

NMR 用DOSY实验进行分子质量解析的NMR分析方法

关于如何将实验室技术提升到新水平的两个示例

Innovation with Integrity

摘要

¹H扩散序谱 (DOSY) 主要用于研究溶解分子的扩散情况。扩散与分子质量 (g/mol) 成正比。因此, 可以使用NMR波谱仪进行质量解析实验, 由于同时结合了质量数据与NMR数据, 这为强大的分析策略创造了机会。

使用NMR进行合成控制

¹H NMR波谱法是化学实验室的一项宝贵的合成控制技术。它可以推导出主产物的分子结构, 同时, 利用¹H NMR的高灵敏度, 检测被稀释的副产物及残留溶剂。

在大多有机合成产物中, 都会遇到一些未知的小信号。因此, 为了充分了解反应条件、起始材料的转化, 以及杂质特征, 对所有信号进行归属是有必要的, 包括一些来源不明的小信号。因此, 在研究反应条件时, 归属小信号极为重要。

当存在来自混合物中强信号时, 对未知的小信号进行归属是一项十分挑战且花费时间的工作, 以至于传统的二维NMR波谱法可能无法有效地通过常规工作得到所需的信息。在大多数情况下, 异核二维实验提高波谱分辨率是以牺牲信噪比 (S/N) 为代价的, 这通常会导致被稀释的化合物的信号低于检测阈值。如果小信号高于检测阈值, 那么它也有可能被其他信号覆盖, 或者被误认为是二维伪信号, 例如T1噪声。所以, 对混合物中的未知杂质进行归属, 是一项具有挑战性的工作, 很难通过标准的二维NMR方法完成。

液相色谱与质谱联用 (LCMS) 可以提供宝贵的信息,但在处理与主化合物具有相同分子质量的同分异构副产物时, LCMS存在“盲区”。这使得LCMS很难回答“反应是否发生在分子结构中的正确‘位置’”。其次,未知杂质可能不可电离,在LCMS中检测不到。在很多情况下,必须大规模合成副产物,以便通过色谱法进行分离,再通过NMR和LCMS进行分析。这个过程可能需要花费好几周的时间,往往因为资金或时间的限制,而无法执行。

在下文中,我们将提供两个示例,介绍如何利用DOSY实验克服这些挑战。DOSY通常只需不到五分钟就可完成,往往避免了耗时的二维NMR实验。DOSY还适用于任何常规的NMR样品,并且可以获得与色谱柱层析类似的结果。鉴于DOSY实验的巨大优势,NMR科学家又提出了“色谱”NMR一词。

示例1: 用DOSY进行混合物分析

第一个示例对D₂O中的5毫克咖啡因和乙二醇进行了DOSY实验。

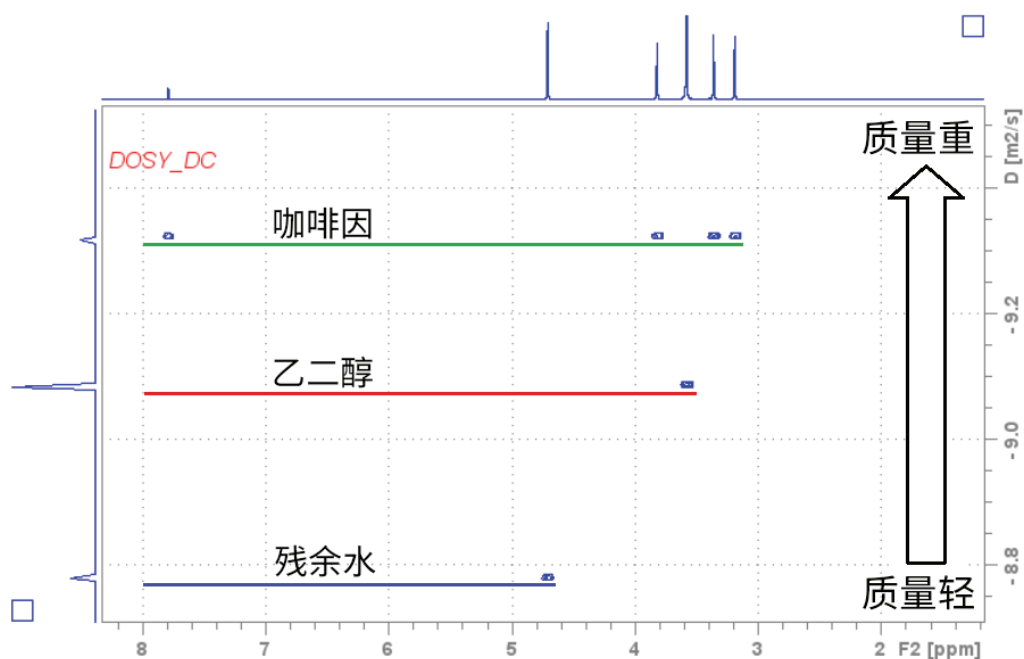


图1:使用DOSY_DC参数集,在2分55秒内记录到的¹H NMR DOSY实验:使用AvanceCore 400 MHz NMR波谱仪对D₂O溶剂中约5毫克的咖啡因和乙二醇进行测试。请注意:y轴是沿着扩散系数的指数(10为底数)进行绘制的(即DOSY指数γ),详见应用说明的结尾。

通过DOSY实验得到的波谱在x轴上显示为标准的一维¹H NMR谱,每个峰都与y轴上的一个扩散系数相关联。扩散系数是通过沿着z轴(与磁场B₀平行)的线性磁场梯度,对NMR样品管内的分子位置进行空间编码而得到的。通常在扩散约100ms后,由分子的空间位移得出扩散系数。

扩散系数与分子量(g/mol)成正比(详见本应用说明文末)。较重的分子实体的信号出现在间接维度(y轴)的顶部,较轻的分子实体的信号出现在底部。

因此，在一条水平线上观察到的信号可能来自相同的分子。利用这一原理，我们可以快速可靠地归属¹H信号。

- 通常而言，产物和聚合物是反应混合物中最重的组分，它们出现在DOSY谱的顶部。在上例中，就是咖啡因（图1的绿色部分）。
- DOSY的质量解析能力往往足以区分较重的组分与中等分子量的前体和碎片（位于DOSY谱的中部）。为了进一步说明上例DOSY谱的中部，我们向混合物中添加了乙二醇（图1的红色部分）。
- 较小的有机分子（例如：残留溶剂和水）通常在DOSY谱的底部，很好分辨（图1残留水，蓝色）。

归属不同分子相应的DOSY信号十分简单，在谱图平面上画一条水平线即可。因此，DOSY实验是一种最为简单且功能强大的NMR实验。与异核二维实验相比，DOSY具有堪比¹H实验的灵敏度。因此，如果有大概10-50毫克的样品材料，它便可在几分钟的测量时间内，检测到10-100ppm浓度范围内的信号。

示例2: 利用DOSY实验归属相关化合物

在化学过程中，副反应往往会产生各种各样的副产物，它们在结构上与主产物非常相似，通常被称为相关化合物。特别是同分异构副产物，它可能十分具有挑战性，使用标准的质谱分析法无法将它们彼此区分，也无法将它们与主产物区分开。

NMR能够解析类似的化学结构差异，包括同分异构体。然而，结构相似会导致波谱相似。通过化学反应得到的分析样品通常是产物、副产物、起始材料、碎片和残留溶剂的混合物。高浓度物质（例如：产物）的信号可能会覆盖和掩盖来自相似但浓度更低的物质（例如：副产物）的信号。例如，图2所示的布洛芬及其相关化合物布洛芬甲酯的混合物。

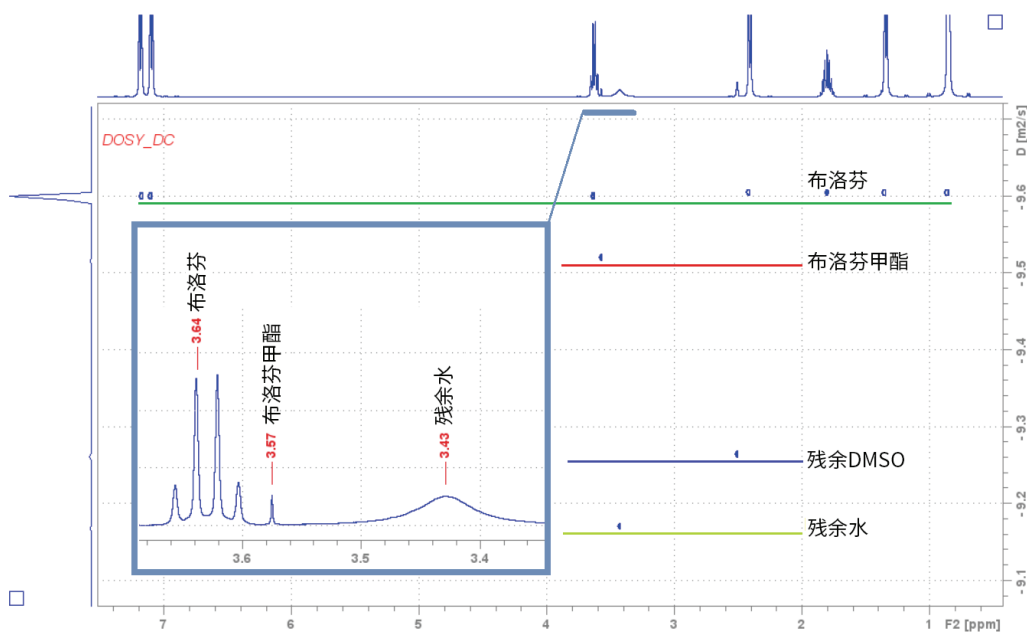


图2: DMSO中20毫克布洛芬及大约0.9%布洛芬甲酯的¹H DOSY谱图。布洛芬甲酯是布洛芬的一种副产物，它会产生微弱的信号，但大多被主成分的信号覆盖，不过3.57 ppm处的信号除外。布洛芬甲酯的这个信号足以用来计算扩散系数D，该信号的扩散系数D与布洛芬的扩散系数相似，但并不完全相等，这表明该物质不同于主产物，但有着相似的分子量。尽管3.57 ppm处的多重信号并没有提供更多信息，但我们可以得出结论：它并非来自残留溶剂，而可能来自一种副产物。这个信息可用于相应地调整样品的重量比例。

在¹H谱中，主产物布洛芬在很大程度上覆盖了布洛芬甲酯的信号，但3.57 ppm处的信号除外，可以看到它是一个小的单峰（见图2）。这个信号来自布洛芬甲酯的甲基。在本例中，¹H谱并不足以用来充分表征样品，因为我们无法确认3.57 ppm处的这个单峰是来自残留溶剂、聚合物还是相关化合物。我们可以很好地解析这个单峰谱线形状。但是，作为一个单峰，它无法获得该信号其附近的耦合信息。因此，其他实验（例如灵敏的¹H TOCSY）不太可能揭示其他信号（即可能隐藏在其他信号下方的信号）的相关性。因此，TOCSY实验不大可能解决这个挑战。异核二维实验也面临同样的困境，该实验往往不够敏感，无法可靠地检测被稀释的杂质。

如果研究的信号在¹H谱中得到了很好的分辨，而且没有被其他信号遮盖，那么DOSY实验就是一种稳健可靠的实验策略。

现在，我们可以通过二维平面绘制水平线，来评估含有布洛芬和布洛芬甲酯的混合物的DOSY谱：

- 图2中的绿色水平线归属于主要化合物布洛芬。
- 3.57 ppm处的信号归属于与布洛芬有着相似分子量的物质，因此可能是相关化合物（见图2的红色部分）。因此，在上述示例中，3.57 ppm处的信号归属于布洛芬甲酯（请注意：布洛芬甲酯的其余信号大多被布洛芬的信号遮盖，因此，无法用于DOSY评估）。
- 我们可以清楚地将布洛芬甲酯的信号与出现在DOSY谱图底部的、较轻的残留有机溶剂（例如：DMSO或水）（见图2的蓝色和浅绿色部分）区分开。

与其他依赖于对谱图的所有峰一一进行归属的二维实验不同，DOSY不需要了解精确的化学结构。一个单一的信号就足以用来获取扩散系数。

如何在AvanceCore 400 MHz NMR波谱仪的手动模式下进行DOSY实验？

NMR的结构解析通常依赖于对峰和耦合模式的检查（见应用说明：如何在15分钟内读取和解析NMR谱）。就这一点而言，最重要的信息是：峰是否存在。

与之相对的是，DOSY实验依赖于定量性质，即正确和未受干扰的峰强度非常重要。不同于其他NMR实验，DOSY实验的优化更具挑战性，这是因为很难确定实验中各种干扰因素与其对信号的定量影响之间的因果关系。

于是，布鲁克的科学家对实验程序进行了系统性的检查，目的在于建立一种易于使用的DOSY实验。这种DOSY实验适用于DOSY_DC参数集，并针对小有机分子和30 kDa的聚合物进行了测试。该实验“开箱即用”，无需作进一步的调整：

通过在TopSpin命令行输入“edc”，创建一个新的实验或复制旧实验。

- 通过在TopSpin命令行输入“rpar DOSY_DC”，读取DOSY参数集。
- 通过在TopSpin命令行输入“getprosol”，读取脉冲功率。
- 通过在TopSpin命令行输入“zg”（或“xaua”）或点击“play”按钮，开始实验。
- 实验完成后，通过在TopSpin命令行输入“xau”触发自动处理。“xau”会启动处理AU程序（自动化程序）。这将通过调用Dynamics Center软件（2.8或更高版本），触发DOSY拟合，Dynamics Center软件可以从布鲁克网站下载，DOSY功能可免费使用。
- Dynamics Center软件会自动将DOSY谱写回实验文件夹（处理编号1），您可以像评估其他NMR谱一样，对其进行评估。

如何在IconNMR的自动模式下进行DOSY实验?

NMR的生产力与使用进样器自动执行NMR实验密切相关。通过使用IconNMR软件,可以将NMR波谱仪转变成一种简单易用的开放式测量平台,从而十分轻松地对大量样品进行全自动测量。

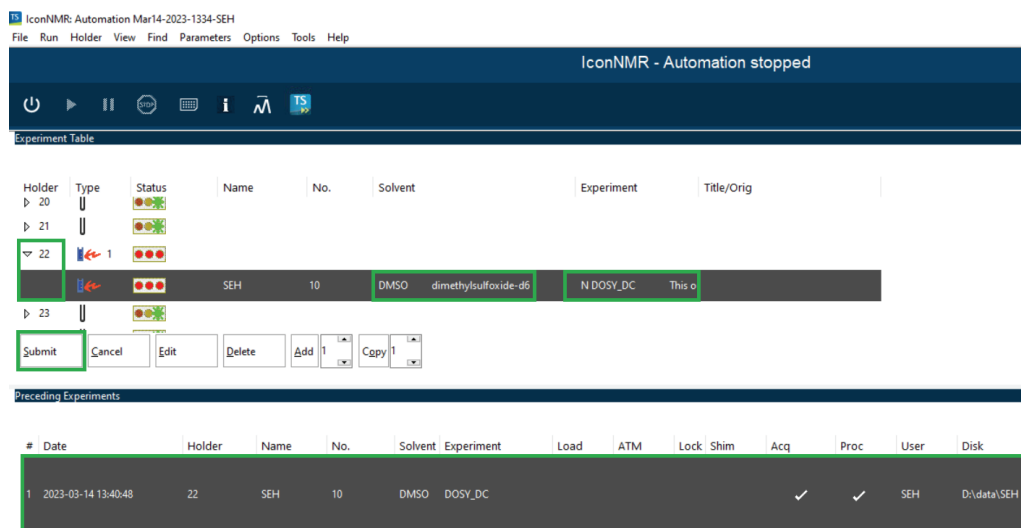


图3:使用IconNMR自动采集NMR谱,这将NMR波谱仪变成一种开放式平台,可供非专家用户使用。仅需点击几下,不到五分钟就可以记录DOSY_DC实验,从而可以与每个标准的¹H实验一起记录。

使用IconNMR, 仅需点击几下就可以设置好NMR实验,如图3所示:

1. 将样品放入换样器的样品架中,然后在IconNMR中双击样品架的位置,为该样品设置实验。
2. 在下拉菜单中选择溶剂。
3. 在下拉菜单中选择参数集DOSY_DC。
4. 点击“提交”,开始实验,或将实验添加到测量队列中。
5. 在IconNMR的“过往实验”部分,双击DOSY实验,便可在TopSpin中显示结果(或找到被写入网络文件夹或通过电子邮件发送的结果)。

DOSY_DC数据集的采集不到五分钟即可完成,因此,可以与每个标准的¹H实验一起记录。

如何通过扩散系数推导出分子量

在很多情况下,通过DOSY实验获得的扩散系数可以非定量的相对方式来使用,即通过视觉检查谱线,并将兴趣信号与同一样品的参考信号进行比较(如示例1和示例2所示)。这可以确保所有组分都在同样的实验条件下(例如:温度、离子强度等)进行测量。

如果需要对比不同样品的扩散数据,那么可以通过直接在TopSpin软件的“Multiple Display”中叠加谱,或者通过计算各个物质的相对扩散系数来实现。相对扩散系数可以通过将某个物质的扩散系数除以同一样品中已知标准组分的扩散系数来计算。

另一种使用扩散数据的方法是,按照下述方式进行校准。校准可以用来推导未知物质的绝对分子量(单位:g/ml)。在一定温度下,扩散系数与分子量有关,较重的分子的扩散比较轻的分子慢。此外,三维折叠、分子间氢键和范德华力等次级效应也会影响扩散系数,很多理论都在探讨建立一个通用模型。尽管没有一个封闭的解析解,但我们可以通过以下关系得到良好的近似结果:

$$D \sim M^\beta$$

公式1中:D表示扩散系数、M表示分子量、 β 表示指数。

对于单点校准,根据理论, β 取-0.5。对于多点校准,可以进一步精确得到 β 值。

D₂O的分子量校准

物质	M [g/mol]	log (M [g/mol])	DOSY 指数 γ	D [m ² / (s*1E9)]	log (D [m ² / (s*1E9)])	M DOSY [g/mol]	M %偏差
H ₂ O	18	1.255	-8.785	1.642	0.215	16	-10
MeOH	32	1.505	-8.944	1.138	0.056	34	6
乙二醇	62	1.792	-9.088	0.816	-0.088	66	6
DSS*	218	2.338	-9.316	0.483	-0.316	188	-14
PEG 400 g/mol	400	2.602	-9.485	0.327	-0.485	408	2
PEG 3.86 kDa	3860	3.587	-10.031	0.093	-1.031	5025	30
PEG 10.37 kDa	10370	4.016	-10.206	0.062	-1.206	11238	8
PEG 31.63 kDa	31630	4.500	-10.381	0.042	-1.381	25131	-21

*DSS:3-(三甲基硅基)-1-丙磺酸钠

DMSO的分子量校准

物质	M [g/mol]	log (M [g/mol])	DOSY 指数 γ	D [m ² / (s*1E9)]	log (D [m ² / (s*1E9)])	M DOSY [g/mol]	M %偏差
DMSO	32	1.505	-9.230	0.589	-0.230	36	13
乙二醇	62	1.792	-9.340	0.457	-0.340	62	-1
PhEtOH	122	2.086	-9.431	0.371	-0.431	96	-21
布洛芬	206	2.314	-9.586	0.259	-0.586	204	-1
PEG 400 g/mol	400	2.602	-9.753	0.177	-0.753	459	15

D₂O线性拟合:Log(D) vs. log(M)

斜率:	-0.501
y截距:	0.822

Linear Fitting DMSO: log(D) vs. log(M)

斜率:	-0.474
y截距:	0.508

*DMSO线性拟合:log(D) vs. log(M)

表1:25° C下D₂O和DMSO的分子量M与扩散系数D的多点校准

通过多点校准, 可以绘制已知的分子质量M[g/mol] (x轴) 和对应的扩散系数D (y轴) 的关系, 见图4。扩散系数是通过读取TopSpin软件的DOSY指数 γ , 并代入公式2而得到的:

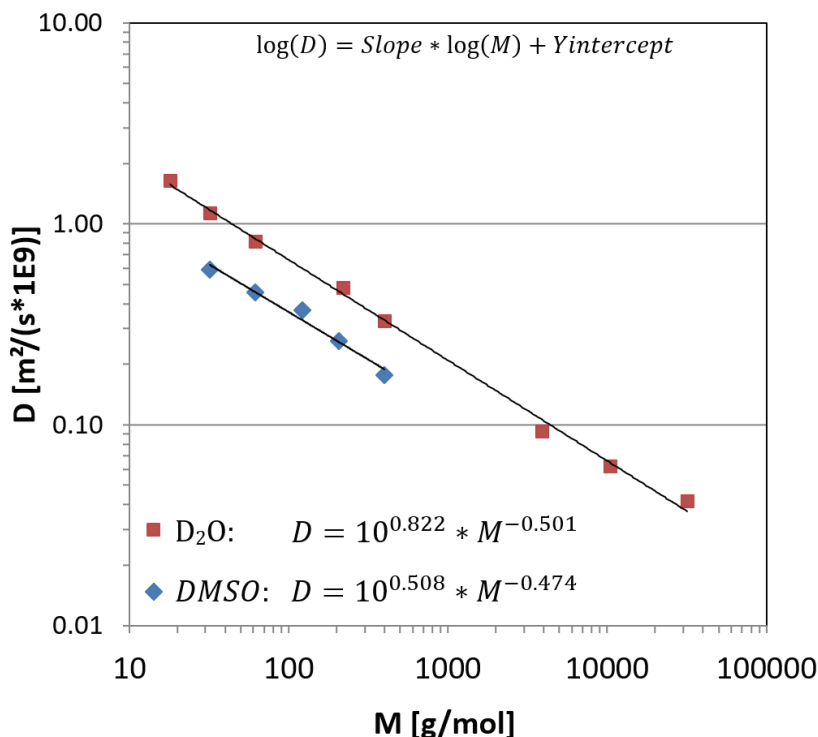


图4: 25° C下, D₂O和DMSO的分子质量M与扩散系数D的多点校准

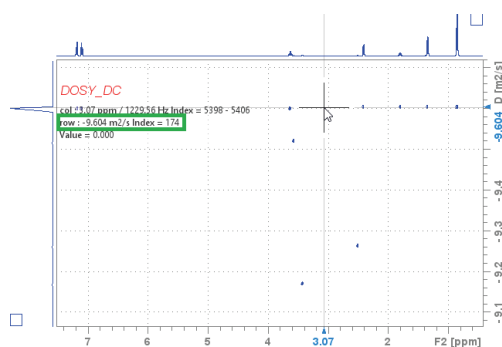


图5: 在TopSpin软件中, 通过光标的位置, 读取扩散系数的DOSY指数 γ ($\gamma = -9.604$)。

$$D = 10^{\gamma * 1E9}$$

公式2: D代表扩散系数[m² s⁻¹ * 1E-9]

进行回归分析的方法有很多, 例如: 图1所示的线性回归。另一种方法是使用幂回归。在任一情况下, 将算得的分子量 (表1中的M DOSY) 与已知的真实分子量 (表1中的M [g/mol]) 关联起来, 算出偏差百分比 (图1的M % 偏差)。

使用DOSY实验根据校准, 确定未知分子量时, 典型误差约为± 30 % (见表1的“M % 偏差”列)。在比较结构、极性和氢键性质相似的化合物时, 误差可能较小。换言之, 如果结构的官能团不同, 则可能导致极性和氢键发生剧烈变化, 误差也更大, 比如布洛芬和布洛芬甲酯 (图1)。如果只考虑分子量对扩散系数的影响, 那么布洛芬甲酯应当更重, 所以扩散速度比布洛芬慢, 即布洛芬甲酯的信号应当出现在布洛芬信号的上方。但由于它们的重量差异很小 (仅14 g/mol), 极性变化很大——布洛芬具有极性羧酸基团[-COOH], 这是布洛芬甲酯所没有的, 它含有少量的极性酯基团(-COOMe)——因此情况相反。

以水 (18 g/mol) 和布洛芬 (206 g/mol) 为例, 假设算得的分子量偏差为30%, 可以得到23 g/mol 和268 g/mol的结果, 这足以区分二者。因此, 30%的相对误差往往不会对DOSY数据的实际用途产生影响。

获取高质量DOSY谱

为了获取高质量DOSY谱, 我们需要避免NMR样品管发生溶剂对流现象。最简单的方法是在5mm样品管中使用高粘度溶剂, 例如D₂O或DMSO, 同时避免高温。如果必须使用CDCl₃等低粘度溶剂, 那么使用3mm样品管并保持室温条件, 可以在大多数情况下有效避免对流。

对于出于常规目的, 而且需要获取在样品之间具有可比性的高质量谱, 我们建议保留DOSY实验的标准参数不变。更改参数可能会以许多意想不到的方式影响DOSY实验的定量性质。

DOSY实验的间接维度的扩散系数是通过峰强度的定量拟合得到的。标准NMR实验通常在实验设置和所用样品方面具有稳健性。但对于DOSY实验, 情况恰恰相反。它严重依赖于对所有实验参数和样品性质(例如: 温度、黏度、浓度等)的良好控制, 以获得准确且精准的扩散系数。不同于其他二维实验, 间接维度的分辨率很大程度上与间接维度的增量数量不相关。为了获得良好的DOSY数据, 并拟合非重叠信号的单指数衰减曲线, 我们至少需要三个(2+1) F1增量进行线性拟合, 并计算线性拟合的误差。DOSY_DC参数集使用了8个F1增量, 由于不需要过采样, 我们建议对所有常规应用使用该参数集。

为了优化DOSY实验的性能, 时有科学文献建议优化各个样品的DOSY梯度, 以便在间接维度的数值重构中使用最大范围的值。从数学角度来看, 在获取较重的聚合物(>50000 g/mol)的DOSY数据时, 这可能是有道理的。但在使用DOSY_DC数据集进行常规应用时, 优化DOSY梯度可能没有必要, 也不会显著提高准确性、精确性或分辨率。相反, 更改梯度时间或梯度强度(向较小衰减方向)通常会导致伪影重聚, 这些伪影是扰相梯度的干扰引起的。因此, 梯度场的持续时间和强度同样不能更改。如果产生了伪影, 那么峰幅会受到严重影响, 进而影响DOSY实验的准确性、精确性和分辨率。

甚至不充分弛豫也可能损害谱的可再现性, 这会影响相位循环补偿误差的能力。因此, 如果你试图优化实验参数, 那么需要在定量的基础上评估结果。如果无法进行评估, 则建议不要更改参数, 扫描次数和谱宽除外。关于如何获取高质量数据, 请参考DOSY_DC参数集提供的其他细节。



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.bb.io.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