

用¹H 定量核磁共振法同时确定成盐化合物的 质量分数和各组分的比例^{*}

冯玉飞¹⁾ 马玲云¹⁾ 刘睿²⁾ 关皓月¹⁾ 刘倩¹⁾ 杨东升¹⁾ 牛剑钊^{1)†}

(1)中国食品药品检定研究院, 100050, 北京; (2)北京师范大学化学学院, 100875, 北京)

摘要 ¹H 定量核磁共振(¹H quantitative nuclear magnetic resonance, ¹H qNMR)方法具有操作简便、实验快速等优点, 本文通过该方法可准确测定富马酸丙酚替诺福韦在样品中的含量, 并给出丙酚替诺福韦和富马酸的比例, 结果与其他分析测试所得结果相符. 该方法以氘代二甲基亚砜(DMSO-*d*₆)为溶剂, 采集待测样品的核磁共振氢谱, 对比丙酚替诺福韦定量峰、富马酸定量峰与内标物响应峰面积, 分别计算丙酚替诺福韦和富马酸的质量分数. 富马酸丙酚替诺福韦和富马酸与内标物的质量比值在 0.91~1.24 范围内线性关系良好, ¹H qNMR 法测得二者质量分数分别为 100.06% 和 10.90%, 与质量平衡法测得的结果基本一致. 本研究建立的核磁共振定量方法不仅可准确、快速地测定丙酚替诺福韦和富马酸这 2 种成分的质量分数和比例, 还为多组分、成盐的化学原料药的比例确定、绝对含量测定提供参考.

关键词 ¹H 定量核磁共振波谱法; 富马酸丙酚替诺福韦; 质量平衡法; 原料药

中图分类号 R917

DOI: 10.12202/j.0476-0301.2022263

0 引言

慢性乙型肝炎(CHB)已成为我国病毒性肝病中发病比率较高的一种, 感染者约 8 000 万人, 其中 700 万例因终末期肝病和癌症的高风险急需治疗^[1]. 富马酸丙酚替诺福韦(tenofovir alafenamide fumarate, TAF)作为一种抗乙型肝炎病毒(HBV)药物, 是新型替诺福韦的前体药物, 通过改变亲脂结构, 具有更好的血浆稳定性和更强的肝脏靶向性, 应用较小的剂量就能达到所需的抗病毒效力, 明显降低了肾脏毒性反应程度及骨密度降低等副作用, 降低继发肾功能损伤的可能性. 它兼顾了疗效、安全性和耐药性^[2-6].

富马酸丙酚替诺福韦的品质控制关系到病人的生命健康, 该类药物对照品研制直接关系到该药物的安全性和有效性, 为富马酸丙酚替诺福韦的品质保驾护航.

目前对照品的赋值国际通用的定值方法是质量平衡法, 又称为杂质扣除法^[7]. 该方法的测定结果不仅易受到未知杂质的紫外吸收信号的干扰, 还需要扣除样品中水分、残留溶剂、炽灼残渣等因素的影响, 而且操作烦琐、费时、样品用量大, 在实验过程中不可避免地会产生系统误差^[8]. 因此, 找到一种不受外

界影响或者影响较小的绝对含量测定方法, 用于佐证质量平衡法的赋值结果或者是补充, 是十分有意义的.

核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)氢谱自问世以来, 在化合物结构解析、定性鉴别等方面得到诸多应用^[9-10]. 该方法仅与称样量和峰面积有关, 可实现样品的绝对定量, 即定量核磁共振(quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR)分析法^[11-13]. 此项技术具有无须使用对照品、测定速度快、准确度高等优点, 各国药典均已收录该方法^[14-16]. 尽管 qNMR 法可用于含量测定以及聚合物聚合度测定, 但由于种种原因, 药典中品种普及较少, 只有个别品种应用到 qNMR, 目前多见于对照品的研制^[17-21], 很少见到 qNMR 法“一法多测”的应用.

基于以上认知, 本文以富马酸丙酚替诺福韦的对照品研制为例, 运用 ¹H qNMR 技术, 实现快速、准确, 同时一法多测富马酸及丙酚替诺福韦的绝对含量, 并给出不同成分的比例. qNMR 法为多组分、成盐的化学原料药中各成分的快速、高效比例确定, 以及绝对含量的测定提供了参考.

1 材料

1.1 仪器 Bruker Ascend 600 型核磁共振波谱仪(布

^{*} 国家自然科学基金资助项目(21801020)

[†] 通信作者: 牛剑钊, 男, 汉族, 副主任药师, 研究方向: 药品质量控制与药物标准物质的研制. E-mail: njz@nifdc.org.cn

收稿日期: 2022-08-24

鲁克公司, 600 MHz), 5 mm PABBO 探头, Topspin 4.0 实验控制及数据处理软件; XPE206DR 型电子天平(梅特勒公司)。

1.2 试剂 氘代二甲基亚砜(DMSO-*d*₆, Cambridge Isotope Laboratories Inc., 批号: PR-30847/04309DM1, 含量: D, 99.9%, 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, 批号: 510137-201601, 含量: 99.9%); 富马酸丙酚替诺福韦(中国食品药品检定研究院自采)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 精心称取富马酸丙酚替诺福韦约 10~16 mg, 每份富马酸丙酚替诺福韦样品中加入内标物 1, 3, 5-三甲氧基苯约 10~13 mg, 加入 DMSO-*d*₆ 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。

2.2 ¹H NMR 图谱测定结果以及结构分析 以 DMSO-*d*₆ 为氘代试剂, 在 298 K 分别记录样品和内标物质的核磁共振氢谱。富马酸丙酚替诺福韦为丙酚替诺福韦与富马酸以 2:1 (物质的量之比) 的成盐(图 1), 在氢谱中分别对 2 个化合物的信号峰进行归属, 化合物氢信号归属结果如表 1 所示。

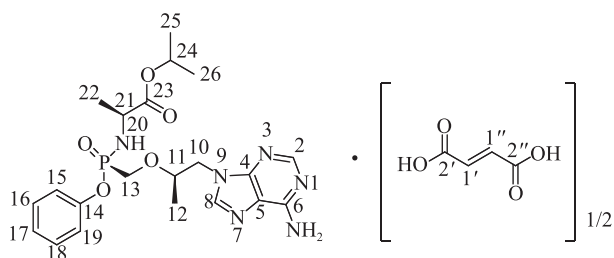


图 1 富马酸丙酚替诺福韦的结构式

2.3 定量峰的选择 富马酸丙酚替诺福韦及内标的核磁共振氢谱如图 2 所示。选择 $\delta(8.15)$ 与 $\delta(8.11)$ 为丙酚替诺福韦的定量信号, $\delta(6.63)$ 为富马酸的定量信号, 所选信号峰之间互不干扰。另外, 1, 3, 5-三甲氧基苯被选为内标物, 它不会与氘代试剂或富马酸丙酚替诺福韦反应。内标物在 $\delta(6.25)$ 产生一个单峰信号, 该信号峰与样品峰、溶剂峰分离良好, 信号强, 易于准确积分。

2.4 参数优化以及数据处理及计算方法 根据《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0441, 对核磁共振波谱仪的参数进行优化, 最终确定参数设置为: 采用 zg30 脉冲, 在 25 °C 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 2.73 s, 接收器增益 71.8, 弛豫延迟时间 30 s。

对选定的内标物定量信号和样品定量信号进行

表 1 富马酸丙酚替诺福韦的氢谱信号归属

$\delta/10^{-6}$	H 个数	峰型	J/Hz	归属
8.15	1	s	—	2
8.11	1	s	—	8
7.29	2	m	—	16, 18
7.20	1	s	—	6-NH
7.13	1	t	7.38	17
7.06	2	m	—	15, 19
6.63	2	s	—	1', 1''
5.61	1	dd	11.72, 10.52	20
4.85	1	m	—	24
4.28	1	dd	14.42, 3.73	10
4.15	1	dd	14.43, 6.61	10
3.95	1	m	—	11
3.87	2	m	—	21, 13
3.77	1	dd	13.33, 9.65	13
1.15	6	dd	6.27, 0.99	25, 26
1.14	3	d	7.20	22
1.07	3	d	6.24	12

积分, 所有谱图采用相同积分区间, 待测物质量分数的计算公式为

$$w_s = \frac{(A_s/n_s) \times M_s \times m_r}{(A_r/n_r) \times M_r \times m_s} \times w_r \quad (1)$$

式中: m_r 、 m_s 分别为内标物与样品的质量; M_r 、 M_s 分别为其相对分子质量; w_r 、 w_s 分别为其质量分数; 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。

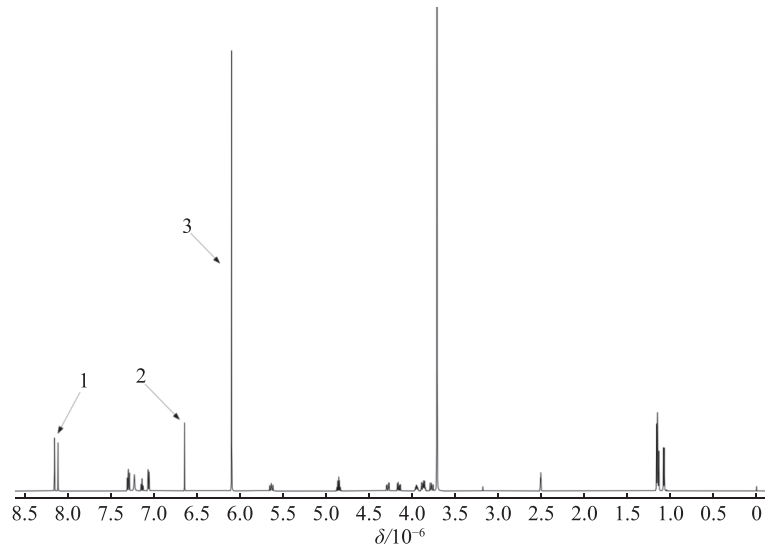
2.5 方法学验证

2.5.1 线性与范围 平行制备供试溶液 5 份, 依据 2.4 节采集并处理谱图进行计算, 以称取质量比值 (m_s/m_r) 为横坐标 x 、峰面积比值 (A_s/A_r) 为纵坐标 y 绘制标准曲线, 得到线性回归方程, 结果如表 2 所示。

2.5.2 精密度试验 取 1 份样品溶液反复测定 5 次, 依据 2.4 节采集并处理谱图进行计算, 以定量信号峰分别与内标物在 $\delta(6.25)$ 的信号峰的积分面积比值计算 RSD, 即为该定量信号面积的重复性。富马酸丙酚替诺福韦定量信号 $\delta(8.15)$ 与 $\delta(8.11)$ 的面积重复性为 0.17%; 富马酸定量信号 $\delta(6.63)$ 的积分面积重复性为 0.09%。显示该方法具有良好的重复性。

2.5.3 重现性试验 平行制备供试溶液 5 份, 依据 2.4 节采集数据并处理谱图, 计算结果见表 3。富马酸丙酚替诺福韦质量分数测定的重现性为 0.31%, 富马酸质量分数测定的重现性为 0.35%。显示该方法具有良好的重现性。

2.6 定量结果 平行配制 5 份供试溶液, 依据 2.4 节采集数据, 处理谱图, 并计算富马酸丙酚替诺



1 为丙酚替诺福韦的定量信号, 2 为富马酸的定量信号, 3 为内标物信号.

图 2 富马酸丙酚替诺福韦及内标物的氢谱示意

表 2 线性回归方程

$\delta/10^{-6}$	回归方程	r	线性范围
8.15, 8.11	$y = 0.212x - 0.0019$	0.9997	0.91~1.24
6.63	$y = 0.1078x - 0.0025$	0.9997	

福韦的质量分数, 结果如表 3 所示, 测得富马酸丙酚替诺福韦质量分数平均值为 100.06%, 丙酚替诺福韦和富马酸质量分数分别为 89.20%、10.90%, 证明丙酚替诺福韦和富马酸的物质的量之比为 2 : 1, 与理论值相一致.

表 3 富马酸丙酚替诺福韦及富马酸质量分数测定结果

样品号	m_s/mg	m_r/mg	$\delta(8.15, 8.11)$			$\delta(6.63)$	
			A_s/A_r	丙酚替诺福韦 质量分数/%	富马酸丙酚替诺福韦 质量分数/%	A_s/A_r	富马酸 质量分数/%
1	15.31	12.35	0.2610	89.38	100.26	0.1314	10.96
2	11.10	12.14	0.1915	88.91	99.74	0.0961	10.87
3	12.27	10.74	0.2395	88.99	99.83	0.1201	10.87
4	11.76	11.41	0.2175	89.58	100.49	0.1087	10.91
5	11.60	11.56	0.2107	89.14	99.99	0.1056	10.88
平均值				89.20	100.06		10.90
重现性/%				0.31	0.31		0.35

3 结果与讨论

3.1 样品定量峰分析 选用丙酚替诺福韦分子结构中 2 和 8 位的 2 个氢的信号和富马酸分子结构中 1' 和 1'' 的 2 个氢的信号作为定量信号, 进行定量核磁分析, 同时获得富马酸、丙酚替诺福韦绝对含量, 并确定富马酸丙酚替诺福韦的成盐比例. 为多组分、主成分杂质、盐等化学原料药的快速、高效比例确定、绝对含量测定提供了 qNMR 法“一法多测”范例.

3.2 弛豫时间分析 通过翻转恢复试验对所有的质子共振谱线的弛豫时间 t_1 值分别进行测试, 结果如表 4 所示. 在进行 qNMR 试验时, 为了保证积分结果

的准确性, 弛豫延迟时间选定为 30 s, 以满足测量精度的要求.

3.3 与质量平衡法结果比较分析 用质量平衡法 (mass balance method) 对富马酸丙酚替诺福韦对照品进行标定, 测得其质量分数为 99.27%. ^1H qNMR 法测得的值为 100.06%, 2 种方法的测定结果基本一致.

3.4 对于富马酸质量分数的分析 富马酸丙酚替诺福韦中富马酸的理论质量分数为 10.86%, 经离子色谱法测得富马酸的质量分数为 11.43%. ^1H qNMR 法测得富马酸的值为 10.90%, 与理论值、离子色谱法测定结果基本一致. 因此, qNMR 法可以给出富马酸丙酚替诺福韦中富马酸和丙酚替诺福韦的比例, 这进一

表4 各定量信号在DMSO-d₆中的t₁值

物质	$\delta/10^{-6}$	t ₁ /s
1, 3, 5-三甲氧基苯	6.09	2.937
丙酚替诺福韦	8.25	3.851
	8.11	5.342
富马酸	6.63	4.757

步凸显出该方法的优势, 相信未来该方法会得到长足发展, 更多品种的相关数据会被收录进入药典。

4 结束语

本研究建立了测定富马酸丙酚替诺福韦及富马酸质量分数的qNMR法, 以氘代二甲基亚砜(DMSO-d₆)为溶剂, 脉冲序列为zg30, 弛豫延迟时间为30 s, 扫描次数32次。选取NMR氢谱中 $\delta(6.25)$ 为内标物的响应信号, $\delta(8.15)$ 与 $\delta(8.11)$ 为丙酚替诺福韦的定量信号, $\delta(6.63)$ 为富马酸的定量信号, 测定了丙酚替诺福韦与富马酸的质量分数, 同时计算分析得出富马酸丙酚替诺福韦的质量分数以及二者比例。此方法快速简便可靠, 与质量平衡法测定结果一致。qNMR法用样量少, 操作简单, 在无对照品的情况下可以准确测定样品质量分数, 确定各组分比例, 未来会更多在药品品质控制领域得到应用。¹H qNMR法虽与质量平衡法原理不同, 但二者可相互补充, 相互佐证, 是对照品量值核验不可缺少的2种方法。

5 参考文献

- [1] 王明杰. 富马酸丙酚替诺福韦治疗慢性乙型肝炎的研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2022, 33(5): 668
- [2] 王素娜, 连建奇, 贾战生, 等. 富马酸丙酚替诺福韦治疗慢性乙型肝炎的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(8): 1828
- [3] 高彩杰, 刘建芬, 郭慧娟, 等. 富马酸丙酚替诺福韦片一种治疗慢性乙肝新药[J]. 临床合理用药, 2021, 14(2B): 176
- [4] AGARWAL K, BRUNETTO M, SETO W K, et al. 96 weeks treatment of tenofovir alafenamide vs. tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis B virus infection[J]. Journal of Hepatology, 2018, 68(4): 672
- [5] 陈好, 吕涛, 韩少伟, 等. 核苷(酸)类似物治疗应答不佳转为富马酸丙酚替诺福韦治疗慢性乙型肝炎患者的早期临床观察[J]. 新发传染病电子杂志, 2022, 7(2): 41
- [6] LIU X P, REN J, ZHANG Q W, et al. Synthesis of propofol and tenofovir fumarate[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Industry, 2019, 50(8): 863
- [7] 郑子繁, 刘卫晓, 金芑军, 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
- [8] 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
- [9] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版): 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 53
- [10] HOLZGRABE U, MALET-MARTINO M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification: the NMR approach[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 55(4): 679
- [11] HOLZGRABE U, MALET-MARTINO M. NMR spectroscopy in pharmaceutical and biomedical analysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 93: 1
- [12] BEYER T, DIEHL B, HOLZGRABE U. Quantitative NMR spectroscopy of biologically active substances and excipients[J]. Bioanal Rev, 2010, 2: 1
- [13] WANG Z F, YOU Y L, LI F F, et al. Research progress of NMR in natural product quantification[J]. Molecules, 2021, 26(20): 6308
- [14] 美国药典委员会. 美国药典 USP 43-NF 38[S/OL]. 2020[2022-08-20]. <http://www.usp.org>
- [15] 日本药局方编辑委员会. JP17[S]. [出版地不详]: 日本厚生省出版社, 2016: 47
- [16] 欧洲药典委员会. EP10.0[S]. [出版地不详]: 欧洲药品质量管理局, 2020: 58
- [17] 张才煜, 张娜, 何兰. 核磁共振内标法测定波生坦的含量[J]. 药学学报, 2014, 49(2): 249
- [18] 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
- [19] 刘阳, 白洁, 刘静, 等. ¹⁹F核磁共振定量技术测定泮托拉唑钠含量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1948
- [20] 李艺英. ¹H定量核磁共振内标法测定磷酸奥司他韦原料药含量[J]. 广东化工, 2020, 47(10): 145
- [21] 冯玉飞, 吴先富, 肖新月. ¹H定量核磁共振波谱法测定盐酸莫西沙星及其杂质7-氨基莫西沙星喹啉羧酸的含量[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(4): 357

Simultaneous determination of contents and ratio of salt-forming compounds by ^1H qNMR

FENG Yufei¹⁾ MA Lingyun¹⁾ LIU Rui²⁾ GUAN Haoyue¹⁾ LIU Qian¹⁾
YANG Dongsheng¹⁾ NIU Jianzhao¹⁾

(1) National Institute for Food and Drug Control, 100050, Beijing, China;

2) College of Chemistry, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China)

Abstract ^1H quantitative nuclear magnetic resonance (^1H qNMR) is an easy, fast analytical method. This method was used to simultaneously determine both contents and ratio of tenofovir alafenamide and fumarate in salt-forming drugs tenofovir alafenamide fumarate (TAF). ^1H NMR sample was prepared using deuterated dimethyl sulfoxide ($\text{DMSO-}d_6$) as solvent. Content of TAF and fumarate were calculated after comparison of peak integrations of sample with internal standard. A linear relationship was found between TAF and fumarate in the range of 0.91-1.24. Content of TAF and fumarate from ^1H qNMR was estimated to be 100.06 % and 10.90 %, respectively. These data were consistent with the mass balance method. This ^1H qNMR method provides accurate and rapid determination of ratio and absolute content of multi-component, salt-forming API.

Keywords ^1H quantitative nuclear magnetic resonance (^1H qNMR) method; tenofovir alafenamide fumarate (TAF); mass balance method; APIs

【责任编辑: 武 佳】