

液体核磁样品装样高度对信号分辨率与信噪比的影响

常刚*, 周佩, 宋艺果, 孟令杰*, 高禄梅

(西安交通大学大型仪器设备共享实验中心, 西安 710049)

摘要: 液体核磁探头中的射频线圈激发产生自由感应衰减 (FID) 信号并接收, 其激发接收范围与效率影响 FID 信号的强弱, 而样品装样高度是否与射频线圈作用范围完全匹配决定信号信噪比是否最优; 测试时样品所处磁场的稳定均匀性会影响核磁信号的分辨率, 它通过探头中的梯度线圈与匀场线圈协同来优化, 只有在装样高度至少覆盖梯度与匀场线圈优化范围时才可能获得最佳分辨率。为研究样品装样高度对信号分辨率与信噪比的影响, 设计了 A、B 两组氢谱实验, A 组浓度恒定, 装样高度递增, 模拟日常测试中样品量充足的样品, B 组样品质量恒定, 溶剂递增, 模拟样品量稀少的样品。两组实验所有采样参数均相同, 并用不同厂商设备作比照。结果表明, 在装样高度达到 4 cm 时两组实验均获得满意的分辨率, A 组在装样高度达到 4.6 cm 时有最佳信噪比, B 组装样高度在 4.0 cm-4.7 cm 左右时获得最佳信噪比, 且不同厂商的数据趋势一致。故样品量充足时装样高度推荐在 4.6 cm 左右, 样品量较少时推荐装样高度 4 cm 至 4.7 cm 之间。

关键词: 液体核磁; 样品装样高度; 分辨率; 信噪比

Effect of the sample-filling height on the signal to noise ratio and resolution of the NMR signal

Chang Gang*, Zhou Pei, Song Yiguo

(Instrument Analysis Center of Xi'an, Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: Radio frequency coils in the probe are used to excite and detect the NMR signal, the effective spatial range in which it exerts corresponding function should match the sample-filling height, in order to reach best signal to noise ratio. Coordination of gradient coils and shim coils aims to supply homogeneous and stable magnet, this demands the sample-filling height is not less than their range of action. Two groups of experiments are arranged to determine the effect of the sample-filling height on the signal to noise ratio and resolution of the NMR signal, and compare and contrast two different manufacturers' instrument separately. Group A with constant concentration

analogizing samples with sufficient quantity increases sample-filling height by adding solution sequentially, Group B with constant mass analogizing samples with rare quantity increases sample-filling height by adding solvent sequentially. It turns out that when sampling height is 4 cm, signal to noise ratio and resolution are both optimal for group A. When sample-filling height is between 4.0 cm-4.7 cm, best observation could be obtained for group B.

Keywords: Liquid nuclear magnetic resonance, sample-filling height, signal to noise ratio, resolution

引言

液体核磁共振 (NMR) 技术, 特别是核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$), 作为一种强大的分析工具, 在化学、生物学、医学和材料科学等领域中有着非常广泛的应用^[1-5]。该技术能够提供关于分子中氢原子所处磁环境的详细信息, 进而揭示分子的结构。其中, 液体核磁共振氢谱因其灵敏度高和采样时间短, 成为测定溶液中化合物结构的重要手段。然而, 在实际操作中, 液体样品制备和处理步骤对谱图质量有着不可忽视的影响^[6,7]。其中, 液体核磁样品制备时核磁管装样的液面高度就是一个关键的因素。探头中的射频线圈、梯度线圈、匀场线圈皆有固定的物理尺寸与位置, 作用范围集中分布在其周围, 而样品装样高度决定被测自旋核能否尽可能处在最优响应范围内, 即 FID 信号的激发与接收是否遍及尽可能多的自旋核, 自旋核是否分布在磁场更加均一稳定的空间。

同时, 谱仪作为核磁共振实验的核心设备, 其工艺差异同样可能影响实验结果^[8,9]。因此, 利用本单位不同厂商的对标设备作对比, 聚焦于样品溶液高度这一因素, 探讨其对核磁共振氢谱信号的具体影响, 从而为优化液体核磁的装样高度这一实验条件, 提供科学依据。

实验与方法

1 实验材料

CDCl_3 (D 大于 99.9%, 0.3%TMS); 布洛芬; 核磁管

2 仪器与设备

Bruker AVANCE NEO 400 MHz 核磁共振波谱仪 (5 mm iprobe 探头); JEOL JNM-ECZ400S/L1 400 MHz 核磁共振波谱仪 (5 mm FG/RO 自动调谐探头); 天平 (精度: 0.01 mg)

3 样品制备与实验

为了模拟样品量充足且易溶解的样品，设计 A 组实验：配置 3 mL 浓度为 1.62 mmol/L 布洛芬的 CDCl₃ 溶液，通过加入不同溶液体积改变样品高度（2.4 cm、3.2 cm、4.0 cm、4.6 cm、5.4 cm、6.1 cm、7.0 cm）进行测试，当添加高度为 4 cm，相当于加入 130 毫克左右布洛芬。

为了模拟样品量稀少（如低含量的天然产物）或溶解度低的样品，设计样品质量恒定溶剂逐渐增多的 B 组实验：取 0.13 mg 布洛芬固体溶于 250 μL CDCl₃ 中，随后通过补加一定量的 CDCl₃ 改变样品高度（2.4 cm、3.0 cm、4.0 cm、4.7 cm、5.4 cm、6.2 cm）进行测试。

4 采样参数

在开始实验前检查温控，确保温度控制在 298K，并对仪器进行手动匀场，确保仪器在最佳测试状态。所有样品均在同一核磁管内进行氢谱实验，实验温度：298K，核磁管状态：不旋转，两组实验采样参数相同，如表 1 所示。

表 1. 实验采样参数

样品	实验参数	参数设置
A 组	pulse	zg30
	sw (ppm)	20
	olp (ppm)	6.175
B 组	ns	16
	d1 (s)	3
	rg	50

结果与分析

测试完成后利用 MestReNova 软件对实验数据进行处理，以 CDCl₃ 中内标 TMS 的氢定标（0.00 ppm）作图。分别分析各组实验不同样品高度对指定 NMR 信号的信噪比和线宽的影响。为了便于观察，A、B 两组样品数据分析均以与羧基相连的叔碳上的氢（3.7 ppm）为例，如图 1 红圈位置所示，四重峰的信噪比由软件自动计算，取最大值，再计算信噪比最高峰的半高宽。

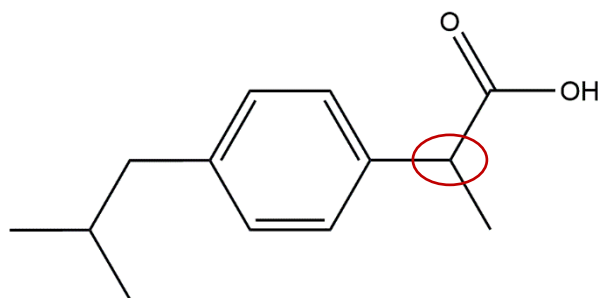


图1 布洛芬分子结构示意图

A 组样品分别在 Bruker 400M 与 JEOL 400M 谱仪测试的谱图线型如图 2 所示。可看出样品装样高度过低时，谱图的质量受到的较大的影响。在 2.4 cm 与 3.2 cm 高度时信号强度较弱，谱峰相对较宽。在 4.0 cm 高度之后，增加样品高度其信号强度略有增加，但效果不明显，可以发现 Bruker 谱仪与 JEOL 谱仪的测试结果基本一致。通过相应的软件计算了不同高度时的线宽以及信噪比，并分别对样品装样高度作图，见图 3。匀场操作是匀场线圈与梯度线圈配合、通常利用试剂中的氘信号进行调节。当装样高度低于梯度线圈的覆盖范围时，会使匀场线圈内的电流失调，不能有效匀场，导致谱峰变宽，在 JEOL 的谱仪上尤为明显。而装样高度显著超出匀场所需的作用范围时，对匀场无益，浪费样品与氘代试剂，实际测试中，往往会使有效激发范围内的自旋核个数减少。同时在测试过程中发现过低或者过高装样高度会导致匀场耗时显著增加。

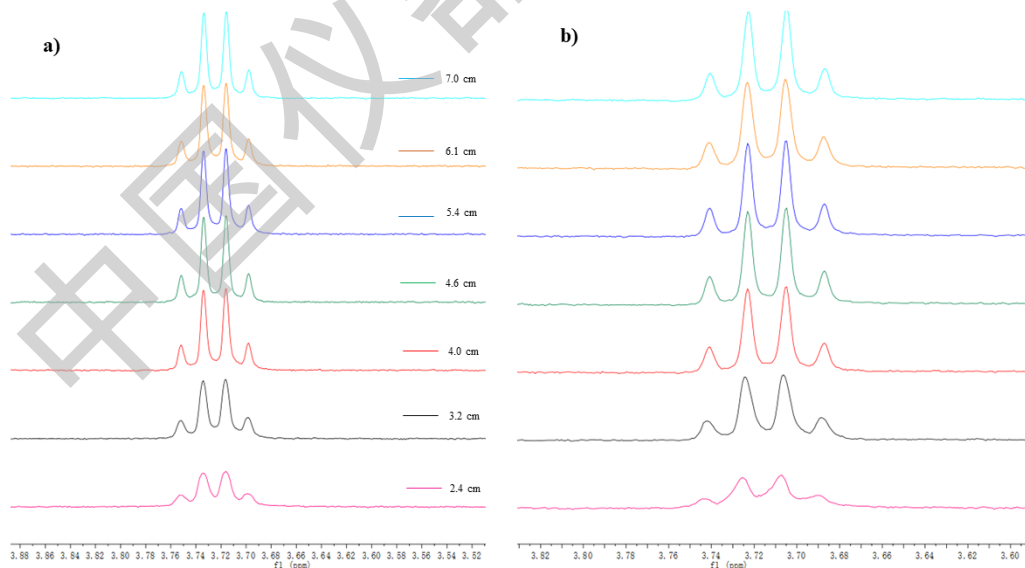


图2. A 组样品在 3.7 ppm 处谱图对比： Bruker (a) 、 JEOL (b)

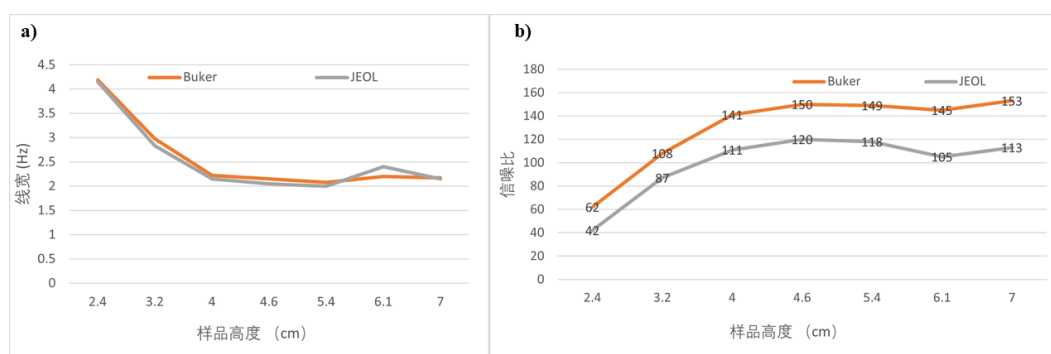


图3 A组实验在不同仪器测定的线宽 (a) 与信噪比 (b)

核磁信号的宏观磁化矢量与样品中相应自旋核的个数成正比，当装样高度大于射频激发线圈的有效作用范围时，近似存在核磁共振实验的灵敏度与样品浓度成正比^[10]的认知，在测天然产物的用户群体里，由于样品量多数情况下非常稀少，广泛流传的经验是：减少样品装样高度来增加样品浓度，希望以此来获得较高信噪比的谱图。当样品装样高度过分低以至于低于射频线圈的有效激发与接收范围，此时部分激发功率并未有效作用到有限高度的样品上，即数目一定的潜在可被激发的自旋核被激发的概率会降低，相当于变相的降低了浓度；换种抛开浓度概念的理解，样品中所有的核都在射频线圈的有效激发与接收范围内，但宏观上收到的激发脉冲的功率相当于变小了，可类比单次扫描时 30°脉冲比 90°脉冲激发的 FID 信号弱，故过分降低装样高度，反而会得到更低的信噪比。B 实验组数据映证了以上的论述。

B 组样品在不同仪器测试的谱图如图 4 所示。指定信号的线宽以及信噪比分别对样品装样高度作图，见图 5。结果表明并非浓度最大时测试效果最佳。随着高度增加信号质量有一定提升，可以发现 Bruker 谱仪与 JEOL 谱仪的测试结果一致，均在高度为 4.0 cm 时测试信噪比最佳，线宽最窄，裂分最好。样品高度过低时，部分激发功率没有作用到样品上，而 B 组中近似认为原子核个数恒定，在射频线圈覆盖的最大范围内，原子核数目一定，当样品高度低于最大激发范围时，部分激发功率无效，故随着高度升高，信号逐渐增强。同时过低的高度会导致测试时匀场效果差，从而导致谱峰变宽，如图 4，4.7 cm 以及更高装样高度测试时信号质量有所下降，是因为在射频线圈的有效激发与接收范围内，可被激发的自旋核个数降低了。不难推测射频线圈的有效激发与接收范围在 4.0 cm 与 4.7 cm 之间。相的装样高度即最佳制样条件。

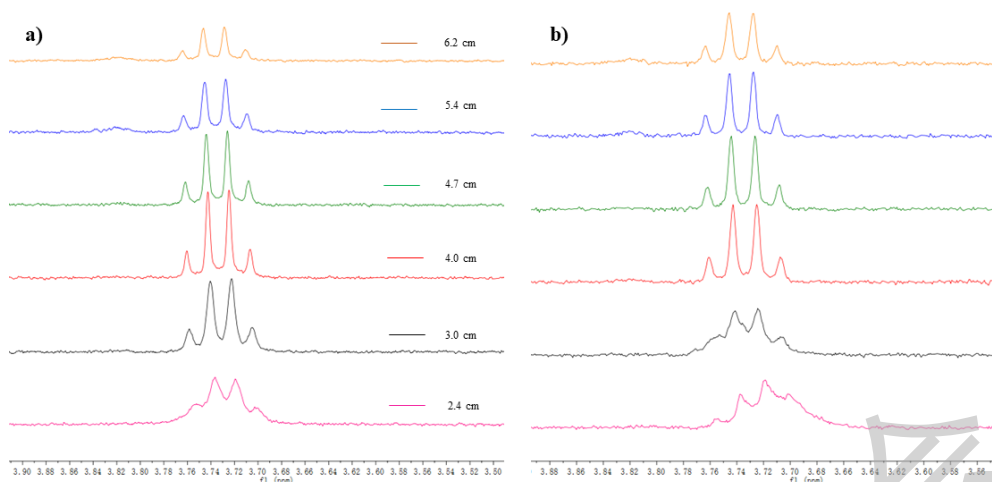


图 4 B 组样品在 3.7 ppm 处谱图对比：Bruker (a)、JEOL (b)

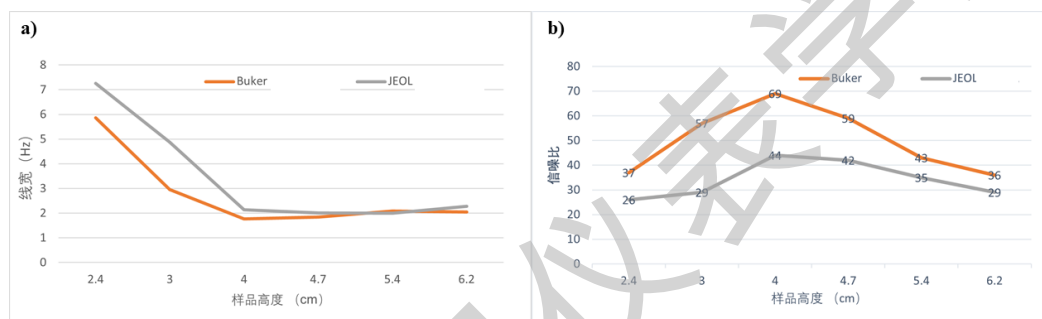


图 5 B 组实验在不同仪器测定线宽 (a)与信噪比 (b)

应用案例

为验证 B 实验组的分析，在本单位 600 MHz 超低温探头上设计了类似实验，以 1 毫克未知天然产物为研究对象，以氘代甲醇作为溶剂，逐渐增多溶剂氘代甲醇的量设计样品装样高度如下的实验组，2.0 cm、2.5 cm、3.0 cm、3.5 cm、4.0 cm、5.0 cm、6.0 cm。分别进行了分辨率与信噪比的快速优化，结果如图 7。

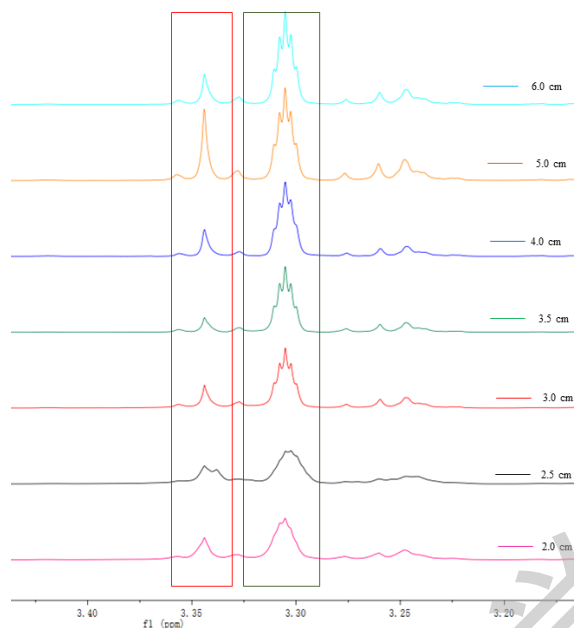


图 7 600 MHz 超低温探头装样高度优化

图 7 中，样品高度从下向上依次为 2.0 cm、2.5 cm、3.0 cm、3.5 cm、4.0 cm、5.0 cm、6.0 cm。利用氘代甲醇的未氘代溶剂信号进行分辨率优化，在装样高度为 3.5 cm 时即达到良好的分辨率，如图 7 中绿框所示信号。所以装样高度应大于等于 3.5 cm，在此基础上进行信噪比的优化；以氘代甲醇的未氘代溶剂信号为信噪比基准，以其左侧 3.345 ppm 处的信号进行判定，图中红框所示信号，随着装样高度依次增加，峰强度先增大后下降，在 5.0 cm 处信噪比最优，以此可粗略判断该设备射频线圈激发与接收信号的有效范围在 5.0 cm 左右，提示我们获得最优的信噪比，装样高度应在 5.0 cm 左右。以此为依据，在西安交大分测中心的用户群体中推荐该装样高度，尤其在天然产物的用户群体中获得良好的应用效果，谱图质量得到了稳定的改善。

结论

本文通过实验探究了核磁管装样液面高度对液体核磁共振氢谱信号的影响，发现液面高度对信噪比和线宽均有显著影响，优化样品液面高度是提高谱图质量的有效途径之一。当样品量充足时，装样液面高度控制在 4.6 cm 能获得理想谱图；当样品量很少时，装样高度将显著影响信噪比，最佳的测试条件将是样品高度接近射频线圈的有效激发与接收覆盖范围，文中所用的设备推荐控制装样液面高度在 4.0-4.7 cm 范围内实验结果较佳。其他核磁设备当样品量较小时，随着装样高度递增，同样存在信噪比增大继而减小的趋势，最优的装样高度即在峰值附近，对应该设备射频线圈激发与接收信号的有效范围，说明该方法具有普遍的应用与指导意义。

参考文献:

- [1] Lambert J B, Mazzola E P, Ridge C D. 核磁共振波谱学: 原理、应用和实验方法导论[M]. 向俊锋, 周秋菊译, 北京:化学工业出版社, 2021.
- [2] Schwieters C D, Bermejo G A, Clore G M. Xplor-NIH for molecular structure determination from NMR and other data sources[J]. Protein Science, 2018, 27(1): 26–40.
- [3] Keeler J. Understanding NMR spectroscopy, 2nd Edition[M]. England, Wiley Publishers, 2013.
- [4] Semenova O, Richardson P M, Parrott A J, *et al.* Reaction monitoring using SABRE-hyperpolarized benchtop (1T) NMR spectroscopy[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(10): 6695–6701.
- [5] 姚新生, 陈英杰. 超导核磁共振波谱分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1991.
- [6] 崔洁, 向俊锋. 液体样品对核磁图谱质量影响因素探讨[J]. 分析测试技术与仪器, 2020, 26 (2): 126-131.
- [7] 耿珠峰, 李璟, 许美凤, 等. 样品制备对化合物NMR结构解析的影响[J]. 现代仪器, 2010,16 (01): 14-15.
- [8] Mukhopadhyay R. Liquid NMR probes: Oh so many choices[J]. Analytical Chemistry, 2007, 11(1): 7959-7963.
- [9] 中国科学院化学研究所, NMR探头技术的进展[EB/OL]. (2012-08-30)[2024-10-08]. http://cpam.iccas.ac.cn/document_old.action?docid=45197.
- [10] Duggan B, Sample Preparation[EB/OL]. (2022-07-22) [2024-10-08]. <http://sopnmr.ucsd.edu/sample-preparation.htm>.