TETRAHEDRON ORGANIC CHEMISTRY SERIES
Series Editors: J E Baldwin, FRS & R M Williams

VOLUME 19

High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry

Related Pergamon Titles of Interest

BOOKS

Tetrahedron Organic Chemistry Series:
CARRUTHERS: Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis
DEROME: Modern NMR Techniques for Chemistry Research
FINET: Ligand Coupling Reactions with Heteroatomic Compounds
GAWLEY & AUBE: Principles of Asymmetric Synthesis
HASSNER & STUMER: Organic Syntheses Based on Name Reactions and Un-named Reactions
McKILLOP: Advanced Problems in Organic Reaction Mechanisms
OBRECHT & VILLALGORDO: Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries
PERLMUTTER: Conjugate Addition Reactions in Organic Synthesis
SESSLER & WEGHORN: Expanded, Contracted & Isomeric Porphyrins
TANG & LEVY: Chemistry of C-Glycosides
WONG & WHITESIDES: Enzymes in Synthetic Organic Chemistry

JOURNALS

BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY
BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS TETRAHEDRON
TETRAHEDRON: ASYMMETRY
TETRAHEDRON LETTERS

Full details of all Elsevier Science publications/free specimen copy of any Elsevier Science journal are available on request from your nearest Elsevier Science office

High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry

TIMOTHY D W CLARIDGE

Dyson Perrins Laboratory, Oxford

1999

PERGAMON

An imprint of Elsevier Science

Amsterdam - Lausanne - New York - Oxford - Shannon - Singapore - Tokyo

ELSEVIER SCIENCE Ltd
The Boulevard, Langford Lane
Kidlington, Oxford 0X5 1GB, UK

© 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

This work is protected under copyright by Elsevier Science, and the following terms and conditions apply to its use:

Photocopying
Single photocopies of single chapters may be made for personal use as allowed by national copyright laws. Permission of the Publisher and payment of a fee is required for all other photocopying, including multiple or systematic copying, copying for advertising or promotional purposes, resale, and all forms of document delivery. Special rates are available for educational institutions that wish to make photocopies for non-profit educational classroom use.

Permissions may be sought directly from Elsevier Science Rights & Permissions Department, PO Box 800, Oxford 0X5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.co.uk. You may also contact Rights & Permissions directly through Elsevier's home page (http://www.elsevier.nl), selecting first 'Customer Support', then 'General Information', then 'Permissions Query Form'.

In the USA, users may clear permissions and make payments through the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA; phone: (978) 7508400, fax: (978) 7504744, and in the UK through the Copyright Licensing Agency Rapid Clearance Service (CLARCS), 90 Tottenham Court Road, London W1P OLP, UK; phone: (+44) 171 631 5555; fax: (+44) 171 631 5500. Other countries may have a local reprographic rights agency for payments.

Derivative Works
Tables of contents may be reproduced for internal circulation, but permission of Elsevier Science is required for external resale or distribution of such material.
Permission of the Publisher is required for all other derivative works, including compilations and translations.

Electronic Storage or Usage
Permission of the Publisher is required to store or use electronically any material contained in this work, including any chapter or part of a chapter.

Except as outlined above, no part of this work may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without prior written permission of the Publisher. Address permissions requests to: Elsevier Science Rights & Permissions Department, at the mail, fax and e-mail addresses noted above.

Notice
No responsibility is assumed by the Publisher for any injury and/or damage to persons or property as a matter of products liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of any methods, products, instructions or ideas contained in the material herein. Because of rapid advances in the medical sciences, in particular, independent verification of diagnoses and drug dosages should be made.

First edition 1999

Library of Congress Cataloging in Publication Data A catalog record from the Library of Congress has been applied for.

British Library Cataloguing in Publication Data A catalogue record from the British Library has been applied for.

ISBN: 0 08 042799 5 (hardbound)
ISBN: 0 08 042798 7 (paperback)

© The paper used in this publication meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48-1992 (Permanence of Paper).

Аннотация

Прошло больше, чем десять лет, с тех пор как увидела свет последняя книга Энди Дерома *"Современные Методы ЯМР для химических исследований"* Эта книга оказала огромное влияние на использование химиками органиками развивающейся области импульсной спектроскопии ЯМР, предоставляя химикам в практической форме мощность этих методов для выяснения молекулярной структуры. Вероятно, справедливо утверждение, что спектроскопия ЯМР имела самое большое влияние на область химических исследований со времён изобретения точных весов. Интересно, что оба эти метода, то есть взвешивание и ЯМР, основываются на свойствах ядер.

В этой новой книге Тим Кларидж исходит из книги Энди Дерома и соединяет её в практическом контексте с более современными методами. Эта книга будет интересна как для сотрудников академических учреждений, так для специалистов в промышленности, которые намереваются применять ЯМР для решения химических проблем.

Дж.Е. Балдуин
лаборатория Дайсон Перринс
Оксфорд, 1999

Предисловие

Со времён первого наблюдения протонного магнитного резонанса в воде и в парафине дисциплина ядерного магнитного резонанса (ЯМР) беспрецедентно выросла как аналитический метод и теперь в многочисленных различных обличьях находит применение в химии, биологии, медицине, в науке о материалах и в геологии. Несмотря на её происхождение в лабораториях физиков, именно в химической лаборатории спектроскопия ЯМР нашла самое большое применение и, можно утверждать, обеспечила основы, на которых развивается современная органическая химия. Современный высокоразвитый ЯМР всё ещё продолжает развиваться, что вызывает необходимость для всех химиков-органиков осознавать, и правильно оценивать его потенциал, насколько он эффективен и способен продвигать их текущие исследования. Способность не отставать от разработок в методах ЯМР, однако, обескураживающая задача, затрудняемая не только числом доступных методов, но также и путём, которым эти новые методы появляются. Они распространяются через химическую литературу и в специализированных журналах по магнитному резонансу, и в изданиях, посвященных специфическим областям химии, а также и более общим объектам. Они часто упоминаются как загадочные сокращения и описываются сложным математическим языком, что, естественно, мало нравится химикам-исследователям. Несметное число последовательностей может ошеломить непосвященного и может поставить в тупик заинтересованного читателя в вопросе, с чего начинать и какой выбрать метод для решаемой проблемы. В этой книге я попытался собрать вместе наиболее ценные для химика-исследователя методы и описать их действие, используя иллюстрированные модели. Вероятно, многие химики считают даже этот уровень понимания слишком глубоким, но только отсюда они могут полностью оценить возможности и (в равной, если не в большей степени) ограничения этих методов. По всей книге делается акцент на более новых методах, которые являются, или, несомненно, сами будут становиться принципиальными методами для доказательства и исследования химических структур в растворе.

Спектроскопия ЯМР, прежде всего, практический предмет, который наиболее полезен, когда имеется интересный образец для исследования, спектрометр в распоряжении и знания, чтобы использовать эту (иногда пугающе!) дорогую аппаратуру. Таким образом, эта книга содержит достаточно информации и руководство по вопросам осуществления и выполнения описываемых методик, и таким образом должна быть равно полезной дома, в лаборатории ЯМР, или на столе спектроскописта или химика.

Эта книга пишется с точки зрения менеджера средств ЯМР в академической научно-исследовательской лаборатории и поэтому включенные темы, естественно, подвержены влиянию областей химии, с которыми я сталкиваюсь. Методы выбираются, однако, по принципу их широкой применимости и ошибкоустойчивости, и потому что, во многих случаях, они уже стали зарекомендовавшими себя методами ЯМР и в академических лабораториях, и в промышленных учреждениях. Книга не задумывалась как обзор всех последних разработок в методах ЯМР. Он вряд ли уместился бы в одну книгу, и большинство методов представляло бы мало интереса для большинства химиков-исследователей. Вместо этого, книга представляет собой квинтэссенцию самых многих методов, разработанных за эти годы, с сохранением только наиболее подходящих их частей. Она должна найти применение в академических и промышленных научно-исследовательских лабораториях, а также может являться основой для курсов повышения квалификации по методам ЯМР в химических исследованиях.

Признательность

Подготовка этой книги стала возможной, благодаря взаимодействиям, помощи, терпению, пониманию и знаниям многих людей, за что я им глубоко благодарен. Я должен поблагодарить моих коллег, и бывших, и настоящих, в группе ЯМР лаборатории Дайсон Перринз, в частности Элизабет Макгуиннесс и Тину Джексон за их первоклассную поддержку и помощь, и Нормана Григори, и доктора Гуо-Лианг Пинга за всевозможные ремонты, модификации и улучшения, которые они сделали для приборов, использованных для получения многих рисунков в этой книге. Большинство этих рисунков создавались специально для этой книги и стали возможными, благодаря великодушию различных исследовательских групп и индивидуумов, предоставляя мне возможность доступа к их данным и образцам. Для этого я хотел бы выразить благодарность доктору Гарри Андерсону, профессору Джеку Балдуину, доктору Паулю Буму, доктору Джону Брауну, доктору Дункану Кармичаелу, доктору Энтони Фейрбенксу, профессору Джорджу Флиту, доктору Дэвиду Ходжсону, доктору Марку Молони, доктору Джо Пичу и профессору Крису Шофилду и членам их групп, слишком многочисленных для перечисления, которые любезно готовили образцы; они знают, кто это, и я обязан каждому из них. Я также благодарен профессору Джеку Балдуину за разрешение использовать аппаратуру отдела для получения иллюстративных спектров.

Я хотел бы поблагодарить докторов Кэролин Карр и Ника Риса за их помощь в корректуре рукописи и за их способность отыскивать те раздражающие небольшие ошибки, которые я читал много раз, но ещё не исправил. Естественно, я несу ответственность за те ошибки, которые остаются, и был бы благодарен за сообщения о них, касаются ли они фактов, либо типографского набора. Я также благодарю Эйлин Моррелл и Шэрон Вард из Elsevier Science за их терпение в ожидании выполнения этого проекта и за их сдержанное отношение, когда не соблюдались различные крайние сроки.

Я представляю, что каждый начинающий карьеру в науке некоторое время подвергается влиянию, или даже вдохновляется одной или несколькими фигурами, которые могут действовать в качестве учителя, наставника, или, возможно, образца для подражания. Лично я обязан доктору Джереми Эверетту и Джону Тайлеру, оба формально (как было тогда) из Beecham Pharmaceuticals, за приём в их лаборатории ЯМР в течение года «многопланового» студента, который, как предполагалось, приобретал производственный опыт в другом месте в качестве хроматографиста, анализирующего мочу лошади! Мой случайный побег от этого и последующее время в Beechams оказалось плодотворным годом для меня, и я благодарю Джереми и Джона за их раннюю поддержку, которая зажгла мой интерес к ЯМР. Мое понимание того, что он действительно может делать, пришло позже из исследований дипломированного специалиста с Энди Деромом, и я, подобно многим другим, остаюсь вечно благодарным за понимание и вдохновение, которые он создал.

Наконец, я благодарю мою жену Рэйчел за её бессмертное терпение, понимание и поддержку в течение всего этого долгого и иногда настолько извилистого проекта, что я уверен, что она иногда думала, что никогда не увидит его окончания. Я могу только принести извинения за недостаток внимания, которое она в это время незаслуженно испытывала.

Тим Кларидж

Содержание

Аннотация ... *1*
Предисловие ... *2*
Признательность ... *3*

СОДЕРЖАНИЕ ... **4**

ГЛАВА 1 ... **10**

ВВЕДЕНИЕ ... **10**

1.1. РАЗВИТИЕ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ... 10
1.2. СОВРЕМЕННЫЙ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ И ЭТА КНИГА ... 13
1.2.1. Что содержит эта книга ... *14*
1.2.2. Номенклатура импульсных последовательностей ... *16*
1.3. ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЯМР 17
Литература ... *21*

ГЛАВА 2 ... **22**

ВВЕДЕНИЕ В ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ... **22**

2.1. ЯДЕРНЫЙ СПИН И РЕЗОНАНС ... 22
2.2. ВЕКТОРНАЯ МОДЕЛЬ ЯМР ... 25
2.2.1. Вращающаяся система отсчёта ... *26*
2.2.2. Импульсы ... *28*
2.2.3. Химические сдвиги и взаимодействия ... *30*
2.2.4. Спиновые эхо ... *32*
2.3. ВРЕМЕННЫЕ И ЧАСТОТНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ... 34
2.4. СПИНОВАЯ РЕЛАКСАЦИЯ ... 35
2.4.1. Продольная релаксация: установление равновесия ... *36*
2.4.2. Измерение T_1 последовательностью инверсии-восстановления ... *38*
Быстрая оценка T_1 ... 39
2.4.3. Поперечная релаксация: потеря намагничивания в x-y плоскости ... *40*
2.4.4. Измерение T_2 последовательностью спин-эхо ... *42*
T_2 редактирование спектра ... 45
2.5. МЕХАНИЗМЫ РЕЛАКСАЦИИ ... 45
2.5.1. Путь к релаксации ... *46*
2.5.2. Диполь-дипольная релаксация ... *48*
2.5.3. Релаксация анизотропии химического сдвига ... *49*
2.5.4. Спин-вращательная релаксация ... *50*
2.5.5. Квадрупольная релаксация ... *51*
Скалярное взаимодействие с квадрупольными ядрами ... 53
ЛИТЕРАТУРА ... *55*

ГЛАВА 3 ... **56**

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ... **56**

3.1. КРАТКИЙ ОБЗОР СПЕКТРОМЕТРА ЯМР ... 56
3.2. РЕГИСТРАЦИЯ И ОБРАБОТКА ДАННЫХ ... 59
3.2.1. Импульсное возбуждение ... *59*
Вне-резонансные эффекты ... 60
3.2.2. Детектирование сигнала ... *62*
3.2.3. Регистрация ССИ ... *63*
Условие Найквиста ... 63
Фильтрование шума ... 65
Время регистрации и цифровое разрешение ... 66

Дополнение нулями и артефакты усечения ... 68
Линейное предсказание ... 69
3.2.4. Квадратурное детектирование ... *71*
Одновременная и последовательная регистрация ... 73
Пришлые сигналы ... 74
3.2.5. Циклирование фазы ... *75*
3.2.6. Динамический диапазон и усреднение сигнала ... *78*
Усреднение сигнала ... 79
Оверсэмплинг и цифровое фильтрование ... 80
3.2.7. Функции окна ... *83*
Улучшение чувствительности ... 83
Улучшение разрешения ... 84
3.2.8. Фазовая коррекция ... *86*
3.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА ... 88
3.3.1. Выбор растворителя ... *88*
3.3.2. Опорные соединения ... *91*
3.3.3. Ампулы и объёмы образца ... *92*
3.3.4. Фильтрование и дегазирование ... *94*
3.4. ПОДГОТОВКА СПЕКТРОМЕТРА ... 95
3.4.1. Датчик ... *95*
3.4.2. Настройка датчика ... *97*
Настройка и согласование ... 98
3.4.3. Стабилизация отношения поле-частота ... *99*
Система стабилизации ... *99*
Оптимизация стабилизации ... 100
Получение данных без стабилизации ... 101
3.4.4. Оптимизация однородности поля: шиммирование ... *101*
Система шиммирования ... 101
Шиммирование ... 103
Обычные дефекты формы линии ... 105
Шиммирование, используя ССИ или спектр ... 105
Градиентное шиммирование ... 107
3.5. КАЛИБРОВКИ СПЕКТРОМЕТРА ... 109
3.5.1. Радиочастотные импульсы ... *109*
Напряжённости РЧ поля ... 109
Импульсы наблюдения: высокая чувствительность ... 111
Импульсы наблюдения: низкая чувствительность ... 112
«Косвенные» импульсы ... 112
Напряжённость гомоядерного декаплирующего поля ... 114
Напряжённость гетероядерного декаплирующего поля ... 114
3.5.2. Импульсные градиенты поля ... *115*
Напряжённости градиента ... 116
Времена восстановления градиента ... 119
3.5.3. Температура образца ... *120*
3.6. ТЕСТЫ СОВЕРШЕНСТВА СПЕКТРОМЕТРА ... 121
3.6.1. Форма линии и разрешение ... *122*
3.6.2. Чувствительность ... *123*
3.6.3. Предварительное насыщение растворителя ... *125*
ЛИТЕРАТУРА ... *126*

ГЛАВА 4 ... **128**

ОДНОМЕРНЫЕ МЕТОДЫ ... **128**

4.1. ОДНОИМПУЛЬСНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ 128
4.1.1. Оптимизация чувствительности ... *129*
4.1.2. Количественные измерения и интегрирование ... *132*
Сбор данных ... 133
Обработка данных ... 133
4.2. МЕТОДЫ СПИНОВОГО ДЕКАПЛИРОВАНИЯ ... 134
4.2.1. Основы спинового декаплирования ... *135*
4.2.2. Гомоядерное декаплирование ... *135*
Сдвиги Блоха-Зигерта ... 136
Экспериментальная реализация ... 137
X {H} декаплирование ... 138
^{1}H{X} декаплирование ... 141

4.3. РЕДАКТИРОВАНИЕ СПЕКТРА СПИНОВЫМ ЭХО ... 142
4.3.1. J-модулированное спиновое эхо ... *142*
4.3.2. Тест присоединённых протонов (APT – 'Attached Protons' Test) ... *145*
4.4. УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И РЕДАКТИРОВАНИЕ СПЕКТРА ... 146
4.4.1. Перенос поляризации ... *148*
4.4.2. INEPT ... *150*
Рефокусированный INEPT 151
Повышение чувствительности 154
Редактирование при помощи INEPT ... 156
4.4.3. DEPT ... *157*
Последовательность DEPT 157
Редактирование при помощи DEPT 158
Оптимизация чувствительности ... 160
4.4.4. PENDANT ... *160*
4.5. НАБЛЮДЕНИЕ КВАДРУПОЛЬНЫХ ЯДЕР 161
Литература ... *163*

ГЛАВА 5 ... 165

КОРРЕЛЯЦИИ ЧЕРЕЗ ХИМИЧЕСКУЮ СВЯЗЬ I: ГОМОЯДЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ СДВИГА ... 165

5.1. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ДВУМЕРНЫХ МЕТОДОВ ... 167
5.1.1. Генерирование второго измерения ... *167*
5.2. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (COSY) ... 171
5.2.1. Коррелирование связанных спинов ... *173*
5.2.2. Интерпретация COSY ... *174*
5.2.3. Тонкая структура пиков ... *177*
5.3. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ 2D ЯМР ... *178*
5.3.1. 2D формы линии и квадратурное детектирование ... *179*
Фазочувствительные представления ... 179
Фазы сигнала в фазочувствительном COSY 181
Заворот сигналов в двух измерениях ... 181
Представления абсолютного значения ... 182
5.3.2. Аксиальные пики ... *185*
5.3.3. Инструментальные артефакты ... *186*
F2 артефакты квадратуры ... 186
T_1 шум ... 186
Симметризация ... 187
5.3.4. 2D регистрация данных ... *188*
5.3.5. Обработка 2D данных ... *191*
Фазовая коррекция ... 192
Представление ... 193
5.4. КОГЕРЕНТНОСТЬ И ПЕРЕНОС КОГЕРЕНТНОСТИ ... 193
5.4.1. Пути распространения когерентности ... *196*
5.5. СЕЛЕКТИРОВАННАЯ ГРАДИЕНТОМ СПЕКТРОСКОПИЯ ... 197
5.5.1. Выбор сигнала импульсными градиентами поля ... *199*
Дефокусирование и рефокусирование с ИГП ... 199
Селективное рефокусирование ... 200
Выбираемый градиентом COSY ... 202
5.5.2. Фазочувствительные эксперименты ... *203*
5.5.3. ИГП в ЯМР высокого разрешения ... *204*
Преимущества градиентов поля ... 205
Ограничения градиентов поля ... 205
5.5.4. Практическая реализация ИГП ... *206*
5.6. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ COSY ... 207
5.6.1. Который из подходов COSY? ... *208*
5.6.2. Двухквантово фильтрующий COSY (DQF-COSY) ... *209*
ДКФ последовательность ... 209
Интерпретация мультиплетной структуры ... 212
Измерение констант взаимодействия ... 215
Многоквантовые фильтры более высокого порядка ... 217
5.6.3. COSY-β ... *218*
5.6.4. Задержанный COSY: детектирование малых взаимодействий ... *219*
5.6.5. Ретрансляционный COSY ... *221*
5.7. ПОЛНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (TOCSY) ... 221
5.7.1. Последовательность TOCSY ... *223*

Блокировка спина и перенос когерентности ... 223
5.7.2. Использование TOCSY ... *226*
5.7.3. Реализация TOCSY ... *229*
Селектированный градиентом TOCSY ... 230
Одномерный TOCSY ... 231
5.8. КОРРЕЛЯЦИЯ РАЗБАВЛЕННЫХ СПИНОВ: INADEQUATE ... 232
5.8.1. 2D INADEQUATE ... *233*
5.8.2. 1D INADEQUATE ... *235*
5.8.3. Осуществление INADEQUATE ... *236*
Постановка эксперимента ... 237
5.8.4. Изменения в INADEQUATE ... *238*
Литература ... *240*

ГЛАВА 6 ... **243**

КОРРЕЛЯЦИИ ЧЕРЕЗ ХИМИЧЕСКУЮ СВЯЗЬ II: ГЕТЕРОЯДЕРНАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ СДВИГА ... **243**

6.1. ВВЕДЕНИЕ ... 243
6.2. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ... 244
6.3. ГЕТЕРОЯДЕРНАЯ ОДНОСВЯЗНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ... 246
6.3.1. Гетероядерная многоквантовая корреляция (HMQC) ... *247*
HMQC последовательность ... 248
Влияние гомоядерных протонных взаимодействий ... 250
Интерференция от ^{1}H-^{12}C/1H-^{14}N резонансов ... 251
6.3.2. Гетероядерная одноквантовая корреляция (HSQC) ... *252*
6.3.3. Практические реализации ... *253*
Градиентное селектирование [7] ... 254
BIRD-HMQC ... 258
Практическая установка ... 260
X-Y корреляции ... 261
6.3.4. Гибридные эксперименты ... *262*
2D редактирование по мультиплетности ... 262
Использование дисперсии сдвига X-спина ... 264
Редактирование и фильтрование 1D протонных спектров ... 266
6.4. СПЕКТРОСКОПИЯ ГЕТЕРОЯДЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИИ ЧЕРЕЗ МНОГО СВЯЗЕЙ ... 267
6.4.1. HMBC последовательность ... *268*
6.4.2. Применение HMBC ... *272*
Практическая постановка ... 275
6.5.1. Корреляции через одну связь ... *276*
Гомоядерное декаплирование в f_1 ... 278
6.5.2. Многосвязные корреляции и малые взаимодействия ... *279*
ЛИТЕРАТУРА ... *280*

ГЛАВА 7 ... **283**

ОТДЕЛЕНИЕ СДВИГОВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ: J-РАЗРЕШАЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ... **283**

7.1. ВВЕДЕНИЕ ... 283
Основные применения ... 283
7.2. ГЕТЕРОЯДЕРНАЯ J-РАЗРЕШАЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ... 284
7.2.1. Измерение дальних протон-углеродных констант взаимодействия ... *287*
Полуселективная последовательность ... 287
Селективная последовательность ... 288
Селективная последовательность с протонным детектированием ... 289
7.2.2. Практические соображения ... *290*
Практическая постановка эксперимента ... 291
7.3. ГОМОЯДЕРНАЯ J-РАЗРЕШАЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ... 292
7.3.1. Наклон, проекции и симметризация ... *293*
7.3.2. Применения ... *294*
7.3.3. Практические соображения ... *297*
7.4. «КОСВЕННАЯ» ГОМОЯДЕРНАЯ J-РАЗРЕШАЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ... 297
Литература ... *298*

ГЛАВА 8 ... **300**

КОРРЕЛЯЦИИ ЧЕРЕЗ ПРОСТРАНСТВО: ЯДЕРНЫЙ ЭФФЕКТ ОВЕРХАУЗЕРА ... **300**

8.1. ВВЕДЕНИЕ ... 300

ЧАСТЬ I: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ **302**

8.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯЭО 302
8.3. ЯЭО СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ 302
8.3.1. ЯЭО в двухспиновой системе *303*
Происхождение ЯЭО 303
Спиновая релаксация и дипольное взаимодействие 305
ЯЭО и молекулярное движение 309
ЯЭО и межъядерное расстояние 311
Гетероядерные ЯЭО 311
8.3.2. ЯЭО в многоспиновой системе *312*
Дополнительные пути релаксации 313
Межъядерные расстояния (снова) 314
Косвенные эффекты и спиновая диффузия 316
Перенос насыщения 318
8.3.3. Резюме *319*
8.3.4. Применения *321*
E или Z геометрия 322
Положение ароматического замещения 322
Конфигурация заместителя 323
Отнесение резонансов 324
Эндо или экзо аддукты 325
Конформационная предпочтительность 325
8.4. ПЕРЕХОДНЫЙ ЯЭО 326
8.4.1. Кинетика ЯЭО *327*
8.4.2. Измерение межъядерных расстояний *328*
8.5. ЯЭО ВРАЩАЮЩЕЙСЯ СИСТЕМЫ КООРДИНАТ 329

ЧАСТЬ II: ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ **332**

8.6. ИЗМЕРЕНИЕ ЯЭО СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ: РАЗНОСТНЫЙ ЯЭО 332
8.6.1. Оптимизация разностных экспериментов. *333*
Уменьшение артефактов вычитания 333
Оптимизация предварительного насыщения 334
Селективное насыщение и селективный перенос поляризации (SPT) 335
Перенос насыщения 337
Количественная обработка усилений 338
8.7. ИЗМЕРЕНИЕ ПЕРЕХОДНЫХ ЯЭО: NOESY 339
8.7.1. 2D NOESY последовательность *340*
Осложнения с NOESY 343
Оптимальный выбор времени смешивания 344
Измерение расстояния 345
8.7.2. 1D последовательности NOESY *346*
1D градиентный NOESY 346
Интерпретация переходных ЯЭО 348
8.7.3. Применения *349*
8.7.4. Измерение химического обмена: EXSY *354*
8.8. ИЗМЕРЕНИЕ ЯЭО ВРАЩАЮЩЕЙСЯ СИСТЕМЫ КООРДИНАТ: ROESY 356
8.8.1. 2D ROESY последовательность *356*
Осложнения с ROESY 356
Происхождение кросс-пика 358
Прямой ROE 358
8.8.2. 1D ROESY последовательности *360*
8.8.3. Применения *360*
8.9. ИЗМЕРЕНИЕ ГЕТЕРОЯДЕРНЫХ ЯЭО 363
8.10. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СООБРАЖЕНИЯ 364
ЛИТЕРАТУРА *366*

ГЛАВА 9 ..... **369**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ **369**

9.1. СОСТАВНЫЕ ИМПУЛЬСЫ 369
9.1.1. Несметное число импульсов *372*
9.1.2. Инверсия и рефокусирование *374*
9.2. ШИРОКОПОЛОСНОЕ ДЕКАПЛИРОВАНИЕ И БЛОКИРОВКА СПИНОВ 375
9.2.1. Блокировка спинов *377*
9.2.2. Адиабатические импульсы *377*

9.3. СЕЛЕКТИВНОЕ ВОЗБУЖДЕНИЕ И ФОРМОВАННЫЕ ИМПУЛЬСЫ 378
9.3.1. Формованные мягкие импульсы *379*
Гауссовы импульсы 381
Чисто-фазовые импульсы 382
Осуществление формованных импульсов 384
9.3.2. Последовательности DANTE *385*
9.3.3. Создание возбуждения *386*
9.3.4. Практические соображения *388*
Калибровка амплитуды 389
Калибровка фазы 389
9.4. ПОДАВЛЕНИЕ СИГНАЛА РАСТВОРИТЕЛЯ 390
9.4.1. Предварительное насыщение *392*
9.4.2. Нулевое возбуждение *393*
Скачок-возврат 393
Двучленные последовательности 393
9.4.3. Импульсные градиенты поля *395*
9.5. НЕДАВНИЕ МЕТОДЫ 397
9.5.1. Гетерогенные образцы и вращение под магическим углом (ВМУ) *397*
9.5.2. Спектроскопия упорядоченной диффузии *399*
Спиновое эхо ИПГ 399
Эхо, стимулируемое ИПГ 402
2DDOSY 402
Литература *403*
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ **406**

Глава 1

Введение

С момента первого наблюдения протонного магнитного резонанса в воде [1] и в парафине [2], дисциплина ядерного магнитного резонанса (ЯМР) имеет видимый беспрецедентный рост как аналитический метод и теперь, в многочисленных различных обликах, находит применение в химии, биологии, медицине, науке материалов и геологии. Несмотря на её возникновение в лабораториях физиков, именно в химической лаборатории спектроскопия ЯМР нашла самое большое применение. Чтобы представить диапазон методов, теперь доступных в современной органической лаборатории, включая описанные в этой книге, мы начнём с краткого обзора эволюции спектроскопии ЯМР высокого разрешения (растворов) и некоторых из значительных разработок, которые образуют предмет.

1.1. РАЗВИТИЕ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Прошло немногим более пятидесяти лет с тех пор, как были произведены первые наблюдения ядерного магнитного резонанса и в твёрдом теле, и в жидких образцах, из которых и развивался предмет, чтобы стать основной структурной методикой химика-исследователя. За это время произошло множество ключевых достижений в ЯМР высокого разрешения, которые направляли развитие предмета [3,4] (Таблица 1.1) и, следовательно, работу химиков-органиков и их подходы к доказательству структуры. Конструктивный шаг произошел в начале 1950-ых, когда было осознано, что резонансная частота ядра подвергается воздействию со стороны его химического окружения, и что одно ядро может влиять на резонанс другого через промежуточные химические связи. Хотя эти наблюдения рассматривались физиками-исследователями как неприятные химические осложнения, несколько пионеров-химиков немедленно поняли значение этих химических сдвигов и спин-спиновых взаимодействий в контексте структурной химии. Первый протонный спектр ЯМР высокого разрешения (рис. 1.1) ясно демонстрирует как характеристики спектра ЯМР, в этом случае химические сдвиги,

Рисунок 1.1. Первый опубликованный протонный спектр ЯМР «высокого разрешения», записанный при 30 МГц, показывая протонные химические сдвиги в этаноле (воспроизведено с разрешения из ссылки [5]).

Таблица 1.1. Резюме некоторых ключевых разработок, которые оказали основное влияние на практику и применение спектроскопии ЯМР высокого разрешения в химическом исследовании

Десятилетие	Известные успехи
1940-ые	Первое наблюдение ядерного магнитного резонанса в твёрдых телах и жидкостях (1945).
1950-ые	Развитие измерений химических сдвигов и констант спин-спинового взаимодействия как структурных инструментов.
1960-ые	Применение усреднения сигнала для улучшения чувствительности. Применение импульсного Фурье преобразования (ФП) подходы к ядерному эффекту Оверхаузера, используемому в структурных исследованиях.
1970-ые	Применение сверхпроводящих магнитов и их комбинации с применением ФП. Компьютерное управление экспериментом.
1980-ые	Разработка многоимпульсных и двумерных методов ЯМР. Автоматизация спектроскопии.
1990-ые	Применение методик импульсных градиентов поля для выбора сигнала. Разработка комбинированных аналитических методов, например, ЖХ-ЯМР.
2000 +	Применение сверхпроводниковых датчиков высокой чувствительности. Применение проточного ЯМР («безампульный» ЯМР) в обычном структурном исследовании.

могут прямо связываться с химической структурой, а это то, из чего развивался ЯМР, чтобы достичь того положения, которое он занимает сегодня.

1950-ые также видели множество инструментальных разработок, которые обеспечили химикам даже большее химическое понимание. Они включают применение вращения образца для усреднения до нуля неоднородностей поля, что обеспечило существенное повышение разрешения, таким образом, обнаруживая тонкие расщепления от спин-спинового взаимодействия. Позже спиновое декаплирование смогло обеспечить более определённую информацию, помогая химикам понимать эти взаимодействия. С этими улучшениями стало возможным разработать изощрённые отношения между химической структурой и измеряемыми параметрами, приводя к таким понятиям как зависимость констант вицинального взаимодействия от двугранных углов (теперь хорошо известная зависимость Карплуса). Применение компьютеров в течение 1960-х должно быть также играло главную роль в увеличении влияния ЯМР на химическое сообщество. Практика многократной регистрации одного и того же спектра непрерывного облучения и сложение их при помощи методики CAT (компьютерное усреднение сканирований) привела к существенному улучшению чувствительности и сделала возможным практическое наблюдение меньших количеств образца. С реализацией идеи возбуждения всех спинов одновременно энергией одиночного радиочастотного импульса, собирая отклик временной шкалы и преобразуя его в требуемый спектр частотного измерения процессом, известным как преобразование Фурье (ФП), стало возможным более быстрое усреднение сигнала. Этот подход обеспечивает огромное увеличение в отношении сигнал/шум, и полностью изменил принцип регистрации сигнала ЯМР Середина 1960-ых также ознаменовалась применением ядерного эффекта Оверхаузера к конформационным исследованиям. Хотя он был описан ещё в 1950-ых как средство увеличения чувствительности ядер путём одновременного облучения электронов, эффект Оверхаузера находит широчайшее применение для увеличения чувствительности ядер, или при изучении пространственной близости ядер, и остается одним из наиболее важных инструментов современного ЯМР. К концу 1960-ых появился первый коммерческий спектрометр Фурье преобразования, работающий на частоте 90 МГц для протонов. Последующий большой рост напряжённостей поля обеспе-

чивается введением сверхпроводящих магнитов в течение 1970-ых, которые оказались способны обеспечивать значительно более высокие поля, чем использовавшиеся ранее электромагниты. Они в комбинации с подходом ФП сделали наблюдение ядер С-13 каждодневным, обеспечивая химика-органика ещё одним датчиком молекулярной структуры. Это также проложило путь к обычному наблюдению всего множества ранее недоступных ядер низкого естественного содержания и низкого магнитного момента. Также в начале 1970-ых впервые в лекции высказана идея расширения информации, содержащейся в спектре ЯМР, на два отдельных частотных измерения. Однако по причине приборных ограничений, качество первых двумерных спектров рассматривалось слишком плохим для публикации, и только в середине 1970-ых, с улучшением стабильности приборов и с развитием компьютеров, сделавших возможными необходимые сложные вычисления, разработка 2D методов начинается всерьез. Эти методы вместе с различными многоимпульсными одномерными методами, которые также становились возможными с подходом ФП, не оказывали значительного влияния на более широкое химическое сообщество до 1980-ых, когда их стремительная разработка была подобна взрыву. Этот период дал огромное количество представленных новых импульсных методик, которые способствовали выполнению множества упражнений со спинами и, таким образом, обеспечивали химика даже большими структурными данными, на меньших количествах образца, и за меньшее время. Больше не было нужды полагаться на эмпирические корреляции химических сдвигов и констант взаимодействия со структурными свойствами, а вместо этого стало возможно собирать и относить спиновые взаимодействия (через связи, через пространство или химический обмен) и использовать их для определения структуры надежнее и быстрее. Эволюция новых импульсных методов продолжалась на протяжении 1990-ых вместе с появлением принципиально другого пути извлечения из молекулярных систем желательной информации. Эксперименты отбора импульсным градиентом поля теперь стали обычными структурными инструментами, обеспечивая спектры лучшего качества, часто за более короткое время, чем было возможно ранее. Они получили широкое применение после совсем недавнего крупного теоретического достижения (их использование для выбора сигнала впервые было продемонстрировано в 1980) и опять же в результате прогрессивных технологических разработок, позволяющих преодолеть практические трудности. Точно так же недавнее появление комбинированных аналитических методов, таких как жидкостная хроматография и ЯМР (ЖХ-ЯМР), которые появились после преодоления экспериментальных сложностей соединения этих совершенно разных методов, и эти методы практически оказались популярными, например, в фармацевтической промышленности.

С началом нового столетия остаётся наблюдать, какие появятся новые разработки, и какое влияние они окажут на структурную органическую химию и деятельность научно-исследовательской лаборатории. Уже доступны новые типы «экранированных» сверхпроводящих магнитов, которые имеют значительно меньшие «поля рассеяния» и, следовательно, требуют меньшего пространства в лаборатории. Достижения в области высокотемпературных сверхпроводящих материалов могут привести к ещё меньшим и более экономичным магнитам, охлаждаемым жидким азотом, и, возможно, ко всё более высоким напряжённостям поля. Могут ли эти достижения вместе с продолжающейся миниатюризацией всего электронного оборудования означать, что настольные высокопольные приборы высокого разрешения станут обычными в будущем? Применение сверхпроводящих материалов в катушках детектирования датчика уже обеспечивает существенные улучшения чувствительности прибора, и, хотя такие датчики теперь становятся коммерчески доступными, остаётся посмотреть станут ли они неотъемлемой частью обычных спектрометров. Появление «безампульного» ЯМР в применениях высокой производительности - также появляющийся метод, использующий технологию инъекции потока, и может таким образом привести к отсутствию необходимости ампул для ЯМР в обычных структурных исследованиях после их использования в течение почти половины столетия. Несомненно, все

разработки будут сопровождаться прогрессом в вычислительной технике и большей гибкостью и возможностями для обращения с данными, которые он обеспечивает.

Современная спектроскопия ЯМР - теперь высоко развитый и технологически развитый предмет. При таком прогрессе в методологии ЯМР за последние годы для химика-исследователя и даже посвященного спектроскописта трудно оценить то, что может предложить современный ЯМР.

Эта книга служит цели помочь в этой задаче, представляя более широкой аудитории основные современные методы ЯМР.

1.2. СОВРЕМЕННЫЙ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ И ЭТА КНИГА

Мало кто сомневается, что спектроскопия ЯМР теперь представляет наиболее разностороннюю и информативную спектроскопическую методику, используемую в современной химической научно-исследовательской лаборатории, и что спектрометр ЯМР представляет одно из самых больших единовременных капиталовложений в аналитическую аппаратуру лаборатории. По обеим этим причинам важно, чтобы химик-исследователь мог наилучшим образом использовать доступный спектрометр и применять современные достижения спектроскопии ЯМР для продвижения их химических или биохимических исследований. Даже базовый (минимально оснащённый) современный спектрометр оборудуется для выполнения несметного числа импульсных методик способных снабжать химика множеством данных о молекулярной структуре и её динамике. Эти методы не всегда находят путь в руки практикующего химика, оставаясь вместо этого в специальной сфере скрытыми за непонятными сокращениями или незнакомым жаргоном ЯМР. Ясно, что так не должно быть, и цель этой книги собрать самые полезные из этих современных методов ЯМР и представить их более широкой аудитории, которая должна, в конце концов, извлечь максимальную пользу от их применения.

На протяжении всей книги применяется нематематический подход, который везде, где возможно, твердо основывается на использовании иллюстративных описаний явлений ЯМР и методов. В подготовке этой работы я попытался руководствоваться своей интуицией, чтобы удовлетворять требованиям трёх основных классов потенциальных читателей:

- те, кто использует ЯМР растворов как инструмент в их собственном исследовании, но имеют мало или не имеют совсем прямого взаимодействия со спектрометром,
- те, кто прошли обучение для непосредственного использования спектрометра, чтобы получать их собственные данные, но не имеют непосредственного отношения к содержанию и обслуживанию прибора, и
- те, кто использует спектрометры и номинально ответственны за ежедневное содержание прибора (хотя они не могут рассматриваться как профессиональные ЯМР спектроскописты).

Первыми из них могут оказаться химики-исследователи и студенты в академической или промышленной среде, кому нужно знать какие из современных методов доступны и могут помочь им в их усилиях, но не чувствуют потребности знать принципы работы спектрометра. Их данные, вероятно, должны собираться в полностью автоматизированных условиях, или обеспечиваться центральной аналитической службой. Вторыми могут быть химики в академической среде, которые имеют практический доступ к спектрометру и имеют его или её собственные образцы, требующие специфических исследований, которые возможно недоступны для полностью автоматизированной аппаратуры. Третий класс читателей может работать в малой химической компании или академическом отделе химии, который вложил капитал в аппаратуру ЯМР, но не использует профессиональных ЯМР спектроскопистов для его содержания, используя для этого, скажем, химика-аналитика или химика-синтетика. Это, часто имеет место (по крайней мере, в Великобритании) для новых начинающих химических компа-

ний. Для них эта книга содержит достаточное практическое руководство и по выполнению ЯМР экспериментов, и по работе и содержанию современного спектрометра. Даже если Вы относите себя к первой из перечисленных категорий, некоторые элементарные понятия о том, как спектрометр собирает интересующие данные и как последовательность производит, скажем, 2D корреляционный спектр, ожидающий анализа на вашем столе, могут быть чрезвычайно полезными для правильного извлечения информации, которую он содержит, или для идентификации и удаления артефактов, которые могут возникнуть от несовершенств аппаратуры или применения менее оптимальных условий для Вашего образца. Хотя книга явно не нацелена на просвещенных спектроскопистов, она ещё может содержать новую информацию или может служить как напоминание того, что до недавнего времени было понятно, но забылось. Текст пригоден для (британских) курсов повышения квалификации по спектроскопии ЯМР, а отдельные разделы книги могут также подходить для применения в продвинутых студенческих курсах. Книга, однако, не содержит описания основных явлений ЯМР, таких как химические сдвиги и константы взаимодействия, так же как она не содержит и обширных обсуждений по вопросам их корреляции с химическими структурами. Эти темы уже хорошо описаны в различных вводных текстах [6-9] и предполагается, что читатель уже знаком с этими вопросами.

Основное внимание уделяется методам спектроскопии высокого разрешения (жидких образцов, растворов), преимущественно тех, которые используются во всей органической химии как подходящих для этого ряда, хотя расширения рассуждений для неорганических систем должны быть простыми, полагаясь на те же самые принципы и подобную логику. Аналогично, большее внимание уделяется молекулам малого и среднего размеров (с массами, скажем, до нескольких тысяч), так как большинство исследований в органической химии выполняется для подобных систем. Нельзя утверждать, что описываемые методы неприменимы к макромолекулярным системам, поэтому приводятся соответсвующие соображения, когда они заслуживают специальных комментариев. Биологические макромолекулы здесь, однако, не рассматриваются, но обсуждаются во множестве специализированных работ [10-12].

1.2.1. Что содержит эта книга

Цель этой книги состоит в том, чтобы представить наиболее важные методы ЯМР, используемые для установления органической структуры, объяснить информацию, которую они обеспечивают, как они действуют, и обеспечить некоторое руководство по их практическому применению. Выбор экспериментов, естественно, субъективный, частично основанный на личном опыте, но также принимает во внимание те методы, которые чаще всего встречаются в химической литературе и те, которые признаны в сообществе ЯМР как наиболее информативные и наиболее широко применяемые. Действие многих из них описывается, используя иллюстрированные модели (уравнения появляются нечасто, и используются только тогда, когда они служат специальной цели), так что химик может получать некоторое понимание используемых методов без обращения к непривлекательным математическим описаниям. Огромное число доступных методов ЯМР может создать впечатление трудноразрешимой задачи, но в действительности большинство экспериментов составляются из меньшего числа постижимых строительных блоков, сложенных вместе, и как только вы ими овладели, оценка более сложных последовательностей становится гораздо менее пугающей задачей. Для тех читателей, которые желают проследить конкретную тему более подробно, даются первоначальные ссылки, но в противном случае все описания самодостаточны.

После этого вводного раздела, глава 2 вводит основную модель, использованную на протяжении всей этой книги для описания методов ЯМР, и описывает, как она обеспечивает простую картину поведения химических сдвигов и спин-спиновых взаимодействий в течение импульсных экспериментов. После этого модель используется для визуализации релаксации ядерного спина, фактора центральной важности для оптимального выполнения всех ЯМР экспериментов (действительно, кажется, ран-

ние попытки наблюдать ЯМР наиболее вероятно терпели неудачу по причине недостаточного понимания в то время релаксационного поведения выбираемых образцов!). Методы для измерения скорости релаксации также обеспечивают простое введение в многоимпульсные последовательности ЯМР. Глава 3 описывает практические аспекты выполнения спектроскопии ЯМР. Эта глава для обращения к ней, когда необходимо, и по существу состоит из отдельных разделов, касающихся принципов действия спектрометра и обращения с данными ЯМР, как правильно приготовить образец и спектрометр перед попыткой экспериментов, как калибровать прибор и как контролировать и измерять его эффективность, если у вас такие обязанности. Ясно, невозможно описать все аспекты экспериментальной спектроскопии в одной главе, но эта (вместе с некоторыми описаниями в главе 9) должна содержать достаточную информацию, чтобы позволить выполнение наиболее современных экспериментов. Эти описания поддерживаются общепринятым языком, и в них я преднамеренно попытался избегать применения диалекта, специфического для конкретного изготовителя приборов. Глава 4 содержит наиболее широко используемые одномерные методы, простирающиеся от оптимизации одноимпульсного эксперимента, до редактирования мультиплетности гетероядерных спектров и концепции переноса поляризации, другой центральной особенности импульсных методов ЯМР Она включает в себя универсально используемые методы для редактирования углеродных спектров согласно числу присоединённых протонов. Также рассматриваются специфические требования для наблюдения некоторых квадрупольных ядер, которые обладают чрезвычайно широкими резонансами. Введение двумерных методов представляется в главе 5 определенно в контексте определения гомоядерных корреляций. Конечно, 2D концепция вводится имея в виду реально полезный эксперимент, хотя также становится очевидным, что общие используемые принципы одинаковые для любого двумерного эксперимента. После этого представляется множество корреляционных методов для идентификации скалярного (J) взаимодействия между гомоядерными спинами, которые главным образом подразумевают протоны. В эти описания включено введение в действие и применение импульсных градиентов поля, самой последней революции в спектроскопии ЯМР, снова с целью представления их со специфичным приложением в уме так, что их использование не кажется оторванным от реальности. И опять, цель этих обсуждений показать, что привлеченные принципы достаточно общие, и могут применяться к множеству экспериментов, а больше всего выигрывают от градиентной методологии гетероядерные корреляционные методы главы 6. Эти корреляции используются для построения карты связывающих взаимодействий обычно между протонами и гетероатомами либо через одну, либо через несколько связей. В этой главе наибольшее внимание уделяется современным корреляционным методам, основанным на возбуждении и детектировании протонов, и на так называемой «инверсной» спектроскопии. Они обеспечивают существенный выигрыш в чувствительности над традиционными методами, которые используют детектирование менее чувствительного гетероатома, которые, однако, требуют описания, по причине специфических преимуществ, которые они обеспечивают для некоторых молекул. Глава 7 рассматривает методы для разделения химических сдвигов и констант взаимодействия в спектрах, которые снова основываются на двумерных методах. Глава 8 отстраняется от взаимодействия через связи и переключается на взаимодействия через пространство в форме ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Принципы ЯЭО представляются первоначально для простой двух-спиновой системы, а затем для более реальных многоспиновых систем. Описывается практическая реализация и 1D и 2D экспериментов ЯЭО, включая недавно разработанные 1D методы ЯЭО импульсных полевых градиентов. Также здесь описываются методы ЯЭО вращающейся системы координат, так как они неизбежно приобретут когда-то большую важность в мире органического ЯМР с продолжением роста интереса к большим молекулам в таких областях, как комплексы хозяин-гость, олигомерные структуры и так далее. Заключительная глава рассматривает дополнительные экспериментальные методы, которые, сами по себе, не составляют законченных ЯМР экспериментов, но являются инструментами, которыми строятся современные мето-

ды. Они обычно используются как элементы в пределах описанных последовательностей в предшествующих главах и включают такие темы как широкополосное декаплирование, селективное возбуждение специфических областей спектра и подавление сигнала растворителя. Наконец, глава заканчивается кратким обзором некоторых недавно разработанных методов, включая разделение спектров растворяемых веществ, основанных на их диффузных свойствах и прямом анализе высокого разрешения материалов, присоединённых к смолам твердого состояния. В конце книги находится глоссарий некоторых сокращений, которые составляют язык современного ЯМР, и, об этом можно спорить, призваны, чтобы характеризовать предмет. Нравятся они вам или нет, ясно, что они должны присутствовать здесь и, хотя они обеспечивают хорошую основу при разговоре об импульсных экспериментах для сведующих, они могут также служить для запутывания непосвещенных и изумлять их этим жаргоном ЯМР. Глоссарий обеспечивает непосредственное объяснение сокращений вместе с указанием его местоположения в книге.

1.2.2. Номенклатура импульсных последовательностей

Фактически все ЯМР эксперименты могут описываться в выражениях импульсной последовательности, которая, в соответствии с названием, предлагает обозначение, которое описывает ряд радиочастотных импульсов, или импульсов полевого градиента, используемых для манипуляции ядерными спинами, и, таким образом, кроят эксперимент, чтобы обеспечить желательную информацию. По прошествии лет развивался в значительной степени стандартный (хотя не полностью) иллюстративный формат для представления этих последовательностей путём, подобным тому, который используется для нотной записи, чтобы кодировать симфонию[1]. Поскольку они неоднократно используются по всему тексту, форма и условности, используемые в этой книге, заслуживают объяснения. Здесь даются только определения различных иллюстративных компонентов последовательности, а их физическое значение в эксперименте ЯМР станет очевидным в более поздних главах.

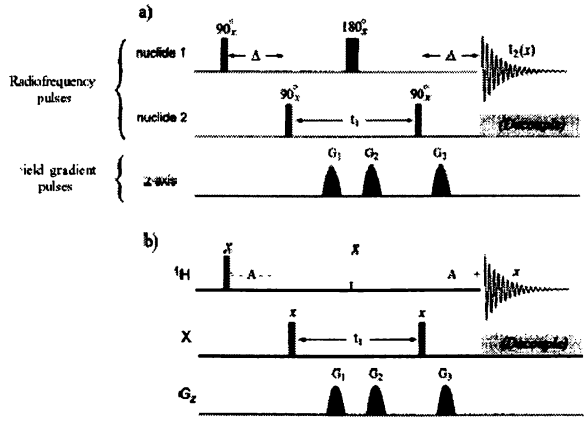


Рисунок 1.2. Номенклатура импульсной последовательности, (a) полная импульсная последовательность и (b) сокращённое представление, используемое во всей остальной части книги.

Пример достаточно сложной последовательности показан на рисунке 1.2 (эксперимент гетероядерной корреляции из главы 6) и иллюстрирует большинство важных моментов. Рис. 1.2a представляет более подробное рассмотрение последовательности, в то время как рис. 1.2b - сокращённый

[1] * Действительно, также как профессиональный музыкант может читать нотную запись и «слышать» симфонию в его голове, опытный спектроскопист часто может читать импульсную последовательность и представлять общую форму образующегося спектра

эквивалент, используемый во всей книге по причинам ясности. Радиочастотные (РЧ) импульсы, применённые к каждому нуклиду, вовлеченному в эксперимент, представляются отдельными рядами, бегущими слева направо в порядке, в котором они применяются. Большинство экспериментов в настоящее время включает протоны, и часто один (а иногда два) дополнительных нуклида. В органической химии это естественно наиболее часто углерод, но может быть и любое другое, так называемое X-ядро. Это наиболее часто применяемые РЧ импульсы, так называемые *90°* или *180°* импульсы (значение которых детализируется в следующей главе), которые показываются тонкими черными и толстыми серыми полосами, соответственно.

Импульсы других углов отмечаются подходящим греческим символом, который описывается в сопровождающем тексте. Все РЧ импульсы также имеют связанную с ними конкретную фазу, указываемую как *x, y,-x* или *-y* над каждым импульсом. Импульсы, которые действуют только на немногие резонансы, так называемые *селективные* или *формованные импульсы*, отличаются закруглёнными, а не прямоугольными полосами, поскольку это отражает способ, которым эти импульсы применяются экспериментально. Сегменты, которые используют длинный ряд очень многих близко расположенных импульсов, такие, как декаплирование, показаны на рисунке 1.2, как сплошное серое окно, со скобкой, указывающей, что применение декаплирующей последовательности необязательно. Ниже ряда радиочастотных импульсов показываются импульсы полевого градиента (G_Z), всякий раз, когда они используются, снова изображаемые как формованные импульсы.

Действие очень многих ЯМР экспериментов кардинально зависит от настройки эксперимента на значения специфических констант взаимодействия. Это достигается путём определения некоторых задержек в последовательности, согласно этим значениям, показывая эти задержки общим символом Δ. Другие периоды времени в последовательности, которые не настраиваются на J-значения, но выбираются согласно другим критериям, таким как скорость восстановления спинов (релаксация), обозначаются символом τ. Символы t_1 и t_2 резервируются для периодов времени, которые, в конечном счете, соответствуют частотным осям f_1 и f_2 *двумерных спектров*, одна из которых (t_2) всегда будет соответствовать периоду регистрации данных, когда действительно детектируется отклик ЯМР. Период регистрации во всех экспериментах показывается простой затухающей синусной волной, чтобы показать так называемый спад свободной индукции или ССИ. Снова следует подчеркнуть, что, хотя эти последовательности могут иметь довольно тревожащий вид, они обычно создаются из значительно меньших и более простых сегментов, которые имеют хорошо определённые и легко понятые действия. Небольшая настойчивость может разъяснять то, что могло бы сначала показаться полной загадкой.

1.3. ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЯМР

Огромный рост доступных импульсных методов ЯМР за последние два десятилетия может удивить и может вызвать недоумение, с чего начать, или как лучше всего применять эти новые разработки. Ответ на это не простой, так как это зависит от количества химических трансформаций, от природы обрабатываемой молекулы и от требуемой информации. Он также зависит от количества материала и доступной аппаратуры и её возможностей. Факт, что сам ЯМР находит применение в стольких многих областях исследований, означает, что определённые правила для выбора эксперимента в значительной степени невозможно объяснить. Схема, которая подходит для разрешения одного типа проблем, может быть полностью непригодной для другого. Однако кажется неправильным, что книга такого направления не должна содержать никакого руководства по выбору эксперимента, кроме описания методов в последующих главах. Здесь я попытаюсь поднять вопрос об этой теме в довольно общих выражениях и представить некоторые вольные рекомендации, чтобы помочь прокладывать путь через лабиринт доступных методов. Даже в этом случае только при правильном понимании совре-

менных методов можно правильно выбрать оптимальную экспериментальную стратегию для *вашей* молекулы или системы, и это понимание я надеюсь развить в остальных главах.

Большинство исследований ЯМР будет начинаться с анализа протонного спектра интересующего образца с обычным анализом химических сдвигов, констант взаимодействия и относительных интенсивностей сигналов или вручную, или с помощью различных изощрённых машинных баз данных корреляции спектр-структура, теперь доступных. Кроме того, обычно сталкиваются с необходимостью выбора из множества доступных для использования методов ЯМР. Ключ к выбору подходящих экспериментов для решаемой проблемы - осознание типа информации, которую могут обеспечить основные методы ЯМР. Хотя существует огромное число импульсных последовательностей, имеется относительно малое количество того, что может называться сердцевиной экспериментов, из которых большинство других получаются минорным изменением, и из которых только довольно малая часть находит когда-либо широкое использование в научно-исследовательской лаборатории. Для начала, вероятно, полезно понять, что фактически все методы ЯМР используют только три основных явления:

1. Взаимодействия через связи: скалярное (J) взаимодействие через связывающие электроны.
2. Взаимодействия через пространство: ядерный эффект Оверхаузера, осуществляющийся через дипольное взаимодействие и спиновую релаксацию.
3. Химический обмен: физический обмен местами одного спина с другим в определённом местоположении.

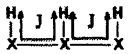
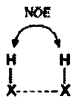
При попытке анализировать структуру молекулы и/или её поведение в растворе спектроскопией ЯМР, нужно, следовательно, рассмотреть, как использовать эти явления, чтобы получить желательную информацию, и из этого выбрать подходящую методику. Таким образом, при воссоздании структуры молекулы обычно ищут доказательства скалярного взаимодействия между ядрами, поскольку это может использоваться для указания местоположения химических связей. Когда установлено относительное местоположение всех связей в молекуле, определяется общая структура молекулы. Пространственная близость между ядрами, и между протонами в частности, может использоваться, чтобы определять стереохимические отношения в молекуле и таким образом решать вопросы конфигурации и конформации. Уникальная особенность спектроскопии ЯМР и основная причина для её превосходства над любой другой методикой для растворов при доказательстве структуры, - её способность определять взаимосвязи между *специфическими ядрами* в молекуле или даже между молекулами. Такие изящные подробности обычно получаются корреляцией одного ядра с другим, используя вышеупомянутые явления. Несмотря на огромную мощь ЯМР, фактически только несколько типов корреляций доступны для использования химиками при структурном и конформационном анализе.

Основные спиновые взаимодействия и главные используемые для их выявления методы, которые часто двумерные, суммируются в таблице 1.2, и далее развиваются в последующих главах.

Гомоядерный корреляционный эксперимент COSY идентифицирует те ядра, которые разделяют J-взаимодействие, которые для протонов действуют через две, три, и, менее часто, через четыре связи. Эта информация может, следовательно, использоваться, чтобы показывать присутствие пути связанности. Корреляция протонов, которые существуют в одной и той же сети связанностей или цепи спинов, но сама не разделяет J-взаимодействие, может делаться при помощи эксперимента TOCSY. Он может использоваться для идентификации группы ядер, которые находятся в той же самой изолированной спиновой системе, такой как аминокислотный остаток пептида или сахарного кольца олигосахарида. Гетероядерные через одну связь корреляционные методы (HMQC или HSQC) идентифицируют гетероатомы, к которым прямо присоединяются протоны, и могут, например, обеспечивать углеродные отнесения из ранее установленных протонных отнесений. Протонные химические сдвиги могут также распределяться согласно сдвигу присоединённого гетероатома, таким образом помогая отнесению самого протонного спектра. Дальние гетероядерные корреляции через две или три связи

(HMBC) обеспечивают богатство информации о скелете молекулы и могут использоваться для определения местоположения связей углерод-углерод или углерод-гетероатом. Эти корреляции могут быть особенно ценными, когда отсутствуют протон-протонные корреляции. Эксперимент INADEQUATE идентифицирует связанность между подобными ядрами низкого естественного содержания, для которых он предпочтительнее, чем COSY. Он может, следовательно, коррелировать прямо связанные углеродные центры, но так как он связан с присутствием соседних ядер углерод-13, он страдает от ужасающе низкой чувствительности и поэтому мало применяется. Современные варианты, которые используют протонное детектирование, очень улучшили эффективность, но ещё вероятно мало используются, чем гетероядерные корреляционные методы. Измерения, основанные на ядерном эффекте Оверхаузера (ЯЭО), наиболее часто применяются после определения общей структуры и установления отнесений ЯМР.

Таблица 1.2. Основные корреляции, устанавливаемые методами ЯМР

Корреляция	Основные методики	Комментарии	Глава
	^{1}H-^{1}H COSY	Протонное J-взаимодействие через 2 или 3 связи	5
	^{1}H-^{1}H TOCSY	Ретрансляционное протонное J-взаимодействие в связанной спиновой системе. Удалённые протоны могут коррелировать, образуя непрерывную сеть взаимодействия между ними.	5
	^{1}H-X HMQC ^{1}H-X HSQC	Гетероядерное взаимодействие через одну связь при наблюдении протонов	6
	^{1}H-X HMBC	Дальнее гетероядерное взаимодействие при протонном наблюдении. Обычно через 2-3 связи при X=^{13}C	6
	X-X COSY X-X INADEQUATE	COSY используется только тогда, когда естественное содержание X-спина >20% Проблема чувствительности, когда X имеет низкое естественное содержание	5
	^{1}H-^{1}H разностный ЯЭО 1D/2D NOESY 1D/2D ROESY	Корреляции через пространство. ROESY – наиболее применим для молекул среднего размера с массами 1-2 кДа	8
	1H-X разностный ЯЭО 2D HOESY	Чувствительность ограничена наблюдением X-спинов. Следует учитывать специфику ЯЭО при декаплировании протонов	8
	1D насыщение или перенос инверсии 2D EXSY	Обмен спинов при химически удалённых положениях. Обмен должен быть медленным во временной шкале ЯМР для наблюдения отдельных резонансов. При промежуточном и быстром обмене требуется анализ формы линии.	8

Коррелирующие спины показаны жирным шрифтом для каждой корреляции с X, указывающим любое ядро спина ½. Сокращения объясняются в глоссарии.

Они определяют 3D стереохимию, молекулы так как этот эффект устанавливает соответствие пространственной близости между ядрами. Огромное большинство таких экспериментов исследует протон-протонный ЯЭО, хотя в исключительных случаях успешно применялись гетероядерные ЯЭО, включающие протон и гетероатом. Последняя группа экспериментов коррелирует ядра, вовлечённые в процессы химического обмена медленные на временной шкале ЯМР, которые вызывают отдельные резонансы для каждого обменивающегося ядра или центра.

Самое большое применение ЯМР в химической научно-исследовательской лаборатории находится в обычной характеризации исходных материалов, интермедиатов синтеза и его конечных продуктов. В этих обстоятельствах часто не требуется полного *доказательства структуры*, достаточно *подтверждения* структуры, так как известные синтетические реагенты естественно ограничивают вероятные образующиеся продукты, и таким образом обычно достигается желательная цель синтеза. Обычный анализ такого плана обычно следует общей процедуре, подобной той, которая приведена в таблице 1.3, который дополняется данными других аналитических методов, чаще всего масс-спектрометрии и инфракрасной спектроскопии. На этот общий протокол за последнее десятилетие повлияло множество разработок, которые могут теперь, вероятно, таким образом характеризовать современную методологию ЯМР:

- *косвенное* наблюдение гетероядер через протонное детектирование.
- *обычное* ежедневное применение 2D методов.
- применение импульсных градиентов поля для чистого выбора сигнала.
- более широкое применение изощрённых процедур обработки данных, которые увеличивают информационное содержание или качество спектров.

Таблица 1.3. Типичный протокол для обычного подтверждения структуры синтетических органических материалов

Процедура	Метод	Информация
^{1}H 1D спектр	1D	Информация, извлекаемая из химических сдвигов, констант спин-спинового взаимодействия и интегральных интенсивностей.
2D ^{1}H-^{1}H корреляция	COSY	Идентификация спин-спиновых взаимодействий между протонами
1D 13C с редактированием спектров	1D, DEPT или APT	Количество углеродных атомов и определение мультиплетности (C, CH, CH_2, CH_3). Последнего часто можно избежать, выполняя протон-детектируемые гетероядерные 2D эксперименты
1D гетероядерные спектры, например, 31P, 19F и т.д.	1D	Химические сдвиги и гомо-/гетероядерные константы спин-спинового взаимодействия
2D ^{1}H-^{13}C дальняя корреляция	HMBC	Идентификация корреляций через две и три связи. Устанавливаются корреляции и через гетероатомы, напр. N, O. Фрагменты структуры складываются вместе.
ЯЭО (NOE) корреляции через пространство	1D и 2D ЯЭО (NOE)	Конфигурационный и конформационный стереохимический анализ

Не все эти шаги могут быть необходимы, а прямое наблюдение такого гетероядра, как углерод или азот, часто может заменяться его косвенным наблюдением через более чувствительные протон-детектируемые гетероядерные методы корреляции сдвига.

Первый пункт в этом списке возникает из почти универсального принятия методов, основанных на наблюдении протонов, всякий раз, когда возможно. Это принципиально помогает преодолевать ограничения относительно низкой чувствительности, связанной с наблюдениями ЯМР, и в результате обеспечивают данные при относительно меньших количествах образца и/или обеспечивают получе-

ние данных за более короткие времена. Это соображение часто повторяется в этой книге. Вторая существенная особенность - увеличение применения диапазона 2D методов для обычной характеристики структур с ростом вычислительной мощности и увеличением ёмкости памяти данных, которые позволяют теперь использовать их столь же широко, как и 1D наблюдение. Третья проблема - разработка импульсных градиентов поля и огромное влияние, которое они оказывают на практическую реализацию современных методов, - ещё одна повторяющаяся тема этой книги. Эти моменты можно иллюстрировать, рассматривая роль обычных 1D углерод-13 спектров в современной лаборатории ЯМР. Традиционно углеродный спектр используется как обычный инструмент, дополняется методами редактирования спектра, которые указывают мультиплетности каждого углеродного центра, то есть, идентифицируют его как принадлежащий к четвертичному атому, метиновой, метиленовой или метильной группе. Самая большая проблема в любом углерод-13 детектированном эксперименте - присущая ему низкая чувствительность. В настоящее время несколько 2D протон-детектируемых ^{1}H-^{13}C экспериментов корреляции сдвига требуют значительно меньшего количества времени, чем 1D углеродный спектр того же самого образца, особенно с методикой селектирования градиентом, и обеспечивают и углеродные данные сдвига (протонированных центров) и корреляционную информацию. Это гораздо более мощный инструмент для обычного подтверждения структуры, чем один 1D углеродный эксперимент. Кроме того, редактирование может вводиться в 2D эксперимент, чтобы различать метиновые корреляции от метиленовых, например, обеспечивая даже большее количество данных в одиночном эксперименте за меньшее время. Даже большая польза может получаться при косвенном наблюдении гетероядер ещё более низкой чувствительности, например азот-15, и при рассмотрении наблюдения нуклидов низкой распространённости разумно сначала рассмотреть применение для этого протон-детектирующего метода.

Даже имея дело с неизвестными материалами или с молекулами высокой структурной сложности, схема Таблицы 1.3 всё же представляет пригодную программу действий. В таких случаях, основные эксперименты этой таблицы ещё, вероятно, должны использоваться, но могут требовать сбора данных при множестве экспериментальных условий (растворитель, температура, pH и т.д.) и/или могут потребовать дополнительной поддержки других методов или расширенных версий этих методов, прежде чем получится полная картина. Следующие главы нацелены на объяснение первичных методов ЯМР и некоторых из их более полезных вариантов и описывают их практическую реализацию, так что химик-исследователь может понять полный потенциал, который предлагает современная спектроскопия ЯМР.

Литература

[1] F. Bloch, W.W. Hansen and M.E. Packard, ***Phys. Rev.,*** 1946, 69, 127.

[2] E.M. Purcell, H.C. Torrey and R.V. Pound, ***Phys. Rev.,*** 1946, 69, 37-38.

[3] J.W. Emsley and J. Feeney, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.,*** 1995, 28, 1-9.

[4] J.N. Shoolery, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.,*** 1995,28, 37-52.

[5] J.T. Arnold, S.S. Dharmatti and M.E. Packard, ***.J. Chem. Phys.,*** 1951, 19, 507.

[6] L.M. Harwood and T.D.W. Claridge, ***Introduction to Organic Spectroscopy***, Oxford University Press, Oxford, 1997.

[7] H. Gunther, ***NMR Spectroscopy***, 2nd edn., Wiley, Chichester, 1995.

[8] H. Friebolin, ***Basic One- and Two-dimensional NMR Spectroscopy***, 3rd edn., VCH Publishers, Weinheim, 1998.

[9] R. Abraham, J. Fisher and P. Loftus, ***Introduction to NMR Spectroscopy***, Wiley, Chichester, 1988.

[10] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer and N.J. Skelton, ***Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice***, Academic Press, San Diego, 1996.

[11] J.N.S. Evans, ***Biomolecular NMR Spectroscopy***, Oxford University Press, Oxford, 1995.

[12] H.J. Dyson and P.E. Wright, in: ***Two-dimensional NMR Spectroscopy; Applications for Chemists and Biochemists***, eds. W.R. Croasmun and R.M.K. Carlson, VCH Publishers, New York, 1994.

Глава 2

Введение в ЯМР высокого разрешения

Для любого желающего улучшить понимание современных методов ЯМР вместе с оценкой информации, которую они могут обеспечить и, следовательно, их потенциальных применений, необходимо выработать понимание некоторых элементарных принципов. Они, если хотите, обеспечивают основу, на которую опираются описания в последующих главах, и многие из фундаментальных тем, представленных в этой вводной главе, будут упоминаться во всём остальном тексте. Придерживаясь стиля книги, все концепции представляются в иллюстрированной манере и избегают подробных математических описаний ЯМР. После напоминания явления ядерного спина вводится векторная модель ЯМР Блоха. Это представляет удобную и постижимую картину того, как спины ведут себя в эксперименте ЯМР, и обеспечивает основной инструмент, которым будет описываться большинство экспериментов.

2.1. ЯДЕРНЫЙ СПИН И РЕЗОНАНС

Ядра всех атомов могут характеризоваться квантовым числом ядерного спина I, которое может иметь значение больше нуля или равное нулю, и, которое принимает значения кратные 1/2. Те ядра, для которых I=0 не обладают ядерным спином и, следовательно, не могут проявлять ядерного магнитного резонанса, так называемые «ЯМР пассивные». К сожалению, с точки зрения химиков-органиков ядро, вероятно представляющее наибольший интерес – углерод-12, имеет нулевой спин, так же, как и все ядра с чётными и массой, и атомным номером. Однако огромное большинство химических элементов имеет по крайней мере, один изотоп, который обладает ядерным спином, и который, в принципе по крайней мере, может наблюдаться методом ЯМР (Таблица 2.1) и, как утешение, протон - высокораспространённый ЯМР-активный изотоп. Свойство ядерного спина фундаментально для явления ЯМР. Вращающиеся ядра обладают угловым моментом P и, конечно, зарядом, и движение этого заряда вызывает связанный с ним магнитный момент, μ, (рис. 2.1) так что:

$$\mu = \gamma P \qquad (2.1)$$

где выражение γ - *гиромагнитное отношение*[2], которое постоянно для любого данного ядра и может рассматриваться как мера того, насколько оно магнитное. И угловой момент, и магнитный момент - величины векторные, то есть они имеют и модуль, и направление. Попадая во внешнее постоянное магнитное поле (обозначенное B_0, строго - плотность магнитного потока) микроскопические магнитные моменты выстраиваются относительно поля в дискретное число ориентаций по причине квантования вовлеченных энергетических состояний.

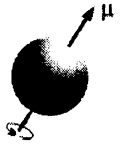


Рисунок 2.1. Ядро несет заряд и при вращении обладает магнитным моментом, μ.

[2] Термин гиромагнитное отношение также широко используется для γ, хотя это не соответствует рекомендациям IUPAC [1].

Таблица 2.1. Свойства некоторых ядер спина 1/2

Изотоп	Природное содержание, %	Частота ЯМР, МГц	Относительная чувствительность
^{1}H	99,98	400	1,0
^{3}H	0	426,7	1,2*
^{13}C	1,11	100,6	$1,76x10^{-4}$
^{15}N	0,37	48,5	$3,85x10^{-6}$
^{19}F	100	316,3	0,83
^{29}Si	4,1	79,5	$3,69x10^{-4}$
^{31}P	100	161,9	$6,63x10^{-2}$
^{77}Se	7,58	16,3	$5,25x10^{-4}$
^{103}Rh	100	12,6	$3,11x10^{-5}$
^{113}Cd	12,16	88,7	$1,33x10^{-3}$
^{119}Sn	8,58	149,1	$4,44x10^{-3}$
^{183}W	14,40	16,6	$1,03x10^{-5}$
^{195}Pt	33,80	86,0	$3,36x10^{-3}$
^{207}Pb	22,60	83,7	$2,07x10^{-3}$

Частоты приведены для спектрометров 400 МГц (напряжённость поля 9,4 Т), чувствительности даются относительно наблюдения протонов и учитывают как собственную чувствительность ядра, так и его естественное содержание.

Свойства квадрупольных ядер приведены ниже в таблице 2.3.

* В предположении 100 % ^{3}H мечения.

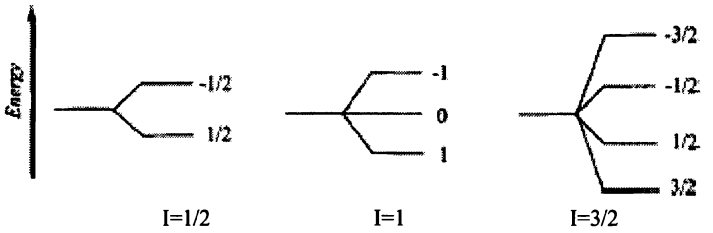


Рисунок 2.2. Ядра с магнитным квантовым числом I могут принимать 2I + 1 возможных ориентаций относительно приложенного постоянного магнитного поля B_0. Для ядра спина -1/2, это дает знакомую картину ядра, ведущего себя как микроскопический стержневой магнит, имеющий две возможные ориентации, α и β.

Для спина магнитного квантового числа I существуют 2I+1 возможных спиновых состояний. Так для ядер спина ½, таких как протон, имеются 2 возможных состояния, обозначаемых +1/2 и -1/2, в то время как для I = 1, например для дейтерия, возможны состояния +1, 0 и -1 (рис. 2.2) и так далее. Для ядра полуцелого спина, два состояния соответствуют популярной картине ядра, принимающего две возможных ориентации относительно постоянного поля, или параллельную (альфа-состояние) или антипараллельную (β-состояние), первое имеет более низкую энергию. Действие постоянного поля на магнитный момент может описываться в выражениях классической механики полем, придающим вращательное движение моменту, который в результате описывает круговой путь вокруг приложенного поля (рис. 2.3). Это движение упоминается в этом контексте, как прецессия, или более определенно, *прецессия Лармора*.

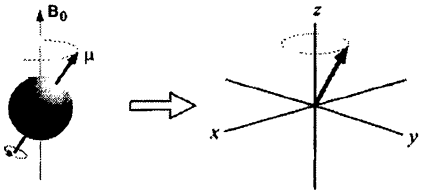


Рисунок 2.3. Постоянное магнитное поле, приложенное к ядру, вынуждает его прецессировать со скоростью, зависящий от напряжённости поля и гиромагнитного отношения спина. Поле традиционно прилагается вдоль z-оси Декартовой системы координат, а движение ядра представляется как вектор, перемещающийся по поверхности конуса.

Это аналогично знакомому движению гироскопа в земном гравитационном поле, в котором гироскоп вращается вокруг собственной оси, а эта ось, в свою очередь, прецессирует вокруг направления поля. Скорость прецессии определяется угловой скоростью (ω rad·s^{-1} или ν Гц):

$$\omega = -\gamma B_0 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$$

или

$$\nu = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \equiv -\gamma B_0 \text{ Hz} \qquad (2.2)$$

и известна как *Ларморова частота* ядра. Направление движения определяется знаком γ и может происходить по часовой стрелке или против часовой стрелки, но всегда в том же самом направлении для любого данного ядра. Ядерный магнитный резонанс происходит, когда ядро изменяет его спиновое состояние, управляемое поглощением кванта энергии. Эта энергия прикладывается как электромагнитное излучение, чья частота должна соответствовать таковой прецессии Лармора для удовлетворения резонансного условия. Приложенная энергия даётся выражением:

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \qquad (2.3)$$

где h – постоянная Планка. Другими словами, резонансная частота спина - просто его Ларморова частота. Современные спектрометры ЯМР высокого разрешения в настоящее время используют напряжённости поля до 18,8 Т (тесла), которые для протонов соответствуют резонансным частотам до 800 МГц, которые попадают в радиочастотную область электромагнитного спектра. Для других ядер при подобных напряжённостях поля резонансные частоты будут отличаться от протонных (благодаря зависимости ν от γ) но обычно указывают рабочую частоту спектрометра как его резонансную частоту для протонов. Таким образом, обычно говорят об использовании, например, «спектрометра 400 МГц», хотя и выражение «100 МГц для углерода-13» тоже правильное, так как $\gamma_H/\gamma_C = 4$. Обычно также определяют направление постоянного магнитного поля как направленное вдоль z-оси системы Декартовых координат, так, что отдельное прецессирующее ядро спина 1/2 будет иметь компонент его магнитного момента вдоль z-оси (продольный компонент) и ортогональный компонент в *x-y* плоскости (поперечный компонент) (рис. 2.3).

Теперь рассмотрим ансамбль подобных ядер спина 1/2 в приложенном постоянном поле. Как утверждалось, ориентация параллельно к приложенному полю α имеет несколько меньшую энергию, чем антипараллельная ориентация β, таким образом, при равновесии будет избыток ядер в α состоянии, как определяется распределением Больцмана:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\Delta E/} \qquad (2.4)$$

где $N_{\alpha,\beta}$ представляет число ядер в спиновой ориентации, R - газовая постоянная и T - температура. Разности между спиновыми энергетическими уровнями очень малы, поэтому также малы соответст-

вующие разности заселённостей и составляют только около 1 части на 10^4 (10^{-4}) при самых высоких доступных напряжённостях поля. Поэтому ЯМР настолько мало чувствителен относительно других методов, таких как ИК и УФ, где разности энергий основного и возбуждённого состояния существенно больше. Ничтожный *избыток* заселенности ядерных спинов можно представить как ансамбль спинов, беспорядочно распределённых относительно конуса прецессии и параллельно Z-оси. Они вызывают результирующий *вектор объёмной намагниченности* M_0 вдоль этой оси (рис. 2.4). Важно понимать, что это z-намагничивание возникает по причине *разности заселенностей* между возможными спиновыми состояниями, момент, к которому мы возвратимся в следующем разделе. Так как отсутствуют причины, определяющие предпочтительную ориентацию спинов в поперечном направлении, существует случайное распределение индивидуальных магнитных моментов относительно конуса и, следовательно, отсутствует *чистое намагничивание* в поперечной *(x-y)* плоскости.

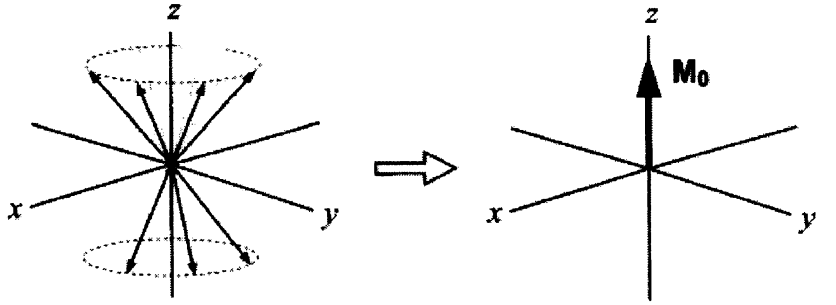


Рисунок 2.4. В векторной модели ЯМР множество подобных спинов представляются вектором объёмной намагниченности. При равновесии избыток спинов в α состоянии помещает его параллельно +z-оси.

Таким образом, мы можем упростить нашу картину множества подобных магнитных моментов, заменив их одним одиночным вектором объёмной намагниченности M_0, который ведет себя согласно правилам классической механики. Эта упрощенная картина упоминается как векторная модель Блоха (в честь спектроскописта-пионера Феликса Блоха), или чаще как *векторная модель* ЯМР.

2.2. ВЕКТОРНАЯ МОДЕЛЬ ЯМР

Развивая основную модель ансамбля ядерных спинов, мы можем теперь описывать поведение этих спинов в импульсных экспериментах ЯМР. Важно рассмотреть две части: во-первых, применение радиочастотных (РЧ) импульсов, и, во-вторых, события, которые случаются после этого. Существенное условие - индуцировать переходы между энергетическими уровнями, которые вызывают явление ядерного магнитного резонанса, - применение изменяющегося во времени магнитного поля, колеблющегося на Ларморовой частоте спина. Это поле обеспечивается магнитным компонентом применённого РЧ поля, которое обозначается B_1, чтобы отличать его от статического поля B_0. Это РЧ поле передается через катушку, окружающую образец, геометрия которой устроена так, что поле B_1 существует в *поперечной плоскости*, перпендикулярной постоянному полю. При попытке рассматривать, как это осциллирующее поле действует на вектор объёмной намагниченности, встречаются с ошеломляющей задачей, включающей одновременно вращающиеся поля и прецессирующие векторы. Чтобы помочь визуализировать эти события, удобно использовать упрощенный формализм, известный как *вращающаяся система отсчёта*, в отличие от так называемой *лабораторной системы координат*, описывавшейся до сих пор.

2.2.1. Вращающаяся система отсчёта

Чтобы помочь визуализации процессов, встречающихся в течение эксперимента ЯМР, используется множество простых концептуальных изменений. Во-первых, переменное поле B_1 рассматривается как состоящее из двух противоположно вращающихся магнитных векторов в x-y плоскости, результирующая которых точно соответствует применённому осциллирующему полю (рис. 2.5). Теперь можно значительно упростить вещи, устраняя одно из них, и, одновременно, замораживая движение другого, изображая события *во вращающейся системе координат* (рис. 2.6). В ней набор координат *x, y, z.* рассматривается как вращающийся вместе с ядерной прецессией в том же самом направлении и с той же самой скоростью. Так как частота колебания РЧ поля точно соответствует частоте ядерной

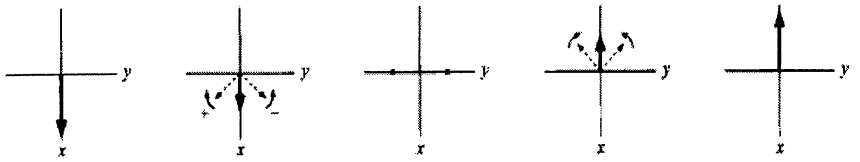


Рисунок 2.5. РЧ импульс обеспечивает колеблющееся магнитное поле вдоль одной оси (здесь ось X), который эквивалентен двум противоположно вращающимся векторам в поперечной плоскости.

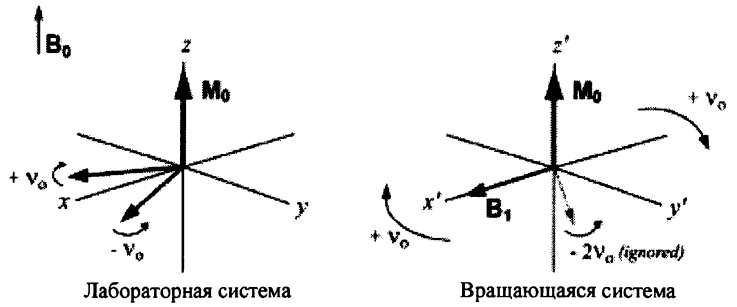


Рисунок 2.6. Представления лабораторной и вращающейся систем координат. В лабораторной системе координат система рассматривается как статическая, в то время как во вращающейся системе координат, она вращается со скоростью равной приложенной РЧ частоте ν_0. В этом представлении движение одного компонента приложенного РЧ поля замораживается, в то время как другой компонент далек от условия резонанса и может игнорироваться. Это обеспечивает упрощенную модель описания импульсных экспериментов ЯМР

прецессии (что необходимо для удовлетворения условия магнитного резонанса), вращение одного из РЧ векторов теперь отсутствует во вращающейся системе, в то время как другой вектор движется с *удвоенной частотой* в *противоположном* направлении. Этот последний вектор далек от резонанса и просто игнорируется. Точно так же прецессионное движение спинов заморожено, так как они движутся с той же самой угловой скоростью, что и РЧ вектор, и, следовательно, система координат. Так как это прецессионное движение вызвано постоянным магнитным полем B_0, это также больше не проявляется в представлении вращающейся системы.

Концепцию вращающейся системы координат можно лучше изобразить по следующей аналогии. Предположим, вы находитесь на территории ярмарки и стоите, наблюдая вращающегося на карусели ребенка. Вы видите, как ребенок перемещается к вам, а затем прочь от вас с вращением карусели, и, таким образом, познаете круговой путь, которым он следует. Это соответствует событиям наблюдения в так называемой *лабораторной системе координат* (рис. 2.7а). Теперь вообразите, что Вы видите, если Вы ступаете на карусель, когда она вращается. Теперь вы движетесь с той же самой угло-

вой скоростью и в том же самом направлении, что и ребенок, тогда его движение не является больше очевидным. Его прецессия «заморожена» с вашей точки зрения и теперь вы наблюдаете

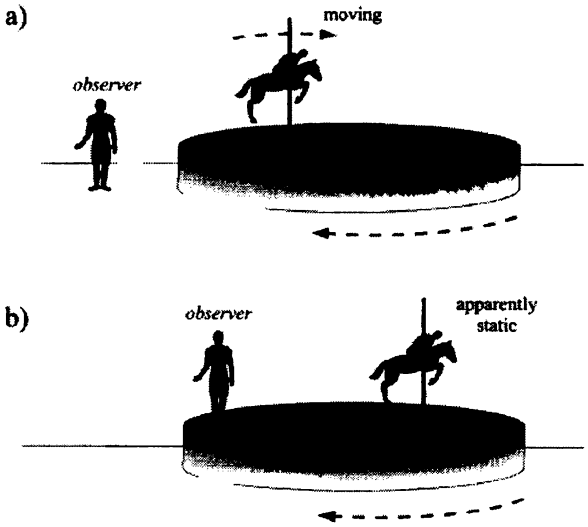


Рисунок 2.7. Ярмарочная карусель может рассматриваться (a) в лабораторной или (b) во вращающейся системе отсчёта.

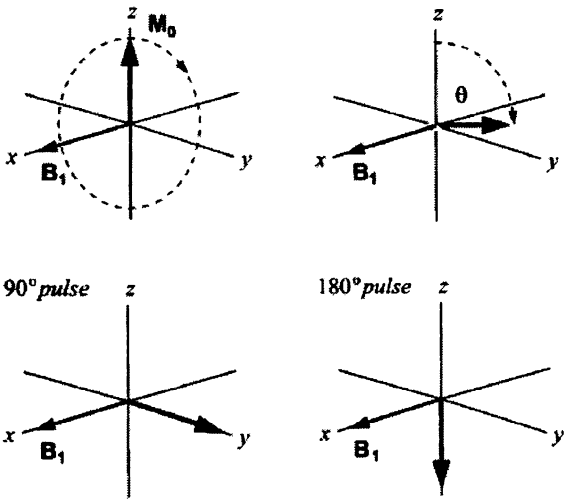


Рисунок 2.8. РЧ импульс вызывает вращение вектора объёмной намагниченности и поворачивает его от состояния равновесия в направлении *x-y* плоскости. Угол θ – угол отклонения импульса или угол поворота, который чаще всего равен 90 или 180 градусам.

события *во вращающейся системе координат* (рис. 2.7b). Очевидно, ребенок еще перемещается в «реальном» мире, но ваше восприятие событий очень упростилось. Аналогично, подобная транспозиция упрощает нашу картину событий в эксперименте ЯМР.

Строго говоря, нужно использовать другую схему обозначения координат для лабораторной и вращающейся систем, такую как *x, y, z* и *x', y'* и *z'* соответственно, как показано на рисунке 2.6. Однако так как мы будем иметь дело почти исключительно с описанием событий во вращающейся системе координат, во всей остальной части книги будет использоваться более простое обозначение *x, y, z*, специально указывая, когда используется лабораторная система координат.

2.2.2. Импульсы

Теперь мы в состоянии визуализировать эффект применения РЧ импульса к образцу. «Импульс» просто состоит из включения РЧ облучения определённой амплитуды в течение периода времени t_p, а затем выключения его. Как в случае постоянного магнитного поля, электромагнитное РЧ поле налагает вращающий момент на вектор объёмной намагниченности в направлении, которое перпендикулярно к направлению поля B_1 («моторное правило») который поворачивает вектор от Z-оси к *x-y* плоскости (рис. 2.8). Таким образом, применение РЧ поля по *x*-оси будет направлять вектор к оси *y*. Скорость, с которой движется вектор, пропорциональна напряжённости РЧ поля (γB_1) и таким образом угол θ, на который поворачивается вектор, известный как угол поворота, или угол отклонения импульса (но более формально как угол нутации) будет зависеть от амплитуды и продолжительности импульса:

$$\theta = 360\gamma B_1 t_p \text{ degrees} \qquad (2.5)$$

Если выключить РЧ как раз тогда, когда вектор достигает оси y, получится то, что называется 90-градусным импульсом, если он достигает -Z-оси, он называется 180° импульсом, и так далее. Возвращаясь ненадолго к рассмотрению индивидуальных магнитных моментов, которые составляют вектор объёмной намагниченности, мы видим, что 90° импульс, соответствуют *выравниванию заселённостей* α и β состояний, так как теперь нет никакой чистой Z-намагниченности. Однако *имеется* чистое намагничивание в *x-y* плоскости, получающееся от «сбора в пучок» индивидуальных векторов намагничивания, вызванных приложением РЧ импульса. Спины, как говорят, обладают *фазовой когерентностью*, на этом этапе, к которой их принуждает РЧ импульс (рис. 2.9). Заметьте, что это выравнивание заселённостей - *не* такое же состояние, как *насыщение* резонанса, которое будет встречаться во множестве обстоятельств в этой книге.

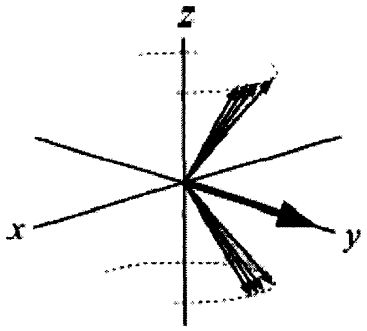


Рисунок 2.9. После 90° импульса индивидуальный пучок спиновых векторов располагается вдоль оси Y и, как говорят, обладает фазовой когерентностью.

Насыщение тоже соответствует равным спиновым заселённостям, но ***с беспорядочно распределёнными*** относительно поперечной плоскости ***фазами*** индивидуальных спинов, так что не существует чистой поперечной намагниченности, и, таким образом, отсутствует какой-либо наблюдаемый сигнал. Другими словами, *при условиях насыщения спины испытывают недостаток фазовой когерентности.* 180° импульс ***инвертирует заселенности*** спиновых состояний, так что больше спинов должно существовать в β-, а не в α-ориентации, и располагать суммарный вектор антипарал-

лельно постоянному полю. **Только намагничивание в *x-y* плоскости**, в конечном счете, **способно индуцировать сигнал в катушке детектирования** (см. ниже), так что 90° и 270° импульсы будут производить максимальную интенсивность сигнала, но 180° и 360° импульсы не будут производить ничего (это обеспечивает полезные средства «калибровки» импульсов, как описывается в следующей главе). Огромное большинство многоимпульсных экспериментов, описанных в этой книге, и вообще в ЯМР, применяют только 90° и 180° импульсы.

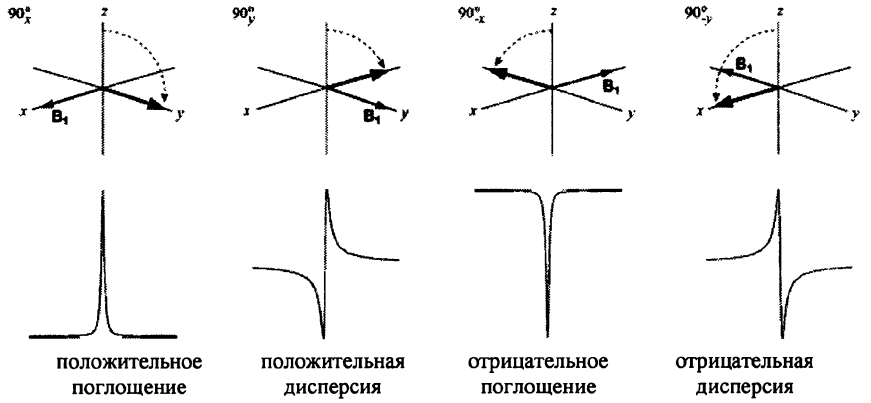


Рисунок 2.10. Возбуждение импульсами различной РЧ фазы. Различные начальные положения возбужденных векторов производят резонансы ЯМР с подобно измененными фазами (здесь, +y-ось произвольно определена как вызывающая положительное поглощение).

Приведённый выше пример использовал $90°_x$ импульс, который является 90° импульсом, в котором поле B_1 применяется *вдоль оси X*. Однако можно применять импульс с произвольной фазой, скажем по любой из осей *x*, *y*, *-x*, или *–y*, в зависимости от потребности, который приводит к различной начальной фазе возбужденного вектора намагничивания. Спектры, обеспеченные этими импульсами, показывают резонансы, *чьи фазы* также различаются на 90° Система детектирования спектрометра определяет одну ось, которая представляет положительный *сигнал поглощения* (определённый опорной фазой приемника, раздел 3.2.2), означающий, что только намагничивание, первоначально выровненное по этой оси, будет производить резонанс чистого вида поглощения. Намагничивание, которое отличается от него на +90°, говорят, представляет чистый сигнал *дисперсного вида*, тот, который отличается на 180° - отклик отрицательного поглощения, и так далее (2.10 рис.). Векторы намагничивания, начинающиеся между этими положениями, вызывают резонансы, показывающие смесь поведения дисперсии и поглощения. Для ясности и оптимального разрешения, все резонансы ЯМР демонстрируются преимущественно в режиме поглощения всякий раз, когда это возможно (что достигается через процесс, известный как фазовая коррекция). Заметьте, что во всех случаях *детектированные* сигналы те, которые *испускаются* ядрами, как описано ниже, и отрицательная фаза сигнала не подразумевает изменения от испускания к поглощению излучения (поглощение соответствует начальному возбуждению спинов).

Идея применения последовательности импульсов различных фазовых углов обладает центральной важностью во всех ЯМР экспериментах. Процесс повторения многоимпульсного эксперимента с различными импульсными фазами и объединением собранных данных соответствующим образом

Рисунок 2.11. Детектированный отклик ЯМР - спад свободной индукции (ССИ). Сигнал исчезает, поскольку ядерные спины релаксируют обратно к тепловому равновесию.

называется *циклированием фазы*, и является одной из наиболее широко используемых процедур для отбора интересующих сигналов в эксперименте ЯМР и отмены ненужных. Мы столкнемся с этой концепцией позже в главе 3 (а на самом деле во всей остальной части книги!).

Теперь рассмотрим, что происходит немедленно после применения, например, 90° импульса. Мы уже знаем, что во вращающейся системе прецессия спинов эффективно замораживается, потому что B_1 частота v_0 и, следовательно, частота вращающейся системы координат точно соответствует спиновой ларморовой частоте. Таким образом, вектор объёмной намагниченности просто остаётся неподвижным вдоль +y-оси. Однако если мы отстранимся от нашей удобной фантазии и возвратимся к рассмотрению событий в лабораторной системе координат, мы увидим, что вектор начинает прецессировать вокруг z-оси на его ларморовой частоте. Этот вращающийся вектор намагничивания будет производить слабое колеблющееся напряжение в катушке, окружающий образец, почти таким же способом, каким вращающийся магнит в динамо велосипеда индуцирует напряжение в катушках, которые его окружают. Эти электрические сигналы мы и хотим детектировать, и это как раз те сигналы, которые, в конечном счете, производят наблюдаемый сигнал ЯМР. Однако намагничивание в *x-y* плоскости соответствует отклонению от равновесных спиновых заселённостей и, точно так же как любая другая химическая система, выведенная из её состояния равновесия, система будет стремиться восстановить это состояние, и поэтому поперечная компонента вектора будет постепенно исчезать, и, одновременно, будет расти его проекция на z-ось. Этот возврат к равновесию упоминается, как ***релаксация***, и это вызывает затухание сигнала ЯМР со временем, производя наблюдаемый спад свободной индукции или ССИ (рис. 2.11). Процесс релаксации имеет множество значений для практики ЯМР, и эта важная область также рассматривается в этой вводной главе.

2.2.3. Химические сдвиги и взаимодействия

До сих пор мы рассматривали только представление вращающейся системы ансамбля подобных спинов, включая одиночный вектор, который является стационарным во вращающейся системе, так как опорная частота v_0 точно соответствует ларморовой частоте спинов (в этом случае говорят, что РЧ поле является *резонансным* для этих спинов). Теперь рассмотрим образец, содержащий две группы химически удаленных, но несвязанных спинов A и X, с химическими сдвигами v_A и v_X Гц соответственно, которые различаются на v Гц. После возбуждения одиночным 90°-ым импульсом, оба вектора приводятся в *x-y* плоскость вдоль оси Y вращающейся системы координат. Выбор опорной частоты, резонансной для спинов A ($v_0 = v_A$), означает, что они остаются вдоль оси Y, как прежде (пока игнорируя эффекты релаксации). Если спины X имеют больший химический сдвиг, чем A ($v_X > v_A$), тогда вектор X будет двигаться быстрее, чем опорная частота вращающейся системы координат на v Гц, и будет двигаться, *опережая* A (2.12 рис.). Наоборот, если $v_X < v_A$, он будет двигаться медленнее и будет отставать. Три набора несвязанных спинов можно представлять тремя вращающимися векторами, и так далее, так что разности химических сдвигов между спинами просто представляются векторами, прецессирующими с различными скоростями во вращающейся системе, согласно их отстройкам от опорной частоты v_0.

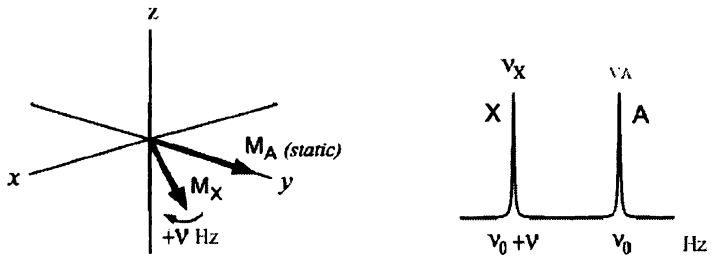


Рисунок 2.12. Химические сдвиги во вращающейся системе. Векторы эволюционируют согласно их отстройкам от опорной частоты (частоты передатчика) ν_0. Здесь она резонансная для спинов A ($\nu_0 = \nu_A$), в то время как спины X перемещаются вперед со скоростью $+\nu$ Гц = ($\nu_X - \nu_0$).

Используя вращающуюся систему координат, чтобы представить эти события, нам нужно рассматривать только *разности химических сдвигов* между интересующими спинами, которые будут находиться в диапазоне килогерц, а не абсолютные частоты, которые имеют порядок многих мегагерц. Как мы обнаружим в разделе 2.2, это точно аналогично действию системы детектирования спектрометра ЯМР, в которой опорная частота вычитается из полученных данных, чтобы создать сигналы, в диапазоне КГц, подходящем для оцифровки. Таким образом, «трюк» использования абстрактной вращающейся системы отсчёта фактически является аналогом действительного физического процесса в приборе.

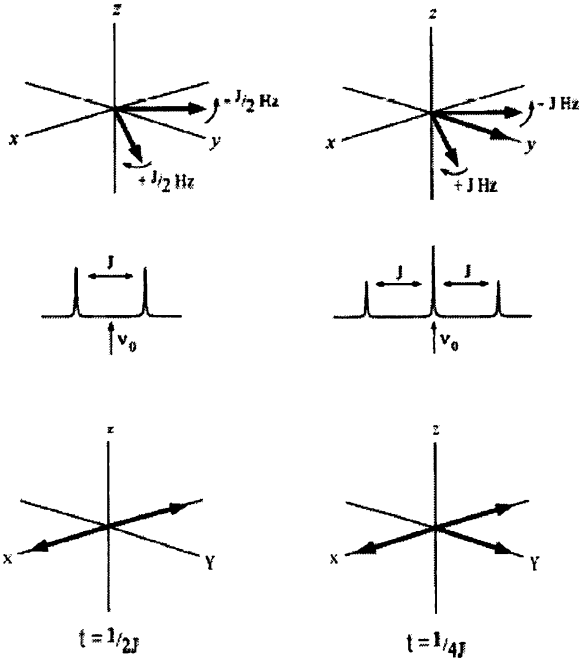


Рисунок 2.13. Скалярные взаимодействия во вращающейся системе. Мультиплетные компоненты развиваются согласно их константам взаимодействия, векторы имеют антифазное расположение после периода эволюции 1/(2J) и 1/(4J) секунд для дублетов и триплетов, соответственно.

При рассмотрении эффектов взаимодействия при резонансе удобно удалять совсем эффекты химического сдвига, выбирая опорную частоту вращающейся системы координат равной химическому сдвигу интересующего мультиплета. Это снова помогает прояснить восприятие событий, упрощая вращение векторов на картине. В случае дублета эти две линии представляются двумя векторами, прецессирующими с частотами +J/2 и -J/2 Гц, в то время как для триплета центральная линия остается неподвижной, а две внешних, перемещаются со скоростью +J и -J Гц (рис. 2.13). Во многих ЯМР экспериментах желательно контролировать ориентацию мультиплетных векторов относительно друг друга, и, как мы увидим, особенно важные отношения - те, когда два вектора *антифазны* друг к другу, то есть, имеют противоположные направления. Этого можно просто достигать, выбирая подходящий период задержки, при котором развиваются векторы, и который равен 1/(2J) для дублета, но 1/(4J) для триплета.

2.2.4. Спиновые эхо

Рассмотрев, как представлять химические сдвиги и J-взаимодействия с векторной моделью, теперь мы готовы рассматривать, как можно манипулировать эффектами этих свойств в простых многоимпульсных экспериментах. Идея здесь - обеспечить простое введение, используя векторную модель, чтобы понять, что происходит в течение импульсной последовательности. Во многих экспериментах существуют временные задержки, в течение которых намагничиванию просто позволяется прецессировать под влиянием химических сдвигов и взаимодействий, обычно с целью создания состояния определённого намагничивания прежде, чем применяются дальнейшие импульсы или получаются данные. Чтобы иллюстрировать эти пункты, мы рассмотрим один из фундаментальных строительных блоков многочисленных ЯМР экспериментов - спиновое эхо.

Рассмотрим сначала две группы химически удалённых протонов A и X, которые испытывают взаимодействие J_{AX} и будут подвергаться простой двухимпульсной последовательности, показанной на рисунке 2.14. Для простоты мы рассмотрим эффекты химических сдвигов и взаимодействия отдельно, начиная с химических сдвигов, и опять, предполагая опорную частоту равной резонансу спинов A (рис. 2.15). Начальный $90°_x$ импульс создает поперечное A и X намагничивание, после которого X вектор прецессирует в течение первого временного интервала Δ. Следующий $180°_y$ импульс (заметьте, он действует теперь *вдоль оси Y)* поворачивает X намагничивание на 180° относительно y-оси, и таким образом помещает его назад в *x-y* плоскость, но *теперь отстающим позади* вектора A. Намагниченность A-спинов остается вдоль оси Y, так что является инвариантной к этому импульсу.

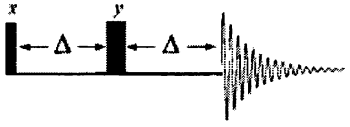


Рисунок 2.14. Основная импульсная последовательность спинового эхо.

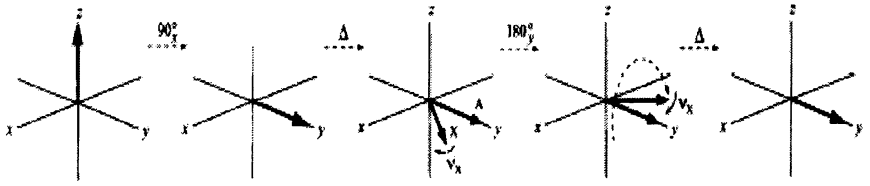


Рисунок 2.15. Эволюция химического сдвига рефокусируется последовательностью спинового эхо.

В течение второго периода времени Δ, X намагничивание будет прецессировать на тот же самый угол, как в первый период, и в конце последовательности оказывается там, где оно начиналось, и *в том же самом положении, как вектор* A. Таким образом, после периода времени 2Δ не накапливается никакая разность фаз между векторами A и X, несмотря на их различные сдвиги, как будто спины A и X имели тот же самый химический сдвиг в течение всего 2Δ периода. Мы говорим, *что спиновое эхо рефокусировало химические сдвиги,* а стадии расфазирования и перефазирования определяют терминологию эхо.

Рассмотрим теперь эффект на взаимодействие между двумя спинами с опорой на мультиплет спина A, помните, что мы можем игнорировать эффекты химических сдвигов. Снова, в течение первого периода компоненты дублета будут двигаться в противоположных направлениях, и затем обменяются их положениями применением $180°_y$ импульса. На этом этапе казалось бы очевидно полагать, что две половины дублетов, будут просто рефокусироваться, как в случае разностей химических сдвигов выше, но мы должны рассмотреть действие 180° импульса на J-связанного партнера также, другими словами, эффект на X-спины. Чтобы оценить, что случается, нам нужно напомнить себе, что вызывает две половины дублета. Они получаются от взаимодействия спина A с его партнером X, который может иметь одну из двух ориентаций (α или β) относительно магнитного поля. Когда спин X имеет одну ориентацию, спин A будет резонировать, как высокочастотная половина его дублета, а когда X находится в другой ориентации, A будет резонировать как низкочастотная половина. Так как имеется примерно одинаковое число X спинов в α и β ориентациях, обе половины дублета будут иметь равную интенсивность (очевидно, имеются не точно равные количества α и β X-спинов, иначе не должен был бы наблюдаться сигнал ЯМР, но разность столь мала, что ею следует пренебречь для этих аргументов). Эффект применения 180° импульса на спины X должен инвертировать относительные ориентации, так что любой спин A, который взаимодействовал с X_α - теперь взаимодействует с X_β, и наоборот. Это означает, что быстрее движущийся вектор теперь становится более медленным, и наоборот, полный результат представляется на рисунке 2.16a. Две половины дублета, следовательно, *продолжают дефазироваться, так,* что к концу 2Δ периода J-взаимодействие, в отличие от химических сдвигов, продолжало развиваться так, что *гомоядерные взаимодействия не рефокусируются спиновым эхо.* Причина добавления термина *гомоядерный* к предыдущему выражению в том, что это не обязательно применимо к случаю гетероядерных спиновых эхо, то есть, когда мы имеем дело с двумя различными нуклидами, такими как ^1H и ^{13}C, например. Это потому, что в гетероядерной системе можно выбирать, применить ли 180° импульс только в одном канале, таким образом, только один из двух нуклидов испытает этот импульс, и в этом случае будет происходить рефокусирование гетероядерного взаимодействия (рис. 2.16b). Если применяются два одновременных 180° импульса к обоим ядрам при помощи двух различных источников частоты, происходит непрерывное дефокусирование гетероядерного взаимодействия точно так же, как для гомоядерного спинового эхо выше.

Применение $180°_y$ импульса вместо $180°_x$ импульса в вышеупомянутых последовательностях использовалось, чтобы обеспечивать более удобную картину событий. Всё же важно понимать, что рефокусирующие действия на химический сдвиг и взаимодействия, описанные выше, также происходили с 180° импульсом за исключением того, что рефокусированные векторы теперь лежали бы вдоль -y-оси вместо +y-оси. Одна дальнейшая особенность последовательности спин-эхо, в том, что она будет также рефокусировать вредные действия, которые возникают из неоднородностей в постоянном магнитном поле, так как они могут рассматриваться только как ещё один вклад в разности химических сдвигов по всему образцу. Важность спинового эхо в современных методах ЯМР следует твёрдо ещё раз подчеркнуть. Это позволяет выполнять эксперименты без необходимости беспоко-

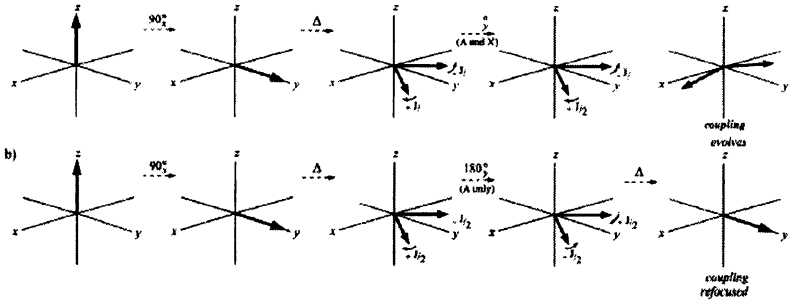


Рисунок 2.16. Влияние спиновых эхо на скалярное взаимодействие как показано для двух связанных спинов A и X: (a) гомоядерное спиновое эхо (в котором оба спина испытывают 180° импульс) позволяет взаимодействию эволюционировать по всей последовательности; (b) гетероядерное спиновое эхо (в котором только один спин испытывает 180° импульс) вызывает рефокусирование взаимодействия. Если оба гетероядерных спина испытывают 180° импульсы, гетероядерное взаимодействие развивается как в (a) (см. текст).

иться о разностях химических сдвигов в спектре и без осложнений, которые они могут вводить (например, разности фаз). Это затем позволяет нам манипулировать спинами согласно их взаимодействиям с соседями, и это те взаимодействия, которые в полной мере используются во многих из современных методов ЯМР, описанных ниже.

2.3. ВРЕМЕННЫЕ И ЧАСТОТНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

В предыдущем разделе было показано, что испускаемый РЧ сигнал от возбужденных ядерных спинов (ССИ) детектируется как зависящее от времени колеблющееся напряжение, которое устойчиво спадает в результате спиновой релаксации. В этой форме данные мало пригодны для нас, потому что это представление временной шкалы ядерных частот прецессии в образце. Что нам действительно необходимо - дисплей частотных компонент, которые составляют ССИ, так как это их мы связываем с энергетическими переходами, и, в конечном счете, химическим окружением. Другими словами, нам нужно перенести наши данные ***временной шкалы*** **в** ***частотное измерение***.

Временные и частотные измерения связываются простыми функциями, одна являющаяся инверсией другой (рис. 2.17). Дело осложняется тем, что подлинный ССИ обычно потенциально состоит из сотен компонентов различных частот и амплитуд, в дополнение к шуму и другим возможным артефактам, и в таких случаях извлечение частот прямым исследованием невозможно. Наиболее широко используемый метод создания спектра частотного измерения - математическая процедура преобразования Фурье, которое имеет общую форму

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{i\omega t}dt \qquad (2.6)$$

где f(ω) и f(t) представляют данные частотной и временной шкалы, соответственно. На заре импульсного ЯМР ФП скорость преобразования часто была ограничивающей стадей создания спектра, хотя с сегодняшними компьютерами и применением процедуры быстрого преобразования Фурье (алгоритм Кули-Таки) требования времени мало значительны. Рис. 2.18 демонстрирует эту процедуру для очень простых спектров. Даже для этих довольно простых спектров, содержащих только несколько линий, ясно, что соответствующий ССИ быстро становится слишком сложным для прямой интерпретации, и становится невозможным для подлинного ССИ любой сложности (например, см. рисунок 2.11).

Сами подробности преобразования Фурье обычно мало интересуют пользователей ЯМР, хотя имеется одна особенность, которую нужно знать. Выражение $e^{i\omega t}$ может также записываться как

cos ωt + i sin ωt, а в этой форме, очевидно, что преобразование фактически обусловливает *два* спектра частотного измерения, которые отличаются только их *фазами сигнала.* Эти две функции косинуса и синуса сдвинуты по фазе на 90° друг относительно друга и называются «действительной» и «мнимой» частями спектра (потому что функция содержит комплексные числа).

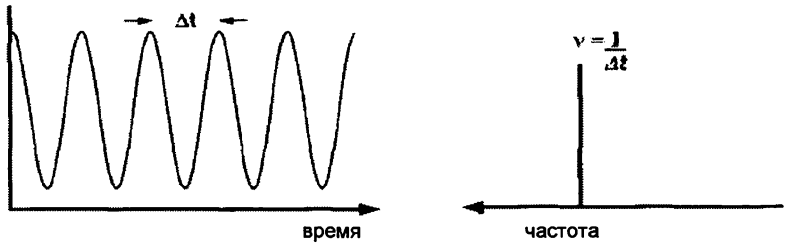


Рисунок 2.17. Временная и частотная шкала разделяют простую обратную зависимость.

Обычно нам представляют только «действительную» часть данных (хотя нетрудно показать и «мнимую» часть) и при помощи надлежащей регулировки фазы, мы выбираем, чтобы она содержала преимущественно данные в режиме чистого поглощения, и чтобы мнимая часть содержала данные дисперсного вида. Значение этих фазовых отношений будет обсуждаться в главах 3 и 5.

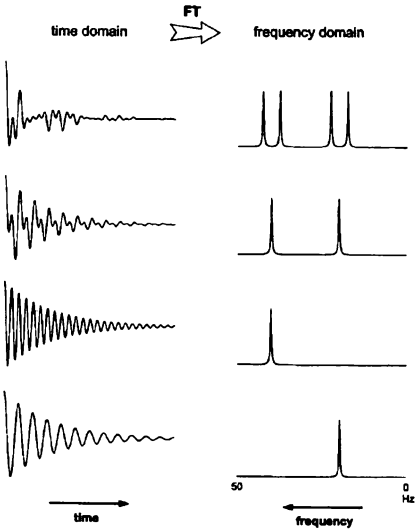


Рисунок 2.18. Преобразование Фурье ССИ временной шкалы производит соответствующие спектры частотного измерения.

2.4. СПИНОВАЯ РЕЛАКСАЦИЯ

Действие РЧ импульса на образец при тепловом равновесии возмущает ядерные спины и выводит их из этого состояния покоя. После этого возмущения можно было бы интуитивно ожидать, что система будет восстанавливать состояние равновесия и при этом терять избыточную энергию, переданную системе применённым импульсом. Тогда возникает множество вопросов: куда эта энергия идет, как она попадает туда (или другими словами какие механизмы переносят энергию), и сколько времени это занимает? Хотя желательна некоторая оценка всех этих вопросов, последний из них имеет

самое большое отношение к ежедневной практике ЯМР. Времена жизни возбужденных ядерных спинов чрезвычайно длительны, скажем, по сравнению с возбужденными электронными состояниями оптической спектроскопии. Они могут быть несколько секунд или даже минут для ядерных спинов в противоположность меньше чем пикосекунд для электронов, вследствие низких энергий переходов, связанных с ядерным резонансом. Эти продлённые времена жизни решающие для успеха спектроскопии ЯМР, как аналитического инструмента в химии. Они означают не только то, что резонансы ЯМР довольно узкие относительно таковых вращательных, колебательных или электронных переходов (как следствие принципа неопределенности Гейзенберга), но они также обеспечивают время для манипуляции спиновыми системами после их начального возбуждения, выполняя множество воздействий на спин, и, таким образом, формируя информацию, доступную в образующихся спектрах. Это мир многоимпульсных экспериментов ЯМР, в которые мы вскоре будем вас вводить, и знание скоростей релаксации имеет большое значение при проектировании этих экспериментов, для того, как они должны осуществляться и для выбора экспериментальных параметров для оптимальных результатов. Даже в простейшем возможном случае одноимпульсного эксперимента скорости релаксации влияют и на достижимое разрешение и чувствительность (как упоминалось в главе 1, самые ранние попытки наблюдать явление ЯМР, вероятно, не удавались по причине недостаточного понимания свойств спиновой релаксации исследуемых образцов).

Скорости релаксации ядерных спинов могут также связываться с аспектами молекулярной структуры и поведения при благоприятных обстоятельствах, в частности, внутреннего молекулярного движения. По правде говоря, однако, отношения между скоростями релаксации и структурными свойствами не определены настолько же хорошо, как таковые для химического сдвига и констант спин-спинового взаимодействия, и не используются рутинно. Проблема надежной интерпретации данных релаксации возникает в значительной степени из многочисленных побочных эффектов, которые влияют на экспериментальные результаты, означая, что эмпирические корреляции для использования таких данных обычно недоступны, и этот аспект ЯМР не будет обсуждаться далее в этой книге.

2.4.1. Продольная релаксация: установление равновесия

Немедленно после импульсного возбуждения вектор объёмной намагниченности ядерных спинов смещается от +z-оси теплового равновесия, которая соответствует изменению спиновых заселённостей. Восстановление намагничивания, вдоль z-оси, называемое *продольной релаксацией*, следовательно, соответствует восстановлению равновесных заселённостей, и, следовательно, общей потере энергии спинов (рис. 2.19). Энергия, потерянная спинами, переносится в среду в форме тепла, хотя вовлеченные энергии настолько малы, что изменения температуры в массе образца недетектируемы. Это вызвало первоначальное название для этого процесса как *спин-решёточная релаксация*, которое произошло от ЯМР твёрдого тела ранних дней, где избыточная энергия описывалась как рассеивающаяся в окружающую жесткую решетку.

Теория ЯМР Блоха полагает, что восстановление +z-намагничивания, M_z, следует экспоненциальному поведению, описываемому выражением:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{(M_0 - M_z)}{T_1} \tag{2.7}$$

где M_0 - намагничивание при тепловом равновесии, а T_1 постоянная времени (первого порядка) для этого процесса. Хотя экспоненциальное восстановление предполагалось как гипотеза, оно в большинстве случаев стало точной моделью для релаксации ядер спина 1/2. Начиная с положения полного отсутствия z-намагниченности (например, немедленно после помещения образца в магнит или после 90° импульса) продольное намагничивание во время t будет выражаться:

$$M_z=M_0(1-e^{-t/T1}) \quad (2.8)$$

Как показано на рисунке 2.20. Следует подчеркнуть, что T_1 обычно упоминается как время продольной релаксации в среде ЯМР (следуя соглашению по всей этой книге), в то время как, фактически, это - *постоянная времени*, а не прямая мера *времени* требуемая для восстановления.

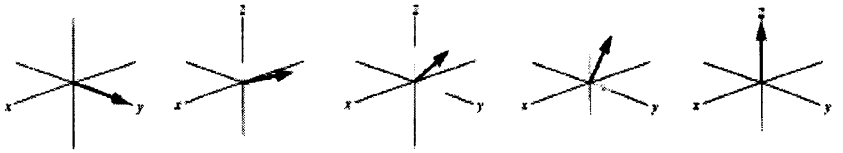


Рисунок 2.19. Продольная релаксация. Восстановление вектора намагничивания (показано на резонансе во вращающейся системе) уменьшается поперечная *(x-y)* и восстанавливается продольная (z) компонента.

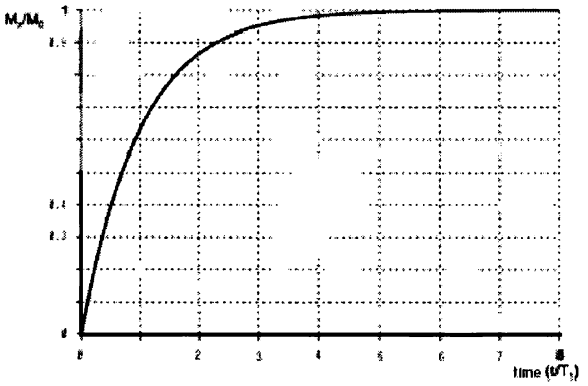


Рисунок 2.20. Экспоненциальный рост продольного намагничивания диктуется постоянной времени T_1 и достаточно близок к завершению после периода $5T_1$

Точно так же при упоминании скорости, с которой восстанавливается намагничивание, $1/T_1$ представляет *постоянную скорости релаксации* (c^{-1}) для этого процесса.

Для органических молекул среднего размера (массой в несколько сотен) протонные T_1 обычно попадают в диапазон 0,5-5 с, в то время как углеродные T_1 имеют тенденцию простираться от нескольких секунд до многих десятков секунд. Чтобы спины релаксировали полностью после 90° импульса, необходимо выждать период, по крайней мере, $5T_1$ (в этот момент намагничивание восстанавливается на 99,33%) и, таким образом, может оказаться необходимым выжидать полного восстановления много минут. Этот путь получать ЯМР спектры редко бывает самым эффективным, и правильный подход описывается в разделе 4.1. Причина, по которой требуются такие периоды, лежит не в факте, что избыточной энергии некуда деваться, так как вовлеченные энергии настолько малы, что они могут легко приниматься в тепловую энергию образца, а скорее в том, что отсутствует эффективное средство для передачи этой энергии. Время, требуемое для *спонтанной* эмиссии в ЯМР настолько длительное (грубо эквивалентно веку Вселенной!), что оно не оказывает действия на спиновые заселённости, таким образом, *стимулированная* эмиссия, должна способствовать релаксации. Вспомните, что фундаментальным требованием для стимулирования переходов ядерного спина и, следовательно, для восстановления равновесных заселённостей в этом случае, является магнитное поле, колеблющееся на ларморовой частоте спинов, и длительные времена релаксации предполагают, что такие подходящие поля не слишком распространены. Эти поля могут возникать из множества источников, содержащих колебания, требуемые для индуцирования релаксации, происходящей от локальных молекулярных движений. Хотя детали различных релаксационных механизмов могут становить-

ся достаточно сложными, их качественная оценка, как в разделе 2.5 ниже, является важной для понимания многих свойств ЯМР спектров. На практическом уровне некоторое знание T_1, в частности, является важным для оптимального выполнения почти любого эксперимента ЯМР, и простая последовательность, показанная ниже, предлагает плавное введение в многоимпульсные методы ЯМР, а также представляет средство выведения этого важного параметра.

2.4.2. Измерение T_1 последовательностью инверсии-восстановления

Имеется множество различных экспериментов, изобретённых для определения времен продольной релаксации ядерных спинов [2], хотя здесь будет рассматриваться только чаще всего применяемый метод восстановления инверсии. Сначала описывается полная процедура, после чего описывается «быстрый черновой» подход, удобный для постановки эксперимента.

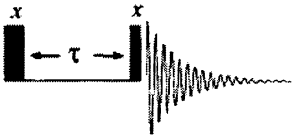


Рисунок 2.21. Последовательность восстановления инверсии.

По сути, всё, что нужно сделать, чтобы определить T_1, - вывести спиновую систему из теплового равновесия, а затем придумать какие-либо средства для последующего его восстановления как функции времени. Эксперимент инверсии-восстановления простая двух-импульсная последовательность (рис. 2.21), которая, как подразумевает название, создает начальное возмущение заселённости, *инвертируя* спиновые заселённости путём применения 180° импульса. Вектор намагничивания, первоначально выровненный по -Z-оси, будет постепенно приближаться назад к *x-y* плоскости, проходить через эту плоскость, и, в конечном счете, полностью восстановится вдоль +z-оси, со скоростью, определяемой интересующей величиной T_1. Так как намагничивание вдоль z-оси не наблюдаемо, восстановление контролируется, помещая вектор назад в *x-y* плоскость 90° импульсом после подходящего периода τ, сопровождающего начальную инверсию (рис. 2.22).

Если период τ нулевой, вектор намагничивания оказывается в положении с полной интенсивностью, направленной вдоль оси Y, производя инвертированный спектр, и при помощи обычного фазирования спектра, определяя +y-ось, и, тем самым, определяя положительное поглощение. Повторение эксперимента с увеличивающимися значениями τ позволяет следовать за интересующей релаксацией спинов (рис. 2.23). Наконец, когда τ достаточно длинное ($\tau_\infty > 5T_1$), полная релаксация будет

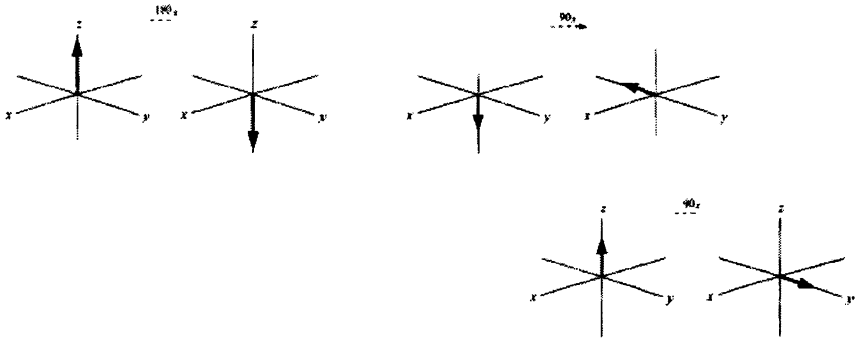
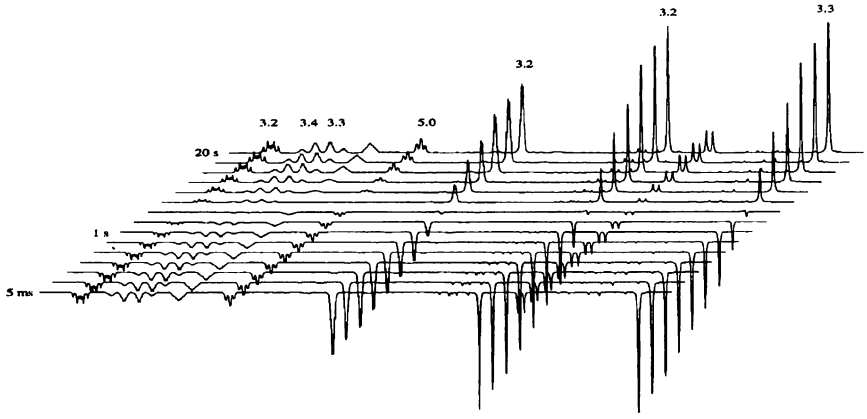


Рисунок 2.22. Процесс восстановления инверсии. При коротких периодах восстановления вектор заканчивается вдоль оси -y, таким образом, спектр инвертируется, в то время как при более длинных периодах получается обычный спектр нормированной интенсивности.



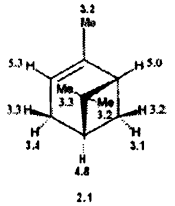


Рисунок 2.23. Эксперимент восстановления инверсии, выполненный для α-пинена **2.1** в необезгаженном $CDCl_3$ (показана только алифатическая область ^1H спектра). Использовались задержки восстановления в интервале от 5 мс до 20 с и T_1 (вычисленные из подгонки интенсивностей пиков, как описано в тексте) показаны для каждого резонанса.

происходить между двумя импульсами и будет регистрироваться максимальный положительный сигнал. Интенсивность детектированного намагничивания, M_t тогда:

$$M_t = M_0(1 - 2e^{-\tau/T_1}) \qquad (2.9)$$

где M_0 соответствует равновесной намагниченности, такой, как та, которая зарегистрирована при τ_∞. Обратите внимание здесь на дополнительный фактор два по сравнению с равенством 2.8, так как восстановление начинается от инвертированного намагничивания. Время релаксации определяется подгонкой интенсивностей сигналов к этому уравнению, алгоритмы для этого можно найти во многих пакетах программ ЯМР. Альтернативный традиционный метод извлечения T_1 из такого уравнения состоит в анализе полулогарифмического графика $\ln(M_0 - M_t)$ относительно τ, чей наклон составляет $1/T_1$. Наиболее вероятные причины ошибки в применении метода восстановления инверсии - неточная регистрация M_0, если не достигается полного равновесия, и погрешности 180° импульса вызывают неполную начальную инверсию. Фактор масштабирования (2 в равенстве 2.9) может делаться переменным в программах подгонки, чтобы допускать неполную инверсию.

Быстрая оценка T_1

Во многих практических случаях достаточно иметь только оценку времен релаксации для вычисления оптимальных выборов временных интервалов экспериментов для имеющегося образца. В этих случаях описанная выше процедура чрезмерно трудоёмкая и, так как наши молекулы, вероятно, должны содержать ядра представляющие интервал T_1, точные числа мало полезны при постановке эксперимента. Этот «быстрый черновой» метод достаточен, чтобы обеспечивать оценку T_1 и также использует последовательность восстановления инверсии. Идеально рассматриваемый образец должен быть достаточно «сильным», чтобы позволять не слишком много сканирований на каждое значение τ, делая всю процедуру быстрой для выполнения. Основа метода - исчезновение сигналов,

когда продольное намагничивание проходит через плоскость *x-y* при её восстановлении (во время τ_{null}). Потому что на этом этапе разность заселенностей нулевая (M_t.= 0). Из приведённого выше уравнения, можно показать, что:

$$\tau_{null} = T_1 \ln 2 \tag{2.10}$$

следовательно,

$$T_1 = \frac{\tau_{null}}{\ln 2} = 1{,}443\tau_{null} \tag{2.11}$$

Таким образом, процедура состоит в том, чтобы прогнать эксперимент с τ = 0 и регулировать (фазировать) спектр, чтобы он имел отрицательное поглощение. Выждав >5T_1, повторяют эксперимент с инкрементированным τ, используя те же самые регулировки фазы, до тех пор, пока сигнал не пройдёт через нулевое состояние (см. рисунок. 2.23), таким образом, определяя τ_{null}, которые могут иметь различные величины для каждого резонанса в спектре. Ошибки могут вводиться неточными 180° импульсами от вне-резонансных эффектов (см. раздел 3.2) и от выжидания недостаточных периодов между регистрациями, поэтому факт, что эти значения являются оценочными, не следует переоценивать.

Одна большая проблема с этими методами - необходимость знать хоть что-нибудь о T_1 в образце даже перед этими измерениями. Перед каждой новой оценкой T_1 нужно выждать, чтобы система пришла к равновесию, и, при необходимости усреднения сигнала, возможно, также придется слишком долго ждать перед каждым повтором! К сожалению, слабые образцы, которые требуют усреднения сигнала, больше всего выигрывают от правильно выполненного эксперимента. Чтобы избежать этого, важно чувствовать свойства релаксации типов ядер и соединений, которые вы обычно изучаете, так что, когда вы встретитесь с новым материалом, вы будете иметь некоторые отправные цифры для руководства. Влияния на величину T_1 рассматриваются в разделе 2.5.

2.4.3. Поперечная релаксация: потеря намагничивания в x-y *плоскости*

Возвращаясь обратно к ситуации немедленно после 90° импульса, в котором поперечная намагниченность резонансная во вращающейся системе, существует другой путь, при котором наблюдаемое намагничивание может утрачиваться. Вспомните, что вектор объёмной намагниченности возникает из сложения многих микроскопических векторов для индивидуальных ядер, которые, как говорят, обладают фазовой когерентностью после импульса. В образце, состоящем из подобных спинов, можно было бы предсказать, что они останутся статическими во вращающейся системе полностью ориентированными вдоль оси y (игнорируя эффекты продольной релаксации). Однако это поддерживается, только если магнитное поле, испытываемое каждым спином в образце, *точно одинаково*. Если это не так, некоторые спины испытают несколько большее локальное поле, чем среднее, заставляя их иметь более высокую частоту и выползать вперед, в то время как другие испытают несколько меньшее поле, и начнут отставать. Это вызывает разворачивание веером индивидуальных векторов намагничивания, которое, в конечном счете, ведёт к нулевому *чистому* намагничиванию в поперечной плоскости (рис. 2.24). Это другая форма релаксации, упоминаемая как *поперечная релаксация*, которая снова предполагается являющейся экспоненциальным спадом, теперь характеризуемым постоянной времени T_2.

Различия магнитного поля в образце можно рассматривать возникающими из двух отдельных источников. Первое возникает просто из неоднородности постоянного магнитного поля по всему объёму образца, которая возникает действительно от несовершенства аппаратуры, и это – та самая величина, которую стремятся минимизировать для каждого образца при оптимизации или «шиммировании» постоянного магнитного поля. Второе - от локальных магнитных полей, возникающих из внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий в образце, которые представляют «истинные» или

«природные» процессы поперечной релаксации. Постоянная времени релаксации для комбинации этих двух источников обозначается T^*_2 так что:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2(\Delta B_0)}} \qquad (2.12)$$

где T_2 относится к вкладу от истинных релаксационных процессов, а $T_{2(\Delta B_0)}$ - к вкладу от неоднородности поля. Спад поперечной намагниченности проявляется в наблюдаемом спаде свободной индукции. Кроме того, ширины резонансов ЯМР обратно пропорциональны T_2, так как короткие T_2 соответствуют более быстрому размыванию поперечной намагниченности, которая, в свою очередь, соответствует большей разности частот между векторами и, таким образом, большей протяженности (более широкая линия) в частотном измерении (рис. 2.25). Для (одиночной) экспоненциальной релаксации форма линии Лоренцева с полушириной линии, $\Delta\nu_{1/2}$ (рис. 2.26)

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{T_2^*} \qquad (2.13)$$

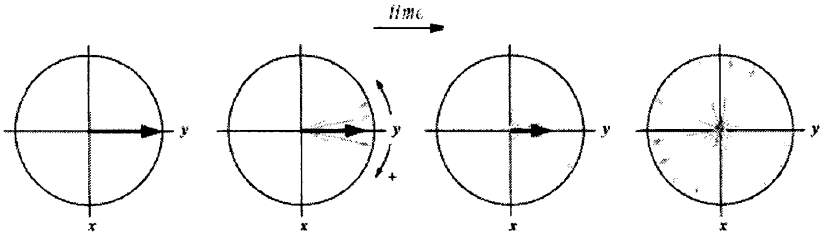


Рисунок 2.24. Поперечная релаксация. Локальные различия поля в пределах образца вызывают прецессию спинов со слабо различными частотами, в конечном счете, приводят к нулевой чистой поперечной намагниченности.

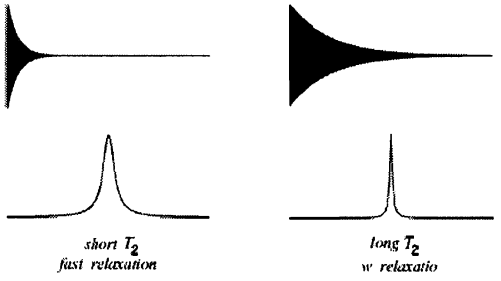


Рисунок 2.25. Быстро релаксирующие спины производят быстро затухающие ССИ и широкие резонансы, в то время как релаксирующие медленно производят более длинные ССИ и более узкие резонансы.

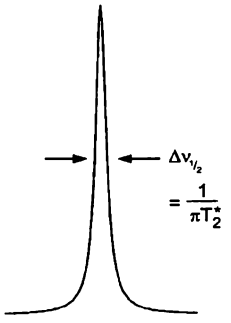


Рисунок 2.26. Определение полуширины резонансной линии.

Для большинства ядер спина 1/2 в малых быстро кувыркающихся молекулах в слабо вязких растворах, - это неоднородность поля, которая обеспечивает доминирующий вклад в наблюдаемые ширины линий, и непосредственно из них редко можно получать подлинные T_2 измерения. Однако ядра со спином >1/2 (квадрупольные ядра) могут релаксировать очень эффективно, взаимодействуя с локальными электрическими градиентами поля, и, таким образом, имеют широкие линии и короткие T_2, которые могут определяться непосредственно из ширины линий.

Вообще говоря, релаксационные механизмы, которые влияют на восстановление продольной намагниченности, также содействуют уничтожению поперечной намагниченности, и поэтому ясно не может оставаться какое-либо намагничивание в x-y плоскости, когда она вся вернулась к +z-оси, T_2 никогда не может быть длиннее, чем T_1. Однако могут также действовать дополнительные механизмы, уменьшающие T_2, поэтому оно может быть короче. Снова, для большинства ядер спина 1/2 в малых быстро кувыркающихся молекулах T_1 и T_2 имеют одно и то же значение, в то время как для больших молекул, которые кувыркаются медленно в растворе (или для твёрдых тел), T_2 часто гораздо меньше, чем T_1 (см. раздел 2.5). В то время как продольная релаксация вызывает потерю энергии спинов, поперечная релаксация происходит взаимным обменом энергии *между спинами*, например, один спин возбуждается до β состояния, в то время как другой, одновременно, спадает до α состояния; так называемый процесс опрокидывания. Отсюда возникло первоначальное выражение *спин-спиновая релаксация*, которое ещё широко используется. Продольная релаксация, таким образом, энтальпический процесс, в то время как поперечная релаксация - энтропийная. Хотя измерение T_2 имеет гораздо меньшее значение в обычной спектроскопии, методы для него описываются ниже для полноты, и представляется их альтернативная практическая польза.

2.4.4. Измерение T_2 последовательностью спин-эхо

Измерение природного времени поперечной релаксации T_2 в принципе может получаться, если удалять вклад от неоднородности магнитного поля. Этого можно достичь, как уже предполагалось, используя последовательность спин-эхо. Рассмотрим снова образец, состоящий из подобных спинов, и вообразим, что образец состоит из микроскопически малых областей, так что в пределах каждой области поле совершенно однородно.

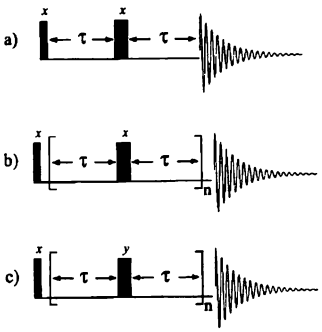


Рисунок 2.27. Последовательности спин-эхо для измерения времен релаксации T_2. (A) основное спиновое эхо, (b) последовательность Карр-Парселла и (c) последовательность Карра-Парсела-Мейбум-Гилла (Carr-Purcell-Meiboom-Gill - CPMG).

Векторы намагничивания в любой данной области будут прецессировать с той же частотой, и они иногда упоминаются как *изохроматы* (означая «того же самого цвета или частоты»). В основной двух-импульсной последовательности эхо (рис. 2.27a) некоторые изохроматы опережают средние, в то время как другие отстают в течение периода времени τ (рис. 2.28). 180° импульс поворачивает векторы к -y-оси, и после следующего периода τ более быстро движущиеся векторы совпадают с более медленными по -y-оси. Таким образом, эхо рефокусировало размытость в *x-y* плоскости, вызванную неоднородностями поля. Если нужно начать получение данных немедленно после 90° импульса,

можно видеть, что ССИ первоначально спадает, но затем вновь появляется по прошествии времени 2τ с образованием эхо (рис. 2.29a). Однако в течение периода времени 2τ также происходит некоторая потеря фазовой когерентности, благодаря природной поперечной релаксации, и она *не* рефокусируется спиновым эхо, так как в действительности отсутствует фазовая память, связанная с этим процессом, подлежащим отмене. Это означает, что в то время, когда интенсивность эхо наблюдаемого намагничивания будет спадать согласно *природной* постоянной времени T_2, независимой от неоднородности поля. Это может ясно наблюдаться в последовательности спиновых эхо, применённой в течение регистрации ССИ (рис. 2.29b).

Логический эксперимент для определения T_2 был бы должен повторить последовательность с увеличением τ и измерять амплитуду эхо относительно времени, по аналогии с методом инверсии-восстановления, обсуждавшимся выше. Однако требуется некоторая осторожность при использовании такого подхода, так как образование эхо зависит от изохроматов, испытывающих точно одинаковое поле по всей продолжительности импульсной последовательности. Если любой данный спин диффундирует в соседнюю область в течение последовательности, он испытает несколько отличающееся поле от того, где он начинал, и таким образом, не будет полностью рефокусирован. С увеличением τ такие потери диффузии становятся более жёсткими, а экспериментальные данные релаксации менее надежными (хотя этот метод обеспечивает основу для ЯМР измерения молекулярной диффузии в растворе; см. главу 9).

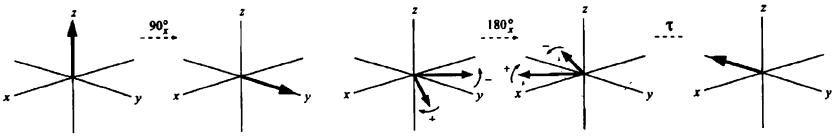


Рисунок 2.28. Спиновое эхо рефокусирует векторы намагничивания, дефазируемые неоднородностью поля.

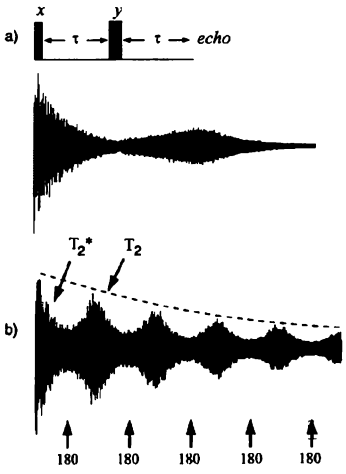


Рисунок 2.29. Экспериментальное наблюдение спиновых эхо, (a) Регистрация сигнала начиналось немедленно после 90 ° возбуждающего импульса, а 180 ° импульсы применялись, чтобы рефокусировать потери неоднородности поля и производить наблюдаемое эхо. (b) последовательность спиновых эхо показывает истинную T_2 релаксацию намагничивания (пунктирная линия).

Лучший подход к определению T_2, который минимизирует эффект диффузии, состоит в том, чтобы повторять последовательность эхо в пределах одиночного эксперимента, используя короткое τ, чтобы образовать многократное эхо, спад которого следует постоянной времени T_2. Это последовательность Карр-Парселла (рис. 2.27b), которая вызывает образование эхо поочередно по -*y* и +*y* осям после каждого рефокусирующего импульса. Потери происходят от диффузии между пиками эхо, или

другими словами в период времени 2τ, так если он поддерживается коротким относительно скорости диффузии (типично τ < 100 мс) такие потери становятся незначительными. Интенсивность эхо в более длинные периоды времени ослабляется повторением много раз перед регистрацией последовательности –τ-180-τ-. Недостаток этого метода в том, что любые ошибки в длительности 180° импульса будут кумулятивно вести к несовершенному рефокусированию по мере продолжения эксперимента. Лучшая реализация этой схемы последовательность Карра-Парселла-Мейбума-Гилла (CPMG) (рис. 2.27c) в которой $180°_y$ импульсы (в противоположность импульсам $180°_x$) вызывают рефокусирование, происходящее для каждого эхо в +*y* полушарии. Здесь ошибки в длительностях импульсов не кумулятивные, но малые и постоянные на каждом нечётном эхо, но отменяются на каждом чётном эхо (2.30 рис.).

Величины T_2 затем можно извлекать, выполняя последовательность экспериментов с увеличением 2τn (увеличением n) и получением данных после последнего чётного пика эхо в каждом случае. Применение CPMG последовательности показывается на рисунке 2.31 для образца с различными ширинами резонансных линий и иллюстрирует более быстрое исчезновение более широких резонансов, то есть тех, для которых T_2 короче. В действительности определение T_2 любым из этих методов не настолько просто. Самая важная проблема, вероятно, должна быть от гомоядерных взаимодействий, которые не рефокусируются спиновым эхо, и, следовательно, накладывают дополнительные фазовые модуляции на детектированные сигналы. В результате, исследования, включающие измерения T_2, даже менее широко распространены, чем те, которые включают T_1. К счастью, с точки зрения выполнения практической каждодневной спектроскопии, точные T_2 значения не важны и значение T^*_2 (которые могут рассчитываться из ширин линий, как описано выше) имеют значительно большее значение.

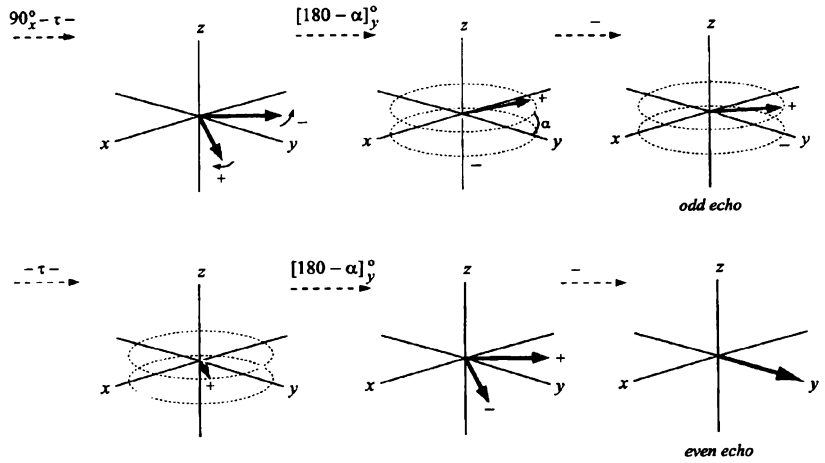


Рисунок 2.30. Действие CPMG последовательности в присутствии несовершенств импульса. Предполагается, что 180° импульс короче на α°, что означает, что векторы будут попадать выше (тёмно-серый) или ниже (светло-серый) *x-y* плоскости после одиночного 180° импульса и, таким образом, уменьшать интенсивность «нечетного» эхо. Повторением последовательности ошибки подавляются несовершенным вторым 180° импульсом, поэтому для точного определения T_2 релаксации может использоваться «чётное» эхо.

Именно это значение определяет скорость спада поперечной намагниченности, так что оно эффективно определяет, насколько может быть длительным многоимпульсный эксперимент прежде, чем система отрелаксирует до такой степени, что сигнал исчезнет для детектирования.

T_2 редактирование спектра

Одно интересное применение этих методов эхо лежит в использовании общих различий во временах поперечной релаксации различных видов. Большие молекулы обычно показывают более широкие резонансы, чем меньшие, так как они обладают более короткими T_2 временами спиновой релаксации. Если разности в этих временах достаточно большие, резонансы быстрее релаксирующих видов могут преимущественно уменьшаться в интенсивности CPMG последовательностью эхо, в то время как резонансы меньших, медленнее релаксирующих молекул, уменьшаются меньше (рис. 2.32). Это, следовательно, обеспечивает средства, хотя и довольно грубые, редактирования спектра по размеру молекулы, сохраненяя резонансы меньших компонентов за счёт более массивных. Этот подход широко использовался в изучении биологических жидкостей, чтобы подавлять фоновые вклады от очень больших макромолекул, таких как липиды и белки.

Селективное уменьшение резонанса воды растворителя [3] также может достигаться подобным способом, если время поперечной релаксации протонов воды может уменьшаться (то есть резонанс расширяется) так что оно становится гораздо более коротким, чем исследуемых растворяемых веществ. Это может достигаться добавлением подходящих парамагнитных релаксационных агентов (относительно которых молекулы воды образуют сферу гидрирования) или реагентами, которые способствуют химическому обмену. Хлорид аммония и гидроксиламин использовались с большим эффектом таким образом [4,5], как показано для протонного спектра восстановленного аргинина пептида вазопрессина в 90 % H_2O [6] (2.33 рис.). Этот метод подавления сигнала растворителя был назван WATR (ослабление воды поперечной релаксацией). Хотя он способен показывать впечатляющие результаты, он имеет ограниченное применение; более общие процедуры подавления сигнала растворителя описываются в главе 9.

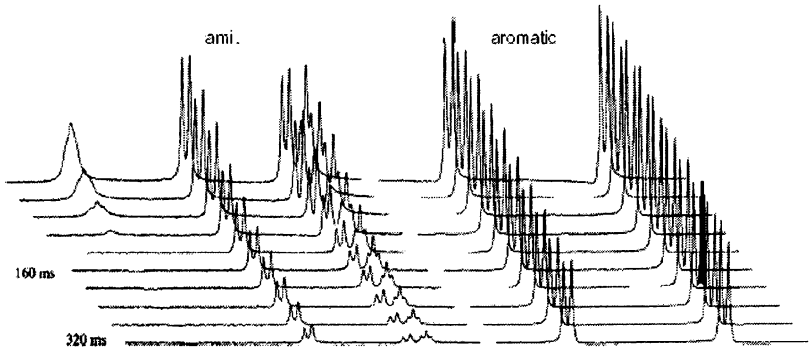


Рисунок 2.31. CPMG последовательность, выполненная на пентапептиде лейенкефалине **2.2** в ДМСО. Очень быстрый спад самого высокочастотного амидного протона происходит, потому что он участвует в быстром химическом обмене с водой растворителя, значительно расширяя резонанс. Числа показывают полный период T_1 релаксации $2\tau n$.

2.5. МЕХАНИЗМЫ РЕЛАКСАЦИИ

Релаксация ядерного спина - не спонтанный процесс, она требует возбуждения подходящим флуктуирующим полем, чтобы индуцировать необходимые спиновые переходы. Имеются четыре основных механизма, которые способны делать это: диполь-дипольный, анизотропия химического сдвига, вращение спинов и квадрупольные механизмы. Который из этих процессов является доминирующим,

может непосредственно влиять на внешний вид спектра ЯМР, и это - те факторы, которые мы рассматриваем здесь. Здесь делается акцент не столько на явных деталях базовых механизмов, которые могут находиться в физических текстах ЯМР [7], а на способах, которыми спектры подвергаются воздействию этими механизмами, и как, в результате, различные экспериментальные условия влияют на наблюдаемый спектр.

2.5.1. Путь к релаксации

Фундаментальное требование для продольной релаксации ядра спина 1/2 - зависящее от времени магнитное поле, колеблющееся с ларморовой частотой ядерного спина. Только через это может вызываться изменение спинового состояния, или, другими словами, может происходить релаксация.

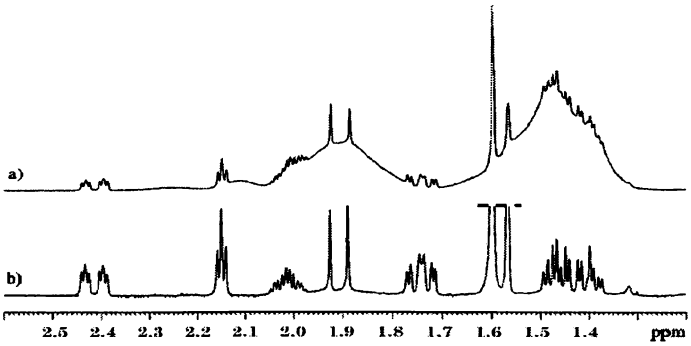


Рисунок 2.32. Фильтр T_2. Широкие резонансы полистирена (M = 50,000) в (a) подавлялись в (b) через основанное на T_2 редактирование CPMG последовательностью, оставляя только резонансы меньшей молекулы камфоры. Задержка τ была 1.5 мс, и эхо повторялось 150 раз, чтобы производить полный период релаксационной задержки 2 минуты 450 мс.

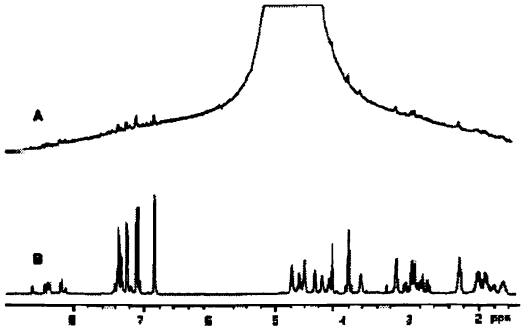


Рисунок 2.33. Ослабление растворителя методом WATR (a). Протонный 1D спектр 8 мМ восстановленного аргинина вазопрессина в 90 % H_2O/10 % D_2O, pH = 2,75 содержащий 0,2 М NH_2OH. (B) Тот же самый образец, зарегистрированный последовательностью CPMG, использующей полный период релаксационной задержки 235 мс (воспроизведено с разрешения от [6]).

Локальные магнитные поля возникают из ряда источников, описанных ниже, в то время как их временная зависимость происходит от движений молекулы (вибрация, вращение, диффузия и т.д). Фактически только хаотическое кувыркание молекулы происходит со скоростью, которая подходит для релаксации ядерного спина, другие являются либо слишком быстрыми, либо слишком медленными. Это случайное движение происходит с расхождением частот в соответствии с молекулярными столкновениями, ассоциациями, и так далее, испытываемыми молекулой, но характеризуется *временем вращательной корреляции* τ_c, среднее время, затраченное молекулой для вращения на один радиан. Короткие времена корреляции, следовательно, соответствуют быстрому кувыркнию и наоборот. Распределение частот флуктуирующих магнитных полей, связанных с этим движением, называется *спектральной плотностью* $J(\omega)$ и может рассматриваться как пропорциональное вероятности нахо-

ждения компонента движения при данной частоте, ω (в рад $с^{-1}$). Только когда подходящий компонент существует, может происходить спиновая релаксация на ларморовой частоте спина. Функция спектральной плотности имеет общую форму:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} \qquad (2.14)$$

и схематично представлена на рисунке 2.34a для быстрой, промежуточной и медленной скоростей кувыркания молекулы (обратите внимание на удобное использование логарифмического масштаба). Поскольку каждая кривая представляет вероятность, площадь под каждой остаётся постоянной. Для ларморовой частоты ω_0, указанной на рисунке 2.34a, также даётся соответствующий график T_1 относительно скорости кувыркания молекулы (рис. 2.34b). Быстрое молекулярное движение имеет только относительно малый компонент на ларморовой частоте, так что релаксация медленная (T_1 длинное). Это область, занимаемая малыми молекулами в слабо вязких растворителях, известна как *предел чрезвычайного обужения.* С уменьшением скоростей кувыркания спектральная плотность при ω_0 сначала увеличивается, а затем спадает еще раз для медленного кувыркания, так что кривая T_1 имеет минимум при промежуточных скоростях.

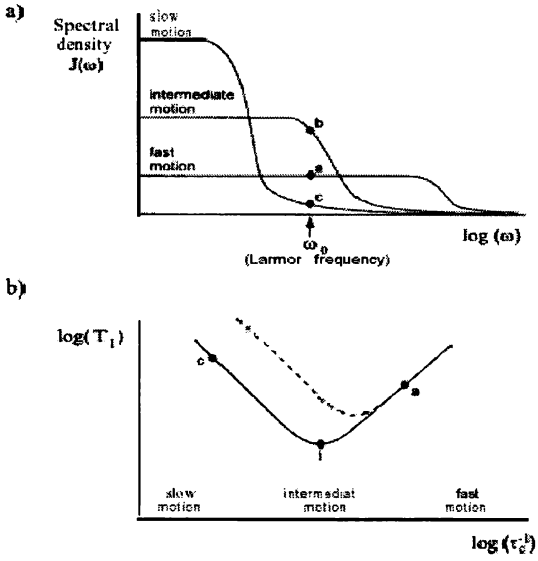


Рисунок 2.34. (A) Схематичное представление спектральной плотности как функции частоты показано для молекул, подвергающихся быстрому, промежуточному и медленному кувырканию. Для спинов с ларморовой частотой ω_0, соответствующая кривая T_1 показывается в (b) как функция скоростей кувыркания молекулы (обратные времена корреляции τ_c). T_1 кривая зависит от поля, потому что зависит от поля ω_0, а минимум случается для более быстрого движения в более высоких полях (пунктирная кривая в (b)).

Таким образом, *для малых быстро кувыркающихся молекул более быстрое движение соответствует более медленной релаксации и, следовательно, более узким ширинам линий,* так как скорости продольной и поперечной релаксации идентичны при этих условиях ($T_2 = T_1$). Уменьшение скорости кувыркания, как это бывает с увеличением вязкости растворителя или с уменьшением температуры образца, уменьшает времена релаксации и расширяет резонанс ЯМР. Точка, при которой наблюдается минимум, и режим приближения медленного движения, зависит от поля, потому что сама ω_0 зависит от поля (рис. 2.34b). Поведение в режиме медленного движения немного более сложно. Энергосберегающие опрокидывающие процессы, которые ведут к поперечной релаксации, также стимулируются очень низкочастотными флуктуациями и кривая T_2 заметно отличается от кривой для T_1 (рис. 2.35). Таким образом, для медленно кувыркающихся молекул, таких как полимеры и биологические

макромолекулы, времена релаксации T_1 могут снова быть очень длинными, но ширины линий становятся довольно широкими в результате коротких T_2.

Молекулярное движение, следовательно, фундаментально для процесса релаксации, но остаётся посмотреть, как возникают требуемые для этого поля, и как эти механизмы влияют на наблюдаемые спектры.

2.5.2. Диполь-дипольная релаксация

Наиболее важный релаксационный механизм *для многих ядер спина 1/2* происходит из дипольного взаимодействия между спинами. Это также источник чрезвычайно важного ядерного эффекта Оверхаузера и дальнейшие обсуждения этого механизма можно найти в главе 8, поэтому это описано

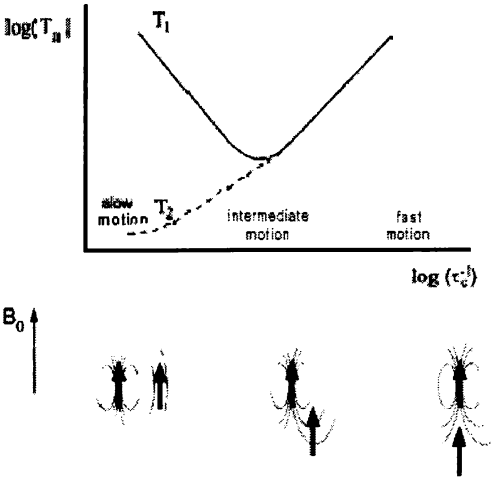


Рисунок 2.35. Иллюстрация схемы зависимости T_1 и T_2 от скоростей кувыркания молекулы. T_1 релаксация нечувствительна к очень медленным движениям, в то время как релаксация T_2 еще может стимулироваться ими.

Рисунок 2.36. Диполь-дипольная релаксация. Величина прямых магнитных взаимодействий между двумя спинами через пространство модулируется молекулярным кувырканием, и таким образом индуцирует спиновые переходы и, следовательно, релаксацию.

здесь преднамеренно кратко. Дипольные взаимодействия можно представить, используя аналогию «стержневого магнита», для ядра спина 1/2, в которой каждое ядро обладает Северным и Южным магнитными и полюсами. Со сближением двух таких диполей их связанные магнитные поля взаимодействуют; они притягиваются или отталкиваются, в зависимости от их относительных ориентаций. Теперь предположим, что эти диполи были двумя соседними ядрами в молекуле, которая кувыркается в растворе. Ориентация каждого ядра относительно постоянного магнитного поля не изменяется с кувырканием молекулы так же, как игла компаса сохраняет её направление с поворотом компаса. Однако их относительные положения в пространстве изменяются и локальное поле, испытываемое одним из ядер, благодаря его соседу, будет колебаться с кувырканием молекулы (рис. 2.36). Кувыркание с соответствующей скоростью может, следовательно, индуцировать релаксацию.

Этот механизм - часто доминирующий релаксационный процесс для протонов, которые связаны с их соседями, как с источником магнитных диполей. Таким образом, протоны, которые испытывают недостаток ближайших соседей, релаксируют медленнее (обратите внимание, что метиновые протоны в альфа-пинене (рис. 2.23) все имеют более длинные T_1, чем метиленовые группы). Наиболее очевидное последствие этого будет проявляться в том, что интегральные интенсивности будут ниже, чем ожидаемые интегралы в обычных протонных спектрах, благодаря частичному насыщению мед-

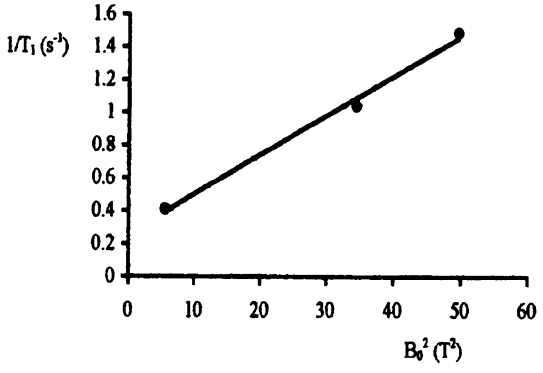
леннее релаксирующих спинов, которые не успевают восстанавливаться достаточно перед следующим импульсом-регистрацией. Если доступны T_1 данные, то можно предсказать, что протоны с длительными временами релаксации должны быть удалены от других протонов в молекуле. Ядра углерода-13 также релаксируют, прежде всего, дипольными взаимодействиями, либо с их прямо связанными протонами, либо, в отсутствие их, с более отдалёнными. В очень больших молекулах и при высоких полях механизм анизотропии химического сдвига, описанный ниже, может также играть роль, особенно для sp^2 центров, как это может быть для ядер спина 1/2, которые представляют большие диапазоны химических сдвигов. Дипольная релаксация может также возникать от взаимодействия ядерного спина с неспаренным электроном, магнитный момент которого более чем 600 раз больше, чем протона, и таким образом обеспечивает очень эффективный источник релаксации. Это иногда упоминается как *парамагнитный релаксационный механизм*. Даже присутствие растворённого кислорода, который сам является парамагнетиком, может давать вклад в спиновую релаксацию, а преднамеренная добавка релаксационных агентов, содержащих парамагнитные молекулы, в качестве которых наиболее часто используется ацетилацетонат хрома (III), $Cr(AcAc)_3$, для органических растворителей, или хлоридов марганца (II) для воды, чтобы уменьшать времена релаксации, и, таким образом, ускорять регистрацию данных (глава 4).

2.5.3. Релаксация анизотропии химического сдвига

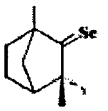
Распределению электронов в химических связях свойственно отсутствие симметрии или наличие *анизотропии* и, в результате, локальное поле, испытываемое ядром, и, следовательно, его химический сдвиг, будут зависеть от ориентации связи относительно приложенного постоянного поля. В растворе быстрое кувыркание молекулы усредняет эту *анизотропию химического сдвига* (АХС), так что наблюдается только одиночная частота для каждого химически отдельного участка, иногда упоминающаяся как изотропный химический сдвиг. Однако это флуктуирующее поле может стимулировать

Таблица 2.2. Времена продольной релаксации ^{77}Se как функция B_0 и соответствующая зависимость скорости релаксации от квадрата приложенного поля (представляется с разрешения от [8]).

B_0 (T)	T_1 (c)	$1/T_1$ (c^{-1})
2,36	2,44	0,41
5,87	0,96	1,04
7,05	0,67	1,49



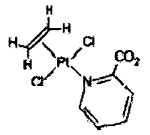
релаксацию, если оно достаточно сильное. Это обычно происходит для ядер, которые представляют большой диапазон химических сдвигов, так как они обладают самой большой анизотропией сдвига, например ^{19}F, ^{31}P и, в частности, многие металлы.



2.3

Характерное свойство релаксации АХС - её *зависимость от квадрата* приложенного поля, означающее, что она имеет большее значение при более высоком B_0. Например, скорость продольной релаксации селена 77 в селоне **2.3**, как было показано, зависит линейно от B^2_0, показывая, что АХС является существенным релаксационным механизмом [8] (Таблица 2.2), пока нет никакого ЯЭО протон-селен, демонстрируя, что диполь-дипольный механизм ^1H - ^{77}Se является неэффективным

Ядра, чья релаксация подвергается преобладающему влиянию механизма АХС, могут показывать значительно большие ширины линий при более высоких полях, если они обладают большей анизотропией сдвига, и любое потенциальное преимущество от большей дисперсии и чувствительности может теряться в результате уширения линий. По этой причине изучение некоторых ядер металлов может быть более успешным при более низких полях. Уменьшение времени корреляции нагревом образца, например, может ослаблять эффект уширения, хотя этот подход ясно имеет довольно ограниченное применение. В некоторых случаях улучшенная релаксация АХС при более высоких полях может быть полезной. Умеренно улучшенная скорость релаксации, такая как для ^{77}Se в примере выше, позволяет более быстрый сбор данных (Раздел 4.1), таким образом, обеспечивая улучшение в чувствительности (за единицу времени) выше того, что ожидалось только от увеличения магнитного поля.



Механизм АХС может также иметь, возможно, неожиданное влияние на спектры ядер, которые связаны скалярной спин-спиновой связью с АХС-релаксирующим спином. Если АХС вызывает очень быструю релаксацию, спутники, возникающие из взаимодействия с этим спином уширяются и даже могут исчезнуть совсем. Таким образом, хотя взаимодействие может быть очевидным при низких полях, оно может исчезать при более высоких. Этот эффект можно увидеть в протонных спектрах платинового комплекса **2.4** зарегистрированных при 80 и 400 МГц [9] (рис. 2.37). Увеличенная ширина линий спутников относительно родительской линии при более высоком поле растет с квадратом приложенного поля, как и ожидалось для механизма АХС. Чтобы понимать, почему это случается, вспомните природу самих спутников Pt. Эти дублетные компоненты возникают от ядер спина ½ - ^{195}Pt, существующих в одном из двух состояний, α и β, которые вызывают разность частот J Гц для соответствующих протонных сигналов. Релаксация АХС индуцирует быстрые переходы спинов платины между этими состояниями, вызывая неоднократные переключения положения компонентов дублета. С увеличением этой скорости обмена (то есть скорости релаксации) спутники сначала расширяются, и, в конечном счете, сливаются с родительской линией, как при любом динамическом процессе. Это быстрое и повторяющееся изменение спиновых состояний имеет прямую аналогию с обычным спиновым декаплированием (глава 4).

2.5.4. Спин-вращательная релаксация

Молекулы или группы, которые вращаются очень быстро, имеют связанный с ними *молекулярный* магнитный момент, произведенный вращающимся электронным и ядерным зарядами. Поле, благодаря этому, колеблется с изменением вращательного состояния молекулы или группы в результате, например, молекулярных столкновений, и это обеспечивает дальнейший механизм ядерной релаксации. Это наиболее эффективно для малых симметричных молекул или для свободно вращающихся метильных групп, и его эффективность *увеличивается с увеличением скоростей кувыркания.* Это коренное отличие от описанных ранее механизмов. Таким образом, нагрев образца увеличивает спин-вращательную релаксацию, эта температурная зависимость, является характеристичной для этого механизма и позволяет устанавливать её присутствие.

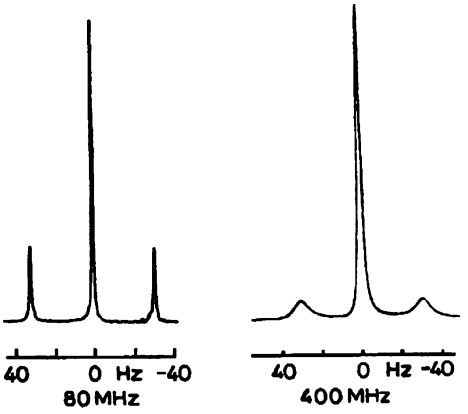


Рисунок 2.37. Резонанс этенового протона платинового комплекса **2.4** в $CDCl_3$ при 80 и 400 МГц показывающий уширение спутников ^{195}Pt при более высоком поле (воспроизведено с разрешения от [9]).

2.5.5. Квадрупольная релаксация

Квадрупольный релаксационный механизм непосредственно имеет отношение только к тем ядрам, которые имеют ядерное спиновое квантовое число I, больше чем 1/2 (квадрупольные ядра), для которых этот релаксационный процесс часто является доминирующим. Он также может быть очень эффективным механизмом, и ширины линий многих таких ядер могут составлять сотни или даже тысячи герц. Свойства некоторых ядер с I > 1/2 суммируются в таблице 2.3. Пока для многих химиков-органиков прямое наблюдение этих ядер не может быть рутинным. Их наблюдение может иногда оказаться очень полезным для специфических проблем и косвенные эффекты, которые они производят в спектрах ядер спина ½, не следует упускать из вида.

Квадрупольные ядра в дополнение к магнитному дипольному моменту обладают электрическим квадрупольным моментом. Это происходит от отклонения распределения заряда ядра от обычной сферической симметрии, связанной с ядром спина ½, и приобретения им эллипсоидальной формы. Это явление можно рассматривать как возникающее от двух, расположенных «спина-к-спине» *электрических* диполей (рис. 2.38). Таким образом, квадрупольный момент подвергается воздействию электрических *градиентов поля* вокруг ядра, а не симметричных электрических полей. Градиент модулируется кувырканием молекулы в растворе, и, опять, если это происходит с соответствующей частотой, может индуцировать переворачивание состояний ядерного спина и, таким образом, стимулировать релаксацию. Это аналогично релаксации ядерных диполей зависящими от времени локальными магнитными полями, но ***квадрупольный релаксационный механизм - единственный, который зависит от электрических, а не от магнитных взаимодействий.***

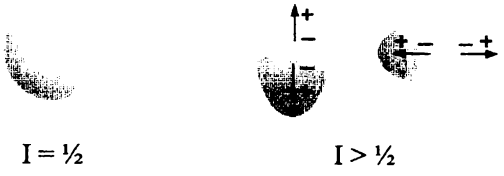


Рисунок 2.38. Квадрупольные ядра испытывают недостаток сферического распределения заряда ядра спина 1/2, т.к. имеют эллипсоидальную форму, которая может рассматриваться, как возникающая от пары электрических диполей. Поэтому квадрупольные ядра взаимодействуют с электрическими градиентами поля.

Таблица 2.3. Свойства некоторых квадрупольных ядер

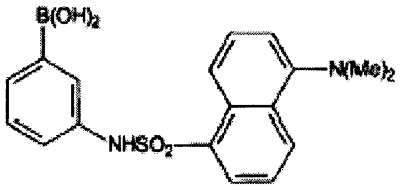
Изотоп	Спин (I)	Естественное содержание (%)	Квадрупольный момент $(10^{-28})м^2$	Частота ЯМР (МГц)	Относительная чувствительность
^{2}H	1	0,015	$2,8x10^{-3}$	61,4	$1,45x10^{-6}$
^{6}Li	1	1,42	$-8x10^{-4}$	58,9	$6,31x10^{-4}$
^{7}Li	*3/2*	*92,58*	*$-4x10^{-2}$*	*155,5*	*0,27*
^{10}B	*3*	*19,58*	*$8,5x10^{-2}$*	*43,0*	*$3,93x10^{-3}$*
^{11}B	3/2	80,42	$4,1x10^{-2}$	128,4	0,13
^{14}N	1	99,63	$1x10^{-2}$	28,9	$1,01x10^{-3}$
^{17}O	5/2	0,037	$-2,6x10^{-2}$	54,2	$1,08x10^{-5}$
^{23}Na	3/2	100	0,10	105,8	$9,27x10^{-2}$
^{27}Al	5/2	100	0,15	104,2	0,21
^{33}S	3/2	0,76	$5,5x10^{-2}$	30,7	$1,72x10^{-5}$
^{35}Cl	3/2	75,73	-0,1	39,2	$3,55x10^{-3}$
^{37}Cl	3/2	24,47	$-7,9x10^{-2}$	32,6	$6,63x10^{-4}$
^{59}Co	7/2	100	0,38	94,5	0,28

Наблюдение таких ядер обычно наиболее благоприятно для тех ядер, которые обладают низким квадрупольным моментом и высоким естественным содержанием, которые существуют в более высоко симметричных окружениях; те же, которые выделены курсивом, рассматриваются наименее предпочтительными из доступных изотопов; частоты ЯМР указаны для приборов 400 МГц (магнит 9,4 Т); чувствительности относительно ^{1}H учитывают и собственную чувствительность ядра, и его естественное содержание.

Скорости релаксации квадрупольного ядра диктуются двумя новыми ранее не рассматривавшимися факторами. Первый - величина самого квадрупольного момента (Таблица 2.3). Большие значения делают вклад в более эффективную спиновую релаксацию и, следовательно, в более широкие ширины линий, в то время как меньшие значения обычно производят более острые линии. Таким образом, ***ядра с меньшими квадрупольными моментами обычно более предпочтительны для наблюдения ЯМР***. Как и прежде, чтобы механизм был эффективным, молекулярное кувыркание должно происходить с соответствующей частотой, и опять, быстрое молекулярное кувыркание уменьшает эффективность, приводя к более длинным временам релаксации и более острым линиям. *Высокие температуры или растворители низкой вязкости, таким образом, более вероятно будут производить узкие ширины линий*. Предельный случай растворителей низкой вязкости - суперкритические жидкости, которые обладают вязкостью близкой к газам, а растворяющими свойствами соответствующими жидкостям. Они действительно использовались в изучении квадрупольных ядер [10], но так как они суперкритические только при очень высоких давлениях, они требуют применения однокристальных сапфировых ампул для ЯМР, так что их использование не может считаться рутинным!

Второй новый фактор - величина электрического градиента поля. В высоко симметричных окружающих средах, таких как тераэдрическая или октаэдрическая симметрия, градиент поля, в принципе, нулевой и квадрупольный механизм подавляется. В действительности, локальные искажения еще возникают, если только моментально вводится элемент асимметрии и, следовательно, улучшается релаксация и уширяются линии. Однако более высокая степень электрической симметрии может коррелироваться с более узкими резонансами. Таким образом, например, ^{14}N ширина линии $N(Me)^{+}_{4}$ - меньше чем 1 Гц, в то время как, для NMe_3 - ближе к 80 Гц. Изменения ширины линии в спектрах ^{11}B (I = 3/2) использовались при идентификации тераэдрических комплексов борной кислоты при актив-

ном центре β-лактамазы [11], фермента, ответственного за деструкцию β-лактамных антибиотиков, таких как пенициллины, и частично за защитный механизм бактерий. Борные кислоты, такие как 3-дансиламидофенилборная кислота **2.5**, известны как обратимые ингибиторы серинового активного центра β-лактамазы, и комплексы, образованные таким образом, показывают значительные изменения в химическом сдвиге ^{11}B борной кислоты вместе с уменьшением ширины линии относительно свободной кислоты (рис. 2.39). Это уменьшение свойственно ядру бора, принимающему более симметричное тетраэдрическое окружение при связывании с сериновым активным центром фермента. Этот сдвиг и обужение линий могут имитироваться, помещая борную кислоту в щелочной раствор, в котором преобладает ион $R\text{-}B(OH)_3^-$.



2.5

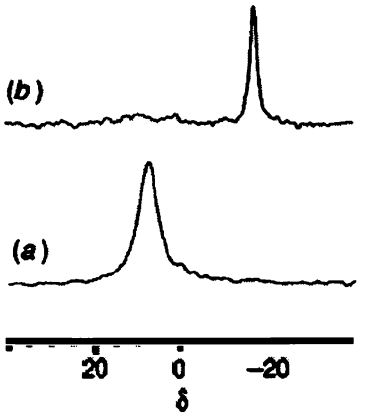


Рисунок 2.39. Спектр ЯМР ^{11}B (128 МГц) дансиламидофенилборной кислоты **2.5** (a) как свободная тригональная борная кислота ($\nu_{1/2}$ =580 Гц) и (b) как тераэдрический комплекс с сериновым активным центром P99 β-лактамазы из *Enterobacter cloacae* ($\nu_{1/2}$ =160 Гц). Спектры отсчитываются от внешнего триметилбората (приводится с разрешения от [11]).

Широкие резонансы многих квадрупольных ядер означают, что неоднородность поля делает незначительный вклад в ширины линий, поэтому описанные ранее методы для измерения времён релаксации больше не нужны. Для малых молекул, по крайней мере, T_2 и T_1 идентичны и могут определяться непосредственно из ширины линии на полувысоте. Широкие резонансы вместе с иногда низкой свойственной чувствительностью и низким естественным содержанием квадрупольных ядер - основные причины для их относительно низкой популярности для исследований ЯМР относительно ядер спина 1/2. Очень быстрая релаксация некоторых квадрупольных ядер может затруднять их прямое наблюдение на обычных спектрометрах высокого разрешения; см. раздел 4.5.

Скалярное взаимодействие с квадрупольными ядрами

Вероятно более уместно для практикующего химика-органика влияние, которое квадрупольные ядра имеют на спектры ядер спина 1/2 на основе их взаимного скалярного взаимодействия. Взаимодействие с квадрупольным ядром, спина I теоретически производит 2I+1 линий, так, например, углеродный резонанс $CDCl_3$ появляется как триплет 1:1:1 (^2H имеет I = 1) по причине взаимодействия $^{13}C\text{-}^2H$, составляющего 32 Гц. Однако чаще, если релаксация квадрупольного ядра быстрая относительно величины взаимодействия, расщепление может утрачиваться почти таким же способом, которым теряется взаимодействие с ядром, испытывающим быструю релаксацию AXC. Углеродный резонанс $CDCl_3$ - только триплет, потому что дейтерий имеет относительно малый квадрупольный момент, делающий его взаимодействие очевидным, в то время как всё взаимодействие с ядрами хлора (^{35}Cl и ^{37}Cl имеют I = 3/2) гасится быстрой релаксацией самих этих спинов (рис. 2.40).

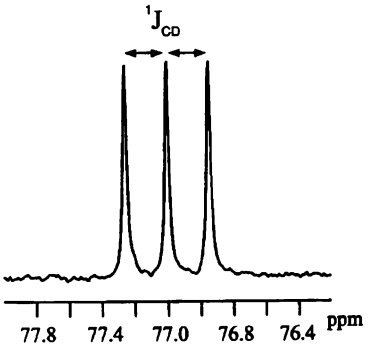


Рисунок 2.40. Спектр $CDCl_3$ углерода-13 показывает взаимодействие с дейтерием, но не с хлором-35 или хлором-37.

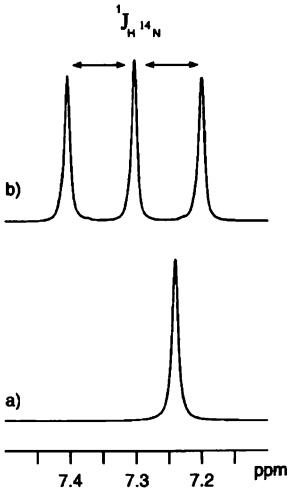


Рисунок 2.41. ^1H спектр нитрата аммония в ДМСО (a) перед и (b) после подкисления. В (b) NH_4^+ ион доминирует, и индуцированная симметрия уменьшает скорость квадрупольной релаксации ^{14}N и показывает ^1H-^{14}N константу односвязного взаимодействия (51 Гц).

Точно так же протонный резонанс от $CHCl_3$ - острый синглет, несмотря на присутствие соседних атомов хлора.

Внешний вид спектра ядер спина ½, следовательно, также находится под влиянием факторов описанных выше, которые диктуют скорость квадрупольной релаксации. Взаимодействия с квадрупольными ядрами, которые существуют в высоко симметричной окружающей среде, подобно, будут наблюдаться по причине более медленной релаксации, которую испытывают эти ядра. По этой причине протонный спектр $^{14}NH_4^+$ необычно острый триплет 1:1:1, (рис. 2.41, ^{14}N имеет I = 1), а фторный спектр $^{11}BF_4^-$ острый квартет 1:1:1:1 (рис. 2.42, ^{11}B имеет I = 3/2). Увеличение температуры образца обусловливает более медленную релаксацию квадрупольного ядра, так что имеется также больше вероятность наблюдать взаимодействия. В противоположность, *уменьшение температуры увеличивает скорости релаксации и коллапсирует тонкую структуру взаимодействий.* Это противоположно обычному поведению, связанному с динамическими системами, когда нагревание обычно ведёт к упрощению спектров по причине слияния резонансов. Вероятность исчезновения тонкой структуры взаимодействий также увеличивается с уменьшением величины константы взаимодействия. Поэтому обычно наблюдение скалярного взаимодействия с квадрупольным ядром скорее исключение, чем правило.

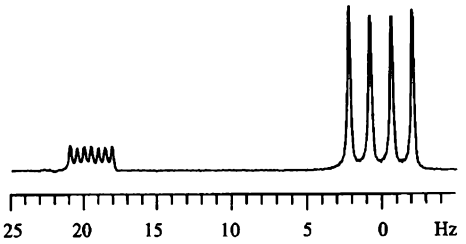


Рисунок 2.42. Спектр ^{19}F борофторида натрия в D_2O. Ион $^{11}BF_4^-$ производит чётный квартет (^{11}B I = 3/2, распространённость 80 %, J = 1,4 Гц) и $^{10}BF_4^-$ ион производит четный септет (^{10}B I = 3, распространённость 20 %, J = 0,5 Гц) разность частот между ними существует, благодаря изотопному сдвигу $^{10}B/^{11}B$.

ЛИТЕРАТУРА

[1] R. K. Harris, J. Kowalewski and S.C.D. Menezes, ***Magn Reson Chem***, 1998, **36,** 145-149.
[2] M.L. Martin, J.J. Delpeuch and G.J. Martin, **Practical NMR Spectroscopy**, Heydon, London, 1980
[3] P.J. Hore, ***Method. Enzymol.***, 1989, **176,** 64-77
[4] D.L. Rabenstein, S. Fan and T.K. Nakashima, ***J Magn Reson***, 1985, **64,** 541-546
[5] D.L.Rabenstein, G.S. Srivasta and R.W.K. Lee, ***J Magn Reson***, 1987, 71, 175-179
[6] C.K. Lanve and D.L. Rabenstein, ***Magn Reson Chem***, 1991, **29,** 409-417
[7] R.K. Harris, **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, Longman, Harlow, 1986
[8] T.C. Wong, T.T. Ang, F.S. Guziec Jr. and C.A. Moustakis, ***J Magn Reson***, 1984, **57**, 463-470
[9] I.M. Ismail, S.J.S. Kerrison and P.J. Sadler, ***Polyhedron***, 1982, **1,** 57-59
[10] M.P. Waugh and G.A. Lawless, in **Advanced Applications of NMR to Organometallic Chemistry,** eds. M. Glelen, R. Wllem, B. Wrackmeyer, Wiley, Chichester, 1996
[11] J.E. Baldwin, T.D.W. Claridge, A.E. Derome, B.D. Smith, M. Twyman and S.G. Waley, ***J.C. S. Chem Commun***, 1991,573-574.

Глава 3

Практические аспекты ЯМР высокого разрешения

Спектрометры ЯМР - дорогие приборы, представляющие вероятно одну из самых крупных статей финансовых расходов химической лаборатории, и поэтому для того, чтобы получить от них наилучшие результаты они должны правильно эксплуатироваться и обслуживаться. Эта глава изучает некоторые из фундаментальных экспериментальных аспектов, применимых к спектроскопии ЯМР растворов высокого разрешения, от инструментальных процедур до приготовления образцов для анализа. Последующие разделы также касаются основ калибровки спектрометра и оценки его эффективности.

3.1. КРАТКИЙ ОБЗОР СПЕКТРОМЕТРА ЯМР

Схематическая иллюстрация современного спектрометра ЯМР представлена на рисунке 3.1. Фундаментальное требование для спектроскопии ЯМР высокого разрешения - сильное постоянное магнитное поле, которое в настоящее время обеспечивается исключительно магнитами сверхпроводящего соленоида, изготовленными из провода сплава ниобия. Они способны производить стабильные и постоянные магнитные поля, необходимые для спектроскопии ЯМР, напряжённостью до 18.8 Тесла с современной технологией, которые соответствуют частотам резонанса протонов до 800 МГц.

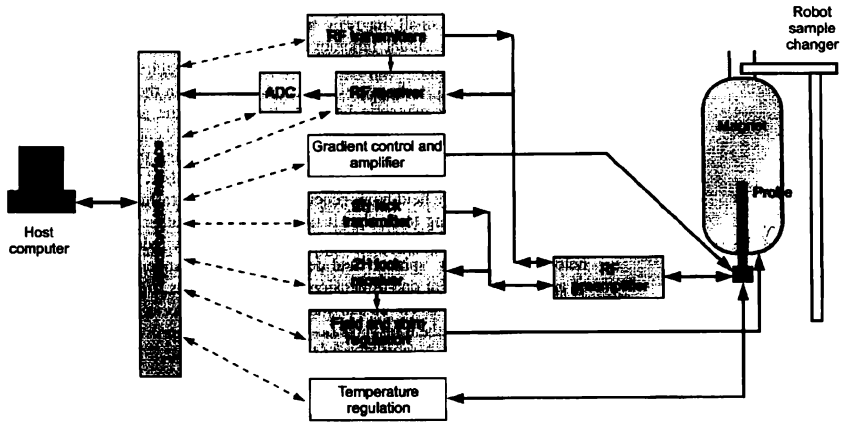


Рисунок 3.1. Иллюстрация схемы современного спектрометра ЯМР В серый цвет окрашены обязательные компоненты спектрометра, в то время как остальные можно рассматривать дополнительными (хотя импульсные градиенты поля становятся стандартом на новых приборах).

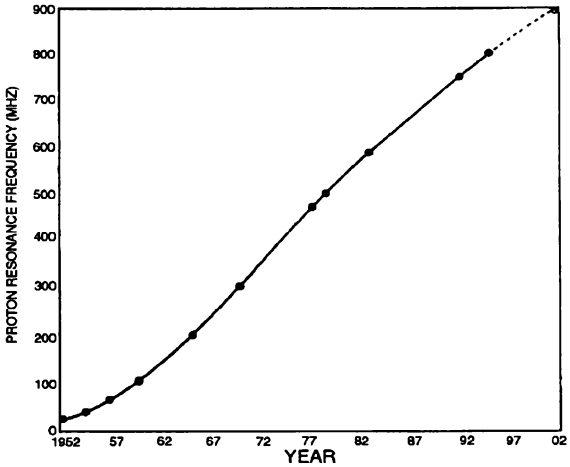


Рисунок 3.2. Увеличение частоты резонанса протонов с момента становления спектроскопии ЯМР как аналитического метода (приводится с разрешения от [1]).

Стремление постоянного увеличения магнитного поля поощрялось требованиями большей дисперсии сигнала и повышения чувствительности приборов и продолжалось с тех пор как потенциал спектроскопии ЯМР, как аналитического инструмента, был впервые осознан более 50 лет назад (рис. 3.2) и до сих пор представляет область интенсивного соревнования между изготовителями магнитов.

Соленоид магнита находится в сосуде жидкого гелия (при 4 °K), окруженный экраном излучения и охлаждаемый рубашкой жидкого азота (при 77 °K), непосредственно окруженной полостью высокого вакуума. Вся эта сборка - чрезвычайно эффективная система и после заряда магнит действует в течение многих лет без какого-либо внешнего источника питания. Он требует лишь периодической доливки криогенных жидкостей, обычно еженедельно или раз в две недели для азота, но только каждые 2-12 месяцев для гелия, в зависимости от возраста и конструкции магнита. Центральный канал дьюара магнита сам находится при температуре окружающей среды, он вмещает набор электрических катушек, известных как шиммовые катушки, которые производят их собственные малые магнитные поля, и используются для подстройки главного постоянного поля и удаляют остаточные неоднородности. Этот процесс оптимизации однородности магнитного поля, известный как *шиммирование*, требуется для каждого анализируемого образца и обсуждается в разделе 3.4. Внутри шиммовых катушек точно в центре магнитного поля помещена головка датчика - сердце любого спектрометра ЯМР. Она содержит в себе радиочастотную катушку (катушки) и связанный с ней колебательный контур, который действует как антенна, передавая и принимая электромагнитное излучение. Эти катушки далее могут быть окружены катушками импульсного градиента поля, которые служат для *уничтожения* однородности поля управляемым способом (может показаться довольно странным, что в многочисленных экспериментах однородность поля нарушается, чтобы получать довольно благоприятные эффекты). Образец, помещённый в цилиндрическую стеклянную трубку (ампулу), удерживается в турбине или, точнее, в роторе и опускается сверху в датчик на воздушной или азотной подушке. Для одномерных экспериментов образец, находясь в датчике, обычно вращается с частотой 10-20 Гц для усреднения до нуля неоднородности поля в поперечной *(x-y)* плоскости и, таким образом, для улучшения разрешения сигнала. На современных приборах для многомерных ЯМР экспериментов вращение образца теперь используется редко, поскольку это может индуцировать дополнительные модуляции сигнала и связанные с ними нежелательные артефакты. Это требует получения приемлемого разрешения при статическом образце, а это совершенно возможно с современной технологией шиммирования. Старые приборы могут ещё требовать вращения образца для всех видов работ.

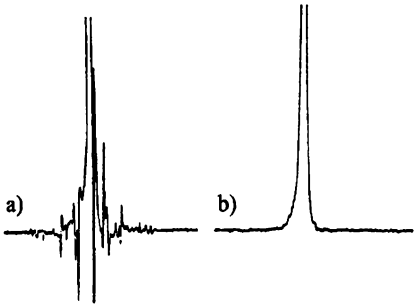


Рисунок 3.3. Колебания пола могут вызывать неприятные артефакты возле основания резонанса (a), которые могут эффективно подавляться, устанавливая сборку магнита на антивибрационной подставке (b) (рисунок любезно предоставлен фирмой Брукер).

Датчики бывают различных размеров по диаметру и длине, в зависимости от конструкции магнита, но обычно указывается диаметр ампулы, для которого они предназначены. Наиболее широко используемый диаметр ампулы - 5 мм, но применяются и другие размеры, обычно 3, 8 и 10 мм (Раздел 3.4). Датчики могут предназначаться для наблюдения одной частоты *(селективный датчик)*, могут перестраиваться в очень широком диапазоне частот *(широкополосные датчики)* или могут настраиваться на предопределенные диапазоны частот, например, двух-ядерные (дуал) или четырёх-ядерные (QNP, квадро) датчики. Во всех случаях они также способны одновременно к наблюдению частоты дейтерия, чтобы обеспечивать сигнал для управления полем (сигнал стабилизации). Часто добавляется вторая (внешняя) катушка, чтобы позволять одновременное применение импульсов на одном или больше дополнительных ядрах.

Во многих случаях полезно монтировать всю сборку магнита на системе гашения вибраций, так как колебания пола (которые могут возникнуть от многих источников, включая природные резонансы пола, кондиционеры, движение в лаборатории и так далее) могут производить вредные воздействия на спектры, которые заметны вблизи оснований резонансов (рис. 3.3). Такие артефакты имеют меньшее значение для рутинных 1D измерений, но они могут сильно препятствовать детектированию сигналов низкого уровня, таких которые, например, получаются в экспериментах гетероядерной корреляции или ядерного эффекта Оверхаузера.

В измерительной стойке спектрометра находятся радиочастотные передатчики [3] и система детектирования для канала наблюдения, дополнительные каналы передатчика, канал стабилизации и генератор импульсного градиента поля. Большинство спектрометров поставляются либо в двух-канальной, либо в трёх-канальной конфигурации, плюс канал стабилизации. Спектрометр контролируется через главный компьютер, мозги спектрометра, который в последние годы обычно опирается на систему UNIX и связан со спектрометром через соответствующий интерфейс. Однако у некоторых изготовителей, кажется, существует тенденция к применению Windows рабочих станций ПК для этой цели. Электрические аналоговые сигналы ЯМР преобразуются в цифровой формат, требуемый главным компьютером, при помощи аналого-цифрового преобразователя (АЦП), характеристики которого могут иметь большое значение для регистрации данных ЯМР (Раздел 3.2). Компьютер спектрометра также обрабатывает полученные данные, хотя это может также выполняться «автономно» на других (в том числе и на ПК) при помощи одного из множества доступных пакетов программ для ЯМР.

---

[3] Ссылка на «канал(ы) декаплирования» часто используется при упоминании этих дополнительных каналов, но это не следует принимать слишком буквально, поскольку они могут использоваться только для применения всего нескольких импульсов, а не настоящей декаплирующей последовательности. Эта номенклатура происходит от ранних разработок спектрометров ЯМР, когда дополнительный канал был способен производить только «шумовое декаплирование», обычно протонов.

К прибору также могут добавляться различные дополнительные периферальы, такие как блоки изменяемой температуры, которые позволяют регулирование температуры образца в датчике, автоматизированные устройства смены образцов, и так далее. Недавно получило популярность сопряжение ЯМР-спектрометра с другими аналитическими методами, такими как ВЭЖХ, особенно в фармацевтической промышленности. Их полезность будет, очевидно, зависеть от типа обрабатываемых образцов и природы используемых экспериментов.

При развернувшемся соревновании между изготовителями приборов за создание постоянно увеличивающихся магнитных полей, легко убедиться, что наличие прибора, работающего при самой высокой доступной напряжённости поля, очень важно в современной лаборатории. В то время как изучение биологических макромолекул без сомнения извлекает выгоду от доступности большей чувствительности и дисперсии, проблематичные малые или среднего размера молекулы часто также лучше обрабатывать с помощью соответствующих современных методов. Ограничения дисперсии сигналов обычно менее жёсткие, и часто могут преодолеваться, используя соответственно выбираемые многомерные эксперименты. Ограничения чувствительности, которые обычно возникают, благодаря недостатку материала, а не проблем растворимости или агрегации, могут разрешаться, используя датчик меньшей геометрии (Раздел 3.3.3). В конце концов, новый датчик будет стоить, по крайней мере, на порядок величины меньше, чем новый спектрометр. Так, например, если имеется недостаточно материала, чтобы накопить спектр углерода-13, не изыскивая время на более высоко-полевом приборе, можно было бы рассмотреть использование протон-детектируемого эксперимента гетероядерной корреляции, чтобы определять эти сдвиги косвенно. Кроме таких соображений, имеются подлинные физические причины, в значительной степени касающиеся природы релаксации ядерного спина, которые означают, что некоторые эксперименты на малых молекулах, вероятно, будут работать *менее хорошо* при очень высоких магнитных полях. В частности это относится к ядерному эффекту Оверхаузера (глава 8), одной из основных методик ЯМР в доказательстве структуры. Для многих случаев обычно имеющегося в химической лаборатории прибора более низкого поля, но современной спецификации, достаточно, чтобы позволить химику провести некоторые из несметного числа современных импульсных ЯМР экспериментов на интересующих образцах и последовательно решить проблему. Лучшее понимание этих современных методов ЯМР должно помочь в выборе подходящих экспериментов.

3.2. РЕГИСТРАЦИЯ И ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Этот раздел исследует некоторые из процедур спектрометра, которые касаются сбора, оцифровки и вычислительной манипуляции данных ЯМР, включая выбор некоторых основных параметров, которые определяют способ, которым получаются данные. Такие технические особенности могут показаться неуместными любому, кто не считает себя спектроскопистом, но важность понимания нескольких основных соотношений между экспериментальными параметрами происходит от необходимости распознавать артефакты спектра или испорченные данные, которые могут возникнуть от неправильных установок параметров, и оценить ограничения, свойственные ЯМР измерениям. Только тогда можно полно и правильно использовать имеющуюся спектроскопическую информацию.

3.2.1. Импульсное возбуждение

Широко признаётся, что современные спектрометры ЯМР используют «короткий импульс» радиочастотной энергии, чтобы возбуждать ядерные резонансы в интервале частот. Этот импульс является *монохроматическим* излучением передатчика, однако, переходы ядерного спина, вызывающие наши спектры, различаются по энергии согласно их различным ларморовым частотам, и таким обра-

зом, казалось бы, что импульс не сможет возбуждать одновременно все резонансы в спектре. Однако принцип неопределённости Гейзенберга сообщает нам, что возбуждающий импульс продолжительности Δt имеет связанную с ним неопределённость частоты или протяженность частоты (полосу частот) 1/Δt Гц и, таким образом, эффективно ведет себя, как будто он был полихроматичным.

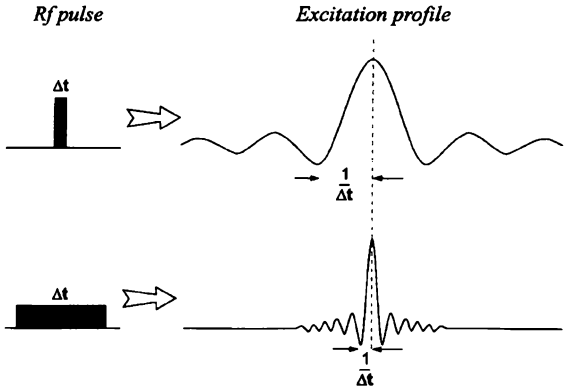


Рисунок 3.4. Одиночный монохроматический радиочастотный импульс имеет эффективную ширину полосы возбуждения, которая обратно пропорциональна продолжительности импульса. Короткий интенсивный импульс, следовательно, способен возбуждать в широком окне частот (a), в то время как более длинный более слабый импульс обеспечивает более селективный профиль возбуждения (b).

Продолжительность РЧ импульса Δt обычно упоминается как *ширина импульса*. Короткий, импульс высокой мощности обеспечивает возбуждение по широкому окну частот, в то время как более длинный импульс малой мощности (который обеспечит тот же самый чистый угол отклонения) эффективен в значительно меньшей области частот (рис. 3.4).

Рассмотрим протонный спектр, зарегистрированный при 400 МГц с частотой передатчика, помещённой в центре интересующей спектральной области. Спектральное окно шириной 10 мд соответствует 4000 Гц. Следовательно, нам нужно возбуждать более чем ±2000 Гц, что означает, что продолжительность импульса должна составлять 0,5 мс или меньше. Частота наблюдения для углерода-13 на том же самом приборе составляет 100 МГц, так что типичная ширина спектра 200 мд соответствует ±10 кГц, требуя импульса только 100 мкс, но со значительно более высокой мощностью, поскольку его энергия теперь распределяется в более широкой области. Если сделать импульс очень длинным (скажем, десятки миллисекунд) и слабым, он будет возбуждать только в довольно малом диапазоне частот, вызывая *селективное возбуждение* только части спектра. Как станет очевидным в более поздних главах, применение методов селективного возбуждения - теперь банальность в многочисленных ЯМР экспериментах. Длительные импульсы малой мощности, которые возбуждают только выбранную область спектра, обычно упоминаются как «мягкие» импульсы, в то время как те, которые имеют короткую продолжительность и высокую мощность, называются «жёсткими» импульсами. Если не указано явно, все импульсы в этой книге будут подразумеваться неселективными жёсткими импульсами.

Вне-резонансные эффекты

На практике современные приборы ЯМР проектируются, чтобы производить высокомощные 90° импульсы ближе к 10 мкс, а не в сотни микросекунд, предсказанные из вышеупомянутых аргументов. Это делается, чтобы подавить нежелательные эффекты, которые возникают когда частота РЧ импульса *находится вне резонанса, то есть*, когда частота передатчика не точно соответствует ларморовой частоте ядер, ситуация значительного практического значения, которая игнорировались до настоящего времени.

Как показано в предыдущей главе, спины, которые являются резонансными, в течение импульса поворачивают их вектор намагничивания вокруг РЧ поля B_1 к *x-y* плоскости. Те спины, которые являются вне-резонансными, будут, в дополнение к этому $\mathbf{B_1}$ полю, испытывать *остаточный* компонент ΔB *статического* B_0 поля вдоль z-оси вращающейся системы координат, для которой:

$$\frac{\gamma \Delta \mathbf{B}}{2\pi} = \text{ɣ}\Delta \mathbf{B} = \Delta \nu \mathrm{Hz} \tag{3.1}$$

где $\Delta\nu$ представляет частоту отстройки от опоры. Векторная сумма B_1 и ΔB - *эффективное поле* B_{eff}, испытываемое вне-резонансным спином, вокруг которого он вращается (или, правильнее, нутирует) (рис. 3.5). Она больше, чем само B_1, и отклоняется от *x-y* плоскости на угол θ, где:

$$\tan\theta = \frac{\Delta B}{B_1} \tag{3.2}$$

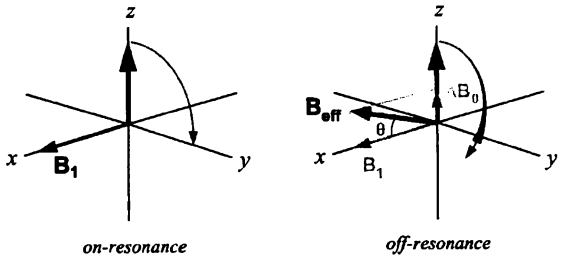


Рисунок 3.5. Возбуждение намагничивания, для которого резонансная РЧ (a) обусловливает вращение суммарного вектора относительно приложенного РЧ поля B_1. Те спины, которые испытывают вне-резонансное возбуждение (b), вместо этого, поворачиваются относительно эффективного РЧ поля B_{eff}, которое отклоняется от *x-y* плоскости на угол θ, который увеличивается с увеличением отстройки.

Для тех спинов, которые дальше от резонанса, угол *θ* становится больше, и чистое вращение к *x-y* плоскости уменьшается пока, в пределе, θ не достигает 90° В этом случае вектор объёмной намагниченности просто остается вдоль +Z-оси и, таким образом, не испытывает никакого возбуждения вообще. Другими словами, ядра резонируют вне *возбуждающей ширины полосы* импульса. Так как вне-резонансный вектор отклоняется от оси y в течение импульса, он также приобретает (частотно-зависимую) разность фаз относительно резонансного вектора (рис. 3.6). Она обычно мала и является примерно линейной функцией частоты и поэтому может корректироваться регулировкой фазы конечного спектра (Раздел 3.2.8).

Как вредные вне-резонансные эффекты сказываются в импульсном эксперименте, зависит до некоторой степени от используемого угла отклонения импульса. 90° возбуждающий импульс идеально переносит намагничивание от +z оси в *x-y* плоскость, но при вне-резонансных условиях наклон эффективного поля будет помещать вектор выше этой плоскости. Однако большая величина B_{eff} будет означать, что вектор намагничивания следует по более длинной траектории, а это увеличивает чистый угол поворота и производит некоторую компенсацию, и, следовательно, *90° импульс довольно терпим к вне-резонансным эффектам*, судя по удалению z-намагничивания (рис. 3.7a). В противоположность, 180° инвертирующий импульс идеально производит чистое -z намагничивание, не оставляя ничего в поперечной плоскости, но теперь увеличенный эффективный угол поворота вреден, имея тенденцию перемещать вектор дальше от Южного полюса. Таким образом, ***180° импульсы не работают хорошо, когда применяются вне-резонансно*** (рис. 3.7b), и могут быть источником плохой эффективности эксперимента. На практике относительно просто обеспечивать достаточно

короткие импульсы (около 10 мкс), чтобы гарантировать достаточно однородное, возбуждение и инверсию в относительно малых диапазонах частот, встречающихся в спектроскопии ЯМР ^{1}H.

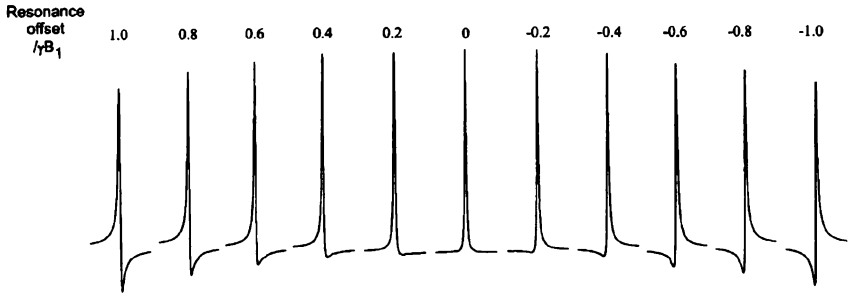
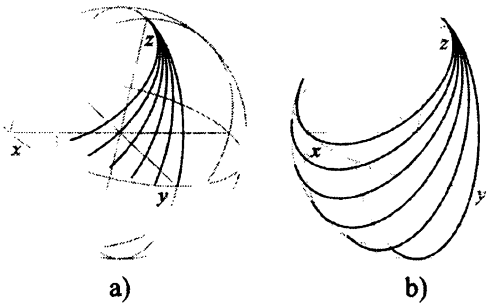


Рисунок 3.6. Экспериментальные профили возбуждения для 90° импульса, как функция положения резонанса относительно силы приложенного РЧ поля γB_1. Большие отстройки вводят большие фазовые ошибки и уменьшают амплитуду результирующей поперечной намагниченности.

Рисунок 3.7 Траектории возбуждения как функция положения резонанса для a) 90° импульса и b) 180° импульса. Отстройка изменяется от нуля (при резонансе) до $+\gamma B_1$ Гц шагами по $0{\div}2\gamma B_1$ (как на рисунке 3.6). 90° импульс имеет степень «компенсации отстройки», судя по его способности генерировать поперечную намагниченность в широкой ширине полосы частот. **180° импульс, напротив, довольно плохо работает далеко от резонанса**, оставляя вектор далеко от целевого Южного полюса и со значительным поперечным компонентом.



Однако для ядер, которые обладают намного большей дисперсией частоты, таких как ^{13}C или ^{19}F, это встречается не часто, и может происходить резонансное искажение и/или ослабление, и в результате в многоимпульсных экспериментах могут возникнуть ложные сигналы. Один из подходов к преодолению этих ограничений - применение кластеров импульсов, известных как *составные импульсы*, которые призваны, чтобы компенсировать эти (и другие) дефекты; см. главу 9.

3.2.2. Детектирование сигнала

Прежде, чем переходить к рассмотрению, как регистрируют слабые сигналы ЯМР, мы кратко рассмотрим процесс детектирования, который происходит в приёмнике ЯМР. Энергия, испускаемая возбужденными спинами, производит мизерные аналоговые электрические сигналы, которые должны преобразовываться в ряд двоичных чисел для обработки компьютером. Этот процесс *оцифровки* (Раздел 3.2.3) должен происходить для всех частот в спектре. Как химики, мы, в действительности, заинтересованы только знанием *разностей химических сдвигов* между ядрами, а не их *абсолютных* ларморовых частот, так как именно из этих разностей выводят различия в химических окружениях. Как мы уже знаем, ларморовы частоты обычно составляют десятки или сотни мегагерц, в то время как диапазоны химических сдвигов охватывают только несколько килогерц. Например, протонный

спектр, зарегистрированный при 200 МГц, соответствует диапазону частот только 2-3 кГц, и даже для углерода (50 МГц на том же самом приборе) диапазон частот составляет только около 10 кГц. Следовательно, вместо того, чтобы оцифровывать сигналы на многие мегагерцы и сохранять только немногие интересующие килогерцы, более разумно вычитать опорную частоту из детектированного сигнала *перед оцифровкой*, оставляя только интересующее окно частот (рис. 3.8). Результирующие сигналы теперь находятся в *звуковом* диапазоне, который, для людей по крайней мере, соответствует частотам меньше, чем 20 кГц (так можно также слышать резонансы ЯМР!).

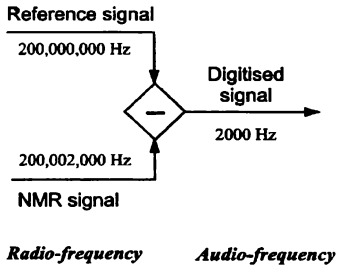


Рисунок 3.8. Процесс детектирования ЯМР Фиксированная опорная частота вычитается из детектированного сигнала ЯМР, так что оцифровываются и регистрируются только *разности частот* между резонансами.

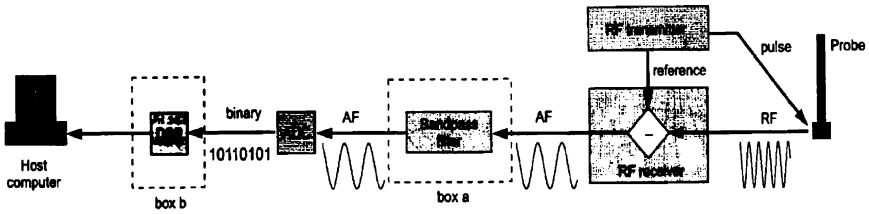


Рисунок 3.9. Иллюстрация схемы сбора данных ЯМР Импульсное РЧ возбуждение стимулирует отклик ЯМР в датчике, который затем усиливается и детектируется в приёмнике. Опорная частота приёмника (равная несущей РЧ импульса) вычитается, чтобы оставлять только звуковые частоты (AF) которые оцифровываются аналого-цифровым преобразователем (ADC или АЦП в русском варианте), а затем сохраняются в компьютере. Функции частей, изображённых прямоугольниками, описываются в тексте ниже (DSP· цифровой процессор сигнала).

Опорная частота обычно выбирается равной несущей частоте первого импульса, используемого для возбуждения спиновой системы, и подаётся как непрерывный опорный сигнал передатчика (рис. 3.9). Этот процесс детектирования точно аналогичен представлению вращающейся системы введённой в предыдущей главе, где опорная частота вращающейся системы координат равна частоте РЧ импульса. Если вы ранее чувствовали небольшие затруднения по поводу возможно необоснованного применения формализма вращающейся системы координат, тогда возможно понимание, что имеется подлинная экспериментальная параллель во всех спектрометрах, поможет рассеять ваши сомнения. Оцифрованный ССИ, который вы видите, следовательно, содержит только звуковые частоты, которые остаются после вычитания опоры, и именно они производят резонансы, наблюдаемые в конечном спектре после преобразования Фурье.

3.2.3. Регистрация ССИ

Условие Найквиста

Чтобы правильно определять частоту сигнала ЯМР, он должен оцифровываться с соответствующей скоростью. *Теорема о выборках или теорема Найквиста* сообщает нам, что, чтобы характери-

зовать обычный, колеблющийся сигнал правильно, он должен определяться как минимум двумя точками данных на длину волны. Другими словами, чтобы характеризовать сигнал частоты F Гц, мы должны делать выборки со скоростью, по крайней мере 2F; что также известно как *условие Найквиста*. На языке ЯМР самая высокая распознаваемая частота называется *шириной спектра* SW (рис. 3.10). Интервал времени между зарегистрированными точками данных упоминается, как *время задержки для выборки одного значения* DW, определяется как:

$$DW = \frac{1}{2SW} \tag{3.3}$$

Сигналы с частотами, которые меньше чем, или равны ширине спектра, будут характеризоваться правильно, поскольку они будут стробироваться двумя или больше точками на длину волны, в то время как сигналы с более высокими частотами будут определяться неправильно, и, фактически, будут появляться в спектре на частотах, которые ниже, чем их истинные значения.

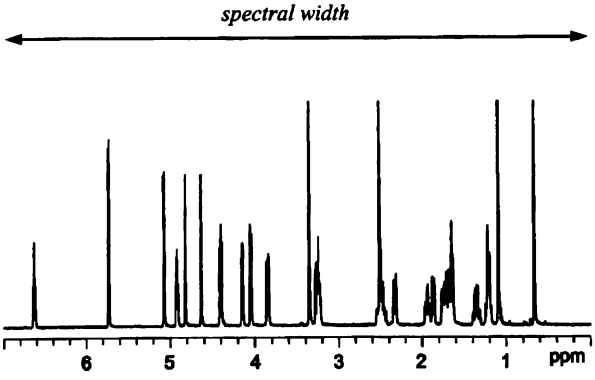


Рисунок 3.10. Ширина спектра определяет размер наблюдаемого окна частот. Только в этом окне правильно характеризуются частоты линий.

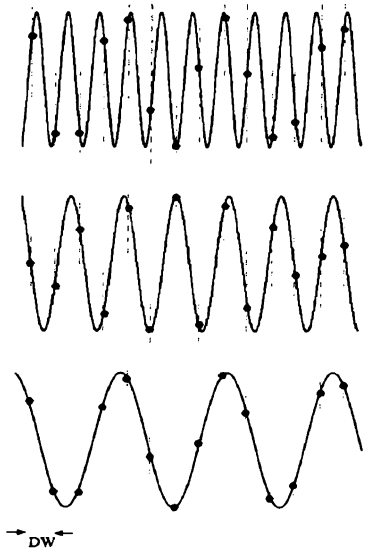


Рисунок 3.11. Условие Найквиста. Чтобы правильно характеризовать частоту сигнала ЯМР, он должен стробироваться по крайней мере дважды на длину волны, т.е., как говорят, попадать в пределы ширины спектра. Регистрация сигналов (a) и (b) отвечает этим критериям. Сигналы с частотами, слишком высокими, чтобы удовлетворять этому условию, мигрируют обратно в пределы ширины спектра, и, таким образом, появляются при неправильной частоте. Фрагмент выборки сигнала (c) соответствует фрагменту (a), и, следовательно, он регистрируется неправильно, как имеющий низкую частоту.

Чтобы понять, почему это происходит, рассмотрим процесс выборки для трёх частот, две в пределах и третья вне спектральной ширины (рис. 3.11). Зарегистрированные точки данных самой высокой частоты ясно соответствуют точкам нижней из этих трех частот, и этот сигнал будет, следовательно, появляться с неправильной частотой в спектральном окне. Резонансы, которые появляются при неправильных частотах, потому что в действительности они существуют вне спектральной ширины, как говорят, являются *пришлыми* или *завёрнутыми обратно* в спектр. Их местоположение при такой ошибке зависит от того, которая из двух обычно используемых схем *квадратурного детектирования* используются, что объясняется в разделе 3.2.4.

Фильтрование шума

Один особенно коварный эффект миграции или заворота в том, что заворачиваются в спектральное окно не только резонансы ЯМР, но также и шум. Это может серьезно угрожать чувствительности, так как шум может простираться практически по бесконечному диапазону частот (так называемый белый шум), все из которых потенциально могут заворачиваться в спектр и накладываться на резонансы ЯМР. Поэтому важно предотвращать это, отфильтровывая все сигналы выше некоторого порога частоты *звуковым полосовым фильтром* после детектирования, но до оцифровки (рис. 3.9, окно а). Эффект фильтрации шума продемонстрирован на рисунке 3.12, а улучшение отношения сигнал-шум в спектре, использовавшем его, совершенно очевидно на рисунке 3.13. Ширина полосы пропускания фильтра изменяется, чтобы позволять применение различных ширин спектра, и обычно автоматически устанавливается программным обеспечением спектрометра немного больше, чем спектральное окно. Это необходимо, потому что аналоговые фильтры не совершенны и не обеспечивают идеально острой отсечки частоты, а вместо этого имеют тенденцию устойчиво уменьшать амплитуду шума в зависимости от величины отстройки частоты сигнала от частоты среза фильтра, как показано на рисунке 3.12. Кроме того, сигналы, находящиеся вблизи частоты среза фильтра, подвергаются дополнительным фазовым искажениям.

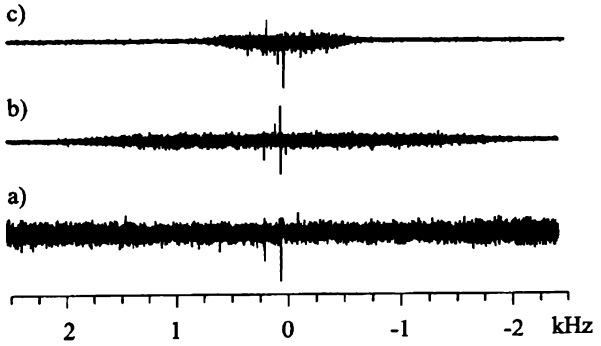


Рисунок 3.12. Удаление шума аналоговыми фильтрами. Спектры записывались при ширине спектра 5 кГц при отсутствии образца в датчике. Окно аналогового фильтра устанавливалось (a) 6 кГц, (b) 3 кГц и (c) 1 кГц и связанное ослабление шума очевидно, хотя точка отсечки не определяется точно.

Практическое следствие этого в том, что эти фильтры могут ослаблять интенсивность и сигналов, попадающих на края спектра, и таким образом могут препятствовать точному измерению интенсивности сигнала, и поэтому разумно заботиться, чтобы резонансы не попадали на края. Аналоговые фильтры могут также вводить множество других искажений в спектр, и в последние годы применение цифровых методов фильтрации, имеющих превосходные характеристики, стало стандартной особен-

ностью современных спектрометров ЯМР. Цифровая обработка сигнала рассматривается в разделе 3.2.6.

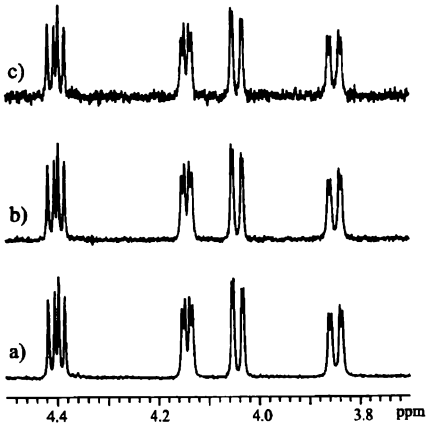


Рисунок 3.13. Действие аналоговых фильтров на отношение сигнал/шум. Спектр (a) регистрировался с правильной шириной фильтра (1,25 ширины спектра), а (b) и (c) с увеличенной в 10 и в 100 раз полосой пропускания фильтра, соответственно.

Время регистрации и цифровое разрешение

Полный период регистрации ССИ, известный как *время регистрации* AQ (от английского слова "acquisition"), в конечном счете, диктуется частотным разрешением, требуемым в конечном спектре. Из принципа неопределенности разрешение двух линий, отстоящих друг от друга на Δv Гц, требует сбора данных в течение, по крайней мере, 1/Δv секунд. Если выборки ССИ делаются в течение слишком короткого времени, разности частот не могут разрешаться и тонкая структура теряется (минимальная ширина линий, которые могут разрешаться, составляет приблизительно 0,6/AQ). Аналогично, если сигнал затухает быстро, тогда невозможно делать его выборки в течение долгого периода времени, что снова может не позволять разрешить тонкую структуру. В этом случае, быстрый спад подразумевает большую ширину линии, возникающую из природных (поперечных) релаксационных процессов, или от плохой однородности поля, и невозможно восстановить разрешение, продлевая время регистрации. Таким образом, при выборе подходящего времени регистрации следует учитывать вероятные разности частот, которые следует разрешать, и времена релаксации наблюдаемых спинов.

Время регистрации определяется скоростью оцифровки (которая диктуется шириной спектра и определяет время задержки для выборки одного значения DW) и тем, сколько всего точек данных стробируется. Если ССИ содержит TD точек данных временной шкалы тогда:

$$AQ = DW \cdot TD = \frac{TD}{2SW} \tag{3.4}$$

Имея дело с конечным спектром, мы имеем дело с частотой, а не со временем, и необходима некоторая мера того, насколько хорошо оцифровываются резонансы в спектре. Интересующая величина – разность частот между смежными точками данных в спектре, или *цифровое разрешение* DR (приводится в Герцах на точку данных или просто Гц/точка). Следует подчеркнуть, что это не то, о чём говорят спектроскописты, когда они упоминают «разрешение», достигнутое на спектрометре, поскольку оно связано с однородностью магнитного поля. Цифровое разрешение относится только к отношению частотного окна к количеству точек данных, которое мало для хорошо оцифрованного спектра, но большое при плохой оцифровке.

Последующим преобразованием Фурье генерируются два набора данных, представляющие «действительный» и «мнимый» спектры (Раздел 3.3), поэтому действительная часть, с которой обычно имеют дело, содержит половину точек данных исходного ССИ (при отсутствии дальнейших манипуляций) и его размер данных - SI, следовательно, TD/2. Цифровое разрешение - тогда:

$$DR = \frac{\textbf{Полное окно частот}}{\textbf{Общее число точек данных}} = \frac{SW}{SI} = \frac{2 \cdot SW}{TD} = \frac{1}{AQ} \quad (3.5.)$$

Таким образом, цифровое разрешение - просто обратная величина времени регистрации, поэтому чтобы накопить хорошо оцифрованный спектр, нужно делать выборки данных в течение длительного периода времени; ясно, это тот же самый аргумент, который представлен выше.

Эффект неправильного цифрового разрешения демонстрируется на рисунке 3.14. Ясно, при высоком значении, то есть при коротком AQ, тонкая структура не может разрешаться. Подлинный спектр может узнаваться только при длительных временах регистрации. Для протонной спектроскопии необходимо разрешать разности частот несколько меньшие, чем 1 Гц, чтобы уметь распознавать малые взаимодействия, поэтому обычно используются времена регистрации порядка 2-4 секунд, что соответствует цифровым разрешениям от 0,5 до 0,25 Гц/точка. Это затем ограничивает точность, с которой могут делаться измерения частоты, включая сдвиги и взаимодействия, (даже когда списки пиков приводят резонансные частоты со многими знаками после десятичной точки).

Ситуация несколько иная при изучении ядер, отличающихся от протонов, однако, так как они часто представляют слишком мало взаимодействий (особенно при протонном декаплировании), и потому что обычно больше заинтересованы в оптимизации чувствительности, не желают регистрировать ССИ в течение длительных периодов времени и, таким образом, регистрировать больше шума. Так как нет необходимости с высокой точностью определять формы линии, удовлетворяет низкое цифровое разрешение, чтобы разрешать разности химических сдвигов, и 1-2 Гц/точка (AQ = 0.5-1 с) обычны в ^{13}C ЯМР. Исключения составляют ядра с высоким естественным содержанием, которые могут показывать гомоядерные взаимодействия, такие как ^{31}P, или когда спектр используется для оценки отношения содержания соединений в растворе. Это справедливо, например, в применении производных «кислот Мошера» для определения преобладания энантиомеров из ^{19}F ЯМР спектров, для которых резонансы должны оцифровываться хорошо, чтобы представить истинную интенсивность каждого фрагмента. В таких случаях параметры, которые могут использоваться для «рутинного» наблюдения ^{19}F, скорее всего не годятся для количественных измерений. Точно так же применение ограниченного цифрового разрешения в обычных спектрах углерода-13 - одна из причин, почему интенсивности сигналов не обеспечивают надежного признака относительных концентраций. В противоположность,

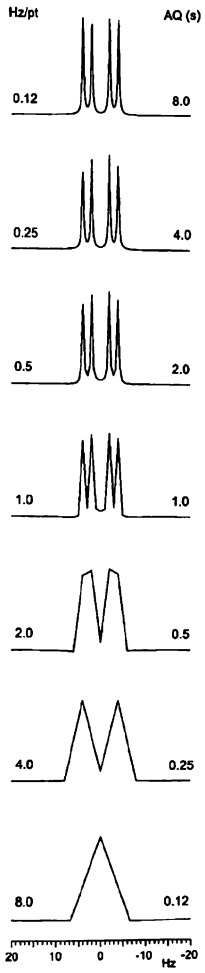


Рисунок 3.14. Влияние времён регистрации данных на способность разрешать тонкую структуру. Более длительные времена регистрации соответствуют более высоким уровням оцифровки (меньше Гц/точка), которые здесь позволяют характеризовать структуры взаимодействий в двойном дублете (J = 6 и 2 Гц).

спектры быстро релаксирующих квадрупольных ядер содержат широкие резонансы, которые требуют только низкого цифрового разрешения и, следовательно, коротких времён регистрации.

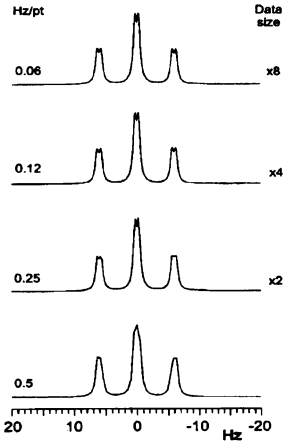


Рисунок 3.15. Чтобы увеличивать тонкую структуру и улучшать определение формы линии, можно использовать дополнение нулями.

Дополнение нулями и артефакты усечения

В то время как отклик ЯМР спадает по всему ССИ, шумовой компонент остается достаточно постоянным и, в конечном счете, будет доминировать в хвосте ССИ. На этом этапе в продолжении регистрации мало преимуществ, так как оно только добавляет шум к конечному спектру. *При условии, что ССИ спал до нуля*, когда прекращается регистрация, можно искусственно улучшать цифровое разрешение, добавляя нули к концу ССИ. Этот процесс известен *как дополнение нулями*. Он интерполирует эти добавленные точки данных в частотном измерении, и таким образом улучшает определение форм резонансных линий (Рис. 3.15).

Показано [2], что, удваивая число точек данных во временной шкале, добавляя в конец нули (однократное «дополнение нулями») можно улучшать частотное разрешение в спектре. Причина этого улучшения происходит от факта, что информация в ССИ расщепляется на две части (действительную и мнимую) после преобразования, так что информация эффективно теряется при рассмотрении только действительной (поглощения) части. Удвоение размера данных восстанавливает эту потерянную информацию и, следовательно, является полезным инструментом в обычном анализе протонных спектров (можно было бы конечно просто удваивать количество точек полученных данных, но это ведет к уменьшению чувствительности и требует большего количества времени спектрометра). Дальнейшее дополнение нулями просто увеличивает *цифровое разрешение* спектра, интерполируя точки данных, так что никакая новая информация не может появляться, и улучшение это чисто косметическое. Однако так как это ведет к лучшему определению каждой линии, это может еще быть чрезвычайно полезным при подробном анализе тонкой структуры мультиплетов или при измерении точных интенсивностей резонансов, в определении преобладающего энантиомера, например, при помощи хиральных реагентов сольватирования. В 2D экспериментах времена регистрации обязательно сохраняются довольно короткими, и дополнение нулями рутинно применяется для улучшения внешнего вида конечного спектра. Более изощрённый подход к продлению временного сигнала, известный как *линейное предсказание*, описывается ниже.

Если ССИ не спал до нуля в конце времени регистрации, набор данных, говорят, *усекается* и это ведет к искажениям в спектре после дополнения нулями и преобразования Фурье.

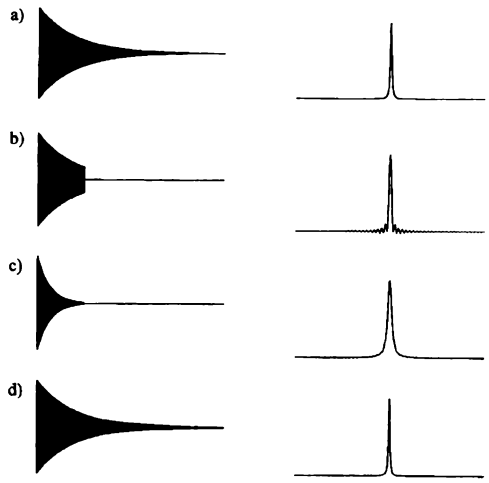


Рисунок 3.16. Обработка усечённого ССИ. (a) Полный ССИ и соответствующий резонанс, (b) усечённый ССИ, который расширялся дополнением нулями, производит синусный звон в спектре, (c) аподизация ССИ в (b) вместе с заполнением нулями и (d) линейным предсказанием ССИ в (b).

Искажения возникают из Фурье преобразования ступеньки в ССИ, результат которого описывается функцией (sin *x*)/*x*, также известный как *sinc x*. Рис. 3.16 показывает, что это производит нежелательные фрагменты окружения, которые симметричны относительно основания резонанса, часто упоминаемые как «синусный звон». Чтобы избегать этой проблемы, важно либо убедиться, что время регистрации достаточно длинное, чтобы заставить ССИ гладко затухать до нуля при помощи подходящей функции формирования (Раздел 3.2.7) или искусственно продлевать ССИ линейным предсказанием.

В протонной спектроскопии времена регистрации достаточно длинные, поэтому артефакты усечения редко наблюдаются в обычных спектрах, хотя они могут быть заметными вокруг резонансов малых молекул с длинными временами релаксации, например, линии растворителя. Как утверждалось выше, времена регистрации для других ядер обычно поддерживаются короткими, и ССИ обычно усекаются. Это, однако, редко является проблемой, так как существует обычная практика применять функцию окна для увеличения чувствительности таких спектров, которая также непосредственно приводит спад ССИ к нулю, таким образом, удаляя эффекты усечения. Попробуйте обработать стандартный ^{13}C спектр Фурье-преобразованием прямо, но без применения функции окна. Для некоторых резонансов вы, вероятно, получите отрицательные отклики в спектрах, которые оказываются ошибками фазирования. Фактически эти искажения возникают полностью от низкого использованного цифрового разрешения, то есть от коротких времен регистрации, и соответствующего усечения ССИ [3] (рис. 3.17a). Применение простой затухающей функции (Раздел 3.2.7) удаляет эти эффекты (рис. 3.17b) и, когда используется таким образом, часто упоминается как *аподизация*, что буквально означает «удаление ног». Подобные рассуждения применяют к усечённым 2D наборам данных, где формирующие функции играют существенную роль.

Линейное предсказание

Метод линейного предсказания (LP) может играть множество ролей в обработке данных ЯМР [4,5], от отделения испорченных или искажённых данных, до полной генерации данных частотного измерения из ССИ; альтернативы ФП. Здесь мы рассмотрим его наиболее популярное использование, известное как прямое линейное предсказание, которое продлевает усечённый ССИ. Вместо простого добавления нулей в конце, этот метод, как предполагает название, предсказывает значения отсутст-

вующих точек данных, используя информационное содержание предыдущих точек, и, таким образом, действительно продлевая ССИ (рис. 3.16d).

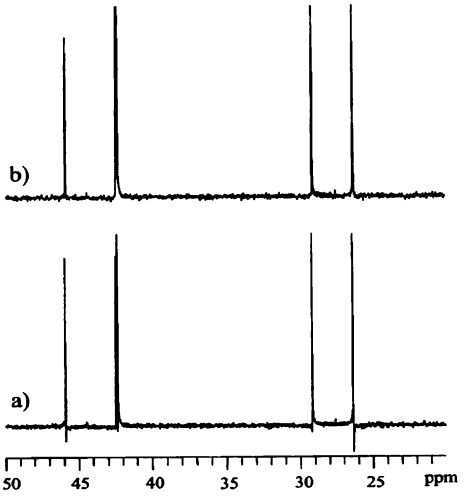


Рисунок 3.17. Углеродные спектры часто отображают искажения при прямом преобразовании (a), которые кажутся фазовыми ошибками, но которые фактически происходят от короткого времени регистрации. Применение аподизационной функции уширения линий до преобразования удаляет эти искажения (b - уширение линий 1 Гц).

Во временной последовательности точек данных значение отдельной точки d_n, может оцениваться из линейной комбинации непосредственно предшествующих значений:

$$d_n = a_1 d_{n-1} + a_2 d_{n-2} + a_3 d_{n-3} + a_4 d_{n-4} \ldots \qquad (3.6)$$

Где a_1, a_2... и так далее представляют LP коэффициенты. Число коэффициентов (упоминаемое как *порядок* предсказания) соответствует числу использованных точек данных для предсказания следующего значения в последовательности. При условии, что коэффициенты могут определяться из известных данных, затем можно экстраполировать вне полученных точек данных. Повторение этого процесса, включающее недавно предсказанные точки, в конечном счете, ведет к продлённому ССИ.

Этот процесс ясно превосходит дополнение нулями и производит намного лучшее приближение к истинным данным, чем простое добавление нулей в конце. Он улучшает разрешение, избегает необходимости применения сильных аподизационных функций и очень ослабляет ошибки усечения. Естественно, метод имеет свои ограничения, наиболее жёсткое из них - требование высокого отношения сигнал/шум в ССИ для точной оценки LP коэффициентов. Успешное выполнение также требует, чтобы число точек, использованное для предсказания, было значительно больше, чем число линий, которые включают в себя ССИ. Это может быть проблемой для 1D наборов данных со многими составляющими сигналами, поэтому линейное предсказание таких данных используется менее широко. Метод гораздо более ценен для расширения усечённых наборов данных в косвенно детектированных измерениях из 2D или 3D экспериментов (вам, возможно, захочется вернуться к этим обсуждениям, когда вы ознакомитесь с 2D подходом, см. главу 5). Здесь индивидуальные интеферограммы содержат довольно немного линий (рассмотрите колонку из 2D набора данных) и, таким образом, лучше подходят для предсказания, обеспечивая адекватную чувствительность. Применение линейного предсказания в обычном накоплении 2D спектров органических молекул подверглось подробному исследованию [6]. Обычно используется предсказание от двух- до четырёх-кратного, так, например, 128 t_1 точек данных могут легко расширяться до 256 (2-кратно), или 512 (4-кратно). Аподизация данных будет еще, вероятно, требоваться, хотя не так сильно, как для необработанных данных, и дополнение нулями также может применяться одновременно для дальнейшего улучшения оцифровки. Рис.

3.18 ясно демонстрирует улучшенное разрешение, достижимое с помощью линейного предсказания в косвенном измерении двумерного эксперимента гетероядерной корреляции. Те же самые принципы могут использоваться в *обратном* линейном предсказании. Точки данных в начале ССИ иногда портятся звоном в схеме приемника, когда начинается детектирование, что вызывает искажение базовой линии спектра. Замена этих точек неиспорченными предсказанными точками устраняет искажение; пример этого вы найдёте в разделе 3.5.

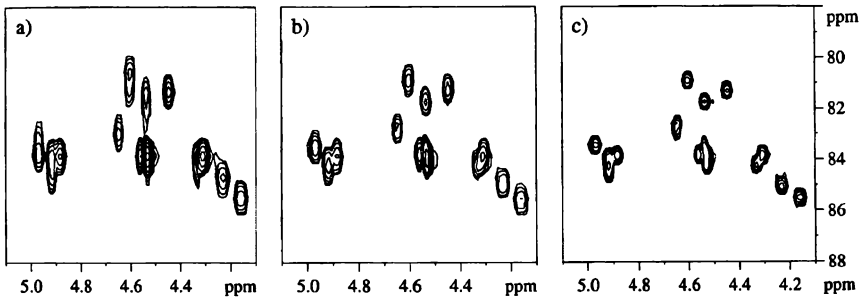


Рисунок 3.18. Улучшение разрешения пиков в двумерном гетероядерном протонно-углеродном корреляционном эксперименте (глава 6) через линейное предсказание. Те же самые сырые данные использовалось в каждом спектре с F1 (углеродным) измерением, обработанным с (a) никакого расширения данных, (b) однократное дополнение нулями и (c) линейное предсказание вместо дополнения нулями.

3.2.4. Квадратурное детектирование

Выше описывалось, как в течение процесса детектирования ЯМР сигнала опорная частота, равная частоте возбуждающего импульса, вычитается из сигнала ЯМР, чтобы производить сигнал звуковой частоты, который оцифровывается и позже подвергается Фурье-преобразованию. Проблема с анализом данных, произведённых этим *одноканальным детектированием*, в том, что ФП по существу неспособно отличать частоты выше опорной от тех, которые ниже неё, то есть, она не может различать положительные частоты от отрицательных. Это заставляет вектор намагничивания, двигающийся при +ν Гц во вращающейся системе, производить два резонанса в спектре в +ν и -ν Гц после преобразования Фурье (рис. 3.19). Неизбежное запутывающее наложение в спектре, полученном с опорой, помещённой в центре ширины спектра, может избегаться, помещая опору на одном краю, спектра чтобы гарантировать, что все частоты вращающейся системы координат имеют один и тот же знак.

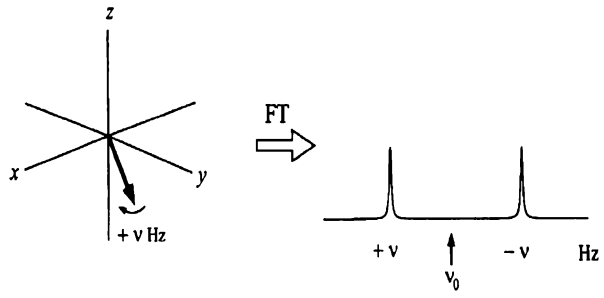


Рисунок 3.19. Одноканальная схема детектирования неспособна различать положительные и отрицательные частоты во вращающейся системе. Это вызывает наложение зеркально отображённого спектра на истинный, если передатчик помещается в центре спектра.

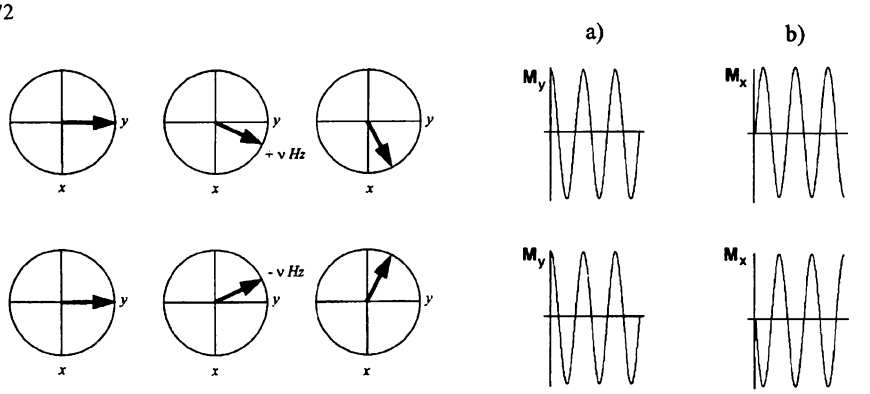


Рисунок 3.20. Двухканальная система квадратурного детектирования контролирует намагничивание на двух ортогональных осях, обеспечивая, и (a) косинус и (b) синус модулированные данные, которые, в конечном счете, позволяют определять знак прецессии (см. текст).

В то время как это решает потенциальные проблемы наложения резонансов, это вводит множество других нежелательных факторов. Во-первых, хотя не будет существовать никакого зеркального отображения резонансов ЯМР, остающихся в пределах спектрального окна, шум будет еще зеркально отражаться относительно опорной частоты и добавляться к уже присутствующему. Это ведет к уменьшению отношения сигнал/шум с коэффициентом $\sqrt{2}$, или приблизительно 1,4 (не с коэффициентом 2, потому что шум случаен и не складывается когерентно). Кроме того, это производит самое большое возможное разделение частот между импульсом и самым высоким резонансом частоты, таким образом, увеличивая нежелательные вне-резонансные эффекты. Предпочтительное положение для опоры, следовательно, в центре спектра и тогда требуется двухканальное *(квадратурное)*, детектирование, чтобы отличать знак.

Чтобы помочь представить, почему одноканальное детектирование не может различать положительные и отрицательные частоты, и как квадратурный метод может это делать, рассмотрим снова одиночный вектор намагничивания во вращающейся системе. Применение одноканального детектора равнозначно способности наблюдать прецессирующее намагничивание *только по одной оси*, скажем по оси y. Рис. 3.20 показывает, что результирующий сигнал вдоль этой оси для вектора, перемещающегося при +ν Гц, идентичен сигналу вектора, перемещающегося при -ν Гц, оба вызывают косинусоидальный сигнал, и поэтому оба неразличимы (рис. 3.20a). Если, однако, можно было бы использовать два (фазочувствительных) канала детектирования, чьи опорные сигналы различаются по фазе на 90° (отсюда и термин - *квадратурный*), тогда можно было бы наблюдать намагничивание одновременно и по *x*, и по *y* осям, так что один канал контролирует косинусный сигнал, другой синусный (рис. 3.20a и b). С дополнительной информацией, обеспеченной синусоидальным откликом второго канала, можно определять знак вращения, и векторы, перемещающиеся при ±ν Гц могут различаться (рис. 3.21). Технически преобразование Фурье тогда оказывается *комплексным* с *x и y* компонентами, обрабатываемыми отдельно как действительные и мнимые входы в преобразование, после которого правильно определяются положительные и отрицательные частоты. В одноканальном случае данные используются в качестве входа в *действительное* ФП.

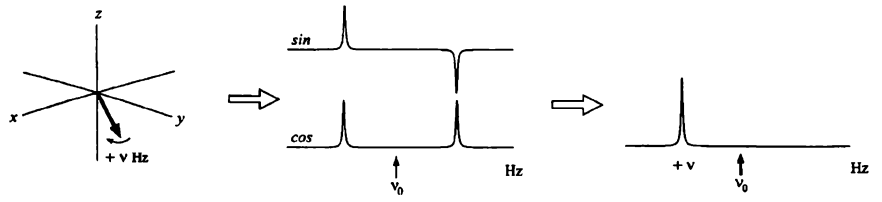


Рисунок 3.21. Схема двухканального детектирования может различать положительные и отрицательные частоты во вращающейся системе, позволяя помещать передатчик в центре спектра без появления сигналов зеркального отображения.

Одновременная и последовательная регистрация

Квадратурное детектирование универсально используется во всех современных спектрометрах. Однако существуют две экспериментальных схемы его осуществления, и которую из них вы используете, будет вероятно диктоваться аппаратурой спектрометра и возможно возрастом прибора (на некоторых современных приборах оператор может выбирать между этими двумя методами).

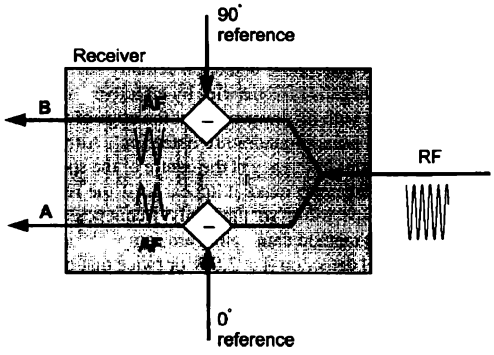


Рисунок 3.22. Иллюстрация схемы экспериментальной реализации квадратурного детектирования в приемнике ЯМР. Входящий РЧ сигнал расщепляется на два, а опорные сигналы, отличающиеся по фазе на 90 ° в этих двух каналах, вычитаются. Каналы A и B, следовательно, обеспечивают требуемые синусную и косинусную компоненты.

В обеих реализациях входной РЧ сигнал из датчика и предусилителя расщепляется на два, и каждый подаётся в отдельные фазочувствительные детекторы, чьи опорные частоты идентичны, но различаются по фазе на 90° (рис. 3.22). Результирующие звуковые сигналы затем отбираются, оцифровываются и хранятся для последующего анализа, и именно в его выполнении различаются эти два метода. Первый связан с *одновременной* регистрацией двух каналов (то есть каналы стробируются точно в один и тот же момент времени) и точки данных для каждого сохраняются в отдельных областях памяти (рис. 3.23а). Два набора данных, произведенные таким образом, представляют косинусные и синусные компоненты, требуемые для различения знака, и используются как действительный и мнимый входы для подпрограммы комплексного ФП. Так как это позволяет располагать частоту передатчика в центре спектра, нужно оцифровывать диапазон частот только ±SW/2. Согласно критерию Найквиста частота выборок теперь становится равной SW, то есть (2*SW/2) или половине того, что требуется для одноканального детектирования, поэтому уравнения, приведённые в предыдущем разделе, немного отличаются для *одновременного квадратурного детектирования*:

$$DW = \frac{1}{SW} \quad \text{и} \quad AQ = DW \bullet \frac{TD}{2} = \frac{TD}{2 \cdot SW} \tag{3.7}$$

Заметьте, что в вычислении времени регистрации нам нужно рассматривать только *половину* всех точек данных временной шкалы, так как теперь две точки стробируются одновременно.

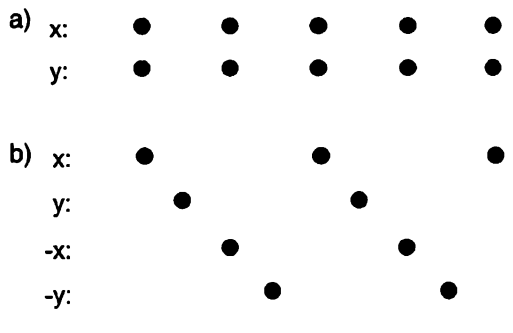


Рисунок 3.23. Схемы выборки данных для двух обычных методов квадратурного детектирования. (a) Одновременная регистрация: два квадратурных канала (представляющие *x и y* намагничивание) стробируются в тот же самый момент времени. (b) Последовательная регистрация: эти два канала стробируются поочередно при удвоенной по сравнению с методом (a) скорости, и фазы инвертируются для поочерёдных пар точек данных (см. текст).

Второй метод квадратурного детектирования фактически пытается устранить проблемы положительных и отрицательных частот эффективным подражанием одноканальной схеме детектирования с передатчиком на краю спектра и поэтому иногда упоминается как «псевдоквадратурное детектирование». Хотя она позволяет располагать частоты передатчика в центре спектра, она использует остроумную схему регистрации, чтобы представлять, как будто опорная частота расположена на одном краю спектра, так что всегда характеризуются только частоты одного знака. В этом методе точки данных стробируются *последовательно* со скоростью подходящий для одноканального детектирования (то есть 2*SW или удвоенной, по сравнению с одновременным методом), но для каждой отобранной точки данных опорная фаза инкрементируется на 90° (рис. 3.23b). Эффект на вектор намагничивания в том, что он оказывается должен продвигаться во вращающейся системе на 90° больше между каждым периодом регистрации, чем это фактически должно происходить, так что сигнал кажется должен обрабатываться быстрее, чем это действительно происходит. Поскольку оцифровка происходит со скоростью 2SW, и каждый 90° фазовый сдвиг соответствует продвижению на 1/4 цикла, частота оказывается должна увеличиться до 2*SW/4 или SW/2. Так как передатчик располагается в центре спектра, истинный диапазон частот простирается от +SW/2 до -SW/2, что означает искусственное увеличение на +SW/2, сдвигая частотное окно в интервал от +SW до 0. Таким образом, больше нет отрицательных частот, которые нужно отличать. Экспериментально требуемые 90° фазовые сдвиги достигаются переключением между двумя фазочувствительными детекторами, чтобы давать 0° и 90° сдвиги, и простым инвертированием сигналов от этих каналов, чтобы обеспечивать 180° и 270° сдвиги, соответственно (рис. 3.23b). Зарегистрированные данные обрабатываются отдельной областью памяти как *действительные числа,* которые используются для входа в *действительное* ФП. В этой *последовательной* схеме *квадратурного детектирования* применяются соображения регистрации из раздела 3.2.3, как они были бы для одноканального детектирования. В главе 5 эти идеи расширяются на квадратурное детектирование в двумерной спектроскопии.

Пришлые сигналы

В разделе 3.2.3 было показано, что резонанс попадающий вне спектрального окна (поскольку он нарушает условие Найквиста) ещё будет детектироваться, но появится при неправильной частоте и, говорят, является *пришлым* или *завёрнутым обратно* в спектр. Это может запутывать, если невозможно сказать представляет ли резонанс правильный химический сдвиг, или нет. Точное положение пришлого сигнала в спектре зависит от используемой схемы квадратурного детектирования и от того, как далеко вне окна он действительно резонирует. При одновременной (комплексное ФП) схеме сигналы оказываются «завёрнутыми» в спектральное окно и появляются в *противоположном конце*

спектра (рис. 3.24b), в то время как при последовательной схеме (действительное ФП) сигналы «заворачиваются обратно» *на том же конце спектра* (рис. 3.24c). Если вам любопытно знать, почему существует это различие, смотрите ссылку [7].

К счастью в протонной спектроскопии обычно можно детектировать присутствие пришлого пика по признаку его искажённой фазы при правильной фазе всех других сигналов. В гетероядерных спектрах, которые показывают только единственный резонанс, такие фазовые характеристики не могут обеспечивать этой информации, так как отсутствует другой сигнал, с которым можно было бы сравнивать. В таких случаях необходимо расширять спектральное окно и регистрировать любое движение пика.

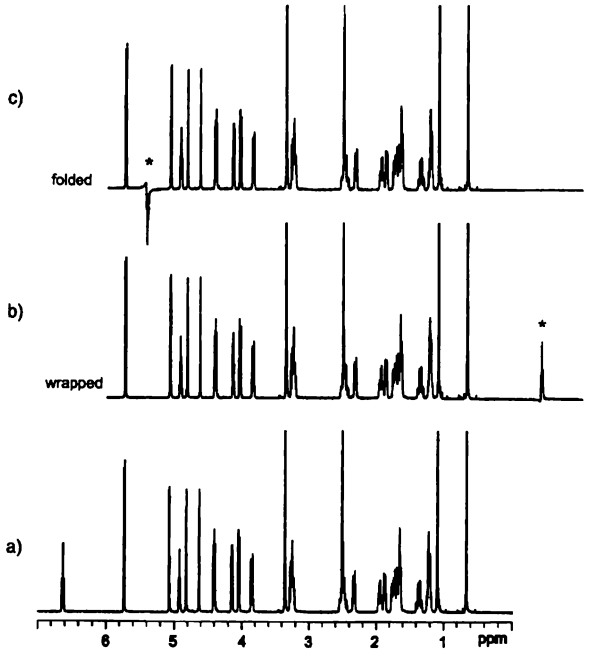


Рисунок 3.24. Эффект наложения резонансов, спектр (a) показывает все резонансы при их правильных сдвигах, в то время как (b) и (c) образуются при неправильном расположении спектрального окна. Спектр (b) показывает, как резонанс заворачивает назад в спектр в дальнем конце, когда используется одновременная регистрация, в то время как в (c) при последовательной регистрации он заворачивается обратно в ближнем конце. Как правило, фаза пришлого резонанса (резонансов) также искажается.

Сигнал, который не является пришлым, не будет изменяться и будет появляться при той же самой *абсолютной* частоте. В противоположность пришлому резонансу, который переместится к краю спектра, и появится на другой абсолютной частоте.

3.2.5. Циклирование фазы

На этом этапе мы кратко рассмотрим один конкретный артефакт, который возникает из применения квадратурного детектирования, не только по причине необходимости распознавать их, если и когда они случаются, но что более важно, потому что один из подходов к их удалению вводит концепцию *циклирования фазы*, - экспериментального метода, который лежит в самом сердце почти каждого эксперимента ЯМР. Этот процесс включает повторение импульсной последовательности с идентичными выборами времени и углами отклонения импульсов, но с разумными изменениями в *фазах* РЧ импульса (импульсов) и с маршрутизацией данных в блоки памяти компьютера (часто свободно упоминающийся как *фазовый цикл* приёмника). Цель всего этого - когерентно складывать желательные сигналы с усреднением во времени, в то время как все другие сигналы, либо от нежелательных ЯМР переходов, или от несовершенств аппаратуры, отменять в конце цикла, чтобы они не появля-

лись в образующемся спектре. Мы увидим важность фазовых циклов на протяжении остальной части книги, особенно в разделах о многоимпульсном одномерном и двумерном ЯМР, но во введении мы возвращаемся к идее квадратурного детектирования.

В общей схеме квадратурного детектирования требуются два сигнала для оцифровки, которые различаются по фазе на 90°, но которые в остальном идентичны. Оцифрованные данные из каждого канала затем складываются в двух отдельных блоках памяти, здесь обозначенные как 1 и 2. Экспериментально довольно трудно гарантировать *точно* 90° разность фаз и амплитуду сигнала, идентичную в каждом канале.

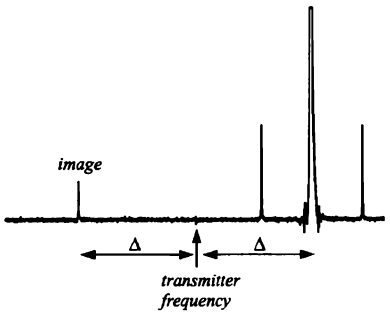


Рисунок 3.25. Квадратурные отражения - нежелательные артефакты зеркального отображения, которые возникают из несовершенств спектрометра. Здесь зеркальное отображение $CHCl_3$ можно увидеть примерно на половине высоты углеродных спутников в спектре одного сканирования. Циклирование фазы обычно используется для их подавления, хотя последние проекты аппаратуры могут устранять их полностью.

Такой разбаланс канала по фазе и амплитуде ведёт к поддельным изображениям резонансов, зеркально отражённых относительно частоты передатчика, известные как *квадратурные отражения*, или, разговорно, как *квадратурные отображения* (рис. 3.25). Их происхождение можно понять, если представить, что амплитуда сигнала в одном канале упала до нуля. Тогда схема представляет собой один из видов одноканального детектирования, так снова положительные и отрицательные частоты не могут различаться, и, таким образом, появляются зеркальные относительно опоры отображения (снова см. рисунок 3.19). В правильно сбалансированном приемнике эти отображения обычно меньше чем 1% при одном сканировании, но даже они могут быть существенными, если вы хотите детектировать слабые резонансы в присутствии очень сильных, поэтому требуются какие-то средства компенсации разбаланса.

Одно решение состоит в том, чтобы гарантировать, что данные от каждого канала, A и B, делают вклад одинаково в оба блока памяти 1 и 2. Это может достигаться, выполняя два эксперимента, первый с $90°_x$ импульсом, второй с $90°_y$ и сложением данных. Чтобы содержать косинусные и синусные компоненты для применения в подпрограмме ФП в отдельных областях памяти, должна также использоваться соответствующая маршрутизация данных (рис. 3.26a и b). Это обычно обрабатывается спектрометром внутренне, определяясь с точки зрения оператора как «фаза приёмника», и принимая значения 0, 90, 180 или 270 ° или *x*, y, *-x* и -y. Обратите внимание, однако, что фаза *опоры РЧ приёмника не изменяется* в последовательных сканированиях, изменяется только маршрутизация данных. Для любой импульсной последовательности ЯМР необходимо определять фазы РЧ *и* фазу приёмника, чтобы гарантировать сохранение желательных сигналов и отмены сигналов артефактов.

Использованием двухтактного фазового цикла, поэтому, можно компенсировать эффекты разбаланса в двух каналах приемника. Можно также удалять посторонние сигналы, которые могут случаться, такие как от сдвига постоянной составляющей в приёмнике, одновременно инвертированием фазы РЧ импульса и приемника, таким образом, рис. 3.26a переходит в 26c и аналогично, 26b становятся 26d. Сигналы ЯМР будут следовать фазе импульса, и таким образом складываться в памяти, в то время как отстройки постоянной составляющей или ложные сигналы не будут зависеть от неё, и поэтому уничтожатся. Это дает нам второй возможный двухступенчатый фазовый цикл, который, при

комбинации с первым, производит четырехступенчатый цикл, известный как CYCLOPS [8] (Циклически Упорядоченный Фазовый цикл, Таблица 3.1).

Таблица 3.1. Четырёх-ступенчатый фазовый цикл CYCLOPS, показанный на рисунке. 3.26

Число сканирований	Фаза импульса	Фаза приёмника
1	x	x
2	y	y
3	-x	-x
4	-y	-y

Это краткое обозначение традиционно используется, чтобы описывать все фазовые циклы импульсной последовательности.

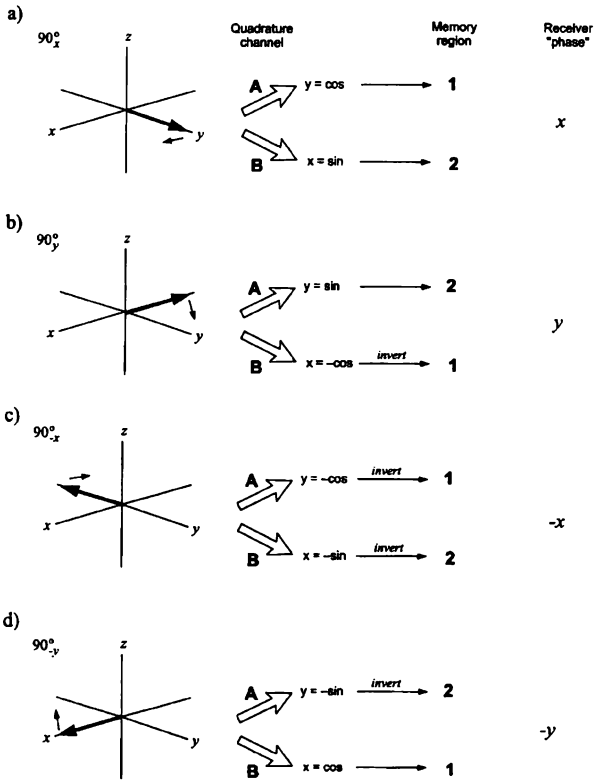


Рисунок 3.26. Циклирование фазы. Схема CYCLOPS подавляет нежелательные артефакты, одновременно сохраняя желательные сигналы ЯМР. Этот четырёхступенчатый фазовый цикл объясняется в тексте.

Это стандартный фазовый цикл, используемый для одноимпульсных регистраций на всех спектрометрах, и часто вкладывается в фазовые циклы двумерных экспериментов, опять же с целью удаления артефактов приемника.

3.2.6. Динамический диапазон и усреднение сигнала

При регистрации ССИ аналого-цифровой преобразователь (АЦП) ограничивает частотный диапазон (то есть ширину спектра), который он может характеризовать, в соответствие с тем, насколько быстро он может оцифровывать входной сигнал. В дополнение к ограничению *частот*, АЦП также обладает свойством *ограничивать амплитуды* измеряемых сигналов. Процесс оцифровки преобразует электрический аналоговый сигнал ЯМР в двоичное число, пропорциональное величине сигнала. Это цифровое значение определяется, как последовательность компьютерных бит, количество которых характеризует *разрешение АЦП*. Типичные разрешения АЦП на современных спектрометрах составляют 14 или 16 бит. АЦП на 16 бит может представлять значения в диапазоне ±32767 то есть 2^{15}-1, с одним битом зарезервированным для представления знака сигнала. Отношение между максимальным и наименьшим детектируемым значением (число наиболее значимых бит к числу наименее значимых бит), 32767:1, является *динамическим диапазоном* АЦП.

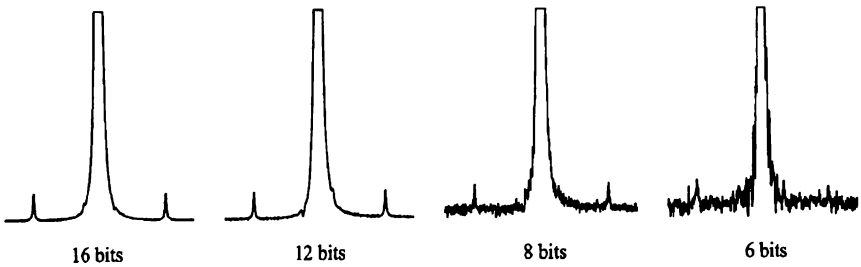


Рисунок 3.27. Динамический диапазон и детектирование малых сигналов в присутствии больших. С уменьшением разрешения АЦП и, следовательно, его динамического диапазона спутники углерода-13 родительского протонного резонанса становится замаскированными шумом, и становятся едва заметными только с 6-битным разрешением (все другие параметры регистрации были идентичны для каждого спектра). Это увеличение шума называется *шумом оцифровки или квантования* (см. текст ниже).

Если предполагать, что усиление приемника (или просто *усиление)* устанавливается так, что самый большой сигнал в ССИ при каждом сканировании полностью заполняет АЦП, то наименьший сигнал, который может регистрироваться, имеет значение 1. Любой сигнал, чья амплитуда меньше, чем эта, не будет регистрироваться АЦП; недостаточен доступный динамический диапазон. Однако шум будет также делать вклад в детектированный сигнал и он может быть достаточно интенсивным, чтобы превысить порог наименьшего значащего бита АЦП. В этом случае малый сигнал ЯМР *будет* регистрироваться, потому что он сидит верхом на шуме, и усреднение сигнала, следовательно, ведет к суммированию этого слабого сигнала, что означает, что даже те сигналы, чья амплитуда ниже уровня шума, ещё могут детектироваться. Однако АЦП может ещё ограничивать детектирование меньших сигналов в присутствии очень больших, даже при высоком отношении сигнал/шум. Рис. 3.27 иллюстрирует, как уменьшение доступного динамического диапазона ограничивает наблюдение меньших сигналов при низком тепловом шуме в спектре. Эта ситуация чаще всего встречается в протонных исследованиях, особенно для растворов в недейтерированной воде, где резонанс воды может быть во много тысяч раз больше, чем сигналы растворённого вещества. Такие разности интенсивностей

препятствуют детектированию сигнала растворяемого вещества, поэтому разработано множество процедур для селективного уменьшения интенсивности резонанса H_2O и облегчения требований динамического диапазона; некоторые из этих схем подавления сигнала растворителя описываются в главе 9.

Если какой-либо сигнал настолько большой, что он не может поместиться в максимально допустимое для регистрации АЦП значение, его интенсивность не будет правильно измеряться и это вызывает жёсткое искажение спектра (рис. 3.28a).

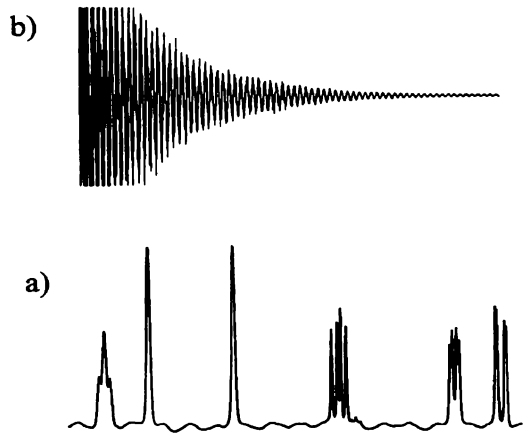


Рисунок 3.28. Перегрузка приёмника или АЦП искажает базовую линию спектра (a), это может распознаваться как "обрезание" ССИ (b).

Эффект может распознаваться как «обрезание» наиболее интенсивной части затухающего ССИ (рис. 3.28b), которое следует из установки слишком высокого усиления приёмника или просто усиления. Оно должно устанавливаться соответственно для каждого изучаемого образца, либо ручным регулированием, или, что более удобно, через программы автоматизации спектрометра (rga).

Усреднение сигнала

Повторяющаяся регистрация и суммирование спада свободной индукции ведут к общему увеличению в отношении сигнал/шум, поскольку сигналы ЯМР растут пропорционально общему числу сканирований NS, в то время как шум, являющийся случайным, растёт как функция $\sqrt{NS}$ Таким образом, отношение сигнал/шум увеличивается согласно $\sqrt{NS}$ Другими словами, чтобы удвоить отношение сигнал/шум, необходимо получить *в четыре раза больше сканирований* (рис. 3.29). Часто считают, что продолжительное усреднение ведет к непрерывному улучшению в отношении сигнал/шум, хотя это справедливо только отчасти. Каждый раз, когда сканирование повторяется, двоичное число для каждой зарегистрированной точки данных добавляется к содержанию соответствующей ячейки памяти компьютера. С накоплением большего числа сканирований общее число в каждой ячейке памяти будет увеличиваться, поскольку сигнал «складывается». Этот процесс можно повторять только, если кумулятивное общее число помещается в размер компьютерного слова. Если оно становится слишком большим, оно не может регистрироваться и потенциально ведёт к порче данных (хотя спектрометры обычно автоматически обрабатывают эту проблему, просто деля данные, и, уменьшая разрешение АЦП всякий раз, когда ожидается переполнение памяти, таким образом, предохраняя данные и позволяя продолжать регистрацию). Момент, когда длина компьютерного слова не может больше вмещать в себя сигнал, будет зависеть от числа бит использованного АЦП (его разрешения), и от

числа бит в компьютерном слове. Например, если и АЦП, и длина слова составляют по 16 бит, тогда любой сигнал, который заполняет АЦП, будет также заполнять и память, что не позволит производить никакие дальнейшие сканирования.

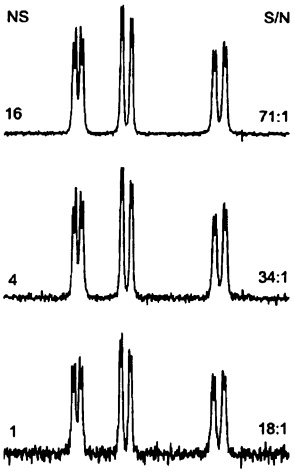


Рисунок 3.29. Усреднение сигнала производит чистое увеличение отношения сигнал/шум (С/Ш) в спектре. Оно улучшается как *корень квадратный из числа* произведённых сканирований (NS), потому что шум, являющийся случайным, нарастает *медленнее*, чем сигнал ЯМР

Поэтому длина слова должна быть больше, чем разрешение АЦП, чтобы позволять усреднение сигнала, и чем больше длина слова, или меньше разрешение АЦП, тем больше сканирований может производиться. Для современных приборов длина слова обычно составляет 32 бита, поэтому при 16-битном АЦП можно накопить около 66.000 сканирований (2^{32-16}), если самый большой сигнал заполняет АЦП (фактически, можно производить больше сканирований, так как сигнал ЯМР, также содержит шум, который не складывается когерентно, означая, что память не будет заполняться так быстро, как предполагает эта простая оценка). Так как усреднение сигнала более необходимо, когда уровни шума относительно высокие, и потому что более длинные слова используются на современных приборах, проблема переполнения теперь встречается редко.

Оверсэмплинг и цифровое фильтрование

Хотя это вошло в стандартное использование только на спектрометрах самого последнего поколения, давно было известно, что эффективный динамический диапазон может, при некоторых обстоятельствах, улучшаться *оверсэмплингом* ССИ (избыточными выборками) [9]. В частности, он применяется, когда *шум оцифровки* (или *шум квантования)* становится существенным, и ограничивает достижимый уровень отношения сигнал-шум для наименьших сигналов в спектре. Этот шум возникает из «ошибки округления» свойственной процессу оцифровки, при котором аналоговый сигнал ЯМР характеризуется дискретными однобитными шагами, которые не могут точно представлять истинную интенсивность сигнала (рис. 3.30). Хотя это не истинный шум, но он возникает из систематических ошибок в процессе выборки. Это и вводит шум в спектр ЯМР. Рис. 3.27 уже показал, как большие ошибки в процессе оцифровки, вызванные меньшим количеством бит АЦП, увеличивают уровень шума. В реальных ситуациях этот шум становится доминирующим, когда усиление приемника устанавливается на относительно низкий уровень, так что тепловой (аналоговый) шум, возникающий от датчика и усилителей, становится незначительным (рис. 3.31). Это наиболее вероятно может возникать в протонной спектроскопии при попытке наблюдать малые сигналы в присутствии гораздо больших. Поэтому предпочитаются высокие значения усиления, чтобы преодолевать шум оцифровки.

Оверсэмплинг, как предполагает название, включает оцифровку данных с гораздо большей скоростью, чем требуется условием Найквиста или, что эквивалентно, регистрация данных при намного большей ширине спектра, чем требовалось бы обычно. Шум оцифровки тогда может рассматриваться как распространяющийся по значительно большему диапазону частот, так что в интересующей области этот шум имеет уменьшенную интенсивность, таким образом, приводя к улучшению чувствительности (рис. 3.32). Если скорость регистрации увеличивалась с фактором оверсэмплинга N_{OS},, то шум *оцифровки* уменьшается с фактором $\sqrt{N_{OS}}$ Таким образом, выполнение выборок с четырёхкратной частотой Найквиста теоретически производило бы двукратное уменьшение шума, которое, в свою очередь, приравнивается к эффективному улучшению разрешения АЦП на 1 бит. Аналогично, оверсэмплинг с коэффициентом 16 соответствует четырехкратному уменьшению шума (увеличение разрешения на 2 бита), а фактор 64 дает 8-кратное уменьшение шума или добавляет 3 бита.

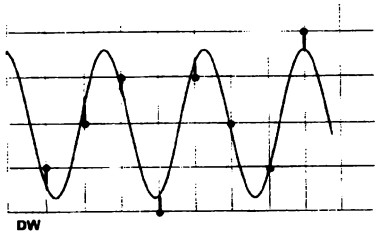


Рисунок 3.30. Ошибки оцифровки. Дискретная цифровая регистрация аналоговой формы волны вводит ошибки в измерения амплитуды, обозначенные вертикальными полосами. Эти ошибки, в конечном счете, делают вклад в дополнительный шум в спектре.

Степень оверсэмплинга, которая может достигаться, ограничивается скоростью оцифровки АЦП, и типичные значения N_{OS} для наблюдения протонов - 16÷32, что означает, что ширина спектра становятся несколько сотен кГц, а разрешение АЦП при благоприятных обстоятельствах может увеличиваться на 2-3 бита (когда тепловой шум может рассматриваться незначительным относительно шума оцифровки).

Чтобы поддерживать желательное цифровое разрешение в интересующей спектральной области при оверсэмплинге, наборы данных должны были бы увеличиваться, согласно фактору оверсэмплинга также, что будет требовать большей ёмкости хранения и более медленной обработки данных. Чтобы преодолеть эти ограничения, современные спектрометры обычно комбинируют оверсэмплинг с методами цифровой обработки сигнала. Так как обычно интересуются только относительно малой частью нашего «оверсэмплированного» набора данных ($1/N_{OS}$), ССИ после оцифровки уменьшается до обычного числа точек данных процессом *децимации* (буквально «выделение каждого десятого») перед сохранением. Это, в действительности, принимает текущее среднее от избыточно выбранных (оверсэмплированных) точек данных, оставляя одну точку для каждого зарегистрированного N_{OS}, в интервалах, определённых условием Найквиста для желательного спектрального окна (специфические искажения, видимые в начале обработанного в цифровой форме ССИ, возникают из этого процесса децимации). Результирующий ССИ тогда имеет то же самое число точек данных, какое он имел бы, если бы он регистрировался обычным образом. Эти цифровые этапы обработки сигнала обычно выполняются специальным процессором после АЦП (рис. 3.9, окно b) и обычно остаются невидимыми пользователю (возможно за исключением необходимости установки некоторых параметров программного обеспечения), хотя они могут также достигаться и отдельной последующей обработкой первоначальных данных, или даже включаться непосредственно в подпрограмму ФП [10]. Применение быстрых специальных процессоров означает, что вычисления легко могут выполняться по мере получения данных, таким образом не ограничивая сбор данных.

Ещё одно преимущество цифровой обработки ССИ - способность математически определять частотные фильтры, которые имеют значительно более крутую и более полную отсечку, чем можно достигать только аналоговой фильтрацией, что означает, что можно устранять миграцию сигналов (их завороты). Теперь можно устанавливать ширины спектра, чтобы охватывать только часть всего спек-

тра, позволяя *селективное детектирование* резонансов ЯМР [11]. Способность уменьшать спектральное окно таким образом, без осложнений от заворотов сигналов, имеет значительную выгоду, в частности при накоплении данных двумерного ЯМР. Принцип фильтрации состоит в следующем (рис. 3.33). Функция цифрового фильтра временной шкалы дается обратным ФП желательного окна частотного измерения. Эта функция может затем сворачиваться с оцифрованным ССИ, так что после преобразования Фурье только те сигналы, которые попали в первоначально определённое окно, остаются в спектре. Обычно применяется прямоугольное по форме окно, хотя на практике такой острый профиль отсечки не может достигаться без введения искажений.

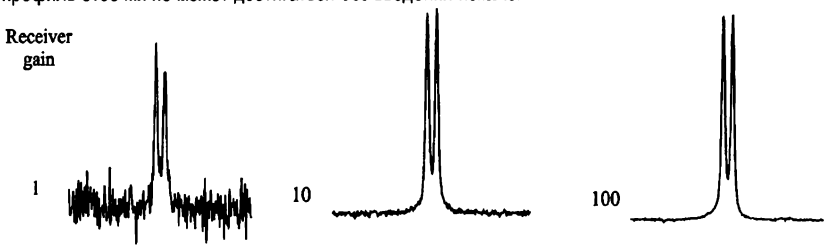


Рисунок 3.31. Шум Оцифровки. При высоких установках усиления приёмника шум в этом протонном спектре исчезающе мал, что означает, что тепловой шум системы низкий. С уменьшением усиления амплитуда сигнала ЯМР (и тепловой шум) уменьшается, и шум оцифровки становится существенным относительно сигнала ЯМР

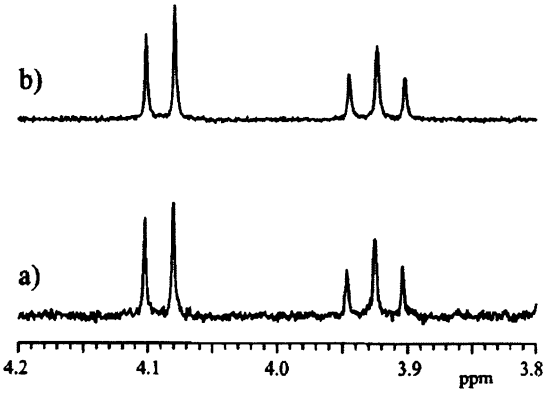


Рисунок 3.32. В благоприятных случаях оверсэмплингом данных можно достичь улучшенной чувствительности и, следовательно, уменьшения шума оцифровки. Спектр (а) показывает часть обычного протонного спектра, зарегистрированного согласно критерию Найквиста. Оверсэмплинг данных с коэффициентом 24 как в (b) обеспечивает повышение чувствительности (все прочие условия такие же, как в (а)).

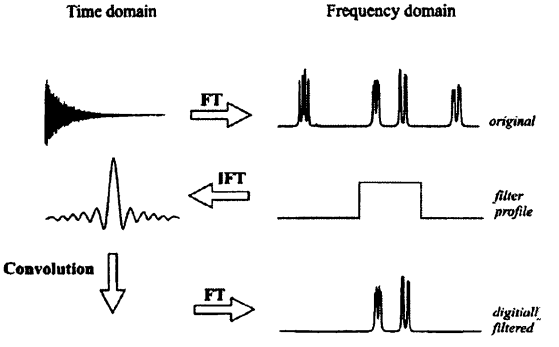


Рисунок 3.33. Применение цифрового фильтра для наблюдения выбранной области спектра. Желательный профиль частотного окна подвергается обратному ФП и результирующая функция времени подвергается свёртке с сырым ССИ. Преобразование модифицированных данных производит спектр, содержащий только поднабор всех резонансов, как определено цифровым фильтром.

Использовались различные альтернативные функции, которые приближаются к этому идеалу, обычно обладают тем свойством, что чем больше коэффициентов использовано в функции, тем более крутая её отсечка частоты. Так как они действуют только *после* АЦП, аналоговый фильтр ещё требуется (рис. 3.9, окно а), чтобы устранять широкополосный шум снаружи избыточно выбранной ширины спектра, но отсечка его частоты теперь далеко удалена от нормального спектрального окна, и его эффективность менее критична.

3.2.7. Функции окна

Существуют различные пути, которыми могут манипулироваться полученные данные перед преобразованием Фурье в попытке улучшить его внешний вид или информационное содержание. Чаще всего можно было бы или улучшать отношение сигнал/шум спектра, чтобы помогать показывать резонансы над уровнем шума, или улучшать разрешение спектра, чтобы показать скрытую тонкую структуру. Чтобы достичь желаемого результата, предлагалось множество математических взвешивающих функций, известных как *функции окна*, но лишь относительно небольшое их число нашло широкое применение, некоторые из которых иллюстрируются на рисунке 3.34. Общая философия всех этих функций одинакова. В любом ССИ интенсивность сигнала ЯМР снижается с течением времени регистрации, в то время как амплитуда шума остается постоянной, что означает, что относительный уровень шума растёт в последней части ССИ. Уменьшение хвоста ССИ, следовательно, будет способствовать уменьшению амплитуды шума в преобразованном спектре, таким образом, *увеличивая чувствительность*. Наоборот, увеличение средней и последней части ССИ, равнозначно замедлению спада сигнала, и, таким образом, сужению резонанса и *повышению разрешения*. Одно предупреждение перед дальнейшим обсуждением. Применение функций окна также упоминалось ранее как «цифровая обработка» или «цифровое фильтрование» данных.

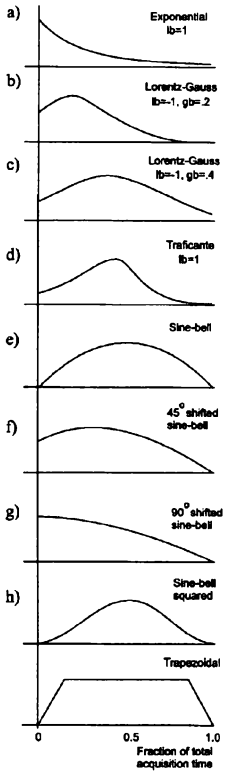


Рисунок 3.34. Некоторые обычно используемые функции окна. Они используются, чтобы изменять накопленный ССИ для улучшения чувствительности и/или разрешения (lb = параметр уширения линий, gb = параметр уширения гауссиана т.е. часть времени регистрации, когда функция имеет ее максимальное значение, см. текст).

Однако это не следует путать с терминологией цифровой обработки сигнала, введённой в предыдущих разделах и которая широко используется в настоящее время. Принятие терминов «окно» или «весовая функция», следовательно, рекомендуется в контексте чувствительности или улучшения разрешения.

Улучшение чувствительности

Как указано выше, амплитуду шума в спектре можно уменьшать, ослабляя последнюю часть ССИ, и самая обычная процедура для достижения этого должна умножать сырые данные на функцию затухающей экспоненты (рис. 3.34а). Поэтому этот процесс также упоминается как *экспоненциальное умножение*. Поскольку он приводит хвост ССИ к нулю, он также подходит и для аподизации усечённых

наборов данных. Однако он также увеличивает очевидную скорость затухания сигнала ЯМР, вызывая расширение линий, что означает, что возможно установление компромисса между улучшением разрешения и чувствительности (рис. 3.35). Использование слишком сильной функции, то есть той, которая вызывает слишком быстрое затухание сигнала, может фактически вести к уменьшению отношения сигнал/шум в образующемся спектре, потому что уширение линий вызывает уменьшение их высот пиков. Программное обеспечение спектрометра обычно позволяет определять величину уширения линий непосредственно в Герцах (здесь параметр **lb**), поэтому экспоненциальное умножение довольно простое в использовании и позволяет химику экспериментировать с различными степенями уширения, чтобы достигнуть подходящего результата. Оптимальный баланс между уменьшением шума и чрезмерным уширением линий достигается, когда спад функции окна соответствует естественному затуханию сигнала ЯМР, в таком случае известное как *согласованный фильтр* [12], который обусловливает удвоение ширины резонансной линии.

Чтобы экспоненциальная функция правильно согласовывала ССИ, спад сигнала ЯМР также должен быть экспонентой (означая, что резонансы ЯМР имеют Лоренцеву форму линии), которая, при правильно настроенном спектрометре, обычно предполагается (по крайней мере, для ядер спина ½). Несмотря на обеспечение максимального улучшения чувствительности, условие согласования часто не подходит хорошо для обычного применения в протонной спектроскопии, так как результирующее уширение линий и потеря разрешения могут устранять разделение близко расположенных линий. Поэтому обычно применяется меньшее уширение линий, чем для согласованной фильтрации. Кроме того, различные резонансы в спектре часто показывают различные невзвешенные ширины линий, так что условие согласования не может удовлетворяться для всех резонансов одновременно. Для повседневной протонной работы становится удобным уширять линии на величину, равную цифровому разрешению в спектре, поскольку это ведет к некоторому усилению чувствительности, но к минимальному увеличению ширины линии. Для гетероядерных спектров разрешение обычно вызывает меньше беспокойства, и обычно используется уширение линий на несколько герц (сравнимое с или немного большее, чем цифровое разрешение). Можно считать необходимым ослаблять искажения возле оснований резонансов, возникающие частично от усечения набора данных (Раздел 3.2.3 и рис. 3.17). Для спектров, которые содержат резонансы в десятки или даже сотни герц шириной (как это бывает для квадрупольных ядер) величина уширения линий, должна соответственно увеличиваться, чтобы достигать какого-либо заметного улучшения чувствительности.

Улучшение разрешения

Можно было предположить, что для улучшения разрешения в спектрах, мы должны применять функцию, которая увеличивает последнюю часть ССИ, таким образом, увеличивая время спада. Проблема с этим подходом в том, что при этом также увеличивается амплитуда шума в хвосте ССИ и усиливается любое усечение сигнала, которое может присутствовать, таким образом, увеличивая возможность для появления нежелательного «звона усечения». Лучший подход состоит в том, чтобы применить функцию, которая первоначально противодействует раннему спаду, а затем приводит хвост ССИ к нулю, чтобы обеспечить необходимую аподизацию. Наиболее популярной функцией для достижения этого является *преобразование Лоренца-Гаусса* [13] (рис. 3.34 b и c), иногда вольно упоминающееся как *Гауссово умножение* (хотя строго это относится к совсем другой математической взвешивающей функции) и также известное как двойное экспоненциальное умножение. Оно преобразует обычную Лоренцеву форму линии в Гауссову форму линии, которая имеет несколько более узкий профиль, особенно возле основания, (рис. 3.36) и, благодаря этому свойству, позволяет разрешать близко расположенные линии. Форма функции регулируется двумя изменяемыми параметрами, которые определяют степень обужения линий в образующихся спектрах и момента времени регистрации, при котором функция достигает её максимального значения. Они обычно представляются

оператору как отрицательное уширение линий в Герцах (здесь параметр **lb**) и как часть общего времени регистрации (здесь параметр **gb**), соответственно. Выбор подходящих значений для них обычно происходит методом проб и ошибок, и для различных групп пиков в одном и том же спектре могут находиться различные оптимальные значения.

Рисунок 3.35. Экспоненциальное умножение ССИ может использоваться для уменьшения шума в спектре. (A) Сырой ССИ и спектр после преобразования Фурье, (b) результаты после обработки экспоненты с LB = 1 Гц.

Современные пакеты обработки ЯМР обычно позволяют диалоговое изменение параметров, в течение которого можно наблюдать и функцию окна непосредственно, и образующийся спектр, так что оптимум можно определять очень быстро. Более отрицательное уширение линий будет приводить к более узким линиям, в то время как расположение максимума дальше по спаду увеличивает этот эффект. Это также приведёт к большему искажению резонансов возле основания и к ухудшению чувствительности, поскольку ранние сигналы приносятся в жертву по отношению к шуму (рис. 3.37). В любом случае неизменно будет заметно некоторое уменьшение чувствительности и необходимо иметь разумное отношение сигнал/шум для приемлемых результатов. Предполагается [14], что оптимальное Гауссово улучшение разрешения для обычного применения в спектрах с узкими линиями стремится к уменьшению ширины линии с коэффициентом 0,66, для которого максимум функции должен случаться в момент времени $1/(\Delta\nu_{1/2})$ секунд, то есть, инверсия резонансной ширины линии в отсутствие функции окна. Подходящие цифры для установки в программном обеспечении обработки могут затем получаться простой арифметикой. Например, начальная ширина линии 1 Гц будет требовать обужения линий 0,66 Гц с максимумом после 1 секунды. С типовым временем регистрации протонов около 3 сек, функция, следовательно, должна достигать максимума при 1/3 полной регистрации. Гауссово умножение может использоваться с хорошим эффектом при комбинации с дополнением нулями, таким образом, гарантируя достаточно тонкое цифровое разрешение, чтобы определять разрешение любой тонкой структуры.

В последние годы вводились новые функции окна [15,16] которые подобны Лоренц-Гауссову окну, но которые нацелены на улучшение разрешения без заметного уменьшения чувствительности.

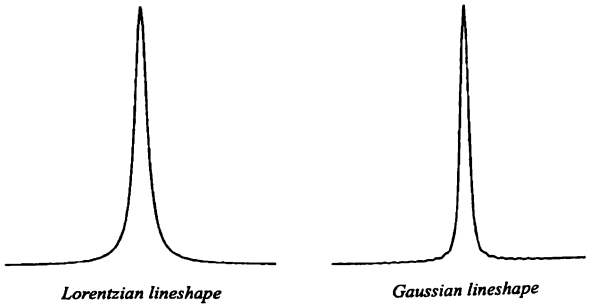


Рисунок 3.36. Сравнение Лоренцевых и Гауссовых форм линии.

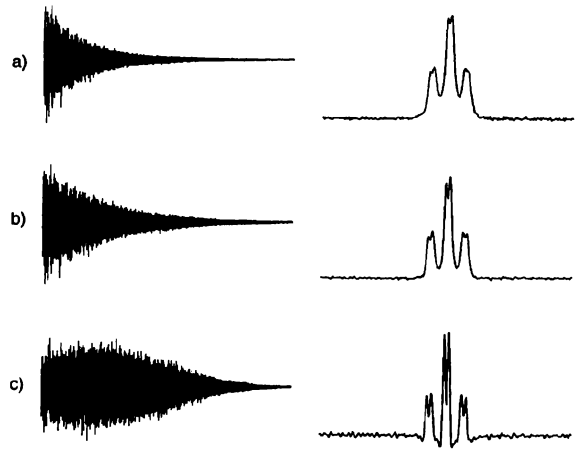


Рисунок 3.37. Преобразование Лоренца-Гаусса (« Гауссово умножение») может использоваться для улучшения разрешения. (a) Сырой ССИ и спектр после преобразования Фурье и результаты после L-G преобразования (b) при LB =-1Hz, GB = 0,2 и (c) LB =-3 Гц и GB = 0,2.

Эти так называемые *TRAF функции* (Рис. 3.34d), которые обычно имеют целью увеличивать среднюю часть ССИ, а также использовать согласованную фильтрацию более поздней части для ослабления шума. Они появляются в пакетах программ ЯМР и обеспечивают альтернативу укоренившимся функциям. Другая функция, чаще используемая в обработке двумерных наборов данных, *синусно-колоколообразное* окно, которое не имеет регулируемых параметров. Оно включает в себя половину синусной волны, начинающееся при нуле в начале ССИ, достигающее максимума на половине пути регистрации, и спадающее обратно к нулю в конце спада (рис. 3.34e). Функция всегда имеет нулевую интенсивность в конце, что устраняет усечение, часто встречающееся в 2D наборах данных. Она является довольно жёсткой функцией улучшения разрешения, которая может вводить нежелательные искажения формы линии, а также производит жёсткое ухудшение чувствительности, потому что начальная часть сигнала ЯМР сильно ослабляется, и поэтому она редко используется в одномерных спектрах. Её вариация - *сдвинутый по фазе синусный колокол*, для которого точка, в которой находится максимум - переменная (рис. 3.34f и g), и может перемещаться к началу ССИ. Опять же, она обычно применяется при 2D обработке и имеет то преимущество, что пользователь имеет возможность балансировать выигрыш в разрешении или искажения формы линий и ухудшение чувствительности. Конечный вариант (дополнительно сдвинутый) *квадратный синусный колокол* (рис. 3.34-d), который имеет свойства, подобные синусному колоколу, но хвосты более мягкие на краях, которые могут вызывать тонкие различия в 2D спектрах. Аналогично, при обработке 2D данных иногда используется *трапецеидальная* функция (рис. 3.34i).

3.2.8. Фазовая коррекция

В разделе 3.2 уже упоминалось, что фаза спектра нуждается в исправлении после преобразования Фурье, потому что фаза опорной частоты приёмника не точно соответствует начальной фазе векторов намагничивания. Эта ошибка постоянна для всех векторов, и так как она независима от резонансных частот, и упоминается как фазовая коррекция «нулевого порядка» (рис. 3.38). Практические ограничения также налагают необходимость частотно зависимой или фазовой коррекции «первого порядка». Рассмотрим события сразу после импульса, который применяется к образцу.

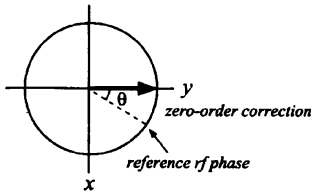
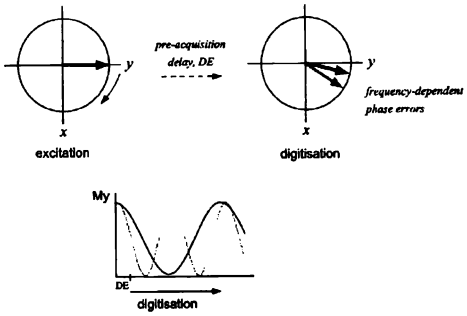


Рисунок 3.38. Фазовые ошибки нулевого порядка (частотно независимые) возникают, когда фаза детектированных сигналов ЯМР не соответствует РЧ фазе опоры приёмника. Все резонансы в спектре подвергаются воздействию в равной степени.

Рисунок 3.39. Фазовые ошибки (частотно зависимые) первого порядка возникают от расфазирования векторов намагничивания в течение задержки пред-регистрации, которая следует за возбуждающим импульсом. Когда начинается сбор данных, векторы с различными частотами приобретают существенную разность фаз, которая изменяется по спектру.



Короткий период временной задержки пред-регистрации DE, требуется для восстановления электроники спектрометра после действия импульса перед регистрацией неискажённого ССИ. Эта задержка обычно составляет десятки микросекунд, в течение которой векторы намагничивания немного развиваются согласно их химическим сдвигам так, что в точке, где начинается оцифровка, они больше не имеют ту же самую фазу (рис. 3.39). Ясно, что резонансы с самыми большими сдвигами требуют самых больших коррекций. Если задержка пред-регистрации мала относительно отстройки частоты, фазовые ошибки имеют приблизительно линейную зависимость сдвига и могут удаляться. Если задержка становится большой, коррекция не может делаться без образования холмистой базовой линии спектра. Внешний вид этих фазовых ошибок нулевого и первого порядков показывается в спектрах рис. 3.40.

Обычно обе формы ошибок случаются в спектре непосредственно после ФП. Процедура фазовой коррекции по существу одинакова на всех спектрометрах. Коррекция нулевого порядка используется, чтобы регулировать фазу одного сигнала в спектре к виду чистого поглощения, при визуальной оцен-

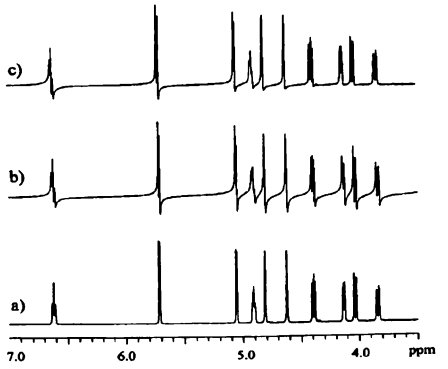


Рисунок 3.40. Ошибки Фазы нулевого и первого порядков в ^{1}H спектре, (a) правильно фазированный спектр, (b) спектр в присутствии частотно независимых фазовых ошибок (нулевого порядка) и (c) спектр в присутствии частотно зависимых фазовых ошибок (первого порядка).

ке, а коррекция первого порядка затем используется для регулировки фазы сигнала, находящегося далеко от первого, подобным образом. Идеально оба выбираемых резонанса должны быть так далеко друг от друга в спектре, насколько это возможно, чтобы максимизировать частотно зависимый эффект.

3.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦА

Этот раздел описывает некоторые из наиболее важных аспектов приготовления образца для анализа ЯМР, тема, которой слишком часто уделяется недостаточно внимания в научно-исследовательской лаборатории. Даже для обычных применений ЯМР химику разумно принять систематическую стратегию приготовления образца, которая гарантированно будет давать хорошие результаты, экономя приборное время и устраняя душевные расстройства.

3.3.1. Выбор растворителя

Так как все современные спектрометры ЯМР опираются на систему дейтериевой стабилизации для поддержания стабильности поля, для ЯМР неизменно требуются дейтерированные растворители, а они теперь доступны от многих коммерческих поставщиков. В действующей лаборатории органической химии объём используемых в ЯМР растворителей может быть удивительно большим, и стоимость растворителя может играть некоторую роль в его выборе. Обычно хлороформ и вода - наиболее широко используемые самые дешевые растворители, хотя ДМСО становится все более и более предпочтительным, особенно в промышленном секторе, по причине его полезных растворяющих свойств. Ацетон, метанол и дихлорметан также широко используются рутинно.

Выбор подходящего растворителя для анализируемого вещества основывается на множестве критериев. Наиболее очевидное требование, ***чтобы анализируемое вещество растворялось в нём при концентрации, требуемой для изучения***. Это будет зависеть от широкого диапазона факторов, включая фундаментальную чувствительность ядра, полную чувствительность прибора, природу эксперимента, и так далее. Если эксперименты, вероятно, будут выполняться при очень низких температурах, также важно знать, что растворяемое вещество останется в растворе, когда температура уменьшится, и что не образуется осадок в ампуле для ЯМР, и не ухудшит разрешение. Для экспериментов при температурах датчика, отличающихся от температуры окружающей среды (которые могут быть на несколько градусов выше, чем окружающая комнатная температура), также должны учитываться точки плавления и кипения растворителей. Таблица 3 суммирует некоторые важные свойства наиболее часто встречающихся растворителей. Для работы при очень высоких температурах обычно выбирают в качестве растворителя диметилсульфоксид или толуол, в то время как для очень низких температур более подходят дихлорметан, метанол или тетрагидрофуран. Даже для экспериментов, выполняемых при обычных температурах, применение растворителей может ограничивать их точки плавления. В холодный день растворы ДМСО могут замерзать в лаборатории. Вязкость растворителя также будет влиять на разрешение, которое может получаться с наилучшей эффективностью, обеспечиваемой наименее вязкими растворителями, такими как ацетон (который, по этой причине, используется в качестве растворителя для тестовых образцов разрешения спектрометра). Максимально острый возможный сигнал стабилизации также выгоден в экспериментах, основанных на разностной спектроскопии. Наиболее важным из них является эксперимент разностного ЯЭО (глава 8).

Для протонной и углеродной спектроскопии следует предвидеть химические сдвиги резонансов растворителя, поскольку они могут оказаться в самом неудачном месте и препятствовать наблюдению интересующих резонансов. В протонной спектроскопии наблюдаемый резонанс растворителя возникает от остаточных *протонированных* молекул (растворители ЯМР обычно поставляются с уровнями дейтерирования выше 99,5 %). Для обычных исследований, где может быть доступным несколько милли-

граммов материала, должны быть достаточны растворители более низкого качества, для которых резонанс остаточных протонов по абсолютной величине часто сравним с величиной сигнала растворяемого вещества.

Таблица 3.2. Свойства обычных дейтерированных растворителей.

Растворитель	δ_H (м.д.)	$\delta_{(HDO)}$ (м.д.)	δ_C (м.д.)	Точка плавления	Точка кипения
Уксусная кислота-d_4	11.65,20.4	115	179.0, 20.0	16	116
Ацетон-d_6	20.5	2.0	206.7, 29.9	-94	57
Ацетонитрил-d_3	1.94	2.1	118.7, 1.4	-45	82
Бензол-d_6	7.16	0.4	128.4	5	80
Хлороформ-d	7.27	1.5	77.2	-64	62
Окись дейтерия-d_2	4.80	4.8		4	101
Дихлорметан-d	5.32	1.5	54.0	-95	40
N, N-диметил-формамид-d_7	8.03,2.92,2.75	3.5	163.2,34.9,29.8	-61	153
Диметилсульфоксид-d_6	2.50	3.3	39.5	18	189
Метанол-d_4	4.87,3.31	4.9	49.2	-98	65
Пиридин-d_5	8.74,7.58,7.22	5.0	150.4,135.9,123.9	-42	114
Тетрагидрофуран-d_8	3.58,1.73	2.4	67.6, 25.4	-109	66
Толуол-d_8	7.09,7.00,6.98,2.09	0.4	137.9,129.2,128.3, 125.5,20.4	-95	111
Трифторуксусная кислота-d_1	11.30	11.5	164.2, 116.6	-15	75
Трифторэтанол-d_1	5.02,3.88	5.0	126.3, 61.5	-44	75

Протонные сдвиги δ_H, и углеродные сдвиги δ_C, указаны относительно ТМС (протонные сдвиги для остаточного частично протонированного растворителя). Протонные сдвиги остаточного сигнала HDO/H_2O очень зависят от состояния раствора.

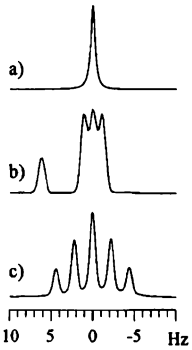


Рисунок 3.41. Остаточные протонированные резонансы дейтерированных растворителей (a) $CHCl_3$ в $CDCl_3$, (b) $CHDCl_2$ в CD_2Cl_2 и (c) CHD_2COCD_3 в $(CD_3)_2CO$. Мультиплетность, видимая в (b) и (c) возникает из (геминальных) взаимодействий через две связи с дейтериевым спином -1, производящая триплет 1 1 1 и квинтет 1 2 3 2 1, соответственно. Левый синглет в (b) - остаточный CH_2Cl_2 в растворителе, разность сдвигов возникает из 6 Гц изотопного сдвига H-D.

Растворители с более высокой степенью дейтерирования выгодны для протонной спектроскопии, когда количества образца имеют порядок десятков микрограмм или меньше, и, вероятно, должны использоваться совместно с методиками микрообразцов (Раздел 3.3.3). Резонанс протона растворителя, за исключением хлороформа и воды, будет включать в себя мультиплет от взаимодействия с дейтериевым спином - 1. Например, дихлорметан показывает триплет $CDHCl_2$, в то время как ацетон, диметилсульфоксид или метанол показывают квинтет от CD_2H (рис. 3.41). В углеродной спектроскопии, часто доминирует резонанс дейтерированного растворителя, который снова будет мультиплетом, вследствие взаимодействия с дейтерием. Для других обычных ядер редко рассматривается интерференция с растворителем, одним известным исключением является сам дейтерий. Пока используются очень большие количества образца (многие десятки миллиграммов) и можно быть уверенным, что резонанс растворителя не будет накладываться на резонансы растворяемого вещества, обычно

необходимо регистрировать ^2H спектры в *протонированном* растворителе, так как огромные сигналы дейтерированного растворителя, вероятно, поглотят интересующие. Это тогда не позволяет использовать систему стабилизации для поддержания стабильности поля. Отсутствие подходящей опоры стабилизации требует добавки небольшого количества дейтерированного растворителя в раствор, чтобы обеспечить внутреннее начало отсчёта химического сдвига (см. ниже).

Кроме резонанса самого растворителя существует другой существенный источник интерференции сигналов – вода, наблюдаемая в протонных спектрах, которая присутствует в различной степени во всех растворителях, а также часто связывается с растворяемыми веществами. Резонанс воды часто довольно широк, и его химический сдвиг может варьировать в зависимости от состояния раствора. Все растворители гигроскопичны до некоторой степени (включая и дейтерированную воду) и должны настолько мало подвергаться действию атмосферы, насколько это возможно, чтобы предотвращать их увлажнение. Очень гигроскопичные растворители, такие как диметилсульфоксид, метанол и вода лучше всего содержать в сухой атмосфере инертного газа. Возможно, следует заказывать растворители в мелкой фасовке, особенно те, которые используются нечасто. Могут также использовать молекулярные сита, чтобы поддерживать растворители сухими, хотя требуется некоторая осторожность при фильтровании приготовленного раствора перед анализом, чтобы удалять тонкие частицы, которые могут присутствовать. Альтернативно раствор для ЯМР может пропускаться через активированную окись алюминия с целью удаления воды, как часть процесса фильтрации.

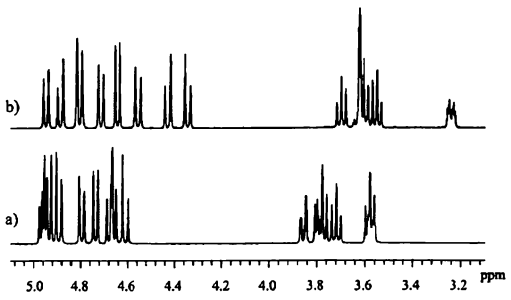
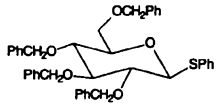


Рисунок 3.42. Замена растворителя может использоваться для улучшения дисперсии резонансов. Протонный спектр сахара **3.1** в $CDCl_3$ показан в (a) и в C_6D_6 в (b). Обратите внимание на появление резонанса при 3.2 мд в (b), который был накрыт при 3.6 мд другим резонансом в (a).



3.1

Растворитель может также вызывать потерю резонансов способных к обмену протонов, так как они будут заменяться дейтронами. В частности, это, вероятно, должно происходить с дейтерированной водой и метанолом. Чтобы совсем избежать дейтерообмена, нужно рассмотреть использование H_2O, содержащего 10-20% D_2O (чтобы обеспечить сигнал стабилизации) или метанола-d_3 (CD_3OH). В этих случаях требуется подходящая схема подавления сигнала растворителя (глава 9), чтобы ослаблять большой резонанс растворителя (который может ещё и привести к потере способных к обмену протонов растворяемого вещества процессом, известным как перенос насыщения). Исследования в 90% H_2O доминируют в ЯМР биологических макромолекул, потому что протоны, способные к обмену с растворителем, такие как скелетные амидные NH протоны в пептидах и белках или имидо протоны в ДНК и основных парах РНК, часто играют ключевую роль в определении структуры этих молекул [17,18]

Природа растворителя может также иметь существенное влияние на внешний вид спектра, и при замене растворителя иногда могут наблюдаться существенные изменения. Выгодны ли эти изменения, обычно трудно предсказать, и определяется экспериментально. Полезная смена растворителя - от неароматического растворителя к ароматическому, например замена хлороформа на бензол (Рис. 3.42), используя магнитную анизотропию, показываемую последним. В конкретных трудных случаях, где замена одного растворителя на другой просто производит различные, но одинаково непригодные

спектры, подходящий компромисс между двумя крайностями может обеспечить титрование второго растворителя в первый. Такие изменения могут оказаться полезными в 1D экспериментах, которые используют селективное возбуждение специфического резонанса, обнаруживая целевой протон, когда ранее он был скрыт, как в примере на рисунке 3.42. Селективное удаление резонанса добавлением другого растворителя может также оказаться полезным в интерпретации спектра. Добавление капли D_2O к органическому раствору в ампуле для ЯМР, тщательное смешивание с последующим отстаиванием смеси в течение некоторого времени, удаляет (или ослабляет) кислые способные к обмену протоны. Кислые протоны, которые защищены от растворителя, подобные тем, которые участвуют в водородных связях, не могут полностью обмениваться немедленно, но могут требовать многих часов для их исчезновения, и это может служить полезным датчиком Н-связанных взаимодействий.

3.3.2. Опорные соединения

При приготовлении образца обычно добавляют подходящее соединение, сигнал которого используется как *внутреннее* начало отсчёта химического сдвига в спектре, и выбор его должен соответствовать анализируемому веществу и растворителю. В протонном и углеродном ЯМР стандарт, используемый в органических растворителях, - тетраметилсилан (ТМС, 0.0 мд), который имеет множество благоприятных свойств. Он имеет острый 12-протонный синглетный резонанс, который удобно располагается на одном конце спектра. Он летучий, и поэтому может легко удаляться. Он химически инертен, и в редких случаях может оказаться неподходящим, как, например, при изучении силанов или циклопропанов.

Таблица 3.3. Стандартные вещества (0 мд) и их опорные частоты (Ξ значения) для некоторых нуклидов.

Нуклид	Первичный стандарт	Ξ значение (МГц)	Альтернативный стандарт
^{1}H	Me_4Si	100.000 000	TSP-d_4 (aq)
^{2}H	Me_4Si	15.351	следы дейтерированного растворителя
^{6}Li	LiCl (aq)	14.717	
^{7}Li	LiCl (aq)	38.866	
^{10}B	$BF_3O(Et)_2$	10.746	H_2BO_3 (aq)
^{11}B	$BF_3O(Et)_2$	32.089	H_2BO_3 (aq)
^{13}C	Me_4Si	25.145 004	1,4-диоксан @ 67.5 мд, TSP-d_4 (aq)
^{14}N	CH_3NO_2	7.224	
^{15}N	CH_3NO_2	10.136 767	NH_4NO_2 (aq), NH_3 (liq)[a]
^{17}O	H_2O	13.557	
^{19}F	$CFCl_3$	94.094 003	
^{29}Si	Me_4Si	19.867 184	
^{31}P	H_3PO_4 (85%)	40.480 747	
^{119}Sn	Me_4Sn	37.290 665	
^{195}Pt	$K_2[Pt(CN)_6]$	21.414 376	
^{207}Pb	Me_4Pb	20.920 597	

[a] Сдвиги ^{15}N биомолекулярных материалов чаще указываются относительно внешнего жидкого аммиака.

Для обычной работы часто нет необходимости добавлять какой-либо внутренний стандарт, поскольку этой цели могут служить остаточные линии самого растворителя (Таблица 3.2). Для водных растворов применяется водорастворимый эквивалент ТМС - частично дейтерированный натрий 3-(триметилсилил)пропионат натрия -d_4 (TSP-d_4), сдвиг которого принимается за 0.0 мд. Летучая альтернатива - 1,4-диоксан (^{1}H 3.75 мд, ^{13}C 67.5 мд), который может удаляться лиофилизацией. Стандартные эталонные вещества для некоторых других обычных нуклидов приведены в таблице 3.3. Часто они не добавляются в изучаемый раствор, а помещаются во внешнем, концентрическом жакете или в отдельном аксиальном капилляре внутри раствора, в таком случае эталонное вещество может также находиться в другом растворителе по сравнению с исследуемым образцом.

Альтернатива добавлению дополнительных эталонных веществ должна использовать так называемый внешний стандарт. Здесь спектр отдельного эталонного вещества получается перед и/или после интересующего образца и значение спектрального эталона переносится. Для обоих спектров должны использоваться идентичные установки поля, которые на некоторых старых приборах требуют того же самого растворителя стабилизации, или должна использоваться дополнительная коррекция опорной частоты спектра, чтобы компенсировать любые различия. Это ограничение не возникает на приборах, которые используют смещение частоты передатчика стабилизации при захвате стабилизации.

Привязка более «экзотических» ядер обычно менее ясна, чем для обычно использующихся, и во многих случаях непрактично добавлять эталонные вещества к драгоценным образцам, а иногда даже трудно идентифицировать какое вещество является «приемлемым» опорным стандартом. В таких случаях может использоваться Ξ-шкала, которая не требует применения специфического эталонного вещества. Вместо этого определяют *опорную частоту* для опорного вещества каждого нуклида при напряжённости поля, при которой протонный сигнал ТМС резонирует при точно при 100.000 МГЦ. Опорные частоты соответственно масштабируются для используемого магнитного поля, и это затем определяет абсолютную частоту при 0.0 мд для рассматриваемого нуклида. Эти Ξ-значения для выбранных ядер также суммируются в таблице 3.3, если недоступны более подробные таблицы [19].

3.3.3. Ампулы и объёмы образца

Новички в мире практического ЯМР часто находят стоимость апмпул для ЯМР удивительно высокой. Цены отражают необходимость производить ампулы, которые соответствуют строгим требованиям правильности (изгиб) и концентричности, поскольку отклонение от них может производить нежелательные артефакты в спектрах обычно в виде «боковых сигналов вращения». Обычно, ампулы более высокого качества (и более дорогие) требуются на более высокополевых приборах, особенно для работы на протонах. Могут потребоваться некоторые эксперименты, чтобы выбрать подходящий баланс между стоимостью и эффективностью для ваших конкретных приборов.

Диаметр ампулы обычно определяется размерами используемого датчика. Обычные диаметры ампул в химических лабораториях 2.5 или 3 мм (для применения с так называемыми микродатчиками), 5 мм (наиболее широко используются), или 10 мм (обычно используются для наблюдения ядер низкой чувствительности, где растворимость изучаемого материала ограничена). В биологических макромолекулярных исследованиях, где растворимость и соображения агрегации предотвращают использование концентрированных образцов, все более и более находят применение ампулы диаметром 8 мм. Так как обычно чувствительность имеет первостепенную важность при выполнении любого эксперимента ЯМР, также благоразумно использовать правильный объём образца для конфигурации датчик/ампула, а не растворять образец больше, чем необходимо. Важный фактор здесь - длина катушки детектирования в датчике. Объёма образца должно быть достаточно, чтобы оставалось немного раствора выше и ниже катушки, так как разности магнитной восприимчивости на границах раствор/воздух и раствор/стекло ведут к локальным искажениям магнитного поля. Для стандарт-

ной 5 мм ампулы, требуемый объём составляет 400-600 мкл, в то время как для микроампул он уменьшается примерно до 100-150 мкл. Для больших ампул, возможно, будет необходимо использовать «подавитель воронки», чтобы предотвращать образование воронки в ампуле при вращении образца. Это обычно тефлоновая вставка, которая плотно размещается в ампуле для ЯМР, соприкасаясь с поверхностью образца и, таким образом, удерживает раствор. При использовании этих вставок требуется определённая осторожность при работе с изменяемой температурой, благодаря тепловому расширению или сокращению вставки. При низких температурах вставка может даже упасть в раствор при неправильном её применении.

Для работы с меньшими количествами образца можно применять микроячейки, которые размещаются в пределах стандартных 5 мм ампул для ЯМР, но которые позволяют использовать только десятки микролитров раствора, позволяя концентрировать доступный материал в катушке детектирования. При использовании таких ячеек рекомендуется заполнять объём вокруг ячейки с растворителем, поскольку это минимизирует разности восприимчивости и улучшает разрешение. Совсем недавно стали доступными специальные ампулы и вставки, которые позволяют удерживать меньшие объёмы образца в пределах чувствительных областей катушек (рис. 3.43). Они используют стекло, которое имеет магнитную восприимчивость, согласованную с растворителем, и, таким образом, позволяют использовать меньшие высоты образца без искажений формы линии [20]. Теперь доступны ампулы индивидуально согласованные с водой и с небольшим выбором органических растворителей.

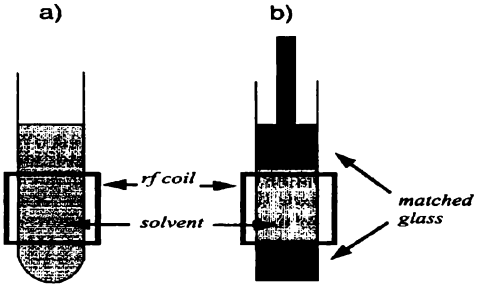


Рисунок 3.43. Схематичное сравнение (a) обычная ампула для ЯМР и (b) согласованная ампула и вставка, в которой магнитная восприимчивость стекла согласована с растворителем. Это позволяет уменьшить объём образца и, таким образом, концентрировать большее количество анализируемого вещества в пределах катушки детектирования.

Ампулы для ЯМР должны содержаться в чистоте, сухими, свободными от пыли, а также не должны содержать волокон на стекле, поскольку это искажает цилиндр, которым ограничивается образец. Новые ампулы не всегда чистые при поставке, хотя, к сожалению, часто предполагается, что это так. Органические смазки, используемые при их изготовлении, могут оставаться на стекле и обнаруживаться, когда ампула используется впервые. Для обычного мытья ампул их ополаскивают подходящим органическим растворителем, таким как ацетон, или дистиллированной водой, несколько раз: обычно достаточно. Более стойкое загрязнение лучше обрабатывать химическими, а не механическими средствами и/или рекомендуется смачивание детергентом или сильными минеральными кислотами. Следует избегать применения хромовой кислоты, поскольку это может оставлять следы парамагнитного хрома (VI), который будет ухудшать разрешение. Ампулы не следует сушить, подвергая их высоким температурам в течение продолжительного времени, так как это может привести к искажению их формы. Лучший подход состоит в том, чтобы выдерживать ампулы под вакуумом при слегка повышенной температуре, если возможно, или продувать в ампулы фильтрованный азот. Если используется сушка в печи, ампулы должны укладываться на плоский поднос и нагреваться в течение только 30 минут. Их не следует помещать в мензурку или штатив для ампул, поскольку это позволяет им изгибаться. Если важно удаление всех следов протонированной воды из ампулы, то необходимо перед сушкой ополаскивать ампулу D_2O, чтобы гарантировать обмен воды, которая адсорбируется на поверхности стекла. Неиспользованные ампулы должны храниться с одетыми на них крышками, чтобы предотвращать попадание пыли. Наконец, также важно избегать загрязнения

внешней стороны ампулы для ЯМР (которое включает в себя жиры отпечатков пальцев) поскольку это ведет к переносу примесей в датчик. Накопление их в датчике со временем ведёт к ухудшению эффективности прибора.

3.3.4. Фильтрование и дегазирование

Для любого ЯМР эксперимента необходимо достигать однородного магнитного поля во всём объёме образца, чтобы получить спектр высокого разрешения, и просто представлять диапазон обстоятельств, которые ухудшают это условие. Одно из наиболее вредных - присутствие в образце частиц, так как они могут искажать локальные магнитные поля, поэтому наиболее важно удалять их из образца для ЯМР до анализа. Даже очень слабые изменения поля в пределах образца могут производить значительное ухудшение разрешения. Это не должно удивлять, если помнить, что часто пытаются разрешать линии, чьи резонансные частоты составляют многие сотни МГц, но которые отстоят одна от другой меньше чем на 1 Гц. Это соответствует разрешению 1 части на 10^9 (10^{-9}), что грубо эквивалентно измерению расстояния от Земли до Солнца с точностью 1 км! Можно применять коммерческие прокаливаемые фильтры, но они требуют постоянной промывки между образцами. Удобная и дешевая альтернатива - пропускать раствор через маленькую вставку ваты в пастеровской пипетке непосредственно в ампулу для ЯМР (перед этим хорошо ополаскивать вату небольшим количеством ЯМР растворителя). Если вата не годится для образца, можно использовать вставку из стекловаты, хотя это не обеспечивает такой хорошей фильтрации. Если в растворе вероятно присутствие ионов металлов (парамагнитные ионы являются наиболее неприятными), или от подготовки образца или от разложения самого образца, то пропускание раствора через маленькую колонку смолы, хелатирующей металлы, должно удалять их.

В ситуациях, где требуется очень высокое разрешение, или, если должны выполняться исследования релаксации, тогда кроме того может оказаться необходимым удалять все следы кислорода из раствора. Это может потребоваться при измерении ядерных эффектов Оверхаузера, хотя для обычных измерений ЯЭО обычно нет необходимости беспокоиться о дегазировании образца (см. главу 8). Необходимость удаления кислорода возникает, потому что O_2 является парамагнетиком и его присутствие обеспечивает эффективный путь релаксации, который ведет к уширению линий. По существу имеются два подхода к дегазированию образца. Первый включает пробулькивание инертного газа через раствор, чтобы вытеснять кислород. Это обычно бескислородный азот или аргон, который должен пропускаться через раствор в ампуле для ЯМР в течение примерно одной минуты для органических растворителей, и вдвое дольше для водных растворов. При выполнении этой процедуры требуется большая осторожность и следует использовать тонкий капилляр, чтобы *медленно* вводить газ. Очень легко моментально совсем выдуть образец из ампулы, вводя газ слишком быстро, поэтому, вероятно, лучше потренироваться на менее ценном образце! Заметьте, что с летучими растворителями, вероятно, произойдёт существенное уменьшение объёма образца, и может значительно уменьшиться количество ТМС, если он используется.

Второй и более тщательный подход - методика «замораживания–откачивания -оттаивания». Ампула для ЯМР, содержащая раствор, замораживается жидким азотом или сухим льдом и помещается под вакуум на подходящей вакуумной установке. Коммерческие производители ампул производят множество специализированных ампул и адаптеров для этой цели, но простая альтернатива - соединять стандартную ампулу с вакуумной линией при помощи иглы, проткнутой через каучуковую крышку мембраны на ампуле. Ампулу затем отключают от вакуумной системы при помощи запорного крана и образцу позволяют оттаивать, в это время из раствора выделяются все растворённые в нём газы. Затем процедура обычно повторяется ещё не менее двух раз. Этого обычно достаточно, чтобы полностью дегазировать образец. При использовании обычного вакуумного насоса может оказаться необходимым помещать ловушку жидкого азота между насосом и образцом, чтобы избежать возможности конденсации вакуумных масел в ампуле. Кроме того, при замораживании водных образцов легко

сломать ампулу, если это выполняется слишком быстро; удерживания ампулы наклонно прямо над замораживающей средой обычно достаточно, чтобы избежать таких бедствий. Альтернативный подход для водных образцов, содержащих нелетучие растворяемые вещества, состоит в осторожном помещении образца прямо под вакуум без замораживания, например, в вакуумном сосуде, и, позволяя растворённому газу выделяться из раствора.

После процедуры дегазирования ампулу следует запечатать. Если образец подвергается кратковременному анализу, скажем не более чем несколько часов, то стандартной обтягивающей крышки для ампулы ЯМР, обернутой *небольшим количеством* парафиновой плёнки воска (или, ещё лучше, применить каучуковую мембрану), обычно достаточно, так как диффузия газов в растворе в ампуле будет довольно медленная. Для более продолжительных исследований можно приобрести специализированные адаптеры или ампулы с завинчивающейся пробкой, или стандартные ампулы могут запаиваться пламенем на горелке, для чего доступны ампулы для ЯМР с ограничениями сверху, чтобы упростить весь процесс. При запаивании пламенем очень желательно охлаждать или замораживать раствор, а затем запечатывать при оттягивании лёгким вакуумом. **Неправильное охлаждение или вакуумирование раствора может вызывать опасное повышение давления в ампуле при оттаивании образца.** Запаянный конец ампулы должен быть симметричным, иначе образец будет плохо вращаться, поэтому практика на негодных ампулах, вероятно, была бы оправданной.

3.4. ПОДГОТОВКА СПЕКТРОМЕТРА

Спектрометр ЯМР должен оптимизироваться для каждого помещаемого в него образца. Прецизионная природа требуемых регулировок и количество затрачиваемого на их выполнение времени будет зависеть от образца, спектрометра, природы эксперимента, опытности оператора, но во всех случаях цель их состоит в том, чтобы достичь оптимального разрешения и чувствительности и чтобы гарантировать воспроизводимость системы. Подробности этих требуемых регулировок зависят от конструкции рассматриваемого спектрометра, поэтому здесь не делается никаких попыток их описывать. Они все разделяют те же самые общие процедуры, однако, которые суммируются в схеме 3.1 и описаны ниже.

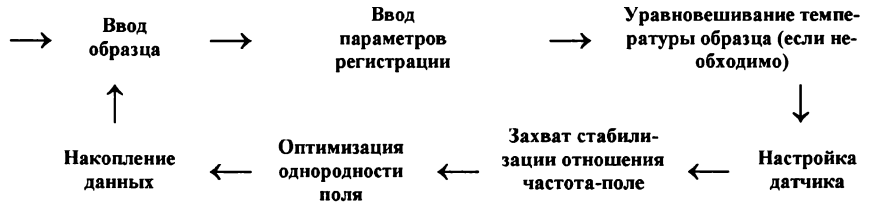


Схема 3.1. Типовая процедура подготовки спектрометра для сбора данных. Все эти этапы можно автоматизировать, хотя на момент написания существует ещё только очень ограниченный выбор полностью автоматически настраиваемых датчиков.

3.4.1. Датчик

Если вы химик, использующий доступные вам средства ЯМР, тогда вопрос о выборе подходящего датчика для рассматриваемого изучения может быть неуместным, так как вы будете, вероятно, вынуждены использовать то, что вам доступно. Если, однако, вас привлекают к приобретению прибора или его модернизации, или вам настолько повезло, что вы имеете доступными множество датчиков для данного прибора, то важно уметь сделать правильный выбор. Так как датчик должен получать самые слабые сигналы ЯМР, он является, вероятно, наиболее критической частью спектрометра

ЯМР, и его конкретное проектирование и конструирование будет влиять не только на типы доступных экспериментов, но также и на полную эффективность прибора. В течение многих лет в области проектирования датчиков существует значительная конкуренция среди производителей приборов, которая стимулирует увеличение их эффективности, и если раньше владельцы приборов ограничивались выбором датчиков от изготовителя спектрометра, теперь эта проблема облегчается существованием нескольких компаний, которые производят датчики, совместимые с приборами основных производителей ЯМР.

Имеются два главных фактора, которые имеют решающее значение для улучшения совершенства датчика. Во-первых - материал, использованный при конструировании самой приёмной катушки. Так как эта катушка находится в очень тесной близости к образцу, этот материал может искажать магнитное поле в пределах него, подвергая риску однородность. Современные композитные металлы проектируются так, что они не ведут к искажениям поля (они, как говорят, имеют *нулевую магнитную восприимчивость),* таким образом, позволяя получать лучшие формы линий, что, в конечном счете, ведёт к улучшению отношения сигнал/шум. Второй фактор лежит в проектировании формы катушки и её размеров. Современные катушки обычно длиннее, чем прежние, так что в их пределах находится больший объём образца. Это требует большего объема, в котором магнитное поле однородно, поэтому эти изменения в конструировании датчика в значительной степени следовали за улучшениями в системах шиммирования комнатной температуры (см. ниже). Позже при обсуждении сложных многоимпульсных экспериментов мы столкнёмся ещё и с требованием высокой однородности РЧ поля, создаваемого внутри этой катушки.

Существует великое множество конструкций датчиков различных размеров, которые можно получить для любого данного прибора. Размер датчика обычно характеризуется диаметром ампулы, для которого он проектируется, и как упоминалось ранее, обычные размеры составляют 3, 5, 8 и 10 мм, из которых в настоящее время чаще всего используется диаметр 5 мм. Чисто по причине свойственной чувствительности данной конструкции катушки, более узкие 3 мм катушки, используемые в микродатчиках, будут иметь лучшее качество и, таким образом, предпочитаются при исследовании очень малых количеств образца, возможно в микрограммовом диапазоне. Эти микродатчики в значительной степени используются области химии природных соединений [21] и при изучении биосинтетических материалов, где эти малые количества образца обычны. Для случаев экстремально ограниченного количества материала созданы так называемые нано-датчики, которые позволяют сконцентрировать доступный образец в даже меньшем объёме около 40 мкл, но они не получили широкого распространения. Ампулы более широкого диаметра, 8 или 10 мм позволяют помещать в активную область катушки большие объёмы образца, поэтому они обычно используются, когда чувствительность ограничивается фактором растворимости образца.

Другое важное соображение при выборе датчика - диапазон ядер, которые можно наблюдать, и для которого эта конфигурация катушки была оптимизирована. Простейшая конструкция датчика содержит одиночную катушку, которая проектируется для наблюдения только одного ядра, чаще всего это ядро водорода – протон (^{1}H). Фактически эта катушка образует колебательный контур «с двойной настройкой» чтобы позволять одновременное наблюдение дейтерия для регулирования частоты-поля через систему стабилизации, хотя присутствие канала дейтерия обычно не обсуждается явно при выборе конфигураций датчика. Однако многие современные эксперименты ЯМР требуют импульсов, применяемым к двум (или больше) различным нуклидам, один из которых наиболее часто протон, для которых необходимы две катушки. В этом случае широко используются две возможных конфигурации, в зависимости от того, желают ли наблюдать протон или другой нуклид (называемый X-ядром). Традиционная конструкция с двумя катушками, оптимизированная для наблюдения X-ядер, с X-катушкой как внутренний из двух, позволяющей ей находиться ближе к образцу, обеспечивает наилучшую возможную чувствительность для наблюдения X-ядра (имеет максимальный «коэффици-

ент заполнения»). Эта конфигурация обычно описывается кратким обозначением **X{H}**. Современные многоимпульсные эксперименты имеют тенденцию использовать более высокую природную чувствительность наблюдения протонов везде, где возможно. При этом выгоднее иметь такую конструкцию датчика, при которой протонная катушка находится ближе к образцу, а X-катушка - теперь самая внешняя; **H{X}**. Эта конструкция датчика часто упоминается *как имеющая инверсную конфигурацию*, по причине этого изменения геометрии. В любом случае, схема с X-катушкой может проектироваться для работы только на одной частоте, либо чтобы иметь возможность настраиваться в широком диапазоне частот на целый ряд резонирующих в нём ядер. Такие датчики известны как датчики *широкополосного наблюдения* или *широкополосные инверсные датчики*. Альтернативная популярная конфигурация датчика в органической химии - *четырёх-ядерный датчик* (quadro, QNP), который позволяет наблюдение четырех чаще всего встречающихся ядер ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, и ^{31}P. В исследованиях биологических макромолекул, и совсем недавно в органической химии, используются *датчики тройного резонанса*, позволяя наблюдение протонов и импульсное воздействие или декаплирование двух других ядер; ^{1}H {X, Y}. Позже предложено добавление в датчик катушек градиента магнитного поля. Они окружают обычные РЧ катушки и предназначены для нарушения однородности постоянного магнитного поля во всём объёме образца в течение коротких периодов времени очень воспроизводимым способом. Методы селектирования градиентом магнитного поля вводятся в главе 5. Цель самых последних конструкций датчика - уменьшение теплового шума, используя сверхпроводящие материалы для катушки детектирования (для этого катушку необходимо охлаждать жидким гелием) и, хотя это предложено несколько лет назад [22,23], только недавно это стало доступным [24]. До сих пор такие датчики доступны только в некоторых конфигурациях, ограничиваемых множеством технических условий, не самое жёсткое из которых - необходимость поддерживать температуру катушки детектирования при 4°K, в то время как температура образца остаётся комнатной! Они обычно предлагают фактор повышения чувствительности 4÷8 по сравнению с обычными датчиками (при оптимальных условиях) и в настоящее время представляют многообещающую область для будущих разработок.

3.4.2. Настройка датчика

Датчик ЯМР довольно специализированная (и дорогая) часть аппаратуры, чья первичная цель состоит в том, чтобы удерживать передающие и приёмные катушки как можно ближе к образцу для детектирования слабых сигналов ЯМР. Чтобы катушки могли передавать РЧ импульсы к образцу и эффективно принимать сигналы ЯМР, электрические свойства колебательного контура катушки должны оптимизироваться для каждого образца. Регулировки производятся при помощи переменных конденсаторов, которые распложены в датчике в непосредственной близости от катушки (катушек) и включены в схему настройки. Имеются два аспекта в этой процедуре оптимизации, известные как *настройка* и *согласование*, хотя весь процесс более часто упоминается как «настройка датчика». Первый из них, как подразумевает название, настраивает катушку на радиочастоту соответствующего ядра и аналогичен настройке радиоприёмника на желательную радиостанцию. Плохо настроенный датчик приведет к жёсткой деградации чувствительности, так же, как радиопередача заглушается шипящим шумом. Второй аспект - стремление выравнивать (или согласовать) импеданс (полное эффективное сопротивление переменному току) комбинации катушки/образца с таковым передатчика и приемника так, чтобы максимально возможная РЧ энергия могла передаваться от передатчика в образец и впоследствии от образца в приемник. Поскольку электрические свойства изменяются от образца к образцу, оптимальные условия настройки и согласования также изменяются, и поэтому требуют проверки для каждого нового образца. Эти различия могут в значительной степени приписываться различиям между растворителями при самых заметных изменениях, встречающихся между неполярными органическими растворителями и ионными водными растворами.

Настройка датчика необходима по ряду причин. Кроме фундаментального требования для максимизации чувствительности, это гарантирует, что ширины импульсов могут сохраняться короткими, что, в свою очередь, уменьшает вне-резонансные эффекты и минимизирует мощность, требуемую для широкополосного декаплирования. Правильно настроенный датчик также требуется, если должны воспроизводиться ранее калиброванные ширины импульсов, - существенное условие успешного выполнения многоимпульсных экспериментов.

Настройка и согласование

Процесс настройки датчика включает применение к датчику РЧ, контроль его реакции на это некоторыми подходящими средствами и регулировка ёмкостей конденсаторов в головке датчика (при помощи длинных стержней, которые проходят через его корпус), чтобы достичь желательной характеристики. В случае широкополосных датчиков, которые могут настраиваться в очень широких диапазонах частот, может даже потребоваться физическая замена конденсаторов, либо удаление их из датчика, либо посредством механизма переключения, содержащегося в датчике. Существуют различные процедуры контроля характеристики датчика, но самый полезный и широко применяемый на современных приборах, использует развёртку частоты взад-вперед (wobble) в узкой области частот (обычно несколько МГц) возле целевой частоты, в течение которой отклик датчика сравнивается с откликом внутренней эталонной нагрузки 50 Ω (все спектрометры ЯМР настраиваются по этому стандартному импедансу). В это время дисплей отображает одновременно степень настройки и ошибку согласования (рис. 3.44a), позволяя делать интерактивные регулировки конденсаторов настройки, чтобы достичь желаемого результата (рис. 3.44b). Характеристика достигает минимума, когда датчик согласовывается с нагрузкой 50Ω. При дисплее такого типа можно видеть направление, в котором должны делаться регулировки, чтобы достигнуть условия правильной настройки и согласования. Важно отметить, что регулировки настройки и согласования, не являются взаимно исключающими, и регулировки одной величины, вероятно, изменяют другую, поэтому, чтобы достичь оптимума требуется циклический процесс: настройка – согласование - настройка и т.д.

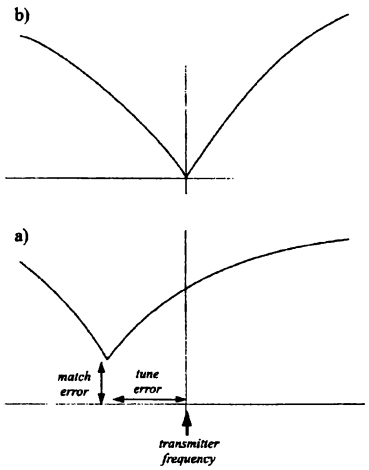


Рисунок 3.44. Настройка и согласование датчика ЯМР вобулоскопическим методом. Тёмная линия представляет видимую характеристику датчика для (a) ненастроенного и (b) правильно настроенного датчика.
В специальной русскоязычной литературе вобулоскоп обычно именуется «измерителем частотной характеристики» (ИЧХ). (Прим. пер)

Метод настройки датчика на старых спектрометрах, которые неспособны производить дисплей развёртки частоты, состоит в том, что между передатчиком/приемником и датчиком помещается *согласователь направления* и РЧ применяется как последовательность очень быстрых импульсов. Согласователь направления обеспечивает некоторый вид дисплея, обычно простой стрелочный измеритель, который измеряет полную мощность, отражающуюся обратно из датчика. Цель состоит в том,

чтобы *минимизировать* этот отклик процессом настройки и согласования так, чтобы максимальная мощность могла подаваться на образец. К сожалению, в этом процессе, в отличие от метода, описанного выше, отсутствует дисплей, показывающий ошибки настройки и согласования отдельно, и отсутствует указание направления, в котором должны делаться изменения, имеется просто индикация полного отклика системы. Этот метод - ясно худший из двух, но может оказаться единственно доступным на приборах ранних выпусков.

Когда интересует больше, чем одна частота ядер, правильно начинать регулировку *самой низкой частоты* и продвигаться вверх к самой высокой. Также разумно удалять РЧ фильтры, согласователи и так далее с пути РЧ, согласуется только сам датчик. Температура датчика и образца будут воздействовать на настройку датчика, поэтому её следует проверять всякий раз, когда делаются её изменения. Если требуются большие изменения температуры, разумно быстро *перепроверять настройку через каждые десять или двадцать градусов*, чтобы никогда не оказываться слишком далеко от оптимума; это особенно важно при использовании метода согласователя направления. Когда спектрометр используется в среде открытого доступа, где взаимодействие со спектрометром поддерживается минимальным, или когда прибор работает в автоматическом режиме, настройка датчика для каждого образца обычно невозможна (хотя теперь появились датчики с возможностью полной автоматической настройки), в таком случае удобно настраивать датчик для наиболее часто используемого растворителя и мириться с некоторым ухудшением эффективности для других. Различные растворители могут требовать различной калибровки ширины импульса при этих условиях.

Наконец в этом разделе мы рассмотрим одну конкретную ситуацию, в которой выгодно преднамеренно расстраивать датчик. При выполнении исследований в *протонированной воде* ширина линии резонанса растворителя в хорошо настроенном датчике значительно уширяется, по причине явления *затухания излучения* [25]. Это происходит, когда ССИ растворителя спадает ускоренно, потому что в катушке возникает достаточно сильный ток, произведенный самим интенсивным сигналом ЯМР, который производит ***вторичное РЧ поле***, которое вызывает движение намагниченности воды обратно к +z оси с большей скоростью, чем ожидалась бы только от природных релаксационных процессов. Быстрый спад ССИ, в свою очередь, обусловливает расширенный резонанс воды. Это случается только для очень интенсивных резонансов и имеет наибольший эффект, когда образец эффективно взаимодействует с катушкой, то есть, когда датчик хорошо настроен. Небольшая расстройка датчика обеспечивает более острый (и более слабый) резонанс воды, чья форма линии дает лучший признак однородности поля. Перенастройка датчика является существенной для последующих наблюдений ЯМР, использующих схемы подавления сигнала растворителя.

3.4.3. Стабилизация отношения поле-частота

Несмотря на внушительную стабильность поля, обеспечиваемую сверхпроводящими магнитами, они ещё имеют тенденцию значительного дрейфа в течение нескольких часов, вызывая дрейф частоты резонансов ЯМР, ведущий к потере разрешения.

Чтобы преодолеть эту проблему, требуется некоторое измерение этого дрейфа, чтобы иметь возможность применения его коррекции. На всех современных спектрометрах это измерение обеспечивается, контролируя частоту резонанса дейтерия растворителя. Сигнал дейтерия собирается специальным спектрометром наблюдения ядер ^{2}H, содержащимся в приборе, который действует параллельно с основными каналами и упоминается как *канал стабилизации* (lock channel) или просто как *стабилизация* (lock).

Система стабилизации

Канал стабилизации регулирует поле, контролируя резонанс дейтерия *дисперсного вида*, а не сигнал вида поглощения, который обычно рассматривается в ЯМР, и служит цели поддерживать центр

этого резонанса при постоянной частоте (рис. 3.45). Дрейф магнитного поля изменяет резонансную частоту и, следовательно, производит сигнал ошибки, который имеет и величину и знак (в отличие от резонанса режима поглощения, который изменяется только по величине).

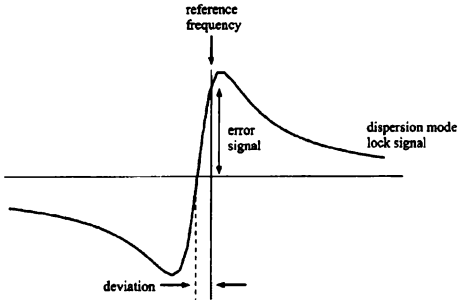


Рисунок 3.45. Система стабилизации спектрометра контролирует сигнал дисперсного вида резонанса дейтерия растворителя. Сдвиг резонансной частоты благодаря дрейфу в постоянном поле производит сигнал ошибки, который указывает модуль и направление дрейфа, позволяя системе обратной связи, компенсировать его.

Он затем управляет системой обратной связи, которая регулирует установку поля. Сигнал дисперсии также имеет преимущество наличия довольно крутого профиля, что обеспечивает самую высокую чувствительность к изменениям. Контроль резонанса дейтерия также обеспечивает меру однородности магнитного поля в пределах образца, так как только однородное поле производит острый интенсивный резонанс. Таким образом, сигнал стабилизации может использоваться как индикатор оптимизации (шиммирования) магнитного поля (Раздел 3.4.4), где сигнал режима поглощения представляется оператору как дисплей канала стабилизации. Так как самое лучшее регулирование отношения частота-поле обеспечивается самым сильным и самым острым резонансом стабилизации, более высоко дейтерированные невязкие растворители обеспечивают самое лучшее регулирование. С точки зрения стабильности поля сигнал воды самый неподходящий для стабилизации, так как он обычно имеет довольно широкий резонанс по причине обменных процессов, которые, в свою очередь, сильно зависят от температуры и pH растворителя.

Оптимизация стабилизации

Первая процедура для захвата стабилизации - создать условие резонанса для сигнала дейтерия, который включает изменение (развёртку) либо поля, либо частоты передатчика стабилизации. Из этих двух вариантов предпочитается последний, так как он позволяет избежать необходимости изменения частот передатчика в других каналах и теперь является стандартным на современных приборах. Кроме того, имеются три фундаментальных зависящих от датчика параметра, которые следует рассмотреть для оптимального качества стабилизации. Первый из них - мощность передатчика стабилизации, используемая для возбуждения резонанса дейтерия. Её необходимо устанавливать на самый высокий уровень, чтобы максимизировать отношение сигнал/шум, но не следует устанавливать настолько высокой, чтобы это вело к *насыщению в канале стабилизации.* Это состояние, при котором к спинам дейтерия применяется большее количество энергии, чем может рассеиваться через процессы спиновой релаксации, и обнаруживается по беспорядочно дрейфующему вверх и вниз уровню стабилизации. Уровень насыщения можно определять, делая небольшие изменения мощности в канале стабилизации, и наблюдая их действие на сигнал стабилизации. При увеличении мощности сигнал стабилизации также увеличивается, но при насыщении он будет затем дрейфовать обратно вниз. Наоборот, при уменьшении мощности уровень стабилизации снижается, но при насыщении он будет иметь тенденцию немного ползти вверх. Правильный подход – сначала определить точку насыщения, а затем уменьшить мощность, чтобы гарантировать, что вы работаете без насыщения, прежде чем продолжать. Вторая особенность - *усиление стабилизации.* Это усиление, которое применяется к детектированному сигналу стабилизации, и обычно менее критичное, чем мощность, хотя оно должно не быть столь высоким, чтобы вводить чрезмерный шум стабилизации. Последняя харак-

теристика - *фаза стабилизации*. Мы уже видели, что регулировка отношения частота-поле связывается с контролем формы линии чисто дисперсного вида, а это происходит только, когда резонанс был правильно фазирован. В этом случае *наблюдаемый* сигнал стабилизации производит максимальную интенсивность при регулировке фазы стабилизации, так как только тогда он имеет требуемую форму линии чистого поглощения.

Получение данных без стабилизации

В случаях, когда дейтерий недоступен для захвата стабилизации, например при желании наблюдать или декаплировать сам дейтерий, может оказаться необходимым получать данные «без стабилизации» (хотя недавние разработки аппаратуры позволяют декаплирование дейтерия во время регистрации соответствующим запиранием канала стабилизации). Съёмка без стабилизации возможна в ограниченные периоды времени, которые зависят от скорости дрейфа магнита. Для экспериментов, которые должны производиться в течение очень многих часов по причинам чувствительности, полезный подход - получать серии ССИ, каждая из которых накапливается в течение более короткого периода времени, скажем, в течение одного часа. Тогда дрейф в пределах каждого набора данных будет по существу незначителен, в то время как любой дрейф, встречающийся по всей продолжительности эксперимента может корректироваться *сложением спектров частотного измерения*, для которых всякий дрейф частоты, компенсировался вручную внутренней привязкой спектра. Сложение затем обеспечивает требуемое улучшение отношения сигнал/шум без вредного влияния дрейфа поля.

3.4.4. Оптимизация однородности поля: шиммирование

ЯМР эксперименты требуют однородного магнитного поля по всему объёму образца ЯМР, помещённого в катушку детектирования. Отклонение от этого идеала вводит различные искажения формы линии, подвергая риску и чувствительность, и разрешение. Таким образом, каждый раз, когда образец вводится в магнит, необходима «тонкая настройка» магнитного поля, и несколько минут потраченные для достижения хорошего разрешения и формы линии - время потраченное с пользой. Для тех, кто действительно использует спектрометр ЯМР, очень важно знание основ оптимизации поля, но даже если вам предстоит только *интерпретировать* ЯМР спектры, возможно, потому что кто-то другой получал данные, или если весь процесс выполнялся автоматически, то некоторое понимание наиболее обычных дефектов, возникающих из остаточных неоднородностей поля, может быть неоценимым.

Система шиммирования

Поддержание стабильного магнитного поля, которое однородно до 1 части на 10^9 в активном объёме современных датчиков ЯМР (обычно от 0,1 до 1,5 $см^3$) чрезвычайно требовательно. Этот удивительный подвиг достигается тремя уровнями оптимизации поля. Первый лежит в тщательном конструировании самого магнита сверхпроводящего соленоида, хотя однородность поля, производимая им, довольно грубая, по сравнению с критериями ЯМР Это основное поле затем модифицируется на двух уровнях наборами «шиммовых» катушек. Эти катушки несут электрические токи, которые производят свои собственные малые магнитные поля, которые используются для компенсации остаточных градиентов поля в образце. Фактически, шиммы - маленькие металлические клинья, используемые в инженерии для совмещения частей вместе, и первоначально использовались в конструировании железных магнитов для изменения положения полюсов, чтобы регулировать поле. В настоящее время, когда доминируют сверхпроводящие магниты, это название сохранилось в ЯМР, поэтому термин

«шиммирование» означает процесс оптимизации однородности поля[4] Сверхпроводящие («холодные») шиммовые катушки находятся внутри криостата магнита, и удаляют большие градиенты поля магнита. Токи в них устанавливаются при первом запуске магнита, и обычно не требует изменения в дальнейшем. Шиммы комнатной температуры («тёплые») устанавливаются в цилиндрическом корпусе, в который непосредственно вставляется датчик ЯМР, вся эта сборка помещается в отверстие магнита таким образом, что катушка датчика находится точно в центре постоянного поля. Эти шиммы (которых обычно имеется на современном приборе примерно двадцать - тридцать) предназначены для удаления любых остаточных градиентов поля, путём регулировки токов через них, хотя на практике регулярно нужно изменять только малую часть их общего числа (см. ниже).

Таблица 3.4. Шиммовые градиенты, имеющиеся на спектрометрах высокого разрешения.

Шиммовый градиент	Порядок градиента	Взаимодействующие шиммовые градиенты
Z^0 (главное поле)	0	
Z^1 (Z)	1	
Z^2	2	Z
Z^3	3	Z, (Z^2)
Z^4	4	Z^2, Z^0, (Z, Z^3)
Z^5	5	Z^3, Z, (Z^2,Z^4)
Z^6	6	Z^4, Z^2, Z^0, (Z, Z^3, Z^5)
X	1	Y, (Z)
Y	1	X, (Z)
XZ	2	X, (Z)
YZ	2	Y, (Z)
XY	2	X, Y
X^2-Y^2	2	XY, (X, Y)
XZ^2	3	XZ, (X, Z)
YZ^2	3	YZ, (Y,Z)
XYZ	3	XY, (X, Y, Z)
Z(X^2-Y^2)	3	X^2-Y^2, (X, Y, Z)
X^3	3	X
Y^3	3	Y
XZ^3	4	XZ^2, (XZ, X, Z)
YZ^3	4	YZ^2, (YZ, Y, Z)

Не все они могут присутствовать на низкополевых приборах, в то время как на очень высокопольных спектрометрах могут иметься дополнительные шиммы высоких порядков. Показанные в скобках шиммы взаимодействуют менее сильно, и поэтому могут не требовать последующей перенастройки. Те шиммы, которые взаимодействуют с Z^0 (главное поле), могут вызывать мгновенное пропадание сигнала стабилизации при регулировке.

Постоянное поле в вертикальном отверстии сверхпроводящего магнита также направлено вертикально, и оно определяет, по соглашению, Z-ось. Шиммы, которые воздействуют на поле вдоль этой оси, упоминаются как *аксиальные* или Z-шиммы, в то время как те, которые, действуют в горизонтальной плоскости известны как *радиальные* или шиммы X/Y (Таблица 3.4). При получении спектров высокого разрешения существует традиционная практика вращения образца (примерно при 10-20 Гц) вокруг вертикальной оси. Это производит эффект усреднения неоднородностей поля в X-Y плоскости, таким образом улучшая разрешение. Усреднение означает, что регулировки шимм, содержащих X или Y выражение должны выполняться при неподвижном образце, поэтому эти шиммы обычно упоминаются как «невращающие шиммы». Современные наборы шимм способны обеспечивать формы линии без вращения образца, которые почти соответствуют вращающемуся образцу, поэтому всё

[4]Обратите внимание, что некоторые (старые) тексты могут упоминать этот процесс как «настройку». Теперь этот термин применяется исключительно для процессов, включающие в себя радиочастоты, например, можно *шиммировать* магнит, но *настраивать* датчик.

чаще работают с *не вращающимися образцами*. ***В случае многомерных исследований рекомендуется работать без вращения образца***, потому что это может вводить модуляционные эффекты в полученные данные, приводя к нежелательным артефактам, в частности, в форме так называемого t_1 шума (см. главу 5).

Шиммирование

Для того чтобы достичь оптимальной однородности поля, необходимы высококачественные образцы. Высота образца также имеет большое влияние на величину требуемого Z шиммирования, которое можно свести к минимуму, всегда используя одинаковую высоту раствора. Большинство спектрометров обладает программным обеспечением, которое способно производить процесс шиммирования автоматически, это особенно важно, если используется устройство автоматической смены образцов. Однако такие системы не безошибочны и могут производить крайне плохие результаты в некоторых случаях. Здесь также одинаковая высота столба раствора образца жизненно важна для успешности процедур автоматического шиммирования быстрого и успешного достижения оптимума. Также важно, чтобы весь образец находился при тепловом равновесии, чтобы отсутствовали конвекционные потки, что для водных растворов, в частности, может потребовать 10-20 минут уравновешивания в датчике[1].

Для успешного шиммирования требуется подходящий индикатор однородности поля. По существу, имеются три схемы, которые широко используются, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки: 1) уровень стабилизации, 2) форма ССИ, и 3) форма резонанса ЯМР Окончательная мера однородности - сам резонанс растворителя ЯМР, так как дефекты, очевидные в спектре часто можно связать непосредственно с недостатками в специфических токах шимм, как описано ниже. Наиболее часто однородность поля контролируется высотой резонанса дейтериевой стабилизации, который следует максимизировать. Хотя принципиально это простая задача, в действительности это осложняется фактом, что большинство шимм взаимодействует с другими. Другими словами, изменения сделанные в одной из них, вызывают необходимость переоптимизировать те шиммы, с которыми она связана. К счастью не все шиммы влияют друг на друга, но могут подразделяться на меньшие группы, с которыми последовательно имеют дело в течение процесса шиммирования. Подробно процедура шиммирования описана в [26], и физические основы шиммирования градиентом поля также представлены [27], но здесь мы больше будем беспокоиться об исправлении дефектов формы линии, которые обычно встречаются при ежедневной работе на спектрометре ЯМР.

При шиммировании не всегда достаточно использовать простейший возможный подход и максимизировать уровень стабилизации, регулируя каждую шимму по очереди, поскольку это может привести к «ложному максимуму», в котором уровень стабилизации оказывается оптимальным, но все же форма линии остаётся искаженной. Вместо этого шиммы должны регулироваться в интерактивном режиме. Как пример процедуры, которую следует предпринимать, процесс регулирования шимм Z и Z^2 (как наиболее часто используемой) должен выполняться так:

(1) Регулировать Z шимму, чтобы максимизировать уровень стабилизации, и запомнить новый уровень.

---

[1] При применении чрезмерно высокого столба раствора образца (10 см и более) при термостатировании образца и при температурах образца, на 20 – 30 градусов превышающих окружающую, возникновение сильных и неравномерных конвекционных потоков в 5 мм ампулах неизбежно. Это ведёт к значительной нестабильности уровня сигнала стабилизации, которая не позволяет пользоваться многими процедурами автоматического определения параметров эксперимента (Autogain, Autopower, Autophase) и автоматического поддержания однородности (автошимм), ставит под сомнение результаты даже одномерного эксперимента, делая бессмысленным выполнение многомерных экспериментов. (*Прим. пер.*).

(2) Изменить Z^2 так, чтобы наблюдалось заметное изменение уровня стабилизации, которое может происходить, как вверх, так и вниз, и запомнить то направление, в котором Z^2 изменялась.

(3) Перенастройте Z для максимального уровня стабилизации.

(4) Проверьте больше ли уровень стабилизации, чем начальный уровень в п.(1). Если это так, повторяйте всю процедуру, регулируя Z^2 в том же самом направлении, до тех пор, пока никакое дальнейшее улучшение не получается. Если результирующий уровень становится ниже, процедура должна повторяться, только при этом Z^2 следует изменять в направлении противоположном п. (2).

Если магнитное поле уже близко к оптимальному для образца, когда он помещается в магнит, то простое максимизирование уровня стабилизации каждой шиммой по очереди приводит к оптимуму, так как уже в начале однродность поля была близка к оптимальной. Здесь снова воспроизводимая высота образца значительно упрощает жизнь.

Шиммирование выполняется, сосредоточиваясь на одной взаимодействующей группе, всегда начиная и заканчивая шиммой самого низкого порядка. Основные взаимодействия суммируются в таблице 3.4. Всякий раз, когда необходимо делать изменения в шимме высокого порядка, будет необходимо перенастраивать все шиммы низкого порядка в той же самой взаимодействующей группе, используя для этого такой же циклический подход, как описано выше для регулирования Z и Z^2. Обычно порядок оптимизации, которого следует придерживаться, такой:

(1) Оптимизируйте Z и Z^2 в интерактивном режиме, как описано выше. Если это первый проход через Z и Z^2, то регулируют фазу стабилизации по максимальному уровню стабилизации.

(2) Оптимизируйте Z^3: введите некоторое изменение, затем повторите шаг (1). Если результат лучше, чем ранее, повторите эту процедуру, если нет, измените Z^3 в противоположном направлении и повторите шаг (1).

(3) Оптимизируйте Z^4 в интерактивном режиме с Z^3, Z^2 и Z.

(4) Прекратите вращение образца (если применяется) и регулируйте Z, чтобы получить максимальный отклик (оно, вероятно, немного изменилось, так как изменилось положение образца относительно поля). Регулируйте X и Y по очереди, чтобы получить максимальный отклик.

(5) Оптимизируйте X и XZ в интерактивном режиме. Регулируйте Z, чтобы получить максимальный отклик.

(6) Оптимизируйте Y и YZ в интерактивном режиме. Регулируйте Z, чтобы получить максимальный отклик.

(7) Оптимизируйте XY в интерактивном режиме с X и Y

(8) Оптимизируйте X^2-Y^2 в интерактивном режиме с XY, X и Y

(9) Повторите шаг (1).

Чем выше порядок шиммы, тем большие изменения будут требоваться, и когда положения шимм далеки от оптимальных, большие изменения в токах шимм могут оказывать только малое действие на уровень стабилизации, и отклик шиммы будет чувствоваться «довольно вялым». Ближе к оптимуму отклик становится очень чувствительным, и малые изменения могут вызывать драматический эффект. Вышеописанной процедуры при любой напряжённости поля должно быть достаточно для большинства обстоятельств, если установки основных шимм не окажутся установленными слишком неправильно. Если искажения формы линии остаются, тогда может оказаться возможным идентифицировать виновную шимму (или шиммы) по природе искажения (см. ниже), что позволит применить соответствующие коррекции.

Обычные дефекты формы линии

Форма линии резонанса ЯМР дает окончательную проверку однородности поля, поэтому полезно уметь распознавать обычные искажения, которые вызываются ошибками в установках шимм (рис. 3.46). Таким образом, все Z-шиммы влияют на ширину резонанса ЯМР, но неуловимо различными путями; примеси в шиммах чётного порядка (Z^2, Z^4 и Z^6) будут производить несимметричные искажения линии, в то время как примеси в нечётных порядках (Z, Z^3, Z^5) будут вызывать симметричное уширение резонанса. В любом случае, общее правило состоит в том, что чем выше порядок шиммы, тем ниже будет видно искажения на резонансе. Ошибки в Z^3 обычно вызывают уширение основания резонанса, а так как широкий резонанс соответствует быстрому спаду ССИ, такие ошибки иногда видны как острый спад в начале ССИ. Другое обычно наблюдаемое искажение выглядит как плечо на одной стороне пика, возникающее из плохо оптимизированных Z и Z^2 шимм (это часто связывается с достижением «ложного максимума», просто максимизируя уровень стабилизации каждой шиммой, и обычно преодолевается, производя существенное изменение Z^2, и следуя процедуре, описанной выше).

Ошибки в шиммах X/Y низкого порядка вызывают ненавистные «боковые сигналы вращения» (для вращающегося образца!). Это отображения главного резонанса, смещённые от него на расстояния, кратные частоте вращения. Шиммы, содержащие одиночный член X или Y производят «боковые сигналы 1-го порядка» на частоте вращения от главной линии, в то время как XY, и X^2-Y^2 дают боковые сигналы второго порядка на удвоенной частоте вращения. Однако если не произошло ничего слишком неправильного, вы не должны встретиться с боковыми сигналами, больше чем первого порядка максимум в ежедневном ЯМР, и они должны определённо быть не больше, чем один или два процента от главного резонанса. Если имеется какое-либо сомнение относительно присутствия боковых сигналов, простая проверка состоит в том, чтобы изменить скорость вращения, скажем, на 5 Гц, и снова накопить данные; переместятся только боковые сигналы. Если образец не вращается, ошибки в шиммах X/Y низкого порядка делают вклад в общее уширение резонанса.

Шиммирование, используя ССИ или спектр

Хотя уровень стабилизации используется как первичный индикатор однородности поля, он не всегда самый точный. Уровень стабилизации зависит только от одного параметра - высоты резонанса дейтерия. Он, являясь довольно чувствительным к ширине главной части резонанса, является менее чувствительным к изменениям в широкой основе пика. Присутствие таких глыб в основании сигнала может легко наблюдаться в спектре (особенно в случае протонов), но для того, чтобы это использовать при шиммировании, спектрометр должен быть способен давать «дисплей реального времени» спектра одиночного сканирования так, чтобы изменение токов шимм могли оцениваться быстро. При современных компьютерах преобразование Фурье и фазовая коррекция спектра могут выполняться очень быстро, позволяя корректировать искажения формы линии, как одну шимму. Альтернативно, форма и продолжительность ССИ могут использоваться, как более непосредственный индикатор однородности и могут часто использоваться одновременно с дисплеем стабилизации. Этот подход работает лучше всего, когда одиночный резонанс доминирует над спектром (как в водных растворах) для которых форма ССИ должна быть гладким экспоненциальным спадом.

Так как при этом методе шиммирования вероятно, что изменение токов шимм, будет делаться *в течение регистрации* спектра (что определённо будет вести к специфической форме линии), важно оценивать более поздний спектр, при регистрации которого не производилось регулировки, чтобы решить произошли ли улучшения.

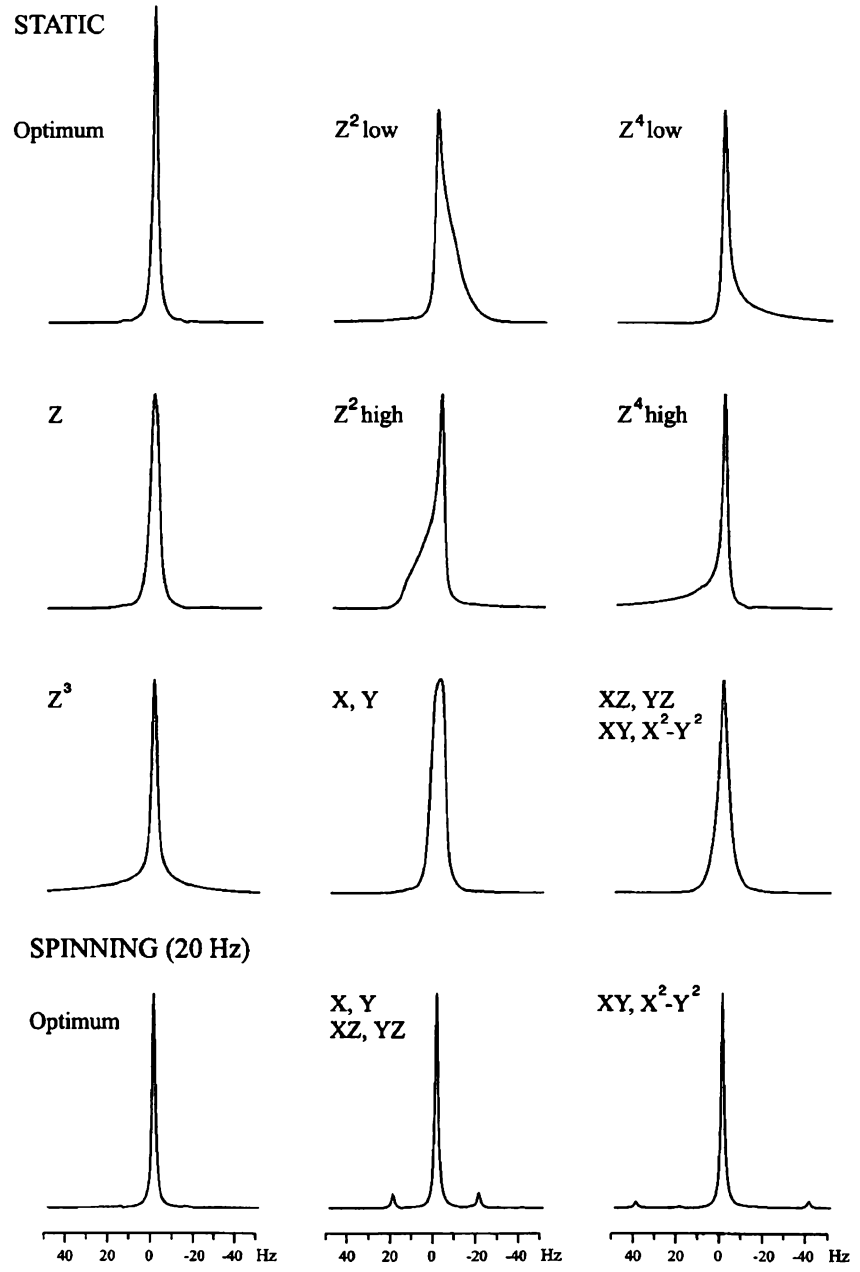


Рисунок 3.46. Дефекты формы линии, которые возникают из неправильных установок различных шимм. Эти эффекты были преувеличены с целью иллюстрации.

Градиентное шиммирование

Совсем недавно предложен подход к оптимизации поля, который пришел из мира томографии магнитного резонанса и использует градиенты поля, чтобы получить карту неоднородности B_0 в образце. Эти неоднородности затем могут компенсироваться вычисленными изменениями установок шимм [28]. Результаты, которые могут достигаться этим подходом, немного удивляют, когда наблюдаются впервые, особенно для тех, кто не любит утомительного ручного шиммирования магнита, и этот относительно новый метод, несомненно, будет пользоваться большей популярностью в будущем.

Последующие обсуждения предполагают некоторое понимание действия импульсных градиентов поля (ИПГ), и читатель, не знакомый с ними, может пожелать вернуться к этому разделу после того, как он ознакомится с главой 5. В любом случае оценка возможностей этого метода должна легко осознаваться из нижеследующего. Здесь мы рассмотрим основы метода, опираясь на оптимизацию Z-шимм, которые требуют импульсных градиентов поля по Z-оси, (хотя недавняя работа [29] демонстрирует применение обычных сборок шимм для генерирования подходящих градиентов так называемыми импульсами нарушения однородности, которые имеют преимущество в том, что не требуют специализированной градиентной аппаратуры). Основополагающий принцип состоит в том, что все спины всего образца, составляющие синглетный резонанс, будут обладать той же самой частотой прецессии (Лармора), *только* если постоянное поле везде однородно (конечно, к этому мы стремимся при шиммировании!). Любое отклонение от этого условия будет вызывать прецессию спинов в физически различных местоположениях в пределах образца с различными скоростями, согласно их *локальному* постоянному полю. Если возбужденным спинам позволяют прецессировать в поперечной плоскости в течение фиксированного периода времени перед детектированием, эти различные скорости просто соответствуют различным фазам их наблюдаемых сигналов (рис. 3.47). Детектируя эти сигналы в присутствии приложенного полевого градиента, *пространственное распределение* спинов кодируется как *распределение частоты* в спектре, позволяя получать карту неоднородности поля (кодируемой как разности фаз) вдоль образца, в случае градиентов по Z-оси (или поперёк образца для градиентов по осям X и Y).

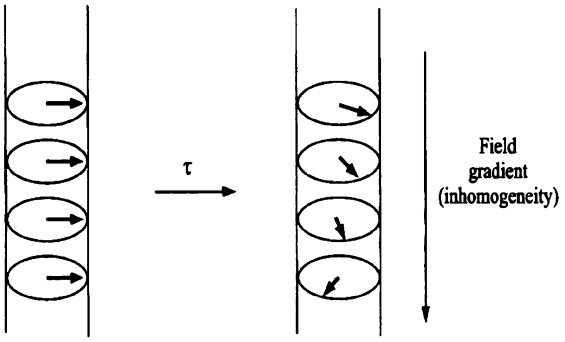


Рисунок 3.47. Ошибки в локальном постоянном поле вдоль образца кодируются как фазы сигнала, когда намагничиванию позволяют прецессировать в неоднородном постоянном поле в течение времени τ. Результирующие пространственно зависимые разности фаз используются как основа градиентного шиммирования.

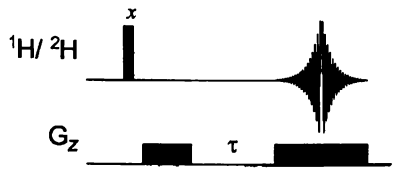


Рисунок 3.48. Градиентная последовательность эхо, пригодная для шиммирования градиента поля вдоль Z-оси. Импульсные градиенты поля обеспечивают пространственное кодирование, в то время как задержка τ кодирует неоднородность постоянного поля как фазу сигнала.

Пригодная схема для регистрации – это градиентное эхо на рис. 3.48, в которой спины сначала дефазируются импульсным градиентом поля (ИГП), а затем перефазируются после периода прецессии τ_1, чтобы позволить детектирование. Получающийся спектр – одномерный пространственный профиль (или отображение) образца (рис. 3.49). Регистрируя второе эхо задержкой τ_2, и беря разность, получают фазовый портрет, в котором кодируется только свободная прецессия в течение периода (τ_2-τ_1). Распределение фазы в этом профиле прямо отображает неоднородность вдоль образца. Необходимые коррекции токов шимм для удаления этих неоднородностей вычисляются из последовательности фазовых портретов, зарегистритрованных с известными отстройками в каждой из Z-шимм. Как только зарегистрированы все фазовые портреты для данного датчика, они могут использоваться для градиентного шиммирования всех последующих образцов с автоматическим выполнением всего процесса.

Первичное экспериментальное требование для градиентного шиммирования – образец должен содержать доминирующий сильный синглетный резонанс.

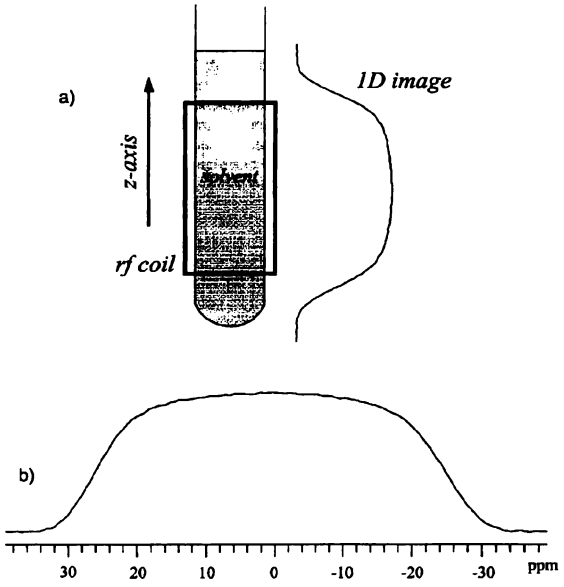


Рисунок 3.49. (A) 1D дейтериевое отображение ДМСО по Z-оси (режим абсолютных значений). (b) Частотная ось этого отображения кодирует пространственное измерение вдоль образца.

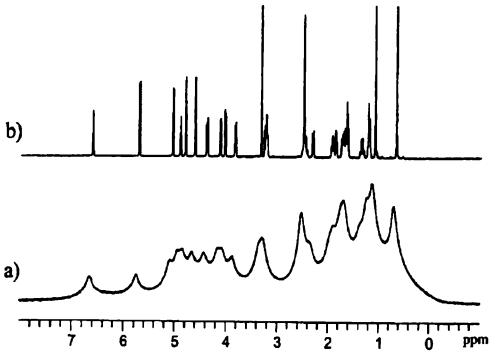


Рисунок 3.50. Автоматическое дейтериевое градиентное шиммирование. Спектр (a) получался при установке на ноль всех Z-шимм. После меньше чем двух минут градиентного шиммирования шимм Z-Z^5 (3 итерации) получен спектр (b). В качестве растворителя использовался ДМСО, и для каждого эхо градиента дейтерия получалось одно сканирование, зарегистрированное через катушку стабилизации датчика. Автоматическое переключение на наблюдение дейтерия достигалось смодельным устройством переключения.

Хороший кандидат для наблюдения протонов - 90% H_2O, но хотя он идеальный для биомолекулярных исследований, он ясно имеет небольшое применение для большинства растворителей, используемых в органической спектроскопии. Альтернатива в этом случае - наблюдать резонанс дейтерия растворителя [30] (который в большинстве случаев также является синглетом), используя канал стабилизации датчика. Потенциальная проблема тогда в чувствительности и необходимости подходящей аппаратуры, чтобы позволять наблюдение дейтерия на катушке стабилизации без ручного переключения кабелей прибора, каждый раз, когда шиммируется образец. Необходимые устройства переключения канала стабилизации теперь коммерчески доступны.

Удивительная способность градиентного шиммирования показана на рисунке 3.50. Нижний протонный спектр регистрировался с установленными на ноль всеми шиммами $Z\text{-}Z^5$, в то время как верхний спектр - результат только 3 итераций дейтериевого градиентного шиммирования, используя резонанс растворителя ДМСО. Весь процесс занял меньше, чем 2 минуты, без вмешательства оператора. Хотя этот пример довольно экстремальный, способности этого подхода совершенно очевидны, и он, вероятно, должен сыграть значительную роль в автоматизированной спектроскопии, где невоспроизводимые высоты образцов могут вести к довольно плохим результатам с обычными «симплекс» программами оптимизации шимм. Индивидуальная картография полевых ошибок в пределах каждого образца преодолевает эти проблемы.

3.5. КАЛИБРОВКИ СПЕКТРОМЕТРА

Этот раздел, прежде всего, предназначен для тех, кто участвует в постановке экспериментов, или для тех, кто запускает новые приборы, для которых требуются новые калибровки. Как для любой аналитической аппаратуры, правильные калибровки требуются для оптимальной и воспроизводимой эффективности прибора. Все эксперименты, встречающиеся в этой книге, критически зависят от применения РЧ и градиентных импульсов прецизионной амплитуды, формы и продолжительности, и калибровки, описанные ниже, следовательно, фундаментальны для правильного выполнения этих последовательностей. Периодическая проверка этих калибровок, наряду с испытаниями эффективности, описанными в следующем разделе, также обеспечивает признак полного здоровья спектрометра.

3.5.1. Радиочастотные импульсы

Современные многоимпульсные ЯМР эксперименты критически зависят от применения РЧ импульсов известной продолжительности (*ширины импульса*), которые соответствуют точным углам отклонения намагничивания, чаще всего 90° и 180° Калибровки ширины импульса обычно определяются для 90° импульса (PW_{90}), из которого можно производить все другие углы отклонения. Импульсы PW_{90} микросекундного диапазона обычно возбуждают в довольно широкой полосе частот и называются *неселективными* или *жёсткими импульсами*, в то время как импульсы миллисекундного диапазона - низкой мощности и действуют в значительно меньшем частотном окне, и поэтому называются *селективными* или *мягкими* импульсами. Реализация селективных импульсов и их калибровка рассматривается отдельно в главе 9, в то время как здесь мы концентрируемся на более широко используемых жёстких импульсах, и на более слабых РЧ полях, используемых для целей декаплирования.

Напряжённости РЧ поля

Калибровка ширины импульса эквивалентна определению напряжённости радиочастотного поля импульса (B_1), и, фактически, часто при постановке экспериментов полезнее думать в выражениях

напряжённостей поля, а не ширины импульсов. Например, ширины полос возбуждения и внерезонансные эффекты лучше всего рассматриваются в отношении напряжённостей поля, а так же ширины полосы декаплирования. Отношения между шириной импульса и напряжённостью РЧ поля γB_1 простые:

$$\gamma B_1 = \frac{1}{PW_{360}} \equiv \frac{1}{4 \cdot PW_{90}} \; Гц \tag{3.9}$$

Таким образом, ширина 90° импульса 10 мкс соответствует напряжённости поля 25 кГц, - типичное значение для импульсного возбуждения на современном спектрометре.

Хотя передатчики спектрометра часто используются в полную мощность при применении одиночных импульсов, имеется много случаев, когда требуются низкие мощности передатчика, например при применении декаплирующих последовательностей или селективных импульсов. Эти меньшие мощности получаются ослаблением выхода передатчика, и единицы, используемые для определения степени ослабления - децибел или dB. Это, фактически, мера отношения между двумя уровнями мощности P_1 и P_2, определяется как:

$$dB = 10 \log_{10}\left(\frac{P_1}{P_2}\right) \tag{3.10}$$

Когда говорят об ослаблении выхода передатчика на столько-то dB, это относится к определённому изменению мощности *относительно первоначального выхода.* Фактически, удобнее думать в выражениях изменений в выходном напряжении, а не мощности, так как напряжённость РЧ поля и, следовательно, ширины импульсов (интересующие нас значения) пропорциональны напряжению. Так как ***мощность пропорциональна квадрату напряжения*** ($P = V^2/R$, где R - сопротивление), мы можем переписать равенство 3.10 так:

$$dB = 20 \log_{10}\left(\frac{V_1}{V_2}\right) \equiv 20 \log_{10}\left(\frac{PW_1}{PW_2}\right) \tag{3.11}$$

Где PW_1 и PW_2 - ширины импульсов для одного и того же чистого угла отклонения при двух ослаблениях. Таким образом, если желают удвоить ширину импульса, требуется дополнительное ослабление $20 \cdot \log_{10}2$ dB (6 dB). Альтернативное выражение имеет форму:

$$\mathbf{+n\ dB \Rightarrow PW \times 10^{n/20}} \tag{3.12}$$

или, другими словами, добавление *n* dB ослабления увеличивает ширину импульса с коэффициентом $10^{n/20}$. Некоторые примерные величины ослаблений представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5. Зависимость ширины импульса от ослабления

Ослабление /dB	1	3	6	10	12	18	20	24
Множитель ширины импульса	1,1	1,4	2,0	3,2	4,0	7,9	10	15,8

Дополнительное ослабление уровней выхода передатчика увеличивает ширину импульса на показываемые факторы. Таким образом, добавление 6 dB будет удваивать ширину импульса, в то время как уменьшение на 6 dB будет уменьшать его вдвое.

В качестве пояснения выполните эксперимент, если ваш спектрометр может изменять ослабление выхода внутренне, следует определить ширину импульса в широком диапазоне ослаблений. График

ширин импульсов относительно $\log_{10}$ (ослабления) должен дать одиночную прямую линию по всему диапазону. Изломы на графике могут возникнуть, когда включаются различные усилители мощности, или когда переключаются большие аттенюаторы вместо многих малых.

Импульсы наблюдения: высокая чувствительность

Мы начинаем с самой основной калибровки импульса ЯМР, того, который необходим для наблюдения ядер. Когда спектр анализируемого вещества можно получать при однократном сканировании, или только от нескольких сканирований, калибровка ширины импульса производится, просто наблюдая за поведением намагничивания при увеличении возбуждающего импульса, помня, что нулевые интенсивности сигнала получаются при 180° или 360° импульсах. Чтобы выполнять любую калибровку импульса, важно, чтобы датчик сначала настраивался для образца так, чтобы результаты были воспроизводимы. Частота передатчика должна помещаться на резонанс сигнала, чтобы устранить потенциальные погрешности, возникающие от вне-резонансных эффектов, и спектры регистрируются с шириной импульса меньше чем 90°, скажем 2-3 мкс. Резонанс используется для определения фазовой коррекции для всех последующих экспериментов, и фазируется к виду обычного положительного сигнала поглощения. Эксперимент повторяется с идентичной фазовой коррекцией, но с прогрессивно увеличивающейся шириной импульса (рис. 3.51). Прохождение через 180° нуль тогда обеспечивает калибровку PW_{180} импульса, в то время как продвижение дальше этого дает инвертированный резонанс, откуда становится ясно, что вы ушли слишком далеко. Иногда точное детектирование нуля может быть затруднено, так как часто имеется слабый остаточный сигнал, точный внешний вид которого зависит от использованного датчика, поэтому на практике стремятся получить минимальный остаточный сигнал.

Между регистрациями должна быть задержка, достаточная для полной релаксации спинов, и если используется усреднение сигнала для каждого эксперимента, она также должна применяться перед каждым сканированием, чтобы получить надежную калибровку. В протонной спектроскопии такие задержки маловероятно будут слишком обременительны, но могут оказаться утомительно длительными для медленнее релаксирующих спинов. Если вы имеете представление о вероятной ширине импульса, возможно из калибровки подобных образцов или из литературы, то лучший подход в этом случае состоит в том, чтобы искать 360° нуль. Так как намагничивание остается близко к +Z оси, его восстановление требует меньшего времени, и весь процесс может выполняться быстрее.

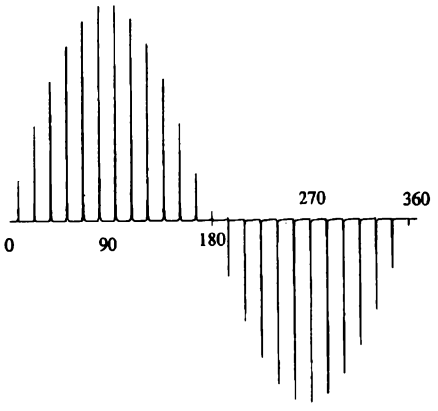


Рисунок 3.51. Калибровка ширины импульса для канала наблюдения. Последовательность экспериментов регистрируется с прогрессивно инкрементированным возбуждающим импульсом. Максимальный сигнал производит 90° импульс, и первый нуль при 180° импульсе. Для калибровки может использоваться либо 180°, либо 360° условие (при условии, что вы знаете, который из этих случаев вы наблюдаете).

Процесс может далее упрощаться, контролируя один ССИ, который также имеет минимальную амплитуду при 360° импульсе. В любом случае следует проверять, является ли полученный нуль действительно тем, которым вы его полагаете, поскольку все импульсы кратные 180°, вызывают нули.

Импульсы наблюдения: низкая чувствительность

Когда образец слишком слабый, чтобы позволять его наблюдение за несколько сканирований, возможен один подход - использовать метод усреднения сигнала и искать 360° нуль как описано выше [31], хотя это может становиться довольно трудоёмким делом. Альтернативный подход [32] требует, чтобы только два спектра накапливались с шириной импульса второго равной точно удвоенной ширине первого ($PW_2 = 2PW_1$). Снова, требуется достаточная задержка между сканированиями, чтобы избегать эффектов насыщения, и спектрометр должен работать в режиме масштабирования «абсолютной интенсивности», так, чтобы относительные интенсивности сигналов от обоих экспериментов могли сравниваться. Гетероядерные спектры для этого должны также получаться без усиления ЯЭО, а применение схемы инверсно-включаемого декаплинга (Раздел 4.2.3) позволяет получать такие спектры с широкополосным декаплированием во время регистрации, чтобы помочь чувствительности. После некоторой простой арифметики [32], можно показать, что:

$$\theta_1 = \cos^{-1}\left(\frac{I_2}{2I_1}\right) \qquad (3.13)$$

где I_1 и I_2 соответствуют измеренным интенсивностям сигналов в первом и втором эксперименте соответственно. Продолжительность импульса в первом эксперименте соответствует импульсному углу θ_1, из которого может производиться ширина 90° импульса. Для оптимальных результатов θ_1 должен быть больше чем 30°, а угол отклонения θ_2 во втором эксперименте должен быть меньше, чем 180 °, и снова требуется некоторая интуиция, чтобы этот подход был эффективным.

Более удобный подход во многих случаях - выполнять калибровки не на интересующем образце непосредственно, а на соответствующем образце, специально приготовленном для целей калибровки, достаточно сильном, чтобы позволять наблюдение 180/360° нуля непосредственно и быстро. Тогда калибровка может регистрироваться и использоваться в будущих экспериментах, так как она должна быть весьма воспроизводимой, если используются подобные растворители и датчик настроен правильно. Самые большие несоответствия случаются между водой и органическими растворителями, особенно когда водные растворы высоко ионные, и могут потребоваться отдельные калибровки.

«Косвенные» импульсы

В противоположность изложенному выше, калибровка импульсов для ядер других, чем те, которые наблюдаются, должна выполняться «косвенно». Это часто упоминается как калибровка «декаплирующих» импульсов, хотя это несколько неправильно, так как импульсы не имеют ничего, производящего декаплирования, но могут быть неотъемлемой частью импульсной последовательности. Чаще всего косвенный канал используется в двух режимах; первый применяет короткие жёсткие импульсы обычно при максимальной мощности, второй применяет импульсную декаплирующую последовательность в течение более длительных периодов времени при значительно меньшей мощности. Поэтому обычно регистрируют косвенные калибровки при этих двух уровнях мощности, для которых следующий метод одинаково применим, и, имея выполненную калибровку при высокой мощности,

ослабление низкой мощности может оцениваться из равенства 3.11 до его точного определения. На более современных спектрометрах, которые используют, линейные усилители вместе с внутренними коррекциями мощности, калибровки низкой мощности становятся лишними, так как все ширины импульсов могут рассчитываться из единственной калибровки высокой мощности при помощи этого уравнения, поэтому следует проверить, так ли оборудован ваш спектрометр.

Чтобы связывать поведение косвенного спина A, поведением спина наблюдения X, используют взаимное гетероядерное скалярное взаимодействие J_{AX}, которое должно существовать между ними для возможности калибровки. Простейшая последовательность калибровки[33,34], подходящая для ядер спина ½, показана на рисунке 3.52.

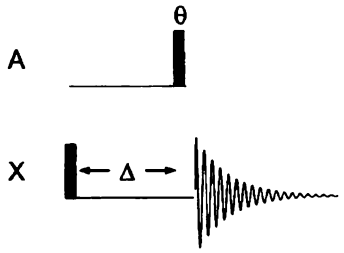


Рисунок 3.52. Последовательность для калибровки «косвенных» импульсов передатчика (на ядрах других, чем наблюдение). Период Δ установлен равным $1/2J_{AX}$.

Импульсы A и X должны быть резонансными, калибровка X-импульса должна быть уже известной, а значение J_{AX} должно быть измерено непосредственно из (связанного) X спектра. Задержка устанавливается равной $1/2J_{AX}$ секунд для AX группы, так что векторы дублета X-спина - ***антифазные*** после этого периода эволюции. Последующий A импульс воздействует на X намагничивание, *ненаблюдаемое*, когда $\theta = 90°$, поскольку это производит чистую гетероядерную многоквантовую когерентность, которая не может генерировать детектируемый сигнал в датчике (см. главу 5 для объяснения этого эффекта).

Подход состоит в том, чтобы начинать с очень малого θ и фазировать спектр так, чтобы линии дублета находились в антифазе. С увеличением θ интенсивность дублета будет уменьшаться и становятся нулевой, когда $\theta = 90°$, в то время как вне этого условия дублет вновь появляется, но с инвертированной фазой (рис. 3.53). Если необходимо выполнять калибровку с A_2X группой, задержка должна быть 1/4J, и внешние линии триплета ведут себя, как описано выше, в то время как центральная линия остаётся незатронутой. При калибровке меньших мощностей с целью широкополосного декаплирования, обычно более удобно устанавливать *продолжительность* θ импульсов согласно требуемой ширине полосы декаплера (Раздел 9.2) и изменять ослабление выхода, чтобы достичь нулевого условия.

Легко доступная альтернатива, которая, в частности, подходит для калибровки протонов (хотя и не ограничивается ими) в ^{1}H-X системах - последовательность DEPT (глава 4). Она улучшает чувствительность наблюдения, производя перенос поляризации от ^{1}H к X, и зависит от быстрее релаксирующих протонов для частот повторения при усреднении сигнала. 90° протонный импульс достигается, когда XH_2 или XH_3 группы проходят через нуль, в то время как XH группы в этот момент имеют максимальную интенсивность (рис. 3.54). Следует иметь в виду, что для целей калибровки импульса, *все* протонные импульсы в последовательности должны изменяться в каждом эксперименте, а не только конечный «θ» протонный импульс (см. главу 4 для объяснения этой последовательности).

Как часто бывает в экспериментальных процедурах, простота лучше всего, и косвенные калибровки импульса могут наиболее удобно выполняться на сильных калибровочных образцах, использующих последовательность рис. 3.52. Для ^{1}H-^{13}C систем, $CHCl_3$ или (^{13}C - меченная) муравьиная кислота - удобные материалы для органических и водных калибровок, соответственно. При прямом наблюдении протонов (инверсная конфигурация), главная ^{12}C линия $CHCl_3$ будет наблюдаться как

большой дисперсный сигнал между интересующими ^{13}C спутниками (рис. 3.55), но это не должно вызывать проблем, пока чувствительность достаточна для наблюдения спутников. Для косвенной калибровки ^{15}N естественного содержания с ^{1}H наблюдением, доминирующий ^{14}N-связанный протонный резонанс очень широкий, благодаря квадрупольному ^{14}N ядру, и может маскировать малые ^{15}N спутники. В таких случаях, ^{15}N линия может предпочтительно подавляться, благодаря её большей скорости поперечной релаксации, применением спинового эхо перед последовательностью рис. 3.52; смотри ссылку [35] для дальнейших подробностей. Более удобная альтернатива - использовать для целей калибровки ^{15}N меченые материалы.

Напряжённость гомоядерного декаплирующего поля

Гомоядерное декаплирование требует включения декаплирующего (B_2) поля в течение регистрации ССИ и, как описано в главе 4, это требует применения быстрого управления декаплером в течение этого периода, так что методы, представленные выше, следовательно, больше не применимы. Напряжённости поля, используемые в гомоядерном декаплировании, значительно меньше, чем требуемые для измерительного импульса, и иногда полезно иметь некоторую их меру при постановке экспериментов декаплирования, чтобы достичь желательной селективности. Прямая мера средней напряжённости поля, произведённой в течение гомоядерного декаплирования, может получаться через измерение сдвига Блоха-Зигерта [36], который представляет изменение резонансной частоты линии при применении облучения вблизи неё. При условии, что отстройка декаплера от невозмущённого резонанса больше, чем напряжённость поля декаплера $\nu_0 - \nu_{dec} >> \gamma B_2$, тогда:

$$\gamma B_2 = ((\nu_{BS} - \nu_0) \cdot 2(\nu_0 - \nu_{dec}))^{1/2} \text{ Гц} \qquad (3.14)$$

где ν_{BS} - частота сигнала в присутствии облучающего поля, ν_0 - частота сигнала в отсутствие облучающего поля, и ν_{dec} - частота применённой РЧ. Пример такой калибровки показан на рисунке 3.56.

Напряжённость гетероядерного декаплирующего поля

Измерение напряжённости гетероядерного декаплирующего поля является дополнительным к импульсным методам, описанным выше для «косвенных» измерений ширин импульсов. Этот метод применим к измерению выходов от средней мощности до низкой, подобной той, которые используются в широкополосном декаплировании, мягких импульсах и селективном декаплировании, и использует непрерывное, а не импульсное, облучение. Опять же метод использует гетероядерное взаимодействие между спинами и наблюдает его изменения при применении вне-резонансного гетероядерного декаплирования [37]. Снова рассмотрим AX пару, в которой непрерывное декаплирование спина A применяется настолько далеко от резонанса, что это не оказывает действия; X спектр показывает дублет. По мере приближения частоты декаплера к резонансу, наблюдаемое взаимодействие начинает коллапсировать, до тех пор, пока, в конечном счете, X спектр не покажет только синглет, когда частота декаплирования совпадает с резонансом. Измерение уменьшенного расщепления (измеряемой или «видимой» КССВ) в промежуточных стадиях обеспечивает меру напряжённости поля согласно [37]:

$$\gamma B_2 = \left[\left(\frac{J \cdot \nu_{off}}{J_r} \right)^2 + \frac{J_r^2 - J^2}{4} - \nu_{off}^2 \right]^{1/2} \qquad (3.15)$$

где J - константа взаимодействия AX, J_r - уменьшенное расщепление в присутствии декаплирующего поля и ν_{off} - отстройка декаплера от резонанса. Когда напряжённость поля декаплера намного больше, чем положение резонанса декаплера, выражение упрощается:

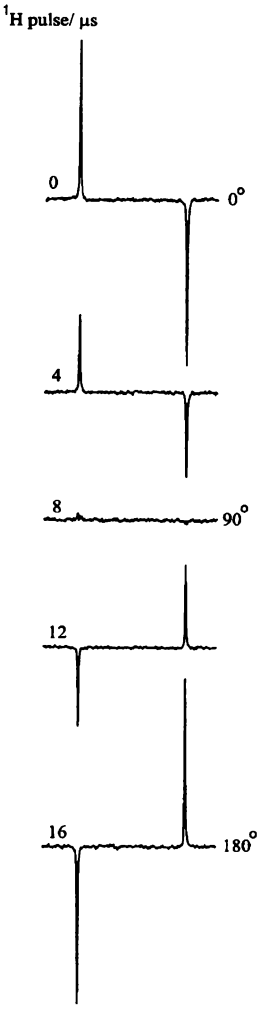


Рисунок 3.53. Косвенная калибровка ширины протонного импульса наблюдением углерода, используя последовательность рис. 3.52. С увеличением ширины протонного импульса углеродный сигнал, уменьшался, пока он не исчез при условии ^1H (90°). При дальнейшем её увеличении сигнал вновь появляется, но с инвертированной фазой (одна та же фазовая коррекция используется для всех спектров). Образец - ^{13}C - меченая муравьиная кислота в D_2O.

$$\gamma B_2 \approx \frac{J \cdot \nu_{off}}{J_r} \; Гц \qquad (3.16)$$

Таким образом, измеряя резонансное расщепление в отсутствие и в присутствие облучения, легко вычислить напряжённость поля. Для ^1H-^{13}C спектроскопии односвязное взаимодействие подходит для мощностей от средних до сильных, в то время как для очень слабых декаплерных полей (<50 Гц) может оказаться необходимым использовать дальние ^1H-^{13}C взаимодействия, чтобы получить значительные изменения в расщеплении. Калибровка протонной напряжённости поля этим методом показана на рисунке. 3.57.

3.5.2. Импульсные градиенты поля

Многочисленные современные ЯМР эксперименты для выбора или отвержения сигнала используют импульсы градиента поля (см. главу 5), требуя, чтобы они применялись в течение хорошо определённых продолжительностей и при известных напряжённостях градиентов. Эксперименты, представленные в литературе будут (или должны) устанавливать напряжённости градиентов, требуемые для достижения желаемых результатов, поэтому необходимо иметь некоторое знание средств, обеспечивающихся прибором при пожелании осуществлять эти методы. Здесь описываются практические процедуры для определения напряжённостей градиентов и периодов восстановления градиентов, так как именно эти два параметра должны определяться оператором при подготовке эксперимента выбора градиентом. Обсуждения ограничиваются статическим градиентом B_0, а не гораздо менее широко используемыми РЧ B_1 градиентами [38,39]. Однако использование B_1 градиентов имеет множество существенных преимуществ [40] и может оказаться, что они станут более широко используемыми по мере преодоления теоретических и технических ограничений.

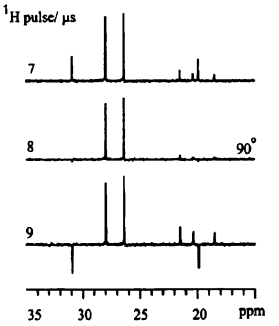


Рисунок 3.54. Калибровка косвенных протонных импульсов, использующая последовательность DEPT. Когда протонный редактирующий импульс в последовательности точно равен 90°, наблюдаются только метиновые резонансы (см. также главу 4). Образец - ментол в $CDCl_3$.

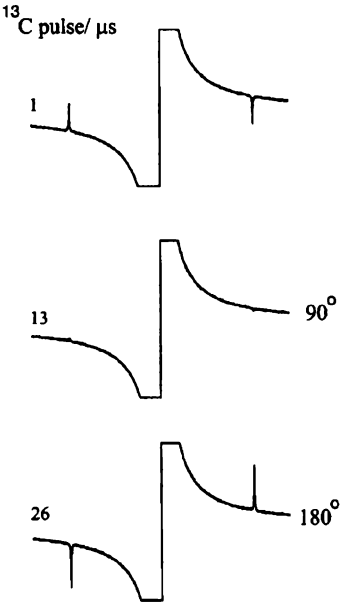


Рисунок 3.55. Калибровка косвенных импульсов (здесь ^{13}C) при наблюдении протонов, используя последовательность рис. 3.52. Родительский $^1H(^{12}C)$ резонанс наблюдается как большой дисперсный сигнал, но спутники, понятно, снова исчезают при 90° ^{13}C импульсе в косвенном канале (f_2), образец - $CHCl_3$.

Напряжённости градиента

Для применения импульсных градиентов поля в ЯМР высокого разрешения, знание точных напряжённостей произведённого градиента фактически не критичное для успеха экспериментов. Напротив, применение РЧ импульсов *требует* точных ширин импульсов. При условии, что градиенты *достаточно сильные* для эксперимента, критическими факторами являются воспроизводимость импульсов и способность производить градиентные *импульсы точных амплитудных отношений.* Описанная ниже процедура может использоваться, чтобы калибровать напряжённости градиента и проверять линейность выхода градиентного усилителя.

По существу имеются два подхода к калибровке градиента, один основанный на измерении молекулярной диффузии, другой, использующий изображение подходящего калибровочного образца.

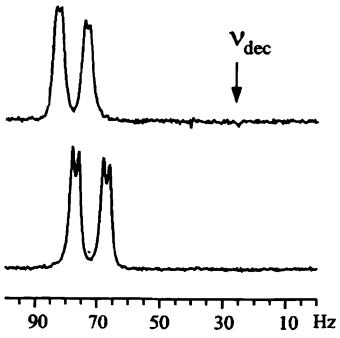


Рисунок 3.56. Калибровка напряжённости гомоядерного декаплирующего поля через сдвиг Блоха-Зигерта. Отстройка декаплера от невозмущённого резонанса была 47,5 Гц вызывающая сдвиг 5,5 Гц, показывая среднее РЧ поле, равное 23 Гц.

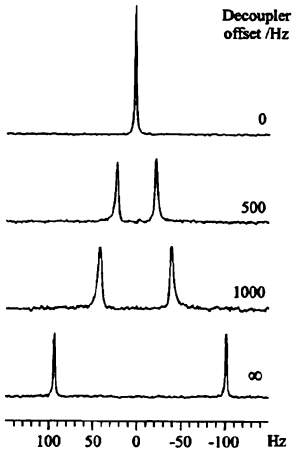


Рисунок 3.57. Калибровка гетероядерной напряжённости поля декаплера через внерезонансное протонное декаплирование. Из уменьшенного расщепления дублета ^{13}C-^{1}H, напряжённость РЧ поля протонов вычисляется как 2,2 кГц, обычное значение для широкополосного протонного декаплирования.

При относительно низких напряжённостях полей градиентов, используемых в ЯМР высокого разрешения, второй подход значительно проще и не зависит от прецизионных экспериментальных условий или необходимости эталонного растворяемого вещества с хорошо определёнными диффузными свойствами. Калибровка градиентов основывается на измерении профиля одномерного изображения фантома известных пространственных размеров, помещённого в стандартную ампулу для ЯМР, содержащую H_2O (рис. 3.58). Фантом - обычно диск из каучука или тефлона 2-4 мм длиной (обрезок подавителя воронки, например), который располагается в ампуле так, что он находится в центре РЧ катушки. Образец не вращается, и захват стабилизации необязателен, но в этом случае развёртка поля стабилизации должна быть выключена. Протонный спектр сначала получается в отсутствие градиента поля при передатчике, настроенном на резонанс. Затем получается спектр с очень большой шириной спектра, скажем 50 кГц, в присутствии градиента поля. Это может, в принципе, достигаться простой схемой импульс-регистрация с постоянно включённым градиентом (рис. 3.59a), хотя этот подход имеет свои ограничения, потому что применение РЧ импульсов в присутствии градиента требует возбуждения в очень широкой полосе. Таким образом, предпочтительно регистрировать спектр с градиентной последовательностью спин-эхо (рис. 3.59b), в котором второй из двух градиентов имеет ту же самую напряжённость, но вдвое продолжительнее первого, и применяется в течение

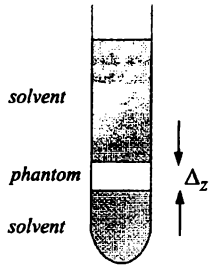


Рисунок 3.58. Образец фантома, пригодный для калибровки напряжённости поля градиента Z-оси. Шип или каучуковый фантом имеет точные размеры (Δ_Z, обычно 2-4 мм по высоте) и исключает растворитель из слоя трубки. Он располагается в ампуле, так что он сидит в центре РЧ катушки, когда помещается в датчик.

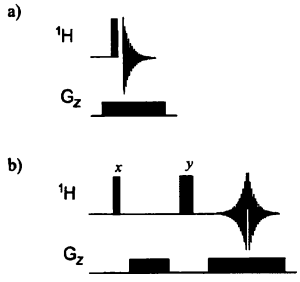


Рисунок 3.59. Последовательности сбора градиентных профилей для калибровки напряжённости поля градиента Z-оси. Последовательность (a) собирает ССИ непосредственно в присутствии приложенного градиента, в то время как последовательность (b) использует градиентное эхо (см. текст). В (b) второй градиент имеет ту же самую напряжённость, но вдвое продолжительнее первого.

всего периода регистрации, когда рефокусируется спиновое эхо. В любом случае время регистрации должно поддерживаться коротким (10 мс или меньше), а применяемые градиенты относительно низких напряжённостей. Результирующие данные обрабатываются *несдвинутой* синусно-колоколообразной функцией окна (она соответствует форме эхо ССИ) и вычисляется абсолютное значение. Тогда спектр показывает прогиб в профиле, соответствующий области образца, которая содержит фантом, и, следовательно, не содержит растворителя (рис. 3.60), из которого можно рассчитывать напряжённость градиента таким образом:

$$G_Z = \frac{2\pi\Delta\nu}{\gamma\Delta_Z} \equiv \frac{\Delta\nu}{4358\cdot\Delta_Z}\ Гс\cdot см^{-1} \text{ или } \frac{\Delta\nu}{4{,}358\cdot10^5\cdot\Delta_Z}\ Тл\cdot м^{-1} \qquad (3.17)$$

где $\Delta\nu$ - ширина прогиба в Герцах, и Δ_Z - высота фантома в см. Единицы SI для градиента поля - Тл·м$^{-1}$, хотя обычно для значений, цитируемых в литературе, даётся в Гс·см$^{-1}$ (1 Гс·см$^{-1}$ = 0,01 Тл·м$^{-1}$). Подобный метод можно использовать для калибровок *x* и *y* градиентов. В таком случае фантом не требуется, а внутренний диаметр ампулы для ЯМР определяет ширину образца, с областями вне ампулы, обеспечивающими пустую область, и ширина результирующего «пика» используется в вышеприведённом выражении.

Повторение обсуждаемой процедуры с нарастающими напряжённостями поля градиента показывает линейность усилителя с большими градиентами, производящими пропорционально более широкий прогиб в профиле. Рис. 3.61 показывает полученный результат для инверсного 5 мм датчика Z-градиента. Полагая линейность усилителя по всему диапазону, максимальная напряжённость градиента для этой системы – 0,51 Тл·м$^{-1}$ или (51 Гс·см$^{-1}$).

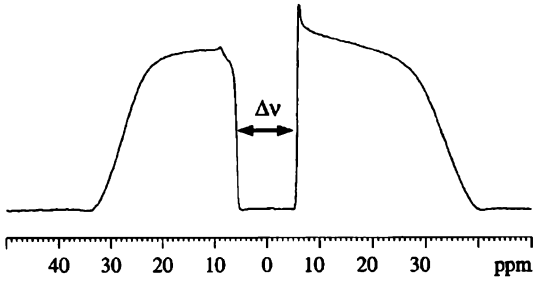


Рисунок 3.60. Типичный градиентный профиль, полученный последовательностью Рис. 3.59b. Здесь прогиб - 5896 Гц шириной соответствует напряжённости градиента 0,051 Тл·м$^{-1}$ (10 % максимума).

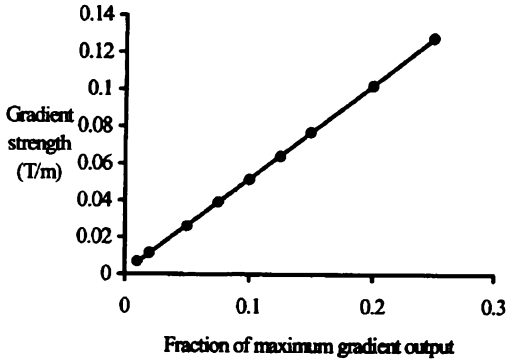


Рисунок 3.61. Калибровка линейности градиентного усилителя, использующая последовательность рис. 3.59b. Полагая линейность системы по всему диапазону выхода и экстраполируя калибровку, максимальная напряжённость градиента, обеспеченная этой системой – 0,51 Тл·м$^{-1}$ (51 Гс·см$^{-1}$).

Времена восстановления градиента

Как обсуждается в главе 5, после применения градиентного импульса возникают существенные искажения в магнитном поле, окружающем образец, и для получения спектра высокого разрешения вихревым токам, ответственным за эти искажения, нужно позволить затухать перед сбором данных. Простая схема измерения периода восстановления градиента показана на рисунке 3.62, в которой начальный градиентный импульс сопровождается переменным периодом восстановления, после которого получаются данные. Искажения спектра легко наблюдаются на остром протонном синглете, таком как от хлороформа. Вначале период восстановления т устанавливается на большое значение (1 с), чтобы получить опорный спектр, и значение прогрессивно уменьшается, до тех пор, пока в спектре не появляются искажения (рис. 3.63). Это обеспечивает некоторый индикатор периода восстановления, требуемого после градиентного импульса, в течение которого данные не должны собираться, или не должны применяться следующие градиентные или РЧ импульсы. Успех селектированного градиентом ЯМР высокого разрешения критически зависит от способности использовать очень короткие периоды восстановления, которые обычно составляют около 100 мкс на современных приборах, которые имеют активно экранированные датчики. В то время как ЯМР эксперименты обычно используют *формованные градиентные* импульсы (так как это помогает уменьшать генерацию вихревых токов), более строгое испытание эффективности аппаратных средств может достигаться,

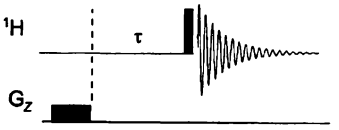


Рисунок 3.62. Простая схема исследования времени восстановления градиента.

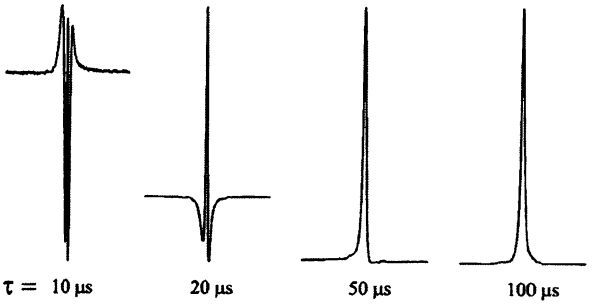


Рисунок 3.63. Восстановление градиента после применения импульса прямоугольного градиента 1 мс 0,25 Тл·м$^{-1}$ (50 % максимального выхода). Образец - хлороформ и данные получались с активно экранированным инверсным 5 мм датчиком градиента Z-оси.

используя *прямоугольные* градиенты, как на рисунке 3.63. Выполнение этого испытания с полусинусным формованным градиентным импульсом показывает полное восстановление резонанса за 10 мкс.

3.5.3. Температура образца

Многие спектрометры оборудуются средствами поддержания, контроля и регулировки температуры в датчике. Обычно датчиком температуры является термопара, чей конец помещается близко к образцу в газовом потоке, используемом для обеспечения регулирования температуры. Однако, показания, обеспечиваемые этими системами, не могут отражать истинную температуру образца, если они не подвергались калибровке. Один из способов такой калибровки - измерение специфического параметра ЯМР, который имеет известную температурную зависимость, для обеспечения более правильных показаний *температуры образца*. Хотя в качестве эталонных предлагались многие вещества [41], только два приняты в качестве стандартных температурных калибровочных образцов для спектроскопии растворов. Это - метанол для диапазона 175-310 °K и 1,2-этандиол (этиленгликоль) для 300-400 °K.

Для калибровки низких температур используется чистый MeOH со следами HCl для обострения резонансов, для которого выполняется следующее равенство [42,43]:

$$T(K)=403 - 29{,}53\Delta\delta - 23{,}87(\Delta\delta)^2 \qquad (3.18)$$

где Δδ - разность химических сдвигов HO-CH_3 (мд). Это выражение можно аппроксимировать к трём линейным уравнениям вида:

$$175\text{-}220\ ^\circ K: \quad T(K) = 537{,}4 - 143{,}1\ \Delta\delta \qquad (3.19)$$

$$220\text{-}270\ ^\circ K: \quad T(K) = 498{,}4 - 125{,}3\ \Delta\delta \qquad (3.20)$$

$$270\text{-}310\ ^\circ K: \quad T(K) = 468{,}1 - 108{,}9\ \Delta\delta \qquad (3.21)$$

которые представляются как диаграммы калибровки на рисунке 3.64. Для калибровок чистым этан-1,2-диолом, подходит равенство [43]:

$$T(K) = 466{,}0 - 101{,}6\ \Delta\delta \qquad (3.22)$$

где Δδ теперь представляет разность химических сдвигов OH-CH_2 (мд) (рис. 3.65). Для обоих образцов, разность сдвигов пиков уменьшается с увеличением температуры образца,

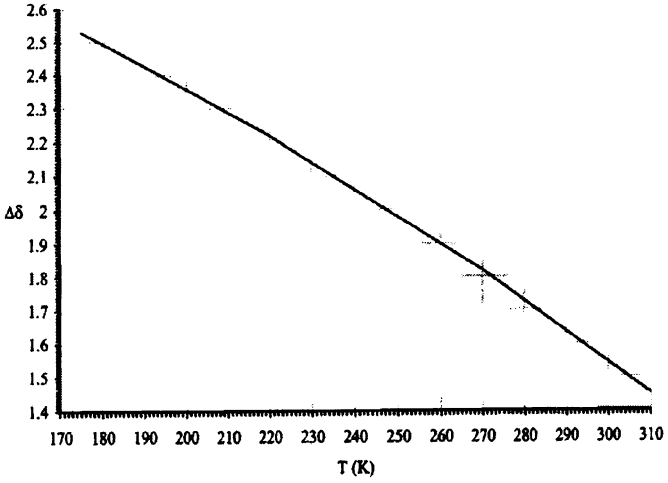


Рисунок 3.64. Диаграмма калибровки температуры для чистого метанола. Разность сдвигов Δδ (мд) измеряется между резонансами CH_3 и OH.

благодаря уменьшению силы межмолекулярной H-связи, которое, в свою очередь, вызывают смещение гидроксильного резонанса в сторону низкой частоты.

Прежде выполнения температурных измерений, образец должен уравновешиваться в течение, по крайней мере, 5-10 минут при каждой новой температуре, хорошая практика также делать несколько измерений, чтобы гарантировать, что они не изменяются, прежде чем переходить к вычислениям.

3.6. ТЕСТЫ СОВЕРШЕНСТВА СПЕКТРОМЕТРА

Существуют большое число процедур, разработанных для проверки различных аспектов эффективности прибора, и было бы определённо неуместно, не говоря уже о том, что довольно утомительно, описывать их в книге такого сорта. Вместо этого я хочу кратко представить только те, которые, вероятно, будут использоваться при обычной «проверке состояния» спектрометра, и поэтому этот раздел будет представлять наибольший интерес для тех, кто отвечает за содержание прибора. Эти испытания общеприняты в сообществе ЯМР и изготовителей приборов, так как обеспечивают количественную меру эффективности прибора и, теоретически, по крайней мере, должны также обеспечивать сравнение между возможностями различных спектрометров. Естественно, это ведет к агрессивным заявлениям продавцов приборов об их результатах, и требуется некоторая предосторожность при сравнении рекламируемых цифр. Это требует внимания к подробностям используемых процедур. Например, выполнялось ли испытание формы линии с вращением, или без вращения образца, или насколько широкая использовалась область спектра для оценки уровня шума при проверке чувствительности. При использовании этих испытаний для внутренней проверки, совершенство вашей методологии - важный фактор, если результаты подлежат сравнению с предыдущими измерениями. Идеально эти испытания должны выполняться равномерно, скажем, каждые шесть месяцев, или один раз в год, при сохранении соответствующих записей. Дополнительно для оптимальной эффективности также может требоваться более частое обновление установок «главных» шимм, хотя они имеют тенденцию сильно зависеть от стабильности прибора (также как и окружающей среды).

Нужно также понимать, что возможно результаты теста при установке, достигнутые на современном приборе, будут определённо существенно лучше, чем начальные испытательные данные прибора, установленного несколько лет назад (см., например, обсуждения по датчикам в разделе 3.4.1). Идея, что приемлемый результат теста для старого прибора, должен, следовательно, соответственно масштабироваться и опора на предыдущие записи становится необходимой при желании измерять эффективность прибора.

3.6.1. Форма линии и разрешение

Определение формы линии резонанса ЯМР, бесспорно, наиболее важный тест, так как другие параметры могут быть оптимальными только при оптимальной форме линии. Тест измеряет свойства подходящего синглетного резонанса, который в совершенно однородном поле и в отсутствие других искажений производит точную Лоренцеву форму линии, или другими словами, её ССИ имеет чисто экспоненциальный спад. Естественно, единственный путь, чтобы достигнуть этого, – при помощи тщательной оптимизации магнитного поля и шиммирования, которые могут потребовать много часов для достижения хороших результатов теста, в зависимости от исходного состояния системы. В настоящее время и форма линии, и измерение разрешения часто извлекаются из одного набора тестовых данных. *Форма линии* определяется шириной резонанса на уровне 0,55 % и 0,11 % высоты пика (эти величины выводятся из измерения протонных ширин линий на высоте ^{13}C спутников и на уровне одной пятой этой высоты). *Разрешение определяется* шириной линии на полувысоте ($\Delta\nu_{1/2}$) резонанса. Фактически, по определению, это не может быть истинной мерой разрешения (как можно измерять разрешающую способность по одиночной линии?), хотя способность прибора разделять соседние линии определяется узостью синглета. Для истинной Лоренцевой линии ширины при 0,55% и 0,11% должны быть, соответственно, в 13,5 и в 30 раз больше, чем на половине высоты, хотя проверка этого часто не выполняется, и поэтому часто (ошибочно) делаются попытки просто минимизировать все измерения. Тесты могут выполняться и на вращающемся, и на статическом образце (убеждён, вы догадаетесь, где какой при сравнении результатов), первый подходит преимущественно для протонных измерений самого высокого разрешения, в то время как второй указывает пригодность для одно- и двухмерных экспериментов без вращения.

Тест протонной формы линии использует образец хлороформа в дейтероацетоне, обычно при концентрациях 3% для приборов 400 МГц и ниже, и 1% для приборов выше 500 МГц. Старые приборы и/или датчики низкой чувствительности или при наблюдении через внешние «катушки декаплирования», могут требовать 10% при 200 МГц и 3% при 500 МГц, чтобы предотвращать шум, препятствующий измерениям близко к базовой линии. Выполняется одиночное сканирование и данные регистрируются при условиях высокого цифрового разрешения (время регистрации 16 секунд, что обеспечивает спад ССИ до нуля) и обрабатывается без применения функций окна. Не пытайтесь делать измерения на высоте самих спутников, пока не убедитесь измерением, что они составляют 0,55% основного пика. Так как они возникают от протонов, связанных с ^{13}C, которые релаксируют быстрее, чем протоны родительской линии, они могут оказаться относительно увеличенными, если после предыдущих импульсов не установилось полное равновесие. Результаты теста для прибора 400 МГц показываются на рисунке 3.66. Традиционный тест на протонное разрешение, который был принят в эру непрерывного ЯМР (о-дихлорбензол в дейтероацетоне), всё меньше используется в настоящее время, и, кажется, уйдёт в историю ЯМР.

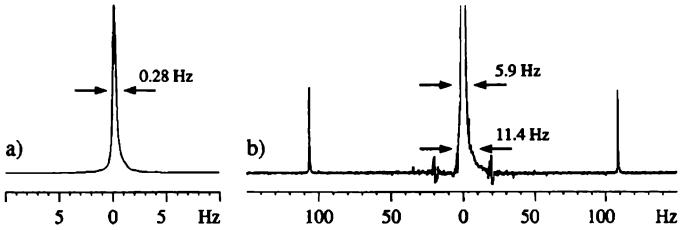


Рисунок 3.66. Тесты протонного разрешения и формы линии проверяют на статическом образце 3% $CHCl_3$, зарегистрированные на спектрометре 400 МГц, оборудованном дуальным $^1H\{^{13}C\}$ инверсным датчиком. Спутники ^{13}C ясно видны в (b) при ±109 Гц, в то время как артефакты при ±20 Гц возникают от колебаний пола.

Тесты формы линии и разрешения на других ядрах следуют процедуре, подобной упомянутой выше. Не все ядра доступны с данным датчиком, поэтому на многоядерных датчиках обычно требуются тесты только «внутренней» и «внешней» катушек наблюдения. Это означает, что второе испытание будет часто включать углерод-13, для которого широко используются два образца; тестовый образец ASTM (Американское Общество Испытания и Материалов) (40 % п-диоксан в дейтеробензоле также используется для проверки чувствительности) или 80% бензол в дейтероацетоне. В любом случае должно использоваться резонансное непрерывное (CW) декаплирование протонов, которое обеспечивает улучшенные результаты для одиночного резонанса по сравнению с широкополосным декаплированием. После тщательного шиммирования используются довольно длительные (30-40 секунд) времена регистрации.

3.6.2. Чувствительность

Большой недостаток спектроскопии ЯМР относительно многих других аналитических методов низкая чувствительность, от которой она страдает. Он, конечно, в значительной мере компенсируется её многочисленными преимуществами, но ещё остаётся одной из наиболее вероятных причин неудачи эксперимента, и поэтому заслуживает серьезного внимания. Термин «чувствительность» строго определяет минимальное количество материала, которое детектируется при определённых условиях, но используется довольно свободно повсюду в ЯМР часто наряду с термином «отношение сигнал-шум». Тест чувствительности прибора – на самом деле измерение отношения сигнал/шум, при котором высота пика анализируемого вещества сравнивается с уровнем шума в спектре. Оптимальная форма линии является существенным условием максимальной высоты пика, и обычно сначала должен выполняться тест формы линии и разрешения, а установки шимм обычно оптимизируют заново по образцу чувствительности (по подобным причинам проверки чувствительности выполняют при вращении образца). Датчик также должен индивидуально настраиваться для каждого тестового образца, а 90° импульс должен быть точно определён. Определение интенсивности шума имеет первостепенную важность для этого измерения, так как различные подходы могут вести к различным результатам теста. Это имеет конкретное значение в настоящее время, поскольку старый метод «ручной» оценки шума заменяется автоматизированными вычислительными программами, поставляемыми продавцами приборов. Традиционный метод сравнивает интенсивность пика P, с удвоенным уровнем среднеквадратичного шума в спектре N_{rms}. Хотя N_{rms} не измеряется прямо, оно может оцениваться из шума базовой линии от пика до пика N_{pp}, считая, что N_{rms} - одна пятая N_{pp}, при прямом измерении на бумажных графиках. Сигнал/шум, таким образом, имеет вид:

$$\frac{S}{N} = \frac{2{,}5P}{N_{pp}} \qquad (3.23)$$

Измерение шума от пика до пика должно включать все шумовые полосы в пределах определённого частотного окна, но несколько зависит от того, что можно было бы называть «оптимизмом оператора» при исключении отдельных «острых выбросов» или «сбоев». В то время как вычислительные методы для определения шума имеют преимущество удаления такой необъективности оператора. Используемые алгоритмы могут оставлять впечатление тайны, окружающей измерение, что может затруднять сравнения между опубликованными результатами продавцов. Хотя это может быть важно с точки зрения приобретения прибора, для обычного обслуживания прибора этот подход не так важен. Для контроля эффективности компьтеризованный подход, вероятно, должен быть более надёжным.

Проверка чувствительности для протонов использует образец 0,1% этилбензола в дейтерохлороформе. Как и для всех тестов чувствительности, регистрируется спектр одного сканирования после 90° импульса на полностью уравновешенном образце (в этом случае релаксационная задержка 60 секунд). Спектр обрабатывается согласованной фильтрацией, соответствующей уширению линий 1 Гц для метиленовой группы, по которой измеряется интенсивность сигнала (этот резонанс уширяется слабо неразрешённым дальним взаимодействием с ароматическими протонами). Традиционно шум измеряется в интервале между 3 м.д. и 5 м.д., хотя среди производителей увеличивается тенденция ограничивать эту область до 200 Гц шириной, что, конечно, производит более впечатляющие результаты (обращайте внимание на метод измерения при сравнении результатов). Результаты для 400 МГц представлены на рисунке 3.67.

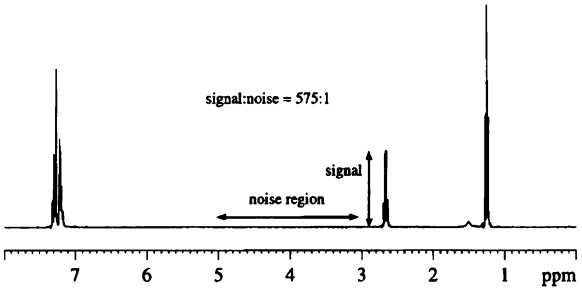


Рисунок 3.67. Тест проверки чувствительности на протонах для образца 0,1% этилбензола, зарегистрированный на спектрометре 400 МГц, оборудованном сдвоенным $^{1}H\{^{13}C\}$ инверсным датчиком.

Проверка чувствительности для углерода производится двумя способами, с протонным декаплированием и без него. Они дают совершенно различные результаты и опять важно знать, который подход использовался. В то время как первый обеспечивает признак абсолютной чувствительности прибора, второй представляет более реальное испытание полной эффективности, так как он также принимает во внимание эффективность протонного декаплирования и, таким образом, ближе к выполнению подлинных экспериментов. Оба подхода регистрируют углеродные спектры при необычных условиях высокого цифрового разрешения, чтобы правильно определять формы пиков, требуя времен регистрации около 4 секунд. Версия взаимодействия с протонами снова использует образец ASTM (40% п-диоксан в дейтеробензоле), но на сей раз измеряют высоту пика триплета дейтеробензола. Применяется уширение линий 3,5 Гц и шум измеряется в окне от 80 до 120 мд. Версия с протонным декаплированием использует 10% этилбензол в дейтерохлороформе и *широкополосное* декаплирование составным импульсом обычно последовательность WALTZ-16 (глава 9). Используется уширение линий 0,3 Гц и шум регистрируется в той же самой области, при определении высоты пика по самому высокому ароматическому резонансу. В этом случае для оптимальных результатов требуется настройка протонной катушки и надлежащая калибровка импульсов протонного декаплирования. Тестовые образцы для других обычных ядер суммируются в таблице 3.6. Если вы заинтересованы в других ядрах, следует выбрать подходящий стандарт, который будет использоваться для будущих измерений.

Таблица 3.6. Стандартные образцы для проверки чувствительности некоторых обычных ядер.

Ядро	Образец проверки чувствительности	Примечание
^{1}H	0,1% этилбензол в $CDCl_3$	
^{13}C	10% этилбензол в $CDCl_3$	Применение широкополосного протонного декаплирования
^{13}C	40% диоксан в C_6D_6	При отсутствии декаплирования. Сигнал C_6D_6 используется в измерении.
^{31}P	0,0485 М трифенилфосфат (TPP) в ацетоне-d_6	Без декаплирования
^{19}F	0,05% трифтортолуол в $CDCl_3$	Без декаплирования
15N	90% формамид в ДМСО-d_6	Используется инверсный управляемый декаплинг для подавления ЯЭО
^{29}Si	85% гексаметилдисилоксан в бензоле-d_6	Без декаплирования

3.6.3. Предварительное насыщение растворителя

Интерес к биологически и медицински важным материалам часто требует проведения анализа ЯМР на образцах в 90% H_2O, если должны наблюдаться также и обмениваемые растворителем протоны. Различные тесты, представленные до сих пор, использовали органические растворители, хотя их диэлектрические свойства и воды существенно различаются, и датчик, который хорошо функционирует для, скажем, хлороформа, может оказаться неоптимальным для ионного водного раствора, особенно в отношении чувствительности. Точная настройка датчика и калибровка ширины импульса играют здесь важную роль, но протонированные водные растворы также требуют эффективного подавления резонанса растворителя, если должно наблюдаться растворяемое вещество (см. главу 9 для обсуждения методов подавления). Тест подавления сигнала растворителя использует предварительное насыщение растворителя и может применяться для измерения множества характеристик эффективности, включая способность подавления, разрешение и чувствительность. Хорошая эффективность подавления предъявляет высокие требования и к статической (B_0), и к РЧ (B_1) однородности поля. Узкая форма линии вплоть до базовой линии, и, следовательно, хорошая однородность B_0, является основной предпосылкой для хороших результатов и гарантирует, что все ядра растворителя будут резонировать в пределах малого частотного окна. Хорошая однородность B_1 означает, что ядра растворителя во всех областях образца, испытывают подобную РЧ мощность и, таким образом, подавляются в одинаковой степени. Большинство остаточного сигнала растворителя, которое наблюдается после преднасыщения, возникает из периферийных областей образца, которые испытывают уменьшенное поле B_1.

Тестовый образец 2 мМ сахароза с 0,5 мМ натрий 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонатом (DSS) в 90% H_2O/10% D_2O, плюс следы азида натрия для подавления роста бактерий. В отсутствие подавления наблюдается только резонанс растворителя. Тест включает резонансное предварительное насыщение растворителя, в течение двухсекундного периода, сопровождаемого регистрацией

90° импульсом. Мощность предварительного насыщения выбирается таким образом, чтобы значительно ослаблять резонанс ($\gamma B_1 \approx 25$ Гц), и эта установка используется в будущих сравнительных испытаниях. Естественно, более высокие мощности будут производить большее подавление, но они должны быть не столь высокими, чтобы уменьшать соседние резонансы сахарозы. Обычно накапливаются 8 откликов после двух «фиктивных» сканирований, которые создают стационарное состояние. Об эффективности подавления судят, измеряя ширину линии остаточного сигнала растворителя на уровне 50% и 10% высоты резонанса DSS. При применении современных датчиков, которые имеют соответствующее экранирование проводников РЧ катушки, ширина линии на уровне 50% должна быть несколько меньше, чем 100 Гц и достаточно симметрична. Более старые датчики могут показывать хуже эффективность и могут досаждать широкими несимметричными горбами (несмотря на тщательное внимание к оптимизации шимм), которые образуются от приёма сигнала на неэкранированных проводниках катушек [44]. О разрешении судят по расщеплению аномерного протонного дублета при 5,4 мд, который должен расщепляться, по крайней мере, до 40% высоты аномерного пика. Чувствительность может измеряться также из этого резонанса при измерении шума в интервале от 5,5 до 7,0 мд, используя один из методов, описанных выше (может потребоваться коррекция базовой линии).

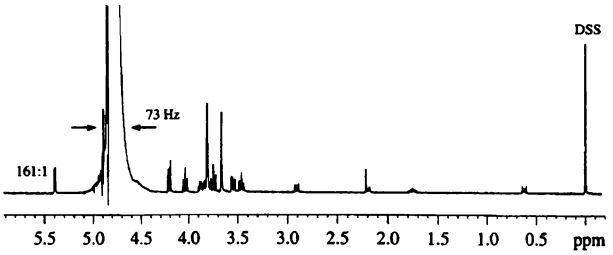


Рисунок 3.68. Протонный тест преднасыщения растворителя. Данные получены на спектрометре 400 МГц, оборудованном двойным $^1H\{^{13}C\}$ инверсным датчиком для образца 2 мМ сахарозы и 0,5 мМ DSS в 90% H_2O/10% D_2O.

Результаты теста для 400 МГц $^1H\{^{13}C\}$ датчика при использовании предварительного насыщения умеренной мощности показаны на рисунке 3.68. Дальнейшего уменьшения резонанса воды можно достичь с большей мощностью РЧ.

ЛИТЕРАТУРА

[1] J.N. Shoolery, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc***, 1995,**28**,37-52
[2] E. Bartholdi and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1973, **11,** 9-19
[3] M. B. Comisarow, ***J. Magn. Reson.***, 1984, 58, 209-218
[4] J.J. Led and H. Gesmar, ***Chem. Rev.*** 1991,**91**, 1413-1426
[5] J.C. Hoch and A.S. Stern, ***NMR Data Processing***, Wiley-Liss, New York, 1996
[6] W.F. Reynolds, M. Yu.R.G. Enriuquez and I. Leon, ***Magn. Reson. Chem.***, 1997,**35**,505-519
[7] C.J. Turner and H.D. W. Hill, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **66,** 410-421
[8] D.I. Hoult and, R.E. Richards, ***Proc. Roy. Soc.*** *(Land)*, 1975, **A344**, 311
[9] M.A. Delsuc and J.Y. Lallemand, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **69,** 504-507
[10] E. Kupce, J. Boyd and I. Campbell, ***J. Magn. Reson.*** *(A)*, 1994, **109,** 260-262
[11] M.E. Rosen, ***J. Magn. Reson.*** *(A)*, 1994, **107,** 119-125
[12] R.R. Ernst, ***Adv. Mag. Reson.***, 1966,**2**, 1-135
[13] A.G. Ferrige and J.C. Lindon, ***J. Magn. Reson.***, 1978,**31**,337-340
[14] G.A. Pearson, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **74**, 541-545

[15] D.D. Traficante and G.A. Nemeth, ***J. Magn. Reson.***, 1987,**71**,237-245
[16] C.R. Pacheco and D.D. Traficante, ***J. Magn. Reson.*** *(A)*, 1996, **120,** 116-120
[17] J.N.S. Evans, ***Biomolecular NMR Spectroscopy***, Oxford University Press, Oxford, 1995
[18] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer and N.J. Skelton, ***Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice***, Academic Press, San Diego, 1996
[19] R.K. Harris and B.E. Mann, eds. ***NMR and the Periodic Table***, Academic Press, London, 1978
[20] R.W. Dykstra, ***J. Magn. Reson.*** *(A)*, 1995, **112,** 255-257
[21] R.C. Crouch and G.E. Martin, ***Magn. Reson. Chem.***, 1992, **30**, 566-570
[22] P. Styles, N.F. Soffe, C.A. Scott, D.A. Cragg, F. Row, D.J. White and P.C.J. White, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **60,** 397-404
[23] P. Styles, N. F. Soffe and C.A. Scott, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **84,** 376-378
[24] H.D.W.Hill, ***Magnetic Moments*** *(Varian Newsletter)*, 1996, **8,** 4-6
[25] N. Bloembergen and R.V. Pound, ***Phys. Rev.***, 1954, **95,** 8-12
[26] W.W. Conover, in ***Topics in Carbon-13 NMR Spectrosocopy***, ed G.C. Levy, Wiley, New York, 1983
[27] G.N. Chmurny and D.I. Hoult, ***Concept. Magn. Reson.***, 1990, **2**, 131-159
[28] P.C.M. Van Zijl, S. Sukumar, M.O. Johnson, P. Webb and R.E. Hurd, ***J. Magn. Reson.*** *(A)*, 1994, **111,** 203-207
[29] H. Barjat, P.B. Chilvers, B.K. Fetler, T.J. Horne and G.A. Morris, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **125,**197-201
[30] S. Sukumar, M.O. Johnson, R.E. Hurd and P.C. M. van Zijl, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **125,** 159-162
[31] J.R. Wesener and H. Gunther, ***J. Magn. Reson.***, 1985,**62**, 158-162
[32] E. Haupt, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **49,** 358-364
[33] D.M. Thomas, M.R. Bendall, D.T. Pegg, D.M. Doddrell and J. Field ***J. Magn. Reson.***,1981, **42**, 298-306
[34] A. Bax, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **52**, 76-80
[35] E. Kupce and B. Wrackmeyer, ***J. Magn. Reson.***, 1991,**94** 170-173
[36] F. Bloch and A. Siegert, ***Phys. Rev.***, 1940, **57**, 522-527
[37] S.D. Simova, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **63,** 583-586
[38] W.S. Price, ***Ann. Re.p NMR Spectrosc.***, 1996,**32**,51-142
[39] D.G. Cory, F.H. Laukien and W.E. Maas, ***J. Magn. Reson.*** *(A)*, 1993, **105,** 223-229
[40] W.E. Maas, F. Laukien and D.G. Cory, ***J. Magn. Reson.*** *(A)*, 1993,**103,** 115-117
[41] M.L. Martin, J.J. Delpeuch and G.J. Martin, ***Practical NMR Spectroscopy***, Heydon, London, 1980.
[42] A.L. Van Geet, ***Anal. Chem.***, 1970, **42**, 679-680
[43] D.S. Raidford, C.L. Fisk and E.D. Becker.***Anal. Chem.***, 1979, **51,** 2050-2051
[44] R.W. Dykstra, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **72**, 162-167.

Глава 4

Одномерные методы

Подход к любой структурной или механистической проблеме будет неизменно начинаться с регистрации одномерных спектров. Так как они обеспечивают основы для дальнейшей работы, важно, чтобы они выполнялись правильно и делалось полное применение данных, которые они предоставляют, прежде чем будут выполняться более обширные и потенциально ёмкие по времени эксперименты. Эта глава описывает наиболее широко используемые в химической лаборатории одномерные методы, начиная с простого одноимпульсного эксперимента, и, продвигаясь к рассмотрению различных многоимпульсных методов, которые увеличивают информационное содержание наших спектров. Их ключевые характеристики кратко суммируются в таблице 4.1. Эта глава не покрывает широкий выбор методов, которые являются строго одномерными аналогами двумерных экспериментов, поскольку они более удобно описаны вместе с родительским экспериментом и находятся во всех следующих главах.

4.1. ОДНОИМПУЛЬСНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

В предыдущей главе описаны процедуры для оптимального сбора ССИ, и как они диктуются релаксационным поведением ядер и цифровым разрешением, требуемым в образующемся спектре, которое, в свою очередь, определяет время регистрации данных. При постановке эксперимента нужно также рассматривать, какой оптимальный угол импульса возбуждения нужно использовать, и как часто импульсы могут применяться к образцу для усреднения сигнала (рис. 4.1). Эти параметры также зависят от времён спиновой релаксации. Имеются два экстремальных случая, которые следует рассмотреть для одноимпульсного эксперимента, в частности, либо добиваются оптимальной чувствительности в течение данного периода накопления данных, либо требуются точные количественные данные от нашего образца. Экспериментальные условия для выполнения этих критериев могут совершенно различаться, поэтому каждый из них должен рассматриваться отдельно.

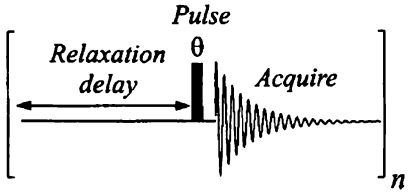


Рисунок 4.1. Существенные элементы одноимпульсного эксперимента ЯМР релаксационная (восстанавливающая) задержка, угол импульсного возбуждения и время регистрации данных.

Таблица 4.1. Основные применения многоимпульсных методов, описанных в этой главе.

Методика	Основные применения
J-модулированное спин-эхо или APT (Attached Protons Test)	Редактирование спектров гетероядра (обычно углерода-13) согласно мультиплетности резонансов.
INEPT	Усиление ядер низких γ через перенос поляризации от ядер высоких γ, например, ^{1}H, ^{31}P, ^{19}F. Редактирование спектров согласно мультиплетности резонансов.
DEPT	Усиление ядер низких γ через перенос поляризации от ядер высоких γ с редактированием спектров согласно мультиплетности резонансов. Экспериментально более эффективно для рутинной ^{13}C спектроскопии, чем INEPT. Сигналы четвертичных углеродов не наблюдаются.
DEPT-Q	То же, что и DEPT, но с сохранением четвертичных углеродов.
PENDANT	Усиление ядер низких γ через перенос поляризации от ядер высоких γ, например, ^{1}H, ^{31}P, ^{19}F. Редактирование спектров согласно мультиплетности резонансов с сохранением сигналов четвертичных углеродов.
RIDE или ACOUSTIC	Наблюдение низкочастотных квадрупольных ядер с очень широкими резонансами. Последовательность подавляет «акустический звон» датчика.

4.1.1. Оптимизация чувствительности

Если применять 90° импульс к спиновой системе при тепловом равновесии, ясно, что будет получаться максимально возможная интенсивность сигнала, так как все намагничивание помещается в поперечную плоскость. Это может, следовательно, оказаться оптимальным импульсным углом отклонения для достижения максимальной чувствительности. Однако обычно заинтересованы в выполнении усреднения сигнала, поэтому перед применением последующих импульсов становится необходимым выжидать время, в несколько раз превышающее T_1, чтобы позволить системе релаксировать и снова восстанавливать полный сигнал. Период $5T_1$ ведёт к восстановлению продольного намагничивания на 99,3% (см. рисунок 2.20 в главе 2), пригодному для всех практических целей. Такое медленное повторение – на самом деле не самый эффективный путь усреднения сигнала, и оказывается лучше не иметь дела с задержкой восстановления совсем, а регулировать условия импульса, чтобы максимизировать *стационарное состояние производимой намагниченности.*

При условиях, когда имеется полное затухание поперечной намагниченности между сканированиями (т.е. ССИ спадает до нуля), оптимальный угол отклонения для времени повторения импульса t_r, известный как *угол Эрнста*, α_e, дается выражением[1,2]:

$$\cos\alpha_e = e^{-t_r/T_1} \qquad (4.1)$$

и показан на рисунке 4.2. Поскольку время повторения уменьшается относительно скорости спиновой релаксации, то есть, когда используются более частые пульсации, меньшие углы отклонения производят оптимальное отношение сигнал/шум. Протонные спектры обычно получаются с достаточным цифровым разрешением, чтобы показать тонкую мультиплетную структуру, и времена регистрации обычно составляют порядка $3T^*_2$, что является достаточным, чтобы позволять почти полное затухание поперечной намагниченности между сканированиями ($3T^*_2$ соответствует затуханию на 95%). Кроме того, так как для молекул от малого до среднего размеров $T^*_2 = T_1$, и для наблюдения протонов в хорошо шиммированном магните $T^*_2 \approx T_2$, мы имеем $t_r \approx 3T_1$, и таким образом, из рис. 4.2, импульсный угол для *максимизирования чувствительности* обычно будет составлять >80° Однако для протонов в молекуле будет существовать интервал значений T_1 и будет невозможно использовать оптимальные условия для всех протонов. В таких случаях большой угол отклонения импульса, вероятно,

будет вести к существенным различиям интенсивностей для протонов с сильно различающимися временами релаксации, т.е. медленнее релаксирующие спины покажут уменьшенную интенсивность сигнала [3]. Это иллюстрируется в графиках отношения сигнал/шум на рис. 4.3.

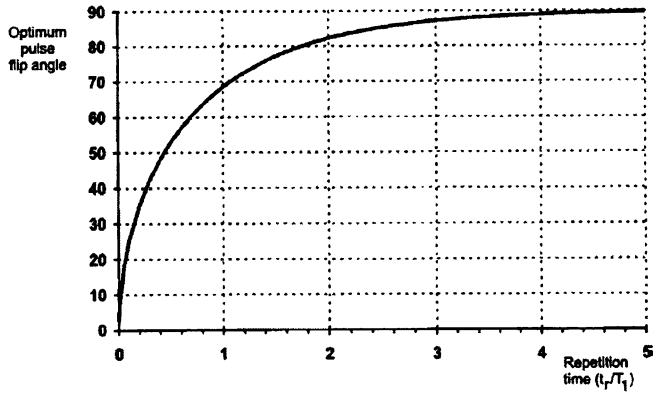


Рисунок 4.2. Угол Эрнста для оптимальной чувствительности при усреднении сигнала. Угол отклонения импульса диктуется временем повторения импульсов t_r относительно времени продольной релаксации T_1.

Когда требуются протонные интегралы, чтобы показать число ядер, вызывающее каждый резонанс, как для рутинных протонных регистраций, разумно оптимизировать импульсный угол отклонения для более длинных значений T_1, и, таким образом, использовать более короткие импульсы (смотрите следующий раздел для подробностей о *точных* количественных измерениях). Полагая, что самое длинное T_1 составляет около 4 секунд, а время регистрации 3 секунды, оптимальный угол отклонения составит около 60°, хотя графики на рис. 4.3 ясно обладают довольно широкими максимумами, что означает, что точная установка угла отклонения импульса - не критическая.

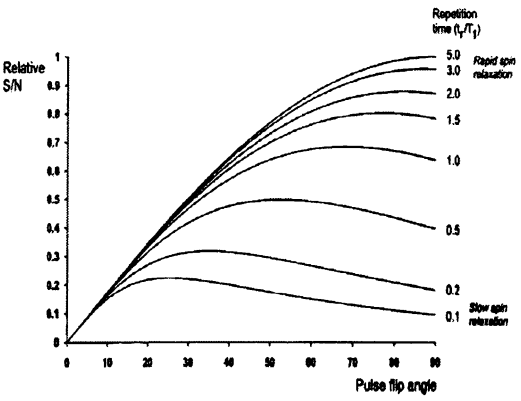


Рисунок 4.3. Зависимость отношения сигнал/шум от угла отклонения импульса для различных времен повторения импульсов. Максимум на каждой кривой соответствует углу Эрнста. Когда молекула содержит ядра с очень разными временами релаксации (T_1), применение импульсов с большим углом отклонения производит большую разность в интенсивностях сигналов и делает ненадежными даже полуколичественные измерения. Оптимизация рекомендуемого угла для самых медленных релаксирующих спинов уменьшает эти различия интенсивностей. Графики генерировались из уравнений, данных в [3].

Применение импульсов слишком часто, то есть, используя очень короткие времена повторения относительно T_1, ведёт к существенному уменьшению отношения сигнал/шум, до тех пор, пока в предельном случае, намагничивание не имеет времени, чтобы восстанавливаться между импульсами, и, таким образом, невозможно наблюдать никакого сигнала. Это состояние известно как *насыщение* и вызывает полную потерю резонансов, что может быть помехой или выигрышем, в зависимости от вашей точки зрения. Если вы заинтересованы в наблюдении сигнала, тогда, ясно, этого следует избе-

гать, в то время как, если сигнал нежелателен, например, большой резонанс растворителя, тогда это должно поощряться (глава 9).

Условия регистрации гетероядерных спектров обычно значительно отличаются от условий наблюдений протонов. Часто не требуется хорошей оцифровки спектров, когда тонкая структура невелика или не наблюдается, поэтому времена регистрации удерживаются сравнимыми с T'_2, которое часто меньше, чем T_2. При таких условиях поперечная намагниченность между сканированиями не затухает полностью, и такое частое применение импульсов вызывает стационарные спиновые эхо [2,4,5], где поперечная намагниченность, остающаяся от одного импульса, рефокусируется последующими импульсами. Это эхо может приводить к искажениям фазы и интенсивности в результирующих спектрах, которые являются функцией положения резонанса. Применение частых импульсов, когда времена повторения значительно короче, чем времена продольной релаксации, как в случае наблюдения углерода-13, например, далее делает вклад в искажения относительных интенсивностей по причине эффектов частичного насыщения. Это основная причина для появления четвертичных углеродных центров (которые релаксируют довольно медленно вследствие недостатка присоединённых протонов) часто с характерно слабыми интенсивностями. В экстремальных случаях они могут становиться полностью насыщенными и теряться совсем, если импульсы применяются слишком часто, и/или, если угол отклонения импульса слишком большой. Таким образом, обычные углеродные спектры обычно получаются с несколько уменьшенными импульсными углами (<45°) и с релаксационной задержкой около секунды. Подобные рассуждения применимы и к другим гетероядрам. Для обычных наблюдений всегда имеется некоторый необходимый компромисс между оптимальной чувствительностью и нежелательными аномалиями интенсивности, которые возникают для ядер с широко различными временами релаксации.

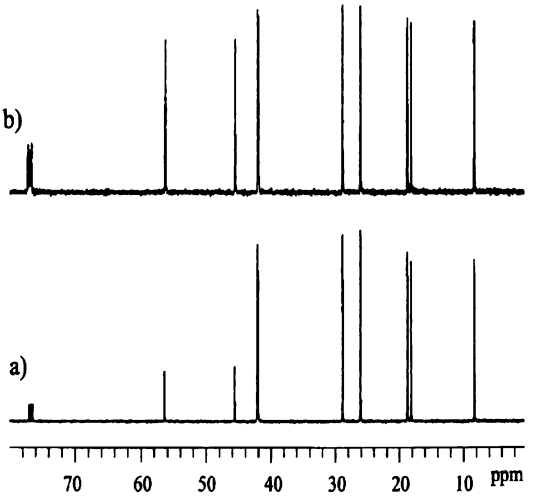
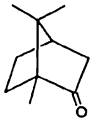


Рисунок 4.4. Спектры углерода-13 камфоры **4.1**, полученные: (a) без и (b) с добавлением $Cr(AcAc)_3$ при прочих идентичных стандартных условиях наблюдения (1 сек. релаксационная задержка, 30° возбуждающий импульс, время регистрации 0,5 с). В (a) два четвертичных резонанса показывают уменьшенные интенсивности сигналов в результате частичного насыщения. В (b) эта разность в значительной степени устраняется добавлением релаксационного агента, в то время как уменьшенное отношение сигнал-шум протонированных резонансов возникает от подавления ^1H-^{13}C усиления ЯЭО и уширения линий, вызванного релаксационным агентом.



4.1

Если это проблематично, один подход к сокращению этих аномалий - добавление парамагнитных релаксационных агентов, таких как ацетилацетонат хрома(III), $Cr(AcAc)_3$ с целью сокращения и, частично, уравнивания времен продольной релаксации, чтобы позволять более быстрое усреднение сигнала (рис. 4.4; около 10-100 мМ релаксационного агента достаточно и раствор должен принимать слабый розово-пурпурный оттенок).

Наконец мы рассмотрим ситуацию, когда импульсной последовательностью вынуждены использовать 90° импульсы, в этом случае вышеуказанные аргументы больше не применимы. Это фактически случай для большинства многоимпульсных и многомерных последовательностей. При таких условиях требуется компромисс между скоростью получения данных и неприятными эффектами насыщения, и как показано в [6], для стационарного состояния намагниченности чувствительность максимальна при частоте повторения равной 1,3 T_1. Это ведет к отношению сигнал/шум, которое приблизительно в 1,4 раза больше, чем то, которое получается, используя время повторения $5T_1$ *в течение данного периода сбора данных* (рис. 4.5). Таким образом, для большинства последовательностей, целью является время повторения 1,3 T_1.

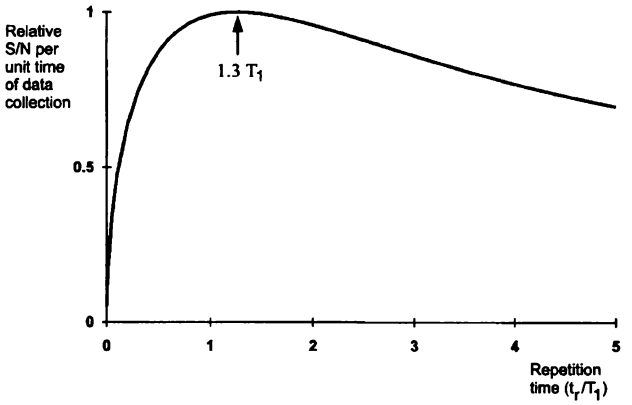


Рисунок 4.5. Оптимальное время повторения импульсов при использовании 90° импульсов. Кривая рассчитывалась из уравнения в [3]

4.1.2. Количественные измерения и интегрирование

Широкое применение интегрирования в протонном ЯМР возникает из хорошего использования доктрины, что площадь резонанса ЯМР пропорциональна относительному числу ядер, порождающих его. Фактически это строго справедливо при хорошо определённых условиях, и в обычных протонных спектрах точность интегрирования может быть только в пределах 10-20% или около того. В то время как этот уровень точности обычно достаточен для оценки относительного подсчёта протонов в молекуле, ясно этого недостаточно для количественных измерений, где требуется точность в пределах нескольких процентов. Факт, что интегралы обычно сообщаются программным обеспечением ЯМР до многих знаков после десятичной запятой, может внушать веру в эти цифры, таким образом, обесценивая ожидания того, что может производиться из обычных спектров. Наоборот, во вводных лекциях по ЯМР широко преподается, что невозможно интегрировать спектры углерода-13. В то время как это действительно не годится для обычных регистраций, не только для углерода-13, но также и для многих других гетероядер. Тем не менее, совершенно возможно получать значащие интегралы, когда используются подходящие условия, как описано ниже. Во всех случаях важно сознавать факт, что измерения ЯМР - всегда *относительные измерения* интенсивностей сигналов. Не существует ЯМР эквивалента коэффициетам поглощения ультрафиолетовой спектроскопии, поэтому *абсолютные* количества образца не могут определяться непосредственно.

Сбор данных

Кроме очевидной потребности адекватного отношения сигнал/шум в спектре, для количественных измерений имеются три свойства специфической важности. Это предотвращение дифференциальных эффектов насыщения, необходимость правильно характеризовать форму линии резонанса ЯМР и необходимость избегать дифференциальных усилений ЯЭО. Как упоминалось в предыдущем разделе, получение данных, когда импульсы следуют часто относительно времен спиновой релаксации, ведет к возмущению относительных интенсивностей сигналов в спектре. Поэтому, чтобы избегать этого, *важно выжидать пока* спины полностью отрелаксируют между импульсами, требуя времён повторения не менее $5T_1$ *самых медленно релаксирующих ядер.* Это позволяет применение 90° импульсов наблюдения, обеспечивая максимальный возможный сигнал при каждом сканировании. Ясно, требуется некоторое знание значений T_1 для интересующего образца, которые могут оцениваться описываемыми в главе 2 методами восстановления инверсии или оценками, сделанными из предварительного знания подобных соединений. В то время как времена повторения порядка $5T_1$ обычно терпимы для протонной работы, они могут быть утомительно длительными при изучении гетероядер, которые могут требовать многих минут между сканированиями. Чтобы уменьшать эти периоды до несколько более терпимых, здесь могут использоваться релаксационные реагенты.

Второе фундаментальное требование касается достаточно хорошей оцифровки данных для правильного определения формы линии. Чтобы минимизировать ошибки интенсивности, необходимо иметь, *по крайней мере, четыре* полученных точки данных, покрывающих резонансную ширину линии, хотя предпочтительно гораздо больше, поэтому выгодно использовать минимальную ширину спектра, подходящую для образца, и соответственно регулировать времена регистрации. Ширина спектра не должна быть слишком узкой, чтобы гарантировать, что фильтры приемника не налагаются на резонансные интенсивности на краях спектра.

Дальнейший источник искажений интенсивностей в гетероядерных спектрах, регистрированных с широкополосным протонным декаплированием, возникает из ЯЭО, произведённого протонным насыщением (глава 8). Ясно, что различные усиления будут предотвращать накопление значащих данных интенсивности, поэтому необходимо получать измерения в условиях подавления ЯЭО. Кроме того, желательно получать протоннодекаплированные спектры для достижения оптимального отношения сигнал/шум и минимального наложения резонансов. Решение этого очевидного противоречия состоит в использовании схемы инверсно-включаемого декаплинга, описанной в следующем разделе. Отсутствие ЯЭО и необходимость низкой скорости повторения импульсов означает значительное увеличение продолжительности количественных измерений по сравнению обычным наблюдением того же самого образца. Добавление релаксационного агента опять же ускорит процесс, позволяя уменьшать задержки повторения, и также помогая подавлению ЯЭО, поскольку оно будет устранять дипольную релаксацию, ответственную за это усиление (см. рисунок 4.4 выше).

Обработка данных

Получив необходимые предостережения, чтобы гарантировать, что полученные данные действительно отражают относительные отношения в образце, правильная обработка данных может далее улучшать результаты. Спектры гетероядер, в частности, извлекают выгоду из применения экспоненциальной функции, которая уширяет линии. Это помогает гарантировать, что данные, в дополнение к улучшению отношения сигнал/шум, достаточно хорошо оцифровываются. Для протонной спектроскопии, достижение адекватной чувствительности - не слишком жёсткая проблема, хотя применение согласованного экспоненциального окна опять же будет помогать гарантировать достаточную оцифровку. Применение дополнения нулями далее поможет с определением формы линии и настоятельно рекомендуется, хотя *оно не должно использоваться* как замена правильной оцифровки полученного

ССИ. Необходимо также тщательное фазирование спектра. Отклонения формы линий от чистого поглощения будут уменьшать интегральные интенсивности с вкладами от отрицательно идущих компонентов; в предельном случае интегральная интенсивность нулевая для чисто дисперсной формы линии! Другой потенциальный источник ошибки возникает из искажений базовой линии спектра, которые имеют своё происхождение в приёмных каскадах спектрометра. Эти ошибки означают, что области спектра, которые должны иметь нулевую интенсивность, то есть те, которые свободны от сигналов, имеют ненулевое значение и делают положительный или отрицательный вклад в измерения. Пакеты программ ЯМР включают подходящие программы коррекции этого.

Заключительное соображение при интегрировании - где должен начинаться и заканчиваться интеграл. Для Лоренцевой линии, хвосты распространяются на значительное расстояние от центра, и идеально интеграл должен охватывать 20 ширин линии с каждой стороны пика, если он должен включать 99 % его. Для наблюдения протонов оно, вероятно, должно быть по 10-20 Гц с каждой стороны. На практике может оказаться невозможным расширить интеграл на такие расстояния, если там встречаются различные другие сигналы. Они могут возникнуть от экспериментальных несовершенств (таких как боковые сигналы вращения), спутники от взаимодействия с другими ядрами, или от других резонансов в образце. Спутники могут быть особенно неприятными в некоторых случаях, поскольку они могут составлять большую часть полного сигнала, вследствие высокого естественного содержания второго ядра, и нужно решать, либо включать их, или исключать при *всех измерениях.* В некоторых случаях спутники могут использоваться с преимуществом в количественных измерениях. Один из примеров этого - оценка преобладающего энантиомера или диастереомера в протонном ЯМР, где минорный изомер составляет только несколько процентов от главного. В таких случаях измерение **ee** или **de** требует сравнения очень большого интеграла относительно очень малого, ситуация, склонная к ошибке. Можно выполнять сравнение интегралов подобного соотношения, если рассматривать только спутники углерода-13 основных сигналов (каждый представляет в 0,55 %), и, соответственно, масштабировать вычисление.

4.2. МЕТОДЫ СПИНОВОГО ДЕКАПЛИРОВАНИЯ

Применение спин-спинового декаплирования без сомнения знакомо самым обычным пользователям ЯМР спектроскопии растворов. Оно представляло важный инструмент для химика с начала применения ЯМР к проблемам химической структуры [7]. Оно теперь настолько широко используется в наблюдении гетероядерных спектров (когда вы последний раз видели полностью протонносвязанный углеродный спектр?), что можно почти не обращать внимания на факт, что оно является неотъемлемой частью многочисленных импульсных экспериментов. В настоящее время скалярное спин-спиновое декаплирование наиболее часто применяется с одной из двух целей в уме; или *селективное декаплирование* отдельного резонанса в попытке идентифицировать его взаимодействующего партнёра, или неселективное *(широкополосное)* декаплирование одного нуклида, чтобы увеличить и упростить спектр другого. Декаплирование обычно классифицируется как *гомоядерное,* при котором декаплируемые и наблюдаемые ядра одного типа, или *гетероядерное,* при котором они различные. Символ того ядра, которое испытывает декаплирование РЧ, традиционно отличают, помещая его в фигурные скобки. Так, например, $^{13}C\{^{1}H\}$ указывает наблюдение углерода в присутствии протонного декаплирования, в то время как $^{1}H\{^{13}C, ^{31}P\}$ представляет наблюдение протонов в присутствии одновременного декаплирования углерода и фосфора (или более обычно импульсные воздействия на углерод и фосфор). Можно также найти упоминание спинового декаплирования, как один пример эксперимента «двойного резонанса», выражение, возникшее из непрерывных (CW) экспериментов, в которых РЧ наблюдения и декаплирования применялись одновременно. Аналогично, H, C, P пример

выше может называться экспериментом «тройного резонанса», поскольку он требует трёх РЧ каналов.

4.2.1. Основы спинового декаплирования

Упрощенное [8], но удобное описание того, как действует спиновое декаплирование, рассматривает два ядра спина -1/2 A и X, которые разделяют взаимное скалярное взаимодействие J Гц. Резонансная частота X-спинов будет зависеть от того, либо их связанные партнеры ориентируются параллельно (α-ориентация), или антипараллельно (β-ориентация) к приложенному внешнему постоянному полю. Для ансамбля спинов мы можем полагать, что равное число ядер находится в α- и в β-состоянии, вследствие очень малой разности энергий между двумя ориентациями, и поэтому X спектр показывает знакомый фрагмент дублета. Применение РЧ поля, обозначаемого как поле B_2 (вспомните, что поле передатчика называется B_1), на частоте спинов A вызывает их непрерывные быстрые переходы между α и β ориентациями, непрерывно инвертируя эти спины. Если эта переориентация быстрая относительно константы взаимодействия, дублет X-спина превращается в синглет, так как времена жизни α и β ориентаций теперь недостаточны для различения взаимодействия. Таким образом, если спины A облучаются в течение регистрации данных достаточно сильным полем, так что $\gamma B_2 > J$ Гц, X-резонанс не показывает никакого взаимодействия с A и, как говорят, спины декаплируются (развязываются).

В то время как обычная цель таких экспериментов удаление скалярного спин-спинового взаимодействия, от применения дополнительного РЧ поля может возникать множество дополнительных эффектов, которые могут быть выгодными или вредными в зависимости от обстоятельств. Неполное декаплирование может вводить остаточное уширение линий, или даже хуже, оставлять довольно скрытые частично декаплированные мультиплеты, в то время как неоднородное облучение резонанса может вводить эффекты переноса заселенности, которые вызывают искажения интенсивности в мультиплетах (Раздел 4.4). Возмущения заселённости, вызванные РЧ, могут также производить изменения интенсивностей, которые возникают из ядерного эффекта Оверхаузера (глава 8), который действует совершенно независимо от J-взаимодействия. Наконец, также могут наблюдаться изменения положений резонансных сигналов близко по частоте к применённому РЧ полю, так называемые сдвиги Блоха-Зигерта. Во многих случаях возможно иметь некоторый контроль над этими факторами, согласно используемому протоколу эксперимента, как описано в следующих разделах.

4.2.2. Гомоядерное декаплирование

Гомоядерное декаплирование включает селективное применение когерентного декаплирующего поля к целевому резонансу с целью идентификации скалярных спиново-связанных партнеров и наиболее часто применяется в протонной спектроскопии (рис. 4.6). Хотя применение этого метода для идентификации взаимодействий ^1H-^1H спинов было в значительной степени заменено двумерными корреляционными методами (глава 5), селективное декаплирование может ещё быть очень полезным и удобным инструментом в арсенале ЯМР. Его очень просто поставить, обеспечивая быстрые ответы на относительно простые вопросы, и он может быть особенно полезным в идентификации спинов, которые разделяют очень малые взаимодействия, которые не всегда обнаруживаются в 2D корреляционных экспериментах. В очень скученных спектрах, где должно исследоваться только специфическое взаимодействие, подвергнутые воздействию резонансы могут не быть очевидными, и в интерпретации может помочь применение *разностной спектроскопии* [9,10]. Здесь контрольный

спектр, зарегистрированный в отсутствие декаплирования[6], вычитается из полученного в присутствии резонансного декаплирования, чтобы показать любые возникающие при этом изменения. В таких случаях двумерный корреляционный эксперимент может, однако, оказаться более подходящим.

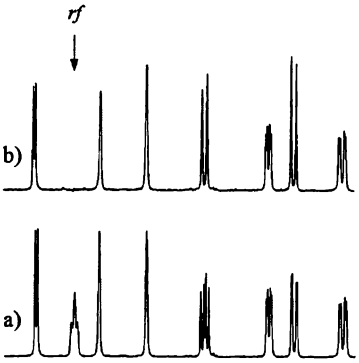


Рисунок 4.6. Гомоядерное декаплирование позволяет быструю идентификацию связанных партнеров, удаляя взаимодействия с облучённым спином. (a) - Контрольный спектр и (b) - декаплированный спектр.

Сдвиги Блоха-Зигерта

Применение РЧ поля в течение регистрации ССИ может также перемещать сигналы, которые резонируют близко к частоте декаплера. Этот эффект известен [11,12] как сдвиг *Блоха-Зигерта* и, более формально, он случается, когда γB_1 становится сравнимым с разностью сдвигов в Герцах между частотой декаплирования и резонансом. Это возникает, потому что декаплирующее поле действует на соседние спины, так что и они испытывают модифицированное эффективное поле, которое обратно зависит от положения их резонанса относительно частоты декаплирования, но пропорционально $(\gamma B_2)^2$, *что вызывает сдвиг резонансов* от этой частоты декаплирования (рис. 4.7). Эффект преимущественно ограничивается экспериментами гомоядерного декаплирования, где резонансы могут быть очень близкими к частоте декаплирования, но не вызывают никакого беспокойства в большинстве импульсных ЯМР экспериментов, так как РЧ импульс выключается до сбора данных.

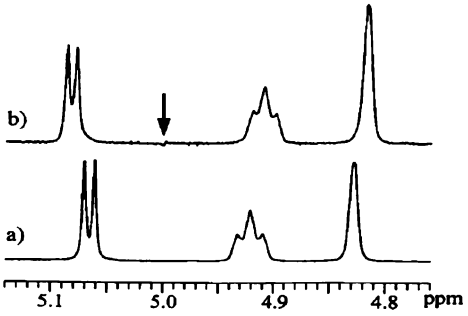


Рисунок 4.7. Сдвиг Блох-Зигерта вызывает смещение резонансов, находящихся по частоте близко к применённому РЧ полю, прочь от его точки применения (a) - обычный спектр и (b) - спектр, полученный с декаплирующим полем, место приложения которого отмечено стрелкой.

Известное исключение составляет применение предварительного насыщения растворителя в течение времени эволюции (t_1) протонных гомоядерных 2D экспериментов. Это может вести к сдвигам f_1 частот резонансов близких к растворителю, но так как оно не присутствует в f_2, это вводит асимметрию в сдвиги перекрёстных пиков, связанных с этими резонансами. В экспериментах гомоядерного

[6] Для любой формы разностной спектроскопии лучший способ - получать контрольный ССИ с декаплерной частотой, применённой за пределами спектра далеко от всех резонансов, а не выключать её полностью.

декаплирования это редко является главной проблемой, по причине требования пределов селективности поля B_2 и, таким образом, поддерживает сдвиги малыми. Однако такие малые сдвиги могут еще вводить артефакты вычитания в спектры разностного декаплирования, так как опорный спектр не будет содержать сдвиги Блоха-Зигерта, поэтому нужно быть осторожными, чтобы не интерпретировать их, как свидетельство взаимодействия. Также требуется осторожность, если нужно измерять точные химические сдвиги из декаплированных спектров. В разделе 3.5.1 сдвиг Блоха-Зигерта используется количественно, как средство калибровки мощности декаплера.

Экспериментальная реализация

Применение гомоядерного облучения во время регистрации ССИ вызывает некоторые связанные с ним инструментальные проблемы. При детектировании откликов возбужденных спинов приемник не должен быть открытым, когда включён декаплер, так как это просто заглушит сигнал ЯМР. Решение лежит в дискретной регистрации ССИ, и в применении гомоядерного облучения *только* тогда, когда *не регистрируются* точки данных, то есть в течение времени задержки для выборки ССИ , но не во время самой выборки [13]. Спектрометры имеют специально сконструированные режимы гомоядерного декаплирования, внутренне выполняющие необходимое управление. Время, на которое включается декаплер, таким образом, составляет только малую часть общего времени регистрации, этот так называемый *рабочий цикл*, составляющий обычно 20% или меньше. Низкий рабочий цикл означает, что эффективная средняя мощность декаплера несколько меньше, чем мгновенное B_2 поле, следовательно, РЧ мощность обычно больше, чем та, которая требуется для предварительного насыщения резонанса, где такой конфликт приемника не возникает. Если закрытие декаплера в течение сбора данных неполное, может появляться множество артефактов спектра [14,15]. Наиболее известный - уменьшение отношения сигнал/шум, вследствие «утечки» РЧ декаплера в приемник, и на частоте декаплера появляется заметный «острый выброс», хотя это в действительности только вопрос эстетики. Проблема утечки сильно различается, кажется, от одного прибора к другому и, если проблема серьезная, может излечиваться только изменением прибора [15]. Вторая проблема может устраняться, просто *устанавливая частоту передатчика* равной частоте декаплера [16], что позволяет обычным программам циклирования фазы, используемым в 1D регистрации, удалять неприглядный «нуль-частотный» острый выброс (рис. 4.8).

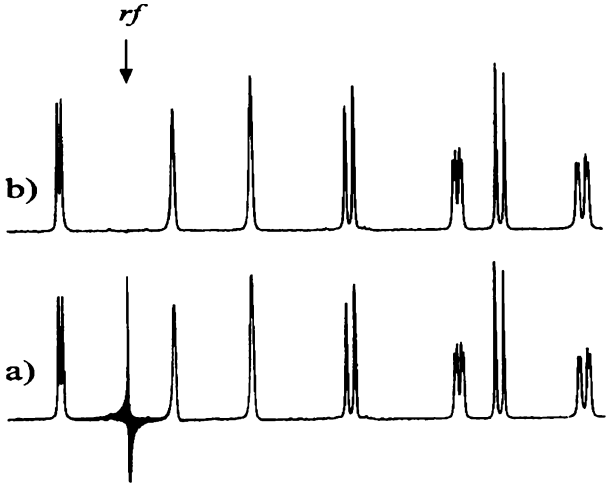


Рисунок 4.8. Эстетически непривлекательный «острый выброс» декаплерной частоты, иногда наблюдаемый в экспериментах гомоядерного декаплирования, как в (a), может легко удаляться, задавая равными частоты передатчика и декаплера, как в (b).

X {H} декаплирование

Применение широкополосного протонного декаплирования в течение регистрации спектров углерода-13 теперь используется постоянно. Удаление всех ^{1}H-^{13}C взаимодействий концентрирует всю интенсивность углеродного резонанса в одиночную линию, обеспечивая существенное увеличение интенсивности сигнала и упрощение спектра. Вдобавок, непрерывное насыщение протонных спинов обеспечивает дальнейшее усиление сигнала (до 200% в случае углерода-13), благодаря ядерному эффекту Оверхаузера (глава 8). По этим причинам применение широкополосного протонного декаплирования стало стандартным условием обычного наблюдения чаще всего встречающихся нуклидов.

Принципы гетероядерного декаплирования не отличаются от гомоядерного случая. Главное отличие состоит в значительно большем разделении между декаплируемой и наблюдаемой частотами, что означает, что сдвиги Блоха-Зигерта и интерференция приемника больше не представляют проблем. Применение широкополосного гетероядерного декаплирования вызывает появление множества других практических проблем. Во-первых, необходимо декаплировать однородно по всему протонному спектру, а это требует, чтобы применённое РЧ поле было эффективным в значительно большем частотном окне. Ширина полосы декаплирования обычно имеет порядок многих килогерц, и больше при более высоких напряжённостях поля. Протонные спектры шириной 10 мд покрывают 4 кГц при 400 МГц, но 6 КГц при 600 МГц, например. Обычно более широкая полоса декаплирования может достигаться увеличением мощности декаплера, хотя непрерывное применение высокой мощности РЧ, вероятнее всего, разрушит датчик и образец, но не достигнет желаемых результатов. Высокие мощности также вызывают проблему РЧ разогрева образца, которая наиболее явно выражается в ионных образцах, и может быть фатальной для чувствительных к теплу соединений. Эффект коварен, поскольку нагревание происходит в пределах самого образца, поэтому обычный метод контроля температуры образца (термопара, помещённая в потоке воздуха, обдувающего образец) в значительной степени нечувствителен к его наличию, обычным индикатором является дрейф уровня стабилизации, когда начинается импульсная последовательность. Чтобы преодолеть проблему декаплирования при широкой полосе без применения чрезмерных мощностей, используются специально спроектированные модуляционные схемы декаплирования (так называемые *последовательности декаплирования составным импульсом (CPD – Composite Pulse Decoupling)*, описанные в главе 9). Тщательное проектирование датчиков может также помогать, уменьшая нагревание образца, которое вызывается *электрическим* компонентом РЧ. Как при импульсном возбуждении, требуемая протяженность частоты может удерживаться на минимуме, помещая частоту декаплера *в центре области*, подлежащей декаплированию. Если ваш гетероядерный спектр показывает неожиданно широкие или даже расщеплённые резонансы, это может быть вызвано неправильной установкой частоты декаплера, и/или плохой настройкой канала декаплирования, или его неправильной калибровкой (глава 3).

Нагревание образца также может уменьшаться запиранием РЧ, когда она не существенна для эксперимента (рис. 4.9). Запирание декаплера в течение задержки восстановления *(инверсно-включаемый декаплинг*, рис. 4.9b) также удаляет ЯЭО и обеспечивает декаплированный спектр *без* усиления ЯЭО. Это происходит, потому что любой ЯЭО, который нарастает в течение времени регистрации, воздействует только на продольную намагниченность, и поэтому не влияет на детектированные (поперечные) сигналы, а затем ему позволяют затухать в течение задержки восстановления, потому что это снова не оказывает влияния. Этот метод имеет конкретное значение в наблюдении ядер с отрицательными гиромагнитными отношениями, так как ЯЭО *вызывает уменьшение* интенсивности сигнала для таких ядер (глава 8).

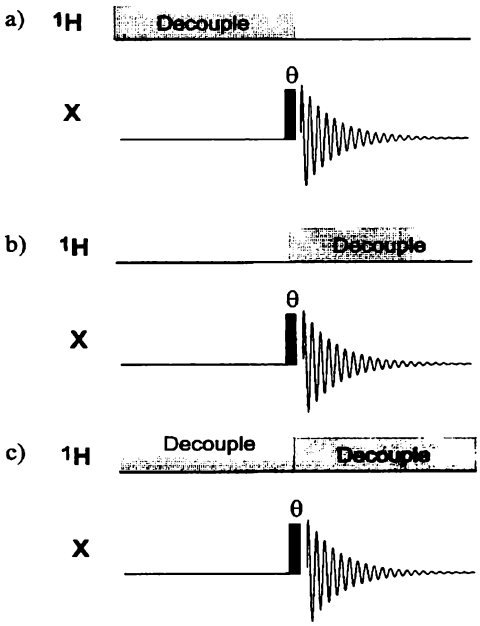
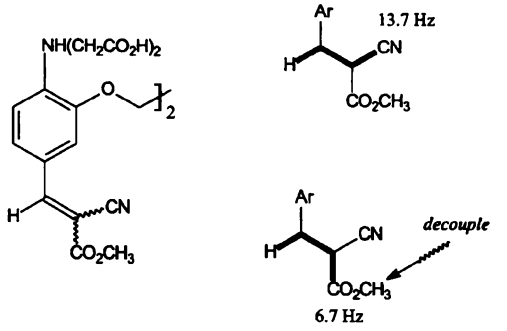


Рисунок 4.9. Возможные схемы применения протонного декаплирования при наблюдении гетероядер. (a) - управляемый декаплинг (связанный спектр с ЯЭО), (b) - инверсно-включаемый декаплинг (декаплированный спектр без ЯЭО) и (c) - декаплинг при управлямой мощности, где РЧ применятся при двух различных мощностях (декаплированный спектр с ЯЭО).

Он также используется для точных количественных измерений, как обсуждалось в предыдущем разделе. Наоборот, активирование декаплера в течение релаксационной задержки, но его выключения в течение периода регистрации *(управляемый декаплинг,* рис. 4.9a), вызывает спектр, который сохраняет спиновое взаимодействие при усилении ЯЭО. Дальнейшее развитие метода уменьшения нагревания образца обеспечивает декаплированный спектр с усилением ЯЭО и известно как *управляемый декаплинг при изменяемой мощности* (рис. 4.9c). Здесь высокая мощность декаплера применяется во время регистрации, чтобы достичь полного декаплирования, но между сканированиями применяется уменьшенная мощность, чтобы поддерживать степень насыщения, и, следовательно, создавать ЯЭО. Этот подход особенно применим к исследованиям при высоких полях, где большая ширина полосы требует относительно высоких мощностей декаплера. Сравнение этих различных схем декаплирования показывается на рисунке 4.10 для терпена альфа-пинена **4.2**.

4.2

По аналогии с гомоядерным декаплированием, описанным выше, возможно также *селективное гетероядерное* декаплирование. Декаплирование отдельного протонного резонанса могло, в принципе, идентифицировать связанных партнеров путём наблюдения коллапса мультиплетной структуры в спектре гетероспина. Это, однако, требует, чтобы декаплирующая РЧ была эффективной для *спутников* родительского протонного резонанса, которые могут быть далеко друг от друга, если J_{XH} большая. Односвязные протон-углеродные взаимодействия превышают 100 Гц, поэтому их трудно удалять, одновременно сохраняя достаточную селективность, поэтому, вероятно, двумерный гетероядерный корреляционный спектр должен оказаться более продуктивным подходом. Селективное удаление дальних (через 2 или 3 связи) протон-углеродных взаимодействий достигается легче, так как оно обычно меньше, чем 10 Гц. Пример этого показывается идентификацией конфигурационных изомеров **4.3** через измерение трёхсвязных протон-углеродных взаимодействий (рис. 4.11), которые разделяют зависимость типа Карплуса от двугранных углов связей.



4.3

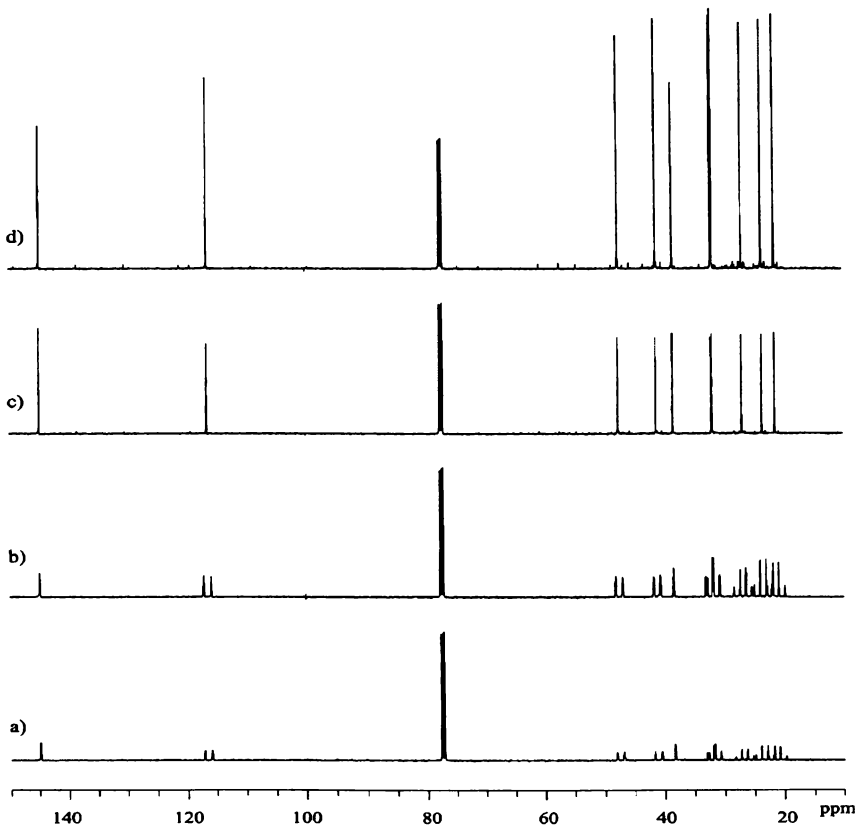


Рисунок 4.10. Спектр углерода-13 альфа-пинена, полученного (a) - без протонного облучения на любой стадии (связанный спектр без ЯЭО), (b) - с управляемым декаплингом (связанный спектр с ЯЭО), (c) - с инверсно-включаемым декаплингом (декаплированный спектр без ЯЭО) и (d) - с декаплингом при управляемой мощности (декаплированный спектр с ЯЭО). Все другие экспериментальные условия были идентичными и для каждого графика использовалось одинаковое абсолютное масштабирование.

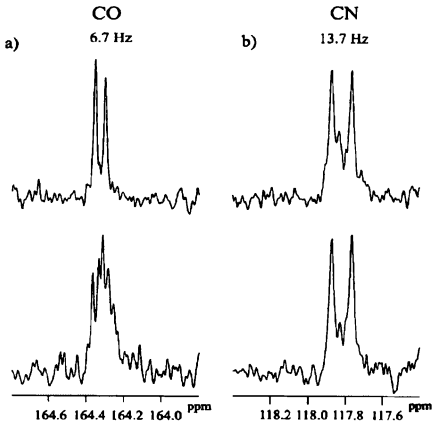
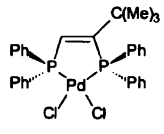
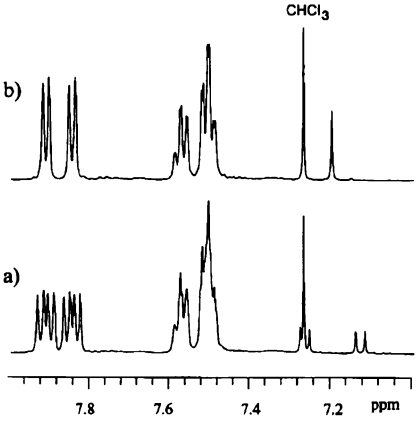


Рисунок 4.11. Применение селективного протонного декаплирования при измерении гетероядерных дальних протон-углеродных констант взаимодействия. Нижние дорожки - от полностью протон-носвязанного спектра углерода-13, и верхние трассы от тех, в которых метильные эфирные протоны **4.3** селективно декаплировались, чтобы показать взаимодействие через три связи карбонильного углерода через алкен.

Рисунок 4.12. Упрощение обычного протонного спектра (a) - фосфина палладия **4.4** в $CDCl_3$ применением широкополосного фосфорного декаплинга. (b) - Все дальние ^{1}H-^{31}P взаимодействия удаляются, как наиболее заметно для протона алкена (7,2 м.д.) и *орто*-протонов фенильных колец (более чем 7,8 м.д.)



4.4



Величина протонных взаимодействий с углеродными атомами нитрила и сложного эфира через алкен, следовательно, указала бы их относительную стереохимию, но в то время как взаимодействие нитрила представляло чистый дублет в содержащем взаимодействия с протонами спектре ^{13}C, взаимодействие карбонила маскировалось дополнительными взаимодействиями через три связи с эфирными метильными протонами. Селективное декаплирование этих метильных протонов устранило эту интерференцию, вызывая дублет карбонила, достаточный для идентификации нитрила как расположенного *транс* к протону алкена.

$^{1}H\{X\}$ декаплирование

Спектрометры ФП традиционно строились со способностью декаплировать только протоны при наблюдении гетероядер, как описано выше. Современные приборы теперь имеют способность обеспечивать импульсное воздействие на X-ядра и их декаплирование при наблюдении протонов - $^{1}H\{X\}$ («инверсная» конфигурация). Ширина полосы, требуемая для широкополосного декаплирования, например, углерода-13, далеко превышает ту, которая необходима для декаплирования протонов, и методы декаплирования составным импульсом, описываемые в главе 9, становятся существенными для успеха. Таким образом, декаплирование углерода-13 в интервале химических сдвигов более 150 м.д. (интервал, типичный для углеродов, несущих водород) при 400 МГц-^{1}H требует ширины по-

лосы 15 кГц. Широкополосное декаплирование X-ядер наиболее часто применяется, как часть многомерной импульсной последовательности, чтобы упрощать структуры перекрёстного пика, хотя это может быть полезным инструментом при интерпретации 1D протонных спектров, когда гетероядро имеет высокое естественное содержание и, таким образом, делает существенный вклад в тонкую структуру взаимодействия, например ^{19}F или ^{31}P. Рис. 4.12 демонстрирует упрощение ^{1}H спектра фосфина палладия **4.4** при применении широкополосного декаплирования ^{31}P, и эта процедура часто помогает при интерпретации мультиплетных структур или извлечении гомоядерных протонных взаимодействий. Аналогично, если известны химические сдвиги X-ядра, может использоваться *селективное* X-декаплирование для идентификации связанных партнеров в протонном спектре, и в простых случаях это может служить как готовая альтернатива двумерному эксперименту гетероядерной корреляции [7].

4.3. РЕДАКТИРОВАНИЕ СПЕКТРА СПИНОВЫМ ЭХО

Основная причина применения широкополосного протонного декаплирования гетероядер - удаление структуры взаимодействия, чтобы сконцентрировать интенсивность сигнала и таким образом улучшить отношение сигнал/шум и уменьшить перекрывания резонансов (рис. 4.10 выше). Могут также возникать дополнительные улучшения, такие как увеличение сигнала от ЯЭО и прояснение любых остальных гомоядерных взаимодействий. Аргумент против этой очевидной пользы - потеря информации мультиплетности, существующей в протонносвязанном спектре (рис. 4.10a), означающая, что нет возможности *априорного* различия, например, метинового и метиленового углеродных резонансов. Поэтому желательно уметь регистрировать полностью протоннодекаплированные спектры, все же еще сохраняя ценные данные мультиплетности. Некоторые из самых ранних многоимпульсных последовательностей были спроектированы для достижения этой цели. Они основываются на простых спиновых эхо и обеспечивают спектры, в которых мультиплетности кодируются как интенсивности сигналов и их знаки. Несмотря на конкуренцию со стороны методов, основанных на переносе поляризации, которые будут кратко описаны ниже, эти методы ещё находят широкое использование в лабораториях органической химии. Поскольку они также довольно простые для понимания, они обеспечивают подходящее введение в идею редактирования спектров по мультиплетности. Последующие разделы используют векторную модель вращающейся системы координат для иллюстративного объяснения действия экспериментов, поэтому предполагается близкое знакомство с введением в главе 2.

4.3.1. J-модулированное спиновое эхо

Один из простейших подходов к редактированию - J-модулированная последовательность спин-эхо [17] (рис. 4.13a, также упоминаемая как SEFT, **S**pin-**E**cho **F**ourier **T**ransformation [18]), которые можно легко оценить, опираясь на векторную модель. Ключ к пониманию этой последовательности - понимание, что эволюция углеродных векторов намагничивания под влиянием $^{1}J_{CH}$ взаимодействия происходит только тогда, когда выключается протонный декаплер, в то время как во всё остальное время действуют только углеродные химические сдвиги. Дальнейшее упрощение приходит от полного игнорирования углеродных химических сдвигов, так как эволюция сдвига в течение первого периода точно рефокусируется в течение второго 180° (^{13}C) рефокусирующим импульсом (см. раздел 2.2).

---

[7] Фактически, этот подход использовался, чтобы идентифицировать резонансные частоты гетероядер до появления методов импульсного ФП [7], который сделал возможным их прямое наблюдение. Таким образом, протонный спектр регистрировался в то время, когда второе РЧ поле применялось к гетероядру Последовательно продвижение частоты декаплера при повторении измерений, в конечном счёте, указало бы положение X резонанса, когда наблюдалось бы исчезновение из протонного спектра взаимодействия X-^{1}H.

Таким образом, чтобы понять эту последовательность нужно рассматривать влияние гетероядерного взаимодействия только в течение первого периода.

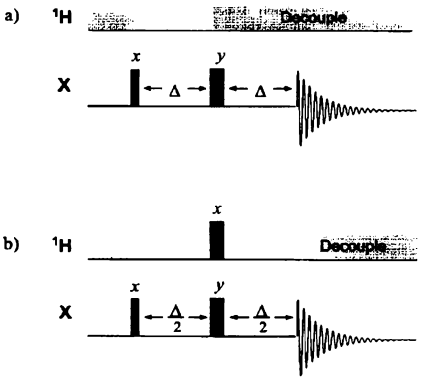


Рисунок 4.13. Последовательности J-модулированного спинового эхо. (a) - Вариант управляемого декаплинга и (b) импульсный вариант.

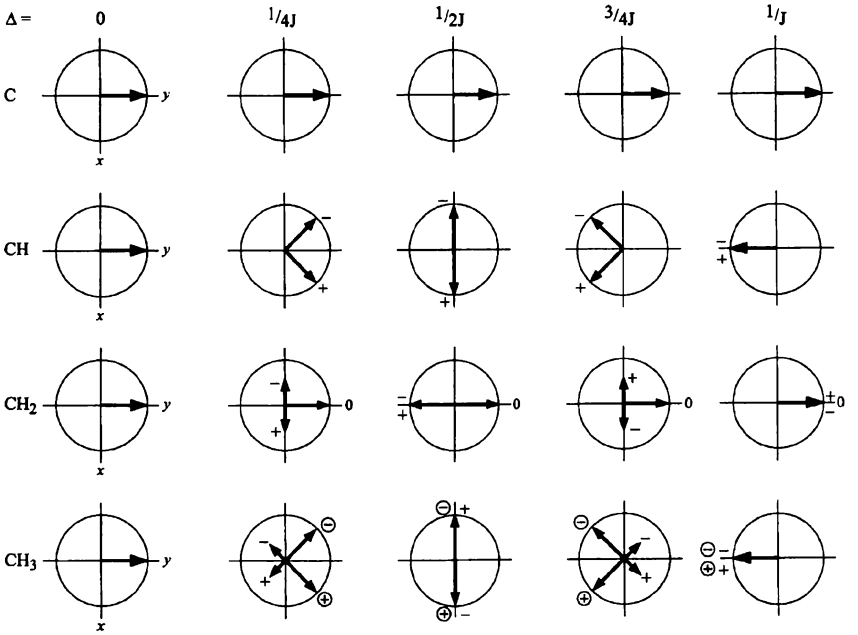


Рисунок 4.14. Эволюция углеродных векторов намагничивания под влиянием протон-углеродных взаимодействий.

Рассмотрим события при Δ = 1/J с, для чего уместная эволюция вектора для различных мультиплетностей показана на рисунке 4.14. Так как химические сдвиги не играют никакой роли, четвертичные углероды остаются стационарными вдоль +y в течение Δ (дальнее C-H взаимодействие, которое может существовать, будет гораздо меньшим, чем односвязное взаимодействие, и может считаться незначительным). Векторы дублета для метиновой пары развиваются со скоростью ±J/2 Гц, поэтому каждый из них будет поворачиваться на половину цикла за 1/J секунд и, следовательно, встречаются снова вдоль оси -y. Поскольку они теперь имеют 180° разность фаз относительно четвертичных сиг-

налов, они будут в результирующем спектре, в конечном счете, появляться инвертированными. Применение этих аргументов к другим мультиплетам показывает, что метиленовые векторы, развивающиеся со скоростью ±J Гц выравниваются вдоль +y, в то время как метильные векторы, развивающиеся со скоростями ±J/2 и ±3J/2 Гц закончатся вдоль -y. В более общем виде, определяя угол θ так, что θ = 180JΔ градусов, интенсивности сигналов углеродных мультиплетностей - I, изменяются согласно условиям:

C:	$I = 1$
CH:	$I \sim \cos\theta$
CH_2:	$I \sim \cos^2\theta$
CH_3:	$I \sim \cos 3\theta$

как показано на рисунке 4.15. Спектр для Δ = 1/J с (θ = 180°), следовательно, отобразит сигналы четвертичных и метиленовых углеродов положительными, а метиновых и метильных отрицательными, при фазировании, как для одноимпульсного углеродного спектра (рис. 4.16b), хотя отредактированные спектры часто представляются с положительными метиновыми резонансами и отрицательными метиленовыми. Углеродные мультиплетности, следовательно, кодируются интенсивностями сигналов и, по крайней мере, некоторая информация мультиплетности, потерянная в одноимпульсном

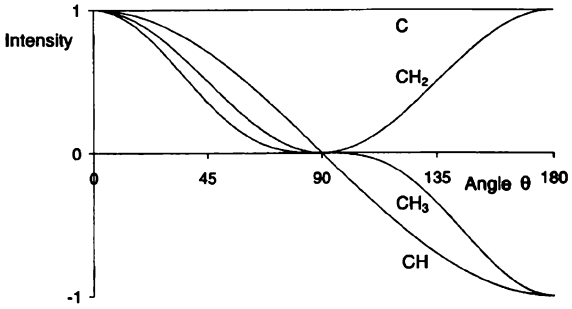


Рисунок 4.15. Изменение интенсивностей углеродного сигнала в J-модулированном спиновом эхо как функция времени эволюции (θ = 180JΔ°).

углеродном эксперименте, восстанавливается, одновременно имея преимущество декаплирования резонансов. Применение протонного декаплирования в течение всего времени, кроме короткого периода Δ, также будет гарантировать получение спектров с усилением от ЯЭО. Установка Δ = 1/2J секунд соответствует нулю для всех протонированных углеродов (рис. 4.15), таким образом, создавая спектр только четвертичных атомов (рис. 4.16c). Точность редактирования ясно критически зависит от правильной установки Δ, которая, в свою очередь, зависит от J, и так как, вероятно, в образце должно иметься широкое множество величин J, вынуждены принимать некоторую компромиссную установку для Δ. Односвязные протон-углеродные взаимодействия лежат между 125 и 250 Гц, хотя чаще они имеют значения между 130 и 170 Гц (Таблица 4.2), поэтому типичное значение для Δ должно быть ≈7 мс ($1J_{CH}$ ~ 140 Гц), когда ожидается присутствие ароматики и углеродных центров, несущих электроотрицательные гетероатомы. Если взаимодействия оказываются далеко от выбираемого значения, соответствующий резонанс может показывать неожиданное и потенциально запутывающее поведение. Алкиновые углероды особенно склонны к этому, вследствие исключительно большого значения $^1J_{CH}$.

Эксперимент спинового эхо очень простой в постановке, поскольку он не требует протонных импульсов или их калибровки, желательное свойство, когда эксперимент вводился впервые, но не имеет больших последствий в настоящее время. Те же самые результаты могут, фактически, получаться применением протонных 180° импульсов, а не выключением декаплера [19] (рис. 4.13b).

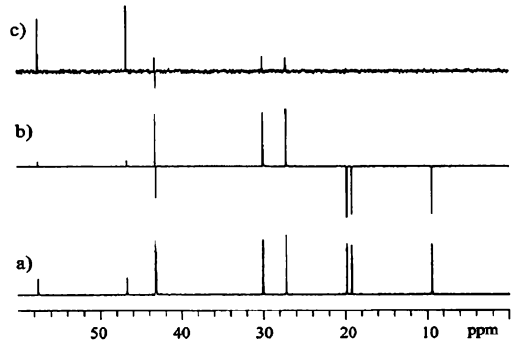


Рисунок 4.16. Углеродный спектр камфоры **4.1**, отредактированный последовательностью J-модулированного спинового эхо. (a) Обычный углеродный спектр (карбонил не показан), и отредактированные спектры с (b) $\Delta = 1/J$ ($\theta = 180°$) и (c) $\Delta = 1/2J$ ($\theta = 90°$) секунд, предполагая, что J равно 130 Гц. Некоторый прорыв протонированных углеродов наблюдается в (c), благодаря изменениям в константах взаимодействия в молекуле.

Таблица 4.2. Типичные интервалы протон-углеродных констант взаимодействия через одну связь.

Окружение углерода	Типичный интервал $^1J_{CH}$ (Гц)
Алифатический CH_n	125-135
Алифатический CH_nX (X = N, O, S)	135-155
Алкен	155-170
Алкин	240-250
Ароматика	155-165

В этом случае период расщепляется на два периода 1/2J, разделённых одновременным применением протонных и углеродных 180° импульсов. Они служат, чтобы рефокусировать углеродные химические сдвиги, но, одновременно, позволять продолжать развиваться взаимодействиям в течение второго $\Delta/2$ периода (Раздел 2.2). Следовательно, полный период эволюции, в течение которого взаимодействие активно - 1/J, как в эксперименте управляемого декаплирования, описанном выше, и производятся идентичные модуляционные фрагменты. Короче, это импульсная форма гетероядерного спинового эхо, которая широко используется в многочисленных импульсных последовательностях для рефокусирования эволюции сдвига, при сохранении эволюции взаимодействий.

4.3.2. Тест присоединённых протонов (APT – 'Attached Protons' Test)

Основное неудобство J-модулированного спинового эхо, описанного выше, - применение 90° углеродного возбуждающего импульса, который, как обсуждалось в разделе 4.1, не является оптимальным для усреднения сигнала и может вести к насыщению сигналов, особенно четвертичных центров. Предпочтительный подход, использующий ширину возбуждающего импульса несколько меньше, чем 90°, требует небольшой модификации J-модулированного эксперимента, приводя её к последовательности APT (тест присоединённых протонов) [20] (рис. 4.17). Применение возбуждающего импульса малого угла отклонения оставляет компонент намагничивания вдоль +z оси, которая инвертируется следующим 180° (^{13}C) импульсом. В системах с медленно релаксирующими спинами этот инвертированный компонент может отменять намагниченность, возникающую от релаксации поперечных компонентов, оставляя маленький или никакой чистый сигнал для наблюдения в последующих цик-

лах. Поэтому необходимо добавлять дальнейший 180° (^{13}C) импульс, который возвращает проблематичный -z компонент к +z перед регистрацией, таким образом, устраняя возможную отмену. Поперечные компоненты также испытывают 180° вращение до детектирования, но иначе не затрагиваются вне этой фазовой инверсии. Эксперимент APT обычно используется с углами возбуждения 45° или меньше и поэтому лучше годится для усреднения сигнала, чем основная последовательность эхо, описанная выше, но даёт подобные результаты редактирования.

Плохая точность редактирования спиновых эхо в присутствии широкого диапазона величин J и неспособность полностью характеризовать все углеродные мультиплетности - главные ограничения этих методов. Более сложные изменения импульсного J-модулированного спинового эхо должны быть найдены, которые позволяют полное разложение углеродных спектров на C, CH, CH_2 и CH_3 подспектры [21], и, которые также показывают большую терпимость к изменениям $^1J_{CH}$ [22].

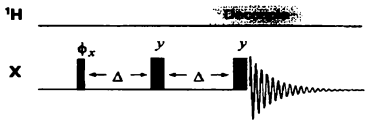


Рисунок 4.17. Последовательность теста присоединённых протонов (APT).

Аналогично, разработаны J-компенсированные последовательности APT для большей терпимости к разбросу величин J [23] и для прямой генерации полных подспектров [24]. Неизменно, простейшие последовательности всё ещё находят самое широкое применение.

4.4. УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И РЕДАКТИРОВАНИЕ СПЕКТРА

Одно из основных беспокойств для химика, использующего спектроскопию ЯМР, - относительно плохая чувствительность методики по сравнению с другими аналитическими методами, которая происходит от малых разностей энергий и, следовательно, малых разностей заселенностей между спиновыми состояниями. Разработки, которые обеспечивают увеличенную интенсивность сигнала относительно фонового шума - постоянная цель исследований в сообществе ЯМР, будь то в проектировании аппаратуры ЯМР непосредственно, или в создании новых импульсных методик и методов обработки данных. Продолжающаяся разработка более высокополевых магнитов ясно делает вклад в выигрыш в чувствительности, и сопровождается прочим прогрессом приборов. Кроме этих разработок, оптимальная чувствительность обеспечивается выбором вида ядра наблюдения, обладающего самым сильным сигналом, как определяется свойственной чувствительностью ядра и его естественным содержанием. Свойственная чувствительность зависит от гиромагнитного отношения спина γ тремя способами, с большим γ, дающим вклад в:

- высокую резонансную частоту, которая, в свою очередь, подразумевает большую разность энергии перехода, и, следовательно, большую разность заселенностей Больцмана,
- высокий магнитный момент и, следовательно, в более сильный сигнал, и
- *высокую скорость* прецессии, которая индуцирует больший сигнал в катушке детектирования (точно так же, как более быстрое вращения динамо велосипеда вызывает более яркий свет лампы).

Таким образом, обычно, интенсивность сигнала ЯМР пропорциональна γ^3 для одиночного ядра, но поскольку сам шум увеличивается с квадратным корнем частоты наблюдения [25], отношение сигнал/шум растёт как $\gamma^{5/2}$. Заметьте также, что, поскольку оба из вышеупомянутых выражений зависят от резонансной частоты, отношение сигнал/шум для одиночного ядра растёт с постоянным полем согласно $B_0^{3/2}$ (при всех других равных условиях). Когда больше, чем один нуклид вовлекается в по-

следовательность, можно вывести общее выражение для отношения сигнал/шум одномерного эксперимента:

$$\frac{S}{N} \propto NAT^{-1}B_0^{3/2}\gamma_{exc}\gamma_{obs}^{3/2}T_2^*(NS)^{1/2} \qquad (4.2)$$

где N - число молекул в наблюдаемом объёме образца, A - член, который представляет распространённость активных спинов ЯМР, вовлеченных в эксперимент, T - температура. B_0 - постоянное магнитное поле, γ_{exc} и γ_{obs} представляют гиромагнитные отношения первоначально возбужденных и наблюдаемых спинов, соответственно, T_2^* - эффективное время поперечной релаксации, и NS - общее число выполненных сканирований. Высокое гиромагнитное отношение протона, в дополнение к его 100% распространённости (и вездесущность), объясняет, почему наблюдение протонов предпочитается в ЯМР высокого разрешения. Действительно, многие из недавно разработанных многоимпульсных гетероядерных экспериментов используют прямое наблюдение протонов, чтобы достичь большей чувствительности, в то время как гетероядерный спин наблюдается косвенно, как описано в главе 6. Этот раздел имеет дело с теми широко используемыми одномерными импульсными методами, которые помогают при *прямом наблюдении* ядер относительно низких значений γ, здесь называемых X-ядрами, например, ^{13}C, ^{15}N, ^{29}Si и так далее. Эти методы характеризуются начальным возбуждением спина высокого γ, обычно ^1H, ^{19}F или ^{31}P, сопровождаемым *переносом поляризации* к ядру низкого γ, с которым оно скалярно спин-спиново связано. Этот процесс вводит γ_{high} как γ_{exc} выражение в равенстве 4.2 вместо γ_{low}, и таким образом обеспечивает повышение чувствительности с коэффициентом $\gamma_{high}/\gamma_{low}$.

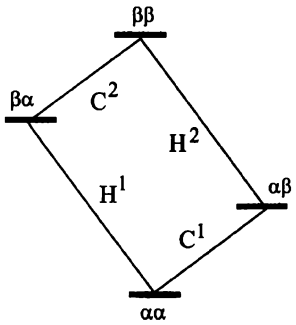


Рисунок 4.18. Схематическая диаграмма энергетических уровней для двухспиновой ^1H-^{13}C системы. Два перехода для каждого ядра соответствуют двум линиям в каждом дублете.

Как рассматривалось в предыдущем разделе, и будет рассматриваться полностью в главе 8, существенные усиления ядер низких γ могут получаться при насыщении, например, протонов, вследствие ЯЭО. Этот эффект, однако, может быть неподходящим для ядер, которые обладают отрицательным γ, так как тогда ЯЭО *вызывает уменьшение* интенсивности сигнала и, в худшем случае, может привести к полной потере сигнала. Методы переноса поляризации не страдают от таких неудобств и, во многих случаях способны обеспечивать значительно большие усиления, чем один ЯЭО. Кроме того, эти эксперименты обеспечивают другие средства для редактирования мультиплетности спектров и позволяют различие групп, которые обладают различными числами присоединённых ядер. Способность редактировать углеродные спектры и, следовательно, отличать четвертичные, метиновые, метиленовые и метильные группы предлагает альтернативу методам спинового эхо предыдущего раздела, и эти методы переноса поляризации, в частности эксперимент DEPT, стали обычными экспериментами в репертуаре химика-органика. С методами, которые касаются редактирования мультиплетности протонных спектров, преимущественно имеют дело в главе 6.

4.4.1. Перенос поляризации

Методы переноса поляризации увеличивают интенсивность сигнала, перенося больше разности заселенностей спинов высоких γ на их спиновосвязанных партнеров с низким γ. Через это они заменяют одну из трёх γ_{low} зависимостей интенсивности сигнала, описанные выше как γ_{high}, приводя к усилению сигнала с коэффициентом ($\gamma_{high}/\gamma_{low}$). Принципы всех методов переноса поляризации можно понять, рассматривая скалярно связанную пару спинов 1/2, в качестве которой для иллюстрации здесь взята пара ^1H-^{13}C, где *оба спина имеют распространённость 100%*, чья диаграмма энергетических уровней показана на рисунке 4.18. При тепловом равновесии заселенности для каждого из четырёх спиновых переходов подчиняются закону Больцмана, как представлено на рисунке 4.19a. Отсюда *разности заселенностей* через переходы - 2ΔH и 2ΔC для протонных и углеродных спинов соответственно, и так как они линейно масштабируются с γ, отношение 2ΔH/2ΔC равно γH/γC или ≈4. Резонансные интенсивности для протона, таким образом, в четыре раза больше, чем для углерода, если судить по этим заселенностям (рис. 4.19b). Теперь рассмотрим результат *селективного инвертирования одной линии* дублета H-спина, скажем H^1, (например, слабым селективным импульсом), который равен инвертированию разности заселенностей через соответствующий переход (рис. 4.19c). Так как H^2 остаётся незатронутым, разность заселенностей через переход H^2 не отличается от разности до инверсии. Характерный момент в том, что обе разности заселенностей C-спинов теперь изменяется этим процессом. Таким образом, разность заселенностей C^1 становится 2ΔH+2ΔC, в то время как разность C^2 - 2ΔH+2ΔC, и разности заселенностей, ранее связанные с протонами, передаются углеродам.

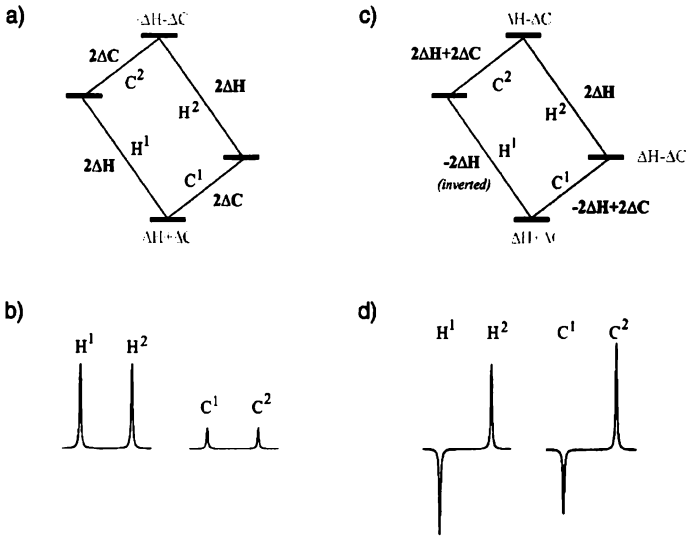


Рисунок 4.19. Перенос поляризации в двухспиновой системе. (a) - Заселенности (серого цвета) и разности заселенностей (жирный шрифт) для каждого перехода при равновесии и (b) - соответствующие спектры, полученные последующим импульсным возбуждением, показывают четырехкратную разность заселенностей (см. текст). (c) - Ситуация после селективной инверсии половины протонного дублета и (d) - соответствующие спектры, показывающие улучшенную интенсивность углеродных резонансов.

Так как 2ΔH в четыре раза больше, чем 2ΔC, C-переходы покажут относительные интенсивности – 3,5, так что регистрация углеродной намагниченности на этом этапе производила бы спектр с инвер-

тированной половиной дублета и с интенсивностями сигналов большими, чем в углеродном спектре после одиночного импульса (рис. 4.19d). Для пары ^1H-^{15}N интенсивности сигналов после переноса поляризации от протонов составляют +11 и -9, ($\gamma_H/\gamma_N \approx 10$) и увеличение сигнала даже более внушительно. Так как половина заселенностей H-спинов инвертирована, но интенсивности линий не подвергаются воздействию, не произошло никакого *чистого* переноса намагничивания от протона к углероду. *Интегральная интенсивность* всего углеродного дублета остаётся такой же, как в отсутствие переноса поляризации, так что мы говорим, что был *дифференциальный* перенос поляризации.

Эксперимент, описанный выше, называется *селективным переносом заселённости* (SPT), или более точно, в этом случае, с инверсией протонного спина, - *селективной инверсией заселённости*, (SPI). Важно отметить, однако, что полная инверсия спиновых заселённостей не является требованием для проявления эффекта SPT. Любого *неравного возмущения* линий в мультиплете будет достаточно, для того чтобы, например, насыщение одной линии протона также изменило бы интенсивности углеродного резонанса. В экспериментах переноса гетероядерной поляризации (заселенности), это связанные с гетероспином спутники родительского протонного резонанса, который должен подвергаться возмущению, чтобы индуцировать SPT. Эффект не ограничивается гетероядерными системами и может появляться в протонных спектрах, когда гомоядерно-связанные мультиплеты подвергаются несимметричному насыщению. Рисунок 4.20 иллюстрирует эффект селективного, но неравного насыщения двойного дублета и показывает результирующие искажения интенсивности в мультиплетной структуре связанного с ним партнера, которые наиболее очевидны в разностном спектре. Несмотря на эти искажения, интегральная интенсивность протонного мультиплета не подвергается воздействию присутствием SPT по причине равных положительных и отрицательных вкладов (см. рисунок. 4.19d). Искажения такого сорта имеют конкретную причастность к эксперименту разностного ЯЭО, описанному в главе 8.

Самое большое ограничение SPI эксперимента - его недостаток общности. Хотя он достигает желательного переноса поляризации, он способен производить его только для одного резонанса в спектре одновременно. Чтобы выполнить его для всех, можно было бы поочерёдно неоднократными шагами проходить через спектр, инвертируя спутники один за другим, и, выполняя отдельный эксперимент при каждом шаге.

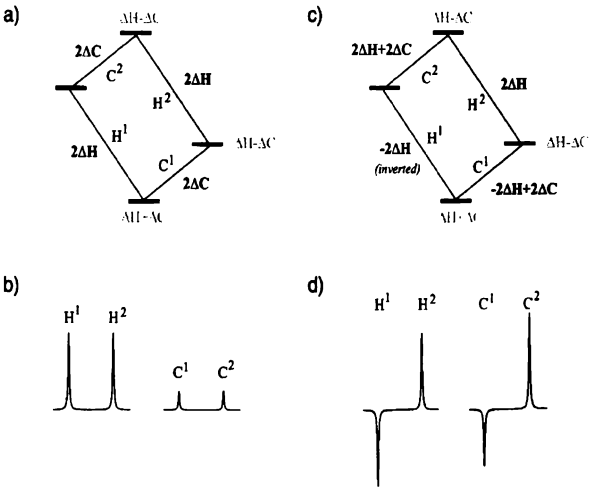


Рисунок 4.20. Селективный перенос заселённости (SPT) искажает интенсивности протонного мультиплета, когда резонанс связанного партнера насыщается неравномерно (b). Эти возмущения более очевидны в разностном спектре (c), когда невозмущённый спектр (a) вычитается.

Ясно, более продуктивно было бы инвертировать половину каждого протонного дублета одновременно для всех резонансов в одиночном эксперименте и именно этого достигает последовательность INEPT.

4.4.2. INEPT

Эксперимент INEPT [26] (Нечувствительные Ядра, улучшенные Переносом поляризации) является одним из предшественников многих импульсных ЯМР экспериментов, разработанных в течение последующих лет, и еще составляет особенность некоторых из наиболее широко используемых многомерных экспериментов в современном импульсном ЯМР. Его цель - позволять *неселективный* перенос поляризации между спинами, и его действие можно легко понять, опираясь на векторную модель. Наиболее часто в роли исходного ядра используется протон, и это обсуждение везде будет касаться спиновых систем XH, хотя следует помнить, что любое ядро спина 1/2 высокого γ представляет собой подходящий источник.

Последовательность INEPT (рис. 4.21a) обеспечивает метод для инвертирования половины каждого XH дублета способом, который не зависит от его химического сдвига, требующий применения только неселективных импульсов. Последовательность начинается с возбуждения всех протонов, которые затем эволюционируют под действием химического сдвига и гетероядерного взаимодействия с X-спином. После периода Δ/2, протонные векторы испытывают 180° импульс, который служит для рефокусирования эволюции химического сдвига (и неоднородности поля) в течение второго Δ/2 периода. Одновременное применение 180° (X) импульсов будет гарантировать, что гетероядерное взаимодействие будет продолжать развиваться, инвертируя знак прецессии протонного вектора. Это опять последовательность спин-эхо, в которой требуется рассмотрение только эволюции взаимодействия. Для XH пары полный Δ период 1/2J (Δ/2 == 1/4J) оставляет два протонных вектора расположенными противоположно, или *антифазно* вдоль ±x, *так что* последующий 90°$_y$ (H) импульс выравнивает их по ±z-оси (рис. 4.22). Это, следовательно, соответствует желательной инверсии половины протонного дублета, как для SPI, но для всех спиновых пар одновременно. 90° (X) импульс регистрирует вновь созданные разности заселенностей, чтобы производить улучшенный спектр. На практике эти последние два импульса применяются одновременно, хотя в этом иллюстрированном представлении оказывается удобнее рассматривать протонный импульс, как происходящий сначала.

Асимметричные интенсивности пиков, произведённые эффектом SPI, -3 и +5 для пары CH, возникают из вклада природной намагниченности X-спина, которые могут удаляться применением простого фазового цикла.

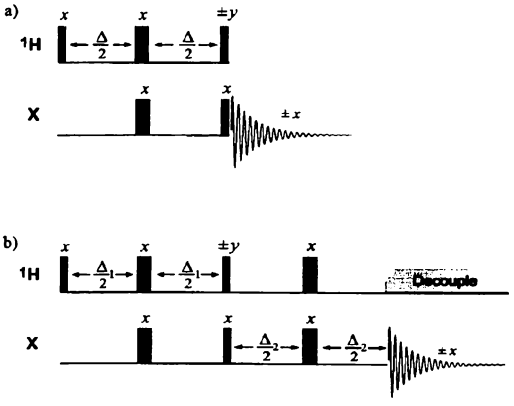


Рисунок 4.21. (a) - Последовательность INEPT и (b) - рефокусированная последовательность INEPT.

Таким образом, повторяя эксперимент с фазой последнего протонного импульса при *-y* вызывает инвертированное расположение антифазных линий относительно *+y* эксперимента, то есть то, что было -z, теперь становится +z, и наоборот (рис. 4.23). Результирующие дублеты X-спина инвертируются аналогично, хотя природное X-намагничивание, не обращая внимания на протонный импульс, не изменяется. Вычитание двух экспериментов, инвертируя фазу приёмника, вызывает сложение вклада переноса поляризации, но отменяет природное намагничивание (рис. 4.24). Этот двухступенчатый фазовый цикл - основной цикл, требуемый для INEPT. Поскольку этим процессом сохраняется только компонент переноса поляризации, особенность чистых экспериментов переноса поляризации - отсутствие откликов от ядер, не имеющих существенного протонного взаимодействия.

Рефокусированный INEPT

Одна проблема основной описанной выше последовательности INEPT в том, что она устраняет применение протонного спинового декаплирования в течение регистрации ССИ X-спина. Так как это удаляет его J-расщепление, это будет вызывать совпадение антифазных линий и их отмену, не оставляя никакого наблюдаемого сигнала.

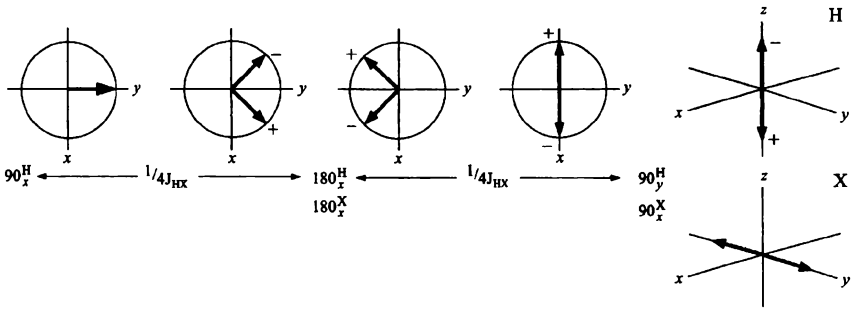


Рисунок 4.22. Эволюция протонных векторов в течение последовательности INEPT После начальной эволюции под J_{XH}. Импульс 180° (H) поворачивает векторы относительно оси x, а импульс 180° (C) инвертирует их знак прецессии. После полного периода эволюции $1/2J_{HX}$ векторы оказываются антифазными и впоследствии ориентируются по ±z оси $90°_{y}$ (H) импульсом. Это производит желательную инверсию одной половины каждого H-X дублета для всех резонансов.

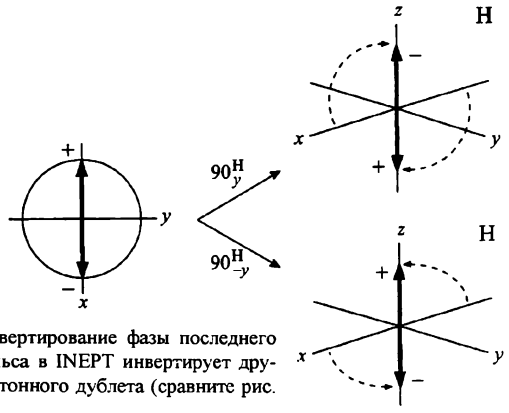


Рисунок 4.23. Инвертирование фазы последнего протонного импульса в INEPT инвертирует другую половину протонного дублета (сравните рис. 4.22).

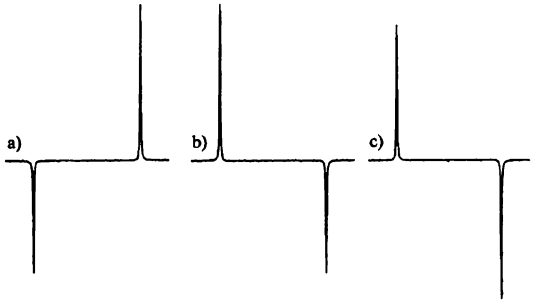


Рисунок 4.24. Экспериментальные углерод-13 спектры INEPT муравьиной кислоты, записанные с фазой последнего протонного импульса установленной в (a) по *y* и в (b) по -y. Вычитание этих двух наборов данных (c) отменяет природное намагничивание, которое не генерировалось переносом поляризации и уравнивает интенсивности двух линий.

Добавление дальнейшего периода Δ_2, после переноса поляризации позволяет рефокусировать намагничивание X-спина под влиянием XH взаимодействия, давая последовательность *рефокусированного-INEPT* [27] (рис. 4.21b), результаты которой иллюстрируются на рисунке 4.25. Опять период рефокусировки применяется в виде спинового эхо для удаления зависимости химического сдвига, и для XH системы соответствующий период для полного рефокусирования - снова 1/2J. Так как теперь рефокусируется намагничивание X-спина, необходимо рассматривать взаимодействие со всеми присоединёнными протонами. Выбор Δ_2 = 1/2J - не подходит для ядер, связанных с больше чем одним протоном, и не ведет к правильному рефокусированию векторов, вместо этого они остаются антифазными и не производят никакого сигнала при декаплировании (это основная идея как можно использовать INEPT для редактирования спектра). Показано [28], что для оптимальной чувствительности, рефокусирующий период для XH_n группы требует, чтобы:

$$\Delta_2 = \frac{1}{\pi J}\sin^{-1}\left(\frac{1}{\sqrt{n}}\right) \qquad (4.3)$$

где угловое выражение должно вычисляться в радианах. Для углеродной спектроскопии это соответствует 1/2J, 1/4J и секунд ≈ l/5J для CH, CH_2 и CH_3 группы, соответственно.

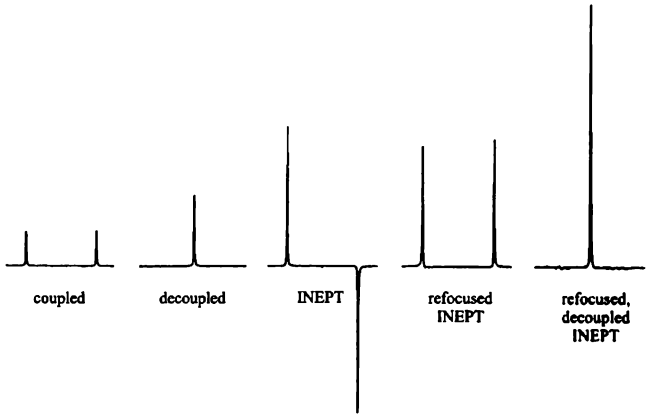


Рисунок 4.25. Экспериментальные спектры углерода-13 муравьиной кислоты, полученные с INEPT и без него, иллюстрирующие прирост интенсивности, возникающий из переноса поляризации.

Если все мультиплетности должны наблюдаться одновременно, применяется компромиссная установка ≈1/3,3J, которая для предполагаемого взаимодействия 140 Гц дает Δ_2 = 2,2 мс. Спектр, зарегистрированный при этих условиях, но без протонного декаплирования, покажет значительные фазовые ошибки, так как период рефокусирования не будет оптимальным для всех мультиплетностей; такие ошибки, однако, удаляются протонным декаплированием.

В случаях, когда интересует XH взаимодействие тонкой структуры, и протонное декаплирование не применяется, относительные интенсивности линии в мультиплетах будут искажаться относительно связанного спектра без переноса поляризации, и это одно потенциальное неудобство показанных выше последовательностей INEPT. Даже с подавлением вклада от природной намагниченности X-спина аномалии интенсивностей остаются для групп XH_n при n> 1 (рис. 4.26). Потенциально запутывающая особенность - исчезновение центральной линии XH_2 мультиплетов. Одна из последовательностей, предложенных для создания обычных интенсивностей в мультиплетах – «INEPT4+», содержащая рефокусированный INEPT с дополнительным «чистящим» протонным импульсом, чтобы удалять компоненты намагниченности, ответственные за аномалии интенсивности [29]. На практике предпочитаются последовательности, основанные на DEPT, описанные ниже, так как они показывают большую терпимость к экспериментальной расстройке.

Наконец заметьте, что эти обсуждения INEPT предполагают эволюцию намагничивания, подвергаемого преобладающему влиянию взаимодействия между спинами X и H, считая все другие взаимодействия пренебрежимо малыми. В ситуациях, где гомоядерное протонное взаимодействие становится существенным ($J_{HH} \geq \approx 1/3\ J_{HX}$), необходимо изменять Δ_1 период для оптимальной чувствительности, и аналитические выражения для этого выведены в [30]. Такие соображения наиболее вероятно существенны для переноса поляризации от протонов через дальние взаимодействия, то есть, когда протоны не связаны прямо с гетероядром. Примеры могут включать взаимодействия с третичными азотами, четвертичными углеродами или с фосфором. В некоторых случаях ситуация может значительно упрощаться, если гомоядерные взаимодействия удаляются применением *селективного* протонного декаплирования в течение протонного периода эволюции Δ_1 [31]. Рис. 4.27 иллюстрирует регистрацию ^{15}N спектров аденозин-5'-сульфата **4.5** переносом поляризации через

	(a)	(b)	(c)
CH	1 1	-3 +5	-1 1
CH_2	1 2 1	-7 2 +9	-1 0 1
CH_3	1 3 3 1	-11 -9 15 13	-1 -1 1 1

Рисунок 4.26. Относительные интенсивности линий мультиплетов в связанных спектрах INEPT. (a) - обычные интенсивности мультиплетов, и интенсивности с INEPT - (b) и без него (c) - с подавлением природного намагничивания.

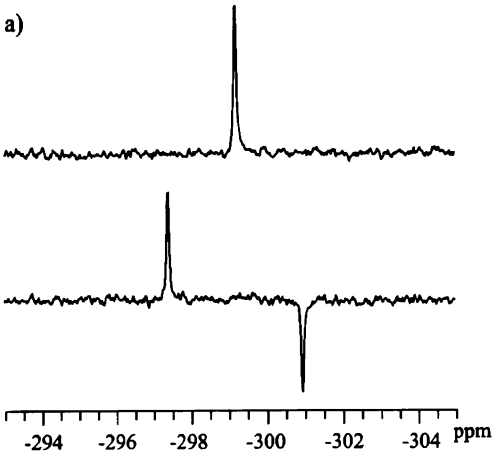
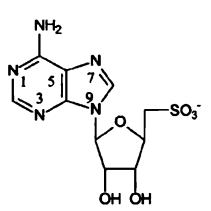
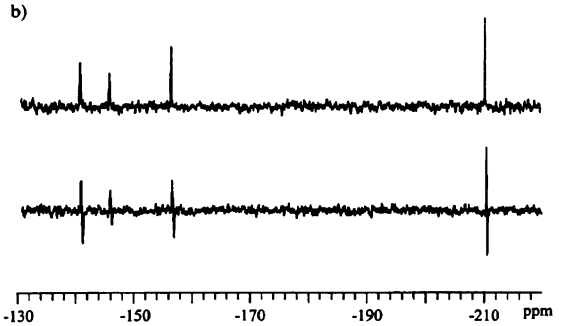


Рисунок 4.27. INEPT спектры ^{15}N естественного содержания для аденозин-5'-моносульфата **4.5.** Нижние дорожки показывают результаты с последовательностью INEPT, а верхние трассы с последовательностью рефокусированного INEPT. Задержки рассчитывались, принимая (a) J = 90 Гц и (b) J = 10 Гц. Для (a) нижняя строка показывает этот фрагмент 1:0:-1 группы NH_2, в то время как в (b) все резонансы показывают антифазные взаимодействия ^1H-^{15}N через две связи. Спектры отсчитываются от нитрометана.



4.5



односвязные и дальние (двухсвязные) взаимодействия. Все азотные центры в пуриновом блоке наблюдаются в двух экспериментах, в которых задержки оптимизировались для J = 90 Гц и 10 Гц, значения которых предполагались для одно- и двух-связных взаимодействий, соответственно.

Повышение чувствительности

Чтобы оценивать улучшение чувствительности от применения последовательности INEPT, нужно сравнить результаты с полученными из обычного прямого наблюдения ядер низких γ. Это неизменно означает получение спектра в присутствие протонного широкополосного декаплирования, для которого увеличение сигнала будет происходить по причине ^{1}H-X ЯЭО (глава 8). Таким образом, чтобы сделать справедливое сравнение, мы должны рассматривать сигнал, возникающий от переноса поляризации относительно сигнала из наблюдения с ЯЭО, который *для XH пары* дается выражением:

$$I_{INEPT} = I_0 \left| \frac{\gamma_H}{\gamma_X} \right| \qquad I_{NOE} = \left(1 + \frac{\gamma_H}{2\gamma_C} \right) \tag{4.4}$$

Где I_{INEPT} - интенсивность сигнала после переноса поляризации, I_{NOE} интенсивность в присутствии ЯЭО, и I_0 - представляет интенсивность сигнала в отсутствие любого усиления. Заметьте, во-первых, что ЯЭО делает вклад, который *добавляет* к природному намагничиванию, и, во-вторых, по этой причине результирующая интенсивность сигнала также зависит от *знаков* гиромагнитных отношений, в то время как перенос поляризации зависит только от их модулей. ЯЭО, следовательно, *вызывает уменьшение* интенсивности сигнала для ядер с *отрицательным* гиромагнитным отношением, и может вызывать инвертирование наблюдаемого сигнала, если ЯЭО больше, чем природное намагничивание, или становиться близким к нулю, если он сравним с ним. Таблица 4.3 сравнивает теоретические *максимальные* интенсивности сигналов, которые могут ожидаться для переноса поляризации и ЯЭО от протонов к гетероядерным спинам в XH парах. Степень усиления сигнала не зависит линейно от числа присоединённых ядер источника n, использованных для переноса поляризации.

Таблица 4.3. Интенсивности сигналов для X-спина в парах ^{1}H-X, возникающие из переноса поляризации (I_{INEPT}) и из прямого наблюдения с максимальным ЯЭО (I_{NOE}).

X	^{13}C	^{15}N	^{29}Si	^{31}P	^{57}Fe	^{103}Rh	^{109}Ag	^{119}Sn	^{183}W	^{195}Pt	^{207}Pt
I_{INEPT}	3,98	9,87	5,03	2,47	30,95	31,77	21,50	2,81	24,04	4,65	4,78
I_{NOE}	2,99	-3,94	-1,52	2,24	16,48	-14,89	-9,75	-0,41	13,02	3,33	3,39

Интенсивности даются относительно получаемых прямым наблюдением в отсутствие ЯЭО (I_0).

Другими словами, усиление, ожидаемое для XH_2 группы, не удваивается по сравнению с XH группой. Хотя большие усиления возникают с большим количеством присоединённых протонов, когда используется оптимальная рефокусирующая задержка, по этому усиление для XH группы только умеренное [29].

На практике вследствие несовершенства эксперимента или других релаксационных процессов, уменьшающих величину ЯЭО (анизотропия химического сдвига для металлов в частности), цифры в таблице 4.3 могут не соответствовать, хотя они могут служить некоторым руководством при выборе наиболее подходящего метода. Результаты для гетероядер более высоких γ, таких как ^{31}P и ^{13}C, ясно сравнимы, в то время как перенос поляризации обеспечивает гораздо больший прирост для ядер с низким γ. Дальнейшее важное преимущество подхода переноса поляризации, не отражённое в цифрах таблицы 4.3, в том, что частота повторения эксперимента зависит от времён продольной релаксации *протонов*, так как интересующие заселённости происходят только от этих спинов. В противоположность, эксперимент прямого наблюдения с ЯЭО или без него, зависит от времён релаксации X-спинов, которые обычно значительно продолжительнее. Возможность более быстрого усреднения сигнала обеспечивает другое существенное улучшение чувствительности в единицу времени при использовании переноса поляризации, и на практике это свойство может быть достаточно важным, или иногда даже более важным, чем прямые улучшения чувствительности от самого переноса.

Короче говоря, методы переноса поляризации обеспечивают самую большую пользу для тех ядер, которые имеют низкие гиромагнитные отношения и медленные в релаксации. Это также предпочтительный подход к прямому наблюдению ядер с отрицательными γ, где ЯЭО может вести к общему ослаблению сигнала. Азот-15 [32] (рис. 4.28) и кремний-29 рутинно получают выгоду от методов переноса поляризации, как и наблюдение металлов. В частности, переходные металлы часто обладают очень низкими γ и чрезвычайно нечувствительны, несмотря на их иногда высокое естественное содержание, некоторые примеры представляют ^{57}Fe, ^{103}Rh, ^{109}Ag и ^{183}W.

Несмотря на эти внушительные повышения чувствительности при прямом наблюдении X-спинов, более современный подход - наблюдать X-спины *косвенно*, через связанный протон, когда возможно, что может достигаться через множество экспериментов гетероядерной корреляции. Поскольку эти методы дополнительно используют наблюдение протонов, они извлекают выгоду от дальнейшего теоретического усиления $(\gamma_{high}/\gamma_{low})^{3/2}$ над схемами X-наблюдения (см. равенство 4.2). Эти темы обсуждаются в главе 6, и должны рассматриваться как потенциально более быстрые пути получения данных для X-ядер.

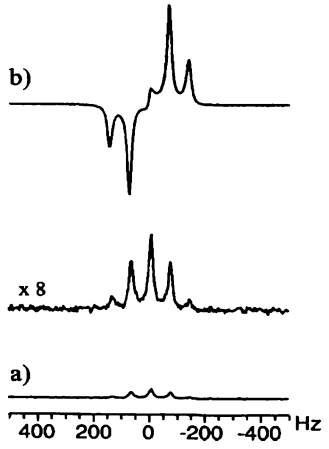


Рисунок 4.28. Увеличение сигнала ^{15}N спектра нитрата аммония при помощи INEPT. Прямое наблюдение, использующее: (a) - угол Эрнста, оптимизированный для T_1 азота, и (b) - INEPT, оптимизированный для T_1 протонов. Оба спектра получены за одно и то же полное время накопления.

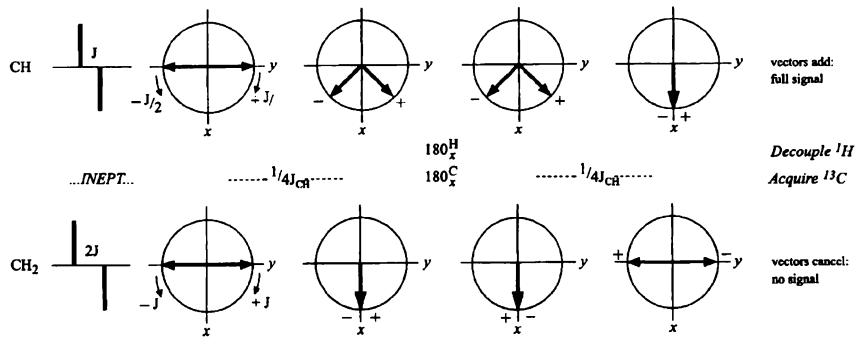


Рисунок 4.29. Редактирование с INEPT может достигаться разумным выбором рефокусирующей задержки Δ_2. Полная задержка $1/2J_{CH}$ сохраняет CH резонансы, но устраняет CH_2 (и CH_3) резонансы.

Редактирование при помощи INEPT

Возвращаясь к выбору периода Δ_2 в рефокусированной последовательности INEPT, очевидно, что в то время как период 1/2J производит полное рефокусирование дублетов, триплеты (и квартеты) остаются антифазными и будут отсутствовать в спектре, зарегистрированном с протонным декаплированием (рис. 4.29). Выбор Δ_2 = 1/2J, следовательно, даёт подспектр, содержащий только метиновые резонансы. Эта идея редактирования гетероядерных спектров согласно мультиплетностям тесно связывается с редактированием спиновым эхо, описанным в разделе 4.3. При распространении этой идеи на выбор других углеродных мультиплетностей снова удобно определять угол $\theta = 180J\,\Delta_2$ градусов, из которого интенсивности сигналов в декаплированном эксперименте:

$$\mathbf{C}: \quad \propto \mathbf{sin}\theta$$
$$\mathbf{CH_2} \quad \propto \mathbf{2sin}\theta\ \mathbf{cos}\theta$$
$$\mathbf{CH_3}: \propto \mathbf{3sin}\theta\ \mathbf{cos^2}\theta$$

как представлено графически на рисунке 4.30. Чтобы различать все протонированные углероды, достаточно регистрировать три спектра с Δ_2, настроенной, соответственно, чтобы давать θ = 45, 90 и 135 градусов. Эксперимент 90° соответствует Δ_2 = 1/2J, упомянутому выше, и, следовательно, показывает только метиновые группы, θ = 45° производит все отклики, в то время как θ = 135° снова имеет все отклики, но с инвертированными сигналами метиленовых групп. Этот процесс объединяет увеличение сигнала переносом поляризации с определением мультиплетности через редактирование спектра.

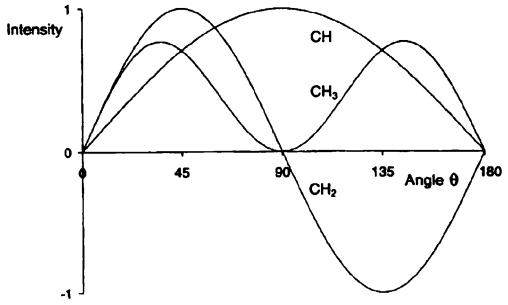


Рисунок 4.30. Изменение интенсивностей углеродного сигнала в рефокусированном эксперименте INEPT как функции времени эволюции ($\theta = 180J\Delta_2°$). Идентичные результаты получаются для эксперимента DEPT, для которого угол θ представляет угол отклонения последнего протонного импульса.

Достижимое здесь редактирование превосходит то, что обеспечивается основными методами спинового эхо из раздела 4.3, так как сравнение трёх спектров INEPT позволяет определять мультиплетность всех резонансов в спектре. Однако в обычной спектроскопии углерода-13 эта информация имеет тенденцию получаться не из INEPT, а из связанной с ней последовательности DEPT, которая имеет лучшую терпимость к несовершенствам эксперимента. Увы, DEPT не может описываться полностью рекурсией к векторной модели, и понимание INEPT даёт длинный путь к пониманию свойств DEPT.

В итоге, последовательность INEPT обеспечивает увеличение сигнала для всех протонносвязанных резонансов в одиночном эксперименте на основании переноса поляризации. Она также позволяет более быстрый сбор данных, так как частота повторения теперь диктуется быстрее релаксирующими протонами, а не гетероядром. Разумным выбором рефокусирующих задержек рефокусированный INEPT может также обеспечивать редактирование мультиплетностью, например, спектров углерода-13. Однако, те ядра, которые не разделяют протонного взаимодействия, не могут испытывать перенос поляризации, и, следовательно, отсутствуют в спектрах INEPT. Последовательность INEPT также широко используется как строительный блок в гетероядерных двумерных последовательностях, как можно увидеть в более поздних главах.

4.4.3. DEPT

Эксперимент DEPT [33] (Неискажённое усиление переносом поляризации) - наиболее широко используемый редактирующий эксперимент переноса поляризации в спектроскопии углерода-13, хотя его применение определённо не ограничивается протонно-углеродной комбинацией. Он позволяет полное определение всех углеродных мультиплетностей, как и рефокусированный INEPT, обсуждённый выше, но имеет множество отличительных преимуществ. Одно из них в том, что он непосредственно производит фрагменты мультиплетов в содержащих взаимодействия с протонами углеродных спектрах, которые соответствуют получаемым из прямого наблюдения, означая, что метиленовые углероды показывают знакомый триплет 1:2:1, а метильные углероды – квартетный 1:3:3:1 фрагмент интенсивности; отсюда и происходит термин «неискаженный». Однако для большинства применений во время регистрации применяется протонное декаплирование и мультиплетная структура не имеет никакого последствия, поэтому польза DEPT должна состоять в другом.

Последовательность DEPT

Импульсная последовательность DEPT показана на рисунке 4.31. Чтобы проследить события во время неё, еще раз рассмотрим пару ^{1}H-^{13}C, и обратим внимание, что действие двух 180° импульсов должно снова рефокусировать химические сдвиги, где необходимо. Последовательность начинается также как INEPT, 90°(H) импульсом, после чего протонное намагничивание эволюционирует под влиянием протон-углеродного взаимодействия, так что после периода 1/2J два вектора протонных спутников антифазны. Применение 90°(C) импульса на этом этапе производит новое состояние дел, которое ранее не встречалось, при котором и поперечное протонное и углеродное намагничивание развиваются когерентно. Это новое состояние называется *гетероядерная многоквантовая когерентность* (HMQC), которая обычно не может быть представлена векторной моделью, и без обращения к формализму математики невозможно строго описать её поведение.

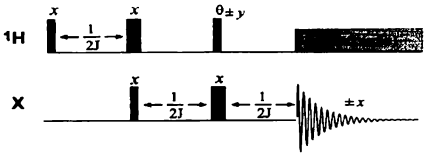


Рисунок 4.31. Последовательность DEPT

Однако для этих целей мы можем представить эту многоквантовую когерентность, объединяемую и из протонного и из углеродного намагничивания, чтобы снова разделить их несколько позже [8].

HMQC теперь эволюционирует в течение дальнейшего периода времени под влиянием протонного химического сдвига, но также и, одновременно, под влиянием углеродных химических сдвигов до тех пор, пока не применён протонный импульс θ. Однако она *не будет* подвергаться протон-углеродному взаимодействию (это другое интересное свойство многоквантовой когерентности, которого мы не будем касаться сейчас, см. главу 5). Чтобы удалить эффекты протонных химических сдвигов, второй период эволюции также устанавливается на 1/2J, и между двумя задержками применяется протонный 180° импульс, совпадающий с 90° (C) импульсом. Действие θ импульса предназначено для переноса HMQC в антифазную поперечную углеродную намагниченность, то есть, чтобы восстанавливать наблюдаемое намагничивание. Подробности результата этого процесса переноса зависят от мультиплетности углеродного резонанса. Другими словами, метиновые, метиленовые и метильные группы различно реагируют на этот импульс, и это обеспечивает основу редактирования с DEPT. В конечной задержке 1/2J углеродное намагничивание рефокусируется под влиянием протонного взаимодействия, но развивается также и согласно углеродному химическому сдвигу, поскольку это делается во второй 1/2J период. Таким образом, одновременное применение 180° (C) импульса с протонным θ импульсом ведет к общему рефокусированию углеродных сдвигов в течение конечного 1/2J периода. Углеродное намагничивание, следовательно, детектируется без химического сдвига, зависящего от фазовых ошибок, с протонным декаплированием или без него. Чередование фазы θ импульсов, в комбинации со сложением/вычитанием данных приемником, ведёт к отмене природного углеродного намагничивания, как для INEPT. Чистый результат - снова перенос поляризации от протонов к углероду, объединённому с потенциалом редактирования спектров.

Редактирование при помощи DEPT

Как намекалось выше, ключ к редактированию спектра с DEPT - понимание, что фаза и интенсивность углеродных резонансов зависят от протонного угла отклонения θ. Фактически, результаты редактирования для угла θ аналогичны произведённым рефокусированным INEPT с $\Delta_2 = \theta/180J$, так что предыдущие рассуждения, касающиеся θ, одинаково применимы и к DEPT, как показывает график рисунка 4.30. Однако с INEPT редактирующая задержка Δ_2 должна выбираться согласно константе спинового взаимодействия, в то время как с DEPT редактирование достигается через изменяемый угол импульса θ, который не имеет зависимости от J. Это означает, что эффективность редактирования DEPT имеет тенденцию превосходить INEPT, когда встречается интервал значений J, и это основное преимущество DEPT в обычном анализе. Задержки эволюции в DEPT конечно зависят от J, хотя оказывается, что эксперимент весьма терпим к ошибкам в этих установках.

---

[8] Поперечная намагниченность, которую мы наблюдаем непосредственно в эксперименте ЯМР, известна как *одноквантовая когерентность*. *Многоквантовая когерентность*, однако, не может наблюдаться прямо, потому что она не индуцирует никакого сигнала в катушке детектирования. Чтобы сделать многоквантовую когерентность полезной для нас, она должна переноситься обратно всигнал одноквантовой когерентности действием РЧ импульсов. Концепция когерентности разрабатывается далее в главе 5.

Отправная точка для определения мультиплетностей резонансов с DEPT получение трёх спектров с θ = 45°, 90° и 135°, отмечая, что 90° эксперимент требует вдвое больше сканирований, чтобы достигнуть того же самого отношения сигнал/шум, что и другие. Знаки откликов суммируются в таблице 4.4. Зная эти фрагменты, определять мультиплетности прямым сравнением - тривиальное дело, в то время как сигналы четвертичных углеродов могут определяться по их появлению только в прямом углеродном спектре. Примеры спектров показаны для бициклического терпена андрографолида **4.6** (рис. 4.32). Расширенный подход должен объединить эти спектры, соответственно, чтобы производить «под-спектры», которые показывают отдельно CH, CH_2 и CH_3 резонансы. Лично я думаю всегда лучше исследовать первоначальные спектры DEPT непосредственно, так как это такое

Таблица 4.4. Знаки мультиплетных резонансов в спектрах DEPT.

	DEPT-45	DEPT-90	DEPT-135
XH	+	+	+
XH_2	+	0	
XH_3	+	0	+

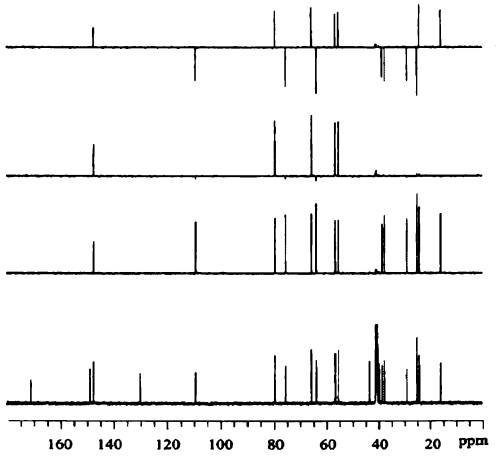
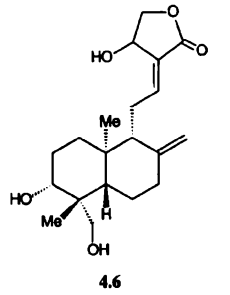


Рисунок 4.32. Обычные углеродные и DEPT-редактированные спектры терпена андрографолида **4.6**.



4.6

простое дело. Комбинирование спектров даёт больший потенциал для генерации «артефактов», а также становится труднее идентифицировать, что происходит, если редактирование терпит неудачу вследствие присутствия необычно высокой константы взаимодействия или от некалиброванности прибора, например. На практике, регистрация одиночного спектра DEPT при θ = 135° часто достаточна, чтобы обеспечить желательную информацию, когда в молекуле отсутствуют метилы или они легко распознаются по их химическим сдвигам. Недавно представлена модифицированная последовательность DEPT, называемая DEPTQ [34], которая включает детектирование четвертичных резонансов и сохраняет преимущества и способности редактирования первоначальной последовательности. Её способность наблюдать все мультиплетности делает её сильным конкурентом за рутинное лабораторное применение.

Ошибки в редактировании DEPT могут возникнуть из множества источников. Наиболее вероятна - неправильная установка протонных импульсов, особенно θ импульсов, использованных для редактирования, которые могут часто появляться по причине плохой настройки протонного канала. Даже малые ошибки в θ могут вести к появлению малых неожиданных пиков в DEPT-90, если θ слишком мал, он приближается к DEPT-45, в то время как при слишком большом, он приближается к DEPT-135.

Обычно, по причине их низкой интенсивности, эти ложные сигналы легко распознаются и не должны вызывать никаких проблем. Ошибки могут возникать даже с правильными калибровками импульса, когда установка периода задержки очень далека от требуемой $^1J_{CH}$ [35] и, в частности, CH_3 резонансы могут ещё оказываться слабыми в подспектре CH. Типичная компромиссная величина для J_{CH} для определения 1/2J - ≈ 140 Гц, для которой 1/2J = 3,6 мс. Алкиновые углероды, в частности, представляют очень высокие значения $^1J_{CH}$ (обычно > 200 Гц), и могут появляться как слабые сигналы, показывающие причудливое поведение знака. Даже более неожиданным может быть *появление четвертичного углерода* алкиновой группы, которая испытывает перенос поляризации от протона алкина, удалённого на две связи, по причине исключительно большой величины $^2J_{CH}$.

Оптимизация чувствительности

Выше показано, что для эксперимента рефокусированного INEPT получается оптимальная чувствительность для данной мультиплетности, когда период рефокусирования устанавливается согласно числу взаимодействующих протонов и связанной константе взаимодействия. Когда DEPT используется, прежде всего, как средство, увеличивающее, чувствительность гетероядра, а не для редактирования спектра, применяются подобные рассуждения. Разность здесь в том, что протонный импульс θ должен оптимизироваться согласно числу спинов в группе XH_n согласно:

$$\theta_{opt} = \sin^{-1}\left(\frac{1}{\sqrt{n}}\right) \qquad (4.5)$$

Обратите внимание на подобие с равенством 4.3 за исключением того, что зависимость от J снова отсутствует для DEPT. Для XH группы, θ_{opt} - 90 °, в то время как этот угол уменьшается для более высоких мультиплетностей.

4.4.4. PENDANT

Последовательности переноса поляризации, представленные выше, обеспечивают увеличение сигнала нечувствительных ядер, но страдают от недостатка откликов от тех, которые не обладают прямо связанными протонами (исключение составляет последовательность DEPTQ [34]). Наоборот, последовательности редактирования, основанные на спиновом эхо, отображают такие отклики, но увеличивают усиление только от ЯЭО и требуют усреднения сигнала, что диктуется обычно медленнее релаксирующими нечувствительными спинами. Одна последовательность, которая пытается объединять всё самое лучшее обоих подходов - PENDANT [36] («усиление поляризации, создаваемое в течение теста присоединённых ядер») (рис. 4.33). Она связана с переносом поляризации от протонов, как для INEPT, и, действительно, последовательность имеет близкое подобие с рефокусированным INEPT рис. 4.21b. С точки зрения протонированных ядер PENDANT может, по сути, пониматься по отношению к этому эксперименту. Однако она также содержит дополнительный 90° (X) импульс, чтобы вызывать отклики от непротонированных ядер, и испытывает недостаток обычного циклирования фазы, используемого для подавления таких сигналов. Редактирование спектра достигается разумным выбором периода рефокусирования, полагая величину 5/8J в качестве оптимальной для $1/2\Delta_2$. Это должно позволять одновременное наблюдение и протонированных, и непротонированных углеродов и обеспечивать редактирование, подобное эксперименту DEPT-135 (рис. 4.34), хотя на практике могут еще появляться четвертичные углероды с довольно низкой интенсивностью и могут быть не слишком явными, особенно с более разбавленными образцами. Это, несомненно, по причине их более медленной релаксации, связанной с применением 90° ^{13}C возбуждающих импульсов,

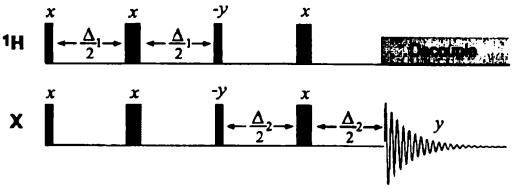


Рисунок 4.33. Последовательность PENDANT. Циклирование фазы не используется, так как подавление природного намагничивания в этом случае не требуется.

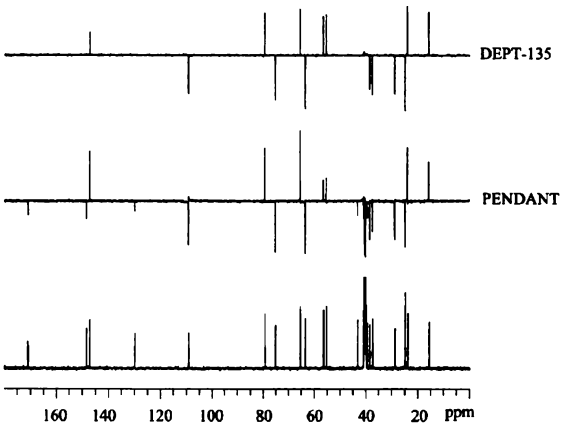


Рисунок 4.34. Углеродные спектры PENDANT и DEPT-135 андрографолида **4.6.** Подобные результаты получаются для обоих экспериментов с дополнительным появлением откликов от четвертичных углеродов в спектре PENDANT.

аналогично проблемам, связанным с более простыми спин-эхо экспериментами редактирования раздела 4.3.1, и потому что скорости повторения импульсов в последовательностях переноса поляризации обычно оптимизируются согласно протонным T_1. Для рутинного редактирования углеродных спектров более подходящим оказывается недавний эксперимент DEPTQ [34]. Последовательность PENDANT, казалось бы, предлагает большую выгоду в переносе поляризации через *дальние* взаимодействия, особенно в системах $X\text{-}H_n$, когда n большое ($3 < n < 9$), для которого задержки 5/8J периода рефокусирования становятся 1/16J для оптимальных результатов [37].

Прежде, чем оставить эти разделы о редактировании спектров X-ядер, в заключение прокомментируем пользу таких экспериментов в современной лаборатории ЯМР. Как уже упоминалось, методы, основанные на наблюдении протонов, становятся доминирующими в мире выяснения органической структуры с химическими сдвигами X ядер, определяемыми косвенно из 2D гетероядерных корреляционных спектров. Последние разработки в этой области развивали методы, в которых и 1D и 2D спектры редактируются таким образом, чтобы показывать мультиплетности X-ядер (глава 6). Более высокая чувствительность и более быстрый сбор данных, возможные с этими методами по сравнению с прямым наблюдением X-ядра, вместе с дополнительными корреляционными данными, обеспечивающимися 2D методами, будут неизбежно вести к уменьшенной зависимости от традиционного, более ёмкого по времени эксперимента наблюдения и редактирования X-ядер. Основная движущая сила этого изменения акцента - применение импульсных градиентов поля и, поскольку они становятся нарастающе общими на обычных приборах, можно ожидать, что подход химика к доказательству структуры будет развиваться в соответствии с ним.

4.5. НАБЛЮДЕНИЕ КВАДРУПОЛЬНЫХ ЯДЕР

Характеристическое свойство многих квадрупольных ядер - широкие линии, которые они производят, благодаря быстрой квадрупольной релаксации (Раздел 2.5.5). Быстрое восстановление спинов

после возбуждения означает, что они часто могут получаться при условиях очень частого следования импульсов с полным возбуждением 90° импульсом, который ясно выгоден для целей усреднения сигнала. Однако соответствующий быстрый спад ССИ может сделать прямое наблюдение ядер с ширинами линий в сотни или тысячи герц экспериментально сложной задачей.

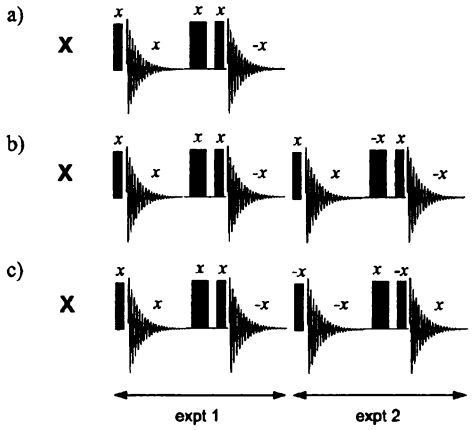


Рисунок 4.35. Последовательности для наблюдения квадрупольных ядер с очень широкими линиями, для которых проблему составляет акустический звон. Последовательность (a) устраняет звон, связанный с 90° импульсом, в то время как ACOUSTIC (b) и RIDE (c) далее устраняет звон, связанный с 180° импульсами.

После РЧ импульса требуется задержка для восстановления схем датчика и электроники приемника прежде, чем ЯМР сигнал сможет оцифровываться. В частности одна проблема - так называемый *акустический звон* в датчике [38], который является наиболее жёстким для низкочастотных ядер низкой распространённости при низких полях и, который может занимать многие десятки микросекунд для затухания. При наблюдении ядер спина 1/2 без проблем может использоваться задержка предрегистрации такого порядка, но в случаях быстро релаксирующих ядер, таких как ^{17}O или ^{33}S, это может привести к потере большей части ССИ прежде, чем начнётся детектирование (ширины линий резонансов 1 и 5 кГц соответствуют временам релаксации только примерно 320 и 60 мкс, соответственно). Это создаёт не только компромиссную чувствительность, но также вводит существенные фазовые ошибки в спектр. Применение более коротких задержек, следовательно, существенно, но ведет к заметному появлению в спектре широких искажений базовой линии от переходных характеристик спектрометра. Предполагались многочисленные последовательности для подавления этого звона [38], две из которых показаны на рисунке 4.35 b и c. В обоих случаях подавление акустического отклика от 90° возбуждающих импульсов достигается за два сканирования, инвертируя фазу ЯМР сигнала при втором сканировании дополнительным 180° импульсом, вместе с одновременной инверсией фазы приёмника [39] (рис. 4.35a). В то время как сигналы ЯМР складываются этим процессом, акустический отклик остается неизменным в этих двух экспериментах и, следовательно, отменяется инверсией приемника. Теперь остаётся только другое нежелательное свойство - акустический отклик от дополнительного 180° импульса, который подавляется слабо отличающимся способом в этих двух последовательностях. С ACOUSTIC [40] (**A**lternate **C**ompound **O**ne-eighties **U**sed to **S**uppress **T**ransients **I**n the **C**oil, рис. 4.35b) весь эксперимент повторяется с инверсией 180° импульса. Он, в действительности, инвертирует связанный акустический отклик относительно первого эксперимента, так что сложение данных от этих двух экспериментов отменяет этот компонент. Альтернативная последовательность RIDE [41] (**RI**ng-down **DE**lay - задержка подавления звона, рис. 4.35c) вместо повторения всего процесса, но с инверсией отклика ЯМР инвертированием фазы обоих 90° импульсов, и вычитает второй эксперимент из первого. Обе последовательности страдают от потенциальных проблем с внерезонансными эффектами по причине применения 180° импульсов, но в остальном обеспечивают существенные уменьшения искажений базовой линии.

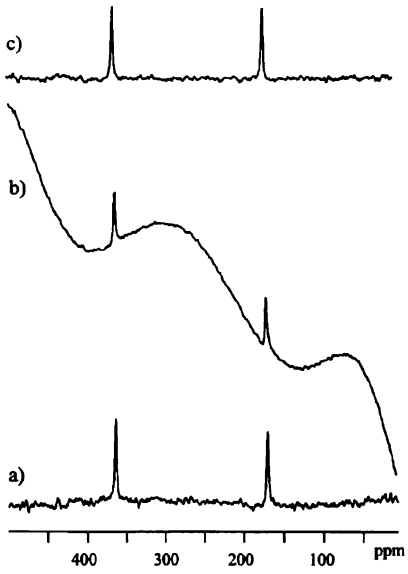


Рисунок 4.36. ^{17}O спектры этилацетата зарегистрированные (a) - с последовательностью RIDE, и (b) – без неё. Жёсткое искажение базовой линии в (b) возникает из акустического звона в датчике, спектр (c) получен из того же ССИ (b), но его первые 10 точек данных заменили точками, предсказанными путём обратного линейного вычисления из 256 неиспорченных точек. Спектры измерены относительно D_2O и обработаны с уширением линий 100 Гц.

Рис. 4.36 показывает применение RIDE в накоплении спектра ^{17}O этилацетата, где ясно видно подавление искажения базовой линии.

Альтернативный подход, теперь доступный с современным программным обеспечением обработки, - накапливать искажённый ССИ при помощи простой одноимпульсной последовательности (один импульс – регистрация) и заменять ранние искажённые точки данных неиспорченными точками, произведенными обратным линейным предсказанием из неиспорчененых последних точек. Рис. 4.36c производился из тех же самых сырых данных, что и 4.36b, но при замене первых 10 точек данных ССИ, предсказанными точками. Полностью удаляется искажение базовой линии и одновременно отсутствует потеря отношения сигнал-шум благодаря экспериментальным несовершенствам, как происходит для набора данных RIDE.

Литература

[1] R.R. Ernst and W.A. Anderson, ***Rev. Sci. Instr.***, 1966,**37**,93-102.
[2] D.E. Jones and H. Sternlicht, ***J. Magn. Reson.***, 1972, **6**, 167-182.
[3] E.D. Becker, J.A. Ferretti and P.N. Gambhir, ***Anal. Chem.***, 1979,**51**, 1413-1420.
[4] R. Freeman and H.D.W. Hill, ***J. Magn. Reson.***, 1971, **4**, 366-383.
[5] P. Waldstein and W.E. Wallace, ***Rev. Sci. Instr.***, 1971, **42**, 437-440.
[6] J.S. Waugh, ***J. Mol. Spectrosc.***, 1970, **35**, 298-305.
[7] R.A. Hoffman.and.S. Forsen, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1966, **1**, 15-204.
[8] W.A. Anderson and R. Freeman, ***J. Chem. Phys.***, 1962, **37**, 85-103.
[9] G. Massiot, S.K. Kan, P. Gonard and C. Duret, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1975, **97**, 3277-3278.
[10] J.K.M. Sanders and J.D. Mersh, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1982,**15**,353-400.
[11] F. Bloch and A. Siegert, ***Phys. Rev.***, 1940,**57**,522-527.
[12] N.F. Ramsey, ***Phys. Rev.***, 1955, **100**, 1191-1194.
[13] J.P. Jesson, P. Meakin and G. Kneissel, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1973, **95**, 618-620.
[14] R.W. Dykstra, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **88**, 388-392.
[15] R.W. Dykstra, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **100**, 571-574.

[16] R.W. Dykstra, ***J. Magn. Reson.*** *(A),* 1993, **102,** 114-115.
[17] D.W. Brown, T.T. Nakashima and D.L. Rabenstein, ***J. Magn. Reson.***, 1981, **45,** 302-314.
[18] C.L. Cocq and, J.Y. Lallemand, ***J.C.S. Chem Commun***, 1981, 150-152.
[19] F.K. Pel and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **48,** 318-322.
[20] S.L. Patt and J.N. Shoolery, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **46,** 535-539.
[21] H. Bildsoe, S. Donstrup, H.J. Jakobsen and O.W. Sorensen, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **53,** 154-162.
[22] O.W. Sorensen, S. Donstrup, H. Bildsoe and H.J. Jakobsen, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **55**, 347-354.
[23] A.M. Torres, T.T. Nakashima and R.E.D. McClung, ***J. Magn. Reson.*** *(A),* 1993, **101,** 285-294.
[24] J. Ollerenshaw, T.T. Nakashima and R.E.D. McClung, ***Magn. Reson. Chem.***, 1998, **36,** 445-448.
[25] R. Freeman, **A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance**, 2nd ed., Longman, Harlow, 1997.
[26] G.A. Morris and R. Freeman, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1979, **101,** 760-762.
[27] D.P. Burum and R.R. Ernst, ***J Magn Reson*** , 1980, **39,** 163-168.
[28] D.T. Pegg, D.M. Doddrell, W.M. Brooks and M.R. Bendall, ***J Magn Reson***, 1981, **44,** 32-40.
[29] O.W. Sorensen and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **51**, 477-489.
[30] K.V. Schenker and W. von Phillpsborn, ***J. Magn. Reson.,*** 1985, **61**, 294-305.
[31] A. Mohebbi and O. Gonen, ***J. Magn. Reson.*** *(A),* 1996, **123**, 237-241.
[32] W. von Phillpsborn and R. Muller, ***Angew. Chem. Int. Ed. Engl***, 1986, **25**, 383-413.
[33] D.M. Doddrell, D.T. Pegg and M.R. Bendall, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **48**, 323-327.
[34] R. Burger and P. Bigler, ***J. Magn. Reson.***, 1998, **135**, 529-534.
[35] M.R. Bendall and D.T. Pegg, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **53**, 272-296.
[36] J. Homer and M.C. Perry, ***J.C.S. Chem. Commun.***, 1994, 373-374.
[37] J. Homer and M.C. Perry, ***J.C.S. Perkm Trans.*** , 1995, **2**, 533-536.
[38] I.P. Gerothanassis, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1987, **19**, 267-329.
[39] D. Canet, J. Brondeau, J.P. Marehal and B. Robin Lherbier, ***Org. Magn. Reson.***, 1982, **20**, 51-53.
[40] S.L. Patt, ***J. Magn. Reson.***. 1982,**49**, 161-163.
[41] P.S. Belton, I.J. Cox and R.K. Harris, ***J.C.S. Faraday Trans.*** , 1985, **81** (2), 63-75.

Глава 5

Корреляции через химическую связь I: Гомоядерная корреляция сдвига

Обсудив множество методов, которые считаются обычными одномерными методами, в предыдущей главе, эта глава ведет в мир двумерного ЯМР. В то время как многие из методов в главе 4 использовали взаимодействия через связи как инструмент для достижения специфических целей, таких как усиление чувствительности через перенос поляризации, двумерные методы в этой и следующей главах используют спиновое взаимодействие, чтобы наглядно представить специфические взаимодействия через связи. Весьма вероятно, что вы уже применяли двумерные методы в вашем исследовании, и наиболее вероятно в виде эксперимента COSY, поэтому эта глава начинается с обсуждения именно этой методики. Это не только наиболее широко используемый из 2D экспериментов, его простая форма обеспечивает удобное введение в многомерные эксперименты вообще. В то время как методы в этой главе нацелены на определение корреляций между подобными спинами *(гомоядерные корреляции),* большая часть обсуждения одинаково уместна для всех двумерных ЯМР экспериментов, и многие части этой главы обеспечивают основы для последующих глав.

Принципы, лежащие в основе генерации двумерного спектра впервые были изложены в лекции в 1971 [1], хотя сам подход нашел широкое применение много лет позже [2]. В течение 1980-ых мир ЯМР и, следовательно, подход химиков к определению структуры значительно изменился разработкой многочисленных двумерных методов. В настоящее время также существуют многие методы более высоких размерностей (3D и 4D). Эти методы, использующие три или более размерностей (измерений) нашли самое большое применение у биологических ЯМР спектроскопистов, изучающих макромолекулы (вполне самостоятельная область) и, в настоящее время существует тенденция значительно менее частого их использования в пределах того, что может рассматриваться как общая органическая химия. Эти методы, следовательно, не входят в поле зрения этой книги, но обсуждаются в текстах, посвященных биомолекулярному ЯМР [3,4].

Эта глава начинается представлением принципов, которые лежат в основе всех двумерных методов. Сами методы, кратко суммированные в таблице 5.1, начинаются с основного эксперимента корреляционной спектроскопии (COSY), который устанавливает соответствие ядер, разделяющих взаимное скалярное взаимодействие в молекуле, сделав протон-протонный COSY одним из рабочих вариантов метода разъяснения органической структуры. Далее в этой главе представляются некоторые варианты основного эксперимента COSY, которые показывает множество выгодных свойств и, следовательно, также находят широкое распространение. Тема двух последних разделов - несколько иные методы. Первый из них - полная корреляционная спектроскопия (TOCSY) представляет альтернативу подходу COSY для установления корреляций в молекуле. Он обеспечивает эффективный перенос информации по сети связанных спинов, особенность, которая может быть чрезвычайно мощной в анализе более сложных спектров.

Таблица 5.1. Основные применения главных методов, описанных в этой главе.

Метод	Основные применения
COSY-90	Корреляция взаимодействующих гомоядерных спинов. Обычно используется для корреляции протонов, взаимодействующих через 2 и 3 связи, но может использоваться для любых высоко распространённых в природе ядер. Базовый эксперимент COSY
DQF-COSY	Корреляция взаимодействующих гомоядерных спинов. Обычно используется для корреляции протонов, взаимодействующих через 2 и 3 связи. Показывает более высокое разрешение, чем базовый COSY Можно получать добавочную информацию о тонкой структуре 2D пиков. Синглеты подавляются.
COSY-β	Корреляция взаимодействующих гомоядерных спинов. Обычно используется для корреляции протонов, взаимодействующих через 2 и 3 связи, но может использоваться для любых высоко распространённых в природе ядер. Структура 2D пиков упрощена по сравнению с базовым COSY. В некоторых случаях могут различаться вицинальные и геминальные отношения.
Delayed-COSY	Корреляция взаимодействующих гомоядерных спинов через малые взаимодействия. Часто используется для корреляции взаимодействий через много связей (> 3) и поэтому ещё известен как дальнодействующий COSY (long-range COSY или LRCOSY).
TOCSY	Корреляция взаимодействующих гомоядерных спинов и тех, которые присутствуют в той же самой системе, но не имеют общих взаимодействий. Использует распространение намагниченности вдоль непрерывной цепи спинов. Мощный метод анализа сложных протонных спектров.
INADEQUATE	Корреляция взаимодействующих спинов низкого естественного содержания (< 20%). Обычно используется для корреляции соседних углеродных центров при естественном содержании, но имеет чрезвычайно низкую чувствительность.

Заключительный метод INADEQUATE устанавливает корреляции между подобными спинами низкого естественного содержания. Он может использоваться, например, чтобы идентифицировать непосредственно соседние углеродные центры, и в этой форме - возможно завершающий эксперимент при определении молекулярного скелета, хотя, увы, он также почти самый малочувствительный.

Подход в этой главе - снова иллюстративный. В то время как он избавляет от необходимости вязываться в формализм, который строго описывает поведение намагничивания в течение многоимпульсных экспериментов, он имеет ограничения, которые не позволяют таким упрощенным подходом полностью описывать многие из методов. Мы уже столкнулись с этими ограничениями при попытке понять эксперимент DEPT в предыдущей главе, где было невозможно описать поведение гетероядерной многоквантовой когерентности в выражениях классической векторной модели. Объяснение этой методики было, таким образом, получено в значительной степени из легче понимаемой последовательности INEPT. Несмотря на эти ограничения, все-таки можно развить некоторое физическое понимание, как действуют эти эксперименты, без обращения к не всем понятным математическим описаниям. Раздел 5.4 вводит графический формализм, известный как *пути переноса когерентности, что* обеспечивает простое представление «потока» намагничивания в течение импульсных экспериментов, который оказался особенно наглядным для двумерных последовательностей и для тех экспериментов, которые используют импульсные градиенты поля для выбора сигнала. Прежде всего, однако, мы должны сначала выработать некоторое чувство как создаются двумерные спектры.

5.1. ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ДВУМЕРНЫХ МЕТОДОВ

Первый пункт, который следует выяснить при обсуждении двумерных методов, - факт, что эти два измерения относятся к двум *частотным измерениям*, в то время как так называемые одномерные методы имеют, конечно, только одно. В любом случае будет также присутствовать измерение, представляющее *интенсивность сигнала*, хотя оно обычно никогда не включается при описании размерности эксперимента. Эти два частотных измерения могут представлять любую комбинацию химических сдвигов или скалярных взаимодействий. Совсем недавно разработаны методы, где идея двумерного представления упрощается включением одного частотного и одного «другого» измерения. Например, гибридные ВЭЖХ-ЯМР методы способны создавать 2D график с обычными 1D спектрами ЯМР, включающими одно измерение, и хроматографическое время удерживания в другом измерении. Аналогично, можно разлагать спектры растворяемых веществ согласно их диффузным свойствам, в таком случае второе измерение представляют коэффициенты диффузии (глава 9).

Обычные двумерные спектры находят такое широкое использование в химическом исследовании, потому что они помечают взаимодействия в пределах, а иногда и между интересующими нас молекулами. Взаимодействия, которые можно исследовать, могут разбиваться на три отдельных категории, которые касаются совершенно различных физических явлений: ***взаимодействия через связи, взаимодействия через пространство и химический обмен***. Первый из них рассматривается в этой и в следующей главе при разделении на гомоядерные (между подобными ядрами, например ^1H-^1H) и гетероядерные (между различными ядрами, например, ^1H-^{13}C) взаимодействия, и рассматриваемые эксперименты преимущественно нацелены на идентификацию и последующую сборку фрагментов структуры в молекуле. Взаимодействие через пространство обеспечивает основу для ядерного эффекта Оверхаузера, который наиболее часто используется, чтобы выяснять стереохимию и конформацию молекул, как описано в главе 8. Наконец, картография путей химического обмена, которые могут быть внутри- или межмолекулярными, также будет рассмотрена в главе 8, так как методы для изучения и ЯЭО, и обмена по существу идентичны.

5.1.1. *Генерирование второго измерения*

Независимо от природы отображаемого взаимодействия, все двумерные последовательности имеют один и тот же основной формат и могут подразделяться на четыре хорошо определённых единицы, называемых периодами *подготовки*, *эволюции*, *смешивания* и *детектирования* (рис. 5.1).

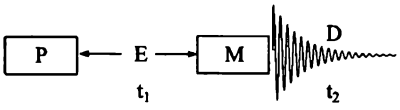


Рисунок 5.1. Общая схема для любого двумерного эксперимента. P: Подготовка, E: Эволюция, M.. Смешивание и D: Детектирование.

Периоды подготовки и смешения типично включают в себя импульс или кластер импульсов и/или фиксированные периоды времени, точные детали которых сильно зависят от природы эксперимента. Период детектирования полностью аналогичен периоду детектирования любого одномерного эксперимента, в течение которого спектрометр собирает ССИ возбужденных спинов. Период эволюции обеспечивает ключ к генерациии второго измерения. Прежде, чем продолжать, кратко вспомним, что происходит в течение регистрации одномерного ССИ и процессы, которые производят спектр единственного частотного измерения. Процесс детектирования включает регистрацию (оцифровку) колеблющегося спада свободной индукции за одинаковые временные интервалы, продиктованные условием Найквиста для правильного периода регистрации. Собранные данные затем подвергают Фурье-преобразованию, чтобы произвести требуемый спектр частотного измерения. Другими словами общее требование создания частотного измерения - обычная регистрация намагничивания, поскольку оно изменяется некоторым образом как функция времени. При распространении этой идеи можно

заключить, что чтобы генерировать спектр *с двумя частотными измерениями* f_1 и f_2, необходимо отбирать данные как функцию *двух отдельных временных переменных* t_1 и t_2. Ясно, что одно временное измерение и, следовательно, одно частотное измерение происходит от обычного периода детектирования (t_2 на рисунке. 5.1), но как возникает другое?

Чтобы иллюстрировать требуемую процедуру, рассмотрим простую импульсную последовательность, в которой блоки и подготовки, и смешивания рисунка 5.1 каждый представляет одиночный 90° импульс (рис. 5.2), действующий на образец, который содержит только одиночный несвязанный протонный резонанс, скажем хлороформ, с отстройкой химического сдвига ν Гц. При рассмотрении событий с векторной моделью (рис. 5.3) начальный 90° импульс помещает равновесную намагниченность в *x-y* плоскость вдоль +y-оси, после чего она будет прецессировать (или *развиваться)* согласно этой отстройке химического сдвига.

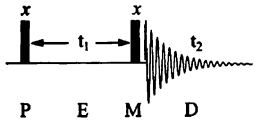


Рисунок 5.2. Иллюстративная двумерная последовательность, в которой P и M - 90° импульсы. Это также последовательность базового COSY

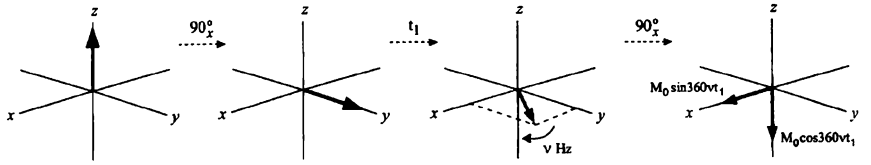


Рисунок 5.3. Действие последовательности COSY (рис. 5 2) на одиночный невзаимодействующий протонный резонанс.

По прошествии периода времени t_1, вектор поворачивается на угол $360\nu t_1$ градусов, и затем подвергается второму импульсу. Чтобы оценить влияние этого импульса, удобно рассматривать вектор как состоящий из двух ортогональных компонентов, один вдоль первоначальной оси y ($M_0 \cdot \cos 360\nu t_1$), и другой по x-оси ($M_0 \cdot \sin 360\nu t_1$). Второй 90° импульс помещает y-компонент вдоль -z оси, в то время как x-компонент не подвергается действию и остается прецессирующим в поперечной плоскости и производит детектируемый ССИ. Преобразование Фурье этого ССИ будет, следовательно, производить спектр, содержащий одиночный резонанс, чья интенсивность зависит от фактора $\sin 360\nu t_1$.

Выполнение этого эксперимента с t_1, установленным на ноль, означает, что два 90_x импульса сложатся, производя чистый 180° импульс, который соответствует просто инвертированному равновесному вектору. Так как поперечная намагниченность отсутствует, отсутствует и детектируемый сигнал, и спектр содержит только шум. Теперь вообразите повторение эксперимента неоднократно с интервалом t_1, каждый раз увеличенным на одинаковую величину, при раздельном сохранении результирующих ССИ. С увеличением t_1 от нуля, результирующая интенсивность сигнала также увеличивается, так как x-намагничивание имеет время развиваться в течение периода эволюции, достигая максимума при прохождении через угол 90°. Дальнейшее увеличение в t_1 вызывает уменьшение x- компонента, прохождение через нуль, а затем принятие отрицательных значений, и так далее согласно синусной модуляции. Подвергая каждый из приобретённых t_2 ССИ преобразованию Фурье, производят ряд спектров, содержащих одиночный резонанс, чья интенсивность (или *амплитуда)* изменяется как функция времени, согласно $\sin 360\nu t_1$ (рис. 5.4). При более длинных значениях t_1, эффекты релаксации уменьшают интенсивность поперечной намагниченности согласно T_2^*, так что интенсивности сигналов показывают устойчивый (экспоненциальный) спад в дополнение к *амплитудной модуляции.* Интенсивность резонанса как функции времени, следовательно, представляет другой спад свободной индукции для временной шкалы t_1 (упоминаемый как интеферограмма), который генерировался искусственно или *косвенно* (рис. 5.5). Частота амплитудной модуляции соответствует отстройке хими-

ческого сдвига резонанса во вращающейся системе, и мы говорим, что намагничивание было *частотно мечено* как функция t_1. Подвергая данные этой временной шкалы преобразованию Фурье, можно было бы снова ожидать, что это произведёт одиночный резонанс с химическим сдвигом ν Гц *в частотном измерении* f_1, так же, как для измерения f_2.

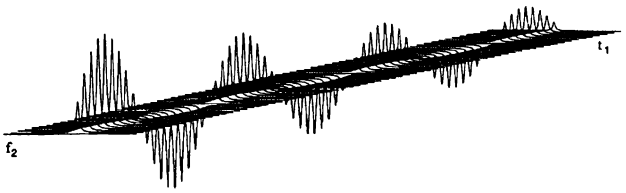


Рисунок 5.4. Амплитудная модуляция синглетного резонанса как функция периода эволюции t_1. При более длинных значениях t_1 интенсивность сигнала уменьшается спиновой релаксацией.

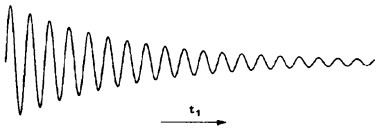


Рисунок 5.5. Изменение интенсивности пика, амплитудно модулированного резонанса рис. 5.4, производит ССИ (интеферограмму) для t_1 измерения.

Обобщение этого процесса требует контроля интенсивности *каждой точки данных* в f_2 измерении как функции t_1, чтобы производить полный двумерный набор данных. Следующее преобразование Фурье относительно t_1 генерирует другое полное частотное измерение, которое в комбинации с обычным измерением производит двумерный спектр, показывающий одиночный резонанс при ν Гц в обоих измерениях (рис. 5.6). Заметьте, что обозначение частотных осей как f_1 и f_2 следует от расположения соответствующих временных шкал в импульсной последовательности, то есть t_1 сопровождается t_2. Новая искусственная (t_1) временная шкала отбирается дискретно, регистрируя ССИ для каждой t_1 временной точки, и, сохраняя каждую отдельно, по аналогии с регистрацией t_2 описанных ранее точек данных. Повторяющаяся регистрация ССИ с систематически инкрементируемыми t_1 периодами времени (рис. 5.7) фундаментальна для генерации *всех двумерных наборов данных*. Действительно, эту простую идею просто можно расширять, чтобы произвести трёхмерный спектр, имея три независимых периода инкрементируемого времени, один для «прямого» детектирования и два для «косвенного» (рис. 5.8);

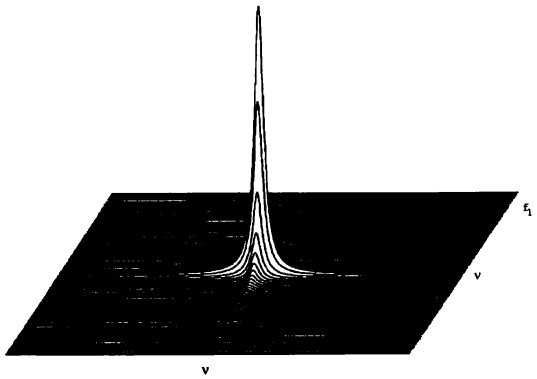


Рисунок 5.6. Двумерный спектр, полученный из последовательности рис. 5 2 для образца, содержащего одиночный невзаимодействующий спин. Получается один пик со сдвигом ν Гц в обоих измерениях.

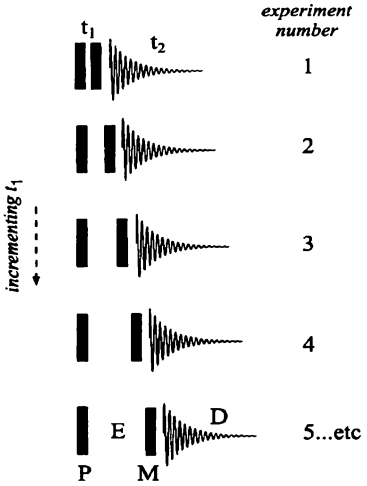


Рисунок 5.7. Обобщенная схема сбора двумерного набора данных. Эксперимент повторяется много раз с инкрементированием периода t_1 в каждой стадии и сохранением отдельно получаемых ССИ. Следующее двойное Фурье-преобразование относительно первого t_2, а затем t_1, даёт двумерный спектр

в то время как технические детали могут быть несколько сложными, принцип весьма простой. Философия многомерного подхода такова, что один сигнал, модулированный как функция одной временной переменной (скажем, t_1) детектируется в более поздний момент как функция другой переменной (t_2 в случае 2D эксперимента). Эти общие описания одинаково применимы к спектрам, которые содержат много резонансов. При повторении вышеуказанного эксперимента для образца, содержащего только два несвязанных спина с отстройками (начальными установками) v_A и v_X Гц, обусловливают спектр с двумя 2D синглетами, чьи частоты в обоих измерениях соответствуют просто соответствующим отстройкам химического сдвига резонансов (рис. 5.9).

Требуя усилий для генерирования двумерного набора данных, спектры рисунков 5.6 и 5.9 не сообщают нам ничего, что мы не могли бы произвести из соответствующих одномерных спектров, просто химические сдвиги участвующих ядер. Они не предоставляют никакой новой информации, потому что 2D пики отображают (или коррелируют) точно ту же самую информацию в обоих измерениях ($v_1 = v_2$), в этом случае химические сдвиги. Двумерные спектры становятся полезными, когда пики, которые они содержат, коррелируют *различную* информацию об этих двух осях, то есть когда $v_1 \neq v_2$. Это требует, чтобы намагничивание, эволюционирующее при частоте v_1 в течение периода времени t_1, затем развивалась при другой частоте v_2 в период детектирования (t_2). Ясно, чтобы это случалось, должен быть некоторый механизм, которым частота прецессии намагничивания изменяется во время последовательности, и, более определенно, в период смешения. Детали этого периода диктуют информационное содержание образующегося спектра согласно взаимодействию, которое используется, то есть спин-спиновое взаимодействие, ЯЭО, или химический обмен.

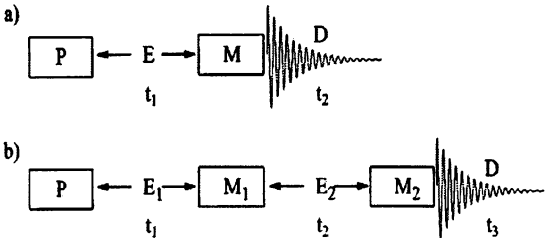


Рисунок 5.8. Схематичные представления (a) - двумерных и (b) - трёхмерных экспериментов. 3D эксперимент собирается, независимо изменяя t_1 и t_2 интервалы, чтобы генерировать f_1 и f_2 измерения, соответственно, по аналогии с 2D экспериментом.

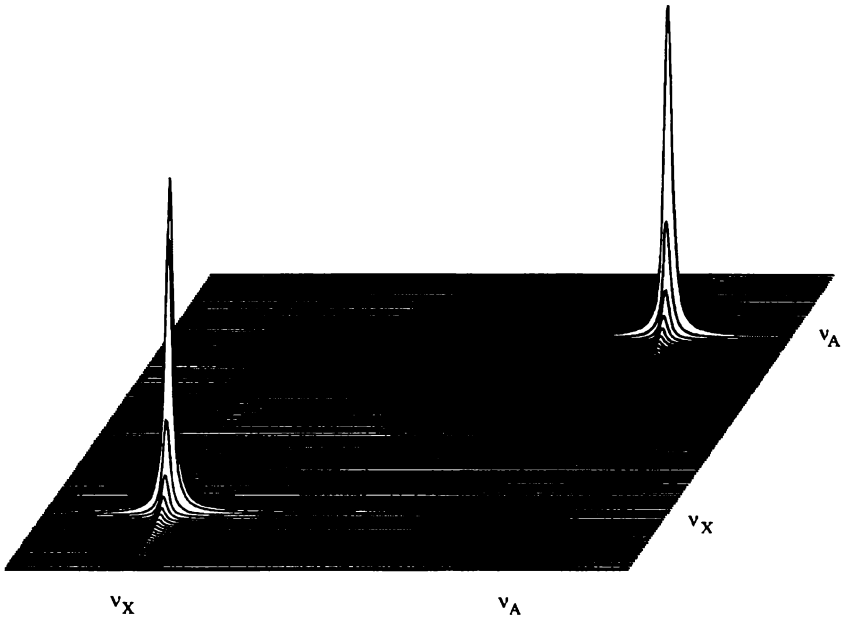


Рисунок 5.9. Двумерный спектр, следующий из последовательности рис. 5.2 для образца, содержащего два несвязанных спина A и X с отстройками ν_A и ν_X. Каждый производит 2D пик при его соответствующей отстройке химического сдвига в обоих измерениях.

Именно то, как производятся информативные корреляционные пики, станет очевидным при изучении различных последовательностей в последующих разделах.

Прежде чем продолжать, требуется комментарий относительно представления 2D спектров. Спектры рисунков 5.6 и 5.9 представлены в режиме «пакетной графики», чтобы подчеркнуть их подобие одномерным спектрам и присутствие двух частотных осей и одной оси интенсивности. Хотя они могут выглядеть эстетически внушительно, эта форма представления мало полезна на практике. Обычный способ представления 2D спектров - через «контурные графики», в которых интенсивности пиков представляются контурами, как горный хребет представлялся бы на географической карте. Рис. 5.10 показывает эквивалентное представление контурных рисунков 5.6 и 5.9, и, если не утверждается обратного, все 2D спектры с этого времени в тексте будут использовать этот контурный режим.

5.2. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (COSY)

В примечаниях этой главы утверждалось, что COSY была первая предложенная двумерная последовательность, и фактически то, что дано на рис. 5.2 выше, использовало только два 90° импульса. Последовательность, которая коррелирует химические сдвиги спинов, разделяющих взаимное J-взаимодействие, наиболее часто применяется в протонной спектроскопии, хотя одинаково применима к любому высоко распространённому нуклиду. Это без сомнения наиболее широко используемый из всех двумерных методов, и поэтому он рассматривается первым.

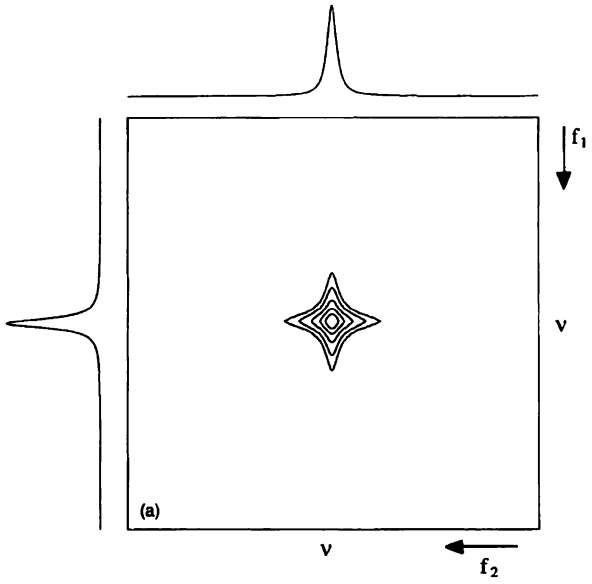
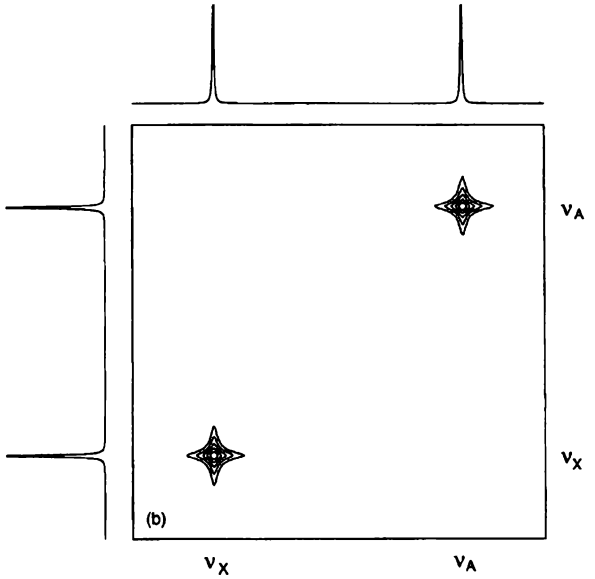


Рисунок 5.10. Эквивалентные представления контурного графика рисунков 5.6 и 5.9. Рядом с f_1 и f_2 осями - обычные 1D спектры для целей отнесения.



Этот раздел обеспечивает введение в действие эксперимента и его основные свойства, после чего вы должны получить возможность понимать и интерпретировать обычные спектры COSY. Более поздние разделы рассматривают более определённые и полезные свойства базового эксперимента и его кузенов.

5.2.1. Коррелирование связанных спинов

Исходя из предыдущих обсуждений, касающихся несвязанных спинов, мы теперь рассмотрим более общий случай спинов, которые связаны скалярно. Сначала мы отметим, что компонент мечения частоты описанного выше эксперимента работает для всех возбуждённых спинов, поэтому нет необходимости рассматривать его в дальнейшем. Теперь мы интересуемся смешивающей частью последовательности, в этом случае действием импульса после t_1. Короче говоря, этот импульс переносит «намагниченность», первоначально связанную с одним спином, на соседние спины, с которыми он взаимодействует, этот процесс, формально известный как ***перенос когерентности*** (раздел 5.4), возможен только по причине J-взаимодействия. Перенос когерентности фактически уже описывался в главе 4, где он представлялся в немного ином облике, как перенос поляризации от протона к углероду, который является ничем иным, как ***гетероядерным переносом когерентности***. При этом первоначальные заселённости спинов («намагничивание»), связанные с протоном, в конечном счёте, переносились к углероду. В гетероядерном случае события легко могли изображаться, обращаясь к диаграммам заселённости (SPI) и к векторной модели (последовательность INEPT), потому что можно было бы рассматривать действие импульсов на исходный протон и целевой углерод совершенно независимо. Поскольку обстоятельства гомоядерного случая значительно более сложные, потому что все спины испытывают одни те же импульсы одновременно, и имеется тенденция разрушения простой картины событий. Однако подобные процессы переноса действуют, и с COSY мы просто имеем аналогичный ***гомоядерный перенос когерентности***, имеющий место между спинами. Подобие может дальше иллюстрироваться при сравнении последовательности COSY рис. 5.2 с основной последовательностью INEPT рис. 4.2.1a. Игнорируя рефокусирующие 180° импульсы в INEPT, эти две последовательности в значительной степени идентичны, обе с первоначальным возбуждением, сопровождающимся периодом эволюции, после чего *оба* связанных спина испытывают 90° импульс, который вызывает перенос. Концепция когерентности и переноса когерентности является самой важной в большинстве ЯМР экспериментов, и она далее рассматривается в разделе 5.4.

Ключевой момент всего этого в том, что перенос намагниченности происходит между связанными спинами. Чтобы оценить результат этого в конечном спектре COSY, рассмотрим случай двух J-связанных спинов A и X, с константой взаимодействия J_{AX} и отстройками химических сдвигов ν_A и ν_X. Намагничивание, связанное со спином A, будет после начального 90° импульса прецессировать в течение t_1 согласно его отстройке химического сдвига ν_A. Второй 90° импульс затем переносит некоторую часть этой намагниченности к связанному спину X, в то время как другая часть остаётся связанной с первоначальным спином A (причины этого различия описываются в разделе 5.2.3). Те, которые остаются с A, будут затем прецессировать в период детектирования на частоте ν_A, точно так же, как это происходило в течение t_1, поэтому в конечном спектре они будут производить пик при ν_A в обоих измерениях, обозначенный (ν_A, ν_A). Этот пик, следовательно, эквивалентен тому, который наблюдается для несвязанной AX системы рис. 5.9. И так как он представляет одну и туже частоту в обоих измерениях, он находится на диагонали 2D спектра и поэтому упоминается как ***диагональный пик***. В противоположность, переносимое намагничивание будет прецессировать в t_2 при частоте нового «хозяина» - спина X, и будет, таким образом, производить пик, соответствующий двум различным химическим сдвигам в двух измерениях (ν_A, ν_X). Этот пик находится вне диагонали и поэтому упоминается как вне-диагональный или, чаще, ***перекрёстный пик***, или кросс-пик (рис. 5.11). Этот пик наиболее интересен, поскольку он обеспечивает прямое доказательство взаимодействия между спинами A и X. Весь процесс также действует и в обратном направлении, то есть те же самые аргументы применимы намагничиванию, первоначально связываемому со спином X, вызывая диагональный пик при (ν_X, ν_X), и перекрёстный пик при (ν_X, ν_A).

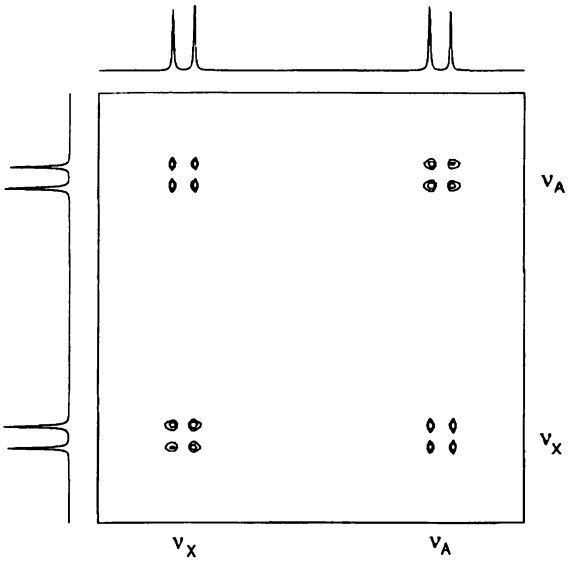
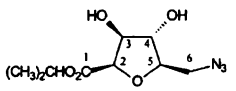


Рисунок 5.11. Спектр COSY связанной двухспиновой AX системы. Диагональные пики эквивалентны наблюдаемым в 1D спектре, в то время как перекрёстные пики обеспечивают доказательство взаимодействия между коррелированными спинами.

Таким образом, спектр COSY будет симметричным относительно диагонали, с перекрёстными пиками с обеих сторон его, отражающими одно и то же взаимодействие (рис. 5.11).

5.2.2. Интерпретация COSY



5.1

Применение методики COSY в спектральном отнесении наилучшим образом иллюстрируется при рассматрении некоторых практических примеров. Спектр COSY азосахара **5.1**, мономера для синтеза олигомерных карбопептоидов, демонстрирует и мощность методики, а также и некоторые из его ограничений или потенциальных ловушек (рис. 5.12).

Цель - отнести все протонные резонансы в спектре **5.1**. В этом простом примере это могло выполняться путём рассмотрения и анализа мультиплетной тонкой структуры каждого резонанса. Однако этот процесс терпит неудачу, когда спектры отображают существенное наложение резонансов, и большая дисперсия, доступная в двух измерениях, часто может обходить такие ограничения. Кроме того, COSY имеет добавочное преимущество скорости, избегая необходимости использовать ёмкий по времени анализ 1D спектра. Естественно, можно возвращаться к таким уровням подробностей, когда отнесения сделаны и общая структура определена, чтобы собрать дополнительные структурные данные из констант взаимодействия, например, но COSY может очень быстро обеспечивать доказательство структуры без этой необходимости. Первый шаг в анализе - согласование диагональных пиков с эквивалентными резонансами в 1D спектре, поскольку это обеспечивает ориентацию для всех последующих отнесений. Связанные спины затем коррелируются пошаговыми движениями, начиная и заканчивая на диагональном пике через промежуточный перекрёстный пик. Отнесения для **5.1** начинаются с характеристичного дублета H_2. Корреляция с его вицинальным партнером в сахаре делается через любой из симметрично связанных кросс-пиков, который таким образом относит H_3, и так далее.

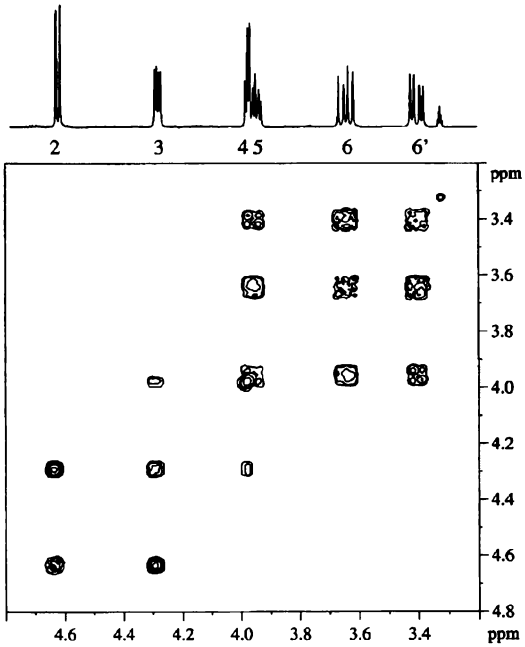
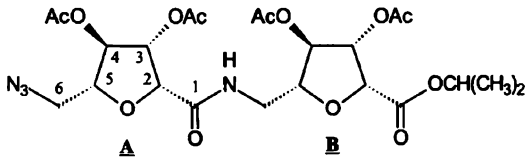


Рисунок 5.12. 400 МГц спектр COSY азосахара **5.1** в MeOD. Выше показан обычный 1D спектр.

Эта тривиальная процедура обеспечивает основу, на которой анализируются спектры COSY. Мощность и простота эксперимента иллюстрируются далее вторым примером, карбопептоидным димером **5.2** (рис. 5.13). В этом случае в молекуле существуют две отдельных спиновых системы на смежных сахарных кольцах, и их различие и отнесения легко следует из характеристичных дублетов H_2 в каждой. Эти две кольцевые системы отмечены на рисунке 5.13 выше и ниже диагонали красным цветом (кольцо A) и черным (кольцо B) для ясности. Дальнейшие корреляции от протонов H_6 кольца B к смежному амиду NH не показываются на этом рисунке, но их присутствие легко различает кольца A и B. Разумеется, корреляции от одиночного амидного резонанса также обеспечили бы подходящую отправную точку для определения кольца B.



5.2

Эксперимент COSY, несмотря на его простоту, однако, подвержен множеству ограничений и предостережений, в которых также нужно быть уверенным. Корреляция между H_4 и H_5 на рисунке 5.12 почти теряется, благодаря почти вырождению этих резонансов, и при наложении взаимодействующих спинов, таким образом, пошаговый процесс отнесения может прерываться, так как может быть неясно, от какого резонанса последующие корреляции должны прослеживаться.

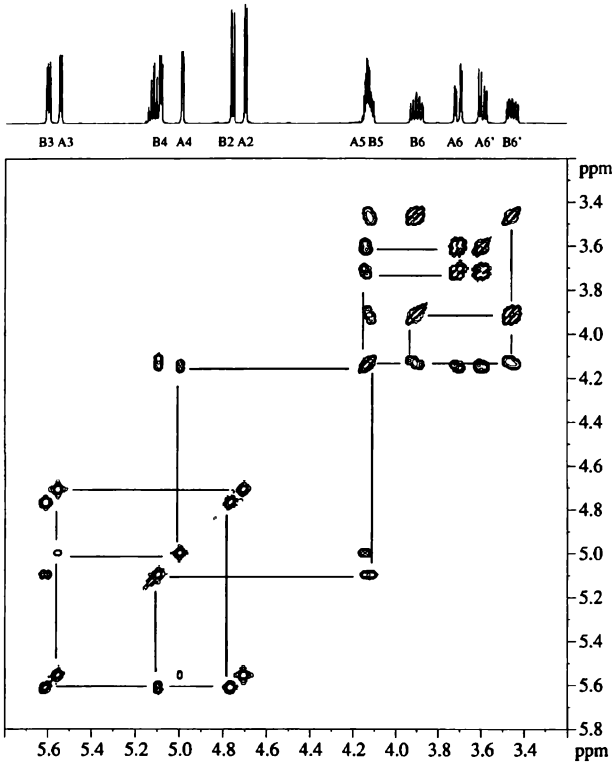


Рисунок 5.13. 500 МГц COSY спектр карбопептоидного димера **5.2** в $CDCl_3$, показан с 1D спектром выше. Красным цветом выше диагонали прослеживаются отнесения для сахарного кольца, а чёрным цветом ниже диагонали для сахарного кольца B (этот график исключает корреляции с амидным протоном остатка B). Оба могут относиться, начиная с H_2 протона каждого сахара, кольца метятся от N-конца карбопептоида и нумерация сахарного кольца следует IUPAC рекомендациям для номенклатуры углеводов.

В таких случаях требуется некоторая осторожность, чтобы избегать неправильных отнесений, и, в конечном счете, могут потребоваться более изощрённые методы, чтобы обеспечить однозначные результаты. Со сложными структурами можно оставаться с различными группами связанных спинов, идентифицированных из COSY спектров, которые не могут быть связаны через гомоядерные корреляции. Эти части молекулярной «пилы» требуют дополнительных экспериментальных данных, если они должны соединяться вместе, таких как из экспериментов гетероядерной корреляции или измерений ЯЭО. Большинство протон-протонных взаимодействий действуют через две или три связи, поэтому протонный спектр COSY обычно идентифицирует вицинальные и геминальные отношения. Дальнейшее общее ограничение COSY - неспособность *априорно* различать между этими двумя типами корреляции. На рисунке 5.12 вицинальные H_5-H_6 перекрёстные пики кажутся подобными геминальному H_6-$H_{6'}$ перекрёстному пику. При анализе COSY эти два возможных отношения нужно держать в уме, особенно, когда могут ожидаться диастереотопные геминальные протоны, особенно в системах циклических или со стереогенными центрами. Вариант последовательности базового COSY (COSY-β, раздел 5.6.3) может, при благоприятных обстоятельствах, различать между вицинальными и геминальными отношениями, и этот метод также находит широкое использование. Структурные свойства, такие как ненасыщенность или хорошо известная W-геометрия, также может увеличивать дальние константы взаимодействия и COSY может быть удивительно эффективным при раскрытии этих корреляций.

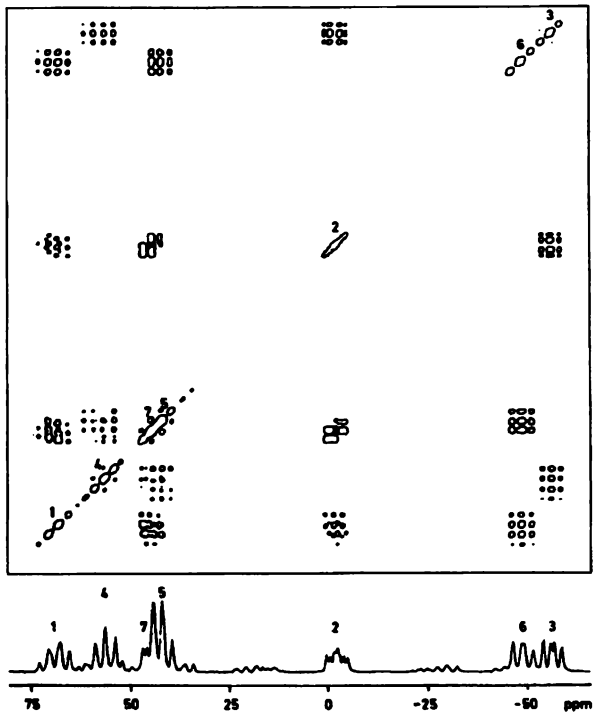


Рисунок 5.14. ^{31}P-^{31}P спектр COSY P_7Me_5 кластера **5.3** с ^{31}P 1D спектром ниже (воспроизводится с разрешения от [5]).

Таким образом, *небезопасно* автоматически предполагать, что *все* перекрёстные пики соответствуют или вицинальным или геминальным отношениям взаимодействия. Геометрические факторы могут также вызывать вицинальные взаимодействия близкие к нулю, в таком случае не производится никакого перекрёстного пика COSY, несмотря на присутствие смежных протонов. Таким образом, ***отсутствие* перекрёстного пика** между протонами ***не всегда исключает*** их **соседнее расположение** в структуре.

Эксперимент COSY не ограничивается протонной спектроскопией, но подходит для установления гомоядерных корреляций для любого нуклида высокой распространённости, наиболее обычные примеры ^{19}F, ^{31}P или ^{11}B. Рис. 5.14 иллюстрирует ^{31}P-^{31}P спектр COSY кластера P_7Me_5 **5.3**, для которого процедура отнесения точно такая, как описано для протонных спектров выше. В этом случае, односвязные P-P взаимодействия идентифицируются непосредственно, наряду с одиночным взаимодействием через две связи между P_2 и P_7, которое возникает из большого $^2J_{PP}$ взаимодействия.

5.2.3. Тонкая структура пиков

Спектр рис. 5.11 также показывает тонкую структуру в каждом диагональном и кросс-пике, которая эквивалентна структуре, видимой в одномерных мультиплетах. Всегда ли такая тонкая структура разрешается, зависит от экспериментальных установок, использованных при регистрации данных. В то время как в иллюстративном примере рис. 5.11 данные записывались так, чтобы показать эти детали, тонкая структура на рисунках. 5.12 и 5.13 не разрешается, как часто случается в обычном анализе.

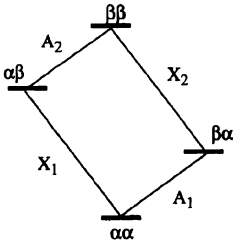


Рисунок 5.15. Схематическая диаграмма энергетических уровней для связанной двух-спиновой AX системы.

Интерпретация тонкой мультиплетной структуры может, при соответствующих экспериментальных условиях, обеспечивать ценную информацию. Эта тема, обсуждаеся в разделе 5.5.2, где мы сталкиваемся с версией COSY эксперимента, лучше подходящей для этой цели. Чтобы понять происхождение этой тонкой структуры в спектре 2D, необходимо слабо изменить описание переноса намагниченности, данное выше. Утверждалось, что этот перенос случается между связанными спинами, но более точно нужно говорить, что он случается *между переходами, связанными с этими спинами.* Ссылка на диаграмму энергетических уровней для связанной 2-спиновой системы (рис. 5.15) должна разъяснить это. Намагничивание, связанное, скажем, с переходом A_1, который вызывает половину дублета спина A, перераспределяется на другие три перехода A_2, X_1 и X_2 вторым 90° импульсом последовательности COSY. То, которое связано с A_2 в течение периода детектирования, и вызывает тонкую структуру *в пределах* диагонального пика, в то время как то, которое теперь представляет X_1 и X_2, обеспечивает структуру перекрёстного пика. Результат в том, что, в дополнение к модуляции, благодаря химическим сдвигам, в течение t_1 и t_2 имеется дополнительная модуляция, возникающая от J-взаимодействия, и это производит тонкую структуру взаимодействия в обоих измерениях.

Вспомните также, что после второго импульса, «некоторое намагничивание остается связанным с первоначальным спином». Мысленно возвратимся к обсуждению переноса поляризации, в эксперименте INEPT, где было показано, что основное требование для переноса поляризации - антифазное расположение векторов дублета исходного спина, который для INEPT генерировался последовательностью спин-эхо. Компоненты намагничивания, которые были в фазе непосредственно перед вторым 90° импульсом, не делали бы вклада в перенос, следовательно, Δ период оптимизировался, чтобы максимизировать антифазный компонент. То же самое условие применимо к переносу намагниченности между двумя протонами, как в эксперименте COSY. Это требует, чтобы протон-протонному взаимодействию позволялось эволюционировать, чтобы создать степень антифазного намагничивания, которая может переноситься вторым импульсом, в то время как фазированный компонент остаётся связанным с первоначальным спином (рис. 5.16). Период эволюции взаимодействия для COSY - период t_1, так что количество переносимого намагничивания, детектированного в t_2 также модулируется, как функция t_1 ($\sin 180Jt_1$). Это та модуляция, которая упоминается в конце последнего абзаца, которая, в конечном счете, характеризует тонкую структуру взаимодействия перекрёстного пика в f_1. Аналогично, амплитуда фазированного неперенесённого компонента также модулируется в t_1 взаимодействием ($\cos 180Jt_1$) и это производит тонкую структуру взаимодействия диагонального пика в f_1. Мультиплетная структура далее рассматривается в разделе 5.5.2 с целью извлечения констант взаимодействия из 2D перекрёстных пиков.

5.3. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ 2D ЯМР

Этот раздел вводит наиболее важные экспериментальные аспекты, касающиеся двумерных наборов данных, и снова использует эксперимент COSY, чтобы их иллюстрировать.

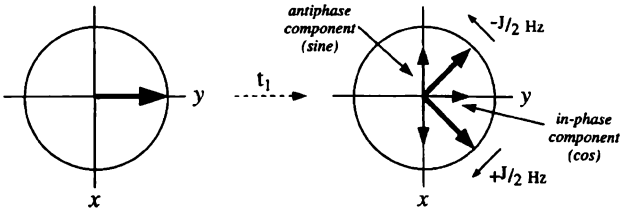


Рисунок 5.16. Эволюция взаимодействия в течение t_1 производит фазированные и антифазные компоненты намагничивания, но только антифазный компонент делает вклад в перенос намагниченности и, следовательно, в перекрёстные пики в спектре 2D.

Многие обсуждения - просто расширения того, что уже обсуждалось в главе 3 для одномерного эксперимента, и предполагается близкое знакомство с этим. Никакие новые концепции не вводятся здесь, хотя модифицированный подход к постановке эксперимента и к обработке данных является существенным, если 2D эксперименты должны быть успешными.

5.3.1. 2D формы линии и квадратурное детектирование

Все двухмерные спектры, представленные до сих пор, использовали квадратурное детектирование в обоих измерениях, позволяя помещать опорные частоты для каждого измерения в центре спектра. Квадратурное детектирование для f_2 данных достигается или одновременной, или последовательной схемами регистрации, описанными в разделе 3.2.4, и, следовательно, полностью аналогично тем, которые используются для одномерных регистраций. Квадратурное детектирование в f_1 также необходимо по тем же самым причинам. Как и в 1D случае, оно требует некоторых средств отличия частот, которые расположены выше опорной частоты, от тех, которые расположены ниже, при эволюции в течение t_1. Другими словами, снова необходимо различать положительные и отрицательные частоты во вращающейся системе, так, чтобы сигналы зеркального отображения не появлялись с противоположной стороны от f_1 =0. Широко используются для этого два общих подхода, один, обеспечивающий так называемый *дисплей фазо-чувствительных данных*, в то время как другой обеспечивает данные, которые традиционно отображаются в *режиме абсолютных значений (магнитуды)*, где вся информация о фазе отвергается. Первый из них показывает формы линии, в которых компоненты поглощения и дисперсии разделяются, означая, что предпочтительный сигнал режима поглощения будет доступным для дисплея с высоким разрешением. Второй подход хуже тем, что он производит формы линии, в которых части поглощения и дисперсии неразрывно смешаны, делая его плохо подходящим для работы с высоким разрешением. Однако, так как спектры абсолютных значений простые при обработке и манипуляции, они еще находят применение в некоторой обычной работе и в полностью автоматизированных процессах, и поэтому также рассматриваются здесь.

Фазочувствительные представления

Как для 1D данных, f_1 квадратурное детектирование требует накопления двух наборов данных, которые различаются по фазе на 90°, таким образом, обеспечивая необходимые синусные и косинусные амплитудно-модулированные данные. Так как f_1 измерение генерируется искусственно, строго нет никакой опорной РЧ, чтобы определять фазу сигнала, поэтому это - фаза импульсов, которые примыкают к t1, которые диктуют фазу детектированного сигнала. Таким образом, *для каждого t_1 инкремента* собираются два набора данных, один с 90°_x импульсом подготовки (синусная модуляция t_1), другой с 90°_y (косинусная модуляция t_1), и оба сохраняются отдельно (рис. 5 17). Эти два набора эквивалентны двум каналам данных, собранных с *одновременной* регистрацией, которая производит

желательное различие частоты, когда подвергается комплексному преобразованию Фурье (также упоминаемому как гиперкомплексное преобразование 2D данных).

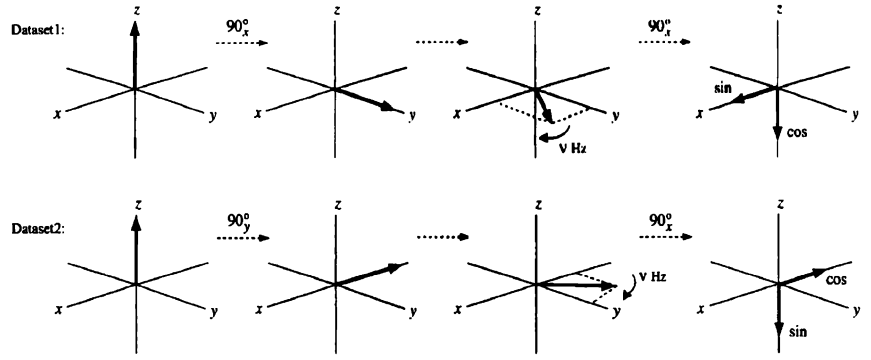


Рисунок 5.17. Метод квадратурного детектирования f_1 Стейтса требует получения двух наборов данных на инкремент, чтобы генерировать отдельные синусно и косинусно модулированные наборы данных.

Скорость регистрации в t_1 или, другими словами, размер временного инкремента t_1, диктуется шириной спектра f_1 и подвергается тем же самым правилам как для одновременной регистрации одномерных данных. Этот метод производится из первоначальной работы Стейтса, Хаберкорна и Рубена [6,7] и поэтому упоминается в литературе как метод квадратурного детектирования f_1 «Стейтса».

Альтернативный подход аналогичен методу *последовательной* регистрации, представленной в разделе 3.2.4. Как и в 1D подходе цель состоит в том, чтобы избегать возникающих и положительных, и отрицательных частот, *сдвигая соответствующий диапазон частот* от $\pm 1/2SW_1$ к 0 или к $+SW_1$ Гц, делая частоты эволюции, появляющиеся в течение t_1, быстрее, чем это нужно фактически. Как и для метода Стейтса выше, отсутствует сдвиг опорной РЧ фазы для этого искусственного измерения, так что достигается эквивалентный эффект, инкрементируя фазу импульса подготовки на 90° для каждого t_1 инкремента, и делая выборки данных вдвое быстрее, чем для метода Стейтса (деля на два t_1 инкремент). Только один набор данных получается в течение каждого t_1 периода, но собирается вдвое больше t_1 инкрементов, поэтому общее t_1 время регистрации, и, следовательно, цифровое разрешение, равны для обоих методов. Этот подход к f_1 квадратурному детектированию [8] теперь упоминается как пропорциональное временное фазовое инкрементирование или **TPPI** (Time Proportional Phase Increment).

Методы Стейтса и TPPI производят эквивалентные наборы данных [9] (хотя они отличаются немного во внешнем виде пришлых сигналов и артефактов, известных как аксиальные пики; см. ниже), и какой из них вы выбираете, вероятно, зависит от схемы, предпочитаемой вашим продавцом приборов, хотя на современных приборах могут на выбор предоставляться оба метода. Самый важный момент из всего этого - форма двумерных линий, которые они производят. Оба метода включают детектирование сигнала, *который амплитудно модулируется* как функция периода эволюции t_1 (рис. 5.4), и это фундаментальное требование для создания спектров, которые имеют раздельные компоненты поглощения и дисперсии *(чисто-фазовые* спектры), таким образом, позволяя *фазочувствительное* представление. Отдельные действительные и мнимые части данных существуют и для f_1, и для f_2 измерений, опять же аналогичные действительным и мнимым частям 1D спектра. Это вызывает четыре квадранта данных (рис. 5.18) с только (действительный, действительный) набором данных, представляемых пользователю в качестве конечного 2D спектра, другие сохраняются для фазовой коррекции. Показываемый спектр обычно содержит формы линии типа поглощения в обоих измере-

ниях (рис. 5.6) везде, где возможно, так как форма линии двойного поглощения дает самое высокое возможное разрешение (рис. 5.18, RR четверть). Информация о фазе, содержащаяся в перекрёстных пиках, может также при некоторых обстоятельствах обеспечивать дополнительную информацию и это особенно справедливо для эксперимента фазочувствительного COSY

Фазы сигнала в фазочувствительном COSY

При обсуждении двумерных спектров важно рассматривать относительные фазы и формы линии для всех резонансов в 2D графике. Для спектра COSY, как объясняется выше, диагональные пики возникают от синфазного компонента намагничивания, произведённого эволюцией при спин-спиновом взаимодействии. Оно не переносится к связанному спину смешивающим импульсом, и диагональные пики поэтому имеют фазированную (синфазную) мультиплетную тонкую структуру в обоих измерениях. Перекрёстные пики, напротив, возникают из переносимого антифазного компонента и поэтому имеют антифазную мультиплетную структуру в обоих измерениях. Начальная фаза этих двух наборов сигналов также различается на 90°, так как диагонали возникают из намагничивания, которое модулировалось косинусно, в то время как перекрёстные пики возникают из тех, которые модулировались синусно. Таким образом, в конечном спектре фазы диагональных и перекрёстных пиков будут также различаться на 90°, а так как перекрёстные пики наиболее интересны, они фазируются, чтобы иметь формы линии (антифазные) вида поглощения в обоих измерениях, что означает, что диагональные пики обладают (синфазными) двойной дисперсии формами линий (рис. 5.19).

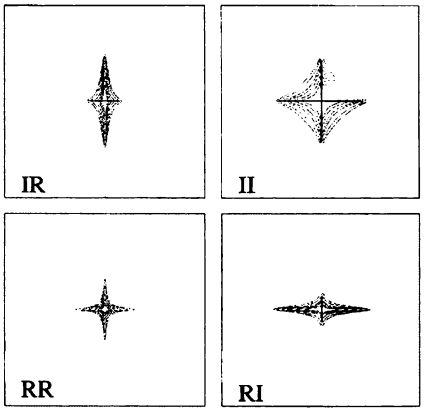


Рисунок 5.18. Четыре квадранта фазочувствительного набора данных. Только RR четверть представляется как спектр 2D, и она фазируется, чтобы содержать формы линии типа поглощения в обоих измерениях и, чтобы обеспечивать самое высокое разрешение (R = действительное, I = комплексное число). Положительные контуры показаны черным, а отрицательные красным цветом.

Неудачное присутствие форм линии дисперсного вида - неизбежное последствие последовательности COSY с широкими хвостами диагоналей, потенциально маскирующих пики, которые находятся близко возле диагонали. Один из популярных вариантов эксперимента (DQF-COSY) удаляет дисперсный вклад, и поэтому предпочитается для работы с высоким разрешением. Антифазный характер перекрёстных пиков COSY может также быть неприятным, когда взаимодействия малые относительно резонансных ширин линий, потому что происходит отмена линий и перекрёстный пик исчезает. Это важный фактор при определении при помощи этого эксперимента происходит ли корреляция, благодаря малым взаимодействиям, тема, обсуждаемая в разделе 5.6.2.

Заворот сигналов в двух измерениях

Резонансы, которые попадают вне выбираемой ширины спектра, будут характеризоваться неправильными частотами, и таким образом окажутся пришлыми в спектре 2D. Для симметричных наборов данных, таких как COSY, обе спектральных ширины выбираются одинаковыми, поэтому заворачивание будет случаться в обоих измерениях, и положение пришлого сигнала может обычно предсказы-

ваться из использованной для каждого измерения схемы квадратурного детектирования. Таким образом, по аналогии с одномерными спектрами, одновременные выборки или метод **Стейтса**, вызывает ***заворачивание* сигналов, появляющееся *в дальнем конце спектра***, в то время как завороты от последовательной регистрации или **TPPI** появляются как ***завёрнутые сигналы* у ближнего конца**. Некоторое недоумение может возникнуть, если различные схемы регистрации используются для двух измерений, например, одновременная регистрация в f_2, но TPPI в f_1 [10]. Преднамеренное заворачивание сигналов может быть полезным трюком при получении 2D данных, так как уменьшенные ширины спектра подразумевают уменьшенные времена регистрации и меньшие наборы данных, или альтернативно, большее разрешение. Например, часто можно удалять одинокие фенильные группы из спектров COSY и концентрироваться только на алифатической области, так как здесь наиболее часто находятся интересные корреляции.

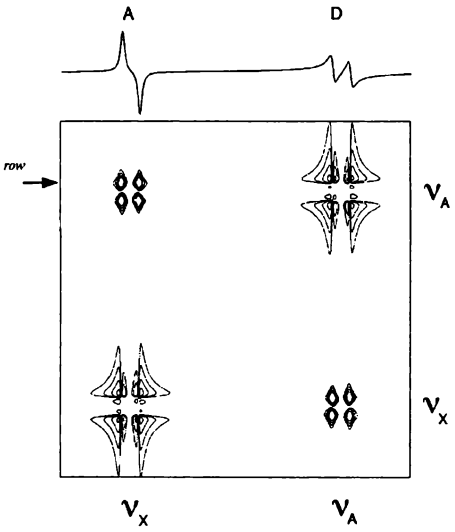


Рисунок 5.19. Фазочувствительный COSY для связанной двух-спиновой AX системы. Диагональные пики имеют широкие фазированные формы линии *двойной дисперсии* (D), в то время как перекрёстные пики имеют узкие, антифазные формы линии *двойного поглощения* (A), как далее иллюстрировано в ряду, выделенном из спектра.

С современными цифровыми фильтрами могут устраняться пришлые сигналы в f_2, хотя пришлые в f_1 остаются, так как отсутствует эквивалентная фильтрация в косвенном измерении.

Представления абсолютного значения

До появления вышеупомянутых методов, которые позволили представление фазочувствительных дисплеев 2D, собирались наборы данных, *которые фазово модулировались* как функция t_1, а не модулировались амплитудно. Фазовая модуляция возникает, когда синусно и косинусно модулированные наборы данных, собранные для каждого инкремента t_1, комбинируются (складываются или вычитаются) шагами фазового цикла, означая, что каждый ССИ на t_1 инкремент содержат смесь обеих частей. Здесь - знак фазовой прецессии позволяет дифференцирование положительных и отрицательных частот. Этот метод плох для фазочувствительного подхода по причине неизбежного смешивания поглощения и дисперсных форм линии, поэтому обычно подходит только для рутинной работы низкого разрешения.

Выбор только одного из двух возможных наборов зеркальных данных в f_1 теперь достигается подходящей комбинацией синусных и косинусных наборов данных. *Сложение* этих двух наборов данных в фазовом цикле (Таблица 5.2) выбирает те сигналы, которые имеют *такой же самый знак* прецессии в t_1, какой они имеют в течение t_2 (скажем, оба положительные) и они упоминаются как сигналы *P*-

типа. Вычитание в фазовом цикле выбирает те сигналы, которые имеют *противоположный знак прецессии* в течение t_1 и t_2 (скажем, отрицательный в t_1 и положительный в t_2) и упоминается как сигналы *N-типа*. Чтобы прояснить этот момент, помните, что два знака прецессии, о которых мы говорим здесь, просто представляют два возможных сигнала, которые детектировались бы по любую сторону от f_1 =0, не используя квадратурного детектирования.

Таблица 5.2. Фазовые циклы COSY для выбора сигналов N-типа (эхо) или P-типа (анти-эхо) в f_1.

	N-тип			P-тип		
	Импульс 1	Импульс 2	Детектор	Импульс 1	Импульс 2	Детектор
Цикл 1	x	x	x	x	x	x
Цикл 2	y	x	-x	y	x	x

Используя его, становится возможным выбирать только один из них, чтобы он появлялся в конечном спектре, в то время как зеркальное отображение отменяется. Информационное содержание спектров P-типа или N-типа эквивалентно, только их внешний вид различается посредством их отражения относительно f_1 = 0. Одно значительное различие возникает из того факта, что с выбором сигналов N-типа, выбираются те, которые имеют противоположные знаки прецессии в этих двух периодах времени. Это может рассматриваться, как аналогичное спиновому эхо, где векторы двигаются в противоположных направлениях по обе стороны от рефокусирующего импульса. Подобный эффект возникает в течение t_2 с выбором N-типа, посредством чего также возникают эхо, известные как *когерентный перенос эхо* (рис. 5.20). По этой причине выбор N-типа также упоминается как ***выбор эхо***, а сигналы P-типа как ***выбор анти-эхо***, так как рефокусирующее действие не возникает для сигналов, которые прецессируют в одном и том же направлении. Рефокусирование неоднородности поля с выбором эхо вместе с фактом, что сигналы P-типа подвергаются более жёстким искажениям, означает, что выбор N-типа предпочтителен, когда используется этот метод квадратурного детектирования. Традиционно эти спектры затем представляются с диагональю, бегущей снизу слева вверх направо, как в более ранних рисунках.

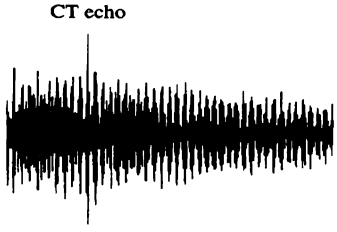


Рисунок 5.20. Эхо перенос когерентности, наблюдаемый в ССИ, полученном из N-типа набора данных COSY

Самый большой недостаток данных, собранных с фазовой модуляцией, - сложное смешивание форм линии дисперсного вида и поглощения. Резонансы, как говорят, обладают *фазово искажённой* формой линии (рис. 5.21а), которая имеет два основных неудобства. Во-первых, нежелательная и сложная смесь и положительных, и отрицательных интенсивностей, и, во-вторых, присутствие дисперсных вкладов и связанных широких хвостов, которые не годятся для спектроскопии высокого разрешения. Чтобы удалить недоумение от смешанных положительных и отрицательных интенсивностей, спектры рутинно представляются в режиме абсолютных значений, обычно после *вычисления магнитуды (абсолютного значения)* (рис. 5.22):

$$\mathbf{M} = (\text{real}^2 + \text{imaginary}^2)^{1/2}$$

где M представляет образующийся спектр. Чтобы улучшать разрешение и для устранения дисперсного хвоста от формы линии, также используются жёсткие функции окна. Хотя пригодны множество формирующих функций [11], наиболее часто используются *синусный колокол* (SINE), или *синус-квадратный колокол* (QSINE) (Раздел 3.2.7), которые просты в использовании, поскольку они имеют только одну переменную - положение максимума.

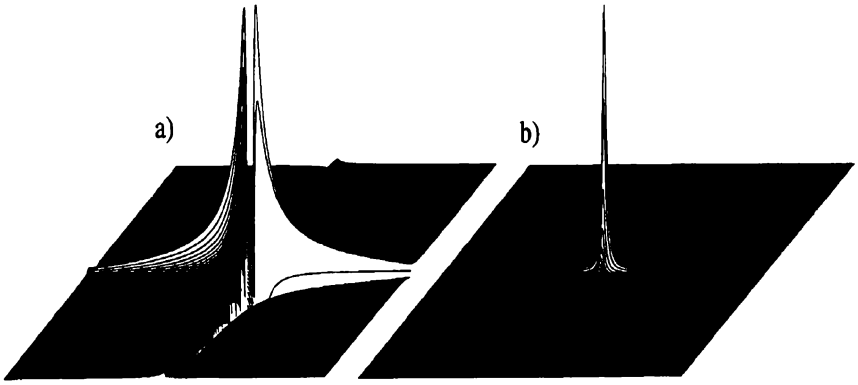


Рисунок 5.21. Иллюстрация пакетного графика: (a) - фазово искажённая форма линии и (b) - форма линии двойного поглощения. Ясно, разрешение в (b) значительно лучше, и по этой причине предпочитаются фазочувствительные методы.

Когда используется несдвинутый синусный колокол, то есть, когда половина синусной волны имеет максимум в центре времени регистрации, результирующие пики не обладают никакой дисперсной компонентой, таким образом, воспроизводя желаемую форму линии поглощения (рис. 5.22c). Форма функции (окна) синусного колокола также выгодна для увеличения интенсивностей кросс-пиков относительно диагонали. Так как перекрёстные пики возникают из синусных модуляций, как описано выше, они первоначально имеют нулевую интенсивность, которая нарастает в пределах времени регистрации. Диагональные пики косинусно модулированные, потому что начинаются с максимальной интенсивности, и, следовательно, ослабляются функцией окна. Однако ослабление представляет проблему для сигналов с различными временами релаксации (или, другими словами, ширинами линий), поскольку они будут ослабляться в различной степени и, в частности более широкие линии будут заметно уменьшаться по интенсивности начальной частью синусного колокола. Мораль, при интерпретации данных абсолютного значения, обработанных таким образом, следует опасаться различных интенсивностей перекрёстного пика, а не просто связывать их с меньшими константами взаимодействия. Последняя проблема с применением этих функций окна предельного улучшения разрешения в том, что большинство ранних сигналов ослабляется, а более поздний шум улучшается, приводя к потенциальной потере чувствительности. Чтобы улучшить это, можно сдвигать максимум функции к началу ССИ, с неизбежным добавлением некоторого дисперсного компонента, хотя лучший подход - получать фазочувствительные данные, которые не требуют применения таких жёстких функций окна. Несмотря на это, когда чувствительность не является ограничивающим фактором, эксперимент абсолютных значений имеет преимущество, не требуя выполнения фазовых коррекций, поэтому он хорошо подходит для рутинных регистраций и для автоматизированных методов, особенно, когда осуществляется как COSY-β вариант, описанный в разделе 5.6.3.

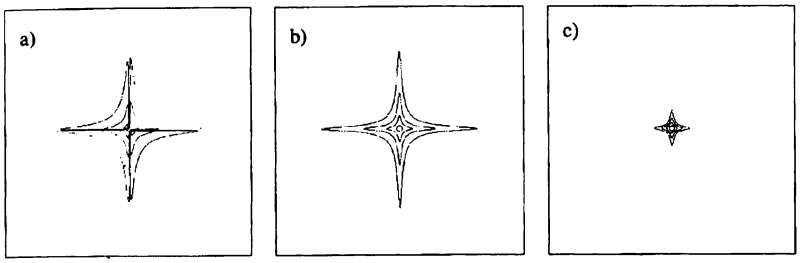


Рисунок 5.22. Контурные графики (a) - фазово-искаженная форма линии, (b) - то же самое с последующим вычислением абсолютного значения, и (c) - то же самое с последующим улучшением разрешения несдвинутым синусно-колоколообразным окном и вычислением абсолютного значения.

5.3.2. Аксиальные пики

Аксиальные пики - это экспериментальные артефакты, которые возникают из намагничивания, которое было продольным (ориентированым вдоль Z-оси) в течение t_1 периода эволюции, которое затем возвращается в поперечную плоскость смешивающим импульсом и детектируется в t_2. Так как это намагничивание не эволюционирует в течение t_1, частотное мечение отсутствует, и, следовательно, имеет нулевую частоту f_1. Пики могут связываться со всеми резонансами в спектре и, следовательно, появляться как полоса сигналов через спектр при f_1 =0 Гц. Для методов Стейтса или абсолютного значения, это случается в центре f_1 измерения (рис. 5.23) и, если не устраняется, может налагаться на подлинные перекрёстные пики. Если для квадратурного детектирования в f_1 используется TPPI, пики сдвигаются к одному краю спектра, который, как описано выше, - оказывается там, где f_1 = 0, и хотя это эстетически нежелательно, - наложение уменьшается.

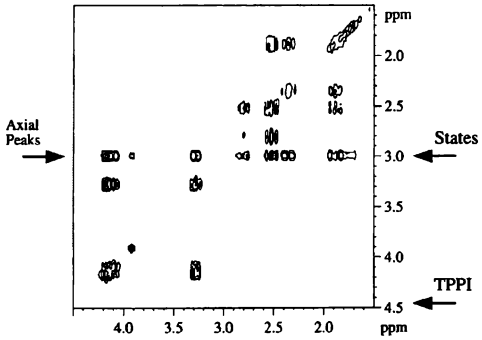


Рисунок 5.23. Аксиальные пики в спектре COSY образуют полосу сигналов вдоль f_2 в (a) середина f_1 (наборы данных метода Стейтса, или абсолютного значения) или (b) на высокочастотном краю спектра (наборы данных TPPI).

Ответственные за продольную намагниченность аксиальные пики возникают и из экспериментального несовершенства, и от релаксации в течение t_1. Таким образом, если подготовительная последовательность не помещает все намагничивание в поперечную плоскость, которая для COSY означает, что начальный импульс не соответствует точно 90° и остаётся некоторый остаточный z-компонент. Устранение этих нежелательных пиков достигается просто повторением эксперимента с инвертированной фазой приёмника. Фаза аксиальных пиков не будет изменяться и поэтому они отменяются, когда эти два набора данных вычитаются фазовым циклом. Эта процедура также имеет выгоду отмены любых отстроек ССИ, которые возникают из несовершенств приемника. Чтобы избежать одновременной отмены желательных сигналов, фаза импульса подготовки также инвертируется, чтобы гарантировать, что он соответствует фазе приёмника, приводя к двух-шаговому фазовому циклу таблицы 5.3.

Таблица 5.3. Основной двух-шаговый фазовый цикл для устранения аксиальных пиков

	Импульс 1	Импульс 2	Приёмник
Сканирование 1	x	x	x
Сканирование 2	-x	x	-x

5.3.3. Инструментальные артефакты

В то время как существует всё множество артефактов, которые могут возникать в 2D спектрах согласно деталям эксперимента, здесь кратко рассматриваются два наиболее вероятно встречающихся. Оба возникают от несовершенства аппаратуры и насколько они существенны для вас будет несколько зависеть от вашего прибора и его эффективности, но в любом случае полезно уметь распознавать эти артефакты, когда они появляются.

F2 артефакты квадратуры

Артефакты, появляющиеся вдоль рядов f_2 во многих случаях являются точной параллелью тем, которые могут наблюдаться в 1D регистрации, и не удивительно, что применяются такие же решения. Артефакты квадратуры зеркального отображения, возникающие из разбаланса квадратурных каналов приемника, снова могут подавляться интегрированием в существующий фазовый цикл 4-шаговой программы CYCLOPS (Раздел 3.2.5). Она включает приращение фазы всех импульсов в последовательности вместе с фазой приёмника шагами по 90°, и ведет к четырехкратному увеличению продолжительности фазового цикла. На современных приборах интенсивность артефактов квадратуры настолько мала (или даже не существует при цифровых, частотно сдвинутых схемах детектирования), что добавления CYCLOPS часто можно избегать и экономить время, когда чувствительность не ограничивается.

T_1 шум

Оцифровка данных в течение 2D эксперимента подвергается тому же самому тепловому шуму, возникающему в датчике и предусилителе, что и в 1D эксперименте. Этот шум делает вклад в шумовую базовую плоскость, наблюдаемую в спектре 2D. Существует также особенно нежелательный артефакт, связанный с 2D экспериментами, упоминаемый как t_1 шум (обратите внимание, что t_1 здесь относится к периоду эволюции, и его не следует путать с постоянной времени релаксации T_1). Он появляется как полосы шума, параллельные оси f_1, где существует резонанс ЯМР, и иногда именно он ограничивает наблюдение пиков в спектре, а не истинный тепловой шум. Действительно, оказалось, что самая ранняя работа по 2D ЯМР не была опубликована, благодаря избыточному t_1-шуму, присутствовавшему в спектрах. Вообще говоря, он вызывается нестабильностями прибора, которые ведут к случайным флуктуациям в интенсивностях и фазах сигналов от одного ССИ к следующему в течение 2D эксперимента. Так как эти флуктуации касаются возмущений резонанса ЯМР, полосы t_1-шума характерно появляются только при f_2 сдвигах резонансов и имеют интенсивности, пропорциональные соответствующей резонансной амплитуде (рис. 5.24). Таким образом, наиболее сильные полосы шума связаны с интенсивными острыми пиками и наиболее заметны для синглетов.

Нестабильности приборов, которые делают вклад в t_1-шум, многочисленны [12, 13], включая невоспроизводимую фазу и амплитуду РЧ импульса, нестабильность в стабилизации отношения полечастота и однородности поля, и так далее. Эти факторы находятся в руках изготовителей прибора, которые постоянно борются за уменьшение различных источников нестабильностей приборов все эти годы, хотя проблемы ни в коем случае не устраняются полностью. В подготовке 2D регистрации,

имеется множество этапов, которые также помогут минимизировать эти артефакты. Те же самые аргументы применимы к любому эксперименту, который использует разностную спектроскопию, чтобы сохранять выбранные сигналы и отменять другие (например, эксперимент разностного ЯЭО в главе 8), и потому не являются исключительными в мире 2D ЯМР. Применение сильного острого сигнала стабилизации обеспечивает оптимальное регулирование отношения частота-поле, а применение программ автоматического шиммирования на шиммах низкого порядка для долговременных регистраций должно также помогать поддерживать воспроизводимость формы линии. Стабильность окружающей среды образца также важна. Стабильность магнитного поля, конечно, существенна, поэтому движение любых магнитных материалов где-нибудь вблизи прибора очень нежелательно; это может даже включать движение (человеческое или иное) над или под магнитом, или в лаборатории по соседству.

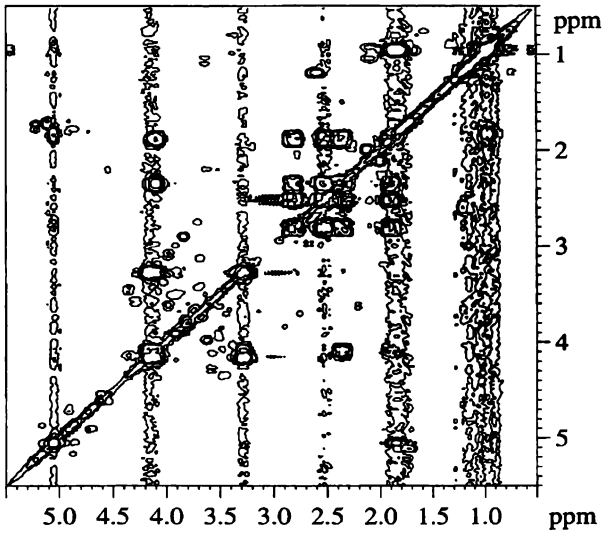


Рисунок 5.24. Полосы шума, параллельные оси f_1 (t_1 шум), часто появляются в 2D спектрах.

Температурная стабильность также должна поддерживаться соответствующим блоком контроля температуры и уравновешивание образца перед прогоном эксперимента является существенным, особенно для обменивающихся растворяемых веществ или растворителей, особенно для водных растворов. Наконец, рекомендуется практика ***не вращать образцы*** в течение 2D регистраций. Это обычно вызывает дополнительную модуляцию детектированного сигнала при вращении образца, особенно от несовершенства ампулы или «колеблющегося» ротора образца, что увеличивает вклад в t_1 шум.

Симметризация

Нежелательный t_1 шум в спектрах может также уменьшаться в соответствии с множеством стратегий обработки ССИ. Одна из наиболее обычных процедур для экспериментов COSY абсолютного значения - симметризация [14]. Она включает замену симметрично связанных точек данных по обе стороны диагонали меньшим из двух значений, таким образом, сохраняя перекрёстные пики, но подавляя несимметричные артефакты. Её, однако, следует применять с осторожностью, поскольку она может увеличивать артефакты, которые имеют совпадающую симметрию, такие как области t_1 шума, связанного с интенсивными синглетами, придавая им вид подлинных корреляционных пиков. Недо-

умения обычно можно избежать путём сравнения симметризованного спектра с несимметризованным. Этот метод обычно не подходит для фазочувствительных данных, поскольку он может вводить искажение структуры перекрёстного пика и может вести к уменьшению чувствительности, поэтому симметризация находит довольно ограниченное использование в современном ЯМР.

Существенные уменьшения уровня t_1 шума также могут получаться в некоторых экспериментах, где выбор сигнала достигается импульсными градиентами поля. Хотя гомоядерные эксперименты, такие как COSY, показывают немного выгоды в этом отношении, более заметный прирост, очевиден для протон-детектируемых экспериментов гетероядерной корреляции. Более современные методологии последующей обработки отклика, такие как опорная деконволюция [15,16], также обеспечивает внушительные уменьшения t_1 шума [17,18], и алгоритмы, требуемые для этого, постепенно появляются в коммерческом программном обеспечении обработки данных ЯМР.

5.3.4. 2D регистрация данных

Успех любого эксперимента ЯМР, конечно, кардинально зависит от правильной установки параметров регистрации. В случае 2D экспериментов следует рассматривать параметры для каждой размерности отдельно, и мы увидим, что наиболее подходящие установки параметров для f_2 редко оптимальны для f_1. Аналогично, следует больше внимания уделять постановке 2D эксперимента, чем обычно требуется для 1D регистрации, чтобы оптимально использовать доступное приборное время и пространство для хранения данных. Снова, общие соображения ниже будут применяться ко всем 2D экспериментам, хотя мы на этой стадии ограничиваем наше обсуждение экспериментом COSY.

На самом общем уровне при постановке эксперимента требуется ответить на три фундаментальных вопроса:

1) Позволят ли определённые параметры (или ограничат) детектирование желательной информации и исключат ли нежелательную?
2) Сколько времени это занимает, и имею ли я достаточно времени?
3) Сколько требуется пространства для хранения данных и настолько оно доступно?

Идеально мы хотели бы получать наборы данных быстро. Мы хотели бы, чтобы они были как можно меньше для скорости обработки и простоты обращения, и всё же ещё были бы способны обеспечивать нужную информацию. Поэтому, мы ставим наш эксперимент с такими целями в уме.

Прежде всего, ширина спектра, которая должна быть одинаковой в обоих измерениях COSY эксперимента, должна поддерживаться минимальной с отстройками передатчика выбранными так, чтобы сохранять только те области спектра, которые обеспечивают полезные корреляции. Обычно можно уменьшать ширину спектра до значений много ниже 10 м.д. или около того (протонное окно наблюдения в 1D экспериментах). Применение чрезмерно больших окон ведет к худшему цифровому разрешению в конечном спектре, или требует больших размеров данных, ни то, ни другое нежелательно. Ширины спектра, в свою очередь, определяют частоты выборок для данных в t_2 в точной аналогии с 1D регистрацией и размер t_1 инкремента, опять же согласно критериям Найквиста. Время регистрации (AQ_t) и, следовательно, цифровое разрешение ($1/AQ_t$) для каждого измерения затем диктуется числом точек данных, собранным в каждом измерении. Для t_2 это оцифрованное в каждом ССИ *число точек данных*, в то время как для t_1 это *число ССИ, собранное в течение эксперимента*. Правильная установка этих параметров - наиболее важный аспект в постановке 2D эксперимента, и образ мысли о временах регистрации и цифровом разрешении в 2D наборе данных, обязательно, совершенно отличается от 1D эксперимента. Для иллюстрации представьте перенос типичных параметров, используемых в 1D протонной регистрации, в две размерности COSY. Время регистрации могло бы быть 4 секунды, что соответствует цифровому разрешению 0,25 Гц/точка, без релаксационной задержки между сканированиями. Например, на приборе 400 МГц при ширине спектра 10 м.д. это цифровое разрешение требовало бы 32К слов для сбора ССИ. 2D эквивалент с квадратурным детектированием

Стейтса в f_1 и с подавлением аксиальных пиков, требует сбора 4 сканирований для каждого t_1 инкремента. Среднее время регистрации для каждого было бы 6 секунд (t_2 плюс среднее значение t_1), что соответствует 24 сек сбора данных на каждый ССИ. Если бы 16K инкрементов t_1 должны были бы делаться для измерения f_1 (помним, что два набора данных собираются для каждого t_1 инкремента), это соответствовало бы полному времени эксперимента около 4½ дней. Кроме того, размер результирующей матрицы данных был бы немного больше, чем 1000 миллионов слов, а при обычных компьютерных системах с 32 битами на слово это требует приблизительно 4 гигабайт дискового пространства! Я полагаю, вы согласитесь, что четыре дня регистрации базового COSY совершенно недопустимы, уже не говоря о необходимости отдельного жесткого диска на эксперимент, так что получение данных с такими высокими уровнями оцифровки в обоих измерениях - ясно невозможно.

Ключ решения лежит в том, какой уровень оцифровки требуется для данного эксперимента. Первое, что следует отметить, добавление точек данных для расширения t_2 измерения ведет к относительно малому увеличению в полной длине эксперимента, поэтому мы можем быть достаточно расточительны с этим (хотя это приведёт к соответствующему увеличению размера матрицы данных). Добавление t_1 точек данных, с другой стороны, требует, чтобы полный ССИ, получаемый в результате потенциально многих сканирований, требовался *на каждый инкремент*, что значительно больше увеличивает полное время сбора данных. Таким образом, обычно стремятся удерживать число инкрементов t_1 на минимуме, который согласуется с разрешением интересующих корреляций, и, увеличивая, насколько необходимо, t_2, когда требуется более высокое разрешение. По этой причине цифровое разрешение в f_2 часто лучше, чем в f_1, особенно в случае наборов фазочувствительных данных. Применение меньших t_1 времен регистрации (AQ_{t1}) обычно также предпочтительно по причинам чувствительности, так как ССИ, зарегистрированные для более длинных значений t_1, будут ослабляться релаксацией и, таким образом, будут делать меньший вклад в полную интенсивность сигнала. Применение малого AQ_{t1} вероятно должно вести к усечению t_1 данных, и тогда необходимо применять подходящие функции окна, которые приводят конец данных к нулю (аподизация), чтобы уменьшать появление артефактов усечения.

Для COSY, в частности, один из факторов, которые ограничивают уровень используемой оцифровки, - присутствие по существу антифазных перекрёстных пиков. Поэтому слишком низкая оцифровка будет вызывать их отмену и исчезновение корреляции (см. раздел 5.6.2 для дальнейших обсуждений). Уровень оцифровки будет также зависеть от типа эксперимента и данных, которые ожидают выделять из него. Для COSY абсолютного значения обычно заинтересованы в установлении места существования корреляции, без особого интереса к тонкой структуре в этих перекрёстных пиках. В этом случае можно использовать низкий уровень оцифровки, совместимый с идентифицирующими корреляциями. Как правило, успех обеспечен, когда цифровое разрешение составляет от J до 2J Гц/точка (AQ от 1/J до 1/2J секунд), что должно позволять детектирование большинства корреляций, возникающих от взаимодействия J Гц или больше. Таким образом, для нижнего предела, скажем, 3 Гц, цифровое разрешение 3-6 Гц/точка (AQ приблизительно 300-150 мс) будет достаточным. Время регистрации для t_1 - обычно половина того, что для t_2 в этом эксперименте, с однократным дополнением нулями, применённом в t_1 так, чтобы конечное цифровое разрешение было одинаковое в обоих измерениях спектра (как требуется для симметризации).

Для регистраций фазочувствительных данных следует, вероятно, интересоваться использованием информации, содержащейся в пределах мультиплетных структур перекрёстного пика, и требуется более высокая степень оцифровки, чтобы адекватно отразить её (тонкую структуру), более подходящее цифровое разрешение лежит около J/2 Гц/точка или лучше (AQ =2/J Гц или больше). Снова, оцифровка в t_2 - обычно в 2, или даже в 4, или в 8 раз больше, чем в t_1. В любом измерении, но наиболее часто в t_1, оно может улучшаться дополнением отклика нулями, хотя всегда следует помнить, что *длительность регистрации временного измерения задаёт фундаментальный предел для раз-*

решения пиков и эффективных ширин линий после оцифровки, ***независимо от дополнения нулями***. Альтернативный подход для продления данных временной шкалы использует прямое линейное предсказание при обработке данных (Раздел 3.2.3). Правило, как всегда, в том, что высокое разрешение требует длинных периодов выборки данных.

Выбрав подходящие уровни оцифровки и размеры данных, остаётся выбрать число сканирований или переходов, которые должны собираться для каждого ССИ, частоты повторения и, следовательно, используемые релаксационные задержки. Минимальное число переходов диктуется минимальным числом шагов в фазовом цикле, используемом для выбора желательных сигналов. Далее сканирования могут включать в цикл дополнительные шаги для подавления артефактов, возникающих от различных несовершенств. Кроме того, дальнейшие переходы должны требоваться только для усреднения сигнала, когда чувствительность становится ограничивающим фактором. Так как большинство экспериментов получаются при «стационарных» условиях, необходимо также включать «фиктивные» (холостые) сканирования перед сбором данных, чтобы позволить установиться стационарному состоянию. На современных приборах, которые используют двойную буфферизацию памяти регистрации, холостые прохождения требуются только в самом начале каждого эксперимента, что делает незначительное увеличение полного требуемого времени. На старых приборах, которые испытывают отсутствие этой особенности, необходимо добавлять холостые прохождения для каждого t_1 инкремента, и они могут затем делать существенный вклад в полную продолжительность эксперимента. Частота повторения будет зависеть от протонных T_1 в молекуле и, так как последовательность использует 90° импульсы, оптимальная чувствительность достигается, повторяя сканирования через каждые 1,3 T_1 секунд.

Таблица 5.4. Иллюстративные таблицы данных для экспериментов COSY.

Эксперимент	Ширина спектра (м.д.)	$N(t_2)$	$N(t_1)$	Гц/точка (t_2)	Гц/точка (t_1)	Время эксперимента	Размер набора «сырых» данных
a) Фазочувствительный	10 x 10	32 K	32 K	0,25	0,25	4,5 дней	1000 мегаслов
b) Фазочувствительный	6 x 6	2 K	1 K	2,3	2,3	55 мин	2 мегаслова
c) Абсолютные значения	6 x 6	1 K	256	4,6	4,6	22 мин	0,25 мегаслова

Сценарий (a) просто переносит параметры регистрации из типичного протонного 1D спектра во второе измерение, что ведёт к недопустимым требованиям времени, в то время как применение параметров (б) и (в) более подходит для регистраций 2D. Все вычисления используют фазовые циклы для квадратурного детектирования f_1 и подавления аксиальных пиков только, для (b) и (c), задержка восстановления между сканированиями - 1 сек. Использовалось также однократное дополнéние нулями в f_1 для (b) и (c).

Возвращаясь к примеру регистраций на 400 МГц, обсуждённому выше, мы можем применить более подходящие критерии для выбора параметров. Таблица 5.4 сравнивает верхний результат с более реальными данными, и ясно показывает, что при этих условиях COSY становится жизнеспособным экспериментом, требуя только часы или даже минуты накопления, а не многие дни. Введение импульсных полевых градиентов в спектроскопию высокого разрешения (Раздел 5.6) позволяет получать эксперименты с только 1 сканированием на ССИ, таким образом, далее уменьшая полное требуемое время для сбора данных, когда чувствительность не ограничивает. Требования хранения данных в этих реальных примерах также находятся в пределах способностей современных компью-

теров, и, вероятно, должны становиться всё менее значащими, так как они продолжают развиваться. Хотя обсуждались COSY спектры, общая линия представленного здесь рассуждения применима к постановке любого 2D эксперимента. Эти проблемы кратко рассматриваются, опираясь на различные классы методов, в следующих главах, описывающих другие 2D методы.

5.3.5. Обработка 2D данных

Общая процедура для обработки любого 2D набора данных одинакова и в основном следует порядку, очерченному в блок-диаграмме рис. 5.25. Детали параметров, выбранных для каждой стадии, будут зависеть от использованной методики, условий регистрации и природы изучаемого образца. Поэтому здесь рассматриваются только общие принципы, которые должны учитываться в течение обработки данных. Все они - расширения идей, уже представленных в главе 3, для обращения с 1D данными, и этот раздел предполагает близкое знакомство с ними (разделы 3.2.3 и 3.2.8). Методы обработки имеют даже большую важность для двумерной работы, где оператор может формировать внешний вид конечного спектра в значительной степени согласно выбираемым параметрам. Выбор функции окна имеет основное влияние на конечный спектр, и этот выбор заметно отличается для фазочувствительных и абсолютного значения наборов данных, поэтому первоначально мы ограничиваем обсуждение фазочувствительным случаем. Эти функции обычно применяются с тремя целями в уме:

- учесть усечение временных данных и таким образом ослабить артефакты усечения,
- увеличить разрешение в спектре, и
- обеспечить оптимальное отношение сигнал/шум.

Вследствие использования коротких времен регистрации, обычно происходит усечение данных в обоих измерениях. Особенно, когда применяется дополнение нулями, поэтому почти всегда в случае t_1, функция окна должна сводить ССИ к нулю (аподизация), чтобы избежать звона усечения.

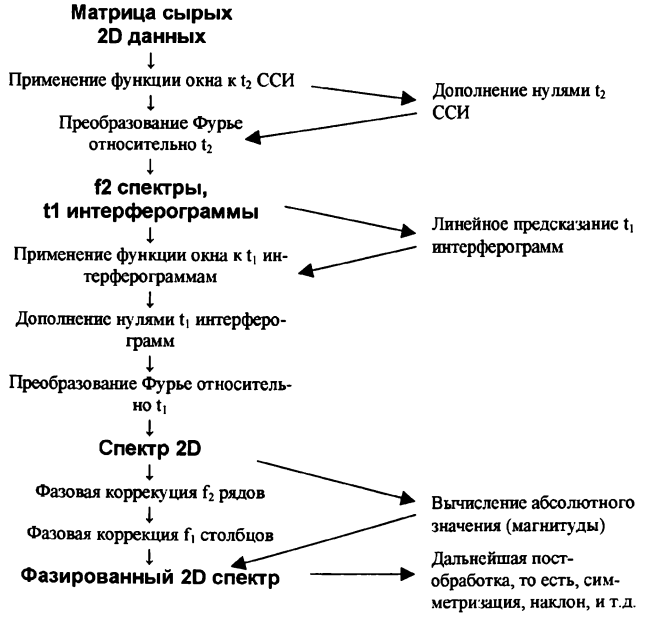


Рисунок 5.25. Типовая схема обработки двумерного набора данных. Пункты, показанные справа, являются дополнительными или альтернативными процедурами, которые могут выполняться.

Часто применение более длинных t_2 времен регистрации заменяет дополнение нулями в этом измерении, и применимы рассуждения, подобные аналогичным для 1D ССИ. Обычно в первую очередь заботятся о некотором улучшении разрешения без ухудшения отношения сигнал/шум, для чего может использоваться любая из функций улучшения разрешения раздела 3.2.8. Наиболее популярными являются преобразование Лоренца-Гаусса, или сдвинутый синусный колокол, или синус-квадратный колокол. Последние две гарантируют приведение отклика к нулю, а поэтому также подходят для формирования t_1 данных, перед дополнением нулями, которое обычно применяется как минимум однократно. В любом измерении чрезмерно сильное улучшение разрешения ведет к появлению отрицательных выбросов возле резонансов, поэтому метод проб и ошибок обычно даёт самый лучший подход к достижению оптимальных результатов. Часто первый ССИ 2D матрицы данных может использоваться, как удобный пробный 1D спектр, чтобы визуально проверять действие, которое различные функции окна будут оказывать на конечные f_2 данные. Современные программы теперь позволяют диалоговые изменения параметров формы, наряду с дисплеем конечного спектра, делая такое экспериментирование довольно простым. Альтернатива дополнению нулями t_1 данных для наборов данных высокого отношения сигнал-шум - расширение t_1 интерферограмм линейным предсказанием, обычно в два или в четыре раза от их первоначального размера. Это не только продлевает спад, но также уменьшает потребность аподизации сильно усечённых данных, что ещё более улучшает разрешение в f_1. Кроме того, если желательно, можно также применять последующее дополнение нулями, чтобы улучшать оцифровку конечного спектра.

Наборы данных абсолютного значения (обычно представляются последующим вычислением магнитуды) требуют применения более сильных функций улучшения разрешения в обоих измерениях, чтобы подавлять нежелательные вклады дисперсного вида в фазовоискажённые формы линии. Это чаще всего достигается синусным колоколом или функциями синус-квадратного колокола. Они хорошо подходят к антифазным пикам, которые вызывают корреляции COSY, так как, они начинаются с нулевой интенсивности (будучи первоначально антифазными, они не имеют чистого намагничивания) и растут в течение ССИ. Однако большинство 2D экспериментов производит фазированные резонансы, которые обеспечивают полную интенсивность в начале ССИ, и, если их использовать несдвинутыми, эти функции ведут к ослаблению большой части сигнала и могут сильно ухудшать чувствительность (попробуйте обработать 1D протонный спектр несдвинутым синусным колоколом!).

Фазовая коррекция

Фазовая коррекция 2D спектра предпринимается независимо для двух частотных измерений. Когда первый ССИ 2D матрицы содержит сигналы, он может обрабатываться и фазироваться как для 1D спектра, и результирующие константы коррекции фазы нулевого и первого порядков можно применять к f_2 данным. Частотнонезависимая фазовая коррекция для f_1 будет зависеть от деталей циклирования фазы, использованного в импульсной последовательности, но должна быть близка к 0° или 90° Теоретически частотно зависимая фазовая коррекция (1-го порядка) в f_1 не должна требоваться, так как временные задержки прежде выборки данных, которые производят эти ошибки, не возникают для искусственно произведённой временной шкалы. На практике для оптимальных результатов часто требуется некоторая малая коррекция для обоих измерений, и это предпринимается в интерактивном режиме, как для 1D спектра. Таким образом, стремятся наблюдать сигналы на обоих концах спектра, по которым и выполняют коррекцию. Это включает независимо выбор f_2 рядов (или f_1 столбцов) из 2D спектра. Чтобы обеспечить необходимое распределение частоты резонансов, обычно от каждого измерения требуется 2 или больше, и полученные фазовые константы применяются ко всем другим рядам (или столбцам).

Представление

Как уже утверждалось, наиболее информативный и удобный способ представления 2D данных – в виде контурного графика, в котором горизонтальные и вертикальные оси представляют частотные измерения, а интенсивность пика показывается соответствующими контурами. Установка нижнего контура определяет отсечку, ниже которой сигналы отсутствуют. Обычно она устанавливается некоторым образом выше уровня шума базовой плоскости, но если установлена слишком высоко, может устранять потенциально полезную информацию, такую как слабые корреляции, возникающие от малых взаимодействий. В некоторых случаях уровень отсечки, подходящий для обнаружения слабых сигналов будет слишком низкий для более интенсивных сигналов, и может вызывать появление артефактов, таких как t_1 шум, который делает график эстетически непривлекательным. В таких ситуациях, вероятно, необходимо создавать множество графиков с различными установками. Также может быть удобно делать растяжки различных областей, особенно в скученных ситуациях, или где должны анализироваться детали структур перекрёстных пиков. Такой анализ лучше всего выполняется в интерактивном режиме на экране, если возможно, где применение курсоров и перекрестий более точное, чем применение карандаша и линейки. В ситуациях, где должны показываться и различаться и положительные, и отрицательные контуры, могут использоваться различные цвета или различные стили линий, если требуется чёрно-белый вывод (на печать).

5.4. КОГЕРЕНТНОСТЬ И ПЕРЕНОС КОГЕРЕНТНОСТИ

Понятие когерентности уже было затронуто во введении в COSY в этой главе и кратко упоминалось в главе 4. Оно лежит в основе каждого эксперимента ЯМР и, чтобы понять многие из тем, которые следуют в этой книге, полезно выработать некоторое чувство и понятие переноса когерентности. Когерентность - обобщение понятия поперечной намагниченности, однако важно оценить некоторые специфические признаки когерентности, которые можно иллюстрировать, опираясь на диаграмму энергетических уровней связанной (J-взаимодействующей) 2-спиновой AX системы (рис. 5.26a). После применения 90° импульса к этой системе при равновесии, существует поперечная намагниченность, которая, согласно векторной модели, может представляться как четыре вектора во вращающейся системе, по одному для каждого из переходов на рисунке 5.26a. Они вызывают появление в

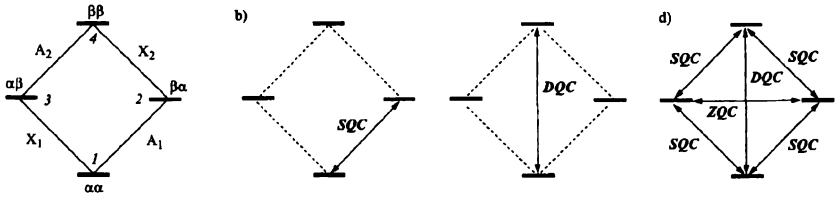


Рисунок 5.26. Схематические диаграммы энергетических уровней для связанной двух-спиновой системы AX (см. текст). SQC = одноквантовая когерентность, DQC = двух-квантовая когерентность и ZQC = нуль-квантовая когерентность.

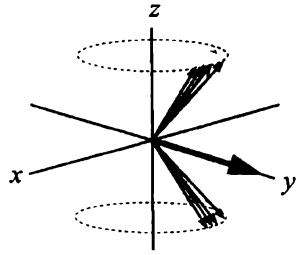


Рисунок 5.27 Чистая поперечная намагниченность производится из возмущения индивидуальных магнитных моментов, которое вызывает наблюдаемый сигнал ЯМР Эти спины, как говорят, *обладают фазовой когерентностью* и, так как только одноквантовые спиновые переходы (α↔β) вовлекаются в генерирование этого состояния, оно называется *одноквантовой когерентностью.*

образующемся спектре четырёх линий двух дублетов. Эти переходы называются *одноквантовыми* переходами, потому что они связаны с изменением магнитного квантового числа M на единицу ($\Delta M = 1$). Связанная с каждым из них намагниченность, поэтому упоминается как *одноквантовая когерентность*, которая, говорят, обладает *порядком когерентности* p = 1. Одноквантовая когерентность - обычная поперечная намагниченность, детектируемая в любом эксперименте ЯМР, так как она способна индуцировать напряжение в детекторе ЯМР. В этом отношении полезно рассмотреть разность между переходом, возбужденным 90° импульсом, как выше, и тем который насыщен слабым РЧ облучением. Обе ситуации соответствуют равным α и β заселенностям и, следовательно, нулевой разности заселенностей через переходы, но только первый из них производит детектируемый сигнал. Насыщенный переход не имеет *чистого* детектируемого намагничивания, потому что спины распределяются *возле x-y плоскости* со случайной фазой. Спины, возбужденные импульсом, однако, собираются вместе вдоль одной оси в поперечной плоскости и, таким образом, производят обнаруживаемый чистый компонент, *они имеют фазовую когерентность*, наложенную на них импульсом (Рис. 5 27). Одноквантовая когерентность обычно определяется как фазовая когерентность между двумя состояниями, которые имеют $\Delta M == \pm 1$.

Теперь представим применение селективного 90° импульса к 2-спиновой системе при равновесии, но только к одному из переходов, скажем к A_1. Это создает одноквантовую когерентность только для этого перехода (Рис. 5 26b). Затем представьте применение селективного 90° импульса к переходу X_2 и, следовательно, выравнивание заселённостей через этот переход. Этот процесс переносит некоторые из спинов, связанные с состоянием βα, в состояние ββ, а некоторая часть фазовой когерентности, первоначально связанной с A_1, теперь связывается с 1-4 переходами (αα-ββ) (рис. 5 26c). Это новая форма когерентности, ранее совсем не рассматривавшаяся. Она соответствует изменению на 2 магнитного квантового числа ($\Delta M = 2$) и поэтому называется двухквантовой или, чаще, *двухквантовой когерентностью* (p = 2), которую трудно представлять средствами векторной модели, использовавшимися до настоящего времени. В эксперименте COSY подобное положение дел возникает с помощью неселективного 90° импульса, применённого одновременно ко всем переходам. Таким образом, в течение t_1 одноквантовые когерентности (поперечная намагниченность), произведенные первым 90° импульсом эволюционируют под влиянием спин-спинового взаимодействия, давая антифазные компоненты намагничивания, требуемые для *переноса когерентности*, как описано в разделе 5.2.3. При применении второго 90° импульса когерентность, первоначально связанная с одноквантовым переходом A_1, распространяется среди других переходов в пределах спиновой системы (X_1, X_2, A_2, 1-4 и 2-3), в то время как некоторая часть остается с A_1 (рис. 5 26d). Первые два снова соответствуют одноквантовой когерентности, но теперь спина X, так что это переносит когерентность от A к X (Рис. 5 28) и вызывает перекрёстный пик COSY. Когерентность, остающаяся с A_1, или та, которая перенесена к A_2, в конечном счете, производит мультиплет диагонального пика, что мы уже видели. Когерентность 1-4 - двухквантовая когерентность, описанная выше, в то время как когерентность 2-3 соответствует нулевому изменению магнитного квантового числа, так называемая *нуль-квантовая когерентность* (p = 0). Продольная намагниченность, хотя и не является состоянием когерентности, также имеет p = 0, так как это не соответствует поперечной намагниченности.

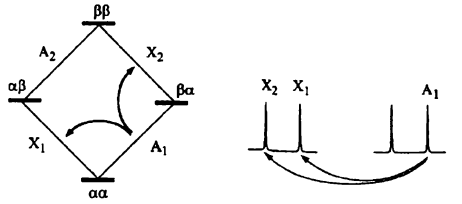


Рисунок 5.28. Процесс переноса когерентности, ответственный за генерацию кросс-пиков в корреляционной спектроскопии, иллюстрируется для перехода A_1. Когерентность спина A в течение периода t_1 2D последовательности становится когерентностью спина X в течение t_2, таким образом, коррелируя эти два спина в образующемся спектре.

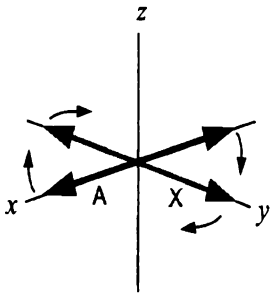


Рисунок 5.29. Упрощенная картина многоквантовой когерентности в AX системе рассматривает её как состоящую из группы развивающихся антифазных векторов, которые имеют нулевое чистое намагничивание, и, следовательно, никогда не могут прямо наблюдаться.

Все когерентности, для которых $p \neq \pm 1$, упоминаются как *многоквантовые когерентности.* Квантовомеханические правила отбора диктуют, что только те когерентности, которые соответствуют $\Delta M = \pm 1$, способны индуцировать сигнал в катушке детектирования или, другими словами, ***только одноквантовые когерентности могут наблюдаться непосредственно,*** так как все другие не имеют *чистого* намагничивания, связанного с ними. К сожалению, простое утверждение этого факта оставляет некоторую атмосферу таинственности, окружающей «невидимые» многоквантовые когерентности. Простая физическая картина этих состояний рассматривает их как комбинации пар развивающихся векторов, которые *всегда* антифазные и, следовательно, никогда не производят наблюдаемого *чистого* намагничивания (рис. 5.29). Частота эволюции этих состояний диктуется химическими сдвигами участвующих ядер и порядком когерентности. В то время как одноквантовые когерентности развиваются во вращающейся системе согласно отстройке химического сдвига спина от передатчика, двухквантовая когерентность развивается *согласно суммам* отстроек химического сдвига двух спинов ($\nu_A + \nu_X$), а нуль-квантовые когерентности согласно их *разностям отстроек* ($\nu_A - \nu_X$). В системе, содержащей больше чем два связанных спина, также могут возбуждаться более высокие порядки многоквантовой когерентности, так, например, по крайней мере, три связанных спина требуются для генерации трёх-квантовой когерентности, и так далее. Хотя снова, эти более высокие порядки не могут наблюдаться *непосредственно,* их присутствие может обнаруживаться *косвенно,* если они преобразуются в одно-квантовые когерентности перед детектированием. Например, добавление третьего импульса к COSY восстановило бы одноквантовую когерентность из иначе невидимых многоквантовых когерентностей, которые генерировались; пример этого находится в двухквантово фильтрованном COSY, описанном ниже. Также как спин-спиновая релаксация производит потерю наблюдаемых сигналов, уничтожая фазовую когерентность поперечного (одноквантового) намагничивания, многоквантовые когерентности также дефазируются такими релаксационными процессами и, подобно, имеют ограниченное время жизни, в течение которого ими можно управлять.

Следует также отметить, что порядок когерентности имеет знак, связанный с ним, таким образом, одноквантовая когерентность может иметь порядок $p = +1$ или $p = -1$, в то время как двухквантовые когерентности будут иметь $p = \pm 2$ и так далее. Положительные и отрицательные знаки представляют гипотетические векторы, которые прецессируют с одной и той же скоростью, но в противоположных направлениях во вращающейся системе. Для одноквантовой когерентности, это просто соответствует двум наборам зеркальных сигналов, которые наблюдались бы по обе стороны опорной частоты в отсутствие квадратурного детектирования, и, таким образом, имеет реальное физическое проявление. Используя квадратурное детектирование при сборе данных, мы хотим сохранять один из этих наборов сигналов и устранять другой, чтобы избежать возможного недоумения.

5.4.1. Пути распространения когерентности

Существование различных уровней когерентности, существующей во время любой импульсной последовательности, может иллюстрироваться диаграммами уровней когерентности. Они первоначально вводились в ЯМР с целью проектирования фазовых циклов импульсной последовательности [19-21], но могут также обеспечивать чрезвычайно эффективные, а также простые графические средства прослеживания потока намагничивания через импульсную последовательность. Этот формализм оказывается особенно мощным при рассмотрении пути следования намагничивания от начала 2D импульсной последовательности до его попадания в детектор. Он также обеспечивает средства для следующих многоквантовых когерентностей, которые не могут представляться векторной моделью, таким образом, преодолевая некоторые ограничения этого без обращения к математическому формализму. Диаграмма уровней когерентности для одноимпульсной 1D регистрации представлена на рисунке 5.30. Одиночный импульс производит только когерентности с $p = \pm 1$, и они представлены на этом рисунке как сплошные и пунктирные линии. Как утверждалось выше, один из этих путей выбирается квадратурным детектированием аппаратных средств, в то время как другой отбрасывается, и чисто по соглашению сохраняется путь $p = -1$ (заметьте, что в оригинальной статье [19], выбран противоположный договор). Диаграммы уровней когерентности используются, чтобы показать путь следования желательного намагничивания, который выбирается применением фазовых циклов или импульсных градиентов поля. Все другие возможные пути (которых может быть очень много) не показаны и полагаются подлежащими устранению, поэтому пунктирный путь рис. 5.30 обычно не будет показываться.

Чтобы ввести идею путей распространения когерентности для 2D экспериментов, снова рассматривается последовательность COSY, и для простоты описываются эксперименты COSY абсолютных значений P- и N-типа, описанные в разделе 5.3.1. Желательные пути для обоих этих экспериментов показываются на рисунке 5.31 с единственным различием, между ними - наличием относительного знака прецессии (одноквантовой) когерентности в периоды времени t_1 и t_2, являющегося одинаковым для сигналов P-типа и противоположным для N-типа. Эта разность затем ясно иллюстрируется последующими путями переноса когерентности, оба из которых начинаются равновесием продольной намагниченности, которая имеет когерентности нулевого порядка. Так как порядок когерентности $p = -1$ выбирается в t_2, соответствующая когерентность в t_1, поэтому $p = -1$ для сигнала P-типа, но $p = +1$ для N-типа. Эти пути выбираются фазовым циклом, описанным ранее, и показаны в таблице 5.2. В течение периода t_1 и вообще в любой период свободной прецессии под влиянием химических сдвигов и/или взаимодействий, порядки когерентности остаются неизменными; только РЧ импульсы способны изменять уровни когерентности (хотя релаксация, в конечном счете, восстанавливает продольную намагниченность и, следовательно, нулевой уровень когерентности).

Для эксперимента фазочувствительного COSY оба пути $p = \pm 1$ должны сохраняться в течение t_1. Вспомните, что для чисто фазового 2D спектра детектируемый в t_2 сигнал *должен* быть амплитудно модулированным, как функция t_1. Такой сигнал может получаться только, если обе из противоположно вращающихся когерентностей сохраняются, так как сохранение только одной из них неизбежно ведёт к фазовомодулированному сигналу (рис. 5.32), и, следовательно, к фазово искажённой форме линий, как для P- или N-типа COSY.

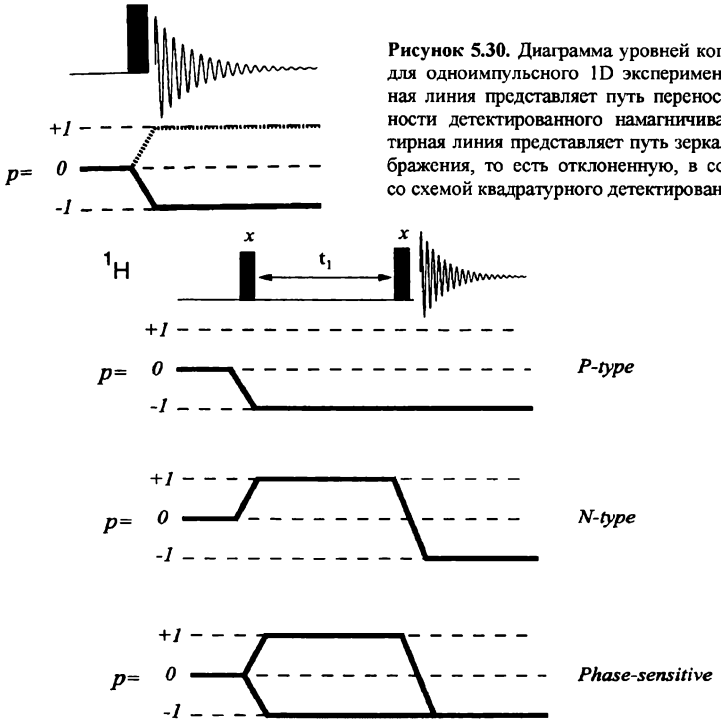


Рисунок 5.30. Диаграмма уровней когерентности для одноимпульсного 1D эксперимента. Сплошная линия представляет путь переноса когерентности детектированного намагничивания, пунктирная линия представляет путь зеркального отображения, то есть отклоненную, в соответствии со схемой квадратурного детектирования.

Рисунок 5.31. Диаграммы уровней когерентности и путей переноса когерентности для (a) P-типа, (b) N-типа и (c) фазочувствительного COSY

Однако присутствие обоих путей подразумевает детектирование резонанса ЯМР плюс его зеркальное (квадратурное) изображение в f_1, поэтому применение подходящей схемы квадратурного детектирования (Стейтса или TPPI) для устранения одного набора этих откликов на этапе обработки данных является существенным. Необходимость сохранять оба пути в течение t_1 для регистрации чистых фазовых спектров фундаментальна для всех 2D экспериментов. Это имеет первостепенную важность при использовании импульсных градиентов поля для выбора пути когерентности.

5.5. СЕЛЕКТИРОВАННАЯ ГРАДИЕНТОМ СПЕКТРОСКОПИЯ

Можно обсуждать то, что самая важная фундаментальная разработка в экспериментальной методологии в ЯМР высокого разрешения в течение 1990-ых была введением импульсных градиентов поля, которые расширяют возможности многочисленных методов ЯМР [22-24]. Концепция *применения градиентов магнитного поля* к образцу давно использовалась в (ядерной) томографии магнитного резонанса [25] и, хотя потенциал для их использования в ЯМР высокого разрешения давно осознан [26,27], технические ограничения не позволяли их широкое использование в течение ряда лет [28]. В настоящее время, импульсные градиенты поля находят применение в многочисленных

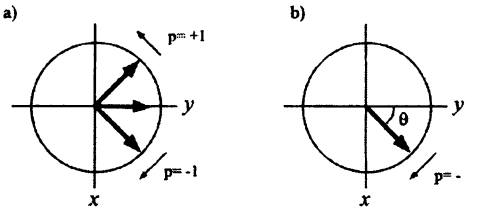


Рисунок 5.32. (A) Амплитудная модуляция требует сохранения обоих противоположно вращающихся векторов (p = ±1 когерентностей) в течение t_1. Результирующий сигнал (окрашен в серый цвет), модулируется по амплитуде вдоль оси Y, так как векторы прецессируют. (b). Фазовая модуляция получается, только если один вектор (p = 1 или p = -l) сохраняется, когда фазовый угол θ изменяется с прецессией вектора.

одно- и многомерных методах ЯМР, как средства выбора тех сигналов, которые считались интересными, и подавления тех, которые не интересны, и оказались чрезвычайно выгодными для многих рутинных методов, используемых в структурной органической химии. Этот раздел вводит общие принципы применения импульсных градиентов поля (ИГП), и хотя располагался в этом введении в двумерные методы ЯМР, содержит довольно общие соображения, применимые ко всем градиентно селектированным экспериментам. Градиентно-селектирующие методы не собраны вместе в отдельной главе, а представляются рядом с более обычными эквивалентами на протяжении всей книги. Это более правильно отражает способ, которым градиентные методы устойчиво проникали мир ЯМР, и теперь могут рассматриваться как стандартные методы, так как большее количество приборов теперь поставляется с включенными в них соответствующими аппаратными средствами. Кроме того, большинство методов, которые используют ИГП - часто простые изменения первоначального неградиентного эквивалента (отсюда применение в литературе таких выражений, как *улучшенные градиентом* или *ускоренные градиентом* эксперименты) и, таким образом, не требуют никакого большего понимания, чтобы позволять применять эксперимент и интерпретировать данные. Фактически, преимущества, налагаемые ИГП, перед традиционными методами в значительной степени касаются практичности сбора данных, часто позволяя сбор превосходных качественных данных в более короткое время.

Термин «традиционный» в этом контексте, относится к тем экспериментам, которые используют циклирование фазы, чтобы выбирать желательные сигналы и подавлять все другие. Понятие циклирования фазы уже встречалось в предыдущих разделах. На этом этапе достаточно помнить, что эта процедура включает повторение импульсной последовательности с фазами РЧ импульса (импульсов), регулируемыми при каждом сканировании, и данные от каждого сканирования, комбинируются так, что желательные сигналы конструктивно складываются, в то время как нежелательные отменяются. Процедуры фазовой циркуляции, таким образом, все основаны на разностной спектроскопии и, в результате, подвержены проблемам неполного вычитания нежелательных сигналов, которые ведут к артефактам в конечном спектре. Зависимость от процедуры разности также означает, что при каждом сканировании собираются данные, которые, в конечном счете, отвергаются, что, конечно, не делает оптимального использования динамического диапазона приемника. Эти методы также требуют завершения полного фазового цикла, чтобы достигать требуемого выбора независимо от силы сигнала, таким образом, образуя фундаментальный предел минимального времени эксперимента. Эксперименты, которые используют ИГП для выбора сигнала, не страдают от этих ограничений, потому что только желательный сигнал собирается на каждом переходе, таким образом, ведя к более чистым спектрам, которые свободны от артефактов разности, и, когда чувствительность не ограничивается более быстрым сбором данных, потому что отсутствует ограничение минимального числа шагов в фазовом цикле.

5.5.1. Выбор сигнала импульсными градиентами поля

Дефокусирование и рефокусирование с ИГП

Прежде чем подвергать любой образец анализу ЯМР, необходимо произвести шиммирование магнитного поля, чтобы удалить его неоднородности. Это будет гарантировать, что все спины в объёме образца, находящиеся в одном и том же химическом окружении, испытывают одинаковое приложенное поле и, следовательно, обладают той же самой ларморовой частотой независимо от их расположения в объёме образца. Если, однако, к образцу преднамеренно применялся линейный *градиент магнитного поля* (известный как градиент B_0), скажем вдоль Z-оси, химически эквивалентные спины теперь испытывали бы различное приложенное поле, зависящее от их расположения в образце, в этом случае от расположения по длине образца. Это можно понять, рассматривая образец состоящим из микроскопически тонких дисков в *x-y* плоскости, каждый из которых испытывает различные локальные магнитные поля в соответствии с их физическим местоположением (рис. 5.33). Если градиент поля был наложен в течение дискретного периода времени как *импульс градиента* (рис. 5.34a), тогда в течение него спины, ранее возбужденные РЧ импульсом, прецессируют с различными частотами и поэтому повернутся на различные углы (рис. 5.33b).

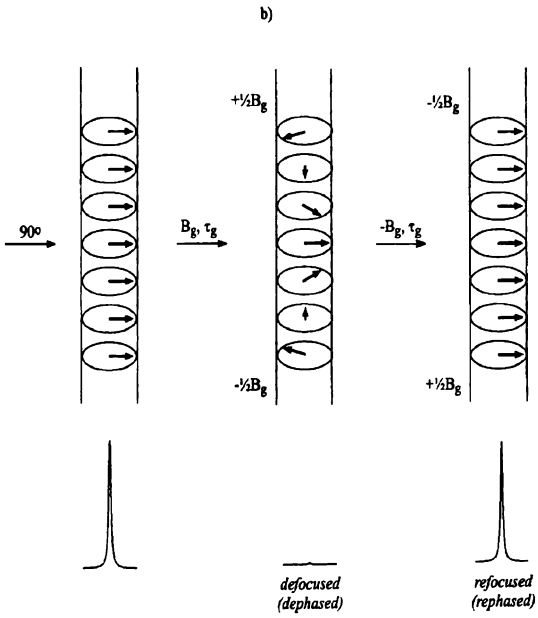


Рисунок 5.33. Действие импульсов полевого градиента. (a) В однородном магнитном поле все химически подобные спины обладают одной и той же Ларморовой частотой в пределах каждого микроскопически тонкого диска по всему образцу, вызывая сложение их индивидуальных магнитных моментов, что производит острый резонанс. (b) После действия линейного градиента поля напряжённостью B_g продолжительностью T_g, спины эволюционировали на различные углы согласно их локальным магнитным полям, давая при сложении нулевую чистую намагниченность. (c) Применение второго идентичного градиента, но в противоположном направлении, рефокусирует индивидуальные векторы еще раз и восстанавливает резонанс, намагничивание говорят, сначала *расфокусировалось*, а затем *рефокусировалось* действием градиентов.

При условии, что градиентный импульс имеет достаточную напряжённость и продолжительность, *чистое* сохранение намагничивания, которое является суммой поперечной намагниченности всех дисков в образце, будет нулевое и не будет никакого детектируемого ЯМР сигнала. Градиентный импульс, говорят, *расфокусировал* (или *дефазировал)* намагничивание. Эффект применения такой последовательности с увеличением напряжённости градиента показывается на рисунке 5.35.

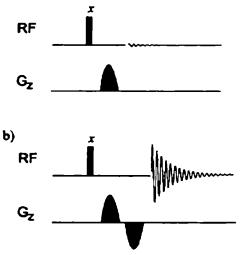


Рисунок 5.34. Представление импульсной последовательности: (a) одиночный импульс полевого градиента по Z-оси и (b) - два градиентных импульса по оси Z, применённые в противоположных направлениях. Градиентные импульсы обычно имеют формованный, а не прямоугольный профиль, такой как синусный профиль, показанный здесь (см. раздел 5.5.4). RF (РЧ) показывает радиочастотный канал импульса.

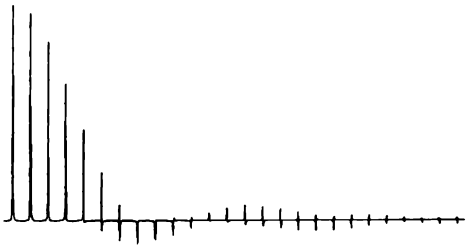


Рисунок 5.35. Разрушение резонанса ЯМР импульсным градиентом поля. Последовательность рис. 5.34a использовалась с прогрессивно увеличивающимся градиентом для каждого эксперимента.

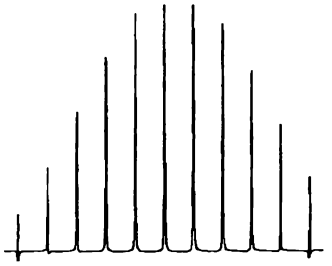


Рисунок 5.36. Восстановление резонанса ЯМР в градиентном эхо. Последовательность рис. 5.34b использовалась с фиксированной напряжённостью первого градиента, а напряжённость второго изменялась от 90% до 110% первого градиента.

Хотя *теперь отсутствует какой-либо детектируемый сигнал*, намагничивание не было потеряно из поперечной плоскости и может быть восстановлено. Применение второго градиентного импульса, немедленно после первого, равной интенсивности и продолжительности, но в противоположном направлении (теперь по -Z-оси, рис. 5.34b), вызывает «раскручивание» расфазирования первого градиента действием второго (рис. 5.33c), и векторы намагничивания от каждого диска *рефокусируются* (или *рефазируются*), производя *градиентное эхо* и наблюдаемый чистый сигнал (рис. 5.36). Концепция дефокусирования всех нежелательных сигналов и выборочного рефокусирования только желательных лежит в центре каждого градиент-селектирущего эксперимента, но чтобы понять, как это рефокусирование может производиться селективно, мы должны рассмотреть действие градиентного импульса на поперечную намагниченность в немного более формальном контексте.

Селективное рефокусирование

В отсутствие импульса полевого градиента ларморова частота спина ω зависит от применённого постоянного поля B_0, так что $\omega = \gamma B_0$. Когда применяется градиентный импульс, появляется дополнительное пространственно зависимое поле $B_{g(z)}$, связанное с градиентом, вызывающим пространственно зависимую ларморову частоту $\omega_{(z)}$:

$$\omega_{(z)} = \gamma(B_0 + B_{g(z)}) \text{ rad s}^{-1} \qquad (5.1)$$

Если градиент применяется в течение продолжительности τ_g секунд, вектор намагничивания поворачивается на пространственно зависимый фазовый угол, $\Phi_{(z)}$

$$\Phi_{(z)} = \gamma(B_0 + B_{g(z)})\,\tau_g = \gamma B_0\,\tau_g + B_{g(z)}\,\tau_g \text{ rad} \tag{5.2}$$

Первый член в конечном выражении просто представляет прецессию Лармора в отсутствие градиента поля, который является постоянным, по всему образцу и, таким образом, не будет рассматриваться далее на этом этапе, кроме замечания, что эта прецессия опирается на практическое применение градиентов поля, как описано позже. Второе выражение представляет пространственно зависимую фазу, вызванную непосредственно градиентным импульсом, а это и есть интересующая величина. Обобщая вышеуказанное выражение, которое применимо только к поперечному одноквантовому намагничиванию, необходимо включать выражение, которое представляет порядок когерентности намагничивания *p*, так что:

$$\Phi_{(z)} = p\,B_{g(z)}\,\tau_g \tag{5.3}$$

Эта модификация отражает факт, что p-квантовая когерентность дефазируется со скоростью пропорциональной p. Таким образом, двухквантовые когерентности дефазируются вдвое быстрее, чем одноквантовые когерентности, а нульквантовые когерентности нечувствительны к градиентам поля. Когда когерентность включает различные виды ядер, должно учитываться гиромагнитное отношение и порядок когерентности для каждого типа ядер, так что:

$$\Phi_{(z)} = B_{g(z)}\,\tau_g\,\Sigma p_i\gamma_i \tag{5.4}$$

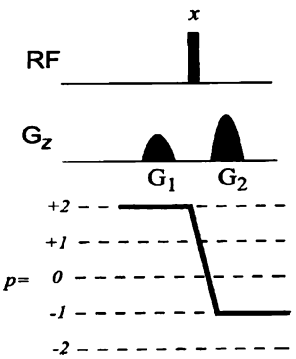


Рисунок 5.37. Иллюстрация выбора сигнала импульсными градиентами поля, использующими два градиента с отношением G_1:G_2 1:2 выбирает только показанный путь переноса когерентности, оставляя все другие расфокусированными и ненаблюдаемыми.

Поэтому очевидно то, что степень дефокусирования, вызванного градиентом, зависит от порядка когерентности и гиромагнитного отношения вовлеченных спинов, и эти два признака обеспечивают ключ к выбору сигнала градиентами поля. Цель градиентов в большинстве экспериментов - селективное рефокусирование намагничивания, которое следует желательным путем переноса когерентности в течение эксперимента, в то же время оставляя все другие пути дефокусированными и, следовательно, ненаблюдаемыми. В то время как ИГП сами неспособны изменять порядки когерентности, РЧ импульсы могут это, и они комбинируются с РЧ импульсами, чтобы генерировать подходящие порядки когерентности вместе с импульсными градиентами поля, чтобы выбирать их, что, в конечном счете, обеспечивает желаемый результат.

Этот общий процесс показывается для гомоядерной спиновой системы в схеме рис. 5.37, в которой должна сохраняться только двухквантовая когерентность, существующая до импульса. Таким образом, до РЧ импульса существует когерентность p = 2, которая испытывает градиент напряжённости B_{g1} и продолжительности τ_1 и, таким образом, получает пространственно зависимую фазу:

$$\Phi_1 = 2\gamma\,B_{g1}\,\tau_1 \tag{5.5}$$

После РЧ импульса когерентность преобразуется в наблюдаемое одноквантовое намагничивание порядка p = -1, которое испытывает второй импульсный градиент напряжённости B_{g2} и продолжительности τ_2, и который кодирует фазу:

$$\Phi_2 = -2\gamma B_{g2} \tau_2 \qquad (5.6)$$

Для того чтобы когерентность после определённого пути переноса рефокусировалась, и, следовательно, наблюдалась, её *полная пространственно зависимая фаза от всех градиентных импульсов должна быть нулевой:*

$$\Sigma\Phi_i = \Sigma\gamma B_{gi} \tau_i = 0 \qquad (5.7)$$

или, другими словами, рефокусирование, индуцированное последним градиентом, должно точно отменять дефокусирование, вызванное всеми более ранними градиентами на пути переноса когерентности. Таким образом, в этой иллюстрации Φ_2 должно равняться $-\Phi_1$, для того, чтобы это условие удовлетворялось. Это может достигаться либо изменением продолжительности второго градиента относительно первого, поддерживая амплитуду неизменной, или изменяя амплитуду, но сохраняя продолжительность. В настоящее время общепринято использовать градиентные импульсы одинаковой продолжительности по всей импульсной последовательности и изменять их амплитуды. Следовательно, устанавливая $B_{g2} = 2B_{g1}$ в этом примере (помня, что порядок когерентности имеет знак, также как величину) выбирают желательный путь (рис. 5.37). В противоположность, одноквантовая намагниченность, возникающая из, например, любой трёхквантовой когерентности (p = 3), которая могла первоначально существовать, приобретает чистую фазу:

$$\Phi = (3\ \gamma B_{g1}\tau_1) + (-1\gamma 2B_{g1}\tau_1) = \gamma B_{g1}\tau_1 \qquad (5.8)$$

и, следовательно, остается дефазированной и не делает вклада в детектированный сигнал. Градиентная пара, следовательно, выбрала только желательный путь. Для *гомоядерных* систем с градиентами равной продолжительности, достаточно рассматривать только *порядки когерентности* и *отношения амплитуд градиентов*, вовлеченные в выбор пути переноса когерентности, как показано в примерах COSY ниже. Для *гетероядерных* систем также должны включаться *гиромагнитные отношения* участвующих спинов, как будет показано в главе 6. Так как во всех последующих обсуждениях полагается, что градиенты в последовательности имеют ту же самую форму и продолжительность, градиентный импульс отныне будет просто обозначаться в краткой форме как G_i, который принимается представляющим импульс напряжённости B_{gi} и продолжительности τ_i.

Выбираемый градиентом COSY

Чтобы иллюстрировать включение ИГП в обычные эксперименты, снова в качестве примера используется последовательность базового COSY. Уже показано, что для эксперимента COSY абсолютного

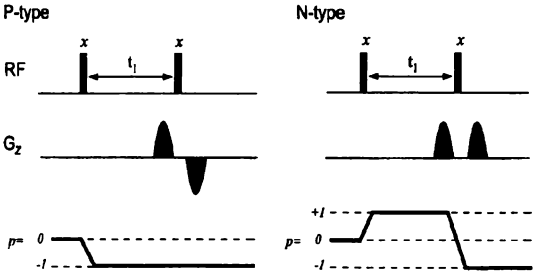


Рисунок 5.38. Необходимые градиентные комбинации для выбора данных COSY P- и N-типа, показанные с соответствующим выбранным путем переноса когерентности.

значения сигналы, сохраняющиеся в конечном спектре COSY, следуют путем переноса когерентности, иллюстрированным на рисунке 5.38, с выбором N-типа, который является предпочтительным.

Для выбора сигнала достаточно фазово кодировать когерентности перед вторым 90° импульсом и декодировать их после импульса, непосредственно перед детектированием. Для сигналов N-типа желательные порядки когерентности +1 и -1 в этих точках и, таким образом, фазовое кодирование, индуцированное каждым градиентом, может представляться, используя краткое обозначение, как:

$$\Phi 1 = 1G_1$$
$$\Phi 2 = -1G_2 \qquad (5.9)$$

Так как в COSY имеют дело с *гомоядерной* спиновой системой, гиромагнитные отношения включать не обязательно, так как они постоянны повсюду, так что единственные переменные - напряжённости градиента. Обнадеживающе весьма очевидно, что чтобы эти два выражения отменяли друг друга, просто выбирают $G_2 = G_1$, то есть, оба градиента должны иметь одну и ту же приложенную напряжённость в том же направлении. Наоборот, для выбора P-типа (порядки когерентности -1 по обе стороны импульса) нужно выбирать $G_2 = -G_1$, то есть, подобные градиенты, но применённые в противоположных направлениях. В любом случае, желательный путь выбирается *в одиночном сканировании* без необходимости циклирования фазы, потому что градиенты, которые рефокусируют сигналы N-типа, одновременно не могут рефокусировать P-тип; следовательно, квадратурное детектирование в f_1 свойственно этой схеме. Аксиальные пики также подавляются этим градиентным выбором, потому что, по определению, они возникают из намагничивания, которое было вдоль Z-оси в течение t_1, и, следовательно, не затрагивалось первым градиентом. Когда это намагничивание делается поперечным вторым 90° импульсом, конечный градиент дефазирует его, и оно просто не наблюдается. Таким образом, первоначальные четыре шага фазово циклированного COSY абсолютного значения (два для квадратурного детектирования f_1 и два для подавления аксиальных пиков) могут замещаться единственным шагом с ИПГ, позволяя собирать 2D набор данных только с одним сканированием на t_1 приращение, приводя к четырехкратному уменьшению во времени. При этом предполагается, что чувствительность достаточна, чтобы позволять сбор только одного сканирования на инкремент, что имеет место во многих обычных случаях. Как упражнение для изучения, пробуйте прогнать градиентную последовательность COSY сначала с выбором N-типа, а затем с выбором P-типа, как описано выше, и сравните результаты. Одно должно быть просто зеркальным отображением другого относительно центра f_1.

5.5.2. Фазочувствительные эксперименты

Одна проблема с градиентным подходом, описанным выше для COSY, в том, что он обязательно устраняет регистрацию наборов фазо-чувствительных данных с высоким разрешением, выбирая только один путь в t_1. Так как это ведет к фазово-модулированным данным, что обеспечивает только фазово-искаженные формы линии. Вспомните, что фазочувствительные регистрации требуют сохранения обоих путей $p = \pm 1$ в течение t_1, но это невозможно, когда градиент помещается внутрь периода эволюции, так как только один из этих путей может рефокусироваться до детектирования.

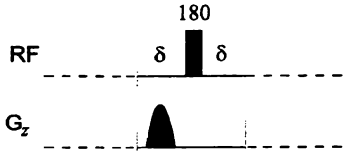


Рисунок 5.39. Градиентные импульсы часто применяются в спиновых эхо, чтобы рефокусировать эволюцию химического сдвига, встречающуюся в течение импульса, и таким образом удалять фазовые ошибки из спектров.

Наиболее общее решение сбора фазочувствительных данных состоит в том, чтобы совсем избегать помещения градиентов внутрь t_1, поскольку это тогда позволяет использовать обычное квадратурное детектирование f_1 Стейтса или TPPI. Детали того, как это делается, зависят от применяемой последовательности, и примеры этого подхода будут проиллюстрированы для различных методов в этой и в последующих главах. Существует также остроумный подход к квадратурному детектированию f_1

[29], который обеспечивает фазочувствительные данные режима поглощения и позволяет удобно помещать градиенты в пределы времени эволюции. Процедура включает сбор наборов данных и P-, и N-типа поочередно, и сохранение их *отдельно* для каждого значения t_1. Два пути выбираются обычно, инвертируя знак конечного рефокусирующего градиента, как для P, относительно N выбора выше. Эти наборы данных при обычной обработке содержат сигналы зеркального отображения в f_1 измерении, поэтому зеркальное отражение одного набора данных относительно f_1=0, и сложение его со вторым сохранит только один набор сигналов и, следовательно, обеспечит требуемое f_1 различие частот. Эта процедура также точно подавляет дисперсные вклады, иначе заметные в фазово-искаженных формах линий каждого набора данных, и, таким образом, производит предпочтительные формы линии типа поглощения. Обращение с данными, требуемое для этой процедуры, теперь находится в обычном программном обеспечении обработки данных, и часто упоминается как *подход эхо-антиэхо*.

Однако, это не всё, что требуется для получения чисто-фазовых спектров. Следуя равенству 5.2 выше, эволюция химических сдвигов под влиянием статического поля B_0 в течение применения градиентного импульса для удобства игнорировалась, поскольку это не играло никакой роли в определении выбора сигнала. Такая эволюция сдвига в течение градиентного импульса (который имеет обычно порядок миллисекунд) ведёт к заметным частотнозависимым фазовым ошибкам в спектрах, если их не устранять. Эти ошибки не имеют последствий для представлений абсолютного значения и, следовательно, не рассматривались для примеров COSY выше, но оказываются бедственными для наборов фазочувствительных данных. Чтобы избежать этих неудач, градиентные импульсы либо применяются в пределах существующих периодов J-эволюции (Δ), или должны помещаться внутрь спинового эхо, чтобы рефокусировать эволюцию химического сдвига (рис. 5.39). Примеры обоих этих подходов вы найдёте в последующих методах.

5.5.3. ИГП в ЯМР высокого разрешения

Этот раздел подводит итог некоторых ключевых свойств импульсных градиентов поля при применении к спектроскопии ЯМР высокого разрешения, выделяя некоторые преимущества, которые они обеспечивают, а также предупреждая относительно потенциальных ограничений. Многие из этих свойств будут делаться очевидными при описании выбираемых градиентом методов в остальной части книги, так что здесь просто даётся краткий обзор этих тем. Вообще говоря, роль ИПГ в экспериментах ЯМР высокого разрешения может группироваться в три класса:

- Выбор пути переноса когерентности: Примеры, обсуждённые выше, уже обеспечили иллюстрацию того, как градиенты могут использоваться. Таким образом, цель состоит в выделении намагниченности, которая следует одним желаемым путём, и в подавлении той, которая следует любым другим путём. Это применение представляет самое широкое использование градиентов в органической спектроскопии ЯМР, результирующие эксперименты обеспечивают альтернативу обычному фазоциклированному эквиваленту.
- Подавление резонанса растворителя: Способность ИГП полностью уничтожить резонанс ЯМР делает их идеально подходящими для методов подавления сигнала растворителя, где преследуется цель выборочно удалить резонанс растворителя, но сохранять все другие. Самое широкое использование этих методов находится в исследованиях молекул в *протонированной* воде, где градиент-основанные методы подавления оказываются наиболее эффективными (глава 9).
- Удаление нежелательного намагничивания: Чистка в этом контексте означает устранение откликов, которые возникают из экспериментальных несовершенств и т.п., таких как неточные ширины импульсов. Например, применение несовершенного 180° инвертирующего импульса на +Z намагничивание оставляет нежелательный остаточный компонент в поперечной плоскости. Он может разрушаться применением одиночного очищающего Z-градиента (иногда упоминающегося

как импульс «нарушения однородности»), гарантируя, что он не будет делать вклад в конечный спектр. Применение чистящих Z-градиентов требует, чтобы вся желаемая намагниченность располагалась вдоль Z-оси, и, таким образом, являлась инвариантной к градиентному импульсу. Одно из самых ранних применений градиентного импульса в эксперименте высокого разрешения было подобие очищающего импульса в 2D обменной последовательности [30].

Преимущества градиентов поля

Основная польза, возникающая из применения градиентов поля для выбора пути когерентности, в противоположность обычному циклированию фазы, может суммироваться таким образом:

- Качество: При каждом сканировани детектируется только желательный сигнал, избегая необходимости сложения/вычитания сигнала в шагах фазового цикла. Артефакты разности, таким образом, не возникают, и t_1 шум, часто связанный с ними в 2D спектрах, уменьшается, обеспечивая более чистые спектры.
- Скорость: Так как отсутствует требование завершения фазового цикла, времена эксперимента диктуются только чувствительностью и соображениями разрешения. Когда чувствительность не ограничивает, 2D эксперименты могут получаться с одним сканированием на t_1 инкремент, приводя к существенной экономии времени.
- Динамический диапазон: Поскольку всегда детектируется только желательный сигнал, а все другие разрушаются в датчике, может достигаться оптимальное использование динамического диапазона приемника, что позволяет установку большего усиления приёмника. Это до некоторой степени даёт компенсацию потери чувствительности, иногда связанной с градиентным выбором (см. ниже).
- Подавление сигнала: Могут достигаться очень высокие отношения подавления сигнала. Устранение протонов, связанных с углеродом-12, в протон-детектируемых ^{1}H-^{13}C корреляциях становится тривиальным (отношение подавления ≈ 1:100) и даже выбор естественного содержания ^{1}H-^{13}C-^{13}C фрагментов становится возможным [31], требующий отношения подавления 1:10.000 (см. раздел 5.8.4). Аналогично подавление больших резонансов растворителя становится значительно проще с градиентными методами [32,33] (глава 9).
- Простота использования: в противоположность применению РЧ импульсов, точная калибровка напряжённостей градиентов не требуется, и использованные абсолютные напряжённости не являются критическими для успеха эксперимента, при условии, что они достаточны, чтобы дефазировать нежелательное намагничивание. Более важен факт, что градиентные *отношения* должны быть прецизионными, а градиенты воспроизводимыми. Эти требования могут достаточно легко выполняться соответствующим проектированием прибора, сделав селектированные градиентом методы, простыми в исполнении и экспериментально здравыми.

Ограничения градиентов поля

Несмотря на их бесспорные преимущества, ИГП имеют множество фундаментальных ограничений, которые также должны быть оценены. Они имеют важные последствия для проектирования градиентных экспериментов и, хотя можно не касаться проектирования эксперимента, эти моменты помогают объяснять некоторые особенности, которые обычны для многих селектированных градиентом последовательностей.

- Чувствительность: При использовании для выбора когерентности, градиенты способны рефокусировать только один из двух $\pm p$ порядков когерентности. В некоторых применениях это означает, что детектируется только половина доступного сигнала в отличие от фазоциклированных экспериментов, в которых могут сохраняться оба пути. Эксперименты, которые используют ИГП для

выбора когерентности, могут, следовательно, представлять пониженную чувствительность по сравнению с фазоциклированным эквивалентом с коэффициентом обычно 2 или $\sqrt{2}$, в зависимости от точных экспериментальных подробностей [24,34]. Градиентная чистка, однако, не вызывает такой потери чувствительности.

- Квадратурное детектирование: Как описано выше, требуется некоторая осторожность при использовании градиентов в фазочувствительных экспериментах. Это либо требует, чтобы градиенты не помещались в пределы периодов эволюции временной шкалы, или чтобы использовался подход эхо-антиэхо.
- Фазовые ошибки: Химические сдвиги также эволюционируют в течение применения градиентного импульса, благодаря статическому полю B_0. Поэтому градиентные импульсы обычно применяются в пределах спинового эхо, чтобы рефокусировать эту эволюцию, и таким образом удаляют фазовые ошибки, когда требуется фазочувствительное представление.
- Потери диффузии: Детектированный сигнал может ослабляться потерями, благодаря диффузии. Условие рефокусирования требует, чтобы рефокусирующий градиент отменял пространственно зависимую фазу, вызванную всеми предыдущими градиентами. Если молекулы должны двигаться вдоль направления градиента (по длине ампулы ЯМР для Z-градиента) между импульсами расфазирования и перефазирования, напряжённости градиентов не должны совершенно согласовываться и будет появляться неполное рефокусирование, приводя к потере интенсивности сигнала (это - именно то явление, которое используется, чтобы изучать диффузию в ЯМР растворов [35,36] (см. главу 9). Это больше будет проблемой для малых, быстро двигающихся молекул в слабо вязких растворителях, которой лучше всего избегать, поддерживая в последовательности градиентные импульсы дефокусирования и рефокусирования близко друг к другу. Степень ослабления сигнала также зависит от *квадрата напряжённостей градиентов*, поэтому применение более слабых градиентов, которые должны ещё быть достаточными для дефазирования намагниченности, также будет помогать минимизировать такие потери.

5.5.4. Практическая реализация ИГП

Как знает каждый пользователь спектрометра ЯМР, простейший путь генерировать градиент поля через образец - приводить к нулю один из токов шиммы от её оптимума. В принципе, можно генерировать необходимый градиент, моментально включая максимальный ток в Z-шимме, и некоторые спектрометры оборудуются так называемой способностью «нарушения однородности», чтобы позволять это. Однако такая установка подходит только, чтобы обеспечивать основной чистящий градиент, так как она производит только относительно слабые поля и не предлагает никакого контроля над амплитудой и досаждала бы опасными вихревыми токами, описанными ниже. Для выполнения полного диапазона экспериментов градиентного выбора требуется датчик, оборудованный отдельной градиентной катушкой, окружающей обычные РЧ катушки, вместе с подходящим градиентным усилителем. Градиент поля через образец тогда производится, применяя ток к градиентным катушкам. Инвертирование знака градиента соответствует изменению приложенного тока. Типичные максимальные напряжённости градиента - около 0,5 Т $м^{-1}$ (50 Гс $см^{-1}$) для обычной работы, хотя на практике фактические использованные напряжённости градиента часто будут несколько меньше этого. Метод калибровки напряжённостей градиента описывается в разделе 3.5.2.

Настолько эта схема проста, настолько она досаждает множеством технических проблем, которые сделали бы сбор данных высокого разрешения невозможным, если они оставлены без внимания, и именно эти проблемы настолько замедлили введение градиентов поля в ЯМР высокого разрешения. Худшая из них – вихревые токи, которые генерируются при применении градиентного импульса. Это токи в проводящих компонентах, которые окружают образец, таких как корпус датчика, зазор магнита

и даже сами шиммовые катушки, которые, в свою очередь, производят далее ложные магнитные поля в пределах образца. Так как они могут длиться в течение сотен милисекунд, они предотвращают регистрацию спектра высокого разрешения. Наиболее эффективный путь подавлять генерацию вихревых токов - применение так называемых активно экранированных градиентных катушек, которые теперь используются во всех коммерческих градиентных датчиках. Они состоят из второй градиентной катушки, окружающей первую и управляемой тем же самым током. Внешняя катушка проектируется таким образом, что поле, которое она производит *вне активной области образца*, отменяет то, которое производится внутренней катушкой. Чистый результат - градиент поля в пределах образца, но отсутствие градиента вне его, и, следовательно, никакие вихревые токи не производятся в окружающих структурах. Так как вихревые токи вызываются быстрым изменением в локальном магнитном поле при применении градиента, они также могут ослабляться, используя профиль формованного градиента с плавным нарастанием и спадом, а не простой прямоугольный импульс, который имеет очень крутые передние и задние фронты. Обычно используемые градиентные профили - половина синусной волны или усечённые гауссовы импульсы. Этими средствами можно получать невозмущённый спектр в пределах десятков микросекунд градиентного импульса. Метод для измерения периодов восстановления градиента также дается в разделе 3.5.2.

Достойно упоминания одно последнее указание относительно градиентов поля. Так как градиентный импульс индуцирует пространственно зависимую фазу для всей намагниченности в образце, он также ведет к разрушению самого сигнала дейтериевой стабилизации, довольно тревожный вид, когда встречается впервые. Как же тогда спектрометр сохраняет стабильность отношения частота-поле в продолжительных экспериментах? Ключевой пункт происходит от факта, что регулирующая система интегрирует сигнал ошибки стабилизации в течение обычно многих секунд, и поэтому слабо подвергается воздействию краткими возмущениями, вызванными градиентным импульсом. Сигнал, представляемый оператору не точно тот, который используется для регулировки отношения частота-поле и интегрируется по более коротким периодам времени, так что представляет более драматическую картину событий оператору (которая сама может быть полезным индикатором того, работает ли градиентная система!).

Теперь заканчиваем эту часть главы, которая по существу закладывала основы для понимания 2D (или более общего nD) ЯМР. По всей этой последовательности базового COSY, либо в форме ее абсолютного значения, или в фазочувствительных формах, использовалась как иллюстративная 2D последовательность. Не только простая последовательность COSY, но и спектры довольно просты для интерпретации и требуют относительно небольшого объяснения. Вне этой основной последовательности имеются множество других экспериментов COSY, которые обеспечивают химика новой или модифицированной информацией. Они, фактически, более широко используются в лаборатории, чем эксперимент, описанный до сих пор, и это к ним теперь обращаются, прежде чем переходить к рассмотрению других гомоядерных корреляционных методов.

5.6. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ COSY

Имеется огромный диапазон экспериментов, которые, по сути, вариации простой описанной выше последовательности COSY. В этом разделе мы рассматриваем их выбор и исследуем пользу, которой эти модифицированные последовательности обеспечивают практикующего химика. Многие из вариантов COSY, предложенные в литературе, предлагают небольшой выигрыш по сравнению с более простыми последовательностями, в то же время, являясь гораздо более сложными для выполнения и обработки, или выгодны для довольно ограниченного класса соединений и испытывают недостаток широкой применимости. В то время как эксперименты, описанные ниже, представляют толь-

ко часть предложенных последовательностей, они утвердились за эти годы как наиболее широко используемые и информативные методы.

5.6.1. Который из подходов COSY?

Прежде чем продолжать, мы кратко исследуем ключевые характеристики различных экспериментов и рассмотрим, чем они могли бы быть интересны химику-исследователю. Таблица 5.5 суммирует самые важные атрибуты, некоторые из которых уже введены, в то время как другие углубляются в следующих разделах. В то время как TOCSY эксперимент строго не является членом семейства COSY, но его информационное содержание настолько близко родственно COSY, что он также включен в таблицу.

Предвосхищая то, что последует, на этой стадии можно дать некоторые общие рекомендации. Наиболее информативные фазочувствительные версии экспериментов COSY. Для разрешения спектров любой сложности самым полезным, на основании его высокого разрешения и информативной структуры перекрёстного пика, является фазочувствительный эксперимент DQF-COSY.

Таблица 5.5. Резюме характеристических свойств основных COSY экспериментов и родственного TOCSY эксперимента

Последовательность	Преимущества	Потенциальные недостатки
COSY-90 абсолютных значений (режима магнитуды)	Простой и эффективный, обработка абсолютных значений хорошо подходит для автоматизации	Фазовоискажённые формы линий производят плохое разрешение, которое требует применения оконных функций, сильно улучшающих разрешение.
Фазочувствительный COSY-90	Высокое разрешение, благодаря форме линии поглощения. Превосходная тонкая структура кросс-пиков; возможно измерение J.	Диагональные пики имеют дисперсную форму линий, которые могут накладываться на соседние кросс-пики. Требует высокого цифрового разрешения для выявления мультиплетных структур.
Фазочувствительный DQF-COSY	Высокое разрешение, благодаря форме линии поглощения. Превосходная тонкая структура кросс-пиков; возможно измерение J. Диагонали также имеют формы линий поглощения. Синглеты подавляются.	Теоретическая потеря чувствительности с фактором 2 относительно варианта COSY-90. Требует высокого цифрового разрешения для выявления мультиплетных структур.
COSY-β	Простой и эффективный. Обработка абсолютных значений хорошо подходит для автоматизации. Упрощение структур кросс-пиков уменьшает перекрывание пиков. В некоторых случаях по наклону пиков можно различать вицинальные и геминальные взаимодействия.	Требует представления абсолютных значений, так как фазочувствительный вариант имеет формы линий смешанной фазы.
Задержанный COSY	Улучшенное детектирование малых и дальних взаимодействий (< 2 Гц), таких как между протоном и аллильной системой или при W-конфигурации.	Обычно имеет низкую чувствительность и отклики имеют смешанные формы линий, поэтому могут требоваться представления абсолютных значений. Предпочтительнее TOCSY.
TOCSY	Обеспечивает многоступенчатые (ретрансляционные) эксперименты, чтобы преодолевать неоднозначности, возникающие при перекрывании линий. Высокая чувствительность. Син-фазные формы линий могут позволять корреляции даже в присутствии широких резонансов.	Число шагов переноса, связанных с каждым кросс-пиком, неизвестно наперёд. Син-фазная форма линий имеет тенденцию маскировать тонкую структуру кросс-пиков, предотвращая измерение J.

Как описано ниже, теоретическое снижение чувствительности не так вредно, как это может показаться сначала, и этот метод широко используется в доказательстве структуры. Чтобы действительно извлекать выгоду из информации, содержащейся в структурах кросс-пиков, требуется высокое цифровое разрешение, которое неизменно соответствует более длительным экспериментам, а фазирование результирующего двухмерного спектра непосвященному может показаться чёрной магией. По этим причинам он не так хорошо подходит для быстрого потока образцов, обычного для загруженных органических лабораторий. Для установления корреляций в относительно явно дисперсных спектрах эксперимент COSY абсолютных значений предлагает более быструю обработку и простоту обращения с данными, поэтому он может предпочитаться, когда требуется полностью автоматизированная генерация спектров. COSY-β вариант абсолютных значений, где смешивающий импульс β - обычно 45° или 60°, обеспечивает наиболее компактную структуру пиков и для диагональных, и для перекрёстных пиков, и лучше подходит для обычного применения. В изучении сложных спектров, где происходит значительное наложение пиков, эксперимент полной корреляции или TOCSY может быть чрезвычайно информативным. Он обеспечивает дополнительную корреляционную информацию, передавая намагничивание по системам связанных спинов. Он особенно предпочитается при анализе пептидов и олигосахаридов, например, в которых молекулы содержат в себе дискретные мономерные единицы, которые сами представляют изолированные спиновые системы.

Этот метод имеет всё, но заменил устаревший и плохой ретрансляционый COSY эксперимент, который вызывает пошаговые переносы между связанными спинами. Задержанный (или дальний) эксперимент COSY обычно резервируется для решения специфических вопросов о присутствии малых взаимодействий и обычно менее используется.

5.6.2. Двухквантово фильтрующий COSY (DQF-COSY)

Предыдущие разделы уже имели дело с получением таких данных COSY, которые могут представляться в фазочувствительном режиме. Формы линии чистого поглощения, связанные с ним, обеспечивают самое высокое возможное разрешение и позволяют выделять информацию из тонкой структуры мультиплетов перекрёстного пика. Однако также было указано, что базовая последовательность COSY-90 страдает от одного серьезного недостатка, который состоит в том, что диагональные пики обладают формами линий дисперсного вида, в то время как перекрёстные пики фазируются в режиме чистого поглощения. Широкие хвосты, связанные с дисперсными диагональными пиками, могут маскировать перекрёстные пики, которые оказываются вблизи диагонали, поэтому потенциально имеется возможность потери полезной информации. Присутствие дисперсных вкладов в диагональ может (в значительной степени) преодолеваться применением двухквантово фильтрованного варианта COSY [37], и по этой причине DQF-COSY - лучший выбор для регистрации данных фазочувствительного COSY.

ДКФ последовательность

Последовательность DQF-COSY (рис. 5.40) отличается от основного COSY эксперимента добавлением третьего импульса и применением модифицированного фазового цикла или градиентной последовательности, для обеспечения желательного выбора. Таким образом, после t_1 мечения частоты, второй 90° импульс производит многоквантовую когерентность, которая не наблюдается в последовательности COSY-90, так как остаётся невидимой для детектора. Она может, однако, преобразовываться в одноквантовую когерентность применением третьего импульса, и, следовательно, затем детектироваться. Требуемый фазовый цикл или градиентная комбинация выбирают только те сигналы, которые существовали как двухквантовая когерентность между последними двумя импульсами, в

то время как все другие маршруты подавляются, отсюда и происходит термин двухквантово фильтрованный COSY.

Правила для фильтрования многоквантовых когерентностей порядка p простые. Все импульсы перед p-квантовой когерентностью должны циклироваться шагами по 180/p градусов со связанным чередованием фазы приёмника на каждом шаге [38], поэтому подходящий фазовый цикл (хотя не только один) для двухквантового фильтра может выглядеть как в таблице 5.6.

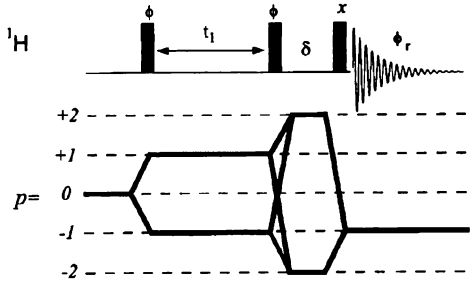


Рисунок 5.40. Эксперимент DQF-COSY и путь переноса когерентности. Импульсы фазово циклируются, как описано в тексте, чтобы выбрать показанный путь с квадратурным детектированием, наблюдающим намагничивание p =-1. Период δ позволяет изменение РЧ фазы и составляет обычно только несколько микросекунд.

Таблица 5.6. Подходящий фазовый цикл для двухквантовой фильтрации

φ	φ_r
x	x
y	-x
-x	x
-y	-x

Фаза φ используется для всех импульсов перед двух-квантовой когерентностью, а фаза φ_r для приемника. Фаза конечного импульса остается неизменной.

Более эффективная фильтрация может получаться градиентным выбором [39]. Порядок когерентности +2 в фильтре может выбираться, используя отношение амплитуды градиента +1: +2 с каждой стороны последнего 90° импульса, как в примере рис. 5.37 выше, в то время как порядок -2 сохраняется отношением +1:-2. Таким образом, можно выбирать путь либо +2, либо -2, *но не оба одновременно.* В этом и состоит отличие градиентного от фазо-циклированного эксперимента, в котором сохраняются оба пути. Поэтому **градиентный эксперимент детектирует *только половину* доступного сигнала** и, таким образом, **имеет вдвое худшую чувствительность** относительно его фазо-циклированного кузена. Это фундаментальное ограничение способности рефокусировать только один из двух возможных ±*p* путей порядка когерентности на каждом переходе и является одним из неудобств использования ИГП для выбора когерентности, но оно должно уравновешиваться относительно более чистым подавлением нежелательных сигналов. Так как эти градиенты не требуются в пределах t_1 в этой последовательности, может использоваться обычное квадратурное детектирование (Стейтс или TPPI). Однако просто введение подходящих градиентов до и после конечного импульса вводило бы в спектр большие фазовые ошибки по причине эволюции химического сдвига в течение градиентных импульсов. Это поэтому должно рефокусироваться, если требуются фазочувствительные данные, так оба градиента применяются в пределах спиновых эхо, производя последовательность рис. 5.41 для селектированного градиентом фазочувствительного эксперимента DQF-COSY.

Следствие шага фильтрации и основная причина для его применения состоит в том, что диагональные пики теперь обладают антифазными формами линий типа поглощения, также как и перекрёстные пики, которые не подвергаются воздействию фильтрацией. Строго говоря, для спиновых систем больше, чем два спина, диагональные пики ещё обладают некоторыми дисперсными вкладами, но они теперь антифазны и поэтому отменяются, и имеют тенденцию быть слабыми и редко вызывают проблемы. Жёсткое образование хвостов, ранее связанное с диагональными пиками, поэтому удаляется, обеспечивая драматическое улучшение в качестве спектров (рис. 5.42).

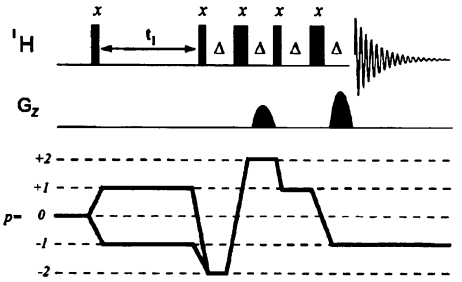


Рисунок 5.41. Селектированный градиентом эксперимент DQF-COSY и путь переноса когерентности. Не требуется никакого циклирования фазы, так как требуемый путь выбирается отношением градиентов 1:2. Оба градиентных импульса применяются внутри спин-эхо для фазочувствительных представлений. Заметьте, что только один путь сохраняется двухквантовым фильтром.

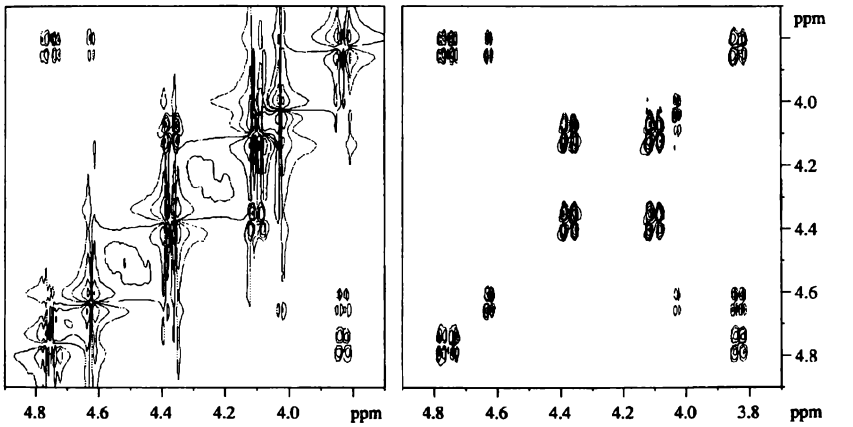
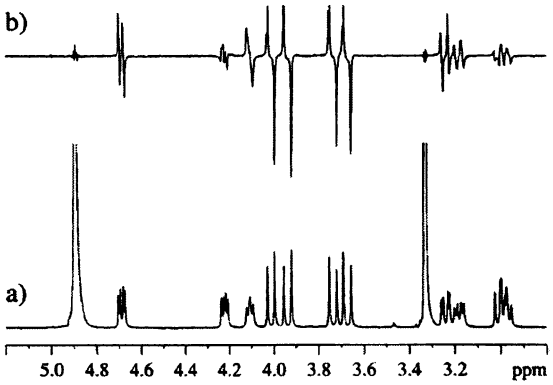


Рисунок 5.42. Двух-квантово фильтрованный спектр COSY (справа) обеспечивает большую ясность вблизи диагональных пиков, чем основной (слева) фазочувствительный COSY, поскольку он не страдает от широких, дисперсных диагональных пиков.

Дополнительная выгода от фильтрации в том, что синглетные резонансы не появляются в образующемся спектре, потому что они неспособны создавать двухквантовую когерентность, и поэтому не могут проходить через фильтр. Так как острые синглеты производят наиболее интенсивные полосы t_1 шума, может быть выгодным одно только их подавление. Эта фильтрация могла также использоваться для подавления больших резонансов растворителя, которые иначе будут доминировать над спектром. В то время как некоторого успеха можно достичь циклированием фазы с отношениями подавления порядка нескольких сотен, значительно большее подавление может предоставляться градиентным выбором, где отношения подавления могут достигать 10.000:1. Редактирование фильтрацией иллюстрируется в 1D двухквантово фильтрованном спектре пептида лей-энкефалина **5.4** в CD_3OD (рис. 5.43), произведённый 1D последовательностью рис. 5.44. Синглетные резонансы растворителя удаляются, в то время как резонансы от всех связанных спинов сохраняются, и появляются с характеристичной антифазной структурой.

Потенциальное неудобство использования двухквантовой фильтрации - теоретическое уменьшение отношения сигнал/шум с коэффициентом 2, благодаря потерям, связанным с генерацией двухквантовой когерентности.

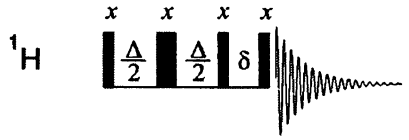


Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

5.4

Рисунок 5.43. 1D двухквантовая фильтрация спектра пептида лей-энкефалина **5.4** в CD_3OD. Синглетные резонансы растворителя, усечённые в обычном 1D спектре (a), отфильтровывались в (b). Остальные пики в (b) отображают характеристичную антифазную мультиплетную структуру (которая может маскироваться вычислением абсолютного значения, если желательно).

Рисунок 5.44. 1D двухквантовый фильтр. Последовательность производится от 2D эксперимента, заменяя переменный период t_1 фиксированным спиновым эхо, оптимизированным, чтобы производить антифазные векторы ($\Delta = 1/2J$), что требуется для генерации двухквантовой когерентности. Выбор сигнала тогда - как для 2D эксперимента, и градиентный выбор может осуществляться как на рисунке 5.41.



Однако польза, возникающая из удаления дисперсных вкладов в диагональ, обычно больше чем компенсирует уменьшение чувствительности, поэтому DQF-COSY используется широко.

Интерпретация мультиплетной структуры

Главная часть анализа 1D спектра состоит из измерения констант взаимодействия в мультиплетах, чтобы получить столько информации, насколько это возможно об отношениях между спинами в молекуле. В то время как это, по крайней мере, вероятно для хорошо разрешённых мультиплетов, задача быстро становится более трудной, и получаются менее надежные данные для резонансов при наложении. В таких случаях было бы полезно использовать большую дисперсию, доступную в 2D спектре, чтобы показать взаимодействующие фрагменты областей, иначе неприступных, и уже было показано, что структура перекрёстного пика COSY отражает структуру соответствующего 1D мультиплета. Этот раздел исследует, как интерпретировать данные в пределах перекрёстных пиков с конечной целью извлечения констант взаимодействия.

Чтобы сделать это, сначала необходимо различить активные и пассивные взаимодействия в кросс-пике. ***Активное* взаимодействие** *вызывает перекрёстный пик*, который коррелирует связанные спины. Как описано ранее, взаимодействие, ответственное за кросс-пик, **появляется как антифазное расщепление** в обоих измерениях и, таким образом, производит основной массив антифазного квадрата, из которого, в конечном счете, получаются все перекрёстные пики COSY (рис. 5.45). ***Пассивные* взаимодействия** - это взаимодействия *со всеми другими спинами*, и **появляются** в спектре **как синфазные расщепления**. Они копируют антифазный массив активного взаимодействия без введения дальнейших изменений знака.

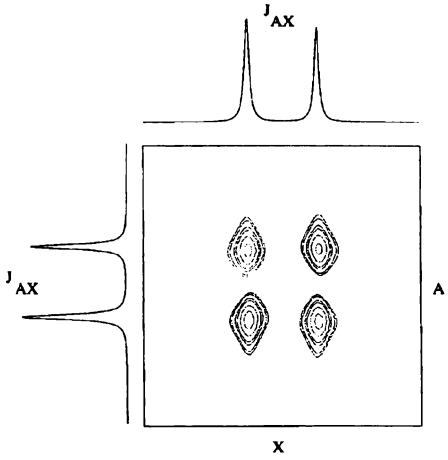


Рисунок 5.45. Квадратный фрагмент антифазного взаимодействия отражает активное взаимодействие J_{AX} между двумя коррелированными спинами, A и X. Этот фрагмент обеспечивает основу для всех структур перекрёстного пика COSY.

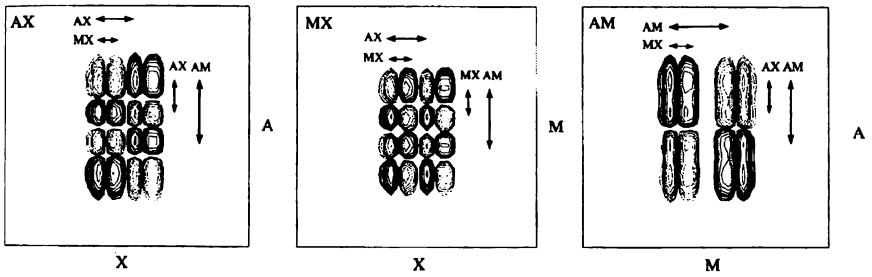


Рисунок 5.46. Структуры перекрёстных пиков из спектра фазочувствительного COSY трехспиновой AMX системы. Стрелки указывают расщепление, благодаря меченым взаимодействиям. Спектр моделировался с $J_{AM} = 18$, $J_{AX} = 12$ и $J_{MX} = 6$ Гц, и конечное цифровое разрешение составляло 2,3 Гц/точка в каждом измерении.

Эти свойства и основные принципы анализа мультиплетных структур могут иллюстрироваться сравнением перекрёстных пиков трех-спиновой AMX системы, в которой $J_{AM} > J_{AX} > J_{MX}$ (рис. 5.46). Рассмотрим сначала перекрёстный пик MX, в котором антифазный квадратный фрагмент активного J_{MX} взаимодействия ясно виден в верхнем левом углу. Этот весь фрагмент затем воспроизводится с той же самой фазой большими пассивными взаимодействиями J_{AX} в f_2 и J_{AM} в f_1, чтобы произвести конечную 4x4 структуру. Это пошаговое расщепление - точный эквивалент тому, которое используется в анализе 1D мультиплетов через «деревья» взаимодействий. Структура f_2 мультиплета AX возникает из большого антифазного взаимодействия J_{AX}, далее расщепляющегося меньшим пассивным взаимодействием J_{MX}, чтобы дать структуру ++−−. В f_1 активное взаимодействие - теперь меньшее из двух, так что просто повторяется, давая фрагмент +−+−. Наконец, мультиплет AM подвергается преобладающему влиянию самого большого активного взаимодействия J_{AM} в обоих измерениях, который первоначально дает большой квадратный массив, с каждой частью затем расщеплённой меньшими пассивными взаимодействиями со спином X. Правила для интерпретации этих структур, следовательно, точно аналогичны правилам интерпретации 1D мультиплетов, кроме различия между активными и пассивными взаимодействиями. Когда взаимодействие происходит между одним спином и *n* эквивалентными спинами, результирующая структура пика может выводиться, воображая только один из *n* спинов активным, а все другие пассивными. Затем можно построить антифазный аналог знакомого треугольника Паскаля для взаимодействия с эквивалентными спинами (рис. 5.47). Таким

образом, для системы A_3X перекрёстный пик показывает дублет для A и +1+1-1-1 квартет для X (рис. 5.48).

В реальных системах мультиплетные структуры могут происходить от очень многих взаимодействий, и разрешение всех их может быть невозможным. Это ведет к наложению в пределах мультиплета со связанной с этим отменой линий и/или суперпозицией. Обычно, структуры кросс-пиков имеют тенденцию к простейшему фрагменту, так как соседние линии с подобными знаками сливаются. Часто в таких случаях меньшие взаимодействия не могут разрешаться, почти как в случае пассивного MX и AX взаимодействия в перекрёстном пике AM рис. 5.46.

n	(a)	(b)
0	1	1
1	1 1	1 -1
2	1 2 1	1 0 -1
3	1 3 3 1	1 1 -1 -1
4	1 4 6 4 1	1 2 0 -2 -1
5	1 5 10 10 5 1	1 3 2 -2 -3 -1
6	1 6 15 20 15 6 1	1 4 5 0 -5 -4 -1

Рисунок 5.47. (A) обычный треугольник Паскаля для 1D мультиплетов и (b) антифазный эквивалент для предсказания мультиплетных структур COSY от взаимодействия с n эквивалентными спинами.

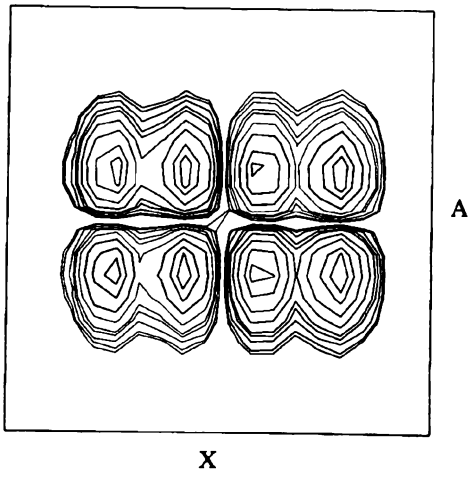


Рисунок 5.48. Перекрёстный пик COSY для A_3X группы, иллюстрирующей структуру, предсказанную из треугольника Паскаля.

При анализе тонкой структуры подробно часто выгодно исследовать оба набора эквивалентных перекрёстных пиков с обеих сторон диагонали, так как они могут иметь различный внешний вид согласно различным использованным уровням оцифровки, что означает, что взаимодействие может не разрешаться в одном измерении, но быть весьма очевидным в другом.

Измерение констант взаимодействия

При условии, что мультиплетные структуры достаточно разрешаются и свободны от наложения с другими пиками, в принципе, возможно измерять константы взаимодействия непосредственно из них [40]. Однако требуется некоторая осторожность, так как следует учитывать, может ли отмена линий в мультиплете вести к ошибочному измерению. Например, если бы центральные линии двойного дублета должны были накладываться деструктивно и отменяться, измеренное расщепление было бы тогда больше, чем истинная константа взаимодействия. Цифровое разрешение также должно быть адекватно, чтобы правильно характеризовать константу взаимодействия с самым высоким разрешением, находящемся в измерении f_2. Чтобы улучшать точность измерения, полезно выделять 1D трассы из 2D спектра и подвергать их *обратному преобразованию Фурье*, применять дополнение нулями (или лучше еще, линейное предсказание), а затем преобразование Фурье, чтобы воспроизводить 1D ряд с улучшенным цифровым разрешением. Этот процесс показывается на рисунке 5.49 для αβ констант взаимодействия в тирозиновом остатке пептида лейэнкефалина **5.4**. Над 2D кросс-пиками - 1D трассы, которые обрабатывались, как описано выше и дополнялись нулями, чтобы производить то же самое цифровое разрешение, как в обычном 1D спектре, показанном наверху (0,4 Гц/точка). Из антифазных и фазированных расщеплений два активных αβ взаимодействия и пассивное ββ взаимодействие легко измеряются как 6.1, 8.3 и 14.0 Гц.

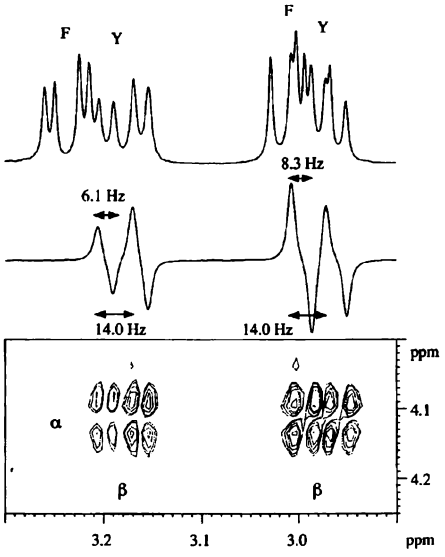


Рисунок 5.49. Фрагменты DQF-COSY спектра пентапептида лейэнкефалина **5.4.** 2D перекрёстные пики и f_2 1D трассы, взятые через них, соответствуют корреляциям в тирозиновом (Y) остатке. Верхняя трасса взята из обычного 1D спектра, в котором β-протонные резонансы частично перекрываются с резонансами фенилаланина (F). Первоначальные 2D данные имели разрешение в f_2 1,8 Гц/точка, но 1D трассы обрабатывались, как описано в тексте, чтобы получить конечное разрешение 0,4 Гц/точка.

Измерение констант взаимодействия, таким образом, однако, ограничивается ширинами линий, которые в 2D спектрах молекул малого и среднего размеров обычно диктуются цифровым разрешением спектра, а не природными ширинами линий. При таких условиях синфазные линии имеют тенденцию сливаться вместе, чтобы производить отдельные максимумы, которые могут маскировать взаимодействие, в то время как антифазные линии остаются разделёнными, но могут производить очевидные расщепления, которые больше, чем истинные взаимодействия. Поскольку константы взаимодействия становятся меньшими, расщепление антифазных линий фактически имеет тенденцию к *минимум* ≈0,6 ширины линии [41] (рис. 5.50), после чего дальнейшие уменьшения истинного разделения только уменьшают интенсивности пиков, пока не происходит полная отмена, и перекрёстный пик теряется.

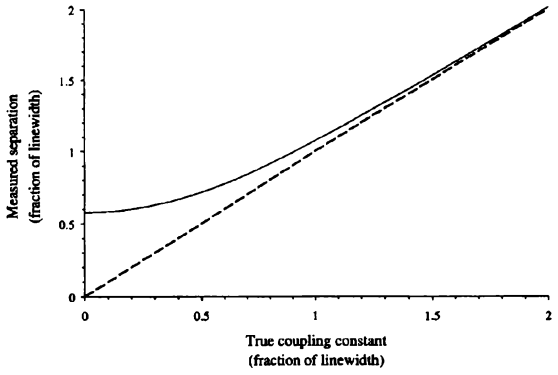
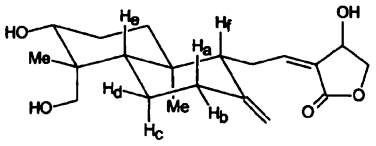


Рисунок 5.50. Разделение пиков антифазных линий как функция константы взаимодействия и ширины линии. Когда константы взаимодействия становятся относительно малыми, измеренное расщепление (сплошная линия) отклоняется от истинного значения (пунктирная линия), производя завышение измеряемых величин.

Можно заключить, следовательно, что невозможно надежно измерять константы взаимодействия, которые значительно меньше, чем наблюдаемые ширины линий после оцифровки. Правило успеха измерений состоит в том, что взаимодействия должны быть больше, чем в 1,5 раза увеличенная *оцифрованная* ширина линии, и спектры, зарегистрированные для измерения констант взаимодействия, обычно приобретаются с более высоким цифровым разрешением в f_2, где можно быть расточительным с точками данных. Эти соображения также показывают, что перекрёстные пики будут исчезать из спектров COSY, если ширины линий большие, или если цифровое разрешение низкое относительно активной константы взаимодействия. Таким образом, перекрёстные пики, благодаря малым взаимодействиям или широким линиям, более расположены к исчезновению. Это может быть серьёзной проблемой для очень больших молекул, которые имеют, естественно, широкие резонансы, и в таких случаях превосходные результаты обеспечивает эксперимент TOCSY, так как перекрёстные пики имеют только синфазную структуру. Существуют также более изощрённые методы, которые позволяют измерение констант взаимодействия в сложных мультиплетах. Например, метод последующей обработки DISCO [42-44] связывается с добавлением и вычитанием рядов из COSY спектров, чтобы производить упрощенные следы, содержащие меньшее количество сигналов, таким образом, делая более надёжные измерения. Подробности различных доступных методов не будут затрагиваться здесь, но обсуждаются в недавнем обзоре [40].

Даже когда имеющиеся данные не позволяют измерение констант взаимодействия, анализ относительных величин активных и пассивных взаимодействий в мультиплетах может проливать свет при интерпретации спектров. Например, в благоприятных случаях можно определять относительную конфигурацию протонов в замещённых циклогексанах, рассматривая структуры перекрёстных пиков. Так как *аксиально-аксиальные* взаимодействия в конформерах кресла типично значительно большие, чем *аксиально-экваториальные* или *экваториально-экваториальные* взаимодействия *(ах-ах* ≈10-12 Гц, *ах-eq/eq-eq* ≈2-5 Гц), они появляются как большие антифазные расщепления в мультиплетах перекрёстных пиков, показывая диаксиальные отношения между коррелированными спинами. Это иллюстрируется на рисунке 5.51, который показывает область спектра DQF-COSY андрографолида **5.5**, гепатозащитного агента, присутствующего в традиционных индийских травяных средствах. Три из кросс-пиков протона H_C отображают большие активные взаимодействия, совместимые либо с геминальным (H_d), либо диаксиальным (H_a, H_e) отношением, в то время как значительно меньшее активное взаимодействие с H_b ограничивает их до *акс-экв* или *экв-экв*. Такие подробности могут извлекаться из 2D карты, даже когда мультиплеты захоронены или слишком сложны для прямого анализа в 1D спектре. Например, корреляции H_a идентифицируют его геминального партнера и указывают три ви-

цинальные *акс-экв* или *экв-экв* отношения с H_e, H_a и H_b. Этот тип информации, который может надежно определяться только из фазочувствительных представлений, может часто с хорошим эффектом использоваться в стереохимических отнесениях, особенно при использовании совместно с ядерным эффектом Оверхаузера.



5.5

Многоквантовые фильтры более высокого порядка

При использовании тех же самых последовательностей, что и DQF-COSY, но с модифицированными фазовыми циклами или градиентными комбинациями, можно фильтровать многоквантовые когерентности более высоких порядков между последними двумя импульсами. Так, например, градиентное отношение 1:3 в последовательности рис. 5.41 выбирает только трехквантовую когерентность. Трёхквантово фильтрованный (TQF) эксперимент COSY устраняет отклики от всех синглетов и двухспиновых систем, приводя к потенциальному упрощению. Вообще, p-квантовый фильтр может использоваться для удаления пиков, возникающих от спиновых систем с меньшим, чем p количеством связанных спинов [38,45]. Такие эксперименты имеют потенциальное использование в изучении молекул, содержащих хорошо определённые спиновые системы, которые изолированы одна от другой в молекуле, как аминокислоты в пептидах и белках [46]. Однако, большой недостаток фильтрования когерентностей более высоких порядков - уменьшение чувствительности с коэффициентом 2^{p-1} для p-квантового фильтра. В то время как фактор 2 для потери чувствительности в DQF-COSY относительно его нефильтрованного кузена можно терпеть, фактор 4 для TQF-COSY может сделать его ненадежным. В значительной степени по этой причине TQF-COSY редко используется, и фильтрование более высоких порядков по существу не встречается в обычных работах.

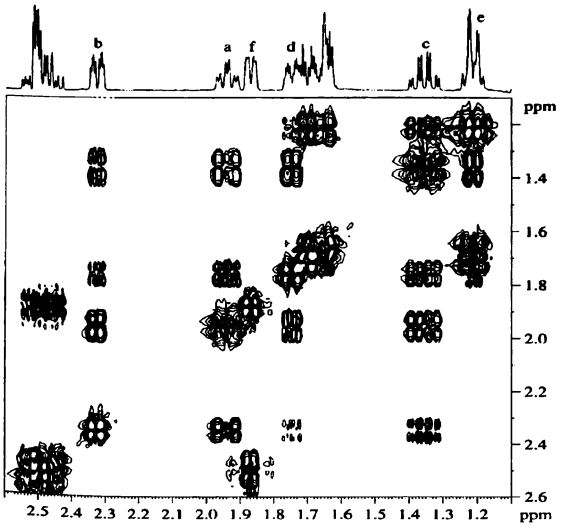


Рисунок 5.51. Область спектра DQF-COSY андрографолида **5.5**. Данные собирались при условиях высокого f_2 разрешения (1,7 Гц/точка), чтобы показать тонкую структуру взаимодействия в пределах перекрёстных пиков.

Правила для интерпретации тонкой структуры мультиплетов в COSY, зарегистрированном с фильтрацией высоких порядков, также требуют некоторой модификации [46,47].

5.6.3. COSY-β

Обычная модификация последовательности базового COSY одна из тех, в которых 90° смешивающий импульс заменяется импульсом уменьшенного угла отклонения β, обычно 45 или 60 градусов (рис. 5.52). Эти эксперименты обычно получаются и представляются как эксперименты абсолютного значения (магнитуды), так как, строго говоря, применение импульсного угла меньше, чем 90° не производит чисто амплитудно модулированных данных.

Применение уменьшенного смешивающего импульса в значительной степени ограничивает перенос когерентности между переходами, *которые связываются прямо*, или другими словами, теми,

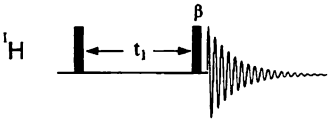


Рисунок 5.52. COSY- β эксперимент. β смешивающий импульс обычно установится 45° или 60°

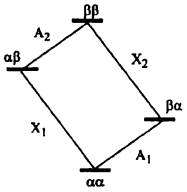


Рисунок 5.53. Схематическая диаграмма энергетических уровней для двух-спиновой AX системы..

которые разделяют энергетический уровень, например A_1 и X_2 на рисунке 5.53. Перенос когерентности между *удалённо связанными* переходами, например A_1 и A_2, ослабляется. Это вызывает уменьшение интенсивности некоторых линий *в пределах* мультиплетных структур и диагональных и перекрёстных пиков, которые особенно заметны, когда спины испытывают больше, чем одно взаимодействие. Диагональные пики имеют несколько меньшие «следы», увеличивая возможности разрешения кросс-пиков, которые расположены близко к ним, в то время как перекрёстные пики сами также имеют упрощенную структуру, которая может принимать характерный «наклонный» внешний вид (рис. 5.54). В благоприятных случаях этот эффект наклона можно использовать, чтобы различать пики, возникающие из активных взаимодействий противоположного знака, таких как геминальные или вицинальные взаимодействия. Рассмотрим ситуацию для трех-спиновой AMX системы, в которой все спины взаимодействуют друг с другом. Перекрёстный пик AM, например, будет иметь положительный наклон, и его наклон будет приблизительно параллелен диагонали, если два *пассивных* взаимодействия, J_{AX} и J_{MX} имеют *одинаковый* знак. Напротив, пик покажет отрицательный наклон, и будет лежать антипараллельно диагонали, если знаки пассивных взаимодействий различны. В протонной спектроскопии вицинальные взаимодействия обычно положительные, а геминальные взаимодействия - отрицательные, что означает, что перекрёстный пик между протоном и его *геминальным* партнером будет обладать *положительным наклоном*, в то время как с вицинальным партнером он покажет *отрицательный наклон*. Этот эффект очевиден в COSY-45 спектрах **5.1** на рисунке 5.54. Взаимодействия с дополнительными спинами далее расщепляют структуру перекрёстного пика, и в таких случаях наклон может не различаться. Однако, когда этот эффект наблюдается, он обеспечивает ценное дополнительное свидетельство, опознавая геминальные пары.

Выбор между β = 45° и 60° - дело личного вкуса. Установка β = 45° вызывает самое большое отношение интенсивности между прямыми и удаленными переходами (фактор около 6 для 45° против 3 для 60°) и, таким образом, дает самое большое уменьшение сложности пиков, в то время как установка β = 60° обеспечивает слегка повышенную чувствительность. Так как первичная цель этого варианта - уменьшение следа диагонального и перекрёстного пика, эксперимент COSY-45 - вероятно тот, который следует выбирать. Благодаря более компактным структурам пика и простоте обработки,

эксперимент COSY-45 абсолютного значения еще находит широкое применение в обычном анализе и автоматизированных процедурах в химической лаборатории.

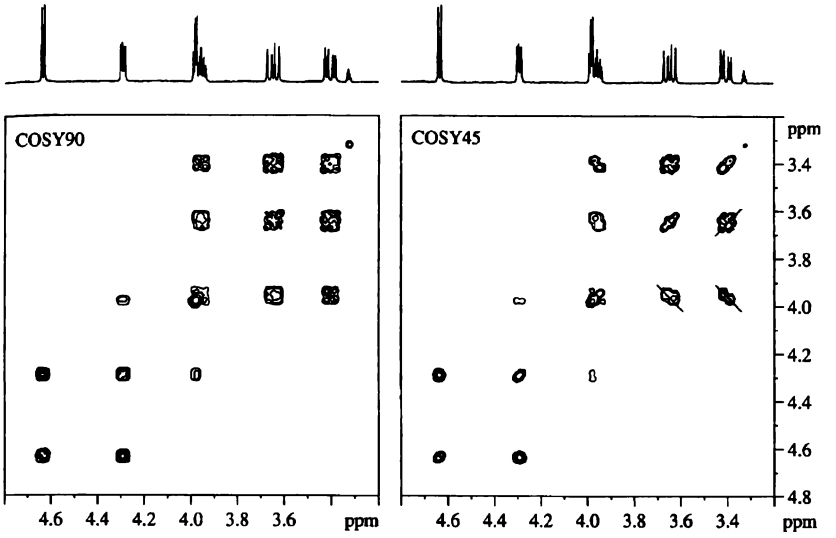


Рисунок 5.54. COSY-45 спектр абсолютного значения **5.1** по сравнению с эквивалентным спектром COSY-90. Наклон, очевидный на некоторых кросс-пиках COSY-45, может показывать возникает ли активное взаимодействие от протонов, разделяющих геминальные или вицинальные отношения, которые производят пики с положительными и отрицательными склонами, соответственно (см. текст).

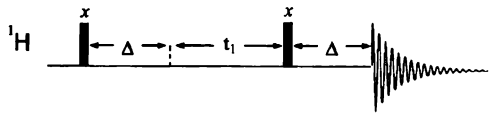
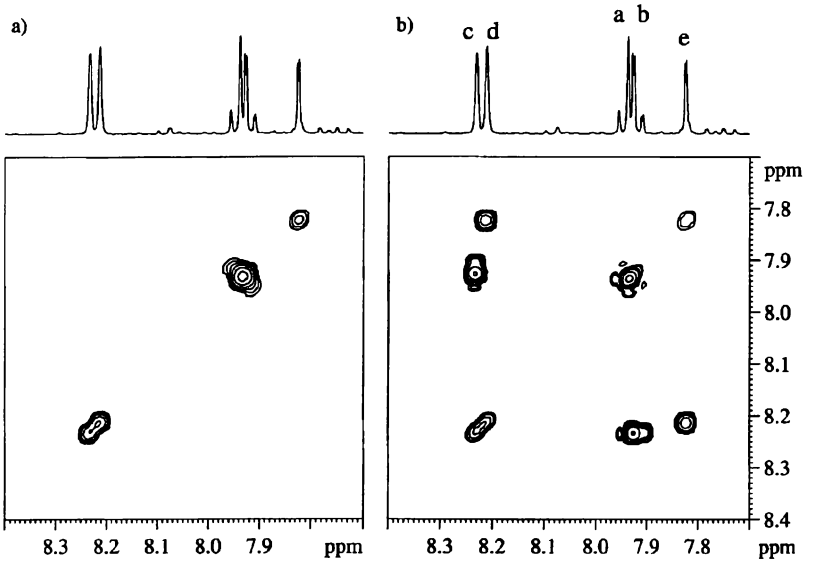


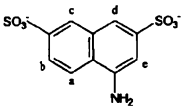
Рисунок 5.55. Последовательность задержанного (или дальнего) COSY Дополнительные фиксированные задержки вставлены в последовательность базового COSY, чтобы улучшить внешний вид корреляций от малых взаимодействий (см. текст).

5.6.4. Задержанный COSY: детектирование малых взаимодействий

Последовательности COSY, встречавшиеся до настоящего времени, удивительно эффективны для обнаружения малых взаимодействий между протонами. Однако, такие перекрёстные пики обычно довольно слабые, и их идентификация, как подлинных корреляций, может быть трудной. Эксперимент задержанного COSY (рис. 5.55) увеличивает интенсивность корреляций, благодаря взаимодействиям, которые меньше, чем природные ширины линий, и, так как они часто встречаются для путей взаимодействия через много связей, эксперимент также упоминается *как дальний COSY.* Корреляции более, чем через 4 или 5 связей, в жестких или ненасыщенных системах, подобных тем, которые от *w*-, алильных или гомоалильных взаимодействий, могут легко наблюдаться этим экспериментом, даже когда взаимодействие может не разрешаться в 1D спектре (рис. 5.56).

Предыдущие обсуждения подчеркивали необходимость антифазного расположения мультиплетных векторов, чтобы происходил перенос когерентности. В COSY это возникает от эволюции спин-спиновых взаимодействий в течение t_1 и развивается с тем меньшей скоростью, чем меньше взаимодействие.





5.6

Рисунок 5.56. (A) обычный COSY-90 спектр и (b) спектр задержанного COSY **5.6.** Дополнительная задержка 200 мс использовалась в (b), в то время как все другие параметры были такими же (a). Малые дальние взаимодействия (1 Гц) не очевидны в обычном эксперименте COSY, но корреляции в (b) однозначно обеспечивают протонные отнесения.

В случае очень малых констант взаимодействия нет достаточного времени, чтобы это происходило при обычных условиях, используемых для регистраций COSY, и, поэтому перекрёстные пики этих взаимодействий слабые или недтектируемые. Можно увеличить интенсивность этих пиков, регулируя t_1 и t_2 измерения так, чтобы они оптимизировались для детектирования сигнала переноса когерентности из этих меньших взаимодействий. В то время как это могло бы, в принципе, достигаться, расширяя оба периода времени, и, следовательно, увеличивая цифровое разрешение в обоих измерениях, это производит огромные наборы данных и ведёт к длительным экспериментам. Подход, использованный в последовательности задержанного COSY, состоит в том, чтобы вставлять *фиксированную* задержку, после каждого импульса, чтобы увеличить *явные* времена эволюции, еще сохраняя тот же самый уровень оцифровки, как в стандартном эксперименте COSY. Применение дополнительных задержек предотвращает использование фазочувствительных представлений по причине больших фазовых искажений, которые возникают, когда необходима обработка абсолютных значений.

Для оптимального детектирования малых взаимодействий максимум сигналов переноса когерентности должен находиться *в средней точке* каждого временного измерения. Можно показать, что этот максимум возникает в момент t, где

$$t = \frac{\tan^{-1}(\pi J T_2)}{\pi J} \tag{5.10}$$

Когда J мала настолько, что $JT_2 >> 1$, поддерживается приближение $t = T_2$ и, чтобы гарантировать, что центр каждого временного измерения совпадает с этим максимум, дополнительная задержка Δ поэтому:

$$\Delta = T_2 - {}^1/_2AQ \tag{5.11}$$

где AQ - полное t_1 или t_2 время регистрации. Для типовых параметров регистрации COSY и типичных протонных значений T_2, Δ попадает в диапазон от 50 до 500 мс. Так как фактические значения T_2 обычно неизвестны наперёд, и в любом случае будет существовать разброс в молекуле, в большинстве случаев должна удовлетворять компромиссная установка около 200 мс. Кросс-пики, возникающие от взаимодействия большей величины, могут сильно ослабляться в этом эксперименте, поэтому неизменно также необходимо регистрировать стандартный COSY, чтобы установить отношения обычных взаимодействий.

5.6.5. Ретрансляционный COSY

Эксперимент ретрансляционного COSY будет рассматриваться только очень кратко, потому что он, по существу, заменяется значительно превосходящим TOCSY экспериментом, описанным ниже, хотя, однако, можно еще столкнуться со ссылками на этот эксперимент в старой литературе. Эксперимент ретрансляционного COSY (рис. 5.57) пытается преодолевать проблемы, вызванные совпадающим наложением перекрёстных пиков в COSY, которые могут вести к нарушению в пошаговой трассировке систем взаимодействия в молекуле. Он включает дополнительный шаг переноса когерентности, в котором она переносится от спина A его партнеру M, как в стандартном COSY, и последовательно передаётся на следующий связанный спин X в последовательности. Это производит перекрёстный пик в спектре между спинами A и X, *даже хотя и не существует никакого прямого взаимодействия между ними*, на основании разделения ими общего взаимодействующего партнёра M.

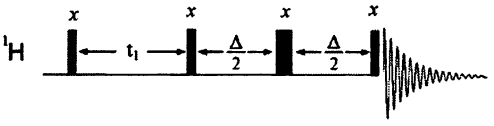


Рисунок 5.57. Ретрансляционная COSY последовательность, в которой в конец к основному COSY эксперименту добавлен дополнительный шаг переноса.

Неоднозначности от совпадающего наложения перекрёстных пиков, связанных со спином M, поэтому удаляются, обеспечивая прямое доказательство существования A и X, в одной и той же спиновой системе.

Ретрансляционный перенос когерентности [48] достигается, вставляя фиксированный период времени Δ после второго импульса снова в форме спинового эхо, чтобы удалить эффекты химического сдвига. В течение него развивается взаимодействие M-X, чтобы производить антифазные мультиплетные векторы (MX взаимодействие было пассивным в начале переноса A-M, поэтому эти векторы синфазны после второго 90° импульса). Третий 90° импульс затем вызывает перенос M-X когерентности перед детектированием. Фиксированная задержка должна устанавливаться оптимально равной 1/2J, чтобы максимизировать этот перенос, отсюда компромиссная установка для J = 7 Гц дает = 70 мс. Прямые отклики, наблюдаемые в обычном эксперименте COSY, также могут присутствовать, но с изменяющимися интенсивностями.

5.7. ПОЛНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (TOCSY)

Основная особенность всех COSY экспериментов, описанных выше, - прямая корреляция гомоядерных спинов, которые разделяют скалярное взаимодействие. В протонной спектроскопии это

обычно обеспечивает химика доказательством геминальных и вицинальных отношений между протонами в молекуле. Полная корреляционная спектроскопия [49] или TOCSY также даёт гомоядерные протонные корреляционные спектры, основанные на скалярных взаимодействиях, но может также устанавливать корреляции между протонами, которые находятся в пределах *той же самой спиновой системы*, независимо от того, связаны ли они сами друг с другом. Другими словами, при условии, что имеется непрерывная цепь спин-спиново связанных протонов A-B-C-D-и т.д., TOCSY последовательность переносит намагничивание спина A на спины B, C, D и т.д., передавая когерентность от одного протона к следующему по цепи. В принципе, это может коррелировать все протоны в пределах спиновой системы, и эта особенность заслуживает названия *полная корреляционная спектроскопия*. Способность ретранслировать намагничивание, таким образом, обеспечивает чрезвычайно мощное средство картирования корреляции, делая даже большее применение дополнительной дисперсии, существующей в двух измерениях. Это особенно выгодно в случаях жёсткого наложения резонансов, для которых спектры COSY часто могут оставлять неоднозначности. TOCSY спектр для **5.1** показан на рисунке 5.58, и регистрировался так, чтобы позволить многоступенчатые переносы по углеводному кольцу.

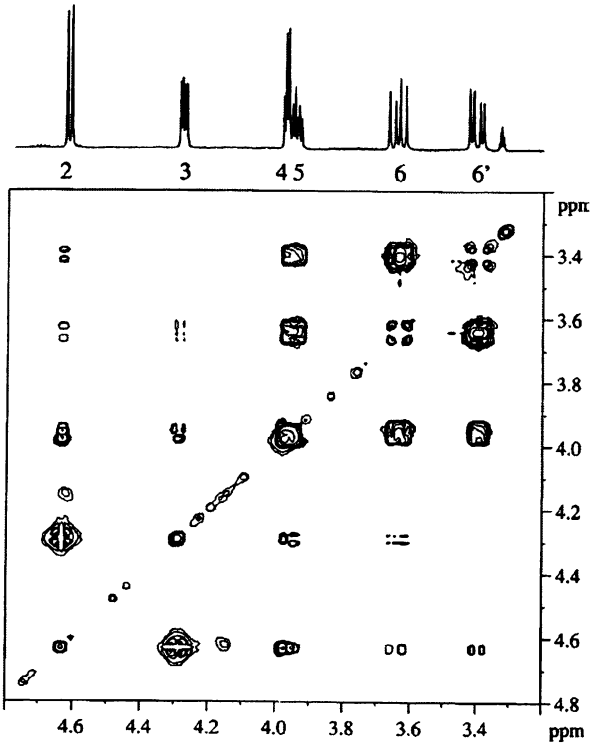
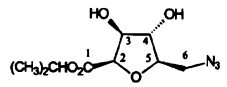


Рисунок 5.58. TOCSY спектр **5.1**. Ретрансляционные перекрёстные пики очевидны между спинами, которые испытывают недостаток прямых скалярных взаимодействий, но которые существуют в пределах той же самой спиновой системы и возникают из распространения намагничивания по цепи связанных спинов. Сравните это со спектром COSY на рисунке 5.12.



5.1

Его следует сравнивать со спектром COSY того же самого образца на рисунке 5.12. Дополнительные ретрансляционные перекрёстные пики, видимые в TOCSY, обеспечивают *корреляции между всеми спинами* в кольцевой системе, и эта способность полностью устанавливать соответствие спиновых систем особенно полезна, когда в молекуле существуют дискретные единицы, как вскоре будет показано. Вторая существенная особенность TOCSY, которая контрастирует с COSY, в том, что он использует чистый перенос *синфазного* намагничивания, и поэтому не страдает от отмены анти-

фазных пиков при условиях низкого цифрового разрешения или больших ширин линий. В этих случаях эта особенность делает TOCSY более чувствительным из этих двух методов.

По существу идентичный эксперимент также упоминался как гомоядерная спектроскопия Хартман-Ханна [50,51] или HOHAHA (они отличаются только некоторыми техническими подробностями в первоначально опубликованных последовательностях). Это название происходит от его подобия методам, используемыми в ЯМР спектроскопии твёрдых тел для переноса поляризации от протона к ядру углерода (так называемая перекрёстная поляризация), которые основываются на согласовании Хартмана-Ханна, описанном ниже. По той же самой причине, перенос намагничивания в течение TOCSY последовательности иногда упоминается как *гомоядерная перекрёстная поляризация.* По всему этому тексту используется первоначальная терминология TOCSY, хотя TOCSY и HOHAHA теперь используются в химической литературе как синонимы.

5.7.1. Последовательность TOCSY

Последовательность TOCSY, представленная в её наиболее общей форме на рисунке 5.59, очень напоминает уже описанную последовательность COSY, единственное отличие - применение *смешивающей последовательности* вместо единственного смешивающего импульса. Она известна как *блокировка спина* или *последовательность изотропного смешивания* (эта терминология объясняются ниже) и её цель - выполнять ретрансляционный перенос намагниченности, упомянутый выше. Такие подробности, как квадратурное детектирование и подавление аксиальных пиков, аналогичны COSY, поэтому, чтобы понять действие эксперимента TOCSY, необходимо только оценить влияние блокировки спина.

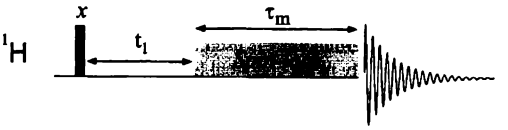


Рисунок 5.59. Последовательность TOCSY. Время смешивания блокировки спина τ_m заменяет одиночный смешивающий импульс основного эксперимента COSY

Блокировка спина и перенос когерентности

Чтобы понять действие периода блокировки спинов в эксперименте TOCSY, рассмотрим последовательность событий в течение первого перехода 2D эксперимента (то есть того, для которого $t_1 = 0$). Эксперимент начинается возбуждением спинов $90°_x$ импульсом, так что они все ложатся вдоль $+y$ оси во вращающейся системе. На этом этапе применяется РЧ поле блокировки спина, на сей раз по $+y$ оси, параллельно ядерным векторам. В её простейшей форме блокировка спина - непрерывный импульс малой мощности постоянной фазы, применённый в течение периода обычно десятков миллисекунд. Удобно представлять, что он состоит из непрерывной последовательности близко расположенных $180°_y$ импульсов, окружённых бесконечно малыми периодами δ (рис. 5.60).

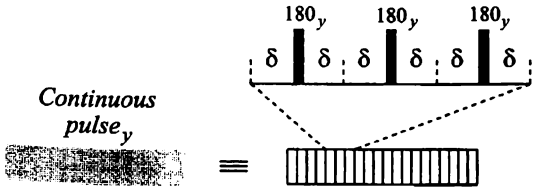
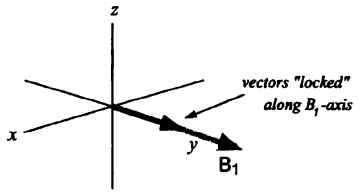


Рисунок 5.60. Блокировка спина в ее простейшей форме - одиночный длительный импульс малой мощности. Он может представляться как непрерывная последовательность близко расположенных 180° импульсов, окружённых бесконечно малыми периодами δ.

Каждый δ-180-δ период составляет не больше, чем гомоядерное спиновое эхо, описанное в главе 2, и чтобы представить эволюцию химических сдвигов и гомоядерных спин-спиновых взаимодействий в течение блокировки спина, достаточно рассмотреть события в пределах дискретного периода δ-180-δ. Уже показано в разделе 2.2.4, что 180° импульс рефокусирует эволюцию химических сдвигов, поэтому после каждого периода δ-180-δ не накапливается никакая эволюция сдвига и все спиновые векторы остаются вдоль +y оси. При распространении этого аргумента за весь период смешения, очевидно, что никакая чистая эволюция химического сдвига не происходит в течение τ_m, и, следовательно, ядерные векторы, как говорят *спин-блокированы* во вращающейся системе вдоль, в этом случае, оси y (рис. 5.61).



spin-lock$_y$

Рисунок 5.61. Векторы удерживаются по оси B_1 длительным РЧ импульсом и, как говорят, *спин-блокированы* во вращающейся системе.

В течение спин-блокирующего смешения все протоны испытывают одинаковое эффективное поле и, следовательно, одинаковую отстройку *химического сдвига (то есть ноль)* во вращающейся системе. Раздел 2.2.4 также показал, что, напротив, *гомоядерные* спин-спиновые взаимодействия *продолжают развиваться* после 180° импульса, так что в продолжение всей блокировки спина J-взаимодействия ведут себя так, как они находились бы в течение периода свободной прецессии. В итоге, в течение смешения блокировки спина все разности химических сдвигов во вращающейся системе удаляются, а спин-спиновые взаимодействия остаются активными (рис. 5.62).

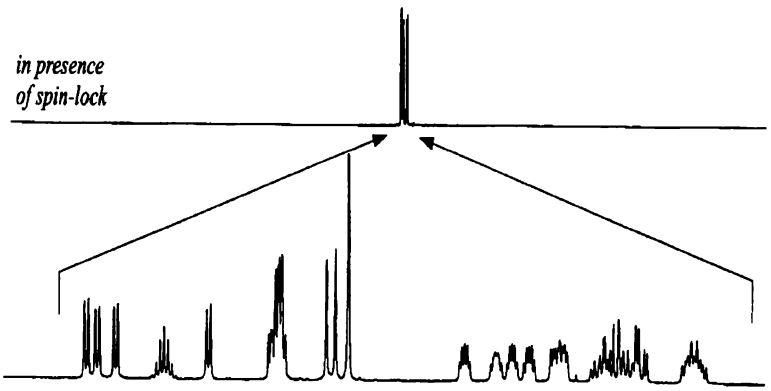


Рисунок 5.62. Иллюстрация схемы событий в течение смешивания блокировки спина. Все разности химических сдвигов между спинами устраняются, а все спин-спиновые взаимодействия между ними остаются, это вызывает *условие сильного взаимодействия* всех спинов (см. текст).

Вспомните из азов ЯМР, что ядра, которые разделяют взаимодействие и имеет очень близкие (или совпадающие) химические сдвиги относительно их константы взаимодействия называются *сильно связанными*, и, что при таких условиях они теряют их уникальную идентичность, и, в конечном счете, становятся неразличимыми. Таким образом, для системы, содержащей связанную пару AB, невозможно рассматривать взаимодействия спина независимо от взаимодействий его сильно связанного соседа B, и наоборот. Такое условие сильного взаимодействия *вызывается* для всех ядер спиновых

систем применением поля блокировки спина, так как протоны остаются связанными, но все обладают одинаковым эффективным химическим сдвигом. Протоны, следовательно, теряют их «уникальную» идентичность в течение периода смешения, и это обеспечивает механизм, которым когерентность может распределяться по всем спинам в пределах той же самой спиновой системы. При этих условиях существует колебательный обмен когерентностью между протонами в течение блокировки спина, который для AX системы обусловливает полный перенос когерентности от A к X после периода $1/2J_{AX}$ секунд [49], и возврат к A после 1/J секунд (рис. 5.63). Хотя события становятся более сложными для больших систем, общая идея колебательного обмена когерентностью между спинами сохраняется, приводя к распространению намагничивания по цепи связанных спинов [52] (рис. 5.64).

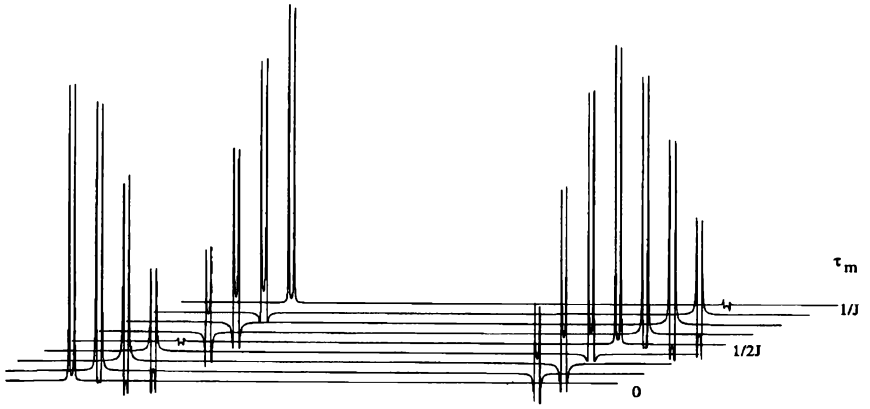


Рисунок 5.63. Колебательный перенос намагничивания между связанной протонной парой под влиянием блокировки спина. Перенос моделировался, используя блокировку спина MLEV-17 (см. текст) увеличивающейся продолжительности в каждом следующем эксперименте. В каждом случае, она применялась немедленно после селективного возбуждения высокочастотного дублета с чистой фазой селективным 90° импульсом EBURP-2 (глава 9).

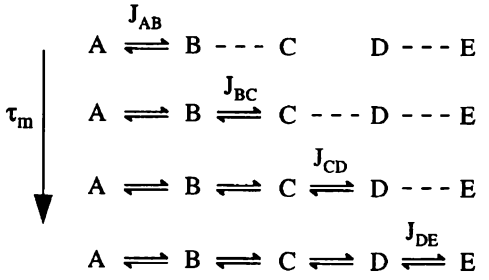


Рисунок 5.64. Схематическая иллюстрация распространения намагничивания вдоль цепи связанных спинов как функция времени смешивания блокировки спина. Стрелки указывают циклический обмен когерентностью между ядрами.

Для коротких, около 20 мс, времен смешивания в протонных экспериментах, существенную интенсивность имеют только одностадийные переносы и видимые корреляции эквивалентны наблюдаемым в COSY. Более длинные периоды смешения позволяют намагничиванию дальше распространяться вдоль цепи связи и вызывают появление ретрансляционных пиков, возникающих от многоступенчатых переносов, как видно на рисунке 5.58 выше. Малые взаимодействия ведут к слабым полезным действиям переноса и могут вести к разрушению переноса и к потере ретрансляционных пиков. Так как намагничивание может перемещаться по спиновой цепи в любом направлении, 2D TOCSY спектры снова симметричны относительно диагонали.

Требование, чтобы ядра испытывали идентичные локальные поля в течение времени смешивания, как условия существования переноса между ними, также упоминается как *согласование Хартман-Ханна.* Более формально и более обычно, это может выражаться как:

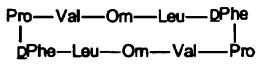
$$\gamma_A B_{1A} = \gamma_X B_{1X} \qquad (5.12)$$

Где B_{1A} и B_{1X} - поля B_1, испытываемые спинами A и X, а γ_A и γ_X - их гиромагнитные отношения, соответственно. Включение γ_s в это означает, что нуклиды, вовлеченные в обмен, не обязательно одинаковые, так, например, может инициироваться перенос между протоном и углеродом, если одновременные РЧ поля, которые удовлетворяют равенству 5.12 применяются к каждому нуклиду. Это, по аналогии, ведет к гетеро-TOCSY, или, более забавно, к гетероядерной спектроскопии Хартман-Ханна (HEHAHA), как средства установления гетероядерных корреляций [53,54].

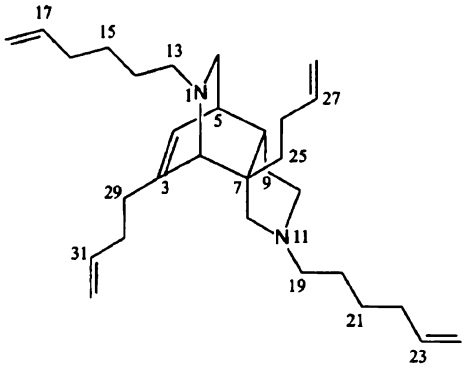
5.7.2. Использование TOCSY

Способность TOCSY распространять намагничивание по спиновой системе подразумевает, что этот эксперимент станет популярным инструментом для изучения молекул, которые содержат в себе дискретные и часто хорошо определённые единицы. Очевидные примеры этого - белки, пептиды и олигосахариды, для которых часто можно прослеживать всю аминокислотную последовательность или систему сахарных колец от отдельного разрешённого протона. Это иллюстрируется в TOCSY спектре циклического декапептида грамицидина **5.7** (рис. 5.65).

Показана только алифатическая область, в которой все протоны боковой цепи каждого остатка могут прослеживаться от присоединённого альфа-протона (за исключением фенилаланинового ароматического кольца), как показано для остатков орнитина и пролина.



5.7



5.8

Передача намагничивания по цепи взаимодействующих спинов может часто преодолевать проблемы, вызываемые близкими или совпадающими кросс-пиками в COSY, эффективно перенося связанные корреляции в области спектра, которые иначе были бы лишены перекрёстных пиков, и, следовательно, используя добавочное «пространство» в 2D спектре. Этот подход использовался в отнесении боковой цепи **5.8,** интермедиата в биомиметическом синтезе представителей алкалоидов манзамина и керамафидина [55,56], найденных природно в морских губках.

Благодаря сильной скученности в некоторых областях алифатической области, отнесения боковой цепи легче получались из ретрансляционных корреляций, включающих разрешённые протоны алкена, такие как H23 (рис. 5.66). Точно так же многочисленные корреляции от H4 обеспечивают подтверждение отнесений, полученных из спектра DQF-COSY.

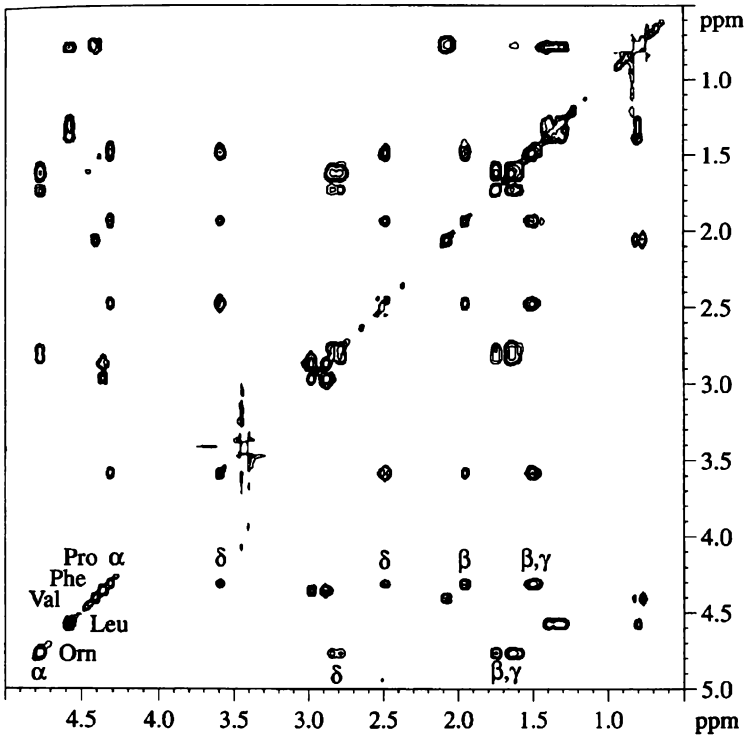


Рисунок 5.65. Алифатическая область TOCSY спектра циклического декапептида грамицидина-S **5.7.** Использовалась 80 мс блокировка спина MLEV-17, обеспечивающая полный перенос по алифатическим боковым цепям каждого остатка. Корреляции от альфа-протонов пролина и орнитина метятся корреляциями от δ протонов, что соответствует трёхступенчатому переносу.

Некоторая неопределённость распространения намагниченности, найденная в TOCSY, однако, также может быть недостатком, так как обычно невозможно явно установить число шагов, включённых в создание любой данной корреляции. Временная зависимость нарастания перекрёстного пика ряда TOCSY спектров, регистртированных с увеличением τ_m (например, шагами по 20 мс (рис. 5.67)), может обеспечить приблизительный признак, возникает ли пик от 1, 2 или более шагов, хотя часто невозможно определить это точнее. При применении TOCSY к молекулам, которые не состоят из хорошо разграниченных мономерных единиц, часто выгодно использовать его как дополнение к спектрам COSY, из которого может идентифицироваться большее количество непосредственных взаимодействующих соседей. Применение очень длинных периодов блокировки спинов для стимулирования многошагового переноса также ведет к потерям чувствительности, благодаря релаксации (во вращающейся системе) спин-блокированного намагничивания.

Также замечено, что TOCSY обусловливает **чистый перенос *синфазного* намагничивания**, что означает, что эффекты отмены от *антифазной* мультиплетной тонкой структуры, связанной с COSY, отсутствуют в TOCSY. Такая отмена может быть проблематичной для молекул, которые обладают большими природными ширинами линий, например для (био)полимеров, но может также предотвращать наблюдение пиков COSY в спектрах малых молекул, которые имеют сложные мультиплетные структуры, которые могут отменяться при условиях недостаточного цифрового разрешения. В этих

случаях эксперимент TOCSY может рассматриваться как более чувствительный выбор по причине большей чувствительности кросс-пиков. Отсутствие антифазной структуры также означает, что спектры могут регистрироваться очень быстро в условиях довольно низкого цифрового разрешения без потери интенсивности пиков.

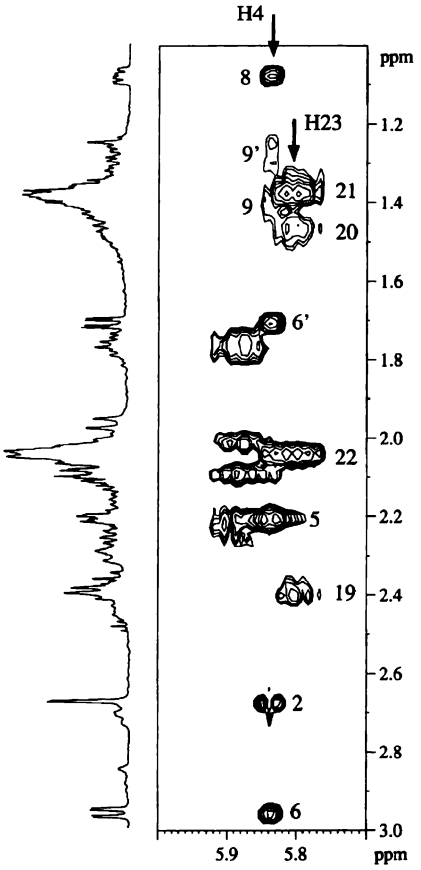
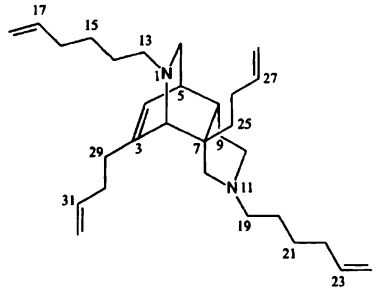


Рисунок 5.66. Участок TOCSY спектра (T_m = 80 мс) биомиметического интермедиата **5.8** рядом с обычным 1D спектром. Корреляции от протонов H4 и H23 метятся. Несмотря на обширное наложение в некоторых областях 1D спектра, многочисленные ретрансляционные корреляции в TOCSY случаются в иначе чистой области 2D спектра и обеспечивают готовую идентификацию протонных сдвигов.



5.8

Наконец, так как и диагональные, и перекрёстные пики обладают одной и той же фазой, оба производят формы линии двойного поглощения, что означает возможность получения фазочувствительных спектров высокого разрешения.

Существует один побочный эффект блокировки спина, который состоит в том, что он также позволяет *некогерентный* перенос намагниченности во вращающейся системе. Другими словами, эффекты через пространство, известные как ядерные эффекты Оверхаузера вращающейся системы координат (ROE), могут, в принципе, также наблюдаться между спинами. Они имеют тенденцию быть гораздо слабее, чем пики TOCSY, особенно для малых молекул и коротких времён смешивания, поэтому редко вызывают проблемы. Эти проблемы могут возникать для очень больших молекул, в которых они более сильные и быстрее нарастают. Для таких молекул разработаны так называемые чистые последовательности TOCSY [57-59], которые устраняют пики ROE, отменяя их равными, но противоположными пиками ЯЭО (глава 8); такие методы применимы только к очень большим молекулам, где существует эта разность в знаке.

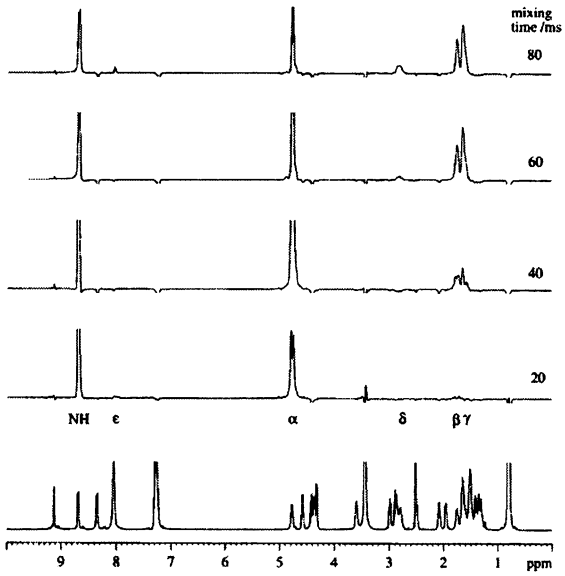


Рисунок 5.67. Зависящее от времени распространение намагничивания по протонной спиновой системе, как показано для остатка орнитина грамицидина-S. Трассы извлечены из спектров 2D MLEV-17 TOCSY при химическом сдвиге протона NH и показывают увеличение переноса по боковой цепи с увеличением времени смешивания.

Значительно большая проблема - появление нежелательных пиков TOCSY в спектрах ЯЭО вращающейся системы координат (ROESY), эта тема рассматривается в главе 8.

5.7.3. Реализация TOCSY

Хотя, в принципе простая схема, представленная на рисунке 5.59, должна обеспечивать TOCSY спектры, её пригодность для практического использования ограничивается эффективной шириной полосы непрерывного облучения блокировки спина. Спины, которые находятся вне резонанса применённого импульса малой мощности, испытывают уменьшенное РЧ поле, что вызывает нарушение согласования Хартмана-Ханна и прекращение переноса. Это аналогично плохому качеству внерезонансного 180° импульса (раздел 3.2.1). Решение этих проблем должно заменить блокировку спина непрерывного облучения расширенной последовательностью из «составных» 180° импульсов, которые расширяют эффективную ширину полосы без чрезмерных требований мощности. Сами составные импульсы описываются в главе 9 наряду с обычными схемами смешивания, используемыми в TOCSY, поэтому не должны обсуждаться здесь. На этом этапе достаточно сказать, что эти составные импульсы действует как более продуктивные широкополосные 180° импульсы в общей схеме на рис. 5.60.

Для практической реализации TOCSY эксперимента в широком использовании имеются, по существу, два подхода, основанные на методах составного импульса (рис. 5.68). Первый из них [51] (рис. 5.68а) основывается на так называемой блокировке спина MLEV-17, в которой используется чётное число циклов через последовательность MLEV-17, чтобы производить желательный полный период смешения. Чтобы гарантировать сбор данных режима поглощения, должно сохраняться только намагничивание вдоль одной оси, поэтому необходимо устранять намагничивание, не параллельное ей, до или после последовательности переноса. В этой реализации это достигается применением «подстроечных импульсов», приложенных в течение 2-3 миллсекунд вдоль выбранной оси.

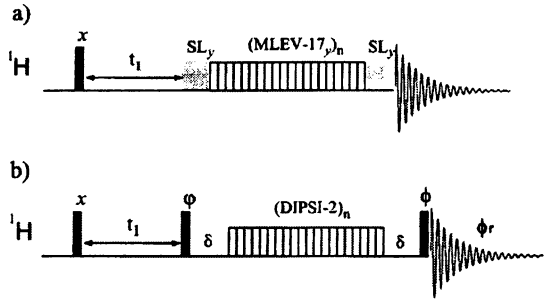


Рисунок 5.68. Две практические схемы реализации TOCSY, основанные: (a) - на смешивающей схеме MLEV-17 и (b) – на схеме изотропного смешивания DIPSI-2. Последовательность MLEV заключается между короткими подстроечными импульсами блокировки спинов непрерывным облучением (SL), чтобы обеспечивать чисто-фазовые данные. В схеме (b) это может достигаться циклированием фазы 90° импульсов Z-фильтра, которые окружают смешивающую схему.

Это требует независимой инверсии каждого из окружающих 90° импульсов с совпадающей инверсией приемника, таким образом $\varphi = x,-x,-x,\ x,\ \phi = x,\ x,\ -x,\ -x,\ \phi_r = x,-x,-x,\ x$. Эти δ периоды необходимы, чтобы позволять переключение мощности.

Это периоды, в которые применяется одиночный импульс низкого уровня мощности, в течение которого намагничивание, не параллельное этой оси, будет дефазироваться, благодаря неоднородности РЧ поля (также как поперечная намагниченность быстро дефазируется в неоднородном постоянном поле). Этот процесс устраняет дисперсные вклады в спектр.

Альтернативный подход состоит в восстановлении продольной намагниченности после периода эволюции и использовании подходящей *изотропной* схемы *смешивания*, чтобы переносить эту Z-намагниченность между спинами [60,61] (изотропный здесь означает, что перенос намагниченности, одинаково эффективен по *x*, *y*, или z - оси, так что полная последовательность имеет эффект подобный тому, который описан выше). Z-намагничивание затем преобразовывается к чисто-фазовой поперечной намагниченности после смешивания, предоставляя возможность сбора данных режима поглощения. Идея генерирования, а затем выбора Z-намагничивания с целью сбора чисто фазированных спектров была названа «z–фильтрацией» [62]. Она также имеет преимущество для старых приборов, в которых для генерирования смешивающей схемы низкой мощности может использоваться протонный «декаплер» [60], если главный протонный передатчик неспособен соответствующим образом управлять уровнем мощности; это ограничение не возникает на современных приборах. В этом подходе может использоваться множество изотропных схем смешивания, включая MLEV-16, WALTZ 16 [63,64] и DIPSI-2 [65,66], последняя из них особенно хорошо подходит для переноса в ^{1}H-^{1}H TOCSY.

В каждой из этих двух общих схем большая эффективная ширина полосы достигается смешиванием составным импульсом и для этого требуются значительно меньшие мощности, чем для 90° импульса подготовки. Для MLEV напряжённость РЧ поля должна примерно вдвое превышать желательную ширину полосы, в то время как для более эффективного DIPSI-2 она может быть примерно равной последней. Таким образом, для окна 10 мд при 400 МГц требуется $\gamma B_1 \approx 8$ кГц (90° ≈ 30 мкс) или 4 кГц (90° ≈ 60 мкс) соответственно, оба из которых легко достижимы.

Селектированный градиентом TOCSY

Для образцов достаточной концентрации, для которых достаточно только одного сканирования на инкремент, градиентные версии TOCSY могут быть притягательными альтернативами для быстрой регистрации спектров. По аналогии с предыдущими обсуждениями COSY последовательности, TOCSY абсолютных значений просто требует помещения равных градиентов с обеих сторон последовательности блокировки спина (рис. 5.69a), чтобы выборочно рефокусировать путь N-типа и обеспечить разли-

чие f_1 частот. Подстроечные импульсы не требуются, так как чисто фазированные спектры не образуются этим методом. Что касается COSY абсолютного значения, этот эксперимент может хорошо подходить для автоматизированных схем регистрации по причине простоты обработки, хотя обычно по причинам разрешения предпочитается фазочувствительная версия.

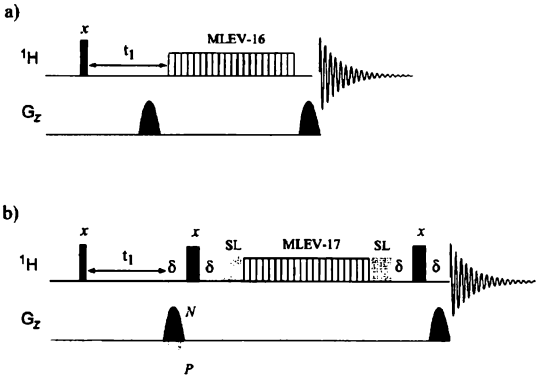


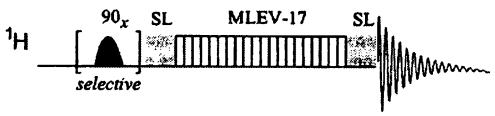
Рисунок 5.69. Селектированный градиентом TOCSY Последовательность (a) подходит для представлений абсолютного значения с комбинацией градиентов 1:1, выбирающей спектр N-типа. Последовательность (b) обеспечивает наборы фазочувствительных данных через метод эхо-антиэхо, для которого раздельные данные P- и N-типов собираются через инверсию первого градиента.

Это может выполняться, помещая градиенты в пределах спиновых эхо, чтобы рефокусировать эволюцию химического сдвига. Квадратурное детектирование обеспечивается затем, собирая данные P- и N-типа отдельно для каждого t_1 инкремента через инверсию градиента и обработку их согласно процедуре эхо-антиэхо раздела 5.5.2 (рис. 5.69b).

Одномерный TOCSY

Как альтернатива сбору полного набора 2D данных, в некоторых обстоятельствах может оказаться выгодным 1D аналог. Обычно большинство 2D последовательностей можно адаптировать для получения 1D эквивалента [67,68], что означает, что эксперименты могут получаться быстрее, требуют меньшего количества памяти для хранения и могут регистрироваться при условиях более высокого цифрового разрешения. Они могут оказаться особо привлекательными, когда требуется только специфическая информация, как часто случается для молекул от малого до среднего размеров, или когда малые количества образца требуют многих сканирований для адекватного отношения сигнал/шум, и таким образом не позволяют сбор 2D наборов данных. Все 1D аналоги многомерных экспериментов начинаются селективным возбуждением одного резонанса в спектре и использованием его как источника для всех последующих переносов намагниченности. Результирующие спектры могут, следовательно, рассматриваться как эквиваленты сечениям по рядам с высоким разрешением через связанный 2D спектр при химическом сдвиге возбужденного спина. Методы селективного возбуждения описываются в главе 9, и поэтому не рассматриваются здесь. Многочисленные методы для генерирования 1D TOCSY спектров без помощи градиента [69-72] или с его помощью [73-76] представляет обобщенная схема, использующая последовательность MLEV-17, показанная на рисунке 5.70. После возбуждения выбираемых спинов перенос намагниченности немедленно инициируется смешивающей схемой, так как теперь нет нужды в периоде эволюции. Единственные резонансы, появляющиеся в образующихся спектрах, те, которые «получили» намагничивание от исходного спина. Эксперимент производит 1D подспектры для дискретных спиновых систем в молекуле, потенциально показывая мультиплетные структуры, которые иначе налагались или скрывались. Кроме того, более высокое цифровое разрешение, даваемое 1D аналогами, может разрешать неоднозначности, возникающие от наложения кросс-пиков в 2D спектрах, и может также обеспечивать более быстрый метод прослеживания переноса намагниченности вдоль цепи спинов как функции времени смешивания.

Рисунок 5.70. Общая последовательность для 1D селективного TOCSY Может использоваться любая подходящая схема селективного 90° импульса (см. главу 9), чтобы выборочно возбуждать целевой резонанс, от которого инициируется перенос.



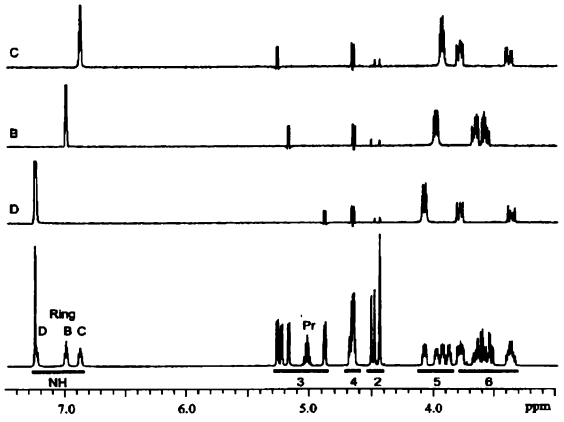
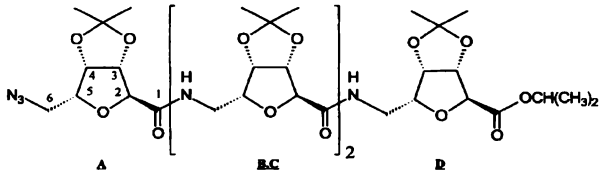


Рисунок 5.71. Одномерные спектры TOCSY тетрамерного карбопептоида **5.9** в $CDCl_3$. Каждый амидный протон селективно возбуждался и использовался как отправная точка для переноса когерентности. Селективное возбуждение достигалось методом формованного возбуждения и использованием 97 мс смешивания блокировки спина MLEV-17.

Рис. 5.71 показывает 1D TOCSY спектры для карбопептида **5.9**, в котором перенос происходит от выбранных амидных протонов с индивидуальными кольцевыми системами, разрешёнными в каждом случае. Этот подход часто применим к изучению олигосахаридов, где аномерные протоны могут обеспечивать удобную отправную точку для установления внутриостаточных отнесений.



5.9

5.8. КОРРЕЛЯЦИЯ РАЗБАВЛЕННЫХ СПИНОВ: INADEQUATE

Одна из главных целей в определении структуры органической молекулы - однозначная идентификация углеродного скелета соединения. Углерод-углеродные связанности, однако, редко определяются непосредственно, если мы не подразумеваем их присутствие из корреляций, наблюдаемых между протонами, таких как в экспериментах COSY-типа, или между протоном и углеродными ядрами, таких как в экспериментах дальней гетероядерной корреляции, описанных в следующей главе. Необходимость принимать этот косвенный подход лежит в относительно плохой чувствительности и низком естественном содержании (1,1 %) изотопов углерода-13. Распространённость молекул, содержащих два смежных спина ^{13}C, составляет только 0,01%, поэтому в попытке непосредственно идентифицировать ^{13}C-^{13}C взаимодействия, мы вынуждены наблюдать только одну из каждых 10.000 молекул в нашем образце (в отсутствие изотопного обогащения). Другими словами, нужно искать ^{13}C спутники непосредственно в ^{13}C спектре, и, ясно, для этого требуются большие количества образца и

длительные периоды регистрации. Несмотря на эти ограничения, по той причине, что способность непосредственно прослеживать углеродный скелет молекулы - возможно окончательный подход к разъяснению органической структуры, значительные усилия приложены к развитию методов для идентификации непосредственно C-C связанностей, все из которых обычно основываются на последовательности INADEQUATE (Incredible **N**atural **A**bundance Doubl**E** **QUA**ntum **T**ransfer **E**xperiment - невероятный эксперимент двухквантового переноса при естественном содержании) [77]. Эти методы также подходят для коррелирования нуклидов, отличных от углерода, которые существуют при относительно низких уровнях естественного содержания около от 1% до 20 %, например, ^{29}Si, ^{119}Sn и ^{183}W (4,7; 8,6 и 14,4 %, соответственно).

Эти методы определённо не первые, к которым обращаются при рассмотрении структурной проблемы, по причине больших количеств образца, обычно необходимых, но в благоприятных случаях могут оказаться эффективными и с молекулами, которые обладает очень немногими протонами, или даже не имеющими их, когда может оказаться, что нет других вариантов. Более современные методы, основанные на протонном детектировании и градиентном выборе, показывают некоторый потенциал для снижения требований к образцу, и также кратко представляются ниже.

5.8.1. 2D INADEQUATE

Основное осложнение при попытке коррелировать спины низкой распространённости (упомянутые здесь как *разбавленные* или *редкие* спины) - интерференция, вызванная доминирующими родительскими резонансами, которые испытывают недостаток гомоядерных взаимодействий, и, следовательно, не могут обеспечивать данные связанности. Более популярные корреляционные методы, такие как COSY, хотя подходят в принципе, плохо помогают в этих случаях, и последовательность INADEQUATE является наиболее подходящей. Основа INADEQUATE - двухквантовая фильтрация, преследующая цель подавлять неинформативные родительские резонансы [78]. Эта фильтрация, аналогична той, с которой мы уже столкнулись в эксперименте DQF-COSY (раздел 5.6.2). Спины углерода-13 естественного содержания очень хорошо подходят для такой фильтрации, потому что они ограничиваются только двухспиновыми системами AX или AB (потому что молекулы, содержащие больше, чем два ^{13}C центра, будут существовать в концентрации близкой к нулевой), и, потому что ^{1}Jcc взаимодействия охватывают ограниченный диапазон, что означает, что последовательность может разумно хорошо оптимизироваться для генерации двух-квантовой когерентности. Двумерный корреляционный спектр [79] генерируется, позволяя двухквантовым когерентностям, связанным с взаимодействующими спинами, развиться в течение переменного периода t_1, после которого они должны преобразовываться в одноквантовое (поперечное) углеродное намагничивание для наблюдения. Полная последовательность INADEQUATE дается на рисунке 5.72.

Генерация двухквантовой когерентности требует антифазного расположения взаимодействующих векторов, которые здесь развиваются в течение периода $\Delta = 1/2J_{CC}$. Это обеспечивается в виде гомоядерного спинового эхо, чтобы создавать возбуждение, независимое от химических сдвигов. Период t_1 представляет подлинный двухквантовый период эволюции, в котором эти когерентности развиваются *при суммах* частот вращающейся системы координат двух связанных спинов, то есть, при суммах их *отстроек* от частоты передатчика.

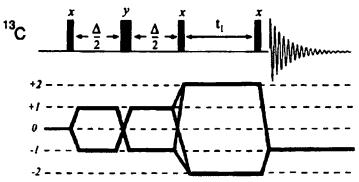


Рисунок 5.72. Последовательность INADEQUATE и соответствующий путь переноса когерентности. Эксперимент выбирает двухквантовую когерентность в течение периода эволюции с подходящим фазовым циклом (аналогичный выбору в эксперименте DQF-COSY, раздел 5.6.2) При этом он отклоняет все вклады от всех несвязанных спинов.

Таким образом, для двух связанных спинов A и X, которые имеют отстройки ν_A и ν_X, частота f_1 перекрёстного пика будет ($\nu_A + \nu_X$). После преобразования двухквантовой когерентности в одноквантовую, перекрёстные пики в f_2 будут наблюдаться с обычными частотами химических сдвигов A и X. По всей последовательности может применяться широкополосное протонное декаплирование, чтобы предотвратить эволюцию гетероядерных взаимодействий и чтобы генерировать ядерный эффект Оверхаузера от ^1H к ^{13}C для улучшения чувствительности.

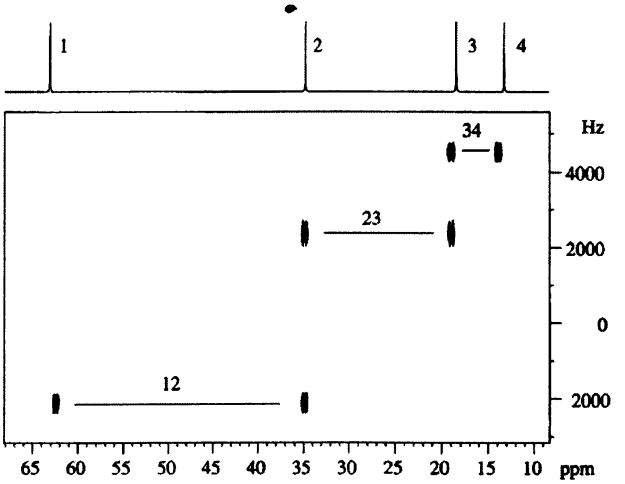
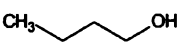


Рисунок 5.73. 2D INADEQUATE (режим абсолютных значений) и обычный углеродный спектр н-бутанола **5.10.**

Образующийся спектр для н-бутанола **5.10** (рис. 5.73) значительно отличается по внешнему виду от других корреляционных спектров, встречающихся в этой главе, хотя опять f_2 измерение представляет химические сдвиги каждого участвующего спина.



5.10

Так как два связанных спина разделяют ту же самую двухквантовую (ДК) частоту в f_1, корреляции делаются последовательными горизонтальными трассами параллельно f_2. Углеродная связанность, поэтому устанавливается последовательностью вертикальных и горизонтальных шагов. Если возбуждающая ДК последовательность оптимизирована для односвязных C-C взаимодействий, то каждый шаг идентифицирует смежные углеродные центры в молекуле. Спектры не отображают никаких диагональных пиков, хотя центры коррелированных спиновых пар появляются вдоль «псевдо» диагонали (двухквантовая диагональ) наклона 2, то есть, где $f_1 = 2f_2$. Эта характеристичная симметрия может быть полезной при распознании подлинных откликов и артефактов. Каждый перекрёстный пик состоит из дублета с расщеплением J_{CC}, возникающем из тонкой структуры AX (или AB).

Пример мощности этого метода в доказательстве структуры показывается для сесквитерпенового лактона ацетилизомонтанолида (рис. 5.74). Полный углеродный скелет молекулы может прослеживаться непосредственно в спектре с нарушением, встречающимся только тогда, когда имеются связи с гетероатомом. К сожалению, действительно, редко имеется достаточное количество образца, чтобы рассматривать использование этой методики, и поэтому этот метод в его первоначальной форме остаётся мало используемым. Однако существует больший потенциал для непосредственной трассировки углерод-углеродных связанностей недавно разработанными методами, основанными на протонном возбуждении и наблюдении в комбинации с градиентным выбором; см. раздел 5.8.4 ниже.

5.8.2. 1D INADEQUATE

Одномерный эксперимент INADEQUATE был фактически первоначальной версией и предполагался, как средство измерения констант углерод-углеродного взаимодействия [78].

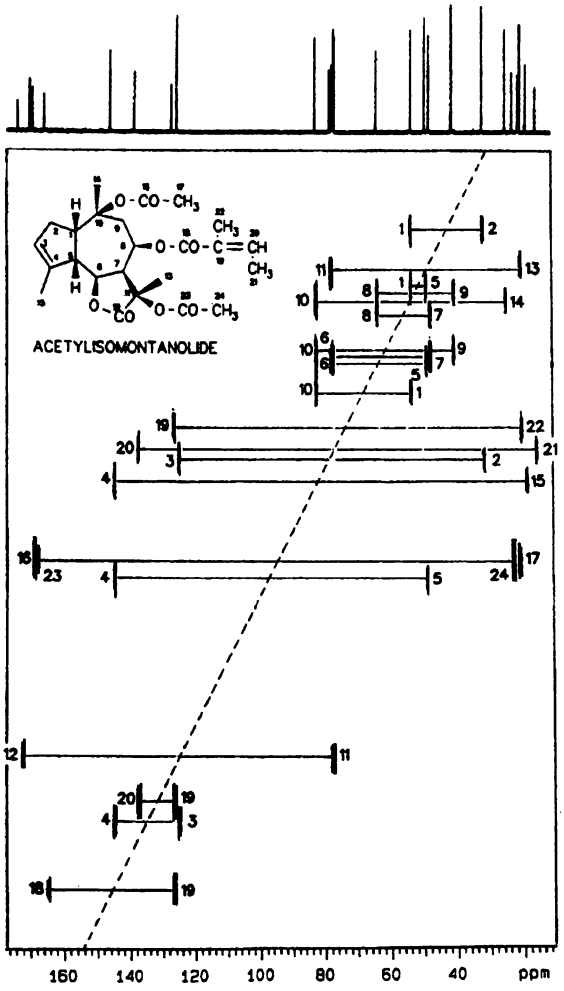


Рисунок 5.74. 2D ^{13}C INADEQUATE и обычный углеродный спектр сесквитерпенового лактона ацетилизомонтанолида в $CDCl_3$ (воспроизведено с разрешения от [80]).

Применение двухквантовой фильтрации удаляет родительские резонансы, которые доминируют в спектре и маскируют желательные расщепления, особенно когда должны измеряться меньшие взаимодействия через 2 и 3 связи. Оно может также подавлять резонансы от примесей низкого уровня, которые иначе могут налагаться. Замена периода эволюции t_1 короткой, фиксированной задержкой (достаточной только для того, чтобы позволить изменять фазу спектрометра) обусловливает 1D двухквантово фильтрованный эксперимент, в котором углерод-углеродные взаимодействия появляются как антифазные дублеты (рис. 5.75).

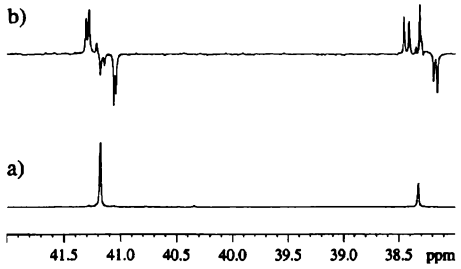


Рисунок 5.75. 1D эксперимент INADEQUATE (b) выбирает спутники углерода-13 в обычных спектрах углерода-13 (a) и обеспечивает средства измерения углерод-углеродных констант взаимодействия. Некоторые остаточные родительские резонансы от одиночных ^{13}C центров остаются в (b).

Из этих фрагментов можно непосредственно определять значения J_{CC}, если они достаточно разрешены. Альтернативное применение, которое широко использовалось, состоит в прослеживании дважды ^{13}C-меченных предшественников в изучении путей метаболизма или биосинтеза [81]. ДК фильтрация используется, чтобы подавлять фоновые сигналы тех ядер, которые не содержат оригинального ^{13}C-^{13}C фрагмента (до предела естественного содержания), одновременно сохраняя только те, которые переживают неизменённый путь.

5.8.3. Осуществление INADEQUATE

Основные компоненты фазового цикла INADEQUATE включают в себя двухквантовую фильтрацию и квадратурное детектирование f_1. Фильтрация может достигаться как для эксперимента DQF-COSY, описанного ранее, то есть, все импульсы, вовлеченные в возбуждение ДК (перед t_1 в этом случае) изменяются шагами *x, y,-x,-y* с инверсией приемника при каждом шаге (эквивалентная схема, находящаяся в импульсных последовательностях спектрометра, изменяет шагами *конечный* 90° импульс *x, y,-x,-y*, в то время как приемник изменяется ступенчато в противоположном направлении *x,-y,-x, y*; существуют также другие возможности). Этой простой схемы может быть недостаточно, чтобы полностью подавлять синглетные вклады, которые появляются по оси f_1 аксиальными пиками и отличаются от подлинных C-C корреляций. Расширение последовательностью EXORCYCLE (раздел 7.2.2) на 180° импульс вместе с CYCLOPS (раздел 3.2.5) может улучшить это. Можно также достичь более чистого подавления применением импульсных градиентов поля, которые по причинам чувствительности требуют градиентного датчика, оптимизированного для наблюдения ^{13}C.

Квадратурное детектирование требует для наблюдаемых сигналов выполнения 90° фазовых инкрементов при каждом шаге t_1. Так как желательные сигналы проходят через двухквантовую когерентность, они *вдвое чувствительнее* к сдвигам РЧ фазы, что означает, что возбуждающие импульсы перед t_1 должны сами инкрементироваться только 45° шагами. Такие фазовые инкременты легко достигаются на современных спектрометрах. Таким образом, для сбора фазо-чувствительных данных могут применяться обычные подходы Стейтса или TPPI. Однако в течение разработки этих последовательностей доступные аппаратные средства были неспособны создавать малые фазовые сдвиги, поэтому разработано множество альтернативных схем, которые избегали 45° сдвигов РЧ фазы совсем. Один популярный подход, использованный для генерации спектров абсолютных значений, состоял в том, чтобы использовать зависимость ширины импульса для увеличения интенсивности сигналов N-типа относительно P-типа [82]. Увеличение конечного импульсного угла до 135° производит отношение интенсивности N:P 6:1, так что сигнал P-типа по существу исчезает, и даёт различие частоты, хотя и с формами линии смешанного режима, которые требуют вычисления абсолютного значения.

Успех INADEQUATE может компроментироваться вредными вне-резонансными эффектами, которые особенно неприятны для таких ядер как углерод-13, которые имеют относительно большое спектральное окно. Поэтому разработаны вариации, использовавшие составные импульсы, чтобы противодействовать эффектам отстройки частоты и чтобы минимизировать потери [83,84].

Постановка эксперимента

Нет сомнения, что решающий фактор при рассмотрении применения ^{13}C INADEQUATE - чувствительность, и поэтому для этого эксперимента требуются значительно большие количества образца, чем для других 2D последовательностей. Признаком, предвещающим успешное проведение этого эксперимента, можно считать возможность получения обычного 1D ^{13}C спектра *за одно сканирование* после 90° импульса возбуждения, и спектр при этом должен показать отношение сигнал-шум, *по крайней мере*, 20:1.

Таблица 5.7. Типичные диапазоны для односвязных C-C констант взаимодействия

CC-группа	Типичная величина $^1J_{CC}$ (Гц)
C-C	35 – 40
C-C(O)	40 – 60
C=C (алкены)	70 – 80
C=C (ароматика)	55 – 70
C≡C	120 - 220

Главным фактором в определении величины является гибридизация углерода.

Для реальных количеств образца, с которыми сталкиваются в химической лаборатории, это редко достижимо, и даже в благоприятных случаях, требуется регистрация, по крайней мере, в течение ночи. Недавно разработанный алгоритм постобработки CCBond [85,86] (теперь коммерчески доступный, как FRED™ программа в программном обеспечении Varian) оказался чрезвычайно успешным при автоматическом анализе спектров INADEQUATE, даже когда отношение сигнал-шум было слишком низким для человеческого глаза, чтобы распознать фрагмент связанности. Используя такой подход, спектры с порядком величины отношения сигнал-шум ниже, чем требуется традиционно, могут подвергаться надежному анализу [87,88], явно увеличивая полезность этого метода (о других экспериментальных подходах к улучшению чувствительности смотрите следующий раздел).

Максимальная чувствительность требует оптимальной генерации двухквантовой когерентности. Для слабо связанных систем Δ должно равняться $1/2J_{CC}$, в то время как при сильном взаимодействии ($\Delta\delta/J_{CC} < 3$) требует оптимальных периодов $3/2J_{CC}$ [89]. Как всегда, выбор представляет некоторый компромисс по ожидаемым значениям J_{CC}. Взаимодействия через одну связь обычно простираются от 35 до 70 Гц [77,90,91] (Таблица 5.7), но чаще меньше, чем 50 Гц в отсутствие C-C ненасыщенности, так что разумный выбор Δ около 10-14 мс. Так как оптимальная частота повторения $1,3 \cdot T_1$ ядер ^{13}C, следует также рассматривать применение релаксационных агентов для ускорения регистрации данных, особенно когда могут присутствовать четвертичные центры. В органических растворах для

этого широко используется ацетилацетонат хрома, и даже растворённый кислород оказывается полезным [92]. Метилентетраамин-гексаацетат гадолиния (Gd (TTHA)) [93] рекомендуется для водных растворов, а опыт показывает, что концентрации до 10 мМ производят приемлемые результаты без значительного воздействия на положения углеродных резонансов, хотя это может существенно уширить *протонный спектр* образца.

Благодаря большим вовлеченным ширинам спектров, спектры регистрируются с низким разрешением в обоих измерениях, около 10-20 Гц/точка в f_2 и 50-100 Гц/точка в f_1. Обработка тогда требует функций окна, которые минимизируют искажения, возникающие от усечённых ССИ, таких как сдвинутый синусный колокол или квадратный синусный колокол. Чтобы минимизировать ширину спектра f_1, частота передатчика должна помещаться в центре 1D ^{13}C спектра, так, что двухквантовые частоты падают по обе стороны от неё, то есть и положительные, и отрицательные ДК частоты появляются в f_1. Можно далее также уменьшать f_1 ширину спектра, преднамеренно заворачивая пики в f_1 измерении, делая её равной ширине в f_2. Это не вызывает никакой двусмысленности в интерпретации, потому что оба участвующих кросс-пика заворачиваются в вместе и связанности могут еще идентифицироваться в горизонтальных следах.

5.8.4. Изменения в INADEQUATE

За эти годы представлено множество изменений в основной последовательности INADEQUATE, особенно опираясь на ^{13}C эксперименты, и все в первую очередь нацелены на улучшение ужасающе низкой чувствительности первоначальной методики. Протонно-углеродный перенос поляризации до последовательности INADEQUATE через INEPT [94] или DEPT [95] может использоваться как средство увеличения разности заселённостей ^{13}C, и позволяющее более быстрые частоты повторения, так как они диктуются теперь более быстрой релаксацией протонного спина. Однако они предотвращают использование широкополосного протонного декаплирования и, следовательно, не дают никакого усиления ЯЭО, поэтому могут получаться только минимальные улучшения. Наоборот, намагничивание может переноситься к протонам, прямо присоединённым к ^{13}C центрам, шагом инверсного INEPT *после* последовательности INADEQUATE. Этот вариант, упоминаемый как INSIPID [96], извлекает выгоду из более высокой чувствительности протонного детектирования. Увы, он также сильно страдает от необходимости подавлять сигналы протонов, присоединённых к одиночным ^{13}C центрам, также как те, которые присоединены к ^{12}C, обладающие интенсивностями, которые, соответственно, в 100 и в 10.000 раз больше, чем таковые желательных ^{1}H-^{13}C-^{13}C фрагментов! Более современные эксперименты, упоминаемые как протон-детектируемые INEPT-INADEQUATE [31], или более смело, как просто ADEQUATE [97], занимаются проблемой чувствительности, используя и перенос поляризации и наблюдение протонов, и преодолевают проблемы подавления протонов, используя импульсные градиенты поля для выбора сигнала. В принципе это ведет к повышениям чувствительности с коэффициентом 32 $((\gamma_H/\gamma_C)^{5/2})$, хотя фактор около 8-16 кажется более реальным при учёте экспериментальных потерь [31]. Получаемый 2D спектр представляет пошаговую корреляцию протонов, которые сидят на соседних ^{13}C центрах, и таким образом картируют прямые углеродные связанности в молекулярном каркасе.

Спектр на рисунке 5.76 регистрировался на 50 мг образца немеченого ментола **5.11** в течение 16 часов, хотя адекватный результат будет достижим меньше, чем за половину этого времени. Эта мощная методика должна оказаться ценной при доказательстве структуры неизвестных материалов.

Первоначальная последовательность показывается на рисунке 5.77 и, если вы позволите небольшое отклонение в этом месте, служит чтобы показать свойства, общие для многих современных импульсных последовательностей. Хотя на первый взгляд она может показаться пугающе сложной, она,

несомненно, наиболее усовершенствованная последовательность в этой книге, её можно разбить на более удобоваримые фрагменты, как показано. В то время как детали этой последовательности могут быть несколько таинственными, оценка её действия значительно более доступна при рассмотрении в этой постепенной манере, так как становится очевидно, что она состоит из более простых уже встречавшихся последовательностей (вышеупомянутые INEPT и INADEQUATE). Последовательность затем просто может рассматриваться как изменение HSQC методики главы 6, в которой двухквантовая когерентность (ДКК) эволюционирует в течение t_1 вместо одноквантовой когерентности (ОКК), используемой в HSQC. Когда сталкиваются с попыткой следовать новой импульсной последовательности, рекомендуется попытаться сначала распознать меньшие фрагменты в ней, которые получаются из более коротких хорошо поставленных последовательностей. Мы встретимся с большим количеством примеров этого в следующей главе.

Естественно, вышеупомянутые методы требуют присутствия углеродов, несущих водород, и, когда применимо, должны оказаться гораздо более полезными в структурном анализе, чем их ^{13}C детектированные аналоги. Однако даже они, вероятно, должны использоваться только после того, как потерпят неудачу более чувствительные методы, подобные тем, которые основываются на протон-протонных и протонно-углеродных корреляциях, для решения проблемы.

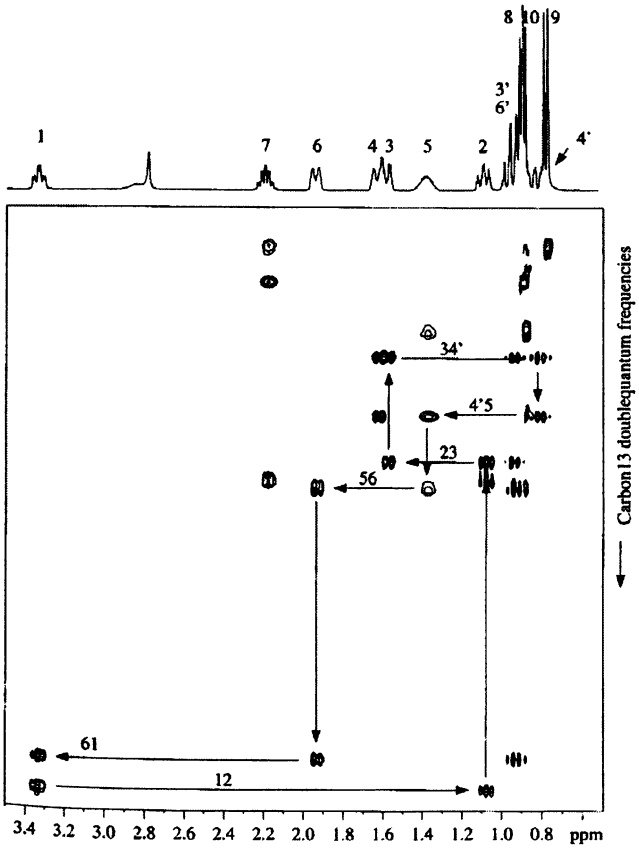
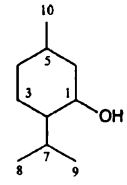


Рисунок 5.76. Протон-детектированный спектр INEPT-INADEQUATE ментола **5.11** (50 мг в $CDCl_3$), зарегистрированный при 400 МГц, использовавший оптимизированную последовательность INADEQUATE [97]. Показана пошаговая трассировка углеродного скелета циклогексанового кольца, в котором углеродные связанности идентифицируются горизонтальными трассами (альтернативные «маршруты», включающие в себя 3, 4 и 6 диастереотопных партнеров, также существуют, но для ясности не показаны).



5.11

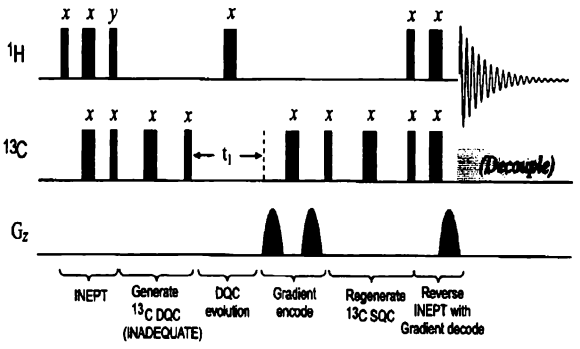


Рисунок 5.77. Селектированная градиентом последовательность INEPT-INADEQUATE для идентификации углерод-углеродных связанностей через наблюдение протонов (временные задержки в последовательности для ясности удалены). Последовательность выбирает ^{1}H-^{13}C-^{13}C фрагменты, для которых отношения градиентов составляют -1:-1:1. Несмотря на сложность последовательности, её действие можно понять, распознавая дискретные, более простые сегменты в пределах неё, которые играют определённые роли, которые в этом случае являются шагами INEPT и INADEQUATE.

Литература

[1] J. Jeener, ***Ampere International Summer School***, Basko Polje, Yugoslavia, 1971.
[2] W.P. Aue, E. Bartholdi and R.R. Ernst, ***J. Chem. Phys.***, 1976, **64,** 2229-2246.
[3] J.N.S. Evans, ***Biomolecular NMR Spectroscopy***, Oxford University Press, Oxford, 1995.
[4] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer and N.J. Skelton, ***Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice,*** Academic Press, San Diego, 1996.
[5] J. Hahn, in J.G. Verkade, L.D. Qum, eds., ***Phosphorus-31 NMR Spectroscopy in Stereo-chemical Analysis***, VCH Publishers, Florida, 1987
[6] D.J. States, R.A. Haberkorn and D.J. Ruben, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **48,** 286-292.
[7] M. Ohuchi, M. Hosono, K. Funhata and H. Seto, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **72,** 279-297.
[8] D. Manon and K. Wuthrich, ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, 1983, **113,** 967-974.
[9] J. Keeler and D. Neuhaus, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **63,** 454-472.
[10] C.J. Turner and H.D. W. Hill, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **66,** 410-421.
[11] A. Bax, R. Freeman and G.A. Morris, ***J. Magn. Reson.***, 1981,**43**,333-338.
[12] A.P. Mehlkopf, D. Korbee, T.A .Tiggleman and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **58,** 315-323.
[13] G.A .Morris, ***J Magn Reson***, 1992, **100,** 316-328.
[14] R. Baumann, G. Wider, R.R. Ernst and K. Wuthrich, ***J. Magn. Reson.***, 1981, **44,** 402-406.
[15] G.A. Morris, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **80,** 547-552.
[16] G.A. Morris and D.Cowbum, ***Magn. Reson. Chem.***, 1989, **27**, 1085-1089.
[17] T.J. Horne and G A Morris, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1996, **123,** 246-252.
[18] A. Gibbs, G.A. Morris, A.G. Swanson and D.Cowbum, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1993, **101,** 351-356
[19] A.D. Bain, ***J. Magn. Reson.***, 1984,**56**,418-427.
[20] G. Bodenhausen, H. Kogler and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **58,** 370-388.
[21] H. Kessler, M. Gehrke and C. Gnesinger, ***Angew. Chem.*** *Int. Ed. Engl.*, 1988,**27**,490-536.
[22] J. Keeler, R.T. Clowes, A.L. Davis and E.D. Laue, ***Method Enzymol***, 1994, **239,** 145-207.
[23] S. Berger, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1997, **30,** 137-156.
[24] T. Parella, ***Magn. Reson. Chem.***, 1998, **36,** 467-495.
[25] P.C. Lauterbur, ***Nature***, 1973, **242**, 190-191.

[26] A. Bax, P.G. de Long, A.F. Mehlkopf and J. Smidt, ***Chem. Phys. Lett.***, 1980, **69,** 567-570.
[27] P. Barker and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.,*** 1985, **64,** 334-338.
[28] R.E. Hurd, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **87**, 422-428.
[29] A.L. Davis, J. Keeler, E.D. Laue and D. Moskau, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **98,** 207-216.
[30] J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann and R.R. Ernst, ***J. Chem. Phys.***, 1979, **71**. 4546-4553
[31] J. Weigelt and G. Ottmg, ***J. Magn. Reson. (A),*** 1995, **113,** 128-130.
[32] V. Sklenar, M. Pioto, R.Leppik and V. Saudek, ***J. Magn. Reson. (A).*** 1993, **102,** 241-245
[33] T.L. Hwang and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson. (A),*** 1995,**112**,275-279.
[34] G. Kontaxis, J. Stonehouse, E.D. Laue and J. Keeler, ***J. Magn. Reson. (A),*** 1994, **111, 70-76**
[35] E.O. Stejskal and J.E. Tanner, ***J. Chem. Phys.***, 1965, **42,** 288-292.
[36] W.S. Price, ***Ann. Rep. NMR Spectrosc.***, 1996,**32**,51-142.
[37] M. Rance, O.W. Sorensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R.R. Ernst and K. Wuthrich, ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, 1983, **117,** 479-485.
[38] U. Piantini, O.W. Sorensen and R.R. Ernst, ***J. Am. Chem. Soc.,*** 1982, **104,** 6800-6801
[39] A.L. Davis, E.D. Laue, J. Keeler, D. Moskau and J. Lohman, ***J. Magn. Reson.***, 1991, **94,** 637-644.
[40] M. Eberstadt, G. Gemmecker, D.F. Mierke and H. Kessler, ***Angew. Chem.*** *Int. Ed. Engl.*, 1995,**34,**1671-1695.
[41] D. Neuhaus, G. Wagner, M. Vasak, J.H.R. Kagi and K. Wuthrich, ***Eur. J. Biochem.***, 1985, **151,**257-273.
[42] H. Kessler and H. Oschkmat, ***Angew. Chem.*** *Int. Ed. Engl.*, 1985, **24,** 690-692.
[43] H. Kessler, A. Muller and H. Oschkmat, ***Magn. Reson. Chem.***, 1985,**23**,844-852.
[44] H. Oschkmat and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **60**, 164-169.
[45] A.J. Shaka and R. Freeman,.***J. Magn. Reson.***, 1983,**51**, 169-173.
[46] N. Muller, R.R. Ernst and K Wuthrich, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1986, **108**, 6482-6492.
[47] J. Boyd and C. Redfield, ***J Magn Reson***, 1986, 68, 67-84
[48] G. Eich, G. Bodenhausen and R.R. Ernst, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1982, **104**, 3731-3732.
[49] L. Braunschweiler and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **53**, 521-528.
[50] D.G. Davis and A. Bax, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1985, **107**, 2820-2821.
[51] A. Bax and D.G. Davis, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **65**, 355-360.
[52] J. Cavanagh, W.J. Chazin and M. Rance, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **87**, 110-131.
[53] G.A. Morris and A. Gibbs, ***J. Magn. Reson.***, 1991, **91**, 444-449.
[54] A. Gibbs and G.A. Morris, ***Magn. Reson. Chem.***, 1992, **30**, 662-665.
[55] J.E. Baldwin, L. Bischoff, T.D.W. Claridge, F.A. Heupel, D.R. Spring and R.C. Whitehead, ***Tetrahedron***, 1997, **53**, 2271-2290.
[56] J.E. Baldwin, T.D.W. Claridge, A.J. Culshaw, F.A. Heupel, V. Lee, D.R. Spring, R.C. Whitehead, R.J. Boughtflower, I.M. Mutton and R.J. Upton, ***Angew. Chem.*** *Int. Ed. Engl.*, 1998, **37**,2661-2663.
[57] C. Gnesinger, G. Otting, K. Wuthrich and R.R. Ernst, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1988, **110,** 7870-7872.
[58] J. Briand and R.R. Ernst, ***Chem. Phys. Lett.***, 1991,**185**, 276-285.
[59] J. Cavanagh and M. Rance, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **96**, 670-678.
[60] M. Rance, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **74**, 557-564.
[61] R. Bazzo and I.D. Campbell, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **76**, 358-361.
[62] O.W. Sorensen, M. Rance and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **56**, 527-534.
[63] A.J. Shaka, J.Keeler and R.Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **53**, 313-340.
[64] A.J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **52**, 335-338.
[65] S.P. Rucker and A.J. Shaka, ***Mol. Phys.***, 1989, **68**, 509-517.
[66] A.J. Shaka, C.J. Lee and A. Pines, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **77**, 274-293.
[67] H. Kessler, S. Mronga and G. Gemmecker, ***Magn. Reson. Chem.***, 1991,**29**,527-557.
[68] T. Parella, ***Magn. Reson. Chem.***, 1996, **34,** 329-347.
[69] D.G. Davis and A. Bax, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1985, **107**, 7197-7198.
[70] H. Kessler, U. Anders, G. Gemmecker and S. Steuemagel, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **85,** 1-14.

[71] H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger and W. Bermel, ***J. Magn. Reson***,. 1986, **70**, 106-133.
[72] S. Subramanian and A. Bax, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **71**, 325-330.
[73] P. Adell, T. Parella, F. Sanchez-Ferrando and A. Virgin, ***J. Magn. Reson. (B),*** 1995, **108,** 77-80.
[74] T. Facke and S. Berger, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **113**, 257-259.
[75] C. Dalvit and G. Bovermann, ***Magn. Reson. Chem.***, 1995, **33**, 156-159.
[76] G.Z. Xu and J.S. Evans, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1996, **111**, 183-185.
[77] J. Buddrus and H. Bauer, ***Angew. Chem.*** *Int. Ed. Engl.*, 1987, **26**, 625-642.
[78] A. Bax, R. Freeman and S.P. Kempsell, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1980, **102**, 4849-4851.
[79] A. Bax, R. Freeman and T.H. Frenkiel, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1981, **103**, 2102-2104.
[80] M. Budesinsky and D. Saman, ***Ann. Rep. NMR Spectrosc.***, 1995,**30**,231-475.
[81] J.C. Vederas, ***Nat. Prod. Rep.*** , 1987, **4**, 277-337.
[82] T.H. Mareci and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **48**, 158-163.
[83] J. Lambert, H.J. Kuhn and J. Buddrus, ***Angew. Chem.*** *Int. Ed. Engl.*, 1989, **28**, 738-740.
[84] A.M. Torres, T.T. Nakashima, R.E.D. McClung and D.R. Muhandiram, ***J. Magn. Reson.***, 1992,**99**,99-117.
[85] R. Dunkel, C.L. Mayne, J. Curtis, R.J. Pugmire and D.M. Grant, ***J. Magn. Reson.***, 1990,**90**, 290-302.
[86] R. Dunkel, C.L. Mayne, R.J. Pugmire and D.M. Grant, ***Anal. Chem.***, 1992,**64**,3133-3149.
[87] R. Dunkel, C.L. Mayne, M.P. Foster, C.M. Ireland, D. Li, N.L. Owen, R.J. Pugnure and D.M. Grant, ***Anal. Chem.***, 1992, **64,** 3150-3160.
[88] J.K. Harper, R.Dunkel, S.G. Wood, N.L. Owen, D. Li, R.G. Cates and D.M. Grant, ***J.C.S. Perkm Trans*** , 1996, **2**, 191-200.
[89] A. Bax and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1980, **41,** 507-511.
[90] E. Breitmaier, W. Voelter, **Carbon-13 NMR Spectroscopy**, VCH Publishers, Wemheim, 1987.
[91] K. Kamienska-Trela, ***Ann. Rep. NMR Spectrosc.***, 1995,**30**, 131-230.
[92] D.L. Mattiello and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1998, **135,** 514-521.
[93] J. Lettvin and A.D. Sherry, ***J. Magn. Reson.***, 1977, **28,** 459^61.
[94] O.W. Sorensen, R. Freeman, T.A. Frenkiel, T.H. Mareci and R. Schuck, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **46,** 180-184.
[95] S.W. Sparks and P.D. Ellis, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **62,** 1-11.
[96] P.J. Keller and K.E. Vogele, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **68,** 389-392.
[97] B. Reif, M. Kock, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical and C. Griesinger, ***J. Magn. Reson., Series (A)***, 1996,**118,** 282-285.

Глава 6

Корреляции через химическую связь II: Гетероядерная корреляция сдвига

6.1. ВВЕДЕНИЕ

Эта вторая глава по установлению корреляций через химическую связь концентрируется на методах, которые коррелируют различные нуклиды, так называемые *гетероядерные* корреляции сдвига. Для химика-органика это означает, что в огромном большинстве случаев установление связанности между протоном и углеродными ядрами и, таким образом, методы, встречающиеся в последующих разделах, связаны, прежде всего, с ними. Не следует говорить, что методы не подходят для коррелирования других нуклидов, например ^{1}H с ^{15}N или ^{31}P, или даже ^{31}P с ^{13}C и так далее. Действительно, многие из современных методов, используемых рутинно в химической лаборатории, первоначально осуществлялись как методы для корреляции ^{1}H-^{15}N в белках и пептидах. Основные методы, описанные в последующих разделах, суммируются в таблице 6.1.

Множество методов уже описано в главе 4, которые позволяют редактирование 1D спектров гетероядерного спина, например тех, которые основаны на спиновых эхо или переносе поляризации, таким образом, обеспечивая ценную информацию о числе присоединённых протонов. Они, однако, не обеспечивают никакого *прямого доказательства,* которые протоны присоединяются к которому гетероядру (X-спину) в молекуле, и для этого широко используются гетероядерные 2D корреляции, чтобы переносить ранее установленные протонные отнесения на прямо связанное гетероядро или, при случае, наоборот. Это может затем обеспечить ещё одно доказательство для подтверждения правильности или отклонения предложенной структуры, или может обеспечить отнесения, которые могут использоваться как базис дальнейших исследований.

Кроме того, эксперимент может использоваться как средство распространения резонансов сложного протонного спектра согласно химическому сдвигу прямо присоединённого ядра, используя обычно большую дисперсию химических сдвигов X-спина, чтобы помогать интерпретации от протонов. Высокая чувствительность современных корреляционных методов часто обеспечивает быстрый метод для косвенного определения химических сдвигов X-ядер и избегает необходимости его прямого наблюдения совсем, предлагая значительную экономию времени. Таким образом, ^{1}H-^{1}H COSY и ^{1}H-^{13}C корреляционные эксперименты (как HMQC или HSQC последовательности) представляют первичные 2D методы в структурной органической химии.

Для более сложных проблем существуют методы, которые комбинируют свойства двух, иначе отдельных методов, которые должны упоминаться здесь как «гибридные» эксперименты. Хотя изобретен широкий диапазон комбинаций, по существу ограничиваемый только воображением спектроскописта, значительное использование получили два основных свойства.

Таблица 6.1. Основные применения главных методов, описанных в этой главе.

Методика	Основные применения
HMQC	Корреляция взаимодействующих гетероядерных спинов через одинарную связь и, следовательно, идентификация прямо связанных ядер, наиболее часто ^{1}H-^{13}C. Использует детектирование нуклида высокой чувствительности, например, ^{1}H, ^{19}F, ^{31}P («инверсная методика»). Экспериментально удачная последовательность, хорошо подходящая для обычной характеризации структуры.
HSQC	Корреляция взаимодействующих гетероядерных спинов через одинарную связь и, следовательно, идентификация прямо связанных ядер. Использует детектирование нуклида высокой чувствительности, например, ^{1}H, ^{19}F, ^{31}P («инверсная методика»). Обеспечивает улучшенное разрешение по сравнению с HMQC, поэтому больше подходит для скученных спектров, но более чувствительна к экспериментальным несовершенствам.
HMBC	Коррелирование связанных спинов через многие связи. Использует детектирование нуклида высокой чувствительности, например, ^{1}H, ^{19}F, ^{31}P («инверсная методика»). По существу HMQC, оптимизированная для детектирования малых взаимодействий. Наиболее ценная методика в коррелировании ^{1}H-^{13}C более чем через 2 или через 3 связи. Мощный инструмент для связывания вместе фрагментов структуры.
HETCOR	Корреляция взаимодействующих гетероядерных спинов через одну связь. Использует детектирование нуклида низкой величины γ, обычно ^{13}C, поэтому имеет значительно пониженную чувствительность, чем инверсные методы. Польза от высокого разрешения в ^{13}C измерении, Поэтому может находить применение, когда оно критично, иначе заменяется вышеуказанными методами.

Первое - редактирование корреляционного спектра так, чтобы он содержал данные и сдвига, и мультиплетности, по аналогии с 1D методами редактирования, представленными в главе 4. Второе свойство - передача корреляций, чтобы увеличить информационное содержание спектра, обеспечивая дополнительную информацию соседней группы. Кроме этих методов, которые используют гетероядерные через одну связь взаимодействия, корреляции с гетероядром через больше, чем одну связь, так называемые дальние или многосвязные корреляции, могут обеспечить богатство информации о том, как молекулярные фрагменты связываются вместе.

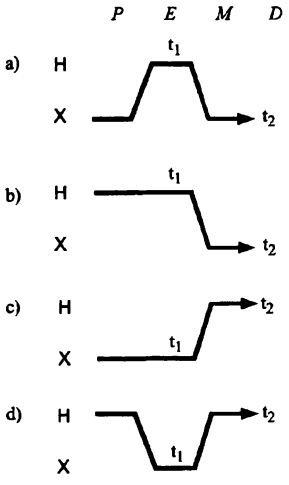
6.2. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Первоначальные методы для определения гетероядерных корреляций сдвига основаны на наблюдении X-ядра низкого γ с протоном, детектируемым косвенно, и, следовательно, появляющимся вдоль f_2 измерения 2D эксперимента. Этот подход принимался, потому что, как мы увидим, оригинальные 2D последовательности произведены от ранних экспериментов переноса поляризации, таких как INEPT (раздел 4.4), которые сами разрабатывались для увеличения чувствительности наблюдений низких γ, и потому что раньше импульсные приборы ЯМР проектировались в расчёте на этот режим работы. В течение последнего десятилетия или около того, подход к сбору данных существенно изменился к тому, в котором наблюдается ядро высокого γ, наиболее часто протон, при косвенно детектируемом гетероядре. Это переключение вызвало появление массы экспериментов, часто упоминаемых как «инверсные» корреляции сдвига, стимулированных улучшенной чувствительностью.

Зависимость силы сигнала ЯМР от гиромагнитного отношения обсуждалась ранее в разделе 4.4, где введена концепция переноса поляризации, как средства улучшения чувствительности. Из качественных аргументов, представленных в этом разделе, более формальное выражение для отношения сигнал/шум одномерного эксперимента, включающего ядра спина 1/2 давалось как:

$$\frac{S}{N} = \propto NAT^{-1}B_0^{3/2}\gamma_{exc}\gamma_{obs}^{3/2}T_2^*(NS)^{1/} \qquad (6.1)$$

где N - число молекул в наблюдаемом объёме образца, A - представляет распространённость активных спинов ЯМР, вовлеченных в эксперимент, T - температура, B_0 - постоянное магнитное поле, γ_{exc} и γ_{obs} представляют гиромагнитные отношения первоначально возбужденных и наблюдаемых спинов, соответственно, T_2^* - эффективное время поперечной релаксации, и NS - общее число накопленных сканирований. Выбирая как выполнять гетероядерный эффект корреляции сдвига, можно изобрести четыре общих схемы, как представлено на рисунке 6.1, согласно которому спин используется как начальный «источник» намагничивания, и, который детектируется (представляется фактором γ в равенстве 6.1).



Относительная интенсивность		
1H-31P	1H-13C	1H-15N
1	1	1
2,5	4	10
Традиционный		
4	8	30
10	32	300
Инверсный (современный)		

Рисунок 6.1. Это четыре общих схемы для получения 2D спектров гетероядерной корреляции сдвига. Относительные чувствительности этих подходов сравниваются для протонных корреляционных экспериментов с фосфором-31, углеродом-13, и азотом-15.

Рядом с каждой схемой приведены относительные теоретические чувствительности, ожидаемые для H-X пары, основанные на γ значениях участвующих ядер. Схема 6.1b представляет подход, принятый в традиционных эффектах корреляции сдвига, в которых начальная протонная намагниченность частотно метится в t_1, а затем переносится на X-спин для детектирования. Схема 6.1d - современный «инверсный» подход, в котором протонное ядро используется, и как источник, и как наблюдаемый спин. Ясно, что предсказанная чувствительность значительно больше, чем таковая традиционного метода, и зависимость от гиромагнитного отношения спина низкого γ была полностью удалена, хотя естественное содержание этого спина остаётся ещё важным фактором для всех подходов (член A в вышеприведённом уравнении). Чем ниже γ X-спина, тем больше выгода, возникающая от протонного детектирования; сравните цифры для ^{31}P и ^{15}N на рисунке 6.1, например. Дополнительный теоретический выигрыш в протонно детектируемых экспериментах с коэффициентом 2 или 3 можно ожидать для XH_2 или XH_3 групп, соответственно.

Внушительное превосходство, иллюстрированное на рисунке 6.1 для инверсных методов относительно традиционных, может не соответствовать действительности при рассмотрении деталей конкретной последовательности. Существенные факторы могут включать различное релаксационное поведение участвующих спинов или присутствие мультиплетных расщеплений, которые расширяют резонанс, и таким образом уменьшают отношение сигнал-шум. Однако даже реальный фактор уси-

ления четыре в ^{1}H-^{13}C корреляциях соответствует фактору экономии времени шестнадцать, что означает, что эксперименты, которые требовали только ночной регистрации с детектированием ^{13}C, могут производиться примерно за час, в то время как те, что традиционно требуют пары часов, могут выполняться за несколько минут. Кроме того, исследования на очень разбавленных образцах, которые рассматривались бы невозможными, становятся реальными целями при протонном детектировании. Такие соображения приводят к универсальному принятию протон-детектируемых инверсно-корреляционных методов, всякий раз, когда возможно, и в химической, и в биологической спектроскопии, и именно на этих методах мы сосредоточимся ниже, наряду с только относительно кратким рассмотрением более традиционных X-детектирующих методов, которые ещё могут использоваться в специфических обстоятельствах.

Принятие инверсного подхода также имеет значение для проектирования прибора ЯМР. Обычные датчики строились для оптимизации чувствительности при наблюдении X-ядра низкого γ, что влечет за собой размещение катушки X-ядра ближе к образцу и помещение протонной катушки снаружи неё. Инверсные датчики имеют противоположную конфигурацию, так что протонная катушка находится ближе к образцу для оптимальной чувствительности, таким образом, обеспечивая *больший коэффициент заполнения.* Однако даже с обычными датчиками, протонно детектируемые эксперименты могут еще выполняться, хотя с чувствительностью меньшей, чем оптимальная, и могут еще обеспечивать более быстрый подход, чем первые эксперименты X-наблюдения.

6.3. ГЕТЕРОЯДЕРНАЯ ОДНОСВЯЗНАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Широко используются два метода, которые обеспечивают односвязные гетероядерные корреляции сдвига, известные как HMQC и HSQC. Корреляционные данные, обеспечиваемые этими двумя методами по существу эквивалентны, методы отличаются только в более точных деталях, которые для обычной спектроскопии часто не имеют большого последствия. Таким образом, оба метода вездесущи в химической литературе и, следовательно, будут описываться в последующих разделах. Исторически в химическом сообществе предпочтение отдавалось эксперименту HMQC, а биологическими спектроскопистами - HSQC. Это, по крайней мере частично, происходило благодаря способу представления, в котором ранние эксперименты HMQC предназначались для ^{1}H-^{13}C корреляций в малых молекулах, а HSQC для ^{1}H-^{15}N корреляций в белках. На практическом уровне эксперимент HMQC более устойчив по отношению к несовершенствам экспериментов или некалиброванности, в то время как HSQC эксперимент имеет более благоприятные характеристики для работы очень высокого разрешения и более гибкий в отношении модификации и расширения последовательности, поэтому теперь также широко используется в химической лаборатории; эти моменты также проводятся в следующих разделах. Оба метода используют оптимальный подход к установлению гетероядерной связанности, используя протонное детектирование и следуя общей схеме на рис. 6.1d. Однако этот подход ставит технические трудности в подавлении родительского резонанса, возникающего от протонов, связанных с нуклидами с $I \neq 1/2$, ^{1}H-^{12}C и ^{1}H-^{14}N, например. Это доминирующая линия, наблюдаемая в 1D протонных спектрах, но - просто источник интерференции в гетероядерных корреляциях, так как только *спутники* низкой интенсивности могут приводить к желательным корреляциям, то есть ^{1}H-^{13}C или ^{1}H-^{15}N протоны в приведённых выше примерах. Необходимое подавление теперь наиболее эффективно выполняется применением импульсных градиентов поля (ИГП), которые оказали огромное влияние на гетероядерную корреляционную спектроскопию в частности.

6.3.1. Гетероядерная многоквантовая корреляция (HMQC)

Эксперимент гетероядерной многоквантовой корреляции (HMQC) является одним из двух обычно используемых протон-детектируемых односвязных корреляционных экспериментов. Хотя он предложен много лет назад [1,2], эксперимент не находил широкого применения, до тех пор пока не была представлена схема [3], которая смогла преодолеть технические трудности, связанные с описанным выше наблюдением протонов. С тех пор, и особенно с появлением ИГП, методика становится доминирующей в органической спектроскопии ЯМР.

Спектр 2D предоставляет простую карту связанностей, в которой перекрёстный пик коррелирует с двумя присоединёнными ядрами, как видно в ^{1}H-^{13}C HMQC спектре ментола **6.1** (рис. 6.2). Это иллюстрирует три самых важных признака эксперимента при применении к обычным структурным проблемам.

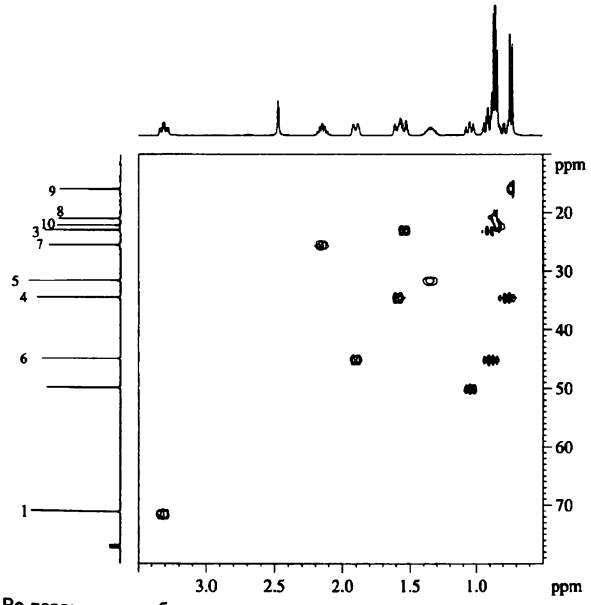
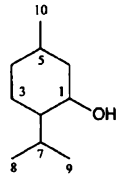


Рисунок 6.2. 500 МГц HMQC односвязный корреляционный спектр ментола **6.1.** Обычный 1D протонный и углеродный спектры также показываются для справки.



6.1

Во-первых - способность переносить известные протонные отнесения, определенные, например, методами, описываемыми в главе 5, на спектр гетероядра, таким образом расширяя характеризацию молекулы. Во-вторых - дисперсия протонных резонансов согласно гетероядерному сдвигу, что само может помогать интерпретации протонного спектра. Например, область между 0,7 и 1,2 м.д. рис. 6.2 содержит множество перекрывающихся протонных резонансов, которые не поддаются прямому анализу даже при 500 МГц. Более ясная картина событий в этой области появляется, когда они рассеиваются по ^{13}C измерению, показывая присутствие семи отдельных групп. Это свойство становится все более и более ценным с увеличением сложности и наложения в протонных спектрах. Последнее свойство, которое может оказаться удивительно полезным в структурном отнесении - способность идентифицировать *диастереотопные* геминальные пары. Они не всегда легко идентифицируются в спектрах COSY, вследствие недостатка дифференцирования геминальных и вицинальных взаимодействий, и могут вести к двусмысленности в протонном отнесении. Только для этих геминальных пар будут наблюдаться по две корреляции с одним углеродным резонансом, как видно для корреляций C6, C4 и C3 на рисунке 6.2. В противоположность предыдущим гомоядерным 2D спектрам, встре-

чающимся в этой книге, в спектрах гетероядерной корреляции сдвига отсутствует диагональ и симметрия относительно $f_1 = f_2$, простое следствие различия нуклидов, представленных в двух измерениях.

HMQC последовательность

Несмотря на мало обещающее название, основная HMQC последовательность довольно проста и включает только четыре РЧ импульса (рис. 6.3), действие которых рассматриваются здесь для простой спиновой пары ^1H-^{13}C.

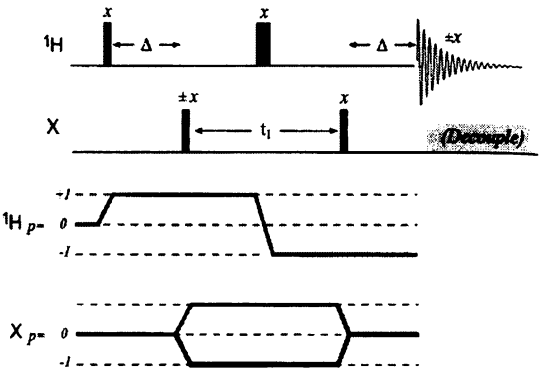


Рисунок 6.3. Последовательность HMQC и связанный путь переноса когерентности. Периоды Δ устанавливаются на $1/2J_{CH}$, чтобы позволять дефокусирование и последующее рефокусирование гетероядерного взаимодействия через одну связь.

Таблица 6.2. Типичные диапазоны для односвязных углеродно-протонных констант взаимодействия.

Расположение протона	Типичный диапазон $^1J_{CH}$ (Гц)
Алифатический CH_n-	125 – 135
Алифатический CH_nX (X=N, O, S)	135 –155
Алкеновый	155 – 170
Алкиновый	240 – 250
Ароматический	155 - 165

Последовательность начинается с возбуждения протонов, сопровождаемого эволюцией протонного намагничивания под влиянием односвязного углеродно-протонного взаимодействия. В течение периода Δ антифазное протонное намагничивание развивается в соответствии с $^1J_{CH}$ (Таблица 6.2), поэтому обычно установится около 3,3 мс. Как в случае INEPT или COSY, это антифазное намагничивание может переноситься к связанному партнеру действием последующего РЧ импульса, поэтому роль первого углеродного импульса в HMQC - генерировать протонно-углеродную многоквантовую когерентность (отсюда и название эксперимента). Вспомните, что многоквантовая когерентность описывалась в разделе 5.4 как объединение поперечной намагниченности связанных спинов, в этом случае протон и его прямо связанный углерод, которые развиваются когерентно, но которые не могут наблюдаться прямо. Если начать сбор данных протонного сигнала непосредственно после этого уг-

лерodного импульса, было бы нечего детектировать, при условии, что задержка Δ устанавливался точно равной $1/2J_{CH}$ [9].

Эта когерентность, фактически, комбинация двух- и нуль-квантовой гетероядерной когерентности, как представлено в пути переноса когерентности рис. 6.3. Таким образом, например, $^1H_p = +1$ и $^{13}C_p = +1$ соответствует *двух-квантовой* когерентности ($\Sigma p = 2$), в то время как для $^1H_p = +1$ и $^{13}C_p = -1$ нуль-квантовая когерентность ($\Sigma p = 0$).

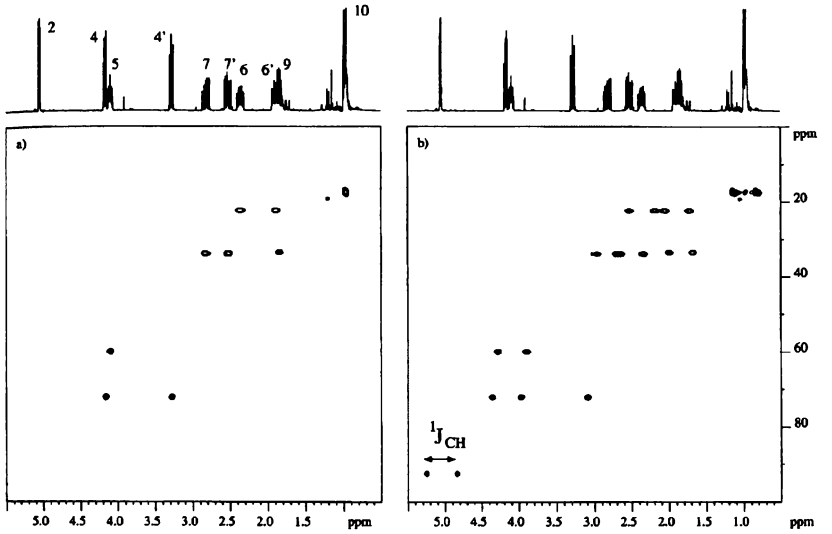
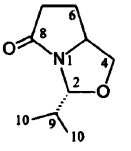


Рисунок 6.4. Спектры 400 МГц HMQC **6.2** зарегистрированные (a) – при наличии и (b) – при отсутствии углеродного декаплирования в течение сбора данных. В отсутствие декаплирования каждый перекрёстный пик появляется с дублетной структурой по f_2, возникающей из $^1J_{CH}$. Эти дублеты просто обычные ^{13}C спутники, наблюдаемые в 1D протонном спектре. 1K t_2 точек данных собирались для 256 t_1 инкрементов по 2 сканирования каждый. Данные обрабатывались сдвинутыми на $\pi/2$ синусными колоколами в обоих измерениях и представлялись в фазочувствительном режиме. Однократное дополнение нулями в t_1 давало цифровые разрешения 4 и 40 Гц/точка в f_2 и f_1, соответственно.



6.2

Характерный момент на этой стадии - то, как такие когерентности развиваются в течение последующего периода t_1. Так как они содержат выражения для поперечных и протонных, и углеродных намагничиваний, они будут развиваться под влиянием *и протонных, и углеродных химических сдвигов* (хотя особенность многоквантовых когерентностей такова, что они не будут эволюционировать под «активным» взаимодействием, поэтому J_{CH} не обязательно рассматривать на этом этапе). Что, в конечном счете, требуется, однако, это мечение частоты *согласно* только *углеродным сдвигам*, так как именно их желают характеризовать в косвенно детектируемом f_1 измерении. Чтобы удалить эффект протонных сдвигов в течение t_1, включается спиновое эхо, помещая протонный 180° импульс в средней точке t_1, так, чтобы к концу периода эволюции эти сдвиги расфокусировались и, таким обра-

[9] Заметьте, что это точно описанная в разделе 3.5.1 процедура для калибровки импульсов на косвенно наблюдаемом спине и, позволяющая определить протонный 180° импульс, является также близко родственной началу последовательности DEPT (раздел 4.4.3), которая подобно связана с генерацией многоквантовой когерентности.

зом, не имели влияния в f_1. Эволюция углеродных сдвигов не подвергается действию протонным импульсом, поэтому они остаются, производя желательное мечение частоты. Конечный углеродный импульс затем преобразует многоквантовую когерентность обратно в наблюдаемое одноквантовое протонное намагничивание, которое снова антифазно относительно $^1J_{CH}$. При сборе протонного ССИ обычно желательно применять широкополосное декаплирование *углеродных* спинов, чтобы удалять тонкую структуру дублета J_{CH}, таким образом, удваивая отношение сигнал/шум. Чтобы избежать отмены антифазных протонных спутников, вставляется второй Δ период, чтобы рефокусировать протон-углеродное взаимодействие, после чего детектируется протонное намагничивание. Обычное квадратурное детектирование в f_1 осуществляется, инкрементируя фазу углеродного импульса до t_1, или согласно процедурам Стейтса или TPPI, чтобы получить фазочувствительный дисплей. Результат - двумерный спектр с ^1H сдвигами, представленными в f_2, и ^{13}C сдвигами в f_1, а перекрёстные пики указывают односвязные связанности (рис. 6.4a и b). Один тонкий момент, к сведению, хотя эта последовательность (и HSQC ниже) номинально детектирует односвязные корреляции, в исключительных обстоятельствах они могут отсутствовать, а дальние корреляции могут появляться. Это случается, когда фактическая вовлеченная константа взаимодействия далека от значения, предполагаемого при вычислении Δ, ситуация наиболее вероятно случается для алкинов, где односвязные и двухсвязные (H-C=C) взаимодействия необычно большие. Большое взаимодействие через две связи (>50 Гц) может быть достаточным, чтобы производить перекрёстный пик, и следует быть осторожным, и не путать его с односвязной корреляцией, когда имеете дело с этими системами.

Влияние гомоядерных протонных взаимодействий

Выше отмечалось, что протонное намагничивание также развивается согласно его химическому сдвигу в течение времени Δ после первоначального возбуждения. Однако, оно точно рефокусируется в течение второго Δ периода по причине присутствия протонного спин-эхо, и поэтому не вызывает возникновения фазовых ошибок в протонном измерении. Что беспокоит больше всего - эволюция протонного намагничивания в течение двух Δ периодов и гетероядерная многоквантовая когерентность в течение t_1 под влиянием гомоядерных протон-протонных взаимодействий. Так как эти гомоядерные взаимодействия не рефокусируются спиновым эхо, они будут эволюционировать в оба периода и потенциально будут делать вклад в нежелательные фазовые ошибки в протонном измерении. Однако, Δ устанавливается согласно величине $^1J_{CH}$, которая обычно как минимум на порядок величины больше, чем J_{HH}, так что на практике степень эволюции благодаря протон-протонному взаимодействию довольно мала. Другими словами, период Δ слишком короткий, чтобы успела произойти существенная эволюция, и малые фазовые ошибки, которые могут возникнуть, редко доставляют неприятности (как описано ниже, это не тот случай, когда отыскиваются корреляции через дальние гетероядерные взаимодействия, которые сравнимы по размеру с гомоядерными протонными взаимодействиями). В противоположность, многоквантовая когерентность эволюционирует в течение t_1 под *пассивными* J_{HH} взаимодействиями без рефокусирования и, таким образом, конечные углеродные резонансы распределяются протон-протонными взаимодействиями по f_1. Это может казаться немного странным, но это - последствие того факта, что и протонные, и углеродные когерентности развиваются в течение t_1, и мы просто выбираем удаление протонных химических сдвигов спиновым эхо. Фактически, по причине довольно низкого цифрового разрешения, использованного в измерениях углерода-13, как описано ниже, эти протонные взаимодействия редко разрешаются, но делают вклад в нежелательное *уширение* резонанса по f_1. Эти гомоядерные взаимодействия *не появляются* в f_1 измерении HSQC, и эта особенность - основная разница между двумя спектрами (см. раздел 6.3.2 и рис. 6.7 ниже).

Интерференция от ^{1}H-^{12}C/1H-^{14}N резонансов

HMQC последовательность служит цели детектировать только те протоны, которые связаны связью с гетероядром *спина 1/2*, или, другими словами, только с сателлитами ^{13}C обычного протонного спектра. В случае ^{13}C это означает, что только 1 из каждых 100 протонных спинов делает вклад в спектр 2D (остальные 99 присоединены к ЯМР неактивному ^{12}C), в то время как для ^{15}N с естественным содержанием всего 0,37 %, делает вклад только 1 из 300. Когда регистрируется HMQC ССИ, все *протоны* индуцируют сигнал в приёмнике в *каждом сканировании*, и нежелательные резонансы, которые ясно представляют подавляющее большинство, должны удаляться подходящим фазовым циклом, если нужно обнаруживать корреляционные пики (известное исключение из этого, - когда для выбора сигнала используются импульсные градиенты поля, см. раздел 6.3.3 ниже). Инвертируя первый ^{13}C импульс в чередующихся сканированиях, инвертируется фаза ^{13}C самих спутников, в то время как связанные с ^{12}C протоны остаются незатронутыми (рис. 6.5). Одновременная инверсия приемника приводит к отмене нежелательных резонансов с соответствующим сложением желательных спутников. Эта двухшаговая процедура - фундаментальный фазовый цикл эксперимента HMQC, как показано на рисунке 6.3 выше.

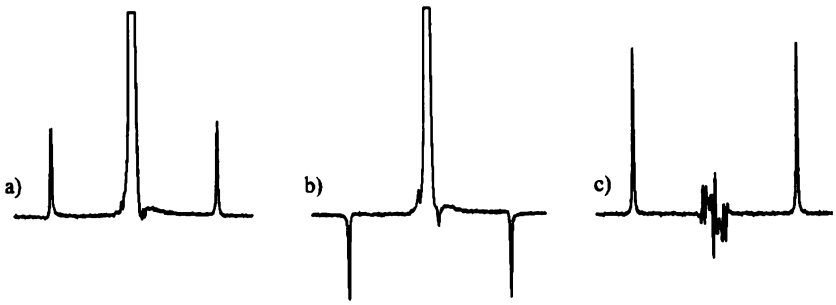


Рисунок 6.5. Выбор спутниковых резонансов в эксперименте HMQC через циклирование фазы. Фаза спутников углерода-13 может инвертироваться путём инвертирования фазы первого 90° углеродного импульса (a относительно b). Вычитание этих двух наборов данных, также инвертируя фазу приёмника, отменяет резонанс родителя ^{1}H-^{12}C, но усиливает спутники (c).

Проблема этой схемы в том, что чистое подавление нежелательных резонансов вряд ли будет достигнуто только циклированием фазы, и присутствие остаточных сигналов, способствующих появлению нежелательных полос t_1 шума в образующихся спектрах, которые могут маскировать подлинные корреляции. Обширное усреднение во времени может помочь прогрессивно уменьшать интенсивность этих артефактов, но устраняет преимущества экономии времени, во всём остальном с этим подходом становится возможнным достижение более высокой чувствительности, а применение фазового цикла «двойной разности» [4] позволило улучшать подавление. Детектирование всех протонных резонансов в каждом сканировании также налагает ограничения динамического диапазона, при этом существенная часть данных, которые собирает АЦП, в конечном счете, отвергается. Фактически полезный подход требует ослабления родительского протонного резонанса перед началом сбора данных, и раздел 6.3.3 описывает два метода, которые широко используются для достижения этой цели.

6.3.2. Гетероядерная одноквантовая корреляция (HSQC)

Гетероядерный одноквантовый корреляционный эксперимент (HSQC) [5] также следует общей схеме рис. 6.1d, но отличается от HMQC, в котором в течение периода t_1 развивается только поперечное (одноквантовое) намагничивание гетероядерного спина ($\Sigma p = \pm 1$), а не многоквантовая когерентность ^{1}H-X (рис. 6.6). Поперечное гетероядерное намагничивание генерируется переносом поляризации от присоединённых протонов через последовательность INEPT, точно как описано для 1D эксперимента в разделе 4.4.2 (сравните первую часть рис. 6.6 с таковой на рис. 4.21a). Намагничивание X-ядра эволюционирует в течение t_1 с протонным 180° импульсом в его центре, рефокусирующим ^{1}H-X эволюцию взаимодействия, таким образом, декаплируя ^{1}H-X взаимодействие, так что только гетероядерные химические сдвиги остаются в f_1. После t_1 гетероядерное намагничивание переносится назад к протону обратным шагом INEPT, чтобы производить, снова, синфазное протонное намагничивание для детектирования в присутствии декаплирования X-спина. Основной двух-шаговый фазовый цикл аналогичен таковому HMQC, требуя инверсии первого 90° X импульса со связанной инверсией приемника.

В то время как это, в конечном счете, производит корреляции подобные таковым в эксперименте HMQC, перекрёстные пики не содержат гомоядерных ^{1}H-^{1}H взаимодействий по f_1. Это потому, что в течение t_1 развивается только намагничивание X-ядра, которое поэтому не подвергается влиянию гомоядерных протонных взаимодействий. Это вызывает улучшенное разрешение в этом измерении, - основное преимущество HSQC перед HMQC для малых молекул [6] (рис. 6.7). Потенциально большее f_1 разрешение в HSQC делает этот подход лучше, когда гетероядерный спектр плохо рассеян, хотя для многих обычных отнесений малых молекул дисперсия ^{13}C не накладывает ограничений и любой подход удовлетворяет. Наиболее известное неудобство HSQC перед HMQC - больше число импульсов, которое он использует, особенно 180° импульсы на гетероядро, что способствует потерям интенсивности от неоднородности РЧ, некалиброванности импульсов или от вне-резонансного возбуждения. Это имеет большее значение для ^{13}C, чем для ^{15}N, вследствие большей протяженности частот. Такие потери могут минимизироваться тщательной настройкой датчика и, если необходимо, применением составного 180° импульса (глава 9). Как и в HMQC, требуется подавление доминирующего родительского резонанса, если эксперимент предназначен для общего применения, как описано ниже.

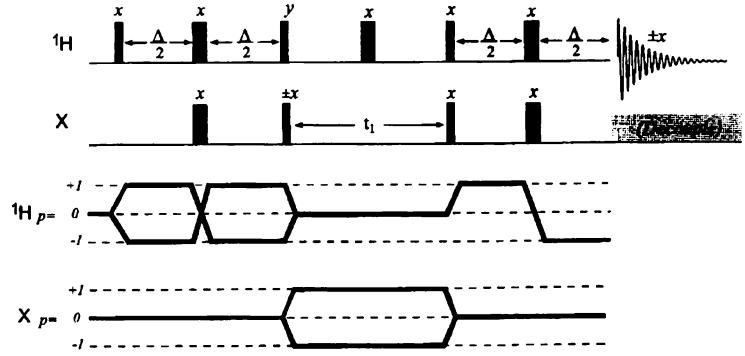


Рисунок 6.6. Эксперимент HSQC и связанный путь переноса когерентности. Эксперимент использует последовательность INEPT, чтобы генерировать поперечное X намагничивание, которое эволюционирует, а затем переносился обратно к протону обратным шагом INEPT Заметьте, что в отличие от HMQC, только одноквантовая X когерентность развивается в течение t_1 (см. текст).

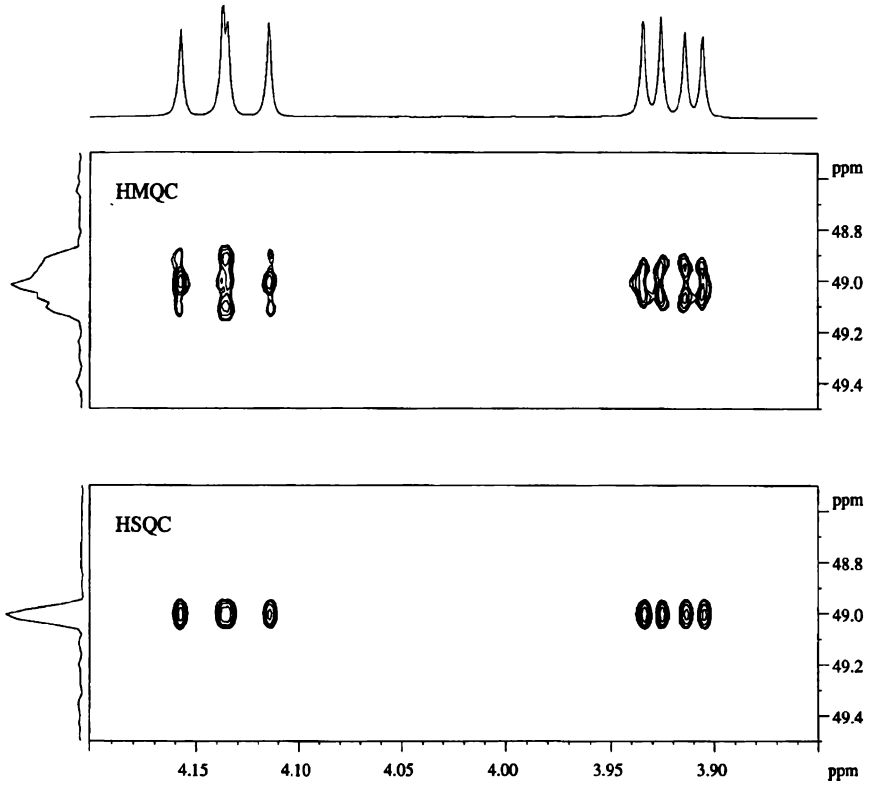


Рисунок 6.7. Сравнение экспериментальных перекрёстных пиков, взятых из HMQC и HSQC спектров, полученных при идентичных условиях высокого f_1 разрешения (2,5 Гц/точка). Верхняя 1D трасса взята из обычного 1D протонного спектра, а вертикальные трассы - f_1 проекции из 2D спектров. Дополнительное уширение в HMQC спектре возникает от неразрешенных гомоядерных протонных взаимодействий в f_1.

6.3.3. Практические реализации

Чтобы сделать HMQC/HSQC последовательности общеприменимыми, желательно, если не обязательно, подавлять резонансы тех протонов, которые не могут вызывать корреляции более эффективно, чем это может достигаться только циклированием фазы. По существу для достижения этого широко используются две схемы. Наиболее современный и определённо наиболее эффективный подход - через включение в последовательность импульсных полевых градиентов. Старая, но ещё очень эффективная схема, служит цели селективно насыщать родительские резонансы, потому что они имеют незначительную интенсивность при детектировании. Эффективность основных методов подавлять родительский сигнал сравнивается в 1D ^{1}H-^{13}C HMQC спектрах рис. 6.8, и обсуждается далее ниже.

Рисунок 6.8. Сравнение методов подавления сигнала, используемых в протон-детектируемых экспериментах гетероядерной корреляции (см. описания в тексте). Спектр (a) берется из обычного 1D протонного спектра без подавления родительского резонанса и показывает требуемые ^{13}C спутники. Другие спектры регистрируются (b) - с циклированием фазы, (c) - оптимизированное предварительным насыщением BIRD, и (d) - импульсные градиенты поля, чтобы удалять родительскую линию. Все спектры регистрированы при прочих идентичных условиях и получены от двух сканирований. Полное подавление может достигаться градиентным селектированием, но ценой некоторой интенсивности в этом случае (см. текст).

Градиентное селектирование [7]

Импульсные градиенты поля, несомненно, представляют окончательный подход к подавлению сигнала (рис. 6.8d). Отношения ослабления свыше 1000:1 легко достигаются при одиночном сканировании, что означает совершенное и удобно осуществимое подавление родительского ^1H-^{12}C или ^1H-^{14}N сигналов. Циклирование фазы также не существенно, потому что выбор сигнала достигается исключительно рефокусированием градиента, и в ситуациях, где количества образца не являются ограничивающими, эти эксперименты могут выполняться за несколько минут.

Селектированная градиентом последовательность действует, используя подходящую комбинацию градиентов, которые рефокусируют только те отклики, которые следуют желательным путём переноса. Схема рис. 6.9a пригодна для сбора данных абсолютных значений, поскольку она выбирает только один ^{13}C путь переноса в течение t_1 (предпочтительно эхо, или N-тип), и, следовательно, непосредственно обеспечивает f_1 квадратурное детектирование [10]. Чтобы понять процесс выбора сигнала, рассмотрим действие каждого градиента в свою очередь, уделяя должное внимание порядкам когерентности p (как представлено в пути переноса когерентности) и гиромагнитным отношениям участвующих спинов. Вспомните, что путь переноса когерентности представляет только путь, который мы желаем сохранить, другие не показываются, так как они не будут выбираться. Полагая, что градиенты имеют тот же самый профиль, и имеют ту же самую продолжительность, но отличаются только их силой G_n, просто суммировать фазы, индуцированные градиентами, используя краткое обозначение раздела 5.5. Таким образом, первый градиент рис. 6.9a действует, когда и протон, и углерод имеют порядок когерентности p = +1 (гетероядерная двухквантовая когерентность), таким образом, действие градиента записывается как $G_1(\gamma_H + \gamma_C)$. Для второго градиента оно становится $G_2(-\gamma_H + \gamma_C)$ и для

[10] Это сохранение только одного из двух возможных путей переноса градиентным выбором - причина уменьшения отношения сигнал-шум на рисунке 6.8d (который получался с последовательностью 6.9a с $t_1 = 0$) при сравнении с другим спектром. Точные детали того, как градиенты включаются в импульсные последовательности, будут диктовать, будут ли происходить такие потери сигнала [7] С точки зрения пользователей достаточно сознавать, что такие потери могут возникать при градиентном выборе, и, когда чувствительность критична, выбирать те методы, которые разработаны, чтобы избегать их.

третьего G3 (-γH). Чтобы сохранять этот путь, полная фаза, индуцированная градиентами, должна быть нулевая:

$$G_1(\gamma_H + \gamma_C) + G_2(-\gamma_H + \gamma_C) + G_3(-\gamma_H) = 0 \quad (6.2)$$

Заметьте, что *отношения* γ значений становятся важными только в гетероядерных экспериментах и, так как $\gamma_H/\gamma_C = 4$, вышеприведённое выражение упрощается:

$$G_1(5) + G_2(-3) + G_3(-4) = 0 \quad (6.3)$$

Имеется множество градиентных отношений, которые удовлетворят этому выражению и будут вести к желательному выбору сигнала, например 2:2:1, 5:3:4 или 3:5:0.

Оптимальный выбор в присутствии различных экспериментальных несовершенств рассматривался несколько подробнее в [8] и авторы рекомендуют применение градиентов в отношении 3:5:0 (то есть использование только двух градиентных импульсов). С подходящим градиентным отношением остаётся позаботиться, чтобы градиенты имели достаточную силу для достижения желательного подавления. Этот подход абсолютного значения требует вычисления абсолютного значения и поэтому больше всего подходит для полностью автоматизированного получения обычных спектров, когда разрешение и чувствительность не являются критическими.

Чтобы достичь фазочувствительного представления, необходимо сохранять и N, и P пути ^{13}C в течение t_1. Это, однако, является фундаментально невозможным в одиночном сканировании, если градиенты применяются в течение периода t_1, так как никакая градиентная комбинация не может рефокусировать *одновременно* сигналы и из +1, и из -1 пути. Например, результирующее влияние градиентной комбинации 2:2:1 на ^{13}C путь P-типа (порядок когерентности -1 в течение t_1) будет:

$$G_1(\gamma_H - \gamma_C) + G_2(-\gamma_H - \gamma_C) + G_3(-\gamma_H) = 0 \quad (6.4)$$

и сигнал будет оставаться дефазированным. Имеются два основных подхода к преодолению этого ограничения; либо избегать применения градиентов в течение всего t_1 [9,10], таким образом, позволяя применение обычных методов квадратурного детектирования Стейтса или TPPI, либо накопить сигналы N- и P-типа в чередующихся сканированиях и комбинировать их методом обработки «эхо-антиэхо» [11-13]. Рис. 6.9b показывает схему, основанную на методе эхо-антиэхо.

Чтобы получить чисто фазированные спектры, необходимо рефокусировать эволюцию химического сдвига углерода-13, которая происходит в течение градиентных импульсов, поэтому t_1 окружает дополнительная пара спиновых эхо, в остальном последовательность похожа на таковую рис. 6.9a. Два различных пути собираются инвертированием знака последнего градиента. Так, например, N-тип рефокусируется последовательностью 2:2:-1, а P-тип - 2:2:1 (обратите внимание, что этот выбор является противоположным таковому рис. 6.9a, по причине использования дополнительных 180° ^{13}C импульсов).

Логика подобна той, которая применяется выше к градиентному выбору в HSQC эксперименте, для которого также возможно множество различных подходов [7]. Подходящая последовательность, использующая подход эхо-антиэхо, показана на рисунке 6.10, и требует только двух градиентов в пропорции к гиромагнитным отношениям X и ^1H спинов, так как каждый действует на одноквантовое X и ^1H намагничивание. Таким образом, для эксперимента корреляции ^1H-^{13}C, отношения 4:1 и 4:-1 будут выбирать когерентности N- и P-типа при чередующихся сканированиях. Снова, первый градиент применяется в пределах спинового эхо, чтобы рефокусировать эволюцию химического сдвига X-спина в течение градиентного импульса, в то время как второй может применяться в течение обычного рефокусирующего периода INEPT.

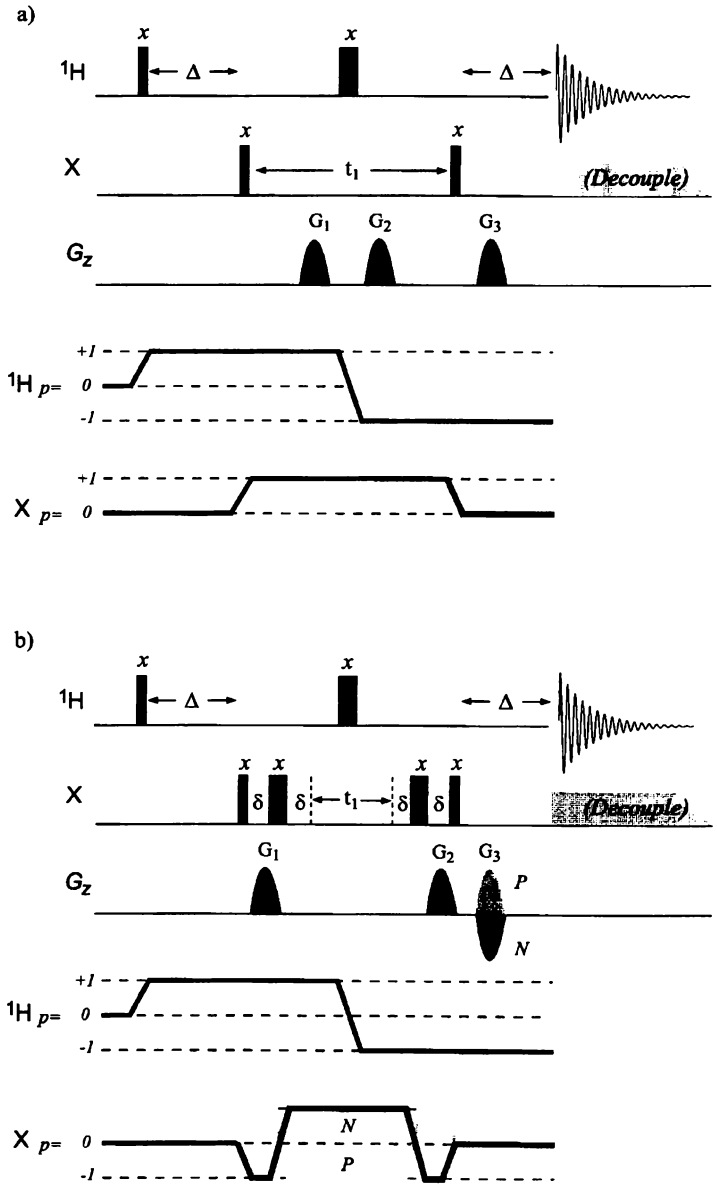


Рисунок 6.9. Последовательности для селектированного градиентом HMQC эксперимента. Последовательность (a) подходит для сбора данных абсолютного значения. Последовательность (b) обеспечивает фазочувствительные данные через процедуру эхо-антиэхо. пути N- и P-типа выбираются последним градиентом, в то время как градиенты первых двух помещаются в пределах спиновых эхо, чтобы рефокусировать эволюцию сдвига.

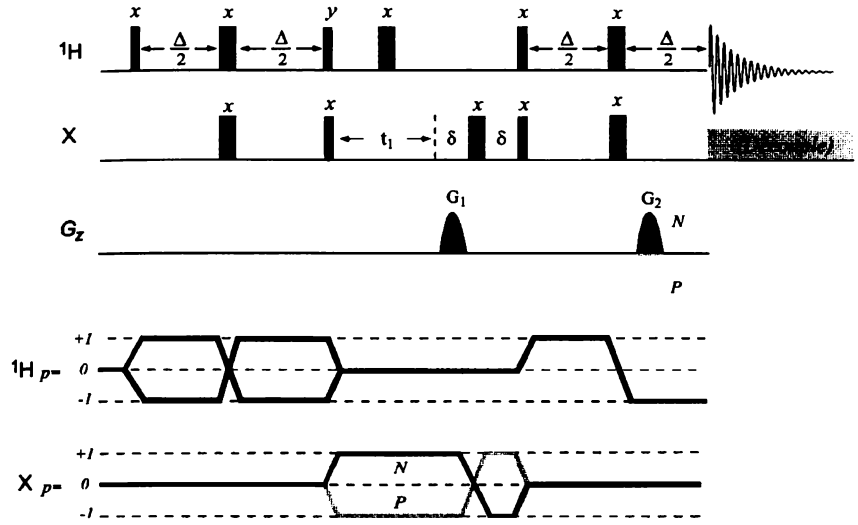


Рисунок 6.10. Селектированная градиентом, фазочувствительная HSQC последовательность, использующая подход эхо-антиэхо. Пути N- и P-типа выбираются последним градиентом.

Способность полностью подавлять родительские ^{1}H-^{12}C или ^{1}H-^{14}N резонансы производит спектры, которые в значительной мере лишены полос t_1 шума, которые иначе могут досаждать в эксперименте. Это иллюстрируется на рисунке 6.11, который показывает раздел селектированного градиентом ^{1}H-^{15}N HSQC спектра карбопептоида **6.3**, зарегистрированного с ^{15}N декаплированием, изображённым традиционно и с пониженными уровнями контуров, чтобы показать тепловой шум базовой линии.

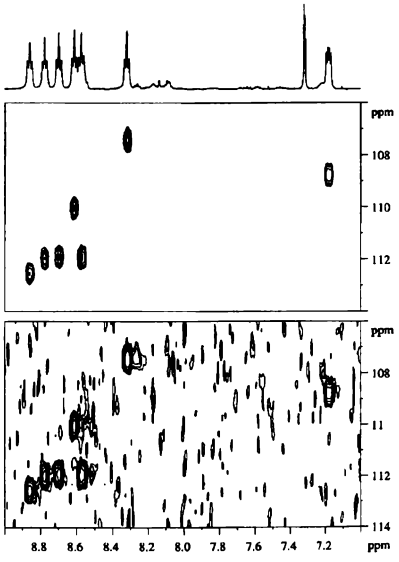
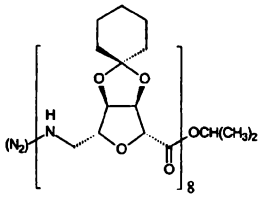


Рисунок 6.11. Селектированный градиентом HSQC спектр карбопептоида **6.3** при природной ^{15}N распространённости, изображённый при высоком и низком уровнях контуров, чтобы показать шумовое основание. Никаких артефактов t_1 шума не остаётся от родительских резонансов ^{1}H-^{14}N (^{15}N отсчитывается от внешнего жидкого аммиака).



6.3

BIRD-HMQC

Не каждый спектрометр ЯМР или датчик оборудуются способностью импульсного градиента поля, но может ещё быть способным выполнять основные описанные выше гетероядерные эффекты корреляции сдвига. В таких случаях желательно использовать альтернативную схему удаления интерферирующих родительских резонансов и производить спектры, лишенные нежелательных артефактов. В BIRD (декаплирование билинейного вращения) варианте (рис. 6.12), нежелательные резонансы ^1H-^{12}C подавляются перед HMQC последовательностью в соответствии с остроумной схемой предварительного насыщения. Последовательность начинается с инверсии *только ^{12}C углерод-связанных протонов* так называемым «импульсом «BIRD» (действие которого описывается ниже), оставляя незатронутыми связанные с углеродом-13 протоны. После инверсии период восстановления τ позволяет векторам намагничивания релаксировать обратно к равновесию вдоль +Z-оси, пока они не пройдут через *x-y* плоскость (рис. 6.13). На этом этапе начинается сама HMQC последовательность и, так как отсутствует какое-либо продольное намагничивание ^1H-^{13}C, для них не производится никакого поперечного компонента и, следовательно, достигается желательное подавление резонансов. В течение детектирования и следующего периода инверсии-восстановления намагничивание ^1H-^{13}C просто релаксирует обратно к его положению равновесия и готово к повторению последовательности, так как оно не инвертируется импульсом BIRD.

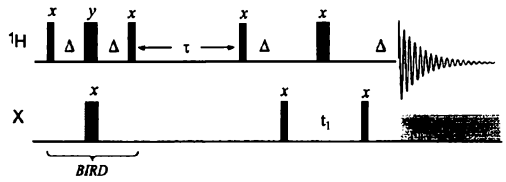


Рисунок 6.12. BIRD вариант эксперимента HMQC. Используется обычная HMQC последовательность, но с предшествующим элементом инверсии BIRD и задержкой восстановления инверсии τ. Эта процедура, в конечном счете, ведет к насыщению нежелательных родительских резонансов.

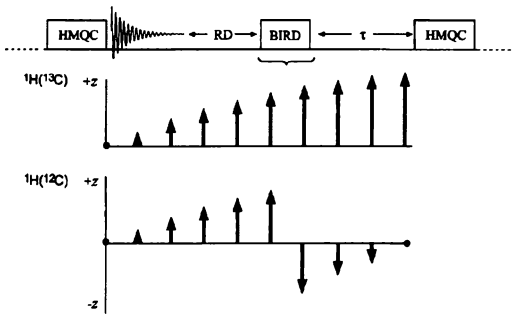


Рисунок 6.13. Устранение родительских ^1H-^{12}C протонных резонансов BIRD последовательностью восстановления инверсии. В начале сбора данных не существует никакого продольного протонного намагничивания, но оно вновь появляется в течение периода регистрации и последующей задержки восстановления (RD) через спиновую релаксацию. Элемент BIRD выборочно инвертирует только те протоны, которые присоединены к углероду-12, которые затем продолжают релаксировать в течение задержки восстановления инверсии τ. При правильном выборе τ ^1H-^{12}C намагничивание не имеет продольного компонента, когда начинается последовательность HMQC, и поэтому она не делает вклада в детектированный ССИ.

Импульс BIRD [14] - фактически кластер импульсов (рис. 6.12), используемый как инструмент в ЯМР, чтобы отличать спины, которые обладают гетероядерным взаимодействием от тех, которые им не обладают. Эффект импульса может изменяться в зависимости от фаз импульсов в пределах кластера, поэтому мы концентрируемся здесь на описанной выше селективной инверсии. Для иллюстративных целей будут рассматриваться фазы протонного импульса *x, y, x*, поскольку это обеспечивает более ясную картину с векторной моделью, хотя эквивалентные результаты достигаются с фазами *x, x,-x*, как в первоначальной публикации. Схема (рис. 6.14) начинается с протонного возбуждающего

импульса, сопровождаемого спиновым эхо. Так как углерод-12 связанные протоны не имеют односвязных гетероядерных взаимодействий, только их химические сдвиги развивается в течение Δ.

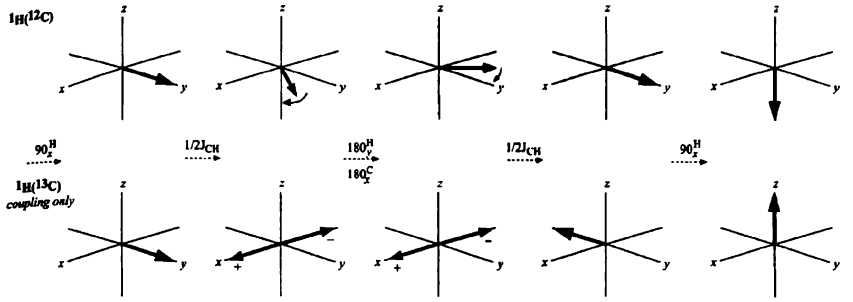


Рисунок 6.14. Селективная инверсия протонов, связанных с углеродом-12, с элементом BIRD. Эволюция протонного химического сдвига рефокусируется в последовательности, а гетероядерные взаимодействия через одну связь развиваются.

Они в последствии рефокусируются 180°(^{1}H) импульсом, так что в конце второго Δ периода второй 90° (^{1}H) импульс помещает вектор вдоль -Z оси и производит желательную инверсию ^{1}H-^{12}C резонансов. Для тех спинов, которые обладают гетероядерным взаимодействием, химические сдвиги будут рефокусироваться, как выше, поэтому нам нужно рассмотреть только эффект самих взаимодействий. Если Δ устанавливается на $1/2J_{CH}$, два протонных вектора будут лежать вдоль $\pm x$ непосредственно перед 180° (^{1}H, ^{13}C) импульсами, после чего взаимодействие будет *продолжать развиваться*. Таким образом, после полного периода 2Δ векторы дублета лежат вдоль -*y*, а затем возвращаются к +z действием завершающего протонного импульса, и для этих спинов всё происходит так, как будто BIRD никогда не появлялся.

Успех применения схемы подавления BIRD кардинально зависит от правильной установки задержек восстановления и частот повторения, согласно протонным значениям T_1 молекулы. На практике вряд ли будет известно точно, каковы они, и в любом случае будет существовать разброс их в молекуле, поэтому следует применять хорошие компромиссные предполагаемые величины. Это исключает [3] достижение оптимальной чувствительности установкой времен согласно *самому короткому* T_1 значению в молекуле, и снова установка времени повторения эксперимента, то есть времени между началом регистрации данных одного эксперимента и началом последовательности HMQC следующего (t_2 + RD + τ рис. 6.13), около 1,3·T_1. Период инверсии-восстановления τ должен устанавливаться приблизительно на 0,5 T_1 для эффективного подавления, а протонное время регистрации t_2, устанавливаться согласно желательному цифровому разрешению. Релаксационная задержка RD выбирается тогда, чтобы обеспечить желательное время повторения (t_2 + RD ≈ 0,8·T_1). Например, принимая наименьшее ожидаемое T_1 в молекуле равным 600 мс, установка t_2 на 200 мс, соответствует цифровому разрешению f_2 5 Гц/точка, вышеприведённые рекомендации, предлагают выбор τ= 300 мс и RD = 280 мс [11]. Так как обычно вынуждены делать лучшее приближение для T_1 значений, экспериментальные

[11] Такое частое повторение импульсов может показаться чрезмерно быстрым для наблюдения желательных резонансов, особенно для тех протонов, которые имеют более длительные времена релаксации. Однако следует вспомнить, что обычно измеряемые протонные T_1 относятся к протонам, связанным с углеродом-12, в то время как в HMQC затрагивает протоны, связанные с углеродом-13. Это ядро действует как дополнительный источник дипольной релаксации для прямо присоединённого протона, что ведёт к укорочению величины протонного T_1, совместимому с более частым повторением сканирований.

установки тонко настраиваются, чтобы давать оптимальное подавление нежелательных резонансов. Это легче всего достигается, прогоняя эксперимент в интерактивном режиме установки, который позволяет регулирование параметров в реальном времени, и, изменяя т, производить *минимальный* ССИ.

Схема BIRD замечательно эффективна при подавлении неприятных ^{1}H-^{12}C резонансов и связанного с ними t_1 шума и широко применяется в изучении малых молекул. Однако этот метод не годится для изучения очень больших молекул, потому что в течение периода т *отрицательный* ЯЭО (глава 8), произведённый инвертированными протонами, *вызывает уменьшение* интенсивности сигнала наблюдаемых протонов и, следовательно, ухудшает чувствительность. Традиционным подходом для больших молекул в отсутствие градиентов поля [15] было применение сильного периода блокировки спинов в течение первой INEPT последовательности HSQC эксперимента. Это уничтожает все намагничивание, не выровненное с осью блокировки спина, и подавляет нежелательные родительские сигналы.

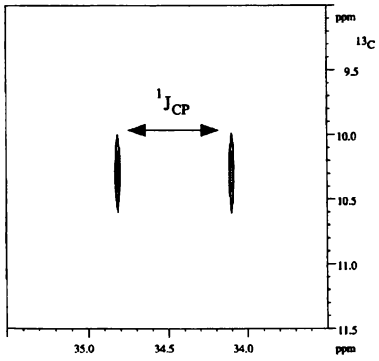
Практическая установка

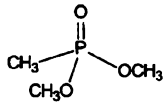
Высокая дисперсия перекрёстного пика, обычно связанная с гетероядерными эффектами корреляции сдвига, наряду с недостатком какого-либо требования хорошо определённой тонкой структуры перекрёстного пика означает, что HMQC, или HSQC эксперименты могут регистрироваться с довольно низким цифровым разрешением для обычных применений, увеличивая их эффективность во времени. Требуемое цифровое разрешение 5 Гц/точка в протонном f_2 измерении и только 50 Гц/точка в гетероядерном f_1 измерении обычно достаточны для разрешения корреляции. Улучшение f_1 разрешения может достигаться линейным предсказанием ССИ, когда чувствительность позволяет, и/или улучшение цифрового разрешения дополнением нулями (обычно, как минимум однократно). Альтернативно, применение линейного предсказания может вести к существенной экономии времени, когда доступны большие количества образца, уменьшением числа инкрементов t1, которые должны регистрироваться, и вычислением, регенерируя эти отсутствующие t_1 точки данных, чтобы обеспечить адекватное разрешение f_1 [16]. Следует помнить, однако, что очень высокое разрешение в f_1 не желательно для эксперимента HMQC, так как следует избегать разрешённых расщеплений, возникающих из гомоядерных протонных взаимодействий, и таким образом деградирующих отношение сигнал/шум. Кроме того, обработка требует только простой аподизации в обоих измерениях и/или применения функции окна сдвинутого синус-квадратного колокола или Гаусса благотворно для наборов фазочувствительных данных.

Протонно-углеродные корреляционные эксперименты, основанные на методах, описываемых выше, могут удивительно быстро получаться для обычных органических образцов, особенно когда используются импульсные градиенты поля, и датчик оптимизирован для протонного детектирования. Частоты повторения диктуются более коротким временами релаксации протонов, связанных с ^{13}C, и могут, поэтому, быть чаще, чем в гомоядерных спектрах COSY, например, где контролируются протоны, связанные с ^{12}C. Они обычно быстрее получаются и часто более информативны, чем 1D углеродный спектр, часто доступный в течение минут, и теперь это обычные эксперименты в органической лаборатории. Сопровождение этих методов методами редактирования спектров, как описано ниже, далее расширяет их использование как структурных инструментов, и может всё более вытеснять прямые 1D эксперименты X-наблюдения, такие как APT и DEPT, на периферию обычных методов доказательства структуры.

X-Y корреляции

Следует помнить, что 2D методы, представленные здесь, пригодны для корреляции множества различных нуклидов [17] и не обязательно требуют протонного детектирования, если наблюдаемое ядро имеет высокую распространённость. Как иллюстрация, рис. 6.15 показывает фосфорно детектированную ^{31}P-^{13}C корреляцию **6.4.** Основная HMQC последовательность использовалась с дополнительным широкополосным протонным декаплированием, применяемым постоянно, но без декаплирования углерода-13 во время периода детектирования. Корреляции поэтому появляются как $^{1}J_{CP}$ дублет. Такие эксперименты часто упоминаются как *гетероядерные X-Y корреляции*, чтобы показывать участие двух нуклидов, отличных от протона, который обычно декаплируются. Они требуют, чтобы спектрометр обладал тремя каналами РЧ и датчиком, который может настраиваться на вовлечённое ядро, что недоступно на стандартном двухканальном приборе. Однако, с увеличением доступности трехканальных спектрометров в химических лабораториях, можно ожидать, что такие методы обеспечат дополнительные пути определения структуры и изучения химических процессов. Инверсные корреляционные методы могут также обеспечивать доступ к данным химического сдвига ядер, которые иначе слишком нечувствительны для прямого наблюдения. Конкретно, это имеет значение для косвенного наблюдения металлов, многие из которых имеют очень низкую собственную чувствительность, но могут, однако, детектироваться через их спиново-связанных соседей на смежных лигандах, наиболее часто через ядра фосфора или протоны. Косвенное наблюдение ^{57}Fe, печально известного как трудное ядро для прямого наблюдения, является одним из таких примеров [18-20] (рис. 6.16).

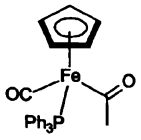




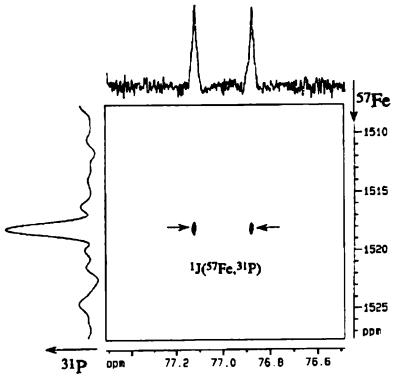
6.4

Рисунок 6.15. Фосфорно детектированный ^{31}P-^{13}C HMQC спектр **6.4.** В течение детектирования *фосфорного ССИ* применялось протонное декаплирование, но не использовалось никакого декаплирования углерода-13. Эти данные получены использованием самодельного третьего канала и датчика, модифицированного для трёхканальной работы.

Рисунок 6.16. Фосфорно детектированный, протонно декаплированный ^{31}P-^{57}Fe HMQC спектр **6.5.** Проекции генерированы из 2D спектра (воспроизведено с разрешения от [20])



6.5



6.3.4. Гибридные эксперименты

Как упоминалось ранее, спектры корреляции сдвига могут далее улучшаться, путём их объединения с другими импульсными методиками, чтобы получать спектры с измененными характеристиками или повышенным информационным содержанием. Этот раздел достаточно краток и предназначен, чтобы обеспечить обзор типов методов, которые были разработаны, и которые, вероятно, будут играть все более и более видную роль в разъяснении органической структуры. Первые два раздела ниже представляют два из более полезных методов для доказательства структуры, а также иллюстрируют способ, которым могут связываться различные методы, чтобы производить «новые» эксперименты. Третий раздел иллюстрирует, как может использоваться гетероядерный спин в редактировании или упрощении 1D протонных спектров.

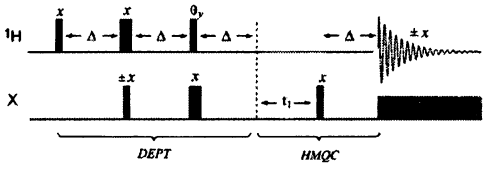


Рисунок 6.17 DEPT-HMQC последовательность для редактирования по мультиплетности в пределах 2D корреляционного эксперимента. Обычная последовательность DEPT предшествует HMQC и обеспечивает редактирование через угол отклонения протонов θ. Установка θ = 180° инвертирует XH_2 отклики относительно XH и XH_3.

2D редактирование по мультиплетности

За исключением способности идентифицировать диастереотопные XH_2 группы, до сих пор встречающиеся гетероядерные эффекты корреляции сдвига не обеспечивают никакого прямого доказательство мультиплетности XH_n групп, вызывающих каждую корреляцию, аналогичную способу, которым широкополосно декаплированные гетероядерные спектры не обеспечивают никакой информации о мультиплетности. Теперь доступны различные методы обеспечения такого редактирования непосредственно *в* 2D экспериментах гетероядерной корреляции, таким образом, убивая двух птиц одним камнем, если вам нравится. Они обеспечивают большее количество информации в обычном анализе и требуют меньшего количества времени, чем обычные 1D методы редактирования. Кроме того, такие эксперименты обеспечивают доступ к гетероядерной информации мультиплетности, когда малые количества образца предотвращают прямое наблюдение редактированных спектров X-спина, таким образом более расширяя диапазон количеств образца, который можно рассматривать доступным для структурных исследований.

Включение последовательности DEPT главы 4 в HMQC [21] (рис. 6.17) предлагает один из методов для непосредственного редактирования корреляционного спектра. Роль последовательности DEPT перед HMQC - генерировать гетероядерную многоквантовую когерентность, которая развивается в течение t_1. Полный анализ [21,22] показывает, что в этой последовательности используются другие многоквантовые члены, чем в 1D DEPT, чистый результат состоит в том, что интенсивности перекрёстных пиков имеют различную зависимость от протонного редактирующего импульса θ° Наиболее полезная реализация использует θ = 180°, что производит спектры с XH_2 корреляциями, инвертированными относительно таковых XH и XH_3 групп, что эквивалентно обычной DEPT-135 1D последовательности (должно использоваться фазочувствительное представление!). Редактирование может легко вводиться в HSQC последовательность [10,23,24] простым сложением спинового эхо (Δ 180°(^{1}H, X) - Δ) после t_1. В это время эволюционирует только гетероядерное взаимодействие, точно так же как в импульсной последовательности 1D J-модулированного спинового эхо, описанной в разделе 4.3.1. Следовательно, установка Δ = 1/2J также обеспечивает 2D корреляционный спектр, в котором XH_2 отклики инвертируются относительно таковых XH и XH_3. В одном примере этого подхода, объединение этого эхо с существующим t_1 периодом производит модифицированную схему HSQC

рис. 6.18 [7,25]. Редактированный HSQC спектр замещённого дисахарида **6.6** показан на рисунке. 6.19 и ясно различает CH и CH_2 корреляции.

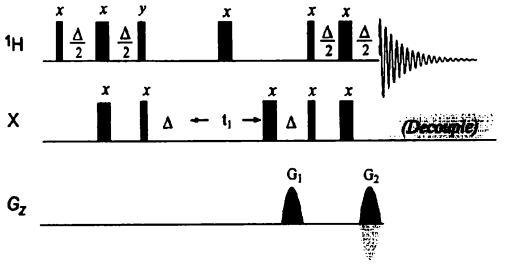
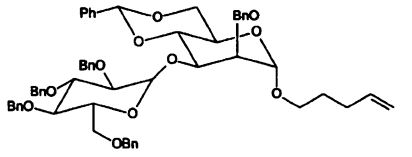


Рисунок 6.18. Селектированная градиентом последовательность спинового эхо HSQC для редактирования мультиплетности в 2D корреляционном эксперименте. Установка Δ = 1/2J инвертирует XH_2 отклики относительно таковых XH и XH_3.



6.6

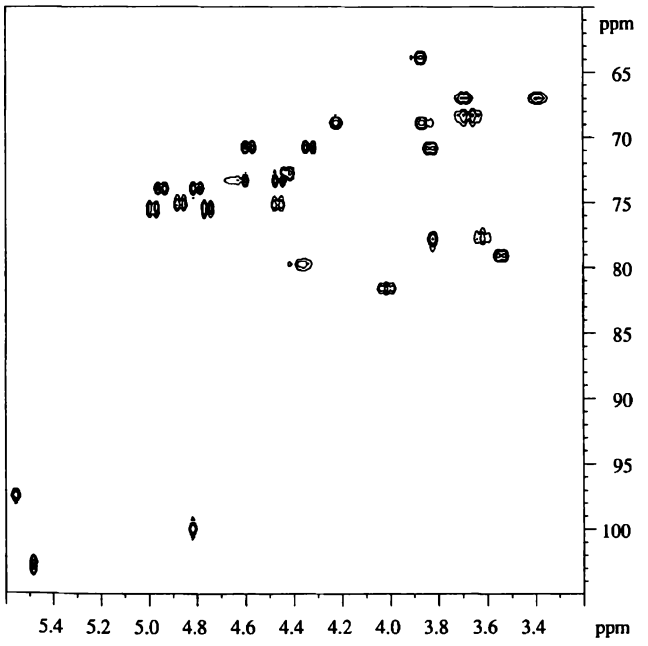
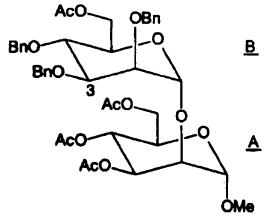


Рисунок 6.19. Редактированный мультиплетностью HSQC спектр дисахарида **6.6**, в котором положительные CH корреляции (красные) отличаются от отрицательных CH_2 (черные) корреляций.

Потенциальная проблема с этими подходами редактирования - отмена перекрывающихся корреляций с противоположными фазами в скученных областях 2D спектров. Альтернативные последовательности, основанные на редактировании через многоквантовую фильтрацию, производят спектры, содержащие корреляции *только* XH, *либо* XH_2, *либо* XH_3 групп, так что проблема отмены сигнала устраняется. Эти методы слишком многочисленные, чтобы обсуждать их здесь, но включают REPAY [26], HYSEL [27,28], HmQC [22], MAXY [29,30] и другие [10,31]. Более экзотические модификации даже включают добавление переноса блокировки спина [32,33] способом, подобным тому, который описан ниже. Когда обращаться к таким уровням сложности, будет диктоваться природой и сложностью изучаемой проблемы, но относительно эффективности таких схем редактирования в условиях наступления импульсных градиентов поля, вероятно можно предсказать, что они станут более широко используемыми для исследования сложных структур.

Использование дисперсии сдвига X-спина

При анализе молекул, которые показывают очень скученные протонные спектры, 2D гомоядерные эффекты корреляции сдвига, обсуждаемые в главе 5, могут еще давать спектры, которые слишком перекрываются, чтобы позволять полную интерпретацию. В таких случаях может использоваться потенциально большая дисперсия родительских химических сдвигов гетероатома как средства дальнейшего разделения протон-протонных корреляций. Кроме того, в случаях точно перекрывающихся *протонных* резонансов эксперименты гетероядерной корреляции через одну связь не обеспечивают однозначной идентификации родительского гетероатома, и один из подходов к преодолению таких проблем лежит в переносе информации гетероядерной корреляции на соседние протоны. Таким образом, добавляя период смешения блокировки спинов TOCSY после HmQC/HSQC последовательности и непосредственно перед сбором данных [34,35] переносят намагниченность, которая возвращался к протону, от которого она произошла на соседние J-связанные протоны (рис. 6.20). Также могут использоваться расширенные периоды смешения, чтобы *передавать* намагничивание по протонной сети, потенциально обеспечивая полный протонный подспектр молекулярного фрагмента, которому принадлежит гетероатом.



6.7

Результат может рассматриваться как X-спин-редактированный 2D TOCSY эксперимент. Протонные корреляции теперь появляются вдоль рядов, взятых при химических сдвигах f_1 гетероспина. При достаточной дисперсии сдвига в измерении X-спина наложение, существующее в 2D TOCSY, удаляется. HSQC-TOCSY спектр дисахарида **6.7** (рис. 6.21b) содержит многочисленные дополнительные корреляции в HSQC спектре (рис. 6.21a) и может использоваться для картирования протонных путей взаимодействия. Это наиболее ясно видно при сдвиге C3 кольца B, от которого протон H3 производит TOCSY корреляции ко всем другим протонам в кольце, за исключением H1 (который в этом случае имеет нулевое взаимодействие с H2, таким образом, создавая нарушение в переносе).

Огромное упрощение скученных спектров, таким образом, делает это очень мощной методикой. Однако при рассмотрении применения этих методов следует иметь в виду, что перекрёстные пики в ^{13}C-редактирующем эксперименте происходят только от ^{13}C спутников, по причине начального шага HmQC/HSQC, и эксперимент имеет, следовательно, значительно более низкую чувствительность, чем гомоядерный 2D TOCSY, в котором могут участвовать все протоны. Эксперимент обычно находит применение, когда после начальных стадий исследования сложных спектров, использующих уже представленные методы, остаются неоднозначности. В таких случаях следует также рассматривать применение дальних гетероядерных корреляций, кратко описываемых ниже.

Также предложены дальнейшие модификации (добавление спинового эхо), позволяющие различать прямые и ретрансляционные пики через инверсию прямых корреляций [36], и селектированные градиентом версии этих последовательностей без такого редактирования [37,38] и с таковым [10,39]. Хотя добавление TOCSY переноса, вероятно, наиболее полезное расширение, в принципе можно добавлять любую схему гетероядерного смешения, включая ступени COSY, NOESY и ROESY.

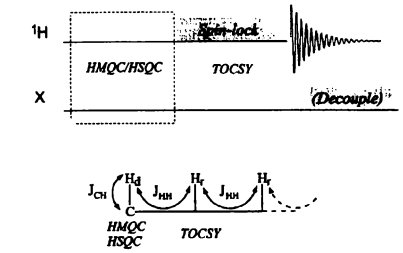


Рисунок 6.20. Схема HmQC/HSQC-TOCSY последовательности и путь взаимодействия, который она устанавливает. Прямые корреляции производятся для протона, связанного с гетероатомом спина 1/2 (Hd), как в основной последовательности корреляции сдвига, и далее ретрансляционные корреляции производятся для тех протонов, которые получают намагниченность через перенос TOCSY (H_r).

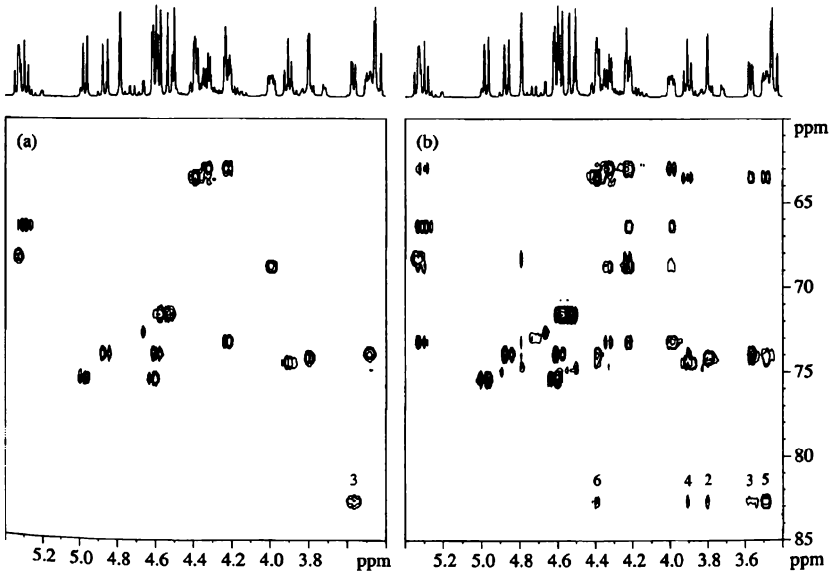


Рисунок 6.21. Выбранные области (a) HSQC и (b) HSQC-TOCSY спектров дисахарида **6.7**. Протонные корреляции, возникающие от H3 кольца B, метятся и обеспечивают почти полную карту протонов в пределах этого кольца (отсутствует только корреляция с H1).

Редактирование и фильтрование 1D протонных спектров

Идея использования гетероатома для редактирования спектра 2D, как описано выше, одинаково применима к редактированию 1D протонных спектров. Вообще говоря, имеются две причины, почему можно рассматривать выполнение этого. Во-первых, можно пожелать *редактировать* протонный спектр согласно мультиплетностям гетероатома, чтобы производить подспектры, которые являются протонными аналогами, например, APT или DEPT-редактированных углеродных спектров. Эти аналоги обеспечивают более быстрый и чувствительный путь к идентификации углеродных мультиплетностей в молекуле и позволяют анализ меньших количеств образца на основании протонного детектирования. Во-вторых, можно пожелать выборочно наблюдать только протоны, присоединённые к изотопной метке гетероатома. Таким образом, используют метку *для фильтрования* протонного спектра, перенося селективность, связанную с гетеро-меткой, на более чувствительный протон. В то время как же время протонные сателлиты естественного содержания немеченых положений также будут проходить через фильтр, они будут присутствовать со значительно ослабленной интенсивностью. Последовательности HmQC или HSQC могут преобразовываться в их 1D эквиваленты, просто удаляя возрастающий период времени t_1 (рис. 6.22), так, что эксперимент становится только гетероядерным фильтром. Только намагничивание, которое прошло через X-спин, будет наблюдаться в конечном спектре и снова подавление всех нежелательных сигналов значительно улучшается применением импульсных градиентов поля. Селективное наблюдение ^{13}C-меченого глицина в водной смеси показывается на рисунке 6.23.

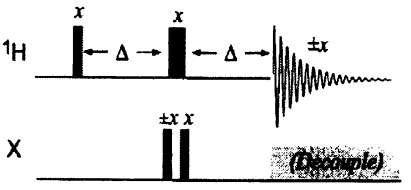


Рисунок 6.22. Последовательность 1D HmQC. Она может использоваться для редактирования спектров, выбирая только те протоны, которые связаны с ЯМР активными гетероатомами. Улучшенное подавление нежелательных резонансов может достигаться объединением с импульсными градиентами поля, как для 2D эксперимента.

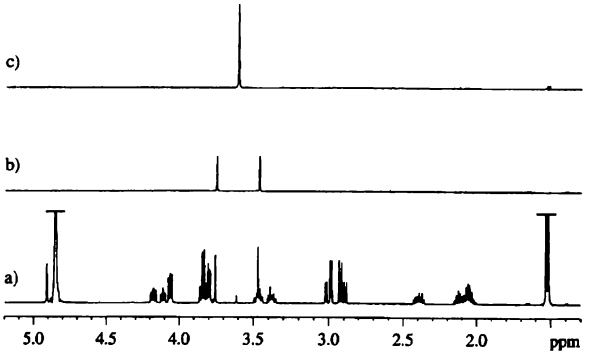


Рисунок 6.23. Селективное наблюдение протонов, связанных с меткой углерода-13 (2-^{13}C-глицин) выбирающей градиентом 1D последовательностью HmQC (a). 1D протонный спектр и фильтрованный спектр регистрировали (b) - без декаплирования и (c) - с декаплированием углерода-13 во время регистрации.

Классический подход к генерированию редактируемых мультиплетностью протонных спектров состоит в том, чтобы использовать последовательности INEPT или DEPT реверсивно, чтобы переносить

первоначальную углеродную намагниченность на протон для детектирования. Они страдали от низкой чувствительности и плохого подавления ^{1}H-^{13}C резонансов, поэтому никогда не были популярными. Большая чувствительность может достигаться, используя инверсный $^{1}H \rightarrow {}^{13}C \rightarrow {}^{1}H$, подход, комбинированный с многоквантовым фильтрованием [21,27], как для 2D методов редактирования, обсуждавшихся выше, а методы, использующие редактирование через градиентный выбор, теперь обеспечивают более чёткие результаты [22,28,29,40]. Пример выбора подспектра, содержащего только резонансы метиленового протона, показан на рисунке 6.24. По сравнению со стандартным 1D протонным спектром приходится платить чувствительностью, потому что снова вынуждены наблюдать спутники углерода-13 обычного протонного спектра. Однако это упрощение может оказаться полезным при анализе высоко скученных спектров и может обеспечивать ценные данные мультиплетности, когда малые количества образца предотвращают использование углеродно детектированных методов редактирования.

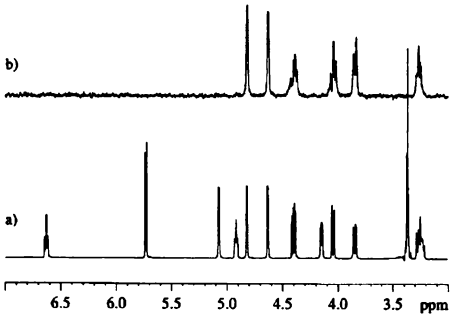
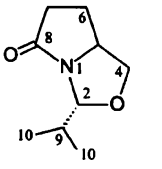


Рисунок 6.24. Редактирование протонного спектра согласно углеродным мультиплетностям. В (b) из обычного спектра выбираются только резонансы, возникающие от метиленовых групп. (a) Чистое подавление всех других резонансов достигается импульсными градиентами поля, хотя некоторые фазовые ошибки остаются на выбранных сигналах.

6.4. СПЕКТРОСКОПИЯ ГЕТЕРОЯДЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИИ ЧЕРЕЗ МНОГО СВЯЗЕЙ

Гетероядерные корреляционные методы ^{1}H-X, представленные до сих пор, все зависят от присутствия протона, связанного с гетероатомом, и поэтому неспособны обеспечивать отнесения для непротонированных центров и не производят однозначных углеродных отнесений, когда протонные резонансы точно совпадают.

Таблица 6.3. Наблюдаемые дальние корреляции в HMBC спектре 6.2 (Δ = 60 мс).



6.2

Протон	Коррелируемый углерод
2	4, 5, 8, 9, 10
4	2, 5w, 6w
4'	2w, 5, 6
5	4w, 7w, 8
6	4, 5, 7, 8
6'	4, 5, 7, 8
7	5, 6, 8
7'	5, 6, 8
9	2, 10
10	2, 9, 10'
10'	2, 9, 10

Слабые корреляции, соответствующие меньшим константам взаимодействия, отмечены (w). Не все они наблюдаются на рисунке 6.25 при показанных уровнях контуров.

В таких случаях альтернативный подход - устанавливать корреляции между углеродами и соседними протонами через больше, чем одну связь, так называемыми *дальними* или *многосвязными* корреляциями, чаще всего через протон-детектируемую гетероядерную корреляцию через много связей эксперимент (HMBC). В подавляющем большинстве случаев, он будет включать протонно-углеродные связанности через взаимодействия через две или три связи ($^{n}J_{CH}$, где n == 2, 3), так как корреляции через большие расстояния часто исчезающе малы (см. ниже). Способность идентифицировать ^{1}H-^{13}C корреляции, через связи углерод-углерод или углерод-гетероатом предоставляет богатую информацию о молекулярном скелете, обеспечивая один из наиболее мощных подходов к определению органической структуры, возможно второй после более трудных для понимания прямых ^{13}C-^{13}C корреляций, обеспечиваемых методами главы 5, основанными на INADEQUATE. Сам спектр HMBC по внешнему виду сильно похож на спектр HmQC с дальними корреляциями каждого протона, представляемыми в столбце, взятом при его химическом сдвиге. Содержание информации таких спектров показывается в спектре HMBC **6.2** (рис. 6.25), который нужно сравнивать с HmQC на рисунке 6.4. Полный набор корреляций, наблюдаемых в этом спектре, суммируется в таблице 6.3, но характерные свойства эксперимента можно оценить, рассматривая корреляции одного протона H2. Во-первых, обратите внимание на крупное достижение односвязной корреляции, появляющейся как меченный стрелкой дублет при 93 мд. Это точный эквивалент корреляции, видимой на рисунке 6.4b, и здесь служит как опорная точка, хотя они могут, временами, быть нежелательным усложняющим фактором. Возможность такого появления пиков нужно всегда держать в уме при интерпретации этих спектров. Во-вторых, заметьте, что корреляции с C4, C5 и C8 возникают из взаимодействий через гетероатомы (N и O), свойство, которое иногда, кажется, удивляет тех, кто незнаком с экспериментом. Этот тип данных может быть особенно ценным, когда отсутствуют протон-протонные взаимодействия. Наконец, заметьте, что H2 показывает корреляцию с карбонильным углеродом C8. Этот центр ненаблюдаем в односвязных корреляционных экспериментах. Способность наблюдать непротонированные центры, таким образом, не только позволяет определять их химические сдвиги, но также и обеспечивает ценные данные связанности. В настоящее время комбинация COSY, HmQC/HSQC, а затем HMBC обычно представляет первичные методы при решении проблем молекулярной связанности в малых органических молекулах.

6.4.1. HMBC последовательность

Эксперимент HMBC [41,42] устанавливает многосвязные корреляции, и опять имеет преимущество большей чувствительности (по сранению с обычным экспериментом XH-корреляции), связанное с протонным детектированием, и, по сути, последовательность HmQC «настраивается» для детектирования корреляций через малые взаимодействия (рис. 6.26a). По причине их подобия, здесь будут представлены только различия, относящиеся к HMBC, а применения эксперимента рассматриваются в следующем разделе.

Настройка эксперимента достигается, задавая достаточно длинным период подготовки, чтобы позволить эволюционировать малым дальним протон-углеродным взаимодействиям и производить антифазное смещение векторов, требуемых для последующей генерации гетероядерной многоквантовой когерентности. Так как дальние ^{1}H-^{13}C взаимодействия, по крайней мере, на порядок величины меньше, чем взаимодействия через одну связь (часто < 5 Гц), задержка Δ должна, в принципе, со-

ставлять, по крайней мере, 100 мс ($1/2^{n}J_{CH}$), хотя рутинно часто используются более короткие задержки, чтобы избежать потерь релаксации.

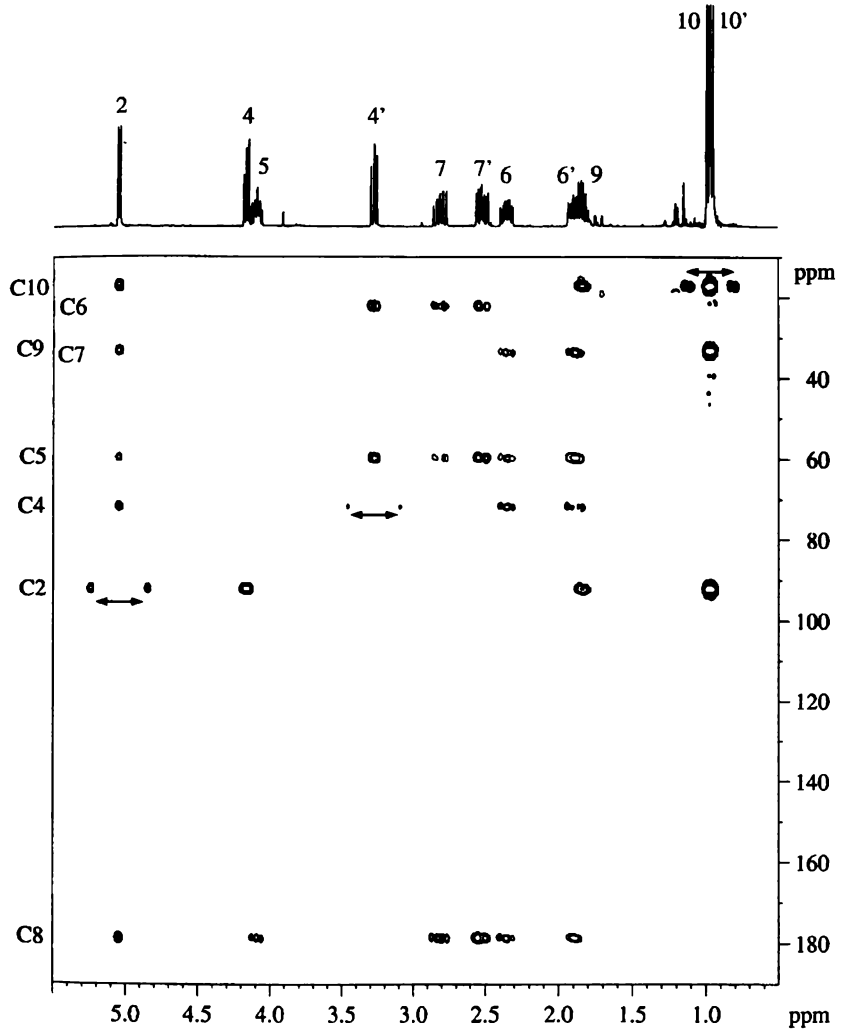


Рисунок 6.25. HMBC спектр дальней корреляции **6.2**, зарегистрированный с $\Delta = 60$ мс и с градиентным выбором. Последовательность использует низкочастотный J-фильтр (раздел 6.4.1) чтобы ослаблять пролезание от односвязных корреляций (которые появляются с $^{1}J_{CH}$ дублетной структурой вдоль f_2 (меченные стрелкой)). Собирались 1K t_2 точек данных для 256 t_1 инкрементов по 8 сканирований каждый, и данные обрабатывались несдвинутыми синусными колоколами, в обоих измерениях, с последующим вычислением абсолютного значения. После однократного дополнения нулями в t_1 цифровое разрешение составляло 4 и 80 Гц/точка в f_2 и f_1, соответственно.

В течение этого длинного периода гомоядерные взаимодействия ^1H-^1H, которые имеют величину, подобную дальним гетероядерным взаимодействиям, также развиваются и

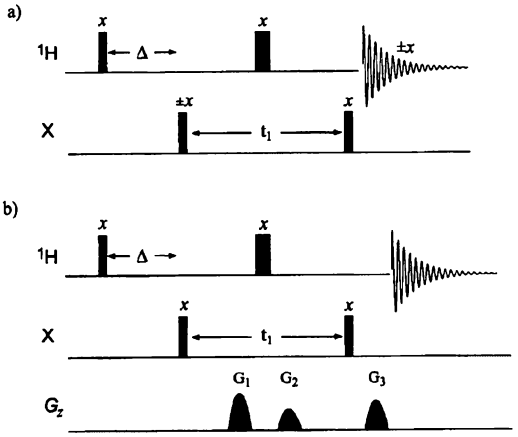


Рисунок 6.26. HMBC последовательность (a) без и (b) с применением импульсных градиентов поля. Последовательность близко родственная эксперименту HmQC, и перенос когерентности следует подобным путем.

вводят фазовые искажения в наблюдаемые перекрёстные пики (эти искажения, достаточно малые, чтобы игнорироваться в HmQC по причине значительно меньших использованных Δ периодов). Поэтому для HMBC спектров широко используются представления абсолютного значения, чтобы маскировать эти фазовые ошибки, и поэтому обычно получают HMBC наборы данных, которые фазово модулированы (выбор N-типа) как функция t_1. По причинам чувствительности период рефокусирования в HmQC опускается в HMBC так, что дальние гетероядерные взаимодействия антифазны в начале t_2, предотвращая применение декаплирования ^{13}C.

Хотя период Δ выбирается согласно дальним взаимодействиям, он может оказаться также кратным подходящей установке для односвязных корреляций, добавочно вызывая их появление. Так как ССИ получаются без декаплирования ^{13}C, они обладают характерной дублетной структурой в f_2, (как видно на рисунке 6.4b и рис. 6.25) которая помогает их идентификации. Они могут рассматриваться как полезные дополнения, или как нежелательные интерференции, в зависимости от вашей точки зрения; так как они одновременно обеспечивают односвязные корреляционные данные, они могут затенять или перепутываться с дальними корреляциями. Их подавление, по крайней мере частично, получается добавлением одношагового низкочастотного J-фильтра (называемого так потому, что он сохраняет или пропускает только те пики, которые возникают от взаимодействий, *которые меньше, чем* выбираемое значение отсечки, здесь константа односвязного взаимодействия) [41,43] (рис. 6.27). Здесь, период Δ_1 устанавливается согласно $^1J_{CH}$ в то время как Δ_2, устанавливается согласно дальнему взаимодействию, как указывалось выше.

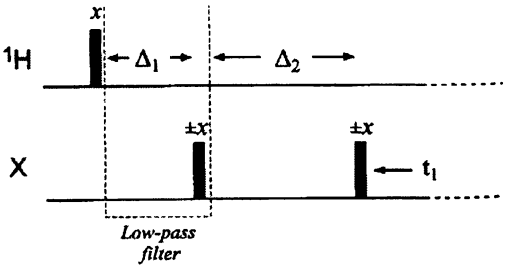


Рисунок 6.27. Низкочастотный фильтр для удаления артефактных односвязных корреляционных пиков из HMBC спектров. Он включает в себя дополнительный период Δ_1 и 90° X-импульс в начале HMBC последовательности. Δ_1 устанавливается равной $1/^1J_{CH}$ и Δ_2 - $1/^nJ_{CH}$. Инвертирование фазы первого X-импульса при чередующихся сканированиях без инвертирования фазы приёмника отменяет нежелательные односвязные вкла-

ды.

Чередование фазы первого углеродного импульса *без изменения* таковой приемника вызывает отмену сигналов, возникающих из одно-связных корреляций при чередующихся сканированиях. На практике подавление часто не полное, особенно при наличии широкого диапазона $^1J_{CH}$ значений, поэтому применение очищающей схемы в дополнение к низкочастотному J-фильтру, как показано, обеспечивает улучшенное подавление [44]. В рутинных исследованиях можно опускать все схемы фильтрования и допускать присутствие пролезаний от взаимодействий через одну связь.

Без всякого сомнения, самая большая проблема, связанная с HMBC последовательностью, лежит в подавлении родительских сигналов ^1H-^{12}C, которые иначе могут маскировать дальние спутники. В отличие от HmQC, последовательность BIRD не подходит хорошо для удаления этих резонансов, так как это также вероятно приведёт к ослаблению желательных сигналов. Традиционно для отмены интенсивного родительского резонанса последовательность полагается только на циклирование фазы, что требует очень стабильного спектрометра для получения желаемого эффекта. Даже в этом случае, полосы остаточного t_1 шума обычно досаждают в первоначальном эксперименте HMBC и ограничивают его применение как обычного инструмента в органической химии. Введение импульсных градиентов поля [10,45] значительно улучшило применимость HMBC, так как при этом легко достигается полное подавление родительской линии, наряду с драматическим уменьшением связанного t_1 шума. Польза от выбираемого градиентом подхода ясно демонстрируется в спектрах рис. 6.28.

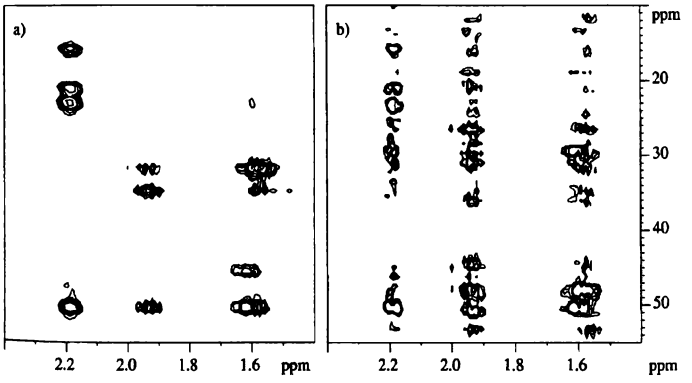


Рисунок 6.28. HMBC спектры, полученные при идентичных условиях но с выбором сигнала при помощи (a) импульсных градиентов поля и (b) - только циклирования фазы.

Спектр 6.28a регистрировался градиентным выбором, а 6.28b с обычным циклированием фазы при прочих идентичных условиях (не считая 256-кратное увеличение усиления приемника в (a) по сравнению с (b)). Собирались четыре сканирования на инкремент, что соответствует минимальному фазовому циклу (два шага для выбора сигнала и два для подавления аксиальных пиков). Дальние корреляции чётко идентифицируются в (a), но едва наблюдаются выше полос t_1 шума в (b). Улучшенные результаты для фазо-циклированной версии могут достигаться, собирая гораздо большее количество сканирований за счёт приборного времени.

Дальние корреляции, основанные на HSQC последовательности обычно менее эффективны. Существенная эволюция взаимодействий ^1H-^1H в течение периода Δ ведет к нежелательным переносам COSY-типа среди протонов вторым 90° протонным импульсом последовательности INEPT. Эта проблема отсутствует в HMBC.

6.4.2. Применение HMBC

Присутствие дальних корреляций в HMBC спектрах подвергается множеству факторов и экспериментальных, и структурных, и понимание этих моментов важно для оптимального применения и интерпретации эксперимента, и поэтому обсуждаются здесь, прежде чем переходить к иллюстрации некоторых применений. Интенсивности перекрёстных пиков зависят, среди других вещей, и от величины дальнего взаимодействия, и от значения, выбранного для Δ, которое оптимально должно быть равно $1/2 \cdot {}^{n}J_{CH}$ (интенсивность кросс-пика $\propto \sin \pi {}^{n}J_{CH} \Delta$). Дальние протон-углеродные взаимодействия через две или три связи редко превышают 25 Гц, а в отсутствие ненасыщенности чаще меньше, чем 5 Гц [46,47] (Таблица 6 4), требуя установки Δ равной 100 мс или больше.

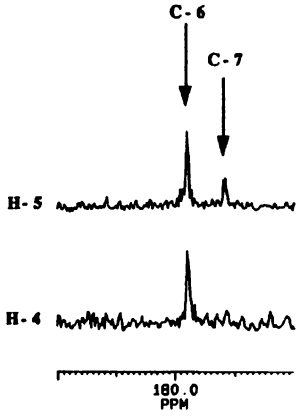
Таблица 6.4. Типичные значения дальнодействующих протон-углеродных констант взаимодействия

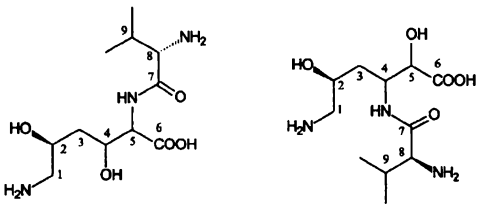
Путь взаимодействия	$^{2}J_{CH}$	Путь взаимодействия	$^{3}J_{CH}$	Путь взаимодействия	$^{4}J_{CH}$
H-C-C	(±) ≤5	**H-C-C-C**	≤5	**H-C=C-C=C**	(±) ≤1
H-C=C	≤10	**H-C=C-C**	≤15[a]	**H-C-C-C-C**[b]	≤1
H-C≡C	40-60	**H-C≡C-C**	≤5		
H-C(=O)-C	20-25				

[a] *транс-* > *цис-*, *цис-* обычно < 10 Гц
[b] прпедпочтительная w-конфигурация
Такие гетероатомы, как O, N и так далее, также могут включаться в пути взаимодействия вместо показанных атомов C.

Такие длинные задержки могут вести к потерям релаксации прежде детектирования, особенно для больших молекул, поэтому на практике применяется компромисс с установкой Δ около 60-80 мс для обычных применений, так как малые органические молекулы имеют тенденцию иметь более медленные скорости релаксации, более длинные задержки могут успешно использоваться при поиске большего числа связанностей через меньшие взаимодействия, с выбором значений до 200 мс. При использовании более длинных задержек также становится возможным детектировать пики, которые возникают из корреляций через 4 связи, и которые, наиболее вероятно, случаются, когда путь взаимодействия содержит ненасыщенность, или когда они имеют плоскую зиг-загообразную (w-взаимодействие) конфигурацию, как обычно наблюдается в дальних протон-протонных взаимодействиях. Нужно также признать, что взаимодействия через три связи могут быть, а часто так оно и есть, больше по абсолютной величине, чем взаимодействия через две связи, показывая Карплус-подобную зависимость от двугранного угла [48]. Действительно, одно из ограничений при использовании данных HMBC - ***недостаток различия между корреляциями через две и три связи***. Кроме того, *недостаток корреляции сам по себе не может рассматриваться как свидетельство отдаленности рассматриваемых ядер в структуре*, так как делать вклад в величину $^{n}J_{CH}$, находящуюся близко к нулю, может множество факторов (для больших подробностей см. обсуждения в ссылке [46]). Наиболее интенсивные корреляции обычно наблюдаются для метильных групп, так как намагничивание детектируется на трех протонах одновременно, и потому что они отображают более простую структуру взаимодействий, если таковые вообще имеются, в то время как самые слабые корреляции обычно связаны с плохо разрешёнными сложными протонными мультиплетами.

Несмотря на недостаток различия, протоны потенциально могут коррелировать с очень многими углеродными соседями в пределах двух или трех связей, обеспечивая массу структурных данных о неизвестной молекуле. Связанности также могут прослеживаться через гетероатомные связи (как видно на рисунке 6.25), где протон-протонные взаимодействия обычно пренебрежимо малы, и в этом эксперименте чрезвычайно эффективны при сборке иначе некоррелируемых молекулярных фрагментов. Таким образом, эксперимент HMBC смог определить региохимию дипептидного антибиотика Tu 1718B, выделенного из культуры *Streptomyces* [49]. Из биосинтетических аргументов были предложены две возможные структуры **6.8a** и **6.8b**, но никакая протонная корреляция или данные углеродных химических сдвигов не могли однозначно идентифицировать, которая из них была правильной. Подтверждение было получено из анализа дальних корреляций протонов H4 и H5, и, в частности, корреляции с карбонильными группами (рис. 6.29).

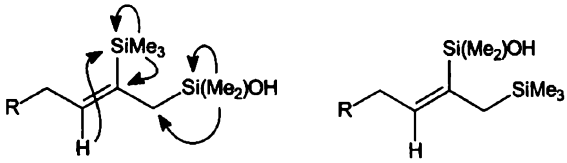




6.8

Рисунок 6.29. Колонки, взятые из спектра HMBC антибиотика Tu 1718B, при сдвигах протонов H4 и H5. Показаны только ключевые корреляции с карбонильными резонансами (воспроизведено с разрешения от [49]).

Наблюдались корреляции H5 с обоими H4, которые коррелировались только с C-6, эти данные согласуются только с **6.8a**. Связанности через кислород, связывающий соседние сахарные остатки в олигосахаридах, аналогично, обеспечивают полезные средства идентификации соседних остатков в этих соединениях. Естественно, последовательность не ограничивается протонно-углеродными связанностями, а может проектироваться для любой пары спинов 1/2. Таким образом, дальние протонно-кремниевые и протонно-углеродные корреляции, установленные через HMBC, использовались для подтверждения структуры неожиданного продукта перестройки эпоксидисиланов [50] как силанола **6.9a**, а не **6.9b**. Дополнительные исследования ЯЭО идентифицировали стереохимию через алкен.



Потенциальная проблема ограничения HMBC - большая ширина спектра, которая должна косвенно оцифровываться в f_1. Обычно большую проблему представляет необходимость включать карбонильную область (в отличие от односвязных корреляционных экспериментов), что во многих случаях означает, что данные обычно собираются с довольно низким разрешением в f_1. В областях ^{13}C спектра, где многие резонансы располагаются близко друг к другу, такое низкое разрешение может оказываться недостаточным и вызывать наложение кросс-пиков. Это может случаться, например, с отнесениями пептидов, где амидные карбонильные резонансы все попадают в окно 6 мд. Одно из решений этой проблемы - ***выбирать только часть f_1 измерения, которая содержит карбонильные резонансы***, так чтобы только они появлялись в конечном спектре, и, следовательно, нужно оцифровывать только малое окно в f_1. Это достигается ***селективным возбуждением*** только интересующих ^{13}C резонансов ***формованным углеродным импульсом*** (глава 9) вместо первого неселективного углеродного импульса обычной последовательности [51]. Рис. 6.30 сравнивает карбонильную область **6.10** обычного HMBC со спектром полуселективного эксперимента HMBC. Цель состояла в том, чтобы получить специфические к последовательности отнесения для каждого углеводного аминокислотного остатка, идентифицируя дальние ^1H-^{13}C корреляции с карбонильными углеродами, таким образом, обеспечивая связь между смежными остатками [52]. В случае рис. 6.30b гауссовым импульсом 2 мс селективно возбуждалась область C=O, обеспечивая существенное увеличение разрешения в f_1,

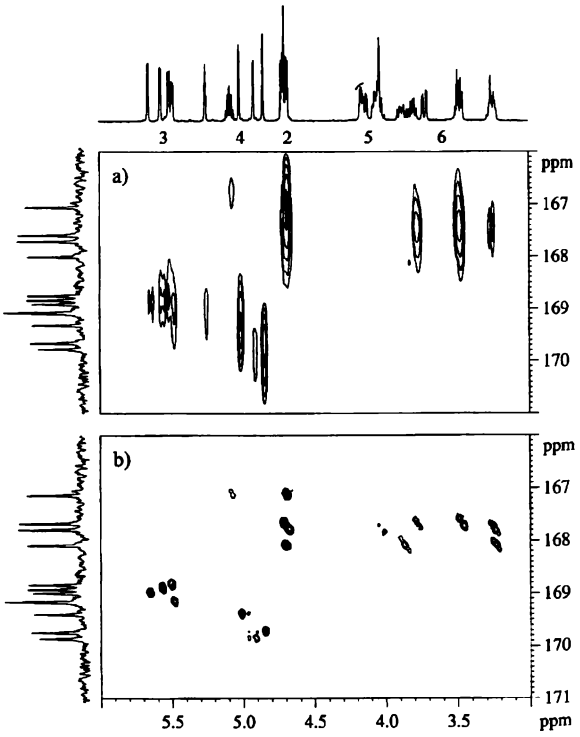
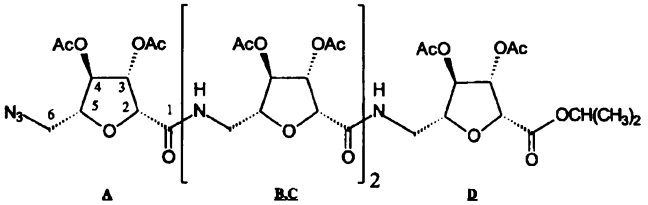


Рисунок 6.30. Карбонильные области HMBC спектров **6.10**, полученные (a) обычной HMBC и (b) - полу-селективной HMBC последовательностью. Малая дисперсия сдвига карбонила вызывает значительное наложение кросс-пиков с низким f_1 разрешением 80 Гц/точка в (a), в то время как более высокое разрешение в (b) 6 Гц/точка удаляет это ограничение.



6.10

достаточное, чтобы идентифицировать требуемые дальние корреляции $H2^i$ с CO^i и CO^i с $H6^{i+1}$, и, таким образом, устанавливать связанности через амидную связь.

Практическая постановка

Вследствие небольших величин дальних взаимодействий относительно взаимодействий через одну связь, и по причине необходимости длительных и часто неоптимальных периодов задержки, чувствительность эксперимента HMBC несколько ниже, чем для HmQC или HSQC кузенов. В отсутствие импульсных полевых градиентов необходимо получать много сканирований для каждого приращения, пытаясь подавлять интенсивные ^1H-^{13}C сигналы и показать интересующие корреляции, делая эксперимент ёмким по времени, даже когда доступны большие количества образца (качество спектра сильно зависит от стабильности спектрометра). Селектированные градиентом версии значительно быстрее регистрируются и подвергаются только требованиям чувствительности и разрешения, так как подавление родительского сигнала больше не является проблемой, а также лучше используется динамический диапазон приёмника. Как правило, при использовании градиентного выбора для успеха эксперимента HMBC обычно требуется почти в четыре раза больше времени, чем для соответствующего HmQC или HSQC эксперимента, чтобы обеспечивать приемлемые данные. То, что до недавнего времени обычно занимало целую ночь при фазо-циклированном эксперименте, теперь может получаться за несколько часов, или даже десятков минут - настолько эффективно применение импульсных градиентов поля в эксперименте HMBC.

Установка Δ описана выше, а выбор цифрового разрешения для двух измерений следует аргументам, подобным для односвязных экспериментов корреляции, то есть около 50 Гц/точка в f_1 и около 5 Гц/точка во f_2 в большинстве случаев должны обеспечить приемлемые результаты. В HMBC получаемый t_2 ССИ начинается как антифазное намагничивание относительно $^nJ_{CH}$, так как период рефокусирования опускается, и сигнал создаётся по мере рефокусирования в течение самого t_2. Оптимальные функции окна, обеспечивающие фильтрование близкое к согласованному, следовательно, несдвинутый синусный колокол или синус-квадратный колокол. В противоположность, интерферограммы t_1 затухают от их максимальных значений и требуют достаточной аподизации, только чтобы избежать ошибок усечения, которые могут появляться при условиях высокого отношения сигнал/шум, поэтому удовлетворительна простая функция экспоненциального спада. Улучшенного *цифрового разрешения* в измерении f_1 можно достичь дополнением нулями (рекомендуется как минимум однократное), можно также увеличивать разрешение, используя прямое линейное предсказание. Наконец, *время повторения эксперимента диктуется величиной T_1 протонов, **прямо связанных с центрами углерода-12***. Времена повторения, поэтому, оцениваются из времен релаксации, какие они были бы для *гомоядерных* корреляционных экспериментов, и длиннее, чем оптимальные для HmQC или HSQC.

6.5. ТРАДИЦИОННАЯ X-ДЕТЕКТИРУЕМАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Традиционные методы гетероядерной корреляции сдвига следуют схеме, приведённой выше на рис. 6.1b, и связаны с прямым наблюдением X-спина и с ядром источником (типично протонами), детектированными косвенно. Как обсуждалось в начале этой главы, этот общий подход менее чувствителен, чем включающий прямое наблюдение протонов, и это вело к общему снижению популярности методов наблюдения X-спинов. Однако нельзя полностью игнорировать их существование, так как они имеют одно главное преимущество перед протонно детектируемыми аналогами - их *способность регистрировать X-спин с высоким цифровым разрешением*. При протонно детектируемых методах часто в косвенном измерении измеряется большой диапазон химических сдвигов X-спина и регистрация его с высоким разрешением влечет за собой сбор многих t_1 инкрементированных наборов данных, делая эксперименты занимающими много времени. При детектировании X-спина, высокое разрешение может достигаться просто, собирая больше точек данных на ССИ, делая минимальным различие в полной продолжительности эксперимента. Когда требуются гетероядерные корреляции для скученного углеродного спектра, например, для сложных ароматических систем, ^{13}C детектированный подход может, поэтому оказаться превосходным. Обычная причина для обращения к этим методам может заключаться в чисто практических соображениях, когда ваш спектрометр может оказаться неспособным действовать в «инверсном» режиме, то есть, он не может конфигурироваться для наблюдения протонов, но ещё может обеспечивать импульсное возбуждение и декаплирование гетероядра. Это будет случаться только со старыми приборами, а не со спектрометрами современной архитектуры. Чувствительность этих методов может также увеличиваться использованием микроячейки или микрокапилляров [53] вместо стандартных ампул ЯМР. Следующие эксперименты описываются в контексте ^1H-^{13}C, но могут проектироваться и для других спиновых пар.

6.5.1. Корреляции через одну связь

Методы для установления гетероядерных связанностей основываются на общей идее переноса поляризации от протона к углероду и, таким образом, могут быть поняты, опираясь на ранее встречавшийся 1D эксперимент INEPT раздела 4.4.2. Вспомните, что рефокусированная последовательность INEPT позволяет перенос протонных заселенностей (поляризации) на присоединённый углерод применением одновременных протонных и углеродных импульсов после того, как гетероядерное взаимодействие развилось в течение периода Δ_1. После переноса углеродное намагничивание, созданное таким образом, антифазно относительно $^1J_{CH}$, поэтому позволяется эволюция под влиянием гетероядерного взаимодействия в течение периода Δ_2 до тех пор, пока углеродные векторы не переориентируются. На этом этапе применяется протонное декаплирование и регистрируется углеродный ССИ (рис. 6.31a; здесь 180° импульсы в средних точках Δ_1 и Δ_2, которые служат для удаления эволюции химического сдвига, для простоты опущены). Чтобы производить двумерный эксперимент корреляции сдвига [54], переменный период эволюции t_1 добавляется немедленно после начального протонного возбуждения и перед шагом переноса поляризации так, что детектированный сигнал ^{13}C становится модулированным протонным химическим сдвигом как функция t_1 (рис. 6.3.1b). В это время взаимодействия ^1H-^1H и ^1H-^{13}C также будут эволюционировать, приводя к появлению и гомоядерных, и гетероядерных расщеплений в f_1, таким образом, уменьшая интенсивности сигналов. Удаление ^1H-^{13}C взаимодействия может достигаться, рефокусируя $^1J_{CH}$, вставкой 180° углеродного импульса в средней точке t_1 (предпочтительно применяемого в виде составного импульса), чтобы уменьшить эффекты отстройки резонанса (рис. 6.31b).

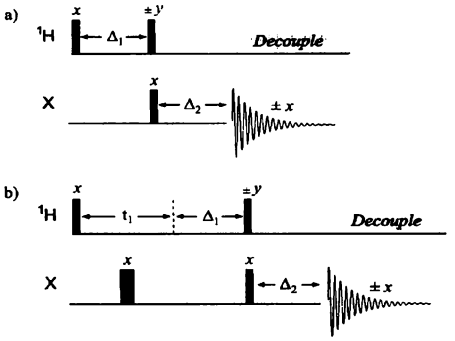
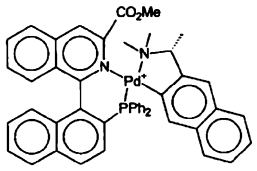


Рисунок 6.31. (a) - 1D рефокусированный эксперимент INEPT, показанный в упрощённой форме для ясности с удаленными рефокусирующими 180° импульсами в средних точках Δ_1 и Δ_2. 2D эффект корреляции сдвига (HETCOR) в (b) - производится от INEPT добавлением периода эволюции t_1, чтобы кодировать протонные химические сдвиги перед переносом поляризации. 180° углеродный импульс в средней точке t_1 рефокусирует эволюцию гетероядерного взаимодействия и таким образом обеспечивает углеродное декаплирование в f_1.

Поскольку отсутствует чистая эволюция CH взаимодействия в t_1, антифазное намагничивание, требуемое для переноса поляризации, развивается только в течение последующего периода Δ_1, который поэтому оптимизируется для $\Delta_1 = 1/2{\cdot}{}^1J_{CH}$ точно как для INEPT (обычно 3,5 мс для корреляции ^1H-^{13}C). Образующийся спектр показывает углеродные химические сдвиги, коррелирующие перекрёстные пики в f_2 и протонные сдвиги в f_1, которые дальше расширяются гомоядерными протонными взаимодействиями в f_1.

Рис. 6.32 показывает часть спектра углеродно-протонной корреляции сдвига комплекса палладия **6.11**. Несмотря на обширное переполнение в ароматической области, углеродные сдвиги достаточно рассеяны, чтобы разрешить все корреляции (обратите внимание, что некоторые резонансы уширяются ограниченными динамическими процессами в молекуле, а некоторые расщепляются взаимодействием с фосфором).



6.11

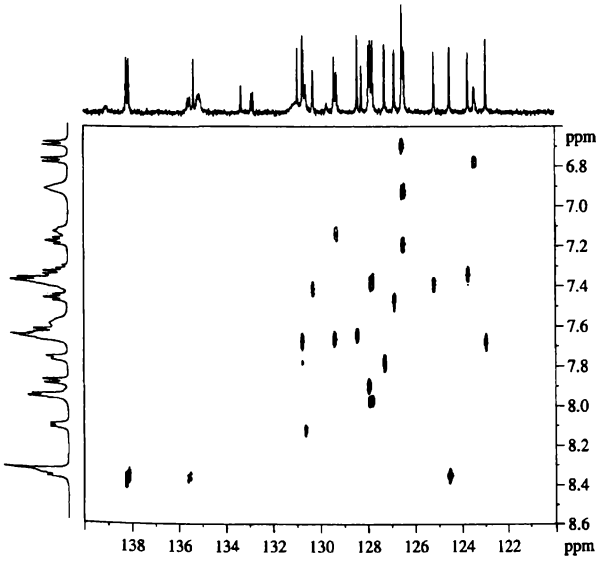


Рисунок 6.32. Ароматическая область спектра абсолютного значения HETCOR ^{13}C-^1H (500 МГц) комплекса палладия **6.11** 2K t_2 точек данных собирались для 256 t_1 инкрементов по 128 сканирований каждый для окна 40 x 2,6 мд. Несдвинутые синусные колоколы применялись в обоих измерениях, и после дополнения нулями до цифрового разрешения в каждом измерении 2,5 и 5,0 Гц/точка в f_2 и f_1, соответственно.

Схема рис. 6.31b широко использовалась для получения спектров корреляции сдвига абсолютного значения и часто упоминается как HETCOR или гетеро COSY. Преобразование в предпочтительный фазочувствительный эквивалент (различные формы которого были исследованы [55]) требует перевведения одновременных 180° (^1H, ^{13}C) импульсов в центры и Δ_1, и Δ_2, чтобы удалять эволюцию химического сдвига в течение этих периодов, точно также как в полном рефокусированном INEPT. Кроме того, требуется объединение с методом Стейтса или TPPI циклирования фазы 90° протонного импульса шага переноса поляризации. Подавление аксиальных пиков выполняется чередованием фазы конечного протонного импульса вместе с приемником (который эквивалентен тому, который используется в INEPT, чтобы подавлять вклады от природной намагниченности X-спина). Что касается последовательности INEPT, редактирование фазочувствительного спектра будет возможно разумным выбором рефокусирующей задержки Δ_2, например, установка $\Delta_2 = 1/1{,}5 \cdot J_{CH}$ производит спектр, в котором отклики от CH_2 групп инвертируются. Для обычного применения, выбор $\Delta_2 = 1/3J_{CH}$ (обычно 2,3 мс для ^1H-^{13}C) обеспечивает положительные интенсивности для всех протонированных углеродов.

Так как используется перенос поляризации, *частота повторения эксперимента диктуется восстановлением быстрее релаксирующих протонных спинов, и времена повторения должны выбираться около 1,3·T_1 для протонов*. Разрешение в протонном измерении может быть очень низким для обычных применений, так как обычно нет необходимости разрешать тонкую структуру протонов, и потому что гомоядерное взаимодействие синфазное, отсутствует опасение отмены сигнала; цифровое разрешение f_1 может, поэтому быть таким низким, как 10 Гц/точка или около того, требуя довольно немного t_1 инкрементов. Число сканирований на инкремент должно устанавливаться так, чтобы интересующие углеродные резонансы могли наблюдаться только в спектре первого зарегистрированного ССИ (который эквивалентен 1D эксперименту INEPT).

Гомоядерное декаплирование в f_1

Введя слабую модификацию последовательностей, представленных выше, можно достичь (почти полного) удаления гомоядерных протонных взаимодействий из f_1, также как удаления расширения мультиплетов и увеличения и чувствительности, и разрешения в f_1. Чтобы сделать это, используется подход, подобный описанному выше для удаления *гетероядерного взаимодействия* в f_1, то есть, для каждой связанной спиновой пары, нужно инвертировать в средней точке t_1 *только один из двух спинов*, так чтобы эволюция взаимодействия рефокусировалась в конце t_1. Для гетероядерного случая это тривиально, так как можно применять 180° углеродный импульс, наверняка зная, что его протонный партнер не подвергается действию. Однако применение одиночного протонного 180° импульса не приводит к успеху, так как оба протона испытывают этот импульс, и взаимодействие будет продолжать развиваться, как для гомоядерного спинового эхо. Ещё хуже то, что протонные химические сдвиги будут рефокусироваться в течение t_1, совершенно разрушая измерение протонного сдвига (хотя это и нежелательно в этом применении, такой подход может быть полезным, когда желают анализировать только фрагменты взаимодействия в f_1; см. главу 7 о J-разрешающей спектроскопии). Что тогда необходимо, так это средство инвертирования только *удаленных* J-связанных соседей *непосредственно* связанного с ^{13}C протона (который, в конечном счете, вовлекается в шаг переноса поляризации). Решение этой, по-видимому невозможной задачи, лежит в применении последовательности BIRD [14], уже представленной в разделе 6.33, как средства селективного инвертирования ^{12}C-связанных протонов, в то время как остальные ^{13}C-связанные протоны не затрагиваются [56,57]. Различие протонов в контексте декаплирования f_1 связывается с совершенно различными величинами односвязных и дальних взаимодействий ($^1J_{CH} >> {}^{2/3}J_{CH}$), так что дальние взаимодействия могут рассматриваться как незначительные. Следовательно, помещая кластер BIRD в средней точке t_1, рефокусируют протон-протонное взаимодействие, в то время как углеродный 180° импульс BIRD также служит для рефокусирования протон-углеродного

взаимодействия, как выше (отсюда BIRD; билинейное вращательное декаплирование). Резонансы f_1 тогда появляются как синглеты, за исключением резонансов от неэквивалентных геминальных протонов, которые сохраняют их взаимное взаимодействие (поскольку никакой протон не испытывает инверсии, так как оба связаны с ^{13}C) [58].

6.5.2. Многосвязные корреляции и малые взаимодействия

В годы, предшествующие широкому распространению протон-детектируемых экспериментов, предложены многочисленные X-детектированные последовательности для установления дальней ^1H-^{13}C корреляции [59]. Этот раздел представляет наиболее широко используемую последовательность (COLOC) и кратко упоминает более современные последовательности, которые в большинстве случаев имеют превосходную эффективность.

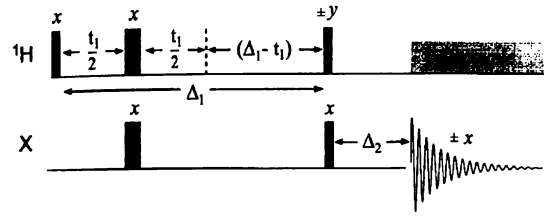


Рисунок 6.33. Последовательность COLOC для установления дальних корреляций через наблюдение X-спина.

Прямой путь для получения дальних корреляций состоит в том, чтобы оптимизировать периоды J-задержки, находящиеся в односвязной последовательности HETCOR выше, для значительно меньших дальних взаимодействий. Потенциальный недостаток этого подхода - общая длина результирующей последовательности по причине малых взаимодействий и связанных с ней потерь сигнала благодаря спиновой релаксации. Ранняя модификация, известная как COLOC (Корреляция через дальнее взаимодействие), помещает период t_1 *внутрь* задержки Δ_1 и таким образом уменьшает полную длину последовательности (рис. 6.33) [60,61]. Период t_1 теперь определяется парой 180°(H,C) импульсов, которые перемещаются через Δ_1 по мере инкрементирования t_1, такие эксперименты обычно упоминаются как «постоянно-временные» эксперименты. Детектированный сигнал модулируется протонными сдвигами, потому что, хотя он рефокусируется в течение t_1, они продолжают развиваться в *остатке* периода Δ_1, который сам зависит от t_1, таким образом, позволяя характеризацию протонных химических сдвигов. В противоположность, гомоядерные протонные взаимодействия развиваются в течение всего фиксированного периода Δ_1, независимо от положения движущегося 180° протонного импульса, что означает, что эти взаимодействия не вызывают никакой модуляции как функции t_1, и f_1 измерение удобно показывает только протонные химические сдвиги. Переносы благодаря взаимодействиям через одну связь также могут появляться в спектре COLOC, если периоды Δ_1 и Δ_2 оказываются кратными соответствующим значениям J_{CH}, и, если желательно, включение низкочастотного J-фильтра, как описано выше для HMBC, может помочь ослаблять их [62].

Большая проблема этой последовательности - влияние односвязных взаимодействий в течение рефокусирующго периода Δ_2, которые могут вести к исчезновению дальних кросс-пиков, даже когда задержки Δ_1 и Δ_2 оптимизируются для дальних взаимодействий [63]. После шага переноса поляризации векторы углеродных ядер, связанные с *взаимодействиями через одну связь* синфазные (они - *пассивные* взаимодействия, так как они не были ответственным за процесс переноса поляризации) и в течение последующего Δ_2 периода они побывают в фазе и не в фазе неоднократно под влиянием $^1J_{CH}$. Если они окажутся, по совпадению, имеющими антифазное расположение, когда начинается регистрация и применяется протонное декаплирование, векторы отменятся, и кросс-пик будет потерян. В любом случае интенсивность детектированной дальней корреляции будет модулироваться односвязным H-C

взаимодействием углерода. Чтобы удалить эти эффекты, нужно гарантировать, что эти векторы вернутся к их первоначальному синфазному расположению в конце Δ_2, но одновременно позволить первоначально антифазным векторам, *благодаря дальним взаимодействиям*, продолжать развиваться и становиться синфазными. Снова, этого можно достигнуть, помещая в средней точке Δ_2 последовательность BIRD, которая инвертирует углерод и его далеко взамодействующий протон, но не непосредственно связанный протон [64,65]. Применение кластера BIRD, таким образом, рекомендуется для всех X-детектированных методов дальней корреляции.

Обычно, оптимизация задержек Δ_1 и Δ_2 для эксперимента COLOC может быть проблематичной. Вдобавок к односвязным модуляционным эффектам, уже описанным, эффективность переноса также подвергается влиянию гомоядерными протонными взаимодействиями, развивающимися в течение Δ_1. Фиксированный период Δ_1 также ограничивает $t_{1(max)}$ ($t_{1(max)}/2 \leq \Delta_1$), который может диктовать сбор меньшего количества инкрементов, чем было бы иначе желательно, таким образом, сокращая цифровое разрешение измерения f_1. Эти проблемы обсуждались несколько подробнее в [66] и здесь же представлены 1D последовательности для оптимизации параметра. Для обычного применения, предполагается [59], что оптимизирующие задержки для $^nJ_{CH}$ = 10 Гц должны обеспечить большинство интересующих откликов, особенно при использовании последовательности BIRD в пределах рефокусирующей задержки Δ_2, это соответствует задержкам 50 мс (1l/2 $^nJ_{CH}$) и 33 мс (1/3 $^nJ_{CH}$) для Δ_1 и Δ_2 соответственно.

За эти годы предлагались и различные другие последовательности, которые обычно показывают улучшенную эффективность по сравнению с COLOC. Если гетероспин-детектирующие методы лучше всего подходят к изучению ваших молекул, обратите внимание на две последовательности - XCORFE [67] и FLOCK [68], детали которых можно найти в оригинальной литературе.

ЛИТЕРАТУРА

[1] L. Muller, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1979, **101**,4481-4484.
[2] A. Bax, R.H. Griffey and B.L. Hawkins, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **55**, 301-315.
[3] A. Bax and S. Subramanian, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **67**, 565-569.
[4] J. Cavanagh and J. Keeler, ***J. Magn. Reson.***1988,**77** 356-362.
[5] G. Bodenhausen and D.J. Ruben, ***Chem. Phys. Lett.***, 1980,**69**, 185-188.
[6] W.F. Reynolds, S. McLean, L.-L. Tay, M.Yu., R.G. Enriquez, D.M. Estwick and K.O. Pascoe, ***Magn. Reson. Chem.***, 1997,**35**,455-462.
[7] T. Parella, ***Magn. Reson. Chem.***, 1998, **36,** 467-495.
[8] J. Ruiz-Cabello, G.W. Vuister, C.T.W. Moonen, P. van Gelderen, J.S. Cohen and P.C.M. van Zijl, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **100** 282-302.
[9] G.W. Vuister, J Ruiz-Cabello and P.C.M. van Zijl, ***J. Magn. Reson.,*** 1992, **100,** 215-220.
[10] W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerrsebaum and W. Bermel, ***Magn. Reson. Chem.***, 1993, **31,** 287-292.
[11] J.R. Tolman, J. Chung and J.H. Prestegard, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **98,** 462-467.
[12] A.L. Davis, J. Keeler, E.D. Laue and D. Moskau, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **98,** 207-216.
[13] J. Boyd, N. Soffe, B. John, D. Plant and R. Hurd, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **98,** 660-664.
[14] J.R. Garbow, D.P. Weitekamp and A. Pines, ***Chem. Phys. Lett.***, 1982, **93,** 504-508.
[15] G. Otting and K. Wuthrich, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **76,** 569-574.
[16] W.F. Reynolds, M..Yu., R. G. Enriquez and I. Lean, ***Magn. Reson. Chem.***, 1997,**35**,505-519.
[17] S. Berger, T. Facke and R. Wagner, ***Magn. Reson. Chem.***, 1996,**34**,4-13.
[18] R. Benn, H. Brenneke, A. Frings, H. Lehmkuhl G. Mehler, A. Rufunska and T. Wildt, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1988, **110**, 5661-5668.

[19] E.J.M. Meier, W. Kozminski, A. Linden, P. Lustenberger and W. von Phillipsborn, ***Organomet.***, 1996, **15,** 2469-2477.
[20] D. Nanz, A. Bell, W. Kozminski, E.J.M. Meier, V. Tedesco and W. von Phillipsborn, ***Bruker Report***, 1996, **143**,29-31.
[21] H. Kessler, P. Schmeider and M. Kurz, ***J. Magn. Reson.***, 1989,**85**,400-405.
[22] T. Parella, F. Sanchez-Ferrando and A. Virgili, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **117**, 78-83.
[23] S.-I. Tate, Y. Masui and F. Inagaki, ***J. Magn. Reson.***, 1991, **94**, 625-630.
[24] T. Parella, F. Sanchez-Ferrando and A. Virgili, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **126,** 274-277.
[25] T. Parella, J. Belloc, F. Sanchez-Ferrando and A. Virgili, ***Magn. Reson. Chem.***, 1998, **36,** 715-719.
[26] T. Domke and D. Leibfritz, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **88,** 401-405.
[27] J. Stelten and D. Leibfritz, ***J. Magn. Reson.***, 1992,**99**, 170-177.
[28] J. Stelten and D. Leibfritz, ***Magn. Reson. Chem.***, 1996,**34**,951-954.
[29] M. Liu, R.D. Farrant, J.K. Nicholson and J.C. Lindon, ***J. Magn. Reson., (B)***, 1995, **106** 270-278.
[30] M. Liu, R.D. Farrant, J.K. Nicholson and J.C. Lindon, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **112,** 208-219.
[31] J.M. Schmidt and H. Ruteqans, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1990,**112**, 1279-1280.
[32] H. Kessler, P. Schmeider and H. Oshkinat, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1990, **112,** 8599-8600.
[33] U. Wollborn and D. Leibfritz, ***Magn. Reson. Chem.***, 1991,**29**,238-243.
[34] L. Lerner and A. Bax, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **69**, 375-380.
[35] D.G. Davis, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **84,** 417-424.
[36] T. Domke, ***J. Magn. Reson.***, 1991, **95**, 174-177.
[37] B.K. John, D. Plant, S.L. Heald and R.E. Hurd, ***J. Magn. Reson.***, 1991 **94,** 664-669.
[38] G. Mackin and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1996, **118,** 247-255.
[39] R.C. Crouch, A.O. Davis and G.E. Martin, ***Magn. Reson. Chem.*** 1995,**33**,889-892.
[40] T. Parella, F. Sanchez-Fenando and A. Virgili, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1995, **109,** 88-92.
[41] A. Bax, M.F. Summers, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1986, **108,** 2093-2094.
[42] M.F. Summers, L.G. Marzilli and A. Bax, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1986, **108,** 4285-4294.
[43] H. Kogler, O.W. Sorensen, G. Bodenhausen and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **55**, 157-163.
[44] T. Parella, F. Sanchez Ferrando and A. Virgili, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **112,** 241-245.
[45] P.L. Rinaldi and P.A. Keifer, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1994, **108**, 259-262.
[46] P.E. Hansen, ***Prog. Nucl. Magn Reson Spectrosc***, 1981,**14**, 179-296.
[47] J.L. Marshall, **Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR Couplings Applications to Organic Stereochemistry and Confonnational Analysis**, VCH Publishers, Florida, 1983.
[48] V.F. Bystrov, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1976, **10**,41-81.
[49] J.E. Baldwin, T.D.W. Claridge, K.C. Goh, J.W. Keeping and C.J. Schofield, ***Tetrahedron Lett.***, 1993, **34,** 5645-5648.
[50] D.M. Hodgson and P.J. Comma, ***Tetrahedron Lett.***, 1996, **37**, 5613-5614.
[51] H. Kessler, P. Schmeider, M. Kock and M. Kurz, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **88,** 615-618.
[52] M.D. Smith, T.D.W. Claridge, G.E. Tranter, M.S.P. Sansom, G.W.J. Fleet, ***J.C.S. Chem. Commun.***, 1998, 2041-2042.
[53] R.W. Dykstra, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **112**, 255-257.
[54] A. Bax and G.A. Morris, ***J. Magn. Reson.***, 1981, **42**, 501-505.
[55] K.A. Carpenter and W.F. Reynolds, ***Magn. Reson. Chem.***, 1992, **30**, 287-294.
[56] A. Bax, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **53**, 517-520.
[57] J.A. Wilde and P.H. Bolton, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **59**, 343-346.
[58] V. Rutar, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **58**, 306-310.
[59] G.E. Martin and A.S. Zektzer, ***Magn Reson Chem***, 1988,**26**,631-652
[60] H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock and H.R. Loosli, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **57**, 331-336.
[61] H. Kessler, C. Griesinger and J. Lautz, ***Angew. Chem.***, *Int. Ed. Engl.*, 1984,**23**,444-445.
[62] M. Salazar, A.S. Zektzer and G.E. Martin, ***Magn. Reson. Chem.***, 1988, **26**, 28-32.

[63] M.J. Quast, A.S. Zektzer, G.E. Martin and R.N. Castle, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **71**, 554-560.
[64] C. Bauer, R. Freeman and S. Wimperis, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **58**, 526-532.
[65] V.V. Krishnamurthy and J.E, Casida, ***Magn. Reson. Chem.***, 1987, **25**, 837-842.
[66] M. Perpick-Dumont, R.G. Enriquez, S. McLean, F.V. Puzzuoli and W.F. Reynolds, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **75**, 414-426.
[67] W.F. Reynolds, D.W. Hughes, M. Perpick-Dumont and R.G. Enriquez, ***J. Magn. Reson.***, 1985,**63**,413-417.
[68] W.F. Reynolds, S. McLean, M. Perpick Dumont and R.G. Enriquez, ***Magn. Reson. Chem.***, 1989,**27**,162-169.

Глава 7

Отделение сдвигов и взаимодействий: J-разрешающая спектроскопия

7.1. ВВЕДЕНИЕ

В отличие от методов, встречающихся в предыдущих двух главах, которые используют скалярные взаимодействия, чтобы *коррелировать химические сдвиги* взаимодействующих спинов, «J-разрешающие» эксперименты имеют цель разделять (или разрешать) химические сдвиги от скалярных взаимодействий, таким образом, позволяя химику исследовать один параметр без осложнений, возникающих от другого. Например, анализ скученных протонных спектров часто усложняется наложением соседних мультиплетов, делая выделение констант взаимодействия или точное измерение химических сдвигов трудными или даже невозможными. Это наложение ясно следует из подобий в химических сдвигах соответствующих протонов, так если бы индивидуальные мультиплеты могли бы некоторым образом показываться независимо от их сдвигов, наложение удалялось бы и, в принципе, фрагменты взаимодействий могли бы анализироваться. На практике J-разрешающие методы подвергаются множеству технических трудностей, которые могут ограничивать их эффективность в этом отношении, и поэтому эти методы нашли гораздо меньшее применение в обычной структурной работе, чем эксперименты корреляции сдвига. Один из главных источников осложнений при использовании J-разрешающих методов (сильное взаимодействие между спинами) во многих случаях может устраняться, или возможно уменьшаться до приемлемого уровня использованием более высоких напряжённостей магнитного поля. По мере того как они становятся более рутинно доступными химику-исследователю, J-разрешающие методы, возможно, более вероятно реабилитируются как полезные инструменты в арсенале химиков, а не уйдут в тень. Все методы основываются на двумерной спектроскопии, в которой параметры сдвига и взаимодействия разделяются, представляя химические сдвиги в f_2, и *только спиновые взаимодействия* в f_1, которые могут быть

Таблица 7.1. Основные применения главных методов, описанных в этой главе.

Методика	Основные применения
Гетероядерная J-разрешающая	Отделение гетероядерных взаимодействий (обычно ^{1}H-X) от химических сдвигов. Используется для определения мультиплетности гетероатома или чтобы обеспечить измерение гетероядерных констант взаимодействия.
Гомоядерная J-разрешающая	Отделение гетероядерных взаимодействий (обычно ^{1}H-^{1}H) от химических сдвигов. Используется для обеспечения прямых измерений гомоядерных констант взаимодействия или для отображения химических сдвигов резонансов без взаимодействий тонкой структуры (например, протон-декаплированные протонные спектры).
«Косвенная» гомоядерная J-разрешающая	Отделение протонных гомоядерных взаимодействий согласно химическим сдвигам присоединённых углеродных центров. Используется для обеспечения прямых измерений констант гомоядерного взаимодействия.

гетероядерными или гомоядерными взаимодействиями, в зависимости от деталей эксперимента. Основные методы этой главы суммируются в таблице 7.1. Эти методы наиболее широко изуча-

лись в ранних разработках двумерной ЯМР спектроскопии и могут быть поняты, опираясь на векторную модель, и основываясь на простых спиновых эхо. Поэтому я рекомендовал бы вам ознакомиться со спиновым эхо, прежде чем продвигаться дальше. См. раздел 2.2.

7.2. ГЕТЕРОЯДЕРНАЯ J-РАЗРЕШАЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

В гетероядерной версии эксперимента химический сдвиг X-спина представляется в f_2, в то время как взаимодействия с гетероядром, обычно с протоном, представляются в f_1. Измерение f_1, следовательно, позволяет анализ резонансной мультиплетности, также как измерения самих констант гетероядерного взаимодействия (J_{XH}), как описано далее ниже.

Чтобы уменьшить f_1 информационное содержание 2D спектра до только взаимодействий, необходимо сделать детектированные ССИ нечувствительными к эволюции химического сдвига в течение t_1 периода, что легко достигается использованием спинового эхо в течение t_1 (рис. 7.1a) [1,2]. Таким образом, после начального возбуждения X-спина применяются одновременные 180° протонные и углеродные импульсы в средней точке t_1, так что химические сдвиги X-спина будут рефокусироваться, а гетероядерное взаимодействие будет продолжать развиваться. В J-разрешающих экспериментах отсутствует «смешивающий» шаг, потому что намагничивание или перенос когерентности к другим спинам не используются. Последовательность точный 2D аналог J-модулированной 1D редактирующей последовательности, представленной в разделе 4.2, с фиксированным периодом эволюции взаимодействия, заменённым здесь переменным периодом t_1. Так как протонное декаплирование неизменно применяется в течение периода детектирования, гетероядерные X-H взаимодействия не появляются в f_2. Детектированные сигналы, следовательно, испытывают желательную чистую амплитудную модуляцию согласно эволюции гетероядерных взаимодействий в t_1 (рис. 7.2). Кроме того, спиновое эхо рефокусирует эффекты неоднородности поля, так как они просто представляют собой другой источник разностей химических сдвигов в пределах образца, что означает, что резонансы в f_1 обладают *природными* ширинами линий, то есть, они управляются T_2, а не T_2^* гетероспина [3].

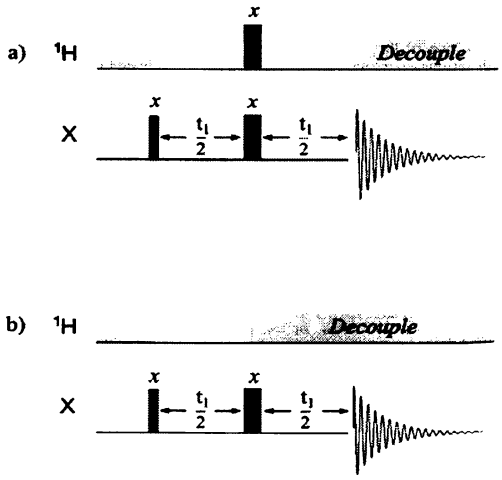


Рисунок 7.1. Методы (a) – инверсии спина и (b) - управляемого декаплинга для регистрации гетероядерных J-разрешающих спектров. В (b) эволюция взаимодействия происходит только в течение половины периода t_1, так что расщепления, наблюдаемые в f_1, оказываются с половиной их истинных значений $^1J_{XH}$.

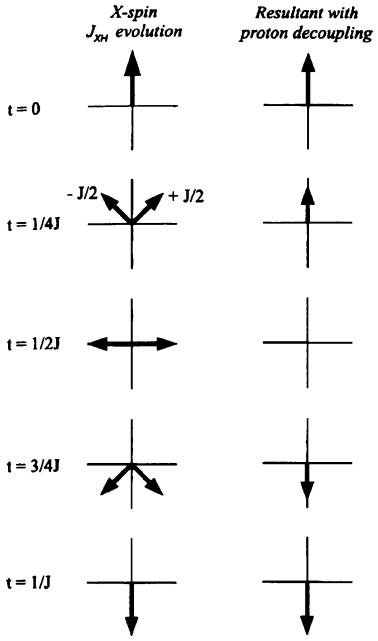
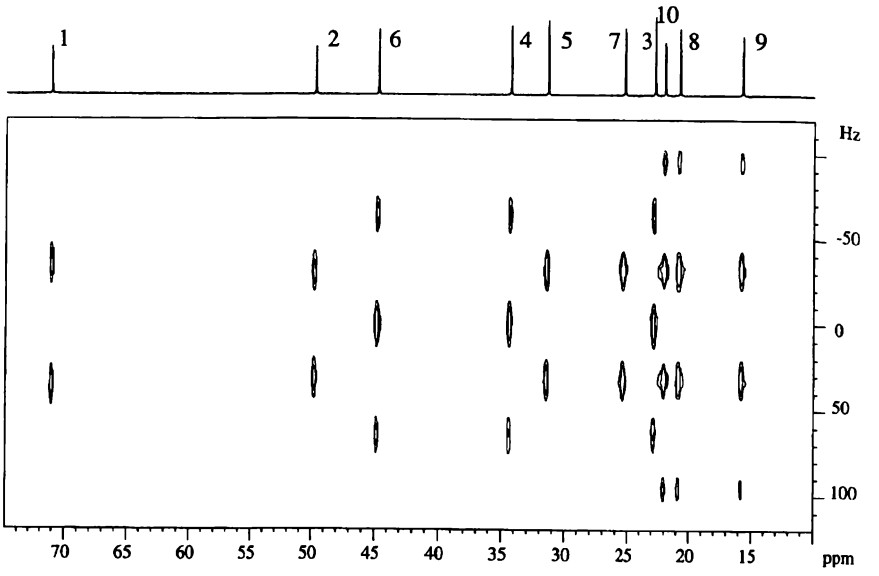
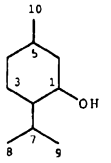


Рисунок 7.2. Амплитудная модуляция сигнала X-спина эволюцией гетероядерного взаимодействия в течение t_1, показанная для взаимодействующей пары X-H. Векторы дублета развиваются по всему t_1, но замораживаются в течение t_2 применением протонного декаплирования, так что результирующий сигнал X-спина показывает чистую амплитудную модуляцию, согласно константе гетероядерного взаимодействия.

Схема рис. 7.1a упоминается, как метод «спинового переворота» или «протонного переворота» по причине использования 180° протонного импульса. Широко используемая альтернатива - метод «управляемого декаплера» (gated decoupling) [4] (рис. 7.1b), в котором этот импульс опускается, а вместо этого применяется протонное декаплирование для одной половины периода эволюции (снова аналогично 1D методу редактирования спектра). Химические сдвиги снова рефокусируются X-импульсом, но гетероядерные взаимодействия теперь эволюционируют в течение только половины полного времени эволюции, вызывая расщепления f_1, уменьшенные вдвое (убедитесь, которую версию вы используете, если намереваетесь измерять J_{XH}!). Заметьте, что если в t_1 не применялись ни протонное декаплирование, ни протонный 180° импульс, действие одиночного X (180°) импульса не должно было бы рефокусировать гетероядерное взаимодействие в дополнение к химическим сдвигам, таким образом, предотвращая работу всего эксперимента. Притягательность метода управляемого декаплера лежит в простоте его реализации, так как не требуется никакой калибровки $^1H(180°)$, (очень важный момент, в то время, когда эти методы первоначально разрабатывались), потому что результаты лучше ведут себя в присутствие сильного взаимодействия (см. ниже), и потому что погрешностями в протонном импульсе не вводятся никакие артефакты.

Рис. 7.3 показывает ^1H-^{13}C J-разрешенный спектр ментола **7.1**. Проекция на f_2 ось производила бы обычный протонно декаплированный 1D углеродный спектр, в котором резонансы появляются как синглеты, в то время как в f_1 ясно очерчиваются углеродные мультиплетности от $^1J_{CH}$. Такой спектр представляет простой путь определения мультиплетностей, но этот подход редко используется в настоящее время, так как 1D методы редактирования спектра главы 4 предлагают более быструю альтернативу, и редактирующие гетероядерные корреляции сдвига главы 6 также более информативны. J-разрешенный спектр может оказаться полезным, когда присутствуют необычно большие значения $^1J_{CH}$, и производят неоднозначные результаты из методов редактирования спектров.





7.1

Рисунок 7.3. 125 МГц ^{1}H-^{13}C гетероядерный J-решённый спектр ментола **7.1**, над которым рнасположен обычный 1D углеродный спектр. Использовался метод управляемого декаплера рис. 7.1b, и расщепления в f_1 поэтому составляют половину их истинных значений $^{1}J_{CH}$.

Вспомните, что они полагаются на установку задержек согласно оцененным величинам J, и могут оказаться неудачными, когда использованная синхронизация далека от оптимальной, в то время как J-разрешающие методы не имеют такого требования. Более привлекательное применение для J-разрешающего эксперимента в настоящее время лежит в измерении самих констант гетероядерного взаимодействия и, в частности, в измерении дальних протон-углеродных взаимодействий, так как они могут в значительной мере использоваться в конформационных или конфигурационных исследованиях. В то время как, в принципе, можно регистрировать f_1 измерение с достаточным цифровым разрешением, чтобы разрешить малые дальние взаимодействия в присутствии далеких больших взаимодействий через одну связь (которые обычно как минимум на порядок величины больше), более продуктивным подходом является устранение $^{1}J_{CH}$ из f_1, и сохранение только $^{2/3}J_{CH}$, таким образом, *уменьшая ширину спектра* f_1, и, позволяя более точную оцифровку для более точных измерений. Множество подходов к этому представлено в следующем разделе.

Уточнения к основным последовательностям рис. 7.1 включают применение последовательностей переноса поляризации перед спиновым эхо для подготовки поперечного намагничивания X-спина. Для этой цели были предложены INEPT, DEPT [5], также как более недавний эксперимент PENDANT [6]. В дополнение к повышению чувствительности последовательности переноса поляризации позволяют увеличить частоты повторения, которые диктуются временами T_1 быстрее релаксирующих протонов. Им также можно отдавать предпочтение при изучении ядер, которые испытывают потерю интенсивности от ^{1}H-X ядерного эффекта Оверхаузера, произведенного протон-

ным декаплированием, то есть тех X-спинов, которые имеют отрицательные гиромагнитные отношения, например ^{15}N или ^{29}Si (см. главу 8). Исключение использования протонного декаплирования в течение релаксационной задержки минимизирует нарастание ЯЭО и, следовательно, потери сигнала, в то время как добавление шага переноса поляризации увеличивает чувствительность.

7.2.1. Измерение дальних протон-углеродных констант взаимодействия

Применение дальних ^1H-^{13}C констант взаимодействия в определении молекулярной конфигурации или конформации [7-9] становится всё более и более активной областью с многочисленными методами для их измерения, развитыми в последние годы. В принципе, J-разрешающие методы хорошо подходят для таких измерений, но, как правило, страдают от присутствия значительно больших $^1J_{CH}$ взаимодействий, как упоминалось выше. Обычная цель описанной ниже последовательности - устранять эти менее информативные односвязные взаимодействия ^1H-^{13}C из f_1 и таким образом уменьшить соответствующую ширину спектра. Так как $^1J_{CH}$ значения больше чем 125 Гц, в то время как дальние взаимодействия обычно меньше, чем 10 Гц, можно сделать существенные уменьшения ширины спектра f_1, что позволяет достигать более высокого цифрового разрешения и обеспечивать точную характеризацию остальных $^nJ_{CH}$ значений без необходимости собирать предельно большие наборы данных, требующие временных затрат. Описания преднамеренно кратки, но служат цели иллюстрировать самые полезные подходы.

Полуселективная последовательность

Помещая кластер BIRD (раздел 6.3) с фазами протонного импульса x, x,-x в средней точке t_1 на месте одновременных 180° импульсов метода спинового переворота (рис. 7.4a), можно инвертировать только те протоны, которые разделяют дальние взаимодействия, оставляя прямо связанные с ^{13}C спином незатронутыми.

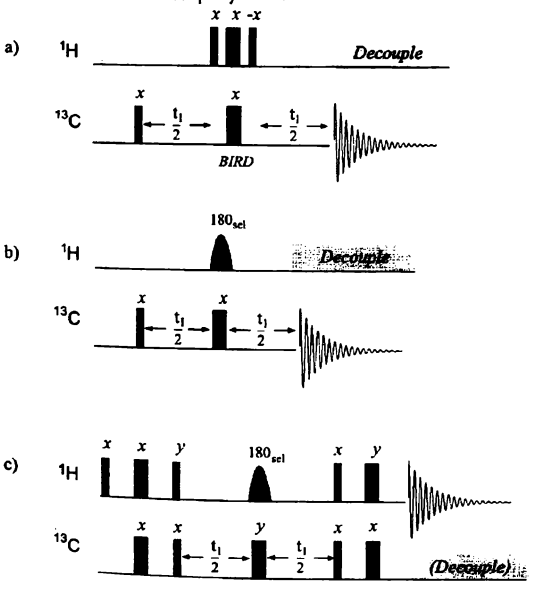
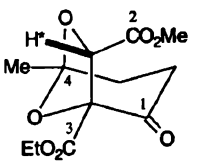


Рисунок 7.4. Гетероядерные J-разрешающие последовательности для измерения дальних протон-углеродных констант взаимодействия; (a) - полу-селективная, (b) - селективная и (c) - селективная с наблюдением протонов (см. текст).

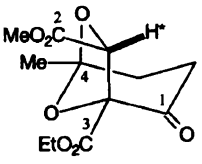
Это вызывает селективное рефокусирование взаимодействий через одну связь $^{13}C(180°)$ импульсом, и таким образом удаление их из f_1, в то время как дальние взаимодействия остаются [10,11]. Следы f_1 отображают *все* $^nJ_{CH}$ значения, связанные с каждым углеродом, и могут, таким образом, обладать весьма сложной тонкой структурой, так как каждый углерод, вероятно, может взаимодействовать со многими протонами. Такая сложность может сама предотвращать измерение констант взаимодействия и не позволять получение какой-либо информации, по которой спиновые пары делают доступными специфические взаимодействия.

Селективная последовательность

Чтобы упрощать тонкую структуру, появляющуюся в f_1, можно селективно инвертировать резонанс только одного протона в течение t_1, заботясь, чтобы избегать инвертирования его односвязных ^{13}C спутников. Это требует применения селективного $^1H(180°)$ импульса на месте обычного «жёсткого» импульса в методе спинового переворота (рис. 7.4b). В этом случае все взаимодействия будут рефокусироваться и, следовательно, удаляться из f_1, за исключением тех, которые происходят с выборочно инвертированным протоном (или протонами) [12]. Измерение f_1, следовательно, показывает только простые мультиплеты (дублеты, триплеты или квартеты, зависящие от выбранной группы протонов) и взаимодействующие пары, вызывающие каждое взаимодействие, легко идентифицируются. Это было одним из подходов, использованных для измерения дальних взаимодействий с узловым мостиковым протоном, в ряду структур связанных с **7.2**, в попытке определять неизвестную стереохимию мостика и, таким образом, различать *эндо* и *экзо* продукты.



7.2 *endo*



7.2 *exo*

		Carbon			
		1	**2**	**3**	**4**
$^nJ_{CH}$ /Hz	*exo* = 3.4	1.9	0.5	3.9	
	endo = 5.9	2.7	2.8	1.0	

7.2

Недостаток ЯЭО на узловых мостиковых протонах не обеспечивает однозначного определения, поэтому дальние взаимодействия в неизвестных продуктах сравнивались с взаимодействиями в структурах известной конфигурации. Рис. 7.5 показывает участок одного такого спектра, в котором эти взаимодействия измерялись из дублетных расщеплений f_1. Это требует, чтобы интересующие протоны были достаточно разрешенными, и потребуются многочисленные эксперименты, если

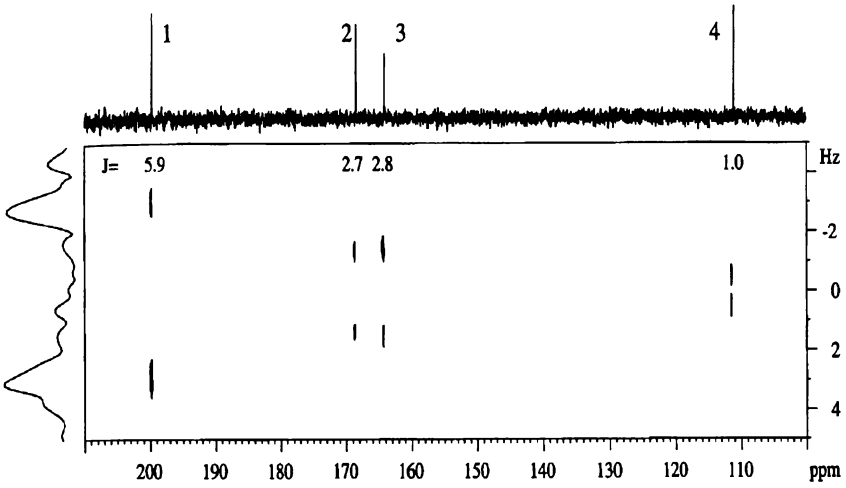


Рисунок 7.5. Область селективного гетероядерного J-разрешенного спектра **7.2**. Дальние гетероядерные взаимодействия с выбранным протоном появляются как расщепления в f_1, значения которых показаны. Вертикальные следы берутся через резонанс при 199 мд. 4К t_1 точек данных собирались для 32 инкрементов t_1 по спектральным ширинам 100 мд и 14 Гц соответственно. Гауссов 180 ° импульс 100 мс использовался для выбора протонного резонанса. Конечное разрешение f_1 после дополнения нулями составляло 0,1 Гц/точка

должны определяться многие $^nJ_{CH}$ значения. Это, однако, широко использовалось в измерении дальних констант взаимодействия в моносахаридных единицах [13], а другие варианты включили INEPT [14] и DEPT [15] последовательности для усиления чувствительности.

Селективная последовательность с протонным детектированием

Дальние взаимодействия могут также наблюдаться через наблюдение участвующего протона, приводя к существенным повышениям чувствительности. Изящный путь выполнения протон-детектируемого эксперимента основывается на простой модификации HSQC последовательности, представленной в разделе 6.3, и может выполняться как фазочувствительный эксперимент с импульсными градиентами поля или без них [6] (рис. 7.4с). Неселективный $^1H(180°)$ инвертирующий импульс в пределах t_1 (который служит для рефокусирования гетероядерных взаимодействий в HSQC) здесь сделан селективным, и добавляется одновременный неселективный $^{13}C(180°)$ импульс, производящий спиновое эхо в течение t_1, по проекту и работе аналогичный селективному эксперименту, представленному выше. Шаг переноса поляризации после t_1 переносит намагниченность назад на протоны для детектирования через их односвязное протон-углеродное взаимодействие. Образующийся спектр, таким образом, показывает нормальный ^1H спектр в f_2 и $^nJ_{CH}$ дублеты в f_1. Эти взаимодействия происходят от выборочно инвертированного протона с углеродом, присоединённым к протону при химическом сдвиге f_2 (рис. 7.6), поэтому измерения ограничиваются дальними взаимодействиями только с протонированными углеродами. Опять, можно идентифицировать спиновую пару, вызывающую взаимодействие, полагая, что целевой протон достаточно хорошо разрешён, чтобы инвертироваться селективно.

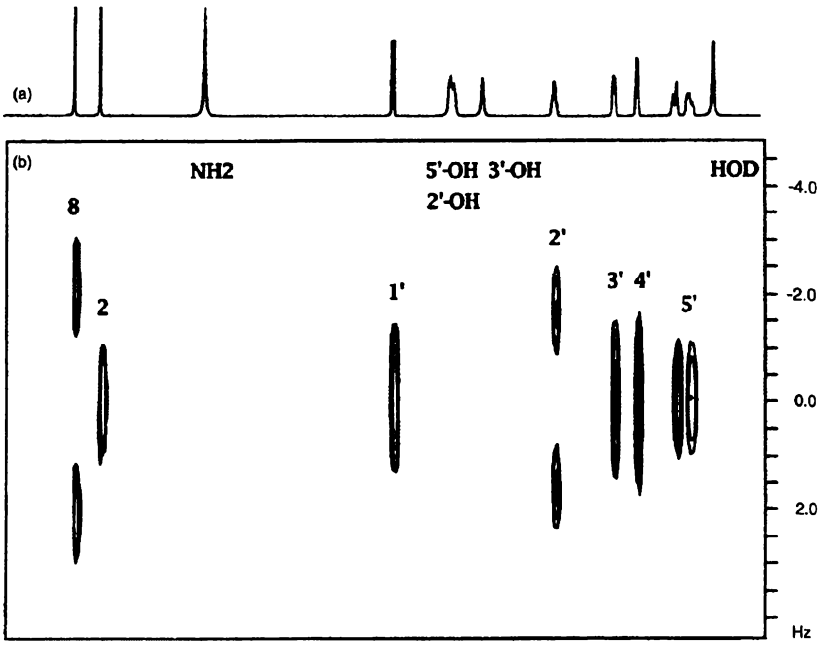
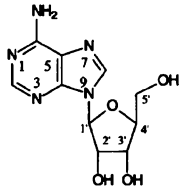


Рисунок 7.6. Протон-детектированный селективный гетероядерный J-разрешенный спектр аденозина **7.3**. Протон H1 селективно инвертировался, а дублетные расщепления в f_1 регистрируют его дальние взаимодействия с C8 и C2' (воспроизведено с разрешения от ссылки [6]).



7.3

7.2.2. Практические соображения

Требования для различения знака в f_1 для J-разрешающих экспериментов рис. 7.1 легко выполняются в *системе первого порядка*, потому что мультиплеты симметричны относительно их центров и поэтому завороты относительно $f_1 = 0$ не вызывают недоумения. Циклирование фазы для квадратурного детектирования f_1, следовательно, ненужно. Так как в присутствии широкополосного декаплирования детектированные сигналы испытывают чистую амплитудную модуляцию, также могут получаться чистые фазовые спектры. Однако когда система не удовлетворяет условиям первого порядка, то есть ***в присутствие сильного взаимодействия между протонами*** (более точно, между теми протонами, которые вызывают ^{13}C спутники, и другими), H-X мультиплеты теряют их симметрию, и детектируемые сигналы испытывают некоторую фазовую модуляцию, которая, в свою очередь, вносит в спектр вклады дисперсного вида. В этом случае спектр 2D может представляться в режиме абсолютных значений, чтобы маскировать фазовые искажения, или альтернативно, после преобразования f_1, могут выделяться столбцы из 2D набора данных при химическом сдвиге интересующего резонанса и обрабатываться отдельно, как 1D следы. Несмотря на

полный дисперсный вклад в 2D форму линии, отдельный столбец показывает характеристики режима поглощения. Дальнейшие осложнения для метода спинового переворота возникают в присутствии сильного взаимодействия [1].

Качество J-разрешающих спектров может серьёзно компроментироваться недостатками в точности импульсов, (особенно 180° импульсов), возникающих от некалиброванности импульса, РЧ неоднородности, и вне-резонансных эффектов. Результат - появление множества дополнительных слабых резонансов в случайных положениях в спектре, упоминающиеся как «призраки» и «фантомы». Призраки являются результатом несовершенств 180° рефокусирующего импульса, таких что некоторая поперечная намагниченность будет не в состоянии испытывать эффект импульса, и, таким образом, будет не в состоянии рефокусироваться. Фантомы являются результатом комбинированных недостатков в 90° и 180° импульсах, вызывающих существование остаточной продольной намагниченности после 90° импульса, которая становится поперечной после следующего несовершенного 180° импульса. Эти ложные отклики могут устраняться фазовым циклом EXORCYCLE [16], который широко используется в последовательностях, которые используют спиновые эхо. Это включает продвижение фазы рефокусирующего импульса X-спина через *x, y,-x,-y*, в то время как приемник инвертируется, то есть его фаза изменяется ступенчато в очерёдности *x,-x, x,-x*. Ступенчатое продвижение фазы рефокусирующего импульса (шагами по 90°) вызывает сдвиг эхо по фазе на 180°, как объясняется в разделе 2.2, следовательно, инверсия приемника следует за эхо, в то время как нежелательные отклики, в конечном счете, отменяются. Недостатков протонного 180° инвертирующего импульса [17] можно избегать использованием метода управляемого декаплинга, но где это невозможно, как в случае гомоядерных J-разрешающих экспериментов, которые следуют, рекомендуется применять составной 180° импульс, такой как $90_x240_y90_x$ [18].

Практическая постановка эксперимента

Оцифровка данных, в частности число инкрементов t_1, которые необходимы, будет диктоваться информацией, требуемой от спектра. Если просто желают определять мультиплетности, достаточно использования низкого цифрового разрешения, позволяя выполнение немногих инкрементов и быстрый сбор данных. Для углерода-13 самые широкие мультиплеты являются результатом квартетов метильных групп, поэтому f_1 ширина спектра должна быть приблизительно в 3,2 раза больше $^1J_{XH}$ (хотя было бы возможно уменьшать ширину спектра далее и преднамеренно заворачивать внешние линии квартетов). Это требование может полезно уменьшаться с коэффициентом два для метода управляемого декаплера до около 200 Гц, принимая константу взаимодействия 125 Гц.

Чтобы просто характеризовать мультиплетную структуру, должно быть достаточно цифрового разрешения в f_1 около 20 Гц/точка, требуя всего 20 инкрементов. Если желают измерять значение $^1J_{CH}$ мультиплетной структуры, было бы более подходящим цифровое разрешение несколько меньше, чем 5 Гц/точка. Приблизительно 200 инкрементов требовались бы для 2 Гц/точка, что вело бы к значительно более длинному эксперименту, особенно если требуется много сканирований на инкремент по причинам чувствительности. Если требуется даже более точная оцифровка для измерения *дальних* взаимодействий, этот подход становится невозможным. В противоположность, при использовании одного из селективных методов для $^nJ_{CH}$ можно иметь необходимость оцифровывать только окно 10 Гц, что требует только 40 инкрементов для 0,5 Гц/точка. После преобразования в f_2 столбцы могут выделяться из 2D набора данных и обрабатываться как 1D ССИ, включая применение дополнения нулями для дальнейшего улучшения измерений.

7.3. ГОМОЯДЕРНАЯ J-РАЗРЕШАЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Гомоядерная версия J-разрешающего эксперимента [19] наиболее часто применяется в протонной спектроскопии, хотя подходит для любого распространённого ядра. В принципе, разделение δ и J должно показать протонные мультиплеты в f_1, свободном от наложения, и, таким образом, доступными для анализа, и синглеты в f_2 при соответствующих химических сдвигах, так что проекция f_2 представляет «широкополосно протонно декаплированный протонный спектр». Возможность генерирования такого спектра имеет очевидную привлекательность, позволяя точное измерение химических сдвигов даже в наиболее сильно скученных протонных спектрах. Однако, увы, не слишком легко преодолевается множество технических трудностей, которые приходится преодолевать, при достижении этой цели. Второе возможное применение находится в измерении самих гомоядерных констант взаимодействия, которое будет возможно в рамках некоторых предостережений, и будет кратко детализироваться в дальнейшем.

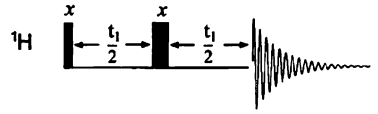


Рисунок 7.7. Гомоядерный J-разрешающий эксперимент. 180° импульс в средней точке t_1 рефокусирует протонные сдвиги, но не гомоядерные взаимодействия, поэтому только они появляются в f_1.

Гомоядерная последовательность (рис. 7.7) очень похожа на гетероядерные методы (хотя ограничивается только версией спинового переворота), и использует схему EXORCYCLE.

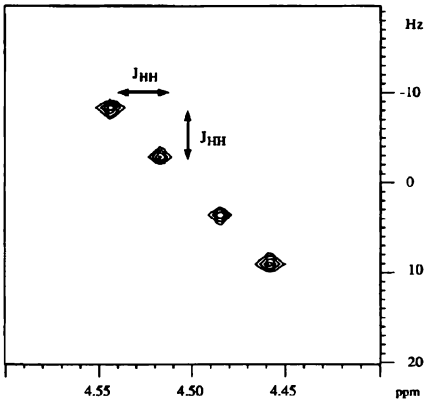


Рисунок 7.8. Мультиплет из гомоядерного J-разрешающего эксперимента, показывающий характерный наклон, вызванный присутствием протонных взаимодействий и в f_1, и в f_2.

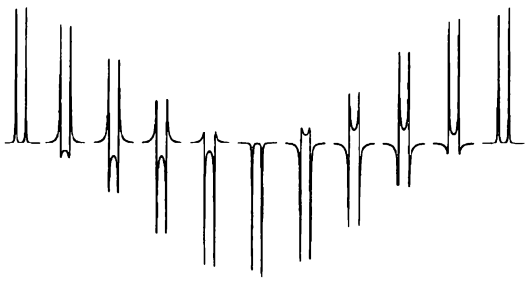


Рисунок 7.9. Фазовая модуляция протонного дублета как функция времени. Сигналы сохраняют полную интенсивность всегда (например, они не испытывают амплитудной модуляции), но каждая линия испытывает полное 360° изменение фазы в течение последовательности. Результаты показываются для дублета 10 Гц со временами эволюции от 0 до 200 мс инкрементами по 20 мс.

Внешний вид гомоядерного спектра фундаментально отличается от его гетероядерного эквивалента и в химических сдвигах, *и во взаимодействиях*, появляющихся в f_2 (потому что ***нельзя одновременно широкополосно декаплировать и наблюдать протонный спектр***). Таким образом, вместо того, чтобы располагаться параллельно оси f_1, протонные мультиплеты появляются

вдоль наклонной -1 (в единицах Гц), или, другими словами, находятся под 45° к обеим осям (полагая одинаковый масштаб графика для обоих измерений, рис. 7.8). Столбцы, параллельные f_1, следовательно, не отображает ожидаемых протонных мультиплетов, а проекция f_2 показывает и химические сдвиги, и скалярные взаимодействия. Чтобы преодолеть эти недостатки, рутинно применялась методы последующей обработки, как описано в следующем разделе. Кроме того, в отличие от гетероядерного случая, детектируемые сигналы неизбежно испытывают *фазовую модуляцию*, как функцию t_1 (рис. 7.9), вызывая фазово искажённые формы линии. Спектры поэтому обычно представляются как данные абсолютного значения после сильного улучшения разрешения и вычисления магнитуды. Дальнейшие осложнения возникают в присутствии сильного взаимодействия между протонами в форме дополнительных откликов (см. ниже), так что ***J-разрешающий эксперимент наиболее подходит для перекрывающихся спектров, которые ещё относятся к первому порядку.***

7.3.1. Наклон, проекции и симметризация

Чтобы достичь конечной цели сохранения только химических сдвигов в f_2, можно устранить взаимодействия из этого измерения, «наклоняя» (или «причёсывая») мультиплеты на угол 45° относительно их центров [20], как схематично показано на рисунке 7.10. Программное обеспечение для этого процесса - обычные в настоящее время пакеты для обработки данных ЯМР Образующийся спектр тогда имеет вид подобный гетероядерному аналогу со столбцами, параллельными f_1, воспроизводящими мультиплетные структуры (при условии, что выполняется вычисление магнитуды), и проекция на f_2 ось производит широкополосно-декаплированный протонный спектр (рис. 7.11). Рис. 7.12 сравнивает следы, взятые из этого J-разрешающего спектра с эквивалентными мультиплетами 1D протонного спектра, и иллюстрирует тонкое разрешение мультиплетной структуры, которое может получаться в f_1 измерении.

Дальнейшие улучшения в виде уменьшения t_1 шума также могут достигаться дополнительной последующей обработкой. Прежде процедуры наклона полосы t_1 шума будут лежать параллельно оси f_1, как для всех 2D экспериментов, в то время как после наклона они будут находиться под 45° к ней. В системах первого и более высокого порядка сами мультиплеты будут симметричными относительно линии $f_1 = 0$ Гц после наклона [21]. Если весь набор данных симметризовался относительно этой линии, то есть, точка более низкой интенсивности для симметрично связанных точек данных, заменяет более интенсивные, мультиплеты сохранялись бы, в то время как вклады от наклонного t_1 шума будут уменьшаться [22]. Процедура подобна той, которая представлена в разделе 5.3.3 для уменьшения t_1 шума спектров COSY абсолютного значения, хотя, конечно, требуется другая процедура симметризации, и снова нужно иметь в виду возможность введения артефактов в спектр в результате самой симметризации. Снова, эти программы обычны для современных пакетов обработки данных ЯМР.

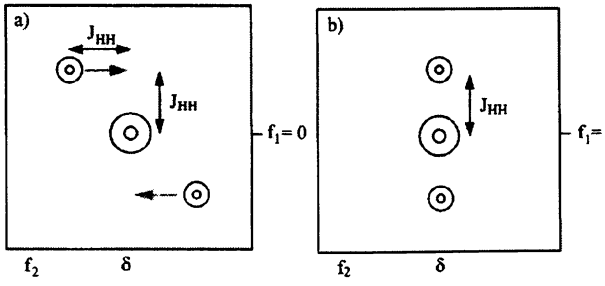
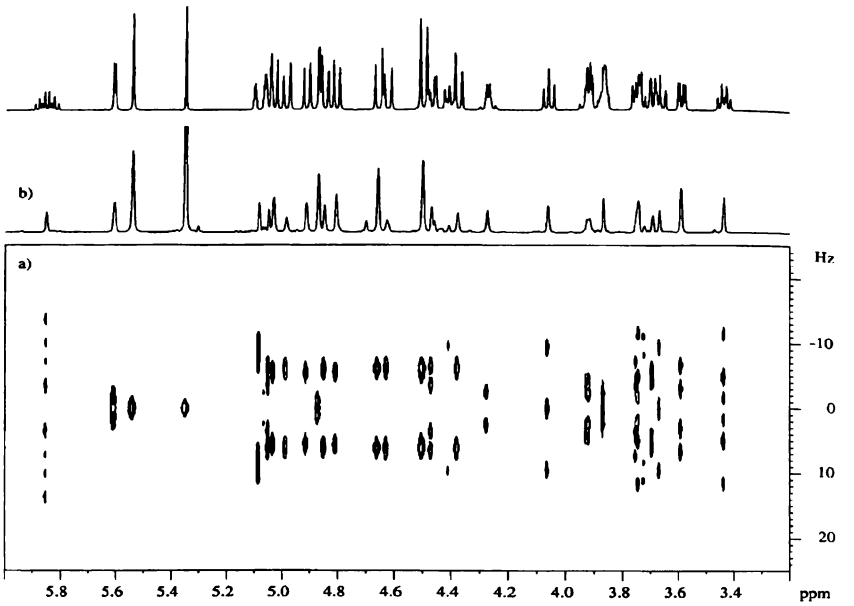
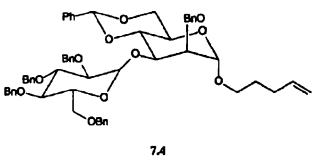


Рисунок 7.10. Схематическая иллюстрация процедуры наклона для устранения гомоядерных взаимодействий из измерения f_2. (a) - Первоначальная мультиплетная структура и (b) - после процедуры наклона.





7.4

Рисунок 7.11. (a) Протонный гомоядерный J-разрешающий спектр 500 МГц 7.4 (после наклона и симметризации). Проекция f_2 (b) аппроксимирует «протонно-декаплированный протонный спектр», и значительно менее сложный, чем обычный 1D спектр (c). 4K t_2 точек данных получались для 64 инкрементов t_1 при спектральных ширинах 5 мд и 60 Гц, соответственно. Конечное разрешение f_1 после дополнения нулями было 0,5 Гц/точка. Данные обрабатывались несдвинутыми синусно-колоколообразными окнами в обоих измерениях и представляются в режиме абсолютных значений.

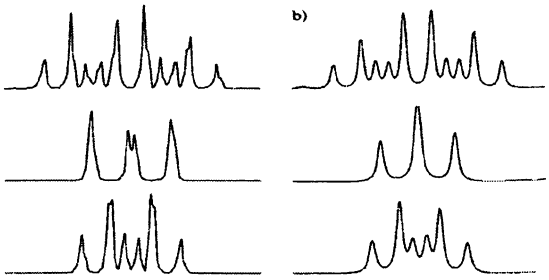


Рисунок 7.12. (a) Избранные следы f_1, взятые из J-разрешающего спектра рис. 7.11 и (b) эквивалентные мультиплеты из 1D протонного спектра.

7.3.2. Применения

Возможно наиболее очевидное применение гомоядерного J-разрешающего эксперимента - разделение перекрывающихся мультиплетов, так что может анализироваться тонкая структура внутри каждого из них. Для успешного разделения сдвигов и взаимодействий имеется, однако, строгое требование, что спиновые системы должны быть первого порядка [21], потому что сильное взаимодействие вызывает появление нежелательных дополнительных откликов на полпути между сдвигами сильно связанных протонов. Чтобы уменьшить степень сильного взаимодействия в спек-

трах, рекомендуется применение самой высокой доступной напряжённости поля для J-разрешающей спектроскопии везде, где возможно. Рис. 7.13 показывает симулированные спектры для трехспиновой системы при напряжённостях полей 200 и 600 МГц. При более низком поле (Рис. 7 13a), связанные протоны при 3,7 и 3,8 мд (J = 12 Гц) испытывают сильное взаимодействие, что очевидно из эффекта «крыши» их 1D резонансов, что вызывает дополнительные отклики между ними в J-разрешенном спектре. Никакие подобные артефакты не связаны с резонансом при 4,5 мд, который испытывает только взаимодействие первого порядка с его партнерами. В противоположность, более высокополевой спектр (Рис. 7 13b) не показывает никаких дополнительных откликов, так как все взаимодействия теперь (приблизительно) первого порядка.

Гомоядерный J-разрешающий спектр может также помогать в измерении протонных *гетероядерных взаимодействий*, особенно когда существует взаимодействие с гетероядром высокой распространённости, таким как ^{31}P или ^{19}F. Так как только протон связанной гетероядерной пары испытает 180° импульс, гетероядерное взаимодействие рефокусируется в f_1 и, следовательно, отсутствует в f_1. Это взаимодействие будет, тем не менее, действовать в течение детектирования протонного ССИ и будет, таким образом, появляться в f_2. Так как это гетероядерное расщепление сидит *параллельно* оси f_2, а не под 45° к ней, оно *не удаляется* из этого измерения процессом наклона и может, таким образом, изучаться без наложения гомоядерных протонных взаимодействий по f_2.

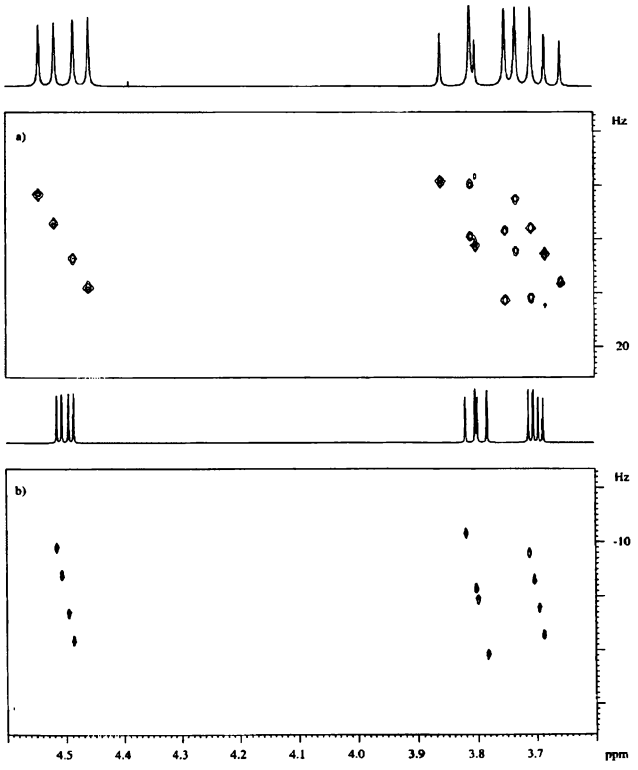
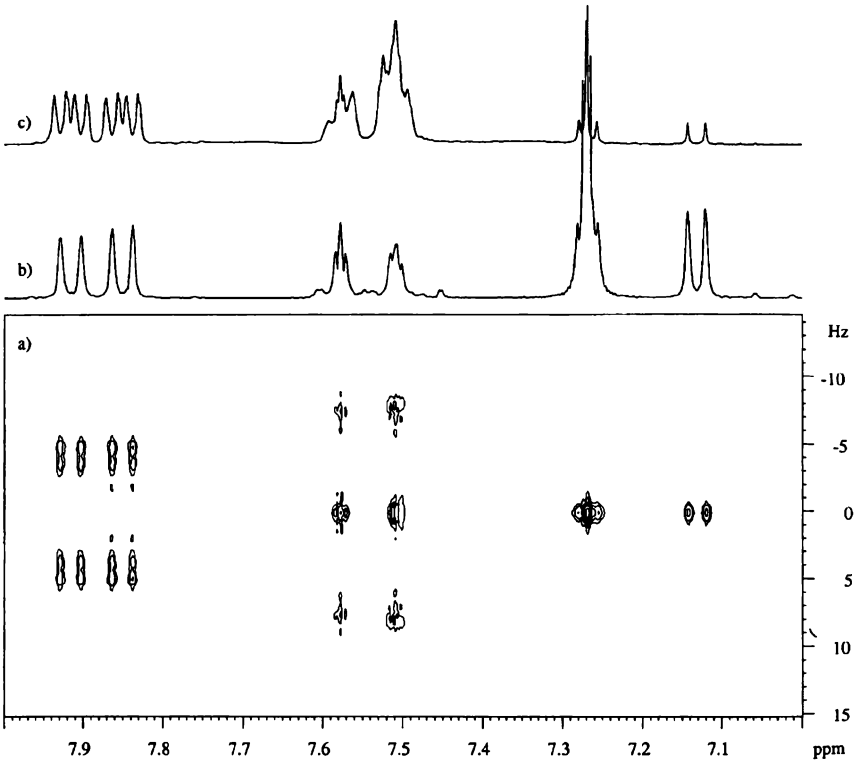
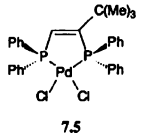


Рисунок 7.13. Симулированный 2D гомоядерный J-разрешающий и 1D спектры для трехспиновой протонной системы при (a) 200 и (b) 600 МГц. Дополнительные артефакты в (a) являются результатом сильного взаимодействия между двумя низкочастотными протонами (никакой наклон не применялся).

Рис. 7.14 демонстрирует этот подход для комплекса фосфина палладия **7.5**. Проекция f_2 наклоненного спектра содержит расщепления для ^1H-^{31}P взаимодействий только при каждом протонном сдвиге, как наиболее ясно видно для фенильных *орто*-протонов при 7,85 и 7,92 мд. Эти данные могут использоваться в дополнение к 1D протонно-декаплированному спектру X-спинов, в котором протон-протонные взаимодействия наблюдаются без вмешательства спиновых взаимодействий H-X (для сравнения см. рисунок 4.12 из раздела 4.2 для того же самого комплекса).





7.5

Рисунок 7.14. Измерение протонных гетероядерных взаимодействий из наклоненного гомоядерного J-разрешающего спектра (a). Спектр (b) - f_2 проекция (a) и показывает только протонные сдвиги и ^1H-^{31}P взаимодействие. Спектр (c) - обычный 1D спектр показывает и сдвиги, и ^1H-^1H и ^1H-^{31}P взаимодействия.

Если желательно, гетероядерные взаимодействия могут также удаляться из J-разрешенного спектра применением широкополосного декаплирования X-спина в течение времени регистрации. Для измерения гетероядерных взаимодействий ряды, взятые параллельно f_2 через мультиплетные компоненты, обеспечивают лучшее разрешение, чем сама проекция.

Возможность регистрации «широкополосно гомоядерно декаплированных спектров» также упоминалась выше и показана на рисунке 7.11. Простой J-разрешающий эксперимент имеет тенденцию переменного успеха в этом отношении вследствие наложений от сильного взаимодействия, плохих форм линий и ограниченного получаемого разрешения, и потому что интенсивности сигналов в проектируемом спектре имеют малое отношение к интенсивности сигнала в обычном 1D

спектре. Больший успех снова ожидается на более высокополевых приборах, но в любом случае требуется осторожность в интерпретации таких данных. Более изощрённая обработка данных [23,24], основанная на процедурах распознавания фрагмента, кажется, обещает некоторую надежду относительно надежного достижения этой цели, но требуемый алгоритм ещё должен войти в широкое применение.

7.3.3. Практические соображения

Многие из практических соображений, приведённые выше для гетероядерной J-спектроскопии, равно применимы к гомоядерному случаю, и выбор цифрового разрешения в f_1 следует подобным соображениям, как и прежде. Большинство протонных мультиплетов будет редко превышать ширину 50 Гц (хотя таковые для других нуклидов со многими гомоядерными взаимодействиями могут это делать), поэтому, по крайней мере для протонной спектроскопии, ширина спектра f_1, равная этой, будет достаточна. Использование 64 или 128 t_1 инкрементов, следовательно, обеспечит f_1 разрешение 1,6 и 0,8 Гц/точка, соответственно. Использование много большего количества инкрементов, чем это, вызывает применение довольно длинных t_1, что означает потери релаксации станут существенными. Из-за применения вычисления абсолютного значения в обоих измерениях следует применять сильные функции улучшения разрешения, такие как несдвинутые синусные колокола.

7.4. «КОСВЕННАЯ» ГОМОЯДЕРНАЯ J-РАЗРЕШАЮЩАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Альтернативный подход к разрешению протонных мультиплетов – «растягивать» их относительно химического сдвига углеродного ядра, к которому протоны присоединяются, а не относительно химического сдвига самих протонов [25]. Преимущество этого подхода обычно лежит в большей дисперсии углеродных химических сдвигов, хотя нужно допускать пониженную чувствительность наблюдения углерода.

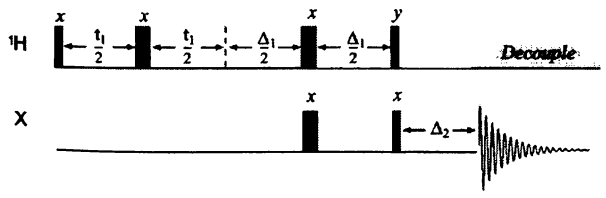


Рисунок 7.15. Косвенная гомоядерная J-разрешающая последовательность. Протонные взаимодействия действуют в течение t_1, после чего перенос поляризации ведёт к наблюдению X-спинов.

Последовательность, которая достигает этого (рис. 7.15) простой вариант основанной на INEPT гетероядерной последовательности корреляции сдвига рис. 6.31 (HETCOR), так что потеря чувствительности несколько компенсируется использованием шага переноса поляризации. Фактически единственное различие между ними лежит в чистой эволюции *только сдвигов* или *только взаимодействия* в течение всего t_1. Добавление протонного 180° импульса в средней точке t_1 здесь служит, чтобы рефокусировать протонные химические сдвиги и константы гетероядерного взаимодействия (так что 180° импульс X-спина из HETCOR становится лишним), но позволяет свободно развиваться протонным гомоядерным взаимодействиям. Образующийся спектр, поэтому

содержит в f_1 только протонные мультиплеты, растянутые соответствующими сдвигами X-спинов в f_2 (рис. 7.16) [12].

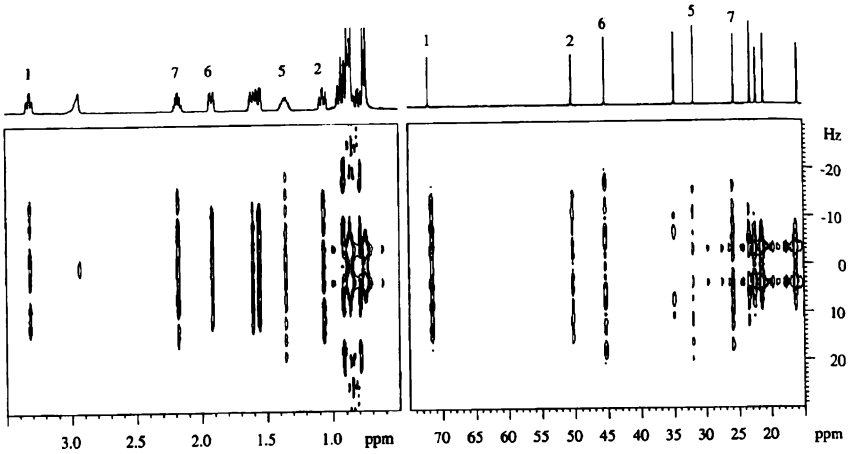


Рисунок 7.16. Прямой гомоядерный J-разрешенный спектр и косвенный гомоядерный J-разрешенный спектр **7.1.** Оба эксперимента представляют гомоядерные взаимодействия в f_1, растянутые или протонным, или углеродным химическим сдвигом, соответственно.

Снова, сильное взаимодействие, на сей раз между протонными спутниками, вызывает проблемы. Кроме того, так как нужно рассматривать *спутники* каждого протона, а не сам родительский резонанс растворителя (так как только спутники могут делать вклад в перенос поляризации), мультиплетные фрагменты, наблюдаемые для систем высшего порядка, могут отличаться от таковых родительского резонанса в 1D спектре. Другие осложнения встречаются в случае неэквивалентных геминальных протонов, так как каждый из них может обладать различными мультиплетными фрагментами, но оба будут наблюдаться при том же самом углеродном химическом сдвиге, потенциально приводя к наложению сложных мультиплетов (это очевидно для H6 протонов в косвенном спектре рис. 7.16). Наиболее вероятное применение этого варианта находится в разделении фрагментов мультиплетов протонов, имеющих совпадающие вырожденные химические сдвиги, которые поэтому неразделимы в обычной гомоядерной версии.

Литература

[1] G. Bodenhausen, G.A. Morris, R. Freeman and D.L. Turner, ***J. Magn. Reson.***, 1977, **28**, 17-28.
[2] L. Muller, A. Kumar and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1977, **25**, 383-390.
[3] G. Bodenhausen, R. Freeman, R. Niedermeyer and D.L. Turner, ***J. Magn. Reson.***, 1976, **24**, 291-294.
[4] R. Freeman, G.A. Morris and D.L. Turner, ***J. Magn. Reson.***, 1977, **26**, 373-378.

[12] Обратите внимание на подобие здесь с подходом, использованным в последовательности 7.4c, в которой основная HSQC последовательность корреляции сдвига адаптировались для измерения дальних гетероядерных взаимодействий. В обоих случаях период эволюции химического сдвига последовательности корреляции сдвига преобразуется в один, в котором активны только взаимодействия (использованием спиновых эхо), таким образом, создавая J-разрешающий эксперимент. Часто тонкие изменения, которые включают в себя добавление или удаление одного или двух стратегически размещённых импульса, это всё, что требуется, чтобы изменить характеристики образующегося спектра, производя «новую» импульсную последовательность (которая может быть или не быть полезной химику). Это частично делает вклад в многообразие импульсных последовательностей ЯМР, находящихся во всей химической литературе.

[5] V. Rutar and T.C. Wong, ***J. Magn. Reson.***, 1983, 53, 495-499.
[6] M.L. Liu, R.D. Farrant, J.M. Gillam, J.K. Nicholson and J.C. Lindon, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1995, **109,** 275-283.
[7] V.F. Bystrov, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*** , 1976, **10**,41-81.
[8] P.E. Hansen, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1981, **14,** 179-296.
[9] J.L. Marshall, **Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR Couplings Applications to Organic Stereochemistry and Conformational Analysis**, VCH Publishers, Florida, 1983.
[10] A. Bax, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **52**, 330-334.
[11] V. Rutar, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **56,** 87-100.
[12] A. Bax and R. Freeman, ***J. Am. Chem. Soc.*** , 1982, **104,** 1099-1100.
[13] C. Moral, F.R. Taravel and M.R. Vignon, ***Magn. Reson. Chem.***, 1988,**26**,264-270.
[14] T. Jippo, O. Kamo and K. Nagayama, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **66,** 344-348.
[15] D. Uhrin, T. Liptaj, M. Hricovini and P. Capek, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **85**, 137-140.
[16] G. Bodenhausen, R. Freeman and D.L. Turner, ***J. Magn. Reson.***, 1977, **27**, 511-514.
[17] G. Bodenhausen and D.L. Turner, ***J. Magn. Reson.***, 1980, **41,** 200-206.
[18] R. Freeman and J. Keeler, ***J. Magn. Reson.***, 1981, **43**, 484-487.
[19] W.P. Aue, J Karhan and R.R. Ernst, ***J Chem Phys***, 1976, **64,** 4226-4227
[20] K. Nagayama, P. Bachmann, K. Wuthrich and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1978, **31,** 133-148.
[21] G. Bodenhausen, R. Freeman, G.A. Morris and D.L. Turner, ***J. Magn. Reson.***, 1978, **31,** 75-95.
[22] J.D. Mersh and J.K.M. Sanders, ***J. Magn. Reson.***, 1982,**50**, 171-174.
[23] M. Woodley and R. Freeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1994, **109,** 103-112.
[24] M. Woodley and R. Freeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1994, **111,** 225-228.
[25] G.A. Morris, ***J. Magn. Reson.*** , 1981, **44**, 277-284.

Глава 8

Корреляции через пространство: ядерный эффект Оверхаузера

8.1. ВВЕДЕНИЕ

Предыдущие три главы в этой книге касались *скалярных взаимодействий* между ядрами, то есть, косвенных взаимодействий, которые передаются через промежуточные электронные спины, подобные тем, которые находятся в химических связях. Мы видели, что, применяя подходящие методы, химик может использовать эту информацию о взаимодействиях и складывать вместе молекулярные фрагменты и, в конечном счете, молекулярные брутто структуры. В этой главе мы коснемся совершенно другой формы взаимодействия между ядерными спинами, это прямые магнитные взаимодействия через пространство *(дипольные взаимодействия)*, которые вызывают ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО). Он вызывает изменения в интенсивностях резонанса и, как мы обнаружим, близко связан с релаксацией ядерного спина. ЯЭО типично используется на последних стадиях структурного исследования, когда общая структура молекулы уже была (в значительной степени) определена путём применения различных методов, описанных в четырех предшествующих главах. Важность ЯЭО в современном доказательстве структуры может сильно преувеличиваться. Он уникален в его способности обеспечивать химика информацией о трехмерной геометрии молекулы. Такую информацию можно получать, благодаря тому, что ЯЭО зависит от межъядерных расстояний (среди других факторов), так что только те спины, которые «близки» в пространстве, способны проявлять этот эффект.

ЯЭО также находит широкое использование как средство усиления чувствительности ядер спина ½ низких γ, настолько широко распространенных фактически, что его наличие часто считается само собой разумеющимся, и его вклад в эксперименты часто не учитывается. Как описано в главе 4 и ниже, применение широкополосного протонного декаплирования в течение регистрации углеродных спектров даёт ни много, ни мало, как троекратное увеличение интенсивности резонанса, благодаря ЯЭО от протонов на углероды. Однако основная цель этой главы - разработать оценку ЯЭО, как инструмента в структурном анализе, где он играет уникальную роль. Интерпретация измерений ЯЭО, однако, требует больше осторожности, чем для тех методов, которые используют скалярные взаимодействия, и обычно более склонна к получению ошибочных заключений. Как часть этого, также важно сознавать природу предпринимаемых измерений ЯЭО, и, в частности, понимание того какой тип ЯЭО используется, либо ЯЭО ***стационарного состояния***, либо ***переходный*** ЯЭО. Первый из них иллюстрируется широко используемым экспериментом «разностного ЯЭО», в то время как второй лучше известен как двумерная методика NOESY. Более новые селектированные градиентом одномерные эксперименты ЯЭО, которые оказывают значительное влияние на структурные изучения малых молекул, также наблюдают переходные ЯЭО, так как они являются одномерными аналогами NOESY.

Таблица 8.1. Основные применения главных методов, описанных в этой главе.

Методика	Основные применения
Разностный ЯЭО	Обнаружение ЯЭО и, следовательно, пространственной близости между протонами. Подходит только для «малых» молекул (M_r < 1000*), для которых ЯЭО положительны. Наблюдает ЯЭО ***стационарного состояния*** или ***равновесные ЯЭО***, произведенные от ***насыщения*** цели.
NOESY (2D или 1D)	Обнаружение ЯЭО и, следовательно, пространственной близости между протонами. Подходит для «малых» (M_r < 1000*) и «больших» молекул (M_r > 2000*), для которых ЯЭО положительны и отрицательны, соответственно, но может терпеть неудачу для молекул среднего размера (нулевой ЯЭО). Наблюдает ***переходный ЯЭО***, производится путём **спиновой *инверсии*** цели. *В благоприятных случаях можно получать оценку межьядерных расстояний.*
ROESY (2D или 1D)	Обнаружение ЯЭО и, следовательно, пространственной близости между протонами. Подходит для любых молекул, но часто существенен для молекул среднего размера, **ЯЭО положительны для всех размеров молекул**. Наблюдает ***переходный ЯЭО*** во вращающейся системе координат, но подвержен вмешательству других механизмов, так что требует осторожной интерпретации. *В благоприятных случаях можно получать оценку межьядерных расстояний.*
HOESY	Обнаружение гетероядерных ЯЭО и, следовательно, пространственной близости между различными нуклидами, например, ^1H-^{13}C. Может обеспечивать полезную стереохимическую информацию, когда гомоядерный ЯЭО недостаточен или неподходящий, но страдает от низкой чувствительности.
EXSY (2D)	Качественная картография путей обмена в динамических системах, когда скорости обмена медленные во временной шкале ЯМР химического сдвига, обусловливая наблюдение раздельных резонансов для каждого обменивающегося ядра. В благоприятных случаях могут получаться ***количественные данные по кинетике обмена.***

* Указанные молекулярные массы обеспечивают только приблизительные диапазоны, к которым применимы эксперименты (см. главный текст).

Природа измерения имеет фундаментальное значение для того, как данные должны *интерпретироваться* и должны *сообщаться*. Таким образом, эти два существенно различных подхода к измерениям ЯЭО будут обсуждаться отдельно на протяжении большинства главы, хотя они оба разделяют одну и ту же базовую теорию. Основные методы, описанные в этой главе, суммируются в таблице 8.1.

Который из этих двух подходов принимается в лаборатории, может диктоваться свойствами подвижности изучаемой молекулы (молекул), и, более определенно, скорости, с которой эти молекулы кувыркаются в растворе. Предвосхищая, что последует, будет показано, что стационарные эксперименты пригодны только для молекул, которые «быстро» кувыркаются в растворе (мы также увидим, что означает «быстро» в этом контексте). Такие измерения традиционно были областью малых органических молекул в относительно невязких растворах. В противоположность, очень большие молекулы, которые «медленно» кувыркаются в растворе (или меньшие молекулы в очень вязких растворах), могут успешно изучаться только методами переходного ЯЭО, которые могут также подходить для исследований малых молекул. Между этими двумя крайностями скоростей кувыркания молекулы обычный ЯЭО может становиться слабым и даже исчезающе малым, состояние, которое наиболее вероятно встречается для молекул с массами около 1000-2000 дальтонов. Именно здесь измерения ЯЭО вращающейся системы координат играют жизненную роль, и они также будут представлены ниже.

Глава представляется в двух частях, первая покрывает необходимую теорию, которая лежит в основе ЯЭО, а вторая обсуждает технические подробности измерения ЯЭО усиления, экспериментальные шаги, необходимые для оптимизации таких измерений, и как правильно интерпретировать

данные. Придерживаясь стиля этой книги, математические уравнения поддерживаются на минимуме и вводятся только тогда, когда они служат для иллюстрации момента фундаментальной важности. Аналогично, уравнения обычно представляются, а не выводятся, а заинтересованному читателю предлагается читать специальные работы по этим темам для дальнейшей разработки [1].

Часть I: Теоретические аспекты

8.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯЭО

ЯЭО можно определить как **изменение интенсивности одного резонанса, когда спиновые переходы другого некоторым образом возмущаются от их равновесных заселённостей**. Интересующее возмущение обычно соответствует или *насыщению резонанса*, то есть, выравнивание разности спиновой заселённости через соответствующие переходы, или её *инвертированию*, другими словами, инвертированию разностей заселенностей через переходы. Величина выражается как относительное изменение интенсивности между интенсивностью равновесия I_0, и той, которая существует в присутствии ЯЭО - I, так что

$$\eta\{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \times 100\% \qquad (8.1)$$

где η{S} указывает ЯЭО, наблюдаемый для спина **I**, когда возмущается спин **S**, который также будет упоминаться, как ЯЭО *от* спина **S** *на спин* **I**. Применение символов **I** и **S** происходит от первоначальных публикаций по явлению (которые, фактически, наблюдали ЯЭО от электронных спинов к ядерным спинам в металле) и стало признанной номенклатурой при описании ЯЭО. Однако и **S**, и **I** использовались для определения *возмущённого спина* за эти годы и даже в современных текстах встречаются оба определения, так что всегда следует выяснять применяемую терминологию. Здесь, **S** всегда будет относиться к возмущенному спину (или источнику), а **I** к усиленному (или интересующему) спину. Изменения интенсивности, вызванные ЯЭО, могут быть либо положительными (увеличение), либо отрицательными (уменьшение), как диктуется свойствами подвижности молекул и знаками гиромагнитных отношений участвующих спинов. Везде будет использоваться термин «усиление», чтобы обозначать изменения интенсивности.

8.3. ЯЭО СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ

В создании фона к тому, как ЯЭО возникает, и какие факторы диктуют его знак и величину, мы ограничим наше обсуждение ЯЭО стационарного состояния, в котором возмущение производится, *насыщая* переходы **S** спина применением селективного слабого РЧ облучения к **S** резонансу (рис. 8.1). Именно эта форма ЯЭО, которая наблюдается популярным методом разностного ЯЭО, имела такое огромное влияние на структурную органическую химию. Дальнейшие обсуждения, касающиеся других форм измерения ЯЭО, затем логически следуют из этого фонового материала. Мы начнём, рассматривая простой случай гомоядерной двухспиновой системы, а затем продолжим рассматривать более реальные многоспиновые системы.

8.3.1. ЯЭО в двухспиновой системе

Происхождение ЯЭО

Рассмотрите систему, включающую только два гомоядерных ядрами спина 1/2, I и S, находящиеся в жесткой молекуле, которая изотропно кувыркается в растворе, то есть, она не имеет предпочтительной оси, относительно которой она вращается.

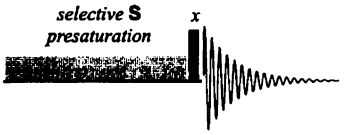


Рисунок 8.1. Общая экспериментальная схема для наблюдения усиления ЯЭО стационарного состояния.

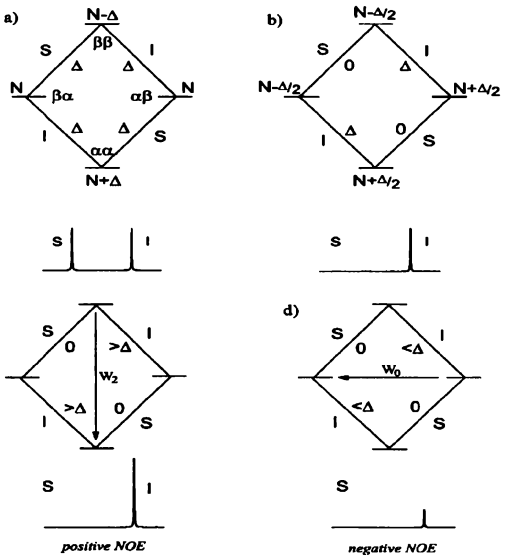


Рисунок 8.2. Схематические диаграммы энергетических уровней и разности заселенностей для двух спинов S и I, которые разделяют дипольное взаимодействие; (a) - при равновесии, (b) - после мгновенного насыщения S-спинов, (c) - после релаксации через W_2 процессы и (d) - после релаксации через процессы W_0. Под каждым - соответствующие схематические спектры.

Эти два ядра не разделяют скалярное взаимодействие ($J_{IS} = 0$), но достаточно близкие, чтобы разделять дипольное взаимодействие. Это прямое магнитное взаимодействие между двумя спинами через пространство такое, что один спин может чувствовать присутствие его дипольно связанного партнера. Это взаимодействие может рассматриваться аналогичным взаимодействию, когда два стержневых магнита расположены близко друг к другу, и следует идее, введённой в главе 2, что ядерные магнитные диполи могут рассматриваться как микроскопические стержневые магниты (см. ниже).

Диаграмма энергетических уровней для ансамбля 4N молекул показывается на рисунке 8.2. Так как мы рассматриваем гомоядерную систему, энергии I и S переходов будут по существу идентичны (разности химических сдвигов пренебрежимо малы по сравнению с частотами Лармора) и мы можем, следовательно, полагать, что заселенности состояний αβ и βα равны при равновесии. Согласно распределению Больцмана тогда будет существовать избыток ядер низкой энергии в αα

ориентации, и дефицит ядер в энергетически более высоком состоянии ββ. Мы будем, в конечном счете, интересоваться *разностями заселенностей* через переходы, так как это они диктуют интенсивность ЯМР резонансов, поэтому мы просто обозначим в символической форме избыток заселенности как Δ, а недостаток, как -Δ относительно состояний αβ и βα. Заметьте, что дипольные взаимодействия не производят наблюдаемых расщеплений в спектрах растворов (см. ниже), так что два перехода, связанные с каждым спином, имеют идентичную энергию. Спектр в отсутствие возмущения, следовательно, содержит два синглетных резонанса равной интенсивности (рис. 8.2a).

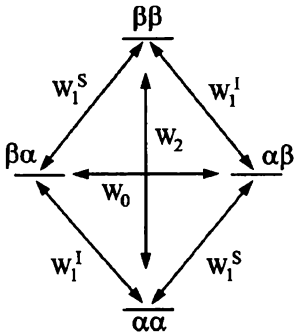


Рисунок 8.3. Шесть возможных переходов в двухспиновой системе.

Теперь представьте, что мы мгновенно насыщаем **S** резонанс, приводя разности заселённостей через **S** переходы к нулю. Новые спиновые заселённости показаны на рисунке 8.2b. Ясно, что система была выведена из равновесия, и равновесные разности заселенностей, поэтому будут пытаться восстановить его, изменяя её спиновые заселённости. Изменения спиновых состояний, необходимые для достижения этого, вызываются процессами продольной релаксации, поэтому нам нужно рассмотреть, какие пути релаксации теперь доступны спинам. При игнорировании на некоторое время механизма, которым эти изменения могут происходить, мы видим, что для двухспиновой системы можно идентифицировать шесть возможных путей (рис. 8.3). Четыре из них соответствуют одноквантовым переходам, включая переворот одиночного спина, например αα-βα. Метки W представляют «вероятности переходов» для каждого перехода, или другими словами, скорости, с которыми происходят соответствующие спиновые перевороты, а нижние индексы магнитное квантовое число перехода. Два других перехода αβ-βα и αα-ββ, включают одновременный переворот **S**, и **I** спинов. Хотя эти переходы случаются, они *не могут наблюдаться прямо* в эксперименте ЯМР, в отличие от переворотов одиночного спина, потому что полное изменение магнитного квантового числа ΔM не равно единице. Они, как говорят, являются «запрещенными» квантово-механическими правилами отбора. Процесс αβ-βα W_0 упоминается, как нуль-квантовый переход (ΔM= 0) в то время как αα-ββ W_0 процесс - двухквантовый переход (ΔM = 2) (заметьте, что та же самая терминология использовалась при описании переходов скалярно связанных спинов в главе 5). Они оба способны действовать как пути релаксации и, фактически, только они оба ответственны за сам ЯЭО. Все вместе они упоминаются *как пути поперечной релаксации*, выражение, предполагающее одновременное участие обоих спинов.

Возвращаясь к диаграмме рис. 8.2, теперь мы в состоянии рассматривать, как могут использоваться различные пути релаксации для восстановления состояния равновесия, отмечая, что всё время переходы W_1^S остаются насыщенными непрерывной РЧ энергией. Разности заселённостей через переходы I-спинов - еще Δ, как они были при равновесии, поэтому процессы W_1^I не будут играть роли в восстановлении равновесия и, таким образом, не играют роли в создании ЯЭО. Про-

цесс W_2 будет действовать, удаляя спины из состояния ββ и перенося их в состояние αα, пытаясь восстановить разности заселённостей через **S** переходы. При этом *он будет увеличивать разность заселенностей* через два **I** перехода (рис. 8.2c). Таким образом, релаксация через процесс W_2 будет вызывать чистое увеличение интенсивностей резонанса **I** спина в спектре; тогда это *положительный ЯЭО*. Аналогично, процесс W_0 будет действовать, перенося спины от состояния βα к αβ, снова пытаясь восстановить разности заселённостей через **S** переходы. В этом случае результат - *уменьшение разности заселенностей* через два **I** перехода (рис. 8.2d), так что релаксация через процесс W_0 будет вызывать чистое уменьшение интенсивностей резонанса **I** спина в спектре; тогда это *отрицательный ЯЭО*.

Из этих качественных соображений мы уже можем сказать достаточно много о том, появления какого ЯЭО можно ожидать. Ясно, процессы перекрёстной релаксации W_2 и W_0 конкурируют друг с другом, при этом знак наблюдаемого ЯЭО диктует доминирующий путь. Кроме того, W_1^I пути будут действовать, восстанавливая равновесные разности заселённостей для **I** переходов, как только ЯЭО начинает развиваться, так появится тенденция действовать против нарастания ЯЭО. Таким образом, если релаксационные механизмы для путей W_1^I оказываются гораздо более продуктивными, чем для путей W_2 и W_0, измеряемый ЯЭО может никогда не развиться; он, в действительности, совсем обходится. Это может иметь существенное влияние на экспериментальное измерение ЯЭО, как мы увидим в дальнейшем. ЯЭО, следовательно, получается из баланса между множеством конкурирующих путей релаксации. Насыщение **S** переходов в течение периода времени, длинного относительно времен релаксации, позволяет возникновение нового *стационарного состояния* заселенностей, как результата этой конкуренции, и это, в конечном счете, измеряется. Полное рассмотрение скоростей различных процессов, вовлеченных в изменения заселенности, ведет к так называемому уравнению Соломона, которое для ЯЭО стационарного состояния может использоваться, чтобы вывести выражение:

$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_s}{\gamma_I}\left[\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1^I + W_2}\right] \equiv \frac{\gamma_S}{\gamma_I}\left[\frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}}\right] \qquad (8.2)$$

Член σ_{IS} представляет *скорость кросс-релаксации* для двух спинов, в то время как ρ_{IS} - полная *скорость дипольной продольной релаксации спина I*. Гиромагнитные отношения (γ_S и γ_I) включены, чтобы учитывать различные равновесные заселённости, которые существовали бы для спинов с различающимися γ; для гомоядерной спиновой системы как рассматривается в настоящее время, эти значения, очевидно, равнялись бы и могут игнорироваться. Это фундаментальное выражение содержит в себе качественные аргументы, достигнутые выше; $W_2 - W_0$ диктует знак ЯЭО, в то время как процессы W_1^I не делают в него никакого вклада, но служат, чтобы уменьшать его величину. Чтобы оценивать размер и знак ЯЭО, как он связан с молекулярным движением и, действительно, как он может быть связан каким-либо образом с межъядерными расстояниями, необходимо определить, какие факторы влияют на участвующие константы скорости, а для этого следует учитывать вовлеченные процессы спиновой релаксации.

Спиновая релаксация и дипольное взаимодействие

ЯЭО возникает в результате перераспределения спиновых заселённостей и, следовательно, переворотов между спиновыми состояниями. Такие перераспределения случаются в результате продольной спиновой релаксации (глава 2), которые происходят не спонтанно, а требуют подходящего стимула, чтобы индуцировать переходы. Этот стимул - магнитное поле, флуктуирующее с частотой соответствующего перехода (и здесь и ниже «частота» соответствует энергии перехода, а не скорости, с которой происходят спиновые перевороты). Здесь существует аналогия с импульсным возбуждением спиновой системы, первоначально находящейся в равновесии. Завися-

щий от времени магнитный компонент электромагнитного РЧ излучения взаимодействует с ядерными магнитными моментами и, таким образом, способен отклонять вектор объёмной намагниченности в поперечную плоскость. Возбуждение происходит только, если РЧ имеет магнитный компонент, колеблющийся на ларморовой частоте спинов; поэтому можно применять возбуждающие импульсы к протонам, в то же время оставляя незатронутыми, скажем, углеродные спины.

Магнитное поле, уместное для ЯЭО - локальное поле, испытываемое спином в результате дипольных взаимодействий с соседними магнитными ядрами. Эти взаимодействия можно визуализировать, используя микроскопическую аналогию стержневого магнита, для ядер спина ½, которые, как считается, обладают магнитными Северным и Южным полюсами (рис. 8.4). В зависимости от относительной ориентации двух ядер друг относительно друга, поле, произведенное соседним спином, будет или усиливать приложенное магнитное поле, или противодействовать ему, с зависящей от времени флуктуацией, производимой в соответствии с вращательным движением молекулы, в котором эти ядра участвуют (рис. 8.5).

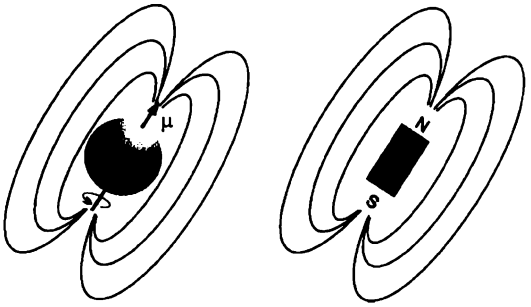


Рисунок 8.4. Аналогия стержневого магнита для ядра спина ½, в котором магнитный диполь рассматривается как обладающий Северным и Южным магнитными полюсами.

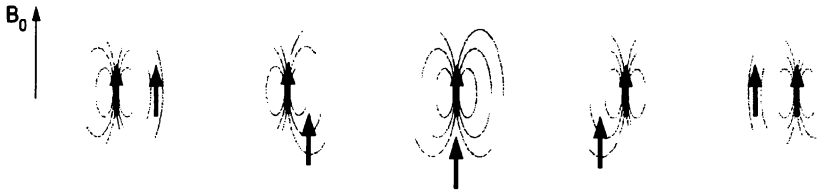


Рисунок 8.5. Прямое взаимодействие через пространство между двумя соседними ядрами спина 1/2 (дипольное взаимодействие). Оно колеблется с кувырканием молекулы в растворе и может обеспечить зависящее от времени поле, способное стимулировать спиновые переходы.

Именно это обеспечивает механизм релаксации, известный как *продольная диполь-дипольная релаксация*, и это требование взаимодействия с соседним спином интуитивно совпадает с аргументами, представленными выше, для ЯЭО, возникающего из *взаимных* спиновых переворотов (процессы W_2 и W_0). Величина дипольного взаимодействия между спинами остро чувствительна к межъядерному расстоянию r, являясь пропорциональной r^{-3}, и именно таким образом сам ЯЭО, в конечном счете, зависит от расстояния.

Здесь следует отметить, что, несмотря на обеспечение важного релаксационного механизма, ***дипольные взаимодействия обычно не производят наблюдаемых расщеплений в спектрах ЯМР растворов***. Это потому, что, хотя взаимодействия имеют конечное значение в любой момент времени, они усредняются точно до нуля на временной шкале ЯМР быстрым изотропным кувырканием молекулы.

Чтобы индуцировать спиновые переходы, которые мы рассматриваем, молекула должна кувыркаться с соответствующей частотой, чтобы обеспечивать соответствующее флуктуирующее поле. Скорость, с которой молекула кувыркается или вращается в растворе, обычно определяется её *временем вращательной корреляции* τ_c. Обычно оно определяет среднее время, требуемое для молекулы, чтобы повернуться на угол в 1 радиан относительно любой оси, что означает, что быстро кувыркающиеся молекулы обладают малыми временами корреляции, в то время как медленно кувыркающиеся молекулы имеют большие времена корреляции. Очень грубую оценку этого времени для молекулы массы M_r можно получить из соотношения:

$$\tau_c \approx M_r \times 10^{-12} \text{ с} \qquad (8.3)$$

Мощность, доступная в молекулярной системе, чтобы индуцировать переходы на основании её молекулярного кувыркания, упоминается как *спектральная плотность* $J(\omega)$ (раздел 2.5) и она обеспечивает меру того, как скорости релаксации W_0, W_1 и W_2 изменяются как функция скоростей кувыркания. Это схематично иллюстрируется на рисунке 8.6 для трёх различных времён корреляции. Альтернативное описание спектральной плотности в том, что она представляет вероятность нахождения флуктуирующего магнитного компонента при любой данной частоте в результате движения и, таким образом, площадь под каждой из кривых рис. 8.6 должна тогда быть одинаковой. Таким образом, для молекулы с коротким τ_c (быстрое кувыркание) существует почти равная, но сравнительно малая возможность нахождения компонентов и при высоких, и при низких частотах, вплоть до почти $1/\tau_c$ - точки, в которой вероятность начинает быстро падать. Наоборот, имеется только очень малая вероятность того, что молекулы, которые кувыркаются медленно *(в среднем)*, произведут быстро осциллирующие поля, так что соответствующая спектральная плотность концентрируется в меньшем частотном окне.

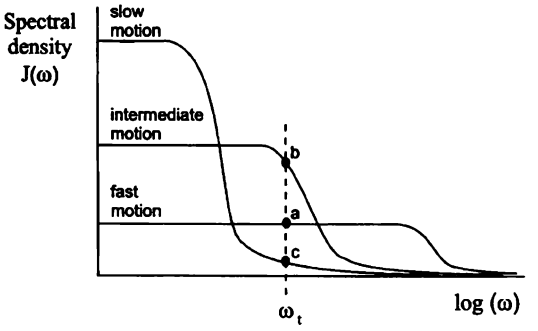


Рисунок 8.6. Схематические спиновые плотности для молекул, кувыркающихся в трех режимах движения, как функция частоты ω, где ω_t представляет частоту спинового перехода.

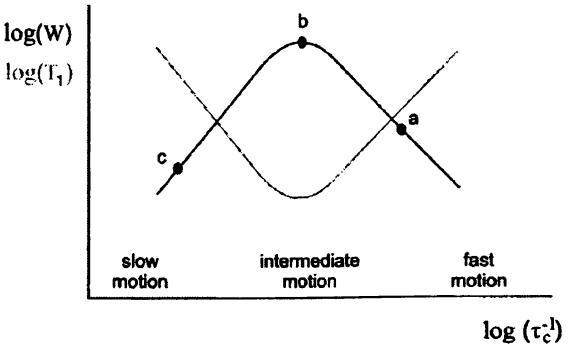


Рисунок 8.7. Схематическое изменение скоростей релаксации и, следовательно, времён релаксации (показаны серым цветом), как функции скоростей кувыркания молекулы.

Эти кривые, следовательно, предсказывают, как будут изменяться скорости релаксации со временем корреляции. Для перехода частоты ω_t спектральная плотность будет довольно низкой, если скорость кувыркания молекулы значительно большая, чем эта (точка a), и, таким образом, скорости релаксации будут также низкими. По мере того, как скорость кувыркания замедляется и приближается к ω_t, спектральная плотность и, следовательно, скорости релаксации увеличиваются (точка b), только чтобы уменьшиться еще раз, как только скорость кувыркания упадёт ниже ω_t. Таким образом, зависимость скоростей релаксации от τ_c можно представить как на рисунке 8.7, с самой быстрой релаксацией, случающейся, когда скорость корреляции $1/\tau_c$ совпадает с частотой перехода. Точка самой быстрой релаксации W_1 также соответствует минимуму T_1 и наоборот, поэтому сами значения T_1 также зависят от скоростей молекулярного движения.

Используя эти аргументы, можно предсказывать, когда процессы W_0 или W_2 будут доминировать. Для нульквантовых процессов W_0, вовлеченные разности энергий очень малы, являющиеся разностями между частотами **I** и **S**, поэтому $\omega_t = |(\omega_I - \omega_S)|$. Эти переходы будут, следовательно, весьма предпочтительны для молекулы, которая медленно кувыркается в растворе. Двухквантовые переходы W_2 соответствуют сумме частот **I** и **S**, поэтому $\omega_t = (\omega_I + \omega_S)$ и они будут стимулироваться быстро кувыркающимися молекулами. Как пример вовлеченных частот перехода, рассмотрим гомоядерную протонную систему при частоте наблюдения 400 МГц. Частоты одноквантовых переходов W_{II} (и W_{IS}) будут соответствовать примерно 400 МГц. Частоты переходов W_0 даются разностями частот **I** и **S**, то есть их разностями химических сдвигов, которые будут в диапазоне Гц или кГц. Частоты переходов W_2 являются суммами ω_I и ω_S, которые равны примерно 800 МГц. Ясно, протяжённость частот молекулярных движений, к которым чувствителен ЯЭО, чрезвычайно большой.

Теперь из предыдущих аргументов можно качественно предсказать, что ***молекулы, которые быстро кувыркаются в растворе***, вероятно, будут способствовать процессу более высокой энергии W_2, и, следовательно, *представляют* ***положительный ЯЭО***, в то время как *те, которые* ***кувыркаются медленно***, будут способствовать процессу W_0 и, таким образом, *показывать* ***отрицательный ЯЭО***; действительно это и наблюдается на практике.

Количественные выражения для скоростей релаксации в дипольно связанной двухспиновой системе выводятся следующим образом:

$$W_{II} \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[\frac{3\tau_C}{r^6 (1 + \varpi_I^2 \tau_C^2)} \right] \tag{8.4a}$$

$$W_0 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[\frac{12\tau_C}{r^6 (1 + (\varpi_I - \varpi_S)^2 \tau_C^2)} \right] \tag{8.4b}$$

$$W_2 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left[\frac{12\tau_C}{r^6 (1 + (\varpi_I + \varpi_S)^2 \tau_C^2)} \right] \tag{8.4c}$$

где константа пропорциональности одинакова для всех.

Заметьте, что, в дополнение к зависимости от времен корреляции, эти выражения содержат выражение для межьядерного расстояния r между спинами **S** и **I**. Здесь, наконец, обнаруживается происхождение широко знаменитой зависимости от расстояния «r^{-6}», и иногда опасно связываемой с интерпретациями ЯЭО [2]. Эта зависимость от расстояния выражается в степени дипольного взаимодействия между двумя спинами. Важно обратить внимание на этой стадии, что эта зависимость от расстояния фактически лежит в *скоростях релаксации* и, как мы увидим, это может иметь огромные значения для способа, которым интерпретируются данные ЯЭО. Зависимость, обратной шестой степени расстояния также означает, что ЯЭО с расстоянием падает очень быстро, поэтому на практике существенный ЯЭО будет развиваться только между протонами, которые находятся в

пределах приблизительно 0,5 нм друг от друга (естественно, это будет зависеть от того, насколько чувствительный и стабильный спектрометр и, следовательно, насколько малое усиление можно «увидеть»). Обратите внимание также на зависимость уравнений 8.4 от квадрата гиромагнитных отношений двух спинов, поэтому в гетероядерных системах могут получиться совершенно другие скорости, в зависимости от участвующих спинов.

Когда молекула в растворе кувыркается настолько быстро, что $\omega\tau_C << 1$, все члены в этих выражениях, содержащих ω, становятся незначительными, и скорости упрощаются до:

$$W_{II} \propto \gamma_I^2\gamma_S^2 \frac{3\tau_C}{r^6} \tag{8.5a}$$

$$W_0 \propto \gamma_I^2\gamma_S^2 \frac{2\tau_C}{r^6} \tag{8.5b}$$

$$W_2 \propto \gamma_I^2\gamma_S^2 \frac{12\tau_C}{r^6} \tag{8.5c}$$

Это условие упоминается, как *предел чрезвычайного обужения*, так как все уширяющие эффекты, относящиеся к дипольным взаимодействиям, при этих условиях полностью усредняются до нуля. Этот режим обычно применим только для малых молекул в растворителях низкой вязкости, и точка, в которой это условие нарушается, зависит от времени корреляции молекулы, а также от напряжённости поля спектрометра (через ω).

ЯЭО и молекулярное движение

Стараясь увидеть, как скорости релаксации в двухспиновой системе зависят от молекулярного движения, теперь мы в состоянии предсказывать поведение самого ЯЭО, как функции этого движения и межьядерного расстояния. Принимая уравнения 8.4 для константы скорости, и, заменяя их в уравнениях для ЯЭО (уравнение 8.2), получаем кривую, представленную на рисунке 8.8 для теоретического изменения *гомоядерного* ЯЭО, как функции скоростей кувыркания молекулы, как определяется $\omega_0\tau_C$, (где ω_0 - частота наблюдения спектрометра, приблизительно равна ω_I и ω_S). Обратите внимание, что двухспиновая система релаксирует исключительно диполь-дипольным механизмом и, таким образом, представляет теоретически максимально возможный ЯЭО. Кривая имеет три отдельных области для этого, которые мы будем свободно упоминать как области режимов быстрого, промежуточного и медленного движения. Для тех молекул, которые в растворе кувыркаются быстро (короткое τ_C в пределе чрезвычайного сужения), ЯЭО имеет максимально возможное значение +0,5 или 50%. Меньшие органические молекулы в растворителях низкой вязкости обычно попадают в этот режим быстрого движения, который является традиционно основой измерений ЯЭО стационарного состояния.

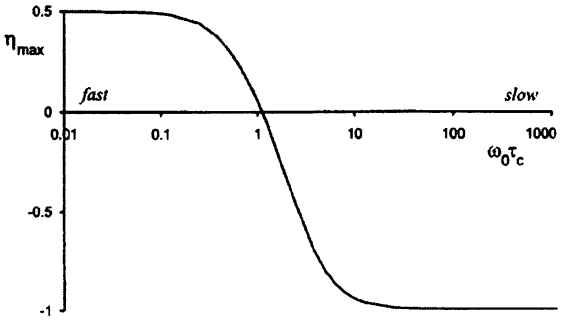


Рисунок 8.8. Изменение максимального теоретического гомоядерного ЯЭО стационарного состояния в двухспиновой системе, как функции скоростей кувыркания молекулы (определенной безразмерным параметром $\omega\tau_C$). Область быстрого движения - предел чрезвычайного обужения, а область медленного движения предел спиновой диффузии.

При другой крайности молекулы, которые в растворе кувыркаются очень медленно, испытывают отрицательный ЯЭО, как показано выше. Максимальное усиление в этом режиме движения получается, когда W_2, и W_{II} оба нулевые, которое, как можно увидеть из уравнения 8.2, равно -1 или -100 %. *Для измерений ЯЭО в этой области становится важным использовать переходные эксперименты, так как основанные на стационарных измерениях становятся неинформативными*, как объясняется ниже. Эта область, населенная (биологическими) макромолекулами, и изучением тех систем, которые традиционно широко используют измерения переходного ЯЭО, преимущественно через 2D эксперимент NOESY. Между этими двумя крайностями - промежуточная область, в которой ЯЭО изменяет знак и даже становится нулевым, когда $W_2=W_0$. В этой области модуль и знак ЯЭО высоко чувствительны к скорости молекулярных движений и ЯЭО может быть довольно слабым, возможно слишком слабым для наблюдения, что является главной помехой для структурных исследований. Точка, в которой эта область начинается, будет зависеть от ряда факторов; размер и форма молекулы, состояние раствора (вязкость, температура, возможно pH и т.д.) и напряжённость поля спектрометра. Как правило, молекулы с массой 1000-2000 дальтонов, вероятно, будут попадать в этот промежуточный режим. Рост интереса к большим синтетическим молекулам во многих областях, например, супермолекулярной химии, должен, вероятно, означать, что большее количество молекул, рутинно обрабатываемых химиком-исследователем, будет попадать в эту потенциально неприятную область. Фактическая точка прохождения через ноль случается когда:

$$\omega\tau_c = \sqrt{5/4} = 1.12 \qquad (8.6)$$

или, другими словами, когда скорость кувыркания молекулы приблизительно соответствует частоте наблюдения спектрометра. Она, следовательно, зависит от поля, как показано на рисунке 8.9, который теперь показывает изменение ЯЭО как функции τ_C непосредственно для трёх различных напряжённостей поля. Применение более высокой напряжённости поля увеличивает вероятность попадания относительно «малых» молекул в промежуточный режим или возможно молекул среднего размера, переходящих отсюда в режим медленного движения. В некоторых случаях, следовательно, применение более высокопольного прибора, которое часто расценивается как панацея для всех химиков, может даже оказаться вредным для эксперимента ЯЭО, так как это приближает условие «нулевого ЯЭО».

Зависимость промежуточного режима от поля предлагает одно решение проблемы «нулевых» ЯЭО; пробуя различные напряжённости поля. Обычно это невозможно или непрактично, поэтому альтернативный подход состоит в изменении состояния раствора и, следовательно, скорости кувыркания молекул, один из простейших подходов состоит в изменении температуры образца. Технически другой экспериментальный подход к проблеме - измерять вместо этого ЯЭО *во вращающейся системе*. Это описывается ниже, здесь же достаточно сказать, что эти ЯЭО остаются положительными для всех скоростей кувыркания молекул, и это надо иметь в виду, когда желательно совсем исключить проблему «пересечения нуля».

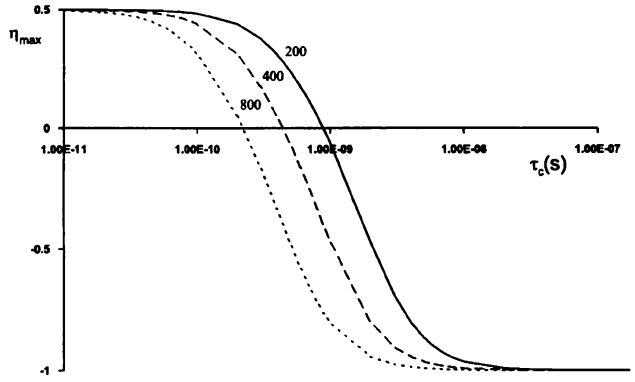


Рисунок 8.9. Изменение максимального теоретического гомоядерного ЯЭО стационарного состояния в двухспиновой системе как функция скоростей кувыркания молекулы, показанная для трёх частот наблюдения спектрометра (МГц).

ЯЭО и межъядерное расстояние

Теперь можно рассматривать, как расстояние между двумя спинами влияет на усиление ЯЭО стационарного состояния. Полагая, что молекула существует в режиме предельного обужения, затем, заменяя упрощенные уравнения скоростей 8.5 в уравнении 8.2, мы получаем:

$$\eta_I\{S\} = \left[\frac{\left(\frac{12\tau_c}{r^{-6}}\right) - \left(\frac{2\tau_c}{r^{-6}}\right)}{\left(\frac{2\tau_c}{r^{-6}}\right) + 2\left(\frac{3\tau_c}{r^{-6}}\right) + \left(\frac{12\tau_c}{r^{-6}}\right)}\right] = \left[\frac{12-2}{2+6+12}\right] = \frac{1}{2} \quad (8.7)$$

Так, для максимального ЯЭО на рисунке 8.8 выше предсказывается усиление 50%. Однако, также предсказывается, что оно *не зависит от* межъядерного расстояния. Таким образом, по крайней мере, для гипотетической изолированной двухспиновой системы, рассматриваемой здесь, величина стационарного усиления не обеспечивает **никакой информации о расстоянии вообще**. Важный момент здесь в том, что слишком самоуверенно утверждать, что различные усиления ЯЭО в молекуле прямо пропорциональны r^{-6}. В реальных химических системах должны также приниматься во внимание различные «другие» факторы, прежде чем снова вводить какую-либо зависимость от расстояния; это далее проводится ниже. Хотя *величина* стационарного усиления предсказывается независимой от расстояния в этой системе, *скорость, с которой* она достигается - нет, по причине зависимости скоростей релаксации от расстояния (как выражено в уравнении 8.4), что означает, что ЯЭО между более близкими спинами развивается быстрее; это основа измерений переходного ЯЭО, описанная в разделе 8.4. Это также подразумевает, что ***дальние ЯЭО будут иметь существенные интенсивности*** *только тогда, когда используются* ***длительные периоды предварительного насыщения***, - момент значительной практической важности.

Гетероядерные ЯЭО

Эквивалент уравнения 8.7 для гетероядерной пары, испытывающий предельное сужение, - более общее выражение:

$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{2\gamma_I} \quad (8.8)$$

Для обычной ситуации наблюдения углерода-13 в присутствии насыщения протонов (широкополосное декаплирование) $\gamma_H/\gamma_C \approx 4$ и усиления ЯЭО могут достигать 200%, что соответствует трёхкратному увеличению чувствительности.

Таблица 8.2. Теоретические максимальные стационарные усиления гетероядерного ЯЭО в присутствии насыщения протонов

X	^{6}Li	^{13}C	^{15}N	^{19}F	^{29}Si	^{31}P	^{57}Fe	^{103}Rh	^{109}Ag	^{119}Sn	^{183}W	^{195}Pt	^{207}Pb
$\eta_X\{^1H\}$ %	339	199	-494	53	-252	124	1548	-1589	-1075	-141	1202	233	239

Эти числа предполагают релаксацию исключительно через диполь-дипольные взаимодействия, хотя для металлов, в частности, анизотропия химического сдвига может также быть существенным механизмом, ^{6}Li – несколько аномален в том, что он квадрупольный, но еще может демонстрировать ЯЭО. Он имеет самый маленький квадрупольный момент из всех таких ядер, однако настолько, что дипольный механизм ещё дает существенный вклад в релаксацию.

Так как релаксация углеродных ядер в значительной степени зависит от протонных дипольных взаимодействий, этот максимум почти выполняется на практике. Это, ясно, ценный путь усиления чувствительности и, по крайней мере, для случая ^{13}C, выгодно отличается от обычных регистраций с фактором четыре, достижимым с последовательностью переноса поляризации от ^{1}H к ^{13}C из главы 4. Максимальные усиления ЯЭО для множества ядер в присутствии насыщения протонов, обозначенных $X\{^1H\}$, суммируются в таблице 8.2.

В гетероядерных системах наблюдаемый ЯЭО также зависит от знаков гиромагнитных отношений перекрёстно релаксирующих спинов. Так ЯЭО от протонов к ядрам с отрицательным γ_S покажет отрицательный ЯЭО, *даже если молекула находится в режиме предельного обужения.* Наиболее обычные примеры этого - ^{15}N и ^{29}Si, для *которых при насыщении протонов* ***уменьшение интенсивности сигнала*** происходит настолько сильно, что *наблюдаемый резонанс может сам становиться отрицательным.* Если генерируются меньше, чем полный (отрицательный) ЯЭО, ***резонанс может исчезать совсем,*** поскольку ЯЭО отменяет природный сигнал и по этой причине *спектры ядер с отрицательным у обычно регистрируют в отсутствие ЯЭО, или, используя схемы инверсно-включаемого декаплинга* (раздел 4.2.3), *методами переноса поляризации* (раздел 4.4) или, реже, добавлением парамагнитного релаксационного реагента, *чтобы погасить ЯЭО.* В некоторых случаях гетероядерный ЯЭО также может использоваться более определенно для структурных отнесений; см. раздел 8.9.

Вне условий предельного сужения, абсолютные величины гетероядерного $X\{^1H\}$ ЯЭО уменьшаются и, в случае ^{13}C, ^{15}N и ^{29}Si близко приближаются к нулю, хотя, за исключением ^{19}F, не изменяют знак. Для очень больших молекул тогда имеется небольшое повышение или потеря чувствительности, возникающая от гетероядерного ЯЭО.

8.3.2. ЯЭО в многоспиновой системе

В предыдущем разделе рассматривался ЯЭО для гипотетического случая двухспиновой системы, в которой спины релаксируют исключительно через взаимную диполь-дипольную релаксацию. Переходя к рассмотрению более реальных многоспиновых систем, будут обсуждаться два ключевых вопроса; как присутствие других спинов воздействует на величину ЯЭО стационарного состояния, и, как они снова вводят зависимость ЯЭО от расстояния. Эти соображения приводят к

заключению, что измерения ЯЭО стационарного состояния должны использоваться сравнительным способом, чтобы обеспечивать данные о структуре, и, что они сами по себе обычно не обеспечивают оценки межъядерных расстояний.

Дополнительные пути релаксации

ЯЭО возникает в результате дипольной перекрёстной релаксации между двумя ядрами и, следовательно, производить ЯЭО может только диполь-дипольный релаксационный механизм. Все другие конкурирующие механизмы (с редким исключением скалярной релаксации в сильно связанной системе, которая редко имеет значение) служат, чтобы разбавить полное влияние путей W_2 и W_0, стимулируя только путь релаксации W_1, и, следовательно, уменьшить величину ЯЭО.

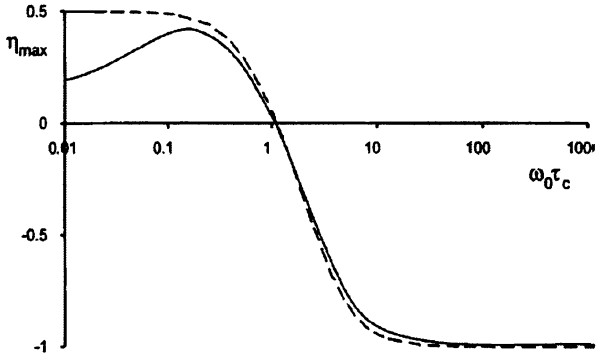


Рисунок 8.10. Схематическая иллюстрация максимального гомоядерного ЯЭО стационарного состояния в присутствии (сплошная линия) и в отсутствие (пунктирная линия) внешних источников релаксации, которые конкурируют с перекрёстной релаксацией.

Эти различные другие вклады в спиновую релаксацию можно группировать вместе и представлять членом $\tilde{n}_I^*$, внешней скоростью релаксации для спина I. Добавление его к уравнению 8.2 дает:

$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I}\left[\frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS} + \rho_I^*}\right] \qquad (8.9)$$

Это иллюстрирует эффект разбавления $\tilde{n}_I^*$ на величину ЯЭО, который иногда упоминается термином «утечка». Его действие оказывает несколько большее значение для молекул в пределе крайнего обужения, чем в режиме отрицательного ЯЭО. Для малой быстро кувыркающейся молекулы абсолютная величина σ_{IS} мала по сравнению с медленно кувыркающийся молекулой, поэтому относительный вклад $\tilde{n}_I^*$ в уравнение 8.9 имеет большее значение. Эффект этого схематически иллюстрируется на рисунке 8.10 который показывает, что утечка становится более существенной с увеличением скоростей кувыркания молекул, что означает, что для малых молекул может наблюдаться очень малый ЯЭО. В противоположность, эффекты утечки менее проблематичны для молекул в режиме отрицательного ЯЭО.

Чтобы максимизировать величину ЯЭО для молекул в условиях крайнего обужения необходимо минимизировать $\tilde{n}_I^*$. Наиболее существенный вклад этого в рутинно приготовленных растворах - от парамагнитного кислорода, растворённого в растворителях. Неспаренный электрон спина 1/2 имеет магнитный момент, который более чем в 600 раз больше, чем у протона, и поэтому может обеспечить интенсивное магнитное взаимодействие, способное к порождению эффективной релаксации. Дегазирование растворов перед исследованиями ЯЭО может оказаться необходимым

при поиске дальних взаимодействий в малых молекулах, но в остальных случаях для большинства рутинных исследований не нужно (см. раздел 8.10). Точно так же другие парамагнитные примеси, например, некоторые металлы, будут гасить ЯЭО и должны избегаться. Образцы, к которым релаксационные агенты были добавлены преднамеренно, чтобы способствовать релаксации, поэтому не годятся для исследования ЯЭО. *Межмолекулярные* дипольные взаимодействия, возникающие от переходных взаимодействий с молекулами растворяемого вещества или растворителя, потенциально являются другой помехой. В большинстве случаев молекулы растворителя дейтерируются, поэтому релаксация, возникающая от этих ядер, довольно неэффективна по сравнению с протонами (благодаря γ^2 зависимости продольных скоростей дипольной релаксации) и взаимодействия с другими (протонированными) молекулами растворяемого вещества обычно представляют только вероятную проблему, когда используются очень концентрированные растворы, поэтому их лучше всего избегать при изучении ЯЭО. Другие, недипольные релаксационные механизмы, подобные тем, которые обсуждались в главе 2, также действуют в обход ЯЭО. Наиболее важная - квадрупольная релаксация, связанная с ядрами со спином >1/2. Это обычно доминирующий механизм для таких ядер, поэтому ЯЭО на квадрупольных ядрах наблюдается очень редко (исключение представляет ^{6}Li, как указано в таблице 8.2).

Межъядерные расстояния (снова)

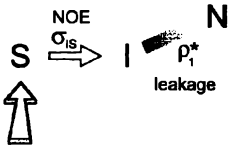


Рисунок 8.11. Трёхспиновая система, в которой сосед I-спина N, действует как внешний источник релаксации для спина I через их взаимное дипольное взаимодействие.

Вероятно наиболее очевидный «другой» вклад в релаксацию спина I в многоспиновой системе возникает от соседних ядер, отличающихся от спина **S**, в той же самой молекуле. Действие дипольных взаимодействий с этими спинами вызывает продольную релаксацию спина **I**, *независящую* от перекрёстной релаксации между **I** и **S**, таким образом, разбавляя ЯЭО **I-S**. Чтобы иллюстрировать влияние соседних спинов, рассмотрим гипотетическую гомоядерную трёхспиновую систему **I**, **S** и N (N = сосед), в которой релаксация возникает исключительно от дипольных взаимодействий, игнорируя для удобства все другие возможные вклады в $\vec{n}_i^*$, описанные выше (рис. 8.11). Полагая для простоты, что ЯЭО существует только между, **I** и **S**, ЯЭО стационарного состояния можно записать:

$$\eta_I\{S\} = \eta_{max}\left[\frac{r_{IS}^{-6}}{r_{IS}^{-6} + r_{IN}^{-6}}\right] \qquad (8.10)$$

где η_{max} представляет максимальный ЯЭО, возможный в гомоядерной двухспиновой системе, как раньше. Заметьте, что если бы спин N не присутствовал, ЯЭО был бы просто η_{max} и не показывал никакой зависимости от расстояния, точно так же, как предсказано выше для двухспиновой системы. Эффект введения добавочного спина должен снова вводить зависимость от расстояния, но еще несмотря на это, величина ЯЭО стационарного состояния не просто зависит от r_{IS}^{-6}. Фактически можно видеть, что модуль ЯЭО будет диктоваться балансом между расстояниями r_{IS} и r_{IN}. Это справедливо для всех измерений ЯЭО стационарного состояния; результат будет всегда представлять баланс между межъядерным расстоянием **I-S** и всеми другими расстояниями **I-N** (а в реальной химической системе может быть большое число других соседних ядер). Другими словами, ЯЭО стационарного состояния является результатом соревнования между перекрёстной релакса-

цией **I-S** и всеми другими источниками релаксации спина I. Уравнение 8.10 также показывает, что уменьшение межъядерного расстояния **I-S** теперь действительно делает вклад в увеличение ЯЭО между **I** и **S**, так как полный вклад в числителе будет относительно больше, чем в знаменателе. Появление соседнего спина, следовательно, снова приводит к мысли, что меньшее межъядерное расстояние может до некоторой степени коррелироваться с большими ЯЭО усилениями.

К этому утверждению следует еще относиться с некоторой предосторожностью, однако, как показано на рисунке 8.12, в котором $\eta_B\{A\}$ рассматривается для трехспиновой системы. A, B и C, где расстояние B-C изменяется (и игнорируется любое прямое взаимодействие AC). Когда C далеко от B, это мало влияет на его релаксацию, позволяя доминировать перекрёстной релаксации AB, производя ЯЭО близкое к максимальному. Когда **I** и **S** равноудалены от B, они играют равную роль в релаксации B, и ЯЭО представляет, таким образом, половину максимально возможного значения. Когда C становится гораздо ближе к B, чем A, теперь доминирует релаксация спина B, а перекрёстная релаксация A-B проигрывает в соревновании, вызывая малый ЯЭО.

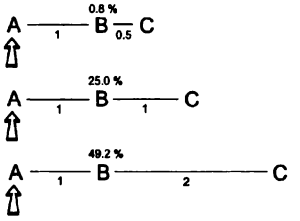


Рисунок 8.12. Вычисленные усиления ЯЭО стационарного состояния A→B для изолированной трёхспиновой системы с показанными относительными межъядерными расстояниями. Стрелка указывает насыщаемый спин. Любое прямое взаимодействие A-C игнорируется.

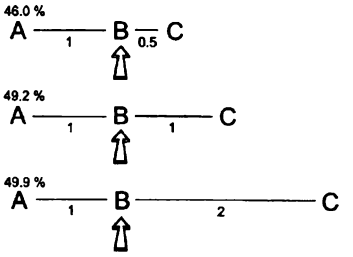


Рисунок 8.13. Вычисленные усиления ЯЭО стационарного состояния B→A для изолированной трёхспиновой системы с относительными межъядерными расстояниями как показано. Стрелка указывает насыщаемый спин. Любое прямое A-C взаимодействие игнорируется

Таким образом, обычно, *несмотря на то, что два спина, находятся «близко» друг к другу,* и при этом они разделяют сильное дипольное взаимодействие, *они еще не могут представлять большого ЯЭО,* если усиливаемый спин имеет других ближайших соседей.

Следующая важная особенность появляется, если мы рассматриваем результаты от насыщения B и изучаем эффект $\eta_A\{B\}$ на A (рис. 8.13) и сравниваем их с таковыми рис. 8.12. При C отдаленном от B релаксация по существу полностью доминируется B, так что он испытывает почти максимальное усиление. Как только C приближается к B, усиление на A уменьшается только немного, так как его релаксация еще доминируется намного более близким спином B. Таким образом, обычно, ***ЯЭО стационарного состояния между спинами несимметричные,*** *то есть,* $\eta_A\{B\} \neq \eta_B\{A\}$, потому что соседи, окружающие A, маловероятно соответствуют окружению B и по числу, и по близости.

Примеры, обсуждённые выше, ограничивались обсуждением прямых ЯЭО эффектов между A и B, в то время как для удобства, игнорировались эффекты, которые могут наблюдаться при самом C. Если рассматривать спин C, из рис. 8.14 очевидно, что он испытывает чистое уменьшение интенсивности сигнала при насыщении A. Это возникает из механизма реле (ретрансляции), в котором изменения заселенности B, вызванные первичным ЯЭО A-B, последовательно изменяют заселенность спина C, в то же время он также разделяет дипольное взаимодействие и, следовательно, также кросс-релаксирует с B. *Отрицательный* ЯЭО, наблюдаемый при C, - результат *увеличения* в разностях заселённостей B-спина, произведенных ЯЭО A-B. Вспомните, что в пределе крайнего обужения, насыщение резонанса (то есть *уменьшение разности заселённостей* через соответствующий переход), *вызывает положительный ЯЭО*, следуя той же самой логике, *увеличение* разностей заселённостей для B (ЯЭО A-B), в свою очередь, произведет *отрицательный* ЯЭО на его дипольно связанных соседях. Этот косвенный эффект, часто упоминаемый как *«трехспиновый эффект»*, не следует путать с прямым отрицательным ЯЭО, наблюдаемым для медленно кувыркающихся молекул.

Величины отрицательных трехспиновых усилений обычно довольно малы, так как они опираются на нарастание большого ЯЭО на соседнем спине, подходящем для ретрансляции. Поэтому они также имеют тенденцию медленно развиваться и показывать характеристичный период задержки

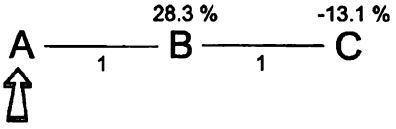


Рисунок 8.14. Трехспиновый стационарный эффект. Отрицательное усиление при C возникает из косвенного эффекта через спин B, когда спин A насыщается. Измененные C-спиновые заселенности также делают вклад в усиленный ЯЭО на B (см. B, рис. 8 12)

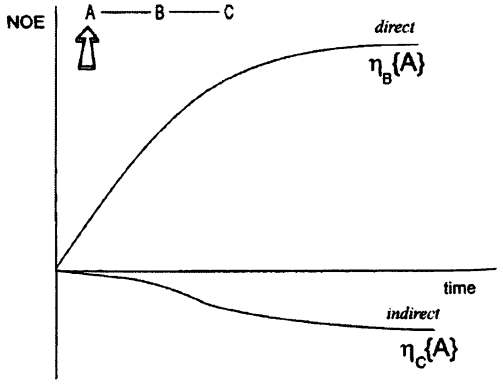


Рисунок 8.15. Схематическая иллюстрация нарастания прямых и косвенных ЯЭО в быстро кувыркающейся трехспиновой системе.

перед появлением (рис. 8.15), а также имеют тенденцию для наблюдения, только когда используются более длинные периоды предварительного насыщения. Иллюстрации, использованные выше, производят нереалистично высокие значения, для всех усилений, так как они повсюду предполагают чистую дипольную релаксацию. Экспериментальный ЯЭО чаще несколько меньше, чем 20 %, а трехспиновые эффекты редко бывают больше, чем несколько процентов максимум. Они появляются чаще всего, когда B и C образуют диастереотопную геминальную пару, так как расстояние B-C тогда ограничивается очень коротко, таким образом, облегчая ретрансляцию. Они

также предпочитаются, когда эти три спина имеют приблизительно линейную расположение, и их появление может быть диагностически полезным, когда они наблюдаются. Причина этой особенно благоприятной геометрии, возникает из баланса между отрицательным косвенным трехспиновым эффектом на С и положительным прямым эффектом между А и С (рис. 8.16). При малых углах А-В-С доминирует прямое действие, которое ретранслируется через В, в то время как при линейном расположении происходит противоположное. Между этими крайностями два эффекта могут взаимно отменяться, так что, *даже хотя А и С могут быть близкими в пространстве*, потому что они разделяют сильное дипольное взаимодействие, *ЯЭО между ними может быть довольно малым.* Это другой важный момент, который надо иметь в виду (особенно, когда используются более длительные времена насыщения), так как в любой реальной системе всегда могут существовать множество конкурирующих косвенных путей. Кривые рис. 8.16 демонстрируют, что точка прохождения через ноль изменяется с межъядерными расстояниями, и что наклоны кривых большие в этот момент, так хотя маловероятно, что ЯЭО отменится точно до нуля, он очень может

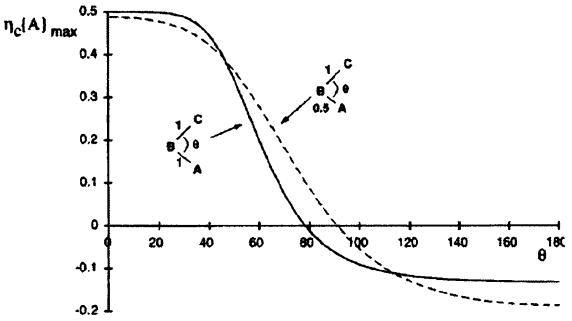


Рисунок 8.16. Вычисленные ЯЭО стационарного состояния для спина С при насыщении спина А, как функция угла А-В-С в быстро кувыркающейся изолированной трёх-спиновой системе. Результирующий ЯЭО является балансом между прямыми и косвенными эффектами А-С и две кривые иллюстрируют зависимость от относительных межьядерных расстояний.

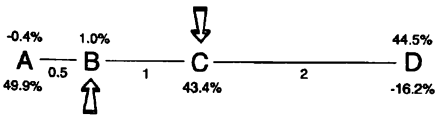


Рисунок 8.17. Вычисленные усиления ЯЭО стационарного состояния в изолированной четырёх-спиновой системе с относительными межьядерными расстояниями, как показано. Эти усиления определялись из уравнений, представленных в таблице 3.1 из [1].

быть меньше, чем ожидаемый из простых геометрических соображений. Хотя, в принципе, можно предсказать, что 4-спиновые эффекты ретрансляции вызовут положительные ЯЭО, они очень редко наблюдаются на практике, просто потому что они настолько слабые.

Влияния различных факторов, описанных выше, далее иллюстрируются, опираясь на четырёх-спиновую систему рис. 8.17, которая показывает необходимость учитывать все соседние спиновые взаимодействия, чтобы правильно интерпретировать данные ЯЭО стационарного состояния. Ясно, что усиления ЯЭО между В и С отличаются драматично, несмотря на то, что эти эффекты возникают через идентичные межъядерные расстояния. Кроме того, усиления В →А, В → С и С → D, все довольно подобны, несмотря на то, что имеется фактор четыре в различии между наибольшими и наименьшими расстояниями. Сущность правильного применения данных ЯЭО стационарного состояния - накопить множество измерений и проверить на логичность в пределах предложенного геометрического расположения, а не полагаться на отдельное ЯЭО усиление при получении ответа. Если бы выполнялось только одиночное облучение С на рисунке 8.17, можно сделать ошибочное заключение, что D его ближайший партнёр, а не В. При более осторожном подходе, измеряя также ЯЭО и от В, и от D должно появиться то, что подвергнет сомнению это заключение.

Снова, такие захватывающие различия маловероятно произойдут в действительности, в значительной степени по причине эффектов других многочисленных $\vec{n}_i^*$ источников релаксации, которые мы решили игнорировать, но должно быть ясно, что тщательное рассмотрение является существенным. Вообще говоря, только в очень специфических случаях отдельное измерение ЯЭО будет приводить к определённому структурному ответу, в то время как сравнительное изучение многих ЯЭО в молекуле более вероятно обеспечит решающий и правильный результат.

Когда молекула кувыркается в растворе настолько медленно, что она показывает отрицательный ЯЭО, последствия косвенных эффектов более драматичные и гораздо более проблематичны, и настолько сильны, что ЯЭО стационарного состояния становятся в значительной мере бесполезным. Проблема по существу двойная: во-первых, они имеют тот же самый знак, что и прямые эффекты, поэтому не могут легко различаться, и, во-вторых, они растут быстро и могут достигать очень высоких интенсивностей. Первая из них последствие факта, что отрицательный ЯЭО (уменьшение заселенности) возникает от насыщения (принудительное уменьшение заселенности), поэтому, аналогично, косвенный эффект на третий спин также будет отрицательным, и так далее. В предельном случае увеличенных времен насыщения ЯЭО, первоначально произведенный между двумя спинами, может распространяться по всей молекуле, до тех пор, пока все ядра не станут испытывать то же самое ЯЭО усиление (рис. 8.18). Это распространение информации по всей молекуле часто упоминается как *спиновая диффузия* по довольно очевидным причинам, и может уподобляться тепловой диффузии через проводящее твёрдое тело. Предел медленного кувыркания также упоминается как *предел спиновой диффузии*. Из-за этого, ЯЭО стационарного состояния в режиме отрицательного ЯЭО подводит, и не обеспечивает надежной информации о расстоянии или сближенности. Вместо этого становится необходимым рассматривать *скорость, с которой* растут ЯЭО между спинами, чтобы подобрать информацию о расстоянии, диктуя применение измерений кинетики в форме экспериментов переходного ЯЭО (Раздел 8.4).

Перенос насыщения

Осложнения, возникающие от переноса насыщения от одного резонанса к другому посредством химического обмена (рис. 8.19) также отличаются в двух крайних режимах движения.

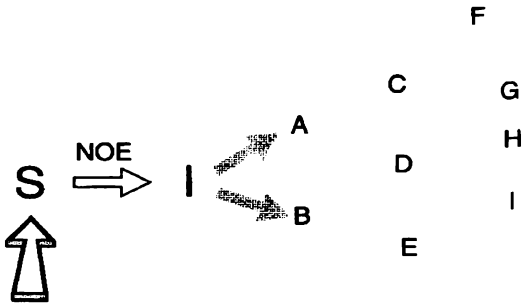


Рисунок 8.18. Схематическая иллюстрация процесса спиновой диффузии, в котором первоначальный **S-I** ЯЭО эффективно передается на соседние ядра и распространяется по всей молекуле.

Обменные пики всегда показывают поведение того же знака, что и первоначально насыщенный резонанс, поэтому имеют противоположный знак для положительного ЯЭО, но такой же, как отрицательные ЯЭО. Идентификация откликов, возникающих от химического обмена, а не ЯЭО - дальнейшая проблема, связанная с режимом отрицательного ЯЭО; перенос насыщения рассматривается далее в следующих ниже практических разделах.

8.3.3. Резюме

Предыдущие разделы охватывали наиболее важные принципы в сердцевине ЯЭО. Несмотря на попытку избегать обширного применения базовой математики, и вместо этого полагаясь на иллюстрированные модели, где возможно, эти разделы, обязательно, немного больше технические, чем другие главы в книге. Цель состояла в том, чтобы представить разумно тщательное введение в ЯЭО, которое еще совместимо с уровнем этого текста, а не просто снабжая читателя утверждениями фактов с небольшим оправданием или поддержкой. Этот раздел даёт обзор ключевых моментов, которые представлены выше, позволяя читателю более непосредственное напоминание самых важных свойств ЯЭО.

- ЯЭО - изменение интенсивности резонанса ядерного спина, **I** ("Interesting"), когда разности заселённостей через переходы ближайшего соседа **S** ("Source") отклоняются от их значений равновесия обычно ***насыщением*** или ***инверсией заселенности.*** Он возникает, поскольку система возмущённого спина изменяет её спиновые заселённости, пытаясь восстановить состояние равновесия.
- *ЯЭО стационарного состояния* - те, которые измеряются после периода непрерывного насыщения **S**-спина, в течение которого новое «стационарное» состояние равновесия развивается для заселенностей I-спина. Усиление ЯЭО обычно обозначается как $\eta_I\{S\}$ и указывается в процентах.

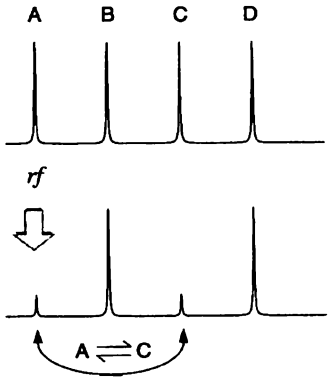


Рисунок 8.19. Схематическая иллюстрация процесса переноса насыщения. Насыщение резонанса A ведёт к одновременному насыщению резонанса C, если ядра A и C испытывают взаимный химический обмен в течение периода насыщения.

- ЯЭО стационарного состояния могут обеспечить информацию только об относительных межъядерных расстояниях, а не об измерениях абсолютных межьядерных расстояний.
- ЯЭО возникает только между ядрами, которые разделяют взаимное *дипольное взаимодействие* (прямое, магнитное взаимодействие через пространство) и, таким образом, релаксируют друг с другом через диполь-дипольный релаксационный механизм. Только этот механизм делает вклад в изменения заселенности ядерного спина, которые производят ЯЭО, который близко связан с продольной спиновой релаксацией. Зависимость от межьядерного расстояния, которая делает ЯЭО настолько полезным, происхоит от силы дипольного взаимодействия между двумя спинами, которая обратно пропорциональна расстоянию между ними r_{IS}, (как r^{-3}).
- Продольная спиновая релаксация требует стимула в форме магнитного поля, колеблющегося на частоте, равной частоте (энергии) перехода. В случае дипольной релаксации, она возникает из зависящего от времени поля, которое спин испытывает от его дипольно-связанного соседа, поскольку молекула вращается или кувыркается в растворе. ЯЭО в свою очередь зависит от скоростей кувыркания молекул.

- Величина и знак ЯЭО образуется из соревнования между различными путями релаксации. Если доминирует путь W_2 ($\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\beta$), наблюдаются положительные ЯЭО, в то время как доминирование пути W_0($\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha$) ведёт к наблюдению отрицательных ЯЭО. Пути релаксации W_2 и W_0 (которые включают взаимный переворот двух спинов) все вместе упоминаются *как пути поперечной релаксации*, и только они делают вклад в генерацию ЯЭО. Все другие вклады в релаксацию в виде процессов W_1 ($\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\alpha$ и $\beta\alpha \leftrightarrow \beta\beta$, включающих переворот только одного спина) служат, чтобы уменьшать полную величину эффекта, и поэтому упоминаются как вклады *утечки*.
- Быстрое молекулярное кувыркание, соответствует короткому времени корреляции, т.е. способствует более высокой энергии процесса W_2, поэтому малые молекулы в растворителях низкой вязкости показывают положительный гомоядерный ЯЭО *(предел крайнего обужения)*. Наоборот, медленное кувыркание молекул (длительные времена корреляции) способствует процессу низкой энергии W_0, что означает, что большие молекулы, или меньшие молекулы в высоко вязких растворителях, показывают отрицательный гомоядерный ЯЭО (*предел спиновой диффузии)*.
- Максимально возможный положительный ЯЭО - $\gamma S/2\gamma I$, другими словами 50 % в *гомоядерной* системе. Усиления в *гетероядерных* системах могут быть гораздо большими, например, 199% от ^1H к ^{13}C, и могут служить полезным источником усиления чувствительности при наблюдении I-спина низкого γ. Они также становятся отрицательными, если одно из γ_S отрицательно, например, -494 % от ^1H к ^{15}N, и может в некоторых случаях вести к жёсткому уменьшению сигнала или даже к его исчезновению.
- Максимально возможный отрицательный ЯЭО в гомоядерной системе -100 %.
- Между пределами крайнего сужения и спиновой диффузии, лежит трудная область, в которой ЯЭО может становиться нулевым (когда $\omega_0\tau_C \approx 1$) или, по крайней мере, довольно слабым, часто требуя изменения экспериментальных условий или применения измерений ЯЭО вращающейся системы координат.
- В изолированной гомоядерной двухспиновой системе в пределе крайнего обужения, релаксирующей исключительно через диполь-дипольный механизм, ЯЭО стационарного состояния предсказывается +50% и *независимым от межъядерного расстояния* r_{IS}. Однако, начальная скорость, с которой ЯЭО растёт, пропорциональна $\mathbf{r_{IS}^{-6}}$.
- В более реальной многоспиновой системе, соседние ядра **N**, которые близки к **I**, могут также делать вклад в его путь релаксации W_1. Величина ЯЭО тогда становится зависящей от межъядерного расстояния **I-S** (инверсно, как $\mathbf{r_{IS}^{-6}}$), но также среди других факторов имеет и зависимость от расстояния между **I** и его ближайшим соседом (инверсно, как $\mathbf{r_{IN}^{-6}}$).
- Прямое следствие этого заключается в том, что для правильной интерпретации данных ЯЭО стационарного состояния, становится существенным рассматривать не только межъядерные расстояния **I-S**, но также и близость всех других ядер (источников релаксации), окружающих **I**.
- Это также означает, что ***ЯЭО стационарного состояния редко симметричен***. То есть, ЯЭО, наблюдаемый на спине А при насыщении спина В, $\eta_A\{B\}$, вряд ли будет равняться обратному измерению от насыщения А и наблюдения В, $\eta_B\{A\}$. Это следствие того факта, что соседи, окружающие А, маловероятно соответствуют окружению В по числу и расстоянию.
- Релаксация спина с ближайшим соседом будет подавляться этим соседом и, как следствие, ЯЭО на этом спине от более отдалённого исходного спина будет иметь тенденцию быть малым. Наоборот, ядра, которые не имеют близлежащих соседей, испытают релаксацию только от отдаленных соседей и, в результате, ЯЭО от этих соседей будут большие, несмотря на от-

носительно большое вовлеченное межъядерное расстояние. Таким образом, следует ожидать, что ЯЭО через подобные расстояния на метиленовый и на метиновый протоны будет обычно несколько меньше для метиленового протона, потому что он всегда будет иметь, по крайней мере, одного ближайшего соседа - его геминального партнера.

- ***Дальние ЯЭО нарастают только медленно***, благодаря зависимости скорости от r^{-6}, потому требуют длительных периодов насыщения прежде, чем становиться заметными.
- ЯЭО усиления *могут также передаваться* к соседним спинам. Например, ЯЭО от А к В может далее передаваться на спин С, который также поперечно релаксирует с В, такие события упоминаются как *косвенные эффекты.* Свойства косвенных усилений заметно отличаются в положительном и отрицательном режимах ЯЭО.
- Когда прямые (А-В) ЯЭО *положительны*, косвенные эффекты при С *слабые и отрицательные* преобладают, когда эти три спина имеют приблизительно линейное расположение (поэтому могут обеспечивать полезную геометрическую информацию), и развиваются только медленно, с характеристичным временем задержки, и поэтому также требуют длительных периодов предварительного насыщения. Они упоминаются как *трехспиновые эффекты.* Хотя теоретически возможны дальнейшие связи, они обычно слишком слабые для наблюдения.
- Возможно, что положительные прямые действия и отрицательные косвенные эффекты могут отменяться или содействовать уменьшению величины ЯЭО. Таким образом, несмотря на то, что два спина расположены близко, ЯЭО между ними может быть довольно малым или даже незначительным (особенно, когда используются более длительные периоды насыщения).
- Когда прямые (А-В) ЯЭО отрицательные, косвенные эффекты также отрицательны, и поэтому не могут различаться, они распространяются быстро и имеют высокие интенсивности. Этот процесс упоминается как *спиновая диффузия* и фатален для ЯЭО стационарного состояния, так как это вызывает потерю специфики и, следовательно, не обеспечивает никакой информации о геометрии молекулы. В этом режиме обычно становится необходимым использовать кинетические (переходные) методы, основанные на измерении скоростей роста ЯЭО.
- Принимая во внимание все тонкости, связанные с ЯЭО стационарного состояния, представленные выше, должно быть ясно, что неблагоразумно придавать слишком большое значение абсолютным величинам усилений ЯЭО стационарного состояния. В действительности, различия в несколько процентов, сами по себе, означают немного, и обычно необходимо рассматривать набор усилений при выполнении структурного или конформационного анализа, чтобы убедиться в однозначности заключения. Качественная интерпретация многих измерений - наиболее подходящий подход к интерпретации данных ЯЭО стационарного состояния.

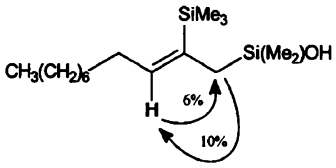
8.3.4. Применения

Теперь представим некоторые специфические примеры иллюстрации проблем, описанных выше, и как могут использоваться измерения ЯЭО, чтобы обеспечить уникальные данные по структурному анализу. Как утверждалось во введении, ЯЭО наиболее часто используется во время последних стадий структурных исследований, когда общая структура молекулы, по крайней мере, в большой степени определена. Для довольно малой молекулы, это может быть возможным из знания использованной химии и из одномерных спектров, в то время как большие или структурно сложные молекулы могут требовать применения различных корреляционных методов, прежде чем рассматривать применение эксперимента ЯЭО. В любом случае, доверительность точности протонных отнесений обладает первостепенной важностью, так как ошибки в них, вероятно (если не более вероятно), должны привести к получению ошибочных стереохимических заключений, которые должны вскрываться самими изучениями ЯЭО.

Все примеры, представленные здесь, использовали разностный метод ЯЭО стационарного состояния и, следовательно, ограничиваются «малыми» молекулами, в которых ключевые резонансы достаточно разрешаются для селективного облучения. В рутинной работе научно-исследовательской лаборатории часто встречается много молекул, когда необходимо сделать разумный выбор растворителя для оптимальной дисперсии сигнала. Они также обеспечивают некоторое показание величин усилений ЯЭО, типично встречающихся в обычных лабораторных исследованиях, которые часто не оправдывают ожиданий теоретических чисел, обсужденных в предыдущих разделах. Дополнительные примеры, использующие другие методы ЯЭО, представляются в последующих разделах.

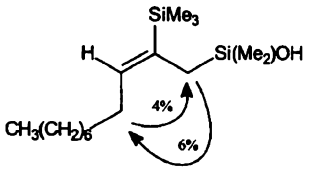
E или Z геометрия

Различие E и Z алкеновых изомеров часто возможно прямым измерением вицинальных протон-протонных взаимодействий через ненасыщенность, посредством того, что *цис-* и *транс-* взаимодействия обычно существенно различаются и позволяют делать это различие (обычно $J_{цис}$=7-11 Гц, $J_{транс}$=12-18 Гц). Когда существует только одиночный алкеновый протон, этот метод не может больше использоваться, и тогда ЯЭО предлагает альтернативный подход при условии, что протонированная группа существует через двойную связь. Один такой пример находится в различии *E* и Z силанолов **8.1a** и **8.1b** [3]. Z-изомер легко идентифицировался из ЯЭО между алкеновым протоном и группой CH_2Si, а дальнейшее подтверждение обеспечивалось наблюдением контрастирующих ЯЭО для другого (E-) изомера. Асимметрия в величинах ЯЭО усилений также ясно очевидна в этом примере и не должна вызывать никакого удивления после предшествующих обсуждений.



Z

8.1a



E

8.1b

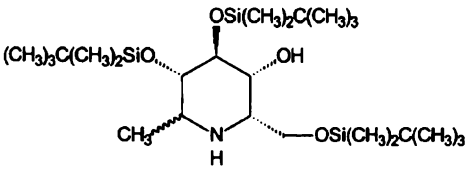
Положение ароматического замещения

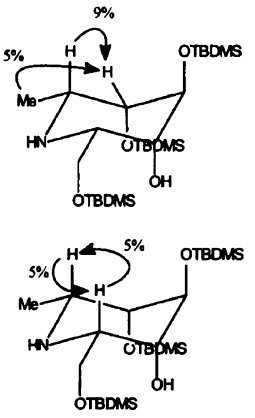
Определение положения замещения в молекуле может также быть проблематичным, когда не существует никаких прямых протон-протонных взаимодействий, чтобы связать новую часть, что часто имеет место, когда замещение делается на гетероатоме. В частности, при работе с ароматическими системами ЯЭО часто может обеспечивать однозначные решения. Эти системы особенно благоприятны, потому что они ограничены, будучи плоскими, и, следовательно, обычно безопасно полагать, что ближайшие соседи будут в смежных положениях в кольце. Дифференцирование π- и τ-замещённых гистидинов [4] **8.2a** и **8.2b** обеспечивает простую иллюстрацию этого. В π-замещённых системах облучение протона H5 усиливает только одну CH_2 группу, связанную с имидазольным кольцом, в то время как в τ-замещённых изомерах усиливались обе. До применения ЯЭО, дифференцирование было возможно только через химическую деградацию или через эмпирические правила, основанные на различиях в малой (<1,5 Гц) константе взаимодействия H2-H5, которая не всегда могла разрешаться. Альтернативный подход, который следует рассматривать в настоящее время в таком случае, должен устанавливать связанность, идентифицируя

дальние протонно-углеродные корреляции через гетероатом при помощи эксперимента HMBC (раздел 6.4).

Конфигурация заместителя

Другой широко встречающийся вопрос и, возможно, наиболее общая проблема в синтетической химии, для решения которой используется ЯЭО, относительная конфигурация заместителей в кольцевых системах. Она наиболее часто применяется к 5- и 6-членным кольцам, не только по причине их вездесущности, но также и потому что большие кольца имеют тенденцию значительно большей гибкости, более затрудняя однозначный вывод. Для 6-членных колец, в частности, прямой анализ протонных констант взаимодействия в кольце может сам по себе быть информативным по причине обычно определённых различий в *аксиально-аксиальных относительно аксиально-экваториальных/экваториально-экваториальных* констант взаимодействия в конформациях кресла ($J_{ax\text{-}ax} \approx$ 10-12 Гц, $J_{ax\text{-}eq}/J_{eq\text{-}eq} \approx$ 2-5 Гц; см. раздел 5.6.2 и рис. 5.51, например). Однако в определении ориентации метильной группы в **8.3** они не были бы информативны, по причине подобия между *ax-eq* и *eq-eq* константами взаимодействия. Сбор ЯЭО усилений смог идентифицировать метил, как занимающий экваториальное положение, в частности ЯЭО 1,3-диаксиального метинового протона.



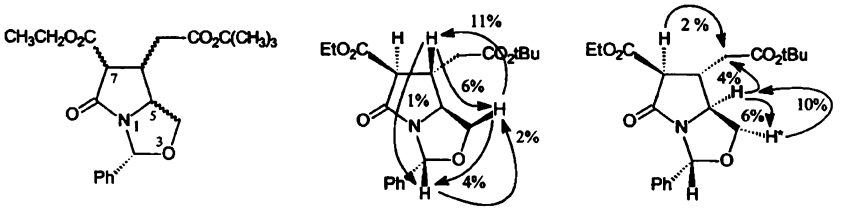


8.3

Вицинальные взаимодействия в пятичленных кольцах обычно предлагают большую двусмысленность в определении относительных конфигураций и здесь всегда требуются осторожные измерения ЯЭО, так как *цис-* и *транс-* ЯЭО между смежными протонами имеют часто подобную величину. В этих случаях разумно накопить настолько много ЯЭО усилений, насколько будет возможно для данного образца, чтобы гарантировать логичность всех из них в пределах предложенной стереохимии. Эти моменты иллюстрируются конфигурационным отнесением синтезированных эпоксипролинов [5] **8.4a** и **8.4b**. Незначительное J взаимодействие между H2 и H3 в **8.4a** пробно предсказывало, что эти протоны имеют *транс*-конфигурацию, а немного большее, чем 2,5 Гц взаимодействие в **8.4b** предполагает, что они разделили *цис*-расположение. Заключения, извлечённые из интерпретации данных ЯЭО, согласовывались с этим предположением, но основывались на сравнении ЯЭО очень подобной величины между H5 и H4 протонами в каждом соединении. Доступность обоих изомеров позволяла сравнение их откликов ЯЭО H4-H5, основанных на

идентификации H5β из его ЯЭО с H2, и разности, наблюдаемые между этими изомерами, обеспечивали дальнейшее подтверждение отнесений. Подтверждение этих отнесений произведено дополнительными синтетическими структурными корреляциями.

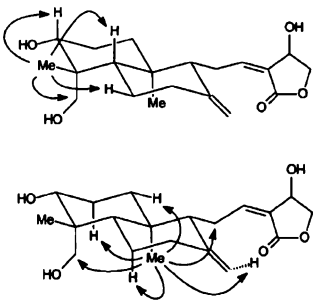
В бициклическом лактаме **8.5** оказалось возможным определить относительную конфигурацию трех стереоцентров через последовательную интерпретацию данных ЯЭО, основываясь на известной стереохимии только при одном (C2). Недостаток ЯЭО между протонами на смежных углеродах C5, C6 и C7 предполагает, что соседние протоны разделяют *транс* расположения, хотя одно отсутствие ЯЭО никогда не может рассматриваться, как определённое доказательство, как подчеркивалось в предыдущих обсуждениях. Более важно, что эта стереохимия подтверждается наблюдением дополнительных H6-H4, H6-H2 и H7-H9 ЯЭО. Снова обратите внимание на асимметрию в ЯЭО между H2-H4, H4-H6 и H4*-H5, с ЯЭО *на* метиленовый протон, являющимся всегда *меньше*, чем ЯЭО отсюда на метиновый протон, вследствие тесной близости геминальных соседей.



8.5

Отнесение резонансов

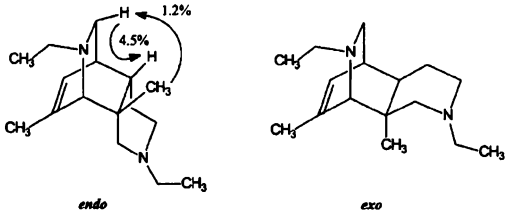
Предпосылка для большинства ЯЭО исследований конфигурации или конформации - отнесение протонного спектра молекулы, означающее, что каждый резонанс может связываться с единственным протоном в пределах общей структуры. Такие отнесения обычно производятся из 1D спектров и различных корреляционных методов, описанных в предыдущих главах, хотя в некоторых случаях ЯЭО может самостоятельно использоваться для отнесения резонансов. Он наиболее вероятно полезен для отнесения резонансов изолированных групп, которые не разделяют никаких протонных скалярных взаимодействий, хотя ни в коем случае не ограничивается этим. Пример - отнесение двух метильных резонансов в гепатозащитном агенте андрографолиде **8.6**, которые являются отдаленными один от другого в молекуле и показывают весьма характеристичные отклики ЯЭО. Применение экспериментов дальней гетероядерной корреляции должно также рассматриваться при решении таких проблем, и действительно может понадобиться в первую очередь при определении общей структуры.



8.6

Эндо или экзо аддукты

Необходимость различать *экзо-* и *эндо-* аддукты в сочленённых кольцевых системах - другой обычно встречающийся случай, который часто может обращаться к ЯЭО, и определение стереохимии при С5 лактама **8.5** выше может рассматриваться как один такой пример. В таких случаях отклики ЯЭО, наблюдаемые между протонами при сочленении и протонами на соседних кольцах, могут часто обеспечивать однозначное стереохимическое отнесение. Это имело место для идентификации **8.7**, как *эндо* циклоаддукта [6]. Материал, синтезируемый как часть модельного изучения для биомиметического синтеза манзаминовых алкалоидов, семейство *n*-карболиновых алкалоидов полученных из морских губок, которые обладают мощными антилейкемическими и цитотоксическими свойствами. Здесь было важно подтвердить, согласуется ли стереохимия продукта с предложенной изучаемой гипотезой биосинтеза, как оказалось в нашем случае. Здесь узловой мостиковый протон фактически слишком сильно перекрывался со смежным резонансом для селективного насыщения, хотя ЯЭО на нём были очень отчётливы. Когда вообще нельзя использовать узловые мостиковые протоны, или если они не существуют, тогда отнесение должно полагаться на наблюдение ЯЭО между кольцевыми протонами с обеих сторон сочленения.



endo *exo*

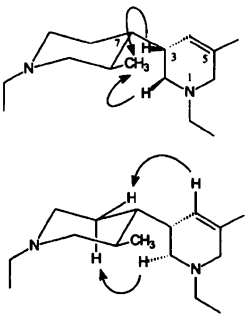
8.7

Конформационная предпочтительность

Определение предпочтительной конформации в малых гибких молекулах, используя ЯЭО, представляет гораздо большую проблему, исключительно по причине быстрого обмена между многими возможными конформациями и потому что сам ЯЭО будет представлять только среднее взвешенное межъядерных расстояний, существующих в конформерах. Детальные исследования, необходимые в этих случаях для выделения значимых данных, поэтому редко предпринимаются. Однако когда ограниченные конформационные процессы ведут к одной сильно предпочтительной конформации, может оказаться достаточно доступных данных ЯЭО, которые позволяют её опре-

делить. Очевидными примерами могло служить различение конформеров кресла и ванны циклогексанов или медленно взаимно конвертирующих ротамеров. Специфические конформации могут также становиться предпочтительными в присутствие стерических затруднений или, например, сильных взаимодействий водородного связывания.

Пример предпочтительной конформации, определённой измерениями ЯЭО, - структура **8.8** (также полученная как часть биомиметического синтеза манзаминовых алкалоидов, упомянутых выше [7]), в которой два гетероциклических кольца приблизительно ортогональны друг к другу. Ограниченные и специфические ЯЭО, наблюдаемые при сочленении двух колец, не совместимы со свободным вращением вокруг одиночной связи, связывающей кольца, и структура оказывается, по существу заторможенной, предположительно присутствием С8 метильной группы. Эти ортогональные отношения далее поддерживаются почти незначительным взаимодействием между протонами Н7 и Н3, показывая, что двугранный угол между ними близок к 90° Комбинированное применение ЯЭО и констант взаимодействия часто представляет оптимальный подход к вопросам конформации.



8.8

8.4. ПЕРЕХОДНЫЙ ЯЭО

В предшествующих разделах неоднократно подчёркивалось, что ЯЭО стационарного состояния, измеренные между двумя ядрами, невозможно легко преобразовывать в межъядерные расстояния, потому что они образуются из баланса между влияниями всех соседних спинов. В лучшем случае они обеспечивают информацию только об *относительных* межъядерных расстояниях. Также подчёркивалось, однако, что *скорость*, с которой ЯЭО нарастает к этому стационарному состоянию, при соответствующих условиях может прямо связываться с этими расстояниями. Также было показано, что для молекул, которые представляют отрицательные усиления, стационарные измерения могут не позволять обеспечивать какую-либо надёжную информацию пространственной близости и здесь мы вынуждены учитывать кинетику ЯЭО. Логический подход к таким измерениям состоял бы в том, чтобы следовать подходу, принятому для измерения стационарных эффектов. Насыщение целевого резонанса в течение периодов, которые гораздо меньше, чем необходимо для достижения стационарного состояния, позволяло бы появление *некоторого* ЯЭО, который затем регистрируется. Повторение эксперимента с прогрессивно инкрементируемыми периодами насыщения позволяет показать нарастание. Вследствие применения сокращенных периодов насыщения, усиления, наблюдаемые этим методом, называются *усечёнными управляемыми ЯЭО (ТОЕ).*

Хотя он когда-то и был популярным, этот экспериментальный подход гораздо меньше используется в настоящее время и поэтому не будет рассматриваться в дальнейшем. Более общий подход к получению данных кинетики, мгновенно возмутить спиновую систему не насыщением, а инвертируя целевой резонанс (то есть, инвертируя разности заселённостей через соответствующие переходы), а затем позволяя ЯЭО развиваться в отсутствие дальнейшего внешнего вмешательства. Новые заселенности затем отбираются 90° импульсом как обычно (рис. 8 20). В этом случае наблюдается первоначальное нарастание ЯЭО в течение некоторого времени, но, в конечном счете, он исчезает, поскольку спиновая релаксация восстанавливает состояние равновесия; эти усиления, поэтому называются *переходными ЯЭО.*

Измерение переходного ЯЭО получило широко распространенную популярность, первоначально в биохимическом сообществе, в форме 2D NOESY эксперимента, который остается чрезвычайно важным структурным инструментом в этой области и все более и более в анализе меньших молекул. Совсем недавно 1D эксперимент переходного ЯЭО (то есть 1D NOESY) был преобразован и распространился в химическом сообществе как селектированная градиентом последовательность, способная предоставлять весьма впечатляющие высококачественные спектры.

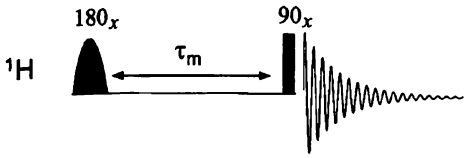


Рисунок 8.20. Общая схема для наблюдения переходного ЯЭО. После инверсии целевого резонанса (источника), ЯЭО развивается в течение времени смешивания τ_m, после чего регистрируется сигнал.

В этом видее и в виде 2D последовательности переходные измерения становятся всё более и более популярными в обычных химических применениях. На практике переходные эксперименты, либо 1D, либо 2D, более рутинно используются качественно как «моментальные» методы, обеспечивая быстрый обзор усилений в молекуле, а не используются для установления графика роста ЯЭО. Независимо от того, как они используются, чтобы правильно выполнять и интерпретировать эти методы необходимо понимать кое-что из кинетики ЯЭО.

8.4.1. Кинетика ЯЭО

После (предполагаемой) мгновенной инверсии резонанса **S**-спина, *начальная* скорость роста ЯЭО спина **I** линейно зависит от скорости кросс-релаксации между этими двумя спинами *даже в многоспиновых системах*, так что:

$$\frac{dI_z}{dt} = 2\sigma_{IS}S_z^0 \qquad (8.11)$$

(коэффициент 2 в этом случае возникает из инверсии заселённостей, а не насыщения, как рассматривалось раньше). Пользуясь уравнениями 8.4 и приближением $\omega_I=\omega_S$ для гомоядерной системы, скорость кросс-релаксации (W_2-W_0) принимает вид:

$$\sigma_{IS} \propto \gamma^4 \left\{ \frac{6}{1+4\omega_0^2\tau_c^2} - 1 \right\} \frac{\tau_c}{r_{IS}^6} \qquad (8.12)$$

В отличие от стационарных усилений, переходные усиления единственно зависят только от межъядерного расстояния как r_{IS}^{-6}, в то время как имеет силу так называемая *аппроксимация начальной скорости*. Здесь два перекрёстно релаксирующих спина первоначально ведут себя, как изолированная спиновая пара и рост ЯЭО имеет линейную зависимость от времени смешивания. При использовании более длинных периодов смешения релаксация спина **I** начинает конкурировать с перекрёстной релаксацией между **I** и **S**, поэтому кривая нарастания отклоняется от линейности и ЯЭО, в конечном счете, затухает до нуля (рис. 8.21). Таким образом, для того чтобы аппроксимация начальной скорости имела силу, должны использоваться времена смешивания значительно короче, чем время релаксации T_1 спина **I**. Только при этих условиях возможно значащее измерение расстояния.

Если, с другой стороны, цель состоит в том, чтобы качественно идентифицировать корреляции через пространство, как чаще бывает в обычной работе, сравнимые с T_1 периоды смешения обес-

печивают максимальные усиления. Так как переходные ЯЭО развиваются в отсутствие внешнего РЧ поля, они имеют тенденцию быть более слабыми, чем эффекты в стационарном состоянии.

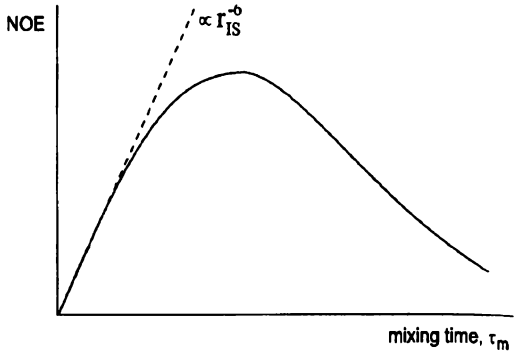


Рисунок 8.21. Схематическая иллюстрация развития ЯЭО между спинами **I** и **S** как функции времени смешивания.

Максимальное теоретическое гомоядерное усиление также уменьшается до 38 % (от 50 %) для положительного ЯЭО, так что осторожный выбор времени является критическим для успеха переходных экспериментов. Во всех других отношениях зависимость переходного ЯЭО от времен корреляции соответствует зависимости стационарных эффектов с максимальными гомоядерными усилениями для режима отрицательного ЯЭО, снова составляющего –100 %, вследствие доминирования эффективной кросс-релаксации. Имея дело с молекулами, которые существуют в этом режиме, также необходимо быть осторожным и, если возможно, избегать потенциальных осложнений, возникающих из опасности спиновой диффузии (действительно, это первичная причина использования переходных методов), которая снова требует применения консервативно коротких периодов смешения.

8.4.2. Измерение межъядерных расстояний

Полагая аппроксимацию начальной скорости справедливой (рост ЯЭО линейный), величина усиления между двумя спинами A и B после периода τ будет пропорциональна скорости кросс-релаксации, которая, в свою очередь, зависит от r_{AB}^{-6}:

$$\eta_A\{B\} = k\sigma_{AB}\tau = k' r_{AB}^{-6}\tau \qquad (8.13)$$

Константы пропорциональности здесь содержат время корреляции молекулы τ_C, в дополнение к множеству известных физических констант, и {B} теперь показывает инверсию, а не насыщение B. В принципе, если бы величина τ_C была известна, это непосредственно обеспечило бы измерение r_{AB}. В то время как это возможно определить (из измерений времени релаксации), это редко делается на практике, и чаще используют известное внутреннее расстояние как опорное и избегают необходимости таких трудоёмких измерений. Если ЯЭО между опорными ядрами X и Y межъядерного расстояния r_{XY} также измеряется, тогда:

$$\frac{\eta_A\{B\}}{\eta_X\{Y\}} = \frac{r_{AB}^{-6}}{r_{XY}^{-6}} \qquad (8.14)$$

Прямое сравнение двух интенсивностей ЯЭО, таким образом, обеспечивает неизвестное межъядерное расстояние. Эти простые отношения широко использовались для определения межъя-

дерных расстояний, особенно в биологических макромолекулах. Из одиночного эксперимента *можно оценивать* расстояния, *полагая, что аппроксимация начальной скорости имеет силу для всех взаимодействий.* Это связывается со всеми изучаемыми межъядерными векторами, обладающими одинаковыми временами корреляции, которые не могут встречаться, когда присутствует внутреннее движение. Рассмотрение этого вопроса лежит вне поля зрения этой работы; дальнейшие подробности можно найти в ссылке [1].

Значение одиночного «межъядерного расстояния» также должно тщательно рассматриваться. В действительности, межъядерные расстояния изменяют во времени с конформационным усреднением, так что концепция одиночного расстояния - просто удобная модель событий. Кроме того, в случаях конформационного обмена вычисленное расстояние имеет тенденцию сильно взвешиваться к более коротким расстояниям, так как ЯЭО значительно более интенсивный для них, по причине фактора r^{-6}. Рассмотрим случай быстрого усреднения во временной шкале ЯМР между двумя равно заселёнными конформерами, так что только одиночные резонансы наблюдаются для каждого химически удалённого центра. В одном конформере расстояние между двумя спинами – 0,25 нм, в то время как в другом оно – 0,60 нм (рис. 8.22). ЯЭО при условиях быстрого конформационного обмена усредняется как $\langle r^{-6} \rangle^{-1/6}$ (где <...> указывает среднее значение), так что *очевидное* разделение, как можно было бы вычислить из наблюдаемых интенсивностей ЯЭО, – 0,28 нм, а не среднее 0,42 нм, которое можно было бы предсказать.

Поэтому обычно измерения ЯЭО будут иметь тенденцию недооценки, а не переоценки расстояний в таких случаях, которые могут быть проблематичными для вычислений структуры. Эти проблемы наиболее жёсткие в случае малых молекул, где следует ожидать обширного конформационного усреднения, и детализированные вычисления структуры, основанные на *количественных* измерениях расстояния для гибких малых молекул довольно редки.

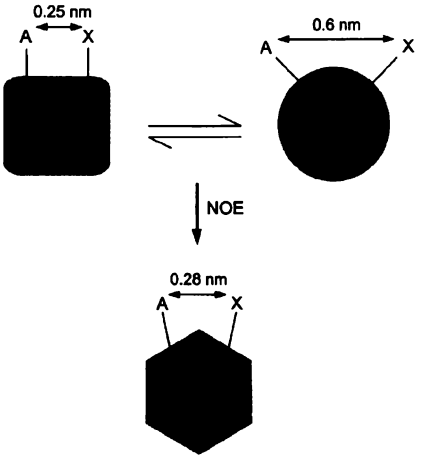


Рисунок 8.22. Влияние быстрого конформационного обмена на оценки межъядерных расстояний, основанных на измерениях ЯЭО.

Однако этот подход окажется чрезвычайно успешным в вычислениях структуры биологических макромолекул, где, чтобы избежать проблем усреднения и ошибок в измерениях интенсивности, обычно используются полуколичественные измерения (Раздел 8.7).

8.5. ЯЭО ВРАЩАЮЩЕЙСЯ СИСТЕМЫ КООРДИНАТ

Самая большая проблема, связанная с описываемыми до сих пор методами, - ясно, область «прохождения через нуль» около $\omega_0\tau_C \approx 1$, где обычный ЯЭО (лабораторной системы координат),

наблюдаемый через стационарные или переходные методы, становится исчезающе малым. Это обычно случается для молекул среднего размера с массами около 1000-2000 дальтон, в зависимости от частоты спектрометра и состояния раствора. С ростом интереса к большим молекулам во многих областях органического химического исследования вместе с более широкой доступностью более высокополевых приборов, эта область молекул, вероятно, должна всё более часто посещаться химиками-исследователями. В отличие от изменяющихся условий растворов, в попытке избежать этого, измерение ЯЭО во *вращающейся системе координат* обеспечивает альтернативное решение, хотя экспериментально проблематичное. Эти эффекты - аналоги вращающейся системы координат для переходных ЯЭО, описанных выше, и многие из обсуждений в разделе 8.4, касающиеся их применения, также уместны здесь. В этом случае, однако, скорость кросс-релаксации между гомоядерными спинами выражается:

$$\sigma_{IS} \propto \gamma^4 \left\{ \frac{3}{1+\omega_0^2\tau_c^2} + 2 \right\} \frac{\tau_c}{r_{IS}^6} \qquad (8.15)$$

В отличие от соответствующего уравнения для переходного ЯЭО (8.12 выше) это выражение остается положительным для всех значений τ_C, и бесспорная выгода ЯЭО вращающейся системы координат (ROE), совершенно очевидна, потому что они остаются положительным для всех реальных скоростей кувыркания молекул. Для малых молекул величина ROE соответствует таковой переходного ЯЭО, в то время как для больших молекул она достигает максимума 68% для гомоядерных спинов, но ни при каких обстоятельствах не становится равной нулю (рис. 8.23).

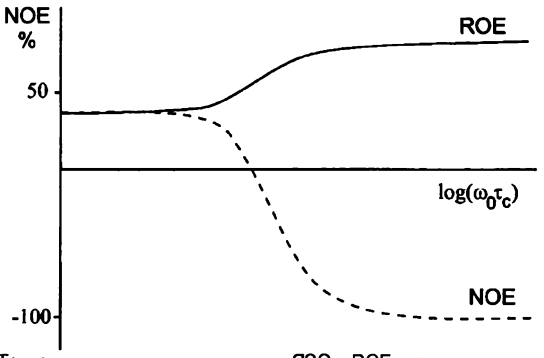


Рисунок 8.23. Схематическая иллюстрация зависимости ROE и переходного ЯЭО для изолированной гомоядерной двух-спиновой системы как функция скоростей кувыркания молекулы.

Точно так же скорости нарастания ЯЭО и ROE идентичны для малых молекул, но отличаются для очень больших. Для малой молекулы, которая имеет $\omega_0\tau_C << 1$ оба уравнения 8.12 и 8.15 упрощаются:

$$\sigma_{IS} \propto \frac{5\gamma^4\tau_c}{r_{IS}^6} \qquad (8.16)$$

В противоположность, для очень больших молекул, которые имеют, $\omega_0\tau_C >> 1$ левое выражение в скобках обоих уравнений 8.12 и 8.15 становится незначительным, давая:

$$\sigma_{IS}^{NOE} \propto \frac{-\gamma^4\tau_c}{r_{IS}^6} \quad \text{and} \quad \sigma_{IS}^{ROE} \propto \frac{2\gamma^4\tau_c}{r_{IS}^6} \qquad (8.17)$$

и, следовательно:

$$\sigma_{IS}^{ROE} = -2\sigma_{IS}^{NOE} \qquad (8.18)$$

Для очень больших молекул ROE, следовательно, растет вдвое быстрее, чем ЯЭО, и имеет противоположный знак [8].

Измерение ROE требует несколько другого экспериментального подхода (Раздел 8.8). По сути, ROE развиваются в то время, когда намагничивание удерживается статическим в *поперечной плоскости*, а не вдоль *продольной* оси (поэтому они иногда также упоминаются как поперечный ЯЭО). Чтобы генерировать требуемое возмущение заселённости исходных спинов, целевой резонанс подвергается *селективному* 180 ° импульсу прежде неселективного 90° импульса, так что он испытывает систему 270° переворотов, и таким образом инвертируется относительно всех других. Поперечная намагниченность затем «замораживается» во вращающейся системе координат применением непрерывных *импульсе блокировки спинов* низкой мощности. Это аналогично блокировке спина, описанной в разделе 5.7 для TOCSY эксперимента, и служит той же цели, то есть, чтобы предотвращать эволюцию (во вращающейся системе) химических сдвигов. Простейшая схема 1D последовательности поэтому такая, как на рис. 8.24. Эксперимент чаще выполняется как 2D эксперимент, где обычно называется ROESY (спектроскопия ЯЭО вращающейся системы координат).

Ситуация во время блокировки спина может рассматриваться как поперечный эквивалент событий во время смешивания переходного ЯЭО (рис. 8.25). Действие блокировки спина - поддерживать противоположное расположение векторов намагничивания, которые иначе утрачивались бы через дифференциальную эволюцию химического сдвига, и, таким образом, позволяет ROE развиваться через перекрёстную релаксацию в поперечной плоскости.

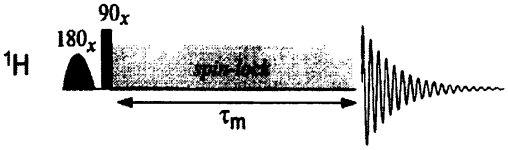


Рисунок 8.24. Общая схема наблюдения ЯЭО вращающейся системы координат. ROE развивается в течение длинного импульса блокировки спинов, который составляет период смешения τ_m.

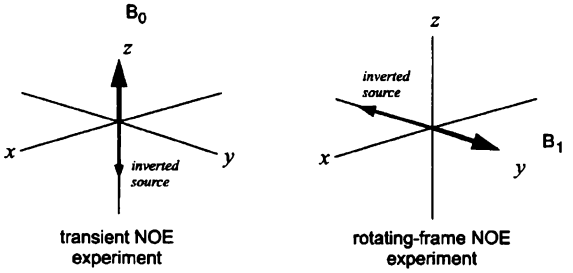


Рисунок _8.25. Эксперимент ЯЭО вращающейся системы координат может рассматриваться как поперечный эквивалент эксперимента переходного ЯЭО.

Спиновая релаксация здесь характеризуется постоянной времени $T_{1\rho}$ ($\cong T_2$). При использовании блокировки спина постоянное поле B_0 обычного ЯЭО эффективно заменяется гораздо меньшим РЧ полем B_1, и это то, что изменяет динамику ЯЭО. В то время как γB_0 обычно соответствует частотам в сотни мегагерц, γB_1 обычно только несколько килогерц, что означает, что $\gamma B_1 << \gamma B_0$ и, следовательно, ω_1 (частоты вращающейся системы координат) $<<\omega_0$. Следствие этого в том, что $\omega_1 \tau_C << 1$ для всех реальных значений τ_C, и *все молекулы ведут себя так, как будто они находятся в пределе крайнего обужения.* Таким образом, ROE положительны и любые косвенные эффекты имеют знак, противоположный прямым эффектам, и имеют тенденцию быть слабыми, а перенос насыщения может различаться знаком от ROE, независимо от размера молекулы и динамики.

Аргументы против этой очевидной пользы - множество экспериментальных проблем, преимущественно переносы TOCSY, также происходящие в течение блокировки спина, и ослабления сигнала от вне-резонансных эффектов. Эти проблемы далее обсуждаются в практических разделах, следующих ниже, поэтому здесь достаточно отметить, что требуется ещё большая забота при по-

лучении и использовании ROE, чем требуются для ЯЭО, настолько большая, что часто рассматривают эту методику как доступную только большим профессионалам.

Часть II: Практические аспекты

8.6. ИЗМЕРЕНИЕ ЯЭО СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ: РАЗНОСТНЫЙ ЯЭО

Основное требование для наблюдения ЯЭО стационарного состояния - правильный период предварительного насыщения целевого резонанса перед регистрацией спектра, как обсуждалось выше и указано на рисунке 8.1. Это диктует, что стационарные измерения получаются только из одномерных спектров, в которых спины, испытывающие ЯЭО, будут производить резонансы с изменяющимися интенсивностями относительно обычного 1D спектра. Вопрос тогда состоит в том, как лучше показывать и измерять эти изменения. Хотя, в принципе, это может достигаться прямым интегрированием резонансов относительно контрольного спектра, в действительности это нетривиальная операция, когда усиления могут составлять всего несколько процентов. Вместо этого, существует универсальный подход, который состоит в том, чтобы использовать «разностную спектроскопию» и вычитать контрольный спектр из спектра ЯЭО и получать разностные спектры, в которых, идеально, единственные остающиеся сигналы - усиления ЯЭО и насыщаемый резонанс (рис. 8.26). Это так называемый эксперимент разностного ЯЭО, который играл основную роль в структурной органической химии в течение многих лет [9]. Цель «разностного» подхода в том, чтобы делать *наблюдения* усилений *более легкими* и *более надёжными*, но не придает никакой новой информации разностному спектру, которой не было в первоначальном спектре ЯЭО.

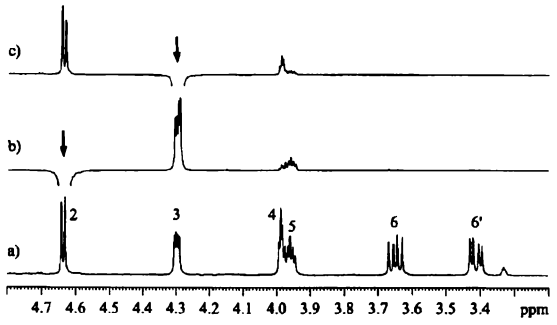
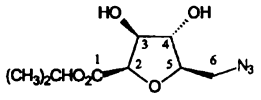


Рисунок 8.26. Контрольный 1D спектр (a) и спектры разностного ЯЭО (b и c) **8.9** в MeOD. Разностные спектры показывают только ЯЭО усиления и усечённый сигнал разности насыщаемого (помеченного стрелкой) резонанса. Наблюдаемые усиления согласуются с показанной 2,5-*цис* геометрией через кольцевой кислород **8.9**.



8.9

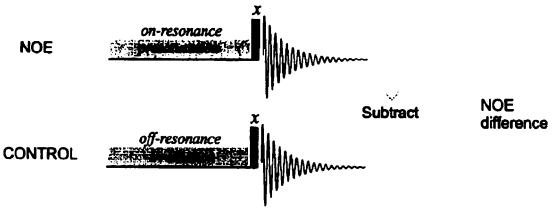


Рисунок 8.27. Процедура получения спектра разностного ЯЭО.

Эксперимент разностного ЯЭО схематично показан на рисунке 8.27. Спектр ЯЭО генерируется, применяя предварительное насыщение к целевому резонансу в течение периода т, после чего

преднасыщающее РЧ [13] выключается, и при помощи 90° импульса получается 1D спектр. Контрольный спектр получается *идентичным* способом, за исключением того, что предварительное насыщение больше не требуется. Чтобы удерживать условия регистрации для обоих экспериментов настолько подобными, насколько возможно, что является критическим для успешного разностного эксперимента, частота предварительного насыщения, перемещается достаточно далеко от всех резонансов (она помещается «вне-резонансно») для контроля, а не выключается совсем, обычно, её помещают далеко за краем спектра. Вычитание получающихся спектров (или ССИ, сопровождаемых ФП) дает разностный спектр. Успех этого подхода критически зависит от этих двух спектров, являющихся идентичными во всех остальных отношениях, за исключением свойств, введённых резонансным предварительным насыщением; в противном случае появляются ложные разностные отклики (см. ниже). На практике, совершенное вычитание резонансов экспериментально очень требовательно, поэтому разработаны различные процедуры для минимизации нежелательных изменений и, следовательно, артефактов.

8.6.1. Оптимизация разностных экспериментов.

Уменьшение артефактов вычитания

Эксперименты ЯЭО обычно требуют существенного приборного времени, потому что искомые усиления очень малы. Эксперимент разностного ЯЭО представляет собой строгое испытание и кратковременной, и долговременной стабильности спектрометра, так как изменения РЧ фазы, или частоты, или магнитного поля делают вклад в *разностные артефакты* (рис. 8.28).

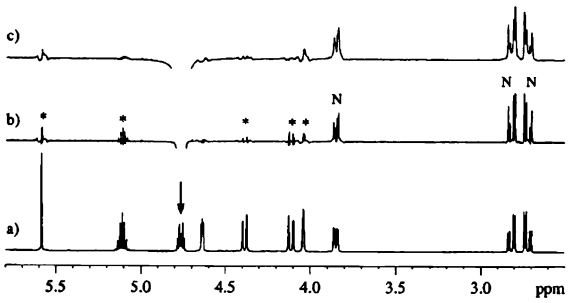


Рисунок 8.28. Артефакты разностного ЯЭО, показанные звёздочками в разностном спектре (b), возникают, когда два подобных, но не совсем идентичных сигнала, вычитаются, пытаясь показать истинный ЯЭО (N). Артефакты могут немного ослабляться при помощи функций окна путём уширения линий (c, lb = 1 Гц).

Они появляются как сигналы, подобные дисперсным, которые могут маскировать подлинный ЯЭО, кроме того, что они неприглядно выглядят. Совершенствование проектирования спектрометра прошло длинный путь для уменьшения этих нестабильностей и сделало наблюдение более слабых ЯЭО ещё более надёжным при уменьшении артефактов. Однако всё ещё требуется специальное внимание, чтобы достигать оптимальных результатов.

Первое соображение - стабильная окружающая среда образца, включая температуру образца, пункт особого беспокойства для водных растворов и для растворяемых веществ с химическими сдвигами, зависящими от температуры. Деятельность вблизи магнита давно рассматривается фактором, вкладывающим в ухудшение результатов разностной спектроскопии. Насколько это су-

---

[13] Исторически, преднасыщающее РЧ, как правило, применяется через «канал декаплирования», традиционно являющийся вторым РЧ каналом спектрометра. Однако, выражение «декаплирование» совершенно неправильное в контексте ЯЭО, так как спектры, получаются полностью J-связанными, поэтому правильно применять термин «преднасыщающая РЧ».

щественно, зависит от физического расположения прибора, напряжённости поля и от деятельности в смежных лабораториях или коридорах (включая и те, которые этажом выше и ниже), но в любом случае ясно, что разумно минимизировать возмущения поля. Получение данных в течение целой ночи или в субботу - воскресенье может оказываться выгодным, если такие вмешательства окажутся вредными.

Кратковременные случайные нестабильности приборов подавляются, используя большое число сканирований, точно так же, как подобным образом усреднением сигнала уменьшается случайный шум, и улучшенное отношение сигнал/шум в образующихся спектрах также помогает надежной идентификации усилений. Долговременные нестабильности, такие как от малых дрейфов поля или температуры, уменьшаются, чередуя регистрации контрольных спектров и экспериментов ЯЭО, чтобы в течение эксперимента все спектры испытывали максимально одинаковое чистое изменение. Типичный подход, когда требуются множественные измерения ЯЭО образца - получить 8 или 16 сканирований для каждого эксперимента и циклически повторять все частоты облучения (обычно автоматически под управлением компьютера). Для дальнейшего усреднения сигнала, соответствующие наборы данных суммируются, чтобы получать желательное общее число сканирований, которое должно быть идентичным для каждого набора зарегистрированных данных. Для множественных экспериментов ЯЭО обычно достаточно единственного контрольного эксперимента для вычислений всех разностей. В каждую регистрацию также следует включать 2 или 4 «холостых сканирования» (в течение которых не происходит регистрация данных), чтобы гарантировать полное затухание эффектов насыщения от предыдущего облучения. Так как предварительное насыщение требуется для каждой регистрации, обычная релаксационная задержка между сканированиями не обязательно необходима и полностью заменяется периодом преднасыщения.

Артефакты вычитания, кроме того, могут уменьшаться соответствующей обработкой данных. Разностные спектры можно получать, вычитая два ССИ (ЯЭО и контрольный), и, применяя Фурье преобразование к полученному ССИ, или альтернативно, вычитая сами ЯЭО и контрольные спектры, в этом случае они оба должны обрабатываются *идентичными цифровыми фазовыми коррекциями* перед вычитанием. Результаты этих методов эквивалентны за исключением случаев, когда спектры представляют большой динамический диапазон (то есть где очень большие сигналы существуют в присутствии очень малых), в этих случаях вычитание ССИ может уменьшать шум спектра [10]. В любом подходе, применяя умеренное уширение линий к спектрам, обычно несколько Герц, помогает уменьшать артефакты разности (рис. 8.28с). Объяснение этого состоит в том, что интенсивность остаточного сигнала, получаемого от вычитания близко перекрывающихся линий лоренцевых форм обратно пропорциональна ширине линий резонанса [11].

Оптимизация предварительного насыщения

Выбор оптимального времени предварительного насыщения τ сильно зависит от информации, требуемой от молекулы и от её размера и структуры, поэтому здесь можно представить только общие рекомендации. Так как стационарные измерения применяются только в режиме положительного ЯЭО, эти соображения ограничиваются молекулами малого и среднего размера и, фактически, большинство того, что нам нужно знать, уже представлено в предыдущих разделах, так как выбор τ диктуется кинетикой ЯЭО. Таким образом, если требуются измерения подлинных количественных стационарных усилений, то τ должен быть больше чем $5T_1$ самых медленно релаксирующих спинов, которые могут сделать усреднение сигнала занимающим слишком много времени. Однако большинство структурных работ не требует достижения полного стационарного состояния, которое будет достигаться, пока развивается измеряемый ЯЭО, позволяя собирать большее количество сканирований в доступное время, что само облегчает наблюдение ЯЭО. Применение более коротких времен предварительного насыщения способствует наблюдению

ближних взаимодействий, так как они развиваются быстрее. В противоположность, дальние взаимодействия и косвенные эффекты нарастают медленно и увеличиваются с увеличением периода предварительного насыщения. Для большинства структурных исследований достаточна информация о ближайших соседях, поэтому в обычных исследованиях ЯЭО малых органических молекул (Mr < 500) обычно используются относительно короткие времена предварительного насыщения, около 4 или 5 секунд (приблизительно в 3 раза больше самого длинного T_1). При таких условиях не следует удивляться, что не наблюдаются дальние взаимодействия, и, если ожидается, что они будут информативными, или если полезную геометрическую информацию могут обеспечить косвенные эффекты, потребуются дальнейшие эксперименты с более длительным предварительным насыщением (>>$5T_1$, возможно десятки секунд) для того, чтобы их детектировать. Ясно, полезно заранее знать приблизительные значения T_1 протонов в молекуле, и их можно измерять быстрым методом инверсии-восстановления из раздела 2.4. Это дополнительно обеспечивает поддержку данных, так как удалённые протоны, которые изолированы от источников дипольной релаксации, будут представлять необычно продолжительные T_1, а также замедлять развитие ЯЭО.

Селективное насыщение и селективный перенос поляризации (SPT)

Чтобы гарантировать целостность данных ЯЭО, важно в любой момент подвергать предварительному насыщению только один резонанс. Даже малая степень насыщения соседнего резонанса, вызванная «излишним» уровнем преднасыщающей РЧ, может быть вредной для структурных исследований. Такое проникновение обычно можно легко наблюдать в разностном спектре и следует призвать к большой осторожности при интерпретации данных. Естественно более полезно определить эту ошибку, прежде чем оставлять эксперимент, требующий многих часов, и принять меры для её смягчения. Эффективный подход к этому состоит в том, чтобы непосредственно налагать ЯЭО и контрольный спектры, получаемые после первого цикла эксперимента (например, после 8 переходов для каждой точки облучения), используя режим двойного дисплея спектрометра. В то время как ЯЭО усиления маловероятны, чтобы быть заметными на этой стадии (если они не очень большие), эффекты насыщения близко возле целевых резонансов обычно ясно видны и могут помочь сделать правильные изменения в постановке эксперимента.

Идеально, каждый целевой резонанс должен быть хорошо удален от всех других, но этот критерий может не всегда выполняться. Здесь может быть полезной смена растворителя, которая может иногда вести к драматическим сдвигам резонансов, которые могут случайно помещать интересные резонансы в более удобное положение. Кроме того, может помогать множество экспериментальных процедур. Наиболее прямой путь уменьшать частотное окно, в котором эффективна РЧ и, следовательно, улучшать селективность - ослаблять её мощность.

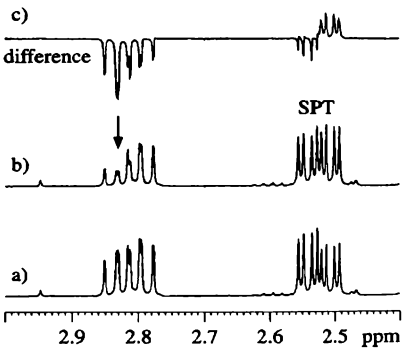


Рисунок 8.29. Артефакты селективного переноса поляризации (SPT). Неравномерное насыщение резонанса (b) может вызывать появление SPT искажений интенсивности в его J связанных соседях. Они появляются как антифазные фрагменты в разностном спектре b-a (c), который имеет нулевой чистый интеграл, но может маскировать подлинный ЯЭО.

Это также уменьшает степень насыщения целевого резонанса, который, в свою очередь, уменьшает *абсолютную величину* усиления ЯЭО, поэтому необходимо найти компромисс между этими двумя факторами, обычно с акцентом на селективности. Дополнительные артефакты также могут возникать при использовании низких мощностей предварительного насыщения, если мультиплеты подвергаются *неравномерному* возмущению. Они возникают из так называемого *селективного переноса заселённости* (SPT), который уже описывался в разделе 4.4. Это проявление переноса поляризации между J-связанными спинами, и родственно процессу, которым перекрёстные пики генерируются в спектрах COSY. Отклики появляются как *антифазные* мультиплеты, для тех спинов, которые J-связаны с насыщенным спином (рис. 8.29). Интегральная интенсивность таких антифазных линий нулевая, при правильном фазировании, и поэтому не должна препятствовать количественной обработке ЯЭО, хотя потенциально интенсивные SPT отклики могут отвлекать, и могут маскировать подлинные отклики ЯЭО, поэтому неплохо их подавлять.

Один из подходов к достижению равномерного насыщения мультиплета при использовании слабых мощностей РЧ состоит в том, чтобы поддерживать селективность путём циклического переключения частоты преднасыщения между индивидуальными линиями *в пределах* каждого мультиплета [12]. Процесс включает облучение каждой линии в течение короткого периода времени по очереди, затем, неоднократно повторяя последовательность, чтобы достичь полного желательного периода предварительного насыщения. Цель каждого облучения должна состоять в насыщении только одиночной линии, а не всего мультиплета, таким образом, могут использоваться значительно пониженные РЧ мощности, в то время как циркуляция будет гарантировать приблизительно равное подавление по всему мультиплету. Здесь важное соображение - период насыщения, используемый для каждой линии. При слишком коротком насыщение может быть неэффективным (и появятся нежелательные артефакты частотной модуляции), в то время как при слишком длинном периоде, релаксация может эффективно вести к неравномерному насыщению. Релаксационное поведение спинов - снова очень важно, и обычно для большинства малых молекул хорошо работают периоды 50-300 мс, снова эмпирический подход - самый лучший для оптимизации (рис. 8 30). Таким образом, мультиплет из пяти линий с насыщением каждой линии по 200 мс требует 5 циклов, чтобы достигать полного периода предварительного насыщения 5 с. Такие последовательности легко можно программировать для автоматической работы на современных спектрометрах.

Дополнительный подход к подавлению SPT искажений - накапливать спектры с *точным* 90° импульсом наблюдения. Это эффективно распределяет насыщение равномерно по всем компонентам мультиплета и, таким образом, удаляет источник этих искажений. Точность 90° импульса может улучшаться использованием составного импульса (раздел 9.1), для которого предложена последовательность $270_X360_{-X}90_Y$, [13]. 90° импульс регистрации также ведет к максимальному сигналу и, так как длинные периоды предварительного насыщения используются между переходами, он представляет подходящий выбор для оптимальной чувствительности и является стандартным для метода разностного ЯЭО. В ситуациях, где мультиплет перекрывается другим резонансом, метод циркуляции частоты не подходит для однородного подавления мультиплетов, но применение точного 90° импульса даёт средство с успехом использовать в эксперименте для насыщения только одиночную доступную линию мультиплета, хотя в таких случаях абсолютная величина ЯЭО будет мала по причине малой степени возмущения заселенности. В случаях проблем наложения, альтернатива состоит использовании эксперимента 2D NOESY, описанного ниже, в котором селективное облучение не применяется совсем.

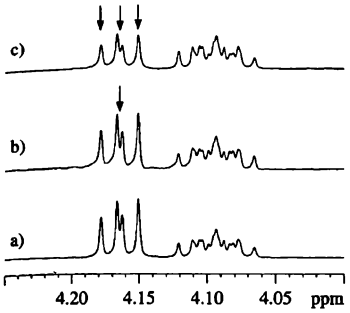


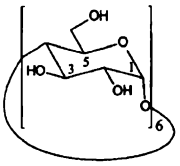
Рисунок 8.30. Селективное насыщение мультиплетов при помощи циркуляции частоты. (a) Контрольный спектр, (b) применение одиночной частоты предварительного насыщения низкой мощности к центру мультиплета и (c) предварительное насыщение, используя ту же самую мощность, но с циркуляцией частоты по этим четырем линиям. Низкая мощность будет гарантировать, что соседний мультиплет не будет затрагиваться.

Перенос насыщения

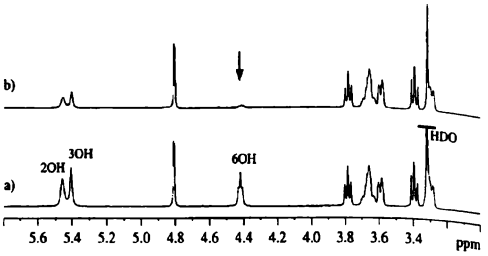
Дополнительным механизмом, которым может происходить насыщение резонанса, другим, чем прямое облучение, является *перенос насыщения*, вызванный процессами химического обмена, которые медленные на временной шкале химического сдвига ЯМР. Это может быть, например, конформационный обмен, посредством чего насыщение спинового перехода в одном конформере будет прогрессивно вести к насыщению соответствующего спина в другом, если обмен происходит в течение периода предварительного насыщения (см. рисунок 8.19 выше). Это может быть выгодно в некоторых обстоятельствах, так как это может позволять косвенное насыщение иначе скрытого резонанса, или может изучаться совершенно отдельно, как средство анализа обменной динамики. В выражениях измерений ЯЭО это чаще дополнительное осложнение, убедитесь, что наблюдаете, так как ЯЭО тогда образуются из насыщения больше, чем одного резонанса. Точно так же любые ЯЭО, которые развиваются, могут также обменом переноситься на другие резонансы, ещё более усложняя положение. Обменные процессы обычно более продуктивны, чем кросс-релаксация, и сигналы, возникающие от обмена, обычно более интенсивны, чем ЯЭО, и представляют то же самое поведение знака, и как первоначально насыщенный резонанс. Поэтому они появляются со знаком, противоположным положительным ЯЭО усилениям, позволяя им различаться, но с тем же самым знаком, что и отрицательные усиления. Это дальнейшая ловушка работы в режиме отрицательного ЯЭО независимо от того, который экспериментальный подход принимается.

Относительно общее свойство экспериментов ЯЭО, выполненных в органических растворителях, содержащих следы воды - перенос насыщения между способными к обмену протонами и водой (рис. 8.31). Часто эти типы резонансов могут быть довольно широкими и могут невольно насыщаться, если случается, что они распространяются под соседние сигналы, которые, в свою очередь, могут производить неожиданные отрицательные отклики в другом месте в разностных спектрах в результате обмена. Этот эффект может также использоваться для идентификации резонансов способных к обмену протонов в молекуле насыщением резонанса воды, как использовалось в определении структуры антибиотика пулвомицинина **8.11** [14] (рис. 8.32).

Рисунок 8.31. Экспериментальная демонстрация переноса насыщения. Прямое насыщение 6-OH резонанса α-циклодекстрина **8.10** в ДМСО ведет к одновременному косвенному частичному насыщению 2- и 3-OH резонансов, также как резонанса воды (показана усечённой в (a)).

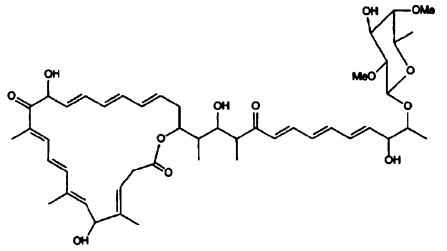


8.10



Количественная обработка усилений

Количественная обработка процента ЯЭО усиления может делаться наиболее экономично прямым анализом одного спектра разностного ЯЭО, а не, возможно, более очевидного выбора непосредственного сравнения интегралов в спектрах ЯЭО и контрольного. Насыщенный пик может использоваться как внутренний стандарт для этих измерений с пиком одиночного резонанса, принятым за -100 % или пиком метильной группы за –300 %, и так далее (знаки минус возникают из *договора* построений графиков усилений как положительно направленных откликов, который определяет насыщенный пик как имеющий отрицательную интенсивность, когда сами ЯЭО имеют положительный знак).



8.11

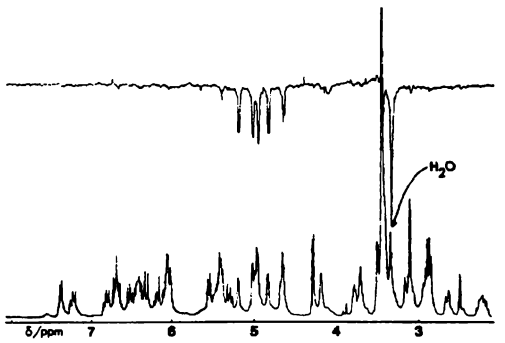


Рисунок 8.32. Идентификация резонансов способных к обмену протонов пулвомицинина **8.11** в разностном эксперименте переноса насыщения. Пик H_2O селективно насыщался, приводя к частичному насыщению пяти гидроксильных резонансов через химический обмен (воспроизведено с разрешения от [14])

Все ЯЭО усиления затем интегрируются относительно этого стандарта, и проценты получаются непосредственно. При выполнении этого, в то же время компенсируют неполное насыщение, которое может получаться при использовании низкой мощности преднасыщения; масштабируя опорный пик, чтобы предполагать полное насыщение, мы аналогично масштабируем все усиления. Эта процедура допустима, так как абсолютный масштаб ЯЭО усилений прямо пропорционален степени насыщения. Следует рассматривать возможность осторожного применения коррекции базовой линии в разностных спектрах перед интегрированием, так как ошибки базовой линии могут создавать драматические разности при измерении малых усилений. Даже в этом случае очень точные измерения усилений обычно имеют ограниченное применение в окончательном анализе, так как такие малые различия не могут интерпретироваться выразительно. Цитирование результатов в 1% или, возможно, 0,5 % достаточно для большинства качественных интерпретаций, где акцент должен быть на интерпретацию наличия усилений, а, не полагаясь на одно измерение процента.

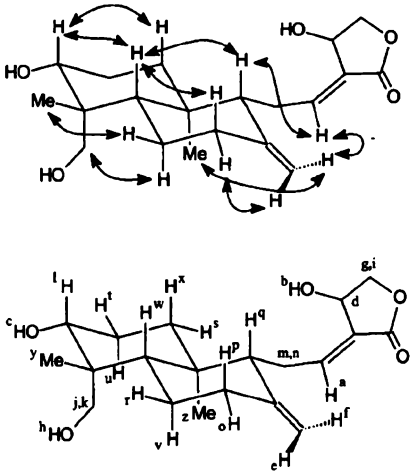
8.7. ИЗМЕРЕНИЕ ПЕРЕХОДНЫХ ЯЭО: NOESY

Наиболее широко распространенный подход для наблюдения переходного ЯЭО - гомоядерная двумерная спектроскопия ЯЭО (NOESY). Рост популярности этого эксперимента стимулировался в значительной степени интересами в биологических макромолекулах, чьи ЯЭО отрицательные, сильные и, которые растут быстро, и эта область еще находится под властью NOESY. Эта методика традиционно меньше использовалась для меньших молекул, преимущественно потому что ЯЭО в пределе крайнего обужения более слабые и имеют тенденцию расти более медленно, и, потому что разностный эксперимент ЯЭО стационарного состояния был жизнеспособной и очень эффективной альтернативой. По мере совершенствования приборов эксперимент NOESY все более и более завоевывает позиции в обычных исследованиях малых молекул, так как он в некоторых обстоятельствах может предлагать преимущества перед экспериментом разностного ЯЭО. Наиболее очевидное преимущество неселективная природа эксперимента, наряду со способностью, по крайней мере в принципе, наблюдать все ЯЭО в молекуле в одиночном эксперименте (эти факторы параллельны преимуществу 2D COSY перед 1D селективным спиновым декаплированием). Кроме того, простота постановки NOESY относительно более требовательного ко времени разностного ЯЭО, имеет преимущества при автоматизации эксперимента, например.

Стационарные измерения хорошо подходят для конфигурационных и конформационных исследований малых молекул, так как получаемые усиления существенно большие, чем от переходных измерений. Энергия непрерывно подается в спиновую систему в форме РЧ насыщения, и она способна управлять развитием ЯЭО. Переходные усиления, напротив, развиваются исключительно от возмущений заселённости, вызванных начальной инверсией резонанса, поэтому имеют тенденцию иметь меньшую интенсивность и скоротечность существования, требуя даже большей заботы в их получении. Кроме того, очень малые молекулы (M_r < 200), которые в растворе кувыркаются очень быстро, производят чрезвычайно слабый ЯЭО, потому что перекрёстная релаксация имеет тенденцию быть неэффективной, и поиски переходных усилений могут быть трудными или даже бесполезными в таких случаях. В случае больших молекул следует ожидать большего успеха. Недавно появившиеся селектированные градиентом 1D эксперименты переходного ЯЭО, описанные ниже, оказывают значительное влияние на изучения ЯЭО малых молекул, в частности по причине спектров исключительного качества, которые они способны обеспечивать. Однако их использование требует существенно другого подхода к анализу данных ЯЭО по сравнению с тем, который используется в настоящее время химиками при интерпретации спектров разностного ЯЭО, потому что измеряются *переходные*, а не *стационарные* усиления, как далее обсуждается ниже.

8.7.1. 2D NOESY последовательность

Эксперимент NOESY [15] снова следует принципам, представленным в главе 5 для генерации 2D набора данных, и имеет внешний вид подобный гомоядерным COSY корреляционным спектрам, хотя в этом случае перекрёстные пики 2D спектра указывают взаимодействия ЯЭО между коррелированными спинами. Эти пики возникают из *некогерентного* переноса намагничивания между спинами в течение времени смешивания через ЯЭО, таким образом, позволяя прямо показывать пространственные близости. Спектр NOESY встречающегося в природе терпена андрографолида **8.12** в ДМСО, представленный на рисунке 8.33, показывает исчерпывающую карту тесных контактов в молекуле, некоторые из которых показаны на структуре. Все перекрёстные пики ЯЭО имеют фазу противоположную диагонали, показывая, что они возникают из положительных ЯЭО усилений, как предполагалось для молекулы этого размера (M_r = 350), при условиях окружения. Немногие перекрёстные пики, разделяющие ту же самую фазу, что и диагональ в области 3-6 мд, относящиеся к протонам гидроксилов и H_2O, возникают из химического обмена протонов в этих группах (раздел 8.7.4).



8.12

Последовательность NOESY (рис. 8.34) тесно связана с COSY, так что здесь мы рассмотрим только специфические для эксперимента ЯЭО характеристики. Самая важная из них - период смешения τ_m, в течение которого развивается ЯЭО, и, чтобы понять роль, которую он играет в 2D эксперименте, мы возвращаемся к векторной модели (рис. 8.35). После начального возбуждения и t_1 эволюции, вектор намагничивания существует в поперечной плоскости. Второй 90° импульс помещает один его компонент на z-ось и, следовательно, производит требуемую инверсию заселенности, которая позволяет переходному ЯЭО развиваться в течение последующего периода смешения (компоненты, которые остаются в поперечной плоскости, - это те, которые детектируются в эксперименте COSY). После соответствующего периода τ_m, новые заселенности регистрируются 90° импульсом и собирается ССИ; можно легко видеть параллель с 1D последовательностью «инверсии-смешивания-регистрации», которая показана на рисунке 8.20. Последовательность повторяется для накопления достаточного количества сканирований для приемлемого отношения сиг-

нал/шум. В то время как, в принципе, должно быть необходимо оставлять, по крайней мере $5T_1$ между сканированиями, чтобы позволять заселённостям восстанавливаться, это вело бы к чрезмерно длительным экспериментам, особенно в случае малых молекул.

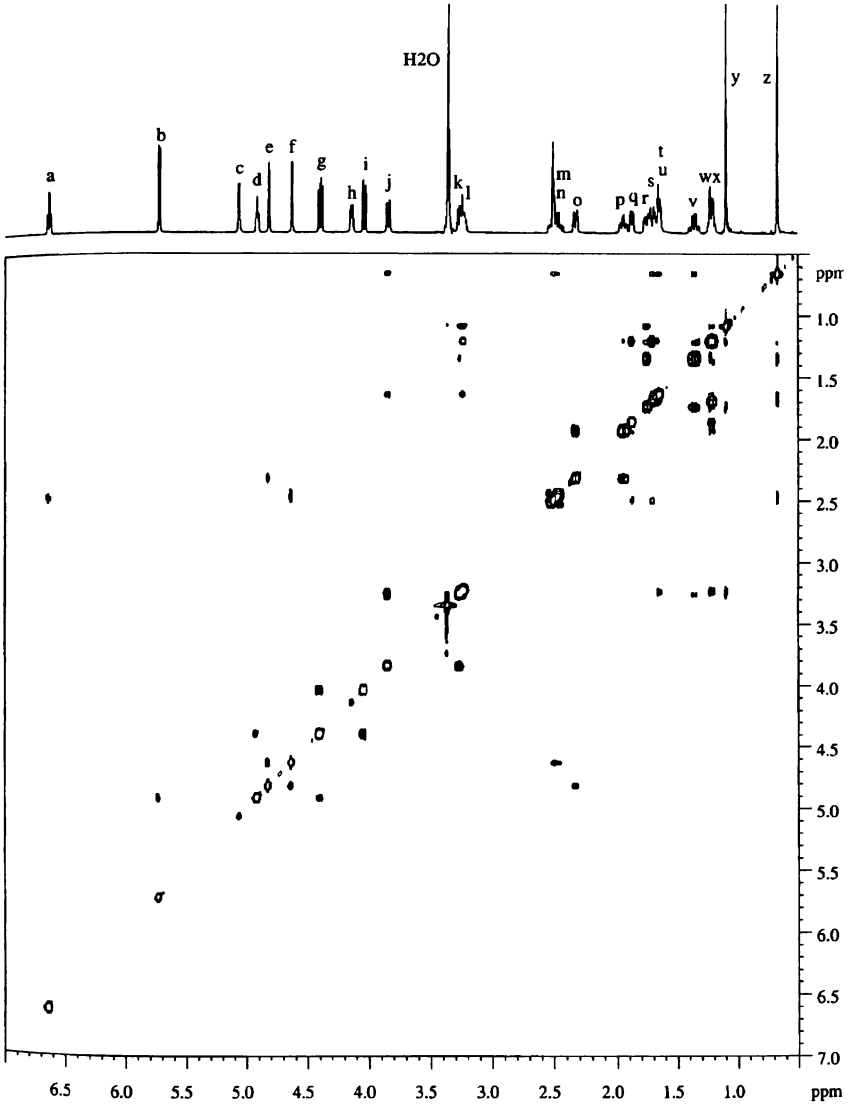


Рисунок 8.33. Спектр 2D NOESY терпена андрографолида **8.12** в ДМСО при 25°С. Спектр регистрировался со временем смешения 600 мс и с задержкой восстановления 1,5 сек. 2К точек данных собирались в течение 512 инкрементов по 16 сканирований, используя TPPI квадратурное детектирование в f_1. Данные обрабатывались окном синус-квадратного колокола в обоих измерениях с дополнением нулями в f_1.

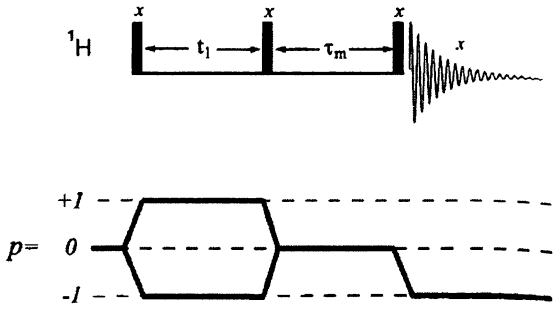


Рисунок 8.34. Последовательность 2D NOESY и связанный с ней путь переноса когерентности. Добавочное (необязательное) использование полевого градиента (показано серым цветом) во время смешения описывается в тексте.

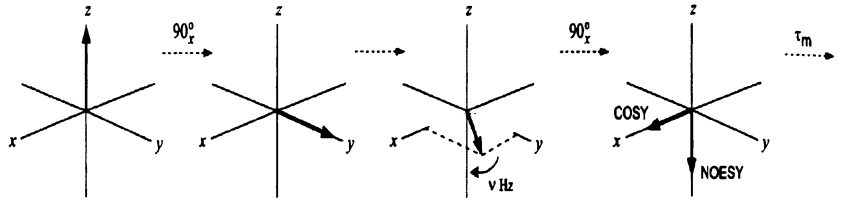


Рисунок 8.35. Эволюция векторов намагниченности во время NOESY Инвертированная намагниченность создаёт ЯЭО в течение периода смешения, в то время как остающееся поперечное намагничивание устраняется фазовым циклированием или импульсными полевыми градиентами.

На практике укороченные задержки восстановления, обычно 1-3 сек для малых молекул (≈1-2T_1 самых медленно релаксирующих спинов) представляет приемлемый компромисс [16].

Последовательность NOESY, кроме деталей использованных временных интервалов, идентична последовательности DQF-COSY, поэтому остаётся выбирать сигналы, возникающие от ЯЭО, и подавлять все другие посредством подходящего фазового цикла (Таблица 8.3).

Таблица 8.3. Основной фазовый цикл NOESY для трёх импульсов (P_N) и приемника (P_R), включая подавление аксиальных пиков.

Сканирование	P_1	P_2	P_3	P_R
1	x	x	x	x
2	x	x	y	y
3	x	x	-x	-x
4	x	x	-y	-y
5	-x	x	x	-x
6	-x	x	y	-y
	-x	x	-x	x
8	-x	x	-y	y

Так как ЯЭО связаны только со спиновыми заселённостями, то есть с z-намагничиванием когерентности нулевого порядка, они нечувствительны к изменениям РЧ фазы, и цикл с 4 шагами достаточен, чтобы отменить сигналы, возникающие от одно- и двухквантовых когерентностей, существующих в течение τ_m. Цикл повторяется с дополнительной фазовой инверсией импульса подготовки и приемника, чтобы отменять аксиальные пики и производить конечный цикл с 8

товки и приемника, чтобы отменять аксиальные пики и производить конечный цикл с 8 шагами. Так как химический обмен между центрами также связан с обменом продольной намагниченности между резонансами, этот эксперимент будет также детектировать эти процессы способом, аналогичным переносу насыщения, описанному выше для 1D экспериментов, и по этой причине точно эта последовательность также называются EXSY (спектроскопия обмена) при использовании для изучения динамических обменных процессов (см. раздел 8.7.3). Для NOESY настоятельно рекомендуется применение фазочувствительного представления, так как оно позволяет отличать химический обмен от положительного ЯЭО на основании знака, помогает идентификации некоторых из артефактов, описанных ниже, и позволяет количественные измерения [17], в дополнение к обычному преимуществу от дисплея более высокого разрешения. Кросс-пики NOESY при этом синфазные, имеют форму линии чистого поглощения, и появляются симметрично относительно диагонали [18] (так как переходные усиления симметричны по природе). Их знак относительно диагонали диктуется подвижным поведением молекулы и, следовательно, знаком самого ЯЭО (Таблица 8 4).

Таблица 8.4. Отклики, наблюдаемые в эксперименте NOESY.

Знак диагонали	Происхождение кросс-пика	Знак кросс-пика
Положительный	Положительный ЯЭО	Отрицательный
	Отрицательный ЯЭО	Положительный
	Химический обмен	Положительный

По соглашению диагональ фазируется положительной, а знаки всех других сигналов даются относительно неё.

Выбор желательных когерентностей может также выполняться при помощи импульсных градиентов поля, таким образом, избегая необходимости циклирования фазы [19-21]. Это может достигаться просто, вставляя одиночный z-градиент в пределах времени смешивания так, чтобы все когерентности дефазировались, и оставалось только желательное z-намагничивание (рис. 8 34). Польза экономии времени от такого подхода вероятно значительная только тогда, когда доступны большие количества образца, и достаточно малое количество сканирований на инкремент обеспечивает достаточную чувствительность. При работе с водными растворами к этой основной последовательности могут добавляться дополнительные схемы подавления сигнала растворителя; это описывается в разделе 9.4.

Осложнения с NOESY

Основные нежелательные сигналы, остающиеся от последовательности NOESY, возникающие из нуль-квантовых когерентностей (НКК, ZQC), которые существовали в течение времени смешивания, и которые впоследствии преобразуются в наблюдаемые сигналы последним 90° импульсом. Так как они также обладают когерентностью нулевого порядка, они не удаляются циклированием фазы или градиентными процедурами выбора (обе из которых действуют как нуль-квантовый фильтр) и, таким образом, могут загрязнять конечный спектр. Эти когерентности, возникают между J-связанными спинами и, таким образом, вызывают COSY-подобные пики, которые являются нуль-квантовыми аналогами сигналов, детектированных в двухквантово фильтрующей последовательности COSY, и имеют подобный внешний вид антифазных мультиплетов. Если и НКК (ZQC) и пик ЯЭО совпадают, то есть, если J-связанные спины также демонстрируют ЯЭО между ними, пик ЯЭО, может оказаться несколько искажённым этим наложением. Для больших молекул с широки-

ми линиями, НКК пики, являющиеся антифазными, имеют тенденцию отменяться, но в малых или среднего размера молекулах их действительное удаление может быть выгодным.

Для подавления НКК пиков предлагалось множество подходов [15,22,23], но, вероятно, наиболее широко используемый - вводить малое случайное изменение во времени смешивания между переходами, или, чаще, между одним t_1 инкрементом и следующим. В то время как в течение времени смешивания НКК колеблются с частотой, равной разности химических сдвигов двух J-связанных спинов (ν_A - ν_X), ЯЭО растут прогрессивно (рис. 8 36). Таким образом, случайное изменение τ_m будет вызывать усреднение НКК, в то время как интенсивности ЯЭО будут изменяться мало (фактически, эта рандомизация НКК сигналов просто делает их появление подобным t_1 шуму, а не дискретным перекрёстным пикам). Требуемая степень изменения должна быть, по крайней мере, сравнима с обратными наименьшими разностями сдвигов $|(\nu_A - \nu_X)|^{-1}$, поэтому, при предположении их (разностей ХС) равными, скажем, 50 Гц, потребуется случайная флуктуация ±10 мс. Даже с таким подходом, нет ничего необычного в том, что в перекрёстных пиках, очень близких к диагонали, наблюдается некоторая остаточная COSY-подобная структура. Дополнительные пики артефактов также могут возникать между J-связанными спинами, когда ширины импульсов отклоняются от 90 ° [24], поэтому требуется их тщательная калибровка.

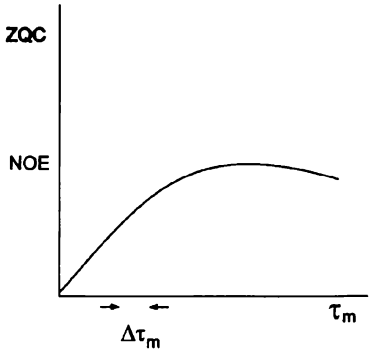


Рисунок 8.36. Изменение ЯЭО и НКК (ZQC) интенсивностей в течение времени смешивания NOESY Вклады НКК могут подавляться, делая малые случайные изменения в τ_m, в то время как это оказывает незначительное влияние на интенсивности ЯЭО.

Оптимальный выбор времени смешивания

Подходящий выбор времени смешивания, τ_m, является критическим для успеха экспериментов переходного ЯЭО. Неправильный выбор τ_m может вызывать полное отсутствие наблюдаемых сигналов, так как слишком короткое значение означает, что усиления ещё должны расти до детектируемого уровня, в то время как чрезмерно длинное τ_m может означать, что усиления уменьшаются благодаря релаксации. Свойства подвижности молекулы и, следовательно, времена продольной релаксации ядер играют самую важную роль в определении роста ЯЭО и, в свою очередь, диктуют выбор τ_m (рис. 8.37). Этот выбор также очень зависит от типа информации, требуемой из спектра. Если желают установить качественную карту ЯЭО в молекуле, как часто случается в работе с малыми молекулами, то оптимальное время смешивания будет то, где ЯЭО имеют их максимальные интенсивности. Если данные должны использоваться для количественных или полуколичественных измерений расстояний для применения в структурных вычислениях, то необходимо убедиться, что вы работаете в пределах линейной области роста развития ЯЭО, и будут требоваться времена смешивания значительно короче времени максимального ЯЭО.

Выбор τ_m для качественных исследований может оцениваться из знания времен продольной релаксации T_1. Часто перед прогоном эксперимента они неизвестны, поэтому здесь может помочь

их быстрое их измерение или оценка, основанная на известных фактах. Точные измерения дают мало выгоды, потому что неизбежно будет существовать расхождение значений в молекуле, в любом случае требуется компромиссная величина для τ_m. Для малых молекул время смешивания порядка T_1 будет производить интенсивности близкие к максимальным, а для многих обычных органических молекул с массами < 500 дальтонов в слабо вязких растворителях значения T_1 обычно простираются примерно от 0,5 до 2 секунд.

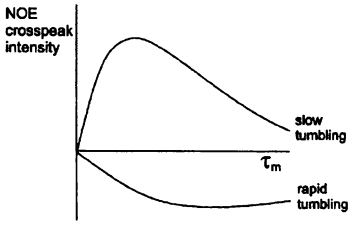


Рисунок 8.37. Схематическая иллюстрация роста перекрёстного пика ЯЭО для больших, медленно кувыркающихся, и малых, быстро кувыркающихся молекул. Предполагается, что диагональный пик положительный.

С уменьшением скоростей кувыркания молекулы (вследствие увеличения молекулярной массы или вязкости раствора, например), T_1 аналогично уменьшаются и, соответственно, в принципе, желательны более короткие времена смешивания. В таких случаях нужно быть уверенным, что вы не приблизились к опасной области $\omega_0\tau_C \approx 1$, где эффективность эксперимента будет уменьшаться. Для молекул в режиме отрицательного ЯЭО больше подходят более короткие значения, около 0,5 T_1, чтобы избежать осложнений, возникающих от спиновой диффузии.

Измерение расстояния

В то время как исчерпывающее обсуждение этого вопроса лежит вне поля зрения этой книги, здесь очень кратко представляются используемые принципы, с мыслью, что читатель должен, по крайней мере, мочь следовать обсуждениям по вычислениям структуры, основанным на измерениях ЯЭО, встречающихся в химической литературе. Огромное большинство работ в этой области посвящено биомолекулярным структурам, и поэтому методики, разработанные с макромолекулами в уме, нельзя непосредственно переносить на количественные измерения в малых молекулах [25], хотя общие принципы остаются такими же.

Наиболее используемый подход к измерениям расстояния происходит из уравнений 8.13 и 8.14, приведённых выше, и связан с известным опорным расстоянием r_{XY}, из которого можно рассчитать другие расстояния [26], и с предположением об однородном изотропном кувыркании молекул. Вспомните, что основное уравнение было:

$$\frac{\eta_A\{B\}}{\eta_X\{Y\}} = \frac{r_{AB}^{-6}}{r_{XY}^{-6}} \qquad (8.19)$$

Отношение ЯЭО определяется одним из двух общих подходов. Первый (рис. 8.38a) включает определение скорости роста ЯЭО и для опорного и для неизвестных расстояний, регистрируя ряд NOESY спектров в интервале значений τ_m, и контролируя нарастание интенсивностей кросс-пиков через их объёмные интегралы [27]. Второй, более простой подход (рис. 8.38b) непосредственно сравнивает интенсивности перекрёстного пика I_{XY} и I_{AB}, измеренные при одном времени смешивания, *о котором известно, что оно лежит в пределах режима линейного роста* для обеих спиновых пар. Успех этих подходов частично основывается на нечувствительности вычисленного расстояния к точности экспериментально измеренных ЯЭО, благодаря зависимости r^{-6}. Таким образом, ошибка в два раза в скорости роста соответствует ошибкам только в 10% в конечной оценке расстояния. Однако, измерение отдельных «точных расстояний» не позволяет внутренней гибко-

сти, так как имеет мало смысла для структур в состоянии раствора, поэтому другой более общий и широко используемый подход должен использовать полуколичественные измерения расстояния в вычислениях структуры. Он включает характеристики интенсивностей пиков как сильные, посредственные и слабые относительно опорного пика, которые, в свою очередь, берутся, чтобы показывать верхнюю (и возможно нижнюю) границы расстояний от межъядерных расстояниях, обычно, ≥0,25 нм, ≥0,35 и ≥0,5 нм, соответственно.

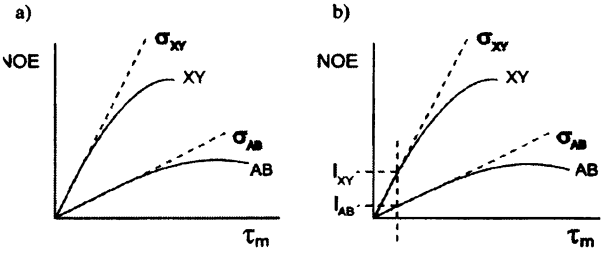


Рисунок 8.38. Схематическая иллюстрация двух подходов для оценки межъядерных расстояний из измерений ЯЭО, в которых опорная спиновая пара XY обеспечивает внутреннюю калибровку для неизвестной пары AB (см. текст).

Измерение внутреннего опорного расстояния для протонного ЯЭО - обычно расстояние между диастереотопными геминальными протонами (0,175 нм) или между *орто* ароматическими протонами (0,28 нм). Хотя эти разграничения слабы, комбинированное применение многих из них может приводить к хорошо определённым конформациям в растворе, как достаточно продемонстрировано для многочисленных белковых структур [28,29]. Альтернативный подход, который использует единственный NOESY спектр, использует отношение перекрёстного пика к интенсивностям диагонального пика вместо скорости роста [30]; оба метода применялись к определению конформаций и конфигураций малых молекул в растворах и показали сходные результаты [31].

8.7.2. 1D последовательности NOESY

К настоящему времени 1D эксперименты переходного ЯЭО, часто упоминаемые как 1D NOESY, нашли ограниченное использование в обычной структурной работе, находя применение преимущественно в ситуациях, где требуются количественные измерения расстояния. Такая работа обычно занимает много времени, по причине необходимости накапливать эксперименты в интервале значений τ_m. Простейшая 1D схема (рис. 8.39a) требует контрольного эксперимента, зарегистрированного с $\tau_m = 0$ с применением разностной спектроскопии, чтобы показать ЯЭО усиления, и поэтому также страдает от опасных разностных артефактов. Для работы с малыми молекулами обычно более продуктивен разностный метод ЯЭО стационарного состояния, в то время как большие, более сложные молекулы обычно требуют 2D подхода. Однако, недавно представленные селектированные градиентом 1D эксперименты [32-34] находят нарастающее использвание в качественных применениях и поэтому рассматриваются здесь. Эти эксперименты не зависят от разностной спектроскопии, чтобы показывать усиления ЯЭО, и чисто удаляют те сигналы, которые возникают не от ЯЭО, таким образом, обеспечивая очень высококачественные спектры за короткое время. Они наиболее полезны, когда сбор усилений используются качественно для получения структурных ответов, и представляет более быструю альтернативу эксперименту разностного ЯЭО.

1D градиентный NOESY

Наиболее эффективный эксперимент на сегодняшний день [34] (рис. 8.39b) основывается на последовательности «спинового эхо двойного импульсного полевого градиента» (DPFGSE), как средства выбора целевого резонанса, из которого ЯЭО, в конечном счете, и развивается.

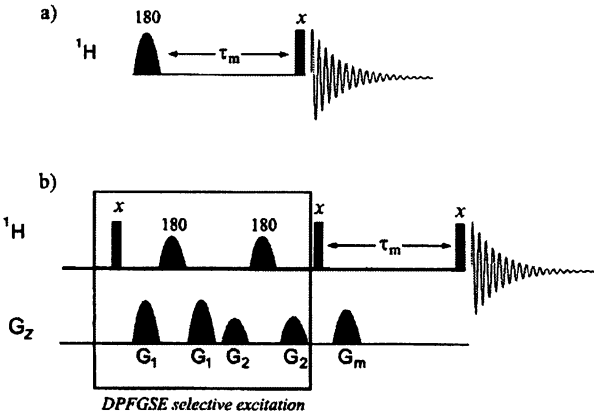


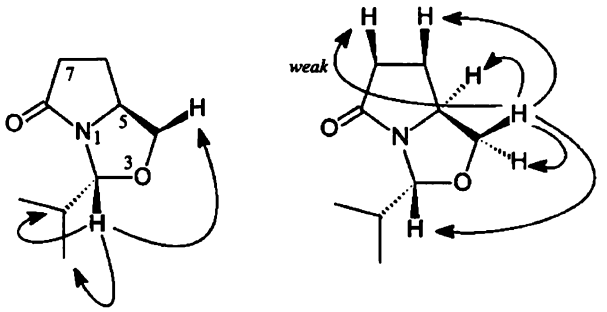
Рисунок 8.39. Схемы 1D NOESY Основная схема (a) требует разностной спектроскопии, чтобы показывать ЯЭО, в то время как селектированный градиентом DPFGSE - ЯЭО (b) показывает ЯЭО без наложения артефактов разности.

Этот подход к селективному возбуждению описывается в разделе 9.3.3, поэтому здесь достаточно отметить, что он служит для выборочного рефокусирования целевой спиновой намагниченности в поперечной плоскости, оставляя намагниченности всех других спинов дефазированными и поэтому ненаблюдаемыми. Последующий 90° импульс помещает целевое намагничивание вдоль -Z оси, после чего усиления ЯЭО растут, с чистящим градиентом (Gm), применяемым для удаления любых остаточных поперечных компонентов. Наконец, намагничивание регистрируется обычным способом, и полученный спектр содержит только инвертированный целевой резонанс и ЯЭО, который развился из него, ***без необходимости вычисления разностного спектра.*** Таким образом, могут получаться высококачественные спектры, которые свободны от артефактов разности; в этом основная выгода схем градиентного выбора. Эксперименты также быстры для выполнения, так как больше не требуется обширное усреднение сигнала для уменьшения артефактов, и потому что может оптимально использоваться динамический диапазон приемника, так как всегда оцифровываются только желательные сигналы.

На практике, действие релаксационных процессов в течение τ_m будет вызывать восстанавление нежелательных компонентов дефазированной намагниченности и производить малые наблюдаемые сигналы в конечном спектре для всех резонансов. Их интенсивности могут поддерживаться близкими к нулю вставкой обычно одного или двух неселективных 180° импульсов (сопровождаемых с обеих сторон противоположными очищающими градиентами), разумно расположенных в пределах периода смешения [34] с отмененной любых остающихся малых сигналов 4-шаговым разностным фазовым циклом (EXORCYCLE). Таким образом, хотя разностная спектроскопия используется в форме фазового цикла, сигналы, подлежащие отмене, имеют близкую к нулю интенсивность и легко удаляются, в отличие от обычной разностной спектроскопии, где сигналы имеют по существу максимальную интенсивность. Для малых и среднего размера молекул опыт предполагает, что один инвертирующий импульс в течение τ_m достаточен, чтобы уменьшить фоновые сигналы до недетектируемых уровней со временами смешивания приблизительно 500 мс или меньше, в то время как два предпочитаются для τ_m до 1,5 сек.

Снова могут возникать артефакты между J-связанными спинами, эквивалентные эффектам SPT, описанным для стационарных разностных экспериментов, и пики НКК, описанные для NOESY. Больше применяемых экспериментальных процедур для их удаления описывается в [34]. Однако, во многих случаях большая выгода градиентного подхода - способность наблюдать с большей надёжностью дальние ЯЭО усиления, которые иначе были бы недетектируемы, или, по крайней мере, ненадежны в присутствии артефактов разности. Присутствие больших скалярных взаимодействий между такими отдаленными спинами в большинстве случаев маловероятно, поэтому проблема интерференции J-взаимодействий не возникает, и часто удовлетворяют более

простые схемы. Типичный результат, использующий последовательность рис. 8.39b, показан на рисунке 8.40 для малого бициклического лактама **8.13**. Каждый резонанс отбирался 40 мс гауссовым 180° импульсом с двумя неселективными 180° импульсами, применяемыми в течение времени смешивания 800 мс. Каждый спектр был результатом только 12 минут сбора данных при 10 мг образца и все они ещё совершенно приемлемы для качественных стереохимических отнесений. Наблюдаемые сигналы могут приписываться ЯЭО усилениям или артефактам SPT-типа, в противном случае с бесформенной базовой линией, где они не возникают.



8.13

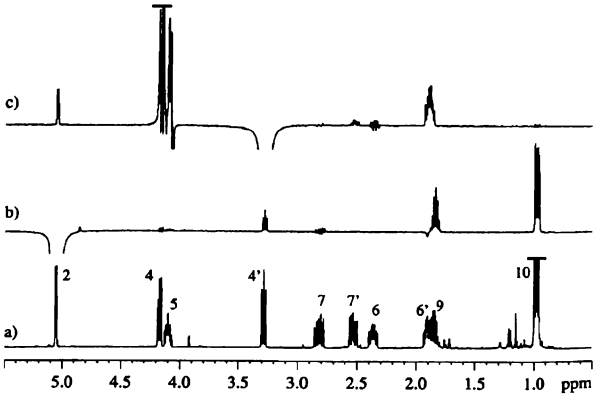


Рисунок 8.40. Выбираемые градиентом 1D NOESY спектры бициклического лактама **8.13**, полученные со временем смешивания 800 мс. Спектр (a) обычный 1D спектр, и сильный геминальный H4'-H4 ЯЭО в (c) усечён.

Интерпретация переходных ЯЭО

Чистые преимущества селектированного градиентом эксперимента ЯЭО перед обычным стационарным разностным ЯЭО означают, что он становится популярным инструментом в структурных изучениях малых молекул. Однако имеются фундаментальные различия между данными, представленными двумя экспериментальными протоколами, со *стационарными* экспериментами, наблюдающими *равновесные ЯЭО*, и *переходными* экспериментам, наблюдающими *кинетику* ЯЭО. Как следствие, 1D NOESY эксперименты требуют несколько иного подхода к интерпретации данных в отличие от, в настоящее время принятого для измерений, стационарного разностного ЯЭО, некоторые из ключевых соображений включают:

- Усиление ЯЭО остро чувствительно к выбору времени смешивания, и может заметно изменяться с его изменениями.

- Усиление ЯЭО будет также зависеть от степени инверсии цели, которая очень может быть меньше, чем полная, вследствие несовершенств импульса и других экспериментальных недостатков.

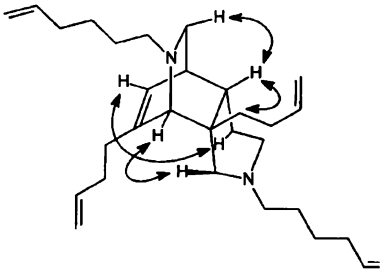
- Экспериментально, измерение процентов усиления более сложно. Целевой резонанс не может использоваться как опорный, как это удобно имеет место в стационарных разностных спектрах, так как он уменьшается релаксацией в течение τ_m. Требуется опорный спектр с $\tau_m \approx 0$ сек, из которого могут количественно определяться усиления, и также должна определиться степень инверсии *каждого* целевого резонанса. Экспериментально измеренные ЯЭО усиления затем должны масштабироваться соответственно для «100 % инверсии».

- *Абсолютные* проценты усиления от переходных экспериментов будут меньше, чем стационарные усиления, даже хотя они могут наблюдаться яснее. Восприятие того, что рассматривается как «надежное» или «измеряемое» усиление, должно, следовательно, регулироваться, если сообщаются проценты.

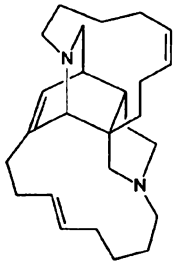
Экспериментальные сложности, связанные с правильными измерениями процентов усиления, вероятно должны означать, что эти цифры *не будут* рутинно определяться для качественных структурных исследований, обычно предпринимаемых (и претендующие на их измерение должны сообщать подробности выбранного подхода). Более реальный подход к сообщению результатов, казалось бы, тот, который принят в исследованиях ЯЭО макромолекул, использующих полуколичественную классификацию усилений (малый, посредственный и слабый). Полагая, что времена смешивания удерживаются короткими, так что усиления лежат в пределах, или, по крайней мере, близко к линейному режиму роста, сравнение *в пределах* каждой спектральной дорожки обеспечивает приблизительные относительные соотношения расстояний между целевым спином и тем, который показывает усиления. Чтобы создать самодостаточный аргумент, снова желательно размещение вместе данных от множества экспериментов.

8.7.3. Применения

Несмотря на его происхождение в значительной степени из рук (или лабораторий) биологических спектроскопистов, в настоящее время наблюдается рост применения NOESY методов для структурного и конформационного анализа молекул малого и среднего размеров, встречающихся в химической лаборатории. Примеры, представленные здесь, демонстрируют множество систем, к которым эти эксперименты применялись, а также служат иллюстрациями некоторой пользы от их использования вместо ранее встречавшегося стационарного эксперимента.

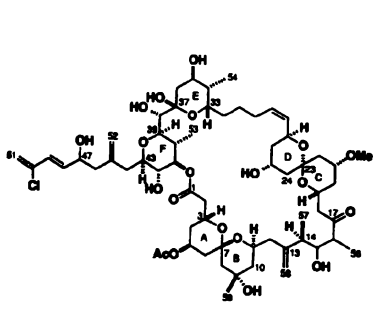


8.14

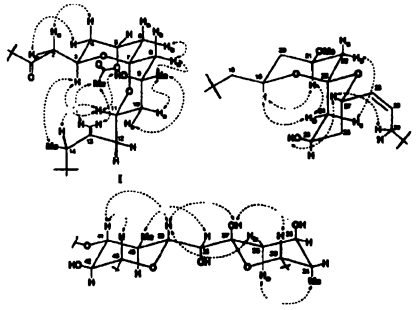


8.15

В первом примере 2D NOESY спектры использовались для определения стереохимии в синтетическом циклоаддукте **8.14** [7], потенциального биомиметического предшественника встречающегося в природе алкалоида морской губки керамафедрина В **8.15.** Эта проблема, по существу, такая же, как обсуждалась для **8.7** выше, используя эксперимент разностного ЯЭО, но в этом случае дополнительные ненасыщенные боковые цепи вызывают обширное наложение в протонном спектре и предотвращают использование селективного предварительного насыщения. Достаточная характеристика ЯЭО, присутствующая в 600 мс NOESY спектре, дает решающее доказательство *эндо* стереохимии, как показано. Наблюдались только положительные ЯЭО, совместимые с молекулой массы 436 дальтонов в хлороформе. Спектры NOESY также успешно применялись для доказательства структуры молекул значительно большей массы и сложности, как показано для цитотоксического вещества с макроциклическим лактонным кольцом цинахиролида-А, **8.16** [35], также из морской губки. Структура молекулы определялась обширными 2D ЯМР экспериментами 600 МГц, из которых NOESY сыграл критическую роль в определении относительной стереохимии шести оксановых колец, как показано (воспроизведено с разрешения от [35]).



8.16a



8.16b

Рисунок 8.41. Внутриостаточные ЯЭО, использованные для идентификации соседних остатков в пептидной последовательности.

Использовались времена смешивания до 700 мс, и молекулы относительно большой массы, приблизительно 1200 дальтонов, могут оказаться вблизи точки отсечки успешного наблюдения ЯЭО. Вероятно, по этой причине также даётся поддерживающее доказательство из 200 мс ROESY спектров.

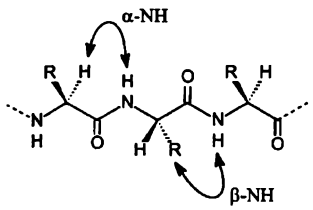
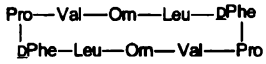


Рисунок 8.41. Межостаточные ЯЭО, используемые для иденификации соседних остатков в пептидной последовательности.



8.17

Обычная область, в которой использовались 2D методы, - помощь в обеспечении отнесения резонансов, находится в изучении пептидов или малых белков, особенно когда одни те же аминокислоты встречаются в пептидной последовательности больше, чем один раз. Для определения положения специфического аминокислотного остатка в пептиде используется так называемый процесс *последовательного отнесения*, который связан с наблюдением ЯЭО между протонами в смежных остатках (рис. 8.41). Обычно это происходит между альфа протоном и амидным NH следующего остатка. Идентификация соседних аминокислот, таким образом, может использоваться для связывания этих единиц вместе, что может затем отображаться обычно известной пептидной последовательностью. Как только все остатки последовательно идентифицированы, это может обеспечить базис для конформационных исследований через дальние контакты ЯЭО [36-38]. Как иллюстрация, пошаговая идентификация соседних резонансов показана в NOESY спектре для циклического декапептида грамицидина-S **8.17** на рисунке 8.42.

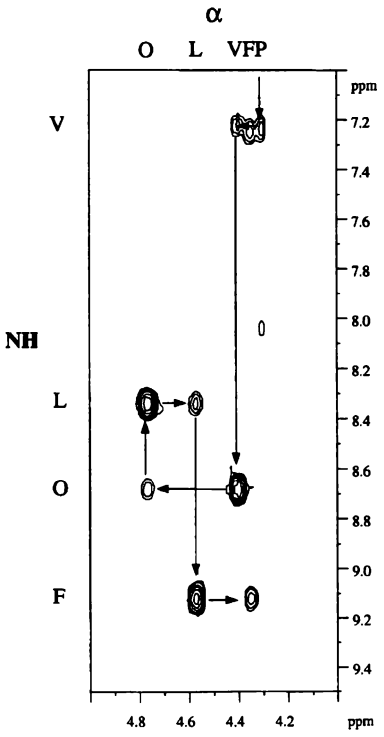
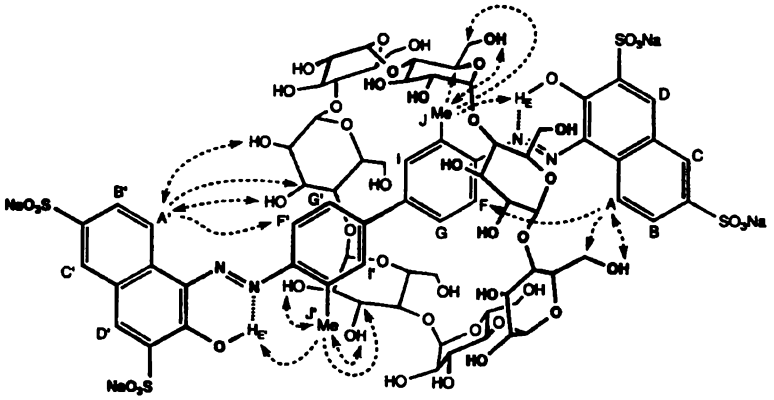


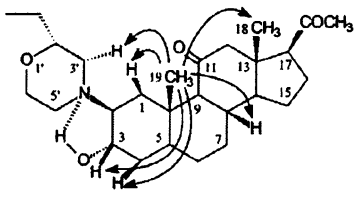
Рисунок 8.42. Последовательный процесс отнесения, показанный для 300 мс NOESY спектра грамицидина-S **8.17** в ДМСО, начиная с альфа-протона пролина. Межостаточные αH-NH ЯЭО часто более сильные, чем внутриостаточный ЯЭО, в расширенной конформации скелета.

В то время как большинство исследований полагается на наблюдение внутримолекулярных ЯЭО, для определения отношений между молекулами, разделяющими пространственную близость, также может использоваться *межмолекулярный* ЯЭО. Это может, в частности, быть уместным в изучении комплексов «хозяин-гость», когда желают определить, как гость сидит в хозяине, и здесь информация скалярного взаимодействия не может играть никакой непосредственной роли. Один пример этого - характеризация ротаксанов, пространно сопряжённых систем, сидящих в защитных изолирующих молекулярных рубашках. Азокраситель ротаксан **8.18** использует альфа-циклодекстрин в качестве молекулы-оболочки, которая по своей природе несимметрична с входом в малую полость при 5-6 витке молекулы.



8.18

Градиентный эксперимент 1D NOESY, описанный выше использовался, чтобы картировать дальние ЯЭО хозяин-гость [39], который различил два конца комплекса и представил картину, как сидит альфа-циклодекстрин. ЯЭО и от HG', и от HI к протонам 3 и 5 на внутренней поверхности альфа-циклодекстрина подтвердил, что центральная часть гостя была скрыта в пределах гидрофобной полости (структура воспроизведена с разрешения от ссылки 39). Все ЯЭО для этих молекул в ДМСО были отрицательными, благодаря ограниченной подвижности этих больших комплексов. И 1D градиентные, и 2D NOESY эксперименты также использовались для оценки конформации обезболивающих стероидов [40]. Они обладают скученными протонными спектрами, требующими применения 2D экспериментов и средства 1D методов могут применяться только к ограниченному набору резонансов, что, тем не менее, оказываются существенным.



8.19

В **8.19**, в частности, дальние ЯЭО в 1D эксперименте наблюдались от метила 19 специфично к H3' экваториальному протону присоединённого морфолинового кольца, но не с другими протонами в этом фрагменте. Это показало, что свободное вращение кольца ограничено (межмолекулярной водородной связью), и, что оно заняло фиксированное положение относительно скелета стероида. Знание таких конформаций окажется полезным в объяснении механизмов, которыми эти молекулы вызывают анестезию.

Заключительный пример особенно иллюстрирует некоторые преимущества 1D градиентного эксперимента NOESY перед обычным методом разностного ЯЭО. Одной из целей этой работы было сравнить структуру раствора дифенилалильного комплекса палладия **8.20** с кристаллической структурой и отсюда производить механистические понимания [41]. Протонный спектр был отнесен через комбинированный анализ фосфорно декаплированного протона, DQF-COSY и ROESY спектры, полученные со временем смешивания 500 мс. Специфические тесные близости также исследовались через 1D методы ЯЭО, где соответственно разрешённые резонансы были доступны, выбранные примеры из которых показаны на рисунке 8.43. Некоторые специфические моменты достойны комментария, первый из которых - ясность в спектрах ЯЭО, которые не затрудняются артефактами разности, таким образом, давая уверенность, что наблюдаемые усиления подлинные. Во-вторых, эти спектры собирались только за четырнадцать минут каждый, в то время, как эквивалентные разностные эксперименты требовали сбора данных в течение многих часов, чтобы адекватно подавить резонансы в загроможденной ароматической области. Наконец заметьте усиления широких резонансов при 7.4 мд, связанных с *орто* протонами динамически ограниченной Ph^1-группой фосфина. Они были характерны и высоко информативны, но не могли надёжно различаться ни в 1D разностном, ни в 2D эксперименте. Способность надёжно выделять данные такого сорта делает 1D градиентный эксперимент NOESY чрезвычайно мощным инструментом в современном доказательстве структуры.

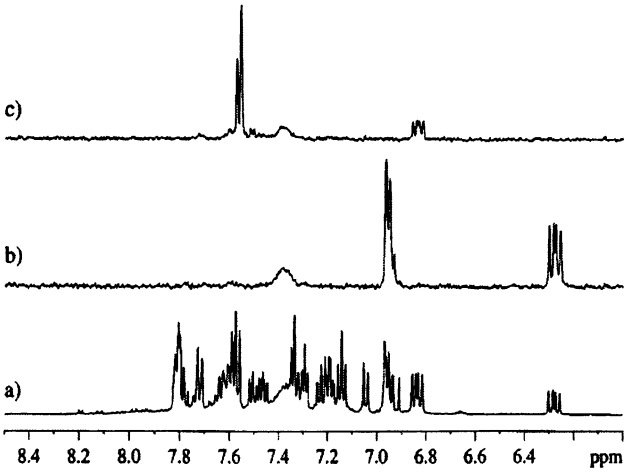
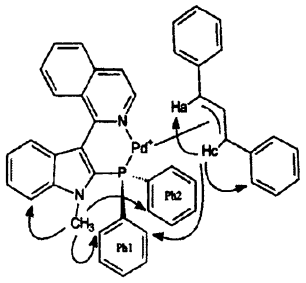


Рисунок 8.43. Выбираемые градиентом 1D спектры NOESY комплекса палладия **8.20,** полученные со временем смешивания 800 мс в каждом случае. (a) Родительский 1D спектр, (b) выбран H_C (не показан) и (c) выбран N-Me (не показан).



8.20

8.7.4. Измерение химического обмена: EXSY

Хотя механизмы химического обмена и ЯЭО совершенно не связаны, они разделяют обычно перенос продольной намагниченности и, таким образом, могут обнаруживаться теми же самыми 1D или 2D ЯМР экспериментами. Фактически, импульсные последовательности NOESY и EXSY (спектроскопия обмена [42]) идентичны и 1D последовательность переходного ЯЭО может одинаково хорошо применяться для измерения констант скорости обмена [43,44]. Кроме того, последовательность с предварительным насыщением, используемая для 1D стационарного эксперимента, также служит простым методом обеспечения доказательства процессов медленного конформационного обмена, особенно в протонных спектрах, на основании эффектов переноса насыщения, при условии, что обмен быстрый относительно скоростей спиновой релаксации. *Практическое различие лежит в зависимости EXSY* ***от скоростей обмена, а не от скорости спиновой релаксации***. Прежде, чем двигаться дальше, здесь предполагается теперь рассмотреть эти эксперименты в контексте наблюдения обменных процессов, и некоторого понимания основ явления обмена. Более обширные обсуждения 1D и 2D методов для изучения динамических процессов можно найти в обзорах [45-47] и в специальных текстах [48,49].

Аналогично исследованиям ЯЭО обменные эксперименты могут использоваться и качественно для установления карты путей обмена, и количественно, для определения констант скоростей обмена. В системах многопозиционного обмена 2D EXSY эксперимент оказывается особенно мощным в измерении их для всех путей. Однако для любых применений наблюдаемые обменные процессы должны быть медленными на временной шкале химического сдвига ЯМР, так как обменивающиеся резонансы должны разрешаться для того, чтобы наблюдать перенос между ними. Кроме того, этот обмен не должен быть *слишком медленным*, иначе релаксационные процессы, встречающиеся в течение τ_m, удалят всю память обменного процесса. Таким образом, эксперименты переноса намагниченности пригодны только для ограниченного диапазона скоростей обмена и, как правило успеха, *они должны быть как минимум* сравнимы со скоростями продольной релаксации ($k_{ex} \geq 1/T_1$). На практике это означает, что эти эксперименты чувствительны к обменным процессам с $k_{ex} \approx 10^2 - 10^{-2}$ c^{-1}. Изучение различных ядер обеспечивает окно различных скоростей в пределах этого интервала, благодаря различиям во временах релаксации, с медленнее релаксирующими спинами, способными исследовать более медленные обменные процессы. Процессы быстрого обмена, которые ведут к слиянию резонансов, могут изучаться анализом формы линии (часто упоминаемым как «анализ формы полосы») [46,48], который обычно требует применения компьютерного моделирования [50]. Как иллюстрация 2D метода, рис. 8.44 показывает EXSY спектр бора-11 смеси 1:1 BCl_3 и BBr_3. Обменные перекрёстные пики демонстрируют присутствие лигандобразующих процессов, и указывают, что механизм включает обмен только одиночного галогенного атома [51]. Количественный анализ этих данных также обеспечивает (псевдо) константы скорости первого порядка для каждого обменного процесса (см. ниже).

Правильный выбор времени смешивания τ_m, является снова важным для успешного применения EXSY, и зависит от констант скорости обмена. Так как они маловероятно известны с любой точностью (так как было бы мало смысла в выполнении эксперимента, если бы они были), и поскольку может существовать их протяженность в изучаемой кинетической системе, снова требуется некоторый компромисс. В отсутствие известных скоростей верхний предел можно определять (по крайней мере, для случая симметричного двухцентрового обмена) из знания, что константа скорости при слиянии k_C, дается выражением $\pi\delta\nu/\sqrt{2}$, где $\delta\nu$ - разность сдвигов (в Гц) в пределе медленного обмена, и, следовательно, $k_{ex} < k_C$. В качественной работе цель - достичь максимальной интенсивности перекрёстного пика и рекомендуется устанавливать $\tau_m \approx 1/k_{ex}$. При таких компромиссных условиях могут действовать многоступенчатые переносы, когда возможны подходя-

щие пути, производящие «косвенные» обменные пики, которые можно перепутать с прямыми пиками от относительно медленных процессов. Например, это наблюдалось для лигандобразующих реакций оловянных галидов [52,53], галидов бора [51] и тетракарбоксилатов свинца (IV) [54].

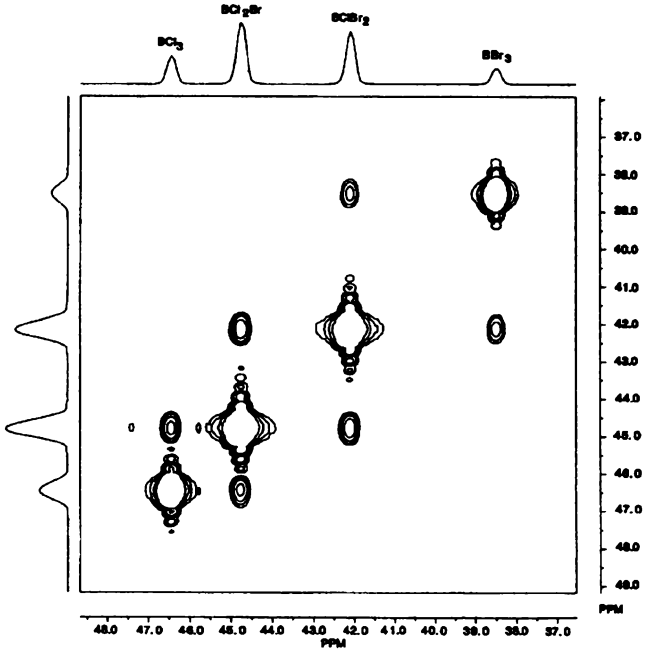


Рисунок 8.44. Спектр 2D EXSY 128 МГц бора-11 смеси 1:1 BCl_3 и BBr_3 при 400° K. Спектр регистрировался со временем смешения 50 мс (воспроизведено с разрешения от [51]).

Выбор τ_m для количественной работы будет диктоваться использованным методом, чтобы вычислить k_{ex}, для чего имеется по существу два широко используемых подхода [51]. Простейший включает сбор EXSY спектров по диапазону τ_m значений и после начального линейного роста обменных кросс-пиков (снова аппроксимация начальной скорости, в точной аналогии с подходом, взятым для анализа NOESY). Большое неудобство в этом, ясно, необходимость собирать многие 2D спектры, которые могут предъявлять неразумные требования к приборному времени. Второй подход - определять константы скорости из единственного EXSY спектра, а для этого подходящий выбор τ_m абсолютно критический; при слишком малом τ_m и перекрёстные пики будут иметь слабые интенсивности, которые подвергаются существенной ошибке, при слишком длинном τ_m интенсивности становятся нечувствительными к параметрам кинетики. Методы для определения оптимума τ_m в таких случаях описаны в [55,56]. При получении подходящих данных, можно использовать вычислительный анализ (например, программой D2DNMR [57]), чтобы вычислить скорости обмена для многоцентровых систем. Для более простого случая равно заселённого 2-центрового обмена представлены явные уравнения для оценки констант скорости из интенсивностей диагонального и перекрёстного пиков [58].

Одно- и двумерные эксперименты обмена намагниченности находят самое большое применение в изучении неорганических и металлоорганических систем, для которых часто существует высокая степень гибкости, и обширные обзоры этой области представлены в [46,47,59], в которых можно найти широкое множество примеров применений. Изучение ядер низкого естественного содержания, что наиболее часто предпринимается, имеет существенную выгоду избежания потенциальных осложнений от ЯЭО эффектов, которые также могут быть действующими. Наиболее вероятна подверженность таким интерференциям динамических протонных исследований.

8.8. ИЗМЕРЕНИЕ ЯЭО ВРАЩАЮЩЕЙСЯ СИСТЕМЫ КООРДИНАТ: ROESY

Польза от регистрации ЯЭО вращающейся системы координат описана в более ранних разделах, и исходит из факта, что они положительны для всех скоростей кувыркания молекул и, следовательно, для всех размеров молекул, и оказывается особенно выгодной при изучении молекул среднего размера, которые представляют обычно очень малый ЯЭО вследствие их свойств подвижности ($\omega_0\tau_C \approx 1$). Так как наблюдение ROE включает измерение переходного усиления, их применение и интерпретация в значительной степени аналогичны NOESY и их не обязательно повторять здесь. Основное беспокойство с ROESY экспериментами (первоначально называвшихся CAMELSPIN [60] вследствие подобия движения фигуриста в течение этого маневра, и поведения векторов намагничивания в течение эксперимента) - факт, что они восприимчивы к множеству процессов, отличных от перекрёстной релаксации, и, следовательно, могут содержать множество налагающихся и потенциально запутывающих откликов, в дополнение к желательным ROE. Оценка этих эффектов, и как иметь дело с ними, являются, следовательно, обязательными для любого желающего использовать эти методы, и требуются некоторые предостережения в применении экспериментов ROE.

8.8.1. 2D ROESY последовательность

Первоначальная и простейшая последовательность ROESY (рис. 8.45) имеет период смешения, определяемый продолжительностью непрерывного низкой мощности РЧ импульса блокировки спинов, в течение которого развивается ROE. Намагничивание не параллельное оси блокировки спина дефазируется неоднородностью РЧ поля (рис. 8.46), поэтому требуется только циклирование фазы для подавления аксиальных пиков и f_1 квадратурного детектирования. Также представлены варианты градиентной селекции [20]. Для молекул малого и среднего размера выбор τ_m следует тому, что существует для NOESY при, обычно, $\tau_m \leq 600$ мс, в то время как для больших молекул в пределе спиновой диффузии, более подходят более короткие значения, так как скорость роста ROE удвоенная по сравнению со скоростью ЯЭО (раздел 8.5). Спектр 2D устанавливает карту взаимодействий через пространство при помощи перекрёстных пиков, которые имеют *фазу, противоположную* диагонали.

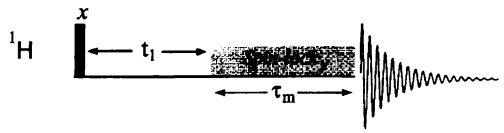


Рисунок 8.45. Последовательность 2D ROESY Время смешивания τ_m, определяется продолжительностью импульса блокировки спинов низкой мощности.

Осложнения с ROESY

Как утверждалось ранее, перекрёстные пики могут возникнуть в ROESY спектрах в результате процессов, которые случаются в течение блокировки спина, других, чем перекрёстная релаксация между спинами. Основные осложнения, которые могут возникать [61]:

- кросс-пики COSY-типа между J-связанными спинами
- TOCSY переносы между J-связанными спинами, и
- ослабление перекрёстного пика от вне-резонансных эффектов РЧ.

Первый из них возникает, когда длинный импульс блокировки спинов действует способом, аналогичным последнему 90° импульсу COSY эксперимента, таким образом, вызывая перенос коге-

рентности между J-связанными спинами. Результирующие пики отображают обычную антифазную структуру пика COSY и имеют тенденцию быть слабыми, поэтому не будем больше их касаться. Значительно большая проблема исходит от переносов TOCSY, которые возникают, потому что период блокировки спинов в ROESY подобен тому, который используется в TOCSY эксперименте (раздел 5.7). Он может, следовательно, также индуцировать когерентные переносы между J-связанными спинами, когда они испытывают подобные РЧ поля, то есть, когда удовлетворяется условие согласования Хартман-Ханна. Так как блокировка спина ROESY не модулируется (то есть не последовательность составного импульса), это согласование ограничивается взаимно связанными спинами с подобными отстройками химического сдвига или спинами с равными, но противоположными отстройками от частоты передатчика.

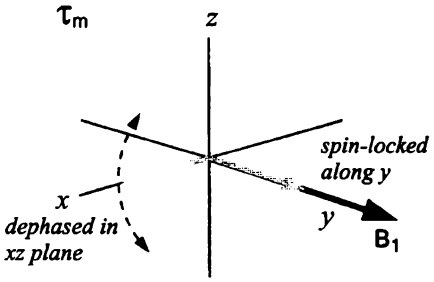
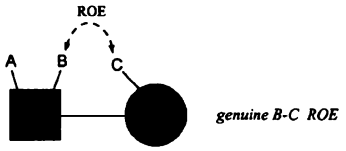
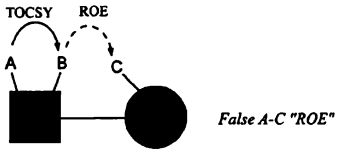


Рисунок 8.46. Блокировка спина ROESY. Во время неё намагничивание, параллельное полю B_1, остаётся спин-блокированным, в то время как ортогональные компоненты управляются вокруг него (здесь в плоскости *xz*) и, в конечном счёте, дефазируются через неоднородность поля B_1.





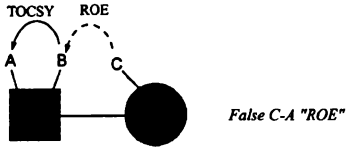


Рисунок 8.47. Генерация «ложных» пиков ROE в ROESY спектрах может возникнуть от комбинации механизмов ROE и TOCSY

Эти условия часто встречаются в природных соединениях, таких как углеводы, нуклеиновые кислоты, пептиды, алкалоиды и стероиды, для которых резонансы группируются вблизи центра спектра. В дополнение к нежелательным прямым эффектам TOCSY, многоступенчатые переносы, включающие и TOCSY, и стадии ROE, могут вести к «ложным» перекрёстным пикам ROE, которые априорно, кажется, возникают из ROE между двумя коррелирующими спинами, но фактически отсутствуют [62]. Таким образом, например, перенос TOCSY от спина A к B, который сопровождается

переносом ROE от B к C в системе рис. 8.47, производил бы очевидный перекрёстный пик, предполагающий ROE между A и C. Аналогично обратные ROE-TOCSY шаги производили бы подобный сигнал, но заключение будет неправильно в любом случае! Так как TOCSY перенос сохраняет фазу сигнала, его причастность к генерации перекрёстного пика не очевидна и может вести к решительно неправильным заключениям. Кроме того, если переносы TOCSY и ROE случаются одновременно между двумя спинами, пик ROE может уменьшаться по абсолютной величине, или даже отменяться вследствие противоположных фаз пиков. Различные пути переноса, которые могут случаться в течение ROESY суммируются в таблице 8.5.

Значительное внимание уделялось путям избежания переноса TOCSY в течение ROESY, простейший из которых - через ограничение согласования Хартман-Ханна с разумным расположением частоты передатчика, чтобы гарантировать, что связанные спины с обеих его сторон не располагаются симметрично [63]. Альтернативно, регистрация двух спектров с различными отстройками передатчика оставляет подлинные пик и ROE мало изменёнными, но должна значительно изменить интенсивности тех, которые включают шаг TOCSY, и, таким образом, облегчает их идентификацию [62]. Модификация самой блокировки спина также ведет к уменьшению эффективности TOCSY (рис. 8.48). Использование РЧ низкой мощности (рис. 8.48a) с γB_1, сравнимым с максимальным сдвигом резонансной частоты [61] (обычно 2-3 кГц) или импульсной блокировки спина [64] (рис. 8.48b), предполагает подобное ослабление [65], ни одно из которых не полное в действительности.

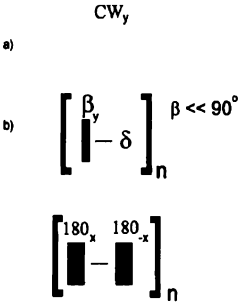


Рисунок 8.48. Практические схемы смешивания ROESY эксперимента, (a) одиночный импульс малой мощности, (b) импульсная блокировка спина, включающая повторяющуюся последовательность импульса малого угла отклонения, сопровождаемого короткой задержкой, и (c) Tr-ROESY блокировка спина чередующейся фазы.

Таблица 8.5. Отклики, наблюдаемые в ROESY эксперименте.

Знак диагонали	Происхождение кросс-пика	Знак кросс-пика
Положительный	Прямой ROE	Отрицательный
	Косвенный ROE (3-спиновый эффект)	Положительный (слабый)
	TOCSY	Положительный
	TOCSY-ROE	Отрицательный (ложный ROE)
	ROE-TOCSY	Отрицательный (ложный ROE)
	Химический обмен	Положительный
	COSY-тип	Антифазный / смешанно фазный

По соглашению диагональ фазируется положительной, а знаки всех других сигналов даются относительно неё.

Совсем недавно[14] показано, что блокировка спина чередующейся фазы (рис. 8.48c) оказывается эффективной при уменьшении TOCSY переноса [66-68], и была названа Tr-ROESY (поперечный ROESY). Этот подход уничтожает согласование Хартман-Хана между связанными спинами, таким образом подавляя TOCSY перенос, и измеряет среднее ROE и ЯЭО, так как векторы намагничивания проводят время и в поперечной плоскости, и вдоль продольной оси, поскольку они следуют качающейся траектории (рис. 8.49). Недостаток потенциальное уменьшение интенсивности перекрёстного пика относительно обычного ROESY, благодаря этому усредняющему процессу.

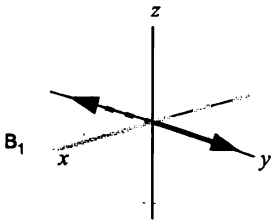


Рисунок 8.49. Качающееся движение спин-блокированных векторов в течение смешивающей последовательности Tr-ROESY

В малых молекулах ($\omega_0\tau_C$ << 1) теоретические потери отсутствуют, они появляются с фактором 2 для молекул среднего размера ($\omega_0\tau_C \approx 1$), и с фактором 4 для очень больших молекул ($\omega_0\tau_C$ >> 1). Следовательно, имеется некоторый компромисс для молекул в области $\omega_0\tau_C \approx 1$, для которого измерения вращающейся системы координат оказываются наиболее выгодными. Этот метод обычно требует, чтобы величина γB_1 была вдвое больше максимальной остройки резонансной частоты (γB_1 обычно 4-6 кГц) и его успех сильно зависит от применения точно калиброванного 180° импульса.

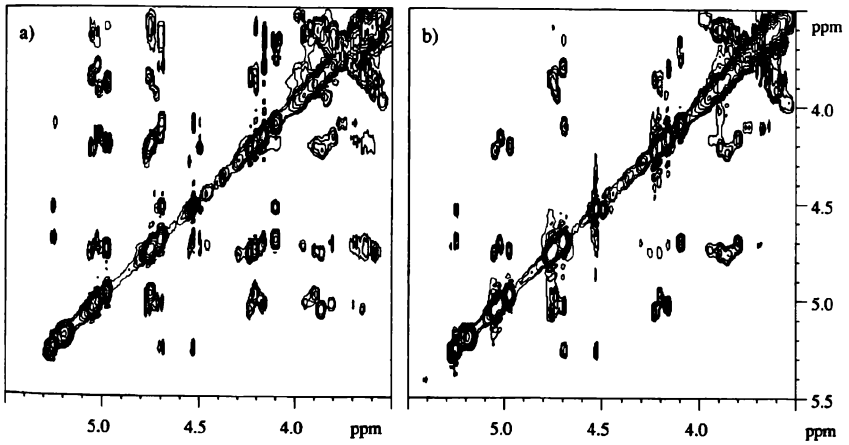


Рисунок 8.50. ROESY спектры тетрамерного карбопептоида **8.21**, полученные с (a) одиночным 2,6 кГц непрерывным импульсом блокировки спинов и (b) 3,7 кГц фазово чередующая Tr-ROESY блокировка спинов при 4,5 мд. Спектр (a) подвергается преобладающему влиянию TOCSY пиков, которые разделяют ту же самую фазу, что и диагональ, в то время как они в значительной степени подавлены в (b), таким образом, обнаруживая подлинные пики ROE.

Способность этой схемы подавлять интерференцию от механизма TOCSY показывается на рисунке 8.50 для тетрамерного карбопептоида **8.21**, в котором исчезновение и TOCSY, и ложных пиков ROE, ясно заметно вместе с выявлением подлинных ROE в (b).

[14] Следует быть очень осторожным в использованной РЧ мощности для блокировки спина, так как может произойти повреждение передатчика, и/или датчика, если в течение слишком длительных периодов времени применяются слишком высокие мощности.

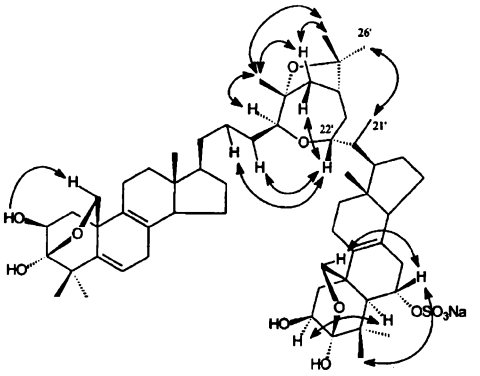
Третий фактор усложнения, специфический для ROESY - ослабление интенсивностей перекрёстного пика как функции отстройки резонанса от частоты передатчика [69]. Вне-резонансные спины испытывают отклонение оси блокировки спина, которая выходит из *x-y* плоскости (раздел 3.2.1), вызывая уменьшение наблюдаемого поперечного сигнала в дополнение к уменьшению скоростей кросс-релаксации. Это больше проблема для количественных измерений, хотя к счастью молекулы среднего размера показывают самую слабую зависимость скоростей кросс-релаксации ROE от отстройки. Так называемая компенсированная ROESY последовательность [69] устраняет эти частотно зависимые потери, если требуются количественные данные.

8.8.2. 1D ROESY последовательности

Параллельно с 1D NOESY последовательностью, упомянутой выше, 2D ROESY эксперимент также имеет 1D эквивалент (фактически, это был первоначальный эксперимент ROE [60]) и селектированные градиентом аналоги [70-72], все включают селективное возбуждение целевого спина. Они могут производиться из 1D NOESY последовательности включением подходящей блокировки спина вместо сегмента 90-τ_m-90 NOESY, и, таким образом, не требуют никакой дальнейшей разработки.

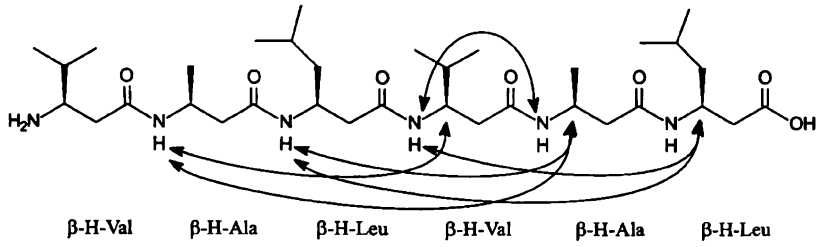
8.8.3. Применения

Ввиду различных факторов усложнения, связанных с ROESY экспериментом, вероятно, благоразумно избегать использования этой методики всякий раз, когда возможно, а вместо неё выбирать стационарный или обычный переходный эксперимент, как первый выбор. Определённо, для малых молекул в пределе чрезвычайного обужения отсутствует теоретическое различие между NOE (ЯЭО) и ROE, поэтому, кажется, ожидается мало выгоды от выполнения потенциально более сложных исследований ROE. Однако возникают ситуации, когда применение измерений вращающейся системы координат неизбежно, потому что обычные эксперименты дают незначительные усиления ($\omega_0\tau_C \approx 1$). И не удивительно, что большинство применений ROESY включало большие молекулы, особенно макроциклические природные соединения: пептиды, олигосахариды и комплексы хозяина-гостя, как показано ниже избранными примерами.



8.22

В доказательстве структуры крелластина цитостатического димерного стероида [73] **8.22**, основной скелет молекулы производился преимущественно из многочисленных дальних протонно-углеродных корреляций, наблюдаемых в HMBC спектрах. Относительная стереохимия бициклической системы при соединении двух стероидных единиц производилась из анализа ROESY спектров, зарегистрированных при 600 МГц со временем смешивания 400 мс, показавших несколько ключевых усилений. Конечная конфигурация при C22' определялась сравнением конформеров минимальной энергии молекулярной механики двух возможных стереоизомеров с противоположными конфигурациями в этом положении. Только C22'-R конфигурация помещает 21' и 26' метильные группы в близости, требуемой для наблюдения ROE между ними. Большая масса молекулы, 933 дальтонов, без сомнения предотвращает использование NOESY измерений, и содержит много примеров такого сорта, где измерения вращающейся системы координат играют критическую роль в характеризации новых природных соединений. Конформационные исследования пептидов также выиграли от ROESY эксперимента, так как обычно большие пептиды обладают определёнными конформациями, и, следовательно, потенциально интересными фармакологическими свойствами. Недавние исследования олигомеров β-пептидов идентифицировали синтетические гексамерные последовательности со спиральными структурами в растворе, которые охарактеризованы измерениями ЯМР и КД [74]. В последовательности **8.23** характерные ROE наблюдались между амидным протоном остатка *i* и H^{β} протонами остатков (*i* + 2 и (*i* + 3) вдоль последовательности, и были характеристичными для структуры, принятой для пептида.

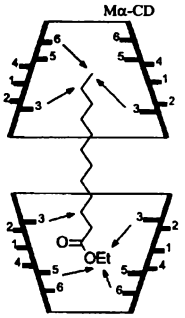


8.23

Эти и дополнительные ROE использовались для определения 18 пространственных ограничений для применения в протоколах внутримолекулярной динамики, классифицируя их интенсивности как слабые, посредственные и сильные (раздел 8.7.1), позволяя вычислить конформации гексапептида. Эти 14 структур минимальной энергии, произведённых из этого, показываются на рисунке 8.51 и ясно иллюстрируют хорошо определённую спиральную структуру, принимаемую в пиридине.

Комплексы включения хозяина-гостя также часто ограничиваются изучением измерений вращающейся системы по причине требования достаточно большого хозяина, который бы смог размещать гостя, и одной из самых хорошо изученных систем хозяина оказались циклодекстрины (CD, или ЦД) (см. структуру **8.10** выше). Одно такое исследование было во включении составных частей природной смеси половых феромонов оливковой фруктовой мухи как средства управления выделением этих летучих веществ [75].

Характеризация комплексов, образованных таким образом, таких как этил-додеканоат, упакованный в «чашки» перметилированного альфа-циклодекстрина **8.24**, обязательно делалась из межмолекулярных ROE, так как NOESY усиления были незначительны. Интерференция от переноса TOCSY также была очевидна в этой работе в виде ложных ROE от молекул гостя на протоны H4 циклодекстрина. Так как эти протоны сидят на внешней поверхности чашки ЦД, возникновение ROE от прямых действий маловероятно, но вместо этого они производятся переносом подлинных ROE между гостем и внутренними протонами H3 и H5. Измерения вращающейся системы координат также широко применялись в характеризации относительно больших металлоорганических комплексов, таких как **8.20** в разделе 8.7.3 выше.



8.24

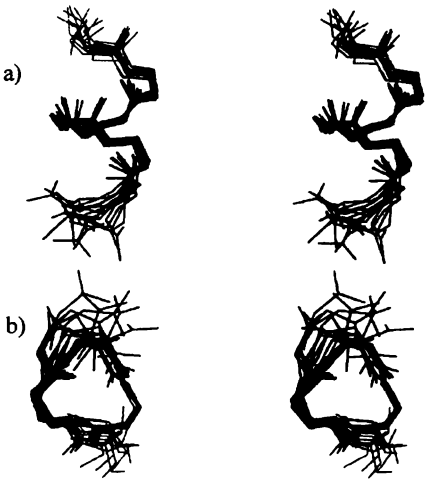
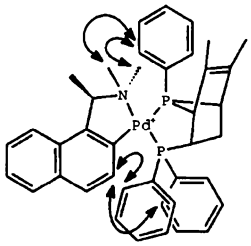
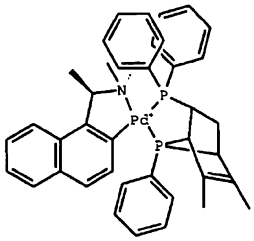


Рисунок 8.51. Стерео изображения 14 структур минимальной вычисленной энергии гексамерного β-пептида **8.23**, основанные на ограничениях расстояний, полученных из ROESY спектров. Проекции сбоку и сверху показаны в (a) и (b) соответственно, с опущенными для ясности боковыми цепями β-аминокислот (воспроизведено с разрешения от [74]).

Второй пример - определение абсолютной конфигурации P-хирального дифосфина, [76] **8.25**. Одним из его аспектов была идентификация комплекса, либо как региоизомера **8.25a**, либо **8.25b**, прежде дальнейшего исследования, и через наблюдение ROE от фенильных колец было показано, что это **8.25a**. Анализ данных ROESY далее позволил сделать выбор между возможными диастереомерами и, таким образом, определил абсолютную стереохимию.



8.25a



8.25b

8.9. ИЗМЕРЕНИЕ ГЕТЕРОЯДЕРНЫХ ЯЭО

Кроме его общего применения как средства усиления чувствительности ядер спина 1/2 с низкими гиромагнитными отношениями, специфический гетероядерный ЯЭО был случайно использован как инструмент в структурных исследованиях [77] и оказался способным при благоприятных обстоятельствах предоставлять уникальный источник структурной информации. Методы для его наблюдения в значительной степени параллельны методам гомоядерных экспериментов в виде 1D стационарных разностных и 2D переходных экспериментов, поэтому здесь нет ничего принципиально нового для понимания. Главное ограничение этих подходов - низкая чувствительность, связанная с наблюдением спина низкого γ, что означает, что гетероядерные ЯЭО гораздо менее используются, чем их гомоядерные протонные аналоги. Наиболее широко распространённые применения включали ^{1}H-^{13}C ЯЭО, и совсем недавно ^{1}H-^{6}Li ЯЭО [78], в которых насыщается протон, а наблюдается гетероатом. Поскольку релаксация углерода, несущего протон, подвергается преобладающему влиянию его дипольных взаимодействий с этим протоном, только четвертичные углероды имеют тенденцию показывать полезные специфические дальние ЯЭО. Кроме того, селективное облучение протонного резонанса часто ограничивается родительской линией ^{12}C, оставляя ^{13}C спутники в спектре незатронутыми, что означает, что ^{13}C центр, связанный с целевым протоном, обычно *не показывает* усиления при этих условиях.

Последовательность 1D гетероядерного разностного ЯЭО (рис. 8.52a) по существу идентична гомоядерному эквиваленту, за исключением добавления широкополосного протонного декаплирования в течение регистрации.

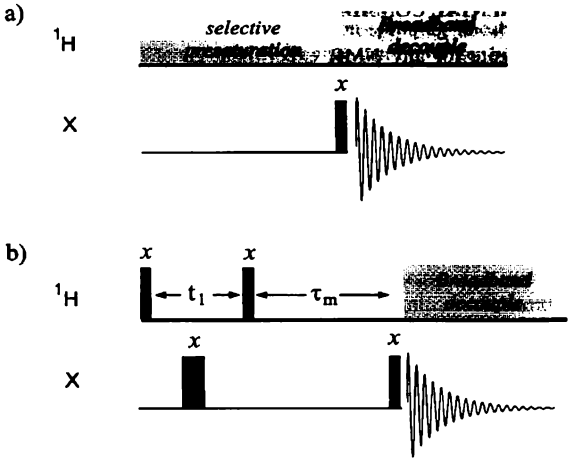


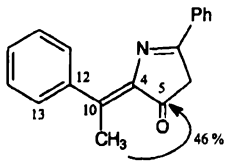
Рисунок 8.52. Последовательности для измерения усиления гетероядерного ЯЭО, (a) стационарный эксперимент и (b) 2D переходный эксперимент (HOESY).

Так как это производит неспецифические ЯЭО усиления, между сканированиями должен оставляться достаточный период восстановления, чтобы позволять им затухать. Период предварительного насыщения теперь диктуется потенциально длительными временами релаксации гетероатома, но кроме этого соображения требуются шаги, подобные оптимизации для гомоядерного эксперимента. Проблемы, связанные с селективным предварительным насыщением целевого протонного резонанса, могут обрабатываться подобным способом, хотя здесь SPT интерференции подавляются использованием широкополосного декаплирования. Совсем недавно представлен 1D

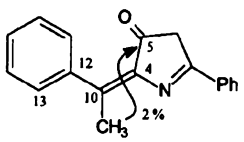
эксперимент селектированного градиентом переходного гетероядерного ЯЭО, который использует селективное возбуждение в обычно лучше разреженном углеродном измерении, и который использует протонное детектирование для улучшенной чувствительности [79].

2D последовательность [80,81], упоминаемая как HOESY (гетероядерная спектроскопия эффекта Оверхаузера, рис. 8.52b), избегает необходимости селективного протонного предварительного насыщения, но естественно страдает от низкой чувствительности. Последовательность, аналогичная NOESY, с дополнительным 180° импульсом в течение t_1, служащим для рефокусирования $^1J_{CH}$ эволюции взаимодействия, и, таким образом, обеспечивает углеродное декаплирование в f_1. В [82] представлены уравнения, позволяющие оценивать оптимальную величину τ_m для наблюдения структурно информативных дальних ЯЭО на непротонированные ядра. Для случая ^1H-^{13}C ЯЭО, где углеродные времена релаксации значительно длиннее, чем, таковые протонов, максимальная интенсивность перекрёстного пика достигаются, когда $\tau_m \approx 2T_1$ протона. Отрицательные трёхспиновые $^1H \rightarrow {}^1H \rightarrow {}^{13}C$ эффекты также могут становиться заметными [83]. Также представлена улучшенная градиентом протон-детектируемая версия и продемонстрирована для ^1H-^{31}P и $^1H^7Li$ спиновых пар [84].

Гетероядерные эксперименты нашли применение в спектроскопии ЯМР ^{13}C для отнесения четвертичных углеродов и для определения стереохимии в ситуациях, где не может применяться ЯЭО ^1H-^1H. Четвертичные отнесения чаще делаются через методики дальней корреляции, такие как HMBC, *хотя неспособность различать априорно и корреляции через 2 и 3 связи может вызывать неоднозначность.* Короткодействующая природа ЯЭО означает, что он может оказываться полезным в различении близлежащих непротонированных центров (то есть тех, которые удалёны на две связи [85]) от более отдалённых [86,87]. Применение гетероядерных ЯЭО в определении стереохимии показывается примером соединения **8.26** [88]. Гомоядерный протонный ЯЭО не мог использоваться для различия *E* и Z изомеров показанных оксазолонов, хотя это оказалось возможным из гетероядерных ЯЭО, произведенных при карбонильном углероде после насыщения метильных протонов.



Z



E

$\eta\{Me^{11}\}$/%

	4	5	10	12	13
Z:	25	46	62	15	-6
E:	10	2	40	21	-5

8.26

8.10. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СООБРАЖЕНИЯ

Предпосылкой для любого ЯМР эксперимента является, конечно, хорошо приготовленный образец (раздел 3.3). Кроме того, имеется множество экспериментальных факторов, которые имеют конкретное значение, касающееся измерений ЯЭО, особенно для метода разностного ЯЭО, который весьма нетерпим к плохой постановке эксперимента. Стабильное магнитное поле в течение

всего эксперимента существенно, что означает, что система стабилизации, которая ответственна за регулировку отношения частота-поле, должна работать хорошо. Дрейф поля особенно заметен и вреден в методе разностного ЯЭО, а оптимальной эффективности можно достигать, выбирая растворитель с сильным и острым сигналом стабилизации, где это возможно, например, ацетон. Растворители со слабыми сигналами дейтерия, такие как $CDCl_3$, или широкие резонансы дейтерия, такие как D_2O, вероятно, подходят менее хорошо в этом отношении. Выбор растворителя и температуры образца может также использоваться для хорошего эффекта, чтобы контролировать скорости кувыркания молекул (времена корреляции), которые могут быть особенно полезными для молекул среднего размера, близко к условию нулевого ЯЭО $\omega_0\tau_C \approx 1$. Применение растворителя низкой вязкости и/или более высоких температур будет увеличивать скорости кувыркания и смещать движение к пределу чрезвычайного обужения, в то время как растворители высокой вязкости и/или пониженные температуры будут поддерживать смещение к пределу спиновой диффузии. Растворители стабилизации с температурнозависящими сдвигами, особенно D_2O, в частности, требуют определённого внимания к температурной стабильности и будут почти определённо требовать активного регулирования температуры. Дрейф резонансной частоты стабилизации, возникающей от изменения температуры образца, будет вызывать сдвиг *всех резонансных частот* в спектре, поскольку поле следует за этим дрейфом, и является бедствием для разностных экспериментов. Если температурная стабилизация невозможна, или если она действует неадекватно, тогда для захвата стабилизации может использоваться малое количество дополнительного дейтерированного растворителя (5-10% ацетона d_6 - хороший выбор), и, обычно, обеспечивает превосходные результаты (по той же самой причине нужно всегда стабилизироваться по резонансу CD_3, а не по резонансу OD в случае метанола-d4).

Также ***следует избегать очень высоких концентраций растворяемого вещества в образцах ЯЭО***, так как переходные взаимодействия между протонированными молекулами способствуют *межмолекулярной* диполь-дипольной релаксации, которая конкурирует с генерацией самого ЯЭО. Другой внешний источник релаксации, который может гасить ЯЭО, являются ***парамагнитные примеси***, особенно некоторые ***ионы металлов*** и ***молекулярный кислород***. Хотя они являются нежелательными добавками к любому образцу ЯМР, их присутствие может быть особенно вредным для исследований ЯЭО, так как парамагнитная релаксация доминирует над перекрёстной релаксацией. Ионы металлов могут удаляться фильтрацией через подходящие хелатирующие смолы, в то время как кислород может удаляться методом замораживания-откачивания-оттаивания, описываемом в разделе 3.3. Выгодны ли усилия по удалению следов кислорода, сильно зависит от изучаемого образца. ***Для очень больших молекул эффективная перекрёстная релаксация означает, что ЯЭО создается быстро до больших значений и поэтому индуцированная кислородом парамагнитная релаксация имеет относительно небольшое значение и дегазирование действует мало. Наоборот, внешняя релаксация для меньших молекул, которые кувыркаются быстро, вызывает радикальное уменьшение ЯЭО (см. рисунок. 8.10) и дегазирование, вероятно, должно быть более выгодно***. Аналогично, слабые медленно развивающиеся ЯЭО, возникающие из дальних усилений или косвенных эффектов, также будут усиливаться, при минимизации внешней релаксации. Обычно, чем меньше молекула, и, чем больше исследуемые межъядерные расстояния, тем больше улучшение от дегазирования растворителя. На практике, однако, *обычные эксперименты ЯЭО успешны и в необезгаженных растворах для всех, кроме наименьших молекул* и, с вышеуказанными предостережениями в уме, их необязательно дегазировать для большинства органических молекул.

Наконец, ***вращение образца также может быть вредно для экспериментов ЯЭО*** (или, в действительности, для любого эксперимента ЯМР, когда получаются малые отклики), в частности

через процесс, известный как «Q-модуляция[15]», изменение взаимодействия между РЧ катушкой и образцом, вызванное слабым колебанием образца, когда он вращается в датчике [16]. С улучшением формы линии без вращения, достижимым с современными шиммами, вращение образца можно больше не рекомендовать и для 1D (особенно для разностных экспериментов), и для 2D экспериментов ЯЭО.

ЛИТЕРАТУРА

[1] D. Neuhaus and M.P. Williamson, ***The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis***, VCH Publishers, New York, 1989.

[2] R.A. Bell and J.K. Saunders, ***Can. J. Chem.***, 1970,**48**, 1114-1122.

[3] D.M. Hodgson and P.J. Comina, ***Tetrahedron Lett.***, 1996, **37**, 5613-5614.

[4] R. Colombo, F. Colombo, A.E. Derome, J.H. Jones, D.L. Rathbone and D.W. Thomas, ***J.C.S. Perkm Trans.* 1,** 1985.

[5] J.K. Robinson, V. Lee, T.D.W. Claridge, J.E. Baldwin. and C.J. Schofield, ***Tetrahedron***, 1998, **54,** 981-996.

[6] J.E. Baldwin, T.D.W. Claridge, F.A. Heupel and R.C. Whitehead, ***Tetrahedron Lett.***, 1994, **35**,7829-7832.

[7] J.E. Baldwin, L. Bischoff, T.D.W. Claridge, F.A. Heupel, D.R. Spring and R.C. Whitehead, ***Tetrahedron***, 1997, **53**, 2271-2290.

[8] B.T. Farmer, S. Macura and L.R. Brown, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **80**, 1-22.

[9] J.K.M. Sanders and J. D. Mersh, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1982,**15,** 353-400.

[10] J.C. Lindon and A.G. Ferrige, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1980, **14,** 27-66.

[11] D. Neuhaus, G. Wagner, M. Vasak, J.H.R. Kagi and K. Wuthrich, ***Eur. J. Bwchem.***, 1985, **151,**257-273.

[12] M. Kinns and J.K.M. Sanders, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **56,** 518-520.

[13] A.J. Shaka, C. Bauer and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **60,** 479-485.

[14] R.J. Smith, D.H. Williams, J.C.J. Barna, I.R. McDermott, K.D. Haegele, F. Pinou, J. Wagner and W. Higgins, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1985,**107,** 2849-2857.

[15] S. Macura, Y. Huang, D. Suter and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1981, **43**, 259-281.

[16] N.H. Andersen, K.T. Nguyen, C.J. Hartzell and H.L. Eaton, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **74**, 195-211.

[17] E.T. Olejniczak, J.C. Hoch, C.M. Dobson and F.M. Poulsen, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **64,** 199-206.

[18] M.P. Williamson and D. Neuhaus, ***J. Magn. Reson.***, 1987, 72, 369-375.

[19] V. Dotsch, G. Wider and K. Wuthrich, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1994,**109,** 263-264.

[20] T. Parella, F. Sanchez-Ferrando and A. Virgili, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **125,** 145-148.

[21] R. Wagner and S. Berger, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1996, **123,** 119-121.

[22] G. Otting, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **86,** 496-508.

[23] L. Mitschang, J. Keeler, A.L. Davis and H. Oschkinat, ***J. Biomol. NMR***, 1992, **2**, 545-556.

---

[15] Символ Q в радиотехнике используется для обозначения «добротности» контура ($Q \approx L\omega/R$, где L – индуктивность контура, а R – его активное соротивление). Вероятно, Q-модуляцию следует понимать как механическое изменение добротности контура приёмной катушки при вращении образца. (*Прим. перев.*).

[16] Это иногда заметно как модуляция или дрожание профиля настройки датчика и появление откликов в 1D спектрах, которые симметричны относительно основных резонансов при частотах, равных скорости вращения, кроме того, безразличны к шиммированию и имеют случайную фазу, оба из них отличаются тогда от «боковых сигналов вращения», вызванных неоднородностью поля. Вследствие их случайных свойств они имеют тенденцию усредняться при многих сканированиях, но, тем не менее, являются нежелательными артефактами.

[24] G. Bodenhausen, G. Wagner, M. Rance, O.W. Sorensen, K. Wuthrich and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **59,** 542-550.
[25] N.H. Andersen, H.L. Eaton and X. Lai, ***Magn. Reson. Chem.***, 1989,**27**,515-528.
[26] J.W. Keepers and T.L. James, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **57**, 404-426.
[27] A. Kumar, G. Wagner, R.R. Ernst and K. Wuthrich, ***J. Am. Chem. Soc***, 1981, **103,** 3654-3658.
[28] J.N.S. Evans, **Biomolecular NMR Spectroscopy**, Oxford University Press, Oxford, 1995.
[29] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer and N.J. Skelton, ***Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice***, Academic Press, San Diego, 1996.
[30] G. Esposito and A. Pastore, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **76**, 331-336.
[31] M. Reggelin, H. Hoffman, M. Kock and D.F. Mierke, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1992, **114,** 3272-3277.
[32] J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler and A.J. Shaka, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1994, **116,** 6037-6038.
[33] K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.L. Hwang and A.J. Shaka, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1995, **117,** 4199-4200.
[34] K. Stott, J. Keeler, Q.N. Van and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson.***, 1997,**125**,302-324.
[35] N. Fusetani, K. Shinoda and S. Matsunaga, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1993,**115**,3977-3981.
[36] K. Wuthrich, **NMR of Proteins and Nucleic Acids**, Wiley, New York, 1986.
[37] H.J. Dyson and P.E. Wright, ***Ann. Rev Biophys Biophys Chem***, 1991,**20**,519-538.
[38] M.P. Williamson and J.P. Waltho, ***Chem. Soc. Rev.***, 1992, **21,** 227-236.
[39] S. Anderson, T.D.W. Claridge and H.L. Anderson, ***Angew. Chem. Int.*** *Ed. Engl.*, 1997, **36,** 1310-1313.
[40] L. Fielding, N. Hamilton and R. McGuire, ***Magn. Reson. Chem.***, 1997,**35**, 184-190.
[41] T.D.W. Claridge, J.M. Long, J.M. Brown, D. Hobbs and M.B. Hursthouse, ***Tetrahedron***, 1997,**53**,4035-4050.
[42] J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann and R.R. Ernst, ***J. Chem. Phys.***, 1979, **71**, 4546-4553.
[43] I.D. Campbell, C.M. Dobson, R.G. Ratcliffe and R.J.P. Williams, ***J. Magn. Reson.***, 1978, **29,** 397-417.
[44] J.J. Led and H. Gesmar, ***J. Magn. Reson.***, 1982, **49,** 444-463.
[45] K.G. Orrell, V. Sik and D. Stephenson, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1990, **22**, 141-208.
[46] K.G. Orrell and V. Sik, ***Ann. Rep. NMR Spectrosc.***, 1993,**27**, 103-171.
[47] C.L. Perrin and T.J. Dwyer, ***Chem. Rev.***, 1990, **90,** 935-967.
[48] J. Sandstrom, ***Dynamic NMR Spectroscopy***, Academic Press, London, 1982.
[49] M. Oki, ***Applications of Dynamic NMR Spectroscopy to Organic Chemistry***, VCH Publishers, Wemheim, 1985.
[50] D.S. Stephenson and G. Binsch, ***J. Magn. Reson.***, 1978, **32**, 145-152.
[51] E.F. Derose, J. Castillo, D. Saulys and J. Morrison, ***J. Magn. Reson.***, 1991, **93,** 347-354.
[52] R. Ramachandran, C.T.G. Knight, R.J. Kirkpatrick and E. Oldfield, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **65,**136-141.
[53] I. Planet, E. Fouquet, M. Pereyre, M. Glelen, F. Kayser, M. Biesemans and R. Willem, ***Magn. Reson. Chem.***, 1994,**32**,613-617.
[54] J.E.H. Buston, T.D.W. Claridge and M.G. Moloney, ***J.C.S. Perkm Trans***, 1995, **2**, 639-641.
[55] C.L. Perrin, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **82,** 619-621.
[56] V.S. Dimitrov and N.G. Vassilev, ***Magn. Reson. Chem.***, 1995,**33**,739-744.
[57] E.W. Abel, T.P.J. Coston, K.G. Orrell, V. Sik and D. Stephenson, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **70,** 34-53.
[58] G. Bodenhausen and R.R. Ernst, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1982, **104,** 1304-1309.
[59] K.G. Orrell and V. Sik, ***Ann. Re.p NMR. Spectrosc.***, 1987,**19**,79-173.
[60] A.A. Bothner By, R.L. Stephens, J. Lee, C.D. Warren and R.W. Jeanioz, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1984,**106**, 811-813.
[61] A. Bax and D.G. Davis, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **63,** 207-213.
[62] D. Neuhaus and J. Keeler, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **68,** 568-574.
[63] T.M. Chan, D.C. Dalgamo, J.H. Prestegard and C.A. Evans, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **126,** 183-186.

[64] H. Kessler, C. Griesinger, R. Kerssebaum, K. Wagner and R.R. Ernst, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1987,**109,** 607-609.
[65] A. Bax, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **77**, 134-147.
[66] T.L. Hwang and A.J. Shaka, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1992, **114,** 3157-3159.
[67] T.L. Hwang, M. Kadkhodaei, A. Mohebbi and A.J. Shaka, ***Magn. Reson. Chem.***, 1992, **30,** 24-34.
[68] T.L. Hwang and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1993, **102,** 155-165.
[69] C. Greisinger and R.R. Ernst, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **75**, 261-271.
[70] P. Adell, T. Parella, F. Sanchez-Ferrando and A. Virgili, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1995, **108, 77-80.**
[71] C. Dalvit and G. Bovermann, ***Magn. Reson. Chem.***, 1995,**33**, 156-159.
[72] M. J. Gradwell, H. Kogelberg and T.A. Frenkiel, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **124,** 267-270.
[73] M.V.D. Auna, C. Giannini, A. Zampella, L. Minale, C. Debitus and C. Roussakis, ***J. Org. Chem.***, 1998, **63,** 7382-7388.
[74] D. Seebach, M. Overhand, F.N.M. Kuhnie, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel and H. Widmer, ***Helv. Chim. Acta***, 1996, **79,** 913-941.
[75] A. Botsi, K. Yannalopoulou, B. Perly and E. Hadjoudis, ***J. Org. Chem.***, 1995, **60,** 4017-4023.
[76] B.-H. Aw, S. Selvaratnam, P.-H. Leung, N.H. Rees and W. McFariane, ***Tetrahedron Asymmetry***, 1996, 7, 1753-1762.
[77] K.E. Kover and G. Batta, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1987, **19,** 223-266.
[78] W Bauer, in ***Lithium Chemistry***, ed. A.-M Sapse and P.V.R. Schleyer, Wiley, New York, 1995.
[79] K. Stott and J. Keeler, ***Magn. Reson. Chem.***, 1996, **34**, 554-558.
[80] P.L. Rinaldi,.***J. Am. Chem. Soc.***, 1983, **105**,5167-5168.
[81] C.Yu. and G.C. Levy, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1983, **106,** 6533-6537.
[82] K.E. Kover and G. Batta, ***J. Magn. Reson.*** , 1986, **69,** 344-349.
[83] K.E. Kover and G. Batta, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **69,** 519-522.
[84] W. Bauer, ***Magn. Reson. Chem.***, 1996, **34,** 532-537.
[85] F. Sanchez-Ferrando, ***Magn. Reson. Chem.***, 1985,**23**, 185-191.
[86] F.J. Leeper and J. Staunton, ***J.C.S. Chem. Commun.***, 1982,911-912.
[87] M.F. Aldersley F.M. Dean and B.E. Mann, ***J.C.S. Chem. Commun.***, 1983, 107-108.
[88] C. Cativiela and F. Sanchez-Ferrando, ***Magn. Reson. Chem.***, 1985,**23**, 1072-1075.

Глава 9

Экспериментальные методы

Эта заключительная глава преимущественно рассматривает собрание экспериментальных методов, которые находят широкое применение в современном ЯМР высокого разрешения, но сами по себе не могут рассматриваться как индивидуальные методы. Более того, они представляют собой сегменты последовательностей, в которых они используются, или могут добавляться к уже встречавшимся методам, чтобы увеличивать их информационное содержание или преодолевать диапазон экспериментальных ограничений. В дополнение к знакомым простым РЧ импульсам они являются компонентами, используемыми для конструирования современных ЯМР экспериментов. В зависимости от контекста они могут рассматриваться как необходимые для правильного выполнения желаемого эксперимента, или рассматриваться как необязательное дополнение, чтобы увеличивать эффективность. Например, широкополосное декаплирование протонов в течение регистрации углерода рутинно использует так называемую схему «декаплирования составным импульсом» (CPD), чтобы достичь эффективного удаления всех протонных взаимодействий, и теперь рассматривается как необходимое. Импульсные полевые градиенты (ИПГ) могут, одинаково хорошо включаться в эту главу, так как во многих случаях они служат как средство выбора сигнала, альтернативное традиционным процедурам фазовой циркуляции. Факт, что ИПГ описаны в предыдущей главе, показывает способ, которым они проникли в современные последовательности ЯМР, и могут теперь рассматриваться как рутинные для многих многомерных экспериментов. Глава заканчивается кратким введением в некоторые относительно новые экспериментальные методики (по крайней мере, новые в контексте ЯМР высокого разрешения), которые находят растущую популярность.

9.1. СОСТАВНЫЕ ИМПУЛЬСЫ

Из многообразия многоимпульсных последовательностей ЯМР, используемых во всех современных химических исследованиях, успех выполнения всех из них критически зависит от точности углов поворота ядерных спинов, испытывающих РЧ импульсы. Тщательная калибровка ширины импульсов является существенной в этом контексте, несмотря на то, что множество факторов, неизменно работают против экспериментатора, и производят импульсы, которые отклоняются от их идеалов, таким образом, ведя к деградации эффективности эксперимента. Кроме ограничений, накладываемых возможностями самого спектрометра в отношении точности таймирования импульсов, мощностей, сдвигов фазы РЧ, и так далее (для которых оператор может сделать немно-

гое), имеются два известных вклада в несовершенство импульса, которые могут разрешаться экспериментально, а именно, неоднородность РЧ (B_1) и вне-резонансные эффекты.

Неоднородность в приложенном РЧ поле означает, что не все ядра в пределах объёма образца испытывают желательный угол поворота импульса (рис. 9.1b), особенно на периферии образца. Это по действию подобно (локальной) плохой калибровке ширин импульсов и упоминания «неоднородность РЧ (или B_1)» ниже может равнозначно читаться как «некалиброванность ширины импульса». Модификации, которые делают последовательности более терпимыми к неоднородности РЧ, следовательно, также обеспечивают экспериментатора некоторой свободой действий при постановке импульсных экспериментов.

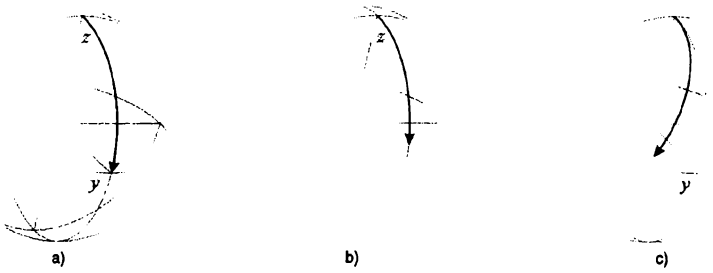
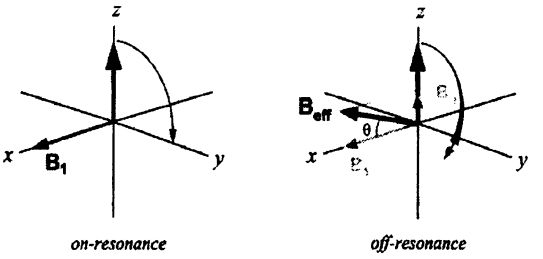


Рисунок 9.1. Несовершенства импульсного возбуждения. (a) Совершенный $90°_x$ импульс применённый при равновесии, (b) действие неоднородности B_1и (c) эффект вне-резонансного возбуждения.

Вне-резонансное возбуждение возникает, когда частота передатчика не точно соответствует ларморовой частоте спина, и уже вводилась в разделе 3.2. Чтобы резюмировать кратко, вне-резонансные векторы намагничивания испытывают эффективное РЧ поле во вращающейся системе, которое отклоняется от *x*-*y* плоскости, в отличие от самого приложенного поля B_1 (рис. 9.2). Эти векторы управляются этим эффективным полем и, таким образом, не следуют траектории случая идеального резонанса (рис. 9.1c). Проблема исходит из факта, что импульсные приборы ЯМР, используют монохроматичное РЧ излучение, когда требуется полихроматичное возбуждение.

Рисунок 9.2. Вне-резонансное возбуждение вызывает вращение обобщённого вектора относительно эффективного РЧ поля, отклоняясь от поперечной плоскости.



Борьба с эффектами неоднородности B_1 сильно зависит от конструкции РЧ катушки, а это полностью зависит от изготовителей датчиков, которые постоянно совершенствуются в этом отношении.. Преодоление вне-резонансных эффектов непосредственно требует применения более высокомощных передатчиков, которые способны возбуждать более широкие полосы, но здесь встре-

чаются две основные проблемы. Первая - неспособность схемы датчика поддерживать такие высокие мощности без повреждений и, второе - коварный эффект РЧ нагревания образца, который может повредить драгоценные образцы. Улучшения схемы датчика, которые минимизируют это нагревание, в значительной степени сопровождались ростом напряжённостей постоянных полей, поэтому, несмотря на технические разработки, проблема остается существенной. Она имеет большую актуальность при более высоких напряжённостях поля и для тех ядер, которые представляют широкий диапазон химических сдвигов, таких как ^{13}C или ^{19}F. Рассмотрим регистрацию данных простым 90° импульсом, который имеет ширину полосы однородного возбуждения около $\pm\gamma B_1$ Гц или всего $2\gamma B_1$ Гц, где γB_1 - напряжённость РЧ поля (раздел 3.5). Принимая типичное значение 10 мкс для 90° импульса, это соответствует γB_1 Гц, или 25 кГц. Для возбуждения ^1H при 400 МГц, полная полоса возбуждения, таким образом, составит 125 мд, которая ясно вполне достаточна, а для ^{13}C - достаточно 500 мд. В противоположность, 180° инвертирующий импульс имеет полную ширину полосы (здесь принято значение эффективности >90%) только примерно 0,4 γB_1, которая в этом примере соответствует 25 мд для протонов, снова приемлемо, но только 100 мд для ^{13}C. Ядра углерода, которые резонируют вне этой ширины полосы, испытывают уменьшенную эффективность инверсии. Вне-резонансные ошибки для 180° инвертирующего импульса иллюстрируются на рисунке 9.3a, на котором ясно, что траектории векторов намагничивания далеки от идеала и заканчиваются всё дальше от «Южного полюса» с увеличением отстройки, таким образом, генерируя нежелательную поперечную намагниченность. Комбинированный эффект таких несовершенств импульса в многоимпульсных последовательностях должен деградировать чувствительность и потенциально вводить ложные артефакты, и поэтому полезно так или иначе производить их компенсацию.

Изящный подход к компенсации недостатков, возникающих от неоднородности B_1, или отстройки резонанса - применение *составного импульса* [1]. Это, фактически, кластер импульсов изменяющейся продолжительности и фазы, который используется вместо одиночного импульса, и имеет чистый угол поворота, равный ему, но имеет большую полную терпимость к этим ошибкам. Первый составной импульс [2], и до сих пор ещё один из наиболее широко используемых, - трёхимпульсный кластер $90_X180_Y90_X$, эквивалент $180°_Y$ импульса. Самокомпенсирующиеся способности этой последовательности для инверсии спинов иллюстрируются траекториями рис. 9.3.

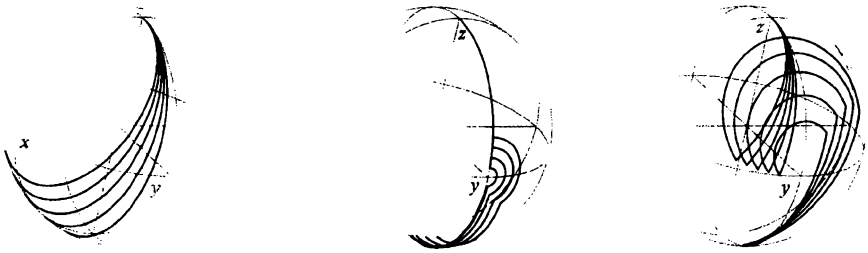


Рисунок 9.3. Моделированный эффект (a) положения резонанса ($0,2\text{-}0,6\ \gamma B_1$) на свойствах инверсии одиночного $180°_X$ импульса, и дающего эффект компенсации $90_X180_Y90_X$ составного 180° импульс на (b) неоднородность B_1 и (c) – на отстройку резонанса.

И для неоднородности B_1 (рис. 9.3b), и для отстройки резонанса (рис. 9.3c) улучшенная эффективность очевидна от кластеризации векторов вблизи Южного Полюса. Эффективная ширина по-

9.1.2. Инверсия и рефокусирование

Один фактор усложнения, связанный с реализацией составных импульсов возникает из факта, что многие составные последовательности проектировались с конкретным начальным состоянием намагничивания в уме и не могут выполняться хорошо, или давать ожидаемый результат, когда импульсы действуют на другие состояния. Два основных применения применение составных 180° импульсов для *инверсии* заселенности, например, в эксперименте инверсии-восстановления, или в вездесущем спиновом эхо для *рефокусирования*, в котором они действуют на продольное и поперечное намагничивание, соответственно.

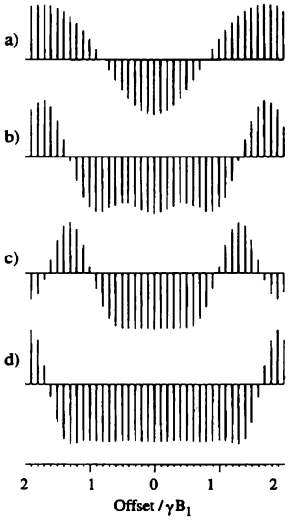


Рисунок 9.6. Симулированные профили инверсии для (a) 180_X, (b) $90_Y180_X90_Y$, (c) $90_Y240_X90_Y$ и (d) $38_X111._X159_X20._X$ (см. рисунок 9.3, а также таблицу 9.1).

Таким образом, например, последовательность $90_X180_Y90_X$ обеспечивает небольшую компенсацию отстройки при использовании в качестве рефокусирующего импульса (таблица 9.1). Хотя она предлагает компенсацию неоднородности B_1, и таким образом, делает величину эхо менее чувствительной к ней, возвращая векторы ближе к *x-y* плоскости, она вносит ошибки в *фазу* эхо, которые могут быть вредными для полной эффективности эксперимента. Последовательность $90_X240_Y90_X$ предполагалась как лучший рефокусирующий элемент для компенсации отстройки [9], а также созданы более изощрённые последовательности, которые обеспечивают низкие фазовые искажения [10,11]. Последние последовательности, разработанные числовыми методами оптимизации, проектировались без предопределенного исходного состояния и поэтому одинаково эффективны как элементы инверсии, и как фазово-неискажающие рефокусирующие элементы [7,8].

Мораль всего этого такова, что следует соблюдать значительную осторожность, когда в импульсные последовательности вводятся составные импульсы. Разумно проверять последовательности компенсированного импульса относительно исходных некомпенсированных последовательностей на известном образце, чтобы видеть достигаются ли улучшения в действительности. Это предполагает проверку, правильно ли были введены составные элементы и, способен ли спектрометр правильно выполнять желательные последовательности, многие из которых требуют точного контроля РЧ амплитуд и фаз в течение расширенных периодов. Экспериментальная эффективность самого составного импульса лучше всего проверяется простым экспериментом, таким как последовательность инверсии ($180_{X,-X}$-90_X-ССИ$_X$), или последовательность спин-эхо (90_X-$180_{X,Y,-X,-Y}$-ССИ$_{X,-X}$) с составным 180° импульсом, и, анализируя результаты для одиночного

резонанса. Компенсация отстройки может исследоваться ступенчатой развёртркой частоты передатчика для 180° составного импульса, прочь от начального положения резонанса (но, устанавливая его на резонанс для 90° импульса), а неоднородность B_1 может симулироваться уменьшением углов поворота импульса.

9.2. ШИРОКОПОЛОСНОЕ ДЕКАПЛИРОВАНИЕ И БЛОКИРОВКА СПИНОВ

Область, в которой составные импульсы с большим успехом применяются рутинно - широкополосное гетероядерное декаплирование. Их использование в этой области возникает из понимания, что гетероядерного декаплирования можно достичь непрерывным применением последовательности 180° инвертирующих импульсов к декаплируемому спину. Это иллюстрируется на рисунке 9.7 для пары X-H в присутствии протонного декаплирования. После возбуждения X векторы дублета расходятся в течение периода τ согласно J_{XH}. Приложенный к протонам 180° импульс в это время инвертирует α и β состояния протона, таким образом, обращая знак прецессии векторов X-спина, которые рефокусируются после дальнейшего периода τ. Если эта процедура повторяется в течение наблюдения X с большой скоростью относительно величины J_{XH}, действие взаимодействия подавляется и поэтому спектр оказывается декаплированным.

Из обсуждений в предыдущем разделе должно быть очевидно, что применение последовательности из простых 180° импульсов маловероятно даст эффективное декаплирование в широкой полосе в присутствии либо неоднородности B_2, либо некалиброванности импульса (обратите внимание на применение символа B_2 по отношению к РЧ полю *декаплирования*). Далее, уменьшая период τ до бесконечно малого, последовательность становится одиночным непрерывным декаплерным импульсом (так называемое *декаплирование непрерывным облучением*) и, опираясь на те же самые аргументы, это также плохая декаплирующая последовательность, особенно внерезонансно. Одно решение достижения декаплирования в более широкой полосе состоит в том, чтобы использовать составные инвертирующие импульсы, которые показывают превосходную вне-резонансную эффективность, и современное *декаплирование составным импульсом* (Composite Pulse Decoupling CPD) развилось из оригинальных последовательностей $90_X180_Y90_X$ и $90_X240_Y90_X$.

Простая замена ими одиночных 180° импульсов не может быть полным ответом, однако. Обозначив составной кластер инверсии $90_X180_Y90_X$ как элемент R, мы можем видеть, что последовательность RR (два последовательных составных импульса) должна возвращать спиновые векторы обратно к +Z оси, чтобы снова начинать последовательность вращения. Однако, эти элементы сами не совершенны (см. рисунок 9.3), оставляя малые ошибки, которые накопятся, если просто повторять последовательность. Уловка состоит в том, чтобы повторять процесс, но наоборот, со всеми инвертированными РЧ фазами, чтобы противодействовать этим ошибкам, применяя элемент $\overline{\mathbf{R}}$ ($90_{-X}180_{-Y}90_{-X}$) и так называемый «магический цикл» RR$\overline{\mathbf{R}}\,\overline{\mathbf{R}}$. Эта первоначальная декаплирующая последовательность называется MLEV-4. Впоследствии оказалось, что малые остаточные ошибки от магического цикла можно компенсировать дальнейшим вложением их элементов, чтобы производить «суперциклы», такие как RR$\overline{\mathbf{R}}\,\overline{\mathbf{R}}\;\;\overline{\mathbf{R}}RR\overline{\mathbf{R}}\;\;\overline{\mathbf{R}}\,\overline{\mathbf{R}}$RR R$\overline{\mathbf{R}}\,\overline{\mathbf{R}}$R, давая в этом случае MLEV-16. Эти циклы оказались более эффективными при больших ширинах полосы без требования чрезмерных РЧ мощностей.

За эти годы по этим направлениям разработано множество таких последовательностей декаплирования составным импульсом (Таблица 9.2), из которых наиболее широко используется WALTZ-16, чей основной элемент инверсии – $90_X180_{-X}270_X$ (или более кратко $1\,\bar{2}\,3$, откуда и происходит название).

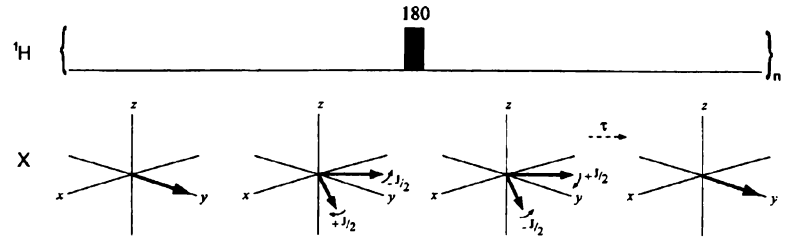


Рисунок 9.7. Гетероядерное широкополосное протонное декаплирование последовательностью 180° протонных импульсов.

Таблица 9.2. Избранные последовательности составного импульса для широкополосного декаплирования и блокировки спинов

Последовательность	Ширина полосы γB_2	Применение	Ссылка
Декаплирование			
Непрерывное облучение (CW)	<0,1	Только селективное декаплирование	
MLEV-16	1,5	^{1}H декаплирование	[12]
WALTZ-16	2,0	^{1}H декаплирование высокого разрешения	[13, 14]
DIPSI-2	1,2	^{1}H декаплирование очень высокого разрешения	[15]
GARP	4,8	Декаплирование X-ядер	[16]
SUSAN	6,2	Декаплирование X-ядер	[17]
Блокировка спина			
MLEV-17	0,6	Схема смешения TOCSY	[18]
DIPSI-2	1,2	Схема смешения TOCSY	[19]
FLOPSY-8	1,9	Схема смешения TOCSY	[20]

Технические особенности широкополосного декаплирования широко обсуждаются в [21].

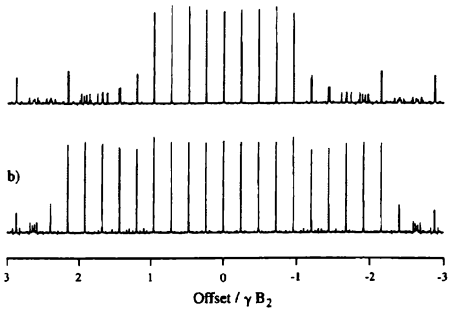


Рисунок 9.8. Экспериментальное сравнение профилей напряжённости РЧ поля декаплирования γB_2 в зависимости от отстройки частоты декаплирования (a) WALTZ-16 и (b) GARP Образец – C-13 меченная муравьиная кислота в D_2O.

Последовательность WALTZ=16 обеспечивают очень эффективное декаплирование по ширине полосы $2\gamma B_2$, оставляя только малые остаточные расщепления (<0,1 Гц) и поэтому предпочитается в приложениях высокого разрешения, таких как широкополосное протонное декаплирование гетероядерных спектров. Эта ширина полосы может, однако, ограничиваться при декаплировании ядер с большей дисперсией химического сдвига, например, ^{13}C или ^{31}P, как необходимо в протон-детектируемых гетероядерных последовательностях корреляции сдвига, таких как HMQC или HSQC. Для таких случаев при помощи вычислительной оптимизации разработаны другие CPD по-

следовательности, которые имеют менее строгие требования для остаточных ширин линий (<1,5 Гц). Наиболее популярный из них GARP (Таблица 9.2), который является эффективным в полосе $4{,}8\gamma B_2$ (рис. 9.8). С продолжающимся увеличением постоянных полей, становятся необходимыми даже больше ширины полосы декаплирования, для которых наиболее эффективным подходом на настоящее время оказывается применение адиабатических методов декаплирования, кратко представленных ниже.

9.2.1. Блокировка спинов

Способность «блокировать намагничивание спинов» по предопределенной оси играет существенную роль в эксперименте TOCSY, и в разделе 5.7.1 уже упоминалась мысль, что одиночный непрерывный импульс или ряд близко расположенных 180° импульсов могут, в принципе, использоваться в этом контексте, чтобы неоднократно рефокусировать эволюцию химического сдвига, в то же время, позволяя развиться *гомоядерным* взаимодействиям. Следуя из приведённых выше рассуждений ясно, что лучший подход должен использовать ряд 180° составных импульсов, которые предлагают компенсацию отстройки резонанса и неоднородности РЧ, и многие из последовательностей, первоначально разработанные как гетероядерные декаплирующие последовательности (которые требуют повторяющихся спиновых инверсий), с тех пор применялись как последовательности блокировки спинов (которые требуют повторного рефокусирования спина). Первоначальные и наиболее широко используемые основываются на последовательности MLEV-16, в которой каждый цикл сопровождается 60° импульсом для компенсации ошибок, которые иначе накопились бы в течение расширенного смешивания, производя популярную блокировку спина MLEV-17 (Таблица 9.2). С тех пор разработаны более изощрённые последовательности, которые позволяют учитывать влияние гомоядерных взаимодействий, фактора, не рассматриваемого в течение проектирования ранних гетероядерных декаплирующих последовательностей. В частности последовательность DIPSI-2 обеспечивает лучшее качество, чем MLEV или WALTZ в этих обстоятельствах, и поэтому также широко используется в эксперименте TOCSY.

9.2.2. Адиабатические импульсы

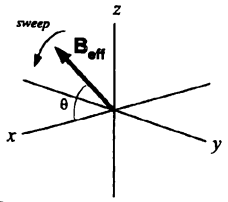


Рисунок 9.9. Адиабатический инвертирующий импульс. Развёртка РЧ частоты в течение импульса позволяет эффективному РЧ полю, испытываемому спинами, описывать дугу от +z оси до -z оси, неся с собой вектор объёмной намагниченности.

Альтернативным подходом к спиновой инверсии, который становится популярным способом очень эффективного широкополосного декаплирования, предлагается адиабатическими импульсами. В отличие от импульсов, применяемых на одиночной частоте, они используют развёртку частоты *в течение* импульса, которая начинается далеко от резонанса при положительной отстройке, проходит через резонансное условие, и, наконец, заканчивается далеко от резонанса с отрицательной отстройкой. В течение этого эффективное РЧ поле B_{eff}, испытываемое спинами начинается вдоль +z-оси, описывает дугу, которая проходит через *x-y* плоскость при условии резонанса и заканчивается вдоль -Z-оси (Рис. 9.9). Если развёртка достаточно «медленная», векторы намагничивания, первоначально находящиеся в равновесии будут непрерывно вращаться вокруг B_{eff} в течение импульса, и будут «тянуться» эффективным полем, таким образом, также заканчиваясь на Южном Полюсе и испытывая желательную инверсию. Более формально, развёртка должна быть достаточно медленной, чтобы удовлетворять адиабатическому условию:

$$\left|\frac{d\theta}{dt}\right| \ll \gamma B_{eff} \qquad (9.1)$$

(где θ представляет угол между B_{eff} и X-осью, как выше) но должна быть быстрой относительно спиновой релаксации (поэтому она упоминается, как *адиабатически быстрое прохождение).* Пока выполняется адиабатическое условие, достигается точная инверсия независимо от магнитуды приложенного РЧ поля и поэтому эти импульсы очень терпимы к неоднородностям поля B_1. Кроме того, они действуют в очень широких полосах и поэтому хорошо подходят для широкополосного декаплирования.

Чтобы гарантировать действительное начало и конец B_{eff} по ±z-оси, когда используются конечные отстройки, амплитуда импульса может мягко усекаться на каждом конце, что в одном из примеров производит профиль амплитуды, имеющий форму колбасы, что и объясняет название WURST [22]. Помещение адиабатических инвертирующих импульсов в подходящие суперциклы вызывали схемы декаплирования, которые эффективны в значительно больших полосах (>20 γB_2), чем достижимые с обычными последовательностями составных импульсов [23-26]. Они поэтому подходят для декаплирования гетероядер на самых высокополевых приборах, доступных в настоящее время, и можно ожидать, что они станут более широко используемыми.

9.3. СЕЛЕКТИВНОЕ ВОЗБУЖДЕНИЕ И ФОРМОВАННЫЕ ИМПУЛЬСЫ

До сих пор рассуждения в этой главе касались исключительно применения так называемых ***жёстких импульсов***, то есть, импульсов, которые равно эффективны по всему диапазону химических сдвигов. Мы также видели инструменты, в виде составных импульсов, которые помогают вплотную приблизиться к этому идеалу. В некоторых случаях, однако, отличительным преимуществом может быть то, что только выбранная область спектра подвергается так называемому ***мягкому*** **импульсу**, и множество примеров, использующих такое ***селективное возбуждение***, представлено в главах 5, 6 и 7. Основные применения в химическом контексте включают:

- Уменьшенный размер **nD** последовательностей, например, 1D аналоги 2D экспериментов [27].
- Селективное удаление нежелательных резонансов, например, подавление сигнала растворителя [28].
- Извлечение специфических частей информации, например, измерение специфических дальних ^1H-^{13}C констант взаимодействия [29,30].
- 1D последовательности, которые по существу требуют выбора одиночного резонанса, например, эксперименты переноса инверсии (или насыщения) в исследованиях химической динамики [31].

Замена жёстких импульсов их селективными аналогами в многомерной последовательности ведет к спектру малого размера, имеющему множество преимуществ перед его вездесущим кузеном. [32] 1D аналоги более обычных 2D экспериментов позволяют использовать большее цифровое разрешение и таким образом более детально понимать тонкую структуру; они приравниваются к срезам высокого разрешения через родственный 2D эксперимент при химическом сдвиге выбранного спина, например 1D TOCSY эксперимент раздела 5.7.3. Они могут также оказаться выгоднее

в отношении скорости получения и обработки, и требуют меньшего количества памяти компьютера для хранения. Короче говоря, такие методы могут обеспечивать более быстрые и подробные ответы, когда обсуждается специфический структурный вопрос. Обсуждения применения селективных импульсов в ЯМР высокого разрешения охарактеризованы во множестве обширных обзоров [32-35].

Основной подход к созданию *селективного* импульса - уменьшать РЧ мощность и увеличивать продолжительность импульса. Аналогично, уменьшением B_1 уменьшается полоса частот, в которой эффективен импульс. Одновременно, скорость вращения векторов, управляемых РЧ, также уменьшается, что означает, что требуются более длинные импульсы для достижения желательного угла поворота. Простейший селективный импульс поэтому - слабый прямоугольный импульс, по аналогии с обычным прямоугольным жёстким импульсом. К сожалению, он имеет довольно нежелательный профиль возбуждения в форме боковых лепестков, которые простираются далеко от окна основного возбуждения (рис. 9.10a), вызывая довольно плохую селективность. Происхождение нежелательных боковых лепестков лежит в острых краях импульса, которые вводят в профиль колебание, подобное синусному; обратите внимание на подобие «синусного звона» в спектрах, вызванного преждевременным усечением ССИ (раздел 3.2.3). Они могут подавляться путём сглаживания краёв импульса (рис. 9.10b), точно также как уменьшает звон аподизация усечённого ССИ. Такое *формирование импульса* вызвало множество селективных импульсов с различными характеристиками, которые находят применение в современном ЯМР Некоторые из этих импульсов рассматриваются ниже, которые выбраны за их общую применимость и/или другие желательные свойства для спектроскопии высокого разрешения.

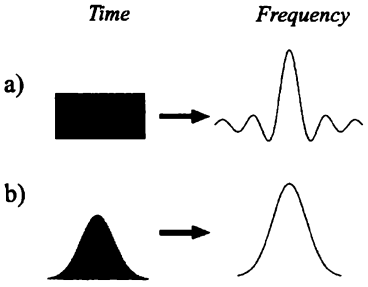


Рисунок 9.10. Схематические профили возбуждения для (a) прямоугольного импульса низкой мощности и (b) гладко усечённого *формованного импульса*.

9.3.1. Формованные мягкие импульсы

С применением селективных импульсов связано множество экспериментальных факторов, которые имеют большое значение при выборе (и проектировании) мягкого импульса. Короче говоря, главные свойства:

- Продолжительность
- Частотная характеристика, и
- Фазовое поведение

Мягкие импульсы обычно имеют длину 1-100 мс, на три порядка величины длиннее, чем жёсткие импульсы, что может иметь значение в отношении эволюции химического сдвига и взаимодействия и релаксационных потерь в течение импульса. Следовательно, желательно иметь мягкий

импульс, который настолько короткий, насколько это возможно, но еще способный обеспечивать желательный выбор. Этот выбор определяется шириной полосы частот, в которой импульс эффективен. Идеально, профиль ширины полосы должен быть прямоугольным, чтобы всё, что находится вне желательного окна, было нечувствительно к импульсу. Такой профиль иногда упоминается [36] как «шляпа» по очевидным причинам. Фаза возбужденных резонансов также должна быть однородна по всему окну возбуждения, хотя в действительности это может быть трудно достижимым, так как вне-резонансные эффекты жёсткие при использовании слабых B_1 полей. Если их не корректировать, это вызывает значительное фазовое искажение далеко от точного резонанса, что может быть вредным для многоимпульсных последовательностей, где часто требуется прецизионное управление намагничиванием. Эти первичные соображения обсуждаются ниже для некоторых обычно встречающиеся формованных импульсов, в то время как их практическая реализация описывается в разделе 9.3.4.

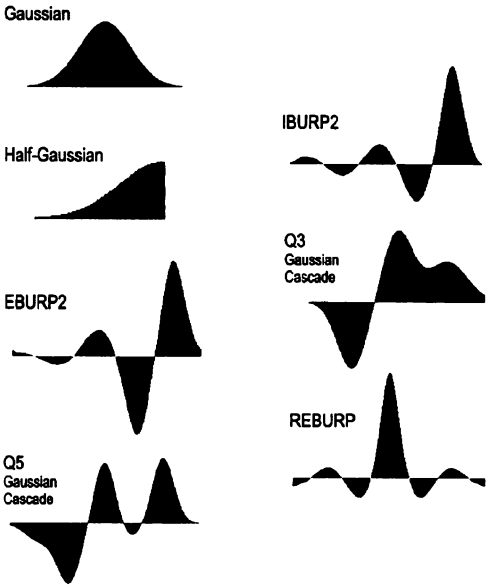


Рисунок 9.11. Временные характеристики (профили) некоторых обычных формованных импульсов селективного возбуждения.

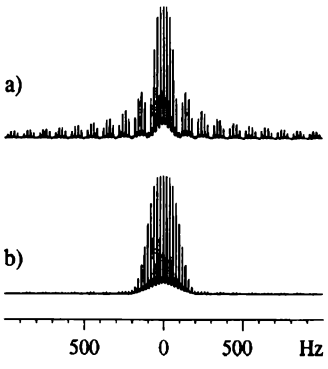


Рисунок 9.12. Абсолютные значения частотных профилей (частотных характеристик) возбуждения для (a) прямоугольного импульса и (b) для гауссова формованного импульса.

Гауссовы импульсы

Первоначальный и экспериментально простейший формованный импульс имеет гладкую гауссову огибающую [37] (рис. 9.11). (Абсолютное значение) профиля возбуждения частоты также является гауссовым, быстро затухая с отстройкой и, хотя он не имеет идеального профиля шляпы, он явно превосходит прямоугольный импульс (рис. 9.12). В непосредственной близости от окна основного возбуждения векторы намагничивания также чувствуют действие импульса, но имеют тенденцию возвращаться назад к исходному положению и поэтому *не испытывают полезного эффекта,* как можно видеть в траекториях рис. 9.13a. Этот рисунок также иллюстрирует проблему фазовой дисперсии по ширине полосы для различных отстроек. Для импульса фазы *x* импульсом создаются и желательный M_Y, и нежелательный M_X компоненты (имеющие характеристики поглощения и дисперсии, соответственно), производя существенный фазовый градиент, который может корректироваться в простейшем из экспериментов, но обычно бывает проблематичным. Кроме того, также генерируются инвертированные отклики (заканчивающиеся в -y полусфере) и таким образом профиль сохраняет некоторое нежелательное колебательное поведение (это скрыто на рисунке 9.12, потому что использовался дисплей абсолютного значения, но его можно увидеть на рисунке 9.14 ниже).

Лучшие альтернативы для возбуждения продольной намагниченности - полугауссиан [38], который, как предполагает название, является просто гауссовым профилем, заканчивающимся в средней точке, и 270° гауссиан [39]. Импульс полугауссиана не производит отрицательных боковых лепестков, потому что векторы никогда не достигают -y полусферы, хотя он еще производит значительный дисперсный компонент M_X, что очевидно из траекторий рис. 9.13b. Дисперсные отклики могут удаляться фазопеременным жёстким «чистящим» импульсом, приложенным ортогонально и немедленно после полугауссиана. Это отменяет любые M_X компоненты, сохраняя только желательные M_Y компоненты, и, таким образом, удаляя фазовый градиент.

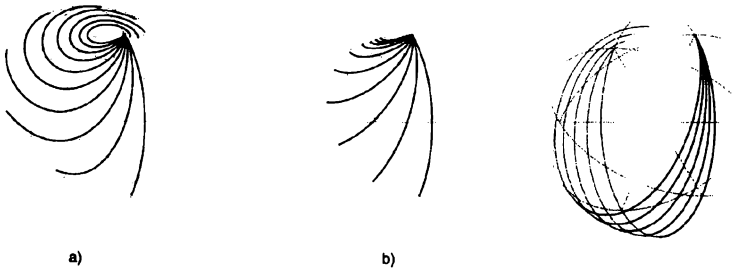


Рисунок 9.13. Симулированные траектории возбуждения как функция отстройки резонанса для (a) гауссиана, (b) полугауссиан и (c) гауссиана-270.

Улучшенные фазовые свойства этой схемы объясняют название «чистящий полугауссиан» [40] (рис. 9.14). 270° гауссов импульс приравнивается к чистому повороту на -90 ° и идентичен 90° импульсу, за исключением троекратной разности в амплитуде. Интересная особенность этого импульса в том, что для спинов близко к резонансу, он имеет саморефокусирующий эффект и на химические сдвиги, и на константы взаимодействия (рис. 9.13c), и, таким образом, имеет лучшие фазовые свойства, чем 90° гауссов импульс (рис. 9.14). Поскольку он не требует чистки, он прост для применения и должен выбираться в качестве возбуждающего импульса, когда не критична высокая селективность.

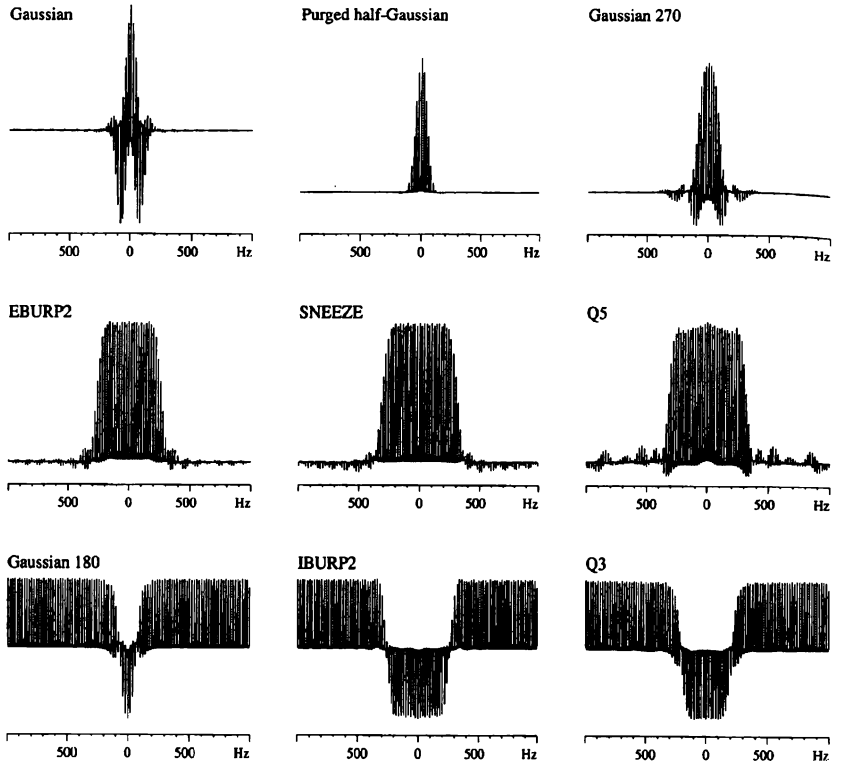


Рисунок 9.14. Симулированные профили возбуждения некоторых формованных импульсов (продолжительности по 10 мс), см. таблицу 9.3. Профили инверсии (нижняя дорожка) симулировались последовательностью 180(мягкий)-90 (жесткий).

Чисто-фазовые импульсы

За эти годы разработаны более развитые формы импульсов, которые служат цели производить почти «шляпный» профиль, но еще сохраняют однородную фазу для всех возбужденных резонансов в пределах предопределенного частотного окна. Они действуют без необходимости применения очищающих импульсов или дальнейших модификаций, позволяя их использование непосредственно вместо жестких импульсов. Они обычно генерируются компьютеризованными процедурами, которые вызывают более экзотические огибающие импульса (и сокращения! Рис. 9.11), и, которые управляют векторами намагниченности по значительно более извилистым траекториям, чем более простые гауссово-формованные кузены. Траектории показаны на рисунке 9.15 для двух членов семейства импульсов BURP (**B**and-selective, **U**niform **R**esponce, **P**ure phase pulses – селективно полосовые, однородной характеристики чистофазные импульсы) [41,42], а именно импульс возбуждения EBURP2 и импульс инверсии IBURP2 (см. раздел 9.3.4 и таблицу 9.3 ниже).

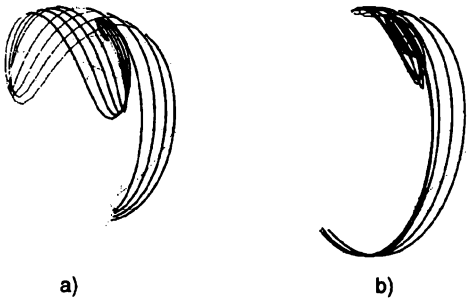


Рисунок 9.15. Симулированные траектории векторов ядерных спинов как функция отстройки резонанса во время: (a) 90° импульса возбуждения и (b) 180° импульса инверсии IBURP2.

Несмотря на совершённые кругосветные путешествия, траектории для всех отстроек в эффективном окне заканчиваются близко к идеальной конечной точке с очень малыми ошибками в интенсивности и фазе. Соответствующие профили для этих импульсов показаны на рисунке 9.14 и показывают однородное чистофазное поведение (хотя экспериментально они критически зависят от точной калибровки импульсов). Экспериментальная демонстрация селективного возбуждения импульсом EBURP2 показана на рис. 9.16 для двух различных ширин полосы возбуждения. Интересно, что другой подход к проектированию импульсов привёл к семейству импульсов, подобному так называемым гауссовым каскадам [43,44] (таблица 9.3, рис. 9.11). Как обещает название, они состоят из кластеров гауссовых импульсов, чьё чистое действие ближе к идеальному, чем одиночный элемент, вспомните составные жёсткие импульсы раздела 9.1.

Одно из свойств этих более развитых огибающих в том, что они часто проектируются с конкретной функцией в уме и не могут хорошо исполнять других функций. Например, импульсы EBURP - 90° *возбуждающие импульсы*, разработаны для воздействия на продольную намагниченность, и не будут работать, как хотелось бы, с поперечной намагниченностью. Аналогично, селективные 180° инвертирующие импульсы не могут работать как рефокусирующие элементы в генерации спиновых эхо. Те импульсы, которые разработаны для действия на *любое* начальное состояние намагниченности, называются *универсальными импульсами*. *Более сложные* профили имеют также тенденцию становиться длиннее, чем их более простые аналоги для данной возбуждающей ширины полосы и угла поворота, что означает, что эффекты релаксации могут быть проблематичными, особенно для случая больших молекул или для очень длинных, высоко селективных импульсов.

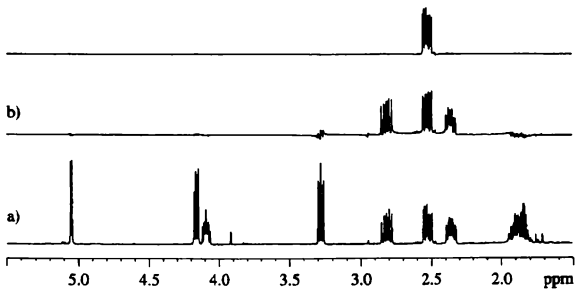


Рисунок 9.16. Селективное возбуждение полосово-селективным импульсом EBURP2, используя продолжительность импульса (b) 14 мс и (c) 100 мс.

Таблица 9.3. Свойства некоторых селективных мягких формованных импульсов.

Формованный импульс	Применение	Фактор ширины полосы	Фактор ослабления, дБ	Ссылка
Прямоугольный	Универсальный	1,1		
90° импульсы				
Гауссов	Универсальный	2,1	7,7	[37]
Очищенный полугауссов	Только возбуждение	0,8	7,7	[38,40]
Гауссов-270	Только возбуждение	1,3	16,7	[39]
EBURP2	Только возбуждение. Чистая фаза.	4,9	24,3	[42]
SNEEZE *	Только возбуждение. Чистая фаза.	5,8	26,6	[57]
UBURP	Универсальный. Чистая фаза.	4,7	32,2	[42]
Гауссов каскад G4	Только возбуждение. Чистая фаза.	7,8	25,4	[43]
Гауссов каскад Q3	Универсальный. Чистая фаза.	6,2	25,3	[44]
180° импульсы				
Гауссов-180	Универсальный	0,7	13,7	[37]
IBURP2	Только инверсия. Чистая фаза.	4,5	25,9	[42]
REBURP	Универсальный. Чистая фаза.	4,6	28,0	[42]
Гауссов каскад G3	Только инверсия. Чистая фаза.	3,6	23,1	[43]
Гауссов каскад Q3	Универсальный. Чистая фаза.	3,4	22,4	[44]

Универсальные импульсы действуют одинаково на любое начальное состояние намагниченности, в то время как возбуждающие и инвертирующие импульсы проектируются, чтобы действовать только на продольную намагниченность. Фактор ширины полосы есть произведение продолжительности импульса Δt на ширину полосы возбуждения Δf, которая определяется здесь как окно возбуждения, в котором эффективность импульса составляет, по крайней мере, 70 % (чистая амплитуда импульса в пределах 3 дБ от максимума, другие публикации могут определять это значение для более высоких уровней, и поэтому цитируют меньшие факторы ширины полосы). Используйте этот фактор для оценки подходящей продолжительности импульса для желательной ширины полосы. Фактор ослабления используется для приблизительной калибровки мощности и представляет величину, на которую должен увеличиваться выход передатчика по сравнению с мягким прямоугольным импульсом равной продолжительности. Профили, основывающиеся на гауссиане, усекаются на уровне 1 %.

* Импульс SNEEZE производит более однородное возбуждение M_Z, чем EBURP2.

Влияние релаксации на их эффективность обсуждается в [45,46], и предложены более терпимые профили, такие как SLURP [47].

Осуществление формованных импульсов

На современных приборах высокого разрешения контроль амплитуд импульса «в полёте» стандартное (если нет, дополнительное) свойство. Он выполняется так называемым генератором формы волны, который управляет огибающей РЧ перед усилением мощности [48]. Обычно огибающая определяется рядом дискретных шагов как гистограмма, в которой каждый элемент имеет определённую амплитуду и фазу. Чтобы обеспечивать близкое совпадение с гладкой теоретической огибающей импульса, должно определяться достаточное число элементов, которое обычно

составляет 256 (но зависит от доступных блоков памяти формы волны). Многие огибающие импульса предопределены на современных приборах, позволяя простую их реализацию.

9.3.2. Последовательности DANTE

На заре селективного возбуждения, когда спектрометры не оборудовались для генерации амплитудно-модулированных РЧ импульсов, и был изобретен метод DANTE (**D**elayed **A**lternating with **N**utation for **T**aiored **E**xcitation - Чередование Задержек с Нутацией для Формованного возбуждения) [49], требующий только короткие жёсткие импульсы. Хотя DANTE в значительной степени заменен амплитудно модулированными мягкими импульсами, он может еще использоваться на старой аппаратуре, или на тех более новых приборах, которые испытывают недостаток генераторов формы волны.

Основа последовательности DANTE состоит из ряда N коротких жёстких импульсов угла отклонения α, где $\alpha << 90°$, перемежающихся фиксированными задержками τ, для свободной прецессии:

$$\text{DANTE: } [\alpha\text{-}\tau\text{-}]_N, \text{ или более правильно } [\tau/2\text{-}\alpha\text{-}\tau/2]_N$$

Полная длина селективного импульса есть произведение $N\tau t_p$, где t_p - продолжительность каждого жёсткого импульса, а чистый резонансный угол поворота - сумма индивидуальных импульсов.

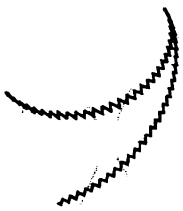


Рисунок 9.17. Симулированные зигзагообразные траектории возбуждения векторов ядерного спина в различных положениях резонанса для последовательности DANTE. 30 импульсов по 3° каждый разделены задержками по 0,33 мс, производя эффективный селективный импульс в 10 мс.

Эффект такой последовательности показывается на рисунке 9.17. После каждого жёсткого импульса, спинам позволяют прецессировать в течение короткой задержки τ, согласно их отстройке от резонанса перед новым воздействием импульса. Резонансные траектории не показывают никакой прецессии и, таким образом, направляются прямо к +y оси, в то время как близкие к резонансу следуют зигзагообразным путём. Если N достаточно большое (обычно *>20)*, результат сильно напоминает гладкий путь, полученный под влиянием мягкого прямоугольного импульса эквивалентной полной продолжительности, и даёт подобную селективность.

«Формование» импульса в подходе DANTE достигается, *удерживая амплитуду импульса постоянной*, но изменяя *продолжительность* каждого жёсткого импульса по всей последовательности для соответствия желательной огибающей. Таким образом, например, гауссова огибающая может эмулироваться, изменяя продолжительности импульса согласно Гауссову профилю. Ограничения этого подхода возникают, когда требуются очень малые продолжительности импульса (< 1 мкс), так как передатчики импульсов тогда неспособны обеспечивать необходимую точность. В таких случаях может оказаться необходимым добавлять фиксированное ослабление к выходу передатчика, чтобы позволять применение более длинных, но более точных жёстких импульсов.

Главное отличие между мягкими формованными импульсами и DANTE методами - возникновение сильных боковых окон возбуждения по обе стороны основного окна при DANTE. Они происходят при отстройках от передатчика при частотах, кратных частоте повторения жёсткого импульса 1/т. Они возникают от векторов намагничивания, которые далеки от резонанса, и, которые прецессируют полный круг в течение периода т. Так как это поведение точно эквивалентно отсутствию прецессии, они возбуждаются как при резонансе. Дальнейшие боковые сигналы при ±2/т, 3/т и так далее, также случаются на основе траекторий, заканчивающих кратные количества полных кругов в течение т. Такое многопозиционное возбуждение может иногда быть желательным [50,51], но, если требуется только одиночное окно возбуждения, частота повторения жёсткого импульса должна регулироваться, изменяя т так, чтобы гарантировать, чтобы возбуждения боковых полос не совпадали с другими резонансами.

9.3.3. Создание возбуждения

Недавние методы селективного возбуждения комбинируют формованные импульсы с импульсными градиентами поля, чтобы производить экспериментально здравые возбуждающие последовательности с множеством желательных свойств [34]. Эти последовательности основываются на спиновом эхо либо с одно-, либо с двух-импульсным полевым градиентом (рис. 9.18), которые можно понять, опираясь на одиночную эхо последовательность (рис. 9.18a). Она может быть представлена как G1-S-G1, где S представляет *любой* селективный 180° импульс (или импульсную последовательность), а окружающие градиенты идентичны. Для тех спинов, которые испытывают селективный импульс инверсии, два градиента действуют противоположно, и, таким образом, рефокусируют это выбранное намагничивание, поэтому такая последовательность называется градиентным эхо. Спины, которые не испытывают действия этого импульса, то есть те, которые находятся вне его эффективной ширины полосы, чувствуют только кумулятивный эффект обоих градиентов, поэтому остаются, полностью дефазированными в поперечной плоскости и, таким образом, ненаблюдаемы. Это одиночное градиентное эхо поэтому достигает чистого выбора резонанса согласно профилю импульса S.

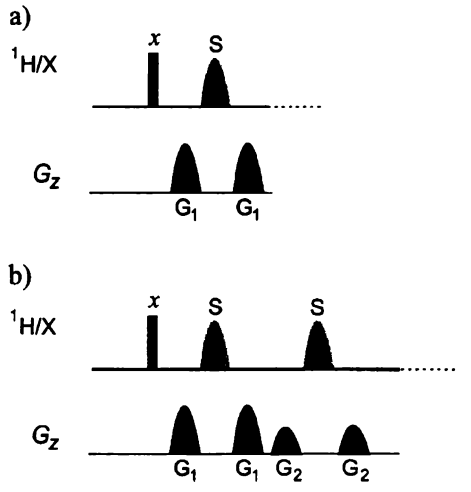


Рисунок 9.18. Последовательности селективного возбуждения, основанные (a) на одиночном и (b) на двухимпульсном спиновом эхо полевого градиента. Элемент S представляет любой селективный 180° инвертирующий импульс или импульсную последовательность.

Фазовый профиль выбранного резонанса также диктуется фазовыми свойствами селективного импульса S, которые могут не быть идеальными. Новые повторения градиентных эхо (рис. 9.18b, с другой напряжённостью градиента G_2, чтобы избежать случайного рефокусирования ранее дефазированного нежелательного намагничивания), точно подавляют любые остальные фазовые ошибки, и результирующий *чисто-фазовый* профиль возбуждения зависит только от *инвертирующих* свойств селективного импульса. Экспериментально это даёт огромную выгоду, потому что это делает простой реализацию селективной последовательности, и, потому что градиенты поля гарантируют превосходное подавление нежелательных резонансов. Также значительно проще выбирать (и проектировать) импульс с желательным «шляпным» профилем инверсии, когда его фазовое поведение не вызывает беспокойства. Результирующий профиль последовательности возбуждения двойного ИПГ спинового эхо (DPFGSE) диктуется кумулятивным эффектом повторяющихся инвертирующих импульсов, вызывая «обтёсывание» намагничивания рядом градиентных эхо, отсюда происходит термин *формирование возбуждения* (excitation sculpting) [28,52]. Пример полного чисто-фазового селективного возбуждения, которое может достигаться с этой последовательностью, показывается на рисунке 9.19.

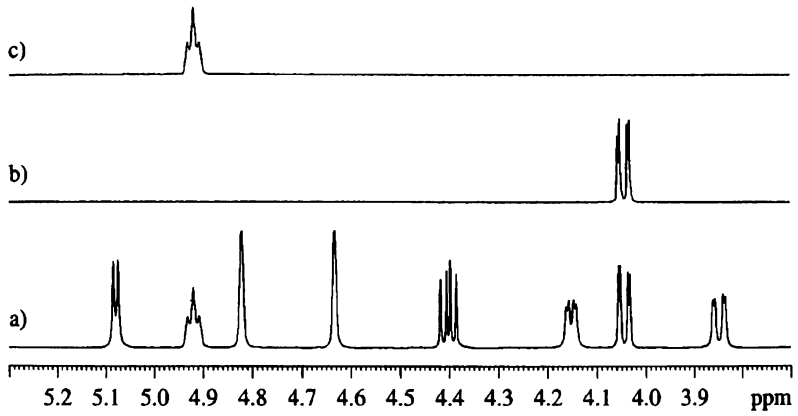


Рисунок 9.19. Чистое селективное возбуждение с последовательностью спин-эхо двухимпульсного полевого градиента, использующей 40 мс Гауссов 180 ° импульс и градиенты 007:007:003:003 $Т \cdot м^{-1}$

Это может представлять отправную точку для множества селективных 1D экспериментов, включая TOCSY [53,54] и NOESY [52,55] (см. например 1D градиентный эксперимент NOESY раздела 8.7.2). Применение второй DPFGSE последовательности после одного шага переноса ведет к более развитым экспериментам «двойной селекции» [56], в то время как небольшое её изменение производит чрезвычайно эффективную схему подавления сигнала растворителя, описанную ниже в разделе 9.4.3. Напротив, более короткое возбуждение одиночного эхо может более подходить для изучения очень больших молекул, где релаксационные потери T_2 могут быть существенными.

Для применения в лаборатории удобно в качестве элемента S выбирать простой, здравый инвертирующий импульс, и гауссов импульс хорошо подходит для обычного применения. Пример профилей возбуждения для этого иллюстрируются на рисунке 9.20 и предлагают руководство по выбору продолжительности импульса для желательного окна возбуждения. Для многих приложений протонной спектроскопии оказывается подходящим гауссов импульс около 40 мс.

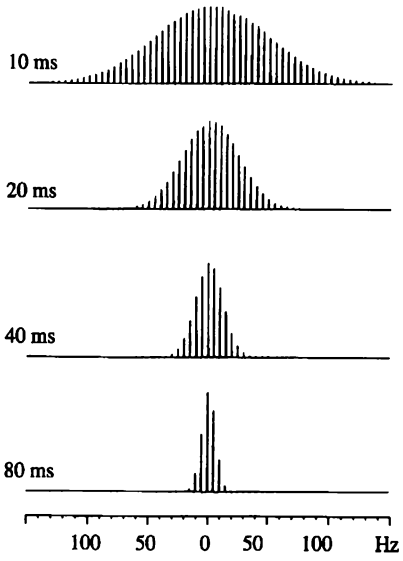


Рисунок 9.20. Экспериментальные профили возбуждения для возбуждающих последовательностей спинового эхо двухимпульсного полевого градиента, в котором элемент S - 180° Гауссов импульс (усечённый при 1 %) указанной продолжительности.

9.3.4. Практические соображения

Этот раздел обсуждает некоторые из практических последствий использования мягких импульсов, которые обычно требуют значительно больше осторожности и внимания в их реализации, чем жёсткие импульсы, и, таким образом, обычно требуют вмешательства оператора для их успеха. Общее правило выбора мягкого импульса - выбирать простейший импульс, который обеспечит требуемые характеристики эффективности. Более сложные формы импульсов, хотя и обеспечивают улучшенные профили, имеют тенденцию требовать максимальной осторожности в калибровке и поэтому гораздо более неудобные в использовании. Например, импульсы BURP чрезвычайно чувствительны к некалиброванности ширины импульса, которая ведет к существенному искажению в противном случае «равномерного» профиля [42]. С чисто практической точки зрения простые гауссовы импульсы наиболее разумные и простые в использовании и представляют подходящий начальный выбор для многих приложений [32]. Если требуется очень высокая селективность, чисто-фазные импульсы (BURP, или гауссовы каскадные семейства) оказываются более подходящими, и выбор специфического, или универсального импульса (Таблица 9.3) становится существенным, в соответствии с применением.

Профиль возбуждения мягких импульсов определяется продолжительностью импульса, эти два фактора разделяют обратную пропорциональность. Более точно, формы импульсов связывают с ними безразмерный *фактор ширины полосы,* который есть произведение продолжительности импульса Δt и его эффективной ширины полосы возбуждения Δf, для правильно калиброванного импульса. Он фиксирован для любой данной огибающей импульса, и представляет его эффективность во времени. Он используется для оценки требуемой продолжительности импульса для желательной эффективной ширины полосы. Таблица 9.3 суммирует эти факторы для некоторых обычных огибающих импульса. Таким образом, ширина полосы возбуждения 100 Гц требует 90° гауссова импульса в 21 мс, но EBURP2 импульса в 49 мс; ясно, гауссов импульс более эффективен по времени.

Определив необходимую продолжительность импульса, следует калибровать мощность передатчика так, чтобы импульс вызывал правильный угол отклонения. Эта процедура отличается от аналогичной для жёстких импульсов, где используют фиксированную амплитуду импульса, но изменяют её продолжительность. Для практического удобства калибровка амплитуды обычно основывается на ранее записанных калибровках для мягкого прямоугольного импульса (как описано ниже), из которых вычисляется оценка требуемого изменения мощности. Таблица 9.3 также суммирует необходимые изменения в ослаблении передатчика для различных огибающих эквивалентной продолжительности с более усовершенствованными формами импульсов, неизменно требующими увеличенных пиковых амплитуд РЧ (уменьшения ослабление выхода передатчика).

Для иллюстрации предположим, что мы желаем возбудить окно 100 Гц импульсом SNEEZE, и ранее решили, что мягкий 90° прямоугольный импульс 10 мс требует ослабления 68 дБ. Из фактора ширины полосы, можно определить, что продолжительность импульса должна быть 58 мс. Из уравнений отношения мощностей, данных в разделе 3.5.1, можно вычислить, что мягкий *прямоугольный* импульс этой продолжительности требует на 15,3 дБ *большего ослабления*, чем импульс 10 мс (20·log5.8), просто потому, что он более длинный. Таблица 9.3 показывает, что огибающая SNEEZE требует на 26,6 дБ *меньшего ослабления*, чем прямоугольный импульс равной продолжительности. Импульс SNEEZE, следовательно, требует на 11,3 дБ (26,6-15,3) *меньшего ослабления*, чем таковой для опорного 10 мс мягкого прямоугольного импульса, и установка амплитуды передатчика становится 56,7 дБ. Для оптимальных результатов затем может потребоваться тонкая настройка.

Калибровка амплитуды

Калибровка амплитуды мягкого импульса по существу следует процедурам, представленным для жёстких импульсов в разделе 3.5.1, и описания ниже предполагают близкое знакомство с ними. Для мягких импульсов в канале наблюдения, частота передатчика должна помещаться на резонанс для целевого спина и 90° или 180° условие отыскивается непосредственно изменением мощности передатчика, начиная с очень низких значений (высокие ослабления) и прогрессивно увеличивая (помните о логарифмической, а не линейной зависимости от дБ). Если калибровки выполнялись косвенно, например, в канале декаплирования старых приборов, используется слабое изменение метода рис. 3.52 (глава 3) для 2-спиновой пары АХ (рис. 9.21а). При этом к каналу наблюдения применяется дополнительный импульс блокировки спинов, чтобы декаплировать АХ взаимодействие в течение мягкого импульса [58]. Коллапс АХ дублета означает, что мягкий импульс может применяться к центру дублета А-спина. Изменение мощности передатчика производит результаты, подобные таковым на рис. 3.53 (глава 3) когда 90° или 180° условие удовлетворяется. С современной аппаратурой, однако, калибровки, определенные непосредственно в канале наблюдения равносильны, если он позже используется как косвенный (декаплерный) канал в последующих экспериментах, таким образом, обходя необходимость таких косвенных калибровок.

Калибровка фазы

Точное управление *относительной фазой* между импульсами является критическим для успеха многих многоимпульсных ЯМР экспериментов, поэтому может потребоваться некоторая коррекция фазы мягкого импульса, чтобы поддерживать эти отношения, когда к одному тому же ядру должны применяться и жёсткие, и мягкие импульсы. Когда в канале наблюдения используются мягкие импульсы, разность фаз (которая может возникнуть по причине потенциально различных путей РЧ, использованных для импульсов высокой и низкой мощности) может определяться прямым исследованием, из двух отдельных 1D импульсно полученных спектров, зарегистрированных с импульсами высокой и малой мощности, но при прочих идентичных условиях.

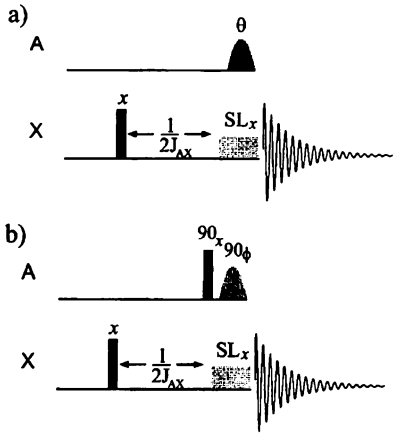


Рисунок 9.21. Последовательности калибровки мягкого импульса для (a) амплитуды и (b) разности фаз для жёстких/мягких селективных импульсов, применённых в косвенном (декаплерном) канале. SL - блокировка спина, примененная для декаплирования A и X в течение мягкого импульса.

Используя фазовую коррекцию только нулевого порядка (частотно независимую) для каждого спектра, разность в получающихся фазовых константах (мягкий *минус* жёсткий) представляет разность фаз между маршрутами высокой и низкой мощности РЧ. Добавление её как постоянного сдвига к фазе мягкого импульса должно давать спектры идентичной фазы с таковой спектра жёсткого импульса при идентичной обработке, и эта коррекция может использоваться во всех последующих экспериментах, *при условии, что мощность мягкого импульса, остается неизменной.*

Если разности фаз определялись косвенно, подходит последовательность рис. 9.21b, в которой в косвенном канале прежде мягкого используется дополнительный жёсткий импульс. Когда два 90° импульса имеют одну и ту же фазу, их действие аддитивно, и последовательность ведет себя, как будто к выбранному спину применён чистый 180° импульс, вызывая инверсию антифазного AX дублета. Точно так же два 180° импульса подобной фазы ведут себя как чистый 360° импульс и не оказывает действия на дублет.

9.4. ПОДАВЛЕНИЕ СИГНАЛА РАСТВОРИТЕЛЯ

К счастью большинство растворителей, используемых в органической спектроскопии ЯМР легко доступно в дейтерированной форме. Для протонной спектроскопии, в частности, это позволяет химику сфокусироваться на спектре растворяемого вещества, не возмущенном растворителем, который присутствует в огромном избытке. К сожалению, большинство молекул биохимического или медицинского интереса, особенно биологические макромолекулы, должны изучаться в воде и для того, чтобы наблюдать все интересующие протоны в этих молекулах, включая, часто жизненно важные лабильные протоны, в качестве растворителя должна использоваться протонированная вода (содержащая 10 % D_2O, чтобы поддерживать стабилизацию отношения поле-частота). В то время как H_2O - 110 М в протонах, концентрации растворяемых веществ – чаще лежат в миллимолярном интервале и разность концентраций 10^4-10^5 налагает жёсткие экспериментальные трудности, которые требуют ослабления резонанса растворителя. Кроме того, недавно разработанная область ЖХ-ЯМР часто способствует применению протонированных растворителей по причинам экономии, также сделав важным и эффективное подавление сигнала растворителя. На более практическом уровне при использовании D_2O или MeOD для обычной спектроскопии может наблюдаться значительный остаточный HDO резонанс, который может ограничивать применимое усиление приёмника и оказаться эстетически непривлекательным.

Основная причина для подавления большого резонанса растворителя в присутствии гораздо меньших резонансов растворяемого вещества в том, что динамический диапазон сигналов ЯМР

лежит внутри динамического диапазона приемника и АЦП (Раздел 3.2.6). Дальнейшее беспокойство включают искажения базовой линии, t_1 шум в 2D экспериментах, затухания излучения и потенциальные ложные отклики, которые связаны с очень интенсивными сигналами. Затухание излучения ведет к жёсткому и нежелательному уширению резонанса воды, которое может маскировать резонансы растворяемого вещества. Это возникает, потому что интенсивный сигнал ЯМР, произведённый при возбуждении воды, производит сильный РЧ ток в катушке детектирования (который, в конечном счете, производит наблюдаемый резонанс). Этот ток, в свою очередь, производит свое собственное РЧ поле, которое способствует движению векторов намагниченности протонов воды назад к положению равновесия. Если хотите, он действует как водно-селективный импульс. Потеря поперечной намагниченности, поэтому, ускоряется, производя уменьшенное кажущееся T_2 и, следовательно, расширяя резонанс [17]. Обычно хорошая форма линии является предпосылкой успешного подавления сигнала растворителя и, так как усилия по оптимизации шиммирования окупаются, интенсивный водный синглет H_2O идеально подходят для градиентного шиммирования (раздел 3.4.4). Существуют также сообщения об улучшении результатов при удалении из образца микроскопических воздушных пузырьков ультразвуковым перемешиванием.

Цель подавления сигнала растворителя, следовательно, уменьшить величину резонанса растворителя, прежде чем ЯМР сигнал достигнет приемника. Это, казалось бы, простое требование произвело огромную область исследований [59, 60], подчеркивая тот факт, что это ни в коем случае не тривиальное упражнение. Более широко используемые подходы можно широко классифицировать на три области:

- методы, которые насыщают резонанс воды;
- методы, которые производят нулевое чистое возбуждение резонанса воды, и
- методы, которые уничтожают резонанс воды импульсными градиентами поля.

Следующие разделы иллюстрируют примеры из этих областей, которые оказались наиболее популярными, но представляют только малый подраздел доступных методов (см., например, главу 2 из ссылки [61]). Все схемы неизбежно включают некоторую потерю интенсивности сигнала для тех резонансов, которые расположены близко к резонансу растворителя, и тщательное регулирование состояния раствора, простейшим из которых является термостатирование образца, которое может оказаться полезным, сдвигая резонанс воды относительно сигналов растворяемого вещества для исключения потерь сигнала (рис. 9.22).

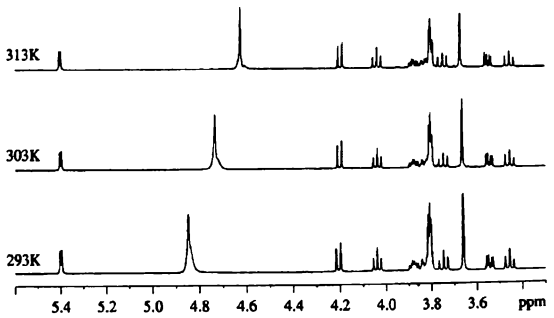


Рисунок 9.22. Температурная зависимость HDO (здесь частично подавленного). Сдвиг соответствует приблизительно 5 Гц/°K при 500 МГц. Спектры измерены относительно внутреннего TSP.

Проверка затухания излучения включает расстройку протонной катушки и пересканирование протонного спектра. Это деградирует РЧ взаимодействие, таким образом, уменьшая обратную ЭДС, и, обостряя резонанс воды.

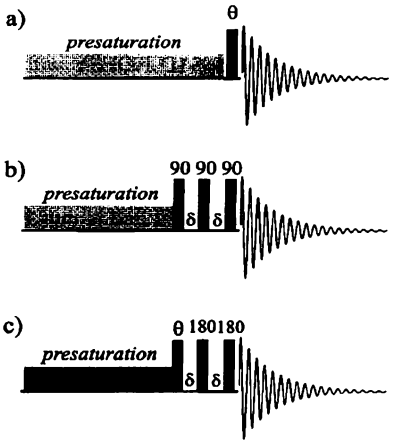


Рисунок 9.23. Схемы подавления сигнала растворителя, основанные на предварительном насыщении: (a) одно предварительное насыщение, (b) 1D NOESY и (c) FLIPSY Последовательность (b) использует обычный NOESY фазовый цикл, в то время как FLIPSY использует EXORCYCE на одном (или обоих) 180° импульсах (т.е. импульс = x, y,-x,-y, приёмник = x,-x,y,-y).

9.4.1. Предварительное насыщение

Простейшая, наиболее разумная и наиболее широко используемая методика - предварительное насыщение растворителя [62]. Она проста для применения, может легко добавляться к существующим экспериментам и оставляет (не обменивающиеся) резонансы, расположенные далеко от частоты предварительного насыщения, невозмущёнными. Она включает применение непрерывного слабого РЧ облучения на частоте растворителя перед возбуждением и регистрацией (рис. 9.23a), делая спины растворителя насыщенными, и, следовательно, ненаблюдаемыми (рис. 9.24).

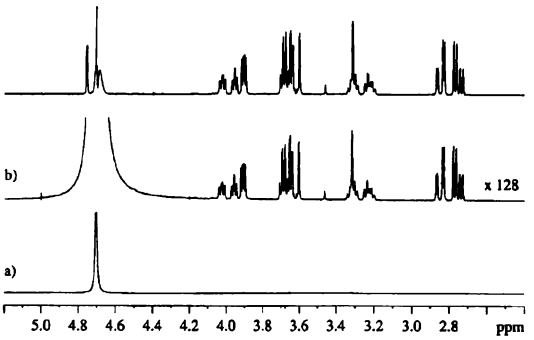


Рисунок 9.24. Предварительное насыщение растворителя (2 сек) показывает резонанс при 4,75 мд в (c), ранее замаскированный резонансом HDO в (a) и в его разтяжке (b).

Резонансы, расположенные близко к частоте растворителя, неизбежно также испытывают некоторую потерю в интенсивности, при этом более слабое облучение ведёт не только к меньшей степени нежелательного облучения соседних резонансов, но и к уменьшению насыщения растворителя. Более длинные периоды предварительного насыщения улучшают подавление за счёт продолжительности экспериментов, поэтому требуется компромисс, и обычно используется облучение в течение 1-3 секунд. Наилучшие результаты даёт оптимизация методом проб и ошибок. Везде, где возможно, должен использоваться тот же самый РЧ канал и для предварительного насыщения и для последующего протонного импульса, с соответствующим переключением мощности передатчика.

Особенность простого предварительного насыщения в протонированных растворах (особенно с более старыми датчиками, которые могут также испытывать недостаток подходящего экранирования проводников катушки [63]) - остаточный «горб» в 1D спектре, который происходит от периферийных областей образца, которые страдают от неоднородности полей B_0 и B_1. Эффективное средство подавления этого для 1D регистрации - так называемая последовательность NOESY-PRESAT, которая просто использует *неселективный* 1D NOESY с нулевым временем смешивания, или другими словами, первое приращение 2D NOESY эксперимента с τ_m= 0 (рис. 9.23b). Обычный фазовый цикл NOESY подавляет горб, но последовательность ограничивается регистрацией с 90° импульсами, которые не оптимальны для интегрирования спектра или усреднения сигнала. Недавнее изменение, названное FLIPSY [64] (одномерный NOESY с регулируемым углом поворота, рис. 9.23c), позволяет применение произвольного угла отклонения возбуждающего импульса θ и поэтому лучше годится для обычного применения.

Основное неудобство всех схем предварительного насыщения в том, что они также ведут к подавлению способных к обмену протонов процессом переноса насыщения. В благоприятных случаях состояние раствора может изменяться (температура и pH), чтобы достаточно замедлить обмен для уменьшения ослабления сигнала, но этот подход имеет ограниченную применимость. Методы, представленные ниже в значительной степени избегают таких потерь.

9.4.2. Нулевое возбуждение

Второй общий подход старается не производить никакого чистого возбуждения резонанса растворителя. Другими словами, последовательность, в конечном счете, возвращает намагниченность растворителя к +z оси, в то время как, одновременно, перед регистрацией помещает все другие намагничивания в поперечную плоскость. Раздел 9.4.3 описывает родственный подход, использованный совместно с импульсными градиентами поля.

Скачок-возврат

Чтобы оценить принцип нулевого возбуждения, рассмотрим простейший пример, последовательность «скачок-возврат» [65] 90_x-τ-90_{-x}, которая последовательно порождает много других. Частота передатчика помещается на резонанс растворителя, и все намагничивание отклоняется в поперечную плоскость первым жёстким 90° импульсом. В течение последующей задержки τ (обычно несколько сотен мкс длиной) все векторы расходятся веером в поперечной плоскости согласно их отстройкам, за исключением векторов протонов растворителя, которые являются резонансными и имеют нулевую частоту во вращающейся системе. Таким образом, резонанс растворителя отклоняется, обратно к +z-оси, как только второй 90° импульс поворачивает xy-плоскость в xz-плоскость. Единственная остающаяся поперечная намагниченность - ±x компонент всех векторов перед вторым импульсом. Следовательно, это производит профиль возбуждения, имеющий форму синуса (рис. 9.25a) с максимальной амплитудой при отстройках от частоты передатчика ±1/4τ Гц и с резонансами по обе стороны от передатчика, показывающими противоположную фазу (вследствие их ±x ориентации), но без дополнительной фазовой дисперсии. На практике эта простая схема производит довольно узкий нуль при настройке передатчика, и обычно остается заметный резонанс растворителя, поэтому были исследованы более изощрённые последовательности.

Двучленные последовательности

Двухчленные последовательности служат цели улучшать нулевой профиль возбуждения и обеспечивают схемы, которые менее чувствительны к несовершенствам спектрометра. Можно написать ряд 1-$\bar{1}$, 1-$\bar{2}$-1, 1-$\bar{3}$-3-$\bar{1}$... и так далее, где числа указывают относительные ширины им-

пульсов, каждый из которых отделяется задержкой τ, а чёрточка вверху указывает фазовую инверсию импульса. Для *вне-резонансных спинов* импульсные элементы *аддитивны* при максимуме возбуждения, так, например, если требуется 90° вне-резонансное возбуждение, 1-$\bar{1}$ соответствует последовательности 45_X-τ-$45_{\bar{X}}$. Из этого двучленного ряда получается, что последовательность 1-$\bar{3}$-3-$\bar{1}$ [66] имеет хорошую эффективность и наиболее терпима к несовершенствам импульса на основании её симметрии [67]. Траектория спинов с отстройкой частоты 1/2τ от передатчика для чистого 90° импульса (1 ≡11,25°) показана на рисунке 9.26. В течение каждого τ периода спины прецессируют во вращающейся системе на пол-оборота, так что эффект импульсов

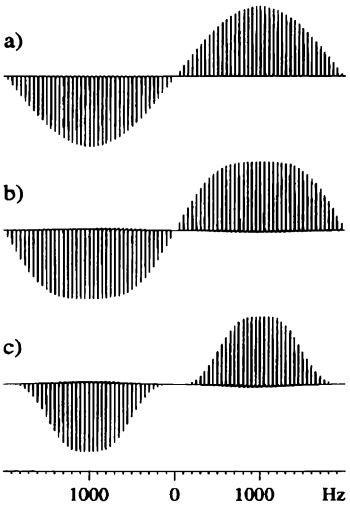


Рисунок 9.25. Симулированные профили возбуждения для: (a) последовательности скачок-возврат, (b) 1-$\bar{1}$ и (c) 1 $\bar{3}$ 3 $\bar{1}$двухчленных последовательностей. Использована последовательность скачок-возврата при τ = 250 мкс, а двухчленные последовательности использовали τ = 500 мкс.

инвертированной фазы аддитивен, и вектор намагничивания приводится шагами в поперечную плоскость. Как прежде, резонансный вектор растворителя показывает отсутствие прецессии, поэтому просто отклоняется взад-вперед, наконец, оставаясь на Северном Полюсе. В то время как максимальное возбуждение случается при ±1/2τ Гц от настойки передатчика, следующие нули случаются при отстройках ±n/τ (n = 1, 2, 3..., соответствующих полным оборотам в течение каждого τ), *так что* требуется разумный выбор τ, чтобы обеспечивать возбуждение желательной ширины полосы. Профили возбуждения последовательностей 1-$\bar{1}$ и 1-$\bar{3}$-3-$\bar{1}$ показаны на рисунке 9.25b и c. Конечно, возбуждение неоднородно, поэтому накладывает ограничения на количественные измерения, и снова существует фазовая инверсия по обе стороны от растворителя. Могут достигаться и обеспечение эффективного нуля при настройке передатчика, и отношения подавления свыше 1000-кратного.

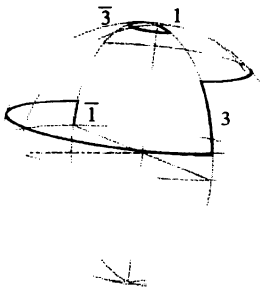


Рисунок 9.26. Траектория вектора намагничивания в течение двухчленной последовательности 1-$\bar{3}$-3-$\bar{1}$. Следы показываются для спина с отстройкой от передатчика +l/2τ Гц, что соответствует максимуму возбуждения.

При осуществлении этой последовательности может оказаться необходимым добавить ослабление передатчика, чтобы увеличить продолжительность каждого импульса, так чтобы более ко-

роткие элементы не требовали очень коротких (<1 мкс) импульсов (обратите внимание на подобие требованиям для селективного возбуждения жёсткими импульсами DANTE, описанным выше). Двухчленные последовательности можно регулировать для обеспечения произвольного полного угла поворота соответствующим регулированием рекомендуемых углов для каждого элемента. Например, *инверсии* всех вне-резонансных сигналов можно достичь, удваивая все элементы относительно чистого 90° условия. Именно этот подход использовался в описываемых ниже методах градиентного эхо.

9.4.3. Импульсные градиенты поля

Наиболее эффективный на настоящее время подход к подавлению сигнала растворителя - разрушение чистой намагниченности растворителя импульсными полевыми градиентами (ИПГ), таким образом, обеспечивая, что ничего не остается наблюдаемым непосредственно перед регистрацией.

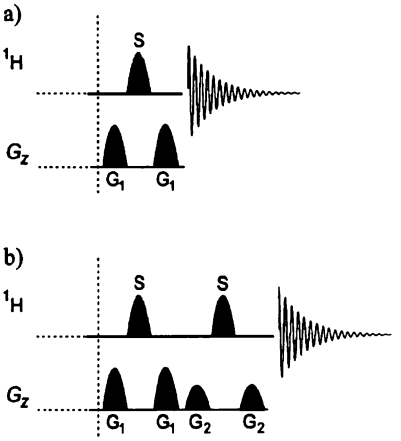


Рисунок 9.27. Схемы подавления сигнала растворителя, использующие импульсные полевые градиенты, основанные на принципах: (a) WATERGATE (одиночное эхо) и (b) создание возбуждения (двойное эхо). Импульсный элемент S имеет нулевое результирующее влияние на резонанс растворителя, но инвертирует все другие.

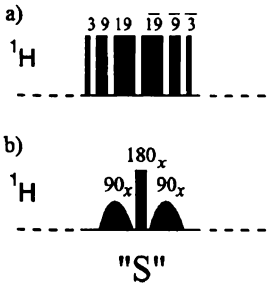


Рисунок 9.28. Две возможных версии элемента вне-резонансной инверсии S, основанного на: (a) последовательности жёстких импульсов двучленного типа и (b) комбинации мягких и жёстких импульсов.

Описанные здесь градиентные схемы действуют на поперечную намагниченность и поэтому легко добавляются к существующим одно- и многомерным последовательностям [68].

Один популярный подход, называемый WATERGATE [69,70] (подавление сигнала воды кроеным градиентным возбуждением) использует одиночное спиновое эхо ИПГ G_1-S-G_1, (рис. 9.27a), в котором оба градиента применяются в одном и том же направлении. Элемент S выбирается так, чтобы обеспечивать нулевой чистый поворот резонанса растворителя, но чтобы обеспечивать 180° *инверсию* всем другим. Это вызывает то, что намагниченность растворителя испытывает кумулятивное расфазирование двумя градиентами, ведущее к его разрушению, в то время как все другие рефокусируются в спиновом эхо вторым градиентом и поэтому сохраняются.

Как видно из предыдущего раздела, двухчленная последовательность имеет соответственно скроенный профиль для элемента S, и последовательность 3α-9α-19α-$\overline{19\alpha}$-$\overline{9\alpha}$-$\overline{3\alpha}$ (рис. 9.28a, с 26α = 180° и задержкой τ между импульсами, здесь назвываемая W3 [71]) имеет желательный для этой цели вне-резонансный профиль инверсии. Профиль возбуждения WATERGATE для этого показан на рисунке 9.29a. Снова характеристичные нули также случаются при отстройках ±n/τ Гц, но между ними возбуждение весьма однородно и не страдает от фазовой инверсии несопровождаемой 90° двучленами. Совсем недавно показаны расширенные двухчленные последовательности для обеспечения более узкой ложбины при настройке передатчика, которые таким образом уменьшают ослабление сигналов растворяемого вещества близко к растворителю, и имеют более широкую область однородного возбуждения [71]. Улучшенный профиль так называемой W5 последовательности показан на рисунке 9.29b.

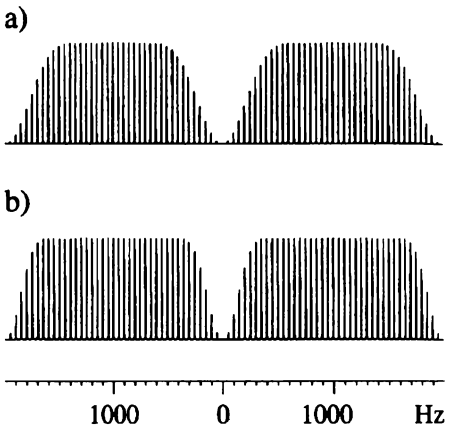


Рисунок 9.29. Симулированные профили возбуждения для WATERGATE, использующие (a) W3 и (b) W5 последовательности двучленного типа для обеспечения нуля при сдвиге растворителя (τ = 500 мкс).

Эта последовательность, увы, утратила изящную краткую форму её предшественника и поэтому представляется таким образом: 7,8-18,5-37,2-70,0-134,2-$\overline{134,2}$-$\overline{70,0}$-$\overline{37,2}$-$\overline{18,5}$-$\overline{7,8}$, где каждое число представляет угол отклонения импульса в градусах.

Элемент S также может обеспечиваться комбинацией жёстких и мягких импульсов [28,69] (рис. 9.28b). Здесь, мягкие импульсы действуют только на резонанс воды, заставляя его испытывать чистый поворот на 360°, в то время как все другие подвергаются желательной инверсии на основе жёсткого импульса. В этом подходе профиль подавления диктуется свойствами инверсии комбинации мягкого импульса, и вне-резонансные нули больше не случаются (хотя может потребоваться коррекция для любой разности фаз между жесткими и мягкими импульсами).

Улучшенный подход к градиентному подавлению использует метод «формирования возбуждения», описанный в разделе 9.3.3, и применяет спиновое эхо двойного ИПГ вместо одинарного [28]. Это имеет преимущество рефокусирования эволюции гомоядерных взаимодействий и может производить спектры с улучшенными фазовыми свойствами и меньшим искажением базовой линии. Элементы S точно такие же, как выше, за исключением того, что ложбина подавления с двойным эхо более широкая, так как он применяется дважды. Спектр подавления сигнала воды 2 мМ сахарозы в 90% H_2O, использующий этот подход, показан на рисунке 9.30a и иллюстрирует впечатляющие результаты, теперь рутинно доступные. Остаточный сигнал растворителя может ещё сильнее удаляться (рис. 9.30b), вычитая низкочастотные компоненты из ССИ перед преобразованием Фурье [72], что требует, чтобы частота передатчика помещалась на резонансе растворителя.

Последовательность формирования возбуждения может также легко кроиться для достижения многопозиционного подавления [73,74].

Одно последнее указание относительно ИПГ состоит в том, что их использование в некоторых экспериментах для выбора когерентности также ведет к подавлению сигнала растворителя без дальнейшей модификации. Например, эксперимент DQF-COSY неотъемлемо отфильтровывает несвязанные спины (то есть синглеты), и когда используются ИПГ для обеспечения этого фильтрования, синглетный резонанс воды также удаляется в источнике. Фактически, первоначальная публикация, которая стимулировала широкое использование градиентов поля в ЯМР высокого разрешения, выразительно продемонстрировала такое подавление [75]. Точно так же эксперименты гетероядерной корреляции, такие как HMQC и HSQC, по существу выбирают протоны, связанные с, скажем, ^{13}C или ^{15}N и таким образом также, вырезают воду.

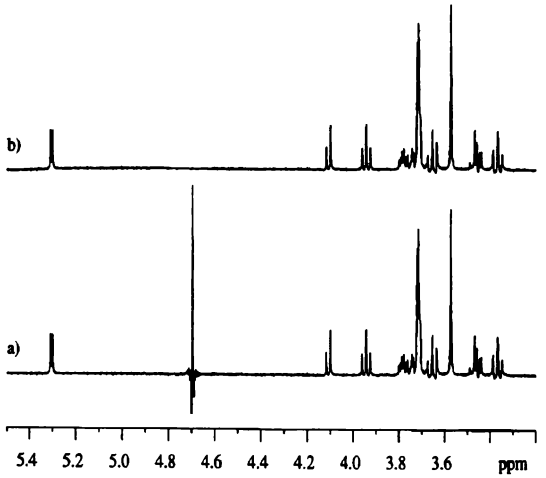


Рисунок 9.30. Подавление сигнала растворителя со схемой формирования возбуждения, использующей подход рис. 9 28b с 90° гауссовыми импульсами 4,1 мс и градиентами 0,1:0,1:0,03:0,03 $Т \cdot м^{-1}$ Образец - 2 мМ сахароза в 9:1 H_2O: D_2O. В (b) малый остаточный сигнал растворителя был полностью удален дополнительной обработкой ССИ (см. текст).

В то время как эти методы сами по себе маловероятно окажутся достаточными для 90% H_2O растворов (случай, в котором в конце могут добавляться вышеупомянутые методы градиентного эхо), они часто достаточны для «влажных» образцов D_2O.

9.5. НЕДАВНИЕ МЕТОДЫ

Этот заключительный раздел кратко рассматривает две области, которые уже существовали как методы ЯМР сами по себе в течение более чем трёх десятилетий, но еще только относительно недавно вошли в применение в господствующем ЯМР высокого разрешения. Этот переход был побужден техническими разработками в аппаратуре, более определенно в проектировании датчика. Первый метод использует так называемое вращение под магическим углом (ВМУ) жидких (частично) гетерогенных образцов, методика, которая широко применялась за эти годы для материалов твердого состояния и которая требует очень быстрого вращения образца, обычно с частотой многих килогерц. Второй изучает свойства самодиффузии молекул в растворе и полагается на импульсы полевого градиента, чтобы картировать их движение.

9.5.1. Гетерогенные образцы и вращение под магическим углом (ВМУ)

Последние годы видели расцветающий интерес к твердо-фазным методикам органического синтеза для производства комбинаторных библиотек новых молекул [76,77]. Стимулирующий фактор

в этом подходе - анализ вновь синтезированных материалов, для которых идеально выполнялся бы прямой структурный анализ материала, в то время же время поддерживаемый методиками твёрдых тел, и, таким образом, еще более доступный для дальнейшей химии. Прямой анализ ЯМР таких материалов, даже при сольватации, осложняется двумя основными факторами, которые могут сильно ухудшать разрешение спектра:

- · ограниченное движение связанного анализируемого вещества, и
- физическая гетерогенность в пределах образца.

Ограниченное движение связанных анализируемых веществ по сравнению со свободными молекулами в растворе может означать, что дипольные взаимодействия D, не полностью усредняются до нуля. Они имеют усредненную во времени угловую зависимость:

$$D \propto r^{-3}(3\cos^2\theta - 1) \qquad (9.2)$$

где r - межъядерное расстояние, а θ - угол между постоянным полем и межъядерным вектором. Для изотропно кувыркающихся молекул в слабо вязких растворах угловое выражение усредняется до нуля, поскольку молекула свободно вращается, то дипольные взаимодействия не наблюдаются. Когда движение достаточно ограничено, может перевводиться некоторое остаточное дипольное взаимодействие, которое будет делать вклад в уширение резонансов ЯМР. Применение длинных связывающих цепей позволяет большее движение концевого анализируемого вещества в растворе и может, следовательно, уменьшать этот эффект. Потенциально большая проблема лежит в гетерогенности образца. Растворы, содержащие твёрдофазные смолы, обычно в форме бусинок, страдают от локальной неоднородности поля на границе бусинка-растворитель, благодаря разности магнитной восприимчивости, и это ведет к жёсткому уширению линий (рис. 9.31а).

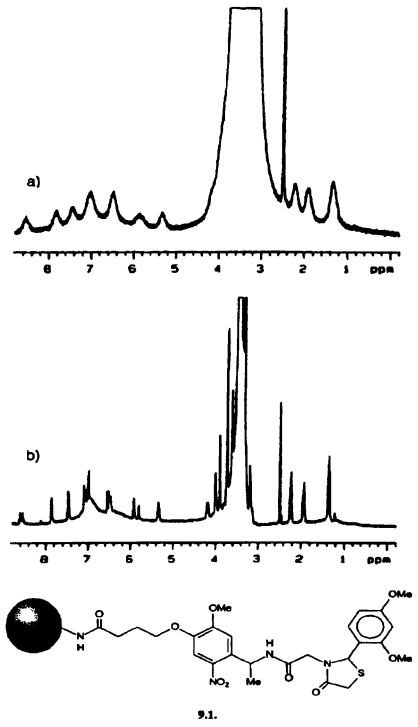


Рисунок 9.31. (a) обычный ^1H спектр анализируемого вещества **9.1**, связанного с бусинками смолы TentaGel, растворёнными в ДМСО, и (b) ВМУ (2 кГц) спектр того же самого образца. Десятая часть массы образца в (a) использовалась в (b) и оба накапливались за 16 сканирований. Большие усечённые сигналы возникают от самой смолы (воспроизведено с разрешения от ссылки [81]).

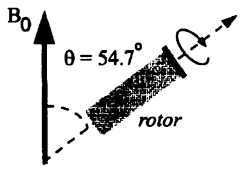


Рисунок 9.32. Вращение под магическим углом (ВМУ) включает быстрое вращение образца, наклонённого под магическим углом 54,7° к постоянному полю.

Хотя сообщалось о некоторых успехах при ЯМР эксперименте на углероде-13 гелевой фазы [78,79], эти вредные эффекты означают, что спектры высокого разрешения сольватируемых смол не могут получаться с обычными датчиками для растворов, проблема, в частности, для протонной спектроскопии.

Магнитная восприимчивость имеет подобную указанной выше угловую зависимость, и уширение линий и от дипольных взаимодействий, и от неоднородности восприимчивости, могут устраняться быстрым вращением образца под так называемом «магическим углом» θ = 54,7 °, так что приведённое выше угловое выражение становится нулевым, и полное молекулярное движение эмулирует движение в растворе. Это ***вращение под магическим углом*** (рис. 9.32) давно использовалось в ЯМР спектроскопии твёрдых тел для усреднения эффектов анизотропии химического сдвига [80] и теперь стало стандартной методикой для прямого анализа связанных со смолой объектов. Существенный выигрыш в разрешении и, следовательно, чувствительности, который обеспечивает ВМУ по сравнению с обычным датчиком для растворов, показан на рисунке 9.31 [81]. Спектр ВМУ показывает троекратное улучшение отношения сигнал/шум, используя всего одну десятую часть образца, по сравнению с обычным спектром раствора, и несёт значительно большее ин формационное содержание. Чтобы достигать таких результатов, образцы обычно вращаются со скоростями 2-5 кГц в специально сконструированных роторах, помещаемых в соответствующий ВМУ датчик высокого разрешения [82] и требует оборудования для управления вращением. Полный диапазон одно- и двухмерных методов высокого разрешения теперь может применяться к связанным со смолой образцам при условиях ВМУ для полной неразрушающей идентификации новых синтетических продуктов [83-86]. Также было исследовано влияние различных комбинаций растворителя и смолы и выявлено большое их значение для качества получаемых спектров [87].

9.5.2. Спектроскопия упорядоченной диффузии

Изучение молекулярной диффузии в растворе предлагает понимание множества физических молекулярных свойств, включая размер молекулы, форму и агрегационные состояния, которые, основанные на ЯМР измерениях, применялись ко многим областям химии в течение более, чем трёх десятилетий [88]. Различные скорости подвижности или *коэффициенты диффузии* также можно использовать как основу для разделения спектров смесей соединений в растворе. Эта процедура упоминается как *спектроскопия упорядоченной диффузии* или DOSY. Применение ЯМР измерений диффузии к разделению смесей малых молекул, таким образом, относительный новая для ЯМР высокого разрешения развивающаяся область, которая обязательно найдёт нарастающее применение в научно-исследовательской лаборатории, и поэтому кратко представлена в этом разделе. Все современные измерения диффузии, основанные на ЯМР, полагаются на применение импульсных градиентов поля для картирования физического местоположения молекулы в растворе и недавно стали возможными на обычных спектрометрах ЯМР высокого разрешения при использовании активно экранированных датчиков ИПГ Молекулярная диффузия тогда характеризуется вдоль направления приложенного полевого градиента, который обычно применяется вдоль z-оси обычных градиентных датчиков.

Спиновое эхо ИПГ

Основная схема для характеризации диффузии - спиновое эхо импульсного градиента поля [89] (рис. 9.33а). В отсутствие градиентных импульсов, она будет рефокусировать эволюцию химического сдвига, так что детектируемый сигнал ослабляется только поперечной релаксацией в течение периода 2т. Когда используются импульсные градиенты поля, *полное* рефокусирование сигна-

ла будет происходить, *только* когда локальное поле, испытываемое спином, идентично в течение этих двух градиентных импульсов.

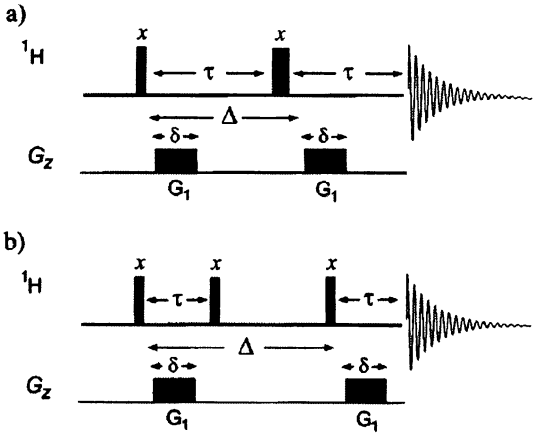


Рисунок 933. Основные последовательности для измерения молекулярной диффузии, основанные на: (a) спиновом эхо ИПГ и (b) ИПГ стимулируемом эхо. Диффузия в течение периода Δ характеризуется рядом измерений с нарастающими напряжённостями градиента.

Так как используется *полевой градиент*, *локальное* поле - пространственно зависимое, что означает, что условие рефокусирования встречается, только если спин остаётся в том же самом физическом местоположении, когда применяются эти два ИПГ Если молекула должна диффундировать прочь от её начального положения в течение задержки диффузии Δ, то локальное поле, испытываемое в течение второго ИПГ, не соответствует точно таковому первого, и будет происходить только частичное рефокусирование сигнала (рис. 9.34). Детектированный сигнал, следовательно, ослабится на величину, продиктованную тем, как далеко переместилась молекула в течение периода Δ, и, следовательно, его коэффициентом диффузии. Чтобы характеризовать скорости диффузии, можно прогрессивно изменять задержку Δ, длину градиентных импульсов или силу градиентных импульсов, и контролировать соответствующее затухание сигнала. Однако, изменения, сделанные при полной длине последовательности эхо будут вводить дополнительные осложнения, возникающие из увеличивающихся релаксационных потерь, поэтому используется универсальная практика увеличивать напряжённости градиентов, в то же время, удерживая неизменными все периоды времени.

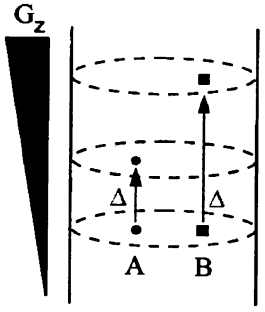


Рисунок 9.34. Схематичное представление ослабления сигнала через молекулярную диффузию. Локальное поле, испытываемое молекулой в течение первого градиентного импульса (молекулы показаны чёрным), не соответствует точно тому, которое испытывается в течение второго градиентного импульса (молекулы показаны серым), благодаря диффузии в течение задержки Δ, сигнал рефокусируется не полностью, и его отклик ослабляется. Большее ослабление наблюдается для более быстро движущейся молекулы B, благодаря большей разности в локальных полях, которые она испытывает в течение этих двух градиентных импульсов.

В то время как релаксационные потери T_2 в этом случае ещё происходят, они постоянны для всех экспериментов и, таким образом, не делают вклада в прогрессивное ослабление сигнала, которое контролируется (рис. 9.35).

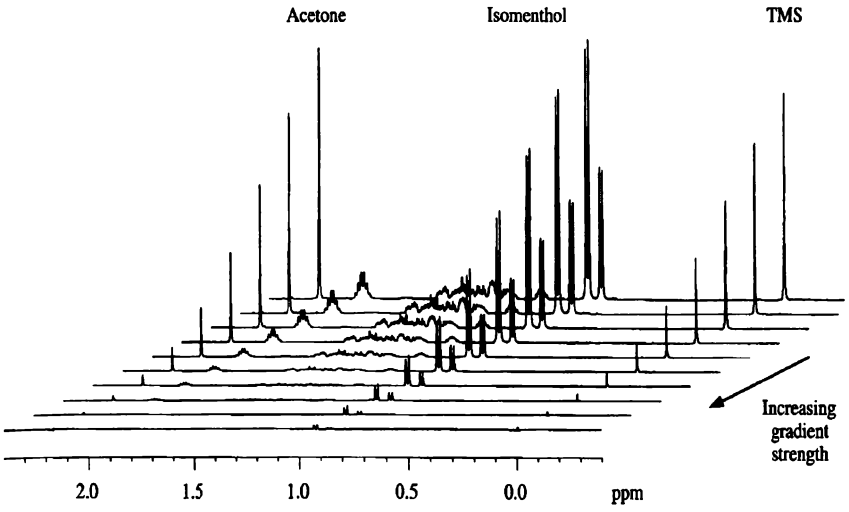


Рисунок 9.35. Взвешенные диффузией протонные спектры смеси ацетона, ТМС и изоментола в $CDCl_3$ при 298°K. Задержка диффузии была 30 мс и напряжённость градиента прогрессивно увеличивались от 0,025 до 0,25 Т $м^{-1}$ в биполярной последовательности LED [90,91].

Наблюдаемая интенсивность сигнала I для основного эксперимента спинового эхо ИПГ дается:

$$I = I_0 \exp\left(\frac{-2\tau}{T_2} - (\gamma\delta G)^2 D\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \qquad (9.3)$$

Где I_0 - интенсивность сигнала при нулевой напряжённости градиента, G - напряжённость градиента, D - коэффициент диффузии, и задержки Δ и δ - как на рисунке. 9.33. Построение графика $\ln(I/I_0)$ относительно G2, например, дает линейный график, чей наклон пропорционален D (рис. 9.36), и, так как константы γ, δ и Δ известны, можно рассчитать коэффициент диффузии

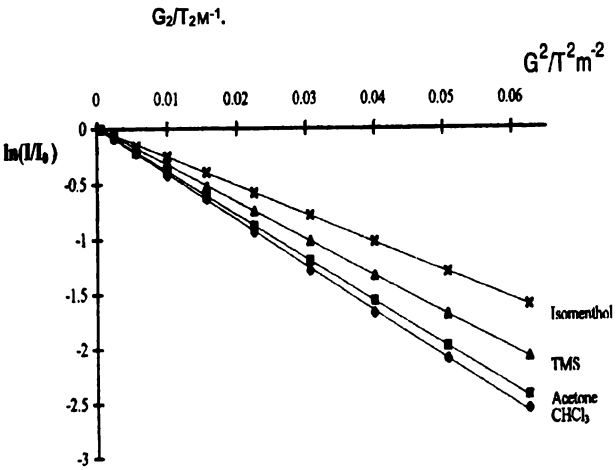


Рисунок 9.36. График диффузии для спадов, показанных на рисунке 9.35, включая данные спада для остатка $CHCl_3$ растворителя. Наклоны указывают относительные скорости подвижности 1,0:1,3:1,5:1,6 для компонентов изоментол: ТМС: ацетон: хлороформ.

Эхо, стимулируемое ИПГ

Применение последовательности спин-эхо ИПГ, показанной выше, на практике ограничивается вышеупомянутыми релаксационными потерями и теперь редко используется для измерений диффузии. Поскольку намагничивание поперечно в течение периода диффузии, эти потери диктуются поперечными (T_2) скоростями релаксации, которые сами увеличиваются с размером молекулы. Так как большие молекулы требуют более длинных периодов диффузии для перемещения на достаточные расстояния, применение длительных задержек (которые обычно лежат в интервале от 10 мс до 1 с) может вести к недопустимой деградации отношения сигнал/шум. В последовательности стимулированного эхо [92] (рис. 9.33b) намагничивание, продольное в течение периода диффузии, благодаря второму 90° импульсу, что означает, что последовательность теперь вместо этого ограничивается более медленными продольными (T_1) скоростями релаксации. После периода диффузии намагничивание возвращается к поперечной плоскости третьим 90° импульсом для рефокусирования и детектирования. Все недавно представленные последовательности диффузии [90,91,93] получаются из этой основной последовательности стимулированного эхо, для которой должны использоваться изменения в равенстве уравнения 9.3.

2DDOSY

Как только коэффициенты диффузии определены из соответствующих подпрограмм подгонки данных, становится возможным использовать эти данные для генерации размерности диффузии в псевдо 2D-спектре [93-96]. Так как каждый резонанс для данной молекулы должен ассоциироваться с одним и тем же коэффициентом диффузии, они могут распределяться в размерности диффузии графика DOSY (рис. 9.37).

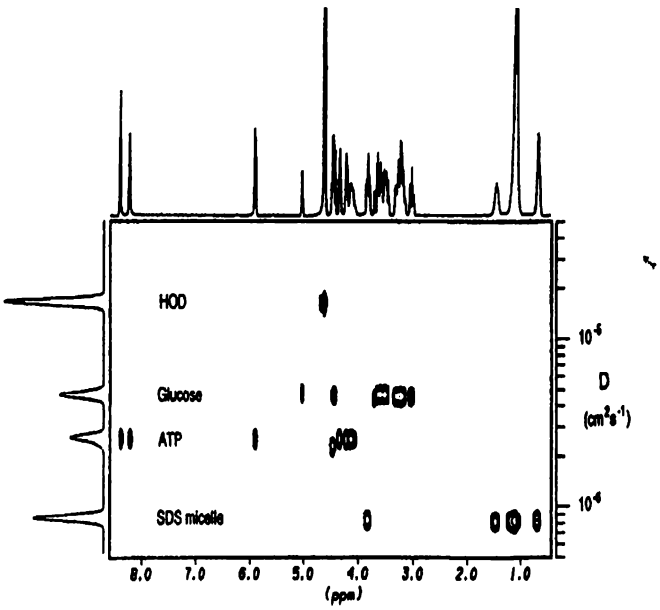


Рисунок 9.37. 2D управляемый диффузией спектр (DOSY) смеси глюкозы, аденозин 5'-трифосфата (АТФ) и мицелл натриевого сульфата додецила (SDS) в D_2O. Горизонтальная ось показывает обычный протонный спектр, который распределяется по вертикальному измерению индивидуальными коэффициентами диффузии (воспроизведено с разрешения от ссылки [95]).

Это редактирование спектра на основе диффузии также может применяться к обычным двумерным последовательностям, давая псевдо-3D графики [97]. Редактирование смесей малых молекул таким образом экспериментально очень требовательное, по причине необходимости разрешать малые различия в подобных коэффициентах диффузии, и технические трудности, связанные с этим, несколько подробнее обсуждаются в [93]. Однако это, конечно, имеет большой потенциал для прямого анализа смеси широкого множества источников и определённо является областью для будущих разработок.

Литература

[1] R. Freeman, S.P. Kempsell and M.H. Levitt, ***J. Magn. Reson.***, 1980, **38,** 453-479.
[2] M.H. Levitt and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1979, **33**, 473-476.
[3] A.J. Shaka, C. Bauer and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **60,** 479-485.
[4] M.H. Levitt, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1986,**18**,61-122.
[5] A.J. Shaka and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **55**, 487-493.
[6] M. Keniry and B.C. Sanctuary, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **97.**
[7] N.S. Bai, M. Ramakrishna and R. Ramachandran, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1993, **102,** 235-240.
[8] R. Ramachandran, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1993,**105,** 328-329.
[9] M.H. Levitt and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1981, **43**, 65-80.
[10] R. Tyeko, H.M. Cho, E. Schneider and A. Pines, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **61,** 90-101.
[11] A.E. Derome, ***J. Magn. Reson.***, 1988,**78**, 113-122.
[12] M.H. Levitt, R. Freeman and T. Frenkiel, ***J. Magn. Reso.n***, 1982, **47**, 328-330.
[13] A.J. Shaka, J. Keeler and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **53**, 313-340.
[14] A.J. Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **52**, 335-338.
[15] A.J. Shaka, C.J. Lee and A. Pines, ***J. Magn. Reson.***, 1988, **77**, 274-293.
[16] A.J. Shaka, P.B. Barker and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **64,** 547-552.
[17] N.S. Bai, N. Han and R. Ramachandran, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1994,**106,** 241-244.
[18] A. Bax and D.G. Davis, ***J. Magn. Reson.***, 1985, **65,** 355-360.
[19] S.P. Rucker and A.J. Shaka, ***Mol. Phys.***, 1989, **68,** 509-517.
[20] M. Kadkhodaic, O. Rivas, M. Tan, A. Mohebbi and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson.***, 1991, **91,** *437-443.*
[21] A.J. Shaka and J. Keeler, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectms.c***, 1987,**19**,47-129.
[22] E. Kupce and R. Freeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **115,** 273-276.
[23] E. Kupce and R. Freeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **117,** 246-256.
[24] E. Kupce and R. Freeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1996, **118,** 299-303.
[25] R. Fu and G. Bodenhausen, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **117,** 324-325.
[26] R. Fu and G. Bodenhausen, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1996, **119,** 129-133.
[27] H. Kessler, H. Oschkinat, C. Gnesinger and W. Bermel, ***J. Magn. Reson.***, 1986, **70,** 106-133.
[28] T.L. Hwang and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1995, **112,** 275-279.
[29] A. Bax and R. Freeman, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1982, **104,** 1099-1100.
[30] M.L. Liu, R.D. Farrant, J.M. Gillam, J.K. Nicholson and J.C. Lindon, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1995,**109,** 275-283.
[31] J.M. Brown, P.A. Chaloner and G.A. Morris.***J.C.S. Perkm Trans.,*** 1987,**2**, 1583-1588.
[32] H. Kessler, S. Mronga and G. Gemmecker, ***Magn. Reson. Chem.***, 1991,**29**,527-557.
[33] R. Freeman, ***Chem. Rev.***, 1991,**91**, 1397-1412.
[34] S. Berger, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1997,**30**, 137-156.
[35] R. Freeman, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectroc.***, 1998,**32**,59-106.
[36] H. Geen, S. Wimperis and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **85,** 620-627.
[37] C. Bauer, R. Freeman, T. Frenkiel, J. Keeler and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson.***, 1984, **58,** 442-457.

[38] J. Friedrich, S. Davies and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **75**, 390-395.
[39] L. Emsley and G. Bodenhausen, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **82**, 211-221.
[40] H. Kessler, U. Anders, G. Gemmecker and S. Steuernagel, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **85**, 1-14.
[41] H. Geen and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **87**, 415-421.
[42] H. Geen and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1991, **93**, 93-141.
[43] L. Emsley and G. Bodenhausen, ***Chem. Phys. Lett.***, 1990, **165**, 469-476.
[44] L. Emsley and G. Bodenhausen, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **97**, 135-148.
[45] P.J. Hajduk, D.A. Honta and L.E. Lerner, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1993, **103**,40-52.
[46] D.A. Honta, P.J. Hajduk and L.E. Lerner, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1993,**103**, 53-60.
[47] J.-M. Nuzillard and R. Freeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1994, **107**, 113-118.
[48] N.L. Gregory, T.D.W. Claridge and A.E. Derome, ***Meas. Sci. Technol.***, 1994,**5**, 1359-1365.
[49] G.A. Morris and R. Freeman, ***J. Magn. Reson.***, 1978, **29**, 433-462.
[50] S.L. Patt, ***J. Magn. Reson.***, 1992, **96**, 94-102.
[51] E. Kupce and R. Feeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1993, **105**, 234-238.
[52] K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.L. Hwang and A.J. Shaka, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1995, **117**,4199-4200.
[53] G.Z. Xu and J.S. Evans, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1996,111, 183-185.
[54] K.E. Kover, D. Uhrin and V.J. Hruby, ***J. Magn. Reson.***, 1998, **130**, 162-168.
[55] K. Stott, J. Keeler, Q.N. Van and A.J. Shaka, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **125**, 302-324.
[56] M.J. Gradwell, H. Kogelberg and T.A. Frenkiel, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **124**, 267-270.
[57] J.M. Nuzillard and R. Freeman, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1994,**110**, 252-256.
[58] J.M. Bernassau and J.M. Nuzillard, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1994, **103**, 77-81.
[59] P.J. Hore, ***Method. Enzymol.***, 1989, **176**,64-77.
[60] M. Gueron, P. Plateau and M. Decorps, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1991, **23**, 135-209.
[61] W.E. Hull, in **Two dimensional NMR Spectroscopy, Applications for Chemists and Biochemists**, eds. W.R. Croasmun and R.M.K. Carlson, VCH Publishers, New York, 1994.
[62] D.I. Hoult, ***J. Magn. Reson.***, 1976, **21**, 337-347
[63] R.W. Dykstra, ***J. Magn. Reson.***, 1987, **72**, 162-167.
[64] D. Neuhaus, I.M. Ismail and C.-W. Chung, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1996, **118**, 256-263.
[65] P. Plateau and M. Gueron, ***J. Am. Chem. Soc.*** , 1982, **104**, 7310-7311.
[66] P.J. Hore, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **54**, 539-542.
[67] P.J. Hore, ***J. Magn. Reson.***, 1983, **55**, 283-300.
[68] D. Callihan, J. West, S. Kumar, B.I. Schweitzer and T.M. Logan, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1996, **112**,82-85.
[69] M. Piotto, V. Saudek and V. Sklenar, ***J. Biomol. NMR***, 1992, **2**, 661-665.
[70] V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik and V. Saudek, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1993,**102**, 241-245.
[71] M. Liu, X. Mao, C. Ye, J.K. Nicholson and J.C. Lindon, ***J. Magn. Reson.***, 1998, **132**, 125-129.
[72] D. Manon, M. Ikura and A. Bax, ***J. Magn. Reson.***, 1989, **84**, 425-430.
[73] T. Parella, P. Adell, F. Sanchez-Ferrando and A. Virgili, ***Magn. Reson. Chem.***, 1998, **36**, 245-249.
[74] C. Dalvit, G. Shapiro, J.-M. Bohlen and T. Parella, ***Magn. Reson. Chem.***, 1999, **37** 7-14.
[75] R.E. Hurd, ***J. Magn. Reson.***, 1990, **87**, 422-428.
[76] G. Lowe, ***Chem. Soc. Rev***. 1995, **24**, 309-317.
[77] D. Obrecht and J.M. Villalgordo, ***Solid-supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small Molecular Weight Compound Libraries***, Pergamon, Oxford, 1998.
[78] E. Giralt, J. Rizo and E. Pedroso, ***Tetrahedron***, 1984, **40**, 4141-4152.
[79] G.C. Look, C.P. Holmes, J.P. Chinn and M.A. Gallop, ***J. Org. Chem.***. 1994, **59**, 7588-7590.
[80] E.R. Andrew, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1971,**8**, 1-39.
[81] W.L. Fitch, G. Detre, C.P. Holmes, J.N. Shoolery and P.A. Keifer, ***J. Org. Chem.***, 1994, **59**, 7955-7956.

[82] P.A. Keifer, L. Baltusis, D.M. Rice, A.A. Tymiak and J.N. Shoolery, ***J. Magn. Reson. (A)***, 1996, **119,** 65-75.

[83] R.C. Anderson, M.A. Jarema, M.J. Shapiro, J.P. Stokes and M. Zihox, ***J. Org. Chem.***, 1995, **60,**2650-2651.

[84] R.C. Anderson, J.P. Stokes and M.J. Shapiro, ***Tetrahedron Lett.***, 1995, **36,** 5311-5314.

[85] R. Jelmek, A.P. Valente, K.G. Valentine and S.J. Opella, ***J. Magn. Reson.***, 1997, **125,** 185-187.

[86] C. Dhallum, C. Boutillon, A. Tartar and G. Lippens, ***J. Am. Chem. Soc.***, 1997, **119,** 10494-10500.

[87] P.A. Keifer, ***J. Org. Chem.***, 1996,**61**, 1558-1559.

[88] P. Stilbs, ***Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.***, 1987, **19,** 1-45.

[89] E.O. Stejskal and J.E. Tanner, ***J. Chem. Phys.***, 1965, **42,** 288-292.

[90] S.J. Gibbs and C.S. Johnson Jr., ***J. Magn. Reson.***, 1991, 93, 395-402.

[91] D. Wu, A. Chen and C.S. Johnson Jr., ***J. Magn. Reson. (A),*** 1995, **115,** 260-264.

[92] J.E. Tanner, ***J. Chem. Phys.***, 1970, **52**, 2523-2526.

[93] M.D. Pelta, H. Baqat, G.A. Morris, A.L. Davis and S.J. Hammond, ***Magn. Reson. Chem.***, 1998, **36,**706-714.

[94] K.F. Morris and C.S. Johnson Jr., ***J. Am. Chem. So.c***, 1992, **114,**3139-3141.

[95] K.F. Morris and C. S. Johnson Jr., ***J. Am. Chem. Soc.***, 1993,**115,** 4291-4299.

[96] H. Baqat, G.A. Morris, S. Smart, A.G. Swanson and S.C.R. Williams, ***J. Magn. Reson. (B)***, 1995,**108,**170-172.

[97] H. Baqat, G.A. Morris and A.G. Swanson, ***J. Magn. Reson.,*** 1998, **131,** 131-138.

Список сокращений

Сокращение /термин	Пояснение	Перевод	Раздел
ACOUSTIC	Alternate compound 180s used to suppress transients in the coil (for quadrupolar nuclei)	Чередующиеся составные 180° импульсы для подавления переходов в катушке (для квадрупольных ядер)	4.5
AFT	Attached proton test (spectrum editing)	Тест присоединённых протонов (редактирование спектра)	4.3.2
BIRD	Bilinear rotation decoupling	Декаплирование билинейным вращением	6.3.3
BURP	Band-selective, uniform-response, pure-phase (selective) pulse	Полосно-селективный, однородной характеристики, чистой фазы (селективный) импульс.	9.3.1
CAMELSPIN	Cross-relaxation appropriate for minimolecules emulated by locked spins (ROESY)	Кросс-релаксация, пригодная для минимолекул, эмулированная блокировкой спинов (вместо ROESY)	8.8
COLOC	Correlation through long-range coupling	Корреляция через дальние взаимодействия	6.5.2
COSY	Correlation spectroscopy	Корреляционная спектроскопия	5.2
CPD	Composite pulse decoupling	Декаплирование составным импульсом	9.2
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill T_2-dependent spin-echo sequence	Последовательность T_2-зависимого спинового эхо Карр-Парселла-Мейбум-Гилла.	2.4.4
CSA	Chemical shift anisotropy	Анизотропия химического сдвига	2.5.3
CYCLOPS	Cyclically-ordered phase-sequence (for suppressing quadrature artefacts)	Циклически упорядоченная импульсная последовательность для подавления артефактов квадратурного детектирования	3.2.5
DANTE	Delays alternating with nutation for tailored (selective) excitation	Задержки, чередующиеся с нутациями для формированного (селективного) возбуждения	9.3.2
DEPT	Distortionless enhancement by polarisation transfer (spectrum editing)	Неискажённое усиление переносом поляризации (редактирование спектра)	4.4.3
DIPSI	Decoupling in the presence of scalar interactions	Декаплирование в присутствие скалярных взаимодействий	9.2
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy	Спектроскопия, управляемая диффузией	9.5.2
DPFGSE	Double pulsed field gradient spin-echo (selective excitation)	Спиновое эхо двухимпульсного полевого градиента (селективное возбуждение)	9.3.3
DQF-COSY	Double-quantum filtered correlation spectroscopy	Спектроскопия двухквантово фильтрованной корреляции	5.6.2

EXORCYCLE	Phase cycle to suppress 'ghost' and 'phantom' artefacts in spin-echo sequences	Фазовый цикл для подавления «пришлых» и «фантомных» артефактов в последовательностях спинового эхо.	7.2.2
EXSY	Exchange spectroscopy	Обменная спектроскопия	8.7.4
FID	Free induction decay	Спад (отклик) свободной индукции (ССИ)	2.2.2
FLIPSY	Flip-angle adjustable one-dimensional NOESY (solvent suppression)	Одномерный эксперимент ЯЭО спектроскопии регулируемого угла переворота (подавление сигнала растворителя)	9.4.1
FLOPSY	Flip-flop mixing sequence (for total correlation spectroscopy)	«Всплескивающая» смешивающая последовательность (для полной корреляционной спектроскопии – TOCSY)	9.2
GARP	Globally-optimised, alternating phase, rectangular pulses (for broadband decoupling)	Глобально оптимизированные чередующейся фазы прямоугольные импульсы (для широкополосного декаплирования)	9.2
HEHAHA	Heteronuclear Hartmann-Hahn spectroscopy	Гетероядерная спектроскопия Хартмана-Хана	5.7
HETCOR	Heteronuclear correlation	Гетероядерная корреляция	6.5.1
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Гетероядерная корреляция через много связей	6.4
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation	Многоквантовая гетероядерная корреляция	6.3.1
HOESY	Heteronuclear Overhauser effect spectroscopy	Спектроскопия гетероядерного эффекта Оверхаузера	8.9
HOHAHA	Homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy (aka TOCSY)	Гетероядерная спектроскопия Хартмана-Хана (вместо TOCSY)	5.7
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation	Гетероядерная одноквантовая корреляция	6.3.2
INADEQUATE	Incredible natural-abundance double-quantum transfer experiment	Невероятный эксперимент двухквантового переноса при естественном содержании	5.8
INEPT	Insensitive nuclei enhanced by polarisation transfer	Усиление нечувствительных ядер переносом поляризации	4.4.2
J-MOD	J-modulated spin-echo	J-модулированное спиновое эхо	4.3.1
LP	Linear prediction	Линейное предсказание	3.2.3
MAS	Magic angle spinning	Вращение под магическим углом (ВМУ)	9.5.1
MLEV	Broadband decoupling cycle from Malcolm Levitt	Цикл широкополосного декаплирования от Малкома-Левитта	9.2
MQF	Multiple-quantum filter	Многоквантовый фильтр	5.6.2
NOE	Nuclear Overhauser effect	Ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО)	8.2
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy	Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера	8.7

PENDANT	Polarisation enhancement nurtured during attached nucleus testing (spectrum editing)	Усиление поляризации, создаваемое во время теста присоединённых ядер (редактирование спектра)	
PFG	Pulsed field gradient	Импульсный полевой градиент (ИПГ)	5.5
RIDE	Ring-down delay sequence (for quadrupolar nuclei)	Последовательность подавления звона (для квадрупольных ядер)	4.5
ROESY	Rotating-frame Overhauser effect spectroscopy	Спектроскопия эффекта Оверхаузера вращающейся системы координат	8.8
SEFT	Spin-echo Fourier transform (spectrum editing)	Фурье-преобразование спинового эхо (редактирование спектра)	4.3.1
SPFGSE	Single pulsed field gradient spin-echo (selective excitation)	Спиновое эхо одиночного импульсного полевого градиента (селективное возбуждение)	9.3.3
SPT	Selective population transfer	Селективный перенос поляризации	4.4.1
SUSAN	Spin decoupling employing ultra-broadband inversion sequences generated via simulated annealing (broadband decoupling sequence)	Спиновый декаплинг, использующий ультра-широкополосные инверсные последовательности через симулированный отжиг (последовательность широкополосного декаплирования)	9.2
TOCSY	Total correlation spectroscopy	Тотальная корреляционная спектроскопия	5.7
TPPI	Time-proportional phase incrementation	Пропорциональное во времени инкрементирование фазы	5.3.1
Tr-ROESY	Transverse rotating-frame Overhauser effect spectroscopy	Спектроскопия эффекта Оверхаузера поперечно вращающейся системы координат	8.8
WALTZ	Wideband, alternating-phase, low-power technique for zero-residual splitting (broadband decoupling sequence)	Широкополосная, чередующейся фазы методика низкой мощности для нулевых остаточных расщеплений (последовательность широкополосного декаплирования)	9.2
WATERGATE	Water suppression through gradient tailored excitation	Подавление сигнала воды через формированное градиентом возбуждение	9.4.3
WATR	Water attenuation by transverse relaxation	Ослабление сигнала воды поперечной релаксацией	2.4.4
WURST	Wideband, uniform rate and smooth truncation (broadband decoupling sequence)	Широкополосное, постоянной скорости и гладкое усечение (последовательность широкополосного декаплирования)	9.2

Перевод с английского к.х.н. В.А. Денисенко
Владивосток
октябрь 2002 г.