

高效液相色谱-核磁共振联用技术 及其应用

陈 忠* 柯恩烽

(厦门大学化学系 国家教委材料与生命过程分析科学开放实验室 厦门 361005)

摘 要 高效液相色谱-核磁共振(HPLC-NMR)在线联用技术是同时进行未知混合物的分离和结构鉴定的最好手段之一。详细介绍了在HPLC-NMR联用技术中 ^1H 谱的分辨率、检测限和多重溶剂峰抑制的最新进展,并简要评述了其它分离方法与NMR联用情况。

关键词 高效液相色谱 核磁共振 灵敏度 溶剂峰抑制

1 前 言

液相色谱-核磁共振(LC-NMR)联用技术并不是一个新概念。早在70年代末就有LC-NMR联用技术的报道^[1]。将高分离能力的高效液相色谱(HPLC)与提供最丰富结构信息的NMR结合似乎是很自然的事,实际上由于这两种技术存在着固有的矛盾:NMR的检测灵敏度明显比HPLC低,且作为HPLC流动相的混合溶剂往往产生多重强溶剂峰而影响溶质峰的正确检测,因此HPLC和NMR的联用并不是两种技术的简单组合。长期以来人们一般先用HPLC对混合物进行分离,然后将分离好的组分移至NMR试管中,再进行NMR检测,最后确定混合物中该组分的结构,整个过程要耗费很多时间。近年来随着NMR理论和技术的发展,出现了许多新技术新方法。高性能脉冲梯度场技术和选择激发技术的出现,使得多重溶剂峰的有效抑制成为可能。高场探头性能的不断改进,大大提高了NMR的检测灵敏度。NMR谱仪的模块化设计和硬件的快速控制,使得接口设计更为灵活。这些技术解决了HPLC和NMR的匹配问题。由于HPLC-NMR一体化联用技术能一次性完成从样品的分离纯化到峰的检测、结构测定和定量分析,提供大量分子结构和混合物组成的信息,提高了研究效率和灵活性,因此引起人们的广泛关注,并获得快速发展^[2,3]。最近,世界生产谱仪的最大两家公司Varian公司和Bruker公司都推出商品化的HPLC-NMR配件,这无疑将进一步促进HPLC-NMR联用技术的发展和應用。

2 HPLC-NMR联用装置和特点

在HPLC-NMR联用系统中,HPLC可以看作是NMR的一种进样装置,试样经HPLC

* 通讯联系人

收稿日期:1996年—09—04;收到修改稿日期:1996—11—12

分离后,通过一个适当的中间连接装置注入到 NMR 探头。由于 HPLC 分离和 NMR 分析的样品都处于液体状态,使用温度范围也相近,因此这两种谱仪联用时不必作太多的改动。

图 1 给出了一种典型的 HPLC-NMR 联用装置^[4]。它是由泵、紫外检测器、色谱柱和注入阀组成 LC 系统,通过一条 2~2.5 m 长的特制毛细管连接到 NMR 液相探头上。位于 NMR 探头底部的阀用来控制 NMR 测试是在停流状态下还是在连续流动状态下进行。在图 1 所示的系统中,可以将 NMR 视为 HPLC 的特殊检测器。我们知道, HPLC 所用的检测器 FID、TCD、ECD 和 RI 等都有局限性,而 NMR 信号的化学位移、积分强度和谱线分裂情况能提供丰富的定量定性信息。

目前 HPLC-NMR 联用系统一般采用可液相探头,它不仅具有较高的灵敏度而且保留了较好的色谱分辨率。图 2 为 Bruker 公司生产的 HPLC-NMR 探头内部构造简图^[5],它与普通 NMR 探头的不同在于这种探头带有一流动腔,探头底部有两个标准的 HPLC 联结器作为流动相的入口和出口。通常用于 NMR 测量的样品管(内径 5 mm)体积为 250 μl ,而在 HPLC-NMR 探头中,玻璃管内径为 2~4 mm,所对应体积仅为 40~120 μl 。由于提高填充因子,即样品体积与线圈体积之比,有利于 NMR 灵敏度的增加,因此 LC-NMR 探头的射频线圈是直接固定在玻璃上,玻璃管的管壁平行于质子检测线圈,且平行部分的长度要大于检测线圈的长度。样品在这种探头中不能旋转,无法通过旋转以减小 x, y 方向上磁场不均匀性的影响,对 NMR 的分辨率会有所影响。实际上,在现代 NMR 实验中,为了避免因样品旋转引起的调制问题,一般都是在样品下旋转的情况下进行多维实验和反式检测实验。

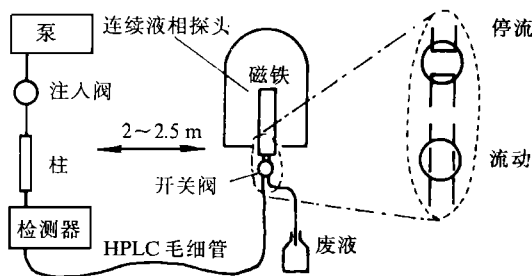


图 1 HPLC-NMR 的实验布局

Fig. 1 Experimental arrangement for HPLC-NMR coupling

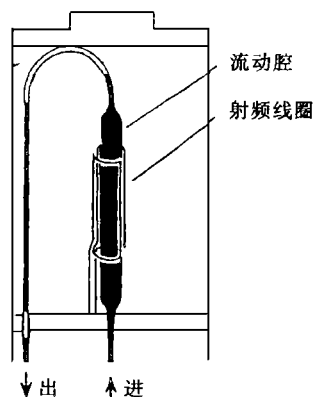


图 2 HPLC-NMR 液相探头剖面图

Fig. 2 Continuous-flow probe for HPLC-NMR coupling

Griffiths 详细研究了 HPLC-NMR 实验中 HPLC 参数和 NMR 参数之间的相互影响以及最优化匹配问题^[6]。对于某一色谱峰,由于 NMR 的化学位移可作为峰分离的另一维,因此色谱峰的分离并不是最关心的问题。实验中心发现窄的色谱峰有利于 NMR 检测灵敏度的提高,为此,尽可能将色谱的峰宽调整到小于或等于 NMR 检测线圈的长度。增加柱的负载也会提高 NMR 的灵敏度,但色谱峰会随之加宽,甚至产生拖尾现象。实验表明对于内径为 4.6 mm 柱负载量的黄型值为 100 μl 。

Wu 等^[7-9]设计了用于体积为 5nl 至 1 μ l 检测腔使用的射频微线圈, 提出了一种可预测流动状态 NMR 实验信噪比的理论模型, 讨论了分离参数、线圈几何形状和 NMR 采样参数对信噪比的影响, 得到了样品腔体积减小 400 倍时信噪比只降低 2 倍的理论预测。为了获得实验验证, 将约 1 μ g 的氨基酸和多肽混合样品, 通过微孔 LC 分离后注入到体积仅为 50nl 微腔进行 NMR 测量, 获得了高质量的色谱保留时间与 NMR 化学位移相关联的二维谱。

NMR 技术的特点是低灵敏度, 因此 NMR 灵敏度是 LC-NMR 联用系统的主要问题。NMR 检测的信噪比依赖于检测体积中同等核的数目、磁场强度、NMR 检测线圈的填充因子以及检测核的自旋晶格弛豫时间。Albert^[5]报道了在 600MHz 120 μ l 流动腔中在检测分子量小于 300 化合物的检测限为 500ng。在停流检测模式中, 检测限还依赖于累加次数 N。由于信噪比的增加是与 $N^{1/2}$ 成正比, 因此停流检测的检测限可以比流动检测的检测限低一个数量级。另外, Varian 公司最近公布的技术指标^[10]: 在 500MHz 60 μ l 的 LC-NMR 探头进行在流¹H 检测, 对于分子量小于 400 化合物的检测限约为 10 μ g, 在相同条件下进行的停流过液采样的检测限约为 200ng。

3 溶剂峰抑制

溶剂峰抑制是 HPLC-NMR 最关键的技术之一。为了获得高质量的 HPLC-NMR 谱, 首先要解决溶剂峰抑制问题。这一问题虽与液态生物样品 NMR 测量中水峰抑制有些类似, 但有其自身的特点。首先, 在典型的反相 HPLC 应用中, 一般采用二元或三元组分混合溶剂作为流动相, 这些流动相所含有的质子基团会产生比感兴趣信号大几个数量级的溶剂峰, 这些强溶剂峰使得被分析成分的 NMR 信号变差, 且强的溶剂峰所伴随的¹³C 卫星峰也会干扰有用信号的观测。采用氘代有机溶剂作为流动相从上来说是可行的, 但由于氘代有机溶剂如 CD₃CN 和 CD₃OH 等一般都非常昂贵, 限制了其在实际中的应用。其次, HPLC-NMR 中样品常常是流动的, 这样流动相会源源不断的流入腔内, 进入 NMR 检测范围, 这限制了预饱和之类溶剂峰抑制方法的使用。最后, 实验过程中流动相溶剂梯度会引起某些溶剂峰化学位移的移动。

在 Ogg 等^[11]提出溶剂峰抑制序列 WET 的基础上, 美国 Varian 公司的 Smallcombe 等^[12]发展了一种适合停流(stop-flow)和在流(on-flow)HPLC-NMR 溶剂峰抑制的方法。该方法将造型选择脉冲、脉冲梯度场、选择性¹³C 去偶和实时硬件控制技术组合起来, 成为一种功能强大的通用的多溶剂峰抑制方法。

WET 技术采用一系列变扳转角的选择溶剂射频脉冲, 在每一选择脉冲之后, 加一去相梯度场。实验表明采用 4 脉冲方式的 WET 序列能获得较好的抑制效果。图 3 给出适用于一维 HPLC-NMR 的改进型 4 脉冲 WET 脉冲序列^[12]。4 个选择性 WET 射频脉冲采用 SEDUCE 选择脉冲^[13]。对于类似的频率响应, SEDUCE 造型脉冲比其它造型脉冲所用的时间短, 这在流动 NMR 实验中尤为重要。其脉冲相位分别为 x, y, y 和 y 。对于射频场 B_1 不敏感的 WET, 扳转角分别为 98.2°, 80.0°, 75.0° 和 152.2°。对于纵向弛豫 T_1 和射频场 B_1 都不敏感的 WET, 扳角为 81.4°, 101.4°, 69.3° 和 161.0°。脉冲梯度场强度分别为 32, 16, 8 和 4, 作用时间为 2ms, 每一脉冲梯度场后再加 2ms 的延迟。在¹H 选择性脉冲作用期间, 同时加一低

功率 ^{13}C 选择性去偶。最后采用 $(90^\circ \text{ } x 90^\circ \text{ } y 90^\circ \text{ } x 90^\circ \text{ } y)$ 空间选择组合脉冲以获得较好的基线。

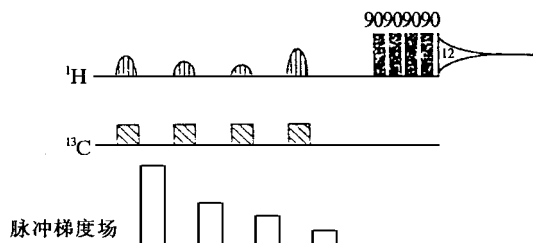


图3 改进型 WET 脉冲序列

Fig. 3 The modified WET sequence

从 3.67ppm 处可看出两图的垂直幅度是不同的, 对于 CH_3CN 中的甲基信号, 抑制比大于 50 000 : 1。

图4是用图3所示的 WET 序列在停流状态下获得溶剂峰抑制的例子^[12]。样品为 10mmol/L 的蔗糖溶液, 溶剂为 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (50: 50), 采用一个腔体积为 60 μl 的 PFG 反式检测 LC - NMR 探头, 数据在 Unity 500 上收集的。a 为小扳转角的单脉冲谱, CH_3CN 的甲基峰在 1.95ppm 处因辐射阻尼效应而明显展宽。b 为图3所示的改进型 WET 序列的结果。采用射频场 B_1 不敏感 WET, 20ms 的 SEDUCE 选择脉冲和一个组合脉冲。

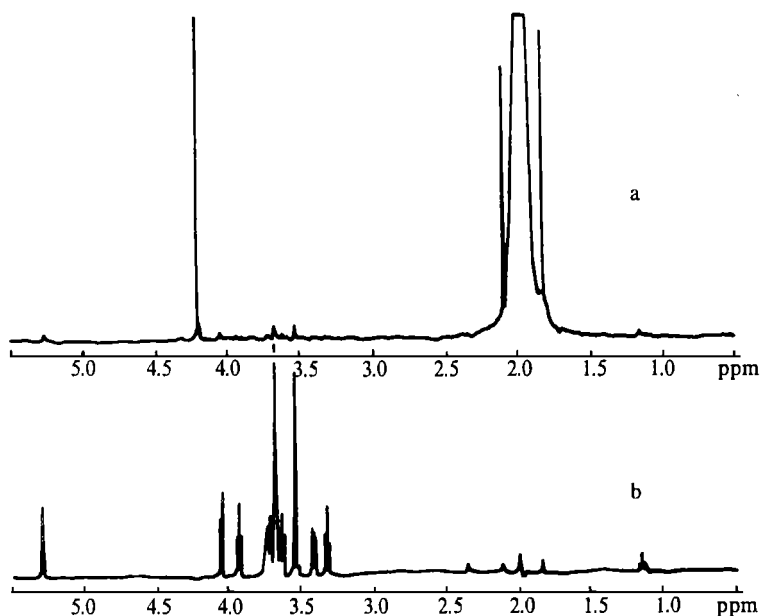


图4 WET 序列进行溶剂峰抑制的典型实例

Fig. 4 A example of solvent suppression obtained using the WET sequence

在 HPLC 溶剂梯度变化期间进行流动状态 NMR 实验, 实验过程中有些溶剂峰的化学位移会因流动相梯度而变化。如 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ 的流动相中, 当溶剂梯度变化时, CH_3CN 上的甲基峰和水峰的相对位置会发生变化。Smallcombe^[12] 提出了 ‘搜索扫描’ 的方法: 用一小扳转角单脉冲寻找溶剂峰, 将 1.95ppm 附近的强峰定位为 CH_3CN 的甲基峰, 并将射频发射机

的频率设置为该频率, 然后再定位另一强峰为 HOD 峰。根据搜索扫描所定位的溶剂峰, 计算出一个频可调的 SLP^[14] WET 脉冲。在溶剂梯度过程, 搜索扫描确定溶剂峰和时间平均扫描获得实际信号是同步进行, 从而实现了溶剂峰的自动跟踪和最佳抑制。图 5 为 LC 梯度期间采用搜索扫描和 WET 脉冲解决实际问题的例子^[10]。用 CH₃CN:D₂O 溶剂梯度(在 22min 内 CH₃CN 从 5% 提高至 50%) 来分离一些多肽。注意图中搜索扫描的跟踪能力以及对 ~4.6ppm 处水峰和 ~1.95ppm 处 CH₃CN 的甲基峰良好的抑制效果。结果表明将 WET 序列与各种相位循环或脉冲梯度场二维脉冲序列相结合能获得高质量溶剂峰抑制二维谱^[12], 说明了 WET 脉冲序列有很好的通用性。

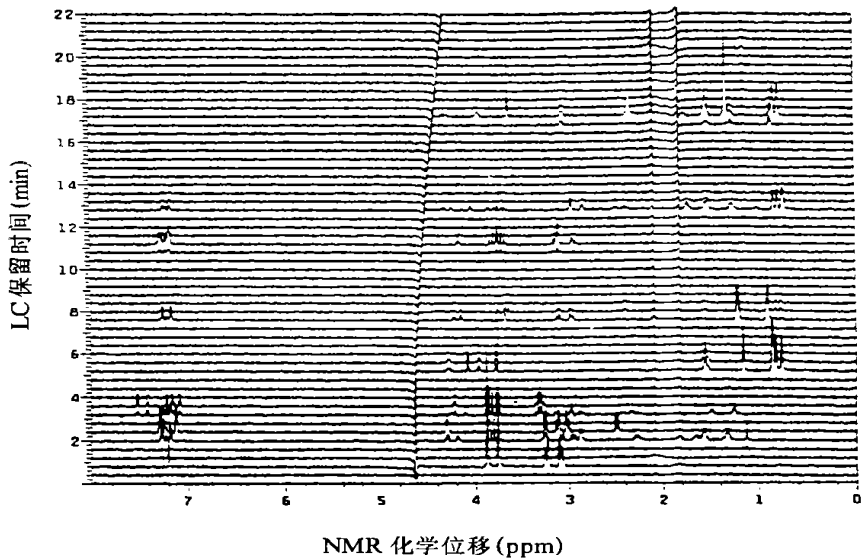


图 5 LC 溶剂梯度期间用搜索扫描和溶剂峰抑制所获得的 NMR 谱

Fig. 5 ¹HLC- NMR spectra usingscout scan and WET solvent suppression during an LC gradient

4 HPLC- NMR 的应用

HPLC- NMR 分析提供了在短时间内扫描混合物主要成分的快速方法。停流测量时, 一旦感兴趣的成分注入探头, 就可对实验进行长时间的累加。对于浓度较高的成分还可进行停流 2D NMR 实验。目前这种联用技术已用于进行药物代谢研究, 药物杂质分析以及多肽合成和发酵过程的研究, 监测合成反应中同分异构体的比率等等。它不仅用于分析实验室, 而且用于原材料和产品质量控制以及在线过程监测。在检测质量相同的同分异构体时, HPLC- MS 难以分辨, 而 HPLC- NMR 克服了 HPLC- MS 的不足。HPLC- NMR 也适用于不挥发的缓冲系统, 如磷酸盐缓冲液, 这对于 HPLC- MS 是相当困难的。Albert 等^[15] 在线 HPLC- NMR 联机系统研究了单体丙烯酸盐。通过连续流动 1HNMR, 对混合物中各成分的化学结构进行了归属。Pürsch 等^[16] 利用 LC- NMR 研究了松香油及其衍生物随温度变化所引起构型变化的中间体。对于那些在柱中保留时间相近或相同的共洗脱成分, 紫外光谱无法分辨主峰边的肩峰, 由于主峰所对应的组分和肩峰所对应的组分进入流动腔的时间略有不同, 利用时间切片(time slicing)功能, 可以将两种成分分开。图 6 为 HPLC 不能分

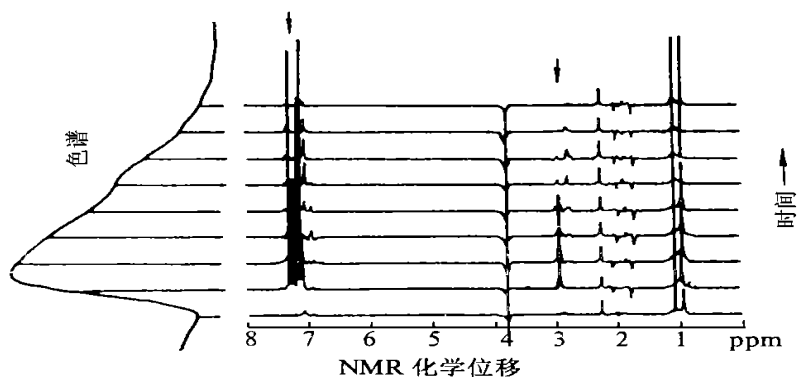


图6 利用时间切片法得到共洗脱样品区域的停流 NMR 谱

Fig 6 Times lying through a coeluting sample region produces stop-flow NMR spectra

辨区域时间切片产生的停流 NMR 谱^[7],从箭头所示的位置很容易看出化学位移的不同。

5 NMR 与其它分离手段

在 HPLC-NMR 联用技术发展的同时,其它分离手段与 NMR 联用技术的研究也取得一定的进展。下面简述高效毛细管电泳(HPCE)、超临界流体色谱(SFC)和超临界流体萃取(SFE)与 NMR 联用技术的发展情况。

高效毛细管电泳(HPCE)是近年发展起来的高效分离方法。由于样品用量极少,且毛细管区带电泳(CZE)可保持被分离物如肽和蛋白质的活性,因而受到分析化学家和生物化学家的极大重视。Sweedler 等最早报道 CE 与 ^1H NMR 联用系统^[17,18],其所用的 NMR 检测腔的体积为 5nl, NMR 检测线圈是垂直于超导磁场方向(常规探头的 NMR 检测线圈是平行于超导磁场方向),检测线圈这样放置的目的是为了提高 NMR 信号的灵敏度。显然其难以消除磁场非均匀性的影响,只获得了 7~11Hz 的分辨率谱。在一分钟时间内对于精氨酸的检测限为 35ng。Albert^[5]对 CE-NMR 联用系统最新进展进行了简洁的评述。

超临界流体色谱(SFC)和超临界流体萃取(SFE)是两种重要的分离方法。由于 SFC 和 SFE 一般是以超临界流体作为流动相,因此很容易从流出溶液中除去溶剂。这避免了一直困扰着 HPLC-NMR 联用中多重强溶剂峰的问题。由于超临界 CO_2 分离是在温度高于 31.3 ,压力大于 7.29MPa 条件下进行的,因此对探头的压力和温度有一定的要求。探头中检测线圈的形状与图 2 类似。Albert 等^[15,19]用其所建立的 SFC-NMR 联用系统研究发现:与液态相比,由于超临界态有较低的粘滞系数,因此 T_1 增加了 2~3 倍。实验中还发现随着压力的增加, ^1H NMR 峰会逐渐移向高场。Branmann 等^[20]则采用 SFE-NMR 联用技术成功地从粗咖啡中萃取出咖啡碱和三甘油酯。

6 展望

在线 HPLC-NMR 联用技术解决了医药、聚合物和生物医学不同领域的实际问题。连

续流动检测将 ^1H NMR 化学位移作为第二维; 停流检测可以用 2DNMR 技术进行结构分析。这类系统, 在基本上没有降低 NMR 谱质量的前提下, 比脱机分析至少节省了 40% 的时间。

HPLC-NMR 的特点不仅来自 HPLC 的高效分离能力和 NMR 精确的结构分析能力, 而且还在于巧妙而完美的联用技术。这种联用技术包括适当的接口技术, 其要兼顾 HPLC 和 NMR 各组成部分的性能和参数的最佳化, 从而使整个系统更为实用更为完美。通过优化连续流动探头的设计, 可进一步降低 NMR 的检测限; 通过脉冲梯度场相关的溶剂抑制技术, 可获得更好的抑制效果; 通过设计更合理的螺线式检测线圈的流动腔, NMR 信号的分辨率可望达到 0.5Hz 的水平。随着各种功能的日趋完善, 其应用范围将不断扩大, 从而进一步发挥其潜在能力和应用价值。可以预计在不久的将来, 在线 HPLC-NMR 联用系统将成为中等大小分子的各种有机化合物分离和分析的最有效手段之一。CE-NMR 将会逐渐进入实验室, 对于某些特殊需要的问题, 将采用 SFC-NMR 和 SFE-NMR 来解决。

参 考 文 献

- [1] Haw J F, Glass T E, Hausler, Moted E and Corn H C. Direct coupling of liquid chromatograph to a continuous flow hydrogen nuclear magnetic resonance detector for analysis of petroleum and synthetic fuels. *Anal. Chem.* 1980, 52: 1135 ~ 1140.
- [2] Korhammer S A, Bernreuther A. Hyphenation of high - performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic techniques (SFC, GPC, GC, CE) with nuclear magnetic resonance(NMR): A review. *Fresenius J. Annl. Chem.*, 1996, 354: 131 ~ 135.
- [3] Lindon J C, Nicholson J K, Wilson I D. The development and application of coupled HPLC-NMR spectroscopy. *Adv. Chromatogr.*, 1996, 36: 315 ~ 382.
- [4] Albert K. On- line use of NMR detection in separation chemistry. *J. Chromatogr.*, 1995, A 703: 123 ~ 147.
- [5] Albert K. Directon- line coupling of capillary electrophoresis and H- ^1H NMR spectroscopy. *Angew. Chem.*, 1995, 34: 641 ~ 642.
- [6] Griffiths L. Optimization of NMR and HPLC conditions for LC- NMR. *Anal. Chem.*, 1995, 67: 4091 ~ 4095.
- [7] Wu N, Peck T L, Webb A G, Magin R L, Sweedler J V. Nanoliter volume sample cells for H- ^1H NMR: Application to on- line detection in capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116: 7929 ~ 7930.
- [8] Olson D L, Peck T L, Webb A G, Magin R L, Sweedler J V. High- resolution microcoil H- ^1H NMR for mass- limited, nanoliter- volume samples. *Science*, 1995, 270: 1967 ~ 1970.
- [9] Wu N, Webb L, Peck T L, Sweedler J V. On- line NMR detection of amino acids and peptides in microbore LC. *Anal. Chem.*, 1995, 67: 3101 ~ 3107.
- [10] Duff D. Varian introduces new on- line, off- line LC- NMR accessory. *Magnetic Moments*, 1995, 7: 1.
- [11] Ogg R J, Kingsley P B, Taylor J S. WET, a T- ^1H - and B- ^1H - insensitive water- suppression method for in vivo localized H- ^1H NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1994, B104: 1 ~ 10.
- [12] Smallcombe S H, Patt S L, Keifer P A. WET solvent suppression and its application to LC- NMR and high- resolution NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 1995, A 117: 295 ~ 303.
- [13] Mccoy M A, Mueller L. Selective shaped pulse decoupling in NMR- homonuclear $< \text{C}-^{13}\text{C} >$ carbonyl decoupling.

J. Am. Chem. Soc., 1992, 114: 2108 ~ 2112.

- [14] Patt S L. Single- frequency- shifted and multiple- frequency- shifted laminar pulses. J. Magn. Reson., 1992, 96: 94 ~ 102.
- [15] Albert K, Braumann U, Streck R, Spraul M, Ecker R. Application of directon- line coupling of HPLC and SFC with ^1H NMR spectroscopy for the investigation of monomeric acrylates. Fresenius J. Anal. Chem., 1995, 352: 521 ~ 528.
- [16] Pursch M, Strehlschein S, Handel H, Albert K. Temperature- dependent behavior of C- 30 interphases. A solid- state NMR and LC- NMR study. Anal. Chem., 1996, 68: 386 ~ 393.
- [17] Wu N, Peck T L, Webb A G, Magin R L, Sweedler J V. Nanoliter volume sample cells for ^1H NMR: Application to on- line detection in capillary electrophoresis. J. Am. Chem. Soc., 1994, 116: 7929 ~ 7930.
- [18] Wu N A, Peck T L, Webb A G, Magin R L, Sweedler J V. ^1H - NMR spectroscopy on the nanoliter scale for static and on- line measurements. Anal. Chem., 1994, 66: 3849 ~ 3875.
- [19] Albert K, Braumann U, Tseng L H, Nicholson G, Bayer G. On- line coupling of supercritical fluid chromatography and proton high- field nuclear magnetic resonance spectroscopy. Anal. Chem., 1994, 66: 3042 ~ 3046.
- [20] Braumann U, Handel H, Albert K, Ecker R, Spraul M. On line monitoring of the supercritical fluid extraction process with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Anal. Chem., 1995, 67: 930 ~ 935.

Hyphenation of High- performance Liquid Chromatography with Nuclear Magnetic Resonance and its Applications

Chen Zhong Ke Enfeng

(The Laboratory of SEDC of Analytical Science for Material and life Chemistry)

(Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The direct on- line coupling between high performance liquid chromatography (HPLC) and proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is one of the most powerful techniques for simultaneous separation and structural elucidation of unknown compounds in mixtures. The resolution, detection limit and multiple solvent suppression of the ^1H NMR spectra obtained in HPLC- NMR are described. Recent advances in the hyphenation between other separation methods and NMR spectroscopy are discussed.

Key words High- performance liquid chromatography nuclear magnetic resonance sensitivity solvent peak suppression