

定量核磁共振氢谱检测右佐匹克隆片的含量*

郑晓红¹, 车逸豪², 肖志会^{1**}

(1. 中国科学院南海海洋研究所仪器设备公共服务中心, 广州 510301;

(2. 中国科学院南海海洋研究所中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广州 510301)

摘要 目的:建立定量核磁共振氢谱(qHNMR)测定右佐匹克隆含量的方法。**方法:**以1,3,5-三甲氧基苯 δ 6.08处质子信号为内标峰,以右佐匹克隆 δ 8.54、8.38、8.12、7.78处质子信号为定量峰,以DMSO- d_6 为溶剂,在恒温298 K,弛豫延迟时间10 s,扫描次数32次条件下采集氢谱。**结果:**定量核磁共振氢谱法测定右佐匹克隆片中右佐匹克隆平均含量为2.94%,即平均每片中含右佐匹克隆3.00 mg, RSD为0.15%,与药物说明标示的量基本一致。**结论:**定量核磁共振氢谱可用于药物中右佐匹克隆含量的测定,并且具有快速、准确以及操作简单等优势。

关键词:右佐匹克隆;1,3,5-三甲氧基苯;氢核磁共振定量法;含量测定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)03-0380-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.03.02

Determination of dexzopiclone tablets content by quantitative nuclear magnetic resonance*

ZHENG Xiao-hong¹, CHE Yi-hao², XIAO Zhi-hui^{1**}

(1. Equipment Public Service Center of South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative ^1H -NMR (qHNMR) method for the determination of dexzopiclone tablets content. **Methods:** Proton signal at δ 6.08 of 1,3,5-trimethoxybenzene and δ 8.54, 8.38, 8.12, 7.78 of dexzopiclone were served as the internal standard and quantitative peaks, respectively. DMSO- d_6 was employed as the solvent. The qHNMR spectra were acquired at 298 K with 10 s relaxation delay and 32 scanning times. **Results:** The content of dexzopiclone was estimated to be 2.94% (RSD = 0.15%) by qHNMR method, which indicated that 3.00 mg of dexzopiclone was in one tablet. The result was consistent with the description of the label. **Conclusion:** qHNMR method can be used to determine the content of dexzopiclone. The method is accurate, simple and efficient.

Keywords: dexzopiclone; quantitative nuclear magnetic resonance; content determination; 1,3,5-trimethoxybenzene

* 2021年度中国科学院技术支撑人才项目(2022006)

** 通信作者 Tel:(020)89023100;E-mail: xzh@scsio.ac.cn

第一作者 Tel:(020)89023100;E-mail: zhengxiaohong@scsio.ac.cn

定量核磁技术用于定量分析的依据是化学环境不同的氢原子核的共振峰面积只与氢原子数有关,不需特定的对照品,快速准确,特异性强,特别适合无对照品的新药含量测定,已先后被美国药典、欧洲药典、日本药局方和2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)收录^[1-8]。

右佐匹克隆化学名为(+)-(7S)-6-(5-氯-2-吡啶基)-7-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲酰氧基]-5,6-二氢吡咯并[3,4-b]吡嗪-5-酮(见图1),是吡咯环酮类短效催眠药,用于治疗失眠症。霍美娣等^[9]对其化学结构进行了确证,刘惠军等^[10]对佐匹克隆原料及片剂有关物质的HPLC测定进行了研究。《中国药典》采用电位滴定法(通则0701)及紫外-可见分光光度法(通则0101)测定右佐匹克隆含量,采用高效液相色谱法(通则0512)测定有关物质^[11]。目前,定量核磁共振氢谱法测定右佐匹克隆含量未见报道。本文以1,3,5-三甲氧基苯为内标,建立了基于定量¹H-NMR测定右佐匹克隆片中右佐匹克隆含量的方法。研究了溶剂、内标物及NMR实验参数对测量结果的影响,为该物质的含量测定提供了一种新思路,建立了一种简单、方便、快捷的测定右佐匹克隆含量的方法。

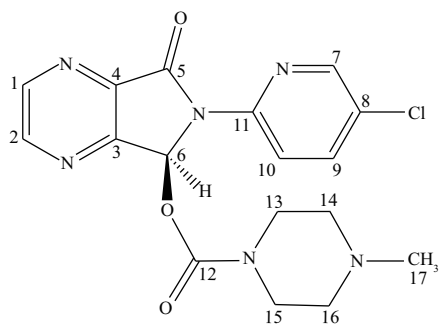


图1 右佐匹克隆的化学结构式

Fig. 1 The structure of dexzopiclone

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Bruker Avance III HD 700 MHz NMR 谱仪(Bruker 公司);高效液相 HPLC 型号 Agilent1260(安捷伦科技有限公司),YMD-Pack ODS-A(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);MestReNova 14.3.0 数据处理软件(Mest-

relab Research S. L. 公司);ME204E 万分之一电子天平(梅特勒公司)。

1.2 试剂

对照品 1,3,5-三甲氧基苯(批号 510137-201601,含量 99.9%)、右佐匹克隆(批号 100871-200801,含量 100%),均购自中国食品药品检定研究院。右佐匹克隆片(商品名:伊坦宁,成都康弘药业集团股份有限公司,批号 3D006,规格 3 mg · 片⁻¹);DMSO-*d*₆(99.9%,CIL 公司),色谱乙腈(北京迈瑞达公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

分别精密称取一定量的 1,3,5-三甲氧基苯和右佐匹克隆片待测样品,置于同一离心管,加入 DMSO-*d*₆ 0.6 mL,超声(功率 70 W)溶解 30 min,离心取上清液转移至 5 mm 核磁管中。

2.2 NMR 实验和谱图处理

采用 zg30 脉冲序列,谱宽 1 409 7.74 Hz(谱仪对应的质子共振频率为 70 0.18 Hz)、中心频率为 490 1.26 Hz、 $\theta = 30^\circ$ 、时间域数据点为 64 k,测定温度为 298 K,延迟时间为 10 s,采样次数为 32 次,每份样品平行测定 5 次取平均值,采用线宽因子为 0.3 Hz 的窗函数对原始的自由感应衰减(FID)信号进行傅里叶变换得到频域谱,对谱图进行手动相位和基线校正及化学位移定标处理,同时对照参考文献^[9]对右佐匹克隆的¹H、¹³C NMR 信号进行归属,见表 1。

2.3 右佐匹克隆含量的测定

2.3.1 含量测定的公式 采用下列公式^[2]计算待测样品中右佐匹克隆的含量。

$$P_x = \frac{I_x}{I_{IS}} \cdot \frac{N_{IS}}{N_x} \cdot \frac{M_x}{M_{IS}} \cdot \frac{m_{IS}}{m_x} \cdot P_{IS}$$

I_x 为右佐匹克隆片待测样品定量峰的积分面积, I_{IS} 为 1,3,5-三甲基苯内标定量峰的积分面积; N_x 和 N_{IS} 分别为右佐匹克隆片待测样品和 1,3,5-三甲基苯内标定量峰包含的质子数($N_x = 4$, $N_{IS} = 3$); M_x 和 M_{IS} 分别为右佐匹克隆待测样品和 1,3,5-三甲基苯的相对分子质量($M_x = 388.81$, $M_{IS} = 168.19$); m_x 和 m_{IS} 分别为右佐匹克隆待测样品和 1,3,5-三甲基苯内标的称样量; P_x 和 P_{IS} 分别为右佐匹克隆待测样品和 1,3,5-三甲基苯内标的质量分数($P_{IS} = 99.9\%$)。

表1 右佐匹克隆信号归属

Tab.1 Assignment of NMR signals of dexzopiclone

编号(No.)	δ_{H}	δ_{C}	编号(No.)	δ_{H}	δ_{C}
1	8.98(d, $J=2.6$ Hz, 1H)	147.8	9	8.12(dd, $J=8.9, 2.6$ Hz, 1H)	138.6
2	8.95(d, $J=2.6$ Hz, 1H)	148.6	10	8.38(d, $J=8.9$ Hz, 1H)	116.1
3		155.5	11		127.1
4		143.4	12		163.1
5		152.8	14,16	2.31~1.79(brs, 4H)	53.8
6	7.78(s, 1H)	79.1	15,13	3.44~3.12(brs, 4H)	43.6
7	8.54(d, $J=2.6$ Hz, 1H)	146.6	17	2.10(s, 3H)	45.8
8		147.8			

2.3.2 测定结果 按“2.1”项方法制备供试品溶液,在“2.2”项条件下进行检测,并将 $^1\text{H-NMR}$ 谱中 δ 8.54、8.38、8.12、7.78信号作为其定量峰,1,3,5-三甲氧基苯 $^1\text{H-NMR}$ 谱中 δ 6.08的信号作为其内标的定量峰,按上述公式计

算,每个定量峰积分面积计算的平均值作为结果,测得待测样品中右佐匹克隆的含量均值为2.94%,折算成质量即平均每片右佐匹克隆片(伊坦宁)中含右佐匹克隆3.00 mg, RSD为0.15%,见表2。

表2 右佐匹克隆含量测定结果

Tab.2 Content of dexzopiclone

编号 (No.)	取样量(sample amount)/mg		含量 (content)/%	平均值 (average value)/%	RSD/ %
	m_{X}	m_{IS}			
1	100.5	2.1	2.93	2.94	0.15
2	103.4	1.7	2.94		
3	103.0	5.3	2.94		

2.4 稳定性试验

取同一待测样品溶液分别在1 d内的第0、6、12和24 h进行NMR测定,结果显示待测样品中右佐匹克隆与1,3,5-三甲氧基苯内标的峰面积之比的RSD为0.090% ($n=4$)。表明待测样品的DMSO- d_6 溶液室温放置24 h稳定。

2.5 线性试验^[2]

精密称取内标物1,3,5-三甲氧基苯29.80 mg,用DMSO- d_6 1 mL溶解,得到29.80 mg·mL⁻¹的内标液;精密称取右佐匹克隆对照品25.10 mg,精密加入内标液0.1 mL,用DMSO- d_6 制成质量浓度为3.138、4.701、6.275、7.844、9.413、10.981、12.550 mg·mL⁻¹的一系列对照品溶液。按照“2.2”项条件下进行 $^1\text{H-NMR}$ 分析。以右佐匹克隆对照品与1,3,5-三甲氧基苯的峰面积之比 Y 为纵坐标,右佐匹克隆对照品与1,3,5-三甲氧基苯的质量比 X 为横坐标进行线性回归,得回归方程($n=7$):

$$Y=0.173X-0.0364 \quad r=0.9972$$

右佐匹克隆对照品与内标物的质量比在0.421~1.684与峰面积之比呈线性关系。

2.6 HPLC法测定^[14]

色谱条件:安捷伦1260高效液相色谱仪, YMD-Pack ODS-A(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为水-乙腈(90:10→5:95)进行梯度洗脱(流动相体系中含有十万分之一的甲酸,洗脱时间30 min),检测波长280 nm,流速1 mL·min⁻¹,柱温25 $^{\circ}\text{C}$,进样量5 μL 。

溶液的制备:精密称取右佐匹克隆对照品12.62 mg,用甲醇溶解并配制成浓度为0.505、0.252、0.126、0.063、0.032、0.016 mg·mL⁻¹的标准品溶液;精密称取右佐匹克隆待测样品30 mg,用甲醇配制成浓度为1.500 mg·mL⁻¹的待测液。

用HPLC外标法测定待测样品中右佐匹克隆的含量为3.04%,测定结果与qHNMR方法基本一致。

3 讨论与结论

3.1 溶剂的选择

合适的溶剂除了对样品和内标均有良好的溶解性外,其残留的信号峰应不干扰所分析样品的信号峰。右佐匹克隆易溶于二甲亚砜或氯仿,较易溶于醋酸,难溶于甲醇、丙酮或乙腈,极难溶于乙醚或异

丙醇,几乎不溶于水。试验中用3种常用的氘代试剂进行提取,发现 CDCl_3 提取成分复杂,谱图略显杂乱; $\text{DMSO}-d_6$ 溶剂中右佐匹克隆信号峰清晰,分辨率好; CD_3OD 溶剂提取谱图清晰,由于溶剂效应信号分离度不如 $\text{DMSO}-d_6$,综合考虑右佐匹克隆的溶解度,本文最终确定用 $\text{DMSO}-d_6$ 为氘代试剂,见图2。

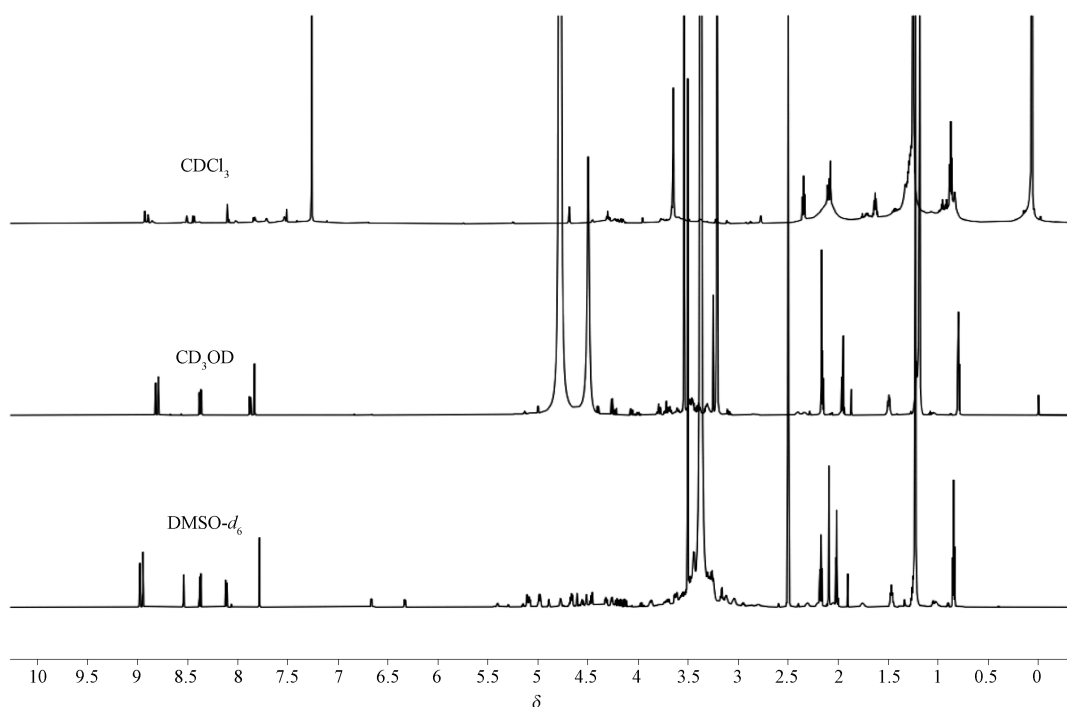


图2 不同氘代试剂提取后右佐匹克隆 $^1\text{H}-\text{NMR}$ 谱图

Fig. 2 $^1\text{H}-\text{NMR}$ spectra of dexzopiclone in different deuterated reagents

3.2 延迟时间(d_1)的确定

在核磁定量实验中,延迟时间(d_1)必须设定的足够长($\geq 5T_1$),才能使原子核完全弛豫,确保被积分的信号强度与原子核数目呈正比^[12]。为考量 d_1 对实验结果的影响,针对同一待测样品,分别将 d_1 设置为1、2、5、10、15、20 s,结果表明:当 $d_1 \geq 10$ s后,待测样品及内标的定量峰的积分面积不再变化^[2],为同时满足 $d_1 \geq 5T_1$ 且节省采样时间,本文选择 d_1 为10 s。

3.3 采样次数(ns)的确定

ns的多少直接影响NMR的信噪比:ns越大,信噪比越高,定量越准确。对于qHNMR,一般要求信噪比(S/N) ≥ 250 ^[13]。但ns越大,采样时间也越长。为考量ns对实验结果的影响,针对同一待测样品,分别将ns设定为8、16、32和64。结果表明:700 MHz

液氮超低温探头灵敏度较高, S/N 都能达到要求,综合考量测试时间及定量结果的准确性,本文选择ns为32。

3.4 内标及定量峰的选择

理想的内标应满足以下条件:(1)化学惰性不与样品反应;(2)非挥发性、稳定、溶于常规使用的NMR试剂;(3)内标的定量峰与待测样品的定量峰分离良好,分子量与待测样品接近等。待测样品及内标的定量峰均应选择不受其他信号干扰的孤立峰,若化合物中多个信号均符合上述条件,最好采用其积分面积之和,取其平均值作为结果以减小误差。处于不同化学环境的质子NMR弛豫时间不同,在qHNMR实验中,待测样品和内标最好选择处于相似化学环境的质子作为定量峰。由图3可知,右佐匹克隆位于 δ 8.54、8.38、8.12、7.78信号峰相对独立,

与1,3,5-三甲氧基苯位于 δ 6.08的信号均无重合。因此本文选定 δ 8.54(d, 1H)、8.38(d, 1H)、8.12

(dd, 1H)、7.78(s, 1H)为待测样品的定量峰, δ 6.08(s, 3H)为内标1,3,5-三甲氧基苯的定量峰。

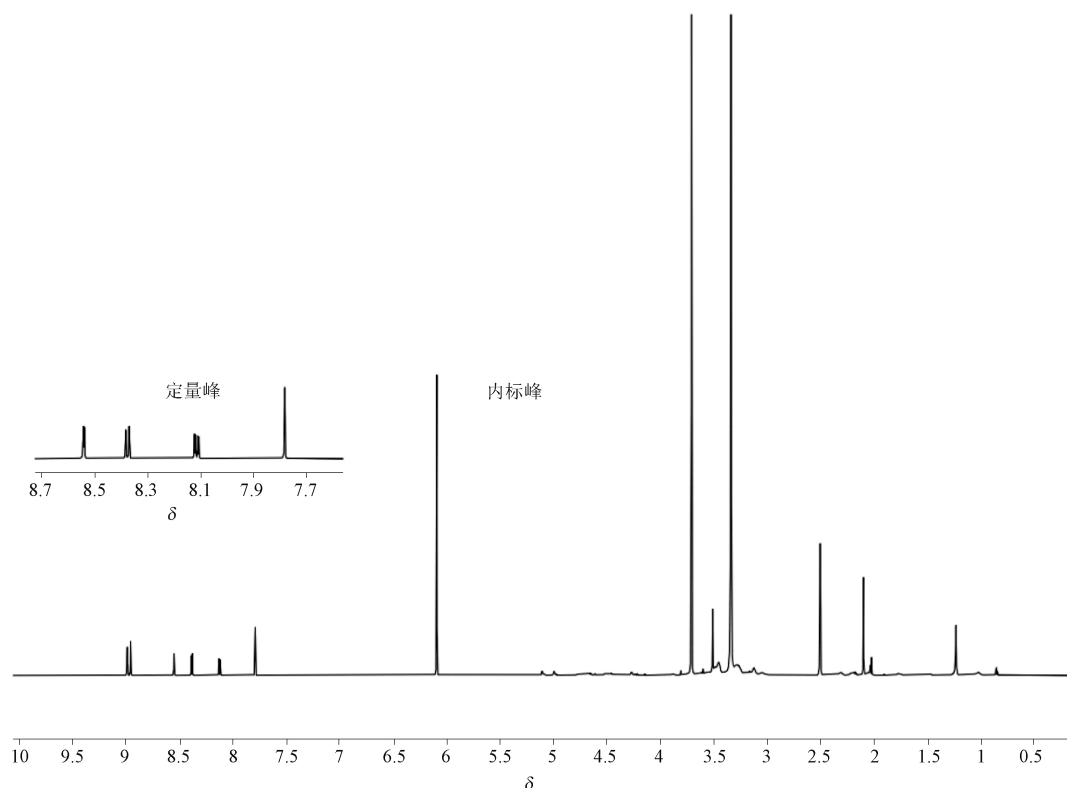


图3 右佐匹克隆和1,3,5-三甲氧基苯氢谱

Fig.3 ^1H -NMR spectra of Dexzopiclone and 1,3,5-trimethoxybenzene

3.5 qHNMR 的优势

HPLC 外标法所需实验时间长并且高度依赖标准品,而 qHNMR 则无需标准品,降低了对标准品依赖程度,对样品无破坏性,操作简便,重现性好等优点,已广泛用于药物的常量分析。在文献调研的过程发现各国药典尚未收载右佐匹克隆 qHNMR 含量测定方法也未见文献报道,故对其研究具有重要意义。本文基于 ^1H -NMR 技术,以1,3,5-三甲氧基苯为内标,DMSO- d_6 为溶剂,对氢核磁共振定量法进行了方法学研究,核磁定量方法的测定结果与HPLC 法基本一致,与药品说明书吻合。本文所建立的 qHNMR 方法操作简便,快速准确,不破坏样品,为右佐匹克隆含量测定提供了一种新的手段,也为其质量控制研究提供了实验依据。

参考文献

[1] 黄挺,王静羽,张伟,等. 近十年定量核磁共振法应用研究进

展[J]. 化学试剂,2023,45(6):123

HUANG T, WANG JY, ZHANG W, *et al.* Research progress in the application of quantitative nuclear magnetic resonance method in recent decade[J]. *Chem Reagents*, 2023, 45(6):123

[2] 张芬芬,沈文斌,徐开兵,等. 定量核磁共振氢谱测定新药替格瑞洛[J]. 波谱学杂志,2020,37(2):216

ZHANG FF, SHEN WB, XU KB, *et al.* A proton nuclear magnetic resonance method for quantitative analysis of ticagrelor [J]. *Chin J Magn Reson*, 2020, 37(2):216

[3] 卢爱民,蒋红梅,吕波,等. 核磁共振氢谱内标法测定饮料中咖啡因含量[J]. 南京农业大学学报,2014,37(6):119

LU AM, JIANG HM, LÜ B, *et al.* Quantitative determination of caffeine in beverages by ^1H -NMR with internal standard method [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2014, 37(6):119

[4] HOLZGRABE U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications [J]. *J Progr Nuclear Magn Reson Spectrosc*, 2010, 57(2):229

[5] 王瑾,陈忠兰,朱雪坤,等. 核磁共振氢谱法定性和定量分析伐地那非[J]. 药物分析杂志,2021,41(7):1272

WANG J, CHEN ZL, ZHU XK, *et al.* Qualitative and quantita-

- tive analysis of vardenafil by ^1H -NMR [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(7):1272
- [6] 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
- [7] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部[S] 2020:52
Ch P 2020. Vol IV[S]. 2020:52
- [8] 曹伶俐,杨宁辉,张智强. 氢核磁共振定量法测定盐酸伊托必利片含量[J]. *化学研究与应用*,2019,31(8):1548
CAO LL, YANG NH, ZHANG ZQ. Quantitative nuclear magnetic resonance to determine the content of itopride hydrochloride tables [J]. *Chem Res Appl*, 2019, 31(8):1548
- [9] 霍美娣,雷勇胜,蒋庆峰,等. 右佐匹克隆的波谱分析及结构确证[J]. *中南药学*,2017,15(1):39
HUO MD, LEI YS, JIANG QF, *et al.* Spectral analysis and structure identification of dexzopiclone [J]. *Cent South Pharm*,2017, 15(1):39
- [10] 刘惠军,吴丽红. 佐匹克隆原料及片剂有关物质的 HPLC 测定 [J]. *中国药理学杂志*,2008,43(12):954
- LIU HJ, WU LH. Determination of related substances of zopiclone and its tablets by HPLC [J]. *Chin Pharm J*, 2008, 43(12):954
- [11] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020:197
Ch P 2020. Vol II [S]. 2020:197
- [12] HOLZGRABE U, DEUBNER R, SCHOLLMAYER C, *et al.* Quantitative NMR spectroscopy – applications in drug analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5):806
- [13] 马晓丽,邹萍萍,雷伟,等. 定量核磁技术参数的优化及其在中草药定量分析领域的应用 [J]. *药学报*,2014,49(9):1248
MA XL, ZOU PP, LEI W, *et al.* Optimization of experimental parameters for quantitative NMR (qNMR) and its application in quantitative analysis of traditional chinese medicines [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(9):1248
- [14] 李铮,季加威,杜小伟,等. 款冬花及蜜款冬花 HPLC 特征图谱和一测多评分析方法建立和应用 [J]. *药物分析杂志*,2023,43(12):2053
LI Z, JI JW, DU XW, *et al.* Establishment and application of HPLC characteristic chromatogram and determination by QAMS for *Farfarae Flos* and *honeyed Farfarae Flos* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(12):2053

(本文于 2023 年 7 月 26 日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。