

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.023

氢核磁共振定量法测定伊立替康中间体含量*

毛联岗^{1,2},程青芳^{2△}

(1. 连云港杰瑞药业有限公司,江苏 连云港 222000; 2. 江苏海洋大学药学院,江苏 连云港 222005)

摘要:目的 建立测定伊立替康中间体盐酸1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶含量的氢核磁共振定量法。方法 试验条件:内标为盐酸吉西他滨,内标峰为盐酸吉西他滨 δ 7.99, δ 6.26, δ 6.21处质子峰,定量峰为待测物 δ 2.38处质子峰,溶剂为重水;测定温度为22℃,激发脉冲角度为30°,采样32次,脉冲延迟时间为20 s,脉冲宽度为9.42 μ s,采样时间为3.276 s,扫描宽度为10 000 Hz,线宽因子为0.3 Hz,观测频率为500.11 MHz。结果 待测样品和内标物质的量比在0.510 6~1.916 9范围内与待测样品和内标的峰面积比值线性关系良好($r=0.997\ 3$, $n=6$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于0.6%。氢核磁共振定量法测定的3批样品含量分别为98.38%, 98.19%, 98.25%,与质量平衡法结果的98.09%, 97.70%, 97.88%接近。结论 所建立的方法专属性良好,可用于测定盐酸1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶的含量。

关键词:氢核磁共振定量法;盐酸1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶;盐酸吉西他滨;含量测定

中图分类号:R917;R979.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)08-0092-04

Content Determination of Irinotecan Intermediate by Quantitative Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance

MAO Liangang^{1,2}, CHENG Qingfang²

(1. JARI Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang, Jiangsu, China 222000; 2. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu, China 222005)

Abstract: Objective To establish a quantitative hydrogen nuclear magnetic resonance (qNMR) method for the content determination of 1-chloroformyl-4-piperidinylpiperidine hydrochloride (an intermediate of irinotecan). **Methods** The test conditions were as follows: the internal standard substance was gemcitabine hydrochloride, the internal standard peak were proton peaks at δ 7.99, δ 6.26, and δ 6.21 of gemcitabine hydrochloride, and the quantitative peak was the proton peak at δ 2.38 of the sample to be tested, and the solvent was heavy water. The measured temperature was 22℃, the excitation pulse angle was 30°, the samples were taken 32 times, the pulse delay time was 20 s, and the pulse width was 9.42 μ s. The sampling time was 3.276 s, the scan width was 10 000 Hz, the linewidth factor was 0.3 Hz, and the observation frequency was 500.11 MHz. **Results** The amount of substance ratio of the sample to be tested and the internal standard substance had a good relationship with the peak area ratio of the sample to be tested and the internal standard substance in the range of 0.510 6-1.916 9 ($r=0.997\ 3$, $n=6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 0.6%. The contents of three batches of samples determined by qNMR were 98.38%, 98.19% and 98.25%, which were close to 98.09%, 97.70% and 97.88% of the results of the mass balance method. **Conclusion** The established method has good specificity, which can be used for the content determination of 1-chloroformyl-4-piperidinylpiperidine hydrochloride.

Key words: quantitative hydrogen nuclear magnetic resonance; 1-chloroformyl-4-piperidinylpiperidine hydrochloride; gemcitabine hydrochloride; content determination

*基金项目:江苏省连云港高新区科技项目[ZD201917]。

第一作者:毛联岗,男,高级工程师,研究方向为药物合成及质量控制,(电子信箱)718838263@qq.com。

△通信作者:程青芳,女,博士,教授,研究方向为药物合成及质量控制,(电子信箱)489417058@qq.com。

中国医药科技出版社,2020.

中国中医药现代远程教育,2019,17(22):112-114.

[5] 赵昕,邵尉,张鹏,等. 香苏胃痛胶囊质量标准研究[J]. 药学实践杂志,2018,36(3):265-269.

[10] 马粉利,曹金一,马亚东,等. 妇安胶囊质量标准薄层色谱法初步研究[J]. 海峡药学,2019,31(10):84-85.

[6] 张玉杰,李明春,梁延春,等. 参芪苓口服液薄层色谱鉴别[J]. 云南中医学院学报,2015,38(3):21-24.

[11] 陈惠玲,曾荣洁. 妇炎消胶囊质量标准的研究[J]. 中国药品标准,2014,15(4):272-275.

[7] 王雪彦,陈泽莲,宋毅. 参苓胃炎合剂中丹参的薄层鉴别[J]. 华西药学杂志,2013,28(6):643-644.

[12] 陈美红,陈建华,龙凤来. 八珍片的甘草薄层鉴别方法对比研究[J]. 产业与科技论坛,2017,16(24):72-73.

[8] 朱家红,陈贇,王影超,等. 胃炎宁颗粒质量标准研究[J]. 亚太传统医药,2019,15(6):93-96.

[13] 杨素红,胡玉良,王英晶. 尿石清合剂质量标准的研究[J]. 山西中医学院学报,2019,20(5):333-336.

[9] 方春雪,高梓漠,王法宇,等. 祛湿健脾颗粒薄层鉴别研究[J].

(收稿日期:2021-08-05;修回日期:2021-11-18)

盐酸伊立替康属半合成水溶性喜树碱类拓扑异构酶 I 抑制剂,主要用于治疗晚期大肠癌、小细胞肺癌、胃癌、宫颈癌等^[1-3]。文献报道的盐酸伊立替康的合成路线较多,代表工艺是通过盐酸 1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶和 7-乙基-10-羟喜树碱缩合生成伊立替康,再在水中与浓盐酸成盐^[4-6]。因此,盐酸 1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶是盐酸伊立替康合成过程中重要的中间体,其含量直接影响原料药的质量。由于盐酸 1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶结构不稳定,且紫外吸收很弱,目前尚无化合物的检测方法报道,制药企业中采用较多的是滴定法和气相色谱(GC)法。滴定法的突变终点较模糊,专属性差。GC 法测定时由于样品分子本身含有盐酸盐,沸点较高,汽化不完全,化学性质不稳定,且缺少标准对照品,导致测定结果欠准确。氢核磁共振定量法(qNMR)具有简便、快速、灵敏度高、应用范围广、不破坏样品、无需标准对照品等优点,广泛应用于医药、食品、化工等领域^[7-14]。目前,qNMR 法已作为一种测定药物绝对含量的方法先后被美国药典、英国药典、欧洲药典、日本药局方和中国药典等作为法定标准收录。本研究中在课题组前期工作^[15]的基础上对内标、核磁参数、氘代溶剂等因素进行考察,建立了测定盐酸 1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶含量的 qNMR 法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Bruker Avance III HD 型 500 MHz 核磁共振谱仪(Topspin 3.2 操作软件,瑞士 Bruker 公司);XS105 DU 型微量分析电子天平(感量为 0.01 mg,瑞士 Mettler Toledo 公司);Agilent 7890A 型气相色谱仪(美国 Agilent Technologies Inc. 公司)。

1.2 试药

1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶盐酸盐(连云港杰瑞药业有限公司,批号分别为 20200513,20190403,20190501,20190602);盐酸吉西他滨对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 100622-201903,含量 99.9%);氘代二甲基亚砜(DMSO-d₆,美国剑桥同位素实验室,氘代度为 99.8%);重水(D₂O,上海思域化工科技有限公司,氘代度为 99.9%)。

2 方法与结果

2.1 试验条件

采用 zg30 脉冲序列,测试 ¹H-NMR。参数设置,脉冲宽度(PW)9.42 μs;测定温度(T)22 ℃,激发脉冲角度(θ)30°,采样次数(NS)32 次,脉冲延迟时间(D₁)20 s,采样时间(AQ)3.276 8 s,扫描宽度(SW)10 000 Hz,时间

域数据点(TD)-209.5 ℃,线宽因子(LB)0.3 Hz,观测频率 500.11 MHz。

2.2 溶液制备

取待测样品 8.9 mg 和内标盐酸吉西他滨 10.0 mg,精密称定,置不同或同一离心管中,加入 0.6 mL D₂O,振荡溶解,即得供试品溶液和内标溶液,以及混合溶液。各平行制备 3 份。

2.3 数据处理

在上述试验条件下,调整仪器参数,匀场,采样。对得到的图谱采用手动方式进行基线校正、相位调整以及化学位移校正。校正后的图谱信号均为正信号,定量信号峰左右对称,基线平滑且向信号峰过渡自然,定量峰与该物质的其他峰积分比例较好。同一图谱,根据样品和内标定量峰的积分范围分别进行积分,各积分 3 次,当 RSD 小于 1% 时,取平均值。根据积分结果按如下绝对定量公式计算待测样品的含量。

$$\omega_s = [(A_s / n_s) \cdot M_s \cdot m_r] / [(A_r / n_r) \cdot M_r \cdot m_s] \cdot \omega_r$$

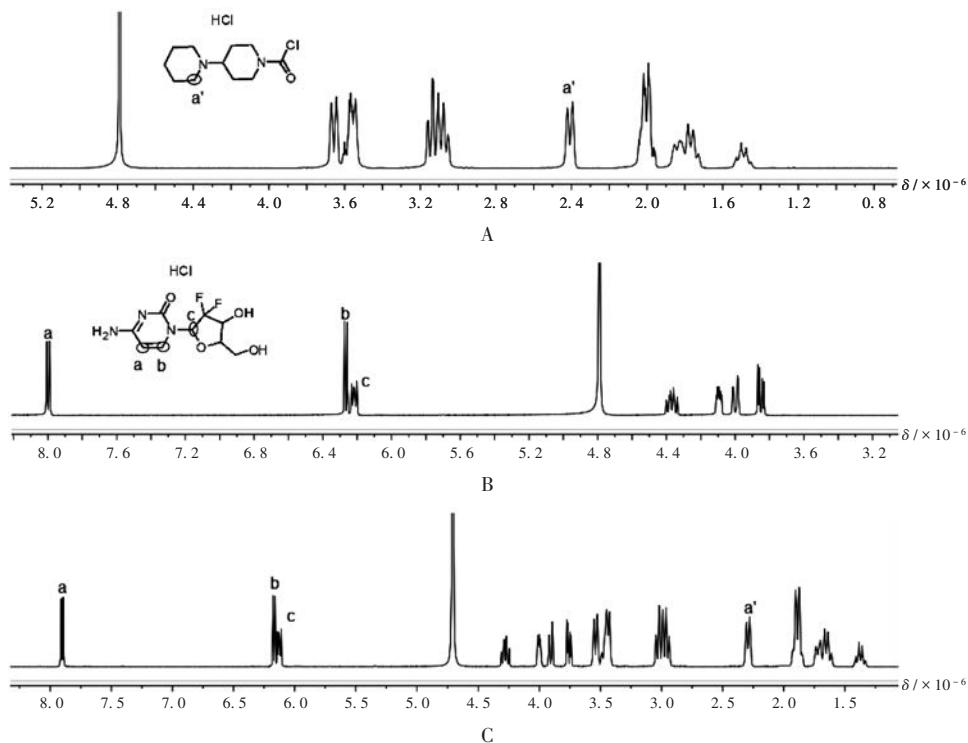
式中,A_s和 A_r分别为待测样品和内标定量峰的积分面积;n_s和 n_r分别为待测样品和内标定量峰包含的质子数;M_s和 M_r分别为待测样品和内标的相对分子质量;m_s和 m_r分别为待测样品和内标的质量;ω_s和 ω_r分别为被测样品和内标的含量。

2.4 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下供试品溶液、内标溶液及混合溶液各适量,按 2.1 项下试验条件进样测定,记录 ¹H-NMR 谱图。结果待测样品与内标的化学位移峰基本无重叠,定量峰能完全分离,互不干扰,表明该方法的专属性较好。详见图 1。

线性关系考察:在定量 ¹H-NMR 试验中,参数设置合理时,各质子吸收峰的面积与其包含的质子数目呈正相关。为进一步考察测试条件的影响,考察了待测样品的线性范围。分别称取待测样品 4.58, 9.10, 10.70, 12.48, 14.42, 17.16 mg,精密称定,置核磁管中,各加入内标 10.0 mg,按 2.1 项下试验条件进样测定,记录 ¹H-NMR 谱。以待测样品与内标的物质的量比(X, n_s/n_r)为横坐标,以待测样品与内标的峰面积比值(Y, A_s/A_r)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 Y=0.087 4X+0.052, r=0.997 3(n=6)。结果表明,待测样品与内标物质的量比在 0.510 6~1.916 9 范围内与待测样品与内标的峰面积比值线性关系良好。

精密度试验:取 2.2 项下供试品溶液,按 2.1 项下试验条件连续进样测定 6 次,记录 ¹H-NMR 谱并积分,计算定量峰与内标峰峰面积的比值。结果的 RSD 为 0.23%(n=6),表明方法精密度良好。



注:定量峰标记为a',a,b,c。

A. 供试品溶液 B. 内标溶液 C. 混合溶液

图1 代表性的氢核磁共振谱图

Note:Quantitative peaks are marked as a',a,b and c.

A. Test solution B. Internal standard solution C. Mixed solution

Fig.1 Representative ¹H-NMR spectra

稳定性试验:取供试品溶液(批号为20200513)适量,分别于室温下放置0,4,6,8,10,16,24 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录¹H-NMR谱并积分,计算定量峰与内标峰峰面积的比值。结果的RSD为0.53%(n=7),表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:称取样品(批号为20200513)适量,精密称定,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下试验条件进样测定,记录¹H-NMR谱并积分,计算定量峰与内标峰峰面积的比值及样品含量。结果的RSD为0.50%(n=6),表明方法重复性良好。

2.5 样品含量测定

取样品适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量,记录¹H-NMR谱并积分,计算定量峰与内标峰峰面积的比值及样品含量。以 δ 2.38(d,2H)处信号峰为待测样品的定量峰, δ 7.99(d,1H), δ 6.26(d,1H), δ 6.21(t,1H)处信号峰为内标的定量峰。结果见表1。

2.6 qNMR法与质量平衡法测定结果比较

采用企业的GC法测定样品(批号分别为20190403,20190501,20190602)中盐酸1-氯甲酰基-4-哌啶基

表1 样品含量测定结果(n=3)

Tab.1 Results of content determination of samples(n=3)

批号	编号	取样量(mg)		$A_s n_i / A_i n_s$	$\omega_s(\%)$	$\bar{X}(\%)$	RSD(%)
		m_s	m_i				
20190403	1	9.20	10.10	1.002 7	98.05		
	2	8.92	10.17	0.973 3	98.85	98.38	0.42
	3	8.99	10.08	0.983 6	98.24		
20190501	4	8.91	10.00	0.982 1	98.18		
	5	9.10	10.00	1.001 5	98.03	98.19	0.17
	6	9.00	10.40	0.955 7	98.37		
20190602	7	8.88	10.04	0.972 9	97.98		
	8	8.92	9.90	0.994 1	98.28	98.25	0.25
	9	8.94	10.03	0.985 4	98.48		

哌啶的含量,结果分别为98.41%,98.17%,98.39%,干燥失重法测定的结果分别为0.21%,0.29%,0.36%,炽灼残渣法测定的结果分别为0.11%,0.18%,0.15%。根据质量平衡法,1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶盐酸盐含量=(100%-干燥失重-炽灼残渣) $\times$ GC纯度,结果显示,质量平衡法测定3批样品中1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶盐酸盐含量分别为98.09%,97.70%,97.88%,与qNMR法测定的结果较接近。

3 讨论

3.1 内标物与氘代溶剂选择

待测样品的信号峰在 δ 1.3~3.7之间,选择盐酸吉西他滨为内标时,内标的信号峰在 δ 3.8~8之间,两者的信号峰基本无重叠;混合溶液谱图的化学位移峰峰形简单清晰且基本无重叠,达到核磁定量的要求。此外,待测样品和内标的相对分子质量较接近,称样量接近,可减少称量误差,能较好地满足定量要求。故选择盐酸吉西他滨为内标物。

核磁定量法测定样品含量的首要条件是待测样品和内标能在合适的氘代溶剂中具有良好的溶解性且其残留信号峰对定量峰无干扰。预试验中参考文献[15],以0.5 mL DMSO和0.5 mL D_2O 的混合物作为氘代溶剂,结果待测样品在该混合试剂中溶解性较差,需加热或超声才能使其完全溶解,这可能会影响测定结果;当采用0.6 mL D_2O 为溶剂时,发现待测物和内标物的溶解性均很好,且 D_2O 还能消除样品中活泼质子的干扰,保证了检测结果的准确性。故最终确定以0.6 mL D_2O 为氘代溶剂。

3.2 NMR 试验参数选择

脉冲延迟时间(D_1): D_1 是积分信号强度的主要影响因素之一。若 D_1 较短,则样品和内标中的质子无法完全弛豫,相应峰面积的比值会产生偏差,导致定量测定结果的误差。本研究中考察了 D_1 对结果的影响,将 D_1 分别设置为5 s, 10 s, 20 s, 40 s, 80 s进行NMR测定。结果表明,样品及内标定量峰的积分面积在 $D_1 = 20$ s后不再发生明显变化,故选择 D_1 为20 s。

采样次数(NS):NS增大,NMR信号信噪比(S/N)随之增大,试验时间也会延长。考察了NS对结果的影响,将NS分别设置为4, 8, 16, 32, 64, 128次进行NMR测定。结果表明,样品及内标定量峰的 S/N 在NS = 32后不再发生明显变化,故选择NS为32。

定量峰:定量峰的选择直接影响测定结果的准确性。待测样品在 δ 2.38处的峰为清晰的2个质子的二重峰,峰形简单、相对独立,与内标物的核磁信号峰无重叠,故选择 δ 2.38(d, 2H)处的峰为待测样品的定量峰。在内标物的核磁信号峰中,在 δ 7.99和 δ 6.26处的峰各为1个质子的清晰的二重峰,在 δ 6.21处的峰为清晰的1个质子的三重峰,一般选择定量峰的原则是峰形相近,包含质子数相近,信号无干扰。 δ 7.99(d, 1H), δ 6.26(d, 1H)这两组峰的峰形及包含的质子数均与待测样品的定量峰相近,且信号之间无干扰,可以选择这两组信号峰为内标的定量峰,但由于 δ 6.21(t, 1H)与 δ 6.26(d, 1H)处的峰峰形虽清晰,但峰位较接近,故为了尽可能消除干扰,将 δ 7.99(d, 1H), δ 6.26(d, 1H),

δ 6.21(t, 1H)处的3组信号峰选为内标的定量峰。

3.3 方法评价

本研究中建立的测定盐酸1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶含量的qNMR法以盐酸吉西他滨为内标,专属性强,线性关系、精密度、重复性、稳定性等均较好,分析效率较高。以该法测定的3批1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶盐酸盐含量结果均与质量平衡法接近。由于盐酸1-氯甲酰基-4-哌啶基哌啶具有紫外吸收弱和不稳定性等自身化学结构的特点,采用qNMR测定其含量可克服企业常规的滴定法和色谱含量测定法的缺陷并形成有效的补充,为建立盐酸伊立替康中间体的质量控制新方法提供参考。

参考文献

- [1] TAKIGUCHI Y, MORIYA T, ASAKA - AMANO Y, et al. Phase II study of weekly irinotecan and cisplatin for refractory or recurrent nonsmall cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2007, 58(2):253-259.
- [2] 孙晓东,岳树香,李建伟. 盐酸伊立替康临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2011, 20(14):79-80.
- [3] 马钰,胡静,刘宝瑞,等. 伊立替康的临床应用研究进展[J]. 肿瘤基础与临床, 2016, 29(6):541-545.
- [4] 马新荣. 盐酸伊立替康制备工艺与质量研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [5] 高河勇,冯琥,韩怡政. 一种伊立替康的化学半合成工艺: 中国, 200810032566. 7[P]. 2009-07-15.
- [6] 李玉艳,尤启冬,李志裕,等. 抗肿瘤新药伊立替康的合成研究[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(4):238-240.
- [7] 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.
- [8] 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):357-361.
- [9] 郭强胜,刘明珂,禹珊,等. 定量核磁共振法同时测定复合维生素B片中 B_1 、 B_2 、烟酰胺和泛酸钙[J]. 波谱学杂志, 2016, 33(3):442-451.
- [10] 张奉民,丁克鸿,陶文波. 定量核磁共振技术测定噻菌酯的含量[J]. 分析试验室, 2017, 36(2):150-153.
- [11] 胡敏,胡昌勤,刘文英. 核磁共振波谱法测定药物基准物质的绝对含量[J]. 分析化学, 2004, 32(4):451-455.
- [12] 李锡东,张伟,王卫华,等. 定量核磁共振法测定6种有机氯农药的纯度[J]. 分析试验室, 2016, 35(2):240-243.
- [13] 孙林林,张芬芬,沈文斌,等. 核磁共振法测定依帕利净含量[J]. 分析测试学报, 2016, 35(9):1157-1161.
- [14] 张友杰,刘小鹏. 药物核磁共振定量分析参数的研究[J]. 波谱学杂志, 2007, 24(3):289-295.
- [15] 张海霞,贺磊,李善金,等. 核磁共振定量法测定培美酮甲酯绝对含量[J]. 化学试剂, 2020, 42(8):967-970.

(收稿日期:2021-08-02;修回日期:2021-09-28)