

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) основан на явлении *резонансного поглощения электромагнитного излучения радиочастотного диапазона веществами, помещенными в постоянное магнитное поле*. В отличие от всех рассмотренных ранее спектроскопических методов, здесь происходит возбуждение атомных ядер с ненулевым магнитным моментом.

Спектроскопия ЯМР - очень молодая область науки. Открытие, эффектов магнитного резонанса произошло в середине 40-х годов. В 1944 г. советский физик Е.К. Завойский впервые наблюдал поглощение электромагнитных радиоволн парамагнитным веществом, т.е. ему принадлежит заслуга создания метода ЭПР. Явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в конденсированной фазе было открыто американскими физиками Ф. Блохом и Э.М. Парселлом в 1946 г (Нобелевская премия по физике, 1952 г.).

Открытое физическое явление легло в основу создания нового вида спектроскопии, являющегося сегодня одним из самых информативных методов исследования структуры и динамических превращений молекул, межмолекулярных взаимодействий, механизмов химических реакций и количественного анализа веществ. Простота приготовления образцов, быстрота исследования и высокая информативность спектров ЯМР сделали этот вид спектроскопии одним из наиболее важных экспресс-методов анализа органических соединений. Однако этим применение ЯМР не ограничиваются. В медицинской диагностике настоящую революцию произвела *ЯМР-томография*. Она по чувствительности и разрешающей способности превосходит рентгеновскую томографию, но в отличие от нее безвредна для пациента.

Спектроскопия ЯМР возникла и быстро развивается на стыке современной физики, химии, биологии и медицины. Конструирование и серийный выпуск промышленностью ЯМР-спектрометров на протонах относятся к середине 50-х XX века. Для спектроскопии ЯМР на других

ядрах приборы высокого разрешения стали производиться в 70-х годах. За последние десятилетия произошло бурное развитие и совершенствование экспериментальных и расчетных методов ЯМР. В современных спектрометрах ЯМР, которые являются сложными измерительно-вычислительными комплексами пятого поколения, широко используются последние достижения криогенной техники, радиоэлектроники, точной механики и вычислительной техники.

1. Физические принципы метода

Ядерный магнетизм является весьма сложным физическим понятием, для его описания привлекается математический аппарат квантовой механики. Однако для понимания сути эффекта ядерного магнитного резонанса достаточно использования простой "классической" модели строения атома.

Итак, если представить себе ядро атома в виде вращающегося положительно заряженного шарика, то мы увидим, что заряд вращается по кольцевой орбите, порождая микроскопический кольцевой ток. Согласно законам классической электродинамики, вращение электрически заряженной частицы вокруг некоторой оси создает магнитное поле, совпадающее по направлению с осью вращения. Кольцевой ток индуцирует магнитное поле, поэтому ядро представляет собой не что иное, как микроскопический магнит. Магнитный момент ядра направлен вдоль оси вращения (если быть точным, прецессирует относительно этой оси) - и его можно уподобить крошечному стержневому магниту с характерными *спиновыми* (вращательными) и *магнитными* моментами. Такая система характеризуется магнитным моментом, пропорциональным угловому моменту количества движения. Для ядер, обладающих спином, пропорциональность магнитного момента (μ_n) угловому моменту количества движения (P) выражается соотношением

$$\mu_n = \gamma_n P = \gamma_n \hbar I,$$
 где коэффициент пропорциональности - γ_n называется *гиромагнитным* или *магнитомеханическим отношением ядра* (отношение магнитного момента к угловому).

момент может быть выражен также через так называемый *ядерный g-фактор*. При этом магнитный момент равен $\mu_n = g_n I$. Значения I , γ_n и g_n определяются природой ядра, являются характеристикой каждого типа ядер и представляют табулируемые константы. В таблице 1 приведены магнитные свойства ядер, которые имеют наибольшее значение для спектроскопии ЯМР органических соединений.

Таблица 1. Свойства ядер, наиболее важных для ЯМР-спектроскопии

Изо- топ	Спин	Распростра- ненность в природе, %	Гиромагнит. отношение γ , 10^7 Тл/с	Относительная чувствитель- ность ($B_0 = 4,69$ Тл)	Частота ЯМР, МГц ($B_0 = 2,349$ Тл)
^1H	1/2	99,98	26,752	1,00	100,0
^{10}B	3	19,6	2,875	0,020	10,747
^{11}B	3/2	80,4	8,584	0,165	32,084
^{13}C	1/2	1,11	6,728	0,016	25,144
^{14}N	1	99,634	1,934	0,001	7,224
^{15}N	1/2	0,366	-2,712	0,001	10,133
^{17}O	5/2	0,038	-3,628	0,029	13,557
^{19}F	1/2	100,0	25,181	0,833	94,077
^{29}Si	1/2	4,67	-5,319	0,008	19,865
^{31}P	1/2	100,0	10,841	0,066	40,481

Отсутствие или наличие спина ядра и его значение определяются числом протонов и нейтронов, т.е. связаны с такими характеристиками ядра, как его заряд, равный сумме зарядов протонов, и массовое число. Различают три вида зависимости ядерного спина от этих величин.

1. При четных значениях заряда и массового числа, т.е. при четных числах протонов и нейтронов, ядерный спин $I = 0$, например, у таких очень распространенных изотопов, как $^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$, $^{28}_{14}\text{Si}$, $^{32}_{16}\text{S}$ и др.

2. У всех элементов с нечетным массовым числом при любом порядковом номере, когда числа протонов и нейтронов разной четности, ядра имеют полуцелочисленный спин: $I = 1/2; 3/2; 5/2$, например, у изотопов ^1_1H , $^{11}_5\text{B}$, $^{13}_6\text{C}$, $^{17}_8\text{O}$, $^{19}_9\text{F}$, $^{27}_{13}\text{Al}$, $^{31}_{15}\text{P}$, $^{35}_{17}\text{Cl}$, $^{37}_{17}\text{Cl}$, $^{79}_{35}\text{Br}$, $^{81}_{35}\text{Br}$ и др.

3. При четном массовом числе и нечетном заряде, т.е. нечетном числе, как протонов, так и нейтронов, ядро обладает целочисленным спином: $I = 1, 2, 3, 5, 7$; к ним относятся изотопы ^2_1H , $^{10}_5\text{B}$, $^{14}_7\text{N}$, $^{30}_{15}\text{P}$ и др.

Для используемой в широкой практике спектроскопии ЯМР наибольшее значение имеют ядра ^1H и ^{13}C , имеющие $I = 1/2$. Из ядер, имеющих $I = 1$, заметное значение имеют ядра ^2_1H (в основном - из-за использования дейтерированных растворителей).

Рассмотрим классическую модель, описывающую поведение магнитного момента ядра μ_n со спином $I = 1/2$ в постоянном магнитном поле B_0 . При наблюдении ЯМР используется также радиочастотное поле B_1 , которое всегда перпендикулярно постоянному полю B_0 .

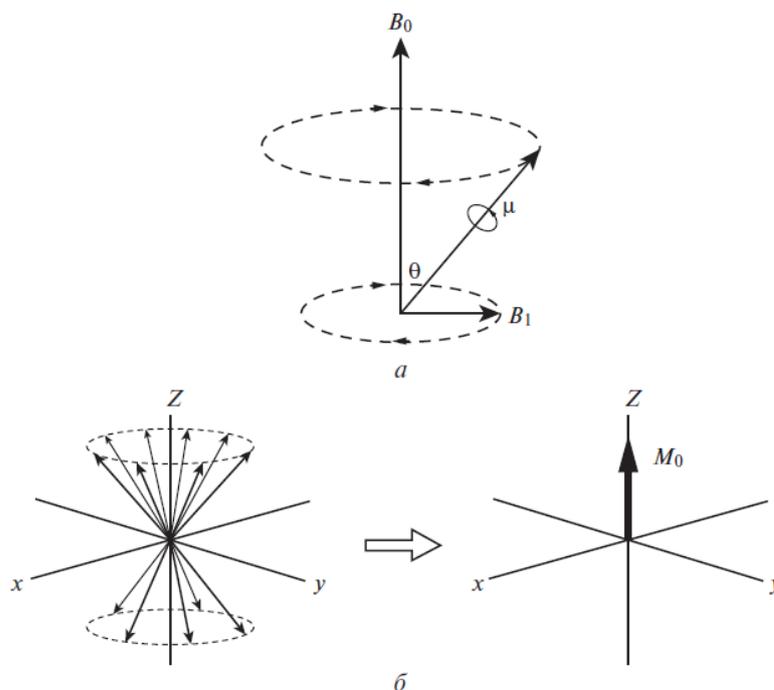


Рис. 1. Прецессия вектора μ_n в магнитном поле B_0 и возникновение равновесной намагниченности

Как всякий магнитный диполь, в соответствии с общими законами электродинамики μ_n начнет прецессировать вокруг направления магнитного поля B_0 , составляя с ним некоторый угол θ (рис. 1). При этом возможны два устойчивых состояния. Более низкой энергией будет обладать такое состояние, когда проекция μ_n на ось Z (μ_z) ориентирована параллельно вектору поля B_0 . Тогда говорят, что магнитный момент ядра *ориентирован по*

полю B_0 . Более высокой энергией обладает состояние, когда μ антипараллельна вектору B_0 . О таком состоянии говорят, что магнитный момент ядра *направлен против поля* B_0 . Таким образом, во внешнем магнитном поле B_0 происходит квантование - расщепление уровней энергии.

Спин ядра - важная характеристика, он определяет число разрешенных ориентаций магнитного момента ядра в постоянном магнитном поле. В общем случае для ядра со спином I возникает $2I + 1$ дискретных подуровней. Для протона и всех других ядер со спином $1/2$ возникает два подуровня ($+1/2$ и $-1/2$). Ядра дейтерия ^2H и ^{14}N имеют спин, равный 1. Для таких ядер уровней будет три ($-1, 0, +1$), а для ядра ^{11}B , спин которого равен $3/2$, таких уровней будет четыре ($-3/2, -1/2, +1/2$ и $+3/2$).

На рис. 2 показаны диаграммы уровней энергии в постоянном магнитном поле с магнитной индукцией (плотность магнитного потока) B_0 для ядер со спинами $1/2$ и 1 . В общем случае расщепление энергетических уровней в магнитном поле носит название *эффекта Зеемана*.

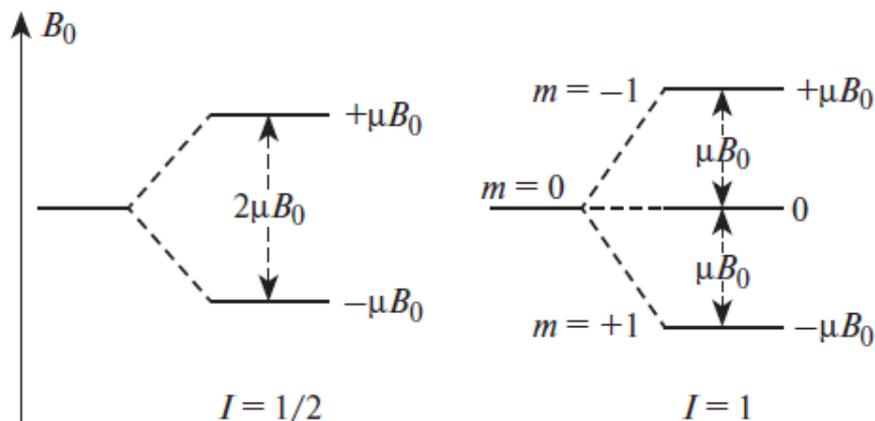


Рис. 2. Диаграмма уровней энергии для ядер со спинами $I = 1/2$ и $I = 1$ в поле B_0

Очевидно, если в системе существует несколько дискретных состояний с различными энергиями, то между ними возможны переходы. Разность энергии этих уровней равна $\Delta E = (\gamma_n \hbar / 2\pi) B_0$, отсюда $\nu_0 = (\gamma_n / 2\pi) B_0$. Отметим, что разность энергий между соседними уровнями линейно растет с увеличением B_0 .

В ЯМР разрешены переходы, при которых магнитное квантовое число m_I , которое может принимать значения от $-I$ до $+I$, изменяется на ± 1 . Если воздействовать на такую систему радиочастотным полем B_1 с энергией кванта $h\nu_0 = \Delta E$, то произойдет поглощение этого кванта. В результате система перейдет из нижнего состояния на более высокое, и это поглощение может быть зарегистрировано. При регистрации спектров ЯМР большое значение имеет природное содержание изотопа. Оно определяет интенсивность сигнала в спектре. Например, при наблюдении ЯМР на ядрах ^{13}C такой изотоп будет содержать только каждая сотая молекула, а вероятность появления двух ядер ^{13}C в одной молекуле, при прочих равных условиях, будет еще в 100 раз меньше.

Соотношение $\nu_0 = \mu B_0 / h = \gamma B_0 / 2\pi$ позволяет определить резонансную частоту каждого ядра ν_0 . Поскольку магнитные моменты ядер очень малы, эти частоты соответствуют диапазону метровых радиоволн для достижимых в настоящее время значений B_0 . Из соотношения также ясно, что решающее значение имеет плотность магнитного потока B_0 - чем она выше, тем выше частота ν_0 и интенсивность сигнала (табл. 2).

Таблица 2. Резонансные частоты для ^1H в разных магнитных полях B_0

B_0 (Т)	ν_0 (^1H)
Магнитное поле Земли: на полюсе $6,5 \times 10^{-5}$ на экваторе $3,5 \times 10^{-5}$	2,7 кГц 1,5 кГц
2,34	100 МГц
7,02	300 МГц
14,04	600 МГц
17,55	750 МГц
21,06	900 МГц
23,4	1 ГГц

Итак, в отсутствие внешнего магнитного поля любые ориентации вектора ядерного магнитного момента в пространстве равновероятны, т.е. квантовые спиновые состояния вырождены по энергии. При наложении постоянного магнитного поля B_0 возникает взаимодействие между ним и

магнитным моментом ядра μ_n . Энергия этого взаимодействия зависит от ориентации вектора магнитного момента относительно направления поля.

Ядра с направленными "по полю" и "против поля" магнитными моментами имеют различную энергию и возникает возможность энергетического перехода с одного уровня на другой. Этот переход и является *физической основой спектроскопии ЯМР*, основанной на поглощении электромагнитного излучения ядрами образца, помещенного в магнитное поле.

2. Заселенность энергетических уровней и условие ЯМР. В макроскопическом ансамбле частиц, помещенных в постоянное магнитное поле B_0 , равновесная заселенность спиновых состояний при данной температуре определяется законом Больцмана: $N_i = \exp(-E_i/kT)$, где N_i — вероятность нахождения частицы на i -том уровне; E_i - энергия уровня; kT — тепловая энергия (k - постоянная Больцмана, T - термодинамическая температура).

В реальных условиях, т.е. при обычных в ЯМР значениях γ_n , B и T , избыток заселенности нижних уровней очень невелик (порядка $\sim 10^{-5} - 10^{-6}$). Так, например, для протонов в магнитном поле $B_0 \sim 1,25$ Т при комнатной температуре отношение $N_\beta / N_\alpha = 1,000007$.

При равновесной заселенности уровней избыток частиц в более низком энергетическом состоянии достаточен для того, чтобы при облучении образца экспериментально наблюдались спектры поглощения. При одинаковой заселенности уровней никаких сигналов ЯМР не будет наблюдаться, так как вероятность переходов в обоих направлениях одинакова.

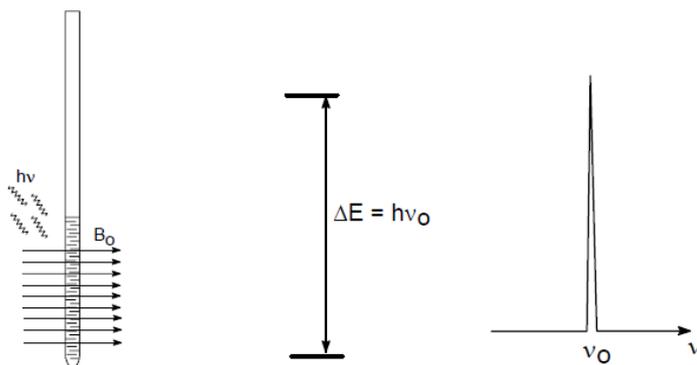
Для возбуждения этих переходов на образец, помещенный в постоянное однородное магнитное поле, необходимо воздействовать переменным магнитным полем B_v , сравнимым по энергии с ΔE зеемановских уровней системы. Резонансное поглощение электромагнитного излучения происходит при условии, что вектор

$$\Delta E = \frac{\gamma \hbar}{2\pi} B_0.$$

осциллирующего магнитного поля перпендикулярен направлению постоянного магнитного поля $B_v \perp B_0$ и для рассматриваемой двухуровневой системы удовлетворяется равенство, представляющее так называемое условие *ядерного магнитного резонанса*.

Порядок значений разности энергий спиновых состояний ядер в магнитных полях порядка 1Т таков, что резонансные частоты лежат в радиодиапазоне (1-100 МГц), поэтому спектроскопия ЯМР и относится к методам радиоспектроскопии.

Таким образом, в упрощенном виде эксперимент по спектроскопии ЯМР выглядит следующим образом: ампула с образцом исследуемого соединения помещается в магнитное поле и облучается электромагнитным излучением с частотой ν . При некоторой частоте ν_0 , соответствующей энергии $\Delta E = h\nu_0$, наблюдается поглощение энергии. Графически его представляют в виде спектра - зависимости интенсивности поглощения от частоты:



3. Способы регистрации спектров ЯМР. Для регистрации спектров ЯМР могут быть использованы 2 принципиально различных типа спектрометров.

3.1. Спектрометры с непрерывной разверткой радиочастоты или магнитного поля. Условие резонанса выполняется двумя путями:

1) изменением частоты ν переменного электромагнитного поля, например, при переключении диапазонов частот источников и (приемников) при неизменной напряженности постоянного магнитного поля $H = \text{const}$;

2) изменением напряженности постоянного поля (полевая развертка) при неизменной частоте $\nu - \text{const}$ переменного поля. ЯМР спектрометры с разверткой по полю имеют обычно источники электромагнитного излучения постоянной частоты порядка 10^7 - 10^8 Гц (60, 100, 200 МГц). Принципиальная схема такого спектрометра приведена на рисунке 3.

Главная часть прибора - магнит, создающий высокооднородное постоянное поле B_0 . Исследуемый образец помещают в стеклянную ампулу, которая вращается в магнитном поле (вращением достигается компенсация неоднородности поля).

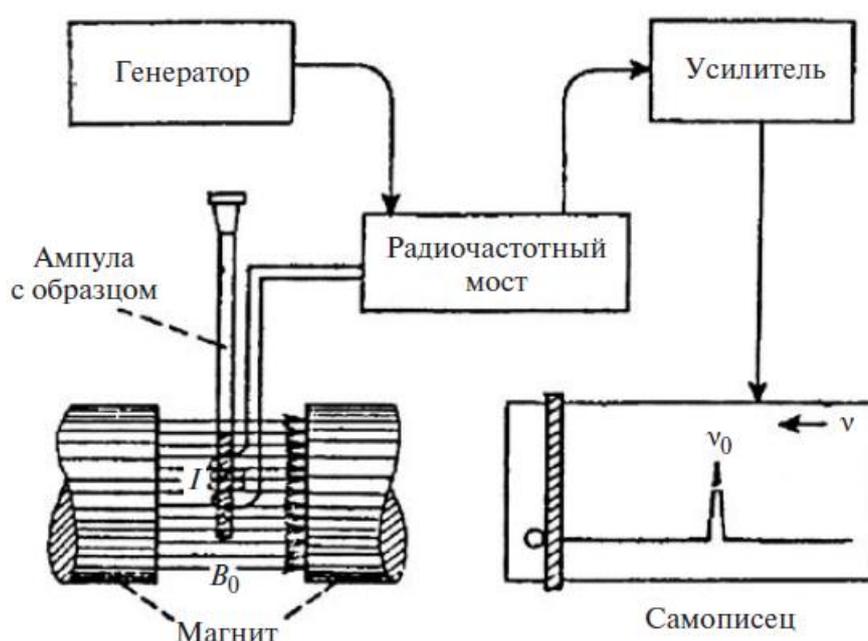


Рис. 3. Блок-схема спектрометра ЯМР для регистрации спектров в режиме непрерывной развертки

Ампулу охватывает катушка, в которую при соответствующей величине индукции магнитного поля подается переменный ток определенной частоты, причем детектор настраивают на ту же частоту. Частоту генератора поддерживают постоянной, а магнитное поле постепенно изменяют до достижения резонанса для каждой группы сигналов – и, в результате, получают спектр. При такой «развертке поля» увеличению резонансной частоты соответствует уменьшение напряженности поля.

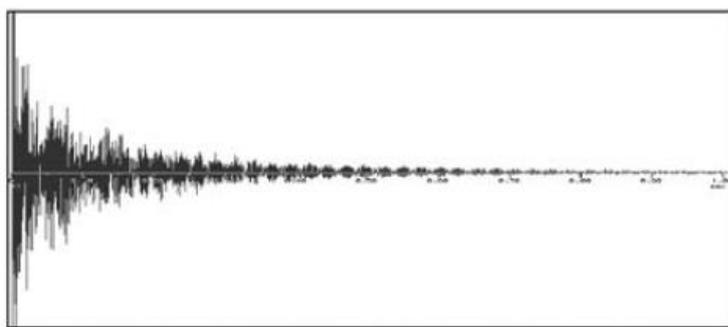
Можно изменять и частоту генератора при постоянном магнитном поле - с тем же результатом. Такой эксперимент называют экспериментом «с частотной разверткой». В тот момент, когда достигается частота, удовлетворяющая условию резонанса, самописец фиксирует сигнал поглощения. При дальнейшем изменении частоты в том же направлении условие резонанса нарушается, и самописец снова регистрирует нулевую линию.

Данный тип приборов можно использовать для регистрации спектров ЯМР на ядрах с высоким гиромагнитным отношением γ и высоким природным содержанием (^1H , ^{19}F , ^{31}P). Для регистрации ^{13}C -ЯМР спектров они малоэффективны: разница гиромагнитных отношений между ядрами ^{13}C и ^1H такова, что в одинаковом внешнем магнитном поле разность между энергиями спиновых состояний ^{13}C существенно меньше, чем для ^1H - и в результате интенсивность резонансного сигнала ядра ^{13}C составляет лишь 1.6% от интенсивности сигнала ^1H . Учитывая дополнительно природное содержание изотопа ^{13}C - 1.1%, получаем относительную чувствительность спектроскопии $^{13}\text{C} : ^1\text{H} \sim 1 : 5700$. Поэтому на приборах прямого прохождения необходимо использовать специальные методики (увеличение напряженности магнитного поля, многократное сканирование). Электромагнит такого спектрометра, позволяющего регистрировать спектры ЯМР ^{13}C , весил бы порядка 5 тонн!

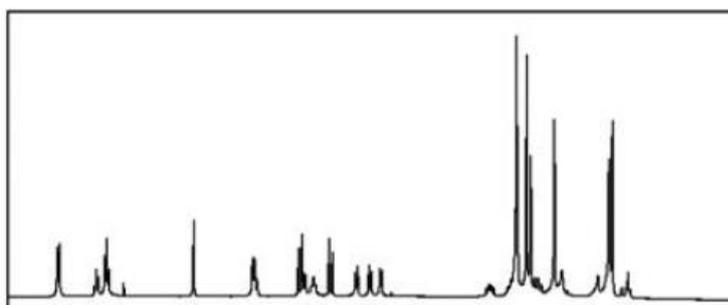
3.2. Импульсные спектрометры ЯМР с Фурье-преобразованием (Фурье-спектрометры ЯМР). Магнитное поле, в котором находится исследуемый образец, в этих приборах постоянно. Как правило, используют очень сильные поля, создаваемые сверхпроводящими магнитами (чем и обусловлена высокая стоимость этих приборов). Образец подвергают не длительному непрерывному облучению, а воздействию кратковременного мощного радиочастотного прямоугольного импульса (50 Вт или больше), повторяющегося через определенные промежутки времени. Продолжительность импульса очень мала (10-50 микросекунд), что в

соответствии с принципом неопределенности приводит к тому, что фактически импульс генерирует радиочастотное поле в широком диапазоне, возбуждая *одновременный* резонанс всех ядер данного типа.

Стремясь вернуться в состояние теплового равновесия, ядерные спины начинают рассеивать полученную ими избыточную энергию в виде радиоизлучения. Его и регистрируют в виде интерферограммы - суперпозиции затухающих гармонических колебаний. Процесс этого восстановления, называемый "спадом свободной индукции" (ССИ), описывается большим числом затухающих синусоидальных кривых во временной шкале, каждая из которых соответствует некоей резонансной частоте. Этот сигнал с помощью АЦП (аналога-цифрового преобразователя) переводят в цифровую форму и записывают в память компьютера. Линия ССИ представляет собой набор гармонических функций, поэтому ее можно анализировать с помощью ЭВМ на базе математической операции, называемой Фурье-преобразованием. В результате преобразования временной шкалы в частотную, получается обычная спектральная картина, т.е. зависимость поглощения излучения образцом от частоты (рис. 4). Многократно повторяя эту процедуру, получают усредненный спектр, при этом снижается соотношение сигнал-шум.



а



б

Рис. 4. Интерферограмма реального спектра ^1H -ЯМР (а) и соответствующий ей частотный спектр (б), полученный после преобразования Фурье

В результате с использованием фурье-спектроскопии ЯМР можно регистрировать спектры ядер ^{13}C (и других ядер с низким природным содержанием), к тому же значительно сокращается время обычного эксперимента, а получаемый спектр становится существенно информативнее.

Импульсная методика открыла перед исследователями новые возможности. Например, с ее помощью легко осуществить накопление сигнала. Современный компьютер, осуществляя преобразование Фурье, превращает интерферограмму в частотный спектр за несколько секунд. Накопление сигналов совершенно необходимо при регистрации спектров ядер с низким природным содержанием или с малыми магнитными моментами. Таких ядер большинство, и их сигналы часто столь слабы, что теряются в шумах.

Накопление спектров «сильных ядер», например спектров ^1H -ЯМР, необходимо при исследовании очень разбавленных растворов многокомпонентных смесей веществ. Например, чтобы увеличить отношение сигнал/шум в 10 раз, достаточно суммировать сигнал от 100 импульсов и после этого провести его Фурье-преобразование. Накопление проводят с небольшими задержками между импульсами (от долей секунды до нескольких секунд), поэтому весь эксперимент с 100-кратным накоплением занимает несколько минут. При этом можно получить отличный спектр, располагая всего несколькими микрограммами вещества, что исключительно важно для решения многих задач. Современные эксперименты с накоплением часто занимают десятки, а иногда даже сотни часов, а число суммируемых импульсов при этом достигает миллионов!

