

附件：0441 核磁共振波谱法草案公示稿（第一次）

0441 核磁共振波谱法

核磁共振（Nuclear magnetic resonance, NMR）波谱是一种基于特定原子核的电磁特性的分析方法。在外磁场作用下，具有磁矩的原子核在外磁场中吸收了与其裂分能级间能量差相对应的射频场能量而产生原子核自旋能级的跃迁，进而产生核磁共振信号共振现象的分析方法。核磁共振波谱按测定的原子核可分为核磁共振氢谱、碳谱、氟谱、磷谱及氮谱等。核磁共振波谱通过化学位移值、谱峰多重性、偶合常数值、谱峰相对强度和在各种二维谱及多维谱中呈现的相关峰，提供分子中原子的连接方式、相对数量、空间的相对取向等定性的结构信息。核磁共振定量分析的基础是核磁共振信号的强度与引起该信号的原子核的数量成正比。以结构分析为基础，在进行定量分析之前，首先对化合物的分子结构进行鉴定，再利用分子特定基团的质子数与相应谱峰的峰面积之间的关系进行定量测定。

带正电荷的原子核在作自旋运动时，可产生磁场和自旋角动量 P ，其磁性用核磁矩 μ 表示，自旋角动量 P 的大小与自旋量子数 I 有关（核的质量数为奇数， I 为半整数；核的质量数为偶数， I 为整数或 0），自旋角动量 P 与核磁矩 μ 均为矢量，二者方向一致，且空间取向均为量子化的，其空间取向是量子化的； μ 也是一个矢量，方向与 P 的方向重合，空间取向也是量子化的，取决于可用磁量子数 m 的取值表示（ $m=I, I-1, \dots, -I$ ，共有 $2I+1$ 个数值）。

对于 ^1H 、 ^{13}C 等 $I=1/2$ 的核，只有两种取向，对应于两个不同的能量状态，粒子通过吸收或发射相应的能量在两个能级间跃迁。

当具有核磁矩的原子核（自旋量子数 $I \neq 0$ ）的磁核处于一个均匀的外磁场 H_0 中时，磁原子核因受到磁场的作用力在保持自旋运动的同时还再围绕着外磁场方向作旋转运动，同时仍然保持本身的自旋。这种运动方式称为拉摩莫尔进动（Lamor processionon）。原子核的进动频率由下式决定：

$$\omega_0 = \gamma H_0$$

26 其中 γ 为旋磁比，是原子核的基本属性之一。不同原子核的 γ 值不同，其
27 值越大，核的磁性越强，在核磁共振中越容易被检测。如果提供一个射频场，
28 其频率 (ν) 满足：

$$29 \quad \Delta E = h\nu = \mu H_0 / I$$

30 其中 h 为普朗克常数，则：

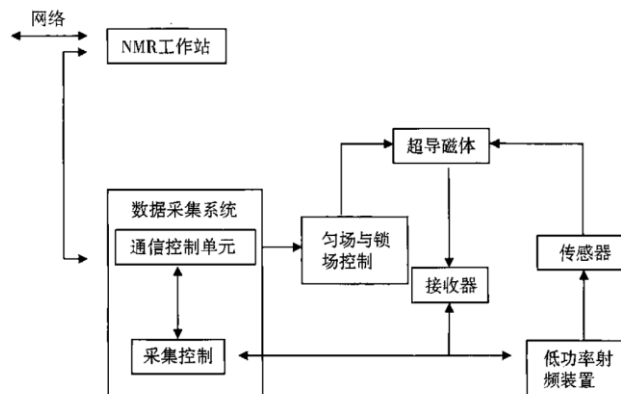
$$31 \quad \nu = \omega_0 / 2\pi = \gamma H_0 / 2\pi$$

32 即射频场的频率正好等于在磁场 H_0 中的核进动频率，那么低能级核就能
33 吸收这一射频场的能量而跃迁至高能级态，~~导致在两个能级间跃迁，~~产生核
34 磁共振现象。

35 ~~核磁共振波谱是一种专属性较好但灵敏度较低的分析技术。低灵敏度的~~
36 ~~主要原因是基态和激发态的能量差非常小，通常每十万个粒子中两个能级间~~
37 ~~只差几个粒子（当外磁场强度约为 2T 时）。核磁共振波谱法作为一种重要波~~
38 谱分析手段，具有准确、快速和样品可回收等特点，伴随高磁场谱仪和超低温
39 探头等核磁技术的发展，NMR 的灵敏度提高显著；能提供复杂体系中分子结
40 构、相互作用、动态过程和含量等大量信息，在药物定性和定量分析中具有重
41 要作用。

42 1. 核磁共振波谱仪

43 常见的有两类核磁共振波谱仪：经典的连续波（CW）波谱仪和现代的脉
44 冲傅里叶变换（PFT）波谱仪，目前使用的绝大多数为后者。其组成主要包含
45 超导磁体、射频脉冲发射系统、核磁信号接收系统和用于数据采集、储存、处
46 理以及谱仪控制的计算机系统（如图）。



47 图 PFT 核磁共振波谱仪的主要组成

48
49

50 在脉冲核磁共振波谱仪上，一个覆盖所有共振核的射频能量的脉冲将同
51 时激发所有的核，当被激发的核回到低能态时产生一个自由感应衰减（FID）
52 信号，它包含所有的时间域信息，经模数转换后通过计算机进行傅里叶变换
53 得到频（率）谱。

54 实验中按照仪器操作规程设置谱仪参数，如脉冲倾角和与之对应的脉
55 冲强度、脉冲间隔时间、数据采集点（分辨率）、采样时间等。采集足够的
56 FIDs，由计算机进行数据转换，调整相位使尽可能得到纯的吸收峰，用参照物
57 校正化学位移值，用输出设备输出谱图。

58 核磁共振波谱仪性能的稳定是数据可靠性的基础保证，因此，需要开展
59 仪器确证以证明仪器能够满足预定用途。参照分析仪器确证指导原则，核磁
60 共振波谱仪器的确证包括四个阶段：设计确证（DQ）、安装确证（IQ）、运
61 行确证（OQ）和性能确证（PQ），其中性能确证的项目因预期用途而异，可
62 包括但不限于测试核的线型、分辨力、灵敏度、脉冲宽度、¹H 谱定量重复性
63 等。

64 2. 核磁共振谱

65 核磁共振信号（峰）可提供四个重要参数：化学位移值、谱峰多重性、偶
66 合常数数值和谱峰相对强度。处于不同分子环境中的同类原子核具有不同的共
67 振频率，这是由于作用于特定核的有效磁场由两部分构成：由仪器提供的特
68 定外磁场以及由核外电子云环流产生的磁场（后者一般与外磁场的方向相反，
69 这种现象称为“屏蔽”）。处于不同化学环境中的原子核，由于屏蔽作用不同
70 而产生的共振条件差异很小，难以精确测定其绝对值，实际操作时采用一参
71 照物作为基准，精确测定样品和参照物的共振频率差。在核磁共振波谱中，一
72 个信号的位置可描述为它与另一参照物信号的偏离程度，称为化学位移。

73 共振频率与外磁场强度 H_0 成正比，磁场强度不同，同一化学环境中的核
74 共振频率不同。为了解决这个问题，采用位移常数 δ 来表示化学位移：

$$75 \quad \delta = \frac{\nu_s - \nu_r}{\nu_0} + \delta_r$$

76 式中 ν_s 为样品中磁核的共振频率；

77 ν_r 为参照物中磁核的共振频率；

78 ν_0 为仪器的输出频率，MHz；

79 δ_r 为参照物的化学位移值。

80 因此也可用氘代溶剂中残留的质子信号作为化学位移参考值。

81 常用的化学位移参照物是四甲基硅烷（TMS），其优点是化学惰性；单
82 峰；信号处在高场，与绝大部分样品信号之间不会互相重叠干扰；沸点很低
83 （27℃），容易去除，有利于样品回收。而对于水溶性样品，常用 3-三甲基
84 硅基丙酸钠-d₄（TSP）或 2, 2-二甲基-2-硅戊基-5-磺酸钠（DSS），其化学位
85 移值也非常接近于零。DSS 的缺点是其三个亚甲基质子有时会干扰被测样品
86 信号，适于用作外参考。

87 化学位移仅表示了磁核的电子环境，即核外电子云对核产生的屏蔽作用，
88 但未涉及同一分子中磁核间的相互作用。这种磁核间的相互作用很小，对化
89 学位移没有影响，但对谱峰的形状有着重要影响。这种磁核之间的相互干扰
90 称为自旋-自旋偶合，由自旋偶合产生的多重谱峰现象称为自旋裂分，裂分间
91 距（赫兹）称为偶合常数 J ，偶合常数与外磁场强度无关。偶合也可发生在氢
92 核与其他核（ $I \neq 0$ ）之间，如 ¹⁹F、¹³C 和 ³¹P 等。

93 核磁共振信号的另一个特征是它的强度。在合适的实验条件下（见“测定
94 方法”），谱峰面积或强度正比于引起此信号的质子数，因此可用于测定同一
95 样品中不同质子或其他核的相对比例，以及在加入内标后进行核磁共振定量
96 分析。

97 3. 测定方法

98 在熟悉核磁共振理论的基础上，应多了解样品的性质，并严格遵守操作
99 规程，正确操作仪器。不正确的样品制备、谱仪调整及参数设置会导致谱图数
100 据的分辨率和灵敏度降低，甚至给出假峰和错误数据。核磁共振样品一般为
101 溶液，配备特定装置的核磁共振波谱仪可直接进行固体样品分析。

102 通常应用最多的是 ¹H（质子）核磁共振波谱，其他还包括 ¹⁹F、³¹P、¹³C
103 核磁共振波谱以及各种二维谱等。由于二维谱可以提供同核或异核连接的相
104 关信息，故在复杂结构的鉴定中发挥重要作用。常用的二维谱实验技术主要
105 包括：（1）同核位移相关谱，如 ¹H-¹H COSY 谱、TOCSY 谱等；（2）异核

106 位移相关谱，如 HMQC 谱、HSQC 谱、HMBC 谱等；（3）空间相关谱，如
107 NOESY 谱、ROESY 谱等；（4）偶合常数分辨谱等。

108 核磁共振波谱实验测定前，一般须先将供试品制成合适的溶液。

109 **3.1 溶剂选择** 合适的溶剂除了对样品有较好的溶解度外，其残留的信号
110 峰应不干扰所分析样品的信号峰。氘代溶剂同时提供异核锁信号。应尽可能
111 使用高氘代度、高纯度的溶剂，并注意氘原子会对其他原子信号产生裂分。常
112 用的核磁共振波谱测定用氘代溶剂及其残留质子信号的化学位移见下表。

113 表 氢谱测定中氘代溶剂及其残留质子信号的化学位移

溶剂名称	分子式	残留质子 信号 δ (ppm)	可能残留的 水峰 δ (ppm) *
氘代三氯甲烷	CDCl_3	7.26	1.56
氘代甲醇	CD_3OD	3.31	4.87
氘代丙酮	$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	2.05	2.84
氘代二甲基亚砜	DMSO-d_6	2.50	3.33
氘代乙腈	CD_3CN	1.94	2.13
氘代苯	C_6D_6	7.16	/
重水	D_2O	/	4.79
氘代二氧六环	Dioxane-d_8	3.55	/
氘代乙酸	$\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}$	2.05, 8.5*	/
氘代三氟乙酸	$\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$	12.5*	/
氘代吡啶	$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	7.18, 7.55, 8.70	4.80
氘代 <i>N,N</i> -二甲基甲酰胺	DMF-d_7	2.77, 2.93, 8.05	/

114 注：*活泼质子的化学位移值是可变的，取决于温度和溶质的变化。

115
116 适用于氢谱 ($^1\text{H NMR}$) 的溶剂同样也适用于氟谱 ($^{19}\text{F NMR}$)，常见的
117 有 CDCl_3 、 CD_3OD 、 D_2O 、 DMSO-d_6 、 DMF-d_7 、酸和碱等，通常不含氟的溶
118 剂均可使用。同时应注意含氟样品中氟原子对其他核的 *J*-偶合。

119 **3.2 样品制备** 按各品种项下的要求。样品的浓度取决于实验的要求及仪
120 器的类型，测定非主要成分时需要更高的浓度。供试液的体积取决于样品管
121 的大小及仪器的要求，通常样品溶液的高度应达到线圈高度的 2 倍以上。选
122 用符合定量要求的核磁管，常用外径为 5mm 或 10mm，长度为 15cm 或 20cm
123 的核磁管。当样品量较少时可选用微量核磁管。

124 **3.3 测定** 将样品管放入谱仪中，先进行样品和谱仪的调谐，再仔细对谱
125 仪匀场，使谱仪达到最佳工作状态。设置合适的实验参数，采样，完成后再进
126 行图谱处理，并分段积分。

127 同一个实验通常可同时得到定性和定量数据。对于核磁共振定量分析，
128 实验参数的正确设置非常重要，以保证每个峰的积分面积与质子数成正比。
129 必须保证有足够长的弛豫时间，以使所有激发核都能完全弛豫，因而定量分
130 析通常需要更长的实验时间。

131 **3.4 定性和定量分析** 核磁共振波谱分析可广泛应用于结构确证、热力
132 学、动力学和反应机理的研究，以及用于定量分析。如果在品种项下采用核磁
133 共振波谱法进行定性或定量分析，则应参照 9101 分析方法验证指导原则开展
134 方法验证研究。

135 (1) ~~1.~~定性分析

136 核磁共振波谱是一个非常有用的结构解析工具，化学位移提供原子核环
137 境信息，谱峰多重性提供相邻基团情况以及立体化学信息，偶合常数值大小
138 可用于确定基团的取代情况，¹H NMR 中谱峰强度（或积分面积）可确定基团
139 中质子的个数等。一些特定技术，如双共振实验、化学交换、使用位移试剂、
140 各种二维谱等，可用于简化复杂图谱、确定特征基团以及确定偶合关系等。

141 对于结构简单的样品可直接通过氢谱的化学位移值、偶合情况（偶合裂
142 分的峰数及偶合常数）及每组信号的质子数来确定，或通过标准物质图谱
143 和/或文献值（图谱）比较确定样品的结构，以及是否存在杂质等。与文献值
144 （图谱）比较时，需要注意一些重要的实验条件，如溶剂种类、样品浓度、化
145 学位移参照物、测定温度等的影响。对于结构复杂或结构未知的样品，通常需
146 要 ¹H、¹³C 及其二维谱、¹⁹F、³¹P 谱并结合其他分析手段，如质谱等方能确定
147 其结构。

148 (2) ~~2.~~定量分析

149 与其他核相比，¹H 核磁共振波谱更适用于定量分析。在合适的实验条件
150 下，两个信号的积分面积（或强度）正比于产生这些信号的质子数：

$$151 \quad \frac{A_1}{A_2} = \frac{N_1}{N_2} \quad (1)$$

152 式中 A_1 、 A_2 为相应信号的积分面积（或强度）；

153 N_1 、 N_2 为相应信号的总质子数。

154 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：

155
$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{n_1}{n_2} \quad (2)$$

156 式中， n_1 、 n_2 分别为相应官能团中的质子数。

157 如果两个信号来源于不同的化合物，则

158
$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{n_1 m_1}{n_2 m_2} = \frac{n_1 W_1 / M_1}{n_2 W_2 / M_2} \quad (3)$$

159 式中 m_1 、 m_2 分别为化合物 1 和化合物 2 的分子个数；

160 W_1 、 W_2 分别为其质量；

161 M_1 、 M_2 分别为其分子量。

162 由式(2)和(3)可知，核磁共振波谱定量分析可采用绝对定量和相对定
163 量两种模式。绝对定量为采用标准物质，直接检测待测样品中的组分含量；相
164 对定量基于待测样品中每个组分特征峰的积分值，检测特定组分间的相对含
165 量。

166 在绝对定量模式下，将已精密称定重量的样供试品和内标物混合配制溶
167 液，测定，通过比较样供试品特征峰的峰面积与内标峰的峰面积计算样品的
168 含量(纯度)。内标物为与分析样供试品共溶于待测溶液中的标准物质。合适
169 的内标物应满足如下要求：有合适的特征参考峰，最好是适宜宽度的单峰；内
170 标物的特征参考峰与样供试品的峰能完全分离；能溶于分析溶剂中；其质子
171 是等权重的；内标物的分子量与特征参考峰质子数之比合理；不与待测样品
172 相互作用等。常用的内标物有：1, 2, 4, 5-四氯苯、1, 4-二硝基苯、对苯二
173 酚、对苯二甲酸、苯甲酸苄酯、顺丁烯二酸等。内标物的选择依据样品性质而
174 定。

175 相对定量模式主要用于测定样品中杂质的相对含量(或混合物中各成分
176 相对含量)，由式(3)来计算。

177 ① ~~(1)~~绝对定量模式 溶剂、内标和化学位移参照物 按各品种项下的
178 规定。

179 供试品溶液制备 分别取供试品和内标适量(按各品种项下的规定)，精
180 密称定，置同一具塞玻璃离心管容器中，精密加入溶剂适量，振摇使完全溶
181 解，加化学位移参照物适量，振摇使溶解，摇匀，即得。

182 **测定法** 将供试品溶液适量转移至核磁管中，正确设置仪器参数，调整
183 核磁管转速使旋转边峰不干扰待测信号，记录图谱。用积分法分别测定各品
184 种项下规定的特征峰峰面积及内标峰峰面积，重复测定不少于5次，取平均
185 值，由下式计算供试品的量（ W_s ）：

$$186 \quad W_s = W_r \times \frac{A_s}{A_r} \times \frac{E_s}{E_r}$$

187 式中 W_r 为内标物的重量；

188 A_s 和 A_r 分别为供试品特征峰和内标峰的平均峰面积；

189 E_s 和 E_r 分别为供试品和内标物的质子当量重量（质量）（以分子
190 量除以特征峰的质子数计算得到）。

191 **② ~~(2)~~ 相对定量模式** 溶剂、化学位移参照物、供试品溶液制备以及测
192 定方法 按各品种项下的规定并参照“绝对定量模式”项下。

193 由下式计算供试品中各组分的摩尔百分比：

$$194 \quad \frac{A_1/n_1}{A_1/n_1 + A_2/n_2 + \dots + A_m/n_m} \times 100$$

195 式中 A_1 和 A_2 分别为各品种项下所规定的各特征基团共振峰的平均峰面
196 积；

197 m 表示供试品中不同组分的数量；

198 n_1 、 n_2 、 n_m 分别为各特征基团的质子数。

199 核磁共振定量分析除需要注意供试品称样量及准确度、待测样品和内标
200 物的浓度、供试品的溶解度之外，还需注意以下核磁共振激发脉冲、采集时
201 间、测试温度、相位和基线校正、积分参数等实验参数的设置及优化：~~供试品~~
202 ~~称样量及准确度、待测样品和内标物的浓度、供试品的溶解度、核磁共振激发~~
203 ~~脉冲、采集时间、测试温度、相位和基线校正、积分参数等。~~

204 4. 固体核磁共振

205 固体核磁共振的基本原理与液体核磁共振相同，区别在于固体核磁共振
206 是以固体样品为研究对象，分析不同固态环境中相同类型的核表现出的不同
207 共振频率。固体核磁共振波谱在药物分析中的应用范围包括原料药的固态形
208 式研究（多晶型、溶剂合物、共晶物等）以及固体制剂的分析研究等。固体核

209 磁共振波谱法中最常用的核是 ^{13}C , 其他自旋量子数 $I=1/2$ 的核, 如 ^{15}N 和 ^{31}P ,
210 也有一定应用。

211 由于固态下样品分子的偶极-偶极相互作用以及多种各向异性相互作用,
212 使得固体核磁共振波谱的分辨率较低, 且谱线较宽。为提高固体核磁共振技
213 术的分辨率, 通常可采用魔角旋转、交叉极化、高功率去偶等实验技术。

公示稿

起草单位: 中国医学科学院药物研究所

参与单位: 中国食品药品检定研究院、北京市药品检验研究院、深圳市药品检验研究院、
中国科学院深圳先进技术研究院

0441 核磁共振波谱法修订说明

一、修订的目的意义

核磁共振波谱法是药物分析领域广泛应用的一项重要技术方法，是药物研发和质量控制的有力手段之一，在各国药典中均有收载。《中国药典》0441 核磁共振波谱法在内容的全面性、先进性以及对实际应用的指导性方面，与发达国家药典仍存在一定差距，主要体现在仪器及测定方法的关键参数、定量核磁、二维核磁、固体核磁、方法确认和验证等方面。修订《中国药典》0441 核磁共振波谱法，将有利于提高方法的先进性及对实际应用的指导性，更好地满足我国药品研发、生产和监管的需求。

二、主要修订内容

0441 核磁共振波谱法的修订总体保持《中国药典》通则的体例格式，重点补充了仪器确证、方法确认与验证、二维核磁共振、固体核磁共振等内容，同时增强与《中国药典》现有指导原则的协调与一致性。