

^1H 和 ^{19}F 核磁共振定量法测定塞来昔布含量

魏永鸽¹, 徐凯², 范明松^{3*} (1. 郑州铁路职业技术学院, 郑州 450052; 2. 黄河科技学院, 郑州 450005; 3. 上海雷允上药业有限公司, 上海 201401)

摘要: 目的 分别采用 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法测定塞来昔布绝对含量, 并将 2 种方法的测定结果与质量平衡法测定结果进行比较。方法 ^1H 核磁共振定量法以 CD_3OD 为溶剂, 塞来昔布 δ 6.92 处质子峰作为定量峰, 马来酸 δ 6.33 处为内标峰。在弛豫延迟时间 10 s, 采样时间 4.01 s, 扫描次数为 32 条件下采集混合物的氢谱。 ^{19}F 核磁共振定量法以 CD_3OD 为溶剂, 4-溴-2-氟-乙酰苯胺为内标, 在谱宽 240 ppm, 中心频率 -94.26 ppm, 样品扫描次数为 16 次条件下采集氟谱, 计算 ^1H 和 ^{19}F 核磁共振定量法的测试结果。结果 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法测定结果相近, 且与质量平衡法测定结果基本一致。结论 核磁共振定量法可以用来测定塞来昔布含量, 具有准确、高效的优点。

关键词: 塞来昔布; 含量测定; 氢核磁共振定量法; 氟核磁共振定量法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)16-1982-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.16.011

引用本文: 魏永鸽, 徐凯, 范明松. ^1H 和 ^{19}F 核磁共振定量法测定塞来昔布含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(16): 1982-1985.

Content Determination of Celecoxib by ^1H and ^{19}F Quantitative Nuclear Magnetic Resonance

WEI Yongge¹, XU Kai², FAN Mingsong^{3*} (1. Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou 450052, China; 2. Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450005, China; 3. Shanghai LeiYunShang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of celecoxib by ^1H quantitative nuclear magnetic resonance and ^{19}F quantitative nuclear magnetic resonance, and compare the results of the two methods of quantitative nuclear magnetic resonance with mass balance method. **METHODS** CD_3OD was employed as solvent, proton signal peaks of celecoxib at δ 6.92 and δ 6.33 of maleic acid were served as quantitative peaks and inner peak, respectively. The spectra of the mixture were collected at 10 s relaxation delay, 4.01 s acquisition time and 32 scanning times. In the ^{19}F quantitative fluorine nuclear magnetic resonance, CD_3OD was used as solvent, 4-bromo-2-fluoroacetanilide was employed as internal standard, the spectra were obtained with spectral width of 240 ppm, transmitter frequency offset was -94.26 ppm and the scanning times was 16. The results of ^1H quantitative nuclear magnetic resonance and ^{19}F quantitative nuclear magnetic resonance were calculated. **RESULTS** The results of ^1H quantitative nuclear magnetic resonance and ^{19}F quantitative nuclear magnetic resonance were very close, which were generally consistent with that of the mass balance method. **CONCLUSION** Quantitative nuclear magnetic resonance can be used for the quantitative determination of celecoxib with the superiority of accurate and effective.

KEYWORDS: celecoxib; content determination; ^1H quantitative nuclear magnetic resonance; ^{19}F quantitative nuclear magnetic resonance

塞来昔布是一种非甾体抗炎药, 化学名为 4-[5-(4-甲基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺, 由辉瑞制药公司和法玛西亚公司联合开发。主要用于急性疼痛、风湿性关节炎和骨关节炎、增强肿瘤细胞放射敏感性等^[1-2], 尤其对老年患者膝骨关节炎的康复治疗作用明显^[3]。塞来昔布的含量测定主要采用 HPLC^[4-6]。但流动相的 pH 值对色谱峰峰型和保留时间影响很大, 且分析时间较长^[6], 质量平衡法得出塞来昔布的绝对含量还需测定其水分、炽灼残渣、残留溶剂等。给塞来昔布合成

工艺优化带来较大困扰, 因此建立一种快速、准确的含量测定方法显得非常必要。

目前, 核磁共振定量法在欧洲、美国、中国等药典中均被收录。该法应用于原料药和制剂含量测定和质量控制已有大量报道^[7-14], 其最大优势是无需对照品即可准确完成含量测定。核磁共振定量法可准确定量药物含量的主要技术有 ^1H 核磁共振定量法^[7-11]和 ^{19}F 核磁共振定量法^[12]。本研究首次分别采用 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法分别测定塞来昔布的含量, 并将这 2 种核

作者简介: 魏永鸽, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0371)60867321
工程师 Tel: (021)51583466 E-mail: fanmingsong007@163.com

E-mail: weiyongge24@126.com *通信作者: 范明松, 男, 博士, 高级

磁共振定量法测定结果与质量平衡法的测定结果进行比较,为塞来昔布合成工艺优化提供一种便捷、准确的含量测定方法,也为暂无对照品的化合物含量测定提供一种新的参考方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

600 MHz ADVANCE III型核磁共振仪(配备超低温探头,Topspin 3.2 数据处理软件,瑞士 Bruker 公司);SX2-4-13 型箱式电阻炉(上海跃进医疗器械厂);915KFTi-touch 型卡氏水分仪(Metrohm 公司);1260 型高效液相色谱仪(Agilent 公司)。

1.2 材料

塞来昔布原料药(湖北零加一科技有限公司,批号:20180915,20180922,20181012,20190225,2190312,20190525);氘代甲醇(CD_3OD ,美国 Sigma 公司,批号:171107);马来酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:190015-201604;含量:99.2%);4-溴-2-氟-乙酰苯胺(TCI Chemicals 公司,批号:W180615;含量:98.6%);塞来昔布对照品(江苏盛迪医药科技有限公司,批号:20191011;含量:99.6%);乙腈(HPLC 级,德国默克公司);磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司,批号:20170525)。

2 方法与结果

2.1 测试条件

^1H 核磁共振定量法: CD_3OD 作为溶剂,采用 zg30 脉冲序列,测定温度为 298 K,弛豫时间(D1)为 10 s,采集时间(AQ)为 4.01 s,脉冲宽度(P1)9.54 s,射频中心频率(O1P)设置为 6.62 ppm,样品空扫次数(DS)为 2 次,样品扫描次数(NS)为 32 次。

^{19}F 核磁共振定量法: CD_3OD 作为溶剂,采用 zgfhgqn.2 脉冲序列,测定温度为 298 K,谱宽(SW)为 240 ppm,时间 D1 10 s,时间 AQ 5.24 s,中心频率(O1P)-94.26 ppm,样品空扫(DS)为 4 次,样品扫描次数(NS)为 16 次。

2.2 供试品溶液的配制

精密称取塞来昔布原料药 25.0 mg 和马来酸 10.0 mg 置于离心管中,加入 2 mL 的 CD_3OD 并混匀,即得 ^1H 核磁共振定量法用的供试品溶液。吸取 0.5 mL 至核磁管中,待测。

精密称取塞来昔布原料药 10.0 mg 和 4-溴-2-氟-乙酰苯胺 20.0 mg,加入 2 mL 的 CD_3OD 并混匀,即得 ^{19}F 核磁共振定量法用的供试品溶液。吸

取 0.5 mL 至核磁管中,待测。

2.3 2 种核磁共振定量法的计算

计算公式:

$$\text{含量}(\%) = (A_s/n_s \times M_s \times m_r) / (A_r/n_r \times M_r \times m_s) \times W_r$$

式中: A_s 为塞来昔布 ^1H 或 ^{19}F 定量峰的积分面积; n_s 为塞来昔布定量峰代表原子数; M_s 为塞来昔布分子量; m_s 为塞来昔布称样量; A_r 为内标峰(马来酸或 4-溴-2-氟-乙酰苯胺)的积分面积; n_r 为内标峰所代表的原子数; M_r 代表内标分子量; m_r 代表内标质量; W_r 为内标的百分含量。

2.4 色谱条件

色谱柱:Zorbax SB-Phenyl(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长:216 nm;流动相:乙腈-0.25% 磷酸二氢钾溶液(稀磷酸调节 pH 值至 3.0)(60:40);柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL·min $^{-1}$ 。

2.5 塞来昔布定性与方法学验证

2.5.1 核磁定性分析结果 ^1H -NMR 图谱结果见图 1B。 ^1H -NMR(600 MHz, CD_3OD): δ 8.02~7.89 (t, 2H), δ 7.44~7.55(d, 2H), δ 7.05~7.25(m, 4H), δ 6.92(s, 1H), δ 2.36(s, 3H)。由于 CD_3OD 的质子交换作用,分子结构中的 $-\text{NH}_2$ 的 2 个活泼氢未在 ^1H -NMR 显示出来。综上, ^1H -NMR 图谱与塞来昔布分子结构相符。

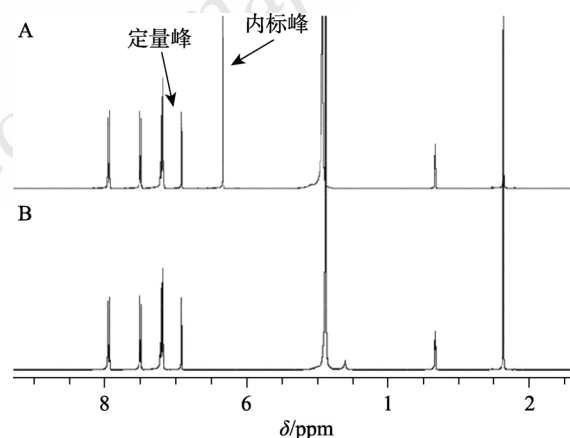


图 1 塞来昔布 ^1H 核磁共振定量法谱图(A)与 ^1H -NMR(B)
Fig. 1 Spectrum of ^1H quantitative nuclear magnetic resonance(A) and ^1H -NMR(B) of celecoxib

2.5.2 专属性考察 本研究中, ^1H 核磁共振定量法以 CD_3OD 为溶剂,消除了 $-\text{NH}_2$ 活泼氢对图谱中基线的影响。据报道^[13],塞来昔布的主要杂质为 4-[3-(4-甲基)-5-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺,与塞来昔布结构式的区别在于吡唑环上苯磺酰胺取代基位置不同,从而导致吡唑环上氢(定量峰)的化学位移存在一定差别,不干扰塞来昔布

定量峰。中间体及副反应杂质均未在定量峰 δ 6.92 处出峰, 且该处为一峰型尖锐的单峰, 故选为 ^1H 核磁共振定量法的定量峰。内标物质马来酸未改变塞来昔布质子峰的化学位移及峰裂分, 见图 1A, 判断马来酸未与塞来昔布发生化学反应, 是一种化学惰性物质, 且马来酸在 δ 6.33 也是峰型尖锐的单峰, 故选为内标峰。定量峰与内标峰完全分离, 互不干扰, 专属性较高。

^{19}F 核磁共振定量法选用 4-溴-2-氟-乙酰苯胺为内标物质。内标物质和塞来昔布的 ^{19}F 化学位移 δ 分别为 -124.71 ppm 和 -63.80 ppm, 定量峰与内标峰也完全分离, 互不干扰, 专属性较高, 见图 2。

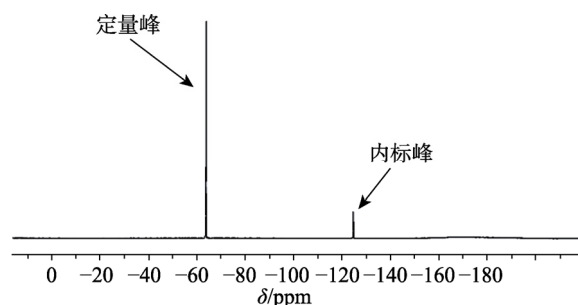


图2 塞来昔布与4-溴-2-氟-乙酰苯胺混合物的 ^{19}F 核磁共振定量法图谱

Fig. 2 ^{19}F quantitative nuclear magnetic resonance spectrum of the mixture of celecoxib and 4-bromo-2-fluoroacetanilide

2.5.3 线性考察 所用内标物质均经过干燥处理。精密称取马来酸内标物质 25.84 mg 转移至 25 mL 量瓶中, 加入 CD_3OD 溶解后定容, 作为 ^1H 核磁共振定量用马来酸内标溶液。取塞来昔布适量, 采用内标溶液配制 2.84, 5.15, 8.20, 12.44, 15.08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的一系列溶液, 混匀。取 0.5 mL 进核磁共振仪获取 ^1H -NMR 谱, 并进行相位校正、积分。采用塞来昔布定量峰与马来酸内标峰峰面积之比为横坐标(x), 塞来昔布称样量与马来酸称样量比值为纵坐标(y)得出回归方程。得到的线性回归方程为 $y=1.9881x-0.5582$ ($r=0.9990$)。因此塞来昔布在 2.84~15.08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

精密称取 4-溴-2-氟-乙酰苯胺内标物质 30.22 mg 转移至 25 mL 量瓶中, 加入 CD_3OD 溶解后定容, 作为 ^{19}F 核磁共振定量用内标溶液。取塞来昔布适量, 用 4-溴-2-氟-乙酰苯胺内标溶液配制 2.47, 4.83, 7.86, 12.42, 18.67 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 一系列溶液, 混匀。取 0.5 mL 进核磁共振仪获取 ^{19}F -NMR 谱, 并进行相位校正、积分。采用塞来昔布定量峰与 4-溴-2-氟-乙酰苯胺内标峰峰面积之比为横

坐标(x), 塞来昔布称样量与马来酸称样量比值为纵坐标(y)得出回归方程。线性回归方程为 $y=1.1219x+0.1006$ ($r=0.9992$)。因此塞来昔布在 2.47~18.67 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.4 仪器精密度考察 取 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法的供试品溶液, 分别连续测定 6 次, 计算 A_s 与 A_r 比的 RSD 值。结果显示, ^1H 核磁共振定量法 RSD 值为 1.75%, ^{19}F 核磁共振定量法 RSD 值为 1.14%, 说明仪器精密度良好。

2.5.5 稳定性考察 取 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法的供试品溶液, 于 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进行测定。以 A_s 与 A_r 比值为参考, 分别计算 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法的 RSD 值。结果显示 ^1H 核磁共振定量法 RSD 值为 0.85%, ^{19}F 核磁共振定量法 RSD 值为 0.40%。说明 2 种核磁定量法样品溶液在 48 h 内保持基本稳定。

2.5.6 重复性考察 分别平行配制 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法 6 份供试品溶液, 分别测定塞来昔布含量, 并分别计算 2 种方法的 RSD 值。结果显示 ^1H 核磁共振定量法 RSD 值为 1.38%, ^{19}F 核磁共振定量法的 RSD 值为 0.86%。说明 2 种核磁定量法的重复性良好。

2.5.7 检测限与定量限 取塞来昔布对照品逐步进行稀释, 分别按 ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法测试条件进行检测。以 $S/N=10$ 作为定量限, $S/N=3$ 作为检测限。结果显示, ^1H 核磁共振定量法的定量限为 0.28 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限为 0.12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。 ^{19}F 核磁共振定量法的定量限为 0.15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限为 0.06 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.8 2 种核磁共振定量法与质量平衡法含量测定结果的比较 精密称取适量塞来昔布样品, 乙腈溶解、定容后进 HPLC 分析, 结果见图 3。HPLC 面积归一化法^[5]测定 6 批样品结果分别为 99.82%, 99.79%, 99.80%, 99.72%, 99.85% 和 99.76%; 水分分别为 2.15%, 2.28%, 1.94%, 2.00%, 2.14% 和 2.19%; 炽灼残渣为 0.08%, 0.14%, 0.08%, 0.09%, 0.12% 和 0.08%; 残留溶剂分别为 0.000 5%, 0.000 2%, 0.000 4%, 0.000 3%, 0.000 5% 和 0.000 4%。质量平衡法计算公式为 $(100\% - \text{水分} - \text{炽灼残渣} - \text{残留溶剂}) \times \text{HPLC 面积归一化法测定结果}$, 2 种核磁共振定量法与质量平衡法含量测定结果见表 1。可见, ^1H 核磁共振定量法和 ^{19}F 核磁共振定量法的测定结

果较为接近, 且与质量平衡法测定结果基本一致。

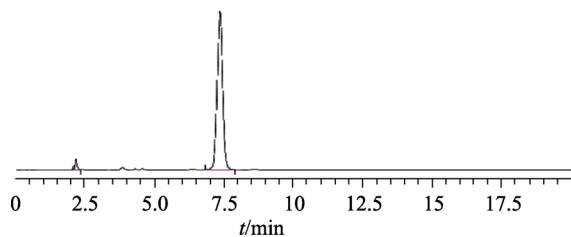


图3 HPLC 图谱

Fig. 3 Spectrum of HPLC

表1 3种方法的塞来昔布测定结果

Tab. 1 Determination results of celecoxib by three methods

批次	^1H 核磁共振定量法	^{19}F 核磁共振定量法	质量平衡法
20180915	96.95	97.35	97.59
20180922	97.21	97.25	97.37
20181012	97.56	97.39	97.78
20190225	97.85	97.53	97.64
20190312	97.68	97.72	97.59
20190525	97.56	97.77	97.49

3 讨论

匀场的质量直接影响着图谱的质量, 若磁场均匀度较差, 不仅造成分辨率下降, 也会影响样品和内标物质的峰宽和峰型变化, 最终影响测定结果的准确度^[12]。足够的 D1 可以使原子核完全弛豫, 使样品定量峰或内标物质的内标峰与原子核数目成正比^[9-11]。 ^1H 核磁共振定量法预实验分别考察了 D1 为 1, 2, 5, 8, 10, 12, 15 s 时对 As/Ar 的影响。当 $D1 > 10$ s 时, 比值趋于稳定。分别对 AQ 为 1, 2, 3, 4, 5, 6 s 和 NS 分别为 8, 16, 32, 48, 64 时 As/Ar 比值的影响, 结果显示对当 $AQ > 4.0$ s, $NS > 32$ 次时 As/Ar 的比值趋于稳定。因此, AQ 设置为 4.0 s, NS 设置为 32 次。为使进入核磁共振仪的核磁管溶液体系达到稳定状态, 有必要设置一定的 DS 次数, ^1H 核磁共振定量法 DS 为 2 次。按同样方法逐一确定 ^{19}F 核磁共振定量法的各项仪器参数。

化合物中往往含有 -OH、-NH₂、-SH 等活泼质子, 容易导致图谱基线起伏不平。本研究采用 CD₃OD 作为溶剂, 利用质子交换作用可以消除活泼质子对图谱基线的影响, 有助于 ^1H -NMR 图谱的简化、减小干扰的可能性, 也有助于实现对定量峰或内标峰的准确积分。因此, 本研究为简化 ^1H 核磁共振图谱提供了一种策略。选择的塞来昔布的定量峰属于烯键氢, 由于不同类型质子恢复 Boltzmann 平衡的时间不同, 为提高测试结果的准确性, 选择内标物质的内标峰也应属于烯键氢, 结合溶解度问题最终选择马来酸作为内标物质。

^1H 核磁共振定量法、 ^{19}F 核磁共振定量法和质量平衡法的测定结果基本一致, 可以相互佐证。本研究为塞来昔布合成工艺优化、结构鉴定^[14]及质量控制提供了一种无需对照品、快速、准确的含量测定方法, 值得推广。

REFERENCES

- [1] LI W W, SUN W, LUO M, et al. Influence of celecoxib on radiosensitization of irradiation-resistant cell line CNE-2R of nasopharyngeal carcinoma [J]. Her Med(医药导报), 2015, 34(11): 1439-1444.
- [2] ZHANG L, HUANG J J. Influence of celecoxib on Brest cancer cells SKBR-3 [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(8): 669-673.
- [3] XIE Y Y, XIAO C Y, YE S H, et al. The curative effect of comprehensive rehabilitative treatment with celebrex on knee osteoarthritis in elderly patients [J]. Mod Hosp(现代医院), 2015, 15(1): 20-22, 26.
- [4] GAO J, CAO G, ZHANG X D, et al. Determination of related substances in celecoxib capsule by HPLC [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2013, 28(2): 182-184.
- [5] JIANG Z D, YANG L, LU W. Determination of the related substances in celecoxib by HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2018, 49(9): 1295-1299.
- [6] KE Z G, WANG H W, ZHENG H G, et al. Determination of celecoxib tablet by RP-HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2003, 23(4): 205-207.
- [7] BHARTI S K, ROY R. Quantitative ^1H NMR spectroscopy [J]. Trac Trends Anal Chem, 2012(35): 5-26.
- [8] LI C X, WANG X P, CUI F, et al. Determination of erlotinib hydrochloride by proton nuclear magnetic resonance [J]. Her Med(医药导报), 2017, 36(12): 1398-1401.
- [9] WANG S H, HAO H J, WANG G D, et al. Determination of the absolute content of palmitate by quantitative proton nuclear magnetic resonance [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(4): 654-658.
- [10] XU K, WEI Y G, HAO H J. Determination on content of hydrochloride palmitate in tablets by proton nuclear magnetic resonance [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2018, 37(12): 1495-1499.
- [11] GUO L C, HAO H J, DU L Y. Determination of risperidone by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2018, 37(4): 492-495.
- [12] WU D, CHEN H, WANG T, et al. Determination of gefitinib by ^{19}F QNMR [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(19): 2343-2346.
- [13] YAO S N, XU C, ZHANG Q Q, et al. Development in the synthesis, pharmacology, clinical applications of celecoxib [J]. Guid China Med(中国医药指南), 2013, 11(28): 51-55.
- [14] HUANG Z H, CAI D D, ZHUO K H. Analysis and Identification of a new dithio-carbonyl analogue in health foods [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(7): 991-994.

收稿日期: 2019-06-20

(本文责编: 李艳芳)