

核磁共振法在定量分析方面的应用

华 西 苑

自从1946年Purcell等在石蜡中, Bloch等在液体水中观察到核磁共振现象后, 1951年发现同一分子中化学环境不同的质子有分开的共振谱线(即化学位移), 从此, 高分辨核磁共振法在化学领域中的应用得到广泛和迅速的发展。在定量分析上的应用只是其中一个很小的部份。近年来有几本书总结或涉及到这个课题^[1-3], 文献上亦有许多报道。国内有高分辨核磁共振仪的单位逐年增多, 除了可作为一般有机化合物、药物等结构测定的工具外, 用于解决某些定量分析问题有其独特的优点。

一、弛豫过程简介

核磁共振现象的一般原理本文不加赘述。因为下面要用到弛豫时间, 所以作一简单介绍, 将质子放在外加强磁场中, 用频率为 ν 的射频照射, 当频率与磁场强度的关系符合Larmor方程时即发生吸收或辐射, 两者的几率是相等的。之所以能观察到核磁共振现象是因为处在低能级上的核数比高能级稍多(服从Boltzman分配律), 产生净的吸收。但如果没有其它非辐射的途经使高能级的核重新回到低能级, 过一段时间后, 两个能级的核数达到平衡, 将观察不到核磁共振现象; 但实际上我们能不断看到核磁共振吸收信号, 这就是因为有弛豫过程, 使高能级的核通过非辐射的途经回到低能级。有两种类型的弛豫:

(一) 自旋晶格弛豫(或称纵向弛豫)用 T_1 表示

产生这种弛豫过程的原因是自旋体系与周围介质交换能量, 高能级的核把能量交给周围介质, 回到低能级。 T_1 是核在 高能状态平均寿命的度量。因为最早是在固体中研究的, 所以沿用这个名称, “晶格”可理解成周围介质。

(二) 自旋—自旋弛豫(或称横向弛豫)用 T_2 表示

自旋—自旋弛豫是自旋体系之间相互交换能量, 使高能级的核回到低能级, 同时低能级核上升到高能级。显然体系总能量没有变化, 但对一个特定激发态的核来说平均寿命缩短。描述这个过程的参数称自旋—自旋弛豫时间, 用 T_2 表示。往往用 T_2 来定义谱线宽度。

三、核磁共振应用于定量分析的条件

定量分析中最重要的是选择合适的射频场强度及扫描速度。Reilly^[4]及 Williams^[5]研究了这个问题。

吸收型及色散型核磁共振图谱中信号的面积 A^a 及 A^d 可分别用以下两式表示：

$$\text{吸收型: } A^a = \frac{\pi K}{T} \frac{H_1}{R} \frac{N}{[1 + (\gamma H_1)^2 T_1 T_2]^{1/2}} \quad (1)$$

$$\text{色散型: } *A^d = \frac{0.347K}{T} \frac{H_1}{R} N \quad (2)$$

式中 γ 为回磁比； H_1 为射频场强度； N 为单位体积中的核数； T 为绝对温度； T_1 为自旋—晶格弛豫时间； T_2 为自旋—自旋弛豫时间； R 为磁场扫描速度； K 是比例系数。

从式(2)可看到色散型信号的面积与弛豫时间无关，与 N 成正比。但式(1)，只有当分母中 $(\gamma H_1)^2 T_1 T_2 \ll 1$ 时吸收峰面积才与弛豫时间无关。所以，为了准确测量两个核磁峰的面积比，亦即使两个峰的面积比等于其相应的质子数比，用式(1)来分析，必须满足下列两种情形中的任一种 (1) 两种类型核的 $(T_1 \cdot T_2)$ 近似相等；或 (2) $(\gamma H_1)^2 T_1 T_2 \ll 1$ 。如果满足第一个条件，按式(1)，峰面积比等于核数比。这时对射频功率的选择没有限止。要满足第二个条件，可在非常低的射频功率时操作[此时 $(\gamma H_1)^2 \ll 1$]，但为了提高信噪比又希望射频功率高。所以，只能选择一个两者兼顾的射频功率。

J.L.Jungnickel 等^[6]研究了射频功率对乙醇及萘满中各种不同类型氢的选择性饱和现象(积分扫描速率 $R = 10$ 周/秒，样品在四氯化碳中的体积浓度约 30%)示于图 1，图 2。纵座标是各种不同类型氢占氢的百分数与理论值的偏差，横座标是射频功率。图 1 表示乙醇在 0.2 毫高斯以上开始发生选择性饱和。图 2 表示萘满在 0.8 毫高斯以上开始发生选择性饱和

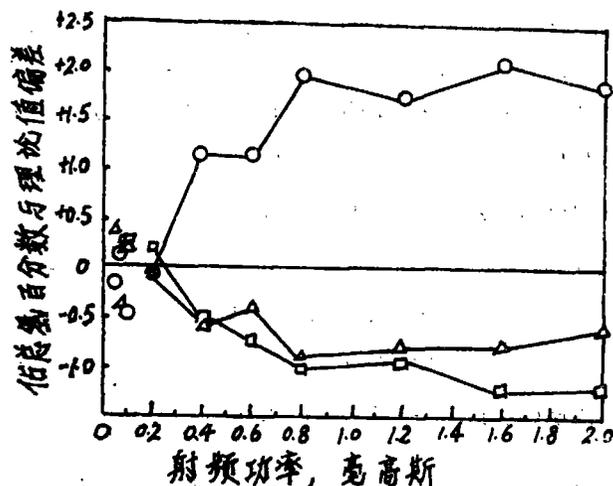


图 1 射频功率对于乙醇中每种类型氢测定误差的影响^[6]

○ OH 质子 △ CH₃ 质子 □ CH₂ 质子

* 指基线上下两个峰极值之间的面积。

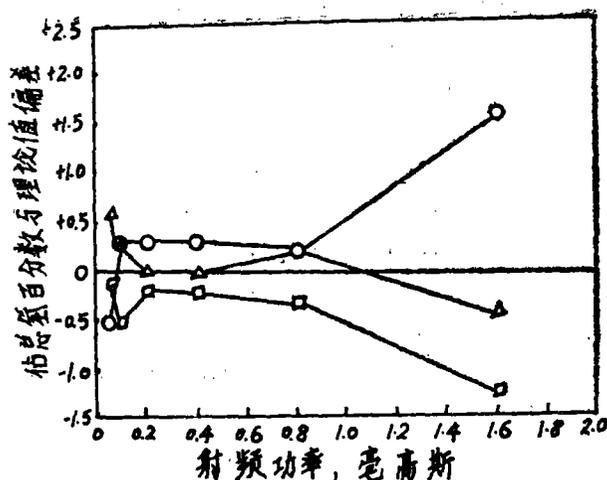


图 2 射频频率对于茶满中每种类型氢测定误差的影响^[6]

○ 芳基质子 △ α -CH₂ 质子 □ β -CH₂ 质子

和, 芳香环上的氢偏高。所以作定量分析时必须仔细选择射频频率, 以排除饱和效应的影响。此外亦应注意样品浓度及溶剂等因素, 因为这些都影响弛豫时间。

三、定量法

核磁共振测量中一般用吸收型信号, 但某些特殊情形下(例如有机微量分析中的某些问题)亦可以用色散型信号, 因为根据(2)式, 色散型信号即使在非常高的射频频率时峰面积也与弛豫无关。

一般是通过测量吸收型信号下的面积来定量, 如果谱线宽度相等亦可以用峰高定量法。现代仪器都带有积分仪, 所以常用积分线的阶梯高度来测量面积比。有时峰有部分交叉或者测量长碳链化合物中某一特征基团, 需特别放大, 不适宜作积分(放大倍数太大时积分不易作好), 可用求积仪或剪纸称重法测量面积。面积测量的准确性与仪器操作条件密切相关, 归纳如下:

(一) 选择合适的射频频率及扫描速度, 避免饱和现象。

(二) 仔细调节积分基线零点及射频相位控制器, 以得到正确的积分阶梯。

(三) 信噪比应尽可能高, 使基线噪音对积分的影响可忽略不计。

(四) 仔细调节匀场, 用对称性好的样品管, 选择适当的旋转速度, 使旋转边峰尽可能减小, 如果旋转边峰的面积不能忽略, 应加以校正。有时为了避免旋转边峰的影响, 样品管可以不旋转, 测得的面积比无变化。

(五) 在一次快速扫描以后, 立即重复第二次可能导致饱和, 所以相继两次扫描的间隔不要小于 30 秒。应重复测定多次, 取平均值(5—10次)。

(六) 存在于有机化合物中的 ¹³C 与 ¹H 之间会发生偶合, 但因 ¹³C 的自然丰度约 1%, 一般观察不到。只有图谱放大或非重氢溶剂峰中才能观察到。当一个大峰的 ¹³C 卫星峰刚好与某个待测小峰重合时应校正。

定量方法随具体要求灵活掌握。可根据核磁共振基本原理，借用色谱，光谱定量中的技巧。例如有内标法，外标法，峰面积归一法^[7,8]，峰高定量法^[9]等，如果峰面积有部份重叠亦可设法校正基线^[10]。现简述如下。

外标法：

为了得到定量数据必须知道积分曲线的单位阶梯高度所相当的质子数。因此以一个已知浓度的纯样品作标准。外标法是将样品和标准放在两根样品管中分别测定。标准样应模拟样品的组成配制，尽可能一致。所用的样品管必须仔细选择，预先用纯样品核对，保证在同样条件下给出的信号积分值相同。外标法的优点是不污染样品，配样方便，不需重复称重及测量标准样。不必考虑用作标准的峰是否会干扰样品图谱的问题。缺点是标准和样品在不同时间分别测量，仪器的不稳定性对测量准确度有影响；用作标准的管子与待试样的管子不完全相同也会引入误差。

改进的办法是用同一根管子作校正及测量，这样可以除去由于样品管不完全相同所引入的误差，但较麻烦。另一个方法是用一根同轴管将标准放在毛细管中心，样品放在外圈。可使标准及样品同时测量，但制造这种管子较困难，而且需校正毛细管及外圈空间的相对体积。

内标法：

将标准及样品按适当比例配样，放在同一样品管中测试，称为内标法。大多数定量分析都使用这种方法。一个好的内标有许多要求，但常常不能找到一个内标能满足所有的要求。

现将对内标的要求归纳如下：

(一) 应该有一个峰形尖锐的单峰，与待测信号化学位移相近，但又不在干扰样品图谱的区域中。

(二) 标准样与样品对饱和效应的敏感性应相同。

(三) 易溶于所选择的溶剂中，不与所研究的化合物反应。不易挥发损失，但又要容易与样品分离，便于继续使用，

A.F.Cockerill等^[11]用双内标法作定量。他们认为这样做可迅速检出因为标准样分解以及标准峰与少量杂质峰重叠引起的误差。例如测定正丁胺的纯度时用三氧杂环己烷作内标得97.9%，用均四氯乙烷作内标得203.8%。这是因为均四氯乙烷在碱存在下分解成三氯乙烯。用六甲基环三硅氧烷作内标时若有硅酮润滑剂杂质，两者吸收峰相重合，使测定结果偏低。用两个内标可以立即检出这些误差来源。

分子中内标法：

用核磁共振法测定纯化合物的分子量或同一类型混合物的平均分子量时常用此法。例如测定洗涤剂中间产物烷基苯的平均分子量，利用芳基部份的五个质子作内标可以定出分子其余部份的质子数，按烷基苯的结构式即可计算出平均分子量^[12]。

归一法：

根据混合物各组分的特征吸收，利用面积比等于发生共振的相应质子数之比的原则，测出各组分克分子数之比，然后归一得克分子百分数。一般用面积归一法，特殊情形亦可用峰高归一法。

(四) 测定各种性质

核磁共振法可以测定许多性质，例如分子量、元素分析、同位素组成、活泼氢、水份

等。举例说明如下：

1. 分子量测定

Barcza·S^[13] 报导了用核磁共振测定分子量的一般方法。在未知物中至少需知道一个有质子的基团；常常可以通过乙酰化、甲基化等反应引入。其峰不应与图谱其余部份重叠，最好无裂分。若选用二硝基苯或三硝基苯作内标应注意可能与样品形成复合物影响结果。计算公式如下：

$$M_u = \frac{A_u n_s W_s M_s}{A_s n_u W_u} \quad (3)$$

M_u 、 M_s 分别为未知物及标准物分子量； A_u 、 A_s 分别为未知物及标准物测量基团的积分强度； n_u 、 n_s 分别为未知物及标准物测量基团中质子数； W_u 、 W_s 分别为未知物及标准物重量。

用核磁共振法测分子量方法简单，适用于日常分析，而且因为低分子量杂质引入的误差比常规方法小。

如果分子的主要结构是已知的可以不加标准测定分子量。在研究分子量不同的同系物的混合物时，常常可用核磁共振法测定数均分子量。P. W. Flanagan^[14] 测定了环氧乙烷—烷基酚缩合物型的非离子表面活性剂的分子量。芳烃质子化学位移约 $\delta = 7\text{ppm}$ ，环氧乙烷链及端基 OH 的峰在 $\delta = 3.9\text{ppm}$ 附近，由烷基侧链所产生的峰在高场。因为知道每个分子中有 4 个芳基质子，以此为标准定出分子其余部份的质子数，列出平均结构式，即可计算分子量。

Thomas·F. 等^[15] 用吡啶作溶剂（通入少量 HCl 气）测得了聚乙二醇、聚丙二醇、聚丁二酸—缩二乙二醇酯的分子量。图 3 示出 Carbowax 600 在吡啶溶剂中的核磁共振图，中心在 235 C. P. S. ($\delta = 3.91\text{ppm}$) 处的一组低场峰是 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 质子所产生的，222 C. P. S. ($\delta = 3.70\text{ppm}$) 处的高场峰是 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 质子所产生的。可用下式计算其数均分子量。

$$\text{数均分子量} = \frac{44Y}{X} + 62 \quad (4)$$

式中 X 为 CH_2OH 质子共振峰的面积；Y 为 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 质子共振峰面积。

用核磁共振法测得分子量为 592（10 次以上平均结果），沸点升高测得结果为 598。此法已成功地用于测定分子量 6000 以下的聚乙二醇。

2. 总氢分析

Williams^[5] 早就应用核磁共振法定量测定氢，此法比通常的燃烧法快速且不破坏样品。外标法计算公式为：

$$\%H = \frac{\text{总积分面积} \cdot 100}{KW} \quad (5)$$

K 是仪器常数，用标准测定。单位为 mm/g（积分阶梯高度/每克氢）。W 是未知物重量。如果每次注入核磁样品管中溶剂的高度一样，放大倍数不变时 K 是常数，但最好隔一定时间重新校正。B·B·Flockhart 等^[16] 用萘作外标测定了一些样品的总氢，结果与标准的燃烧法一致。内标法所得结果比燃烧法准确度高，内标法计算公式：

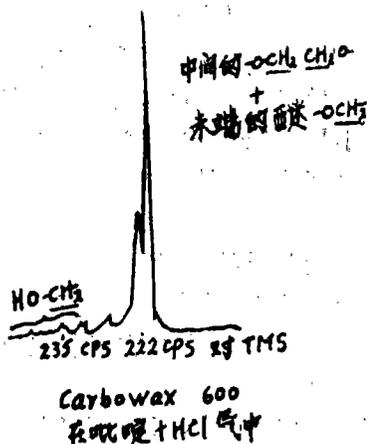


图 3 Carbowax 600 在吡啶溶剂中（加 HCl 气）的核磁共振图

$$\%H = \%H_{ref} \left(\frac{A_s}{A_{ref}} \right) \left(\frac{W_{ref}}{W_s} \right) \quad (6)$$

式中 %H 为未知样氢百分数; $H_{ref}\%$ 为参考样氢百分数; A_{ref} , A_s 各为参考及样品的积分面积; W_{ref} , W_s 各为参考及样品的重量。

3. 有机活泼氢的定量分析

测定活泼氢的经典方法速度慢, 不准确而且破坏样品。核磁方法则简单、准确。基本原理很简单^[17], 用 D_2O 处理含有活泼氢的化合物, 氘取代氢形成 OH 峰, 反应式如下:



将水峰 (HDO) 的积分值与已知重量标准化化合物的积分值相比较可定量测定活泼氢。快交换时计算公式为:

$$\% \text{ 活泼氢} = \% H_{\text{参考}} \left(\frac{A_{\text{水}}}{A_{\text{参考}}} \right) \left(\frac{W_{\text{参考}}}{W_{\text{样}}} \right) \quad (9)$$

这个方程式中必须对 $A_{\text{水}}$ 作校正, 因为重水中本来就有少量氢。

在缓慢交换时水中的氢产生的峰与仍留在原来位置的活泼氢所产生的峰化学位移不同, 使计算复杂化。可以加大量过剩的 D_2O 或加催化剂; 加超过活泼氢量 50 倍的氘可按快交换公式计算。此时因忽略慢交换而引入的最大误差为 2%。

4. 测定水份

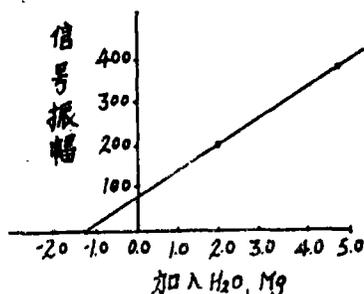


图 4 信号振幅对于加入水量的关系图 (Varian Associates NMR at work, No.57)

最常用的测定水份方法是应用测定活泼氢的原理。有时可以直接测定水峰。例如测量重水中的水时在未知样中加入少量水直接测量水信号的峰高。(此时测量峰高比测量面积准确^[18]) 将峰高与所加的水量作图外推到峰高等于零处即样品中原来存在的水(图 4)。

Olavi 等^[19]用核磁共振法测定丙酮中的少量水份, 利用丙酮的 ^{13}C 卫星峰作内标。在天然碳化合物中存在 1.11% ^{13}C , 丙酮的共振有两个卫星峰 ($J^{13}C-H = 126H_2$), 分别在主峰的高场侧及低场侧, 其中每一个卫星峰因为与另一个 CH_3 基团偶合实际上是一组四重峰, 但是偶合常数很小 ($J = 0.5H_2$), 所以看起来像一个单峰。每个卫星峰是主峰面积的 $\frac{1}{6} \times 0.011$, 这个振幅与丙酮中少量水所产生的共振振幅相近。丙酮主峰在 2.17ppm, 低场卫星峰在 3.22ppm, 所以其低场卫星峰非常适合作内标。从面积比直接可以得到克分子数比。

$$\frac{A_{H_2O}}{A_{^{13}CH_3}} = \frac{2x_{\text{水}}}{6 \times \frac{1}{6} \times 0.0111 \times x_{\text{丙酮}}} = 60.06 \frac{x_{\text{水}}}{x_{\text{丙酮}}} \quad (7)$$

上式适用于 0 到 1 克分子% (大约 0.31% 重量) 的水份测定。浓度更高, 水的振幅比从公式 (7) 所预期的增加得快; 但在线性范围中测量准确度为 0.1% (重量)。用 ^{13}C 卫星峰作内标是内标测定法中很有趣的例子; 此外可用化学位移—浓度关系来测定水, 例如 Brabson^[20] 用 OH 的化学位移来测定水—乙酸混合物的组成。和井内彻等^[21] 用 SO_3H 基团的化学位移测定苯磺酸中水含量。

参 考 文 献

- [1] F.Kasler: "Quantitative Analysis by NMR Spectroscopy", Academic press, 1973.
- [2] Sidney Siggia: "Instrumental Method of Organic Functional Group Analysis, " Wiley-Interscience press, 1972.
- [3] Casy, A.F., "PMR Spectroscopy in Medicinal and Biological Chemistry", Academic press, 1971.
- [4] Reilly, C.A., Anal. chem. 30, 839 (1958).
- [5] Williams, R.B., Ann.N.Y. Acad.Sci, 70, 890(1958).
- [6] J.L.Jungnickel and J.W.Forbes, Anal. chem., 35, 938(1963).
- [7] 桥本茂等, 日本化学会志, 1973, No.12, p2384.
- [8] 华西苑, 肖惠荃, 未发表工作
- [9] Gunther Snatzke等, Org. Magn Reson., 5, 413(1973).
- [11] A.F. Cockerill等, Org. Magn. Reson., 6, 452(1974)
- [12] M.M. Crutchfield等, J.A.O.C.S., 41, 129(1964).
- [13] Barcza, S., J. Org. Chem., 28, 1914 (1963).
- [14] P.W.Flanagan等, Anal.Chem., 35, 1283 (1963).
- [15] Thomas F.等, Anal. chem, 36, 1981 (1964).
- [16] B.D.Flockhart等, Talanta, 12, 533 (1965).
- [17] Paulsen, P.J等, Anal. Chem., 36, 1721 (1964).
- [18] Varian NMR at work, No.57.
- [19] Olavi P.等, 转引自[1] p115.
- [20] Brabson, G.D., J.Chem. Edu., 46, 754 (1969).
- [21] 和井内彻, 真下清, 分析化学(日), 19, 1629 (1970)