

Применение селективных методов гетероядерной спектроскопии ЯМР в исследованиях многокомпонентных систем †

Ю.Е.Черныш, В.А.Волынкин, В.Т.Панюшкин, В.И.Кондаков, М.С.Коробов, Г.С.Бородкин

Научно-исследовательский институт физической и органической химии

Ростовского государственного университета

344090 Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/2, факс (8632)43–4667

Кубанский государственный университет

350040 Краснодар, ул. Ставропольская, 149, факс (8612)69–9570

Гродненский государственный аграрный университет

230008 Гродно, ул. Терешковой, 28, Беларусь, факс +37(5152)77–0168

Обсуждены некоторые наиболее важные аспекты применения селективных методик в спектроскопии ЯМР для интерпретации спектров сложных многокомпонентных систем, измерения констант спин-спинового взаимодействия и определения структуры соединений. Описаны методики получения селективных спектров, а также применения селективных радиочастотных импульсов совместно с импульсами градиентов магнитного поля. Рассмотрены практические методы подавления сигналов воды при исследовании биологических образцов. Библиография — 198 ссылок.

Оглавление

I. Введение	344
II. Селективные импульсы	345
III. Импульсы градиентов магнитного поля	346
IV. Селективные методики с инверсным детектированием	347
V. Измерение коэффициентов самодиффузии	354
VI. Наблюдение «подводных» сигналов. RECUR NMR	357
VII. Гомоядерные селективные методики	359
VIII. Гетероядерные методики	362
IX. Двухмерные корреляционные эксперименты, основанные на гетероядерной <i>J</i> -кросс-поляризации	364
X. Комбинация селективного и неселективного возбуждения в экспериментах ЯМР	364

I. Введение

Спектроскопия ЯМР — один из наиболее эффективных методов исследования веществ в жидком, твердом и жидкокри-

сталлическом состояниях.¹ При правильной интерпретации спектры ЯМР дают полное представление о молекулярных конформациях, межъядерных и межмолекулярных расстояниях, углах и свойствах связей, молекулярной динамике. Основная информация обычно содержится в трех главных параметрах спектра ЯМР: химических сдвигах, константах спин-спинового взаимодействия (КССВ) и скоростях ядерной спиновой релаксации.^{2–6} Однако данные параметры не всегда можно непосредственно измерить в спектре. Это обусловлено низкой чувствительностью спектроскопии ЯМР вследствие очень малой разности энергий ($\sim 10^{-6}$ эВ) переходов между ядерными энергетическими уровнями, а также низкого естественного содержания многих ядер и их малого гироманнитного отношения, причем часто такие факторы накладываются друг на друга.

Другая проблема состоит в перекрытии резонансных сигналов, что особенно характерно для спектров больших молекул и сложных систем. Для примера сравним резонансы часто используемых ядер ¹H и ¹³C. Метод, основанный на

Ю.Е.Черныш. Доктор химических наук, старший научный сотрудник НИИ ФОХ РГУ. Телефон: (8632)43–3894, e-mail: nmr@ipoc.rsu.ru
В.А.Волынкин. Кандидат химических наук, доцент кафедры общей и неорганической химии КубГУ. Телефон: (8612)69–9574, e-mail: vva@chem.kubsu.ru

В.Т.Панюшкин. Доктор химических наук, профессор, заведующий той же кафедрой. Телефон: (8612)69–9574, e-mail: Panyushkin@chem.kubsu.ru

В.И.Кондаков. Кандидат химических наук, научный сотрудник ГГАУ (Беларусь). Телефон: 375(0152)72–0024, e-mail: Vlad.Kondakov@mail.ru

М.С.Коробов. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИИ ФОХ РГУ. Телефон: (8632)43–3894, e-mail: nmr@ipoc.rsu.ru

Г.С.Бородкин. Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник НИИ ФОХ РГУ. Телефон: (8632)43–3894, e-mail: nmr@ipoc.rsu.ru

Область научных интересов авторов: спектроскопические методы исследования строения сложных многокомпонентных систем, координационная химия, молекулярная динамика, реакционная способность органических соединений.

Дата поступления 19 августа 2004 г.

† Посвящается академику Владимиру Исааковичу Минкину в связи с 70-летием.

детектировании резонансов от ядер ^1H , более чувствителен как вследствие большого природного содержания изотопа ^1H (99.98%), так и высокого гиромангнитного отношения ($26.75 \text{ рад} \cdot (\text{с} \cdot \text{Тл})^{-1}$). Однако ширина спектра ЯМР ^1H ~ 20 м.д., а сигналы для большинства органических соединений наблюдаются в интервале ~ 8 м.д. Резонанс на ядрах ^{13}C проявляется в гораздо более широкой области химических сдвигов (200 м.д.), сигналы относительно хорошо разрешены, однако природное содержание этого изотопа низкое (1.1% от общего количества изотопов углерода) и гиромангнитное отношение для него небольшое (0.25 от гиромангнитного отношения для ^1H). Поэтому метод, основанный на детектировании сигналов ^{13}C , менее чувствителен. Если использовать более сильные магнитные поля, то чувствительность и разрешение можно повысить. Однако для сложных образцов, таких как биологические жидкости и тканевые экстракты, спектр ЯМР ^1H при частоте поля даже 800 МГц остается сильно переполненным,⁷ а стоимость систем с такими ультравысокими полями очень большая. Альтернативный подход к увеличению чувствительности и спектрального разрешения основывается на создании новых импульсных последовательностей для селективного детектирования определенных сигналов.

В современной методологии ЯМР наряду с существующими и постоянно обновляемыми двух- (2М) и трехмерными (3М) импульсными методиками появились две другие. В соответствии с одной из них применяют селективные радиочастотные (РЧ) импульсы,^{8–10} а в соответствии с другой — импульсные градиенты магнитного поля (Pulse Field Gradient (PFG)), улучшающие спектры путем отбора подходящих когерентных суперпозиций различных состояний ядерной спиновой системы (далее когерентностей).^{11–13} Обе методики, их достоинства и недостатки подробно рассмотрены в работах^{8–13}. Методы, основанные на использовании исключительно селективных РЧ-импульсов, зачастую осложнены артефактами, возникающими из-за значительной длительности импульсов. Для уменьшения нежелательных откликов необходимо применять фазовое циклирование. Для работы с селективными импульсами требуется опытный оператор, а интерпретация итогового спектра часто неочевидна, поэтому их использование ограничено. В случае применения PFG фазового циклирования не требуется, что ускоряет эксперимент в ~ 5 раз. Наиболее перспективными являются подходы, в которых совмещены обе методики.^{14,15}

Комбинировать селективные РЧ-импульсы и импульсные полевые градиенты начали только в последние годы, и это дало хорошие результаты.

II. Селективные импульсы

Назначение селективных импульсов^{8–10} — возбуждать или инвертировать отдельные резонансы, которые в спектре могут быть либо синглетами, либо мультиплетами, но иногда также и поддиапазонами в пределах спектра или одиночными линиями в пределах мультиплета. Для определения структуры органических соединений используют селективные импульсы, которые позволяют в одном эксперименте сократить размерность задачи от 3М до 2М или от 2М до 1М, при этом необходимую информацию получают за более короткое время с весьма высоким разрешением.

При использовании селективных импульсов возникают три основные проблемы. Первая проблема связана со значительной длительностью таких импульсов, которая на три порядка превышает длительность неселективных «жестких» импульсов. Получаемая избирательность — величина, примерно равная обратной длительности импульса. Например, если мы хотим возбудить мультиплет шириной 50 Гц, то длительность прилагаемого селективного импульса должна

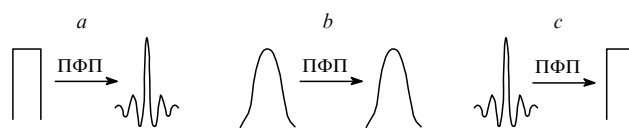


Рис. 1. Формы РЧ-импульсов и профили возбуждения.

Импульс: *a* — прямоугольный, *b* — гауссов, *c* — sinc; ПФП — прямое фурье-преобразование.

быть ~ 20 мс. Стремление повысить селективность может привести к значительным релаксационным потерям в пределах импульсной последовательности.

Вторая проблема связана с формой профиля селективного импульса. Идеальный импульс должен иметь прямоугольную огибающую, однородно заполненную РЧ-несущей. В рамках теории последовательной реакции профиль возбуждения может быть рассчитан с помощью прямого фурье-преобразования формы импульса из частотной области во временную и наоборот. Однако теория последовательной реакции справедлива только для очень слабого возбуждения, поэтому подбор формы новых селективных импульсов необходимо осуществлять экспериментально, в основном их конструируют итеративным способом. Наиболее часто используемые формы импульсов представлены на рис. 1. Прямоугольный импульс приводит к появлению профиля возбуждения sinc-типа, гауссов импульс — профиля гауссовой формы, а импульс sinc-типа — профиля прямоугольной формы.

Третья проблема обусловлена изменением фазы селективного импульса. К сожалению, фаза возбуждения не является постоянной в пределах выбранной ширины селективного импульса. Таким образом, если селективный импульс возбуждает мультиплет, то результатом может быть сложная структура спектра, так как фазу невозможно откорректировать средствами первого порядка. Усилия разработчиков направлены в основном на формирование селективных импульсов малой длительности с постоянной фазой и плавной огибающей в пределах полуокружности. Однако эта задача не имеет точного решения и поэтому приходится искать приближенные решения.

В принципе можно установить профиль возбуждения и изменение фаз используемых импульсов. Для этого последовательно изменяют частоту приложения селективного импульса в интересующей частотной области, однако такая процедура отнимает очень много времени. Хванг и Шака провели эксперимент,¹⁶ в котором использовали импульсные градиенты магнитного поля для получения «образа» формы возбуждающего селективного импульса (рис. 2). Для решения структурных химических задач приведенная импульсная последовательность не подходит, однако в ней отражены многие особенности широко используемых импульсных последовательностей. В эксперименте была использована градиентная последовательность спинового эха. В период, когда селективный импульс включен, под действием градиента магнитного поля воспроизводится образ частотного распределения, которое считывается во время сбора информации, т.е. в течение последнего временного интервала.

У фаз 90-градусного гауссова импульса и sinc-импульса происходит инверсия знака, тогда как полугауссов импульс имеет хорошие фазовые характеристики и хороший профиль возбуждения, но только для χ -намагниченности. Очень хорошие фазовый режим имеют импульсы из семейства BURP¹⁵ (Band-selective Uniform Response Pure-phase Pulses). Эти «мяг-

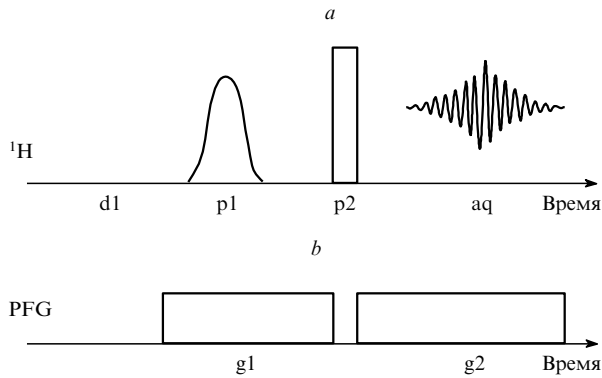


Рис. 2. Последовательности РЧ-импульсов (а) и PFG (b) для определения профилей возбуждения 90-градусных импульсов. d1 — релаксационная задержка; p1 — селективный импульс 90°; p2 — импульс 180°; g1, g2 — импульсные градиенты прямоугольной формы; aq — время сбора информации.

кие» импульсы конструируются для перефокусирования траектории намагниченности таким образом, чтобы скорректировать естественную дивергенцию — расхождение между быстрыми и медленными компонентами вектора намагниченности. Они переносят намагниченности к оси $+y$ во всем диапазоне резонансных офсетов — сдвигов резонансов от нулевого отсчета.

180-Градусный гауссов импульс обеспечивает хорошие селективность и фазовый режим, который поддерживается составным импульсом REBURP (Refocused Band-selective Uniform Response Pure-phase). Необходимо отметить, что на старых приборах, не имеющих блоков запоминания формы огибающей, импульсы современной формы также могут быть запрограммированы с помощью последовательности DANTE (Delays Alternating with Nutation for Tailored Excitation).^{17, 18}

Перед тем как использовать селективные импульсы, оператор обязан откалибровать их профиль возбуждения. Процедуры калибровки подробно описаны Браунем с соавт.¹⁹ Эти процедуры в основном такие же, как при калибровке «жестких» импульсов. Главное отличие состоит в том, что при определении длительности 180-градусного импульса требуется лишь ослабление мощности РЧ-источника. При этом нужно помнить, что ослабление «работает» в логарифмической шкале. Поэтому если эксперимент проводят на старых приборах, на которых нет программы согласования начальных фаз импульсов в пределах одной последовательности, то следует сверять либо фазу 90-градусного селективного РЧ-импульса, либо, по крайней мере, фазы 90-градусных импульсов с фазами «жестких» 90-градусных импульсов при том же уровне мощности. Если оба импульса применяют в пределах одной последовательности, то каждый раз необходимо устанавливать разность в соответствующей фазовой программе.

III. Импульсы градиентов магнитного поля †

Метод выбора когерентностей с использованием импульсных градиентов магнитного поля подробно рассмотрен в работах^{11–13}. Градиент поля по оси z вызывает z -зависимость резонансных частот и тем самым фазовую зависимость намагниченности (рис. 3). Если импульс градиента ограничен по интенсивности и длительности, то после того, как он будет отключен, идентичные спины будут осциллировать со своими начальными частотами, но с фазами, задан-

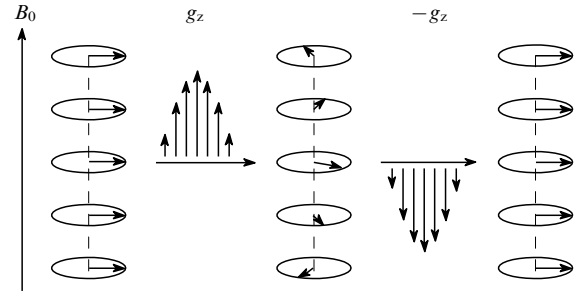


Рис. 3. Схема действия импульсного градиента магнитного поля. Градиент g_z приводит к дефазированию, которое перефазировуется с помощью градиента $-g_z$.

ными с помощью градиента. Если принимать сигнал на этой стадии, он будет зарегистрирован в лучшем случае в виде сигнала уширенной абсорбции. После приложения второго импульса градиента поля противоположного знака получится обычный спектр ЯМР. Следовательно, расфазирование, вызываемое первым градиентом, можно восстановить, применив второй градиент, идентичный первому, но противоположный по знаку.

Реализация этого принципа открывает широкие возможности. Дефазирование и перефазирование зависят от гиромагнитного отношения и порядка когерентностей в момент, когда прикладывается импульс градиента, поэтому можно легко отбирать когерентности посредством изменения их порядка между градиентами, определенными РЧ-импульсами. При применении селективных РЧ-импульсов между двумя градиентами в конечный сигнал вносят вклад только когерентности, генерированные этими импульсами.

Принцип применения импульсов градиентов магнитного поля лучше всего рассмотреть с помощью диаграммы путей переноса когерентностей, которая основана на операторах сдвига I^+ и I^- . Из выражения

$$I_x = \frac{1}{2}(I^+ + I^-) \quad (1)$$

видно, что возбуждение импульсом 90° может соответствовать как понижению, так и повышению уровня когерентности (рис. 4).

При теоретическом описании считают, что в экспериментах ЯМР приборы устанавливают уровень I^- . Поэтому при детектировании с помощью импульсной последовательности РЧ-импульсы следует выбирать такими, чтобы траектория когерентности заканчивалась на данном уровне. При этом импульсы полевых градиентов должны быть распределены таким образом, чтобы исключить другие возможные траектории. Для отбора необходимой когерентности следует выполнить следующее условие:

$$\sum_{i=1} p_i \gamma_i g_i \geq 0, \quad (2)$$

† Для методик ЯМР, использующих импульсы градиентов магнитного поля, применяют аббревиатуры: GRASP (Gradient Accelerated Spectroscopy — спектроскопия ускоренная градиентом) и ge (gradient enhanced — улучшенная градиентом). Предпочтительней использовать аббревиатуру gs (gradient selection — градиентная селективность), которая в настоящее время стала общепринятой. На самом деле градиенты «отбирают» желательные и «игнорируют» нежелательные когерентности, поэтому этот термин, по-видимому, лучше всего отражает сущность всех известных градиентных экспериментов.

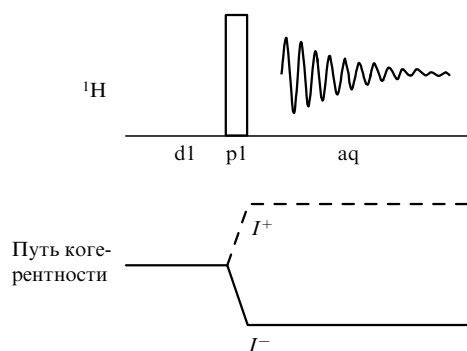


Рис. 4. Диаграмма путей когерентности при возбуждении одиночным РЧ-импульсом.

где p_i — порядок i -й когерентности, а γ_i — эффективный гиромагнитный коэффициент, существующий в течение действия i -го импульса градиента g_i . Считается, что все градиентные импульсы имеют одинаковую длительность и форму.

На рис. 5 приведен типичный результат измерения силы градиента с помощью импульсной последовательности, представленной на рис. 6. Возможность использования импульсов полевых градиентов зависит от степени совершенства аппаратных средств.

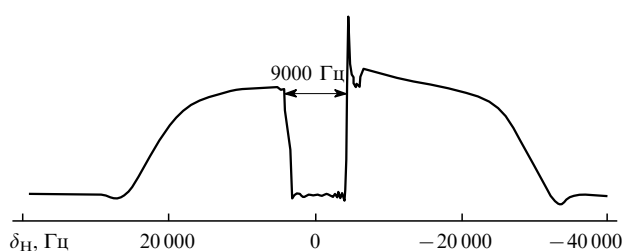


Рис. 5. Результат измерения силы градиента магнитного поля в образце воды (в центре образца расположен тefлоновый диск диаметром 2 мм).¹⁸
 δ_H — химический сдвиг ядер протонов.

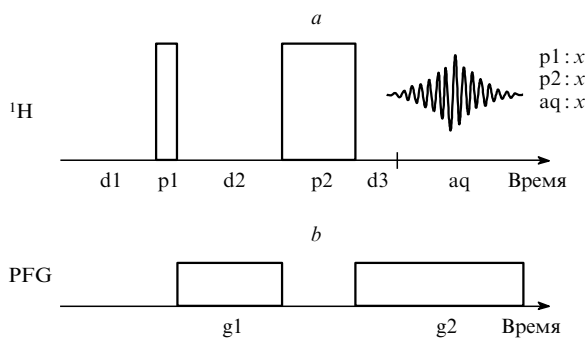


Рис. 6. Последовательности РЧ-импульсов (a) и PFG (b) для определения силы градиента магнитного поля. Обозначения см. на рис. 2

IV. Селективные методики с инверсным детектированием

Селективные методики обычно предназначены для определения структуры органических соединений. Ниже мы будем рассматривать только группы $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (хотя можно брать и другие группы, например NH , NH_2 и NH_3). Существуют пять основных типов спиновых систем — метильной ($^{13}\text{CH}_3$), метиленовой ($^{13}\text{CH}_2$) и метиновой (^{13}CH) групп, четвертичных атомов ^{13}C и всех протонов, связанных не с ^{13}C , а с ^{12}C , O , N и др. Мультиплетность резонансов ^{13}C зависит от числа присоединенных протонов. Вследствие этого для конкретных групп $^{13}\text{CH}_n$ скорости прецессии скалярного взаимодействия, а также возможные наивысшие порядки многоквантовых когерентностей и соответствующие им углы и фазы РЧ-импульсов различны. Эти особенности используют в спектральном редактировании для селективного детектирования сигналов ^1H и ^{13}C . В настоящее время для отнесения сигналов C , CH , CH_2 и CH_3 спектральное редактирование в методе ЯМР ^{13}C используют как рутинную технику.

К импульсным относятся такие методики, как АРТ (Attached Proton Test),^{20–23} SEMUT (Subspectral Editing Using a Multiple-Quantum Trap),^{24,25} RELAY (Relayed Correlation Spectroscopy),^{26,27} INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer),^{28,29} DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer)^{30–32} и PENDANT (Polarisation Enhancement During Attached Nucleus Testing).³³ Важную роль в спектральном редактировании играют различные эффекты прецессии J в группах CH_n . Например, в случае INEPT интенсивность сигналов различных групп CH_n зависит от времени и угла прецессии J , пропорционального числу присоединенных протонов n . Для импульсной последовательности DEPT редактирование проводят с использованием особых углов импульсов переноса двух- и нульквантовых когерентностей, содержащих $n + 1$ спинов.

В соответствии с этими методами намагниченность переносится с ^1H на ^{13}C и теоретически чувствительность ядер ^{13}C должна увеличиваться в 4 раза² как за счет предварительного насыщения ^1H -когерентностей,^{21,22} так и за счет использования различных импульсных последовательностей.^{26–33} Кроме того, импульсные последовательности, создающие перенос ^1H -поляризации, применяют в двухмерных гетероядерных корреляционных экспериментах,³⁴ в которых сигналы протонов и атомов углерода располагаются соответственно в измерениях F_1 и F_2 .

В последние 10 лет опубликовано множество сообщений об использовании гетероядерной фильтрации для упрощения спектров ЯМР ^1H .^{35–50} Один из методов известен как инверсно детектируемая или ^1H -детектируемая спектроскопия ЯМР. Он отличается высокой чувствительностью, поскольку как для создания когерентности, так и для детектирования используют ядра ^1H с высоким гиромагнитным отношением.⁴

Гетероядерные одно- или многоквантовые когерентности входят в состав средней части большинства импульсных последовательностей, основу которых составляют INEPT и DEPT с инверсной регистрацией сигнала (обратный DEPT и обратный INEPT).^{35–37}

В импульсной последовательности RELAY³⁸ для выборочного возбуждения когерентностей групп $^{13}\text{CH}_n$ используют пару 90-градусных (^1H) импульсов.^{26,27}

Применяя нестандартные методы, можно легко получить подспектры ^1H только групп $^{13}\text{CH}_2$ (^{13}CH или $^{13}\text{CH}_3$). Получить спектр ^{13}CH -групп — задача нетривиальная, поскольку спиновые системы ^{13}CH и $^{13}\text{CH}_3$ имеют одинаковые фазы. Авторами статьи⁴⁶ разработан метод получения селективных спектров групп $^{13}\text{CH}_n$ с минимальным искажением

фазы и интенсивностей. В основе метода лежит принцип квантового фильтрования максимального порядка (Quantum Filtering of Maximum Order (MAXY)).^{43–47} В эксперименте с использованием этого метода спиновые системы групп ¹³CH_n возбуждаются до соответствующего максимально возможного для данной группы порядка гетероядерной многоквантовой когерентности: для ¹³CH — до второго порядка, ¹³CH₂ — до третьего порядка, ¹³CH₃ — до четвертого порядка. Это обеспечивает возможность селективного наблюдения сигналов одной, двух или всех трех групп. Селективность может достигаться как за счет фазового циклирования, так и за счет применения импульсных полевых градиентов.

1. Методики DEPT и INEPT

Возможность редактирования спиновой системы при использовании методик DEPT и INEPT достигается за счет использования соответствующего угла для одного из импульсов в последовательности DEPT или угла прецессии πJτ (J — константа спин-спинового взаимодействия, τ — время между импульсами) гетероядерного взаимодействия в методике INEPT. Уголы импульса (ψ = β, DEPT) и прецессии (ψ = πJτ, INEPT) влияют на интенсивность сигналов различных групп ¹³CH_n. Для ¹³CH интенсивность зависит от sin(ψ); для ¹³CH₂ — от sin(2ψ); для ¹³CH₃ — от (3/4)(sin3ψ + sinψ). Аналогичные принципы реализованы в методиках DEPT и INEPT с инверсным детектированием.

С использованием последовательностей обратный DEPT или обратный INEPT получают несколько спектров путем задания конкретных значений времен задержек и углов импульсов. Затем, вычитая (складывая) спектры получают редактируемые спектры групп ¹³CH_n, но при этом происходит искажение истинных интенсивностей сигналов (табл. 1).

Импульс β_y в последовательности обратный DEPT (рис. 7) прикладывается к гетероядерной нуль- и двухквантовой когерентностям 2 S_yI_x (¹³CH), 4 S_xI_xI_z (¹³CH₂) и 8 S_yI_xI_z (¹³CH₃), а произведения операторов, которые остаются такими же, как и перед приложением импульса β_y, вносят вклад в наблюдаемые сигналы.

Зависимости интенсивностей сигналов для перечисленных выше групп будут следующими: для ¹³CH

$$2 S_y I_x \xrightarrow{\beta_y} 2 S_y I_x \cos \beta, \tag{3}$$

для ¹³CH₂

$$4 S_x I_x I_z \xrightarrow{\beta_y} 4 S_x I_x I_z \cos 2\beta,$$

для ¹³CH₃

$$-8 S_y I_x I_z I_z \xrightarrow{\beta_y} -2 S_y I_x I_z I_z (3 \cos 3\beta + \cos \beta).$$

Модуляция интенсивностей при использовании последовательности обратный INEPT для гамильтониана спин-спинового взаимодействия вида πJ_{IS}τ(2 S_yI_z) (где J_{IS} —

Таблица 1. Комбинация спектров ЯМР для получения подспектров ¹H индивидуальных групп ¹³CH_n с применением последовательности обратный DEPT с углом импульса β = 60° (I), 120° (II), 180° (III).^{35–37}

Спиновая система	Интенсивность сигнала, отн. ед.			Комбинация	Отношение интенсивностей	Число экспериментов
	I	II	III			
¹³ CH	0.5	-0.5	-1.0	0.111(I) – II – 0.555(III)	1.0	3
¹³ CH ₂	-1.0	-1.0	2.0	I + II	2.0	2
¹³ CH ₃	-1.875	1.875	-3.0	I + 0.5 III	3.3	2

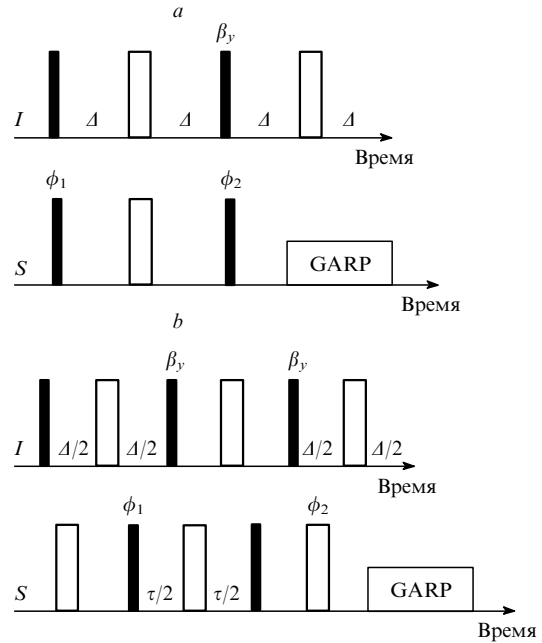


Рис. 7. Импульсные последовательности обратный DEPT (a) и обратный INEPT (b).

I, S — спины связанной системы IS; Δ — временные интервалы между импульсами; β_y — импульс, прикладываемый вдоль оси y; φ₁ и φ₂ — углы поворота для первого и второго импульсов соответственно; GARP — Globally-optimised, Alternating-phase Rectangular Pulses for Broadband Decoupling — прямоугольные импульсы с меняющимися фазами, служат для широкополосной развязки. Здесь и на других рисунках темные и светлые прямоугольники — импульсы 90° и 180° соответственно.

константа спин-спинового взаимодействия между ядрами со спинами I и S) происходит в течение периода τ в середине импульсной последовательности. Выражения для наблюдаемых сигналов до и после эволюции системы под влиянием спин-спинового взаимодействия имеют следующий вид: для ¹³CH

$$2 S_y I_x \xrightarrow{\pi J \tau (2 S_y I_z)} 2 S_y I_x \cos \psi, \tag{4}$$

для ¹³CH₂

$$2 S_y I_z \xrightarrow{\pi J \tau (2 S_y I_z)} 2 S_y I_z \cos 2\psi,$$

для ¹³CH₃

$$2 S_y I_x \xrightarrow{\pi J \tau (2 S_y I_z)} 2 S_y I_x \frac{1}{4} (\cos 3\psi + \cos \psi).$$

На рис. 8 для различных спиновых систем приведены зависимости интенсивностей сигналов от относительных величин угла импульса (ψ = β, обратный DEPT), времени эволюции (ψ = τ, обратный INEPT) и фазы импульса (ψ = φ₂, MAXY). Для разделения сигналов групп ¹³CH, ¹³CH₂ и ¹³CH₃ необходимы импульсы 60°, 120° и 180° (обратный DEPT) или времена эволюции 1/3J, 2/3J и 1/J (обратный INEPT).

2. Селективные методики на основе последовательности MAXY

В последовательности MAXY (рис. 9,a) спиновые системы (¹³CH_n) возбуждаются до максимально возможного квантового порядка по следующей импульсной схеме 90_x^o(I) – Δ – 90_x^o(S)180_x^o(I) – Δ – 90_x^o(I) (где Δ = 1/2J).^{46, 47}

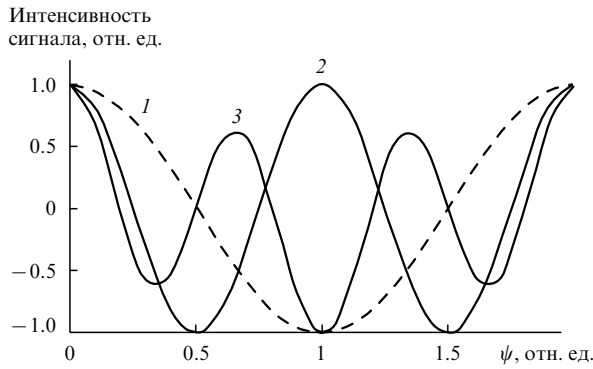


Рис. 8. Зависимости интенсивностей сигналов групп $^{13}\text{C}\text{H}$ (1), $^{13}\text{C}\text{H}_2$ (2) и $^{13}\text{C}\text{H}_3$ (3) от величины угла импульса β (обратный DEPT) (1), времени эволюции τ (обратный INEPT) (2) и фазы импульса ϕ_2 (MAXY) (3).

Разные спиновые системы имеют разные максимально возможные квантовые переходы, но для получения одноквантовой когерентности ^1H можно преобразовать все или любой из переходов. Для спектрального редактирования можно использовать протонные многоквантовые импульсы чтения с различными фазами (θ), например как в последовательности RELAY,^{26,27} или различные углы (β), как в последовательности DEPT.^{30,31} Однако можно использовать просто $\pm x$ - или $\pm y$ -фазы (т.е. фазы, связанные с положительным или отрицательным направлением этих импульсов вдоль координатных осей), так как при этом достигается наибольшая интенсивность сигнала.

а. Получение селективного спектра с использованием фазового циклирования

При использовании схемы $90^\circ_\theta(I) - \Delta - 90^\circ_{\phi_2}(S) 180^\circ_\phi(I) - \Delta$ ($\phi = \theta/2$) все многоквантовые когерентности могут быть преобразованы в измеряемую намагниченность.⁴⁷

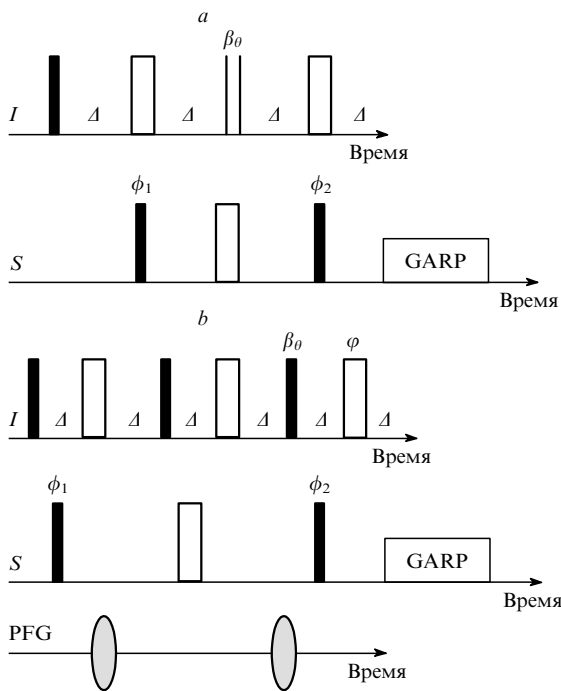


Рис. 9. Импульсная последовательность MAXY без (а) и с применением PFG (b).

для $^{13}\text{C}\text{H}$
 $+ 2 I_x S_y \xrightarrow{90^\circ_\theta - \Delta - 180^\circ_\phi(I) 90^\circ_{\phi_2}(S) - \Delta} I_y \cos \theta,$ (5)

для $^{13}\text{C}\text{H}_2$
 $+ 2 I_x I_y S_x \xrightarrow{90^\circ_\theta - \Delta - 180^\circ_\phi(I) 90^\circ_{\phi_2}(S) - \Delta} I_y \cos 2\theta,$

для $^{13}\text{C}\text{H}_3$
 $- 8 I_x I_y I_z S_y \xrightarrow{90^\circ_\theta - \Delta - 180^\circ_\phi(I) 90^\circ_{\phi_2}(S) - \Delta} (1/4) I_y (3 \cos 3\theta + \cos \theta).$

Под действием импульса $90^\circ(I_\theta)$ часть намагниченности преобразуется в нуль- и двухквантовые когерентности с интенсивностями, пропорциональными $\cos n\theta$. В выражение для группы $^{13}\text{C}\text{H}_3$ входят два слагаемых, пропорциональных $\cos 3\theta$ и $\cos \theta$ с отношениями интенсивностей 3:1, которые соответствуют трехквантовой когерентности ^1H вида $8 I_x I_y I_z$. Выбор необходимых резонансов может быть осуществлен за счет фазового циклирования импульса $90^\circ(\theta)$ с $\theta = 180^\circ/n$, где n — число присоединенных протонов. Преимущество этой процедуры состоит в том, что резонансы протонов, не связанных с ^{13}C , в дальнейшем лучше подавляются при циклировании фазы приемника. Программы фазового циклирования для отбора резонансов $^{13}\text{C}\text{H}_2$ и $^{13}\text{C}\text{H}_3$ с использованием двух- и трехквантовой когерентностей ^1H представлены в табл. 2.

Интересно, что математические выражения для наблюдаемых сигналов при использовании как последовательности обратный DEPT, так и последовательностей обратный INEPT и MAXY имеют одинаковый вид (см. уравнения (4) и рис. 8).

Подспектры групп CH_3 и CH_2 можно получить, используя соответствующие значения ϕ (см. табл. 2). В экспериментах MAXY их получают с помощью фазового циклирования, поскольку переменной является фаза импульса чтения (θ). При использовании методик обратный DEPT и обратный INEPT выделить такие подспектры значительно труднее, так как переменными являются соответственно угол импульса и время.

Таблица 2. Программы фазового циклирования для селективного наблюдения резонансов групп $^{13}\text{C}\text{H}_2$ и $^{13}\text{C}\text{H}_3$ для последовательности MAXY.

Фаза	Для $^{13}\text{C}\text{H}_2$	Фаза	Для $^{13}\text{C}\text{H}_3$
ϕ_1	$0^\circ, 180^\circ$	ϕ_1	$0^\circ, 180^\circ$
ϕ_2	$0^\circ, 0^\circ, 180^\circ, 180^\circ$	ϕ_2	$0^\circ, 0^\circ, 180^\circ, 180^\circ$
θ	$(0^\circ)_4, (90^\circ)_4, (180^\circ)_4, (270^\circ)_4$	θ	$(0^\circ)_4, (60^\circ)_4, (120^\circ)_4, (180^\circ)_4, (240^\circ)_4, (300^\circ)_4$
ϕ	$(0^\circ)_4, (45^\circ)_4, (90^\circ)_4, (135^\circ)_4$	ϕ	$(0^\circ)_4, (30^\circ)_4, (60^\circ)_4, (90^\circ)_4, (120^\circ)_4, (150^\circ)_4$
ϕ_n	$0^\circ, 180^\circ, 180^\circ, 0^\circ, 180^\circ, 0^\circ, 0^\circ, 180^\circ$	ϕ_r	$0^\circ, 180^\circ, 180^\circ, 0^\circ, 180^\circ, 0^\circ, 0^\circ, 180^\circ$

Примечание. В нижнем индексе после скобки указано число циклов.

б. Получение селективного спектра с использованием импульса $\beta_x(I)$

Если импульс $\beta(I)$ приложен вдоль оси x , он будет преобразовывать часть намагниченности в гетероядерную нуль- и двухквантовую когерентность, которая затем преобразуется в одноквантовую когерентность спина I импульсом, следующим после задержки Δ . Сбор данных начинается по истечении Δ и приводит к сфазированной (правильной) форме линии поглощения для всех спинов с интенсивнос-

Таблица 3. Комбинация спектров ЯМР для получения подспектров ^1H индивидуальных групп $^{13}\text{CH}_n$ в последовательности MAXY с импульсами $\beta = 0^\circ$ (I), 90° (II), 270° (III).⁴³⁻⁴⁷

Спиновая система	Интенсивность сигнала, отн. ед.					Комбинация спектров	Отношение интенсивностей	Число экспериментов
	I	II	III	II + III	II - III			
^{13}CH	1	1	1	1	0	I	1.0	1
$^{13}\text{CH}_2$	0	2	-2	0	2	II - III	2.0	1
$^{13}\text{CH}_3$	0	3	3	3	0	II + III - I	3.0	2

тиями, пропорциональными $\sin\beta$ (для $^{13}\text{CH}_2$) или $\sin^2\beta$ (для $^{13}\text{CH}_3$); исключение составляет группа ^{13}CH , на которую импульс $\beta_x(I)$ не оказывает воздействия:

$$\text{для } ^{13}\text{CH} \\ + 2I_x S_y \xrightarrow{\beta_x(I)} + 2I_x S_y \xrightarrow{\Delta - 180_x^\circ(I)90_x^\circ(S) - \Delta} + I_y, \quad (6)$$

для $^{13}\text{CH}_2$

$$+ 4I_x I_y S_x \xrightarrow{\beta_x(I)} + 4I_x I_z S_z \sin\beta \xrightarrow{\Delta - 180_x^\circ(I)90_x^\circ(S) - \Delta} + I_y \sin\beta,$$

для $^{13}\text{CH}_3$

$$- 8I_x I_y I_z S_y \xrightarrow{\beta_x(I)} - 8I_x I_z I_2 S_y \sin^2\beta \xrightarrow{\Delta - 180_x^\circ(I)90_x^\circ(S) - \Delta} \\ \longrightarrow + I_y \sin^2\beta.$$

При исследовании зависимости интенсивности сигналов от угла импульса (β_x) особенно интересны углы 0° , 180° , 90° и 270° , так как для них наблюдаются экстремальные значения интенсивностей, что можно использовать для спектрального редактирования. Если применяется 0- или 180° -градусный по ^1H импульс чтения, то можно наблюдать только резонансы групп ^{13}CH . Степень подавления сигналов групп $^{13}\text{CH}_2$ и $^{13}\text{CH}_3$ очень высока, так как они находятся в состоянии многоквантовой когерентности, а все протоны, не связанные с ^{13}C , будут иметь только продольную намагниченность.

При применении 90° - или 270° -градусного по ^1H импульса чтения когерентности групп $^{13}\text{CH}_2$ и $^{13}\text{CH}_3$ будут преобразованы в гетероядерные нуль- и двухквантовые когерентности, что даст возможность получить истинную интенсивность (для $\beta = 90^\circ$ все сигналы в спектре положительны, а для $\beta = 270^\circ$ отрицательны только сигналы групп $^{13}\text{CH}_2$). Это позволяет редактировать спектры с помощью фазового циклирования, поскольку углы 90° и 270° эквивалентны 90° -градусному импульсу с фазами в направлениях x и $-x$. В результате, если фаза приемника меняется (вычитание спектров), то получается подспектр только групп $^{13}\text{CH}_2$; если фаза приемника фиксирована (сложение спектров), — то подспектр групп ^{13}CH и $^{13}\text{CH}_3$.

в. Использование импульса $\beta_y(I)$

Еще один способ получения подспектров групп ^{13}CH и $^{13}\text{CH}_2$ заключается в использовании импульса чтения $\beta(I)$, приложенного только вдоль оси y . Результат воздействия такого импульса отражен в следующих уравнениях:

$$\text{для } ^{13}\text{CH} \\ + 2I_x S_y \xrightarrow{\beta_y(I)} + 2I_x S_y \xrightarrow{\Delta - 180_x^\circ(I)90_x^\circ(S) - \Delta} + I_y \cos\beta, \quad (7)$$

для $^{13}\text{CH}_2$

$$+ 4I_x I_y S_x \xrightarrow{\beta_y(I)} + 4I_x I_z S_z \sin\beta \xrightarrow{\Delta - 180_x^\circ(I)90_x^\circ(S) - \Delta} + I_x \sin\beta,$$

для $^{13}\text{CH}_3$

$$- 8I_x I_y I_z S_y \xrightarrow{\beta_y(I)} - 8I_y I_z S_y \sin\beta \xrightarrow{\Delta - 180_x^\circ(I)90_x^\circ(S) - \Delta} \\ \longrightarrow + 8I_y I_z S_y \sin\beta.$$

Отметим, что когерентность групп $^{13}\text{CH}_3$ не может быть преобразована в наблюдаемую намагниченность при использовании импульса чтения, приложенного вдоль оси y .

Интенсивности сигналов групп ^{13}CH и $^{13}\text{CH}_2$ изменяются в соответствии с изменением косинуса и синуса угла импульса. Таким образом, импульс 90° , направленный вдоль оси y , позволяет выделить подспектр группы $^{13}\text{CH}_2$. Схема редактирования спектров ЯМР ^1H с использованием методики MAXY с применением сложения и вычитания спектров с β -импульсами приведена в табл. 3.

г. Использование импульсных градиентов магнитного поля

Особенность, выгодно отличающая методику MAXY от методик обратный DEPT и обратный INEPT, заключается в том, что для селективного наблюдения резонансных сигналов можно использовать импульсные градиенты магнитного поля.⁴⁶⁻⁵⁰ Применение PFG позволило значительно улучшить многие импульсные последовательности. В экспериментах MAXY спиновые системы $^{13}\text{CH}_n$ возбуждаются до максимально возможного квантового порядка. При таком возбуждении с использованием PFG можно наблюдать подспектры индивидуальных групп $^{13}\text{CH}_n$ (фаза многоквантовой когерентности пропорциональна ее квантовому порядку). Квантовый порядок всех систем $^{13}\text{CH}_n$ как в обратном DEPT, так и в обратном INEPT одинаков, поэтому нельзя использовать импульсы градиентов магнитного поля для получения селективных спектров. Последовательность MAXY с применением PFG иллюстрирует рис. 9, б. Используются два импульса: первый в период первой задержки Δ , второй — сразу после последнего $90^\circ(S)$ импульса переноса, где полевые градиенты имеют значения соответственно g_1 и g_2 . Суммарный эффект действия импульсов можно записать так:

для ^{13}CH

$$A_1 = \frac{1}{2} \cos[\pi(\gamma_{\text{H}} + \gamma_{\text{C}})g_1\delta + \pi\gamma_{\text{H}}g_2\delta],$$

для $^{13}\text{CH}_2$

$$A_2 = \frac{1}{2} \cos[\pi(2\gamma_{\text{H}} + \gamma_{\text{C}})g_1\delta + \pi\gamma_{\text{H}}g_2\delta],$$

для $^{13}\text{CH}_3$

$$A_3 = \frac{3}{8} \cos[\pi(3\gamma_{\text{H}} + \gamma_{\text{C}})g_1\delta + \pi\gamma_{\text{H}}g_2\delta] + \\ + \frac{1}{8} \cos[\pi(\gamma_{\text{H}} + \gamma_{\text{C}})g_1\delta + \pi\gamma_{\text{H}}g_2\delta],$$

где g и δ — градиент и длительность импульса соответственно. Первый импульс обычно приводит к фазовому сдвигу, пропорциональному квантовому порядку ($n\gamma_H + \gamma_C$), где n — число протонов в группах $^{13}\text{C}_n$. Эффект первого импульса может быть скомпенсирован вторым импульсом градиента. Если выбрать соответствующую величину второго градиента, то появляется возможность селективного наблюдения индивидуальных спиновых систем. При использовании градиентных импульсов одинаковой формы и длительности соотношения амплитуд градиентов должны быть следующими:

для ^{13}CH

$$g_2 : g_1 = (\gamma_H + \gamma_C) : \gamma_H = -5 : 4, \quad (8)$$

для $^{13}\text{CH}_2$

$$g_2 : g_1 = (2\gamma_H + \gamma_C) : \gamma_H = -9 : 4,$$

для $^{13}\text{CH}_3$

$$g_2 : g_1 = (3\gamma_H + \gamma_C) : \gamma_H = -13 : 4.$$

При использовании PFG для селективного наблюдения сигнала происходит 50%-ное снижение его интенсивности. Более того, любые процессы молекулярной самодиффузии могут приводить к ослаблению сигнала многоквантовой когерентности, пропорциональному квадрату квантового порядка.⁵¹

Применение методики MAXY может быть весьма успешным в случае сложных спектров, таких как спектры пептидов или белков, а также спектров биологических жидкостей и тканевых экстрактов. Общей проблемой при изучении таких объектов методом ЯМР является перекрывание сигналов, причем даже увеличение напряженности магнитного поля зачастую ее не решает. Для отнесения большинства спектральных линий в общем случае требуется расширенное изучение объектов методами двумерной спектроскопии ЯМР.⁷ Однако в качестве начального шага в процедуре отнесения линий полезно перед проведением сравнительно длительных 2М-экспериментов определить, какие линии относятся к группам ^{13}CH , $^{13}\text{CH}_2$ и $^{13}\text{CH}_3$. Значительного упрощения спектров можно достичь за счет подавления сигналов воды.⁷⁵ При таком подходе облегчается как отнесение сигналов, так и структурное исследование сложных молекул.

3. Двумерные селективные методики с использованием последовательности MAXY

Двумерная корреляционная спектроскопия — один из современных методов, используемых для отнесения сигналов в спектрах ЯМР. В основе этого метода лежит общий подход, согласно которому намагниченность переносится от одного спина к другому посредством спин-спиновой взаимодействия, химического обмена или кросс-релаксации. В случае корреляций $^1\text{H} - ^1\text{H}$, особенно в макромолекулах, перекрывание сигналов может стать серьезной проблемой, ограничивающей применение метода. Одно из решений данной проблемы заключается в использовании редакционных возможностей методик RELAY,^{23, 24} INERT^{25, 26} и DEPT^{27–29} в экспериментах по гетероядерной^{36, 41, 46, 48, 52} и гомоядерной корреляции.^{34, 37–39, 44–47} За счет переворота мультиплетов и увеличения разрешения в двумерных спектрах степень перекрывания спектральных сигналов можно снизить.

Последовательности на основе 2М MAXY представлены на рис. 10.⁴⁴ На временной оси период инкрементирования (t_1) располагается в центре, когда спиновые системы $^{13}\text{C}_n$ находятся в наивысшем квантовом состоянии. Под действием импульса 180° (^{13}C) в середине последовательности изменяется квантовый порядок и происходит перефокусирование

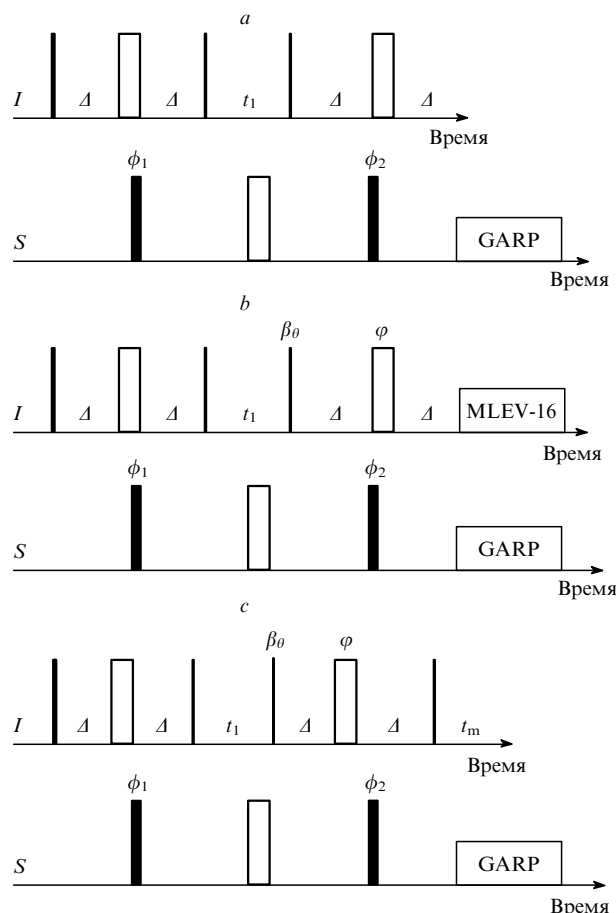


Рис. 10. Импульсные последовательности на основе 2М MAXY. a — 2М MAXY–COSY (Correlation Spectroscopy), b — 2М MAXY–TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), c — 2М MAXY–NOESY (Nuclear Overhauser Effect and Exchange Spectroscopy). MLEV-16 — M.Levitt's Composite-pulse Decoupling Sequence (последовательность для развязки, в которой использованы составные импульсы М.Левитта); t_1 — период инкрементирования, t_m — время смешивания.

эволюции химических сдвигов ^{13}C таким образом, чтобы только химические сдвиги ^1H имели одноквантовую когерентность (SQ) для ^{13}CH , чисто двухквантовую когерентность (DQ) для $^{13}\text{CH}_2$, а также трехквантовую (TQ) и одноквантовую когерентности для групп $^{13}\text{CH}_3$.

Составной 180° -градусный импульс (^{13}C) можно использовать для подавления мешающих резонансов в области сигналов ^{13}C , особенно для молекул ароматических и алифатических соединений. Таким образом, в конце периода t_1 интенсивности наблюдаемых сигналов будут пропорциональны:⁴⁴

для ^{13}CH

$$-2 I_x S_y \cos(2\pi\delta t_1) \text{Pcos}(\pi J_j t_1),$$

для $^{13}\text{CH}_2$

$$-4 I_x I_y S_x \cos(4\pi\delta t_1) \text{Pcos}2(\pi J_j t_1),$$

для $^{13}\text{CH}_3$

$$+2 I_x I_y I_z S_y [3\cos(6\pi\delta t_1) + \cos(2\pi\delta t_1)] \text{Pcos}^3(\pi J_j t_1).$$

Здесь δ — химические сдвиги протонов, J_j — константа j -го спин-спиновой взаимодействия, $\text{Pcos}(\pi J_j t_1)$ — множитель, отражающий пассивные взаимодействия $^1\text{H} - ^1\text{H}$, разви-

Таблица 4. Изменение квантовой когерентности при изменении фазы.

Спиновая система	Фаза 0°	Фаза 90°	Фаза 180°	Фаза 270°
^{13}CH	$+I_y \cos(2\pi\delta t_1)$	$+I_y \sin(2\pi\delta t_1)$	$-I_y \cos(2\pi\delta t_1)$	$-I_y \sin(2\pi\delta t_1)$
$^{13}\text{CH}_2$	$+(I_{1y} + I_{2y})\cos[2\pi(\delta_1 + \delta_2)t_1]$	$-(I_{1y} + I_{2y})\cos[2\pi(\delta_1 + \delta_2)t_1]$	$+(I_{1y} + I_{2y})\cos[2\pi(\delta_1 + \delta_2)t_1]$	$-(I_{1y} + I_{2y})\cos[2\pi(\delta_1 + \delta_2)t_1]$
$^{13}\text{CH}_3$	$+(9/4)I_y \cos(6\pi\delta t_1)$ $+(3/4)I_y \cos(2\pi\delta t_1)$	$-(9/4)I_y \sin(6\pi\delta t_1)$ $+(3/4)I_y \sin(2\pi\delta t_1)$	$-(9/4)I_y \cos(6\pi\delta t_1)$ $-(3/4)I_y \cos(2\pi\delta t_1)$	$+(9/4)I_y \sin(6\pi\delta t_1)$ $-(3/4)I_y \sin(2\pi\delta t_1)$

вающиеся во время t_1 . Необходимо отметить, что частота прецессии групп $^{13}\text{CH}_n$ пропорциональна числу присоединенных протонов n . Выделить подспектры индивидуальных групп $^{13}\text{CH}_n$ можно так же, как и в одномерных экспериментах. Более того, при соответствующем режиме съемки, таком как TPPI (Time-proportional Phase Incrementation),⁵¹ можно разделять резонансные сигналы различных групп $^{13}\text{CH}_n$.⁴⁴

Разделение когерентностей с использованием режима TPPI. Методику TPPI широко используют в фазочувствительном двумерном эксперименте для достижения эффекта квадратного детектирования в измерении F_1 .⁵¹ В экспериментах 2M MAXY режим TPPI достигается за счет увеличения фаз смещающих импульсов $90^\circ\phi$ (^1H) и $180^\circ\phi$ (^1H) с шагом соответственно 90° и 45° , начиная с 0° для неселективного эксперимента. Увеличение фазы смещающего импульса на 90° сдвигает фазу на -90° для SQ, на -180° для DQ и на -270° ($+90^\circ$) для TQ соответственно, что эквивалентно изменению несущей частоты⁴ для соответствующей когерентности. Таким образом, любую квантовую когерентность можно разделять и маркировать по частоте в соответствии с числом протонов в группах $^{13}\text{CH}_n$. Эти изменения можно проследить после каждого изменения фазы (табл. 4).

При изменении фазы $2\pi\delta t_1$ на 90° функции $\cos(2\pi\delta t_1)$ и $\sin(2\pi\delta t_1)$ для одно- и трехквантовых когерентностей по ^1H в различных экспериментах будут иметь разные знаки циклирования ($++--$ для SQ и $+-+-$ для TQ), соответствующие изменению фазы на -90° и $+90^\circ$; для гомоядерных двухквантовых когерентностей системы $^{13}\text{CH}_2$ функция $\cos(2\pi\delta t_1)$ будет иметь знаки ($+-+-$) вследствие изменения фазы частоты на 180° . На сигналы ядер ^1H , не связанных с ^{13}C , режим TPPI не влияет. После соответствующего преобразования Фурье одноквантовые когерентности групп ^{13}CH и $^{13}\text{CH}_3$ появляются вдоль прямой под углом 45° к оси F_1 , а сигналы трехквантовых когерентностей — вдоль прямой под углом -71.56° относительно этой оси. Пики двух- и нульквантовых когерентностей появляются при

$$\omega' = |\omega_1 + \omega_2|,$$

(ω_1 и ω_2 — частоты химических сдвигов одноквантовых когерентностей) в соответствии с несущей частотой при высшей и низшей частотах в спектральном окне F_1 . Таким образом, в измерении F_1 полный спектр делится на четыре части. Верхняя часть — DQ COSY-спектр протонов групп $^{13}\text{CH}_2$, средняя часть — COSY-спектр протонов групп ^{13}CH и $^{13}\text{CH}_3$, нижняя часть — TQ COSY-спектр протонов групп $^{13}\text{CH}_3$, а также любых неподавленных резонансов от групп XH_n ($X \neq ^{13}\text{C}$) (ZQ-спектр), находящихся вдоль нижней границы по F_1 . Положение сигналов $^{13}\text{CH}_2$ и XH_n можно поменять местами, уменьшив фазу импульса 90°_ϕ (^1H) и увеличив фазу импульса 180°_ϕ (^1H) с шагом соответственно 45° и 90° . В общем случае за счет этого наблюдаемый сигнал усиливается в соответствии с выражением $I_y \cos(m\pi) \cos(n2\pi\delta t_1 - n\pi/2)$, где m — число приращений фазы. Для селективных измерений схему TPPI можно применять к импульсам 90°_ϕ (^1H) и 180°_ϕ (^1H) с увеличением фазы на $90^\circ/n$ и $90^\circ/2n$ соответственно.

MAXY – TOCSY. Перенос намагниченности от спина (I_i) к взаимодействующим с ним ядрам I_j может осуществляться по гомоядерному механизму Хартмана – Ханна.^{51, 53 – 58}

Этого легко достичь за счет дополнительного переноса намагниченности перед сбором данных, применив последовательность TOCSY.⁴⁴

MAXY – NOESY. Если перед сбором данных использовать схему $90^\circ_x(^1\text{H}) - t_m - 90^\circ_x(^1\text{H})$, то можно получить кросски благодаря ядерному эффекту Оверхаузера (Nuclear Overhauser Effect (NOE)) или процессам химического обмена.⁴⁴ Для спиновой системы, включающей $^{12}\text{C} - ^1\text{H}_A - ^{13}\text{C} - ^1\text{H}_B$, первый импульс будет преобразовывать когерентность в продольную намагниченность как I_{zB} и $I_{zA} \cos(\omega t_1)$ соответственно. Перенос намагниченности NOE происходит в период смешивания различных состояний связанной спиновой системы. Конечный $90^\circ_x(^1\text{H})$ импульс восстанавливает одноквантовую когерентность спина I . Наблюдаемый NOE кросс-пик, соответствующий переносу когерентности от протона H_B к H_A , определяется как

$$I_A = I \cos(\omega_B t_1) \left\{ \frac{\sigma_{AB}}{(\lambda_1 - \lambda_2) [\exp(-\lambda_1 t_m) - \exp(-\lambda_2 t_m)]} \right\},$$

где $\lambda_{1,2} = (1/2)\{(R_A + R_B) \pm [(R_A - R_B)^2 + 4\sigma_{AB}\sigma_{BA}]^{1/2}\}$, σ_{AB} и σ_{BA} — скорости кросс-релаксации соответственно от А к В (AB) и от В к А (BA), R — скорость продольной релаксации, включая все члены, кроме скорости кросс-релаксации σ_{AB} . Для расчета максимально возможного NOE следует дифференцировать приведенное выше уравнение по t_m . Примем, что

$$R_A = R_B = 2\sigma_{AB} = 2\sigma_{BA},$$

$$\lambda_1 = 3\sigma,$$

$$\lambda_2 = \sigma.$$

Тогда

$$t_m(\text{max}) = \frac{\ln 3}{2\sigma} \approx 1.1 T_1.$$

Если

$$\frac{\sigma_{AB}}{\lambda_1 - \lambda_2} = 0.5,$$

то максимальный эффект NOE составит

$$I_{\text{cross}}(\text{max}) = -0.19 I_{zB}(t_1).$$

Спектры, полученные с использованием методик MAXY – TOCSY и MAXY – NOESY, включают информацию о типе спиновой системы при условии, что два спина участвуют в диполь-дипольном взаимодействии.

4. Селективная одномерная J-спектроскопия. MAXY – JRES

С помощью J-спектроскопии можно разделить химические сдвиги и найти константы спин-спиновой взаимодействия, определив F_1 и F_2 соответственно.^{3, 59} При этом появляется возможность получить одномерный спектр с широкополосной развязкой, проецируя его на измерение F_2 . Однако для сложных образцов, например биологических жидкостей,^{60, 61} применение данного метода ограничено из-за интенсивного перекрытия спектральных линий. Чтобы увеличить разрешение и улучшить форму линии, применяют такие методики,

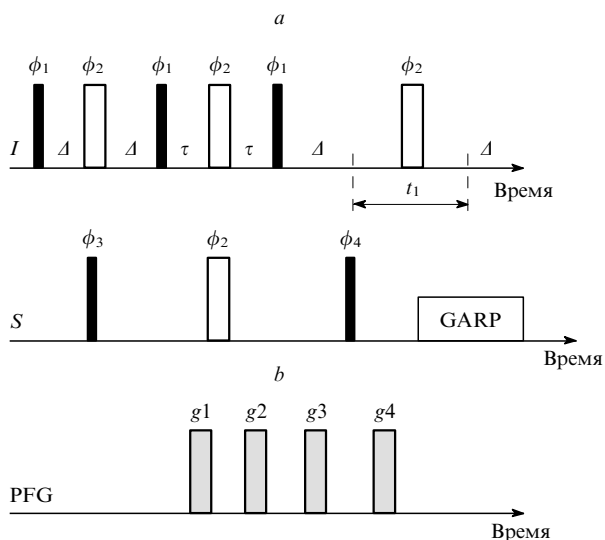


Рис. 11. Последовательность РЧ-импульсов (а) и PFG (b) в методике MAXY – JRES.

Задержка Δ равна 1/(2¹J_{CH}); τ — короткая задержка для компенсации фазы импульса, t₁ — время, на которое увеличивается эволюция намагниченности. Фазы импульсов циклически изменяются по следующей схеме: φ₁ = 0°; φ₂ = 90°; φ₃ = 0°, 180°; φ₄ = 0°, 0°, 180°, 180°.

как псевдоэховзвешивание,⁶² эксперименты с «обращением времени»⁶³ и другие методики,^{64, 65} специальные способы обработки спектров,^{65, 66} а также трехмерную спектроскопию JRES – COSY (JRES — J Relay Selective).^{67, 68} Методику MAXY можно успешно использовать для получения J-спектров каждой из групп ¹³CH, ¹³CH₂, ¹³CH₃.⁴⁵ Импульсная последовательность MAXY – JRES представлена на рис. 11. Преимуществом методики MAXY является возможность применения импульсов градиентов магнитного поля для разделения подспектров групп CH_n. Отношение величин градиентов g1 : g2 : g3 : g4 следующее:

Неселективный спектр	¹³ CH + ¹³ CH ₃	¹³ CH	¹³ CH ₂	¹³ CH ₃
1 : 1 : 4 : 5	1 : (-1) : 2 : 4	1 : (-1) : 2 : 4	1 : (-1) : 2 : 6	1 : (-1) : 2 : 8

Получить селективный спектр группы ¹³CH_n можно также с использованием схемы фазового циклирования.

5. Двумерная корреляционная спектроскопия геминальных протонов

Применив двумерный метод, показывающий корреляцию только между геминальными протонами метиленовых групп, можно упростить спектр COSY и отнесение сигналов.^{37, 38, 44, 47} Авторы работы³⁷ предложили две импульсные последовательности gem-COSY – MQ (рис. 12,а) и gem-COSY – PT (рис. 12,б), основанные на последовательностях обратный DEPT-90 (см.³¹) и обратный INEPT-1/(2¹J_{CH}) (см.³³) соответственно. Методики модифицированы таким образом, чтобы перенос намагниченности H → ¹³C → H ограничивался взаимодействиями в пределах одной связи. Для спиновой системы I₁ – S – I₂ в обеих импульсных последовательностях начальный импульс возбуждения 90°(I) создает отрицательную намагниченность по оси y спина I₁ (-I_{1y}).³⁷

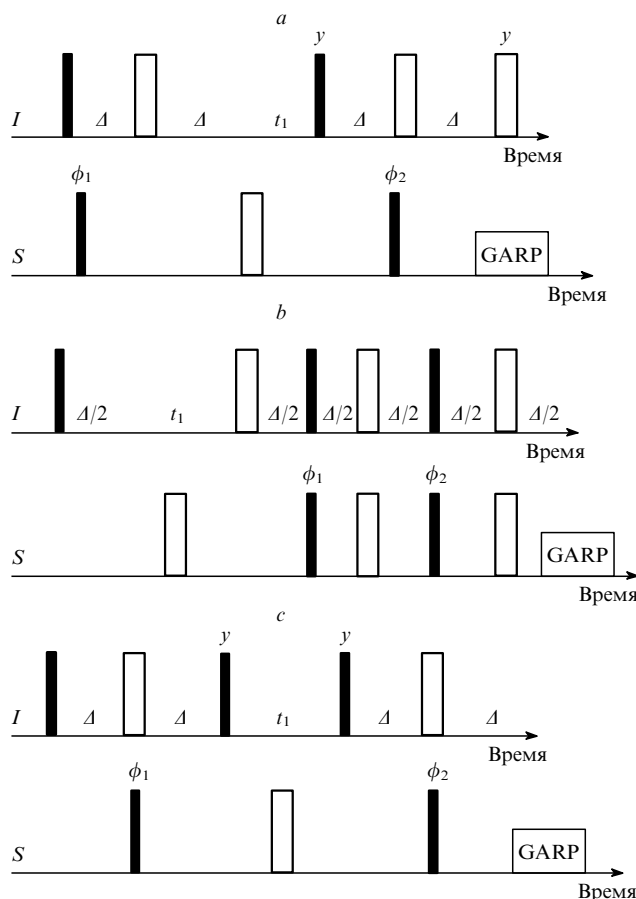


Рис. 12. Импульсные последовательности gem-COSY – MQ (а), gem-COSY – PT (Polarization Transfer) (b) и gem-COSY на основе последовательности MAXY (с).

После периодов эволюции и смешивания выражения для наблюдаемых сигналов имеют вид:

$$\sigma = -I_{2y}\cos(2\pi\delta_1t_1)\cos(\pi J_{12}t_1)\text{Pcos}(\pi J_{1j}t_1) + 2I_{1x}I_{2z}\cos(2\pi\delta_1t_1)\sin(\pi J_{12}t_1)\text{Pcos}(\pi J_{1j}t_1), \quad (9)$$

$$\sigma = -I_{2x}\cos(2\pi\delta_1t_1)\cos(\pi J_{12}t_1)\text{Pcos}(\pi J_{1j}t_1) - 2I_{1z}I_{2y}\cos(2\pi\delta_1t_1)\sin(\pi J_{12}t_1)\text{Pcos}(\pi J_{1j}t_1) \quad (10)$$

(σ — оператор плотности). Уравнение (10) отражает двойной перенос намагниченности I₁ → S → I₂, который и дает кросс-пик, эквивалентный аналогичному пику в спектре COSY, за исключением того, что имеет вид синфазного дублета (J₁₂) в обоих частотных измерениях. Уравнение (10) отражает обратный перенос намагниченности I₁ → S → I₁, который дает двойной диагональный пик дисперсии с противофазным расщеплением (J₁₂). Пассивное взаимодействие ¹H – ¹H, описываемое выражением Pcos(πJ_{1j}t₁), означает то же, что и в обычном COSY.³⁷ Альтернативный способ получения спектра gem-COSY заключается в модификации последовательности 2M MAXY (рис. 12,с).^{44, 47} Если использовать схему 90_x^(1H) – Δ – 90_x^(13C) 180_x^(1H) – Δ – 90_y^(1H), то спиновые системы ¹³CH_n будут возбуждаться до второго максимально возможного квантового порядка (n для ¹³CH_n или n – 1 для ¹H) как показано ниже:

для ^{13}CH

$$I_z \longrightarrow +2I_z S_y \text{ (SQ)},$$

для $^{13}\text{CH}_2$

$$I_z \longrightarrow -4I_z I_x S_x \text{ (DQ)},$$

для $^{13}\text{CH}_3$

$$I_z \longrightarrow -8I_x I_x I_z S_y \text{ (TQ)}.$$

Изменение в последовательности MAXY заключается в том, что второй импульс $90^\circ(^1\text{H})$ прикладывают по оси y , поэтому когерентность от спина I_1 переносится к I_2 во время подготовительного периода. В конце периода эволюции когерентности получаем:

для ^{13}CH одноквантовая когерентность

$$+2I_z S_y,$$

для $^{13}\text{CH}_2$ двухквантовая когерентность

$$4I_z I_y S_x \cos(2\pi\delta_2 t_1) \cos(\pi J_{12} t_1) \cdot \\ \cdot \text{Pcos}(\pi J_{1j} t_1 + 2I_z S_x \cos(2\pi\delta_2 t_1) \sin(\pi J_{12} t_1)),$$

для $^{13}\text{CH}_3$ трехквантовая когерентность

$$-8I_y I_z S_y \sin^2(2\pi\delta_2 t_1) \text{Pcos}^2(\pi J_{1j} t_1).$$

После применения схемы смешивания $90^\circ(^1\text{H}) - \Delta - 90^\circ(^{13}\text{C}) - 180^\circ(^1\text{H}) - \Delta$ наблюдаемая одноквантовая когерентность составляет:

для ^{13}CH

$$+I_y,$$

для $^{13}\text{CH}_2$

$$+I_y \cos(2\pi\delta_2 t_1) \cos(\pi J_{12} t_1) \text{Pcos}(\pi J_{1j} t_1) - \\ -2I_z I_x \cos(2\pi\delta_2 t_1) \sin(\pi J_{12} t_1),$$

для $^{13}\text{CH}_3$

$$-(1/2)I_y [\cos(4\pi\delta_2 t_1) + 1] \text{Pcos}^2(\pi J_{1j} t_1).$$

Сигналы групп ^{13}CH появляются в районе нулевой частоты нижнего диапазона частот в измерении F_1 , а сигналы группы $^{13}\text{CH}_3$ будут проявляться в виде двух пиков, соответствующих двум- и нульквантовым когерентностям с одной и той же начальной интенсивностью в измерении F_1 . Для групп $^{13}\text{CH}_2$ первое слагаемое описывает перенос $I_1 \rightarrow I_2 S(t_1) \rightarrow I_1(t_2)$, который дает кросс-пик, эквивалентный аналогичному пику в обычном COSY-спектре за исключением того, что мультиплеты находятся в одинаковых фазах в обоих измерениях. Второе слагаемое описывает перенос $I_1 \rightarrow I_2 S(t_1) \rightarrow I_2(t_2)$, приводящий к появлению диагональных пиков в виде дисперсионных дублетов. Если фаза последнего импульса $90^\circ(^1\text{H})$ изменяется по оси x , то знак кросс-пика группы CH_2 не меняется, в то время как знаки пиков других групп изменяются. Это открывает еще один путь для получения спектров gem-COSY с подавлением диагональных пиков (как и в спектре 2M MAXY).

В экспериментах gem-COSY можно использовать переносы TOCSY и NOESY. При использовании методики MAXY диагональные пики подавляются лучше, чем в оригинальном методе MQ. Сигналы протонов групп ^{13}CH , $^{13}\text{CH}_2$, $^{13}\text{CH}_3$ наблюдаются раздельно в разных частях спектра. Протоны группы $^{13}\text{CH}_2$ дают нормальный геминальный спектр gem-COSY. Сигналы протонов группы $^{13}\text{CH}_3$ появляются в правой нижней области спектра. Пики ^{13}CH расположены вдоль нижней части спектра вместе с нульквантовой когерентностью протонов группы $^{13}\text{CH}_3$. Метод двумерной корреляционной спектроскопии геминальных

протонов оказался полезным для анализа спектров больших молекул⁴⁷ и обеспечивает подход для редактирования спектров ^1H , альтернативный стандартному методу редактирования.

6. Измерение констант спин-спинового взаимодействия с использованием экспериментов MAXY

Константа спин-спинового взаимодействия — один из наиболее важных параметров в спектроскопии ЯМР, который широко используют в конформационном анализе сложных молекул и при структурном моделировании.^{2, 4, 69–74}

Для спектров первого порядка или симметричных систем КССВ могут быть измерены непосредственно в спектре. Однако в случае сложных молекул из-за перекрывания сигналов выполнить отнесение линий в спектрах очень сложно.

С использованием методики MAXY можно получать двумерные подспектры групп $^{13}\text{CH}_n$ отдельно или разделять спектры на области в соответствии с числом протонов (n), присоединенных к ^{13}C , т.е. существенно снизить степень перекрывания сигналов. Например, в работе⁷⁵ рассмотрено применение 2M MAXY для определения КССВ в молекуле нейротензина. Несмотря на то что нейротензин довольно короткий пептид, резонансы ^1H в его спектре ЯМР сильно перекрываются, особенно в области низких частот. Применяя метод 2M MAXY с корреляцией только групп $^{13}\text{CH}_2$, можно улучшить разрешение большинства из перекрывающихся пиков, включая пики от β -протонов.

7. Измерение коэффициентов самодиффузии

В настоящее время широко распространена методика измерения коэффициентов самодиффузии с использованием градиентов импульсов магнитного поля, предложенная авторами работы⁷⁶.

После введения импульсной последовательности с задержкой продольного вихревого потока (Longitudinal Eddy Current Delay (LED)) и концепции диффузионно-упорядоченной спектроскопии появилась возможность определять коэффициенты диффузии, связанные с каждым резонансным сигналом в спектре ЯМР высокого разрешения. Поэтому повысился интерес исследователей к измерению коэффициентов диффузии с использованием спектроскопии ЯМР.^{77–87} Полученные коэффициенты диффузии использовали, например, в экспериментах по изучению распределения размеров пузырьков в фосфолипидах,⁸² распределения молекулярных масс полимеров,⁸³ при анализе сложной смеси из клеточных экстрактов,⁸⁵ ассоциации белков,⁸⁶ агрегации молекул инсулина⁸⁷ и связывания белков с лекарственными препаратами.^{88–107} Редактирование одномерных и двумерных спектров ЯМР биологических жидкостей, основанное на различиях молекулярных коэффициентов диффузии и временах релаксации, возможно с использованием методик DIRE (Diffusion Relaxation), DETOCSY (Delay TOCSY)¹⁰⁸ и усовершенствованных двумерных методик типа HETCOR (Heteronuclear Correlation Spectroscopy), COSY и NOESY.^{109–111}

В оригинальном эксперименте PFG-SE (Pulse Field Gradient Spin Echo) ослабление сигнала может быть описано уравнением⁷⁶

$$\ln \frac{A(g)}{A(0)} = -\gamma^2 D \left[\frac{2g_0^2 \tau^3}{3} + g g_0 \delta \left(\frac{3\tau^2}{2} - \frac{\delta^2}{6} \right) + \right. \\ \left. + g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right] - \frac{2\tau}{T_2}. \quad (11)$$

Здесь $A(g)$ и $A(0)$ — интенсивности сигналов при наличии и в отсутствие PFG, γ — гиромагнитное отношение для данного

спина, D — коэффициент диффузии молекулы, g_0 — сила фонового градиента магнитного поля, g и δ — сила и продолжительность градиентного импульса прямоугольной формы, Δ — время между начальными точками двух импульсов градиентов (время диффузии), 2τ — общее время спинового эха, T_2 — время поперечной релаксации. Если

$$g_0^2 = \tau^3 \ll g^2 \delta^2 \Delta,$$

то уравнение (11) упрощается

$$\ln \frac{A(g)}{A(0)} = -\gamma^2 D g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) - \frac{2\tau}{T_2}. \quad (12)$$

Данное уравнение известно как уравнение Стейкзала–Таннера для измерения коэффициентов диффузии.

Если получить ряд спектров с различными силами градиента и построить зависимость натурального логарифма амплитуды сигнала от $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$, то получим прямую, наклон которой равен коэффициенту самодиффузии. Чтобы найти точные значения D , необходимо ослабить сигнал ЯМР. Этого можно достичь, если использовать широкий диапазон импульсов градиентов. Для медленно диффундирующих частиц значения градиентов могут иметь порядок 1000–2000 мТл·м⁻¹.

В исследуемом образце ЯМР в течение эксперимента могут индуцироваться переменные вихревые потоки, осложняющие точное детектирование сигнала ЯМР.¹¹² Тот же диапазон значений параметра $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$ может быть получен при использовании малых значений градиентов с компенсацией переменных вихревых потоков за счет более длительного времени диффузии.^{113, 114} Однако в таком случае вследствие спиновой релаксации может понизиться чувствительность.¹¹³

Другой способ увеличения силы градиента состоит в использовании того факта, что эффект расфазирования/перезафазирования импульсов градиентов также зависит от квантового порядка спиновых систем, подвергшихся воздействию¹¹⁵ градиентов в течение действия многократной квантовой последовательности. В этом случае эффективное гироманнитное отношение γ_{ef} является суммой значений γ спинов, участвующих в когерентности. В случае гомоядерной двухквантовой последовательности $\gamma_{\text{ef}} = 2\gamma$, поэтому происходит двукратное повышение силы градиента и четырехкратное понижение коэффициента диффузии, который можно измерить.^{116–120} Диффузионное рассеивание продольных порядков спинов $2I_z I_z$ и $4I_z I_z I_z$ перпендикулярно направлению градиента было исследовано в работах^{118, 119}. Показано, что система $2I_z I_z$ имеет эффективные гироманнитные отношения 2γ и 0, а система $4I_z I_z I_z$ — 3γ и γ .

Методика МАХУ была адаптирована^{43–46, 121–123} для определения диффузионного изменения максимального квантового порядка спинового оператора $8I_x I_y I_z S_y$ для спиновой системы $^{13}\text{C}^1\text{H}_3$ (SI_3), имеющей четыре эффективных гироманнитных отношения — $(3\gamma_{\text{H}} + \gamma_{\text{C}})$, $(3\gamma_{\text{H}} - \gamma_{\text{C}})$, $(\gamma_{\text{H}} + \gamma_{\text{C}})$ и $(\gamma_{\text{H}} - \gamma_{\text{C}})$, соответствующие четырем многоквантовым уровням из возможных комбинаций индивидуальных спиновых состояний. Многоквантовые когерентности могут быть преобразованы в наблюдаемые одноквантовые когерентности, причем, используя импульсы градиентов поля, каждую из четырех многоквантовых когерентностей можно получить отдельно. Диффузионное изменение каждой из этих когерентностей также может быть измерено отдельно.^{43–46}

В работе¹²⁴ рассмотрена оригинальная методика, позволяющая сократить продолжительность трехмерных экспериментов. Импульсная последовательность представлена на рис. 13. Модификация методики МАХУ заключается в добавлении периода диффузии и диффузионных градиентных

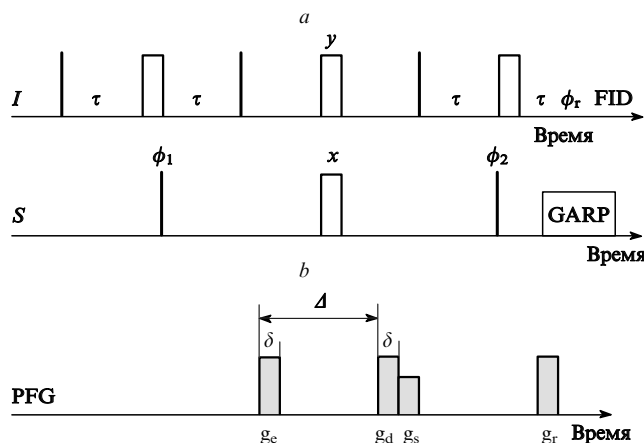


Рис. 13. Последовательности РЧ-импульсов (а) и PFG (b) в модифицированной методике МАХУ для измерения коэффициентов диффузии.

Фазы импульсов во вращающейся системе координат располагаются вдоль оси x , если не указано иначе, т.е. $\phi_1 = x, -x; \phi_2 = x, x, -x, -x; \phi_r = -y, y, y, -y$. Задержка τ равна 3.85 мс; время Δ фиксировано (50 мс); FID — Free Induction Decay (спад свободной индукции); g_e, g_d, g_s, g_r см. в тексте.

импульсов — кодирующего g_e и декодирующего g_d . Амплитуды импульсов для выбора когерентностей и считывания (g_s и g_r соответственно) выбирают согласно желаемому квантовому порядку и фиксируют. Интервал τ устанавливают равным $1/(2^1 J_{SI})$; такой период задержки слишком короткий для того, чтобы произошла существенная гомоядерная J -прецессия.¹²⁵

Описанная импульсная последовательность была применена для определения коэффициентов диффузии при исследовании D,L-аланина.¹²⁶

Большинство методов измерения коэффициентов диффузии¹²⁷ относительно длительны, поскольку включают серию экспериментов, или двумерный эксперимент DOSY (Diffusion-Order Spectroscopy). В работе¹²⁸ предложен метод определения коэффициентов диффузии в одном эксперименте (сканирования), названный 1D DOSY (одномерная диффузионно-упорядоченная спектроскопия). Суть метода заключается в применении пространственной вариации параметров традиционной импульсной последовательности STE (Stimulated Echo)⁷⁸ таким образом, чтобы все сканирования, необходимые для определения данного физического параметра, могли быть проведены одновременно в различных частях образца. Спектр записывают при наличии слабого считывающего градиента, поэтому форма линии содержит необходимую информацию. Для хорошо разрешенных спектров с высоким отношением сигнал/шум метод позволяет сократить время эксперимента на порядок (до 1 с), что важно при исследовании образцов, быстро меняющихся во времени.

Диффузия, релаксация и прецессия спин-спиновой взаимодействия непосредственно влияют на точность измерения коэффициентов. Большее значение Δ допускает меньшую силу или длительность градиента, однако из-за ослабления сигнала, вызванного поперечной релаксацией $\exp(-\Delta/T_2^2)$, происходит уменьшение отношения сигнал/шум. Для компенсации потери чувствительности необходимо снимать больше спектров, что увеличивает длительность эксперимента.

Таким образом, методы на основе последовательности МАХУ можно успешно применять на спектрометрах с низкой силой градиента, а также невысоким магнитным полем

для измерения малых коэффициентов диффузии (в макромолекулах и молекулярных ансамблях). Ослабление сигнала, вызванное самодиффузией, можно наблюдать или одновременно для всех когерентностей с использованием 2М-спектроскопии, или для одной когерентности с использованием импульсов градиентов магнитного поля. Чувствительность таких методов в случае систем с естественным содержанием ^{13}C низкая. Однако они могут быть полезны для измерения коэффициентов диффузии молекул, меченных ^{13}C , в сложных смесях, таких как биологические жидкости или клеточные экстракты.

Вернемся к уравнению (11). Если условие $g_0^2\tau^3 \ll g^2\delta^2\Delta$ не выполняется, то необходимо учитывать эффект фонового градиента. На точности измерения отрицательно сказываются два фактора: наличие фонового градиента и тепловой конвекции. Фоновый градиент обусловлен неоднородностью статического магнитного поля образца, которую можно устранить с помощью методики спинового эха.^{88–90} Этот подход широко используют для измерения времен поперечной релаксации. Тепловая конвекция особенно сильно проявляется, если эксперимент проводят при высокой температуре.

Чтобы получить надежные коэффициенты диффузии метаболитов в биологических жидкостях, необходимо измерять коэффициенты диффузии при физиологической температуре.^{80,81} Поскольку в большинстве спектрометров ЯМР для поддержания температуры используют поток газа (азота или воздуха), поступающего снизу, то в образце возникает температурный градиент, который обуславливает возникновение конвекционного потока. Кроме того, температурные градиенты, зависящие от времени, возникают в моменты переключения импульсов градиентов.

Проблемы конвекции анализировали Карр и Парселл в ранних исследованиях эффекта спинового эха и диффузии.⁹¹ В градиентных экспериментах с использованием множест-

венного спинового эха при наличии конвекционных токов амплитуды сигналов четных эхо больше, чем нечетных. Это происходит потому, что эффект температурной конвекции во время нечетного эха компенсируется в период четного эха. Поэтому самый простой метод — измерять сигналы только четных эхо. Этот принцип применен в методе стимулированного спинового эха (PFG – STE (Stimulated Echo)) и его вариациях, в которых используют удвоение импульсной последовательности.^{93,94} Необходимо отметить, что диффузионные градиенты в последовательности PFG – STE и ее вариациях, таких как LED, выполняют функцию выбора когерентности, как в методе градиент-улучшенной спектроскопии ЯМР.

Известно, что при использовании градиентов для выбора когерентностей чувствительность метода понижается вдвое. Удвоение последовательностей STE и LED приводит к понижению чувствительности еще вдвое, т.е. суммарно в 4 раза. Это эквивалентно сокращению поперечной релаксации на период $1.4 T_2$. Для спинов метаболитов в биологических жидкостях T_2 находится в интервале от нескольких сотен миллисекунд до нескольких секунд, поэтому можно ожидать, что термокомпенсационный метод, основанный на двойной последовательности PFG – SE для времен диффузии, меньших T_2 , будет более чувствительным, чем метод с переносом когерентности.

В методе Карра – Парселла – Мейбума – Гилла (CPMG)^{97,98} спиновое эхо используют для измерения T_2 при времени спиновой стабилизации до нескольких секунд и минимальных фазовых искажениях. Применяя этот метод, можно добиться однородности статического магнитного поля (фоновые градиенты) и компенсировать артефакты от применения неидеальных 180-градусных импульсов. На основе последовательности CPMG создана импульсная последовательность для измерения коэффициентов диффузии при наличии фоновых градиентов и тепловой конвекции (рис. 14,а). Импульс градиента заменен на биполярные им-

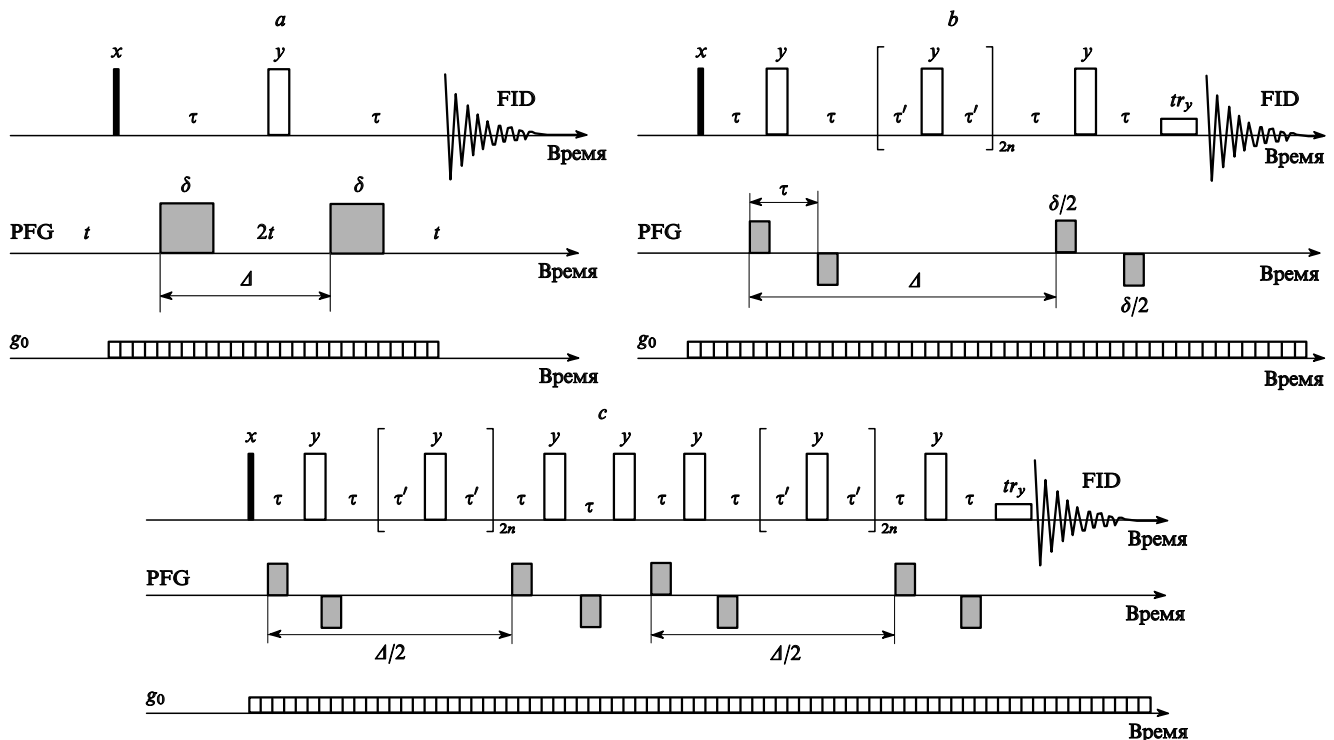


Рис. 14. Последовательности РЧ-импульсов и PFG в методиках спин-эхо (SE) для измерения коэффициентов диффузии (а), MSE (Multiple Spin Echo) (b) и DMSE (c).

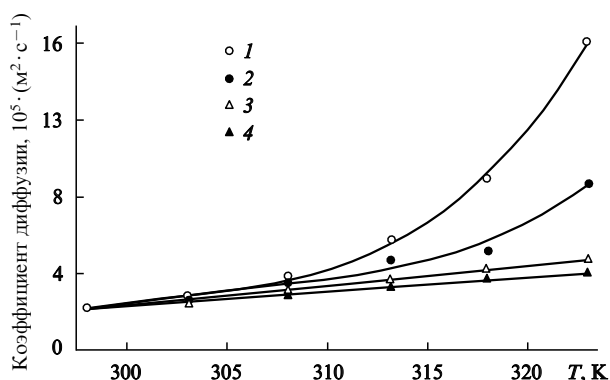


Рис. 15. Коэффициенты диффузии воды, измеренные с использованием методик BP-LED (1), MSE (2) и DMSE (3) в диапазоне 298.2–323.2 К (4 — литературные данные, полученные другими методами).

пульсы (рис. 14,б). Кроме того, вместо одиночного импульса 180° добавлена последовательность импульсов для достижения эффекта множественного спинового эха, что позволяет использовать большие времена диффузии. Под действием завершающего импульса перед сбором данных удаляется дисперсный компонент из детектируемого сигнала. Схема повторена дважды, поэтому названа DMSE (Double Magnetic Spin Echo — двойное PFG спин-эхо) (рис. 14,с). Чтобы все импульсы градиентов были действительно биполярными используют импульс 180° в центре последовательности. Теоретическое описание и результаты тестирования на образцах плазмы крови человека и семенной жидкости приведены в работе¹²³. Результаты сравнивали с данными, полученными с использованием методик BP-LED (Bipolarisation LED)¹⁰⁰ и MSE. Зависимости коэффициентов диффузии от температуры, полученные для этих трех последовательностей, представлены на рис. 15.

Результаты работы¹²³ показали, что с помощью методики DMSE можно эффективно компенсировать тепловую конвекцию. Она нечувствительна к фоновым градиентам. Добавление CPMG-компонента к последовательности DMSE позволяет использовать длительные времена диффузии и подавлять широкие пики ЯМР с коротким временем поперечной релаксации T_2 . Такая возможность спектрального редактирования позволяет использовать DMSE для изучения подвижности молекул в сложных системах. К достоинствам метода можно отнести также хорошую форму сигналов и базовой линии, а также эффективное подавление сигналов воды.

VI. Наблюдение «подводных» сигналов. RECUR NMR

Подавление сигналов воды чрезвычайно важно в спектроскопии ЯМР сложных систем.⁵⁸ В этом отношении основными критериями эффективности являются

- высокая степень подавления пика воды, который в 10^5 – 10^6 раз интенсивнее, чем пики наблюдаемых молекул
- высокая селективность по отношению к сигналам, находящимся близко к сигналу воды;
- малая длительность последовательности эффективного подавления сигнала растворителя, чтобы минимизировать перенос намагниченности к обменивающимся протонам.

Среди методик, в основе которых лежат перечисленные критерии, можно выделить WET (Water Eliminated Transfer)¹²⁹ и WATERGATE (Water Gate);¹³⁰ всем критериям в

наибольшей степени удовлетворяет модифицированная методика WATERGATE.¹³¹ Однако для указанных методов характерен следующий недостаток: резонансные сигналы, находящиеся под сигналом воды («подводные пики»), также подавляются.

При изучении макромолекул были предприняты попытки решить эту проблему с учетом разности времен продольной релаксации (T_1) воды и макромолекулы. Это означает, что при выборе подходящего времени восстановления системы, следующего за схемой инверсии, можно наблюдать сигналы макромолекул.¹³² Для редактирования по T_1 был использован метод HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), модифицированный за счет применения градиентов магнитного поля.¹³³ Метод эффективен при природном содержании ^{13}C или ^{15}N . Если эксперимент повторяют быстро, то сигнал воды может быть частично подавлен вследствие большего времени релаксации по сравнению со временами релаксации для макромолекулы. Эксперименты с использованием HMQC, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) и градиентов магнитного поля дают удовлетворительные результаты без необходимости дальнейшего подавления сигналов воды; однако в случае небольших молекул необходима длительная предварительная задержка, поэтому приходится прибегать к дополнительному подавлению как сигналов воды, так и сигналов ^{12}CH с использованием последовательности BIRD (Bilinear Rotation Decoupling). Наряду с этим можно использовать диффузионный фильтр для ослабления сигналов от диффундирующей воды как, например, в методе DRYCLEAN (Dry Clean).¹³⁴ Однако данные методы неприемлемы при исследовании не крупных молекул метаболитов в биологических жидкостях вследствие близости значений T_1 и коэффициентов диффузии для них и протонов воды.

Кроме указанных, используют также методы, основанные на различиях времен релаксации T_2 между сигналами воды и сигналов наблюдаемых молекул. Такие методы особенно эффективны, если T_2 сигнала воды можно уменьшить, например добавив парамагнитные примеси.¹³⁵

Ряд методик разработан с целью обойти трудности, возникающие в ситуации, когда искомым сигналом является протон А закрыт сигналами других протонов так, что он не может быть возбужден селективно. Главная идея, лежащая в основе этих методик, — возбудить селективно второй протон В, связанный с нужным протоном А. Намагниченность от В и А переносится при использовании последовательности COSY или TOCSY, а второй селективный импульс возбуждает протон А (например, NOE или ROE (Rotating-frame Overhauser Effect)). Применив соответствующие импульсы градиентов магнитного поля, можно устранять нежелательные когерентности в этой схеме. Такие методы^{136–140} были названы gs-1M-CONO (COSY-NOESY), gs-1M-TONO (TOCSY-NOESY) и gs-1M-TORO (TOCSY-ROESY (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy)). Существуют даже методы, известные как gs-1M-ROTO и gs-1M-RORO, где первый шаг достигается переносом ROESY. Однако необходимо иметь в виду, что при использовании в импульсной последовательности нескольких селективных импульсов, их большая длительность может осложнить эксперимент из-за продолжительной релаксации полезного сигнала.

В работе¹³⁸ предложен метод восстановления «подводных» сигналов посредством ЯМР с переносом намагниченности, названный RECUR NMR (Recovering of «Underwater» Resonances NMR). Он основан на модифицированной схеме подавления WATERGATE с последующим переносом намагниченности. Концепция данного метода имеет значительные преимущества перед концепциями других методов.^{136,139} Подавление сигнала воды осуществляется на основе двойной последовательности WATERGATE с пяти-

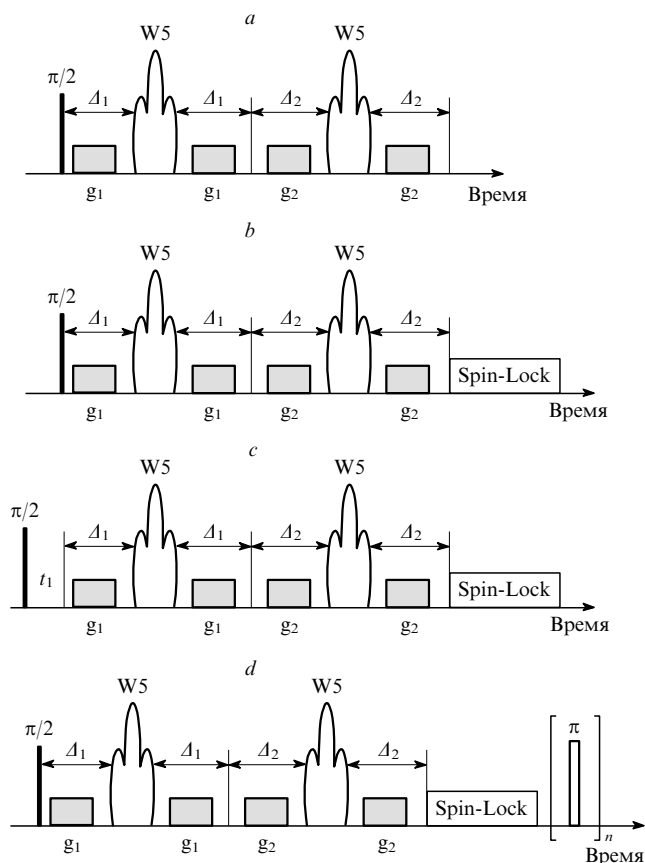


Рис. 16. Стандартная двойная импульсная последовательность WATERGATE-W5 (*a*), одномерная последовательность RECURRENCE-TOCSY (*b*) и двумерная последовательность RECURRENCE-ROESY (*c*), содержащие импульсную последовательность спиновой стабилизации, такую как MLEV-17 или длительный импульс для получения переноса намагниченности типа TOCSY или ROESY для восстановления «подводных» сигналов; *d* — импульсные последовательности RECURRENCE-JRES и RECURRENCE-CPMG; Spin-Lock — спиновый захват.

элементным составным импульсом (W5) как показано на рис. 16,*a*.

«Подводные» сигналы можно восстановить, применив как последовательность TOCSY, так и ROESY, которые осуществляют перенос намагниченности обратно к «подводным» сигналам с использованием скалярных или диполь-дипольных взаимодействий соответственно в одномерных экспериментах (1M) RECURRENCE-TOCSY (рис. 16,*b*). Необходимо отметить, что обе схемы переноса когерентностей приводят к синфазной намагниченности. Поэтому появляется возможность измерять скорость возрастания ROE в одномерном эксперименте с использованием последовательности, представленной на рис. 16,*b*, или используя двумерный эксперимент (рис. 16,*c*). Если ввести схему CPMG перед сбором данных, как показано на рис. 16,*d* (RECURRENCE-CPMG), то можно измерять времена поперечной релаксации любых подводных резонансов. Если вместо указанной схемы применить одиночное спиновое эхо, то последовательность можно использовать для гомоядерной J -спектроскопии ^1H - ^1H (RECURRENCE-JRES).

Импульсная последовательность, представленная на рис. 16,*c* отличается от последовательностей WATERGATE-TOCSY и WATERGATE-ROESY,^{136,139} в которых WATERGATE включена после схемы переноса намагниченности. В этих методиках «подводные» сигналы подавляются, и можно исследовать макромолекулы в

режиме двумерной спектроскопии. Такие последовательности не могут быть использованы в одномерной спектроскопии и не позволяют измерять скорость возрастания ROE или определять T_2 «подводных» сигналов.

Методика RECURRENCE была опробована¹³⁸ на модельной смеси (4:1) D-глюкозы (20 мг·мл⁻¹) и D-галактозы (5 мг·мл⁻¹) в растворе H₂O–D₂O (1:1). Спектры без подавления и с подавлением сигналов воды, полученные с использованием двойной последовательности WATERGATE, представлены на рис. 17,*a,b*. После переноса намагниченности с помощью TOCSY (рис. 17,*c*) или ROESY (рис. 17,*d*) с временами смешивания соответственно 80 мс и 1.5 с «подводные» сигналы полностью восстанавливаются. При использовании последовательности TOCSY перенос намагниченности осуществляется более эффективно. Однако в отсутствие или при слабом спин-спиновом взаимодействии оптимальной является методика RECURRENCE-ROESY.

Для восстановления резонансов индивидуальных групп (например, CH₃) при достаточной концентрации вещества можно использовать последовательность MAXY.^{43,44} С помощью методики RECURRENCE-CPMG были получены следующие времена спин-спиновой релаксации протонов:¹³⁸

Соединение	β -Глюкоза	β -Галактоза	α -Глюкоза	α -Галактоза
Время, с	1.1	1.5	1.3	1.3

Авторы работы¹³⁸ использовали методику 2M RECURRENCE-ROESY при исследовании образца плазмы крови человека для получения межъядерных расстояний в глюкозе.

Методы RECURRENCE-TOCSY и ROESY также можно использовать для спектрального редактирования. Например, при времени спиновой стабилизации 70 мс можно наблюдать

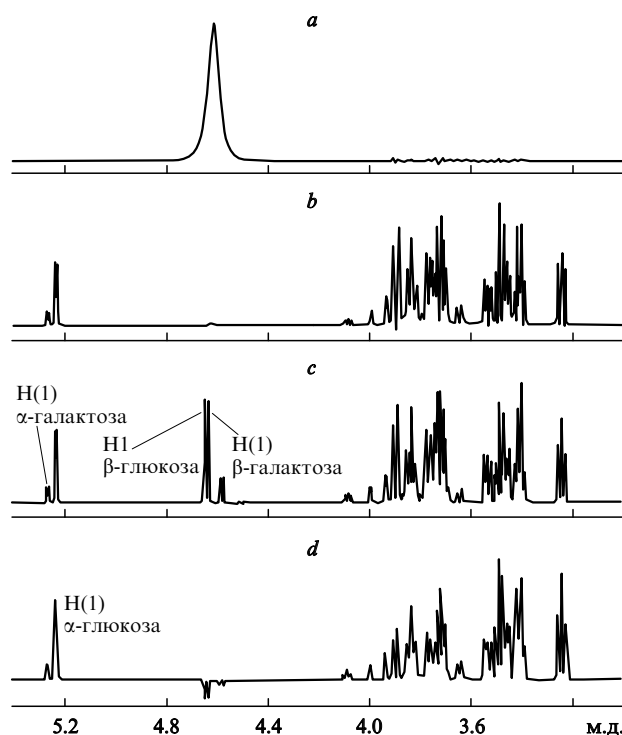


Рис. 17. Одномерные спектры ЯМР D-глюкозы и D-галактозы без подавления (*a*) и с подавлением (*b*) сигналов воды с использованием двойной последовательности WATERGATE.

«Подводные» сигналы от протонов H(1) полностью восстановлены с использованием методик RECURRENCE-TOCSY (*c*) и RECURRENCE-ROESY (*d*).

сигналы наиболее гибких структурных частей липопротеинов, но если это время увеличить до 700 мс, то данные сигналы существенно ослабляются, а сигналы от маленьких молекул метаболитов подавляются в меньшей степени вследствие относительно более длительной релаксации. Использование такого подхода при анализе спектров 2M JRES позволяет выявить (визуализировать) все пики от маленьких молекул, в том числе и «подводные» сигналы. Использование методик TOCSY или ROESY дает возможность измерять T_2 , межъядерный эффект ROE и скорости его возрастания, что важно при исследовании молекулярной структуры и динамики.

VII. Гомоядерные селективные методики

1. Селективный эксперимент COSY

Комбинируя при проведении эксперимента селективные и стандартные «жесткие» импульсы, можно получить новую методологию, которую удобно рассмотреть на примере последовательности COSY.^{141–143}

Импульсная последовательность, представленная на рис. 18, использована при исследовании бруцина (рис. 19). Как видно на диаграмме когерентностей, селективный импульс 90° создает когерентности I^+ и I^- . В период задержки d2, равной $(1/2)J(\text{H,H})$, эволюционирует антифазовая намагниченность $2I_{\text{H}_1}I_{\text{H}_2z}$ протона 2, связанного с первым возбужденным протоном I_{H_1} . Затем под действием «жесткого» 90° -градусного импульса p2 она преобразуется в $2I_{\text{H}_1z}I_{\text{H}_2y}$. Таким образом, в момент приема фазовые намагниченности всех протонов бруцина (см. рис. 19), связанных с селективно возбужденным протоном, эволюционируют и их можно зарегистрировать. В селективном эксперименте COSY (в отличие от обычного эксперимента 2M COSY) спектр можно снять с достаточно высокой точностью, так как посредством селективного импульса мы измеряем только одну строку COSY-матрицы. «Жесткий» импульс 90° создает поперечную намагниченность всех ядер, поэтому сигналы от них могут быть подавлены при фазовом циклировании с минимальным числом шагов (два). В частности, это касается мощных сигналов, например метильных или метоксильных групп, которые мешают анализу мультиплетов. Данная

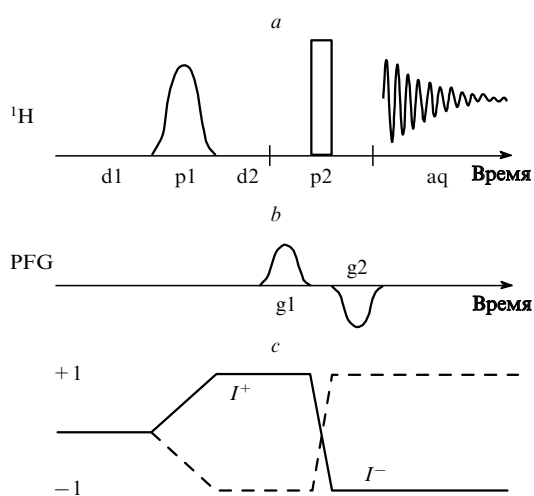


Рис. 18. Последовательности РЧ-импульсов (a) и PFG (b), а также путь когерентности (c) в методике селективного gs-COSY.¹⁴⁴ +1 — переход спиновой системы с низкого на высокий энергетический уровень; -1 — обратный переход.

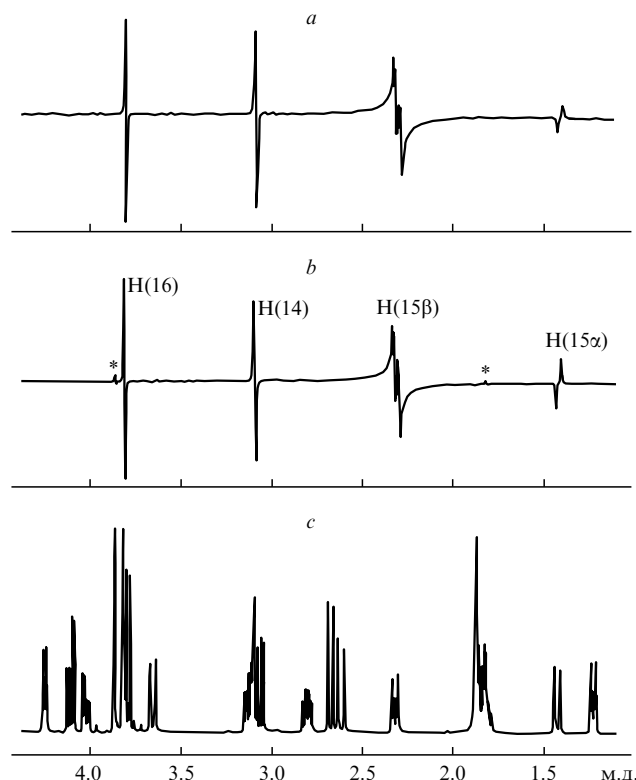


Рис. 19. Спектры бруцина, полученные с помощью селективной последовательности COSY.¹⁶ a — селективное возбуждение H(14), b — селективное возбуждение H(15β) (остаточные артефакты отмечены звездочкой), c — стандартный селективный COSY-спектр.

проблема решается с применением PFG. Под действием градиента g1 расфазированы все когерентности вида I^+ и I^- . Результат действия 90° -градусного «жесткого» импульса на I^+ и I^- следующий:

$$I^+ \xrightarrow{90^\circ I} \frac{1}{2}(I^+ + I^-) + iI_z,$$

$$I^- \xrightarrow{90^\circ I} \frac{1}{2}(I^+ + I^-) - iI_z.$$

Здесь I^- — когерентность, которую можно наблюдать. Она должна быть сдвинута по фазе под влиянием отрицательного градиента после «жесткого» импульса, приводящего к случайным артефактам в спектре 1M COSY. Сигналы, созданные первоначально «жестким» импульсом, будут полностью дефазированы вторым градиентом.

Следует отметить, что градиенты идут по верхней траектории (сигналы с низкой траекторией никогда не достигают приемника), поэтому при использовании градиентного метода с одинаковым числом сканирований сигнал может потерять половину интенсивности. При работе на современных приборах это не является неразрешимой проблемой, поскольку протонная чувствительность при исследовании обычных органических соединений достаточно высока. Другой недостаток рассматриваемой импульсной последовательности заключается в том, что используется градиент ограниченной длительности непосредственно перед приемом данных. Это приводит к большому значению фазового коэффициента. Данный недостаток можно устранить двумя способами: 1) с помощью линейного обратного предсказания, предложенного Бернштейном и Тримбле;¹⁴¹ 2) запро-

граммировать импульс градиента в пределах интервала регистрации. В селективном эксперименте COSY структуры отдельных мультиплетных сигналов обычно представляют больший интерес, чем получение полного 1М-спектра, поэтому каждый мультиплет лучше сфазировать индивидуально.

2. Селективный эксперимент TOCSY

Иной метод селективного возбуждения предложен в работе¹⁴³ для селективного эксперимента TOCSY (рис. 20). Сначала все протоны возбуждаются «жестким» 90° импульсом с последующим расфазированием под влиянием импульсного градиента g_1 . Затем селективный РЧ-импульс 180° изменяет порядок когерентности нужного протона, а перефазирование достигается за счет последующих градиентов g_2 и g_3 . Этот метод имеет практическое преимущество, заключающееся в том, что гораздо проще калибровать селективный импульс 180° , чем селективный импульс 90° . Более того, можно показать, что фаза 180-градусных селективных импульсов относительно «жестких» импульсов не имеет значения. Это позволяет применять селективные импульсы, работающие на специально подобранной частоте заполнения, несколько отличающейся от основной частоты. Следовательно, можно использовать только одну частоту при изменении частотного диапазона спектрального окна и всех исследуемых протонов. После второго импульса градиента используют спиновую стабилизацию MLEV-16, которая в дальнейшем сохраняет порядок когерентности. Перефазирование конечного градиента выполняют, применяя последовательность задержка – импульс 180° – специальный набор импульсов градиентов. Однако с помощью этих методов нельзя решить проблемы, возникающие из-за смешивания антифазовых компонентов в пределах одного мультиплета. Поэтому корректное определение КССВ затруднено.

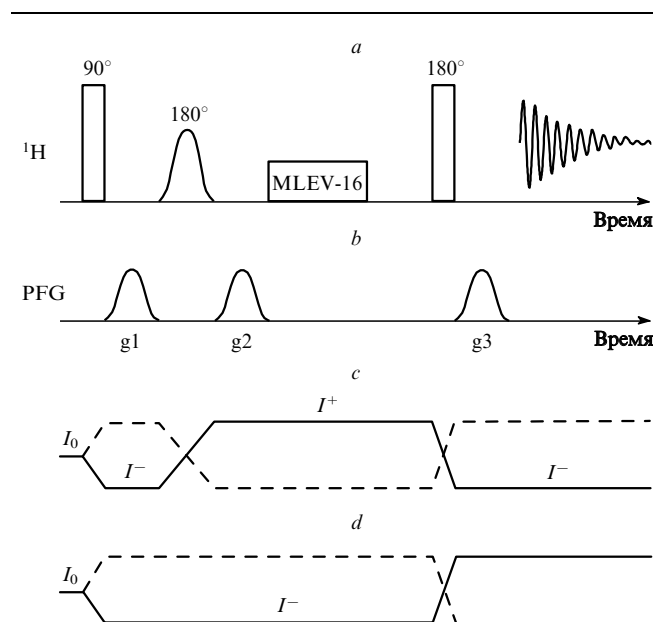


Рис. 20. Последовательности РЧ-импульсов (а) и PFG (b), а также пути когерентности возбужденной (с) и невозбужденной (d) селективным импульсом, в методике gs-SELTOCSY (Selective TOCSY).

3. Эхо-спектроскопия двойного импульсного градиента магнитного поля

В некоторых методах используют селективные импульсы и градиенты не для возбуждения определенных сигналов, а для фильтрации нежелательных намагниченностей. Например, в методике WATERGATE¹⁴⁴ используют последовательность импульсов, представленную на рис. 21.

Для подавления ненужного сигнала (например, очень часто это сигнал воды) вместе с двумя полевыми градиентами применяют «жесткий» (р3) импульс 180° и селективный импульс 180° . Последний часто состоит из двух 90-градусных импульсов р2 и р4. Таким образом, резонансный сигнал воды подвергается воздействию эффективного импульса 360° , все другие сигналы возбуждаются только импульсом 180° , т.е. подвергаются воздействию двух градиентов одного и того же знака. В некоторых приложениях этой методики селективные импульсы заменены биномиальной последовательностью. Принцип WATERGATE применялся в ряде импульсных методик, известных под названием PHOCSY (Pulse Homonuclear Gradient Spectroscopy), которая с их помощью можно обнаружить молекулы связанной воды в белках.^{145–148}

Хванг и Шака¹⁶ показали, что дублирование импульсной последовательности, приведенной на рис. 21, не только обеспечивает подавление, но и улучшает фазовый режим, однако это улучшение достигается за счет уменьшения общей релаксации намагниченности за время действия двух одинаковых наборов импульсов градиентов.

Последовательность, представленную на рис. 21, можно использовать для улучшения других импульсных методик. Некоторые из них оказались очень плодотворны для органической химии, например, NOE разностная спектроскопия. Авторы работы¹⁴⁹ предложили методику GOESY (Gradient Overhauser Effect Spectroscopy), которая оказалась гораздо более совершенной, чем DPGFSE (Double Pulse Field Gradient Spin Echo).

Если скорость инверсии молекулы такова, что эффекты NOE становятся незначительными или нулевыми, то в эксперименте обычно используют вращающуюся систему координат, при этом спины блокируются слабым РЧ-полем. Существует ряд селективных методик, в которых также используется блокировка спина. Одна из них — GROESY (Gradient Rotation Overhauser Effect Spectroscopy)¹⁵⁰ похожа на методику 1М TOCSY, однако применяемая блокировка спина гораздо слабее. Такие последовательности включены в метод селективного ретранслированного COSY.^{150–156}

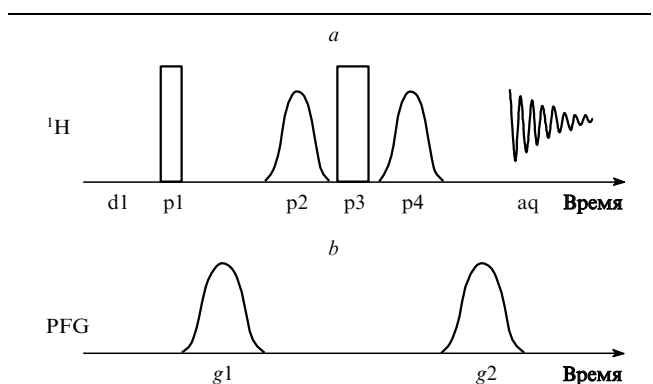


Рис. 21. Последовательности РЧ-импульсов (а) и PFG (b) для схемы подавления сигналов воды WATERGATE.

4. Эксперименты по исследованию связи С—С

Методики типа INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment) используют для изучения спин-спинового взаимодействия С—С, для установления связности спиновой системы, а в случае дальних связей — для анализа структуры молекул. При исследовании органических веществ в экспериментах 2M INADEQUATE получают очень ценную информацию.¹⁵⁷ На практике часто у экспериментатора изучаемое вещество имеется в очень малом количестве. Чтобы получить правильные результаты в эксперименте 2M INADEQUATE в конечном углеродном спектре после одиночного импульса 90° необходимо иметь отношение сигнал/шум не менее 30:1. Селективную методику 1M INADEQUATE называют SELINQUATE (Selective INADEQUATE);¹⁵⁸ ее сравнительно легко реализовать, так как требуется измерение только одной строки двумерной матрицы при использовании селективного импульса по углероду. Однако главная проблема этого метода — подавление ложных сигналов от молекул, имеющих только один изотоп ^{13}C . Константа спин-спинового взаимодействия $^1J(\text{C},\text{C})$ имеет порядок 40 Гц, и соответствующие сигналы можно легко обнаружить, даже если основной сигнал не очень хорошо подавлен. Последнее не так важно, если методику SELINQUATE применяют для установления связности системы, однако это имеет решающее значение, если ее используют при измерении констант 2J или 3J .

Применение импульсных последовательностей градиентов магнитного поля дает возможность усовершенствовать методику INADEQUATE. Вилке и Лейфритц¹⁴² впервые продемонстрировали принцип, используемый в методике H,H-COSY на меченых атомах ^{13}C . В этом случае двухквантовый фильтр не применяют, так как он примерно вдвое уменьшает чувствительность. Соответствующая методика, импульсная последовательность для которой представлена на рис. 22, была названа GRECCO (Gradient Enhanced Measurement of Carbon Coupling).¹⁵⁹

Главная проблема состоит в том, чтобы ограничить кросс-поляризацию (СР) только необходимыми атомами углерода. Для селективной инверсии путей когерентности используют селективный гауссов импульс 180° . За периодом эволюции $(1/2)J_{\text{CC}}$ (обычно 83 мс) следует гауссов импульс 180° (как правило, 10–50 мс). «Жесткий» импульс 90° по углероду переносит намагниченность между связанными спинами. Отношение градиентов $g1:g2:g3$ служит для того, чтобы отбирать намагниченности, инвертированные гауссовым импульсом. Соответствующий путь когерентности иллюстрирует рис. 22,с; путь когерентности, представленный на рис. 22,д, действителен для остальных когерентностей углерода, он изменяется под действием трех градиентов. Набор из трех градиентов обеспечивает идеальное подавление. Комбинацию полуселективного метода СР и частотно-селективного отбора пути когерентности под действием 180° -градусного импульса используют, если необходим селективный перенос поляризации от протона к углероду.

Вейгельту и Оттингу¹⁶⁰ при протонном детектировании INADEQUATE удалось подавить все побочные сигналы, применяя PFG.

Сравнительно недавно была предложена импульсная последовательность¹⁶¹ для наблюдения взаимодействия $^{13}\text{C}—^{13}\text{C}$ в природных соединениях, названная ADEQUATE (Astonishingly Sensitive Double Quantum Transfer Experiment). Применяя такую методику, можно наблюдать взаимодействие углерод–углерод через различное число связей (до шести, рис. 23). Она дает больше информации по сравнению, например, с методикой HMBС (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation). Известно, что для HMBС в зависимости от времени задержки можно наблюдать корреляции через 4–5

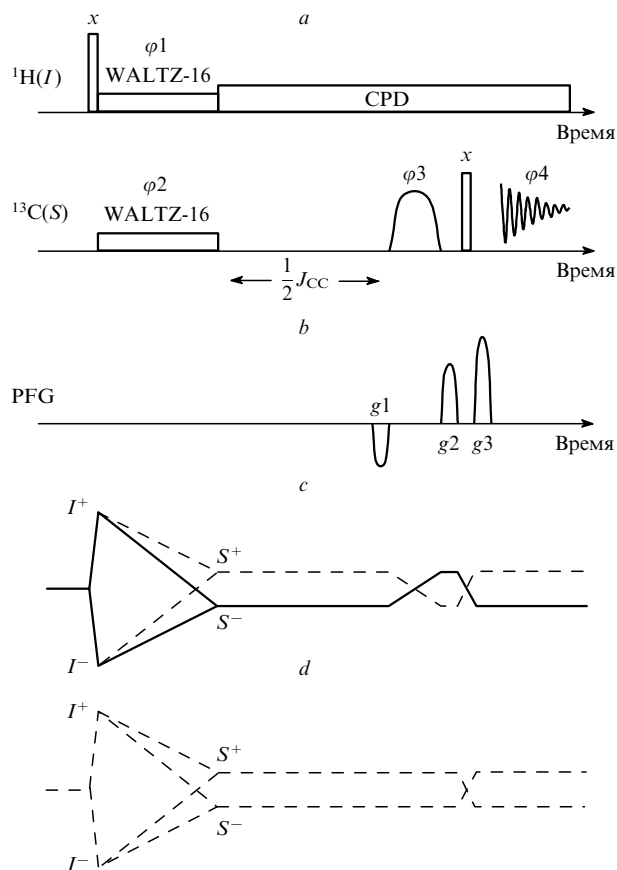


Рис. 22. Последовательности РЧ-импульсов (а), PFG (б), а также селективный (с) и неселективный (д) пути когерентности для методики GRECCO.

WALTZ-16 — последовательность для развязки, CPD — Cross Polarization Decoupling.

связей, однако для наиболее часто используемых времен задержек 50–80 мс наблюдают корреляции только через 2–3 связи. Особенностью версии ADEQUATE является применение адиабатических импульсов с ω_1 -расфокусировкой (расхождением составляющих КССВ по первому измерению), позволяющих анализировать получающиеся спектры так же, как и в методике HMBС. Модификации данной

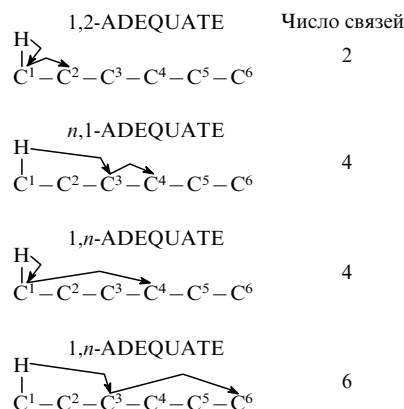


Рис. 23. Схематическое представление корреляций, которые могут быть получены в различных экспериментах ADEQUATE.

методики были успешно использованы для точного измерения констант спин-спинового взаимодействия $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ (см. ¹⁶²) и определения мультиплетности сигналов ^{13}C (см. ¹⁶³).

VIII. Гетероядерные методики

Воздействуя на ядра углерода, можно выявлять скрытые сигналы протонов. Сначала возбуждают конкретный атом углерода, а затем намагниченность переносится к протону, при этом углерод теряет значительную часть намагниченности. И при таком подходе главной проблемой остается подавление сигналов протонов, связанных с ^{13}C . За последние годы разработано множество методов, в которых можно выбрать для возбуждения любой протон через связанный с ним атом углерода, а затем перенести намагниченность от этого протона по каналам скалярной связи на ядро ^{13}C .^{161–172} К достоинствам таких методов следует отнести их высокую чувствительность.⁴

Во время возбуждения рассматриваемого атома углерода протоны должны быть развязаны (декаплированы), чтобы гарантировать одиночную линию для сигналов углерода и тем самым высокую избирательность. Для возбуждения выбранного атома углерода следует использовать селективный импульс 180° , так как его легко калибровать и не требуется фазовой когерентности с другими «жесткими» импульсами по углероду.

Подавление нежелательных когерентностей и селективное возбуждение протонов, связанных с рассматриваемым атомом ^{13}C , лучше достигается под действием PFG. Чтобы избежать релаксационных потерь, необходимо стремиться сократить продолжительность последовательности.

Вероятно, первой последовательностью с использованием селективных импульсов, возбуждающих атом углерода, была последовательность SELINCOR (Selective Incredible Correlation),¹⁶¹ в основе которой лежит принцип HMQC (рис. 24). При использовании последовательности стандартный обратный INEPT намагниченность передается обратно к протонам, а перефазирующий градиент «выбирает» необходимый путь.

Стандартный блок этого типа оказался универсальным инструментом в руках спектроскописта. В появившихся позднее методиках COSY,¹⁷⁰ TOCSY,¹⁷³ NOESY¹⁷⁴ и ROESY использовали селективно возбуждаемый протон, чтобы создавать 1М- и 2М-спектры сигналов, которые не взаимодействуют с другими сигналами. На рис. 25 приведены некоторые спектры из работы¹⁷⁴.

Интересная особенность заключается в проявлении эффекта NOE между химически эквивалентными протонами, например в симметричных молекулах. Обнаружить его можно, используя методику SELINCOR с последующим переносом эффекта NOE. Эквивалентность двух протонов нарушается¹⁷⁵ за счет спаривания одного из них со связанным атомом ^{13}C . Можно также использовать набор градиентных импульсов при условии, что КССВ разрешена. Это позволяет измерять протон-протонные взаимодействия в случаях, когда сигналы протонов накладываются друг на друга или скрыты под другими сигналами.¹³⁷

В дополнение к методам, проиллюстрированным на рис. 25, существует еще одна методика определения констант связи C–H и их знака за счет небольшой модификации принципов, рассмотренных выше, — так называемая методика α/β -gs-SELINCOR–TOCSY.^{176,177}

Для модификации методики SELINCOR используют два «мягких» импульса: первый возбуждает сигнал углерода при протонной развязке, а второй определяет состояние спина. Последний импульс по ^1H в пределах последовательности HSQC создает многоквантовые когерентности (I^+S^+ , I^-S^+ , I^+S^- и I^-S^-).

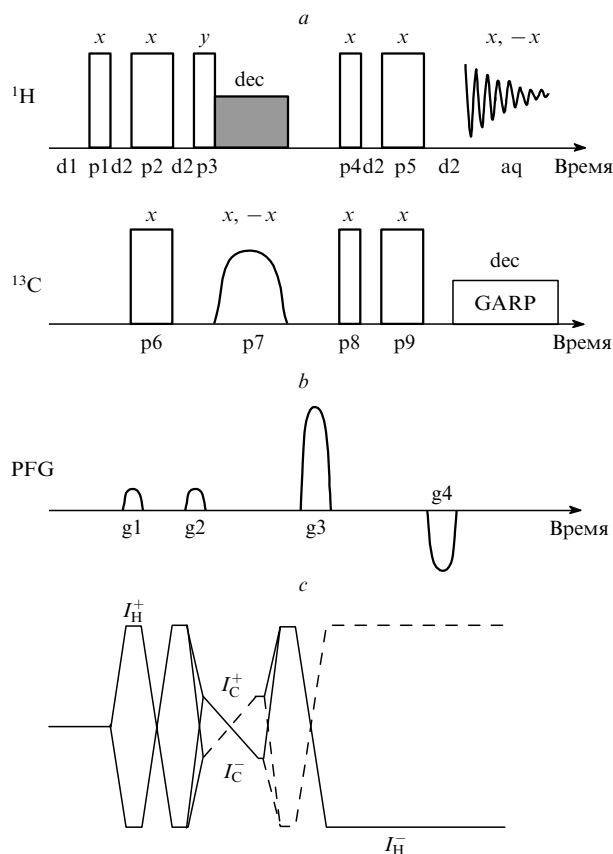


Рис. 24. Последовательности РЧ-импульсов (a), PFG (b) и путь когерентности (c) для методики gs-SELINCOR.

Используется 180° -градусный селективный импульс по углероду с выбранным путем когерентности (сплошная линия). d1 — релаксационная задержка; p1, p3 и p4 — импульсы 90° ; p2 и p5 — импульсы 180° по ^1H ; p6 и p9 — импульсы 180° по ^{13}C ; p7 — селективный импульс 180° по ^{13}C ; p8 — импульс 180° по ^{13}C ; g1–g4 — импульсные градиенты синусоидальной формы; dec — развязка.

Метод учитывает селективное создание когерентности протонов, связанных с определенным атомом углерода (в α - или β -спиновом состоянии). Затем эта когерентность передается от протонов к углероду посредством составного импульса MLEV-16 в течение временного интервала между вторым и третьим импульсами последовательности TOCSY. Когерентность протона, созданная при помощи методики β -gs-SELINCOR, будет распределена по всем протонам, относящимся к одной и той же связанной системе. Все сигналы протонов отфильтрованы, и расстояние между ними соответствует половине дальней КССВ по связи H–C. Для определения этой КССВ необходимо установить временной интервал между соответствующими сигналами.

Гетероядерные эффекты NOE могут оказывать существенную помощь в структурном анализе природных соединений. Традиционно, эти эффекты исследуют либо методом 2М NOESY, либо 1М-методом путем селективного облучения отдельных протонов и измерения гетероядерного разностного NOE-спектра. Использование импульсов градиентов магнитного поля позволяет подавить сигналы протонов, связанных с ^{12}C , до такой степени, что слабые гетероядерные эффекты NOE будут наблюдаться при детектировании протонов. Кроме того, протонное детектирование означает выигрыш в чувствительности. Метод, в основе которого лежит использование как селективных РЧ-импульсов, так и PFG, был введен Стоттом и Кеелером и назван

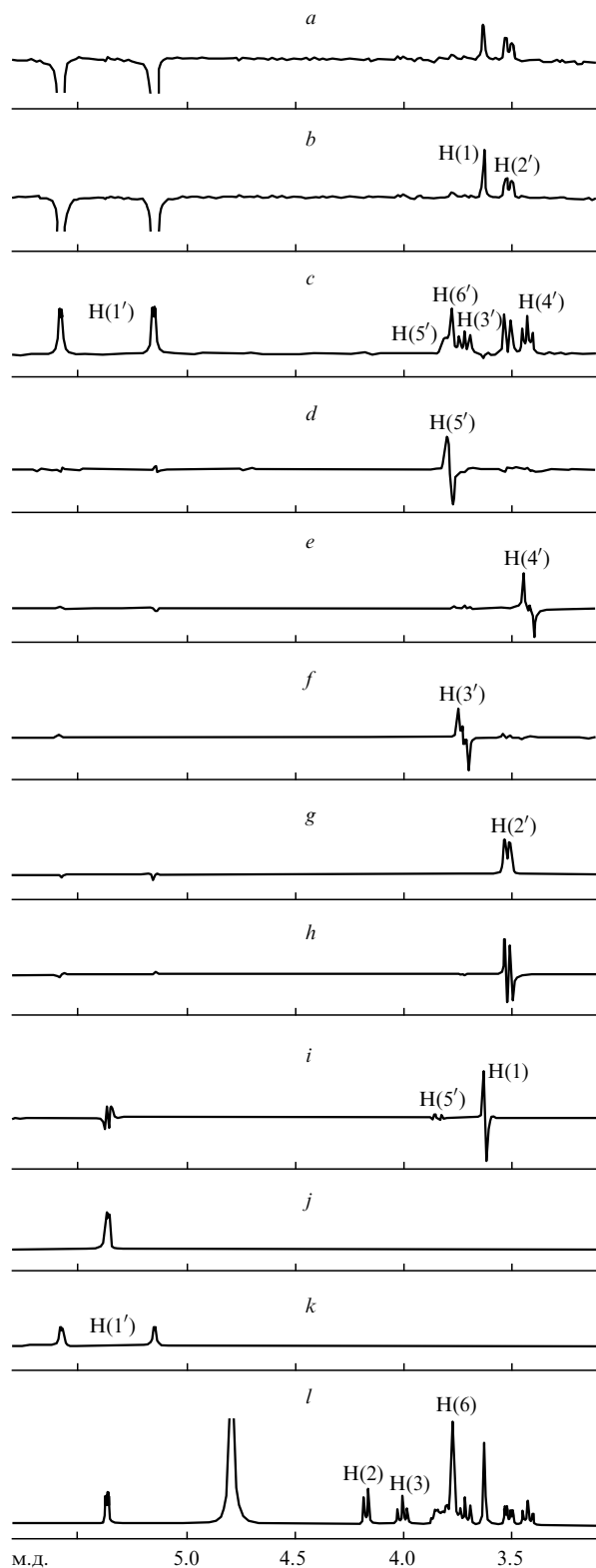


Рис. 25. Спектры ЯМР ^1H сахарозы, полученные с использованием различных вариаций последовательности gs-HSQC.¹⁷⁴ *a* — HSQC-ROESY, *b* — HSQC-NOESY, *c* — HSQC-TOCSY, *d* — HSQC+2 RELAY, *e* — HSQC+3 RELAY, *f* — HSQC+4 RELAY, *g* — HSQC-COSY+r+z (*r* — рефокусирование, *z* — фильтр), *h* — HSQC-COSY, *i* — HSQC-lr (*lr* — long range), *j* — HSQC/D, *k* — HSQC/C, *l* — HSQC. Числа без штрихов и со штрихами — нумерация атомов водорода для фуранозного и пиранозного колец соответственно.

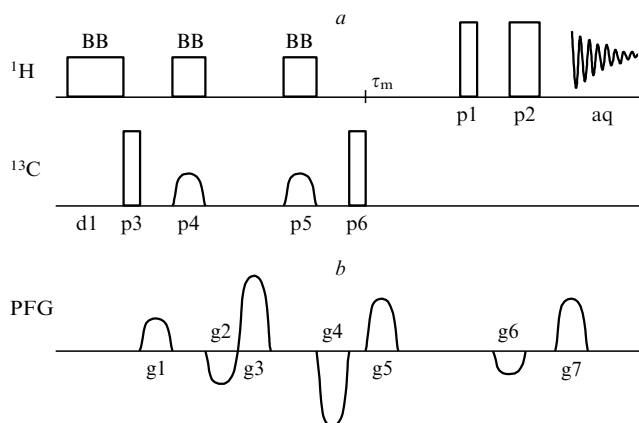


Рис. 26. Последовательности РЧ-импульсов (*a*) и PFG (*b*) для NOE-эксперимента с протонным детектированием.¹⁷¹ BB — широкополосная развязка; p1 и p2 — импульсы 90° и 180° ; d1 — релаксационная задержка; p3 и p6 — импульсы 90° по ^{13}C ; p4 и p5 — селективный импульс 180° по ^{13}C ; g1–g7 — импульсные градиенты синусоидальной формы.

HETGOESY (Heteronuclear Gradient Overhauser Effect Spectroscopy).¹⁷⁸ Основные последовательности, используемые в этом методе, представлена на рис. 26. Жизнеспособность метода была доказана при исследовании гибберилиновой кислоты. Он позволяет решить одну из наиболее трудных проблем — провести отнесение сигналов четвертичных атомов углерода.

Объектами биохимических и металлоорганических исследований часто являются молекулы, в которых больше одного гетероциклического атома (ядра Y). Изучать такие молекулы можно с использованием трехмерной спектроскопии ЯМР,

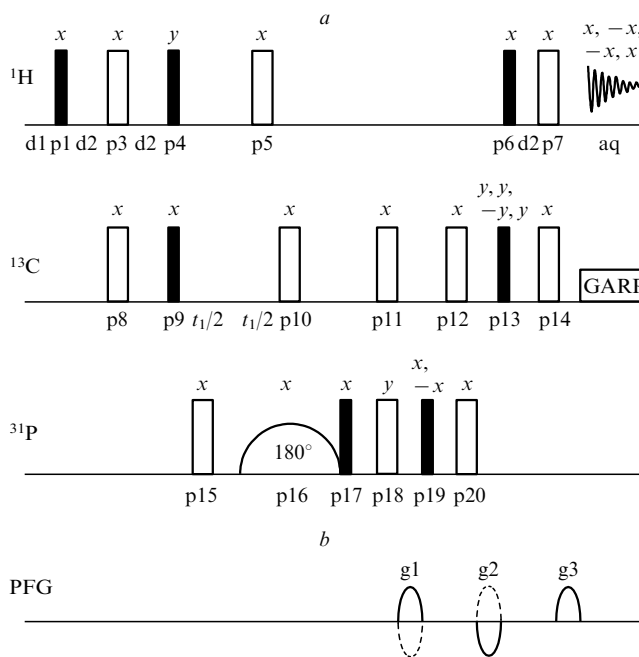


Рис. 27. Последовательности РЧ-импульсов (*a*) и PFG (*b*) для эксперимента gs-SELTRIP (Selective Triple Resonance).¹⁸² p16 — селективный импульс 180° по фосфору. Градиенты g1 и g2 прикладываются в режиме эхо-антиэхо.

получив протонные 3М-спектры и используя частоты ^{13}C и ^{31}P (см. 178–181). Однако при таком подходе велики временные затраты и ограничено разрешение. В эксперименте, названном SELTRIP¹⁸¹ (селективный тройной резонанс), объединены двумерный метод HSQC и селективный импульс 90° по ядру Y. Цель такого объединения — понизить размерность задачи (до двумерной). Модифицированный вариант эксперимента gs-SELTRIP иллюстрирует рис. 27.¹⁸²

IX. Двухмерные корреляционные эксперименты, основанные на гетероядерной J-кросс-поляризации

Современные модификации методики HSQC¹⁸³ можно использовать в многомерных экспериментах ЯМР, базирующихся на тех же принципах. В настоящее время широко используют улучшенную схему HSQC-PEP (Pulse Enhancement Polarisation),¹⁸⁴ имеющую следующие преимущества: 1) отбор когерентностей посредством PFG; 2) максимальная чувствительность и оптимизируемое разрешение, получаемое комбинацией методик эхо-антиэхо и PEP; 3) эффективное подавление сигналов растворителя, достигаемое или исключительно за счет PFG, или за счет применения техники «обратного переворота сигналов воды» (water flip-back); 4) широкое использование различных пар активных ядер; 5) метод применим как для исследования природных соединений с естественным содержанием активных ядер (изотопов), так и для меченых биомолекул; 6) гибкость при включении в импульсную последовательность новых элементов.

Создание модифицированных методик HSQC, в соответствии с которыми тем или иным способом можно выборочно манипулировать спиновым состоянием α или/и β , стало плодотворной концепцией в многомерной спектроскопии ЯМР. Например, известный принцип E.COSY (Exclusive Correlation Spectroscopy)¹⁸⁵ широко применяют для определения гомо- и гетероядерных КССВ в меченых биомолекулах. Чтобы определить знак и величину очень малых КССВ, в спектрах E.COSY измеряют относительное смещение между перекрестными пиками, соответствующим спиновым состояниям α или/и β . Недавно появилось большое число версий HSQC, которые позволяют выбирать или только α или только β спиновые состояния в отдельных двумерных спектрах. Простой пример — эксперимент HSQC- α/β ,¹⁸⁶ в котором вторая часть серии импульсов *retro*-INEPT стандартного эксперимента HSQC-PEP¹⁸⁷ сокращена до единственного импульса 90° . Такой сокращенный блок выбирает две различные когерентности, одну в виде совпадающего по фазе мультиплета, вторую — в виде мультиплета, антифазного ему. Одновременное добавление или вычитание этой когерентности перед сбором данных предоставляет возможность выбора соответственно α - или β -компонента при сохранении максимальной чувствительности. В этом эксперименте можно получить отредактированные двумерные корреляционные спектры, в которых присутствует только один из двух мультиплетных сигналов. Выбор спинового состояния может быть проведен в течение периода косвенной эволюции, что приводит к связанному отредактированному ^1H -X корреляционному эксперименту, названному α/β -HSQC (или эксперимент IPAP).¹⁸⁸ Главное преимущество этого эксперимента состоит в том, что поперечная релаксация в течение косвенного X-измерения не является столь же критическим параметром, как при наблюдении больших биомолекул в ^1H -измерении. Оба подхода могут быть объединены в одном эксперименте α/β -HSQC- α/β . Лучшим примером использования такого подхода является популярная методика TROSY.¹⁸⁹ Редактирующие экспери-

менты ЯМР широко используют для измерения скалярных и остаточных дипольных констант взаимодействия, а также конфигурирования основных принципов современных методологий ЯМР, предназначенных для структурных и динамических исследований больших биомолекул в магнитных полях с высокой напряженностью.

В работе¹⁹⁰ рассмотрен набор корреляционных экспериментов ЯМР как привлекательная альтернатива традиционным экспериментам HSQC. Особенность предложенных импульсных последовательностей — использование гетероядерной кросс-поляризации (Heteronuclear Cross Polarization (HCP)) для переноса намагниченности от ядра X к ^1H и/или от ^1H к X вместо обычной последовательности INEPT. Идея использования HCP в изотропных жидкостях не нова, и ее теоретические аспекты уже описаны (см., например,^{191,192}), в том числе в приложении для белков¹⁹³ и нуклеиновых кислот.¹⁹⁴ За прошлое десятилетие подобные эксперименты (HMQC и HSQC) стали стандартными при исследовании как небольших молекул, так и больших немеченных и меченых биомолекул.

В отличие от ^1H -X-корреляционных экспериментов со свободной прецессией, HCP-эксперименты основаны на синхронном приложении двух магнитных полей к обоим (^1H (спин I) и X (спин S)) ядрам и достижении максимального гетероядерного переноса когерентности при выполнении так называемого условия Хартманна-Хана.¹⁹⁵

Согласно теоретическим предсказаниям, в экспериментах на основе HCP, описанных в работе¹⁹⁰, должна проявляться максимальная чувствительность благодаря выбору и комбинации двух различных намагниченностей. Существование сильной зависимости механизма переноса от относительной фазы между введенной намагниченностью и смешивающей последовательностью HCP подтверждает наличие анизотропии гетероядерного переноса когерентности, включающей процессы смешивания HCP. Ряд аналогичных импульсных схем разработан для того, чтобы можно было просто и избирательно управлять различными когерентностями, доступными до и после смешивания HCP. Для таких схем характерны: высокая чувствительность, хороший допуск по неоднородности РЧ-поля, лучшее (по сравнению с HSQC) поведение спиновой системы в процессах релаксации и химического обмена, универсальность и возможность незначительных модификаций.

Применение новых оптимизированных ультраширокополосных гетероядерных последовательностей с кросс-поляризацией, включающих улучшенные многоимпульсные последовательности или адиабатические импульсы, и методологий на основе HCP является альтернативой использованию наиболее популярных импульсных серий HSQC. Кроме того, различные элементы HCP могут быть включены как эффективные подготовительные и смешивающие стандартные блоки в многомерных экспериментах ЯМР.

X. Комбинация селективного и неселективного возбуждения в экспериментах ЯМР

В работе¹⁹⁶ предложена современная методика исследования молекулярных динамических процессов. В соответствии с этой методикой с помощью мультиплетно-селективной последовательности (Multiplet-Selective Excitation (MUSEX)) возбуждается только одно ядро связанной спиновой системы.¹⁹⁷ Полезность методики заключается в минимизации потери информации о спин-спиновом взаимодействии, что способствует упрощению выделения и отнесения сигналов спиновых систем. Для этого необходимо в экспериментах комбинировать селективное и неселективное возбуждение.

Таблица 5. Варианты метода MUSEX COSY.¹⁹⁶

Метод	Импульсная последовательность	Схема 2М-спектра
NSP–SP(A) MUSEX COSY	$90_x^\circ - t_1 - 90_x^\circ(A) - t_2$	
SP(A)–NSP MUSEX COSY	$90_x^\circ(A) - t_1 - 90_x^\circ - t_2$ $\sigma_4^{\text{набл}} = I_{A_y} S_A^1 C_A^1 S_A^2 C_A^2 C_J^2 +$ $+ I_{B_y} S_A^1 S_B^1 S_B^2 C_J^2 - I_{B_y} C_B^2 C_J^2$	
SP(A)–SP(A) MUSEX COSY	$90_x^\circ(A) - t_1 - 90_x^\circ(A) - t_2$ $\sigma_4^{\text{набл}} = I_{A_y} C_A^1 S_J^1 C_A^2 S_J^2 +$ $+ I_{A_y} S_A^1 C_J^1 S_B^2 C_J^2$	
SP(A)–SP(B) MUSEX COSY	$90_x^\circ(A) - t_1 - 90_x^\circ(B) - t_2$ $\sigma_4^{\text{набл}} = -I_{A_y} C_A^1 C_J^1 C_A^2 C_J^2 +$ $+ I_{A_y} S_A^1 C_J^1 S_B^2 C_J^2 - I_{B_y} C_B^2 C_J^2$	

Примечание. Здесь и в табл. 5 приняты следующие обозначения: NSP — неселективный импульс; SP(A(B)) — селективный импульс, возбуждающий ядра A или B; $C_{A(B)}^{1(2),\tau} = \cos \Omega_{A(B)} t_{1(2)}$; $C_J^{1(2),\tau} = \cos \pi J_{AB} t_{1(2)}$; $S_{A(B)}^{1(2),\tau} = \sin \Omega_{A(B)} t_{1(2)}$; $S_J^{1(2),\tau} = \sin \pi J_{AB} t_{1(2)}$; на схемах 2М-спектра темные точки обозначают положительную интенсивность; t_1 и t_2 — переменные интервалы, τ — постоянный интервал.

Рассмотрим поведение слабосвязанной спиновой системы типа AB, на которую действует двухимпульсная последовательность MUSEX COSY.¹⁹⁶ Случай, когда оба импульса неселективные, хорошо известен как обычный эксперимент COSY.^{4,197} Представляет интерес рассмотреть все возможные комбинации селективных и неселективных импульсов. В табл. 5 схематично представлены 2М-спектры с компонентами, наблюдаемыми явно.

Методика NSP–SP(A) в эксперименте MUSEX COSY позволяет упростить внешний вид спектра ЯМР (*J*-кросс-пики в силу использования селективного возбуждения отсутствуют) без потери информации о спин-спиновом взаимодействии.

Методика SP(A)–SP(A) MUSEX COSY может быть использована в EXSY-спектроскопии, с помощью которой изучается химический обмен.

Методика SP(A)–SP(B) MUSEX COSY полезна для получения информации о спин-спиновом взаимодействии любых двух спинов многоспиновой системы.

Неселективные спектры часто содержат несколько областей, где мультиплетные сигналы перекрываются, что приводит к неоднозначной интерпретации этих спектров. Именно в возможности обойти эту неоднозначность и заключается особая ценность подхода, предложенного в работе¹⁹⁶. Эксперимент MUSEX позволяет сократить накапливаемые данные и продолжительность эксперимента. Указанные выше случаи применимы ко всем типам 2М-экспериментов. В табл. 6 представлены наблюдаемые составляющие для спина A и их схематическое изображение в виде 2М-спектра для трех импульсных последовательностей, которые содержат полный набор всех возможных комбинаций неселективных и многоселективных импульсов. Возбуждение спина B приводит к появлению осевого дублета в спектре. Особенность

Таблица 6. Схематическое представление составляющих 2М-спектра.^{196,198}

Номер	Импульсная последовательность	Схема 2М-спектра
1	$90_x^\circ(B) - t_1 - 90_x^\circ(A) - \tau - 90_x^\circ(A) - t_2$	
2	$90_x^\circ(A) - t_1 - 90_x^\circ(A) - \tau - 90_x^\circ(B) - t_2$	
3	$90_x^\circ(B) - t_1 - 90_x^\circ(B) - \tau - 90_x^\circ(A) - t_2$	

Примечание. На схеме 2М-спектра светлые точки означают отрицательную интенсивность.

эксперимента заключается в использовании альтернативного возбуждения (Alternating Excitation (ALEX)) спинов с помощью последовательности MUSEX. Все расчеты выполнены на основе формализма произведения операторов, так же как в методе MUSEX COSY.

Последовательности 1 и 2 дают возможность визуализировать каждую связь в мультиплетной системе. Последовательность 1 может быть использована шаг за шагом для идентификации всех связанных партнеров в сложной спиновой системе, поскольку в упомянутом выше эксперименте MUSEX COSY можно отслеживать все связи одновременно. Последовательность 2 удобна для изучения релаксационных механизмов. В результирующем спектре (последовательность 3) присутствует диагональный пик спина A — результат интерференции восьми компонент, четыре из них — это одноквантовые когерентности, а остальные переданы от двухквантовой и нульквантовой когерентностей. В этом случае первые два импульса есть ALEX COSY, а последний импульс по ядру B используют в качестве детектирующего. При варьировании фазы две резонансные линии для диагональных пиков могут исчезать, оставляя диагональные линии.

* * *

В настоящее время спектроскопия ЯМР обладает целым арсеналом методов, позволяющих проводить идентификацию, а также исследовать структуру и динамику сложных биологических молекул и систем. В значительной мере успех исследований определяется как разработкой нового оборудования, так и применением различных селективных методик. Совместное использование РЧ-импульсов с импульсами градиентов магнитного поля позволило решить часть проблем, возникающих в экспериментах с селективными импульсами, и, в частности, проблему отбора нужных когерентностей. Можно ожидать, что некоторые из этих методов станут стандартными инструментальными средствами в спектроскопии ЯМР органических соединений, поскольку часто дают быстрый и детальный ответ на вопросы, решение которых совсем недавно представлялось затруднительным.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №03-03-32296, 04-03-96807 и 04-03-81028).

Литература

- R.R.Ernst. In *Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy. Nobel Lecture. The 9th December, 1991*. Prix Nobel, 1992. P. 70
- J.W.Emsley, J.Feeney, L.H.Sutcliffe. *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Pergamon Press, Oxford, 1965
- J.H.Noggle, R.E.Schirmer. *The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Application*. Academic Press, Oxford, 1971
- R.R.Ernst, G.Bodenhausen, A.Wokaun. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Clarendon Press, Oxford, 1987
- D.Neuhaus, M.P.Williamson. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH, New York, 1989
- W.R.Croasmun, R.M.K.Charlson. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Application for Chemists and Biochemists*. (Second Edition). VCH, New York, 1994
- M.Spraul, J.K.Nicholson, M.J.Lynch, J.C.Lindon. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 5, 613 (1994)
- S.Warren, S.M.Silver. *Adv. Magn. Reson.*, **12**, 247 (1988)
- H.Kessler, S.Mronga, G.Gemmecker. *Magn. Reson. Chem.*, **29**, 527 (1991)
- L.Emsley. *Methods Enzymol.*, **239**, 207 (1994)
- T.J.Norwood. *Chem. Soc. Rev.*, **23**, 59 (1994)
- J.Keeler, R.T.Clowes, A.L.Davis, E.D.Laue. *Methods Enzymol.*, **239**, 145 (1994)
- W.I.Price. *Ann. Rep. NMR*, **32**, 51 (1996)
- T.Parella. *Magn. Reson. Chem.*, **34**, 329 (1996)
- V.Blechta, R.Freeman. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **102**, 253 (1993)
- T.-L.Hwang, A.J.Shaka. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **112**, 275 (1995)
- J.Friedrich, S.Davies, R.Freeman. *J. Magn. Reson.*, **75**, 390 (1987)
- Ю.Е.Черныш, Г.С.Бородкин, Б.С.Лукьянов, М.С.Коробов, Ю.М.Коробов, В.Ю.Вдовиченко, Н.В.Станкевич. *Селективная Фурье-спектроскопия ЯМР и ее приложение к исследованию процессов молекулярной динамики*. Изд-во СКНЦ ВШ, Ростов-на-Дону, 2002
- S.Braun, H.O.Kalinowski, S.Berger. *100 and More Basic NMR Experiments*. VCH, Weinheim, 1996
- S.L.Patt, J.N.Shoolery. *J. Magn. Reson.*, **46**, 535 (1982)
- H.Bildsoe, S.Donstrup, H.J.Jakobsen, O.W.Sorensen. *J. Magn. Reson.*, **53**, 154 (1983)
- O.W.Sorensen, S.Donstrup, H.Bildsoe, H.J.Jakobsen. *J. Magn. Reson.*, **55**, 347 (1983)
- J.M.Bulsing, W.M.Brooks, J.Field, D.M.Doddrell. *J. Magn. Reson.*, **56**, 167 (1984)
- J.M.Bulsing, D.M.Doddrell. *J. Magn. Reson.*, **61**, 197 (1985)
- G.A.Morris, R.Freeman. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 760 (1979)
- D.P.Burum, R.R.Ernst. *J. Magn. Reson.*, **39**, 163 (1980)
- D.T.Pegg, D.M.Doddrell, M.R.Bendall. *J. Chem. Phys.*, **77**, 2745 (1982)
- D.M.Doddrell, D.T.Pegg, M.R.Bendall. *J. Magn. Reson.*, **48**, 323 (1982)
- O.W.Sorensen, R.R.Ernst. *J. Magn. Reson.*, **51**, 477 (1983)
- J.Homer, M.C.Perry. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 373 (1994)
- M.H.Levitt, O.W.Sorensen, R.R.Ernst. *Chem. Phys. Lett.*, **94**, 540 (1983)
- L.Muller. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4481 (1979)
- H.Kessler, P.Schmieder, M.Kurz. *J. Magn. Reson.*, **85**, 400 (1989)
- U.Wolborn, T.Domke, D.Leibfritz. *J. Magn. Reson.*, **90**, 575 (1990)
- T.Domke, D.Leibfritz. *J. Magn. Reson.*, **88**, 401 (1990)
- H.Kessler, P.Schmieder, M.Kuck, M.Reggelin. *J. Magn. Reson.*, **91**, 375 (1991)
- T.Domke, P.Xu, R.Freeman. *J. Magn. Reson.*, **92**, 218 (1991)
- U.Wolborn, D.Leibfritz, T.Domke. *J. Magn. Reson.*, **94**, 653 (1991)
- D.Davis. *J. Magn. Reson.*, **90**, 589 (1990)
- W.Willker, J.Stelten, D.Leibfritz. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **107**, 94 (1994)
- J.M.Schmidt, H.Rueterjans. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1279 (1990)
- A.Steck, P.Bigler. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **110**, 90 (1994)
- M.L.Liu, R.D.Farrant, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **106**, 270 (1995)
- M.L.Liu, R.D.Farrant, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **112**, 208 (1995)
- M.L.Liu, R.D.Farrant, B.C.Sweatman, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **113**, 251 (1995)
- M.L.Liu, R.D.Farrant, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *Magn. Reson. Chem.*, **33**, 212 (1995)
- M.L.Liu, J.K.Nicholson, J.C.Lindon, P.N.Sanderson, G.E.Tranter. *Magn. Reson. Chem.*, **34**, 865 (1996)
- H.Kessler, P.Schmieder. *Biopolymers*, **31**, 621 (1991)
- G.E.Martin, R.C.Crouch. *J. Nat. Prod.*, **54**, 1 (1991)
- T.Parella. *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 467 (1998)
- G.Bodenhausen, R.L.Vold, R.R.Vold. *J. Magn. Reson.*, **37**, 93 (1980)
- J.Stelten, D.Leibfritz. *J. Magn. Reson.*, **99**, 170 (1992)
- M.L.Liu, H.R.Tang, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, 83 (2002)
- M.H.Levitt, R.Freeman. *J. Magn. Reson.*, **39**, 533 (1980)
- L.Braunschweiler, R.R.Ernst. *J. Magn. Reson.*, **53**, 521 (1983)
- D.J.Cookson, B.E.Smith. *Org. Magn. Reson.*, **16**, 111 (1981)
- M.R.Bendall, D.M.Doddrell, D.T.Pegg. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 4603 (1981)
- W.S.Price. *Ann. Rep. NMR*, **38**, 289 (1999)
- A.Bax, D.G.Davis. *J. Magn. Reson.*, **65**, 355 (1985)
- W.P.Aue, J.Karhan, R.R.Ernst. *J. Chem. Phys.*, **64**, 4226 (1976)
- J.K.Nicholson, I.D.Wilson. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **21**, 449 (1989)
- A.Bax, R.Freeman, G.A.Morris. *J. Magn. Reson.*, **43**, 333 (1981)
- A.Bax, A.F.Mehlkopf, J.Smidt. *J. Magn. Reson.*, **35**, 167 (1979)
- M.P.Williamson. *J. Magn. Reson.*, **55**, 471 (1983)
- P.Xu, X.Wu, R.Freeman. *J. Magn. Reson.*, **95**, 132 (1991)
- A.J.Shaka, J.Keeler, R.Freeman. *J. Magn. Reson.*, **56**, 294 (1984)
- M.Woodley, R.Freeman. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **109**, 103 (1994)
- G.W.Vuiste, R.Boelens. *J. Magn. Reson.*, **73**, 328 (1987)
- M.L.Woodley, T.A.Carpenter, L.D.Hall. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **106**, 147 (1994)
- M.Karplus. *J. Chem. Phys.*, **30**, 11 (1959)
- V.F.Bystrov. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **10**, 41 (1976)
- G.Xu, C.M.Deber. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **37**, 528 (1991)
- J.L.Nietro, M.Rico, J.Santorio, J.Herranz, F.J.Bermejo. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **28**, 315 (1986)
- M.L.Liu, X.A.Mao. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. (Eds J.C.Lindon, J.M.Holmes, G.E.Tranter). Academic Press, San Diego, 1999. P. 2145
- M.Liu, J.C.Lindon. *Curr. Org. Chem.*, **5**, 351 (2001)
- E.O.Stejskal, J.E.Tanner. *J. Chem. Phys.*, **42**, 288 (1965)
- J.E.Tanner. *J. Phys. Chem.*, **52**, 2523 (1970)
- C.S.Johnson Jr. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **34**, 203 (1999)
- J.S.Gounarides, A.D.Chen, M.J.Shapiro. *J. Chromatogr. B*, **725**, 79 (1999)
- A.D.Chen, M.J.Shapiro. *Anal. Chem.*, **71**, 669A (1999)
- M.Liu, J.K.Nicholson, J.A.Parkinson, J.C.Lindon. *Anal. Chem.*, **69**, 1504 (1997)
- D.P.Hinton, C.S.Johnson Jr. *J. Phys. Chem.*, **97**, 9064 (1993)
- A.Chen, D.Wu, C.S.Johnson Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7965 (1995)
- D.P.Hinton, C.S.Johnson Jr. *Chem. Phys. Lipids*, **69**, 175 (1994)
- H.Barjat, G.A.Morris, S.Smart, A.G.Swanson, S.C.R.Williams. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **108**, 170 (1995)
- A.S.Altieri, D.P.Hinton, R.A.Byrd. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7566 (1995)
- M.F.Lin, C.K.Larive. *Anal. Biochem.*, **229**, 214 (1995)
- R.F.Karlicek Jr., I.J.Lowe. *J. Magn. Reson.*, **37**, 75 (1980)
- R.M.Cotts, M.J.R.Hoch, T.Sun, J.T.Markert. *J. Magn. Reson.*, **83**, 252 (1989)
- G.H.Sorland, D.Aksnes, L.Gjerdaker. *J. Magn. Reson.*, **137**, 397 (1999)
- H.Y.Carr, E.M.Purcell. *Phys. Rev.*, **94**, 630 (1954)
- N.M.Loening, J.Keeler. *J. Magn. Reson.*, **139**, 334 (1999)
- A.Jerschow, N.Müller. *J. Magn. Reson.*, **125**, 372 (1997)
- A.Jerschow, N.Müller. *J. Magn. Reson.*, **132**, 13 (1998)
- S.J.Gibbs, C.S.Johnson Jr. *J. Magn. Reson.*, **93**, 395 (1991)

96. J.Ruiz-Cabello, G.W.Vuister, C.T.W.Mooney, P.Van Gelderen, J.S.Cohn, P.C.M.Van Zijl. *J. Magn. Reson.*, **100**, 282 (1992)
97. E.Kupce, R.Freeman. *J. Biomol. NMR*, **25**, 349 (2003)
98. S.Meiboom, D.Gill. *Rev. Sci. Instrum.*, **29**, 688 (1958)
99. T.Gullion, D.B.Baker, M.S.Corradi. *J. Magn. Reson.*, **89**, 479 (1990)
100. D.H.Wu, A.D.Chen, C.S.Johnson Jr. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **115**, 260 (1995)
101. In *Bruker Almanac*. NMR Tables. 1998. P. 69
102. J.K.Nicholson, P.D.Foxall, M.Spraul, R.D.Farrant, J.C.Lindon. *Anal. Chem.*, **67**, 793 (1995)
103. M.Liu, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *Anal. Chem.*, **68**, 3370 (1996)
104. A.Chen, D.Wu, C.S.Johnson Jr. *J. Phys. Chem.*, **99**, 828 (1995)
105. A.K.Gaigalas, J.B.Hubbard, M.McCurley, S.Woo. *J. Phys. Chem.*, **96**, 2355 (1992)
106. M.Liu, H.C.Toms, G.E.Hawkes, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Biomol. NMR*, **13**, 25 (1999)
107. M.Liu, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *Anal. Commun.*, **34**, 225 (1997)
108. M.Liu, J.K.Nicholson, J.A.Parkinson, J.C.Lindon. *Anal. Chem.*, **69**, 1504 (1996)
109. D.Wu, A.Chen, C.S.Johnson Jr. *J. Magn. Reson. A*, **121**, 88 (1996)
110. E.K.Gosansky, D.G.Gorenstein. *J. Magn. Reson. B*, **111**, 94 (1996)
111. D.Wu, A.Chen, C.S.Johnson Jr. In *Abstracts 37th ENC*. Asilomar, CA, 1996. P. 74
112. B.E.Chapman, P.W.Kuchel. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **102**, 105 (1993)
113. S.J.Gibbs, C.S.Johnson Jr. *J. Magn. Reson.*, **93**, 395 (1991)
114. J.Chen, A.A.De Angelis, V.A.Mandelshtam, A.J.Shaka. *J. Magn. Reson.*, **162**, 74 (2003)
115. D.Zax, A.Pines. *J. Chem. Phys.*, **78**, 6333 (1983)
116. C.H.Sotak. *NMR Biomed.*, **4**, 70 (1991)
117. C.H.Sotak. *J. Magn. Reson.*, **90**, 198 (1990)
118. E.Mischler, F.Humber, B.Diter, D.Canet. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **106**, 32 (1995)
119. P.Mutzenhardt, D.Canet. *J. Chem. Phys.*, **105**, 4405 (1996)
120. P.W.Kuchel, B.E.Chapman. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **101**, 53 (1993)
121. M.Liu, X.-A.Mao, C.Ye, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Magn. Reson.*, **129**, 67 (1997)
122. S.Kim, T.Szyperki. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1385 (2003)
123. X.Zhang, C.-G.Li, C.-H.Ye, M.-L.Liu. *Anal. Chem.*, **73**, 3528 (2001)
124. E.Kupce, R.Freeman. *J. Magn. Reson.*, **163**, 56 (2003)
125. M.Liu, X.-A.Mao, C.Ye, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *Mol. Phys.*, **93**, 913 (1998)
126. S.Altieri, K.E.Miller, R.A.Byrd. *Magn. Reson. Rev.*, **17**, 27 (1996)
127. H.Weingartner, M.Holz. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C*, **98**, 121 (2002)
128. M.J.Thrippleton, N.M.Loening, J.Keeler. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 441 (2003)
129. R.J.Ogg, R.B.Kingsley, J.S.Taylor. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **104**, 1 (1994)
130. V.Sklenar, M.Piotto, R.Leppik, V.Saudek. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **102**, 241 (1993)
131. M.Liu, X.A.Mao, C.H.Ye, H.Huang, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Magn. Reson.*, **132**, 125 (1998)
132. W.S.Price, K.Hayamizu, Y.Arata. *J. Magn. Reson.*, **126**, 256 (1997)
133. W.Kozminski, I.Zhukov. *J. Biomol. NMR*, **26**, 157 (2003)
134. P.C.M.Van Zijl, C.T.W.Mooney. *J. Magn. Reson.*, **87**, 18 (1990)
135. S.Connor, J.K.Nicholson, J.R.Everett. *Anal. Chem.*, **59**, 2885 (1987)
136. D.B.Fulton, R.Hrabal, F.Ni. *J. Biomol. NMR*, **8**, 213 (1996)
137. S.Berger. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **30**, 137 (1997)
138. M.Liu, H.Tang, J.K.Nicholson, J.C.Lindon. *J. Magn. Reson.*, **153**, 133 (2001)
139. C.Dhalluin, J.-M.Wieruszkeski, G.Lippens. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **111**, 168 (1996)
140. P.Adell, T.Parella, F.Sanchez-Ferrando, A.Virgili. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **108**, 77 (1995)
141. M.A.Bernstein, L.A.Trimble. *Magn. Reson. Chem.*, **32**, 107 (1994)
142. W.Willker, D.Leibfritz. *Magn. Reson. Chem.*, **32**, 665 (1994)
143. T.Facke, S.Berger. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **113**, 257 (1995)
144. M.Piotto, V.Saudek, V.Sklenar. *J. Biomol. NMR*, **2**, 661 (1992)
145. E.Kupce, R.Freeman. *J. Biomol. NMR*, **28**, 391 (2004)
146. L.A.Trimble, M.A.Bernstein. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **105**, 67 (1994)
147. C.Dalvit, U.Hommel. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **109**, 334 (1995)
148. K.Stott, J.Stonehouse, J.Keeler, T.-L.Hwang, A.J.Shaka. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4199 (1994)
149. J.Stonehouse, P.Adell, J.Keeler, A.J.Shaka. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6037 (1994)
150. P.Adell, T.Parella, F.Sanchez-Ferrando, A.Virgili. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **113**, 124 (1995)
151. O.W.Sorensen, G.H.Eich, M.H.Levitt, G.Bodenhausen, R.R.Ernst. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **16**, 163 (1984)
152. J.R.Garbow, D.P.Weitekamp, A.Pines. *Chem. Phys. Lett.*, **93**, 504 (1982)
153. D.G.Davis. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **101**, 229 (1993)
154. M.Gueron, P.Plateau. In *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*. (Eds D.M.Grant, R.K.Harris). Wiley, New York, 1996. P. 4931
155. C.Dalvit. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **113**, 120 (1995)
156. C.Dalvit, S.Y.Ko, J.M.Bohlen. *J. Magn. Reson., Ser. B*, **110**, 124 (1996)
157. J.Buddrus, H.Bauer. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **26**, 625 (1987)
158. S.Berger. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **27**, 1196 (1988)
159. T.Facke, S.Berger. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9547 (1994)
160. J.Weigelt, G.Otting. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **113**, 128 (1995)
161. M.Köck, R.Kerssebaum, W.Bermel. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 65 (2003)
162. K.Kövé, P.Forgó. *J. Magn. Reson.*, **166**, 47 (2004)
163. T.Parella, F.Sanchez-Ferrando. *J. Magn. Reson.*, **166**, 123 (2004)
164. S.Berger. *J. Magn. Reson.*, **81**, 561 (1989)
165. M.Ochs, S.Berger. *Magn. Reson. Chem.*, **28**, 994 (1990)
166. R.C.Crouch, J.P.Shockor, G.E.Martin. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5273 (1990)
167. P.Berthault, B.Perly, M.Petitou. *Magn. Reson. Chem.*, **28**, 696 (1990)
168. M.J.Crossley, L.D.Field, J.J.Gosper, B.A.Messerle. *Magn. Reson. Chem.*, **25**, 297 (1987)
169. K.Ding, A.Gronenborn. *J. Magn. Reson.*, **156**, 262 (2002)
170. T.Facke, S.Berger. *Magn. Reson. Chem.*, **33**, 144 (1995)
171. K.Zangger, H.Sterk. *Magn. Reson. Chem.*, **33**, 577 (1995)
172. R.Wagner, S.Berger. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, 470 (1997)
173. T.Facke, S.Berger. *Tetrahedron*, **51**, 3521 (1995)
174. T.Parella, F.Sanchez-Ferrando, A.Virgili. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **114**, 32 (1995)
175. R.Wagner, S.Berger. *Magn. Reson. Chem.*, **35**, 199 (1997)
176. T.Facke, S.Berger. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **119**, 260 (1996)
177. M.Eberstadt, G.Gemmecker, D.F.Mierke, H.Kessler. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 1671 (1995)
178. K.Stott, J.Keeler. *Magn. Reson. Chem.*, **34**, 554 (1996)
179. S.Berger, P.Bast. *Magn. Reson. Chem.*, **31**, 1021 (1993)
180. H.A.Heus, S.S.Wijmenga, F.J.M.van de Ven, C.W.Hilbers. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4983 (1994)
181. J.P.Marino, H.Schwalbe, C.Anklin, W.Bermel, D.M.Crothners, C.Griesinger. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6472 (1994)
182. R.Wagner, S.Berger. *J. Magn. Reson., Ser. A*, **120**, 258 (1996)
183. G.Bodenhausen, D.J.Ruben. *Chem. Phys. Lett.*, **69**, 185 (1980)
184. L.E.Kay, P.Keifer, T.J.Saarinen. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10663 (1992)
185. C.Griesinger, O.W.Sorensen, R.R.Ernst. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6394 (1985)
186. M.D.Sorensen, A.Meissner, O.W.Sorensen. *J. Magn. Reson.*, **137**, 237 (1999)
187. A.G.Palmer III, J.Cavanagh, P.E.Wright, M.Rance. *J. Magn. Reson.*, **93**, 151 (1991)
188. M.Ottiger, F.Delaglio, A.Bax. *J. Magn. Reson.*, **131**, 373 (1998)
189. T.Schulte-Herbrüggen, T.S.Untidt, N.C.Nielsen, O.W.Sorensen. *J. Chem. Phys.*, **115**, 8506 (2001)
190. T.Parella. *J. Biomol. NMR*, **29**, 37 (2004)
191. S.Glaser, J.J.Quant. In *Advances in Magnetic and Optical Resonance. Vol. 19*. (Ed. W.S.Warren). Academic Press, New York, 1996. P. 59

192. M.Ernst, C.Griesinger, R.R.Ernst, W.Bermel. *Mol. Phys.* **74**, 219 (1991)
193. E.R.P.Zuiderweg, L.Zeng, B.Brutscher, R.C.Morshauer. *J. Biomol. NMR*, **8**, 147 (1996)
194. V.Sklenar, T.Dieckmann, S.E.Butcher, J.Feigon. *J. Biomol. NMR*, **7**, 83 (1996)
195. S.R.Hartmann, E.L.Hahn. *Phys. Rev.*, **128**, 2042 (1962)
196. Yu.E.Chernysh, G.S.Borodkin, E.V.Sukholenko, L.E.Nivorozhkin. *J. Magn. Reson.*, **96**, 131 (1992)
197. Ch.J.Turner. *Prog. NMR Spectrosc.*, **16**, 311 (1984)
198. Yu.E.Chernysh, G.S.Borodkin, L.E.Nivorozhkin. *Appl. Magn. Reson.*, **5**, 69 (1993)

THE USE OF SELECTIVE METHODS OF HETERONUCLEAR NMR SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF MULTICOMPONENT SYSTEMS

Yu.E.Chernysh, V.A.Volynkin, V.T.Panyushkin, V.I.Kondakov, M.S.Korobov, G.S.Borodkin

Institute of Physical and Organic Chemistry of the Rostov State University

194/2, Prosp. Stachki, 344090 Rostov-on-Don, Russian Federation, Fax +7(8632)43-4667

Kuban State University

149, Ul. Stavropolskaya, 350040 Krasnodar, Russian Federation, Fax +7(8612)69-9570

Grodno State Agrarian University

28, Ul. Tereshkovoï, 230008 Grodno, Belarus, Fax +37(515)277-0168

Some important aspects of the use of selective techniques in NMR spectroscopy for interpreting the spectra of complex multicomponent systems, measuring the spin-spin coupling constants, and determination of compound structures are discussed. Procedures for recording selective spectra and the application of selective radio frequency pulses together with magnetic field gradient pulses are described. The practical methods for suppression of water signals in the study of biological samples are considered. Bibliography — 198 references.

Received 19th August 2004