



## 核磁共振混合物分析： 因多信号压制技术而获益

在检测杂质和痕量化合物方面，核磁共振氢谱非常具有实用价值。由于大多数有机分子包含高度敏感的<sup>1</sup>H原子核，因此，它们在核磁共振氢谱中“无处可藏”！让我们揭开宝箱，看看通过选择性抑制一些大信号，可揭示出哪些信息。

现实生活中的核磁共振样品通常是多种化合物和溶剂的混合物，很容易产生密集的核磁共振信号。在这份应用说明中，我们将介绍如何使用射频 (RF) 预饱和技术形成的选择性多信号抑制，生成这些样品的高质量谱图。通过选择性多信号压制，样品基质和非氘化溶剂的强峰被抑制。因此，ppm范围内难以发现的信号便可获得解析。例如，对于合成产品，通过该方法可发现其中的杂质和副产品，对于天然产品，则可发现其多种成分。在这份应用说明中，我们将介绍如何在AvanceCore核磁共振波谱仪上，设置基于多信号压制的核磁共振实验——该实验配置过程仅需半分钟即可完成。

在有关核磁共振分析的教科书中，相应示例显示的通常是溶解在氘化溶剂（例如，DMSO-d）中的纯分析物（例如，阿司匹林）的谱图，因而所生成的是仅显示分析物信号的简单谱图。

然而，在现实中，样品通常是由多种化合物组成的混合物或者含有非氘化溶剂，造成谱图拥挤，其中多个强峰占主导地位，并覆盖所关注的信号，如图1所示。

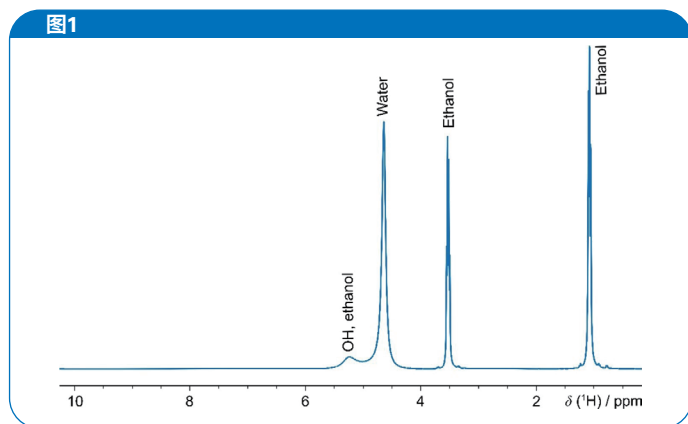


图1: 使用AvanceCore核磁共振波谱仪记录的杜松子酒（一种由杜松子制成的酒精饮料）的核磁共振氢谱。样品由500μl 杜松子酒 + 100μl D<sub>2</sub>O组成。该波谱显示的主要是水和乙醇的广谱信号，其他成分几乎不可见。

反应混合物和天然产品（例如，食品和饮料）是典型的混合物，其中所含成分的核磁共振信号往往被溶剂或样品基质的更强、更密集的信号所掩盖。

## 信号压制之妙

信号压制的优点在于，该方法能够在一次实验中，将谱图的良好分辨率与<sup>1</sup>H原子核的高灵敏度结合起来，从而实现 ppm 浓度范围内成分的检测。

为压制特定信号，通常需要采用一种被称为“预饱和”的技术：使用与需被压制信号的频率完全相同的低功率长射频脉冲，对核磁共振样品施以照射。这种选择性照射使溶剂达到“饱和”，从而在低自旋态与高自旋态之间不会出现布居数差，故不会产生核磁共振信号。使用 AvanceCore 等型号的布鲁克核磁共振波谱仪，可同时抑制多个信号。

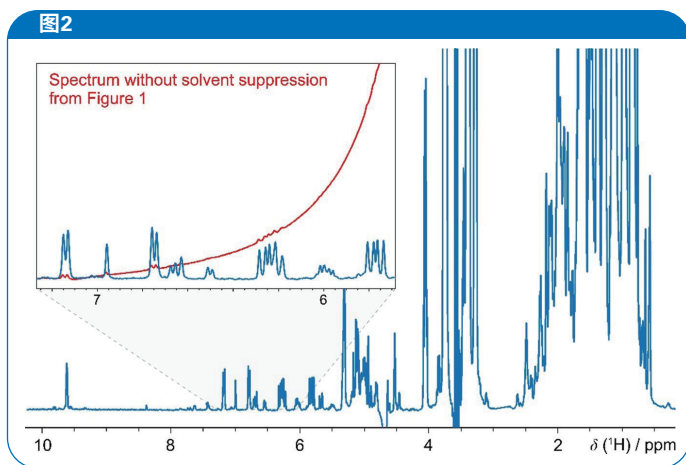


图2: 通过水和乙醇的选择性预饱和形成多信号抑制而生成的杜松子酒的核磁共振氢谱。从图1可见，在相同扫描次数（512次）且无信号抑制的情况下无法显现的许多低浓度成分（另在插图中以红色曲线显示）在此得以显现。

图2显示了图1所用的同一样品的氢谱，但在图2对应的试验中，采用了水和乙醇的信号抑制。谱图质量显著改善，并显现出许多在未采用信号抑制技术的情况下无法观察到的新信号。这两个谱图具有相同的扫描次数（512次）。实验时间为1小时。

由于辐射阻尼（参见应用说明《辐射阻尼：定义及如何应对》），样品基质预期产生的强信号通常会受到谱峰增宽和基线失真的影响。在此情况下，信号压制是从波谱中去除这些辐射阻尼的一种方法。

将信号抑制与同核二维实验（例如，DOSY、J-分辨谱、TOCSY和COSY实验）相结合的方法也很有效，该方法可进一步提高二维弥散，同时保持<sup>1</sup>H原子核的高灵敏度。

## 成分分析

为通过实例来阐述采用信号压制方法的优势，在这份应用说明中，我们对两款不同的杜松子酒进行了分析。样品通过将500 μl 杜松子酒与100 μl D<sub>2</sub>O相混合而制备。我们使用 AvanceCore 核磁共振波谱仪，对这两款杜松子酒进行了检测：

- 1号杜松子酒：一款按照“秘方”生产的未知品牌杜松子酒，声称使用“纯天然”成分，售价为7欧元，0.7升（图3，红色）
- 2号杜松子酒：使用35克新鲜杜松子和20克芫荽，以传统工艺制成（图3，蓝色）。其成分在50%（体积比）的乙醇中浸渍，之后经过蒸馏。馏出物用水稀释至50%（体积比）。

以下谱图概览（图3）将1号未知品牌杜松子酒（图5，红色）与传统工艺制成的2号杜松子酒（蓝色）的核磁共振波谱进行了比较。该图显示了水和乙醇的残余信号——相比采用信号压制的情况，这些信号的强度微弱许多（以#标示），以及在未采用信号压制情况下的乙醇<sup>13</sup>C卫星信号（以\*标示）。

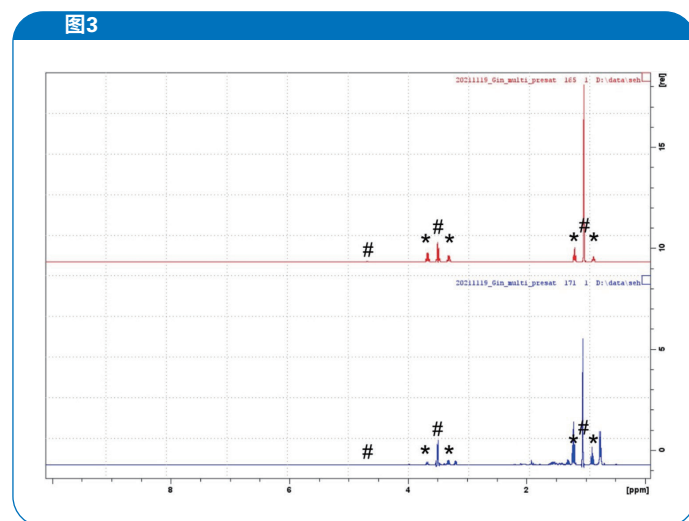


图3: 1号未知品牌杜松子酒（红色）与使用传统工艺制成的2号杜松子酒（蓝色）的核磁共振氢谱概览。残留溶剂信号以#标示，乙醇的<sup>13</sup>C卫星信号以\*标示。<sup>13</sup>C的天然丰度为0.011（1.1%）。它通过自旋耦合影响质子信号，导致质子信号分裂成双峰。由此产生的“<sup>13</sup>C卫星信号”对称分布在连接<sup>12</sup>C质子的信号两旁。选择性信号抑制只影响中心信号，不影响<sup>13</sup>C卫星及其他区域。<sup>13</sup>C卫星信号可通过应用<sup>13</sup>C去耦方法来去除。

图4在放大相同强度的谱图下，从图中可见，未知品牌杜松子酒（红色）的信号较少，使用传统工艺制成的杜松子酒（蓝色）的信号较多。

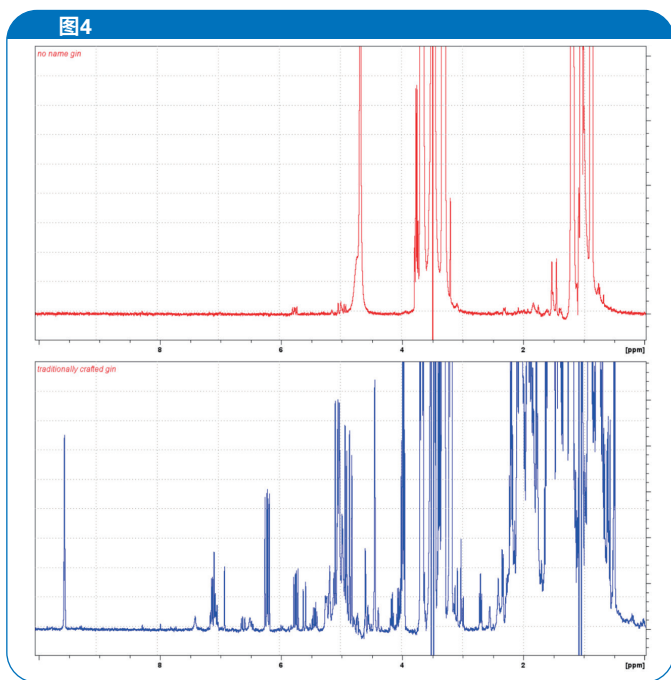


图4: 1号未知品牌杜松子酒（红色）与使用传统工艺制成的2号杜松子酒（蓝色）的核磁共振氢谱细节图。

图5显示了5.4至7.2 ppm范围的氢谱。

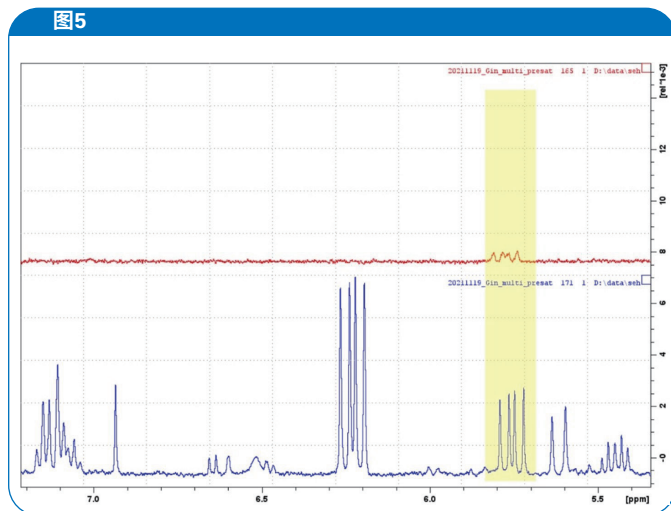


图5: 5.4至7.2 ppm的核磁共振氢谱区域显示了1号未知品牌杜松子酒（红色）与使用传统工艺制成的2号杜松子酒（蓝色）之间的具体成分差异。

在5.77 ppm处，未知品牌杜松子酒的信号（图5中以黄色突出显示）是另一个的十分之一。总体而言，在未知品牌杜松子酒的整个氢谱中发现的信号较少。实验数据揭露了未知品牌杜松子酒“秘方”的一个潜在问题：制作过程中使用的全天然成分很少。

## 如何设置多信号抑制

对于包含待压制信号的谱图区域，可通过在弛豫延迟期间施以选择性射频照射使之达到饱和。随后的激发脉冲将不会在选定的波谱区域中产生可检测到的信号，从而其他区域将不受影响。接下来，我们将介绍如何在AvanceCore核磁共振波谱仪上，设置多信号压制实验。

1. 为选择预饱和信号，需要记录1D  $^1\text{H}$ 核磁共振波谱，如图1所示。
2. 点击“Acquire” > “More” > “Setup Selective 1D Expts.” (图6A)。
3. 点击“Define Regions”，以定义多个谱图区域（图6B）。随即会打开积分窗口（图6C）。
4. (i) 对要压制的信号进行积分，(ii) 通过点击“Save Regions”，将积分区域导出至“reg”，然后(iii) 保存并关闭积分（图6C）。
5. 通过点击“Create Datasets” > “Mult. Solvent Suppr./presat”，创建多信号压制实验（图6D）。随即会出现MULTIPRESATGP窗口，并提示一个新的实验编号（EXPNO），点击“Accept”予以确认。随即会出现sel1d窗口。点击“OK”启动采集。或者，点击“Cancel”，创建实验不采集，调整其他参数后，可使用“zg”开始采集信号。
6. 采样之前，换至新的EXPNO，并将扫描次数设置为1，空扫次数设置为0，rg设置为1（例如，在TopSpin命令中输入以下内容：`ns 1; ds 0; rg 1`）。启动实验（zg），然后，对谱图进行相位校正（通常需要 $-90^\circ$ 的相位校正）。
7. 将谱图与初始氢谱进行比较，并以watt或dB（spw6或spdb6）为单位，调整预饱和和功率，直到达到最佳抑制效果。所需功率（spw6）通常为几毫瓦或零点几毫瓦，并且该参数还（略微）取决于弛豫延迟时间D1的长度。

图6

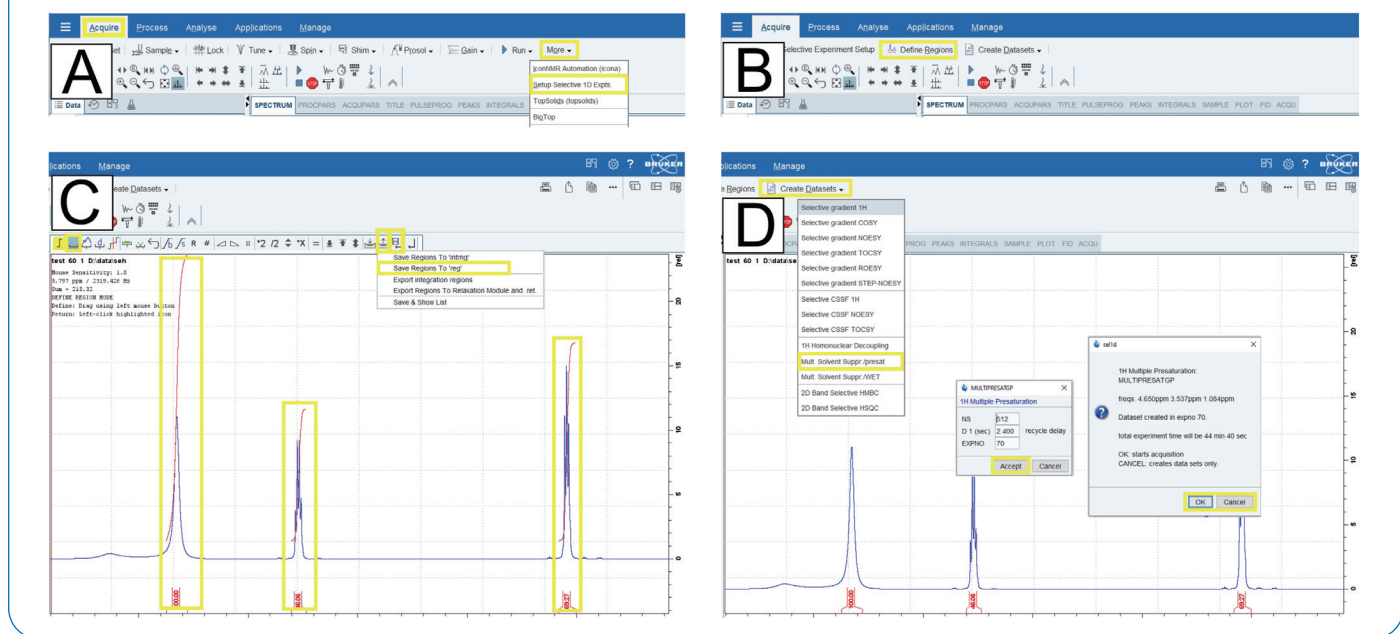


图6: 多溶剂抑制实验的设置流程。

如果仅需抑制一个信号（例如，水信号），则可通过读取ZGPR标准实验模板（“rpar ZGPR”）、设置水信号的频率偏置（“o1p”）、输入脉冲功率（“getprosol”）并启动实验（“zg”）来实现。



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.bbco.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