

利用中场强下的室温探头直接确定碳链 INAD NMR实验

摘要

如应用指南“15分钟读懂NMR”中所述， ^1H 波谱可揭示许多与分子结构有关的信息，但也留下一些有待解答和解析的问题。从分子中存在的 ^1H 之外的其他原子核的NMR信号中可以获得更多信息。通常利用INADEQUATE（简称为“INAD”）实验来直接确定有机分子的碳链结构。相比之下，其他NMR实验（如 ^1H 和 ^1H ^{13}C -HSQC）的劣势在于，无法直接提供碳-碳连接的信息，因而只能间接地帮助确定碳链。通过INAD进行的结构解析更直观，所需的波谱解析时间减少，且能避免结构判定时混淆不清。

^{13}C 在自然界中的丰度低，给记录INAD实验造成很大挑战。在本应用指南中，我们将讲述INAD实验的基本原理，以及能使信噪比(S/N)提高一倍、或检测时间缩短四倍的精简化设置。通过该设置，可以很方便地在Bruker等波谱仪（例如，400 MHz的中场强，且无需低温探头）上进行INAD实验，且所需的进样量可低至25 mg (214 mM)。

我们还将介绍一个稳健的、能提升许多有机分子信噪比的INAD脉冲序列。

利用INAD确定碳链的结构

INAD是主要用于在 ^{13}C 的天然丰度下进行有机分子的结构解析的NMR实验。

通常情况下，通过NMR进行结构解析的一个优势是，信息-复杂度比非常有利，这一优势在小有机分子领域尤为明显。从一维和二维实验中获得的丰富信息，有助于提高结构判定时的确定性。

但是，如果分析较大的分子和中断的氢链，复杂度通常会上升。例如，NMR实验数据可能对应于一个以上的结构式，导致实验结果含混不清。

对于有机分子的碳链，INAD实验能提供直观且简单易用的直接鉴别方法。INAD实验能提供碳-碳相关信息，因而能大幅提升信息-复杂度比。图1中记录的乙酸芳樟酯的二维INAD实验就能体现这一点。

图1

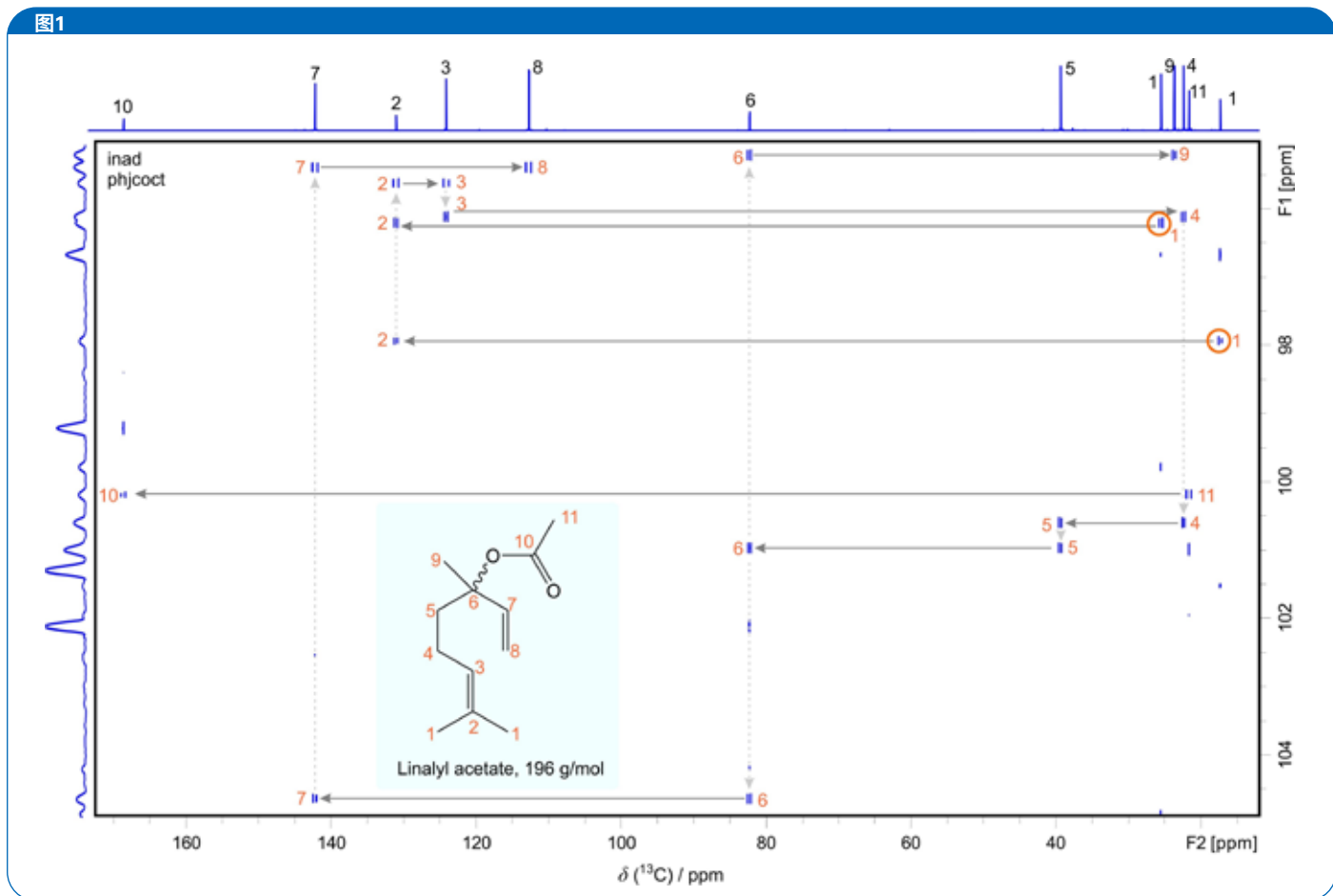


图1: DMSO-D6中乙酸芳樟酯的二维INAD实验。可以按照横向和竖向箭头所示直接确定¹³C主链。

二维INAD实验的结构解析从具有典型化学位移的信号开始。以乙酸芳樟酯为例，将甲基选做起始点（在图1中用橙色圆圈标注）。这些甲基可以通过它们典型的¹³C化学位移，或者通过与¹H-¹³C HSQC比较予以识别。

从这些甲基开始，可以按照编号逐一确定信号所对应的结构：横向箭头表示碳-碳单键连接（ $^1J_{CC}$ ），如从碳1到碳2（用橙色数字表示）。碳2有分支，显示出3个竖向信号（虚线箭头）；其中两个都与碳1对应，另外一个与碳3对应（横向箭头）。利用这种稳健的方法，以此类推（从碳3到碳4、碳4到碳5……）即可大致梳理出碳的结构。

要注意的是，乙酸芳樟酯的主链中含有氧原子。氧原子对于NMR不可见，使得乙酸芳樟酯的INAD波谱包含两个似乎相互独立的碳链（碳1-9和碳10-11）的信息。在我们的DOSY实验应用指南中，我们讲述了如何利用NMR确定哪些信号源自于混合物中的相同分子。

INAD实验让辨别真伪信号变得尤其容易：真信号显示为双线，伪信号显示为单线。当靶标物质含量极低时，利用这一功能辨别信号与噪声尤其有利。

INAD实验用途很大，但通常存在灵敏度限制。天然丰都最高的是¹²C，但NMR对其无法检测。¹³C的天然丰度仅为0.011(1.1%)。由于INAD实验主要是研究相邻¹³C原子之间的连接，故样品有效浓度甚至更低，可低至¹³C浓度的平方，如0.00012(0.01%)。

下文将讲述如何利用采用标准室温探头的400 MHz仪器记录INAD实验。

利用正确的脉冲序列使信噪比最大化

布鲁克的所有新核磁共振波谱仪上都预置有INAD参数集（可以用命令“rpar INAD”读取它的参数）。标准INAD实验的脉冲程序（inadph）利用“相位循环”的方法减少伪信号的产生。与一维 ^{13}C 实验相比，该脉冲程序展现出了高灵敏度：

图2比较了标准 ^{13}C 实验（左侧，蓝色）的灵敏度，与INAD实验（右侧，红色）的灵敏度。灵敏度可通过 ^{13}C 信号的 ^{13}C 卫星峰（带“*”标记）来估计。经过对比，两者信号的信噪比属于同一数量级。

其他INAD脉冲序列（如“inadgpqfsp”）则利用梯度脉冲（gp）或量子滤波器（qf）等更多实验方法。这些方法有助于避免伪信号的产生，但同时也把信噪比降低了50%。在本指南中所述的应用中，信噪比属于限制因素。因此不建议使用梯度脉冲和量子滤波器。

为达到最优信噪比，INAD实验必须能抵抗不同的影响：

- 化学位移
- B1偏差
- $^1J_{\text{CC}}$ 耦合

本应用指南主要讲述性能稳健、能实现最优信噪比和低检测限（LOD）的INADphjcoct脉冲序列。¹

- 本指南中所述的脉冲序列采用形状脉冲，可覆盖高达600 MHz（射频振幅为10 kHz）的 ^1H 场强的碳化学位移。通过将射频振幅提高一倍至20 kHz，可增加激发范围。
- 脉冲能抵抗高达 $\pm 20\%$ 的B1偏差。
- 典型的INAD传输要素被最优控制硬-脉冲-延迟序列取代，能够不受30-100 Hz范围内的、自然产生的 $^1J_{\text{CC}}$ 耦合常数影响。

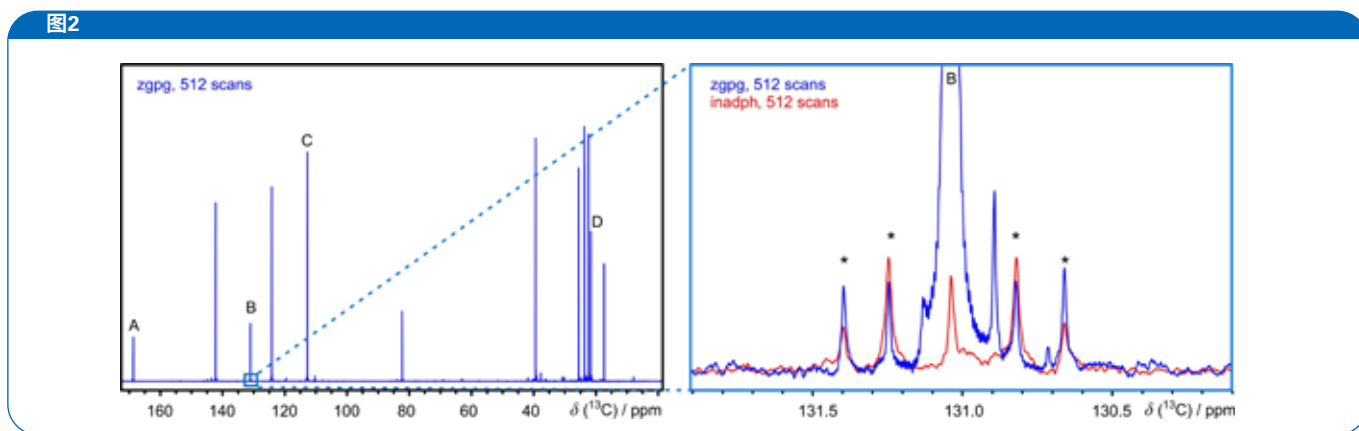


图2: 一维 ^{13}C 实验（左侧，蓝色）与一维INADph实验（右侧，红色）比较。信号B（右侧，蓝色）的详细视图，与采用相同的实验设置记录的、inadph脉冲序列的信号（右侧，红色）相叠加。在叠加图中，相对强度为0.01%的INAD信号带有“*”标记。对于一维 ^{13}C 实验（右侧，蓝色），带“*”标记的信号表示按照 $^1J_{\text{CC}}$ 耦合常数分裂的 ^{13}C 信号的 ^{13}C 卫星峰。对于INAD实验（右侧，红色），带“*”标记的信号表示 ^{13}C 与 ^{13}C 的连接。带“*”标记的信号（蓝色和红色）属于同一数量级，且可以用于快速评价一维INAD实验的灵敏度。INAD波谱正中的信号是伪信号（右侧，131.0 ppm，红色）。它源自仅有一个 ^{13}C 原子的分子，且在很大程度上已被INAD脉冲序列抑制。

采集一系列的一维INAD实验，以比较不同INAD脉冲序列的传输效率。传输效率与INAD相关信号的峰强度成正比，因此也与检测限的信噪比有关。

在本应用指南所聚焦的、接近于检测限的实验中，最优传输效率对于确保最大信噪比最为重要。图3比较了利用不同INAD脉冲序列取得的传输效率。结果显示，inadphjcoct序列的传输效率最高。信噪比的提高（无论是通过增加待测物质的浓度，还是通过采用更优化的脉冲序列），对于检测时间都有显著影响。例如，通过使用最优脉冲序列使得信噪比提高一倍后，检测时间可缩短四倍。这意味着，原本需要4天才能完成的样品检测实验如

今只需一天。选择inadph或inadphjcoct脉冲序列而放弃inadg-pqfsp序列，可使信噪比大约提高一倍（见图3），从而使得检测时间缩短大约四倍（或者，当检测时间维持不变时，检测限对应的浓度值变得更小）。

样品浓度、检测时间和信噪比

INAD实验的限制因素有样品物质的溶解度/样品材料的可用性、检测时间和仪器的灵敏度。一般而言，样品浓度应当越大越好（例如，在一支标准的5 mm NMR管中，添加500 mg样品和100 μ l氘代试剂）。

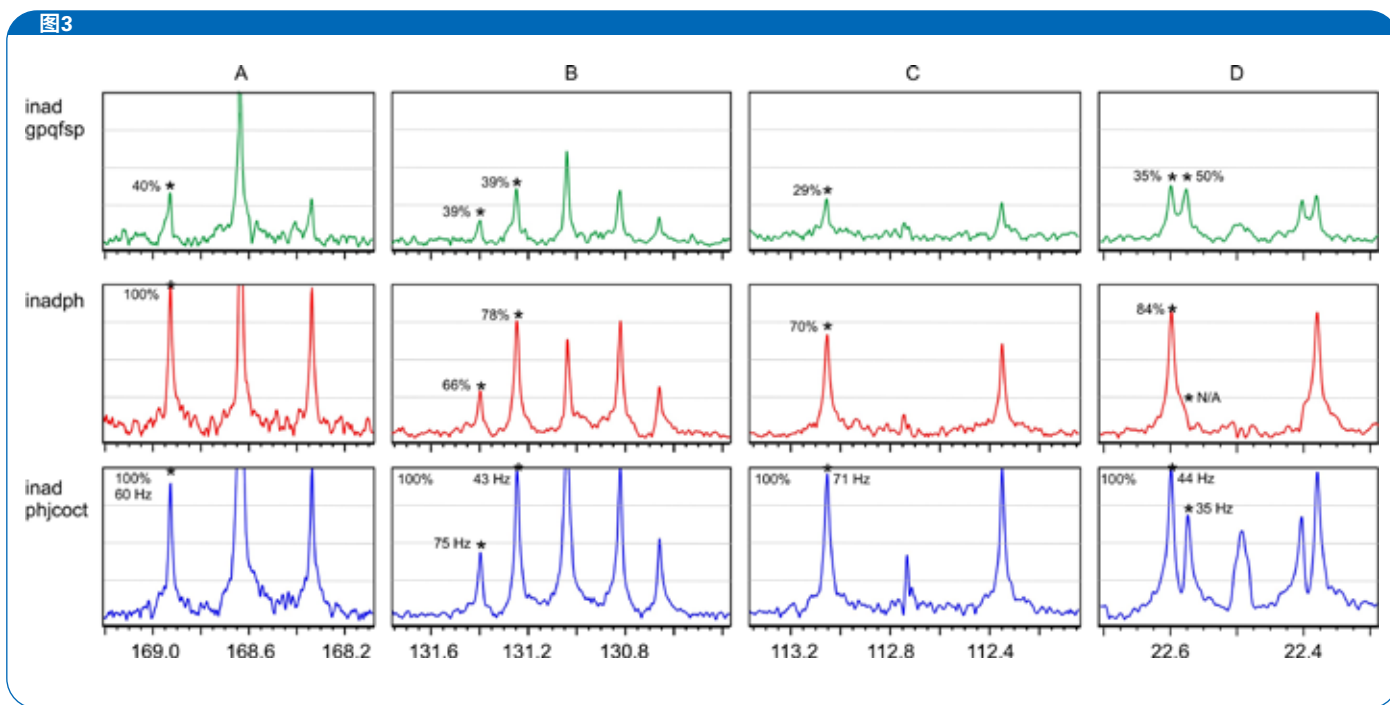


图3: 比较对500 μ l乙酸苄酯+ 100 μ l DMSO-D6进行512次扫描所记录的一维INAD实验。将inadphjcoct脉冲序列（蓝色）的最大信号处理成相对信号强度100%，然后与利用inadph序列（红色，通过相位循环进行相干选择）和inadgpqfsp序列（绿色，通过梯度脉冲进行相干选择）获得的信号进行比较。每个INAD信号的左侧分量带有“*”标记。对于inadphjcoct序列（蓝色），则提供 J_{CC} 耦合。对于inadph（红色）和inadgpqfsp序列（绿色），则提供相对强度（%）。对于inadph脉冲序列（红色），由百分比值（*）可以看出，有些信号的信噪比降低。inadgpqfsp序列（绿色）所显示的信噪比则进一步降低。

图4

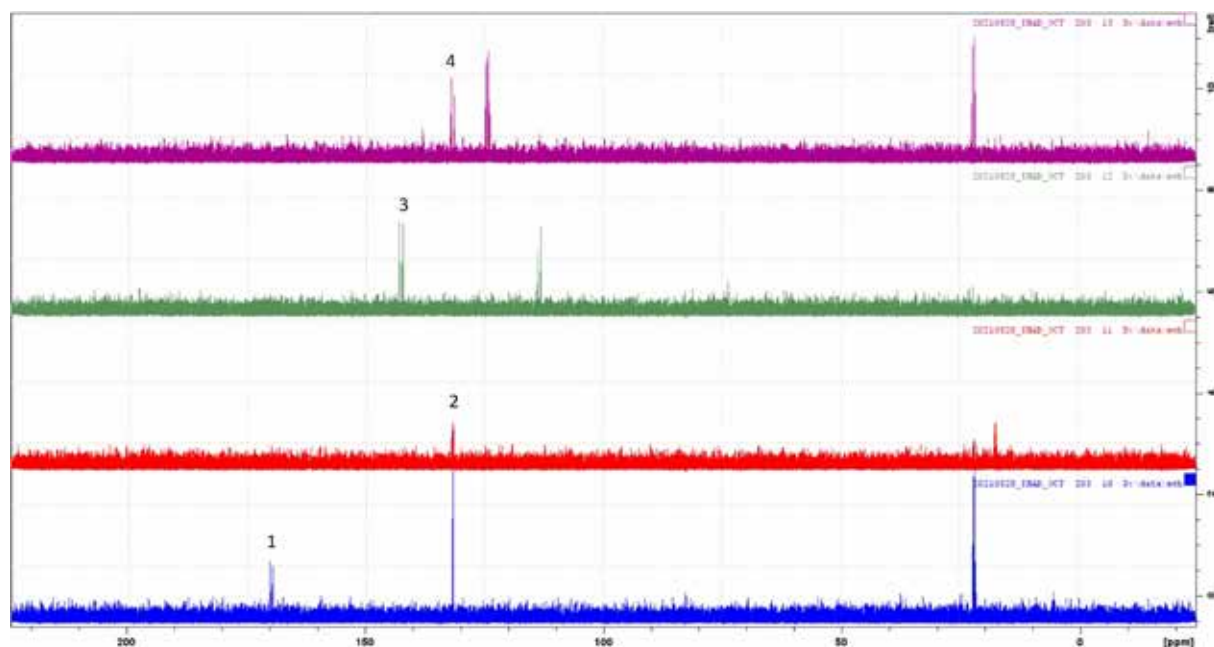


图4: 通过对溶解在DMSO-D6中的25 mg乙酸芳樟酯样品进行两天加14小时的二维INADphjcoct实验所获得的一维投影。因为显示为双线, INAD信号很容易根据它们的多样性而被识别出, 而伪信号显示为单线。信号1、2和4源自于季碳。单个信号的信噪比约为10:1。

当样品的可用性或溶解度有限时, 看下面这个例子, 可以了解利用核磁共振波谱仪能做到什么: 25 mg乙酸芳樟酯 (196 g/mol) 溶解在575 μ l DMSO-D6中, 获得浓度为213 mM的溶液。在一个周末 (两天加14小时), 按照512:128的倍数 (F2:F1) 记录二维INADphjcoct序列。上述图4利用从二维实验获得的投影来显示信噪比。

信噪比通过图4中所示的二维INADphjcoct实验的一维投影测定 (如“sinocal 171 168 200 180 20”)。获得了信号1-4的信噪比值 (显示在表1中):

信号编号	信噪比
1*	8
2*	6
3	12
4*	10

表1: *这些信号源自于季碳。信噪比大于等于5的信号, 被认为具备足够的强度, 能被可靠地识别出。

举例来说, 对25 mg乙酸芳樟酯样品 (196 g/mol, 213 mM) 进行为期两天的检测, 发现信噪比值至少为6。进样量为50 mg (426 mM) 时, 在约12小时后获得的信噪比同样为6。这表明, 在合理的时间范围内, 可以利用核磁共振波谱仪进行INAD实验。

检测时间[h]	浓度[mM]	乙酸芳樟酯 [mg/600 μ l]	扫描 (F2, F1)
Approx. 12	426	50	128, 128
Approx. 48	213	25	512, 128

表2: 样品浓度和检测时间为典型值时, 获得季碳的信噪比为6 (最差情况)。如果样品中不含季碳, 或者利用弛豫增强剂来提高季碳的弛豫, 将样品浓度减半也可获得同样的结果。

季碳：利用弛豫增强试剂提高信噪比

由于T1时间长，季碳会限制INAD实验的灵敏度。含有季碳时，需要3-5秒的弛豫时间。除了增加弛豫延迟时间，还可利用弛豫试剂（如乙酰丙酮铬（CrAcac））来缩短T1时间。以下是为获得最优信噪比可以采取的办法：

- 添加CrAcac以缩短T1和T2时间。缩短T2时间会使得波谱中所有信号的信噪比降低。
- 因此，只有在缩短弛豫恢复时间（现在是可能实现的）能够超额补偿因T2时间缩短而造成的损失时，添加CrAcac才能发挥有益的作用。
- 为获得最优结果，也为了提高有效信噪比，研究T1和T2与CrAcac浓度的关系。
- 添加弛豫试剂后，季碳比其他碳产生的反应更强烈。季碳的信噪比可以提高一倍，使得检测时间可以缩短4倍。经证明，CrAcac浓度低于0.5 mg/600 μ l时即能发挥效用。
- INAD信号用双线记录，伪信号显示在双线的正中部。伪信号的强度一般应与双线信号的强度大致相同。如果伪信号的强度更高，则说明弛豫恢复时间有可能太短。

如何设置INAD实验

利用inadph脉冲序列可加快速度：

- 读取INAD参数集，将脉冲程序更改为“inadph”，将FnMODE更改为“States-TPPI”。
- 为了能够看到F2维中的INAD分裂，从而能够辨别真伪信号，调整以下参数：TD 64k、SI (F2) 64k、SI (F1) 512。
- 通过将ME_mod (F1)设置为LPfc，NCOEF (F1)设置为256，LPBIN (F1)设置为64，可利用线性预测来提高间接维度的分辨率，然后按先后次序重新运行xfb和abs2d。
- 键入“getprosol”。如能获得高浓度样品，则将扫描次数设置为“32:128”，然后键入“zg”开始实验。

若想进行灵敏度最高的INAD实验（适用于低样品浓度），则选择inadphjcoct脉冲序列更具优势：

- 形状脉冲、脉冲程序及参数集，随同本应用指南一起提供。
- 将形状脉冲复制到以下目录中：<TSHOME>\exp\stan\nmr\lists\wave\user
- 将脉冲程序复制到以下目录中：<TSHOME>\exp\stan\nmr\lists\pp\user
- 将参数集复制到以下目录中：<TSHOME>\exp\stan\nmr\par\user

- 在“TopSpin”命令行键入“paracon”，以转换本波谱仪的参数集“INADJC”。
- 创建新实验，读取参数集“INADJC”。该参数集对应于脉冲程序inadphjcoct。
- 校准¹³C的持续时间为25 μs的90°硬脉冲（射频振幅=10 kHz），或者读取“getprosol”，并键入“calcpowlev”，以重新计算25 μs脉冲的功率。为INAD实验中的所有形状脉冲输入该功率。这些形状脉冲覆盖600 MHz的¹H场强内的碳化学位移（37.5 kHz）。如需要更大带宽（>37.5 kHz），可将射频振幅提高一倍至20 kHz（相当于一个12.5 μs脉冲的90°硬脉冲功率），并将所有形状脉冲的持续时间缩短一半。
- 为了能够看到F2维中的INAD分裂，从而能够辨别真伪信号，调整以下参数：TD 64k、SI (F2) 64k、SI (F1) 512。
- 通过将ME_mod (F1)设置为LPfc，NCOEF (F1)设置为256，LPBIN (F1)设置为64，可利用线性预测来提高间接维度的分辨率，然后按先后次序重新运行xfb和abs2d。
- 根据样品浓度调整直接维度的扫描次数。

INAD波谱的最优D1时间，比一维¹³C波谱的最优D1时间更长。D1的起始值最好大于3.3秒。INAD信号用双线记录，伪信号显示在双线的正中部。伪信号的强度一般应与真信号的强度大致相同。如果伪信号的强度更高，则说明弛豫恢复时间太短。

您对利用核磁共振开展分析工作是否还有疑问，或者您是否想知道核磁共振波谱仪对您是否适用？欢迎您通过Marketing.BBIO.CN@bruker.com直接联系我们，我们将十分乐意回答您的问题。

参考文献

- [1] www.bibliothek.kit.edu, Optimal Control in the High Resolution NMR-Spectroscopy: Transfer Elements and their Application for Structure Elucidation, Ehni, Sebastian, 2013



布鲁克 NMR 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