

Современная диффузионно-упорядоченная спектроскопия ЯМР в химии супрамолекулярных систем: возможности и ограничения[†]

С.В.Харламов, Ш.К.Латыпов

*Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова Казанского научного центра Российской академии наук
420088 Казань, ул. Арбузова, 8, факс (843) 273–2253*

Рассмотрена концепция диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР — измерение коэффициентов самодиффузии в условиях высокого разрешения. Обсуждены наиболее важные аспекты в интерпретации экспериментальных данных, возможности и ограничения имеющихся теоретических и феноменологических моделей, связывающих коэффициент самодиффузии с размером или массой молекулярной системы.

Библиография — 219 ссылок.

Оглавление

I. Введение	699
II. Методы измерения коэффициентов самодиффузии в спектроскопии ЯМР высокого разрешения: возможности и границы применимости	700
III. Математическая обработка экспериментальных результатов	709
IV. Количественная интерпретация значений коэффициента самодиффузии	711
V. Заключение	716

I. Введение

Изучение процессов образования межмолекулярных комплексов, ассоциации, самоорганизации, молекулярного распознавания и перестройки супрамолекулярных структур под действием различных факторов — одно из наиболее перспективных направлений современной химии и биохимии. Обусловлено это в первую очередь тем, что такие процессы происходят как в живой, так и в неживой природе. В биохимии — это процессы метаболизма и построения систем по принципу «снизу–вверх» — от супрамолекулярного до органного уровня. Их протекание в живых организмах генетически запрограммировано и детерминировано. В неживой

природе примеров, когда макроскопические свойства и структура определяются кооперативными эффектами, также достаточно много — каталитический эффект мицеллярных систем, процессы в организованных средах и т.д. Поэтому очень важно понимать природу этих процессов, знать, каким образом можно воздействовать на данные ансамбли и создавать новые «умные» супрамолекулярные системы. Чтобы этого достичь, необходимо надежно устанавливать трехмерную структуру на молекулярном уровне, что особенно важно при исследовании растворов.

Спектроскопия ЯМР высокого разрешения в таких исследованиях зарекомендовала себя как один из наиболее эффективных экспериментальных методов.^{1–6} Разработан ряд эффективных методик, позволяющих обнаруживать связи между ядрами (корреляционная спектроскопия) и, таким образом, восстанавливать топологию молекулярных объектов, что в некоторых случаях дает возможность практически «напрямую» устанавливать их структуру. При этом связи могут быть обусловлены как прямыми, так и косвенными спин-спиновыми взаимодействиями. В настоящее время проблем в исследованиях структур систем в растворах на уровне отдельных молекул практически нет — спектроскопия ЯМР позволяет получать исчерпывающую информацию о трехмерной структуре и ее динамике.^{6–17}

С.В.Харламов. Кандидат химических наук, научный сотрудник ИОФХ КазНЦ РАН. Телефон: (843) 272–7484, e-mail: khsergey@iopc.ru

Область научных интересов: спектроскопия ЯМР органических соединений, супрамолекулярные системы, реакции на внешнее воздействие.

Ш.К.Латыпов. Доктор химических наук, заведующий лабораторией радиоспектроскопии того же института.

Телефон: (843) 272–7484, e-mail: lsk@iopc.ru

Область научных интересов: спектроскопия ЯМР органических соединений, динамический ЯМР, гетероциклы, квантовая химия, математические методы в химии.

Дата поступления 2 марта 2010 г.

[†] Обзор приурочен к 65-летию Казанского научного центра Российской академии наук.

Однако, если речь идет об исследовании пространственного строения многокомпонентных комплексов, организованных с помощью слабых нековалентных взаимодействий, появляются серьезные трудности. Во-первых, проблемы возникают из-за «неразличимости» сигналов отдельных компонентов или фрагментов системы в спектрах ЯМР из-за их спектральной «неразрешенности» а чаще всего — из-за магнитной эквивалентности этих компонентов, обусловленной их «симметрией». Другими словами, в таких случаях в спектрах ЯМР в принципе невозможно различить сигналы отдельных компонентов и оценить, много ли их в комплексе (ассоциате). Во-вторых, поверхность потенциальной энергии многокомпонентной системы очень сложна и число энергетических минимумов на ней огромно, поэтому наблюдаемые спектральные и релаксационные эффекты оказываются усредненными по различным состояниям. В конечном итоге традиционные методы спектроскопии ЯМР (анализ химических сдвигов (ХС) и ядерных эффектов Оверхаузера^{18–20}) могут оказаться малоэффективными.

К счастью, еще на этапе становления спектроскопии ЯМР (в 60-х годах XX в.) был найден способ, позволяющий оценивать параметры молекулярной самодиффузии.²¹ Учитывая, что подвижность объекта связана с его размером, можно судить хотя бы о размере, когда другие параметры ЯМР становятся неинформативными. Суть идеи — «пометить» пространственное положение ядерных спинов путем включения градиента магнитного поля и, повторив данную операцию спустя некоторое время, получить информацию о смещении молекулы. Это позволяет оценить ее подвижность.^{22–24} Однако долгое время за получение информации данного рода приходилось платить потерей высокого разрешения.

С развитием теории спектроскопии ЯМР и совершенствованием соответствующей аппаратуры появилась возможность измерять коэффициенты самодиффузии (КСД) в условиях высокого спектрального разрешения и сформировать самостоятельный экспериментальный метод — диффузионно-упорядоченную спектроскопию (Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)).^{25–28} Возможность связать спектральные параметры с коэффициентом самодиффузии делает DOSY важным экспериментальным методом, позволяющим разделить спектральные вклады различных компонентов системы, исходя из различия их размеров. Более того, оценив размер молекулярного объекта, можно судить о его упаковке, степени ассоциации и т.п.^{28–33} Интуитивно понятный физический смысл взаимосвязи КСД — размер (чем больше молекулярный объект, тем меньше КСД, и наоборот), а также простота интерпретации спектров DOSY (благодаря сохранению спектральной информации) обусловили широкое внедрение этого метода в практику.

В настоящее время DOSY — незаменимый инструмент для экспресс-анализа, а иногда и единственный источник информации о структуре системы. Этот метод обладает большим потенциалом в исследовании ионных жидкостей,³⁴ анализе сложных смесей,^{35–39} в том числе различного изомерного состава,³⁷ однако особенно активно его применяют при исследовании супрамолекулярных систем.^{31–33} В первую очередь речь идет об изучении процессов агрегации и самоорганизации,^{40–53} молекулярного распознавания^{54–63} в ансамблях органических и металлоорганических молекул, в том числе в новых каталитических системах на основе комплексов переходных металлов.^{64–66} Это связано с тем, что при формировании супрамолекулярных ансамблей, как правило, заметно изменяются их геометрические парамет-

ры — при ассоциации увеличивается характерный объем (масса), при образовании комплексов включения меняется подвижность компонентов системы и т.д. Например, в работах^{40–42} с помощью метода DOSY наглядно продемонстрированы формирование молекулярных капсул и зависимость их стабильности от внешних условий. При изучении мицеллообразования и агрегации данный метод позволяет надежно фиксировать образование молекулярных ансамблей, определять их размеры, степень агрегированности и т.д.;^{43–53, 64} он незаменим при изучении одних из наиболее интересных объектов супрамолекулярной химии — так называемых молекулярных машин, представляющих собой ансамбли, структурой и поведением которых можно управлять путем внешнего воздействия.^{51, 57, 58, 62} Метод DOSY нашел также применение в исследованиях биосистем,^{67, 68} лекарственных веществ^{69, 70} и структуры наночастиц.⁷¹ Отдельно необходимо отметить примеры использования диффузионно-упорядоченной спектроскопии совместно с методом вращения под магическим углом в спектроскопии ЯМР высокого разрешения (High Resolution Magic Angle Spinning (HR MAS)).^{72–74} Такая комбинация позволяет исследовать диффузионные процессы в вязких и гелеобразных (полужестких) образцах: в частности, в биологических тканях,^{74, 75} клетках,^{76, 77} липосомах,⁷⁸ мембранах,^{79, 80} жидких кристаллах,⁸¹ пищевых продуктах.⁸²

В то же время при использовании метода DOSY обнаружились серьезные методические проблемы, связанные как с артефактами, возникающими при проведении эксперимента, так и с ошибками при численной интерпретации полученных данных, которые не всегда можно корректно учесть. К настоящему времени часть проблем устранена, но некоторые вопросы окончательно не решены, о чем свидетельствует множество критических работ, опубликованных в последние годы.

Авторами данного обзора предпринята попытка обобщить литературный материал и собственный опыт исследований, связанных с анализом возможностей и ограничений диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР, а также с оценкой источников ошибок и способов их минимизации на этапах постановки и проведения эксперимента, преобразования полученных «сырых» данных с целью определения численных значений КСД, интерпретации измеренных КСД с целью поиска их связи с геометрическими параметрами исследуемой системы.

II. Методы измерения коэффициентов самодиффузии в спектроскопии ЯМР высокого разрешения: возможности и границы применимости

Опубликован ряд подробных обзоров, посвященных основам эксперимента по измерению КСД и различным реализациям метода DOSY. Поэтому мы не будем подробно останавливаться на этом вопросе, а упомянем лишь некоторые ключевые моменты, которые помогут ввести в предмет данного обзора, и переадресуем заинтересованного читателя к первоисточникам (см. работы^{25–33}).

Наиболее простой способ экспериментального определения КСД — использование импульсной последовательности Хана,⁸³ модифицированной Стейскалом и Таннером²¹ путем добавления импульсных градиентов магнитного поля (рис. 1). В результате действия такой последовательности на систему ядерных спинов возникает отклик — спиновое эхо,

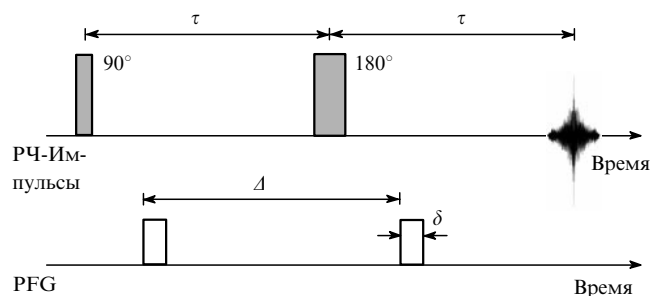


Рис. 1. Импульсная последовательность Стейскала – Таннера. Здесь и далее серые прямоугольники — РЧ-импульсы 90° и 180° , белые — импульс градиента магнитного поля длительностью δ ; Δ — время диффузии, τ — интервал между РЧ-импульсами.

амплитуда которого модулирована значением КСД для рассматриваемой системы.

Первый импульс градиента магнитного поля (Pulsed Field Gradient (PFG)) в импульсной последовательности Хана, кодирует текущее положение магнитного момента (т.е. всей молекулы) в пространстве по ларморовой частоте его прецессии. Второй PFG декодирует новое положение молекулы, в которое она успевает сместиться за время Δ (называемое в связи с этим временем диффузии). Далее по отклонению амплитуды спинового эха от его максимального значения можно судить о смещении молекулы из первоначального положения. В отсутствие градиентов температуры и концентрации причиной таких смещений может быть только броуновское движение молекул (характеризующееся коэффициентом самодиффузии), поэтому, анализируя амплитуды эха, можно определить характерный для рассматриваемой системы КСД. На практике это осуществляется путем аппроксимации экспериментальной зависимости сигнала спинового эха от величины PFG известной аналитической функцией. Впервые такая функция была получена Стейскалом и Таннером²¹ для случая свободной диффузии молекул одного сорта в растворе (при этом предполагалось, что применяемые PFG прямоугольной формы):

$$I(\delta, \Delta) = I_0 \exp \left[-D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) - R \right], \quad (1)$$

где δ — длительность градиентного импульса (с), Δ — время диффузии (с), I_0 — амплитуда сигнала спинового эха в отсутствие PFG, D — КСД ($\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$), γ — гиромагнитное отношение ($\text{Гц} \cdot \text{Тл}^{-1}$), g — величина градиента ($\text{Тл} \cdot \text{м}^{-1}$), R — релаксационный фактор.

Эта зависимость, называемая диффузионным затуханием (спадом), получается при регистрации сигнала эха при последовательном пошаговом увеличении амплитуды PFG.²⁷ Достоинство такого подхода заключается в том, что общая длительность импульсной последовательности остается постоянной в течение всего эксперимента. В результате релаксационный и диффузионный вклады легко разделяются (см. зависимость (1)). Отметим, что в принципе кривую диффузионного затухания можно получить и при пошаговом увеличении Δ или δ , однако такие способы практически не применяют,⁸⁴ поскольку вклад релаксационного фактора в каждой точке будет различным, и анализ экспериментальных данных станет существенно сложнее.

Описанный выше алгоритм, благодаря простоте практической реализации, исследователи активно используют до

сих пор, например при изучении пористых сред.⁸⁵ Вместе с тем у него есть серьезный недостаток — при анализе только амплитуды сигнала эха[‡] нет возможности одновременно работать со спектральной информацией.

На первый взгляд, было бы логичным получить фурье-образ сигнала эха, т.е. обычный спектр, и проанализировать зависимость амплитуды каждого сигнала в спектре от величины PFG. Иными словами, кривые диффузионных затуханий и, таким образом, КСД могли бы быть получены для каждой спектральной линии отдельно. Данная идея практически была реализована ~30 лет назад,^{86–89} однако ее широкое использование началось лишь в середине 1990-х годов, когда удалось решить ряд проблем, связанных с использованием PFG,⁹⁰ и градиентные модули стали неотъемлемой частью спектрометров ЯМР. В первую очередь речь идет о создании систем активного экранирования градиентных катушек в датчиках ЯМР, эффективных генераторов PFG с малыми временами переключения, систем стабилизации магнитного поля и т.п.^{26, 27} К этому времени можно отнести начало становления диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР.²⁵ У исследователей появилась возможность «скоррелировать» (связать между собой) спектральную (ХС) и диффузионную (КСД) информацию (рис. 2). При этом, если спектры различных компонентов хорошо разре-

Таблица 1. Значения коэффициентов самодиффузии некоторых веществ, измеренные при 298 К.

Вещество	Молекулярная масса	КСД, $10^{-10} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	Ссылки
H ₂ O	18	23.0	27
D ₂ O	20	18.7	27
HOD в D ₂ O	19	19.0	27
C ₆ H ₆ в C ₆ D ₆	78	22.1	27
MeOH в CD ₃ OD	32	24.1	91
EtOH в CD ₃ CD ₂ OD	46	10.7	91
Me ₂ SO в (CD ₃) ₂ SO	78	7.3	91
Me ₂ CO в (CD ₃) ₂ CO	58	45.7	91
MeCN в CD ₃ CN	41	43.7	91
Me ₄ Si (1% в CDCl ₃)	88	29.2 ^a	92
Me ₃ Si(CH ₂) ₃ SO ₃ Na (1% в D ₂ O)	218	6.0	93
Глюкоза в D ₂ O	180	6.8	94
Сахароза в D ₂ O	342	5.2	94
Раффиноза в D ₂ O	504	4.3	94
α-Циклодекстрин в D ₂ O	973	3.57	56
β-Циклодекстрин в D ₂ O	1135	3.21	56
γ-Циклодекстрин в D ₂ O	1297	3.09	56
Мальтодекстрин в D ₂ O	6100	2.0	94
Поли(этиленоксид) в D ₂ O	$2.1 \cdot 10^4$	0.351	95
	$1.6 \cdot 10^5$	0.0874	95
	$5.7 \cdot 10^5$	0.0238	95

^a Значение получено при 300 К.

[‡] Отметим, что при исследовании пористых сред или систем, характеризующихся большими молекулярными массами, достаточно анализа интегральной интенсивности сигнала эха, поскольку в силу физических особенностей данных систем их спектры, как правило, характеризуются низким разрешением, т.е. восстановление спектральной информации из сигнала эха обычно не имеет смысла.

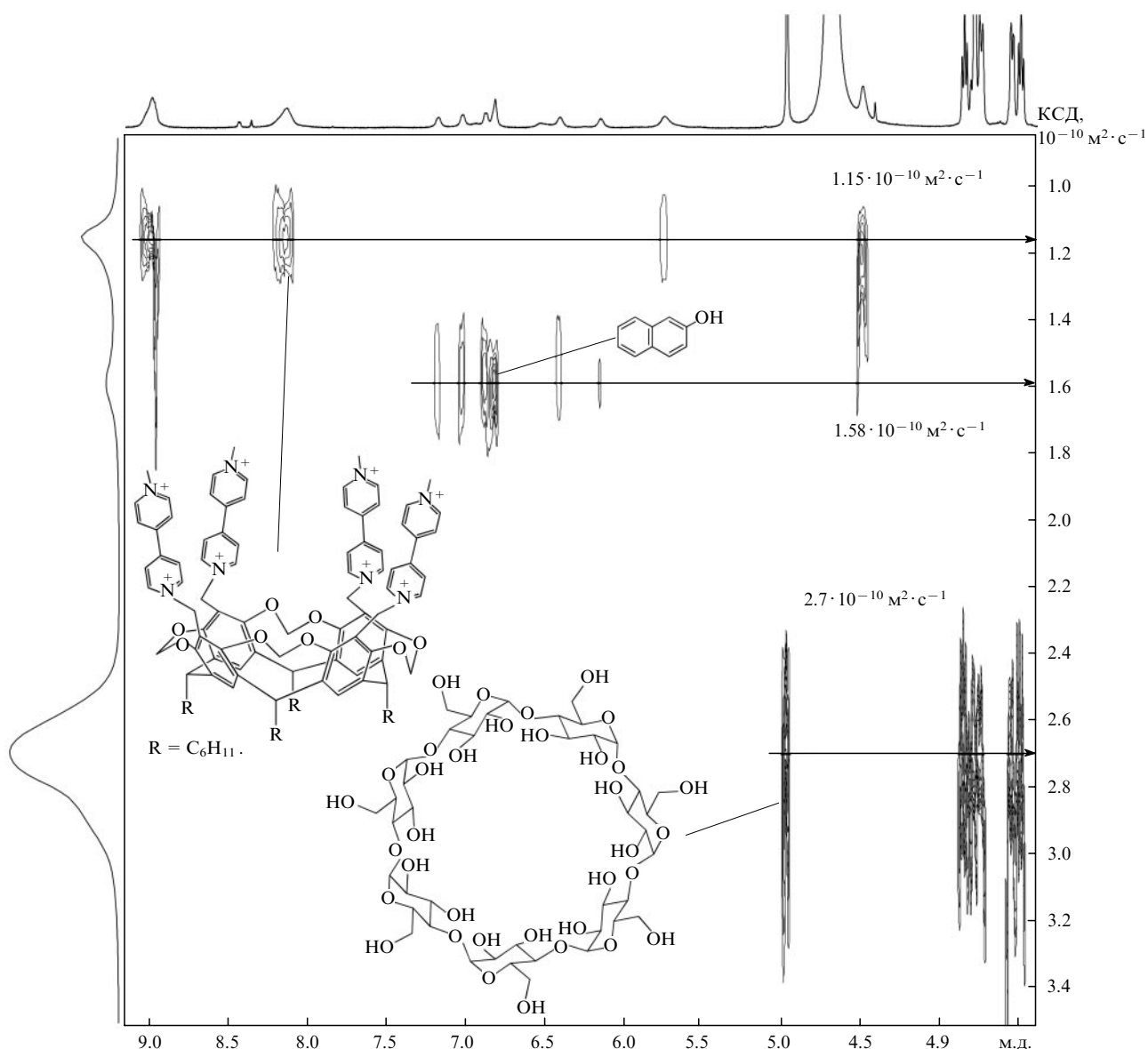


Рис. 2. Пример спектра DOSY трехкомпонентной системы (спектр получен на ядрах ^1H на частоте 600 МГц при температуре 298 К в растворе D_2O).⁶²

шены по ХС, по оси КСД может быть получено также очень высокое разрешение.^{29, 30}

В настоящее время с помощью DOSY можно исследовать объекты массой > 100 кДа ($\text{КСД} < 10^{-12} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$). Метод характеризуется высокой чувствительностью, позволяет надежно детектировать сигнал вещества с концентрацией до 10^{-5} моль $\cdot \text{л}^{-1}$. Таким образом, круг доступных для анализа веществ и материалов очень широк (табл. 1),^{27, 56, 91–95} чем и обусловлена востребованность DOSY. Более того, применение специальных импульсных последовательностей позволяет быстро оценить (в течение нескольких секунд) КСД, поэтому данный метод можно рассматривать как способ экспресс-анализа исследуемой системы.^{96–100}

Однако любой экспериментальный метод, в том числе определение КСД в рамках спектроскопии ЯМР, имеет ряд ограничений. Проблемы, возникающие на этапах постановки и проведения эксперимента DOSY, в первую очередь, носят инструментальный характер (токи Фуко, качество создавае-

мых PFG, температурные градиенты). К ним относятся также и вопросы, связанные с оптимизацией импульсных последовательностей для конкретных образцов, что, в свою очередь, определяется их свойствами (вязкостью растворителей, временами релаксации соединений). Большое число таких проблем в ходе усовершенствования метода устранены или минимизированы. Однако, несмотря на большие усилия,^{25–32, 101–105} часть из них не решена до сих пор.

1. Воздействие токов Фуко на диффузионно-упорядоченные спектры и способы его устранения

При генерировании PFG, сопровождающемся быстрым переключением тока в градиентной катушке, в окружающих ампулу металлических частях датчика спектрометра возникают вихревые токи Фуко — источник неучитываемых «теневых» градиентных импульсов, приводящих, в конечном итоге, к сильному искажению сигнала спинного эха. Сове-

менные датчики снабжены системой активного экранирования,²⁷ что снижает амплитуду токов Фуко на несколько порядков. Однако при использовании PFG большой амплитуды влияние таких токов может быть заметным.

Способы минимизации данного эффекта можно разделить на три группы:

- аппаратные решения;
- модернизация импульсной последовательности;
- коррекция «сырых» экспериментальных данных.

Способы первой группы связаны либо со специфической модификацией исходной формы PFG,^{104, 106} создаваемых градиентным генератором, либо с динамической подстройкой шиммовых катушек,^{107–109} что призвано скомпенсировать возникающие теневые градиенты. Основным практическим подходом среди данных методов является процедура предварительной корректировки «pre-emphasis»,^{27, 32, 104} направленная на первоначальную настройку градиентного модуля спектрометра. Дело в том, что из-за генерирования теневых градиентов, вызываемых токами Фуко, реальная форма PFG в градиентной катушке отличается от задаваемой (рис. 3,а). В ходе процедуры «pre-emphasis» параметры градиентного генератора настраиваются таким образом, чтобы при создании PFG его фронт и спад преобразовывались (рис. 3,б). В результате создаются условия, при которых реальная форма PFG в градиентной катушке совпадает с заданной. Как правило, описанную процедуру выполняют только один раз, после чего параметры корректировки формы PFG запоминаются и используются градиентным генератором в дальнейшем без подстройки. Однако в каждом конкретном случае распределение токов Фуко в металлических частях датчика может быть различным¹⁰⁵ (особенно при использовании PFG большой амплитуды ($\sim 10 \text{ Тл} \cdot \text{м}^{-1}$)), и, возможно, потребуется корректировка параметров процедуры «pre-emphasis».

Способы, относящиеся ко второй группе, связаны с модернизацией импульсных последовательностей и направлены на снижение амплитуды генерируемых токов Фуко, а также на уменьшение их влияния на детектируемый сигнал спинового эха.

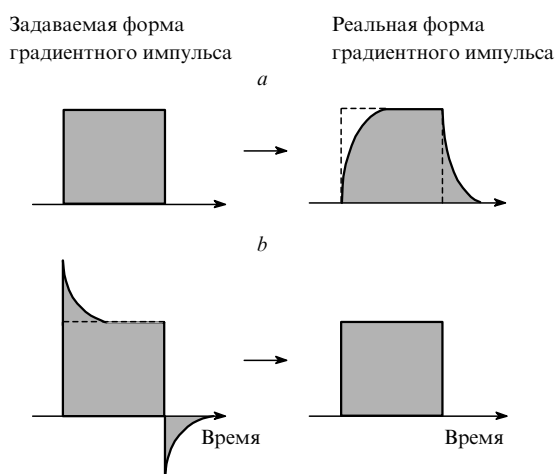


Рис. 3. Иллюстрация принципа процедуры «pre-emphasis».

а — форма PFG, подаваемого на вход градиентной катушки и реально генерируемая внутри нее без предварительной подстройки формы градиентного импульса, б — то же при условии предварительной подстройки.

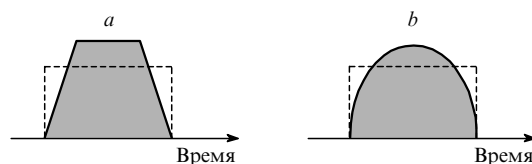


Рис. 4. Различные формы градиентных импульсов — трапецевидная (а) и синусообразная (б).

Пунктиром выделены эквивалентные прямоугольные PFG (с той же площадью).

Первый шаг в данном направлении — применение PFG непрямоугольной формы. Дело в том, что амплитуда токов Фуко пропорциональна скорости изменения тока через градиентную катушку,²⁷ поэтому использование плавно нарастающих/убывающих градиентных импульсов должно приводить к уменьшению этих токов. Например, применение трапецевидных (рис. 4,а) и синусообразных (рис. 4,б) импульсов приводит к хорошим результатам. При этом уравнение (1) можно использовать в неизменном виде, но вместо градиента g необходимо подставить амплитуду эквивалентного прямоугольного импульса, имеющего ту же площадь (т.е. δg), что и исходный PFG.¹¹⁰ Необходимо отметить, что использование непрямоугольных PFG имеет один недостаток — из-за того, что их площадь при той же амплитуде меньше, чем у прямоугольных, воздействие на систему будет меньше, и это может оказаться критичным при исследовании объектов с малыми КСД. Более того, применение таких PFG также не позволяет полностью избавиться от токов Фуко.

В этом отношении хорошо себя зарекомендовали импульсные последовательности, построенные на основе последовательности стимулированного эха (Stimulated Echo (STE)) (рис. 5,а): STE-LED (Stimulated Echo with Longitudinal Eddy current Delay, рис. 5,б)¹¹¹ и особенно STE-BPLED (Stimulated Echo with Bipolar Pulse pair and Longitudinal Eddy current Delay, рис. 5,с).¹¹² Последовательность стимулированного эха имеет ряд преимуществ¹¹³ по сравнению с последовательностью Стейскала и Таннера (подробнее см. ниже).

Эффект подавления токов Фуко достигается благодаря дополнительной задержке τ^* в конце последовательности. Суть в том, что четвертый РЧ-импульс (см. рис. 5,б) переводит вектор намагниченности из плоскости xy вдоль оси z , где влияние теневых градиентов, вызываемых токами Фуко, отсутствует. Он удерживается вдоль этого направления в течение времени τ^* (обычно, порядка нескольких миллисекунд), за которое токи Фуко затухают.²⁹ Далее, последний РЧ-импульс переводит вектор намагниченности вновь в плоскость xy , после чего происходит детектирование сигнала эха.

Отличие импульсной последовательности STE-BPLED от STE-LED состоит в том, что вместо одиночных PFG в ней применяются композитные градиентные импульсы, состоящие из двух PFG противоположных знаков вдвое меньшей длительности, разделенных 180-градусным РЧ-импульсом (см. рис. 5,с). Так как градиентные импульсы имеют противоположные знаки, вызываемые ими токи Фуко частично компенсируются.^{114, 115} Более того, применение композитных PFG имеет дополнительные преимущества, например позволяет минимизировать влияние эффектов неоднородности основного магнитного поля B_0 кросс-релаксации¹¹³ (см. ниже).

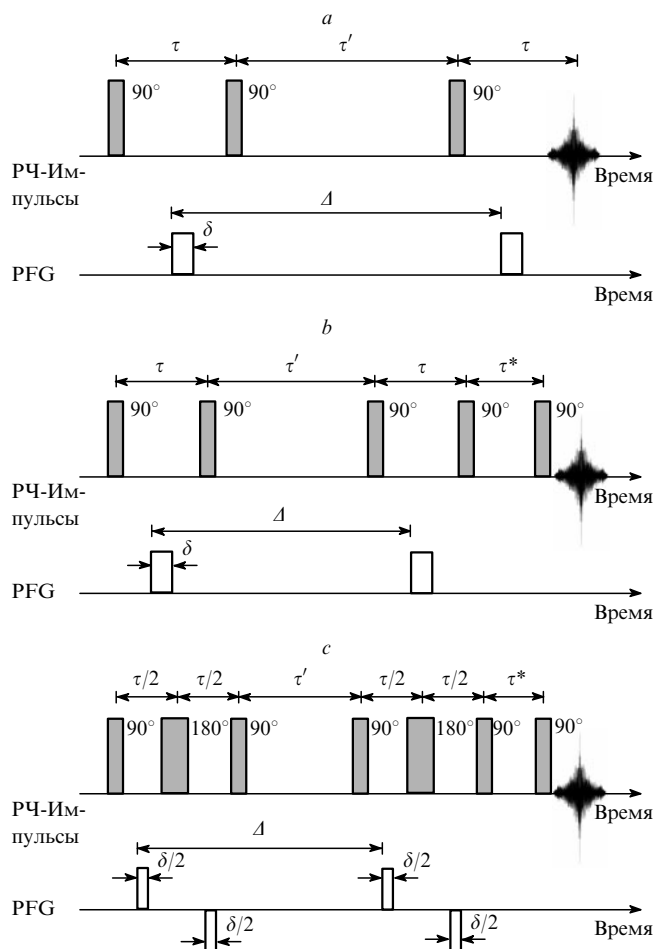


Рис. 5. Импульсные последовательности STE (a), STE-LED (b) и STE-BPLED (c). τ , τ' — интервалы между РЧ-импульсами, τ^* — задержка для подавления токов Фуко.

К третьей группе относятся способы, связанные со специальной обработкой спадов свободной индукции.^{27, 101, 102} Основная задача в данном случае состоит не в том, чтобы устранить токи Фуко, а в том, чтобы избавиться от вызываемых ими искажений в конечном спектре. Однако такие подходы не универсальны, что ограничивает сферу их применения.

2. Влияние качества импульсов градиента магнитного поля на измерение коэффициентов самодиффузии

Как показала практика, градиентные импульсы, создаваемые градиентной катушкой, практически однородны лишь в области ее центра.^{27, 29} Более того, нет гарантии, что в катушке возникает градиентный импульс, абсолютно идентичный создаваемому градиентным генератором. В результате амплитуда PFG в области образца, возбуждаемой РЧ-катушкой, может варьироваться в пределах 30%. Вместе с тем любое отклонение от заданной формы или амплитуды PFG приводит к искажению характера диффузионного затухания. В итоге вариация измеряемого значения КСД по образцу может достигать 50%. Если при сравнительном анализе относительных значений КСД небольшая систематическая

ошибка допустима, то при проведении количественных измерений это неприемлемо.

Предложено несколько подходов к решению этих проблем.^{27, 29, 103, 116–133} Наиболее удачные алгоритмы, продемонстрировавшие свою эффективность, рассмотрены ниже.

В общем случае метод, ведущий к получению в образце PFG требуемого качества, состоит из двух важных этапов. Оба этапа взаимосвязаны, поэтому для оптимизации PFG может потребоваться выполнение нескольких итераций.

Этап 1 — определение величины импульса градиента магнитного поля. По абсолютной величине градиент магнитного поля, создаваемый градиентной катушкой, пропорционален величине электрического тока, протекающего через нее. Коэффициент пропорциональности (калибровочная константа) g_{cal} — уникальная характеристика конкретного датчика. Поэтому, прежде чем переходить к любым диффузионным измерениям, важно точно определить данный параметр.

Теоретически g_{cal} и даже форма создаваемого градиентного импульса могут быть рассчитаны в каждом конкретном случае исходя из известных геометрических параметров, числа витков в катушке, силы тока через нее. Однако, если в окружении градиентной катушки присутствуют металлические детали (даже при наличии системы активного экранирования), то выполнить такой расчет с высокой точностью нельзя. Поэтому данный способ применяется только на первом этапе работы с некалиброванной градиентной катушкой, чтобы оценить, какова будет величина создаваемого PFG при заданной силе тока через катушку.

Чтобы учесть все особенности реально создаваемого в образце градиентного импульса, необходимо провести контрольный эксперимент, используя образец с заведомо известным КСД. Однако следует учесть, что степень влияния нелинейности PFG, токи Фуко и т.п. зависят от тока, текущего через градиентную катушку. Поэтому описанный алгоритм наиболее эффективен, когда измерения на реальном образце проводят в абсолютно идентичных условиях, т.е. с теми же задержками, длительностями и амплитудами импульсов, которые использованы в импульсной последовательности. Таким образом, для получения точного значения КСД исследуемого объекта необходимо предварительно в тех же условиях провести эксперимент на стандартном образце с КСД того же порядка. При этом, если при исследовании объектов с относительно большими КСД подобрать подходящий стандарт достаточно легко,^{90, 94, 120–126} то при изучении систем с малыми КСД проблематично.¹²⁷

Этап 2 — учет пространственного профиля импульса градиента магнитного поля. Все полученные выше выводы о связи КСД и формы кривой диффузионного затухания сделаны на основе предположения, что создаваемый в образце градиент магнитного поля имеет строго определенное значение во всем его объеме. Вместе с тем практически ни одна из существующих конструкций градиентных катушек не позволяет создать PFG с такими свойствами.^{27, 29} Только в датчиках с возможностью вращения образца под магическим углом и градиентной катушкой, расположенной вдоль оси вращения (в так называемых датчиках HR MAS), может быть получена практически идеальная однородность.¹³⁴ Однако таких примеров для образцов в жидкой фазе очень мало,¹³⁴ так как, с одной стороны, такие датчики не входят в стандартную комплектацию обычного «жидкостного» спектрометра ЯМР, и с другой — работа с ними имеет свою специфику.

В стандартных датчиках высокого разрешения, оснащенных градиентной катушкой, область, в которой однородность PFG оказывается на приемлемом уровне, обычно ограничена величиной ~ 10 мм вблизи центра градиентной катушки. Поэтому форма наблюдаемого диффузионного спада будет отличаться от идеальной¹¹⁸ (см. уравнение (1)). Например, при определении КСД воды²⁹ ($T = 296$ K), если использовать первые пять точек кривой диффузионного спада (амплитуда PFG невелика), получается значение $1.79 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$; если взять последние пять точек (амплитуда PFG близка к максимальной), то КСД равен $1.60 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, в то время как при использовании всех точек диффузионного спада получается $1.71 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Таким образом, КСД определяется с большой ошибкой, которая возрастает с увеличением амплитуды PFG.

а. Физическое уменьшение высоты образца

Чтобы получить в образце PFG постоянной величины, можно использовать несколько подходов. Один из них заключается в том, что уменьшают высоту исследуемого образца до размеров области, в которой создаваемый импульс градиента максимально однороден.^{29, 133} Вместе с тем данная операция может привести к потере однородности основного магнитного поля в объеме образца. В итоге, использование образцов высотой < 30 мм оказывается неоправданным.¹³³

Чтобы избежать сильных искажений магнитного поля на границе образца, можно воспользоваться следующей идеей: исследуемый образец небольшой высоты должен находиться в области, где градиент линейен, а его высота дополняется до размеров, необходимых для сохранения однородности магнитного поля, материалом с магнитной восприимчивостью, соответствующей восприимчивости самого образца. В качестве такого материала можно использовать твердые вставки специально подобранного состава^{128, 129, 135} либо жидкость, не дающую сигнала на частоте исследуемых ядер.²⁷ Однако широкого распространения такая идея не получила в связи с трудностью подбора для произвольного образца материалов вставок с необходимой магнитной восприимчивостью.

б. Модернизация импульсной последовательности

Удачной идеей, направленной на минимизацию нелинейности PFG, является модификация импульсной последовательности, в результате которой сигнал получается только от той части образца, где градиент максимально однороден. Достигается это за счет возбуждения небольшой области образца в самом центре градиентной катушки.

Одним из таких способов является метод «Slice-Selection»,^{29, 130} идея которого позаимствована из томографии ЯМР:¹³⁶ во время воздействия на систему 90-градусным импульсом, возбуждающим требуемый частотный диапазон (в случае ядер ^1H он составляет ~ 10 кГц), включается градиент небольшой амплитуды. Это приводит к тому, что условия резонансного возбуждения будут выполняться только для небольшой пространственной области, находящейся в центре образца, где добавочное магнитное поле, создаваемое градиентной катушкой, близко к нулю. Варьируя величину градиента, можно добиться того, что высота возбуждаемого слоя будет мала, но при этом его толщина должна быть достаточной, чтобы избежать влияния на диффузионный спад тех молекул, которые за время наблюдения

пересекают границы активного слоя. Такому условию удовлетворяет толщина слоя порядка нескольких миллиметров.²⁹ Например, для воды при выборе слоя толщиной ~ 3 мм коэффициенты самодиффузии, определяемые исходя из первых пяти, последних пяти и всех точек диффузионного спада практически совпадают ($2.25 \cdot 10^{-9}$, $2.23 \cdot 10^{-9}$ и $2.22 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно) и близки к реальному значению КСД молекул воды.²⁹

Еще один способ — применение в импульсной последовательности специального адиабатического инвертирующего импульса,^{131, 132} под действием которого также возбуждается только центральная часть образца.

Несмотря на привлекательность описанных подходов, их применение ограничено, поскольку выделение тонкого слоя образца неизбежно приводит к значительному снижению отношения сигнал/шум.

в. Параметризация уравнения Стейскала – Таннера с учетом формы импульса градиента магнитного поля

Наиболее эффективным современным подходом к решению проблемы неидеальности пространственной формы PFG является количественный учет отклонения реальной формы импульса от идеальной.^{103, 116, 119} Дело в том, что при воздействии на систему реального PFG, значение которого меняется вдоль образца, диффузионный спад оказывается многоэкспоненциальным, даже если имеют дело с молекулярными объектами строго одного типа. В рамках предложенного метода реальная форма градиентного импульса описывается численно, а затем соответствующим образом модифицируется уравнение Стейскала – Таннера (1).

Существуют два способа модификации уравнения Стейскала – Таннера. Первый — «прямой» способ — основан на представлении диффузионного затухания как функции квадрата задаваемой амплитуды градиентного импульса для образца с известным КСД. Далее полученное затухание аппроксимируется подходящей функцией (функцией распределения,¹⁰³ экспонентой степенного ряда¹¹⁹) с соответствующими переменными для учета наблюдаемого отклонения экспериментальной кривой от зависимости (1).

Одна из таких модификаций уравнения Стейскала – Таннера имеет следующий вид:¹⁰³

$$I(\delta, A) = I_0 \frac{\int \rho(g_{\text{cal}}) \exp \left[-D\gamma^2 (I g_{\text{cal}})^2 \delta^2 (A - \delta/3) \right] dg_{\text{cal}}}{\int \rho(g_{\text{cal}}) dg_{\text{cal}}} \quad (2)$$

Здесь амплитуда градиентного импульса g , учитывая, что она пропорциональна току I , протекающему через градиентную катушку, заменена на $I g_{\text{cal}}$. Вместе с тем, с учетом сказанного выше, значение g_{cal} во время действия PFG варьируется вдоль образца в некоторых пределах (от $g_{\text{cal}}^{\text{min}}$ до $g_{\text{cal}}^{\text{max}}$), поэтому наблюдаемое значение затухания сигнала спинового эха при заданном токе I должно быть взвешенным с весовой функцией $\rho(g_{\text{cal}})$. Граничное условие: данная функция должна равняться нулю вне активной области образца.

Чтобы получить представление о функции $\rho(g_{\text{cal}})$, необходимо провести эксперимент Стейскала – Таннера с включенным во время накопления сигнала слабым градиентом магнитного поля. В итоге получается изображение образца (как в ЯМР-томографии).^{29, 103} Если бы создаваемый PFG был линейен по всему возбуждаемому объему образца, то в результате такого эксперимента должен получиться спектр,

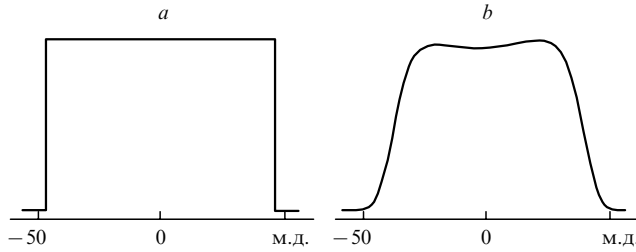


Рис. 6. Ожидаемое (a) и реальное (b) одномерные изображения образца (спектр получен на ядрах ^1H на частоте 400 МГц при 298 К в растворе 10% D_2O –90% H_2O).

представляющий собой прямоугольную функцию (рис. 6,a). Реальная же форма спектра сложнее, поскольку отражает распределение $\rho(g_{\text{cal}})$ (рис. 6,b).

Вместе с тем анализ серии таких одномерных профилей для модельного образца с известным КСД, полученных при последовательном увеличении силы тока через градиентную катушку, дает возможность определить вид функции $\rho(g_{\text{cal}})$.¹⁰³ С учетом того что в стандартных датчиках распределение величины создаваемого градиента магнитного поля вдоль образца достаточно узкое (как правило, к краям PFG на ~25% слабее, чем в центре градиентной катушки^{27, 29, 103}), распределение g_{cal} адекватно описывается следующим образом:

$$\rho(g_{\text{cal}}) = \begin{cases} 0, & g_{\text{cal}}^{\min} > g_{\text{cal}} > g_{\text{cal}}^{\max} \\ \frac{2(g_{\text{cal}} - g_{\text{cal}}^{\min})}{(g_{\text{cal}}^{\max} - g_{\text{cal}}^{\min})^2}, & g_{\text{cal}}^{\min} < g_{\text{cal}} < g_{\text{cal}}^{\max} \end{cases}.$$

Данное распределение получено для стандартного образца (1% H_2O в D_2O + 10^{-3} кг·л $^{-1}$ GdCl_3), и далее оно может использоваться для любых образцов без изменений в качестве характеристики выбранного датчика.¹⁰³

В итоге уравнение (2) с найденными параметрами распределения принимает форму

$$I(\delta, \Delta) = \frac{2}{(g_{\text{cal}}^{\max} - g_{\text{cal}}^{\min})^2} \left\{ \frac{\exp(-q g_{\text{cal}}^{\min 2})}{2q} - \frac{\exp(-q g_{\text{cal}}^{\max 2})}{2q} - \frac{\pi^{1/2} g_{\text{cal}}^{\min}}{2q^{1/2}} \left[\text{erf}(q^{1/2} g_{\text{cal}}^{\max}) - \text{erf}(q^{1/2} g_{\text{cal}}^{\min}) \right] \right\},$$

где

$$q = \gamma^2 I^2 \delta^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right),$$

$$\text{erf}(z) = \frac{2}{\pi^{1/2}} \int_0^z \exp(-t^2) dt.$$

При использовании описанной модификации уравнения Стейкала–Таннера среднеквадратическая ошибка при аппроксимации диффузионного затухания уменьшается более чем на порядок по сравнению со случаем, когда нелинейность PFG игнорируется.¹⁰³

Однако следует отметить, что при использовании описанного «прямого» способа требуется большая осторожность. Дело в том, что в экспериментах на стандартном образце для получения параметров модифицированного

уравнения (2) необходимо, кроме нелинейности PFG, исключить влияние на измеряемое значение КСД всех других факторов (температурных градиентов, нежелательных путей переноса когерентности и т.п.).

Данный недостаток лишен «непрямой» способ,¹¹⁹ поскольку он предполагает восстановление топографии пространственного распределения сигнала и профиля градиентного импульса для конкретного исследуемого образца. Далее рассчитывается ожидаемая форма зависимости диффузионного затухания для всего образца, после чего она аппроксимируется, как в «прямом» методе. Данный способ является более общим, поскольку допускает существование неоднородности РЧ-поля по объему образца, в других подходах это не учитывается.

Уравнение Стейкала–Таннера (1) в этом случае должно быть модифицировано следующим образом:^{116, 119}

$$I(\delta, \Delta) = I_0 \exp \left(- \sum_{n=1}^N c_n \hat{q}^n g_{\text{cal}}^{2n} I^{2n} \right),$$

где c_n — весовые коэффициенты, характеризующие степень отклонения реального диффузионного затухания от моноэкспоненциального (коэффициент c_1 имеет очевидный физический смысл — он характеризует отклонение реального среднего по образцу значения градиента от заданного);

$$\hat{q} = \gamma^2 \delta^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right).$$

Рассматриваемую модель можно использовать и в случаях с большой степенью нелинейности PFG.¹¹⁹

Одно из преимуществ описанных способов, в сравнении с методом «Slice-Selection», заключается в том, что не теряется отношение сигнал/шум, так как они «работают» со всем объемом образца, возбуждаемым РЧ-катушкой. Однако в экспериментах по восстановлению топографии пространственных профилей градиентного и РЧ-импульсов необходимо более глубокое фазовое циклирование, для чего требуется значительно больше времени и использование существенно более сложных импульсных последовательностей.

Таким образом, чтобы создать в исследуемом образце градиент с требуемыми параметрами (амплитудой, формой, однородностью), необходимо пройти несколько этапов. Во-первых, для некалиброванной градиентной катушки следует провести теоретический расчет параметров создаваемого PFG при заданном токе через нее. Для коммерческого оборудования этот этап, как правило, с хорошей точностью выполняется при вводе датчика в эксплуатацию. Во-вторых, должно быть выполнено восстановление топографии пространственного профиля градиентного импульса, что даст представление об отклонениях реальных параметров PFG от ожидаемых. Используемый математический алгоритм обработки экспериментальных данных должен быть модифицирован с учетом этих отклонений. Наконец, если это возможно, подобрав стандартный образец (в зависимости от типа конкретной исследуемой системы) с известным значением КСД, необходимо убедиться в эффективности выполненных ранее шагов — измеряемый КСД должен совпадать с известным (полученным альтернативным методом). После этого можно быть уверенным, что ошибка, вносимая в измеряемые значения КСД «неидеальностью» PFG, минимальна.

3. Температурные градиенты в образце и способы их уменьшения

Наличие в образце конвекционных потоков — еще один фактор, который может привести к существенной ошибке при определении КСД. Из-за того что температура образца в датчике спектрометра стабилизируется потоком газа заданной температуры, обдувающим ампулу снизу вверх, происходит неравномерный разогрев образца, в итоге возникает градиент температуры. Если этот градиент достаточно велик, то вдоль образца появляются продольные конвекционные потоки жидкости, которые накладываются на диффузионные потоки. Это приводит к сильному искажению диффузионных затуханий (вплоть до синусообразных модуляций кривой затухания). Несмотря на то что данный источник ошибок определения КСД неоднократно обсуждался в литературе,^{137–139} задача по эффективному устранению температурных градиентов или, по крайней мере, корректному учету данных эффектов при анализе получаемых результатов окончательно не решена до сих пор.^{135, 139, 140}

Существуют несколько подходов к минимизации температурных градиентов в образце. Прежде всего это, конечно, использование качественной системы термостабилизации, так как зависимость КСД от температуры очень сильная. В большинстве случаев ее можно описать формулой, полученной в рамках активационной модели Френкеля:^{84, 141}

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right),$$

где

$$D_0 = \frac{\delta^2}{6\tau_0}$$

— множитель, не зависящий от температуры, в котором δ — длина элементарного прыжка молекулы из одного положения равновесия в другое (м), τ — период колебаний молекулы около положения равновесия (с); E_d — энергия активации самодиффузии (Дж), R — универсальная газовая постоянная ($\text{Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$), T — абсолютная температура (К).

Такая зависимость приводит к тому, что на каждый градус изменения температуры КСД меняется на несколько процентов, поэтому любая нестабильность температурного режима может привести к заметной ошибке.

Другой важный метод достижения однородного распределения температуры по объему образца — использование потока обдувающего газа большой интенсивности, особенно при температурах, отличных от комнатной.^{133, 137} К сожалению, при более высоких температурах, когда необходимо применение потока газа очень большой интенсивности ($> 1 \text{ м}^3 \cdot \text{ч}^{-1}$), этот подход может привести к ошибкам, связанным с вибрацией ампулы: вызванные вибрацией перемещения образца, накладываясь на диффузионное движение, могут существенно исказить результаты. При проведении низкотемпературных экспериментов при охлаждении потоком газообразного азота также могут возникнуть аналогичные проблемы.

Альтернативным (или дополнительным) способом является физическое ограничение объема (диаметра и/или высоты) образца.^{27, 29, 130, 137} В первую очередь рекомендуется уменьшать диаметр,¹⁴² — продольные потоки жидкости минимизируются благодаря трению о стенки ампулы. Вместе с тем указанное ограничение объема образца неизбежно приводит к уменьшению отношения сигнал/шум, а при значительном ограничении — и к потере однородности

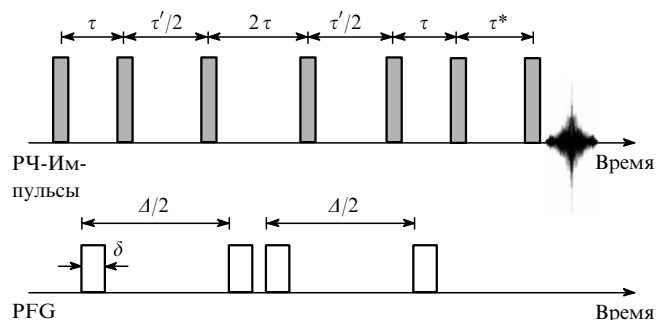


Рис. 7. Импульсная последовательность двойного стимулированного эха для компенсации конвекционных потоков с задержкой для подавления токов Фуко.

магнитного поля, особенно на границе образца. В конечном итоге это может привести к значительному уширению спектральных линий и усложнению анализа результатов. Для решения данной проблемы можно использовать ампулы специальной формы,¹³⁵ в которых объем образца ограничен с двух сторон вставками, магнитная восприимчивость которых подбирается близкой к магнитной восприимчивости раствора.^{129, 135} Вместе с тем метод с применением таких ампул является дорогостоящим и неудобным, так как материал вставок приходится подбирать фактически под каждый образец.

При работе с образцами низкой вязкости все описанные выше подходы могут оказаться недостаточными для минимизации эффектов конвекции. В этих случаях полезно использовать модифицированные импульсные последовательности, нивелирующие влияние потоков вещества в образце.^{143–145} Например, при использовании последовательности «двойного стимулированного эха» (Double Stimulated Echo (DSTE))^{143, 144} (рис. 7) эффективный градиент температуры в образце становится равным нулю из-за равенства нулю фазового сдвига, обусловленного движением вещества с постоянной скоростью (ламинарный поток). Есть примеры, когда даже при относительно высокой температуре (347 К) удалось получить корректное значение КСД, в то время как применение импульсной последовательности STE-BPLED приводит к большей на порядок ошибке.^{143, 144}

Применение последовательности DSTE чрезвычайно эффективно при проведении низкотемпературных экспериментов, в которых трудно создать большой равномерный поток охлаждающего газа, а применение ампул меньшего диаметра нежелательно из-за ухудшения отношения сигнал/шум. При сравнении результатов действия одномерных вариантов последовательностей STE-BPLED и DSTE на исследуемый образец (растворитель CDCl_3 , $T = 253 \text{ К}$) при использовании импульсного градиента магнитного поля (с амплитудой 95% от максимальной) (рис. 8) хорошо видно, что в случае STE-BPLED проявляется влияние конвекции и фазы сигналов сильно искажаются. Это приводит к тому, что ошибка при определении КСД оказывается очень большой. В то же время при использовании импульсной последовательности DSTE спектр получается без искажений[§] и КСД определяется с хорошей точностью (ошибка $< 10\%$).

§ Опорные спектры при использовании обеих последовательностей, полученные при интенсивности PFG 2% от максимальной, имеют схожий вид (см. рис. 8, а).

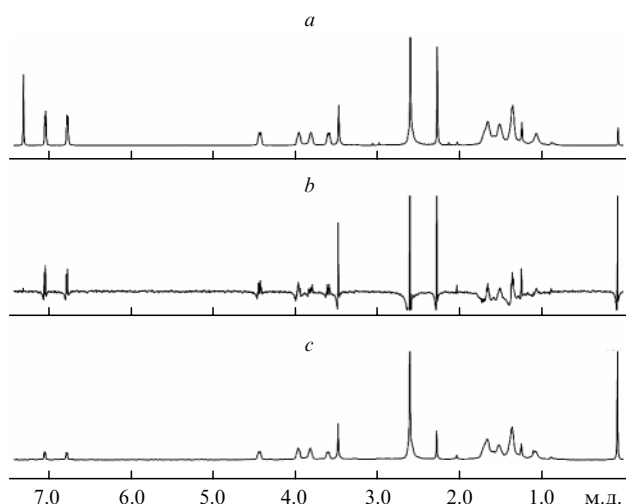


Рис. 8. Спектры, полученные с помощью импульсных последовательностей STE-BPLED (*a*, *b*) и DSTE (*c*). *a* — 2%; *b*, *c* — 95% амплитуды PFG; спектр получен на ядрах ^1H на частоте 600 МГц при 253 К в растворе CDCl_3 .

Недостатком последовательности DSTE является необходимость глубокого фазового циклирования. Кроме того, общая чувствительность данной последовательности несколько меньше, что связано с ее большей длительностью, чем, например, STE-BPLED. В итоге, релаксационное затухание в течение действия последовательности также оказывается большим.¹⁴³ Однако очевидно, что в некоторых случаях проигрыш в чувствительности может быть компенсирован выигрышем от минимизации эффектов конвекции.

Таким образом, игнорирование температурных градиентов может драматически отразиться на результатах диффузионных экспериментов. Чтобы этого не произошло, необходимо стабилизировать температуру образца, для чего измерения желательно проводить при температурах, близких к комнатной, и при больших интенсивностях потока газа обдувающего образец. Если этих мер недостаточно либо их невозможно выполнить, выходом может служить уменьшение диаметра/высоты образца и/или использование специальных импульсных последовательностей.

4. Специфические свойства образца

а. Короткие времена релаксации

В некоторых случаях измерению КСД могут препятствовать «неудобные» (короткие) времена релаксации вещества. Так как длительность большинства импульсных последовательностей, применяемых для определения КСД, относительно велика, быстрая релаксация может привести к сильному уменьшению амплитуды сигнала эха к моменту окончания последовательности. Эта проблема особенно важна при работе с супрамолекулярными системами, протеинами, а также при использовании в качестве спиновых меток ядер, отличных от протонов.

В принципе, согласно уравнению (1), сокращение времен релаксации не приводит к ошибке при оценке КСД. Должно наблюдаться только уменьшение амплитуды сигнала спинового эха. Однако в некоторых случаях вследствие этого невозможно проведение полноценного эксперимента из-за

низкого отношения сигнал/шум, особенно при больших амплитудах PFG. Более того, сокращение времени спин-спиновой релаксации приводит к увеличению ширины резонансных линий, что может сильно усложнить процесс обработки экспериментальных результатов.

Существует несколько подходов для преодоления этой проблемы. Например, время поперечной релаксации можно увеличить с помощью метода спиновой развязки³ либо метода вращения образца под магическим углом с применением PFG по направлению вращения.^{81, 146} Однако как первый, так и второй методы требуют специфических условий (для второго, в частности, необходим специальный датчик), поэтому они не всегда могут быть применены.

Вместе с тем, если принять во внимание, что нередко время спин-решеточной релаксации (T_1) больше времени спин-спиновой релаксации (T_2), эффективным будет использование радиочастотных последовательностей, в которых вектор намагниченности во время наиболее длительного промежутка Δ находится не в плоскости xy вращающейся системы координат, где «работает» спин-спиновая релаксация (скорость релаксации в данном случае $R \sim 1/T_2$), а направлен вдоль оси z . В последнем случае $R \sim 1/T_1$, т.е. релаксационный вклад в уравнении (1) может оказаться существенно меньше.

Наиболее простым примером, иллюстрирующим сказанное, является последовательность STE (см. рис. 5,а),¹⁴⁷ в которой в отличие от последовательности Стейскала – Таннера (см. рис. 1) второй РЧ-импульс следует непосредственно после первого PFG. Так как импульс является 90-градусным, то разворачивает вектор намагниченности вдоль оси z , где он остается в течение промежутка τ , т.е. большую часть времени диффузии Δ . Это дает ряд преимуществ. Во-первых, минимально влияние токов Фуко — теневые градиенты, создаваемые ими, направлены, как правило, вдоль оси z , и в таком направлении они наиболее эффективно влияют на прецессию магнитных моментов в плоскости xy . Во-вторых, минимизируются эффекты J -модуляции, которые могут иметь место для систем с сильным спин-спиновым взаимодействием.²⁷ И наконец, когда вектор намагниченности направлен вдоль оси z , на систему можно воздействовать специальными «разрушающими» градиентами, которые дефокусируют любую оставшуюся в плоскости xy намагниченность (например, из-за неидеальности применяемых РЧ-импульсов). В таком случае существенно улучшается вид конечных спектров. В то же время у этой импульсной последовательности есть существенный недостаток (см. также раздел II.4.6) — регистрируемый сигнал эха имеет в два раза меньшую амплитуду, чем при использовании последовательности Стейскала – Таннера. Это связано с тем, что второй 90-градусный импульс (см. рис. 5,а) разворачивает вдоль оси z только половину намагниченности (x - или y -составляющую).

Тем не менее достоинства описанной последовательности, как правило, компенсируют ее недостатки. Поэтому наиболее широко используемые в настоящее время импульсные последовательности основаны именно на последовательности стимулированного эха.

Чтобы избежать проблем с релаксацией, логичной выглядит попытка максимально сократить длительности всех временных интервалов между РЧ-импульсами. Речь идет в первую очередь о времени диффузии Δ . Однако значительное сокращение этой величины ограничено условием $\Delta > \delta/3$ (см. уравнение (1)). Поэтому для систем с малым значением

КСД, для которых δ должна быть большой, этого шага может оказаться недостаточно.

В таких случаях могло бы помочь применение PFG большей амплитуды, причем, чем больше PFG, тем короче может быть последовательность. Современные коммерчески доступные специализированные диффузионные датчики позволяют получать $PFG > 20 \text{ Тл} \cdot \text{м}^{-1}$. Однако при этом усиливается влияние различных негативных факторов, и в первую очередь — токов Фуко. Поэтому сохранение высокого разрешения в спектрах при измерении КСД может стать проблематичным.

Конструкция большинства стандартных датчиков высокого разрешения, оснащенных градиентной катушкой, позволяет надежно работать с PFG порядка $0.5 \text{ Тл} \cdot \text{м}^{-1}$. Имеются редкие удачные примеры создания в датчиках такого типа градиентов магнитного поля большей величины.^{127, 148} Например, при исследовании фосфорамидатного лиганда при 235 К с $T_1 = 360 \text{ мс}$, $T_2 = 33.9 \text{ мс}$ на ядрах ^{31}P с использованием градиентов порядка $1.5 \text{ Тл} \cdot \text{м}^{-1}$ получены спектры DOSY, отношение сигнал/шум в которых на $\sim 40\%$ больше, чем в соответствующих спектрах, снятых при стандартном PFG, равном $0.5 \text{ Тл} \cdot \text{м}^{-1}$ (см.¹⁴⁸). При этом искажений значений измеряемых КСД не наблюдалось.

При практической реализации описанного подхода необходимо учитывать, что большие значения PFG, кроме всего прочего, приводят к заметным механическим напряжениям в конструкции градиентной катушки. Поэтому необходимо в первую очередь подобрать оптимальное значение мощности для конкретной конструкции используемого датчика. Следующим важнейшим шагом является поэтапная калибровка создаваемого градиента (см. раздел II), которая имеет ряд особенностей.¹²⁷ В конечном итоге все это, безусловно, ограничивает применение данного подхода.

Вместе с тем, если времена релаксации для ядер ^1H короткие, альтернативным шагом может стать попытка «переключиться» на другое ядро в системе (^{13}C , ^{15}N , ^{31}P и т.д.) с большим временем релаксации.^{149–151} К сожалению, малое значение гиромагнитного отношения и небольшое природное содержание изотопов ядер с необходимыми для ЯМР характеристиками обычно сводят на нет выигрыш в отношении сигнал/шум, полученный благодаря большому времени релаксации.

Другой «изящный» способ, который может оказаться полезным при работе с системами с малыми временами релаксации — использование синглетного состояния,^{152, 153} для которого значение характерного времени релаксации, как правило, существенно больше, чем T_1 . Синглетное состояние может быть создано в двухспиновой системе, связанной скалярным взаимодействием.¹⁵² Благодаря возбуждению нульквантового перехода можно создать смешанное синглет-триплетное состояние. При этом триплетная часть имеет характерное время релаксации T_1 , а синглетная — T_s , причем $T_s \gg T_1$. В итоге может быть создан двухспиновый ансамбль, который практически изолирован от окружения и релаксирует чрезвычайно медленно. Например, для 2-хлоракиронитрила при 298 К значение T_1 составляет $\sim 5 \text{ с}$, а $T_s \approx 43 \text{ с}$. При 227 К значение $T_1 < 1 \text{ с}$, что «неудобно» для работы, в то время как $T_s \approx 8 \text{ с}$, и можно надежно определить КСД исследуемого вещества.¹⁵³

Таким образом, чтобы избежать сильных релаксационных затуханий при регистрации диффузионных спадов, целесообразно применять импульсные последовательности, построенные на основе последовательности стимулированного эха с максимально коротким временем диффузии. Если

же этих мер недостаточно, можно использовать более мощные PFG либо применять ядра с большим временем релаксации. Также могут помочь методы, основанные на создании синглетного состояния. В последнем случае, однако, следует использовать существенно более сложные последовательности, требующие длительной настройки. Таким образом, в настоящее время нет универсальных алгоритмов определения КСД в системах с очень малыми временами релаксации.

б. Влияние спиновой диффузии и кросс-релаксации на сигнал стимулированного эха

К сожалению, импульсные последовательности, построенные на основе STE, кроме достоинств имеют также и ряд недостатков.

Во-первых, при направлении вектора намагниченности вдоль оси z (что происходит при использовании последовательности STE) может возникнуть спиновая диффузия (например, при исследовании макромолекул).¹¹³ Это проявляется в том, что амплитуда сигнала эха уменьшается с увеличением Δ сильнее, чем ожидается, исходя из значений времен релаксации для системы. Данная проблема может быть преодолена, если вместо одиночных PFG в импульсной последовательности применять композитные градиентные импульсы, состоящие из двух PFG противоположных знаков^{113–115} (см. рис. 5,с).

Во-вторых, при использовании импульсной последовательности STE проблемы могут возникнуть также из-за эффекта кросс-релаксации.^{113, 154–156} В случае внутримолекулярных эффектов происходит искажение формы сигналов ядер, связанных спин-спиновым взаимодействием (AB-системы), причем степень его проявления возрастает с увеличением Δ . В данном случае применение композитных PFG также позволяет устранить эту проблему.^{113, 155} В то же время, если имеет место межмолекулярная кросс-релаксация (при этом наблюдается зависимость измеряемого КСД от Δ),^{154, 156} использование композитных PFG может оказаться не столь эффективным. Однако в некоторых случаях удается определить истинное значение КСД.¹⁵⁴ Более того, полезным может стать переход на другое ядро, если кросс-релаксация для него не проявляется.¹⁵⁶

Таким образом, при использовании импульсных последовательностей на основе STE вместо одиночных градиентных импульсов целесообразно применение биполярных композитных PFG. При этом необходимо убедиться, что в исследуемой системе отсутствуют эффекты межмолекулярной кросс-релаксации.

III. Математическая обработка экспериментальных результатов

Проблема корректной математической обработки результатов эксперимента, в том числе для случая полидисперсных систем, подробно рассматривалась во многих работах.^{28, 29, 30, 157–176} У исследователей имеется целый арсенал различных алгоритмов. Здесь мы кратко остановимся лишь на принципиальных моментах.

Напомним, что в результате эксперимента Стейскала — Таннера получают набор сигналов спинового эха (для анализа используется только вторая половина сигнала эха^{26, 27}), амплитуда которых, согласно уравнению (1), последовательно затухает. Иными словами, это двумерная матрица амплитуд $\tilde{E}(g, t)$, где g — градиент магнитного поля, t — время. Для получения спектра DOSY данная матрица преоб-

разуется дважды. Сначала выполняется преобразование Фурье $\tilde{E}(g,t) \Rightarrow E(g,v)$. Матрица $E(g,v)$ (v — частота) — набор одномерных спектров, амплитуда резонансов в которых затухает с увеличением g . Последний шаг — переход от $E(g,v)$ к спектру DOSY, т.е. к матрице $S(D,v)$, где D — КСД. Существует большое число алгоритмов, по которым может быть выполнено преобразование $E(g,v) \Rightarrow S(D,v)$.

Исходя из уравнения (1), для системы, содержащей n компонентов, каждый из которых характеризуется дискретным значением КСД (D_n), выражение для $E(g,v)$ может быть записано в виде

$$E(g,v) = \sum_n A_n(v) \exp \left[-D_n \gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right], \quad (3)$$

где $A_n(v)$ — спектр компонента n (с учетом релаксационного фактора).

В основе преобразования $E(g,v) \Rightarrow S(D,v)$ лежит поэтапный анализ диффузионных затуханий, полученных для каждой частотной точки (или небольшого числа таких точек, взятых последовательно, называемых частотным каналом). Далее, в зависимости от свойств системы, может быть выбран тот или иной алгоритм указанного преобразования.

1. Метод Левенберга – Марквардта

Если все сигналы вдоль оси химических сдвигов разрешены, а система характеризуется дискретным набором КСД, диффузионные затухания, полученные для каждого частотного канала, могут быть легко аппроксимированы функцией (1) с помощью стандартного статистического метода Левенберга–Марквардта[¶] (метода наименьших квадратов).^{158, 159} При этом требуются стартовые (затравочные) значения КСД, которые оптимизируются в результате аппроксимации. Основное достоинство метода — его однозначность и простота.

Фактически в отсутствие спектрального перекрытия описанный алгоритм является достаточным. Однако для реальных систем данное условие выполняется редко. В итоге такой метод теряет эффективность.²⁹ Это стимулировало разработку ряда подходов различной сложности, так или иначе позволяющих решить проблему перекрытия отдельных линий в спектре.

2. Метод DISCRETE

Метод DISCRETE (Discrete Sum of Exponential Decays)^{25, 160, 161} является альтернативным методу Левенберга–Марквардта. Он не требует стартовых значений КСД, что очень удобно, когда о системе мало информации. Вместе с тем его недостаток заключается в том, что значения КСД, полученные для нескольких частотных точек в пределах одного сигнала конкретного вещества, очень часто заметно отличаются друг от друга.

3. Метод SPLMOD

Метод SPLMOD (Spline Model)^{162, 163} — логическое развитие метода DISCRETE. Он также не требует стартовых значений

КСД, но при работе с несколькими частотными каналами в пределах одной линии анализ проводится одновременно для всех таких каналов. При этом решение заведомо ищется в пределах величины стандартного отклонения вблизи определяемого значения КСД. Вместе с тем входные данные для алгоритма SPLMOD должны быть определенным образом подготовлены,²⁸ что не всегда легко сделать.

4. Метод CONTIN

У таких объектов, как полимеры или везикулы, часто наблюдается непрерывное распределение по массам и, следовательно, по КСД. В итоге, выражение (3) должно быть модифицировано

$$E(g,v) = \int_0^\infty a(D,v) \exp \left[-D \gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \right] dD,$$

где $a(D,v)$ — одномерный спектр системы при заданном значении КСД.

В методе CONTIN (Continuous Distributions of Exponentials)^{164–166} для корректного решения задачи преобразования $E(g,v) \Rightarrow S(D,v)$ применяется алгоритм ограниченной регуляризации. При использовании данного алгоритма могут возникнуть решения, лишённые физического смысла (отрицательные КСД). Однако после задания соответствующих граничных условий, в конечном итоге данный алгоритм позволяет определять КСД с приемлемой точностью. Особенностью метода CONTIN является сглаживание пиков вдоль оси КСД, в результате чего даже в случае моодисперсных образов данные пики оказываются уширенными. Однако с учетом того, что при исследовании большинства полидисперсных объектов вклады моодисперсных составляющих, как правило, легко выделяются, данная особенность не является серьезным недостатком.¹⁶⁷

5. Метод MaxEnt

В основе метода MaxEnt (Maximum Entropy)^{168, 169} лежит идея определения «наиболее вероятного» спектра КСД $S(D,v)$ путем максимизации энтропии спектрального распределения по отношению к конкретным граничным условиям. Данный метод в некоторых случаях дает более точные результаты, чем все остальные.¹⁶⁸ При этом он не требует сложной настройки или подготовки данных.

6. Метод DECRA

До сих пор рассматривались методы, в которых одновременно анализируется только один частотный канал, либо их ограниченное число, при этом не используется вся доступная спектральная информация. Начиная с метода DECRA (Direct Exponential Curve Resolution Algorithm),^{170–172} был разработан ряд алгоритмов, основанных на одновременном анализе всех частотных каналов. В итоге, проблему спектрального перекрытия удалось решить. При использовании метода DECRA[†] не требуется априорных сведений об образце, с

¶ Метод Левенберга – Марквардта, как правило, является базовым алгоритмом в большинстве программных пакетов для обработки диффузионных спектров ЯМР.

† Особенность метода DECRA заключается в том, что при проведении эксперимента число точек в диффузионном затухании должно быть четным, а величина PFG — возрастать по квадратичному закону.^{172, 173}

помощью этого метода получают чистые спектры компонентов системы с разными КСД.^{172, 173}

7. Методы MCR и CORE

Метод MCR (Multivariate Curve Resolution)¹⁷⁴ является альтернативой DECRA и в целом дает результаты такого же качества. Метод CORE (Component Resolved NMR)^{174, 175} представляет собой общий двухуровневый алгоритм наименьших квадратов, позволяющий решить задачу преобразования $E(g, \nu) \Rightarrow S(D, \nu)$, опираясь на заранее выбранную модель. При этом исходной информации о значениях искоемых КСД не требуется.

Резюмируя, необходимо отметить, что ни один из большого числа существующих методов извлечения значений КСД из результатов эксперимента Стейскала–Таннера, не является универсальным, т.е. подходящим для любой системы. У каждого метода есть свои достоинства и ограничения.¹⁷⁶ В конечном итоге выбор должен быть сделан, исходя из предполагаемых свойств исследуемой системы. При этом, возможно, будет иметь смысл провести последовательный анализ экспериментальных данных несколькими методами, что позволит получить наиболее полную и корректную информацию о системе.

IV. Количественная интерпретация значений коэффициента самодиффузии

До сих пор основное внимание было уделено вопросу о том, как правильно, т.е. с минимальными ошибками, измерить КСД. Не менее важна проблема корректной интерпретации экспериментальных величин, поскольку, несмотря на кажущуюся очевидность связи КСД с геометрическими параметрами, имеются некоторые аспекты, игнорирование которых может привести к тому, что выводы окажутся бессмысленными.

В принципе интерпретацию условно можно разделить на два уровня: качественный и количественный анализ.

Довольно часто под измерением КСД подразумевают оценку подвижности молекулярного объекта как целого. Например, если необходимо ответить на вопрос, имеет ли место комплексообразование в системе «гость–хозяин», иногда достаточно проанализировать изменение КСД молекул «гостя» (небольшая молекула с большим КСД) при добавлении в раствор молекул «хозяина» (большая молекула с малым КСД). Если КСД молекул «гостя» уменьшается и становится близким к КСД «хозяина», то это говорит о том, что молекулы данных типов связываются между собой и в итоге движутся в растворе как единое целое. Иными словами, в системе образуется прочный межмолекулярный комплекс.

Если же необходимо ответить на вопросы, каковы стехиометрия комплекса, константа комплексообразования и т.д., простой оценки величины КСД недостаточно. В этом случае необходим анализ абсолютных значений. Интуитивно понятная связь КСД с геометрическими размерами исследуемого объекта делает привлекательной идею точной оценки физических параметров частицы (размеров, массы) по ее КСД. Это позволяет судить о структуре, упаковке и т.д. Чрезвычайно важной данная информация стала особенно в последние годы, когда в химии супрамолекулярных систем начала проявляться тенденция к созданию наноразмерных молекулярных ансамблей с заданными свойствами по схеме «снизу – вверх» — из элементарных молекулярных фрагментов собирается ансамбль с заданной структурой.

Вместе с тем даже если все инструментальные источники ошибок устранены или, по крайней мере, четко учтены и

значения КСД скорректированы, расчет физических параметров исследуемого объекта, исходя из его КСД, — нетривиальная задача.

1. Взаимосвязь коэффициента самодиффузии со свойствами молекулярного объекта

Для оценки КСД молекул в растворах в приближении диффузии твердой сферической частицы в изотропной континуальной среде чаще всего применяют уравнение Стокса–Эйнштейна

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}, \quad (4)$$

где k — постоянная Больцмана ($\text{Дж} \cdot \text{К}^{-1}$), T — абсолютная температура (К), η — вязкость раствора ($\text{Н} \cdot \text{с} \cdot \text{м}^{-2}$), R_h — гидродинамический радиус (м).

Значение R_h складывается из собственно радиуса диффундирующей частицы и толщины сольватной оболочки. При исследовании самодиффузии частиц, форма которых отличается от сферической, R_h обычно трактуется как средний гидродинамический радиус твердой сферы, которая при прочих равных условиях имела бы тот же КСД в заданном растворе, что и исследуемый объект.

На первый взгляд, связь между измеренным значением КСД и размерами молекулярной частицы ясна из уравнения (4). В какой-то степени очевидность этой связи стимулировала развитие методик корректного определения КСД. Более того, именно из-за простоты уравнение (4) широко используется для количественной оценки размеров системы.^{177–179} Вместе с тем не следует забывать, в каком приближении получено данное уравнение. Форма реальных молекулярных объектов чаще всего не сферическая, а реальные растворы далеки по своим свойствам от идеальной изотропной среды.[‡] Очевидно, что прямое формальное использование этого уравнения для количественных оценок может привести к ошибочным выводам.¹⁸⁰

Преодолеть перечисленные выше трудности можно, используя два принципиально разных подхода. Первый основан на усовершенствовании модели Стокса–Эйнштейна, что позволяет в определенной степени учесть отличие реальной системы от идеальной. В соответствии со вторым, предусматривается эмпирическая калибровка соотношения КСД–параметр в ряду объектов, близких по природе к исследуемой системе, и последующая экстраполяция полученной зависимости в область КСД изучаемого объекта, чтобы оценить искомый параметр и для него. Рассмотрим более детально эти подходы.

2. Модификация уравнения Стокса–Эйнштейна для описания реальных объектов

Из анализа предпосылок, на которых базируется модель Стокса–Эйнштейна, следует, чем меньше исследуемый объект (гидродинамический радиус объекта становится соизмеримым с радиусом молекул растворителя) и/или чем сильнее его форма отклоняется от сферической (вытянутый/сплюснутый эллипсоид, длинная молекулярная

‡ «Идеальность» среды, в частности, подразумевает, что эксперименты проводят при бесконечном разбавлении, когда взаимодействие диффундирующих частиц друг с другом пренебрежимо мало. При конечных концентрациях, с которыми работают на практике, данное условие часто не выполняется.

печочка), тем большую ошибку дают оценки размеров, сделанные на основе уравнения Стокса – Эйнштейна.

«Неидеальность» реальной молекулы может быть учтена, если уравнение (4) модифицировать следующим образом:¹⁸¹

$$D = \frac{kT}{c(r_{sl}, R_h) \cdot f_s(a, b) \pi \eta R_h}, \quad (5)$$

где $c(r_{sl}, R_h)$ — поправочный коэффициент, учитывающий относительные размеры исследуемых молекул (R_h) и молекул растворителя (r_{sl}), $f_s(a, b)$ — фактор, учитывающий отклонение формы исследуемых частиц от сферической.

В приближении Стокса ($R_h \gg r_{sl}$) в знаменателе правой части уравнения (4) стоит коэффициент 6. Исходя из микрофрикционной теории, авторы работы¹⁸² показали, что с уменьшением значения R_h этот коэффициент становится меньше; в общем случае он зависит от соотношения R_h и r_{sl}

$$c(r_{sl}, R_h) = 6 \left[\frac{3r_{sl}}{2R_h} + \left(1 + \frac{r_{sl}}{R_h} \right)^{-1} \right]^{-1}.$$

Позже это выражение было уточнено по результатам полуэмпирических исследований¹⁸³

$$c(r_{sl}, R_h) = 6 \left[1 + 0.695 \left(\frac{r_{sl}}{R_h} \right)^{2.234} \right]^{-1}.$$

Анализ приведенных соотношений показал, что уравнение Стокса – Эйнштейна можно использовать в классическом виде (4), только если радиус исследуемых молекул по крайней мере в пять раз больше радиуса молекул растворителя. Таким образом, например, для молекул среднего размера с радиусом от $0.3 \cdot 10^{-9}$ до $0.6 \cdot 10^{-9}$ м поправочный коэффициент может меняться от 4 до 6. Следовательно, при оценке геометрических параметров большинства молекул органических и неорганических веществ уравнение (4) будет давать заметную ошибку.

Что касается выражения для фактора формы $f_s(a, b)$ (см. уравнение (5)), то для вытянутого эллипсоида (сигароподобных молекул) оно имеет вид^{184, 185}

$$f_s = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a} \right)^2} \left[\left(\frac{b}{a} \right)^{2/3} \ln \frac{1 + \sqrt{1 - (b/a)^2}}{b/a} \right]^{-1},$$

где a и b — характерные размеры эллипса.

Для сплюснутого эллипсоида (дископодобные молекулы) получено выражение

$$f_s = \sqrt{\left(\frac{b}{a} \right)^2 - 1} \left[\left(\frac{b}{a} \right)^{2/3} \operatorname{arctg} \sqrt{\left(\frac{b}{a} \right)^2 - 1} \right]^{-1}.$$

Анализ двух последних уравнений показал, если $a/b > 3$, то ошибка при использовании уравнения (4) превысит 10%. Отметим, что может сложиться ситуация, когда произведение $c(r_{sl}, R_h) \cdot f_s(a, b)$ в уравнении (5) может стать равным 6, т.е. формально уравнение (4) будет справедливо.

Таким образом, для большинства молекулярных объектов в растворах, с которыми обычно имеют дело на практике, уравнение (4), по всей видимости, можно использовать, но с большой осторожностью и только как первое приближение.¹⁸⁶ Для более корректного анализа необходимо применять более сложные модели, учитывающие форму и относительный размер молекулы исследуемого соединения.

Например, в случае ассоциации плоских молекул с использованием такого подхода удалось показать,¹⁸¹ что форма димеров хорошо описывается моделью вытянутого эллипсоида (см. выше). В то же время приближения сплюснутого эллипсоида и сферы давали неадекватные результаты, что позволило исключить вариант ассоциации по типу стеклинга.

При всей наглядности рассмотренных выше поправок, такой подход не получил широкого распространения, так как для произвольного молекулярного объекта чрезвычайно трудно предвидеть форму, которую он будет иметь в растворе. В итоге и характерное значение R_h для такого объекта оценить чрезвычайно трудно. С учетом сказанного, при анализе измеренных значений КСД необходимо сделать ряд допущений, что, очевидно, может стать источником ошибок.

3. Эмпирическая калибровка отношения КСД/параметр

Итак, форма реального молекулярного объекта в растворе может быть очень сложной, и аппроксимация сферой/эллипсоидом может оказаться некорректной. Более того, нередко важны не характерные линейные размеры системы, а ее объем или масса. Альтернативный рассмотренному выше подход к количественной оценке основан на поиске эмпирических корреляций между молекулярным параметром и КСД. На первый взгляд, в модели Стокса – Эйнштейна самодиффузия с массой частицы не связана, однако сравнение однотипных объектов показало, что в большинстве случаев с увеличением гидродинамических радиусов этих объектов (за счет увеличения количества входящих в молекулы атомов) одновременно возрастает и их масса. Для полимеров данный вывод хорошо описывается скейлинговым соотношением Флори^{84, 187 – 189}

$$R \sim M^\delta,$$

где R — линейный размер молекулы, M — ее масса, δ — постоянная Флори.

Данное выражение имеет строгое обоснование в рамках теории фракталов.¹⁸⁷ Для подобных объектов справедливо также соотношение

$$R \sim M^{-\alpha}, \quad (6)$$

где α — параметр, определяемый формой исследуемого объекта.

Таким образом, проведя измерения для класса однотипных молекулярных объектов (обладающих примерно одинаковой формой, характером взаимодействий с молекулами растворителя) с известной массой при заданном значении их концентрации, можно получить эмпирически параметризованное уравнение, связывающее КСД объекта с его массой или, например, объемом. Далее, для объекта того же класса по значению его КСД можно достаточно точно оценить массу (объем).

Данный эмпирический подход хорошо «работает» при исследовании систем полимерного типа, например белков,^{190, 191} протеинов,^{192, 193} полимеров,^{188, 189, 194} полисахаридов.^{195, 196} Вместе с тем имеется ряд примеров удачного использования этого подхода для определения строения каркасных соединений,⁵⁵ а также супрамолекулярной структуры комплексов включения циклодекстрина,¹⁹⁷ нековалентно связанных ассоциатов циануровой кислоты и производных меламина,¹⁹⁸ пиримидинсодержащего макроцикла,⁹³ полиоксометаллатных кластеров.¹⁹⁹

Однако стоит отметить, что найти подходящий ряд структурных аналогов исследуемого соединения зачастую

непросто. Вместе с тем, если имеются две сходные структуры, находящиеся в одних и тех же экспериментальных условиях (в идеальном случае — в одном и том же образце), то, исходя из уравнения (6), взаимосвязь молекулярных масс M_1 , M_2 и соответствующих коэффициентов диффузии D_1 , D_2 для этих структур описывается уравнением

$$\frac{D_1}{D_2} = \left(\frac{M_2}{M_1} \right)^\alpha, \quad (7)$$

где D_1 , M_1 и D_2 , M_2 — КСД и массы первой и второй структур соответственно.

Такая интерпретация фактически означает, что по параметрам D_1 и M_1 для одного вещества в образце можно оценить массу (M_2) исследуемого соединения, зная его КСД (D_2). В том или ином виде данную идею неоднократно применяли многие авторы, при этом в качестве репера использовали как молекулярные аналоги исследуемого соединения с известной массой,^{55, 195, 196} так и молекулы растворителя,^{200, 201} репера ХС.⁹²

Так, при работе с высокосимметричными системами нередко требуется оценить число элементарных магнитно-эквивалентных (в терминах метода ЯМР) фрагментов в макроцикле (рис. 9).⁵⁵ Проведя калибровку зависимости КСД от размера (или массы) в ряду структурно схожих систем и экстраполировав ее в область значения КСД исследуемого соединения, можно однозначно установить структуры таких симметричных систем.⁵⁵

Вместе с тем очевидно, что использовать в качестве репера произвольное вещество для калибровки соотношения (7) нельзя, поскольку характеры самодиффузии молекул этого вещества и исследуемого соединения должны быть схожи.

Схема определения молекулярной массы с использованием внутреннего репера тщательно рассмотрена в работе²⁰². Показано, что вещество, которое может быть использовано как внутренний репер, должно удовлетворять ряду требований:

- не вступать в реакцию и не образовывать нековалентные связи с исследуемым веществом;
- хорошо растворяться в выбранном растворителе;
- обладать узким массовым распределением;
- температура плавления должна быть достаточно низкой, если предполагаются низкотемпературные эксперименты;
- спектр ЯМР должен содержать линии, не перекрывающиеся с линиями основного вещества;

— характер взаимодействий с растворителем должен быть таким же, что и у исследуемого вещества.

Данным требованиям хорошо удовлетворяют углеводороды.²⁰² При этом корректные оценки молекулярной массы получаются, если в качестве реперов использовать молекулы 1-тетрадекана, циклооктана и бензола. Тщательно рассмотрев ряд часто используемых в спектроскопии ЯМР растворителей (толуол, циклогексан, дихлорметан и хлороформ), авторы работы²⁰² пришли к выводу: если наряду с исследуемым веществом в раствор будут добавлены три упомянутые репера, то построенная для них зависимость (6) может быть распространена на исследуемое вещество. Каждый из этих реперов можно использовать самостоятельно (см. уравнение (7)). Например, такой подход позволил определить состав асфальтенов и оценить размеры молекул, входящих в них соединений.³⁹

Таким образом, для количественной оценки физических параметров исследуемого молекулярного объекта (размеров, массы, объема), если есть *a priori* известные сведения о его форме, можно воспользоваться уравнениями для $c(r_{st}, R_h)$ и $f_s(a, b)$, чтобы модифицировать уравнение Стокса–Эйнштейна. Когда такой предварительной информации нет, единственным выходом может стать построение эмпирической зависимости (6) для ряда веществ, сходных по структуре с исследуемым. При этом, если возможно добавить в образец вещество с четко определенными параметрами (репер массы или объема), то достаточно просто сравнить КСД этого вещества с КСД исследуемого, чтобы оценить размеры (массу) молекулы последнего.

4. Измерение коэффициентов самодиффузии в системах с химическим обменом

Еще одним источником ошибок при интерпретации измеренных значений КСД является наличие в исследуемой системе ряда состояний, соответствующих энергетическим минимумам на поверхности потенциальной энергии (например, различных конформаций или структур ассоциатов), и химический обмен между ними. Влияние химического обмена на ХС и КСД достаточно подробно обсуждалось в литературе.^{203–216} Тем не менее с учетом практической важности данной проблемы и некоторой путаницы, связанной с наличием двух характеристических шкал времени в спектроскопии ЯМР (ХС и КСД), кратко рассмотрим некоторые аспекты этой проблемы.

Химический обмен — это марковский случайный процесс переходов спина или группы спинов между несколькими

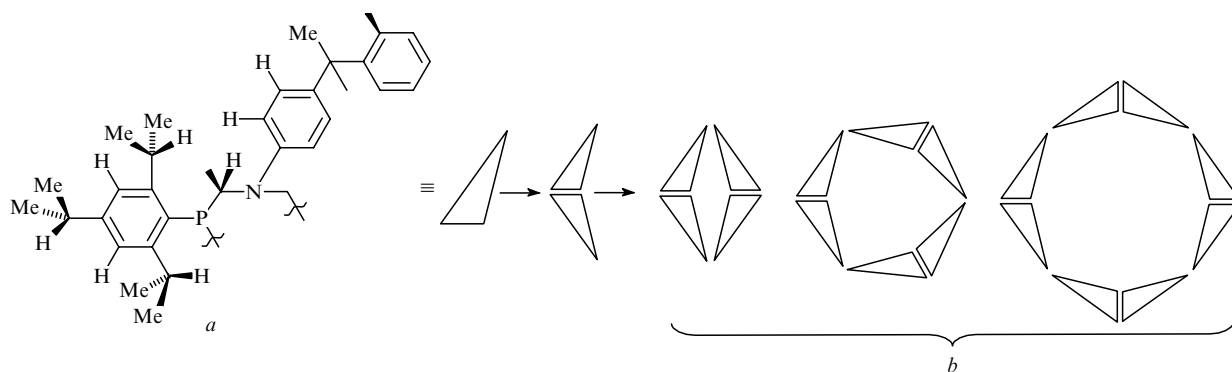


Рис. 9. Строение элементарного фрагмента (a) и возможные структуры макроцикла (b).

Таблица 2. Режимы скорости химического обмена в шкалах времен ХС и КСД в методе DOSY.

Режим	Скорость химического обмена	
	в шкале ХС	в шкале КСД
1	Медленный	Медленный
2	Быстрый	»
3	Медленный	Быстрый
4	Быстрый	»

состояниями. Характеристикой такого процесса служит скорость химического обмена. Обмен называют медленным в шкале ХС, если в спектрах ЯМР наблюдаются резонансные сигналы, принадлежащие отдельным спиновым состояниям (например, двум конформерам). В случае быстрого обмена наблюдается спектр, представляющий собой усредненную резонансную характеристику обоих состояний.

В шкале времен КСД ситуация отличается. Во-первых, различные состояния молекулярной системы характеризуются разными геометрическими параметрами. Во-вторых, обменного уширения линий в таком спектре не происходит.²⁰⁵ В-третьих, шкала времен КСД отличается от шкалы времен ХС, при этом она зависит от установленного в эксперименте времени диффузии (параметра Δ , см. рис. 1).^{205, 206} Поясним обозначенные особенности на примерах. Не считая множества промежуточных вариантов, спектр DOSY может соответствовать четырем режимам скорости химического обмена (табл. 2). Для простоты будем считать, что обмен происходит только между двумя состояниями — A и B .

Самый простой с точки зрения интерпретации — режим 1. В этом случае каждый набор сигналов, соответствующих различным состояниям, будет характеризоваться своим значением КСД.^{40, 41, 63} Более того, появляется возможность «экспресс»-оценки термодинамических параметров химического обмена. Так, в случае формирования псевдокапсул,⁴⁰ благодаря реализации режима 1, значение КСД свободных молекул «гостя» (состояние A) оказалось больше КСД, наблюдаемого для их капсулированной формы (состояние B), что служит дополнительным подтверждением образования молекулярного ансамбля. При этом путем простого интегрирования сигналов в диффузионном спектре были численно определены относительные концентрации молекул «гостя» в свободном и связанном состояниях. Отсюда, в свою очередь, была рассчитана равновесная константа образования капсулы.^{19, 20, 40} Необходимо отметить, что в данном случае интегрирование линий в обычном спектре ЯМР дало бы тот же результат.

Более сложный случай — режим 2. В системе, где реализуется такой режим, состояния A и B характеризуются одним усредненным значением ХС, однако их КСД различны.[§] Пример такой системы — химический обмен молекул свободной и внутриклеточной воды.⁶⁷ В этом случае из-за совпадения ХС анализ термодинамических параметров, исходя из обычного спектра ЯМР, невозможен. Анализ

диффузионного спектра дает единственную возможность определить эти параметры и наблюдать отдельные компоненты.

При реализации режима 3 наблюдается следующая картина: ХС, которые соответствуют исследуемой системе, находящейся в состояниях A и B , различаются, но наблюдается только один КСД, значение которого (D_{exp}) находится из соотношения^{28, 205}

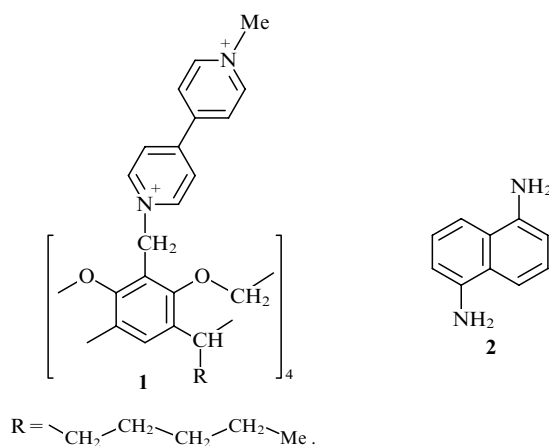
$$D_{\text{exp}} = p_A D_A + p_B D_B, \quad (8)$$

где p_A и p_B — вероятности нахождения исследуемого объекта в состоянии A и B соответственно; D_A и D_B — КСД объекта в этих состояниях.

Такая ситуация реализуется, например, в системах, где возможен обмен протонами между группами NH и молекулами свободной воды.^{211, 213–215} В этом случае протоны групп NH, принадлежащих исследуемой молекуле, резонируют в ожидаемой низкопольной области спектра ЯМР ^1H , а протоны, которые обменивались с молекулами воды, дают вклад в сигнал H_2O (поэтому не могут быть выделены из этого сигнала). В итоге, в спектре DOSY значение КСД, определяемое для линий, соответствующих протонам групп NH, отличается от КСД, определяемого для линий других протонов молекулы, не участвующих в химическом обмене.^{211, 213–215} Для подобных систем также отмечен интересный факт: при варьировании задаваемого в эксперименте значения Δ наблюдаются спектры DOSY, в которых режим химического обмена в шкале КСД изменяется от быстрого к промежуточному, а затем к медленному.²¹³ При этом значение КСД, измеренное для линии протона NH-группы, постепенно увеличивается от соответствующего исследуемой молекуле до характерного для свободной воды. Это дает возможность определить константу скорости химического обмена.^{213, 214}

Рассмотренные выше примеры показывают, что в некоторых случаях при интерпретации спектров DOSY систем, в которых имеет место химический обмен, не все ядра исследуемой молекулы характеризуются одним значением КСД. Если это не учитывать, то можно допустить ошибку в количественных выводах, сделанных на основе анализа наблюдаемых КСД.

Наиболее сложным является режим 4 (см. табл. 2), когда как по оси КСД, так и по оси ХС наблюдается один набор сигналов. Такой режим реализуется чаще всего, например, в большинстве систем типа «гость–хозяин».^{57–62, 197} В частности, при исследовании смеси каликс[4]резорцинарена (1)



§ Подразумевается, что обмен в шкале КСД медленный настолько и разность между коэффициентами самодиффузии такова, что при математическом преобразовании полученных диффузионных затуханий КСД, отвечающие различным молекулярным объектам, надежно разделяются.

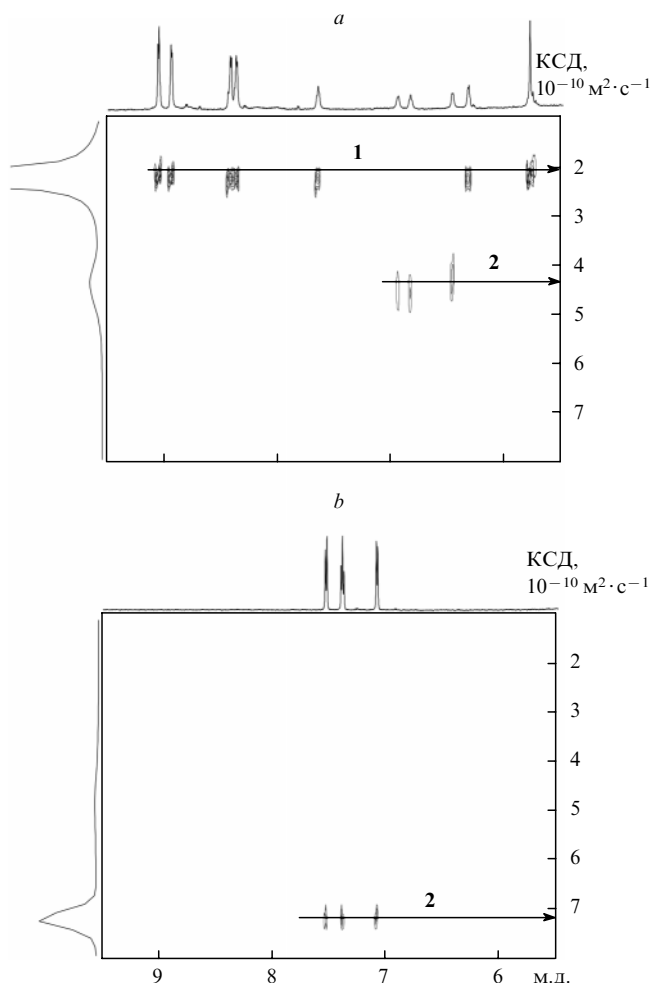


Рис. 10. Спектры DOSY систем 1+2 (а) и 2 (b) (спектр получен на ядрах ^1H на частоте 600 МГц при температуре 298 К в растворе D_2O).

(«хозяин») и нафталин-1,5-диамина (2) («гость») обнаружено,⁵⁷ что КСД соединения 2 больше ($0.43 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$), чем КСД соединения 1 ($0.20 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, рис. 10,а), но в то же время меньше, чем в случае индивидуального раствора соединения 2 ($0.72 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, рис. 10,б). В данном случае значение КСД «гостя» является взвешенным по его свободному (А) и связанному (В) состояниям, между которыми происходит быстрый в шкале КСД химический обмен (см. уравнение (8)). Отсюда, исходя из известных значений КСД для обоих состояний соединения 2, можно оценить величины p_A и p_B , и, таким образом, определить константы комплексообразования.^{19, 20, 57, 217}

По определению, константа комплексообразования в случае формирования комплекса стехиометрии 1 : 1 равна

$$K = \frac{[\text{HG}]}{[\text{H}][\text{G}]}, \quad (9)$$

где $[\text{HG}]$, $[\text{H}]$, $[\text{G}]$ — равновесные концентрации в растворе комплекса «гость–хозяин», свободных молекул «хозяина» и «гостя» соответственно.

Если обозначить через $[\text{H}]_0$, $[\text{G}]_0$ исходные концентрации молекул «хозяина» и «гостя», в которых они были помещены в раствор, то

$$[\text{H}]_0 = [\text{H}] + [\text{HG}],$$

$$[\text{G}]_0 = [\text{G}] + [\text{HG}],$$

а заселенности связанного и свободного состояний

$$p_B = \frac{[\text{HG}]}{[\text{G}]_0},$$

$$p_A = \frac{[\text{G}]}{[\text{G}]_0}$$

соответственно. В итоге соотношение (9) можно переписать в виде

$$K = \frac{p_B}{([\text{H}]_0 - p_B[\text{G}]_0)(1 - p_B)}. \quad (10)$$

Следовательно, для вычисления K достаточно определить заселенность связанного состояния. В рассматриваемом случае (режим 4) с учетом уравнения (8) можно записать

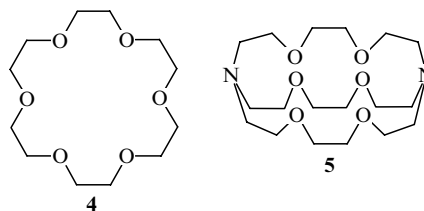
$$p_B = \frac{D_A - D_{\text{exp}}}{D_A - D_B}, \quad (11)$$

где D_A и D_B — КСД свободных молекул «гостя» и комплекса соответственно.

Обычно размеры молекул «хозяина» существенно больше, чем молекул «гостя», поэтому КСД комплекса «гость–хозяин» (D_B) можно с хорошей точностью считать равным КСД «хозяина».¶ Отсюда, комбинируя уравнения (10) и (11), легко определить K .

Важно отметить, что описанный алгоритм позволяет рассчитать K , исходя из результатов только одного эксперимента DOSY, в отличие от традиционного эксперимента ЯМР, основанного на анализе зависимости ХС сигналов молекул «гостя» при последовательном увеличении концентрации «хозяина».^{19, 20, 218}

Например, в системах на основе $\text{MeN}^+ \text{H}_3\text{Cl}^-$ (3, «гость») и краун-эфира (4) или криптанда (5)²¹⁹ при образовании комплексов «гость–хозяин» ХС протонов меняются незначительно и в принципе не могут использоваться для вычисления констант комплексообразования. Но с помощью описанного выше подхода удалось оценить константы комплексообразования в системах 3+4 и 3+5 и показать, что в растворах CD_3OD степень связывания молекул «гостя» обоими «хозяевами» больше на 2–3 порядка, чем в воде.



Таким образом, наличие в системе обменных процессов может приводить к отклонению наблюдаемых КСД от реальных значений. Идентифицировать режимы 1–3 (см. табл. 2) относительно просто (из-за наличия хотя бы по одной временной шкале ЯМР медленного процесса); в случае

¶ Необходимо помнить, что данное приближение «работает» не всегда,²¹⁷ и для определения D_B могут потребоваться дополнительные эксперименты.

режима 4 нет таких простых «подсказок», интерпретация может усложниться и потребуются дополнительные ЯМР-эксперименты. Следовательно, при интерпретации результатов эксперимента по измерению КСД необходима осторожность. В то же время, если наличие химического обмена точно установлено, то появляется возможность численно оценить энергетические характеристики системы.^{19, 20, 30, 217 – 219}

V. Заключение

Приведенный в настоящем обзоре материал свидетельствует о значительном прогрессе в развитии метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии ЯМР для исследования химических ансамблей, особенно супрамолекулярных систем. Следует отметить совершенствование как техники измерения КСД, так и методов интерпретации экспериментальных данных, а следовательно, повышение надежности выводов. Оценка диффузионных параметров с сохранением преимуществ спектроскопии ЯМР высокого разрешения открывает уникальную возможность определения размеров молекулярных систем в растворах, что в случае многокомпонентных ансамблей дает возможность судить об их состоянии, характере межмолекулярных взаимодействий, стабильности и т.д.

Вместе с тем, несмотря на достаточно широкое применение метода диффузионно-упорядоченной спектроскопии, особенно в последние годы, остается много «подводных камней», природа которых в целом известна, однако существующие инструментальные решения не позволяют полностью их преодолеть. Сказанное следует обязательно учитывать при анализе результатов, особенно при их численной интерпретации, чтобы избежать некорректных выводов.

В заключение отметим, что метод диффузионно-упорядоченной спектроскопии при исследовании супрамолекулярных систем не является «панацеей» и не заменяет традиционных методов спектроскопии ЯМР, основанных на анализе эффектов Оверхаузера и ХС, которые в определенных случаях дают комплементарную информацию. Поэтому совместный анализ диффузионных, релаксационных и спектральных параметров ЯМР мог бы стать инструментом, позволяющим перейти от оценки «брутто»-параметров молекулярной системы (размера) к более тонким характеристикам (форме и взаимной ориентации компонентов в системе). Именно комплексное использование различных параметров спектроскопии ЯМР, возможно, позволит получить принципиально новые тонкие структурные характеристики сложных супрамолекулярных (многокомпонентных) систем в жидкости.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-00123-а), Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ (проект МК-2622.2009.3). Экспериментальные результаты получены в Отделении ЯМР Федерального коллективного спектроаналитического центра физико-химических исследований строения, свойств и состава веществ и материалов и в Федеральном центре коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов.

Литература

1. Дж.Эмсли, Дж.Финей, Л.Сатклиф. *Спектроскопия ядерного магнитного резонанса*. Мир, Москва, 1968

2. J.H.Noggle, R.E.Schirmer. *The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Application*. Academic Press, Oxford, 1971
3. Р.Эрнст, Дж.Боденхаузен, А.Вокаун. *ЯМР в одном и двух измерениях*. Мир, Москва, 1990
4. D.Neuhaus, M.P.Williamson. *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*. VCH, New York, 1989
5. R.R.Ernst. In *Nobel Lectures, Chemistry 1991 – 1995*. (Ed. B.G.Malmström). World Sci. Publ. Co., Singapore, 1992. P. 12
6. W.R.Croasmun, R.M.K.Charlson. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Application for Chemists and Biochemists*. VCH, New York, 1994
7. Atta-ur-Rahman. *One and Two Dimensional NMR Spectroscopy*. Elsevier, Amsterdam, 1989
8. Ю.Е.Черныш, В.А.Волынкин, В.Т.Панюшкин, В.И.Кондаков, М.С.Коробов, Г.С.Бородкин. *Успехи химии*, **74**, 344 (2005)
9. А.А.Шахатуни, А.Г.Шахатуни. *Успехи химии*, **71**, 1132 (2002)
10. А.А.Грачев, А.Г.Гербст, А.С.Шашков, Н.Э.Нифантьев. *Успехи химии*, **78**, 776 (2009)
11. L.B.Krivdin, R.Contreras. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, **61**, 133 (2007)
12. A.Balandina, A.Kalinin, V.Mamedov, B.Figadere, Sh.Latypov. *Magn. Reson. Chem.*, **43**, 816 (2005)
13. Т.Н.Колоколова, О.Ю.Савельев, Н.М.Сегреев. *Журн. аналит. химии*, **63**, 118 (2008)
14. A.Balandina, V.Mamedov, Sh.Latypov. *J. Mol. Struct.*, **889**, 89 (2008)
15. I.G.Shenderovich, P.M.Tolstoy, N.S.Golubev, S.N.Smirnov, G.S.Denisov, H.-H.Limbach. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11710 (2003)
16. A.V.Kozlov, V.E.Semenov, A.S.Mikhailov, A.V.Aganov, M.B.Smith, V.S.Reznik, Sh.K.Latypov. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 3259 (2008)
17. Sh.Latypov, A.Balandina, M.Boccalini, A.Matteucci, K.Usachev, S.Chimichi. *Eur. J. Org. Chem.*, **27**, 4640 (2008)
18. D.J.Blears, S.S.Danyluk. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 21 (1967)
19. L.Fielding. *Tetrahedron*, **56**, 6151 (2000)
20. K.Hirose. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.*, **39**, 193 (2001)
21. E.O.Stejskal, J.E.Tanner. *J. Chem. Phys.*, **42**, 288 (1965)
22. P.T.Gallaghan. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*. Clarendon Press, Oxford, 1991
23. J.Karger, H.Pfeifer, W.Heink. *Adv. Magn. Reson.*, **12**, 1 (1988)
24. R.L.Haner, T.Schleich. *Methods Enzymol.*, **176**, 418 (1989)
25. K.F.Morris, C.S.Johnson. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3139 (1992)
26. W.S.Price. *Conc. Magn. Reson.*, **9**, 299 (1997)
27. W.S.Price. *Conc. Magn. Reson.*, **10**, 197 (1998)
28. C.S.Johnson Jr. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **34**, 203 (1999)
29. B.Antalek. *Conc. Magn. Reson.*, **14**, 225 (2002)
30. B.Antalek. *Conc. Magn. Reson., Part A*, **30**, 219 (2007)
31. Y.Cohen, L.Avram, L.Frish. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 520 (2005)
32. Y.Cohen, L.Avram, T.Evan-Salem, L.Frish. In *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*. (Ed. Ch.A.Schalley). Wiley, Weinheim, 2007. P. 163
33. A.Pastor, E.Martinez-Viviente. *Coord. Chem. Rev.*, **252**, 2314 (2008)
34. K.Hayamizu, S.Tsuzuki, Sh.Seki. *J. Phys. Chem. A*, **112**, 12027 (2008)
35. R.E.Hoffman, H.Arzuán, Ch.Pemberton, A.Aserin, N.Garti. *J. Magn. Reson.*, **194**, 295 (2008)
36. C.Carrara, St.Viel, C.Delaurent, F.Ziarelli, G.Excoffier, St.Caldarelli. *J. Magn. Reson.*, **194**, 303 (2008)
37. R.Evans, St.Haiber, M.Nilsson, G.A.Morris. *Anal. Chem.*, **81**, 4548 (2009)
38. A.A.Marchione, E.F.McCord. *J. Magn. Reson.*, **201**, 34 (2009)
39. E.Durand, M.Clemancey, A.-A.Quoineaud, J.Verstraete, D.Espinat, J.-M.Lancelin. *Energy Fuels*, **22**, 2604 (2008)

40. A.Lledo, P.Restorp, J.Rebek Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2440 (2009)
41. A.Y.Ziganshina, S.V.Kharlamov, D.E.Korshin, R.K.Mukhitova, E.Kh.Kazakova, Sh.K.Latypov, V.V.Yanilkin, A.I.Konovalov. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 5312 (2008)
42. L.Avram, Y.Cohen. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 15148 (2002)
43. С.В.Харламов, Е.П.Жильцова, Г.А.Гайнанова, Л.А.Кудрявцева, А.П.Тимошева, А.В.Аганов, Ш.К.Латыпов. *Коллоид. журн.*, **68**, 550 (2006)
44. Г.А.Гайнанова, Е.П.Жильцова, Л.А.Кудрявцева, С.В.Харламов, Ш.К.Латыпов, А.П.Тимошева, А.И.Коновалов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1359 (2006)
45. A.J.Dingley, J.R.Mackay, B.E.Chapman, M.B.Morris, Ph.W.Kuchel, B.D.Hambly, G.E.King. *J. Biomol. NMR*, **6**, 321 (1995)
46. V.V.Syakaev, A.R.Mustafina, J.G.Elistratova, Sh.K.Latypov, A.I.Konovalov. *Supramol. Chem.*, **20**, 453 (2008)
47. E.Marotta, F.Rastrelli, G.Saielli. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 16566 (2008)
48. L.Zakharova, V.Syakaev, M.Voronin, V.Semenov, F.Valeeva, A.Ibragimova, A.Bilalov, R.Giniyatullin, Sh.Latypov, V.Reznik, A.Konovalov. *J. Colloid Interf. Sci.*, **342**, 119 (2010)
49. L.Ya.Zakharova, V.V.Syakaev, M.A.Voronin, F.V.Valeeva, A.R.Ibragimova, Y.R.Ablakova, E.Kh.Kazakova, Sh.K.Latypov, A.I.Konovalov. *J. Phys. Chem. C*, **113**, 6182 (2009)
50. A.V.Kozlov, V.E.Semenov, A.S.Mikhailov, V.S.Reznik, Sh.K.Latypov. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 6674 (2008)
51. L.Galiullina, A.Nikolaev, V.Semenov, V.Reznik, Sh.Latypov. *Tetrahedron*, **62**, 7021 (2006)
52. Н.М.Селиванова, О.И.Гнездилов, А.Б.Конов, Ю.Ф.Зуев, Ю.Г.Галяметдинов. *Изв. АН. Сер. хим.*, 495 (2008)
53. Ю.Ф.Зуев, Р.Х.Курбанов, Б.З.Идиятуллин, О.Г.Усъяров. *Коллоид. журн.*, **69**, 482 (2007)
54. M.B.M.De Azevedo, J.B.Alderete, A.C.S.Lino, W.Loh, A.Faltoni-Alario, N.Duran. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **37**, 67 (2000)
55. Sh.K.Latypov, A.V.Kozlov, E.Hey-Hawkins, A.S.Balueva, A.A.Karasik, O.G.Sinyashin. *J. Phys. Chem. A*, **114**, 2588 (2010)
56. A.C.S.Lino, W.Loh. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **36**, 267 (2000)
57. S.V.Kharlamov, A.Y.Ziganshina, A.V.Aganov, A.I.Konovalov, Sh.K.Latypov. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.*, **58**, 389 (2007)
58. A.Yu.Ziganshina, S.V.Kharlamov, E.Kh.Kazakova, Sh.K.Latypov, A.I.Konovalov. *Mendeleev Commun.*, 145 (2007)
59. A.Gonzalez-Alvarez, I.Alfonso, P.Diaz, E.Garcia-Espana, V.Gotor-Fernandez, V.Gotor. *J. Org. Chem.*, **73**, 374 (2008)
60. D.E.Korshin, R.R.Kashapov, L.I.Murtazina, R.K.Mukhitova, S.V.Kharlamov, Sh.K.Latypov, I.S.Ryzhkina, A.Y.Ziganshina, A.I.Konovalov. *New J. Chem.*, **33**, 2397 (2009)
61. T.Pierro, C.Gaeta, F.Troisi, P.Neri. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 350 (2009)
62. S.V.Kharlamov, A.Y.Ziganshina, R.K.Mukhitova, Sh.K.Latypov, A.I.Konovalov. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 2566 (2008)
63. T.S.Derrick, L.H.Lucas, J.-L.Dimicoli, C.K.Larive. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, S98 (2002)
64. I.P.Beletskaya, V.P.Ananikov. *Eur. J. Org. Chem.*, 3431 (2007)
65. В.П.Анаников, И.П.Белецкая. *Рос. нанотехнол.*, **4**, 56 (2009)
66. В.П.Анаников, И.П.Белецкая. *Изв. АН. Сер. хим.*, 740 (2008)
67. I.Åslund, D.Topgaard. *J. Magn. Reson.*, **201**, 250 (2009)
68. E.D.Rodrigues, D.B.Silva, D.C.R.Oliveira, G.V.J.Silva. *Magn. Reson. Chem.*, **47**, 1095 (2009)
69. S.Trefi, V.Gilard, St.Balayssac, M.Malet-Martino, R.Martino. *Magn. Reson. Chem.*, **47**, S163 (2009)
70. P.Occhipinti, P.C.Griffiths. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1570 (2008)
71. R.Marega, V.Aroulmoji, F.Dinon, L.Vaccari, S.Giordani, A.Bianco, E.Murano, M.Prato. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9086 (2009)
72. W.E.Maas, F.H.Laukien, D.G.Cory. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 13085 (1996)
73. J.Chin, A.Chen, M.J.Shapiro. *Magn. Reson. Chem.*, **38**, 782 (2000)
74. B.Sitter, T.F.Bathen, M.-B.Tessem, I.S.Gribbestad. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **54**, 239 (2009)
75. O.M.Rooney, J.Troke, J.K.Nicholson, J.L.Griffin. *Magn. Reson. Med.*, **50**, 925 (2003)
76. P.Weybright, K.Millis, N.Campbell, D.G.Cory, S.Singer. *Magn. Reson. Med.*, **39**, 337 (1998)
77. Y.Perez, H.Lahrech, M.E.Cabanas, R.Barnadas, M.Sabes, C.Remy, C.Arús. *Cancer Res.*, **62**, 5672 (2002)
78. H.C.Gaede, K.Gawrisch. *Biophys. J.*, **85**, 1734 (2003)
79. O.Wattraint, C.Sarazin. *Biochim. Biophys. Acta: Biomembr.*, **1713**, 65 (2005)
80. H.C.Gaede, K.Gawrisch. *Magn. Reson. Chem.*, **42**, 115 (2004)
81. E.E.Romanova, F.Grinberg, A.Pampel, J.Kärger, D.Freude. *J. Magn. Reson.*, **196**, 110 (2009)
82. L.Shintu, S.Caldarelli. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4148 (2006)
83. E.L.Hahn. *Phys. Rev.*, **80**, 580 (1950)
84. А.И.Маклаков, В.Д.Скирда, Н.Ф.Фаткуллин. *Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров*. Изд-во Казан. ун-та, Казань, 1987
85. A.R.Mutina, V.D.Skirda. *J. Magn. Reson.*, **188**, 122 (2007)
86. T.L.James, G.G.McDonald. *J. Magn. Reson.*, **11**, 58 (1973)
87. P.Stilbs, M.E.Moseley, B.Lindman. *J. Magn. Reson.*, **40**, 401 (1980)
88. B.Lindman, P.Stilbs, M.E.Moseley. *J. Colloid Interf. Sci.*, **83**, 569 (1981)
89. P.Stilbs. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **19**, 1 (1987)
90. T.Parella. *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 467 (1998)
91. M.Holz, X.Mao, D.Seiferling, A.Sacco. *J. Chem. Phys.*, **104**, 669 (1996)
92. E.J.Cabrita, St.Berger. *Magn. Reson. Chem.*, **39**, 142 (2001)
93. L.Ya.Zakharova, V.E.Semenov, M.A.Voronin, F.G.Valeeva, A.R.Ibragimova, R.Kh.Giniyatullin, A.V.Chernova, S.V.Kharlamov, L.A.Kudryavtseva, Sh.K.Latypov, V.S.Reznik, A.I.Konovalov. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 14152 (2007)
94. A.J.Simpson. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, S72 (2002)
95. K.Chari, B.Antalek, J.Minter. *Phys. Rev. Lett.*, **74**, 3624 (1995)
96. S.J.Doran, M.Decorps. *J. Magn. Reson. A*, **117**, 311 (1995)
97. N.M.Loening, J.Keeler, G.A.Morris. *J. Magn. Reson.*, **153**, 103 (2001)
98. M.D.Pelta, G.A.Morris, M.J.Stchedroff, St.J.Hammond. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, S147 (2002)
99. M.J.Thrippleton, N.M.Loening, J.Keeler. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 441 (2003)
100. Y.Shrot, L.Frydman. *J. Magn. Reson.*, **195**, 226 (2008)
101. R.J.Ordidge, I.D.Cresshull. *J. Magn. Reson.*, **69**, 151 (1986)
102. G.A.Morris. *J. Magn. Reson.*, **80**, 547 (1988)
103. P.Damberg, J.Jarvet, A.Graslund. *J. Magn. Reson.*, **148**, 343 (2001)
104. J.J.V.Vaals, A.H.Bergman. *J. Magn. Reson.*, **90**, 52 (1990)
105. M.A.Morich, D.A.Lampman, W.R.Dannels, F.T.D.Goldie. *IEEE Trans. Med. Imag.*, **7**, 247 (1988)
106. P.D.Majors, J.L.Blackley, S.A.Altobelli, A.Caprihan, E.Fukushima. *J. Magn. Reson.*, **87**, 548 (1990)
107. P.Jehenson, M.Westphal, N.Schuff. *J. Magn. Reson.*, **90**, 264 (1990)
108. J.Jehenson, A.Syrota. *Magn. Reson. Med.*, **12**, 253 (1989)
109. S.Crozier, F.A.Beckey, C.D.Eccles, J.Field, D.M.Doddrell. *J. Magn. Reson. B*, **103**, 115 (1994)
110. W.S.Price, P.W.Kuchel. *J. Magn. Reson.*, **94**, 133 (1991)
111. S.J.Gibbs, C.S.Johnson. *J. Magn. Reson.*, **93**, 395 (1991)
112. D.Wu, A.Chen, C.S.Johnson. *J. Magn. Reson. A*, **115**, 260 (1995)

113. M.D.Pelta, H.Barjat, G.A.Morris, A.L.Davis, St.J.Hammond. *Magn. Reson. Chem.*, **36**, 706 (1998)
114. G.Wider, V.Dotsch, K.Wuthrich. *J. Magn. Reson. A*, **108**, 255 (1994)
115. H.Hu, A.J.Shaka. *J. Magn. Reson.*, **136**, 54 (1999)
116. G.A.Morris. In *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*. (Eds D.M.Grant, R.K.Harris). Wiley, Chichester, 2002. P. 35
117. P.Hodge, P.Monvisade, G.A.Morris, I.Preece. *Chem. Commun.*, 239 (2001)
118. B.Håkansson, B.Jönsson, P.Linse, O.Söderman. *J. Magn. Reson.*, **124**, 343 (1997)
119. M.A.Connell, P.J.Bowyer, P.A.Bone, A.L.Davis, A.G.Swanson, M.Nilsson, G.A.Morris. *J. Magn. Reson.*, **198**, 121 (2009)
120. M.Holz, H.Weingartner. *J. Magn. Reson.*, **92**, 115 (1991)
121. J.S.Murday, R.M.Cotts. *Z. Naturforsch. A*, **26**, 85 (1971)
122. A.F.Collings, R.Mills. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **66**, 2761 (1970)
123. H.Weingartner. *Z. Phys. Chem.*, **132**, 129 (1982)
124. R.Mills. *J. Phys. Chem.*, **77**, 685 (1973)
125. M.Holz, R.Haselmeier, R.K.Mazitov, H.Weingartner. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 801 (1994)
126. R.Mills, V.V.M.Lobo. *Self-diffusion in Electrolyte Solutions*. Elsevier, Amsterdam, 1989
127. N.N.Yadav, A.M.Torres, W.S.Price. *J. Magn. Reson.*, **194**, 25 (2008)
128. F.D.Doty, G.Entzminger, Y.A.Yang. *Conc. Magn. Reson.*, **10**, 133 (1998)
129. H.Kato, T.Saito, M.Nabeshima, K.Shimada, S.Kinugasa. *J. Magn. Reson.*, **180**, 266 (2006)
130. M.L.Tillett, L.Y.Lian, T.J.Norwood. *J. Magn. Reson.*, **133**, 379 (1998)
131. S.M.Zhang. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 4974 (2006)
132. S.M.Zhang. *Chem. Phys. Chem.*, **8**, 635 (2007)
133. С.В.Харламов. Дис. канд. хим. наук. ИОФХ КазНЦ РАН, Казань, 2008
134. St.Viel, F.Ziarelli, G.Pages, C.Carrara, St.Caldarelli. *J. Magn. Reson.*, **190**, 113 (2008)
135. K.Hayamizu, W.S.Price. *J. Magn. Reson.*, **167**, 328 (2004)
136. И.В.Коптюг, Р.З.Сагдеев. *Успехи химии*, **71**, 672 (2002)
137. W.J.Goux, L.A.Verkruse, S.J.Salter. *J. Magn. Reson.*, **88**, 609 (1990)
138. X.-A.Mau, O.Kohlmann. *J. Magn. Reson.*, **150**, 35 (2001)
139. M.Nilsson, G.A.Morris. *J. Magn. Reson.*, **177**, 203 (2005)
140. K.I.Momot, Ph.W.Kuchel. *J. Magn. Reson.*, **174**, 229 (2005)
141. Я.И.Френкель. *Кинетическая теория жидкостей*. Изд-во АН СССР, Москва, 1945
142. E.Martinez-Viviente, P.S.Pregosin. *Helv. Chim. Acta*, **86**, 2364 (2003)
143. A.Jerschow, N.Muller. *J. Magn. Reson.*, **125**, 372 (1997)
144. A.Jerschow, N.Muller. *J. Magn. Reson.*, **132**, 13 (1998)
145. G.H.Sørland, J.G.Seland, J.Krane, H.K.Anthonsen. *J. Magn. Reson.*, **142**, 323 (2000)
146. A.Pampel, M.Fernandez, D.Freude, J.Kärger. *Chem. Phys. Lett.*, **407**, 53 (2005)
147. J.E.Tanner. *J. Chem. Phys.*, **52**, 2523 (1970)
148. H.Zhang, R.Kerssebaum, R.M.Gschwind. *Magn. Reson. Chem.*, **47**, 568 (2009)
149. V.Y.Orekhov, D.M.Korzhnev, K.V.Pervushin, E.Hoffman, A.S.Arseniev. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **17**, 157 (1999)
150. W.-Y.Choy, F.A.A.Mulder, K.A.Crowhurst, D.R.Muhandiram, I.S.Millett, S.Doniach, J.D.Forman-Kay, L.E.Kay. *J. Mol. Biol.*, **316**, 101 (2002)
151. F.Ferrage, M.Zoonens, D.E.Warschawski, J.-L.Popot, G.Bodenhausen. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2541 (2003)
152. M.Carravetta, M.H.Levitt. *J. Chem. Phys.*, **122**, 214505 (2005)
153. S.Cavadini, J.Dittmer, S.Antonijevic, G.Bodenhausen. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15744 (2005)
154. L.J.C.Peschier, J.A.Bouwstra, J.Bleyser, H.E.Junginger, J.C.Leyte. *J. Magn. Reson. B*, **110**, 150 (1996)
155. S.V.Dvinskikh, I.Furó. *J. Magn. Reson.*, **146**, 283 (2000)
156. A.Chen, M.Shapiro. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5338 (1999)
157. M.Nilsson, M.A.Connell, A.L.Davis, G.A.Morris. *Anal. Chem.*, **78**, 3040 (2006)
158. А.Н.Колмогоров. *Успехи матем. наук*, **1**, 57 (1946)
159. P.R.Bevington. *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*. McGraw-Hill, New York, 1969
160. S.W.Provencher. *J. Chem. Phys.*, **64**, 2772 (1976)
161. S.W.Provencher. *Biophys. J.*, **16**, 27 (1976)
162. S.W.Provencher, R.H.Vogel. In *Numerical Treatment of Inverse Problems in Differential and Integral Equations*. (Eds P.Deuffhard, E.Hairer). Birkhauser, Boston, 1983. P. 304
163. Y.Zhu, R.B.Gregory. *Nucl. Instrum Methods. A*, **284**, 443 (1989)
164. K.F.Morris, C.S.Johnson Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4291 (1993)
165. R.S.Stock, W.H.Ray. *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.*, **23**, 1393 (1985)
166. J.Jakes. *Czech. J. Phys. B*, **38**, 1305 (1988)
167. K.F.Morris, C.S.Johnson Jr., T.C.Wong. *J. Phys. Chem.*, **98**, 603 (1994)
168. M.A.Delsuc, T.E.Malliavin. *Anal. Chem.*, **70**, 2146 (1998)
169. T.E.Malliavin, V.Louis, M.A.Delsuc. *J. Chim. Phys. Phys. Chim. Biol.*, **95**, 178 (1998)
170. M.Kubista. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **7**, 273 (1990)
171. D.Schulze, P.Stilbs. *J. Magn. Reson. A*, **105**, 54 (1993)
172. B.Antalek, W.Windig. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10331 (1996)
173. W.Windig, B.Antalek. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **37**, 241 (1997)
174. L.C.Van Gorkom, T.M.Hancewicz. *J. Magn. Reson.*, **130**, 125 (1998)
175. P.Stilbs, K.Paulsen, P.C.Griffiths. *J. Phys. Chem.*, **100**, 8180 (1996)
176. R.Huo, R.Weirens, J.V.Duynhoven, L.M.C.Buydens. *Anal. Chim. Acta*, **490**, 231 (2003)
177. R.Xue, Sh.Wang, H.Qi, Y.Song, Ch.Wang, F.Li. *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1444 (2008)
178. A.H.Daranas, J.J.Fernandez, E.Q.Morales, M.Norte, J.A.Gaven. *J. Med. Chem.*, **47**, 10 (2004)
179. H.Pei, M.W.Germann, S.A.Allison. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 9326 (2009)
180. M.Sharma, S.Yashonath. *J. Phys. Chem. B*, **110**, 17207 (2006)
181. A.Macchioni, G.Ciancaleoni, C.Zuccaccia, D.Zuccaccia. *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 479 (2008)
182. A.Gierer, K.Z.Wirtz. *Z. Naturforsch. A*, **8**, 522 (1953)
183. H.-C.Chen, S.-H.Chen. *J. Phys. Chem.*, **88**, 5118 (1984)
184. F.Perrin. *J. Phys. Radium.*, **7**, 1 (1936)
185. G.Li, J.X.Tang. *Phys. Rev. E*, **69**, 061921 (2004)
186. L.Allouche, A.Marquis, J.-M.Lehn. *Chem. – Eur. J.*, **12**, 7520 (2006)
187. P.Flory. *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, New York, 1978
188. A.Jerschow, N.Müller. *Macromolecules*, **31**, 6573 (1998)
189. B.Håkansson, M.Nyden, O.Söderman. *Colloid Polym. Sci.*, **278**, 399 (2000)
190. J.Danielsson, J.Jarvet, P.Damberg, A.Graslund. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, S89 (2002)
191. Sh.Yao, G.J.Howlett, R.S.Norton. *J. Biomol. NMR*, **16**, 109 (2000)
192. D.K.Wilkins, S.B.Grimshaw, V.Receveur, C.M.Dobson, J.A.Jones, L.J.Smith. *Biochemistry*, **38**, 16424 (1999)
193. I.V.Nesmelova, V.D.Skirda, V.D.Fedotov. *Biopolymers*, **63**, 132 (2002)
194. S.Auge, P.-O.Schmit, Ch.A.Crutchfield, M.T.Islam, D.J.Harris, E.Durand, M.Clemancey, A.-A.Quoineaud, J.-M.Lancelin, Y.Prigent, F.Taulelle, M.-A.Delsuc. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 1914 (2009)
195. St.Viel, D.Capitani, L.Mannina, A.Segre. *Biomacromolecules*, **4**, 1843 (2003)

196. P.Groves, M.O.Rasmussen, M.D.Molero, E.Samain, F.J.Canada, H.Driguez, J.Jimenez-Barbero. *Glycobiology*, **14**, 451 (2004)
197. K.S.Cameron, L.Fielding. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, S106 (2002)
198. P.Timmerman, J.-L.Weidmann, K.A.Jolliffe, L.J.Prins, D.N.Reinhoudt, S.Shinkai, L.Frish, Y.Cohen. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2077 (2000)
199. S.Floquet, S.Brun, J.-F.Lemonnier, M.Henry, M.-A.Delsuc, Y.Prigent, E.Cadot, F.Taulelle. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17254 (2009)
200. C.A.Crutchfield, D.J.Harris. *Magn. Reson. Chem.*, **45**, 463 (2007)
201. C.A.Crutchfield, D.J.Harris. *J. Magn. Reson.*, **185**, 179 (2007)
202. D.Li, G.Kagan, R.Hopson, P.G.Williard. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5627 (2009)
203. C.S.Johnson Jr. In *Advances in Magnetic Resonance. Vol. 1.* (Ed. J.S.Waugh). Academic Press, New York, 1965. P. 33.
204. S.W.England, L.Mayne. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 243 (1992)
205. C.S.Johnson Jr. *J. Magn. Reson. A*, **102**, 214 (1993)
206. C.T.H.Moonen, P.V.Gelderen, G.W.Vuister, P.C.M.V.Zijl. *J. Magn. Reson.*, **97**, 419 (1992)
207. G.Wagner, K.Wuthrich. *J. Mol. Biol.*, **160**, 343 (1982)
208. M.Delepierre, C.M.Dobson, M.Karplus, F.M.Poulsen, D.J.States, R.E.Wedin. *J. Mol. Biol.*, **197**, 111 (1987)
209. H.Roder, G.A.Elöve, S.W.England. *Nature (London)*, **335**, 700 (1988)
210. S.Grzesiek, A.Bax. *J. Biomol. NMR*, **3**, 627 (1993)
211. E.J.Cabrita, S.Berger, P.Brauer, J.Kärger. *J. Magn. Reson.*, **157**, 124 (2002)
212. A.Bockmann, E.Guittet. *FEBS Lett.*, **418**, 127 (1997)
213. E.J.Cabrita, St.Berger. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, S122 (2002)
214. P.Thureau, B.Ancian, St.Viel, A.Thevand. *Chem. Commun.*, 200 (2006)
215. T.Brand, E.J.Cabrita, G.A.Morris, R.Gunther, H.-J.Hofmann, St.Berger. *J. Magn. Reson.*, **187**, 97 (2007)
216. S.Leclerc, L.Guendouz, A.Retournard, D.Canet. *Conc. Magn. Reson., Part A*, **36**, 127 (2010)
217. K.S.Cameron, L.Fielding. *J. Org. Chem.*, **66**, 6891 (2001)
218. S.Simova, St.Berger. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.*, **53**, 163 (2005)
219. O.Mayzel, Y.Cohen. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1901 (1994)

MODERN DIFFUSION ORDERED NMR SPECTROSCOPY IN CHEMISTRY OF SUPRAMOLECULAR SYSTEMS: SCOPE AND LIMITATIONS

S.V.Kharlamov, Sh.K.Latypov

A.E.Arbusov Institute of Organic and Physical Chemistry

Kazan Research Centre of the Russian Academy of Sciences

8, Ul. Arbuzova, 420088 Kazan, Russian Federation, Fax +7(843)273–2253

The concept of diffusion ordered NMR spectroscopy (self-diffusion coefficients measurement in high resolution mode) is considered. The most important aspects in the interpretation of experimental data, the possibilities and limitations of the available theoretical and phenomenological models relating the self-diffusion coefficient to the molecular size or weight of the system are discussed.

Bibliography — 219 references.

Received 2nd March 2010