

核磁共振法测定 13-顺阿维 A

刘 阳, 张才煜, 程奇蕾, 杨化新*, 何 兰*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘 要: 目的 建立核磁共振法测定 13-顺阿维 A。方法 采用 $^1\text{H-NMR}$ 测定 13-顺阿维 A, 通过样品与内标物质响应峰面积比较计算样品的质量分数以及其中残留溶剂。结果 以 $\delta 5.64$ 处定量峰和 $\delta 8.45$ 处内标峰面积比值与 13-顺阿维 A 和 1,4-对硝基苯质量比进行线性回归, 线性关系良好。13-顺阿维 A 的质量分数为 98.5%, RSD 值为 1.5% ($n=3$), 重复性良好, 与质量平衡法测定结果一致; 样品中残留溶剂为四氢呋喃, 其质量分数为 1.0%。结论 核磁共振法测定 13-顺阿维 A 快速、准确、方便, 结果可靠, 可以用来进行标准物质的测定。

关键词: 13-顺阿维 A; 核磁共振; 标准物质; 测定

中图分类号: R927.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)02-0251-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.008

Determination of 13-*cis* acitretin by nuclear magnetic resonance

LIU Yang, ZHANG Cai-yu, CHENG Qi-lei, YANG Hua-xin, HE Lan

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

Abstract: **Objective** To establish a nuclear magnetic resonance (NMR) method to determine the content of 13-*cis* acitretin. **Methods** $^1\text{H-NMR}$ was used to characterize 13-*cis* acitretin. The mass fraction and residue solvent of 13-*cis* acitretin were calculated by comparing the peak area of 13-*cis* acitretin with the internal reference substance. **Results** There was a good regression between quantitative peaks ratio of 13-*cis* acitretin and internal reference substance versus mass ratio of $\delta 5.64$ and $\delta 8.45$. Based on NMR, the mass fraction of 13-*cis* acitretin was 98.5% with RSD of 1.5% ($n = 3$) and the residual solvent was tetrahydrofuran with its mass fraction of 1.0%. **Conclusion** It is a rapid, convenient, and precise method for the determination of 13-*cis* acitretin by NMR, and the results can be used in reference substance assay experiment.

Key word: 13-*cis* acitretin; nuclear magnetic resonance; standard substance; determination

阿维 A 为抗皮肤角化异常治疗药物, 是口服治疗银屑病的主流用药, 在《中国药典》2010 年版二部、美国药典 (USP) 34 版、欧洲药典 (EP) 7.7 和英国药典 (BP) 2011 中均有收载。13-顺阿维 A 是阿维 A 的异构体 (图 1), 《中国药典》2010 年版第一增补本中以杂质对照品外标法测定阿维 A 中 13-顺阿维 A。因此, 准确测定 13-顺阿维 A 对照品对阿维 A 药品质量控制具有重要意义。质量平衡法测定样品时需要高效液相色谱法测定样品纯度^[1-2], 测定样品中水分、残留溶剂以及炽灼残渣, 一般需要大于 2 g 样品, 对于 13-顺阿维 A 类制备困难且

比较贵重的样品, 质量平衡法的应用受到一定局限。由于残留溶剂的种类未知, 样品中残留溶剂也无从检查。研究一种使用少量样品 (少于 100 mg) 能准确测定其中残留溶剂种类、含量以及 13-顺阿维 A 含量的方法就显得十分必要。近年来, 核磁共振技术开始越来越多地应用于定量检测^[3-6]。USP 35 和 EP 7.7 中利用核磁共振技术对十几种药品进行质量控制^[7-8]。《中国药典》2010 年版中正式将核磁共振定量技术收载于附录^[9]。本实验利用核磁共振定量技术, 选取合适的内标物质、试验参数设置和定量峰, 快速简便地测定了 13-顺阿维 A。

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2011ZX09303-001); 国家质量监督检验检疫总局公益性行业科研专项 (2012104008-1-14)

作者简介: 刘 阳, 助理研究员, 博士, 研究方向: 药物分析。Tel: (010)67095319 E-mail: liuyang1819@126.com

*通信作者 杨化新 E-mail: yanghx@nicpbp.org.cn

何 兰 E-mail: helan1961@aliyun.com

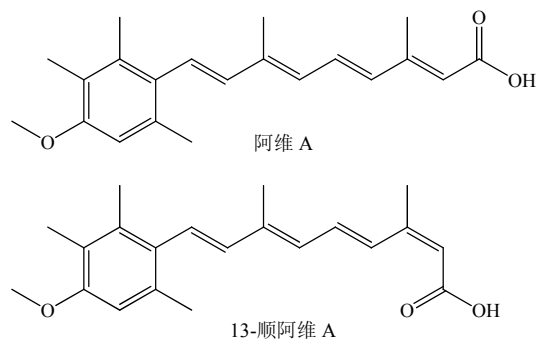


图 1 阿维 A 和 13-顺阿维 A 的结构

Fig. 1 Structures of acitretin and 13-*cis* acitretin

1 仪器与试药

1.1 仪器

Advance 400 型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司), 14.1T 超导磁体, 5 mm 双核 z-梯度探头, Topspin2.3 试验控制, 数据处理软件; Agilent 6890 气相色谱仪; Mettler Toledo XP205 电子天平。

1.2 样品及试剂

13-顺阿维 A (重庆华邦胜凯制药有限公司), 氘代 DMSO (Sigma 公司, 北京金欧翔科贸公司分装), 1,4-对硝基苯(TCI Chemical), 四氢呋喃(Fisher Scientific)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密称取 13-顺阿维 A 样品和内标物质适量, 加入一定体积的氘代 DMSO, 配制成 29.1、7.4 mmol/L 的溶液, 转入 5 mm 核磁管中备用。

2.2 实验条件

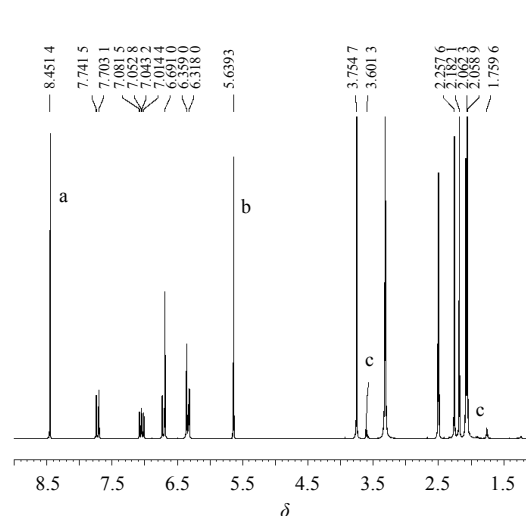
采用 zg30 脉冲序列在恒温 (25 °C) 下获取 ^1H -NMR 谱。参数设置: 谱宽 (SWH) 8 223 Hz, 射频中心频率 (O1P): 2 471 Hz, 采样点数 (TD) 64K, 采样时间 (AQ) 3.98 s, 弛豫时间 (D1) 15 s, 采样次数 (NS) 16, 空扫次数 (DS) 2, 增益 (RG) 203。

2.3 图谱测定

采集图谱, 采集样品和内标物质的核磁共振响应峰, 见图 2。

2.4 定量峰的选择

选择 13-顺阿维 A 中 δ 5.64 处独立单峰, 此峰与其他响应峰分离良好, 适合作为定量峰。与此同时, 阿维 A 样品的 14 位氢出现在 δ 5.79, 与 13-顺阿维 A 定量峰不重叠, 证明 13-顺阿维 A 待测品中不含有阿维 A。见表 1。



a-内标物质峰 b-13-顺阿维 A 峰 c-残留溶剂峰
a-peak of internal standard b-peak of 13-*cis* acitretin c-peaks of residual solvents

图 2 13-顺阿维 A 与内标物质的核磁共振响应峰

Fig. 2 NMR peaks of 13-*cis* acitretin and internal standard表 1 13-顺阿维 A 的 ^1H -NMR 谱解析Table 1 ^1H -NMR analysis of 13-*cis* acitretin

δ	氢个数	峰裂分	J/Hz	峰归属
2.06~2.26	15			16, 17, 19, 20, 21
3.75	3	s		18
5.64 (定量峰)	1	s		14
6.32~6.36	2			8, 10
6.69, 6.73	2			4, 7
7.01	1	dd	11.52	11
7.70	1	d	15.28	12

2.5 仪器参数设定

弛豫延迟时间是每次脉冲发射前的等待时间。弛豫延迟时间的设定必须使待测样品和内标物质中质子完全弛豫, 样品与内标物质相应峰面积的比值才会保持相对恒定。短的弛豫延迟时间会对积分结果产生较大的影响, 增加定量结果的误差。Pauli 等^[4]提出, 为了保证积分结果的准确, 弛豫延迟时间应 ≥ 5 倍的纵向弛豫时间。为了测出适宜的弛豫延迟时间设定, 分别测定并计算了在弛豫延迟时间为 1、5、10、15、20、25 s 时样品定量峰与内标峰面积比值变化, 见图 3。可以看出, 弛豫延迟时间长于 15 s 后, 样品定量峰与内标物质峰面积比不再变化, 因此弛豫延迟时间设定为 15 s。

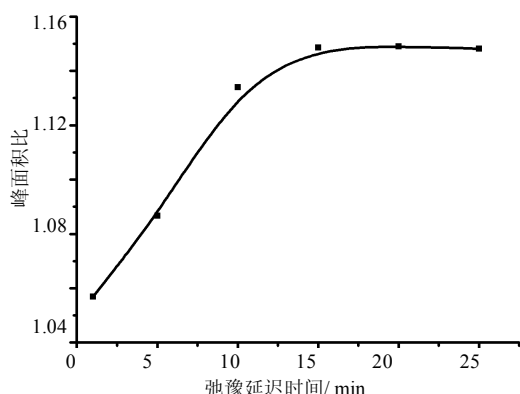


图 3 弛豫延迟时间对 13-顺阿维 A 及内标物质定量峰面积比的影响

Fig. 3 Effect of relaxation time on peak area ratio of 13-cis acitretin vs internal standard

2.6 方法学研究

2.6.1 线性关系考察 准确称取 13-顺阿维 A 18.85、18.09、18.16、17.95、18.31 mg 和 1,4-对硝基苯 13.09、9.01、10.35、17.39、20.41 mg, 以不同的质量比制备 5 个待测样品, 测定 ^1H -NMR 谱, 记录积分面积。以 $\delta 8.46$ 处定量峰和 $\delta 5.64$ 处内标峰面积比值为纵坐标, 13-顺阿维 A 和 1,4-对硝基苯质量比为横坐标做线性回归, 得回归方程 $Y=1.5758X+0.0012$, $R^2=0.9996$ 。结果表明以 1,4-对硝基苯为内标时测定样品中 13-顺阿维 A 的线性关系良好。

2.6.2 精密度试验 取编号 1 样品, 制备供试品溶液, 连续测定 6 次, 记录积分面积, 计算定量峰和内标峰面积比值, 结果 RSD 值为 0.75%。

2.6.3 重复性试验 取编号 1 样品, 平行 3 份, 制备供试品溶液, 进行测定, 以定量峰与内标峰面积比值计算得 13-顺阿维 A 的平均质量分数为 98.5%, RSD 为 1.3%。

2.6.4 稳定性试验 取编号 1 样品, 制备供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、8、12 h 进行测定, 计算样品定量峰与内标定量峰面积比值, 结果其 RSD 值为 1.05%, 表明供试品溶液室温放置 12 h 稳定。

2.7 定量结果

从图 2 中可以看到 $\delta 1.76$ 、 3.60 处出现 2 个杂质峰, 峰位移与四氢呋喃的化学位移一致, 可以确定 13-顺阿维 A 待测样品中的残留溶剂为四氢呋喃。

平行取 3 份样品, 制备供试品溶液, 采用 13-顺阿维 A 响应峰与内标峰, 计算 13-顺阿维 A 质量分数。

$$W_s = (A_s/n_s \times M_s \times m_r) / (A_r/n_r \times M_r \times m_s) \times W_r$$

A_s 为 13-顺阿维 A 的峰面积, n_s 为 13-顺阿维 A 峰包含的氢原子数, M_s 为 13-顺阿维 A 的相对分子质量, A_r 为内标 1,4-对硝基苯的峰面积, n_r 为 1,4-对硝基苯包含的氢原子数, M_r 为 1,4-对硝基苯的相对分子质量, m_s 为称取的 13-顺阿维 A 质量, m_r 为称取的 1,4-对硝基苯质量, W_r 为 1,4-对硝基苯的质量分数

根据图 2 中 $\delta 5.64$ 处 13-顺阿维 A 定量峰与 $\delta 8.45$ 处内标物质峰面积相比, 重复试验 3 次, 计算出 13-顺阿维 A 供试品的质量分数为 98.5%, RSD 值为 1.3%。见表 2。

利用高效液相法测定 13-顺阿维 A 的质量分数, 利用卡氏水分仪测定了 13-顺阿维 A 中水分, 按质量平衡法计算出供试品中 13-顺阿维 A 的质量分数为 99.0%, 与核磁共振定量计算的值基本吻合。见表 2。

表 2 核磁共振法和质量平衡法测定 13-顺阿维 A

Table 2 Results of 13-cis acitretin content by NMR and mass balance method

编 号	13-顺阿维 A/%	
	NMR 法	质量平衡法
1	98.4	99.0
2	99.8	99.2
3	97.2	98.8

取 $\delta 3.60$ 处峰, 用同样的方法计算样品中四氢呋喃的质量分数为 1.1%。为了验证结果的准确性, 利用顶空气相色谱测定了 13-顺阿维 A 样品中残留溶剂, 结果显示样品中含有四氢呋喃 1.0%, 与核磁共振定量的结果一致。

3 讨论

理想的内标化合物应当满足化学惰性、易溶于溶剂、不与样品反应且响应峰与样品响应峰有良好的分离。常用的内标物质包括一些固态高纯的化合物, 如二甲基砷、间苯二甲酸甲酯和顺丁烯二酸等。本实验中选择的 1,4-对硝基苯在溶剂中稳定, 分子中的 4 个氢等价, 在核磁共振图谱中只有 1 个相应峰 ($\delta 8.5$), 易于分辨, 与 13-顺阿维 A 各峰均有较好的分离。

在核磁共振定量试验中, 峰面积需要手动积分且直接影响到最终定量结果的准确性。要达到重复性好、标准偏差小的要求, 应将核磁共振图谱放大, 手动调整相位后, 取轮廓线与基线的刚好重合处为

起点和终点进行积分。应平行积分 5 次, 取平均值作为最后峰面积。

根据德国计量科学研究院的研究, 在使用有证标准物质作为内标物质的情况下, 核磁共振定量测得待测样品的含量误差一般小于 1%^[10], 因此本实验采用核磁共振定量方法的操作简单、专属性强, 其检测限和定量限可以达到微克至纳克级, 可以满足测定 13-顺阿维 A 对照品的要求。

参考文献

- [1] Sharma P, Soni K, Guttikar S, *et al.* Separation of all-trans- and 13-cis-isomers of acitretin on a reversed-phase column, optimization of stability conditions and their simultaneous quantitation in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2012, 4(3): 791-806.
- [2] 吴 芸, 沈红梅. 一种阿维 A 有关物质的分离及测定

方法 [P]. 中国: 102109500A, 2011-06-29.

- [3] O'Neill I K, Pringuer M A. Quantitative NMR analysis [J]. *Chem Ind* (London), 1975(12): 494-495.
- [4] Pauli G F, Jaki B U, Lankin D C. Quantitative ¹H NMR: development and potential of a method for natural products analysis [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(1): 133-149.
- [5] 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): 17-23.
- [6] 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): 327-329.
- [7] USP [S]. 35:761
- [8] EP [S]. 7.7: 2.2.33.
- [9] 中国药典 [S]. 二部. 2010: 附录 IX K
- [10] Malz F, Jancke H. Validation of quantitative NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5): 813-823.