

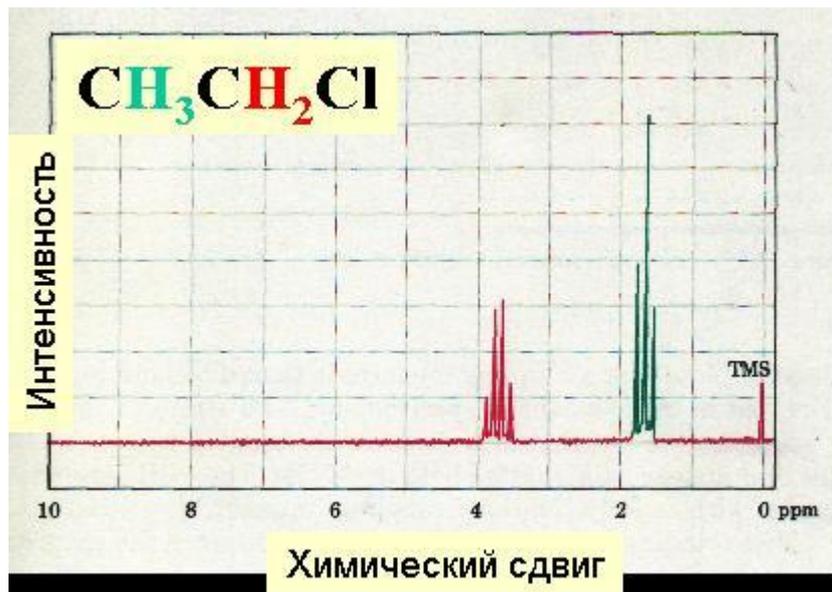
# Лекция 5

1. Применение ЯМР-спектроскопии.
2. Импульсная спектроскопия.
3. Времена релаксации

# Что можно делать с помощью ЯМР-спектроскопии?

- Всё. Ну или почти всё, что касается изучения строения вещества в статике и динамике. ЯМР — **самый** мощный и информативный метод исследования молекул.
- Это **универсальный инструмент** определения химической формулы неизвестных соединений, по своей сложности сравнимый со сборкой пазла или кубика Рубика
- ЯМР дает доказательство строения органических соединений;
- Установление строения органических соединений (первичная и вторичная структура, и иногда - абсолютная конфигурация);
- Конформационные исследования, обменные процессы, кинетика реакций
- Работает на примерно 80 ядрах
- Можно устанавливать % чистоты вещества и состав сложных смесей.

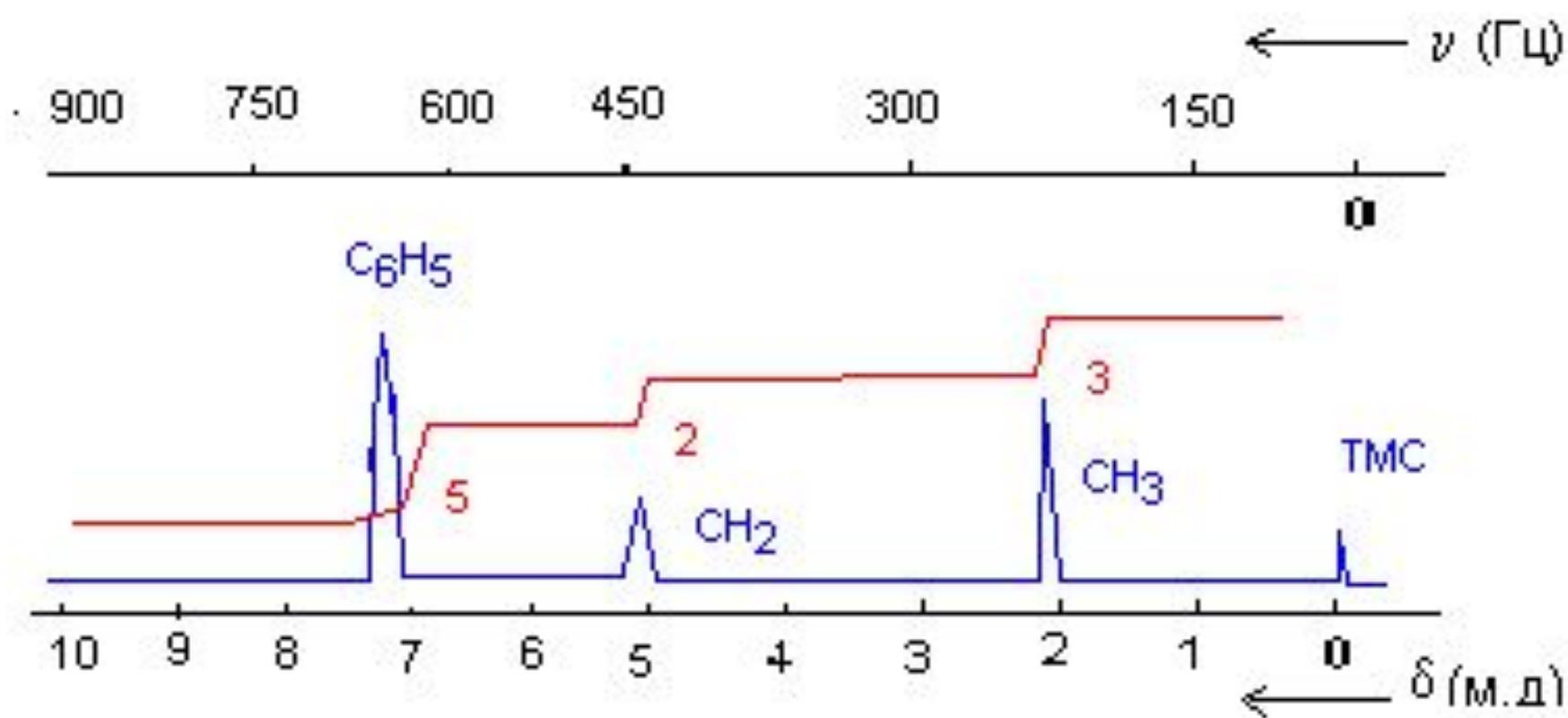
## Свойства спектров ЯМР



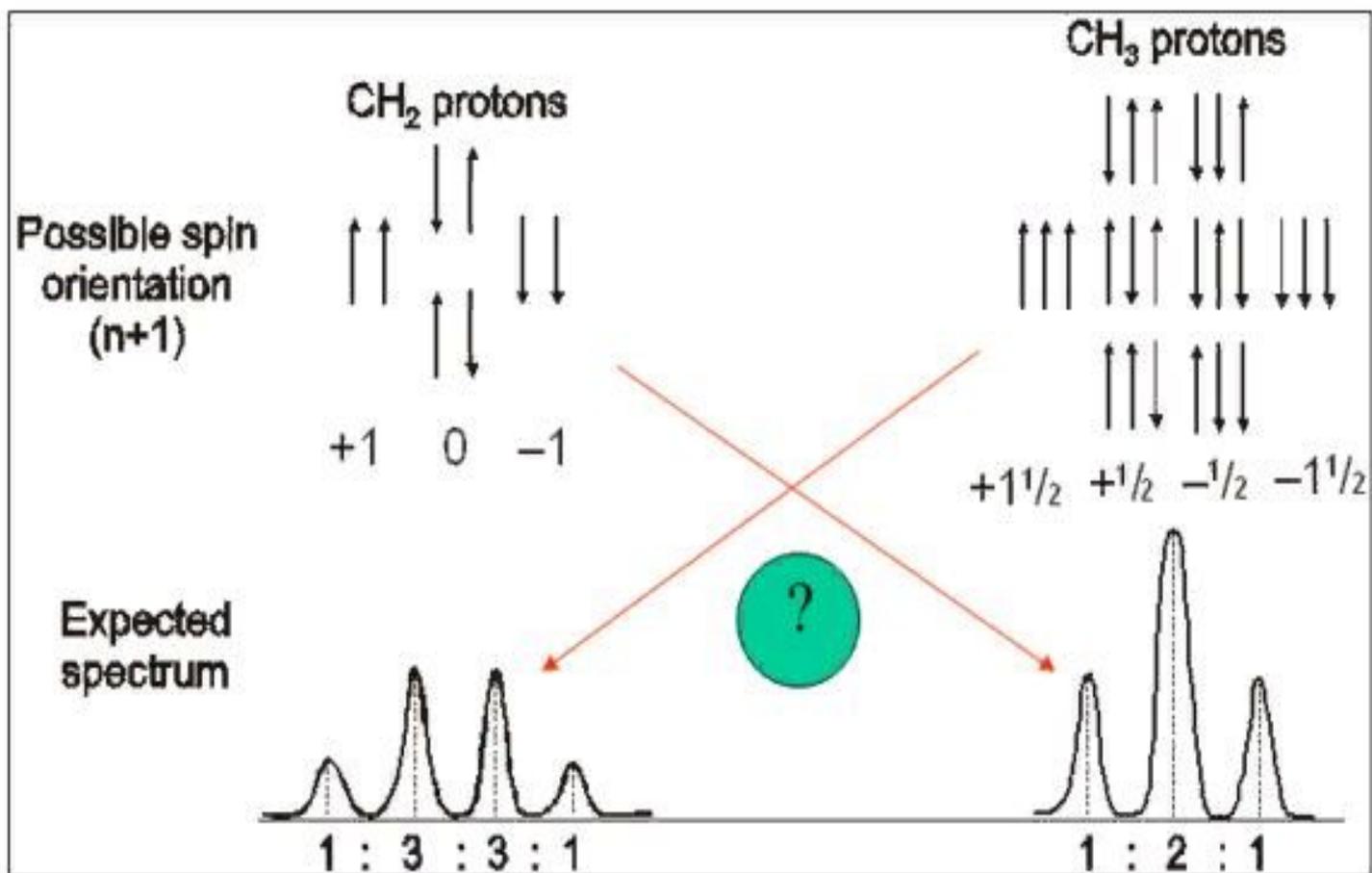
**1.** Интенсивность сигнала. Пропорциональна концентрации магнитных ядер в образце.

**2.** Химический сдвиг. Зависит от степени экранировки ядер электронами. Измеряется в миллионных долях (м.д.).

**3.** Спин-спиновое расщепление линий. Зависит от количества магнитных ядер в непосредственной близости от поглощающего ядра. Это свойство спектра в некоторой степени аналогично сверхтонкой структуре в спектрах ЭПР.

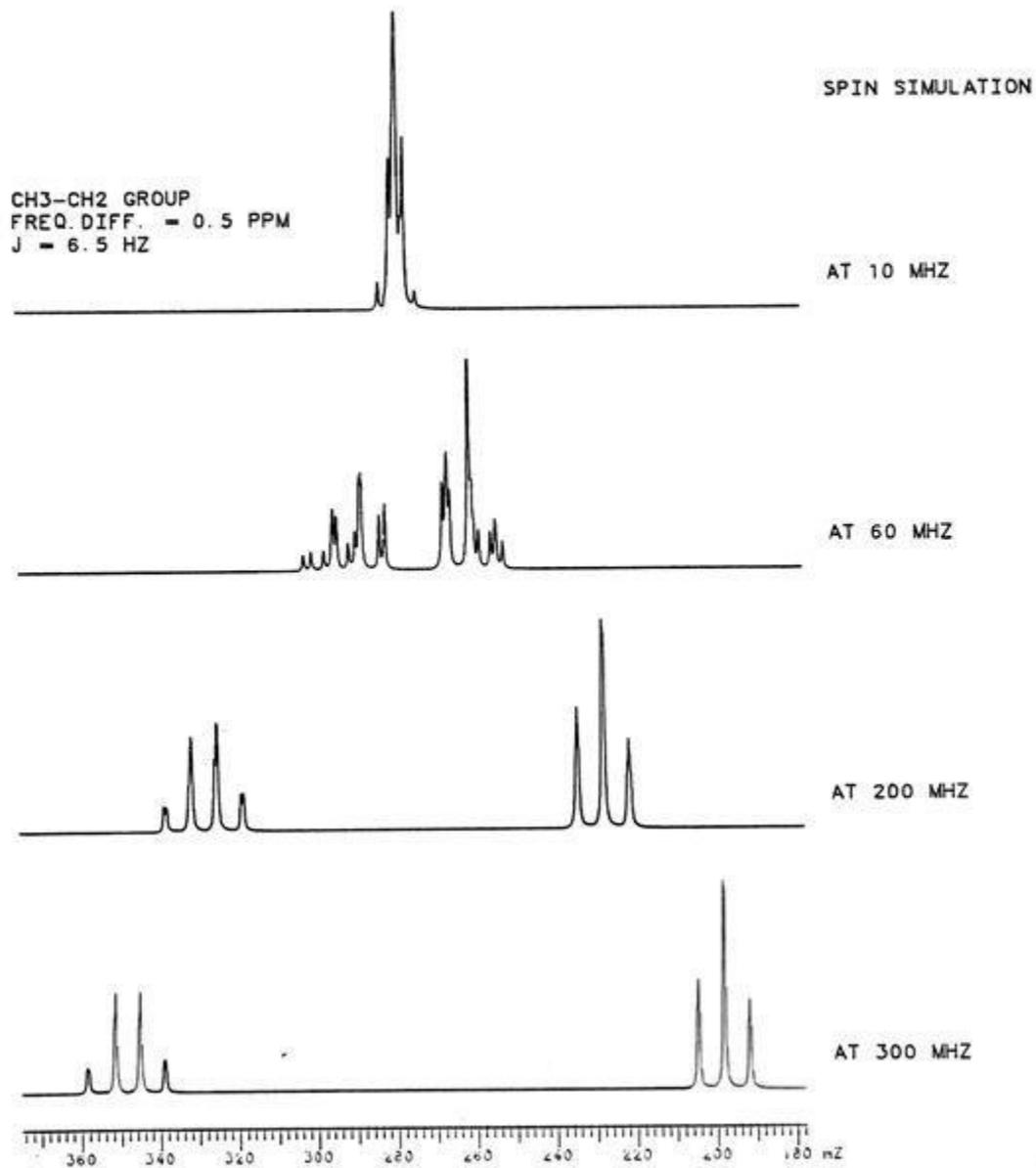


Возможная ориентация протонных спинов в метиленовой и метильной группах и ожидаемое спин-спиновое расщепление



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

# Влияние величины магнитного поля на вид спектра ЯМР

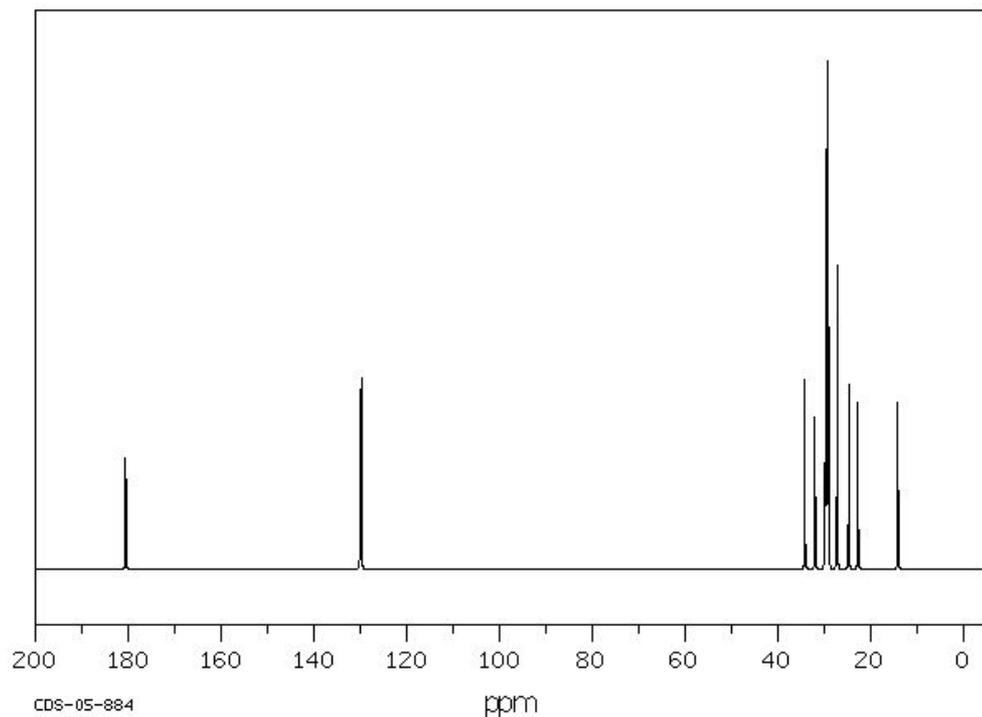
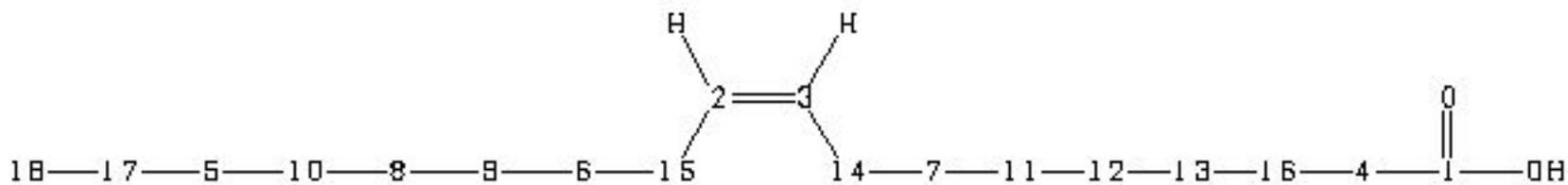


## Применение в медико-биологических исследованиях

1. Исследование структуры белков с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР высокого разрешения и Фурье-преобразований.
2. Изучение свойств свободной и связанной воды помощью импульсного  $^1\text{H}$ -ЯМР.
3.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопия применяется для изучения белков, нуклеиновых кислот и других биологически важных соединений. Обладает большей чувствительностью, чем  $^1\text{H}$ -ЯМР.
4.  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектроскопия часто применяется для исследования структуры и функций фосфолипидов.



# Спектр ЯМР $^{13}\text{C}$ олеиновой кислоты

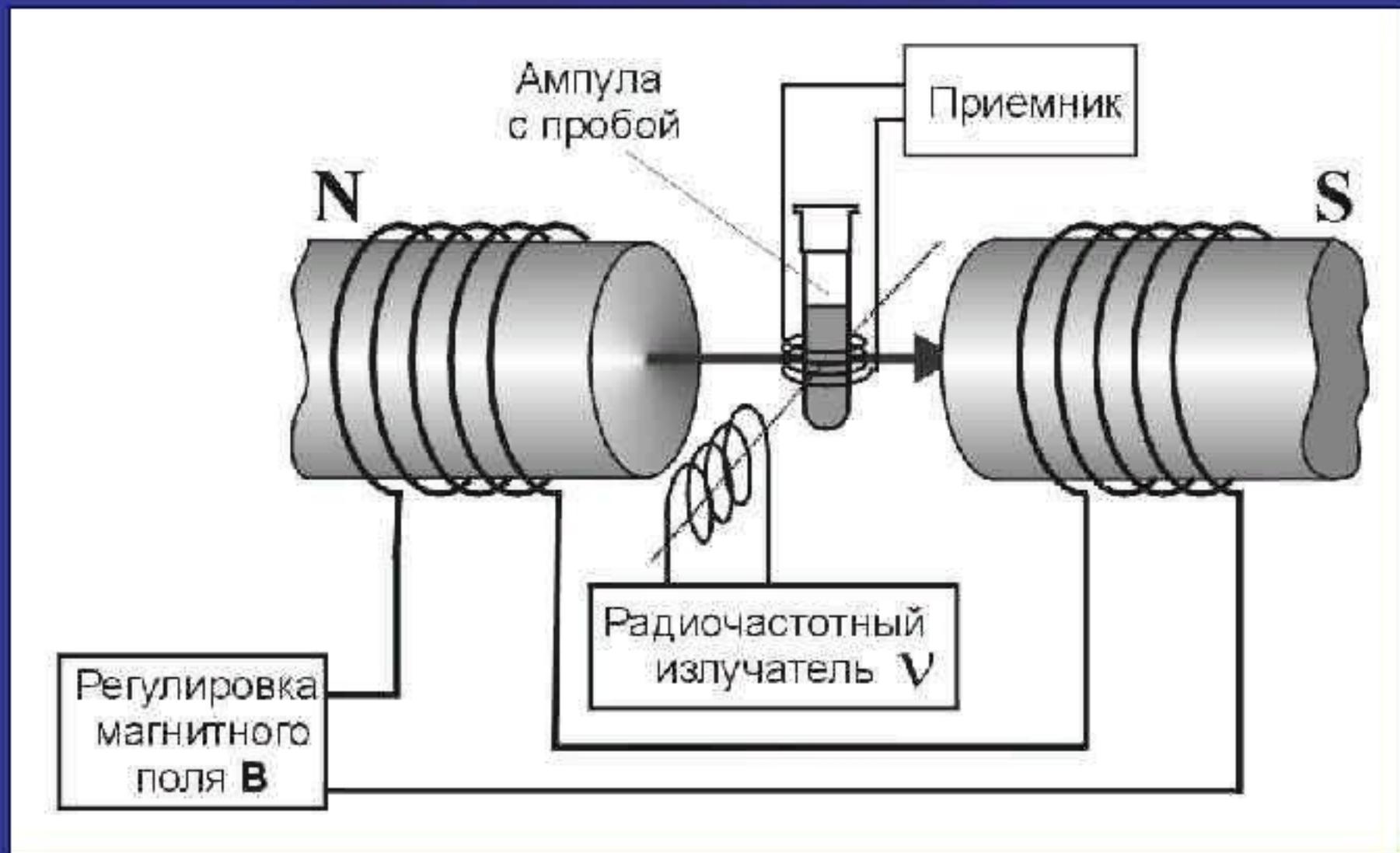


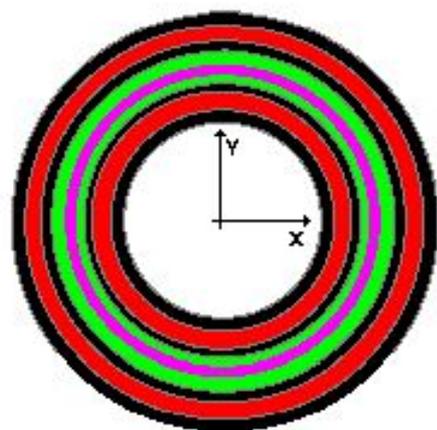
$\delta$ , ppm	Inten sity	Atom
180.58	221	1
130.03	353	2
129.74	377	3
34.18	377	4
31.99	304	5
29.73	765	6
		7
29.65	696	8
29.40	853	9
		10
29.14	1000	11
		12
		13
27.24	608	14
		15
24.73	368	16
22.74	333	17
14.12	333	18

$\nu=15.09$   
МГц

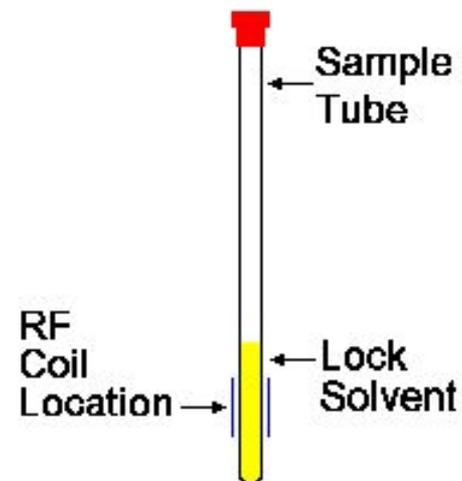
# Техника ЯМР спектроскопии и области её применения

## Схема простейшего спектрометра ЯМР





- Black** Vacuum
- Green** Liquid Helium
- Red** Liquid Nitrogen
- Grey** Container & Support
- Magenta** Superconducting Coil



# ЯМР. Часть 1. Всякая всячина.

## Современный приборы. Топ-модели.



Магнит спектрометра  
ЯМР на 1000 МГц

Bruker

Германия



Магнит спектрометра  
ЯМР на 900 МГц

Varian (Agilent)

США

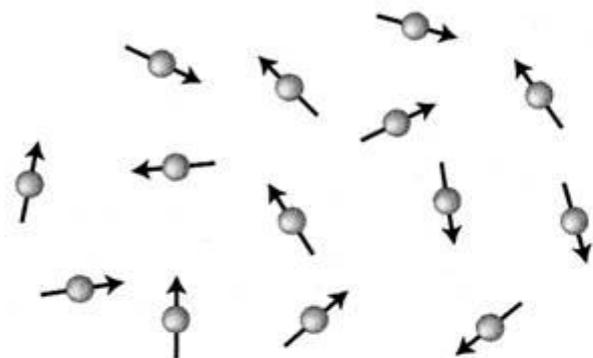


Магнит спектрометра  
ЯМР на 930 МГц

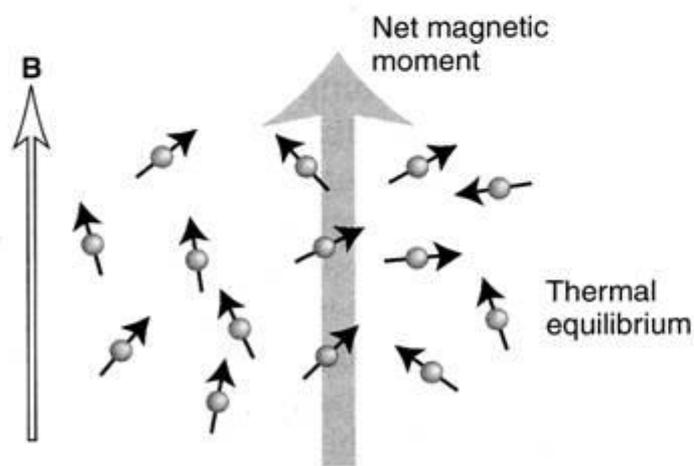
Jeol

Япония

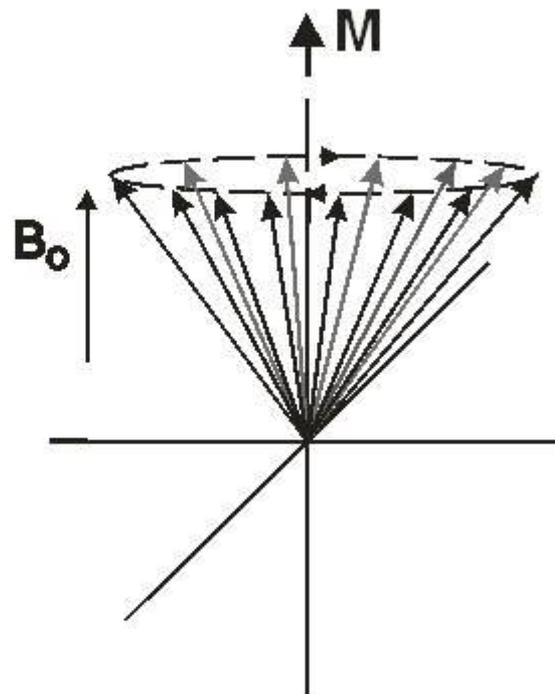
## Влияние магнитного поля на ансамбль ядерных спинов



Ансамбль ядерных спинов



Ансамбль ядерных спинов в присутствии магнитного поля



M - намагниченность образца

В импульсном варианте эксперимента ЯМР, в отличие от CW-метода, возбуждение ядер осуществляют не "постоянной волной", а с помощью короткого импульса продолжительностью (обычно несколько микросекунд). Радиочастотный генератор включают в момент  $t_0$  и выключают в момент  $t_1$ . Продолжительность импульса  $\tau$  зависит от ширины спектра. Например, если  $\tau = 10^{-5}$  сек, то частотная полоса будет шириной  $\approx 10^5$  Гц. Выбор частоты генератора определяется величиной  $B_0$  и

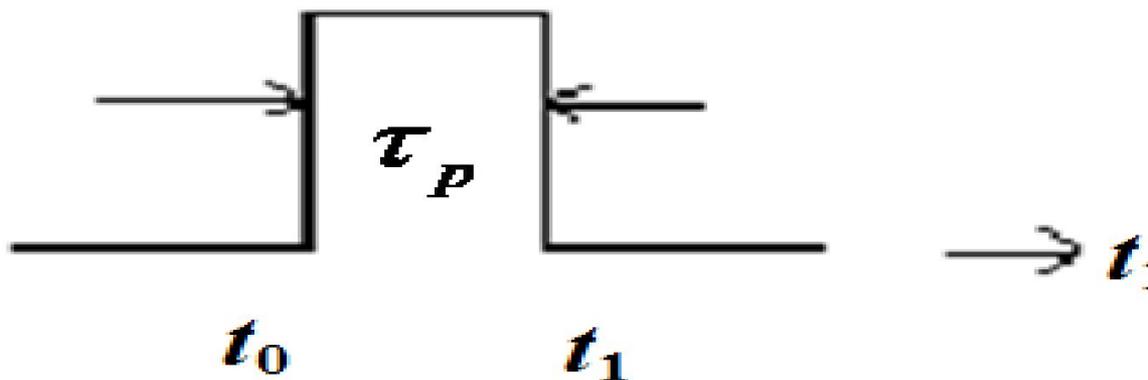
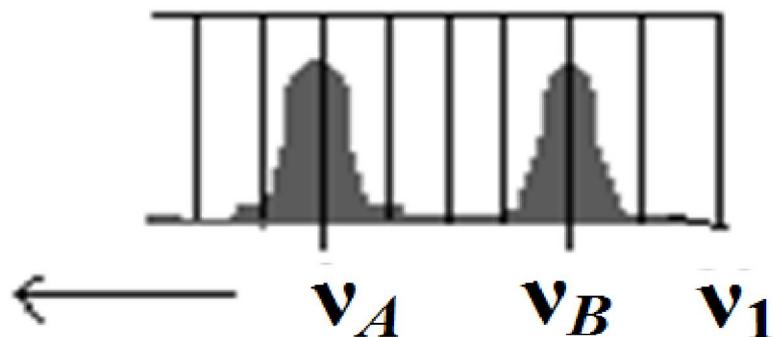


Рис.2. Частотные компоненты импульса.  $\nu_1$  – частота генератора,  $\nu_A$  и  $\nu_B$  – резонансные частоты ядер А и В.



Если среднее значение выбрано правильно, то все частоты в регистрируемом спектре будут находиться в этой полосе (рис. 2). Амплитуды частотных компонент импульса уменьшаются с увеличением расстояния от  $\nu_1$ . Так как желательно, чтобы все ядра облучались одинаково, необходимо использовать "жесткие импульсы", т.е. короткие импульсы большой мощности. Продолжительность импульса выбирают так, чтобы ширина частотной полосы была больше ширины спектра на один-два порядка. Мощность – несколько Ватт.

# Классическое описание импульсного

эксперимента

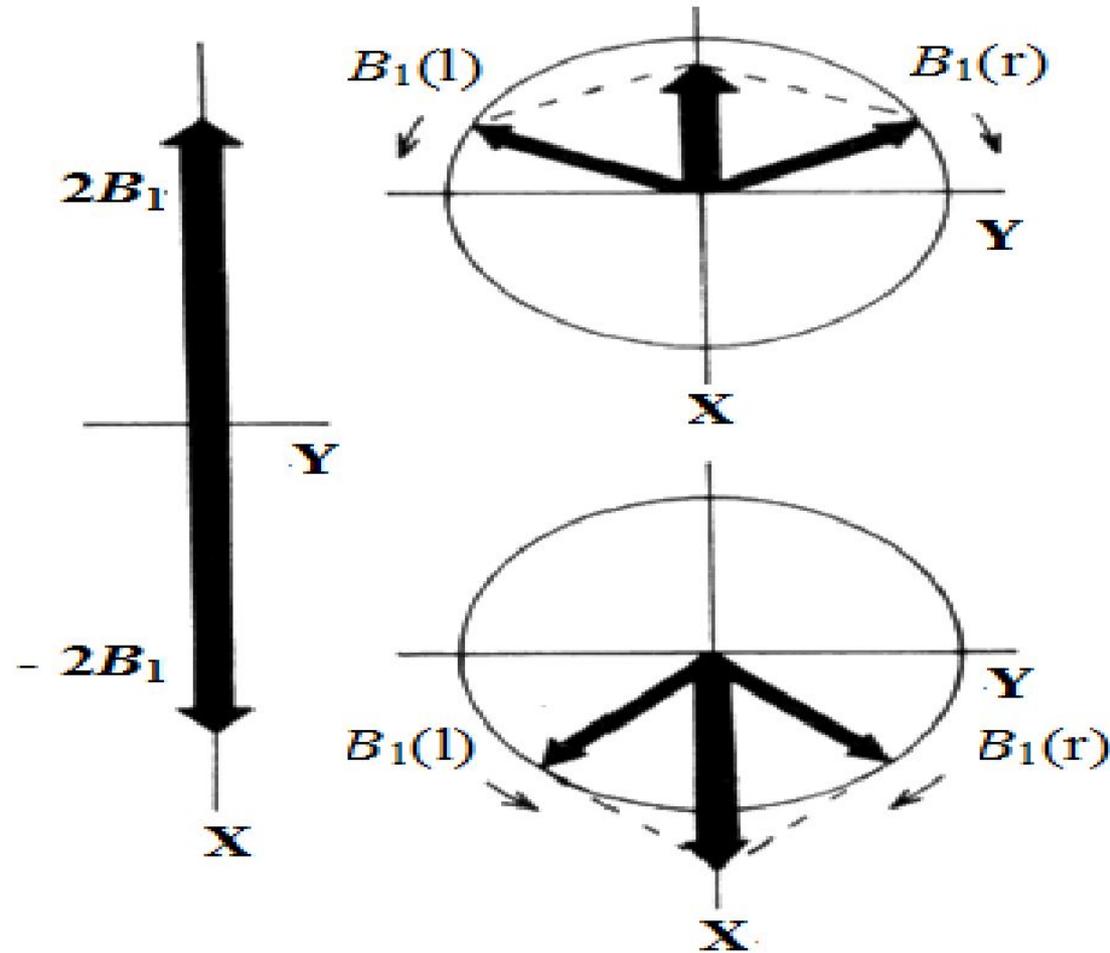


Рис. 3.

Представление осциллирующего магнитного поля в виде суммы двух вращающихся в противоположные стороны векторов намагниченности  $B_1$

Взаимодействующее с ядерными диполями радиочастотное поле  $B_1$  можно представить в виде двух векторов одинаковой длины, вращающихся в плоскости X-Y в противоположном направлении с частотой  $\nu_L$  (сумма этих векторов =  $2B_1$ ) (рис. 3). Это поможет понять, каким образом поле  $B_1$  взаимодействует с намагниченностью образца.

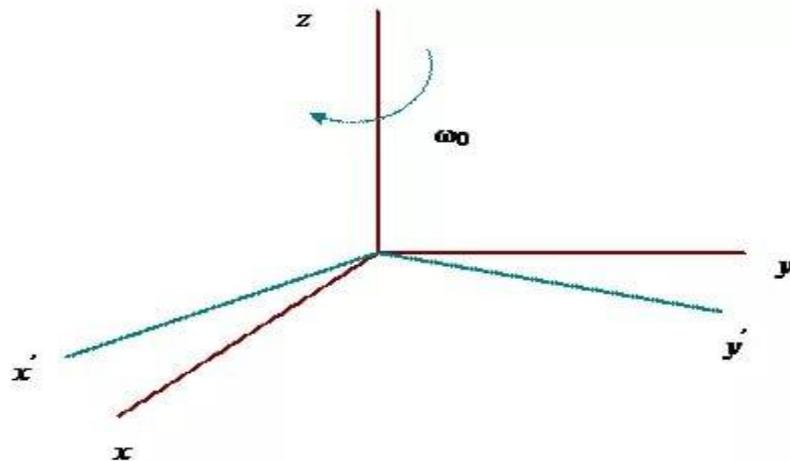
Дело в том, что радиочастотное поле не постоянно, и даже постоянная намагниченность образца, будучи отклоненной от оси Z, начнет совершать прецессирующее движение вокруг оси постоянного поля.

Чтобы исключить все вращения, достаточно вместо стационарной системы координат  $X, Y, Z$  ввести новую (вращающуюся) систему координат  $X', Y', Z$ , связанную с прецессией ядра. Если наша система координат будет вращаться с той же скоростью и в том же направлении, что и прецессия ядра, то магнитный момент каждого индивидуального ядра будет в ней постоянным. Вместе с исчезновением прецессии должна исчезнуть и ее причина – внешнее поле  $B_0$ , которого в новой системе координат уже нет. Однако объемная намагниченность образца  $M_0$  остается по-прежнему направленной вдоль оси  $Z$ .

Поскольку частота поля  $B_1$  выбиралась равной ларморовской частоте, одна из двух компонент, на которые его можно разложить, становится постоянной в плоскости  $X'-Y'$ . Вторая, вращающаяся с той же частотой в противоположном направлении, в новой системе координат вращается вдвое быстрее и не оказывает существенного влияния. С ядерными диполями взаимодействует только та компонента, которая имеет одинаковое с ними направление вращения, т.е. первая. Под влиянием этой компоненты намагниченность  $M_0$  отклоняется от оси  $Z$ , причем отклонение происходит в плоскости, перпендикулярной  $B_1$ .

Во вращающейся системе координат  $X', Y', Z$  ориентация и величина  $B_1$  будут фиксированы. Угол поворота вектора намагниченности или угол импульса будет равен:

$$\theta = \gamma B_i \tau_p$$



Теоретически, включая поле на различные промежутки времени, можно повернуть вектор намагниченности на любой угол  $\theta$ , где каждые  $360^\circ$  будут возвращать намагниченность в начальное положение.

Если напряженность поля  $B_1$  велика, а продолжительность импульса настолько мала, что в течение импульса релаксационными процессами можно пренебречь, то действие поля  $B_1$  сведется к повороту вектора намагниченности  $M$  на угол  $\gamma B_1 \tau_p$ . Если величины  $B_1$  и  $\tau_p$  выбраны

таким образом, что  $\gamma B_1 \tau_p = \frac{\pi}{2}$

то вектор  $M$  после поворота окажется в плоскости  $X' - Y'$ . Такие импульсы называют импульсами поворота на угол  $90^\circ$ .

Те импульсы, для которых  $\gamma B_1 \tau = \pi$ , называют импульсами поворота на  $180^\circ$ . Действие последних на вектор намагниченности  $\mathbf{M}$  приводит к изменению его первоначального направления на противоположное. В большинстве импульсных методик используются

$$\theta = 90^\circ \text{ и}$$

$$\theta = 180^\circ \text{ (рис. 4).}$$

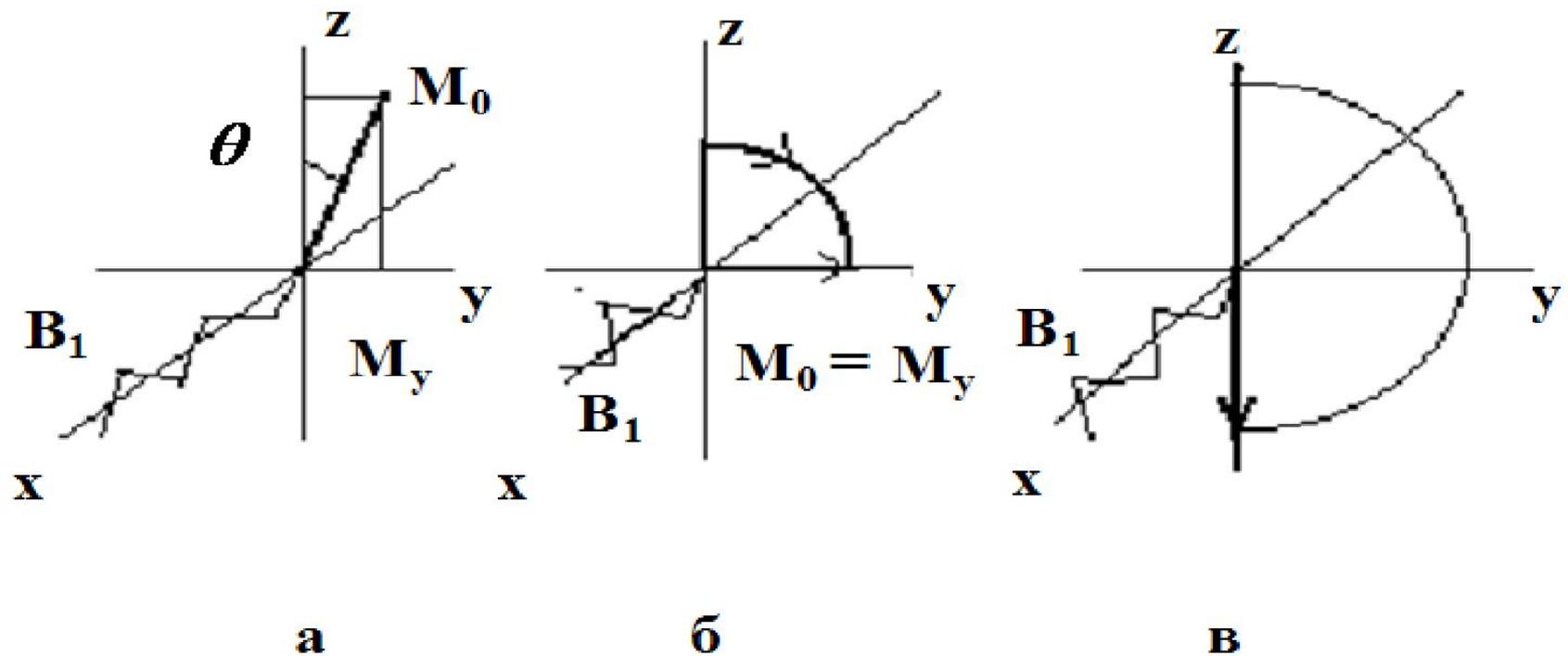


Рис. 4. Ориентация вектора макроскопической ядерной намагниченности  $M_0$  во вращающейся системе координат: после произвольного  $\theta$  - градусного импульса (а); после  $\pi/2$ -импульса (б); после  $\pi$ -импульса (в). Волнистая линия вдоль оси X показывает ориентацию эффективного поля  $B_1$ .

Все импульсы с продолжительностью  $\tau$ , отличной от  $\pi/2$ , оставляют некоторую часть Z-намагниченности, не создающей сигнала ССИ (здесь и далее ССИ означает спад свободной индукции, иногда это явление называют ССН - свободный спад намагниченности). Только ее компонента в плоскости  $X'-Y'$  (поперечная намагниченность  $M_y'$ ) способна создавать напряжение в катушке приемника. Таким образом, импульс  $\pi/2$ , (или теоретически  $3\pi/2$ ,  $5\pi/2$ , и т.д.) создает максимальный сигнал.

И, напротив, импульс  $180^\circ$   $x'$  (или  $2\pi$ ,  $3\pi$ , ...) вообще не вызывает появления сигнала, поскольку он помещает намагниченность на ось  $Z$  (здесь и далее  $\theta^0_{x'}$  – будет соответствовать радиочастотному импульсу, поворачивающему равновесную намагниченность  $M_0$  на угол  $\theta^0_{x'}$  вокруг обозначенной оси (индекс внутри  $\theta^0_{x'}$ ) во вращающейся системе координат) (рис. 4). Таким образом, максимальные сигналы наблюдаются при  $\theta^0_{x'} = 90^\circ$ , т.к. важнейшей является поперечная намагниченность  $M_{y'}$ , ибо катушка приемника ориентирована вдоль оси  $Y'$ . Для  $\theta^0_{x'} = 180^\circ$ -ного импульса сигналы не наблюдаются.

# Фурье-преобразование

Какая разница между сигналами, которые наблюдаются в экспериментах с непрерывной разверткой (стационарный ЯМР) и в импульсном эксперименте?

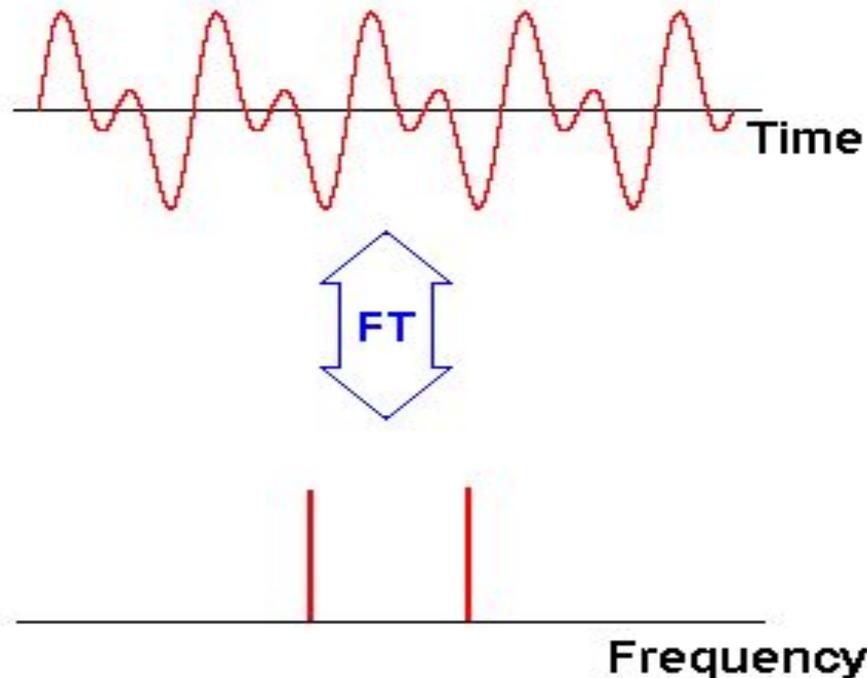
- В методе непрерывной развертки, меняя частоту радиочастотного поля  $\nu_1$ , измеряют зависимость амплитуды от частоты (измерение в частотном представлении). При регистрации данных после импульса измеряют то, как амплитуда развивается во времени (временное представление).

Преобразование Фурье (1) - это математическая операция, которая преобразует функцию от времени в частотные компоненты и позволяет переходить от одного представления к другому и является обычным методом анализа результатов импульсных экспериментов :

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

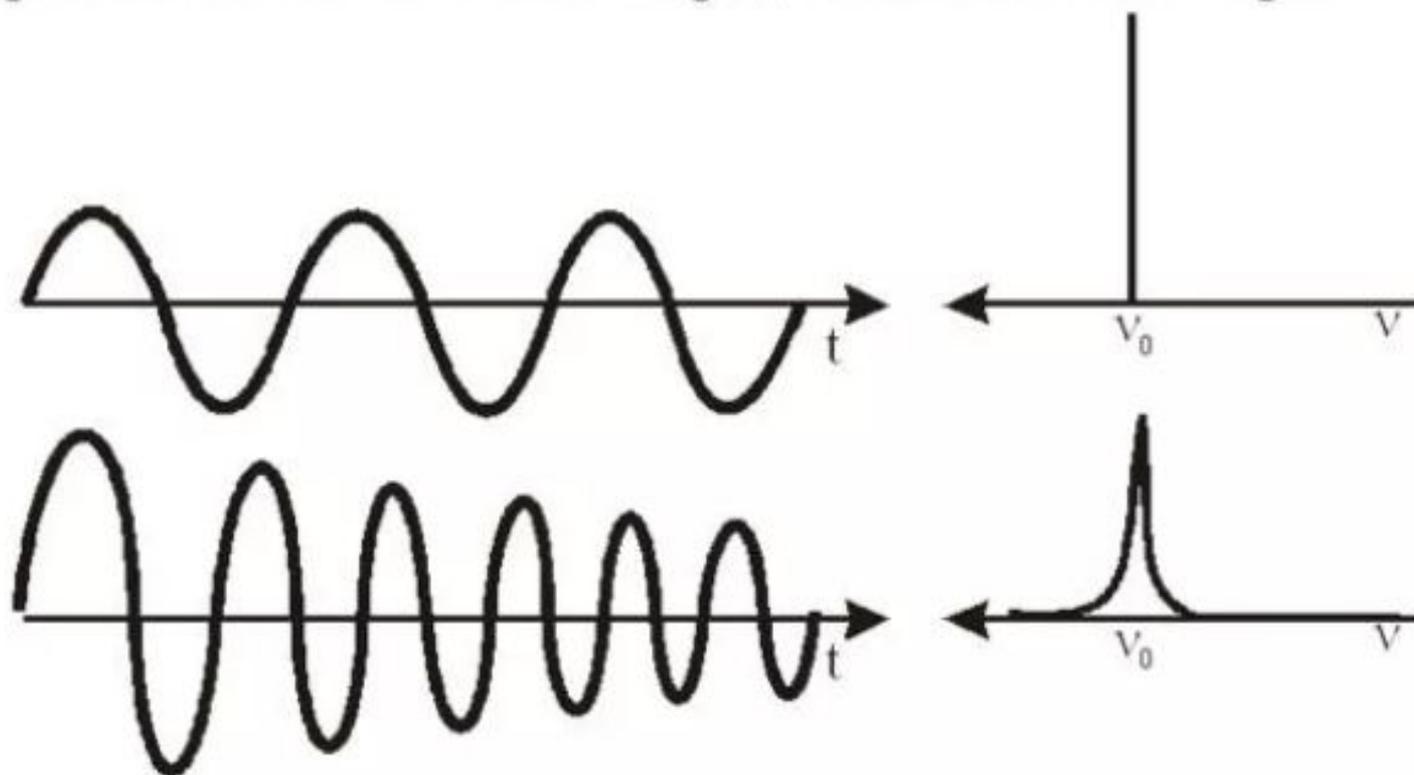
где  $i$  мнимая единица (комплексная величина, равная  $\sqrt{-1}$ )  
 $f(t)$  соответствует спектру "временного представления", а  $f(\omega)$  - спектру "частотного представления".

Здесь  $f(w)$  - сложная комплексная функция, состоящая из реальной ( Re) и мнимой ( Im) частей. Обратное преобразование Фурье (inverse Fourier transform - IFT) преобразует частотные компоненты во временные компоненты.



Если в образце содержатся ядра с различными резонансными частотами или спектр образца представляет собой мультиплет вследствие спин-спинового взаимодействия, то кривые спада различных компонент поперечной намагниченности накладываются друг на друга и имеет место интерференция между несколькими ССИ.

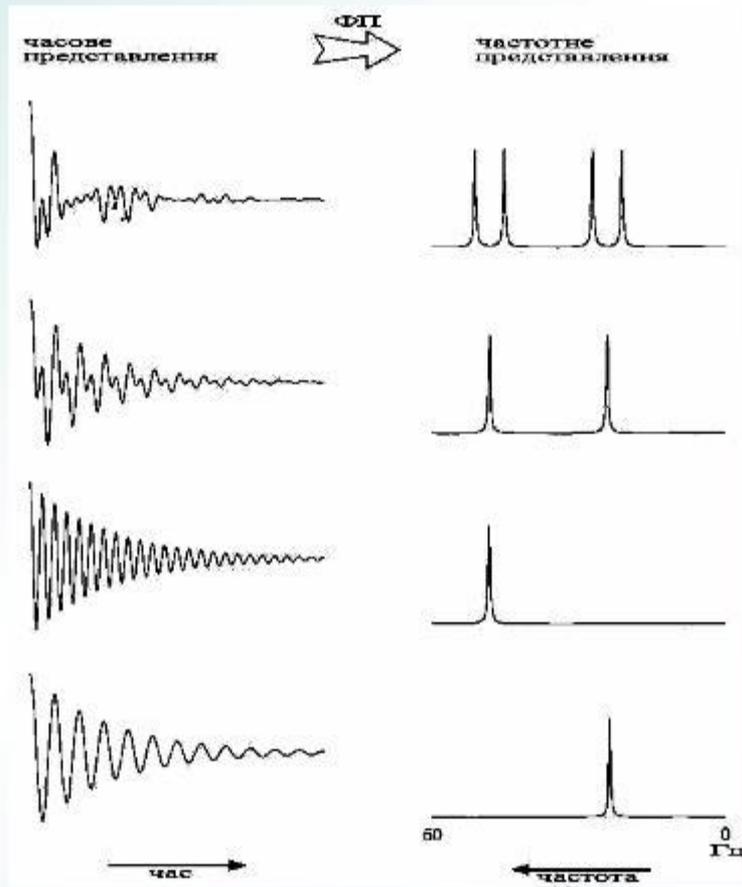
# Временное и частотное представление спектра



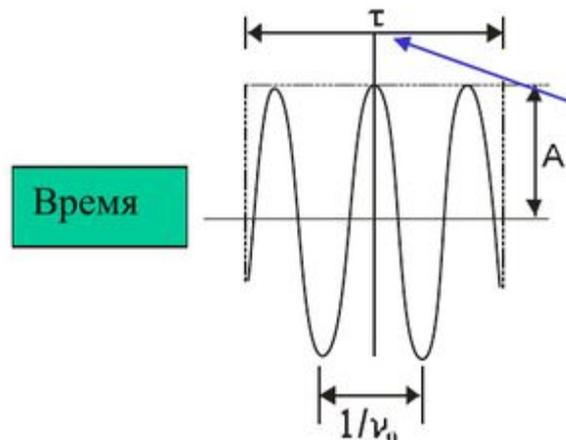
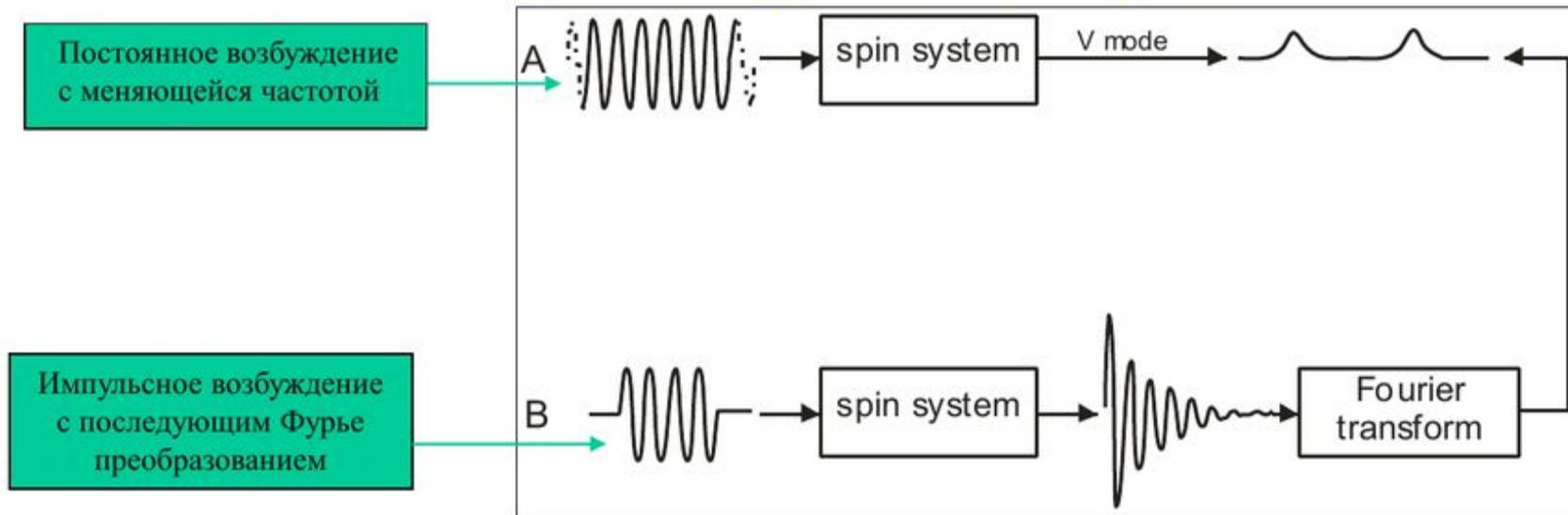


## Фур'є перетворення СВІ: спектр ЯМР

$$f(\omega) = \int f(t)e^{i\omega t} dt$$

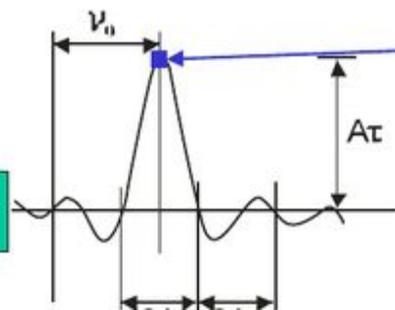


# Импульсная Фурье ЯМР спектроскопия



1. Короткому импульсу монохроматического излучения с частотой  $\nu_0$  и длиной  $\tau$  в частотной области соответствует определенная полоса частот  $\Delta\nu$ , центрированная на частоте  $\nu_0$
2. С уменьшением длины импульса ширина полосы частот увеличивается и наоборот.

Так, например, длине импульса 10 микросекунд соответствует полоса частот 16КHz.



3. Стандартная ширина протонных химических сдвигов у белков 15 ppm. В магнитном поле с напряженностью 7.05 Т ( $\nu_0 = 300 \text{ MHz}$  для  $^1\text{H}$ ) интервал 15 ppm соответствует полосе частот 4.5 KHz для  $^1\text{H}$ .

При включении радиочастотного поля вектор  $M_0$  отклоняется от равновесного положения на угол  $\theta$ . Если постоянное магнитное поле  $B_0$  совершенно однородно, то поведение вектора намагниченности  $M_0$  после окончания действия импульса определяется процессами релаксации, т.е. спиновая система возвращается к равновесному состоянию посредством релаксации ( $M_z \rightarrow M_0$ , а  $M_x$  и  $M_y \rightarrow 0$ ).

Блох предположил, что релаксационные процессы имеют первый порядок и могут быть описаны двумя различными временами релаксации  $T_1$  и  $T_2$ , определяемыми уравнениями

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1},$$

$$\frac{dM_{x'}}{dt} = -\frac{M_{x'}}{T_2}, \quad \frac{dM_{y'}}{dt} = -\frac{M_{y'}}{T_2}$$

для вращающейся системы координат  $(X', Y', Z)$ : где  $T_1$  - время спин-решеточной или продольной релаксации, а  $T_2$  - время спин-спиновой или поперечной релаксации.

Обратные значения величин  $T_1^{-1}$  и  $T_2^{-1}$  соответствуют константам скоростей релаксации. Движение вектора  $\mathbf{M}$  при наличии процессов релаксации представляет собой прецессию с одновременным уменьшением угла между  $\mathbf{M}$  и направлением поля  $\mathbf{B}_0$ . Чтобы представить себе это движение, разложим вектор  $\mathbf{M}$  на компоненты и рассмотрим их как функции времени (рис. 1-15).

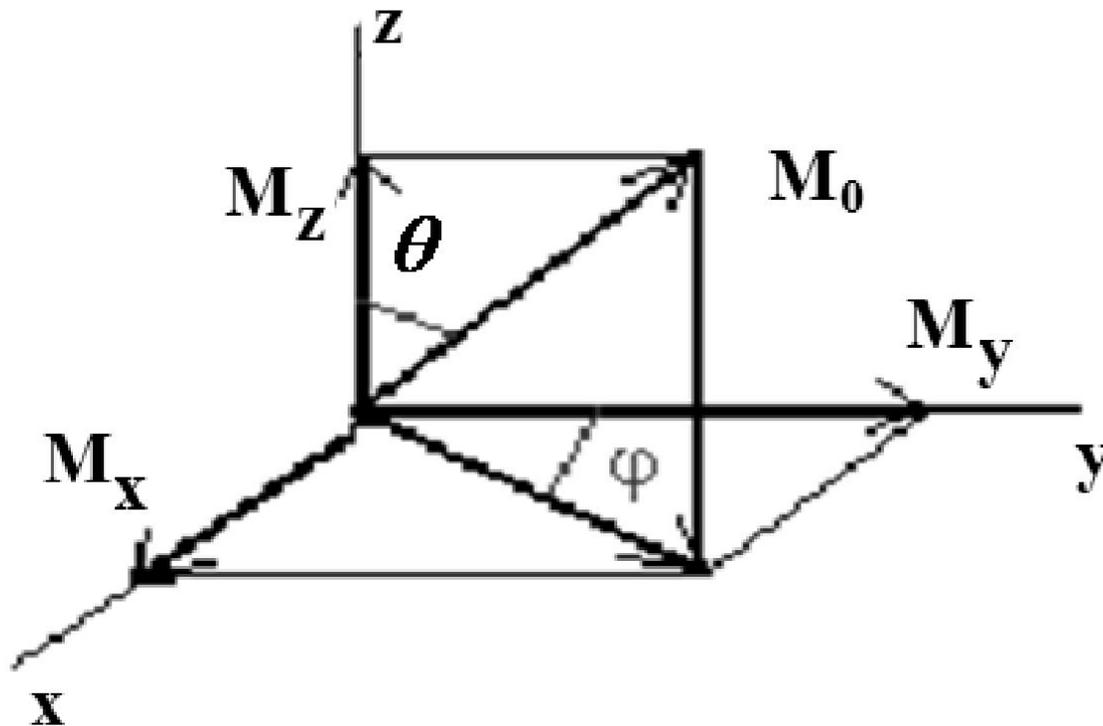


Рис. 1-15. Вектор макроскопической намагниченности  $M_0$  после окончания действия импульса с поворотом на угол  $\theta$  прецессирует с ларморовской частотой  $\omega_L$ . В момент времени  $t$  имеет координаты  $M_x$ ,  $M_y$  и  $M_z$  в стационарной системе координат.

Компонента, расположенная в плоскости  $X-Y$ , будет вращаться вокруг направления поля  $\mathbf{B}_0$  (ось  $Z$ ), в то время как ее амплитуда будет стремиться к нулю по экспоненциальному закону  $\exp(-t/T_2)$ . В то же время амплитуда компоненты  $M_z$  будет, уменьшаясь, стремиться к своему равновесному значению ( $M_z \rightarrow M_0$ ) за промежуток времени  $T_1$ . Нет причин предполагать, что все линии сложного спектра будут релаксировать с одной и той же скоростью, поэтому следует ожидать существование набора различных констант  $T_1$  для разных ядер молекулы.

Из конечного времени жизни возбужденного состояния вытекает конечная ширина линии в частотном спектре. Ширина линии измеряется на полувысоте сигнала ЯМР (рис. 1-16). Поскольку время ЯМР-релаксации в растворах в большинстве случаев довольно велико (несколько минут), резонансные линии в спектре ЯМР оказываются довольно узкими в сравнении, например, с УФ-спектрами поглощения.

Почему время релаксации  $T_1$  обычно велико? Для ответа на этот сложный вопрос понадобилось бы несколько книг, поэтому обсудим его здесь на качественном уровне. Прежде всего, необходимо отметить, что небольшие энергии ЯМР-переходов настолько малы в сравнении с их общей тепловой энергией, что с их рассеянием не возникает никаких проблем. Следовательно, релаксация замедляется не по причине невозможности рассеяния энергии, а из-за недостатка путей ее вывода из спиновой системы.

Их добавляют в образец, если нужно сократить время релаксации для ускорения эксперимента или для повышения точности количественных измерений. Для этой цели обычно используется ацетилацетонат хрома (III).

Экспериментально время спин-решеточной или продольной релаксации  $T_1$  измеряется с использованием последовательности импульсов

$$\left( 180_{x'}^0 - \tau - 90_{x'}^0 - CCI \right)_n$$

с различными значениями времени  $\tau$ . Анализ зависимости изменения интенсивности сигнала от угла поворота равновесной намагниченности  $M_0$  позволяет достаточно просто определить искомое время  $T_1$ .

Время  $T_2$  - время спин-спиновой или поперечной релаксации определяется по аналогичному алгоритму, но с использованием иной последовательности импульсов, а именно:

$$\left( 90_{x'}^0 - \tau - 180_{x'}^0 - CCI \right)_n$$

Теперь выясним, что происходит с поперечной намагниченностью после окончания действия импульса в  $90_{x'}^0$  во вращающейся системе координат.

Если выбрать оси  $X'$  и  $Y'$  так, что высокочастотное поле  $\mathbf{B}_1$  будет направлено по оси  $X'$ , то вектор макроскопической намагниченности  $\mathbf{M}_0$  в момент  $t = 0$  будет расположен вдоль оси  $Y'$ . Т.к. эта ось вращается с частотой Ларморовской прецессии ядер  $\omega_L$ , то компонента  $M_{y'}$  остается постоянной или, более точно, ее величина уменьшается во времени со скоростью, определяемой потерями через релаксацию. В соответствии с выражением (1-16), это уменьшение экспоненциально, и его скорость обусловлена временем поперечной релаксации  $T_2$  (рис. 1-17).

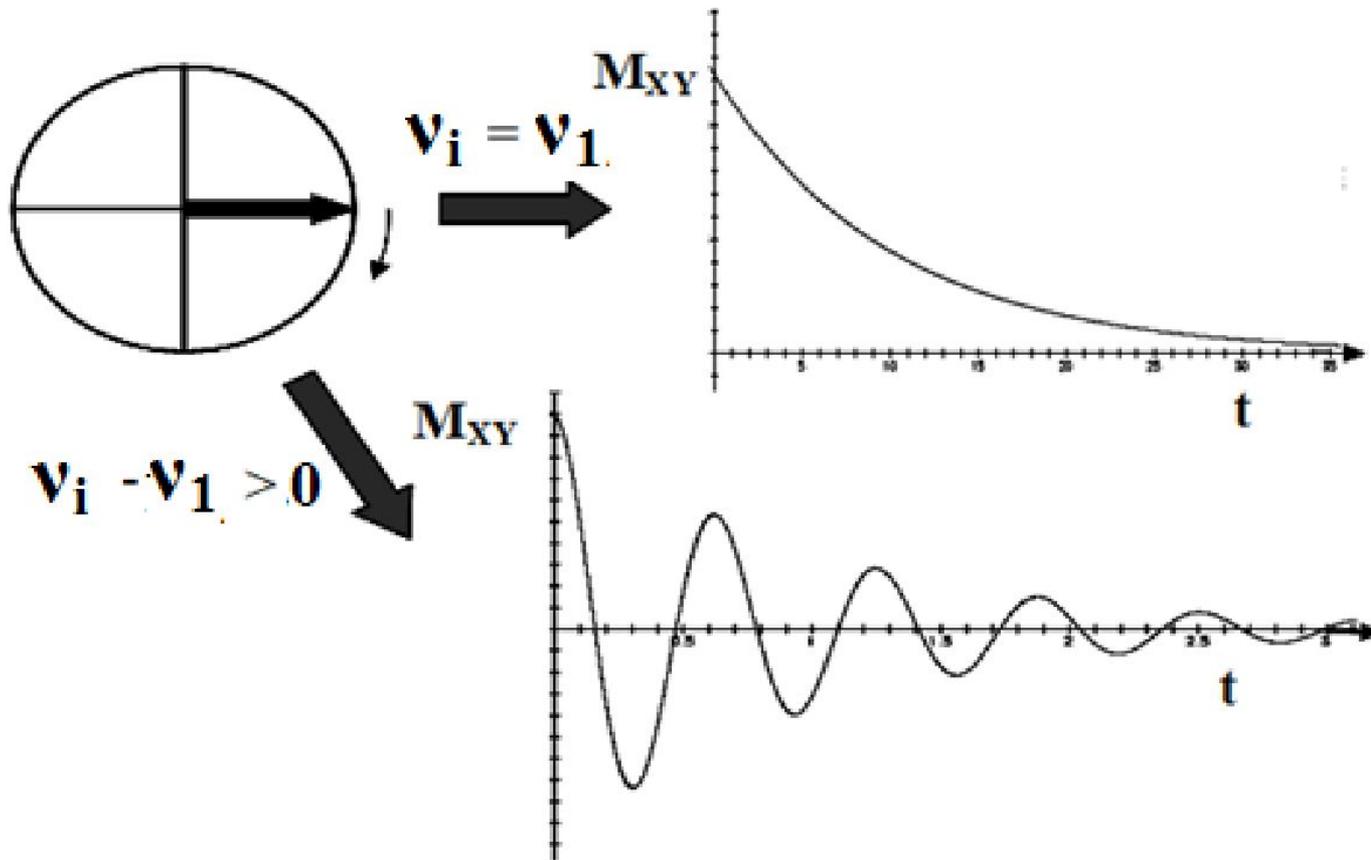


Рис. 1-17. Спад поперечної намагніченості

«Спадающие» кривые, подобные представленной на рис. 1-17 (вверху), в реальных экспериментах не наблюдаются, так как используемые методы детектирования предполагают получение их только в тех случаях, когда частота генератора и резонансная частота наблюдаемых ядер случайно совпадают.

Все процессы, сопровождающиеся потерей поперечной намагниченности, включая возвращение ее на ось  $Z$ , дают вклад в величину  $T_2$ .

Таким образом, при отсутствии всех механизмов поперечной релаксации время  $T_2$  должно равняться времени  $T_1$ , поскольку переход намагниченности на ось  $Z$  будет, очевидно, сопровождаться уходом ее из плоскости  $X - Y$ . При нормально настроенной однородности поля  $B_0$  такая ситуация довольно часто встречается в жидкостях.

# Фазовая когерентность

Проиллюстрируем экспериментально, не вдаваясь в детали, уравнение (1-15). Из этого уравнения следует, что угол поворота вектора намагниченности можно увеличить, либо увеличив амплитуду компоненты  $B_i$  либо увеличив продолжительность импульса  $\tau_p$ . В экспериментах Фриболина с образцом  $H_2O$  увеличивали  $\tau_p$  с интервалом в 1 мкс, а  $B_i$  выдерживали постоянной.

Из полученных результатов следует, что максимум амплитуды соответствует  $\theta = 90^\circ$ , а там, где сигнал проходит через нуль  $\theta = 180^\circ$ , (рис. 1-18). Очевидно также, что большие значения  $\theta$  дают отрицательную амплитуду сигнала, что объясняется появлением поперечной намагниченности -  $M_y$ , при  $\theta > 180^\circ$ .

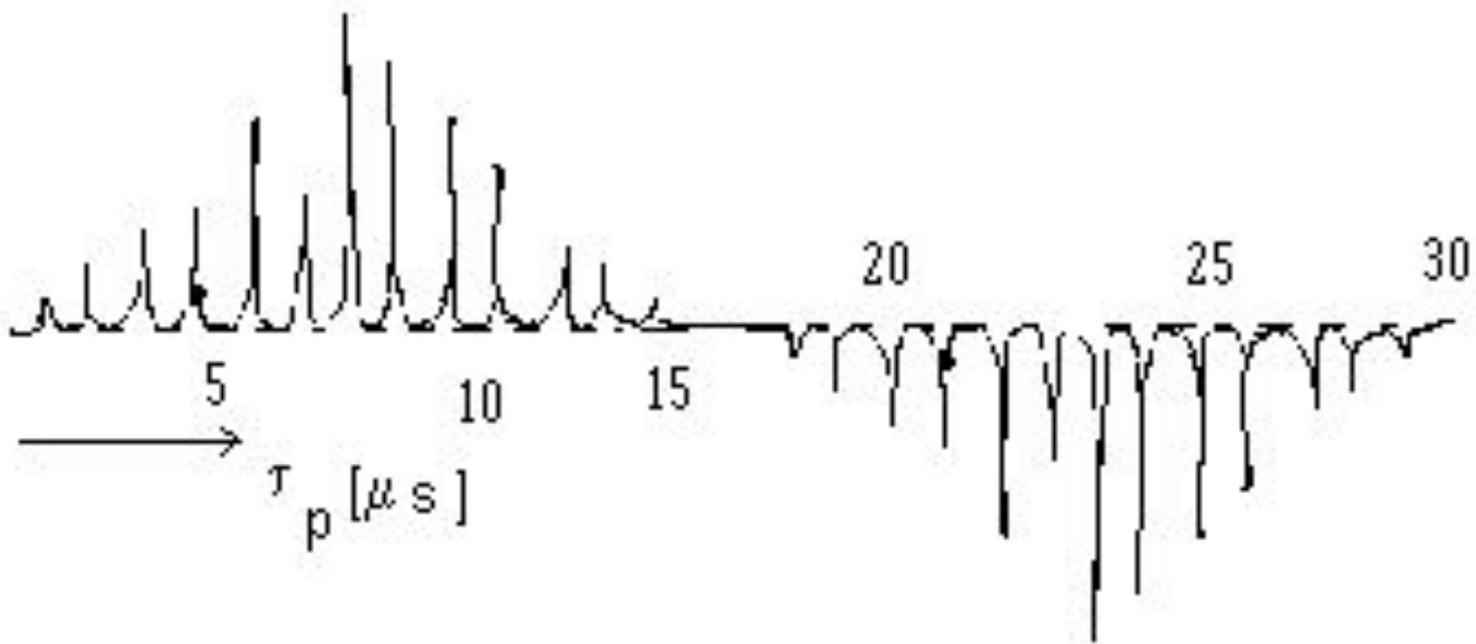


Рис. 1-18. Зависимость амплитуды сигнала ЯМР воды от угла поворота импульса  $\theta$ .

Что касается населенностей энергетических уровней  $\theta > 180^\circ$  ситуация обращается и ядер на верхнем энергетическом уровне окажется больше, чем на нижнем уровне. При  $\theta = 90^\circ$  имеем более сложную ситуацию, т.к.  $M_z = 0$  и оба зеемановских уровня заселены равным образом. Этот случай отличается от насыщения, т.к. в данной ситуации у нас имеется  $M_y$ , а при насыщении - нет.

Появление поперечной намагниченности в данном случае объясняется тем, что под влиянием  $B_1$  ядерные диполи прецессируют вокруг двойного конуса не равномерно, а образуя "редкие" и "плотные" фракции, прецессирующие "по фазе". Это явление - "фазовая когерентность" (рис. 1-19).

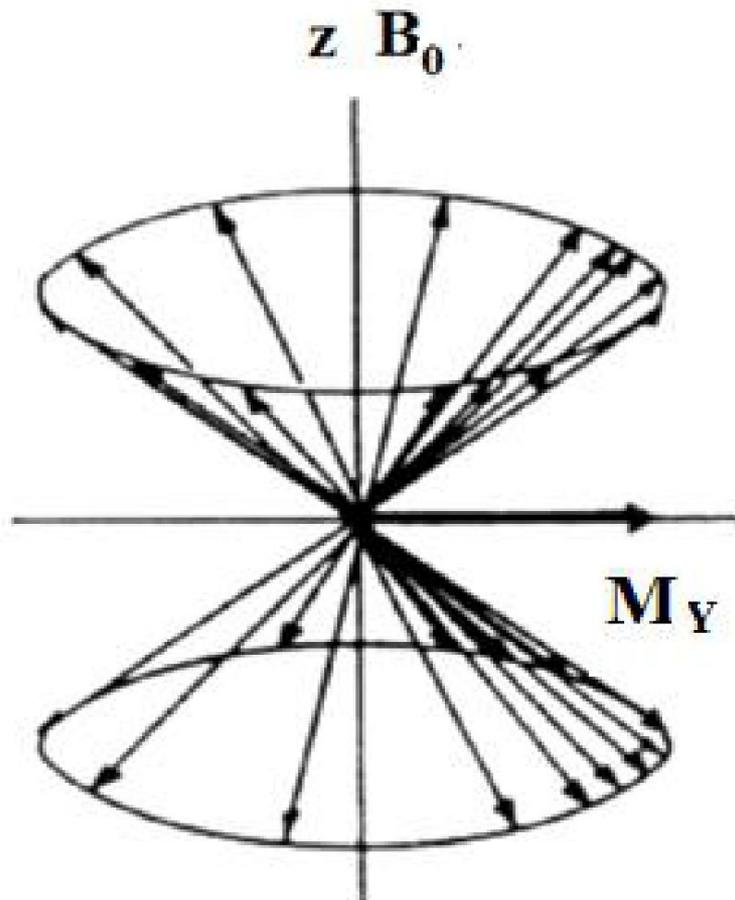


Рис. 1-19. Схематическое представление фазовой когерентности.

