

539.143.43

**МНОГОИМПУЛЬСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ
ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА****Л. М. Сороко****СОДЕРЖАНИЕ**

1. Введение	653
2. Многоквантовая когерентность	657
3. Многомерные спектры ЯМР	663
3.1. Корреляционная спектроскопия (2D COSY). 3.2. Эстафетно-корреляционная спектроскопия (2D RCOSY). 3.3. Многоквантовая спектроскопия (MQS). 3.4. COSY ⊕ многоквантовый фильтр (DQF COSY). 3.5. Двумерные J-спектры. 3.6. Спектроскопия эффекта Оверхаузера (NOESY). 3.7. Нульквантовые (ZQC) 2D-спектры. 3.8. Трехмерные (3D) спектры ЯМР и ACCORDION.	
4. Ренессанс одномерной спектроскопии ЯМР	678
5. Заключение	680
Список литературы	680

1. ВВЕДЕНИЕ

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) возникает у атомных ядер, спиновый момент которых отличен от нуля. Наблюдать это явление можно, если исследуемый образец поместить в однородное магнитное поле и подвергнуть действию радиочастотного (РЧ) магнитного поля. Хотя ЯМР связан с внутренним механическим и магнитным моментами атомного ядра и имеет квантово-механическую природу, для описания этого явления часто можно использовать адекватные классические модели. Так, например, если спиновый момент атомного ядра равен $1/2$, а спины слабо связаны с соседними ядрами и с решеткой образца, то для объяснения многих (но не всех!) методов ЯМР спектроскопии достаточно опираться на наглядную векторную модель.

Постоянное магнитное поле в ЯМР спектроскопии необходимо для того, чтобы в образце возникла наведенная макроскопическая намагниченность, которая направлена вдоль силовых линий постоянного магнитного поля и пропорциональна индукции магнитного поля в месте расположения образца. Макроскопическая намагниченность образца сохраняется до тех пор, пока имеется намагничивающее магнитное поле или пока система ядерных спинов не вынесена из него потоком жидкости или механическим перемещением образца. Однако непосредственно наблюдаемой в ЯМР спектроскопии является только поперечная составляющая вектора намагниченности образца, которая в стационарном состоянии равна нулю. Чтобы ее создать, образец «облучают» коротким импульсом резонансного РЧ поля, которое направлено перпендикулярно вектору макроскопической намагниченности образца (рис. 1, а). Амплитуду и длительность импульса РЧ поля подбирают такими, чтобы во вращающейся системе координат (ВСК) вектор намагниченности образца после окончания действия импульса РЧ поля был повернут на 90° . Полученная при помощи $\pi/2$ -импульса РЧ поля

поперечная намагниченность образца прецессирует в магнитном поле на резонансных частотах и наводит электродвижущую силу (ЭДС) в катушке индуктивности, которая или полностью окружает исследуемый образец, или расположена вблизи изучаемой области. Чтобы получить спектр ЯМР данного спина, сигнал ЭДС $s(t)$, затухающий с характерным временем

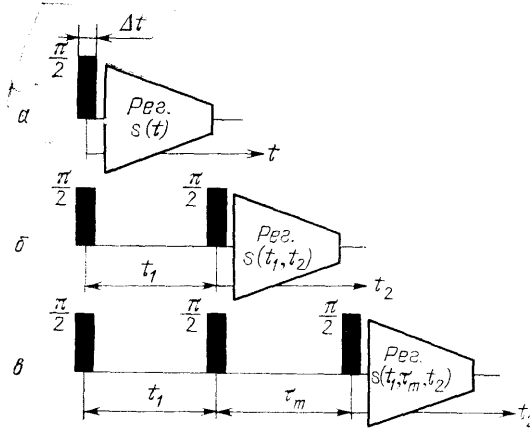


Рис. 1. Последовательности импульсов РЧ поля, используемые в современных спектрометрах ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

a — Одиночный $\pi/2$ -импульс длительностью Δt создает поперечную намагниченность спинов в интервале частот $\Delta\omega \approx (4\Delta t)^{-1}$ вблизи резонансной частоты. b — Два $\pi/2$ -импульса, разделенные во времени, используют для получения двумерного (2D) спектра ЯМР. v — Последовательность из трех $\pi/2$ -импульсов в системах наблюдения многоквантовой когерентности и многоквантовых переходах в спектрах ЯМР. $Рез.$ — обозначает стадию регистрации сигналов ЯМР

релаксации 10^{-2} – 10^2 с, подвергают спектрально-частотному анализу при помощи преобразования Фурье. Каждая спектральная линия ЯМР спектра с частотой ω_0 дает вклад в сигнал ЭДС вида

$$s(t) = \exp(i\omega_0 t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right), \quad (1)$$

где T_2 — время спин-спиновой релаксации, и имеет профиль

$$S(\omega) = A(\omega) + iD(\omega). \quad (2)$$

Он состоит из поглощающей компоненты (моды)

$$A(\omega) = \frac{T_2}{1 + T_2^2(\omega - \omega_0)^2}, \quad (3)$$

которая является вещественной частью спектра, и из дисперсионной компоненты (моды)

$$D(\omega) = \frac{T_2^2(\omega - \omega_0)}{1 + T_2^2(\omega - \omega_0)^2}, \quad (4)$$

которая является мнимой частью спектра. Существует три основных формы отображения ЯМР-спектра: 1) в чисто поглощающей моде, $A(\omega)$; 2) в чисто дисперсионной моде, $D(\omega)$, а также 3) в виде спектра мощности

$$P(\omega) = |A(\omega)|^2 + |D(\omega)|^2, \quad (5)$$

который называют модой абсолютного значения.

Каждая спектральная линия ЯМР-спектра характеризуется химическим сдвигом — относительной разностью частот прецессии свободного спина и спина, связанного в данном химическом соединении. Спектр химических сдвигов содержит информацию о структуре молекул и о взаимодействии одноименных или разноименных спинов, находящихся в разных частях молекулы. В твердом теле химические сдвиги зависят от угла ориентации молекулы относительно внешнего магнитного поля и характеризуются главными значениями тензора химических сдвигов. В аморфном теле или в порошкообразном образце спектральная линия ЯМР сильно размыта и имеет своеобразную «порошковую» структуру.

Спины с низким гиромангнитным отношением и малой естественной изотопной концентрацией, например ^{13}C или ^{15}N , дают слабые сигналы ЯМР.

Чтобы их усилить и тем самым сократить время измерения спектров ЯМР таких спинов, которое иногда достигает 10—20 часов, образец облучают РЧ полями на двух резонансных частотах: на частоте прецессии распространённого спина (I) и на частоте прецессии мало распространённого спина (S), с которым спин I связан. Различие между гиромангнитными отношениями спинов I и S компенсируют, подбирая амплитуды РЧ полей обратно пропорционально соответствующим гиромангнитным отношениям. При соблюдении этих условий намагниченность спина I передается спину S .

Энергия взаимодействия двух спинов в одной и той же молекуле зависит от взаимной ориентации этих спинов. Поэтому спектр химических сдвигов состоит из мультиплетов, которые накладываются друг на друга. Это затрудняет или делает неоднозначной интерпретацию спектральной информации. Ситуацию можно изменить, если сверхтонкое расщепление в мультиплетах убрать методом развязки. С этой целью во время регистрации сигнала ЭДС от первого спина второй спин облучают РЧ полем большой мощности. Второй спин быстро прецессирует, и наступает динамическое усреднение взаимодействия двух спинов. Мультиплеты стягиваются в синглеты. Аналогичный процесс усреднения спиновых взаимодействий происходит в жидкости при быстрых случайных поступательных и вращательных движениях молекул. Поэтому спектр химических сдвигов в жидкости состоит из узких резонансных линий. Наоборот, в твердых телах нет естественных процессов усреднения спиновых взаимодействий, в результате чего ширина резонансных линий ЯМР в 10^3 — 10^5 раз больше, чем в жидкости. Чтобы уменьшить ширину спектральных линий ЯМР в твердом теле, образец быстро вращают под магическим углом $\theta = \arccos \sqrt{1/3} \approx 54^\circ 44'$ относительно основного магнитного поля или же облучают цепочкой коротких импульсов РЧ поля, под действием которой вектор намагниченности поочередно ориентируется вдоль каждой из трех взаимно ортогональных осей ВСК. Спиновые взаимодействия, которые в этом случае обусловлены диполь-дипольным взаимодействием ядерных магнитных моментов, усредняются, и ширина резонансов ЯМР спектра в твердом теле уменьшается в 10—100 раз.

Для получения более полной информации о взаимодействии спинов в молекуле и тем самым о структуре последней образец облучают двумя импульсами РЧ поля на резонансной частоте исследуемого спина так, что эти два импульса разделены во времени. Каждый импульс РЧ поля поворачивает вектор намагниченности на угол 90° ($\pi/2$ -импульс) (рис. 1,б). В момент подачи второго импульса РЧ поля компоненты вектора намагниченности, прецессирующие на разных частотах и имеющие различные химические сдвиги, не находятся в фазе, как непосредственно после первого $\pi/2$ -импульса РЧ поля. Поэтому сигналы ЯМР, измеренные при различных интервалах времени между двумя $\pi/2$ -импульсами РЧ поля, отличаются от сигнала ЯМР, измеренного непосредственно после первого $\pi/2$ -импульса РЧ поля. Подвергнутый спектральному анализу двухмерный массив данных $s(t_1, t_2)$ переходит в двухмерный (2D) спектр $S(\omega_1, \omega_2)$, в котором эффект химических сдвигов отделен от эффекта взаимодействия спинов. Однако структура каждой спектральной линии в двухмерном спектре ЯМР,

$$S(\omega_1, \omega_2) = (A(\omega_1)A(\omega_2) - D(\omega_1)D(\omega_2)) - i(A(\omega_1)D(\omega_2) + D(\omega_1)A(\omega_2)), \quad (6)$$

такова, что ни вещественная, ни мнимая части его не являются чисто поглощающей или чисто дисперсионной. Для того чтобы 2D-спектр ЯМР представить в чистой моде, измеряют два или больше независимых сигнала $s(t_1, t_2)$, варьируя, например, ориентацию вектора начальной намагниченности после первого $\pi/2$ -импульса РЧ поля.

Двухмерные спектры ЯМР содержат так называемые перекрестные пики (кросс-пики) с $\omega_1 \neq \omega_2$, которые несут информацию о том, какие спины в молекуле связаны между собой, а также о том, на каком взаимном расстоянии находятся эти спины в данной молекуле.

Наиболее интересными в ЯМР спектроскопии высокого разрешения можно считать эксперименты по наблюдению многоквантовой когерентности и многоквантовых переходов. Последние возникают тогда, когда спиновая система состоит из двух и более взаимодействующих спинов со спиновым моментом $1/2$ или когда спиновый момент резонирующего ядра $I \geq 1$. В этих экспериментах образец подвергают действию трех импульсов РЧ поля (рис. 1, в). Первый импульс РЧ поля, как обычно, создает исходную поперечную намагниченность образца. На стадии эволюции различные компоненты вектора намагниченности прецессируют на разных частотах. Второй импульс РЧ поля, который называют смешивающим, переводит намагниченность образца в состояние с многоквантовой когерентностью, которая после второго импульса РЧ поля непосредственно не наблюдаема. Только после третьего импульса РЧ поля многоквантовая когерентность переходит в одноквантовую. Сигналы ЯМР измеряют при различных интервалах времени между вторым и третьим импульсами РЧ поля.

Многоквантовая когерентность обладает следующими важными свойствами. Если частота несущих колебаний электромагнитного поля в импульсе РЧ поля имеет расстройку относительно центра резонансной линии, то сигналы с p -квантовой когерентностью испытывают расстройку, которая в p раз больше, чем для одноквантовых сигналов. Сдвиг фазы несущей в импульсе РЧ поля на $\Delta\varphi$ наблюдается в сигналах с p -квантовой когерентностью как сдвиг фазы $p\Delta\varphi$. Наконец, если на основное магнитное поле наложен линейный градиент поля G , то сигнал с p -квантовой когерентностью испытывает воздействие некоторого эффективного градиента магнитного поля, который в p раз больше реального. В частности, в сигналах с нульквантовой когерентностью эффект неоднородности магнитного поля не проявляется вообще. Из сигнала ЯМР, содержащего несколько компонент многоквантовой когерентности, можно отфильтровать сигнал ЯМР с заданной когерентностью p . Чаще всего в ЯМР спектроскопии используют методы формирования нульквантовой и двухквантовой когерентности, в частности, при исследовании систем из двух спинов. Максимальное число квантов, которое наблюдали в многоквантовых экспериментах в твердом теле, составляет около 100.

В однородном магнитном поле обычно исследуют образцы, которые имеют гомогенную структуру. Если же образец неоднороден, то регистрируют совокупность сигналов ЯМР, каждый из которых относится к малому участку образца. Для этого применяют градиент магнитного поля, пространственно селективные импульсы РЧ поля при наличии градиента магнитного поля, или же поверхностные катушки индуктивности, которые обладают пространственной избирательностью.

Методы ЯМР спектроскопии широко используют в органической химии, в биофизике и в биохимии, а также в медицине. ЯМР спектроскопия успешно конкурирует с методами рентгеноструктурного анализа при исследовании поликристаллических образцов. Явление ЯМР используют в безрадиационной томографии (ЯМР интроскопии) для получения анатомических и биохимических изображений головы и внутренних органов человека, а также для микроскопических исследований клеток.

В настоящее время «спиновая индустрия» охватывает десятки крупных фирм и около сотни научно-исследовательских институтов, которые разрабатывают новые методы ЯМР спектроскопии, а также производят ЯМР оборудование и компьютеры специального назначения. Современные спектрометры ЯМР, оборудованные сверхпроводящими или резистивными электромагнитами, дают спектры ЯМР высокого и сверхвысокого разрешения, как

одномерные, так и двухмерные. Выпускается оборудование для быстрого вращения образца под магическим углом, для облучения твердых образцов многоимпульсными последовательностями РЧ полей. Традиционными стали эксперименты с многоквантовой когерентностью, при помощи которых исследованы парные связи ядер ^{13}C в органических молекулах, а также процессы диффузии молекул. Наконец, созданы и успешно опробованы несколько типов ЯМР интроскопов для получения ЯМР изображений, для визуализации потока жидкости, в частности движения крови в сосудах человека, а также для получения локализованных спектров ЯМР высокого разрешения. Показательно, что расходы на производство ЯМР интроскопов составили в 1986 г. в США не менее 2 млрд долларов¹. Методы ЯМР спектроскопии приобрели большую практическую значимость, а число специалистов, которые вовлекаются в «спиновую индустрию» на различных стадиях производства и эксплуатации ЯМР приборов, постоянно возрастает. Данный обзор, который можно рассматривать как дополнение к монографиям^{2,3}, посвящен многоквантовой когерентности и многомерной спектроскопии ЯМР одноименных атомных ядер. Физико-математические основы наиболее типичных методов современной ЯМР спектроскопии изложены на примере двухспиновых систем. За рамками обзора остались проблемы анализа гетерогенных и многоспиновых систем, а также применения описанных методов для анализа структуры сложных молекул в жидкости.

2. МНОГОКВАНТОВАЯ КОГЕРЕНТНОСТЬ

Система из нескольких взаимодействующих спинов после первого $\pi/2$ -импульса РЧ поля переходит в состояние с поперечной намагнитченностью. Это состояние когерентно, так как все спины прецессируют с одной и той же начальной фазой, например, из положения, когда вектор поперечной намагнитченности образца направлен вдоль оси y в ВСК. Когерентность не теряется на стадии эволюции после первого $\pi/2$ -импульса РЧ поля, когда спины прецессируют на разных частотах в соответствии с химическими сдвигами. Согласно квантовомеханической трактовке, сигнал ЯМР, регистрируемый после окончания первого $\pi/2$ -импульса РЧ поля, соответствует одноквантовым переходам между уровнями энергии спина в постоянном магнитном поле. Разность между магнитными квантовыми числами этих уровней m_n и m_k до и после указанного перехода подчиняется условию: $\Delta M = m_n - m_k = \pm 1$.

Под действием химического сдвига на частоте Ω x , y -компоненты вектора намагнитченности \mathbf{I} после $\pi/2$ -импульса РЧ поля свободно эволюционируют, вращаясь в плоскости xy ВСК⁴:

$$\begin{aligned} I_x &\xrightarrow{\Omega t I_z} I_x \cos \Omega t + I_y \sin \Omega t, \\ I_y &\xrightarrow{\Omega t I_z} I_y \cos \Omega t - I_x \sin \Omega t, \end{aligned} \quad (7)$$

где t — время после $\pi/2$ -импульса РЧ поля. После второго $\pi/2$ -импульса РЧ поля система спинов переходит в состояние с многоквантовой когерентностью. Это состояние когерентно, так же как и макроскопическая намагнитченность образца, начинающая свою эволюцию после первого $\pi/2$ -импульса РЧ поля. Однако состояние с многоквантовой когерентностью нельзя свести к намагнитченности образца, так как в этом состоянии содержатся компоненты квантовомеханических переходов с $\Delta M = m_n - m_k \neq \pm 1$, например, $\Delta M = 0$ или $\Delta M = \pm 2$. Многоквантовая когерентность, образовавшаяся после второго $\pi/2$ -импульса РЧ поля, не дает вклада в сигнал ЯМР, регистрируемый после второго $\pi/2$ -импульса РЧ поля. Задача исследователя, ведущего ЯМР эксперименты с многоквантовой когерентностью, состоит в том,

чтобы сформировать состояние системы из нескольких спинов с заданной многоквантовой когерентностью, а после окончания стадии эволюции при помощи детектирующего РЧ импульса преобразовать ее в наблюдаемую одноквантовую когерентность. Обычно для этого преобразования используют третий $\pi/2$ -импульс РЧ поля, а также определенную программу чередования фаз РЧ импульсов и опорного сигнала в приемнике с последующим усреднением массива измеренных сигналов ЯМР.

В системе из двух спинов A и X со спиновыми моментами $1/2$ возникает два вида одноквантовой когерентности и, соответственно, два вида поперечной намагниченности образца⁴: синфазная, когда векторы намагниченности A и X взаимно параллельны, и противофазная (или антифазная), когда эти векторы антипараллельны (рис. 2). Антифазная намагниченность спина A

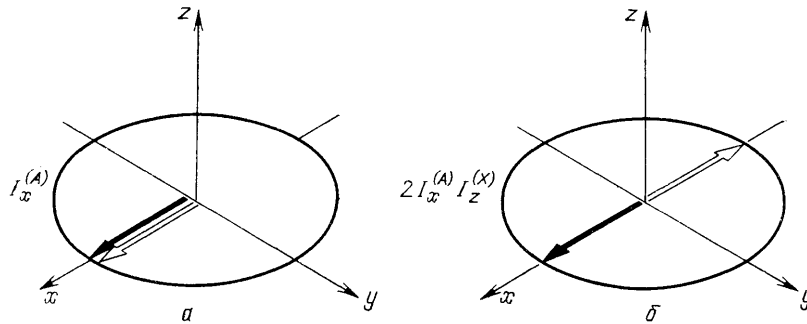


Рис. 2. Векторная модель, поясняющая различие между синфазной (а) и антифазной (б) намагниченностями образца в системе из двух связанных спинов A , X

отлична от нуля тогда, когда уровни энергии спина X имеют неравные заселенности, например, когда система спинов A , X находится в тепловом равновесии. Синфазная намагниченность спина A описывается компонентой $I_x^{(A)}$ вектора $I^{(A)}$, а антифазная — произведением компонент векторов $I^{(A)}$ и $I^{(X)}$, вида $2I_x^{(A)}I_z^{(X)}$ ⁶. Через интервал времени $\tau = (2J)^{-1}$, где J — константа скалярной связи взаимодействующих спинов A и X , синфазная x -намагниченность спина A переходит в антифазную y -намагниченность.

Процесс перехода синфазной x -намагниченности в системе спинов A , X в антифазную y -намагниченность под действием скалярной спин-спиновой связи описывается выражением

$$I_x^{(A)} \xrightarrow{\pi J \tau \cdot 2I_z^{(A)}I_z^{(X)}} I_x^{(A)} \cos \pi J \tau + 2I_y^{(A)}I_z^{(X)} \sin \pi J \tau. \quad (8)$$

Переход синфазной y -намагниченности в антифазную x -намагниченность записывают в виде

$$I_y^{(A)} \xrightarrow{\pi J \tau \cdot 2I_z^{(A)}I_z^{(X)}} I_y^{(A)} \cos \pi J \tau - 2I_x^{(A)}I_z^{(X)} \sin \pi J \tau. \quad (9)$$

Аналогичные процессы перехода антифазной намагниченности в синфазную намагниченность задаются соотношениями

$$\begin{aligned} 2I_x^{(A)}I_z^{(X)} &\xrightarrow{\pi J \tau \cdot 2I_z^{(A)}I_z^{(X)}} 2I_x^{(A)}I_z^{(X)} \cos \pi J \tau + I_y^{(A)} \sin \pi J \tau, \\ 2I_y^{(A)}I_z^{(X)} &\xrightarrow{\pi J \tau \cdot 2I_z^{(A)}I_z^{(X)}} 2I_y^{(A)}I_z^{(X)} \cos \pi J \tau - I_x^{(A)} \sin \pi J \tau. \end{aligned} \quad (10)$$

Двухквантовая (DQC) и нульквантовая (ZQC) когерентности в системе из двух спинов A , X описываются произведениями вида I_xI_y , I_xI_x и I_yI_y . Чистая многоквантовая когерентность соответствует линейной комбинации ука-

занных произведений. Под действием суммы химических сдвигов в системе из двух спинов A , X компоненты чистой двухквантовой и чистой нульквантовой когерентностей эволюционируют на частотах, равных, соответственно, сумме и разности частот химических сдвигов Ω_A и Ω_X .

Чтобы зарегистрировать двухквантовую когерентность в системе спинов A , X , спин X облучают $\theta(x)$ -импульсом РЧ поля через время $t_{\frac{1}{2}}$ после второго $\pi/2(y)$ -импульса РЧ поля, а через интервал времени $(2J)^{-1}$ начинают регистрацию ЯМР от спина A . РЧ импульс $\theta(x)$ поворачивает намагниченность I_x^X на угол θ радиан. При этом двухквантовая когерентность преобразуется следующим образом:

$$2I_y^{(X)}I_x^{(A)} \xrightarrow{\theta(x)} 2I_y^{(X)}I_x^{(A)} \cos \theta + 2I_z^{(X)}I_x^{(A)} \sin \theta. \quad (11)$$

Первое слагаемое в (11) соответствует ослабленной и по-прежнему ненаблюдаемой двухквантовой когерентности, а второе слагаемое представляет собой антифазную намагниченность спина A , которая через время $(2J)^{-1}$ переходит в синфазную намагниченность $I_y^{(A)} \sin \theta$. Для получения сигнала ЯМР максимальной амплитуды угол θ поворота спина в третьем РЧ-импульсе выбирают равным $\pi/2$ радиан. В системе спинов A , X со скалярной связью сигнал ЯМР не зависит от длительности периода эволюции t_2 , так как единственно существующая в этот период двухквантовая когерентность D_0 не эволюционирует между вторым и третьим РЧ импульсами.

Для равномерного возбуждения многоквантовой когерентности и получения спектров ЯМР в какой-то одной моде используют последовательность РЧ импульсов, которая симметрична по возбуждению и детектированию (рис. 3) ^{7,8}. В начальной части последовательности эта совпадает с традиционной последовательностью импульсов a . В точке 1, последовательности a после $\pi/2(x)$ -импульса РЧ поля возникает поперечная намагниченность: $-(I_y^{(A)} + I_y^{(X)})$, которая к концу периода эволюции в точке 2 перейдет в состояние

$$\sigma_2 = (I_y^{(A)} + I_y^{(X)}) \cos \pi J \tau - (2I_x^{(A)}I_z^{(X)} + 2I_z^{(A)}I_x^{(X)}) \sin \pi J \tau. \quad (12)$$

Эффекты химических сдвигов в этом состоянии подавлены первым π -импульсом. Второй $\pi/2(x)$ -импульс РЧ поля преобразует второе слагаемое в (12) в чистую двухквантовую когерентность $(DQC)_y$ в точке 3:

$$\sigma_3 = (2I_x^{(A)}I_y^{(X)} + 2I_y^{(A)}I_x^{(X)}) \sin \pi J \tau. \quad (13)$$

Эффект первого слагаемого в σ_3 убирают чередованием фаз РЧ импульсов.

Важная особенность выражения (13) в том, что величина чистой двухквантовой когерентности σ_3 зависит от времени приготовления τ через $\sin \pi J \tau$, который не допускает усреднения по многим временам τ , необходимого для однородного возбуждения многоквантовой когерентности. После детектирующего $\pi/2(x)$ -импульса РЧ поля в точке 4 возникнет антифазная намагниченность

$$\sigma_4 = (2I_x^{(A)}I_z^{(X)} + 2I_z^{(A)}I_x^{(X)}) \sin \pi J \tau, \quad (14)$$

которая к концу периода свободной прецессии длительностью τ переходит в состояние ⁷

$$\sigma_5 = -(2I_x^{(A)}I_z^{(X)} + 2I_z^{(A)}I_x^{(X)}) \sin \pi J \tau \cdot \cos \pi J \tau - (I_y^{(A)} + I_y^{(X)}) \sin^2 \pi J \tau. \quad (15)$$

После усреднения по переменной τ остается только антифазная намагниченность

$$\sigma_5^{cp} = -\frac{1}{2} (I_y^{(A)} + I_y^{(X)}), \quad (16)$$

которая не зависит от константы связи J . Было показано ⁷, что аналогичный процесс усреднения позволяет получить однородное возбуждение

p -квантовой когерентности в системах из N спинов со спиновыми моментами $1/2$. Главная особенность последовательности рис. б в том, что третий, детектирующий $\pi/2$ -импульс РЧ поля «разбрасывает» многоквантовую когерентность в форме поперечной антифазной намагниченности равномерно среди p активных спинов. Чтобы подавить вклады антифазной намагниченности на стадии регистрации сигнала ЯМР, в каждом четном опыте непосредственно перед началом регистрации сигнала ЯМР вводят «очищающий»

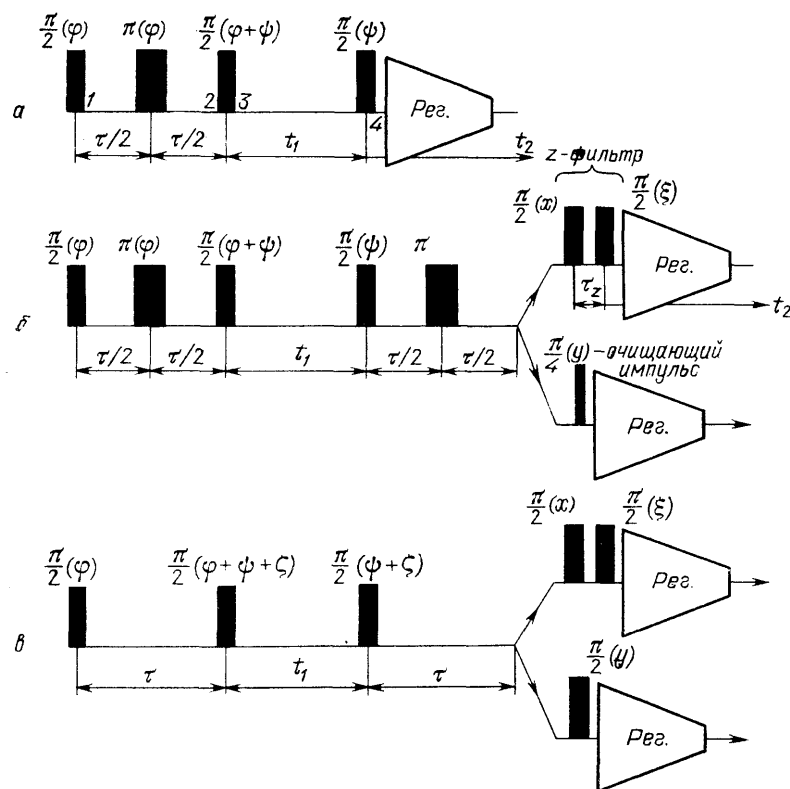


Рис. 3. Последовательность импульсов РЧ поля, используемая для равномерного возбуждения многоквантовой когерентности и получения спектров ЯМР без фазовых искажений.

а — Традиционная последовательность импульсов РЧ поля для возбуждения p -квантовой когерентности, при этом $\varphi = k\pi/p$ ($k = 0, 1, 2, \dots, 2p-1$), а при накоплении данных знаки сигналов ЯМР попеременно чередуют. б — Последовательность импульсов РЧ поля, симметричная по возбуждению и регистрации; в ней используют очищающий РЧ импульс или z -фильтр. в — Эквивалентная последовательность импульсов РЧ поля, в которой отсутствует рефокусирующий π -импульс, при этом фазу ξ чередуют по схеме: $\xi = 0; \pi/2$

$\pi/2$ (y)-импульс⁷. В системе из двух спинов A, X очищающий $\pi/2$ (y)-импульс изменяет знак первого слагаемого состояния σ_z в (15) на обратный. Если четные опыты брать со знаком плюс, а нечетные со знаком минус, то указанное слагаемое исчезает при усреднении многих сигналов ЯМР.

Аналогично строят последовательность РЧ импульсов в многоквантовых фильтрах. Так, например, чтобы возбудить только p -квантовую когерентность, используют последовательность рис. в. Фазу φ первого $\pi/2$ -импульса и первого π -импульса изменяют $2p$ раз: $\varphi = k\pi/p$, $k = 0, 1, \dots, 2p-1$; четные сигналы ЯМР берут со знаком плюс, а нечетные — со знаком минус. Фазу ψ второго и четвертого $\pi/2$ -импульса берут равной 0 для четного p и $\pi/2$ — для нечетного.

Существует несколько методов разделения или разнесения по спектру ЯМР перекрывающихся или расположенных рядом линий многоквантовых переходов¹¹. Прямой метод, основанный на введении расстройки по частоте между опорным сигналом и центром спектра ЯМР, не получил распростра-

нения, так как в системах с образованием сигнала спинового эха на стадии эволюции одновременно с установлением эффекта неоднородности магнитного поля исчезает эффект расстройки по частоте. Поэтому вводят сдвиги фаз РЧ поля на стадии приготовления. При этом сигнал p -квантового перехода испытывает сдвиг фазы в p раз больше исходного. Чтобы разделить многоквантовые переходы, помеченные различными сдвигами фаз, фазу РЧ поля изменяют $(2p_{\max} + 1)$ раз в интервале между значениями 0 и 2π радиан, где p_{\max} — наивысший порядок когерентности в спектре ЯМР, а полученный двухмерный массив данных подвергают, кроме традиционного преобразования Фурье по переменной t , также дискретному преобразованию Фурье по переменной φ , в результате чего координата φ переходит в сопряженную координату p .

Широкое распространение получил метод разделения многоквантовых переходов, в котором фазу РЧ поля на стадии приготовления φ увеличивают монотонно с продолжительностью стадии эволюции t_1 : $\varphi \rightarrow \varphi + \Delta\omega \cdot t_1$ с инкрементом $\Delta\varphi = \Delta\omega \cdot \Delta t_1$. Разделение многоквантовых переходов возникает после дискретного преобразования Фурье по переменной t_1 ¹¹. В отличие от предыдущего метода разделение многоквантовых переходов происходит в одном измерении, точно так же, как в прямом методе с расстройкой по частоте. Чтобы отобразить без перекрытия все многоквантовые переходы вплоть до p_{\max} , инкремент Δt_1 на стадии эволюции должен быть уменьшен по крайней мере в $(2p_{\max} + 1)$ раз.

Рефокусирующий π -импульс, введенный на стадии эволюции, может быть использован для разделения многоквантовых переходов методом сдвига фаз. Для этого последовательно, от опыта к опыту, изменяют фазу РЧ поля π -импульса. При этом каждый p -квантовый переход получит сдвиг фазы в $2p$ раз больше исходного. Дополнительный множитель 2 здесь возникает потому, что π -импульс вызывает передачу когерентности из состояния $(+p)$ в состояние $(-p)$. Многоквантовые переходы можно помечать по величине угла поворота вокруг оси z при помощи составных импульсов¹². Наконец, идентификацию импульса p данной резонансной линии в исходном спектре ЯМР производят «пассивно» по ширине спектральной линии в неоднородном магнитном поле, которая растет линейно с p .

Пространственная неоднородность магнитного поля не влияет на нульквантовую когерентность. Поэтому спектр с нульквантовой когерентностью имеет высокое разрешение без помощи рефокусирующих π -импульсов РЧ поля ($\approx 10^{-10}$). Интересно также и то, что нульквантовую когерентность можно возбудить и зарегистрировать без помощи каких-либо РЧ импульсов¹¹. Для этого достаточно быстро перевести спиновую систему из одного состояния в другое, так, чтобы начальный и конечный гамильтонианы, $\mathcal{H}_{\text{нач}}$ и $\mathcal{H}_{\text{кон}}$, не коммутировали между собой. Тогда недиагональные элементы матрицы плотности σ_{kj} ($k \neq j$) приобретут осциллирующие множители $\exp(-i\omega_{jk}t)$ подобно тому, как это происходит под действием РЧ импульса. Так, например, нульквантовая когерентность возникает в условиях, когда химически реагирующие спины A и X сильно связаны. Разность в намагниченности возникает, если химические компоненты поместить в магнитное поле непосредственно перед их смешиванием. Нульквантовая когерентность в этих условиях возникает практически мгновенно, и необходимость в подготовительной стадии отпадает⁶⁷.

Последовательность событий в многоимпульсных экспериментах можно описать наглядно при помощи диаграммы передачи когерентности (рис. 4)⁸. Переходы между диаграммными (а не энергетическими!) уровнями с различными p происходят только под действием импульсов РЧ поля и на стадии свободной процессии возникнуть не могут. Все траектории на диаграмме передачи когерентности начинаются с диаграммного уровня $p = 0$ и заканчиваются на диаграммном уровне с $p = -1$.

При помощи диаграммы передачи когерентности наглядно интерпрети-

руют различные виды двухмерной спектроскопии ЯМР⁸. Так, например, одноквантовой гомоядерной корреляционной 2D спектроскопии (2D COSY) с использованием последовательности из двух импульсов РЧ поля:

$$\frac{\pi}{2}(x) - t_1 - \beta(\varphi) - t_2 - \text{регистрация данных},$$

соответствуют две траектории передачи когерентности: $[p = 0] \rightarrow [\pm 1] \rightarrow [-1]$. В обменной спектроскопии (2D NOESY) с тремя импульсами РЧ поля возникают две траектории передачи когерентности $[p = 0] \rightarrow [\pm 1] \rightarrow [0] \rightarrow [-1]$. Траектории передачи когерентности в эстафетной корреляционной спектроскопии (2D RCOSY), а также в двухквантовой корреляционной спектроскопии ($\text{COSY} \oplus \text{DQC-фильтр}$), имеют вид (рис. 4б и в) $[p = 0] \rightarrow [\pm 1] \rightarrow [+2] \rightarrow [-1]$. При помощи диаграммы передачи когерентности в многоимпульсных экспериментах можно интерпретировать известные и синтезировать новые последовательности. Рассмотренные выше диаграммы переноса когерентности еще раз наглядно демонстрируют, что главным в отборе определенной траектории передачи когерентности является программа чередования фаз РЧ импульсов. Таким образом было обнаружено, что эксперименты с четырьмя РЧ импульсами можно заменить на эквивалентные трехимпульсные эксперименты.

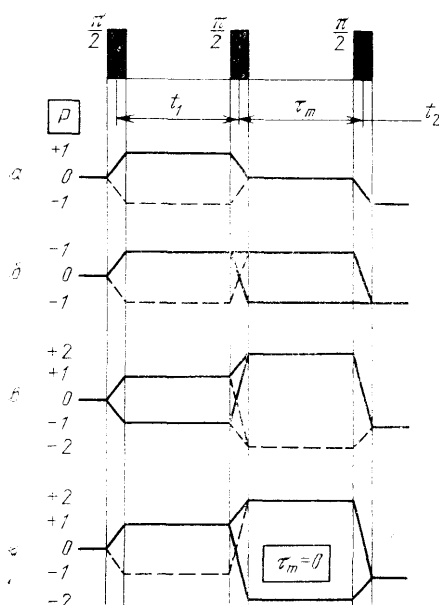


Рис. 4. Диаграмма путей передачи когерентности в экспериментах с тремя РЧ импульсами.

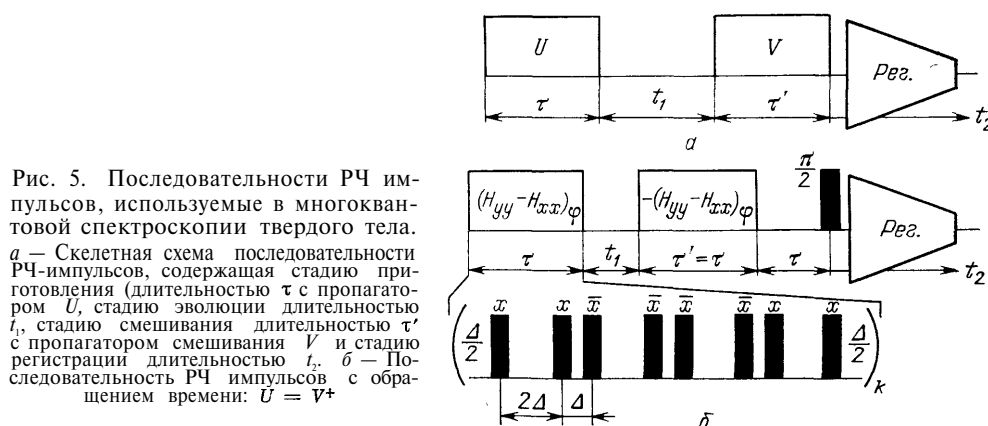
а — 2D NOESY. б — RCOSY. в — 2D-спектроскопия. г — $\text{COSY} \oplus \text{DQC-фильтр}$

Многоквантовая спектроскопия ЯМР в твердом теле имеет принципиальные особенности^{5,9,10}. В отличие от молекул в жидкости, которые обычно содержат небольшое число взаимодействующих спинов и регистрируемые спектры ЯМР характеризуются невысоким значением p_{max} , в твердом теле имеются диполь-дипольные связи, которые охватывают большие группы спинов (кластеры). Число многоквантовых переходов в этих условиях возрастает настолько, что отдельные спектральные линии сливаются в неразрешенные полосы. Предметом наблюдения в соответствующих многоквантовых опытах становятся не отдельные спектральные линии, а, например, зависимость интенсивности многоквантовых полос от величины p . Однако из-за деструктивной интерференции спектральных компонент внутри каждой полосы интенсивность последних становится очень низкой. Чтобы убрать эффект деструктивной интерференции, многоквантовую когерентность в твердом теле возбуждают при помощи повторяющихся последовательностей коротких и мощных РЧ импульсов, которые характерны для спектроскопии ЯМР в твердом теле. Важным оказывается условие обращения времени, при выполнении которого можно сформировать однородное спиновое эхо.

На рис. 5 приведена последовательность РЧ импульсов с обращением времени, которая предназначена для опытов в твердом теле⁹. Стадия приготовления, а также смешивания, содержит повторяющиеся k раз последовательности из 4 пар $\pi/2$ -импульсов с чередующимися ориентациями осей поворота вектора намагниченности в ВСК: $x, -x, -x$ и x . При этом интервалы времени между парами импульсов равны Δ , и между импульсами в каждой паре равны 2Δ . При таком чередовании фаз РЧ импульсов каждая 8-

импульсная последовательность возбуждает двухквантовую когерентность. Разделение порядков с различными p в условиях нулевой расстройки ведут изменением фазы РЧ импульсов по схеме: $\varphi = \Delta\omega \cdot t_1$ одновременно с изменением t_1 . Регистрирующий $\pi/2(x)$ -импульс подают через время 2 мс после окончания стадии смешивания, а затем подают импульс спин-локинга вдоль оси «у» длительностью 100 мкс. Для ослабления артефактов, вызванных неустойчивой работой приемного устройства, фазу $\pi/2(x)$ -импульса попеременно изменяют на 180° .

Было установлено¹⁰, что по мере увеличения продолжительности стадии приготовления τ с 66 до 792 мкс в спектрах ЯМР постепенно появляются когерентности все более высокого порядка, происходит перераспределение порядков многоквантовой когерентности, а эффективный размер кластера из взаимодействующих спинов возрастает монотонно с τ . Важной особенностью



динамического процесса возбуждения многоквантовой когерентности внутри кластера спинов в твердом теле является то, что этот процесс обратим и его можно «рефокусировать». Так, например, при $\tau = 528$ мкс наблюдается спектр до $p = 32$. Если время изменять от 66 до 462 мкс, то такой многоквантовый спектр постепенно стягивается в двухквантовый. Тем самым было показано, что процесс когерентной эволюции системы с большим числом спинов ($p \sim 100$) является обратимым, а многоквантовые явления в твердом теле можно использовать как метод счета спинов в кластере.

3. МНОГОМЕРНЫЕ СПЕКТРЫ ЯМР²³

3.1. Корреляционная спектроскопия (2D COSY).

В основе этого вида спектроскопии лежит принципиальное различие между эффектами химических сдвигов (Ω) и скалярной связи двух спинов (J). Как видно из (7), эволюция под действием химического сдвига можно рассматривать как вращение вектора намагниченности спина A или X в системе координат (I_x, I_y) с угловой скоростью Ω . Каждый из операторов суммы $I_x^{(A)} + I_x^{(X)}$ или произведения $2I_x^{(A)}I_x^{(X)}$ двух невзаимодействующих спинов ($J = 0$) эволюционирует независимо под действием химических сдвигов Ω_A и Ω_X . Поэтому:

$$I_x^{(A)} + I_x^{(X)} \xrightarrow{\Omega_A t I_z^{(A)} + \Omega_X t I_z^{(X)}} (I_x^{(A)} \cos \Omega_A t + I_y^{(A)} \sin \Omega_A t) + (I_x^{(X)} \cos \Omega_X t + I_y^{(X)} \sin \Omega_X t), \quad (17)$$

$$2I_x^{(A)}I_x^{(X)} \xrightarrow{\Omega_A t I_z^{(A)} + \Omega_X t I_z^{(X)}} 2(I_x^{(A)} \cos \Omega_A t + I_y^{(A)} \sin \Omega_A t) \times (I_x^{(X)} \cos \Omega_X t + I_y^{(X)} \sin \Omega_X t). \quad (18)$$

Иначе происходит эволюция под действием скалярной связи двух спинов. Как следует из (8) и (10), вращение векторов намагниченности спинов A и X происходит в системе координат $I_x^{(A)}, 2I_y^{(A)}I_z^{(X)}$ (рис. 6) и сопровождается передачей когерентности между спинами, при этом синфазная намагниченность переходит в антифазную, затем антифазная переходит в синфазную, но с обратным знаком^{4,13}. Процесс повторяется с периодом $T \sim 2/J_{AX}$.

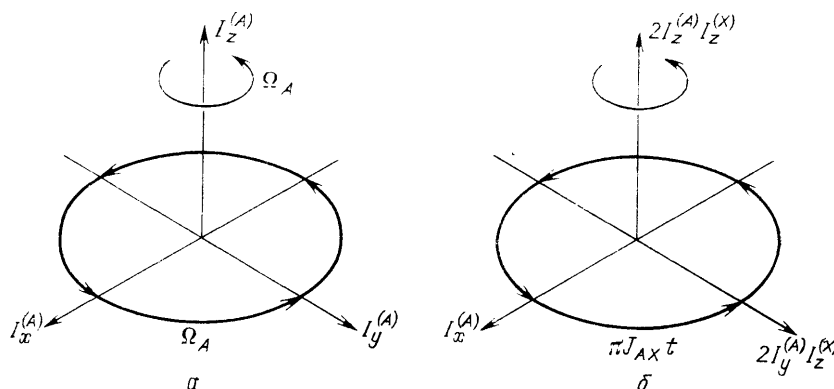


Рис. 6. Векторная модель эволюции спинов под действием эффекта химических сдвигов (а) и под действием скалярной связи J_{AX} (б) в системе из двух связанных одноименных спинов A , X , например протонов

В двумерной спектроскопии корреляции химических сдвигов¹⁴ одноименные спины A и X , например протоны, облучают двумя неселективными $\pi/2$ (x)-импульсами РЧ поля (рис. 7, а). После второго $\pi/2$ (x)-импульса состояние системы с одноквантовой когерентностью описывается выражением из четырех слагаемых⁴:

$$\sigma_3 = (I_x^{(A)} \sin \Omega_A t_1 + I_x^{(X)} \sin \Omega_X t_1) \cos \pi J_{AX} t_1 - (2I_y^{(A)} I_z^{(X)} \sin \Omega_X t_1 + 2I_z^{(A)} I_y^{(X)} \sin \Omega_A t_1) \sin \pi J_{AX} t_1. \quad (19)$$

Из (19) видно, что после второго $\pi/2$ (x)-импульса антифазная намагниченность первого спина A прецессирует на частоте, равной частоте прецессии второго спина Ω_X (!), и наоборот, антифазная намагниченность второго спина X прецессирует на частоте прецессии первого спина Ω_A . В результате этого в спектре 2D COSY возникают кросс-пики.

Первое слагаемое в (19) соответствует непосредственно наблюдаемой намагниченности спина A , которая прецессирует на двух частотах: $\Omega_A + \pi J_{AX}$ и $\Omega_A - \pi J_{AX}$, а второе слагаемое описывает намагниченность спина X , прецессирующую на двух частотах: $\Omega_X + \pi J_{AX}$ и $\Omega_X - \pi J_{AX}$. Из-за множителя $\cos \pi J_{AX} t_1$ первые два слагаемых дают синфазные дублеты, лежащие на диагонали, а центры их находятся в точке с частотами $\omega_1 = \omega_2 = \Omega_A$ для спина A и в точке $\omega_1 = \omega_2 = \Omega_X$ для спина X .

Третье слагаемое в (19) описывает антифазную намагниченность спина A , прецессирующую на частотах $\Omega_X \pm \pi J_{AX}$. Центр дублета спина A расположен в точке $\omega_1 = \Omega_X$, $\omega_2 = \Omega_A$, которая не лежит на диагонали. Четвертому слагаемому соответствует дублет спина X , компоненты которого прецессируют на частотах $\Omega_A \pm \pi J_{AX}$, а центр дублета находится в точке $\omega_1 = \Omega_A$, $\omega_2 = \Omega_X$. Дублеты, не лежащие вблизи диагонали, $\omega_1 = \omega_2$, также называют кросс-пиками.

Чтобы зарегистрировать как s_x -, так и s_y -компоненты сигнала ЯМР, эксперимент COSY повторяют два раза: сначала с последовательностью импульсов $\pi/2$ (x) — t_1 — $\pi/2$ (x), а затем с последовательностью импульсов $\pi/2$ (x) — t_1 — $\pi/2$ (y) (рис. 7, б). В первом случае второй $\pi/2$ (x)-импульс

оставляет в плоскости xOy x -компоненту вектора намагниченности, а y -компоненту поворачивает к оси z и делает ее ненаблюдаемой. Во втором случае поперечной остается y -компонента вектора намагниченности в плоскости xOy .

Чтобы усилить кросс-пики, которые соответствуют дальним связям спинов и интенсивность которых возрастает во времени как $\sin \pi J_{AX} t_1$ (см.

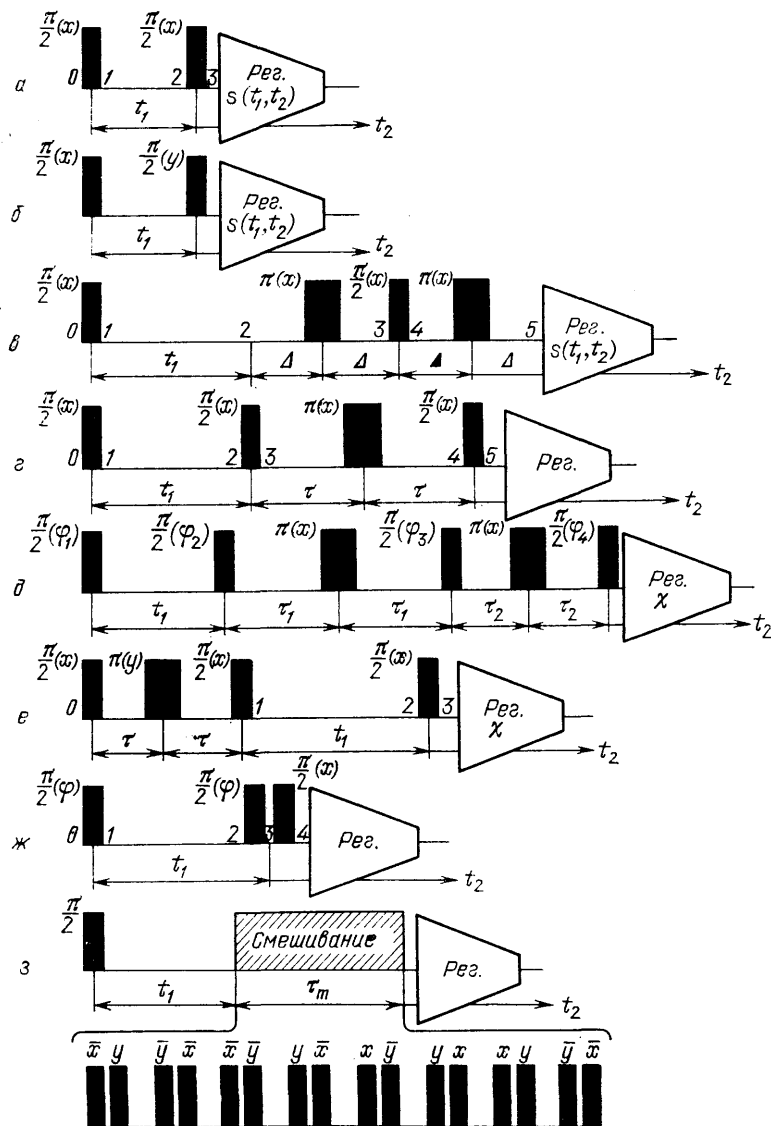


Рис. 7. Последовательности РЧ импульсов, используемые в различных вариантах 2D COSY спектроскопии.

a — Традиционная 2D COSY с двумя $\pi/2$ -импульсами РЧ поля; эксперимент вида x , x . *б* — Эксперимент вида x , y в 2D COSY. *в* — SUPER COSY. *г* — Эстафетная COSY (RCOSY). *д* — Двухступенчатая RCOSY. *е* — Двухквантовая 2D COSY для спинов A . *ж* — COSY \oplus многоквантовый фильтр. *з* — Изотропное смешивание.

(19)), в программу эксперимента COSY вводят задержки времени как на стадии эволюции t_1 , так и после второго $\pi/2$ -импульса перед началом регистрации сигнала ЯМР в зависимости от t_2 ^{36,37}. Чтобы повысить интенсивность дублетов в кросс-пиках, последние преобразуют из антифазной моды в синфазную при помощи последовательности РЧ импульсов SUPER COSY^{17,18} (рис. 7, *в*). Дублеты на диагонали переходят в антифазную моду. Если $\Delta = (4J_{AX})^{-1}$,

то система спинов AX в точке 5 будет находиться в состоянии

$$\sigma_5 = (I_x^{(X)} \sin \Omega_A t_1 + I_x^{(A)} \sin \Omega_X t_1) \cos \pi J_{AX} t_1 - \\ - (2I_y^{(A)} I_z^{(X)} \sin \Omega_A t_1 + 2I_z^{(A)} I_y^{(X)} \sin \Omega_X t_1) \sin \pi J_{AX} t_1. \quad (20)$$

Из (20) видно, что кросс-пики, описываемые первыми двумя слагаемыми (20), имеют синфазную намагниченность и находятся в дисперсионной моде.

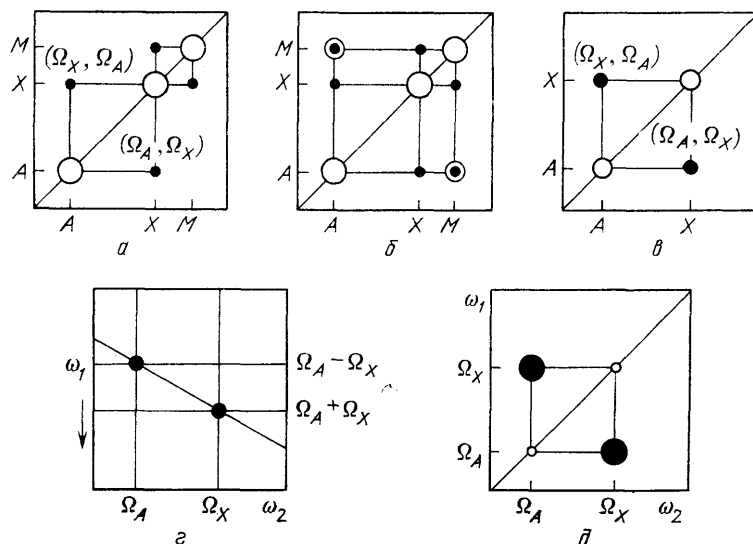


Рис. 8. Структуры спектров в различных вариантах 2D COSY.
а — Традиционный 2D COSY-спектр. б — 2D RCO SY. в — SUPER COSY. г — DQ COSY. д — TOCSY

Чтобы ее перевести в поглощающую моду, фазу опорного сигнала в приемнике изменяют на 90° и регистрируют сигнал s_x . Кросс-пики в опыте SUPER COSY имеют более высокую интенсивность, чем в традиционной схеме COSY (рис. 8, в), и хорошо видны кросс-пики, которые находятся вблизи диагонали $\omega_1 = \omega_2$. Это позволяет наблюдать удаленные спиновые связи.

3.2. Эстафетно-корреляционная спектроскопия (2D RCO SY). В корреляционной спектроскопии (2D COSY) передача намагниченности происходит только между спинами, которые связаны скалярной связью с $J \neq 0$. В эстафетно-корреляционной спектроскопии (2D RCO SY) намагниченность передается между спинами, которые не имеют между собой прямых связей, хотя каждый связан с третьим спином (партнером). Передачу намагниченности ведут по эстафете при помощи последовательности РЧ импульсов, содержащей три $\pi/2$ -импульса и один рефокусирующий π -импульс¹⁹⁻²² (рис. 7, г). Первые два $\pi/2$ -импульса (2D COSY) инициируют передачу намагниченности между двумя непосредственно связанными спинами, а рефокусирующий π -импульс убирает эффект от химических сдвигов на интервале времени между вторым и третьим $\pi/2$ -импульсами. Третий $\pi/2$ -импульс инициирует передачу намагниченности к третьему спину, сигнал от которого регистрируют сразу после третьего $\pi/2$ -импульса. Чтобы убрать нежелательные аксиальные пики и эффект Оверхаузера, фазы трех $\pi/2$ -импульсов чередуют по схеме²²

$$\begin{aligned} \varphi_1 &\rightarrow x, x, x, x, \\ \varphi_2 &\rightarrow x, x, -x, -x, \\ \varphi_3 &\rightarrow x, -x, x, -x. \end{aligned}$$

Механизм действия эстафетной передачи намагниченности поясним на примере системы из трех спинов АХМ, в которой спины A и M не связаны непосредственно ($J_{AM} = 0$)^{4,29}. Первый $\pi/2$ (x)-импульс создает поперечную намагниченность ($-I_y^{(A)}$) спина A . Под действием эффекта химических сдвигов (Ω) и скалярной спин-спиновой связи (J_{AX}) поперечная намагниченность спина A эволюционирует между первым и вторым $\pi/2$ -импульсами РЧ поля согласно схеме

$$I_y^{(A)} \xrightarrow{\Omega_A t_1 I_z^{(A)} + 2\pi J_{AX} I_z^{(A)} I_z^{(X)} t_1} (-I_y^{(A)} \cos \Omega_A t_1 + \\ + I_x^{(X)} \sin \Omega_A t_1) \cos \pi J_{AX} t_1 + \\ + 2(I_x^{(A)} \cos \Omega_A t_1 + I_y^{(A)} \sin \Omega_A t_1) I_z^{(X)} \sin \pi J_{AX} t_1. \quad (21)$$

Второй $\frac{\pi}{2}$ (x)-импульс в конце стадии эволюции преобразует антифазную намагниченность спина A , описываемую вторым слагаемым в (21), согласно схеме

$$I_z^{(X)} (I_x^{(A)} \cos \Omega_A t_1 + I_y^{(A)} \sin \Omega_A t_1) \xrightarrow{\pi/2(I_x^{(A)} + I_x^{(X)})} -I_y^{(X)} (I_x^{(A)} \cos \Omega_A t_1 + \\ + I_z^{(A)} \sin \Omega_A t_1). \quad (22)$$

Первое слагаемое в правой части (22) $I_x^{(A)} I_y^{(X)}$ содержит двухквантовую (DQC) и нульквантовую (ZQC) когерентности, которые не могут дать вклада в процесс передачи намагниченности от спина A к спину M . Второе слагаемое (22) представляет у-намагниченность спина X , которая была передана от спина A . Она находится в противофазе по отношению к намагниченности спина A и в фазе по отношению к намагниченности спина M .

π -импульс в центре стадии эволюции убирает эффект химических сдвигов, и второе слагаемое в (22) будет эволюционировать по схеме

$$2I_z^{(A)} I_y^{(X)} \xrightarrow{2\pi J_{AX} I_z^{(A)} I_z^{(X)} \tau + 2\pi J_{XM} I_z^{(X)} I_z^{(M)} \tau} -I_x^{(X)} \sin \pi J_{AX} \tau \cdot \cos \pi J_{XM} \tau + \\ + 2I_z^{(A)} I_y^{(X)} \cos \pi J_{AX} \tau \cdot \cos \pi J_{XM} \tau - \\ - 4I_z^{(A)} I_x^{(X)} I_z^{(M)} \cos \pi J_{AX} \tau \cdot \sin \pi J_{XM} \tau - \\ - 2I_y^{(X)} I_z^{(M)} \sin \pi J_{AX} \tau \cdot \sin \pi J_{XM} \tau. \quad (23)$$

Первое слагаемое в (23) соответствует x -намагниченности спина X и после смешивающего $\frac{\pi}{2}$ (x)-импульса не меняется. Возникает кросс-пик A, X в 2D-спектре в форме дублета, компоненты которого находятся в фазе вдоль оси ω_2 и в антифазе вдоль оси ω_1 . Второе слагаемое в (23), которое переходит в состояние $-I_z^{(X)} I_y^{(A)}$, инициирует передачу намагниченности от спина A к спину X и далее к A . В 2D-спектре возникают диагональные пики. Третье слагаемое в (23) $I_x^{(X)} I_z^{(A)} I_z^{(M)}$ переходит в трехквантовую когерентность, которая не может дать вклада в 2D-спектр. Только четвертое слагаемое в (23) $I_y^{(X)} I_z^{(M)}$ переходит в антифазную намагниченность спина M : $[-I_z^{(X)} I_y^{(M)}]$. После чередования фаз РЧ импульсов φ_1 и φ_2 , а также фазы опорного сигнала χ в приемнике по схеме

$$\begin{aligned} \varphi_1 &\rightarrow x, x, y, y, -x, -x, -y, -y, \\ \varphi_2 &\rightarrow x, -x, y, -y, -x, x, -y, y, \\ \chi &\rightarrow + + - - + + - - \end{aligned}$$

возникнет сигнал ЯМР вида

$$s_{AM}(t_1, t_2) = -i \sin \pi J_{AX} \tau \cdot \sin \pi J_{XM} \tau \times \\ \times \sin \pi J_{AX} t_1 \cdot \sin \pi J_{XM} t_1 \cdot \exp(-i\Omega_A t_1) \cdot \exp(+i\Omega_M t_2). \quad (24)$$

Для подавления артефактов 8-цикловое чередование фаз φ_1, φ_2 повторяют 4 раза, каждый раз сдвигая фазы всех РЧ импульсов и фазу χ на угол 90° .

Эстафетную цепочку передачи намагниченности можно сделать двухступенчатой, $A \rightarrow X \rightarrow M \rightarrow N$, если в последовательность RCOSY ввести дополнительно π -импульс и $\pi/2$ -импульс РЧ поля²². На рис. 8а, б показана структура типичных спектров 2D COSY и 2D RCOSY.

3.3. Многоквантовая спектроскопия (MQS). На многоквантовых спектрах нет диагональных пиков. Это существенно упрощает расшифровку спектров ЯМР больших молекул, а также получение данных о взаимном расположении спинов, не связанных взаимно прямой скалярной связью, но входящих в разветвленную цепочку спиновых связей в молекуле. Благодаря этим свойствам (MQS) дополняет COSY и RCOSY. На рис. 7, е дана схема последовательности РЧ импульсов, используемая для получения многоквантовых спектров²⁴⁻²⁷. Возбуждающий сэндвич из $\left(\frac{\pi}{2}(x) - \tau - \pi(y) - \tau - \frac{\pi}{2}(x)\right)$ -импульсов РЧ поля создает многоквантовую когерентность. Под действием скалярной спин-спиновой связи в системе из двух спинов возникает состояние в начале стадии эволюции, которое имеет вид⁴:

$$\sigma_1(\varphi=0) = (I_z^{(A)} + I_z^{(X)}) \cos \pi J_{AX} 2\tau + (2I_x^{(A)} I_y^{(X)} + 2I_y^{(A)} I_x^{(X)}) \sin \pi J_{AX} 2\tau, \quad (25)$$

где второе слагаемое описывает чисто двухквантовую когерентность. В частном случае системы из двух спинов $p_{\max} = 2$ сдвиг фазы РЧ импульсов чередуют по схеме: $\varphi = k \frac{2\pi}{4}$, $k = 0, 1, 2, 3$. Для $k = 0$; 2 DQC одинаковы, а для $k = 1$ или 3 DQC имеют противоположные знаки. На стадии эволюции продолжительностью t_1 на DQC не будет действовать J -связь между спинами. Поэтому в конце стадии эволюции возникнет состояние

$$\sigma_2 = [(2I_x^{(A)} I_y^{(X)} + 2I_y^{(A)} I_x^{(X)}) \cos (\Omega_A + \Omega_X) t_1 - (2I_x^{(A)} I_x^{(X)} - 2I_y^{(A)} I_y^{(X)}) \sin (\Omega_A + \Omega_X) t_1] \sin (\pi J_{AX} \cdot 2\tau). \quad (26)$$

Послесмешивающего $\pi/2$ -импульса в наблюдаемую намагниченность перейдет только первое слагаемое. В точке 3 возникнет состояние

$$\sigma_3^{\text{набл}} = (2I_x^{(A)} I_z^{(X)} + 2I_z^{(A)} I_x^{(X)}) \cos (\Omega_A + \Omega_X) t_1 \cdot \sin (\pi J_{AX} \cdot 2\tau), \quad (27)$$

которое соответствует антифазной намагниченности спинов A и X . В точках 2D-спектра MQS $\omega_2 = \Omega_A$ и $\omega_2 = \Omega_X$ появятся два антифазных дублета. Диагональные пики отсутствуют. Чтобы определить знак двухквантовой прецессии, в качестве смешивающего берут β -импульс с $\beta < \pi/2$ радиан⁴³. В результате в наблюдаемую одноквантовую намагниченность перейдут первое и второе слагаемые.

Кросс-пики в DQ COSY спектрах³⁹, обусловленные скалярной связью спинов A и X на частотах химических сдвигов Ω_A и Ω_X , расположены на 2D-спектре $S(\omega_1, \omega_2)$ в точках с координатами $(\Omega_A + \Omega_X, \Omega_A)$ и $(\Omega_A + \Omega_X, \Omega_X)$, в то время как в традиционном 2D-спектре COSY эти же кросс-пики находятся в точках с координатами (Ω_X, Ω_A) и (Ω_A, Ω_X) .

Для того чтобы сохранить двухквантовую когерентность DQC, убрав сигналы от нульквантовой ZQC и одноквантовой IQC когерентности, фазы считывающего импульса α (ψ) и фазу опорного сигнала в приемнике χ чередуют по следующей программе³²:

$$\begin{aligned} \alpha &\rightarrow x, y, -x, -y, \\ \chi &\rightarrow x, -y, -x, y. \end{aligned}$$

Достигнутый коэффициент подавления нежелательной когерентности равен $1000 : 1$ ²⁵.

Квадратурную регистрацию в DQS можно заменить на два опыта, которые выполняют для каждого t_1 , при этом во втором опыте в конце стадии эволюции вводят сдвиг фазы на 45° ⁴⁷.

Чтобы получить простые и легко расшифровываемые DQS в системах, состоящих из многих взаимодействующих спинов, например протонов, измерения проводят с углом поворота РЧ импульса $\alpha = 135^\circ$ вместо $\alpha = 90^\circ$, как в традиционной DQS. В этих условиях передача когерентности к пассивному спину (X) уменьшается в 25 раз, а передача когерентности к несвязанному активно спину (A и M) уменьшается всего в 4 раза. Передача когерентности к связанным активно спинам также уменьшается в 25 раз. Это приводит к существенному уменьшению числа наблюдаемых кросс-пиков. По величине наклона 2D-мультиплетов определяют знаки констант связей J_{AX} , J_{AM} и J_{MX} .

Двухквантовая спектроскопия DQ COSY дает разделение вкладов связанных и несвязанных непосредственно спинов. Тот же результат можно получить методом передачи поляризации между связанными спинами⁵⁸, когда многоквантовая когерентность не создается.

Многоквантовые спектры в твердых телах состоят из очень широких пиков. Однако в²⁸ было показано, что ситуацию можно существенно улучшить, если зафиксировать продолжительность стадии эволюции t_1 и повторять опыты, каждый раз проводя инкрементацию либо фазы РЧ импульса $\varphi = n\delta t$, либо расстройку по частоте $\Delta\omega = n\delta\omega$, где $n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$. Спектр ЯМР регистрируют при фиксированном $t_2^{\text{фикс}}$. Для получения высокой чувствительности и узких спектральных линий величина $t_2^{\text{фикс}}$ должна быть выбрана достаточно малой.

3.4. COSY \oplus многоквантовый фильтр (DQF COSY). Передача когерентности между связанными спинами и непосредственно несвязанными имеет различную зависимость от угла поворота β смешивающего импульса. Поэтому, выполнив опыты с разными β , мы можем существенно упростить 2D COSY-спектры. С этой целью используют последовательность из трех РЧ импульсов вида^{30,31,32,54,55} (рис. 7,ж)

$$\frac{\pi}{2}(\varphi) - t_1 - \frac{\pi}{2}(\varphi) \frac{\pi}{2}(x) - \text{регистрация по } t_2.$$

При этом фазу φ чередуют так, чтобы выделить чисто двухквантовую когерентность между вторым и третьим РЧ импульсами. В точке 3 после второго РЧ импульса система двух спинов A , X находится в состоянии, в котором многоквантовую когерентность можно представить в виде линейных комбинаций из чисто нульквантовой ZQC и чисто двухквантовой когерентности DQC. В результате чередования фаз РЧ импульсов происходит усреднение продольной намагниченности, нульквантовой когерентности ZQC и антифазной одноквантовой когерентности. Остается только чистая двухквантовая когерентность DQC:

$$\begin{aligned} \sigma_3^{\text{DQC}} = & \left[\frac{1}{2} (2I_x^{(A)} I_y^{(X)} + 2I_y^{(A)} I_x^{(X)}) \cos \Omega_A t_1 + \right. \\ & \left. + \frac{1}{2} (2I_x^{(A)} I_y^{(X)} - 2I_y^{(A)} I_x^{(X)}) \cos \Omega_X t_1 \right] \sin \pi J_{AX} t_1. \end{aligned} \quad (28)$$

После третьего $\pi/2(x)$ -импульса возникает одноквантовая намагниченность

$$\begin{aligned} \sigma_4^{\text{набл}} = & \left[\frac{1}{2} (2I_x^{(A)} I_z^{(X)} + 2I_z^{(A)} I_x^{(X)}) \cos \Omega_A t_1 + \right. \\ & \left. + \frac{1}{2} (2I_x^{(A)} I_z^{(X)} - 2I_z^{(A)} I_x^{(X)}) \sin \Omega_X t_1 \right] \sin \pi J_{AX} t_1. \end{aligned} \quad (29)$$

Первое и четвертое слагаемые (29) соответствуют диагональным пикам в виде антифазных дублетов вдоль осей ω_1 и ω_2 . Синглетных компонент в этом спектре нет. В тех случаях, когда ширина спектральной линии сравнима с величиной J , указанные дублеты будут ослаблены по интенсивности в той же степени, как и кросс-пики. Второе и третье слагаемые (29) описывают кросс-пики, которые отличаются от кросс-пиков в COSY уменьшенными вдвое интенсивностями³⁵.

Особенность традиционной COSY состоит в том, что компоненты кросс-пиков имеют противоположные знаки. Чтобы устранить этот недостаток и создать условия для возникновения кросс-пиков от спинов, не связанных между собой непосредственно, как это делают в эстафетной COSY, используют метод изотропного смешивания³³. Вместо второго, смешивающего, импульса РЧ поля используют повторяющиеся симметричные последовательности РЧ импульсов, например, из четырех $\pi(x)$ -импульсов или циклы из 16 импульсов вида $(-x, y; -y, -x; -x-y; -x; x, -y; y, x; x, y; -y, x)$. Этим достигается симметричное смешивание, после которого в системе спинов A, X остаются ненулевыми компоненты вида: $I_x^{(A)}, I_x^{(A)}, I_x^{(A)} I_x^{(X)}$ и $I_y^{(A)} I_z^{(X)} - I_z^{(A)} I_y^{(X)}$. При некотором фиксированном значении времени изотропного смешивания τ_m спектр COSY теперь содержит синфазные сигналы в поглощающей моде, а антифазные сигналы, обусловленные компонентой $I_y^{(A)} I_z^{(X)} - I_z^{(A)} I_y^{(X)}$, находятся в дисперсионной моде. Синфазные сигналы не меняют знака в зависимости от τ_m , а антифазные сигналы изменяют свой знак в зависимости от τ_m . Чтобы убрать антифазные компоненты, спектры COSY, полученные при нескольких различных значениях τ_m , например восьми, усредняют. В методе изотропного смешивания получают кросс-пики не только для непосредственно связанных спинов, но также и для спинов, которые не имеют прямых связей. По этой причине этот метод был назван «спектроскопией полных корреляций» (TOCSY)³³ (рис. 8,з).

В корреляционной спектроскопии с регистрацией спинового эха (SECSY)^{16,40,42,53,66} сигнал спинового эха регистрируют после второго, смешивающего, $\pi/2(x)$ -импульса, который подают в центре стадии эволюции t_1 . Спектры COSY и SECSY связаны между собой соотношением¹⁶

$$S^{\text{COSY}}(\omega_1, \omega_2) = \frac{1}{2} S^{\text{SECSY}}\left(\frac{\omega_1 + \omega_2}{2}, \omega_2\right). \quad (30)$$

В традиционном COSY с последовательностью импульсов $\pi/2(x) - \pi/2(x)$ возникают пики как на положительных, так и на отрицательных частотах ω_1 : $P(\omega_1, \omega_2)$ -пики или сигналы антиэхо, и $N(-\omega_1, \omega_2)$ -пики или сигналы эхо¹⁵. Эти пики переходят в соответствующие пики спектра SECSY на суммарной, $P'((\omega_2 + \omega_1)/2, \omega_2)$ и разностной, $N'((\omega_2 - \omega_1)/2, \omega_2)$ частотах.

3.5. Д в у м е р н ы е J -с п е к т р ы. Мультиплеты, вызванные J -связями, отображаются в традиционной 1D спектроскопии в виде вырожденных по J спектральных линий. В 2D-спектрах это вырождение снято и каждый мультиплет разворачивается относительно своего центра на угол 45° или 90° . Для получения 2D J -спектра используют последовательность из двух импульсов^{43,64} (рис. 9,а). Первый, неселективный $\pi/2$ -импульс создает поперечную намагниченность и инициирует прецессию спинов под действием химических сдвигов Ω и взаимное расхождение компонент мультиплета под действием скалярной спин-спиновой связи J . После π -импульса, который подается в центре стадии эволюции t_1 , эффект химических сдвигов рефокусируется, а компоненты J -мультиплетов продолжают расходиться. Регистрацию ЯМР сигнала как функцию времени t_2 начинают в момент времени $t = t_1$. Так как J -связь присутствует как на стадии эволюции, так и на стадии регистрации, то компоненты мультиплетов в 2D J -спектре развернуты.

относительно оси $\omega_1 = \Omega$ под углом 45° . Вдоль оси ω_2 отображают значения J . Спектральная линия в 2D J -спектрах состоит из смеси поглощающей и дисперсионной моды, при этом примесь дисперсионных компонент сильно уменьшает разрешение в J -спектрах. Поэтому обычно 2D J -спектры отображают в виде спектра мощности, т. е. в виде абсолютного значения^{62,59,68}.

Чтобы повысить разрешение в 2D J -спектрах, регистрацию сигнала $s(t_1, t_2)$ начинают сразу после π -импульса РЧ поля⁷¹ (рис. 9,б). В отличие от последовательности РЧ импульсов, приведенной на рис. 9,а, стадия эволюции здесь заканчивается в момент подачи π -импульса. Благодаря этому эффекты от химических сдвигов (Ω) и от спин-спиновой связи (J) дают вклад в сигнал как на стадии эволюции, так и на стадии регистрации. Возникает эффект

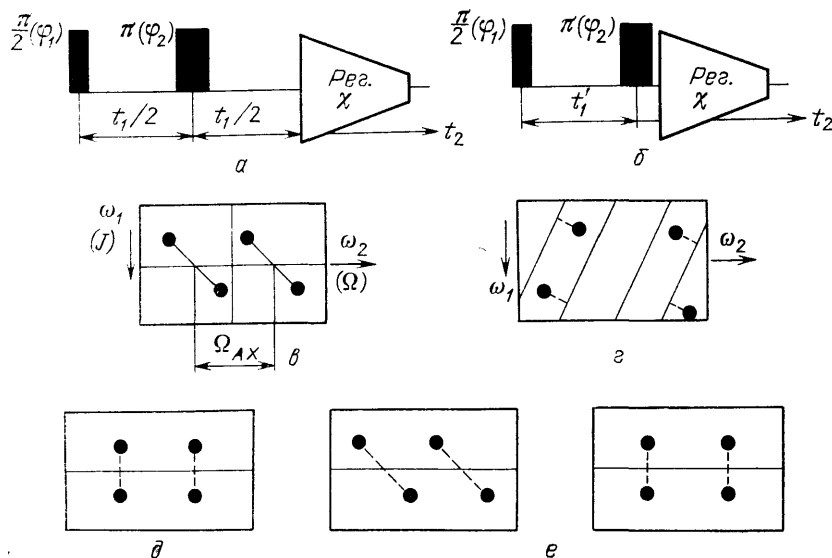


Рис. 9. Последовательность РЧ импульсов, используемая для получения 2D J -спектров, и структура J -спектров.

а — Традиционная последовательность. б — Последовательность для FOCSY 2D J -спектра. в — Традиционный J -спектр. г — Исходный FOCSY-спектр. д — J -спектр после устранения наклона. е — То же для FOCSY J -спектра

перекрытия (нахлестывания) 2D J -спектров, который можно устранить изменением программы облучения точно так же, как в эксперименте COSY—FOCSY^{16,63}. Возникает 2D J -FOCSY-спектр с более высоким разрешением и более высокой чувствительностью, чем в традиционном 2D J -спектре.

Чтобы подавить артефакты в 2D J -спектрах, фазу φ_1 $\pi/2$ -импульса, фазу φ_2 π -импульса, а также фазу χ опорного сигнала в приемнике чередуют по схеме, которую называют «EXORCYCLE»⁷²:

$$\begin{aligned}\varphi_1 &\rightarrow 0, 0, 0, 0, \\ \varphi_2 &\rightarrow 0, 90^\circ, 180^\circ, 270^\circ, \\ \chi &\rightarrow 0, 180^\circ, 0, 180^\circ.\end{aligned}$$

3.6. Спектроскопия эффекта Оверхаузера (NOESY). В состоянии теплового равновесия уровни энергии спиновой системы заселены согласно бoльцмановскому распределению. Однако если селективно облучить резонансную линию спина A системы взаимодействующих спинов A , X , то интенсивность резонансной линии спина X изменится (эффект Оверхаузера). Чем ближе спин X к спину A , тем больше это различие. Скорость изменения эффекта NOE во времени обратно пропорциональна шестой степени расстояния между спинами A и X . По разности интенсивностей ре-

зонансной линии спина X , возникающей под действием селективного возбуждения спина A , судят о пространственной близости спинов A и X ⁴⁵. Эффект Оверхаузера, который вызван диполь-дипольным взаимодействием спинов A , X , состоит из двух процессов: 1) из чистого изменения интенсивности наблюдаемой спектральной линии и 2) из перераспределения интенсивностей спектральных линий в пределах спинового мультиплета. Процесс передачи

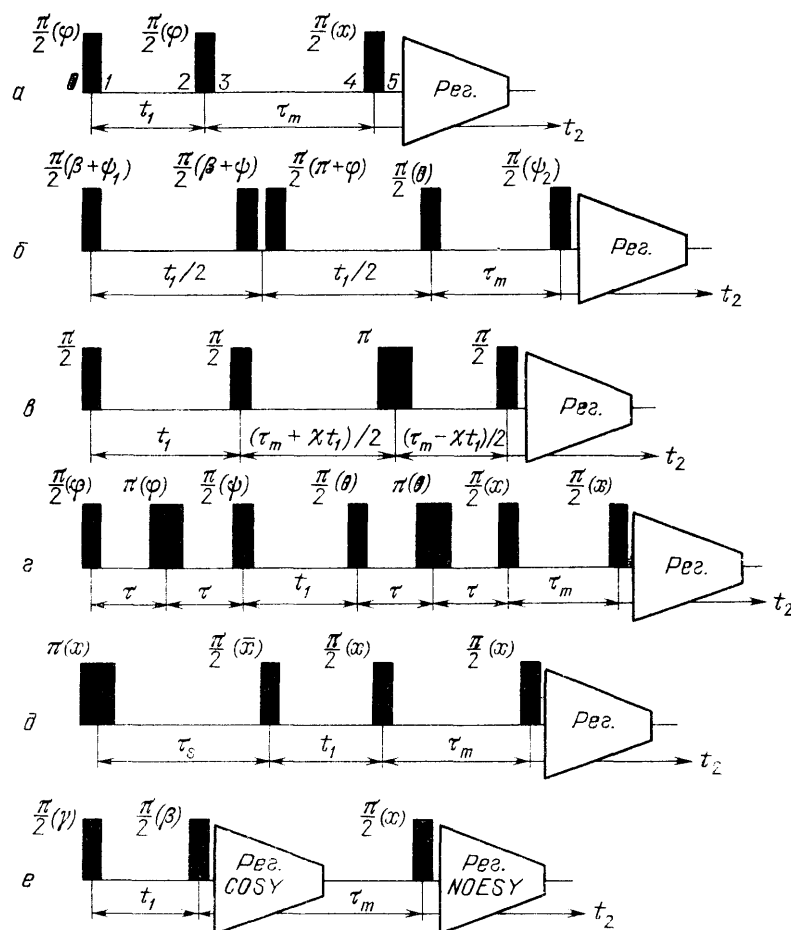


Рис. 10. Последовательности РЧ импульсов, используемые в спектроскопии NOESY. *a* — Традиционная последовательность. *б* — NOESY с обращением времени. *в* — Схема разделения NOE от J-кросс-пиков. *г* — DQ NOESY. *д* — SKEWSY. *е* — COSY \oplus NOESY или COCONOSY

намагниченности под действием эффекта Оверхаузера является некогерентным по своей природе, и его трудно отделить от эффекта химического обмена. Для исследования любого из этих двух явлений используют одну и ту же последовательность из трех импульсов^{46–48} (рис. 10, *a*). Первый, неселективный, $\pi/2$ -импульс создает поперечную намагниченность. Второй $\pi/2$ -импульс является смешивающим. На стадии смешивания длительностью τ_m происходит как кросс-релаксация, так и химический обмен. Сигнал ЯМР регистрируют после третьего $\pi/2$ -импульса. На стадии смешивания τ_m необходимо выделить продольную намагниченность, подавив все поперечные когерентности с $p = 1, 2, 3, \dots$, и нульквантовую когерентность с $p = 0$. Последняя имеет такой же отклик на сдвиги фаз РЧ полей, как и продольная намагниченность. Если опустить все компоненты поперечной намагниченности,

то в точке 3 после второго $\pi/2$ -импульса в начале стадии смешивания система спинов A , X находится в состоянии ⁴:

$$\sigma_3 = (-I_z^{(A)} \cos \Omega_A t_1 - I_z^{(X)} \cos \Omega_X t_1) \cos \pi J_{AX} t_1 + \\ + (I_y^{(A)} I_x^{(X)} - I_x^{(A)} I_y^{(X)}) (\cos \Omega_X t_1 - \cos \Omega_A t_1) \sin \pi J_{AX} t_1. \quad (31)$$

Если учесть характер эволюции нульквантовой когерентности ZQC и принять во внимание то, что компоненты продольной намагниченности смешиваются под действием химического обмена и кросс-релаксации, то после третьего $\pi/2$ -импульса в точке 5 наблюдаемая намагниченность равна

$$\sigma_5^{\text{набл}} = (I_y^{(A)} a_{AA} \cos \Omega_A t_1 + I_y^{(X)} a_{XX} \cos \Omega_X t_1 + \\ + I_y^{(A)} a_{XA} \cos \Omega_X t_1 + I_y^{(X)} a_{AX} \cos \Omega_A t_1) \cos \pi J_{AX} t_1 + \\ + (I_z^{(A)} I_x^{(X)} - I_x^{(A)} I_z^{(X)}) \cos (\Omega_A - \Omega_X) \tau_m \times \\ \times (\cos \Omega_X t_1 - \cos \Omega_A t_1) \sin \pi J_{AX} t_1. \quad (32)$$

В случае симметричного обмена коэффициенты смешивания равны:

$$a_{AA} = a_{XX} = \frac{1}{2} \exp(-R_1 \tau_m) [1 + \exp(-2\kappa \tau_m)], \\ a_{AX} = a_{XA} = \frac{1}{2} \exp(-R_1 \tau_m) [1 - \exp(-2\kappa \tau_m)], \quad (33)$$

где R_1 — скорость спин-решеточной релаксации, а κ — константа обмена. Из (32) видно, что диагональные пики спектра NOESY соответствуют коэффициентам смешивания a_{AA} и a_{XX} , а обменные кросс-пики описываются коэффициентами смешивания a_{AX} и a_{XA} и находятся в фазе с J_{AX} пиками. Кроме этого, в спектре NOESY имеются антифазные диагональные и кросс-пики от нульквантовой когерентности ZQC.

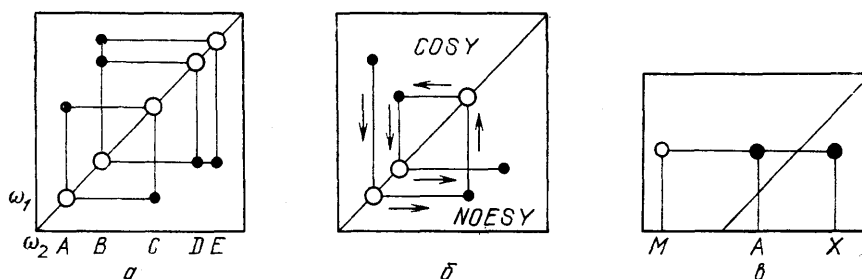


Рис. 11. Структура спектров NOESY.

a — Традиционный спектр NOESY, в котором спин A диполь-дипольно связан со спином C , а спин B связан диполь-дипольно со спином D и E . *б* — β -улитка в спектре COSY \oplus NOESY. *в* — DQ NOESY, где пики, обусловленные J -связью, помечены сплошным кружком, а пик, вызванный некогерентной диполь-дипольной передачей намагниченности от спина A к спину M , не имеющему J -связи ни со спином A , ни со спином X , помечен светлым кружком.

Типичный NOE-спектр приведен на рис. 11, *a*. Пик A связан диполь-дипольной связью с пиком C , а пик B связан одновременно с пиками D и E . Аналогичные эффекты возникают от химического обмена ⁵⁰.

Если время τ_m изменять систематически, то измеренные данные образуют 3D-сигнал ЯМР $s(t_1, t_2; \tau_m)$. После двухмерного преобразования Фурье по t_1 и t_2 возникнет 3D-спектр $S(\omega_1, \omega_2; \tau_m)$. Некогерентные эффекты создают плавное изменение $S(\omega_1, \omega_2; \tau_m)$ от τ_m , а когерентные эффекты передачи когерентности через J -связь, наоборот, приводят к быстрым осциллирующим изменениям $S(\omega_1, \omega_2; \tau_m)$ от τ_m . Чтобы подавить эффекты от ZQC, τ_m варьируют в пределах ± 10 – 20% для каждого t_1 и t_2 , а сигналы ЯМР усредняют. Фазовая когерентность J -корреляции разрушается, в результате чего остаются эффекты NOE и химического обмена, которые медленно изме-

няются с τ_m . Наконец, в спектре NOESY присутствуют также интерференционные эффекты от поперечной намагниченности, которые можно подавить простым чередованием фаз РЧ импульсов. Аналогично убирают квадратурное «изображение» вдоль оси ω_2 .

Чтобы отделить эффект NOE от J -кросс-пиков, в схему облучения вводят рефокусирующий π -импульс (рис. 10, в), который подают не в центре периода смешивания τ_m , а систематически сдвигают его одновременно с инкрементацией t_1 ⁵⁶. Возникает характерная модуляция сигнала ЯМР на разностной (ZQC) и суммарной (DQC) частотах прецессии спинов A и X . После преобразования Фурье J -кросс-пики (и только одни они!) сдвигаются относительно своего первоначального положения на величину $\pm \chi (\omega_A - \omega_X)$ и $\pm \chi (\omega_A + \omega_X)$. Для наблюдения эффекта Оверхаузера только от близко расположенных спинов A , X время τ_m берут достаточно малым, например 100 мс. При времени $\tau_m \sim 300$ мс эффект Оверхаузера наблюдают также от сильно удаленных спинов.

Если скорость спин-решеточной релаксации R_1 мала по сравнению с константой обмена χ , то для устранения диагональных пиков, которые не связаны с обменными процессами, но преобладают при малых временах t_1 , используют дифференциальную обменную спектроскопию⁵¹. Из 2D NOESY спектра вычитают 2D спектр, который получен при $\tau_m = 0$ (рис. 10, а). Для более высокой эффективности указанного метода 2D-спектры необходимо представить в чистой моде. Тогда амплитуда оставшихся в разностном спектре диагональных пиков будет связана непосредственно с диагональными элементами обменной матрицы^{32,33}.

Чтобы подавить в этом разностном спектре эффект селективной передачи населенности уровней энергии, который связан с разной степенью насыщения подуровней мультиплета, был разработан метод предварительного облучения соответствующих мультиплетов⁷⁰. Полученные два сигнала ЯМР суммировались на стадии обработки данных.

Интересное развитие NOESY получила в виде спектроскопии SKEWSY⁴⁴. Скорость обмена и скорость кросс-релаксации здесь измеряют в отсутствие помех от эстафетной передачи намагниченности. Для этого на стадии приготовления в схеме NOESY вводят возмущающий π -импульс РЧ поля. Происходит перераспределение интенсивности пиков, так что интенсивность кросс-пиков в спектре 2D SKEWSY может быть больше, чем в традиционной NOESY, и больше интенсивности диагональных пиков.

Чтобы выполнить последовательную расшифровку резонансных линий в 2D-спектрах, спектры COSY и NOESY располагают рядом на одном графике: COSY — в верхнем левом треугольнике, а NOESY — в нижнем правом треугольнике. Очень часто последовательность J -связей на таком комбинированном 2D-спектре имеет вид спирали (β -улитка¹⁶) (рис. 11, б). Спектр COSY \oplus NOESY можно измерить в одном эксперименте путем регистрации спектра COSY и спектра NOESY в тождественных условиях, не приводящих к систематическим погрешностям⁵⁹. Последовательность РЧ импульсов в этом опыте приведена на рис. 10, е. Первый, неселективный $\pi/2$ (γ)-импульс создает поперечную намагниченность и инициирует эволюцию намагниченности в течение времени t_1 . Вторым $\pi/2$ (β)-импульс оставляет без изменения продольную компоненту намагниченности и инициирует передачу этой компоненты намагниченности среди спинов, скалярно взаимодействующих друг с другом. После $\pi/2$ (β)-импульса, когда оставшиеся в плоскости x , y компоненты намагниченности продолжают прецессировать на различных частотах ω_2 , начинают измерения спектра 2D COSY. Перпендикулярная компонента поперечной намагниченности после $\pi/2$ (β)-импульса возвращается к оси z и в течение времени смешивания τ_m подвергается воздействию процессов кросс-релаксации или химического обмена. После третьего $\pi/2$ (α)-импульса, который преобразует продольную z -компоненту намагниченности в поперечную, регистрируют сигнал NOESY. При помощи определенной про-

граммы чередования фаз РЧ импульсов в спектре $\text{COSY} \oplus \text{NOESY}$ убирают аксиальные пики, а также многоквантовую когерентность первого, второго и третьего порядков. Для получения квадратурного сигнала вдоль оси ω_2 выполняют четыре дополнительных эксперимента. В ⁶⁰ число независимых экспериментов было равно 16.

Неоднозначности, возникающие в спектре 2D NOESY из-за наложения когерентных (J -связь) и некогерентных диполь-дипольных эффектов, устраняют в двухквантовой спектроскопии DQ NOESY ⁴⁹. Первый и второй $\pi/2$ -импульсы РЧ-поля заменяют на сэндвич РЧ импульсов ($\pi/2 - \tau - \pi - \tau - \pi/2$) (рис. 10,з). После окончания первого сэндвича РЧ импульсов исходная z -намагниченность возникает от двухквантовой когерентности, которая помечена суммарной по химическому сдвигу частотой прецессии спинов A , X . Под действием второго сэндвича РЧ импульсов поперечная двухквантовая когерентность (DQC) переходит в продольную намагниченность. Кросс-релаксация развивается на стадии смешивания τ_m . Последний $\pi/2$ -импульс РЧ поля превращает продольную намагниченность в наблюдаемую поперечную. Фазы РЧ импульсов чередуют по определенной схеме ⁴⁹. Спектр DQ NOESY для системы спинов содержит три типа пиков (рис. 11, в). Два из них, расположенные симметрично относительно диагонали, обусловлены J -связями, а третий пик расположен на частоте спина M , который не имеет J -связи ни со спином A , ни со спином X . Спин M получает намагниченность от спина A непосредственно через механизм некогерентной передачи благодаря диполь-дипольному взаимодействию AM .

Существенный недостаток спектроскопии NOESY в том, что основной эффект кросс-релаксации, который приводит к изменению интенсивности пиков наблюдаемого спина, сопровождается нежелательными эффектами перераспределения интенсивности пиков в пределах данного спинового мультиплета. Этот эффект возникает от перераспределения населенностей уровней спиновой системы AX , и его называют селективной передачей населенности (SPT) ⁵⁷. Чтобы подавить эффект SPT в системе из двух спинов AX , частоту РЧ поля располагают точно в центре соответствующего дублета. Однако в более сложных спиновых системах эффект SPT так просто убрать нельзя. В ⁵⁷ был предложен новый метод устранения эффекта SPT. Сущность его следует из анализа эффекта, который возникает в случае, если считывающий $\pi/2$ -импульс не создает поворота спина точно на 90° ⁶⁵. Для пояснения этого эффекта рассмотрим антифазное возмущение населенности уровней, которое описывается состоянием двух спинов вида $I_2^{(A)}I_2^{(X)}$. Согласно ⁶⁹, считывающий импульс РЧ поля можно рассматривать как последовательность двух полуселективных РЧ импульсов, таких, что первый из них действует только на спин A , а второй действует только на спин X .

Во многих описанных выше методах получения 2D-спектров ЯМР используют чередование фаз РЧ импульсов и опорного сигнала в приемнике. Однако метод чередования фаз имеет свои ограничения ⁶¹. Так, например, чередованием фаз невозможно разделить продольную намагниченность и нульквантовую когерентность ZQC. Между тем именно в NOESY возникает такая проблема. Так, например, при использовании последовательности импульсов ($\pi/2 - t - \pi/2 - t' - \beta$) вклад в регистрируемый сигнал дают как продольная намагниченность, имеющаяся перед считывающим β -импульсом, так и нульквантовая когерентность ZQC. Чтобы разделить между собой указанные два эффекта, используют зависимость интенсивности сигнала от угла поворота спина β ³⁴.

3.7. Нульквантовые (ZQC) 2D-спектры. По своей физической сущности нульквантовая когерентность ZQC содержит информацию о спин-спиновых связях. Однако на пути использования этого свойства ZQC в реальном эксперименте стоят две трудности ⁴¹. А именно, последовательность импульсов $\pi/2(x) - \tau - \pi(y) - \tau - \pi/2(x)$ не создает нулькванто-

вую когерентность ZQC в слабо связанной системе из одноименных спинов. С другой стороны, последовательность импульсов $\pi/2(x) - \tau - \pi/2(x)$, хотя и создает нульквантовую когерентность ZQC, но амплитуды отдельных нульквантовых переходов зависят как от спин-спиновой связи, так и от химических сдвигов. Поэтому для возбуждения нульквантовой когерентности ZQC в 2D-спектрах ЯМР целесообразно использовать последовательность РЧ импульсов вида (рис. 12) $\pi/2(x) - \tau - \pi(y) - \tau - \pi/4(y)$ ⁴¹, которая дает

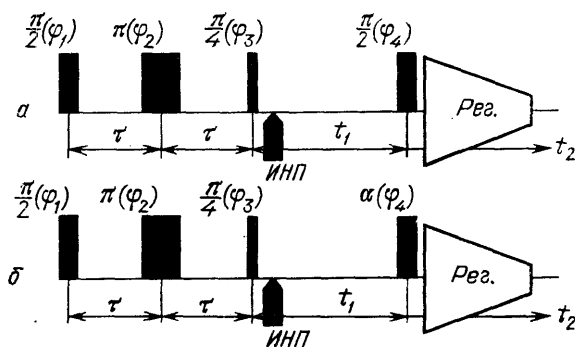


Рис. 12. Схема экспериментов с нульквантовой когерентностью.

a — С регистрирующим $\pi/2$ -импульсом. b — С регистрирующим α -импульсом, где $\alpha < \pi/2$. ИМП обозначает импульс неоднородного магнитного поля

достаточно однородное возбуждение нульквантовых переходов ZQC и в которой эффект химических сдвигов подавлен π -импульсом. После $\pi/4(y)$ -импульса состояние системы из двух спинов вида $I_x^{(A)}I_z^{(X)}$ переходит в состояние $I_z^{(A)}I_z^{(X)}$ с нульквантовой когерентностью ZQC, в то время как намагниченность несвязанных спинов под действием рассматриваемого импульса не изменяется. Чтобы подавить нежелательные сигналы и поляризацию вида $I_z^{(A)}I_z^{(X)}$ от билинейных эффектов, фазы четырех импульсов РЧ поля при $t_1 = 0$ чередуют по схеме:

$$\begin{aligned}\varphi_1 &\rightarrow x, x, x, x, \varphi_2 \rightarrow y, -y, y, -y, \\ \varphi_3 &\rightarrow y, y, -y, -y, \quad \varphi_4 \rightarrow y, y, y, y, \\ \chi &\rightarrow x, x, -x, -x.\end{aligned}$$

При этом в момент времени $t_1 = 0$ подают импульс магнитного поля (рис. 12, a), который нарушает однородность магнитного поля⁴¹. Однако остается незначительная намагниченность от несовершенства РЧ импульсов.

Как было отмечено в³⁴, при $\alpha < \pi/2$ передача нульквантовой когерентности ZQC к пассивным спином (рис. 12, b), которые не участвуют в образовании ZQC, ослабевает, и ZQC хорошо отображается в одном из вариантов 2D-спектра. При малых временах τ подчеркнуты корреляции с большим J , а связи между удаленными спинами, наоборот, ослаблены. Корреляции между пиками на 2D ZQC для $\alpha = \pi/2$ радиан отображаются горизонтальными линиями, идущими параллельно оси ω_2 . Для $\alpha = \pi/4$ радиан корреляции между пиками идут вдоль диагонали ($\omega_2, -2\omega_1$).

3.8. Трехмерные (3D) спектры ЯМР и ACCORDION. Необходимость в регистрации трехмерного (3D)-сигнала $s(t_1, t_2, t_3)$, зависящего от трех переменных времени, возникает в спектроскопии ЯМР по разным причинам. Первая из них — это желание объединить два метода 2D-спектроскопии в одном эксперименте. Об эффективности такого подхода свидетельствует успех, который был достигнут в совместных измерениях эффектов $\text{COSY} \oplus \text{NOESY}$ ^{59,60}. Однако эксперимент этот не является трехмерным по своей природе. Информация, которая в нем регистрируется, представляет собой упорядоченный набор из двух (и только из двух!) сигналов ЯМР: $s_{\text{COSY}}(t_1, t_2)$ и $s_{\text{NOESY}}(t_1, t_2)$. Подлинно трехмерный эксперимент может возникнуть при параллельном объединении двух методов 2D-спектроскопии, например, 2D COSY и 2D J -спектроскопии⁶⁶. Первая из них дает корреля-

цию химических сдвигов двух связанных спинов A, X , а вторая формирует (Ω, J) -спектры тех же спинов. В трехмерном сигнале ЯМР $s(t_1, t_2, t_3)$ содержится информация как о корреляции химических сдвигов, так и о 2D J -спектрах. После трехмерного преобразования Фурье сигнала ЯМР $s(t_1, t_2, t_3)$ возникает 3D-спектр $S(\omega_1, \omega_2, \omega_3)$, в котором J -спектры имеют расстройку по частоте, определяемую химическим сдвигом соответствующего спина. В 3D-спектре ЯМР видны все мультиплеты, все скалярные связи и все химические сдвиги.

Наиболее естественно необходимость в регистрации 3D-сигналов ЯМР возникает в NOESY при вариации продолжительности стадии смешивания τ_m ⁶⁸. Здесь регистрируют сигнал ЯМР вида $s(t_1, \tau_m, t_2)$, который после двухмерного преобразования Фурье переходит в 3D-спектр $S(\omega_1, \tau_m, \omega_2)$. Однако это естественное обобщение требует значительного увеличения продолжительности эксперимента, делает 3D-эксперимент весьма дорогим и недоступным для многих исследовательских групп, а возможные вариации условий эксперимента приводят к ненадежным результатам.

Иначе обстоит дело в спектроскопии ЯМР типа ACCORDION^{67,68}, в которой трехмерный массив данных редуцирован к двумерному массиву. Поясним принцип действия спектроскопии ACCORDION на примере 2D-обменной спектроскопии NOESY, в которой используют последовательность из трех $\pi/2$ -импульсов РЧ поля. В традиционной 2D NOESY продолжительность стадии смешивания τ_m остается постоянной, а продолжительность стадии эволюции систематически изменяют. Сигналы ЯМР регистрируют как функцию времени t_2 после последнего $\pi/2$ -импульса. В эксперименте ACCORDION продолжительность стадии смешивания τ_m изменяют одновременно (!) с изменением продолжительности стадии эволюции t_1 :

$$\tau_m = kt_1. \quad (34)$$

Здесь трехмерный эксперимент, в котором изменяют все временные переменные, t_1, t_2 и τ_m , сводится к двумерному эксперименту. На стадии преобразования Фурье связь между временами τ_m и t_1 вида (34) приводит к тому, что одномерное преобразование Фурье по t_1 представляет собой одновременно одномерное преобразование Фурье по τ_m . В результате такого «трюка» частотные оси ω_1 и ω_m идут параллельно друг другу так, что спектральный диапазон вдоль оси ω_m меньше спектрального диапазона вдоль оси ω_1 в k раз. При этом частотные оси ω_1 и ω_2 в эксперименте ACCORDION имеют различный физический смысл.

Так как коэффициенты смешивания a_{AA} и a_{AX} в эксперименте NOESY зависят от времени τ_m (33), то одномерное преобразование Фурье-сигнала ЯМР вдоль времени τ_m приводит к различным спектральным пикам вдоль оси ω_m :

$$a_{AA}(\tau_m) \rightarrow S_{AA}(\omega_m) = \frac{1}{2} \left[\frac{R_1}{R_1^2 + \omega_m^2} + \frac{2\kappa + R_1}{(2\kappa + R_1)^2 + (\omega_m)^2} \right] \quad (35)$$

для диагонального пика,

$$a_{AX}(\tau_m) \rightarrow S_{AX}(\omega_m) = \frac{1}{2} \left[\frac{R_1}{R_1^2 + \omega_m^2} - \frac{2\kappa + R_1}{(2\kappa + R_1)^2 + (\omega_m)^2} \right] \quad (36)$$

для кросс-пика.

Из (35) и (36) видно, что спектральная линия в диагональном пике состоит из сумм двух лоренцевых линий, причем ширина первой из них определяется скоростью спин-решеточной релаксации R_1 , а ширина второй — суммой $(2\kappa + R_1)$, где κ — константа обмена. Спектральная линия кросс-пика, которая представляет собой разность тех же лоренцевских линий, содержит легко извлекаемую информацию о константе обмена κ .

Рассмотрим в заключение связь между 2D-спектром ACCORDION и 3D-спектром ЯМР. Массив 2D-спектров $S(\omega_1, \tau_m, \omega_2)$ при n значениях пара-

метра τ_m имеет вид стопки из 2D-спектров. После дискретного преобразования Фурье функции $S(\omega_1, \tau_m, \tau_2)$ по τ_m возникает стопка из n 2D-спектров $S(\omega_1, \omega_m, \omega_2)$ с дискретным параметром ω_m . Видно, что одномерная стопка 2D-спектров эквивалентна полному 3D-спектру ЯМР и что 2D-спектр ACCORDION представляет собой косую проекцию³⁸ указанного 3D-спектра на ось ω_1 , при этом угол ε , под которым сделана указанная косая проекция, однозначно определяется величиной k из (34):

$$\operatorname{tg} \varepsilon = k. \quad (37)$$

4. РЕНЕССАНС ОДНОМЕРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

Сильное перекрытие спектральных линий в одномерных спектрах ЯМР устраняется в двухмерной и трехмерной спектроскопии ЯМР, описанных в предыдущих разделах данного обзора. Тем самым перед исследователем открывается доступ к информации, которая позволяет расшифровать структуру неорганических и органических молекул. Если на первой стадии развития многомерных методов ЯМР-спектроскопии соответствующие оценки структуры молекул носили качественный характер, то в настоящее время при помощи современных методов и современного оборудования в области ЯМР-спектроскопии можно проводить количественный анализ структур молекул. Корреляционную спектроскопию ЯМР (COSY) используют там, где необходимо оценить значения констант связи J непосредственно связанных спинов, или передать по эстафете когерентность вдоль цепочки связанных спинов (RCOSY). Для получения данных о взаимном расположении спинов в пространстве используют спектроскопию эффекта Оверхаузера (NOESY). Между тем метод двухмерной спектроскопии ЯМР имеет ряд существенных недостатков. Главный из них состоит в том, что время измерения и обработки многомерных спектров ЯМР очень велико (~ 10 часов и более), а для записи исходных данных и их преобразования требуется цифровая память большого объема. Поэтому неудивительно, что у исследователей всегда существовало желание найти соответствующие эквиваленты методов многомерной спектроскопии ЯМР, особенно для тех задач, где достаточно иметь только частичную информацию о J -связях и об эффекте Оверхаузера. Решение было найдено при помощи метода селективного возбуждения спинов⁷³. Для этой цели первый неселективный $\pi/2$ (x)-импульс РЧ поля был заменен на селективный $\pi/2$ -импульс, который имел огибающую в форме гауссианы. Ширину спектра возбуждения в селективном $\pi/2$ -импульсе выбирают настолько малой, чтобы возбудить переходы, относящиеся только к одному мультиплету, например, спина X в системе спинов A, M, X . Тогда в регистрируемом одномерном спектре ЯМР будут отсутствовать мультиплеты спинов A и M . На рис. 13, а дана программа эксперимента, который является одномерным эквивалентом опыта 2D COSY (см. рис. 7). Замечательно то, что⁷³ при короткой стадии эволюции τ (5 мс) передача когерентности, которая описывается функцией $\sin \pi J \tau$, происходит только к ближайшему мультиплету спина M , отстоящему от мультиплета X по спектру на 0,35 мд. При длительности стадии эволюции $\tau = 70$ мс возбуждается только дальний мультиплет спина A (0,8 мд), а ближний мультиплет спина M не возбуждается ($\pi J \tau = \pi$). Для промежуточной продолжительности стадии эволюции, $\tau = 30$ мс, намагниченность передается как к ближнему мультиплету спина M , так и к дальнему мультиплету спина A . Этот результат показывает, что в одномерном эксперименте 1D COSY можно реализовать двойную селективность: как по Ω , так и по J .

Было проверено экспериментально⁷³, что при селективной по J передаче намагниченности в антифазный мультиплет центр мультиплета приобретает нулевую интенсивность. Это можно использовать для более точного измерения константы связи J между соответствующими спинами.

Если образец облучить последовательностью импульсов, которая представляет собой комбинацию 1D COSY \oplus z-фильтр (рис. 13, в), то антифазный мультиплет перейдет в синфазный. Сумма и разность 1D-спектров с антифазным и синфазным мультиплетами содержит мультиплеты с половинным числом компонент, при этом по смещению центров «усеченных» мультиплетов

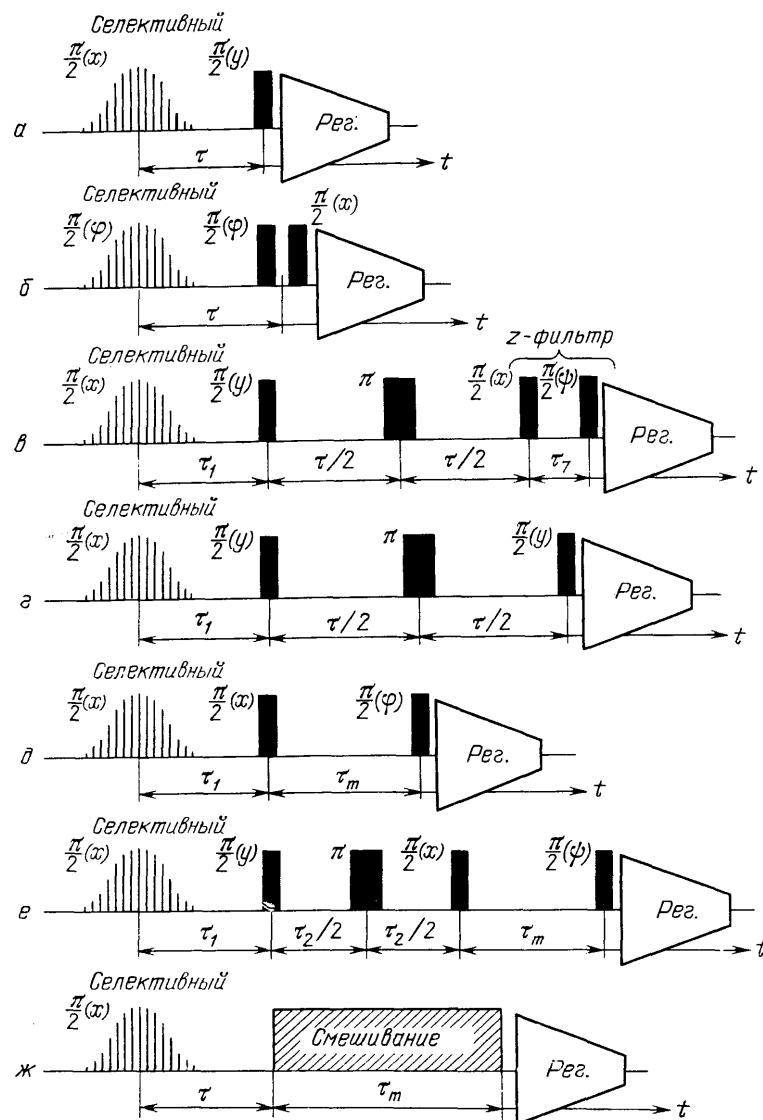


Рис. 13. Последовательности РЧ импульсов, используемые в селективных одномерных 1D-спектроскопиях.

а — Традиционный 1D COSY. б — 1D DQ COSY. в — 1D COSY с z-фильтром. г — 1D RCOSY. д — Традиционный 1D NOESY. е — 1D-эстафетный NOESY. ж — 1D TOCSY

на суммарном и разностном спектрах можно оценить константу активной связи.

Одномерный аналог 1D RCOSY, приведенный на рис. 13, д, с эстафетной передачей намагниченности может быть использован для получения одномерных спектров остатков отдельных аминокислот⁷³. На рис. 13, в, г, е, ж приведены схемы одномерных эквивалентов ряда других экспериментов из двухмерной спектроскопии ЯМР.

Наконец, на рис. 14 показан пример, свидетельствующий о том, что популярность одномерной спектроскопии растет, а не падает. Это — эксперимент с эстафетной передачей намагниченности⁶², в которой можно одновременно исследовать картину как ближних, так и дальних связей. Селективность в данном эксперименте создается при помощи последовательности слабых импульсов РЧ поля DANTE⁴². Если число эстафетных передач

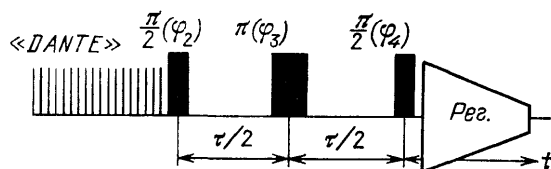


Рис. 14. Последовательность РЧ импульсов в одномерной 1D-спектроскопии с эстафетной передачей намагниченности

невелико, то такой эксперимент может быть выполнен намного быстрее, чем соответствующий 2D-эквивалент, хотя информация, полученная в этих двух опытах, будет равноценной.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы рассмотрели методы многоимпульсной спектроскопии ЯМР, которые изложены в данном обзоре на примере системы, состоящей из двух одноименных (но неэквивалентных) спинов атомного ядра. Указанные методы были созданы для того, чтобы упростить процесс интерпретации сложных *одномерных* спектров ЯМР. В настоящее время, на новом витке развития техники ЯМР, исследователи разрабатывают методы упрощения *двухмерных* спектров ЯМР, а также строят алгоритмы расшифровки спектров ЯМР, которые можно поручить компьютеру. В ходе этих разработок методы COSY, RCOSE, MQS, NOESY и другие продолжают оставаться базовыми кирпичиками новых построений. Это дает основание полагать, что данный обзор будет оставаться полезным в течение обозримого времени, особенно для начинающего исследователя, в качестве задающего ориентира в безбрежном море методов современной ЯМР спектроскопии.

Объединенный институт ядерных исследований
Дубна, Московская обл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ледерман Л. М. // В мире науки. 1985. № 1. С. 11.
2. Лундин А. Г., Федин Э. И. ЯМР-спектроскопия. — М.: Наука, 1986.
3. Сороко Л. М. Интроскопия на основе ядерного магнитного резонанса. — М.: Энергоатомиздат, 1986.
4. Sorensen O. W., Eich G. W., Levitt M. H., Bodenhausen G., Ernst R. R. // Prog. NMR Spectr. 1983. V. 16. P. 163.
5. Bodenhausen G. // Ibidem. 1981. V. 14. P. 137.
6. Lynden-Bell R. M., Bulsing J. M., Doddrell D. M. // J. Magn. Reson. 1983. V. 55. P. 128.
7. Sorensen O. W., Levitt M. H., Ernst R. R. // Ibidem. P. 104.
8. Bodenhausen G., Kogler H., Ernst R. R. // Ibidem. 1984. V. 58. P. 370.
9. Yen Yu-Sze, Pines A. // J. Chem. Phys. 1983. V. 78. P. 3579.
10. Baum J., Munowitz M., Garraway A. N., Pines A. // Ibidem. 1985. V. 83. P. 2015.
11. Weitekamp D. P. // Adv. Magn. Reson. 1983. V. 11. P. 111.
12. Freeman R., Frenkiel T. A., Levitt M. H. // J. Magn. Reson. 1981. V. 44. P. 409.
13. Packer K. J., Wright K. M. // Mol. Phys. 1983. V. 50. P. 797.
14. Aue W. P., Bartholdi E., Ernst R. R. // J. Chem. Phys. 1976. V. 64. P. 2229.
15. Nagayama K. // J. Magn. Reson. 1986. V. 66. P. 240.
16. Nagayama K., Kumar Anil, Wuthrich K., Ernst R. R. // Ibidem. 1980. V. 40. P. 321.

17. Kumar Anil, Hosur R. V., Chandrasekhar K.//*Ibidem*. 1984. V. 60. P. 143.
18. Hosur R. V., Chary K. V. R., Kumar Anil, Govil G.//*Ibidem*. 1985. V. 62. P. 123.
19. Eich G., Bodenhausen G., Ernst R. R.//*J. Am. Chem. Soc.* 1982. V. 104. P. 3731.
20. Bolton P. H.//*J. Magn. Reson.* 1982. V. 48. P. 336.
21. Bolton P. H., Bodenhausen G.//*Chem. Phys. Lett.* 1982. V. 89. P. 139.
22. Wagner G.//*J. Magn. Reson.* 1983. V. 55. P. 151.
23. Bax Ad. Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids. Dordrecht, Holland: Delft Univ. Press, 1982.
24. Mareci T. H., Freeman R.//*J. Magn. Reson.* 1982. V. 48. P. 158.
25. Mareci T. H., Freeman R.//*Ibidem*. 1983. V. 51. P. 531.
26. Thomas M. A., Kumar Anil.//*Ibidem*. V. 54. P. 319.
27. Rance M., Sorensen O. W., Leupin W., Kogler H., Wuthrich K., Ernst R. R.//*Ibidem*. 1985. V. 61. P. 67.
28. Emid S.//*Physica. Ser. B + C.* 1985. V. 128. P. 79.
29. Bax Ad, Drobny G.//*J. Magn. Reson.* 1985. V. 61. P. 306.
30. Piantini U., Sorensen O. W., Ernst R. R.//*J. Am. Chem. Soc.* 1982. V. 104. P. 6800.
31. Bodenhausen G., Dobson Ch. M.//*J. Magn. Reson.* 1981. V. 44. P. 212.
32. Bax Ad, Freeman R., Kempell S. R.//*J. Am. Chem. Soc.* 1980. V. 102. P. 4849.
33. Braunschweiler L., Ernst R. R.//*J. Magn. Reson.* 1983. V. 53. P. 521.
34. Braunschweiler L., Bodenhausen G., Ernst R. R.//*Mol. Phys.* 1983. V. 48. P. 535.
35. Otting G., Wuthrich K.//*J. Magn. Reson.* 1986. V. 66. P. 359.
36. Bax Ad, Freeman R.//*Ibidem*. 1981. V. 44. P. 542.
37. Nakashima T. T., Rabenstein D. L.//*Ibidem*. 1986. V. 66. P. 157.
38. Mansfield P., Maudsley A. A.//*Ibidem*. 1977. V. 27. P. 101.
39. Zuiderweg E. R. P.//*Ibidem*. 1986. V. 66. P. 153.
40. Kumar Anil, Hosur R. V., Chandrasekhar K., Murali N.//*Ibidem*. 1985. V. 63. P. 107.
41. Muller L.//*Ibidem*. 1984. V. 59. P. 326.
42. Morris G. A., Freeman R.//*Ibidem*. 1978. V. 29. P. 433.
43. Freeman R., Morris G. A.//*Bull. Magn. Reson.* 1980. V. 1. P. 5.
44. Bremer J., Mendz G. L., Moore W. J.//*J. Am. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 4691.
45. Jeener J., Meier B. H., Bachman P., Ernst R. R.//*J. Chem. Phys.* 1979. V. 71. P. 4546.
46. Macura S., Ernst R. R.//*Mol. Phys.* 1980. V. 41. P. 95.
47. Bax Ad, Freeman R., Frenkiel T. A., Levitt M. H.//*J. Magn. Reson.* 1981. V. 43. P. 478.
48. Bax Ad, Freeman R., Frenkiel T. A.//*J. Am. Chem. Soc.* 1981. V. 103. P. 2102.
49. Van de Ven F. J. M., Haasnoot C. A. G., Hilbers C. W.//*J. Magn. Reson.* 1985. V. 61. P. 181.
50. Macura S., Huang Y., Suter D., Ernst R. R.//*Ibidem*. 1981. V. 43. P. 259.
51. Bodenhausen G., Ernst R. R.//*Mol. Phys.* 1982. V. 47. P. 349.
52. Bax Ad, Mehlkopf A. F., Smidt J.//*J. Magn. Reson.* 1979. V. 35. P. 167.
53. Weitekamp D. P., Garbow J. R., Murdoch J. B., Pines A.//*J. Am. Chem. Soc.* 1980. V. 103. P. 3578.
54. Shaka A. J., Freeman R.//*J. Magn. Reson.* 1983. V. 51. P. 169.
55. Macura S., Wuthrich K., Ernst R. R.//*Ibidem*. 1982. V. 47. P. 351.
56. Macura S., Wuthrich K., Ernst R. R.//*Ibidem*. V. 46. P. 269.
57. Shaka A., Bauer Ch., Freeman R.//*Ibidem*. 1984. V. 60. P. 479.
58. Dumoulin Ch., Williams E. A.//*Ibidem*. 1986. V. 66. P. 86.
59. Gurevich A. Z., Barsukov I. L., Arseniev A. S., Bystrov V. F.//*Ibidem*. 1984. V. 56. P. 471.
60. Haasnoot C. A. G., van de Ven F. J. M., Hilbers C. W.//*Ibidem*. P. 343.
61. Bolton P. H.//*Ibidem*. 1984. V. 60. P. 342.
62. Santoro J., Rico M., Bermejo F. J.//*Ibidem*. 1986. V. 67. P. 1.
63. Thomas M. A., Kumar Anil.//*Ibidem*. 1984. V. 56. P. 479.

64. Hall L. D., Sukumar S. // Ibidem. 1980. V. 38. P. 559.
65. Schaublin S., Hohener A., Ernst R. R. // Ibidem. 1974. V. 13. P. 196.
66. Bolton P. H. // Ibidem. 1982. V. 46. P. 343.
67. Bodenhausen G., Ernst R. R. // Ibidem. 1983. V. 45. P. 367.
68. Bodenhausen G., Ernst R. R. // Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 1304.
69. Bodenhausen G., Freeman R. // J. Magn. Reson. 1979. V. 36. P. 221.
70. Neuhaus D. // Ibidem. 1983. V. 53. P. 109.
71. Macura S., Brown L. R. // Ibidem. P. 529.
72. Bodenhausen G., Freeman R., Turner D. L. // Ibidem. 1977. V. 27. P. 511.
73. Bermel W., Kessler H., Griesinger C., Oschkinat H. // Bruker Rept. 1986. № 1. P. 22.