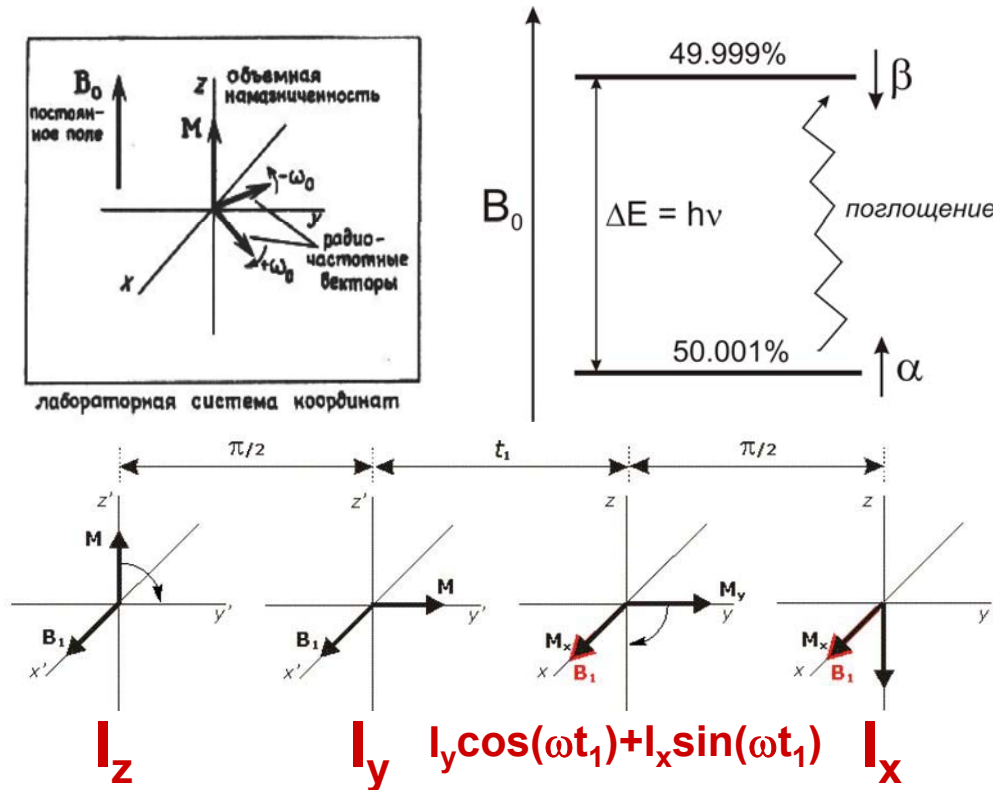


Современные инверсные методы двумерной спектроскопии ЯМР. Возможности косвенной детекции в спектроскопии ЯМР.

- 1. Что такое когерентность и с чем ее едят? Способы конструирования многоимпульсных последовательностей. Типичные ошибки постановки ЯМР-эксперимента.**
- 2. Избирательная регистрация нужной когерентности и подавление нежелательных – важный аспект инверсной двумерной спектроскопии ЯМР.**
- 3. Примеры инверсных двумерных спектров, аналогия с «прямыми» и отличия от них. Основные преимущества и недостатки инверсной спектроскопии ЯМР.**
- 4. Примеры использования косвенной детекции – «фокусы-мокусы» многоимпульсного ЯМР.**
- 5. Возможность измерения коэффициента диффузии методом ЯМР. Диффузионно ориентированная спектроскопия.**

Прецессирующие вектора – способ наглядного изображения более общего понятия – **спиновой когерентности**



В действительности (в рамках аппарата квантовой механики) ничего в системе координат не прецессирует, а возбуждается особое неравновесное состояние спиновой системы, характеризующееся когерентными переходами между определенными уровнями энергии, которое может сохраняться долго. Такие состояния принято называть **когерентностями**.

I_z – природная Z-намагниченность

I_x, I_y – наблюдаемые одноквантовые когерентности с обычным расщеплением

$I_x^A I_z^B$ – наблюдаемая когерентность с противофазным расщеплением

$I_x^A I_y^B$ – ненаблюдаемая двухквантовая когерентность

Что можно делать с когерентностью?

Когерентности различного типа отличаются по фазовым свойствам.

Когерентности реагируют на воздействие РЧ-импульсами и градиентами поля.

Когерентности могут передаваться с ядра на ядро через механизмы:

- спин-спинового взаимодействия
- релаксации (ядерного эффекта Оверхаузера)
- химического обмена

Когерентности можно избирательно:

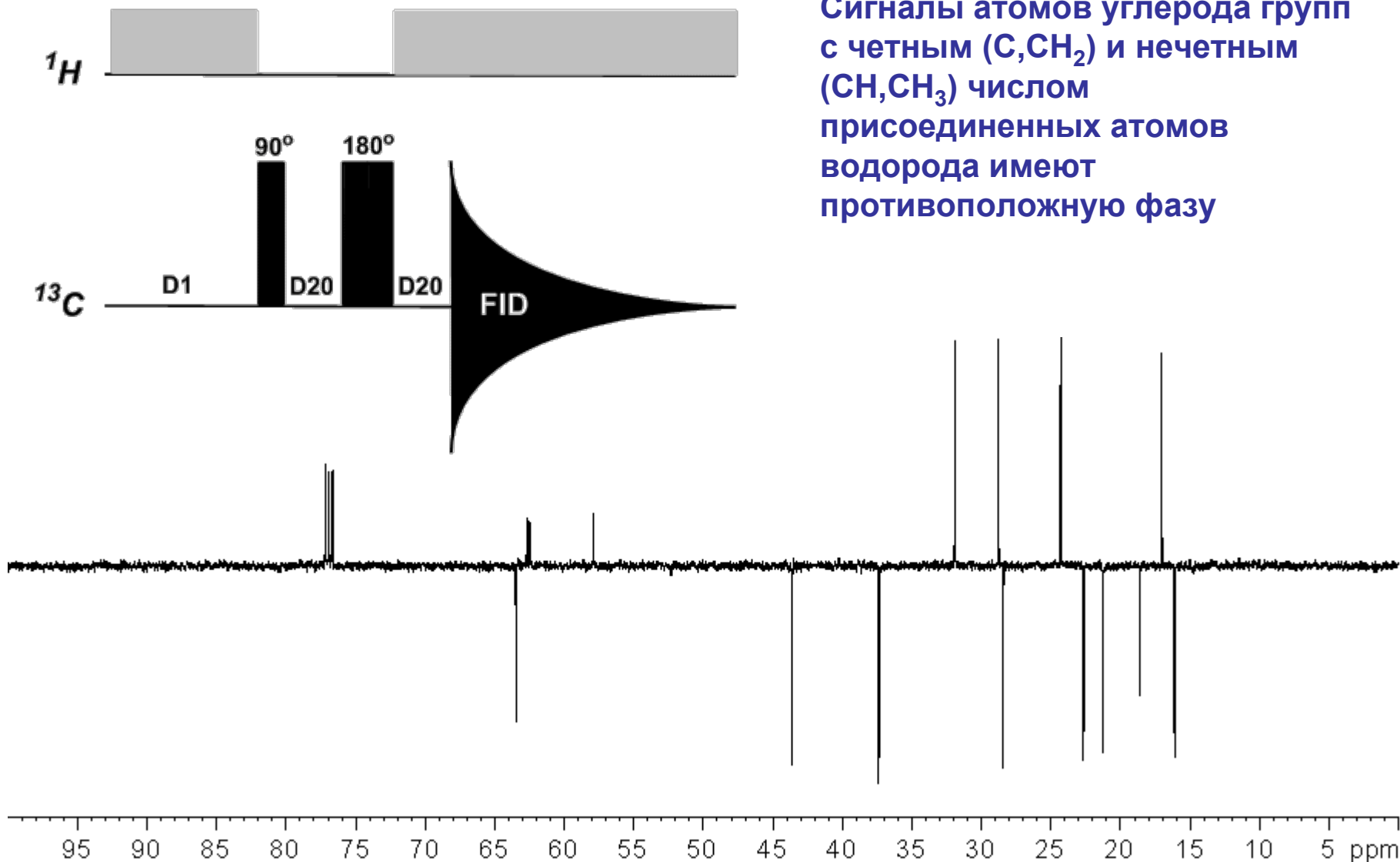
- дефокусировать совсем, или с последующей рефокусировкой (спиновое эхо)
 - модулировать по частотам прецессии сдвигов или КССВ, откладывая их вместе или раздельно по оси F_1 , или подавлять эту модуляцию
 - переводить одну когерентность в другую (перенос поляризации)
 - селективно отбирать нужные и подавлять нежелательные когерентности
- и так далее – до тех пор, пока когерентность не исчезнет необратимо вследствие релаксации.

Непосредственно наблюдать (в одномерном спектре) можно только одноквантовые когерентности. Однако «ненаблюдаемые» многоквантовые когерентности часто используют для «редактирования» спектра или даже наблюдают косвенно по оси F_1 в некоторых типах двумерных спектров.

Отложить по косвенной оси – оси F_1 двумерного спектра – можно практически все, что угодно, лишь бы от этого зависел сигнал.

Спектр ЯМР ^{13}C JMOD

Сигналы атомов углерода групп с четным (C, CH_2) и нечетным (CH, CH_3) числом присоединенных атомов водорода имеют противоположную фазу



Расчет когерентности: импульсная последовательность JMOD

синглет C

$+C_z$
||
90[C,x]
||
V
-Cy
||
1/2J
||
V
-Cy
||
180[C,y]
||
V
-Cy
||
180[H,x]
||
V
-Cy
||
1/2J
||
V
-Cy

отрицательный

дублет CH

$+C_z$
||
90[C,x]
||
V
-Cy
||
1/2J
||
V
+2HzCx
||
180[C,y]
||
V
-2HzCx
||
180[H,x]
||
V
+2HzCx
||
1/2J
||
V
+Cy

положительный

триплет CH₂

$+C_z$
||
90[C,x]
||
V
-Cy
||
1/2J
||
V
+4HzHzCy
||
180[C,y]
||
V
+4HzHzCy
||
180[H,x]
||
V
+4HzHzCy
||
1/2J
||
V
-Cy

отрицательный

квартет CH₃

$+C_z$
||
90[C,x]
||
V
-Cy
||
1/2J
||
V
-8HzHzHzCx
||
180[C,y]
||
V
+8HzHzHzCx
||
180[H,x]
||
V
-8HzHzHzCx
||
1/2J
||
V
+Cy

положительный

Расчет когерентности: **JMOD**, неправильная задержка

$+Cz$
 $\parallel$
 $90[C,x]$
 $\parallel$
 $\vee$
 $-Cy$
 $\parallel$
 t
 $\parallel$
 $\vee$
 $-Cycos(PJt)+2HzCxsin(PJt)$
 $\parallel$
 $180[C,y]$
 $\parallel$
 $\vee$
 $-Cycos(PJt)-2HzCxsin(PJt)$
 $\parallel$
 $180[H,x]$
 $\parallel$
 $\vee$
 $-Cycos(PJt)+2HzCxsin(PJt)$
 $\parallel$
 t
 $\parallel$
 $\vee$
 $-Cycos(2PJt)+2HzCxsin(2PJt)$
 $\parallel$
 $decoupling$
 $\parallel$
 $\vee$
 $-Cy \cos(2\pi J\tau)$

Пусть мы настроились на КССВ $J = 125$ Гц

$J = 125$ Гц: $\tau = 1/2J$, интенсивность $\sim +1$

$J = 165$ Гц: $\tau = 0.66/J$, интенсивность $\sim +0.54$

$J = 187.5$ Гц: $\tau = 0.75/J$, интенсивность ~ 0

$J = 210$ Гц: $\tau = 0.84/J$, интенсивность ~ -0.54

Просчеты при предварительной оценке КССВ могут приводить:

- к существенному ослаблению сигнала
- иногда к практически полному исчезновению сигнала
- изредка даже к качественному изменению картины

что может приводить к ошибкам при анализе спектра

Расчет когерентности: JMOD, неправильный импульс

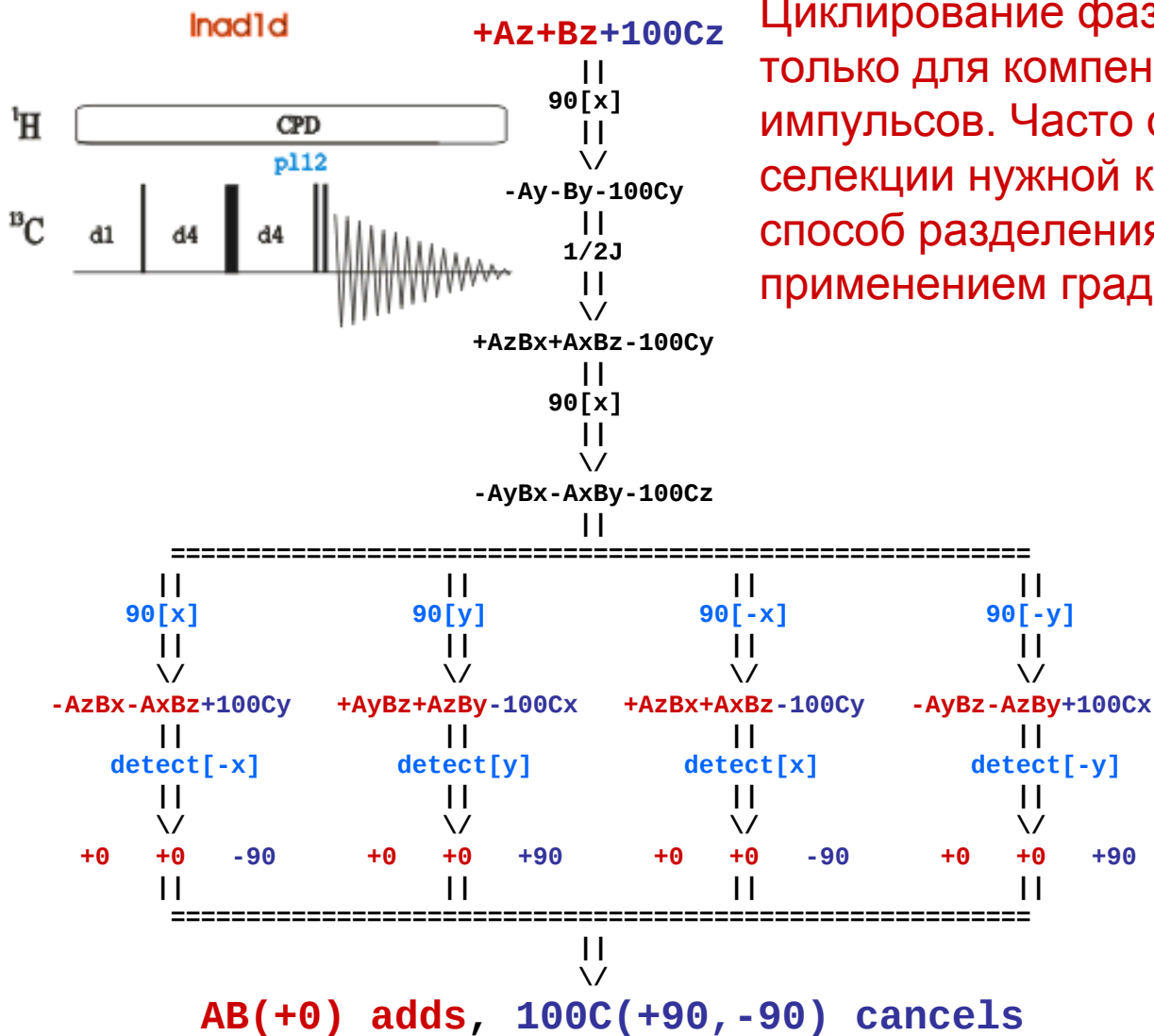
$$\begin{array}{c}
 +Cz \\
 \parallel \\
 B[C,x] \\
 1/2J \\
 2B[C,y] \\
 2B[H,x] \\
 1/2J \\
 \parallel \\
 \vee \\
 +Cz\cos(2B)\cos(B)+2HzCysin(2B)\cos(B)+Cycos(2B)\cos(2B)\sin(B)- \\
 2HyCx\sin(2B)\cos(2B)\sin(B)-2HzCz\cos(2B)\sin(2B)\sin(B)-Hx\sin(2B)\sin(2B)\sin(B) \\
 \parallel \\
 \text{decoupling} \\
 \parallel \\
 \vee \\
 Cy \cos(2\beta) \cos(2\beta) \sin(\beta)
 \end{array}$$

Пусть мы думали, что 90° импульс = 8 мкс

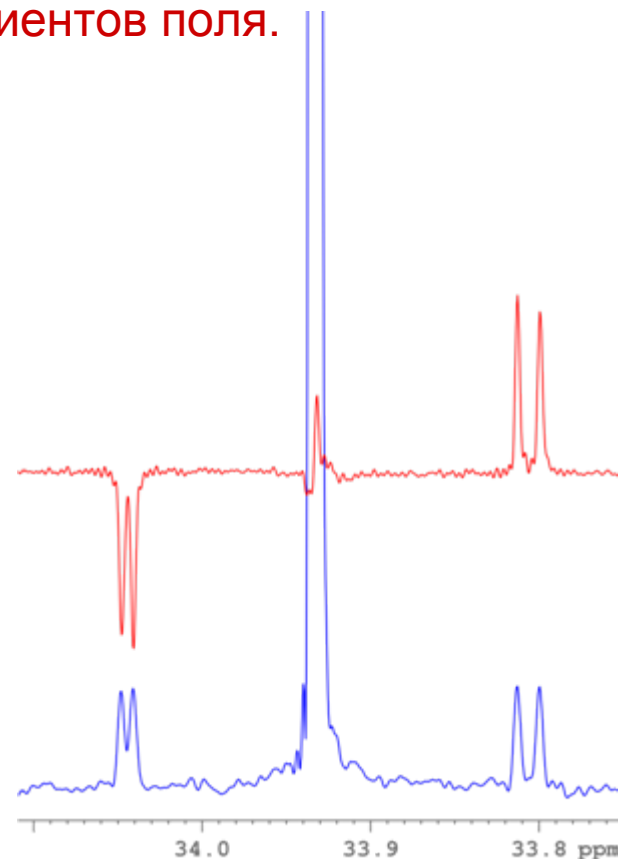
90° = 8 мкс: интенсивность	~ 1
90° = 10 мкс: интенсивность	~ 0.62
90° = 12 мкс: интенсивность	~ 0.22
90° = 14 мкс: интенсивность	~ 0.04
90° = 16 мкс: интенсивность	~ 0

Даже незначительные ошибки калибровки импульсов (особенно 180°) могут приводить к радикальному ухудшению чувствительности эксперимента, а также к появлению артефактов. Чем больше импульсов в программе, тем важнее их корректная калибровка.

Расчет когерентностей: последовательность **INADEQUATE** пример циклирования фазы

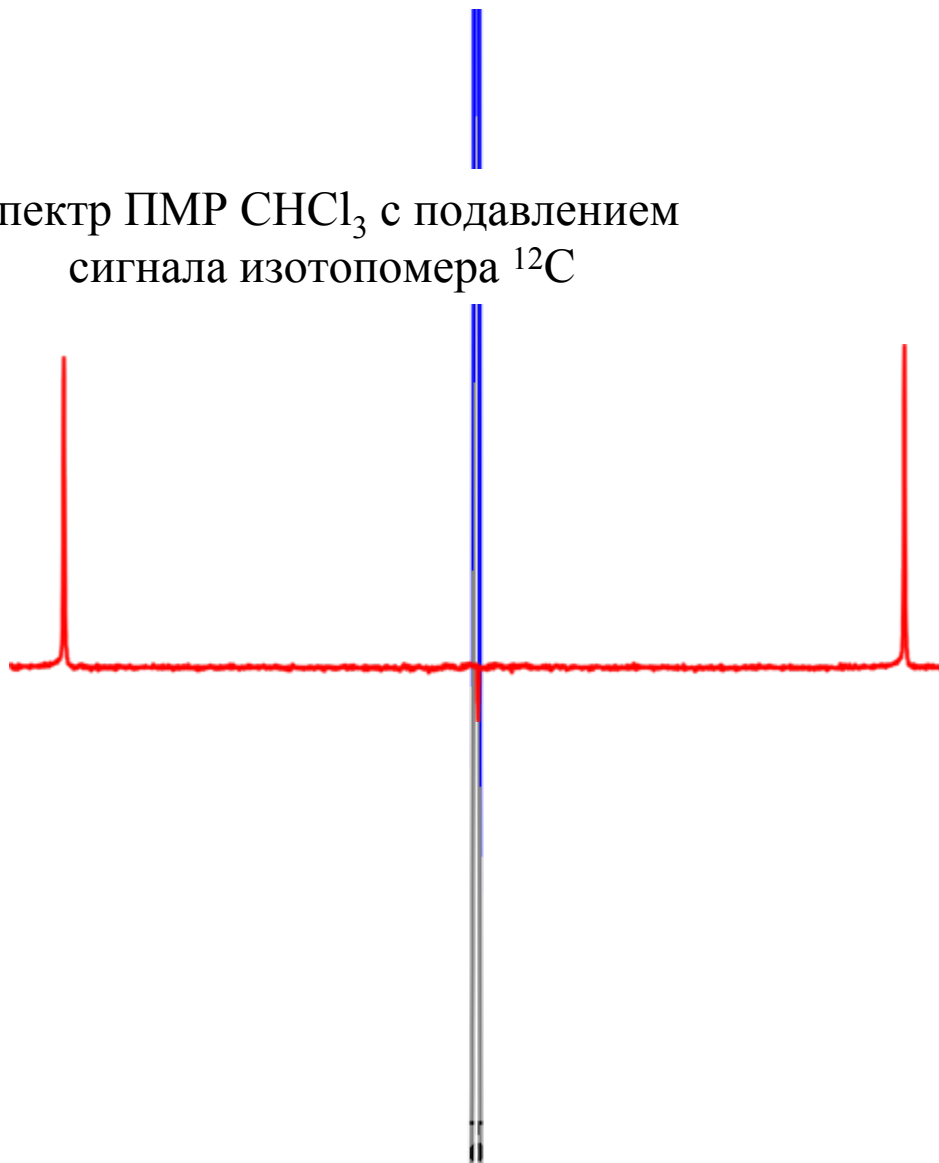


Циклирование фазы бывает необходимо не только для компенсации некачественных импульсов. Часто оно необходимо для селекции нужной когерентности. Другой способ разделения когерентностей – с применением градиентов поля.



Подавление «вредных» когерентностей в 100 раз более
распространенных изотопомеров ^{12}C исключительно
важно для инверсной спектроскопии

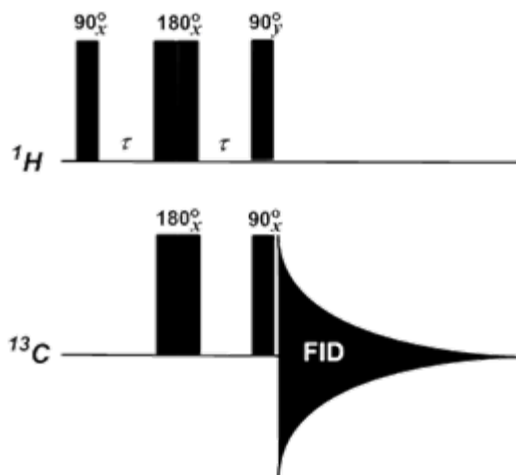
Спектр ПМР CHCl_3 с подавлением
сигнала изотомера ^{12}C



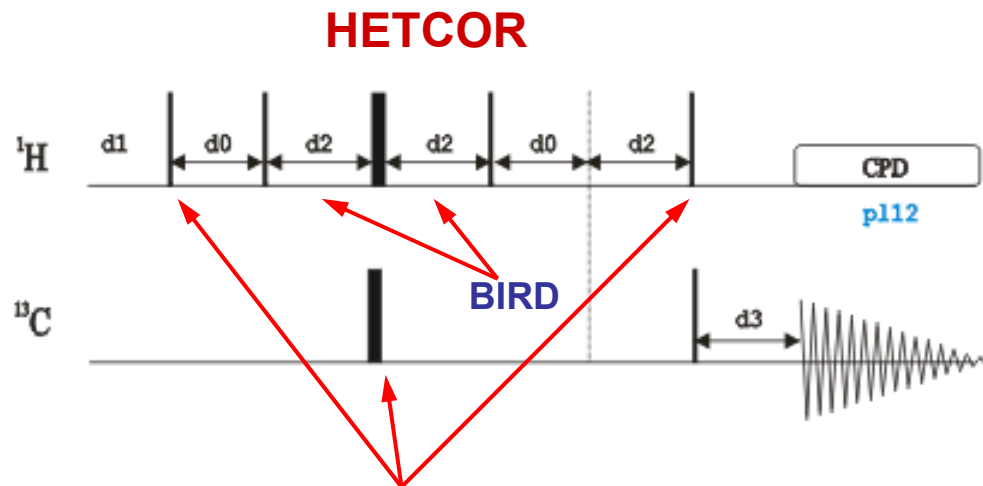
Спектр ЯМР ^{19}F перфторпиридина
с подавлением
сигнала изотомера ^{12}C



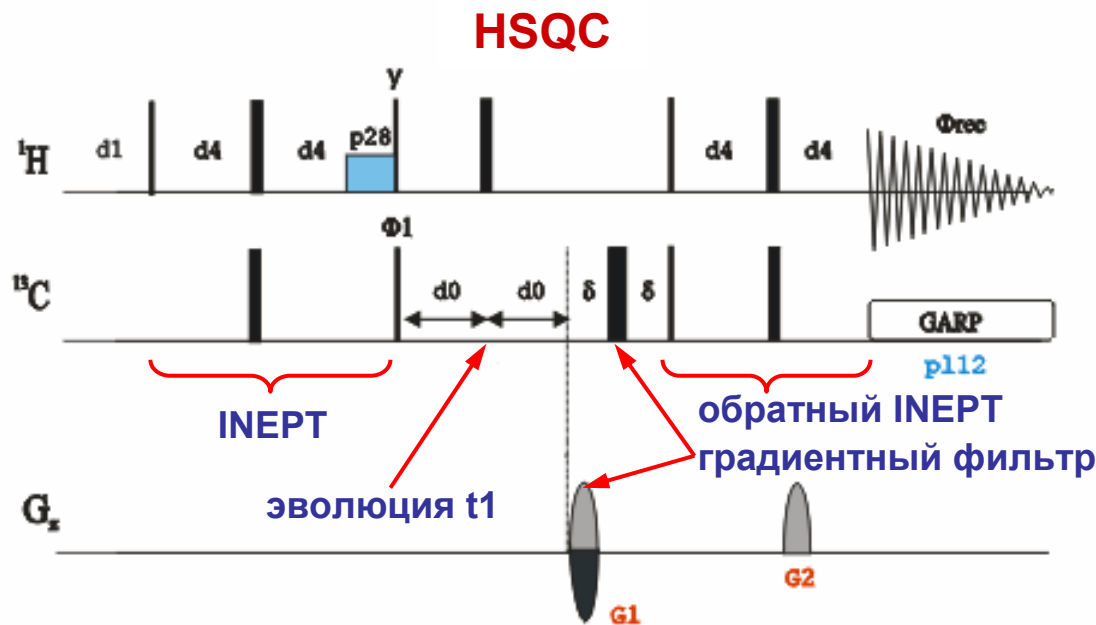
Примеры устройства гетероядерных корреляций



Стандартная последовательность INEPT



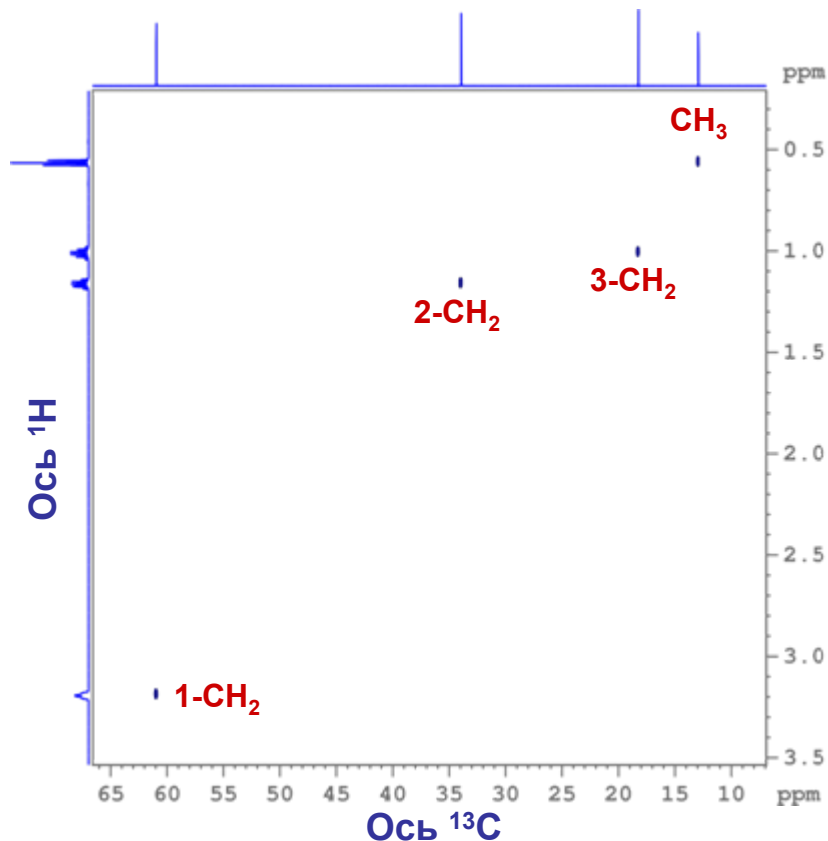
элементы INEPT в HETCOR



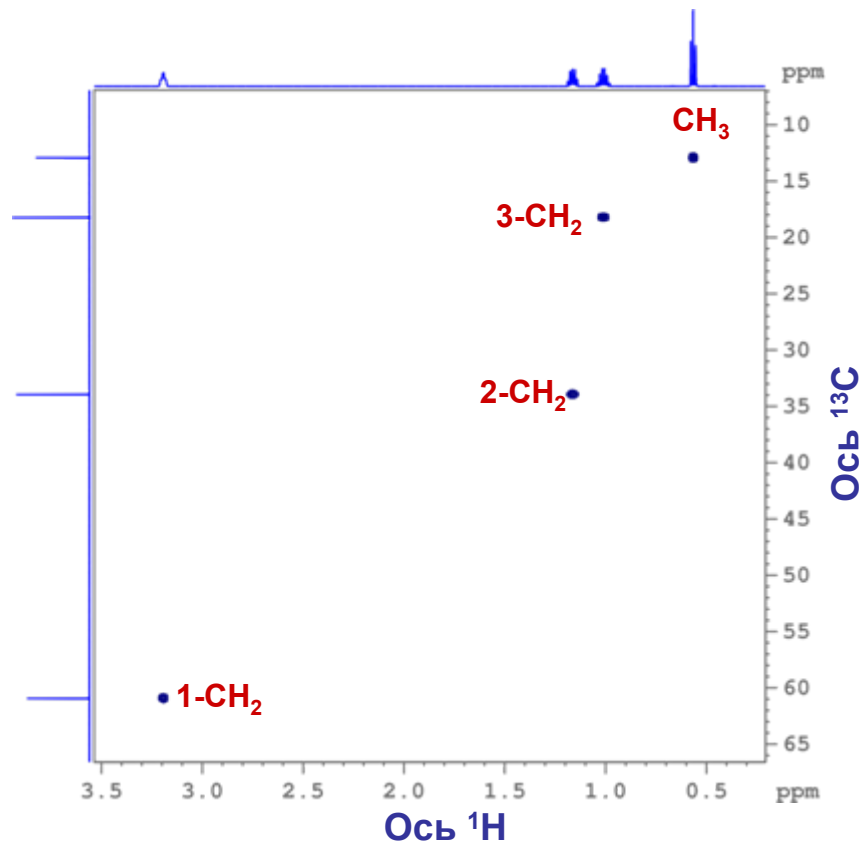
Часто в сложных импульсных последовательностях используются одни и те же «стандартные блоки», это облегчает понимание устройства имеющихся импульсных программ, их модификацию и дизайн новых

Корреляции ^1H - ^{13}C на КССВ $^1J_{\text{CH}}$ н-бутанола $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

HETCOR - «прямая детекция»



HSQC - «инверсная детекция»



AV-600: время регистрации 1 час

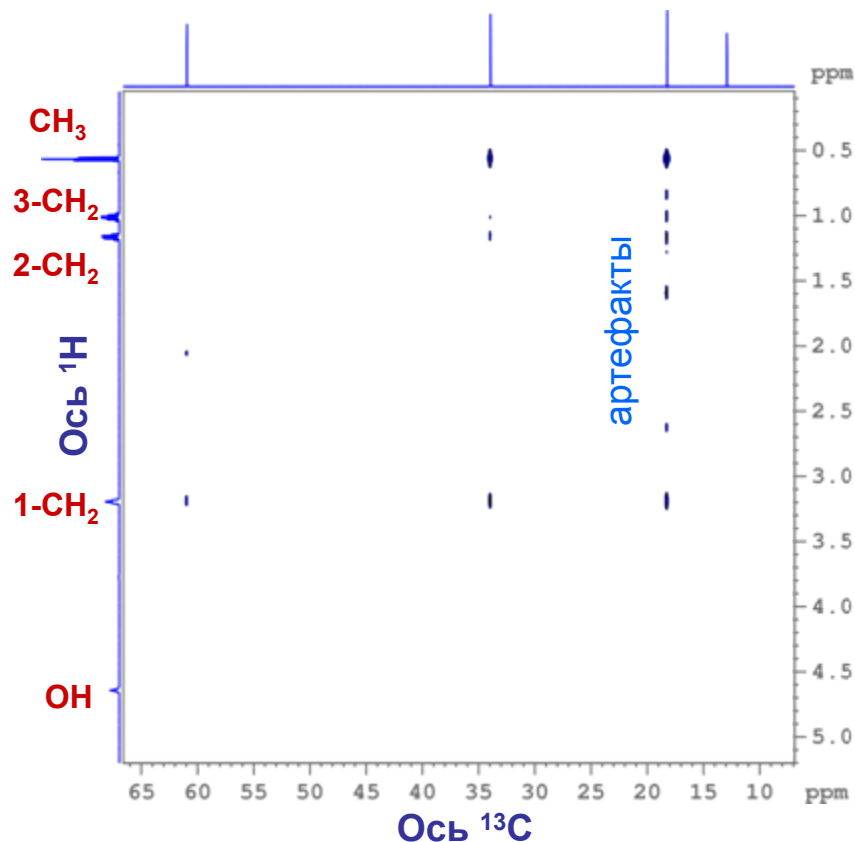
- очень узкие пики по оси ^{13}C
- уширенные синглеты по оси ^1H
- хорошая чувствительность
- простая постановка эксперимента

AV-600: время регистрации 10 мин

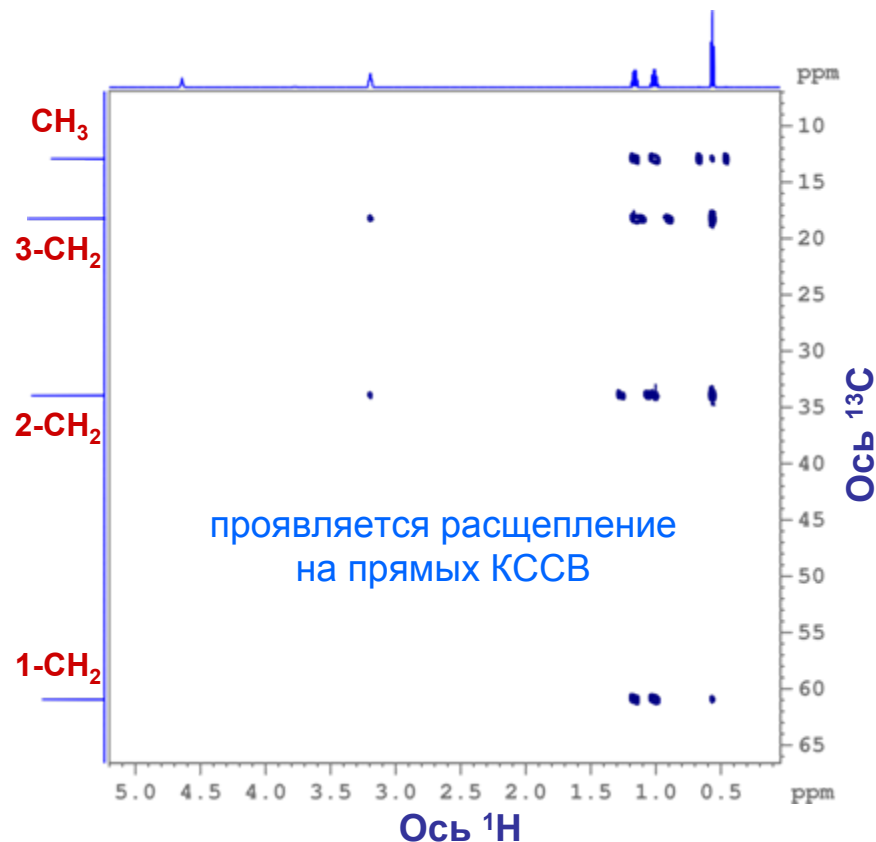
- уширенные пики по оси ^{13}C
- мультиплеты по оси ^1H
- очень высокая чувствительность
- простая постановка эксперимента
- требуется градиентная система

Корреляции ^1H - ^{13}C на дальних КССВ $^nJ_{\text{CH}}$ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

COLOC - «прямая детекция»



HMBC - «инверсная детекция»



AV-600: время регистрации 2 часа

- очень узкие пики по оси ^{13}C
- широкие синглеты по оси ^1H
- низкая чувствительность
- простая постановка эксперимента

AV-600: время регистрации 24 мин

- уширенные пики по оси ^{13}C
- мультиплеты по оси ^1H
- очень высокая чувствительность
- простая постановка эксперимента
- требуется градиентная система

Чувствительность гетероядерных корреляций

$$^1\text{H}: \gamma = 26.7519 \times 10^{-7} \text{ рад} \times \text{T}^{-1} \times \text{с}^{-1}$$

$$^{13}\text{C}: \gamma = 6.7283$$

$$^{15}\text{N}: \gamma = -2.712$$

$$^{19}\text{F}: \gamma = 25.181$$

$$^{31}\text{P}: \gamma = 10.841$$

равновесная намагниченность	$\sim \gamma$
чувствительность детектирования	$\sim \gamma^{3/2}$

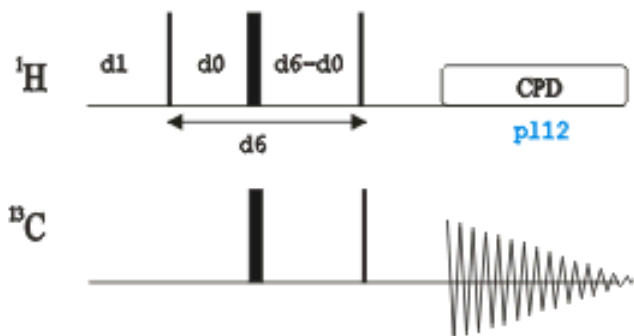
возбуждение и детекция X-ядра	~ 1	1D ЯМР
возбуждение ^1H , детекция X	$\sim \gamma_{\text{H}} / \gamma_{\text{X}}$	2D, «прямая» детекция
возбуждение X, детекция ^1H	$\sim (\gamma_{\text{H}} / \gamma_{\text{X}})^{3/2}$	2D, «инверсная» детекция
возбуждение ^1H , детекция ^1H	$\sim (\gamma_{\text{H}} / \gamma_{\text{X}})^{5/2}$	реальная инверсная 2D

детекция	^{13}C	^{15}N
1D	1	1
прямая	4	10
инверсная	32	300

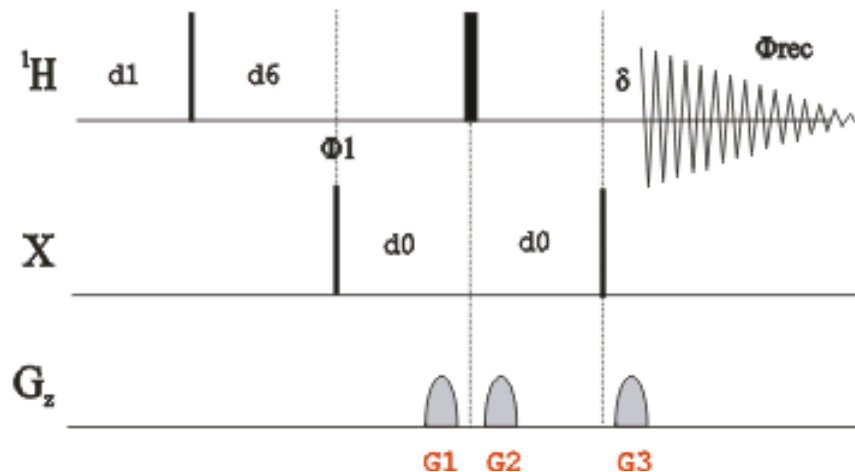
Чувствительность современных инверсных корреляций с возбуждением ^1H , переносом поляризации на ^{13}C (или ^{15}N), эволюцией, последующим обратным переносом поляризации и детектированием ^1H может значительно (на порядок для ^{13}C , на два порядка для ^{15}N) превосходить чувствительность, достижимую в обычных одномерных спектрах

Примеры устройства гетероядерных корреляций

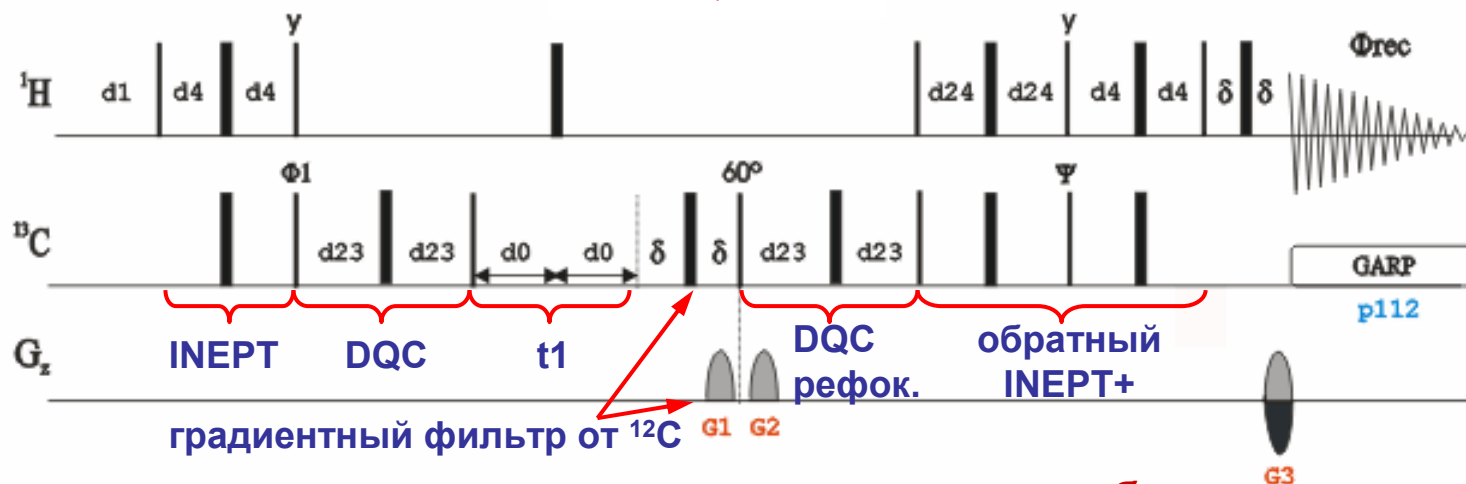
COLOC



HMBC



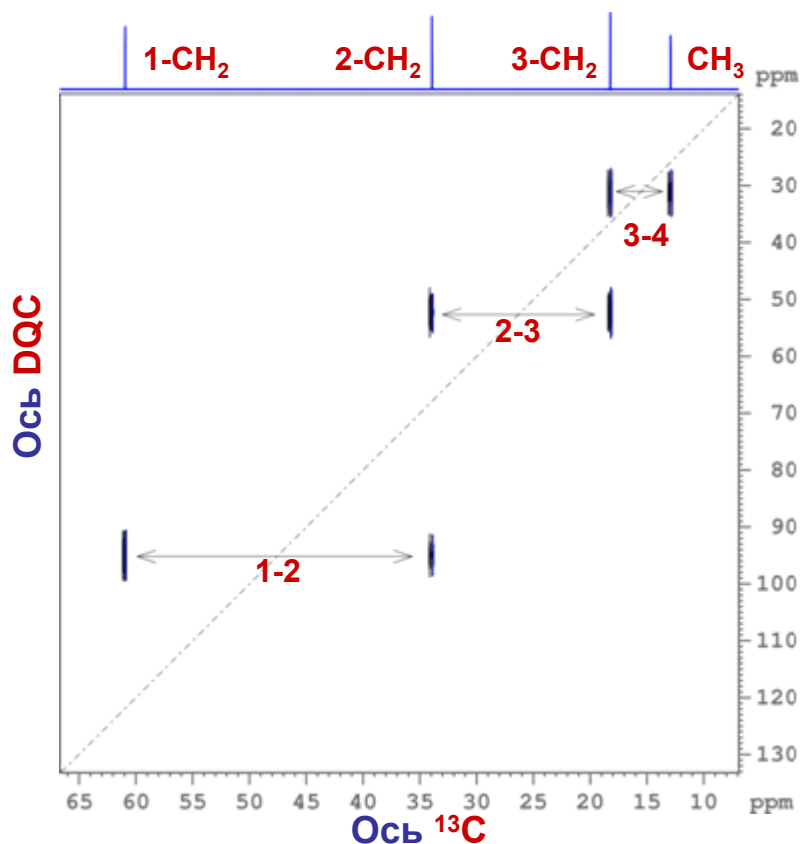
ADEQUATE



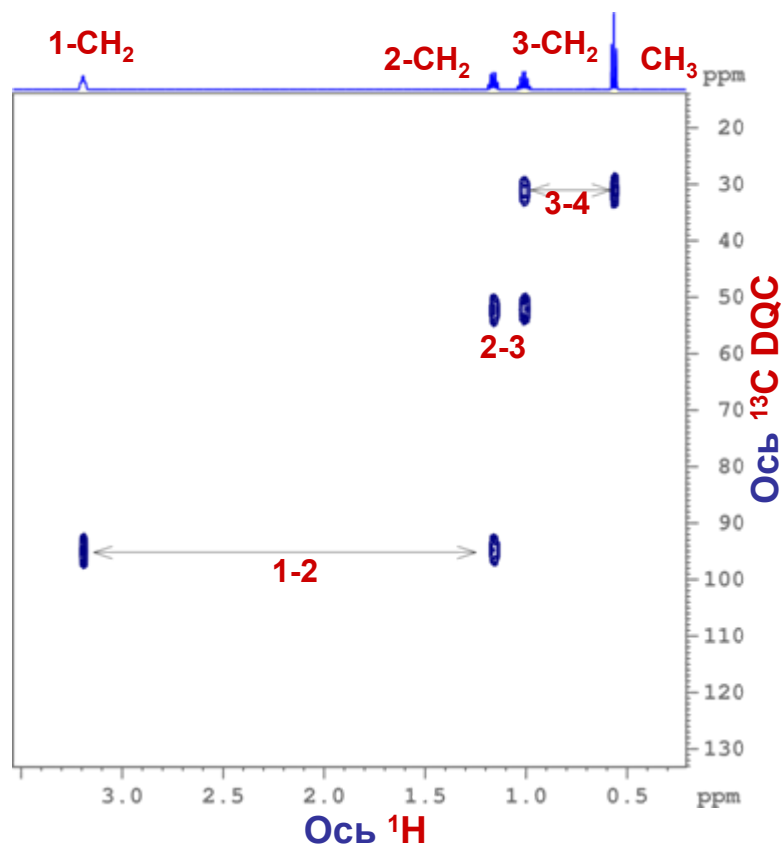
Чем сложнее устроена импульсная программа, тем она больше похожа на девушку: хороший спектр не получается, пока ее не «уговоришь»...

Корреляции ^{13}C - ^{13}C на КССВ $^1J_{\text{CC}}$ $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$

INADEQUATE - «прямая детекция»



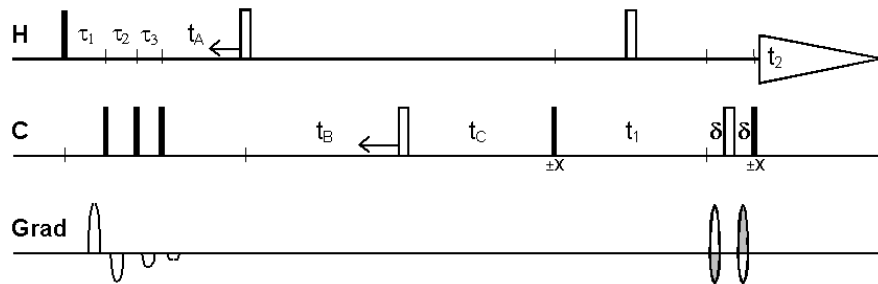
ADEQUATE - «инверсная детекция»



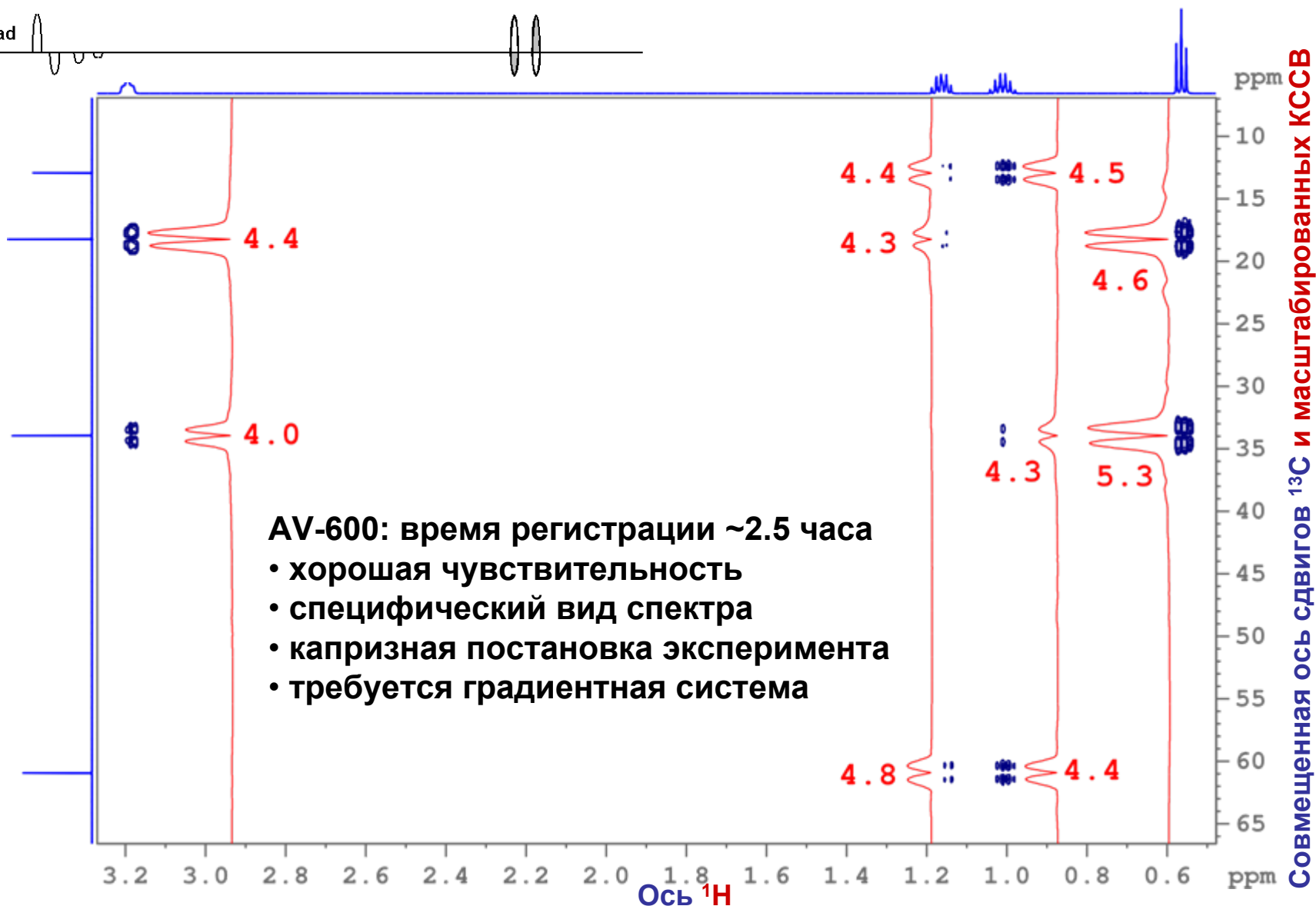
- AV-600: время регистрации ~1.5 часа
- исключительная информативность
 - очень низкая чувствительность
 - капризная постановка эксперимента

AV-600: время регистрации 57 мин

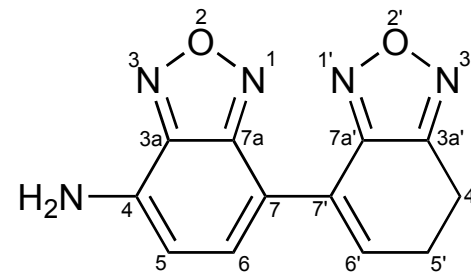
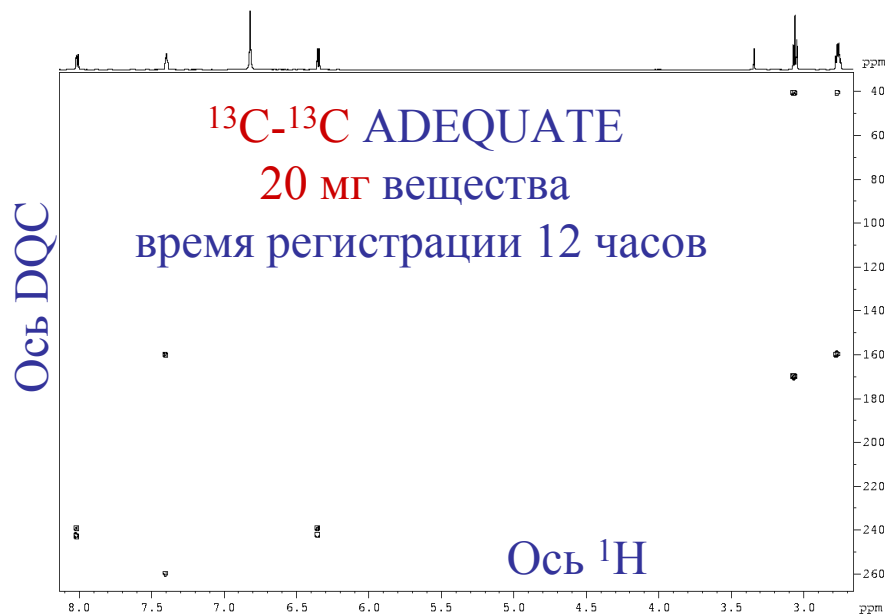
- исключительная информативность
- приемлемая чувствительность
- нетривиальный анализ спектра
- капризная постановка эксперимента
- требуется градиентная система



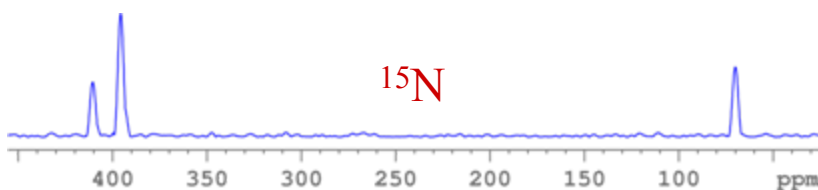
J-HMBC для $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ **измерение дальних $^nJ_{\text{CH}}$**



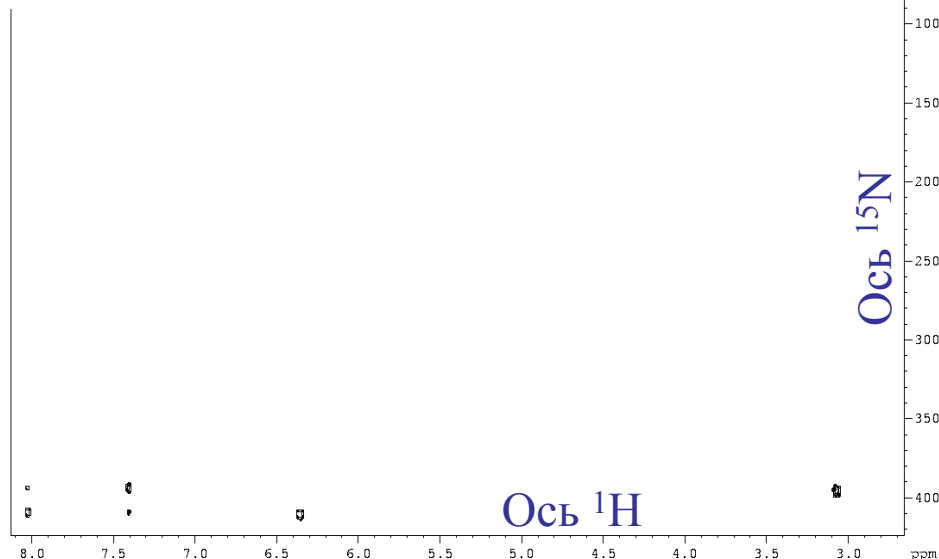
Реальные возможности инверсной спектроскопии



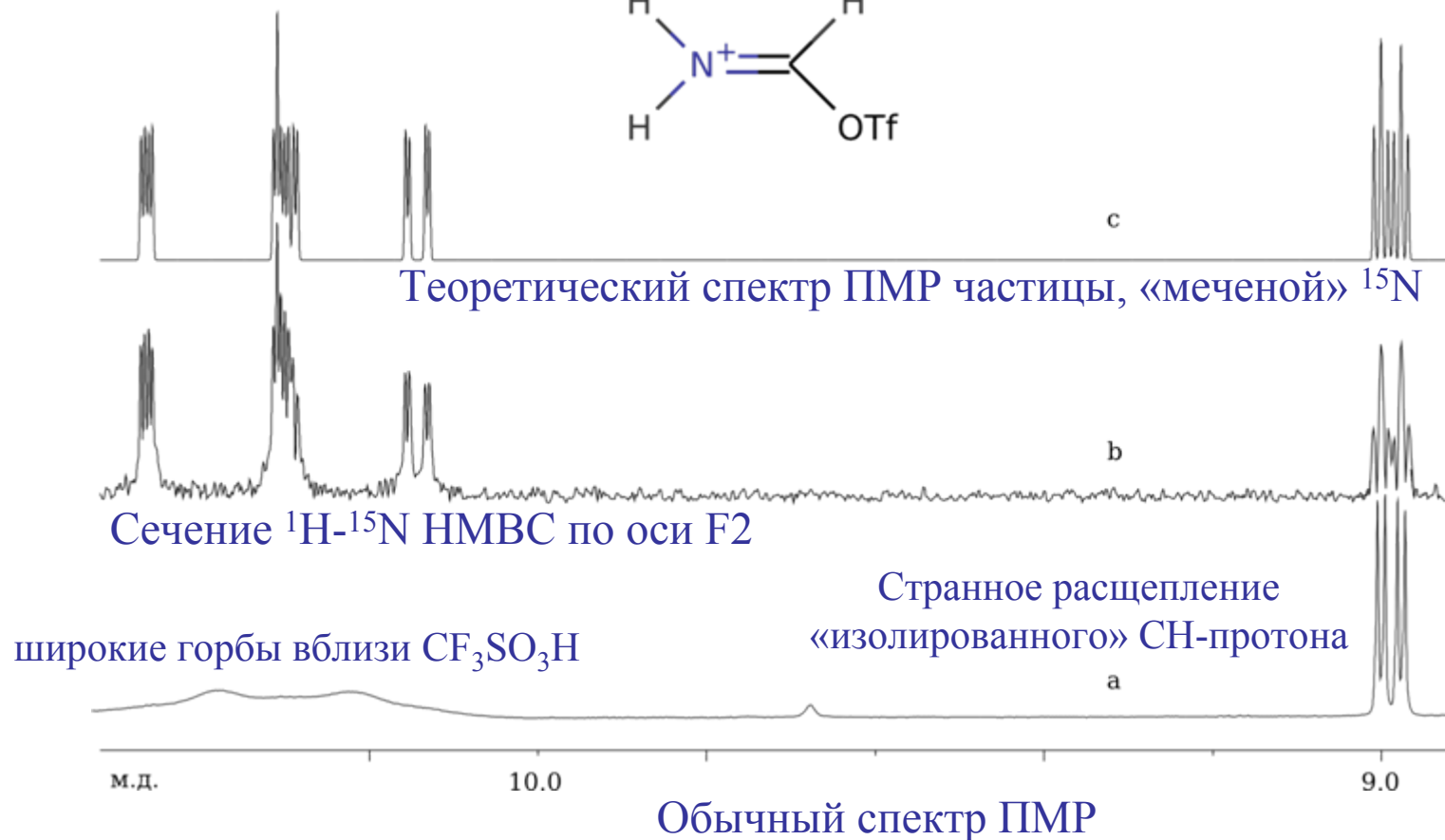
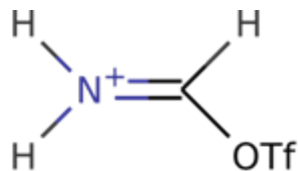
^1H - ^{15}N HMBC на дальних КССВ
20 мг вещества на природном содержании
время регистрации – 33 минуты



Проекция по оси F1 может быть единственным способом получить спектр ЯМР ^{15}N (косвенный) при малой концентрации вещества

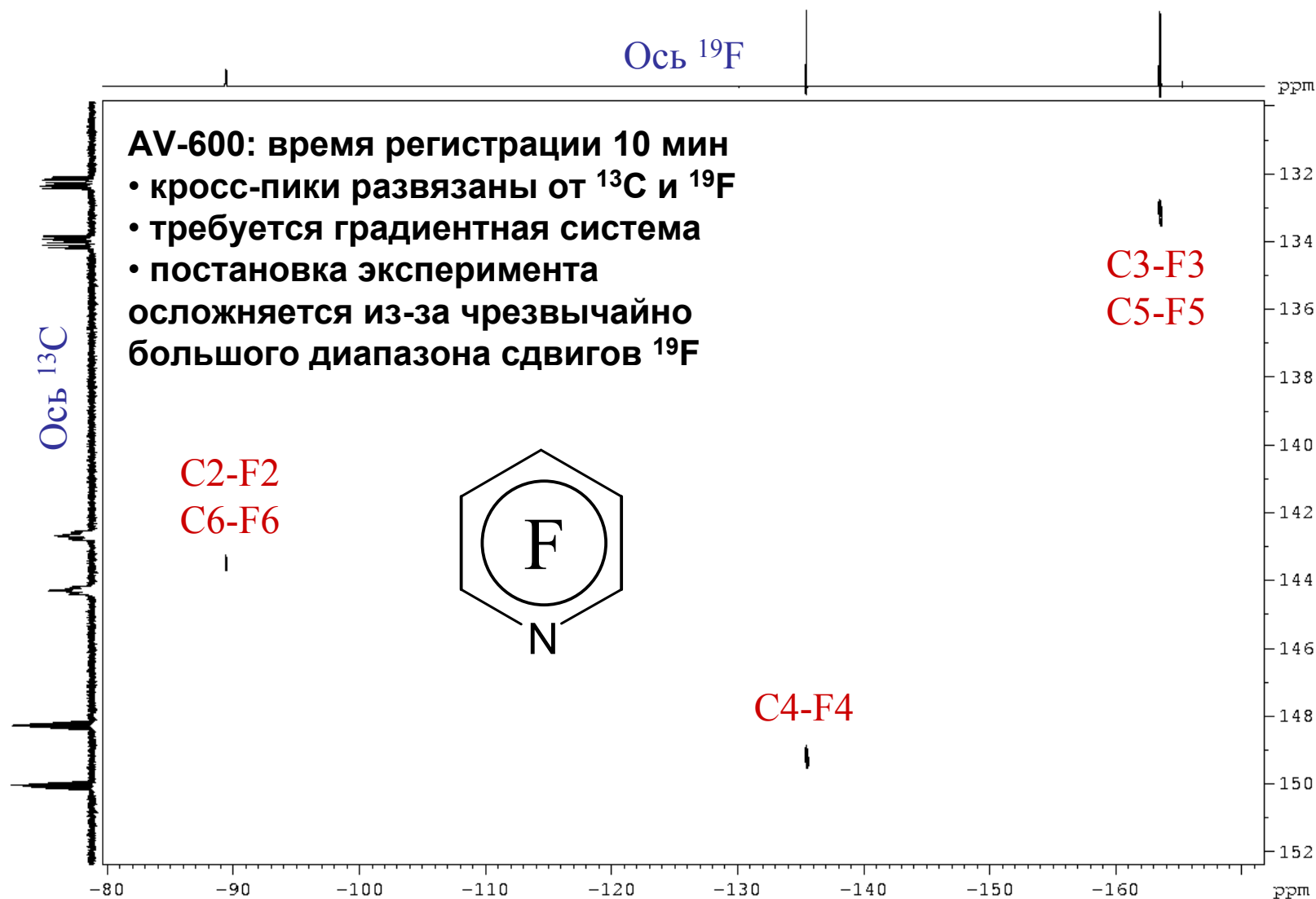


Экзотическое применение инверсной спектроскопии



- успешная расшифровка «странных» спектров ЯМР ^1H и ^{13}C
- возможность точно измерить сдвиги протонов, уширенных квадрупольным взаимодействием с ^{14}N
- возможность точно измерить геминальную КССВ Н-Н-Н

Корреляция ^{19}F - ^{13}C HMQC на прямых КССВ $^1J_{\text{CF}}$ перфторпиридина



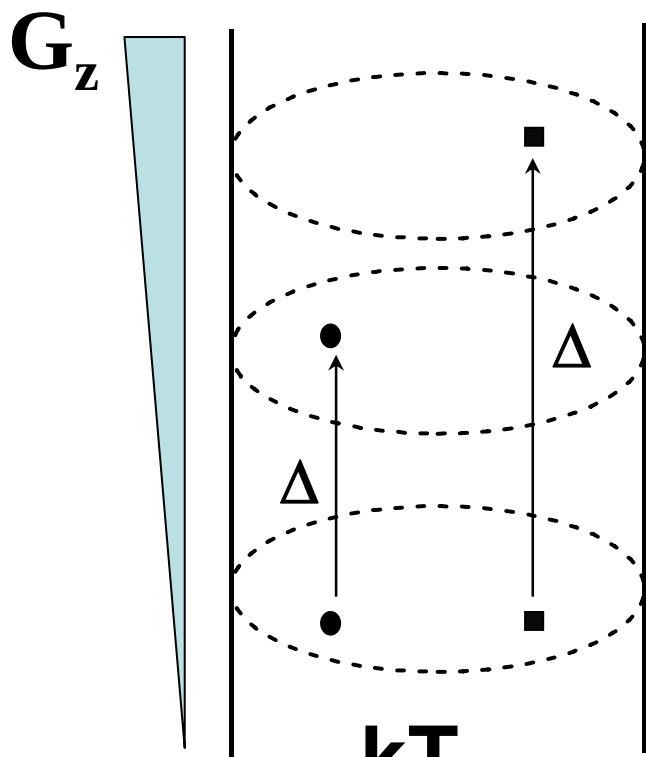
Преимущества и недостатки инверсной детекции

Всегда ли нужно стремиться регистрировать инверсные корреляции, а не прямые?

- Преимущество инверсных корреляций – **высокая чувствительность**
- Но **по оси F1 сигналы уширены** из-за недостаточного цифрового разрешения и дополнительных модуляций
- Также требуется наличие градиентной системы

Если градиентная система отсутствует, зарегистрировать достаточно качественный инверсный спектр малореально. Если спектрометр оснащен градиентной системой – **как правило, целесообразно регистрировать гетероядерные корреляции в инверсном режиме, за исключением тех случаев, когда необходимо высокое разрешение по оси ^{13}C**

Диффузионно ориентированная спектроскопия – DOSY



$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_s}$$

k – константа Больцмана

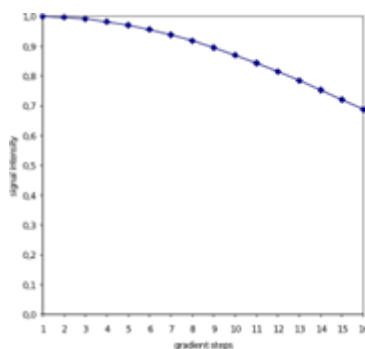
T – температура

η – вязкость

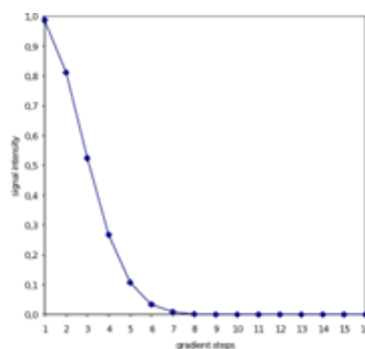
R_s – гидродинамический радиус



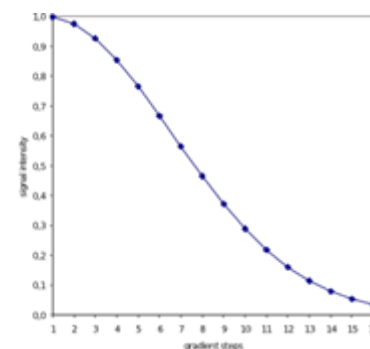
$$I = I_0 \exp[-2\tau/T_2 - (\gamma\delta G)^2 D(\Delta - \delta/3)]$$



медленная
диффузия



быстрая
диффузия



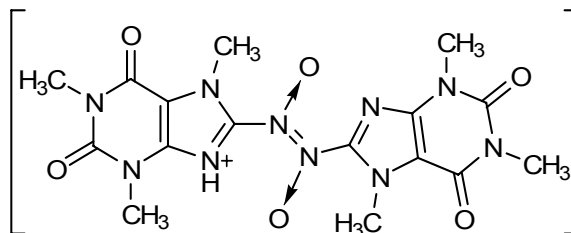
промежуточная
диффузия

Обращение преобразования Лапласа

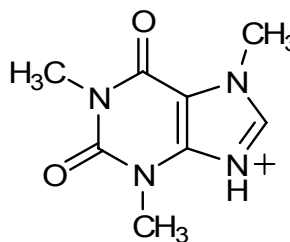
Спектр DOSY

Двумерный спектр DOSY

компонент-В



компонент-А



$$R_s(B) = 1,35 \cdot R_s(A)$$

lgD

-8.64

-8.62

-8.60

-8.58

-8.56

-8.54

-8.52

-8.50

-8.48

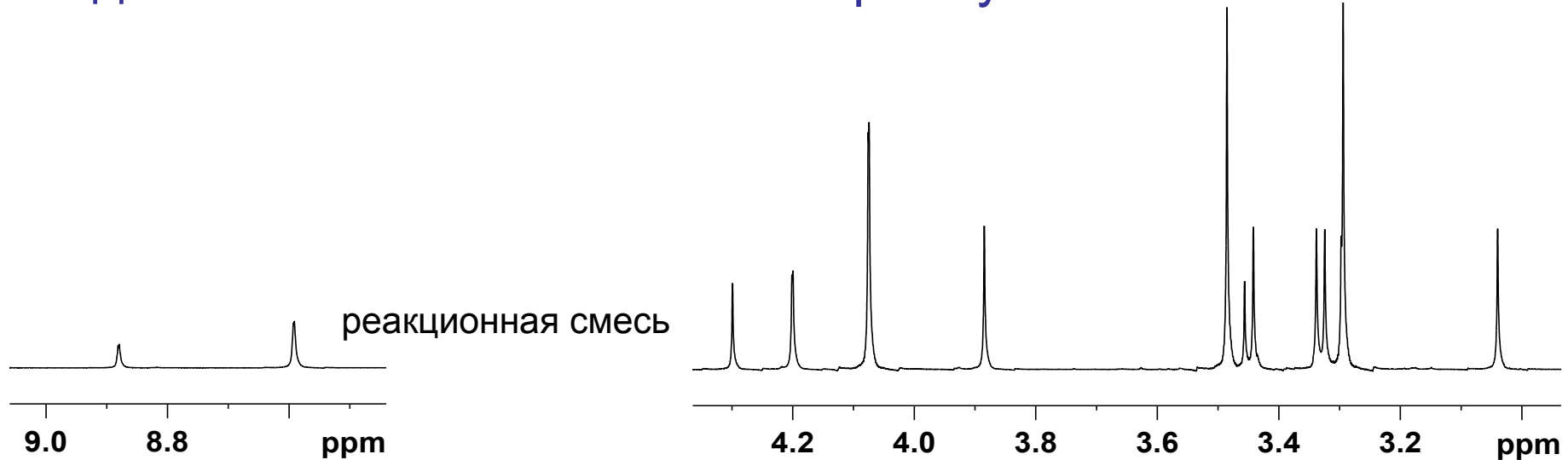
-8.46

-8.44

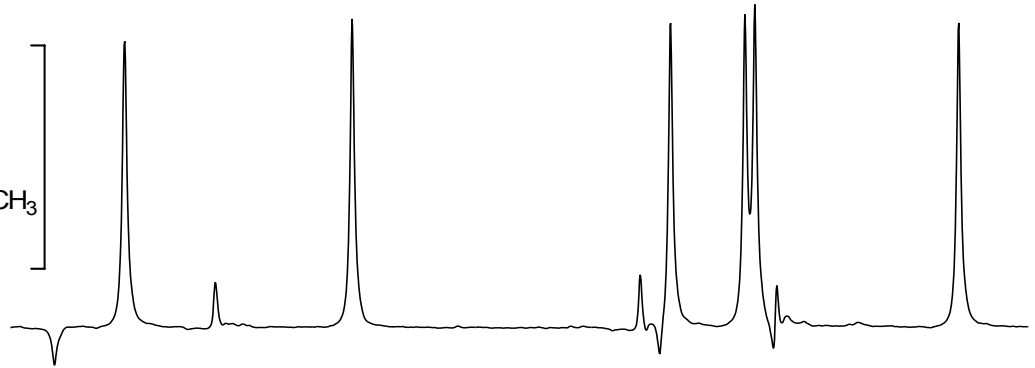
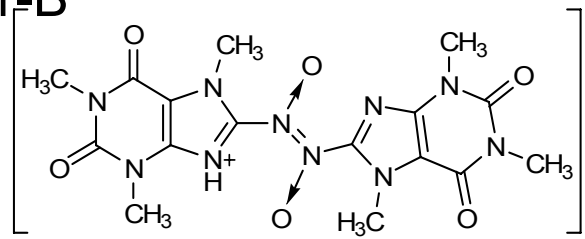
-8.42

ppm

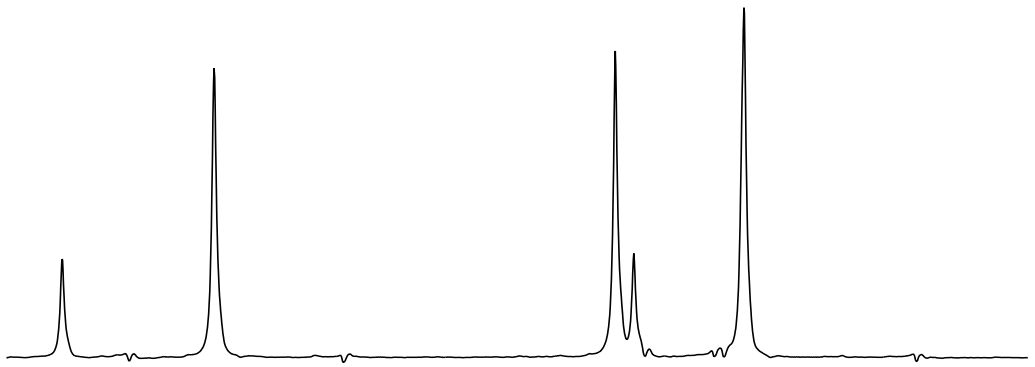
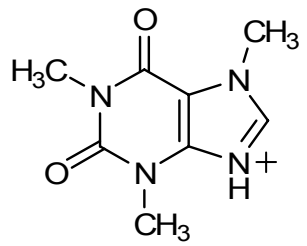
Разделение компонентов по алгоритму DECRA



компонент-B



компонент-A



Литература

1. Эрнст, Боденхаузен, Вокаун, «ЯМР в одном и двух измерениях» в переводе К. М. Салихова – кладезь мудрости, но чересчур «жесткое чтение», раскроешь – мозги набекрень съедут...
2. Бакс, «Двумерный ядерный магнитный резонанс в жидкости» в переводе И. В. Коптюга – тоже очень умная книга, но не до такой степени – уже читается с удовольствием...
3. T. Claridge, «High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry» – исключительно полезная книга, «must read» по нашей теме.
4. Некоторые полезные источники в Интернете:
<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/>
http://chem4823.usask.ca/nmr/practical_nmr.html
http://nmrwiki.org/wiki/index.php?title=Main_Page
http://homepages.strath.ac.uk/~bas01125/NMR_Teaching_Material/Teaching%20Links.htm

До сих пор не охваченные нами практические вопросы спектроскопии ЯМР – предлагаемая тема для еще одной лекции

- 1. Сравнительный обзор практических возможностей ЯМР спектрометров НИОХ: AV-300, AV-400, DRX-500, AV-600, а также ЯМР спектрометров в других институтах СО РАН.**
- 2. Сравнительный обзор «ЯМР-ных» свойств наиболее полезных магнитных ядер.**
- 3. Как определить оптимальный метод «фурьеваия» произвольного двумерного спектра?**
- 4. Основные навыки манипуляций, эффективного «мышения» над двумерными спектрами.**
- 5. Практическая демонстрация анализа набора двумерных спектров ЯМР на примере решения реальной структурной задачи.**