

文章编号: 1000-4556(2007)03-0289-07

# 药物核磁共振定量分析参数的研究

张友杰<sup>1</sup>, 刘小鹏<sup>2\*</sup>

(1. 武汉生物工程学院 分析测试中心, 湖北 武汉 430415; 2. 华中师范大学 分析测试中心, 湖北 武汉 430079)

**摘 要:** 药物核磁共振定量分析已见诸多篇报道. 英、美、欧药典中都先后引入了核磁共振分析方法. 本文对药物核磁共振定量分析的参数作了较为详尽的研究, 提出了选择定量特征峰的新标准. 经维生素 C 实际样品测定其精密度优于 1%, 结果满意.

**关键词:** 核磁共振; 定量分析; 药物; 核磁共振参数; 维生素 C

**中图分类号:** R917      **文献标识码:** A

## 引言

核磁共振定量分析早在上世纪 70 年代就已提出来, 但因为当时该方法灵敏度低, 测定的重现性也不理想而未得到长足的发展. 由于现代超导高磁场的脉冲 Fourier 变换核磁共振谱仪的应用, 核磁共振定量分析方法的灵敏度、精确度、准确度及分析速度等方面已达到或接近高效液相色谱(HPLC)<sup>[1]</sup>的水平.

药物核磁共振定量分析在我国已见诸多篇报道<sup>[2-6]</sup>, 美、英、欧等国和地区药典中都已先后引入了核磁共振定量分析方法. 药物定量分析应用核磁共振方法已成趋势, 这是因为核磁共振定量分析是以结构分析为基础的分析方法, 在进行定量分析之前, 必须进行药物的鉴定. 因此, 药物核磁共振分析是鉴别假冒、伪劣药品的有力武器. 我国药典尚未引入核磁共振方法. 如果能广泛应用核磁共振定量分析方法, 无疑对管理我国的药品市场有着重大的意义.

作者认为, 核磁共振定量分析的准确性与选作定量分析的特征峰质子的弛豫方式有很大关系. 因为某一药物结构中不同含氢基团由于弛豫机理的差别, 导致恢复 Boltz-

收稿日期: 2006-12-11; 收修改稿日期: 2007-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20475019); 湖北省科学基金资助项目(2004ABA118).

作者简介: 张友杰(1938-), 男, 江西人, 教授. \* 通讯联系人: 刘小鹏, 电话: 027-67867962-8116, E-mail: liuxp8828

@sina.com.cn.

mann 平衡完全程度的不同, 从而影响单位质子峰积分面积的一致性. 这是制约核磁共振定量分析方法准确性和重现性的重要因素. 现在流行选作定量用的特征峰常常以甲基单峰为最佳. 实际上, 经研究表明, 甲基峰往往不适于作为定量用的特征峰. 因为此峰往往导致核磁信号积分值偏低. 除此以外, 多项核磁共振实验参数也影响峰面积. 为了阐述影响积分面积的因素, 选用乙基苯作为定量分析研究的对象. 其中含有 3 种不同弛豫机理的质子基团: 甲基、亚甲基和芳氢. 作者认为, 只有选择其相对积分强度等于或很接近于其质子数时的实验条件才有可能做到比较准确的定量分析. 为此, 研究了峰面积与延迟时间、脉冲宽度、取数次数、取数时间和发射偏置等等因素的关系, 以求得到最佳的定量分析条件.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

超导核磁共振谱仪系美国 VARIAN 公司生产的 Mercury plus - 400 型.

分析用电子天平, 感量 0.01 mg, 系 Sartorius 电子天平.

### 1.2 试剂和试样

乙基苯标样, VARIAN 公司随仪器提供.

重水, 北京化工厂出品, 99.8 %  $D_2O$ .

顺丁烯二酸, A. R., 上海三爱思试剂有限公司出品, 经重结晶处理.

维生素 C 样品, 由市场医药商店购买, 系湖北华中药业有限公司出品.

### 1.3 试样定量分析测定手续

将新购维生素 C 约 20 粒在干燥洁净研钵中研磨成粉末, 称取 28.09 mg ( $W_x$ ) 该粉末样品, 加入内标顺丁烯二酸 7.23 mg ( $W_s$ ) 至  $\phi$  5 mm 核磁样品管中, 加入重水 0.5 mL, 在超声震荡器中溶解 5 min, 同时通以高纯氮气 1 min, 盖上管帽后, 放置, 待其中淀粉沉降于管底, 溶液澄清后即可进行核磁共振定量测定. 测得内标峰 ( $\delta$  6.44) 的峰面积  $A_s$  和维生素 C 的峰 ( $\delta$  4.97 或  $\delta$  3.76) 的面积  $A_x$ , 按下式计算维生素 C 的含量:

$$V. T. C \% = \frac{W_s A_x E_x}{W_x A_s E_s} 100\%$$

其中  $E_x$  为维生素 C 的当量 = 分子量 (176.13)  $\div$  定量峰对应的质子数,  $E_s$  为内标当量 (58.036).

### 1.4 谱仪的调节

将试样放入核磁共振谱仪中, 必须经过仔细匀场后再取数, 然后进行仔细的相位校正和线形校正, 待确定结构正确无误后方可选定定量峰和进行积分. 通常每次测定取数至少重复 5 次.

## 2 结果和讨论

### 2.1 延迟时间 $d_1$ 对积分面积的影响

设置核磁共振实验参数如下:

谱宽  $sw=4\ 798.46$  Hz; 脉冲宽度  $pw=3.0$   $\mu$ s; 发射偏置  $tof=25.752\ 1$  Hz; 采样次数  $nt=64$  次; 取数时间  $at=1.0$  s; 采样温度  $T=20$   $^{\circ}$ C.

样品: 乙基苯(溶剂: 氘代氯仿)

延迟时间  $d_1$  对各峰相对积分面积的影响, 见表 1.

表 1 延迟时间对各峰相对面积的影响

Table 1 Effect of delay time on the relative integral area of the peaks

delay time $d_1/s$	relative integral area of the peaks (area of $\text{CH}_2(\delta 2.60)=2.000$ )		
	$\delta 7.20$	$\delta 2.60$	$\delta 1.20$
1	4.310	2.000	2.782
2	4.336	2.000	2.780
5	4.673	2.000	2.776
10	4.972	2.000	2.760
20	5.089	2.000	2.770
50	5.091	2.000	2.833
100	5.271	2.000	2.778

由表 1 数据可以看出, 如令乙基苯的亚甲基质子积分面积为 2.000, 随着延迟时间  $d_1$  的增加, 苯环上质子的积分面积逐渐增加. 当  $d_1=20$  s 时, 积分值与其质子数相吻合(可能包括了很小氘代氯仿残余质子峰面积). 但是, 甲基质子峰积分值并不是这样. 这是因为其弛豫以甲基自旋转动机制为主. 由于甲基高速旋转, 相关时间很短, 导致弛豫时间很长, 加之其受温度影响很大, 积分在一定时间内难以达到 3.000 的相对值.

## 2.2 脉冲宽度 $pw$ 对相对峰面积的影响

设置核磁共振实验参数除  $pw$  和  $d_1=20$  s 外, 其它参数同 2.1.

从表 2 数据可以看出, 随着脉冲宽度增加, 苯环上质子的积分面积下降. 这是因为脉冲宽度(翻转角  $\theta$ )加大后, 弛豫难以在短时间内恢复到平衡状态. 所以, 脉冲宽度或翻转角以不超过  $30^\circ$  为宜. 甲基质子峰积分面积变化不大, 但仍不能接近 3.000 值.

表 2 脉冲宽度  $pw$  对相对峰积分面积的影响

Table 2 Effect of pulse width on the relative integral area of peaks

pulse width $pw/\mu\text{s}$	relative integral area of the peaks (area of $\text{CH}_2(\delta 2.60)=2.000$ )		
	$\delta 7.20$	$\delta 2.60$	$\delta 1.20$
1.0	5.319	2.000	2.745
2.0	5.179	2.000	2.800
3.0	4.971	2.000	2.802
4.5	4.812	2.000	2.808
6.0	4.566	2.000	2.879
9.1	3.982	2.000	2.853

注: 本仪器氢核  $90^\circ$  脉冲宽度  $pw=9.1 \mu\text{s}$

### 2.3 采样次数 $nt$ 对相对峰面积的影响

设置核磁共振实验参数：除  $nt$  和  $d_1=20$  s 外，其他参数同 2.1.

从表 3 中苯环质子的数据可以看出，采样次数少，数据重现性差。当达到 64 次以上时，数据比较稳定，重现性好，也趋近于其质子总数 5。为节省实验时间，加快分析速度起见，累加 64 次即可满足一般分析的要求。甲基质子峰积分虽然累加了 64 次，数据也基本稳定，但离 3.000 值仍有差距。

表 3 采样次数  $nt$  对相对峰积分面积的影响

Table 3 Effect of number of transient on the relative integral area of peaks

number of transient $nt$ (times)	relative integral area of the peaks (area of $\text{CH}_2(\delta 2.60)=2.000$ )		
	$\delta 7.20$	$\delta 2.60$	$\delta 1.20$
1	4.143	2.000	2.883
4	4.821	2.000	2.825
8	5.187	2.000	2.763
16	5.163	2.000	2.724
64	4.969	2.000	2.826
128	4.962	2.000	2.827

### 2.4 采样时间 $at$ 等参数对相对峰面积的影响

总的来说，采样时间对相对峰积分面积没有太明显影响，为兼顾灵敏度和分辨率两者，建议  $at$  在 2.0 ~ 4.0 s 为宜。在射频场比较均匀的情况下，偏置对峰积分影响也不大。只要不是偏离中心频率太远就可以了。谱宽不宜取得过宽，谱宽覆盖了药物全部质子峰即可，以免谱宽过大，射频场不均匀引起单位质子峰面积的不一致。

### 2.5 技术因素的影响

所谓技术因素是指一些人为操作方式，例如，磁场的均匀度、核磁共振峰的选取、峰面积的界定等。这些因素也往往影响定量分析的准确性和重现性。

根据经验，谱仪的工作状态是十分关键的。磁场均匀度往往由分辨率来量度。定量分析时，谱仪的分辨率最好达到该仪器的出厂指标。

在定量分析特征峰选取的问题上，目前流行的做法是“首选含有多个氢的单峰”。显然首先选用的是孤立的甲基峰。但经本文作者研究表明，因甲基弛豫难以达到完全，所以其表现出来的峰积分值小于 3 个质子对应的峰面积，导致测定结果偏低。因此，我们认为，在选作的特征峰与其它峰完全分开的条件下，不管对应的质子多少，不管峰形裂分如何，都可选做定量特征峰。在采用内标法的情况下，最好不选用甲基峰，尽管它是一单峰。

另一个问题是峰面积的界定问题。在实际工作中，要想定量测定的重现性好，标准偏差小，界定峰积分面积的起、止点是十分重要的。根据我们的经验，在界定峰起、止点时应将该峰谱图放大，仔细调整相位，取峰形轮廓线与完全水平的基线刚好重合处为其起、止点。这样积分面积重现性良好。

顺便指出，内标质子与试样质子的同步完全弛豫是非常重要的，它可以影响测定数

据的准确性.

## 2.6 核磁共振定量分析的综合因素

综上所述, 提出核磁共振定量分析的实验条件如下:

a、仔细匀场, 达到分辨率 1.0 Hz 以下;

b、仔细校正相位, 峰形左、右对称, 无边带, 呈正态分布的标准吸收型峰形. 为避免边带可以采用不旋转样品管的操作.

c、仔细校正基线, 最好在全部质子化学位移范围内成水平直线; 寻找准确的基线与吸收峰底部交点.

d、核磁共振参数参考值如下:  $d_1 \geq 20$  s;  $pw \leq 30^\circ$ ;  $nt \geq 64$  次; 数据点数  $np \geq 2 \times sw \times at$ ; 谱宽以覆盖药物全部质子共振频率范围为宜, 不宜过宽. 偏置位于中心频率附近为宜.

e、在上述条件下, 以易于达到完全弛豫的质子峰面积为基数, 求出各质子峰面积的相对比. 查看各峰相对面积与其代表质子数是否吻合. 选择其中分离良好、峰形对称, 且峰面积与其质子数十分接近的峰为定量特征峰.

f、在选择和设置好上述条件下, 对试样进行测定, 至少重复 5 次. 必须着重指出, 上述因素即使完全满足了, 也不应期望核磁共振方法有很高准确度和精密度<sup>[7]</sup>. 因为影响信号积分数值的因素很多, 不可能有很高的精度. 通常相对偏差在 1 ~ 2 % 之内应是满意的了, 不宜过分苛求.

我们在上述条件下, 对实际药物样品维生素 C 进行了测定, 结果见表 4.

表 4 维生素 C 含量的核磁共振定量分析结果

Table 4 Content of vitamin C determined by NMR

number of determination	relative integral area of the peaks (area of peak ( $\delta$ 4.08)=1.000)			
	$\delta$ 6.44 internal standard	$\delta$ 4.97 CH (Ring)	$\delta$ 4.08 CH	$\delta$ 3.76 CH <sub>2</sub>
1	1.594	0.995	1.000	2.013
2	1.590	0.992	1.000	2.013
3	1.598	1.000	1.000	2.012
4	1.591	0.994	1.000	2.008
5	1.592	1.008	1.000	2.014
content of vit. C (average)		67.40 %		67.96 %
standard deviation $\sigma$		0.335		0.402
relative standard deviation		0.50 %		0.59 %

由表 4 可看出, 在仪器状态很好的情况下, 核磁共振定量分析的精确度也可以获得小于 1% 的好结果, 也可以看出在上述分析条件下, 选择不同定量特征峰所得到的相对标准偏差的相差在 0.1% 之内.

### 3 结论

药物核磁共振定量分析法, 由于其操作简便, 样品用量少, 定性鉴定和定量分析同步完成, 其它物质和杂质干扰少, 无须分离过程, 分析速度和精密度可以接近 HPLC 法。特别是 NMR 定量法不依赖于被测物的高纯标准品即可进行定量分析。这样, 定量分析的困难程度大为降低, 只要一般标准品(内标)可溶于溶解试样的溶剂之中就可完成定量分析。这又是 HPLC 法不及之处。核磁共振定量分析由于影响峰面积的因素很多, 其标准偏差在 1% 左右, 即为满意结果, 不可过分追求。核磁共振法这种精度已能满足现代药品市场的监管要求。

### 参考文献:

- [1] Maniara G, Rajamoorthik K, Rajan S, *et al.* Method performance and validation for quantitative analysis by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals[J]. *Anal Chem*, 1998, 70: 4 921—4 928.
- [2] Song Jing-xia(孙静霞), Zhang Zheng-xin(张正行). The applications of NMR quantification analysis of drugs (NMR 在药物定量分析中的应用)[J]. *Chinese J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2005, 25(1): 117—122.
- [3] Liu Ying(刘英), Hu Chang-qin(胡昌勤). Applications of NMR to quantitative analysis for antibiotic drugs(核磁共振在抗生素药物定量分析中的应用)[J]. *Chinese J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2001, 21(6): 447—452.
- [4] Hu Min(胡敏), Hu Chang-qin(胡昌勤), Liu Ying(刘英). Determination of drug reference substance content by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy(核磁共振谱法测定药物基准物质的绝对含量)[J]. *Chinese J Anal Chem(分析化学)*, 2004, 32(4): 451—455.
- [5] Wang Qing-feng(王庆峰), Hang Tai-jun(杭太俊), Zhang Zheng-xing(张正行). Determination of the enantiomeric composition of naproxen by NMR with a chiral lanthanide shift reagents(核磁共振法测定萘普生对映体相对含量)[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 1999, 30(1): 31—33.
- [6] Fent Min(冯敏), Liu De-yu(刘德育), Pan Shi-rong(潘仕荣). The application of NMR spectroscopy to pharmaceutical analysis in vivo(NMR 技术在体内药物分析中的应用)[J]. *Progress in Pharmaceutical Science(药学进展)*, 1998, 22(4): 200—204.
- [7] Mao Xi'an(毛希安). The practical technique and application of modern nuclear magnetic resonance(现代核磁共振实用技术及应用)[M]. Beijing(北京): Scientific and Technical Documents Publishing House(科学技术文献出版社), 2000. 225—226.

## Studies of NMR Acquisition Parameters for Quantitative Analysis of Drugs

ZHANG You-jie<sup>1</sup>, LIU Xiao-peng<sup>2\*</sup>

(1. The Center for Analysis and Testing, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430415;

2. The Center for Analysis and Testing, Central China Normal University, Wuhan 430079)

**Abstract:** The principles underlying selection of NMR acquisition parameters (i. e. , relaxation delay time, pulse width and number of transient etc. ) for quantitative analysis of drugs were discussed in detail. Some requirements on selecting appropriate peaks for quantitative analysis were proposed. We showed that the methyl peak is not suitable for quantitative analysis because it often has long relaxation time. With the principles discussed, the content of vitamin C determined by quantitative NMR analysis was found to have relative standard deviation less than 1%.

**Key words:** nuclear magnetic resonance, quantitative analysis, drug, acquisition parameter, vitamin C

---

\* Corresponding author: Liu Xiao-peng, Tel: 027-67867962-8116, E-mail: liuxp8828@sina.com.cn.