Создание спектрометра высокого разрешения на основе ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) является распространенным аналитическим методом, находящим применение во многих областях современной науки, медицины и промышленности. Трудно переоценить роль ЯМР в фундаментальной и прикладной химии, в которых исследование любых систем, от простейших органических молекул до сложнейших макромолекулярных ансамблей, таких как белки, нуклеиновые кислоты и их комплексы, практически всегда базируется на данных, полученных при помощи спектроскопии ЯМР.

ЯМР – самый мощный и информативный метод исследования молекул. Строго говоря, это не один метод, это большое число разнообразных типов экспериментов (определяемых импульсными последовательностями). Хотя все они основаны на явлении ЯМР, но каждый из этих экспериментов предназначен для получения какой-то конкретной специфической информации. Теоретически ЯМР может если не всё, то почти всё, что могут все остальные экспериментальные методы исследования структуры и динамики молекул, хотя практически это выполнимо далеко не всегда. Одно из основных достоинств ЯМР в том, что, с одной стороны, его природные зонды, т.е. магнитные ядра, распределены по всей молекуле, а с другой стороны, он позволяет отличить эти ядра друг от друга и получать пространственно-селективные данные о свойствах молекулы. Почти все остальные методы дают информацию либо усредненную по всей молекуле, либо только о какой-то одной ее части.

Основные преимущества использования методов ЯМР:

- Экспресс метод. Время проведения одного эксперимента методом ЯМР спектроскопии, составляет несколько минут (кроме тех случаев, когда количество исследуемых ядер в образце слишком мало и для усреднения шумов требуется большое время накопления: часы, сутки и даже недели).
- Информативный метод. Получаемый объем полезной информации больше, чем при проведении исследований другими методами.

- Высокоточный метод. Достоверность результатов полученных в результате обработки данных измерений на ЯМР спектрометре не уступает, а в большинстве случаев превосходит другие методы.
- Недеструктивный метод. Образец, в подавляющем большинстве экспериментов, не требует предварительной подготовки (дробления, нагревания, обработки хим. реактивами) достаточно поместить его в ампулу и далее в датчик прибора.
- Автоматизированный метод.
- Экологически чистый метод.

Краткая теория

ЯМР обусловлен взаимодействием ядерных магнитных моментов с магнитным полем.

Ядра, имеющие нулевой магнитный момент (нулевой результирующий спин) нельзя наблюдать методом ЯМР. Ядра некоторых изотопов химических элементов могут иметь магнитный момент, тогда как другие изотопы того же самого элемента могут не иметь магнитного момента. Все элементы периодической таблицы имеют магнитные изотопы, поэтому теоретически можно получить спектры ЯМР для всех имеющихся в исследуемом образце элементов.

Самые важные для ЯМР ядра – это протоны водорода ^{1}H. Их больше всего в природе, и они имеют очень высокую чувствительность. В химии и биологии чрезвычайно информативными являются ядра углерода, азота и кислорода, однако наиболее распространенные изотопы углерода ^{12}C и кислорода ^{16}O магнитного момента не имеют, у природного изотопа азота ^{14}N момент есть, но он для экспериментов очень неудобен (имеет квадрупольный момент и большую ширину линии). Но есть изотопы ^{13}C, ^{15}N и ^{17}O указанных элементов, которые подходят для ЯМР-экспериментов. Однако их природное содержание очень низкое, а относительная интенсивность наблюдения их методом ЯМР чрезвычайно мала по сравнению с протонами. Поэтому часто для

ЯМР-исследований готовят специальные изотопно-обогащенные образцы, в которых природный изотоп того или иного ядра замещен на тот, который нужен для экспериментов. Чаще всего эта процедура технологически сложная и дорогая, и применяется в тех случаях, когда она является единственной возможностью получить необходимую информацию.

Идеальными ядрами для количественного анализа являются ^{1}H, ^{19}F, ^{31}P. При исследовании строения молекул удобнее всего использовать ядра с полуцелым спином: ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{29}Si, ^{31}P, ^{119}Sn, ^{195}Pt, ^{199}Hg и др., причем подавляющее большинство спектров регистрируется на ядрах ^{1}H и ^{13}C. Из ядер, имеющих спин равный 1, заметное значение имеют ядра ^{2}H (в основном – из-за использования дейтерированных растворителей).

Для исследования образцов методом ЯМР в настоящее время используют не спектрометры с непрерывной разверткой радиочастоты или магнитного поля, а импульсные ЯМР-спектрометры с фурье-преобразованием, или фурье-спектрометрами ЯМР (далее ЯМР-спектрометры).

Частотный анализ ЯМР-сигнала (ССИ – спадом свободной индукции) при помощи фурье-преобразования дает спектр (зависимость поглощения излучения образцом от частоты) с шириной спектральной линии, определяемой однородностью магнитного поля и свойствами образца. Чем выше однородность постоянного магнитного поля, тем меньше ширина линии и тем выше разрешение спектрометра.

ЯМР-спектрометры высокого разрешения, имеющие малую относительную неоднородность постоянного магнитного поля, позволяют применять двумерную фурье-спектроскопию.

Двумерная фурье-спектроскопия ЯМР позволяет изучать сложные связанные подсистемы ядерных спинов, обычные одномерные спектры которых либо сложно интерпретировать из-за большого числа близко стоящих линий, либо вовсе не удается расшифровать из-за перекрытия линий. В итоге существует целый ряд ограничений для практического использования одномерной спектроскопии. Прежде всего они связаны с конечной величиной

спектральной разрешающей способности, вызванной как аппаратурными ограничениями (неоднородность магнитного и радиочастотного полей), так и физическими причинами (собственная ширина линий ЯМР, определяемая естественной шириной линии, обусловленной спонтанным излучением энергии ядром (вносит пренебрежимо малый вклад), а также шириной, обусловленной релаксацией). Уширение линий ЯМР и их перекрытие особенно существенны в молекулярных системах с ограниченной подвижностью молекул – это вязкие жидкости, гетерогенные и анизотропные среды. Также усложнение анализа спектров ЯМР может происходить в случае, если они содержат слишком много линий с близкими резонансными частотами. Это имеет место в ЯМР спектрах сложных молекул, таких, как полимеры, биологические молекулы и т.п. Их спектры настолько сложны и богаты линиями, что множество линий сливаются в одну или небольшое число широких линий. Помимо всего большую трудность для анализа представляют спектры водных растворов протон содержащих веществ, так как их спектр маскируется спадами очень интенсивной резонансной линии воды.

Несмотря на то, что существует теория, позволяющая учесть различия в магнитном экранировании ядер в разных положениях в молекуле и скалярные спин-спиновые взаимодействия между ними, а также ряд методов, позволяющих подавить некоторые взаимодействия, приводящие к появлению чрезмерно большого числа линий, в полной мере их преимущества при исследовании сложных молекул могут быть раскрыты только при использовании двумерной фурье-спектроскопии ЯМР, позволяющей:

- разделять химические сдвиги (электронное экранирование) и скалярные взаимодействия (непрямые спин-спиновые взаимодействия, или *J*-взаимодействия) – *J*-разрешенная двумерная спектроскопия;
- идентифицировать группы ядер, связанных между собой какими-нибудь взаимодействиями – корреляционная двумерная спектроскопия (гомоядерная и гетероядерная);

- изучать когерентность состояний, связанных между собой запрещенными многоквантовыми переходами – многоквантовая спектроскопия.

В гомоядерных межсвязных корреляционных методах перенос намагниченности происходит между ядрами одного вида через т.н. “константу соединения” (*J*-coupling) ядер, соединенных друг с другом несколькими связями.

Гетероядерная корреляционная спектроскопия дает сигналы, основанные на соединении между двумя ядрами двух разных видов (например, можно отдельно смотреть связи C-H).

В итоге можно сказать, что двумерная фурье-спектроскопия ЯМР является в высшей степени информативным методом, позволяющим детально изучить молекулярную структуру, вплоть до определения межъядерных расстояний и углов между химическими связями. Кроме того, она представляет собой инструмент для исследования динамических эффектов, таких как химический и спиновый обмены, внутреннее молекулярное движение. Это стало возможным благодаря тому, что была установлена зависимость резонансной частоты от химического окружения ядра в молекуле (химический сдвиг), а также от присутствия других ядер (сверхтонкая структура спектра).

ЯМР-спектрометр МСА-1-150-100-II-МС60

ЯМР-спектрометр МСА-1-150-100-II-МС60 (серия «ВариоСпин») является последним поколением разработанного в ПАО “Техприбор” прибора данного класса, который позволяет эффективно реализовать методы двумерной фурье-спектроскопии ядерного магнитного резонанса. В ранее разработанном ЯМР-спектрометре МСА-1-150-50-МС20, имеющем магнитную систему с величиной поля 20 МГц (0.5 Тл) с относительной однородностью поля 2×10^{-5} были реализованы только методы одномерной фурье-спектроскопии ЯМР.

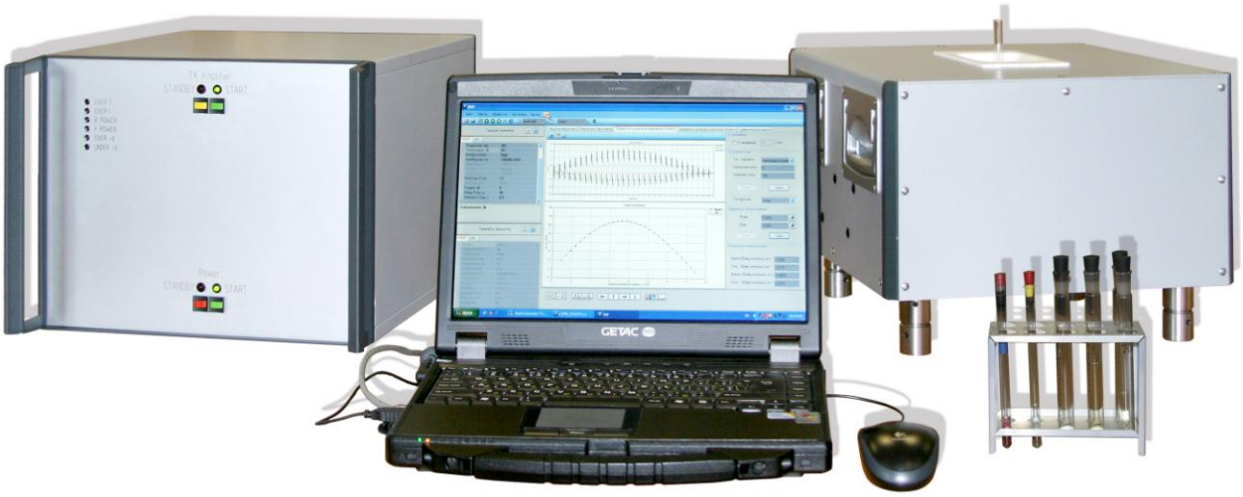

Рис. 1. ЯМР-спектрометр МСА-1-150-100-II-МС60

ЯМР-спектрометр МСА-1-150-100-II-МС60 («ВариоСпин») состоит из магнитной системы с высокой однородностью поля на основе постоянных магнитов, спектроанализатора с предусилителем и двумя усилителями мощности, персонального компьютера, специализированного программно-математического обеспечения и имеет следующие характеристики:

<u>Характеристики магнитной системы (МС60):</u>

Тип магнитной системы…….…..…. на постоянных магнитах

Резонансная частота…….. 60 МГц (1,4 Тл)

Относительная неоднородность поля

- без корректирующих катушек……....……..…….…. не хуже 10^{-6}
- с корректирующими катушками……..…….…. не хуже 5×10^{-8}

Наблюдаемые ядра…… ^{1}H (60,0 МГц), ^{2}H (9,21 МГц), ^{7}Li (23,3 МГц), ^{11}B (19,3 МГц), ^{13}C (15,1 МГц), ^{15}N (6,08 МГц), ^{19}F (56,5 МГц), ^{31}P (24,3 МГц)

Двойное возбуждение…… ^{1}H/^{13}C, ^{1}H/^{31}P, ^{1}H/^{19}F, ^{1}H/^{11}B, ^{19}F/^{7}Li

Разрешение на уровне 50%, Гц…… не более 1

Режимы стабилизации поля (LOCK)….. автоматическая по сигналу и по ^{2}H

Возможность термостабилизации образца

Максимальные размеры образца (диаметр × длина)…….. 10 × 40 мм

Характеристики спектроанализатора (МСА-1-150-100-II):

2 независимых ЯМР-канала, работающих от одного высокостабильного генератора частоты (кратковременная нестабильность – не хуже 1×10^{-10}, долговременная нестабильность – не хуже 1×10^{-9}).

Один ЯМР-канал используется как основной для ЯМР-спектроскопии исследуемого образца, а другой – как LOCK-канал для стабилизации поля магнитной системы.

Радиопередающий тракт основного канала:

- 2 канала с частотным диапазоном по ВЧ……. 1-150 МГц
- Шаг изменения частоты РЧ импульсов……. не более 0,037 Гц
- Диапазон изменения фазы РЧ импульсов……..... не менее 0-360°
- Шаг изменения фазы РЧ импульсов…….. не более 0,025°
- Шаг изменения длительности импульса……. не более 10 нс
- Мощность передатчика (2 шт.)…….. не менее 100 Вт

Приемный тракт основного канала:

Предусилитель:

- Время восстановления
  после воздействия сигнала 20 В……... не более 8 мкс
- Коэффициент усиления…… не менее 35 дБ
- Коэффициент шума…….. не более 1,1 дБ
- Диапазон рабочих частот……... не менее 1-200 МГц

Приемник:

- Максимальная полоса приемника по ПЧ…..…….. не менее 6,0 МГц
- Разрешение…….. не менее 16 бит на 100 МГц
- Регулируемая полоса пропускания фильтра…… от 1 кГц до 6 МГц
- Наличие дополнительного входа для подключения системы
  настройки частоты согласования ЯМР датчика.
- Интерфейс связи с компьютером – Ethernet.

Характеристики усилителя мощности (УМРЧ-50-100-100):

- Полоса частот усиления мощности…….……. 50-100 МГц
- Выходная мощность в импульсном режиме при уровне входного сигнала +8 дБм (1.598Вр-р)……..… не менее 100 Вт (на нагрузке 50 Ом, импульс 10 мс, скважность 100)
- Максимальная длительность ВЧ импульса….……..... не менее 200 мс (на нагрузке 50 Ом, на мощности 50 Вт, скважность 100)
- Неравномерность коэффициента усиления во всей полосе частот……...… не более ± 2 дБ
- Неравномерность коэффициента усиления в полосе частот ± 500 кГц…….… не более ± 0.1 дБ
- Фазовая неравномерность на линейном участке выходной характеристики……..… не более ± 5 ^{0} (диапазон вх. сигнала -40 дБм – 0 дБм, на частотах 60 и 90 МГц)
- Входное / выходное сопротивление всей полосе частот…...….. 50 Ом
- КСВН по входу во всей полосе частот…… не более 1.5
- Длительность переходного процесса ВЧ импульса
  Время включения…….…… не более 250 нс
  Время выключения…….…… не более 200 нс

Конструктивные характеристики:

Габариты по длине, глубине и высоте:

- магнитная система…….....не более 350×300×230 мм
- спектроанализатор.....не более 340×380×270 мм

Условия эксплуатации:

Рабочая температура окружающей среды.....плюс 10 – плюс 40°С

Температура хранения.....0 – плюс 70°С

Влажность.....до 80 % при 25°С

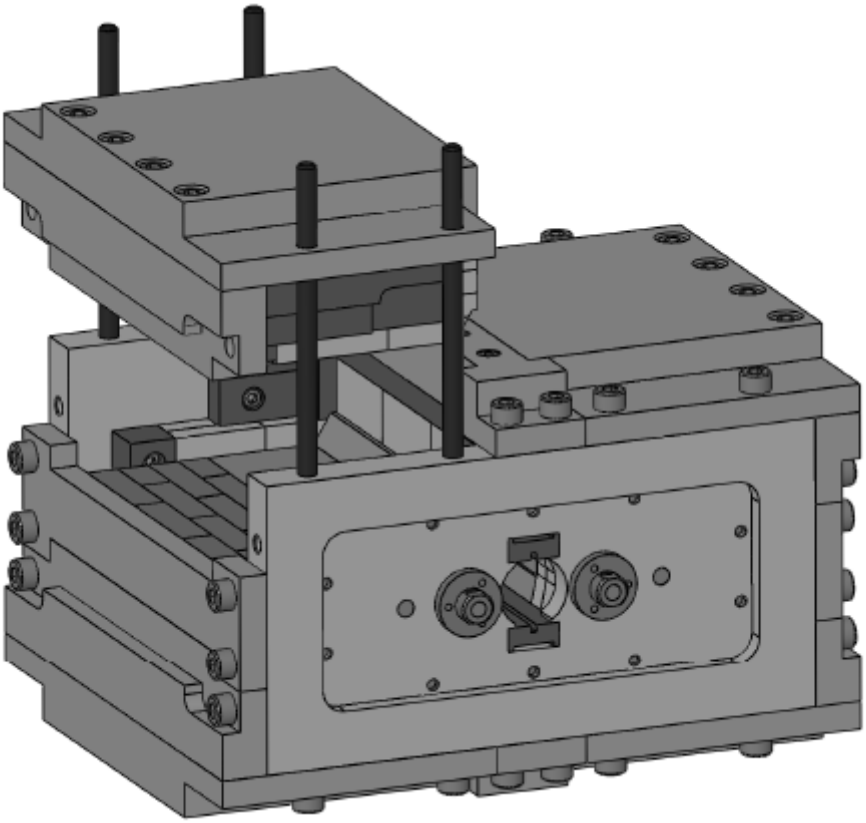

Рис. 2. 3D – сборка магнитной системы
(установка последнего магнитного блока)

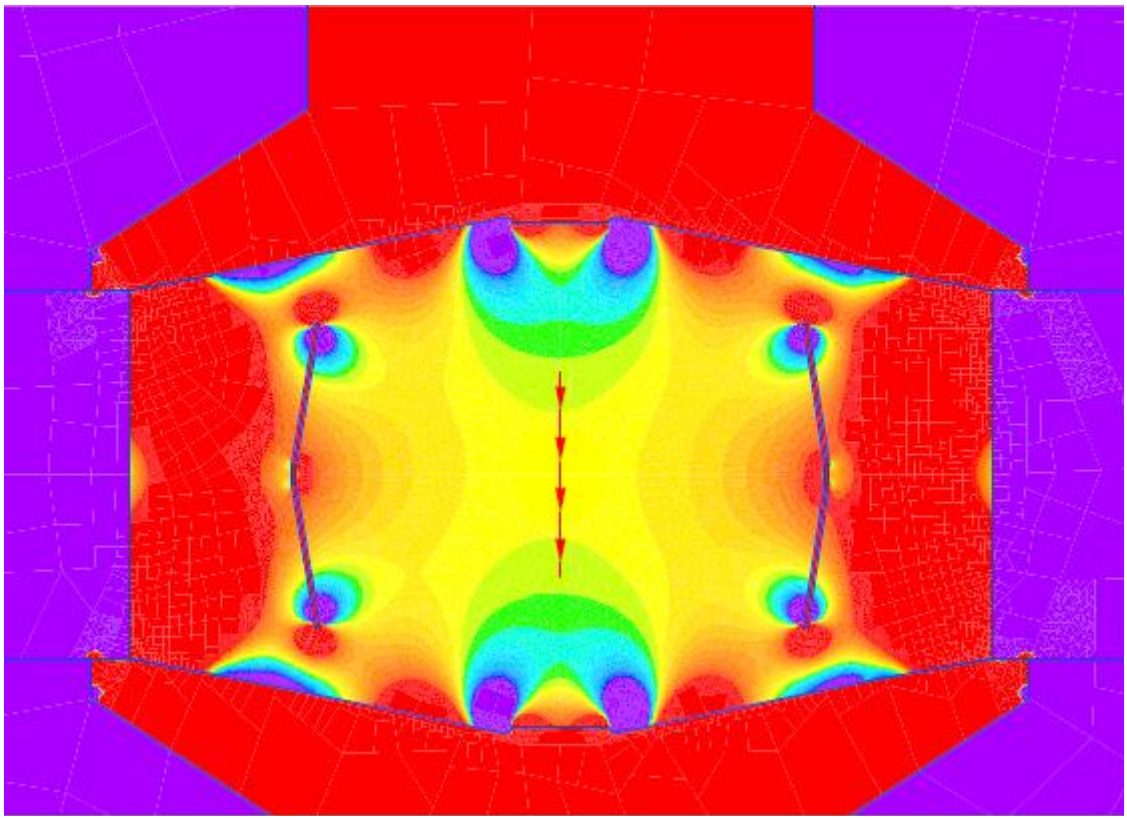

Рис. 3. Картина распределения поля между полюсными наконечниками магнитной системы

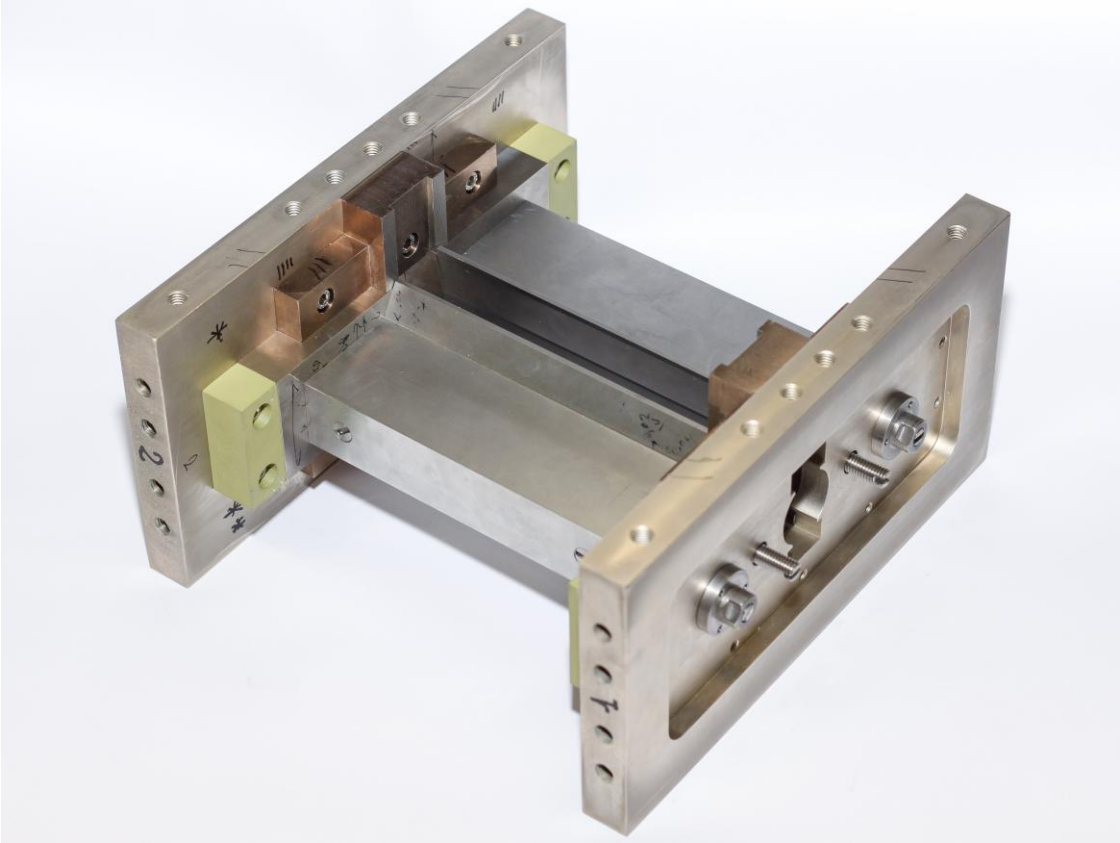

Рис. 4. Магнитная система без магнитных элементов

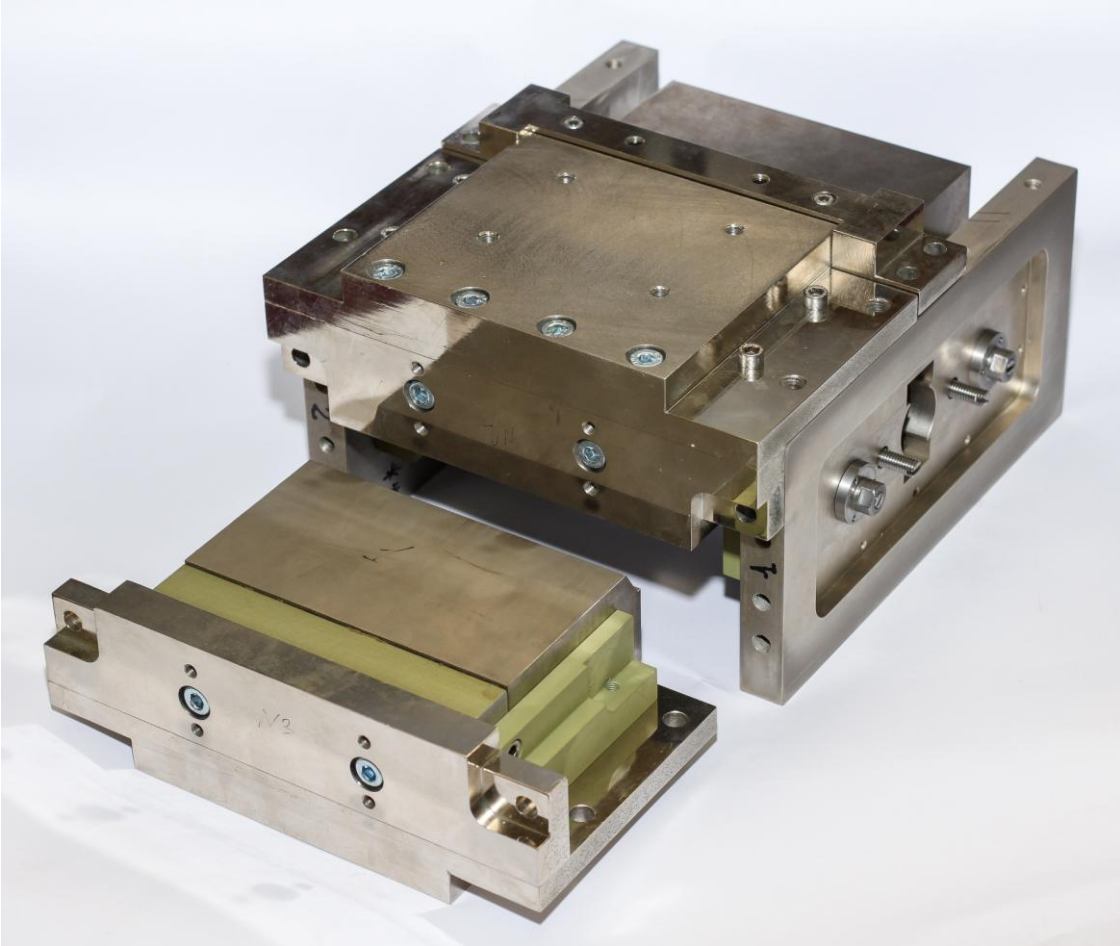

Рис. 5. Магнитная система с магнитными элементами в процессе сборки

Магнитная система при малых габаритах имеет высокое значение магнитной индукции (1.4 Тл) и чрезвычайно низкую величину относительной неоднородности магнитного поля в районе образца. При этом обеспечивается возможность работы с длинными образцами – до 40 мм и образцами диаметром до 10 мм. Это обеспечивается не только уникальностью геометрии магнитной системы, но и технологией ее изготовления: основные элементы магнитной системы имеют допуски изготовления не более 1-2 мкм.

ЯМР-спектрометр МСА-1-150-100-II-МС60 (серия «ВариоСпин») благодаря магнитной системе с высокой однородностью постоянного магнитного поля и современному спектроанализатору реализует следующие методы двумерной спектроскопии:

- *J*-разрешенную двумерную спектроскопию;
- методы корреляционной двумерной спектроскопии: гомоядерные (COSY и TOCSY) и гетероядерные (HETCOR).

Благодаря использованию магнитной системе на основе постоянных магнитов не требуется производить периодическую дорогостоящую процедуру заправки магнитной системы гелием и азотом, которые используются для охлаждения электромагнитов на основе сверхпроводимости.

Сравнительная таблица с зарубежными аналогами:

Характеристика	**FOURIER 60** **ф. Bruker (Германия)**	**NMReady-60Pro** **ф. Nanalysis**	**Magritek** **ф. Magritek** **(Новая Зеландия, Германия)**	**МСА-1-150-100-II-МС60** **(серия «ВариоСпин»)** **(Россия)**
Частота протонного резонанса (МГц)	60 (1.4Тл)	60 (1.4Тл)	60 (1.4Тл); 80 (1.9Тл)	60 (1.4Тл)
Разрешение (Гц) На уровне 50%	< 2 (< 1)	< 1	0.5	< 1
Чувствительность (отношение сигнал/шум)	(10% этилбензол) > 500:1	(1% этилбензол) > 100:1	(1% этилбензол) 60MHz > 180:1 ^{1}H, > 120:1 (2D) 80MHz > 200:1 для двуядерного датчика (2D)	(1% этилбензол) > 100:1
Диаметр образца, мм	5	5	5	5 до 10 (однородность поля с корректирующими катушками не хуже 8×10^{-7})
Наблюдаемые ядра	^{1}H, ^{13}C, ^{19}F	^{1}H, ^{7}Li, ^{11}B, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P	^{1}H, ^{7}Li, ^{11}B, ^{13}C, ^{15}N, ^{23}Na, ^{29}Si, ^{31}P	^{1}H, ^{2}H, ^{7}Li, ^{11}B, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P
Размерность экспериментов (варианты экспериментов)	1D, 2D	1D, 2D (T1, T2, COSY, J-Res, HSQC)	1D, 2D (T1, T2, COSY, J-Res, TOCSY; HSQC, HSQC-ME, HMQC, HMBC, HETCOR)	1D, 2D (T1, T2, COSY, J-Res, TOCSY; HETCOR)
Система стабилизации поля	Автоматическая по сигналу, дейтериевая внутренняя внешняя	Дейтериевая и не дейтериевая	Автоматическая по сигналу	Автоматическая по сигналу и по дейтерию

Температурная стабилизация образца	Да			Да
Компоновка прибора	Один блок + ПК	Один блок со встроенным ПК	Один блок + ПК	Два блока (спектроанализатор с усилителем мощности и магнитная система) + ПК
Масса прибора	145 кг	25 кг	60 кг (60 МГц) 72,5 кг (80 МГц)	60 кг
Температура окружающей среды	18 - 28 ^{o}C (±2 ^{o}C)	18 - 26 ^{o}C	20 - 25 ^{o}C (±2 ^{o}C)	10 - 40 ^{o}C (±2 ^{o}C)

По основным техническим характеристикам ЯМР-спектрометр МСА-1-150-100-II-МС60 не имеет российских аналогов и не уступает лучшим зарубежным аналогам.

Преимущества перед конкурентами:

- возможность формирования оператором произвольных импульсных последовательностей;
- больший размер образца;
- более низкая стоимость.

Краткая история разработки

В 2010 г. на базе ОАО “Техприбор” был разработан первый одноканальный ЯМР-спектроанализатор МСА-1-150-50 (серия «ВариоСпин»).

В 2011 г. на базе ОАО “Техприбор” для предварительного усиления сигнала свободной индукции был разработан малошумящий предусилитель с быстрым временем восстановления для замены дорогостоящих специализированных предусилителей для ЯМР ф. Mitec (США). Характеристики разработанного предусилителя не уступают зарубежному аналогу.

В 2011 г. на базе ОАО “Техприбор” был разработан первый ЯМР-спектрометр низкого разрешения на постоянных магнитах МСА-1-150-50-МС20 (серия «ВариоСпин») с относительной неоднородностью магнитного поля не более 10^{-4}.

В октябре 2011 г. с целью проведения научных исследований Санкт-Петербургский университет (СПбГУ) приобрел у ОАО “Техприбор” ЯМР-спектроанализатор МСА-1-150-50 (серия «ВариоСпин») для импульсного ЯМР-спектрометра SXP4-100 ф. Bruker.

В сентябре 2013 г. с целью проведения научных исследований, а также для обучения студентов СПбГУ приобрел у ОАО “Техприбор” второй ЯМР-спектроанализатор МСА-1-150-50 (серия «ВариоСпин») для импульсного ЯМР-спектрометра SXP4-100 ф. Bruker.

В конце 2013 г. ОАО “Техприбор” приступил к созданию ЯМР-спектрометра высокого разрешения на постоянных магнитах МСА-1-150-50-МС60 (серия «ВариоСпин») с относительной неоднородностью магнитного поля не более 10^{-6}.

В 2014 г. был произведен расчет магнитной системы ЯМР-спектрометра высокого разрешения.

В 2015 была разработана конструкция магнитной системы ЯМР-спектрометра высокого разрешения.

В период с 2015-2016 г.г. на ПАО “Техприбор” были изготовлены все немагнитные детали магнитной системы. Точность изготовления ряда деталей составляет 0.002-0.003 мм.

В феврале 2016 г. ПАО “Техприбор” заключило договор на разработку устройства определения дейтерия в биологическом образце. В августе 2016 г. устройство было разработано и в настоящий момент проходит исследовательские испытания на медицинском томографе.

В 2017 г. на базе ОАО “Техприбор” был разработан новый двухканальный ЯМР-спектроанализатор МСА-1-150-100-II (серия «ВариоСпин») с возможностью одновременной работы основного и LOCK каналов, новый усилитель мощности УМРЧ-150-100-100, а также была собрана и испытана магнитная система МС-60 для ЯМР-спектрометра высокого разрешения МСА-1-150-100-II-МС60 (серия «ВариоСпин»).

Заключение

Результаты проведенных работ позволяют создать отечественное конкурентоспособное производство научного и промышленного диагностического высокотехнологичного оборудования, развить импортозамещающее производство, создать новые рабочие места, повысить экспортный потенциал и удовлетворить потребности различных отраслей промышленности.

ЯМР-спектрометр МСА-1-150-100-II-МС60 (серия «ВариоСпин») благодаря магнитной системе с высокой однородностью поля на основе постоянных магнитов и спектроанализатору, позволяющему осуществлять гомоядерные и гетероядерные возбуждения и реализующему различные методы двумерной спектроскопии, является высокоточным, безопасным, компактным, недорогим и простым в использовании прибором, который может эффективно использоваться в следующих областях:

- обучение и научные исследования;

- контроль качества лекарственных препаратов как в процессе их производства, так и качества готовой продукции (область применения – медицина, фармакология);
- идентификация органических соединений, определение молекулярной структуры, анализ сложных смесей, исследование механизмов реакций (область применения – органическая химия);
- определение геометрии молекул белков и субстрат-ферментных комплексов в растворах, исследование биологических жидкостей (область применения – биология);
- анализ проб сырой нефти (область применения – нефтяная и газовая промышленность);
- определение содержания жира (SFC, TFC), жира и влаги в шоколаде и какао-бобах, сухом молоке, сыре и других пищевых продуктах (область применения – пищевая промышленность);
- определение влажности семян (область применения – сельскохозяйственная промышленность);
- и др.

Использование ЯМР-спектрометра МСА-1-150-100-II-МС60 (серия «ВариоСпин») со специализированным программным обеспечением в системах АСУТП и промышленных лабораториях имеет следующие преимущества:

- экономия рабочего времени затраченного на измерения;
- получение большого объема информации;
- уверенность в полученных данных;
- использование метода, в котором, нет необходимости в специальной подготовке образца;
- измерения, при проведении которых полностью исключается зависимость результата от индивидуальных особенностей оператора;
- измерения, при проведении которых, не требуется высокой квалификации персонала;

- использование на производстве передового и современного научного метода;
- сертифицированные измерения, проводимые по ГОСТ;
- использование не затратного метода. ЯМР спектрометр не требует дополнительных расходных материалов;
- использование компактного, не загромождающего помещение прибора;
- использование абсолютно безвредного, как для оператора, так и для окружающей среды метода.

Спектроанализатор МСА-1-150-100-II (серия «ВариоСпин») с предусилителем и усилителем(ями) мощности УМРЧ-50-100-100, входящий в состав ЯМР-спектрометра, может поставляться отдельно для использования с магнитными системами стороннего производителя, в том числе в случае замены устаревшей электроники при капитальном ремонте имеющихся ЯМР-спектрометров.