

氢核磁共振定量法测定恩替卡韦

黄海伟¹, 何 兰¹, 岳昊坤¹, 王 彤¹, 陶巧凤^{2*}, 刘 阳^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 浙江省药品化妆品审评中心, 浙江 杭州 310012

摘要: **目的** 建立氢核磁共振定量法测定恩替卡韦含量的方法。**方法** 以氘代 DMSO 为溶剂, 恩替卡韦为样品, 1,4-二硝基苯为内标测定氢核磁共振谱, 通过比较样品定量峰与内标物质响应峰面积, 计算恩替卡韦的量。**结果** 同一样品在相同条件下测定 6 次, 定量峰与内标响应峰比值的 RSD 值为 1.1%; 平行配制 3 份样品, 恩替卡韦质量分数 93.8%, RSD 值为 0.70%, 与质量平衡法测定结果 93.8% 一致。**结论** 氢核磁共振定量法与质量平衡法相比样品用量少, 不需要对照品, 测定快速准确, 是一种有效地化学样品含量测定手段。

关键词: 恩替卡韦; 核磁共振; 定量; 对照品; 含量测定

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)05-0520-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.05.011

Determination of entecavir by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR)

HUANG Hai-wei¹, HE Lan¹, YUE Hao-kun¹, WANG Tong¹, TAO Qiao-feng^{2*}, LIU Yang^{1*}

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

2. Zhejiang Province Medicine and Cosmetics Review Center, Hangzhou 310012, China

Abstract: Objective To establish a qNMR method to determine the content of entecavir. **Methods** Using DMSO-*d*₆ as solvent, entecavir as a sample, and 1,4-dinitrobenzene as an internal standard, the ¹H-NMR data of entecavir were characterized, calculate the assay of entecavir by comparing the response signal area of sample (As) and internal standard (Ar). **Results** One sample solution was determined under the same NMR conditions for six times, the RSD value of As/Ar was 1.1%; When prepared and characterized three samples, the content of entecavir calculated was 93.8%, RSD was 0.70%. The results were consistent with that using mass balance method (93.8%). **Conclusion** Using qNMR to characterize the assay of entecavir can avoid the use of reference substance. This is a precise, rapid, and effective method to characterize the contents of chemical samples.

Key words: entecavir; NMR; quantity; reference substance; assay

恩替卡韦 (entecavir) 是环戊酰鸟苷类似物, 由百时美施贵宝 (BMS) 公司研发, 2005 年 4 月获得 FDA 批准用于乙型肝炎的治疗 (图 1)。本品种各国药典中均未收载, 样品贵重且对照品不易获取。使用质量平衡法测定样品含量时, 需要测定样品 HPLC 纯度, 水分含量、残留溶剂以及炽灼残渣等, 消耗数克或更多样品, 耗时 5~7 d, 使质量平衡法的应用受到一定限制。使用一种少量样品 (少于 100 mg), 快速 (小于 1 h) 的恩替卡韦含量测定方法就显得十分必要。

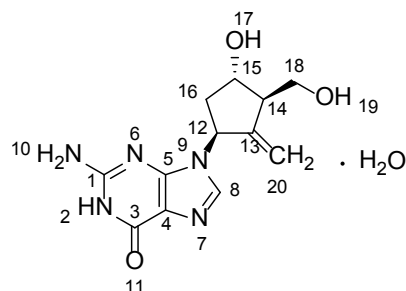


图 1 恩替卡韦结构

Figure 1 Structure of entecavir

收稿日期: 2015-05-26

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2015ZX09303001); 农业部公益专项 (201103027); 中国食品药品检定研究院中青年基金 (2014A6)

作者简介: 黄海伟 Tel: (010)67095342 E-mail: hhaiwei@126.com

*通信作者 陶巧凤, 主任药师。Tel: (0571)81061206 E-mail: taoqiaofeng@126.com

刘 阳, 副研究员。Tel: (010)67095319 E-mail: liuyang1819@126.com

氢核磁共振定量法 (qNMR) 已经在化学及药学等各方面得到广泛应用^[1-3], 中国、美国及英国等各国药典均收载此法^[4-6]。qNMR 测定样品含量时不需要对照品, 无需引入校正因子, 不受样品中水分及残留溶剂干扰, 具有良好的应用前景。本文以恩替卡韦为样品, 利用内标法, 通过比较样品和内标的称样量, 相对分子质量与相应的核磁响应信号峰面积, 测定了恩替卡韦含量, 并对这种方法进行了系统的方法学验证。

1 仪器与试剂

Ascend 500 型核磁共振仪 (瑞士布鲁克公司), 14.1T 超导磁体, 5 mm 双核 z-梯度探头及 Topspin3.2 试验控制及数据处理软件; 高效液相色谱 AT30 (Shimadzu); Mettler Toledo XP205 电子天平。

恩替卡韦 (BMS, 批号 6033331, HPLC 测定质量分数 99.5%), 氘代 DMSO (Sigma, 北京金欧翔科贸公司分装), 1,4-二硝基苯 (TCI Chemical, 质量分数 >99.0%)。

2 方法与结果

2.1 样品溶液制备

精密称取恩替卡韦及内标物质 (1,4-二硝基苯) 适量, 置同一离心管中, 精密加入 2.0 mL 氘代 DMSO 溶解, 配制成浓度分别约为 40 mmol/L 的溶液, 取约 0.65 mL 溶液转入 5 mm 核磁管中备用。平行配制 5 份样品。

2.2 实验条件

采用 zg30 脉冲序列在恒温 (25℃) 下获取 ¹H-NMR 谱。具体试验参数设置如下: 谱宽 (SWH) 10 000 Hz, 射频中心频率 (O1P) 3089 Hz, 采样点数 (TD) 64 K, 采样时间 (AQ) 3.28 s, 弛豫时间 (D1) 15 s, 采样次数 (NS) 16, 空扫次数 (DS) 2, 增益 (RG) 81。

2.3 图谱测定结果

采集图谱, 采集样品和内标物质的核磁共振响应峰 (图 2)。

2.4 内标的选择

1,4-二硝基苯与恩替卡韦均易溶于氘代 *N,N*-二甲基甲酰胺, 且 1,4-二硝基苯的响应信号出现在 δ 8.45, 与恩替卡韦的所有响应信号有良好的分离, 互不干扰。于是将 1,4-二硝基苯选为内标物。

2.5 方法学研究

2.5.1 线性关系 分别准确称取 9.56、12.17、17.68、22.03、30.24 mg 的恩替卡韦和 1,4-二硝基苯, 制备

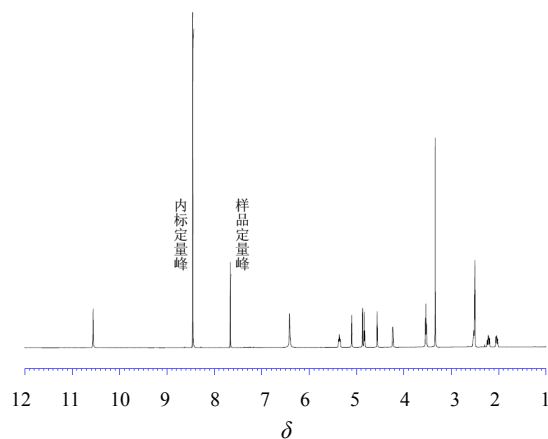


图 2 恩替卡韦样品与内标物质的核磁共振响应峰
Fig. 2 NMR peaks of entecavir sample and internal standard

表 1 恩替卡韦的 ¹H-NMR 谱解析
Table 1 ¹H-NMR analysis of entecavir

δ	氢个数	峰裂分	峰归属
2.05	1	m	16a
2.21	1	m	16b
2.53	1	m	14
3.53	2	m	18
4.23	1	m	14
4.56	1	m	20a
4.87	2	m	17,19
5.10	1	m	20b
6.41	2	s	10
7.66*	1	s	8
8.45*	4	s	1,2-二硝基苯
10.56	1	s	2

*定量峰

*peak used in quantitation

5 个待测样品, 按“2.2”项下试验条件测定 ¹H-NMR 谱, 记录积分面积, 以 δ 7.66 处样品定量峰和 δ 8.45 处内标峰面积比值为纵坐标, 样品和 1,4-对硝基苯质量比为横坐标做线性回归, 回归方程为: $y = 0.1508x - 0.0135$, $R^2 > 0.999$ 。恩替卡韦在 0.03~0.12 mmol 线性关系良好。

2.5.2 进样精密度 取供试品溶液, 按“2.2”项下条件连续测定 6 次, 记录积分面积, 计算定量峰和内标峰面积比值, 其相对标准偏差 RSD=1.1%。

2.5.3 重复性 平行配制 3 份样品, 按“2.2”项下条件进行测定, 以定量峰与内标峰面积比值计算恩替卡韦的平均含量为 93.8%, RSD 为 0.7%。

2.5.4 稳定性 取同一供试品溶液分别在 0、1、4、12 h 进行测定, 比较恩替卡韦相应峰面积, RSD 为 1.05%, 表明供试品溶液室温放置 12 h 稳定。

2.6 定量结果

平行配制 3 份样品, 采用 $\delta 7.66$ 处恩替卡韦样品核磁共振响应信号与 $\delta 8.45$ 处内标信号, 按下式计算恩替卡韦质量分数。

$$W_s (\%) = \frac{(A_s/n_s) \times M_s \times m_r}{(A_r/n_r) \times M_r \times m_s} \times W_r \times 100\%$$

其中, A_s 为恩替卡韦定量峰的峰面积, n_s 为恩替卡韦定量峰包含的质子数, M_s 为恩替卡韦的分子量, A_r 为内标的峰面积, n_r 为内标峰包含的质子数, M_r 为内标的分子量, m_s 为称取的恩替卡韦质量, m_r 为称取的内标质量, W_r 为内标的质量百分含量。经计算, 样品中恩替卡韦含量分别为 93.0%、94.3% 和 94.0%, 平均含量为 93.8%, RSD 为 0.70%, 证明试验结果的重复性较好。

3 讨论

3.1 与其他含量测定结果比较

为了验证核磁共振定量技术测定含量结果的准确性, 本实验同时利用高效液相色谱法测定了恩替卡韦的含量。HPLC 纯度为 100.0%, 卡氏水分仪测定样品中含水量为 6.1%, 炽灼残渣结果为 0.06%。根据质量平衡法计算, 样品中恩替卡韦 (%) = (100% - 水分 - 炽灼残渣) \times HPLC 纯度 = 93.8%, 与 qNMR 定量结果一致。但是耗时从质量平衡法的数天减少至 1 h, 具有很大的优势。

3.2 仪器参数设定

弛豫延迟时间 (D1) 是核磁共振定量试验中最重要的参数之一。D1 每次脉冲发射前的等待时间, 只有设定足够长的弛豫延迟时间才能使上次脉冲激发后的样品完全回到基态。短的弛豫延迟时间会影响积分结果, 增加误差。Pauli 等^[7]提出, 在氢核磁共振定量试验中, 弛豫延迟时间应大于等于 5 倍的

纵向弛豫时间 (T1)。本实验利用 inverse-recovery 技术测定了样品中氢的纵向弛豫时间, 结果均小于 3 s, 于是试验的弛豫延迟时间设定为 15 s。试验表明结果良好。

为了定量分析的准确, 氢核磁共振定量试验中的信噪比应在 150:1 以上。在实验条件下, 扫描 16 次的信噪比大于 200, 满足定量要求。

3.3 积分方法

实验发现, 在核磁共振定量试验中, 手动积分峰面积比自动积分更能真实反映试验结果, 重现性更好。为了保证积分值的准确性, 在手动调整相位后, 以样品或内标响应峰与基线的重合处为起点和终点进行积分。

3.4 应用

利用氢核磁共振定量技术测定恩替卡韦含量, 无需使用对照品, 样品制备过程简单, 整个测定过程快速准确, 结果可靠。这种方法可以作为常用的质量平衡法、含量法等的有效补充, 有效应用于样品含量测定。

参考文献

- [1] Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications [J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010, 57(2): 229-240.
- [2] 魏宁漪, 周颖, 胡昌勤. 愈创木酚磺酸钾异构体的 NMR 定量分析 [J]. *中国药学杂志*, 2011(12): 953-955.
- [3] 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(01): 17-23.
- [4] 中国药典. 二部 [S]. 2010
- [5] USP35-NF30[S]. 2012.
- [6] BP 2013[S]. 2013.
- [7] Pauli G F, Godecke T, DC Jaki B U, *et al*. Quantitative ¹H-NMR development and potential of an analytical method: an update [J]. *J Nat Prod*, 2012(75): 834-851.