

ЯМР спектроскопия. Основные вехи.

W. Pauli (спин, 1924)

W. Gerlach and O. Stern (прямое наблюдение ядерного магнетизма, 1925)

I. I. Rabi (первые опыты по ядерному резонансу, 1938)

F. Bloch and E. M. Purcell (наблюдение резонанса на атомах водорода в жидкой воде и в твердом парафине, 1946)

F. Bloch (возбуждение резонанса методом короткого радиочастотного импульса, 1946)

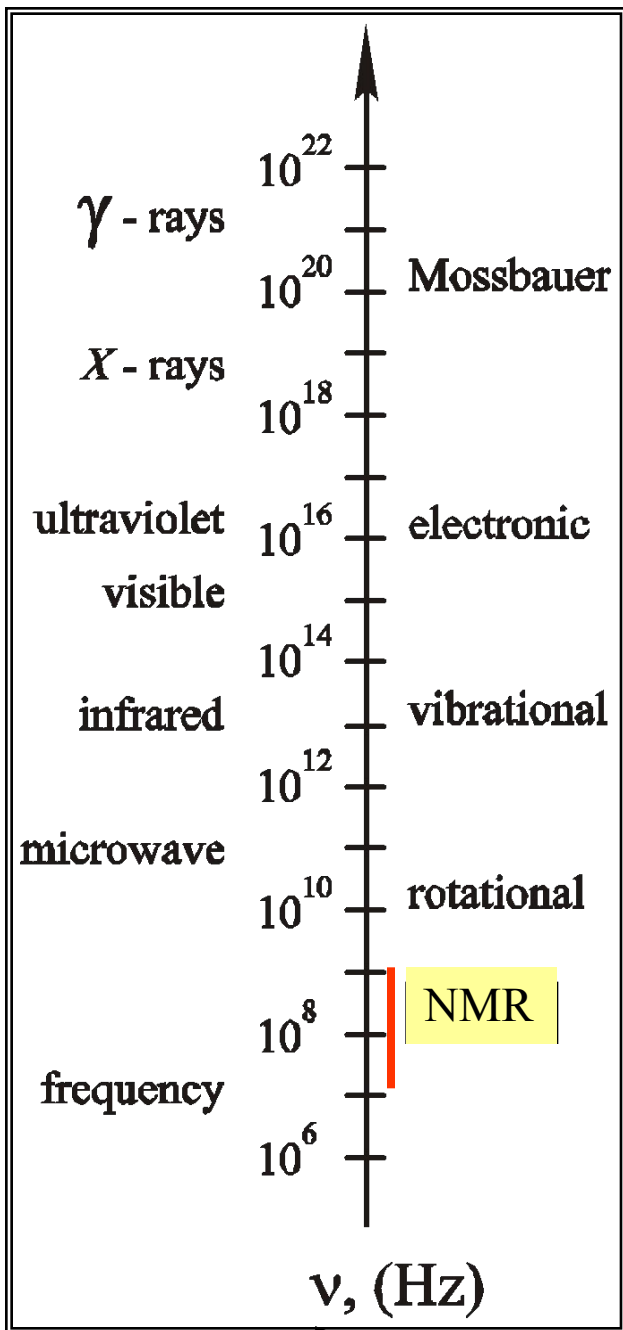
J. Jeener (идея 2D FT-NMR, 1971)

P. C. Lauterbur (ЯМР томография, 1972).

R. R. Ernst (реализация 2D FT-NMR, 1975)

T. A. Cross and S. J. Opella (твердотельный NMR, 1983)

K. J. Wuthrich (трехмерная структура белка, бычий трипсиновый ингибитор, высокого разрешения, 1985).

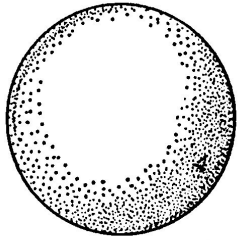


Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)- область спектроскопии, основанная на поглощении электромагнитного излучения в радиочастотной области, 10 MHz - 1 GHz. В противоположность ультрафиолетовому, видимому и инфракрасному излучению, которое взаимодействует с электронными оболочками атомов, излучение в радиочастотном диапазоне взаимодействует с ядрами, помещенными в сильное магнитное поле. В этом поле они приобретают энергию необходимую для того, чтобы поглощение радиочастотного излучения имело место.

Рисунок показывает электромагнитный спектр от самой низкой частоты (радиоволны, частота $\nu = 10^4$ Hz) до самой высокой (гамма-лучи, $\nu = 10^{22}$ Hz).

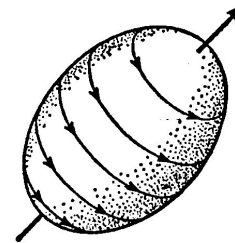
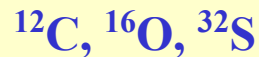
Магнитные свойства ядер. Ядерный спин

1. Некоторые ядра обладают «спином». Термин спин означает, что такие ядра могут рассматриваться как вращающиеся электрические заряды, обладающие не только электрическими, но и магнитными свойствами (магнитным моментом, I).



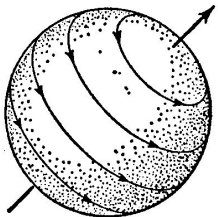
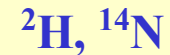
Spherical nonspinning nucleus

Ядра, для которых число протонов Z и число нейтронов N четные числа (12/6- углерод, 16/8 кислород, 32/16- сера), имеют спин равный 0 .



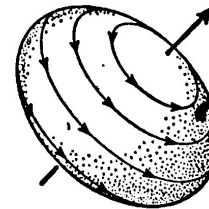
Ellipsoidal (prolate) spinning nucleus

Ядра, для которых одно из чисел N и Z нечетное, а их сумма число четное, имеют спин, равный 1 .



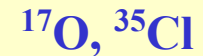
Spherical spinning nucleus

Ядра, для которых одно из чисел N и Z нечетное, а их сумма число нечетное, имеют спин, равный $1/2$.



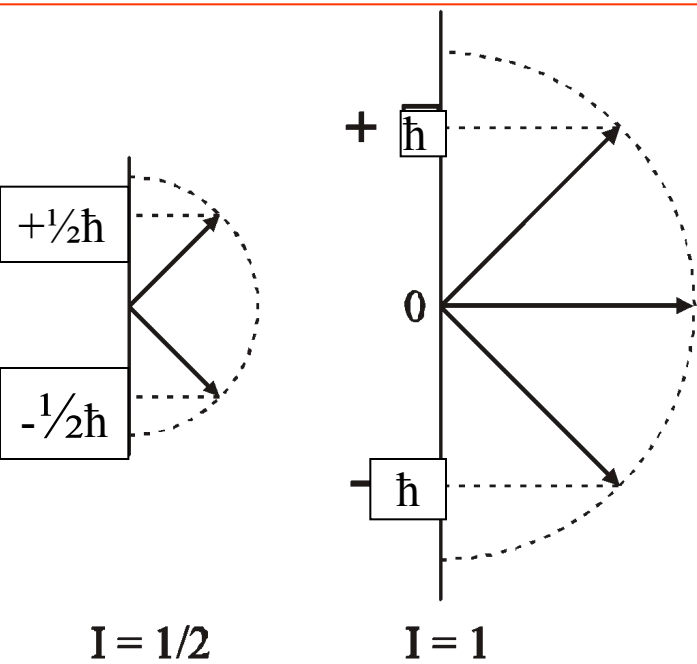
Ellipsoidal (oblate) spinning nucleus

Ядра, для которых одно из чисел N и Z нечетное, а их сумма число нечетное, имеют спин, равный $3/2$ или $5/2$



2. Ряд ядер, особенно важных для структурной биологии, имеют ядерны; спин I равный $1/2$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , and ^{31}P). Ядра атомов ^{12}C and ^{16}O имеют спин, равный 0 .

Магнитные квантовые числа



Важное квантово-механическое свойство вращающегося ядра состоит в том, что средняя величина компоненты его векторного магнитного момента вдоль выделенного направления принимает определенные величины, описываемые набором магнитных квантовых чисел

$$m = 2I + 1,$$

имеющих значения между

$$+I \text{ и } -I$$

$$m = I, (I - 1), I - 2, -I + 1, -I \quad (1.1)$$

где I есть величина спина ядра.

Компоненты вектора углового момента ядер, имеющих спин $\pm 1/2$ (^1H , ^{13}C), имеют два разрешенных значения, $I_z = \pm 1/2 \hbar$, тогда как компоненты вектора углового момента ядер, имеющих спин $I = 1$, имеют три возможных значения, $I_z = 0, \pm \hbar$, где \hbar постоянная Планка.

Напоминаем, что ядра, имеющие спин $\frac{1}{2}$ имеют только два состояния, соответствующие $m = +\frac{1}{2}$ and $-\frac{1}{2}$.

Разность энергий двух состояний дается, соотношением

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0 \quad (1.2)$$

или в терминах частот

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \text{ (Hz)} \quad (1.3)$$

где γ называется гироманнитным отношением.

Если гироманнитное отношение имеет положительное значение (ядра ^1H и ^{13}C), тогда $+1/2$ состояние обладает меньшей энергией.

Напротив, для ядер с отрицательным значением гироманнитного отношения (ядро ^{15}N) состояние $+1/2$ обладает большей энергией.

Атом	$\gamma/10^7 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$
^1H	26.75
^{13}C	6.73
^{15}N	-2.71
^{19}F	25.18
^{31}P	10.84

Гироманнитные отношения для некоторых ядер.

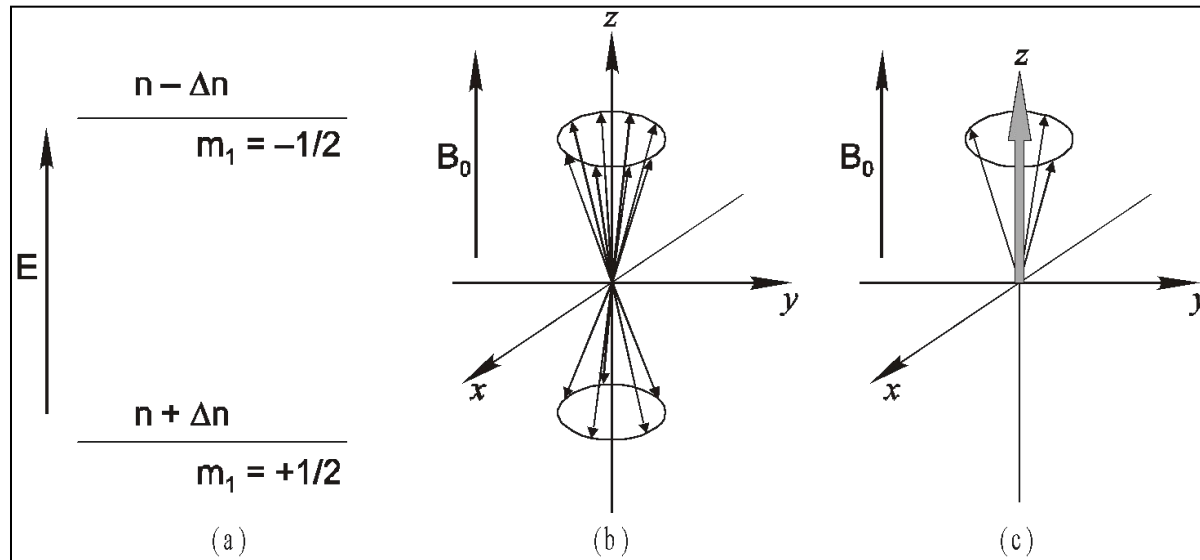
Атом водорода
самый-самый в ЯМР

Распределение ядер по уровням энергии. Закон Больцмана

$$N_{\text{upper}}/N_{\text{lower}} = \exp(-\Delta E/kT) \quad (1.4)$$

где N_{upper} число спинов с высокой энергией ($m = -1/2$), а N_{lower} число спинов с низкой энергией ($m = +1/2$)

$$N_{\text{upper}}/N_{\text{lower}} = \exp(-\gamma h B_0 / 2\pi kT) \quad (1.5)$$



$$\Delta E = \hbar \gamma B_0$$

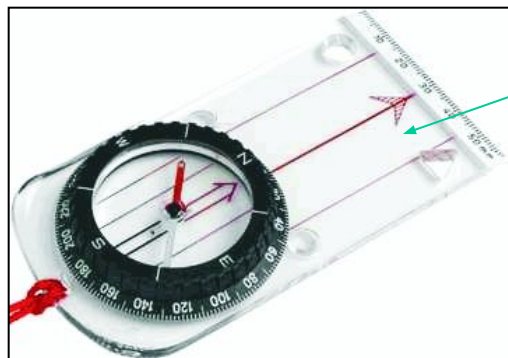
$$N_{\text{upper}}/N_{\text{lower}} = 1 - \gamma h B_0 / 2\pi kT \quad (1.6)$$

Разница в заселенности уровней пропорциональна напряженности магнитного поля!!!

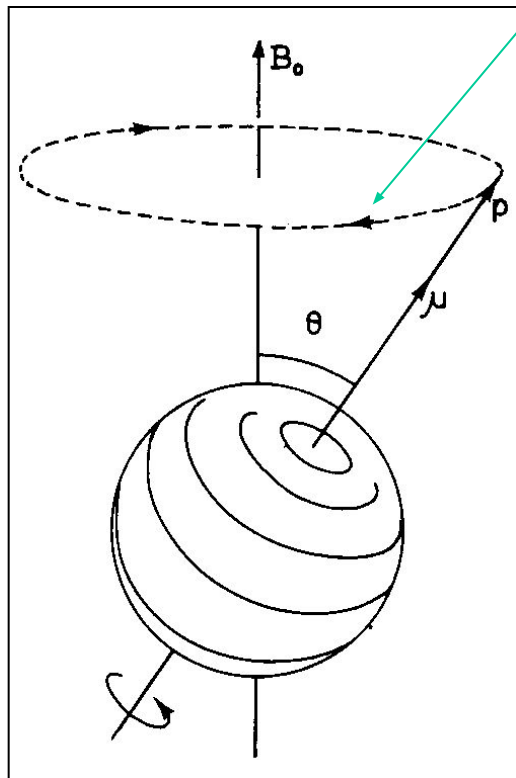
ЯМР спектроскопия фундаментально отличается от оптической спектроскопии тем, что в оптической спектроскопии возбужденные молекулы возвращаются спонтанно к исходному состоянию, тогда как в ЯМР спектроскопии вероятность такого перехода пренебрежимо мала.

1. Эффект статического поля

Эффект статического магнитного поля
на магнитную стрелку компаса



Эффект статического магнитного поля
на магнитную стрелку вращающегося компаса



Эффект статического магнитного поля на стрелку магнитного компаса, вращающуюся вокруг оси север-юг. Благодаря гироскопическому эффекту волчка ось вращения частицы прецессирует по круговой орбите вокруг вектора магнитного поля. Угловая скорость прецессии пропорциональна приложенному магнитному полю \mathbf{B}_0

$$\omega_0 = \gamma \mathbf{B}_0 \quad (\text{rad/sec}) \quad (1.7),$$

где γ гиромагнитное отношение.

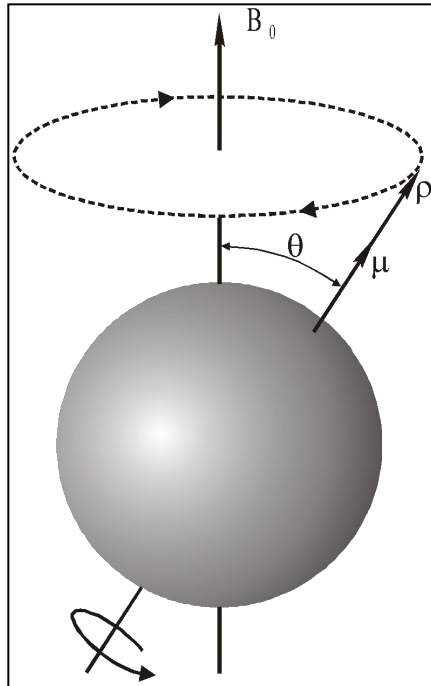
Угловая скорость прецессии может быть преобразована в частоту делением на 2π

$$\nu_0 = \gamma \mathbf{B}_0 / 2\pi \quad (\text{Hz}) \quad (1.8)$$

Это уравнение называется уравнением Лармора, а частота ν_0 - Ларморовской частотой. 7

Частоты прецессии

Классическое механическое описание



ЯМР частоты (поле 14.1 Т), и природная встречаемость некоторых ядер.

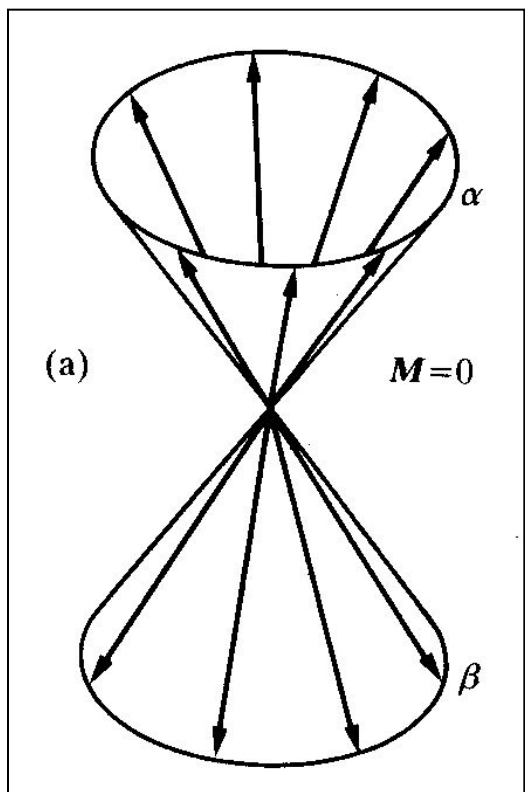
Ядра	ν (MHz)	Природная встречаемость
^1H	600	99.985
^{13}C	150.9	1.108
^{15}N	60.75	0.37
^{19}F	564.75	100.0
^{31}P	243.15	100.0

В магнитном поле 14.1 Т, которое типично для сегодняшних ЯМР экспериментов, Ларморовская частота прецессии равна , $\nu_0 = 6 \times 10^8$ Hz или 600 MHz для ядер водорода. Поскольку атом водорода наиболее популярный атом в ЯМР, то ЯМР-спектрометры классифицируются по этой (водородной) частоте, а не по величине магнитного поля.

Отметим, что частоты ЯМР соответствуют радио-частотам (длина волны 600 MHz соответствует длине волны 50 см)

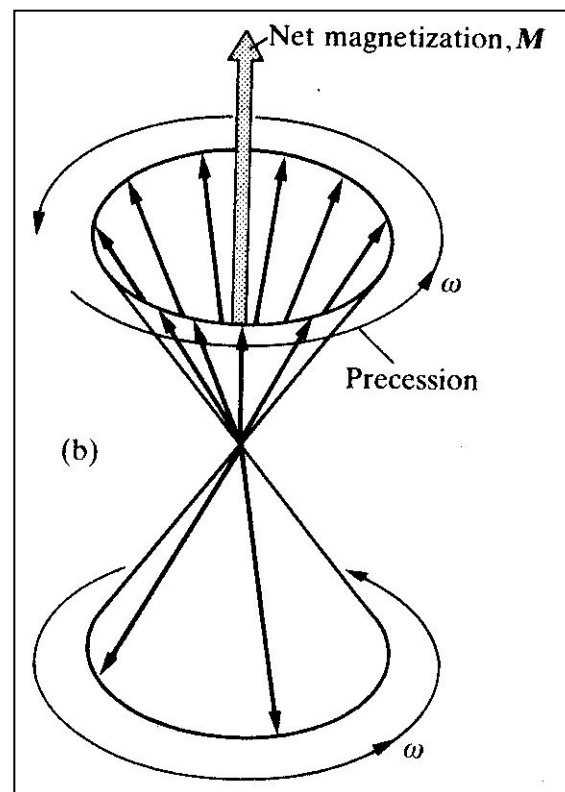
“Атом водорода –самый, самый”

Внешнее поле отсутствует



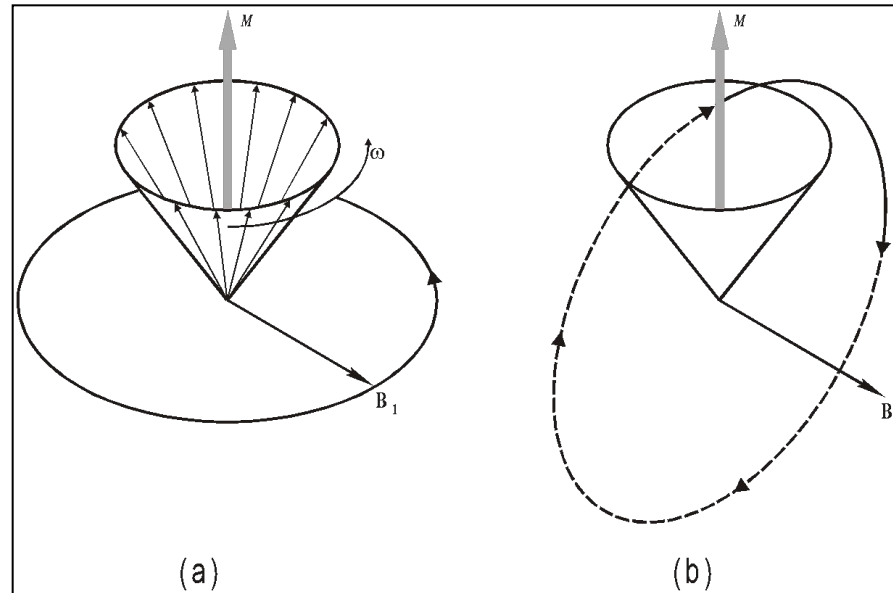
Магнетизация образца ядра имеющего спин $\frac{1}{2}$. В отсутствии внешнего магнитного поля имеется равное число спинов с разной энергией и суммарная магнетизация равна нулю.

Внешнее поле присутствует



Магнетизация образца в присутствии внешнего магнитного поля. Спины прецессируют под определенным углом и имеется разность в популяции спинов в двух состояниях. Как следствие этого появляется суммарная магнетизация вдоль оси Z .

Влияние радиочастотного импульса. Условия резонанса



(a) В резонансных экспериментах радиочастотное магнитное поле B_1 прикладывается в xu плоскости (нижний конус не показан)

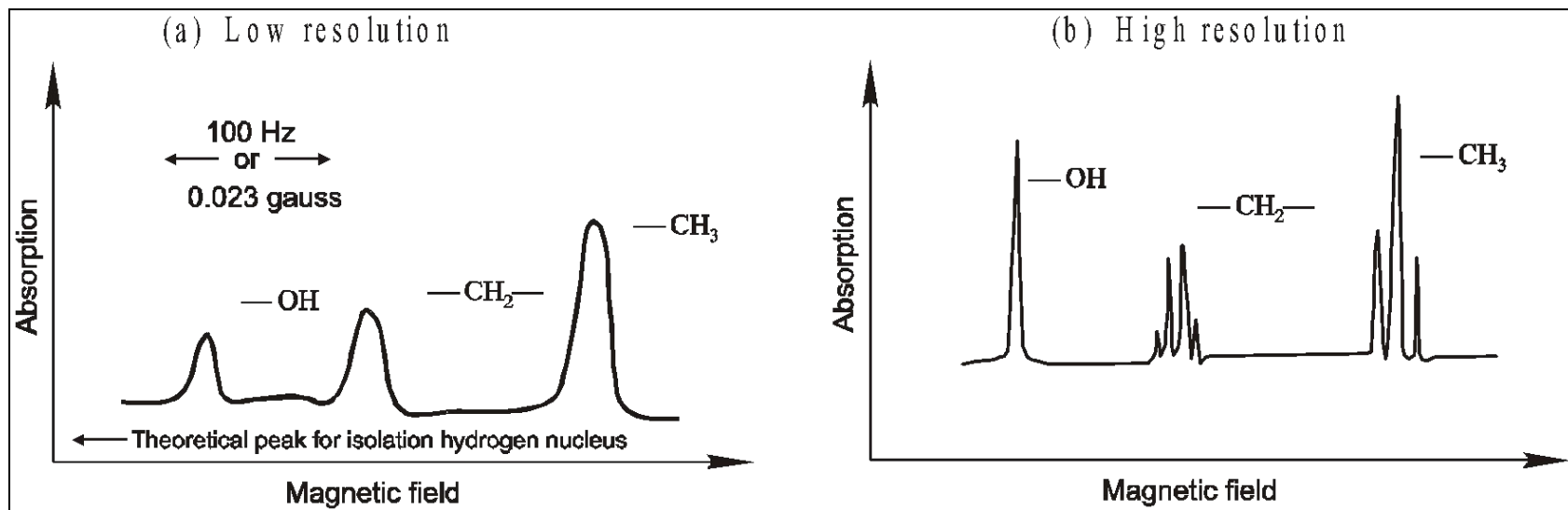
(b) Если частота приложенного магнитного поля, равна частоте Ларморовской прецессии выбранного ядра, то магнетизационный вектор M начинает вращаться вокруг направления B_1

Происхождение термина ядерный магнитный резонанс

Для протона требуемая величина поля B_1 составляет около 6×10^{-4} Т, тогда как величина поля B_0 от 1.4 до 21Т. Таким образом «ничтожные» изменения магнитного поля B_1 вызывают большие изменения в спиновой магнитной системе. Такие явления в физике называются резонансными..

Эффекты ядерного окружения на спектры ЯМР

ЯМР спектры этилового спирта, иллюстрирующие два типа эффектов



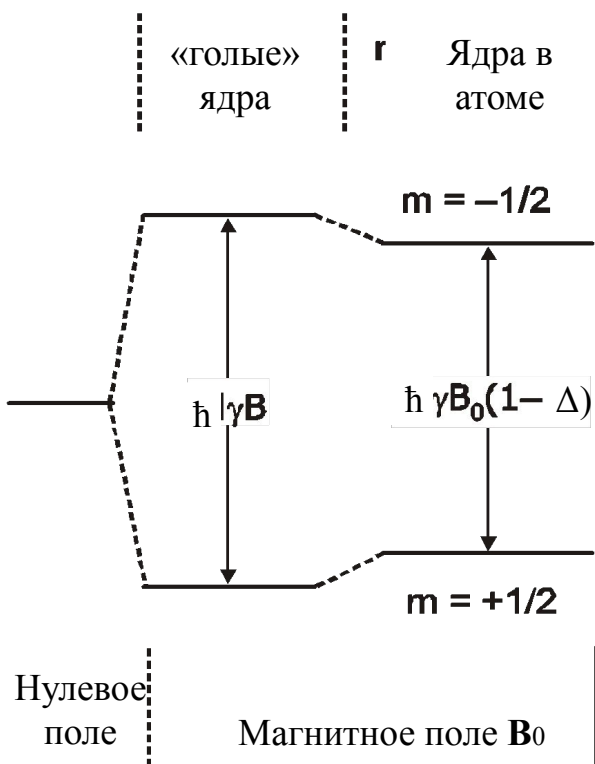
Кривые на рисунке слева показывают спектры C_2H_5OH , полученные при низком разрешении. Видны три резонансные линии, чьи площади соотносятся как 1:2:3. Логически приписать эти пики протонам гидроксила, метилена и метила, соответственно.

Частотное смещение этих пиков зависит от типа группы и называется химическим смещением.

Кривые на рисунке справа показывают тот же спектр этанола, но снятый при высоком разрешении. Каждый протонный пик расщепляется на отдельные пики.

Расщепление пиков на тонкие линии называется спин-спиновым расщеплением

Химическое смещение



Явление химического смещения возникает от того, что реальное магнитное поле \mathbf{B} , действующее на ядро, слегка отличается внешне приложенного \mathbf{B}_0 . Это различие обусловлено экранирующим эффектом электронов, окружающих ядро. Электроны в магнитном поле генерируют маленькое (по сравнению с \mathbf{B}_0 магнитное поле \mathbf{B}' направленное противоположно исходному полю \mathbf{B}_0 (см. Рисунок). \mathbf{B}' пропорционально \mathbf{B}_0 и в 10^4 - 10^5 раз меньше. Поэтому реальное поле \mathbf{B} может быть записано как

$$\mathbf{B} = \mathbf{B}_0 - \mathbf{B}' = \mathbf{B}_0 (1 - \sigma) \quad (1.10),$$

где константа пропорциональности σ называется константой экранирования

В связи с этим условия резонанса также меняются

$$\nu_0 = \gamma \mathbf{B}_0 (1 - \sigma) / 2\pi \quad (1.11),$$

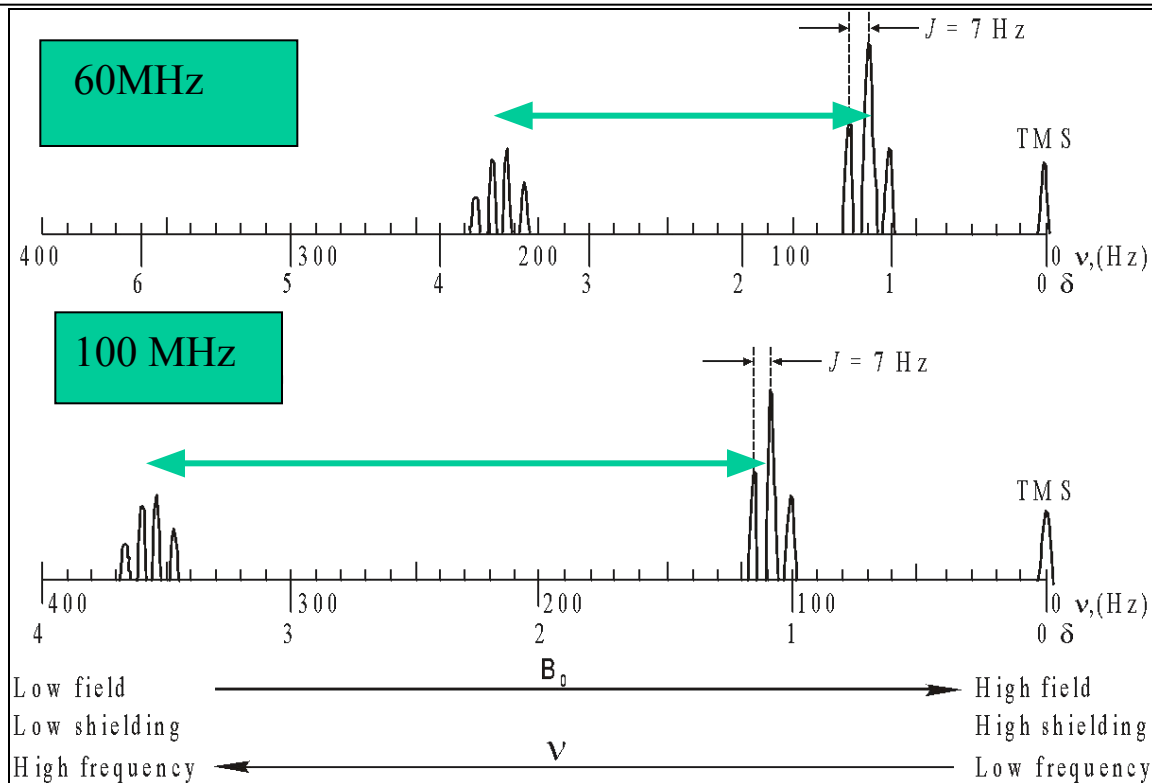
т.е. резонансная частота ядра внутри атома слегка ниже, чем таковая для изолированного ядра.

Важно подчеркнуть, что константа экранирования δ очень чувствительна к химическому окружению. Иначе...

Константа экранирования σ в абсолютных единицах является неудобной мерой химического сдвига. Общепринято измерять химическое смещение, как безразмерный параметр δ , а именно как разность частот между интересующим нас ядром (ν_x) и эталонным ядром (ν_{ref}), разделенную на частоту спектрометра ν_0

$$\delta = (\nu_x - \nu_{ref}) / \nu_0 \quad (1.12).$$

Единицей δ является 1 ppm (одна миллионная часть)

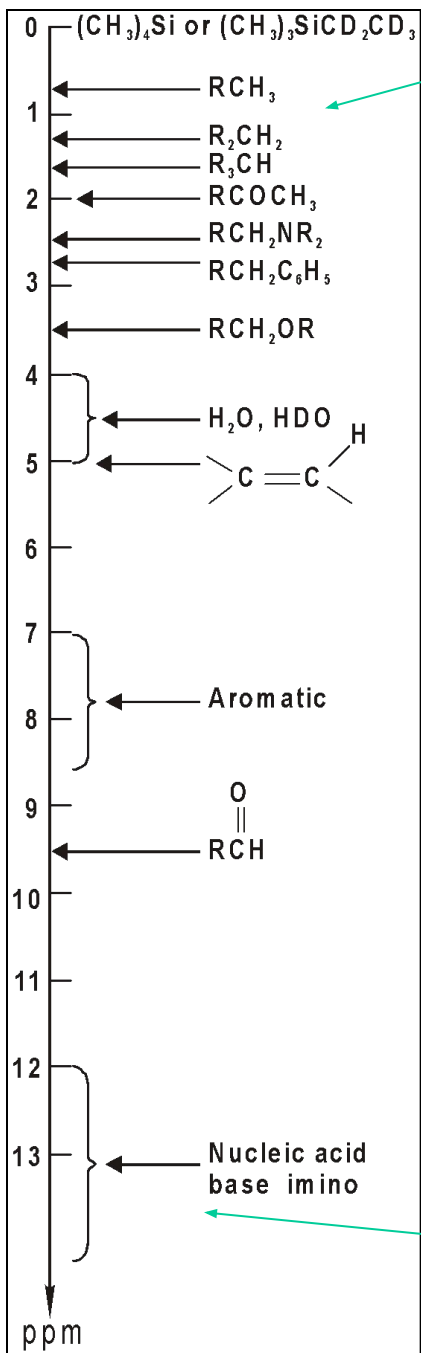


Стандартная абсцисса ЯМР спектра

Эталонный сигнал в спектре ЯМР получается добавлением в раствор небольшого количества тетраметилсилана ($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, или TMS. Эта молекула инертна, растворима в большинстве органических растворителей и дает сильный одиночный сигнал из 12 протонов. К сожалению это вещество плохо растворимо в воде.

Для водных растворов используется как эталон натриевая соль 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоновая кислота (DSS).

Обратите внимание, что расстояние между линиями в спектрах ЯМР возрастает с увеличением рабочей частоты спектрометра!!!!



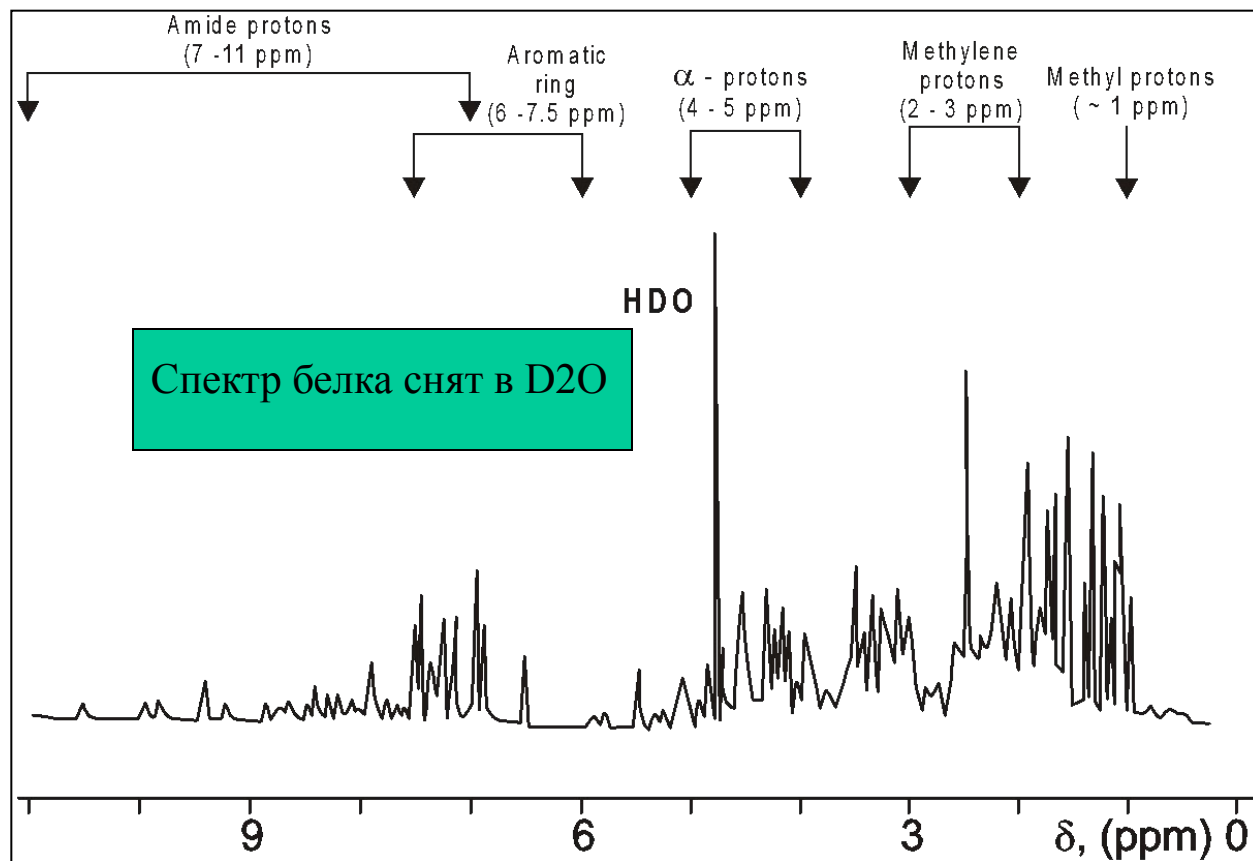
Высокопольное смещение

Величины химических смещений в ядрах зависят от многих факторов, но определяющей является окружающая ядро электронная плотность. Высокая ее величина вызывает большой экранирующий эффект. Это означает что для получения резонанса нужно приложить большее магнитное поле. Высокопольное смещение ведет к малым величинам δ . Напротив, низкая электронная плотность ведет к низкопольному смещению и большим величинам δ . На рисунке показаны приблизительные величины химических смещений для различных типов протонов.

Большинство протонных пиков лежит в интервале от 1 до 13.

Низкопольное смещение

Одномерный
протонный ЯМР
спектр бычьего
трипсинового
ингибитора
(BTI),

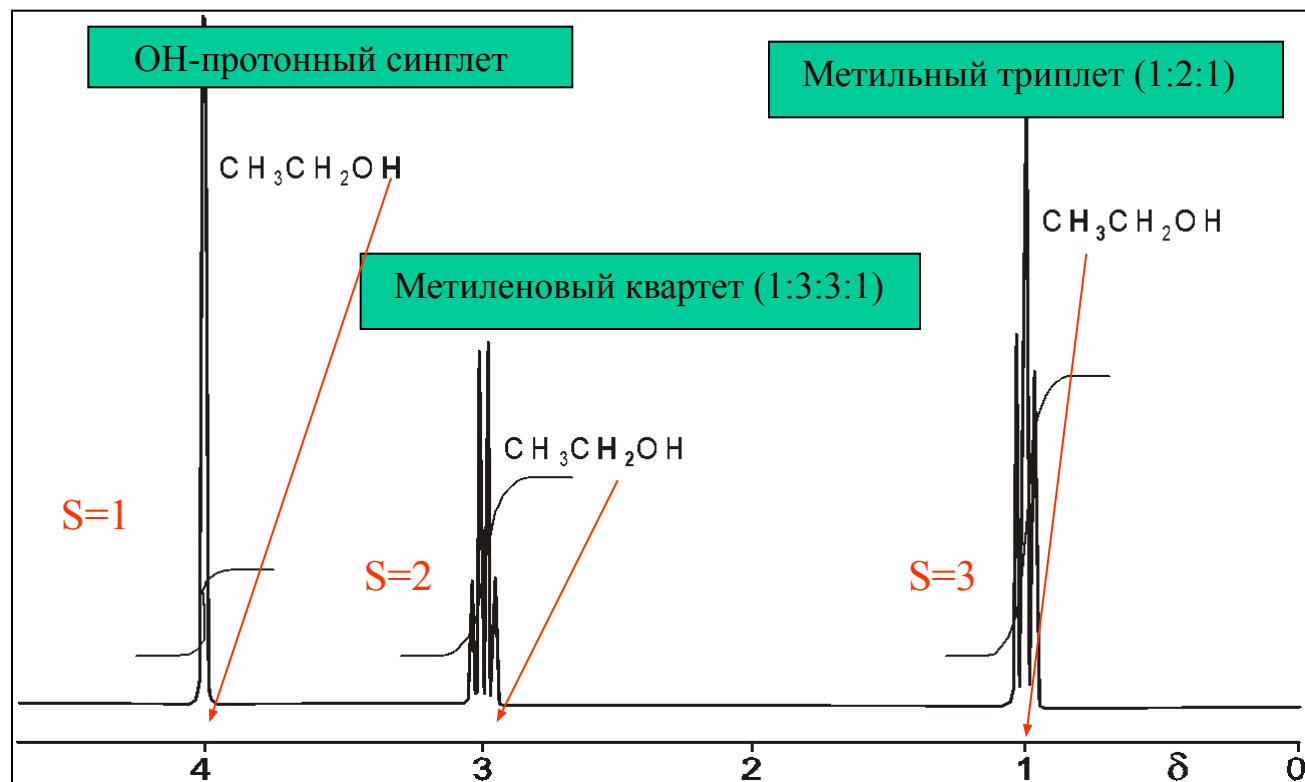


Резонансные пики разных водородных атомов в ВРТИ. Химических смещения даны в единицах ppm. Отчетливо видно, что величины смещений связаны с химической структурой групп. Так, резонансные линии метильных групп расположены в правой части спектра вблизи 1 ppm, тогда как лабильные амидные протоны располагаются в самой левой части спектра (7-11 ppm); в промежутке между ними наблюдаются протоны метиленовых групп (2-3 ppm), α -протоны (4-5 ppm), и протоны ароматических колец (6-7,5 ppm).

Спин-спиновое взаимодействие

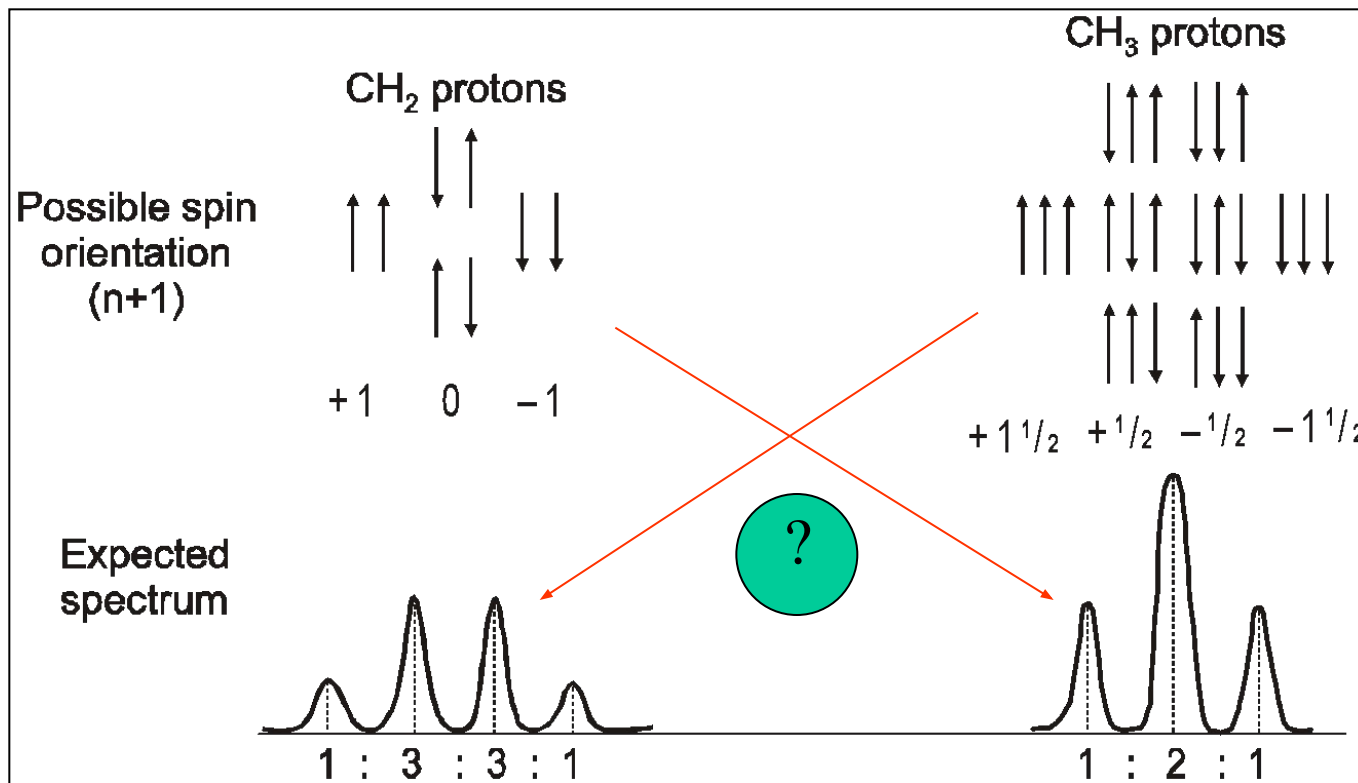
Протонный спектр этанола высокого разрешения, демонстрирующий эффект спин-спинового расщепления.

S-площадь под кривой каждого пика

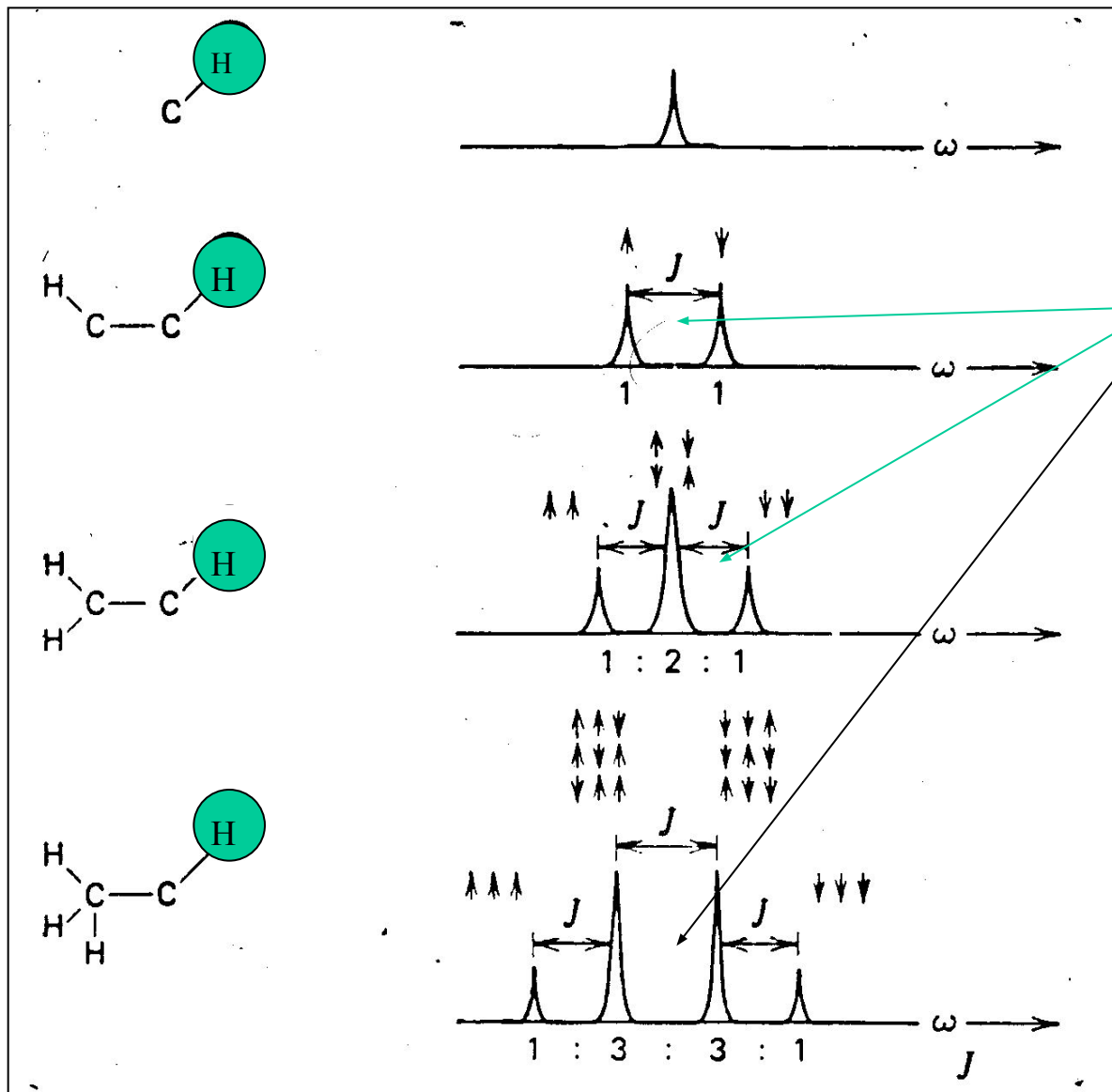


В химической формуле этилового спирта на рисунке жирным выделены водороды, ответственные за резонансные пики. CH_3 протоны образуют одну группу с величиной химического смещения $\delta \approx 1$. Два CH_2 протона находятся в другом окружении и резонируют при $\delta \approx 3$. Наконец, OH протон резонирует при $\delta \approx 4$. Внимательное рассмотрение всех этих пиков показывает, что величина расщепления трех компонентов в метильной полосе идентична величине расщепления четырех компонентов в метиленовой полосе. Это расщепление выражается в герцах и называется константой расщепления и обозначается символом J . Более того, площади пиков в каждом мультиплете относятся к друг другу как целые числа. Так, отношение площадей в метиленовом триплете $1:2:1$, тогда как метиленовом квартете $1:3:3:1$.

Возможная ориентация протонных спинов в метиленовой и метильной группах и ожидаемое спин-спиновое расщепление



Расщепление спинов- это информация не о себе, а о соседях!!

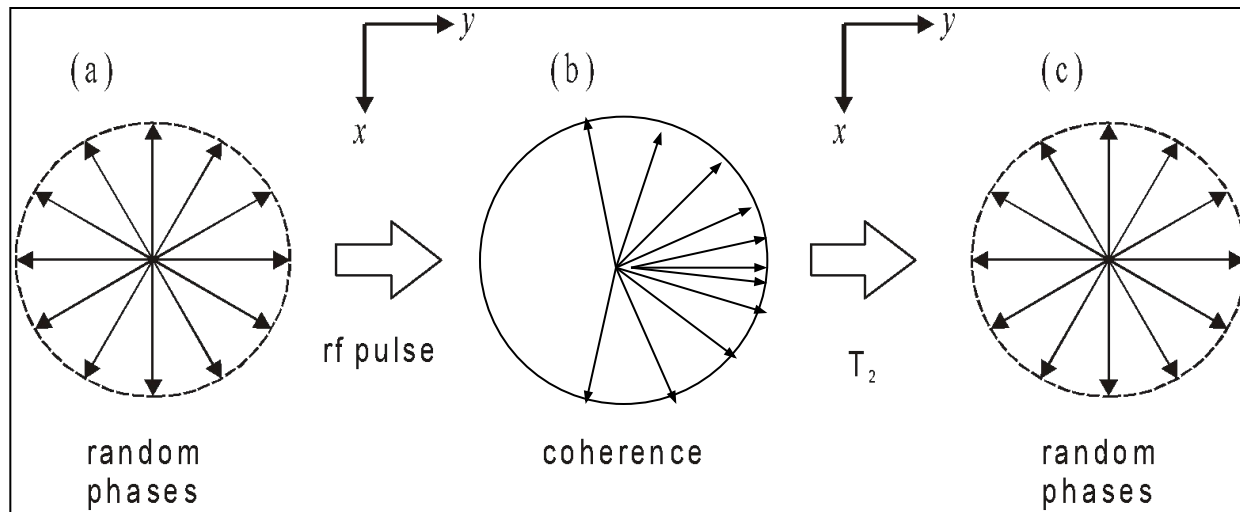


1. Константа спин-спинового расщепления J выражается в Hz.
2. Она одинакова для всех мультиплетов и не зависит от приложенного магнитного поля
3. Величина J для протонов лежит в интервале от 0 до 20 Hz.
4. Число узких линий в мультиплете на единицу больше числа **соседей**
5. Спиновое расщепление данного ядра несет информацию **о его соседях**

ЯМР –это “подслушка”, не о себе – а о соседях (ближайших)!!!

Два типа релаксационных процессов в ЯМР

Поперечное релаксационное время, T_2 .



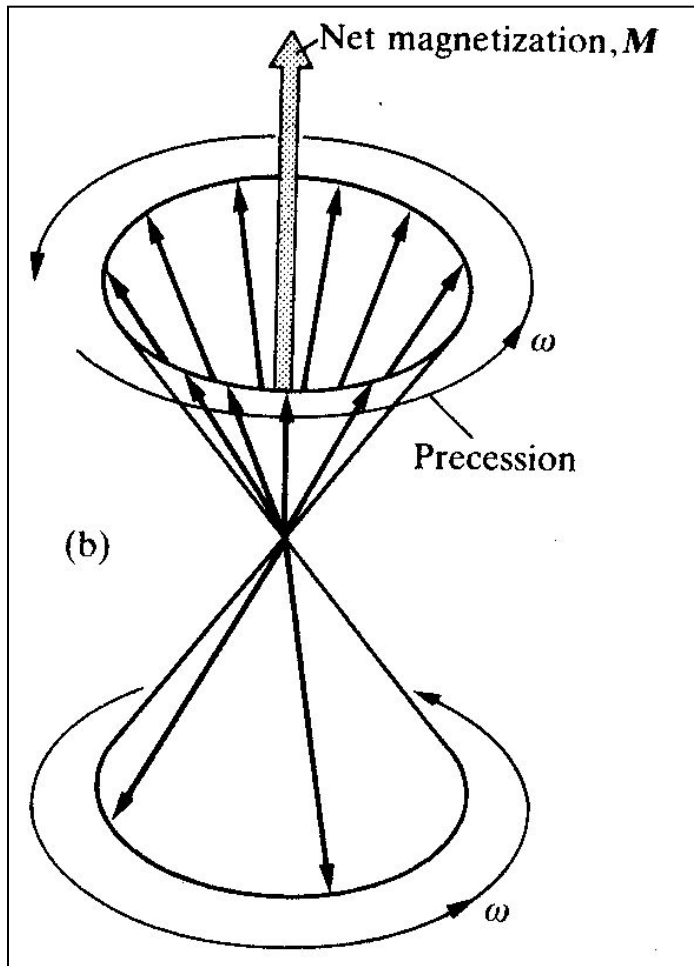
Релаксационное время T_2 отражает корреляцию между спинами и называется спин-спиновой релаксацией. Это время связано с шириной наблюдаемых резонансных линий:

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2} \quad (1.9)$$

где $\Delta\nu_{1/2}$ есть ширина линии на полувысоте пика. Типичное время T_2 для протонного ЯМР несколько секунд, что соответствует ширине линии около 0,1 Hz.

Два типа релаксационных процессов в ЯМР

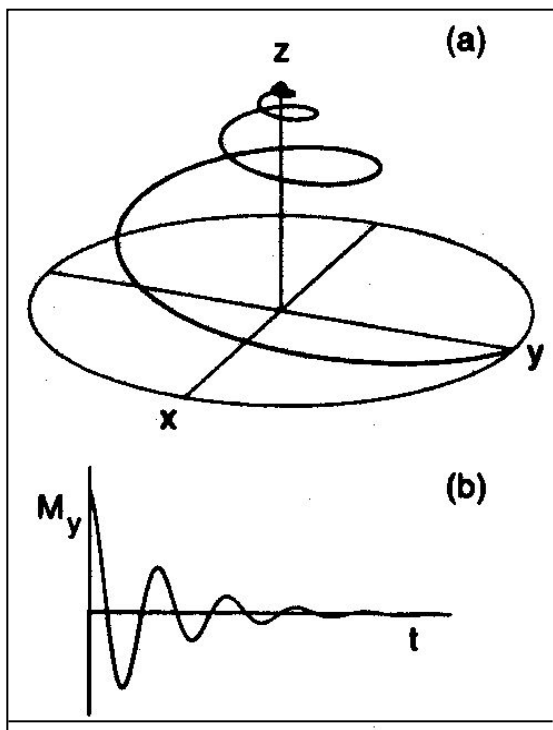
Осевое (продольное) релаксационное время T_1 .



При возвращении системы к равновесию Z -компонента магнетизационного вектора падает со временем от M_1 к M_0 по экспоненциальному закону. Это время релаксации называется осевым или продольным временем релаксации T_1 .

Константа T_1 отражает эффективность связи между ядерными спинами и окружающей средой (решеткой) и называется также временем спин-решеточной релаксации. Это время тесно связано с агрегатным состоянием образца. Оно лежит в интервале времен от 10^{-3} to 10^2 сек. для жидкостей.

Спин-спиновая и спин-решеточная релаксация



Оба типа релаксации всегда присутствуют в ЯМР эксперименте. Общая картина возврата системы спинов к равновесию представлена на рисунке: (a) в пространстве и (b) в y -плоскости.

Отметим, что знание времени спин-решеточной релаксации T_1 необходимо для корректной постановки ЯМР эксперимента. Повтор опыта возможен только после того как спиновая система пришла в равновесие.