

定量核磁共振氢谱法快速测定若干药用辅料中水分*

陈新启¹, 温静¹, 刘豪惠玲², 张梅¹, 焦晓林², 王尉^{1**}

(1. 北京市科学技术研究院分析测试研究所(北京市理化分析测试中心), 北京 100089;

2. 北京城市学院生物医药学部, 北京 100094)

摘要 目的:建立定量核磁共振氢谱(¹H qNMR)法测定若干药用辅料中水分。**方法:**以苯磺酸钠为内标, 重水为溶剂, 采用核磁共振氢谱绝对定量法测定空白试样中水的含量, 并在此基础上, 与空白值进行比对, 建立样品水含量定量计算公式, 并对样品中水分进行测试和计算。**结果:**方法学研究表明, 该方法具有良好的线性关系($r=0.9991$), 线性范围为试样绝对含水量 0.032~0.561 mg, 精密度试验 RSD 为 0.039%, 重复性试验 RSD 为 0.51%, 平均加样回收率为 98.7%, ¹H qNMR 法测得 DMSO-1、DMSO-2、苯磺酸钠、乙酸钠中水分分别为 0.23%、0.28%、0.46%、0.28%, 与 2020 年版《中华人民共和国药典》经典方法试验结果基本一致。**结论:**建立的¹H qNMR 法操作快速、简便, 样品用量少, 结果较准确, 可用于一些药用辅料中水含量的测定。

关键词:定量核磁共振氢谱; 药品; 辅料; 内标法; 水分

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)11-1992-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0258

Rapid determination of water content in certain pharmaceutical excipients by ¹H qNMR method*

CHEN Xin-qi¹, WEN Jing¹, LIU Hao-hui-ling²,
ZHANG Mei¹, JIAO Xiao-lin², WANG Wei^{1**}

(1. Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology (Beijing Center for Physical and Chemical Analysis),

Beijing 100089, China; 2. Biomedicine School, Beijing City University, Beijing 100094, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy (¹H qNMR) method for determining the moisture content in several pharmaceutical excipients. **Methods:** Using sodium benzenesulfonate as the internal standard and heavy water as the solvent, the water content in the blank sample was determined by absolute quantification using nuclear magnetic resonance spectroscopy. By comparing with the blank value, a quantitative calculation formula for the water content in the sample was established, and the water content in the sample was tested and calculated. **Results:** Methodological studies had shown that this method had a good linear relationship ($r=0.9991$), with a linear range of 0.032-0.561 mg absolute water content in the sample, the precision RSD was 0.039%, repeatability RSD was 0.43%, and the average recovery was 98.7%. The ¹H qNMR method measured the water content in DMSO-1, DMSO-2, sodium benzenesulfonate, and

* 北京市科学技术研究院创新工程项目(24CA001-03)

** 通信作者 Tel: (010)58717610; E-mail: wangwei@bepca.ac.cn

第一作者 Tel: (010)58717279; E-mail: chenxq1@aliyun.com

sodium acetate to be 0.23%, 0.28%, 0.46%, and 0.28%, respectively, which were essentially consistent with the results obtained from the method described in the Chinese Pharmacopoeia (2020). **Conclusion:** The ^1H qNMR method established is fast, simple to operate, with a small sample size and accurate results. It can be used for the determination of water content in some pharmaceutical excipients.

Keywords: ^1H qNMR; medicine; excipients; internal standard method; water content

在制药工程等领域,制品中水分的存在,会影响制品活性成分的含量、药效、理化稳定性及保质期等多项参数,为了满足生产工艺、质量控制、产品储存等方面的要求,水分的测定显得十分重要^[1],也是很多药品辅料质控必需的一个指标。此外,在标准物质的研制方面,水分的测定也极其关键^[2-3],这将直接影响到质量平衡法的最终定量纯度值。

针对不同种类的制品及水分要求,2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)列举了若干类测定方法,如费休氏法、烘干法、减压干燥法、甲苯法等。同时,随着研究开发,近年来亦出现了一些其他水分分析手段,如近红外光谱分析、气相色谱法、微波传感分析等^[4-6]。这些方法在不同的领域虽各有优势,但是,目前采用最多的经典方法还是费休氏法。与其他测定水分的方法相比,费休氏法具有检测限低,线性区间宽,适用范围广等优点,可应用于很多场景并被视为标准方法^[7-9]。但是,费休氏滴定法也存在一些不足之处,比如,操作较为烦琐,需要专门配制或购买费休氏试液,在采用容量滴定法时还需要对试液进行标定;为了提高结果的准确度,往往要求的样品量较大;有时需要通过卡式炉联用进行测定等^[10]。

近年来,定量核磁共振波谱(qNMR)技术因其操作简单、无损测定等优点,在各领域得到越来越广泛的应用^[11-15],也是质量平衡法的重要补充^[16],文献报道也有若干利用qNMR测定样品中水分的研究^[17-19]。但这些研究测定的样品对象比较有限,其中有的方法需要化学衍生化,步骤较为烦琐。为了拓展qNMR方法的应用场景,本研究以重水为溶剂,苯磺酸钠为内标,建立了 ^1H qNMR法测定样品中水分绝对含量的方法,对二甲基亚砜(DMSO)等一些不含活泼氢的药品辅料中的水分进行了测定,方法简单快捷,准确性高,样品用量较少,通用性强。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent NMR 600 MHz 核磁共振波谱仪(Agilent

公司);CP225D 分析天平(十万分之一,赛多利斯公司);移液枪(Eppendorf 公司);916 Ti-Touch 自动电位滴定仪(万通公司)。

1.2 试剂

重水(批号 INBAABAFB,北京伊诺凯科技有限公司,含量 99.9%);苯磺酸钠(批号 AMUYD-RT, TCI 公司,标定含量 99.7%);马来酸标准物质(批号 BCCC6481, SIGMA-ALDRICH 公司,纯度 99.94%,用于核磁共振法标定苯磺酸钠);方法验证用若干种实验室常见辅料样品,包括 DMSO-1(批号 T20100429,国药集团化学试剂有限公司)、DMSO-2(批号 F72315773,阿拉丁试剂有限公司)、苯甲酸钠(批号 20230505,国药集团化学试剂有限公司,含量 99.5%)、乙酸钠(批号 BCCJ0024, Sigma-Aldrich 公司,含量 99.0%)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 内标溶液 精密称量苯磺酸钠 666.88 mg,加入重水 20 mL,充分溶解,配成苯磺酸钠内标溶液,密封保存。

2.1.2 供试品溶液 移取 DMSO 样品 5~300 μL (体积可根据样品水分适当调整),精密称定移取的样品质量;用移液枪精准加入内标溶液 500 μL ;溶解混匀并移入核磁管测定。对于固体样品,可精密称定样品(称取质量可根据样品水分适当调整)5~300 mg,其余操作同 DMSO 样品。

2.1.3 空白溶液 为了尽量减少环境可能的影响,采用与“供试品溶液”配制完全相同的操作步骤,不同之处在于加入 DMSO 样品的量为 0。

2.2 检测条件

采用氢谱的脉冲序列,测试温度 25 $^{\circ}\text{C}$,谱宽 $(-2\sim 14)\times 10^{-6}$,脉冲角度 45 $^{\circ}$,脉冲延迟时间 60 s,采样时间 3 s,扫描次数 8 次。数据处理使用 MestReNova5.3.1 软件,先进行相位和基线校准,然后采用手动积分,计算得到水峰和内标定量峰峰面

积的相对比值,采用2020年版《中国药典》四部通则“0441核磁共振波谱法”中绝对定量公式,计算得到空白试样中水分的绝对含量。

2.3 内标及定量峰的选择

将一定量的苯磺酸钠、DMSO样品溶于重水中混合制样,测定试样的 ^1H NMR,得到如图1所示氢谱。图中峰1的两重峰对应苯磺酸钠苯环上磺基邻位的氢质子;峰2为水质子峰;峰3为DMSO质子峰。由图1可以看出,3个谱峰均呈现出良好的线形和分辨率,与其他谱峰基线分离良好且无相互干扰。同时,苯磺酸钠是离子化合物,具有良好的水溶性和稳定性,不易挥发,溶液呈中性状态,没有易电离的氢质子,对样品水分的测定干扰小。因此,苯磺酸钠可作为定量内标,并把 δ_{H} 7.86和4.80处的峰1和峰2作为定量特征峰,对样品中的水分进行测定。

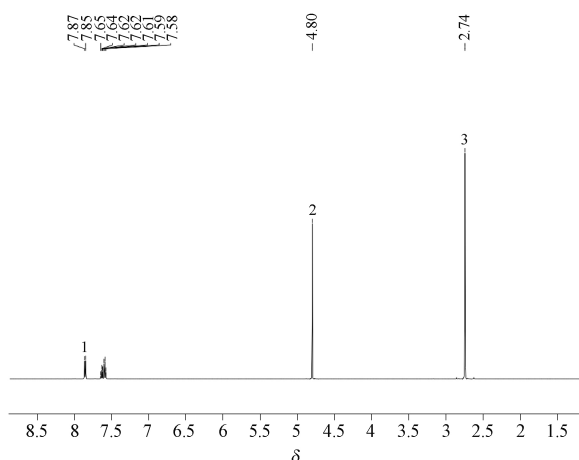


图1 苯磺酸钠和DMSO混合制样的 ^1H NMR谱图

Fig. 1 ^1H NMR spectrum of sodium benzenesulfonate and DMSO mixed samples

2.4 仪器参数的选择

核磁共振定量实验结果的准确性与实验仪器参数的选择紧密相关,仪器参数主要包括延迟时间、采样时间、扫描次数等,其中又以延迟时间的合理设置尤为重要。采用足够的延迟时间,才能保证激发的氢核弛豫完全,从而使氢谱的峰面积与对应的原子数目具有可比性,通常定量核磁要求5T1(纵向弛豫时间)的延迟时间。利用反转恢复法对T1进行测定,结果发现,体系中水质子峰具有最长的纵向弛豫时间,其T1约为11.4 s。除T1外,延迟时间的合理设置还与脉冲角度等多种可能因素

相关。因此,为了得到合理的延迟时间,通过改变该参数,考察目标物与内标定量峰面积的比值使之稳定,是一个较为合理的方法,这样就可以消除各种未知因素带来的可能影响。于是分别设定一系列的延迟时间(1、2、5、10、15...80 s),对样品进行氢谱采样。通过考察目标物与内标定量峰面积的比值可知,60 s的延迟时间足以使该比值保持稳定,而这个数值也与5T1基本吻合。在确定延迟时间的前提下,分别设置系列采样时间(1~10 s)和扫描次数(2~32次)进行氢谱测定,结果表明,这2个参数对比值的影响较小,综合考虑谱图信噪比和实验效率,采用采样时间3 s和扫描次数8作为定量实验条件。因此,最后优化的实验参数为:延迟时间60 s,采样时间3 s,扫描次数8。

2.5 方法学研究

2.5.1 线性关系考察和定量公式的建立 按照“2.1”项下溶液的制备方法和“2.2”项下检测条件,调整DMSO样品(已标定水分)的加入量为0~116.15 mg,其中空白溶液的样品加入量为0,测定上述溶液的 ^1H NMR并积分。因为DMSO的加入量与其所含水的量成正比,因此,DMSO的加入量可换算为水的加入量,以水的加入量X(mg)为横坐标,以目标物(水)/内标物定量峰面积的比值(A_s)为纵坐标Y,得到拟合曲线和线性回归方程

$$Y = 1.80854 + 0.77694X \quad r = 0.9991$$

可知目标物质量与峰面积比值在测定范围内线性关系良好,且拟合曲线基本通过空白溶液的坐标点(0,1.817)。因此,在实际测定中为简化步骤,减少工作量,采用扣除空白的单点法定量是合理可行的。在采用绝对定量公式计算空白溶液含水量(m_k)的基础上,可得到样品水分计算公式:

$$\omega_s = \frac{(A_s - A_k)/m_k}{A_k m_s} \times 100\% \quad (1)$$

式中: ω_s 为样品中水的质量分数(%), m_s 为供试品溶液中加入样品的质量(mg), A_s 为供试品溶液的目标物(水)与内标定量峰面积的比值, A_k 为空白溶液的目标物(水)与内标定量峰面积的比值, m_k 为空白溶液中的含水量(mg)。

采用2020年版《中国药典》四部通则“0441核磁共振波谱法”中核磁绝对定量法计算水分,可得到空白溶液含水量为3.02 mg;系列加入DMSO样品的供试品溶液扣除空白后含水量为

0.032 ~ 0.561 mg, 可作为该方法的线性范围。

2.5.2 精密度试验 按照“2.1”项方法配制 DMSO 样品的供试品溶液, 在相同的试验条件下, 对其进行连续 6 次测定, 计算水/内标物定量峰面积的比值(A_s), 可得到 RSD 为 0.039%。因试验是对同一样本连续进行测定, 故其 RSD 与核磁仪器本身的性能相关, 试验结果表明, 仪器的状态稳定, 精密度良好。

2.5.3 重复性试验 按照“2.1”项方法, 分别取同一 DMSO 样品 6 份配制供试品溶液, 在相同试验条件下平行测定 6 次, 同时测定的还有空白溶液, 根据积分结果分别计算水的质量及 DMSO 样品水分(ω_s), 得到 ω_s 值的 RSD 为 0.51%, 具体见表 1, 由此表明该定量方法具有良好的重复性。

表 1 重复性测试结果

Tab. 1 Results of repetitive test

序号 (No.)	m_s /mg	水的质量 (water mass)/mg	ω_s /%
1	133.33	0.289	0.217
2	133.23	0.287	0.215
3	132.47	0.287	0.215
4	132.96	0.289	0.217
5	132.49	0.285	0.215
6	133.20	0.289	0.217
RSD/%		0.51	

2.5.4 回收率试验 按照“2.1”项方法, 分别称取一定量的 DMSO 样品(已测定水分)于 6 个试管中, 然后分别加入不同质量的重水(H_2O 含量已经通过核磁绝对定量法进行标定), 对上述体系进行含水量测定, DMSO 样品和重水溶液中的 H_2O 质量以及体系含水量测定。6 次回收率试验包含 3 种不同加标量, 其回收率结果没有显著差异, 范围为 96.3% ~ 103.3%, 平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.5%, 定量结果较为准确。

2.5.5 检测限和定量限 在已知“2.5.1”拟合曲线斜率和测定 11 个空白溶液的基础上, 计算得到方法的检测限为供试品溶液中样品水含量 8.7 μg , 定量限为水含量 26 μg , 显示了较高的灵敏度。实际检测时, 可根据样品中水分的高低, 灵活改变加入的样品量, 从而可以大大提高方法的通用性, 扩展方法的适用范围。

2.6 样品测定

按照测定原理, 采用类似的操作步骤, 本研究的分

析方法同样适用于其他一些药品辅料中水分的测定, 其中也包括无机辅料。选择若干种实验室常见的辅料样品, 对本方法开展验证试验, 同时采用 2020 年版《中国药典》的经典方法(费休氏法、烘干法)进行对照测试。由表 2 可以看出, 本方法与 2020 年版《中国药典》的费休氏法(容量滴定法)和烘干法测试结果基本一致(烘干法结果相对偏高, 可能源于样品里面包含有其他挥发性物质), 也说明了本方法的实用性。

表 2 若干样品中水分测定结果及对照

Tab. 2 Measurement results and comparison of water content in several samples

样品 (sample)	水分(water content)/%	
	1H qNMR	药典方法(ChP method)
DMSO-1	0.23	0.24 ¹
DMSO-2	0.28	0.29 ¹
苯甲酸钠(sodium benzoate)	0.46	0.48 ¹ /0.50 ²
乙酸钠(sodium acetate)	0.28	0.29 ¹ /0.31 ²

注(note): 1. 费休氏法(Karl Fischer titration); 2. 烘干法(oven-drying method)

3 讨论

实验室所用的试剂中或多或少都含有一定的水分, 因此, 方便、快捷、准确地测定样品中的微量水一直是个难题。本研究提出的方法, 通过核磁绝对定量法测定并扣除空白溶液中的水分, 可以规避试剂含水对测定结果的影响, 为采用核磁法测定水分提供了一个可选思路。通过对比发现, 本方法与药典方法有较好的一致性, 取得了较满意的测试效果, 且具有方法简单快捷, 样品用量较少, 通用性较强的特点。但在实际应用中, 有以下几点需要重视。

3.1 NMR 参数的选择

定量核磁共振测定中, 激发的氢核完全弛豫是保证准确定量的基础, 而水分子属于小分子, 具有较长的纵向弛豫时间, 因此, 测试条件必须提供足够长的延迟时间, 以保证定量的准确性, 本研究中的延迟时间设为 60 s。

3.2 测试对象的选择

根据测试原理可知, 测试样品中不能含有活泼氢, 因为活泼氢会和溶剂重水中的氘发生交换, 生成 H_2O , 从而使测试结果偏大, 这就使得本方法在测定药用辅料水分时具有一定的局限性, 限制了其对一些有机辅料的应用(比如醇类、酸类等), 但对于很多

不含活泼氢的无机辅料该方法却能够较好地使用。为了消除活泼氢的影响,对于这类有机辅料,可采用如氘代 DMSO 为溶剂(前提是 DMSO 为其良溶剂),则不会发生上述交换反应;另外,通常氘代 DMSO 中样品活泼氢与 H₂O(δ_{H} 约 3.3×10^{-6})的出峰位置不同,保证了水质子峰积分的一致性。综上,对于含有活泼氢的有机物,按照本文的思路,通过改变溶剂种类(比如氘代 DMSO),同样有望开发出类似的方法进行水分测定,从而大大扩展该方法的应用范围。

3.3 测试环境的影响

环境空气湿度的变化可能或多或少会给试验结果带来一些影响,特别是对样品中微量水的测定。空白溶液和供试品溶液采用统一的操作步骤,同步进行测定,可以将这些影响尽可能地降到最低。

3.4 数据处理的影响

数据处理不当可能会对结果带来一些影响,积分处理的过程尤其重要,积分之前需要对相位和基线仔细校准,尽量减少数据处理带来的误差。

参考文献

- [1] ISENGARD HD. Rapid water determination in foodstuffs[J]. *Trends Food Sci Technol*, 1995, 6(5):155
- [2] 刘静,何轶,张聿梅,等. 中药化学对照品标定常见问题分析[J]. *中国药事*, 2017, 31(10):1171
LIU J, HE Y, ZHANG YM, *et al.* Analysis of common problems in standardization of traditional Chinese medicine chemical reference substance[J]. *Chin Pharm Aff*, 2017, 31(10):1171
- [3] 郑子繁,刘卫晓,金芈军,等. 质量平衡法及其在标准物质定值中的应用进展[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(6):623
ZHENG ZF, LIU WX, JIN WJ, *et al.* Progress on reference materials based on mass balance method[J]. *Curr Biotechnol*, 2020, 10(6):623
- [4] FRINK LA, ARMSTRONG DW. The utilisation of two detectors for the determination of water in honey using headspace gas chromatography[J]. *Food Chem*, 2016, 205:23
- [5] CORREDOR CC, BU D, BOTH D. Comparison of near infrared and microwave resonance sensors for at-line moisture determination in powders and tablets[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 696(1-2):84
- [6] VAN KOLLENBURG GH, VAN MANEN HJ, ADMIRAAL N, *et al.* Low-cost handheld NIR spectroscopy for identification of organic solvents and low-level quantification of water contamination[J]. *Talanta*, 2021, 223:121865
- [7] 张捷,尹良军,张书华,等. 费休氏水分测定法测定小柴胡颗粒水分[J]. *延安大学学报(医学科学版)*, 2015, 13(3):6
ZHANG J, YIN LJ, ZHANG SH, *et al.* Fischer moisture determination of Xiaochaihu granules moisture determination[J]. *J Yan'an Univ (Med Sci)*, 2015, 13(3):6
- [8] 李风华,侯学伟. 卡尔费休滴定法测定异丙醇中水分含量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2013, 49(10):1174
LI FH, HOU XW. Determination of moisture in iso-propanol by Karl Fischer titration[J]. *Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal*, 2013, 49(10):1174
- [9] MARGOLIS SA, ANGELO JB. Interlaboratory assessment of measurement precision and bias in the coulometric Karl Fischer determination of water[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 374(3):505
- [10] 王晨,许明哲,王立新,等. 几种卡尔费休氏水分测定法[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(12):2145
WANG C, XU MZ, WANG LX, *et al.* Several Karl Fischer water determination methods[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2008, 28(12):2145
- [11] 张才煜,宁保明,何兰. 核磁共振定量法在化学对照品标化中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(5):919
ZHANG CY, NING BM, HE L. Application of the quantity nuclear magnetic method in the calibration of the chemical reference substances[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(5):919
- [12] MAKI H. Quantitative NMR in analytical chemistry[J]. *Anal Sci*, 2020, 37(11):1485
- [13] CROOK AA, POWERS R. Quantitative NMR-based biomedical metabolomics: current status and applications[J]. *Molecules*, 2020, 25(21):5128
- [14] WANG ZF, YOU YL, LI FF, *et al.* Research progress of NMR in natural product quantification[J]. *Molecules*, 2021, 26(20):6308
- [15] 马惠钟,杨宏天,王和欣,等. 核磁共振定量法测定连翘苷的绝对含量[J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(5):913
MA HZ, YANG HT, WANG HX, *et al.* Quantitative determination of phillyrin by qNMR[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(5):913
- [16] 陈新启,吴少辉,乐胜锋,等. 定量核磁共振波谱法测定3种低聚果糖的含量[J]. *理化检验-化学分册*, 2023, 59(6):637
CHEN XQ, WU SH, LE SF, *et al.* Determination of 3 fructo-oligosaccharides by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Phys Test Chem Anal Part B: Chem Anal*, 2023, 59(6):637
- [17] DAVID K, BEN H, MUZZY J, *et al.* Chemical characterization and water content determination of bio-oils obtained from various biomass species using ³¹P NMR spectroscopy[J]. *Biofuels*, 2012, 3(2):123
- [18] SUN H, WANG B, DIMAGNO SG. A method for detecting water in organic solvents[J]. *Org Lett*, 2008, 10(20):4413
- [19] WAN KN, LI M, HUANG T, *et al.* Accurate determination of trace water in organic solution by quantitative nuclear magnetic resonance[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(42):15673

(本文于2024年4月17日收到)