



质子NMR波谱的¹³C卫星峰

通过分析质子波谱中的¹³C卫星峰,我们能够采取一些有趣的实验策略。在本应用说明中,我们提供了一些示例,来说明我们可以从¹³C卫星峰中获得大量 信息。

典型的高分辨率NMR波谱仪(例如:AvanceCore)可以直接记录 碳谱,这些碳谱在大约0-200ppm的范围内具有高分散度。此外, 样品中的¹³C核也会影响质子波谱,并表现为"¹³C卫星峰"。¹³C卫 星峰可以在含碳基团(例如:CH、CH₂和CH₃基团)的氢信号的左 侧和右侧观察到。

分析¹³C卫星峰为我们带来了获得"碳信息"的可能性,它与¹H核 的高灵敏度相结合,使得我们可以采取一些有趣的实验策略。本 应用说明概述了其中的部分策略。

¹³C 卫星峰用于快速分类¹H信号

NMR是化学领域的一种主流分析方法,这主要是因为它易于使用,还因为它可以提供丰富的结构和定量信息。例如,¹H NMR谱可以用来归属分子结构。这在之前的应用说明中《如何在15分钟内看懂并理解NMR波谱》简要介绍过。在研究有机分子时,我们甚至可以通过分析是否存在¹³C卫星峰,来快速获取有机分子的大致情况。假设我们有足够高的信噪比(S/N),碳卫星峰就可以标记与碳原子结合的氢原子。其他信号(例如:来自未与碳核结合的残余水、羟基或胺基等)则没有¹³C卫星峰。例如,异丙醇这种小有机分子的1H谱就包含两个伴有卫星峰的信号(来自CH₃和CH基团),而羟基信号则与残余水的信号重叠,没有卫星峰(见图1B)。



图1: D₂0中异丙醇的¹H NMR谱。A: 概览 B: 放大了¹³C卫星峰的强度(通过16次扫描获得)。在1.1ppm和3.9ppm的中心信号周围对称地观察到¹³C卫星峰。 C: 放大了¹³C卫星峰信号的强度(通过1次扫描获得)。

使用¹³C卫星峰估算积分和定量的误差

除了结构归属,定量测定反应混合物的组分也通常是兴趣点。借助NMR技术,我们可以通过定量质子波谱,推导出某个化合物在混合物中所占的重量百分比(重量/重量*100%)。

其他常见的分析技术(例如:高效液相色谱法(HPLC)和气相色 谱法(GC))需要使用单独的参考标准品,对某个化合物进行定量 分析。这种参考标准品可以购买,也可以是专门合成的,再获批作 为参考材料使用。而在使用NMR时,我们可以使用一个参考标准 品,对多个化合物进行定量分析。市面上已经有了几种适用的参 考标准品,可以根据不同溶剂相应地进行购买。因此,NMR是一 种非常简单的分析技术,可以准确快速地定量测定混合物中的样 品组分。

如果需要处理大量样品,那么对每个分析样品进行完整的组分定 量测定,可能十分耗时。相反,利用定量NMR分析,测定主要化合物的质量分数(测定值);再从100%中减去这些测定值,便可算出 其他组分或杂质的质量百分比,但前提是已知每个测定值的实验 误差。 分析测定值的误差可以通过¹³C卫星峰来粗略估算。如果¹³C卫 星峰清晰可见(信噪比足够高,例如:图1B中1.1ppm处的异丙 醇信号),那么中心信号的积分误差可能低于0.55%((0.55%= 1.10%/2,其中,1.10%是¹³C的自然丰度)。请注意,这种简单估算 并没有考虑谱畸变(例如:基线偏移或重叠峰)引起的误差。

当混合物比较复杂,或可用的样品量有限时,则可能导致信噪比 下降(例如:图1C所示)。1.1ppm处的异丙醇信号具有清晰可辨的 ¹³C卫星峰,因此,我们假设其积分误差约为0.55%或更好。然而, 这个信噪比不足以用来测定4.0ppm处的信号的卫星峰。这里的 基线噪声比¹³C卫星峰大,因此,积分误差可能大于0.55%。该噪 声还影响了基线校正的准确性和精度,进而导致积分误差变大, 这些误差并不明显,容易被忽视。

通过¹³C卫星峰去耦增加谱分散度

¹H NMR实验是最为灵敏的NMR实验之一,这使得它能够在高浓度的样品主成分中探测到浓度较低的化合物或微量化合物的信号。然而,它的谱分散度有限。AvanceCore NMR波谱仪的谱分散度为每1ppm 400 Hz (因为AvanceCore为400 MHz NMR波谱仪)。在给定的分散度下,随着波谱中信号数量的增加,信号之间

越来越容易重叠。为了解决这个问题,我们可以选择更高的磁场 强度(例如:使用Avance NEO 600 MHz)。

我们也可以通过去耦¹³C卫星峰来简化波谱,见图2所示示例。



图2:DMS0中乙酸芳樟酯的NMR谱。上:标准'H实验。下:碳去耦的'H实验碳去耦可以使¹³C卫星峰塌陷,直至¹³C卫星峰与原本的中心峰合并。为便于对比, ¹³C卫星峰标有<mark>红色(上)</mark>。卫星峰去耦让波谱变得简单,使我们能够识别之前被卫星峰部分覆盖的较小信号(例如:4.95ppm、5.33ppm和5.83ppm处)。

典型的¹H NMR谱(例如:乙酸芳樟酯这种小有机分子)包含许多 ¹³C卫星峰(见图2上),由于它们占据了大量的谱空间,增加了信 号重叠的可能性,可能遮盖其他信号,并且使微量化合物的归属 变得十分复杂,因此这些¹³C卫星峰通常是多余的。这些¹³C卫星 峰可以通过"去耦"来抑制,这可以使¹³C卫星峰与中心信号合并, 从而从谱中有效地被消除掉(见图2下)。去耦是通过使用¹³C辐射 实现的,可以使用诸如"garp"、"waltz"或绝热形状等去耦序列, 这些序列旨在在一定的碳频率波谱范围内实现均匀的去耦。进行 ¹³C去耦时,需要使用AvanceCore Select或Convenience。

在大多数情况下,¹³C卫星峰的多重峰结构与中心信号相同,并具 有相同的谱宽。从谱中消除一个¹³C卫星峰,仪器的分辨率便可增 加一倍;消除第二个¹³C卫星峰,整体分辨率可增加到原来四倍。因此,¹³C去耦是一种非常简单的增加分散度的方法,与许多其他以牺牲信噪比为代价来增加分散度的实验策略相反(例如:多维实验或异核相关实验),¹³C去耦不会改变NMR实验的灵敏度。采用¹³C去耦方法,可以充分发挥¹H NMR波谱技术的潜力,灵敏地检测微量化合物并提高灵敏度。

起始材料、反应产物和副产物通常因结构相似,导致其NMR信号 聚集在谱图中的特定区域。¹³C去耦可以专门在有需要的地方,提 高分辨率,这有助于减少波谱重叠,充分发挥NMR的潜力,来灵 敏地测定反应产物、混合物和微量化合物。

如何设置¹³C去耦

使用AvanceCore波谱仪(Select或Convenience配置),可以从标准¹H实验开始,通过以下步骤获得碳去耦质子波谱:

- •进入ACQUPARS选项卡,输入以下参数:
- PULPROG = zgig
- 在NUC1栏,点击"Edit",激活¹H (F1通道)和¹³C (F2通道)。点击"Default",再选择"Save and Close",来创建 默认路径。
- 在CPDPRG 2行,选择去耦序列 "garp" (对于 "窄带" 去 耦,也可以使用 "waltz")。
- 在TopSpin命令行输入"getprosol",这将设置脉冲参数。
- 在O2行,定义碳信号的中心位置,以ppm为单位(例如:100ppm),或在TopSpin命令行输入"o2p"来定义中

心位置。当碳信号在某个特定波谱区域(例如:脂族化合物在 60ppm附近)聚集时,可以选择相应的碳频率,来获取最佳 去耦性能。

• 输入"zg" 启动实验。

另一个设置碳去耦质子实验的方法是使用绝热去耦技术,它可以自由配置去耦带宽:

- 创建一个新实验和/或通过在TopSpin命令行输入"rpar P_ PROTON_IG"来读取参数集P_PROTON_IG。
- 在TopSpin命令行输入"getprosol",来设置脉冲参数。
- 在TopSpin命令行输入"xaua"启动实验。与"zg"不同,使用"xaua"会启动WaveMaker来设置绝热去耦。
- 如需优化实验,请按照TITLE选项卡给出的说明进行操作。

异构体、对称结构和13C卫星峰

NMR是一种特别强大的分析方法,它可以区分具有相同分子质量的不同分子异构体。

在混合物分析中,异构体可能会让HPLC/GC/MS技术(在使用柱 层析技术分析了混合物的组分后,再通过质谱分析来揭示相关质 量信息)变得复杂。面对异构体,多个HPLC峰可能得出相同的质 量,这可能导致归属不明确。 NMR对质谱分析进行了补充,这是因为它非常适合用于研究异构体的结构相似性,即便位置异构体也是如此。位置异构体不仅 具有相同的分子式,还因此具有相同的分子质量,它们的分子结构也非常相似,往往只在少数官能团的位置上有所不同。这样的 对称结构在归属方面十分具有挑战性,因为它们在NMR谱中显示的信号数量较少。例如:苯环结构包含6个氢原子。由于高度对称,它在¹H NMR谱中显示为单个单重峰,如图3所示。



图3: 对称的化合物苯的'H NMR谱。上: 概览。下: 放大了¹³C卫星峰强度。苯的卫星峰多重性与中心信号的多重性不同, 这表明该谱必定来自具有对称结构 的物质。

¹³C卫星峰打破了这种对称性,揭示了额外的信息。

图4: 对称化合物二甲砜的'H NMR谱。上: 概览。下: 放大了¹³C卫星峰强度。在二甲砜中,卫星峰多重性(四重峰,归属于绿色峰)与中心信号(单重峰)的 多重性不同,这表明该谱必定来自具有对称结构的物质。

另一个例子是二甲砜。其对称分子含有两个甲基(见图4),在 3.1ppm处产生一个单重峰。由于两个甲基的信号都具有完全相 同的化学位移,因此,没有观察到自旋耦合(等时核,即具有相 同化学位移的核不耦合)。 一般情况下,¹³C卫星峰的多重性和中心信号相同。然而,对于二 甲砜,情况并非如此:中心信号为单重峰,¹³C卫星峰显示为四重 峰。卫星峰的化学位移和中心信号不同步,导致发生自旋耦合,并 且观察到¹³C卫星峰为四重峰。卫星峰以四重峰的形式出现,表明 它与相邻的CH₃基团发生耦合,与二甲砜的对称结构相符合。

图5: 对称分子马来酸、乙二醇核酒石酸的¹H NMR谱(放大了¹³C卫星峰的 强度)。尽管所有谱都和中心信号一样具有单重峰,但¹³C卫星峰的多重性 却不相同,这是因为它受到了对称中心自旋耦合的影响。

¹³C卫星峰、Karplus关系式和Gauche效应

很多小有机分子都是对称的。图5展示了三个对称分子的例子。 在¹³C卫星峰中,³J_{HH}耦合常数(即各个峰之间的距离)可以代入 Karplus关系式,来推算氢原子之间的二面角。根据Karplus关系 式,³J_{HH}耦合常数的大小可划分为以下几类:

- •如果氢原子呈顺式构象排列(二面角约为60°),则可观察到约 2Hz的小耦合常数。
- 如果氢原子呈反式构象排列(二面角约为0°或180°),则可观 察到约12Hz的大耦合常数。

如果氢原子之间的取向在快速旋转(例如:围绕单键旋转),则
可观察到约7Hz的中间耦合常数。

例如:马来酸包含一个C=C双键,是一个平面分子,其中氢原子的二面角为0°,并且表现出12Hz的大³JHH耦合常数(见图5)。

乙二醇是另一个广泛存在的对称分子,主要用于制药和合成化 学领域,可通过其独特的¹³C卫星峰加以识别。

另一个例子是酒石酸,它表现出一种有趣的行为(见图5下)。碳 原子2和3带有4个不同的取代基团(其中之一是羟基官能团)。 这些碳原子是sp³杂化的,使得这些碳通过单键与相邻基团结 合。围绕单键的快速旋转会导致大约为7Hz的³J_{HH}耦合常数。然 而,在酒石酸中,我们观察到了2Hz,这表明:

- 单键周围没有旋转
- 氢残基的顺式取向(二面角为60°)

氢原子的顺式取向意味着较大的残基(羟基官能团和羧酸官能团)朝向同一侧。由此产生的空间位阻在能量上是不利的,这种有点出人意料的观察被称为"Gauche效应"。这是由邻位电负性原子(在本例中为两个羟基官能团)引起的特殊电子情况导致的。这些电负性基团会诱导分子轨道发生变化,使得碳原子2和3之间形成部分双键。这种部分双键在能量上是有利的,并且只可能在顺式构象中存在,还可以防止围绕单键的旋转。这个例子说明我们可以通过研究¹³C卫星峰获得大量详细的信息。

布鲁克磁共振微信公众号

布鲁克 (北京) 科技有限公司

网址:www.bruker.com E-mail:sales.bbio.cn@bruker.com 布鲁克应用技术咨询: 400-898-5858 布鲁克售后技术支持: 400-898-1088 布鲁克(北京)科技有限公司 北京市海淀区西小口路66号 中关村东升科技园B-6号楼C座8层 邮编: 100192 电话: (010) 58333000 传真: (010) 58333299 上海办公室 上海市闵行区合川路 2570号1号楼9楼 邮编:200233 电话:(021)51720800 传真:(021)51720810 广州办公室 广州市海珠区新港东路 618号南丰汇6楼A12单元 电话: (020) 22365885/ (020) 22365886