исключить, и те, которые остались - это будут дальние контакты.

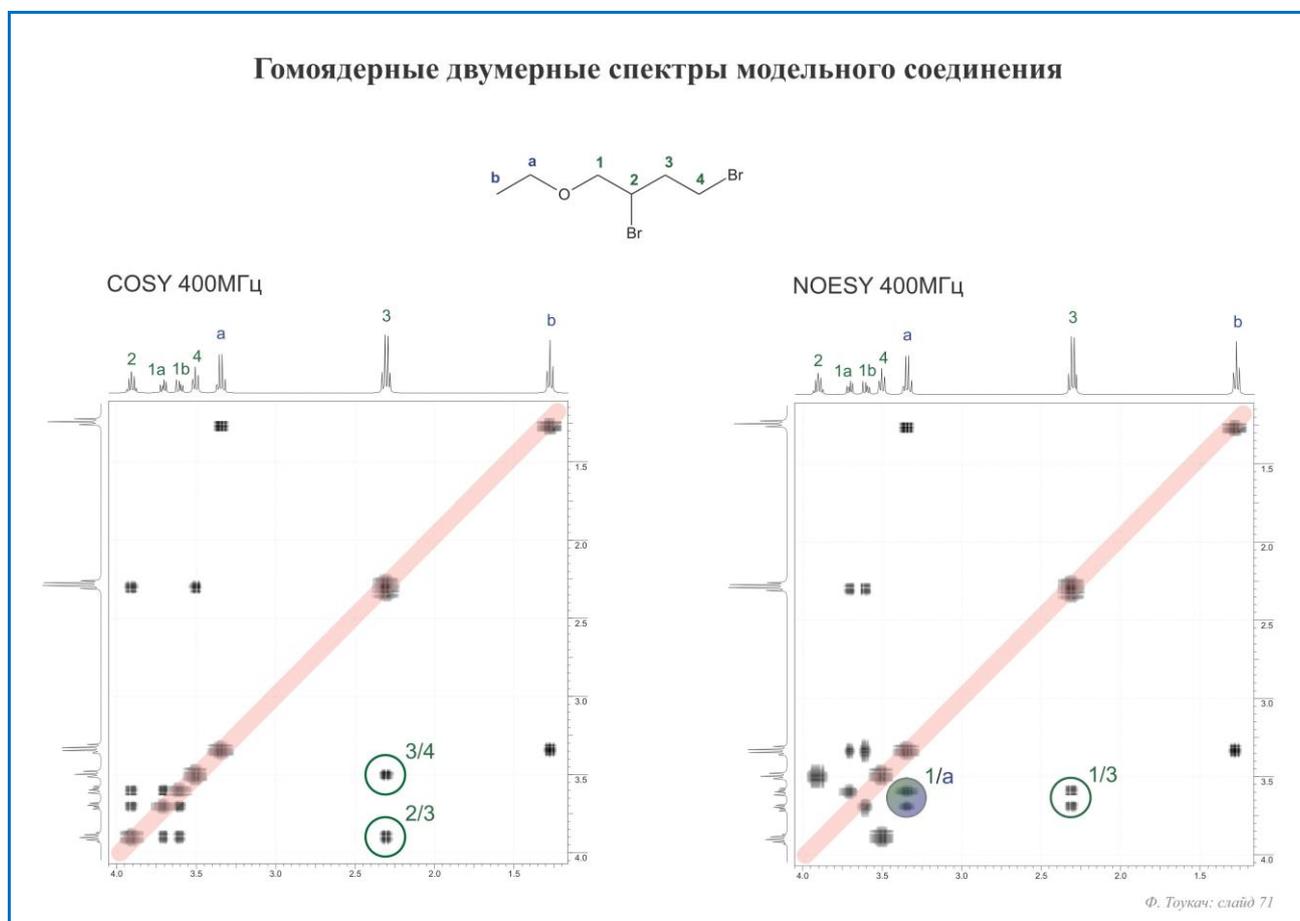
Следующий вариант - DQF, это COSY без диагональной линии. Там за счет фазы при обработке делается так, что в этом эксперименте нет диагонали. Это, как и COSY-45, помогает отнесению близкорасположенных сигналов, поскольку диагональные кросс-пики не пересекаются с недиагональными и не мешают их отнесению. Что **эти эксперименты [RCT]**, что **эти [DQF]**, примерно в 2-4 раза менее чувствительны, чем классический COSY.

Как вы уже знаете, если из COSY «срезать» [спектр] на уровне какого-то хим. сдвига (взять проекцию), то получится одномерный вариант COSY или двойной резонанс. Здесь этот эксперимент представлен **в разностном варианте**. То есть последовательно копируется обычный протонный спектр и протонный спектр с селективным облучением какого-то одного хим. сдвига, и на каждом шаге делается вычитание. Мы видим изменение - сигналы там, где произошли изменения, а все остальное при вычитании взаимоуничтожается. Про плюсы я говорил в прошлый раз. Основной плюс – это быстро. Намного быстрее, чем COSY. Основной минус – то, что вы получаете информацию о корреляциях только одного сигнала, а в COSY - обо всех.

Ну, и наконец последняя **гомоядерная корреляция [TOCSY]**, которая может быть полезна. Это как бы дальнейшее развитие идеи RCT и RCT2 – корреляция протонов со всеми протонами в пределах спиновой системы. Если у вас есть спиновая система, например, **этот остаток [левый в дисахариде]**, в спектре TOCSY вы будете видеть кросс-пики между **всеми этими протонами [красные]**. Но только в пределах одной спиновой системы. Например, **к этому протону [черный справа]** вы не можете перейти, потому что между **этим [красным H1]** и **этим [черным]** нет константы спин-спинового взаимодействия, поэтому кросс-пиков между красными протонами и, к примеру, вот этим вы в TOCSY не увидите. Поэтому TOCSY хорош для того, чтобы разделить спектр на подспектры разных спиновых систем, например, остатков, если речь идет о биомолекуле, построенной из неких единиц.

[Применительно к] TOCSY вы также можете **вот такую аббревиатуру встретить [НОНАНА]**. TOCSY – это, собственно, спектр total correlation spectroscopy. А НОНАНА – это импульсная последовательность, которая не только в TOCSY используется, но и в других экспериментах. Любовь к «прикольным» именам экспериментов в ЯМР особенно заметна, и вот тому пример. Это всего лишь homonuclear Hartmann-Hahn, то есть сокращение от фамилий авторов этой последовательности.

Точно так же, как и другие двумерные эксперименты, TOCSY существует в одномерном варианте, то есть можно поставить его, «зацепившись» за какой-то один сигнал, и посмотреть, какие еще сигналы в протонном спектре относятся к той же самой спиновой системе. Это будет одномерный TOCSY, он так и называется - 1D TOCSY.

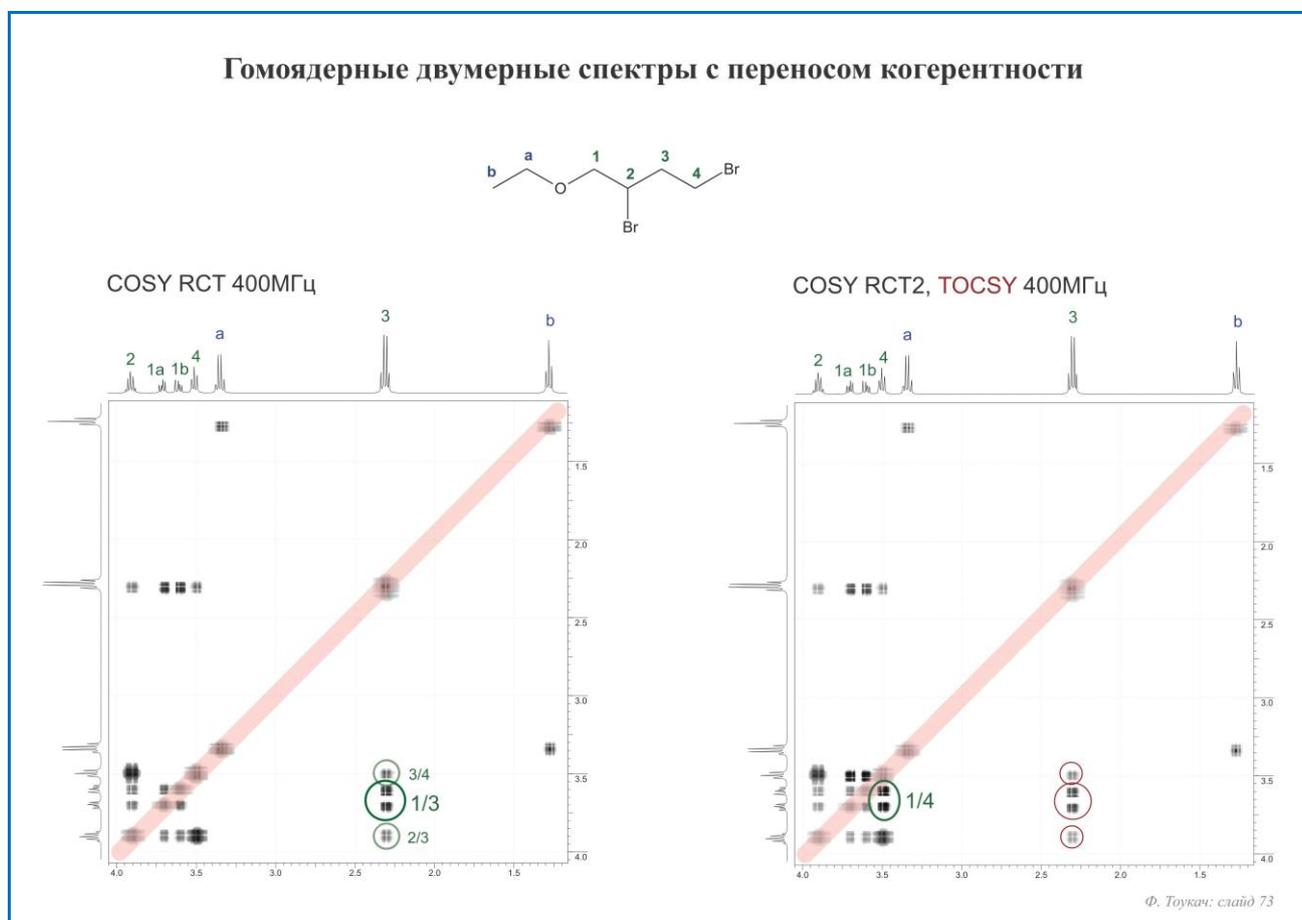


#71 Теперь примеры этих спектров. Здесь я взял молекулу попроще, чтобы вы объяснить могли каждый кросс-пик. И спектр показал смоделированный (не реальный), в котором нет пересечений [сигналов]. Так, сначала смотрим на молекулу. Две спиновые системы: **зеленая** и **синяя**. Зеленая состоит из четырех групп атомов, а синяя из двух. Также следует отметить, что то ли вращение из-за

кислорода и брома затруднено, то ли [наблюдаются] какие-то энантиотопные эффекты, но **первый [зеленый-1]** «разошелся» на два отдельных сигнала. То есть протоны **1a** и **1b**, которые «щепятся» друг на друга, не эквивалентны и имеют разные химические сдвиги. **2** – это единственный протон. Два протона под номером **3** эквивалентны, два протона под номером **4** эквивалентны. Сигналы здесь все подписаны вместе с отнесением. Смотрим на COSY. Розовым обозначена диагональная линия.

Ну, вот наиболее классический пример. Два протона **3** (вот они, **квартет**) имеют корреляции с двумя другими сигналами, а именно с **4** и с **2**¹³³. Но отсюда мы не можем сказать, кто из них **4**, а кто **2**. Для того, чтобы ответить на этот вопрос, надо посмотреть на форму линии. Во-первых, **4**... так, четвертый у нас – триплет, у него два соседа (**3**). А третий – **квартет**. У него один второй, два четвертых, с одинаковыми константами, поэтому они для него кажутся одинаковыми соседями, и мы видим **квартет**. То есть по форме линии можем различить.

А можно было и иначе сделать. К примеру, если мы знаем, что **это [3.6 и 3.7] - первые** по интегралу (по одному протону), и вот между ними **кросс-пик** – ярко выраженная геминальная константа. Зная, что это первый, можем посмотреть, с кем еще у него кросс-пики – **вот они оба [3.6/3.9 и 3.7/3.9]** с каким-то одним. Вот он, **этот один [3.9]**, значит, это **2**. Раз это второй, значит **это [2.3/3.5] - четвертый**, поскольку у **3**, кроме как с **2** и **4**, других кросс-пиков быть не может. Итак, это я вам напомнил те знания об эксперименте COSY, которые вы получили в прошлый раз. К NOESY мы еще вернемся, потом обратно пролистаем.



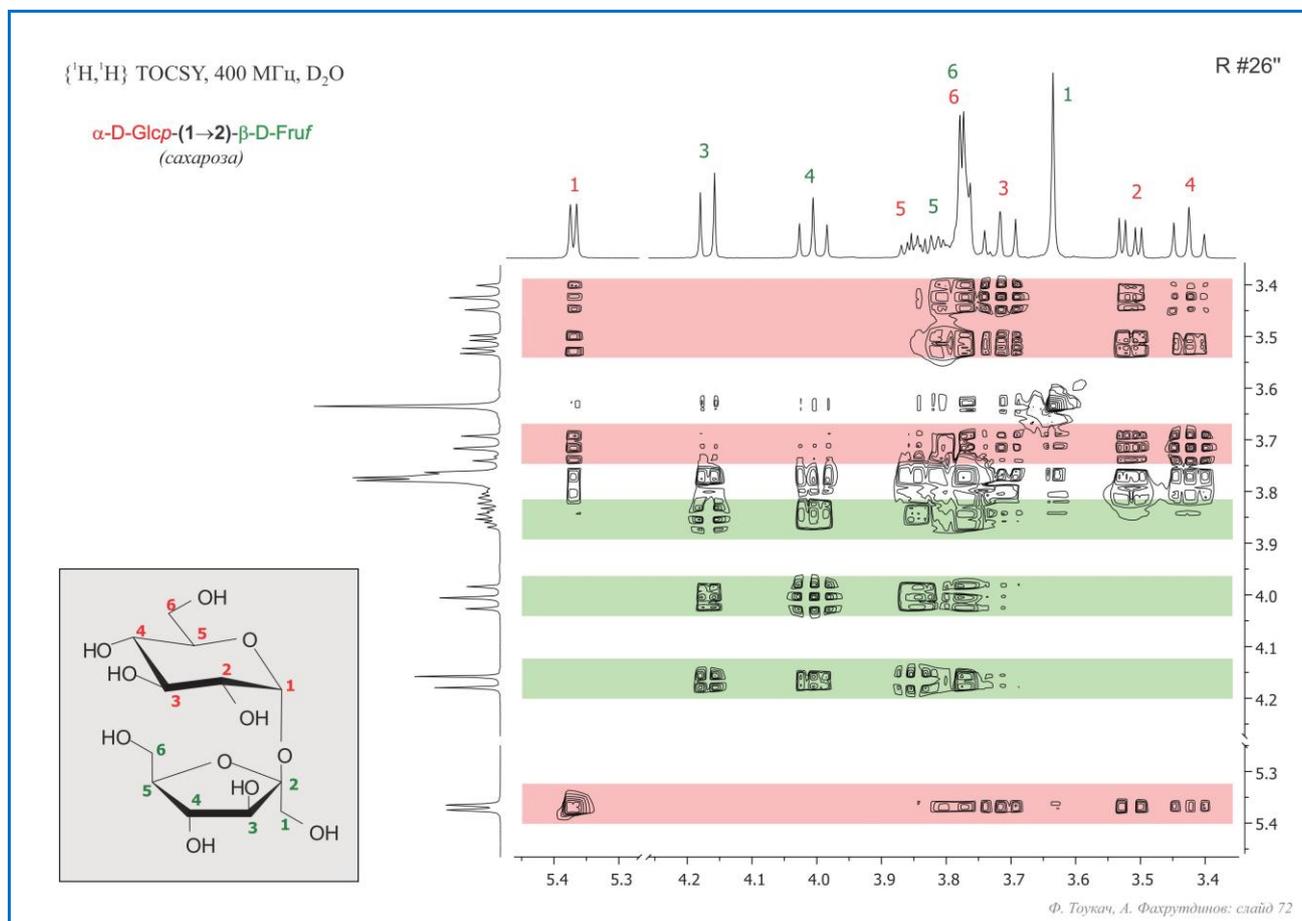
#73 Теперь для этой же молекулы **COSY RCT**, то есть COSY с одноступенчатым переносом когерентности. Здесь у нас к **этим двум сигналам 3/4 и 2/3**, которые были в COSY (эти сигналы

¹³³ В лекции протон **2** ошибочно назван третьим. Дальнейшие рассуждения про форму линии **3** верны, но нерелевантны, так как значение для поставленной задачи имеет **2**, а не **3**.

меньше) добавился ярко выраженный сигнал между **1** и **3** [двойной 3.6-3.7/2.3], которого в COSY не было, он здесь обведен. Ну и какие-то другие, наверное, добавились. Например, между **2** и **4**, вот этот [3.5/3.9]. Его тоже в COSY не было, потому что слишком много связей между ними (четыре алифатических связи, КССВ нет). Зато в COSY RCT мы этот сигнал видим. Ну, и я вам один [двойной сигнал 1/3] обвел для того, чтобы показать разницу между COSY и COSY RCT. Если мы вычтем COSY из COSY RCT... я говорю “вычтем” условно. Поскольку если в строго математическом смысле вычитать, то там и сигналы будут немного сдвинуты, и нормировать их по объему под кросс-пиками будет очень сложно, поскольку какие-то могут больше, какие-то могут меньше оказаться, и при вычитании мы там, где должны получить базовую плоскость, вместо нее получим бугры. Поэтому “вычесть” я говорю умозрительно - посмотреть на один, посмотреть на другой и прикинуть, какие сигналы есть и в том и в другом, и их перечеркнуть. Практически все сигналы исчезнут, поскольку они есть и в COSY и в COSY RCT, а останется вот эта пара [1/3] и вот эта [2/4]. Таким образом, сравнив COSY и COSY RCT, мы сможем получить контакты через четыре связи.

А это COSY RCT2 [правый спектр]. То же самое, только уже не через четыре, а уже через пять связей. То есть перенос не через одну, а через две КССВ. Здесь, по сравнению с COSY RCT, добавляется еще один кросс-пик, состоящий из двух частей. Это корреляция четвертого с двумя первыми, вот она [1/4]. Если из этого спектра вычесть COSY RCT, то останется единственная корреляция через пять связей. Наверное, [эксперимент] RCT3 тоже существует, но уже он редко бывает нужен в реальных исследованиях.

Сейчас популярность этих экспериментов несколько уменьшилась, поскольку их вытесняет TOCSY. Но для TOCSY нужен и прибор помощнее, и, если сигналов много, иногда в TOCSY [бывает] такая «мешанина» кросс-пиков, что сложно разобраться. Тогда COSY RCT и RCT2 могут помочь. Красным написаны и обведены сигналы для **3**, которые будут в TOCSY. То есть **3** в TOCSY будет иметь корреляции с **1**, **2** и **4**, но только с «зелеными». Поскольку это две разных спиновых системы, и от одной [«зеленой»] к другой [«синей»] нельзя перейти, двигая по константам спин-спинового взаимодействия, то и в TOCSY корреляции между «синими» и «зелеными» не будет. Но зато в пределах «зеленых» будет корреляция всех со всеми, и в пределах «синих» тоже будет корреляция всех со всеми. Но их [«синих»] здесь только два, поэтому [их подспектр -] то же самое, что COSY.



#72 Вот наш любимый пример – сахароза. Так выглядит ее TOCSY спектр. Чем он хорош? На основании COSY, как мы уже делали, мы можем сделать **такое [подписи над 1D спектром]** отнесение, но если бы остатков было больше, из-за пересечения [сигналов] это было бы сложно сделать, поэтому иногда полезно хотя бы покрасить [сигналы] в нужные цвета, даже если мы не можем правильно расставить цифры. Для того, чтобы это сделать, как раз можно использовать спектр TOCSY. Допустим, мы знаем, что **вот этот [5.4] - красный...** или мы даже этого не знаем, а просто берем произвольный сигнал и обозначаем его каким-то цветом. А потом находим другие сигналы того же цвета (принадлежащие той же спиновой системе). **Вот «единичка» [красный-1, 5.4], вот она здесь [на другой оси].** В спектре TOCSY у нее будут кросс-пики со всеми красными протонами. То есть **здесь [3.3-3.9, нижний розовый прямоугольник] [находятся сигналы] 5, 3, 2 и 4, и даже до 6 дошло.** У других сигналов красного цвета на тех же хим. сдвигах мы видим **схожие паттерны.** Например, видно, что **эта линия [3.7] похожа на эту линию [5.4].** (...) Здесь два паттерна: красный и зеленый (наверное, вы тоже это) видите. Мы можем понять, что, если **этот [5.4] - красный,** тогда **этот [3.7], и этот [3.5], и этот [3.4] - тоже красные.** Таким образом, мы продвинулись в отнесении, «разобрав» сигналы по спиновым системам.

В случае сахарозы можно было, наверное, и без этого обойтись, потому что одного только COSY достаточно. Но представьте, что у вас не два остатка, а восемь, и тогда уже в COSY будет «адская мешанина» сигналов, и от первых вы сможете дойти в лучшем случае до третьих [H3], а с четвертыми и пятыми будут сложности. Но тут вам поможет TOCSY: сначала вы красите [сигналы] в правильный цвет, картина упрощается, и уже [остается] меньше вариантов выбора, какие цифры куда поставить.

Эксперимент INADEQUATE

^{13}C : $\pi/2_x$ — $1/4J_{CC}$ — π_x — $1/4J_{CC}$ — $\pi/2_x$ — t_1 — $\pi/2_x$ — FID $_{zx}$

^1H : decoupling

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

Ф. Тоукач: слайд 74

#74 Наконец завершает гомоядерные корреляции стоящий особняком эксперимент INADEQUATE. Не помню точно, как расшифровывается, но это что-то типа incredible natural abundance decoupled... что-то такое дальше¹³⁴. В общем, это «невероятная возможность» получить корреляцию по углероду на естественном содержании, то есть на небогащенном образце. Есть протон-протонный COSY, и конечно, хотелось бы получить то же самое, только в углерод-углеродном варианте - за счет анализа¹³⁵ прямых констант углерод-углерод. Но, имея в виду природное содержание 1% и гиромангнитное отношение в четыре раза меньше, чем у протонов, [сложно ожидать адекватной чувствительности от прямой углерод-углеродной корреляции]... Когда нам нужно поставить двумерный эксперимент, [для сравнения] фактически разницу в чувствительности нужно возводить в квадрат. Поэтому получается примерно в миллион раз менее чувствительный эксперимент [по наблюдению прямой углерод-углеродной корреляции], чем протон-протонный COSY. Углерод-углеродный COSY по этой причине поставить нельзя, не хватает чувствительности.

Но выход был найден в виде вот этого эксперимента. Сейчас не будем разбирать, почему он таким получается. Если вам интересно, вы можете, пользуясь [этой информацией об импульсной последовательности](#), самостоятельно прикинуть, что происходит с намагниченностью. А я вам покажу только результат. Здесь по горизонтальной оси - углеродные химические сдвиги, а по вертикальной оси - сумма коррелирующих частот. Что мы видим в спектре? Если есть взаимодействие между [красным](#) и [синим](#) сигналами, то есть [эти углероды \[A и B\]](#) находятся рядом¹³⁶, мы увидим [два кросс-пики](#), находящиеся на равных расстояниях от диагонали [справа и слева].

¹³⁴ Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment

¹³⁵ все-таки не анализа, а детектирования.

¹³⁶ ...и связаны ковалентной связью

Вот красный сигнал. Наличие только одного кросс-пика на этой линии говорит о том, что рядом с этим углеродом (красным [A]), находится только один другой углерод, и его хим. сдвиг - вот этот [синий сигнал]. [Для его нахождения] нужно взять этот сигнал [левый кросс-пик], перейти на другую сторону диагонали, отложив то же самое расстояние, и подняться вверх. Из этой пары кросс-пиков, таким образом, следует, что этот [красный] и этот [синий] сигналы принадлежат углеродам, находящимся рядом.

Аналогично, вот этот сигнал [синий, в рамке], у него четыре... на линии его хим. сдвига находится четыре половинки кросс-пиков. Это значит, что он связан с четырьмя другими углеродами. То есть [искомая структура -] вот такой молекулярный фрагмент [с четвертичным атомом B].

Для сравнения я привел здесь другие топологии [левая часть слайда]: А, В, С, D – это углеродные атомы. В спектре INADEQUATE у них будут такие корреляционные картинки. Пример: у этого В [средний рисунок] - три связанных с ним углерода, значит, здесь [в спектре] мы наблюдаем три половинки кросс-пиков, а перейдя на другую сторону диагонали, мы можем найти другие половинки, подняться от них вверх и увидеть другие химические сдвиги [связанных с В атомов углерода], то есть напрямую проанализировать топологию углеродного скелета. Этот эксперимент очень информативен, но, к сожалению, низкочувствителен. Поэтому... он не используется повсеместно. Что нужно [для того, чтобы этот эксперимент получился]? Нужно, чтобы у вас при средних молекулярных весах [в образце] было больше ста миллиграмм вещества. Во-первых, вещества должно быть >100 мг, а во-вторых в объеме ампулы эти 100 мг должны раствориться. То есть [требуется] хорошая растворимость и подбор растворителя, или обогащенный образец. Обогащенный образец не всегда просто сделать; в химии это, как правило, сложно, если только он не равномерно обогащен. В биологии это иногда бывает проще: если что-то получается путем биосинтеза, можно вырастить организм на меченой среде, [и получить] что-то обогащенное [в нужном месте]. Так или иначе для этого эксперимента, если у вас от 1-5 мг или 10 мг (обычные «классические» количества), нужен образец со степенью обогащения >10% по тому ядру, по которому вы хотите снять INADEQUATE. Но такой эксперимент существует, как ни странно, даже в протон-протонном варианте. Казалось бы, зачем он нужен, если есть COSY? А нужен затем, что он позволяет выявить корреляции, находящиеся очень близко к диагонали. То есть имеет те же самые преимущества, что и COSY-45¹³⁷, только в данном случае они еще более выражены из-за другой структуры недиагональных кросс-пиков.

¹³⁷ в еще большей степени COSY DQF, где диагональные сигналы отсутствуют, а не ослаблены, как в COSY-45.

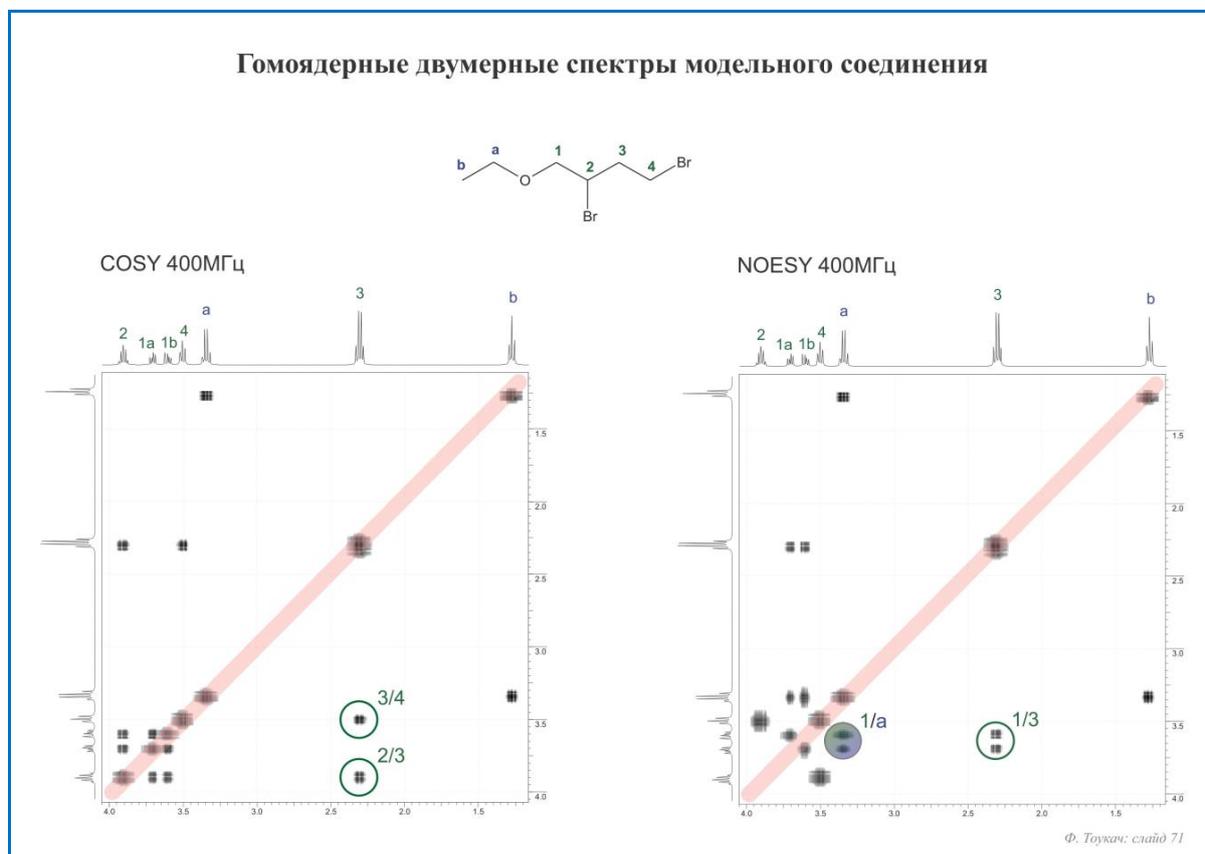
Прямые корреляции через пространство

1D
2D

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

Ф. Тоукач: слайд 75

#75 Следующая группа корреляций – это корреляции через пространство. До этого у нас были спиновые корреляции, передающиеся по химическим связям. В этой группе экспериментов приведены корреляционные эксперименты, выявляющие ядерные эффекты Оверхаузера - то, как ядра «видят» друг друга непосредственно по прямой через пространство. Самый распространенный – это спектр NOESY. То есть прямая пространственная корреляция ядерного эффекта Оверхаузера по всему диапазону химических сдвигов.



#71 Сейчас вернемся немного назад. Для этого же соединения [, для которого был спектр COSY и др.] - спектр NOESY. Сравнивая его с COSY, что мы можем видеть? Во-первых, отсутствие спиновых корреляций, во-вторых, наличие пространственных корреляций. Например, какие-то из протонов **b** близки в пространстве к каким-то из протонов **a**, поэтому между [сигналами] **a** и **b** будет кросс-пик, вот он [3.3/1.3], вот его половина с другой стороны диагонали. В этой [правой] части, в которой мы сравнивали, например, COSY и COSY RCT, мы, как и в случае COSY RCT, видим кросс-пик между двумя первыми и третьим зеленым [двойной 3.6-3.7/2.3]. Но совсем не по той причине, по которой мы его видим в COSY RCT. Это связано с тем, что даже [в конформации, в которой] здесь молекула нарисована, легко видеть, что вверх «торчат» два протона **1** – один на нас, то есть один в вашу сторону, один за доску – и для **3** то же самое, [в результате] хотя бы один из **1** сближен с хотя бы одним из **3** в этой наиболее логичной конформации. Кроме этого, есть вращение вокруг связей, и в какие-то моменты они [**1** и **3**] оказываются сближенными, когда смотрят в одну сторону. Поэтому между ними возникает ядерный эффект Оверхаузера. И мы видим кросс-пики между первыми и третьими, вот они. (...) а также, между **2** и **4**. Между одним [единственным] вторым, который смотрит вниз, но то ли на нас, то ли от нас, и, видимо, одним из [двух] **4**.

Самое интересное здесь - то, что в отличие от COSY эти корреляции не ограничены принадлежностью протонов к одной и той же спиновой системе. Что подтверждается **этим раскрашенным сине-зеленым градиентом, кросс-пиком [3.6/3.3] между зеленым-1 и синим-а**. (...) Оба зеленых-1 дают корреляцию с протонами **a**. Это позволяет связать спиновые системы друг с другом. А что это значит? Это значит, что если у нас молекула состоит из большого количества остатков, например, это пептид или полисахарид или что-то подобное, то мы с помощью NOESY можем решить задачу о последовательности остатков в этой цепочке, то есть сделать секвенирование.

Если в случае с белками секвенирование проще сделать другими методами, то в случае с сахарами секвенаторов не существует¹³⁸, и секвенирование делается одним из двух способов, один из которых - это анализ ядерных эффектов Оверхаузера в спектрах ROESY. Если сопоставить трудоемкость этого процесса с классическим химическим способом определения последовательности путем частичной дегградации и анализа фрагментов, мы увидим, что подход

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

Ф. Тоукач: слайд 75

через ядерные эффекты Оверхаузера на два, если не на три порядка проще и быстрее (определение последовательности всегда было «камнем преткновения» для химических методов).

#75 Возвращаемся к корреляциям через пространство. Эксперимент NOESY имеет, естественно, и свою одномерную «инкарнацию». Это **NOE в разностном варианте [NOE dif]**. У нас был пример, где мы определяли, как прошло бромирование (или окисление, не помню) с помощью одномерного

разностного спектра NOE, где те места, которые пространственно-сближены с облучаемым атомом, как-то «реагировали». Эти места в спектре имеют что-то похожее на сигналы. А все остальные места при вычитании взаимоуничтожаются, и мы имеем базовую линию. Эксперимент NOEdiff, во-первых, точнее, чем NOESY¹³⁹, во-вторых, не то чтобы более чувствителен, скорее он получается быстрее, поскольку нам не нужно делать развертку по второму измерению. **Этот эксперимент [NOEdiff]** - намного более быстрый, чем этот [NOESY], и в нем не надо подбирать время смешивания. Поэтому, если нужно выяснить один пространственный контакт (выявить, что [находится] близко к нему в молекуле), выгоднее применять одномерный NOE. А если нужно, к примеру, определить последовательность остатков в молекуле, в которой этих остатков четыре или больше, тогда имеет смысл NOESY или ROESY. ROESY для полимеров и высокомолекулярных соединений, NOESY для олигомеров и соединений с молекулярной массой меньше 600. Результаты одни и те же.

Что касается интегралов в NOESY, было бы заманчиво, к примеру, в спектре NOESY измерить объемы под кросс-пиками, получить тем самым эти эффекты [Оверхаузера] в количественном выражении и перевести их по формуле в межатомные расстояния. Но для этого нужен специальный прецизионный эксперимент, поскольку размеры кросс-пиков в этих экспериментах довольно сильно «плавают», сами кросс-пики непонятно, где заканчиваются (а где начинается базовая плоскость), поскольку они [имеют] размытые формы, из которых невозможно понять форму линии, можно понять только наличие или отсутствие сигнала. И наконец, есть COSY-или TOCSY-артефакты, которые могут накладываться на эти сигналы, изменяя их интенсивность. Поэтому количественный NOE в основном делается в одномерном варианте, поскольку это намного

¹³⁸ Впрочем, аминокислотные секвенаторы начала XXI века работали с низкой точностью и только на относительно коротких пептидах. Современная ситуация автору неизвестна.

¹³⁹ В аспекте измерения химических сдвигов, КССВ и формы сигналов.

проще экспериментально. А двумерные эксперименты по наблюдению ядерного эффекта Оверхаузера дают нам только качественную картину¹⁴⁰.

И наконец, даже имея количественный NOE, его еще нужно перевести в конформацию, потому что межатомное расстояние, которое мы из него получим... просто попробуйте понять, а что это за межатомное расстояние, в какой конформации молекулы? Если в молекуле возможно вращение, в каждой конформации будет свое межатомное расстояние. Конформации как-то соотносятся по энергии, и в реальном образце присутствуют все. А если мы наблюдаем количественный NOE и из него получаем межатомное расстояние, это одно число. Как его сопоставить с распределением конформаций? Не получается напрямую взять среднее расстояние, а потом межатомные расстояния в разных конформациях усреднить по Больцману и сравнить с этим средним расстоянием. Получаются некорректные результаты. А корректные результаты получатся, если для каждой конформации отдельно посчитать межатомное расстояние, из него посчитать NOE, а потом эти NOE усреднить по Больцману¹⁴¹, и уже это значение сравнить с экспериментально наблюдаемым NOE. Тогда, если оно совпадет, значит, наше предположение о распределении конформаций было верным. А если не совпадет, значит, неверным.

Теперь дальше. Вот первые три эксперимента – это гомоядерные NOE, а четвертый – это NOE в [одномерном] гетероядерном варианте. Естественно, этот эффект не ограничен только протон-протонным взаимодействием. Поэтому иногда бывает полезно наблюдать гетероядерный NOE. Здесь он показан зеленой стрелкой, в двумерном варианте NOESY (heteronuclear NOESY). Например, здесь - между азотом и водородом. Такие эксперименты сложнее в постановке [чем их гомоядерные аналоги], стоят, опять же, дороже и менее чувствительны, но если без них обойтись нельзя, то, попробовать можно как в двумерном, так и в одномерном варианте.

И наконец последний близкий к этим эксперимент – это эксперимент EXSY, который показывает химический обмен. То есть, если время смешивания (задержку между вторым и третьим импульсом в NOESY), подобрать определенным образом, можно увидеть только те сигналы, атомы которых переходят друг в друга за это время [смешивания], то есть [атомы, подверженные] химическому обмену. Здесь я в качестве примера написал -ОН, воду, карбоксил и -NH₂. Это не значит, что все они со всеми обмениваются, это просто умозрительный пример, чтобы показать вам смысл эксперимента. Здесь это, скорее всего, будет не то чтобы обмен, а просто вот этот протон [карбоксильный] окажется на этом атоме [азота] и будет там «висеть» (здесь будет NH₃⁺-группа, а здесь COO⁻). Но какая-то доля обмена и здесь может быть. И вода: [обмениваются] ОН-группы и вода, присутствующая в виде примеси в растворителе, или специально добавленная.

¹⁴⁰ Особенно в ROESY, где интегральные интенсивности кросс-пиков нерепрезентативны в силу не только технологических (как в NOESY), но и физических причин.

¹⁴¹ В соответствии с заселенностями, полученными из разницы энергий конформаций по формуле Больцмана $E-E_0 = -kT \cdot \ln(n(E)/n(E_0))$.

NOE и перенос намагниченности

1D 2D

IRR

Нет NOE
(мало субстрата ~1:500)

¹H

STD

(x1000)

WaterLOGSY

(x100)

INPHARMA

Нет NOE
(мало субстрата ~1:10..100)

ILOE

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

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

Ф. Тоукач: слайд 76

#76 Последний слайд, касающийся ядерного эффекта Оверхаузера. Можно скомбинировать перенос NOE и двумерные эксперименты (собственно, и одномерные тоже). Напоминаю, что если протон А имеет NOE с протоном В, а протон В имеет NOE с протоном С, то мы будем при определенных условиях наблюдать и NOE протона А с протоном С. То есть NOE передается последовательно. Точно также, как в эксперименте COSY RCT передается спин-спиновое взаимодействие. При этом при каждой такой передаче меняется знак. То есть NOE первого с третьим будет иметь отрицательный знак, первого с четвертым снова положительный и так далее, при условии, что первый-второй, второй-третий, третий-четвертый все имеют NOE между собой. Имея в виду этот факт, ЯМР-щики спроектировали несколько интересных экспериментов для исследования взаимодействия лиганда и субстрата в биологических системах. Здесь условно обозначен **субстрат** – большой «кусоч сыра» с вырезами определенной формы, а **лиганды** – это маленькие кусочки, форма которых соответствует или не соответствует формам вырезов в субстрате. Биологически это соответствует тому, что лиганд в определенном положении «дочитя»¹⁴² в определенные места субстрата.

Итак, эксперимент STD¹⁴³, первый. Вот он **красным обозначен**. Мы насыщаем субстрат [импульсами на частоте его сигналов]. NOE передается на лиганд в том случае, если лиганд сближен с субстратом, то есть лиганд сел в **это место** на субстрате, NOE передался на него, а потом лиганд отцепился от субстрата, но NOE еще какое-то время существует. И поэтому лиганд, «плавающий» в растворе тоже будет иметь этот сохраняющийся NOE, переданный с субстрата. Вот **спектр смеси лигандов [черный]**. Условно обозначены один сигнал «квадратного» лиганда и один сигнал «круглого». В этом эксперименте, если только «круглый» лиганд может взаимодействовать с

¹⁴² = происходит docking

¹⁴³ Saturation Transfer Difference

субстратом, мы будем иметь **вот такой пик** на уровне хим. сдвига **этого сигнала** [●]. А для «квадратного» [лиганда аналогичного пика] не будет. То есть, сопоставив **этот [красный] спектр с этим [черным]**, мы можем понять, какие лиганды связываются с субстратом, а какие не связываются. Это эксперимент для скрининга связывания на смеси одного субстрата со множеством лигандов. Можно добавить их сразу много, будет много сигналов **здесь [в черном спектре]**, какой [сигнал] какому [лиганду] принадлежит, как правило, известно, потому что мы знаем, что мы добавляем. А дальше облучаем субстрат и наблюдаем отклик напротив того лиганда, который может с этим субстратом соединиться. Но минус – это низкочувствительный эксперимент. **Этот сигнал [красный ●]** - примерно в тысячу раз меньше сигнала в протонном спектре, то есть [спектр] нужно долго коптить.

Поэтому есть еще один вариант. Там же биологические системы и, как правило, все это в воде находится, поэтому можно насытить сигнал воды. [Равновесный] NOE будет передаваться с сигнала воды на лиганд, причем на какие-то лиганды напрямую, а на какие-то через субстрат. Но через субстрат он сможет передаваться только в том случае, если лиганд имеет возможность связаться с субстратом. **Вот пример [диаграмма слева]**. На «квадратный» лиганд NOE передается от воды только напрямую, а на «круглый» еще и через субстрат. Поэтому меняется интенсивность, и в идеале знак меняется на противоположный. То есть спектр будет **вот такой [синий]**. И здесь уже [сигнал] не в тысячу раз меньше, а в сто раз меньше, потому что воды много, и мы наблюдаем повышение чувствительности. **Вот название этого эксперимента [WaterLOGSY]**. Кто сможет расшифровать? Может, кто-то и сможет. L – это, наверное, ligand; O – я не знаю, что такое¹⁴⁴.

Теперь, существуют и двумерные варианты типа NOESY, которые учитывают возникающие ядерные эффекты Оверхаузера при взаимодействии лигандов и субстрата. **Вот их названия. ILOE** – это, по всей видимости, Inter-Ligand NOE. Если есть два лиганда, которые могут «повиснуть» на субстрате в соседних положениях, в то время, пока они оба «задочились» на субстрат, между ними наблюдается ядерный эффект Оверхаузера. По самым обычным причинам, просто потому что они находятся в пространстве близко друг к другу, и какие-то атомы там взаимодействуют напрямую. Мы наблюдаем в течение какого-то времени эти ядерные эффекты Оверхаузера. Но в обычном NOESY мы их будем наблюдать вперемешку со всеми остальными, например, теми, которые находятся внутри субстрата. А поскольку эти лиганды не все время здесь висят, то и чувствительность будет меньше – мы за счет остальных сигналов эти [межлигандные] не увидим. Но правильно подбирая время смешивания, можно наблюдать NOE только какого-то одного типа, например, обычный NOE или интерлигандный NOE. То есть отделить эти сигналы от всех прочих, и тем самым выяснить, какие лиганды оказываются на субстрате в соседних положениях.

Другая разновидность NOE (менее чувствительная), это когда два лиганда могут зайти в одно и то же положение на субстрате, но не одновременно. Это условно обозначено вот так: два лиганда и одна выемка вот такой [полукруглой] формы, в которую и тот, и другой может зайти (но выемка всего одна). Поскольку NOE существует в течение какого-то времени даже после того, как атомы разошлись в пространстве, то получается, что, если какое-то время здесь побыл один лиганд, а какое-то время - другой, между ними тоже возникает наведенный NOE. То есть, к примеру, NOE отсюда передается на субстрат, а с субстрата на этот, и получается такой вот переданный NOE как бы между двумя лигандами несмотря на то, что одновременно они здесь не находятся и в пространстве не сближены. То есть они здесь находятся попеременно. И чтобы выделить этот тип взаимодействия, тоже нужно другое время смешивания. Эксперимент называется **INPHARMA**. Кому интересно, сами

¹⁴⁴ Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy

найдете расшифровку¹⁴⁵. Для него время смешивания меньше, чем для NOESY, а для интерлигандного [ILOE], наоборот – больше, чем для NOESY. То есть сначала, как правило, если нам нужно выявить такое взаимодействие, мы снимаем классический NOESY, подбираем правильное время смешивания, чтобы видеть внутримолекулярные протон-протонные контакты, а потом, с одной стороны, его увеличиваем, снимаем один эксперимент [ILOE], а потом уменьшаем, снимаем другой эксперимент [INPHARMA].

Гетероядерные корреляции 1D 2D

HETCOR	прямая углерод-протонная спиновая корреляция - отнесение углеродного спектра
{¹H, ¹³C} HSQC *	прямая протон-углеродная спиновая корреляция - отнесение углеродного спектра
{¹H, ³¹P} HSQC	протон-фосфорная спиновая корреляция - локализация фосфатных групп
{¹H, ¹³C} HMBC	дальняя протон-углеродная корреляция - выяснение последовательности остатков
{¹H, X} 1D HMBC	HMBC для одного сигнала - выявление протонов в окружении гетероядра
HSQC-Relay	углерод-углеродная корреляция через vicinalные 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 ¹³C-импульса

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

Ф. Тоукач: слайд 77

#77 За предыдущий час я дал вам обзор по экспериментам (в первую очередь корреляционным) в гомоядерном варианте: как в спиновом, так и в пространственном. Однако существуют крайне важные эксперименты и в гетероядерном варианте. Это те же самые корреляции химических сдвигов, но по осям в данном случае уже не один и тот же спектр, спектры по разным ядрам. Чаще всего по одной оси протоны, а по другой оси углерод или какое-то другое ядро. Самый простой идеологически – это гетероядерный вариант COSY [**HETCOR**], у которого единственный плюс – хорошее разрешение по оси ¹³C, а в основном одни минусы, основной из которых – это низкая чувствительность.

В связи с этим в более позднее время возникли эксперименты **HSQC**, **heteronuclear single quantum coherence**. Тут даже не принципиально, как именно это расшифровывается, поскольку эта расшифровка в отличие от остальных говорит не о получаемом спектре, а о принципе, на основании которого он получается. И этот эксперимент сейчас – это основной эксперимент по гетероядерной корреляции. Для него нужен так называемый «инверсный» датчик. Это специальный датчик, который позволяет перенести намагниченность (большую намагниченность) с протона на другое ядро для увеличения чувствительности по нему, а затем перенести ее обратно (в инверсном

¹⁴⁵ Internuclear NOEs for Pharmacophore Mapping

направлении) на протоны для наблюдения. Это позволяет на полтора порядка (в идеале в 64 раза), улучшить чувствительность.

Сейчас на современных приборах (от «четырехсотки» и выше), как правило, есть инверсные датчики. Датчики отличаются в первую очередь – инверсный-неинверсный, во вторую очередь – селективный или широкополосный, и в третью очередь – градиентный или неградиентный. Соответственно, самый дорогой – это широкополосный, инверсный, градиентный. Он может почти все, достаточно укомплектовать прибор этим единственным датчиком, и с помощью него решать большинство задач. Поскольку сейчас в большинстве приборов такие датчики есть, можно делать эксперименты HSQC, то есть классическую гетероядерную корреляцию по прямым протон-углеродным константам. Вот показано [взаимодействие на примере одной пары атомов \[C1-H1\]](#), которую выявляет этот спектр, протон-углеродный HSQC. В первую очередь он нужен для отнесения углеродного спектра при имеющемся отнесении протонного спектра (для сопоставления углеродов в молекуле сигналам в углеродном спектре).

Также вы можете услышать предложение снять [вот такой спектр \[HMQC\]](#) – это heteronuclear multiple-quantum coherence. По результату – это то же самое (HMQC и HSQC), но вот этот с буквой М - попроще, он не фазочувствительный, его проще снять, но в нем хуже разрешение. Если прибор старый, или прибор в плохом состоянии, или оператор неквалифицированный, то может HMQC будет даже лучше. В первую очередь потому, что для эксперимента HMQC не важно точное установление длины 90-градусного импульса по ^{13}C . Для HSQC при настройке параметров, оператор должен весьма точно (с точностью до 0.1 мс), указать длину 90-градусного ^{13}C импульса, иначе получается резкое падение чувствительности. А HMQC толерантен к этой ошибке, поэтому если 90-градусный импульс измерить проблематично, то лучше делать HMQC. А проблематично может быть в случае, если прибор используется для того, чтобы обучать студентов. Они его, к примеру, «раздолбали» и загадили за время обучения, и 90-градусный импульс «плавает» (то один, то другой) и за время эксперимента может «уплыть». В эксперименте HSQC, это приведет к сильному снижению интенсивности сигналов, а в HMQC – нет. Но зато в HSQC возможно редактирование. Редактированием называется изменение фазы сигнала в зависимости от количества присоединенных протонов. То есть кросс-пики CH_2 -групп и кросс-пики CH -групп в HSQC, снятом в таком режиме, будут смотреть в разные стороны относительно базовой плоскости – вверх и вниз. А в HMQC все [сигналы] всегда вверх. Но, по сути, это те же самые протон-углеродные корреляции.

Теперь дальше. Эксперимент HSQC не ограничен именно этой парой ядер. То есть, в принципе, можно [снять такой спектр] на любых [ядрах]. Первое – это, как правило, протоны, чтобы была хорошая чувствительность, а второй может быть, например, ^{31}P . Для того, чтобы понять, на каких атомах (или хотя бы на каких остатках) «висят» фосфаты, нужно снять [HSQC в варианте \$^1\text{H}\$ - \$^{31}\text{P}\$](#) . В органике после углерода именно фосфор имеет значение [для ЯМР], потому что у фосфора высокое содержание магнитно-активного изотопа. Это достаточно высокочувствительный эксперимент, на который не нужно тратить много времени. Еще один вариант – это ^1H - ^{15}N HSQC. Здесь все намного хуже в смысле чувствительности, но для некоторых типов молекул это может быть незаменимо. И несмотря на то, что чувствительность этого эксперимента мала, она все же больше, чем чувствительность [эксперимента по накоплению] одномерного азотного спектра. Поэтому если нам не нужны четвертичные азоты, а интересны только азоты, у которых есть свои протоны, то вместо одномерного азотного спектра лучше снимать HN HSQC по ^{15}N , потому что быстрее будет. Но там не будет... То есть не четвертичных, естественно, а *третичных* азотов. Там не будет азотов, у которых нет протонов, потому что для этого эксперимента нужна протон-азотная

КССВ. Этот эксперимент настроен на величины констант, характерные для одной связи (150-200-250 Гц).

Но существует [эксперимент,] настроенный и на маленькие константы от 0 до 20 Гц. Это по сути то же самое, но [в нем] другие задержки [между импульсами]. Называется он **НМВС**. Несмотря на похожую аббревиатуру, она, по сути, совершенно иная. Это heteronuclear multiple bond correlation - гетероядерная корреляция через много связей. Много связей – КССВ меньше. И вот пример. Например, **этот протон с этим углеродом [соединены синей стрелкой на правой диаграмме]**. Это раз.. два.. три связи. Константа там - единицы герц, может быть, иногда больше десяти, но так или иначе она намного меньше, чем прямая константа через одну связь. Эксперимент НМВС показывает именно такие корреляции. Естественно, он покажет корреляции и в пределах одного остатка. Например, первый протон со вторым или третьим углеродом, поэтому корреляций в этом эксперименте очень много, из них нужно еще вычленить нужные. Но среди нужных есть очень полезные, а именно те, которые обозначены здесь **синими стрелками**. Это корреляции между атомами в разных спиновых системах. То есть по протонам эти спиновые системы разные, потому что между **этим [черным Н]** и **этим [красным Н]** константы нет, но углерод, при котором находится протон из соседней спиновой системы, имеет константу с протоном из другой [первой] спиновой системы. И именно такие взаимодействия выявляются экспериментом НМВС. Это второй способ выяснить последовательность соединения спиновых систем. То есть применительно к молекулам, построенным из остатков, например, к белкам или полисахаридам, сделать секвенирование.

Этот эксперимент довольно низкочувствительный, в 2-8 раз менее чувствительный, чем HSQC, поэтому иногда приходится его применять в одномерном варианте. То есть для одного протона выявляем все те углероды, которые находятся на расстоянии двух или трех связей от этого протона. Как и HSQC, так и НМВС можно провести с подавлением [выявляемой] константы в спектрах и без подавления. Если мы подавляем константу спин-спинового взаимодействия, все кросс-пики представляют собой «сталагмиты», т.е. некий кружочек на «контурной карте». А если мы КССВ не подавляем, у нас для каждого взаимодействия будет пара кросс-пиков, расстояние между которыми как раз равно величине этой константы.

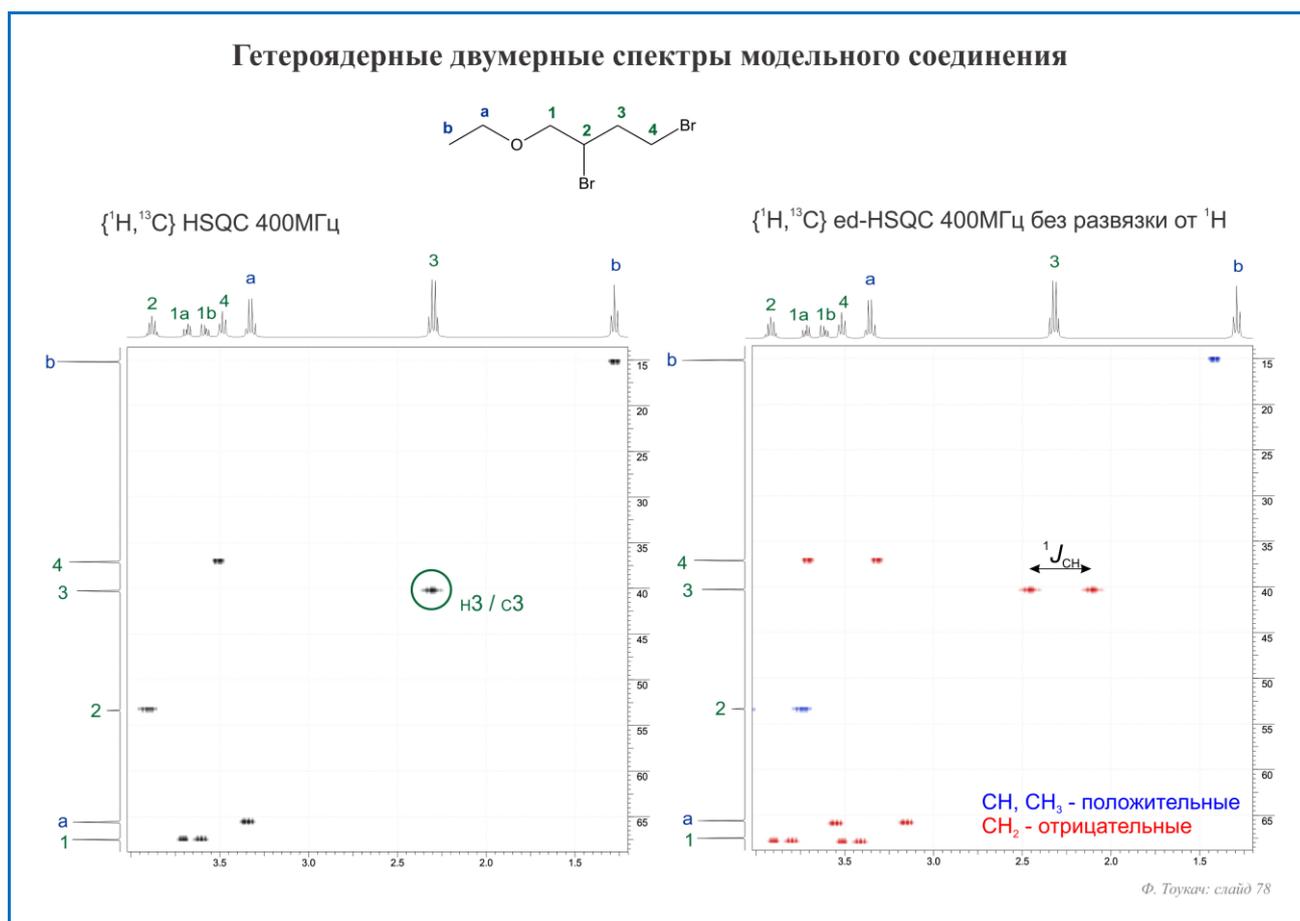
Кроме этого, эти эксперименты (особенно это касается HSQC) можно провести в редактированном варианте, чтобы кросс-пики от CH_2 и кросс-пики от CH и CH_3 смотрели в разные стороны. По сути это будет означать, что они после превращения в контурную карту будут разных цветов на спектре¹⁴⁶.

Далее, те же самые идеи переноса когерентности, которые у нас применялись для COSY можно применить и для СН-корреляции, получив тем самым **спектр HSQC-Relay**. Вот показаны **два взаимодействия, которые выявляет такой эксперимент**. Это взаимодействие протонов с соседним углеродом (не со своим, а с тем, который находится рядом). Но оно возможно только при наличии константы **между этими двумя протонами [H3 и H4 в данном примере]**. Например, если у нас есть две расположенные рядом СН-группы, мы можем, зная, где находится протон одной, найти, где находится углерод в соседней (в углеродном спектре).

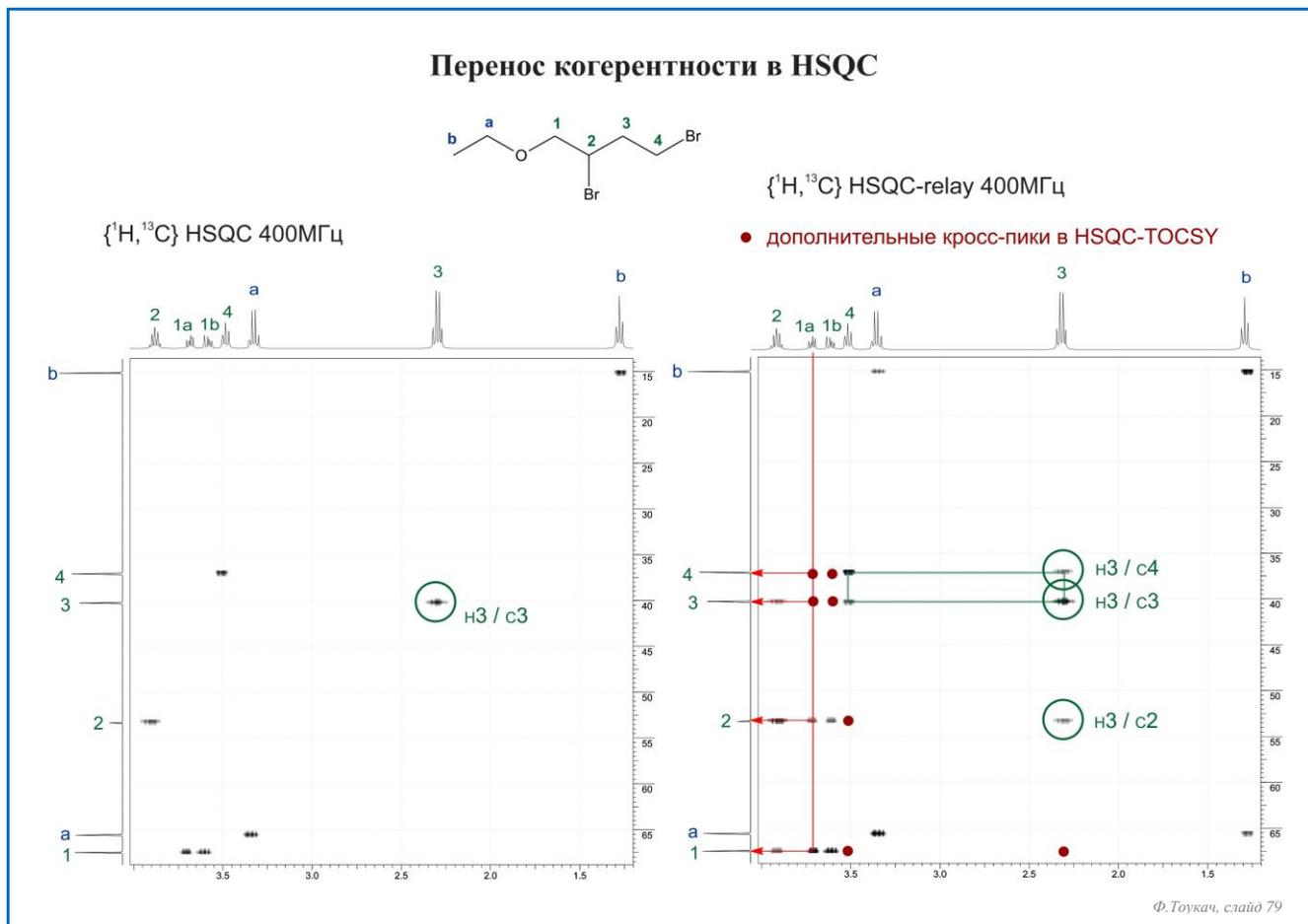
Это [был] одноступенчатый перенос, а тотальный перенос, как в случае с TOCSY, приводит нас к **спектру HSQC-TOCSY**. Здесь [на правой диаграмме] показаны красные точки – углероды, а красные буквы Н – это, соответственно, протоны. В спектре HSQC-TOCSY все они взаимодействуют друг с другом, т.е. каждый из этих углеродов имеет кросс-пики со всеми протонами в пределах той

¹⁴⁶ Положительные и отрицательные сигналы в двумерных спектрах для визуального отличия записываются разным цветом.

же протонной спиновой системы, в которой находятся его собственные протоны. И, наоборот, каждый протон имеет кросс-пики со всеми углеродами, связанными с протонами в той же спиновой системе. Сейчас будут примеры для той же самой молекулы.



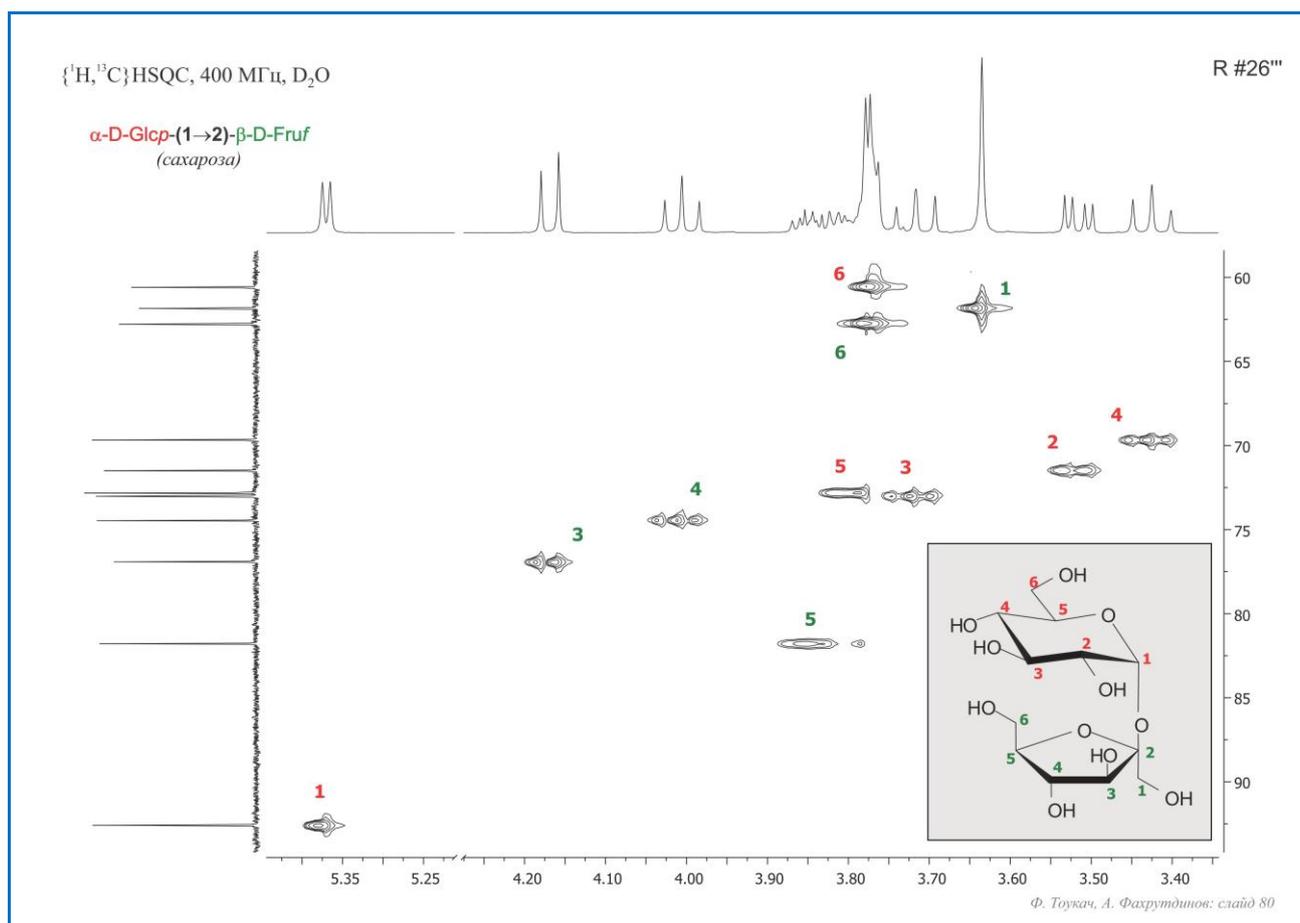
#78 HSQC я думаю, комментировать особо не надо, вы такие спектры уже видели. Если у нас есть отнесение протонного спектра, идем вниз, находим кросс-пик (здесь для примера обведен H3/C3), идем вбок, находим сигнал углерода и приписываем ему зеленую тройку. А справа находится вариант, во-первых, «ed» – это редактированный, то есть сигналы «смотрят» вверх и вниз. А, во-вторых, без развязки от протонов. То есть каждый кросс-пик представлен парой кросс-пиков, расстояние между которыми как раз равно [прямой гетероядерной] константе. Вот пример. Здесь красные [сигналы] – отрицательные, а синие – положительные (то есть синий в этом спектре смотрит на нас, а красный от нас). К примеру, вот тот же самый C3/H3 . Здесь их два, расстояние между ними – это величина прямой константы спин-спинового взаимодействия. Ее легко измерить, и прийти к тому же углероду. Везде по два [кросс-пика], но вот здесь [Hb/Cb], например - синий один, потому что второй вот тут находится (за пределами спектра), его не видно. Его химический сдвиг – это середина [линии, соединяющей кросс-пики], конечно же. Вот его левая половина оказалась внутри этого квадрата, а правая оказалась за пределами, поэтому она здесь не нарисована. То же самое и здесь [H2/C2]. На самом деле их два, а от второго [левого] только маленький кусочек виднеется. Это просто чтобы вас не смущало, что этот сигнал [двумерный] сдвинут относительно этого [одномерного], [так как это –] только половина сигнала. И сдвинут он на половину прямой константы. Цвет, то есть направление, позволяет сразу отделить метильные группы и CH -группы. То есть **b** и **2**, а все остальные – это, соответственно, CH_2 -группы.



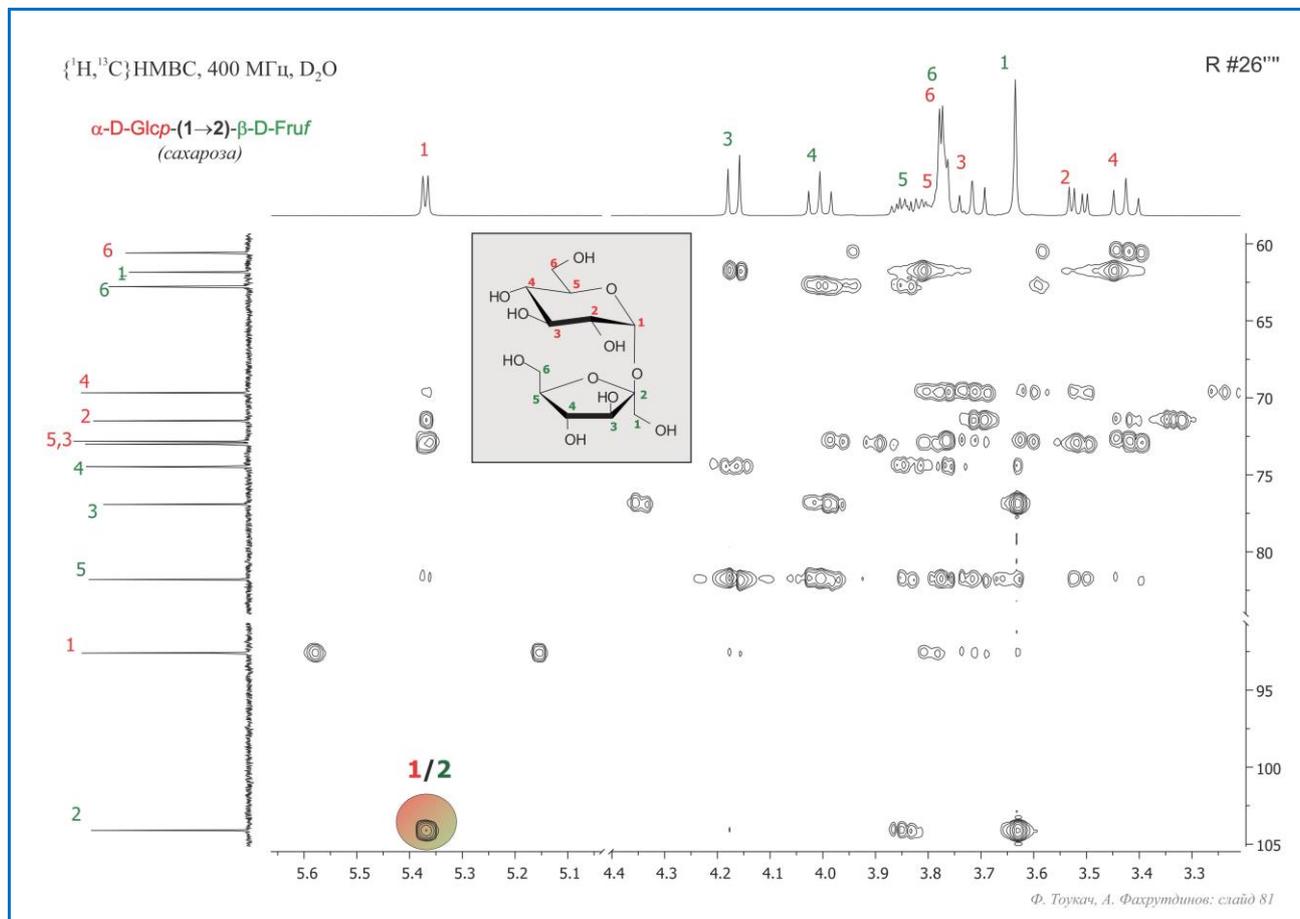
#79 Теперь перенос когерентности. Это [слева] тот же самый HSQC для сравнения, который был на предыдущем слайде. А здесь спектр HSQC-Relay, то есть [CH-корреляция] с одноступенчатым переносом когерентности. Мы здесь видим у третьего протона **кросс-пик со своим углеродом**, а также два кросс-пика **с C4** и **с C2**, то есть с соседними по отношению к нему. Где находится **свой собственный [сигнал C3]**, мы знаем из HSQC, мы можем его из рассмотрения сразу убрать, остаются еще два. Таким образом, если мы знаем, что **это - зеленый-3**, после этого мы знаем, что в углероде этот сигнал и этот сигнал – это второй и четвертый. Кто из них кто, этот эксперимент не дает ответа, но можно посмотреть на соседние сигналы, например, у первого будет со вторым взаимодействие 1-2, поэтому мы сможем понять, кто из них второй (потому что с четвертым у первого не будет). То есть, рассматривая **эти прямоугольники [зеленый прямоугольник]**, мы можем последовательно двигаться от первого углерода ко второму, к третьему и так далее и найти все сигналы углеродов в пределах спиновой системы.

Красные точки на этом спектре – это те места, где будут [находиться] дополнительные сигналы в спектре HSQC-TOCSY. В нем будут все эти сигналы, которые здесь есть на спектре, плюс еще сигналы в местах, обозначенных красными точками. Мы, к примеру, нашли **один протон в какой-то спиновой системе [1a]** – не обязательно первый, любой. Смотрим, какие у него есть кросс-пики в HSQC-TOCSY. Проводим **линии в углеродный спектр, налево [красные стрелки]**, и получаем все сигналы углеродов, относящиеся к той же спиновой системе. Это значит, что, если мы смогли покрасить в какой-то определенный цвет один сигнал в протонном спектре, мы можем понять, какой цвет имеют сигналы [этого остатка] в углеродном спектре. То есть какие сигналы в углеродном спектре имеют тот же цвет, правильнее будет сказать. Иными словами, сделав отнесение одного протона, выявить подспектр в углеродном спектре, относящийся к той же спиновой системе. А какой из этих оставшихся сигналов кто, то есть какие там числа стоят, это уже [выявляется] другими

экспериментами, то есть HSQC и HSQC-Relay. Тем не менее, и HSQC-TOCSY может быть полезен. Когда в углеродном спектре много сигналов, полезно сначала разделить их на спиновые системы и потом работать в каждой спиновой системе по отдельности, упрощая тем самым задачу.



#80 Реальный пример, опять же, сахароза. Здесь очень хороший спектр HSQC. Хорош он тем, что у него идеальная чувствительность, мы почти не видим шумов, необъяснимых «левых» сигналов, искажений формы линии (только [здесь \[3.65/62\]](#) немного). Во-вторых, он хорош тем, что он настолько хорошо разрешен, что мы видим не только наличие сигнала, но и даже его форму. Например, [здесь \[3.72/73\]](#) – триплет. Так как по протонной оси это триплет, по углеродной оси - синглет, здесь мы видим кросс-пик, состоящий из трех составляющих. Сказать, что они [представлены] в соотношении 1:2:1, здесь проблематично, но хотя бы мы видим, что их три. То есть сразу ясно, что это триплет. Впрочем, здесь и так ясно, потому что триплет отдельно стоящий [в одномерном спектре], но если бы этот триплет с чем-то пересекался, и [здесь \[~3.7\]](#) были бы еще другие сигналы, то, исходя из формы кросс-пика в HSQC, мы могли бы сказать, что этот протон [дает] триплет. Но такой хороший HSQC получается редко. Он получился для сахарозы, потому что ее - неограниченное количество, нет проблем с чувствительностью.



#81 А это ее же спектр НМВС. Напоминаю, это [корреляция] через две-три связи, [эксперимент,] настроенный на маленькие константы. Как мы видим, здесь много сигналов, например, **вот красный-1 протон** [5.4]. У него есть кросс-пики с **C2, C5 и C3**. А, может, это только с третьим, не знаю, там от первого до пятого [, пройдет ли корреляция]. Прошу прощения... (...) то же самое – [от H1 до C5] три связи через кислород. **Это** [5.4/73] - комбинированный кросс-пик с C5 и с C3, а **это** [5.4/72] – с C2. А **вот это** [5.4/82] - какой-то артефакт. Сразу видно, что **этот сигнал** [H1/C5] - намного выше, **чем этот** [5.4/82]; это, скорее всего, просто какие-то шумы, колебания базовой плоскости. Если чуть-чуть уменьшить [увеличение по оси интенсивности], этот сигнал исчезнет.

Но наиболее интересен в этом спектре **этот сигнал** [5.4/104], покрашенный красно-зеленым, именно потому, что он двухцветный. Он позволяет связать «первый красный» протон со «вторым зеленым» углеродом. А это значит, доказать, что, во-первых, эти остатки связаны друг с другом, а, во-вторых, что они связаны именно **этими местами**, а не какими-нибудь еще. То есть гидроксил, находящийся при первом положении красного, связывается со вторым положением зеленого, где тоже есть гидроксил, с отщеплением воды, и возникает связь через кислород, которая как раз имеет такие КССВ, которые выявляются экспериментом НМВС. Вывод: по возможности надо пытаться найти в НМВС кросс-пики, связывающие спиновые системы между собой. Именно этим ценен данный эксперимент. Здесь вопрос о последовательности не стоит, потому что [в молекуле] всего два остатка, последовательность у них может быть только одна: А-В. А если бы их было, к примеру, три, там уже есть варианты А-В-С и А-С-В (два [и больше] варианта последовательности). А если четыре [остатка] и больше и дальше – там факториальная зависимость [числа способов соединения остатков от числа остатков].

Комбинированные корреляции 2D

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

Ф. Тоукач: слайд 82

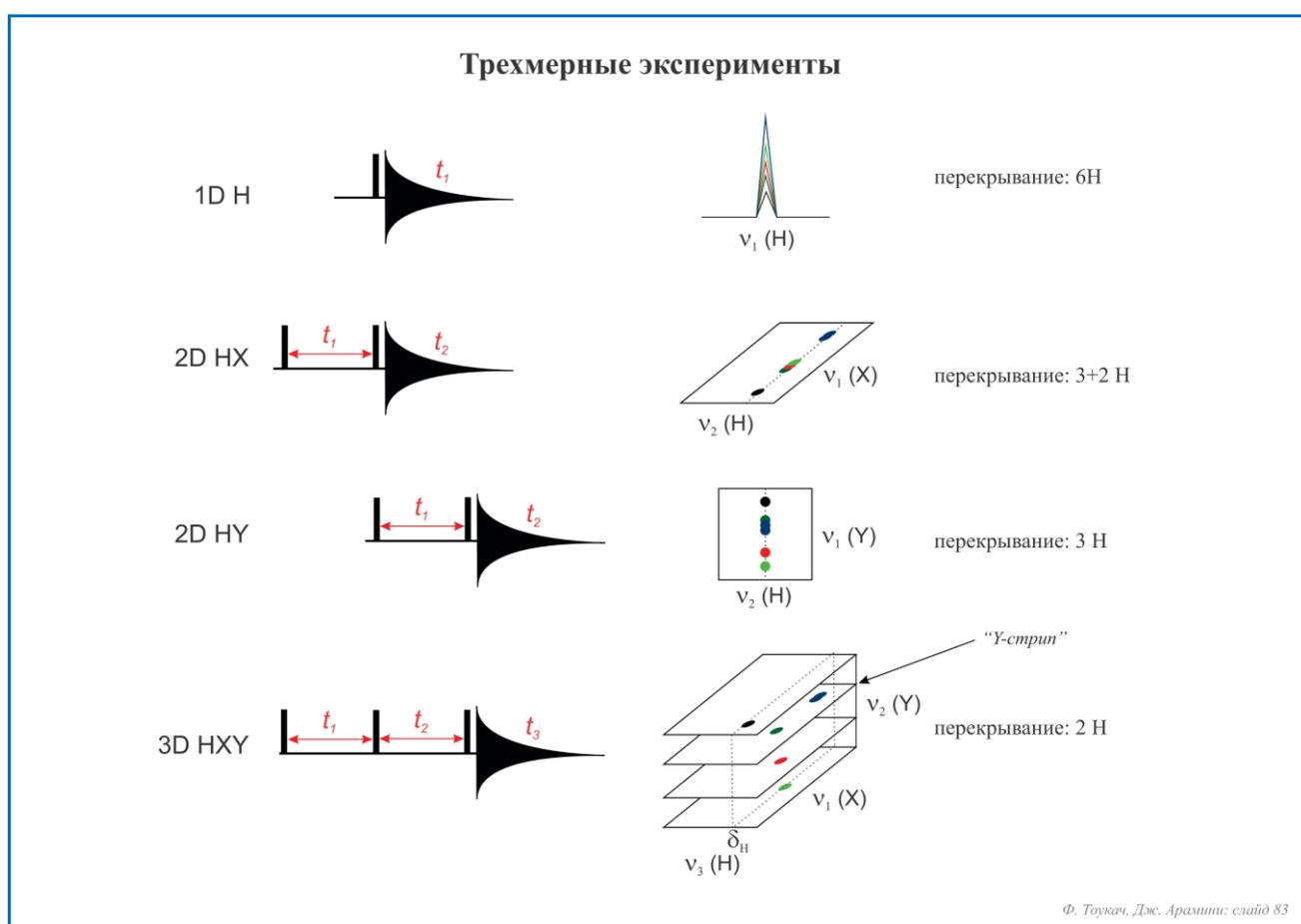
#82 Некоторые комбинированные корреляции мы уже знаем. Например, **HSQC-TOCSY**. Где у нас? Вот этот вот эксперимент, мы его уже рассмотрели. А здесь я привел в качестве примера другой тип молекулы. Это фрагмент пептидной цепи. Что показывает HSQC-TOCSY в этом случае? Это будут контакты **этого углерода [красный C α]** со своим протоном и **со всеми протонами в пределах той же спиновой системы**. Хотя **вот этот [N-H]** может быть, а может и не быть. Он, строго говоря - в другой протонной спиновой системе. Но раз я здесь стрелку нарисовал, значит, иногда [корреляция в HSQC-TOCSY] наблюдается. Хотя из общих соображений не должна наблюдаться, но это можно еще проверить.

Какие еще есть варианты комбинированных корреляций? Во-первых, HSQC-TOCSY не обязательно в варианте HC, может быть еще в варианте HN. **Вот здесь обозначено [красным на правой диаграмме]. Этот азот [взаимодействует] со своим [протоном] и с отделенным углеродом протоном.** Следующий вариант – это **HSQC-COSY**. Это как бы обрезанный вариант HSQC-TOCSY. То есть не со всеми протонам углерод коррелирует в пределах спиновой системы, а только со своим и соседними, **вот пример [сверху слева]: [правый C α взаимодействует] с этим и с этим, но не с другими протонами, которые находятся где-то в этом заместителе [стерео-связь на нас], т.е. **вот этой красной точки [из HSQC-TOCSY] нет.** Есть еще вариант H2BC – это то же самое, но исключая свой собственный [протон], взаимодействие только с соседями, **вот корреляция показана [сверху слева].** В ней не будет **красной точки [из HSQC-TOCSY], которая здесь была бы, и этого протона [C α -H].** Сравнивая их друг с другом, можно выявить корреляции только с протонами при соседних атомах, но не со своими.**

Другие примеры комбинированных корреляций – это комбинирование спиновой и пространственной корреляции. Что будет нам показывать комбинация ^{13}C HSQC и NOESY? Углероды будут иметь кросс-пики с протонами, которые в пространстве сближены с его

собственным протоном СН. Где у нас пример HSQC-NOESY? Вот он [синим справа внизу]. Этот углерод [синий Ca] имеет корреляцию с собственным протоном; мы эту корреляцию можем исключить, потому что из спектра HSQC мы знаем (...), где она находится - убираем ее, таким образом, из рассмотрения и оставшиеся кросс-пики [этого] углерода - это будут те протоны, которые [пространственно] близки к его собственному протону. Это, как минимум, один этот [N-H] и, возможно, еще какие-то [здесь в заместителе \[синяя точка\]](#). Это комбинация HSQC и NOESY.

Соответственно, то же самое может быть не по углероду, а по азоту. Вот она [здесь показана \[синим справа сверху\]](#). По одной оси у нас будет химический сдвиг азота, а по другой оси – протоны. И корреляции будут как с собственными протонами (которые мы тоже можем исключить после рассмотрения NH HSQC), так и с теми протонами, которые сближены в пространстве с собственным NH, то есть с этим протоном [Ca-H]. Если этот [NH] мы на основании HSQC исключаем из рассмотрения, остается единственная корреляция, которая покажет нам протоны, пространственно близкие к своему NH, вот к этому протону.



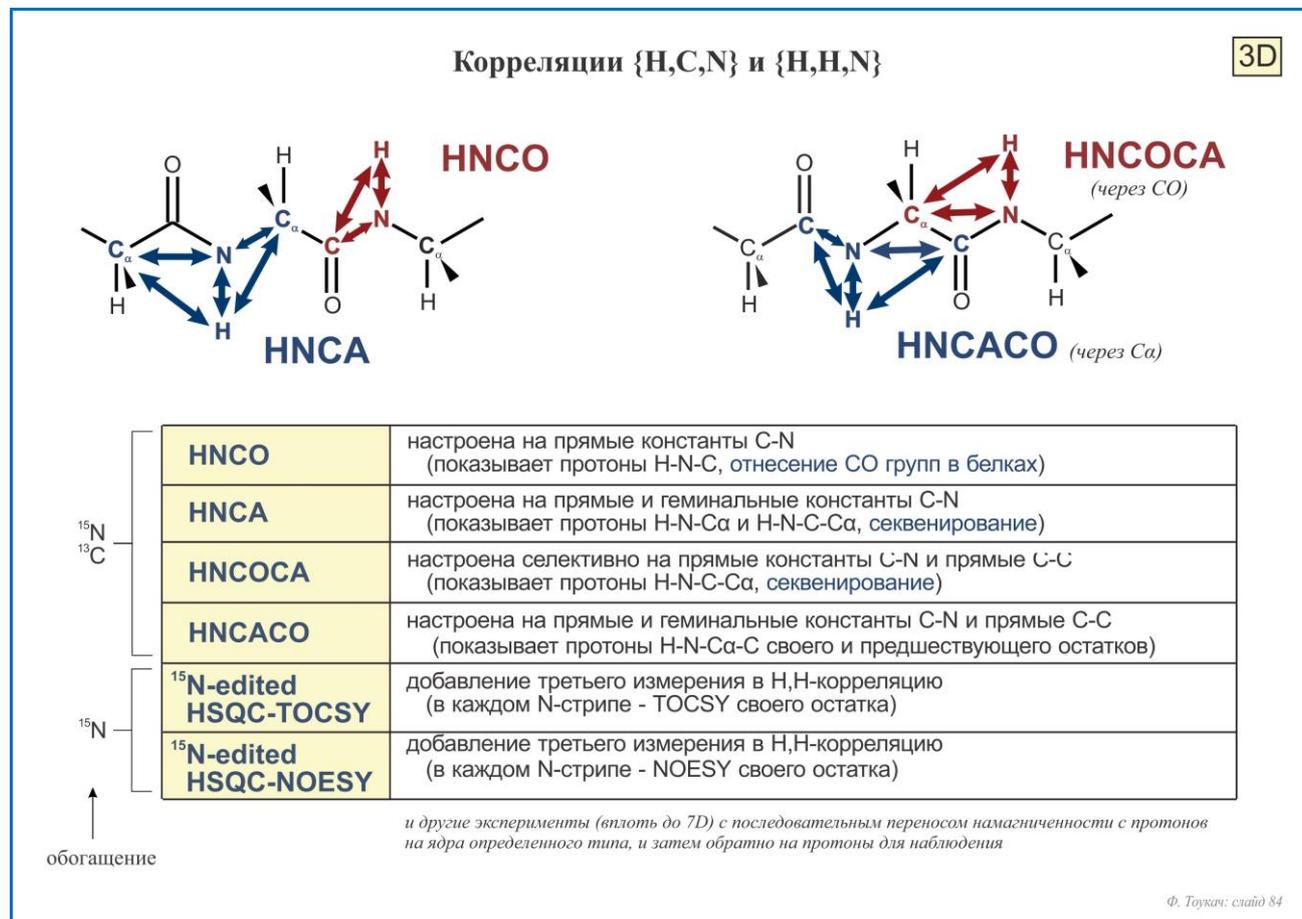
#83 Постепенно, двигаясь через комбинированные корреляции, мы подходим к тому, что неплохо бы добавить третье измерение. Трехмерные эксперименты появились, по-моему, где-то в 90-х¹⁴⁷, но это не был такой принципиальный скачок, как появление двумерных экспериментов, поэтому не был отмечен какими-либо яркими премиями. Но зато, когда приборы стали достаточно высокочувствительными, трехмерные эксперименты позволили разделять сигналы уже не по двум, а по трем осям, уменьшая тем самым вероятность перекрывания [сигналов]. И дальше, как грибы после дождя, появились четырехмерные, пятимерные и так далее. Но для нас это не очень важно. Для

¹⁴⁷ Ikura M; Kay LE; Bax A (1990). "A novel approach for sequential assignment of ¹H, ¹³C, and ¹⁵N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin". *Biochemistry*. 29 (19): 4659–67. [doi:10.1021/bi00471a02](https://doi.org/10.1021/bi00471a02)

понимания достаточно будет рассмотреть трехмерный. Вспоминаем базовую идею двумерных экспериментов. Вот есть **одномерный эксперимент [1D H]**, в нем одна временная ось (в FIDe) и, соответственно, одна частотная ось в спектре. Допустим там **шесть сигналов перекрылись, они обозначены разными цветами**. Вот **двумерный эксперимент [2D HX]**, в котором две временных оси. Одна из них – это задержка между импульсами, а другая – это ось реального времени, в течение которого происходит накопление. После двумерного Фурье преобразования мы получаем две частотных оси – протоны и какое-то другое ядро (или, может, тоже протон), по которому есть расхождение хим. сдвигов. **Здесь перекрывание меньше**. А **вот еще один двумерный эксперимент по другому ядру [2D HY]**. [Здесь есть] тоже какая-то ось времени, виртуальная t_1 , но уже связанная с другим ядром. И часто бывает так, что в эксперименте HX разошлись одни протоны (перестали перекрываться), а в эксперименте HY - другие протоны. И хотелось бы скомбинировать так, чтобы они не перекрывались вообще. И так, действительно, можно сделать, то есть придумать более длинную импульсную последовательность, в которой имеются уже две переменных задержки, инкрементируемые независимо. И третья ось – это ось реального времени, в течение которого происходит накопление. После трехмерного преобразования Фурье мы получим трехмерный спектр, в котором будет протонная ось, ось X и ось Y. И, соответственно, то, что разошлось на одной [двумерной корреляции], но не разошлось на другой, мы в этом спектре будем наблюдать как отдельные кросс-пики. То есть **здесь [3D HXY]** перекрывание минимально по сравнению с **этим [2D HX]**, с **этим [2D HY]**, и тем более с **этим [1D H]**.

Но есть и техническая сложность. В двумерном спектре у нас еще остается третье измерение для интенсивности сигнала, то есть насколько он сильно поднимается от базовой плоскости. А вот здесь [в трехмерном спектре] надо как-то обозначать интенсивность, мы не можем за счет формы кросс-пика это сделать, потому что все три пространственные координаты уже заняты. Можно, например, обозначать интенсивность цветом - чем ярче, тем, значит, объемнее сигнал. То есть трехмерный интеграл по какому-то объему можно обозначать с помощью цвета или рядом числа подписывать. Потому что, если мы используем цвет [для четвертой координаты], мы не сможем цвет использовать для отнесения, или надо будет придумать какой-то другой (более сложный) цветовой код. По этой причине количественные измерения в трехмерных экспериментах почти никогда не делаются, а кросс-пики в них анализируются на уровне «есть сигнал» или «нет сигнала». Если просто **точка** стоит, значит сигнал есть, а насколько он интенсивный, мы не знаем. При необходимости можно измерить [объем этой «точки»], но я сомневаюсь в практической значимости этой информации.

Немного про терминологию. Если мы по оси Y разделим весь спектр на плоскости (обычно разделяют на те плоскости, в которых есть сигналы), то [каждая] такая плоскость называется «стрип». То есть, **это [любая из четырех плоскостей справа внизу] - Y-стрип; Y – эта координата [вертикальная ось]**. А вот **этот обозначенный пунктиром прямоугольник (плоскость) – это H-стрип, протонный стрип, соответственно**.



#84 Это я сказал, потому что сейчас про стрипы будет идти речь. Те же самые примеры с пептидами, там как раз секвенирование с помощью ЯМР можно делать. Это делается с помощью трехмерных корреляций. Вот самые распространенные. Допустим, **HNCO**. Где она? **Вот она, красная [слева].** **Здесь [красными] стрелками** показано, что с чем она коррелирует. Она настроена на прямые константы между (...) углеродами и азотами. Поэтому для нее требуется обогачение, поскольку это низкочувствительный эксперимент: и углероды, и азоты дают низкую чувствительность. Но зато, что она будет показывать? Если есть константы между протоном и углеродом и между протоном и азотом, то у нас будет три координаты: протоны, углерод и азот. Если, к примеру, у нас есть NH-протоны, (пересекающиеся), то по третьей координате (по углеродной), они будут отличаться, если соседние углероды имеют разные химические сдвиги. Можно предположить, допустим, что в каком-то белке сильное пересечение по протонной оси, и есть пересечение по азотной оси. То есть, в спектре NH HSQC есть совпадение сигналов (перекрывание кросс-пиков). Добавляя третью координату (углерод), мы можем эти совпадающие сигналы разнести по третьей координате в том случае, если у них не совпадают хим. сдвиги этих соседних углеродов. Или наоборот можно подойти. Если в спектре [HC] HSQC есть корреляции CO-углеродов с соседними NH-протонами, и многие из них совпадают как по протонной оси, так и по углеродной, то добавление третьего азотного измерения позволяет эти совпадающие сигналы разделить в случае, если хим. сдвиги азотов отличаются. Ну а если совпадают все три хим. сдвига: и протоны, и азот, и углерод, в данном эксперименте уже ничего не поделаешь, они в нем тоже будут совпадать. Используется [эксперимент HNCO] для отнесения CO-групп в белках. CO [в названии] – это, собственно, сокращение от CO-группы.

Еще есть вариант **HNCA** – **стрелки показаны синим**. CA – это альфа-углерод в белках, то есть углерод, соседний с CO. Идея та же самая, только он настроен на прямые константы CN и константы CN через две связи, геминальные. Это тот же самый тип трехмерной корреляции, но только он

показывает связь с другими протонами. В каждом N-стрипе будет свой собственный CH HSQC, связывающий **вот этот NH протон** с α -углеродами **как по одну** сторону, **так и по другую** – т.е. в собственном остатке и в предшествующем остатке. Это значит, можно сделать секвенирование, понять, в какой последовательности остатки связаны друг с другом.

Следующие варианты – это с переносами [когерентности], HNCOCA и HNCACO. Соответственно, **это [HNCOCA]** - перенос с CO на α -углерод, а **это [HNCACO]** - перенос с α -углерода на CO. Здесь, наверное, проще просто на стрелки смотреть и читать комментарии. И то, и то нужно для секвенирования. В одном случае, **здесь [HNCOCA]**, мы будем иметь в каждом N-стрипе, связь протонов с α -углеродами, с тем α -углеродом, который через CO находится от этого протона. А в другом случае [HNCACO] мы будем иметь связь со своим α -углеродом и с тем CO, который находится за ним.

Общая идея – придумать импульсных последовательностей можно очень много, под каждую конкретную задачу. Вот, например, в углеводах конкретно эти не используются, поскольку там можно обойтись более высокочувствительными экспериментами. А в белках, особенно когда очень много аминокислот (это значит, высока вероятность перекрытия сигналов даже в NH-области), эти эксперименты весьма полезны. Что для них нужно? **Для этих экспериментов [первые четыре]** нужно обогащение по ^{13}C и ^{15}N . Но как раз в случае с белками это достаточно просто сделать. То есть, если есть ген, кодирующий этот белок, то выращивая организм на меченой среде, можно наработать в нем меченый белок по этим двум атомам.

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

Ф. Тоукач, слайд 85

#85 Теперь еще два варианта распространенных трехмерных экспериментов (распространенных по сравнению с другими трехмерными, конечно). Это добавление третьего измерения в протон-протонную корреляцию, то есть в TOCSY или в NOESY. Получается здесь следующее. В каждом N-

стрипе будет TOCSY своего остатка - обычный протон-протонный TOCSY, но только для того остатка, в котором находится азот, образующий этот стрип. Например, у нас есть остаток, в нем есть азот, если на азотной шкале сигналы азотов [из разных остатков] «расходятся», то в трехмерном эксперименте будет несколько стрипов, и в каждом будет TOCSY, но только для того же остатка, к которому принадлежит этот азот. Можно это как для TOCSY делать, так и для NOESY. В данном случае, для HSQC-NOESY, отредактированному по ^{15}N , в каждом N-стрипе будет NOESY своего остатка. Это способ разделить общий спектр NOESY или TOCSY, в котором [наблюдается] огромная мешанина сигналов, на более простые подспектры, относящиеся к каким-то частям нашей молекулы, в которых находятся азоты. Иными словами, если в разных частях [молекулы] есть азоты, имеющие разные химические сдвиги, то на основании этого можно разделить TOCSY или NOESY на подспектры этих частей молекулы. Для этих двух экспериментов [на желтом фоне] требуется обогащение только по ^{15}N , ну то есть по тому ядру, по которому происходит редактирование.

Те же самые идеи, связанные с редактированием по гетероядру, можно использовать для изучения взаимодействия субстрата и лиганда. Вот это [две нижних строки] – те же самые трехмерные эксперименты, которые были на предыдущем слайде. Здесь у нас по двум координатам - протон-протонный спектр TOCSY, по третьей координате – ^{15}N . Здесь внизу написано то же самое, что я говорил в конце предыдущего слайда. Теперь смотрите, что можно сделать. Вот этот [эксперимент] X-edited (например, ^{15}N -edited) существует в двух вариантах: X-selected и X-filtered. X-selected показывает только то, что связано с X. (...) А X-filtered, наоборот, показывает все остальное, что не связано с X. То есть к данному эксперименту как бы применяется операция “не”.

Другие два эксперимента – это без HSQC, просто двумерные эксперименты, X-редактированный TOCSY и X-редактированный NOESY. Они лучше тем, что в силу того, что они двумерные, а не трехмерные, они более высокочувствительны, но дают в принципе ту же самую информацию. Двумерный эксперимент – это как бы один стрип из трехмерного эксперимента. То есть выбираем какое-то ядро X (конкретный сигнал в одномерном спектре), запоминаем его хим. сдвиг и настраиваем этот двумерный эксперимент с редактированием на хим. сдвиг этого конкретного сигнала. И получаем кросс-пики (в случае с TOCSY) между теми сигналами из одной спиновой системы, хотя бы один из которых связан с этим ядром X. А в случае с NOESY - то же самое только не протоны из одной спиновой системы, а протоны, сближенные друг с другом в пространстве. То есть это [X-edited TOCSY] - спиновая корреляция, а это [X-edited NOESY] - корреляция ядерного эффекта Оверхаузера.

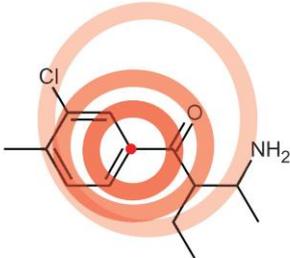
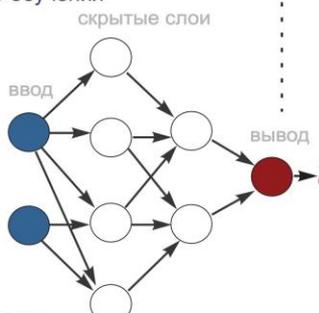
Как это можно применить для изучения связи между субстратом и лигандом? Сейчас вспомню. Здесь это [показано] на примере X-edited NOESY и X-edited HSQC-NOESY. Итак, применение редактирования по какому-то сигналу в двумерных и трехмерных спектрах. Тут X может быть углеродом, азотом или еще чем-то. Здесь рассмотрены две ситуации: меченный субстрат [слева] и меченный лиганд [справа]. Сразу скажу, что именно ситуация с меченым субстратом важна для биологических исследований, потому что меченый субстрат относительно легко получить. А меченый лиганд, и тем более множество меченых лигандов, получить сложнее. Субстрат можно вырастить с помощью нужного гена, «вставленного» в какую-нибудь бактерию, а дальше работать на обогащенном сырье. То есть этот случай [меченный лиганд] - более сложный технологически и более актуальный для химии, а этот случай [меченный субстрат] – биотехнологически простой и актуальный для биологии.

Здесь [красные круги, диаграмма слева] – это ядро, по которому у нас имеются метки в субстрате. Выбираем какой-нибудь один сигнал (в предположении, что это химически разные ядра, т.е. [они имеют] разные сигналы в спектре по ядру X). Дальше облучаем конкретно этот сигнал

[верхний красный круг] и получаем спектр TOCSY или NOESY только для тех протонов, которые связаны с этим [протоном при верхнем красном круге], в том числе в лиганде. То есть, если у нас лиганд занимает эту полость в субстрате, и мы делаем X-редактирование по сигналу этого ядра [красный круг], у нас двумерный спектр NOESY, включающий контакты только этого протона со всеми остальными. Здесь не хватает еще вот сюда [вниз от верхнего правого H-X] стрелки, потому что они тоже сближены, но уже в пределах субстрата. Но то, что в пределах субстрата, обычно не очень интересно, интересно то, что между субстратом и лигандом. При этом в этом спектре NOESY будут отсутствовать контакты протонов, [пространственно] связанных с этим же ядром [его протоном] внутри лиганда, поскольку у него [у ядра X в лиганде] другой химический сдвиг, и его мы не облучаем. То есть по этому ядру [X в лиганде] редактирование не происходит. Тем самым мы исключаем внутрелигандные NOE из рассмотрения. Если у нас лигандов в смеси много, это очень сильно упростит нам картину - мы будем видеть только NOE в субстрате, который один, и NOE между субстратом и тем лигандом, который к нему присоединяется, но не с остальными. Кроме этого, мы увидим еще и каким конкретно протоном лиганд подходит к соответствующей полости в субстрате.

Ну а здесь [справа], соответственно, все наоборот, здесь редактирование по метке в лиганде. Здесь мы выявим NOE только этого лиганда. То есть, если мы увидим сигналы там же, где находились протоны субстрата, значит, именно этот лиганд связывается с субстратом. Это два способа применения [подобных экспериментов].

Предсказание спектров ЯМР

эмпирическое	полуэмпирическое	ab initio
 <p>кодирование структуры: 3 сферы NOSE</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 <p style="color: red;">не нужно ничего, кроме большой базы данных, не работает, если похожих фрагментов в базе мало</p> <ul style="list-style-type: none"> • узлами могут быть атомы, группы, остатки • при поиске в базе структурам с той же стереохимией дается больший вес 	<p>набор правил структура ↔ хим. сдвиг, параметризованный для каждого класса соединений (CHARGE, инкременты)</p> <p>регрессионная модель: с помощью метода наименьших квадратов находится уравнение линейной регрессии, связывающее дескрипторы с предсказываемым значением</p> <p style="color: red;">очень быстро, требует мат. модель</p> <p>нейронная сеть: каждый нейрон есть функция входы → выход; коэффициенты в ней и веса нейронов подбираются путем тренировки сети на модельной базе данных</p> <p style="color: red;">универсально для любых классов, требует обучения</p> <p style="text-align: center;">скрытые слои</p>  <p>ввод → вывод</p> <p>параметры атома (элемент, гибридизация, и т.д.) и его соседей в N сферах</p> <p>частично-связанная 4-слойная нейронная сеть</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 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. <p style="color: red;">наиболее точно сложно в параметризации, медленно</p> <div style="border: 1px solid gray; padding: 5px; background-color: #f5f5f5;"> <p style="color: green; font-weight: bold;">CAST</p> <p style="color: green; font-weight: bold;">SpecSurf</p> <p style="color: green; font-weight: bold;">NMRShiftDB</p> <p style="color: green; font-weight: bold;">ACDLabs</p> <p style="color: green; font-weight: bold;">MG: MestreNova</p> <p style="color: green; font-weight: bold;">MG: ChemOffice</p> <p style="color: green; font-weight: bold;">HyperChem</p> <p style="color: green; font-weight: bold;">Gaussian</p> </div>

Ф. Тоукач: слайд 90

#90 Это [задачи] у нас будет в следующий раз, позже вернемся (...). А сейчас у нас еще один слайд, связанный с предсказанием спектров; он у вас последний. Для того, чтобы эффективно анализировать химические сдвиги, а иногда и константы спин-спинового взаимодействия, бывает очень полезно уметь предсказывать спектры для известной структуры. Но однозначно эту задачу

решить не удалось. Существует три группы подходов. Они написаны сверху: эмпирический, полуэмпирический и *ab initio*.

Что такое эмпирические [методы]? Это умозрительные правила, «подмеченные» из экспериментов и сведенные либо в простые закономерности, либо в базы данных. Наиболее распространенный из них называется HOSE (Hierarchical Organization of Spherical Environment). Состоит он в следующем. Это - пример молекулы, в которой нам нужно предсказать химический сдвиг атома, обозначенного точкой. Мы отходим на одну связь от этого атома, получаем первую сферу (какой-то молекулярный фрагмент). [Запоминаем] все атомы, которые попали в эту первую сферу. Далее ищем в базе данных химических сдвигов структуры, содержащие такой структурный фрагмент (первую сферу). И далее несколько вариантов. Если мы нашли одну [структуру], берем из нее химический сдвиг центрального атома, это и будет ответ. Если мы не нашли ни одной, тогда нам не повезло, что мы на первой же сфере не нашли подходящих вариантов [, и ответ не может быть получен]. Если мы нашли более одной структуры, отступаем еще на один атом, тем самым увеличивая сферу. (... ошибочные рассуждения ...). А если не нашли ни одной - наоборот, уменьшаем (в случае с первой [сферой] уменьшать дальше некуда, а в случае со второй, соответственно, переходим обратно к первой). То есть, если фрагмент найден, мы переходим к следующей сфере, пока не дойдем до [границ] молекулы [или пока поиск фрагмента не будет возвращать 0 или 1 результатов]. После этого [собираем] все структуры, которые содержат данный фрагмент, и из них берем химические сдвиги предсказываемого атома, и усредняем их. Усредненное значение – это и есть ответ. Плюсы [HOSE]: нужна только база данных, не нужно никаких специальных [аналитических] правил. Минусы: эта схема работает плохо или не работает вообще, если похожих структур в базе нет, т.е. нет структур, содержащих данный структурный фрагмент.

Изначально эта схема была придумана именно в том виде, в котором я ее изложил. Но она плохо работала для стереомеров, потому что формулировка «отойти на одну связь» никак не учитывала, в какую сторону в пространстве отойти на одну связь. И получалось, что если у нас была, к примеру, *транс*-двойная связь, могли попасть в фрагменты с *цис*-двойной связью, которые эта [экспертная] система считала такими же. Поэтому дальше эту схему немного модифицировали, и получился так называемый 3D HOSE. Это тот же самый HOSE, но только при усреднении структурам с той же стереохимией [, что и у молекулы, для которой делается предсказание] (с теми же *стерео*-конфигурациями атомов в пределах сферы), дается больший вес, чем структурам с другой стереохимией. Например, для углеводов это крайне важно, поскольку там все отличия [между строительными блоками] именно стереохимические, а в смысле связности атомов почти все моносахариды одинаковы.

Эта схема работает очень быстро. Не максимально быстро, но тем не менее, она может посчитать любой спектр за минуту и применяется, например, в программе ACD Labs [NMR Predictor] (одной из наиболее часто используемых) для предсказания спектров. Теперь этот узел, обозначенный точкой. Как я рассказывал, это - один атом. Но строго говоря, это могут быть и группы атомов и даже целые остатки. И тогда ответом является не одно число (хим. сдвиг), а какой-то вектор, или набор хим. сдвигов для атомов, принадлежащих этой группе. Так [на уровне групп атомов] эта схема тоже работает.

Следующая [группа методов] – полуэмпирические. Это способы предсказания, которые основываются на наборе специальных правил, связывающих структуры и химический сдвиг [или другие атомарные свойства, наблюдаемые в ЯМР]. Минус состоит в том, что эти правила - разные для разных классов соединений. Поскольку правила – эмпирические (они берутся из экспериментов), получается, что не только коэффициенты уравнений разные для разных соединений, но и сами

уравнения разные. Например, для заместителей бензола - одна схема, для белков другая, и так далее. Но у этой схемы есть один очень большой плюс. Она работает не просто быстро, а феноменально быстро - порядка сотых долей миллисекунды на современных компьютерах для предсказания одного спектра. А что это значит? Такая скорость позволяет итеративно перебирать все возможные структуры, для каждой из них генерировать спектр, сравнивать с экспериментальным, получать некую метрику соответствия, а дальше ранжировать структурные гипотезы по величине этой метрики. То есть решать обратную задачу перехода от спектра к структуре. Для простых структур можно и **вот такое [HOSE]** использовать для этого, но только для *простых*, потому что, если нужно перебрать пару миллионов структур и на генерацию каждого спектра потратить минуту, это получится очень долго. Но, естественно, можно **это [HOSE]** и **это [эмпирические правила]** скомбинировать. То есть при переборе структур полуэмпирическим методом с помощью «инкрементов»¹⁴⁸ очень быстро генерировать спектры, а потом отобрать из них тысячу наиболее хорошо подходящих и для них сгенерировать уже более точные спектры **вот таким методом [HOSE]** и их снова ранжировать (уже только «лучшую» тысячу, а не все возможные структуры) (...).

Минус [описанного подхода] - требуются разные правила для разных классов соединений. Значит, можно попытаться автоматизировать процесс поиска этих правил. Это делается с помощью **регрессионной модели**. Что такое регрессия, вы, наверное, знаете? Было у вас на «матане»?.. Можно придумать регрессию, в идеале линейную, которая связывает структурные дескрипторы с предсказываемым значением химического сдвига. Плюсы: опять же, работает очень быстро; минусы – требуется математическая модель. Коэффициенты в регрессии нужно еще определить, и бывает так, что они для разных классов соединений даже с похожими структурными фрагментами получаются существенно разными. Значит, [симуляция спектров] требует предварительного исследования.

Поэтому [хемоинформатики] решили пойти еще одним путем. Тоже построить математическую модель, но не регрессионную, а неизвестно какую. Так, чтобы она находилась внутри нейронной сети, внутри черного ящика. **Нейронная сеть** – это, по сути, набор математических функций или «нейронов», которые связывают одно или несколько входных значений с одним выходным значением. [Искусственная нейронная сеть] называется нейронной, потому что она работает аналогично естественной нейронной сети, где возбуждение одного нейрона (его выходной сигнал) зависит от силы, входящих в него сигналов. Общий смысл: нейрон – это **кружок на этой схеме простейшей искусственной нейронной сети**. Нейроны в ней разделены на слои, [слоев] может быть как очень много, так и очень мало. **Вот здесь [слева]** - входной слой, который получает какие-то дескрипторы (какой [химический] элемент, какая [е целевого атома] гибридизация, какое его окружение в таком-то количестве **этих сфер [HOSE]**, как «соседи» расположены в пространстве, и так далее - то есть *структурные* дескрипторы). **На выходе [справа]** - единственный нейрон, который генерирует предсказанный хим. сдвиг. А между ними может быть несколько промежуточных слоев, которые находятся внутри нейронной сети. Исследователь задает топологию нейронной сети, которая, в принципе, может быть любой – **здесь** она частично связанная, то есть не все нейроны связаны со всеми, но можно для простоты выбрать и полностью связанную искусственную

¹⁴⁸ Инкрементный метод симуляции хим. сдвигов основывается на предположении, что эффекты замещения на конкретном атоме от разных заместителей, находящихся в различных положениях относительно целевого атома, аддитивны. Это значит, что, создав базу данных с правилами типа «нитрогруппа в *мета*-положении увеличивает хим. сдвиг углерода в ароматическом цикле на N м.д.» можно извлечь из нее и просуммировать эффекты заместителей независимо и в произвольном порядке. Этот метод приемлемо работает для жестких молекул в рамках хорошо исследованных классов.

нейронную сеть, где все нейроны связаны со всеми. А дальше происходит обучение. Обучение состоит в том, что у нас есть обучающая выборка с известными дескрипторами и известными выходами (тем, что должно получиться). Нейронная сеть обучается автоматически, подбирая веса **этих стрелочек (связей между нейронами)**, так, чтобы выход в наибольшей степени соответствовал известному значению. Исследователь выбирает тип нейронной сети, создает обучающую выборку, после этого автоматически происходит обучение (подбор весов), нейронная сеть самообучается [на имитирование правильного результата]¹⁴⁹. После этого можно «скормить» ей структурные дескрипторы, для которых неизвестен выход, и получить предсказание. Какой здесь «плюс»? Нам вообще не нужно знать принципы работы этой сети, поскольку она самообучаемая. Мы можем, не имея никаких представлений о том, как химический сдвиг зависит от дескрипторов, все равно использовать нейронную сеть, и она будет делать предсказания. Поэтому она является абсолютно универсальной для любых классов соединений. Минус – это то, что она требует обучения и, если мы ошиблись с обучающей выборкой, она будет давать неправильные предсказания, но выявить это будет довольно сложно.

Классический пример, демонстрирующий недостатки нейронных сетей [в задачах поиска закономерностей], имел место в 80-е годы, когда люди чуть ли не молились на ИНС, думая, что эта технология заменит человека в решении задач по распознаванию образов. В частности, обучали нейронную сеть, которая должна была дать бинарный ответ на вопрос, принадлежит ли танк армии США или армии СССР. То есть ракета [на борту которой предполагалось запускать копии ИНС] должна была определить, чей танк [находится] на поле боя, и ударить в противника, а не в свой. Она «как бы очень хорошо» обучилась, ей показали фотографии всех советских танков, всех американских, и дольше она должна была выяснять [принадлежность]. Оказалось, что она выясняет совершенно неправильно. Начали выяснять, в чем причины. И выяснилось следующее: советские танки были сфотографированы (исходные фотографии были, естественно, с полигонов СССР), в основном, на фоне берез, а американские - на фоне каких-то других деревьев, и «зацепилась» нейронная сеть за деревья, а не за танки. Но выяснить это на этапе обучения было невозможно тем, кто придумывал обучающую выборку. То есть этого просто не заметили, а заметили бы это, могли не заметить что-то еще. Основной минус ИНС - никто толком не знает, как именно она выстроила внутри себя связи и какие признаки посчитала значимыми. Если она «зацепилась» не за те признаки, которые для нас существенны, то и предсказание будет опираться на *эти* признаки, а не на те, которые важны для нас. Тем не менее, в программах предсказания спектров нейронные сети тоже используются, и точность предсказания - в среднем такая же, как и в HOSE-программах. Некоторые программы умеют комбинировать [нейросетевой и эмпирический подходы]. Наряду с химическими сдвигами и то, и другое может генерировать что-то типа метрики достоверности, например, «этот атом имеет такой-то химический сдвиг, но я это могу утверждать с качеством 75%». Соответственно, основываясь на этих процентах, программа может «смешать» предсказания отсюда [HOSE] и отсюда [ИНС], придав бóльший вес предсказаниям тем методом, который выдал бóльшую метрику достоверности. В частности, в ACD Labs [NMR Predictor] именно так и делается.

Наконец, последняя группа предсказаний – это квантово-механические расчеты, которые сейчас чаще всего проводятся с помощью теории функционала плотности. Есть такая аббревиатура **GIAO – gauge-independent atomic orbitals**, которая как раз обозначает алгоритм применения теории функционала плотности (DFT) в предсказании [параметров сигналов] ЯМР. Причем, что интересно,

¹⁴⁹ Обучение ИНС также включает валидацию, и выбор наилучшего способа разделения исходных данных на обучающую и проверочные выборки. Более подробно о машинном обучении в химии можно ознакомиться на лекции автора «Введение в хемоинформатику» (<http://toukach.ru/rus/cheminf.htm>, слайды 15-17).

эта буква «i» – это может быть как gauge-independent, так и gauge-inclusive. Получается, эта аббревиатура имеет по сути противоположные значения: в одних статьях так расшифровывается, а в других – так. Несмотря на противоположность значений [в названии] метод существует, он вполне определенный, и он, опираясь на геометрию молекулы, квантово-механически пересказывает химические сдвиги. Точность здесь... смотря с чем сравнивать. В общем виде эти методы обладают наивысшей точностью при использовании больших базисных наборов и высоких уровней теории (квантово-механической). Но это происходит невероятно долго, на пять-шесть порядков медленнее, чем в [этих моделях \[эмпирических, полуэмпирических и нейросетевых\]](#). Поскольку это очень медленно, существуют сложности и с проверкой и непосредственно с предсказанием. [Это все \[слева и в центре слайда\]](#) можно делать на персональном компьютере, а [здесь \[справа\]](#) уже нужны суперкомпьютеры, чтобы считать [спектры] больших молекул, поэтому это доступно не всем.

Что касается точности, если есть хорошая математическая модель для конкретного класса [соединений], она работает точнее, чем квантовая механика, но она работает только для конкретного класса, и не для всех классов они есть. Квантовая механика в этом смысле универсальна. Другие плюсы квантовой механики относятся к тому, что она предсказывает не только химический сдвиг, но и прочие наблюдаемые в ЯМР параметры, а именно константы спин-спинового взаимодействия, времена релаксации, иногда даже форму линии. Опирается она при этом на молекулярную геометрию и распределение [конформаций] по энергиям. Причем расчет ЯМР происходит относительно быстро при известной геометрии, а основную массу вычислительных ресурсов и времени «съедает» именно расчет молекулярной геометрии. Поэтому можно попытаться скомбинировать: геометрию считать полу-эмпирически, например, с помощью молекулярной механики или молекулярной динамики, а получив эту молекулярно-механическую геометрию, уже для нее квантово-механически считать химические сдвиги.

[Здесь перечислены примеры «софта»: от зеленого к желтому.](#) Зеленый – наиболее эмпирические, а желтый – наиболее квантово-механические. А когда эти два подхода смешиваются, например, [вот так](#) (эмпирическая геометрия и квантово-механическое [предсказание] ЯМР), или в одной и той же программе присутствует возможность сделать и так, и эдак – это [обозначено] промежуточными цветами между зеленым и желтым. Наверняка вам известна [программа ChemOffice](#), одна из самых распространенных. Самый примитивный способ ее использования – это отрисовка формул для статей. Я думаю, что вы этим пользовались и, скорее всего, именно в этой программе фирмы Cambridge. ChemOffice – это название [пакета], а программа в нем называется ChemDraw. Пользовались? Если его поставить полностью, в ChemDraw есть функция “предсказать ЯМР-спектр”. И она может даже что-то предсказать. Использует она алгоритм фирмы Modgraph – это алгоритм, по-моему, основан на HOSE. Он используется также и в программе [MestreNova](#). MestreNova – это программа для обработки и отнесения ЯМР-спектров. Она позволяет и молекулы туда [в документ] вставлять, соотносить сигналы с атомами, пробовать различные взвешивающие функции, делать Фурье преобразования для взятых с прибора файлов, и т.д. Фактически она заменяет спектрометр во всем, кроме непосредственно накопления FIDa, и умеет работать со всеми экспериментами, кроме трехмерных. Сейчас для людей, не работающих непосредственно на спектрометре – это уже промышленный стандарт и практически не имеющая альтернатив программа для обработки ЯМР-спектров. Причем для обработки как технической (подготовки картинок для статей), так и исследовательской, то есть для выяснения каких-то закономерностей, сравнения спектров, отнесения [сигналов] и, в том числе, предсказания, основанного на том же алгоритме, как и тот, что используется в ChemDraw. ChemDraw, чтобы поставить полностью, надо иметь «хитрую» лицензию; я не исключаю, что эта лицензия даже есть на вашем факультете, но не

знаю, покрывает ли она именно эту функцию. Для MestreNova тоже нужна лицензия, ее на факультете нет, но зато к ней есть «кряк» (можно найти в интернете).

HyperChem – программа больше для молекулярного моделирования. Она позволяет предсказывать геометрию. По-моему, встроенной функции предсказания спектров в ней нет, но самую ресурсоемкую часть (предсказание молекулярной геометрии и распределение конформаций по энергиям) она может сделать. Там есть и какие-то квантово-механические подходы, но в основном в ней используется молекулярно-механические силовые поля. Причем она может их как в статике использовать, так и делать молекулярную динамику. Это значит, виртуально нагревать молекулу [стимулируя конформационные переходы], сравнивать ее состояния по энергии, пользуясь каким-то собственным молекулярно-механическим силовым полем, а потом наблюдать за траекторией, то есть сравнивать, какое время молекула находится в том или ином состоянии, и на основании этих данных о заселенности делать выводы об энергиях состояний.

Ну и наконец последнее – **Gaussian** – это чисто квантово-механическая программа. И если вы применяете квантовую механику в России, то, скорее всего, вы используете одну из двух программ: или «Природу», когда-то написанную в МГУ (бесплатная программа с собственными уровнями теории и базисными наборами), или признанный во всем мире стандарт Попла (Gaussian). Сейчас журналы очень неохотно принимают статьи о моделировании (как геометрическом, так и «ЯМР-ном») в молекулярно-механических силовых полях. Последние десять лет в моде квантовая механика. Это значит, что опубликоваться намного проще, сделав квантово-механический расчет. Даже если он менее точен, чем молекулярно-механический, все равно «протолкнуть» в печать «кванты» будет намного легче. И, естественно, «кванты» дают ответы на некоторые вопросы, на которые «молмех» ответов не дает. Например, о константах спин-спинового взаимодействия. [Практическая] проблема здесь следующая: программа [Gaussian] - платная и очень дорогая, и компания Gaussian ревностно следит за соблюдением лицензионных соглашений. Если у вас нет лицензии, и вы опубликуете статью, то вы попадете в «черный список» в этой программе, и рано или поздно, их огромный судебный отдел, который заточен именно на решение этих задач, добьется того, что вашу статью отзовут. Это будет пятно на вашей репутации. Поэтому, хотя *пользуются* многие, если вы результаты хотите *опубликовать*, обязательно включайте в соавторы человека, в лаборатории которого есть лицензия на Gaussian. Причем они действительно за этим следят, и что интересно, в этот «черный список» попал один из разработчиков Gaussian'a (он где-то опубликовался, не имея формальной лицензии на использование). Зато чем эта программа хороша? Она умеет правильно использовать многопоточность, в том числе многопоточность в тысячи и десятки тысяч потоков. Поток¹⁵⁰ – это как бы одна очередь исполнения [инструкций] в программе. Простейший вариант многопоточности – это когда программа умеет «распределяться» между ядрами процессора и параллельно занимает все 32 или 64 ядра на мощном компьютере. А следующий уровень многопоточности – это, когда она умеет использовать видеокарты и разделяться уже на тысячи потоков (как в видеокартах это сделано для задач с большим количеством простых однотипных операций - в рендеринге, 3D-картинках или в «майнинге» биткойнов). То же самое можно делать и программе Gaussian, но, к сожалению, для этого нужен специальный драйвер, который стоит ~17000 \$. Поэтому в России существует «некоторое препятствие» - всегда есть вероятность заплатить огромные деньги, а потом эта штука не заработает, или ей понадобится какое-нибудь специальное аппаратное обеспечение, например, конкретная видеокарта, выпущенная в определенный год, в определенной редакции, которую можно еще и не найти. Вероятность потерять деньги далеко ненулевая... а деньги большие! Поэтому в России обычно ограничиваются

¹⁵⁰ Thread

многопоточностью на центральном процессоре. Но и это дает очень хороший выигрыш производительности в случае Gaussian. Следующий плюс – Gaussian очень хорошо документирован. Как по самой программе, так и по лежащим в ее основе квантово-механическим принципам есть не то что «хелп», а даже целые книги написаны, включая учебники. Значит, можно попытаться разобраться или найти в литературе, какие базисные наборы хороши именно для вашего класса соединений, какие необходимы и достаточны. И после этого сослаться, что вот опубликовано, что «базисный набор такой-то дает такую-то точность в предсказании химических сдвигов в таком-то классе соединений», поэтому мы использовали именно его. Дальнейших объяснений [в статье] не потребуется - если это уже опубликовано и признано, можно на это ссылаться, предсказывать спектры и сравнивать их с экспериментальными, и на основании этого сравнения делать выводы о соответствии или несоответствии структуры [спектрам].

Лекционная часть нашего курса закончена. В следующий раз у нас будет разбор двух задач. Первая задача будет простой: исходя из двух одномерных и трех двумерных спектров, установить структуру соединения при известной структуре остатков. Остатки будут нарисованы; нужно понять, как именно и какими местами они друг с другом связаны. Эта задача похожа на те, что будут у вас на экзамене, только там будут другие остатки. Мы разберем эту относительно простую задачу, вот ее три двумерных спектра, самых распространенных [следующий слайд]. А после этого я вам покажу пример более сложной задачи, где мы установим структуру на основании уже бóльшего количества двумерных спектров, и сами двумерные спектры будут более сложными. От вас не потребуется на экзамене решения задач такого уровня сложности. Но эта часть следующего занятия покажет вам ограничения метода, какие структуры еще можно «разобрать», а какие уже нельзя, и как это, в принципе, делается. Я разберу, а вы посмотрите.

Лекция 7

NMR Lec7s.mp4

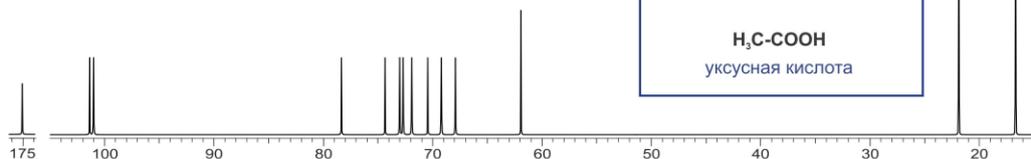
Пример структурной задачи (дисахарид)

Необходимо определить способ связывания моносахаридных остатков, аномерные конфигурации и положение ацетилирования по спектрам ЯМР водного (D₂O) раствора.

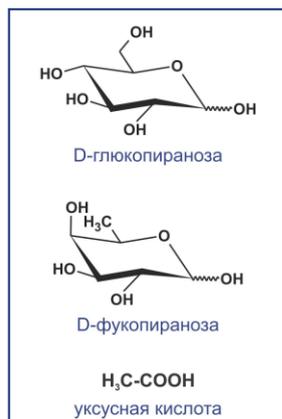
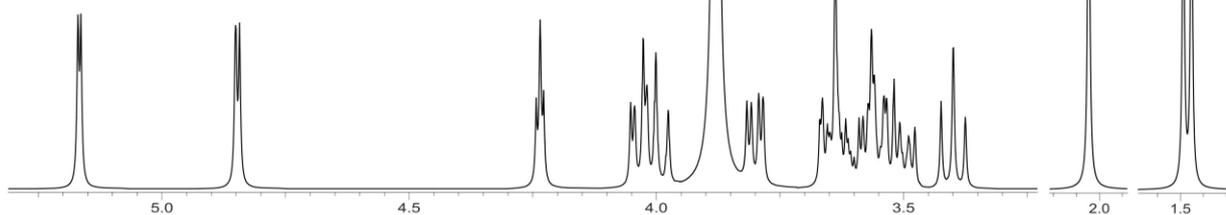
Справочные данные - спектры ЯМР ¹³C незамещенных остатков:

	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

Спектр ЯМР ¹³C, 100 MHz



Спектр ЯМР ¹H, 400 MHz



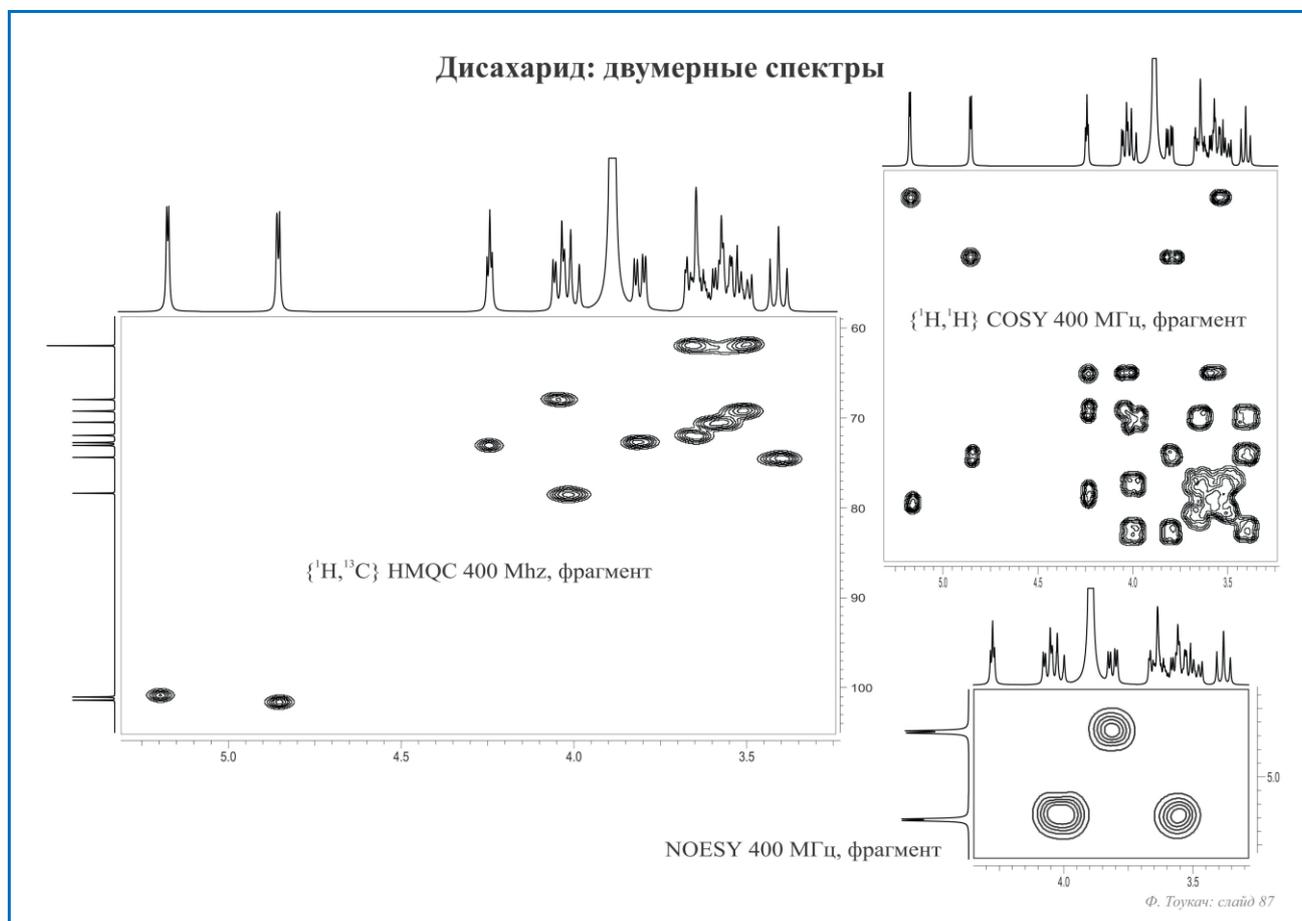
Ф. Тоукач: слайд 86

#86 Сегодня решим две задачи: одну попроще, одну посложнее. Проще - похожа на ту, что будет на экзамене (одна из трех задач). А посложнее - чтобы дать вам представления о возможностях метода и его ограничениях. Что [здесь \[в условии\]](#) написано? Дано три молекулярных фрагмента - они называются «остатками» традиционно в биорганической химии. Остаток - потому, что в составе большей молекулы некоторые OH-группы могут отсутствовать. С отщеплением воды образуются простые эфирные, сложные эфирные и амидные связи. [А это \[в синей рамке\]](#) - молекулы, из которых эти остатки получают. Глюкопираноза, фукопираноза, уксусная кислота - у вас [на экзамене], конечно, другие будут, но тоже, наверное, моносахарид, еще что-нибудь [низкомолекулярное] и еще что-нибудь маленькое [до 4 углеродных атомов]. Нужно определить, во-первых, как они связаны друг с другом, то есть установить первичную структуру, а во-вторых, [здесь](#) не обозначены некоторые *стерео*-центры; нужно установить *стерео*-конфигурацию этих атомов на основании спектров. Все названия будут даны, все справочные данные у вас будут - [в данном случае это таблица](#). На экзамене у вас, наверное, еще будут справочные данные по КССВ - те, которые вы не можете найти на слайдах из лекций. Для конкретного класса соединений то, что вам может понадобиться, есть [здесь \[в условии\]](#). Это значит, что условие задачи сформулировано так, что вам не нужно искать информацию где-то еще. Если вы понимаете, что вам не хватает фактических данных - например, каких-то хим. сдвигов - значит вы пошли не по тому пути, и задачу можно решить другим, более простым способом.

Что у нас здесь есть? [Это \[таблица\]](#) - фрагмент базы данных по химическим сдвигам ¹³C незамещенных остатков. Особенно подчеркиваю, что, как и любой базе, остатки - свободные, не замещенные. А в молекуле они каким-то образом связаны друг с другом, поэтому хим. сдвиги будут

другие. И вы не можете просто сравнить спектр с **этим** [табличными] хим. сдвигами, потому что это для *незамещенных*, а у вас в молекуле они соединены, то есть являются замещенными.

Попробуем установить структуру. Для начала можно просто прикинуть, что с чем и как может связаться. У каждого из этих «сахаров» есть ОН-группы, которые могут образовать связь. У уксусной кислоты есть карбоксил, который тоже может образовать связь. Уксусная кислота может связаться единственным способом, а эти два остатка... **этот [глюкоза]** пятью способами: 1, 2, 3, 4, 6. А **этот [фукоза]** – четыремя, потому что здесь метильная группа в шестом положении.



#87 Посмотрим сначала на одномерные спектры. Что будет дано? Одномерные спектры и какие-то двумерные – в данном случае такие [COSY, HMQC, NOESY]. Может быть, и другие одномерные будут. Это три самых распространенных: **протон-протонная корреляция**, **CН-корреляция** и **NOESY** (пространственная корреляция). Исходя из этого, попытаемся восстановить структуру. Чтобы иметь возможность проанализировать эту таблицу [хим. сдвиги ^{13}C в условии], посчитать эффекты замещения и на основании этого прикинуть, в каких местах образованы связи, нам нужно отнесение спектра ^{13}C . Отнесение спектра ^{13}C напрямую сделать нельзя, потому что в нем только синглеты – можно только сделать отдельные выводы о строении. Поэтому мы сделаем отнесение протонного спектра, установим, какие сигналы в протонном спектре соответствуют каким атомам в молекулах, а потом, с помощью CН-корреляции сделаем отнесение спектра ^{13}C и посмотрим на хим. сдвиги.

Что можно сказать, глядя на ^{13}C [предыдущий слайд]? Во-первых, у нас есть фрагменты структуры – то есть мы уже примерно представляем, где ждать сигналы. В этой молекуле карбоксильная группа одна – вот ее сразу видно, **175 м.д.** Два углерода с хим. сдвигом около 100 м.д. Что это может быть? [ответ из зала] Как углеводчики вы, конечно, знаете, что это «**первые**» [аномерные атомы, обозначенные волнистой связью]. У «первых» рядом два кислорода, поэтому их сигналы сильно смещены влево. У всех остальных углеродов в этих фрагментах один или ни одного

кислорода рядом. А те два, у которых два кислорода, находятся [здесь \[90-110\]](#). Кто из них кто, мы, естественно, пока не знаем. Все $>CH-OH$ - где-то в этой группе сигналов [\[65-80\]](#). Далее, вот [характерный сигнал \[62\]](#). Вы можете и не знать, что CH_2OH -группа дает сигнал где-то в этом месте. Но, во-первых, есть таблица, в ней есть [глюкоза](#). Мы видим, что «шестые» глюкозы (незамещенные), имеют хим. сдвиги ~ 62 м.д. Значит, это может быть незамещенная CH_2OH -группа (пока что, это предположение). В пользу этого говорит и тот факт, что сигнал – выше [остальных]. Поскольку это обычный [эксперимент] ^{13}C , за счет NOE от протонов CH_2 -группы выше, чем CH -группы, потому что у них есть NOE от двух протонов. [Протон-углеродный] NOE, напоминая, увеличивает сигнал. А [этот \[175\]](#) – самый маленький, четвертичный. Потому что у него своего протона нет. Есть еще два высоких сигнала, еще выше из-за NOE – уже от трех протонов, да и по химическому сдвигу точно ясно, что это метильные группы. Метильных групп как раз две – C6 фукопиранозы и C2 уксусной кислоты. Кто есть кто [из метильных групп], не особо важно для установления структуры, но уже глядя только на эту страницу [с таблицей], можно сказать, кто есть кто. Потому что C6 фукопиранозы ~ 16 м.д., а здесь [в спектре] 16.8 м.д., погрешность допустимая. C6 замещенным быть не может – у него нет OH -группы. Поэтому эти значения [16.7] будут сохраняться и в образовавшейся молекуле. Значит, [этот сигнал \[17\]](#) - это C-6 отсюда [из фукопиранозы]. А [этот \[22\]](#) - методом исключения C-2 отсюда [из уксусной кислоты], получается. (...ответы на реплики из зала...)

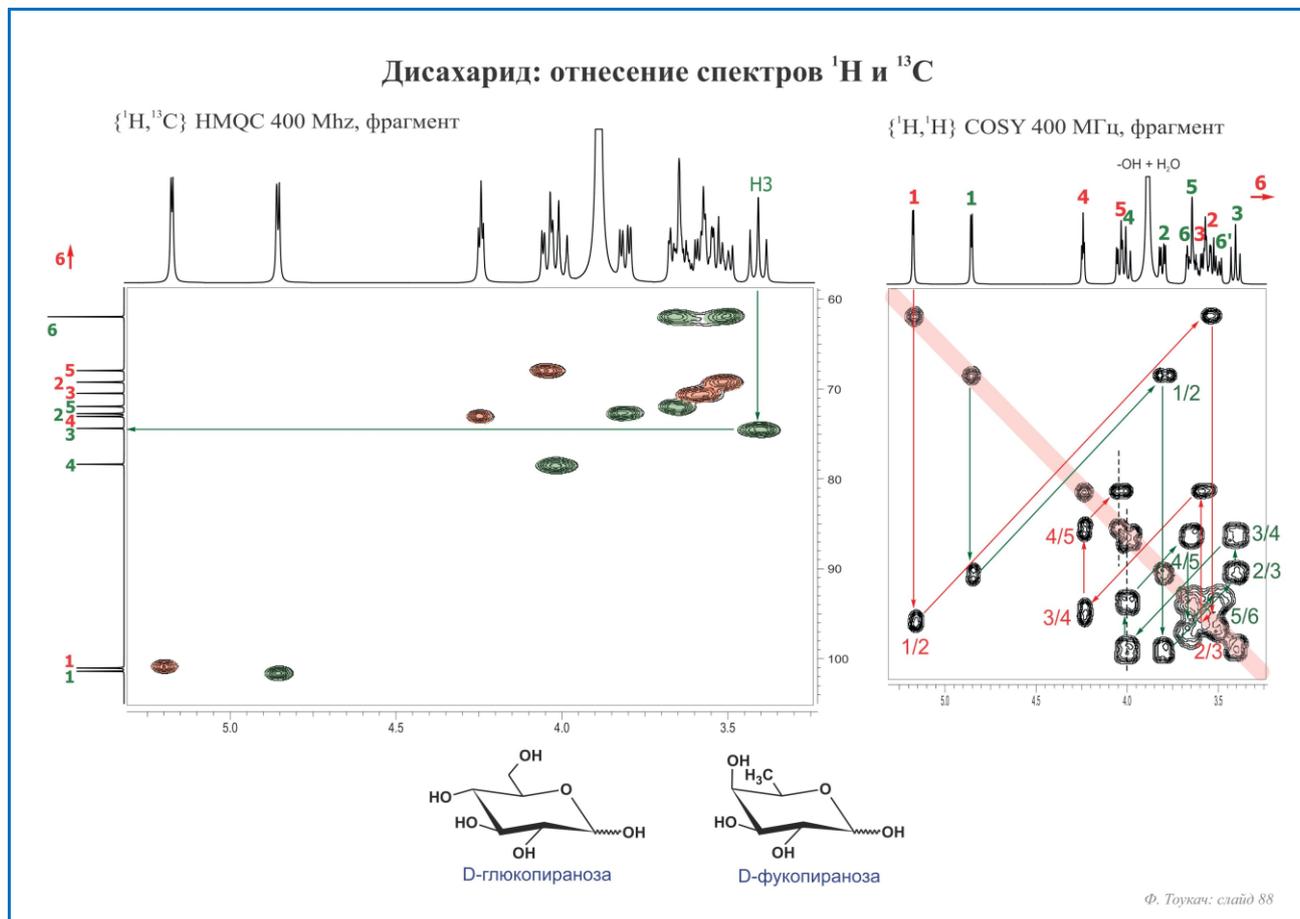
Да, кстати, здесь не сказано, сколько [в молекуле] каждого остатка. Вы правильный вопрос задали. Но и не сказано, что каждый из них присутствует строго в одном экземпляре. Вообще это предполагалось для упрощения, но в реальной задаче вы, конечно, не будете этого знать. Или нужно будет снять хроматограмму, чтобы примерно узнать соотношение компонентов. Но здесь для вас легче – каждый остаток присутствует в молекуле в количестве 1 шт. Строго говоря, если бы уксусной кислоты было две, то мы тоже могли бы наблюдать один сигнал. Потому что они могли быть настолько близки (метильные группы), что [сигналы] слились бы в один. Тогда он был бы выше, как повезет. Кроме того, молекула теоретически может быть похожа на симметричную. То есть [атомы двух остатков ацетата] вообще могут быть химически эквивалентны. Тогда он [сигнал метильной группы уксусной кислоты] - строго один. Даже если [остатки] - [химически] разные, четвертичные сигналы видно плохо, и они могут оказаться рядом. Вообще, химические сдвиги карбоксилов зависят от pH и от заряженных групп неподалеку от них. Но здесь других заряженных групп нет, поэтому в такой молекуле сигналы четвертичных углеродов карбоксилов, в принципе, могли и совпасть. А по высоте мы здесь не можем сказать, потому что у нас нет других «четвертичных» сигналов, у которых [атом] гарантированно один, т.е. не с чем сравнивать. А NOE – это не количественная величина в таком спектре. Поэтому, по тому, был бы он [сигнал] выше или ниже, нельзя сказать, сколько их [атомов] здесь в одном сигнале. Но в данном случае каждый остаток [присутствует] по одному. Если на экзамене у вас возникнет такой вопрос (вы читаете условие и понимаете, что там этого не написано), спросите, я вам отвечу. Если аналогичный случай будет, то дам подсказку, что да, каждый остаток [присутствует] по одному.

Теперь посмотрим на протонный спектр. Тоже [два сигнала \[располагаются\] отдельно \[4.8, 5.2\]](#). Это те же самые аномерные атомы – протоны [при атомах C1 \(вот при этих\)](#). Какой из них какой, мы, конечно, тоже пока не знаем. Тоже [две метильных группы \[1.5, 2.0\]](#). Один [синглет \[2.0\]](#) – очевидно, от ацетата, поскольку нет «соседей». И один [дублет \[1.5\]](#) – отсюда [H6 фукозы], он как раз и должен быть дублетом, потому что у него в пятом положении один «сосед». И [все остальное \[3.3-4.3\]](#), включая воду. Остальное мы пока, глядя на спектр, не можем установить.

Это [3.9] - примесь HDO и H₂O в растворе D₂O (растворитель - D₂O – написан [в условии]). Что значит D₂O? Значит у нас не будет OH-групп. Потому что все они «исчезли» за счет обмена [на дейтерий], и исчезло спин-спиновое взаимодействие с ними, т.е. на них ничего не «щепится». OH-групп для нас, точнее для этого спектра, как бы не существует. Они все [здесь \[3.9\]](#). (...вопросы из зала...) Это в CDCl₃ и т.д., а в D₂O они вообще не дают сигнала. Ну, там особо выбора нет. Просто он [образец] ни в чем же больше не растворяется. То есть можно снимать в D₂O или H₂O. В H₂O сигнал [гидроксильных групп] будет, но он будет расплывчатый, и в зависимости от количества воды, его положение будет разным. Мы будем видеть усредненный сигнал между сигналом воды и всех OH-групп. А в D₂O сигналы OH-групп вообще исчезнут, потому что все эти группы будут обмениваться на -OD, а спектр у нас протонный.

Последнее, что можно сразу сказать, глядя на этот спектр: посмотрим на КССВ [«первых» протонов](#). Можно пересчитать (...), рабочая сторона написана – [400 МГц](#). Мы можем взять линейку, померить, сколько приходится герц на 1 мм, и пересчитать ppm в герцы. И здесь получится [вот это \[расстояние между линиями дублетов при 4.8 и 5.2\]](#) ~3 Гц и ~2 Гц (маленькие КССВ). Мы здесь видим константы двух типов: [большие – вот \[3.4\], например](#), и [маленькие – вот \[4.8\], например](#). Ну, и еще одна [средняя \[сигнал при 1.5\]](#). Раз эти [\[при 4.8 и 5.2\]](#) - маленькие, что это значит? Это значит, что H1 и его единственный «сосед» – H2 – находятся, как минимум, не в антиперипланарном положении. То есть если бы они стояли вот так [показывает антиперипланарное положение пальцами] друг к другу, как «в транс», константа была бы большой (аксиальной, абсолютно верно). Значит, H1 - оба в экваториальном [положении, так как H2 – заведомо аксиальные]. Нам здесь повезло, что и у [этого \[4.8\]](#) - маленькая [КССВ], и у [этого \[5.2\]](#). Поэтому можно сразу сказать, что *стерео*-конфигурацию обоих этих атомов мы уже определили: α (это когда протон экваториальный, а -ОН - аксиальная). (...*пояснения к понятию аномерной конфигурации*... В какой-нибудь идозе, которая конформационно может вывернуться в другую сторону, аномерная конфигурация останется той же самой, но при этом аксиальное с экваториальным поменяются местами. В глюкозе, маннозе и галактозе у β [-аномеров] константы большие, у α [-аномеров] константы маленькие. А в других «сахарах» – надо смотреть, потому что определение α/β – это совпадение R/S-конфигурации C1 с R/S-конфигурацией последнего хирального атома¹⁵¹. Если она совпадает, это α , а если не совпадает, это β . Вам конечно может так и не повезти [как в этой задаче]. Если один [сигнал аномерного протона] будет широким, а другой узким, значит один из них β , а другой α , а какой из них какой, на этом этапе мы пока [не сможем понять]. (...) Все верно, сейчас мы это сделаем. Да, оба остатка - α . А чем это, кстати, хорошо? Раз оба остатка - α , можем [эти строчки с \$\beta\$](#) сразу вычеркнуть из таблицы. И после этого смотреть только [на первую и третью строки](#). Потому что уже известно, что они оба α . В интернете есть, если что, то же самое [таблицы химических сдвигов моносахаридов в α - и β -аномерной конфигурациях].

¹⁵¹ Ошибка в лекции; следует вместо R/S читать *d/l* (направление связи с OH-группой в проекции Фишера). В случае глюкопиранозы и фукопиранозы, находящихся преимущественно в конформации ⁴C₁, приведенный критерий, связанный с положением связи C1-H1 относительно шестичленного «кресла», верен (в α -конфигурации H1 экваториален, а в β -конфигурации аксиален).



#88 Теперь смотрим на COSY. Первое, что нам нужно сделать - это получить отнесение протонного спектра, то есть подписать [вот здесь \[на одномерной проекции\]](#) атомы. (...) Что рекомендуется сделать? [В молекуле -] три спиновые системы. Одна из них - маленькая: уксусная кислота; пока никак не обозначаем. И две больших. И два сигнала H1 - обозначим их какими-нибудь цветами. Нам известно, что они оба первые, по химическому сдвигу. Я здесь обозначил [левый красным](#), а [правый - зеленым](#). Кстати, цветные карандаши могут вам помочь. В данном случае, когда остатков всего два, можно и буквами [обозначить] и как угодно - то есть без цветных карандашей справиться. А если остатков много, тогда удобно или на компьютере раскрашивать или прямо на спектре.

Теперь, имея в виду, что [это - красный-1](#), попробуем найти остальные красные. (...диалог со студентом...) Мы приписали цвета двум первым сигналам, а дальше остатки мы уже попробуем искать, исходя из констант [спин-спинового взаимодействия]. Так, смотрим, [вот красный-1](#), [вот у него кросс-пик \[красный-1/2\]](#), это должен быть H2, поскольку других соседей у него нет. Переходим на другую сторону диагонали, [поднимаемся вверх](#). К сожалению, попадаем в какую-то кучу [сигналов] [вот сюда \[3.5-3.6\]](#). Здесь понять форму линии будет проблематично из-за пересечения с другими сигналами. Зато мы можем запомнить хим. сдвиг ([вот этот - 3.5](#))... И посмотреть, что есть в спектре СН-корреляции.

Здесь несколько сигналов появляется. На этом уровне [протонного хим. сдвига] - [вот этот, вот этот и вот этот \[62/3.5, 69/3.5, 71/3.6\]](#) - всего три варианта. [Вот этот \[62/3.5\]](#) - заведомо H6. Во-первых, потому что хим. сдвиг [62] соответствует незамещенному C6, а другой, даже будучи замещенным, не может оказаться в 62, потому что замещение [увеличивает](#) химический сдвиг на величину 1-10 м.д. (это у вас в условии тоже будет написано). А у соседних [с замещаемым] атомов - уменьшает (может увеличить или уменьшить, ± 2 м.д.). Значит, это «шестой». Кроме этого, одному

сигналу углерода соответствует два кросс-пика в спектре НМРС. Это значит, что у этого углерода два протона. А это только шестой может быть, значит, СН₂-группа. А СН-группа всего одна – вот она, «шестые» глюкопиранозы. Значит, [сюда \[3.5-3.6\]](#) можем сразу подписать «6», но мы еще не знаем, какого цвета, потому что цвета у нас поставлены на [этих \[Н1\]](#) сигналах, а шестой - красный или зеленый, мы пока не знаем. Но так или иначе это шестой, значит, второй уже точно не [здесь \[6.2/3.5\]](#). Значит, второй или [здесь \[69/3.5\]](#) или [здесь \[71/3.6\]](#). Пока так и оставим.

Теперь посмотрим, где Н3. Для этого в COSY проводим [вертикальную линию](#) и находим [еще один кросс-пик \[2/3\]](#). Значит, Н3 где-то [здесь \[~3.6\]](#). Потому что вот [этот \[зеленый-1/2\]](#) не соответствует. Вот [здесь \[красный-1/2 справа от диагонали\]](#) и [здесь \[красный-3/4 справа от диагонали\]](#) химические сдвиги разные, если вы приложите линейку, она у вас косо встанет. Это значит, [кросс-пики] относятся не к одному и тому же сигналу. Значит, 2/3-корреляция находится [где-то здесь \[3.5-3.6\]](#), близко к диагонали или прямо на диагонали, уже не поймешь. Это значит, что Н2 и Н3 находятся (на протонной оси) близко. Смотрим снова [сюда \[НМРС\]](#), где легче выявить сигналы. И видим, что [их тут два \[69/3.5, 71/3.6\]](#). В принципе, еще [этот \[72/3.7\]](#) может быть. Это сейчас он в зеленый окрашен, а у нас [на текущий момент рассуждений] он пока не окрашен. Теперь как нам понять, кто из них [красный-2 и красный-3] справа, кто слева. (...) Для этого надо посмотреть [сюда \[COSY 3.5/3.6\]](#) и увидеть, что снизу от диагонали кросс-пика нет. Если бы Н3 был справа от Н2, кросс-пик был бы [здесь \[под диагональю не месте метки 2/3\]](#) - как раз в том месте, где ничего нет. Значит, от обратного, красный-3 находится слева от красного-2, и [где-то в этой «куче» \[3.5-3.6\]](#).

Теперь, можно ли найти четвертый? Если Н3 слева от Н2, линия 3-4 должна быть чуть левее, чем [линия] 2-3. Линия 2-3 у нас есть, [вот она \[3.5\]](#). И заметим, что слева от нее есть еще [один сигнал \[красный-3/4 справа от диагонали\]](#), который, в принципе, может быть четвертым, но это уже неточно, поскольку им может и [вот этот \[зеленый-4/5\]](#). Дальше можно пойти по одному пути, а если что-то не сложится, вернуться и пойти по другому [пути]. Допустим, пойдем по этому пути. Если, действительно, [это \[красный-3/4 справа от диагонали\]](#) - четвертый (корреляция 3/4), то идем на другую сторону диагонали, [поднимаемся вверх](#) и попадаем [сюда \[4.2\]](#) в какой-то [узкий сигнал \[красный-4\]](#). А теперь смотрим, какой [сигнал] Н4 должен быть [у этого \[остатка глюкозы\]](#), и какой Н4 должен быть [у этого \[остатка фукозы\]](#). Они отличаются как раз *стерео*-конфигурацией четвертого. (...) Вот [глюкопираноза](#), у нее аксиальный Н4, аксиальный Н5 и аксиальный Н3. То есть все они [находятся] в антиперипланарном положении друг к другу. Поэтому Н4 в *глюко*-конфигурации должен быть триплетом с большой КССВ. А [здесь \[в остатке фукопиранозы\]](#) Н4 экваториален, и у него обе константы из-за этого маленькие. Поэтому четвертый [здесь \[у фукозы\]](#) должен быть триплетом с маленькой константой. Если это [сигнал 4.2] - действительно красный-4, то красный [цвет] - это фукопираноза, т.е. *галакто*-конфигурация с экваториально расположенным протоном Н4 (пока как предположение).

Пройдем дальше. Здесь ничего нет вблизи диагонали, поэтому если это [4.2] – Н4, то легко найти Н5. Собственно, вот Н5 [где-то здесь \[4.0\]](#), он пересекся с чем-то еще. И смотрим, у этого Н5 больше нет кросс-пиков (корреляций). А на самом деле, почему такое может быть? Она [корреляция] есть, просто она за пределами этого спектра, потому что Н6 у нас находится где-то [здесь \[справа за пределами слайда\]](#), но только один Н6, [вот этот \[метильная группа фукозы\]](#). А Н6 глюкозы где-то в [этой куче \[3.5-3.6\]](#). Вспоминаем, что Н6 фукозы – это метил, он здесь не нарисован. Корреляция Н5 фукопиранозы со своим же Н6 находится где-то за пределами спектра, поэтому сюда не попала. А вот у этого (предположительно Н5, если мы с красным-4 не ошиблись) больше нет других кросс-пиков. Только [этот \[4.05 на левом пунктире над диагональю\]](#) с Н4 и [диагональный](#). Что как раз

подтверждает гипотезу о том, что именно этот Н5 связан с «шестым» метилом. Значит, как рабочую гипотезу можно нарисовать красные цифры так, как они нарисованы здесь. А дальше заняться зелеными и посмотреть: если там противоречий не будет, и [зеленые числа] действительно приходятся на другие сигналы, значит, спорное предположение спорное на счет 3/4 [что кросс-пик 3.55/4.2] относится именно к этой корреляции] было правильным.

Попробуем «пройтись» по зеленым. 1/2 – очевидная корреляция, вот она [4.8/3.8]. И здесь нам повезло: Н2 – **отдельно стоящий** [3.8]. От Н2 ищем Н3. Это **диагональ**, вот Н3, тоже **отдельно стоящий** [3.4]. У Н3 [остается незадействованным] только один кросс-пик (есть [кросс-пик] с Н2, **диагональный**, и [кроме них] остался **только один** [3.4/4.0]). (...повторение...) Значит, **это** [4.0] – Н4. Смотрим на его форму... Простите, смотрим на форму Н3! (...) У Н3 [наблюдается] широкий триплет. Значит, у него оба соседа - в антиперипланарном положении. Это значит, что протон зеленый-4 находится в аксиальном положении [как и зеленый-2 и зеленый-3]. Что подтверждает, что зеленый – это, стало быть, глюкопираноза, потому что **здесь** [у фукозы] Н4 - **вот такой экваториальный**, и Н3 у него был бы другой формы (одна константа была бы маленькой, та, которая с Н4). Итак, **это Н3**, по его форме мы можем сказать, что зеленый [цвет] – это именно **этот остаток** [глюкозы]. То есть пока противоречий нет (...).

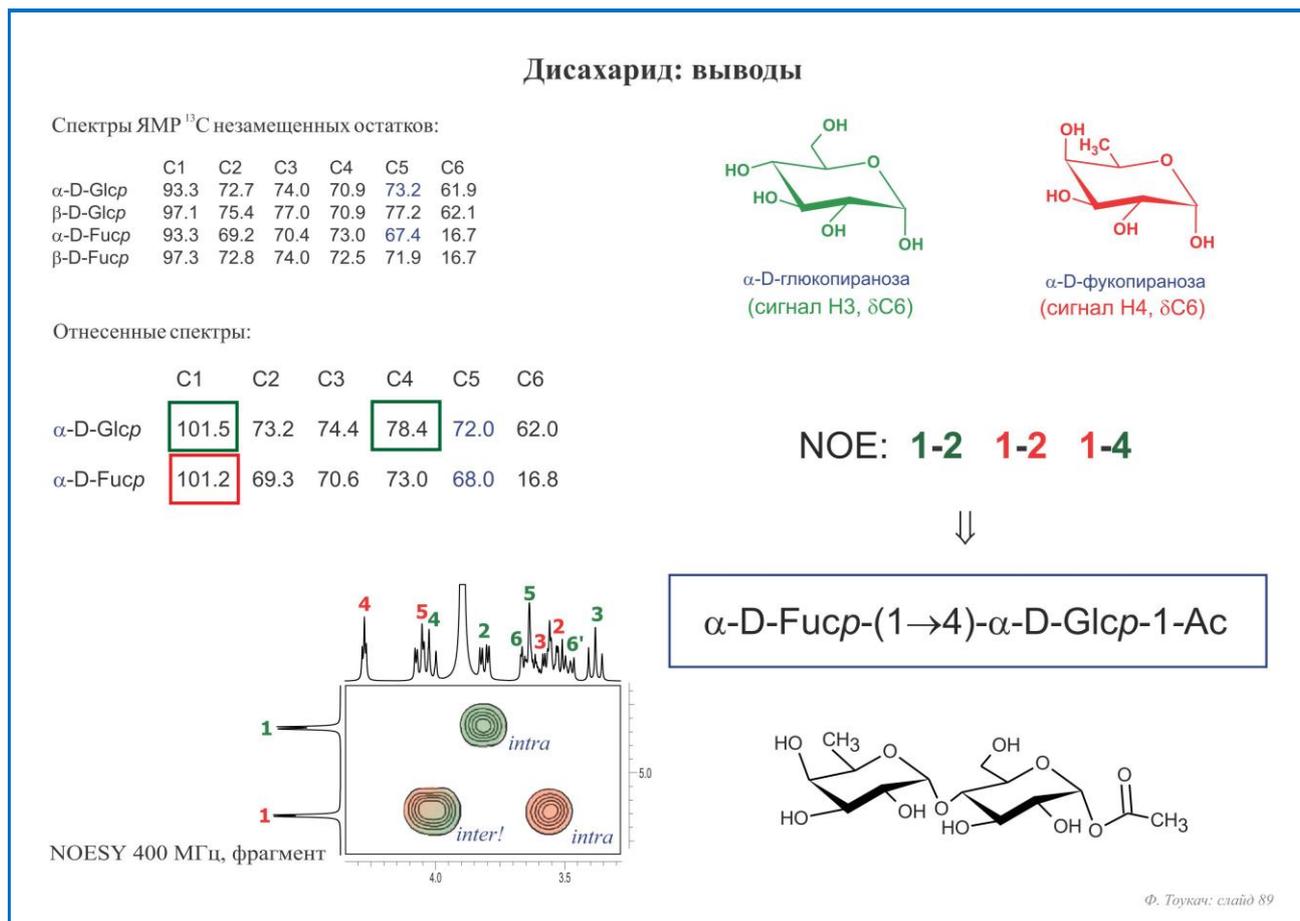
Далее, от Н4 находим Н5. Извиняюсь, от Н3 находим Н4. **Вот Н3** [3.4], вот единственный его оставшийся **кросс-пик** [3.4/4.0], **здесь** [4.0], значит, находится Н4. Он совпал (частично) с красным-5. У зеленого-4 тоже никаких пересечений нет, кроме диагонали у него еще один кросс-пик, **вот этот** [4.0/3.65], который ничем иным, кроме Н5, быть не может. Идем **сюда** [3.6], находим Н5. Форму пятого вообще здесь сложно предсказать, поскольку у него три соседа с разными константами, и, по идее, это должен быть сигнал DDD. То есть восемь линий. Но обычно разрешения не хватает, и там какая-то мешанина получается, тем более, что он здесь пересекается с другими сигналами. То есть он где-то здесь, не конкретно **эта высокая линия**, а что-то в этой области. И должны быть еще шестые. Что у него есть? У него есть [кросс-пики] только **здесь** [вблизи диагонали]. Это, видимо, примерно в том же месте, где находились красный-2 и красный-3. Что подтверждается **этим фрагментом** [3.5-3.7] в СН-корреляции. Значит, **где-то здесь** [3.5-3.7] - два Н6 и, видимо, они находятся рядом, потому что иначе между ними была бы мощная корреляция через геминальную константу ~12 Гц. А здесь единственное, что может быть - тоже в этой области. То есть, красные-2 и -3 и оба зеленых-6 также, как и зеленый-5, все находятся в **этой области** [3.5-3.7]. Теперь, Н6 мы уже можем нарисовать зелеными, **вот эти** [на линии 62 в НМРС].

Зеленые-2, -3 и -5 – **это три сигнала** [зеленые кросс-пики в диапазоне 72-75 в НМРС]. Кто из них кто, как понять? Для этого нам, во-первых, надо посмотреть, кто правее, кто левее (в случае с красными, мы это уже сделали). Красный-3 должен быть левее, чем красный-2¹⁵². А где по отношению к ним зеленый-5 находится? Надо посмотреть на 4/5-корреляцию здесь. И она явно **из трех корреляций** [красный-1/2, красный-2/3, зеленый-4/5] - самая левая. Значит, зеленый сигнал – самый левый. Стало быть, из **этих трех** [69-72/3.5-3.7 в НМРС] зеленый - **вот этот** [72/3.65]. А из красных «второй» правее, «третий» левее, значит, **это - третий**, а **это – второй**. Можно **прямо здесь подписывать** [на НМРС], но я **здесь** [на проекции COSY] подписал.

Берем линейку, **идем сюда** [стрелки на НМРС] и находим нужный сигнал, измеряем его химический сдвиг по шкале, вспоминаем. С остальными все попроще, потому что там однозначное отнесение, то есть просто берем и проводим **вот так** [углом вниз и влево]. И получаем на выходе, во-первых, правильно раскрашенный спектр ¹³C с возможностью измерить хим. сдвиги, а, во-вторых,

¹⁵² В лекции ошибочно сказано наоборот, в стенограмме правильно.

понимание того, что красный – это **этот [остаток фукозы]**, а зеленый – **этот [остаток глюкозы]**. Теперь нам нужно их [остатки] соединить.



#89 Это копия таблицы, которая была в условии. Поскольку они у нас оба α , как мы уже знаем из протонного спектра, смотрим на первые строчки [в каждой паре] и сравниваем с этими хим. сдвигами. А это - то, что мы измерили в отнесенном спектре ^{13}C [снизу от таблицы]. И получается, что некоторые из них близки [к значениям для незамещенных остатков], а некоторые очень неблизки. Например, глюкопираноза-C2. Здесь [в таблице] смотрим α -глюкопираноза-C2. Здесь – 72.7 [таблица], а здесь – 73.2 [отнесение]. [Разница] 0.5 м.д., можно сказать, что близки. А вот, к примеру, четвертый [глюкозы] здесь – 70.9, а здесь – 78.4. Это уже «неблизки». Попарно сравнивая [хим. сдвиги], смотрим, где большие отличия. Я их обвел, чтобы вам не искать. Два атома отличаются у зеленого, и один атом отличается у красного, первый.

Здесь всего три остатка, и чисто из комбинаторики получается всего два варианта того, как их можно соединить. Либо эти [сахарные] «первые» связаны друг с другом, а уксусная кислота идет в зеленый-4, либо красный-1 связан с зеленым-4, а уксусная кислота идет тогда в зеленый-1.

(... диалог со студентом ...) Да, [разница] в пределах 0.5 м.д. в ^{13}C означает, что отличий можно сказать, что нет. То есть там какие-то эффекты, которые мы не можем учесть, вот они как раз в пределах 0.5-1.0 м.д. А если он отличается на 3 м.д., точнее больше, чем на 3 м.д., значит, в этом положении возникла химическая связь. То есть, когда возникает связь через кислород, химические сдвиги меняются на какую-то величину («эффект замещения»), этот эффект составляет на том атоме, который образовал связь, от 2 до 10 м.д., а на соседних от -2 до +2 (иногда от -3 до +3). На соседнем [с положением замещения атоме хим. сдвиг] может и уменьшиться, и увеличиться, а на «своем» [д положении замещения] всегда увеличивается. То же самое относится к сложноэфирным связям через фосфор или серу, тоже часто встречается.

Итак, у нас два варианта [соединения остатков], нам нужно между ними выбрать. Для этого посмотрим на NOE. Здесь приведен только фрагмент NOESY с интересным для нас сигналом, (...) т.е. задача для вас упрощена (из NOESY вырезана именно та часть, которая для нас важна). И в этой части (...) надо попробовать сделать отнесение всех сигналов. [Здесь \[верхний ряд\]](#) – зеленый-2 [на верхней проекции] и зеленый-1 [на левой проекции]. Значит, очевидно, это NOE внутри остатка [глюкозы] между H1 и H2. А [здесь \[нижний ряд\]](#) первый красный имеет два кросс-пика. Смотрим на [этот кросс-пик \[слева\]](#). Он приходится на [красный-5](#) и на [зеленый-4 \[на верхней проекции\]](#), одно из двух. Теперь смотрим [на структуру \[остатка фукозы\]](#). [Красный-1](#) с [красным-5](#) «смотрят» в разные стороны. То есть между ними NOE быть не может. Если бы была β -конфигурация, тогда мы бы ожидали сигнал между первым и своим же пятым. А поскольку здесь α -конфигурация, [этот смотрит сюда \[вправо, H1\]](#), а [этот смотрит сюда \[вниз, H5\]](#), между ними не должно быть NOE. Значит, [этот сигнал \[5.2/4.0\]](#) – это контакт между [красным-1](#) и [зеленым-4](#), т.е. трансгликозидный контакт между разными остатками (вот он выписан). А [третий контакт \[справа в нижнем ряду\]...](#) Это - [первый \[5.2\]](#), с чем он здесь может быть? Он может быть или с [красным] H3, или с [красным] H2, или с [зеленым] H6, или... или все сразу. [Для начала рассмотрим] [красный-1](#) с [зеленым-6](#). Это может быть... Если вы соберете шаростержневую модель, поймете, что если [красный-1](#) «идет» [образует связь] в [зеленый-4](#), то у него еще может быть контакт с [зеленым] H6, а может и не быть. Но для нас это не очень важно. Но зато с [красным] H2 он точно должен быть, потому что они более или менее в одну сторону смотрят у красного (впрочем, так же, как и у зеленого). А [здесь \[3.55 на верхней проекции\]](#) как раз H2 находится. То есть [это \[5.2/3.6\]](#) – контакт H1-H2.

Таким образом, из NOE мы получили [такие три контакта \[после метки NOE:\]](#). Из них [один - разноцветный \[5.2/4.0\]](#), он позволяет сказать, что [этот \[первое положение фукозы\]](#) «идет» [сюда \[четвертое положение глюкозы\]](#). А значит, методом исключения – да, все правильно – укусная кислота методом исключения «идет» [сюда \[зеленый-1, рамка в отнесении\]](#).

Здесь нам в некотором смысле повезло, что они оба были α , и у нас не было проблем с определением аномерной конфигурации. Если бы они были разные, мы бы не смогли на основании протонного спектра так сделать. Пришлось бы посмотреть на константу [$^3J_{H1-H2}$] после отнесения, когда мы бы уже поняли, какой из остатков красный, какой зеленый (после этого смотрим на ширину дублета H1, измеряем константу H1-H2 и делаем вывод, β она или α). И можно еще и по [хим. сдвигу] C5 посмотреть. C5 не может быть замещен, потому что при нем нет «гидроксила». Это значит, что химические сдвиги C5 сильно не изменятся при образовании связи между остатками. Дальше смотрим на наши C5 – [72 м.д. и 68 м.д. \[синий шрифт\]](#). А теперь смотрим [на эти \[в таблице\]](#). Разница между α и β весьма существенна, и 72 определенно ближе к 73 чем к 77, поэтому можно сказать, что по хим. сдвигу C5 мы говорим, что «зеленый» остаток имеет α -конфигурацию. Аналогично по хим. сдвигу C5 68 в «красном» остатке мы можем сказать, что он тоже имеет α -конфигурацию. Принцип такой: выбрать отсюда те атомы, которые не могут быть замещены, и опираясь на химические сдвиги, определить аномерную конфигурацию или что-то еще, что вам нужно будет определить. Поскольку задачи две (одна только что закончена), я предлагаю сейчас сделать короткий перерыв перед следующей задачей, чтобы посередине не прерываться.

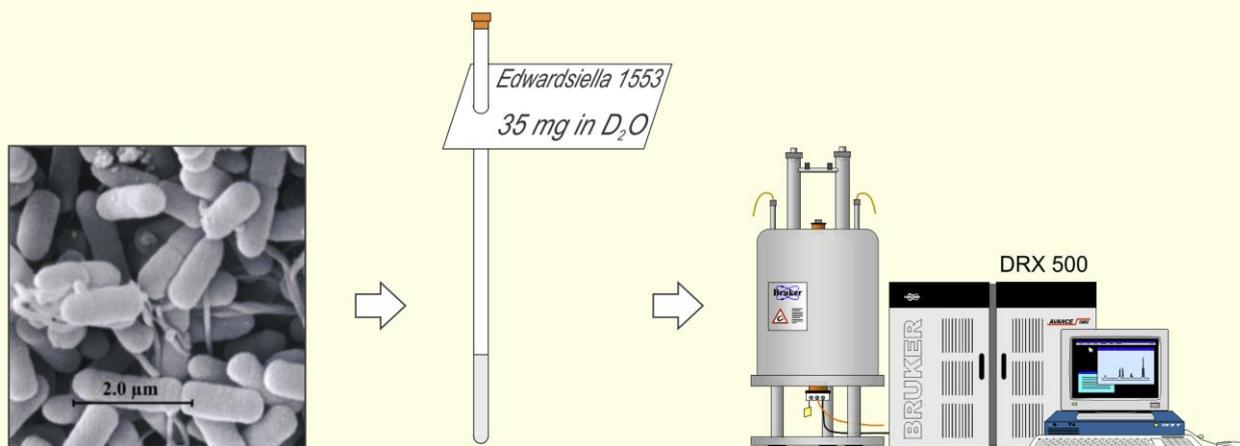
Реальное исследование

Edwardsiella tarda (штамм 1153)

(энтеробактерия морских животных и рептилий + причина гастроэнтерита)

Из клеточной стенки *Edwardsiella* 1153 выделен О-антигенный полисахарид.
Спектр ^{13}C приобрел признаки регулярности после де-О-ацетилирования образца.

ГЖХ (Sugar analyzer): присутствуют как минимум **GlcN**, **Gal**, **GalA** в неизвестных пропорциях



Edw #15 (object) Итак, пример №2. Он сделан на основании реального исследования. Полисахарид (мой любимый пример - углеводный), выделенный из клеточной стенки бактерии, которого удалось получить 35 мг. Только на основании ЯМР эту задачу решить не очень просто, хотя невозможным это тоже не является. И поэтому сначала сняли ГЖХ гидролизатов. То есть гидролизовали образец и посмотрели на газожидкостном хроматографе, чему соответствуют пики отдельных остатков. И получились **вот такие три пика [GlcN, Gal, GalA]**. Пропорции из ГЖХ выявить не удалось, в каком соотношении эти три компонента присутствуют в структуре, [остается неясным]. Кроме этого, если какой-то **новый** компонент или компонент, для которого нет стандарта в ГЖХ, присутствует в структуре, мы тоже его в ГЖХ-спектре не увидим. Поэтому из ГЖХ можно сделать вывод, что **это [GlcN, Gal, GalA]**, скорее всего, есть (в неизвестной пропорции), но, возможно, есть что-то еще. Обозначения, чтобы дальше было понятно: глюкозу вы уже видели (глюкопиранозу), а вот **это N** означает, что у нее во втором положении - аминогруппа. **Галактоза [Gal]**: вы видели пример фукопиранозы, которая у нас была [в предыдущей задаче] - это галактоза, у которой в шестом [положении] CH_3 -группа вместо CH_2OH . Значит, это тоже самое. Отличаются **стерео**-конфигурацией C_4 **друг от друга [Gal от GlcN]**. А вот **эта буква A** означает, что шестой экзоциклический атом окислен. То есть вместо CH_2OH в галактозе (теперь уже, в галактуроновой кислоте), будет карбоксил.



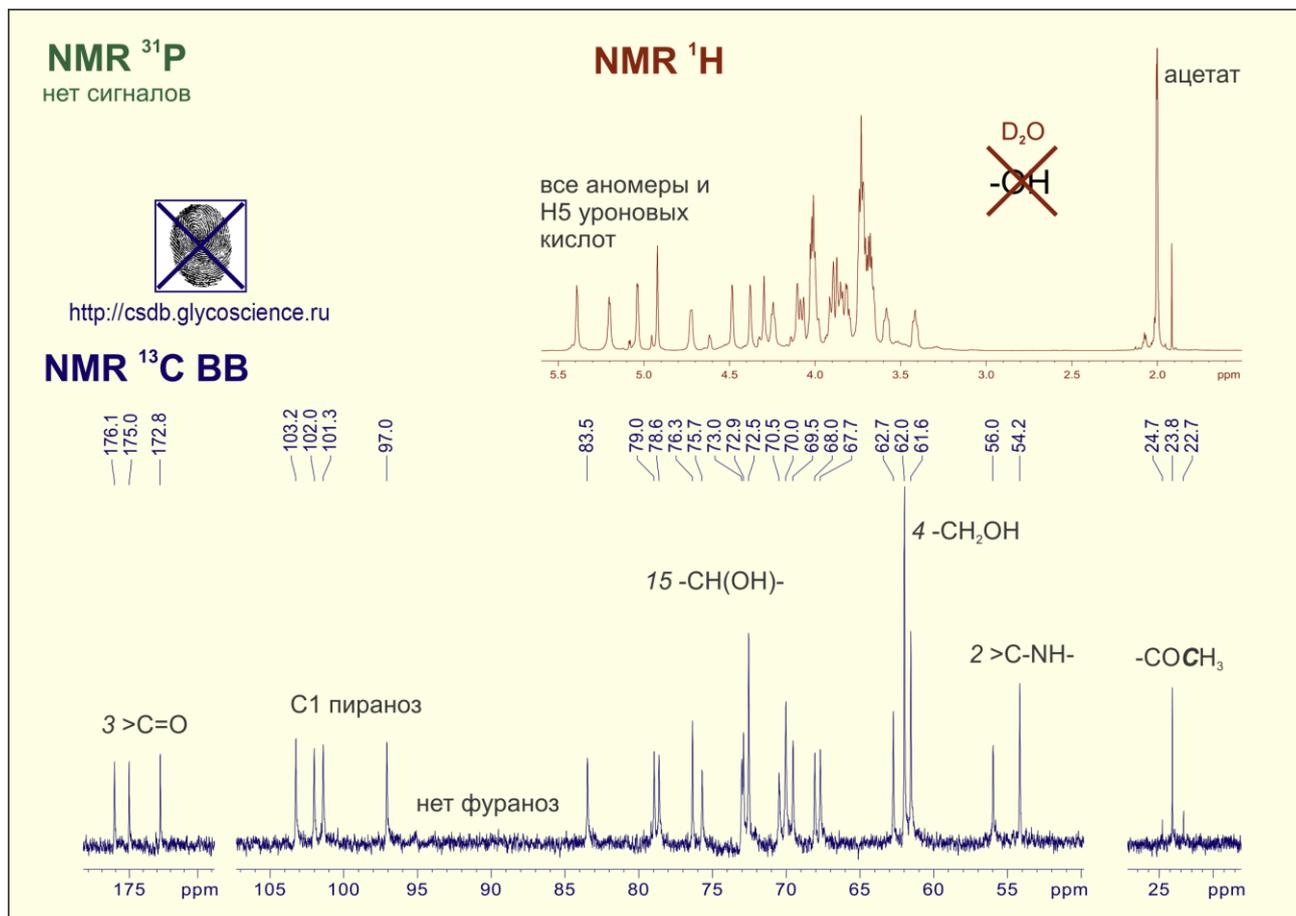
Edw #16 (scheme) Теперь прикинем, что, собственно, с этим делать. Какие эксперименты какую информацию дадут? Поскольку эта задача сложнее, [чем предыдущая,] просто глядя на спектры [решить ее не получится], сразу мозаика не складывается. Поэтому нужно знать, какие эксперименты заказать в центре коллективного пользования, и что с ними делать. Здесь [показан] примерный ход этого исследования. Центральным является **отнесение протонного спектра** и следующее из него через СН-корреляцию **отнесение углеродного спектра**. А дальше конкретная информация о структуре получается путем сопоставления уже имеющейся информации с данными каких-то экспериментов. Эти эксперименты показаны синим. Например, если у нас есть **отнесение спектра ^{13}C** и **позиции замещения**, то через анализ **эффектов гликозилирования** мы можем получить **абсолютные конфигурации**, и так далее. Здесь немного проще был случай, потому что не все эти эксперименты понадобились. С другой стороны, основное отличие от предыдущей задачи – там было известно, что за остатки, а здесь не известно. То есть это природное соединение, еще нужно их [структуру] установить. (...) ГЖХ дает нам мономерный состав, но вместе с отнесением спектров. Кроме этого некоторые эксперименты здесь **показаны зеленым цветом** – это не ЯМР-эксперименты: ГЖХ и варьирование pH. **Этот эксперимент [варьирование pH]** сводится к тому, чтобы подкислить образец и снова снять спектры, посмотреть, что изменится – сигналы заряженных групп «поедут». Сами карбоксилы и аминогруппы, а также то, что находится рядом с ними, будет «съезжать» при изменении pH. Но аминогруппы [будут «съезжать»] только в том случае, если они незамещенные, то есть могут образовать NH_3^+ (а в нашем случае она будет замещенной).

И вот еще **звездочка** – это абсолютные конфигурации. Абсолютные конфигурации иногда можно понять из ЯМР, иногда нельзя, в зависимости от конкретного случая. Выявление абсолютных конфигураций базируется на том, что эффекты замещения (то, насколько изменится хим. сдвиг ^{13}C в том положении, в котором остаток образовал связь) зависят от того, одинаковы ли абсолютные конфигурации связываемых остатков или они разные. То есть для пары DD и для пары LL эффект

[замещения] будет одинаковый, но он будет отличаться от эффекта для пары DL или LD. Это значит, что, анализируя эти эффекты, можно понять конфигурации одних остатков относительно других. Условно, обозначить их X или Y и сказать, что, допустим, эти три остатка все имеют одну и ту же абсолютную конфигурацию, а этот имеет другую. А какая она конкретно (D или L) уже надо подтвердить чем-то еще. Но в большинстве случаев один из этих двух наборов оказывается очень маловероятным. Если у вас получилось подряд три L-глюкозы или три D-аминокислоты в природном пептиде, это значит, [что абсолютные конфигурации,] скорее всего, неправильные. Значит, у нас [в образце] полный энантиомер, то есть нужно все инвертировать. С другой стороны, конечно, при таком подходе никто никогда L-глюкозу и не откроет, если она будет [присутствовать в молекуле]. Поэтому обычно хотя бы один остаток подтверждают оптическим методом, гидролизуют, конъюгируют с какой-то хиральной молекулой типа изооктанола¹⁵³, точнее *втор*-октанола (вторичного) и в зависимости от положения пика говорят, D-остаток или L-. От него «раскручивают» все остальные [абсолютные конфигурации] с помощью ЯМР. Это тоже не всегда получается, потому что при *некоторых* комбинациях остатков эффекты замещения оказываются малочувствительными к абсолютным конфигурациям. Особенно это бывает тогда, когда связь образует атом, протон при котором занимает экваториальное положение. То есть, к примеру, связь 1-4 в галактозу. Если у нас есть галактоза (у которой H4 - как раз экваториальный протон), и обе связи, которые она образует, являются связями 1-4 в галактозу (в нее что-то приходит в C4, и она своим C1 идет в C4 какой-нибудь другой галактозы), шансов определить ее абсолютную конфигурацию через ЯМР нет. Поэтому ее так или иначе придется выделить, конъюгировать с чем-то оптически активным и через ГЖХ посмотреть абсолютную конфигурацию.

Так, что еще здесь важно? Могут попасться фосфорсодержащие фрагменты. Имеет смысл сразу проверить, есть они или нет - просто снять одномерный спектр по фосфору, если в нем нет сигналов, значит, вся часть, связанная с фосфором, отпадает. А если в нем есть сигнал, то дальше РН-корреляция помогает. РН – это не кислотность в данном случае, а «фосфор-протонная», она помогает определить, куда именно идет фосфор. И [также следует использовать] щепление в протонном спектре на атомах фосфора. Фосфор магнитно-активен, то есть на нем есть щепление. Это значит, что можно снять спектр с развязкой от фосфора и без развязки, сравнить, посмотреть, где сигналы изменились, и если их окажется не десять штук, а, к примеру, два или три, сказать, что именно эти два или три атома близки к фосфору и, скорее всего, образуют фосфодифирную связь. Эти названия экспериментов вам уже известны из предыдущих лекций, поэтому не буду на них задерживаться.

¹⁵³ Изооктанол не подойдет, он не хирален:)



Edw #17 (1D) Итак, смотрим на спектры. Сначала снимаем одномерные спектры: протоны, ^{13}C и ^{31}P . «В фосфоре» ничего нет, видимо. Нет сигналов, значит, фосфора в молекуле нет. Далее, спектр ^{13}C . Считаем сигналы, вычисляем... то есть не вычисляем, а смотрим хим. сдвиги и «копируем» их в какую-нибудь базу данных, где можно попробовать найти соединение по fingerprint'у. Потому что обидно будет, если мы потратим два дня на интерпретацию этих спектров, а потом выяснится, что эту структуру уже до этого кто-то открыл и описал, и достаточно было просто провести поиск в базе данных. Ищем в какой-нибудь базе данных. В данном случае не нашли ничего похожего, делаем вывод, что, скорее всего, это новое соединение, и имеет смысл установить его структуру.

Что по протонам можно сказать? Наличие ацетата [2.0]. Все аномерные сигналы находятся здесь [4.7-5.5], но, к сожалению, невозможно понять, то ли их четыре, то ли пять. Вот этот [4.6] уже вряд ли, а вот осталось пять больших сигналов. Разрешение здесь не такое хорошее, как было в предыдущей задаче, маленькие константы мы не видим из-за ширины линии. И большие иногда тоже не видим, поскольку это реальный образец. Но здесь же [>4.5] может быть и Н5 уроновых кислот. То есть остатков сахаров, у которых окислен атом С6. А такой остаток, предположительно, есть, поскольку ГЖХ показало наличие галактурановой кислоты. Значит, наверное, один из этих сигналов – это Н5 галактурановой кислоты. И тогда получается, что еще четыре – это Н1 сахаров. То есть можно сделать предварительный вывод о том, что у нас [в молекуле] четыре остатка. Теперь смотрим на ^{13}C и сразу видим подтверждение в области «первых» (тех, у кого два [атома] кислорода рядом), [здесь 95-105] четыре сигнала находятся. Значит, там четыре сахарных остатка и, возможно, еще какие-то несхарные остатки.

Дальше написано: «нет фураноз». Фуранозы – пятичленные циклы; они всегда дают сигналы между 85 и 95, это их C2 или C4¹⁵⁴. Если таких сигналов нет, значит, все остатки находятся в пиранозной (шестичленной) или линейной форме. В шестичленной намного более вероятно.

Теперь смотрим [сюда \[173-177\]](#) на карбонилы, три СО-группы. С учетом того, что есть ацетат, как минимум одна из них – это уксусная кислота, одна из самых распространенных модификаций природных биополимеров. Также можно посмотреть [вот сюда \[54-56\]](#) и увидеть два сигнала в районе 55 м.д. Для СНОН-групп характерный диапазон хим. сдвигов – 68..75 (если они незамещенные). А у замещенных, соответственно, [хим. сдвиг] еще больше будет. То есть у нас незамещенные, [вот здесь \[центр спектра\]](#). И если мы видим сигналы с меньшими химическими сдвигами [, чем 60], это признак того, что вместо кислорода там находится азот. Он тоже «утягивает» сигнал по отношению к СН₂-группе, но не так сильно, как кислород. И здесь есть [два сигнала](#). Непонятно, то ли один из них вдвое больше другого, то ли из-за шумов так получилось. Как минимум, мы видим какие-то сигналы [вот таких углеродов \[>СН-НН-\]](#), связанных с азотом. При этом вспоминаем, что «при прочих равных» уксусная кислота биохимически «сядет» на азот, а не на кислород. То есть если в молекуле есть аминогруппы, и есть остатки уксусной кислоты, очень вероятно (хотя и не 100%), что уксусная кислота присоединится по аминогруппе, а не по ОН-группе. То есть, у нас будет N-ацетат с учетом того, что есть три СО-группы, точно есть хотя бы один ацетат, и два углерода, связанных с азотом. Это уже позволяет сопоставить [сигналы и предположить], что, может быть, там две таких группы [NAc].

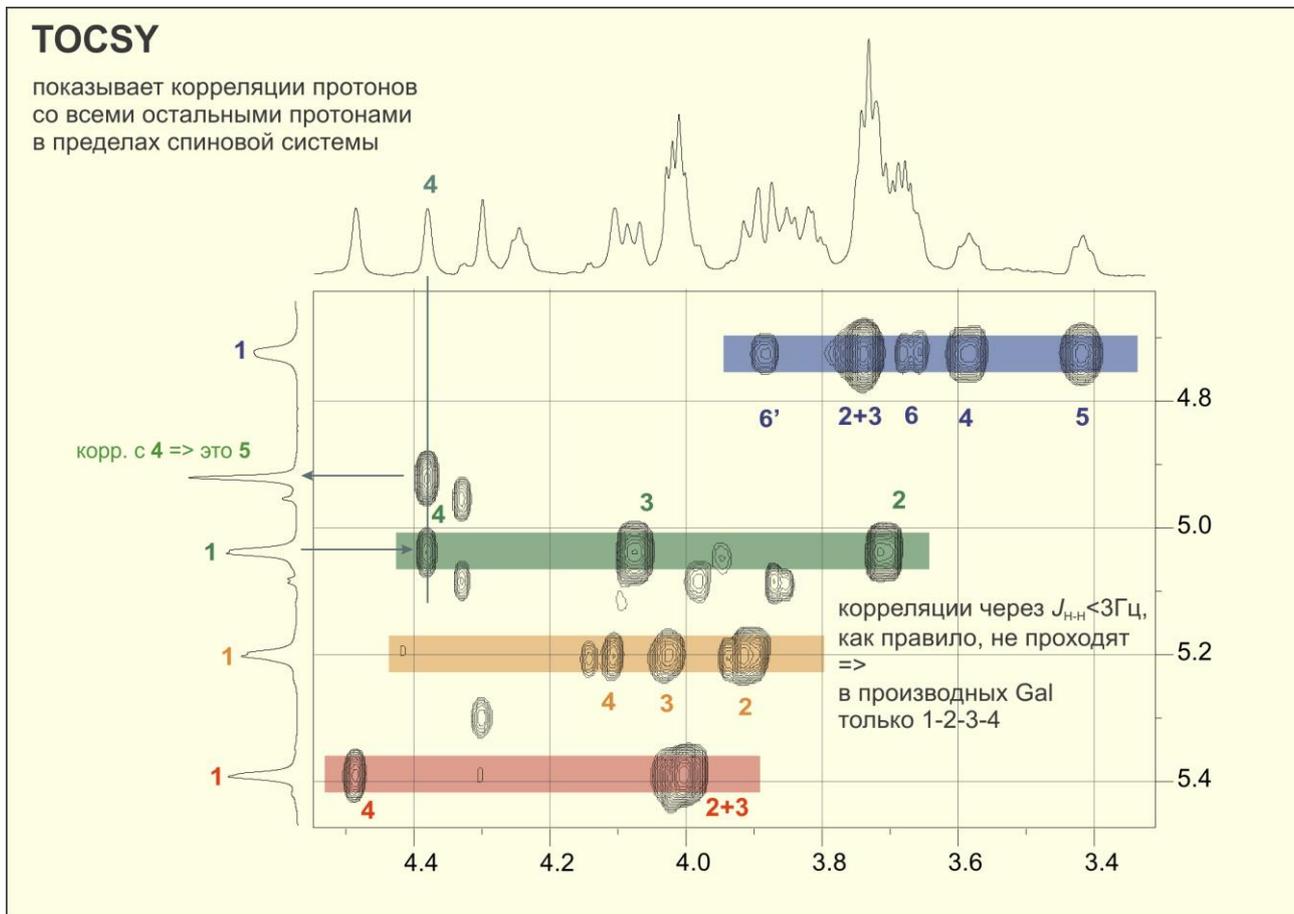
Далее, смотрим на [область незамещенных -СН₂ОН \[60-65\]](#), и их тут как минимум четыре штуки. Мы видим три сигнала, один очень большой (то ли два совпало полностью, то ли симметричная симметричный остаток, в котором СН₂ОН-группы «торчат» в одну сторону¹⁵⁵ от центрального атома и дают один сигнал, оба). То есть [здесь \[60-65\]](#) или четыре, или пять [вот таких \[-СН₂ОН\]](#).

А дальше считаем оставшиеся остатки, ой... оставшиеся сигналы. Я здесь посчитал, получилось 15 штук, и сопоставил [число сигналов с числом атомов в пиранозах]. Что это значит? Если у нас четыре пиранозы (по числу аномеров) и все они – гексозы (т.е. наиболее распространенные, содержащие шесть атомов), всего должно быть 24 сигнала. Здесь в спектре явно больше. То есть, присутствует еще какой-то остаток, видимо, неуглеводный. Но так или иначе, [эти 15 \[65-85\]](#) соответствуют четверем гексозам. Из этого можно сделать вывод, что нет пентоз, и нет гептоз. Или есть пентозы и гептозы, но они друг друга компенсируют (по числу остатков), но это менее вероятно. Первое, что можно предположить – это четыре гексозы. Еще нужно быть осторожным, потому что не всегда можно точно посчитать сигналы. Например, [вот это \[73\]](#) - один или два? Так что точность подсчета сигналов получается ±1. И если ваше предположение не укладывается [в требуемое число сигналов] даже с учетом такой точности, значит, что оно, скорее всего, неправильное. А если укладывается, его можно рассматривать, как рабочую гипотезу. Итак, предварительные выводы сделали. Предположительно четыре углеводных остатка и еще какой-то [неуглеводный]. Если мы посчитаем сигналы, мы увидим, что в этом «еще каком-то» два сигнала.

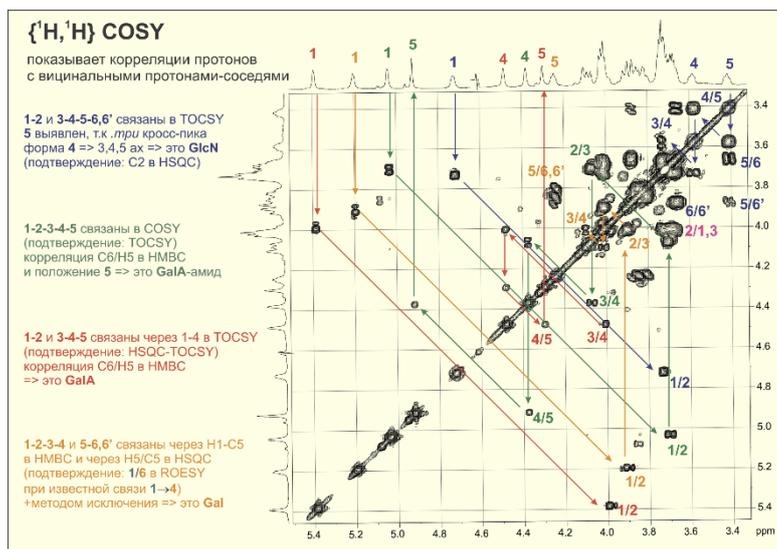
(...вопрос про ацетаты...) Не, ацетат мы тоже уже посчитали [как часть углеводного остатка]. Ацетат - вот один, его [метильная группа \[24\]](#) (или два совершенно одинаковых). Получается, вот из

¹⁵⁴ с высокой вероятностью только С4.

¹⁵⁵ Здесь не принципиально, в одну или в разные стороны, а важно, что СН₂ОН-группы могут быть эквивалентны за счет симметрии остатка или вращения вокруг связей.

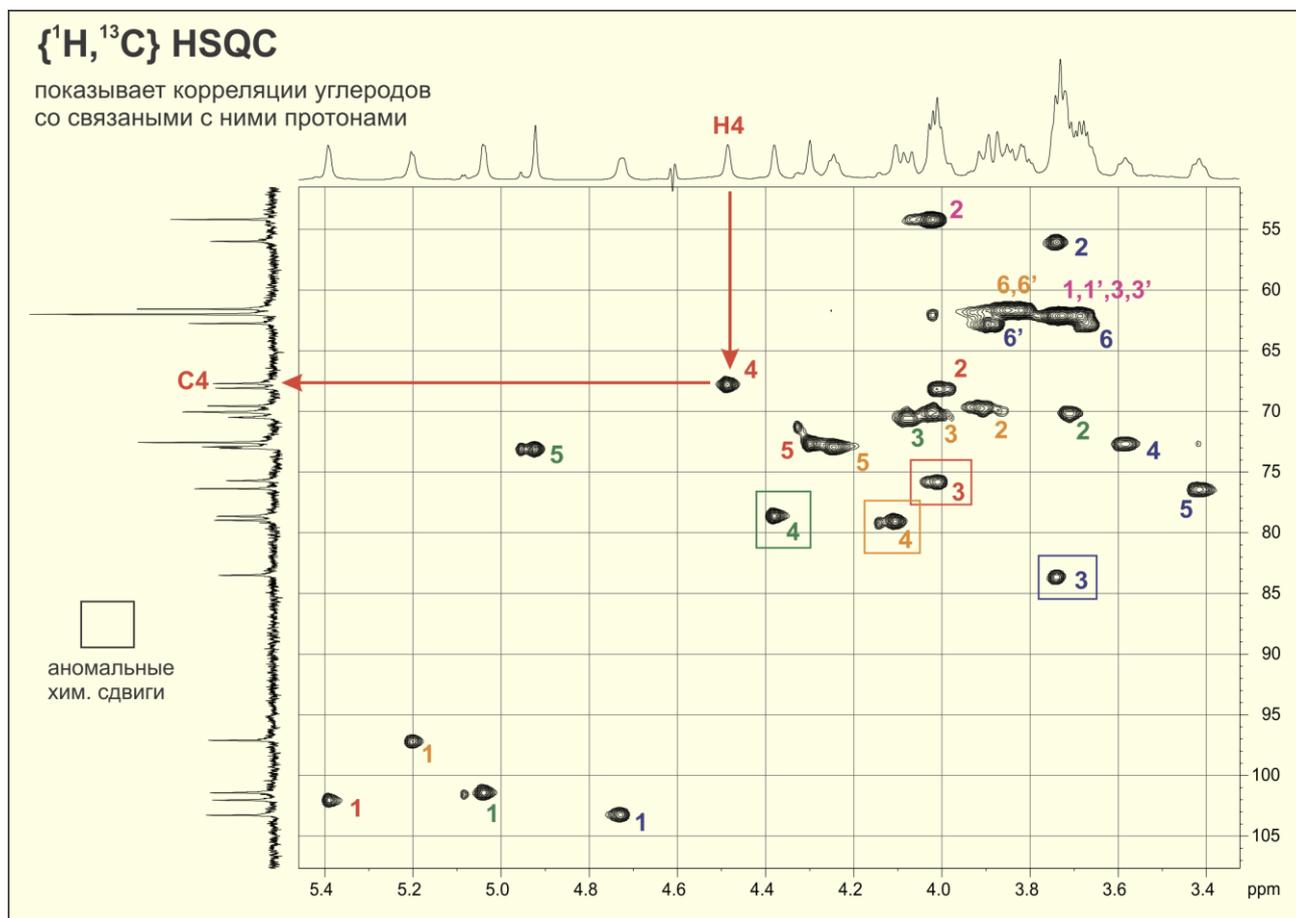


Edw #19 (TOCSY) Но у нас есть спектр TOCSY, вот **этот [сигнал] H1 [4.7]**, обозначенный синим. И мы в TOCSY видим **какое-то количество сигналов [на линии 4.7]**; это все сигналы той же спиновой системы. Среди них – и H2 находится **вот здесь [2+3]** (из COSY мы знаем, что H2 находится здесь). Считаем их общее количество и видим, что сигналов на один меньше, чем мы ожидаем атомов с учетом того, что 6 и 6' разные. Но **один из них [2+3]** очень большой. И значит, здесь, скорее всего, два [сигнала], тем более, что у него еще сбоку горб. Поскольку [рассмотренные синие] кросс-пики в COSY как раз концентрируются вблизи диагонали, то есть H2 и H3 находятся рядом, можно предположить, что и H3 тоже находится **здесь [3.7-3.8]**. То есть, **это [2+3]** - объединенный кросс-пик 1/2 и 1/3. А остальные [сигналы этого остатка] на основании TOCSY мы можем только покрасить в синий цвет, но пока не знаем, кто из них какое «число».



Edw #18 (COSY) Зато, мы теперь вернемся снова к COSY, и уже зная, какие из этих сигналов - синие (в частности, **эти два сигнала [4 и 5]**), посмотрим на них и попробуем с этой [с правой] стороны пойти, к примеру, от **этого сигнала [3.4]**. Идем от него и сразу же видим **три кросс-пики [на линии 3.4]**. А что такое три кросс-пики в сахаре? Это только H5 может быть, потому что у него три соседа: два H6 и один H4. У всех остальных меньше соседей - или два или (у H1) один сосед. Значит, **это H5 [3.4]**. А то, что он синий, мы уже знаем из TOCSY. Из его кросс-пиков два H6 и один H4. Как можно отличить их друг от друга?

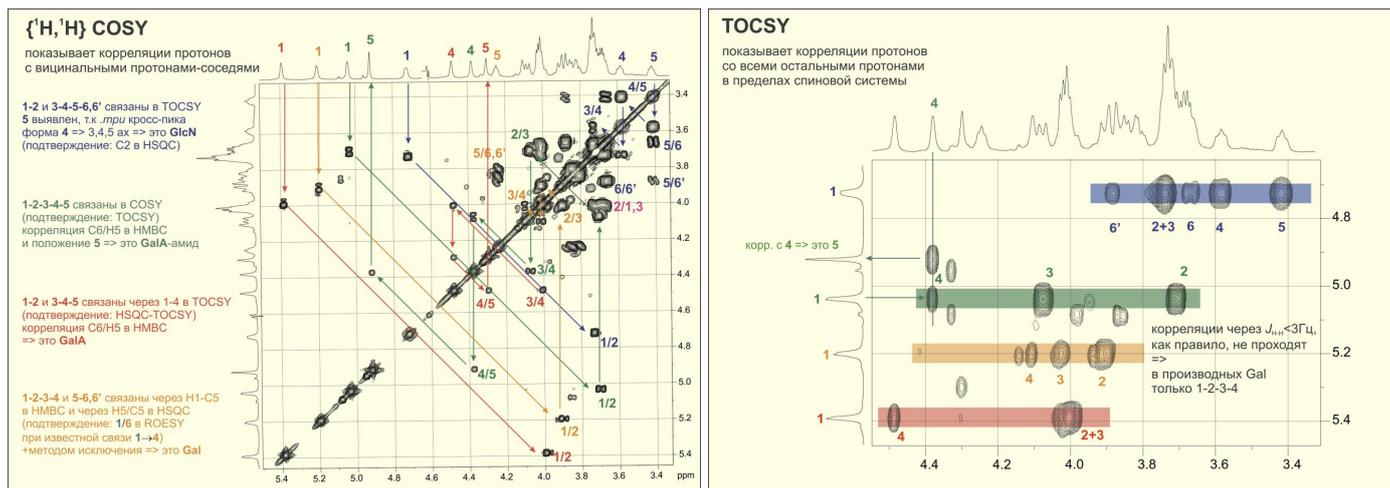
Так, что Н6 еще и между собой должны взаимодействовать. То есть, из **этих трех сигналов** [3.4/3.6, 3.4/3.65, 3.4/3.9], которые Н4 и два Н6, находим те два из них, у которых есть взаимодействие друг с другом. **Вот оно** [6/6']. Значит, **эти два** [3.65 и 3.9] – это Н6, а **это** [3.6] методом исключения получается Н4. Написали сюда 6', 6, 4, а **это 5**; поскольку все это находится на той же самой линии [в TOCSY], что и 2+3, делаем вывод, что это принадлежит одной спиновой системе. То есть написали все синие цифры. Здесь даже не важно, какие именно линии [относятся к этим сигналам], поскольку много пересечений, но важно, что мы знаем их хим. сдвиги [, исходя из положения кросс-пиков]. Теперь смотрим на форму Н4 и Н5. По пятому здесь тяжело судить, почему от трех «соседей» такая [форма] получилась. Но зато у Н4 [тоже] широкий триплет. Это значит, что Н3, Н4 и Н5 - все аксиальные протоны. То есть это или глюкоза, или манноза (манноза отличается положением Н2)¹⁵⁶.



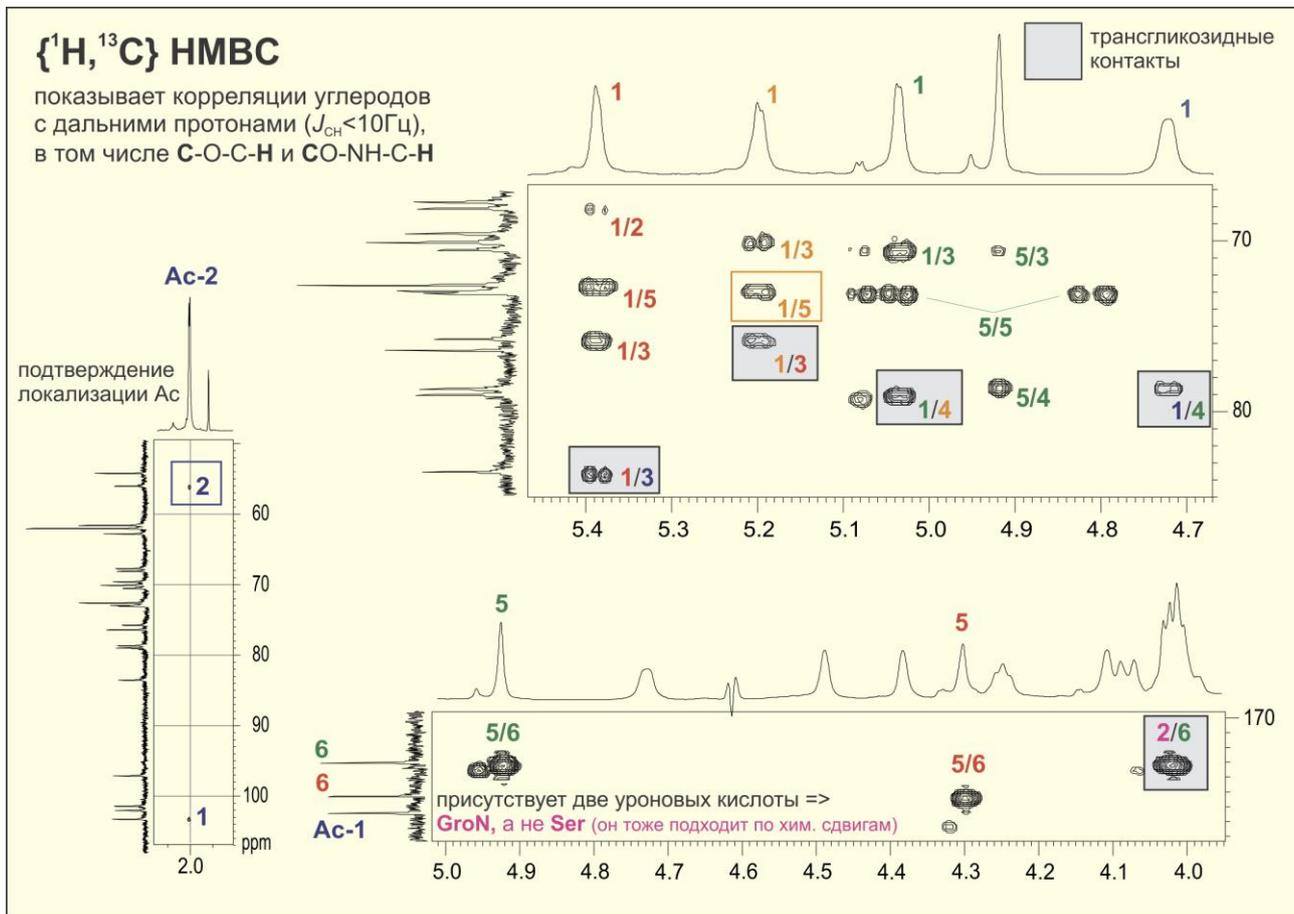
Edw #20 (HSQC) Теперь можно попробовать понять, что у нее [у «синего» остатка] с Н2. Форму сигнала здесь невозможно понять, поскольку в этом месте много других сигналов. Но вспоминаем, что в ГЖХ у нас маннозы не было, а остаток с *глюко*-конфигурацией был. Так что пока рабочая гипотеза, что синий – это остаток с *глюко*-конфигурацией. Теперь смотрим **сюда** [линия 3.75 в HSQC]. На этой линии, где был его Н2 и Н3, есть как минимум один замещенный ([определено] по химическому сдвигу 85) и, как минимум, один [углеродный атом,] несущий азот. (...) Может быть или азот во втором положении и остаток замещен по третьему, или азот в третьем положении и остаток замещен по второму. Вспоминаем, что в ГЖХ у нас был глюкозамин, то есть глюкоза, замещенная азотом по второму положению. Значит, пока еще не доказанная, но рабочая гипотеза, что из этих двух вариантов у нас [реализуется следующий:] азот находится на С2 (по химическому сдвигу 55 в ^{13}C), а замещена она, соответственно, в третьем [положение]. Таким образом, пока можно

¹⁵⁶ или их производные.

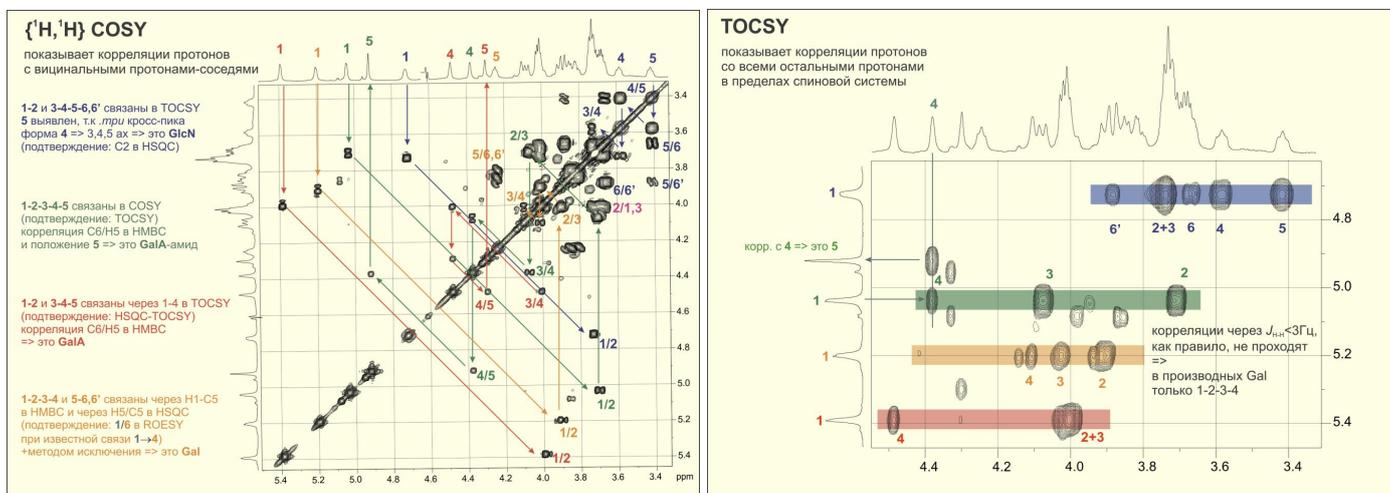
сделать вывод, что это глюкозамин. Его сигналы можно исключить, уже их осталось меньше, идем дальше.



Edw #18 (cosy) Смотрим на этот сигнал [5.05]. Здесь H2 тоже попал куда-то в эту область [3.7-3.8 в COSY], поэтому из COSY однозначно только H2 определяется, **Edw #19 (tocsy)** но зато в TOCSY у нас есть три сигнала [зеленая линия в TOCSY]. А что значит, что в сахаре их три? Значит, что взаимодействие не дошло до H5 и H6, скорее всего. Почему это может быть? Потому что маленькая КССВ между H4 и H5, и [взаимодействие] «не прошло» от H1 дальше [H4]. А маленькая константа может быть как раз в случае *галакто*-конфигурации, когда в четвертом положении протон экваториален. То есть можно предположить, что эти три сигнала [зеленая линия в TOCSY] (неизвестно пока в каком порядке, но, тем не менее) - это H2, H3 и H4. При этом один из них, вот этот [4.4], имеет кросс-пик в TOCSY еще и с чем-то [4.9], что мы вначале приняли за (...) H1. Значит, это, видимо, не H1. В этом месте может быть только H5 уроновой кислоты. Отсюда вывод, что эта штука [сигнал 4.9] коррелирует с чем-то зеленым, не являясь при этом H1. H2, H3 и H4 уже заняты, H6 здесь быть не может, значит, это H5, исходя из этих трех корреляций [4,3,2] и этой [4.4/4.9]. А раз это - H5 [4.9], значит, это - H4 [4.4], а не H2 и не H3. Значит, остаются этот и этот [3.7 и 4.1] - H2 и H3. **Edw #18 (cosy)** А понять, кто из них кто, можно по COSY, потому что в COSY есть корреляция 1/2. 2/3 тоже есть, просто она - в «куче» других сигналов и ее не видно, а 1/2 видно. Таким образом, мы подписали [зеленые] H2, H3 и H4. По химическим сдвигам H4 и H5 можно предположить *галакто*-конфигурацию (а также по отсутствию H5 и H6 здесь [на зеленой линии в 11:07 TOCSY]). И то, что пятый имеет такой хим. сдвиг, [позволяет] предположить (но пока не доказать), что это уроновая кислота, тем более, что у нас в ГЖХ есть галактуоновая кислота. Значит, вывод: зеленое - это предположительно она [GalA].



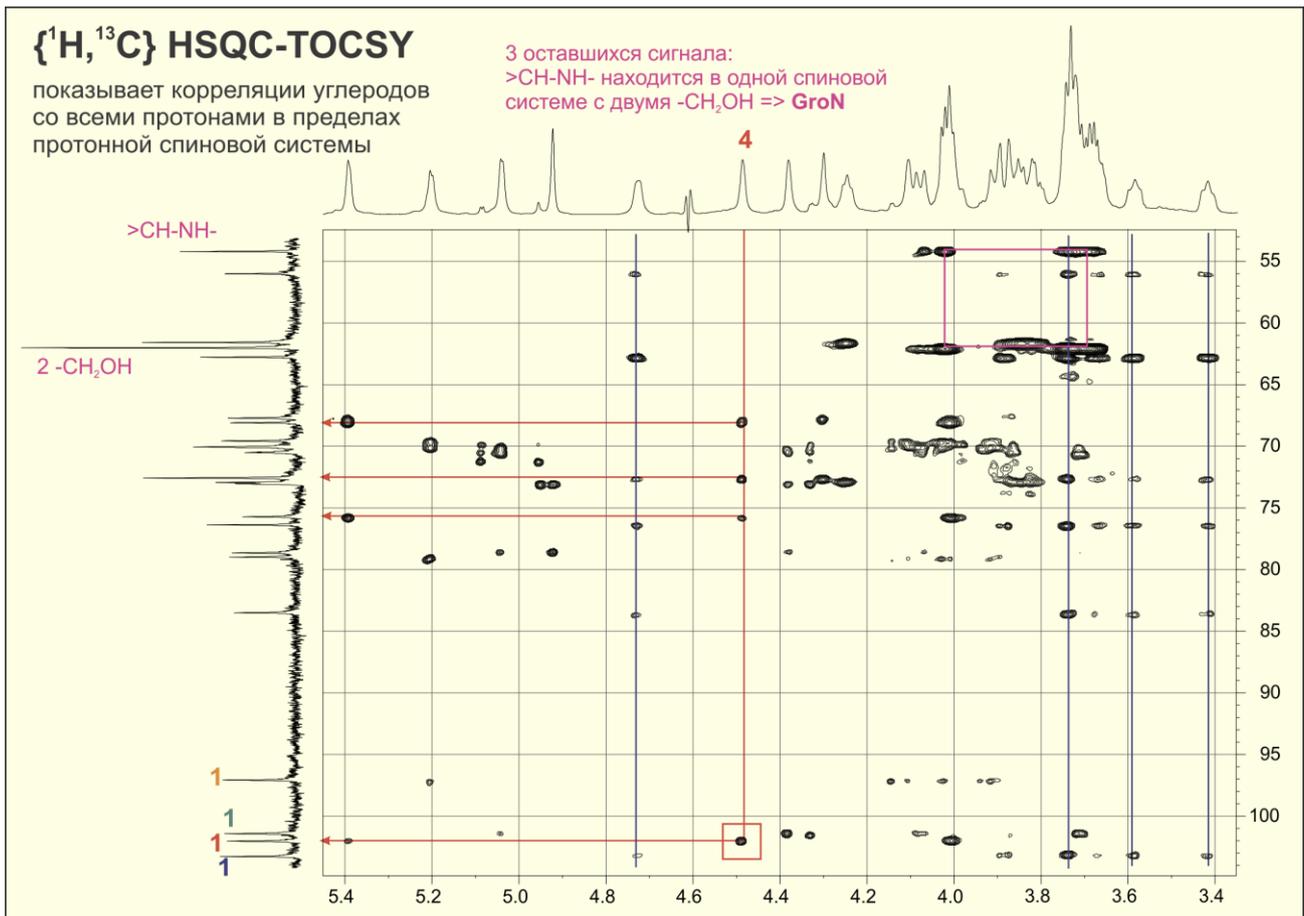
Edw #24 (HMBC) Это предположение нужно еще доказать, а для этого посмотрим на HMBC. Напоминаю, что HMBC – это СН-корреляция через маленькие константы, то есть через две-три связи. И здесь у нас одна из СО-групп имеет корреляцию [173/4.9, 5/6] с найденным H5. Это значит, что C6 представлен углеродом, связанным двойной связью с кислородом, что теперь уже доказывает, что это карбоксильная группа. А по химическому сдвигу вот этого [5] еще и можно определить, что она замещена, то есть это не свободный карбоксил, а карбоксил, на котором «висит» что-то еще, образовав сложноэфирную связь. Итак, какое здесь доказательство? Наличие кросс-пика между H5 и C6 в спектре HMBC.



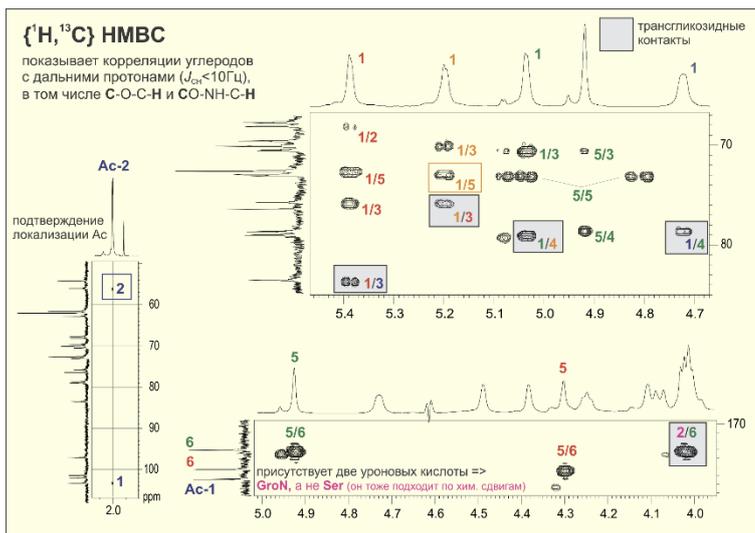
Edw #18 (COSY) Возвращаемся снова к COSY. Теперь красный, тут ситуация близка к синему. То есть в COSY удалось только [корреляцию] 1/2 найти [5.4/4.0]. H3, H4, H5¹⁵⁷ мы обнаружили в

¹⁵⁷ H5 в TOCSY не обнаружили, только H2, H3 и H4.

TOCSY. Edw #19 (TOCSY) Здесь H2 и H3 тоже совпали - один большой кросс-пик [2+3]. И H4 тоже здесь [в слабопольной области, 4.5] - в принципе, на галакто-конфигурацию похоже.

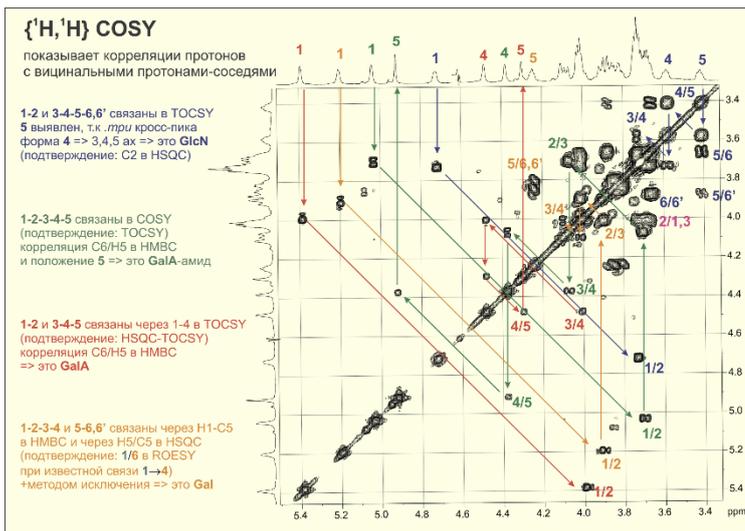


Edw #21 (HSQC-TOCSY) Но здесь нам еще помог спектр HSQC-TOCSY (комбинированная корреляция). [Рассмотрим] как раз этот протон красный-4, который мы выявили в TOCSY (что он красный и четвертый, а не тот большой кросс-пик, где H2 и H3 пересеклись). И по нему смотрим на «углероды». Мы можем от этого красного углерода [1] прийти сюда [4 на протонной проекции], а от него прийти к остальным углеродам, и покрасить углеродные сигналы, обозначенные здесь стрелками, в красный цвет. А зная, какого они цвета, в обычной CH-корреляции перейти от этих сигналов обратно к сигналам в протонном спектре и, сопоставив их с TOCSY, сделать отнесение этой части протонного спектра. Это те же самые рассуждения, что были для «зеленого», только не такой очевидный TOCSY [нет контакта 4/5], поэтому понадобился HSQC-TOCSY. Следует еще доказать, что это галактуронозная кислота.



Edw #24 (HMBC) И это доказательство снова присутствует в HMBC в виде сигнала, связывающего H5 с углеродом в карбонильной области. То есть, это [4.3, 5] – H5 остатка, у которого шестой представлен карбоксильной группой. С учетом того, что по ГЖХ есть галактуронозная кислота, одна – это зеленая, а вторая, видимо, красная. Это соотносится с количеством сигналов в [спектре] ^{13}C : две карбонильных группы (точнее, там три карбонильных группы, но

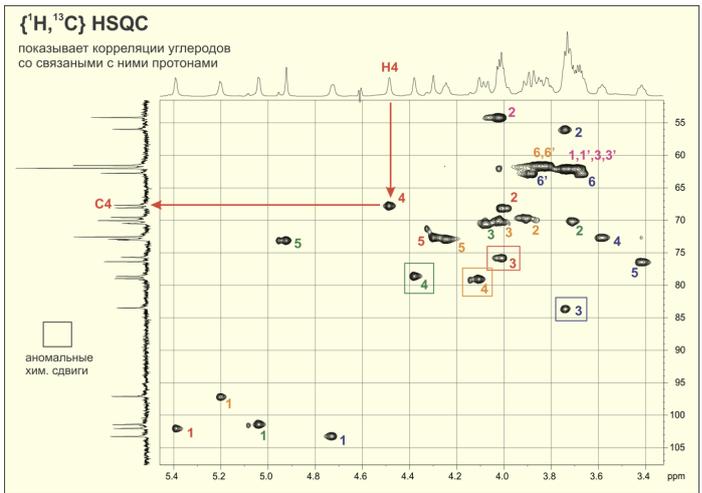
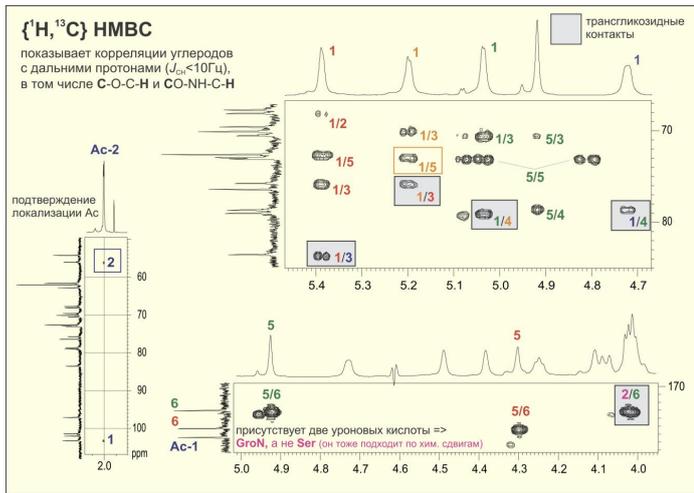
одна из них – это ацетат, поскольку еще есть сигналы у его метильной группы, а две другие – это, видимо, две этих галактуроновых кислоты [«зеленая» и «красная»]).



Edw #18 (COSY)

Последний

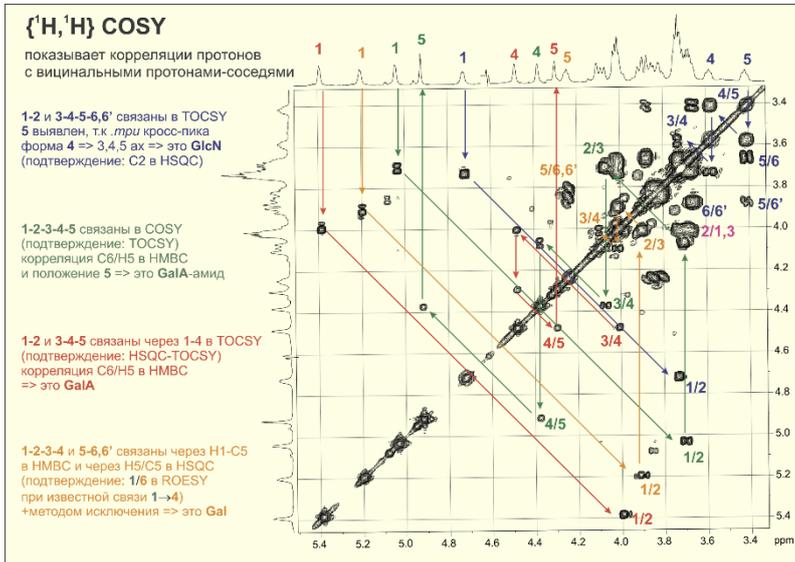
оставшийся - оранжевый. Сейчас посмотрим, что здесь. Здесь в COSY немного получше, удалось дойти до H4. Вот его H2 [3.9], вот H3 [4.0], вот H4 [4.1]. А между H4 и H5 корреляции не наблюдается, что тоже характерно для галактозы, но, как минимум, у нас есть цепочка 1-2-3-4. (...) В TOCSY H5 и H6 тоже нет, т.е. по TOCSY не удалось пройти дальше H4, и по COSY не удалось.



Edw #24 (HMBC)

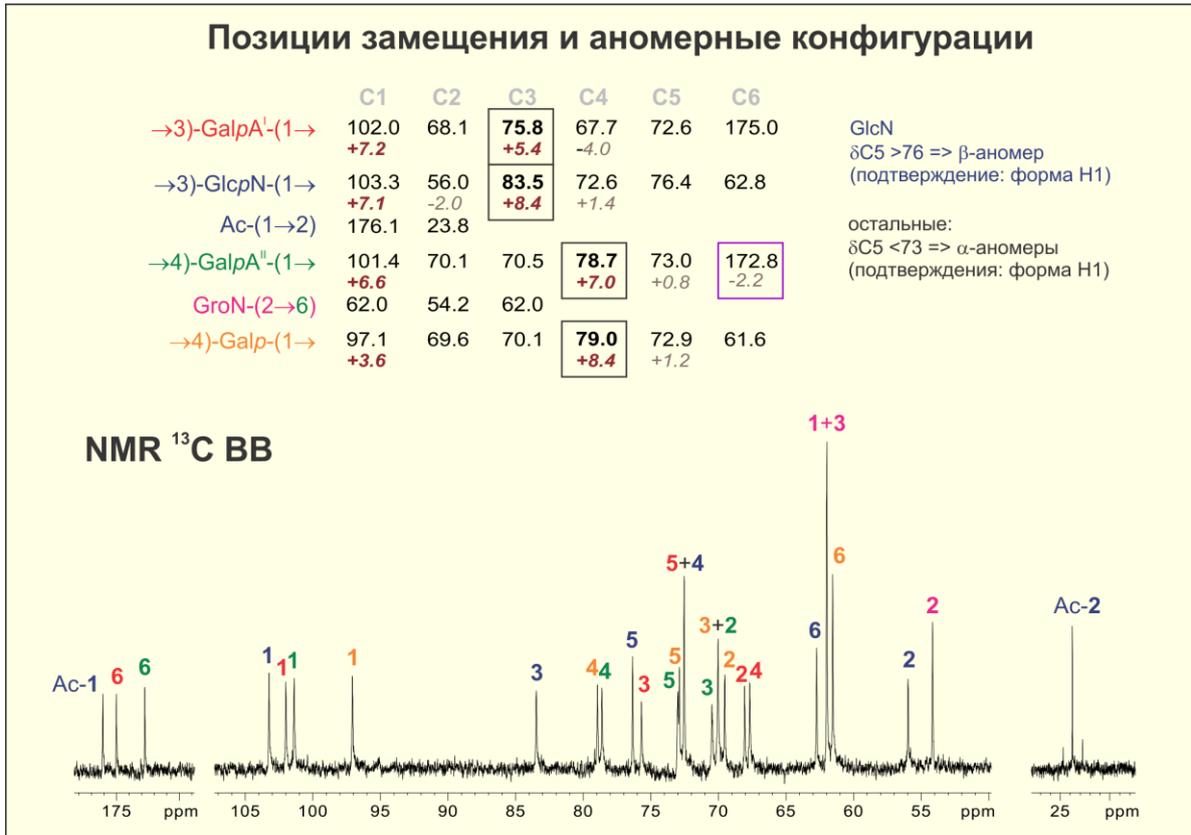
Тем не менее, во-первых, есть контакт H1/C5 в HMBC [73/5.2]. H1 мы уже знаем, где, потому что сюда [5.2] мы уже оранжевую единичку приписали. А в HMBC спектре есть, в том числе и контакты внутри остатков. Это контакты первого протона с C3 и с C5 в пределах того же остатка. Здесь значимый для нас контакт обведен [1/5]. Пока что мы еще не знаем, кто из них - третий, а кто - пятый¹⁵⁸. Это параллельно с рассмотрением спектра HSQC нужно было делать, в котором есть прямая протон-углеродная корреляция. Но так или иначе на последующем этапе наличие этой корреляции позволяет нам связать C5 (неизвестно чей) с этим протоном оранжевым-1 [5.2]. Следовательно, сказать, что этот сигнал (C5) имеет оранжевый цвет, а раз он имеет оранжевый цвет, мы его можем покрасить в СН-корреляции. **Edw #20 (HSQC)** Где он? Вот он [73/4.25]. [Теперь мы можем] найти его протон, сказать, что вот это [4.25] – оранжевый-5.

¹⁵⁸ Это можно выяснить, найдя соответствующие им сигналы в HSQC и сравнив их хим. сдвиги ¹H с известным из COSY положением H3.



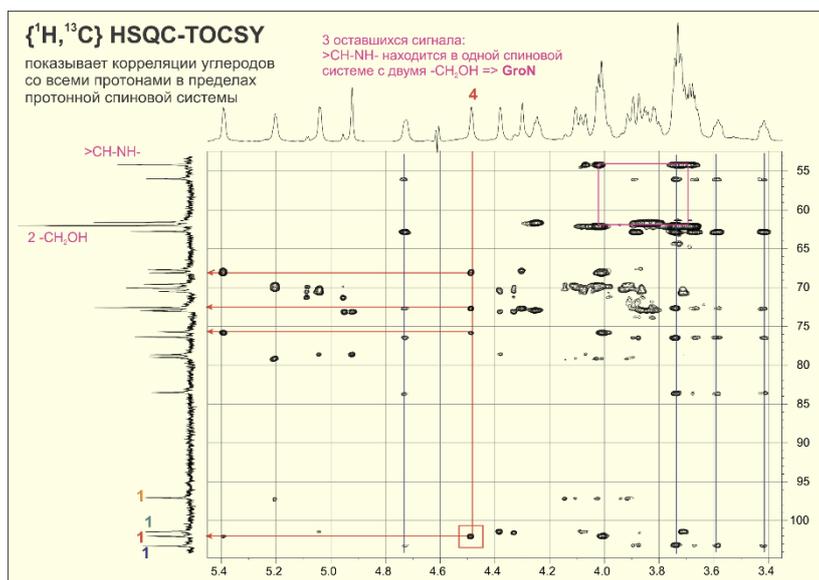
Edw #18 (COSY) А вот у **этого сигнала [4.25]** в COSY уже есть кросс-пик, **вот он [4.25/3.85]**. Это кросс-пик H5 с двумя H6. Естественно, сразу в такой последовательности [отнесение] не всегда бывает очевидно, поэтому нужно попытаться «зайти» разными способами и увидеть здесь еще одно подтверждение. У нас в спектре ROESY потом, когда мы уже последовательность определили, получилась связь из зеленого-1 в оранжевый-4. А в спектре ROESY в таких случаях часто бывает контакт H1 [замещающего остатка] также и с H6 [замещаемого остатка], а поскольку там этот контакт есть, мы делаем вывод, что этот «шестой» - скорее всего, действительно оранжевый, что соотносится с нашими выводами, сделанными из COSY. Таким образом, с помощью других спектров мы связали **эту часть спиновой системы (1-2-3-4)** и **эту часть спиновой системы (5-6,6')** и поняли, что она одного цвета. Как теперь определить, что это за остаток? Здесь это пока проблематично сделать, косвенно в пользу галактоконфигурации свидетельствует отсутствие корреляций 1/5 и 1/6 в TOCSY, но это именно косвенное свидетельство. С другой стороны, у нас [по данным о мономерном составе из] ГЖХ незадействованной осталась только галактоза. То есть можно пока предположить методом исключения, что оранжевый – это галактоза. А потом, когда у нас уже структура будет, доказать это.

[замещаемого остатка], а поскольку там этот контакт есть, мы делаем вывод, что этот «шестой» - скорее всего, действительно оранжевый, что соотносится с нашими выводами, сделанными из COSY. Таким образом, с помощью других спектров мы связали **эту часть спиновой системы (1-2-3-4)** и **эту часть спиновой системы (5-6,6')** и поняли, что она одного цвета. Как теперь определить, что это за остаток? Здесь это пока проблематично сделать, косвенно в пользу галактоконфигурации свидетельствует отсутствие корреляций 1/5 и 1/6 в TOCSY, но это именно косвенное свидетельство. С другой стороны, у нас [по данным о мономерном составе из] ГЖХ незадействованной осталась только галактоза. То есть можно пока предположить методом исключения, что оранжевый – это галактоза. А потом, когда у нас уже структура будет, доказать это.

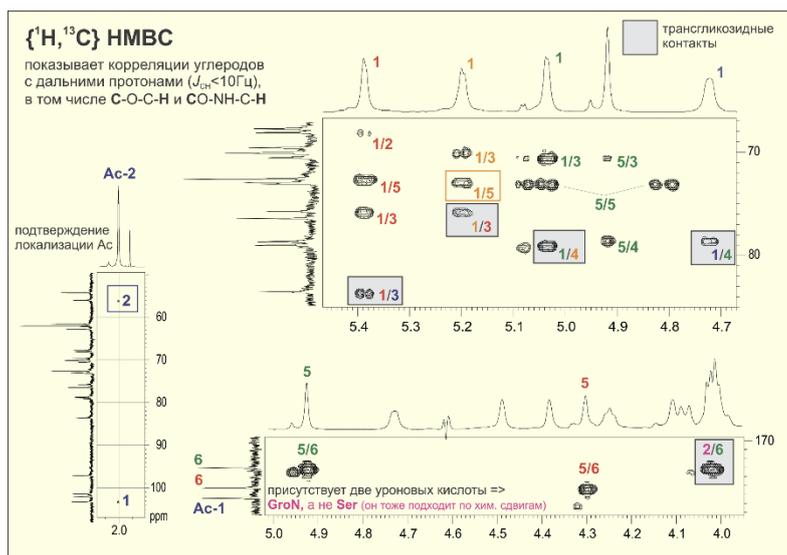


Edw #22 (¹³C) Итак, есть предположение (в чем-то доказанное, в чем-то не очень) о мономерном составе и о том, кто какого цвета, и отнесение хотя бы самых значимых сигналов в протонном спектре. После этого мы смотрим на все спектры, чтобы убедиться, что там нет противоречий нашим

выводам. Если их там нет, подписываем все сигналы [в HSQC], то есть делаем отнесение углеродного спектра, и видим две вещи. Во-первых, что **четыре сигнала [в рамках]** имеют аномально высокие химические сдвиги. Это те места, в которых произошло замещение. Во-вторых, мы видим, что некоторые сигналы остались неподписанными. Здесь они **подписаны розовым**. Написаны числа, но на данном этапе мы про эти числа еще ничего не знаем, мы просто можем их раскрасить каким-то пятым цветом (здесь был выбран розовый). И увидим, что это «куча» сигналов в районе CH_2OH -групп и один сигнал – углерод, связанный с азотом. Сразу возникает [предположение], что это (во-первых) может быть аминокислота, которая своим «вторым», то есть аминогруппой, амидирует карбоксил уруновой кислоты. Но тогда должна быть еще одна карбоксильная группа, пришедшая из аминокислоты, а все карбоксильные группы у нас уже заняты уруновыми кислотами, поэтому [предположение об аминокислоте] маловероятно. Значит, это что-то другое.



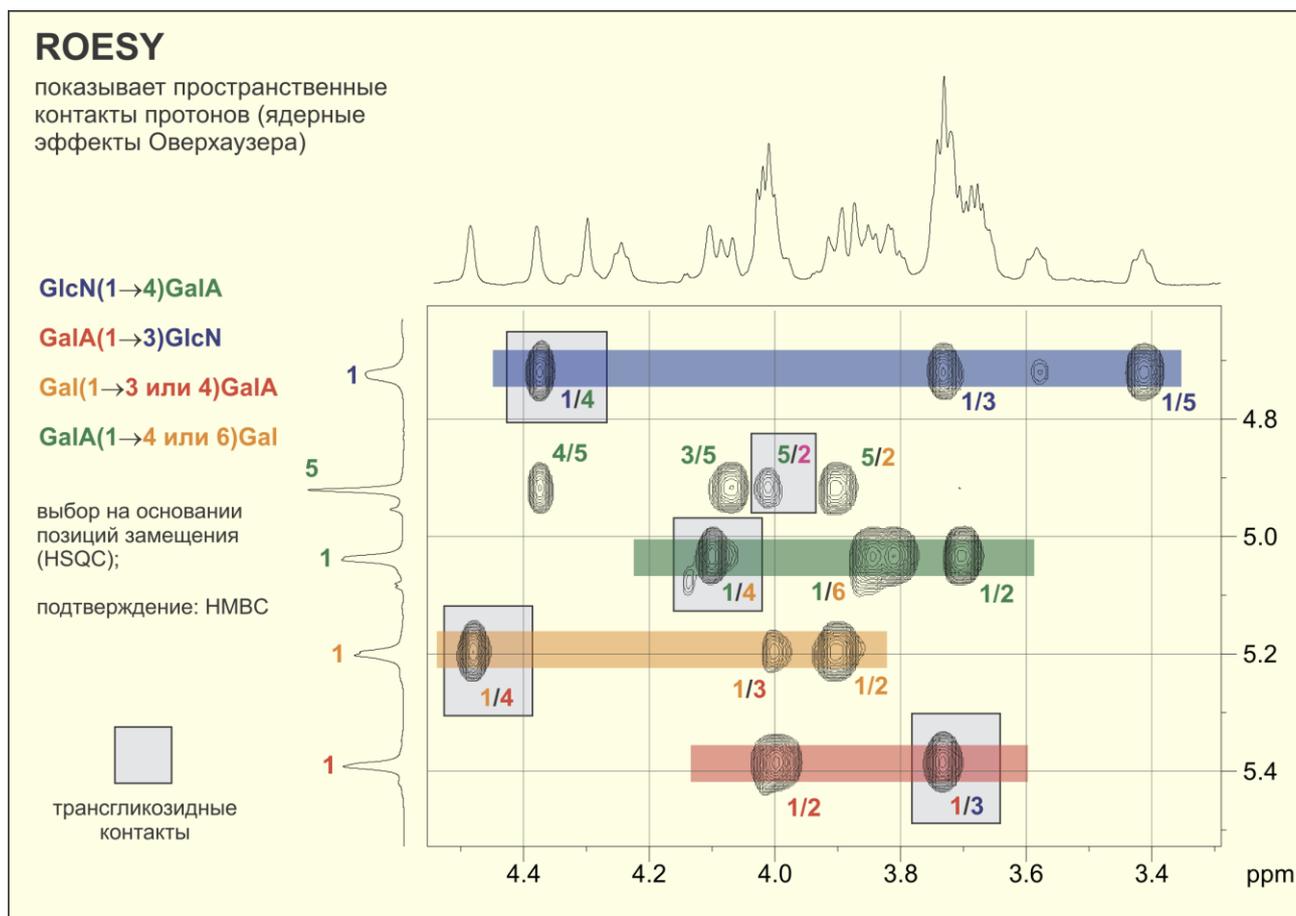
Edw #21 (HSQC-TOCSY) Тут [в этом остатке] то ли два, то ли три [углеродных] атома. Чтобы понять, что это, опять посмотрим на HSQC-TOCSY. Здесь эти атомы **связаны прямоугольником**. Во-первых, это подтверждает, что все незадействованные в отнесении сигналы принадлежат одному остатку. А, во-вторых, это говорит, что **здесь [~62]** CH_2OH [по химическому сдвигу кросс-пиков по оси ^{13}C], и можно этот прямоугольник проследить и точно понять, какой из этих **трех сигналов [61-63]** относится к розовому. Оказалось, что **вот этот [62.0]**, самый большой. И из этого было [сделано] предположение (мы комбинируем это и это [розовые сигналы]), что это – 2-аминоглицерин. (...) Причем не просто 2-аминоглицерин, а симметричный, то есть **эти оба [кросс-пики на нижней стороне розовой рамки]** не замещены. Значит, он может быть присоединен к остальной части молекулы только через азот. И мы же при этом знаем, что одна из галактуроновых кислот имеет хим. сдвиг H_5 соответствующий замещению по шестому [положению]. Значит, это, скорее всего, амид. Эти два факта можно сопоставить и сказать, что, наверное, эта аминогруппа **[кросс-пики на верхней стороне розовой рамки]** соединена амидной связью с карбоксилем одной из уруновых кислот.



Edw #24 (HMBC) Чтобы понять с какой [уруновой кислотой], посмотрим на HMBC и увидим здесь **очень интересный сигнал [173/4.0]**. Как раз в том месте, где находится азотный розовый (H_2), есть кросс-пик с **тем же самым C_6 [6]**, который у нас уже участвовал в рассмотрении при анализе «зеленой» галактуроновой кислоты. И вот это уже однозначное доказательство того, что аминоглицерин своей аминогруппой амидирует шестое

положение именно «зеленой» галактуроновой кислоты.

Теперь смотрим на замещенные позиции [вот здесь \[верхняя врезка\]](#). Ну для начала они [обведены](#), аномальные. Теперь надо понять, кто их замещает. Остатка четыре, вариантов последовательности уже довольно много. На данный момент у нас есть частичная последовательность (розовый своим вторым идет в зеленый-6). Больше мы пока не знаем.



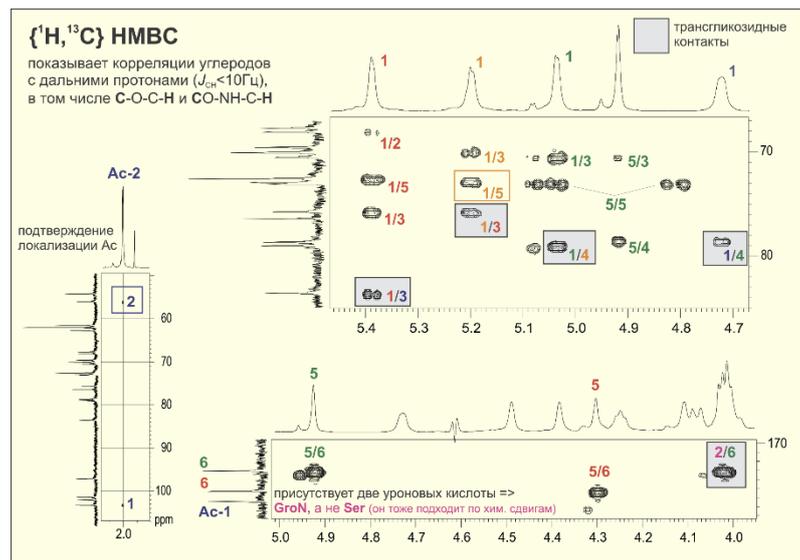
Edw #23 (ROESY) Для того, чтобы понять последовательность, посмотрим на ROESY. «Первые» у нас уже известно, где находится, и смотрим, с кем они сближены. Как правило, там несколько контактов в пределах остатка: для β -сахаров со своим H3 и со своим H5, для α -сахаров со своим H2. Эти сигналы мы из рассмотрения исключаем и смотрим на оставшиеся. Например, в случае синего остался всего [один \[1/4\]](#), который не вместе с остальными (который можно однозначно отнести). Мы к этому моменту уже знаем, что это - зеленый-4. Значит, есть контакт синего-1 с зеленым-4. Делаем выводы о [такой частичной последовательности \[GlcN\(1→4\)GalA\]](#).

Аналогично поступаем с остальными. Например, с красным. [Это \[1/2\]](#) – его собственный H2, а это – какой-то другой. И здесь как раз находится синий-3. [Тут \[на линии 3.75\]](#) находятся еще и другие сигналы, но замещен из них именно синий-3. Это мы знаем по аномальному химическому сдвигу в HSQC. Значит, [вот этот \[5.4\]](#) (красный-1) идет в синий-3. Еще одну [частичную последовательность нарисовали \[GalA\(1→3\)GlcN\]](#).

С двумя другими парами, оранжевый-красный и зеленый-оранжевый, не так просто, потому что там несколько кросс-пиков может соответствовать. Например, [здесь \[на линии 5.05\]](#) есть [кросс-пики] у зеленого-1 и с [оранжевым-4 \[4.1\]](#) и с [оранжевым-6 \[3.85\]](#). А у оранжевого-1 и с [красным-3 \[4.0\]](#), и с [красным-4 \[4.5\]](#). Но, во-первых, замещен из них только один (какие из них замещены, мы уже знаем).

Edw #24 (HMBC)

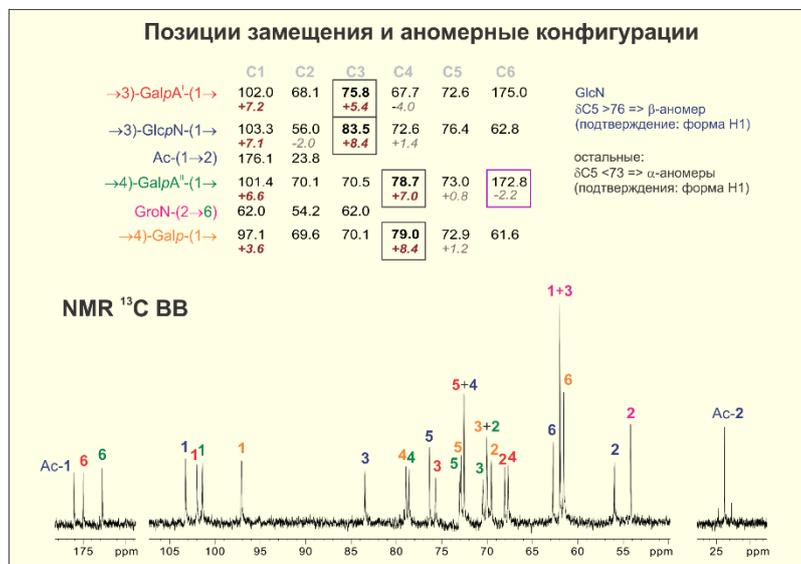
А, во-вторых, мы можем посмотреть еще на HMBC, и выяснить, какие здесь трансгликозидные контакты. Они обведены серыми прямоугольниками. И поскольку они не противоречат ROESY, мы делаем вывод, что замещение произошло именно в этих местах. Остается еще один ацетат. Его метильная группа протонов имеет контакт с одним из углеродов, несущих азот, который при ~57 м.д. Вот **этот контакт [в синей рамке]**. И еще один контакт со своим CO¹⁵⁹. Это значит, что аминокетон (не та, которая в



аминоглицерине, а другая, из глюкозамина) связана с уксусной кислотой. То есть, у нас есть еще одна частичная последовательность: ацетат своим первым идет в синий-2.

Edw #22 (¹³C)

Итак, имеем четыре частичных последовательности, дальше их скомбинировали. Здесь мы уже знаем, что из «красных» замещен третий, а из «оранжевых» замещен четвертый. Во-первых, нет терминальных остатков. То есть все остатки замещены, кроме «розового» аминоглицерина. Значит, сахарный костяк - линейный. Дальше мы примерно знаем молекулярную массу, потому что ее выделяли хроматографически. Молекулярная масса там ~50 000, то есть это полимер, в нем должно быть какое-то повторяющееся



звено. Четыре остатка, не считая бокового аминоглицерина, который пришел на «шестой» галактуроновой кислоты. Четыре остатка и четыре связи. Концевых остатков нет (не образующих [входящую] связь), и ни один из остатков не образует две связи в иных положениях кроме первого. Отсюда вывод чисто по топологии, что это линейный полимер, в котором есть повторяющееся звено из четырех остатков, и к одному из них сбоку прицеплен аминоглицерин.

Имея четыре последовательности, мы можем соединить их вместе. (...) Они соединены в той же последовательности, в какой они **здесь написаны**, сверху вниз. «Красный» идет в «синий», «синий» идет в «зеленый», «зеленый» идет в «оранжевый», «оранжевый» идет снова в «красный», но уже в другой экземпляр «красного» в следующем повторяющемся звене¹⁶⁰.

¹⁵⁹ Ошибка в лекции. Второй контакт метильных протонов уксусной кислоты – с атомом C1 глюкозамина. Со своим CO контакт тоже есть, но он на слайде не показан ввиду тривиальности.

¹⁶⁰ и «розовый» идет сбоку в «зеленый».

Что осталось? Аномерные конфигурации и абсолютные конфигурации. Для [установления] аномерных конфигураций мы посмотрим на C5. Теперь у нас есть уже отнесение спектра ^{13}C , **вот оно полностью написано**. Смотрим на хим. сдвиги C5 и сравниваем их с хим. сдвигами незамещенных [остатков], взятыми из базы данных. Получается, что β -аномер у нас только один – **глюкозамин**, что соответствует широкому сигналу H1 в протонном спектре, а остальные все α , у них узкие сигналы H1, и все пятое у них **имеют хим. сдвиг меньше 73**, а если бы они были β , у них был бы больше 75. Теперь мы знаем аномерные конфигурации (кто из них α , кто β) и, взяв правильные строки из базы данных, считаем эффекты замещения. Они здесь **показаны красным**. Точнее, большие показаны красным, а маленькие (на соседних атомах) показаны серым. Там, где есть замещение, произошло сильное изменение химического сдвига. Это все C1, как обычно и бывает (самое реакционноспособное положение), и **какие-то еще [в рамках]**. Смотрим, соответствуют ли они выявленным из ROESY и HMBC положениям замещения. Выясняется, что соответствуют.

Абсолютные конфигурации

эффекты замещения чувствительны к абсолютным конфигурациям и сведены в базы данных

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 3$)- α -GalpA ^I -(1 \rightarrow)	102.0 +7.2	68.1	75.8 +5.4	67.7 -4.0	72.6	175.0
$\rightarrow 3$)- β -GlcN-(1 \rightarrow)	103.3 +7.1	56.0 -2.0	83.5 +8.4	72.6 +1.4	76.4	62.8
Ac-(1 \rightarrow 2)	176.1	23.8				
$\rightarrow 4$)- α -GalpA ^{II} -(1 \rightarrow)	101.4 +6.6	70.1	70.5	78.7 +7.0	73.0 +0.8	172.8
GroN-(2 \rightarrow 6)	62.0	54.2	62.0			
$\rightarrow 4$)- α -Galp-(1 \rightarrow)	97.1 +3.6	69.6	70.1	79.0 +8.4	72.9 +1.2	61.6

обе GalA - D

(из величины оптического вращения их S-бутилгликозидов)

пара остатков	атом	теория		эксперимент
		DD	DL	
Gal α 1 \rightarrow 3GalA ^I	C-1	3.3	8.3	3.6
GalA ^I β 1 \rightarrow 3GlcN	C-4	0.7	-1.3	1.4



все оптически-активные остатки имеют D-конфигурацию

Edw #25 (absolute) Глядя на эти эффекты, постараемся понять, какие абсолютные конфигурации у нас могут быть. Для этого [проведем] сравнение с базой данных. Например, α 1-3 связь между галактозой и галактуроновой кислотой [первая строка в нижней таблице]. Это пара «оранжевый-красный». Здесь теоретические эффекты замещения, взятые из литературы, существенно отличаются на атоме C1 того [остатка], из которого исходит связь. В нашем случае это «оранжевый» C1. Если [имеют место] одинаковые абсолютные конфигурации [связываемых остатков] - **3.3 м.д.**, а если разные – **8.3 м.д.** А у нас **3.6 м.д.** Очевиден вывод, что реализуется **этот случай [DD]**, «красный» и «оранжевый» имеют одинаковые абсолютные конфигурации.

Теперь смотрим на пару «красный-синий» (β 1-3 связь) [вторая строка в нижней таблице] и видим, что и C3 глюкозы [глюкозамина], и C1 галактозы [галактуроновой кислоты] слабо реагируют на то, одинаковые или разные конфигурации у связываемых остатков. Но нам повезло, что эффект на

соседнем [с позицией замещения] атоме отличается, а именно [это происходит] на атоме C4 остатка, в который приходит связь. В одном случае он - отрицательный, в другом - положительный. У нас **положительный [1.4]** и к тому же еще и больше **этого [0.7]**. Тоже [можно сделать] вывод, что реализуется **этот случай [DD]**, следовательно, «красный» и «синий» имеют одинаковые абсолютные конфигурации.

Остался «зеленый». Это тот самый случай: обе связи, которые он образует - это **связи 1-4 в галактозу**. То есть по эффектам гликозилирования понять абсолютную конфигурацию «зеленого» остатка нельзя. Мы уже знаем, что это за остаток, и можно не все продукты гидролиза проанализировать на абсолютные конфигурации, а только галактуроновую кислоту. Даже не обязательно разделять смесь [продуктов гидролиза]. Мы знаем, где должен быть пик для L-GalA и для D-GalA. И мы знаем, что одна из них [из двух GalA в молекуле] - скорее всего, D, поскольку у нее [у «красной»] абсолютная конфигурация та же самая, что у глюкозамина, а L-глюкозамин никогда не встречается. Но нам повезло - после гидролиза оказалось, что они [«красная» и «зеленая»] обе – D, там был единственный пик. Это значит, что обе галактуроновые кислоты имеют одинаковую абсолютную конфигурацию. Путем сравнения [положения пика на ГЖХ] с референсным *R_f* из литературы можно сказать, что она D. Во-первых, это нам дает базис для того, чтобы сказать, что все **эти три остатка [«оранжевый», «красный», «синий»]** - D, раз они одинаковые. А во-вторых, [это нужно] для того, чтобы понять абсолютную конфигурацию «зеленого» остатка. Таким образом, на основании сравнения эффектов замещения с теоретическими мы выяснили абсолютные конфигурации всех оптически активных остатков. Ацетат и глицерамид оптически неактивны.

Откуда брать хим. сдвиги ¹³C?



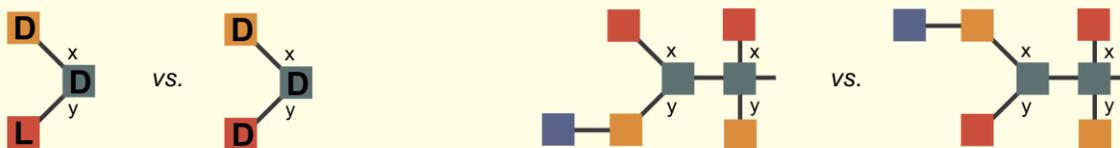
CSDB:
экспериментальные данные ЯМР



GODDESS / GRASS:
химические сдвиги мономеров, димеров (линейные участки), и тримеров (точки разветвления).
эффекты замещения
<http://csdb.glycoscience.ru/help/nmr.html>

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→3)-α-D-GalpA-(1→	102.0	68.1	75.8	67.7	72.6	175.0
	+7.2		+5.4	-4.0		
→3)-β-D-GlcpN-(1→	103.3	56.0	83.5	72.6	76.4	62.8
Ac-(1→2)	+7.1	-2.0	+8.4	+1.4		
	176.1	23.8				
→4)-α-D-GalpA-(1→	101.4	70.1	70.5	78.7	73.0	172.8
	+6.6			+7.0	+0.8	
GroN-(2→6)	62.0	54.2	62.0			
→4)-α-D-Galp-(1→	97.1	69.6	70.1	79.0	72.9	61.6
	+3.6			+8.4	+1.2	

Примеры необходимости расчета по инкрементной схеме:



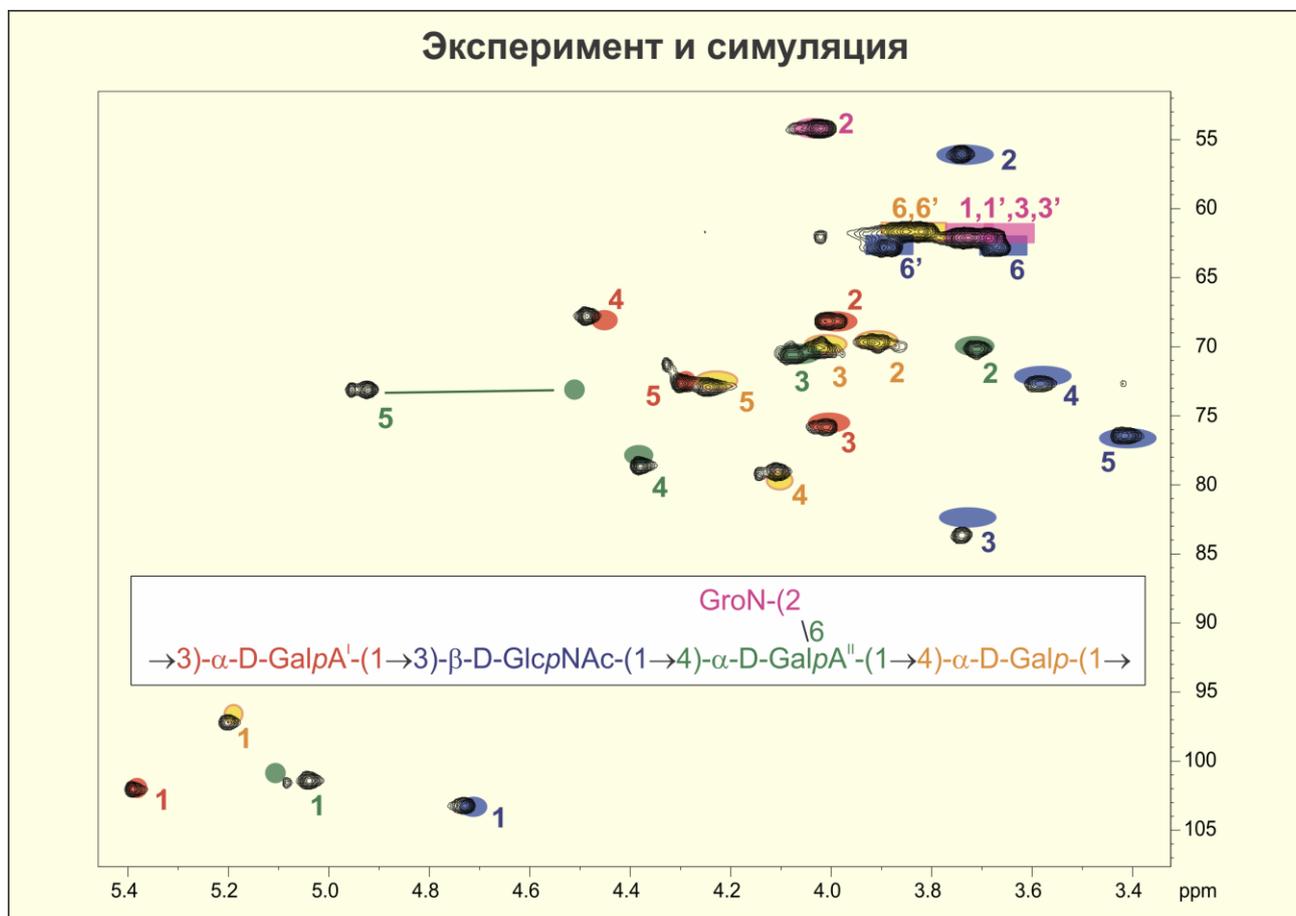
Edw #26 (database)

Здесь я часто упоминал теоретические эффекты из литературы и расчетные или теоретические хим. сдвиги. Конечно, копаться в статьях – очень непродуктивный метод [получения этих данных]. Поэтому нужно или найти хороший обзор, в котором они все есть (толщиной страниц

в 200), или воспользоваться базой данных. В частности, в «нашей» базе (которую мы разрабатываем), есть модуль предсказаний; можно ей «скормить» структуру, и она предскажет химические сдвиги уже с учетом эффектов замещения, дальше можно сравнить [с экспериментальными].

Когда это бывает нужно? В случае с абсолютными конфигурациями, который у нас был. **Вот такой случай [пример слева]** – собственно, это и есть случай с абсолютными конфигурациями. Очень похожие структурные фрагменты, отличающиеся только абсолютной конфигурацией. У них будут разные эффекты замещения – у **этой [нижней] связи** либо на «первом» «красном», либо на замещенном «зеленом», и, анализируя базу данных, можно сравнить.

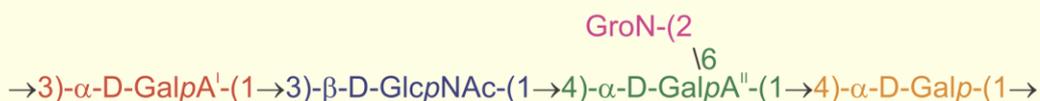
Другой случай – это очень похожие структуры, отличающиеся, например, **вот так [пример справа]**. То есть **здесь [слева от vs.]** в положении x – «красный», а в положении y – два вот таких остатка [«оранжевый» и «синий»], а **здесь [справа от vs.]** – **наоборот**. Спектры очень похожие, но эффекты замещения будут отличаться. Чтобы понять, какой из этих случаев у нас имеет место, нужно посчитать эффекты замещения у **этой связи [в x]** и у **этой связи [в y]** и сравнить их с расчетными эффектами замещения из базы данных. Если нам повезет, в одном случае [они] будут совпадать, а в другом не будут. А если же и в том, и в другом будут [совпадать], или и в том, и другом не будут [совпадать], значит, нужно воспользоваться каким-то другим способом [отличить эти две структуры].



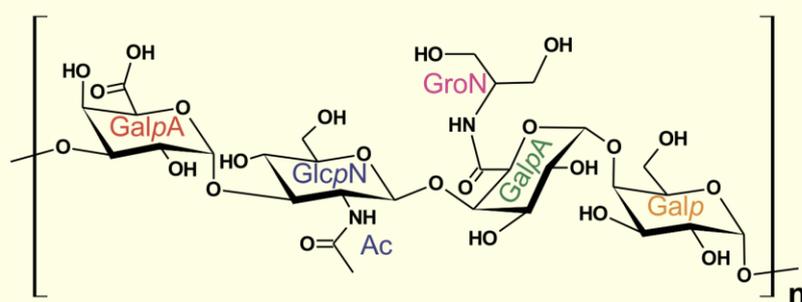
Edw #31 (sim) Вот суперпозиция спектра HSQC и предсказанного спектра для этой конкретной структуры. Предсказаны как протонные, так и углеродные химические сдвиги, предсказанные [сигналы] обозначены здесь эллипсами и прямоугольниками. Отрицательные сигналы – прямоугольники, положительные – эллипсы, раскрашенные и отнесенные в соответствии с предсказанием. Здесь уже видно, что [наблюдается] отличное совпадение за исключением **зеленого-**

5, который отличается сильно. Вспоминаем, что это H5 урановой кислоты, а это значит, он находится близко к карбоксилу. Во-первых, от pH может зависеть. А, во-вторых, в этом [случае] как раз от pH не зависит, потому что она [галактуроновая кислота] замещенная [по C6], там нет протона. Видимо, этот момент, связанный с замещением мало представленным в базе редким остатком аминоклицирина, как раз привел к большому отличию по одному сигналу. Вот, собственно, **ВЫВОД** [на белом фоне].

Строение повторяющегося звена *Edwardsiella* 1153



HSQC => в нативном полисахариде остаток Gal O-ацетилирован в положения 2 (45% звеньев) либо 3 (другие 45% звеньев)



установлено за **30** часов:

выделение и очистка	4
деацетилирование	2
анализ мономерного состава	1
оптические методы	1
накопление ЯМР спектров	8
интерпретация	6
оформление	3
локализация O-ацетатов	4+1

Edw #32 (result) Теперь вспоминаем, что, когда из бактерии выделили это соединение, спектр ^{13}C имел множество сигналов разной (некратной друг другу) интегральной интенсивности. Тот спектр, который вы видели - это спектр уже деацетилированного (обработанного) образца. А что это значит, когда много сигналов и все они разные? Это, скорее всего, [значит, что] либо полимер нерегулярный, т.е. не имеет повторяющегося звена, либо в нем регулярность замаскирована каким-то нестехиометрически присоединенным компонентом. В природных соединениях практически 100% таких компонентов - это или остаток метанола, или остаток уксусной кислоты. То есть метил или ацетат, который в каких-то повторяющихся звеньях есть, а в каких-то нет, что делает повторяющиеся звенья не совсем «повторяющимися» (разными). Первое, что предположили - что это ацетат. Деацетилировали¹⁶¹, и спектр [^{13}C] действительно стал относительно регулярным, то есть число сигналов уменьшилось, и все они стали примерно одной высоты. То есть получился регулярный полимер. А теперь, когда мы знаем его структуру, можно снова посмотреть на исходный образец, а конкретно на его HSQC-спектр. И, зная ответ, уже намного легче «нарисовать» отнесение. Можно снова раскрасить [сигналы] и посмотреть, какие сигналы «съехали». Оказалось, что сигналов стало больше, один из наборов сигналов совпал с тем, который был у нас в де-O-ацетилированном образце, а еще два набора сигналов отличались в «оранжевой» части, а конкретно C2/H2 и C3/H3. Дальше мы

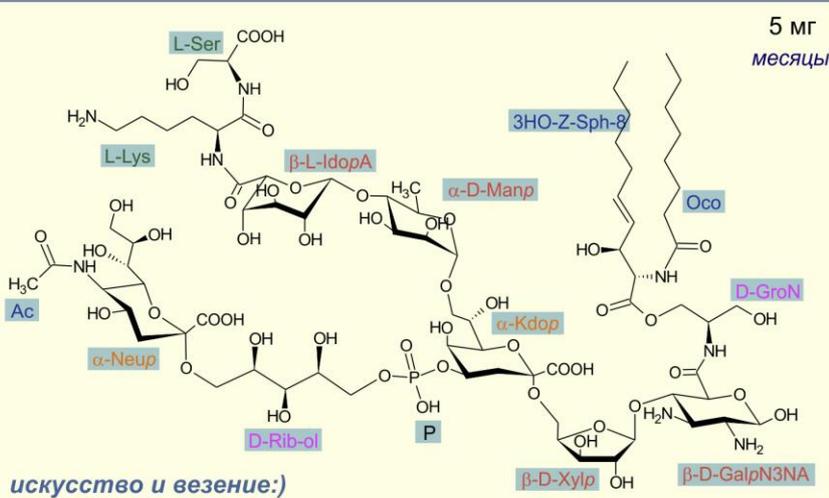
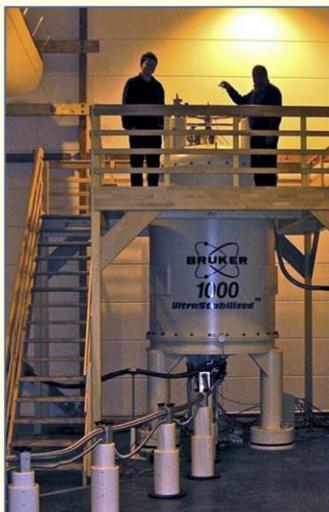
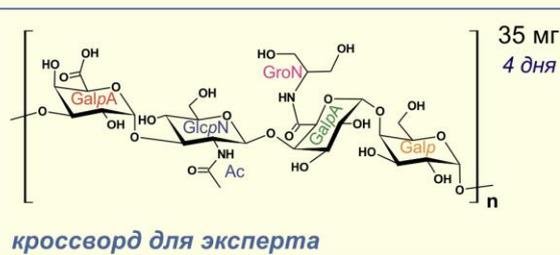
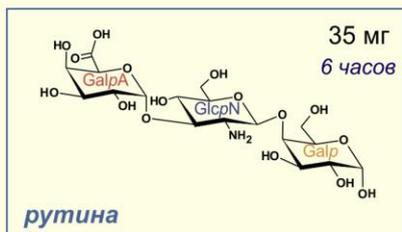
¹⁶¹ Точнее, де-O-ацетилировали. Эта операция не затрагивает N-ацетаты.

их проинтегрировали и увидели, что «оранжевый» остаток в исходном соединении частично замещен во второе и третье положение (примерно поровну) О-ацетильной группой. При деацетилировании О-ацетаты снимаются, а N-ацетаты остаются. Значит, это О-ацетат «висел» на «оранжевом» остатке, но не на всех, а в 45% - во втором, и в 45% - в третьем положении, а еще 10% остались незамещенными. Структурный вывод [вот такой](#).

Теперь посчитаем, во что это обошлось. [Здесь \[справа внизу\]](#) то, про что я рассказывал, написано черным, это именно ЯМР-ная часть. Накопить спектры около 8 часов, в данном случае повезло, что все-таки [все эксперименты были поставлены] за один раз все-таки... а нет, за два раза. Сначала для исходного образца, потом деацетилировали, и для ацетилированного – один раз 8 часов и еще раз 4 часа. Потом интерпретация того, о чем я за час рассказал. Это заняло примерно 6 часов работы над спектрами. Ну и оформление - после [интерпретации] имеет смысл сразу написать все таблицы отнесения, подписать спектры в нужных местах над сигналами, [описать] общий ход рассуждения, чтобы потом через пару месяцев, когда статья уже будет готова, не нужно было все это вспоминать и писать заново. Оформление, таблицы, подготовка картинок со спектрами и [аналогичная] деятельность – это еще 3 часа. По сути, ЯМР-ная часть без учета локализации О-ацетатов – это три дня работы. Еще [есть] [химическая часть](#): 1) ГЖХ, 2) выделить из клеточной стенки, очистить, высушить, и 3) оптические методы (установление абсолютной конфигурации галактуроновой кислоты). Это еще три дня, поскольку это все стандартные методики. Все в целом заняло шесть дней. С учетом того, что это полимер и растворяется он только в воде, кристалл из него вырастить нельзя. Да даже если было бы и можно, проанализировать с помощью РСА такую сложную структуру проблематично. В принципе, ее регулярную часть (деацетилированную) можно было бы попробовать закристаллизовать и получить РСА-картину. Но, мне кажется, что программы, которые переводят эту РСА-картину в структуру, на этой структуре не дали бы нам правильного ответа, и возможно, вообще не дали бы никакого осмысленного ответа. Косвенно такой уровень достоверности перехода от РСА к структуре подтверждается качеством [описаний] углеводных лигандов в гликопротеинах в Protein Data Bank – это крупнейшая база данных по 3D-структурам протеинов, в том числе и гликопротеинов. И вот там, в углеводной части, можно встретить несоединенные друг с другом остатки, трехвалентные углероды и много других артефактов. То есть РСА неприменим. Еще теоретически можно было бы применить масс-спектрометрию, но она вряд ли бы отличила друг от друга эти остатки¹⁶², а не имея отнесения мономерного состава, мы не смогли бы выяснить последовательность. Существуют изощренные методы многомерной масс-спектрометрии, которые позволяют, поставив множество экспериментов, постепенно прийти к идентификации остатков, но это делать с помощью МС очень неудобно, поскольку понятно, что остатки, имеющие разную *стерео*-конфигурацию отдельных атомов, фрагментируются очень похожим образом. Фрагменты имеют одинаковую массу и одинаковое распределение изотопов. То есть в классическом МС галактоза от глюкозы ничем не отличается. Поэтому МС здесь тоже неприменим. Остаются еще химические методы. В принципе, можно было бы всю эту структуру «разложить» химическими методами, только не за шесть дней, а, наверное, в лучшем случае за шесть месяцев напряженной работы. Поэтому ЯМР здесь - единственный способ.

¹⁶² как минимум два остатка галактуроновой кислоты с одинаковыми массами и паттернами фрагментации.

Возможности метода



Edw #33 (limits) Теперь попробуем прикинуть [предел возможностей ЯМР]. Это - структура [пример справа вверху] средней сложности, в природных соединениях бывают иногда и проще, и сложнее. Что можно сделать, а что нельзя? Здесь [вверху] два примера. На современных приборах эта наша структура [справа вверху] [устанавливается за] четыре дня (шесть дней получалось; наверное, я химическую часть не посчитал, только ЯМР-ную => четыре дня). В принципе, задача непростая, и сходу, не имея опыта в решении именно таких задач, решить ее будет непросто. Но зато для человека, который имеет такой опыт, эта задача разрешима более или менее однозначно. То есть, посидев достаточно времени, задачу такой сложности решить в большинстве случаев можно. Поэтому я назвал это “кроссворд для эксперта”, это - зарядка для мозгов, которая рано или поздно приводит к ответу.

Более простые структуры – это уже рутина, пока что не на уровне предсказания с помощью программы, а на примерно уровне, который вы, я надеюсь, приобрели в результате этого курса. Это примерно такая структура [пример слева вверху]: олигомер, три остатка. Данные ГЖХ есть. Часов за шесть, наверное, вы с ней справитесь. При условии, что [вещества] было тоже 35 мг, то есть у нас достаточно хорошие спектры, отношение сигнал/шум позволяет увидеть отдельные сигналы, чувствительности достаточно для спектров HMBC и ROESY. Это уже стало рутинной. И это примерно то, что будет на экзамене.

(...) А это [пример внизу] - наоборот, более сложный случай. Здесь [присутствуют] разные остатки, которые иногда встречаются в природных соединениях, и это не только сахара: жирные кислоты [Oco], аминокислоты [Lys, Ser], сахара с экзоциклическими хвостами, например, этот Kdo. Полиол [Rib-ol] имеется в открытой форме, это не сахар, а многоатомный спирт. У него тоже, естественно, много изомеров, потому что каждый атом может иметь разную стерео-конфигурацию, и полиолы в природных соединениях [встречаются] достаточно часто. И фураноза [Xyl] еще есть. То

есть это структура, в которой представлено разнообразие природных остатков, в том числе даже **фосфат**. И, как правило, за счет того, что она больше, выделять ее сложнее, [в получается, что] ее еще и меньше в доступе. [Имея] 5 мг такой структуры, уже нельзя сказать, удастся решить эту задачу или нет. Во-первых, нужно везение, а, во-вторых, нужен человек, владеющий этим на уровне искусства. И кроме этого нужен уже не классический ЯМР-прибор, а самый лучший из возможных.

Но постепенно программы совершенствуются, искусственный интеллект становится мощнее, приборы улучшаются, частоты растут. То, что раньше было искусством, сейчас становится приемлемой задачей; то, что было приемлемой - становится рутинной, а то, что раньше (лет десять назад) было вообще невозможно, сейчас становится уровнем искусства. То есть постепенно все это смещается [в сторону упрощения] по мере совершенствования программной и аппаратной базы, и мы получаем возможность исследовать и устанавливать структуру все более и более сложных соединений. Обзор по возможностям метода [ЯМР] на этом окончен.