

二维核磁共振谱解析及其应用

王宏钧 张惠苓 卢葛草

(中国科学院福建物质结构研究所, 福州市西河, 350002)

摘 要

2D NMR在波谱学的化学应用中占据首要位置。本文简述了COSY, LRCOSY, COSYDEC, SECSY, DQC-COSY, RCT, INADIQUATE, RELAY, INVERSE, NOESY, HOESY, OHAHA, ROESY, HMQC, HMBC等谱的形状, 指认步骤及其应用。

关键词 二维核磁共振谱, 相关谱, 远程相关谱。

1 概 述

1.1 引 言

二维核磁共振(2D NMR)方法是由吉纳(Jeener)于1971年首先提出的^[1,7], 它可看成是一维NMR谱的自然推广。实验表明, 自旋具有某种记忆能力, 而在不同的演变期内进行测量, 所给出信息的质和量皆不相同。因此, 引入一个新的维数必然会从另一方面给出相关的信息, 从而会大大增加创造新实验的可能性。但在较长的时间内, 这种设想没被人们理解和重视。1976年恩斯特(Ernst)确立了2D NMR的理论基础^[1,8], 并用实验加以证明, 其后恩斯特和费里曼(Freeman)等研究小组又为2D NMR的发展和应用进行了深入的研究, 迅速发展了多种二维方法并把它们应用到物理化学和生物学的研究中, 使之成为近代NMR中一种广泛应用的新方法。

2D NMR是由普通一维谱衍生出的新实验方法, 引入第二维后, 减少了谱线的拥挤和重叠, 以把谱图扩展到另一个外加的方向上, 另一方面也可以在编辑过程中删去较多的峰。图1-1以一个相似的例子说明第一个处理方法的基本原理^[2]。面对读者按年龄增长的次序排列着一队人, 分别属于a, b, c三个家庭。你怎么知道每个人各属于哪个家庭呢? 按这个单列考察, 也许只能知道他们年龄的大小。但是, 如果要求a家庭的人向前迈两步, b家庭的人迈一步, 问题就解决了。现在形成的队列, 在一个方向是按家庭分类的, 在另一个方向则是按年龄分类^[6,11]。二维NMR也是试图处理复杂的谱图, 以达到相似的结果: 给出某种有用的共振谱线的分离, 或者在第二个方向上建立与另一个方向上经典的化学位移的相关联系。我们可以按连接氢原子的数目分类碳原子, 也可以按它们的“活动能力”分类, 或者按J-耦合核的化学位移分类。通过巧妙地处理谱图可以了解为解决某一问题所必须的信息。在异核位移相关谱

1992年9月4日收到

中,一维是一类核,例如 ^{13}C , ^{15}N ,或 ^{31}P 的谱图,另一维是与之耦合的核,通常是 ^1H 的谱图。在等高线图上的每个峰同时表示两种核,例如碳原子,以及和它相耦合的氢的化学位移。如果我们知道了氢的化学位移,那么利用此图可以指认 ^{13}C 或其他异核信号;或把一个复杂谱图在另一维加以扩展;或通过一个核对另一个核的作用而间接观测它。2D NMR方法为解析复杂化学结构提供了强有力的工具。同核二维J分解谱是把化学位移与耦合常数分开,使复杂谱图易于辨认,对于解析相互交迭的复杂耦合谱很有帮助;但它不能直接告诉我们哪一个峰是什么峰,或哪个峰与哪个峰耦合。同核二维化学位移相关实验则是测定同核耦合的有力工具。异核化学位移相关实验则可以给出直接或远程异核耦合的关系,从而获得 ^1H 和 ^{13}C 之间的相互关系。 ^{13}C - ^{13}C 相关实验则反映 ^{13}C - ^{13}C 之间的耦合关系,当所有其他技术都不灵时,它对于直接揭示分子结构极为有用。这些方法已成功地运用于有机化合物,特别是已成功地用于解析溶液中结构复杂的生物大分子的化学结构,可测定中等大小的蛋白质及分子量高达15000的核苷酸片断在溶液中的化学结构,并使溶液中蛋白质的立体结构测定成为可能。

目前,测定生物大分子构象的实验方法主要有两种,即单晶X射线衍射和2D NMR。但由于前者的应用范围受到一些限制,在某种程度上,2D NMR具有更广阔的发展前景。首先单晶X射线衍射只能用于单晶样品,但在许多情况下很难得到甚至得不到适用的单晶样品。其次,X射线衍射只能给出固态构象,由于结晶效应的影响,生物大分子的自然存在状态的溶液中的构象,显著不同于在固态时的构象,特别是小分子多肽。因此,研究溶液中生物大分子构象及其动态的技术就显得非常重要。2D NMR是目前适合于研究溶液中生物大分子构象的唯一技术。应用NMR不仅能检测分子中特定的原子,如 ^1H , ^{13}C , ^{15}N 等,而且给出分子中原子之间通过化学键传递的J耦合联结方式和通过空间传递的NOE联结方式,进一步获得更精确的NMR谱参数,如化学位移,耦合常数,NOE值及弛豫时间等,其中含有大量有关分子结构及其动态的信息。

一维谱的信号是一个频率的函数,记为 $S(\omega)$,共振峰分布在一条频率轴上。而二维谱是二个独立频率(或磁场)变量的信号函数,记为 $S(\omega_1, \omega_2)$,共振峰分布在由两个频率轴组成的平面上。关键的一点是两个独立的自变量都必须是频率,如果一个自变量是频率,另一个自变量是时间、浓度或温度等其他物理化学参数,则不属于二维谱,它们只能是一维NMR谱的多线记录。2D NMR的最大特点是将化学位移,耦合常数等NMR参数在二维平面上展开,于是在一般的一维谱中重迭在一个频率坐标轴上的信号,被分散到由两个独立的频率轴构成的二维平面上,同时还能检测出共振核之间的相互作用。二维谱能否实现取决于采集数据的时间及计算机的运算能力和实验完成后的打印速度,而后者往往是更重要的问题。因此目前普遍采用激光打印机。

在讨论一维谱中能分辨多少信号峰时,只需知道谱宽和每个多重峰的宽度。如所得 ^1H 谱宽为2000Hz,耦合裂分的多重峰的平均宽度为30Hz,那么最多有66组多重峰可以彼此完全分辨开。在 ^{13}C 谱中,谱宽10000Hz,每条线宽2Hz,大约可以分辨5000条不同的信号峰。在二维谱中是用面积单位 $(\text{Hz})^2$ 进行计算的。对一个 ^1H - ^{13}C 化学位移相关谱,其 ^1H 谱宽为2000Hz,

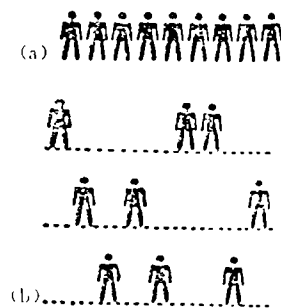


图 1-1 (a) 单列的人.(b) 同列的人按家庭分类

^{13}C 为10000Hz, 它的面积是 $2 \times 10^7 (\text{Hz})^2$, 若每个多重峰的面积是 $2 \times 30 (\text{Hz})^2$, 那么, 理论上可分辨的信号峰的数目可多于100000条^[2,61]。

原则上, 二维谱可以用概念上不同的三类实验得到它, 见图1-2。1. 频率域实验: 属连续波实验, 同时加两种射频频率, 测定自旋体系对两个频率的响应函数就可直接获得一种二维谱, 这可在通常的双共振实验中实现。在连续波自旋去耦实验中, 依次改变去耦频率, 观察有关谱线强度、裂距和多重性的变化, 可得到一组图谱。它是观察频率和去耦频率二个独立频率的函数, 以这两个频率作为互相正交的二坐标作图, 即可获得2D NMR谱。此法费时费力, 无实用价值。2. 混合时域, 频域实验: 它是脉冲傅里叶偏共振去耦实验, 它与前者的差别仅在于得到的是FID信号, 通过一次傅里叶变换获得观察频率函数。在这类实验中, 自旋系统受到射频 ω_2 的扰动, 而测量的是脉冲响应时域信号 $S_{\omega_2}(t_2)$ 。只要系统地改变 ω_2 , 得到一系列时域信号, 再把这些谱对 t_2 进行傅里叶变换就得到二维谱。3. 二维时域实验: 它是获得2D NMR的主要方法。以两个独立的时间变量进行一系列实验, 得到 $S(t_1, t_2)$, 经过两次傅里叶变换得到二维谱 $S(\omega_1, \omega_2)$ 。我们所指的2D NMR均指这种时间域的二维实验, 又称2D-FT-NMR。

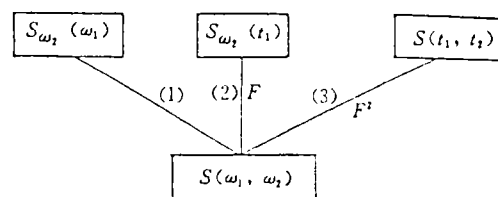


图 1-2 2D NMR 三种获得方式

在2D MMR实验中, 为确定所需的两个独立的时间变量, 要用到特种技术—时间分割。即是把整个时间轴按其物理意义分割成四个区间, 如图1-3所示^[11]。(1) 预备期: $t < 0$, 通常由较长的延迟时间 T_d 和激发脉冲组成。 T_d 的作用是等待核自旋体系达到热平衡, 使核自旋体系处于某种适当的初始平衡状态, 在预备期末加一个或多个射频脉冲, 以产生所需要的单量子或多量子相干。其中可能涉及饱和、极化传递和各种激发技术。(2) 发展期: $0 < t < t_1$, 此时间系控制磁化强度运动, 并根据各种不同的化学环境的不同进动频率对它们的横向磁化矢量作出标识, 以便在检测期检测信号, 采样累加, 在此期间用来标记要间接测定的核或相干^①。(3) 混合期: $t_1 < t < t_1 + \tau$, 它由一组固定长度的脉冲和延迟组成, 在此期间通过相干或极化的传递, 建立检测的条件, 但有时也可以不设混合期。(4) 检测期: $t > t_1 + \tau$, 在此期间检测作为 t_2 函数的各种横向矢量FID变化, 它的初始相及幅度则受到 t_1 函数的调制。

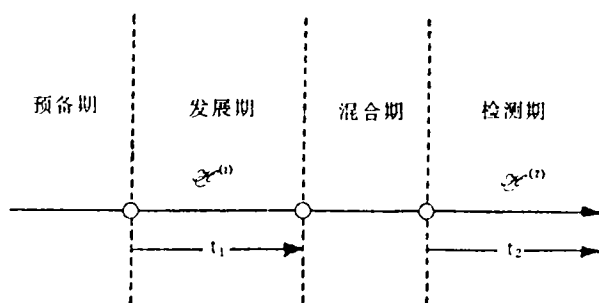


图 1-3 一般二维实验

^①相干(coherence): 指的是描述自旋体系状态的波函数之间关系的一种物理量, 它通常没有简单的物理模型。它是横向磁化及相位有序的量。相干不仅包括 $\Delta m=1$ 的状态之间的关系, 还包括 $\Delta m=0$, $\Delta m=2$ 等状态之间的关系。可通过射频脉冲的作用加以传递, 用乘积算符, 单跃迁算符等可方便地描述这种过程。

用固定时间增量 Δt_1 依次递增 t_1 进行一系列实验, 反复累加, 因 t_2 时间检测的信号 $S(t_2)$ 的振幅或相位受到 t_1 的调制, 则接收机收到的信号不仅与 t_2 有关, 还与 t_1 有关, 每改变一个 t_1 , 记录 $S(t_2)$, 由此得到分别以时间变量 t_1, t_2 为行、列排列的数据矩阵, 即在检测期内获得一组 FID 信号, 组成二维时间域信号 $S(t_1, t_2)$ 。因 t_1, t_2 是两个独立时间变量, 可以分别对它进行傅里叶变换, 一次对 t_2 , 另一次对 t_1 , 两次傅里叶变换的结果, 可得到两个频率变量的函数 $S(\omega_1, \omega_2)$, 如图 1-4 所示。

1.2 二维谱的实验过程 [11, 55]

在二维实验中对每个 t_1 值, 脉冲序列作用后得到一个以 t_2 为变量的一维响应。 t_1 从小到大, 每次等量增加 Δt_1 , 作大量重复实验, 得到一组不同 t_1 值的关于 t_2 的响应。所得的每个响应都是数字化的, 是实数还是复数取决于采用单个检测还是正交检测。这些数据通常存入计算机磁盘以备调用。为了提高灵敏度, 对每个 t_1 值的子实验重复 P 次, 或对不同 t_1 值的所有子实验总体 (一次完全实验) 重复 P 次, 使灵敏度增强 \sqrt{P} 倍。一般都采用后者重复, 因为磁场的慢变化能被部分地平均掉。发展期时间增量 Δt_1 决定于沿 t_1 轴的取样速率 $(\Delta t_1)^{-1}$ 。而检测期取样间隔 Δt_2 则由沿 t_2 轴的取样速率 $(\Delta t_2)^{-1}$ 决定。

实验得到的时域信号 $S(t_1, t_2)$ 构成一个数矩阵, 每个取样点对应于一个矩阵元 $(t_1, t_2) = (n \Delta t_1, m \Delta t_2)$ 。对 t_2 作离散傅里叶变换, 将得到一组有不同 t_1 值的频率谱。这些频率谱作为矩阵的行, 而该矩阵的列则包含 t_1 函数的调制信息 (干涉图)。

由于首先对 t_2 作的 FT 产生复数数据点, 所以干涉图由复数数组组成。为便于存取干涉图, 将上述矩阵转置, 即原矩阵的列一复数干涉图作为新矩阵的行。在相位调制的情况下, 对 t_1 作复数傅里叶变换, 能区分调制频率的正、负, 并给出相位扭曲线形。在幅度调制的

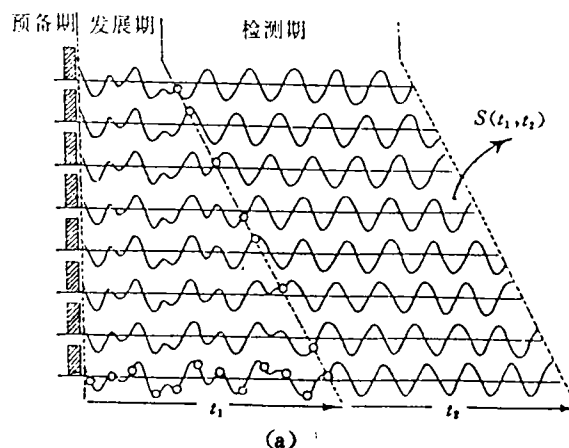
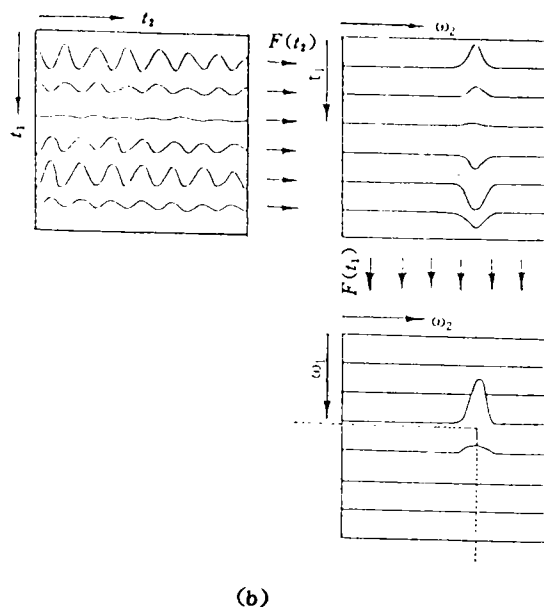


图 1-4 (a) 获得二维时间域函数示意图

(b) 二次傅里叶变换示意图

情况下, 复数傅里叶变换给出关于 F_1 维的零频为对称的谱, 共振峰仍是相位扭曲线形。为改善灵敏度和产生纯吸收型二维谱, 在 FT 之前把 F_2 一频率谱的实部调相到吸收型。数据的虚部用零来代替。在幅度调制情况下的另一处理方法是, 在调相之后, FT 之前除去 F_2 谱的色散虚部, 把实数数据整理到一起, 给出实数数据组成的干涉图。对 t_1 作实数 FT 产生 F_1 维只有正值的二维谱。后一种方法可以节省处理时间和数据存储空间。为了改善沿 F_2 或 F_1 轴二维谱的分辨率, 分别在 FT 之前沿 t_2 或 t_1 轴进行数字滤波处理。如图 1-5 所示。

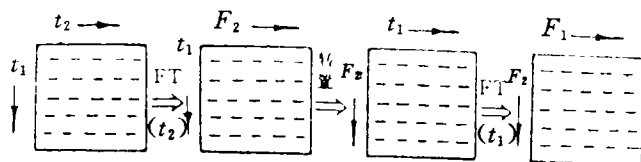


图 1-5 二维傅里叶变换过程

1.3 实验方法

化学上应用 2D NMR 可根据研究和解决问题的具体内容, 采用不同的方式, 根据不同目的, 采用不同的脉冲序列。因此, 必须备有脉冲持续时间, 等待时间和相位等均能自由改变的脉冲程序。此外, 由于二维实验需要快速处理庞大的实验数据, 数据处理和记录都很费时, 必须用大存储量的辅助记忆装置, 快速的激光打印机, 陈列数据处理器, 梯度场探头等新技术装备, 它们对实验操作至关重要; 而带有相应软件的大屏幕快速图象显示系统则能大大提高处理信息的效率。通常 2D 实验需要进行长时间的测定, 因此要求磁场能长期稳定, 并采用灵敏度高的超导高场仪器, 以减少累加次数并能将谱线拉开。为获得更多的信息, 应尽可能地提高分辨率。在做 2D NMR 实验之前, 一定要把一维谱尽可能地做好并解析清楚。

1.4 二维谱的记录 [11.66]

用图形表示两个独立变量的函数, 常用以下四种方法: (a) 多线记录法 (叠迹图或堆积图); 见图 1-6, 是准三维表示 [11],

看起来富有立体感, 两个频率变量表示二维, 信号强度为第三维, 它实际上是一组固定增量 F_1 (或 F_2) 所对应的 $S(F_2)$ [或 $S(F_1)$], 其记录方法与 T_1 测量时所用方法基本相同, 其区别是在软件上配备了“白洗程序”, 它可以使运行中的笔在遇到前次画出的峰轨迹时自动抬起不画, 避免了线条重叠, 得到“纯净”的显示, 看起来非常清晰悦目。但由于峰的频率坐标

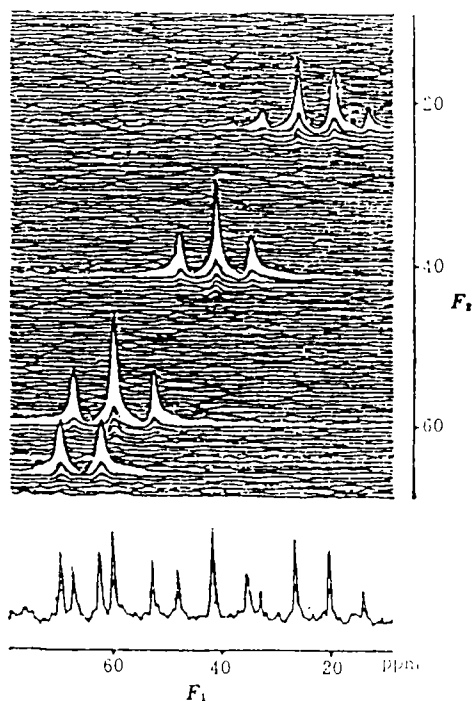


图 1-6 1,3-丁二醇的 NMR 谱 (上图) 二维谱, (下图) 一维质子耦合碳谱

很难确定,实际上很难获得正确的定量信息。其另一缺点是大峰后面的小峰完全被淹没,且作一幅图很费时间。(b)等值线图:与地图上的等高线或X射线衍射图中电子云密度等位线相似,在二个频率轴组成的平面上画共振峰强度的等值线图,以某一信号的振幅C定为最低等值线的值,则下一条等值线的值是2C,以后是4C,8C……。从每个等值线图能提取有关频率的定量数据,只要数一下等值线的圈数即可得到峰的幅度值。因此,只用较少的等值线即可表示动态范围大的信号,而且作一幅图所花时间远少于叠迹法。其缺点是强信号的最低等值线可能会波及很宽范围,并掩盖掉附近的弱信号,因此在解析二维谱时最好将(a)、(b)两种方法结合使用。见图2-2。

分析谱图总会自觉或不自觉地从谱图中选出一个好的“起始点”。所谓“起始点”就是一个容易辨认的信号,此信号确信无疑地归属某个特定的碎片,并以某种方式与其他信号相连。从这个基点开始,可以进行去耦或NOE实验以找到相邻的核,然后利用进一步的相关联系找出下一组相邻的核等等,直到全部连结完成。对于复杂分子,往往需要再找一个起始点,对分子的不同部分重复如上过程,有时相关联系会给出两种或更多种的谱图解释,那就需要反复推敲,排除解释中出现矛盾的结构。许多分子的起始点是很明显的,如甲基的峰,烯烃质子峰,与 ^{31}P 相耦合的质子等等。在分析复杂的分子结构时,好的起始点会不止一个。显然,特征起始点将有助于化合物结构的快速指认。(c)截面图:实际上2D谱的有用信息的峰常集中在有限几个剖面上,通常并不需要记录全谱,只须分开记录这些剖面,所要作的截面图中绝大部分平行于一个频率轴,或与其成 45° 角(如同核J谱),如图2-1(a)。(d)积分投影图:在同核J分解谱、同核相关谱和多量子谱中,对垂直于投影轴(应用最多的是 $F_1=F_2$ 轴)的剖面上的信号强度进行积分就得到2D谱的投影如图1-7所示。对弱耦合体系,在频率域沿 45° 投影可提供十分重要的同核去耦质子谱,但投影图的灵敏度一般较差。下面把四种不同表达方式的优缺点总结如表1。

表 1 四种不同表达方式的优缺点

优 点		缺 点
叠迹图	以示意的方式画出全部信息	隐藏小峰,费时间,难于得到峰的正确频率
等值线图	容易提取频率定量数据,相对地快	得不到低于等值线值的信息和在等值线之间的信息
截面图	容易提取频率、振幅和线形的定量数据	只是信息的一部分
投影图	简化谱,容易提取频率和线形数据	只是信息的一部分

1.5 二维谱的物理表示方法^[11,55]

(1)相敏谱:如果能得到纯二维吸收谱 $R(\omega_1, \omega_2)$,以相敏方式画吸收谱为最佳,与其他方式相比,其优点是吸收峰的高分辨,有较好的灵敏度,且能区分调制频率的正负。(2)功率谱:单个洛仑兹线的线形与相应的吸收型的线形相同,因此仍是高分辨。但由于吸收型分量重叠是相加的,色散型分量重叠是相减的,因此在共振重叠的情况下,线形失真相当严重。另一个缺点是强度被平方,有很大的强度失真,这对二维谱的表示十分不利,故很少采用。(3)绝对值谱:是二维谱最常用的表示方法。定义为功率谱的平方根,无强度失真,但线形失真依然存在。由于色散项的贡献使线形大大增宽,线形严重畸变,特别是在线的基部。一般采用数字滤波技术除去绝对值线形的尾部,以改善线形,提高分辨率。

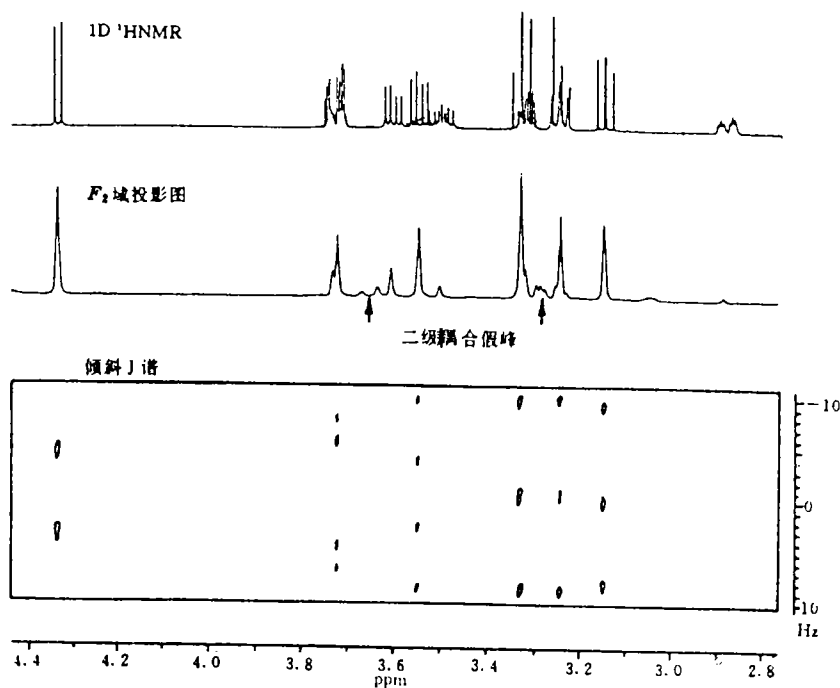


图 1-7 化合物1同核 J 谱 F_2 投影图与正常1D NMR谱比较, 箭头所示为二级耦合产生的假峰

1.6 线型和相位 [11.55]

二维谱相位关系复杂, 用相敏谱表示很不方便, 一般采用功率显示或绝对值显示, 它们都不保留相位的正负特性。功率显示, 分辨率好, 但强度严重畸变, 所以通常采用绝对值模式, 但由于色散的影响, 它往往有很长的尾巴。

由于贮存量与实验时间的限制, 通常发展期取的点数有限, 因此在 t_2 维上会引起比一维谱更严重的截尾效应。而通常用的绝对值模式, 受虚部影响很大, 因此在二重傅里叶变换前作适当的权函数处理是个关键。对于二维谱, 用指数窗函数不如一维谱有效, 而普遍采用高斯型与卷积差型权函数。高斯型权函数给出很好的分辨率, 但要求要有很高的灵敏度, 并要求不同谱线的线宽相同, 使用时应十分注意。

1.7 二维谱共振峰的命名 [11.55]

根据共振峰在二维谱中的位置可以分为: (1) 对角峰(或 Auto peak), 位于对角线($\omega_2 = \omega_1$)上的峰, 称为对角峰。这意味着在发展期和检测期的进动频率相同, 而且在混合期中未发生相干转移^①。对角峰在 F_2 和 F_1 轴的投影, 视不同的实验方案而得到常规的耦合谱或去耦谱。(2) 交叉峰(Cross peak), 出现在 $\omega_2 \neq \omega_1$ 处(即非对角线上), 它表明存

① 磁化矢量的传递包括极化传递和相干传递。极化通常指不同能级间粒子数差, 可用 M_z 表示。极化传递即把从氢核的自旋极化传递到另一个核(如 ^{13}C)上去。相干传递是通过核间某种相互作用(通常是 J 耦合作用)实现的。

在 $(mn) \rightarrow (kl)$ 的相干转移, 在发展期的进动频率不等于检测期的进动频率。从峰之间的位置关系可以判定哪些峰之间有耦合关系, 从而得到哪些核之间有耦合作用, 交叉峰是二维谱中最有用的部分。(3) 轴峰(Axial peak): 出现在 F_2 轴 ($\omega_1 = 0$) 上的峰, 称为轴峰。轴峰是由发展期在 Z 方向上的磁化矢量转化成为检测期可观测的横向磁化分量, 它不受 t_1 函数的调制, 不含任何耦合关系的信息, 但它含有在发展期中纵向弛豫过程的信息。由于轴峰的信号很强, 尾部又长, 使谱中许多有用的小信号被淹没而不能分辨, 因此应尽量设法抑制轴峰。

2 二维分解谱

2D NMR 大致可分为三类: 二维分解谱, 二维相关谱及多量子二维谱。

二维分解谱^[19-22, 57]在发展期 t_1 和检测期 t_2 之间, 若不存在混合期和混合脉冲, 不同核的磁化之间没有转移, 这种实验得到的二维谱称为 2D- J 分解谱, 它只是把 J 分开表示, 并未增加新的信息。与一维谱相比, 二维分解谱不增加信息量。仅仅把一维谱的信号按一定规律在二维空间展开, 使原来重叠的谱线被扩展分离, 从而得到 1D 谱无法或难以测得的化学位移及耦合常数。二维 J 谱可看成是一维 J 谱或自旋回波傅里叶变换的自然推广, 它是 J - δ 相关, 能表现出化学位移与谱线多重性之间的关系。并能使重叠的信号按 δ 和 J 分别在两个不同的频率轴上展开, 即 F_1 轴含有耦合信息, 而 F_2 轴含有化学位移信息, 因此使谱图解析容易进行。二维 J 谱还可以用来区分和归属同核与异核耦合常数。

二维耦合常数分解谱的基本脉冲序列: $D_1 - \pi/2 - t_1/2 - \pi - t_1/2 - ACQ$

2.1 同核二维 J 谱^[1, 11, 14]

它是 J - δ 相关谱, 采用自旋回波技术将 ^1H NMR 中重叠密集的谱线多重峰结构转入第二维, 是准确测定密集 ^1H -NMR 耦合常数的有效实验方法。在复杂化合物 ^1H 谱中, 由于 ^1H 化学位移范围较窄, 而 ^1H - ^1H 间的耦合广泛存在, 因此造成谱线非常密集, 难以辨认。同核二维 J 谱可将化学位移与 J 耦合分开, 使谱上过分密集的信号分散在平面上, 如图 2-1 所示^[22]。由自旋耦合而分裂的耦合信号位于与 ω_2 轴成 45° 角的直线上, 它在 ω_2 轴上的投影为同核去耦的“纯”化学位移谱, 可得到全去耦的 ^1H 谱中的 δ 值。这是没有耦合的 ^1H 化学位移谱, 在相当大的程度上克服了复杂耦合关系引起的谱线重叠和密集, 对解析复杂分子的 ^1H 谱具有十分重要的意义。它在 ω_1 轴上的投影是未去耦谱, 给出 J 值。它不仅使部分重叠的各组质子信号分开, 还可准确测出一维谱中无法测量的较为复杂峰系的耦合常数值。在解析糖类、甾体类或核苷酸化合物方面已被广泛应用。改变倾斜角的大小即可获得不同程度缩小的各种“缩尺”谱, 这种 45° 旋转在计算机上很容易实现, 即令 $F'_1 = F_1$, $F'_2 = F_2 - F_1$, 这样, 在 J'_1 维上给出 J 谱, 而在 J'_2 维上则给出同核去耦谱。此实验的主要用途是区分开重叠的多重峰, 只能得到纯的一级耦合常数和用投影法确定多重峰中心的位置。为消除很强的甲基单峰或溶剂峰对观察 J 耦合的影响, 可采用多量子滤波 J 分解谱, 消除不需要的单量子信号, 简化 J 谱。该法的缺点是难以得到很窄的谱线。当有强耦合时, 会使图形畸变, 使解析工作复杂化。

2.2 异核二维 J 分解谱^[1, 11, 14]

异核二维 J 分解谱是指观察核的化学位移为一维、观察核与另一种核间的 J 耦合为另一维的分解谱, 以 (δ_A, J_{AX}) 记之。它可将一维谱中不易解析的信号分开, 得到适当的归属。对于 ^{13}C 谱, 它将 ^1H 耦合的 ^{13}C 谱多重峰分裂转到了第二域。它分为三类: (1) 门控去耦 J

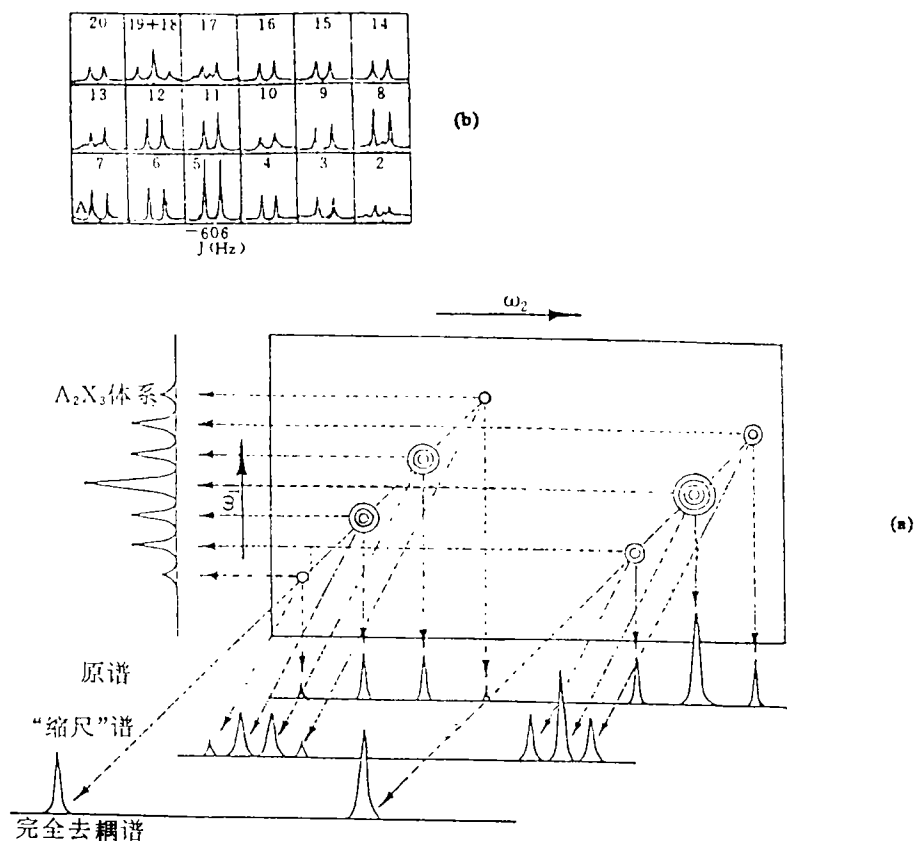


图 2-1 (a) 同核 2D- J 分解谱; (b) BPTI 的 ^1H - J 分解 2D 谱 19 个甲基的截面图

谱: 为了产生 J 调制的自旋回波信号, 在自旋回波的一半时间内加宽带去耦, 在发展期的一半时间产生 J 调制, 使整个 F_1 轴缩小一半。虽然分辨率略低, 但简单易行, 且能对强耦合体系给出与一维谱相同的质子耦合谱。因此, 目前普遍采用门控去耦法, 此法常用来确定 ^{13}C 谱的多重性(双峰, 三重峰, 四重峰)。即便在一维谱中分辨率很差的信号也能明确地归属 CH , CH_2 , CH_3 , 很方便地得到直接耦合的 ^{13}C - ^1H 耦合常数 $^1J_{\text{CH}}$ 。如果只关心 $^1J_{\text{CH}}$, 异核二维 J 谱是非常有效的方法。

基本脉冲序列 [^{13}C]: (BB: 去耦, DO: 不去耦)

^1H : BB(S_3) - BB(S_2) - DO - - BB(S_2) (或 DO)

X : $\text{D}_1 - (\pi/2) \phi_1 - t_1/2 - \pi \phi_2 - t_1/2 - \text{ACQ}(\phi_3)$

为了区分 S_{X} 和 J_{XH} , 在半个发展期内进行 J 调制, 在另外半个发展期内去耦, 避免 π 脉冲的聚焦效应。谱的特点是: F_2 域为 S_{X} , F_1 域为 J_{XH} 耦合多重峰, 裂距为 $J_{\text{XH}}/2$ 。缺点是多重峰分裂为 $J_{\text{XH}}/2$, 观察小耦合更加困难。

图 2-2(a) 是蔗糖“门控去耦”方式获得的 ^{13}C 2D- J 分解谱, (b) 是其二维宽带去耦 ^{13}C 谱。 ^{13}C 去耦单峰呈现于 ω_2 轴上, 它与 ^1H 耦合产生的多重峰呈现于 ω_1 轴上, 以坐标的中心为原点对称地向两侧分散, 分别向 ω_1 , ω_2 轴投影, 即能直观地得到每个 ^{13}C 核的化学

位移、峰的多重性及耦合常数值。由于使用“门控去耦”方式， ω_1 轴上所有峰间裂距是实际耦合常数 J 的一半。(2)选择性质子反转 J 谱：脉冲序列如图2-3^[11]，为了得到高效率的 J 谱，必须将直接相连的质子的 $^1J_{CH}$ 与远程耦合质子($^nJ_{CH}$, $n>1$)分开。如果不要 $^1J_{CH}$ 裂分，容易得到高分辨的多重结构。避开 $^1J_{CH}$ 的简单方法是进行选择性质子反转。弱的选择性 180° 脉冲只影响所选质子共振附近 $\pm 25\text{Hz}$ 范围，因此只有碳氢远程耦合引起的卫线受到反转作用，而 $^1J_{CH}$ 耦合引起的卫线不受反转作用，只要所选质子的共振远离其他质子峰(约离 125Hz 以上)，则只有这个质子和其他碳的远程耦合方能调制自旋回波，而且对每个碳只有一种劈裂，从得到的高分辨远程耦合谱，可以准确测定 $^nJ_{CH}$ ($n>1$)，这给分子构象研究和 ^{13}C 谱的归属提供了很有用的信息。见图2-4^[11]。

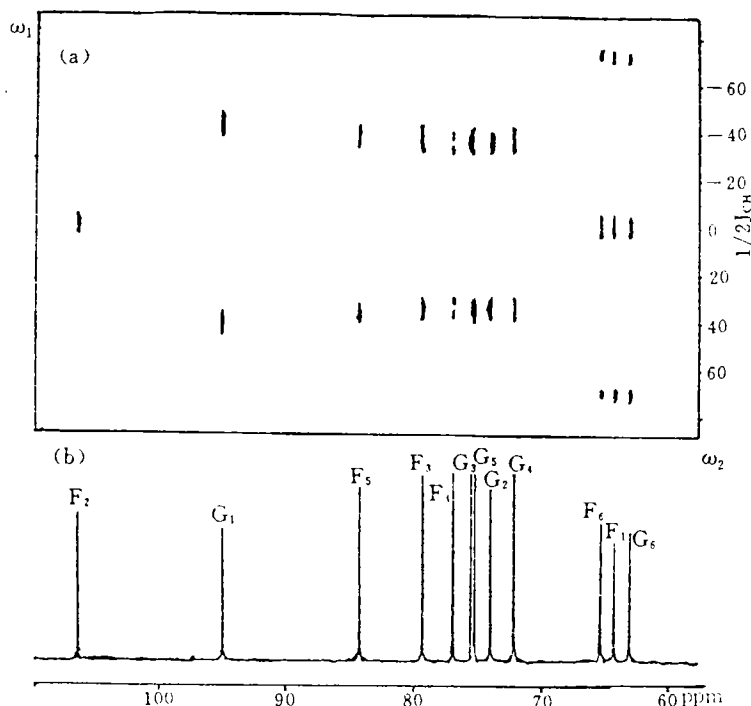


图 2-2 (a) 蔗糖 ^{13}C -2D- J 分解谱

(b) 蔗糖 ^{13}C -1D-宽带去耦谱(D_2O)

(3) 半选择性质子反转 J 谱：

用 $90^\circ_x - (1/2)J - 180^\circ - (1/2)J - 90^\circ_x$ (即BIRD脉冲)代替质子反转中氢的 180° ，即可得到只有单键耦合作用的 $^1J_{CH}$ ，此时所有远程耦合引起的精细结构均已消失。只余下 $^1J_{CH}$ ，利用该法可以很容易地精确测量 $^1J_{CH}$ 值，脉冲序列见图2-5^[11]。如果第二个 90° 脉冲加在 $-X$ 轴上，给出的是只有远程耦合的 J 谱，这时单键耦合($^1J_{CH}=128\text{Hz}$)消失，采用很窄的谱宽就足以显示远程耦合，但在强耦合体系，谱会变得十分复杂，见图2-6^[11]。

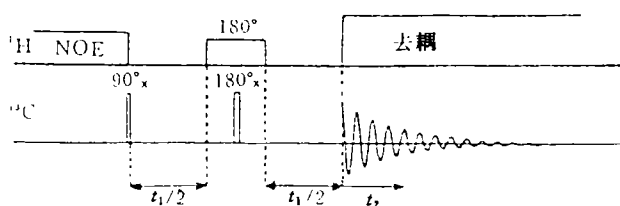


图 2-3 选择性质子反转异核 J 谱实验的脉冲序列

通常在两种极端情况下测试异核 J 分解谱：(1) F_1 域具有很高数字分辨率时， J 分解谱可以观察到天然线宽的多重峰，得到准确的重叠谱线的高阶耦合常数 $^nJ_{HX}$ 。对此实验的最

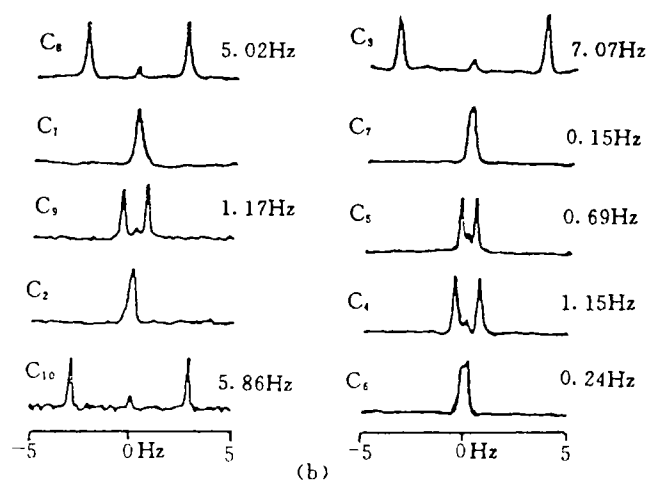
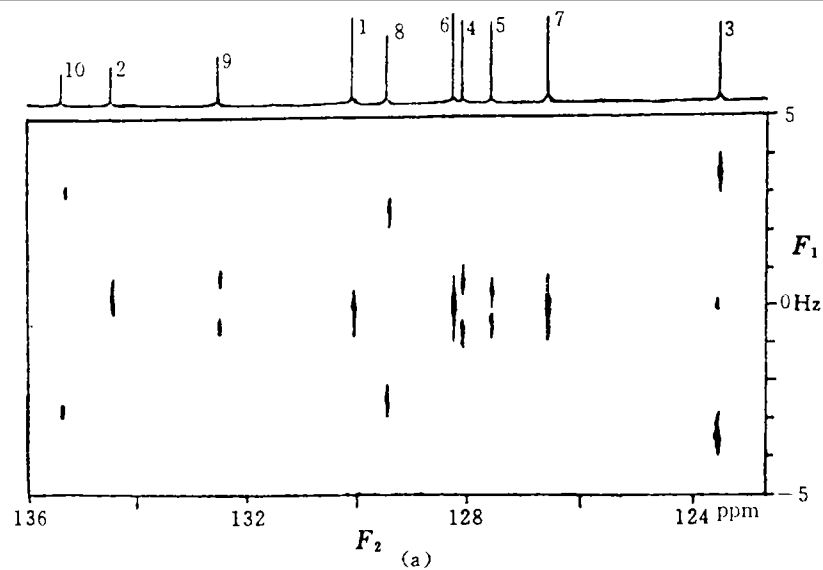


图 2-4 2-乙酰萘的选择二维 J 谱(芳烃部分). (a) —— 绝对值等值线谱;
(b) —— (a) 的相敏截面, 给出各种碳与质子 ^1H 的远程耦合值

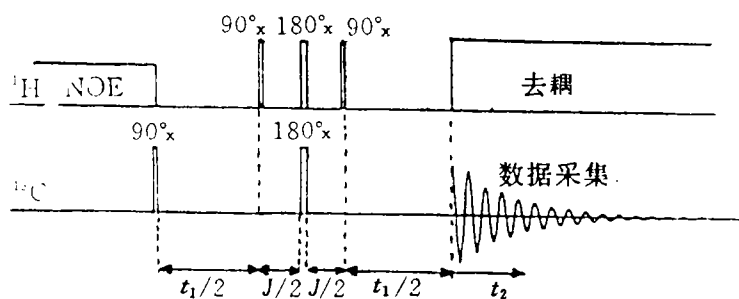


图 2-5 研究 $^1J_{CH}$ 的半选择性质子反转实验的脉冲序列(若沿 $-X$ 轴加第二个 90° 脉冲, 只出现远程耦合的调制)

大改进是在 t_1 中间引入BIRD脉冲取代 π 脉冲,以消除大的一键耦合效应,大大减少了多重峰范围,(只是远程耦合),减少了 SW_1 ,因而减少了实验次数。见图2-7[1,14]。

(2) F_1 域低分辨率实验能快速灵敏地检测峰的多重性,从而快速获得 ^{13}C 分类信息,其关键在于快速,而不考虑精细分裂。对于结构分析,低分辨率实验更为有用。图2-8的 J 谱可以清楚地显示碳的分类,(而偏共振谱的谱线相互重叠,难以区分),最直观的办法是由每个碳峰的 F_1 域截面图进行观测(右下), C_1 - C_4 的截面图显示了 J 耦合信息, C_5 , C_6 两峰重叠,峰形不直观。如略增加 F_2 域数据点,提高其分辨率,使碳峰分开,则会大大改善其效果[1,14]。

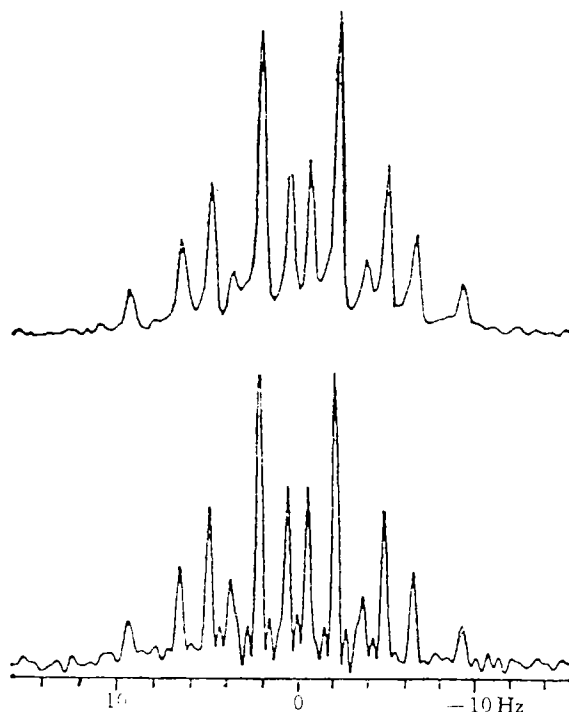


图 2-6 (a) 氯丙烷 C_2 的 ^{13}C 质子耦合谱:一维NMR展开图

3 同核化学位移相关谱 (COSY)(Correlated Spectroscopy)

二维相关谱:若在 t_1 和 t_2 期之间存在混合期和混合脉冲,不同核的磁化之间有转移,这种实验得到的是二维相关谱[18,23-25,46,47,57]。若不同核的磁化之间的转移是由 J 耦合作用传递的,即相干转移是由标量耦合作用传递的,则称为二维化学位移相关谱。其实,它并不表示化学位移之间有任何相关,而是表示具有一定化学位移的核信号之间有联系,如果谱中一个交叉峰出现在 (Ω_A, Ω_B) ,这意味着核A和核B有耦合,可产生多重峰。二维相关谱提供了新的信息,直接表明某一跃迁与其他跃迁有耦合。它比二维 J 分解

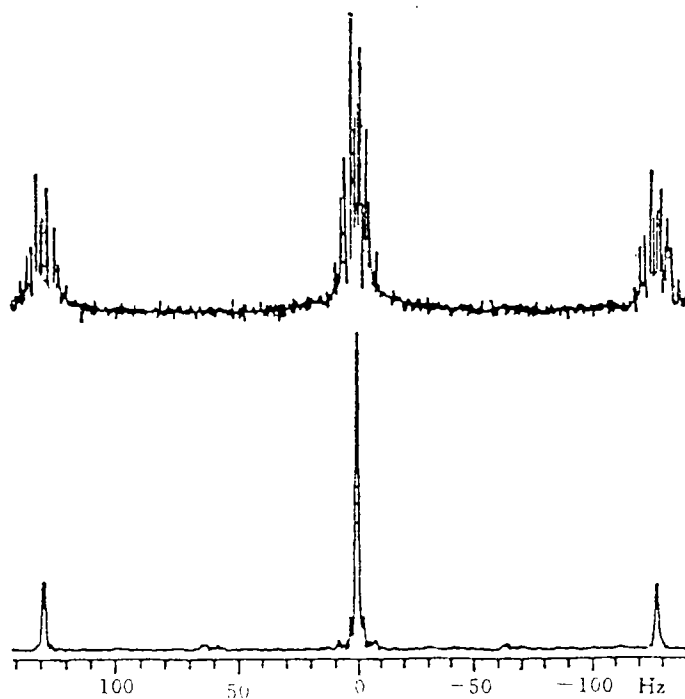
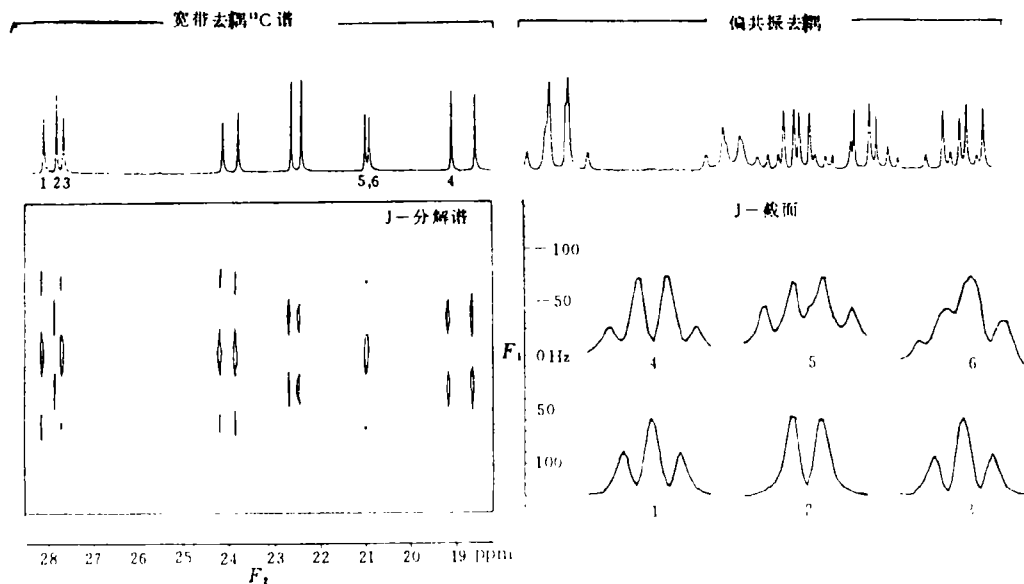
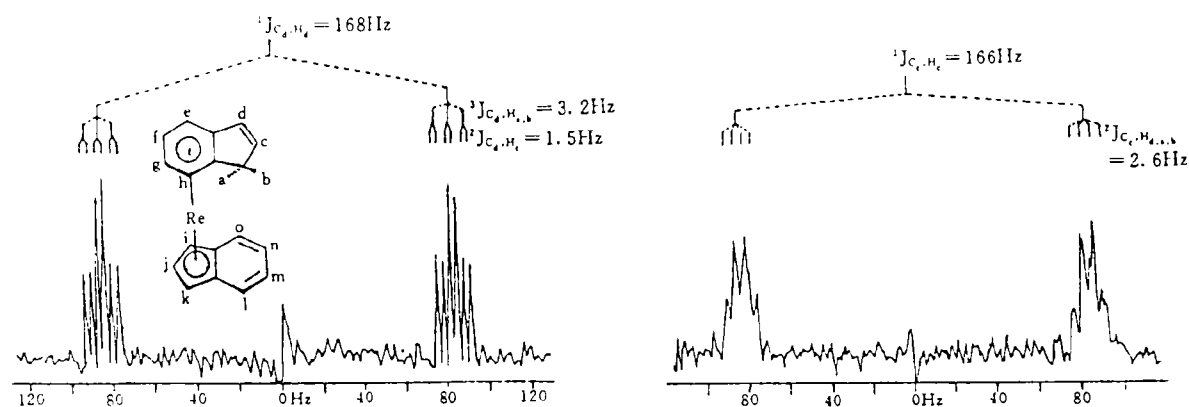


图 2-6 (b) 氯丙烷 C_2 的 ^{13}C 质子耦合谱.(上图)一维NMR谱,(下图)半选择二维谱的截面,下图中只出现 $^1J_{\text{CH}}$

图 2-7 F_1 域高分辨 ^{13}C - ^1H J -分解谱图 2-8 F_1 域低分辨 J -分解谱(胆甾醇乙酸酯)

谱更重要, 应用最广的也是化学位移相关谱。

3.1 同核化学位移相关谱 [1, 11, 14, 17, 18, 25]

同核双共振方法是分析复杂 ^1H 谱的有效方法, 同核化学位移相关谱比它更有效, 且节省时间, 也不要求被辐照核必须充分离开其他谱线, 且较易观测远程耦合。所谓 ^1H - ^1H 相关, 系指同一自旋耦合体系里质子之间的耦合相关。若从某一确定的质子着手分析, 即可依次对其自旋系统中各质子的化学位移进行精确指定。同核相关(^1H - ^1H COSY)谱可提供 ^1H - ^1H 之间通过成键作用的相关信息, 类似于一维谱中同核去耦, 不仅能提供全部耦合核间的关联, 相敏COSY还可以根据相位信息确定耦合常数, 其最大改进是把众多的信息量放入第二维, 许多重

叠峰的耦合关系可以由此确定。 ^1H - ^1H COSY可提供全部 ^1H - ^1H 之间的关联,是归属谱线、推导结构及确定结构的强有力工具。

AX 系统的 ^1H - ^1H COSY谱中有一类为对角峰,这是那些在 t_2 和 t_1 期间具有相同频率的组分,第二脉冲期间没有进行磁化转移,对角线上呈现出正常的 AX 系统的一维谱,代表化学位移。另一类是偏离对角线的交叉峰,它又分为两类:靠近对角线的交叉峰是同类核多重峰的一部分,远离对角线的交叉峰是具有共同耦合常数的不同类核的多重峰。我们感兴趣的是多重峰之间的关联,并由交叉峰找到各耦合质子之间的关联,而多重峰内的相关使谱图复杂化,须设法消除它。COSY实验的关键是增强分辨率。COSY谱有两种模式:一种为幅值模式,其信号全为正,不需调相。另一种为相敏模式,其相位复杂,调相的质量直接影响到耦合常数 J 的检测及信号灵敏度。

同核化学位移相关谱的基本脉冲序列为(COSY- 90°)^[11]: $T_{\alpha}-90^\circ_x-t_1-90^\circ_x-t_2$ -(ACQ)。在此脉冲作用下,根据发展期 t_1 的不同,自旋体系的各个不同跃迁之间产生磁化传递,通过同核耦合建立同种核共振频率间的连接图。此图的两个轴都是 ^1H 的 δ 值,在 $\omega_1 = \omega_2$ 的对角线上可找到同一维 ^1H 谱相对应的谱峰信号。通过任一交叉峰分别作垂线及水平线与对

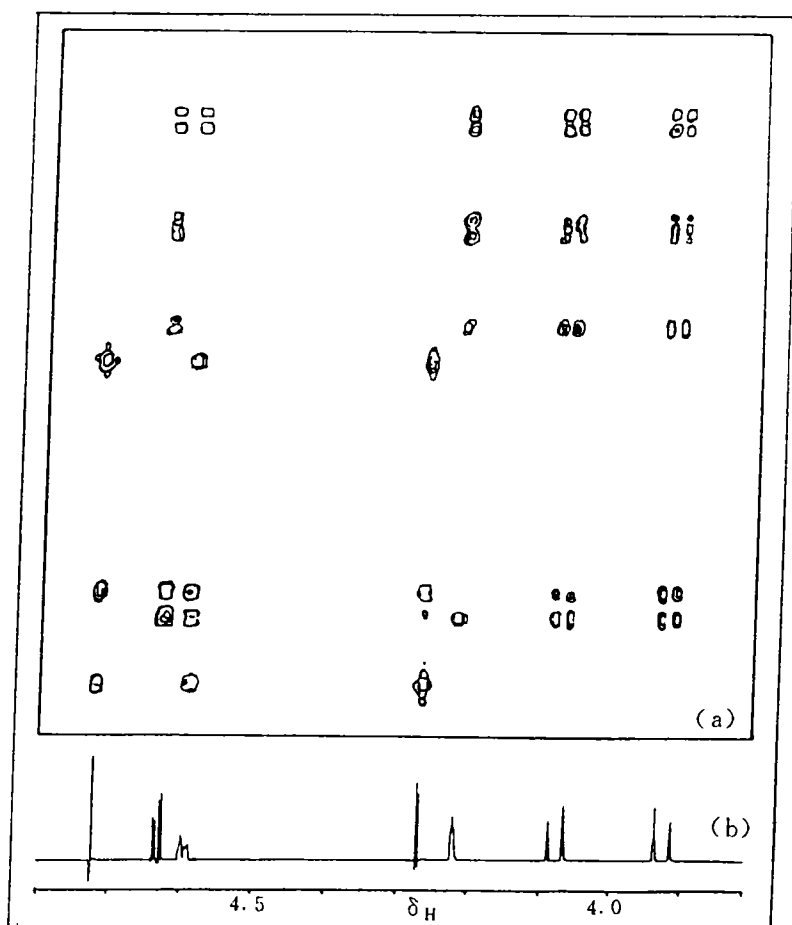


图 3-1 (a)——二维质子同核相关谱; (b)——常规一维质子NMR谱

线相交,即可找到相互耦合的氢核。因此从一张同核位移相关谱可找出所有耦合体系,即它等价于一整套双照射实验的谱图。若对角峰为色散型时,交叉峰为正负交替的吸收型^[18],应通过实验尽量压低对角峰,以突出交叉峰。为便于分析,通过计算机把图画成俯视图,如图3-1,每对交叉峰与对角线上的二个对应峰组成若干正方形图案,而每组因耦合而裂分的多重峰又组成若干组小的正方形图案,即在非对角线上出现的点只要与对角线上的点能构成一个正四边形,则表示对角线上的两点代表的信号间有耦合作用。这种谱相当于在一维谱上同时出现了全部“选择性去耦”实验的结果。因而各原子间的相互耦合关系一目了然,给复杂谱的解析带来很大方便。由于同核相关谱中交叉峰正负相间,如果分辨率不高,会引起互相抵消。为压低对角峰,加强交叉峰,要用与交叉峰相匹配的卷积差,正弦钟和准高斯型回波函数等权函数来处理信号。由豆子提取的一种天然产物I的¹H NMR谱和COSY谱示于图3-2^[11]。为解析COSY谱,首先要选一个“起始点”,即从一个归属明确的峰开始。化合物I的H₁谱线的起始点应定在最低场。尽管500MHz ¹H谱中3.45-3.75ppm峰区很密集,但COSY谱中的交叉峰却分辨得很清楚。图中由H₁对角峰出发,沿平行于F₂轴找出H₁-H₂相关峰,再沿F₁轴平行线找出H₂-共振线,在这一列上即可找出H₂-H₃交叉峰。由此出发沿着F₂轴平行线可以找到H₃-共振线,在H₃-平行于F₁轴的列上又找出H₃-H₄交叉峰,依此类推,可找出H₅。H₃和H₅重叠,从H₅出发沿着F₁轴平行线找到两个H₅-H₆相关峰,最后找到两个H₆-共振线,至此就归属了葡萄糖环的所有谱线^[14]。

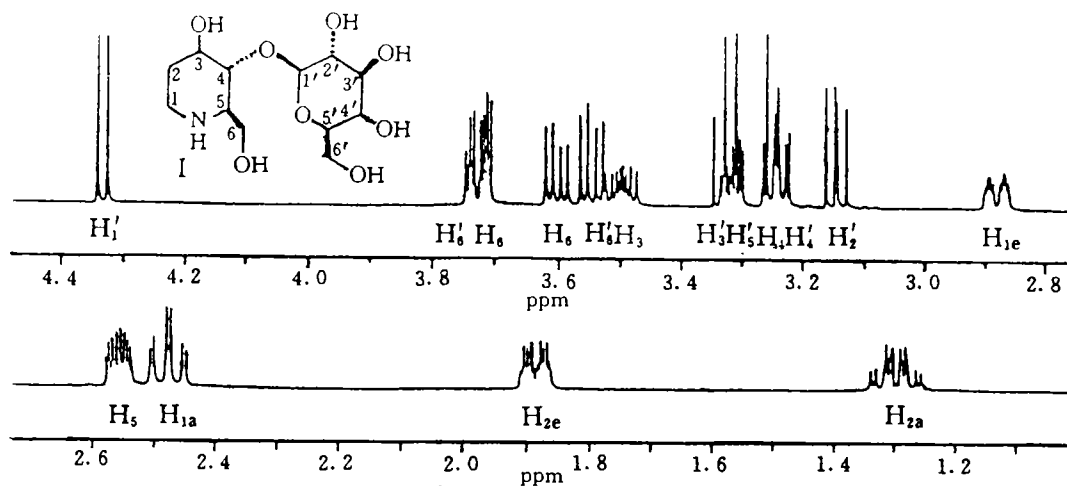


图 3-2 (a) 化合物I的¹H NMR谱(500MHz, D₂O)

3.2 相敏COSY谱^[1,14]

相敏COSY谱的相位很复杂,相位调节的质量直接影响耦合常数的检测及信号灵敏度。以AX系统为例,同一多重峰内的跃迁(如A₁和A₂,X₁和X₂)称为平行跃迁,不转移的磁化作用或平行跃迁间的磁化转移过程保持同相,COSY谱中对角峰与靠近对角线的交叉峰,分别由非磁化转移和平行跃迁间的磁化转移产生,而远离对角线的交叉峰都是来自相连跃迁间的磁化转移。因此,对角峰与交叉峰相位总是相差90°,通常把交叉峰调成吸收线形,而对角峰为色散型,见图3-3^[11],图3-4^[11]。相敏COSY的交叉峰是由一个跃迁磁化转移到另外两个相连跃

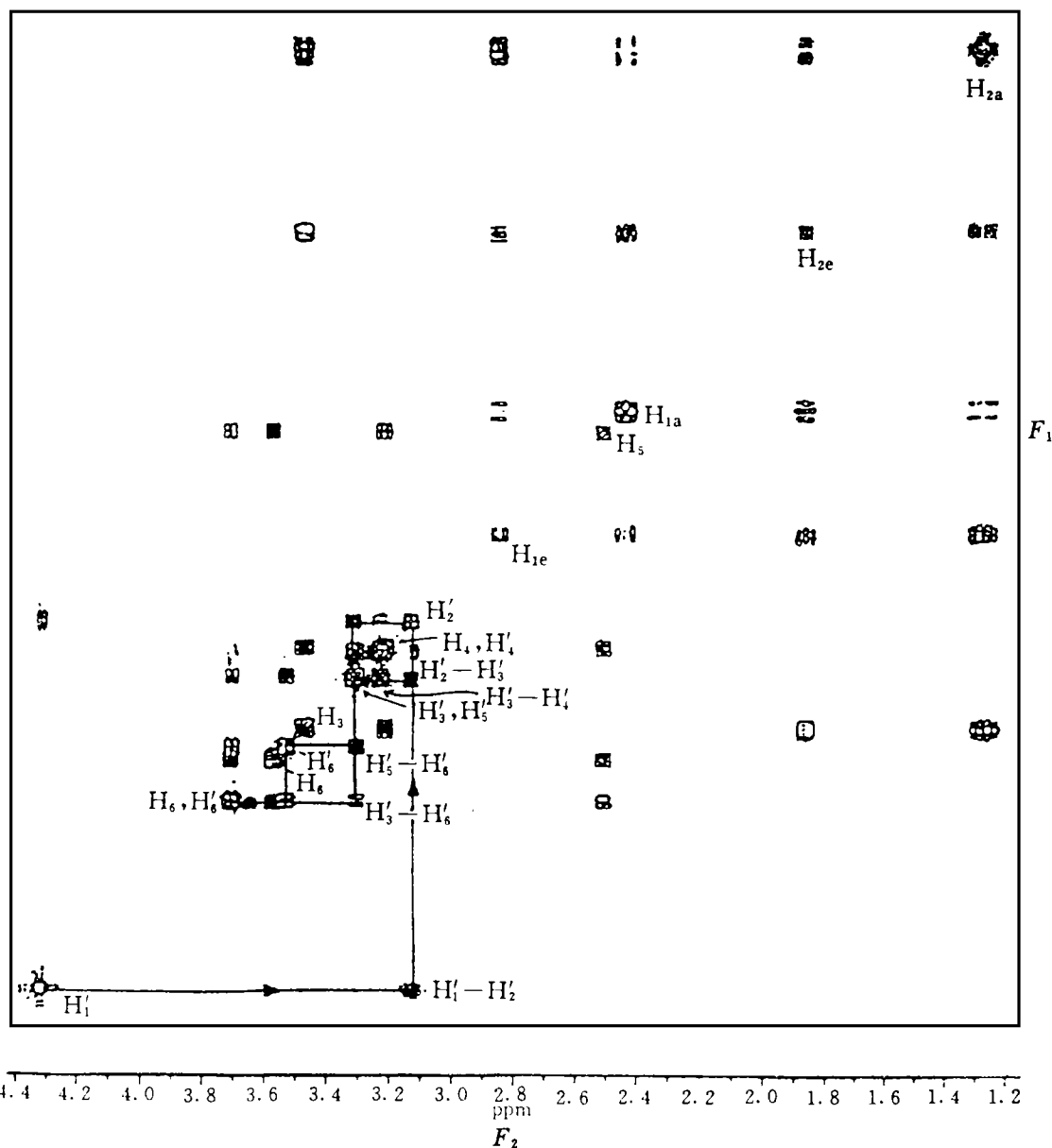


图 3-2 (b) 化合物I的 COSY 全谱

迁, 如 A_I 对 X_I 和 A_I 对 X_{II} 的磁化转移产生 AX 相关交叉峰。 A_I-X_I 是前进式跃迁, 跃迁间的磁化转移相移 90° , 这种磁化转移产生的一对交叉峰相位刚好差 180° , 把交叉峰调成吸收型后, 还得到了多重峰组分的反相对, 图 3-5^[1], 这种峰间的相位关系对归属谱线, 确定耦合常数十分有用, 但分辨率不高时, 峰间反相对特别是小 J 耦合反相对有可能抵消一部分, 如图 3-3(b), 因而影响小 J 耦合信息的检测。相敏 COSY 用特定的相循环和数据处理方式使基本的“相一扭曲” 2D 谱线形状变成纯的 2D 吸收型, 这样得到的纯吸收相谱比常规谱有许多优

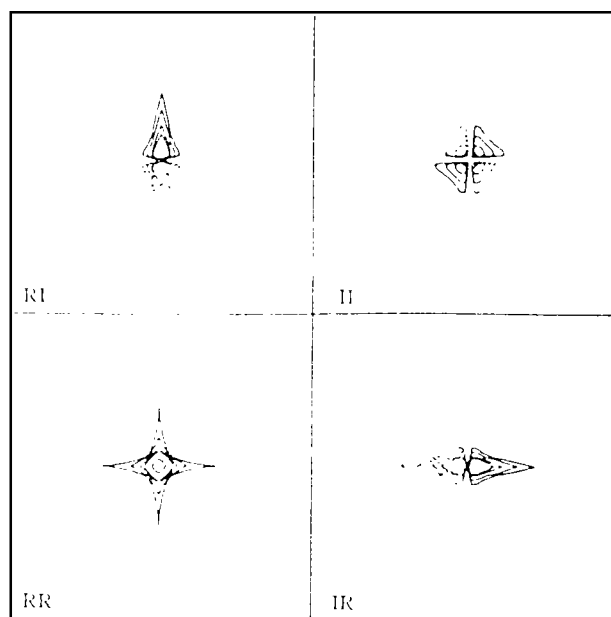


图 3-3 (a) 相敏 COSY 谱中可能产生的四种线形

点, 主要是增加分辨率。对于母体信号淹没在一维谱中的交叉峰的化学位移和耦合常数的精确指定非常有用。最有用的是双量子滤波 COSY(DQF-COSY)。

3.3 与 COSY 有关的实验

3.3.1 COSY-45° [1,11,14]

基本脉冲序列: $\pi/2 - t_1 - \pi/4 - \text{ACQ}$, 即将 COSY-90° 的第二脉冲变成 45°。许多天然产物的直接连接跃迁谱峰落在对角线附近, 导致谱线相互重叠且密集, 不易解析。如选用 COSY-45°, 由于大大限制了多重峰内间接跃迁, 重点反映出多重峰间的直接跃迁, 即可确定三自旋或多自旋系统中耦合常数的符号, 它在某些方面类似于二维谱中的自旋微扰实验。直接相连跃迁是指那些享有共同能级的跃迁; 间接相连跃迁是指在复杂系统中, 不享有共同能级的平行跃迁。直接相连跃迁相对于平行跃迁而言, 磁化转移提高近六倍。COSY-45° 比 COS-90° 减少了平行跃迁间磁化转移强度, 即消除了对角线附近的交叉峰, 使对角线附近较为清晰。COSY-45° 的交叉峰倾斜一定角度, 可以确定每一交叉峰内所包含的被动耦合常数的相对符号, 若交叉峰重心连线与对角线夹角大于 45°, 表明 J_{AB} 与 J_{BX} 反号; 若交叉峰重心连线与对角线夹角小于 45°, 表明 J_{AB} 和 J_{BX} 同号; 若此夹角等于 45°, 表明 J_{AB} 与 J_{BX} 中的一个值很小。COSY-45° 大大简化了谱图, 有利于检测直接相连的磁化转移, 但灵敏度略低, 如图 3-6 所示。也可根据需要, 将第二脉冲设置为 60° 或其他角度。但因信号不能产生纯的幅度调制, 故相敏谱的第二脉冲不能设置为 45°。

E-COSY(Exclusive Conclusion Spectra) [1,14] 为了准确地选择或限制某些相干转移, 采用类似于多量子滤波的特殊相循环, 只显示能级图上直接相连的一级跃迁而排除被动耦合, 大大简化了交叉峰的多重结构, 可清楚地检测到主动耦合常数 J_{AM} , 其缺点是测试颇费时间。

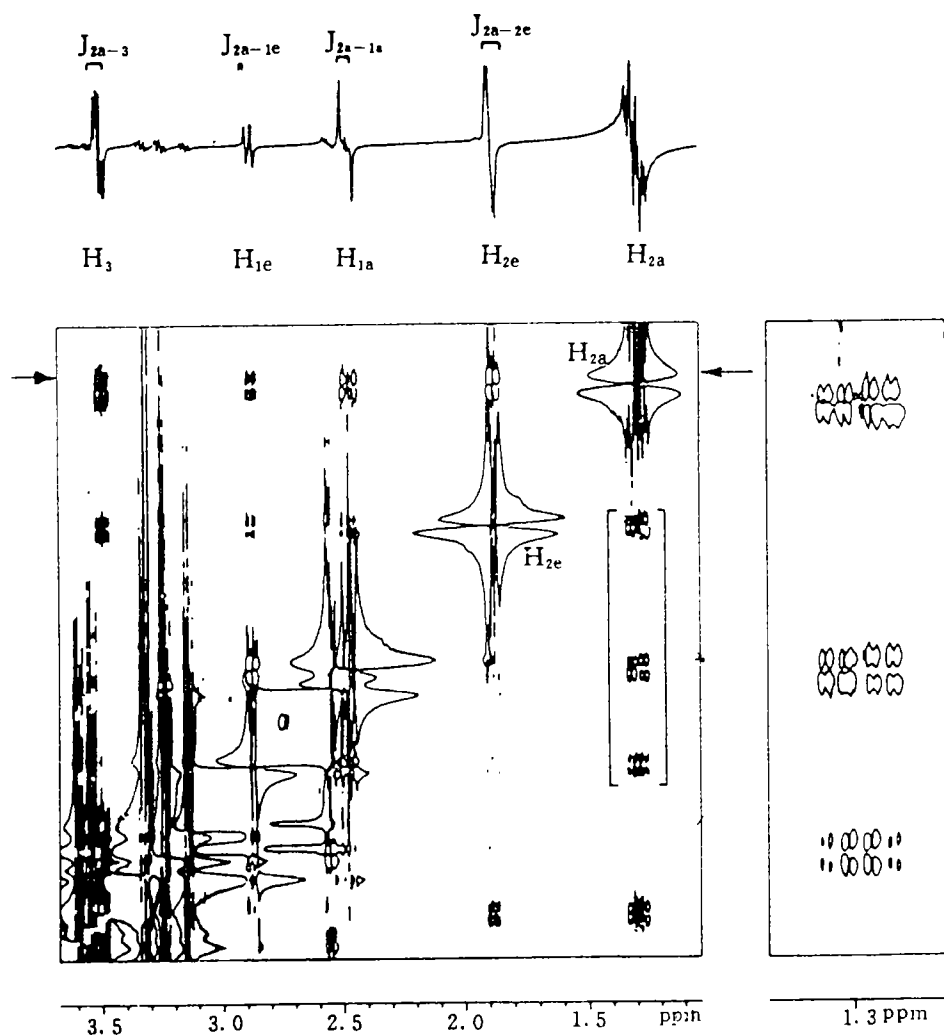


图 3-3 (b) I 的相敏 COSY 谱, 左上为从 2a 对角线沿 F_2 轴“行”截面图

3.3.2 远程耦合常数检测—LR COSY(Long Range COSY) [1,14,16]

远程 ^1H - ^1H 相关谱, 对于一个简单的 AX 自旋系统, 交叉峰强度正比于 $\sin[\pi J(\text{AX})t_1]$ 。常规的 COSY 脉冲系列测得的 COSY 谱, 观察不到较小的远程耦合交叉峰, 除非大大延长 t_1 , 但 t_1 过长, F_1 轴的数据处理不足以解决较小的耦合, 以致交叉峰反相组分相互重叠和抵消。在 COSY- 90° 序列的基础上引入较长的延迟 D_2 , 用于小 J 磁化转移的发展, 能大大增加来自远程耦合的交叉峰强度。其基本脉冲序列为: $\pi/2 - t_1 - D_2 - \alpha - D_2 - \text{ACQ}(t_2)$ 。此实验的关键是如何减少小 J 相关信息的损失, 增加它的检测强度。影响小 J 耦合相关峰强度的主要因素是横向弛豫作用和反相对抵消程度。对于远程耦合, 检测灵敏度是主要矛盾。在 LR COSY 中总要包含由大耦合常数产生的相干转移的 COSY 峰。实验的关键是正确选择 D_2 , 一般取 $D_2 = 0.25$ 秒即可衰减大 J 产生的相关峰, 有可能检测到 4-5 键的质子间的耦合 (0.1~0.5 Hz)。此外还要保证足够的数字分辨率, 避免小 J 反相峰的相互抵消。反之, 若一张谱

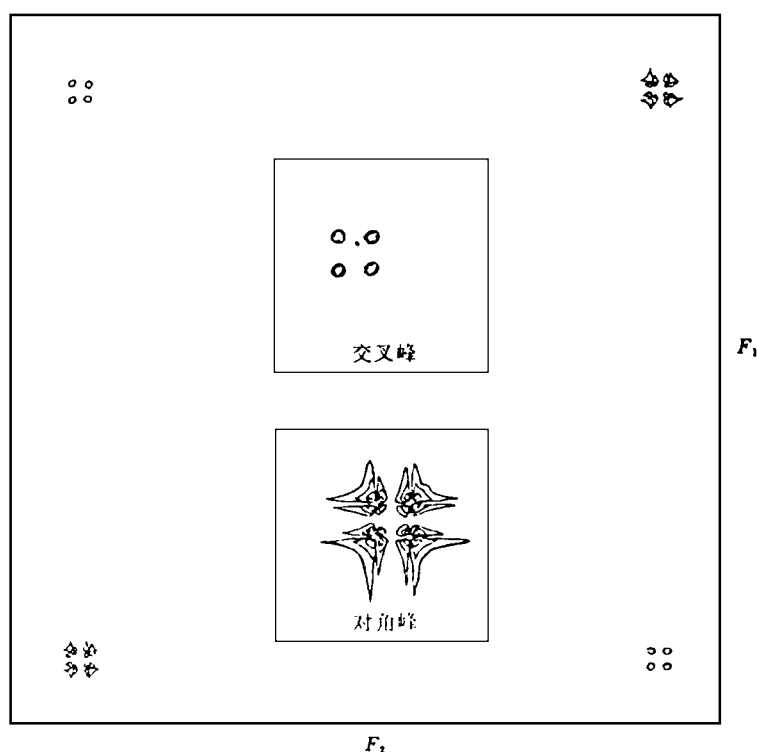


图 3-4 一个 AX 系统的相敏 COSY 谱。黑色为正峰，红色为负峰。
交叉峰为吸收型反相对，对角峰为色散型

图中有过多的由大 J 和小 J 产生的相关峰，以致谱图中每一条谱线与其他所有谱线都相关，使谱图难以解析（特别是刚性体系或聚合不饱和烯氢）。发生这种情况时，可采用降低数字分辨率或缩短采样时间的办法，来衰减减小耦合的相关信息。以突出大耦合的相关信息。通常将 COSY 与 LR-COSY 谱共同比较分析，可确定三键和远程耦合相关信息。例如，应用 LR COSY 可确定糖基的连接顺序和连接位置。这对于确定配糖体类糖基之间的连接位置，及寡糖的结构解析等具有实用意义。图 3-7(1) 是三环葵烷 (tricyclodecane) 衍生物的 LR COSY 谱^[16,25]；(2) 列出了由 COSY 谱得到的质子间的“正常耦合”（左侧）以及 LR COSY 谱所得的具有较小耦合常数的两质子间的耦合（右侧），图上表示出了这些新的交叉峰。图 3-8 给出该衍生物的 COSY 谱，以便于比较分析。

3.3.3 F_1 域 ^1H - ^1H 宽带去耦 COSY (COSY DEC) 谱^[1,14,16]

基本脉冲序列： $D_1 - \pi/2 - t_1/2 - \pi - t_1/2 - a - \text{ACQ}(t_2)$ 。与 COSY- 90° 序列的区别是用 π 脉冲将发展期分成两部分，准确的 π 脉冲使化学位移重聚，在 F_1 域实现 ^1H - ^1H 去耦，简化了谱图，有利于信号指认。但 COSY DEC 谱失去了 J 相关符号信息，见图 3-9^[14]。若用于小耦合检测，脉冲序列变成： $D_1 - \pi/2 - t_1/2 - \pi - t_1/2 (D_3 - t_1) - a - D_2 - \text{ACQ}$ 引入一个固定延迟 D_2 来发展小 J 的相干转移，实验的关键是 π 脉冲的准确性，否则 F_1 域中耦合核之间将出现假峰。

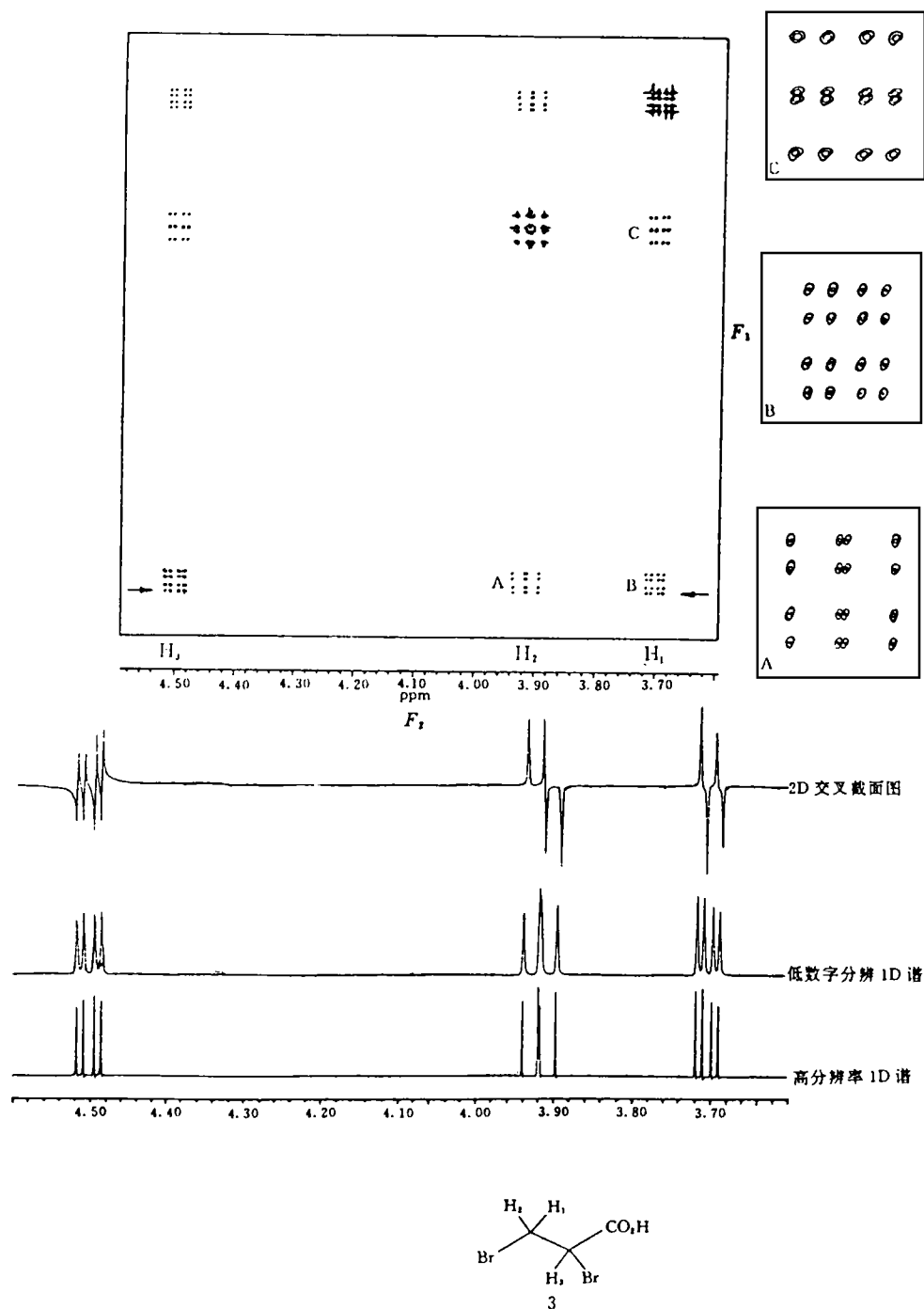


图 3-5 AMX系统的相敏COSY(1,2--二溴丙酸)。红色为正峰，黑色为负峰。下图是2D交叉截面图(上),与1D谱:相同数学分辨率(中);高分辨率1D谱(下)

3.3.4 自旋回波COSY(SECSY)谱^[1,14,16]

基本脉冲序列： $D_x - \pi/2 - t_x - \pi/2 - t_x - \text{ACQ}$ 该序列因能用商业软件进行 J 分

解实验而得到某些应用。 F_2 域为耦合核的化学位移, F_1 域为化学位移之差,中点为 $\Delta\delta=0$,两个耦合核AX的交叉峰坐标为 $[F_2=\delta_A, F_1=\Delta\delta=1/2(\delta_A-\delta_X)]$ 和 $[F_2=\delta_X, F_1=\Delta\delta=1/2(\delta_X-\delta_A)]$,两个相关峰的连线与 $F_1=0$ 轴呈 45° 交角,两个相关峰在其连线上以 $F_1=0$ 点对称,此谱不能区分吸收和色散信号。谱解析不同于一般的COSY谱,找到一个相关点(A)后,通过此点画一条与 $F_1=0$ 轴成 45° 的斜线,在对称点找到另一个相关峰(B),通过(B)画垂直于 $F_1=0$ 轴的垂线,在对称处找到此核的另一相关峰(C),即相互耦合核的化学位移,以此类推找到(D), (E), (F)点,这类试验多用于蛋白质等生物分子的结构鉴定,谱图复杂,谱线密集,可以由一个相关峰找到耦合核的化学位移,即使另一相关点不清楚也无妨,它必定在斜线对称位置上,如图3-10所示^[14]。

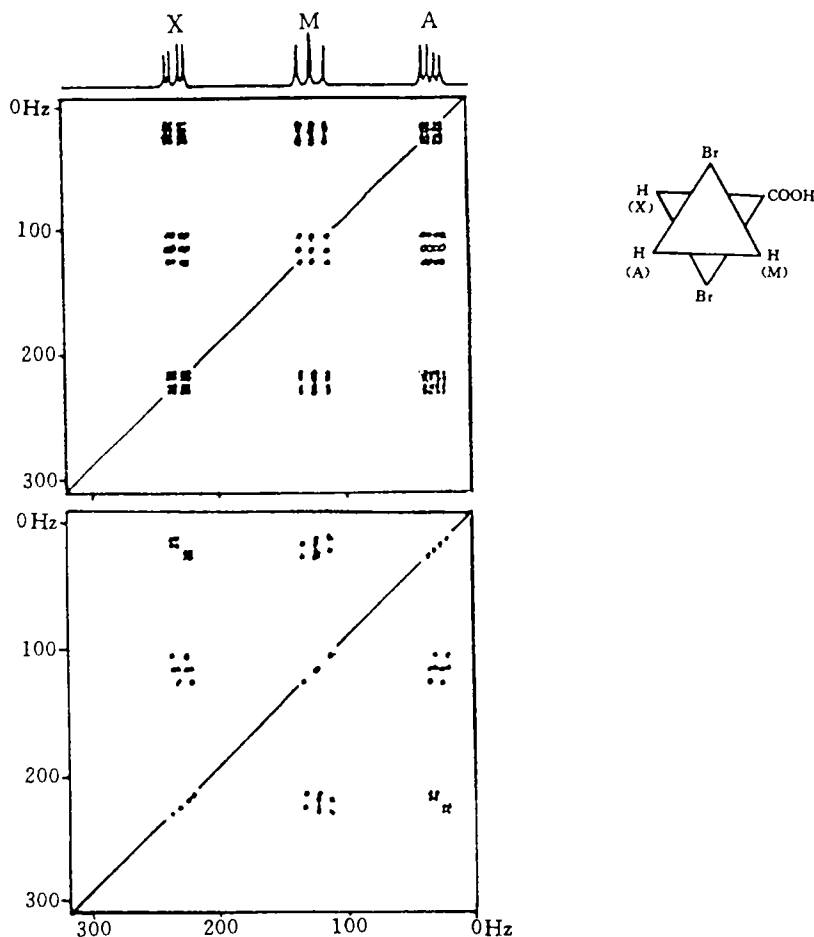


图 3-6 2,3-二溴丙酸的 COSY- 90° (上图) 和 COSY- 45° (下图) 比较

3.3.5 多量子滤波相敏 COSY^[1,14,16]

相敏 COSY 谱对角峰与交叉峰的相位正好相差 90° , 为色散线形。因为对角线上大的色散峰复盖了对角线附近的相关峰, 这大大地限制了相敏谱的应用, 为了改进相敏 COSY 谱, 引入多量子滤波技术^[14]。

双量子滤波相敏 COSY (PS-DQF-COSY) 谱基本脉冲序列: $(\pi/2)_\phi - t_1 - (\pi/2)_\phi -$

$(\pi/2)_x - t_2 - \text{ACQ}$, 其优点是能简化谱图及改进相敏 COSY 谱。

P -量子滤波只保留 P 个以上自旋体系的跃迁而消除 P 以下自旋体系的跃迁谱线。三量子滤波谱中消除了单量子及双量子相干, 只保留了三量子及四量子跃迁。双量子相干实验中, 检测的是 AM 或 AX 等双量子及双量子以上的多量子相干, 而单峰(溶剂及某些甲基峰等)被滤掉了, 因而简化了谱图。双量子滤波相敏 COSY 谱, 对角峰和交叉峰均能调节到纯吸收型, 大大改进了相敏 COSY 谱。通过双量子相干(DQC)转移还可减弱对角线上一维谱的信号, 使谱中对角线区域更为清晰, 有利于图谱解析。DQF 有助于消除 t_2 噪声, 比无滤波 COSY 谱有很大改进。另一方面, PS-DQF-COSY 显著提高了谱的分辨率, 在这种谱中, 测量精确到 0.01ppm 的质子化学位移是完全可能的。若配合应用交叉断面图, 甚至能精确测定甲基质子的化学位移和耦合常数, 见图 3-11^[1]。

3.3.6 双量子相干相关(DQC-COSY)谱(Double Quantum Coherence Correlation Spectroscopy)

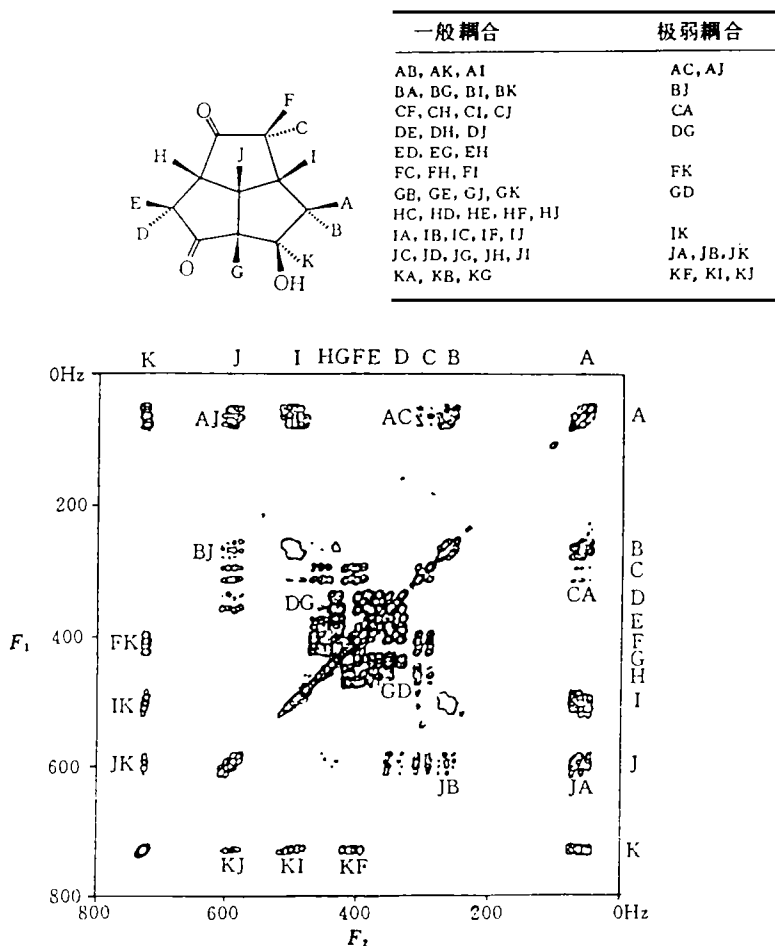


图 3-7 (1) tricyclodecane 衍生物的 LR COSY 谱, (2) (左边) 由 COSY 谱得到的质子间的“正常耦合”, (右边) 由 LR COSY 谱所得到的具有较小耦合常数的两质子间的耦合

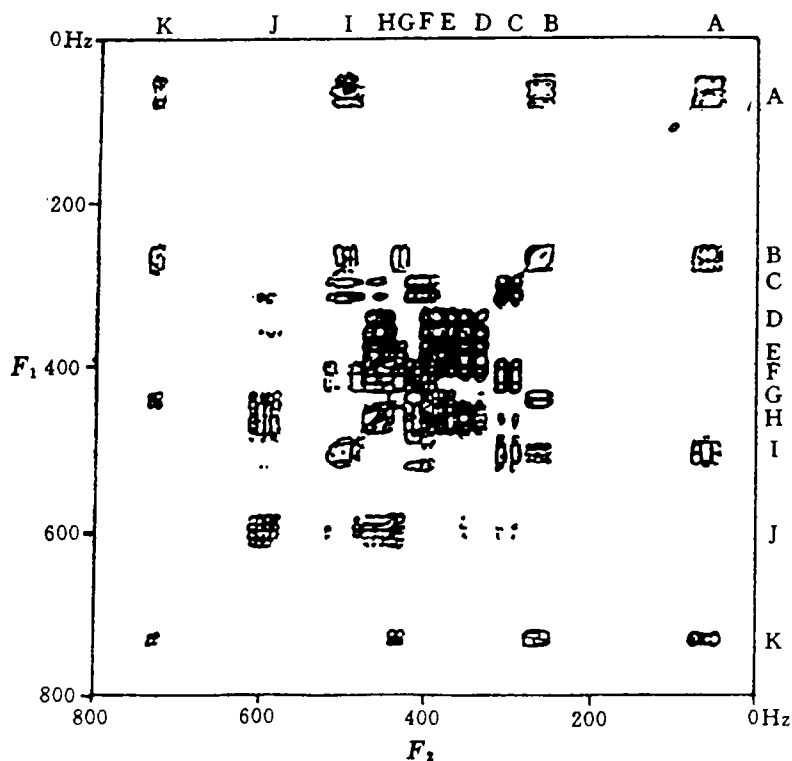


图 3-8 tricyclodecane(三环葵烷)衍生物的 COSY 谱

在一些情况下, DQC-COSY 谱对于解析复杂的质子耦合系统能提供比 COSY 谱更多、更清楚的信息^[16,71]。由于图谱的斜对角线上没有相关峰, 故易辨认具有相近化学位移的质子信号, 而在 COSY 谱的对角线 ($F_1 = F_2$) 上或附近, 常存在密集的相关峰。由于双量子不能被直接检测, 需使用一种脉冲序列激发双量子相干, 然后再变成单量子相干而被检测, 脉冲序列为: $90^\circ - \tau - 90^\circ / 180^\circ / 90^\circ - \tau - 90^\circ - t_2 - 45^\circ - \text{ACQ}(t_2)$ 该实验的关键是激发双量子相干的延迟时间 τ 的选择, 一般取 $(1/4)J(\text{HH})$ 或 $(1/8)J(\text{HH})$ 。相关峰与斜对角线 ($F_1 = 2F_2$) 对称从 DQC-COSY 谱中可以清楚地观察到邻近较大的耦合和偕氢耦合的交叉峰。图 3-12(a) 是马钱子碱的 DQC-COSY 谱^[16], 优化条件选择 $J = 7\text{Hz}$, $\tau = 35.71\text{ms}$, 化学位移

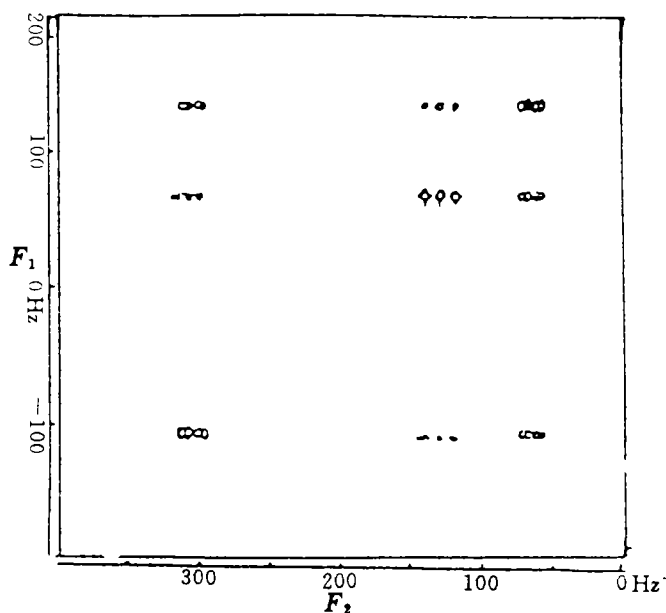


图 3-9 2,3-二溴丙酸的 COSY DEC 谱

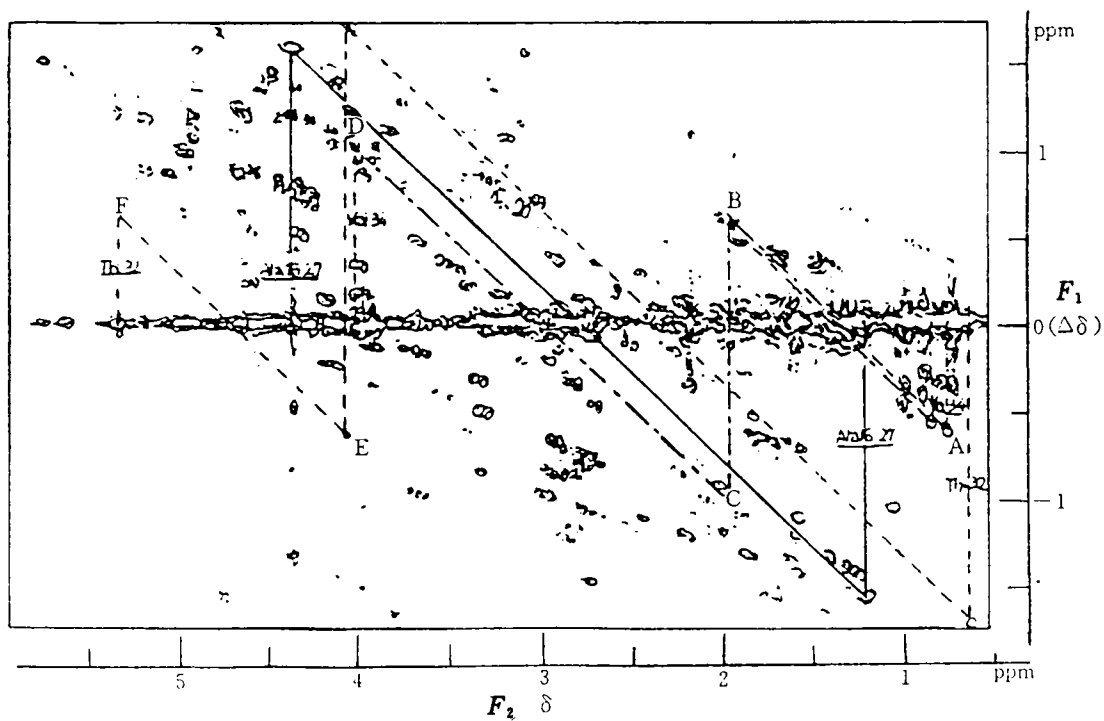


图 3-10 一种蛋白质的SECSY谱

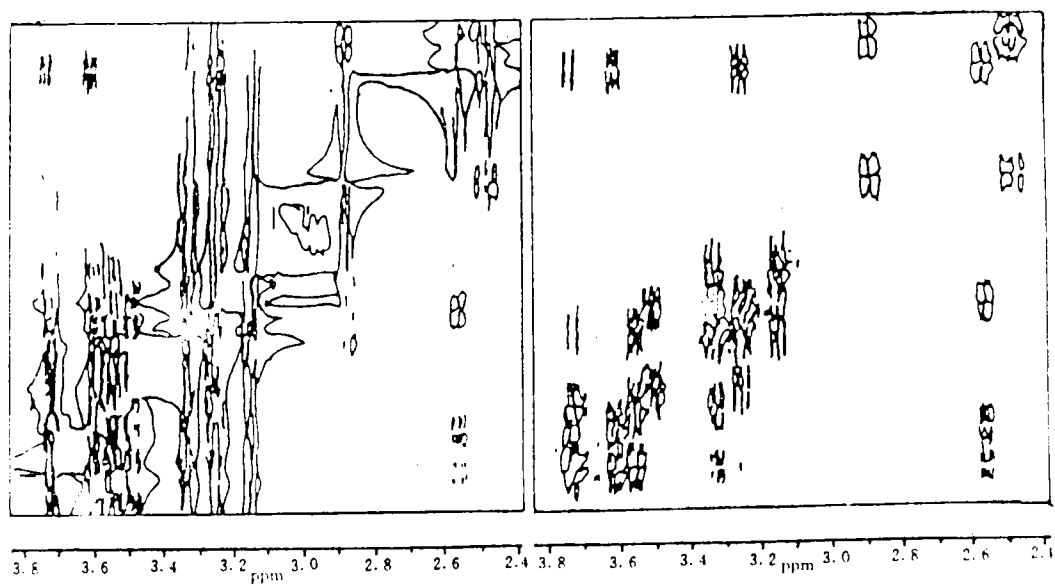


图 3-11 (a) 相敏COSY(左)和DQF-COSY谱(右)的比较

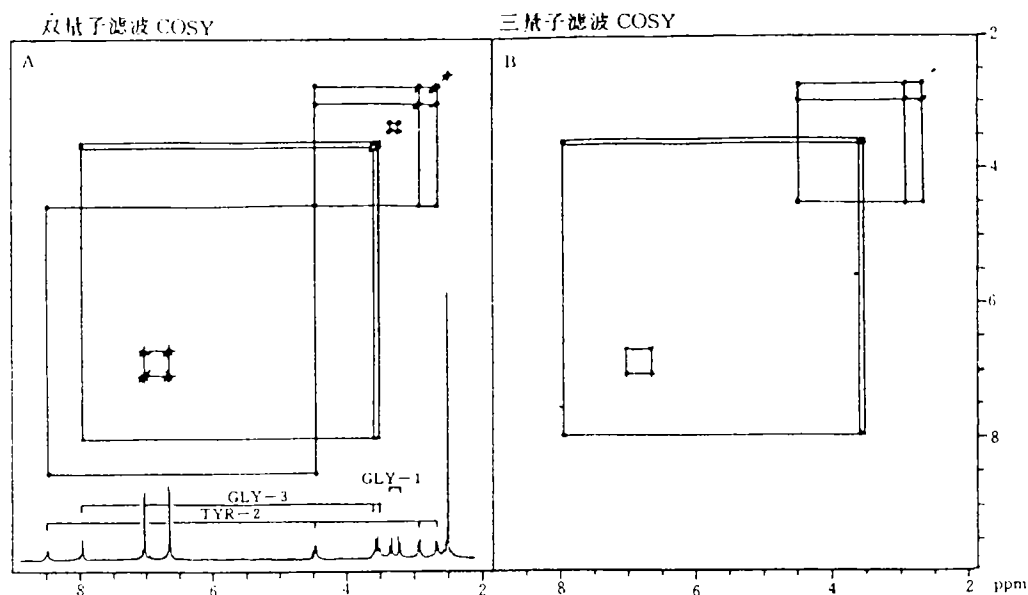


图 3-11 (b) 三肽(Gly-Tyr-Gly)的双量子滤波(左)和三量子滤波(右)COSY谱

以Hz表示, 相关峰与斜对角线($F_1 = 2F_2$)对称, 从该谱可以清楚的观察到邻近较大的耦合和偕氢耦合的交叉峰。 H_{22} 与 H_{23a} 和 H_{22} 与 H_{23b} 的耦合相关峰分别位于频率轴 $F_1 = -2164$ 和 -2142 处, 具有远程耦合的 H_{22} 与 H_{20a} , H_{22} 与 H_{14} , H_{22} 与 H_{20b} 分别在 -2287 , -2442 和 -2568 处观察到, 通过 H_{22} 与 H_{14} 的耦合相关峰可以找到 H_{14} , 以此为起始点进行化合物结构片段(2)的解析。 H_{14} 将与 H_{13} 和 H_{15a} 及 H_{15b} 耦合, 但这些耦合相关峰是易区别的, 因后者能显示偕氢耦合, 因此可以确认 H_{13} 与 H_{14} 的耦合相关峰在 $F_1 = -3831$ Hz处, H_{14} 与 H_{15a} 和 H_{14} 与 H_{15b} 的耦合分别在 $F_1 = -3539$ 和 -3781 Hz处, 而 H_{15a} 与 H_{15b} 的偕氢耦合位于 $F_1 = -4012$ Hz处, H_{13} 与 H_8 在 $F_1 = -3616$ 处耦合相关, H_{13} 与 H_{12} 的耦合在 $F_1 = -3460$ Hz处, H_{12} 与 H_{11a} 及 H_{12} 与 H_{11b} 的耦合分别在 $F_1 = -2935$ 和 -3062 处, 而 H_{11a} 与 H_{11b} 的偕氢耦合在 $F_1 = -3339$ Hz处被观察到, H_{15a} 与 H_{16} 在 $F_1 = -3267$ 、 H_{15b} 与 H_{16} 在 $F_1 = -3539$ Hz处被观察到。图3-12(b)显示了乙基桥质子 H_{17a} 与 H_{18b} 、 H_{17a} 与 H_{18a} 、 H_{17b} 与 H_{18a} 、 H_{18a} 与 H_{18b} 之间的邻氢耦合和偕氢耦合^[16]。

3.3.7 同核接力相干转移(RCT)(Homonuclear Relayed Coherence Transfer)谱^[1,14,16]

结构分析中常遇到线性链各自旋的谱线归属问题。 1H - 1H COSY有时会出现复杂而模糊的相关峰, 当两个质子 M 和 Q 有相同的化学位移时, 这个化学位移值与质子 X 的交叉峰或者表示 MX 耦合, 或者表示 QX 耦合。如果还存在与另一个质子 A 相耦合的第二个交叉峰, 问题就更复杂了。因为这两个交叉峰可能是一个自旋系统 AMX (或 AQX), 也可能是两个独立的自旋系统 AM 和 QX , (或 AQ 和 MX)。RCT实验恰能解决这类问题, 一个 AQX 系统中, $-C-C-C-$, $J_{AQ} \neq 0$, $J_{QX} \neq 0$, 但 $J_{AX} = 0$, RCT可以建立 H_X 和 H_A 之间的关联, 对推导相邻官能团, 确定结构十分有用。常用的脉冲系列为: $D_1 - \pi/2 - t_1 - \pi/2 - \tau_m - \pi - \tau_m - \pi/2 - t_2 - ACQ$ 在第二个脉冲后面经过一个固定延迟后, 加上第三个 $\pi/2$ 脉冲, 使得从 A 转移到 Q 上的磁化作用通过 Q 到

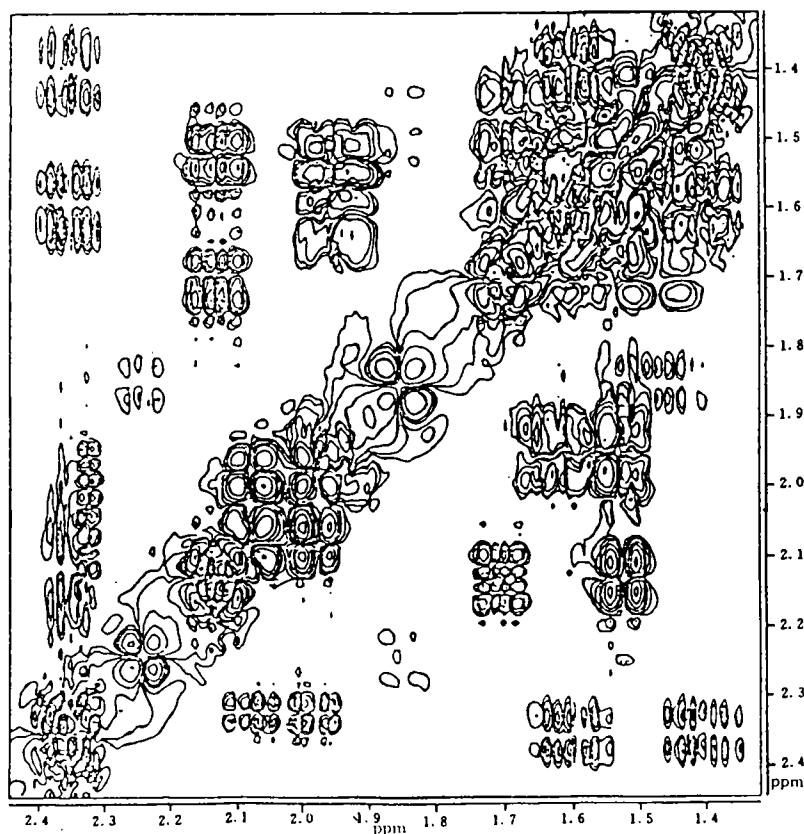


图 3-11 (c) 一种藜芦生物碱的 DQF-COSY 谱

X核的磁化转移, 进一步转移到X核上, 引起相干转移的另一次重新分配, 从而得到了A与X核的相关信息, 如此即可从直接耦合和经过第三种自旋的两步相干转移得到交叉峰。在 τ_m 中间加一个 π 脉冲, 使化学位移重聚, 消除接力相干信号的化学位移效应。对于一对两自旋系统, 不会出现RCT峰, 而对于三自旋系统, 则出现RCT峰。该实验的关键是第二步相干转移及正确选择 τ_m 值。一个近似规则是耦合常数为 $1/(4\tau_m)$ 时, 转移最有效, 具代表性的 τ_m 值为25ms。知道了 J_{AQ} 和 J_{QX} 后, 取 $\tau_m = 0.5/(J_{AQ} + J_{QX})$, 以得到最大RCT峰强度, τ_m 值不仅取决于J值, 更主要的还取决于自旋系统, 一个RCT图中各种自旋系统的RCT峰强度必然不同, 可以选择不同 τ_m 值, 作几个RCT实验, 分析接力交叉峰强度, 得到不同耦合系统的结构信息, 见图3-13^[14]。

RCT谱可以很清楚地指定色氨酸残基的ABCD自旋耦合系统。图3-14是某肽芳香基部分的一部分COSY/RCT组合谱^[16,73], $\tau = 30\text{ms}$, COSY谱显示了一色氨酸的AB、BC和CD的连接, 而且这些连接方式在RCT谱中进一步得到了验证。在RCT谱中, 额外的交叉峰 R_x 和 R_y 分别由AC、BD接力相干转移所致, 此法成功地辅助指定了该多肽的两个色氨酸, 八个苯丙氨酸中的六个以及三个酪氨酸中的两个的化学位移。图3-15是某多肽芳香残基的组合COSY/RCT谱^[73], $\tau = 30\text{ms}$, RCT(右下)谱除了由苯丙氨酸残基AA'BB'C自旋系统的接力磁化矢量转移而产生的额外的交叉峰外, 其余部分均与COSY谱同。COSY谱的实线确定了C(5.92ppm)和BB'(6.75ppm)的连接。虚线部分却出现了两个交叉峰(7.10, 7.24ppm), 因此COSY谱不能确

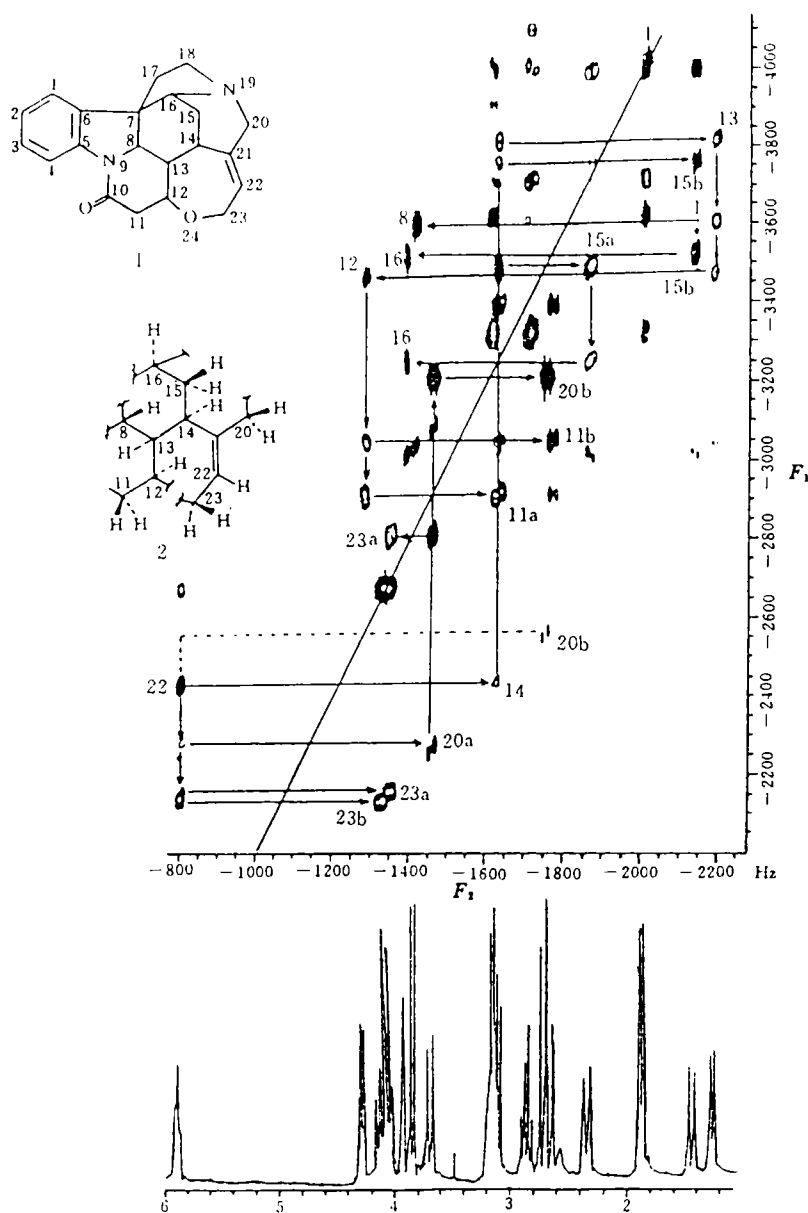


图 3-12 (a) 马钱子碱的 DQC-COSY 谱

定 AA' 的化学位移值。在 RCT 谱中, 由于 RCT 峰的出现, 就能很清楚地把 AA' 的化学位移指定为 7.24ppm , RCT 峰就是由于磁化矢量在 AA' 和 C 自旋系统中转移所产生的。应用 $COSY$ 和 RCT 这两种实验, 使得所有六个苯丙氨酸和三个酪氨酸残基的自旋系统得到了指定。对于这样一些共振信号交叠的自旋系统, 若应用其他方法 (如自旋去耦), 可能会导致错误的结论。上述实例说明, 2D RCT 谱对芳环系统的指定比较有用。但对于脂肪基自旋系统的指定, 由于无效接力

磁化矢量转移和NOE的干扰, 则有其局限性, 如在图3-15中 ^{17}F , 交叉峰N是由于NOE所致。当NOE干扰和相干转移同步时, 也会使峰形畸变。图3-14 ^{17}F 中的交叉峰Y与COSY谱部分比较, 峰强度显著降低。NOE交叉峰若出现在RCT谱的芳香基部分, 则影响不大, 但对于密集的脂肪基部分, 将使问题大大复杂化。因此, RCT谱很少用于脂肪族类化合物的指定。

双接力和更多步接力^[1,14]

在一步RCT脉冲序列的基础上, 将 $(\tau_m - \pi/2)$ 再重复一次, 得到双接力COSY谱, 重复三次则为三接力谱……, 依此类推, 还可得到更多步的接力谱。多步接力谱信号强度随步数的增加而减弱。在研究复杂的碳水化合物、核酸结构和归属大分子肽、小分子蛋白质谱线时, 常常采用一步、二步或三步接力技术, 它是相当有力的实验方法, 其关键问题还是混合时间 τ_m 的选择。

3.3.8 天然丰度样品的双量子 ^{13}C 谱(INADEQUATE)(Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment)^[1,11,14,16,28-32,67]

二维碳骨架直接测量法, 又称双量子相干二维技术, 是一种 ^{13}C - ^{13}C 化学位移相关谱^[28-32]。它最早用于测试天然丰度的 ^{13}C - ^{13}C 耦合常数。目前其应用远远超过了这一范围。该谱在化合物结构测定及 ^{13}C 谱峰指认的NMR研究中具有重要价值。谱图中相互连接的交叉峰以对角线对称, 应用该谱即可正确地指定各碳的化学位移。它是确定分子骨架的有力手段。基本脉冲序列: $(\pi/2)\phi_1 - \tau - (\pi)\phi_2 - \tau - (\pi/2)\phi_3 - \tau - (\pi/2)\phi_4 - t_z(\phi_R)$ 在质子去耦的 ^{13}C 谱系中, 除了通常观察的强 ^{13}C 信号外, 还有比它弱200倍的 ^{13}C - ^{13}C 卫线。 ^{13}C - ^{13}C 之间的耦合常数, 含有丰富的有关分子结构和构型的信息。由于碳组成分子骨架, 它能更直接反映键的特性与取代情况。但由于 ^{13}C 天然丰度仅为1.1%, 出现 ^{13}C - ^{13}C 的几率仅为0.01%, ^{13}C - ^{13}C 耦合引起的卫线通常离 ^{13}C 强峰只有20Hz左右, 其强度又只有孤立 ^{13}C 强峰的1/200, 这种弱峰往往出现在强 ^{13}C 峰的腰部。除上述灵敏度与动态范围等问题外, 其他如旋转边带, 质子宽带去耦的不完全, 微量杂质的影响等因素, 都使 J_{CC} 的测量非常困难。因此对于结构研究, 不益首先选用此法。利用双量子跃迁的相位特性就可以压住强线, 突出其卫线, 求得 J_{CC} , 并根据 J_{CC} 确定其近邻。一个碳原子最多可以有四个碳与它相连, 而 J_{CC} 范围较小, 可利用二维技术测量耦合碳的双量子跃迁频率。 ^{13}C - ^{13}C 同核耦合构成二核体系AX(或AB), 两个耦合的 ^{13}C 能产生双量子跃迁, 而孤立的 ^{13}C 则不能。它只有一个双量子跃迁, 其频率等于两个耦合 ^{13}C 核的化学位移之和, 所以如果两

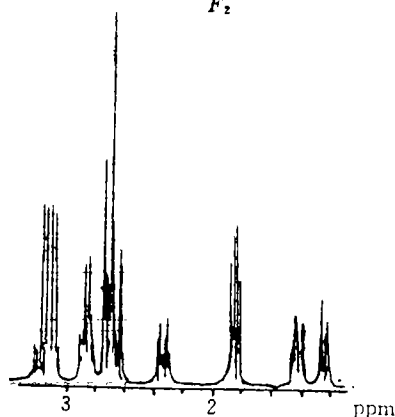
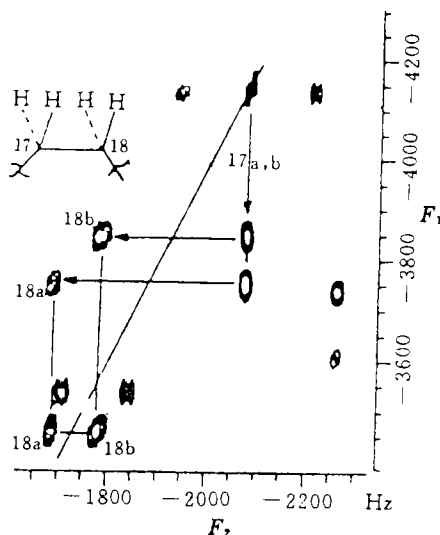


图 3-12 (b) 是图3-12 (a) DQC-COSY谱的放大, 乙基桥质子之间的偶耦合

它弱200倍的 ^{13}C - ^{13}C 卫线。 ^{13}C - ^{13}C 之间的耦合常数, 含有丰富的有关分子结构和构型的信息。由于碳组成分子骨架, 它能更直接反映键的特性与取代情况。但由于 ^{13}C 天然丰度仅为1.1%, 出现 ^{13}C - ^{13}C 的几率仅为0.01%, ^{13}C - ^{13}C 耦合引起的卫线通常离 ^{13}C 强峰只有20Hz左右, 其强度又只有孤立 ^{13}C 强峰的1/200, 这种弱峰往往出现在强 ^{13}C 峰的腰部。除上述灵敏度与动态范围等问题外, 其他如旋转边带, 质子宽带去耦的不完全, 微量杂质的影响等因素, 都使 J_{CC} 的测量非常困难。因此对于结构研究, 不益首先选用此法。利用双量子跃迁的相位特性就可以压住强线, 突出其卫线, 求得 J_{CC} , 并根据 J_{CC} 确定其近邻。一个碳原子最多可以有四个碳与它相连, 而 J_{CC} 范围较小, 可利用二维技术测量耦合碳的双量子跃迁频率。 ^{13}C - ^{13}C 同核耦合构成二核体系AX(或AB), 两个耦合的 ^{13}C 能产生双量子跃迁, 而孤立的 ^{13}C 则不能。它只有一个双量子跃迁, 其频率等于两个耦合 ^{13}C 核的化学位移之和, 所以如果两

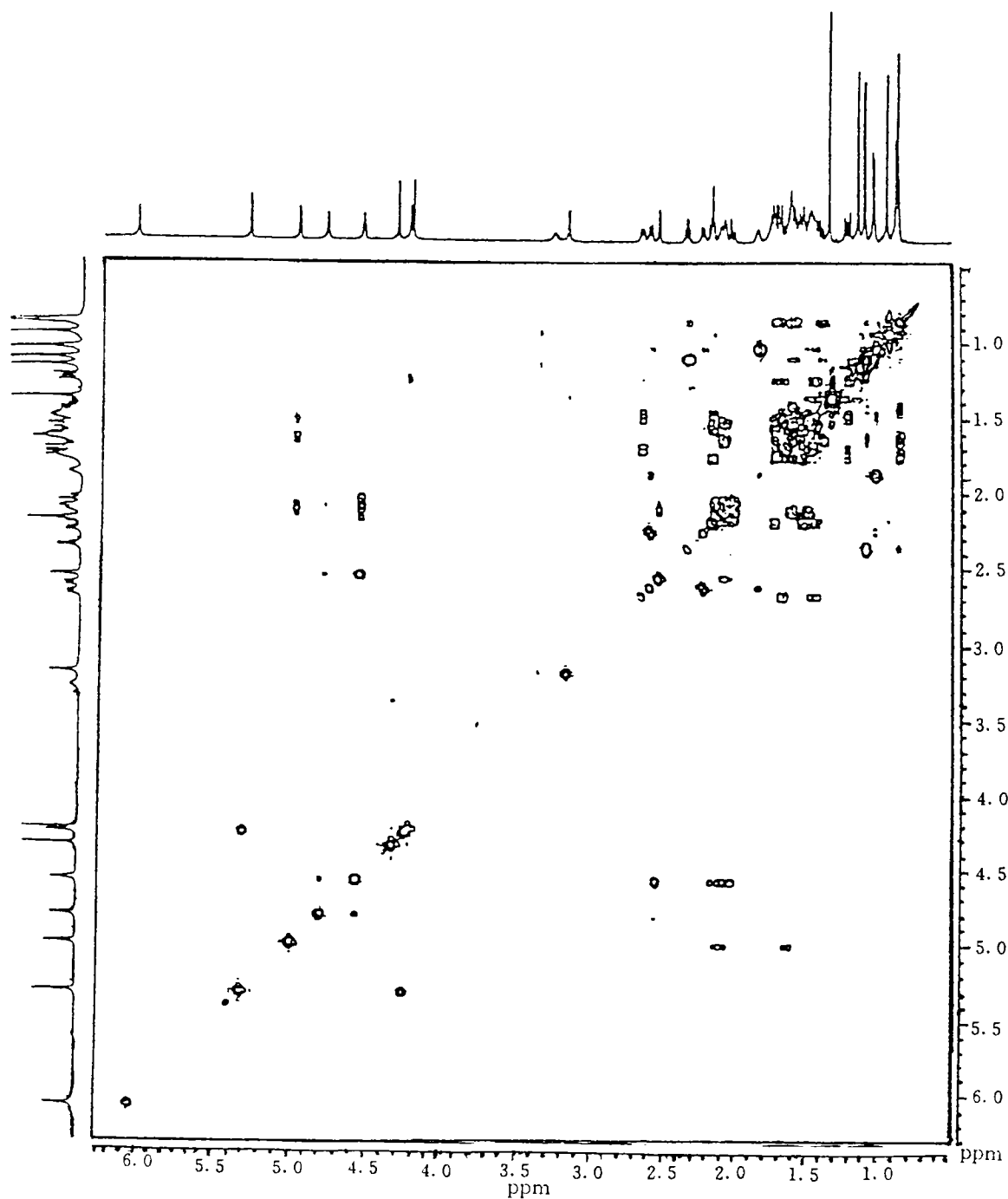


图 3-13 一种天然生物碱的一步接力谱，黄色标记的交叉峰为 $^4J_{HH}$ 相关信息

个碳有相同的双量子跃迁频率，即可断定它们是邻居。此法的要点是通过瞬间产生双量子跃迁，再利用双量子跃迁和单量子跃迁相位特性截然不同这一特点，将主峰压掉，保留所需的弱卫线，这对检测长程耦合和确定碳的骨架十分重要。为了压住纵向与单量子跃迁的影响，

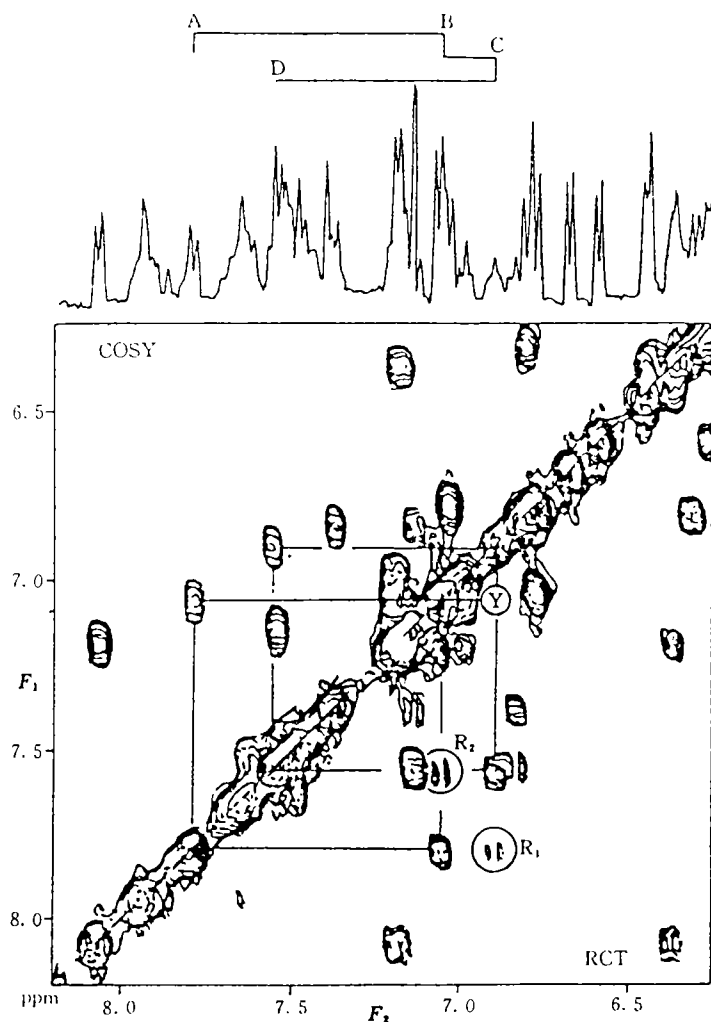


图 3-14 某多肽芳香残基部分的一部分 COSY/RCT 组合谱

应将脉冲做成四循环。在实验中，由于相移不理想， B_1 磁场不均匀及偏置效应等，射频脉冲总存在着不完整性，所以可用 32 或 128 相位循环加以改进。

经两次傅里叶变换后， F_1 和 F_2 轴上分别得到双量子跃迁频率和 ^{13}C 的卫星线，依次代表双量子数和单量子跃迁频率。谱中一个轴是 ^{13}C 化学位移，另一个轴是双量子跃迁频率，凡是分子中直接相连的碳原子间都有相关信号。双量子跃迁频率正比于所涉及的两核的平均化学位移，因此在谱中 $F_1 = 2F_2$ 的斜线（用虚线表示）两侧对称分布着两个相互连接的 ^{13}C 原子信号，表示碳耦合对的单量子平均频率与双量子频率间的关系；水平连线表明一对耦合碳具有相同的双量子跃迁频率。可断定它们是直接键连的邻居。由此可以找出化合物中所有 ^{13}C 原子的连接顺序。因双量子频率为单量子频率之和，连线中心落在 $F_1 = 2F_2$ 的“对角线”上。为了减少占用计算机容量， F_1 谱宽可允许取小于 $2F_2$ 的值，但“对角线”发生了折叠，见图 3-16^[1]。

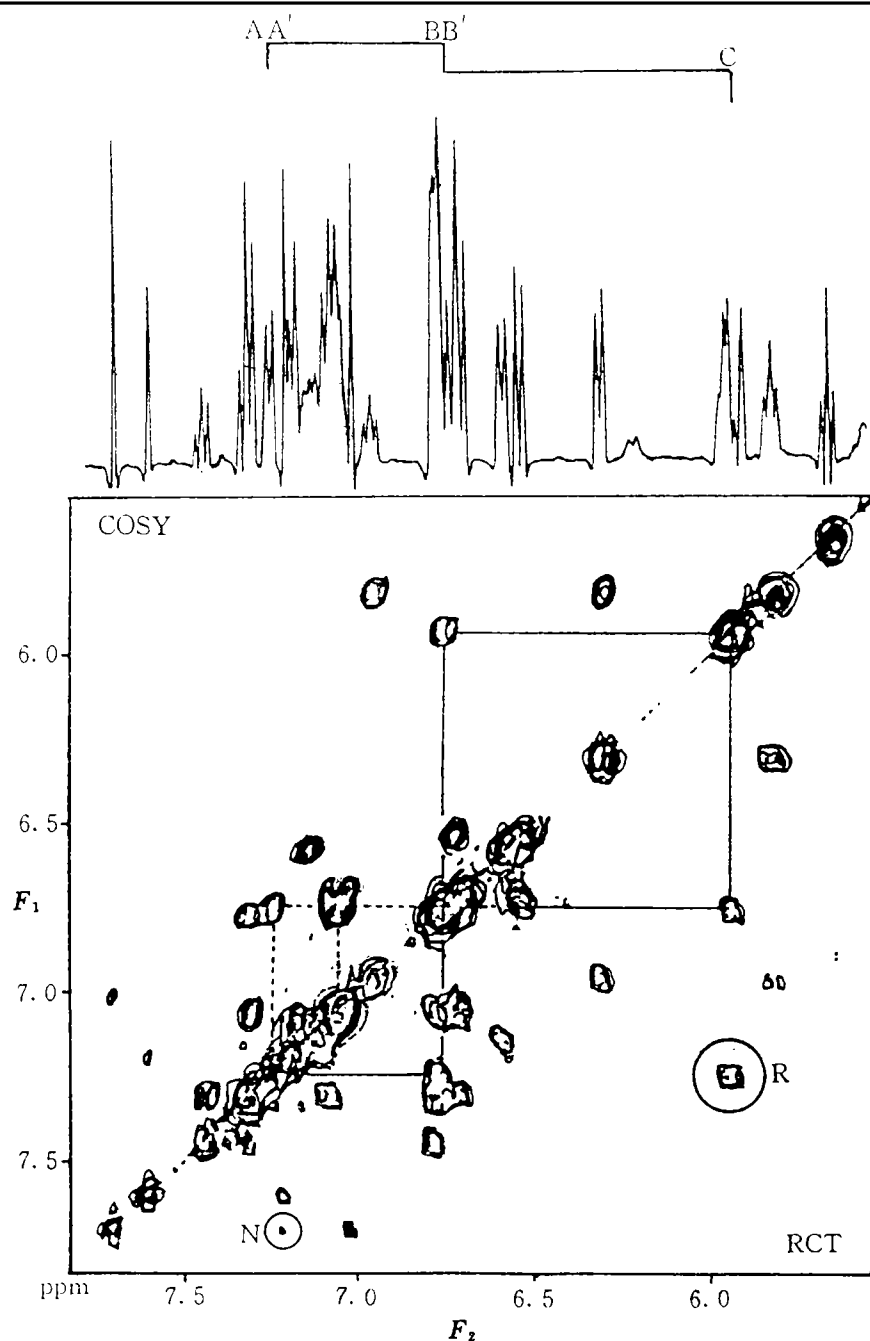


图 3-15 多肽芳香残基的组合 COSY/RCT 谱

图3-17显示了AX系统的 ^{13}C 2D INADEQUATE谱^[21], F_2 轴为 ^{13}C 化学位移, 平行于 F_2 轴的某些“行”上, 出现了 ^{13}C 的AB和AX峰形。 t_1 期间发展的双量子的频率是双量子相干的各核自旋的化学位移之“和”。因此图中的AB或AX系统的相关峰的坐标是A核: F_2 域 ν_A , F_1 域 $\nu_A + \nu_B$, B核: F_2 域 ν_B , F_1 域 $\nu_A + \nu_B$ (ν 为共振频率)。若 C_1 , C_2 核相连, F_1 域 $\delta_{\text{C}_1} + \delta_{\text{C}_2}$ 处, 平行于 F_2 域的“行”上, 对应 δ_{C_1} 和 δ_{C_2} (F_2 域)有两对相关峰, 在 F_2

域 δC_2 列"上出现另一个相关峰(虚线表示), 平行 F_2 轴找到了与其对应的交叉峰, 这是 C_2 和 C_3 的峰, F_1 轴上坐标为 $\delta C_2 + \delta C_3$, 依此类推, 找到了与 C_3 相连的 C_4 共振位置。发现所有相关峰的中点皆位于一条斜线上, 坐标是 F_1 域 $\nu_A + \nu_B$, F_2 域: $(\nu_A + \nu_B)/2$, 这是此类实验的重要特征, AX 或 AB 系统的两组峰在这条斜线的两侧对称排布, 解析谱图时, 首先画出这条斜线, 真正的相关峰必定以这条斜线对称排布。找准了相关峰便可依次推出碳的骨架^[14]。图3-18显示了1, 8 萘二烯的 ^{13}C 2DINADEQUATE谱^[11], 由双键碳 C_7 作为起始点找到 C_4 , 由 C_4 找到 C_3 , C_5 ……。

由于该谱的局限性是灵敏度较常规谱低两个数量级, 因此信号灵敏度低, 噪声大。要求计算机容量大, 样品浓度也尽量大些, 一般需要70-80%的浓度, 必要时要用升温的办法来提高溶解度。脉冲重复时间应接近于 $1.3T_1$ 。读脉冲可采用 50° 或 130° , 不仅其幅度可提高1/4, 同时它直接实现了相位调制, 可以进行正交检波。实现调相的另一种办法是在发展期的任一点可插进 45° (Z) 组合脉冲, 这是因为脉冲的 45° 相位得到信号的 90° 相移, 见图3-19。本方法与其他方法相结合就可以完全确定有机化合物的碳骨架。季碳的四个邻居也可以明确确定。相干接力谱对确定 C-C 连接也是很有效的方法, 但它是间接方法, 难以解决季碳问题。这种方法目前尚未普遍应用的原因是 ^{13}C 核天然丰度太低, 要用相当长的测量时间, 样品量也太大。由于超导磁场能大大增加灵敏度, 因此可以预期, 随着高磁场谱仪的不断普及, 这一方法将会得到更广泛的应用。由于该谱灵敏度低, 录谱有一定难度, 要对碳谱进行全面指认最有效的方法是找出谱中 ^{13}C 原子连接顺序, 由个别可识别谱线顺序找出相连碳原子谱线, 此时测定的是双量子跃迁, 它显示了 ^{13}C - ^{13}C 间的耦合信号(常规 ^{13}C 谱卫星峰), 而单量子跃迁(常规 ^{13}C 谱)信号则被抑制掉了。由于信号灵敏度低, 噪声大, 谱中假峰较多, 并且还会因为个别碳核灵敏度过低, 共振峰被噪声淹没, 以及因数字分辨率不够大, 而造成峰丢失, 这时可用下法加以区别: (1) 若2D谱峰对应1D谱峰处无峰则为噪声。(2) 若对应峰, 但“对角线”另一侧其对应点处对应的1D谱处无峰, 则是假峰。(3) 该2D谱峰对应的1D谱处有峰, 对称点处未出峰, 但对称点对应的1D谱处有峰, 则是因灵敏度低或数字分辨率不够而丢失的峰^[57]。该实验的灵敏度是主要矛盾, 谱仪要调节到最佳状态, 保持最佳匀场和稳定性, 尽可能增加采样次数, 这是一个非常费时的实验, 一般在周末或假日, 外界干扰很小的情况下, 累加一、二天或更多时间, 方能得到较好的谱图。

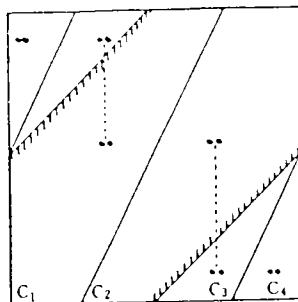


图 3-16 与图3-17一样的 INADEQUATE-2D 实验, 但 F_1 域折叠

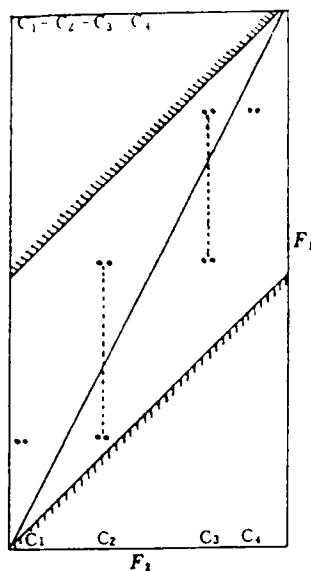


图 3-17 一串 AX 系统的 2D-INADEQUATE 实验

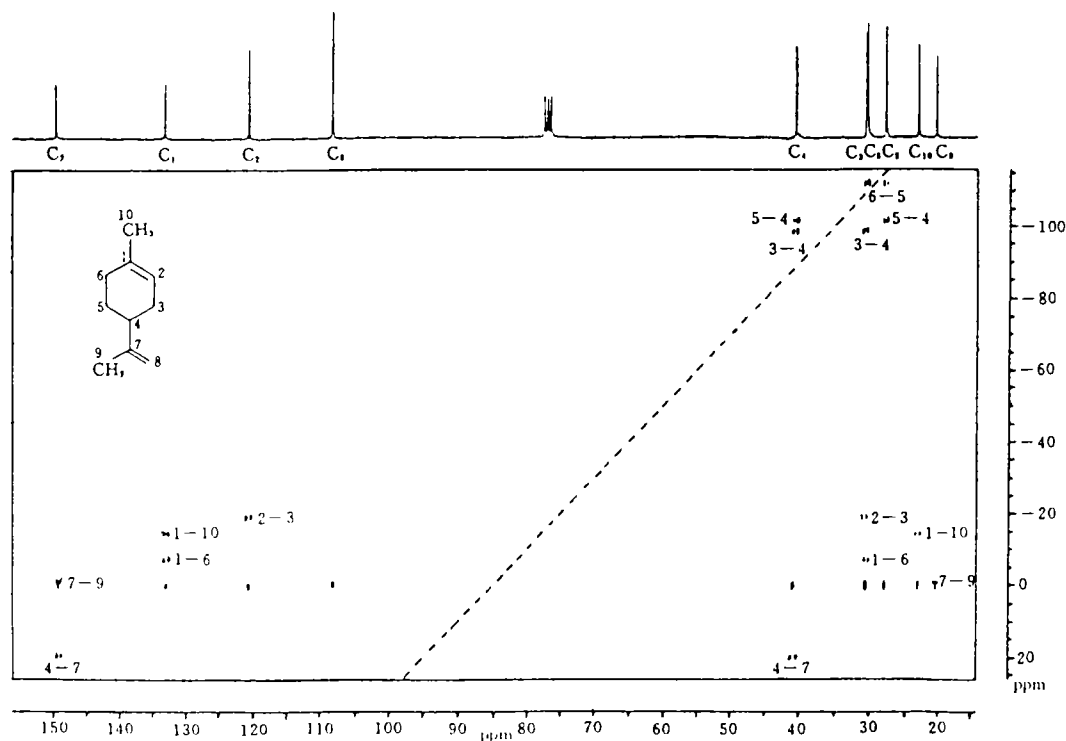


图 3-18 1,8 萜二烯的 INADEQUATE-2D 谱

4 异核化学位移相关谱

异核化学位移相关谱^[23,24]即两种不同核的拉莫(Larmor)频率通过标量耦合建立起来的相关谱,以 $\delta_{^{13}\text{C}}-\delta_{^1\text{H}}$ 应用最广。谱中质子多重线按照 ^{13}C 化学位移很好地分开了,它,在同一实验中把两种核的所有关系都建立起来了,得到直接耦合的 ^1H 和 ^{13}C 之间的化学位移相关关系,即一键的 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ 相关。在不去耦谱中,见图4-1(a),在 $(0, \omega_{\text{C}}+J/2)$ 、 $(0, \omega_{\text{C}}-J/2)$ 、 $(\omega_{\text{H}}-J/2, \omega_{\text{C}}+J/2)$ 、 $(\omega_{\text{H}}+J/2, \omega_{\text{C}}+J/2)$ 、 $(\omega_{\text{H}}+J/2, \omega_{\text{H}}-J/2)$ 、 $(\omega_{\text{H}}-J/2, \omega_{\text{H}}-J/2)$ 、 $(\omega_{\text{H}}-J/2, \omega_{\text{C}}-J/2)$ 处分别得到强度为 $M_{\text{C}}^2/2$ 、 $M_{\text{C}}^2/2$ 、 M_{C}^2 、 $-M_{\text{C}}^2$ 、 M_{C}^2 、 $-M_{\text{C}}^2$ 的六个信号,其中前两个信号没有被 ^1H 频率调制,称为轴峰,它对于谱的解析没有什么用处,要尽量压低它,其余四个峰称为 ^1H 频率调制的相关峰,峰强度正负交替。在去耦谱中,由图中各点在两条轴上的投影,即可得到直接键合的C-H原子之间的相关关系。图的一个轴是 ^{13}C 的 δ_{C} 值,另一个轴是 ^1H 的 δ_{H} 值。在确定 ^1H 信号归属的同时也确定了 ^{13}C 信号的归属。二维异核相关谱实质上是INEPT在二维空间的展开,本法中观测的是 ^{13}C ,系由 ^1H 传递而得,因此灵敏度比通常的 ^{13}C 谱高。异核化学位移相关谱,在 t_1 期间异核去耦,去掉了碳氢间的 J 耦合,但保留了 $^1\text{H}-^1\text{H}$ 间的耦合,并按照 δ_{C} 显示出来,对这种 J_{HH} 可以压掉它,得到干净的 $\delta_{\text{H}}-\delta_{\text{C}}$ 相关谱,亦可充分利用此信息,即以碳的化学位移为标尺,显示出连接在该碳上质子的质子耦合谱,即使两种氢的化学位移完全相同,只要所连碳的化学位移不同,谱线仍可分开。这种二维间接 J 谱, F_2 轴上谱宽一般不超过30Hz,故可得到相当好的分辨率,但在解谱时要注意,氢谱中强耦合的二维间接 J 谱可能变成弱耦合,而在氢谱中不属于强耦合的却

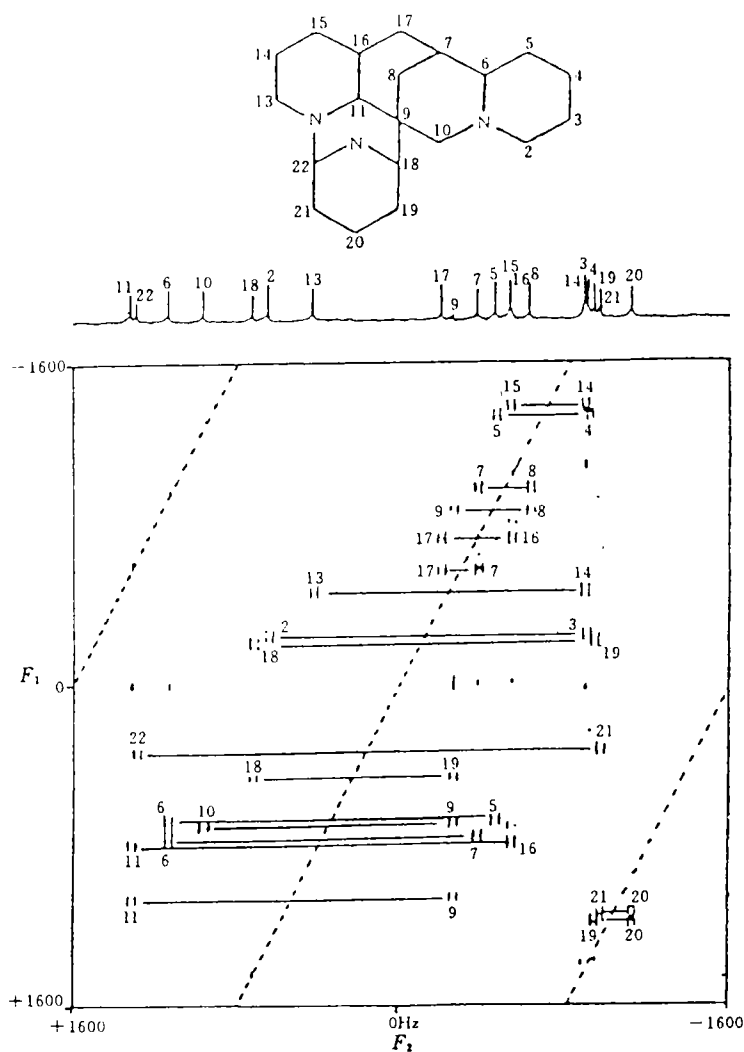


图 3-19 生物碱异红豆碱的 ^{13}C 双量子谱, F_1 和 F_2 依次代表双量子 and 单量子跃迁频率 $F_1 = 2F_2$ 线表示碳耦合的单量子平均频率与双量子频率间的关系, 水平连线表明耦合碳具有相同的双量子跃迁频率

可能变成强耦合。基本的异核位移相关(简称为 X-H COSY)与 COSY 是二维谱中两个最基本、最重要的方法, 它能提供 X 与 H 核化学位移的关联信息, 对结构分析十分有用。

4.1 C-H COSY 谱 [1, 11, 14, 16]

常规的 ^1H - ^{13}C COSY 是指直接键连的 C-H 间的耦合相关 ($^1J_{\text{CH}}$), 对于信号的指定非常有效。基本脉冲序列 [14]:

$$\begin{aligned}
 ^1\text{H}: & D_1 - (\pi/2) \phi_1 - t_1/2 - t_1/2 - \Delta_1 - (\pi/2) \phi_2 - \Delta_2 - \text{去耦} \\
 ^{13}\text{C}: & -(\pi) \phi_3 - \quad -(\pi/2) \phi_4 - \quad -(t_2) \phi_5 - (\text{ACQ})
 \end{aligned}$$

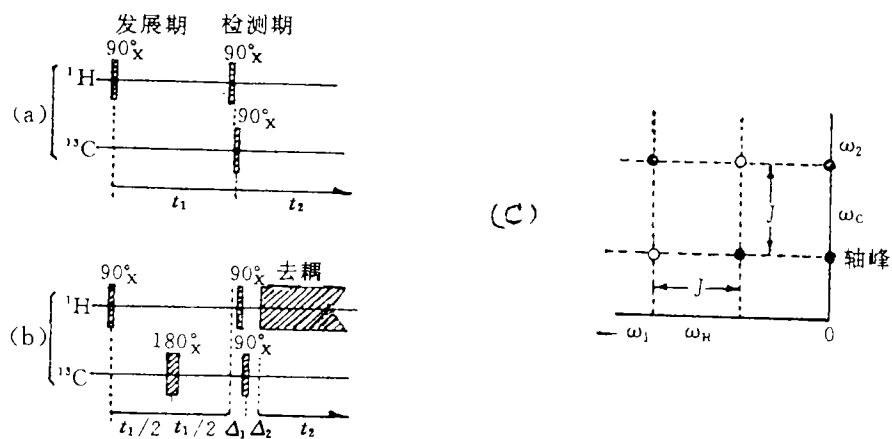


图 4-1 ^1H - ^{13}C 化学位移相关 2D NMR 脉冲序列 (a) 不去耦; (b) 去耦;
(c) 用 (a) 脉冲序列得到的 ^1H - ^{13}C 二旋系统的化学位移相关二维谱
○: 强度是 M_2^2 的相关峰 ●: 强度是 $-M_2^2$ 的相关峰。

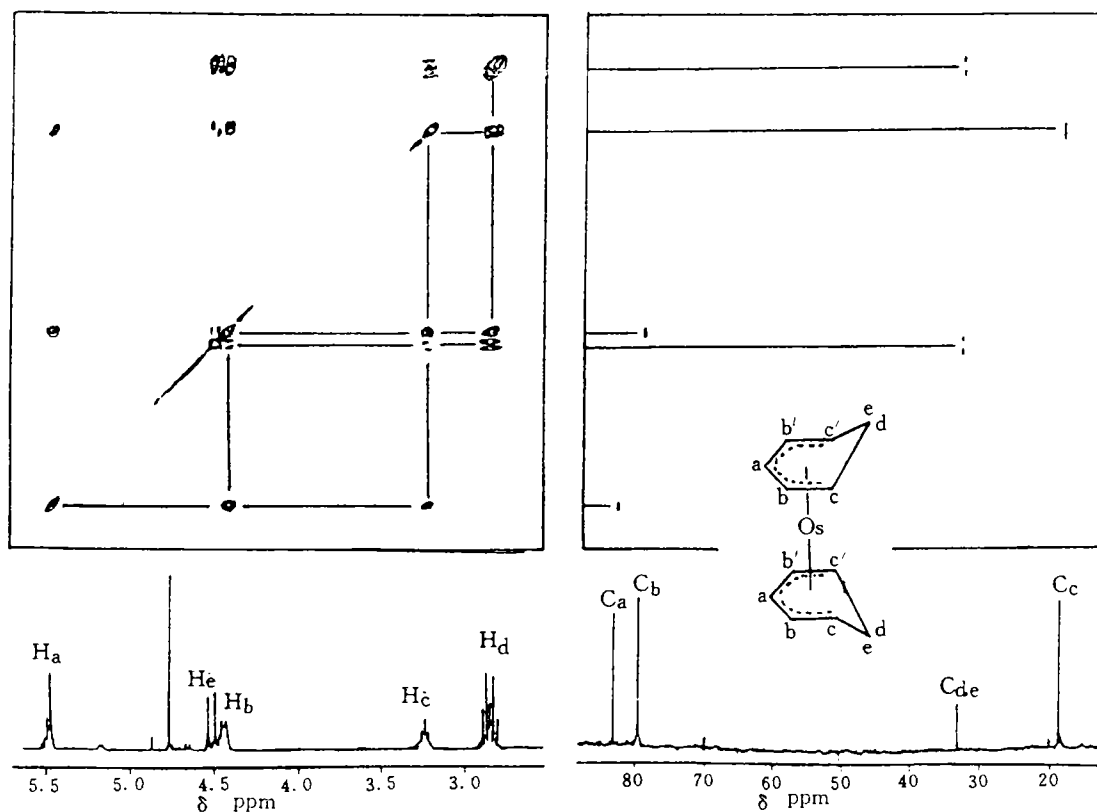


图 4-2 由 COSY 和 C-H COSY 归属 ^1H 和 ^{13}C 谱线 (左图
为 Os 络合物的 COSY 谱, 右图为 C-H COSY 谱)

若取 $^1J_{CH} = 130 \sim 150 \text{ Hz}$, $\Delta_1 = 3 \sim 4 \text{ ms}$, $\Delta_2 = (1/2) \Delta_1$, 谱图中各类C-H相关峰均较强, 两域消除了异核耦合, 以便简化谱峰和获得最佳灵敏度。图4-2^[11]中 F_2 域为 ^{13}C 化学位移, F_1 域为 ^1H 化学位移, 没有对角峰, 其交叉峰表明C-H耦合信息。从一已知的 ^1H 核信号, 根据相关关系, 即可找到与之相连的 ^{13}C 信号, 反之亦然。该实验的关键是选择一个合适的混合期, 以使 ^{13}C 核和 ^1H 核的信息充分转移, 使 ^1H 核的极化转移到 ^{13}C 核上。 Δ_1 和 Δ_2 分别取3.5和2.5ms。此谱常以等值线图表示, 如图4-3所示^[12]。C-H COSY谱的分辨率问题不十分突出, 但灵敏度却相当重要。为压制轴峰和 F_2 域正交检波需用相循环。由C-H COSY谱, 可以方便地得到全部C-H耦合信息, 若由COSY谱已得到了 ^1H 谱线归属, 则可归属 ^{13}C 谱线, 反之, 若可以确定一条或几条 ^{13}C 谱线, 由C-H交叉峰找到相应的 ^1H 谱线, 由COSY找到 ^1H - ^1H 耦合网络, 反过来再由C-H交叉峰找到全部 ^{13}C 谱线归属。在一般情况下, 结合COSY和C-H COSY的解析就很容易确定一个化合物的结构, 对于复杂结构分子的鉴定, 也必须从COSY和C-H COSY谱入手, 逐个推出各官能团之间关联, 得到不同的子结构, 然后用接力谱, 远程 ^1H - ^1H 及 ^{13}C - ^1H 化学位移相关谱或INADEQUATE实验等方法, 画出整个分子骨架。

异核COSY的一个很重要特点是 F_2 域为 ^{13}C 或 ^{31}P 等异核化学位移, 其范围比 ^1H 化学位移宽得多, 采集的是宽带去耦单峰信号, 因此, 异核谱的有效分散性比 ^1H 谱大得多, 即使相当大

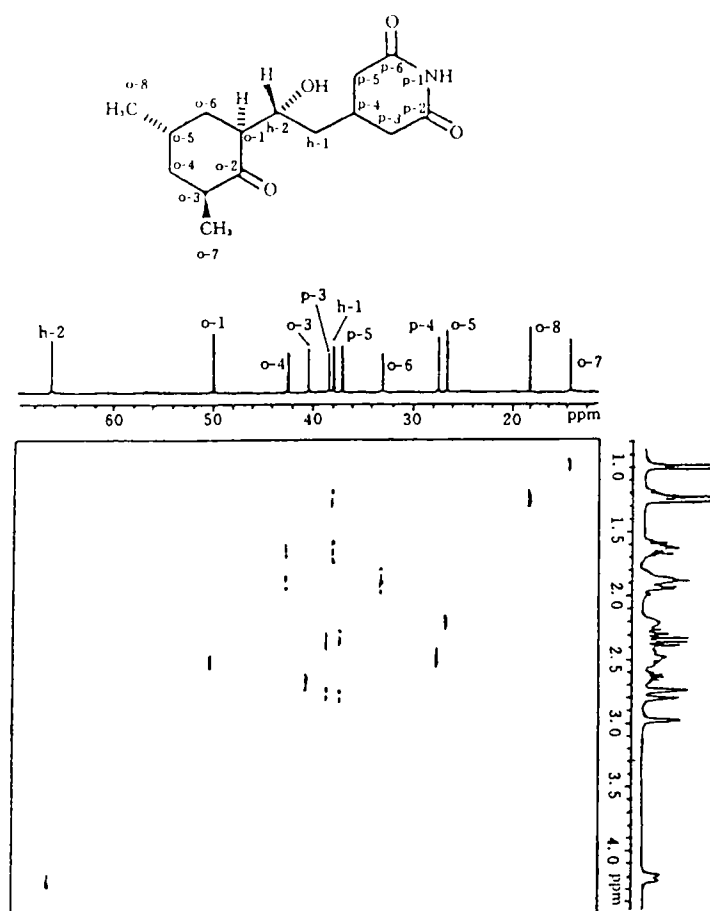


图 4-3 Actidinone 的 ^1H - ^{13}C COSY 谱等值图

的分子,也很少出现谱峰的重叠,这就提供了用异核共振谱线的分散性来分析 ^1H 谱,特别是重叠 ^1H 谱线的可能性。一般采用2D谱“列”截面图,由交叉峰的位置读出某 ^{13}C 对应的 ^1H 化学位移,这是同核选择性去耦方法所无法做到的。若要得到精确的 ^1H 化学位移,可有选择地画出不同 ^{13}C 谱线平行于 F_1 轴的投影图,即各“列”的1D谱图,确定 ^1H 化学位移。 C-H COSY 谱中会出现由 ^1H - ^1H 强耦合作用产生的假峰。 ^1H - ^1H 强耦合作用可能导致磁化作用在整个自旋系统内传递,使远程 C-H 相关信号在 C-H COSY 谱中出现,如 $\text{H}_\text{A}-\text{C}_\text{A}-\text{C}_\text{B}-\text{H}_\text{B}$ 系统,若 H_A 与 H_B 为强耦合,在 C-H COSY 谱中可能除了 $\text{C}_\text{B}-\text{H}_\text{B}$ 交叉峰外,还会出现 $\text{C}_\text{B}-\text{H}_\text{A}$ 交叉峰。

4.2 与 C-H COSY 有关的实验

为了适应不同研究的需要,在 C-H COSY 基本脉冲序列的基础上,进行一些改进,可得到一些新的脉冲序列,由此提供一些新的结构信息或改进谱图质量。

4.2.1 宽带去耦 C-H 相关谱^[1,143,16] (Broad Band Decoupling ^1H - ^{13}C COSY)

基本 C-H COSY 实验在 F_1 域保留了 ^1H - ^1H 耦合,同时耦合导致谱线加宽和灵敏度降低,若想对谱线密集区提供准确的 ^1H 谱线归属,需提高 F_1 域分辨率。消除 F_1 域 ^1H - ^1H 耦合是提高 F_1 域分辨率和灵敏度的一种有效手段。巴克斯(Bax)应用一个半选择脉冲BIRD双线性旋转去耦(Bilinear Rotation Decoupling):^[73,74]

$$^1\text{H}: (\pi/2)_x - (1/2)^1J_{\text{CH}} - (\pi)_y - (1/2)^1J_{\text{CH}} - (\pi/2)_x$$

$$^{13}\text{C}: -\pi -$$

改进了常规的单键异核位移相关的脉冲序列,把与 ^{13}C 相连的 ^1H 翻转,而不影响 ^1H 与 ^{13}C 之间的极化转移。通常

把BIRD放在 t_1 中间,消除 ^1H - ^1H 耦合,但保留同碳上偕氢的耦合,即甲基,次甲基质子显示单峰,不等价的两个亚甲基质子显示双峰。其脉冲序列是:

$$^1\text{H}: (\pi/2)_x - t_1/2 - (\pi/2)_x - (1/2)J - \pi_y - (1/2)J - (\pi/2)_x - t_1/2 - \Delta_1 - \pi/2 - \Delta_2 - \text{去耦}$$

$$^{13}\text{C}: -\pi - \quad \quad \quad -\pi/2 - \quad \quad \quad -\text{采样}$$

它是测定直接键连的 C-H 耦合相关的最有用的脉冲序列。不仅增加了实验的灵敏度,而且也增加了化学位移指定的精确性,见图4-4^[16,75]。

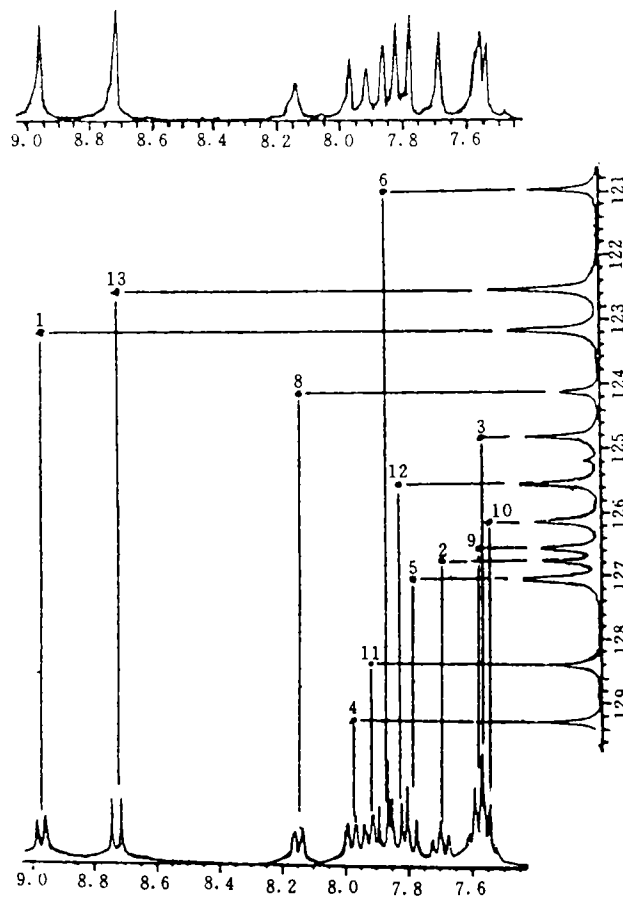


图 4-4 sinusoidal的BD ^1H - ^{13}C COSY谱

4.2.2 远程C-H化学位移相关谱(Long Range ^1H - ^{13}C COSY) [1,14,16]

如果在 ^1H - ^{13}C COSY脉冲序列中, Δ_1 和 Δ_2 对应于远程C-H耦合常数 $^nJ_{\text{LR}}$ (有的是 $^2J_{\text{CH}}$,大部分是 $^3J_{\text{CH}}$),而不是一键耦合的 $^1J_{\text{CH}}$,就能得到通过一键以上的C-H耦合相关信息,这是近几年来发展最快的二维技术之一,它能提供两键或大于两键的C-H耦合信息,建立C-C间的关联,甚至跃过氧、氮或其他原子的官能团间的关联,成为推导结构,归属同碳质子,确定 ^1H (或取代基)取向等立体结构分析,以及解决那些由屏蔽效应难以解释的季碳归属问题的强有力工具。由于该法能够将季碳和相邻碳上的质子相关联,对于确定分子结构的C-C连接十分有效,其灵敏度比INADEQUATE法高得多。图4-5中[16,63,76],C-3除与H-3相关外,还与H-11相关,季碳C-2和C-7分别与H-3和H-5相关,而季碳C-4则同时与H-3和H-11相关,而在常规H-C COSY谱中,则没有季碳与其他质子的相关峰。应用常规的 ^1H - ^{13}C COSY脉冲序列来获得远程C-H耦合的方法有许多缺点,例如有关的耦合常数 $^nJ_{\text{CH}}=0\sim 15\text{Hz}$, $n>1$, ($J_{\text{H-H}}=0\sim 20\text{Hz}$)变化较大,难以进行最佳实验参数的选择,而且由于脉冲序列的持续时间太长,会使质子弛豫在 t_1 和 Δ_1 内,以及碳弛豫在 Δ_2 内,丧失相当多的磁化矢量。因此凯斯勒(Kessler)提出一种通过远程耦合的相关谱(Correlation Spectroscopy Via Long Range Coupling)序列,通常用COLOC作为远程C-H化学位移相关的简称。脉冲序列如下[14]:

^1H : $D_1 - \pi/2 - t_1/2 - \pi - (\Delta_1 - t_1/2) - \pi/2 - \Delta_2$ - 去耦
 ^{13}C : $-\pi - \quad \quad \quad -\pi/2 \quad \quad -\text{ACQ}$

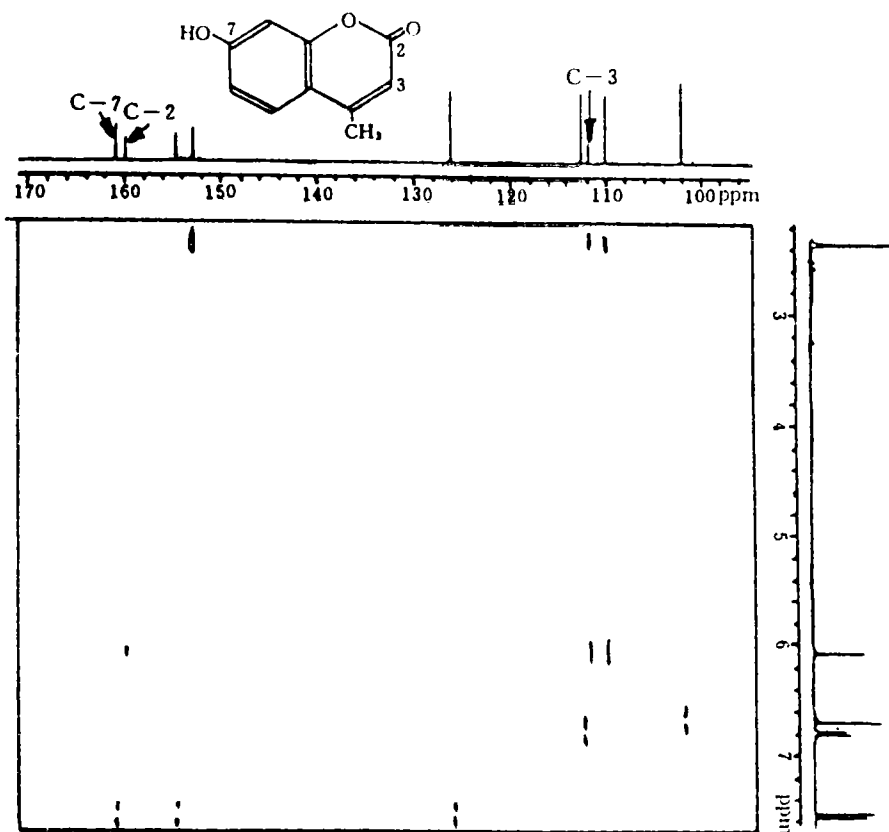


图 4-5 化合物4-methylumbelliferone的远程 ^1H - ^{13}C COSY谱(低场部分)

两个 π 脉冲实现两域异核去耦和 F_1 域同核去耦。 Δ_1 和 Δ_2 对应于 ${}^nJ_{LR}$, 一般取 ${}^nJ_{LR} = 10\text{Hz}$, $\Delta_1 = 50\text{ms}$, S_{ω_s} 应包含季碳的谱宽。 COLOC 又称“固定时间”实验, 其谱宽类似于 C-H COSY 谱, F_1 域为 ${}^1\text{H}$ 化学位移, F_2 域为 ${}^{13}\text{C}$ 化学位移, 交叉峰也类似于 C-H COSY 谱, 只是出现了小耦合的相关峰。 该法不仅能成功地对羰基碳进行指定, 而且应用于配糖体糖基连接顺序和连接位置的确定也很有效。 COLOC 谱的最大缺点是相关峰中包含了全部 ${}^1J_{CH}$ 耦合相关峰, 而且信号很强, 大大影响了小偶合相关信息的检测灵敏度。 图 4-6 中, 以 C_6 为例, 可见到 ${}^3J_{C_6H_2\beta}$, ${}^2J_{C_6H_7}$ 及 ${}^3J_{C_6H_4}$ 等相关峰。

为了压制一键 C-H 相关信息, 提高小偶合检测灵敏度, 近年来相继出现了许多新改进的脉冲序列。 一类是在 COLOC 序列的基础上, 用 BIRD 和 TANGO 带旋转操作的相邻核试验 (Testing for Adjacent Nuclei with Gyration Operation) 序列加以改进, 称为改进的“固定时间”实验。 在此推荐一种改进的脉冲序列^[14]:

${}^1\text{H}$: $D_1 - \pi/4 - \Delta - \pi - \Delta - \pi/4 - t_1/2 - \pi - (\Delta_1 - t_1/2) - \pi/2 - \Delta_s - \pi/2 - \Delta - \pi - \Delta - \pi/2 - \Delta_s$

- 去耦

${}^{13}\text{C}$: $\quad \quad \quad -\pi - \quad \quad \quad -\pi - \quad \quad \quad -\pi/2 - \quad \quad \quad -\pi - \quad \quad \quad -\text{ACQ}$

其中虚线部分 $-\pi/4 - \Delta - \pi - \Delta - \pi/4 -$ 为 TANGO 脉冲, 而 $-\pi/2 - \Delta - \pi - \Delta - \pi/2 -$ 为 BIRD 脉冲。 这里把脉冲放在 Δ_2 延迟中间, 消除远程信号检测的干扰, 达到最佳远程 C-H 极化转移效

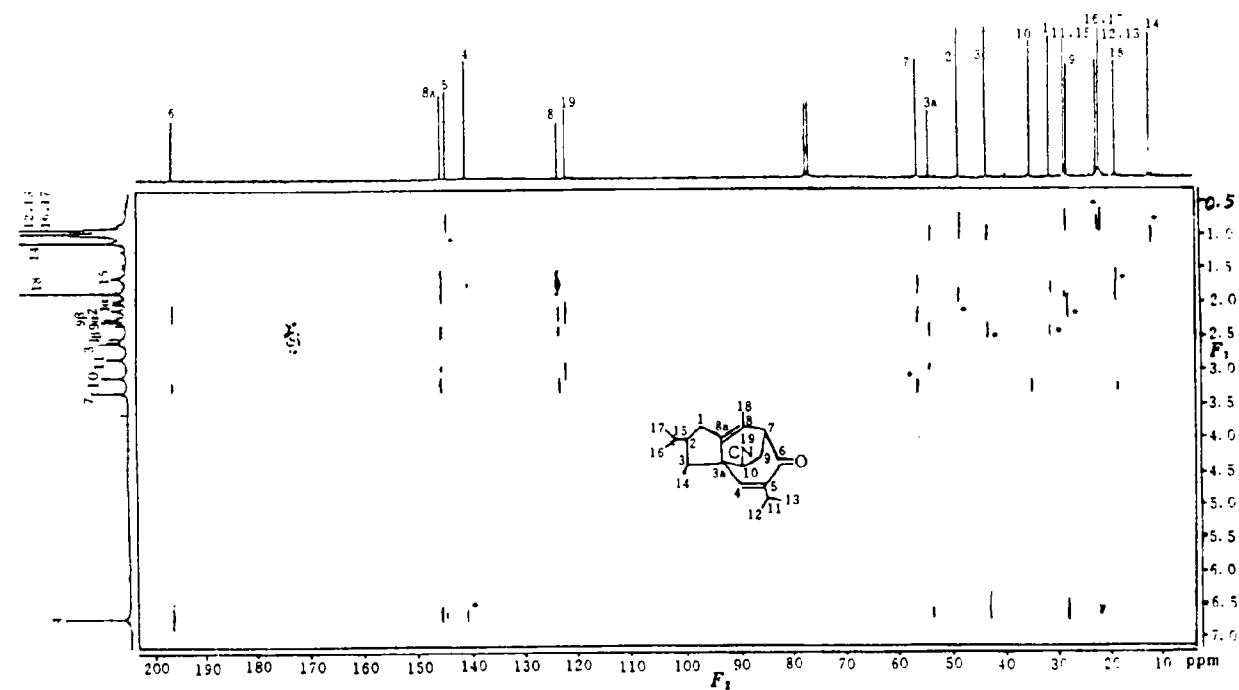


图 4-6 天然产物改性物的 COLOC 谱, * 为 ${}^1J_{CH}$ 交叉峰

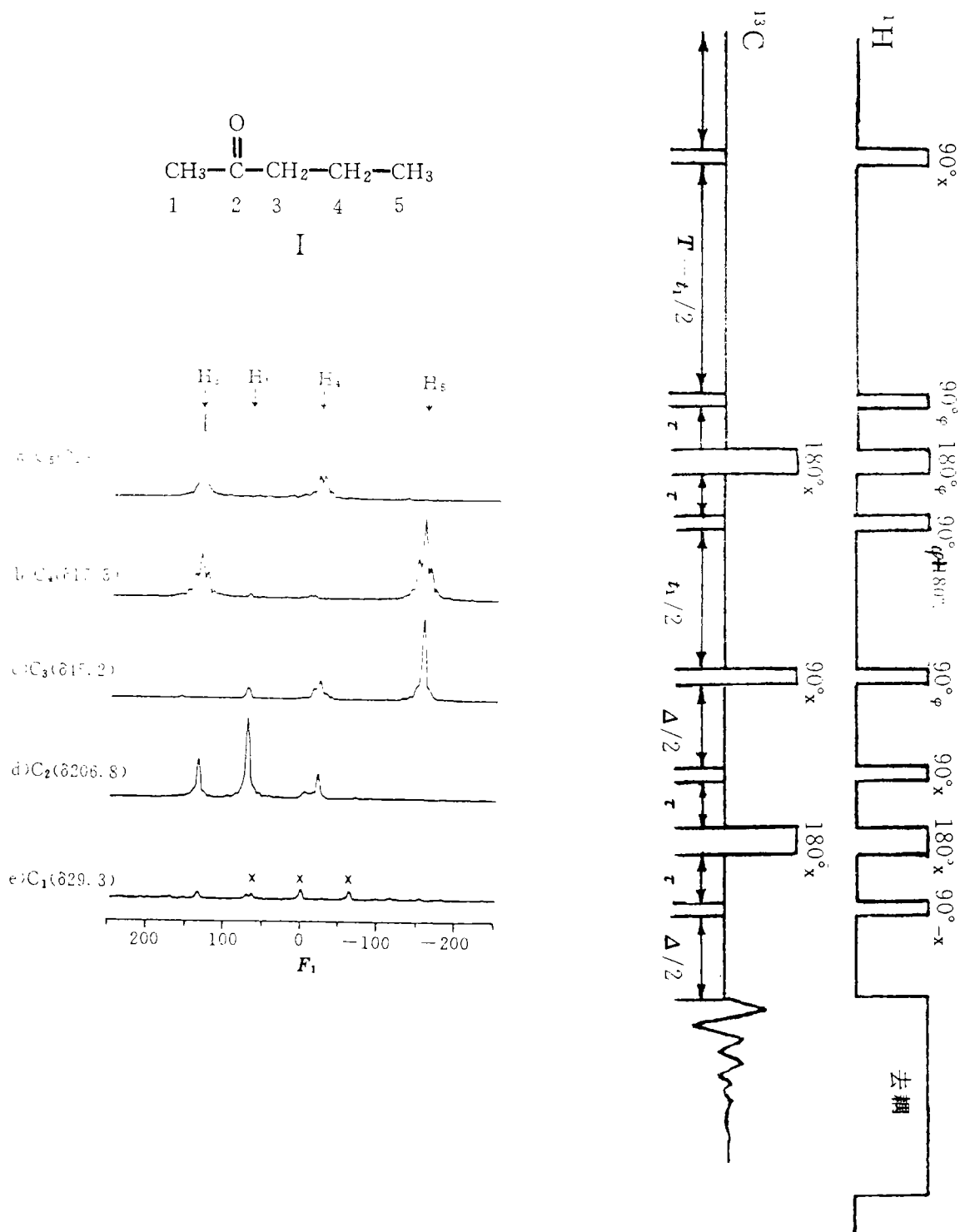


图 4-7 2-戊酮的XCORFE交叉断面图

果。把TANGO脉冲放在系列之前代替准备脉冲,企图进一步压制 $^1J_{CH}$ 的相关信息。如用一个 $(\pi/2)_x(^1H)$ 脉冲代替系列中的TANGO脉冲,其效果更佳,并使系列得以简化。另一类改进的脉冲序列称作Martin系列。它是基于普通的远程异核相关系列,在 Δ_2 中间引入一个BIRD脉冲以压制 $^1J_{CH}$ 相关峰。

1H : $D_1 - \pi/2 - \quad - \pi/2 - \Delta - \pi/2 - \Delta - \pi - \Delta - \pi/2 - \Delta -$ 去耦
 ^{13}C : $-t_1/2 - \pi - t_1/2 - \Delta - \quad - \pi - \quad - ACQ$

图4-6显示一天产然物改性物的COLOC谱^[16],由远程C-H交叉峰确定了结构和全部 ^{13}C 谱线归属,特别是季碳的谱线归属,并配合NOESY谱确定了它的立体结构。远程C-H COSY谱的检测灵敏度是主要矛盾,其重要性比C-H COSY更为突出,也是一种很费时的实验。在500MHz的谱仪上检测几毫克天然产物样品的远程C-H COSY需8到10小时,适当选择2D谱截面高度,可观测到大部分交叉峰。寻找远程C-H交叉峰的最佳方法是取每个碳峰的“列”,找出与之对应的全部 $^nJ_{CH}$ 相关信息。

4.2.3 XCORFE^[16,66]

Reynolds等提出XCORFE脉冲序列,通过由邻近质子耦合调制的间接C-H极化转移来解决C-H连接,其效果优于COLOC。图4-7是2-戊酮的XCORFE交叉断面图^[66], $T = 0.128s$, $\Delta = 0.048s$,可观察到所有的连接和裂分形式。各 1H 的信号是用 $^1H-^{13}C$ COSY指定的。如C-5被H-4裂分成四重峰(因 $^3J_{HH} \sim 8Hz$),而C-5和H-3的耦合是一个单峰($^4J_{HH} \sim 0Hz$),这样就阐明了C-5与H-4是H-C- ^{13}C 连接,C-5与H-3是H-C-C- ^{13}C 连接。从该图谱还能证明C-5与C-4和C-4与C-3的直接连接,以及C-5与C-3和C-3与C-1的两键连接。此外还能观察到C-2与C-1以及C-3与C-4的连接。

4.2.4 抑制单键耦合调制的远程碳-氢相关谱^[16,67]

它是在常规 $^1H-^{13}C$ COSY脉冲序列的第二步磁化矢量转移的延迟时间 $\Delta_2(\tau_2)$ 中间引入一个BIRD脉冲进行调制去耦,其结果抑制了单键C-H自旋耦合 $^1J_{CH}$ 调制的信号强度,突出远程耦合。这在应用远程C-H相关实验作为谱图指认和结构解析的手段中是一颇具潜力的有意义的改进。对于多环芳香体系的化合物的结构解析,已证明该法优于COLOC和XCORFE。从图4-8中($J = 10.4Hz$, $\tau = 2.9ms$, $\Delta_1 = (1/2)J(CH)$, $\Delta_2 = \Delta_1/2 - \tau$)可看出, $^1J_{CH}$ 耦合的信号强度明显低于远程耦合 $^nJ_{CH}(n > 1)$ 的信号强度^[67]。

4.2.5 质子全去耦H-C COSY谱^[16,77,78]

潘皮克(perpick)-杜蒙脱(Dumount)等提出一个改进的COLOC脉冲序列,对一个具有多个不等价亚甲基的复杂化合物,该法得到极易分辨的全去耦氢谱,而且对于分子量约500的化合物,灵敏度高于一切基于 ^{13}C 检测的脉冲序列。质子全去耦谱的优点是:(1)每一个质子都显示单峰,峰形好,即使很小的化学位移差别都能分辨。(2)BIRD脉冲会导致AB两峰的中点产生一伪峰。(3)由于全去耦和峰形的改善而使灵敏度大大提高。图4-9的左右两侧分别是应用该脉冲序列和BD $^1H-^{13}C$ COSY脉冲序列所得到的一些亚甲基的 $^1H-^{13}C$ 交叉断面图。C-14的两个亚甲基质子间距仅28Hz,事实上,其分辨极限可达18-21Hz,而右侧图形的分辨率则较差。

4.3 异核接力相干转移谱(RELAY)(Heteronuclear Relayed Coherence Transfer Spectroscopy)^[1,14,16]

RCT技术是两个相干转移步骤的结合。其原理是:首先磁化矢量从一氢核转到邻位氢核,

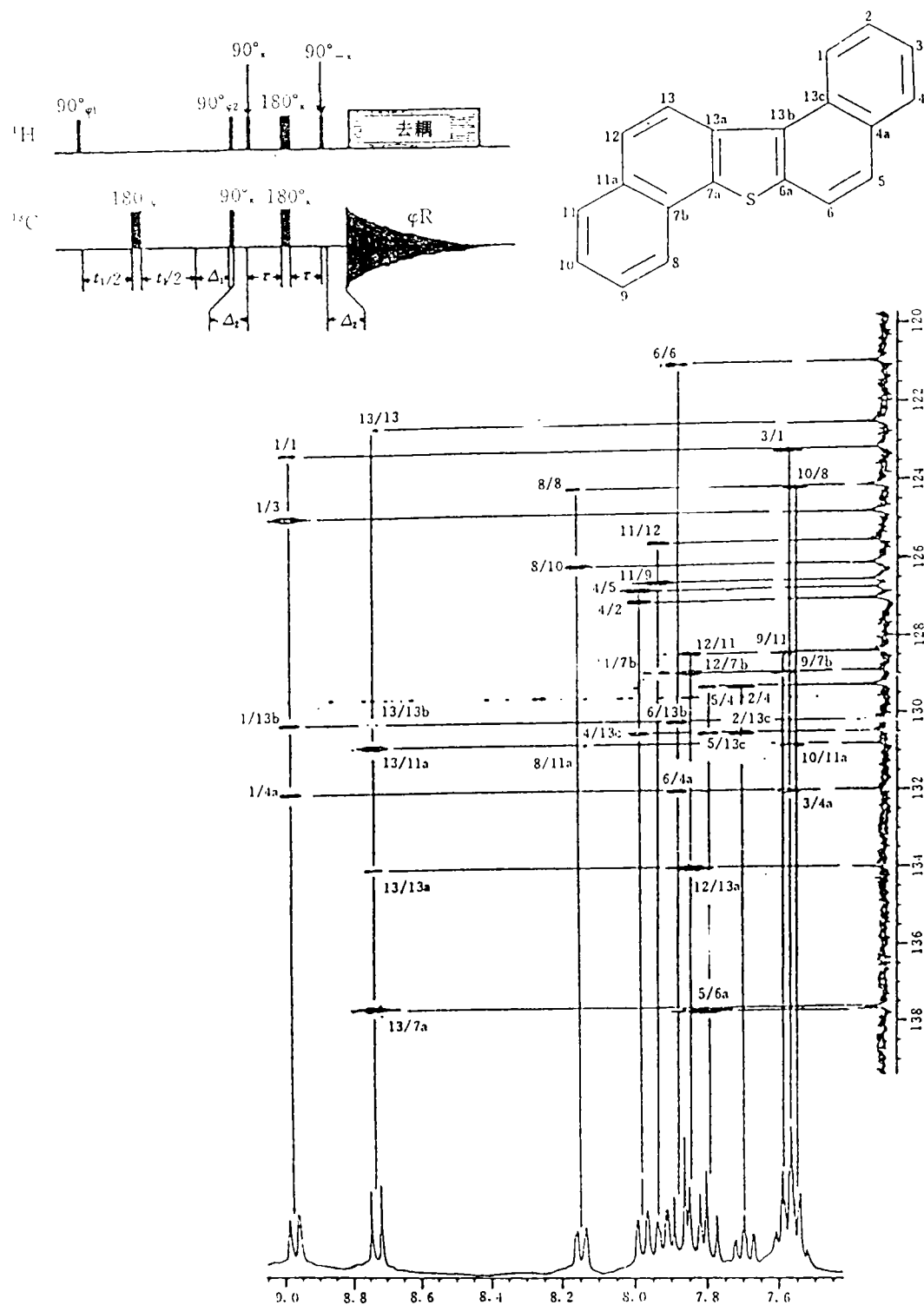


图 4-8 化合物 Sinusoidal 远程碳氢相关谱

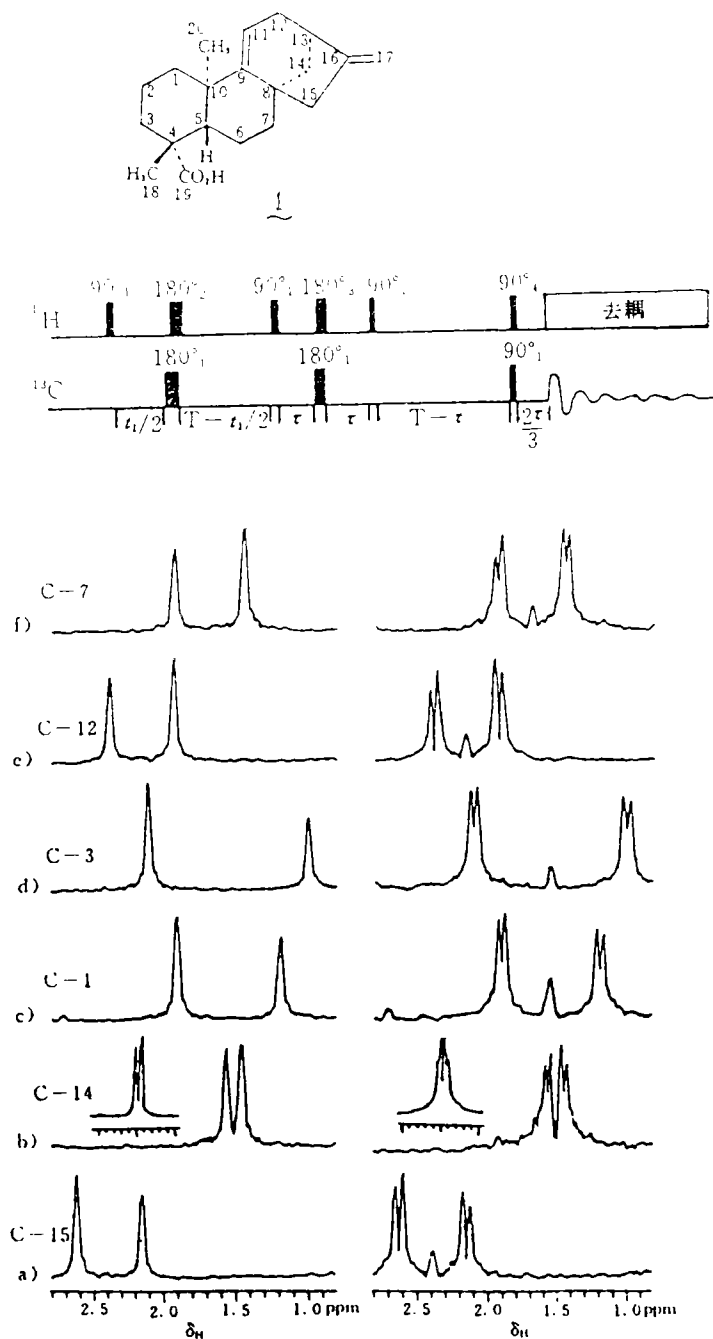


图 4-9 二萜化合物 Kauradienoic Acid 的质子全去耦 ^1H - ^{13}C COSY 谱

然后再由这一氢核传给与它直接相连的碳核,即 $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ 。因此,通过一确定的质子,就能对相邻碳的化学位移进行指定,如此即可得到分子骨架C-C连接的信息。其必要条件是含季碳。RCT的灵敏度最少比C-H COSY低四倍,但不比远程C-H COSY低,比INADEQUATE则高得

多。

4.3.1 H-H-X或H-H-C接力

最常用的接力途径是从第一个 ^1H 磁化转移到第二个 ^1H ,然后再通过第二个 ^1H 把磁化转移到与之相连的碳向量上。它是COSY与C-H COSY两个极化转移的结合,叫做H-H-C接力,其结果是第一个 ^1H 不仅可以同与其直接相连的异核关联,而且还可以同与其相邻的异核关联,建立分子骨架的结构信息。结构单元 $-\text{X}_\text{a}-\text{X}_\text{b}-$ 中,存在 $^3J_{\text{H}_\text{a}-\text{H}_\text{b}}$ 和 $^1J_{\text{X}_\text{b}-\text{H}_\text{b}}$,通过H-H-X接力实验可得到 H_a 与 X_b 的相关信息。基本脉冲序列:^[14]

^1H : $D_1 - \pi/2 - t_1/2 - t_1/2 - \pi/2 - \tau_m - \Delta_1 - \pi/2 - \Delta_2 -$ 去耦

$\text{X}(^{13}\text{C})$: $-\pi - \pi/2 - \text{ACQ}$

这相当于COSY和C-H COSY两个极化转移的结合。为了优化这一实验,以防止接力磁化作用的极化转移效率被降低,可以在 τ_m 和 Δ_2 中间加上 π 脉冲变成:^[1,14]

^1H : $(\pi/2) \phi_1 \leftarrow t_1 \rightarrow (\pi/2) \phi_2 \leftarrow \tau_m/2 \rightarrow \pi \phi_3 \leftarrow \tau_m/2 \rightarrow \Delta_1 \rightarrow (\pi/2) \phi_4 \leftarrow \Delta_2 \rightarrow$ 去耦

^{13}C : $-\pi \phi_5 - (\pi/2) \phi_6 - \text{ACQ} \phi_7$

^1H : $(\pi/2) \leftarrow t_1 \rightarrow (\pi/2) \leftarrow (\tau_m + \Delta_1)/2 \rightarrow \pi \leftarrow (\tau_m + \Delta_1)/2 \rightarrow (\pi/2) \leftarrow \Delta_2/2 \rightarrow \pi \leftarrow \Delta_2/2 \rightarrow$ 去耦

^{13}C : $-\pi - \pi \leftarrow \Delta_1/2 \rightarrow \pi/2 \leftarrow \Delta_2/2 \rightarrow \pi \leftarrow \Delta_2/2 \rightarrow \text{ACQ}$

显然,序列中第一部分是COSY谱,实现 $\text{H}_\text{a}-\text{H}_\text{b}$ 相干转移,在 $\tau_m = (1/2)J_{\text{HH}}$ 时, H_b 改变相位,在 $\Delta_1 = (1/2)^1J_{\text{CH}}$ 延迟之后,又建立一个反向磁矩,实现 $\text{H}_\text{b}-\text{X}_\text{b}$ (或 C_b)的极化转移,这部分极化作用在 t_1 期间受到 δH_a , J_{HH} 调制,FT后得到 $\text{H}_\text{a}-\text{H}_\text{b}$ 的接力峰。接力谱中必然包含直接耦合的相关信息和接力交叉峰,接力实验成功的关键是与 J_{HH} 有关的 τ_m 的选择。接力信号最强, $\text{H}_\text{b}-\text{X}_\text{b}$ 直接极化转移为零的条件是: $\tau_m = (2n+1)/2J_{\text{H}_\text{b}\text{H}_\text{a}}$ ($i=\text{c}, \text{a}$),无被动耦合时, $\tau_m = (2n+1)/2J_{\text{H}_\text{a}\text{H}_\text{b}}$ 时接力信号最大; $\tau_m = n/2J_{\text{H}_\text{a}\text{H}_\text{b}}$ 时接力信号为零。有被动耦合时,($K>1$),($n>0$),则 $\tau_m = (1/2)J_{\text{max}}$ (J_{max} 是 J_{HH} 的最大值)时,接力信号为零,因此在选取 τ_m 时要避免发生这种情况,取 $\tau_m = (0.5/1.3)J_{\text{max}}$,当 $J_{\text{max}} = 14\text{Hz}$ 时,取 $\tau_m = 27\text{ms}$ 。若存在同碳 ^1H 耦合($^2J_{\text{gem}}$)时,可能导致RCT实验失败,通常取 $\tau_m \approx 1/J_{\text{HH}} \approx 70\text{ms}$,这类似于同核接力谱。H-H-C接力实验的关键参数 τ_m 不仅与 J_{HH} 有关,还取决于 ^1H 耦合系统类型。对于未知结构,取 $\tau_m \approx 28\text{ms}$ 。每个化合物中都包含不同的自旋

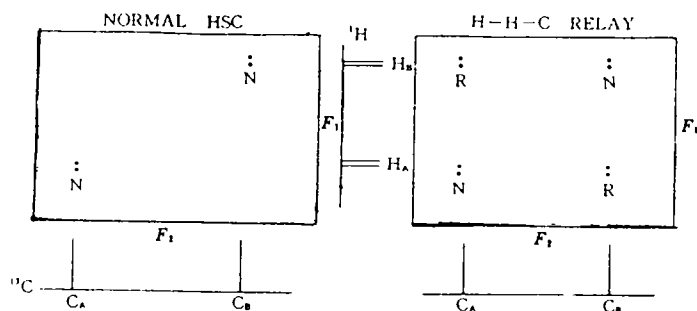


图 4-10 C-H COSY(左)和H-H-C接力谱(右)

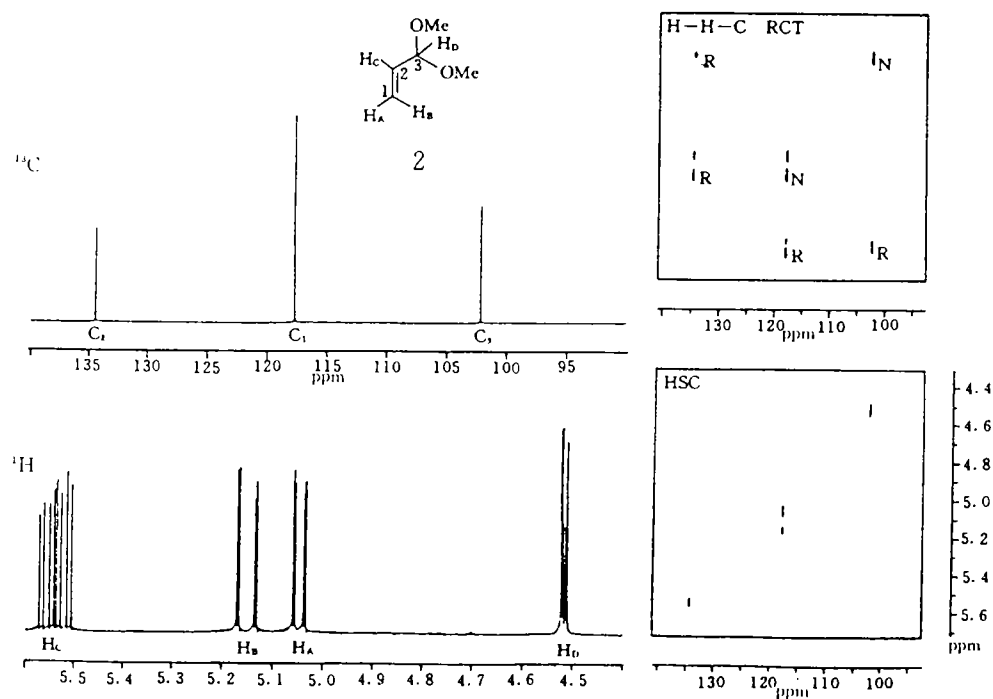


图 4-11 化合物 2 的 ^1H (左下)、 ^{13}C (左上), C-H COSY (右下) 和 H-H-C 接力谱 (右上), 图中标记“N”的交叉峰为直接相连的 C-H 相关峰, 标记 R 的为接力峰

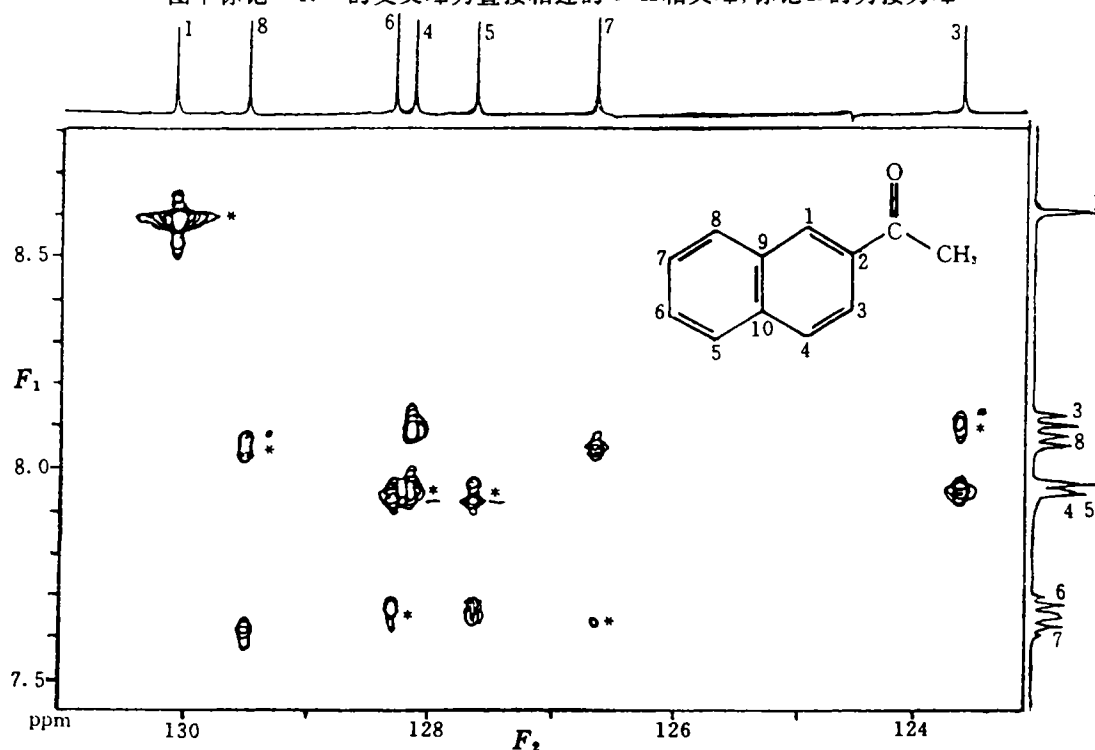


图 4-12 2-乙酰基萘的 H-H-C 接力谱 (芳香碳部分)。* 标记 $^1J_{\text{CH}}$ 交叉峰

系统,只选取一个 τ_m 值不可能使所有的自旋系统的接力峰最强,必要时可以选择几个不同的 τ_m 值并相应地多做几个实验。谱中 F_1 域为 ^1H 化学位移, SW_1 为 ^1H 的谱宽, F_2 域为 ^{13}C (或 X) 化学位移, SW_2 取连氢碳 (或 X) 的谱宽。图4-10比较了一个耦合系统 $\text{H}_\text{A}-\text{C}_\text{A}-\text{C}_\text{B}-\text{H}_\text{B}$ 的 $\text{C}-\text{H}$ COSY 和 $\text{H}-\text{H}-\text{C}$ 接力谱^[14], 在 $\text{C}-\text{H}$ COSY 谱中, 在 $(\nu_{\text{H}_\text{A}}, \nu_{\text{C}_\text{A}})$ 和 $(\nu_{\text{H}_\text{B}}, \nu_{\text{C}_\text{B}})$ 处有交叉峰 (N), 而在接力谱中, 除了这两个峰外, 还多出了 $(\nu_{\text{H}_\text{A}}, \nu_{\text{C}_\text{B}})$ 和 $(\nu_{\text{H}_\text{B}}, \nu_{\text{C}_\text{A}})$ 两个交叉峰, 它们来自间接极化转移, 称作 RCT 峰 (或 R 峰)。由此得到有关分子骨架的信息, 说明 C_A 和 C_B 是相连的。图4-11为化合物2的 ^1H , ^{13}C , $\text{C}-\text{H}$ COSY 和 $\text{H}-\text{H}-\text{C}$ 接力谱^[14], 从接力谱中可以看出, 直接相连的 $\text{C}-\text{H}$ 交叉峰 (N 标志) 强度变化很大, $\text{H}_\text{C}-\text{C}_2$ 交叉峰“消失”了, 由接力谱可方便地归属四个 ^1H 的谱线和 $\text{C}-\text{C}$ 间的关联, 它的主要特征是建立 ^1H 与相邻官能团 ^{13}C 的关联。图4-12是乙酰基萘的 $\text{H}-\text{H}-\text{C}$ 接力谱^[14], 可以看出除 $^1J_{\text{CH}}$ 相关峰外, 还出现了一些很强的 $\text{H}-\text{H}-\text{C}$ 接力相关峰, 清楚地表明 C_1 相邻碳上无质子, 其余各碳与相邻碳上质子均出现接力峰, 这成为归属谱线和推导结构的有力判据。

4.3.2 $\text{H}-\text{X}-\text{X}$ 接力^[1,14,16]

COLOC 实验可以提供 $^2J_{\text{CH}}$ 、 $^3J_{\text{CH}}$ 、 $^4J_{\text{CH}}$ 等相关信息, 但有时难以区分它们, 因而难以确定分子结构或官能团之间的关联。 $\text{H}-\text{X}-\text{X}$ 接力则只提供 $^2J_{\text{XH}}$ 相关信息。由 $^1J_{\text{XH}}$ 极化转移和 $^1J_{\text{XX}}$ 双量子相干的接力作用, 建立 $\text{H}_\text{A}-\text{H}_\text{B}$ 相关信息, 由跨越两键的 RCT 峰可以准确地确定那些与连氢碳相接的季碳。脉冲序列^[14]:

$^1\text{H}: D_1 - (\pi/2) \phi_1 - \Delta_1/2 - t_1/2 - -t_1/2 - \pi \phi_2 - \Delta_1/2 - (\pi/2) \phi_3 - t_r - \text{BB}(S_2) \quad \text{——}$

$\text{DO} - -\text{BB}(S_2)$

$\text{X}: \quad \quad \quad -\pi \phi_4 - \quad \quad \quad -(\pi/2) \phi_5 - t_{\text{XX}}/2 - \pi \phi_6 - t_{\text{XX}}/2 -$

$-(\pi/2) \phi_7 - (t_{\text{r}2}) \phi_8 - \text{ACQ}$

(Δ_1 为 $1/(2J_{\text{XH}})$, $t_{\text{XX}} = 1/(2J_{\text{XX}})$, t_r 是可变聚焦时间, 可通过 INEPT 选择 J_{XH} 多重性)。对于 $\text{H}-\text{X}_\text{a}-\text{H}_\text{b}$ 系统, 若采样之前没有选择性延迟 $t_{\text{r}2}$ 时, 该序列的谱图可产生三种峰: (a) $\text{H}-\text{X}_\text{a}$ 相关峰 (F_1 域为 δ_H 和 J_{HH}), 它不包含第二步转移。 (b) $\text{H}-\text{X}_\text{b}$ 的接力相关峰, F_2 域为 $\delta_{\text{X}_\text{b}}$ 和 J_{XX} ; F_1 域为 δ_H 和 J_{HH} , 类似于 $\text{C}-\text{H}$ COSY 交叉峰, (c) $\text{H}-\text{X}_\text{b}$ 的直接相关峰, 这类峰很弱, 是通过 $^2J_{\text{X}_\text{b}\text{H}}$ 的耦合作用产生的。若 X 核为稀核 (如 ^{13}C), (a) 和 (c) 类信号产生于单个 ^{13}C 或两个 ^{13}C 核的分子, 而令人感兴趣的 (b) 类信号仅仅来源于两个 ^{13}C 核共同存在的分子中。对此序列的改进是在发展期 (t_1) 加一个 BIRD 脉冲, 在 F_1 域消除 J_{HH} , δ_H 在 t_1 终端聚焦而 $^1J_{\text{XH}}$ 继续进动, 使 (c) 类信号被转换成 J 的分解信号而出现在 $F_1 = 0$ 处, 这就减少了 (c) 类信号影响, 对提高 S/N 有利。接力谱的主要问题是怎样衰减 $\text{C}-\text{H}$ COSY 交叉峰, 增强 RCT 峰检测灵敏度。其他接力谱的应用, 视结构解析的特殊要求而定, $\text{H}-\text{X}-\text{H}$ 接力本质上是个灵敏实验, 通过与两个 ^1H 有共同耦合的异核把两个 ^1H 联系起来, 沟通了耦合网络中的空隙, 这类实验不需检测异核, 对于 ^1H 以外的核如 ^{31}P 等富核也很有实用价值。 $\text{H}-\text{C}-\text{C}$ 接力谱的灵敏度较低, 但比 $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ INADEQUATE 的高, 对于确定季碳位置很有实用价值。

4.4 ^1H 检测的异核位移相关谱 (Reverse 或 Inverse)^[1,11,14,16,57]

它又称作反转实验。质子的极化转移使异核位移相关实验比常规的异核 F_1 观察灵敏得多。近年来发展了反转极化转移的脉冲序列, 即从 X 核到 ^1H 核的极化转移。Inverse 实验是通过极化转移或多量子相干或多量子滤波, 用 ^1H NMR 间接地检测 X 核与 ^1H 的关联。它最突出的优点是能提高灵敏度, 对 ^{15}N 等低旋磁比的核尤为显著。目前最常用的 X 核是 ^{13}C , ^{15}N 和 ^{113}Cd

等。基本脉冲序列^[14]:

$$^1\text{H}: D_1 - (\pi/2) \phi_1 - \Delta_1 - (\pi) \phi_2 - \Delta_1 - \text{ACQ}(\phi_R)$$

$$\text{X}: -(\pi/2) \phi_3 - t_1/2 - t_1/2 - (\pi/2) \phi_4 - \text{BB}$$

改进的序列引入半选择脉冲, 称作BIRD脉冲:

$$^1\text{H}: (\pi/2) \phi_1 - \Delta_1 - \pi \phi_1 - \Delta_1 - (\pi/2) \phi_2 - (\pi/2) \phi_1 - t_1/2 - \pi \phi_2 - t_1/2 - \text{ACQ}(\phi_R)$$

$$\text{X}: -\pi \phi_1 - \Delta_2 - (\pi/2) \phi_3 - \Delta_1 - (\pi/2) \phi_3 - (\pi/2) \phi_4 - \text{BB}$$

它能更有效地压制单量子组分, 用BIRD脉冲消除 ^{12}C 单量子相干(SQC), 观察 ^{13}C 双量子跃迁。2D实验中残留的SQC信号不出现在DQ频率上, 也可以采用X核去耦改进灵敏度。该谱的最大优点是提高了稀有核的检测灵敏度,

远程C-H相关更明显。此外, 还有下列特点: (1) ^1H 谱在 F_2 域, 提供了解析密集 ^1H 谱线的可能性, 因为可以有足够的数据点增加 F_2 域数字分辨率。(2) 采用近年来发展起来的WALTZ去耦技术, 在采集 ^1H FIDS时, 实现 ^{13}C 宽带去耦, 使 F_2 域的 ^1H 谱只保留 J_{HH} 耦合, 消除了 $^1J_{CH}$ 耦合, 对分析密集谱线很有利。(3) 近年来出现的Inverse探头, 改变了以前的线圈安装位置, ^1H 线圈在里面, ^{13}C 线圈在外面, 避免了 ^1H 检测灵敏度的损失, 但用此探头检测 ^{13}C 信号, 其灵敏度比宽带探头低。(4) 原则上, 用异核多量子相干代替极化转移来观察 ^1H , 灵敏度比直接观察X核增加 $(r_H/r_X)^{5/2}$ 倍, 对 ^{13}C 可提高31.6倍, 对 ^{15}N 可提高306倍, 而实际上, 由于种种因素的影响, S/N不可能提高到理论值。

最近几年发展起来的脉冲梯度场NMR技术, 用具有梯度线圈的探头, 运用梯度回波选择相干, 不用相循环即可消除伪峰, 在样品浓度不很低的情况下可以减少采样时间, 在反相模式中特别有用, 例如在异核相关中选择双量子相干, 使单量子得到很好的抑制, 大大减少了 t_1 噪声的干扰, 并使基线平滑。

Inverse异核位移相关谱的 F_1 域为X核化学位移, F_2 域为 ^1H 化学位移, 交叉峰表征 ^1H -X之间的关联。图4-13是双量子相干的 ^{15}N - ^1H reverse位移相关谱^[14]。两域保留 J_{HH} ,

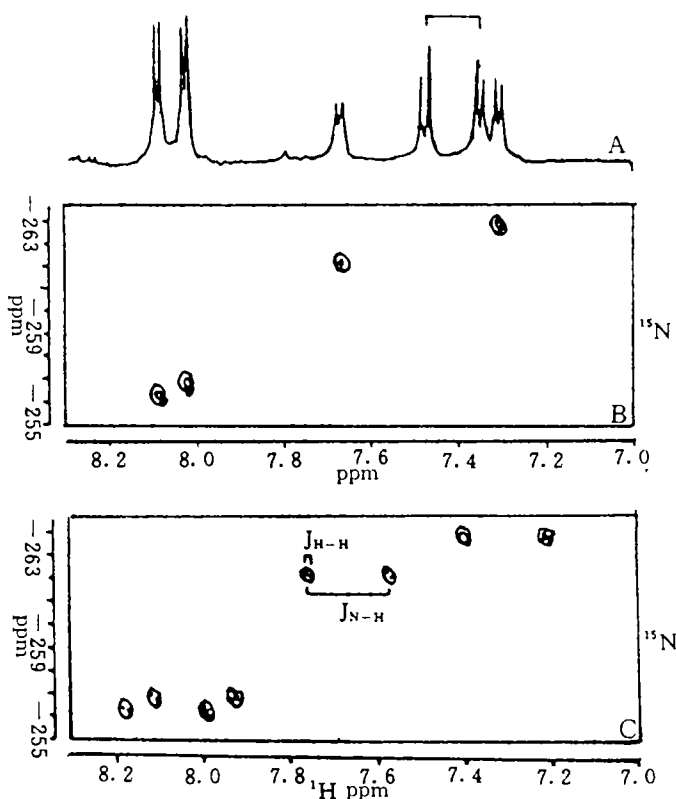


图 4-13 双量子相干的 ^{15}N - ^1H REVERSE位移相关谱两域保留 J_{HH} 交叉峰倾斜; 下图中, F_2 域保留 J_{NH} ; 上图: 用 ^1H 聚焦脉冲实现异核去耦

交叉峰倾斜, 上图是用 ^1H 聚焦的 180° (^1H) 脉冲实现异核去耦, 以改进灵敏度。在 F_1 域消除 δ_H , 则 F_2 域的 δ_H 和 F_1 域的 δ_X 直接相关, F_1 域不出现 J_{XH} 作用。若不采用 X 核去耦, F_2 域保留 J_{XH} 信息。图4-14是一种三萜衍生物的 C-H 位移相关谱^[14], 没有 ^{13}C 去耦。

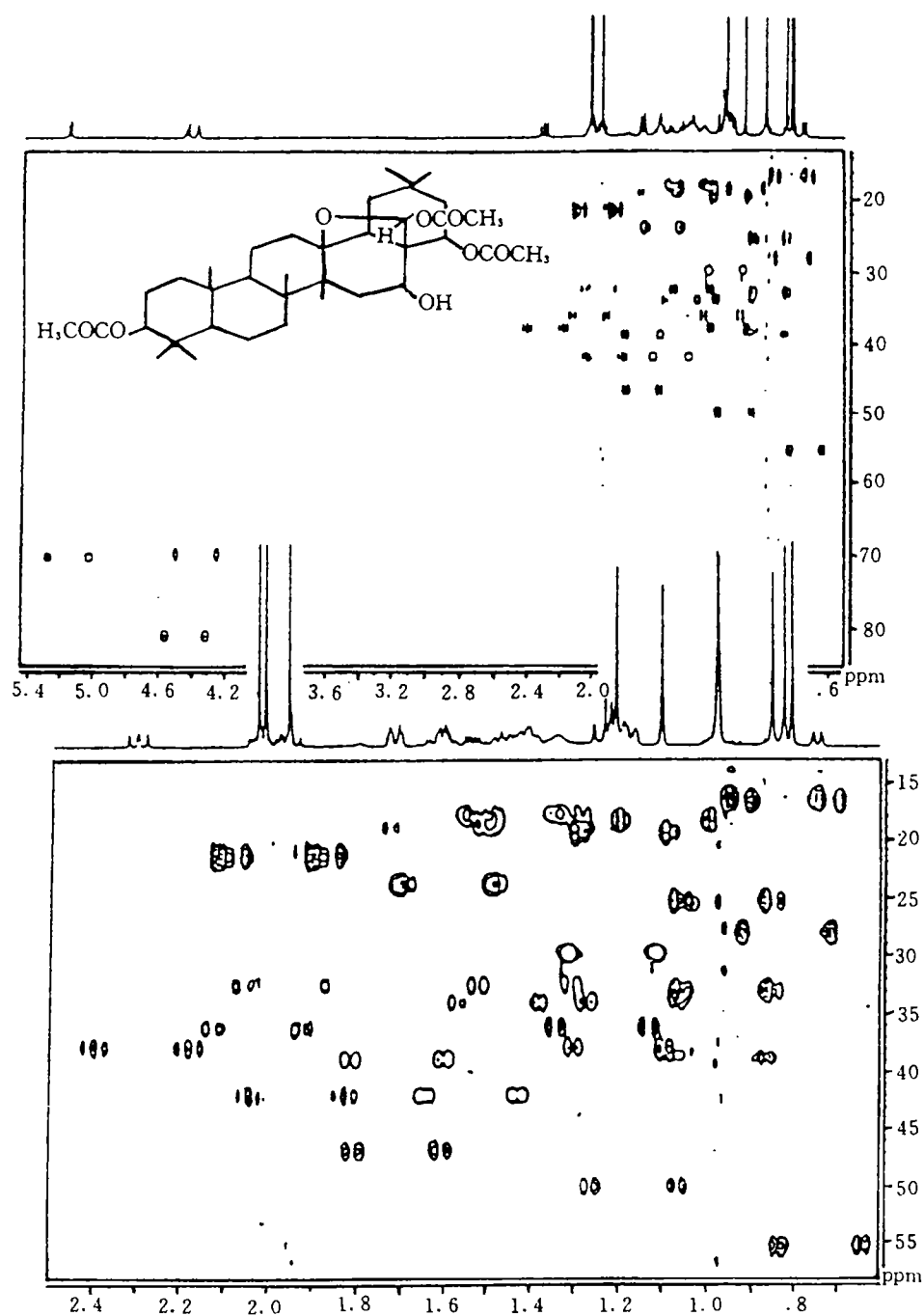


图 4-14 一种三萜的 Inverse ^{13}C - ^1H 位移相关谱 (无 ^{13}C 去耦) (上图) 下图为高场部分放大图

F_2 域为 ^1H 化学位移,但保留 $^1J_{\text{CH}}$ 耦合,因此,每个 ^{13}C 谱线对应两个交叉峰,各对交叉峰的中点为 ^1H 化学位移。这两种谱的 F_2 域都保留 J_{HH} 耦合。

图4-15为同种三萜衍生物的Inverse远程C-H位移相关谱(无 ^{13}C 去耦),谱图的灵敏度比直接检测有很大提高^[14]。

^1H 检测异核位移相关实验中最困难之处在于抑制不与 ^{13}C 耦合的质子信号(^1H - ^{12}C),这将导致严重的动态范围问题,这一困难使该法多年来未被采用。现在已有一些似乎合理的近似方法可解决这一问题,但它们虽然有可能抑制这些(^1H - ^{12}C)但损失了灵敏度,且仅能用于小分子。

由于实验方面的种种原因,C-H化学位移相关信号是通过测定灵敏度低的 ^{13}C 信号来检测的,因而测定需要的样品量较大,时间也较长,对分子量大的化合物,当样品量有限时,该缺点尤为突出,此时HMQC将是最有效的检测方法,见7.2.1中的 ^1H 检测的异核多量子相干相关谱。

5 二维化学交换/NOESY谱^[1,11,14,16]

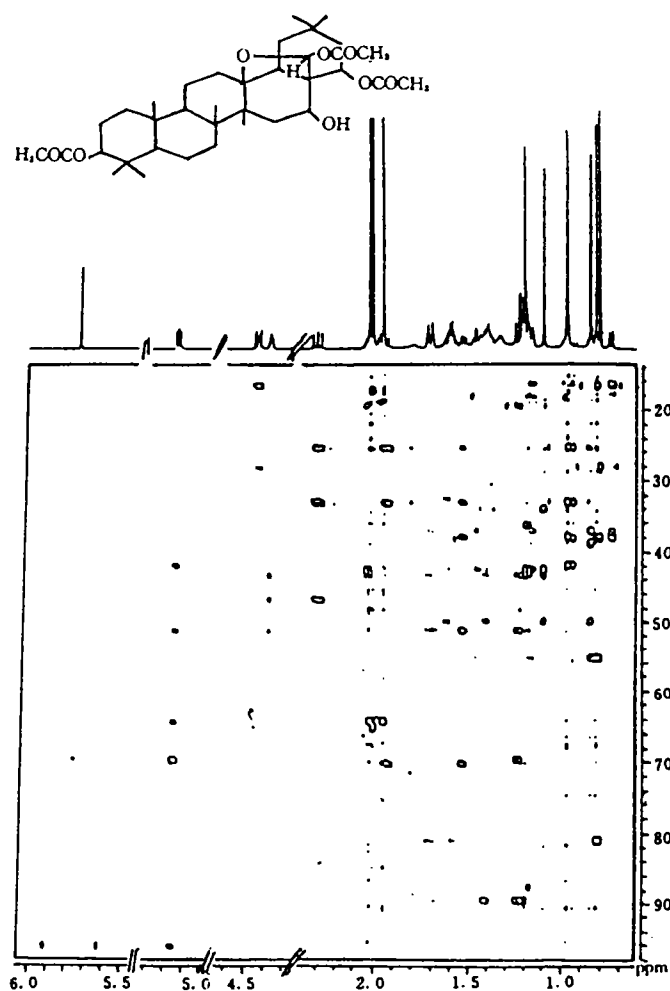


图 4-15 三萜衍生物的Inverse远程C-H位移相关谱(无 ^{13}C 去耦)

自旋交换 2D NMR 可按照引起磁化强度交换的方式分为两类, 即二维 NOE 谱 (NOESY) 及二维交换谱。核间磁化传递通过非相干作用传递, 这种传递主要靠交叉弛豫机理和化学交换来进行。基本脉冲序列: $(\pi/2) - t_1 - \pi/2 - \tau_m - \pi/2 - \text{ACQ}(t_2)$ [14] NOESY 基本脉冲序列就是在 COSY 序列的基础上, 加一个固定延迟和第三脉冲, 以检测 NOE 和化学交换信息。有化学交换存在时, 核的 Z 分量在 t_1 期间受到一个化学位移的调制, 在 τ_m 期间, 该核有可能迁移到另一个位置, t_2 期间检测出另一个化学位移值。混合时间 τ_m 是 NOESY 实验的关键参数, τ_m 的选择对检测化学交换或 NOESY 效果有很大的影响。选择合适的 τ_m , 可在最后一个脉冲采集 Z 磁化矢量之前, 产生最大的交换或建立最大的 NOE。化学交换可能以任何速率进行, 而 NOESY 测的交换过程是慢交换过程, 仅提供交换途径的定性说明, 不能直接得到速度常数的定量信息。如何选择 τ_m 和缺乏定量结果是用 NOESY 研究化学交换存在的问题。最新研究的折叠谱学 (Accordion Spectroscopy) 中提出了解决这两个问题的方法, τ_m 随 t_1 增加而变化, 有效地将三维谱压缩成二维谱, F_1 域的线形显示了与 K (交换速率) 的依赖关系, 对 F_1 域信号进行数学上的线性分析, 即可得到 K 值。

NOESY 与化学交换不同, 在许多情况下, NOE 的建立受纵向弛豫的制约, 比 $1/T_1$ 慢得多, 若在 $1/T_1$ 范围内选择 τ_m , 就有可能观察到相近核之间的 NOE 交叉峰。

5.1 NOESY [26] (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

如果相干转移是由交叉弛豫和非各向同性的样品核间的偶极-偶极耦合传递的, 即借助交叉弛豫完成磁化传递而进行的二维实验, 称为二维 NOE 谱 (NOESY)。它与 COSY 实验的不同之处在于交叉峰之间不存在正负交替现象, 故记录其吸收线型, 而不必担心分辨率不够会引起相邻交叉峰间相互抵消的问题。为了避免普遍存在的 J 耦合作用引起的相干传递的干扰, 通常采用 16 步相循环。测量交叉弛豫, 对研究生物大分子的转移和构型问题是一个很有力的工具。NOESY 中的质子谱现在受到了广泛的重视, 因为它能提供空间关系方面的信息。由化学位移相关谱建立起的 J 耦合网, 能确定出蛋白质中氨基酸单元内的相互关系, 而 NOESY 则能给出相邻氨基酸的信息, 二种谱结合即能得出三维空间信息。由于大分子滚动较慢, 偶极相互作用不能有效地被平均掉, 常引起谱线的增宽, 但同时也能提供较强的交叉弛豫机理, 特别适用于 NOESY 的研究。实验中混合时间 τ_m 的选择十分重要, 对小分子应选择 $\tau_m \sim T_1$, 以得到最佳的灵敏度。而对于大分子, 最好能取几个不同的 τ_m ($\tau_m = 0.05, 0.1, 0.3\text{s}$) 进行实验, 第一个实验只给出交叉弛豫速率快的核的交叉峰, 核间距相当于 $0.2 \sim 0.3\text{nm}$, 而当取较长的 τ_m 值时, 因为还包括了交叉弛豫速率较慢的质子间的交叉峰, 所以交叉峰将明显地增加, 所包括的核间距可达 0.5nm 。NOESY 谱表示的是质子的 NOE 关系, 二个轴均为 ^1H 的 δ 值。45° 对角线上各点在两轴上的投影均为一维谱, 非对角线上的点如能与对角线上的点构成正四边形, 则对角线上的两点所代表的质子间应有 NOE 相关性, 即空间传递的信息。这类谱最大的作用, 是在一张谱图中同时呈现了分子中所有质子间的 NOE 信息, 目前这种方法已成为研究有机化合物立体化学的有力工具。

NOESY 的谱图特征类似于 COSY 谱, 在化学交换位置上, 两个化学位移之间出现交叉峰。NOE 使得一个核的 Z 磁化向量变化而导致另一个核的 Z 磁化向量变化, 一维谱中出现 NOE 的两个核在二维谱中显示交叉峰。NOESY 是非饱和的以及瞬间 NOE 的 2D 实验, 是用 2D 谱的速度和分辨, 提供一种确定化学交换和空间关系的有效方法。一维和二维 NOE 实验可以研究平衡过程 (构象平衡和化学反应平衡), 检测饱和转移, 包含 NOE 转移以及跟踪慢反应等动力学过程。NOESY 的

灵敏度低, 是个慢而费时的实验。

NOESY 谱的主要问题是不能明显地辨别 NOESY 谱中的实验现象是化学交换还是 NOE 相互作用, 常常从化学观点分析是否存在化学交换, 然后对 NOESY 谱给予适当的解释。最近发展起来的 ZZ 谱可以区分开化学交换和 NOE, 但尚未能常规应用。NOE 是一种跨越空间的效应, 是磁不等价核偶极矩之间的相互作用, 它与核之间的距离有关, 当质子之间的距离小于 0.4 nm 时便可观察到。因此利用 NOESY 可研究分子内部质子之间的空间距离, 分析构型、构象, NOESY 可同时在一张谱上描述分子内部各质子之间的空间关系。2D NOE 技术多应用于生物大分子, 如较小的蛋白质和寡肽的氨基酸顺序测定以及寡糖和配糖体中糖基的连接顺序和连接位置的测定。对于大多数较小分子, 由于负 NOE 信号不明显, 较小的正 NOE 信号也不能用 2D NMR 技术进行可靠的检测, 而较少应用。

由 NOESY 谱确定 NOE 信息仍存在问题: (1) 距离较远的核间 NOE 建立速率很慢, 需要较长的混合时间, 各种纵向弛豫机理竞争的结果, 使 NOE 交叉峰很弱, 由于 NOESY 是个瞬态实验, 这一问题更为严重。 (2) J 耦合交叉峰的存在, 给确定真正的 NOE 带来困难。 (3) 没有简单的方法能定量测定 NOE, BOESY 谱只能指示 NOE 的存在, 相对比较交叉峰的强弱, 不能测定它的大小。NOESY 对小分子的 NMR 研究用途不是很大 (应该用一维 NOE), 但对蛋白质等生物大分子的研究却十分重要。

蛋白质等生物大分子在溶液中翻转较慢, 偶极-偶极弛豫是 ω_0 (零量子) 占主导, NOE 值大, 且 NOE 产生的速率也大, 为蛋白质三维结构研究提供了非常有利的证据。NOESY 实验中有一个非常重要的问题是零量子相干与所需要的 Z 组分有相同的相行为, 因此在 NOE 或化学交换交叉峰上还包含零量子相干, 要区别开 2D 谱中真正的 NOE 峰和零量子峰是很困难的, 相循环不能消除零量子相干。由于受零量子相干效应的影响, 在 NOESY 谱上会出现一些额外的交叉峰。

后来在脉冲序列的改造方面曾作了很大努力来消除这种效应, 改进的脉冲系列为:

$$\pi/2 - t_1 - \pi/2 - (\tau/2 - K t_2) - \pi - (\tau/2 + K t_2) - \pi/2 - \text{ACQ}$$

其中 K 为常数, 具代表性的值为 0.25。插入的 π 脉冲对动态 NOE 没有影响, 但能抑制 ZQ 效应的干扰。目前虽然已提出几种消除零量子相干的方法, 但不尽人意。

应特别注意的是三自旋和更多自旋系统中, 具有低进动频率的 J 交叉峰, 会出现在远离对角线的地方。如所周知, NOE 差谱最重要之处是能建立核间通过空间的关联, 与成键作用无关, 而 2D NOE 实验的重要之处, 仅仅表现为能从密集的 ^1H - ^1H 重叠共振

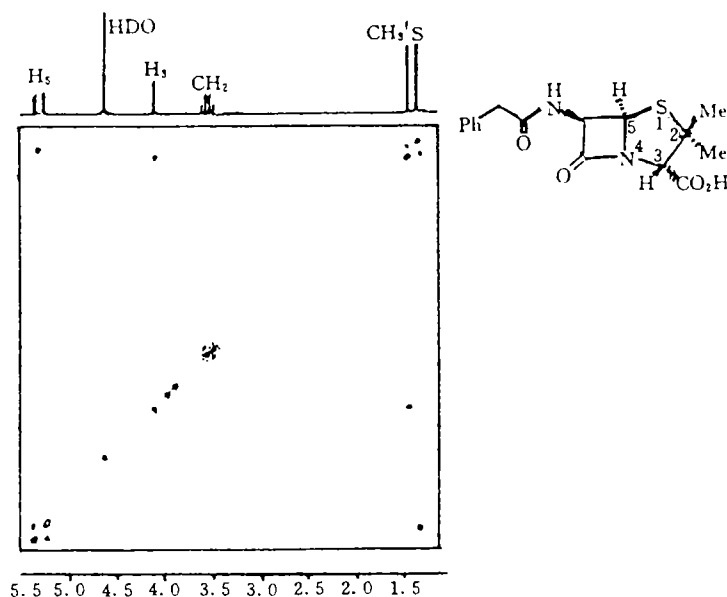


图 5-1 盘尼西林衍生物的 NOESY 谱 (D_2O)

中建立多重峰之间的关联,以确定有NOE核的化学位移。它们的应用主要可分为下述三个方面,这些研究都是交错的,而且每一侧面的研究都基于其他二方面的某些假设。

5.1.1 谱图归属

同其他谱的解析方法一样,归属谱图时也需要找到一个明确的起始点,如烯氢或甲基峰等,首先解释与这个信号的关联,得到一组新的参考信号,以此解释下去。图5-1是盘尼西林在 D_2O 中除气后的NOESY谱^[14];各 1H 的 T_1 值分布范围为0.4s-2s, τ_m 取1s得到的NOESY谱,显示了两个NOE交叉峰, β 取向的H-3与低场的 CH_3 有NOE, α 取向的H-5与高场的 CH_3 有NOE,由此可归属高场的 CH_3 为 α 取向,低场的 CH_3 为 β 取向。

5.1.2 确定共价结构^[14]

用NOE确定结构是把已知的分子碎片互相搭接起来。碎片之间往往是季碳或三取代或四取代双键。也可能是确定某一个芳香系统的取代位置。各分子碎片之间的连接,可通过 ^{13}C - ^{13}C INADEQUATE, 1H - 1H 或 ^{13}C - 1H 远程耦合来建立,但往往因检测灵敏度太低而不能全部满足要求。 1H - 1H NOE实验是建立分子碎片关联的有力方法之一。几乎在所有情况下,定性观察一个特殊的NOE或一组NOE,足以区分不同的分子结构。用NOE确定结构时,-OH和-NH₂是非常好的分析起始点,但是,因为它们之间或与溶剂中的水发生交换,影响测试效果,需要用能形成氢键的溶剂如DMSO或吡啶进行测试,由于分子间氢键的影响,大大降低活泼氢的交换效率。用NOE可把已知各碎片(用质谱建立碎片结构)组装成一个完整的分子结构。异核NOE也是确定结构的有力判据,图5-2^[14](a)中的两个化合物的结构鉴定是通过照射甲基质子共振,观察季碳的谱线增强效应(如(A)中箭头所示)而化合物(B)不存在这样的NOE增强。图(b)中照射次甲基 1H ,与之相邻的三个季碳,包括羰基碳均产生NOE,证明是图中所示的结构,排除了环氧环在“南”而羰基在“北”的另一种异构体。由 1H - 1H NOE分析立体结构,这个次甲基 1H 也是很明显的起始点。图(c)是用NOESY谱确定天然产物立体结构的实例,表明NOE是确定立体结构的强有力的工具。

5.1.3 构象研究^[14]

如果一个分子在溶液中有几种构象,NOE原则上可以表明哪些自旋相互靠近。NOE只能定性地说明溶液中的优势构象(不排除少量其他构象的存在),而不能定量地确定构象和分子中的构象平衡。两自旋间NOE增长速率取决于 γ^{-6} ,确定一种几何特性与两种构象中的一种相匹配,以确定优势构象和半定量的研究构象平衡(如烯醇醚的构象平衡)。近年来,用一维和二维NOE作构象研究的大量工作都集中在肽、蛋白质、核苷酸和多糖等大分子上,这些研究都是定性的区别而不是定量的鉴别。用NOESY和一维NOE方法确定了细胞松弛素B的空间结构,见图5-3^[14]。NOESY谱中交叉峰相当于显示一下所有NOE的位置,指出哪两组峰有NOE增强效应,然后用一维谱选择性照射某几点,仔细检测NOE以确定其构象。构象分析的实验和解释工作都颇费时间。图5-4是凤眼草酮的NOESY谱^[16],从谱图中可以很清楚地观察到质子 α 和

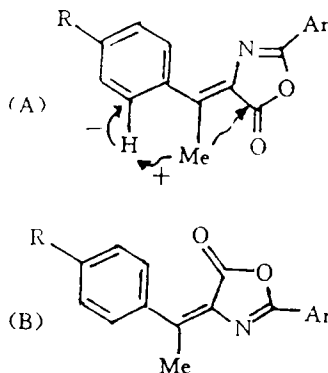


图 5-2(a) 异核NOE确定结构

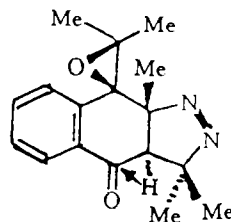


图 5-2(b) 异核NOE确定结构

*c*以及质子*b*和*d*之间的偶极-偶极交叉弛豫所致的NOE峰, 据此即可判断取代基的构型。

5.1.4 相敏NOESY [1,14,16,65]

与COSY谱类似, NOESY也适用于相敏形式显示。在这种相敏谱上, 分辨率高, 易辨认出

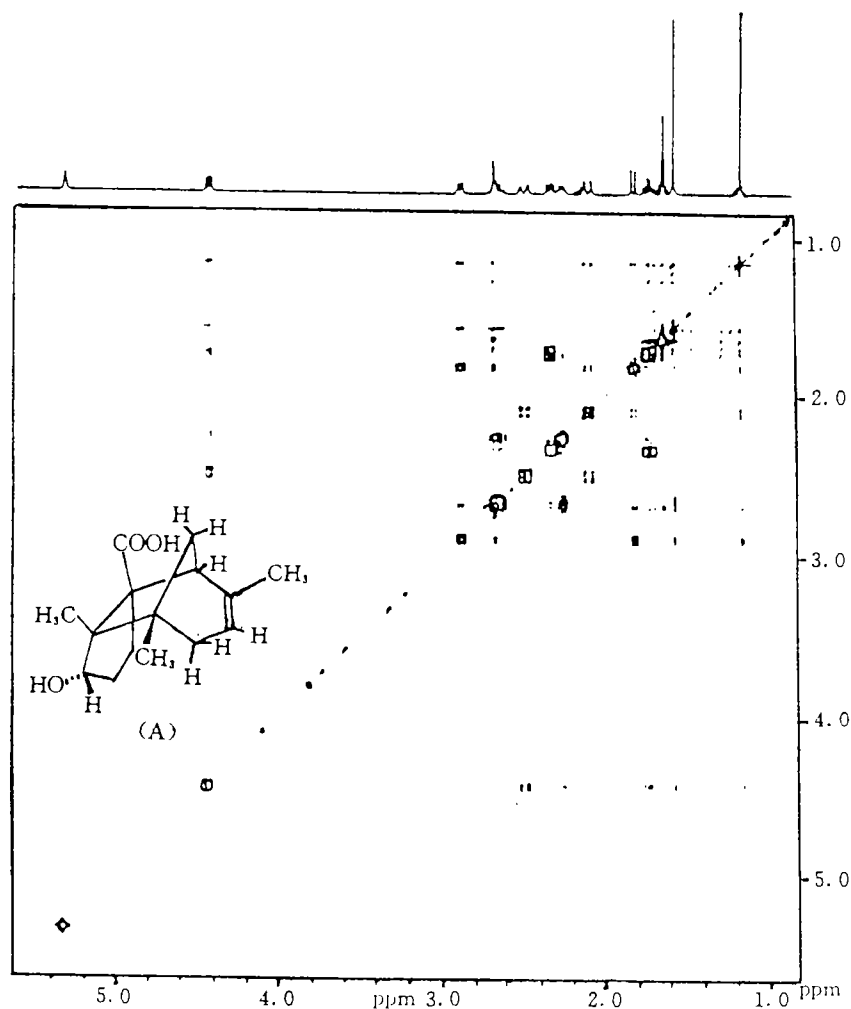


图 5-2(c) 天然产物(A)的NOESY谱

信号峰, 且其谱线比非相敏形式的谱线窄得多, 因而限制了伪峰的产生, 有效地增加了信噪比。其基本脉冲序列如图5-5(1)所示。图5-5中(2)为一生物大分子BPTI [42,43,48,49] 的芳香基部分的纯吸收相敏谱, 混合时间 $\tau = 100\text{ms}$, 图5-5(3)为同样测试条件下所得的绝对值谱, 从中可看出PS NOESY谱的高分辨和易解析特性。

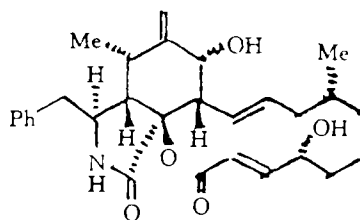


图 5-3 细胞松弛素B

5.2 HOESY(Two-Dimensional Heteronuclear NOE Spectroscopy)^[1,14,18,29]

在NOE差谱,选择性 ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ NOE差谱以及2D NOESY等技术的基础上,又发展了一种新的脉冲序列,使得去耦核(如 ^1H)和观察核(如 ^{13}C)相关,所得的谱图即是HOESY谱。其必要条件是这两个核必须空间接近而使去耦核对观察核有偶极弛豫贡献。基本脉冲序列如图5-6(1)所示^[16]。本实验的关键是混合时间 Δ 的选择。由于小分子中 ^{13}C 核主要是通过与之直接键连质子的偶极作用弛豫的,因此只可能在单键C-H耦合的化学位移处观察到交叉峰。图5-6(2)为樟脑的HOESY谱^[79], $\Delta = 2\text{s}$,所有的交叉峰都源自异核偶极作用,带质子的碳比季碳

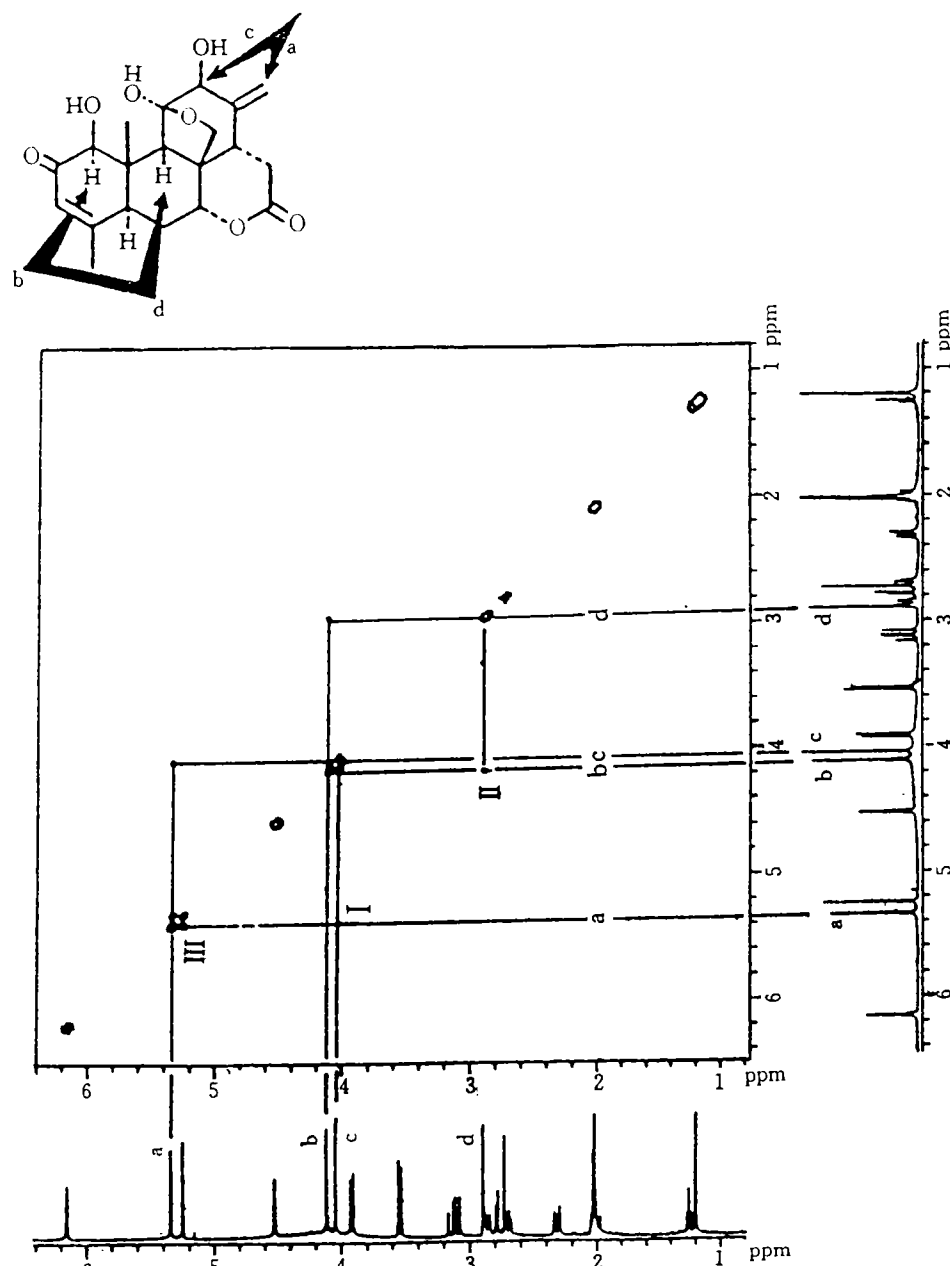


图 5-4 凤眼草酮的 NOESY 谱

的偶极作用强得多(因NOE与核间距 r^{-6} 成反比)。樟脑为一刚性分子,除直接键连的C-H耦极NOE交叉峰外还能观察到季碳与邻近质子的交叉峰,如季碳 h 与甲基 B 和 C 上的质子的交叉峰。应用此谱,可从已知的碳谱指定氢谱,反之亦然。而且氢谱的指定结果还纠正了前人的错误指定。图5-6(3)是2-溴丁醇的HOESY谱^[88], Δ 取2s。由于小分子里的 ^{13}C 核主要是通过直接与键连的质子的偶极作用弛豫的。因此只可能在单键C-H耦合的化学位移处观察到交叉峰。图中显示的四个交叉峰为C-1/H-1, C-2/H-2, C-3/H-3和C-4/H-4。

5.3 相敏HOESY(PS HOESY)^[18,80]

把相敏技术应用到HOESY谱上,即能得到纯吸收的相敏HOESY谱。该技术对于检测“三自旋效应”的间接负NOE信息十分有效,而且成功地应用于寡糖的糖基连接顺序和连接位置的确定。脉冲序列如图5-7(1)^[16]。混合时间 τ_{mix} 的选择是最关键的因素。图5-7(2)是化合物(-)- α -hydrastine的PS HOESY谱C-8和C-3'的交叉断面图^[80]。从图中可看出, C-8与H-1

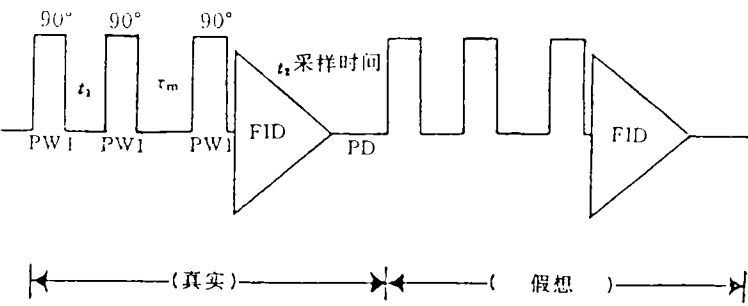


图 5-5 (1) 相敏NOESY基本脉冲系列

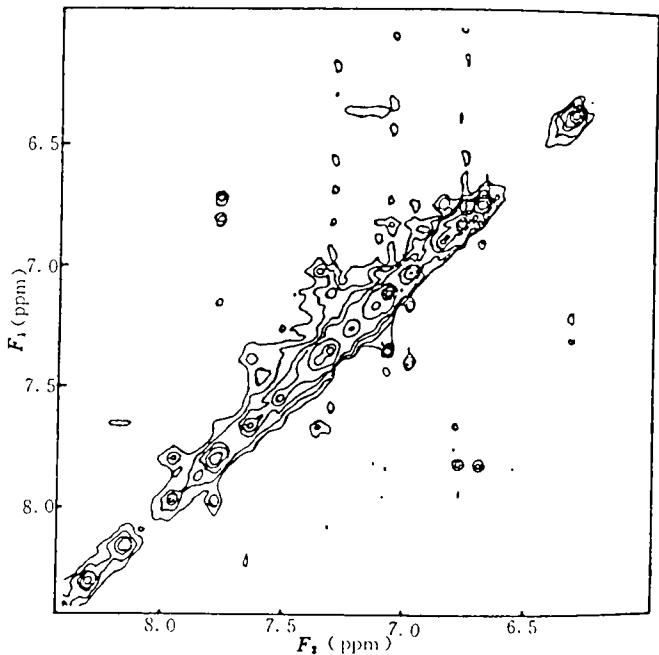


图 5-5 (2) 生物大分子BPTI的芳香基部分的纯吸收相敏谱

有相对于C-8/H-8正NOE所产生的正交叉峰的相反符号的负交叉峰, 它是由H-1影响H-8, 然后再影响到与之相连的C-8所产生的, 故称间接的负NOE。同理,C-3'和4'-OCH₃也是如此。图5-7(3)是化合物Methyl- α -rhamnopyranosyl(1-4)- α -D-rhamnopyranoside的PS NOESY谱C-A-1和C-B-4的交叉断面图^[16,81]。正峰为直接NOE所致, 间接的负的交叉峰则表示糖基的连接位置, 即C-A-1和H-B-4,C-B-4和H-A-1显示出间接的负NOE。由此即可证明糖基A的端基连在糖基B的C-4位上。

5.4 化学交换作用^[1,11,14,27]

如果相干转移是由化学交换传递的, 所得到的谱称为二维交换谱。化学交换谱是核交换

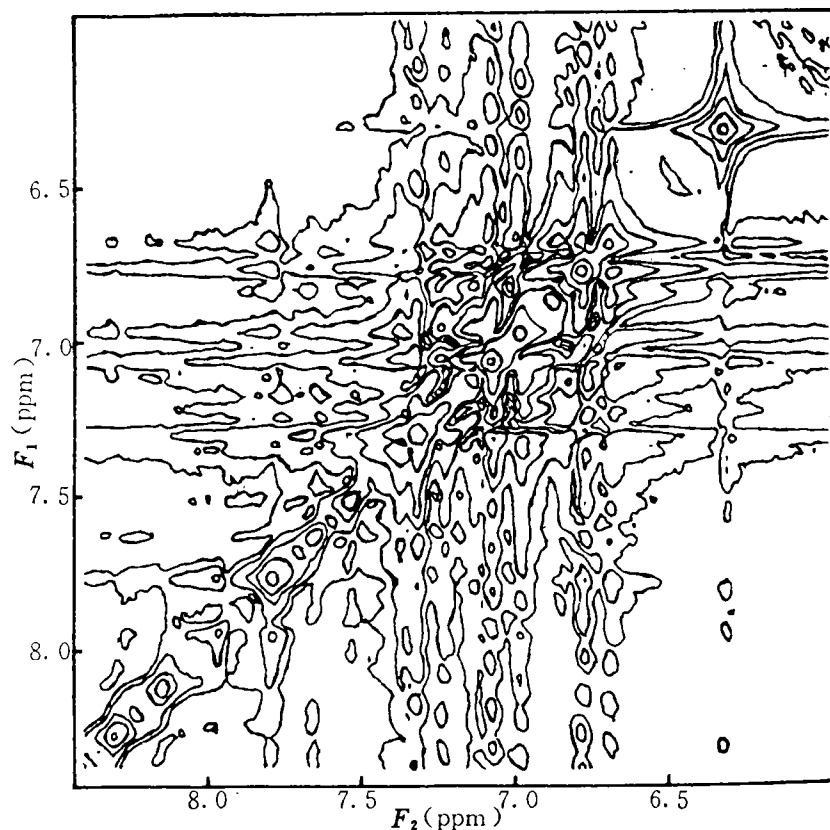


图 5-5 (3) BPTI芳香基部分绝对值谱(测定条件与(2)相同)

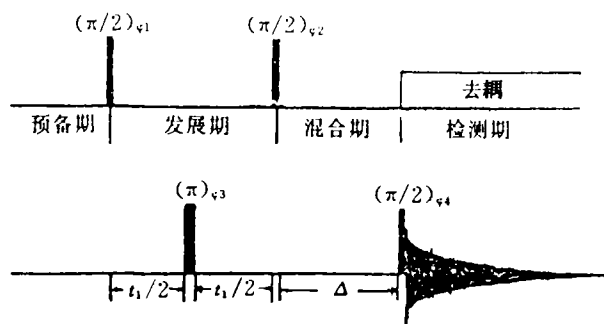


图 5-6 (1) HOESY脉冲系列

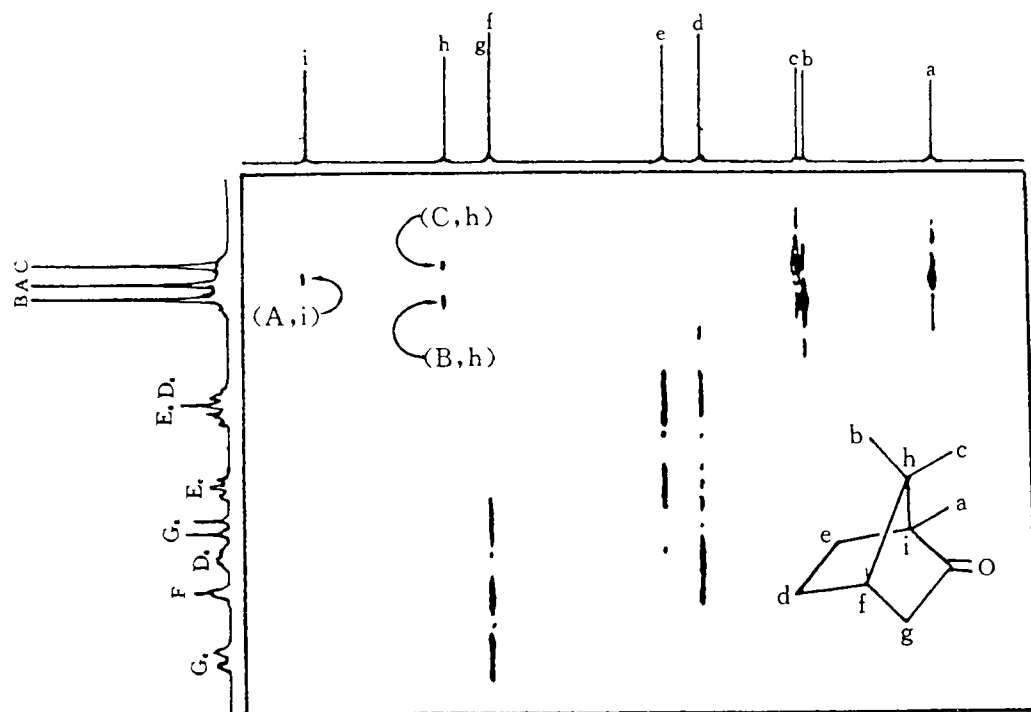


图 5-6 (2) 樟脑的HOESY谱

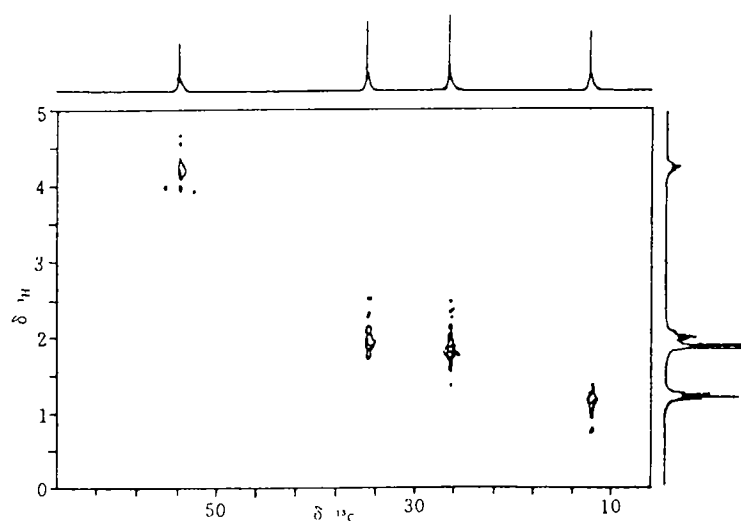


图 5-6 (3) 2-溴丁醇的HOESY谱

它们在分子中的位置，磁化由一个核传递到另一个核，从而得到交叉峰。它也相当于一种弛豫作用，所以化学交换谱与NOESY谱没有本质区别，所用实验方法和脉冲序列也基本相同： $90^\circ_x - t_1/2 - 90^\circ_y - \Delta - t_1/2 - 90^\circ_x - t_2$ 化学交换谱所提供的信息与一维选择饱和传递实验相仿，但前法观测的是稳态效应，而本法为瞬态效应，且灵敏度比饱和法低。但若谱很复杂

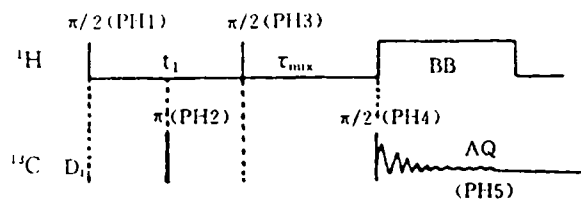
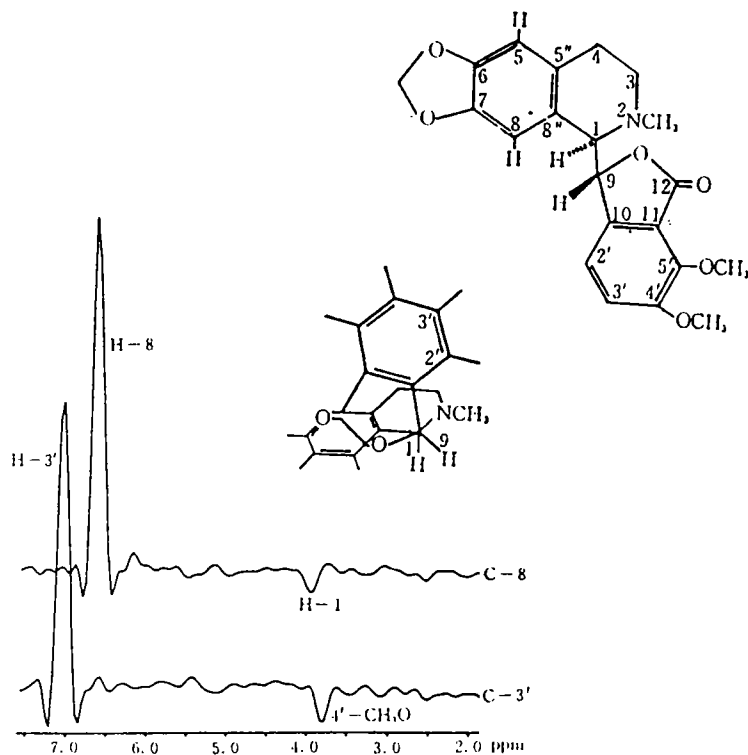


图 5-7(1) PSHDESY 脉冲系列

图 5-7(2) 化合物(-)- α -hydrastine 的 PSHOESY 谱 C-8 和 C-3' 的交叉断面图

且需要观测很多交换峰时, 本法即可显示其优越性。此时利用本法进行一系列 2D 实验, 从交叉峰强度的变化, 即可测定出交换速率。质子交换谱现已用在研究生物大分子, 复杂分子和慢构象转换体系。而 ^{13}C 交换谱, 由于不受 NOE(同核) 干扰, 可作为化学交换定性研究的有力手段, 避免了一维实验的复杂线型分析。一般来讲, 两个交叉峰强度相同, 用虚线相连, 表示它们间有化学交换作用。图 5-8 是 $(\eta^3\text{-烯丙基})_4\text{Cr}_2$ 的 ^{13}C 二维交换谱^[11], 图中纵轴表示化学位移差, 用虚线相连表示它们之间有交换作用。

化学交换指的是构象变化和化学反应。用 NMR 方法研究化学交换过程可以提供处于平衡混合物中发生的反应机理和动力学信息, 速度常数在 10^{-2}s^{-1} 到 10^5s^{-1} 范围内, 构象范围是从单键旋转到蛋白质分子变性和复原过程, 易受影响的化学反应范围是从单个 ^1H 转移直到 *in vivo* 酶的多步转移途径^[14]。具有不同化学位移的两个核频率差为 $\Delta\nu$, 当温度升高时,

交换速率加快,两个峰逐渐靠拢直至合并,合并时的温度为 T_C ,合并时的速率常数为 K_{ex} ,当 $K_{ex}=T_1/\Delta\nu/\sqrt{2}=2.22\Delta\nu$ 时,由慢交换转变成快交换。我们感兴趣的是快慢交换转换区域的自旋行为和谱特征。在慢交换过程中,如大分子翻转很慢, T_2 短,短的生命时间导致FIDS快速衰减而产生宽线,使谱线加宽,随着交换速率加大,谱线变窄,最大可能的加宽随 $\Delta\nu$ 的增加而增加。当快交换时,谱线加宽正比于 B_0^2 。

化学交换或快速弛豫会引起谱线加宽而消除原有的耦合,称为“交换去耦”,靠近四极矩核的 ^{13}C 和 ^1H 谱线加宽引起交换去耦,四极矩核的快速自旋倾倒可提高有效的 T_2 弛豫机制,而引起谱线加宽。化学交换对纵向弛豫速率 R_1 也有很大影响。弛豫时域的快速交换是很有用的,它能把自旋个数信息从一个分子环境转移到另一个环境。如果溶液中发生慢化学变化,一个交换组分被照射饱和,这种饱和现象会被转移到另一与之有交换组分的共振谱线上,若一个慢变化交换组分产生NOE,则谱线增强效应也会被转移到与其交换的另一组分上,若化学位移和弛豫时域都是快速交换过程,所观察到的谱线只是一组平均共振^[14]。

各种交换过程均反映在谱图上。多种化学交换速率与化学位移差相近时,即可产生交换加宽。NOESY实验可以检测化学交换核的化学位移,更适于检测小分子的化学交换。图5-9示出了有机金属Os化合物的化学交换2D谱^[11],谱中的交叉峰显示了相位间的交换作用^[14]。图5-10是七甲基正苯离子的2D化学交换谱^[14],在40℃时, ^1H 谱有4条谱线,随着温度升高,四条线逐渐合并为一条谱线,这是一个甲基之间的交换过程。谱中各交叉峰强度相等,对角峰峰强比为2:2:2:1,证明1-2交换为主,列出各磁化向量的动力学矩阵并求出矩阵的解,即可得到交换速率常数 K 。

各种交换过程均反映在谱图上。多种化学交换速率与化学位移差相近时,即可产生交换加宽。NOESY实验可以检测化学交换核的化学位移,更适于检测小分子的化学交换。图5-9示出了有机金属Os化合物的化学交换2D谱^[11],谱中的交叉峰显示了相位间的交换作用^[14]。图5-10是七甲基正苯离子的2D化学交换谱^[14],在40℃时, ^1H 谱有4条谱线,随着温度升高,四条线逐渐合并为一条谱线,这是一个甲基之间的交换过程。谱中各交叉峰强度相等,对角峰峰强比为2:2:2:1,证明1-2交换为主,列出各磁化向量的动力学矩阵并求出矩阵的解,即可得到交换速率常数 K 。

6 旋转坐标系 2D NMR^[1,14,16,82]

近年来,一系列新的强有力的实验方法——“旋转坐标系实验”(或称“自旋锁定实验”)得到了很大发展和广泛应用。自旋锁定是把COSY序列中的第二个脉冲以及NOESY序列中最后两个脉冲(包括混合时间),用一个长射频脉冲取代,把自旋沿着旋转坐标系的一个轴锁定,在这

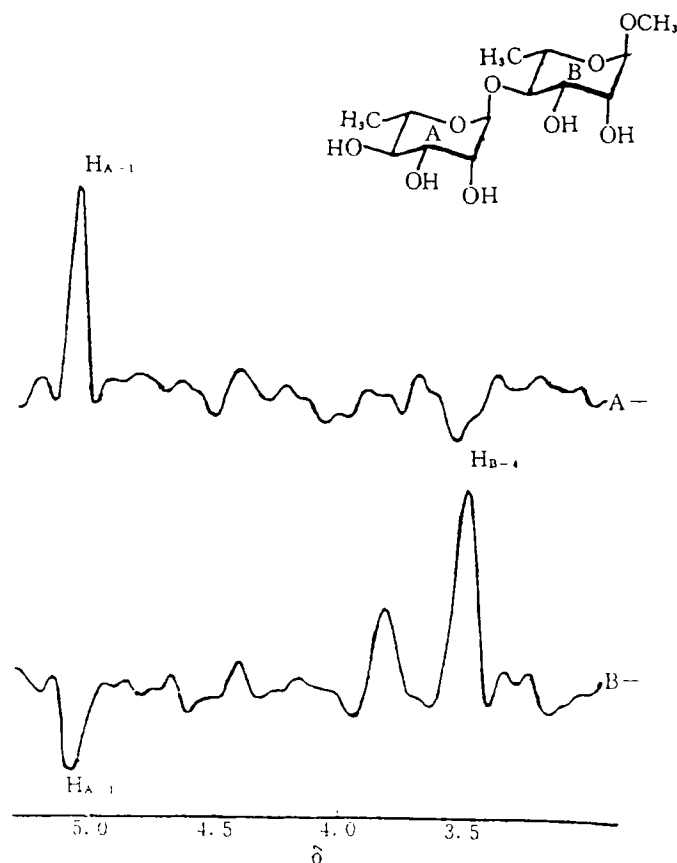


图 5-7(3) 化合物methyl- α -D-rhamnopyranosyl (1-4)- α -D-rhamnopyranoside的PS NOESY谱C-A-1和C-B-4的交叉断面图

种条件下,不存在化学位移差,即一个AMX自旋系统简化成AA'A",因为存在强耦合,很容易发生通过标量耦合的磁化转移,这种“混合”是由强射频场实现的,导致了全部相关,称为TOCSY总相关谱(Total Correlation Spectroscopy)或称作HOHAHA(HOMonuclear HArtmann-HAhn),它类似于COSY谱,可提供自旋系统中耦合关联信息[14]。

6.1 HOHAHA [56, 57, 59]

HOHAHA是通过交叉极化产生Hartmann-Hahn能量转移[84-88],从而观察较低旋磁比核的一种方法。HOHAHA是接力谱的新发展,它通过交叉极化提供中继信息,一般接力谱只能得到与 J 有关的一次接力信号[混合时间 $\tau = (1/2)J$],而在HOHAHA中,混合时间与 J 值关系不大,混合时间短时($<20\text{ms}$),只能得到直接的和一次接力相关,若增加混合时间,一个质子的磁化矢量将重新分布到同一耦合网络的所有其他质子,得到多次接力信息,但灵敏度随之降低,为解决这一矛盾可适当选择中间混合时间(50-70ms),使之既能提供足够接力信息,又不致严重丧失灵敏度,这一高分辨相敏方法(对角峰与交叉峰皆为吸收型)特别适用于具有独立自旋体系的大分子,可进一步判断或证实在 ^1H - ^1H COSY

中因信号严重重叠而造成的不肯定结果。选择适当参数可通过一次实验得到独立自旋体系中所有质子相关信息。在一个AMX自旋体系中,若选择性地给A核 π 脉冲使其磁化矢量反转,在混合时间 τ 中,通过自旋耦合,A核的磁化矢量即向M转移,其转移的强度与耦合常数相关。随着混合时间的延长,M核的磁化矢量又向X核转移。根据混合时间的长短,A核的磁化矢量可依次分配到与A核有自旋耦合的各个核上,从而有利于这些核化学位移的指定。

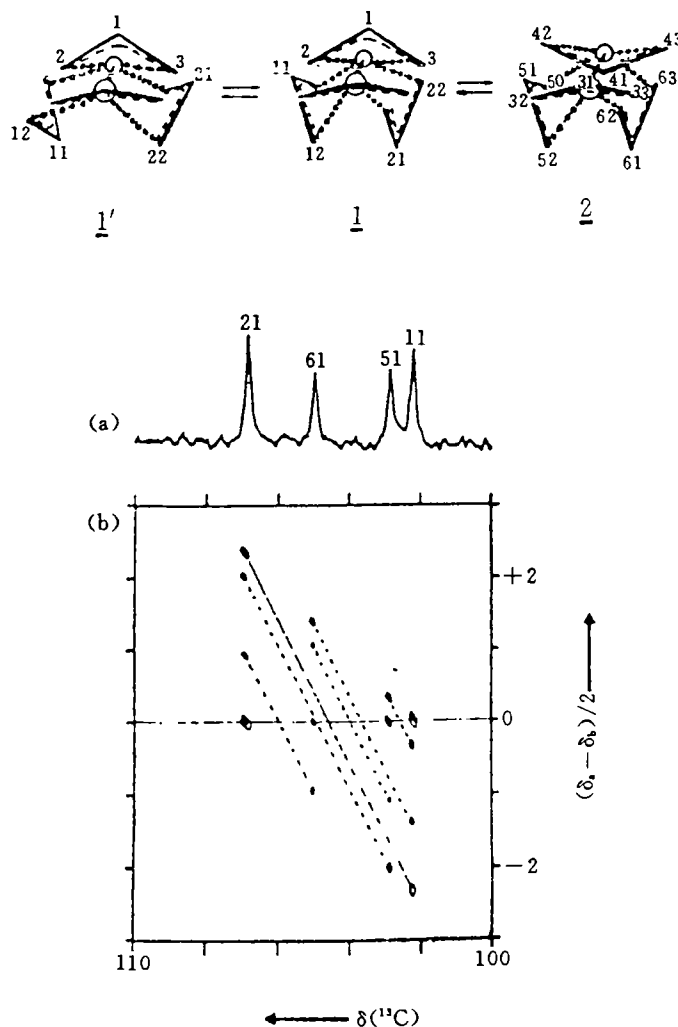


图 5-8 $(\eta^3\text{-烯丙基})_4\text{Cr}_2$ 的二维交换谱(溶剂是氘代苯), (a) 100MHz的一维 ^{13}C 谱, (b) 用 $90^\circ_{\text{y}} - t_x/2 - 90^\circ_{\text{y}} - \Delta - t_x/2 - 90^\circ_{\text{y}} - t_x$ 脉冲序列, 图中纵轴表示化学位移差, 用虚线相联系的表示它们间有交换作用

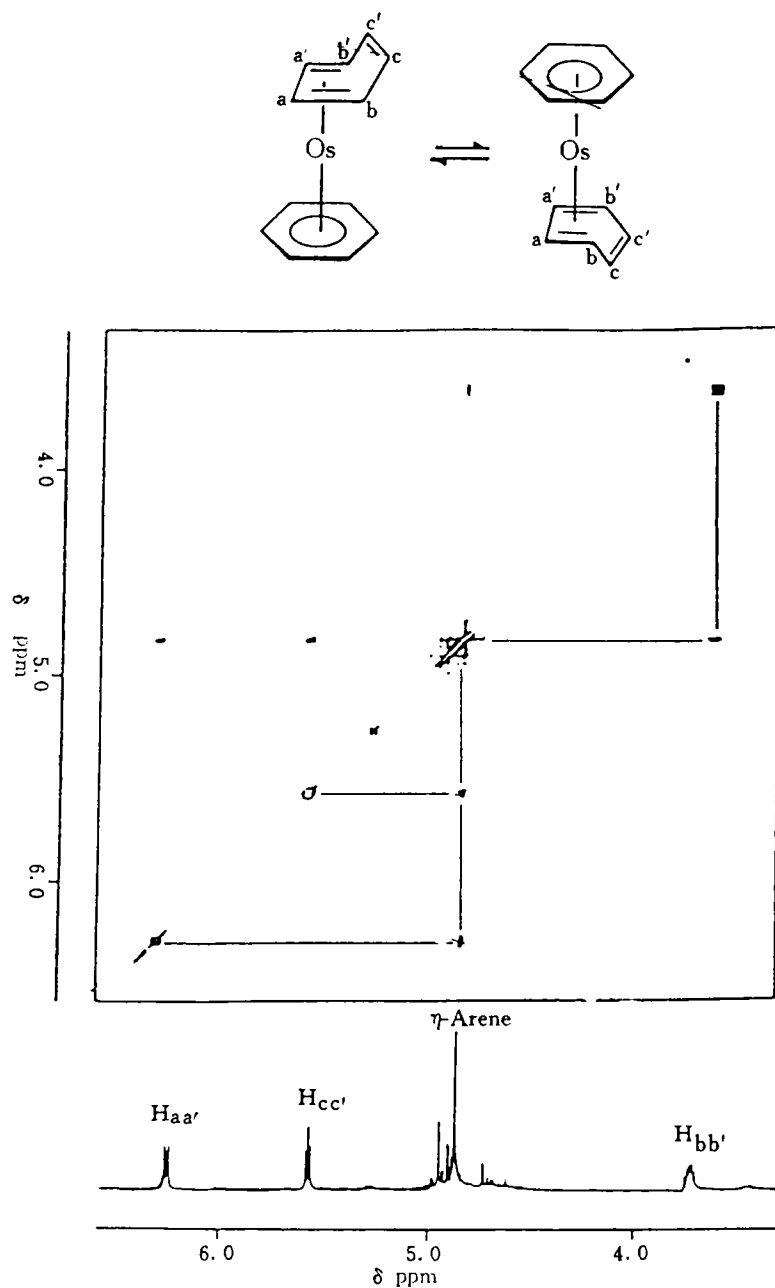


图 5-9 有机金属钨络合物的化学交换途径

2D HOHAHA的特点是:通过改变 t_1 测定,将同核Hartmann-Hahn跃迁信号沿化学位移二维展开,并用一个脉冲序列测得多重接力 ^1H - ^1H 化学位移二维相关谱,即多次接力COSY谱。由此仅用一张谱即可提供由许多1D HOHAHA子谱才能提供的许多结构信息,它不仅在复杂耦合系统的 ^1H 信号归属及结构解析中,而且在肽类、蛋白质等生物大分子的立体结构测定中亦显示出巨大威力。要决定蛋白质或肽类的立体结构,只有在对各 ^1H 信号完全归属的基础上,才能

再根据NOE实验组合成立体结构。 D_2O 中测得的2D HOHAHA与 H_2O 中测得的不同,可检测出磁化由 $C_{\alpha}-H$ 开始移动的情况。这有助于解析一部分被 H_2O 的 1H 信号所淹没的 $C_{\alpha}-H$ 信号。另外将这二者组合使用,还可解析相互重叠而单独使用某一种都无法解析的一部分信号。蛋白质、肽类的NMR往往需要在水溶液中测定,其2D HOHAHA或NOESY谱常常受倒 H_2O 中 1H 信号的严重干扰。

6.2 同核2D HOHAHA谱^[14,16,82,94]

2D HOHAHA 是近年来开发的一种相敏高分辨二维谱,对于解析复杂的质子

网络系统十分有用。 $\begin{array}{c} H & H & H & H \\ | & | & | & | \\ C-C-C-C \end{array}$ 在实验的

混合期内,磁化矢量依据同核标量耦合 J_{AM} 的大小,从质子A传到质子M,若M与第三个核X有耦合,则A的磁化矢量可以通过M核接力传递到X核上。若使用一个较长的混合时间,一个质子的磁化矢量将分布到同一耦合网络系统中的所有质子,但相对于较短的混合时间,强度和灵敏度显著降低。因此要选择一个适当的混合时间,既能充分得到接力

信息,又不严重降低实验的灵敏度。与异核接力相关(RCT)谱相似,除直接耦合的交叉峰外,还能得到磁化矢量接力所致的交叉峰。若要区别2D HOHAHA谱直接耦合的交叉峰与接力相关峰,与COSY谱比较即可确认。图6-1是一复杂含氮化合物的2D HOHAHA谱^[16],化合物部分结构a、b、c(标有 ^{13}C 和 1H 谱的化学位移值)的质子在谱中为三个独立的耦合网络系统。例如质子H-1'的磁化矢量依次可分配到质子H-2', H-3', H-4', H-5'上,而得到相应的交叉峰。

HOHAHA基本脉冲序列目前通常用的是MLEVE-17脉冲序列,如图6-2(a)所示^[14]。HOHAHA的有效射频场相当高,通常采用组合脉冲技术获得高功率自旋锁场。组合脉冲两端用“调整脉冲”(trim pulses)使不平行于X轴的磁矩解除聚焦。COSY和TOCSY(HOHAHA)皆可提供同核J耦合相互作用信息, F_1 域和 F_2 域是相关核的化学位移,谱图形式相同。两者的区别是(1) COSY交叉峰中主动耦合的磁化矢量是反相组分,小J耦合信息可能被抵消,而TOCSY的主动耦合是同相组分,提高了小J耦合的检测灵敏度。(2) TOCSY谱的特征是提供COSY和同核接力相干转移信息,接力转移步数由自旋锁定混合脉冲的长度控制,因此,可以通过设置不同的参数得到不同耦合相关信息,在二维谱线横截面等值图上可以观察到一个完整的自旋体系,从而简化了谱线归属。图6-3(a)、(b)比较了一个天然产物的DQF-COSY和TOCSY谱^[14]。

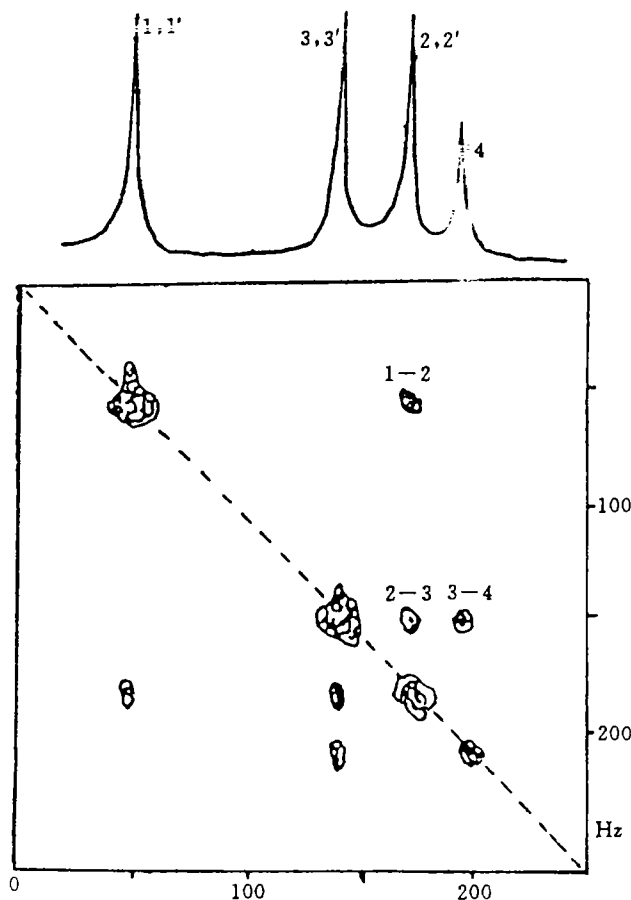
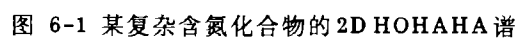


图 5-10 七甲基正苯离子的化学交换谱



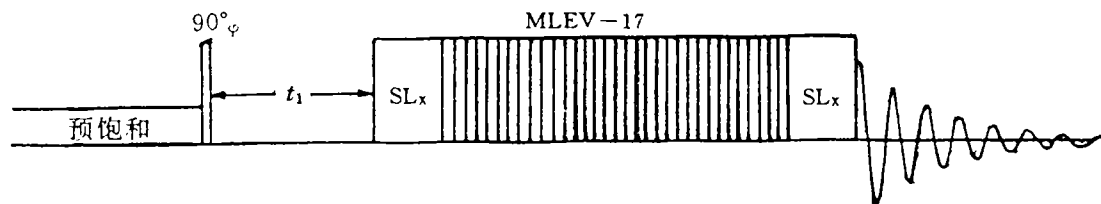


图 6-2 (a) TOCSY 基本脉冲序列 -MLEVE-17 脉冲序列

TOCSY 实验采用 INVERSE 方法较易实现, 用去耦通道产生所需要的高功率射频脉冲更为方便。通常多采用 TPPI 相循环, 实现相敏检测, 这种方法能为观测小 J 耦合相关信息提供非常有利的条件。应当特别指出的是, 该实验中所使用的输出功率高达几瓦, 因此要特别注意控制温度的恒定, 否则谱中可能出现一些由温度起伏所引起的小拖尾峰形。此外, 鉴于该类实验中的自旋锁定要求大功率长期作用, 整个实验过程中应特别当心, 以避免损坏探头。

6.3 ROESY(或 CAMELSPIN) 实验^[1,14]

若采用一个弱自旋锁场, 则在旋转坐标系中产生交叉弛豫 NOE, 得到 ROESY(Rotating frame NOE enhancement spectroscopy) 即旋转坐标系中 NOE 增强谱, 或称为 CAMELSPIN 谱, 它类似于 NOESY 谱, 能提供空间距离相近核的相关信息。基本脉冲序列与 TOCSY 相同, 但采用低功率自旋锁定, 可由连续波照射或由一系列小脉冲角的硬脉冲组成混合脉冲, 如图 6-2(b)^[14]。

ROESY 是旋转坐标系的 NOESY 谱, 它们都能提供通过空间作用的核自旋相关信息, 两着的区别是: (1) NOESY 和 ROESY 的交叉峰都取决于相关自旋间的交叉弛豫, 但 NOESY 是纵向交叉弛豫, 而 ROESY 是横向交叉弛豫。小分子快速运动产生 NOE, 大分子或降温时得到负 NOE, 而一些中等分子 (分子量为 300—1500) 或某些特殊形状分子, 特别

是一些有机物, 天然产物和金属有机络合物等, 几乎不存在 NOE, 因而在 NOESY 谱中得不到 NOE 交叉峰, 而在上述分子体系中都会出现 ROESY 峰, 故 ROESY 特别适宜观测中等分子的交叉弛豫作用。 (2) NOESY 交叉峰对分子量大和小的两种极端的分子体系, 灵敏度都很大, 而 ROESY 交叉峰在不同分子量的分子中变化不大。 (3) NOESY 相关峰为反相组分, 而 ROESY 相关峰为同相组分, 可以检测较小的相互作用。 ROESY 实验的关键也是确定自旋锁场强度和设置适当的照射功率, 因为它是低功率实验, 所需典型自旋锁场场强为 2.5 kHz。在 ROESY 谱上可发现有标量耦合的 HOHAHA 峰。(图 6-4 中标记 * 的交叉峰)^[14]。因此要注意选择谱宽和偏置, 尽量避免产生标量耦合峰。 ROESY 谱中 HOHAHA 峰在相敏谱中容易辨认, 即 HOHAHA 峰与对角峰同相, 与

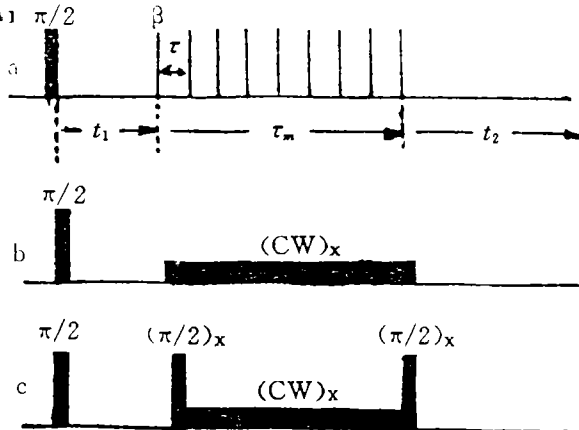


图 6-2 (b) ROESY 基本脉冲序列

- a——脉冲角 β 很小, 一系列硬脉冲产生自旋锁定;
b——低功率连续波照射产生自旋锁定;
c——低功率连续波照射的前、后加两个 90° 脉冲, 把横向磁矩沿着自旋锁轴排列。

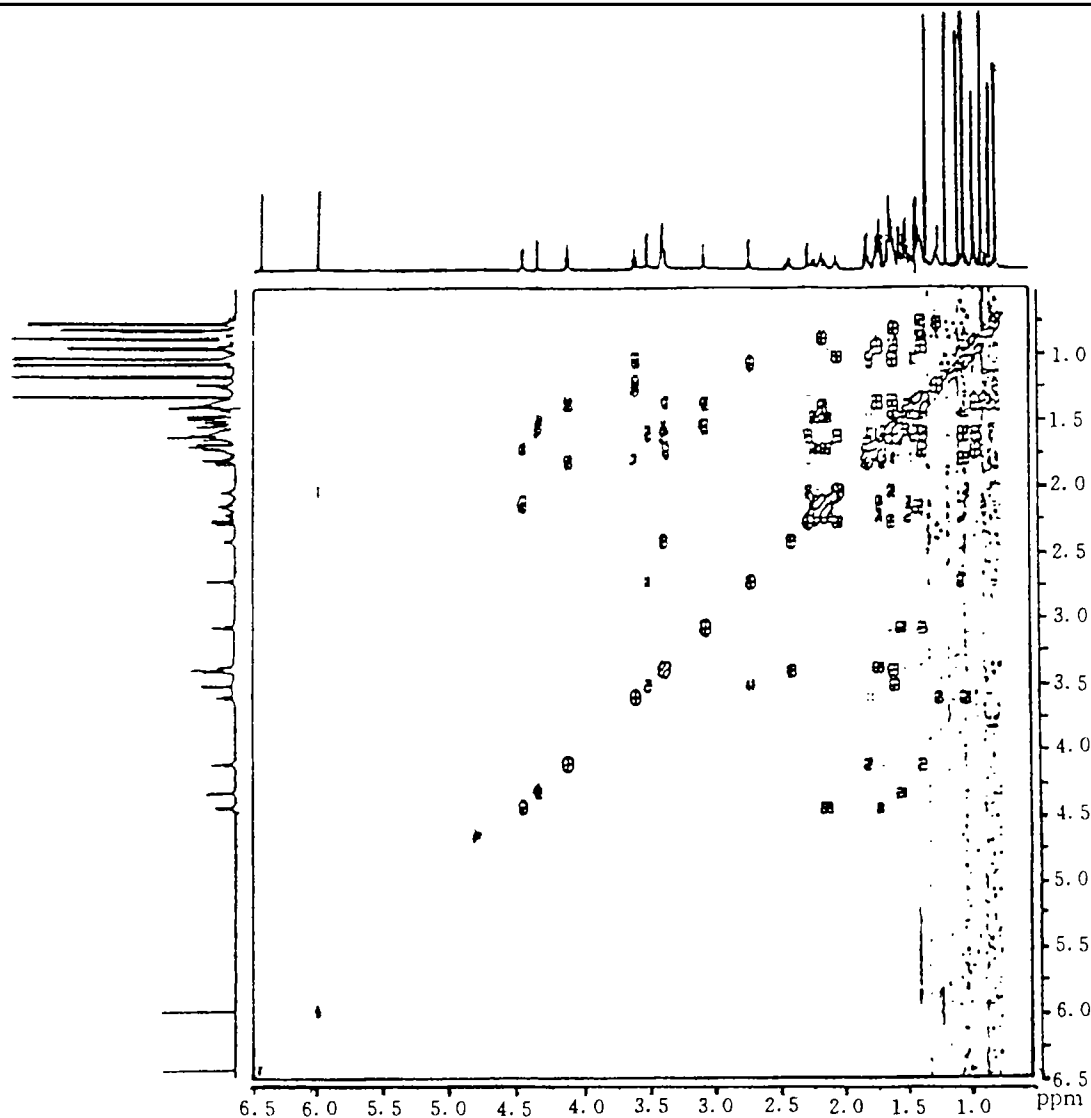


图 6-3 一种天然产物 DQF-COSY 和 TOCSY 谱比较 (a) DQF-COSY

ROESY 峰反相。移动发射机偏置可以消除这些 HOHAHA 峰。此外,在化学位移相近的强耦合体系中,如非等价的同碳质子也会在 ROESY 谱中出现 HOHAHA 峰。在 ROESY 谱中会出现假 ROESY 峰。这是由于继横向交叉弛豫之后进行一个 HOHAHA 转移,或者反过来接力传递。它所产生的峰与 ROESY 峰相位相同,易被误认而导致错误的归属和解释。如图 6-5 中箭头所示^[14], H-6 α 与 Me-19 的假 ROESY 峰,是由于 H-6 α 与 H-6 β 有强耦合作用,在自旋锁定条件下会产生 HOHAHA 转移,而 H-6 β 与 Me-19 有 ROESY 转移,二者接力传递的结果产生了 H-6 α 与 Me-19 的假 ROESY 峰。

7 多量子跃迁谱^[11,16,55]

普通 NMR 是研究选择定则为 $\Delta m = \pm 1$ 的单量子跃迁。用量子力学微扰理论处理,在一级近似下, $\Delta m \neq \pm 1$ 的跃迁是禁阻的。但在偶极相互作用及其他作用的影响下,自旋系统的能级

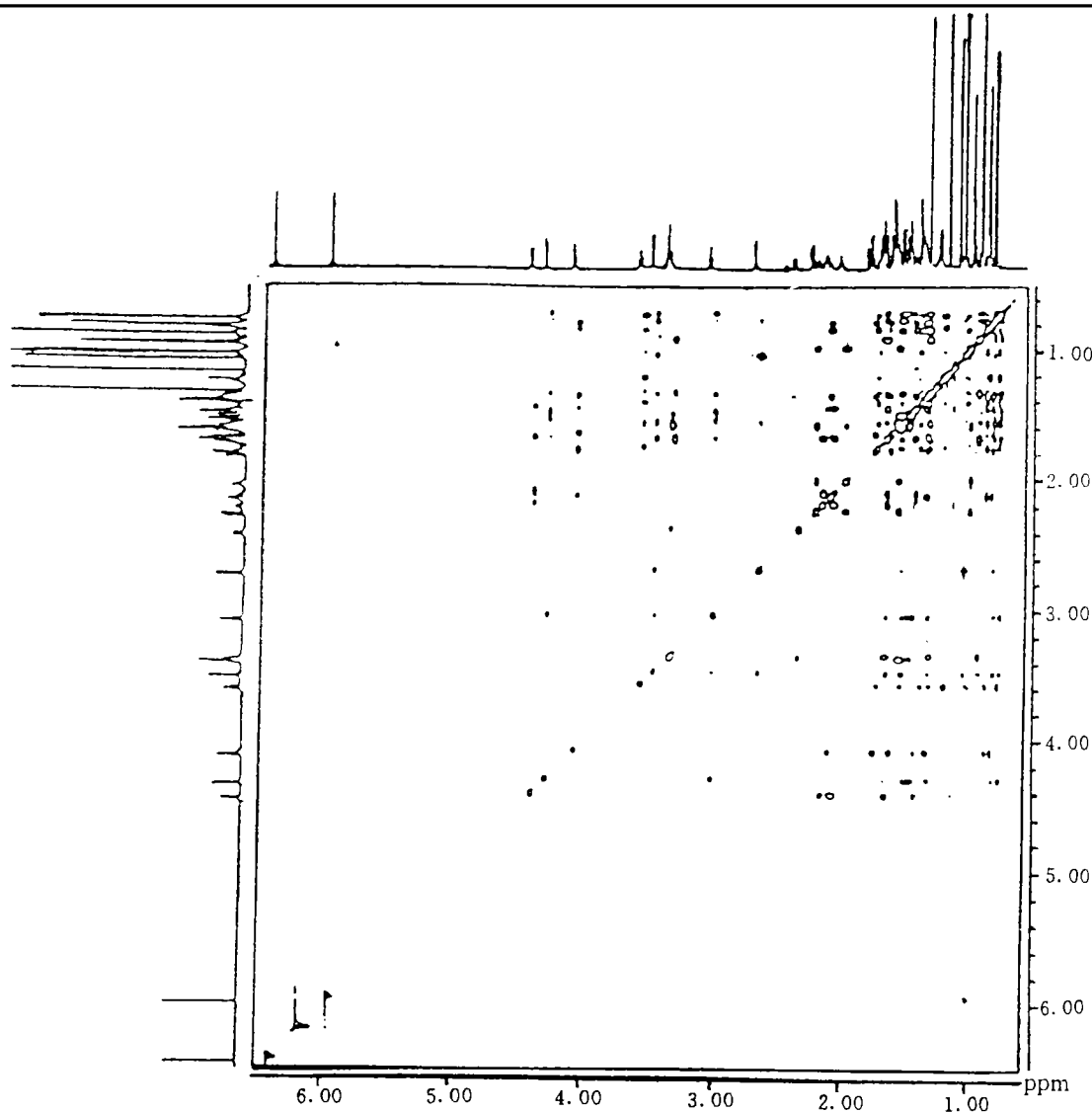


图 6-3 (b) TOCSY

不再由单一态波函数来描述,而变成混合态,可能出现 $\Delta m=0, \pm 2, \pm 3, \dots$ 的跃迁,称为多量子跃迁(MQT),它是在一次跃迁中含有多个能量子的过程。研究MQT-NMR的主要目的是:1. 对于四极核固体谱,用MQT方法可以消除一阶四极相互作用。2. 对于多自旋耦合系统,随着MQT的阶数的升高,谱线数目大大减少,因此MQT是一种简化复杂谱的有效方法。3. 有些交叉弛豫过程只能用MQT方法研究。因此,MQT可能提供弛豫动力学的更详细、更新的信息。MQT-NMR的主要功能是:(1) 多量子跃迁随着阶数的增加,跃迁数目迅速减少,应用高阶多量子谱使谱得到简化。(2) 利用多量子相干的特性,选择性地探测一定阶数的多量子信号,不同自旋系统得以分开。(3) 多量子滤波可以简化一维谱和二维谱。例如INADEQUATE实验,通过双量子相干,选择性地探测 ^{13}C - ^{13}C 同核耦合信号,把非常强的孤立 ^{13}C 核的信号抑制掉。(4) 研究多量子相干的弛豫,在动态NMR的研究中,多量子线宽提供了弛豫动力学更详细、更全面的信息。

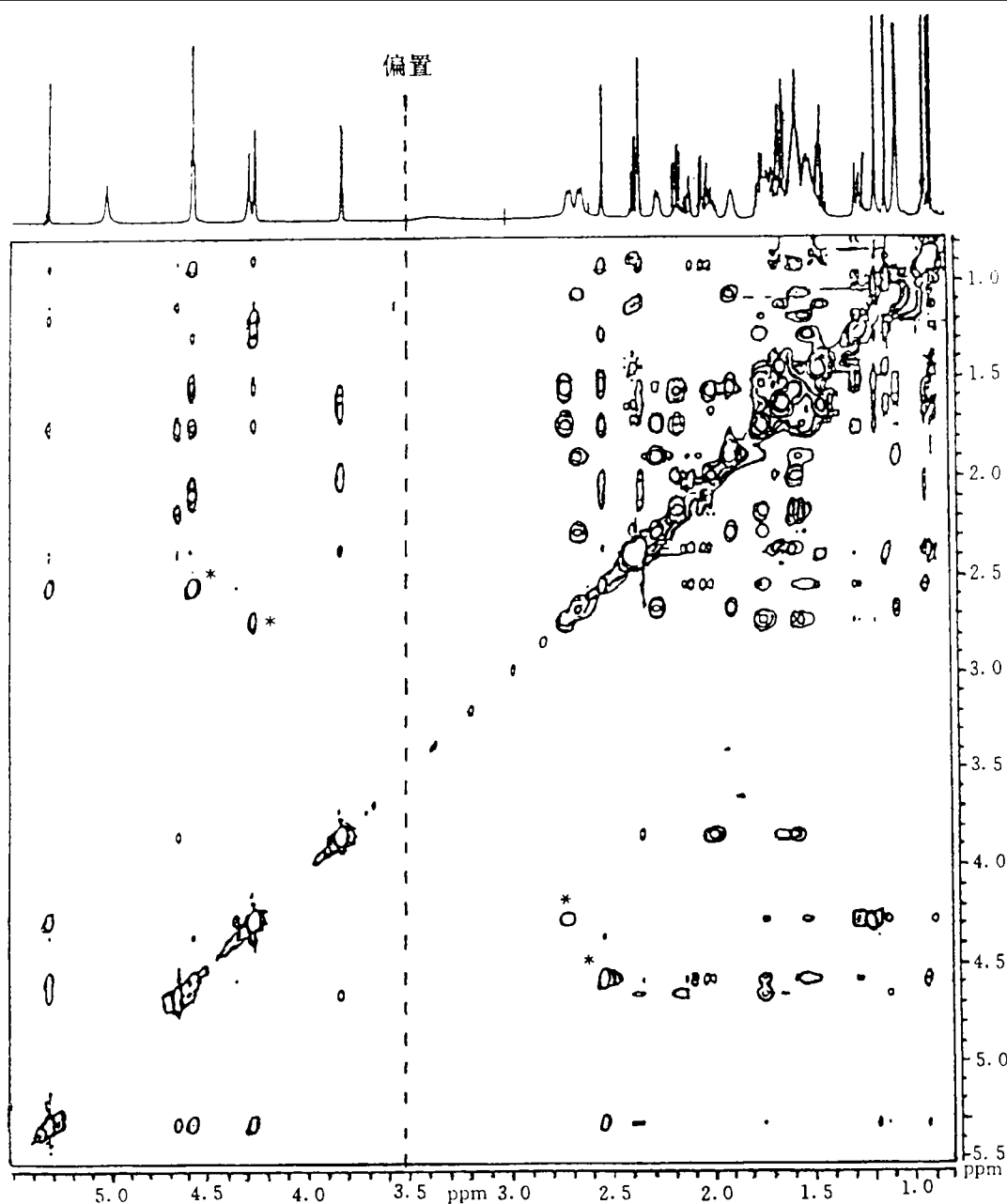


图 6-4 一种藜芦生物碱的 ROESY 谱 * 标记为 HOHAHA 峰

(5) 测四极核或多个耦合自旋的化学位移。一般来讲, 考虑 N 个自旋为 $1/2$ 的耦合系统的 $N-1$ 和 $N-2$ 阶多量子跃迁, 即足以定出所有的耦合常数。而 N 阶多量子跃迁则可以定出各向异性的化学位移。 $N-1$ 和 $N-2$ 阶多量子跃迁的数目能反映出分子对称性, 这有助于谱的解析。

如果预备期末不是加产生单量子相干的非选择 90° 脉冲, 而是加产生多量子相干的多脉冲, 则 t_1 和 t_2 之间的 90° 脉冲使多量子相干转移到可观测的单量子相干, 产生多量子二维谱, 其基本脉冲序列如图 7-1 所示 [55]。若在发展期的中间 $t_1/2$ 处加 180° 脉冲, 消除化学

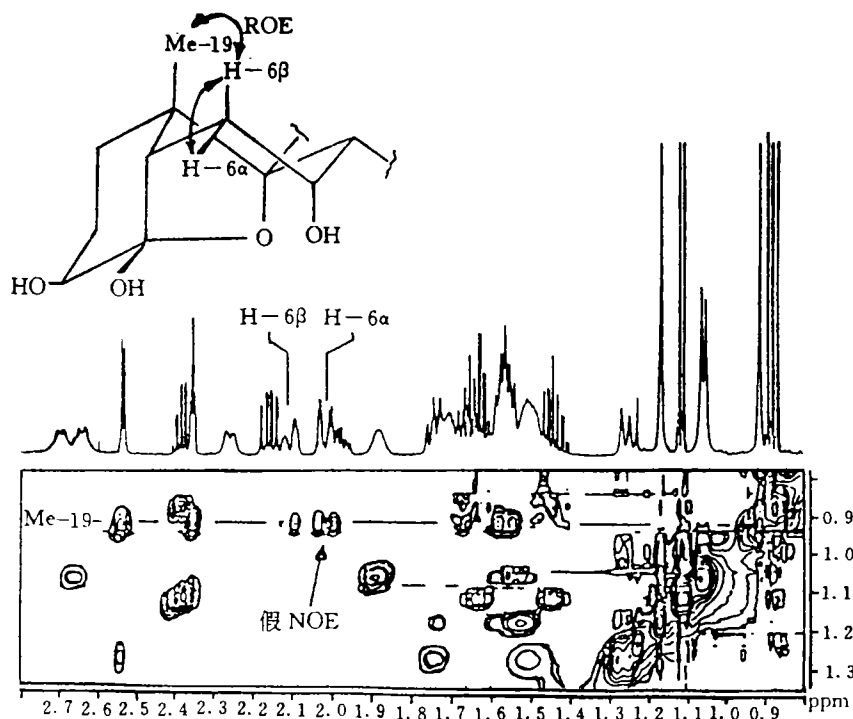


图 6-5 ROESY-HOHAHA 接力传递产生假NOE峰(箭头所指)Me-19
到H-6 β 的横向交叉弛豫之后接着HOHAHA转移到H-6 α

位移的作用,使 $\rho^{(1)}$ 中只存在 J 耦合作用,可得多量子 J 分解谱。多年来,曾应用多量子滤波来简化2D NMR谱。滤波技术可使来自二维谱中属于某种类型耦合网络的特定信号要么存在,要么不存在,从而使谱的归属变得容易得多。绝对值方式2D NMR运转快速简便,毋需进行相位调整。不过,这是以牺牲灵敏度为代价,应用加权函数来得到外观清晰的谱。缺点是由标量耦合引起的交叉峰仍无法与由NOE或化学交换引起的交叉峰分开。而相敏谱就没有这些缺点,但要分离吸收型及色散型分量却很困难。

利用二维谱间接检测发展期信息的特点,可以观测禁阻跃迁,尤其是多量子跃迁,这方面的研究丰富了谱的分析,谱的简化,自旋体系的分离,弛豫研究等方面的内容。广义地讲,多量子跃迁指的是不满足选择定则 $|\Delta m| = 1$ 的跃迁。其中 m 表示体系的总磁量子数,它

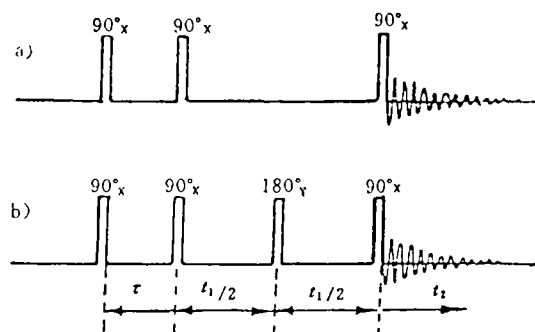


图 7-1 多量子二维实验基本脉冲图

a——多量子二维谱;

b——多量子 J 分解谱。

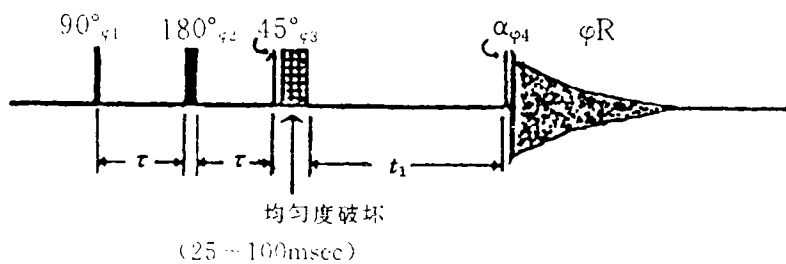


图 7-2 ZQC-COSY 脉冲序列

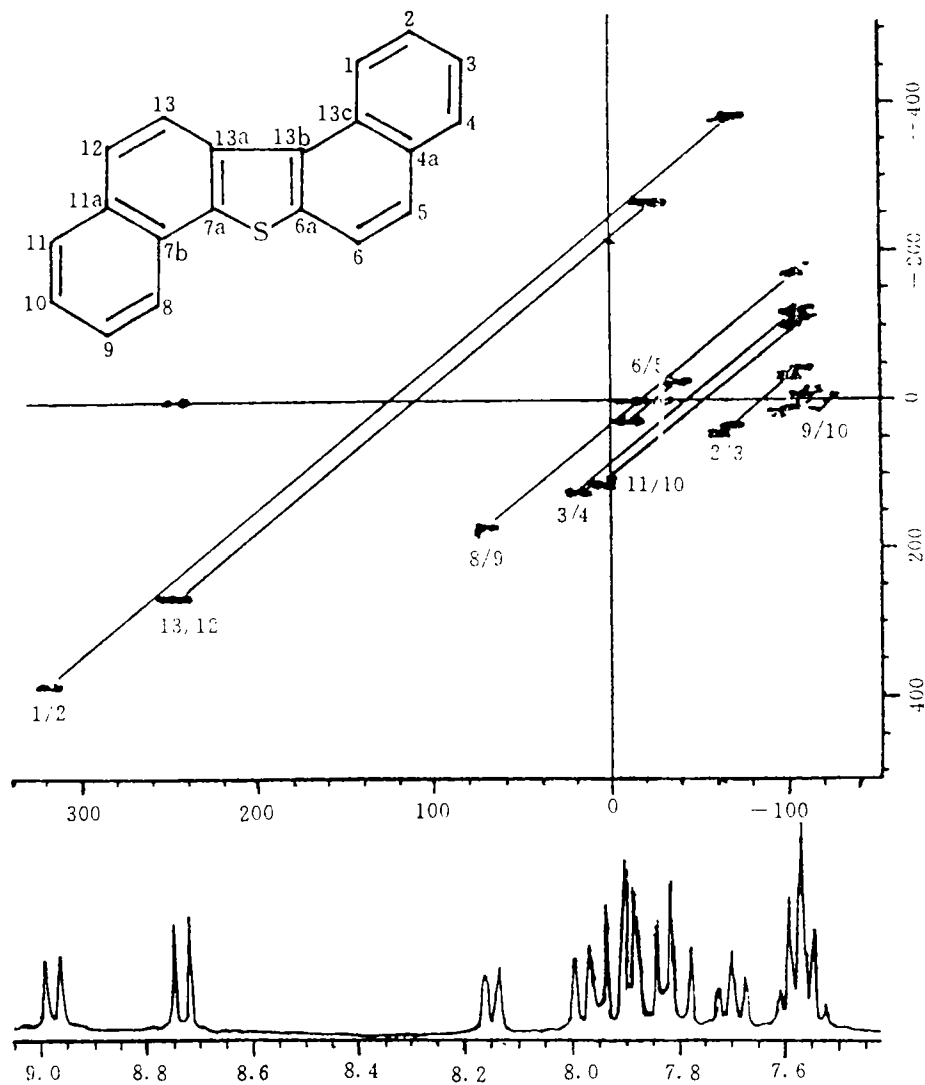


图 7-3 Sinusoidal 的 ZQC-COSY 谱

们按照 $|\Delta m| = n$, 称为 n 量子跃迁, 而不问它具体包含几个跃迁, 例如 $\alpha\beta \rightarrow \beta\alpha$, $;\Delta m|$

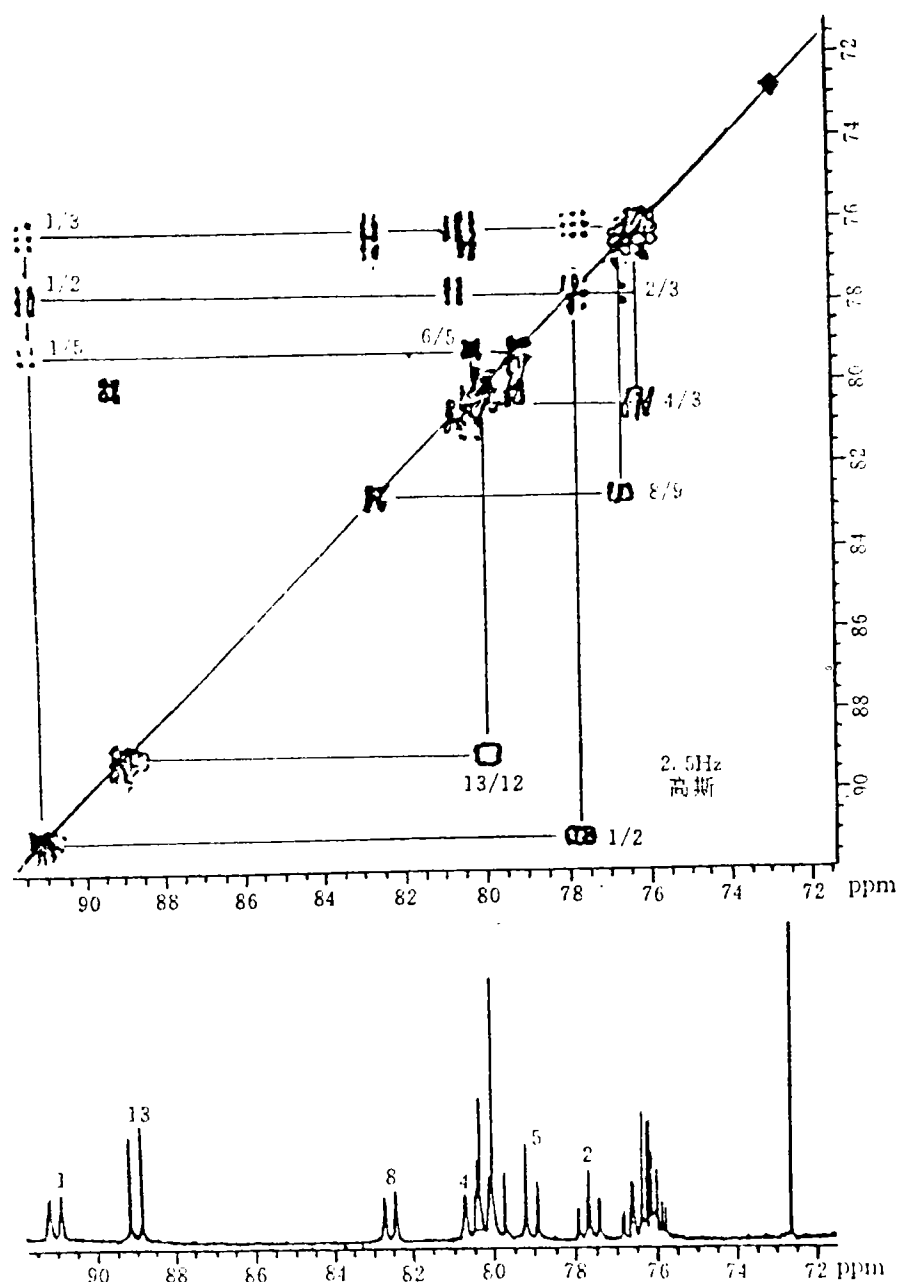


图 7-4 Sinusoidal的常规 COSY 谱

$= 0$ 称为零量子跃迁 (W_0)， $\alpha\beta\beta\beta \rightarrow \beta\alpha\alpha\alpha$ ， $|\Delta m| = 2$ 称为双量子跃迁 (W_2)。产生多量子跃迁的方法大致可分为三类：(1) 完全用选择性脉冲。(2) 混合型，即用选择性脉冲和非选择性脉冲的混合。(3) 完全采用非选择性脉冲。目前用得最广的是第三种^[11]。产生的多量子跃迁不能直接观测到，要把它变回到可观测的单量子跃迁才能进行检测，得到 $S(t_1, t_2)$ 后经过两次傅里叶变换所得到的频率谱，在 F_1 轴包含所有的多量子跃迁频率，把得到的二维谱向 F_1 轴投影(绝对值模式)即可得到包含所有多量子跃迁频率的一维谱。由

N 个 $I=1/2$ 的自旋组成的体系, 最高可产生 N 量子跃迁, 并随着量子数的增加, 多量子跃迁的个数急剧减少。对于 N 个非等同核自旋组成的体系, 其数目为 $\binom{2N}{N-P}$, 其中 $P=1, 2, 3, \dots, N$; 而零量子跃迁的数目为 $(1/2) \left(\binom{2N}{N} - 2^N \right)$ 。因此, 如果通常NMR中看到的是

很复杂的谱图(单量子跃迁谱), 则观测较高级的多量子跃迁时, 得到的谱线数目将大大减少, 达到了简化图谱的目的。这在研究液晶中分子的偶极-偶极常数时尤为重要。此外, 由于不同级的量子跃迁对射频脉冲的频率、相位的变化, 以及对静磁场不均匀性的响应等都各不相同, 利用这些特性可以分离各级量子跃迁^[11]。观察的多量子跃迁频率实际上是通常单量子跃迁频率的和或差。测定多量子弛豫可以为分子运动的研究提供新的有用信息。但在这类实验中, 要注意 ΔB_0 对高级多量子跃迁谱线的增宽效应。通过不同级多量子跃迁的相位特性, 可选择观察某级量子跃迁传递的谱, 多量子跃迁滤波就是基于这一原理。由于量子跃迁的量级与耦合质子数有关, 因此可将复杂体系的谱按量级分解成几种亚谱进行观察。此外, 由于等同核间的耦合不能产生多量子跃迁, 而溶剂峰通常总是单峰, 所以常用此法有效地压低溶剂峰。

7.1 零量子相干相关谱(ZQC-COSY)(Zero Quantum Coherence Correlation Spectroscopy)^[16, 64, 65]

在同核2D NMR技术中, 用来对标量耦合的自旋网络进行归属的方法通常是COSY谱。但COSY谱往往受数据库大小限制, 当信号密集时相关点又受到对角线信号的遮盖。

对于一些氢谱线交叠严重的多环芳香体系化合物, 结合异核COSY和异核Relay曾成功地对质子网络系统进行了指定^[83]。但异核Relay灵敏度低, 实验所需的最佳参数的选择要求严格, 因此在应用上受到一定限制。而ZQC-COSY实验^[64]却是一种能很好解析复杂氢谱的技术, 而且灵敏度高, 测定时间短。与双量子或多量子相干类似, 零量子相干也不能直接进行检测, 因此要创造条件激发零量子相干使其卷积(evolve), 再转变成单量子相干之后加以检测。脉冲序列如图7-2所示^[16]。 $90^\circ_x - \tau - 180^\circ_y - \tau - 45^\circ_z$ 组合脉冲产生ZQC, 然后使其在发展期 t_1 内卷积, 其中 π 脉冲抑制化学位移耦合, 45° 干扰脉冲消除零量子相干。检测脉冲 a 可取 45° 或 90° , 但所得图形不同, 取 45° 所得图形更易解析。它与COSY不同, 其相关峰是与斜对角线($F_1 = \pm 2F_2$)对称。图7-3为Sinusoidal的ZQC-COSY谱^[76], 它与常规COSY谱图7-4相比较^[76], 能提供更多的信息。根据COSY谱, H-1, H-2, H-5, H-6和H-13可以精确指定; H-8也可能正确指定; H-3, H-9, H-12位于7.4~7.5 ppm内; 而H-4, H-10, H-11的指定, 用COSY谱不能很好解决。而ZQC-COSY谱中, 可以精确确定H-4, H-6, H-10, H-11的位置, COSY对H-8的指定也能得到证实。特别有意义的是阐明了H-5和H-6的连接。至此, 各质子都得到了指定, 从低场到高场的顺序是1, 13, 8, 4, 11, 6, 12, 5, 2, 9, 3, 10^[16]。

7.2 ^1H 检测的异核多量子相干相关谱(HMQC)^[16, 56, 57](^1H Detected Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence)及 ^1H 检测的异核多键相关谱(HMBC)(^1H Detected Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)

HMQC^[92]和HMBC是近年来开发的通过多量子相干间接检测低旋磁比核(如 ^{13}C)的新技术。实际上HMQC与常规 ^1H - ^{13}C COSY谱相似, 而HMBC则与远程碳-氢相关谱(如COLOC)相似。不同的是 F_1 轴和 F_2 轴的数据恰好相反。由于多量子相干转移, 使其灵敏度大大提高, 如较INEPT

和DEPT实验增强八倍。与其它检测碳的二维技术比较,对于分子量约为500的样品,测定时间相同的条件下所需的样品量为:

INADEQUATE	200mg	(400mM)
^1H - ^{13}C COSY	5—10mg	(20mM)
COLOC	5—10mg	(20mM)
HMBC	2—3mg	(7mM)
HMQC	1mg	(5mM)

因此这两种方法为分子量大的微量样品大的测定提供了广阔的前景。脉冲序列如图7-5所示[16][92]。

7.2.1 ^1H 检测的多量子相关(HMQC)谱[16,57,70]

HMQC即用脉冲技术,见图7-5,将 ^1H 信号的振幅及相位分别依 ^{13}C 化学位移及 ^1H 间的同核标量耦合信息调制,并通过直接检测调制后的 ^1H 信号,来获得有关 ^{13}C - ^1H 化学位移相关数据[56]。它所提供的信息及谱图与 ^1H - ^{13}C COSY完全相同,即图上两个轴分别为 ^1H 及 ^{13}C 化学位移,直接相连的 ^{13}C 与 ^1H 将在对应的 ^{13}C 化学位移与 ^1H 化学位移的交点处给出相关信号。因而,如同 ^1H - ^{13}C COSY一样,由相关信号分别沿两轴画平行线,即可将相连 ^{13}C 及 ^1H 信号予以直接归属。它只是提供直接相连的 ^{13}C 与 ^1H 间的相关信号,不能得到有关季碳的结构信息[57]。由于HMQC实验受仪器条件的限制,应用方面的报道仍然不是很多。

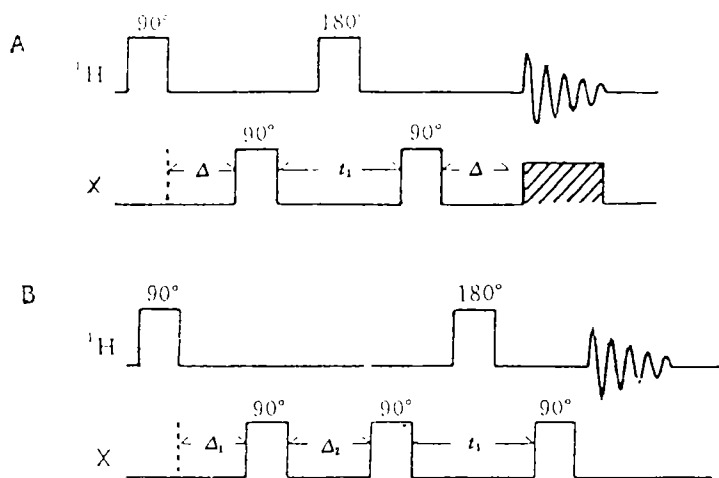


图 7-5 HMQC(A) 和 HMBC(B) 脉冲序列

7.2.2 ^1H 检测的异核多键相关[16,57,70][92,96](HMBC)谱

HMBC是一种测定远程 ^1H - ^{13}C 相关的十分灵敏的方法,特别适用于检测与甲基质子有远程耦合的碳($^2J_{\text{CH}}$, $^3J_{\text{CH}}$)。它给出远程 ^1H - ^{13}C 相关信息,其基本原理是:通过 ^1H 检测异核多量子相干调制,选择性地增加某些碳信号的灵敏度,使孤立的自旋体系相关连,而组成一个整体分子,由于三个甲基质子的协同作用,对于与甲基质子相隔二个键,三个键($^2J_{\text{CH}}$, $^3J_{\text{CH}}$)的碳,提供了有效的极化转移而得到相关信息,却抑制了直接耦合信息($^1J_{\text{CH}}$),使得到的相关谱大为简化,其灵敏度高于一般COSY的相敏二维相关谱。该法特别适用于具有众多甲基的

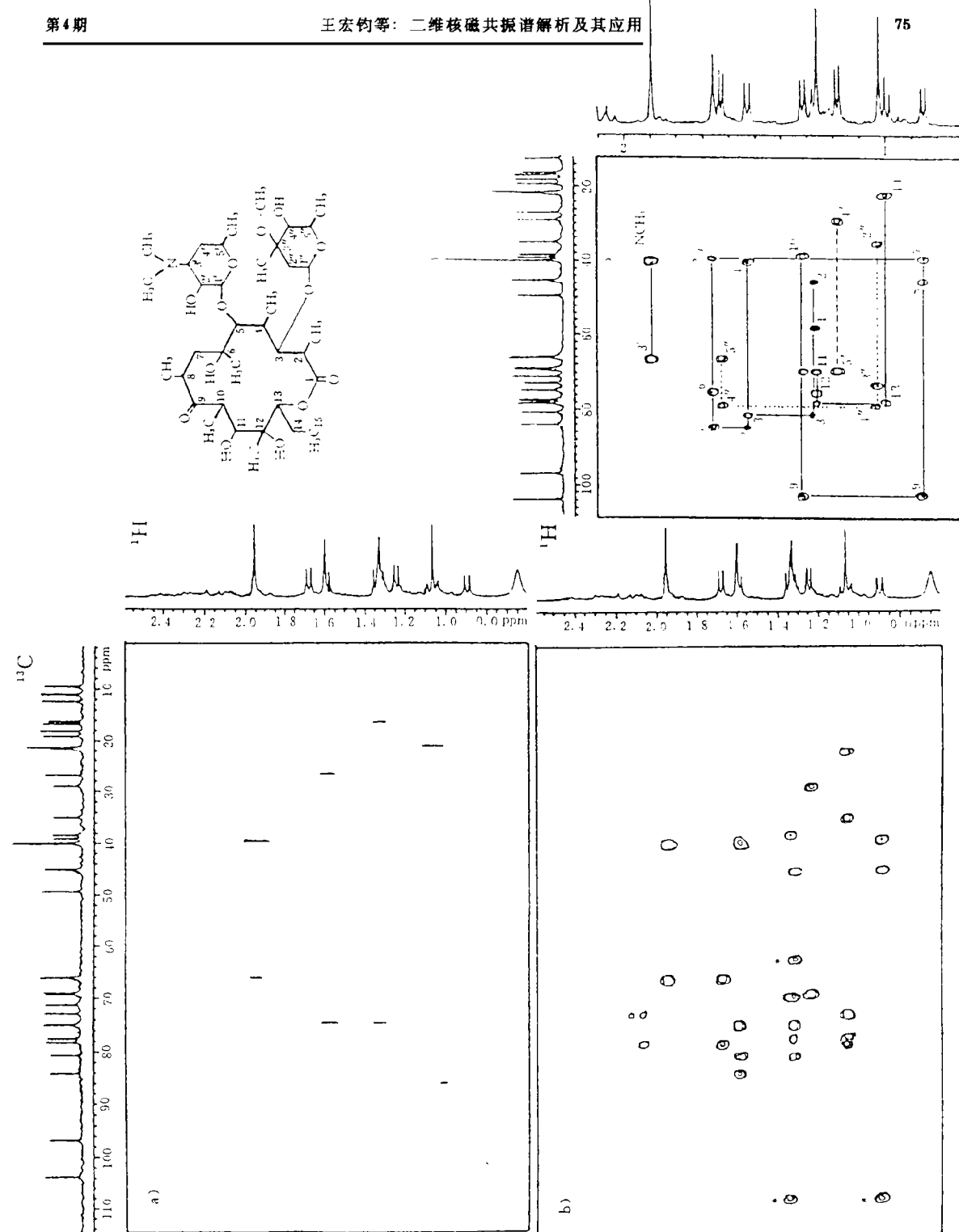


图 7-6 抗生素丝氮霉素的 (a) COLOC 谱, (b) HMBC 谱

(c) 为缩短测定时间, 使 F_2 轴缩窄所得到的 HMBC 谱

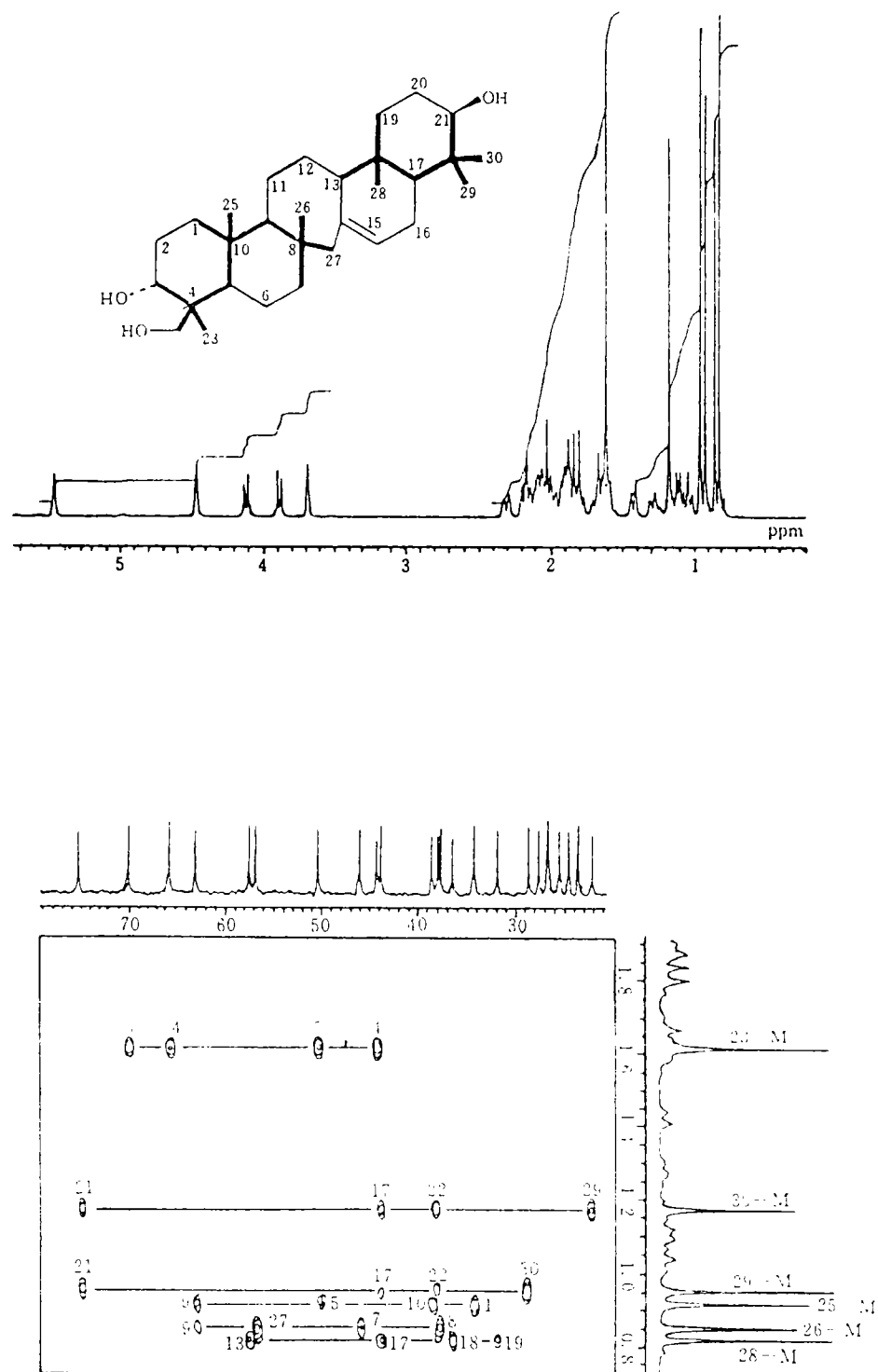


图 7-7 三萜化合物 Lycoclavanol 的 HMBC 谱

天然产物, 如三萜类化合物的结构鉴定。定出各结构单元之间通过季碳的相互连接关系, 以及各 CH_3 在分子中的位置, 从中得到同每一个甲基具有 $^2J_{\text{CH}}$, $^3J_{\text{CH}}$ 耦合的相关碳^[56]。HMBC可高灵敏度地检测 ^{13}C - ^1H 远程耦合($^2J_{\text{CH}}$, $^3J_{\text{CH}}$), 由此可得到有关季碳的结构信息及因杂原子存在而被切断的 ^1H 耦合系统之间的结构信息, 它也是通过测定灵敏度高的 ^1H 核来检测 ^{13}C - ^1H 之间的耦合相关信号, 因而灵敏度比传统的远程耦合 ^1H - ^{13}C COSY高得多, 在远程 ^1H - ^{13}C COSY中, 检测 ^1H - ^{13}C 远程耦合相关信号时往往需要检测季碳信号, 其测定灵敏度特别低, 对分子量大的化合物, 当样品量少时, 很难测得满意的结果。HMBC则由于通过灵敏度高的 ^1H 核的信号来检测 ^{13}C 核之间的远程耦合信息, 故对大分子化合物即使用少量样品也可以在较短的时间内测得可靠的数据。另外, 在HMBC中, 若不用 ^{13}C (X核)去耦器时, 在直接相连的 ^{13}C 与 ^1H 间残留的相关信号对应的 ^{13}C 与 ^1H 信号的交点处, 以该 ^1H 信号为中心, 沿平行于 ^1H 化学位移的方向裂分为二重峰, 故易与远程耦合信号相区别^[57]。

图7-6为抗生素丝氨酸霉素3mg样品的(a) COLOC和(b) HMBC谱。可见HMBC谱所得到的信息比COLOC谱多得多。(c) 为缩短测定时间, 使 F_2 轴变窄所得的HMBC谱。其中羰基碳信号(C-1, C-9)产生折迭。解析该谱, 即可得到该化合物C-C连接的分子骨架片段(粗线部分)。如通过N上的甲基质子即可把甲基碳和C-3'相关联, 通过15- CH_3 质子可将C-14和C-13相关联, 然后依次可以将C-12, C-11直至C-1相关联。对于如此微量的样品, 2D INADEQUATE实验则无能为力^[16, 90, 91]。图7-7是一个三萜化合物Lycoclavanol的HMBC谱, 该化合物有六个甲基, 甲基质子与其邻近的碳显示了清楚的远程耦合交叉峰, 据此即可确定一系列的分子骨架片段(粗线部分), 例如, 23- CH_3 (1.61ppm)质子信号与C-4, C-5, C-24和C-3有耦合交叉峰, 25- CH_3 的质子信号与C-1, C-10, C-5和C-9有耦合交叉峰, 余类推^[16]。

参 考 文 献

- [1] Derome A E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon Press, 1987. 183-274.
- [2] Sanders J K M, Hunter B K. *Modern NMR Spectroscopy - A Guide for Chemistry*, Oxford University Press, 1987. 93-159
- [3] Croasmun W R, Carlson R M K. *Two-Dimensional NMR Spectroscopy Applications for Chemists and Biochemists*, VCH publishers, Inc., 1987. 73.
- [4] Brey WS, Levitt MH. *Pulse Methods in 1D and 2D Liquid-phase NMR*, Academic Press Inc., 1988. 39.
- [5] Jelinski L W. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Chem.*, 1990, 62:212R-223R.
- [6] Ernst R R, Bodenhausen G and Wokaun A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford: Clarendon Press, 1987. 18.
- [7] Bax A. Optimization of 2D Homonuclear Relayed Coherence Transfer NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1985, 61:306-320
- [8] Bax A. 2D-Heteronuclear Relayed Coherence Transfer NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1983, 53:149-153
- [9] Rance M et al. A systematic Approach to the Suppression of J Cross Peaks in 2D Exchange and 2D NOE Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1985, 62:497-510
- [10] Marnett G E, Zektzer A S. *Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity*, VCH Publishers, Inc., 1988. 162-377
- [11] 裘祖文, 裴奎奎. 核磁共振波谱. 北京: 科学出版社, 1989. 367-432.

- [12] 华庆新,王家槐等.研究溶液中蛋白质三维结构的新方法—二维核磁共振技术. *生物化学与生物物理进展*, 1984, 3:2-9.
- [13] 华庆新. 二维核磁共振技术与蛋白质三维结构. *生物物理学报*, 1988, 4(1):67.
- [14] 韩秀雯. 二维核磁共振实验. 大连化物所, 河南化学所编, 1990. 28-161.
- [15] 王宏钧等. 核磁共振波谱学. 光谱实验室, 1990, 7(5/6):43-86.
- [16] 杨崇仁等. 云南植物研究. 昆明:昆明植物所《云南植物研究》编辑部, 1990. 10-30
- [17] 姚新生, 陈英杰. 超导核磁共振波谱分析. 北京:中国医药科技出版社, 1991. 133-151
- [18] Aue WP, Bartholdi E, Ernst R R. 2D-Spectroscopy Application to NMR. *J. Chem. Phys.*, 1976, 64: 2229.
- [19] Müller L, Kumar A, Ernst R R. 2D-Carbon-13 NMR Spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 1975, 63: 5490.
- [20] Bodenhausen G, Freeman R, Niedermeyer R *et al.* Double FT in High-Resolution NMR. *J. Magn. Reson.*, 1977, 26:133.
- [21] Aue WP, Karhan J, Ernst R R. Homonuclear Broad Band Decoupling and 2D J-Resolved NMR Spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 1976, 64:4226.
- [22] Nagayama K, Bachmann P, Wüthrich K *et al.* The Use of Cross-Section and Projections in 2D NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1978, 31:133.
- [23] Maudsley A A, Ernst R R. Indirect Detection of Magnetic Resonance by Heteronuclear 2D Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 1977, 50:368-372
- [24] Freeman R, Morris G A. Experimental Chemical Shift Correlation Maps in NMR Spectroscopy. *J. Chem. Soc. Commun.*, 1978, 684-687
- [25] Bax A, Freeman R. Investigation of Complex Networks of Spin-Spin Coupling by 2D NMR. *J. Magn. Reson.*, 1981, 44:542.
- [26] Yoshito T and Alan P M. *Applications of NMR Spectroscopy to Problems in Stereochemistry and Conformational Analysis*. VCH Publishers, Inc., 1986, 155-179
- [27] Jeener J, Meier B H, Bachmann P *et al.* Investigation of Exchange Processes by 2D NMR Spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 1979, 71:4546.
- [28] Wokaun A, Ernst R R. Selective Detection of Multiple Quantum Transitions in NMR by 2D Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 1977, 52:407-412.
- [29] Chandrakumar N, Subramanian S. *Modern Techniques in High-Resolution FT-NMR* Springer-Verlag. New York Inc., 1987. 350-380.
- [30] Bax A, Freeman R, Frenkiel T A *et al.* Assignment of C-13 NMR Spectra Via Double-Quantum Coherence. *J. Magn. Reson.*, 1981, 43:478.
- [31] Bax A, Freeman R, Frenkiel T A. A NMR Technique for Tracing out the Carbon Skeleton of an Organic Molecule. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103:2102
- [32] Kruk C, Jans A W H, Lugrenburg J. 2D INADEQUATE ^{13}C NMR Study on Vitamin D₃. *Magn. Reson. in Chem.*, 1985, 23:267-270
- [33] Macura S, Huang Y, Suter D, Ernst R R. 2D Chemical Exchange and Cross-Relaxation Spectroscopy of Coupled Nuclear Spins. *J. Magn. Reson.*, 1981, 43:259-281
- [34] Freeman R, Morris G A. Two-Dimensional Fourier Transformation in NMR. *Bull. Magn. Reson.*, 1979, 1:5.
- [35] Freeman R. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Two Frequency Dimensions. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 1980, A373:149.
- [36] Burum D P, Ernst R R. Net Polarization Transfer Via a J-Ordered State for Signal Enhance-

- ment of Low-Sensitivity Nuclei. *J. Magn. Reson.*, 1980, **39**:159-163.
- [37] Bax A. *Two-Dimensional Magnetic Resonance in Liquids*, Holland Delft: Delft University Press., 1984. 9.
- [38] Hahn E L, Maxwell D E. Spin Echo Measurements of Nuclear Spin Coupling in Molecules. *Phys. Rev.*, 1952, **88**:1070-1084.
- [39] Bax A, Mchikopf A F, Snildt J. Absorption Spectra From Phase-Modulated Spin Echoes. *J. Magn. Reson.*, 1979, **35**:373
- [40] Bax A, Freeman R, Morris G A. A simple Method for Suppressing Dispersion-Mode Contributions in NMR Spectra: The "Pseudo Echo". *J. Magn. Reson.*, 1981, **43**:333
- [41] Wagner G, Wüthrich K. Amide Proton Exchange and Surface Conformation of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor in Solution Studies with 2D NMR. *J. Mol. Biol.*, 1982, **160**: 343-361.
- [42] Wagner G, Kumar A, Ernst R R, Wüthrich K. Build up Rates of the NOE Measured by 2D Proton Magnetic Resonance Spectroscopy: Implications for Studies of Protein Conformation. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**:3654.
- [43] Wagner G, Wüthrich K. Sequential Resonance Assignments in Protein ^1H NMR Spectra. *J. Mol. Biol.*, 1982, **155**:347-366
- [44] Rybaczewski E F *et al.* High Resolution ^{13}C NMR in Solids: ^{13}C Local Fields of CH , CH_2 and CH_3 . *J. Chem. Phys.*, 1977, **67**:1231.
- [45] Diverdi J A, Opella S J. N-H Bond Lengths in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**:1761.
- [46] Maudsley A A, Müller L, Ernst R R. Cross-Correlation of Spin-Decoupled NMR Spectra by Heteronuclear 2D Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1977, **28**:463.
- [47] Bodenhausen G, Freeman R. Correlation of Proton and Carbon- ^{13}C NMR Spectra by Heteronuclear 2D Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1977, **28**:471
- [48] Wagner G, Kumar A, Wüthrich K. Systematic Application of 2D ^1H NMR Techniques for Studies of Proteins. *Eur. J. Biochem.*, 1981, **114**:375-384
- [49] Billetter M, Braun W, Wüthrich K. Sequential Resonance Assignments in Protein ^1H NMR Spectra. *J. Mol. Biol.*, 1982, **155**:321-346
- [50] 邱峰等. 2D-NMR研究5-氟脲嘧啶衍生物结构. 波谱学杂志, 1989, **6**(2):231-236.
- [51] 俞汉钢等. 利用二维接力相关谱和J分解谱对里杜霉素质子信号的归属. 波谱学杂志, 1989, **6**(1):29-33.
- [52] 岳淑范等. 2D NMR鉴定吗啡副产物的结构. 波谱学杂志, 1989, **6**(4):407-412.
- [53] 沈联芳. 二维核磁共振波谱学. 波谱学杂志, 1988, **5**(1):71-104.
- [54] 俞汉钢. 利用零量子谱进行自旋网络的归属. 波谱学杂志, 1988, **5**(1):15-71.
- [55] 高汉宾, 郑耀华. 简明核磁共振手册. 武汉: 湖北科技出版社, 1989. 135-166.
- [56] 汪汉卿等. 二维核磁共振技术在多肽及核酸构象研究中的应用. 结构化学, 1989, **8**(5):381-396.
- [57] 崔承彬. 核磁共振的几种新技术及其在结构解析中的应用. 化学通报, 1990, (2):1-6
- [58] 华玉新等. 2D INADEQUATE谱在 δ -维生素E上的应用. 波谱学杂志, 1989, **6**(3):294-298.
- [59] 龚运淮. 天然有机化合物的 ^{13}C 核磁共振化学位移. 昆明: 云南科技出版社, 1986. 279.
- [60] 王宏钧等. 核磁共振波谱学. 光谱能谱分析国际信息汇编, 第二集. 北京: 群言出版社, 1992. 1-20.
- [61] 王东, 俞曙, 费昌沛. 现代核磁共振波谱. 北京: 科学普及出版社, 1991. 81-104.
- [62] Katalin E K Indirect. Negative Heteronuclear Overhauser Effect Detected in a Steady-State, Selective $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ NOE Experiment at Natural Abundance. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**: 5829.
- [63] Morris G A. Modern NMR Techniques for Structure Elucidation. *Magn. Reson. Chem.*, 1986.

- 24:371-403.
- [64] Zektzer A S *et al.* Establishing Vicinal Proton-Proton Connectivities Using Two-Dimensional Proton Zero Quantum Coherence NMR. *J. Heterocyclic Chem.*, 1987, 24:879.
- [65] States D J *et al.* 2D Nuclear Overhauser Experiment with Pure Absorption Phase in Four Quadrants. *J. Magn. Reson.*, 1982, 48:286.
- [66] Reynolds W F *et al.* A Pulse Sequence for Establishing C-C Connectivities Via Indirect ^{13}C - ^1H Polarization Transfer Modulated by Vicinal ^1H - ^1H Coupling. *J. Magn. Reson.*, 1985, 63:413-417.
- [67] Zektzer A S *et al.* New pulse Sequence for Long Range 2D Heteronuclear NMR Chemical Shift Correlation. *Magn. Reson. Chem.*, 1986, 24:1083-1088.
- [68] (a) Eich G *et al.* Exploring Nuclear Spin Systems by Relayed Magnetization Transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104:3731.
- (b) Bax A *et al.* Optimization of 2D Homonuclear Relayed Coherence Transfer NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1985, 61:306.
- [69] Rinaldi P L. Heteronuclear 2D-NOE Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105:5167.
- [70] (a) Bax A *et al.* Correlation of Proton and Nitrogen-15 Chemical Shifts by Multiple Quantum NMR. *J. Magn. Reson.*, 1983, 55:301.
- (b) Bendall M R *et al.* Pulse Sequences Utilizing the Correlated Motion of Coupled Heteronuclei in the Transverse Plane of the Doubly Rotating Frame. *J. Magn. Reson.*, 1983, 52:81.
- (c) Bax A *et al.* ^1H and ^{13}C Assignments from Sensitivity Enhanced Detection of Heteronuclear Multiple Bond Connectivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108:2093.
- (d) Summers M F *et al.* Complete ^1H and ^{13}C Assignments of Coenzyme B_{12} through the Use of New 2D NMR Experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108:4285.
- (e) Bax A *et al.* Structure Elucidation of the Antibiotic Desferriomycin through the Use of New 2D NMR Techniques. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, 108:8056.
- [71] Anthony G, AVENT, Ray Freeman NMR Spin-Lattice Relaxation Studied by Magnetization Transfer. *J. Magn. Reson.*, 1980, 39:163-168.
- [72] Aue W P *et al.* 2D Spectroscopy Application to NMR. *J. Chem. Phys.*, 1976, 64:2229-2246.
- [73] (a) Bax A. Broadband Homonuclear Decoupling in Heteronuclear Shift Correlation NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1983, 53:517.
- (b) King G *et al.* Application of 2D Relayed Coherence Transfer Experiments to ^1H NMR Studies of Macromolecules. *J. Magn. Reson.*, 1983, 54:328.
- [74] Garbow J R *et al.* Bilateral Rotation Decoupling of Homonuclear Scalar Interactions. *Chem. Phys. Lett.*, 1982, 93:504-509.
- [75] Johnston M D *et al.* Total Assignment of the ^1H and ^{13}C NMR Spectra of Dinaphtho[1,2-b:1',2'-d] thiophene Through the Concerted Use of 2D NMR Techniques. *Magn. Reson. Chem.*, 1988, 26:839-847.
- [76] Hallenga K *et al.* A Combination of 2D and 1D NMR Methods for the Study of Peptide Molecules. *Bull. Magn. Reson.*, 1980, 2:343.
- [77] Perpick-Dumont M *et al.* ^{13}C - ^1H Shift Correlation with Full ^1H - ^1H Decoupling. *Magn. Reson. Chem.*, 1988, 26:358-361.
- [78] 杨崇仁等. 棉子糖乙酰化物的2D NMR研究. 波谱学杂志, 1990, 7(3):261.
- [79] Yu C *et al.* 2D Heteronuclear NOE(HOESY) Experiments: Investigation of Dipolar Interac-

- tions between Heteronuclear and Nearby Protons. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**(22):6533.
- [80] Kover K E *et al.* Detection of Indirect Negative Effects in Heteronuclear 2D NOE Spectroscopy with a Absorption Phase. *J. Magn. Reson.*, 1986, **69**:519-522.
- [81] (a) Katalin E K *et al.* Oligosaccharide Sequencing Using an Indirect Negative Heteronuclear Over-hauser Effect. *J. Chem. Soc. Commun.*, 1986, 647-648.
(b) Batta G *et al.* New Approaches to Oligosaccharide Sequencing and Conformational Distribution Around the Glycosidic Bond. One- and Two-dimensional ^{13}C -(^1H)NOE Spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, 1988, **26**:852-859.
- [82] (a) Bodenhausen G. Heteronuclear J Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1980, **39**:169-174.
(b) Bax A *et al.* Structure Elicitation of the Antibiotic Desertomycin through the Use of New 2D NMR Techniques. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**:8056.
- [83] (a) Musmar M J *et al.* Two-Dimensional Relayed Coherence Transfer Experiments as Means of Subgrouping Protonated Carbon Resonances of Complex Polynuclear Heteroaromatics on the Basis of Vicinal Proton-Proton Connectivities. *J. Heterocyclic Chem.*, 1984, **21**:929.
(b) Musmar M J. *et al.* Benzo[b] phenanthro[4,3-d] thiophene: spectral Assignment by 2D NMR Methods and Tertiary Structure Determination. *Magn. Reson. Chem.*, 1986, **24**:1039-1043.
- [84] Hartmann S R *et al.* Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. *Phys. Rev.*, 1962, **128**:2042-2053.
- [85] Pines A *et al.* Proton-Enhanced NMR of Dilute Spins in Solids. *J. Chem. Phys.*, 1973, **59**(2):569.
- [86] Davis D G *et al.* Assignment of Complex ^1H NMR Spectra Via 2D Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**:2820.
- [87] Davis D G *et al.* Simplification of ^1H NMR Spectra by Selective Excitation of Experimental Subspectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**:7197.
- [88] Edwards M W *et al.* Complete Proton and Carbon-13 NMR Assignment of the Alkaloid Gephyrotoxin through the Use of Homonuclear Hartmann-Hahn and 2D NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**:918-923.
- [89] Bax A *et al.* Water Suppression in 2D Spin-Locked NMR Experiments Using a Novel Phase-Cycling Procedure. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**:6511-6513.
- [90] Bax A. *Two-Dimensional Magnetic Resonance in Liquids*, Delft Holland: Delft University Press., 1984. 51-56.
- [91] Bax A. *Two-Dimensional Magnetic Resonance in Liquids*, Delft Holland: Delft University Press., 1984. 183.
- [92] Summers M F *et al.* Complete ^1H and ^{13}C Assignments of Coenzyme B_{12} through the Use of New 2D NMR Experiments. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**:4285.
- [93] Bax A *et al.* ^1H and ^{13}C Assignments from Sensitivity Enhanced Detection of Heteronuclear Multiple Band Connectivity by 2D Multiple Quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**:2093-2094.
- [94] Kusumi T *et al.* Cyanoviridin R R, a Toxin from the Cyanobacterium (Blue-Green Alga) *Microcystis Viridis*. *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**(40):4695.
- [95] Seto H *et al.* Structural Studies of Natural Products by New NMR Techniques. The Str-

- ucture of a New Poyether Antibiotic. *Portmicin Tetrahedron Lett.*, 1987, 28(29):3357.
- [96] Borzo M. Maciel G. E. Nuclear Overhauser Effects in Exchanging System. *J. Magn. Reson.*, 1981, 43:175-192.

Interpretation of 2D NMR Spectroscopy and the Applications

Wang Hongjun Zhang Huiling Lu Getan

(Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, The Chinese Academy of Sciences, Xihe, Fuzhou 350002, P.R. China)

Abstract

2D NMR is of dominant importance in the chemical applications of NMR spectroscopy. In this paper, the appearances of 2D NMR spectra of mainkinds, i.e., COSY, LRCOSY, COSYDEC, SECSY, DQC-COSY, RCT, INADEQUATE, RELAY, INVERSE, NOESY, HOESY, HOHAHA, ROESY, HMQC, HMBC, as well, are briefly described, the assignment procedures introduced, and the applications analyzed.

Key words 2D NMR, COSY, LRCOSY.

“如果我比别人看得远些， 那是因为我站在巨人们的肩上”

牛顿说过：“如果我比别人看得远些，那是因为我站在巨人们的肩上。”怎样才能站在巨人们的肩上，高瞻远瞩，为我国的“四化”建设作出较大的贡献呢？出版科技书刊，构筑人类智慧的“制高点”，是不可缺少的前提。古往今来，世界各国人民认识世界、改造世界总结出来的精神成果，几乎都凝结在科技书刊中。继承这些成果，是在较高的起点上进行新的探索和创造的必要条件。只有站在人类智慧的“制高点”上，才有可能创造出更加光辉灿烂的业绩。

（摘自陆达《出版科技书刊 构筑人类智慧的制高点》一文，原载《光谱实验室》1994第11卷，第1期，第1页）