

# 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

蒋孟虹<sup>1</sup>, 于小波<sup>2</sup>, 毛黎顺<sup>3</sup>, 沈文斌<sup>2\*</sup>, 狄斌<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; <sup>2</sup>中国药科大学分析测试中心, 南京 210009;

<sup>3</sup>江苏柯菲平医药科技有限责任公司, 南京 210016)

**摘要** 建立核磁共振氢谱法测定 10-*O*-(*N,N*-二甲氨基乙基)-银杏内酯 B 甲磺酸盐(XQ-1H)标准物质的含量。以齐多夫定为内标, DMSO-*d*<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O(5:1)为溶剂, 氢谱测定条件为: 脉冲宽度 30°, 延迟时间 20 s, 采样次数 32 次, 窗函数 0.3 Hz。在此条件下, 样品与内标的定量峰分离良好, 线性范围宽, 含量测定结果为 99.12%, RSD 为 0.16%。该方法专属、准确、简便、快速, 适用于对药物基准物质绝对含量的测定。

**关键词** 10-*O*-(*N,N*-二甲氨基乙基)-银杏内酯 B 甲磺酸盐; XQ-1H; 含量测定; 核磁共振法

**中图分类号** R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)04-0339-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130410

## Quantitative determination of 10-*O*-(*N,N*-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate by nuclear magnetic resonance

JIANG Menghong<sup>1</sup>, YU Xiaobo<sup>2</sup>, MAO Lishun<sup>3</sup>, SHEN Wenbin<sup>2\*</sup>, DI Bin<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>3</sup>Jiangsu Carefree Medicinal Co., Ltd., Nanjing 210016, China

**Abstract** A new method was established to determine the content of 10-*O*-(*N,N*-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate by <sup>1</sup>H NMR using DMSO-*d*<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O (5:1) as the solvent and zidovudine as the internal standard. Experimental parameters of NMR were extensively investigated. Under the optimal condition, the sample and internal standard showed good separation and linearity. The content of 10-*O*-(*N,N*-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate was 99.12% and its RSD was 0.16%. This method is specificity, accurate, simple and rapid, and is suitable for the quantitative determination of the content of the reference substance content.

**Key words** 10-*O*-(*N,N*-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate; XQ-1H; determination; nuclear magnetic resonance

10-*O*-(*N,N*-二甲氨基乙基)-银杏内酯 B 甲磺酸盐(代号 XQ-1H, 结构如图 1A 所示)是银杏内酯 B 的 10 羟基衍生物。与银杏内酯 B 相比, XQ-1H 抗血小板活化因子(PAF)的活性较强, 且 XQ-1H 具有良好的水溶性, 弥补了银杏内酯 B 水溶性低的缺陷, 可做成冻干粉针剂, 目前已获得一类新药临床研究批准<sup>[1-2]</sup>。XQ-1H 具有稳定性好、水溶性好、药效好等优点, 用于治疗缺血性中风、炎

症、哮喘等与 PAF 相关的疾病<sup>[3-7]</sup>, 市场开发前景十分广阔。

目前 XQ-1H 尚处于开发研制阶段, 作为创新药, 首先必须确定对照品含量。新药对照品含量一般通过协作标定来确定, 包括使用化学滴定法、色谱法和重量分析法等。化学滴定法特异性不强; 色谱法采用归一化法, 存在杂质和被测组分在检测器上响应差异的局限, 使其难以准确测定绝对含量;

\* 收稿日期 2013-02-25 通信作者 \* Tel:025-83271233 E-mail:cpunmrswb@163.com

\*\* Tel:025-83271269 E-mail:dibin@cpu.edu.cn

而采用定量核磁共振法(QNMR)确定对照品含量时,具有特异性强、快速及准确等优点<sup>[8-9]</sup>。

QNMR 用于定量分析的基础是各化学环境中的质子吸收峰的面积只与所包含的质子数有关,不需引进任何校正因子就可直接根据各共振峰的积分值推算所代表的自旋核的数量<sup>[10]</sup>。目前 NMR 定量方法已收载于《中华人民共和国药典》(2010 年版)<sup>[11]</sup>。由于 QNMR 法测定药品含量时通常无需专用的药品基准物质,而仅以已知含量的药物或化学物质为参比,就可测得药品的绝对含量,所以特别适用于对新药标准物质的含量确定<sup>[8]</sup>。本研究建立 QNMR 测定 XQ-1H 绝对含量,研究溶剂、内标物、定量峰、核磁共振实验参数的选择对方法结果的影响,建立了专属、准确、快速的含量测定方法,为标准物质含量测定提供了一种新的手段。

## 1 材 料

### 1.1 药品与试剂

XQ-1H(江苏柯菲平医药科技有限责任公司);齐多夫定对照品(含量 100.0%,中国药品生物制品检定所,批号:100672-200401);氘代二甲亚砜(99.9%氘代,含 1% TMS)、重水(99.9%氘代,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

### 1.2 仪 器

Avance-500 超导核磁共振仪及操作软件 Topspin 2.1(瑞士 Bruker 公司);M2P 百万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定方法的建立与验证

2.1.1 供试品溶液的制备 分别精密称取供试样品约 6 mg、内标约 5 mg,置同一离心管中,加 DMSO-*d*<sub>6</sub> 0.5 mL,超声溶解,加入 D<sub>2</sub>O 0.1 mL,涡旋,配制成每 1 mL 分别含样品 0.02 mmol、内标 0.04 mmol 的供试品溶液,将其转移至 5 mm 标准核磁共振样品管内,即得。

2.1.2 <sup>1</sup>H NMR 测定条件 采用 QNP 探头,扫描宽度:5501 Hz,中心频率:2 500 Hz;脉冲宽度:30°;时间域数据点:32 K;测定温度:308 K;延迟时间:20 s;采样次数:32 次;窗函数:0.3 Hz。每份样品平行测定 5 次。

2.1.3 专属性考察 XQ-1H 样品、内标齐多夫定

对照品、样品与内标混合溶液的核磁共振氢谱如图 1 所示。结果表明,样品氢谱中在低场区的质子信号 δ 5.33(1H,d)、5.08(1H,s)可作为定量峰,内标齐多夫定的定量峰可选 δ 7.64(1H,d),其混合溶液中样品与内标各定量峰能够完全分离,各定量信号无相互干扰。

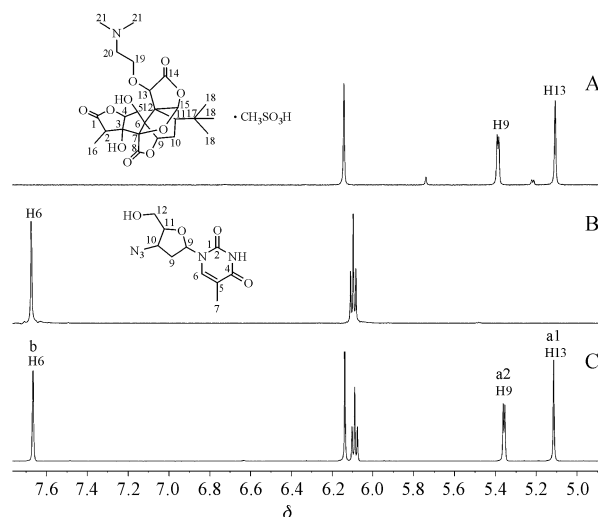


Figure 1 <sup>1</sup>H NMR of XQ-1H (A), internal standard (Zidovudine, B), XQ-1H and IS mixed solution (C)

a1 and a2: Quantitative peaks of XQ-1H; b: Quantitative peak of IS; XQ-1H: 10-*O*-(*N,N*-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate

2.1.4 线性及范围 精密称取约 2, 4, 6, 8, 10, 12 mg 的 XQ-1H 样品,分别置离心管中,取内标齐多夫定对照品约 5 mg,精密称定,按“2.1.1”项下方法配制 6 份系列溶液,按“2.1.2”项下条件进行测定,以 XQ-1H 与齐多夫定的物质的量比 *X* 为横坐标,其定量峰积分面积比值 *Y* 为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为  $Y = 1.0033X + 0.0003$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明,物质的量比在 0.186 ~ 1.103 范围内,氢信号与样品称样量成正比,方法线性关系良好。

2.1.5 进样精密度 取供试品溶液,按“2.1.2”项下条件连续测定 6 次,记录积分面积,计算样品与内标积分面积比值的 RSD( $n=6$ )为 0.22%。

2.1.6 重复性 取 XQ-1H 样品适量,共 6 份,精密称定,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.2”项下条件进行测定。结果 XQ-1H 的平均含量( $n=6$ )为 99.21%,RSD 为 0.17%。

2.1.7 稳定性 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样测定,结果 XQ-1H 样品与内

标的峰面积比值的 RSD( $n = 7$ ) 为 0.13%,表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

2.1.8 耐用性 取同一供试品溶液,分别在开氏温度为 303 K、308 K 和 313 K 的实验条件下,各连续测定 5 次。XQ-1H 与内标的定量峰积分面积比值的 RSD 为 0.21%,说明不同温度对样品的含量测定结果基本一致。

2.2 样品测定

取 XQ-1H 样品,按“2.1.1”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.1.2”项下条件进行测定,采集并处理图谱。按公式(1)计算样品含量,结果见表 1。

$$P_x = \frac{I_x}{I_{IS}} \times \frac{N_{IS}}{N_x} \times \frac{M_x}{M_{IS}} \times \frac{m_{IS}}{m_x} \times P_{IS}$$
 (1)

其中: $P_x$  和  $P_{IS}$  分别为 XQ-1H 和内标的含量(%); $I_x$  和  $I_{IS}$  分别为 XQ-1H 和内标定量峰积分面积; $N_x$  和  $N_{IS}$  分别为 XQ-1H 和内标定量峰积分信号包含的质子数( $N_x = 1, N_{IS} = 1$ ); $M_x$  和  $M_{IS}$  分别为 XQ-1H 和内标的相对分子质量; $m_x$  和  $m_{IS}$  分别为 XQ-1H 和内标的称样量。

Table 1 Results for the determination of XQ-1H

No.	Weight/mg		$I_{XQ-1H}/I_{IS}$	$P_{XQ-1H}/\%$	Mean	RSD/%
	$m_{IS}$	$m_{XQ-1H}$				
1	4.942	5.830	0.528 7	99.25	99.12	0.16
2	4.958	5.969	0.539 4	99.21		
3	5.028	6.153	0.548 3	99.19		
4	4.945	5.929	0.536 2	99.00		
5	5.172	6.140	0.530 1	98.85		
6	5.133	6.044	0.527 6	99.20		

3 讨论

3.1 溶剂的选择

合适的溶剂除了对样品和内标均有良好的溶解度外,其残留的信号峰应不干扰所分析样品的信号峰。XQ-1H 为甲磺酸盐类,易溶于极性溶剂(如二甲亚砜及水),而不溶于氯仿、甲醇等,故考虑选用 DMSO- $d_6$  或  $D_2O$  为溶剂,由于拟选的内标大多数在二甲亚砜中较易溶解,故选用 DMSO- $d_6$  为测定溶剂。实际测定过程中发现,样品及内标中的活泼质子信号经常会干扰所选定的定量峰信号,可加入  $D_2O$  以消除活泼质子的干扰。经实验比较,确定选用 DMSO- $d_6$ - $D_2O$ (5:1)作为测定溶剂。

3.2 内标的选择

合适的内标应满足其参考峰与样品峰分离、能

溶于分析溶剂中、不与待测样品相互作用等条件<sup>[12]</sup>。由 XQ-1H 的氢谱可知,在高场区质子信号密集,可选择在低场区( $>\delta 6.3$ )出现信号的物质作为内标物。根据 XQ-1H 氢谱特征及所用溶剂,参照文献以及本课题组的实践经验,分别考察对苯二酚、富马酸、奈韦拉平、齐多夫定作为内标物的情况。结果表明,对苯二酚( $\delta 6.62, s$ )、富马酸( $\delta 6.72, s$ )、奈韦拉平( $\delta 8.49, dd; \delta 7.10, d$ )和齐多夫定( $\delta 7.64, d$ )在化学位移值大于 6.3 的信号,峰型简单,与样品无重叠,性质稳定。其中对苯二酚( $M_r:110.11$ )和富马酸( $M_r:116.07$ )相对分子质量较小,且测定时所选用信号分别含 4 个和 2 个质子,作为内标物可能引起较大的称量误差。奈韦拉平和齐多夫定相对分子质量较大,测定时所选用信号只含 1 个质子,作为内标物称样量与样品称样量近似,可减小称量误差,且齐多夫定溶解性优于奈韦拉平,故选用齐多夫定作为定量内标。

3.3 定量峰的选择

对于待测物及内标,定量峰为钝峰、偶合裂分数较多、相邻质子峰分离条件不佳时,测定误差均较大,应尽量选择相同峰形的信号作为定量峰;在设定的积分范围内没有干扰;若化合物中多个信号峰均符合条件,最好全部采用,取其平均值,以减小测定误差。XQ-1H 结构复杂,氢谱中其质子信号在高场区密集,因此选定低场区的  $\delta 5.33(1H, d)$ 、 $5.08(1H, s)$  为 XQ-1H 的定量峰(取其积分面积平均值为  $I_x$ ), $\delta 7.64(1H, d)$  为内标齐多夫定的定量峰。

3.4 参数的选择<sup>[13]</sup>

3.4.1 延迟时间( $d1$ )的选择

延迟时间  $d1$  要选择足够长( $\geq 5 \times T1$ )使原子核完全弛豫,从而使被积分的信号强度与原子核数目成正比。实验表明,当  $d1 \geq 10 s$  后,样品定量峰积分面积不再变化,为确保各定量峰信号完全弛豫,选择延迟时间为 20 s。

3.4.2 脉冲宽度的选择

脉冲宽度常选择  $30^\circ \sim 90^\circ$  之间。为使定量实验所采用的各定量峰信号的弛豫能完全恢复到平衡状态,一般选择较小的脉冲宽度,常用  $30^\circ$  倾角。

3.4.3 采样次数的选择

采样次数的选择直接影响图谱的信噪比,一般要求信噪比  $S/N \geq 250$ ,采样次数越多,信噪比越好,但检测时间也越长。实验

结果表明,当采样次数达到16次以上,其信噪比已满足定量分析要求,通过综合考虑选择采样次数为32次。

## 4 结 论

本研究以齐多夫定为内标, DMSO- $d_6$ -D<sub>2</sub>O (5:1)为溶剂,直接称量法配制供试品溶液,经过一系列条件优化,最终确定氢谱测定条件为:脉冲宽度 30°,延迟时间 20 s,采样次数 32 次,窗函数 0.3 Hz。在此条件下,选择  $\delta$  5.33 (1H, d)、5.08 (1H, s) 为 XQ-1H 定量峰,  $\delta$  7.64 (1H, d) 为内标齐多夫定的定量峰,样品与内标的定量峰分离良好, XQ-1H 含量测定结果为 99.12%, RSD 为 0.16%。所建立的方法操作简便、特异性强、快速准确,为 XQ-1H 研发过程中标准物质含量测定提供了一种新的手段,为其质量控制研究提供实验依据。

## 参 考 文 献

- [1] Qin YL. The preparation method of 10-*O*-(*N,N*-dimethylaminoethyl)-ginkgolide B methanesulfonate hemihydrate(甲磺酸 10-*O*-(二甲基胺基乙基)银杏内酯 B 半水结晶及其制备方法): CN, 200710024748[P]. 2008-05-28[2013-02-25].
- [2] Qin YL. The preparation method of dimethylaminoethyl ginkgolide B mesylate injection(一种甲磺酸胺银杏内酯 B 注射剂及其制备方法): CN, 200810196165[P]. 2010-03-24[2013-02-25].
- [3] Liu CD, Cui J, Pan SH, *et al.* The role of dimethylaminoethyl ginkgolide B mesylate as derivative of ginkgolide B on inhibiting platelet adhesion and release function[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2009, **25**(6): 42–44.
- [4] Deng Y, Li YM, Fang WR, *et al.* Protective effect of RNGB on rat brain micro vessel endothelial cell[J]. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2009, **17**(2): 96–99.
- [5] Deng Y, Fang WR, Li YM, *et al.* Blood-brain barrier breakdown by PAF and protection by XQ-1H due to antagonism of PAF effects[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, **616**(1): 43–47.
- [6] Liu H, Pan SH, Liu CD, *et al.* The role of dimethylaminoethyl ginkgolide B mesylate on inhibiting platelet aggregation and release function[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, **32**(6): 914–918.
- [7] Geng XH, Yang QC, Lyu P, *et al.* Therapeutic time window of dimethylaminoethyl ginkgolide B mesylate in focal cerebral ischemia of rats[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(2): 149–152.
- [8] Hu M, Hu CQ, Liu WY. Determination of drug reference substance content by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004, **32**(4): 451–455.
- [9] Yu XB, Shen WB, Xiang BR. Advances in application of quantitative nuclear magnetic resonance technique in pharmaceutical field[J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2010, **34**(1): 17–23.
- [10] Holzgrabe B, Deubner R, Schollmayer C, *et al.* Quantitative NMR spectroscopy-applications in drug analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, **38**(1): 806–812.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: Part 2* (中华人民共和国药典: 二部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: appendix 81–83.
- [12] Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2010, **53**(1): 229–240.
- [13] Beyer T, Diehl B, Holzgrabe U. Quantitative NMR spectroscopy of biologically active substances and excipients[J]. *Bioanal Rev*, 2010, **2**(1): 1–22.