

核磁共振定量法在化学对照品标化中的应用^{*}

张才煜^{1,2}, 宁保明¹, 何兰^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 西安交通大学, 西安 710049)

摘要 **目的:** 建立核磁共振定量法测定多个化学对照品的含量, 并与质量平衡法等其他手段含量测定结果进行对比与分析。**方法:** 采用核磁共振技术建立绝对含量测定方法对多个化学对照品的候选原料进行了定性定量检测。**结果:** 本研究通过对测定的结果进行分析, 总结核磁定量法解决的问题主要有2类: 对于无法溯源的首批对照品的赋值, 起到了对质量平衡法结果的佐证作用, 并通过对核磁谱图的定性分析, 找到核磁定量法、质量平衡法与 HPLC 外标法等其他含量测定方法结果不匹配的原因; 对于含多组分对照品, 利用核磁技术可同时对多组分定性定量的优势, 可分别测定对照品原料中残留溶剂、盐基和异构体等含量, 弥补了一些色谱等方法的不足之处。**结论:** 核磁共振定量方法操作简便, 灵敏度高, 为对照品辅助定值增加新的重要常用手段。

关键词: 核磁共振技术; 化学对照品; 含量测定; 双甲酚磺酸铵; 尼莫地平杂质 I; 苯甲酸利扎曲普坦

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)05-0919-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.05.21

Application of the quantity nuclear magnetic method in the calibration of the chemical reference substances^{*}

ZHANG Cai-yu^{1,2}, NING Bao-ming¹, HE Lan^{1**}

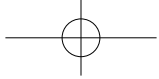
(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract **Objective:** To establish the quantity nuclear magnetic method (qNMR) to determine the contents of the reference standard, also compared with mass balance and other methods. **Methods:** Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) spectra were obtained to test and quantity several chemical reference substances (RS) candidate materials by using a Bruker Ascend 500 spectrometer. **Result:** According to the results, there are two main types of problems can be solved by NMR quantitative analysis: for the first batch of reference materials, it is a supporting assignment way to the mass balance method, sometimes it can found the reason that the results of qNMR method, mass balance method and HPLC external standard method does not match each other; For reference substances containing multi-component, with the advantages of simultaneous qualitative and quantitative determination of multi-component by NMR, the qNMR method can determine the contents of residual solvents,

^{*} 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2017ZX09101001): 药物一致性评价关键技术与标准研究

^{**} 通信作者 Tel: (010) 53851600; E-mail: helan1961@aliyun.com

第一作者 Tel: (010) 53851572; E-mail: colorfish321@126.com



salts and isomers separately, which made up for some shortcomings of chromatographic methods. **Conclusion:** qNMR provides a simple, rapid and important method for purity analysis of the reference substances.

Keywords: quantitative nuclear magnetic resonance; chemical reference substance (qNMR); assay; *N*-(4-chlorophenyl) acetamide; nimodipine related compound I; rizatriptan benzoate

ICH 规定标准物质的定值方法为质量平衡法, 其含量 = $(1 - \text{杂质}\%) \times (1 - \text{水分}\% - \text{挥发性物质}\% - \text{灰分}\% - \text{成盐离子}\%) \times 100\%$, 即分别测定活性成分中的杂质、水分、残留溶剂、无机杂质(灰分)的含量, 加上活性成分的含量, 其和应为 100%^[1-3]。通常在标准物质研制中会综合运用 HPLC 法、TLC 法、DSC 法等测定候选原料的纯度, 采用 HPLC 外标法、容量法、UV 外标法、离子色谱法等测定候选原料的含量。但是随着标准物质研究的不断深入, 我们发现, 由于候选原料与其杂质的紫外响应不一定相同, 无法找到可溯源的外标对照品, 法定标准的液相色谱方法无法检出某些杂质等问题, 使质量平衡法的结果遇到了挑战, 因此, 需要找到一种不受上述因素干扰的新的含量测定方法, 用于佐证质量平衡法的赋值结果。

核磁共振 (NMR) 波谱是一种基于特定原子核在外磁场中吸收了与其分裂能级间能量差相对应的射频场能量而产生共振现象的分析方法。核磁共振定量 (qNMR) 分析以结构分析为基础, 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之间的关系进行定量测定^[4]。HPLC 紫外法则是假设所有的色谱峰面积和为 100% 的前提下计算的相对纯度, 核磁信号的响应因子与氢质子数量成比例, 而与分子种类无关, 因此从原理上讲核磁的应用范围更广^[5]。目前, 国内外已有将 qNMR 技术应用于标准物质标化研究的报道^[6-10], Malz 等^[11]对核磁定量法进行了详细的方法学研究, 并总结了各参数设置的常规值, Pauli 等^[12]对核磁定量法的校准、与其他定量方法的关系、软件使用等均进行了详细的综述。本研究运用 qNMR 技术, 对多个化学标准物质的候选原料进行定性、定量检测分析, 对该方法的应用于情况进行了深入的研究与总结, 为将该方法应用于对照品的赋值佐证提供了科学依据。

1 材料与方法

本研究所使用的对照品候选原料均购自于企业或科研单位: 4-对二硝苯(东京化成工业株式会社,

含量 99.0%); 对苯二酚 (ACROS, 含量 99.5%); 马来酸 (ACROS, 含量 99.5%)。氘代甲醇、氘代氯仿、氘代二甲亚砜 (DMSO)、氘代重水均为 Sigma 试剂, 北京金欧翔科贸有限公司分装。

采用 Ascend-500 型与 Advance-400 型核磁共振波谱仪 (Bruker 公司); MSA6.6S 百万分之一电子天平 (Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 精密称取适量样品与内标化合物, 加适量氘代溶剂溶解, 使样品与内标的浓度约为 $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每个品种配制 6 份样品。

2.2 核磁参数设置 采用 zg30 脉冲序列在恒温 25 °C 获取 ^1H -NMR。具体实验参数如下: 谱宽 (SWH) 10 kHz, 横向弛豫时间 (D1, 15~30 s), 采样次数: 16, 空扫次数: 2, 采用 TOPSPIN2.3 实验控制及数据处理软件, 必要时调节相位, 采用手动积分样品与内标的峰面积。

2.3 qNMR 结果计算 按照《中华人民共和国药典》四部附录 0441^[4]与文献^[3]中相对定量公式与绝对定量公式计算结果。

3 结果与分析

3.1 qNMR 技术在首批对照品 (无溯源对照品) 含量测定的应用 首批对照品通常需要采用多手段对赋值结果进行验证, 如二乙酰氨乙酸乙二胺只收载于国家药品标准中, 其他国家药典未收载, 无法找到可溯源对照品。此外, 随着药品质量控制研究的不断深入, 越来越多的杂质对照品被制定到质量标准中, 但这些杂质并无相应独立的质量标准, 通常会采用主成分的有关物质测定方法测定杂质对照品中的“杂质”。由于杂质原料的合成路线也许与主成分的不同, 其紫外响应、残留溶剂情况甚至引湿性等情况均与主成分亦可能有较大差异, 因此这些杂质对照品中的“杂质”研究与检测成为了研究难点。本文根据化合物的结构与溶解特性采用不同的内标和溶剂, 建立了 qNMR 法测定这些杂质对照品的绝对含量 (表 1)。

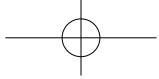
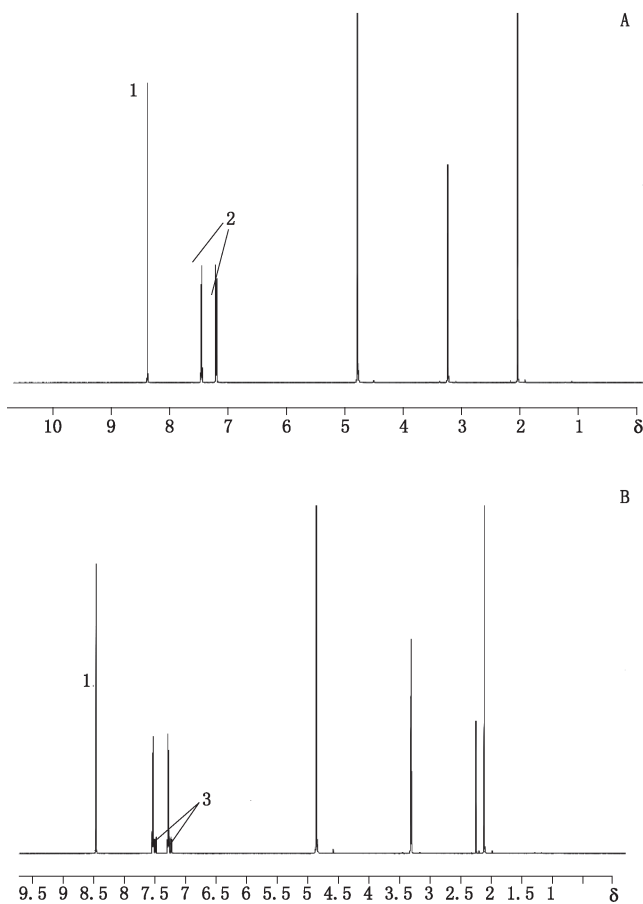


表 1 对照品核磁定量测定结果

Tab. 1 The qNMR results of reference substances

序号 (No.)	对照品名称 (name of reference substance)	内标 (internal standard)	溶剂 (solvent)	qNMR 结果 (results by qNMR)/%	其他含量测定方法 结果 (results by other method)/%
1	双甲酚磺酸铵(聚甲酚磺醛的杂质) [ammonium bicresol sulfonate (impurity of policresulen)]	对硝基苯(<i>p</i> -nitrophenyl isocyanate)	DMSO	87.61	88.2(质量平衡法, mass balance)
2	2,3-二甲苯胺(盐酸氨酮戊酸杂质) (2,3-dimethylaniline, impurity of aminoglutaric acid hydrochloride)	对硝基苯(<i>p</i> -nitrophenyl isocyanate)	CDCl ₃	99.49	99.3(容量法, volumetry)
3	5-邻苯二甲酰亚胺乙酰丙酸(盐酸氨酮戊酸 杂质)(5-aminolevulinic acid hydrochloridem, impurity of aminoglutaric acid hydrochloride)	马来酸(maleic acid)	CD ₃ OD	100.61	99.49(DSC)
4	6-甲氧基乙萘乙酮(萘普生杂质) (2-acetyl-6-methoxynaphthalene, impurity of naproxen)	对苯二酚(hydroquinone)	CD ₃ OD	99.98	99.62(质量平衡法, mass balance)
5	4-三氟甲基苯胺(来氟米特杂质) (4-aminotrifluorotoluene, impurity of leflunomide)	对苯二酚(hydroquinone)	CD ₃ OD	98.64	99.11(质量平衡法, mass balance)
6	盐酸胺碘酮杂质 I (amiodaronehydro chloride impurity I)	对硝基苯(<i>p</i> -nitrophenyl isocyanate)	CDCl ₃	99.75	99.6(质量平衡法, mass balance)
7	培哚普利杂质 I (perindopril impurity I)	对苯二酚(hydroquinone)	D ₂ O	100.23	99.73(质量平衡法, mass balance)
8	钆贝葡胺杂质 II (gadolinium meglumine impurity II)	对苯二酚(hydroquinone)	D ₂ O	92.88	92.2(质量平衡法, mass balance)
9	右旋酮洛芬氨丁三醇(dexketoprofen trometamol)	对苯二酚(hydroquinone)	CD ₃ OD	99.6	99.8(容量法, volumetry)
10	氯吡格雷杂质 1 (clopidogrel Impurity 1)	对硝基苯(<i>p</i> -nitrophenyl isocyanate)	CD ₃ OD	97.45	99.5(质量平衡法, mass balance)
11	氯吡格雷杂质 3 (clopidogrel impurity 3)	对硝基苯(<i>p</i> -nitrophenyl isocyanate)	CD ₃ OD	99.33	98.3(质量平衡法, mass balance)
12	对氯苯乙酰胺(对乙酰氨基酚杂质) [N-(4-chlorophenyl)acetamide, impurity of acetaminophen]	对硝基苯(<i>p</i> -nitrophenyl isocyanate)	CD ₃ OD	99.68	99.96(质量平衡法, mass balance)
13	磷酸肌酸钠(含 4 个结晶水) [sodium (4 crystal water included) creatine phosphate]	对苯二酚(hydroquinone)	D ₂ O	77.52(以无水 物分子量计 算, anhydrous)	76.1(质量平衡法, mass balance)
14	二乙酰氨乙酸乙二胺(ethy enediamine diaceturate)	对苯二酚(hydroquinone)	D ₂ O	99.91	99.96(容量法, volumetry)
15	苯甲酸利扎普坦(rizatriptan benzoate)	对苯二酚(hydroquinone)	CD ₃ OD	苯甲酸 (benzoate): 31.07 利扎普坦 (rizatriptan): 69.06	100.13(容量法, volumetry) 苯甲酸(benzoate): 30.54 (HPLC)
16	福多司坦(fudosteine)	对苯二酚(hydroquinone)	D ₂ O	99.48	99.53(质量平衡法, mass balance)
17	盐酸金刚烷胺(amantadine hydrochloride)	对苯二酚(hydroquinone)	D ₂ O	99.9	99.78(质量平衡法, mass balance)
18	盐酸咪达普利(imidapril hydrochloride)	对苯二酚(hydroquinone)	CD ₃ OD	99.47	100.90(容量法, volumetry)
19	谷氨酰胺(glutamine)	对苯二酚(hydroquinone)	D ₂ O	98.24	98.4(质量平衡法, mass balance)
20	氟芬那酸丁酯(butyl flufenamatum)	对硝基苯(<i>p</i> -nitrophenyl isocyanate)	DMSO	99.59	100(质量平衡法, mass balance)

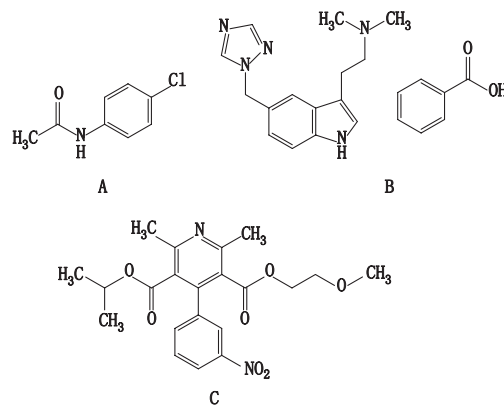
双甲酚磺酸铵为聚甲酚磺醛外标杂质,其纯度较高,但水分高达 11.46%,质量平衡法赋值结果为 88.2%,建立核磁定量法测定其绝对含量为 87.61%,两者基本一致,佐证了质量平衡法结果。对氯苯乙酰胺为对乙酰氨基酚杂质,质量平衡法结果为 99.96%,分别采用上批对照品(100850-201102)与 USP 对照品(批号 R00310,含量 99%)对候选原料进行 HPLC 法含量测定,按干燥品计算含量分别为 100.58% 与 116.40%,差异较大,因此建立核磁定量方法测定其绝对含量为 99.68%,分析原因时在 USP 对照品 qNMR 谱中发现了明显的未知峰(图 1、2),而在其 HPLC 色谱图中未发现明显杂质峰,推测由于 USP 对照品中有杂质存在,且在 HPLC 方法中未被准确检出,影响了 HPLC 法含量测定结果的准确性。



1. 内标对硝基苯 (*p*-nitrophenyl isocyanate, internal standard) 2. 样品 (sample) 3. 未知 (unknown)
A. 候选原料 (candidate reference materials) B. USP 对照品 (USP reference materials)

图 1 对氯苯乙酰胺的图谱

Fig. 1 The qNMR spectrums of *p*-chloroacetanilide



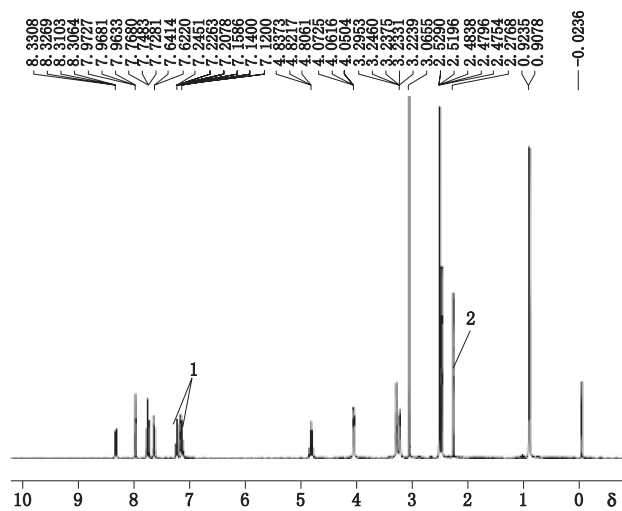
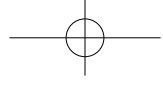
A. 对氯苯乙酰胺 [*N*-(4-chlorophenyl)acetamide, cas: 539-03-7]
B. 苯甲酸利扎曲普坦 [rizatriptan benzoate, cas: 145202-66-0]
C. 尼莫地平杂质 I (nimodipine impurity I)

图 2 对照品化学结构图

Fig. 2 The chemical structures of reference substances

3.2 qNMR 技术在测定含多组分(包括残留溶剂、盐基与异构体等)对照品方面的应用 在一张核磁谱图上不仅可以得到主成分的结构信息,当其他成分(如异构体,多组分化合物)或杂质(如残留溶剂)与主成分无干扰的时候,还可以看到上述化合物的信息,目前已有文献总结了核磁谱中常用残留溶剂的化学位移^[13],因此较容易从核磁图谱上分析出残留溶剂的峰。如在尼莫地平杂质 I 的核磁谱上可以看到一组明显的杂质峰,经与文献[14]及无残留溶剂干扰的尼莫地平杂质 I 的图谱进行比较,确认为残留溶剂甲苯峰,采用相对含量的计算公式,得出甲苯的相对含量为 12.6%,与气相色谱法的测定结果(12.5%)基本一致(图 3)。此外,在氢溴酸东莨菪碱对照品 qNMR 谱中鉴定并准确测定了残留溶剂乙醇的含量^[15]等。

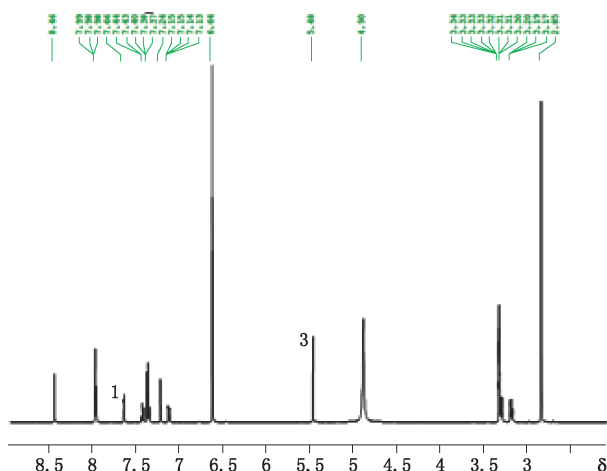
对于成盐对照品,在核磁谱上,有些盐与主成分的信号峰能够被区分,在计算时根据所选的盐基或碱基的定量峰,采用相应的分子量则可分别计算出盐基和碱基的含量。如候选原料苯甲酸利扎曲普坦分子式为 $C_{15}H_{19}N_5 \cdot C_6H_5COOH$,在其 1H -NMR 谱中可见苯甲酸信号与利扎曲普坦信号(见图 4、表 1),因此建立了核磁定量法在一张图谱上同时测定了苯甲酸与利扎曲普坦的绝对含量,并计算出苯甲酸与利扎曲普坦含量比为 0.45,与理论值一致。但盐酸盐等含有活泼氢,通常不作为定量峰,因此在不能确定成盐是否完全的情况下,只能计算此类化合物的碱基的含量,成盐情况则最好通过离子色谱法测定。



1. 甲苯中的苯环上氢峰 (benzene ring hydrogen peak in toluene) 2. 甲苯中的 $-\text{CH}_3$ 峰 ($-\text{CH}_3$ peak in toluene)

图3 尼莫地平杂质 I 的 ^1H -NMR 谱

Fig. 3 ^1H -NMR spectrum of nimodipine impurity I



1. 苯甲酸的氢信号 (H signal in benzoic acid) 2. 内标氢信号 (H signal in internal standard) 3. 利扎曲普坦的氢信号 (H signal in rizatriptan)

图4 苯甲酸利扎曲普坦的 ^1H -NMR 图谱

Fig. 4 ^1H -NMR spectrum of rizatriptan benzoate

有一些化学对照品本身存在 2 种异构体 (如克罗米通等) 或者是 2 个组分 (如茶苯海明), 目前药典收载的含量测定方法基本为 HPLC 法, 采用 2 个组分峰面积总和来计算含量, 但 2 个组分的紫外响应可能不同, 因此在标化时建立了核磁定量法分别测定克罗米通中 2 种异构体的含量^[16] 以及茶苯海明^[17] 中茶碱与苯海拉明的含量。

4 讨论

从 qNMR 法的计算公式可以发现, 其结果主要与称样量和信号峰积分面积相关, 当信号峰信噪比大于 100 时, 结果不确定度为 1%, 信噪比越大, 准确

度越高^[18], 因此获得一张准确的图谱是非常重要的。随着仪器精密度的不断提高, 可以通过参数优化保证结果的准确性, 如需要注意脉冲次数、纵向弛豫时间 (T1)、图谱处理、相位校正等参数以获得准确的积分^[19]。本文在建立 qNMR 方法时对上述因素进行了考察, 如通过匀场、测定样品的 T1 值, 选取其 5 倍的 D1 值 (15~30 s), 以保证每次采样间共振信号强度的一致性, 满足测量精度的要求, 增加扫描次数以减少仪器的干扰, 对获得的图谱进行相位矫正, 尽量选取多个定量峰进行积分, 分别计算结果并比较差异, 以减少手动积分带来的误差。

化学对照品的纯度较高 (通常 $\geq 95\%$), 当其杂质可被所采用的 HPLC 方法检出, 并且与主成分紫外响应因子相差不大的情况下, 质量平衡法结果较为准确; 相应的, 由于化学对照品多数为小分子化合物, 结构简单, 杂质含量低, 对主成分氢信号干扰少, 亦较容易建立核磁定量法, 其结果准确度高。当 2 个结果不一致的时候, 由于核磁定量法具有测定绝对含量与定性的优势, 则更有参考意义。随着分析技术的不断进步与对照品标化工作研究的不断深入, 判断对照品候选原料的质量也并非只是只看 HPLC 纯度那么简单, 若其背后隐藏的杂质未被完全检出, 就存在质量标准无法控制其杂质纯度, 成盐不一定完全等风险。核磁共振技术的引入, 由于其具有测定绝对定量与定性的特点, 为质量平衡法赋值提供了有力的佐证。

参考文献

- [1] WHO Technical Report Series [S]. No. 943, Annex 3, 2007
- [2] 任连杰, 张宁, 陈震, 等. 化学药品注册中对照品的要求 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25 (4): 389
REN LJ, ZHANG N, CHEN Z, et al. Technical requirements of reference standards for registration of chemical drugs [J]. Chin J New Drugs, 2016, 25 (4): 389
- [3] LIU SY, HUA CQ. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods [J]. Anal Chim, 2007, 602 (1): 114
- [4] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部 [S]. 2015: 441
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 441
- [5] PINCIROLI V, BIANCARDI R, COLOMBO N, et al. Characterization of small combinatorial chemistry libraries by ^1H -NMR. Quantitation with a convenient and novel internal standard [J]. J Comb Chem, 2001, 3 (5): 434
- [6] 张才煜, 张娜, 何兰. 核磁共振内标法测定波生坦的含量 [J]. 药

- 学学报, 2014, 49(2): 249
- ZHANG CY, ZHANG N, HE L, *et al.* Quantitative determination of bosentan by proton nuclear magnetic resonance with internal standard method [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(2): 249
- [7] WISE SA, EMONS H. Reference materials for chemical analysis [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(11): 2941
- [8] NELSON MA, BEDNER M, LANG BE, *et al.* Metrological approaches to organic chemical purity: primary reference materials for vitamin D metabolites [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(28): 8557
- [9] SAITO T, IHARA T, MIURA T, *et al.* Efficient production of reference materials of hazardous organics using smart calibration by nuclear magnetic resonance [J]. *Accred Qual Assur*, 2011, 16(7): 421
- [10] MALZ F, JANCKE H. Validation of quantitative NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5): 813
- [11] YANG MR, WANG M, ZHOU J, *et al.* Development of a new certified reference material of tinidazole for quality and safety of agro-products [J]. *Accred Qual Assur*, 2016, 21(7): 341
- [12] PAULI GF, GODECKE T, JAKI BU, *et al.* Quantitative ^1H NMR. Development and potential of an analytical method; an update [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(4): 834
- [13] GOTTLIEB HE, KOTLYAR V, NUDELMAN A. NMR chemical shift of common laboratory solvents as trace impurities [J]. *J Org Chem*, 1997, 62(21): 7512
- [14] 何兰, 卢忠林. 化学药品对照品图谱集—核磁共振 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2014: 1084
- HE L, LU ZL. Atlas of Chemicals Reference Substance—Nuclear Magnetic Resonance [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2014: 1084
- [15] 张才煜, 吴健敏, 李璟, 等. 核磁共振法定量测定氢溴酸东莨菪碱的绝对含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 32(2): 327
- ZHANG CY, WU JM, LI J, *et al.* Quantitative nuclear magnetic resonance determination of the absolute content of scopolamine hydrobromide [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(2): 327
- [16] 张才煜, 黄海伟, 吴建敏, 等. 克罗米通含量测定方法的研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(19): 1721
- ZHANG CY, HUANG HW, WU JM, *et al.* Content determination method of crotamiton [J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(19): 1721
- [17] 张才煜, 耿颖, 卢日刚, 等. 核磁共振定量法测定茶苯海明的含量 [J]. 中国药事, 2018, 32(6): 743
- ZHANG CY, GENG Y, LU RG, *et al.* Study on the content determination method of dimenhydrinate [J]. *Chin Pharm Aff*, 2018, 32(6): 743
- [18] HAYS PA, SCHOENBERGER T. Uncertainty measurement for automated macro program-processed quantitative proton NMR spectra [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(28): 7397
- [19] FERNANDEZ-RAMIREZA A, SALAZAR-CAVAZOSA ML, RIVAS-GALINDO V, *et al.* Determination of isoperoxisomicine A1 content in peroxisomicine A1 batches by means of ^1H NMR [J]. *Anal Lett*, 2004, 37(12): 2433
- (本文于 2018 年 3 月 23 日收到)