

## 在自然丰度下的动力学揭秘：<sup>13</sup>C NMR 同位素效应实验

张文文, 张培超, 盖聪昊, 柴晓云, 邹燕, 赵庆杰\*

海军军医大学药理学系有机化学教研室, 军事药学实验教学示范中心, 上海 200433

**摘要:** 在化学反应动力学研究中, 动力学同位素效应(KIE)为深入理解化学反应路径和机制提供了关键信息。除了广泛应用的氢/氘同位素效应外, 碳原子以及质量更大一些原子的同位素效应也日益受到关注。值得一提的是, Singleton 于1995年提出了一种基于核磁共振(NMR)技术的高精度KIE (<sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C)测量方法, 为该领域带来了重要突破。该方法无需对化合物进行昂贵且复杂的同位素标记操作, 利用<sup>13</sup>C的自然丰度的样品结合高分辨率NMR实验, 能够直接测量<sup>12</sup>C和<sup>13</sup>C之间的KIE数值, 且具有极高的精度。本文将详细介绍这一方法的理论基础、实验步骤以及应用实例, 探讨其在化学反应机理和动力学研究中的重要意义与优势。

**关键词:** 动力学同位素效应(KIE); 核磁共振(NMR)技术; 自然丰度; <sup>13</sup>C NMR同位素效应实验; 化学反应机制  
**中图分类号:** G64; O6

## Unveiling Kinetics at Natural Abundance: <sup>13</sup>C NMR Isotope Effect Experiments

Wenwen Zhang, Peichao Zhang, Conghao Gai, Xiaoyun Chai, Yan Zou, Qingjie Zhao \*

National Demonstration Center for Experimental Military Pharmacy Education, Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China.

**Abstract:** In chemical reaction kinetics studies, kinetic isotope effects (KIE) provide critical information for understanding reaction pathways and mechanisms. While hydrogen/deuterium isotope effects have been extensively studied, increasing attention is being paid to isotope effects involving carbon and other heavier atoms. A significant breakthrough occurred in 1995 when Singleton developed a high-precision NMR-based method for measuring <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C KIE values. This innovative approach eliminates the need for expensive and complex isotope labeling procedures. By utilizing samples with natural <sup>13</sup>C abundance and high-resolution NMR spectroscopy, the method enables direct measurement of <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C KIE values with remarkable precision. This article comprehensively describes the theoretical foundations, experimental protocols, and practical applications of this method, emphasizing its importance and advantages in mechanistic and kinetic studies of chemical reactions.

**Key Words:** Kinetic isotope effect (KIE); Nuclear magnetic resonance (NMR) technology; Natural abundance; <sup>13</sup>C NMR isotope effect experiment; Chemical reaction mechanism

动力学同位素效应(KIE)是一种用于研究化学反应中动力学行为的核心工具<sup>[1]</sup>。传统的KIE测量方法通常依赖于同位素标记化合物, 如使用<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C或<sup>3</sup>H等稳定或放射性同位素。然而, 这些方法往往需要复杂的合成步骤来制备标记物, 且对于每个反应的研究都需要重新进行标记设计和测量, 过程繁琐且成本较高。相比之下, Singleton提出了一种创新技术, 即利用<sup>13</sup>C的自然丰度(1.1%)结合核

磁共振(NMR)技术,在无需同位素标记的情况下,能够实现高精度的 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  KIE测定<sup>[2]</sup>。这一技术极大地简化了实验流程,显著降低了研究成本,同时保持了极高的测量精度。

本文将深入探讨Singleton方法的理论基础与实验步骤,阐述其在化学研究中的广泛应用,分析其独特的优势和创新性,并展示其在化学教育和科研中的巨大潜力。

## 1 Singleton方法产生的时代背景

随着计算化学与实验手段的交叉应用日益成熟,科学家们对复杂反应机制和动力学的研究需求也在不断增加<sup>[3]</sup>。20世纪90年代中期,正值核磁共振(NMR)技术飞速发展、化学研究不断精细化的时期。彼时,传统的动力学同位素效应研究主要依赖于稳定或放射性同位素的标记,这些方法往往复杂、耗时且成本高昂<sup>[4]</sup>。因此,开发一种无需同位素标记却能实现高精度测量的技术,已成为科学研究领域的迫切需求。

核磁共振(NMR)技术因其对特定原子核的高灵敏度以及对分子结构和动力学的深入解析能力<sup>[5-7]</sup>,长期以来被广泛应用于有机化学和物理化学的研究,特别是高分辨率NMR技术的应用,为精确检测 $^{13}\text{C}$ 自然丰度提供了新的可能性。在这种时代背景下,Singleton的突破性方法应运而生。他利用 $^{13}\text{C}$ 自然丰度结合NMR技术,在无需同位素标记的情况下,实现了高精度的 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 同位素效应测定。该方法不仅大幅简化了实验步骤,显著降低了研究成本,还为化学反应机理和动力学研究开辟了新的途径。这一技术的诞生,不仅体现了科学仪器和实验方法的进步,更回应了当时化学领域对高效、经济且精确测量技术的迫切需求,成为化学动力学研究中的重要创新<sup>[8-10]</sup>。

## 2 实验步骤

Singleton的方法基于以下核心原理:在化学反应过程中,由于同位素效应( $^{13}\text{C}$ 核的质量略大于 $^{12}\text{C}$ 核,导致它们对应化学键的振动频率和能量存在差异),含有 $^{13}\text{C}$ 的化合物往往会比含有 $^{12}\text{C}$ 的化合物反应更慢。虽然 $^{13}\text{C}$ 的自然丰度仅约为1.1%,但Singleton开发的高精度 $^{13}\text{C}$  NMR技术能够通过适当的脉冲序列以及信号累积来增强检测能力,从而有效克服噪声。同时,该技术可以精确测量反应过程中不同时间点的反应物或产物的 $^{13}\text{C}$ 化学位移和信号强度变化。通过比较反应速率的差异,进而推导出 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 的动力学同位素效应。

例如,1995年,Singleton首次以异戊二烯与马来酸酐的Diels-Alder反应为例,使用异戊二烯中的甲基基团作为“内标”,随着反应的进行,未反应异戊二烯中 $^{13}\text{C}$ 的比例逐渐增加<sup>[2]</sup>。通过高精度 $^{13}\text{C}$  NMR实验测定高转化率时未反应原料与起始原料的峰面积比(即 $R/R_0$ ),并结合反应转化率( $F$ ),利用下述方程式(1)计算出 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 的动力学同位素效应(KIE)数值:

$$\text{KIE} = \frac{\ln(1 - F)}{\ln[(1 - F)R / R_0]} \quad (1)$$

其中, $F$ 代表起始原料的转化率, $R$ 和 $R_0$ 分别表示高转化率时未反应原料和起始原料中某个碳原子的NMR信号峰面积与内标碳原子的NMR信号峰面积的比值。

具体来说, $R$ 是高转化率时未反应原料中目标碳原子的NMR信号峰面积与内标碳原子的NMR信号峰面积的比值,而 $R_0$ 是起始原料中目标碳原子的NMR信号峰面积与内标碳原子的NMR信号峰面积的比值。通过比较 $R$ 和 $R_0$ 的变化( $R/R_0$ ),可以反映出反应过程中同位素效应的变化情况。

## 3 Singleton方法的理论基础

### 3.1 确定反应体系

为了验证 $^{13}\text{C}$ 自然丰度核磁共振技术的有效性,Singleton于1995年以异戊二烯与马来酸酐的Diels-Alder反应为实例<sup>[11]</sup>,选择异戊二烯中的甲基基团作为“内标”,并假设其同位素组成在反应过程中保持不变(图1)。

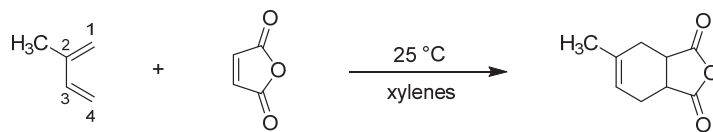


图1 异戊二烯与马来酸酐的Diels-Alder反应

### 3.2 确定反应转化率

为了精确测定反应转化率( $F$ ), 在反应混合物中加入已知量的1,3,5-三甲氧基苯(1,3,5-trimethoxybenzene, TMB)作为 $^1\text{H}$  NMR内标。TMB的化学位移( $\delta$  6.1, 单峰)与反应物和产物的信号无重叠, 且其稳定性高, 适合作为定量分析的参考。通过比较反应物(异戊二烯)与内标的信号积分面积, 计算反应转化率。实验结果表明, 转化率的测定精度可达到 $\pm 0.5\%$ , 确保了后续KIE计算的可靠性。

### 3.3 起始原料的提纯与制备

对粗反应体系进行分离纯化, 回收反应原料, 并制备其相应的高浓度 $^{13}\text{C}$  NMR样品(约 $300\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

### 3.4 NMR数据采集与处理

使用高精度NMR技术对反应体系中的碳同位素丰度进行定量分析(通常在600 MHz下进行长时间采集)。平行多组实验以减少误差, 确保测量结果的准确性和可靠性。

### 3.5 KIE计算

结果显示, 随着反应的进行, 异戊二烯1位和4位的 $^{13}\text{C}$ 相对比例逐渐增加(图2a)。即当反应转化率为98.9%时, 应用公式(1)可以计算出各位置碳的动力学同位素效应, 结果如图2b所示。其中, 动力学同位素效应(KIE)反映了 $^{12}\text{C}$ 与 $^{13}\text{C}$ 在反应速率上的差异。当某个碳原子显示出显著的 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  KIE (通常 $\text{KIE} > 1.02$ )时, 表明该碳原子在反应决速步中直接参与了化学键的形成或断裂。这是因为 $^{13}\text{C}$ 与 $^{12}\text{C}$ 的质量差异会导致化学键的振动频率和零点能发生变化, 从而影响反应过渡态的能量和反应速率。因此, KIE数值的大小和分布为反应机理的推断提供了重要依据。

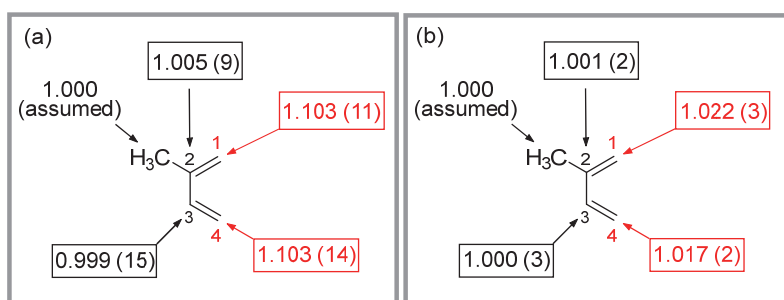


图2 (a) 当反应转化率为98.9%时, 回收的异戊二烯相较于起始异戊二烯的 $^{13}\text{C}$ 同位素组成比值, 括号内为标准差; (b) 根据(a)中的结果和方程式(1)计算得到的 $^{13}\text{C}$ 动力学同位素效应

## 4 Singleton方法的应用

利用Singleton的 $^{13}\text{C}$ 自然丰度核磁共振技术, 不仅可以通过测定高转化率时未反应原料与起始原料的峰面积比来计算 $^{13}\text{C}$ 动力学同位素效应, 还可以通过测量低转化率和完全转化时产物的峰面积比来获得相应的数值。例如, 2023年, 游书力小组在研究Rh(I)催化的不对称C-H芳基化构建平面手性二茂铁的反应机理过程中, 结合理论计算、其他机理实验以及 $^{13}\text{C}$  KIE实验这一有力工具, 深入剖析了反应机理及催化循环中的每个基元步骤, 明确了还原消除步骤很可能是该反应的速率决定步骤<sup>[9]</sup>(图3)。

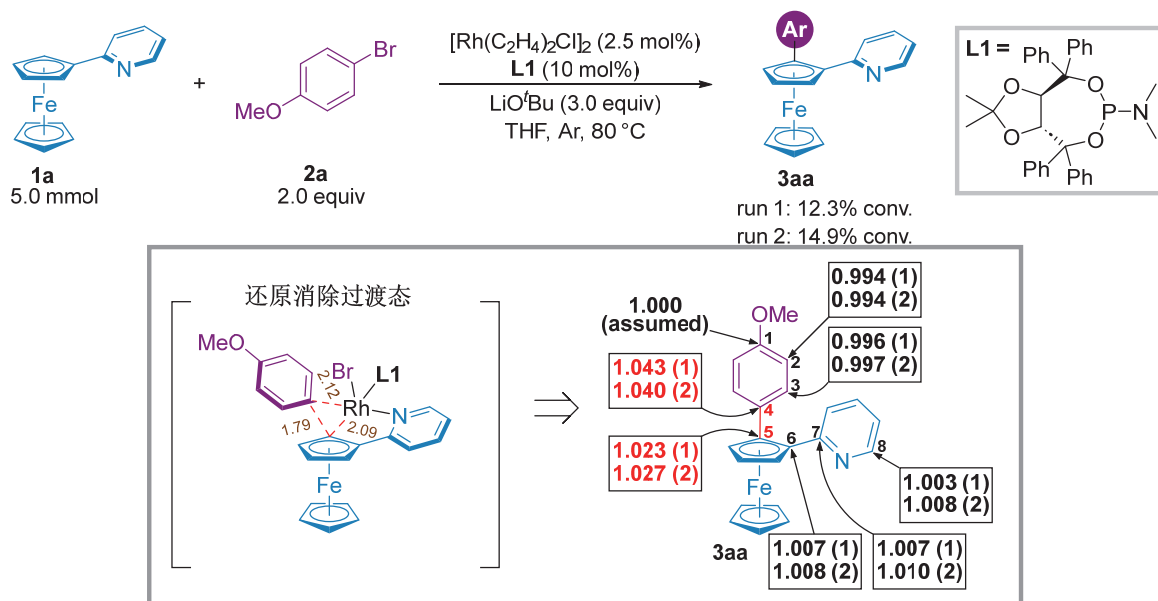


图3 二茂铁吡啶与对甲氧基溴苯的氧化偶联反应

作者以二茂铁吡啶与对甲氧基溴苯的氧化偶联反应为例(图2), 通过<sup>1</sup>H NMR实验分析粗反应混合物来精确测定反应的转化率(使用1,3,5-三甲氧基苯作为内标)。随后, 利用快速柱层析法对粗反应混合物进行纯化, 成功分离出目标产物。接着, 通过定量<sup>13</sup>C NMR实验测定反应在低转化率(两组平行实验:  $F=12.3\%$ 或 $14.9\%$ )和完全转化时产物的峰面积, 并结合反应转化率( $F$ ), 利用以下方程(2)计算出自然丰度条件下的<sup>13</sup>C动力学同位素效应(KIE):

$$\text{KIE} = \frac{\ln(1 - F)}{\ln \left[ 1 - F \left( \frac{R}{R_0} \right) \right]} \quad (2)$$

其中,  $F$ 代表起始原料的转化率,  $R$ 和 $R_0$ 分别表示反应在低转化率和完全转化时产物中碳的峰面积比例。每个样品在600 MHz的谱仪(JEOL JNM-ECZ 600R/S1)上按照Singleton方法进行<sup>13</sup>C NMR分析(采集时间约为18.5 h)。

实验结果显示, 产物中新形成的C—C键的两个碳原子C4-和C5-位均观察到显著的KIE效应(C4约为1.04, C5约为1.02), 这表明还原消除步骤可能是该反应的速率决定步骤。

## 5 Singleton方法的影响与意义

Singleton的方法为化学反应机理和动力学研究领域带来了深远的影响, 其重要性体现在以下几个方面:

(1) 简化实验流程。Singleton的方法省去了昂贵的同位素标记步骤, 特别是针对难以标记或难以合成同位素标记物的复杂体系, 研究人员可以在标准实验条件下直接测量自然丰度下的KIE数值, 显著减少了传统方法所需的化学试剂消耗。

(2) 提高精度, 推动化学反应机理研究。通过长时间采集高分辨率的NMR数据, 可以显著减少误差, 从而精确测量<sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C的同位素效应, 这不仅可以帮助研究人员更深入地理解化学反应的机理, 还能更准确地预测和解释化学反应的行为。

(3) 广泛适用性。Singleton的方法不仅适用于小分子反应, 还可以广泛应用于生物大分子、复杂天然产物以及有机合成中复杂反应的研究<sup>[12-14]</sup>。这种方法的灵活性大大扩展了自然丰度下<sup>13</sup>C KIE实验的应用潜力。

## 6 结语

Singleton提出的基于 $^{13}\text{C}$ 自然丰度的核磁共振技术, 不仅展示了其同位素效应测量中的高精度性和高效性, 还凸显了其在化学反应动力学研究中的重要应用。通过这一创新方法, 研究人员能够更深入地理解化学反应机理、优化实验设计, 并为催化研究、药物开发及其他相关领域提供宝贵的理论基础和实用工具。

总体而言, 自然丰度下的 $^{13}\text{C}$  NMR同位素效应实验不仅为化学教育提供了优质的教学资源, 还为科研工作带来了强大的研究手段。随着该技术的不断发展和广泛应用, 它将在化学教育和科研中发挥愈加重要的作用, 并推动化学科学的不断进步与创新。

## 参 考 文 献

- [1] Bigeleisen, J.; Mayer, M. G. *J. Chem. Phys.* **1947**, *15*, 261.
- [2] Singleton, D. A.; Thomas, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9357.
- [3] Blake, E. Z. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90*, 665.
- [4] 范如霖. 稳定同位素标记有机合成法. 北京: 化学工业出版社, 1986: 1–343.
- [5] Robert, M. S.; Francis, X. W.; David, J. K. 有机化合物的波谱解析. 药康德新药业有限公司分析部, 译. 上海: 华东理工大学出版社, 2017: 125–256.
- [6] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学. 第4版. 北京: 科学出版社, 2018: 1–475.
- [7] Kibrik, E. J.; Steinhof, O.; Scherr, G.; Thiel, W. R.; Hasse, H. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 12602.
- [8] DelMonte, A. J.; Haller, J.; Houk, K. N.; Sharpless, K. B.; Singleton, D. A.; Strassner, T.; Thomas, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9907.
- [9] Liu, C.-X.; Xie, P.-P.; Zhao, F.; Wang, Q.; Feng, Z.; Wang, H.; Zheng, C.; You, S.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 4765.
- [10] Zheng, Y.; Zhang, W.-Y.; Gu, Q.; Zheng, C.; You, S.-L. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1094.
- [11] Diels, O.; Alder, K. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98.
- [12] Izzo, J. A.; Poulsen, P. H.; Intrator, J. A.; Jørgensen, K. A.; Veticatt, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 4765.
- [13] Wambua, V.; Hirschi, J. S.; Veticatt, M. J. *ACS Catal.* **2021**, *11*, 60.
- [14] Hong, F.; Aldhous, T. P.; Kemmitt, P. D.; Bower, J. F. *Nat. Chem.* **2024**, *16*, 1125.