

特约稿

定量核磁共振(QNMR)技术及其在 药学领域的应用进展

张芬芬¹, 蒋孟虹², 沈文斌³, 丁 娅¹

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 江苏 南京 210009)

(2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203)

(3. 中国药科大学药物科学研究院, 江苏 南京 210009)

[摘要] 定量核磁共振(Quantitative Nuclear Magnetic Resonance, QNMR)法操作简便, 不需要自身对照品即可进行含量测定, 准确度高, 定性与定量可同时进行, 在新药开发、药物的对照品研究、质量控制以及代谢组学等药学领域诸多方面具有显著优势。目前美国药典、英国药典、欧洲药典、日本药局方以及中国药典均已将该技术作为法定标准收载于附录中。本文综述了 QNMR 的原理、方法及近年来在药学领域的应用进展, 并对其应用前景进行了展望。

[关键词] 定量核磁共振, 新药开发, 质量控制, 代谢组学

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2014)02-0008-11

Progress in Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Technology in Pharmaceutical Applications

Zhang Fenfen¹, Jiang Menghong², Shen Wenbin³, Ding Ya¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

(2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

(3. Pharmaceutical Research Institute, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Due to the advantages of its feasibility, high accuracy, simultaneous qualitative and quantitative analysis, as well as the content determination without its own reference substance, Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) has been widely used in various pharmaceutical fields including development of new drug, research of pharmaceutical reference substance, quality control, and metabolomics. Nowadays, this technology has been adopted as the standard method by the United States Pharmacopeia, British Pharmacopeia, European Pharmacopeia, Japanese Pharmacopeia, and Chinese Pharmacopeia. This paper reviews the principles, methods and applications of QNMR and predicts its perspectives.

Key words: QNMR, development of new drug, quality control, metabolomics

自 1926 年 Pauli 发现了核磁共振(Nuclear Magnetic Resonance)现象以来,科学家及研究人员对于核磁共振技术的探索方兴未艾(图 1)。作为一门现代分析方法,核磁共振技术主要包括核磁共振光谱(NMR)、核磁共振成像(MRI)以及核磁共振探测(MRS)3 方面的应用。核磁共振光谱(NMR)在化合物的结构解析及确证中具有无可替代的地位,如今已广泛用于小分子及大分子(如蛋白)结构和浓度的测定。定量核磁共振技术(QNMR)集定性鉴别与定量测定于一体,与其他方法相比,不需自身对照品且可以大大简化和缩短样品前处理的步骤及时间。早在 1963 年,该技术已经用于化合物的纯度及制剂的含量测定^[1,2],由于当时磁场强度低、方法的重现性与准确度较差,未得到广泛应用。后来随着磁场强度的提高、超低温碳头的出现,其应用逐渐广泛。美国药典 19 版、英国药典 1975 年版、日本药局方 12 版和欧洲药典第五版分别将

收稿日期:2013-05-10。

通讯联系人:沈文斌,副研究员,研究方向:核磁共振。E-mail:cpunmrswb@163.com;丁娅,副教授,研究方向:纳米药物分析,有机光谱分析。E-mail:ayanju@163.com

QNMR 作为法定标准收载于附录中. 2000 年, 该技术被国际化学测量委员会 (Comité Consultatif pour la Quantité de Matière, CCQM) 定义为基本比例测定方法 (The primary ratio method of measurements)^[3]. 国内对于 QNMR 的研究和应用较晚, 中国药典 2010 版将该技术作为法定标准收载于附录中. 目前, QNMR 包括 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{19}F 、 ^{31}P 、 ^{14}N 、 ^{15}N -NMR 以及一些二维技术, 已应用于医药^[4]、化学^[5]、生物^[6]、食品^[7-10]、化工^[11]、农业^[12,13] 以及军事^[14,15] 等领域, 应用最广泛的是 ^1H -NMR, 其定量准确度可以达到或接近 HPLC 水平^[16]. 在药学中, 该技术已用于新药的研发^[17]、对照品研究、质量控制、代谢组学以及聚合物组成分析等方面. 本文综述了 QNMR 的原理、方法及其在药学中的应用进展, 并对其应用前景进行了展望.

1 定量核磁共振技术的原理

核磁共振图谱中, 共振谱线强度 (I_x) 与诱发核子个数 (N_x) 成正比, 即

$$I_x \propto N_x, \text{ 所以 } I_x = K_s \cdot N_x. \quad (1)$$

其中, K_s 为光谱常数 (spectrometer constant), 在同一次测定中, 所有激发原子的 K_s 均相同.

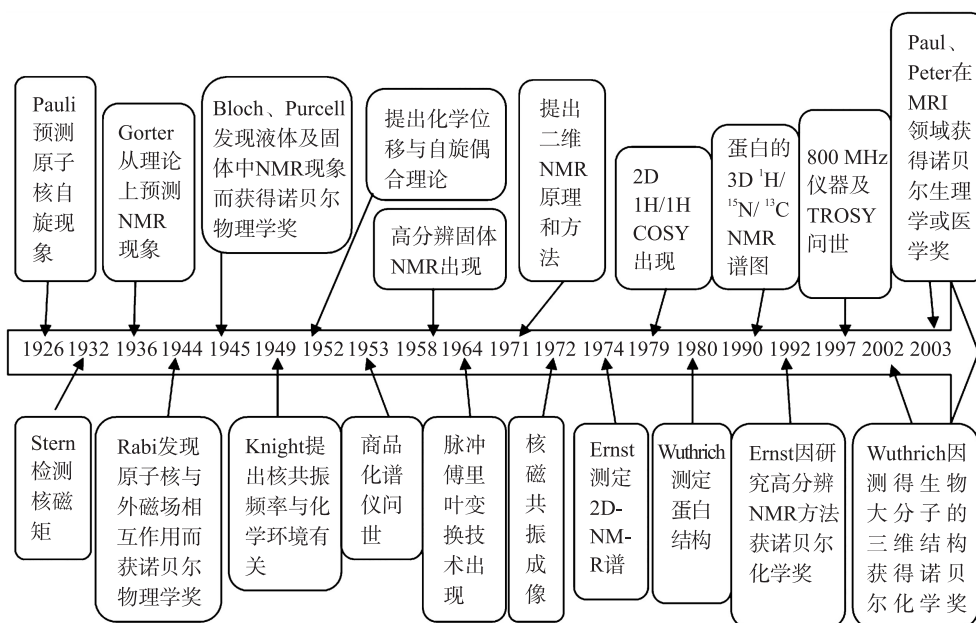


图 1 人们探索核磁共振技术的历程及重大突破

Fig. 1 Major events/discoveries that sparked the evolution of our ability to explore the nuclear magnetic resonance

2 定量方法

与常规滴定分析或色谱分析法不同, 定量核磁共振技术操作简便、不需引入校正因子, 定量公式计算相对简单. 目前常用的方法包括以下几种:

2.1 相对定量法

相对定量方法是 QNMR 中最简单的, 通过比较 2 种或 2 种以上成分特征峰的峰面积来确定含量, 公式如下:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x N_y}{I_y N_x}, \quad (2)$$

式中, n_x 、 n_y 、 I_x 、 I_y 、 N_x 、 N_y 分别为组分的摩尔数、积分的信号强度以及质子数.

2.2 绝对定量法

绝对定量法是以结构和含量已知的化合物为参照, 与待测物制成溶液进行测定, 通过比较两者的信号积分强度来确定待测物的含量, 公式如下:

$$P_x = \frac{I_x}{I_{\text{std}}} \frac{N_{\text{std}}}{N_x} \frac{M_x}{M_{\text{std}}} \frac{m_{\text{std}}}{m_x} P_{\text{std}}, \quad (3)$$

式中, P_x 、 P_{std} 分别为样品和参照物的纯度; m_x 、 m_{std} 为样品和参照物精密称取的质量; M_x 、 M_{std} 为样品和参照物的相对分子质量; 其余与式(2)相同。

2.2.1 内标法

以结构和含量已知的化合物作为内标, 与待测物制成混合溶液同时测定, 通过两者积分信号强度的比值确定待测物的含量, 是目前使用最多的一种方法。

2.2.2 外标法

当被测物与参照物无法共存时, 通常使用外标法: 用与毛细管共轴的特殊核磁管, 或者使用 2 根核磁管分别装待测物和参照物, 分步测定。适用于某些化学性质不稳定或者是有毒物质的测定^[18]。

2.2.3 标准添加法

将含量已知的系列浓度的化合物依次加入到待测物溶液中, 以峰面积对浓度作图, 从得到的标准曲线外推算出待测物浓度(如图 2 所示)^[19], 此法应用较少。

2.3 体内药物浓度测定的电信号参比法

1997 年, Barantin 和 Akoka^[20,21] 介绍了一种测定体内药物浓度的绝对定量法——体内药物浓度测定的电信号参比法 (Electronic Reference To access In vivo Concentrations, ERETIC), 该方法在碳头内设置一个游离线圈, 其在采样时可产生一种射频参比信号。通过完全控制该信号的振幅、相位及频率便可得到其准确的化学位移及积分值, 进而可以算出待测成分的含量。与内标法不同的是, 该信号必须单独积分, 并需要重新连接仪器并调整某些参数。此方法目前已在 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 及 2D NMR 中得到应用。

2.4 基于脉冲长度的浓度测定法

作为 ERETIC 方法的一种替代, 基于脉冲长度的浓度测定法 (pulse length based concentration determination, PULSE) 适用于蛋白的含量测定, 其不需内标也不需外标, 而是采用图谱中已知浓度的蛋白信号强度与待测蛋白信号强度相比较而算出。基本原理是相互作用原则, 如: NMR 信号与 90° 脉冲强度成反比, 将被测样品的探头调谐和匹配后, 即可测定 360° 的射频脉冲, 根据测参比蛋白的射频脉冲及质子的积分值便可测定未知蛋白的浓度, 但此法必需抑制水峰。Mo 等人将此法进行了优化, 使用“接收效率 (receiving efficiency)”来表征在最优条件下如何有效地从横向磁化体系中观察 NMR 信号^[22]。接收效率类似于紫外光谱中的消光系数, 如果保持接收机增益、激发角、样品容积恒定, 被接收效率校准的质子信号便与浓度成正比。这些技术目前还不适用于小分子的含量测定。

2.5 内标的选择

目前, QNMR 中应用最多的方法就是内标法。因此, 内标物 (internal standard, IS) 选择合适与否直接影响测定的结果。所选择的内标应该性质稳定、不与待测物反应、含量准确、纯度高、溶解性好、定量峰不与样品信号峰重叠等。对于某种特定化合物而言, 所选内标最好与其分子量相近以减小称量误差。常用的水溶性内标有邻苯二甲酸钾 (KHP); 脂溶性内标有四甲基对醌、苯甲酸、四氯硝基苯以及 3,5-二硝基苯甲酸; 二甲基亚砜 (DMSO) 和马来酸在水和有机溶剂中均可使用^[23]。另外, Torgny 等^[24] 研究了 25 种内标物质, 最终发现可以作为内标使用的只有 8 种, 分别是: 2,4,6-三碘苯酚、1,3,5-三氯-2-硝基苯、3,4,5-三氯吡啶、1,4-对硝基苯、2,3,5-三碘苯甲酸、对苯二甲酸二甲酯、马来酸以及延胡索酸。

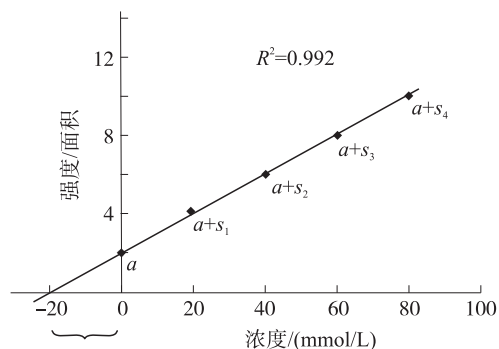


图 2 标准添加法定量图示: 利用外推法将标准曲线在 X 轴负半轴的交点即为待测样品的浓度。本曲线测定的是甘氨酸的浓度, “a” 为待测样品浓度, “a+s₁” 及其他浓度为连续加入待测样品的标准溶液后的浓度, 顺序依次为: $s_1 < s_2 < s_3 < s_4$, 此方法的定量不准确度 < 1%。甘氨酸的测定值和真实值分别为 20.07 mg/dL 和 20.00 mg/dL。

Fig. 2 Quantitative analysis by the standard-addition method. Extrapolation of the calibration curve gives the concentration of the analyte on the negative side of the X-axis. This curve was generated for quantitative analysis of glycine solution. Here, “a” represents the intensity due to the actual concentration of the test solution, “a+s₁” and other intensities are due to successive additions of standard solution to the test solution of the analyte. The concentration values of successive additions are as follows: $s_1 < s_2 < s_3 < s_4$. The quantitative inaccuracy of the method was found to be less than 1%. Calculated and actual concentrations of coded glycine solution were 20.07 mg/dL and 20.0 mg/dL, respectively.

新的研究发现也可不加内标物直接以溶剂中残留质子峰为定量峰进行测定^[25],适用于浓度较低样品的含量测定。

3 定量核磁共振技术在药学领域中的应用

3.1 新药开发早期阶段的应用

QNMR 技术分析速度快、操作简便、对样品无破坏性、不需自身对照品,特别适合于新药开发早期阶段反应过程监测、先导化合物的优化、高通量药物的筛选以及活性药物成分的纯度及含量测定。

3.1.1 反应过程监测

目前,新药的开发通常采用化学合成法,合成过程长,中间体及副产物较多。当合成的化合物及中间体紫外吸收较弱或无紫外吸收、难离子化、热不稳定时,难以用常规方法定量,QNMR 的优势便不言而喻。如 Nga 等^[26]以对氟苯甲酸为内标、二甲基亚砜(DMSO)为溶剂,采用¹H 和¹⁹F NMR 法监测某抗精神分裂症药物合成过程早期各中间体环戊二烯、环戊二烯氧化物及其氟化产物的原位含量(in situ potency),并将结果与气相(GC-FID)色谱测定值进行了比较。结果表明,由于产物的不稳定性,GC 测定值比 QNMR 法测定值低 15% (304 mg/g versus 344 mg/g),QNMR 法测定迅速、产物不经分离即可定量测定,更适用于此过程监测,也应适用于其他新药。

新药开发时合成的先导化合物通常较多,为了保证定量的准确性,图谱处理过程采用手动积分,比较费时。Liu 等^[27]采用外部校准光谱自动积分的方法,分析了 149 种不同化合物,并以手动积分测定值为横坐标、自动积分测定值为纵坐标进行了比较,结果表明其中有 129 种化合物两者测定值一致,该方法不需提前知道化合物的结构,适合于大规模的数据处理,快速省时,80% 情况下均可使用。

3.1.2 化合物的纯度检查

纯度和浓度是 2 个相互关联的概念,虽然 QNMR 测定化合物浓度的报道越来越多,但是很少有期刊接受其纯度测定结果,更多的纯度测定用元素分析或 HPLC。Mahajan 等^[28]就此问题进行了探讨,选择了 16 种结构不同的化合物,分别用 QNMR、元素分析、DSC 以及 HPLC 4 种方法进行了测定。结果表明:除松香酸外,其他 15 种化合物的 QNMR 测定值与其他几种方法高度一致,该方法快速、不需自身对照品、溶剂用量少,可视为绿色环保方法,应该被用于化合物纯度测定研究中。另外,Pauli 等^[29]指出,QNMR 也可用于生物活性天然产物的纯度分析。

3.1.3 药物活性成分的含量测定

化学合成的药物活性成分可以不需分离直接经 QNMR 测定,结果与传统含量测定无显著性差异,近年来这方面的报道越来越多^[30]。此外,QNMR 在天然产物的含量测定中的应用也日益增多。如 Ding 等^[31]用 ERETIC 法,检测延胡索中 5 种主要生物活性生物碱(小檗碱、黄连碱、药根碱、掌叶防己碱、表小檗碱)的含量。以真实值为横坐标、QNMR 测定值为纵坐标进行了线性回归,在 0.1 ~ 20.0 mmol/L 范围内,相对误差(δ) < 3.00%,在 1.0 ~ 20.0 mmol/L 浓度范围内,相对误差(δ) < 0.90%,其回收率分别为:89.94% ~ 97.72%、90.87% ~ 100.05%、98.35% ~ 100.57%、95.37% ~ 101.26% 和 93.18% ~ 98.00%,并对该方法进行了验证,结果表明该方法适用性广、准确、快速、重现性好,适用于其他传统中药的质量控制。Fan 等^[32]用¹H NMR 检测黄连中不同生物碱的含量后还用层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)对不同来源的黄连进行了区分。QNMR 用于天然产物含量测定可以简化样品前处理时间,不经分离即可同时测定多种组分,比色谱法更具有优势。

3.2 药物的质量控制

药物质量控制包括有效成分鉴别、杂质检查及药物活性成分的含量测定,QNMR 集定性鉴别与定量测定于一体,在药物质控中的应用日益广泛。

3.2.1 在各国药典中的应用

作为快速发展的现代分析方法,QNMR 已应用于药物的质量研究中。美国药典(USP)、英国药典(BP)、欧洲药典(EP)和日本药局方(JP)已将其作为法定标准收载于附录中,中国药典 2010 版也开始将其作为法定标准使用。2008 年,美国媒体报道百特公司生产的肝素钠引起死亡,随后发现其中含有类肝素样物质如过硫酸软骨素(OSCS)、硫酸皮肤素及糖胺,研究发现只有¹H NMR 能将其中杂质总量限制为 0.1% 以下。各国药典已

将 ^1H NMR 作为鉴别肝素钠的法定方法,以控制其杂质的限量(图 3~5 为本课题组从事肝素钠质量研究所做谱图).现在,越来越多的药品用 QNMR 技术作为质量控制的标准(如表 1 所示).

表 1 定量核磁共振技术在药典中的应用

Table 1 Applications of QNMR in pharmacopeias

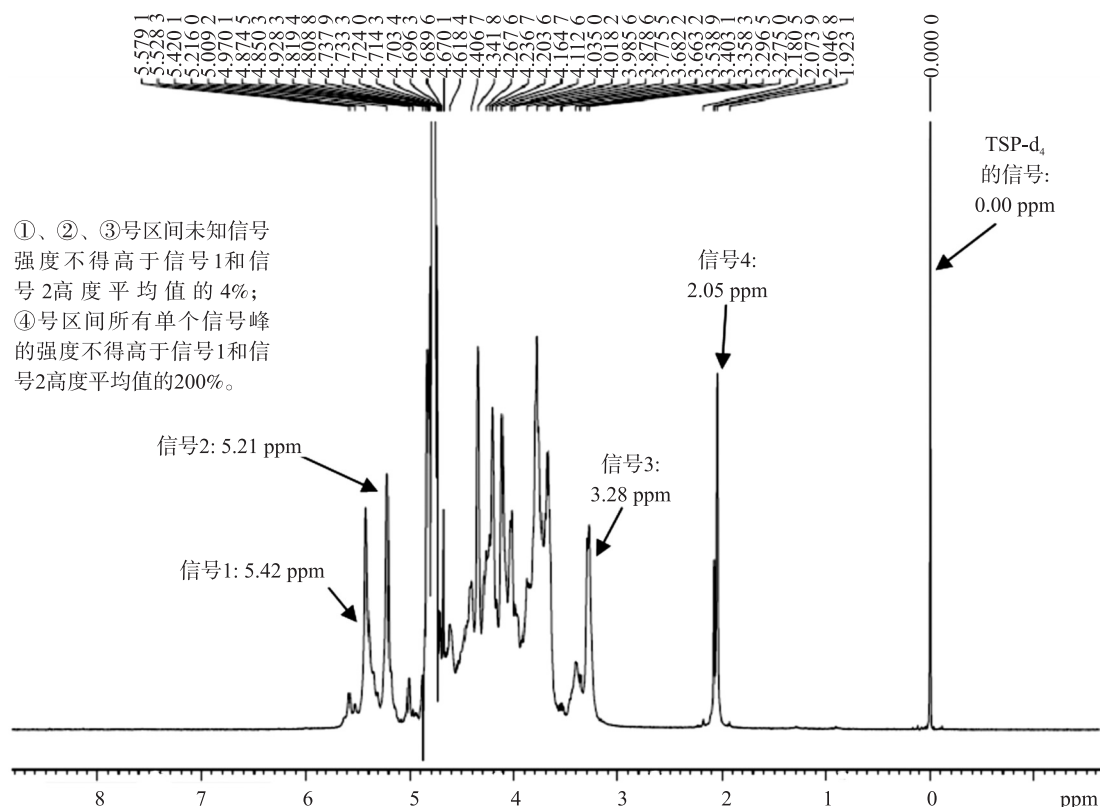
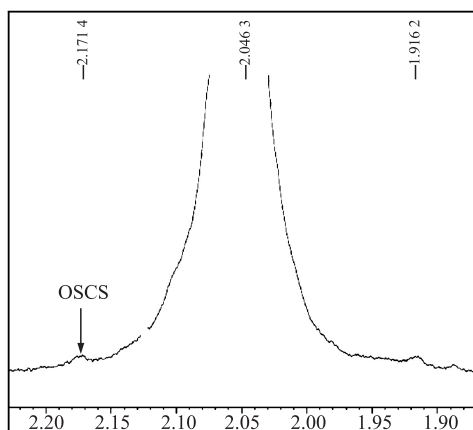
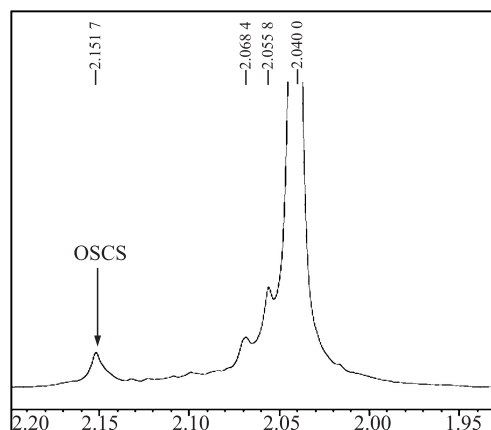
	药品名称	测试方法或项目
USP35-NF30	β -环糊精	取代含量测定
	泊洛沙姆	相对定量法测聚氧乙烯含量
	聚乙二醇-10-油醚	聚合物链长度测定
	聚乙二醇十六十八烷基醚	平均聚合物链长度测定
	亚硝酸异戊酯及其吸入剂	绝对定量法测其含量
	肝素钠	^1H 谱结构鉴别
	肝素钙	^1H 谱结构鉴别
BP2012	枸橼酸奥芬那君	相对定量法测异构体组成
	鲑鱼肝油	^{13}C 谱量计算脂肪酸中 $\beta(2)$ 酰基含量分布
	肝素钙	^1H 谱结构鉴别
	肝素钠	^1H 谱结构鉴别
	肝素(低分子量)	^{13}C 谱结构鉴别
	羟丙基- β -环糊精	^1H 谱计算摩尔取代度
	聚桂醇 400	^{13}C 谱测脂肪醇平均链长及环氧乙烷平均数目
	泊洛沙姆	^1H 谱计算氧丙烯与氧乙烯的比例
	鲑鱼油	^{13}C 谱量计算脂肪酸中 $\beta(2)$ 酰基含量分布
	羟丙基淀粉	^1H 谱计算羟丙基含量
EP7.0	肝素钠	^1H 谱结构鉴别
	肝素钙	^1H 谱结构鉴别
	肝素(低分子量)	^{13}C 谱结构鉴定
	b 型流感嗜血杆菌结合疫苗	^1H 谱鉴别 PRP(磷酸多核糖基核糖醇)
	鱼肝油	^{13}C 谱计算脂肪酸中 $\beta(2)$ 酰基含量分布
	戈舍瑞林	^{13}C 谱结构鉴定
	羟丙基- β -环糊精	^1H 谱计算摩尔取代度
	聚乙二醇单硬脂酸	^1H 、 ^{13}C 谱测脂肪醇平均链长及环氧乙烷平均数目
	泊洛沙姆	^1H 谱计算氧丙烯与氧乙烯的比例
	羟丙基淀粉	^1H 谱计算羟丙基含量
JP16	妥布霉素	NMR 结构鉴定
	多种头孢类药物	^1H 谱结构鉴别
	磷霉素钙水合物	^1H 谱结构鉴别
	磷霉素钠	^1H 谱结构鉴别
	肝素钠	^1H 谱结构鉴别
	肝素钙	^1H 谱结构鉴别
	阿普唑仑	^1H 谱结构鉴别
	罗他霉素	^1H 谱结构鉴别
	妥布霉素	^1H 谱结构鉴别

3.2.2 对照品的含量测定

对照品研究要求较高,其含量测定常用容量法、重量法、库伦法和同位素稀释质谱法. QNMR 具有不需自身对照品等优点,已被用于溯源性研究. 本课题组通过探索,以齐多夫定为内标, $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}=5:1$ 为溶剂,测定了无紫外吸收的标准物质 10-O-(N,N-二甲氨基乙基)-银杏内酯 B 甲磺酸盐的含量^[33]. 如图 7 所示,分别以标准物质的 H_9 、 H_{13} 和内标的 H_6 为定量峰,测得该物质的含量为 99.12%,RSD 为 0.16%,准确、快速. Nogueira^[34] 等以 ISO 34:2009 和 35:2005 为指导,采用质量平衡和 ^1H -NMR 技术开发了双氯芬酸钠的对照品,并进行了表征、稳定性研究及不确定性检查. 在此基础上进行了蒙特卡罗模拟以检测 ^1H -NMR 测定结果的不确定性. 结果表明:在 95% 的置信水平,该认定属性值和相应的不确定性为 $999.76 \pm 0.1 \text{ mg/g}$, ^1H -NMR 测定的纯度验证了质量平衡测定的结果. 另外, QNMR 也用于其他物质及各种抗生素类标准品的含量测定^[35,36],结果令人满意.

3.2.3 原料药的含量测定

化学原料药的含量及纯度高,特别适合用 QNMR 进行含量测定^[37]. 由于该技术操作及样品前处理简

图3 肝素钠的¹H NMR图谱Fig. 3 ¹H NMR spectrum of heparin sodium图4 合格肝素钠的¹H NMR图谱Fig. 4 ¹H NMR spectrum of qualified heparin sodium图5 不合格肝素钠的¹H NMR图谱Fig. 5 ¹H NMR spectrum of unqualified heparin sodium

单,也适合成分复杂的中药含量测定.如Zou等^[38]用¹H NMR技术以氘代氯仿为溶剂,异烟酰胺为内标,白鲜碱 δ 8.0~ δ 8.5的质子为定量峰,测定了传统中药白鲜皮中白鲜碱的含量.该方法的回收率为92.1%~108.1%,RSD<3%,定量限(LOQ)和检测限(LOD)分别为13.2 μ g/mL和3.3 μ g/mL. Moura等^[39]采用¹H NMR方法检测南美皮卡木中具有致幻剂N,N-二甲基色胺.以2,5-二甲氧基苯甲醛(DMBO)为内标,其中的2个甲氧基中的6个质子(δ 3.80、 δ 3.89)及N,N-二甲基色胺中2个甲基中的6个质子(δ 2.70)为定量峰,最终得到检测下限(LLOQ)为12.5 μ g/mL,批内精密度良好(RSD<5.1%).

虽有上述优点,但是QNMR也有其不足:对于结构类似物特别是化学位移相近的信号无法分离.如Wu等^[40]采用HPLC-PDA、QNMR以及HPLC-MS3种方法测定了牛樟菇野生果实体及人工产品中抗炎芳香化合物的含量并进行了验证和比较.结果发现,QNMR测定的结果比HPLC-MS高2.5倍.原因是某些结构类似的微量化合物使得待测物的积分值变大从而使测定结果偏高.因此,使用QNMR法定量时需排除

结构类似物的干扰或使用多种方法进行协作标定.

3.2.4 药物制剂的含量测定

测定药物制剂含量的方法很多,如滴定法、色谱法(HPLC、HPTLC、TLC、GC)、光谱法及各种联用技术(HPLC-MS、GC-MS),每种方法都有其自身的优势和不足^[17]. QNMR 具有不需自身对照品、测定时间短等多种优势,已经用于药物制剂的含量测定.如硫酸依替米星不具有紫外吸收,传统的含量测定需进行衍生化处理或采用联用技术等复杂操作,本课题组采用¹H QNMR 以对苯二酚为内标,加洛糖胺环氮甲基质子 H₇(δ 2.95,3H)与内标质子 H₂(δ 6.82,4H)为定量峰,测得注射液中依替米星的含量为 59.19%,RSD 为 0.24%,该法准确可靠,符合药典规定^[41]. Gadape 等^[42]以 DMSO 为溶剂,马来酸为内标, δ 8.20 和 δ 6.00 的信号峰为定量峰,测定了片剂中卡维地洛的含量,并对该方法进行了验证.结果表明:该方法的检测限(LOD)为 0.35mg/mL,定量下限和上限分别为 1.06 mg/mL,338.24 mg/0.60 mL,在检测限内该法的标准曲线线性良好($R^2 > 0.9980$),RSD<2%,其中的辅料无干扰.将此结果与 HPLC 测定值进行比较,两者无显著性差异.该方法准确、无破坏性,特别适用于市售卡维地洛的含量测定.除了片剂之外,QNMR 已用其他药物制剂的含量测定^[43-46],在药物质量控制中发挥了显著作用.

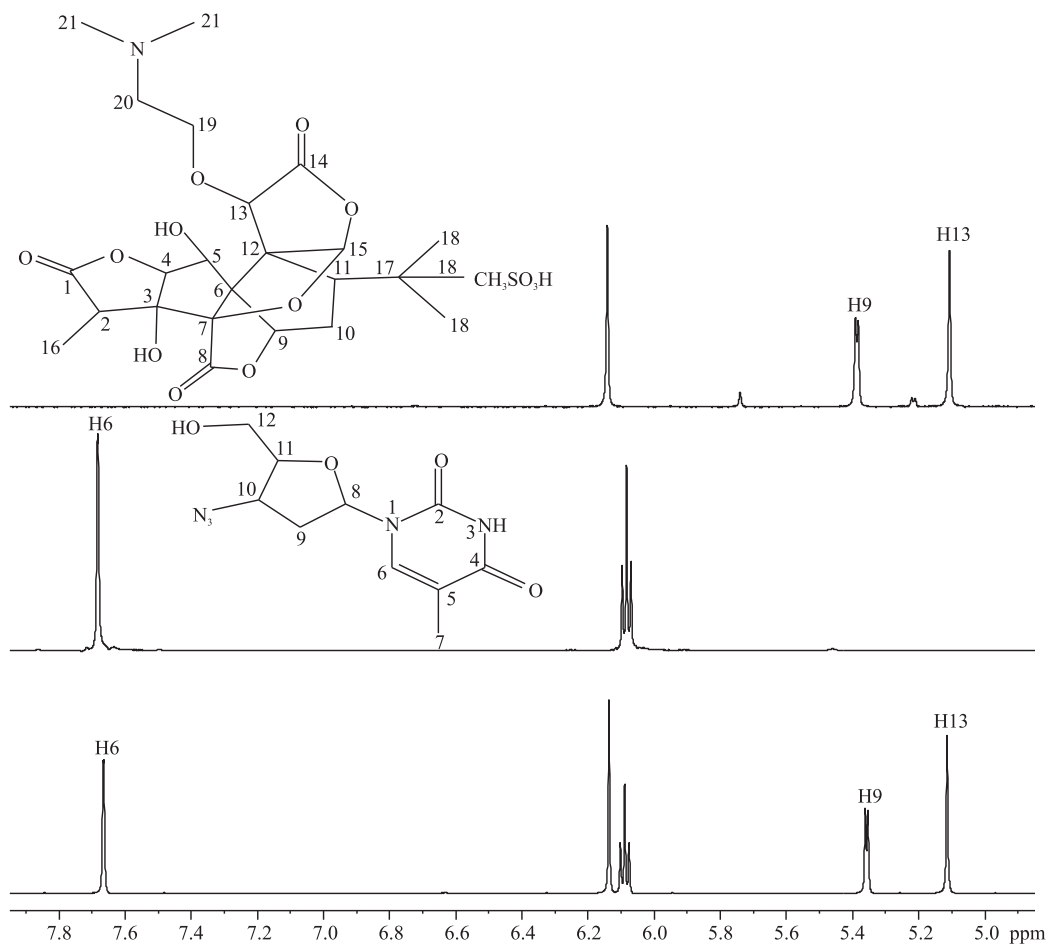


图 6 XQ-1H(A),内标(B)以及 XQ-1H 和内标(C)的¹H-NMR 图谱,H₉和 H₁₃为 XQ-1H 的定量峰,H₆为内标的定量峰

Fig. 6 ¹H-NMR of XQ-1H(A), internal standard(B), XQ-1H and IS mixed solution(C) H₉ and H₁₃: Quantitative peaks of XQ-1H H₆: Quantitative peak of IS

3.2.5 药物生产过程中的质量控制

药物生产过程对其质量也有很大影响,特别是反应和储存条件的改变通常会导致异构体或有关物质的产生,所以应严格监测生产过程中药物的质量. QNMR 技术以其独特的定性和定量能力特别适用于药物生产过程中的质控.如 Li 等^[47]以氘代氯仿为溶剂,采用常规 1D 和 2D NMR 技术鉴别了罗氟司特生产过程中一对异构体(P1、P2)的结构,并用 δ 7.6 ~ δ 8.1 的质子对其相对含量进行了测定,最终测得 P1 和 P2 的浓度比约为 1.8,此方法直接、省时、可靠,适用于生产过程中药物的质量控制及其优化.

3.2.6 药物的杂质检查

目前,药物中的杂质检查通常用 HPLC,但是与 QNMR 相比,其需要自身对照品及大量流动相并且操作时间长。QNMR 由于快速简单、不经分离即可同时测定多种组分,已广泛用于药物杂质检查。如 Ian 等^[48]用¹H、¹³C 和¹⁹F-NMR 技术,相互补充,鉴别并测定了 10 种乳膏及软膏中非法添加的皮质类固醇,发现 2 种乳膏中非法添加有此成分。其中深圳 999 中含有地塞米松-21-醋酸酯,含量为 0.09%;另一种药物百肤康中含有 1 种未知杂质,结合 Q-TOF-LC-MS 确证了此物质为醋酸曲安奈德 21-酯,并测得其含量为 0.11%。Ulrik 等^[49]综述了 QNMR 在药品杂质鉴定和定量的应用及优越性,指出 NMR 光谱特别适用于药物中伪品及杂质的质量控制。除此之外,QNMR 还可用于标准物质中残留溶剂的检查^[50],结果准确、令人满意。

3.3 在代谢组学中的应用

代谢组学涉及到的是药物在体内的原型或其代谢物,内源性干扰物质多且浓度低。目前,代谢组学中药物的定量多采用 LC-MSⁿ,而 QNMR 技术不需分离过程,定性与定量可同时完成,在代谢组学的应用越来越广。如 Gregory A 等^[51]综述了 QNMR 在生物样品及代谢组学中的应用,指出该技术在同位素富集^[52]及高通量筛选方面应用广泛。QNMR 技术还可以测定药物在体内的变化过程,测定各种代谢物的含量。如 Abdul 等^[53]体外模拟了人微粒体中高度代谢的某种药物,并对其代谢产物进行了鉴别和测定,有利于化学合成及药理学研究。

3.4 聚合物的组成分析

聚合物在药学中占有重要地位,分析聚合物中某种成分的组成较困难,通常采用高尖端且昂贵的技术如 X-射线光电子光谱(XPS)、二级离子串联飞行时间质谱(TOF-SIMS)、等温滴定量热法(ITC)或进行衍生化以及使用多种技术互补以得到定量信息。QNMR 技术操作简单、价格适中可直接检测聚合物中某成分的含量。如 Vincent 等^[54]采用¹⁹F-NMR 技术,以氙代氯仿为溶剂,三氟乙醇为内标,测定了通过光链接技术连接到炔聚乙二醇上的氟化苄胺(TagF₆)的量,以计算得到的量为横坐标,实际的量为纵坐标绘制了回归曲线,相关系数(R^2)为 0.98,并对该方法的准确性进行了检验。结果表明:该方法的回收率为 105%,定量下限和上限分别为 0.513 μmol 和 0.760 μmol ,TagF₆与炔聚乙二醇反应良好。如前文所述,该方法已被各国药典用于多种聚合物中摩尔取代度的计算,快速、简单、价格适中。

3.5 其他各种新技术

QNMR 发展迅速,除了常规的 1D、2D 谱外,近年来各种新技术如 DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) 高分辨 NMR^[55]等,扩大了其应用范围;¹H-MAS NMR^[56]技术可以提高固态 NMR 的准确度,但应用不广;还有人采用一些新算法如组合光谱序列或化学位移取代以简化样品谱图、提高准确性^[57,58];另外,有研究发现使用特殊的溶剂信号峰可以使方法的灵敏度达到纳摩尔级水^[59,60];各种联用技术的发展如 HPLC-NMR^[61,62]、CE-NMR^[63,64]等更促进了 QNMR 的应用。

4 结语

QNMR 技术集定性鉴别与定量测定于一体,在药学领域发挥着越来越重要的作用,具体而言具有以下优势:①比 HPLC 更准确精确;②混合物中杂质不需分离,简化了样品前处理时间;③内标通常易得;④测定迅速、操作简单、重现性好;⑤不破坏样品,试样可回收,更经济、环保;⑥不需自身对照品即可完成定量测定,特别适用于新药及对照品的研究;⑦可同时测定混合物中多种成分,应用普遍。但是该方法也有其自身的不足:①所测化合物的结构必须已知才能正确定量,不适用于未知样品;②无法区分结构类似物,所以定量峰必须与其他信号完全分离;③与其他方法相比,该方法的灵敏度较低,不适合痕量组分的含量测定。随着科技的发展及研究人员的不断努力,相信以上不足之处能够得以改进,QNMR 应该也将会成为一种主流方法用于各个领域。

[参考文献] (References)

- [1] Hollis D P. Quantitative analysis of aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures by nuclear magnetic resonance spectrometry [J]. Anal Chem, 1963, 35(11): 1 682-1 684.

- [2] Jungnickel J L, Forbes J W. Quantitative measurement of hydrogen types by integrated nuclear magnetic resonance intensities[J]. *Anal Chem*, 1963, 35(8): 938–942.
- [3] Holzgrabe U, Deubner R, Schollmayer C, et al. Quantitative NMR spectroscopy-applications in drug analysis[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5): 806–812.
- [4] Ulrike Holzgrabe. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical application[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010, 57(2): 229–240.
- [5] Vincenzo Rizzo, Vittorio Pinciroli. Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5): 851–857.
- [6] Lee Fielding. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2007, 51(4): 219–242.
- [7] Takashi Ohtsuki, Kyoko Sato, Naoki Sugimoto, et al. Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 734: 54–61.
- [8] Atsuko Tada, Kana Takahashi, Kyoko Ishizuki, et al. Absolute quantitation of styloside and rebaudioside A in commercial standards by quantitative NMR[J]. *Chem Pharm Bull*, 2013, 61(1): 33–38.
- [9] Marcone M F, Wang S, Albabish W, et al. Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology[J]. *Food Res Int*, 2013, 51: 729–747.
- [10] Carlo Siciliano, Emilia Belsito, Rosaria De Marco, et al. Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution ¹H NMR spectroscopy[J]. *Food Chem*, 2013, 136: 546–554.
- [11] Flores I S, Godinho M S, de Oliveira A E, et al. Discrimination of biodiesel blends with ¹H NMR spectroscopy and principal component analyses[J]. *Fuel*, 2012, 99: 40–44.
- [12] Bekiroglu S, Myrberg O, Östman K, et al. Validation of a quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in grapefruit seed extracts[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(4): 958–961.
- [13] Tahara M, Sugimoto N, Suematsu T, et al. Quality control of organophosphorus pesticide isoxathion oxon based on qNMR[J]. *Jpn J Food Chem Safety*, 2009, 16(1): 28–33.
- [14] Henderson T J. Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: purity determinations for military nerve agents[J]. *Anal Chem*, 2002, 74: 191–198.
- [15] Henderson T J, Cullinan D B. Purity analysis of hydrogen cyanide, cyanogen chloride and phosgene by quantitative ¹³C NMR spectroscopy[J]. *Magn Reson Chem*, 2007, 45: 954–961.
- [16] Malz F, Jancke H. Validation of quantitative NMR[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(5): 813–823.
- [17] Yu Xiaobo, Shen Wenbin, Xiang Bingren. Advances in application of quantitative nuclear magnetic resonance technique in pharmaceutical field[J]. *Prog Pharm Sci*, 2010, 34(1): 17–23.
- [18] Burton I W, Quilliam M A, Walter J A. Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products[J]. *Anal Chem*, 2005, 77: 3 123–3 131.
- [19] Santosh Kumar Bharti, Raja Roy. Quantitative ¹H NMR spectroscopy[J]. *Tren Anal Chem*, 2012, 35: 5–26.
- [20] Barantin L, Pape A L, Akoka S. A new method for absolute quantitation MRS metabolites[J]. *Magn Reson Med*, 1997, 38(2): 179–182.
- [21] Akoka S, Barantin L, Trierweiler M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method[J]. *Anal Chem*, 1999, 71(13): 2 554–2 557.
- [22] Mo H, Harwood J, Zhang S, et al. R: A quantitative measure of NMR signal receiving efficiency[J]. *J Magn Reson*, 2009, 200(2): 239–244.
- [23] Hellriegel C, Rück A. Certified Standards for Quantitative ¹H-NMR (qNMR) [S/OL]. *AnalytiX Volume 10 Article 2*, 2011: 9–11.
- [24] Rundlöf T, Mathiasson M, Bekiroglu S, et al. Survey and qualification of internal standards for quantification by ¹H NMR spectroscopy[J]. *Pharm Biomed Anal*, 2010, 52: 645–651.
- [25] Pierens G K, Carroll A R, Davis R A, et al. Determination of analyte concentration using the residual solvent resonance in ¹H NMR spectroscopy[J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 810–813.
- [26] Do N M, Olivier M A, Salisbury J J, et al. Application of quantitative ¹⁹F and ¹H NMR for reaction monitoring and in situ yield determinations for an early stage pharmaceutical candidate[J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 8 766–8 771.
- [27] Liu X, Kolpak M X, Wu J, et al. Automatic analysis of quantitative NMR data of pharmaceutical compound libraries[J]. *Anal*

- Chem,2012,84;6 914–6 918.
- [28] Shivani Mahajan, Inder Pal Singh. Determining and reporting purity of organic molecules: why qNMR⁺ [J]. Magn Reson Chem,2013,51;76–81.
- [29] Pauli G F, Chen S N, Friesen J B, et al. Analysis and purification of bioactive natural products: the AnaPurNa study [J]. J Nat Prod,2012,75:1 243–1 255.
- [30] Salema A A, Mossa H A, Barsoum B N. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for quantitative analysis of miconazole, metronidazole and sulfamethoxazole in pharmaceutical and urine samples [J]. Pharm Biomed Anal,2006,41;654–661.
- [31] Ding Peilan, Chen Liqin, Lu Yang, et al. Determination of protoberberine alkaloids in rhizoma coptidis by ERETIC ¹H NMR method [J]. Pharm Biomed Anal,2012,60;44–50.
- [32] Fan Gang, Zhang Mengying, Zhou Xiangdong, et al. Quality evaluation and species differentiation of Rhizoma coptidis by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Anal Chim Acta,2102,747;76–83.
- [33] 蒋孟虹,于小波,毛黎顺,等. 核磁共振法测定 10-O-(N,N-二甲氨基乙基)-银杏内酯 B 甲磺酸盐标准物质的含量 [J]. 中国药科大学学报,2013,44;339–342.
- Jiang Menghong, Yu Xiaobo, Mao Lishun, et al. Quantitative determination of 10-O-(N,N-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate by nuclear magnetic resonance [J]. J China Pharm Univ,2013,44(4):339–342. (in Chinese)
- [34] Nogueira R, Garrido B C, Borges R M, et al. Development of a new sodium diclofenac certified reference material using the mass balance approach and ¹H qNMR to determine the certified property value [J]. Eur J Pharm Sci,2013,48;502–513.
- [35] Shao G, Kautz R, Peng S. Calibration by NMR for quantitative analysis: p-Toluenesulfonic acid as a reference substance [J]. J Chromatogr A,2007,1 138;305–308.
- [36] Liu Shuyu, Hua Changqin. A comparative uncertainty study of the calibration of macrolide antibiotic reference standards using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance methods [J]. Anal Chim Acta,2007,602;114–121.
- [37] 朱咏梅,徐景士,袁建军,等. 核磁共振法测定盐酸大观霉素含量 [J]. 江西师范大学学报:自然科学版,2010,34(4):387–390.
- Zhu Yongmei, Xu Jingshi, Yuan Jianjun, et al. The determination of spectinomycin hydrochloride by NMR [J]. Journal of Jiangxi Normal University: Natural Science Edition,2010,34(4):387–390. (in Chinese)
- [38] Zou P, Tu P, Jiang Y. A simple and specific quantitative method for determination of dictamnine in Dictamni Cortex by ¹H NMR spectroscopy [J]. Anal Methods,2013,5(4):1 062–1 067.
- [39] Sidney Moura, Felipe Garcia Carvalho, Carolina Dizioli Rodrigues de Oliveira, et al. qNMR: an applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation [J]. Phytochem Lett,2010,3(2):79–83.
- [40] Wu T Y, Du Y C, Hsu Y M, et al. New approach to the characterization and quantification of Annonia cinnamomea benzenoid components utilizing HPLC-PDA, qNMR and HPLC-tandem MS: comparing the wild fruiting bodies and its artificial cultivated commercial products [J]. Food Res Int,2013,51(1):23–31.
- [41] 于小波,相秉仁,王国华,等. 核磁共振法测定硫酸依替米星含量 [J]. 中国抗生素杂志,2011,36(8):610–612.
- Yu Xiaobo, Xiang Bingren, Wang Guohua, et al. Quantitative determination of etimicin sulfate by nuclear magnetic resonance [J]. Chin J Antibiot,2011,36(8):610–612. (in Chinese)
- [42] Gadape H, Parikh K. Quantitative determination and validation of Carvedilol in pharmaceuticals using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Anal Methods,2011,3(10):2 341–2 347.
- [43] Sharma R, Gupta P K, Mazumder A, et al. A quantitative NMR protocol for the simultaneous analysis of atropine and obidoxime in parenteral injection devices [J]. Pharm Biomed Anal,2009,49(4):1 092–1 096.
- [44] Shamsipur M, Dastjerdi L S, Haghighi S, et al. Chiral selectors for enantioresolution and quantitation of the antidepressant drug fluoxetine in pharmaceutical formulations by ¹⁹F NMR spectroscopic method [J]. Anal Chim Acta,2007,601(1):130–138.
- [45] Salem A A, Mossa H A. Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry [J]. Talanta,2012,88;104–114.
- [46] 邓志威,李璟,许美凤,等. 核磁共振技术在药物分析鉴定中的应用 [J]. 分析测试学报,2012,31(9):1 081–1 088.
- Deng Zhiwei, Li Jing, Xu Meifeng, et al. Application of NMR techniques in pharmaceutical assay [J]. J Instrum Anal,2012,31(9):1 081–1 088. (in Chinese)
- [47] Li J, Geng Z F, Liu P, et al. NMR analysis of a pair of isomers [J]. Chinese Chem Lett,2012,23;1 181–1 184.
- [48] McEwen I, Elmsjö A, Lehnström A, et al. Screening of counterfeit corticosteroid in creams and ointments by NMR spectroscopy [J].

- Pharm Biomed Anal, 2012, 70: 245–250.
- [49] Holzgrabe U, Malet-Martino M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification—the NMR approach[J]. Pharm Biomed Anal, 2011, 55(4): 679–687.
- [50] 徐敏, 张皋, 王民昌, 等. 核磁共振法测定 RDX 标准物质中残余溶剂含量[J]. 光谱实验室, 2007, 24(6): 1 171–1 175.
Xu Min, Zhang Gao, Wang Minchang, et al. Determination of the remnant solvent in reference material of RDX by NMR[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2007, 24(6): 1 171–1 175. (in Chinese)
- [51] Barding Jr G A, Salditos R, Larive C K. Quantitative NMR for bioanalysis and metabolomics[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404(4): 1 165–1 179.
- [52] Korn M, Frank O, Hofmann T, et al. Development of stable isotope dilution assays for ochratoxin A in blood samples[J]. Anal Biochem, 2011, 419(2): 88–94.
- [53] Mutlib A, Espina R, Vishwanathan K, et al. Application of quantitative NMR in pharmacological evaluation of biologically generated metabolites: implications in drug discovery[J]. Drug Metab Dispos, 2011, 39(1): 106–116.
- [54] Pourcelle V, Le Duff C S, Freichels H, et al. Clickable PEG coujugate obtained by “clip” photochemistry: synthesis and characterization by quantitative ^{19}F NMR[J]. J Fluorine Chem, 2012, 140: 62–69.
- [55] Gresley A L, Kenny J, Cassar C, et al. The application of high resolution diffusion NMR to the analysis of manuka honey[J]. Food Chem, 2012, 135: 2 879–2 886.
- [56] Paul J, Hansen E W, Roots J. Application of single-pulse solid-state ^1H -MAS NMR to probe the oxidation products in crosslinked polyethylene: a detailed spectral analysis procedure[J]. Polym Degrad Stabi, 2013, 98: 408–415.
- [57] Liebeke M, Hao J, Ebbels T M D, et al. Combining spectral ordering with peak fitting for 1D NMR quantitative metabolomics[J]. Anal Chem, 2013, 85: 4 605–4 612.
- [58] Michaleas S, Antoniadou-Vyza E. A new approach to quantitative NMR: fluoroquinolones analysis by evaluating the chemical shift displacements[J]. Pharm Biomed Anal, 2006, 42(4): 405–410.
- [59] Dalisay D S, Molinski T F. NMR quantitation of natural products at the nanomole scale[J]. J Nat Prod, 2009, 72(4): 739–744.
- [60] Claridge T D W, Davies S G, Polywka M E C, et al. “Pure by NMR”? [J]. Org Lett, 2008, 10(23): 5 433–5 436.
- [61] Goulas V, Gomez-Caravaca A M, Exarchou V, et al. Exploring the antioxidant potential of teucrium polium extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection[J]. LWT-Food Sci Technol, 2012, 46(1): 104–109.
- [62] Staerk D, Kesting J R, Sairafianpour M, et al. Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC-PDA-MS-SPE-NMR: quinolinone alkaloids of haplophyllum acutifolium[J]. Phytochemistry, 2009, 70(8): 1 055–1 061.
- [63] Li Y, Lacey M E, Sweedler J V, et al. Spectral restoration from low signal-to-noise, distorted NMR signals: application to hyphenated capillary electrophoresis-NMR[J]. J Magn Reson, 2003, 162(1): 133–140.
- [64] Wolters A M, Jayawickrama D A, Larive C K, et al. Capillary isotachopheresis/NMR: extension to trace impurity analysis and improved instrumental coupling[J]. Anal Chem, 2002, 74(10): 2 306–2 313.

[责任编辑: 顾晓天]