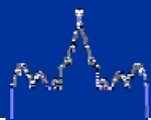


Лекция 8.
Исследование гуминовых веществ
методами спектроскопии магнитного
резонанса
на ядрах ^1H и ^{13}C

И.В. Перминова

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова



Содержание

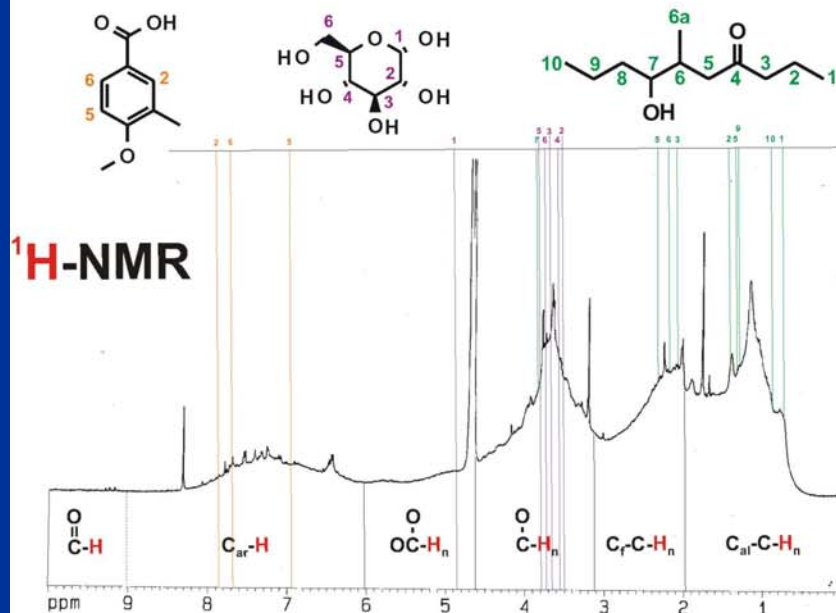
- Применение спектроскопии ЯМР на ядрах ^{13}C для исследования гуминовых веществ
- Выбор количественных условий измерения ^{13}C ЯМР спектров
- Подвижные и скелетные протоны
- Определение распределения протонов по структурным фрагментам ГВ – ПМР
- Принципы двумерной спектроскопии ЯМР и ее применение для исследования ГВ
- Достоинства и недостатки одномерной и двумерной ЯМР: области применимости



ДОСТОИНСТВА ПМР И ^{13}C ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ ГВ

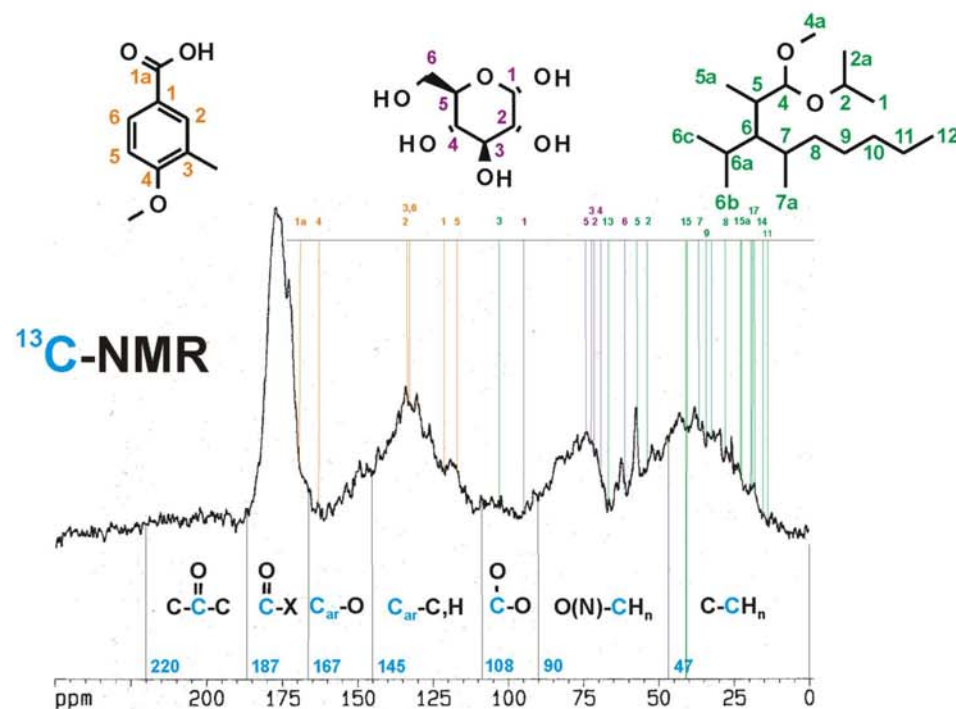
^1H NMR:

sensitive ($5881 \cdot ^{13}\text{C}$):
much better description of
small variations

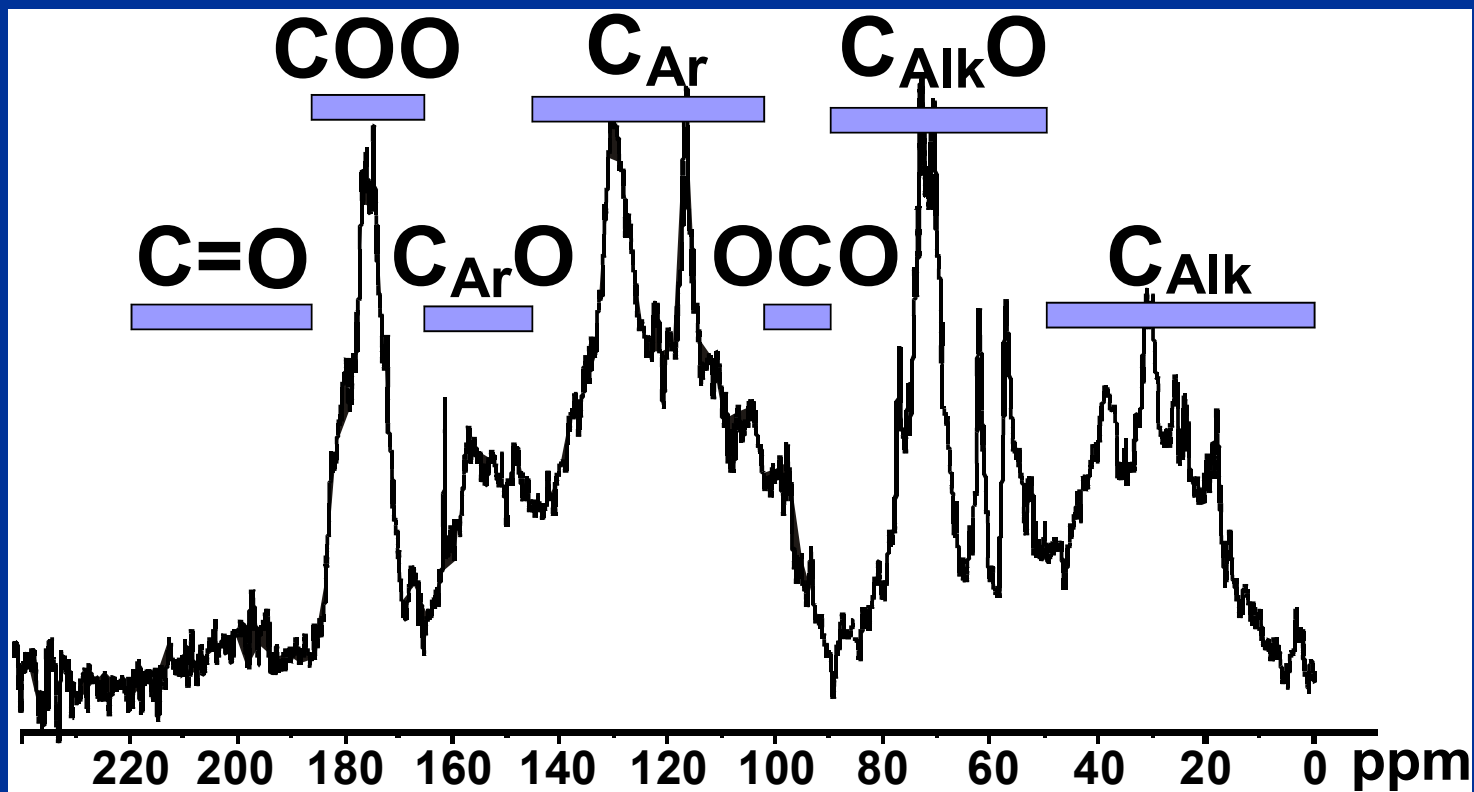


^{13}C NMR:

improved resolution: $[\Delta\delta]_i / [\Delta\nu_{1/2}]_i$
displays a larger variety of structures:
e. g. quaternary carbon atoms



ТИПИЧНЫЙ СПЕКТР ЯМР ^{13}C



Основные структурные группы, выделяемые в углеродном распределении гуминового каркаса:

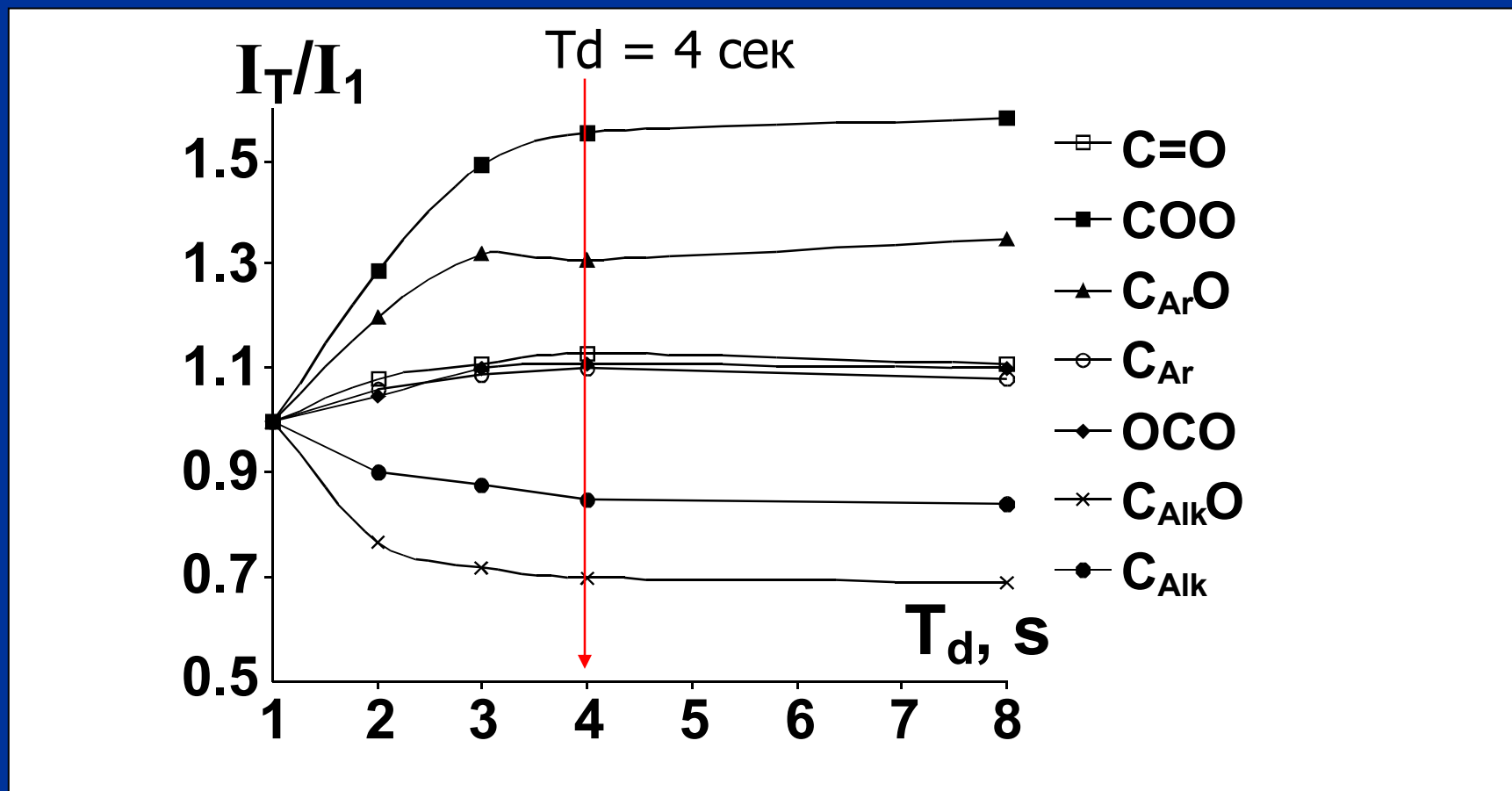
C=O, COO, CArO, CAr, OCO, CAlkO, CAlk

ОТНЕСЕНИЯ В ПМР- И ^{13}C ЯМР-СПЕКТРАХ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ (0.1 М NaOD)

Фрагмент	Интервал, м.д.		Описание
	ПМР	^{13}C ЯМР	
CH-H,C	0.5-1.95	5-48	H-, C-замещенные Алиф. фр.
α-CH	1.95-3.1		Алиф. фр. в α - положении к электроотр. группе / ар. кольцу
CH₃-O CH₂-O,N CH-O,N	3.1-4.7	48-58 58-64 64-90	Метоксильные фрагменты O- и N-замещенные Алифатические Фрагменты ("карбогидратные")
O-CH-O,N	4.7-6.0	90-108	Аномерные Алиф. Фр., дважды замещенные гетероатомами
Ar-H,C	6.0-10.0	108-145	H-, C-замещенные аром. фр.
Ar-O,N	-	145-167	O, N-замещенные аром. Фр.
COO-H,C	-	167-187	Карбокс. гр. и их производные
C=O	-	187-220	кетонные и хинонные группы

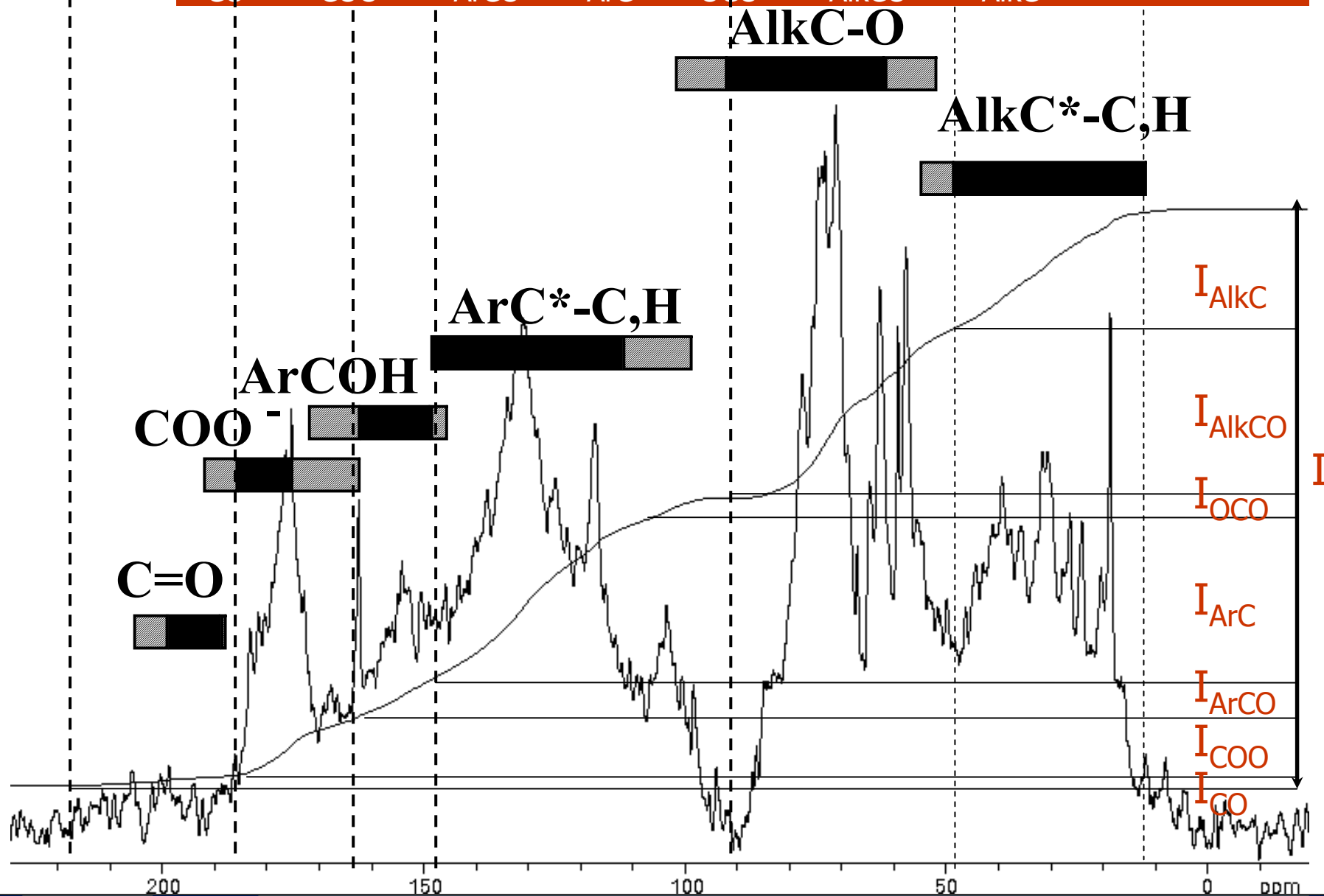
ВЫБОР УСЛОВИЙ РЕГИСТРАЦИИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ^{13}C ЯМР СПЕКТРОВ

- Определение времени задержки (T_d), обеспечивающего **полную релаксацию** третичных и четвертичных атомов C

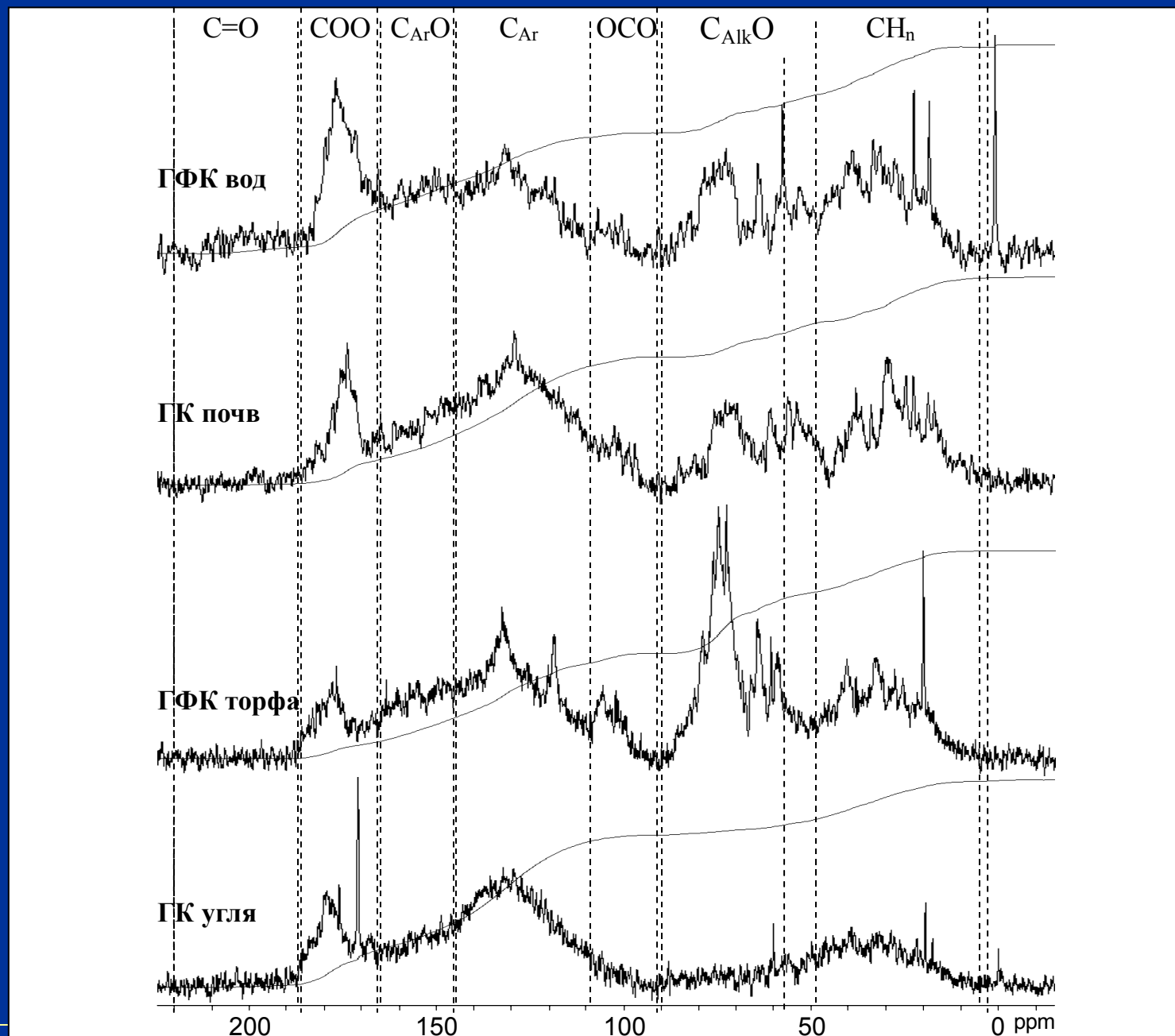


ИНТЕГРИРОВАНИЕ ^{13}C ЯМР СПЕКТРОВ ГВ

$$I_{\text{CO}} + I_{\text{COO}} + I_{\text{ArCO}} + I_{\text{ArC}} + I_{\text{OCO}} + I_{\text{AlkCO}} + I_{\text{AlkC}} = I = 100\%$$

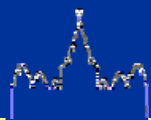


^{13}C ЯМР СПЕКТРЫ ГВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗИСА

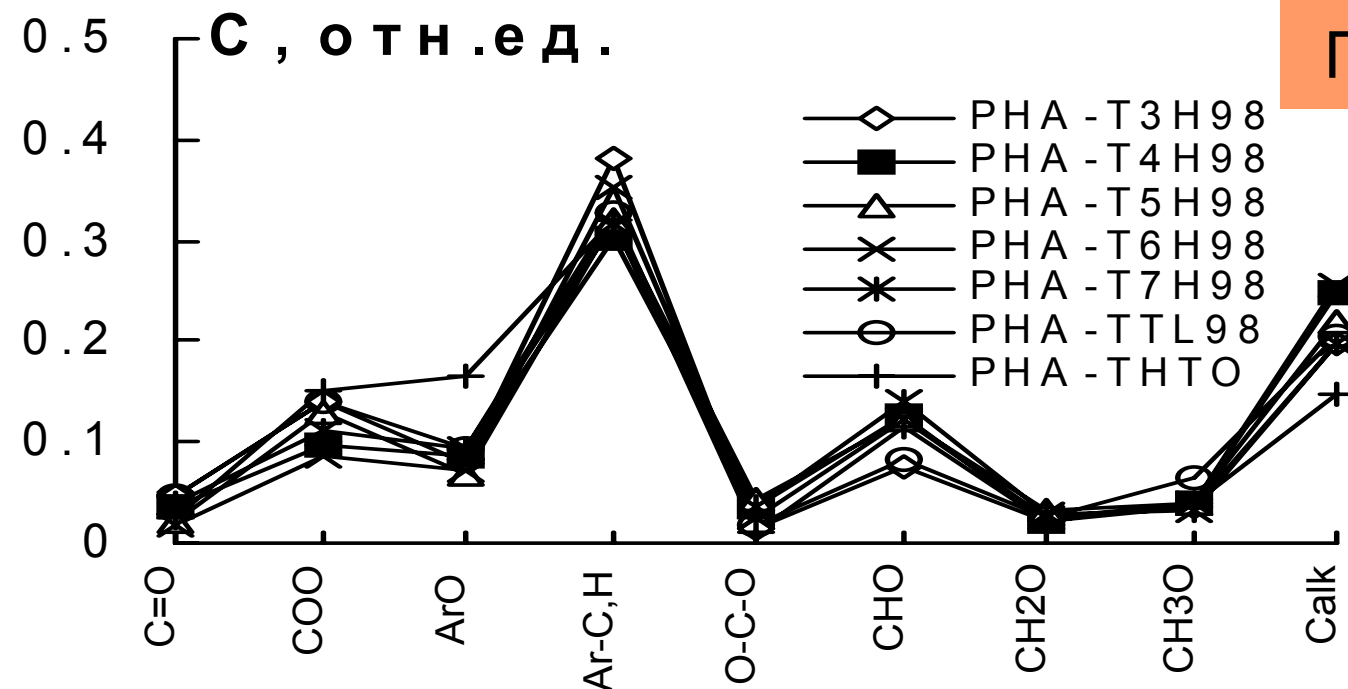
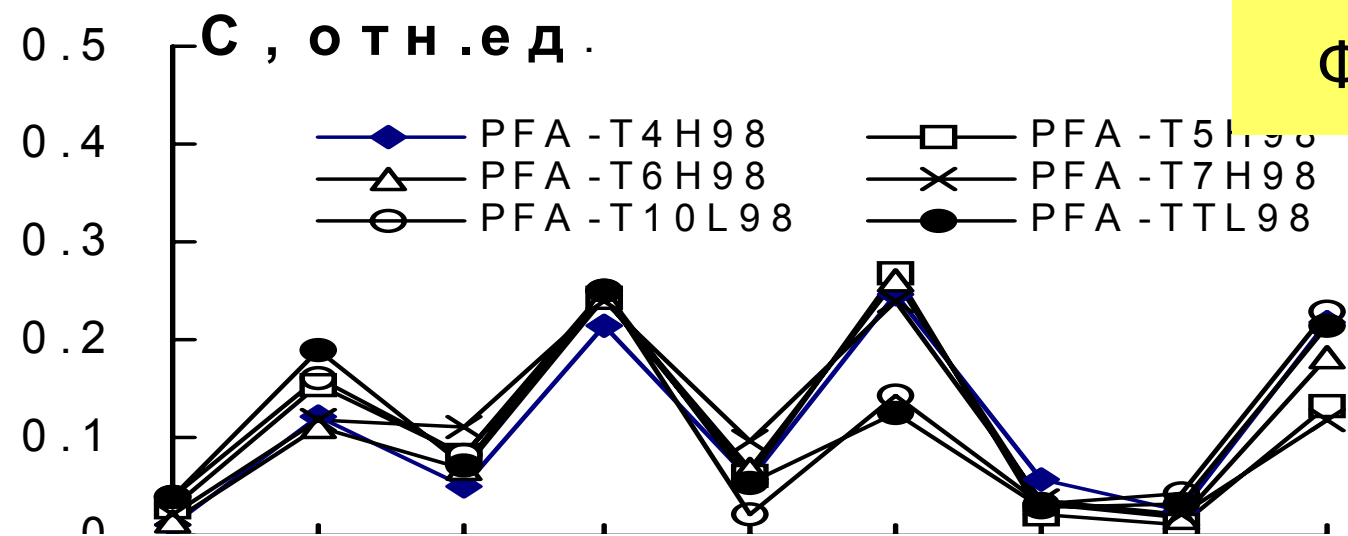


ПРОБЛЕМЫ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ^{13}C ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ

- Ограниченная растворимость ГФК
- Перекрывание спектральных областей
- Различие во временах релаксации ядер углерода различных типов
- Большие затраты времени на получение спектра

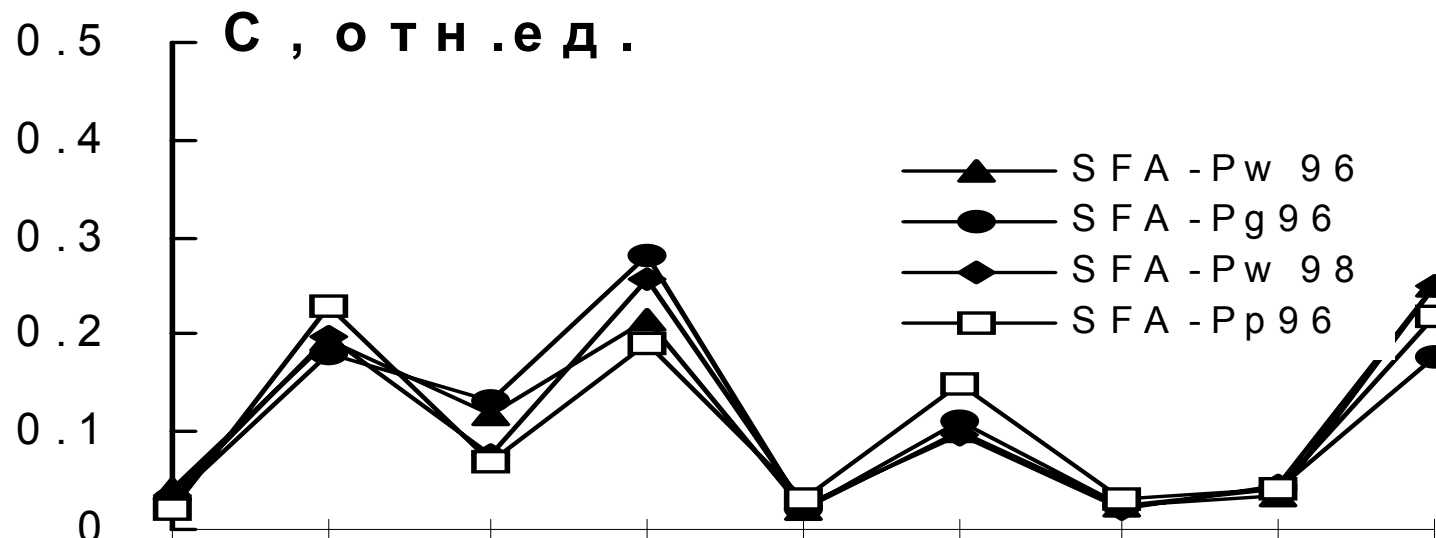


^{13}C ЯМР СПЕКТРЫ ФРАКЦИЙ ГВ ТОРФА

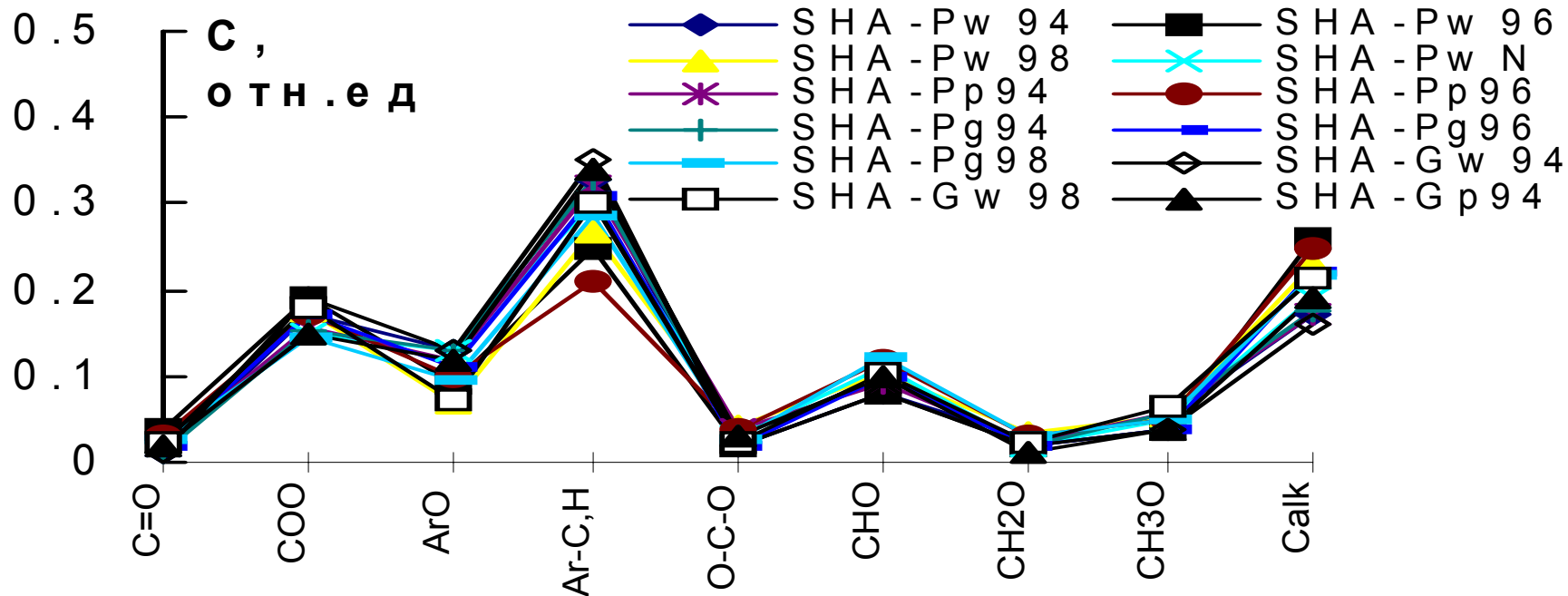


^{13}C ЯМР СПЕКТРЫ ФРАКЦИЙ ГВ ПОЧВ

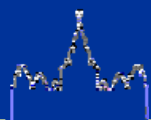
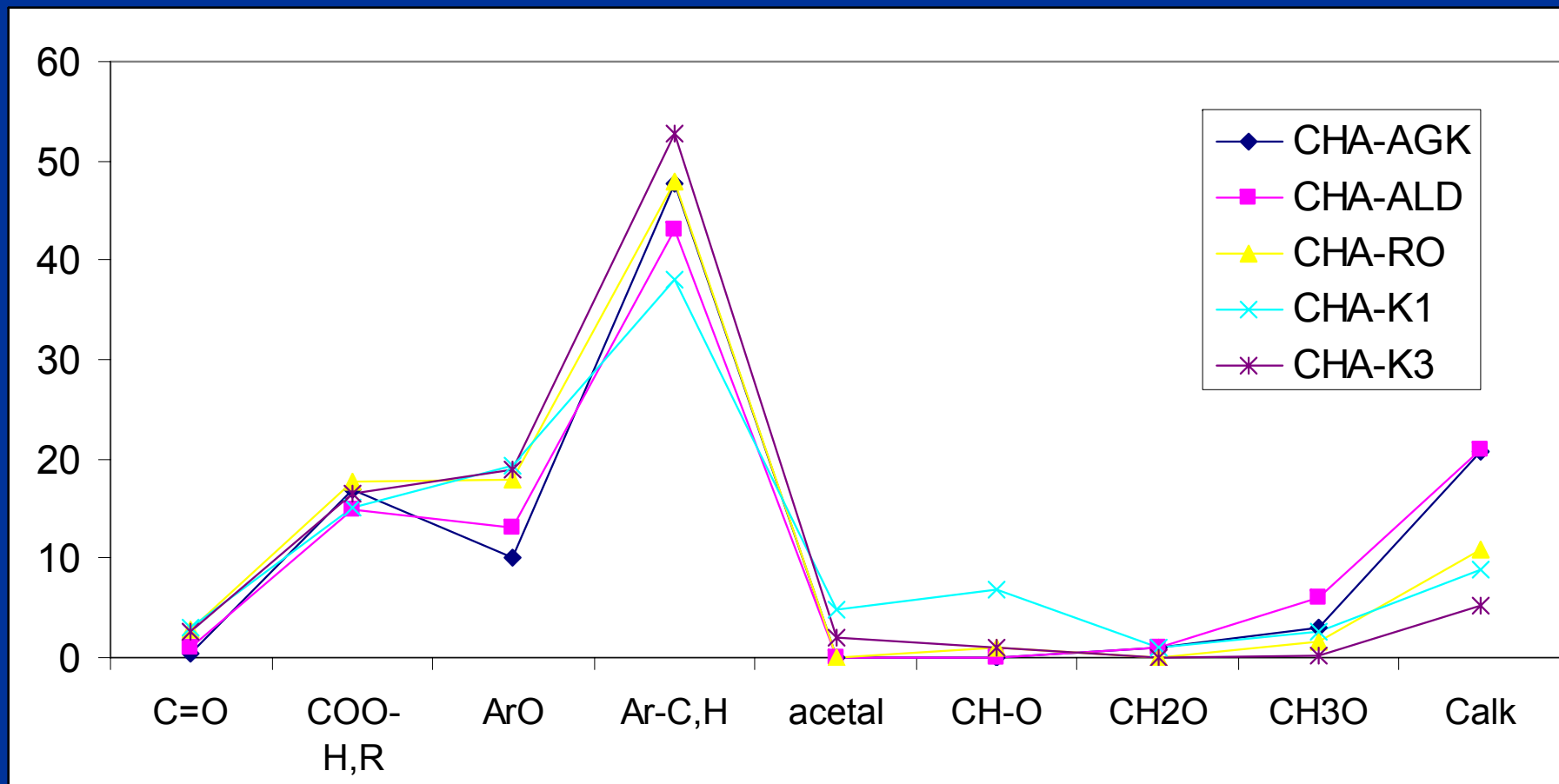
С, отн. ед.



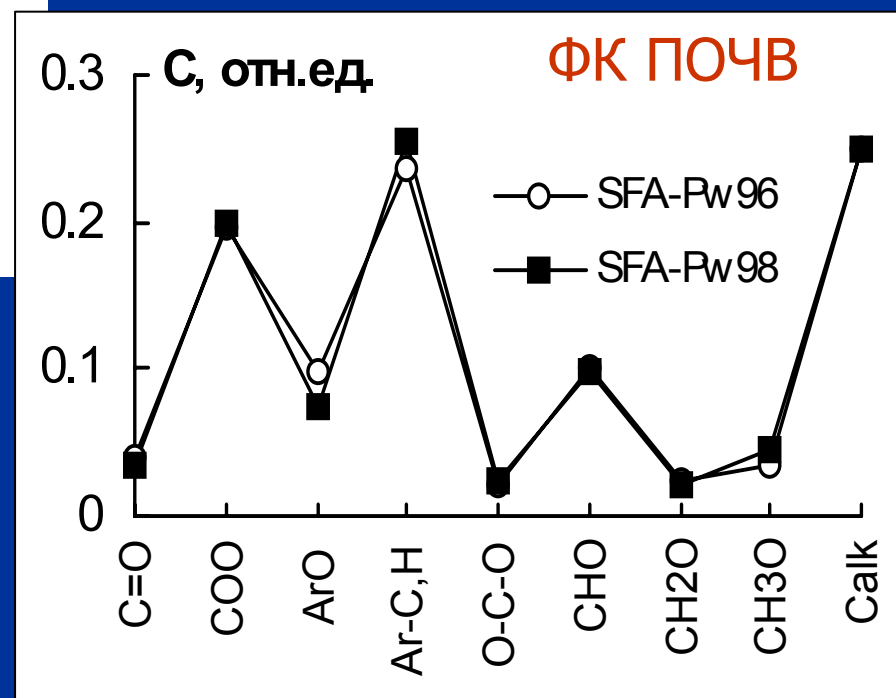
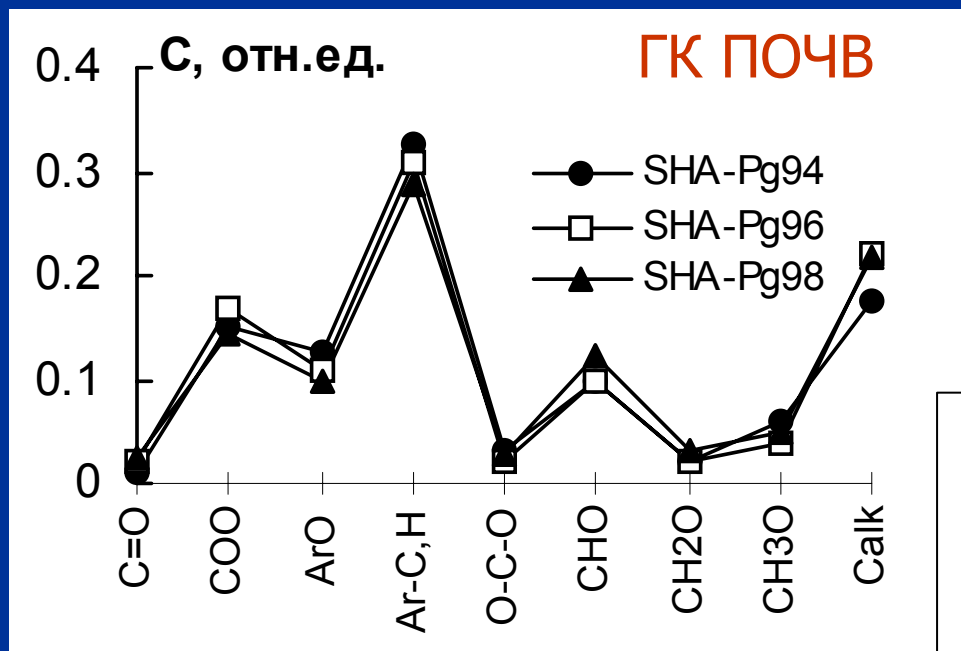
С,
отн. ед



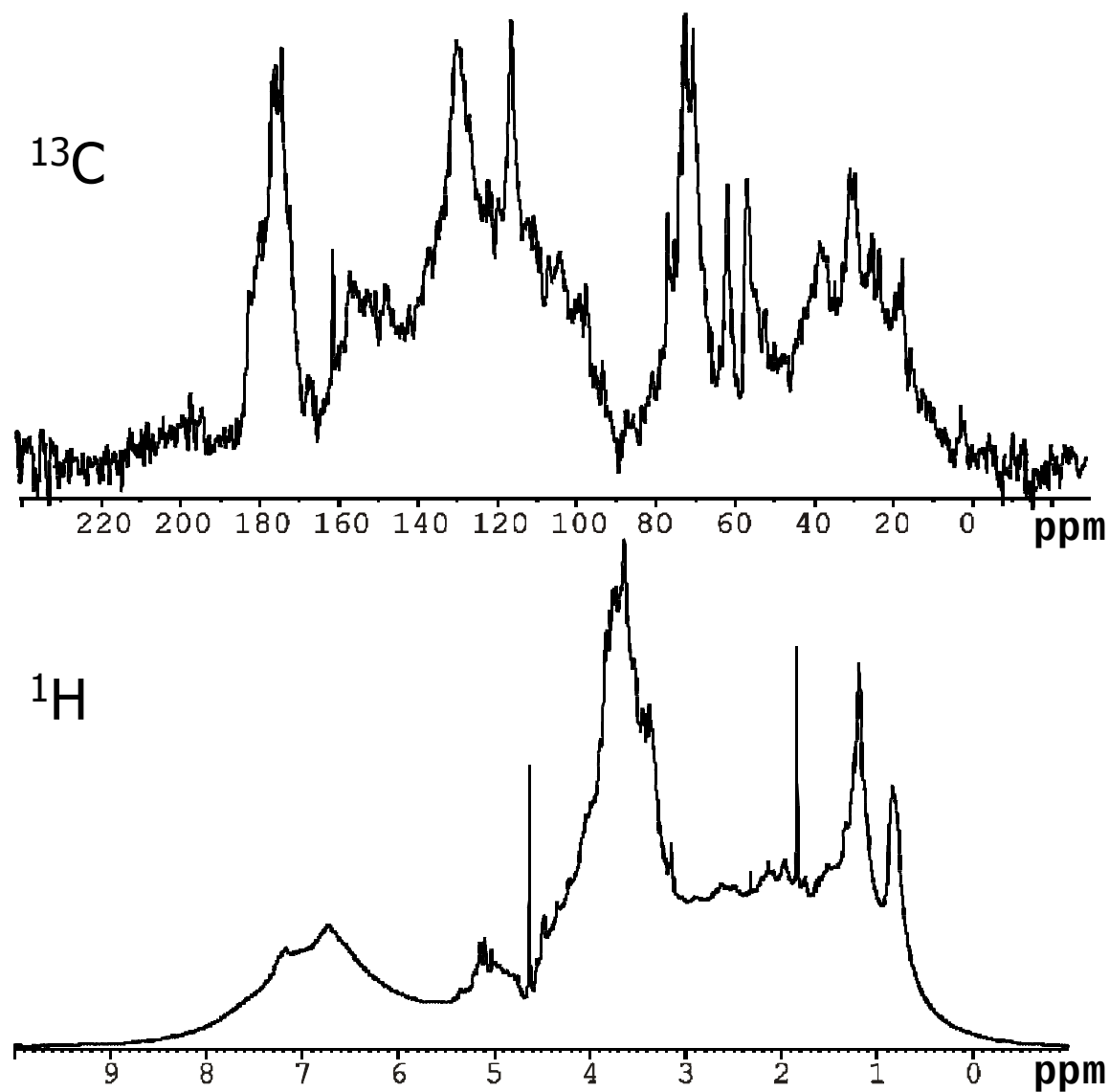
^{13}C ЯМР СПЕКТРЫ ФРАКЦИЙ ГВ ПОЧВ



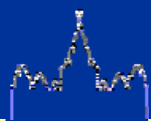
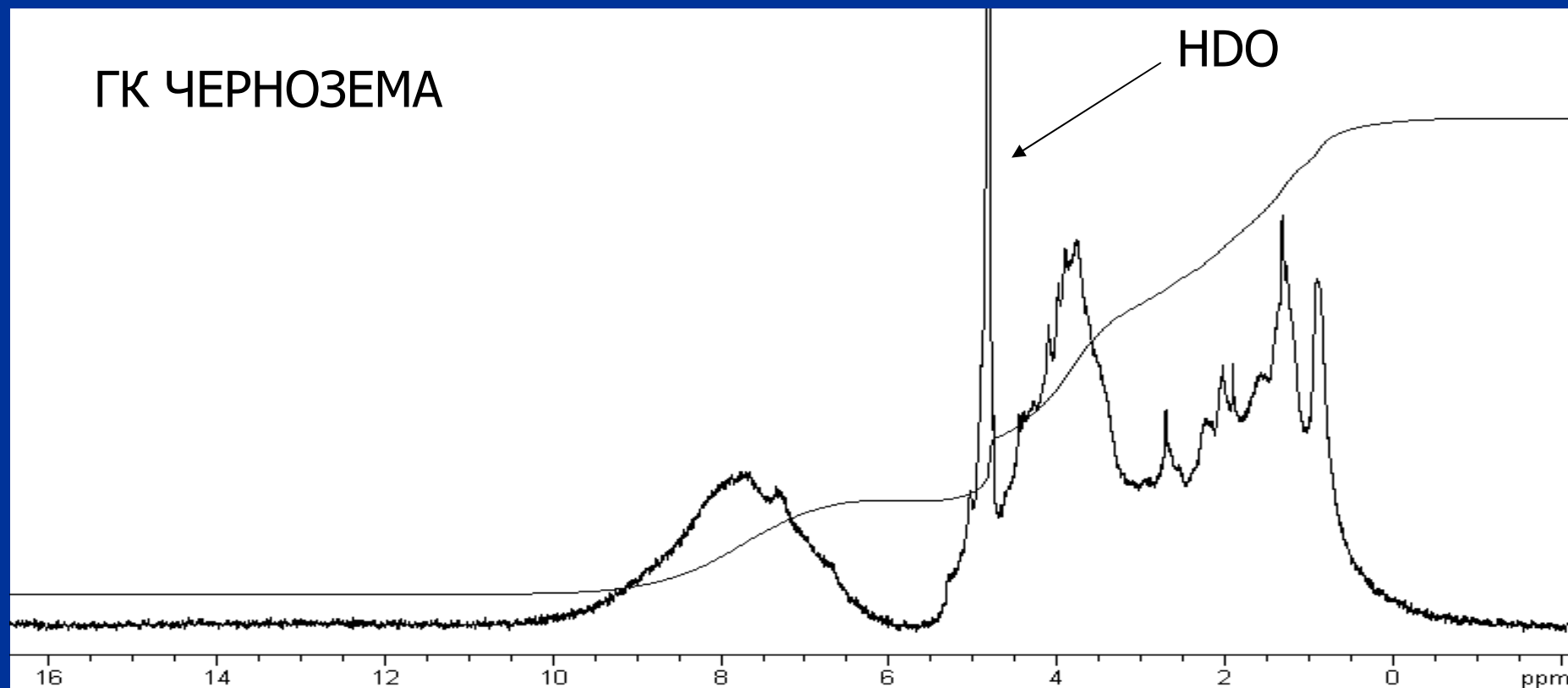
ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ^{13}C



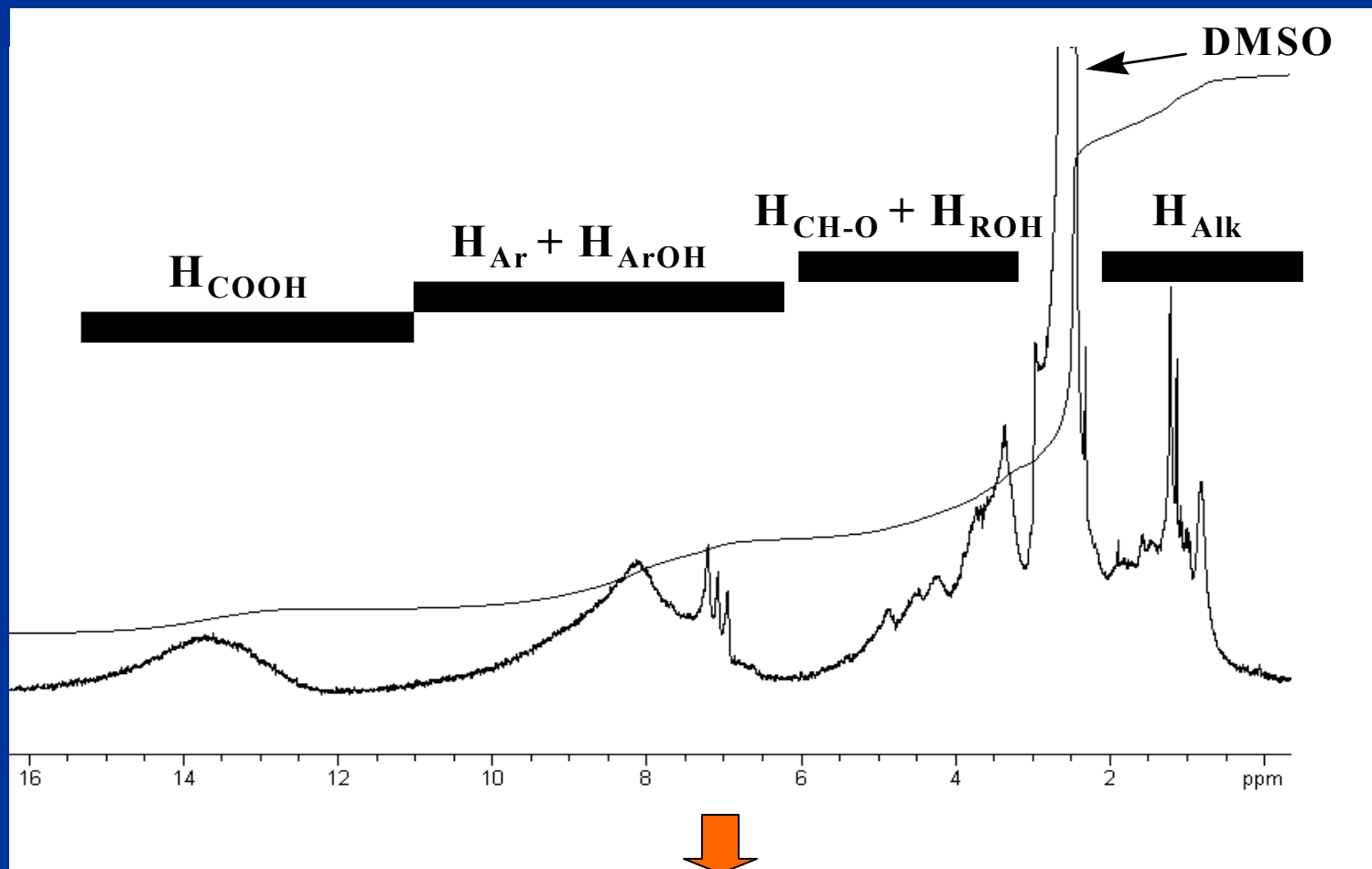
^{13}C ЯМР и ПМР СПЕКТРЫ ГК ТОРФА В 0.1 М NaOD



ПМР-СПЕКТР ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В D2O

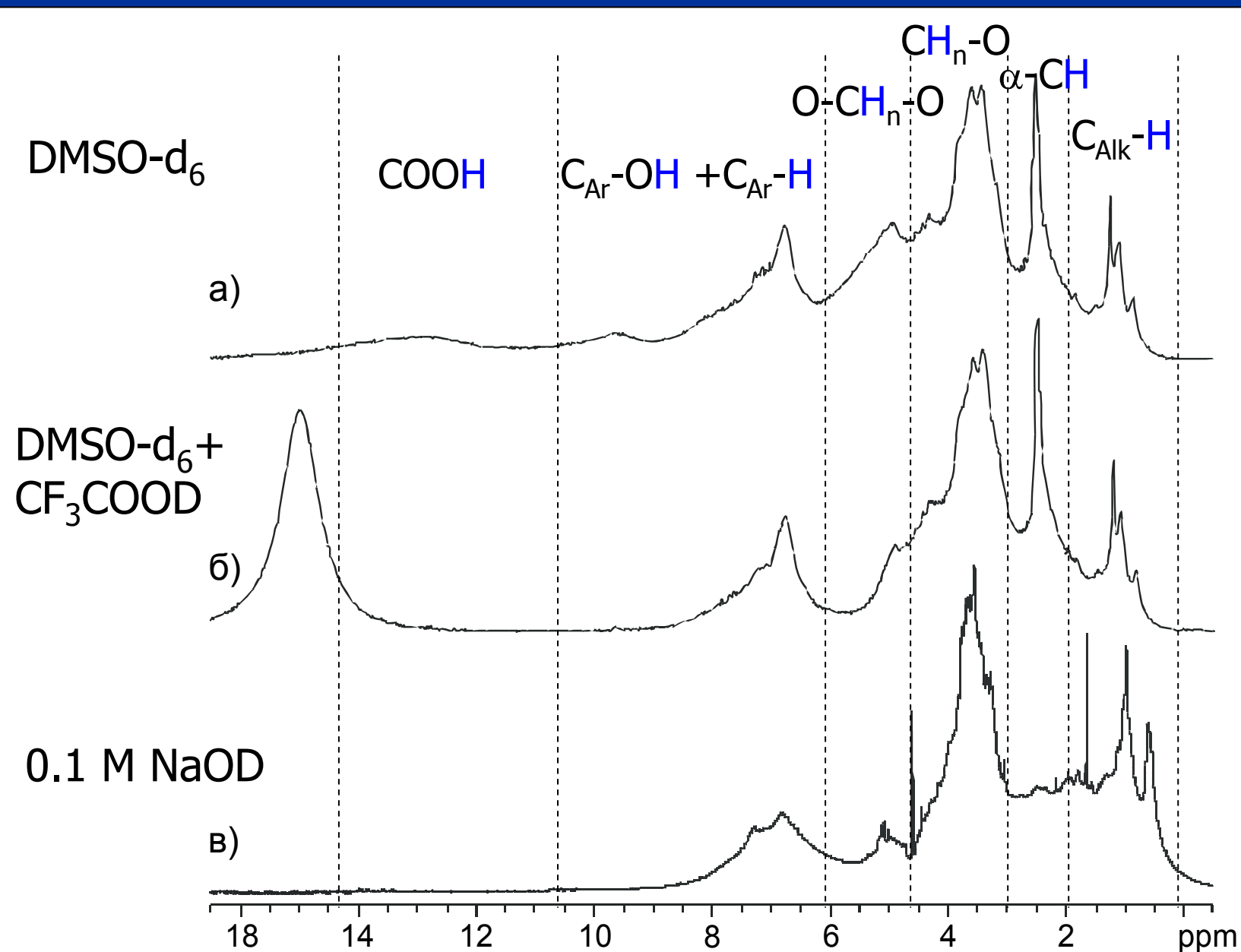


ПМР-СПЕКТРЫ ГВ В АПРОТОННОМ РАСТВОРИТЕЛЕ

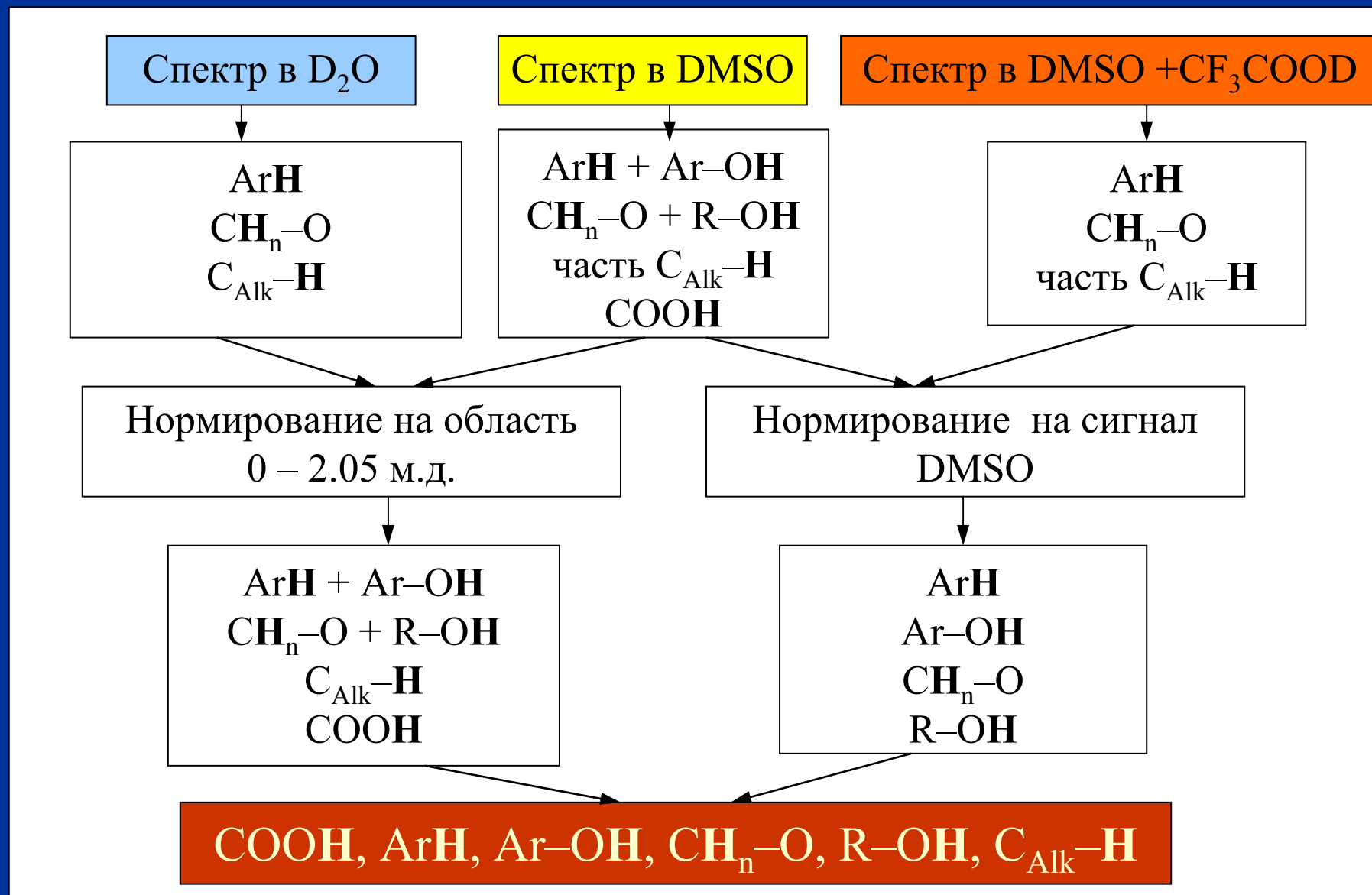


- Пик растворителя закрывает часть спектра
- Значительное уширение сигналов
- Перекрывание подвижных и скелетных протонов

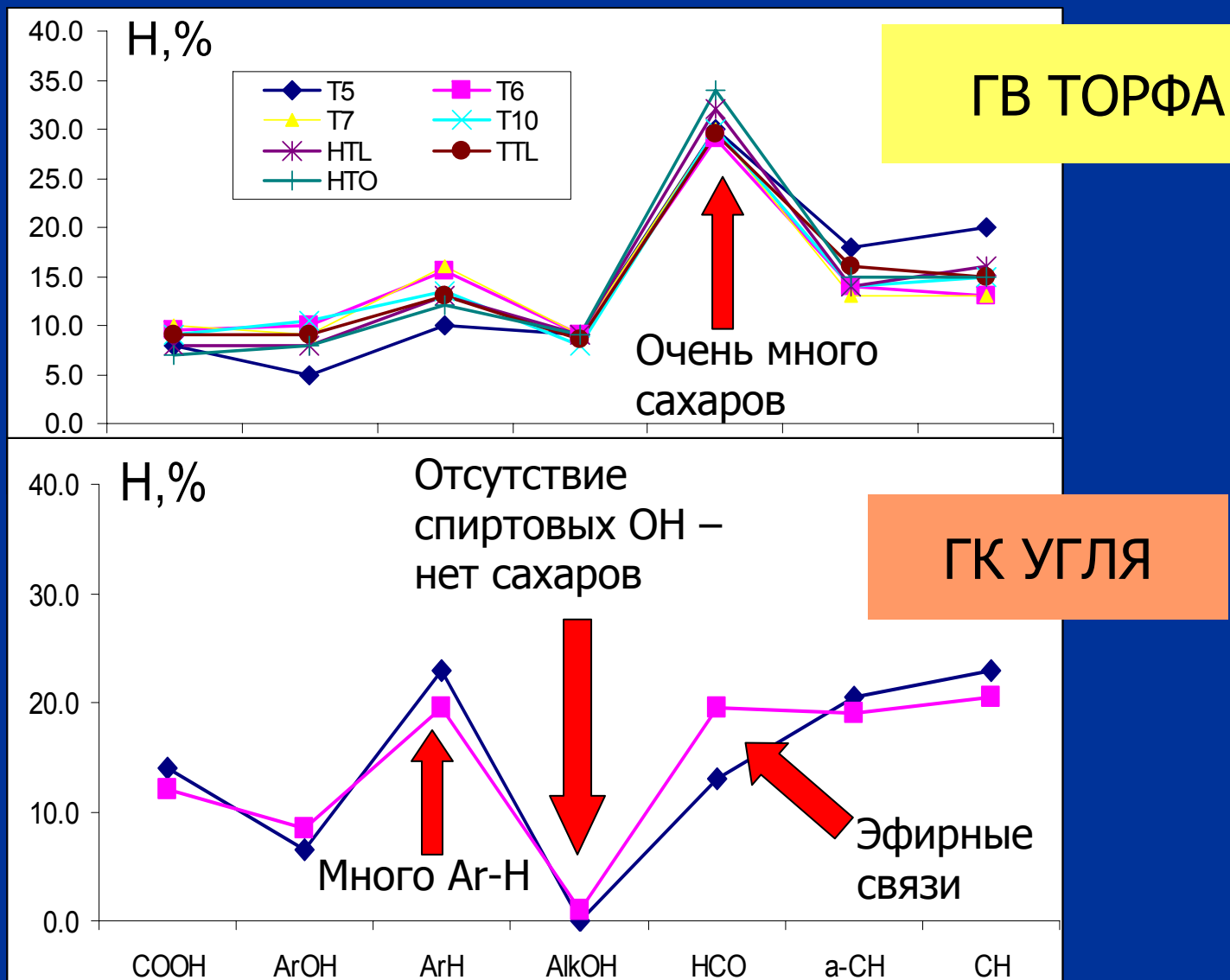
РЕГИСТРАЦИЯ ПОДВИЖНЫХ ПРОТОНОВ ГВ



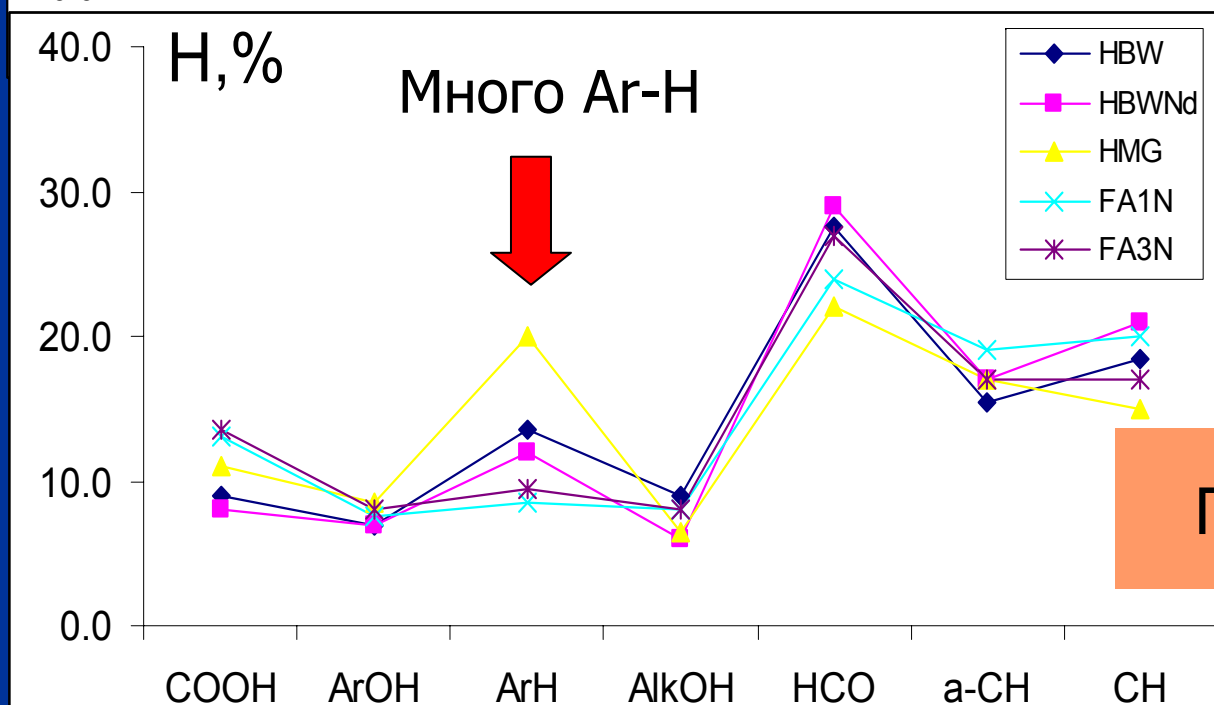
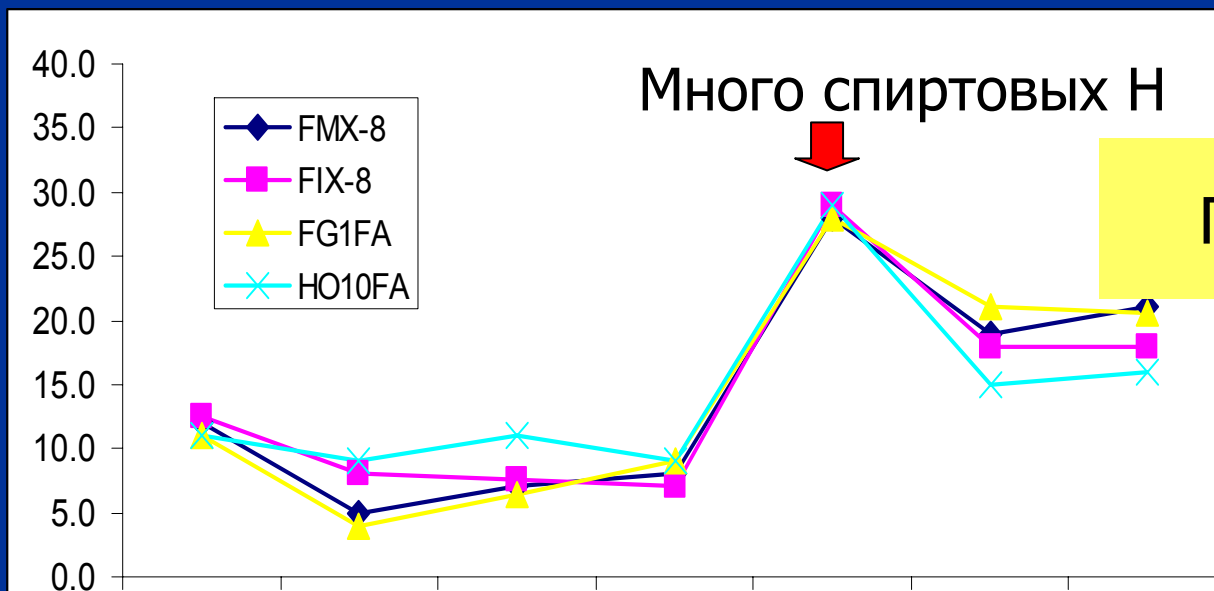
РАСЧЕТ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТОНОВ В ГВ



РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТОНОВ В ГВ ТОРФА И УГЛЯ



ПМР СПЕКТРЫ ГВ ИЗ ВОД И ПОЧВ



ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ОДНОМЕРНЫХ ЯМР - ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Преимущества:

- количественная оценка содержания ядер с данным химическим окружением в составе ГВ
- Возможность использования соответствующих содержаний в качестве численных дескрипторов (**Car, Calk, Har, Halk** и т.д.) для построения корреляционных взаимосвязей структура - свойства

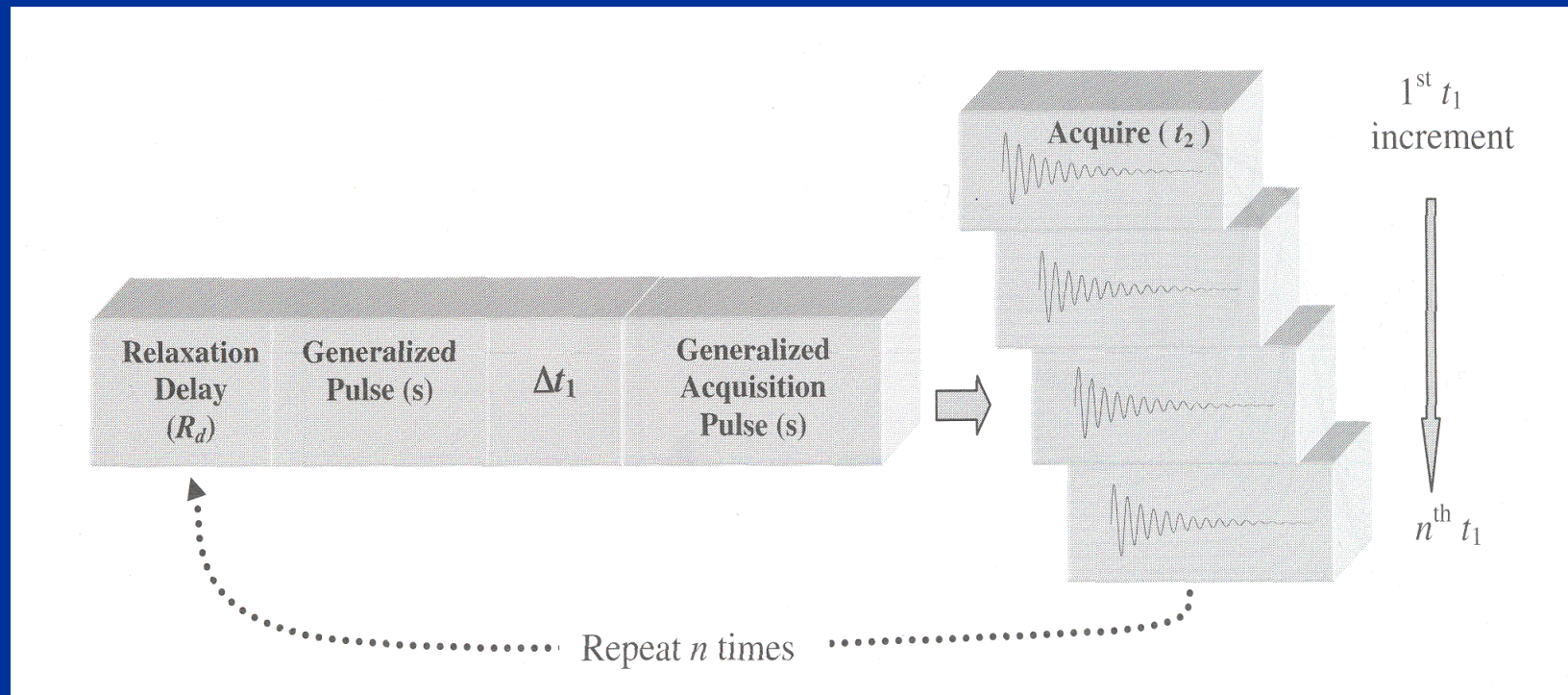
Недостатки:

- низкая разрешающая способность из-за сильного перекрывания пиков в спектре. Поэтому для увеличения возможностей идентификации используют двумерный ЯМР

ДВУМЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ЯМР

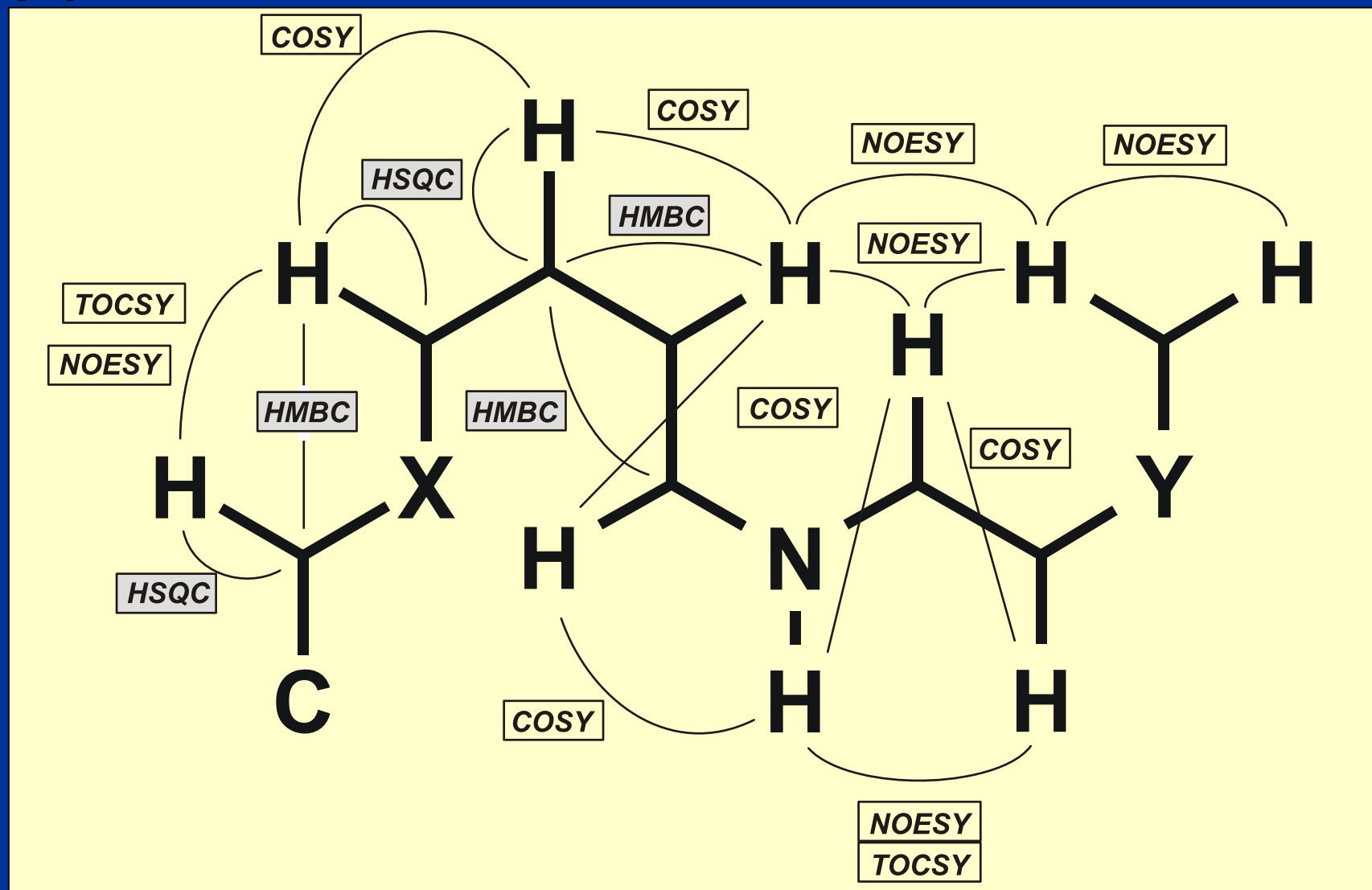
- **Идея двумерной (2-D) спектроскопии** основана на том, что после возбуждения сигнала ЯМР начальным (первым) импульсом, сигнал спада “живет” какое-то время. В течение этого времени сигнал изменяется или, иначе говоря, претерпевает эволюцию.
- Если теперь подвергнуть **спиновую систему** второму импульсу, то полученный после импульса спад сигнала свободной индукции (интерферограмма) может содержать информацию о том, что же происходило между первым и вторым импульсом.

Обобщенная импульсная последовательность для экспериментов корреляционной 2-D ЯМР спектроскопии



Сигнал детектируется во время выборки, t_2 , и модулируется по инкрементам по времени t_1 . Таким образом в 2-D спектре возникают кросс-пики. Это означает, что две частоты (два сигнала) как то связаны друг с другом.

ТИПЫ СПИНОВЫХ СИСТЕМ И ДВУМЕРНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

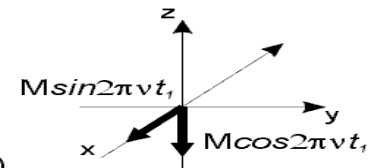
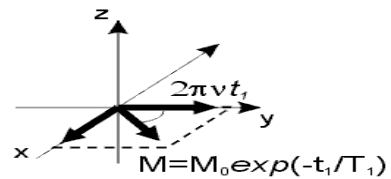
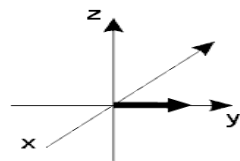
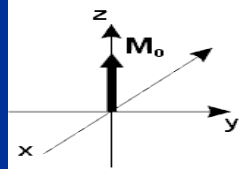


НАБОР ДВУМЕРНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, НАИБОЛЕЕ ИНФОРМАТИВНЫХ ДЛЯ ГВ

COSY	$^{23}\text{J}(\text{H},\text{H})$	Геминальные протоны
TOCSY	$^n\text{J}(\text{H},\text{H})$	Вицинальные и более высокого порядка ($n=2-6$) протонные взаимодействия
HSQC, HMQC	$^1\text{J}(\text{H},\text{X})$	Прямые X-H взаимодействия (наиболее информативен для $\text{X} = ^{13}\text{C}$)
HMBC	$^n\text{J}(\text{H},\text{X})$	Дальние X-H взаимодействия (наиболее информативен для $\text{X} = ^{13}\text{C}$ и ^{15}N)
NOESY, HOESY	Пространственно близкие H...H и H...X взаим-вия	Для NOM/HS сопровождаются химическим обменом

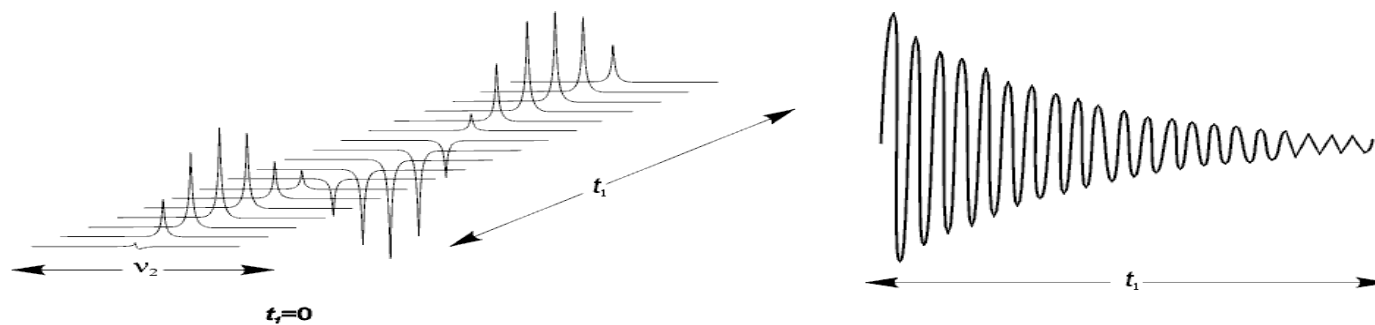


Эксперимент COSY

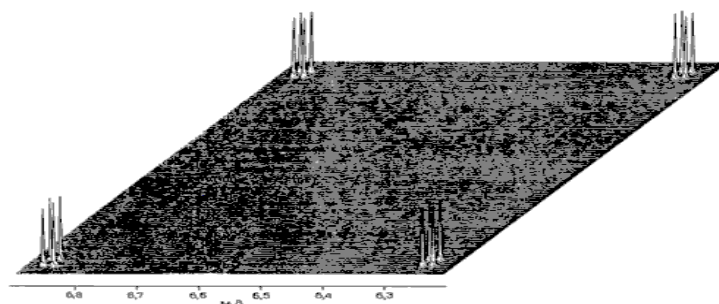
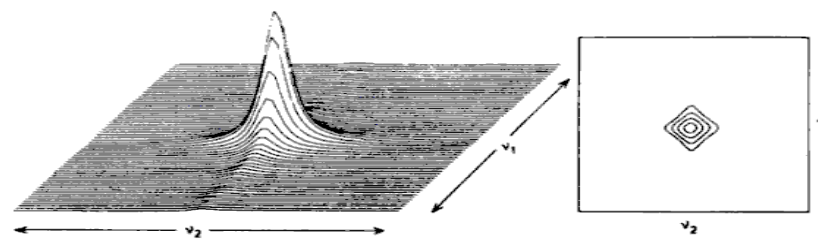


$(\pi/2)_x$ ————— t_1 ————— $(\pi/2)_x$ ————— *выборка (t_2)*

[$(\pi/4)_x$ для COSY-45]

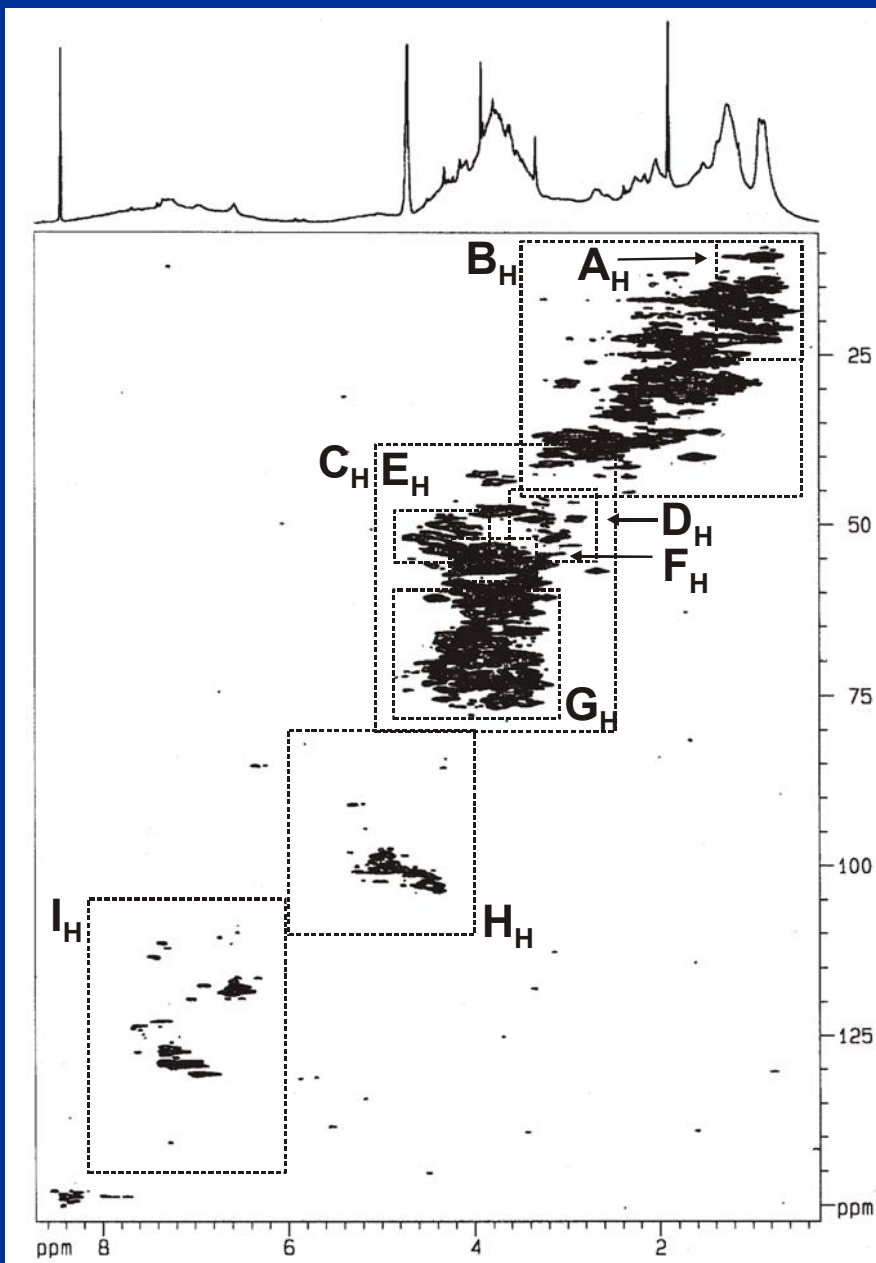


2D-FT



после второго импульса намагниченности, соответствующие переходам взаимодействующих ядер, смешиваются

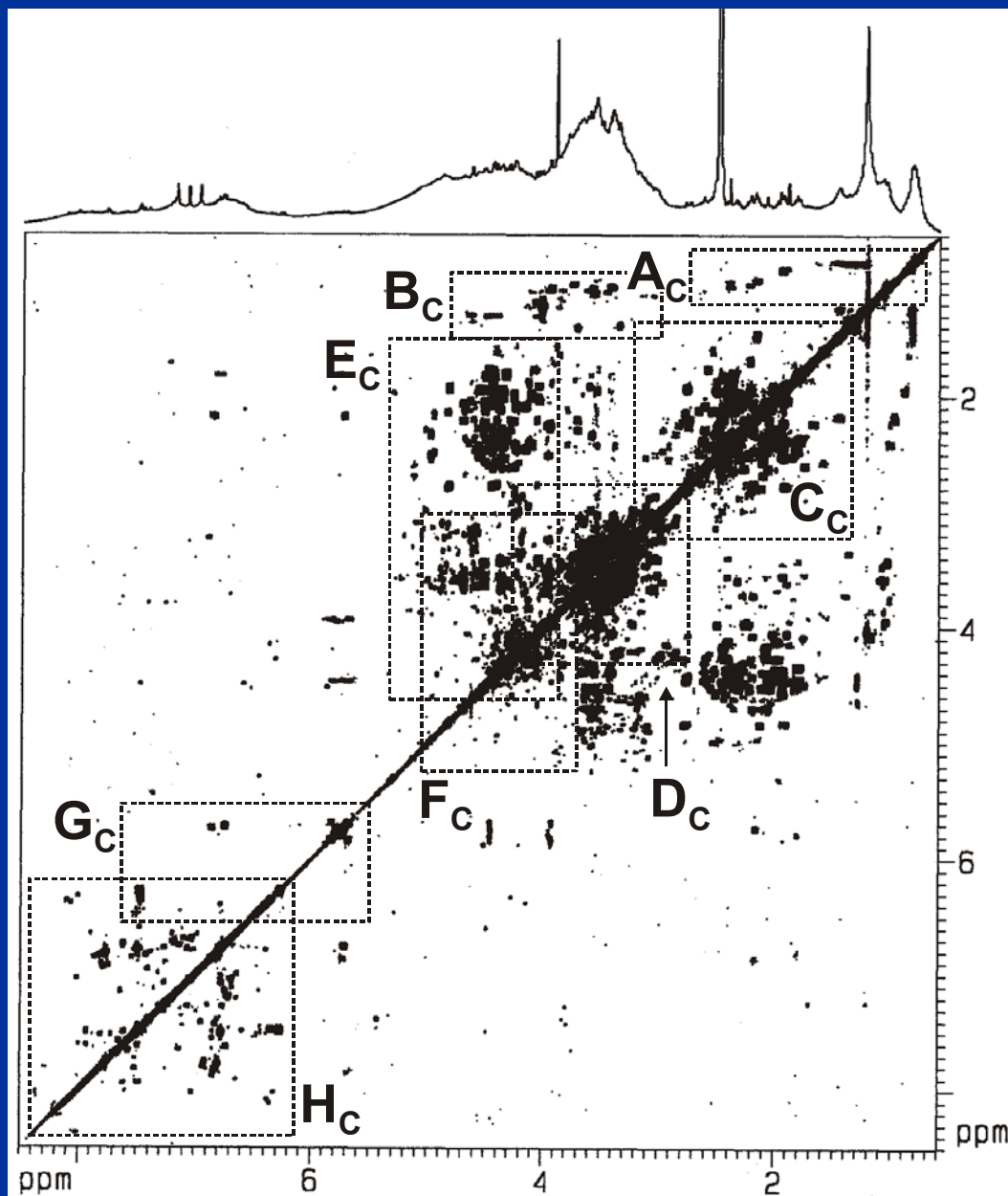
^1H , ^{13}C HSQC СПЕКТР ПОЧВЕННЫХ ФК



Credit to: Hertkorn and Kettrup, 2005

A	-C- CH_3 (bound to alk)
B	- C_f - CH - (β to X - peptides)
C	-X- CH - (bound to X)
D	C-N(H)- CH - (al. amines)
E	-(C=O)NH- CH - (amides)
F	-O CH_3 (esters & ethers)
G	-O- CH - (bound to O)
H	-O- CH -X (anomerics)
I	- C_{ar} H (aromatics)

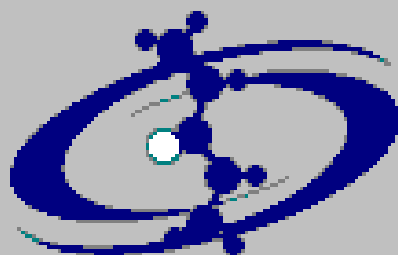
$^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY СПЕКТР ПОЧВЕННЫХ ФК



Credit to: Hertkorn and Kettrup, 2005

A	$-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3$
B	$-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{O}$
C	$-\text{C}_f-\text{CH}-\text{C}_f\text{H}-\text{C}-$
D	$-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}(\text{O})-$
E	$-\text{CH}(\text{O},\text{N})-\text{CH}-\text{C}_f$
F	$-\text{O}-\text{CH}(\text{O})\text{H}-\text{CH}$
G	$-\text{CH}=\text{CH}-$
H	$-\text{C}_{\text{ar}}\text{H}-\text{C}_{\text{ar}}\text{H}-$

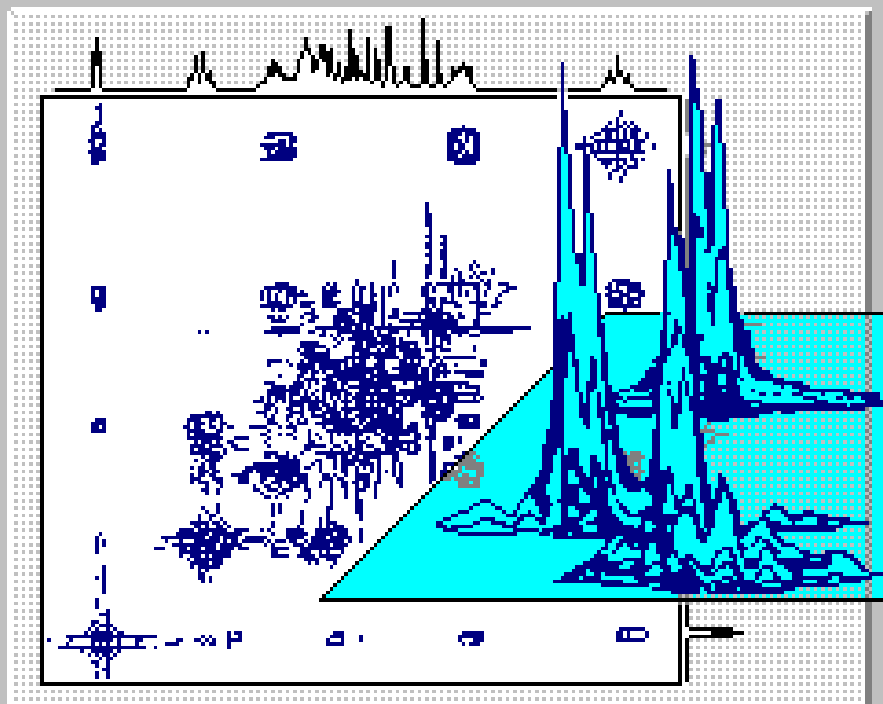
ACD/2D NMR - SOFTWARE



Copyright © 1997-1999
Advanced Chemistry
Development Inc.
All Rights Reserved

133 Richmond St. West
Suite 605, Toronto, ON
M5H 2L3 Canada

Toll-Free: (800) 304-3988
Tel: (416) 368-3435
Fax: (416) 368-5596
<http://www.acdlabs.com>

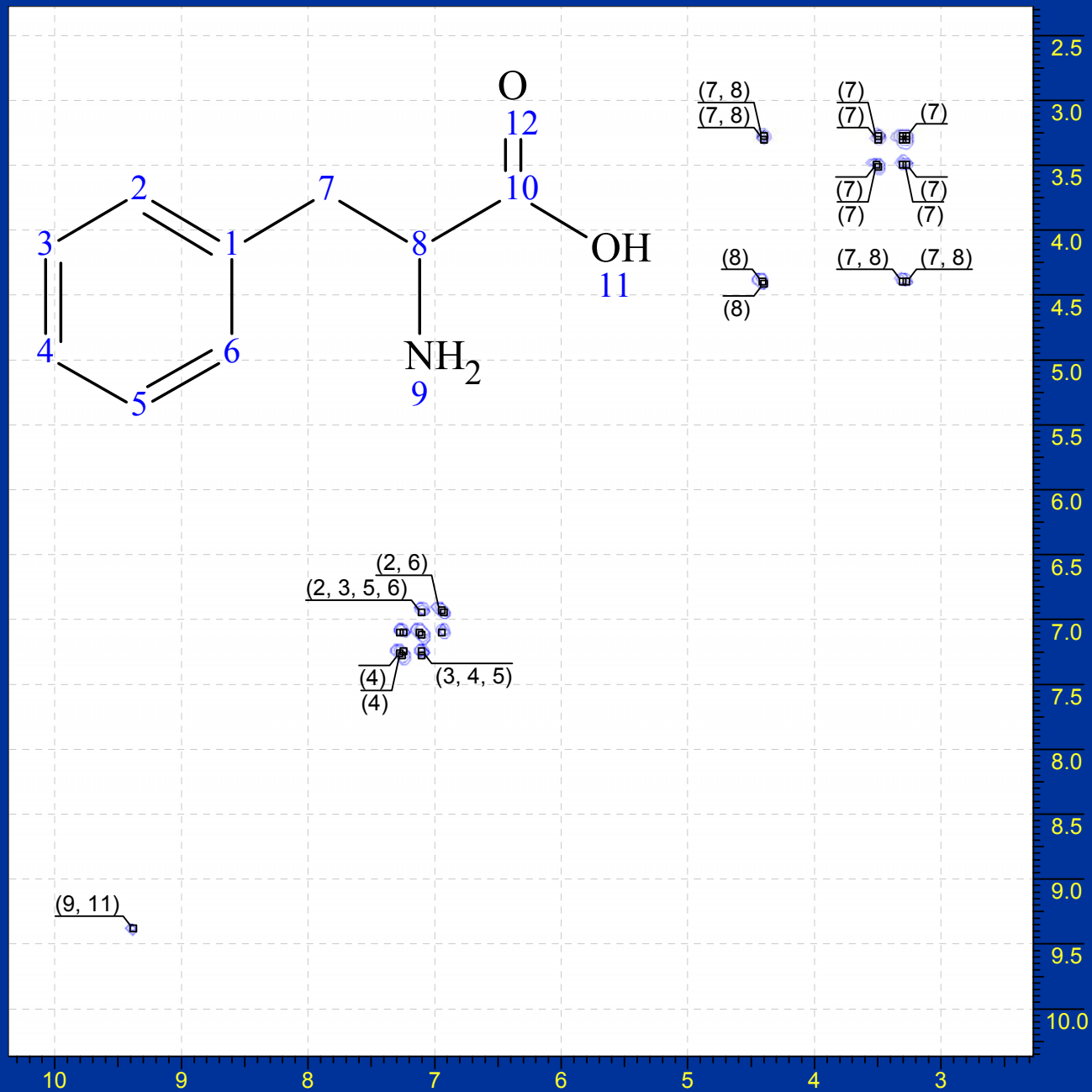


ACD/2D NMR

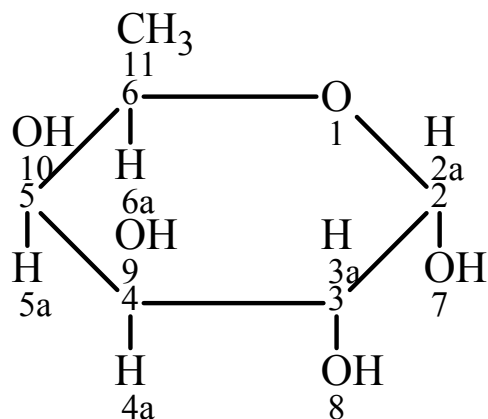


LOMONOSOV MOSCOW STATE UNIVERSITY

Н,Н COSY СПЕКТР ФЕНИЛАЛАНИНА

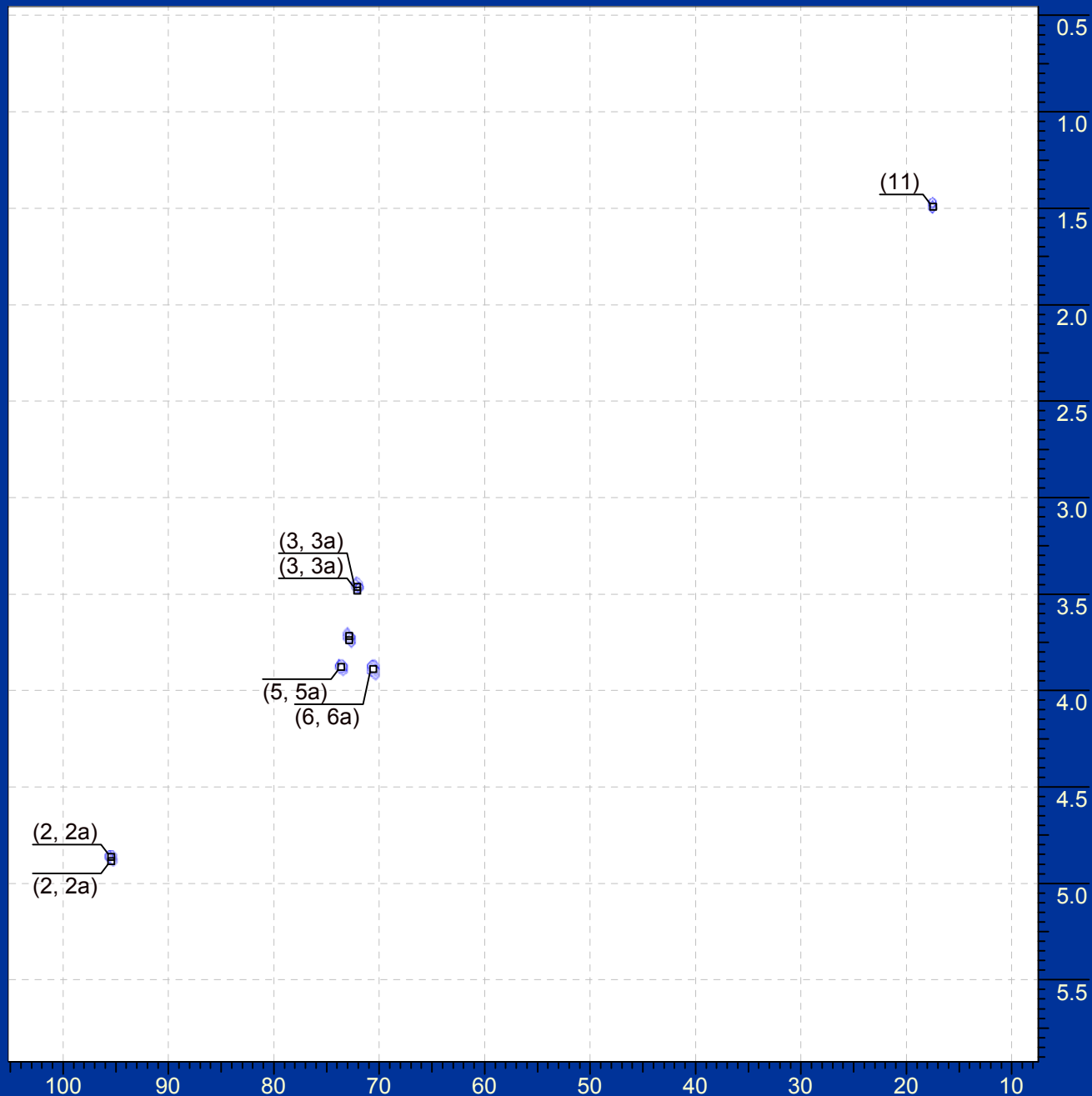


РАССЧИТАННЫЙ HSQC СПЕКТР ФУКОЗЫ

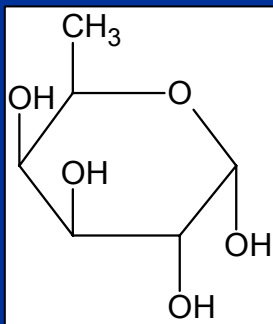


Group	nH	Value	Error
2a	1	4.87	0.25
3a	1	3.46	0.23
4a	1	3.73	0.07
5a	1	3.88	0.30
6a	1	3.89	0.39
7,8,9,10	1	4.92	1.54
11	3	1.49	0.21

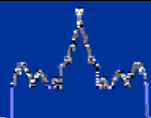
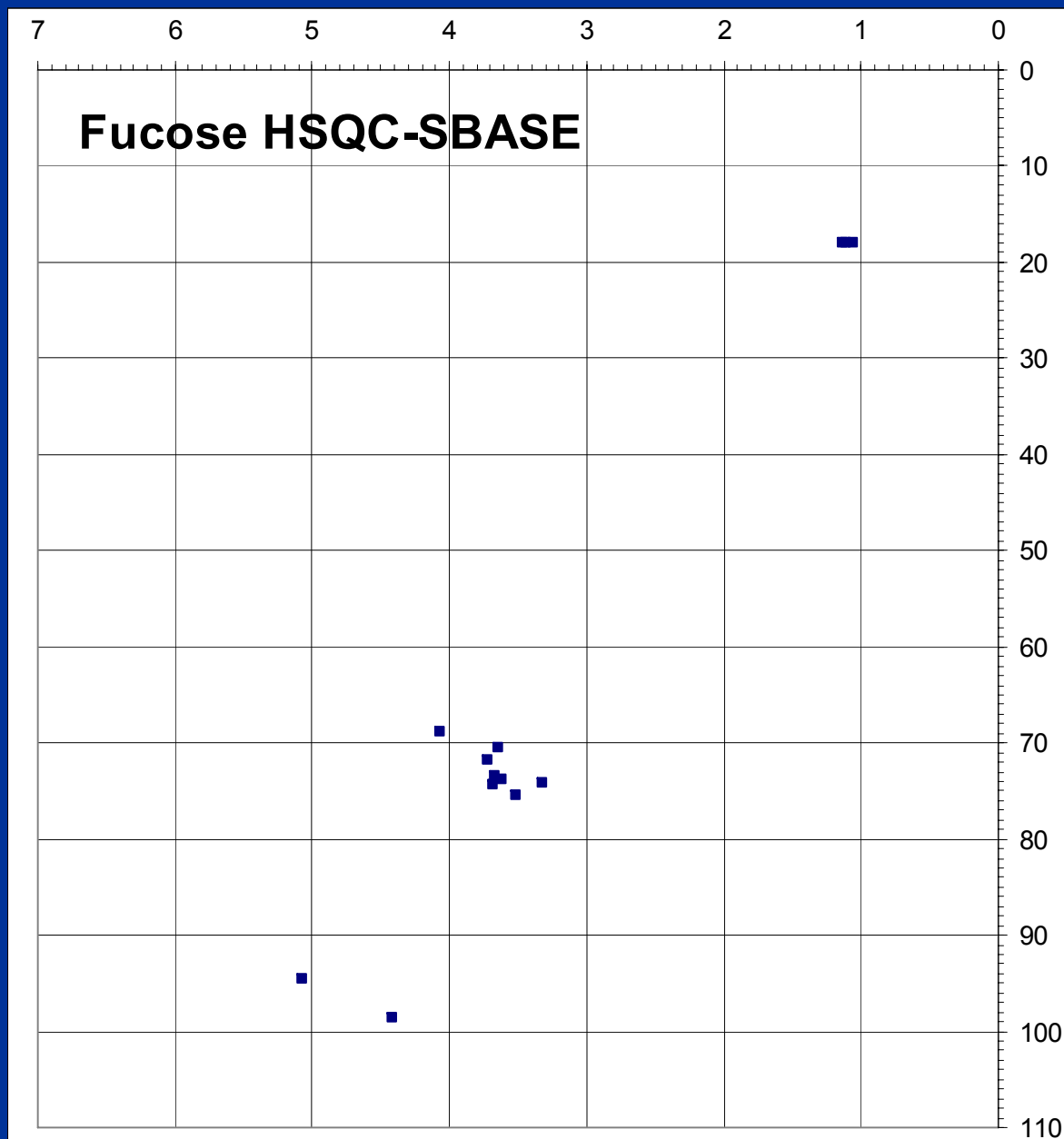
Carbon No.	CHn	Value	Error
2	C	95.16	-
3	C	72.04	-
4	C	72.79	-
5	C	73.52	-
6	C	70.51	-
11	CH ₃	17.54	-



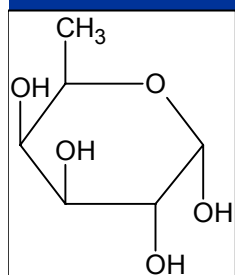
РАСЧЕТНЫЙ HSQC СПЕКТР ФУКОЗЫ



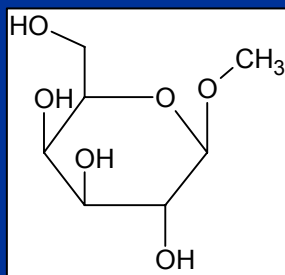
¹ H	¹³ C
5.066	94.646
4.419	98.685
4.069	68.796
3.725	71.758
3.672	73.374
3.679	74.316
3.639	70.546
3.619	73.912
3.507	75.393
3.322	74.181
1.136	17.905
1.103	17.905
1.057	17.905



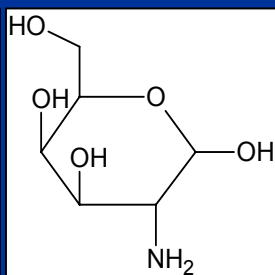
H-C CARBOHYDRATES HSQC SBASE (Brucker)



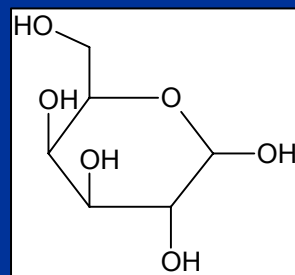
Fucose



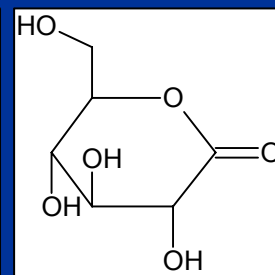
Galactopyranoside-
b-D-l-O-methyl



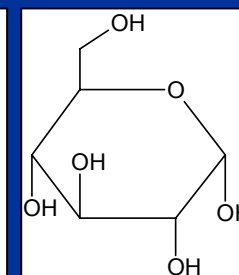
Galactosamine-d+



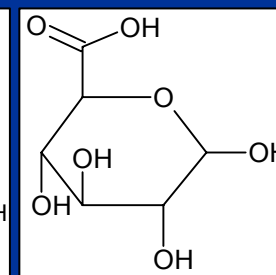
Galactose



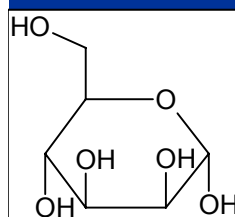
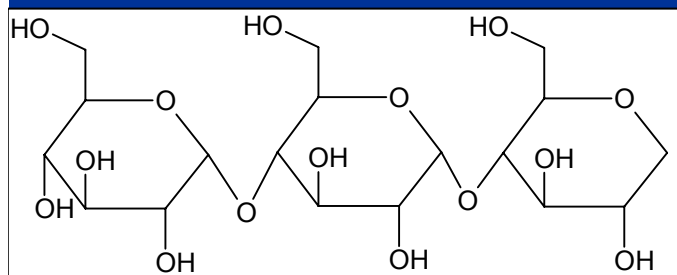
Glucono-1,5-lacton



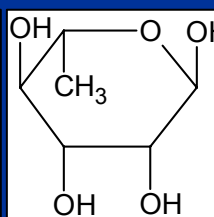
Glucose



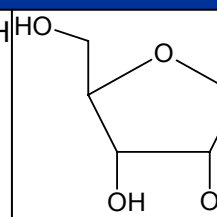
Glucuronic acid



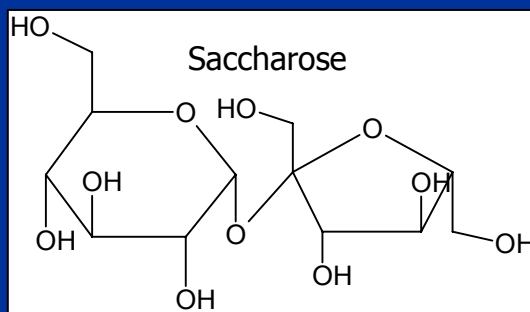
Mannose-d



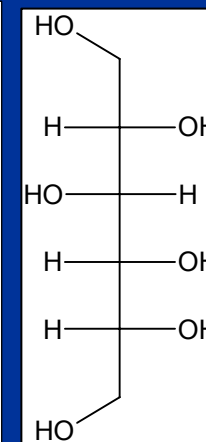
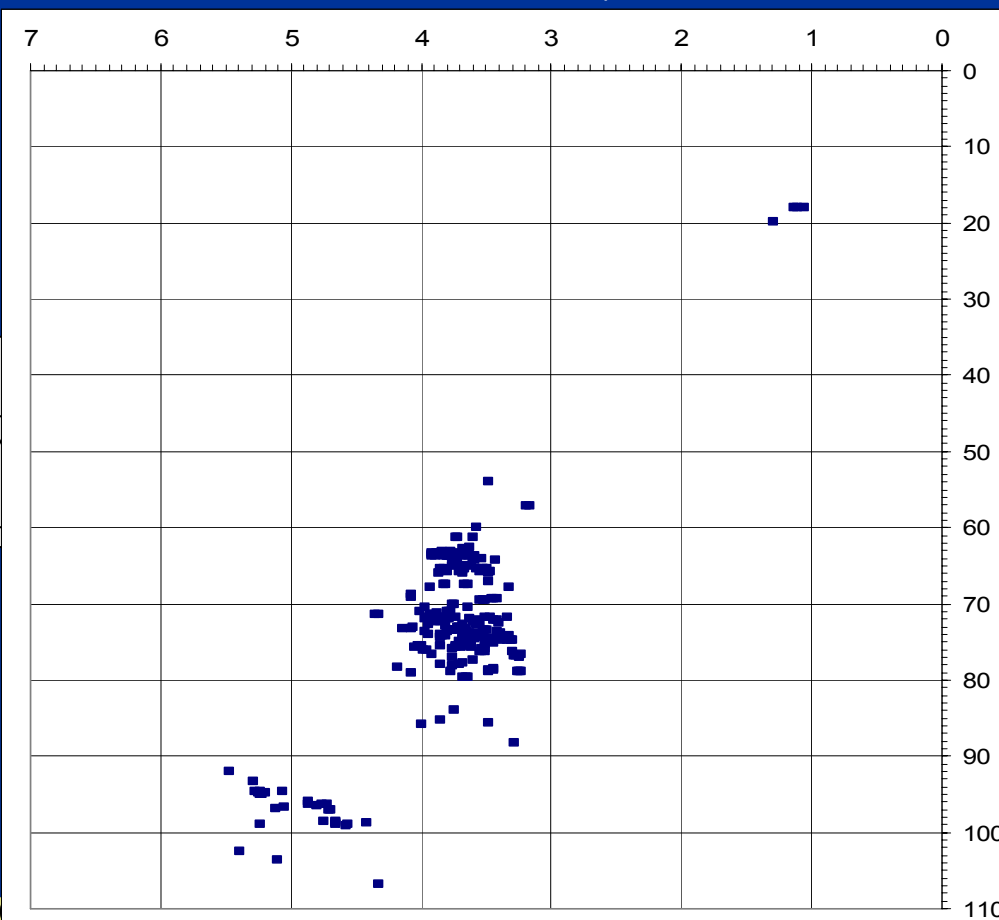
Rhamnose-d,l



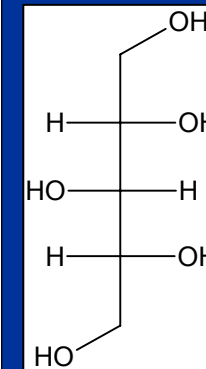
Ribose



Saccharose

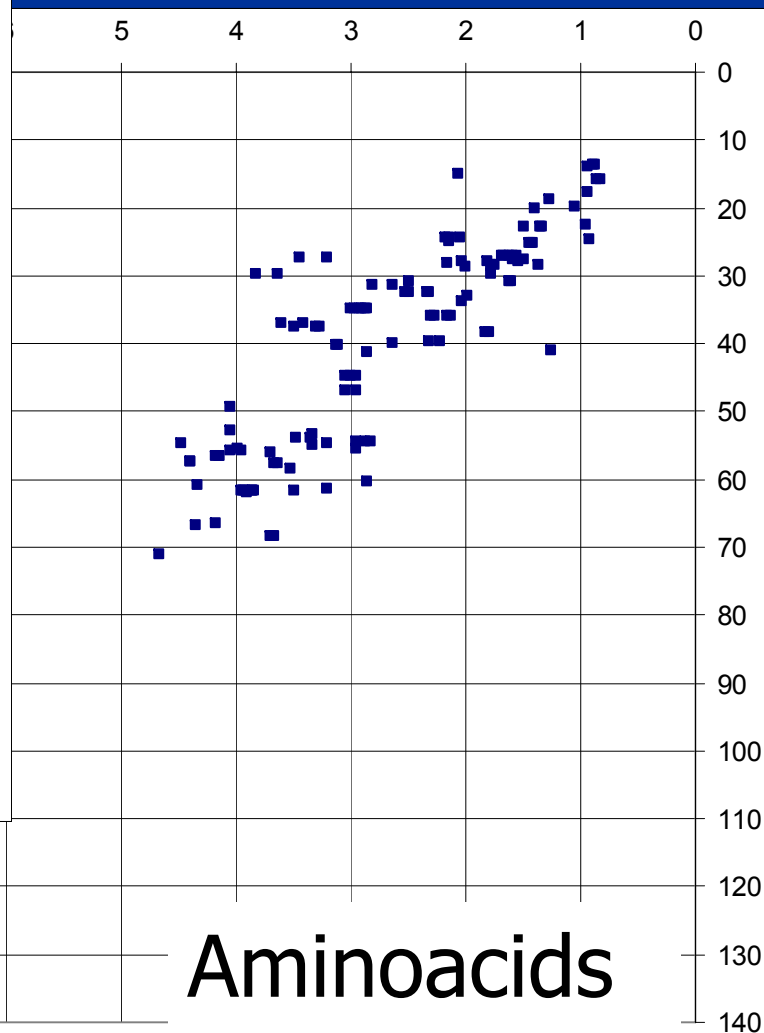
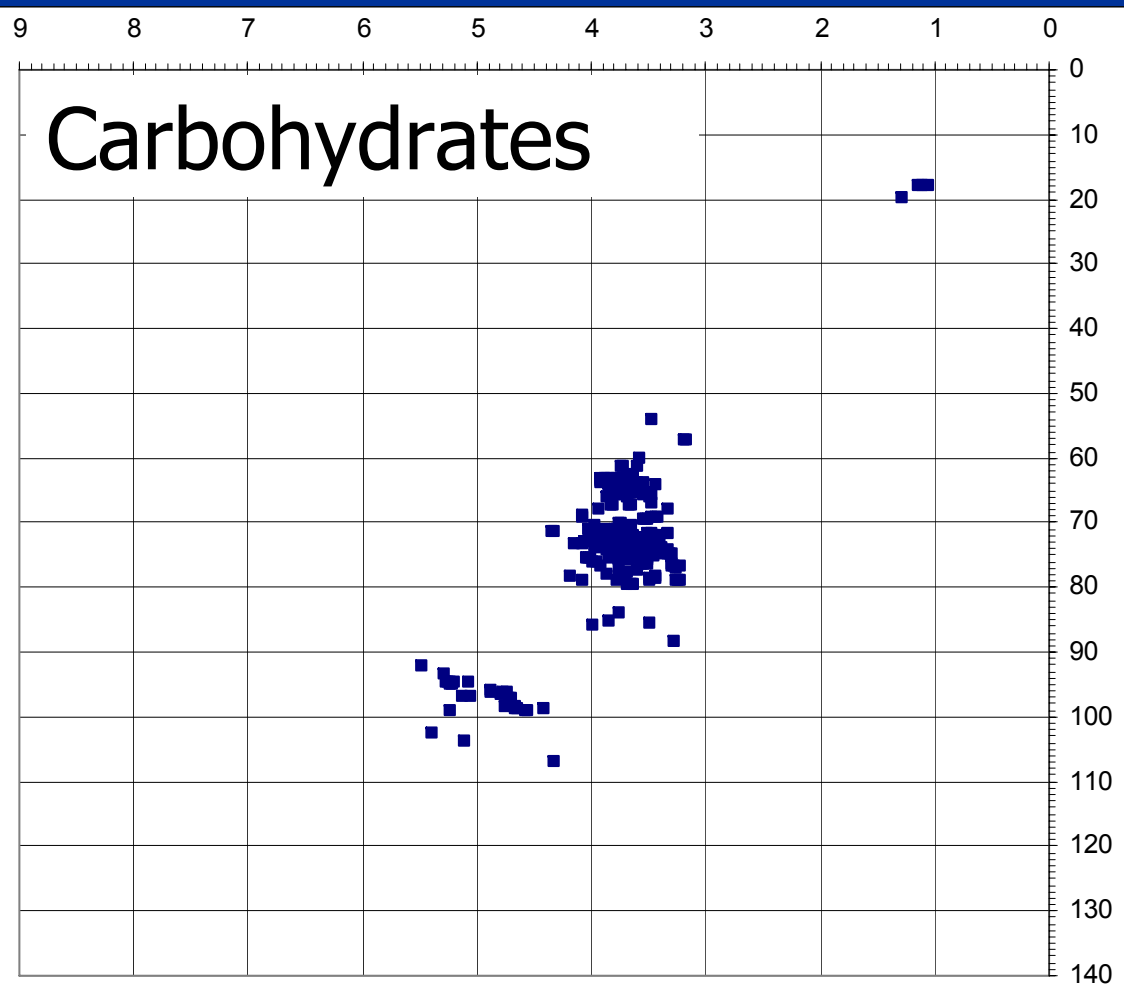


Sorbitol-d



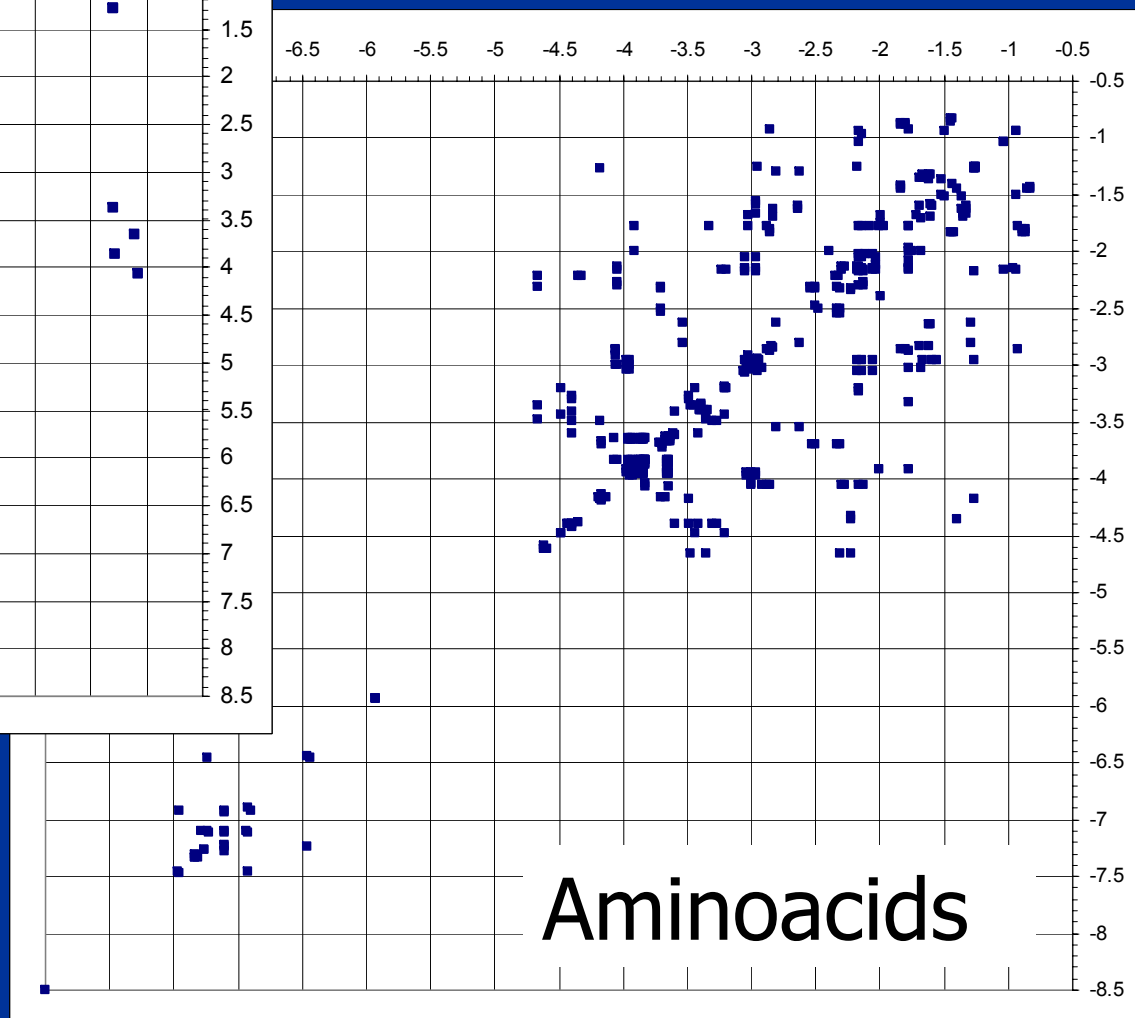
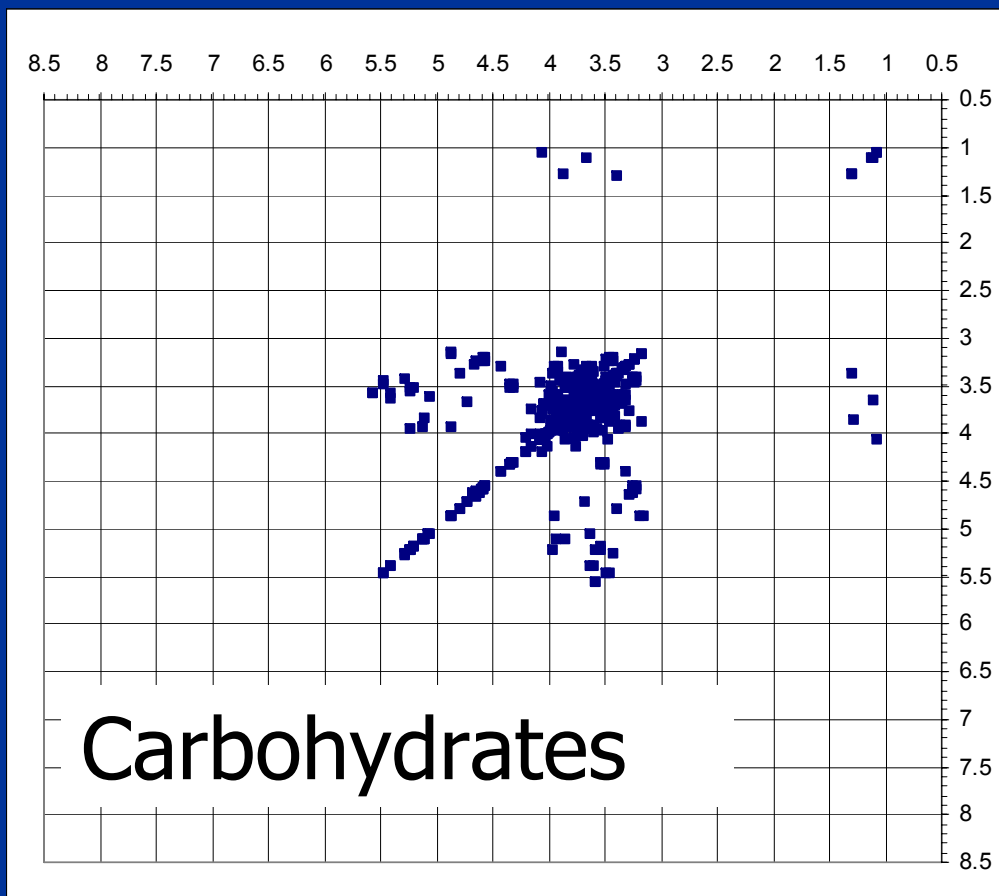
Xylitol

РАСЧЕТНЫЕ ^1H , ^{13}C -HSQC СПЕКТРЫ СМЕСЕЙ АМИНОКИСЛОТ И УГЛЕВОДОВ (SBASE)

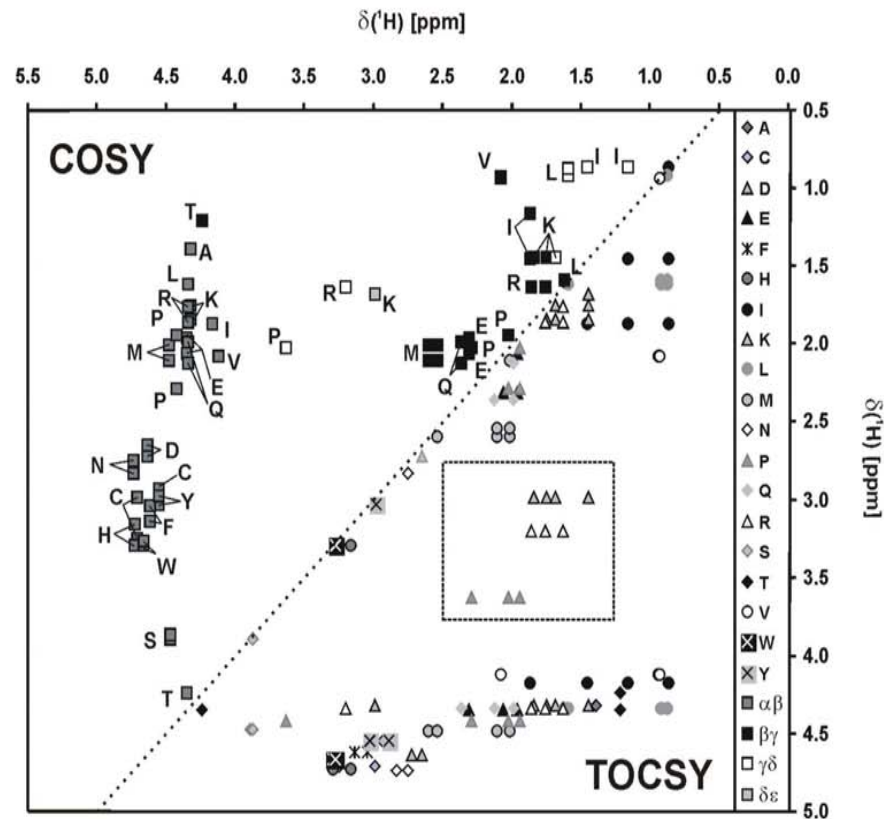


LOMC

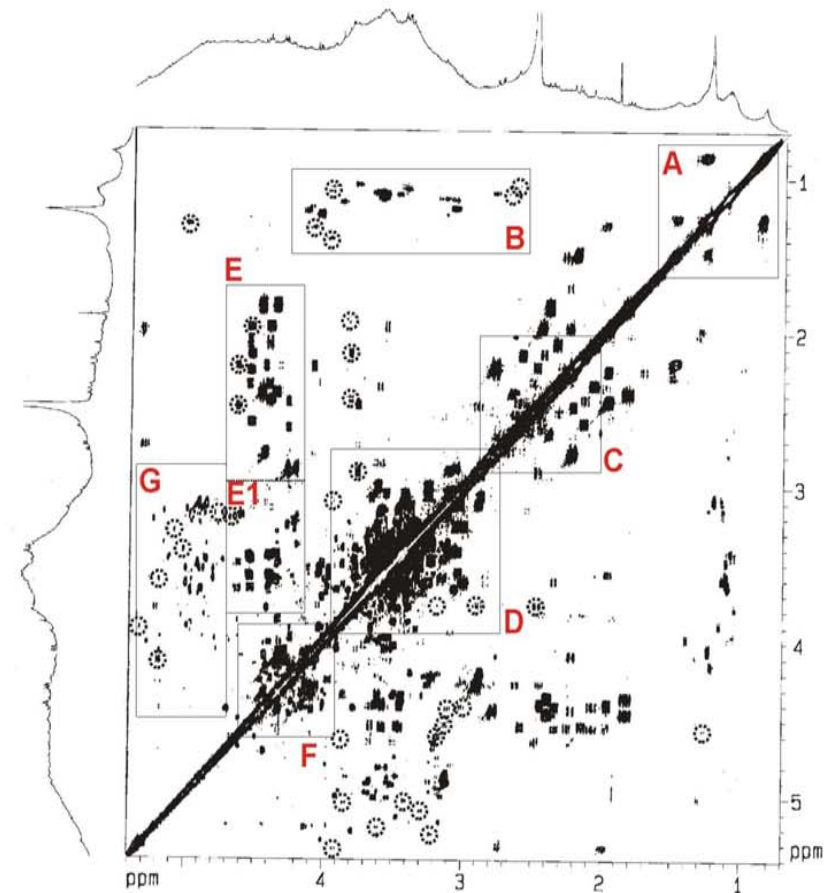
РАСЧЕТНЫЕ H-H COSY СПЕКТРЫ СМЕСЕЙ УГЛЕВОДОВ И АМИНОКИСЛОТ (SBASE, Brucker)



Pattern recognition is of considerable value in assigning cross peaks



cross peak positions of
proteinaceous amino acids
in peptides (following Ala)



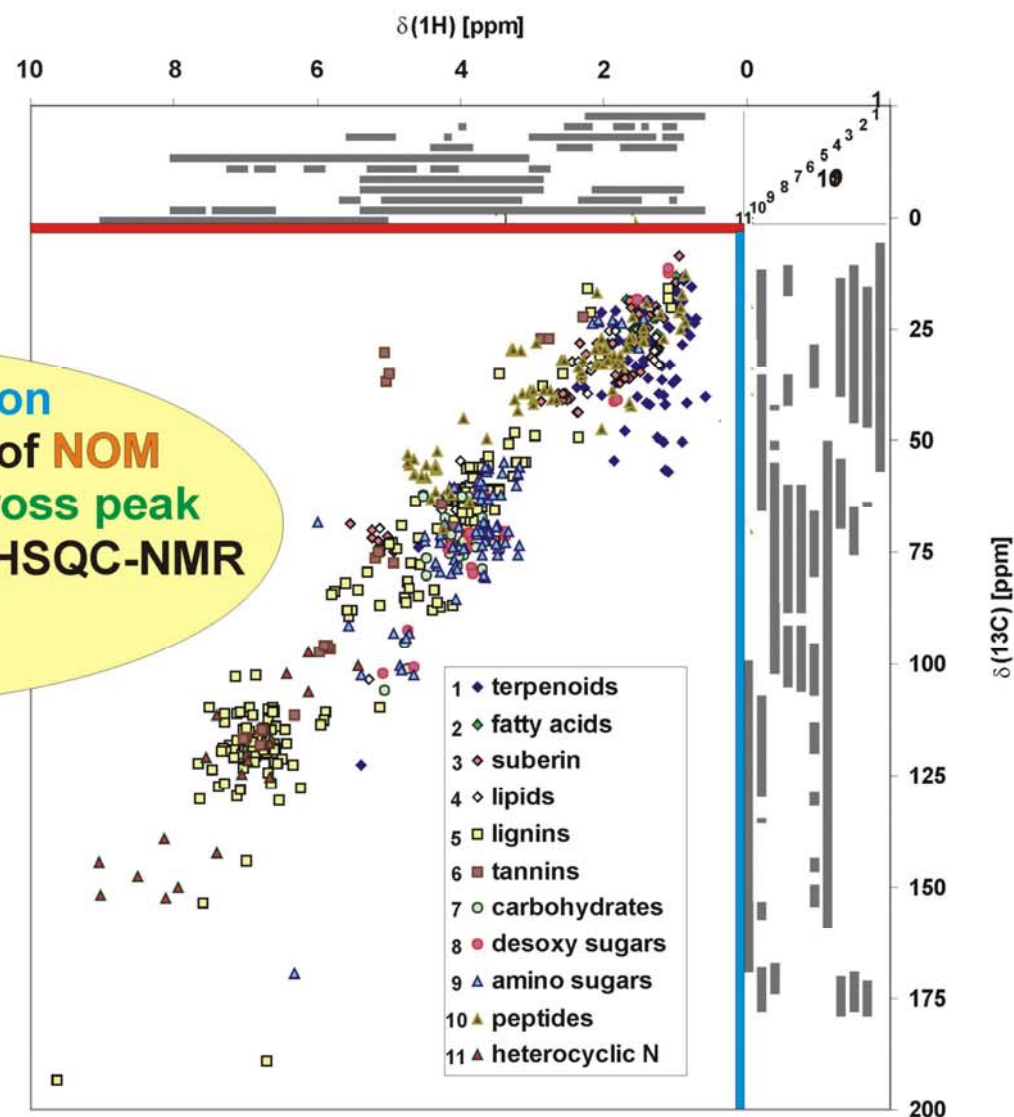
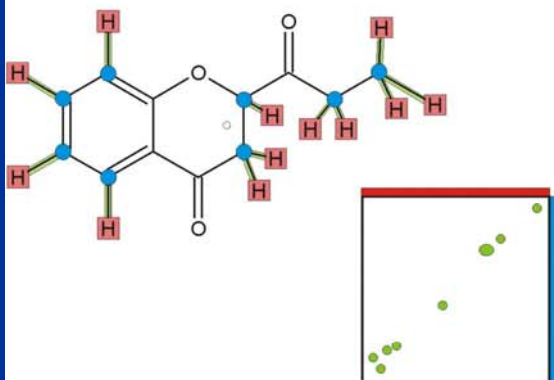
A
B
C
D
E
E1
F
G

-CH_{1,3}-CH_{1,2}-CH_{1,2}-CH_{1,3}
-C-CH-CH-O
-C_f-CH-CH-C-
-CH(O)-CH(O)-
-C(=O)-O-CH-CH-CH-O-
-C(=O)-O-C_f-CH-CH-O-
-C(=O)-O-C_f-CH-CH-O-
-O-CH(O)-CH(O)-

РАСПОЗНАВАНИЕ ОБРАЗОВ

2D NMR of NOM

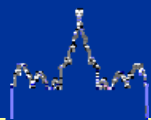
proton and carbon
chemical shift range of NOM
constituents and its cross peak
positions within a ^1H , ^{13}C HSQC-NMR
spectrum



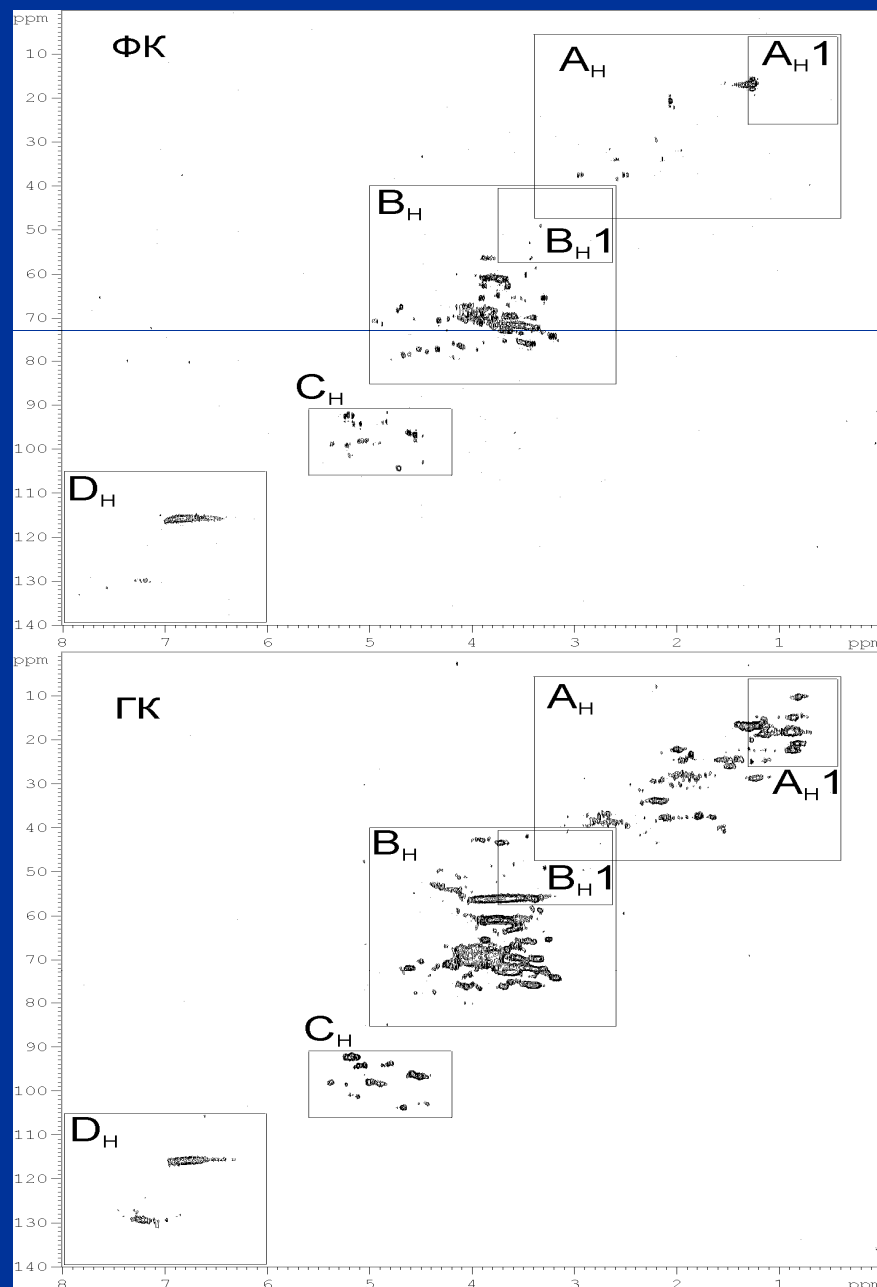
В ЧЕМ СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ
ГУМИНОВЫХ И ФУЛЬВОКИСЛОТ?

В ЧЕМ СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЕ
ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ НИЗИННОГО И
ВЕРХОВОГО ТОРФА?

ЧЕМ РАЗЛИЧАЮТСЯ КАРКАСНЫЕ И
ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ ФРАГМЕНТЫ?

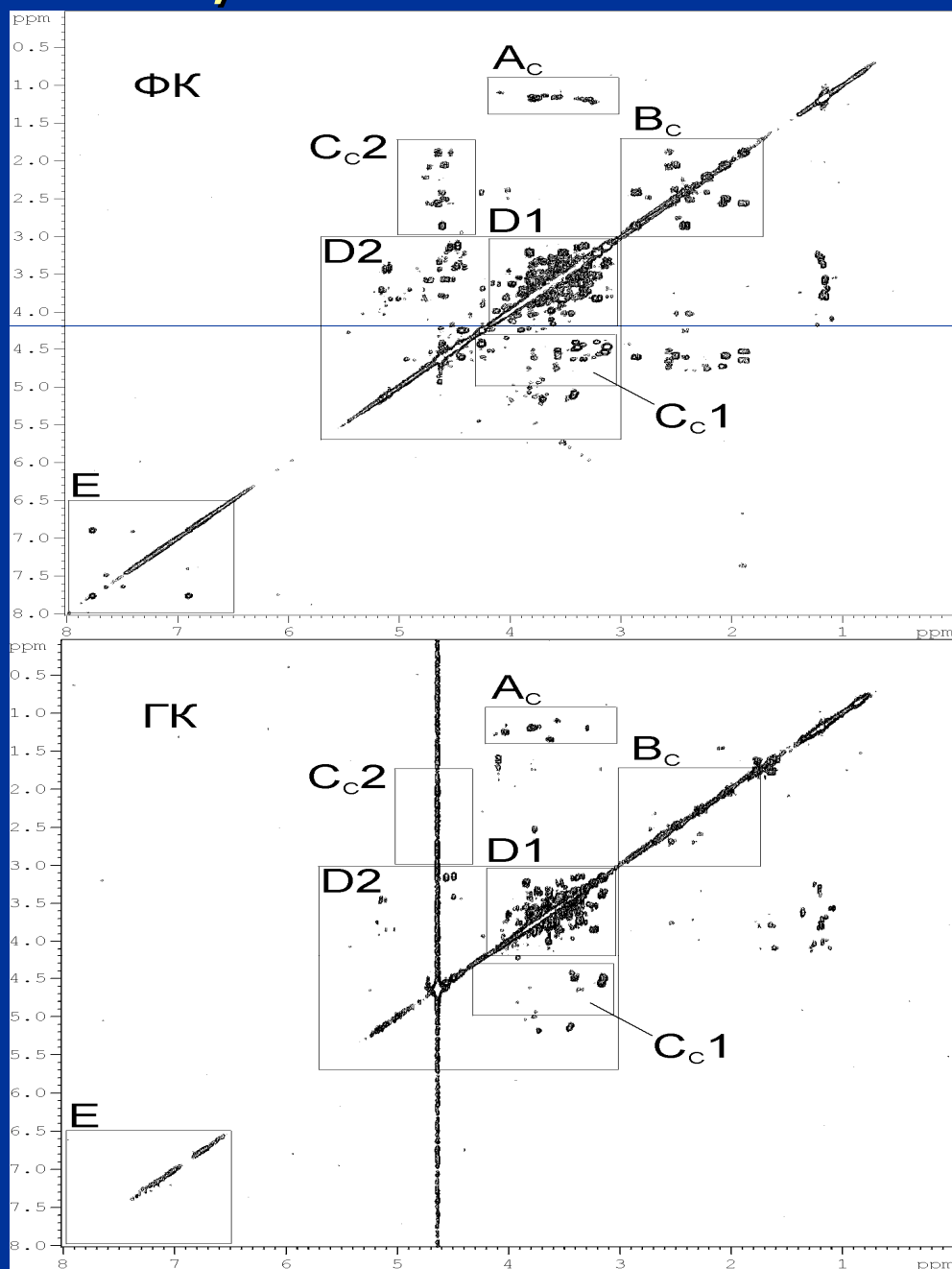


^1H , ^{13}C HSQC СПЕКТРЫ ФК И ГК ТОРФА



- 1) Пептидные боковые цепи (пики в области **Ан**): много в ГК, в ФК – практически нет;
- 2) Длинноцепочечные метиленовые мостики и дезоксисахара (**Ан1**): хорошо видны в ГК, практически нет в ФК;
- 3) $\text{C}\alpha$ пептидов в области **Вн**: много в ГК и мало – в ФК;
- 4) Алиф. СН при -NH- группе (область **Вн1**) – аминсахара: есть в ГК, нет в ФК;
- 5) Интенсивные пики аномерных СН в области **Сн**: есть в ГК и ФК, присутствие циклических сахаров;
- 6) Два пика в области ароматики (**Дн**): 6.8/116 м.д – О-замещение в орто-положение; и 7.15/130 м.д – алкильное замещение в орто-положение: в ФК превалирует о-О-замещение и есть карбонилы в пара-положении, в ГК много орто-О, но есть и много орто-алкильных заместителей.

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY СПЕКТРЫ ФК И ГК ТОРФА

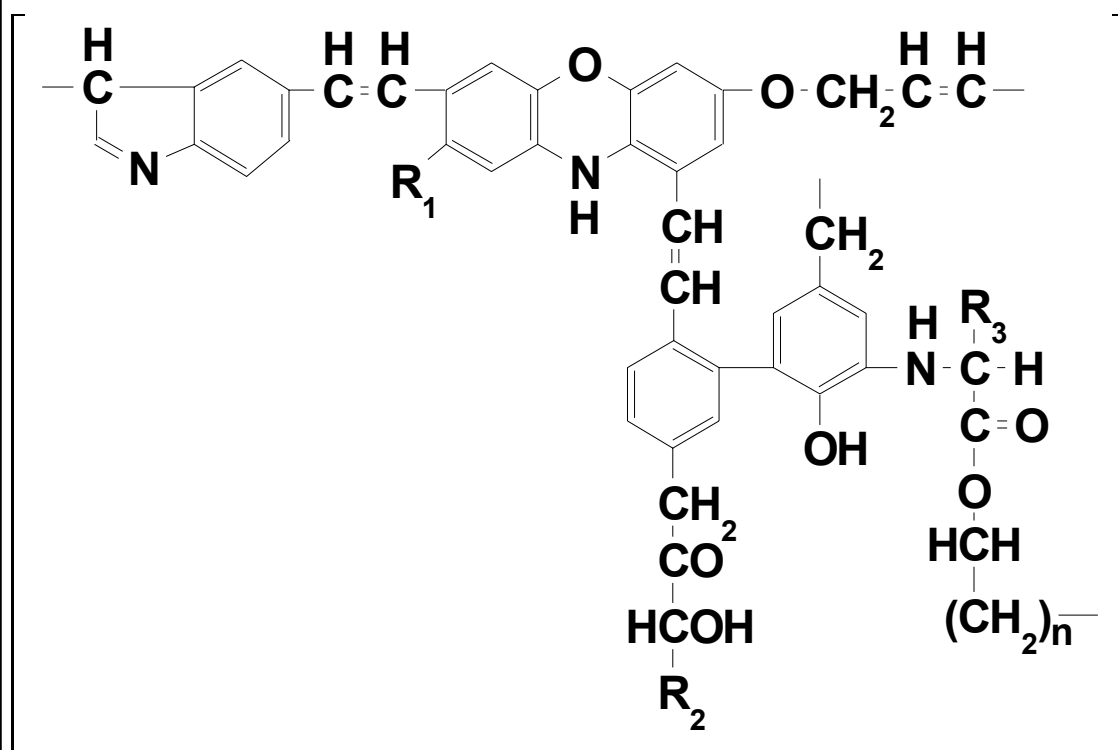


- 1) В области **A_C** для ФК отсутствуют пики метилированных сахаров, есть в ГК
- 2) Для ФК много пиков в области **C_{C2}**, которых практически нет в ГК: это окисленные боковые цепи сложных и простых эфиров
- 3) H α -H β пептидов (пики в области **C_{C1}**): есть в ГК и в ФК;
- 4) **D_{C1}** и **D_{C2}** – циклические сахара: есть в ГК и ФК;
- 5) **E_C** – мало пиков от протонов заместителей в вицинальном положении – высокая степень замещения кольца: в ГК и ФК

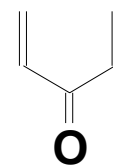
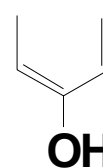
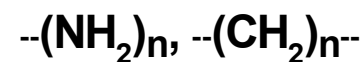
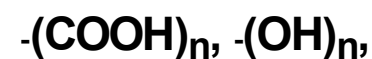
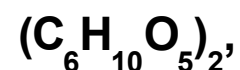
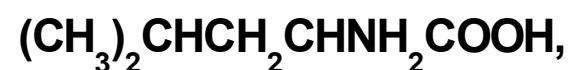
СТРОЕНИЕ ГУМИНОВЫХ МАКРОМОЛЕКУЛ: КАРКАС И ПЕРИФЕРИЯ

Строение структурной ячейки ГВ (Орлов. 1990)

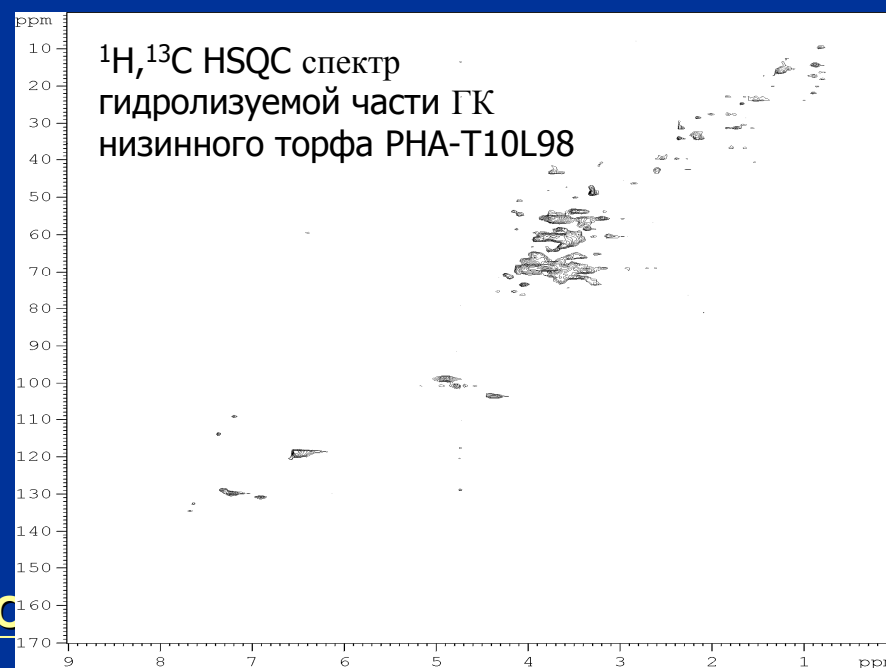
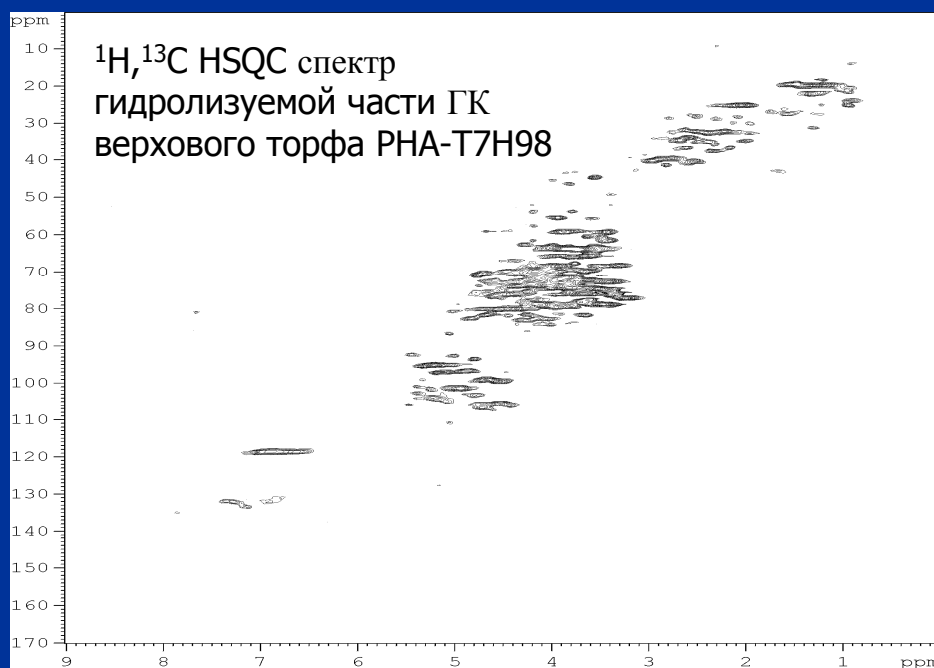
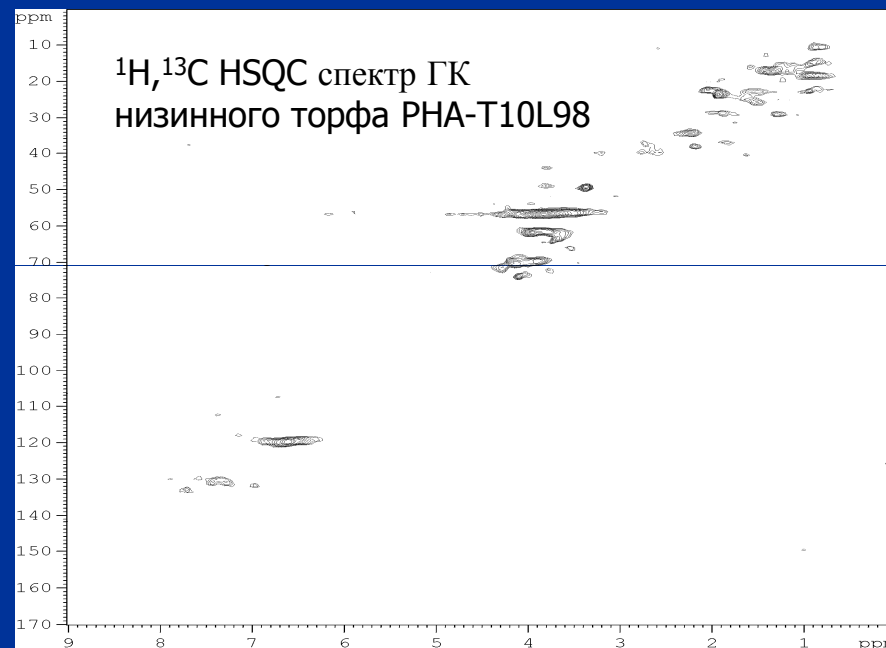
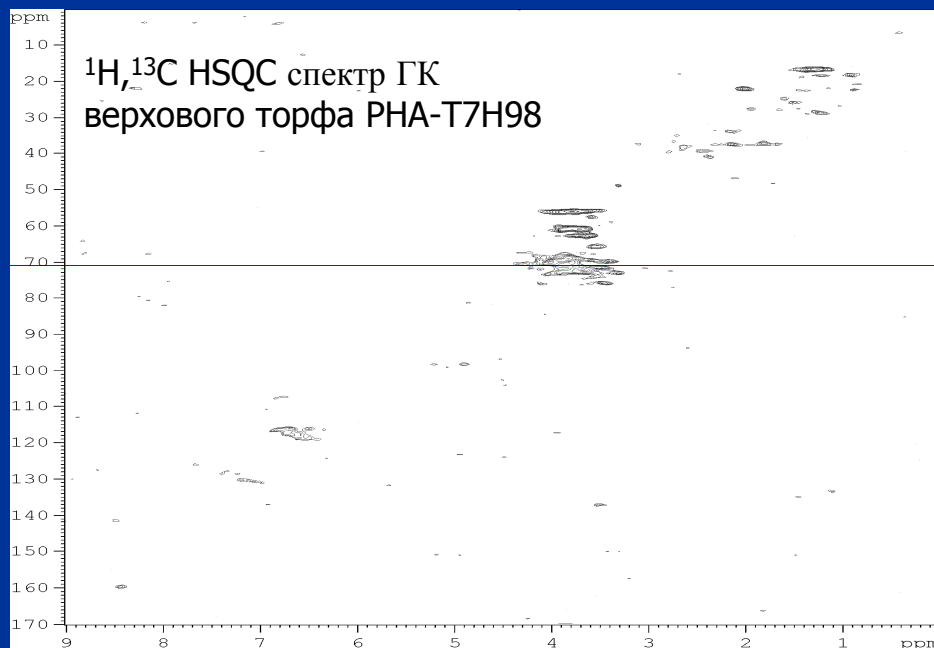
Негидролизуемая часть



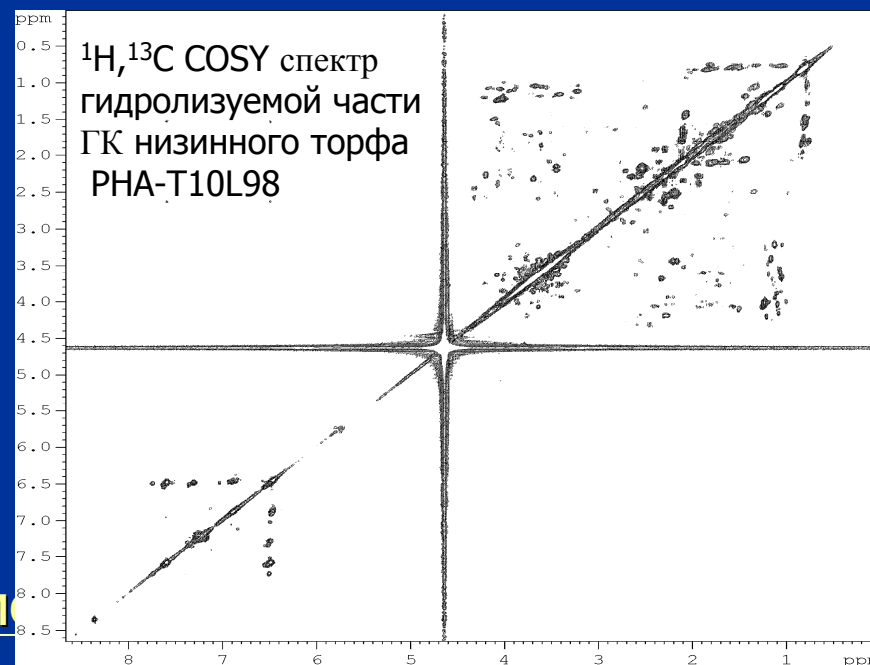
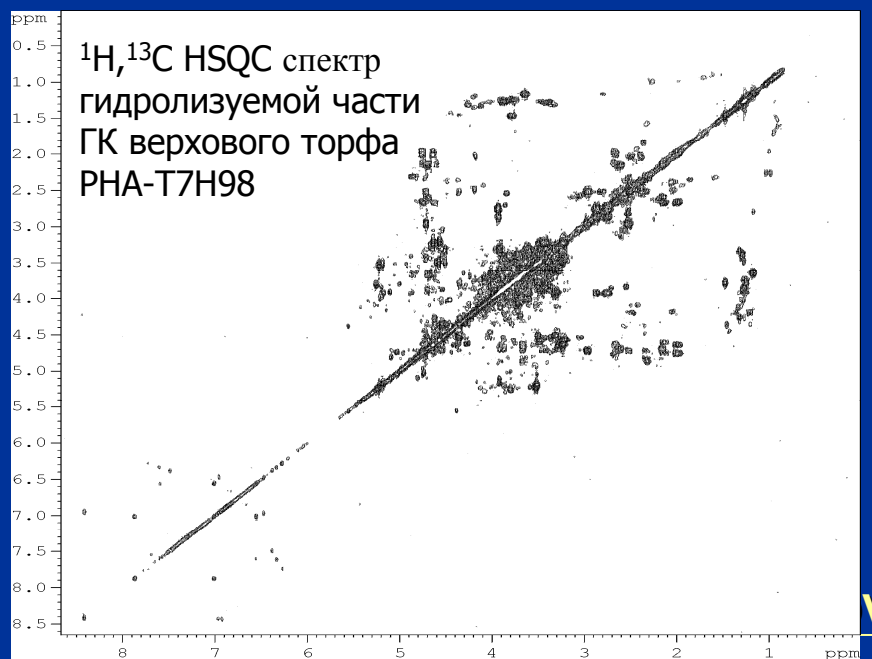
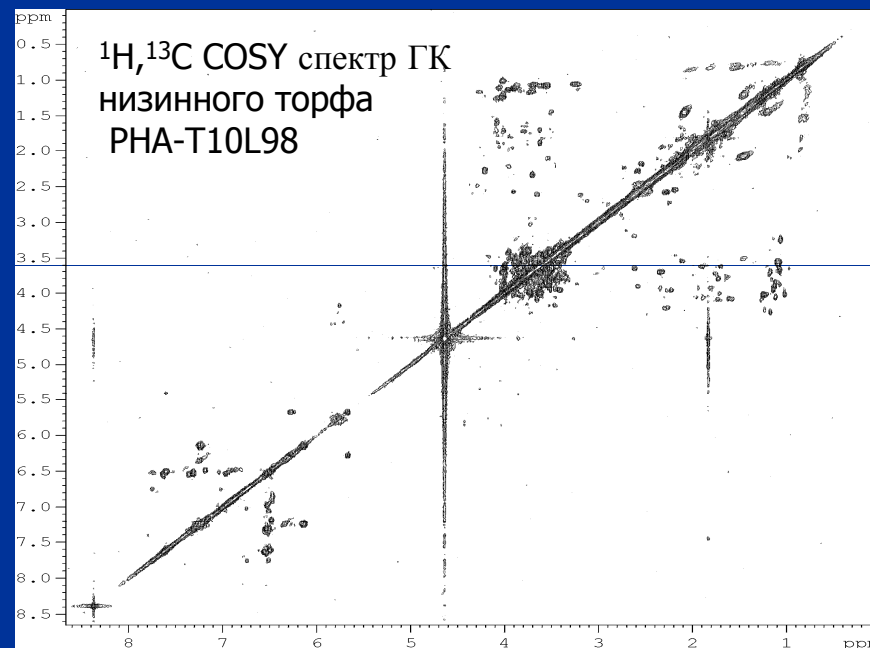
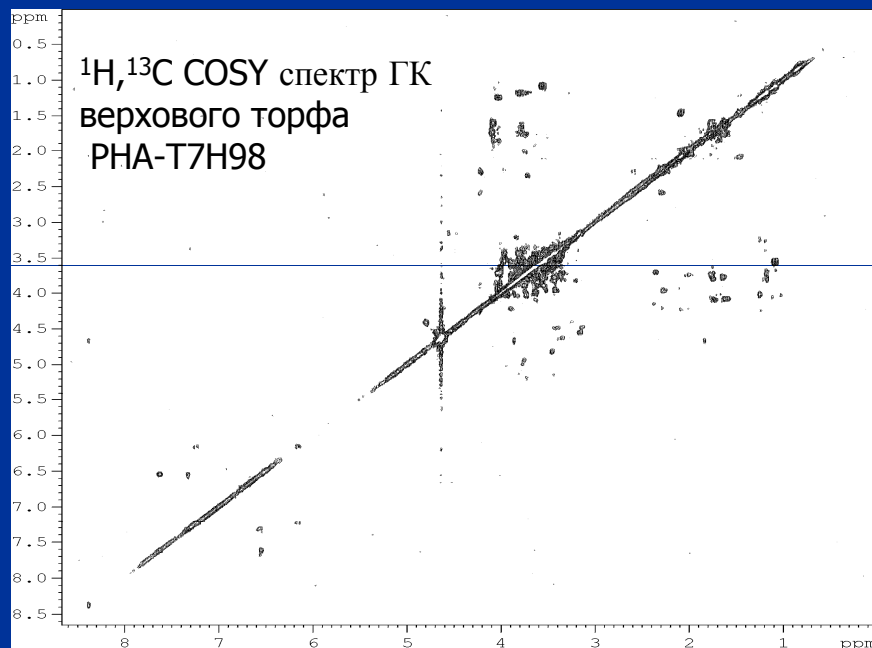
Гидролизуемая часть



ГВ ВЕРХОВОГО И НИЗИННОГО ТОРФА: КАРКАС И ПЕРИФЕРИЯ



ГВ ВЕРХОВОГО И НИЗИННОГО ТОРФА: КАРКАС И ПЕРИФЕРИЯ



ВЫВОДЫ

1. Основной проблемой спектроскопии ПМР гуминовых веществ является регистрация подвижных протонов.
2. Содержание протонов и углеродов с разным химическим окружением может быть использовано в качестве дескрипторов строения ГВ
3. Для более детальной идентификации структур, присутствующих в ГВ, необходимо применение двумерной спектроскопии ЯМР
4. Количественные данные по распределению углерода и водорода могут быть использованы для классификации и выяснения генетической взаимосвязи различных классов гуминовых веществ, данные двумерной ЯМР – для изучения структурной организации супрамолекулярного ансамбля ГВ

