

基于定量核磁共振与色谱含量测定相结合的相对校正因子测定技术研究

王娇娇¹, 葛志伟¹, 陆诗燕¹, 袁京群¹, 唐宇², 王迎超^{2*} (1. 浙江大学农环测试中心, 杭州 310058; 2. 浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要:目的 建立基于定量核磁共振(qNMR)与色谱融合的相对校正因子(RCF)测定方法,探讨方法的可行性与准确性。方法 充分利用qNMR同一次测定中,所有激发原子的光谱常数相同的特点,由核磁信号计算化合物的物质的量之比,运用色谱技术测定色谱峰面积之比,进而将两者结果融合,计算出RCF;以对苯二甲酸二甲酯相对于香豆素的校正因子为例,验证方法的可靠性,并将该方法用于前维生素D₃的RCF的计算。结果 实验结果显示,斜率比值法、多点法、融合技术3种方法测得的RCF值相同,验证了方法的可靠性。此外使用该方法测定了前维生素D₃相对于维生素D₃的RCF,测定结果与文献报道的结果一致,进一步证明了该计算方法准确可靠。结论 液相色谱与定量核磁共振融合技术,为在缺乏对照品的情况下,计算化合物RCF提供了新思路,解决了性质不稳定、对照品不易获得的化合物RCF测定难的问题。

关键词:定量核磁共振;液相色谱法;相对校正因子;维生素D₃;前维生素D₃

doi:10.11669/cpj.2024.05.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)05-0446-05

Determination of Relative Correction Factor Based on Quantitative Nuclear Magnetic Resonance and Chromatography

WANG Jiaojiao¹, GE Zhiwei¹, LU Shiyan¹, YUAN Jingqun¹, TANG Yu², WANG Yingchao^{2*} (1. Analysis Center of Agrobiolgy and Environmental Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determining the relative correction factor (RCF) based on quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) and chromatography, and explore the suitability and accuracy of the method. **METHODS** The spectral constants of all excited atoms are the same in the qNMR experiment. The ratio of the amount of the substances was calculated by qNMR, and the chromatographic peak area was determined by chromatography. Then the RCF was calculated from the above two results. Taking the correction factor of dimethyl terephthalate relative to coumarin as an example, the reliability of the method was verified. Then the method was used to calculate the RCF of pre-vitamin D₃. **RESULTS** The RCF values obtained by slope ratio method, multi-point method, fusion technology were the same. The experimental result verified the reliability of the method. In addition, this method was used to determine the RCF of pre-vitamin D₃ relative to vitamin D₃. The results were consistent with those reported in the literature, which further proved that the calculation method was accurate and reliable. **CONCLUSION** This method provides a new idea for calculating RCF in the absence of reference substance, and solves the problem of difficult determination of RCF of compounds with unstable properties or unavailable standards.

KEY WORDS: quantitative nuclear magnetic resonance; liquid chromatography; relative correction factor; vitamin D₃; pre-vitamin D₃

目前文献报道的相对校正因子(relative correction factor, RCF)常用计算方法有:斜率比值法、多点法、吸光系数比值法^[1]。这些方法建立时都需要用到对照品,但以下3类对照品不仅难以购买而且价格昂贵:①不易获得化合物,例如低含量植物活性成

分、药物杂质等;②不稳定化合物,如受到光、热等作用易发生构型转化的顺反异构体等;③个性化需求的特殊化合物,如特殊催化剂、荧光传感器等。

不同于常用的含量测定仪器分析手段色谱法(如液相色谱法和气相色谱法)、光谱法(如紫外吸

基金项目:浙江省自然科学基金项目资助(LTGY23H290006);浙江大学2022年实验技术研究项目资助(SYBJS202210)

作者简介:王娇娇,女,硕士研究生,实验师 研究方向:药品和食品质量控制 * 通讯作者:王迎超,男,硕士,副研究员 研究方向:药物分析与药物质量控制的研究 Tel: (0571)88982871

收光谱法和荧光光谱法)、质谱法以及各种联用技术^[2-3],定量核磁共振(quantitative nuclear magnetic, qNMR)的分析对象为原子,不需要和分析物完全相同的参考物质,无需制作标准曲线,只需含有相同原子的化合物做内标即可实现绝对定量,已广泛用于药物分析^[4-6]、食品分析^[7]和参考物质质量控制^[3]等领域。根据国际计量委员会对基准分析方法的定义,qNMR已满足基准定量方法的要求^[8-11]。

鉴于qNMR同一次测定中,所有激发原子的光谱常数相同的特点,可采用稳定价廉的化合物或体系中其他化合物作为内标,由核磁信号计算其与待测化合物的物质的量之比,运用色谱技术测定内标与待测化合物的色谱峰面积之比,进而将两者结果融合,即可计算出待测有机化合物的色谱RCF,从而达到由易得、稳定、价廉的化合物来测定不稳定、不易获得、昂贵的化合物RCF的目的。

活性维生素D类化合物具有共轭三烯结构,可热异构化为前维生素D^[12-13],且在避光、无氧、加热80℃条件下,部分维生素D类化合物定量转化为前维生素D,无其他杂质产生^[14]。原型结构与前体结构是一对异构体,在溶液中发生可逆的异构化,这与温度和时间有关,因此前维生素D的制备及定量测定在维生素D类化合物含量测定中都是共性的难点问题^[12]。

本研究首先分别使用斜率比值法、多点法、液相色谱与定量核磁共振氢谱(¹H-qNMR)融合技术3种方法测定了对苯二甲酸二甲酯相对于香豆素的校正因子,验证了方法的可行性。在此基础上,采用融合技术测定了前维生素D₃(pre-Vit D₃)相对于维生素D₃(Vit D₃)的RCF,结果与文献一致。本方法通过色谱技术和定量核磁共振技术的融合为RCF的测定提供了新思路,同时解决了不稳定、不易获得、昂贵的化合物测定难的问题。

1 仪器与试剂

JNM-ECZ500R/M1型全数字化超导核磁共振波谱仪(日本JEOL公司);LC-20AD型高效液相色谱仪(日本岛津公司);AL104型万分之一天平(德国METTLER TOLEDO公司);DHG-9053A型电热恒温鼓风干燥箱。

氘代二甲基亚砷(DMSO-*d*₆,99.9% D+0.03% TMS,美国剑桥同位素实验室公司);甲醇(色谱纯);对苯二甲酸二甲酯、香豆素(分析纯);Vit D₃

(98%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);实验用水为超纯水。

2 方法

2.1 融合技术方法验证

2.1.1 方法验证样本制备 准确称取对苯二甲酸二甲酯和香豆素各5 mg溶于1 mL DMSO-*d*₆中,随后用DMSO-*d*₆稀释成不同浓度标准溶液(样品浓度见表1)用于¹H-qNMR测定。同时将系列标准溶液用乙腈稀释100倍后用液相色谱测定各化合物色谱峰面积。

2.1.2 ¹H-qNMR测定 ¹H-qNMR采集条件:脉冲宽度6.527 μs,脉冲角度90°,弛豫时间40 s,扫描次数16次。数据使用JEOL Delta 6.0.0软件处理,线宽因子0.2 Hz,进行手动相位校正和基线校正,积分时,选定积分区域,每个峰积分3~5次,相对标准偏差(RSD)小于1%时取平均值^[5]。

2.1.3 高效液相色谱条件 岛津InertSustain C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:体积分数80%乙腈水溶液;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:40℃;检测波长254 nm;进样量:10 μL。

2.2 pre-Vit D₃的RCF测定

2.2.1 供试品溶液制备 精密称取Vit D₃ 10 mg,置于棕色小瓶中,加入1.0 mL DMSO-*d*₆,充氮气排除空气,置于80℃电热恒温鼓风干燥箱中,避光加热1 h后取出,迅速冷却,用于¹H-qNMR测定。同时用甲醇稀释100倍后用液相色谱测定Vit D₃和pre-Vit D₃的色谱峰面积。

2.2.2 ¹H-qNMR测定 ¹H-qNMR采集条件:脉冲宽度6.527 μs,脉冲角度90°,弛豫时间10 s,扫描次数64次。数据使用JEOL Delta 6.0.0软件处理,线宽因子0.2 Hz,进行手动相位校正和基线校正,积分时,选定积分区域,每个峰积分3~5次,相对标准偏差(RSD)小于1%时取平均值^[5]。

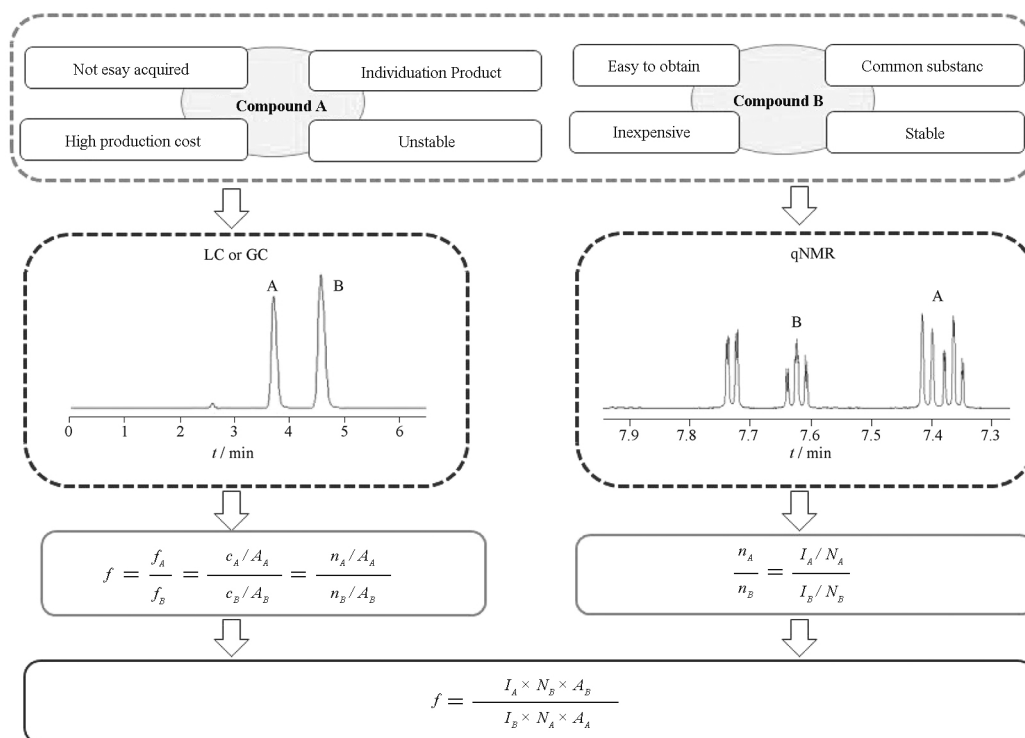
2.2.3 高效液相色谱条件 YMC Carotenoid柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:体积分数98%甲醇水溶液;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:40℃;检测波长265 nm;进样量:10 μL。

3 结果与讨论

3.1 qNMR与色谱融合的色谱相对RCF计算简介 一般常用的气相色谱和液相色谱的检测器对不同物质的响应值不同,但在¹H-qNMR同一次测定中,所有激发氢原子的光谱常数相同。通过

^1H -qNMR中峰面积的比值和代表的原子数,可以得到溶液中不同化合物的物质的量之比,结合色谱测定的峰面积之比,进而计算 RCF(无特殊说明情况

下,本研究 RCF 均为相对摩尔校正因子)。从而达到由易得、稳定、价廉的化合物来测定不稳定、不易获得、昂贵的化合物 RCF 的目的,见图 1。



c_A, c_B - 化合物 A 和 B 的物质的量浓度; f - 化合物 A 相对于 B 的 RCF; f_A - 化合物 A 的校正因子; f_B - 化合物 B 的校正因子; A_A, A_B - 色谱图中化合物 A 和化合物 B 的峰面积; n_A, n_B - 化合物 A 和化合物 B 的物质的量; I_A, I_B - 氢谱中化合物 A 和化合物 B 指定峰的积分面积; N_A, N_B - 氢谱中化合物 A 和化合物 B 指定峰代表的氢原子数。

c_A, c_B - the concentration of compound A and B; f - the relative correction factor of compound A relative to B; f_A - the correction factor of compound A; f_B - the correction factor of compound B; A_A, A_B - the peak areas of compound A and compound B in the chromatogram; n_A, n_B - the molar of compound A and B; I_A, I_B - represent the integral area of the designated peak of compound A and compound B in the hydrogen spectrum; N_A, N_B - the number of hydrogen atoms represented by the designated peak of compound A and compound B in the hydrogen spectrum.

图 1 定量核磁共振(qNMR)与色谱融合的色谱相对校正因子(RCF)计算

Fig. 1 Calculation method of chromatographic relative correction factor based on the fusion of quantitative nuclear magnetic resonance and chromatography technology.

3.2 融合技术方法验证

3.2.1 实验参数的影响 分别考察了不同脉冲角度、弛豫时间、扫描次数对 ^1H -qNMR 积分面积的影响。当脉冲角度为 90° , 弛豫时间 ≥ 40 s, 扫描次数 ≥ 16 次时, 信噪比 > 150 且指定信号积分面积之比趋于稳定。

3.2.2 不同方法测定的 RCF 值比较 运用传统的斜率比值法、多点法以及本研究提出的融合技术测定的对苯二甲酸二甲酯相对于香豆素的 RCF 均为 0.52, 结果见表 1。表明将 qNMR 与色谱技术融合用于 RCF 测定的方案是可行的, 测定结果是准确的。

3.3 pre-Vit D₃ 相对校正因子计算

3.3.1 pre-Vit D₃ 制备条件优化 Vit D₃ 具有共轭

三烯结构, 避光隔绝空气条件下能够热异构化为 pre-Vit D₃(图 2)。Vit D₃ 与 pre-Vit D₃ 之间的转变是可逆的, 升高温度有利于 pre-Vit D₃ 的生成, 但 Vit D₃ 为优势构象, 而 pre-Vit D₃ 为非优势构象, 溶液中非优势构象易向优势构象转化, 最终达到动态平衡^[12]。考察了在避光隔绝空气条件下, 不同温度加热不同时间时溶液中 Vit D₃ 热异构化的比例。结果显示, 分别在 60、80、120 °C 条件下加热 1.5 h 后溶液中 pre-Vit D₃ 峰面积占 Vit D₃ 和 pre-Vit D₃ 面积总和的比例分别为 2.1%、8.2%、8.2%, 但是 120 °C 条件下加热样品的色谱图中出现较多杂峰(图 3), 据文献^[15]报道 100 ~ 180 °C 时 Vit D₃ 会不可逆地生成焦胆钙化甾醇、异焦胆钙化甾醇、异维生素

D₃、异速甾醇等。随后将样品在避光、隔绝空气、80 °C下加热 1、2、3 h,经液相色谱分析发现,随着加热时间的增加,pre-Vit D₃ 峰面积占 Vit D₃ 和

pre-Vit D₃峰面积总和的比例均为 8.2%。因此,pre-Vit D₃ 制备的最佳条件为:避光、隔绝空气、80 °C下加热 1 h。

表 1 对苯二甲酸二甲酯相对于香豆素的 RCF 测定结果

Tab. 1 The calculated results of RCF of dimethyl terephthalate relative to coumarin.

Sample	$c/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		RCF		
	Dimethyl terephthalate	Coumarin	The slope-rate method	The multipoint method	Fusion technique
ST1	13	17	0.52	0.52	0.53
ST2	26	34		0.52	0.51
ST3	39	51		0.52	0.51
ST4	51	68		0.52	0.52
ST5	77	103		0.52	0.52
Average	-	-	-	0.52	0.52

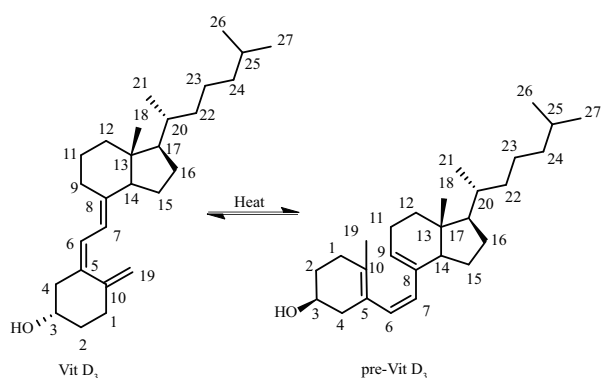


图 2 维生素 D₃ (Vit D₃) 及前维生素 D₃ (pre-Vit D₃) 结构

Fig. 2 Structures of vitamin D₃ and pre-vitamin D₃

3.3.2 ¹H-qNMR 中定量峰选择 在进行 qNMR 分析前先对其质子峰进行归属,明确每个信号峰所对应的质子数,根据文献[15]及谱图分析,将氢原子 δ 6.17、5.95 和 5.02 分别归属为 Vit D₃ 的 H-6、H-7、H-19 质子信号峰,将氢原子 δ 5.89、5.63 和 5.45 分别归属为 pre-Vit D₃ 的 H-6、H-7、H-9 质子信号峰(图 4)。qNMR 分析优先选择耦合裂分较少且与相邻质子峰分离较好的峰作为定量峰,综合考虑选择 Vit D₃ 的 H-19 (δ 5.02) 和 pre-Vit D₃ 的 H-9 (δ 5.45) 作为定量峰。

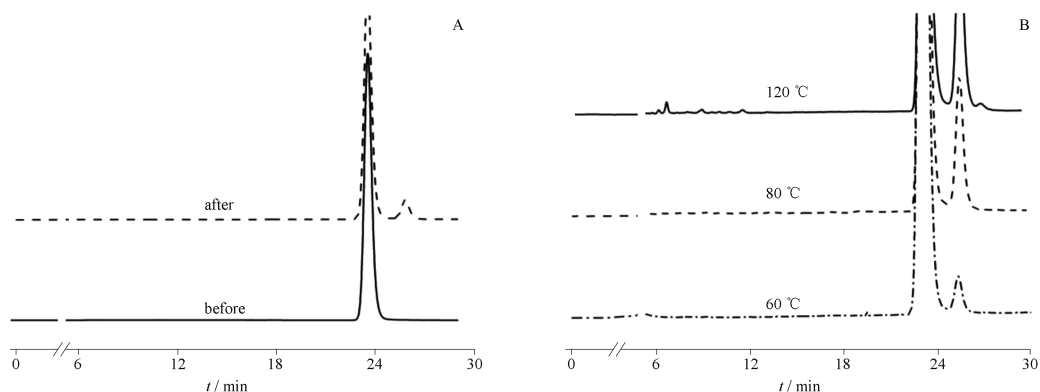


图 3 Vit D₃ 溶液避光隔绝空气条件下,80 °C 加热前、后(A)及不同温度下加热后(B)的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of Vit D₃ solution before and after heating at 80 °C (A) and after heating at different temperatures (B) under the condition of avoiding light and isolating air

3.3.3 ¹H-qNMR 实验参数优化 弛豫时间对核磁共振信号积分结果的准确性影响较大,qNMR 实验的弛豫时间通常设定不低于纵向弛豫时间的 5 倍,采用反转恢复法测定化合物质子的纵向弛豫时间,Vit D₃ 的 H-19 和 pre-Vit D₃ 的 H-9 的弛豫时间分别

为 0.91、1.35 s。弛豫时间设定过长会增加分析时间,在保证采样质子能够得到充分弛豫的同时兼顾分析时间,选择纵向弛豫时间为 10 s。扫描次数增加会提高信号峰的信噪比和稳定性但延长测试时间,考虑到 Vit D₃ 和 pre-Vit D₃ 的稳定性。本研究

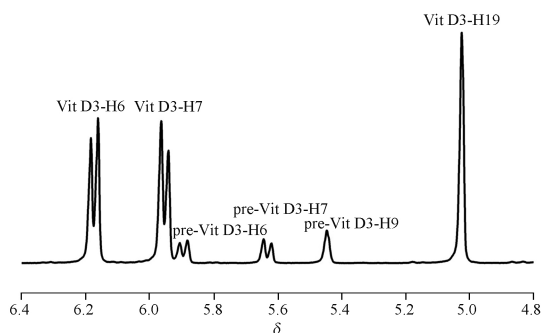


图4 Vit D₃和 pre-Vit D₃的¹H-NMR谱图

Fig. 4 ¹H-NMR spectra of Vit D₃和 pre-Vit D₃

确定的扫描次数为64次,每次分析需15 min左右。

3.3.4 pre-Vit D₃的RCF计算结果 按照“2.3”项下方法制备6份样品并根据图1中的公式计算 pre-Vit D₃相对于 Vit D₃ RCF,平均值为2.1, RSD为1.5%,表明方法重复性良好。

为了验证方法准确度,向含有 pre-Vit D₃和 Vit D₃的溶液中加入不同量的 Vit D₃,并根据图1中的公式计算 pre-Vit D₃相对于 Vit D₃的 RCF。具体操作为:称取 Vit D₃ 50 mg,置于棕色小瓶中,加入5.0 mL DMSO-d₆,充氮气排出空气,置于80 °C电热恒温鼓风干燥箱中,避光加热1 h后取出,迅速冷却,平行取上述溶液0.6 mL 7份,分别加入0、1、2、3、4、5、6 mg Vit D₃,之后测定并计算 RCF,结果见表2,7份样品计算的 RCF 平均值为2.1, RSD为1.2%。表明方法准确可靠,且结果与文献[14]报道一致。

表2 Pre-Vit D₃相对于 Vit D₃的 RCF 测定结果

Tab. 1 The calculated results of RCF of pre-Vit D₃ relative to Vit D₃

<i>m</i> (Vit D ₃)/mg	RCF	Average	RSD/%
0	2.11		
1	2.11		
2	2.08		
3	2.07	2.1	1.2
4	2.09		
5	2.05		
6	2.05		

4 结论

目前,基于 qNMR 与色谱融合的有机化合物 RCF 测定技术的研究未见报道,该技术为难以获得对照品、制备成本高、不稳定、个性化的特殊化合物

RCF 的测定提供了新思路,同时该方法操作简单,便于实现,拓展了 qNMR 技术的使用范围,有望解决药物中间体、药物制剂中无对照品化合物含量测定的难题。此外,该技术还有望用于中药“一测多评”中 RCF 的测定。

REFERENCES

- [1] ZHAO Y Y, GUO H Z, CHEN Y G, *et al.* A comparative study and suggestion on relative correction factor produced by different methods in quantitative analysis of multi-components [J]. *Drug Stand China* (中国药品标准), 2014, 15(4):245-251.
- [2] YU X B, SHEN W B, XIANG B R. Advances in application of quantitative nuclear magnetic resonance technique in pharmaceutical filed [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2010, 34(1):17-23.
- [3] LIU Y, ZHANG C Y, LUAN L, *et al.* Common concerns in application of proton qNMR in characterizing the assay of chemical reference substances [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2020, 40(11):1923-1927.
- [4] LIU Y, LIU Z X, YANG H X, *et al.* Direct comparison of ¹⁹F qNMR and ¹H qNMR by Characterizing Atorvastatin Calcium Content [J]. *J Anal Methods Chem*, 2016, 2016: 7627823. DOI: 10.1155/2016/7627823.
- [5] WANG T Y, XU X Y, YANG J, *et al.* Determination of non-deuterium TSD-1-ND in TSD-1, a novel P2Y₁₂ receptor inhibitor, by ¹H quantitative nuclear magnetic resonance method [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2022, 57(20): 1756-1761.
- [6] LI X B, XU Y W, ZHANG Y J, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of residual solvent ethanol in three low molecular weight heparins by proton nuclear magnetic resonance [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2023, 58(8): 725-729.
- [7] XIAO K, GONG C, GUO Q S, *et al.* Simultaneous determination of fatty acids at sn-1, 3 and sn-2 of triglyceride in edible oils by quantitative ¹³C-nuclear magnetic resonance [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2020, 48(6):802-812.
- [8] KING B. Metrology in chemistry: Part II. future requirements in europe [J]. *Accredit Qual Assur*, 2000, 5: 266-271.
- [9] KING B. The practical realization of the traceability of chemical measurements standards [J]. *Accredit Qual Assur*, 2000, 5: 429-436.
- [10] PAN J Y, ZHAO F, LI W Z, *et al.* Quality evaluation of ginsenoside reference substances based on qNMR spectroscopy [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47(3): 569-574.
- [11] FARDUS-REID F, WARREN J, LE GRESLEY A, Validating heteronuclear 2D quantitative NMR [J]. *Anal Methods*, 2016, 8(9): 2016-2019.
- [12] WANG Q T, WANG M G, LIU X X, *et al.* Study on the preparation of pre-calcitriol reference substance and its examination method in calcitriol soft capsules [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2021, 41(2):370-376.
- [13] HOLICK M F, VITAMIN D: evolutionary, physiological and health perspectives [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(1):4-18.
- [14] WANG C, SHI J M, ZHANG L W, *et al.* Investigation on the calculation methods of Vitamin D assay by HPLC [J]. *Drug Stand China* (中国药品标准), 2020, 21(2):107-113.
- [15] JIN X L, YANG X P, YANG L, *et al.* Thermal Isomerisation of Vitamin D3 in Dimethyl Sulfoxide [J]. *J Chem Res*, 2003 (11): 691-693.

(收稿日期:2023-07-05)