

^{19}F qNMR 在含氟制剂含量测定中的应用*

刘阳¹, 袁松¹, 赵庄², 何兰^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102620; 2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

摘要 目的: 建立 ^{19}F 核磁共振定量 (qNMR) 测定片剂中含氟药物含量的方法。**方法:** 以 4,4'-二氟二苯甲酮为内标, 氘代 DMSO 为溶剂, 采用反门控去耦的 zgfhigqn.2 脉冲序列, 利用 ^{19}F qNMR 测定卡格列净片中卡格列净含量。试验参数如下: 谱宽 $\text{SW}=40 \times 10^{-6}$, 射频中心频率 $\text{O1P}=-110 \times 10^{-6}$, 采样点数 $\text{TD}=128 \text{ k}$, 采样时间 $\text{AQ}=3.5 \text{ s}$, 弛豫延迟时间 $\text{D1}=20 \text{ s}$, 扫描次数 32 次。**结果:** 通过简单的过滤或离心处理后, 使用 ^{19}F qNMR 测得 6 片卡格列净片中卡格列净含量分别为 98.2%、98.9%、101.0%、99.7%、99.2%, 与 HPLC 外标法测定结果相近。**结论:** ^{19}F qNMR 可以用于含氟药物制剂中药品含量测定, 这种技术前处理简单, 检测速度快, 不受辅料等干扰, 可以用于含氟药物制剂含量的高通量测定。

关键词: 氟核磁共振定量; 卡格列净; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)09-1507-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.09.07

Application of ^{19}F qNMR in the assay of fluorine-containing preparation*

LIU Yang¹, YUAN Song¹, ZHAO Zhuang², HE Lan^{1**}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102620, China;

2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To establish a ^{19}F quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) method to determine the content of active pharmaceutical ingredient (API) in fluorine-containing preparation. **Methods:** In ^{19}F qNMR experiments, 4,4'-difluorobenzophenone was used as an internal standard. DMSO- d_6 was used as solvent and zgfhigqn.2 pulse sequence with inverse gated decoupling was applied. Other parameters were as follows: $\text{SW}=40 \times 10^{-6}$, $\text{O1P}=-110 \times 10^{-6}$, $\text{TD}=128 \text{ k}$, $\text{AQ}=3.5 \text{ s}$, $\text{D1}=20 \text{ s}$ and $\text{NS}=32$. **Results:** After simple pre-treatment of filtration or centrifuge, the content of canagliflozin in 5 tablets were measured using ^{19}F -qNMR. The results were 98.2%, 98.9%, 101.0%, 99.7% and 99.2%, respectively. The results were similar to those from HPLC method. **Conclusion:** ^{19}F qNMR can be used in determining the contents of fluorine-containing APIs in tablets. This method only requires minimal pre-treatment and its testing speed is rapid. Meanwhile, the excipients have no

* 中国食品药品检定研究院青年基金 (2015A01); 广西特聘专家专项资助 (2016)

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

第一作者 Tel:(010)53851571; E-mail: liuyang1819@126.com

interference with the determination. This technology is suitable for high-throughput measuring the API content in fluorine-containing preparation.

Keywords: ^{19}F quantitative NMR; canagliflozin; assay; quality control

核磁共振定量 ($q\text{NMR}$) 技术已经被包括《中华人民共和国药典》、美国药典与欧洲药典在内的各药典收载^[1-4], $q\text{NMR}$ 法是一种绝对定量法, 可以直接计算得到待测样品的含量, 不受样品中含有的水分、灰分或无机盐等的干扰。 $q\text{NMR}$ 方法包括内标加入法以及外标曲线法, 由于外标法对仪器以及实验环境要求更为严苛, 内标加入法更为常用。理论上每种有核磁共振响应的核素都可以作为被检测核进行定量测定, 但是由于 ^{13}C 及 ^{15}N 等元素的自然丰度较低, 结构中不同化学环境核的弛豫时间差异大, 为了满足定量的要求, 需要采用特殊的门控技术, 检测时间过长, 实际工作中较少使用对此类元素作为观测核进行定量测定。

^1H 由于广泛存在于有机药物分子中, 且响应较高, 弛豫时间短定量准确性好, 一直是 $q\text{NMR}$ 试验中应用最多的检测元素^[5-7], 但是 ^1H 试验中响应信号容易重叠以及易受杂质干扰, 使这种方法的应用受到一定的限制。 ^{19}F $q\text{NMR}$ 试验虽然仅适用于含氟的药物, 但是其检测灵敏度高, 时间短且很少发生响应信号重叠, 是除了 ^1H 之外 1 种很适用于 $q\text{NMR}$ 的磁性核。之前系统研究了利用 ^{19}F $q\text{NMR}$ 技术测定含氟原料药中的药物含量^[8-10], 证明了 ^{19}F $q\text{NMR}$ 方法的可行性。这种方法是否不受辅料等的干扰, 直接应用于含氟药物制剂含量研究还未见报道。本文中使用了 ^{19}F $q\text{NMR}$ 技术测定了卡格列净片剂中卡格列净含量, 对可能的影响因素进行了系统的研究, 并与传统的高效液相法结果进行了对比。

卡格列净片, 商品名 Invokana, 原研厂家为美国强生制药公司, 于 2013 年获 FDA 批准在美国上市, 是第 1 个被批准用于糖尿病治疗的钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (SGLT2) 药物, 片剂规格为 100 mg 及 300 mg, 其中含有乳糖、微晶纤维素、羟丙基纤维素、交联羧甲基纤维素钠、硬脂酸镁、聚乙烯醇、聚乙二醇及二氧化钛等辅料。卡格列净分子结构见图 1, 其中含有 1 个分子氟, 虽然辅料较多, 但均不含有氟, 不干扰 ^{19}F 测定。

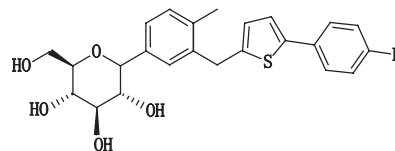


图 1 卡格列净分子结构

Fig. 1 Chemical structure of canagliflozin

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Bruker Ascend 500 型核磁共振仪 (布鲁克公司), 5 mm PABBO 探头及 Topspin3.2 试验控制及数据处理软件; Waters 高效液相色谱仪 (Waters 公司), Agilent Zorbax C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱; Mettler Toledo XP205 电子天平 (0.01 mg, 梅特勒公司)。

1.2 样品及试剂 卡格列净片 (300 mg \cdot 片⁻¹, 公司 A), 卡格列净工作对照品 (99.8%, 公司 A), 氘代 DMSO (>99.9%, Sigma), 4, 4'-二氟二苯甲酮 (含量 99.0%, TCI Chemicals), 乙腈 (色谱纯, Fisher), 三氟乙酸 (色谱纯, Fisher), 水 (18.2 M Ω , 实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 核磁共振样品溶液制备

取本品 1 片, 精密称定后研细, 精密称取细粉约 20 mg (含卡格列净约 10 mg), 同时精密称取 4, 4'-二氟二苯甲酮约 10 mg, 置同一容器中, 加 DMSO- d_6 2 mL 后漩涡震荡 1 min, 使用 0.45 μm 尼龙膜滤过或在 3 000 g 离心 5 min, 取澄清溶液 0.7 mL 置 5 mm 核磁管中进行 ^{19}F 核磁共振定量测定

2.2 核磁共振实验条件

采用 zgfhigqn.2 脉冲序列在恒温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 下获取 ^{19}F NMR 谱。具体试验参数设置如下: 谱宽 SW = 40×10^{-6} , 射频中心频率 O1P 为 -110×10^{-6} , 采样点数 TD 为 128 k, 采样时间 AQ 为 3.5 s, 弛豫延迟时间 D1 为 20 s, 扫描次数为 32 次, 增益 (RG) 为 280。

2.3 HPLC 试验样品制备及测定

精密称取“2.1”项下细粉约 100 mg, 置 500 mL 量瓶中, 加乙腈-水 400 mL, 机械振摇 45 min, 加乙腈-水 (50:50) 稀释至刻度, 摇匀, 静置 20 min。精密量取 8 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈-水

(50:50) 稀释至刻度,混匀,用 0.45 μm PTFE 滤膜滤过,弃去初滤液 2 mL,取续滤液作为供试品溶液。

按此药品标准中 HPLC 测定方法:使用 Agilent Zorbax C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱;流动相 A 为乙腈-水(5:95)(含 0.02% 三氟乙酸),流动相 B 为乙腈-水(95:5)(含 0.02% 三氟乙酸),梯度计洗脱,按外标法以峰面积计算含量。

2.4 图谱测定

按“2.1”项下方法配制供试品溶液,在“2.2”项下试验条件下测定卡格列净和内标混合溶液的 ¹⁹F qNMR 谱,所得氟响应信号峰如图 2 所示。卡格列净的单一响应信号出现在 δ -106,内标的响应信号为 δ -115,样品与内标的响应信号分离较好,相互不产生重叠干扰,也未有辅料产生干扰信号。

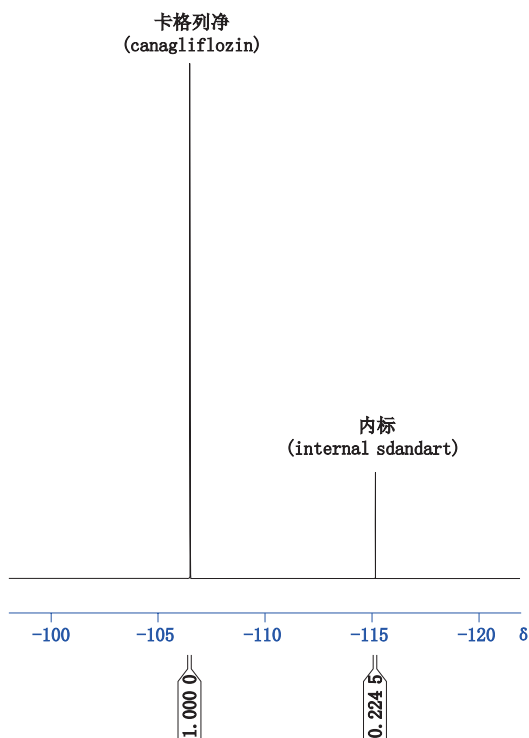


图 2 ¹⁹F qNMR 响应信号及归属

Fig. 2 ¹⁹F qNMR spectrum and assignments

2.5 方法学研究

2.5.1 线性关系 分别精密称取卡格列净片剂粉末 20~60 mg,和 4,4'-二氟二苯甲酮约 10 mg 混合,加氘代 DMSO 使待测样品浓度为 5~15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,在 3 000 g 下离心 5 min 后取上清液,按“2.2”项下试验条件测定 ¹⁹F qNMR 谱,记录响应信号面积,以 δ -106 处样品响应信号和 δ -115 处内标响应信号比值为横坐标,样品和 4,4'-二氟二苯甲酮质量比为

纵坐标做线性回归,计算得回归方程为:

$$Y=4.169X+0.0148 \quad r^2=0.9998$$

表明卡格列净质量浓度在 5~15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.5.2 精密度及稳定性 按“2.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.2”项下试验条件下连续测定 6 次,记录响应信号面积,其样品与内标响应信号面积比的 RSD 为 0.26% ($n=6$)。取同一供试品溶液在 12 h 后再次测定,2 次测定样品响应信号面积比未发生明显变化,从试验结果可以看出该方法的精密度较高且样品在室温下放置 12 h 稳定。

2.5.3 含量测定 按“2.1”项下方法平行制备 6 份样品,采用 δ -106 处样品定量信号与 δ -115 处内标定量信号,按下式计算片剂中卡格列净含量。

$$\text{含量} = \frac{A_s}{A_r} \times \frac{n_r}{n_s} \times \frac{M_s}{M_r} \times W_r \times m_r \times 100\%$$

其中, A_s 为卡格列净响应信号的面积, A_r 为内标的响应信号面积, n_s 为卡格列净响应信号包含的氟原子数 ($n_s=1$), n_r 为内标响应信号包含的氟原子数 ($n_r=1$), M_s 为卡格列净的相对分子质量 (444.5), M_r 为内标的相对分子质量 (218.2), W_s 为卡格列净的称样量, W_r 为内标的称样量, m_r 为内标纯度 (99.0%)。经计算,5 片样品中卡格列净含量分别为标示量的 98.2%、98.9%、101.0%、99.7%、99.2%。

为了验证 ¹⁹F qNMR 测定含量结果的准确性,同时利用 HPLC 外标法测定了相同 6 片中卡格列净的含量。5 片中卡格列净含量分别为标示量的 99.6%、99.4%、100.1%、100.0%、100.1%。2 种分析方法测定含量结果接近,证明 ¹⁹F qNMR 技术可以作为制剂中含氟药物含量测定的快速分析方法。

3 讨论

3.1 内标及仪器参数选择

氟与氢 qNMR 对于内标的选择要求是相同的,包括性质稳定,不易引湿,不与待测样品及所用溶剂反应;响应信号较简单且不与待测样品信号产生重叠等^[11-13]。氟核磁共振试验中由于辅料等均无响应且氟谱范围比较宽,内标选择比氢谱试验容易。4,4'-二氟二苯甲酮容易获得,纯度较高,因此选为内标。

氟的核磁共振响应较高,与氢响应接近,一般扫描 16 或者 32 次即可满足信噪比 S/N 大于 600 的要求^[14]。本次试验中选择扫描 32 次。

3.2 弛豫时间的设定

在所有的 qNMR 试验中,弛豫延迟时间都是一项非常重要的参数设定,设定时间过短会直接影响定量测定结果,设定时间较长会降低工作效率。一般弛豫延迟时间的长度应不短于纵向弛豫时间(T_1)的 5 倍^[15]。使用反转恢复法测定了样品及内标中氟原子的纵向弛豫时间分别为 1.79 s 和 1.41 s,所以最终弛豫延迟时间设定为 20 s。

3.3 样品前处理

^{19}F qNMR 试验中,由于辅料中不含有氟原子,因此不会产生任何响应信号,不干扰样品及内标的测定。但是由于有些辅料不溶于核磁试验中常用的溶剂,有必要通过物理手段在实验前去除。在充分漩涡振荡溶解后,试验了使用 0.45 μm 滤膜或 3 000 g 离心 5 min 的前处理方法,处理后取澄清液置入核磁管中测定。最后结果表明 2 种方法对最后定量结果影响没有差异,均可以作为样品前处理手段。

4 结论

^{19}F qNMR 技术检测灵敏度高,内标物质选择容易。由于常用药品辅料中不含有氟,十分适合复杂基质中以及含氟药物制剂中药物含量的测定。整个测定前处理简单,耗时短,抗干扰能力强,使用溶剂量少,适合大批量含氟药物制剂的高通量测定。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 441
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015: 441
- [2] USP 40-NF 35[S]. 2017: 761
- [3] BP 2017[S]. 2017: Appendix II C
- [4] EP 9. 0[S]. 2017: 2. 2. 33
- [5] HOLZGRABE U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010, 57(2): 229
- [6] 张芬芬,蒋孟虹,沈文斌,等. 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*, 2014, 14(2): 8
ZHANG FF, JIANG MH, SHEN WB, *et al.* Progress in quantitative nuclear magnetic resonance technology in pharmaceutical applications[J]. *J Nanjing Norm Univ*, 2014, 14(2): 8
- [7] 张才煜,吴建敏,李憬,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*, 2012, 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
- [8] LIU Y, LIU ZX, LIN L, *et al.* Direct comparison of ^{19}F qNMR and ^1H qNMR by characterizing atorvastatin calcium content[J/O/L]. *J Anal Methods Chem*, 2016, 7627823/1-5[2016-08-09]. <https://www.hindawi.com/journals/jame/2016/7627823/>
- [9] 刘阳,魏宁漪,岳瑞齐,等. 新型 ^{19}F 核磁共振定量技术测定氟哌利多含量[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(16): 1960
LIU Y, WEI NY, YUE RQ, *et al.* Application of novel ^{19}F quantitative NMR (^{19}F -qNMR) in assay of droperidol[J]. *Chin J New Drugs*, 2014, 23(16): 1960
- [10] 刘阳,魏宁漪,张琪,等. ^{19}F 核磁共振定量技术测定酒石酸吉米格列汀倍半水合物含量[J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(7): 1197
LIU Y, WEI NY, ZHANG Q, *et al.* Quantitative analysis of gemigliptin tartrate sesquihydrate by ^{19}F quantitative NMR (^{19}F -qNMR)[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(7): 1197
- [11] PAULI GF, GODECKE T, de JAKI BU, *et al.*, Quantitative ^1H -NMR development and potential of an analytical method: an update[J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(4): 834
- [12] 于小波,沈文斌,相秉仁. 定量核磁共振技术及其在药学领域中的应用进展[J]. *药学进展*, 2010, 34(1): 17
YU XB, SHEN WB, XIANG BR. Advances in application of quantitative nuclear magnetic resonance technique in pharmaceutical field[J]. *Prog Pharma Sci*, 2010, 34(1): 17
- [13] 刘英,胡昌勤. 核磁共振在抗生素药物定量分析中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2001, 21(6): 447
LIU Y, HU CQ. Application of NMR in quantitative analysis of antibiotics[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2001, 21(6): 447
- [14] DIXON AM, LARIVE CK. Modified pulsed-field gradient NMR experiments for improved selectivity in the measurement of diffusion coefficients in complex mixtures: application to the analysis of the Suwannee River fulvic acid[J]. *Anal Chem*, 1997, 69(11): 2122
- [15] PAULI GF, JAKI BU, LANKIN DC. Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis[J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(1): 133

(本文于 2017 年 12 月 4 日收到)