

定量核磁共振方法开发及标准化探索

邓小娟, 朱孔营, 丁国生

(天津大学 分析测试中心, 天津, 300072)

摘要:大型仪器为教学科研、人才培养提供基础的硬件支撑和技术保障,新工科建设背景下,主动加快大型仪器创新型分析测试技术的标准化建设是大型仪器设备平台改革的重要内容。结合测试工作经验,以核磁共振谱仪为例,探索新技术新应用的规范化,在实际测试中应用,并将典型案例及时转化为教学内容,与行业接轨制定定量核磁团体标准,。通过测试技术的标准化与共享实践,主动发挥引领作用,提升仪器设备的技术共享水平,为前沿科研发展提供技术支撑,为多学科交叉融合的创新人才培养奠定基础。

关键词:核磁共振, 大型仪器, 分析测试技术, 标准化

中图分类号: O657.2 **文献标识码:**

创新型新工科教育体系的建设,要求培养学生的创新能力、理论联系实际能力和适应现代科学技术高速发展的综合能力[1-2]。而大型仪器设备是高校人才培养、科学研究的重要硬件保障和技术支撑基础,合理化、正确化、规范化、最大化、高效化使用大型仪器始终是高校实验室建设的一项长期系统工程[3-5]。因而,在新工科建设背景下,如何将大型仪器分析测试技术由被动的服务教学科研发展转变为主动的支撑引领教学科研发展是当前值得研究的课题[6-7]。例如核磁共振波谱技术是鉴定有机化合物分子结构不可或缺的工具。随着其硬件和软件的发展,新技术及新应用的不断呈现,核磁共振波谱在定量分析方面的应用也越来越广,应用领域包括药品、食品、天然产物等[8-9]。但是目前随着技术和产业发展,科研需求与实际测试及教学之间出现一些新问题,尤其是常规测试方法、教学和培训内容明显滞后于新技术新应用的发展,分析测试技术与前沿科研需求之间不协调的矛盾日益突出。

以核磁共振波谱技术为例,探索创新型分析测试技术的标准化研究,通过技术-标准-人才联动开发测试方法、构建仪器标准化测试技术,在实际测试和实验教学中提升应用效果,进一步申请制定相关团体标准,为新工科背景下的科研创新提供科学技术保障。

1、 定量核磁测试技术及应用发展

核磁是有机化合物分子结构定性分析的不可或缺的手段,自二十世纪五十年代商品化的

核磁共振波谱仪问世以来，核磁共振的应用领域不断拓宽，从物理学渗透到化学、材料学、医学等各个领域。随着磁场技术、组合脉冲和智能化处理软件等的不断发展，以及前沿新型科研发展的需求，核磁在定量分析领域的应用也越来越广泛。定量核磁共振波谱技术相比其他定量分析方法，具有独特的优势，如不破化样品；定量分析时不需要高纯度的目标化合物对照品；简单快速；方法准确可靠不易造假。因此近年来，核磁在药品质量（纯度和含量）、食品真伪鉴别等领域的应用日益增多。目前核磁共振技术已被应用于多种药物的质量控制标准，其中美国药典、英国药典 1975 版、日本药局方早已经开始运用核磁共振技术进行药物的鉴定，我国也在中国药典 2010 年版二部中开始新加入了核磁共振技术，以适应新的质控要求。随着核磁共振技术的发展和质控标准的更高要求，在各国药典中越来越多的加入了核磁共振方法，例如，美国药典在测定定亚硝酸异戊酯制剂中含量时采用的就是核磁共振绝对定量法定量，在对奥芬那君柠檬酸盐的间位、对位异构体相对含量测定中采用了核磁共振相对定量法。

2 定量核磁测试方法开发

2.1 以文献为依据，规范核磁操作流程

大型仪器作为检测的有利工具，为应对高新技术产品和材料的研发需求，开发仪器功能并拓宽其应用、提升测试技术可靠性和精确性是亟待解决的问题。这就需要仪器室以新技术及应用为导向仪器为核心，将分析测试技术与大型仪器功能开发相结合，建立大型仪器标准化测试方法，提高大型仪器测试水平、拓宽其应用，为大型仪器开放共享提供技术保障。为此依据国家/行业标准，核磁室整合仪器分析方法通则和校准规程，建立标准化操作流程，定期对仪器进行校准；进一步依据国标/行标或者国家药典方法，结合学科发展前沿，从科研分析的角度出发，设计并建立具有创新型分析测试技术的标准化检测方法。如参照药典 2015 年版四部通则 0441，建立各种实际样品中有机物的定量核磁共振波谱分析标准化方法。目前，仪器室已经建立了定量核磁共振波谱法测定片剂中吡罗昔康含量的方法[9]。以咖啡因因为内标，选择 $^1\text{H-NMR}$ 的脉冲程序，优化延迟时间、采样次数，选择吡罗昔康中的定量峰，咖啡因中的内标定量峰。吡罗昔康与内标咖啡因的质量比在一定范围内具有良好的线性关系。通过方法学验证表明吡罗昔康片的加标回收率高，相对标准偏差小。该方法可用于吡罗昔康片剂含量的测定。方法中所优化的实验条件具有较好的通用性，对于吡罗昔康其他制剂，只要辅料不干扰内标和待测组分用于定量的核磁谱峰，也可以不经过分离过程，直接用核磁共振波谱法进行定量测定，是不同原理进行含量测定的新选择。

2.2 以服务根本，助力高质量产出

在实际测试中主动探讨相关科研问题，依据需求改进和应用标准化分析测试技术，及时改善测试质量与高水平科研之间的不平衡，满足前沿科研发展需求。将标准化分析测试技术应用于实际相关样品测试中，共享标准化测试技术，完并在实际测试中提前与用户沟通相关文献要求、实验目的等，帮助其定制合理测试方法。例如核磁共振谱仪是有机物分子结构鉴定的有利工具，但是随着科研的发展，越来越多的用户将其用于定量检测或原位反应动力学研究，因此开发并利用定量检测、溶剂峰压制或弛豫时间测定等测试技术，优化条件采集数据，通过在实践中积累经验，建立标准化测试方法，为用户解决测试技术难点并获得更科学有效的测试结果。例如新能源催化、绿色化工过程多相催化反应的基础研究是目前科研前沿热点课题。其中 CO₂ 电化学还原反应 (CO₂RR) 为可再生能源储存及 CO₂ 转化提供了有效途径，目前,CO₂ 转化为 C1 化学品（如甲酸等）被认为是 CO₂RR 最可行的途径之一，甲酸通常被用作燃料电池的液体燃料。研究过程中的甲酸等产物分子量小浓度低，其定性定量分析是难点，核磁共振是有机化合物检测的强有力工具，因而成为了水溶液中痕量甲酸检测的有效手段之一。仪器室在实际测试中利用液体核磁共振谱仪，通过合理配置样品、优化测试参数、利用溶剂峰压制实验，建立一套标准测试流程，为催化反应液中甲酸等产物的定性定量分析提供科学准确测试结果。由此可见应对新的科研发展需求，通过新型测试技术的标准化探索，解决前沿科研带来的新问题，突破测试技术瓶颈，能够加快科研进展，助力高水平论文产出。

3 以方法开发为基础，申请制定团体标准

3.1 标准制定的背景和目的

核磁共振 (NMR) 是定性分析有机化合物分子结构的重要表征手段，广泛拥有化学、化工、材料、医药等领域。液体核磁测试前需要将样品溶解在氘代试剂中，使用氘代试剂制备样品一方面可以防止溶剂中氢信号的干扰，另一方面仪器需要用氘信号锁场和匀场等。样品的制备是影响测试结果的关键因素之一，而不同厂家氘代试剂的同位素丰度会有所不同。但是目前对氘代产品的同位素丰度测定没有统一标准，因而有必要制定相关标准，快速监测氘代试剂的同位素丰度，以保证产品质量。

随着 NMR 仪器硬件和软件技术的发展，仪器灵敏度大大提高，使得 NMR 在定量分析领域的应用也越来越广泛。通常定量核磁（采用内标法对样品进行定量分析，这种方法可满足不同化合物定量分析需求，但步骤较为繁琐，首先需要选择合适的内标物，需要综合考量

溶解性，与待测物和溶剂不发生相互作用，不和待测物谱峰重叠或靠近，最好是单峰等；内标物要求纯度高，通常价格较贵；配制使用时用量较少，称量容易引入误差，导致重现性差。氯仿是最常用的氘代试剂之一，本工作以氘代氯仿为例，采用外标定量核磁方法测定氘代试剂中残留 ^1H 并计算其同位素丰度，方法简易快速，经济实用，重现性好，通用性强，可满足氘代试剂同位素丰度的日常检测，也可用于氘代试剂生产过程的质量监控。

3.2 方法原理

在合适的实验条件下，核磁共振波谱中的谱峰面积或信号强度直接与引起该信号的原子核个数成正比。对于某个特定的共振信号 x ，由于 $I_x \propto N_x$ ，因此

$$I_x = K_s \cdot N_x \quad (1)$$

式中 I —积分面积； N —对应信号的原子核数； K_s —仪器常数。

在参数设置合理的前提下，对于核磁共振同一次测定中所有被激发原子的共振信号， K_s 均相同。影响 K_s 的因素有脉冲角度、弛豫时间、采样次数、去偶等。

如果两个信号来源于同一分子中不同的官能团，式(1)可简化为 (2)：

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{N_1}{N_2} \quad (2)$$

式中 N_1 、 N_2 分别为相应官能团中的质子数。

如果两个信号来源于不同的化合物，则式 (2) 可进一步细化为公式 (3)：

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{N_1 m_1 / M_1}{N_2 m_2 / M_2} \quad (3)$$

式中 m —化合物质量，Kg； M —分子量。

3.3 标准制定主要工作

(1) 核磁共振参数优化

通常当延迟时间 $d1 \geq 5 T1$ (纵向弛豫时间) 时，才能保障 99% 以上的自旋核达到完全弛豫。为此，选择 $d1$ 为 1, 2, 4, 8, 12, 24 s，考察延迟时间对积分面积的影响。结果显示，当 $d1 \geq 2$ s 时，样品与外标定量峰面积比无明显变化，因此最终选定延迟时间为 4 s。分别考察采样次数为 8, 16, 32, 64, 128 次的谱图信噪比，结果表明采样次数 ≥ 32 次时，均能满足定量要求，最终选择采样次数为 64 次。

(2) 线性关系的测定

在一定的实验条件下， ^1H NMR 质子信号的积分面积与产生该信号的原子核数目成正比。为了验证方法的可靠性，测试不同含量氯仿的 ^1H NMR 谱图，以残留氯仿质子峰面积

(y) 为纵坐标，浓度 (x) 为横坐标，绘制标准曲线，线性回归方程为：
 $y=3.8231\times104x+8.4252\times104$ ， $R^2=0.9991$ 。结果表明，残留氯仿质量百分浓度在 0.2%~15.4% 范围内氯仿 ^1H NMR 积分面积与残留氯仿浓度线性关系良好。

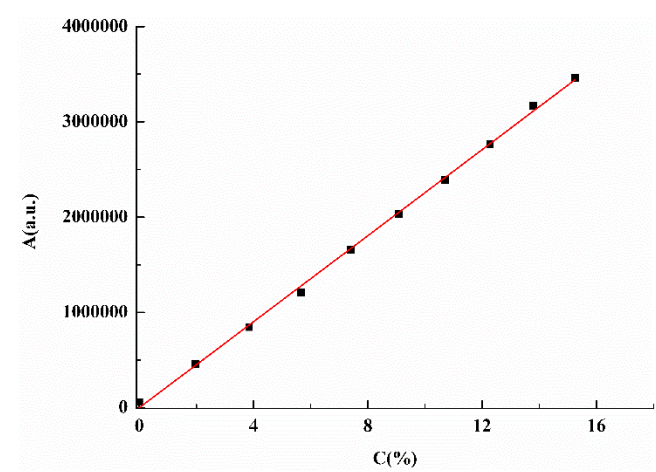


图 1 氯仿 ^1H NMR 积分面积与其含量线性关系曲线

(3) 精密度

取对照品溶液 0.5 mL 在相同条件下连续测试 5 次，结果显示峰面积的 RSD 为 0.0004%，表明仪器精密度良好。

(4) 稳定性

取同一对照品溶液，按照前述相同测试条件，分别于 1，2，4，6，10 天进行测试。结果显示峰面积的 RSD 为 0.0016%，表明对照品溶液在 10 天内稳定性良好。

(5) 方法比对

样品分别在不同实验室间（400 MHz（3 台）和 500 MHz（1 台） NMR 仪器）进行比对，分别进行检测，结果表明，氘同位素丰度计算结果相对标准偏差均小于 0.03%，因此该方法在不同仪器上具有一定的通用性。

表 1 实验室间比对结果

实验室	样品 1		样品 2		样品 3	
	1	2	1	2	1	2
1	99.8001095	99.8549	99.69081	99.79933	99.81899	99.906985
2	99.7965626	99.86281	99.6942	99.79749	99.82049	99.91543
3	99.8193168	99.90206	99.68936	99.81195	99.81974	99.9112075
4	99.7996567	99.88952	99.68254	99.8482	99.81549	99.90467

AVERAGE	99.8039114	99.87732	99.68923	99.81424	99.81868	99.9095731
STDEVA	0.01039053	0.022168	0.004899	0.023533	0.002213	0.0047509
RSD	0.01040329	0.022195	0.004914	0.023576	0.002217	0.0047552

(6) 不确定度评定

不确定度分量	来源	数值
$\frac{u(I_s/I_r)}{I_s/I_r}$	样品测量峰面积重复性	0.00068%
$\frac{u(I_r/I_{is})}{I_r/I_{is}}$	对照品标定测量峰面积重复性	0.0076%
$\frac{u(M_{is})}{M_{is}}$	内标物相对分子质量	0.0025%
$\frac{u(M_r)}{M_r}$	样品相对分子质量	0.00049%
$\frac{u(m_{is})}{m_{is}}$	天平称量内标物	0.12%
$\frac{u(m_r)}{m_r}$	天平称量样品	0.00061
$\frac{u(P_{is})}{W_{is}}$	内标物纯度	0.10

将以上各相对标准不确定度分量合成得到合成相对不确定度：

$$\frac{u(D_r)}{D_r} = \sqrt{\left[\frac{u(I_r/I_{is})}{I_r/I_{is}}\right]^2 + \left[\frac{u(M_{is})}{M_{is}}\right]^2 + \left[\frac{u(M_r)}{M_r}\right]^2 + \left[\frac{u(m_{is})}{m_{is}}\right]^2 + \left[\frac{u(m_r)}{m_r}\right]^2 + \left[\frac{u(P_{is})}{W_{is}}\right]^2}$$

$$\frac{u_c(D_s)}{D_s} = \sqrt{\left[\frac{u(I_s/I_r)}{I_s/I_r}\right]^2 + \left[\frac{u(D_r)}{D_r}\right]^2}$$

测量结果的扩展不确定度：

$$U=k \times u_c(D_s)=0.32\% \quad (k=2)$$

采用氘代氯仿对照品作为外标，减小了内标称量以及测试参数不同带来的误差，简单快速、结果准确，重现性好，省时省力，能够满足实验室氘代氯仿试剂的评估测定及氘代试剂厂家的质量监控要求。

4 结语

新型分析测试技术的标准化是高校教学科研创新和学生实践能力培养的技术保障，也是大型仪器平台改革的重要课题。立足创新能力建设，以相关文献为依据，开发大型仪器新型分析测试方法，为推进大型仪器的功能开发利用、全面开放共享提供技术保障。同时结合本

岗工作,推广标准化分析测试方法的技术共享,支撑高水平科研工作,提升仪器分析实验教学水平。连接内外平台,参与相关标准比对,申请制定团体标准,构建具有高校特色的大型仪器服务窗口,为学校“双一流”建设提供技术支撑。

参考文献

- [1] 王文成,侯崇升,吴小进,等. 实验室开放管理的新工科人才培养探索[J]. 实验室研究与探索, 2019, 38(6): 231-234.
- [2] 陆先亮,徐明华,江一山,等. 基于“新工科”的人才培养实验平台建设研究[J]. 实验技术与管理, 2019, 36(7): 12-14, 19.
- [3] 刘渝萍,周小元,张红菊,等. 高校大型仪器开放共享平台的多元化建设[J]. 实验室研究与探索, 2018, 37(2): 285-288.
- [4] 何亚群,王婕,吴祝武,等. 大型仪器共享平台建设在一流大学人才培养能力建设中的作用[J]. 实验技术与管理, 2019, 36(8): 9-13, 44.
- [5] 胡鹏飞,谢忱,马村,等. 高校分析测试中心大型仪器共享平台建设探索[J], 实验室研究与探索, 2019, 38(10): 256-258.
- [6] 权茂华,孙建林,熊小涛,等. 基于国际/国家标准提升电子显微镜分析实验教学水平[J]. 实验室研究与探索, 2018, 37(1): 147-149, 169.
- [7] 石变芳,宋楠,常静,等. 大型仪器的资源共享建设及在教学科研中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2019, 38(9): 271-274.
- [8] 邓小娟,李文斌,刘塞纳,等. 定量核磁共振波谱法测定片剂中吡罗昔康[J]. 分析试验室, 2017, 36(9): 1032-1035.