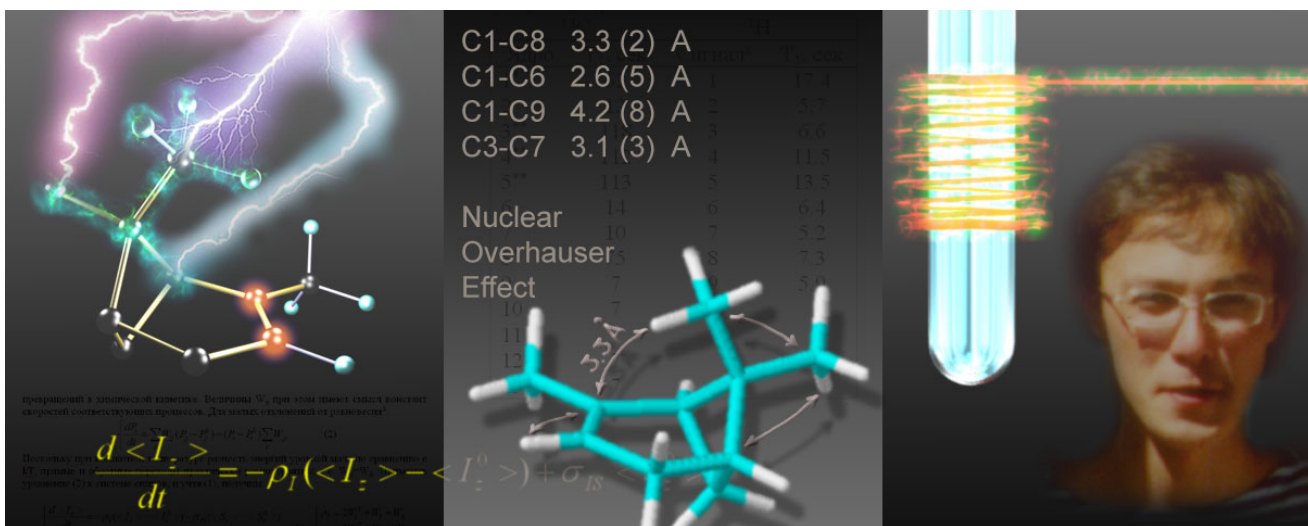


# Использование углерод-протонного ядерного эффекта Оверхаузера для определения геометрии молекулы.



Дипломная работа студента IV курса ФЕН НГУ И.С. Купрова.

Научный руководитель: к.х.н., зав. ЛФМИ НИОХ В.И. Маматюк.

## Оглавление.

<b>1. Введение и формулировка задачи.</b>	1
<b>2. Теоретическое введение и литературный обзор.</b>	2
<b>2.1 Пролог.</b>	2
<b>2.2 Теоретическое рассмотрение.</b>	3
2.2.1 Уравнения Соломона.	4
2.2.2 Природа ЯЭО.	6
<b>2.3 Эксперименты по ЯЭО.</b>	9
2.3.1 Условия возникновения ЯЭО.	9
2.3.2 “Статический” и “динамический” эффекты Оверхаузера.	10
2.3.3 Одномерный вариант эксперимента	11
2.3.4 Эстафетная передача поляризации. Отрицательные ЯЭО.	13
2.3.5 Двумерные эксперименты по ЯЭО. NOESY и ROESY.	14
<b>2.4 Применение ядерного эффекта Оверхаузера.</b>	16
2.4.1 Простые эксперименты.	16
2.4.2 Релаксационная матрица.	16
2.4.3 Передний край спектроскопии ЯЭО – протокол CLOUDS.	17
<b>2.5 Перспективы использования ЯЭО.</b>	17
2.5.1 Чего не хватает.	17
2.5.2 Что будет сделано в ближайшем будущем.	18
<b>3. Экспериментальная часть.</b>	19
<b>4. Результаты и обсуждение.</b>	21
<b>4.1 Измерение эффективных времен продольной релаксации ядер <math>^1\text{H}</math> и <math>^{13}\text{C}</math>.</b>	21
<b>4.2 Эксперименты по ЯЭО.</b>	23
<b>4.3 Ускорение экспериментов по ЯЭО.</b>	26
4.3.1 Теоретическое рассмотрение.	27
4.3.2 Экспериментальная реализация.	30
4.3.3 Анализ результатов.	31
<b>5. Выводы и перспективы.</b>	34
<b>6. Литература.</b>	36

*"There is one thing even more vital to science than intelligent methods; and that is, the sincere desire to find out the truth, whatever it may be."*  
- Charles Sanders Pierce

## **1. Введение и формулировка задачи.**

При квантовохимических расчетах пространственного строения сложных молекул (белки, пептиды, нуклеиновые кислоты) возникает задача минимизации энергии как функции десятков тысяч переменных. Проблема поиска глобального минимума энергии в пространстве такой размерности, особенно в присутствии других минимумов, современной математикой не разрешена. Существующие алгоритмы сходятся из начальной точки в ближайший минимум и просматривают небольшую его окрестность. Способов доказательства "глобальности" найденного минимума энергии не существует.

В таких условиях любая априорная информация о геометрическом строении молекулы имеет огромную важность, поскольку она снижает размерность пространства параметров. Чем ниже размерность задачи, тем больше уверенности в правильном ее решении. Снижение требований к вычислительной технике также немаловажно.

Для получения сведений о геометрии сложных молекул в растворах сейчас в основном используется протон-протонный ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО). Метод состоит в детектировании диполь-дипольных взаимодействий между магнитными моментами протонов. Диполь-дипольное взаимодействие не равно нулю только для пространственно близких ядер и легко детектируется ЯМР-спектрометром. Из анализа спектров ЯЭО можно получить до нескольких тысяч пространственных соотношений и неравенств для межпротонных расстояний. Эти данные существенно облегчают решение квантовохимических задач.

Точное определение расстояний методом протон-протонного ЯЭО затруднено многими факторами (вращение метильных групп, эстафетная передача поляризации, относительно быстрая продольная релаксация и др.). Ошибка, как правило, превышает 20%. Метод  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ЯЭО, тем не менее, широко применяется в конформационном анализе.

Помимо ядра  $^1\text{H}$ , легко наблюдаемым и часто встречающимся является ядро  $^{13}\text{C}$ . Помимо недостатков (главным образом низкая чувствительность), ЯМР на ядрах  $^{13}\text{C}$  имеет ряд преимуществ. Во-первых, изотоп углерода-13 является "разбавленным" – его содержание в природной смеси составляет около 1%. Основным изотопом углерода  $^{12}\text{C}$  имеет спин ноль, и ядра  $^{13}\text{C}$  в большинстве молекул изолированы друг от друга. Во-

вторых, мощность протон-углеродного ЯЭО в несколько раз выше протон-протонного. В-третьих, времена продольной релаксации в  $^{13}\text{C}$  в сотни раз превышают времена релаксации  $^1\text{H}$  (ниже будет показана важность этого факта). В-четвертых, возможно селективное воздействие на  $^{13}\text{C}$ -подсистему путем облучения спутников в протонных спектрах. Список можно продолжать и дальше.

**Цель работы – построить удобный метод определения внутримолекулярных расстояний по данным протон-углеродного ядерного эффекта Оверхаузера.**

## **2. Теоретическое введение и литературный обзор.**

### **2.1 Пролог.**

*“... я сильно сомневаюсь, молодой человек, что эффект, предсказанный в вашей работе, имеет право на жизнь. Тысячекратное увеличение разности заселенностей – это что-то невообразимое, хотя бы с точки зрения термодинамики. Возможно, в ваших расчеты вкралась ошибка”,* Норманн Рамзай мрачно взглянул на Оверхаузера и обвел взглядом аудиторию, *“я и профессор Парселл намерены внимательно проанализировать эти выкладки. Никаких тривиальных ошибок мы найти не смогли”*.

Скептицизм Рамзая, Парселла, Блоха, Раби и многих других именитых физиков, присутствовавших на собрании Американского Физического Общества, был вполне понятен. В работе Альберта Оверхаузера, в то время аспиранта Беркли, предсказывалось *тысячекратное* усиление сигнала ЯМР ядра при насыщении сигнала ЭПР неспаренного электрона [1,2]. Такого увеличения ядерной намагниченности при неизменном внешнем магнитном поле и неизменной температуре не мог себе представить никто. Скептицизм, однако, скоро поутих – ошибок в работе Оверхаузера не обнаружилось. Спустя три месяца Рамзай отправил ему следующее письмо:



27 июля, 1953

*Уважаемый доктор Оверхаузер:*

*Вы, возможно, помните, что на собрании Физического Общества в Вашингтоне, когда Вы представили свой доклад об упорядочении ядер, Блох, Раби, Парселл и я дружно заявили, что с трудом верим Вашим выводам, и предполагаем какую-то фундаментальную ошибку в Вашем рассмотрении. После возвращения в Брукхаузен я имел возможность прочитать Вашу работу.*

*Я долго пытался найти ошибку в Вашем рассмотрении, и пришел в итоге к выводу, что фундаментальных ошибок нет. Более того, мне теперь кажется, что это действительно весьма интересный способ упорядочения ядер. После долгих споров мне также удалось убедить Раби и Роберта Паунда в правильности Ваших предложений. Паунд недавно сообщил, что перед возвращением в Европу он убедил Парселла.*

*Я надеюсь, что Ваши попытки преодолеть серьезные экспериментальные трудности увенчаются полным успехом. Мне будет очень интересно услышать о Ваших успехах в этой области.*

*Искренне Ваш,  
Норманн Ф. Рамзай.*

Экспериментальная проверка, выполненная Карвером и Сликтером [3,4] подтвердила правоту Оверхаузера. При насыщении сигнала ЭПР электрона, сигнал ЯМР ядра  ${}^7\text{Li}$  с порога чувствительности взлетал до зашкаливающей интенсивности. Метод получил название “динамической поляризации ядер”. Карвер позже показал, что применение его металлами не ограничивается. Более того, оказалось необязательным наличие даже электронов – метод работал и для ядерно-ядерных систем.

Сам Оверхаузер рассматривал свою работу как упражнение в теоретической физике, не предвидя сколько-нибудь широкого применения. Однако уже через десять лет число статей, посвященных “ядерному эффекту Оверхаузера” перевалило за три сотни, а буквы NOE вошли в полтора десятка аббревиатур. Первая классическая книга по тому, что химики сейчас называют ядерным эффектом Оверхаузера, вышла в 1971 году [5,6].

## **2.2 Теоретическое рассмотрение.**

В ядерно-ядерных спиновых системах проявление динамической поляризации не столь сильно, как в электрон-ядерных, и обычно не приводит к усилению сигнала даже на порядок. Как будет показано ниже, величина эффекта пропорциональна отношению гироманнитных множителей двух спинов. Для пары электрон-ядро эта величина имеет порядок  $10^3$ , а для пары ядер обычно не превышает десяти.

Строгое описание ядерного эффекта Оверхаузера использует формализм функционала плотности и основано на введении в релаксационный супероператор членов, учи-

тывающих релаксацию по нульквантовым и двухквантовым переходам не через соответствующие одноквантовые переходы, а непосредственно [7]. Этот подход требует численного решения уравнения Лиувилля, которое, хотя и не представляет труда, все же куда менее наглядно, чем полуклассическое описание, основанное на уравнениях Соломона [8]. Ядерный эффект Оверхаузера является релаксационным эффектом, проявляющимся при наличии магнитного дипольного взаимодействия между пространственно близкими спинами. В определенных приближениях он может быть предсказан из относительно простых соображений. Все основные результаты и закономерности могут быть получены из полуклассического рассмотрения, которое представлено ниже.

### 2.2.1 Уравнения Соломона.

Энергия магнитного момента во внешнем магнитном поле  $\vec{H}_0$  есть скалярное произведение вектора момента на вектор поля. В операторной форме<sup>1</sup>:

$$E = -\vec{M} \cdot \vec{H}_0$$

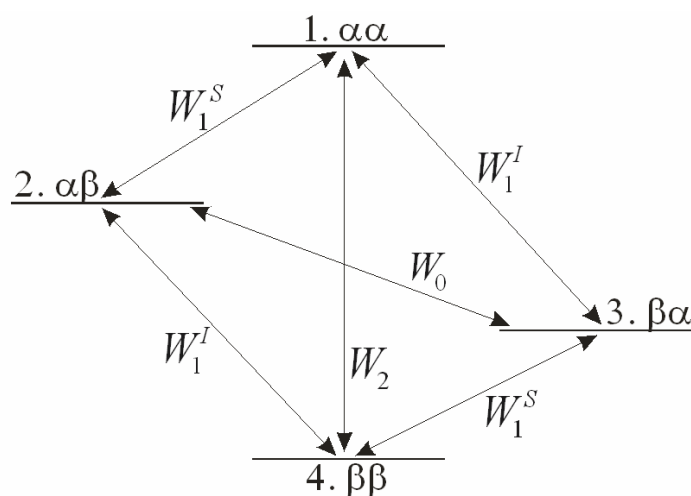
Учитывая связь углового и магнитного моментов  $\vec{M} = \gamma\hbar\vec{I}$ , получим

$$E = -\gamma\hbar\vec{I} \cdot \vec{H}_0,$$

где  $\vec{I}$  – оператор спина,  $\gamma$  – гиромагнитное отношение. Для одиночного спина  $\frac{1}{2}$  и поля, направленного вдоль оси z:

$$E = -\gamma\hbar H_0 I_z \qquad E = \pm\gamma\frac{\hbar}{2} H_0$$

Рассмотрим систему из двух различных не взаимодействующих спинов  $\frac{1}{2}$ : I и S.



<sup>1</sup> Квантовомеханические операторы в этой работе дополнительно никак не выделяются – это обычно не вызывает путаницы.

Во внешнем магнитном поле энергетическая диаграмма будет выглядеть примерно так, как показано на рисунке (разность энергий состояний  $\alpha\beta$  и  $\beta\alpha$  сильно преувеличена). Буквами  $\alpha$  и  $\beta$  обозначены состояния спинов с проекциями  $+\frac{1}{2}\hbar$  и  $-\frac{1}{2}\hbar$  на ось  $z$ .  $\mathbf{W}_1^I$  – вероятность одноквантового<sup>2</sup> перехода  $\alpha\rightarrow\beta$  при  $P_\alpha=1$  и  $P_\beta=0$ ,  $\mathbf{W}_1^S$  – то же, для спина  $S$ .  $\mathbf{W}_0$  – вероятность нульквантового перехода  $\alpha\beta\leftrightarrow\beta\alpha$ .  $\mathbf{W}_2$  – вероятность двухквантового перехода  $\alpha\alpha\leftrightarrow\beta\beta$ .

Все переходы, кроме нульквантового, в изолированной паре спинов запрещены. На практике все эти переходы все же проявляются в спиновых системах, под действием переменных магнитных полей различного происхождения. Средние (по ансамблю) значения проекций спинов равны:

$$\begin{aligned} \langle I_z \rangle &= \frac{1}{2}(P_1 + P_2 - P_3 - P_4)\hbar \\ \langle S_z \rangle &= \frac{1}{2}(P_1 - P_2 + P_3 - P_4)\hbar \end{aligned} \quad (1)$$

где  $P_i$  – нормированные заселенности соответствующих уровней. В равновесном состоянии согласно распределению Больцмана  $P_i^0 = \frac{1}{Z} \exp(-\frac{E_i}{kT})$ .

Процесс возврата заселенностей уровней к равновесию при малом отклонении от него подчиняется кинетике первого порядка. Действительно, переходы имеют вероятностный характер, кроме того, вероятность данного перехода определяется только разностью заселенностей по нему и не зависит от разностей заселенностей по остальным. Этот постулат аналогичен постулату о независимости элементарных превращений в химической кинетике. Для малых отклонений от равновесия<sup>3</sup>:

$$\left\{ \frac{dP_i}{dt} = \sum_j W_{ij}(P_j - P_j^0) - (P_i - P_i^0) \sum_j W_{ji} \right. \quad (2)$$

Поскольку при комнатной температуре разность энергий уровней мала по сравнению с  $kT$ , прямые и обратные переходы практически равновероятны, т.е.  $W_{ij}=W_{ji}$ . Применив уравнение (2) к системе спинов, и учтя (1), получим:

<sup>2</sup> Одноквантовый, двухквантовый, нульквантовый – принятые в ЯМР-спектроскопии термины, указывающие величину  $\Delta S_z$  (изменение проекции спина в единицах  $\hbar$ ).

<sup>3</sup> Иных в ЯМР не бывает. Величина  $E = \gamma \frac{\hbar}{2} H_0$  в поле с индукцией 10 Тл составляет  $10^{-3}kT$  при комнатной температуре. Разность заселенностей и возможности ее искажения не превышают 1/1000.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d \langle I_z \rangle}{dt} = -\rho_I (\langle I_z \rangle - \langle I_z^0 \rangle) - \sigma_{IS} (\langle S_z \rangle - \langle S_z^0 \rangle) \\ \frac{d \langle S_z \rangle}{dt} = -\rho_S (\langle S_z \rangle - \langle S_z^0 \rangle) - \sigma_{IS} (\langle I_z \rangle - \langle I_z^0 \rangle) \end{array} \right. \quad (3) \quad \left\{ \begin{array}{l} \rho_I = 2W_1^I + W_0 + W_2 \\ \rho_S = 2W_1^S + W_0 + W_2 \\ \sigma_{IS} = \sigma_{SI} = W_2 - W_0 \end{array} \right.$$

Это уравнения Соломона. Они являются (после обобщения на случай нескольких спинов) основным инструментом при полуклассическом рассмотрении процессов релаксации и кросс-релаксационных эффектов типа ЯЭО.

Величины, обратные к  $\rho$  и  $\sigma$ , дают характерное время подхода к равновесию, и часто поэтому переобозначаются:

$$\begin{array}{ll} \rho_I = 1/T_1^{II} & \sigma_{IS} = 1/T_1^{IS} \\ \rho_S = 1/T_2^{SS} & \sigma_{SI} = 1/T_1^{SI} \end{array}$$

В общем случае ни одной из этих величин пренебрегать нельзя. Величины  $\rho_I$  и  $\rho_S$  легко измерить экспериментально, если возмущать заселенности только одного спина из двух. Слагаемые  $\sigma_{IS}(\dots)$  при этом равны нулю, либо ими можно пренебречь. Соответствующие методики (“измерение величины  $T_1$ ”) подробно описаны [8].

### 2.2.2 Природа ЯЭО.

Ядерный эффект Оверхаузера состоит в изменении заселенностей спиновых уровней ядра при изменении поляризации пространственно близких спинов. В частном и наиболее распространенном случае производится облучение образца в определенном диапазоне частот. Заселенности по всем переходам, попадающим в этот диапазон, выравниваются. Для перехода  $\alpha \leftrightarrow \beta$  спина  $S=1/2$  выравнивание заселенностей уровней означает  $\langle S_z \rangle = 0$ . Из уравнений Соломона для соседнего с  $S$  спина в этом случае следует, что в равновесии:

$$\langle S_z \rangle = 0; \quad 0 = \frac{d \langle I_z \rangle}{dt} = -\rho_I (\langle I_z \rangle - \langle I_z^0 \rangle) + \sigma_{IS} \langle S_z^0 \rangle$$

Величина  $\sigma_{IS}$  получается из рассмотрения<sup>4</sup> частотного спектра флуктуаций локального магнитного поля, вызванных вращением и перемещением молекул. Для внутри-молекулярного диполь-дипольного взаимодействия ядерных магнитных моментов:

<sup>4</sup> Исключительно объемного. В небольшой работе я не могу на нем останавливаться.

$$W_1^I = \frac{3}{20} \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2}$$

$$W_0 = \frac{1}{10} \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2}$$

$$W_2 = \frac{3}{5} \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r^6} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2}$$

$\gamma_I$  – гиромагнитные отношения ядер,  $r$  – расстояние между ядрами I и S,  $\omega_I$  – резонансные частоты ядер,  $\tau_c$  – время корреляции, параметр автокорреляционной функции локального магнитного поля.

В невязких растворителях (хлороформ, ацетон, четыреххлористый углерод) для ядер  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  с хорошей точностью выполнено:  $\omega_I^2 \tau_c^2 \ll 1$ ,  $(\omega_I \pm \omega_S)^2 \tau_c^2 \ll 1$  (так называемое “предельное сужение”). В обозначениях уравнений Соломона:

$$\langle I_z \rangle = \langle I_z^0 \rangle + \frac{\sigma_{IS}}{\rho_I + \rho_{IS}} \langle S_z^0 \rangle \quad (5) \quad \text{где} \quad \sigma_{IS} = \frac{1}{2} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 \frac{\tau_c}{r^6}$$

$$\rho_{IS} = \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 \frac{\tau_c}{r^6}$$

Второе слагаемое дает превышение новой равновесной поляризации над  $\langle I_z^0 \rangle$ . Это и есть ядерный эффект Оверхаузера. Для небольших (менее сотен ангстрем) молекул величина  $\tau_c$  может быть принята одинаковой в окрестности всех ядер. Существенна зависимость кросс-релаксационного параметра  $\sigma_{IS}$  от шестой степени расстояния. Именно эта зависимость в конечном итоге позволяет определять межъядерные расстояния исходя из величин ЯЭО. Предельное возможное значение ЯЭО можно получить предельным переходом  $r \rightarrow 0$ . Величина  $\rho_I$  от расстояния не зависит, поэтому:

$$\langle I_z \rangle_{\max} = \langle I_z^0 \rangle + \frac{1}{2} \langle S_z^0 \rangle,$$

в случае одинаковых ядер (напр, два протона) с очевидностью максимальный ЯЭО равен 50%, т.е. сигнал усиливается в полтора раза. Для получения максимальной величины гетероядерного ЯЭО необходимо выразить величину  $\langle S_z^0 \rangle$  через  $\langle I_z^0 \rangle$ :

$$\langle S_z^0 \rangle = C \cdot \left[ P_{+\frac{1}{2}} \cdot \frac{1}{2} + P_{-\frac{1}{2}} \cdot \left(-\frac{1}{2}\right) \right] = \frac{C}{2} (P_{+\frac{1}{2}} - P_{-\frac{1}{2}}),$$

где  $C$  – константа, зависящая от системы единиц. Аналогичное выражение можно написать для спина I. Константа  $C$  будет та же. Разность заселенностей спиновых состояний невелика, поэтому:

$$P_{\pm\frac{1}{2}} = C' \cdot \exp\left[\mp \frac{\gamma_S \hbar H_0}{2kT}\right] \approx C' \cdot \left(1 \mp \frac{\gamma_S \hbar H_0}{2kT}\right),$$

подставив в предыдущее выражение, получим:

$$\langle S_z^0 \rangle = C'' \cdot \frac{\gamma_S \hbar H_0}{kT}, \quad \langle I_z^0 \rangle = C'' \cdot \frac{\gamma_I \hbar H_0}{kT},$$

откуда следует, что:

$$\langle S_z^0 \rangle = \langle I_z^0 \rangle \cdot \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \quad \text{и} \quad \langle I_z \rangle_{\max} = \left(1 + \frac{\gamma_S}{2\gamma_I}\right) \langle I_z^0 \rangle.$$

Последнее выражение дает максимально возможную амплитуду гетероядерного ЯЭО.

Вклад диполь-дипольного взаимодействия в собственную релаксацию ядер I (величина  $\rho_{IS}$  в уравнении 5), хотя и зависит от расстояния, не зависит от разности заселенностей по переходам спина S. В случае жесткой геометрии он является постоянным. При измерении величины  $T_1$  ядер углерода вклад от  $\rho_{IS}$  проявляется как “ускорение” релаксации тех атомов углерода, в близкой окрестности которых находятся протоны (группы CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>). Это связано с тем, что измеряемая величина  $T_1$  является эффективной:

$$T_1 = \frac{1}{\rho_I + \rho_{IS}}.$$

Именно она получается при экспериментальном измерении  $T_1$ .

Из уравнения (5) в итоге получим:

$$\langle I_z \rangle = \langle I_z^0 \rangle + q \frac{T_1^I}{r_{IS}^6} \langle S_z^0 \rangle,$$

где  $T_1$ - эффективное (экспериментально измеряемое) время продольной релаксации ядра I,  $r_{IS}$  – расстояние между ядрами I и S, q-константа, включающая фундаментальные параметры и  $\tau_c$ . При данном магнитном поле величина  $\langle S_z^0 \rangle$  для всех протонов с большой точностью одинакова, поэтому можно и ее убрать в константу:

$$\langle I_z \rangle = \langle I_z^0 \rangle + \frac{AT_1^I}{r_{IS}^6} \quad (6)$$

Это основное уравнение в этой работе. Из него, в частности, следует, что величина эффекта Оверхаузера на данном ядре прямо пропорциональна его времени продольной релаксации. В случае <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (протон-протонного) ЯЭО принято пренебрегать различиями  $T_1$  для разных протонов. Это не совсем правильно, но ошибка обычно не выходит за пределы порядка, чего достаточно при качественных оценках. Времена про-

дольной релаксации ядер углерода-13 лежат в диапазоне от 3 до 150 секунд, и пренебрегать различиями  $T_1$  ядер  $^{13}\text{C}$  нельзя. Большие значения времен продольной релаксации характерны для ядер  $^{13}\text{C}$  небольших молекул, особенно для четвертичных атомов углерода, и эксперимент показал, что “дальние” эффекты Оверхаузера можно уверенно наблюдать только на них.

## 2.3 Эксперименты по ЯЭО.

### 2.3.1 Условия возникновения ЯЭО

Для возникновения эффекта Оверхаузера между парой ядерных спинов  $\frac{1}{2}$  необходимы:

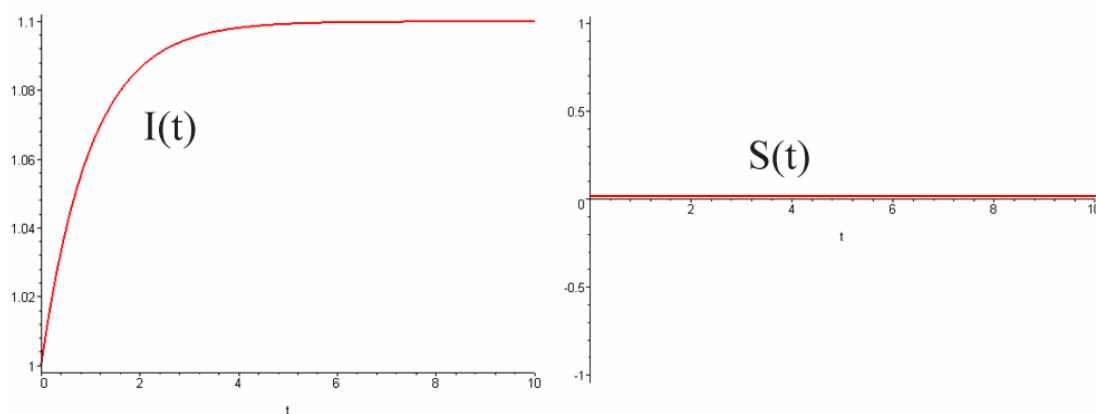
- а) их пространственная близость. ЯЭО является релаксационным эффектом, возникающим из-за частичного снятия запрета на нульквантовые и двухквантовые переходы в спиновых парах магнитным дипольным взаимодействием. Энергия взаимодействия двух магнитных диполей зависит от расстояния как  $\frac{1}{r^3}$ , следовательно вероятность перехода будет зависеть от расстояния как  $\frac{1}{r^6}$ . Это и есть знаменитая шестая степень расстояния. С увеличением расстояния ЯЭО затухает очень быстро.
- б) существование неравновесной заселенности состояний одного из спинов. Насыщение сигнала, соответствующего определенному переходу, наиболее удобно на практике, но в принципе достаточно любого отклонения от равновесия. Насыщение сигнала в спектре ЯМР эквивалентно выравниванию заселенностей двух или нескольких энергетических уровней.
- в) существование неравновесности в течение достаточно длительного времени (порядка времени продольной релаксации ядра, на котором наблюдается отклик). На практике это достигается достаточно длительным облучением образца на определенной частоте перед регистрацией.

Из уравнений Соломона непосредственно следует, что при прочих равных условиях ЯЭО тем больше, чем больше время продольной релаксации наблюдаемого ядра. При  $T_1 \rightarrow \infty$  величина ЯЭО асимптотически сходится к предельному значению.

### 2.3.2 “Статический” и “динамический” эффект Оверхаузера.

Термины относятся к способу создания и поддержания неравновесной заселенности спиновых уровней. Существует два основных подхода к ее созданию. Можно:

- а) непрерывным облучением образца на определенной длине волны поддерживать нулевую разность заселенностей по определенному переходу. Это называется статическим экспериментом.



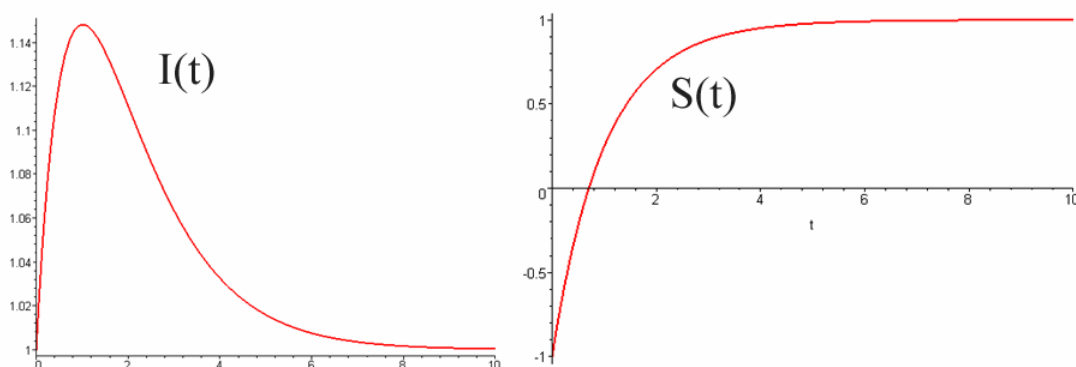
**Рисунок 1.** Графики решений системы уравнений Соломона в случае статического эксперимента ЯЭО ( $z$ -проекция макроскопической намагниченности в безразмерных координатах, равновесные значения  $\langle I_z \rangle$  и  $\langle S_z \rangle$  приняты за единицу). Разность заселенностей уровней спина  $S$  поддерживается равной нулю.  $z$ -проекция спина  $I$  через некоторое время приобретает сверхравновесное значение.

Преимуществом статического эксперимента является получение максимальной возможной амплитуды ЯЭО. Однако, необходимое время облучения может оказаться значительным (сотни и тысячи секунд), что абсолютно неприемлемо в случае, например, ядер с низким природным содержанием, когда требуется множество повторных экспериментов. Этот случай рассмотрен при выводе основного уравнения из уравнений Соломона.

- б) коротким импульсом переменного электромагнитного поля искажить/инвертировать разность заселенностей, позволяя возмущению релаксировать. Это так называемый динамический вариант. Импульсная инверсия заселенностей по переходу, скажем, спина  $S$ , математически означает начальное условие

$$\begin{aligned} \langle I_z \rangle \Big|_{t=0} &= \langle I_z^0 \rangle \\ \langle S_z \rangle \Big|_{t=0} &= - \langle S_z^0 \rangle \end{aligned}$$

к системе уравнений Соломона.



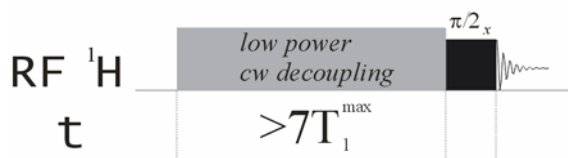
**Рисунок 2.** Графики решений системы уравнений Соломона в случае динамического эксперимента ЯЭО ( $z$ -проекции намагниченности в безразмерных координатах, равновесные значения  $\langle I_z \rangle$  и  $\langle S_z \rangle$  приняты за единицу). Спин  $S$ , заселенности уровней которого были инвертированы, экспоненциально релаксирует к равновесному состоянию. Для спина  $I$  в течение некоторого времени наблюдается сверхравновесная поляризация.

Преимуществом динамических экспериментов является существенно меньшая затрата времени. Для проведения количественных расчетов по данным динамического ЯЭО требуется знать релаксационные параметры насыщаемых ядер, которые не всегда просто измерить. Метод неприменим в случае, когда наблюдаемое ядро релаксирует существенно медленнее насыщаемого. Кроме того, часто возникает проблема селективности инверсии заселенностей [9,10].

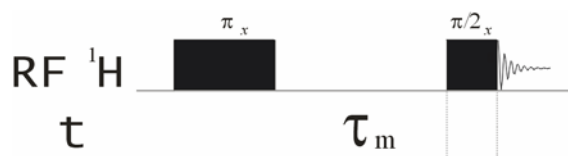
### 2.3.3 Одномерный вариант эксперимента.

Самый простой “одномерный” эксперимент по наблюдению ядерно-ядерного эффекта Оверхаузера представляет собой регистрацию спектра ядерного магнитного резонанса с предварительным (в импульсном варианте эксперимента) или одновременном (в варианте непрерывной развертки) насыщением одной или нескольких спектральных линий<sup>5</sup>.

Стандартная запись простейшей импульсной последовательности выглядит следующим образом:

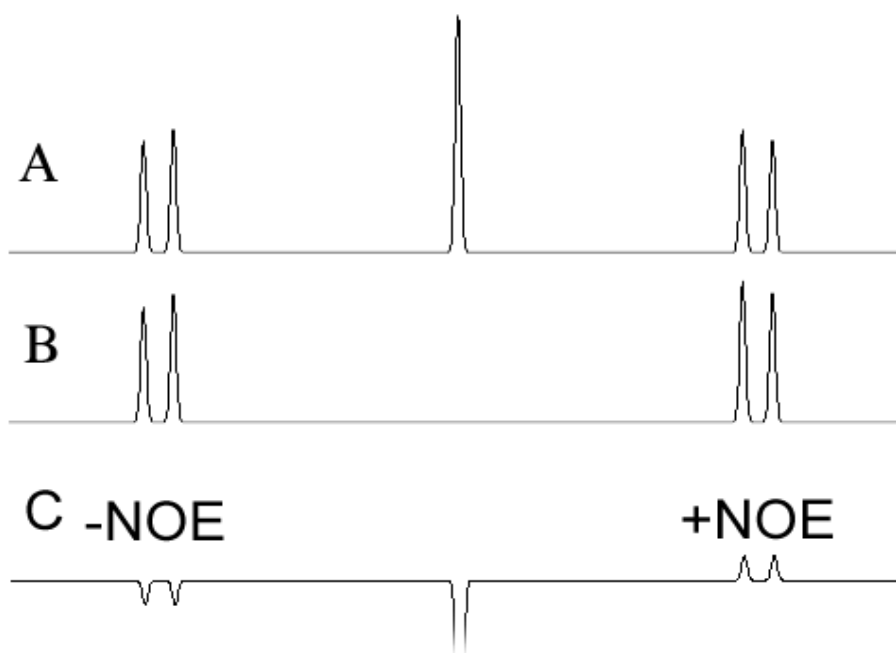


**Рисунок 3.** Архаичная версия статического эксперимента по гомоядерному ЯЭО. Отличается длительностью и невысокой точностью.



**Рисунок 4.** Архаичная версия динамического эксперимента по гомоядерному ЯЭО.  $\tau_m$  – время смешивания, т.е. время эволюции системы, в ходе которого возникает ЯЭО.

Использование этих импульсных последовательностей приводит к спектру ЯМР, в котором один сигнал отсутствует (насыщен), а интенсивности остальных сигналов в той или иной мере искажены. Результаты таких экспериментов принято представлять в виде разности – из спектра с ЯЭО вычитают обычный спектр.



**Рисунок 5.** Типичные спектры, получаемые при измерении ядерного эффекта Оверхаузера в одномерном варианте. А – нормальный спектр ЯМР (три пространственно близких спина, каждый со своей картиной расщепления), В – спектр, полученный с использованием импульсной последовательности Рис. 3 с облучением центрального сигнала, С – разностный спектр, полученный вычитанием В-А. Видно то, что обычно называют положительным эффектом Оверхаузера на правом сигнале и отрицательным на левом. Природа того и другого обсуждается в тексте. Приведенные спектры, являются расчетными (авторская программа, метод DFT). Подобрать аналогичный экспериментальный пример далеко не просто.

Процедура может быть реализована поточечным вычитанием двух спектров, либо поточечным вычитанием двух  $\text{fid}'\text{ов}$ , либо может быть встроена в фазовый цикл [9,10,11]. Все варианты требуют стабильности магнитного поля и частоты спектрометра на уровне  $10^{-10}$ . Это чрезвычайно жесткое условие. Последствия его невыполнения выходят за рамки данной работы, и обсуждаться не будут.

<sup>5</sup> Здесь и далее будут рассматриваться только импульсные эксперименты, поскольку эксперименты с непрерывной разверткой безнадежно устарели.

### 2.3.4 Эстафетная передача поляризации. Отрицательные ЯЭО.

Как отмечалось выше, ядерный эффект Оверхаузера возникает при *любом* искажении заселенностей зеемановских уровней спинов, пространственно близких к данному. Из уравнений Соломона непосредственно следует, что знак ЯЭО противоположен знаку воздействия на соседний спин<sup>6</sup>. Это значит, что если разница заселенностей для одного спина в паре уменьшается, на втором спине эта разница увеличится за счет ЯЭО. И наоборот, если искусственно “поляризовать” один из спинов в паре, разность заселенностей второго понизится, и его сигнал за счет ЯЭО не увеличится, а уменьшится.

Рассмотрим систему из трех спинов, расположенных на одной линии таким образом, что два крайних спина между собой не взаимодействуют. Система уравнений Соломона будет выглядеть так:

$$\begin{cases} \frac{d \langle I_{1z} \rangle}{dt} = -\rho_1 (\langle I_{1z} \rangle - \langle I_{1z}^0 \rangle) - \sigma_{12} (\langle I_{2z} \rangle - \langle I_{2z}^0 \rangle) \\ \frac{d \langle I_{2z} \rangle}{dt} = -\rho_2 (\langle I_{2z} \rangle - \langle I_{2z}^0 \rangle) - \sigma_{12} (\langle I_{1z} \rangle - \langle I_{1z}^0 \rangle) - \sigma_{23} (\langle I_{3z} \rangle - \langle I_{3z}^0 \rangle) \\ \frac{d \langle I_{3z} \rangle}{dt} = -\rho_3 (\langle I_{3z} \rangle - \langle I_{3z}^0 \rangle) - \sigma_{23} (\langle I_{2z} \rangle - \langle I_{2z}^0 \rangle) \end{cases}$$

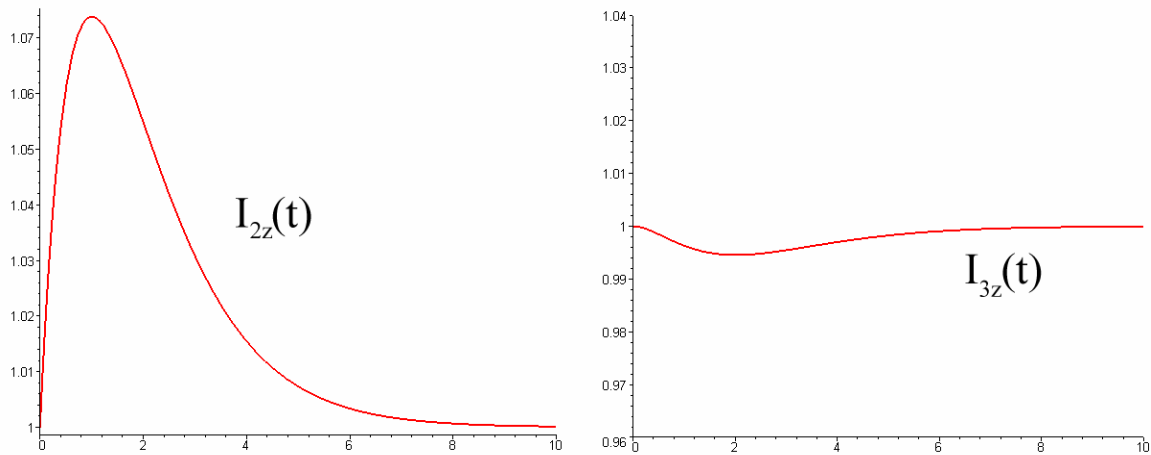
Подвергнем первый спин импульсной инверсии заселенностей (динамический эксперимент):

$$\langle I_{1z} \rangle \Big|_{t=0} = -\langle I_{1z}^0 \rangle$$

$$\langle I_{2z} \rangle \Big|_{t=0} = \langle I_{2z}^0 \rangle$$

$$\langle I_{3z} \rangle \Big|_{t=0} = \langle I_{3z}^0 \rangle$$

Решение уравнений Соломона для второго и третьего спинов в безразмерных координатах имеет вид:



**Рисунок 6.** Графики решений системы уравнений Соломона в случае динамического эксперимента ЯЭО в трехспиновой системе (взаимодействия в системе  $1 \leftrightarrow 2 \leftrightarrow 3$ ). Приведены  $z$ -проекции намагниченности второго и третьего спина в безразмерных координатах, равновесные значения  $\langle I_z \rangle$  приняты за единицу. Заселенности уровней первого спина были инвертированы в момент времени  $t=0$ . Виден положи-

<sup>6</sup> Предполагается, что  $\gamma > 0$ .

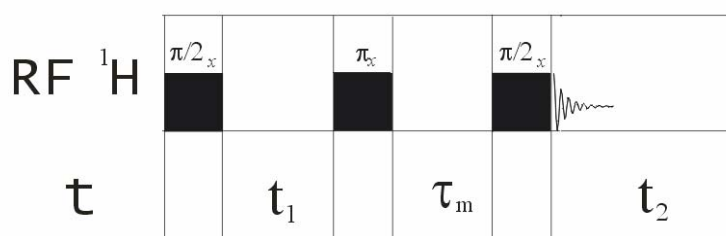
тельный эффект Оверхаузера на втором спине и отрицательный (эстафетный) эффект Оверхаузера на третьем.

Амплитуда эстафетных эффектов Оверхаузера обычно невелика по сравнению с прямыми, их необходимо учитывать лишь при очень точных измерениях. В относительном простых случаях (например,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ЯЭО небольших молекул) отрицательный знак эффекта однозначно указывает на то, что он имеет эстафетную природу.

### 2.3.5 Двумерные эксперименты по ЯЭО. NOESY и ROESY.

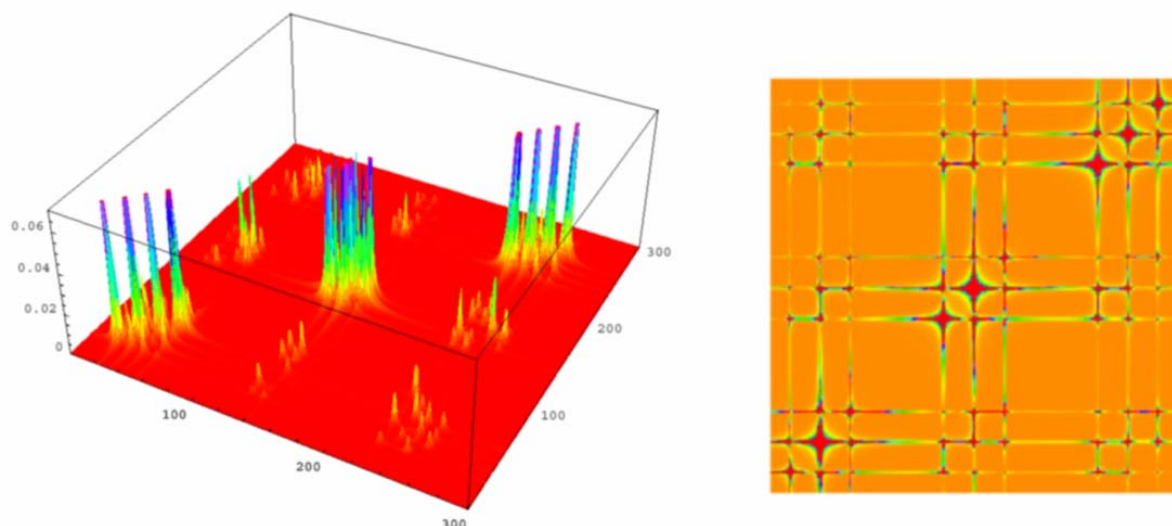
Все рассмотренные выше методы обладают одним существенным недостатком – чтобы получить полную картину проявления ЯЭО в молекуле, экспериментатор вынужден “перебирать” все спины, последовательно облучая каждый и наблюдая отклик на остальных. Этому недостатка лишены так называемые “двумерные” и “многомерные” методы, использующие многоимпульсные последовательности. Теоретические основы этих методов не могут быть изложены в рамках полуклассического подхода, использованного в этой работе. Ниже описаны лишь некоторые свойства двумерных экспериментов по ЯЭО.

Эксперимент NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) представляет собой трехимпульсную последовательность с двумя переменными временами:



**Рисунок 7.** Импульсная последовательность NOESY.  $t_1$  – первый период эволюции,  $t_2$  – второй период эволюции (в течение этого периода происходит регистрация *fid*),  $\tau_m$  – время смешивания. Спектр получается двумерным Фурье-преобразованием по координатам  $t_1$  и  $t_2$ .

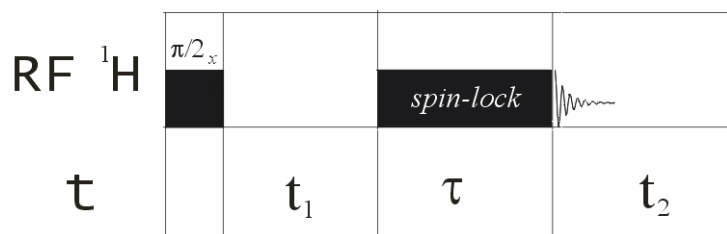
Итоговый спектр представляет собой трехмерную зависимость амплитуды (откладывается по оси аппликат) от двух частот. Обычный протонный спектр при этом находится на диагонали, а внедиагональные сигналы указывают либо на наличие ЯЭО, либо на ошибку в эксперименте. На приведенном ниже рисунке приведен “магнитудный” спектр, то есть спектр, в котором по оси  $z$  отложен модуль комплексной амплитуды сигнала данной частоты. Фазовая информация в таком представлении теряется.



**Рисунок 8.** Магнитудный спектр NOESY для трехспиновой системы с сильными скалярными взаимодействиями. Приведен расчетный спектр (авторская программа, метод DFT).

Если не вычислять модуль комплексного спектра, а откладывать по оси z подходящую линейную комбинацию действительной и мнимой части, получится так называемый “фазочувствительный” спектр. Это последнее представление предъявляет некоторые дополнительные требования к процедуре регистрации.

Для систем со скалярными взаимодействиями в спектрах NOESY часто проявляются так называемые COSY-пики. Это внедиагональные сигналы, обусловленные ядерным эффектом Оверхаузера, а эволюцией спиновой системы под действием J-связи. Дополнительные сигналы нежелательны, поскольку вводят в заблуждение исследователя и/или анализирующие программы. Усовершенствованный вариант последовательности NOESY, называемый ROESY (Rotating-frame Overhauser Spectroscopy) минимизирует вклад скалярных взаимодействий в появление кросс-пигов, и поэтому широко используется сейчас при исследовании строения сложных молекул.



**Рисунок 9.** Импульсная последовательность ROESY.

## 2.4 Применение ядерного эффекта Оверхаузера [12-18].

Описать в рамках небольшой работы огромное множество экспериментов, использующих ядерный эффект Оверхаузера, к глубокому сожалению автора не представляется возможным. Ниже будут описаны лишь самые важные аспекты в вопросе восстановления молекулярной структуры по данным ЯЭО.

### 2.4.1 Простые эксперименты.

В экспериментах по ЯЭО информативными являются:

а) само существование эффекта. Факт обнаружения ЯЭО между парой ядер означает, что они находятся в молекуле на расстоянии менее 4 Å. Этой информации может быть достаточно для однозначного вывода о строении молекулы. В настоящее время эксперименты по *обнаружению* эффекта Оверхаузера чаще всего проводятся в двумерном фазочувствительном варианте.

б) амплитуда эффекта. В статическом варианте эксперимента измеряются амплитуды эффекта Оверхаузера для нескольких пар ядер исследуемой молекулы. Зависимость

$$\langle I_z \rangle = \langle I_z^0 \rangle + \frac{AT_1^I}{r_{IS}^6}$$

позволяет по известным расстояниям рассчитать неизвестные.

В простых случаях и при оценочных расчетах величину  $T_1$  считают постоянной для всех ядер и вносят в константу. Динамические эксперименты ЯЭО более сложны математически, расчеты по ним основаны на уравнениях Соломона.

### 2.4.2 Релаксационная матрица.

В настоящее время исследуемые молекулы редко бывают простыми. Недостаток приборного времени и нежелание “вручную” перебирать большое количество частот обычно склоняют исследователей в сторону использования быстрых двумерных методов, а затем анализа данных 2D ЯЭО.

Для случая многих спинов систему уравнений Соломона можно переписать в матричном виде:

$$\frac{d \langle \vec{I}_z \rangle}{dt} = \hat{R} \cdot (\langle \vec{I}_z \rangle - \langle \vec{I}_z^0 \rangle),$$

где  $\langle \vec{I}_z \rangle$  – вектор-столбец средних проекций ядерной намагниченности,  $\hat{R}$  – так называемая матрица релаксации, включающая собственную релаксацию (диагональные члены) и кросс-релаксацию. Выше показывалось, что кросс-релаксационные члены за-

висят от расстояния между спинами и времени корреляции локального электромагнитного поля. Первое необходимо определить, второе на практике обычно вычисляют по тем или иным моделям.

Задача поиска межъядерных расстояний, таким образом, фактически сводится к задаче отыскания релаксационной матрицы для исследуемой системы спинов. Большинство современных методов определения геометрических параметров молекул в том или ином виде использует этот подход. Задача о поиске матрицы коэффициентов системы линейных дифференциальных уравнений по экспериментальным данным принципиально разрешима, хотя и требует иногда (белок на 40кДа – не шутка!) значительных вычислительных мощностей.

#### 2.4.3 Передний край спектроскопии ЯЭО – протокол CLOUDS.

Аббревиатура CLOUDS расшифровывается как Computed Location Of Unassigned Spins, и представляет собой революционную по простоте и надежности технику восстановления молекулярной структуры по данным спектроскопии ЯЭО. Главным преимуществом CLOUDS является необязательность отнесения сигналов в спектрах ЯМР перед их анализом.

Методика использует измеренные ЯЭО в качестве параметров поверхности потенциальной энергии так называемого “протонного газа” – изначально неупорядоченного облака протонов. Чем дальше релаксационная матрица этого облака от экспериментальной, тем выше энергия. В качестве силы отталкивания используется сила Ван-дер-Ваальса. Численная минимизация энергии протонного облака в пространстве координат индивидуальных протонов приводит к их расположению, которое наилучшим образом соответствует полученным данным ЯЭО.

Недавно показано, что описанный подход в сочетании с квантовохимическими методами расчета структуры (stimulated annealing – моделирование ренатурации белков) позволяет быстро и надежно установить структуру исследуемого соединения.

### **2.5 Перспективы использования ЯЭО.**

#### 2.5.1. Чего не хватает.

Все описанные выше красивые и мощные методы определения структуры в настоящее время реализованы и надежно работают только на протонах. Относительно недавно появились работы по сольватации молекул, использующие ЯЭО на ядрах фтора. Вездесущий в органических соединениях углерод также находится практически без

применения. Список экспериментов по ЯЭО на ядрах  $^{13}\text{C}$  ограничивается ископаемой последовательностью HOESY и банальным усилением сигналов с целью экономии приборного времени.

В то же время, простые оценки показывают, что максимальная амплитуда  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ЯЭО вчетверо больше, чем амплитуда протон-протонного ядерного эффекта Оверхаузера. Изотопа  $^{13}\text{C}$  в природной смеси около 1%, поэтому о взаимодействии  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  и вытекающих из него проблемах можно не беспокоиться. Кроме того, ядра углерода, особенно четвертичные, очень медленно релаксируют. С одной стороны это преимущество – амплитуда ЯЭО выше, с другой – недостаток, поскольку эксперименты могут оказаться недопустимо длительными.

Важность данных об углеродном скелете исследуемых молекул трудно переоценить. Описанный выше CLOUDS работает только на протонном ЯЭО и использует методы квантовой химии для подбора углеродного скелета. Прямые данные о пространственном расположении ядер углерода избавят исследователя от необходимости решать сложные и неоднозначные задачи такого рода.

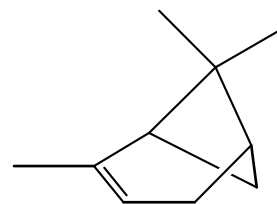
В общих чертах понятно, чего ожидать от экспериментов по гетероядерному эффекту Оверхаузера. К основным чертам относятся длительная релаксация наблюдаемых ядер, низкая чувствительность и высокая относительная амплитуда ЯЭО. Перед автором этой работы была поставлена разведывательная задача – попытаться построить надежный и удобный метод определения расстояний по гетероядерному ЯЭО.

### 2.5.2. Что будет сделано в ближайшем будущем.

Уже сейчас имеются сообщения о так называемых ЯМР-структурах белков, то есть о структурах, определенных только по данным ЯМР. Ряд химических журналов уже приводит правила их публикации в инструкциях для авторов. Последние данные об использовании ЯЭО в биохимии и молекулярной биологии позволяют предположить, что в недалеком будущем определение молекулярной структуры по данным ЯЭО станет рутинным методом в химии и биохимии.

### 3. Экспериментальная часть.

В качестве модельного образца для исследования гетероядерного ЯЭО был выбран 8%<sup>7</sup> раствор  $\alpha$ -пинена<sup>8</sup> в  $\text{CDCl}_3$ . Раствор был дегазирован шестью циклами freeze-ramp-thaw в вакууме порядка  $10^{-3}$  тор и запаян в стеклянную ампулу.



Спектры ЯМР регистрировались на приборе Bruker DPX-250 на частотах 250.13 МГц ( $^1\text{H}$ ) и 61.9 МГц ( $^{13}\text{C}$ ) при температуре  $300 \pm 1$  °С.

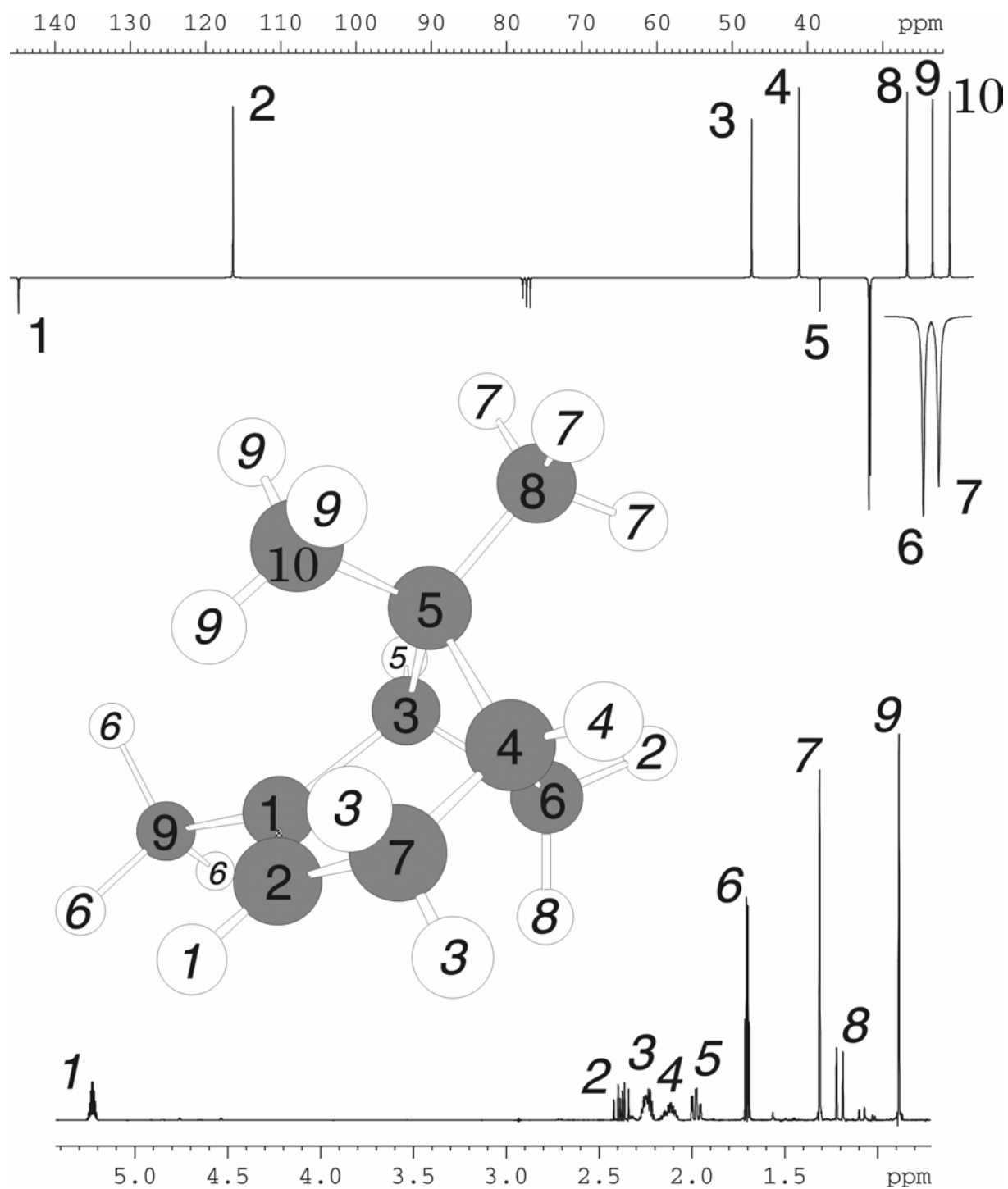
Для регистрации спектров  $^1\text{H}$  использовалась стандартная одноимпульсная последовательность с фазовым циклом CYCLOPS. Ширина развертки составляла 2.5 кГц, время оцифровки 3 секунды (32 килоточки).

Для регистрации спектров  $^{13}\text{C}$  использовались описанные в тексте работы импульсные последовательности, как правило, с фазовым циклом CYCLOPS. Широкополосная протонная развязка, в тех случаях, когда она применялась, использовала последовательность ВВ с минимальной необходимой мощностью.

Для фильтрации сигнала использовалась  $\cos^2 t$ , либо гауссова оконная функция. Отношение сигнал-шум в спектрах  $^1\text{H}$  составляло 100-300, в спектрах  $^{13}\text{C}$  3-50 (1 скан). Количество накоплений выбиралось исходя из требований к отношению сигнал-шум. Во всех спектрах измерялись только относительные (внутри одного спектра) интенсивности сигналов. Задержка между накоплениями при количественных измерениях составляла 7-10  $T_1^{\max}$ . Спектры  $^{13}\text{C}$  интегрировались с использованием гауссова разложения. Сигналы в спектрах  $^{13}\text{C}$  не перекрываются.

Для определения времен продольной релаксации всех ядер использовался метод насыщения-восстановления с 12-шаговой насыщающей последовательностью  $\frac{\pi}{2} - \tau - \frac{\pi}{2} - \frac{\tau}{2} - \frac{\pi}{2} - \frac{\tau}{4} - \dots - \frac{\pi}{2}$  со значением  $\tau=1000\text{ms}$ . На каждую релаксационную кривую получено от 60 до 90 точек. Параметры уравнения 4 вычислялись минимизацией суммы квадратов невязок методом Левенберга-Марквардта в Mathcad. Каждая точка на графике получена интегрированием сигнала, усредненного с 64 накоплениями.

<sup>7</sup> Мольные проценты. Концентрация определена post factum по соотношению площадей сигналов  $^{13}\text{C}$  хлороформа и метильной группы  $\alpha$ -пинена.



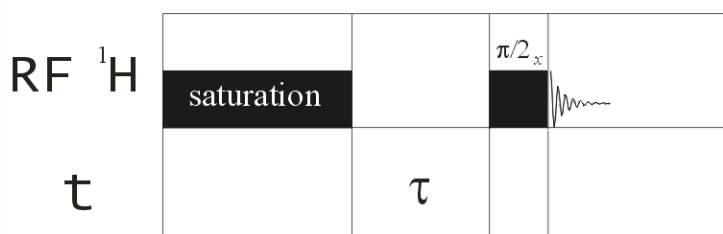
**Рисунок 10.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -пинена и их отнесение. Отнесение выполнено по спектрам COSY, NOESY (с несколькими временами смешивания),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSC, и (для пары 2-8) по эффектам анизотропии экранирования. Два протона при седьмом атоме углерода образуют сильно связанную систему с сильно перекрывающимися сигналами. Отнесение было выполнено независимо и совпадает с литературным. Атомы пронумерованы в порядке расположения соответствующих сигналов в спектрах. Нумерация не соответствует правилам ИЮПАК, но в настоящей работе представляется более удобной.

<sup>8</sup> Автор благодарит Лабораторию терпеновых соединений и лично А.В. Ткачева за предоставление 200  $\mu\text{l}$  чистого вещества.

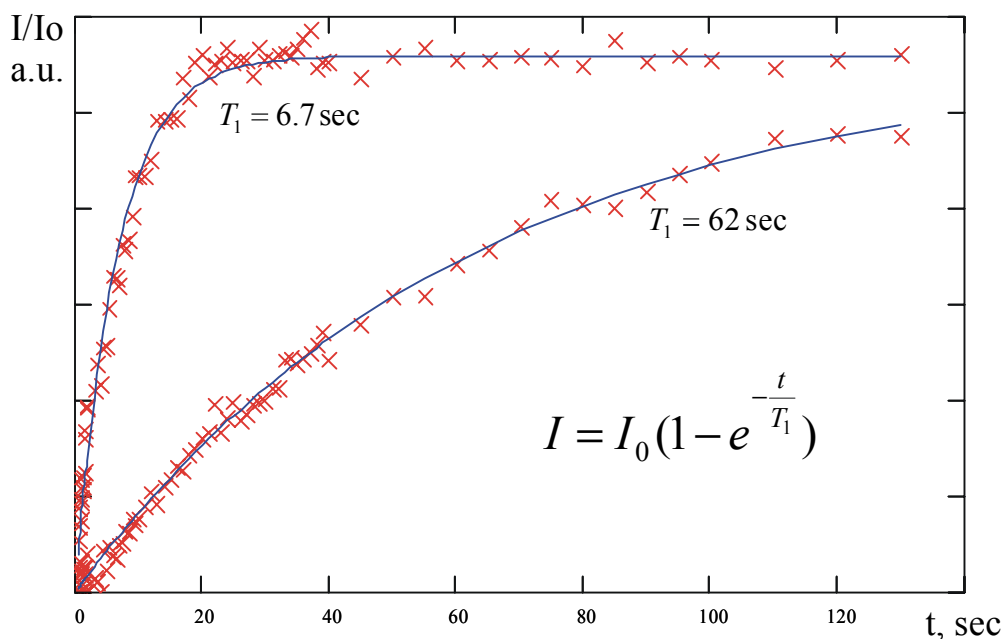
## 4. Результаты и обсуждение.

### 4.1 Измерение эффективных времен продольной релаксации ядер $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ .

Для количественной интерпретации данных ЯЭО требуются значения эффективных времен продольной релаксации наблюдаемых ядер (уравнение 6). Величины  $T_1$  непосредственно из эксперимента по ЯЭО не определяются и были получены в отдельной серии экспериментов с использованием стандартного в таких случаях метода насыщения-восстановления. Исследуемые ядра имеют значительные (до 100 секунд) времена продольной релаксации, и метод насыщения-восстановления оказался наиболее быстрым среди известных автору методов. Схема его приведена ниже.

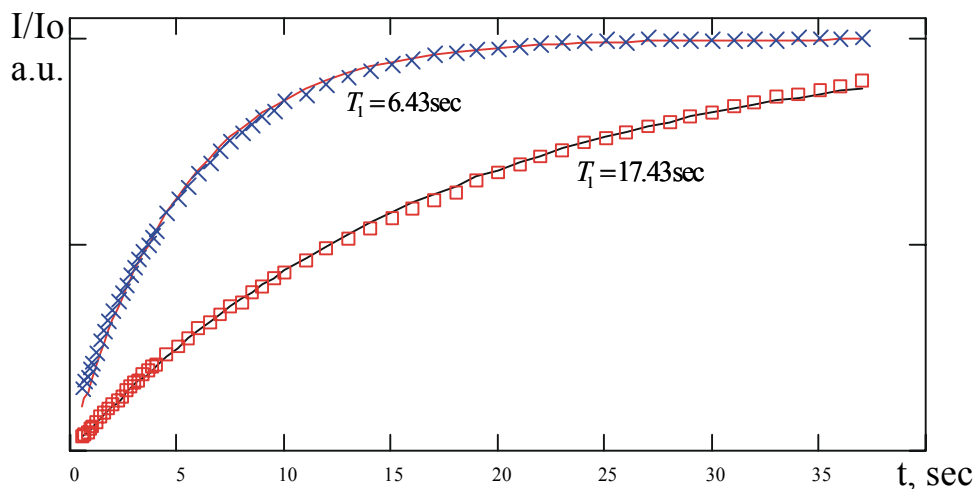


**Рисунок 11.** Импульсная последовательность метода насыщения-восстановления. В случае  $^{13}\text{C}$  в качестве насыщающей последовательности использовалась 12-шаговая последовательность  $\frac{\pi}{2} - \tau - \frac{\pi}{2} - \frac{\tau}{2} - \frac{\pi}{2} - \frac{\tau}{4} - \dots - \frac{\pi}{2}$  со значением  $\tau = 1000\text{ms}$ , для ядер  $^1\text{H}$  использовалось просто широкополосное облучение на минимальной необходимой мощности.



**Рисунок 12.** Релаксационные кривые ядер  $^{13}\text{C}$ . По оси абсцисс – задержка  $\tau$  между прекращением насыщения и началом регистрации в методе насыщения-восстановления. Приведены две (из 10) релаксационные кривые, одна для первичного атома углерода, для которого из-за наличия трех протонов в

непосредственной близости время  $T_1$  невелико, вторая для четвертичного атома при двойной связи  $\alpha$ -пинена.



**Рисунок 13.** Релаксационные кривые ядер  $^1\text{H}$ . По оси абсцисс – задержка между прекращением насыщения и началом регистрации в методе насыщения-восстановления. Кривая с  $T_1=6.4$  сек относится к протону метильной группы. Кривая с  $T_1=17.4$  сек – к протону при двойной связи  $\alpha$ -пинена.

На графиках (рис. 12 и 13) приведены зависимости  $\langle I_z \rangle$  и  $\langle S_z \rangle$  от длительности задержки между прекращением насыщения и регистрацией спада свободной индукции. Шкала по оси ординат произвольна и не влияет на получаемое значение параметра  $T_1$ . Значительное количество полученных точек связано с тем, что изначально для вычисления параметров  $\sigma_{IS}$  в протонной подсистеме предлагался иной путь – итеративное решение обратной задачи для системы уравнений Соломона. Оказалось, что необходимой точности при этом добиться не удастся. В реальных экспериментах на каждую кривую требуется по 8-10 точек.

Из-за большого количества точек относительная погрешность определения времен продольной релаксации протонов не превышает 0.5%, а ядер  $^{13}\text{C}$  – 2%. Большая относительная ошибка измерений на углероде-13 (рис. 12) есть следствие низкого содержания изотопа  $^{13}\text{C}$  в природной смеси и релаксационных требований при широкополосной протонной развязке. И то, и другое снижает чувствительность примерно в сто раз по сравнению с ЯМР  $^1\text{H}$ .

Как видно из уравнения (6), эффект Оверхаузера наиболее сильно проявляется на атомах углерода с большими временами продольной релаксации. Как и следовало ожидать, наибольшими значениями  $T_1$  характеризуются (не представляющие ценности) ядра  $^{13}\text{C}$  растворителя и четвертичные ядра углерода. Наибольшую чувствительность в спектрах ЯЭО следует ожидать именно на них.

**Таблица 1.** Значения времен продольной релаксации ядер (нумерация в порядке расположения сигналов на соответствующих спектрах).

Ядро	<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H	
	Т <sub>1</sub> , сек	Сигнал <sup>а</sup>	Т <sub>1</sub> , сек	
1*	62	1	17.4	
2	12	2	5.7	
chl**	118	3	6.6	
chl**	112	4	11.5	
chl**	113	5	13.5	
3	14	6	6.4	
4	10	7	5.2	
5*	75	8	7.3	
6	7	9	5.9	
7	7			
8	7			
9	7			
10	7			

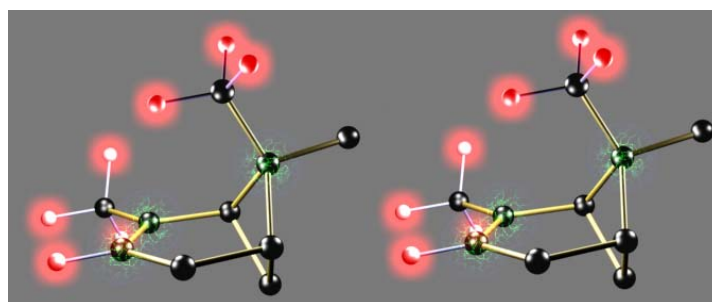
<sup>а</sup> Для перекрывающихся сигналов приведено эффективное время продольной релаксации.

\* Четвертичный атом углерода.

\*\* Триплет хлороформа

Большое время Т<sub>1</sub>, однако, накладывает ограничения на минимальную длительность эксперимента. Для количественного измерения интенсивности сигнала перед началом очередного накопления необходимо дождаться полной релаксации обеих подсистем. На практике это означает время 7-10Т<sub>1</sub>, т.е. около 10 минут.

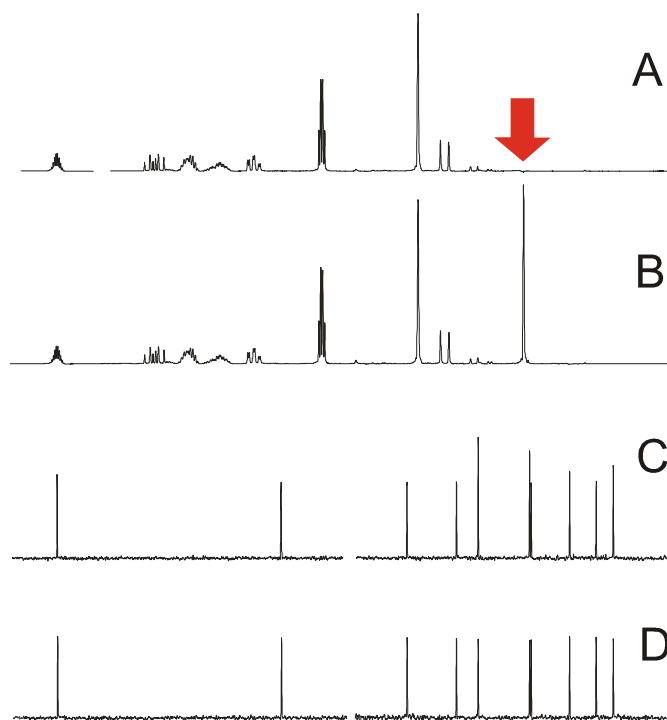
#### 4.2 Эксперименты по ЯЭО.



**Рисунок 14.** Direct-eyed проекция молекулы  $\alpha$ -пинена. Красным выделены протоны, сигналы которых насыщались в различных экспериментах по ЯЭО. Зеленым выделены атомы углерода, на которых наблюдался отклик. Не представляющие интереса атомы водорода не показаны.

В экспериментах по ЯЭО выполнялось облучение на частотах двух метильных групп (протоны 6 и 9) и аллильного протона (1). Нумерация атомов приведена на рис. 10. Частоты выбраны из соображений селективности насыщения. При облучении образца на определенной частоте невозможно добиться абсолютной избирательности –

все сигналы в некотором интервале частот будут так или иначе искажены. Сигналы протонов двух метильных групп 6 и 9, а также сигнал аллильного протона 1 в спектре ЯМР не перекрываются с другими сигналами и располагаются от них достаточно далеко, чтобы обеспечить селективное облучение.



**Рисунок 15.** Общий вид протонного и углеродного спектра  $\alpha$ -пинена при облучении эндо-метильной группы (A, C) и без облучения (B, D). Видны существенные изменения интенсивности сигналов  $^{13}\text{C}$  при облучении протонного перехода. Для всех экспериментов отношение сигнал-шум либо выше чем в приведенных на рисунке спектрах, либо приблизительно такое же.

Во всех случаях селективность облучения протонного сигнала проверялась “холостым” опытом с регистрацией протонного спектра. Отклик наблюдался на обоих атомах углерода двойной связи и алифатическом четвертичном атоме углерода (рис. 15). Интенсивности сигналов нормировались на интенсивность одного из невозмущенных атомов углерода, либо (для проверки правильности) на интенсивность сигнала  $^{13}\text{C}$  дейтерохлороформа. В случае “дального” эффекта Оверхаузера облучался сигнал соответствующего протона. В случае ЯЭО для непосредственно связанной пары СН облучались сателлиты  $^{13}\text{C}$ .

В качестве эталонных расстояний в молекуле  $\alpha$ -пинена были использованы расстояния полученные квантовохимическим методом (метод PM3, программный пакет МОРАС). Другие квантовохимические методы (AM1, MNDO, дают расхождение с PM3 менее чем на 3%). Столь малые отличия обусловлены отсутствием в исследуемой

молекуле гетероатомов. Для чисто алифатических систем хорошо работают все методы.

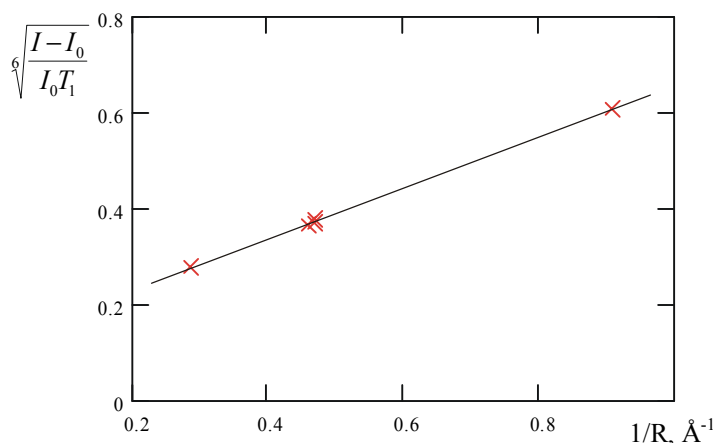
При определении расстояния некоторую трудность представляют метильные группы. Скорость их вращения велика в масштабах времени ЯМР спектроскопии, и при наблюдении ЯЭО метильная группа представляет собой усредненное вращением облако протонной плотности. В этой работе приближенно полагалось, что вращение происходит безбарьерно. Это заведомо не так, но при комнатной температуре такого рода тонкости обычно не проявляются.

Кроме того, имеются трудности и особенности чисто математического характера. Расчет *средней обратной шестой степени* расстояния от протона вращающейся метильной группы до четвертичного атома углерода представляет нетривиальную геометрическую задачу. Операции над неточными величинами также требуют осторожности. Спрявление зависимости (6) в традиционных для подобных измерений координатах:  $\frac{I - I_0}{I_0 T_1}$  vs.  $\frac{1}{R^6}$  требует возведения в шестую степень неточной величины. Губительность этой операции нетрудно продемонстрировать:

$$1.20^6 = 2.99$$

$$1.25^6 = 3.81$$

Поэтому для спрявления были использованы другие координаты, которые наоборот, сглаживают неточности.

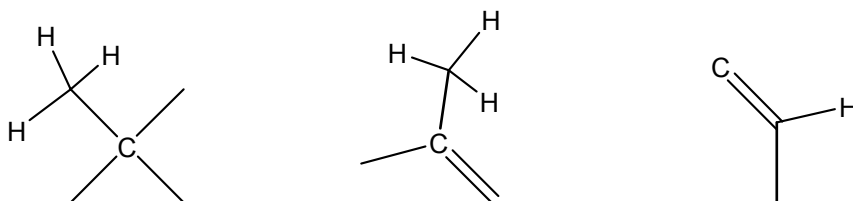


**Рисунок 16.** Зависимость величины эффекта Оверхаузера от межъядерного расстояния в координатах, спрямляющих уравнение (6). Расстояния рассчитаны методом РМЗ с помощью пакета МОРАС.

Рисунок 16 представляет итоговую полученную картину зависимости ядерного эффекта Оверхаузера от расстояния. Коэффициент корреляции составляет 0.995. Согласно полученным данным, приближенное уравнение (6) в данном диапазоне величины

эффекта и расстояний *выполняется с хорошей точностью*. Хотя формально линейная аппроксимация зависимости на рис. 16 дает ошибку 4%, все же стоит увеличить диапазон ожидаемых погрешностей до 5-6%. Это связано с тем, что, во-первых, существует погрешность интегрирования сигналов ЯМР, во-вторых, ошибки, связанные с неполной релаксацией, в-третьих, расстояния, определенные по РМЗ могут несколько отличаться от реальных расстояний в растворе. Существенен учет времени продольной релаксации при расчетах. Более грубое приближение (пренебрежение различиями  $T_1$ ) не срабатывает.

Примечательно, что эффект Оверхаузера одинаковым образом воспроизводится для различных систем  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Три различные системы, обладающие близким расстоянием C-H



попали практически в одну точку. Это хорошо согласуется с представлением о независимости магнитного дипольного взаимодействия от локальной электронной плотности.

**Таким образом, полученные данные показывают, что метод работает, а его точность и воспроизводимость внушают оптимизм.**

К недостаткам приведенной в работе схемы измерений относится ее длительность. Для полной релаксации углеродной подсистемы требуется время около 10 минут. Полный эксперимент по наблюдению отклика от одной группы протонов занимает около 10 часов чистого приборного времени. Это серьезно замедляет процесс измерения. Использование принудительного восстановления намагниченности (дополнительными импульсами после оцифровки) позволило бы уменьшить время эксперимента ориентировочно в пять раз.

### 4.3 Ускорение экспериментов по ЯЭО.

В количественной спектроскопии ЯМР основным процессом, задающим время эксперимента, является релаксация системы к равновесному состоянию. Эксперимент состоит из десятков повторов, и при неполном возврате к равновесию продольная интерференция делает количественные измерения невозможными. Существует несколь-

ко подходов к решению этой проблемы. При достаточно малых временах релаксации можно ничего не предпринимать и делать паузы между повторами для восстановления равновесия. Можно математически учитывать интерференцию – для изолированных спинов это не представляет труда, но с усложнением системы трудности быстро нарастают. Для медленно релаксирующих сложных систем применяется третий подход – принудительное восстановление намагниченности. Можно, попросту говоря, *возвращать* систему обратно.

#### 4.3.1 Теоретическое рассмотрение.

Для ускорения эксперимента необходимо определить минимальную задержку, обеспечивающую релаксацию спиновой системы из состояния, в которое ее вернули, к начальному состоянию<sup>9</sup>. При этом необходимо учесть особенности эксперимента <sup>13</sup>C ЯЭО – развязку от протонов и необходимость полной релаксации протонной подсистемы. **Задача: отследить эволюцию z-компоненты макроскопической намагниченности ядер <sup>13</sup>C после ее восстановления и выключения декаплера.**

Для оценочных расчетов будем использовать полуклассическую модель релаксации. В приведенном выше теоретическом рассмотрении рассматривалась абстрактная пара спинов. На этом этапе необходимо конкретизировать задачу и рассматривать именно объект исследования. Для пары ядер <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C уравнения Соломона переписываются в виде:

$$\begin{cases} \frac{d \langle I_z \rangle}{dt} = -\frac{1}{T_1^I} (\langle I_z \rangle - \langle I_z^0 \rangle) - \sigma_{IS} (\langle S_z \rangle - \langle S_z^0 \rangle) \\ \frac{d \langle S_z \rangle}{dt} = -\frac{1}{T_1^S} (\langle S_z \rangle - \langle S_z^0 \rangle) - \sigma_{SI} (\langle I_z \rangle - \langle I_z^0 \rangle) \end{cases} \quad (7),$$

где через  $I_z$  и  $S_z$  обозначены проекции магнитных моментов, соответственно, ядер <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H. Величины проекций нормированы и безразмерны. Характерные значения  $T_1^I=60$  с,  $T_1^S=10$  с.

Обратный <sup>13</sup>C → <sup>1</sup>H эффект Оверхаузера существенно слабее прямого (12.5% max.), и не играет определяющей роли в релаксации протонной подсистемы. Это отвечает соотношению:

<sup>9</sup> Эти состояния, конечно, близки, но не совпадают. Причин много, главные – релаксация и неидеальность импульсов.

$$\sigma_{SI} I_z^0 \ll \frac{S_z^0}{T_1^S}.$$

Слагаемым, содержащим  $\sigma_{SI}$ , в уравнениях (7) поэтому можно пренебречь. Это предположение существенно упрощает решение, т.к. второе уравнение “отщепляется” и может быть проинтегрировано независимо.

В первый момент после выключения декаплера намагниченность  $\langle S_z \rangle$  равна нулю. С этим начальным условием второе уравнение в системе (7) решается в виде:

$$\langle S_z \rangle = \langle S_z^0 \rangle (1 - e^{-\frac{t}{T_1^S}}).$$

После подстановки решения в первое уравнение (7) получим:

$$\frac{d \langle I_z \rangle}{dt} = -\frac{1}{T_1^I} (\langle I_z \rangle - \langle I_z^0 \rangle) - \sigma_{IS} \langle S_z^0 \rangle e^{-\frac{t}{T_1^S}} \quad (8)$$

Для выполнения расчетов по уравнению (8) необходимо получить оценку величины  $\sigma_{IS}$ . При широкополосном облучении образца на частоте  $^1\text{H}$  населенности по всем протонным переходам выравниваются, так что  $\langle S_z \rangle_i = 0$ . В равновесии нулю равны также и производные по времени. Из первого уравнения в системе (7) при этом следует, что:

$$-\frac{1}{T_1^I} (\langle I_z \rangle - \langle I_z^0 \rangle) + \sum_i \sigma_{IS}^i \langle S_z^0 \rangle = 0, \text{ или } \langle I_z \rangle = \langle I_z^0 \rangle + T_1^I \sigma_{IS}^* \langle S_z^0 \rangle.$$

Сумма означает, что протонов может быть несколько. Параметр  $\sigma_{IS}^* = \sum_i \sigma_{IS}^i$  экспериментально определить очень тяжело. Из эксперимента известно только, что при облучении всех протонов образца одновременно, сигнал углерода усиливается в 2-3 раза, т.е.:

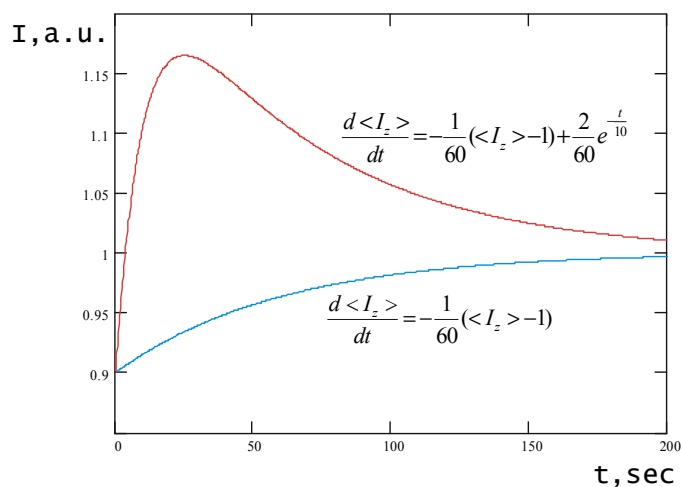
$$T_1^I \langle S_z^0 \rangle \sigma_{IS}^* \approx 2 \langle I_z^0 \rangle, \text{ откуда } \sigma_{IS}^* \approx \frac{2 \langle I_z^0 \rangle}{T_1^I \langle S_z^0 \rangle}.$$

Для сделанных ниже оценок больше ничего знать не требуется. После подстановки в уравнение (8):

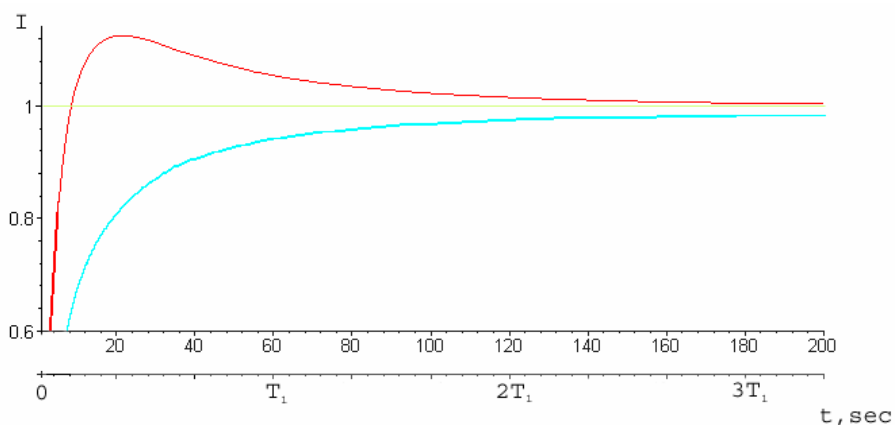
$$\frac{d \langle I_z \rangle}{dt} = -\frac{1}{T_1^I} (\langle I_z \rangle - 1) + \frac{2}{T_1^I} e^{-\frac{t}{T_1^S}} \quad (9)$$

Намагниченность восстанавливается не идеально, а приблизительно до 90-95% равновесного значения<sup>10</sup>. Решая уравнение (9) с этим начальным условием и  $T_1^I = 60$  сек и  $T_1^S = 10$  сек, получим:

<sup>10</sup> Как ее восстанавливать – отдельный разговор.



**Рисунок 17.** Поведение z-проекции намагниченности  $^{13}\text{C}$  после принудительного восстановления. Красным – при наличии эффекта Оверхаузера (декаплер выключен в момент  $t=0$ ). Синим – без эффекта Оверхаузера (напр. сигнал  $^{13}\text{C}$  дейтерохлороформа).



**Рисунок 18.** Зависимость координаты стационарной точки (steady state magnetization в конце периода ожидания) от длительности паузы между повторными экспериментами. Красным – при наличии ЯЭО. Синим – без ЯЭО.

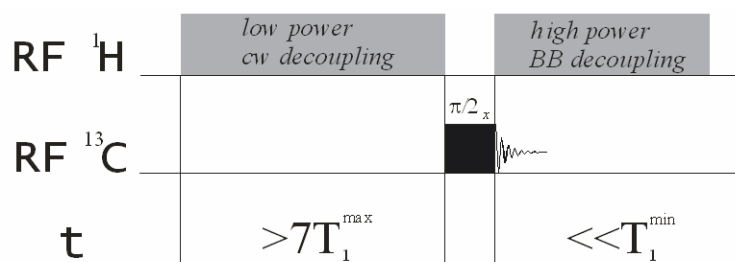
Погрешность определения интеграла сигнала ЯМР составляет несколько процентов. Steady state намагниченность при задержке 100-150 секунд также отличается от равновесной менее чем на 3%. Делать задержку еще меньше нецелесообразно, т.к. возникает продольная интерференция в протонной подсистеме.

Таким образом, ориентировочная минимальная задержка между последовательными экспериментами составляет 100 секунд и лимитируется релаксацией протонной подсистемы. Напомню, что “разведывательный” вариант эксперимента использовал задержку 700-1000 секунд. Экономия времени, таким образом, существенна. Это, впрочем, лишь грубая оценка. На практике наблюдаются отклонения как в сторону меньших задержек (когда протонная развязка не требуется, что особенно актуально на

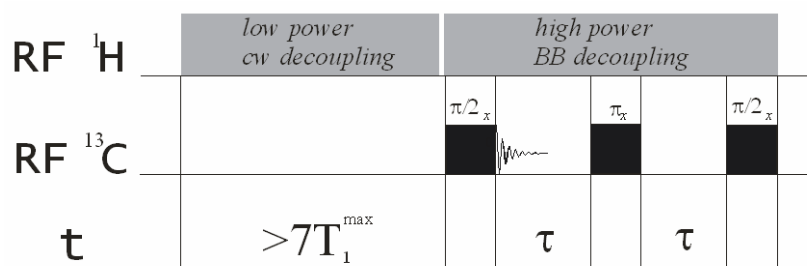
четвертичных протонах), так и в сторону больших (при “неаккуратном” восстановлении).

#### 4.3.2 Экспериментальная реализация.

Типичный статический эксперимент по гетероядерному эффекту Оверхаузера включает узкополосное облучение образца на частоте протонного перехода малой мощностью до установления нового равновесия, затем  $(\pi/2)_x$  импульс на частоте углерода и наблюдение сигнала  $^{13}\text{C}$  с широкополосной протонной развязкой. Развязка необходима для упрощения мультиплетной структуры сигналов  $^{13}\text{C}$  и улучшения отношения сигнал-шум. Она тоже создает ЯЭО и способна исказить результаты эксперимента. В этом случае медленное установление равновесия желательно. При временах оцифровки, много меньших  $T_1$   $^{13}\text{C}$  (200 мс в этой работе), ЯЭО от декаплера пренебрежимо мал.



**Рисунок 19.** Архаичная версия эксперимента по ЯЭО. Отличается длительностью и высокой точностью. Использовалась для получения эталонных данных.



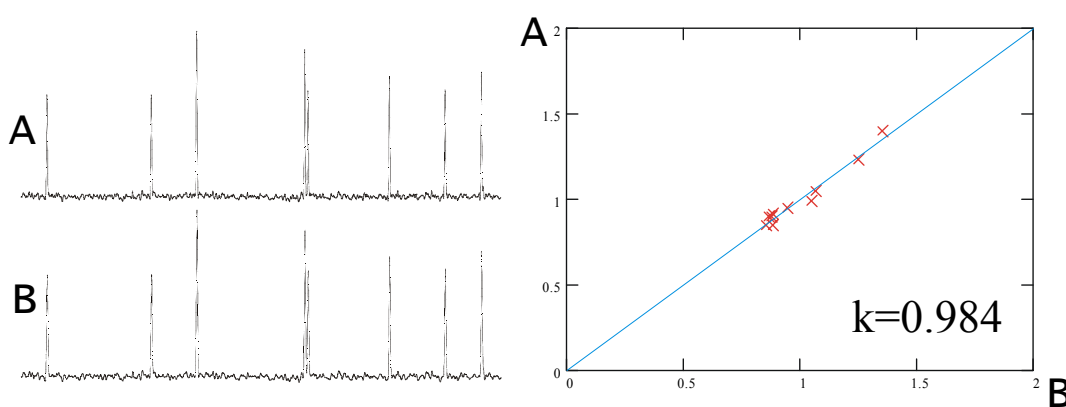
**Рисунок 20.** Импульсная последовательность с принудительным восстановлением намагниченности, использованная для отработки ускорения эксперимента.  $\tau=200$  мс.

Импульсная последовательность с принудительным восстановлением намагниченности отличается несколькими деталями. Во-первых, широкополосная развязка включается не сразу после  $(\pi/2)$ -импульса, а несколькими миллисекундами раньше. Это необходимо для успешной рефокусировки намагниченности. Во-вторых, присутствуют “восстанавливающие” импульсы –  $\pi$ -импульс, рефокусирующий намагниченность и  $(\pi/2)$ -импульс, возвращающий ее к оси z. Для задания начального состояния образец

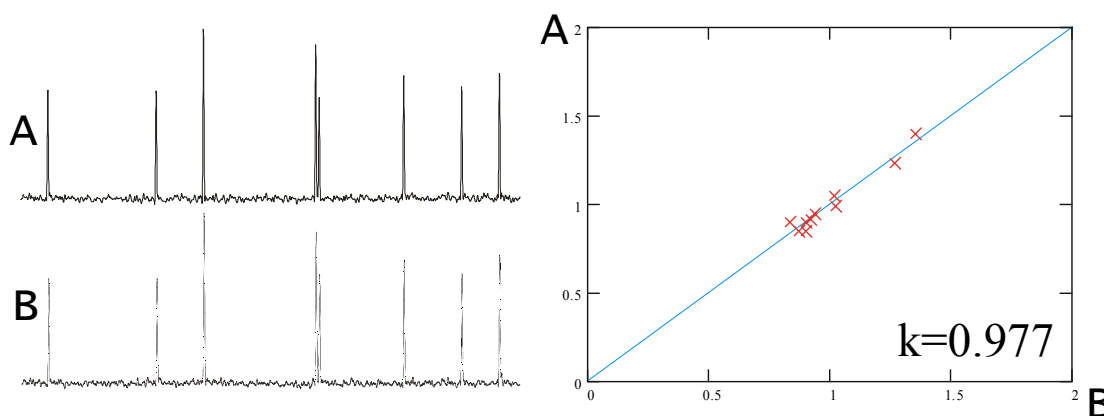
перед экспериментом облучается достаточно длительное время на узкой полосе протонных частот, и именно к этому состоянию (с “проявленным” эффектом Оверхаузера) происходит возврат.

Существует много способов восстановления намагниченности. На приведенной схеме фаза всех импульсов совпадает<sup>11</sup>, однако возможны и другие варианты. Экспериментально испытывался также вариант  $(\frac{\pi}{2})_x - \tau - (\pi)_y - \tau - (\frac{\pi}{2})_{-x}$ , оказавшийся менее экономичным.

### 4.3.3 Анализ результатов.



**Рисунок 21.** Сходимость данных двух экспериментов по ЯЭО с идентичными параметрами. Приведен участок спектра  $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -пинена в области 20-50 ррт. На графике отложены интегралы сигналов ЯМР в произвольных единицах. Среднее значение разницы составляет 0.030 у.е. В эксперименте насыщался сигнал эндо-метильной группы  $\alpha$ -пинена.

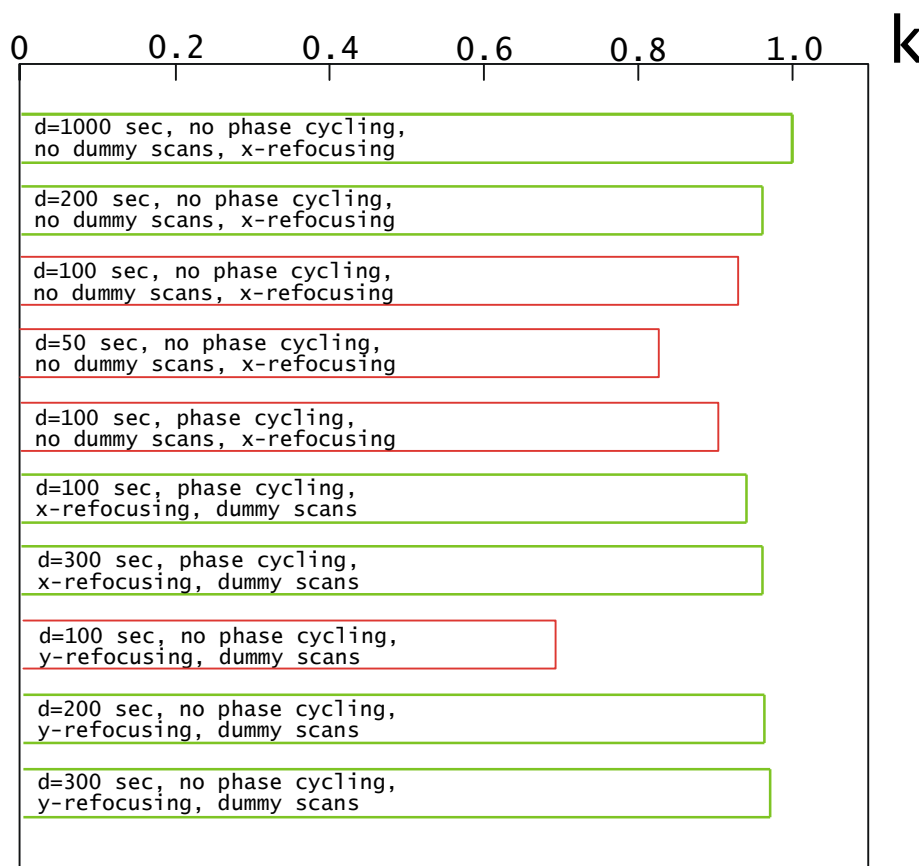


**Рисунок 22.** Сравнение данных двух экспериментов по ЯЭО с различным интервалом между сканами. Эксперимент A – интервал 500 сек (полная релаксация протонной и углеродной подсистем). Эксперимент B – интервал 100 сек (ускорено принудительным восстановлением намагниченности). Приведен участок спектра  $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -пинена в области 20-50 ррт. На графике отложены интегралы сигналов

<sup>11</sup> Внутри последовательности. Фазовые циклы не отменяются. Более того, уже простое циклирование фазы последовательностью CYCLOPS избавляет от многих неприятностей.

ЯМР в произвольных единицах. Среднее значение разницы составляет 0.031 у.е. В эксперименте насыщался сигнал эндо-метильной группы  $\alpha$ -пинена.

Рисунки 21 и 22 свидетельствуют, что ускорение эксперимента с помощью принудительного восстановления намагниченности не приводит к появлению дополнительной погрешности. Ниже приводятся данные проверок метода с варьированием облучаемых ядер, задержек и способов рефокусировки.



**Рисунок 23.** Значения коэффициентов корреляции между интегралами сигналов ЯМР  $^{13}\text{C}$  для различных экспериментов. За эталон принят эксперимент с полной релаксацией ( $d=1000$  сек). Облучался сигнал протона при двойной связи  $\alpha$ -пинена.

Относительно низкий коэффициент корреляции между набором интегралов в “эталонном” эксперименте, и в эксперименте с  $d=100$  и последовательностью  $(\frac{\pi}{2})_x - \tau - (\pi)_y - \tau - (\frac{\pi}{2})_{-x}$ , при повторной записи спектра воспроизвелся. Причина – заметная интерференция на четвертичных атомах углерода. Последовательность  $(\frac{\pi}{2})_x - \tau - (\pi)_x - \tau - (\frac{\pi}{2})_x$  с той же задержкой обеспечивает удовлетворительное совпадение данных эталонного и ускоренного экспериментов. Эти факты представляются странными, т.к. по литературным данным формирование спинового эха у-импульсом считается более аккуратным. Внимательный анализ обеих импульсных последова-

тельностью показал, что первая более чувствительна к погрешностям углов поворота радиочастотных импульсов. Нетрудно показать, что во второй последовательности эти ошибки компенсируются.

Как и следовало ожидать, эксперименты с фазовым циклом оказываются при прочих равных условиях лучше, чем без циклов. Заметное улучшение наблюдается также в экспериментах с несколькими “холостыми” проходами.

Задержка длительностью 100 сек, таким образом, оказывается достаточной для экспериментов с принудительным восстановлением намагниченности. Попытка сделать ее еще меньше приводит к продольной интерференции в протонной подсистеме. Для экспериментов с широкополосной развязкой величина 100 сек является поэтому минимальной возможной. При регистрации спектров без протонной развязки минимальный интервал, по-видимому, еще уменьшится.



**Рисунок 24.** Значения коэффициентов корреляции между интегралами сигналов ЯМР  $^{13}\text{C}$  для различных экспериментов. За эталон принят эксперимент с полной релаксацией ( $d=500$  сек). Облучался сигнал протонов эндо-метильной группы  $\alpha$ -пинена. Красным – эксперименты без облучения и с облучением других групп.

Чувствительность коэффициента корреляции к различиям в сравниваемых спектрах продемонстрирована на рис. 24. При облучении различных групп в молекуле пинена наблюдается усиление сигналов различных атомов углерода на величины около 10-20%. Визуально эти различия могут быть незаметны, однако падение коэффициента

корреляции оказывается очень значительным. Значение  $k=0.95$  на практике означает отличия, с трудом обнаружимые при анализе гауссовых разложений спектров.

Рисунки 21-24 убедительно показывают, что ускорение базового эксперимента в пять раз возможно, и оно не приводит к появлению дополнительной погрешности.

## **5. Выводы и перспективы.**

► Определение расстояний С-Н в диапазоне 1.0-4.0 Å с использованием  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ядерного эффекта Оверхаузера возможно. Точность измерения расстояний лучше 5%<sub>отн.</sub>

► Эффект Оверхаузера одинаковым образом воспроизводится для различных систем  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Три различные системы, обладающие близким расстоянием С-Н попали практически в одну точку. Это хорошо согласуется с представлением о независимости магнитного дипольного взаимодействия от локальной электронной плотности.

► Простейший вариант статического эксперимента по  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ЯЭО оказывается недопустимо длительным. Для полной релаксации углеродной подсистемы требуется время около 10 минут на каждый проход. Полный эксперимент по наблюдению отклика от группы протонов занимает около 10 часов чистого приборного времени.

► Ускорение экспериментов с помощью принудительного восстановления намагниченности возможно и приводит приблизительно к пятикратной экономии приборного времени.

► Использование восстановления намагниченности не создает дополнительной погрешности при измерении ЯЭО.

► Последовательность  $(\frac{\pi}{2})_x - \tau - (\pi)_y - \tau - (\frac{\pi}{2})_{-x}$ , по литературным данным имеющая лучшую “репутацию” среди простых последовательностей восстановления намагниченности, в данном случае оказалась не оптимальной.

Изложенные выше результаты позволяют утверждать, что метод определения внутримолекулярных расстояний с использованием гетероядерного эффекта Оверхаузера является многообещающим дополнением к традиционным методам определения молекулярной структуры. Можно высказать некоторые предположения о перспективах подобных исследований.

Главной проблемой при регистрации гетероядерного ЯЭО является низкая чувствительность, обусловленная малым природным содержанием представляющих интерес изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ . Обогащение исследуемых молекул этими изотопами позволило бы ускорить описанные выше эксперименты в 100 и 500 раз соответственно (пропорционально увеличению содержания наблюдаемых ядер). На практике это означает укорочение экспериментов с нескольких часов до считанных минут. Использование изотопного обогащения – довольно сложная и дорогая процедура, но для биохимических исследований это может оказаться вполне приемлемым.

В химической и биохимической литературе в настоящее время количество структур, определяемых методами ЯМР, стремительно нарастает. Это связано с совершенствованием теоретического и экспериментального аппарата и относительной простотой постановки эксперимента. Кристаллизация и рентгеноструктурный анализ сложных соединений не всегда возможны, и метод ЯМР, работающий с веществами в растворах, для многих соединений сейчас является единственным методом установления пространственной структуры.

## **6. Литература.**

1. *A.W. Overhauser*, Phys. Rev. 91, 476 (1953).
2. *A.W. Overhauser*, Phys. Rev. 92, 411 (1953).
3. *T.R. Carver and C.P. Slichter*, Phys. Rev. 93, 212 (1953).
4. *T.R. Carver and C.P. Slichter*, Phys. Rev. 102, 975 (1956).
5. *Joseph H. Noggle and Roger Shirmer*, "The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Applications", Academic Press, New York, 1971.
6. *David Neuhaus and Michael P. Williamson*, "The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis", V.C.H. Publishers, New York (1989).
7. *Р. Эрнст, Дж. Боденхаузен, А. Вокаун*, "ЯМР в одном и двух измерениях", М., Мир, 1990.
8. *I. Solomon*, Phys. Rev. 99, 559 (1955).
9. *Э. Дероум*, "Современные методы ЯМР для химических исследований", М., Мир, 1992.
10. *M.L. Martin, J.-J. Delpuech, G.J. Martin*, "Practical NMR spectroscopy", Heyden & Son, London, 1980.
11. *A. Vax*, "Two-dimensional nuclear magnetic resonance in liquids", Deleft university press, Deleft, 1984.
12. *Katherine Stott, James Keeler, Que N. Van, A.J. Shaka*, J. Magn. Res., 125, 302-324, 1997.
13. *M. Doloret Diaz, Stephan Berger*, Magn. Res. Chem., 39, 369-373, 2001.
14. *K.V. Pervushin, G. Wider, R. Riek, K. Wuthrich*, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 9607-9612, 1999.
15. *T. Diericks, M. Coles, H. Kessler*, J. Biomol. NMR, 15, 177-180, 1999.
16. *E. Chiarparin, Ph. Pelupessy, B. Cutting, T.R. Eykyn, G. Bodenhausen*, J. Biomol. NMR, 13, 61-65, 1999.
17. *A. Grishaev, M. Llinas*, Proc. Natl. Acad. Sci, 2002, in press.
18. *A. Grishaev, M. Llinas*, Proc. Natl. Acad. Sci, 2002, in press.