

## Application Note 21

# 利用台式核磁共振波谱法 进行药物结构解析——布洛芬

## 引言

核磁共振 (NMR) 波谱的主要用途之一是对未知化合物进行结构解析, 并对已知化合物进行结构确认。

本应用笔记分析了使用牛津仪器宽带台式核磁共振波谱仪 X-Pulse 获得的一系列一维和二维 NMR 波谱, 显示了如何通过 NMR 波谱获得的信息与已知分子的结构特征相对应。在本案例中, 我们选择了布洛芬分子, 在  $\text{CDCl}_3$  溶液中的浓度为 1 mol/L, 并记录下它的波谱。

## 布洛芬

布洛芬, 2-(4-(2-甲基丙基)苯基)丙酸, 是一种常用于治疗疼痛、发烧和炎症的抗炎药。布洛芬最初于 1961 年由在英国诺丁汉 Boots UK 公司工作的 Stewart Adams 博士和 John Nicholson 博士发现。布洛芬已被列入世界卫生组织的基本药物清单, 在全球范围内无需处方即可获得。之所以选择它作为例子, 是因为它在分子量和结构复杂性方面与广泛的常用生产药物相似, 这些药物易于通过台式核磁共振谱仪进行分析。

布洛芬的分子结构如图 1 所示。其中可以清楚地识别出八种独特的质子化学环境 (1、3、4、6、7、9-11) 和十种独特的碳环境 (2-11)。

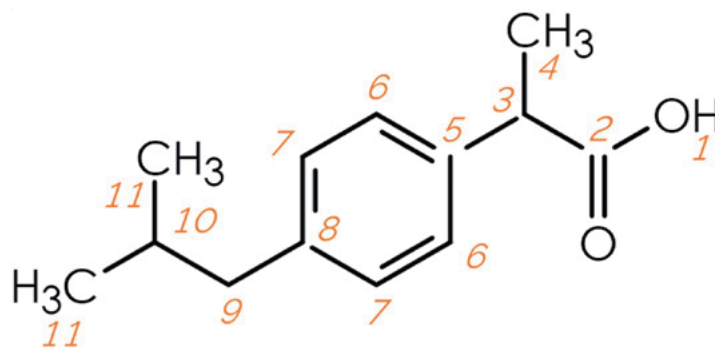


图 1 布洛芬的分子结构

## 结构测定

### 一维核磁共振波谱

简单的一维核磁共振谱,需要激发单独一种同位素原子核,从而专门获得有关这些原子的信息。这会产生信号强度对应频率的波谱。化学位移( $\delta$ )绘制在水平轴上,单位为ppm(百万分之一)。以ppm而不是赫兹(Hz)为单位绘制化学位移图,可确保不同波谱仪测量的数据之间具有可比性。

### 质子( $^1\text{H}$ )核磁共振

大多数已知或未知样品的第一个核磁共振谱,通常会是一个简单的质子(氢-1)核磁共振谱。对于大多数样品来说,仪器可以在5分钟内获得满足结构分析要求的氢谱。布洛芬的 $^1\text{H}$  NMR波谱如图2所示。

核磁共振谱图中的信号包括一个或多个单独的峰。例如, $\delta_{\text{H}}$  11.9 ppm处的信号是一个单峰,而以 $\delta_{\text{H}}$  3.7 ppm为中心的信号包括四个峰(通常称为四重峰)。对于 $^1\text{H}$  NMR谱图中的每个信号,应考虑三个特征要素:

- 1 谱图中信号的化学位移  $\delta_{\text{H}}$ , 对应于产生信号的原子核的局部化学环境。
- 2 每个信号的(积分)面积,对应于与每个信号相关的原子核个数。图2中每个信号下方以绿色来显示积分值。
- 3 信号的多重性,包括信号中的峰数、它们的相对强度和各峰之间的间隔,提供了附近其它核磁共振活性核的信息。

在最初仅考虑信号的化学位移和积分面积,可以进行如下初始归属:

- 一个羧酸质子。
- 四个芳香质子。
- 其余五个信号,来自十三个脂肪族质子。

由于布洛芬中只有一个羧酸质子,1可以指认为 $\delta_{\text{H}}$  11.9 ppm的信号。以 $\delta_{\text{H}}$  7.2 ppm为中心的四个芳香族质子的信号可归属于质子6和7<sup>1</sup>。

为了进一步指定五种烷基信号,应在考虑其积分值和化学位移的同时分析其多重性。

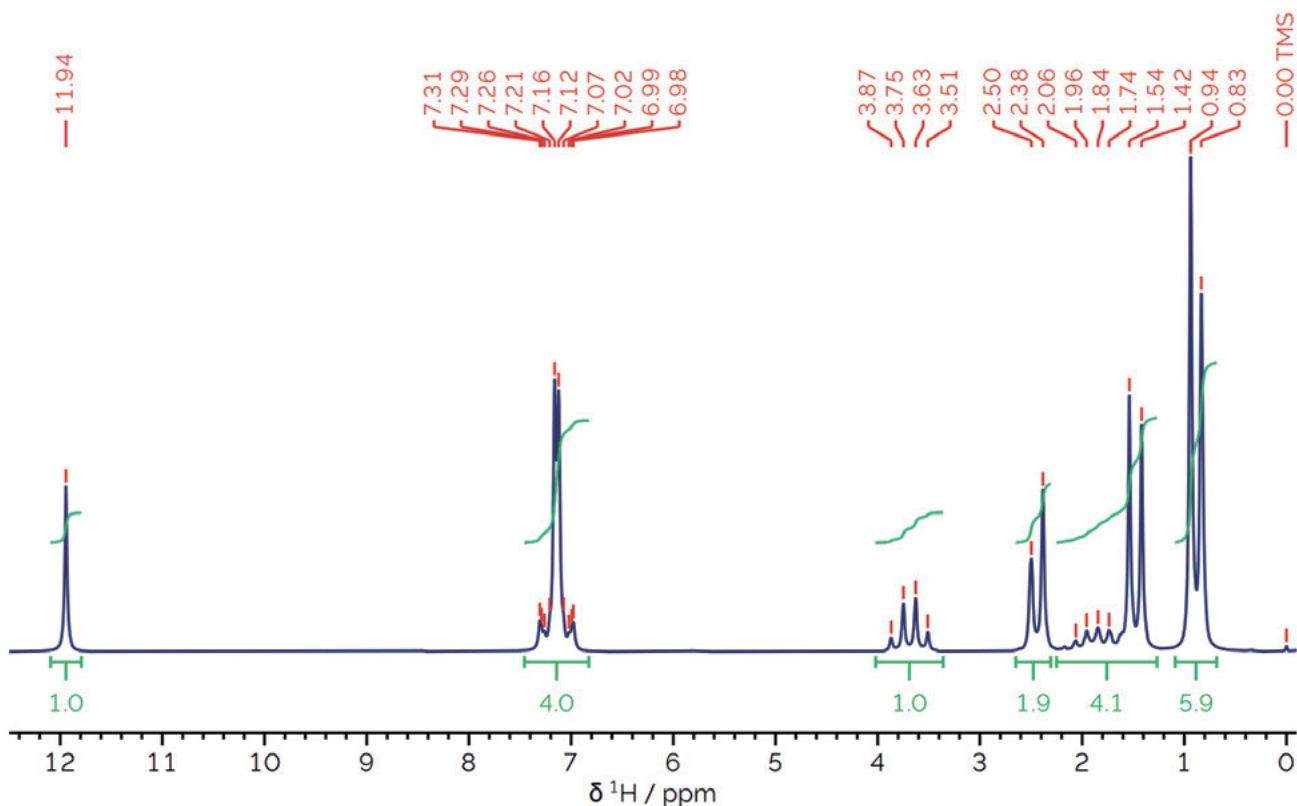


图2 布洛芬在 $\text{CDCl}_3$ 中的 $^1\text{H}$  NMR谱图

<sup>1</sup>该信号的多重性与对位取代芳香环一致,但对此的解释超出了本应用笔记的讨论范畴。

在简单的情况下,组成  $^1\text{H}$  核磁共振信号的峰数,与相邻碳原子连接的质子数相关。因此,可以对剩余五个未归属信号进行如下推论。

$\delta_{\text{H}}$  3.7 ppm 处的信号由四个峰组成,并且积分为一个质子,这意味着一个 CH 基团与  $\text{CH}_3$  基团相邻。布洛芬中唯一与此相一致的质子是 3 号。

$\delta_{\text{H}}$  2.4、1.5 和 0.9 ppm 处有三个信号,每个信号由两个峰(双峰)组成,表明它们紧邻一个 CH 基团。 $\delta_{\text{H}}$  0.9 ppm 处的信号积分为六个质子,表明两个  $\text{CH}_3$  基团,而两个甲基基团 11,是布洛芬中唯一可能的质子。 $\delta_{\text{H}}$  2.4 ppm 处的信号积分为两个质子,因此对应于与 CH 相连的  $\text{CH}_2$  基团,与布洛芬的 9 相一致。 $\delta_{\text{H}}$  1.5 ppm 处的剩余双重峰与  $\delta_{\text{H}}$  1.9 ppm 处的多重峰(意味着具有复杂多重性的信号)重叠。对积分进行仔细检查,可以确定该双重峰对应于三个质子,因此是与布洛芬中的 3 位 CH 相连的  $\text{CH}_3$  的信号。

通过排除过程, $\delta_{\text{H}}$  1.9 ppm 处的多重峰可归属于 10 位 CH 基团。该信号与两个  $\text{CH}_3$  和一个  $\text{CH}_2$  基团相连,可以解释这种复杂的耦合裂分模式。

虽然在这个案例中不需要指认质子核磁共振谱,但是从  $^1\text{H}$  核磁共振谱中可以获得额外信息,以帮助归属信号。

当原子核之间发生耦合,导致在核磁共振波谱中观察到多重峰时,可以通过多重峰中各峰间的分离距离来测量耦合的大小(以 Hz 为单位)。由于耦合是一个常数,因此无论选择哪一对信号,都将测量到相同的值。这可以应用于核磁共振波谱中直接耦合的信号配对。例如, $\delta_{\text{H}}$  3.7 ppm 的四重峰被认为 3,其耦合常数  $^3J_{\text{HH}}$  为 7.1 Hz,而  $\delta_{\text{H}}$  2.4、1.5 和 0.9 ppm 的双重峰的耦合常数分别为  $^3J_{\text{HH}}$  6.7、7.2 和 6.3 Hz,这表明  $\delta_{\text{H}}$  3.7 ppm 的信号与  $\delta_{\text{H}}$  1.5 ppm 的信号相互耦合(已被指定为 4)<sup>2</sup>。使用二维波谱可以避免这种可能耗时的测量和耦合配对过程,从而帮助谱峰归属。详见后文  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 波谱内容。

### 碳-13 核磁共振

质子是一个高旋磁比的原子核,天然丰度接近 100%,是核磁共振波谱中“最好的”原子核。相比之下,碳的情况更为复杂。碳最丰富的同位素碳-12是没有核磁共振活性的。相反,碳核磁共振谱是测量碳-13的,但它只有 1.1% 的天然丰度,并且比质子的旋磁比低。由于碳-13只有质子可接受性的 1/5870,因此需要更高的样品浓度和更长的测量时间。

碳-13核磁共振波谱如图 3 所示。碳谱看起来似乎比质子波谱简单,所有信号都显示为单个尖峰。这是因为所有的碳-质子耦合都通过质子去耦被去除了。

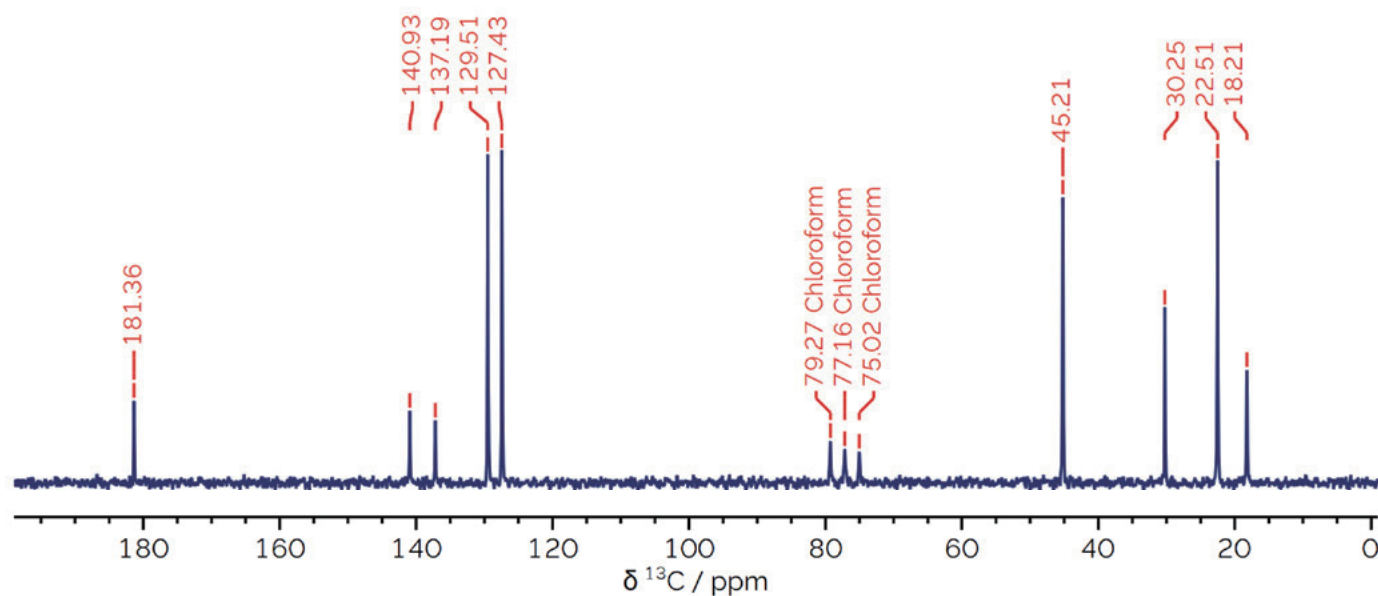


图 3  $\text{CDCl}_3$  中布洛芬的  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR 谱

<sup>2</sup>耦合的大小也可以提供有关原子核相对位置的信息;然而,在布洛芬中没有合适的例子,这也超出了本应用笔记的讨论范畴。

该谱被称为质子去耦碳-13 核磁共振谱, 简化为  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR 波谱<sup>3</sup>。

然而, 如前所述, 布洛芬中有十种化学上独特的碳环境, 但是其核磁共振谱图中仅观察到九种信号, 表明两个信号重叠成为了一个单峰。如果这是一个质子核磁共振谱, 通过评估峰的积分面积, 可以很容易地识别任何重叠信号。但是质子去耦碳-13 核磁共振波谱是一个例外, 即峰 (信号) 的积分直接对应于产生该信号的原子核数目这一规则并不适用<sup>4</sup>。从  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  核磁共振谱的信号强度可以推断出一些信息。一般来说, 不直接与任何质子结合的碳原子 (季碳) 的信号强度, 远低于直接与一个或多个质子结合的碳原子信号。

$\delta_{\text{C}}$  181.4、140.9 和 137.2 ppm 的信号, 以及氘代氯仿溶剂产生的信号 (1:1:1 三重峰) 都可以观察到这一点。

通过考虑这些碳信号的化学位移, 可以将  $\delta_{\text{C}}$  181.4 ppm 处的信号指认为羰基, 从而归属为羧酸碳 2。

而  $\delta_{\text{C}}$  140.9 和 137.2 ppm 处的信号与芳香碳一致, 因此归属为季碳 5 和 8。

在芳香区的  $\delta_{\text{C}}$  129.5 和 127.4 ppm 位置, 两个更强的信号可被指认为芳香 CH 碳 6 和 7。

碳-13 核磁共振谱中的其余四个信号与烷基  $\text{CH}_x$  碳一致, 化学位移较低的信号可能对应末端甲基  $\text{CH}_3$  基团。这些信号的彻底归属还需要其他额外的信息, 而这些信息无法从简单的一维  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  核磁共振谱中获得。



<sup>3</sup>由于碳-13 的天然丰度很低, 因此通常不会观察到碳-碳耦合, 并且相应信号比较弱。

<sup>4</sup>可以获得适于积分的碳-13 波谱, 但这需要采用非标准序列, 并且需要使用更长的实验时间。

## 二维核磁共振波谱

到目前为止,只考虑了简单的一维核磁共振谱。然而,核磁共振波谱学的一大优势是可以使用种类多样的不同脉冲序列,从而获得不同的波谱。一类重要的脉冲序列是给出二维相关谱。这些情况下,可以通过检测到的交叉峰,对应相应一维波谱中观察到的信号之间的相互作用(例如通过  $J$  耦合)。以下示例演示了引入第二维度如何解决重叠带来的复杂问题,并显著简化了归属过程,实现了复杂分子的快速识别。

## $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 相关谱

质子-质子相关谱 (COSY) 是要考虑的第二个二维谱,以布洛芬为例,如图 4 所示。

注意,在  $x$  和  $y$  轴上,显示了前面讨论的简单质子谱。实际的二维波谱由图 4 中红色的交叉峰组成。

作为同核相关谱, COSY 谱沿对角线对称,信号直接耦合时出现非对角线交叉峰。通常,对于在一维谱中观察到  $J$  耦合的信号对,将会在 COSY 谱中观察到交叉峰。

在布洛芬案例中, 4- $\text{CH}_3$  和 3- $\text{CH}$  可在 COSY 谱中观察到交叉峰。另外,在 9- $\text{CH}_2$ 、10- $\text{CH}$  和 11- $\text{CH}_3$  三个信号之间可以观察到交叉峰。这也是一个很好的例子,说明在一维谱中不能分辨的  $J$  耦合,或可在二维 COSY 谱中看到交叉峰,如 9- $\text{CH}_2$  和 11- $\text{CH}_3$  之间的四键相互作用。

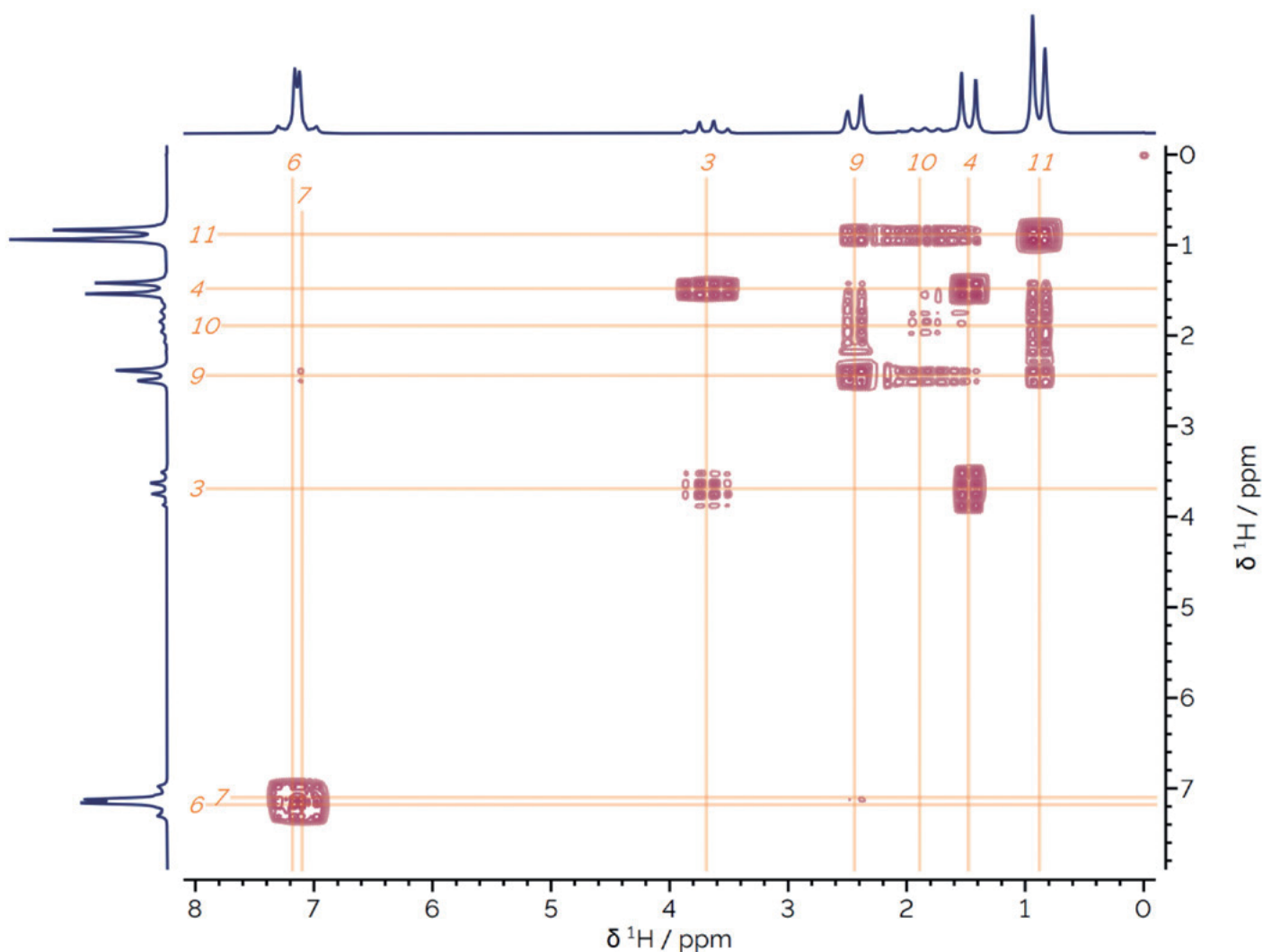


图 4  $\text{CDCl}_3$  中布洛芬的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  梯度选择性相关 NMR 谱图

## $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 相关谱

除了像 COSY 这样的质子-质子相关实验外,观测质子-碳相关的脉冲序列也有助于信号的归属过程。最常用的两种是,允许观察质子-碳单键关联的且带多线编辑的异核单量子相干序列 (HSQC-ME),以及允许观察质子-碳长程关联的异核多键相干序列 (HMBC)。

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-ME 和  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC 波谱 (图 5 和图 6)均在水平方向显示质子谱,而在垂直方向显示碳谱。图 5 中布洛芬 HSQC-ME 波谱的交叉峰对应于质子-碳单键相关。

该波谱还经过多线编辑,提供了  $\text{CH}_x$  环境多重性的信息。 $\text{CH}$  和  $\text{CH}_3$  以正相位的交叉峰显示 (图 5 中为红色), $\text{CH}_2$  则以负相位的交叉峰呈现 (图 5 中为蓝色)。

从 HSQC-ME 谱中应该注意到的第一件事是,它解释了为什么预期的十个碳信号,在一维  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  谱中只能观察到九个信号。 $\delta_{\text{C}}$  45.2 ppm 处的信号与两个质子信号相关:3-CH ( $\delta_{\text{H}}$  3.69 ppm) 和 9- $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.44 ppm),证实了直接连接到芳香环的两个碳原子,具有极为相近的  $^{13}\text{C}$  化学位移。

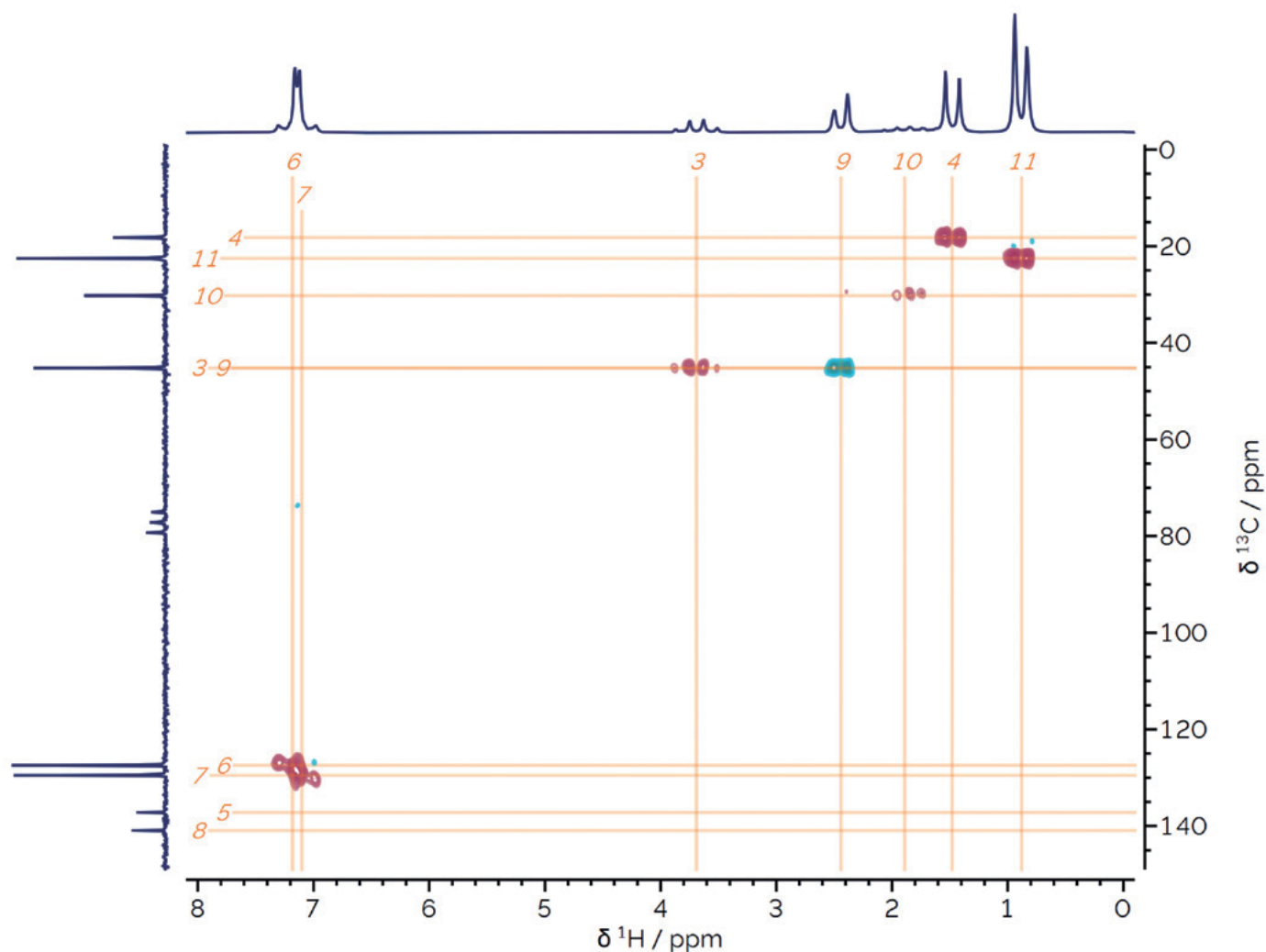


图 5  $\text{CDCl}_3$  中布洛芬的  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  梯度选择性且带多线编辑的异核单量子相干 NMR 波谱

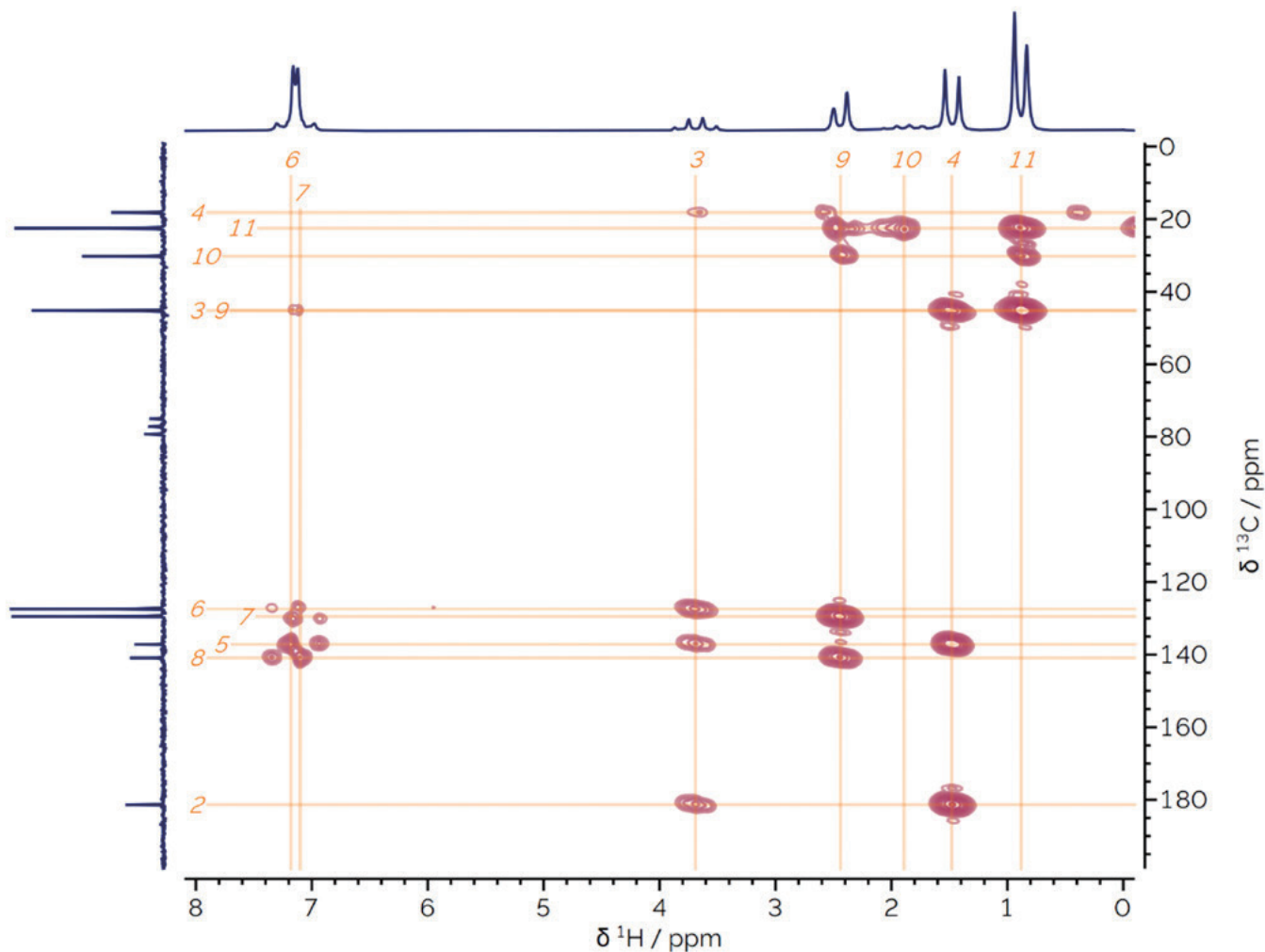


图 6 CDCl<sub>3</sub> 中布洛芬的 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 梯度选择性异核多键相关核磁共振波谱

布洛芬的 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC 波谱如图 6 所示。观察到的交叉峰对应于两键或三键的质子-碳关联。HMBC 谱让布洛芬的完整结构归属/解析得以实现。

例如，在  $\delta_{\text{H}}$  3.69 ppm 处的 3-CH 信号，与  $\delta_{\text{C}}$  127.4 ppm 处的芳香族 CH 和  $\delta_{\text{C}}$  137.2 ppm 处的芳香族季碳相关，可以分别确定这些信号的来源为 6 和 5。通过对所有信号的系统分析，可以推断碳链的连接，并完成全谱归属/结构解析。

### 其它二维相关谱

COSY、HSQC 和 HMBC 实验有助于 NMR 谱图的归属和化合物的解析，但它们并不是 X-Pulse 上仅有的二维脉冲序列。总相关谱 (TOCSY) 序列不仅可以观察 COSY 谱中可见的直接质子-质子耦合，还可以观察到通过自旋体系的间接质子-质子耦合。相关内容在我们的应用笔记“自旋锁定：总相关谱 (TOCSY)”中进行了详细介绍和讨论。

核 Overhauser 增强谱 (NOESY) 可以显示出源自空间相互作用产生的交叉峰<sup>5</sup>，并可据此确定分子的三维结构。

<sup>5</sup>不是 COSY、TOCSY、HSQC 和 HMBC 观察到的通过化学键的相互作用。

## 布洛芬谱图归属

通过分析所有这些波谱,可以在一维谱中实现信号的完全指认。  
布洛芬的质子和碳-13核磁共振谱的完整归属如下。

$\delta_H$  (60 MHz, 40°C,  $CDCl_3$ ): 11.94 (1H, s, 1-OH), 7.46 – 6.83 (4H, m, 6,7- $C_6H_4$ ), 3.69 (1H, q,  $^3J_{HH}$  7.1, 3-CH), 2.44 (2H, d,  $^3J_{HH}$  6.7, 9- $CH_2$ ), 1.89 (1H, qt,  $^3J_{HH}$  6.7,  $^3J_{HH}$  6.3, 10-CH), 1.48 (3H, d,  $^3J_{HH}$  7.2, 4- $CH_3$ ), 0.88 (6H, d,  $^3J_{HH}$  6.3, 11- $CH_3$ ).

$\delta_C$  (15 MHz, 40°C,  $CDCl_3$ ): 181.36 (1C, s, 2-C=O), 140.93 (1C, s, 8-CH), 137.19 (1C, s, 5-CH), 129.51 (2C, s, 7-CH), 127.43 (2C, s, 6-CH), 45.21 (2C, s, 3-CH & 9- $CH_2$ ), 30.25 (1C, s, 10-CH), 22.51 (2C, s, 11- $CH_3$ ), 18.21 (1C, s, 4- $CH_3$ ).

## 总结

利用牛津仪器 X-Pulse 宽带台式核磁共振波谱仪,通过一系列一维和二维质子以及碳-13核磁共振脉冲序列,可以对多种小分子进行完整的结构归属/解析。当 X-Pulse 与 X-Auto 自动进样器结合使用时,对文中所有演示实验可实现一次性多达 25 个样品的自动信号采集。



If you have any questions  
about this application note,  
please contact our experts:  
[info.china@oxinst.cn](mailto:info.china@oxinst.cn)

Visit [nmr.oxinst.cn](http://nmr.oxinst.cn)

Hotline 400 678 0609

© Oxford Instruments Industrial Products Ltd trading as Oxford Instruments Magnetic Resonance, 2022. All rights reserved. Do not reproduce without permission. Part no: MR/244/0622

