

盐酸曲唑酮杂质对照品核磁共振定量方法的建立

夏志鑫, 冯玉飞, 张雅军, 王瑾, 肖新月*, 吴先富*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立盐酸曲唑酮杂质对照品的核磁共振定量方法。方法: 采用 Bruker 500 MHz 核磁共振谱仪, 采集一维核磁共振氢谱, 以对苯二甲酸二甲酯为内标物, 扫描次数设为 32 次, 采样时间为 3.28 s, 弛豫延迟时间(D1)的设置如下: 盐酸曲唑酮杂质 A 和杂质 F 为 20 s[以氘代二甲亚砜(DMSO- d_6)为溶剂], 曲唑酮杂质 B、杂质 C、杂质 D 的 D1 为 30 s(以氘代丙酮为溶剂), 分别进行定量研究。结果: 5 个盐酸曲唑酮杂质对照品的 qNMR 结果与质量平衡法结果基本一致。结论: 本文建立的 qNMR 方法简单快捷, 准确度高, 为盐酸曲唑酮的质量控制及其杂质对照品的定值提供了新的方法, 同时, 可作为质量平衡法定值结果的有力佐证。

关键词: 盐酸曲唑酮杂质; 核磁共振定量; 对苯二甲酸二甲酯; 质量平衡法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)05-0925-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.05.22

Establishment of a quantitative ^1H -NMR method for reference standards of trazodone hydrochloride impurity

XIA Zhi-xin, FENG Yu-fei, ZHANG Ya-jun, WANG Jin,

XIAO Xin-yue*, WU Xian-fu*

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

Abstract **Objective:** To establish a quantitative ^1H -NMR method (qNMR) for reference standards of trazodone hydrochloride impurity. **Methods:** The 1D quantitative ^1H -NMR spectra were collected at Bruker 500 MHz NMR spectrometer. Dimethyl terephthalate was used as the internal standard with the number for scan set at 32 and the acquisition time set at 3.28 s. The relaxation time delay (D1) was set at 20 s for impurities A and F of trazodone hydrochloride (DMSO- d_6 used as the solvent) while 30 s for impurities B, C, D of trazodone hydrochloride (acetone- d_6 used as the solvent) to carry out quantitative study. **Results:** The results of quantitative ^1H -NMR method were basically consistent with those of mass balance method. **Conclusion:** The qNMR method is simple, rapid and accurate for the quality control of trazodone hydrochloride and quantitative determination of reference standards of trazodone hydrochloride impurity. Meanwhile, it provides a supportive evidence for the results of mass balance method. **Keywords:** impurity of trazodone hydrochloride; quantitative nuclear magnetic resonance; dimethyl terephthalate; mass balance method

* 通信作者 肖新月 Tel: (010) 53852486; E-mail: xiaoxy@nifdc.org.cn

吴先富 Tel: (010) 53852026; E-mail: wuxf99@163.com

第一作者 Tel: (010) 53852025; E-mail: xiaxin12358@163.com

盐酸曲唑酮是 1 种 5-羟色胺重摄取抑制剂,属于苯基哌嗪类化合物^[1],作为 1 种非典型四环类抗抑郁药,具有中枢镇静作用,提高睡眠质量的功效^[2]。盐酸曲唑酮杂质主要包括杂质 A 杂质、B 杂质、C 杂质、D 杂质、杂质 E 及杂质 F(结构式见图 1)。目前国内药典未收载盐酸曲唑酮有关物质项,美国药典(USP 40)和英国药典(BP 2018)均采用高效液相色谱法作为盐酸曲唑酮杂质的检测方法。化学对照品的定值通常采用质量平衡法,该方法从总含量中扣除水分、残留溶剂、灰分等的含量来确定标准物质的最终含量^[3-4]。质量平衡法是 1 种间接的纯度测定方法,结果准确度影响因素有很多,例如色谱主峰与杂质峰的分离程度,色谱峰的响应因子等。见十年来,

随着核磁共振定量(qNMR)技术的发展,其在药品标准制定、标准物质定值、药品质量控制等领域的应用日益广泛^[5]。与传统定量方法相比,qNMR 技术具有以下明显的特点:核磁共振信号强度直接与参与共振的原子核数目成正比^[6],理论上只需结构和含量已知的化合物作为参考,不需要提供样品自身标准物质^[7];对样品没有破坏性,操作较为简单,分析速度快等^[8]。本文通过选择合适的内标物与氘代溶剂,探索合适的 qNMR 参数,建立盐酸曲唑酮杂质对照品的定量方法,并对方法进行考察,最后与质量平衡法结果进行比较。研究表明,该方法快速、准确、可信,为盐酸曲唑酮的质量控制及其杂质对照品的定值提供了新的方法。

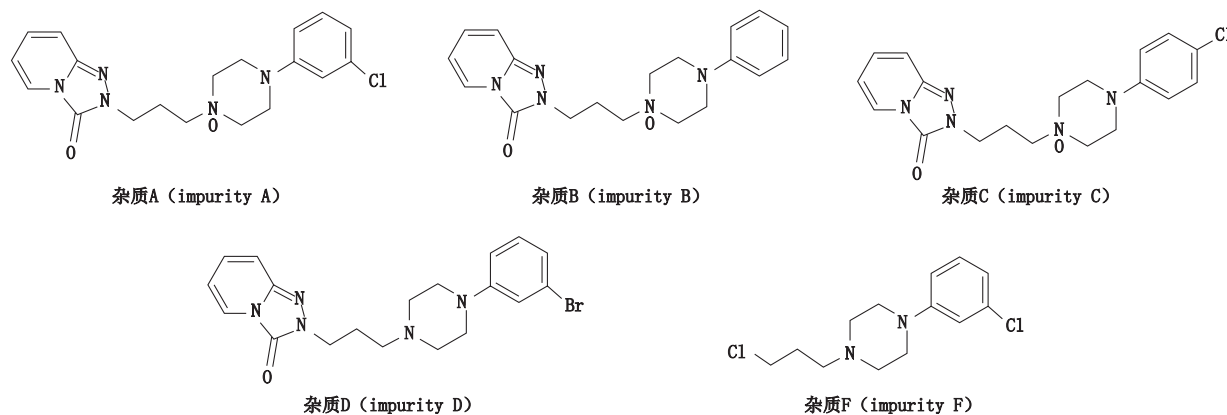


图 1 5 种盐酸曲唑酮杂质对照品的结构

Fig. 1 The structures of five trazodone hydrochloride impurity reference substances

1 仪器与试剂

Ascend-500 型核磁共振波谱仪 (Bruker 公司); MSA 6.6S 百万分之一电子天平 (Sartorius 公司)。

氘代二甲基亚砷 (DMSO- d_6) (Sigma-Aldrich, 纯度 99.9%, 批号 13I-163); 氘代丙酮 (acetone- d_6) (Sigma-Aldrich, 含量 99.9%, 批号 MKCD3426); 对照品对苯二甲酸二甲酯 (DMT, 含量 99.9%, 批号 510052-201401)、盐酸曲唑酮杂质 A (含量 93.1%, 批号 510145-201701)、盐酸曲唑酮杂质 B (含量 99.7%, 批号 510146-201701)、盐酸曲唑酮杂质 C (含量 99.4%, 批号 510147-201701)、盐酸曲唑酮杂质 D (含量 99.6%, 批号 510148-201701)、盐酸曲唑酮杂质 F (含量 99.5%, 批号 510150-201701), 中国食品药品检定研究院; 对苯二酚 (ACROS, 99.5%, 批号 A0275012)。

2 方法

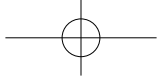
2.1 供试品溶液制备

精密称取盐酸曲唑酮杂质

A、B、C、D 和 F 各约 10 mg, 分别加入 DMT 约 6 mg 及氘代试剂约 0.5 mL (盐酸曲唑酮杂质 A 和 F 以 DMSO- d_6 为溶剂, 其余杂质以 acetone- d_6 为溶剂), 超声 (150 W, 80 kHz) 使其完全溶解, 混合后使用涡旋仪溶解, 所得溶液转移至 5 mm 核磁管中备用。

2.2 核磁仪器参数设置 采用 90° 脉冲, 脉冲程序为 noesyig1d, 谱宽设置为 10 000 MHz, 采样次数 32 次, 采样时间设置为 3.28 s, 采样点数为 64 K, 接收器增益设置为 32; 盐酸曲唑酮杂质 A 和 F 的弛豫延迟时间 (D1) 设置为 20 s, 盐酸曲唑酮杂质 B、C 和 D 的 D1 设置为 30 s。

2.3 数据处理与 qNMR 计算 将采集得到的氢谱进行傅里叶变换, 然后对谱图进行基线校正和相位校正。对选定的内标定量峰和样品定量峰进行积分, 每个峰 5 次, 取积分面积的平均值, 计算公式



如下:

$$P_x = \frac{A_x \times N_{\text{std}} \times M_x \times m_{\text{std}}}{A_{\text{std}} \times N_x \times M_{\text{std}} \times m} \times P_{\text{std}}$$

式中, P_x 为供试品含量; A_x 为供试品定量峰积分面积; N_x 为供试品定量峰包含质子数; M_x 为供试品相对分子质量; m 为供试品称样量; A_{std} 为内标物峰积分面积; N_{std} 为内标物定量峰包含质子数; M_{std} 为内标物相对分子质量; m_{std} 为内标物称样量, P_{std} 为内标物含量。

3 结果与讨论

3.1 溶剂与内标物的选择 本研究将 DMSO- d_6 与 acetone- d_6 作为考察溶剂, 内标物分别考察对苯二酚与 DMT。核磁定量所用溶剂对样品和内标物要有好的溶解性。其中, 盐酸曲唑酮杂质 A 和 F 在 acetone- d_6 中难溶, 在 DMSO- d_6 中易溶, 因此选择 DMSO- d_6 作为溶剂。其余杂质对照品在 acetone- d_6 中易溶, 在 DMSO- d_6 中微溶, 所以选择 acetone- d_6 作为溶剂。内标物定量峰要求与样品定量峰有良好的分离。对苯二酚定量峰与样品峰在 δ 6.5 左右有部分重合, DMT 定量峰与杂质样品峰分离良好, 因此选择 DMT 作为内标物。

3.2 定量峰的选择 一般要求内标物定量峰与样品定量峰有良好的分离, 并优先选择偶合裂分较少的相邻质子峰^[9]。内标物 DMT 选择 δ 8.09/8.13 处苯环质子峰作为定量峰, 盐酸曲唑酮杂质 A、B、C、D 和 F 分别选择 δ 7.85、 δ 7.76、 δ 7.76、 δ 7.76 和 δ 7.27 处的苯环单质子峰。见图 2。

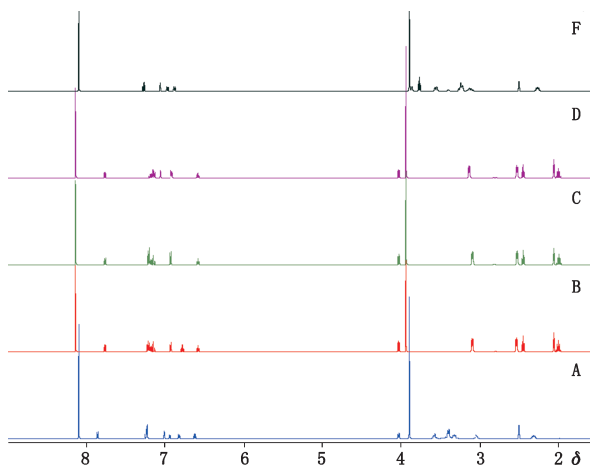


图2 盐酸曲唑酮杂质对照品 A、B、C、D 和 F 加入内标物后 ^1H -NMR 图谱

Fig. 2 The ^1H -NMR spectra of trazodone hydrochloride impurity reference substances standards A、B、C、D and F with internal standards

3.3 参数的设置 影响核磁定量准确度的参数主要有 D1 和扫描次数^[10], D1 主要影响积分强度, 扫描次数主要影响信噪比^[11]。通常要求 D1 大于质子纵向弛豫时间 (T_1) 的 5 倍^[12], 使质子在激发前有足够的时间恢复到平衡态, 确保相应峰有足够的强度。采用反转恢复技术, 测量内标物和样品相应峰在各自溶剂中的 T_1 ^[13]。待测样品定量峰和内标 DMT 定量峰 T_1 为 1.599~5.561 s。具体值见表 1。因此, 将盐酸曲唑酮杂质 A 和 F 的 D1 设置为 20 s, 盐酸曲唑酮杂质 B、C 和 D 的 D1 设置为 30 s。通过测量内标物, 盐酸曲唑酮杂质 B、C、D 和 DMT 在 DMSO- d_6 和 acetone- d_6 中的 T_1 , 发现溶剂对质子 T_1 有一定的影响。在 acetone- d_6 中 DMT 苯环质子的 T_1 约为在 DMSO- d_6 中的 2 倍, 因此, 在建立核磁定量方法, 选择氘代溶剂的过程中, 不仅要考虑溶解性和稳定性, 而且要注意溶剂对质子 T_1 的影响。通常扫描次数与峰信噪比的平方根成正比, 增加扫描次数以获得足够高的信噪比^[14]; 但扫描次数增加会延长实验时间。本实验选择扫描次数为 32, 在保证一定信噪比的前提下, 减少实验时间。

表1 盐酸曲唑酮杂质对照品和内标物定量峰在不同溶剂中的 T_1 (s) 值

Tab. 1 The T_1 values of quantitative peaks for trazodone hydrochloride impurity reference substances and internal standard in different solvents

样品 (sample)	DMSO- d_6	acetone- d_6
杂质 A (impurity A)	2.789	/
杂质 B (impurity B)	3.165	5.373
杂质 C (impurity C)	3.225	5.208
杂质 D (impurity D)	3.019	5.160
杂质 F (impurity F)	1.599	/
DMT	2.190	5.561

3.4 核磁定量方法线性考察 分别配制盐酸曲唑酮杂质 A、B、C、D 和 F 样品测试浓度 50%~200% 范围内的 6 份系列溶液, 进行测定。以样品 / 内标称样量比值为横坐标, 样品定量峰 / 内标定量峰面积比值测得量为纵坐标左图, 进行线性回归, 得到 5 个线性方程。见表 2。

表 2 线性回归方程

Tab. 2 The linear regression equation

样品 (sample)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range) / (mg·g ⁻¹)
杂质 A (impurity A)	$Y=0.116\ 7X+0.000\ 3$	0.999\ 99	14.996–37.776
杂质 B (impurity B)	$Y=0.143\ 90X-0.000\ 83$	0.999\ 98	15.818–32.987
杂质 C (impurity C)	$Y=0.129\ 88X+0.000\ 21$	0.999\ 97	10.580–31.662
杂质 D (impurity D)	$Y=0.116\ 70X-0.000\ 90$	0.999\ 96	10.405–30.483
杂质 F (impurity F)	$Y=0.156\ 60X-0.000\ 62$	0.999\ 95	14.296–38.118

3.5 重复性试验 分别称取盐酸曲唑酮杂质对照品约 10 mg, DMT 约 6 mg。每种杂质对照品各 6 份, 在相同核磁参数条件下连续进样。对每份样品所得

图谱积分 5 次, 将积分平均值带入公式计算, 结果见表 3。重复性结果良好。

表 3 盐酸曲唑酮杂质对照品测量结果

Tab. 3 The quantitative results of trazodone hydrochloride impurity reference substances

样品 (sample)	含量 (content) /%						平均值 (average) /%	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
杂质 A (impurity A)	93.29	93.36	93.00	92.87	93.19	93.45	93.19	0.24
杂质 B (impurity B)	99.60	100.01	99.87	99.58	99.41	99.40	99.65	0.25
杂质 C (impurity C)	99.31	99.29	99.60	100.05	99.80	99.22	99.55	0.33
杂质 D (impurity D)	99.86	99.73	99.77	99.90	99.82	99.53	99.77	0.13
杂质 F (impurity F)	99.80	99.58	99.70	99.84	99.66	99.89	99.74	0.12

3.6 稳定性试验 分别取各杂质对照品的同一份供试品溶液, 在室温下放置 0、3、6、9、12 h, 分别进行测定, 计算各杂质对照品的含量, 考察溶液稳定性。结果见表 4。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

表 4 盐酸曲唑酮杂质对照品 qNMR 稳定性考察结果

Tab. 4 The stability results of trazodone hydrochloride impurity reference substances by qNMR

时间 (time) / h	含量 (content) /%				
	杂质 A (impurity A)	杂质 B (impurity B)	杂质 C (impurity C)	杂质 D (impurity D)	杂质 F (impurity F)
0	93.42	99.57	99.51	99.72	99.62
3	93.48	99.52	99.50	99.79	99.13
6	93.56	99.64	99.92	99.74	99.13
9	93.48	99.57	99.52	99.40	99.64
12	93.46	99.55	99.47	99.78	99.51
RSD/%	0.06	0.04	0.19	0.16	0.26

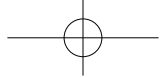
3.7 qNMR 法与质量平衡法比较 根据质量平衡法, 盐酸曲唑酮杂质对照品含量 (%) = (100% - 水分含量 - 残留溶剂含量 - 炽灼残渣含量) ×

HPLC 含量。将盐酸曲唑酮杂质对照品分别按照高效液相方法测得 HPLC 纯度, 采用库仑滴定仪对水分进行测定, 采用气相色谱法测得残留溶剂含量, 同时对炽灼残渣含量进行考察。得到的质量平衡法纯度与 qNMR 法结果基本一致。如表 5 所示。

表 5 盐酸曲唑酮杂质对照品 qNMR 法与质量平衡法比较

Tab. 5 The comparison of quantitative results of qNMR and mass balance method for trazodone hydrochloride impurity reference substances

样品 (sample)	含量 (content) /%	
	质量平衡法 (mass balance method)	qNMR
杂质 A (impurity A)	93.1	93.2
杂质 B (impurity B)	99.7	99.7
杂质 C (impurity C)	99.4	99.6
杂质 D (impurity D)	99.6	99.7
杂质 F (impurity F)	99.5	99.7



4 结论

本文建立了盐酸曲唑酮杂质 A、B、C、D 和 F 的 qNMR 方法,并对该方法的线性和稳定性进行了考察。该方法准确度高,同时具有操作简单、快捷等优点,可作为质量平衡法定值的有益补充。

参考文献

- [1] HARA M, FITTON A, MCTAVISH D. Trazodone: a review of its pharmacology, therapeutic use in depression and therapeutic potential in other disorders [J]. *Drugs Aging*, 1994, 4(4): 331
- [2] FAGIOLINI A, COMANDINI A, KASPER S, *et al.* Rediscovering trazodone for the treatment of major depressive disorder [J]. *CNS Drugs*, 2012, 26(12): 1033
- [3] 陈桂良, 徐新元, 王依婷. 新药开发研究过程中药品标准物质的标定 [J]. *上海计量测试*, 2002, 29(2): 18
CHEN GL, XU XY, WANG YT. The determination of pharmaceutical reference materials during new drug development and research [J]. *Shanghai Meas Test*, 2002, 29(2): 18
- [4] 冯艳春, 刘书好, 胡昌勤. 比阿培南标准物质的研制 [J]. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(9): 679
FENG YC, LIU SY, HU CQ. Establishment of national reference standard of biapenem [J]. *J Chin Antibiot*, 2010, 35(9): 679
- [5] BHARTI SK, ROY R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy [J]. *Trends Anal Chem*, 2012, 35: 5
- [6] 张芬芬, 蒋孟虹, 沈文斌. 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 (工程技术版)*, 2014, 14(2): 8
ZHANG FF, JIANG MH, SHEN WB. Progress in quantitative nuclear magnetic resonance technology in pharmaceutical applications [J]. *J Nanjing Norm Univ (Eng Technol Ed)*, 2014, 14(2): 8
- [7] SIMMLER C, NAPOLITANO JG, MCALPINE JB, *et al.* Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 25: 51
- [8] HOLZGRABE U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications [J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010, 57(2): 229
- [9] SHEN S, YAO J, SHI Y. Quantitative proton nuclear magnetic resonance for the structural and quantitative analysis of atropine sulfate [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 89: 118
- [10] 张琪, 朱洪波, 杨化新, 等. 核磁共振法定量影响因素探析. [J]. *中国药品标准*, 2014, 15(6): 405
ZHANG Q, ZHU HB, YANG HX, *et al.* Discussion on the factors influencing quantitative nuclear magnetic resonance determination [J]. *Drug Stand China*, 2014, 15(6): 405
- [11] MALZ F, JANCKE H. Validation of quantitative NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5): 806
- [12] RIZZO V, PINCIROLI V. Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5): 851
- [13] SOININEN P. Quantitative ^1H NMR Spectroscopy Chemical and Biological Applications [EB/OL]. (2008-10-10) [2015-10-28]. http://publications.uef.fi/pub/urn_isbn_978-951-27-1093-5/urn_isbn_978-951-27-1093-5.pdf. Kuopio, Kuopio University Publications. 2008: 1
- [14] HOLZGRABE U, DEUBNER R, SCHOOLLMAYER C, *et al.* Quantitative NMR spectroscopy—Application in drug analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005(38): 806

(本文于 2018 年 4 月 5 日收到)