

NMR在混合物解析中的應用



Solution & Marketing Division
Application Support Team
Yueqi Ye



內容介紹

- NMR在解析反應中間體時的應用（液態NMR）
 - 胺類化合物合成路徑的解析（DOSY法 MICCS法）
 - 格氏反應（Grignard Reaction）中間體的結構解析（MICCS法）
- NMR在混合樣品解析時的應用（固態NMR）
 - 市販藥品的分離分析（ROSY法）



NMR用樣品管



液體NMR用樣品管
體積500-600 μ l (5 mm)
樣品溶解在氫代溶劑中
注意樣品濃度的均一



固體NMR用樣品管
體積40-170 μ l
直接裝入樣品
注意裝樣後的樣品管平衡



NMR的應用

- 穩定，高純度樣品
 - 利用1D, 2D等進行分子結構解析
 - 有機化學分析等

BUT

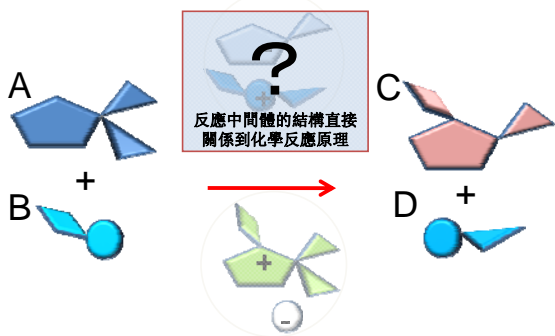
混合樣品時???

不穩定樣品時???

內容介紹

- NMR在解析反應中間體時的應用（液體NMR）
 - 胺類化合物合成路徑的解析（DOSY法 MICCS法）
 - 格氏反應（Grignard Reaction）中間體的結構解析（MICCS法）
- NMR在混合樣品解析時的應用（固態NMR）
 - 市販藥品的分離分析（ROSY法）

反應中間體的重要性



化學反應的確認

反應中

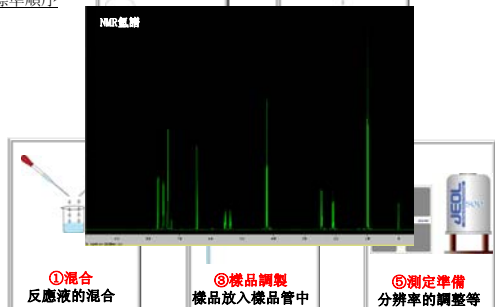
- TLC : 反應過程的確認
- GC : 反應過程的確認, 產物的簡單辨別
- GC/MS : 產物與副產物的確認
- LC : 反應過程的確認, 產物的簡單辨別
- LC/MS : 產物與副產物的確認

反應後

- GC/MS : 反應過程的確認, 產物的簡單辨別
- LC/MS : 反應過程的確認, 產物的簡單辨別
- IR : 產物的結構確認
- NMR : 產物的結構解析

NMR測定的順序

NMR的標準順序



標準NMR測定的問題點

1. 需要分離提純
→ 對一些不穩定, 且不易分離提純的樣品比較困難
2. 從反應到測定所需的手續過長
→ 無法確定壽命短的反應中間體結構



解決方法

問題點：無法確定壽命短的反應中間體結構

↓

解決方法1：中途停止反應

↓

新的問題點：樣品是混合物

↓

DOSY法

JEOL RESONANCE

解決法②

問題點：無法確定壽命短的反應中間體結構

↓

解決方法2：在NMR中直接觀察反應

↓

新的問題點：反應效率不高
分辨率降低

↓

MICCS-NMR法

JEOL RESONANCE

解決方法1

DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) (擴散排序譜)

利用混合物中各成分的自擴散係數的不同進行分離

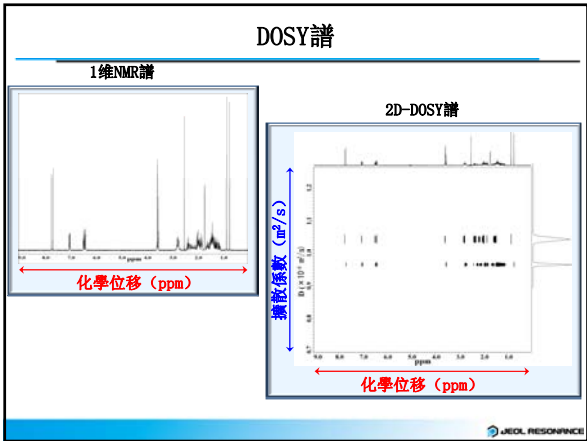
標準配置

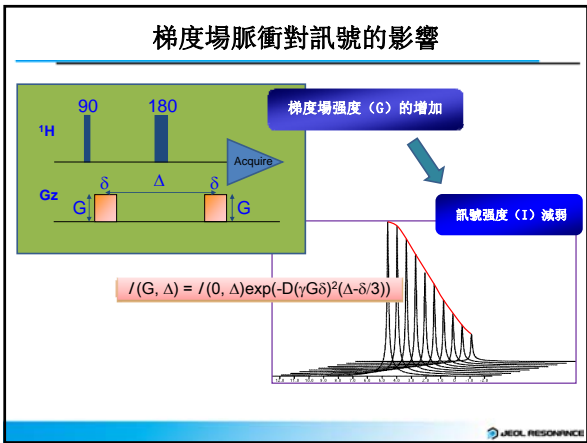
- ◆ 高精度梯度場脈衝 (幾乎所有NMR裝置中都配置)
- ◆ 逆拉普拉斯變化處理程序

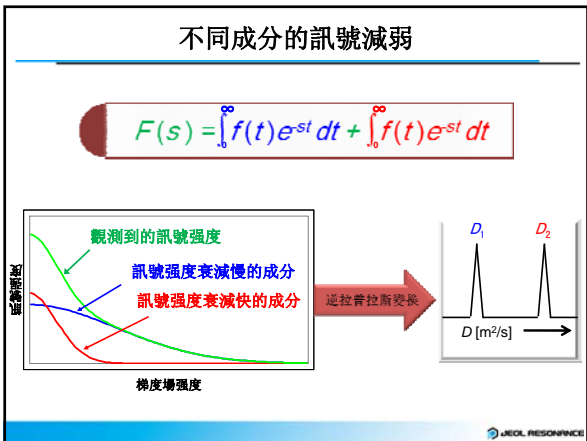
優化配置

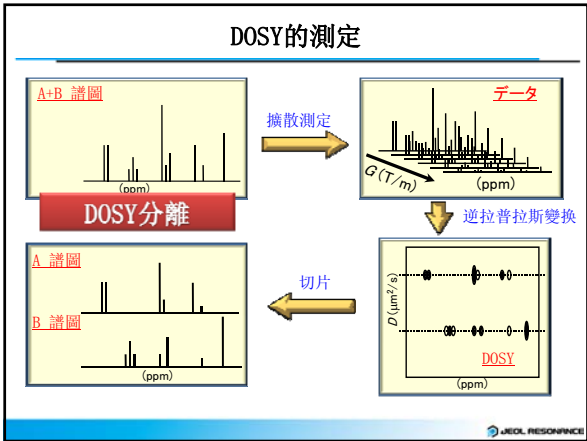
- ◆ 高精度梯度場控制元件
- ◆ 高能梯度場脈衝
- ◆ 高梯度場專用探頭

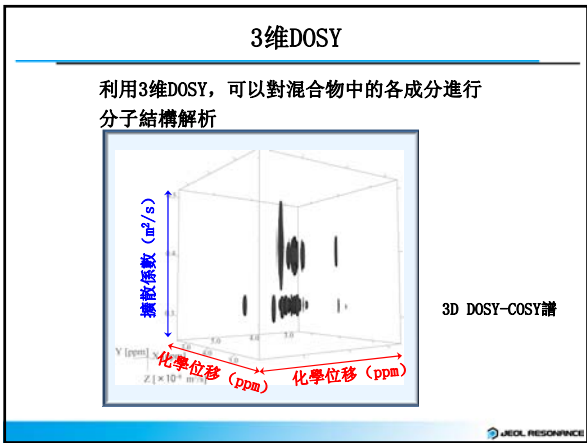
JEOL RESONANCE

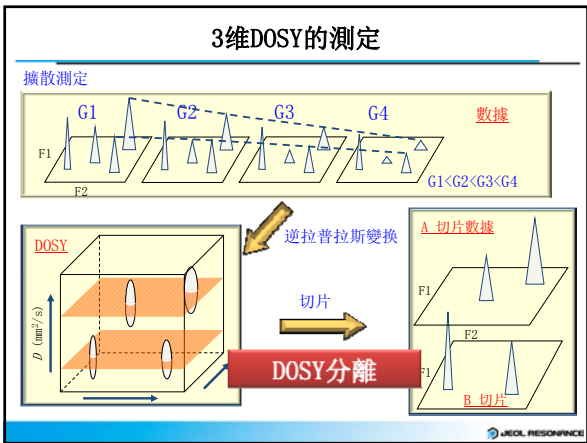








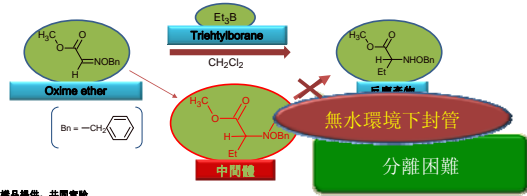




DOSY測定例

胺化合物的合成路徑解析

利用三乙基硼烷作為自由基起始劑與酯進行加成反應。通過DOSY測定確認胺基自由基與三乙基硼烷反應中間體的存在

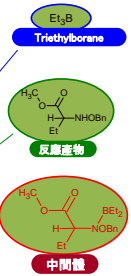
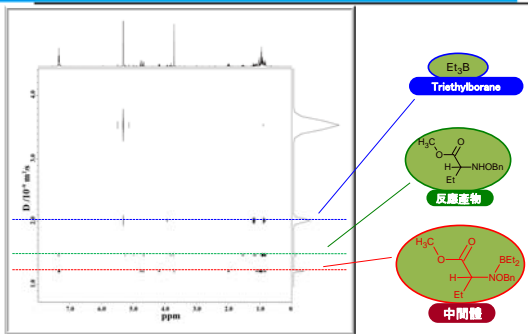


藥品提供、共同實驗
 神戸薬科大学薬品化学研究室
 内藤雅章 富田興子 上田真史
 星薬科大学
 中嶋雅雄

M. Nakakoshi, et al
 Magn. Reson. Chem., 2006

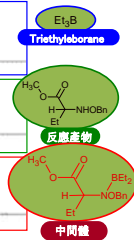
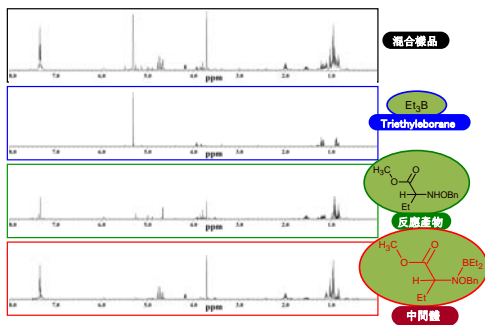
JEOL RESONANCE

測定例：2D-DOSY



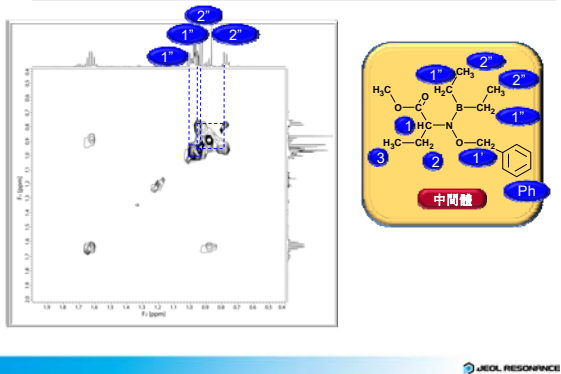
JEOL RESONANCE

測定例：2D-DOSY切片數據

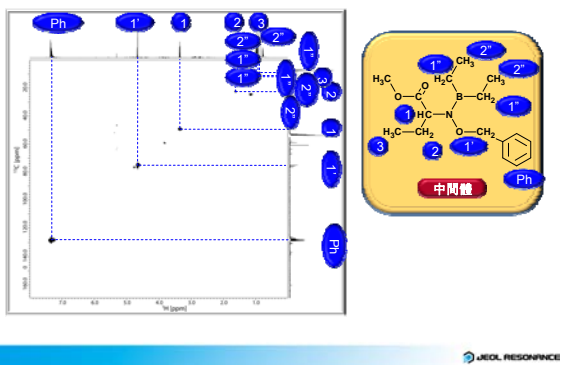


JEOL RESONANCE

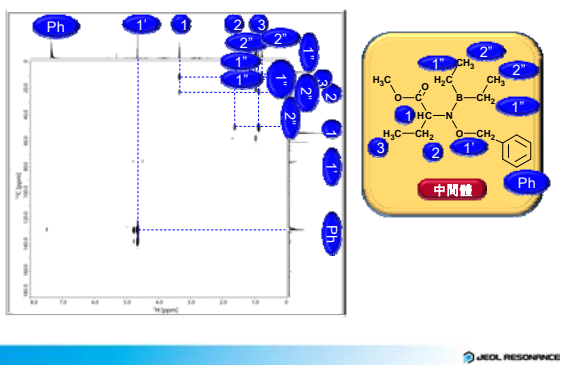
測定例：3D DOSY-COSY切片數據



測定例：3D DOSY-HMQC切片數據

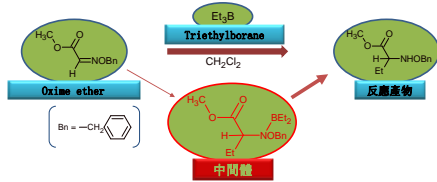


測定例：3D DOSY-HMBC切片數據



測定例總結

利用3D-DOSY使分離不可能的反應中間體的結構解析成為可能。



譯者
神戸薬科大学薬品化学研究室 内藤 龍平 富田 兴子 上田 昌史
星洲利大藥 中越 隆雄

JEOL RESONANCE

解決法1: DOSY總結

DOSY法在測定混合樣品中各成分的分子結構非常有效。

在化學反應中可以用DOSY對反應中間產物進行結構解析。

JEOL RESONANCE

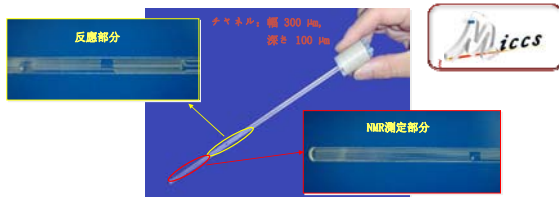
解決法2

MICCS

(Micro Channeled Cell for Synthesis monitoring)

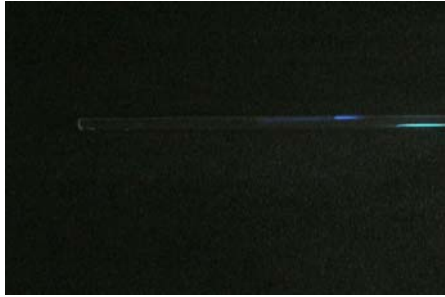
MICCS用樣品管

樣品管有3個進樣口和一個出樣口。用注射泵可以同時進樣3種反應溶劑，並使其在樣品管中的反應部進行反應。最後可以通過NMR檢測部來確認反應進程。



JEOL RESONANCE

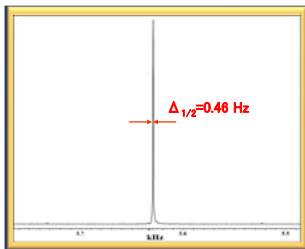
高反應率



JEOL RESONANCE

高分辨率測定

MICCS-NMR含有獨特的內部管道設計。用100% CHCl_3 為樣品時的半峰寬度可以達到0.46 Hz，與普通的樣品管相比毫不遜色。



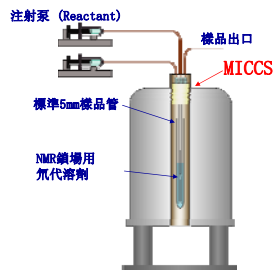
JNM-ECA500
樣品: 100% CHCl_3

JEOL RESONANCE

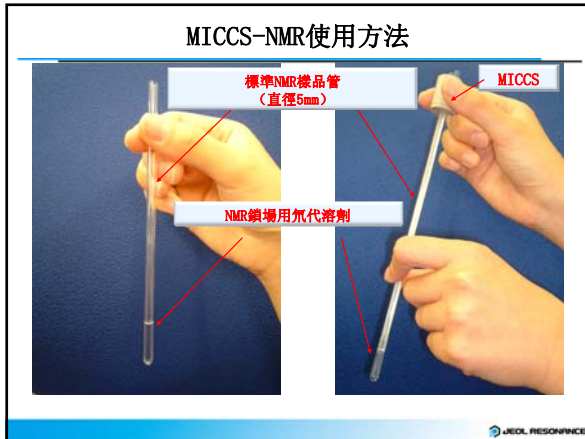
MICCS-NMR模擬圖

使用方法

- ◆把MICCS樣品管插入5mm標準樣品管中
→可以使用標準5mm探頭
- ◆從外部通過注射泵注入反應液
- ◆5mm樣品管中放入氘代溶劑
(外部鎮場)
→內部反應液可以直接用氘溶劑



JEOL RESONANCE



測定實例

1: 胺化化合物的合成路徑解析

- (1) 反應路徑解析
- (2) 反應路徑解析/¹¹B-NMR
- (3) 反應速度解析

2: 格氏反應中間體的結構解析

- (1) 反應路徑的解析
- (2) 2維NMR測定

測定樣品 (1) 3-phenylpropionaldehyde
(2) *trans*-cinnamaldehyde
(3) acetophenone

JEOL RESONANCE

測定例1

胺化化合物的合成路徑解析

利用三乙基硼烷作為自由基起始劑與酯進行加成反應。通過DOSY測定確認氨基自由基與三乙基硼烷反應中間體的存在

無水環境下封管

分離困難

樣品提供: 共同實驗
 神戸薬科大学薬品化学研究室
 内藤 隆章 吉田 兴子 上田 真史
 星薬科大学
 中越 雅道

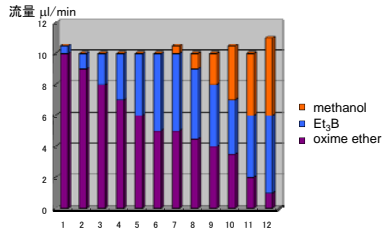
M. Nakakoshi, et al
Magn. Reson. Chem., 2006

JEOL RESONANCE

測定例1: 反應路徑解析

改變進樣流量比

通過改變各個進樣泵的流量比來調節樣品管中反應物的比例

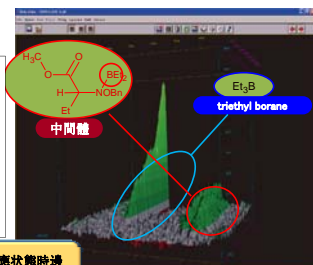
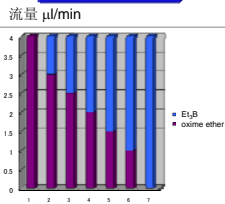


測定例1: 反應路徑解析



測定例1: 反應路徑解析/¹¹B-NMR

改變流量比



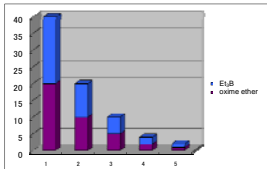
MICCS-NMR可以在反應液達到穩定反應狀態時通過流動測定。因此可以進行NMR積算。
→ 可以進行多核測定或2維測定

測定例1: 反應速度解析

改變全體進樣流速

改變反應進樣的流速，使反應液從樣品管的反應部分到達NMR測定部分的時間發生變化。也導致檢測到的NMR訊號強度發生變化。從而可以進行化學反應速度的解析。

流量 $\mu\text{l}/\text{min}$

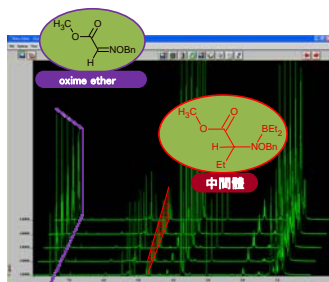


条件	時間
1	22
2	43
3	86
4	216
5	432

按NMR測定部分的溶液體積為7.2 μl 時計算

測定例1: 反應速度解析

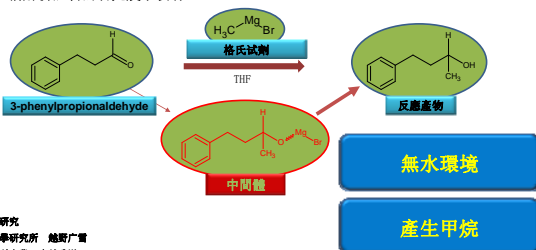
當流速快時，反應液從樣品管的反應部分流到NMR測定部分的時間就短，所以反應原料的訊號就大。如果降低流速的話，到達測定部分的時間就會變長，也就是反應時間變長，所以中間體的訊號強度也會相應的變大。



測定例2

格氏反應中間體的結構解析1

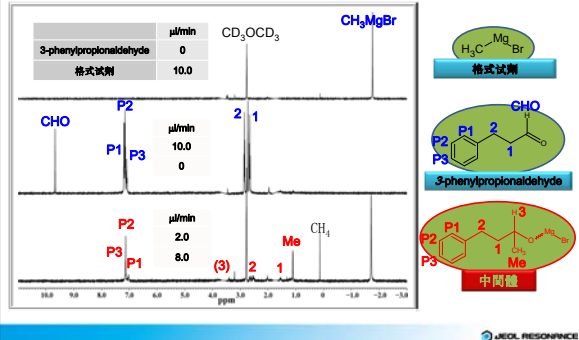
格氏反應是有機化學中非常有名的一個反應。為了確認反應原理需要証明格氏反應中間體的結構。雖然已經有了各種各樣的研究，但是以圖譜數據為基礎進行結構解析証明的研究幾乎沒有。



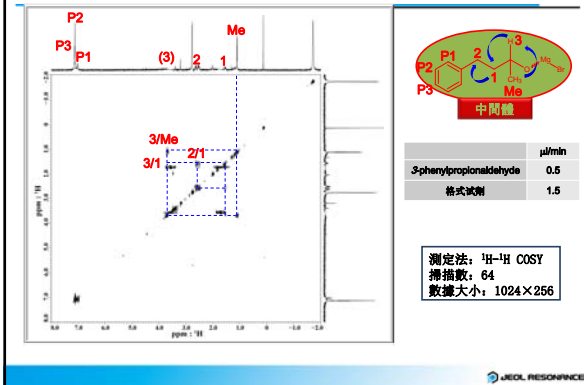
共同研究
理化學研究所 趙斯廣
星洲科大 中越謙道

測定例2: 反應路徑解析

變換進樣流量比

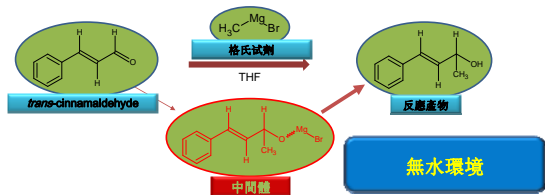


測定例2: 2DNMR測定 (COSY)



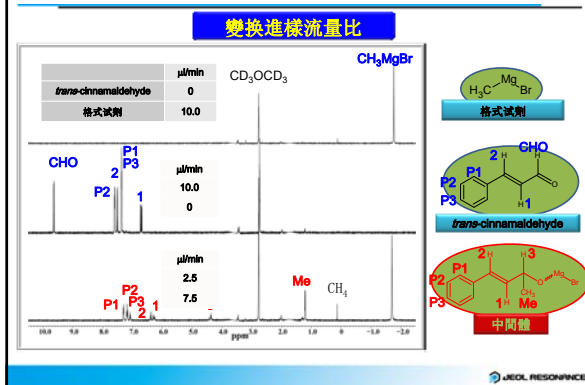
測定例3

格氏反應中間體的結構解析2

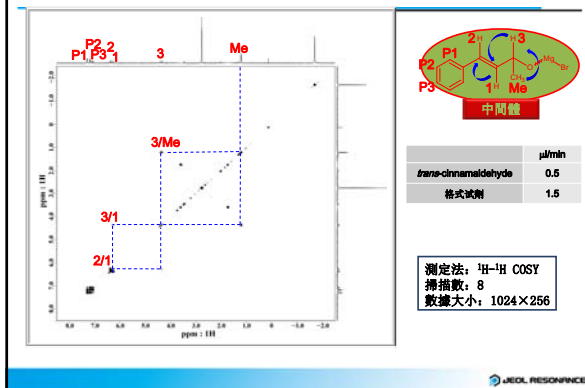


共同研究
 理化學研究所 地野廣貴
 星洲科大學 中越雅理

測定例3: 反應路徑解析

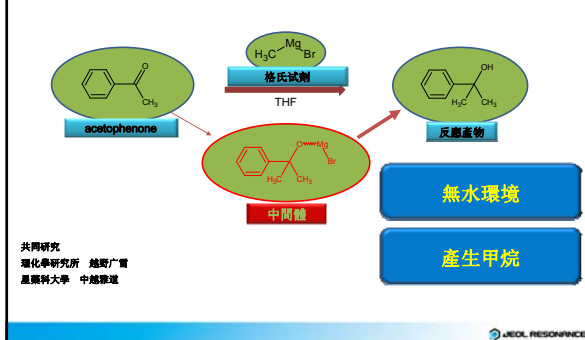


測定例3: 2DNMR測定 (COSY)



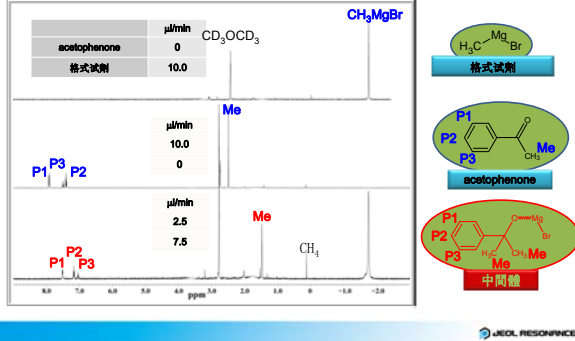
測定例4

格氏反應中間體的結構解析3

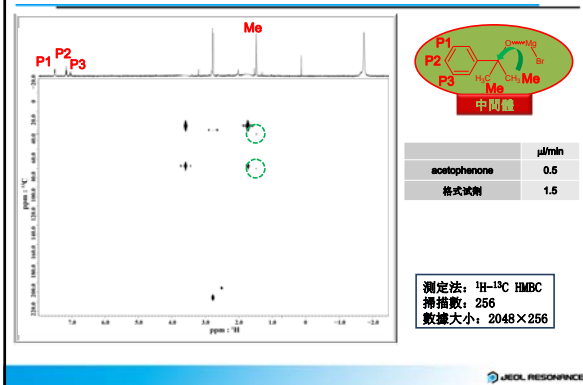


測定例4：反應路徑解析

變換進樣流量比



測定例4：2DNMR測定 (HMBC)



解決方法2：MICCS-NMR總結

利用MICCS-NMR對胺化合物和格式反應中無法分離的中間體結構進行了解析和確認。

*M*icro *C*hanneled *C*ell for *S*ynthesis monitoring



總結

DOSY和MICCS-NMR可以用於化學反應中間體的結構解析



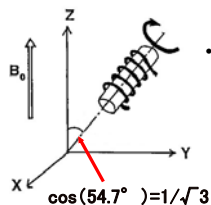
JEOL RESONANCE

內容介紹

- NMR在解析反應中間體時的應用（液態NMR）
 - 胺類化合物合成路徑的解析（DOSY法 MICCS法）
 - 格氏反應（Grignard Reaction）中間體的結構解析（MICCS法）
- NMR在混合樣品解析時的應用（固態NMR）
 - 市販藥品的分離分析（ROSY法）

JEOL RESONANCE

固態NMR



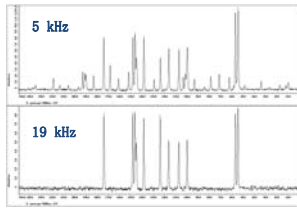
- 高速魔角旋轉（5KHz→110KHz）
 - ^{13}C 譜的簡單化
- 雙極子去耦合法的使用（高速高精度RF位相切換）
 - ^1H 譜的簡單化

固態核磁的液體化

有機化合物結構解析

JEOL RESONANCE

高速旋轉使¹³C簡單化

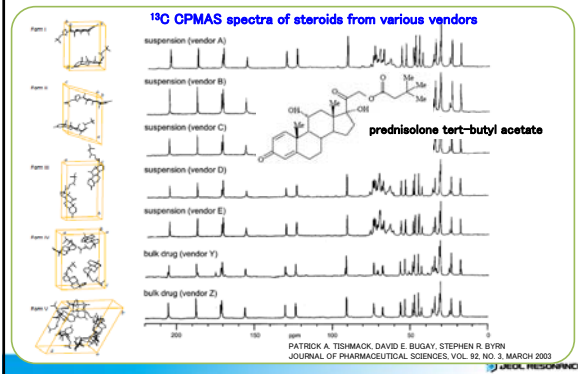


旋轉速度5kHz的固體NMR碳譜，有許多旋轉邊峰，並于主訊號重合。

旋轉速度19kHz的固體NMR碳譜，旋轉邊峰消失，可以清晰的觀測到主訊號。

	化學位移 (ppm)	400MHz (kHz)	500MHz (kHz)	600MHz (kHz)
羰基	180~160	18~16	22.5~20	27~24
芳香基	160~110	16~11	20~13.75	24~16.5
次甲基	80~30	8~3	10~3.75	12~4.5
亞甲基	60~0	6~0	7.5~0	9~0
甲基	40~0	4~0	5~0	6~0

結晶體解析



¹³C CPMAS spectra of steroids from various vendors

suspension (vendor A)
suspension (vendor B)
suspension (vendor C)
suspension (vendor D)
suspension (vendor E)
bulk drug (vendor Y)
bulk drug (vendor Z)

prednisolone tert-butyl acetate

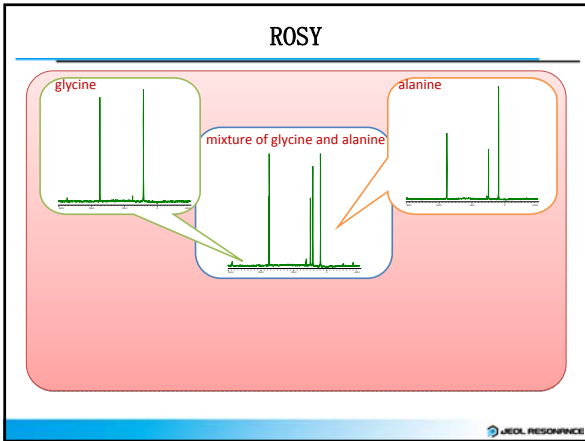
PATRICK A. TISHMACK, DAVID E. BUGAY, STEPHEN R. BYRN
JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 92, NO. 3, MARCH 2003

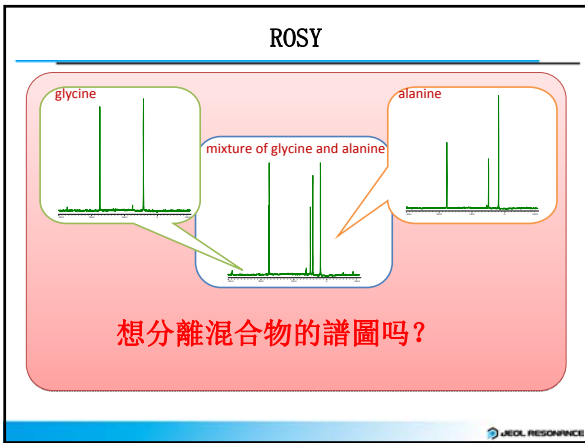
目錄

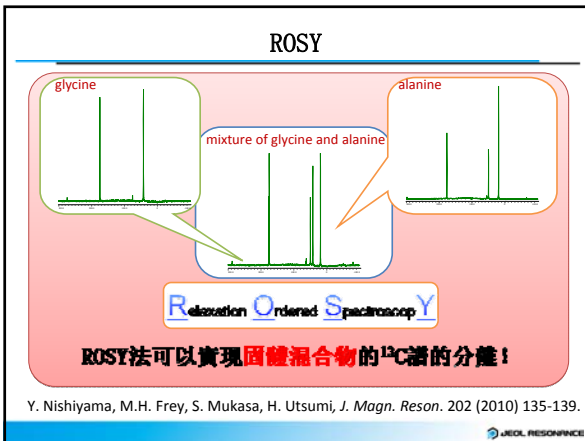
ROSY法?

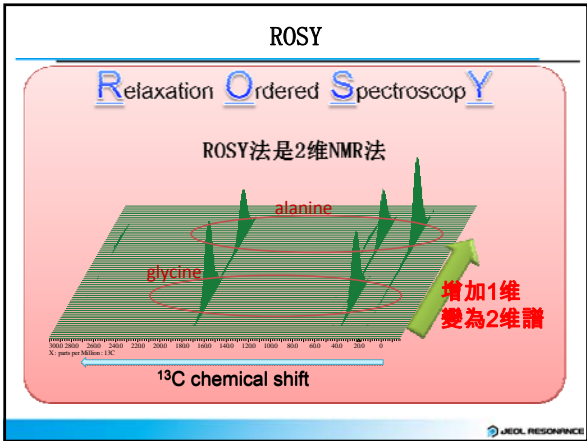
ROSY法原理?

ROSY譜舉例









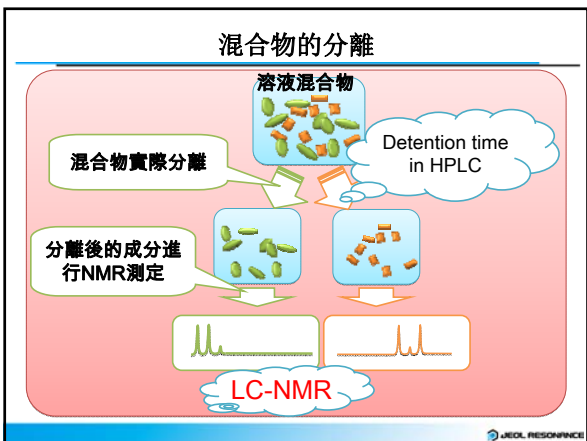
目錄

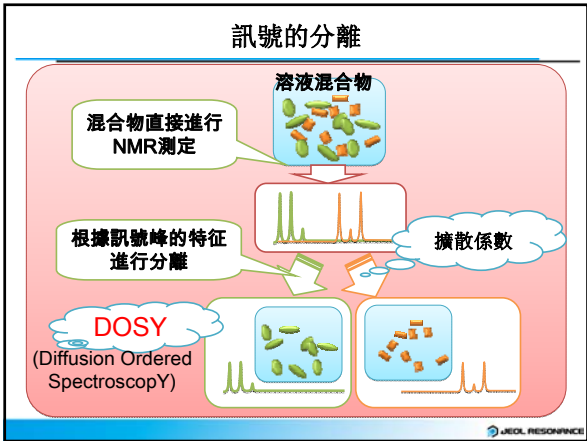
ROSY法?

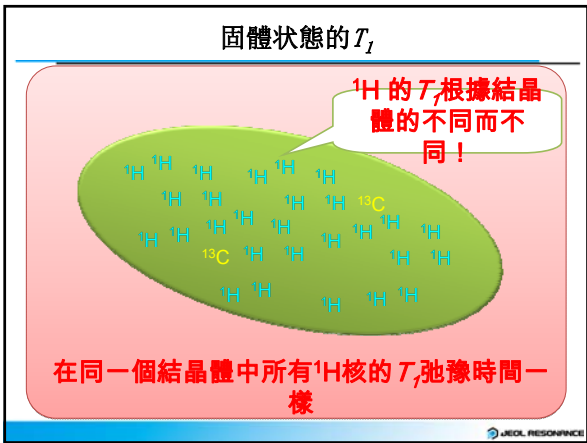
ROSY法原理?

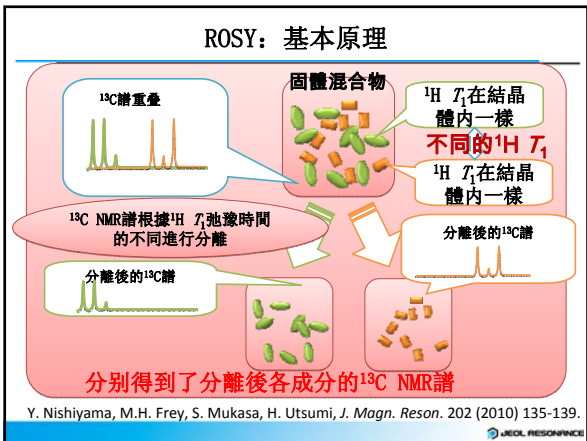
ROSY譜舉例

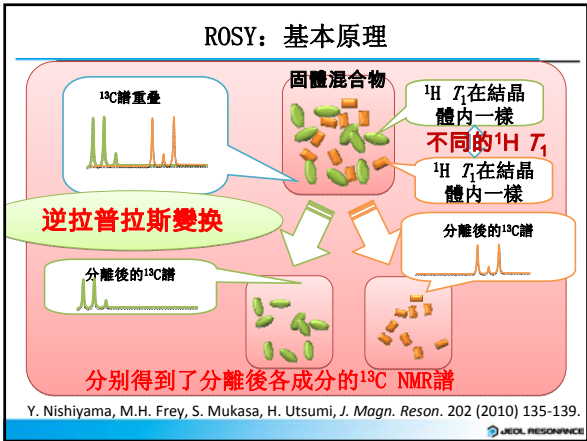
JEOL RESONANCE

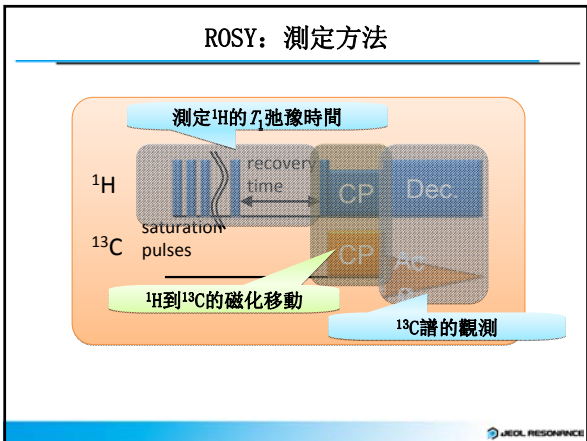


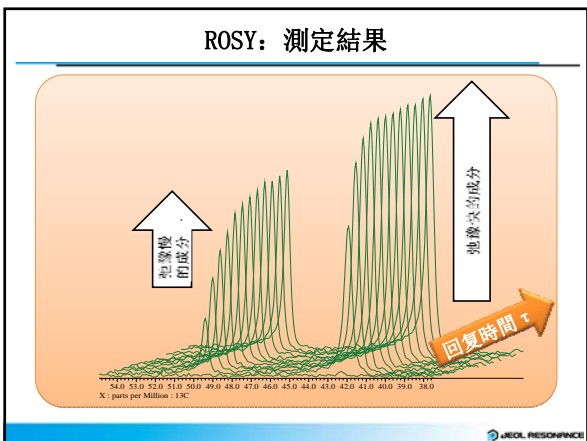




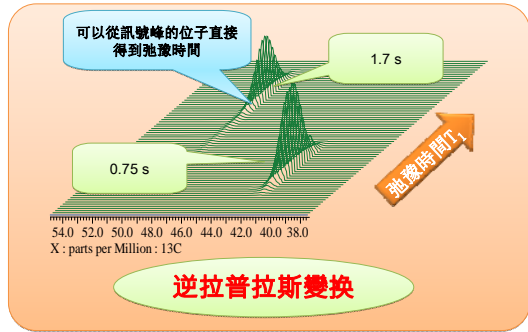




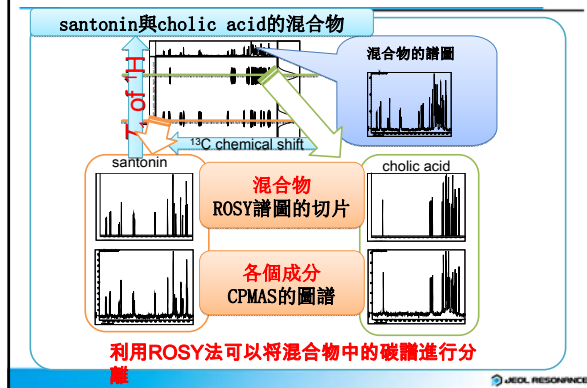




ROSY: 處理結果



ROSY: 測定例

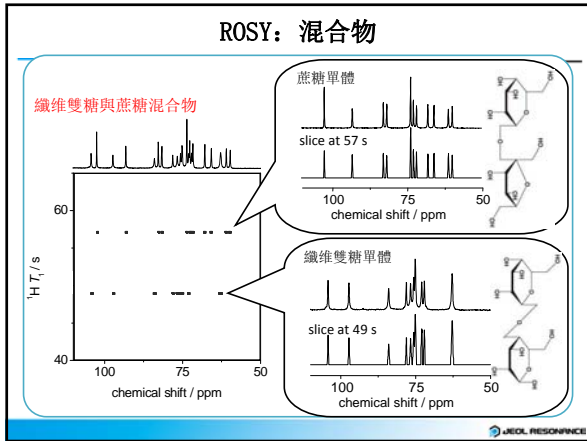


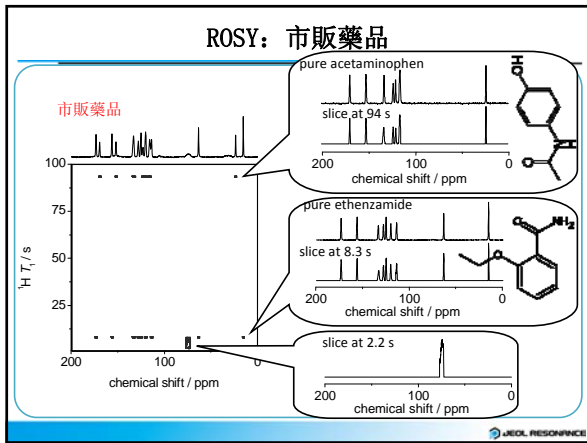
目錄

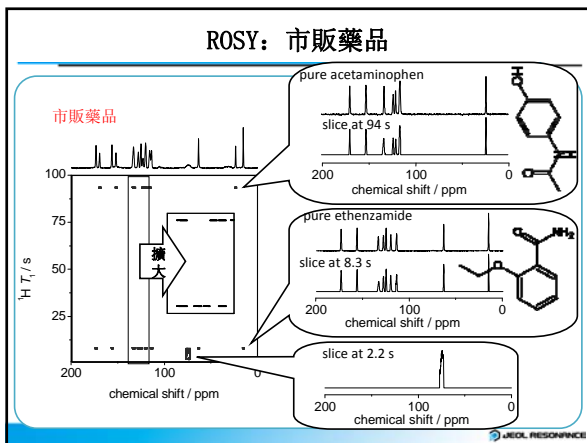
ROSY法?

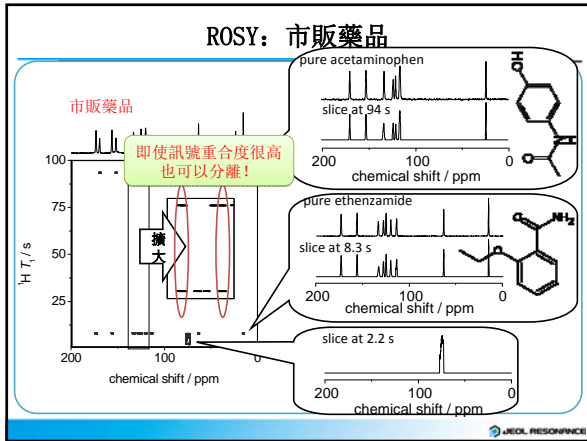
ROSY法原理?

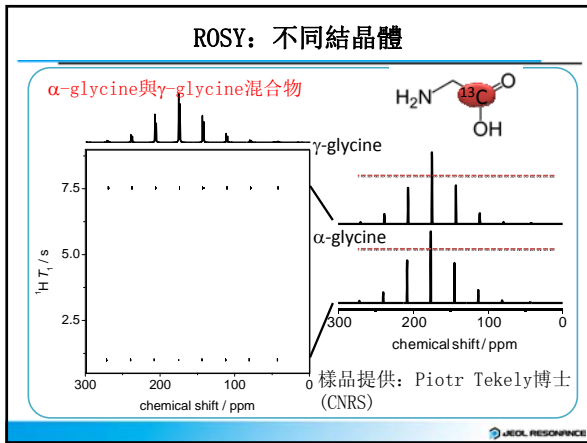
ROSY譜舉例

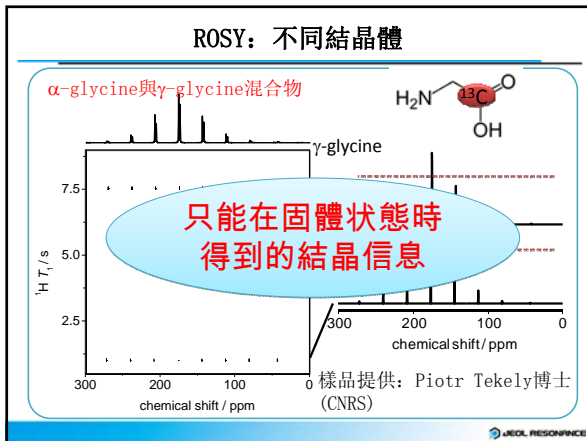












ROSY

ROSY是在混合狀態下使固體各成分的 ^{13}C 譜進行分離的測定方法

混合物的解析
結晶體的解析
結晶與非結晶的解析
粒度分布的解析

Y. Nishiyama, M.H. Frey, S. Mukasa, H. Utsumi, J. Magn. Reson. 202 (2010) 135-139.

總結

舉例對核磁（NMR）中關於混合物以及反應中間體的測定方法進行了相關介紹

- 反應中間體解析
 - 液態NMR: DOSY法
 - 液態NMR: MICCS法
- 混合物解析
 - 液態NMR: DOSY法
 - 固態NMR: ROSY法
