

^1H 与 ^{13}C 核磁共振定量技术在聚桂醇成分分析中的应用比较*

刘阳, 魏宁漪, 何兰**

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立 ^{13}C 核磁共振定量 (qNMR) 测定聚桂醇中脂肪碳链长度及聚氧乙烯醚的聚合度的方法, 比较 ^{13}C qNMR 和 ^1H qNMR 测定方法之间的异同。**方法:** 在 ^{13}C qNMR 试验中, 以乙酰丙酮铬 (Ⅲ) 为弛豫试剂, 氘代氯仿甲醇为混合溶剂, 采用反门控去偶的 zgig30 脉冲序列测定聚桂醇成分; 在 ^1H qNMR 试验中, 以氘代氯仿为溶剂, 采用 zg30 脉冲序列测定聚桂醇成分。**结果:** 通过 ^{13}C qNMR 技术测得聚桂醇样品中脂肪碳链长度为 13.6, 聚氧乙烯醚的聚合度 $n=9.4$, 与使用 ^1H qNMR 技术测定的结果 (脂肪碳链长度为 12.4, 聚氧乙烯醚的聚合度 $n=9.4$) 相近。**结论:** ^{13}C qNMR 与 ^1H qNMR 均能准确测定聚桂醇成分, ^1H qNMR 技术使用样品量少, 检测速度快, 但响应信号重叠多, 精确度低, 适用于快检初筛; ^{13}C qNMR 技术需要样品量大, 耗时长, 抗干扰能力强, 适合进一步精确测定聚桂醇成分。

关键词: 聚桂醇; 碳链长度; 聚合度; 弛豫试剂; 核磁共振定量; 成分分析; 质量控制

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 04-0716-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.04.22

Comparison of ^1H and ^{13}C quantitative nuclear magnetic resonance in component analysis of lauromacrogol*

LIU Yang, WEI Ning-yi, HE Lan**

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish a ^{13}C quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) method in analysis of the average chain length of the fatty alcohol and the average number of moles of polyethylene oxide in lauromacrogol, and to compare the difference between ^1H qNMR and ^{13}C qNMR methods. **Methods:** In ^{13}C qNMR experiment, chromium (Ⅲ) acetylacetonate was used as a relaxation reagent, CDCl_3 and deuterated methanol mixture was used as solvent, and zgig30 pulse sequence was deployed; In ^1H qNMR experiment, CDCl_3 was used as solvent and zg30 pulse sequence was applied. **Results:** Based on ^{13}C qNMR experiments, the average chain length of the fatty alcohol was 13.6 and the average number of moles of polyethylene oxide was 9.4. Both results were similar to those obtained from ^1H qNMR (the average chain length of the fatty alcohol was 12.4 and the average number of moles of polyethylene oxide was 9.4). **Conclusion:** Both ^1H and ^{13}C qNMR can effectively acquire the component information of lauromacrogol. Compared with ^{13}C qNMR, ^1H qNMR method requires smaller amount of samples, the testing speed is quicker but with lower precision. Thus ^1H qNMR is suitable for rapid screening while ^{13}C qNMR

* 广西特聘专家专项资助 (2016)

** 通信作者 Tel: (010) 53851600; E-mail: helan1961@aliyun.com

第一作者 Tel: (010) 53851571; E-mail: liuyang1819@126.com

technique is a perfect tool for accurate determination of the component of lauromacrogol.

Keywords: lauromacrogol; average chain length of the fatty alcohol; average number of moles of polyethylene oxide; relaxation reagent; quantitative NMR; component analysis; quality control

核磁共振定量 (qNMR) 技术建立在核磁共振谱响应信号面积与样品中被激发的原子数目成正比的基础上,在进行测定时不需要引入校正因子,通过计算相应被激发原子数目达到定量的目的。由于这项技术无需使用对照品,测定速度快以及消耗样品量少,已经被包括《中华人民共和国药典》在内的各国药典收载^[1-3],^[4]⁵²,并广泛应用于药物质量控制领域^[5-7]。

qNMR 技术常用于原料药或制剂中药物含量测定,也被应用于高分子聚合物中碳链长度等的测定^[8]。作者之前利用 qNMR 技术,测定了聚桂醇样品中脂肪碳链的长度及聚氧乙烯醚的聚合度,并通过内标法进一步测定了聚桂醇的含量^[9]。聚桂醇由多个环氧乙烷和月桂醇聚合而成,分子式为 $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$,用于食管曲张静脉出血等的硬化治疗^[10]。聚桂醇在包括美国药典 (USP)、欧洲药典及日本药局方在内的各主要药典中均有收录,但是检查项及规定各异。由于聚桂醇中容易存在不同碳链长度的杂质或脂肪烃, NMR 氢谱中杂质与聚桂醇的脂肪链响应信号重叠严重,不同位置共振信号的化学位移较近,难以分离,所以 ¹H NMR 技术仅适用于对聚桂醇碳链长度及聚合度的快筛考察,难以得到进一步的详细结构信息。

欧洲药典使用 ¹³C qNMR 技术测定聚桂醇样品的碳链长度与聚合度^[4]²⁵⁹⁴,但是未探讨具体参数设置对结果的影响以及与 ¹H qNMR 技术得到的结果之间的区别。

本文利用 ¹³C qNMR 技术测定聚桂醇成分中脂肪碳链长度与聚氧乙烯醚聚合度的详细信息,将结果与 ¹H qNMR 的测定结果进行比较,并进一步探讨了 2 种方法各自的优缺点,探索了通过 2 种方法共用来加强对聚桂醇的质量控制。

1 仪器及样品及试剂

1.1 仪器 Bruker Ascend 500 型核磁共振仪 (布鲁克公司), 5 mm PABBO 探头及 Topspin 3.2 试验控制及数据处理软件; Mettler Toledo XP205 电子天平 (梅

特勒-托利多公司)。

1.2 样品及试剂 聚桂醇 (陕西天宇制药有限公司), 氘代氯仿 (>99.9%, Sigma, 北京金欧翔科贸公司分装), 氘代甲醇 (>99.9%, Sigma, 北京金欧翔科贸公司分装), 乙酰丙酮铬 (>97%, Sigma)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 聚桂醇 ¹H NMR 定性定量试验: 取聚桂醇样品适量, 用 1 mL 氘代氯仿溶解, 配制成浓度约为 100 mmol · L⁻¹ 的聚桂醇溶液, 转移 0.6 mL 溶液至核磁管中即得; ¹³C qNMR 试验: 取 100 mmol · L⁻¹ 聚桂醇溶液 0.4 mL, 置 5 mm 核磁管中, 加入含有 0.1 mol · L⁻¹ 乙酰丙酮铬的氘代氯仿与氘代甲醇混合溶液 [氘代氯仿 - 氘代甲醇 (1 : 1)] 0.3 mL, 混匀即得。

2.2 实验条件及方法 采用 zg30 脉冲序列在恒温 (25 °C) 下获取 ¹H-NMR 谱; 具体试验参数: 谱宽 (SWH) 10 000 Hz, 采样点数 (TD) 64 K, 试验弛豫时间 15 s, 采样次数 (NS) 16, 空扫次数 (DS) 2。采用 zgig30 脉冲序列在恒温 (25 °C) 下获取 ¹³C-NMR 谱, 以氘代氯仿为锁场溶剂; 具体试验参数: 谱宽 (SWH) 31 250 Hz, 采样点数 (TD) 64 K, 弛豫时间 3 s, 采样次数 (NS) 12 288, 空扫次数 (DS) 4。

2.3 聚桂醇的 ¹H-NMR、¹³C-NMR 谱解析 聚桂醇的氢谱在之前的报道中已有详细的分析与归属^[9], 聚桂醇样品中脂肪碳链平均长度为 12.4, 聚氧乙烯醚的聚合度 *n* 为 9.4。碳谱由于响应范围更宽, 响应信号的分离更好; 脂肪碳链上的碳出现在 δ 14~35 之间, 聚氧乙烯醚中以及与羟基相连 15 位的碳由于氧的拉电子能力而出现在更低场部分。聚桂醇分子结构见图 1, 聚桂醇 ¹³C qNMR 谱图、响应信号归属及积分见图 2、表 1。

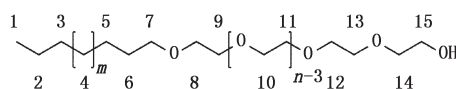
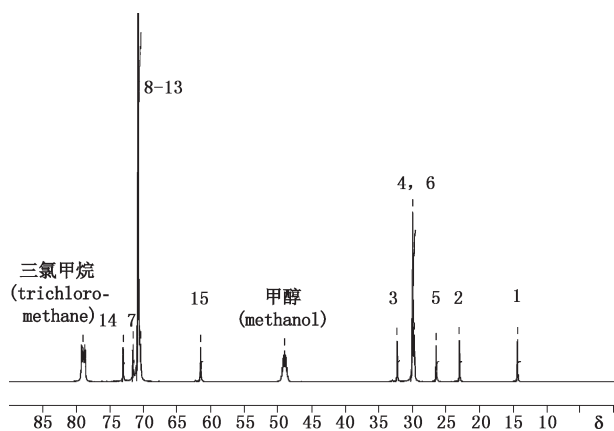


图 1 聚桂醇分子结构

Fig. 1 Lauromacrogol structure

图2 ^{13}C qNMR 响应信号及归属Fig. 2 ^{13}C qNMR spectrum and assignments表1 聚桂醇 ^{13}C -NMR 峰归属及峰面积积分Tab. 1 ^{13}C -NMR assignment and signal integration of

lauromacrogol

δ	峰归属 (assignment)	官能团 (functional group)	峰面积 (integral)
14.33	1	脂肪碳链 (fatty alcohol chain)	0.985 1
22.97	2	脂肪碳链 (fatty alcohol chain)	1.000 0
26.42	5	脂肪碳链 (fatty alcohol chain)	1.006 0
29.66~ 29.95	4, 6	脂肪碳链 (fatty alcohol chain)	7.499 7
32.23	3	脂肪碳链 (fatty alcohol chain)	1.025 6
61.53	15	聚氧乙烯醚 (polyethylene oxide)	1.017 2
70.42~ 70.84	8~13	聚氧乙烯醚 (polyethylene oxide)	17.301 5
71.60	7	脂肪碳链 (fatty alcohol chain)	1.079 8
73.06	14	聚氧乙烯醚 (polyethylene oxide)	0.948 2

脂肪碳链长度可以由 1~7 位置碳响应面积相加得到:

$$A_{\delta 14-33} + A_{\delta 71.60} = 0.985\ 1 + 1.000\ 0 + 1.006\ 0 + 7.499\ 7 + 1.025\ 6 + 1.017\ 2 + 1.079\ 8 = 13.6134, \text{修约为 } 13.6。$$

谱图中 δ 60~71 以及 δ 73.06 处的峰代表与氧原子直接相连的碳,由于每个聚氧乙烯中含有 2 个碳原子,聚氧乙烯聚合度 $n = (A_{\delta 60-71} + A_{\delta 73.06}) \div 2 = (1.017\ 2 + 17.301\ 5 + 0.948\ 2) \div 2 = 9.366\ 4$,修约为 9.4。

3 讨论

3.1 仪器参数设定 qNMR 试验中一般要求信噪比 S/N 大于 150 以保证定量结果的准确性^[11]。由于 ^{13}C 的自然丰度只有约 1.1%, ^{13}C NMR 试验响应较低,一般用于定性试验。但是为了准确测定碳链长度,就需要使用 ^{13}C qNMR 技术。为了达到定量的目的,要满足以下条件:1) 待测样品浓度足够大;由于 ^{13}C 响

应低,更需要使用尽量多的聚桂醇;2) 扫描次数足够多,使得响应信号的面积足够大来保证积分的准确性。普通的 ^1H qNMR 试验一般测定 16~128 次即可达到满意的结果,但是 ^{13}C qNMR 试验需要更多扫描次数。欧洲药典要求扫描 2 048 次^{[4]2594},本次试验中发现响应最低的 δ 73.06 信号的 S/N 达不到大于 150 的定量要求。实际测定中扫描次数超过 12 000 次才达到试验要求。

3.2 脉冲序列选择 由于大量 ^{13}C - ^1H 偶合的发生,会使 ^{13}C NMR 谱图裂分交叉,难以准确积分,因此采用适当的质子去偶技术便十分重要^[12-13]。常用的去偶技术包括质子宽带去偶、偏共振去偶、选择性去偶、门控去偶及反门控去偶等。为了严格保证 ^{13}C NMR 谱图中各碳的响应信号强度与对应的碳原子个数成比例,只有使用反门控去偶技术。质子去偶器只在自由感应衰减(FID)采集期间打开,从而得到无奥弗豪塞尔核效应(nuclear overhauser effect, NOE)增益的去偶谱图,保证响应信号与碳原子个数之间的对应关系,满足定量的要求。由于这项技术会降低信号灵敏度,必须通过增加样品浓度以及采样次数来弥补。这也是 ^{13}C qNMR 试验比较耗时的原因之一。

3.3 弛豫时间的设定以及弛豫试剂的添加 弛豫延迟时间是指 NMR 试验中一次采样结束后到下一次脉冲开始之间的时间^[14]。qNMR 试验中一般需要设定比较长的弛豫延迟时间来保证脉冲测定时上一次激发原子核回到初始态,保证积分的准确性。但是这个时间的设定也延长了整个实验的耗时。由于碳核的弛豫时间相对较长,所以 ^{13}C qNMR 试验中如果设定足够长的弛豫延迟时间,由于扫描次数很多,可能会耗时几天或者更久,操作不便,需要加入弛豫试剂。弛豫试剂是一类顺磁性物质,本身不产生 NMR 响应,可以吸收激发态 ^{13}C 原子转移的能量,从而加快被激发原子核回归到基态,有效降低弛豫延迟时间。本实验中加入 $0.1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰丙酮铬,可以有效降低弛豫延迟时间。试验中设定弛豫时间为 3 s,结果良好。

3.4 碳链长度及聚氧乙烯醚聚合度计算 氢谱计算脂肪碳链长度过程中,需要首先归属氢的响应信号属于甲基或者亚甲基,利用氢的响应信号面积除以相应的氢原子数间接得到碳原子数,再将属于脂肪碳链的碳原子个数相加得到脂肪碳链长度。而 ^{13}C qNMR 的原理及计算就更为简便,只需要将组成脂肪碳链的

C1~C7 对应的响应积分面积相加即可得到脂肪碳链长度,本次试验测定结果为 13.6,与利用 ^1H qNMR 测定出的 12.4 结果相近。

由于聚氧乙烯醚结构中含有 2 个碳原子,其聚合度 n 的值为碳原子个数除以 2,相应计算方法为 C8~14 对应的响应信号积分面积之和除以 2。本文中测得的聚氧乙烯醚的聚合度 n 为 9.4,与之前报道的使用 ^1H qNMR 技术测得的聚合度值 $n^{[9]}$ 相同,表明 2 种方法均具有可行性。

3.5 ^1H qNMR 和 ^{13}C qNMR 方法比较 ^1H qNMR 使用样品量少 (~20 mg),测定速度快(约 15~20 min),但是易受杂质等干扰,尤其是在测定含有不同脂肪碳链长度的杂质以及脂肪烃时,由于响应信号重叠严重,结果容易发生偏差; ^{13}C qNMR 技术虽然耗时久(约 20 h),但是由于碳谱本身的范围广,响应信号之间分离更好,可以有效排除杂质的干扰,测定结果更为可靠。

4 结论

^1H qNMR 和 ^{13}C qNMR 2 种技术各有特点, ^1H qNMR 技术适合于快检及初筛考察聚桂醇类化合物结构及质量, ^{13}C qNMR 技术合适在氢谱的基础上,详细深入地获取聚桂醇样品的结构信息,排除杂质干扰,加强对其的质量控制。通过 2 种方法结合使用,根据不同的检测需求选择合适的技术,为聚桂醇类产品的全面质量控制奠定基础。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典 2015 年版·四部[S]. 2015: 52
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 52

[2] USP 35-NF 30[S]. 2012: 324

[3] JP 17[S]. 2016: 47

[4] EP 8.0[S]. 2014: 52, 2594

[5] HOLZGRABE U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010,

57(2): 229

- [6] 张芬芬,蒋孟虹,沈文斌,等. 定量核磁共振(QNMR)技术及其在药学领域的应用进展[J]. *南京师范大学学报*, 2014, 14(2): 8
ZHANG FF, JIANG MH, SHEN WB, *et al.* Progress of quantitative nuclear magnetic resonance technology in pharmaceutical applications[J]. *J Nanjing Norm Univ*, 2014, 14(2): 8
- [7] 刘阳,周颖,张才煜,等. 核磁共振定量法测定咪基吡啶含量[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(6): 1087
LIU Y, ZHOU Y, ZHANG CY, *et al.* Determination of the content of ^1H -pyrazole-1-carboxamide by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR)[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(6): 1087
- [8] FOURNIAL AG, MOLINIER V, VERMEERSCH G, *et al.* High resolution NMR for the direct characterization of complex polyoxyethylated alcohols (C_iE_j) mixtures[J]. *Colloid Surface A*, 2008, 331(1-2): 16
- [9] 刘阳,岳瑞齐,张才煜,等. 基于 ^1H -NMR 的聚桂醇成分分析[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(9): 1576
LIU Y, YUE RQ, ZHANG CY, *et al.* Component analysis of lauromacrogol based on ^1H -NMR[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(9): 1576
- [10] 郑艳,徐春丽. 聚桂醇 400 临床应用进展[J]. *医药导报*, 2012, 31(2): 190
ZHENG Y, XU CL. Clinical application of lauromacrogol 400[J]. *Her Med*, 2012, 31(2): 190
- [11] WEBER M, HELLRIEGEL C, RUECK A, *et al.* Using high-performance quantitative NMR (HP-qNMR) for certifying traceable and highly accurate purity values of organic reference materials with uncertainties <0.1% [J]. *Accredit Qual Assur*, 2013, 18(2): 91
- [12] HOLZGRABE U, WAWER I, DIEHL B. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis* [M]. Oxford: Elsevier, 2008
- [13] WEBSTER GK. Expanding the analytical toolbox: pharmaceutical application of quantitative NMR[J]. *Anal Chem*, 2014, 86(23): 11474
- [14] 张琪,李晓东,杨化新. 核磁共振技术在药品标准领域中的应用进展[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(3): 545
ZHANG Q, LI XD, YANG HX. Application of nuclear magnetic resonance in pharmaceutical standards[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(3): 545

(本文于 2017 年 5 月 22 日收到)