

^1H 定量核磁共振波谱法测定那红地那非的含量

冯玉飞, 黄海伟, 吴先富, 孙会敏

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] **目的:** 建立采用 ^1H 定量核磁共振(qNMR)波谱法测定那红地那非对照品的含量。**方法:** 在 ^1H qNMR 中, 使用 Bruker Ascend 600 超导核磁共振谱仪, 以氘代氯仿为溶剂, 采用 noesyigld1d 脉冲序列, 弛豫延迟时间为 30 s, 扫描次数 32 次。**结果:** 以那红地那非 $\delta 8.15$ 和 $\delta 9.14$ 的氢质子响应信号作为样品定量信号, 以 1,3,5-三甲氧基苯 $\delta 6.09$ 的氢质子响应信号作为内标物定量信号。样品 $\delta 8.15$ 与内标物 $\delta 6.09$ 信号响应面积比与质量比的线性回归方程为 $y = 0.1197x + 0.0034$, 相关系数为 0.9991, 重现性实验的 RSD 为 1.66% ($n = 5$), 重复性实验的 RSD 为 0.76%, 测得那红地那非的含量为 97.48%; 样品 $\delta 9.14$ 与内标物 $\delta 6.09$ 信号响应面积比与质量比的线性回归方程为: $y = 0.1168x + 0.0045$, 相关系数为 0.9991, 重现性实验的 RSD 为 1.69%, 重复性实验的 RSD 为 0.43%, 测得那红地那非的含量为 95.35%。 ^1H qNMR 法测得那红地那非的含量(两组响应信号测得的含量平均值)为 96.42%, 与质量平衡法结果(96.54%)以及 HPLC 外标一点法结果(97.07%)一致。**结论:** 本研究建立的核磁定量方法可用于那红地那非的含量测定, 该方法准确、快速, 并为质量平衡法对标准物质定值提供有力的佐证。

[关键词] ^1H 定量核磁共振波谱法; 含量测定; 标准物质; 内标法; 那红地那非

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)14-1478-04

Determination of noracetildenafil by ^1H qNMR

FENG Yu-fei, HUANG Hai-wei, WU Xian-fu, SUN Hui-min

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

[Abstract] **Objective:** To establish an ^1H quantitative nuclear magnetic resonance (^1H qNMR) method for determination of noracetildenafil. **Methods:** ^1H qNMR spectra were obtained in CDCl_3 by using Bruker Ascend 600 spectrometer with noesyigld1d pulse sequence, the relaxation delay time was 30 s, and 32 scans were recorded. **Results:** The signals $\delta 8.15$ and 9.14 of noracetildenafil and $\delta 6.09$ of 1,3,5-Trimethoxybenzene were used for quantitation. Linear regression of areas ratio (A_s/A_r) versus mass ratio (W_s/W_r) of $\delta 8.15$ and 6.09 yielded a correlation coefficient of 0.9991 and regression equation of $y = 0.1197x + 0.0034$, the replicability RSD was 1.66% ($n = 5$), the repeatability RSD was 0.76% ($n = 5$), and the determined content was 97.48%. Linear regression of areas ratio (A_s/A_r) versus mass ratio (W_s/W_r) at $\delta 9.14$ and 6.09 yielded a correlation coefficient of 0.9991 and regression equation of $y = 0.1168x + 0.0045$, the replicability RSD was 1.69% ($n = 5$), the repeatability RSD was 0.43% ($n = 5$), and the content of noracetildenafil was 95.35%. The result determined by ^1H qNMR method (96.42%) was consistent with the results by mass balance method (96.54%) and HPLC assay method (97.07%). **Conclusion:** The established ^1H qNMR method can be used for the quantitative determination of noracetildenafil. It is accurate and rapid and could be complementary with the mass balance method for the assay of reference substances.

[Key words] ^1H quantitative nuclear magnetic resonance; content assay; chemical reference standard; internal standard method; noracetildenafil

[作者简介] 冯玉飞, 女, 助理研究员, 研究方向: 药品质量控制和药品标准物质研究。联系电话: (010)67095510, E-mail: fengyf@nifdc.org.cn。共同第一作者: 黄海伟, 男, 副主任药师, 研究方向: 药品质量控制和标准物质研究。E-mail: huanghw@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 孙会敏, 男, 研究员, 研究方向: 药品质量控制和药品标准物质研究。E-mail: sunhm@nifdc.org.cn。吴先富, 男, 研究员, 研究方向: 药品质量控制和药品标准物质研究。E-mail: wuxf99@163.com。

核磁共振(NMR)波谱是一种基于特定原子核在外磁场中吸收了与其裂分能级间能量差相对应的射频场能量而产生共振现象的分析方法,在药物分析中有广泛应用。核磁共振波谱可提供活性化合物的分子结构信息,在此基础上,核磁共振定量(qNMR)分析利用分子特定集团的质子数与相应谱峰的峰面积之间的关系,还可以进行定量测定^[1]。由于此项技术具有无需使用对照品、测定速度快、准确度高等优点,各国药典均已收载该方法^[2-4],并广泛应用于药物质量控制领域^[5-7]。

那红地那非是吡唑并嘧啶酮类磷酸二酯酶5型(PED5)抑制剂,是声称缓解体力疲劳(抗疲劳)功能产品中可能非法添加的PDE5抑制剂之一^[8]。原国家食品药品监督管理局药品补充检验方法(2009030)补肾壮阳类中成药中PDE5型抑制剂的快速检测方法中收载了该物质。本研究采用所标定的那红地那非化学对照品进行了qNMR方法的建立与考察,对该标准物质的研制定值提供了强力的佐证。

材 料

1 仪器

Bruker Ascend 600型核磁共振波谱仪(布鲁克公司,5 mm PABBO探头,Topspin 4.0实验控制及数据处理软件);MSA6.6S-0CE0DM型电子天平(赛多利斯公司)。

2 样品和试剂

氘代氯仿(CDCl₃, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.,氘代度:99.8%,含0.03%四甲基硅烷);1,3,5-三甲氧基苯(中国食品药品检定研究院,含

量:99.9%),那红地那非(中国食品药品检定研究院,批号:520039-201902,含量:96.5%)。

方法与结果

1 供试品溶液制备

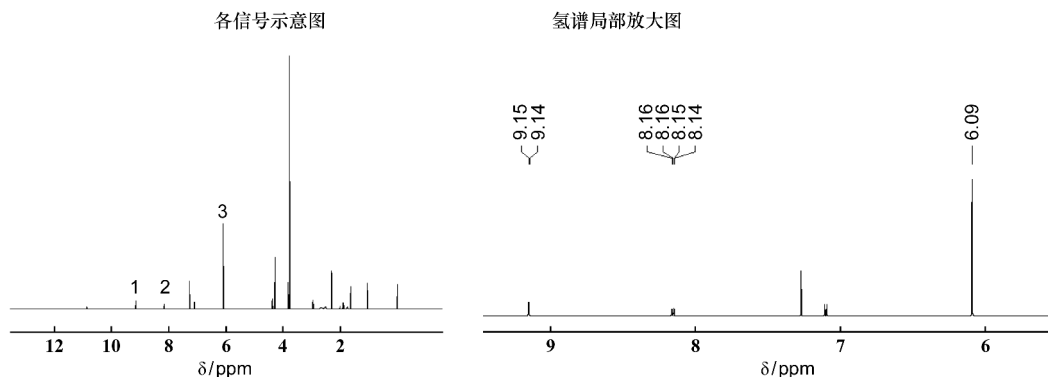
分别精密称取那红地那非约5.6~17.5 mg,内标物1,3,5-三甲氧基苯约2.5~3.0 mg,加入CDCl₃试剂约0.6 mL,振摇使其完全溶解,所得溶液转移至5 mm核磁管中备用。共制备5份样品溶液。

2 核磁仪器参数设置

采用Bruker标准方法noesyig1dld脉冲,在25℃下采集¹H-NMR谱。空扫次数4次,采样次数32次,采样点数64 K,采样时间3.60 s,接收器增益32,弛豫延迟时间30 s。

3 qNMR测定法

将采集得到的氢谱进行傅里叶变换,对得到的谱图进行X轴频率校准、相位校正和基线校正。选取内标物氢谱图中 δ 6.09为内标物的定量信号,选取那红地那非氢谱图中 δ 8.15和 δ 8.14为样品的定量信号,那红地那非样品及内标物的氢谱见图1和表1、那红地那非结构式见图2。对选定的信号进行积分,所有谱图采用相同积分区间,根据《中华人民共和国药典》四部附录,待测物含量的计算公式为 $m_s = \frac{(A_s/n_s) \times M_s \times W_r}{(A_r/n_r) \times M_r \times W_s} \times m_r$ 。式中: W_r , W_s 分别为内标物与样品的质量; M_r , M_s 分别为其分子量; m_r , m_s 分别为其质量百分含量; A_r , A_s 分别为内标物与样品中所选官能团信号的积分面积; n_r , n_s 分别为内标物与样品中所选官能团中的质子数。



1,2:样品的定量氢信号;3:内标的氢信号

图1 那红地那非及内标的氢谱图

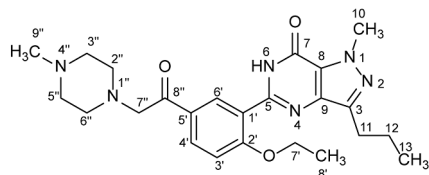


图2 那红地那非结构式

表1 那红地那非的氢谱解析

δ	H 个数	峰型	J/Hz	归属
10.89	1		—	6
9.14	1	d	2.30	6'
8.15	1	dd	8.75, 2.31	4'
7.10	1	d	8.80	3'
4.37	2	q	6.99	7'
4.28	3	s	—	10
3.81	2	s	—	7''
2.95	2	t	15.22	11
2.67	4	br	—	2'', 6''
2.51	4	br	—	3'', 5''
2.30	3	s	—	9''
1.89	2	m	7.57	12
1.63	3	t	6.98	8'
1.05	3	t	7.37	13

4 线性实验

平行制备供试溶液 5 份,按“2”项下条件进行测定,按“3”项下处理谱图并进行计算,以称取质量比值(W_s/W_r)为横坐标,信号面积比值(A_s/A_r)为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程: $\delta 8.15: y = 0.1197x + 0.0034, R = 0.9991$; $\delta 9.14: y = 0.1168x + 0.0045, R = 0.9991$ 。结果表明,样品称样量在 5.615 ~ 17.441 mg 范围内,样品与内标物质量比值在 2.0 ~ 6.1 范围内时,两者定量峰面积比值呈良好的线性关系。

5 重现性实验

平行制备供试溶液 5 份,按“2”项下条件进行测定,按“3”项下处理谱图并进行计算,结果见表 2。 $\delta 8.15$ 和 $\delta 9.14$ 的 RSD 分别为 1.66% 和 1.69%,显示该方法具有良好的重现性。

6 重复性实验

取同 1 份样品溶液反复测定 5 次,计算样品与内标物响应信号面积比值的相对标准偏差, $\delta 8.15$ 的测定结果为: 98.01%, 96.28%, 97.68%, 98.06%, 97.83%, RSD 为 0.76%; $\delta 9.14$ 的测定结果为: 95.72%, 94.75%, 95.31%, 95.75%, 95.48%, RSD 为 0.43%,显示该方法具有良好的重复性。

表2 含量测定结果

样品号	W_s/mg	W_r/mg	$\delta 8.15$		$\delta 9.14$	
			A_s/A_r	含量/%	A_s/A_r	含量/%
1	5.615	2.754	0.2501	98.92	0.2450	96.90
2	8.323	2.915	0.3478	98.23	0.3402	96.08
3	9.852	2.590	0.4599	97.50	0.4500	95.40
4	11.991	2.617	0.5383	94.74	0.5264	92.64
5	17.441	2.854	0.7427	98.01	0.7254	95.72
平均值				97.48		95.35
重现性 RSD/%				1.66		1.69

7 定量结果

平行配制 5 份供试溶液,按“2”项下条件进行测定,按“3”项下处理谱图并计算那红地那非的含量,结果见表 2,两组响应信号测得的含量平均值为 96.42%。

讨 论

1 内标物及溶剂的选择

内标物应具有较高的纯度,所含质子数较少,主要吸收峰与待测物的波谱信号之间无干扰,且不与

样品发生反应。本实验选择了 1,3,5-三甲氧基苯作为内标物,满足上述要求。溶剂通常选择溶解性好,溶解峰与待测物、内标物的波谱峰无干扰的溶剂,本研究选择 CDCl_3 , 满足上述要求。

2 内标物与待测物定量信号的选择

采用 NMR 技术对物质进行定量时,待测物和内标物通常会有多个信号。用于定量的内标物信号和样品信号应选择与其他响应信号完全分离,附近基线平坦,没有杂质信号的干扰。由于不同的响应信号所处位置不同,在定量时会有不同程度的偏差,

因此可选择多个质子信号进行测定,最后取平均值以减少偏差。根据上述要求,本研究选取了 1,3,5-三甲氧基苯苯环上的 δ 6.09 作为内标物定量信号,对于那红地那非,其苯环上有 δ 7.10, δ 8.15 和 δ 9.14 这 3 个氢信号,最后只选择了 δ 8.15 和 δ 9.14,这是因为本批化合物中氢信号 δ 7.10 附近有杂质干扰,因此放弃该信号。

3 与其他含量测定方法的比较

本品质量平衡法测得结果为 96.54%,高效液相含量测定结果为 97.07%。

取两组信号定量结果的平均值为最终结果。从结果可以看出,在本实验中,每个定量信号测定的结果与 2 种含量测定方法测得的结果一致。

4 D1 的选择

通过翻转恢复实验对所有的质子共振谱线的弛豫时间 T1 值分别进行测试,结果见表 3。据文献报道,在进行 qNMR 实验时,为了保证积分结果的准确性,弛豫延迟时间 D1 不应小于所选官能团 T1 的 5 倍^[9],最终 D1 值选定为 30 s,结果表明,该选择可以满足测量精度的要求。

表 3 各定量峰在 CDCl₃ 中的 T1 值

化合物	δ /ppm	T1/s
1,3,5-三甲氧基苯	6.09	4.40
那红地那非	8.15	1.814
	9.14	2.018

ICH 规定标准物质的定值方法为质量平衡法 (mass balance method) 又叫杂质扣除法,即从 100% 中减去与主成分结构类似杂质、水分、残留溶剂和不挥发性杂质的量^[10-15]。质量平衡法通常被认为具有很高准确度。其挑战是纯物质中含有标定者所未知的杂质或其分离方法无法对所有杂质进行有效分离,从而未能准确扣除所有杂质,就会出现量值不准确的情况。而核磁共振定量分析无需可溯源标准物

质,与质量平衡法对标准物质量值的研制原理不同,是质量平衡法研制标准物质的有力验证方法。

质量平衡法、¹H qNMR 法原理不同,可相互补充、相互佐证。本研究建立了测定那红地那非含量的核磁共振分析方法,此方法快速准确,与质量平衡法测定结果一致,是该品种标准物质量值标定的有力佐证方法。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2020:53.
- [2] The United States Pharmacopeial Convention. USP 43-NF 38[S]. 2020.
- [3] 日本厚生劳动省. JP[S]. 17. 2016:47.
- [4] 欧洲药典委员会. EP[S]. 10.0. 2020:58.
- [5] 刘静,冯玉飞,刘阳,等. 核磁共振技术在首批中药化学对照品研制中的应用[J]. 中国现代中药, 2022, 24(2): 298 - 303.
- [6] 刘阳,张才煜,栾琳,等. 氢核磁共振定量法在化学对照品定值中常见问题分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1923 - 1927.
- [7] 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 - 924.
- [8] 国家药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局办公室关于发布保健食品中可能非法添加的物质名单(第一批)的通知[EB/OL]. (2012-03-16)[2018-03-30]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL1975/227343.html>. Notice of the office of the state food and drug administration on the release of the list (first batch) of substances that may be illegally added to health food.
- [9] HOLZGRABE U, WAWER I, DIEHL B. NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis [M]. Oxford: Elsevier Science, 2008: 50.
- [10] WHO. WHO Technical Report Series[S]. 2007.
- [11] WHO. WHO Technical Reports Series No. 885 (Part A), General Guidelines for the Establishment, Maintenance and Distribution of Chemical Reference Substance[S]. 1999.
- [12] World Health Organization. Supplementary Part A(3.3), Evaluation of Chemical Reference Substance, International Pharmacopoeia. Vol 5[S]. 2003.
- [13] 陈忠兰,靳龙龙,徐翔雯,等. 核磁共振波谱法对维莫非尼的定性和定量分析[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(7): 747 - 751.
- [14] 田冶,崇小萌,刘颖,等. 盐酸伊达比星标准物质的研制[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(17): 1747 - 1751.
- [15] 刘倩,冯玉飞,蔡梦洁,等. 首批利伐沙班国家对照品的研制[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(6): 572 - 575.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-03-24