

## 核磁共振二维谱 (2DNMR) 及解析方法

## 1. 二维 J 分解谱和同核化学位移相关谱

黎明 孙平川 何炳林

(南开大学 吸附分离功能高分子材料国家重点实验室 天津 300071)

**摘 要** 本文简要介绍了二维谱的基本思想,谱的分类以及常用的一些重要概念:化学位移相关谱 (COSY), J 耦合分解谱, 对角峰, 自相关峰, 交叉相关峰 (非对角峰)。并描述了 J 耦合分解谱和同核相关谱 (COSY) 的基本解析方法和用途。

**关键词** 化学位移相关谱 (COSY) J 耦合分解谱 对角峰 自相关峰 交叉相关峰 (非对角峰)

## 引 言

NMR 自发现以来已在化学、生物和物理等领域得到广泛应用。随着 NMR 应用的不断深入开展,一些大分子 (如蛋白质、多糖、多肽及核酸等) 的结构解析遇到了谱峰严重重叠的困难。如何提高 NMR 谱的分辨率成了当时 NMR 波谱学家急需解决的问题。

二维 NMR 很好地解决了这个问题。它使得严重重叠的一维谱峰展开在二维平面上,极大地提高了谱的分辨率<sup>[1]</sup>。不仅如此,它还为谱峰的归属提供了非常直接的方式,而且随着脉冲序列的多样化发展,它还能提供许多一维实验难以提供的结构和动力学信息<sup>[2-4]</sup>。因此,二维 NMR 谱成为人们分析研究物质结构和动力学的有力工具。

但是有一点必须说明,核磁二维谱和其它任何分析手段一样,是用来解决物质结构和动态问题的一种工具。这种工具在解决某些问题时非常有效,但它决不是万能的,也就是说它必须和其它分析手段结合在一起,或在用其它手段已得出结果的基础上,对所关心的问题作更深入、更全面的解决。

## 基本原理

二维 NMR 的理论推导较为复杂,但其基本原理并不难理解。所有二维 NMR 都可以用图 1 (a) 说明<sup>[5]</sup>,当样品中核自旋被激发以后 (预备期),它就以确定的频率进动,并且这种进动将持续相当一段时间 (发展期、混合期和检测期),在

这个意义上可以把核自旋体系看成是有记忆能力的体系。二维 NMR 的想法就是利用这种记忆能力,在发展期对核自旋施加扰动,核自旋对扰动的响应将持续到检测期,因此通过检测期的行为可以间接勾画出发展期中核自旋的行为。通常发展期为  $t_1$ ,检测期为  $t_2$ ,并且用固定时间增量递增  $t_1$  进行一系列实验,因此接收机接收到的信号不仅与  $t_2$  有关,而且还与  $t_1$  有关。信号可表达为  $s(t_1, t_2)$ 。由于  $t_1$ 、 $t_2$  是独立的时间变量,因此可以分别对它进行 Fourier 变换,一次对  $t_2$ ,另一次对  $t_1$ 。两次 Fourier 变换的结果就得到了两个频率变量的函数,  $s(\omega_1, \omega_2)$ ,这就是二维核磁共振实验的核心所在。

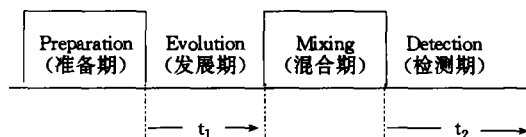


图 1 (a) 一般二维 NMR 实验示意图

在具体的实验中,二维谱的实现过程可用图 1 (b) 描述。二维谱的实验数据是通过一系列脉冲循环采集而得到的。每进行一次循环时用一个  $t_1$ ,并在检测期  $t_2$  采集该循环完毕时的实验数据  $s_1(t_1, t_2)$ ;然后依次进行后面的循环,每次循环时使  $t_1$  逐渐增大,并记录每个循环完毕时的实验数据  $s_i(t_1, t_2)$ ,待整个二维实验完成时,即可得到一个数据矩阵,即每一个  $t_1$  值由一系列  $t_1$  点组成的时域 FID 信号与之对应。计算机进行处理时,先固定  $t_1$ ,对  $t_2$  时域进行 Fourier 变换,得到  $f_2$  频域的信息,然后再对  $t_1$  时域进行 Fourier 变换,最

终得到含  $\omega_1$  和  $\omega_2$  两维频域变量的信号。

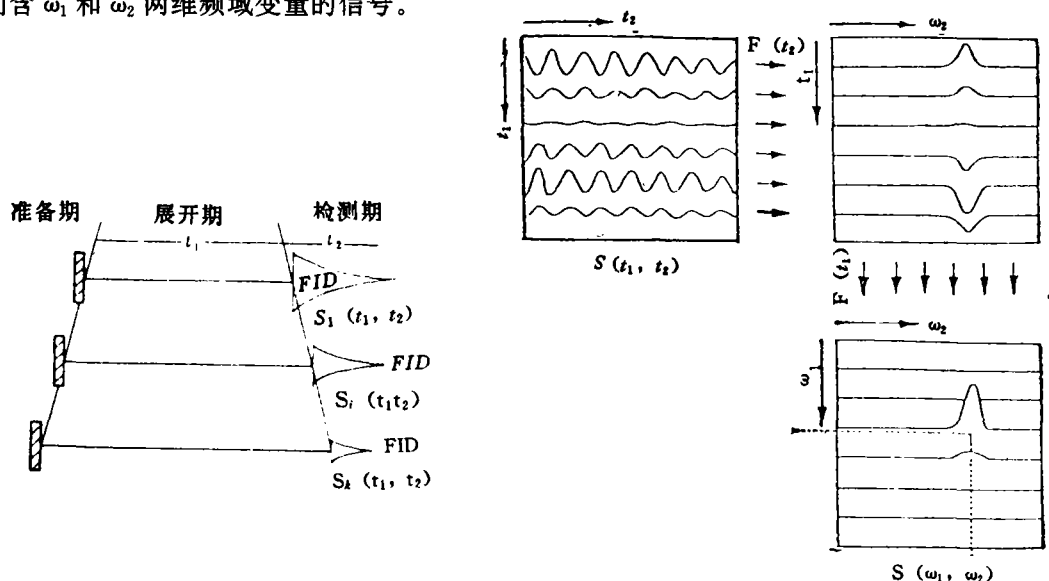


图 1 (b) 获得二维谱的示意图

二维谱的种类非常多。通常将二维谱分为三类：(1) 二维分解谱，其功能为分离不同的相互作用，在液体实验中主要有 J 分解谱。(2) 二维相关谱，其功能为通过 J 耦合来建立不同核的化学

位移之间的联系。(3) 二维动态谱，其功能为探测各核之间的交叉弛豫和动态交换。本文主要介绍二维谱中常用的一些概念及最基本的二维谱——J 分解谱和 COSY 谱的解析法。

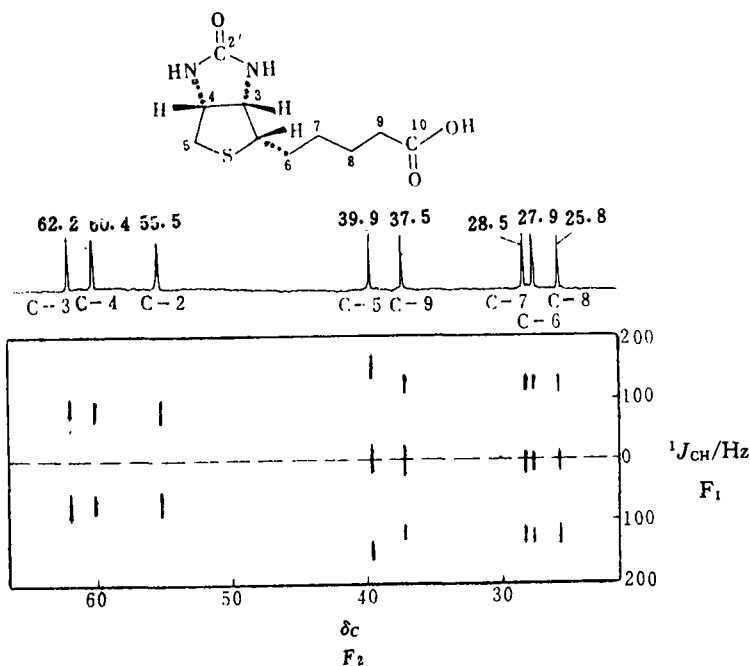


图 2 生物素分子 Boitin 的  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  异核二维 J 谱 (下)

生物素分子 Boitin 的一维质子去偶碳谱 (上)

## 二维 J 分解谱

二维 J 分解谱是指观察核的化学位移为一维，核间 J 耦合为另一维分解谱。这类谱包括异核和同核二维 J 谱。图 2 是一种生物素分子的异核

二维 J 谱 (下)<sup>[6]</sup>。图中  $F_2$  维是化合物的碳的化学位移，其投影就是一维质子去偶碳谱 (图 2 上)， $F_1$  维是碳上直接相连的质子与碳的 J 耦合  $^1J_{\text{CH}}$ ，这样的二维 J 谱既包含了质子去耦的碳谱信息，又包含了质子与碳的  $^1J_{\text{CH}}$  耦合信息，不仅可以辅

助谱峰的归属,而且谱中给出的 $^1J_{CH}$ 耦合信息还可以用于确定化合物的三维结构。此外,若将在实验中将脉冲序列稍加修改,还可得到 $F_1$ 维是质子与碳远程耦合(碳与非直接相连质子间的耦合)信息 $^nJ_{CH}$  ( $n>1$ )的二维异核J谱,这对确定化合物的三维结构有很大的帮助。

在复杂化合物的氢谱中,由于氢谱的化学位移范围较窄,而 $^1H$ - $^1H$ 间的耦合广泛存在,因此通常的一维氢谱非常拥挤,难以辨认。同核二维J谱可以将化学位移与J耦合分开,使拥挤的一维谱

分散在平面上,大大提高了谱的分辨率。图3是一种化合物的二维 $^1HJ$ 谱(下)与普通一维 $^1HNMR$ 谱<sup>[7]</sup>(上),图中 $F_2$ 维是同核去耦质子谱,而 $F_1$ 维则给出质子间的耦合信息。由图可见二维 $^1HJ$ 谱在相当程度上克服了复杂耦合关系引起的谱线重叠和密集,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。因此,二维 $^1HJ$ 谱在解析糖类、甾体类和核苷酸化合物方面已被广泛应用。

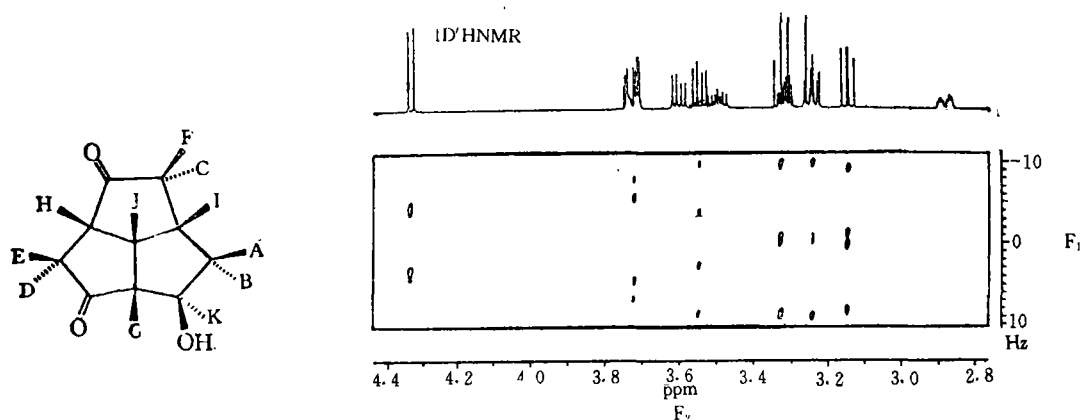


图3 某化合物二维 $^1HJ$ 谱(下)和普通一维 $^1HNMR$ 谱(上)

## 同核化学位移相关谱(COSY)

与J分解谱相比,二维相关谱的种类更多,也更复杂。其中用得最多的是化学位移相关谱,它通过J耦合来建立不同核的化学位移之间的联系。化学位移相关谱也和J谱一样,根据相互作用的核是同核或异核,分为同核相关谱和异核相关谱。

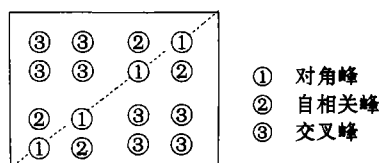


图4 COSY谱中谱峰的命名

通过同核耦合,建立同种共振频率的核间的连接图,就得到同核化学位移相关谱,其主要研究对象为 $^1H$ - $^1H$ 体系,该谱常简称为COSY(correlated spectroscopy)谱。图4为一般COSY谱的示意图。同核COSY谱是关于主对角线完全对称的二维谱,主对角线上的峰与普通一维上的峰相同,称

为对角峰(如图4中的①),对角峰并不比普通一维谱所给出的信息多。临近主对角线的属于同一核的多重态之间的交叉峰称为自相关峰,自相关峰对于谱的归属意义也不是很大。COSY谱中二种不同核之间的交叉峰称为交叉相关峰(如图4中的③),也称为非对角峰。交叉相关峰才是谱解析者的兴趣所在。交叉相关峰的出现说明它所对应的对角峰所属的核之间有耦合。利用COSY谱中的交叉相关峰可以清晰地找出核间的耦合,从而对谱峰进行归属。图5是三环萜烷衍生物的COSY谱<sup>[8]</sup>。该化合物质子间的耦合非常丰富,普通的一维质子谱很难归属。而其二维COSY谱则很清楚地给出了该化合物中质子间的耦合关系。而且由于化合物中质子的耦合是有传递性的,因此一旦确定某一个质子的谱峰归属,根据COSY谱中提供的耦合网络可以找出与之相耦合的质子归属。依此类推,利用二维COSY谱中所有的耦合网络能依次将谱峰进行归属。具体一归属步骤如下:

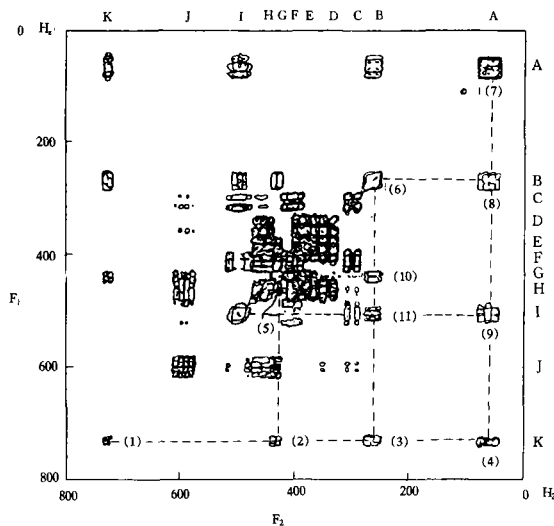


图5 三环癸烷衍生物的质子 COSY 谱

1 对化合物的质子进行编号。对于一些复杂体系，为了在谱分析过程中清晰简便起见，可给体系中的质子进行编号，这种编号完全可以采取个人喜好的方式。本文中三环癸烷衍生物中质子的编号如图所示。

2 从 COSY 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，并以某种方式与其它信号相关连。从这个“起始点”开始，利用 COSY 谱中的耦合网络，可找出与之相耦合的质子的归属。如图 5 中，观察一下三环癸烷衍生物的结构，不难看出，位于最低场（谱的最左边）的谱峰所对应的质子应为 K 质子，因此选 K 质子作为“起始点”。

3 利用“起始点”和 COSY 谱中的耦合网络进行谱峰的归属。在三环癸烷衍生物中，G、B、A 质子与 K 质子之间有耦合，因此在二维 COSY 谱中与 K 质子的对角峰相对应非对角峰 (2)、(3)、(4) 反映的就是 K 与 G、B、A 质子的耦合关系。那么非对角峰 (2)、(3)、(4) 分别由 K 质子与 G、B、A 中的哪一个相耦合而产生呢？由化合物的结构可知，G 质子谱峰的化学位移应高于 A、B 质子的，所以非对角峰 (2) 是由 K 质子与 G 质子相耦合而产生的，故 (2) 所对应的另一个对角峰 (5) 就是 G 质子的谱峰。那么余下的 (3)、(4) 就是 K 与 A 质子相耦合而产生交叉相关峰。与 (2)、(4) 对应的对角峰 (6)、(7) 就对应于 A、B 质子的谱峰。至于 (6) 和 (7) 到底哪个是 A 或 B，观察一下它门所产生的非对角峰可发现，除了

(6) 和 G 质子间有耦合 (10) 外，(6)、(7) 其它的耦合情况基本一样，(8) 是 A、B 相互耦合而产生的交叉峰，(3)、(4) 是它们与 K 质子相耦合而产生的交叉峰，(9)、(11) 是 A、B 与另一个质子相耦合而产生的交叉峰，由该化合物的结构可知该质子为 I，即 (9) 和 (11) 所对应的另一个对角峰 I 质子的谱峰，由于 B 质子离 G 较近，可以认为交叉峰 (10) 是由 B 质子与 G 质子相耦合而产生，那么对角峰 (6)、(7) 则分别对应于质子 B 和 A，这样一来通过 K 质子及化合物中的耦合网络，利用二维 COSY 谱，已经顺利地找出了 A、B、G、I 等质子，依同样的方法，利用这些已归属的质子谱峰，在二维 COSY 谱的耦合网络中，同样能确定化合物中另外一些质子的谱峰归属。

需要说明一点，一般来说，解析某个化合物的二维谱时，如果对其化学结构一无所知，能从二维谱中获取的信息将非常有限，甚至可能一无所获。因此通常的解谱程序是，在解二维谱以前，借助 NMR 一维谱和其它各种手段，对化合物的一级结构（即化学结构）已经有所了解或猜测，通过二维谱再进一步确认，并获取更深入细致的结构信息（如化合物的空间结构信息等）。

上面介绍的是基本的 COSY 谱及解析方法。一般来说，复杂分子的同核相关谱，仍然过于复杂，难以分析，因此需要与其它方法联合使用。COSY 谱本身还分为绝对值 COSY，相敏 COSY，接力 COSY，多量子波 COSY，全相关 COSY 等等，而且谱图中时常会出现一些假信号，所以谱的解析者需要对基本 COSY 的物理思想有清楚

的了解,才能识别出谱峰的真伪,也才能较顺利地对这些变化的 COSY 谱进行分析,以获取想要的信息。

### 参考文献

1. R. R. Ernst, Vith International Conference on Magnetic Resonance in Biological System, Kandersteg, Switzerland (1974).
2. R. R. Ernst, Chimia, 29, 179 (1975).
3. L. Muller, a. Kumar and R. R. Ernst, J. Chem. Phys., 63, 5490 (1975).
4. W. P. Aue, E. Bartholdi and R. R. Ernst, J. Chem. Phys., 64, 2229 (1976).
5. R. R. Ernst, G. Bodenhausen and A. Wokaun, Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions, Clarendon Press, Oxford, 1987.
6. 康恢同, 有机化合物的光谱鉴定, 北京大学出版社, 1992.
7. K, Nagayama et al., J. Magn. Reson, 31, 133 (1978).
8. 裘组文, 裴奉奎, 核磁共振波谱, 科学出版社, 1992.

## Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonant Spectroscopy (2DNMR) and Its Analyzing Method

1. Two-dimensional J-resolved Spectroscopy and Homonuclear  
Chemical Shift Correlated Spectroscopy

Li Ming Sun Pingchuan He Binglin

(The State Key Laboratory of Functional

Polymeric Materials for Adsorption and Separation Nankai Univerity Tianjin 300071)

**Abstract** The basic principle and the classification of two-dimensional spectroscopy are briefly introduced, as well as some important concepts: chemical shift correlated spectroscopy (COSY), J-coupling resolved spectroscopy, diagonal peak, self-correlated peak, cross peak (off-diagonal peak). The analyzing method and application of J-coupling resolved spectroscopy and homonuclear COSY are also described.

**Key word** chemical shift correlated spectroscopy (COSY), J coupling separate spectroscopy, diagonal peak, self correlated peak, cross peak (off-diagonal peak)

(上接 21 页)

## Analysis of Inorganic Component and Structure in Shark Cartilage

MaoLi<sup>1</sup> Chen Yijun<sup>2</sup> Zhu Yuping<sup>2</sup>

Zhu Wei<sup>2</sup> CaoMi<sup>2</sup> Chen Jingheng<sup>1</sup> DaiLemei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

(<sup>2</sup>Center of Materials Analysis, Nanjing University, Nanjing 210093)

**Abstract** Inorganic components and existence of shark cartilage were determined by ICP-AES, FT-IR and XRD respectively. It is found that the main mineral is  $1/2 [\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ . The nutrient function of strontium which is rich in shark cartilage is also discussed.

**Key words** shark, cartilage,  $1/2 [\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ , Sr