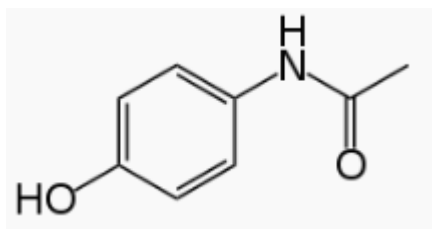


Спектроскопия ЯМР высокого разрешения

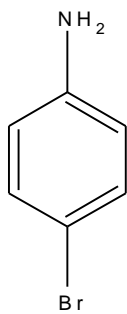
Провести соотнесение линий в спектрах:

- Задание выполняется с помощью программы MestrelNova.
- Изучить общий вид спектра – количество и интенсивность линий, наличие тонкой структуры и неразрешенных полос. Записать в журнал величину рабочей частоты прибора, рассчитать напряженность соответствующего постоянного магнитного поля.
- Установить шкалу в м.д. (для этого щелкните правой клавишей мыши над полем со спектром → «**Properties**» → вкладка «**NMR Spectrum**» → «**Scales**» → вкладка «**Axes**» → «**Units**» → «**ppm**»). Пользуясь курсором, определить химический сдвиг каждой из линий в спектре.
- Установить шкалу в Герцах (для этого щелкните правой клавишей мыши над полем со спектром → «**Properties**» → вкладка «**NMR Spectrum**» → «**Scales**» → вкладка «**Axes**» → «**Units**» → «**Hz**»). Пользуясь курсором, определить химический сдвиг в Герцах для каждой из линий в спектре. Измеренные хим. сдвиги выразить в м.д. и сравнить с предыдущим пунктом.
- Исследовать тонкую структуру спектра – мультиплетность линий и величины констант спин-спинового взаимодействия J . Для измерения констант J использовать «Линейку». Интенсивность компонент мультиплета определить путем интегрирования. Измеренное отношение интенсивностей сравнить с теоретическим.
- Основываясь на данных об интенсивностях линий в спектре и таблице свойств дейтерированных растворителей, выделить в спектре линии, принадлежащие остаточным протонам в растворителе и протонам примесей.
- Занести в журнал «скелетную» схему спектра – количество линий, их химические сдвиги и относительные интенсивности, тонкую структуру мультиплетных линий.
- Оценить максимально допустимую величину неоднородности постоянного магнитного поля, позволяющего получить спектр с таким разрешением.
- Определить ширину линий на половине высоты (в Гц). Совпадает ли ширина для разных линий в спектре? Если нет, то с чем это может быть связано?

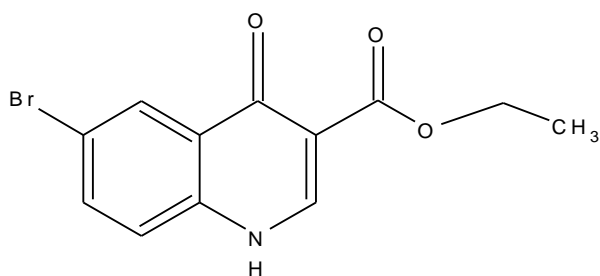
Парацетамол (DMSO-d₆), 500 MHz



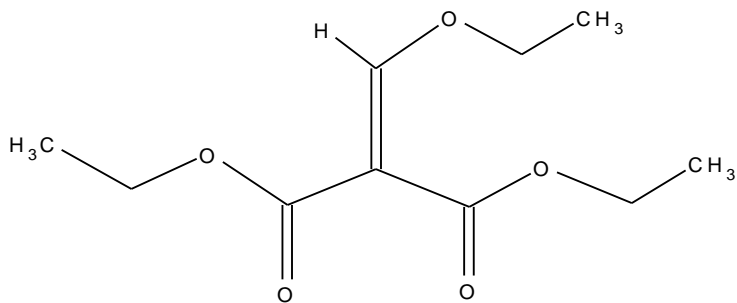
A-105 (DMSO-d6), 500 MHz



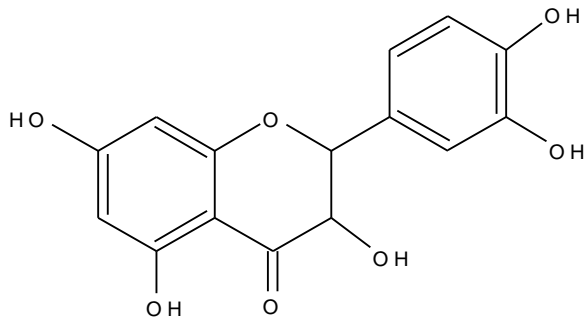
A-100 (in 0.5 ml CF_3COOH + 0.1 ml DMSO-d6), 500 MHz



A-103 (CDCl_3), 500 MHz



KVERCETIN_DMSO_D2O (80% DMSO + 20% D_2O), 500 MHz



Определить структурную формулу вещества:

- Для последующей работы по расшифровке спектра занести в журнал «скелетную» схему спектра – количество линий, их химические сдвиги и относительные интенсивности, тонкую структуру мультиплетных линий.
- При возможности изменять рабочую частоту занести в журнал схему спектра при высоких и низких частотах (например, 60 и 600 МГц), шкала – в Герцах. Для этого выберите **раздел «Tools» на верхней панели MestreNova** → **«Spin simulations ...»** → **«Frequency»**. Объясните, как и почему изменился вид спектра при смене рабочей частоты.
- Основываясь на ширине линий, оцените времена релаксации ядерной намагниченности для ядер данного соединения.

$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ -а в CDCl_3 по спектрам на ядрах ^1H , ^{13}C , 600 MHz

$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ -а в D_2O по спектру на ядрах ^1H , 600 MHz

$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ -b в D_2O по спектру на ядрах ^1H , 600 MHz

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ в CDCl_3 по спектру на ядрах ^1H , 600 MHz

$\text{C}_6\text{H}_6\text{-CF}_3\text{-NO}_2$ в CDCl_3 по спектру на ядрах ^1H , 600 MHz

Образец 2: $\text{C}_3\text{H}_6\text{Cl}_2$, ^1H спектр, частоту можно варьировать

Образец 3: $\text{C}_3\text{H}_6\text{Cl}_2$, ^1H спектр, частоту можно варьировать

Образец 4: $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, ^1H спектр, частоту можно варьировать

Образец 5: $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, ^1H спектр, частоту можно варьировать

Образец 7: $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$, ^1H спектр, частоту можно варьировать

Образец 15: $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_3\text{N}$, ^1H спектр, частоту можно варьировать

ЯМР-релаксометрия: ход выполнения работы

1. Получите у преподавателя растворы сульфатов (CuSO_4 , Na_2SO_4 , MnSO_4) концентрацией 0,25 М. Включите компьютер, подключенный к ЯМР релаксометру. Зарегистрируйте сигнал спада свободной индукции для стандартного образца Daily Check, используя одноимпульсную 90° последовательность FID (Free induction decay, приложение **fid**). Оцените значение времени T_2^* . Посмотрите на вкладку The minispec → Instrument settings и запишите себе настройки прибора (не изменяя их), в частности **рабочую частоту: 9,95 МГц**.

2. Используя приложение **pulses10MHz**, определите длительности 90 и 180-градусных импульсов (их длительность измеряется в мкс). Используйте образец Daily check. Сохраните в файл (Save copy as → Save data pairs / triplets) полученную зависимость амплитуды сигнала FID (пропорциональную компоненте M_x вектора ядерной намагниченности) от длительности импульса. С помощью этой зависимости определите длительности 90 и 180-градусных импульсов.

3. Поместите в прибор пробирку с дистиллированной водой (около 20 – 30 мл) и измерьте время поперечной релаксации (T_2), используя импульсную последовательность CPMG (приложение **t2_cpmg**). Для *чистой воды* используйте параметры последовательности (Acquisition configuration table): 90–180 Pulse Separation (tau) – около 1 мс, Number of Data Points for Fitting – обычно 512, Number of not Fitted Echoes (количество пропускаемых эхо-сигналов) – около 15, Acquisition parameter table → Recycle Delay – около 15 с (время ожидания восстановления равновесной намагниченности между экспериментами, должно быть порядка $5 \cdot T_1 \approx 5 \cdot T_2$). Сохраните результат в файл, определите и запишите в лабораторный журнал величину T_2 . При появлении сообщения Signal clip error (ошибка фиксации сигнала: превышение величины 100 усл. ед.) уменьшите величину коэффициента усиления сигнала индукции (например, используйте величину Acquisition parameter table → Gain 55 dB). Проведите измерение несколько раз с интервалом 1-5 минут. С чем может быть связано изменение результатов измерений T_2 ?

4. Получите сигнал спада свободной индукции, используя одноимпульсную последовательность FID (Free induction decay, приложение **fid**). Оцените значение времени T_2^* . Сохраните результат в файл.

5. Измерьте значение T_1 , используя импульсную последовательность насыщение – восстановление (по англ. Saturation–Recovery, приложение **t1_sr**). Для *чистой воды* используйте параметры последовательности: First Pulse Separation около 100 мс, Final Pulse Separation около 15000 мс, Number of Data Points for Fitting – около 15, Acquisition parameter table → Recycle Delay – около 15 с (время ожидания восстановления равновесной намагниченности между экспериментами, должно быть порядка $5 \cdot T_1 \approx 5 \cdot T_2$). Сохраните результат в файл, определите и запишите в лабораторный журнал величину T_1 .

6. Не извлекая пробирку из резонансной полости, аккуратно добавьте в нее раствора одного из сульфатов (~10 мкл 0,25 М MnSO_4 или ~100 мкл 0,25 М CuSO_4 или ~1000 мкл 0,25 М Na_2SO_4). Используйте автоматические пипетки. Рассчитайте концентрацию полученного раствора и запишите в лабораторный журнал. Измерьте T_2 и T_2^* , сохраните результаты.

7. Для получения зависимости времен релаксации от концентрации соли аккуратно добавьте раствор соли в пробирку еще несколько (4-5) раз и проведите аналогичные измерения (пункты 3-5), сохраните результаты.

8. Измерьте зависимости T_2 и T_2^* от концентрации остальных сульфатов аналогично пунктам 3-7. Запишите исходные концентрации растворов солей. Постройте графики зависимостей $1/T_2$ и $1/T_2^*$ от концентрации. Сопоставьте, какая из солей (сульфаты Cu, Mn, Na) приводит к большему изменению времен релаксации. Попытайтесь объяснить, с чем это связано.

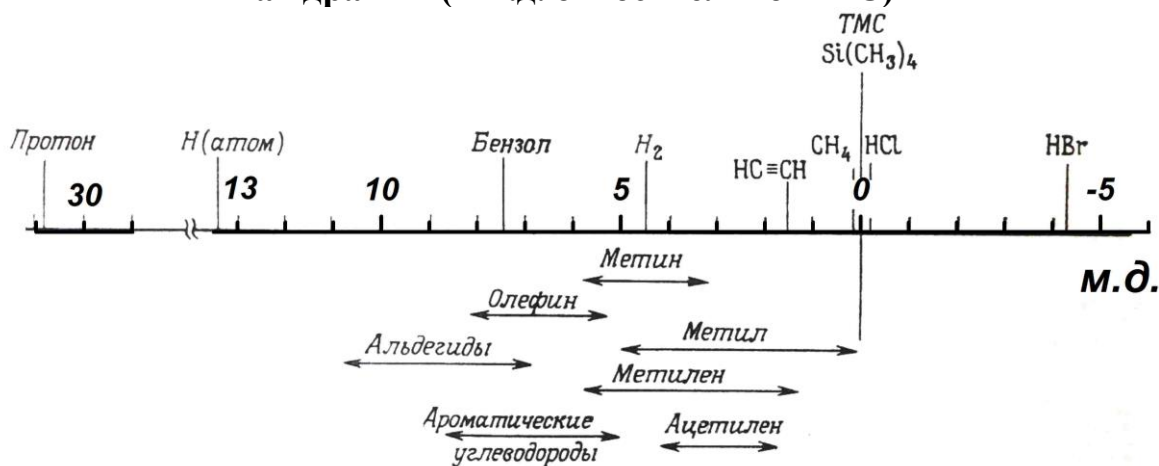
9. Сопоставляя величины $1/T_2$ и $1/T_2^*$, оцените масштаб неоднородности магнитного поля δB_0 в образце (а также $\delta \nu_0$ в Гц и $\delta \nu_0 / \nu_0$ в м.д.).

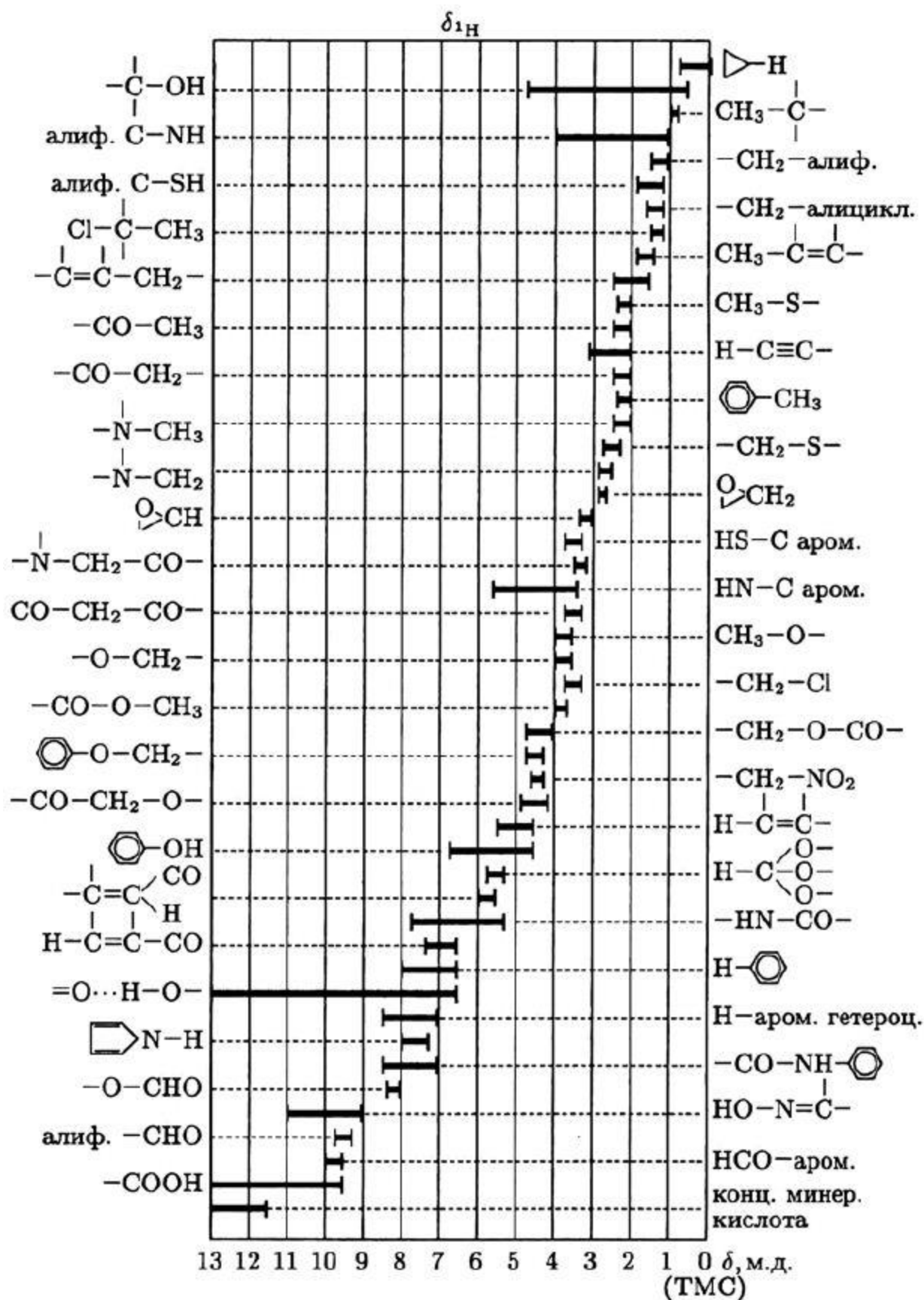
10. * Зарегистрируйте сигнал FID (приложение **fid_spectrum**) для образца с двумя ампулами (в одной – вода, в другой – 0.04 М раствор MnSO_4). Проведите преобразование Фурье сигнала FID и постройте зависимость амплитуды от сдвига резонансной частоты $\nu - \nu_0$ («ЯМР спектр»). Используя расстояние между «линиями», оцените масштаб неоднородности магнитного поля $\delta B_0/B_0$ в образце и ширину единичной линии «спектра» (в м.д.). Сделайте вывод, достаточно ли полученное разрешение для выделения в спектре линий протонов различных функциональных групп. Чем объясняется различие в амплитуде и ширине «линий»?

Свойства важнейших дейтерированных растворителей

Растворитель	Остаточ- ный сигнал ^1H , δ_{H}^* (м.д.)	Сигнал воды, $\delta_{(\text{HDO})}^{**}$ (м.д.)	Остаточный сигнал ^{13}C , δ_{C}^* (м.д.)	Темпера- тура плавле- ния ($^{\circ}\text{C}$)	Темпе- ратура кипения ($^{\circ}\text{C}$)
1	2	3	4	5	6
Уксусная кислота- d_4	11.65, 2.04	11.5	179.0, 20.0	16	116
Ацетон- d_6	2.05	2.0	206.7, 29.9	-94	57
Ацетонитрил- d_3	1.94	2.1	118.7, 1.4	-45	82
Бензол- d_6	7.16	0.4	128.4	5	80
Хлороформ- d_1	7.27	1.5	77.2	-64	62
Оксид дейтерия- d_2	4.80	4.8	—	4	101
Дихлорметан- d_2	5.32	1.5	54.0	-95	40
N,N-Диметил- формаид- d_7	8.03, 2.92, 2.75	3.5	163.2, 34.9, 29.8	-61	153
Диметилсульфо- ксид- d_6	2.50	3.3	39.5	18	189
Метанол- d_4	4.87, 3.31	4.9	49.2	-98	65
Пиридин- d_5	8.74, 7.58, 7.22	5.0	150.4, 135.9, 123.9	-42	114
Тетрагидрофуран- d_8	3.58, 1.73	2.4	67.6, 25.4	-109	66

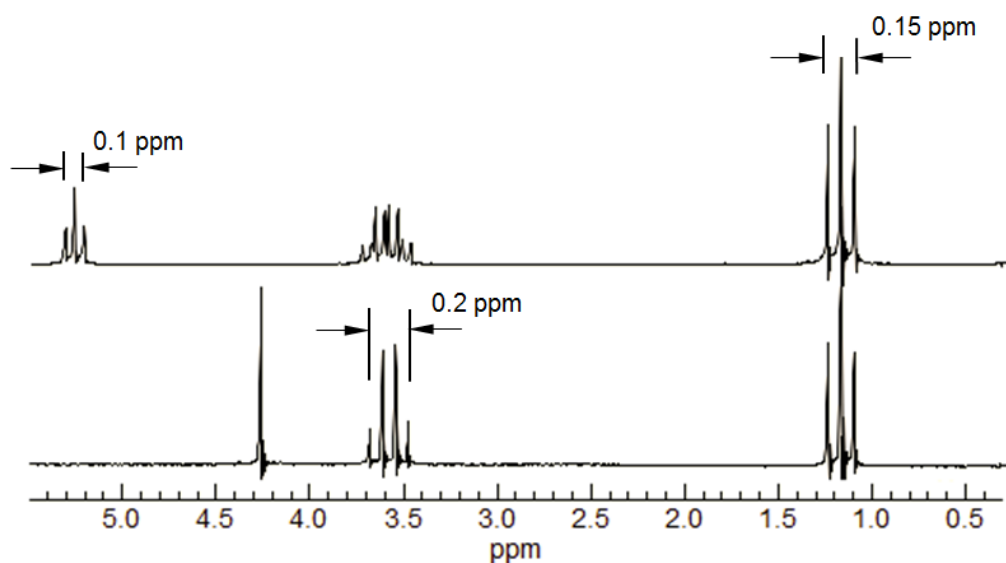
Типичные величины химических сдвигов для ЯМР на ядрах ^1H (в м.д. относительно TMC)





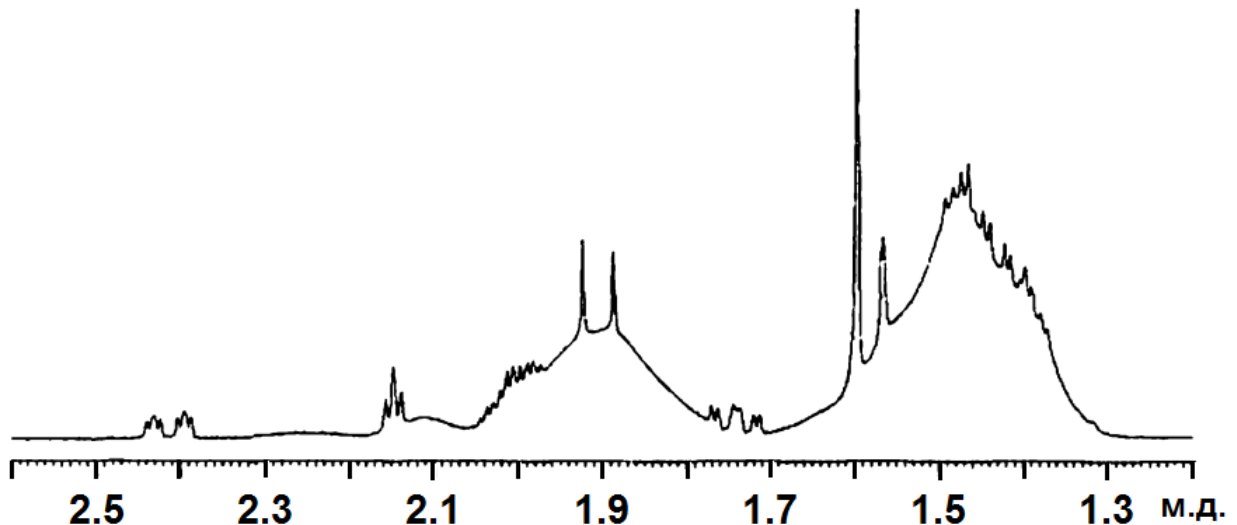
Дополнительные вопросы (на сдаче лабораторной работы)

1. Как изменится время релаксации протонов воды, если удалить из нее растворенный в ней молекулярный кислород?
2. Стоит ли для улучшения разрешения при получении спектра ЯМР добавить в исследуемый раствор соль парамагнитных ионов (например, соль гадолиния Gd^{3+}), как это делают в некоторых магнито-резонансных томографических (МРТ) исследованиях? Для чего в МРТ применяются соли гадолиния?
3. Для фермента получен протонный ЯМР спектр. Для некоторых линий характерны химические сдвиги, примерно в два раза отличающиеся от сдвигов, обычно наблюдающихся для белков. Кроме того, линии шире, чем те, с которыми обычно имеют дело. В чем может быть причина и как проверить вашу гипотезу?
4. Отличаются ли времена релаксации для ЯМР и ЭПР?
5. Оцените, во сколько раз отличается ширина линий магнитного резонанса в следующих случаях: а) ПМР во льду; б) ПМР в воде.
6. Почему в зависимости времени продольной релаксации от времени корреляции наблюдается минимум, а для времени поперечной релаксации минимума нет?
7. На рисунке представлены ПМР спектры чистого этанола H_3C-CH_2-OH (вверху) и его раствора в CCl_4 (внизу), в м.д. относительно ТМС. Рабочая частота прибора 60 МГц. Считая, что ширина линии ОН в спектре этанола в CCl_4 составила 0.5 Гц, оцените скорость протонного обмена в этих условиях. Объясните, почему изменяется вид спектра.



8. Оцените длительность 90° -ного импульса, если величина магнитного поля в импульсе $B_1 = 0.5 \times 10^{-2}$ Тл. Чем отличается воздействие на спиновую систему (например, на протоны в молекулах спирта в ампуле в ЯМР-спектрометре) 90° импульсов различной длительности?

9. Почему в ЯМР спектрах для протонов в бензоле наблюдается *сильный слабопольный сдвиг* линий (по сравнению с неароматическими системами)?
10. В методе Фурье-спектроскопии ЯМР спектр получают как преобразование Фурье от сигнала спада свободной индукции после действия 90° импульса. Оцените длительность 90° импульса, необходимого для возбуждения спектральных линий во всем диапазоне химических сдвигов для ядра ^{31}P : ~ 700 м.д. Постоянное магнитное поле спектрометра $B_0 = 10$ Тл. Для ^{31}P величина $\gamma/2\pi = 17.2$ МГц/Тл.
11. Рассмотрим множество ядерных спинов в твердом теле во внешнем магнитном поле. Ширина линий в спектре ЯМР в статических условиях определяется взаимодействием соседних спинов. Можно ли добиться сужения линий ЯМР за счет вращения твердого тела?
12. Изобразите схематически, как изменяется во времени амплитуда эхо-сигналов в ходе последовательности CPMG для протонов: а) в молоке, б) в углеводороде, содержащем частицы песка («нефтесодержащая порода»)?
13. На рисунке показан ЯМР спектр на протонах раствора смеси камфоры и полистирола (м.м. = 50 000 Да), полученный на приборе с рабочей частотой 600 МГц. Оцените времена ЯМР релаксации T_2 протонов полистирола и камфоры. Как будет выглядеть спектр, полученный после действия последовательности $90^\circ - [\tau - 180^\circ - \tau]_{150 \text{ раз}} - 90^\circ$ при задержке $\tau = 1.5$ мс? (Считать, что все пики относятся к протонам либо в молекулах камфоры, либо полистирола.)



14. Для системы двух спинов ядер ^1H и ^{15}N , связанных спин-спиновым взаимодействием $J_{\text{NH}} \sim 90$ Гц, в тепловом равновесии разности заселенностей водородных и азотных переходов составляют $2 \Delta\text{H}$ и $2 \Delta\text{N}$ (см. рисунок). Вид ЯМР спектров, полученных преобразованием Фурье сигналов, зарегистрированных после действия 90° импульса, представлен на рис. справа.
 - а) Оцените, чему равно отношение $\Delta\text{N}/\Delta\text{H}$.
 - б) Во сколько раз изменятся разности заселенностей уровней и интенсивности линий в ЯМР спектре ^{15}N , если перед регистрацией включается 180° импульс,

инвертирующий заселенность уровней для перехода H_1 ? Т.е. схема эксперимента: (вывод на равновесие) – $180^\circ_{H1} - 90^\circ_N$ – регистрация.

в) Какова должна быть длительность 180° импульса, чтобы добиться воздействия лишь на один переход H_1 , не затронув H_2 ?

Считать, что образец обогащен изотопом ^{15}N , а $\gamma_{H1}/2\pi = 42.6 \text{ МГц/Тл}$, $\gamma_{N15}/2\pi = -4.32 \text{ МГц/Тл}$.

