

Федеральное Агентство по Образованию

Московская государственная академия
тонкой химической технологии имени М.В.Ломоносова

Кафедра Биотехнологии

Чудинов М.В.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ^1H -ЯМР ДЛЯ СТРУКТУРНОГО
АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.

Учебное пособие

Москва, 2005

ББК 52.8

УДК 615.014

Чудинов Михаил Васильевич

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ^1H -ЯМР ДЛЯ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.

Учебное пособие

М., МИТХТ им. М.В.Ломоносова, 2005 – 32 с.

Утверждено Библиотечно-Издательской Комиссией МИТХТ им. М.В. Ломоносова в качестве учебного пособия. (Поз. 245/2005).

В настоящем пособии рассматривается практическое применение ^1H -ЯМР спектроскопии – важнейшего метода структурного анализа органических веществ. Рассмотрены физические основы метода, основные характеристики спектров ПМР и правила их интерпретации на реальном примере.

Данное учебное пособие является дополнением к существующим учебникам по физико-химическим методам анализа и читаемым курсам

лекций «Физико-химические методы исследования в биохимии» и «Современные методы исследования биологически-активных соединений» для студентов 5 курса Высшей Инженерной Школы, обучающихся по специальности «Биотехнология» и для студентов 5 курса направления магистратуры «Химическая технология и биотехнология» очной формы обучения. Пособие будет полезным для студентов, изучающих дисциплину «Фармацевтическая химия» в бакалавриате «Метрология, стандартизация и сертификация», магистров, дипломников и аспирантов, специализирующихся в области органической и биоорганической химии.

Рецензент: доцент кафедры химии и технологии тонких органических соединений, д.х.н. Себякин Ю.Л.

© МИТХТ им. М.В.Ломоносова, 2005 г.

1. Введение.

ЯМР–спектроскопия высокого разрешения, без преувеличения, является на настоящий момент важнейшим методом структурных исследований в органической химии. Такие физические методы, как инфракрасная спектроскопия, УФ–спектроскопия, масс-спектрометрия, могут быть лишь дополнительными аргументами в решении задачи установления строения органической молекулы – синтезированной в реакции или выделенной из природного источника. Именно такая задача чаще всего и встает перед химиком.

К безусловным достоинствам метода относится сравнительная быстрота и дешевизна, высокая чувствительность (для получения протонного спектра высокого качества на современном приборе достаточно долей миллиграмма вещества), простота приготовления образца для анализа. Кроме того, ЯМР–спектроскопия высокого разрешения – метод *неразрушающий*, то есть вещество в процессе анализа сохраняется неизменным, что особенно важно в биоорганической химии, где зачастую работа идет с миллиграммовыми количествами чрезвычайно сложных и дорогостоящих соединений. Но самое главное – метод дает *прямую* информацию о структуре исследуемого соединения, то есть не только позволяет обнаружить наличие тех или иных функциональных групп в молекуле, но и определить их взаиморасположение. Единственный физический метод, дающий аналогичную информацию – рентгеноструктурный анализ. Однако границы применимости РСА, определяемые физическими основами этого метода, значительно уже. Каждый химик знает, что вырастить монокристалл вещества размером 1-2 мм – задача, зачастую более сложная, чем синтез этого вещества, а иногда вовсе неразрешимая. Именно такой монокристалл необходим для определения структуры методом РСА.

Как правило, аналитическая задача, встающая перед исследователем, состоит из двух частей – определения *структуры* и *чистоты* соединения. Не следует забывать, что при всех достоинствах метода ЯМР, он пригоден только для решения первой, структурной, части задачи. Кроме того, существование функциональных групп, не содержащих магнитных ядер, делает метод ЯМР (как и любой другой метод структурного анализа) не вполне универсальным. Практическое решение описанной задачи возможно лишь при использовании сочетания нескольких аналитических методов. Для большинства простых случаев достаточным является сочетание ЯМР, масс-спектрометрии и ИК спектроскопии. Определение чистоты соединения возможно лишь при использовании элементного анализа в сочетании с этими методами.

Тем не менее, 80-90% информации о строении молекулы исследуемого соединения приходится на долю ЯМР–спектроскопии высокого разрешения.

Данное пособие, конечно, не может осветить все возможности этого метода – для этого существуют многочисленные монографии и учебники. Наша цель – доступно изложить физические основы и продемонстрировать базовые способы применения ^1H -ЯМР для решения обычных задач структурного анализа органических веществ.

2. Физические основы ЯМР высокого разрешения. Спектр ЯМР.

Грамотное использование метода ЯМР для установления структуры молекулы требует некоторых представлений о его физических основах. Явление, лежащее в его основе – ядерный магнитный резонанс – было открыто в 1945 г Ф. Блохом и Э. Перселлом. Уже в 1953г были выпущены первые спектрометры ЯМР, а с конца 1970-х годов, с появлением импульсных Фурье-спектрометров развитие метода стало лавинообразным.

Физические основы спектроскопии ЯМР определяются магнитными свойствами атомных ядер. Наблюдать явление резонанса возможно только для атомных ядер с ненулевыми значениями ядерного магнитного момента (*спина*). Важнейшими из таких ядер для химика-органика являются протон ^1H и изотоп углерода ^{13}C (их спин равен $\frac{1}{2}$), а также изотопы ^{31}P и ^{15}N . К сожалению, ядро углерода ^{12}C , природное содержание которого 98,9%, как и все другие ядра с четным массовым числом и четным атомным номером, магнитными свойствами не обладают.

Суть явления резонанса достаточно проста. Если поместить образец вещества во внешнее магнитное поле, взаимодействие собственных магнитных моментов ядер с этим полем приводит в соответствии с правилами квантовой механики к набору ядерных энергетических уровней, так как магнитная энергия ядра может принимать только ряд дискретных значений. Количество этих уровней и соответствующих им собственных состояний ядра определяется формулой $(2I + 1)$, где I – спиновое квантовое число. Для ядер, имеющих $I = 1/2$, количество возможных состояний 2. Используя высокочастотное радиоизлучение, можно вызвать индуцированный переход между этими состояниями, сопровождающийся поглощением

(и испусканием) энергии. Поглощение энергии можно обнаружить, усилить и записать как резонансный сигнал или спектральную линию в спектре ЯМР. Важная особенность явления заключается в том, что резонансная частота прямо пропорциональна индукции внешнего магнитного поля, а коэффициент пропорциональности, называемый *гиромагнитным отношением*, зависит исключительно от свойств самого ядра.

Основное уравнение ЯМР:

$$\nu = \gamma H_0 \quad (1), \text{ где}$$

ν - резонансная частота ядра;

γ - гиромагнитное отношение ядра;

H_0 – напряженность внешнего магнитного поля.

Пример спектра ЯМР протонов, входящих в состав молекулы этилдихлорацетата (обычно говорят о протонном спектре или спектре ПМР данного вещества) представлен на рисунке 1.

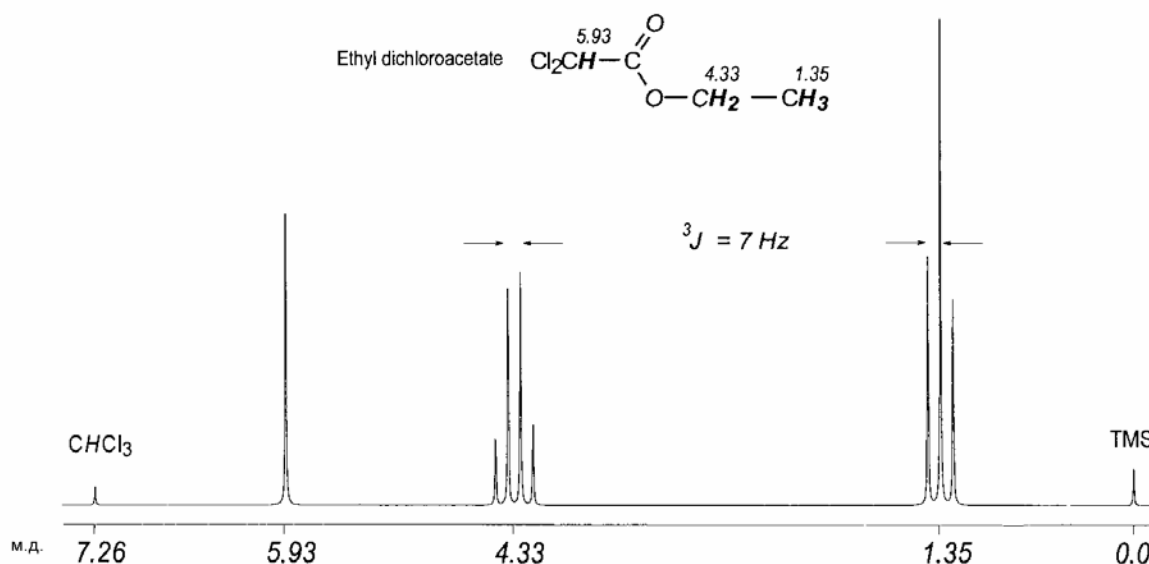


Рис. 1. Спектр этилдихлорацетата (CDCl_3 , 80 МГц).

На рисунке виден ряд характерных особенностей спектра ПМР. Помимо того, что резонансные сигналы различных функциональных

групп наблюдаются на разных частотах, определяемых их *химическим сдвигом*, суммарная площадь под соответствующей спектральной линией (*интегральная интенсивность*) пропорциональна числу протонов, дающих этот сигнал. Кроме того, не все спектральные линии имеют простую форму *синглета*. Для некоторых сигналов наблюдается характерное расщепление и образуются *дублеты*, *триплеты* и *квадруплеты*. Более сложную форму сигнала чаще всего обозначают как *мультиплет*. Шкала абсцисс направлена справа налево и градуирована в относительных единицах частоты – *миллионных долях* рабочей частоты спектрометра (*м.д.* или *p.p.m.* в английском тексте). Как легко понять, для данного спектра 1м.д.=80Гц. Направление шкалы определяется исторически сложившейся традицией, а применение относительных единиц имеет под собой более важные основания.

Развернутое изложение физических основ ЯМР и их подробное математическое описание можно найти в литературе [1-3].

3. Химический сдвиг.

Если исходить из изложенных выше физических основ ЯМР, резонансная частота протона должна быть единственной в магнитном поле заданной напряженности. Однако, это противоречит наблюдаемой картине с многими резонансными сигналами. В действительности, электроны, входящие в химическое окружение ядер в разных функциональных группах, индуцируют собственные магнитные поля. При этом уравнение (1) приобретает вид:

$$\nu = \gamma H_0 (1 - \sigma) \quad (2), \text{ где}$$

σ - безразмерная величина, называемая константой экранирования.

Константы экранирования различных функциональных групп различны, что и приводит к наблюдаемой картине с многими резонансными линиями. Расстояние между резонансными сигналами различных протонов называется *химическим сдвигом*. Абсолютный химический сдвиг протона, то есть смещение сигнала по отношению к сигналу неэкранированного протона экспериментально определить невозможно, поэтому химический сдвиг определяется по отношению к сигналу эталонного вещества. Для протонных спектров в качестве международного стандарта для измерения химических сдвигов выбран тетраметилсилан (TMS) – именно его сигнал принят за 0.

Резонансная частота сигнала зависит, как следует из уравнения (2), от рабочей напряженности поля спектрометра. А вот выраженный в миллионных долях химический сдвиг зависит только от свойств химического окружения ядра. Именно поэтому шкала спектра градуируется в миллионных долях. Часто употребляемые термины «область сильных полей» и «область слабых полей» пришли из

времен спектрометров непрерывной полевой развертки и означают, соответственно правую и левую часть шкалы.

Если протоны одной молекулы имеют одинаковый химический сдвиг и химически равноценны, они называются *химически эквивалентными*. Так, в спектре этилдихлорацетата, приведенном на рисунке 1, химически эквивалентными являются 3 протона метильной группы в остатке этилового спирта и 2 протона метиленовой группы.

Химический сдвиг является основной характеристикой спектра ЯМР и зависит от структуры молекулы. На его величину с одной стороны влияет электронная плотность у ядра, с другой – вторичные магнитные поля, возникающие в результате циркуляции электронов в соседних атомах и связях. Он может изменяться и от действия внешних факторов: растворителя, температуры, концентрации и вязкости раствора.

Электронная плотность у протонов определяется характером химической связи и индукционными эффектами окружающих групп, следовательно и химический сдвиг этих протонов будет разным. Так, из спектра на рисунке 1 видно, что сигнал протона дихлорметильной группы в ацетатном остатке имеет сдвиг 5,93 м.д., а метильные протоны в этильном радикале – 1,35 м.д. Общим правилом можно считать, что протон, присоединенный к более полярной группе, будет иметь больший химический сдвиг.

Если бы экранирование зависело только от электронной плотности вокруг протона, то химический сдвиг и «кислотность» протона были бы непосредственно связаны. В действительности это не всегда так. Так, сигнал кислого протона ацетиленов находится в области 2-3 м.д., а значительно менее кислый альдегидный протон наблюдается в области 9-10 м.д. Такое явление обуславливается электронными токами соседних атомов и внутримолекулярными

межатомными токами. Они могут увеличивать внешнее поле, создавая таким образом дополнительный экранирующий или дезэкранирующий эффект и сдвигая сигнал в ту или другую сторону.

Интервалы экспериментально измеренных значений химических сдвигов для большинства функциональных групп можно найти в справочной литературе [4,5]. Там же можно найти набор *констант Шулери*, предназначенных для ориентировочного расчета химического сдвига метильной и метиленовой групп, присоединенных к различным заместителям, по формуле:

$$\delta = 0,23 + \Sigma \sigma_{\text{эфф}}, \text{ где}$$

$\Sigma \sigma_{\text{эфф}}$ - сумма аддитивных констант заместителей (констант Шулери).

Некоторыми особенностями обладают резонансные сигналы протонов легко обменивающихся групп – гидроксильной, аминогруппы, амидной и некоторых других. Положение и вид этих сигналов существенно зависят от условий съемки спектра – растворителя, температуры и значения pH. Как правило, они наблюдаются в спектре в виде очень широких «бугров», в противоположность узким спектральным линиям, характерным для большинства алкильных, ароматических и других протонов. Химический сдвиг этих уширенных линий очень сильно зависит от pH образца. Лучше всего такие сигналы наблюдаются в таких растворителях, как диметилсульфоксид-d₆, ацетон-d₆, значительно хуже в дейтерохлороформе, и могут полностью исчезать в дейтерированном метаноле и тяжелой воде.

Интервал, в котором расположены резонансные сигналы в спектрах ПМР, не превышает 10-15 м.д. Образцы для спектров ПМР, как уже ясно из сказанного выше, приготавливаются в полностью

дейтерированных растворителях. Это служит двум целям – во-первых, сигналы протонов обычного растворителя существенно изменяли бы вид спектра, усложняя его прочтение, а во-вторых, сигнал ядер дейтерия, содержащихся в таком растворителе, служит в современных приборах для настройки однородности магнитного поля в объеме образца – необходимого условия получения спектра высокого качества. Химический сдвиг остаточных протонов в составе дейтерированного растворителя позволяет калибровать диапазон химических сдвигов, не добавляя в образец эталонное вещество. Значение этого сдвига мало отличается от соответствующего значения для обычного, недейтерированного, растворителя. Для правильной интерпретации спектров ПМР полезно знать химические сдвиги и характерный вид сигналов наиболее распространенных растворителей, которые к тому же являются наиболее распространенными примесями в образцах. Эти значения приведены в таблице 1.

Таблица 1

| Растворитель | Химический сдвиг и мультиплетность |
|--|------------------------------------|
| Дейтерохлороформ CDCl_3 | 7.24 м.д., с. |
| Диметилсульфоксид-d6 $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ | 2.50 м.д., м. |
| Дейтерацетон $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ | 2.15 м.д., м. |
| Дейтерометанол CD_3OD | 3.34 м.д., м.; 3.6-4.1 ушир.с. |
| Тяжелая вода D_2O | 3.8 - 4.9 м.д., ушир. с. |

Дополнительно стоит добавить, что одной из часто наблюдаемых примесей в образцах бывает вода. Малые количества воды накапливаются в некоторых растворителях при хранении, зачастую она присутствует в составе исследуемой пробы. Сигнал протонов воды, как правило, имеет вид интенсивного уширенного синглета, химический сдвиг которого колеблется в весьма широких пределах, в зависимости от используемого растворителя и pH образца. Общим правилом можно считать сдвиг сигнала протонов воды в область слабых полей при снижении pH.

4. Спин-спиновое взаимодействие.

Форма спектральных линий, в частности, *мультиплетность* и *константы спин-спинового взаимодействия* – второй после химического сдвига источник структурной информации.

Если существует система двух химически и магнитно неэквивалентных протонов H_A и H_B , их магнитные моменты взаимодействуют через валентные электроны химической связи. Как было показано ранее, ядро со спином $\frac{1}{2}$ может находиться во внешнем поле в 2 состояниях: ориентированным по полю и против поля. Собственный магнитный момент ядра H_A , складываясь с внешним полем или вычитаясь из него, расщепляет сигнал протона H_B на две спектральные линии. Расстояние между ними, выраженное в герцах, и представляет собой константу спин-спинового взаимодействия, обозначаемую J_{AB} и характеризующую энергию этого взаимодействия. Такая же картина будет наблюдаться для протона H_A , причем ясно, что $J_{AB} = J_{BA}$. Константа спин-спинового взаимодействия не зависит от напряженности приложенного магнитного поля и определяется только природой взаимодействующих ядер, числом и характером связей между ними и геометрией молекулы.

В системе $Y_2-CH-CH_2-X$, имеющей протоны с различными химическими сдвигами, протон группы CH взаимодействует с двумя эквивалентными протонами группы CH_2 . Каждый из протонов группы CH_2 может находиться в двух состояниях и число возможных комбинаций спинов равно 4. (Рис.2)

Вторая и третья комбинация эквивалентны по своему вкладу в магнитное поле, и сигнал протона группы CH будет представлять собой триплет с относительной интенсивностью линий 1:2:1. Сигнал от группы CH_2 будет наблюдаться в виде дублета, а интегральные

интенсивности триплета и дублета будут относиться как 2:1, соответственно количеству протонов.

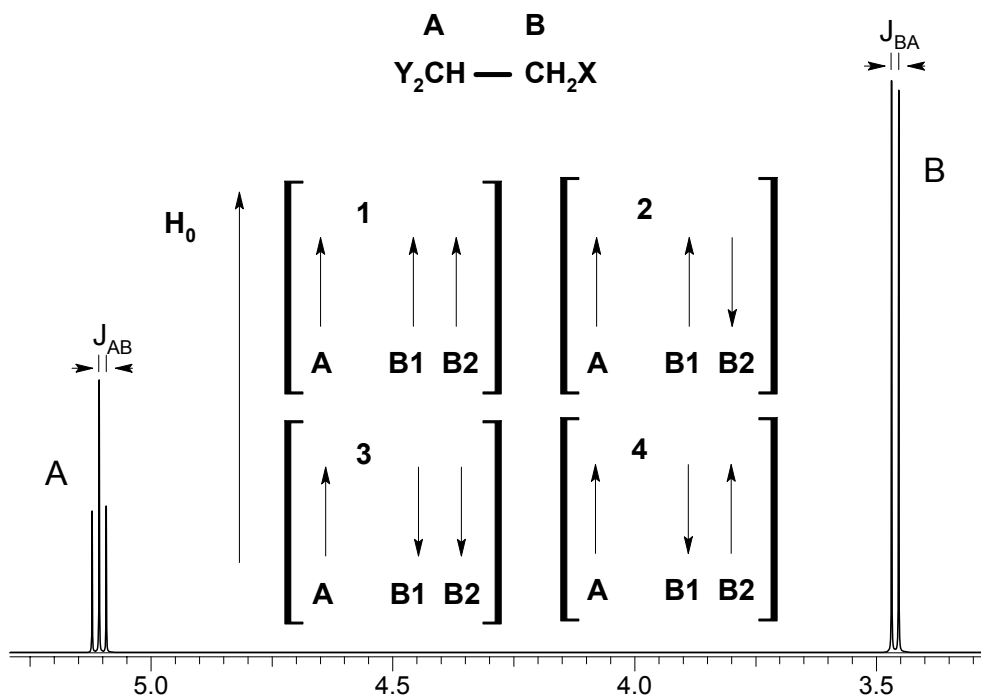


Рис.2 Диаграмма спин-спиновых взаимодействий в системе Y_2CH-CH_2-X .

В общем случае, если протон (или группа эквивалентных протонов) взаимодействует с n эквивалентными магнитными ядрами, сигнал его представляет мультиплет из $n+1$ линий. Распределение интенсивностей линий в мультиплете определяется коэффициентами разложения бинома степени $n : (a+b)^n$.

В том случае, когда происходит взаимодействие с несколькими группами неэквивалентных ядер, мультиплетность сигнала определяется произведением мультиплетностей, характерных для каждой группы $(n+1)(m+1)(k+1)....$ и так далее.

Интенсивности крайних компонентов больших мультиплетов ($n > 5$) часто бывают так малы, что находятся на уровне шума и практически неразличимы в реальном спектре. Химический сдвиг

протона в мультиплетных сигналах определяются по центральной линии.

Величины констант J при спин-спиновом взаимодействии протонов не превышают 20 Гц и заметно уменьшаются с увеличением числа связей, разделяющих ядра. Когда число одинарных связей между взаимодействующими протонами больше пяти, константу можно не учитывать. Для большинства реальных спектров это означает, что спин-спиновые взаимодействия рассматриваются только между группами, соседними по связи С-С.

В реальных спектрах возможность наблюдения и измерения констант зависит еще и от *разрешения*. Под разрешением понимают наименьшее измеримое расстояние между соседними спектральными линиями (линии расположенные ближе, сливаются в одну).

Ясно, что когда разрешение в спектре составляет 0,5 Гц, не может быть речи о наблюдении константы спин-спинового взаимодействия, равной 0,1 Гц. Разрешение, в первую очередь, зависит от интенсивности поля спектрометра – чем выше интенсивность, тем выше базовое разрешение. Константы в сложных мультиплетах, трудно наблюдаемые на спектрометре с рабочей частотой 200 МГц, могут быть хорошо видны при 500 МГц. Помимо этого, разрешение зависит от множества других факторов, связанных с самим образцом. Так, присутствие в образце нерастворенных частиц, высокая вязкость, примеси парамагнитных веществ и ионов металлов могут вообще превратить спектр в набор широких неразрешенных «бугров».

Спин-спиновое взаимодействие с другими магнитными ядрами с $I=1/2$ в протонном спектре наблюдается относительно редко. Взаимодействие с ядром углерода ^{13}C практически ненаблюдаемо ввиду низкого процентного содержания этого изотопа. В спектрах с

хорошим отношением сигнал/шум можно обнаружить у интенсивных синглетных линий так называемые «углеродные спутники» - минорные линии, отстоящие от основной на 120-160 Гц, с интенсивностью около 1% от интенсивности основной линии. В соединениях, содержащих фосфор и фтор, наблюдается спин –спиновое взаимодействие с ядрами ^{19}F и ^{31}P , изотопное содержание которых в природе велико. Значения соответствующих констант можно найти в литературе [4].

В сигналах остаточных протонов дейтерированных растворителей наблюдается спин-спиновое взаимодействие с ядрами дейтерия. Спин этого ядра $3/2$, поэтому количество линий в мультиплете значительно больше и сигналы приобретают характерный сложный вид. Исключением является синглетный сигнал хлороформа в дейтерохлороформе и уширенный синглет обменных протонов тяжелой воды D_2O .

Спектр, в которых разность химических сдвигов неэквивалентных протонов H_A и H_B , выраженный в Гц, значительно превышает константу спин-спинового взаимодействия между ними J_{AB} , называется спектром *первого порядка*.(3)

$$(\nu_\text{A}-\nu_\text{B})/J_{\text{AB}} \geq 10 \quad (3)$$

5. Правила интерпретации спектров первого порядка.

Для спектров первого порядка существует ряд формальных правил, позволяющих значительно упростить соотнесение спектра со структурой исследуемого соединения. Несмотря на то, что приближение первого порядка действительно только для довольно простых соединений, его часто можно использовать для интерпретации сложных спектров, выделяя в них более простые *субспектры*.

Правила таковы:

1) Спектр смеси соединений представляет собой суперпозицию спектров каждого индивидуального компонента смеси с отношением интенсивностей сигналов равным мольным долям компонентов, разделенным на количество протонов в функциональной группе.

2) Спин-спиновое взаимодействие между магнитно эквивалентными ядрами не проявляется в спектре. Следует учесть, что химически эквивалентные атомы не обязательно эквивалентны магнитно, например, экваториальные и аксиальные протоны в алициклических соединениях. В случае затрудненного вращения вокруг химической связи протоны химически неразличимых функциональных групп могут также оказаться неэквивалентными магнитно, отличаясь химическим сдвигом и давая вклад в спин-спиновое взаимодействие. Однако, в большинстве случаев осевая симметрия в молекуле вдвое уменьшает количество сигналов в спектре.

3) Для ядер со спиновым квантовым числом $I = 1/2$ мультиплетность сигнала равна $n+1$, где n — число ядер в соседней группе. Если имеется другая соседняя группа, протоны которой отличаются по химическому сдвигу от протонов первой, ее влияние на мультиплетность следует рассматривать отдельно. При этом

Так, если ядро H_M имеет два химически различных соседних ядра H_A и H_X , то сигнал H_M расщепляется в дублет дублетов. Триплет будет наблюдаться лишь в том случае, если случайно J_{AM} и J_{MX} окажутся одинаковыми.

5) Относительные интенсивности линий внутри мультиплета соответствуют коэффициентам биномиального ряда. Эти коэффициенты можно определить из треугольника Паскаля.

| | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| n= | 0 | | | | 1 | | | | |
| | 1 | | | | 1 | | | 1 | |
| | 2 | | | 1 | | 2 | | | 1 |
| | 3 | | 1 | | 3 | | 3 | | 1 |
| | 4 | 1 | | 4 | | 6 | | 4 | |

б) Величина спин-спинового взаимодействия в общем уменьшается при возрастании числа связей, разделяющих взаимодействующие ядра. В конечном итоге константа спин-спинового взаимодействия по порядку величины становится близкой к естественной ширине линии, и в этом случае уже не наблюдается расщепления.

18

протонами $H_A-C-C-H_B$ зависит от угла между плоскостями H_A-C-C и $C-C-H_B$. Максимум взаимодействия наблюдается при углах 0° и 180° , минимум – при 90° . Для геминальных протонов H_A-C-H_B наблюдается зависимость от угла между связями – константа уменьшается при увеличении угла. Эти свойства используются при исследовании циклических соединений.

В случае, если протоны разделены более чем 4 связями, характер связей приобретает существенное значение. Так, если в системе $H_A-C-C-C-H_B$ $J_{AB} \approx 0,2$ Гц, то в аллильной системе, где одна из связей кратная, J_{AB} возрастает до 2-3 Гц.

Протоны, входящие в состав быстро обменивающихся групп типа OH или NH_2 , как правило, не дают обычной картины спин-спинового взаимодействия, не наблюдается и расщепление сигналов соседних групп.

В тех случаях, когда в спин-спиновом взаимодействии участвует ядро, спиновое квантовое число I которого больше $1/2$, мультиплетность и распределение интенсивностей отклоняются от приведенных выше правил. Так, ядро дейтерия ($I = 1$), расщепляет сигнал соседнего протона в триплет с линиями равной интенсивности.

Сложные спиновые системы не описываются приближением первого порядка.

Признаками отклонения от приближения первого порядка в спектре является «неправильное» распределение интенсивностей линий в мультиплете, появление дополнительных линий. (Рис.4)

В спектроскопии 1H -ЯМР принято обозначать неэквивалентные протоны, химические сдвиги которых мало различаются, соседними буквами алфавита (A, B, C или X, Y, Z). Протонные системы с сильно различающимися сдвигами обозначают соответственно AX, AY и т.д.

Число эквивалентных протонов обозначают индексом, расположенным внизу. Так, например, протонная система в хлористом этиле будет обозначаться A_3X_2 , а в о-дихлорбензоле A_2B_2 .

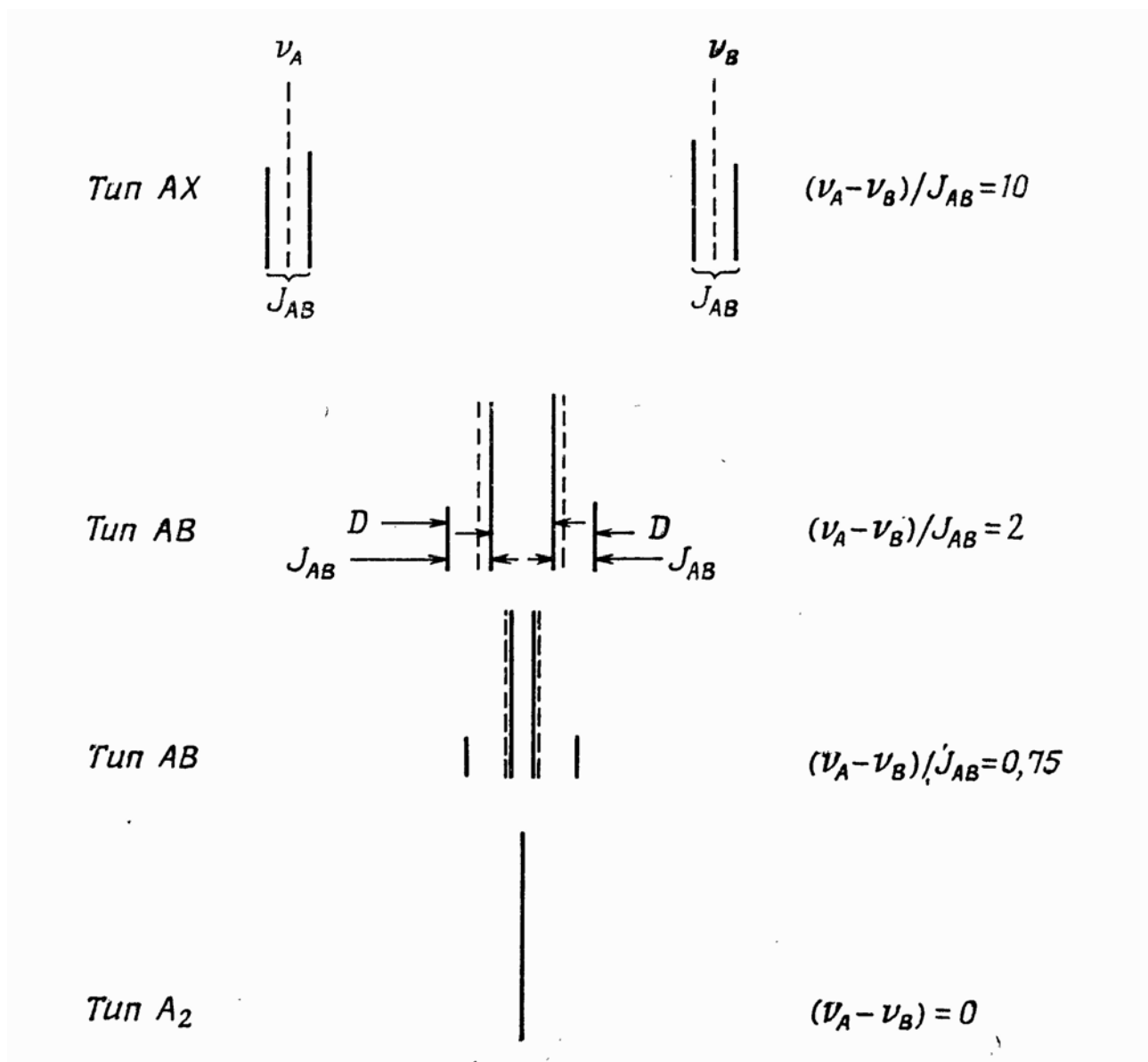


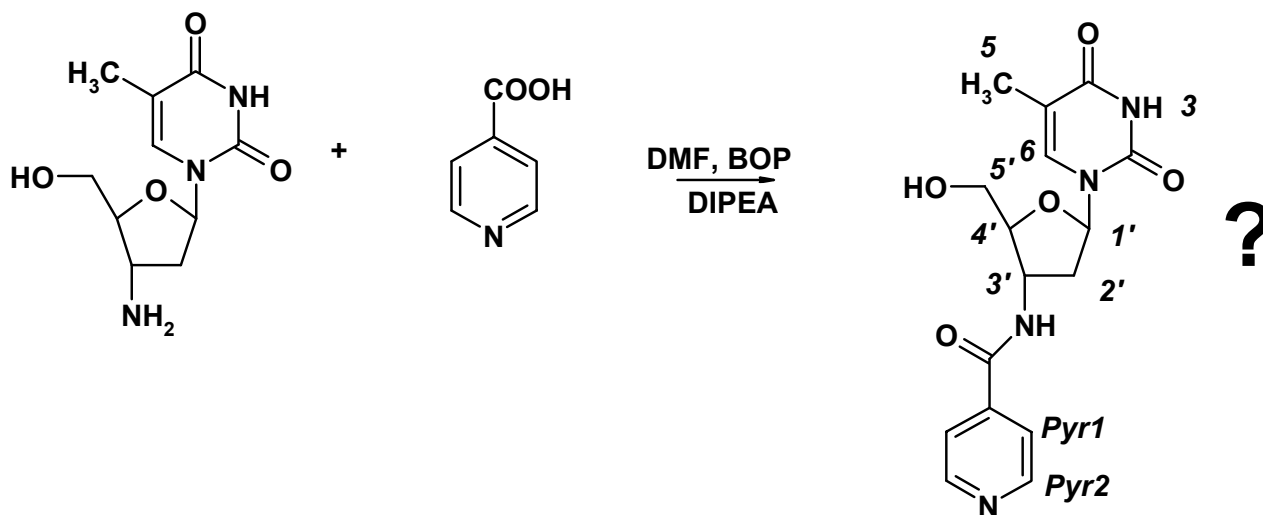
Рис.4 Изменение интенсивности спин-спинового взаимодействия двух протонов A и B по мере уменьшения разницы химического сдвига ($\nu_A - \nu_B$).

Расчетные спектры для большинства простых спиновых систем можно найти в литературе [1].

6. Пример интерпретации реального спектра ПМР.

Приведем пример решения стандартной задачи химика-органика – интерпретации структуры соединения, полученного в процессе химического синтеза.

Синтез проводили в ходе выполнения магистерской диссертации на кафедре биотехнологии МГАТХТ в 2003 году. Целью его было получение нового, ранее неопisanного производного 3'-амино-3'-дезокситимидина – биологически активного аналога природного нуклеозида тимидина с изоникотиновой кислотой. Для этого 3'-амино-3'-дезокситимидин обрабатывали эквивалентом изоникотиновой кислоты в безводном диметилформамиде в присутствии конденсирующего агента и третичного амина. Из реакционной массы с выходом около 85% было выделено белое мелкокристаллическое вещество, элементный анализ которого соответствовал брутто-формуле возможного продукта реакции. Схема реакции, предполагаемая структура соединения и его спектр изображены ниже:



В данном конкретном случае аналитическая задача ставится в наиболее простом виде – необходимо только соотнести спектр с предполагаемой структурой и доказать, что она не противоречит экспериментальным данным. Попробуем разбить её решение на несколько простых этапов.

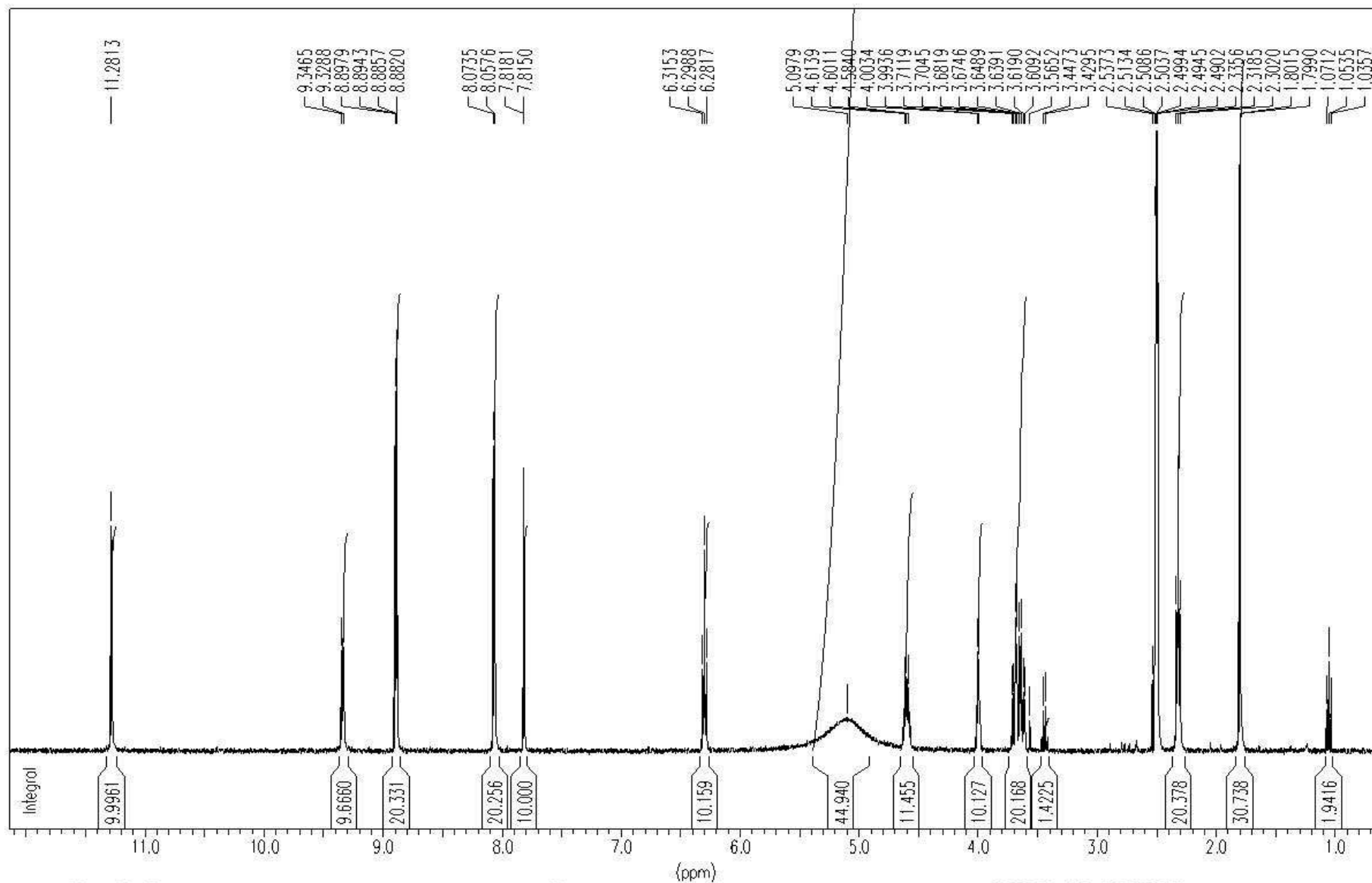


Рис. 5. Спектр соединения, полученного реакцией изоникотиновой кислоты и аминотимидина (DMSO-d₆, 400 МГц).

1) Рассматривая представленную формулу, мы видим, что количество неэквивалентных функциональных групп, содержащих протоны, равно в ней 12, причем 3 из них – ОН и две NH группы – потенциально являются обменными. Осевая симметрия остатка изоникотиновой кислоты позволяет считать α - и β -протоны ароматического ядра (Pyr1 и Pyr2) магнитно эквивалентными. В спектре мы наблюдаем 15 независимых сигналов, однако относительно малая интегральная интенсивность 2-х из них (1.05 и 3.43 м.д.)- около 20% от минимальной для остальных сигналов, ведет к предположению о том, что это могут быть сигналы примеси. Интегральную интенсивность сигнала на 7.8 м.д., из сравнения со спектрами аналогичных структур отнесенного как сигнал ароматического протона 6, примем за единицу – величину соответствующую 1 протону (10 на спектре).

3) Для удобства рассмотрим спектр по частям.

На рис. 6 часть спектра в области слабых полей – область, характерная для сигналов протонов в сильно экранированных группах, например, ароматических. Здесь должны быть представлены сигналы групп 6, Pyr1 и Pyr2. Исходя из правил, описанных в разделах 4 и 5, эти сигналы должны выглядеть соответственно как синглет и 2 дублета с отношением интегральной интенсивности 1:2:2. Такие сигналы мы наблюдаем при 7.8, 8.0 и 8.8 м.д. Если измерить константу спин-спинового взаимодействия в дублетах на 8.0 и 8.8, она окажется равной 6.33Гц и одинаковой для обоих. Это подтверждает наше предположение, что дублеты относятся к ароматическим протонам остатка изоникотиновой кислоты. Однако, рассматривая более внимательно форму сигнала, можно заметить, что она является более сложной, чем простой дублет – видны дополнительные линии, видимо, эта ароматическая система не описывается приближением первого порядка.

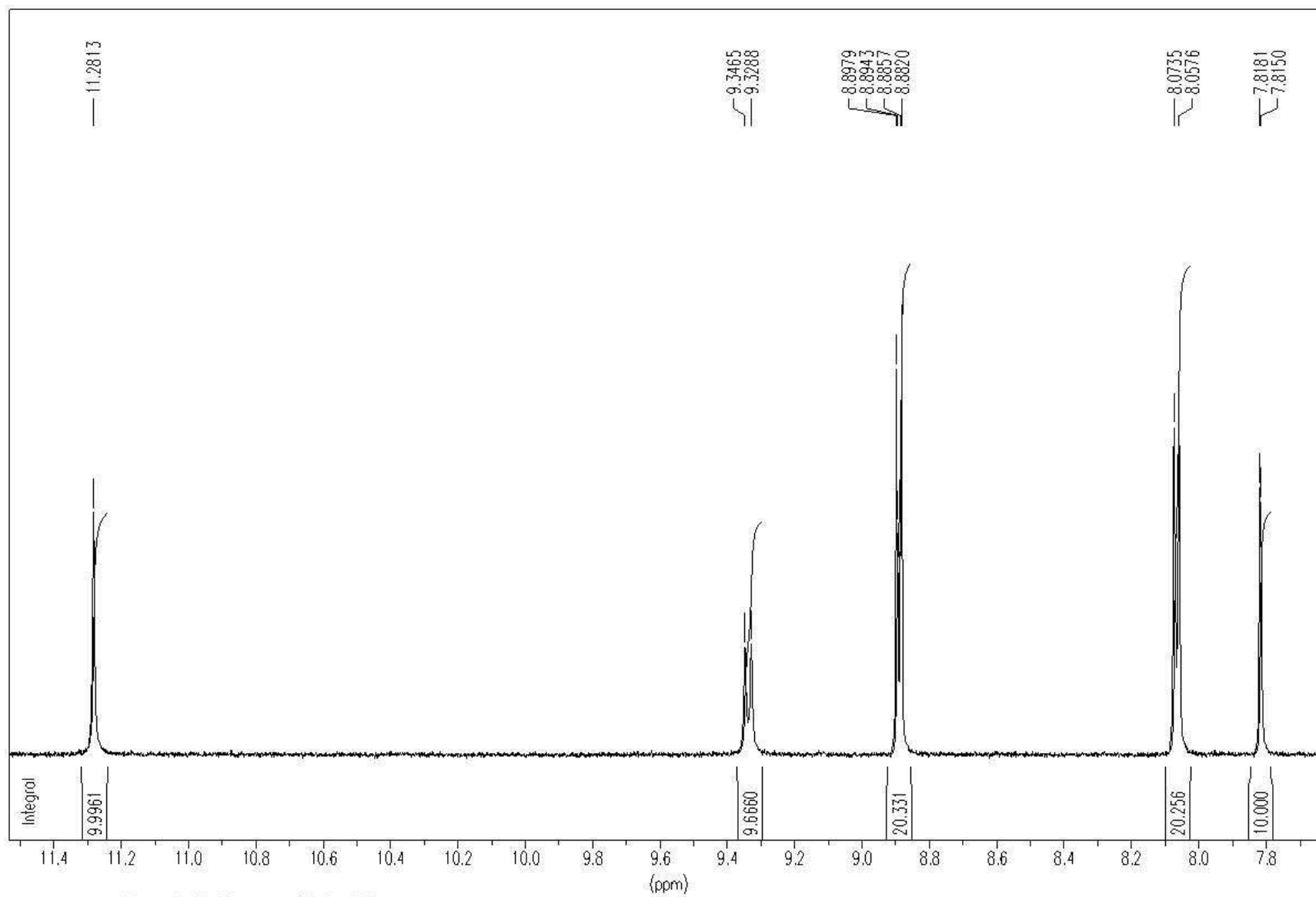


Рис. 6. Субспектр 11.5 - 7.6 м.д.

Для подтверждения наших рассуждений можно провести *компьютерную симуляцию* спектра изоникотиновой кислоты, то есть расчет приблизительного вида спектра на основании структурной формулы. Программы для таких расчетов широко распространены и входят в состав многих пакетов программного обеспечения для химиков (ChemOffice, ACD и др.), а также в стандартное программное обеспечение ЯМР-спектрометров.

Сравнение расчетного спектра с реальным часто помогает прояснить детали тонкой структуры спектра, отнести сомнительные сигналы.

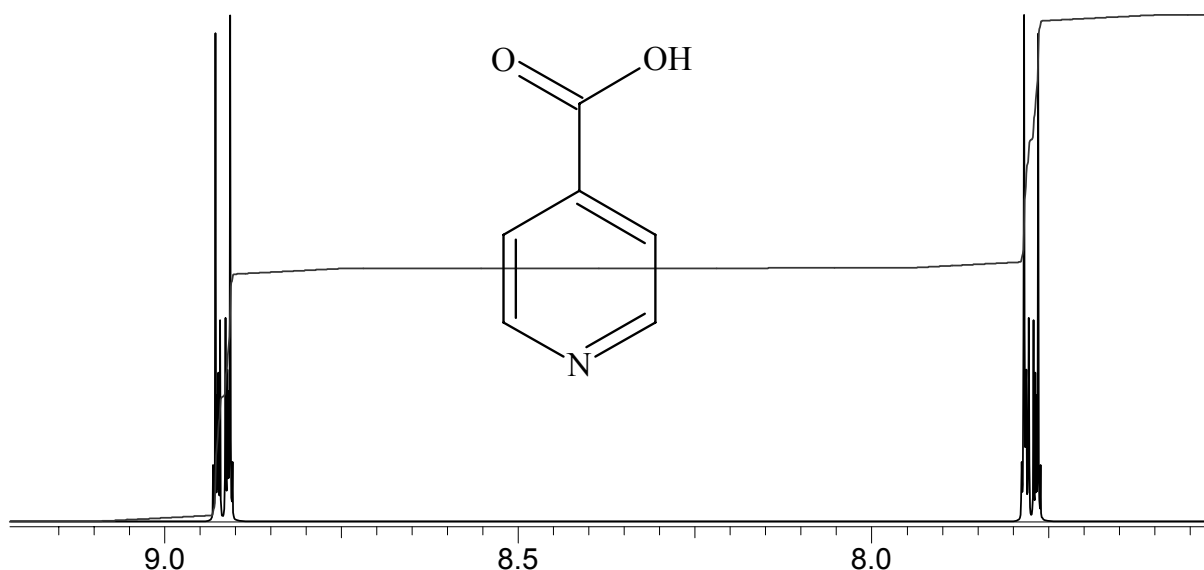


Рис.7. Спектр изоникотиновой кислоты, рассчитанный в программе ACD, без учета обменных протонов.

Как видно из рисунка 7, расчет дает весьма похожий субспектр с мультиплетами сложной структуры и близкими химическими сдвигами. Это не удивительно – ведь значения химических сдвигов рассчитываются программой из эмпирических значений и констант Шулери, заложенных во встроенную базу данных.

Стоит помнить, что отклонения будут тем больше, чем сложнее химическая структура объекта и набор спиновых систем в молекуле.

К сожалению, полностью полагаться на компьютерный расчет в интерпретации ЯМР-спектров нельзя. Опыт показывает, что близкое соответствие можно получить только для достаточно простых структур.

В этой части спектра мы видим еще 2 сигнала – синглет на 11.28 м.д. и дублет на 9.34, оба с равной интегральной интенсивностью, соответствующей 1 протону. Эти спектральные линии можно интерпретировать как сигналы NH протонов в тиминовом кольце и 3'-положении фуранозного цикла. Ясно, что дублетный сигнал могла бы дать только NH группа в положении 3' – только у нее есть соседний протон. КССВ этого дублета равна 7.20 Гц.

Перейдем к рассмотрению следующей части спектра (рис.8). Из литературных данных и сопоставления со спектрами аналогов и исходного соединения известно, что в этой области должны находиться протоны фуранозного цикла: на 6.29 м.д.-характерный триплет гликозидного протона 1', на 4.6, 4.0 и 3.7 м.д – сложные мультиплеты протонов 3', 4' и 5'. Распределение интенсивностей соответствует количеству протонов в соответствующих положениях. Сложная структура мультиплетов указывает на неприменимость приближения первого порядка.

В этой части спектра наблюдаются еще 2 сигнала – квартет с константой 6.98 Гц и малой интенсивностью на 3.43 м.д., который мы ранее интерпретировали как примесь, и очень уширенный сигнал довольно большой интенсивности примерно на 5.1 м.д. Такой сдвиг и форма сигнала характерны для протонов гидроксильных групп и примесной воды. Высокая интенсивность сигнала (~ 4,4 протона) не позволяет отнести его как сигнал гидроксильной группы в 5'-положении. Следует предположить, что сигнал относится к примеси воды в образце.

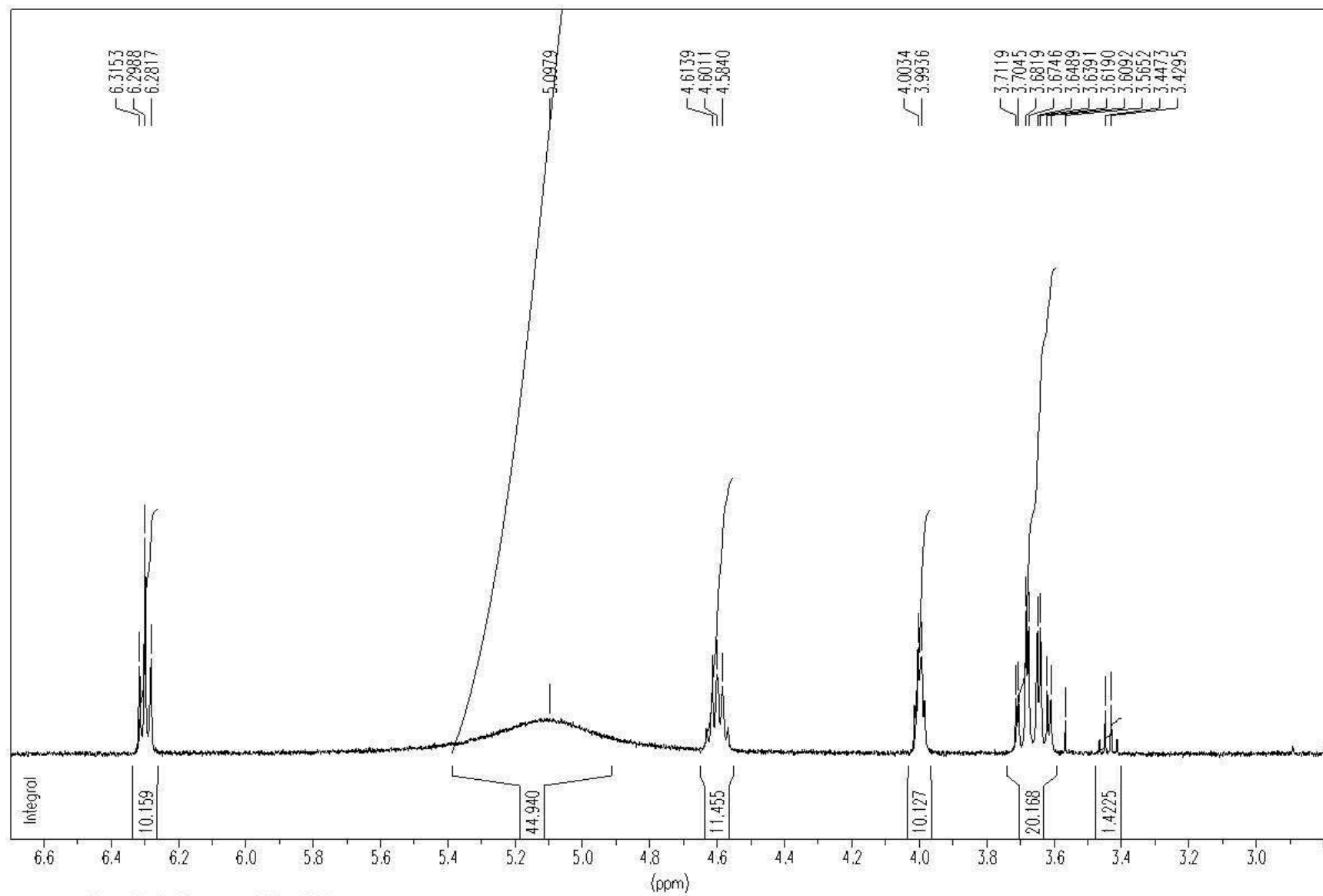


Рис. 8. Субспектр 6.8 - 2.8 м.д.

Оставшаяся часть спектра представлена на рис.9. Наблюдаются 4 сигнала, наиболее интенсивный из которых – на 2.5 м.д. – явным образом соответствует остаточным протонам растворителя – диметилсульфоксида –d₆.

Из 3-х оставшихся сигналов триплет на 1.05 был нами уже определен как примесь, а два других по химическому сдвигу и интенсивности соответствуют протонам групп 5 и 2'.

3) Перейдем к выводам. Всем функциональным группам, содержащим протоны, в предполагаемой структуре соединения нам удалось сопоставить адекватные по химическому сдвигу и интегральной интенсивности спектральные линии (за исключением обменной группы ОН). Измерение КССВ в наиболее простых субспектрах также подтвердило наши предположения. В целом спектр соответствует структурной формуле целевого продукта реакции. Кроме того, в образце обнаружены примеси – вода и органическое соединение, по химическому сдвигу и форме сигналов - предположительно, диэтиловый эфир, и то и другое в незначительных количествах.

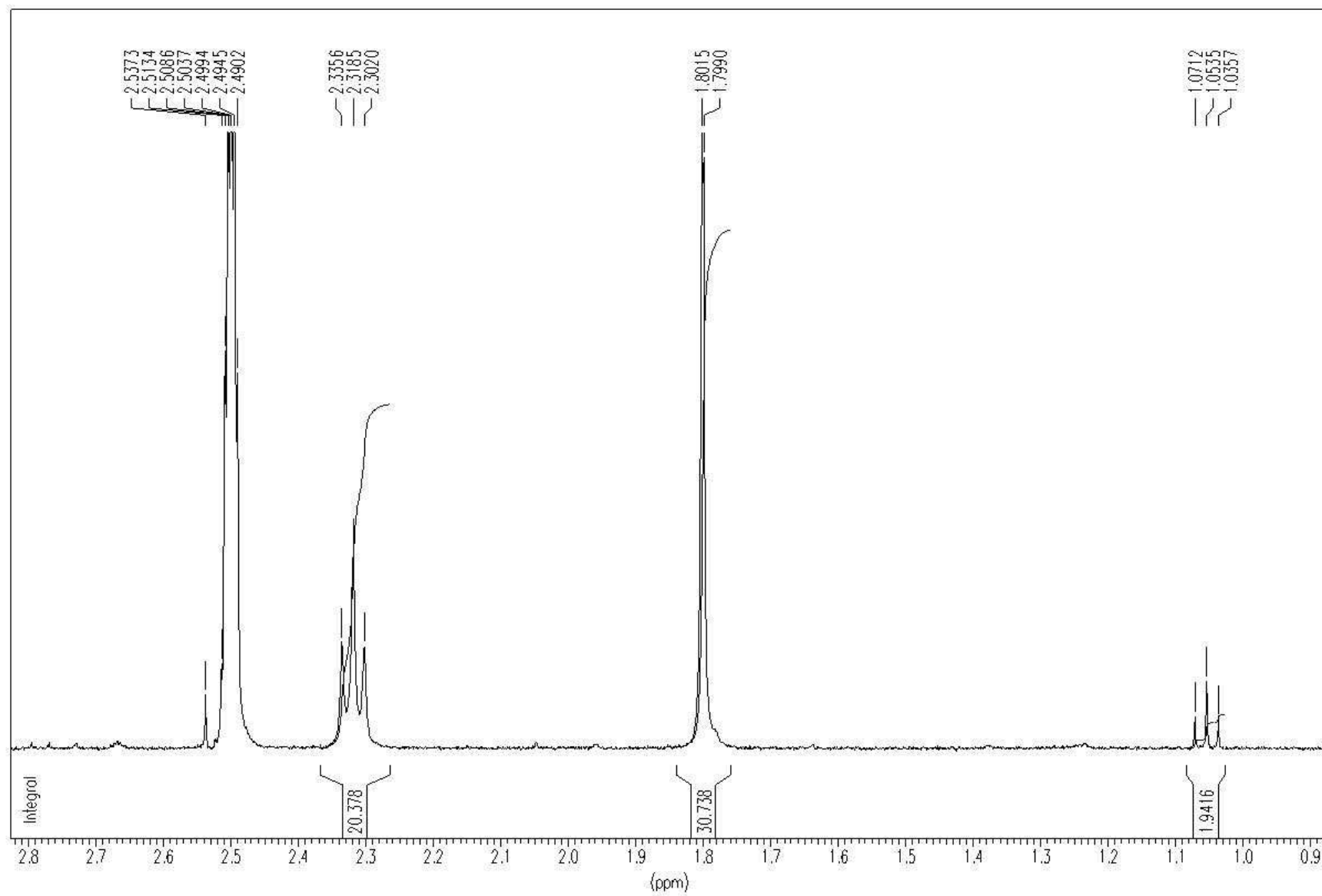


Рис. 9. Субспектр 2.8 - 0.8 м.д.

7. Литература.

1. Х.Гюнтер. Введение в курс спектроскопии ЯМР. // Москва, «Мир», 1984.
2. Р.Эрнст, Дж.Боденхаузен, А.Вокаун. ЯМР в одном и двух измерениях. // Москва, «Мир», 1990.
3. Э.Дероум. Современные методы ЯМР для химических исследований. // Москва, «Мир», 1992.
4. А.Гордон, Р.Форд. Спутник химика. // Москва, «Мир», 1976.
5. Л.А.Казицына, Н.Б.Куплетская. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. // Москва, «Высшая школа», 1971.

Издание учебное

Чудинов Михаил Васильевич

ПРИМЕНЕНИЕ ^1H -ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ СТРУКТУРНОГО
АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.

Учебное пособие

Компьютерная верстка: Чудинов М.В.

Подписано в печать Формат 60×86/16. Бумага писчая.
Отпечатано на ризографе. Тираж 100 экз. Заказ №.....

Лицензия на издательскую деятельность ИД № 03507 от 15.12.2000
Московская государственная академия тонкой химической технологии
имени М.В.Ломоносова.

Издательско-полиграфический центр.

119571 Москва, пр. Вернадского 86.