

【 评价方法学 】

非氘代溶剂在氟核磁共振定量中的应用

刘 阳^{1*}, 施晓光², 杨平荣³, 何 兰^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629
2. 广西壮族自治区食品药品检验所, 广西 南宁 530021
3. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070

摘要: **目的** 建立使用非氘代溶剂的氟核磁共振定量方法。**方法** 以氟化钠为内标、恩曲他滨为样品、去离子水为溶剂, 测定氟核磁共振谱, 进行线性关系考察、精密度试验、稳定性试验、耐用性试验; 平行配制5份样品, 进样测定, 通过样品响应信号与内标响应信号面积比值, 计算恩曲他滨含量; 同时利用质量平衡法测定恩曲他滨的含量, 两种方法进行比较。**结果** 非氘代溶剂的氟核磁共振谱图中氟化钠与恩曲他滨响应信号分离较远, 互不干扰; 方法线性关系良好, 精密度、稳定性、耐用性均符合要求; 氟核磁共振测定样品中恩曲他滨平均质量分数为100.1%, RSD值为0.57%, 与质量平衡法测定结果99.7%基本一致。**结论** 建立的氟核磁共振定量方法无需使用氘代溶剂, 准确快速, 可以有效降低试验成本及环境污染。

关键词: 非氘代溶剂; 恩曲他滨; 氟核磁共振定量; 质量平衡法; 含量测定; 氟化钠

中图分类号: R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)01-093-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.016

Application of non-deuterated solvent in ¹⁹F-quantitative nuclear magnetic resonanceLIU Yang¹, SHI Xiaoguang², YANG Pingrong³, HE Lan¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China
2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China
3. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To establish a ¹⁹F-quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) method using non-deuterated solvent. **Methods** Using sodium fluoride as an internal standard, emtricitabine as sample and de-ionized water as solvent, the ¹⁹F-qNMR of emtricitabine were analyzed. Linear relation test, precision test, stability test and durability test were carried out. Five samples were prepared in parallel for determination, the content of emtricitabine was calculated through response signal area ratios of sample and internal standard. Meanwhile, the mass balance method was used to determine the content of emtricitabine and the two methods were compared. **Results** In the non-deuterated solvent NMR spectra, NaF and emtricitabine response signal are far away from each other, and there was no interference between them. The method has a good linear relationship, and its precision, stability and durability all meet the requirements. The content of emtricitabine was calculated to be 100.1%, RSD was 0.57% in ¹⁹F- qNMR method. The results were consistent with assay calculated by mass balance method (99.7%). **Conclusion** The ¹⁹F-qNMR established in this paper does not require deuterated solvent and provides a effective way to reduce the test cost and environmental pollution.

Key words: Non-deuterated solvent; Emtricitabine; ¹⁹F-qNMR; mass balance method; determination of content; sodium fluoride

核磁共振技术在生物医药、化学化工以及地质地理方面起着难以替代的作用^[1-3], 近年来得到长足发展。氢核磁共振定量技术已经被包括《中国药典》

在内的各大药典收载^[4-7], 其主要特点是需要样品量少、检测时间短、不受对照品限制, 已广泛应用于食品药品质量检验检测中^[8-9]。

收稿日期: 2017-09-21

基金项目: 十二五重大新药创制专项 (2015ZX09303001); 广西特聘专家资助专项 2016

*通信作者: 刘 阳, 男, 副研究员, 研究方向为药物分析。Tel: (010)53851571

何 兰, 女, 教授, 研究方向为药物分析。Tel: (010) 53851600

由于绝大多数化合物中均存在氢原子, 以往研究多集中在氢核磁共振定量, 近年来对于氟核磁共振定量的探索开始逐渐增加。 ^{19}F 谱的范围通常为 δ -200~100, 比 ^1H 谱范围大, 且常见药物对应的 ^{19}F 谱通常仅有 1~2 个响应信号, 样品与内标响应信号不易重叠, 使得内标物质选择比较容易。 ^{19}F 的天然丰度为 100%, 磁矩与 ^1H 的磁矩相差不大, 灵敏度相似, 适合用于核磁共振定量实验, 是一种能够准确测定含氟化学药品含量的专属性新方法^[10-11]。

氟核磁共振定量技术另一个显著特点是可在任何溶液体系下进行, 不需要使用氘代试剂。氘代试剂比较昂贵, 且会造成环境污染, 使用普通非氘代溶剂可以很大程度缓解此类问题。目前专门研究讨论使用非氘代溶剂用于氟核磁共振定量测定的报道较少。

恩曲他滨是由美国 Gilead Sciences 公司研发上市的核酸逆转录抑制酶, 用于成人及儿童中 HIV 感染治疗。恩曲他滨对 HIV-1、HIV-2、HBV 等均有抗病毒活性, 属于世界卫生组织 (WHO) 基本药物, 目前其含量测定方法主要是高效液相色谱 (HPLC) 法。本文在前期研究的基础上, 以去离子水为溶剂, 利用氟核磁共振定量技术测定了恩曲他滨含量, 探索了非氘代溶剂用于氟核磁共振定量的可行性。

1 材料

1.1 主要试剂

恩曲他滨 (中国食品药品检定研究院, 批号 100873-200901, 质量分数 99.96%); 去离子水 (自制); 氟化钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20160217, 质量分数 98.0%)。

1.2 主要仪器

Bruker Ascend 500 型核磁共振谱仪、5 mm PABBO 探头、BVT-2000 温控单元及 Topspin3.2 实验控制与数据处理专用软件 (瑞士布鲁克公司); METTLER TOLEDO XP205 电子天平 (Mettler Toledo 公司)。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的配制

精密称取恩曲他滨样品约 20 mg, 精密加入 50 μL 氟化钠内标溶液 (55.9 mg/mL), 用约 1.5 mL 纯化水稀释, 使样品最终质量浓度约为 15 mg/mL, 内标最终质量浓度约为 1.8 mg/mL, 平行配制 5 份样品, 各取约 0.65 mL 溶液转入 5 mm 核磁管中备用。

2.2 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

(SWH) = 80×10^{-6} , 射频中心频率 (O1P) = -173×10^{-6} , 采样点数 (TD) = 128 K, 采样时间 (AQ) = 1.75 s, 驰豫延迟时间 (D1) = 15 s, 采样次数 (NS) = 16 次, 空扫次数 (DS) = 4 次, 增益 (RG) = 182。

2.3 恩曲他滨的定性分析

按“2.1”项下条件配制供试品溶液, 在“2.2”项下条件下采集恩曲他滨 ^{19}F -NMR 响应信号, 见图 1。

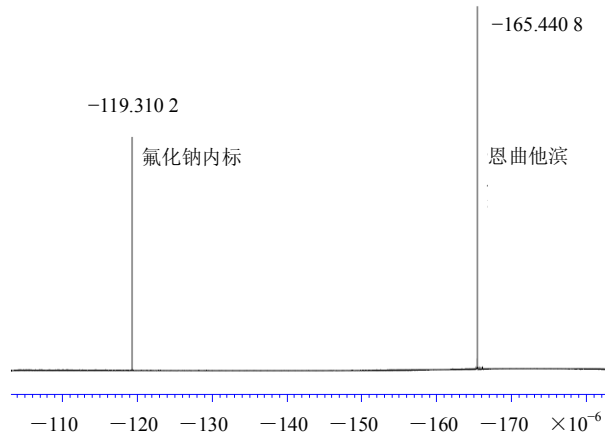


图 1 恩曲他滨样品与内标的核磁共振响应信号

Fig. 1 NMR response signals of emtricitabine sample and internal standard

2.4 方法学研究

2.4.1 线性关系考察 分别精密称取恩曲他滨和氟化钠, 使待测样品浓度约为 100、60、30、15、10 mmol/L, 内标浓度约为 70 mmol/L, 按“2.2”项下试验条件测定 ^{19}F -NMR 谱, 记录响应信号面积, 以 δ -165.4 处样品和 δ -119.3 处内标响应信号面积比值为横坐标, 样品和氟化钠内标质量比为纵坐标做线性回归, 回归方程为: $Y=0.303X+0.0871$, $R^2>0.99$ 。证明恩曲他滨在 10~100 mmol/L (2.5~25.0 mg/mL) 范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 按“2.1”项下条件配制供试品溶液, 在“2.2”项试验条件下连续测定 5 次, 记录响应信号面积, 计算 δ -119.3 处内标响应信号面积和 δ -165.4 处样品响应信号面积比值, 其 RSD=1.22% ($n=5$), 证明该方法的精密度较高。

按“2.1”项下条件配制供试品溶液 5 份, 由 2 名试验人员在 2 d 分别测定, 分别计算内标与样品响应信号面积比值, 10 份数据的 RSD 为 1.53%, 证明该方法精密度较好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液室温放置, 间隔 8 h 进行 2 次测定, 样品响应信号面积相对内标响应信号面积未发生明显变化, 表明供试品溶液

室温放置 8 h 稳定。

2.4.4 耐用性试验 取同一份供试品溶液分别在 20、25、30 和 35 °C 进行测定, 计算内标响应信号面积与样品响应信号面积比值, RSD 为 0.22%, 显示该体系不受测定温度影响。

2.5 恩曲他滨的定量分析

2.5.1 核磁共振含量测定 按“2.1”项下条件配制 5 份样品, 在“2.2”项试验条件下测定, 采集 $\delta -165.4$ 处样品响应信号与 $\delta -119.3$ 处内标响应信号, 按下式计算恩曲他滨质量分数。经计算, 样品中恩曲他滨平均质量分数为 100.1%, RSD 值为 0.57%。

恩曲他滨质量分数 = $(A_S/A_T \times n_S/n_T \times M_S/M_T \times W_T \times m_T) / W_S$

A_S 为恩曲他滨的响应信号面积; A_T 为内标的响应信号面积; n_S 为恩曲他滨响应信号包含的氟原子数 ($n_S=1$); n_T 为内标响应信号包含的氟原子数 ($n_T=1$); M_S 为恩曲他滨的相对分子质量 (247.25); M_T 为内标的相对分子质量 (41.99); W_S 为恩曲他滨的称样量; W_T 为内标的称样量; m_T 为内标质量分数 98.0%。

2.5.2 质量平衡法含量测定 为了验证核磁共振定量技术测定结果的准确性, 本实验同时利用质量平衡法测定了恩曲他滨的含量。购进的样品 HPLC 质量分数为 99.96%, 干燥失重为 0.19% (包括水与残留溶剂), 残渣为 0.03%。根据质量平衡法计算, 样品中恩曲他滨质量分数 = $(100\% - \text{干燥失重} - \text{残渣}) \times \text{HPLC 质量分数} = (100\% - 0.19\% - 0.03\%) \times 99.96\% = 99.74\%$ 。

3 讨论

3.1 溶剂选择

核磁共振实验中需要使用氘代试剂, 其主要作用是用于锁场。由于超导磁体中的电流随着时间会产生漂移, 使磁场强度也会缓慢产生变化, 对于一些测定时间较长的实验, 就会不可避免造成峰的分辨率下降, 损失裂分等信息, 所以进行碳谱等测定时间较长的核磁共振试验时必须使用氘代试剂。对于测定时间较短的核磁共振氢谱, 如果使用非氘代试剂, 虽然无法锁场对谱图造成的影响较小, 但是试剂中存在的大量氢原子会严重干扰待测样品, 所以在氢核磁共振定量试验中也必须使用氘代溶剂。氟核磁共振定量技术由于其灵敏度较高, 检测时间短, 且常用非氘代溶剂-水、甲醇及氯仿等不含氟原子的试剂, 样品测定不受溶剂干扰, 因此无需使用氘代试剂进行测定。非氘代试剂的使用, 可以大大降低试验成本, 减少对环境的污染。

3.2 样品及内标定量信号的选择

由于氟谱的响应信号范围较宽, 很少出现响应

信号重叠的现象。而且恩曲他滨与内标氟化钠中均只含有一个氟原子, 各自的氟核磁共振谱图中只产生一个响应信号, 分别出现于 $\delta -165.4$ 和 $\delta -119.3$ 。这两个响应信号分离较远, 互不干扰, 因此将其分别选为样品与内标的定量信号。

3.3 质量平衡法与 qNMR 结果比较

恩曲他滨质量分数采用 ^{19}F 核磁定量法定量结果为 100.1%、质量平衡法测定结果为 99.7%, 两种方法含量测定结果基本一致, 证明使用非氘代溶剂可以用于含氟药物的含量测定。

本文建立了非氘代溶剂用于氟核磁定量测定恩曲他滨含量的方法, 测定速度以及精密度等均较好, 测定结果与质量平衡法结果接近。这种方法尤其适用于贵重、样品量小以及难以获取对照品的药物含量测定。除了使用氟核磁共振定量技术固有的检测速度快等优点之外, 使用非氘代溶剂还大幅降低了试验成本, 也减少环境污染, 有助于进一步拓展氟核磁共振定量技术在药品质量控制中的应用。

参考文献

- [1] Webster G K. Expanding the analytical toolbox: pharmaceutical application of quantitative NMR [J]. Anal Chem, 2014, 86(23): 11474-11480.
- [2] Pauli G F, Chen S N, Simmler C, et al. Importance of purity evaluation and the potential of quantitative ^1H NMR as a purity assay [J]. J Med Chem, 2014, 57(22): 9220-9231.
- [3] Holzgrabe U, Malet-Martino M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification-The NMR approach [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55(4): 679-687.
- [4] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [5] USP38-NF33 Nuclear magnetic resonance spectrometry [S]. 2015: 761.
- [6] BP 2013 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry [S]. 2013: Appendix II C.
- [7] EP 8.0 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry [S]. 2013: 2.2.33.
- [8] 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.
- [9] 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): 447-452.
- [10] Liu Y, Liu Z X, Lin L, et al. Direct comparison of ^{19}F qNMR and ^1H qNMR by characterizing atorvastatin calcium content [J]. J Anal Methods Chem, 2016: 7627823. doi: 10.1155/2016/7627823.
- [11] 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): 1960-1962.