

各国药典核磁共振波谱法通则概况及其应用

徐昕怡, 洪小栩

国家药典委员会 (北京 100061)

【摘要】近年来, 各国药典陆续修订核磁共振波谱法通则, 以适应核磁共振波谱技术的发展, 并扩大其在生药、化学药品、生物制品、药用辅料和药包材等通则和品种标准中的应用。本文介绍了各国药典核磁共振波谱法通则概况及在品种标准中的应用现状, 旨在为中国药典 0441 核磁共振波谱法通则的修订和核磁共振波谱法在我国制药领域中的进一步应用提供参考。

【关键词】核磁共振波谱法; 药典; 通则; 应用现状

Overview and application of nuclear magnetic resonance spectroscopy method in pharmacopoeias

Xin-Yi XU, Xiao-Xu HONG

Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China

Corresponding author: Xiao-Xu HONG, Email: hongxiaoxu@chp.org.cn

【Abstract】In recent years, the general chapters of nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) method have been revised successively in the pharmacopoeias to adapt to the development of NMR method and to expand its application in the general chapters and monographs of crude drugs, chemical drugs, biological products, pharmaceutical excipients and packaging materials. In this paper, the general chapters of nuclear magnetic resonance spectroscopy in pharmacopoeias and their application in monographs were introduced, aiming to provide a reference for the revision of the Chinese Pharmacopoeia 0441 general chapter of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and the further application of NMR method in the pharmaceutical industry in China.

【Keywords】Nuclear magnetic resonance spectroscopy method; Pharmacopoeia; General chapter; Application status

核磁共振波谱 (nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) 法是一种基于特定原子核在外磁场中吸收了与其裂分能级间能量差相对应的射频场能量而产生共振现象的分析方法。NMR 法作为一种通用的检测技术, 在从液体核磁共振到固体核磁共振 (solid-state nuclear magnetic resonance, SSNMR)、从一维核磁共振 (one

dimensional nuclear magnetic resonance, 1D NMR) 到二维核磁共振 (two dimensional nuclear magnetic resonance, 2D NMR)、从氢核磁共振 (^1H -nuclear magnetic resonance, ^1H NMR) 到杂原子 NMR 应用等诸多方面都具有显著优势, 在药品质量控制如组分鉴定、杂质鉴定、药物含量分析中应用广泛, 已用于多种药品的质量标准中^[1-3]。1975 年,

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202305011

基金项目: 科技部国家科技基础资源调查专项 (2018FY00803)

通信作者: 洪小栩, 博士, 主任药师, Email: hongxiaoxu@chp.org.cn

美国药典 (*United States Pharmacopoeia, USP*) 第 19 版、英国药典 (*British Pharmacopoeia, BP*) 1975 年增补版收载了 NMR 方法, 日本药局方 (*Japanese Pharmacopoeia, JP*) 第 12 版和欧洲药典 (*European Pharmacopoeia, EP*) 4.0 版也分别于 1991 年和 2002 年收载了该法, 中国药典 2010 年版也收载了该法^[4]。近年来, 随着 NMR 技术的发展和药品质量控制的更高要求, *USP*、*EP* 和 *JP* 对 NMR 法通则进行了修订, 并扩大了其在生药、化学药品、生物制品、药用辅料和药包材等通则和品种标准中的应用。本文介绍了 *USP* 现行版、*EP* 10.8 版、*JP* 第 18 版中 NMR 法通则的收载情况, 旨在为中国药典相关标准的制定和 NMR 法在药品质量控制中的进一步应用提供参考。

1 各国药典 NMR 法通则

1.1 *USP* 现行版 <761> NMR 法、<1761> NMR 法的理论和应用

美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的大多数 NMR 方法是基于 *USP* <761> NMR 法通则和 <1761> NMR 法的理论与应用指导原则开发的。2022 年, 在系统性地参考了 *USP* <1058> 分析仪器确证、<1010> 分析数据的解释与处理、<1039> 化学计量学、<1210> 方法验证的统计学工具、<1220> 分析方法的生命周期、<1225> 分析方法验证、<1226> 分析方法确认等指导原则的基础上, *USP* 修订了 <761> NMR 法通则、<1761> NMR 法的理论与实践指导原则, 两个章节互为补充^[5]。

1.1.1 <761> NMR 法

<761> 包括简介、NMR 仪的确证、定性和定量分析、验证和确认四部分。其中, NMR 仪的确证、验证和确认是 *USP* 独有的内容^[1]。

在核磁共振波谱仪的确证部分中指出, NMR 仪器和分析方法作为一个集成系统发挥作用, 产生波谱数据或其他测定结果, 并且必须符合预期目的。由于分析方法的有效性依赖于仪器控制关键过程参数, 仪器必须通过设计、确证和持续确认进行验证。NMR 仪的确证是根据预先批准的协议, 作为质量管理体系的一部分进行记录的过程, 通常在设计确证 (design qualification, DQ)、安装确证 (installation qualification, IQ)、操作确证 (operational qualification, OQ) 和性能确证 (performance qualification, PQ) 不同的阶段进行。

对于 NMR 的验证和确认, <761> 提出可采用生命周期方法 (首选) 或传统方法。定量核磁 (quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR) 的生命周期方法与 <1220> 分析方法生命周期指导原则中阐述的一致, 考虑了分析方法整个生命周期中发生的验证活动。方法的生命周期包括分析目标概况 (analytical target profile, ATP), 以及方法设计、分析方法性能确证 (analytical procedure performance qualification, APPQ)、持续方法性能验证 (continued procedure performance verification, CPPV) 三个阶段。对于定量和半定量应用, 应指定 ATP 报告值可接受的最大测量不确定度。第一阶段方法设计中, 要进行分析方法的开发、质量风险管理 (quality risk management, QRM)、建立方法可操作设计区间 (method operable design region, MODR)。第二阶段 APPQ 中, 要记录 APPQ 规程、评估测量不确定度、记录 APPQ 结果形成文档, 并最终确定分析控制策略 (analytical control strategy, ACS) 和复制策略。第三阶段 CPPV 中, 要进行分析方法性能的常规监控和变更后方法性能的评估, 以确定分析方法是否持续符合预期目的。此外, 也可使用 <1225> 和 ICH Q2 (R1) 分析方法验证指导原则中收载的传统方法验证程序和 <761> 中给出的 NMR 方法最低验证标准。但对于一些特定应用, 应根据预期用途采用更严格的标准以证明适用性。

1.1.2 <1761> NMR 法的理论和应用

<1761> 对 <761> 中的内容进行了补充, 提供了 NMR 在药典和制药工业中的实践和应用, 包括简介、原理、定义、NMR 的特性、NMR 仪、仪器准备、采集参数、其他实验考虑、采集后数据处理、溶液核磁共振应用、2D NMR 和台式核磁共振 12 个部分内容^[1]。<1761> 的内容概要见图 1。

<1761> 指出, NMR 是化学定量分析中最有用和最通用的技术之一。定量核磁共振 (quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR) 可通过直接与标准物质比较确定溶液中特定物质的含量, 也可确定样品中两种或多种物质的相对量, 如药用盐中活性药物成分与其有机抗衡离子之间的摩尔比, 确定嵌段共聚物的平均链长, 或计算每种单体的重均相对分子质量。1D ¹H qNMR

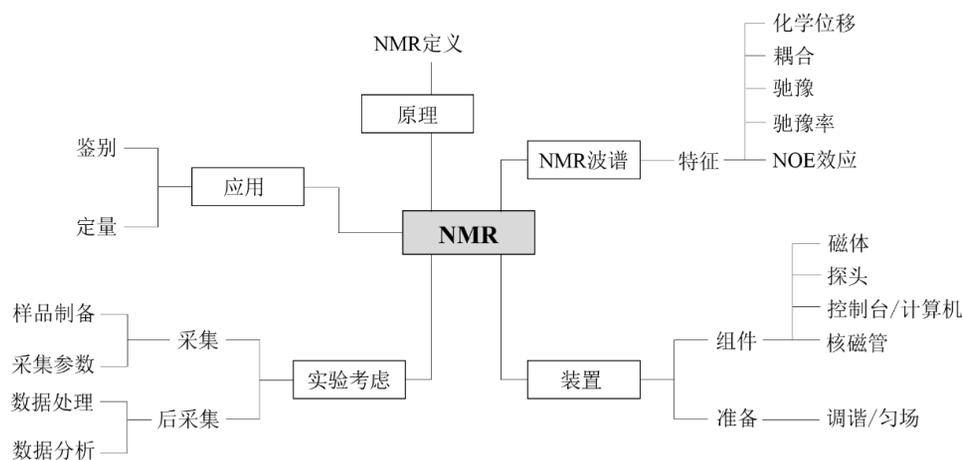


图1 <1761>内容概要

Figure 1. Content summary of <1761>

是最常用的 NMR 定量方法。根据分析物性质， ^{19}F 、 ^{13}C 、 ^{31}P 和 ^{35}Cl 等定量方法也具有优势。2D NMR 的定量测定可采取 2D NMR 信号校准策略和使用本质上定量的特定 2D NMR 实验策略，如时间零 HSQC (time-zero HSQC₀)、定量异核单量子相干 (quantitative heteronuclear single quantum coherence, Q-HSQC) 和定量完善和纯移位 HSQC (quantitative perfected and pure shifted HSQC, QUIPU-HSQC)。qNMR 方法的准确性取决于各种采集和处理参数，如脉冲角、采集时间、弛豫延迟、光谱宽度、自由感性衰减信号 (free induction decay, FID) 中的点数、扫描次数、数据处理期间用于零填充的点数、窗口函数、基线校正、积分范围和温度。响应重叠问题可以通过使用先进的处理技术 (如反卷积方法) 或依靠 2D qNMR 解决。也可使用待测分析物固有的 NMR 特性，如化学位移和耦合常数来开发量子力学模型，量子力学模型可以在不同磁场的 NMR 仪器之间操作，这使台式仪器能够利用高场 NMR 仪器获得的信息。

<1761> 介绍了用于弛豫测量的永磁体紧凑型 NMR 仪。台式 NMR 由于其有限的灵敏度和光谱分散性，不适合阐明复杂和未知的分子结构，但可用于鉴别试验，如原材料的质量控制和检测掺假药物等。台式 NMR 的定量应用最适用于具有 ATP 的方法，该方法对测量不确定度具有适当的容忍度，用于测定浓缩和相对简单的物质。大多数台式 NMR 波谱仪都与流量兼容，在反应和过程的实时或在线监测方面显示出了巨大的潜力，可用作监测动力学的工具，也可用于优化产率、

成本、时间的反应参数。

1.2 EP 10.8版2.2.33 NMR法

EP 10.8 版 2.2.33 包括简介、原理、仪器、傅里叶变换核磁共振 (fourier transform NMR, FT-NMR)、参数、为定量目的优化采集和处理参数、溶液中样品的 NMR、定性分析、定量分析、测定方法和 SSNMR 法共 11 个部分内容^[6]。与各国药典不同，2.2.33 介绍了 SSNMR 法。SSNMR 法使用特定装置的 NMR 仪分析固态样品。一些技术可以为单个原子位点提供可观察的单个谱线，将 NMR 法的适用性扩展到无机材料。2.2.33 介绍了魔角旋转 (magic angle spinning, MAS)、高功率去耦和交叉极化 (cross polarisation, CP) 三种技术。这些技术的结合可提供固体玻璃、无定型物以及陶瓷、聚合物或矿物学来源的结晶材料的化学结构细节的大量信息。

1.3 JP 第18版2.21 NMR法

JP 第 18 版 2.21 包括简介、仪器、方法、仪器和测定条件的记录和鉴别五部分^[7]。2.21 利用了一定篇幅介绍了用于各种目的的 ^1H 和 ^{13}C NMR 的 1D、2D 和多维技术。自旋去耦和奥弗豪塞尔核效应 (nuclear overhauser effect, NOE) 可用于 1D ^1H NMR，宽带去耦、非灵敏核的极化转移增强 (insensitive nuclei enhancement by polarization transfer, INEPT) 和无畸变极化转移增强 (distortionless enhancement by polarization transfer, DEPT) 常应用于 1D ^{13}C NMR。对于 2D NMR，例举了一些同核和异核测定技术，如相关谱 (correlation spectroscopy, COSY)、全相关谱 (total correlation spectroscopy, TOCSY)、

同核哈特曼 - 哈恩谱 (homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy, HOHAHA)、核欧佛豪瑟效应频谱 (nuclear overhauser effect spectroscopy, NOESY)、双量子谱 (incredible natural abundance double quantum transfer experiment, INADEQUATE)、异核多量子相干谱 (heteronuclear multiple quantum coherence, HMQC)、远程碳氢相关 (heteronuclear multiple bond coherence, HMBC)、2D J 分解谱 (2D J-resolved spectroscopy)、双量子滤波 COSY (double quantum filtered-COSY, DQF-COSY)、近程碳氢相关 (heteronuclear single quantum coherence, HSQC) 和扩散排序谱 (diffusion-ordered spectroscopy, DOSY)。同时指出, 多维核磁共振技术可用于分析大分子物质。

1.4 中国药典2020年版0441 NMR法

中国药典 2020 年版 0441 通则包括原理、NMR 仪、核磁共振谱、测定方法四部分^[8]。定性分析可采用双共振实验、化学交换、使用位移试剂、各种二维谱等特定技术, 简化复杂图谱、确定特征基团以及确定耦合关系等。定量分析中提供了绝对定量模式和相对定量模式的供试品溶液制备方法、测定方法和计算公式, 并简要例举了需要注意的实验参数的设置及优化项目。

USP 现行版、EP 10.8 版、JP 第 18 版和中国药典 2020 年版的 NMR 法通则内容对比见表 1。

2 NMR法在各国药典中的应用

2.1 NMR法在各国药典通则中的应用

2.1.1 NMR法在USP现行版通则中的应用

在 USP 现行版有关合成药物、疫苗、生物技术产品、药用辅料和药包材、通用检测方法等通则中, 提及了 NMR 法在鉴别、表征、含量测定、杂质检查和特性检查中的应用, 见表 2^[1]。

此外, USP 现行版收录了 <198> 疫苗中使用的细菌多糖的 NMR 鉴别试验通则, 介绍了 NMR 在疫苗生产中使用的细菌多糖鉴别试验中的应用。<198> 提供了两个方法, 第一种方法利用一个 1D ¹H NMR, 产生样品所有所需信息, 与标准品波谱比较共振位置、线宽、相对强度和谱峰多重性。也可通过计算相关系数评估在相同条件下和相同基质中获取的待测样品和标准品的波谱轮廓相似性。第二种方法将多糖脱乙酰化后简化多

表1 USP现行版、EP 10.8版、JP 18版和中国药典2020年版NMR法通则内容对比
Table 1. Comparison of NMR method general chapters in USP current edition, EP 10.8, JP 18 and Chinese Pharmacopoeia 2020 edition

项目	USP现行版<761>、<1761>	EP 10.8版2.2.33	JP 第18版2.21	中国药典2020年版0441
前言	简介、范围和适用性、原理	简介、原理	简介、原理	简介、原理
NMR仪的确定	用户需求规范, DQ、IQ、OQ、PQ, 系统适用性测试, 确定测试程序	-	-	-
定义	共振、信号、波谱、模式、峰、线和跃迁	-	-	-
设备	磁体、探头 (样品旋转、核磁共振管)、控制台和计算机, 仪器准备 (磁体匀场、探头调谐和匹配)	仪器组成 (磁体、探头、控制台和计算机)、证明仪器正确工作的测试方法	FT-NMR波谱仪、连续波核磁共振 (CW-NMR) 波谱仪类型	仪器组成、仪器输出谱图的过程
测定方法	溶剂选择、样品制备	样品处理、测定程序	¹ H和 ¹³ C NMR的实验技术	溶剂选择、样品制备、测定
定性和定量分析	定性应用、定量应用 (相对定量、绝对定量、外部校准、进一步的校准注意事项、一般程序、计量溯源性和标准物质的选择、样品制备、数据采集、数据处理、数据分析)	定性分析、定量分析 (内标法、规范化过程)	-	定性和定量分析 • 定性分析 • 定量分析 绝对定量模式 (供试品溶液制备、测定法)、相对定量模式]

续表1

项目	USP现行版<761>、<1761>	EP 10.8版2.2.33	JP 第18版2.21	中国药典2020年版0441
采集参数	光谱宽度、停留时间、数据点数、采集时间、扫描次数、射频、接收器增益和脉冲宽度，后脉冲延迟，重复延迟	参数（脉冲宽度、死时间、采集时间、重复时间、接受增益）	记录仪器和测定条件	-
采集后数据处理	增加信噪比或光谱分辨率、零填充、傅里叶变换、定相、基线校正、采峰、积分、高级处理	为定量目的优化采集和处理参数（数字分辨率、信噪比、整合区域、动态范围）	-	-
NMR分析方法的验证和确认	生命周期方法的分析方法验证 <ul style="list-style-type: none"> • ATP • 第一阶段—方法设计（分析方法开发、QRM、MODR、复制策略、分析控制策略） • 第二阶段—APPQ（APPQ程序、测量不确定度、APPQ结果和文档） • 第三阶段—CPPV（日常监测、分析方法的变更） 传统分析方法验证（准确度、精密度、专属性、工作范围、定量限、耐用性、溶液稳定性）、分析方法确认	-	-	-
溶液核磁共振应用	结构解析和表征（示例）、鉴别（示例）、定量（实验设计、样品制备、1D qNMR、2D qNMR）	-	使用化学位移、谱峰多重性和相对强度进行鉴别，使用标准品进行鉴别	-
SSNMR	-	MAS、高功率去耦和CP三种技术和应用	-	-
2D NMR	建立同核连接的策略[COSY、TOCSY、NOESY、旋转坐标系的欧沃豪斯增强谱（ROESY）、INADEQUATE]、建立异核连接的策略（HSQC、HMBC）	-	列举同核和异核测定技术，如COSY、TOCSY、HOHAHA、NOESY、INADEQUATE、HMQC、HMBC、2D J分解谱、DQF-COSY、HSQC和DOSY	-
台式核磁共振	台式时域NMR仪、台式频域NMR仪、台式核磁共振应用	-	-	-

表2 NMR法在USP现行版通则中的应用

Table 2. Application of NMR method in general chapters of USP current edition

通则名称	NMR法应用
<2>口服药物产品的产品质量试验	鉴别试验
<191>一般鉴别试验	
<197>光谱鉴别试验	
<1053>合成肽类药物的质量属性	利用 ¹ H、 ¹³ C和 ¹⁵ N NMR可对原料药的较长序列进行解释,应用qNMR法时需要选择合适的内标
<1059>辅料性能	可用于确保释放改性剂所选功能的一致性
<1149>化学和生物制药原料、中间体和剂型的物理稳定性评估和控制	SSNMR法可在产品开发阶段用于测定物理稳定性
<1234>人用疫苗—多糖和糖结合疫苗	散装多糖的关键质量属性:①干重:可利用NMR法测定残留溶剂;②多糖鉴别:通过视觉方式比较显著共振峰的化学位移、相对强度和谱峰多重性;③多糖纯度和数量:特征共振峰的相对强度可以确定多糖中存在的不同糖残基类型和取代基,如N-或O-乙酰基或丙酮酸的比例。可通过将这些峰强度与所添加的内标的峰强度比较进行定量
<1663>与药物包装/递送系统相关的提取物的评估	可使用NMR法辅助可提取物鉴定,产生与质谱法互补的化合物专属性数据。NMR法可鉴别单个有机可提取物

糖的波谱,采集第二个1D ¹H NMR波谱,定量O-乙酰化的程度。两种方法的选择应基于待测样品的性质和所需的信息^[1]。

2.1.2 NMR法在EP 10.8版通则中的应用

在EP 10.8版2.2.64 NMR法鉴别肽通则中,采用1D ¹H NMR法进行短肽产物(最多约15个氨基酸)的定性鉴别。方法采集的波谱宽度须包含肽的完整波谱,一般为12 ppm或16 ppm。优化温度、pH值、缓冲液和肽浓度等参数以提高特征峰的分辨率,收集的数据点数量要能够充分定义峰值。给出了所需的关键波谱参数,如使用30°短脉冲宽度和快速重复频率,最小信噪比为50:1,以及特征共振峰的鉴别要求^[6]。在EP 10.8版5.16结晶性通则中指出,SSNMR法可提供晶型多态性和分子构象的信息^[6]。

2.1.3 NMR法在JP第18版通则中的应用

JP第18版5.01生药试验通则介绍了采用NMR法测定汉方制剂的生药和提取物的标志物,包括NMR法定量分析原理、qNMR法标准物质和软件、汉方制剂的生药和提取物定量分析用标志物 and 标准物质,以及操作qNMR的注意事项。5.01指出,测定结果保留两位有效数字就足以保证定量分析的准确性。为达到杂质与峰分离所需的分辨率和灵敏度,需要使用400 MHz以上的磁场^[7]。

2.2 NMR法在各国药典品种标准中的应用

2.2.1 NMR法在USP现行版品种标准中的应用

USP现行版中共有17个品种标准,包括9个化药和8个辅料采用NMR进行质量控制。其中,4个化药和8个辅料品种采用¹H qNMR法进行含量测定和特定检测,2个化药品种采用¹³C谱进行定性鉴别,见表3。

2.2.2 NMR法在EP 10.8版品种标准中的应用

EP 10.8版中共有25个品种标准,包括14个化药、6个生物制品和5个辅料采用NMR法进行质量控制。其中,3个化药和5个辅料品种采用qNMR法进行含量测定和检查,其中3个采用¹³C qNMR法检查脂肪酸中β(2)-酰基的位次分布、脂肪醇的平均链长和环氧乙烷的平均含量。1个化药品种采用¹⁹F进行杂质的定性检查,见表4。

2.2.3 NMR法在JP第18版品种标准中的应用

JP第18版中共有55个化药品种标准采用¹H NMR法进行定性鉴别和纯度检查,但没有定量分析,见表5。此外,JP第18版利用qNMR法测定生药检验中使用的化学试剂的绝对纯度。

2.2.4 NMR法在中国药典2020年版品种标准中的应用

中国药典2020年版中共有5个辅料品种标准采用NMR法进行质量控制,利用qNMR法进

行氧乙烯含量和丙交酯乙交酯摩尔比的检查,见表6。但中药、化药和生物制品品种标准中还没有应用NMR法。

表3 NMR法在USP现行版品种标准中的应用

Table 3. Application of NMR method in monographs of USP current edition

类别	品种名称	应用	技术	项目
化药	亚硝酸戊酯吸入剂	定量	¹ H	含量测定:绝对定量法C ₅ H ₁₁ NO ₂
	亚硝酸戊酯	定量	¹ H	含量测定:绝对定量法C ₅ H ₁₁ NO ₂
	达肝素钠	定性	¹ H	鉴别
	依诺肝素钠	定性	¹³ C	鉴别
	磺达肝素钠	定性	¹³ C	鉴别
	醋酸戈舍瑞林	定量	¹ H	特定检测:氨基酸含量
	肝素钠	定性	¹ H	鉴别
	催产素	定性	¹ H	鉴别
	吡咯喹啉醌二钠	定性	¹ H	鉴别
辅料	聚氧乙烯20鲸蜡硬脂醚	定量	¹ H	特定检测:聚合物的平均长度(计算每个分子的氧乙烯单元数)
	聚氧乙烯10油醚	定量	¹ H	特定检测:聚合物的平均长度(计算每个分子的氧乙烯单元数)
	泊洛沙姆	定量	¹ H	特定检测:相对定量法测定氧化乙烯重量百分比
	羟丙基马铃薯淀粉	定量	¹ H	含量测定:羟丙基含量
	羟丙基豌豆淀粉	定量	¹ H	含量测定:羟丙基含量
	羟丙基玉米淀粉	定量	¹ H	含量测定:羟丙基含量
	羟丙基倍他环糊精	定量	¹ H	含量测定:摩尔取代度
	壳聚糖	定量	¹ H	含量测定:脱乙酰度

表4 NMR法在EP 10.8版品种标准中的应用

Table 4. Application of NMR method in monographs of EP 10.8

类别	品种名称	应用	技术	项目
化药	布舍瑞林	定性	¹ H	鉴别
	养殖鱼肝油	定量	¹³ C	检查:脂肪酸中β(2)-酰基的位次分布
	醋酸促性腺激素	定性	¹ H	鉴别
	戈舍瑞林	定性	¹ H	鉴别
	肝素钙	定性	¹ H	鉴别
	肝素钠	定性	¹ H	鉴别
	低分子量肝素	定性	¹³ C	鉴别
	妥布霉素	定性	¹ H	鉴别
	放射性药物备用亚甲磷酸	定性	¹ H	鉴别
	培美曲塞七水二钠	定性	¹ H	鉴别
	三文鱼油,养殖	定量	¹³ C	检查:脂肪酸中β(2)-酰基的位次分布
	特利加压素	定性	¹ H	鉴别
	磺丁基乙二胺钠	定量	¹ H	含量:平均取代度
	放射性药物备用四-O-乙酰基-甘露糖	定性	¹⁹ F	检查:杂质B
	三氟甲磺酸			

续表4

类别	品种名称	应用	技术	项目
生物制品	肺炎球菌多糖结合疫苗（吸附）	定性	¹ H	鉴定功能性多糖
	奥曲肽	定性	¹ H	鉴别
	脑膜炎球菌A、C组、W135和Y结合疫苗	定性	¹ H	纯化多糖：鉴别和血清学特异性
	脑膜炎球菌C群结合疫苗	定性	¹ H	鉴定和血清学特异性研究
	b型流感嗜血杆菌结合疫苗	定性	¹ H	鉴定不同批次的b型流感多糖（PRP）组分
	b型嗜血杆菌和C组脑膜炎球菌结合疫苗	定性	¹ H	细菌种子批
药用辅料	羟丙基倍他环糊精	定量	¹ H	含量：摩尔取代度（MS）
	月桂醇400	定量	¹³ C	检查：脂肪醇的平均链长和环氧乙烷的平均含量
	泊洛沙姆	定量	¹ H	检查：氧乙烯重量百分比
	淀粉，羟丙基，预胶化	定量	¹ H	含量：羟丙基相对含量
	淀粉，羟丙基	定量	¹ H	含量：羟丙基相对含量

表5 NMR法在JP 第18版品种标准中的应用

Table 5. Application of NMR method in monographs of JP 18

类别	品种名称	应用	技术	项目
化药	他唑巴坦、阿普唑仑、氨曲南、香豆素钠、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢洛汀钠、注射用盐酸头孢替安、头孢唑仑盐酸盐、伏格列波糖、曲吡酮、磷霉素钙水合物、头孢唑啉钠水合物、磷霉素钠、妥布霉素、拉氧头孢钠、头孢洛汀钠、头孢曲嗪丙二醇酯、头孢唑啉钠、头孢哌酮钠、头孢卡宾酯盐酸盐水合物、头孢地尼、头孢托仑匹酯、头孢吡肟二盐酸盐水合物、头孢克肟水合物、头孢甲肟盐酸盐、头孢美唑钠、头孢米诺水合物、头孢地嗪钠、头孢哌酮钠、头孢噻肟钠、头孢替坦、头孢替安酯盐酸盐、盐酸头孢替安、注射用盐酸头孢替安、头孢唑仑盐酸盐、注射用盐酸头孢唑仑、头孢匹胺钠、头孢匹罗硫酸盐、头孢泊肟酯、头孢拉定水合物、头孢磺啉钠、头孢他啶水合物、头孢呋辛酯、头孢布汀水合物、头孢唑肟钠、头孢曲松钠水合物、头孢呋辛酯、甲磺酸艾日布林、氟氧头孢钠、哌拉西林水合物、注射用他唑巴坦哌拉西林	定性	¹ H	鉴别
	肝素钙、肝素钠	定性	¹ H	纯度：多硫酸软骨素

表6 NMR法在中国药典2020年版品种标准中的应用

Table 6. Application of NMR method in monographs of Chinese Pharmacopoeia 2020 edition

类别	品种名称	应用	技术	项目
药用辅料	泊洛沙姆188	定量	¹ H	检查：氧乙烯含量
	泊洛沙姆407	定量	¹ H	检查：氧乙烯含量
	丙交酯乙交酯共聚物（5050）（供注射用）	定量	¹ H	检查：丙交酯乙交酯摩尔比
	丙交酯乙交酯共聚物（7525）（供注射用）	定量	¹ H	检查：丙交酯乙交酯摩尔比
	丙交酯乙交酯共聚物（8515）（供注射用）	定量	¹ H	检查：丙交酯乙交酯摩尔比

3 对中国药典0441 NMR法通则的修订展望

可以看出,中国药典2020年版0441 NMR法通则内容较USP现行版、EP 10.8版和JP第18版简单,缺少 ^1H 及杂核(^{13}C 、 ^{19}F 及 ^{31}P 等)谱定性和qNMR方法优化的参数(如谱宽、脉冲序列、采样时间、弛豫延迟时间、采样次数、增益等)要求、2D NMR、SSNMR、NMR的方法验证、台式NMR仪等相关内容,在品种标准中的应用与各国药典相比也有较大差距。随着NMR技术日益成熟,以及在药品质量控制中的应用日益广泛,增修订中国药典0441 NMR法通则的上述内容,将提高方法的先进性和对实际应用的指导性,促进NMR法在中国药典中的应用。

3.1 qNMR法

中国药典2020年版一般采用高效液相色谱法或紫外可见分光光度法对药物进行定量分析,但缺乏对照品时,色谱法和光谱法难以准确定量。近年来随着仪器的发展、数据处理系统的升级和实验方法的改进,NMR法逐渐成为主流的定量分析方法,可克服上述含量测定方法的缺陷^[2,9-11]。因此,扩大qNMR法在中国药典中的应用将更好地满足药品质量控制的要求。USP现行版、EP 10.8版中利用 ^1H qNMR法测定结构较明确的高聚物辅料中的甲氧基、乙氧基、羟丙氧基含量,较中国药典通则0712甲氧基、乙氧基和羟丙氧基含量测定法中的气相色谱法和容量法操作更为简便。文献也报道了利用 ^1H qNMR法同时测定茶苯海明中苯海拉明和8-氯茶碱的绝对含量和相对含量,弥补了各国药典所采用的滴定法繁琐且专属性不强的缺点^[12]。除了 ^1H qNMR法外,其他杂核的定量核磁技术也逐渐成熟。EP 10.8版中的养殖鱼肝油、养殖三文鱼油标准中已采用 ^{13}C qNMR法检查脂肪酸中 $\beta(2)$ -酰基的位次分布,辅料品种月桂醇400标准中采用 ^{13}C qNMR法检查脂肪醇的平均链长和环氧乙烷的平均含量。 ^{19}F qNMR法在含氟化学药品的含量测定中也具有潜在的应用前景^[9]。

3.2 2D NMR法

较1D NMR法而言,2D NMR法可以提供更为丰富的化合物结构信息,解决物质结构空间构象问题,与传统的分析化学方法相结合,是化

合物结构解析的强大分析手段^[9]。2D qNMR法是一种间接定量方法,采用1D和2D qNMR法相结合,在准确定量方面具有优势。近年来,随着技术的发展,缩短了2D qNMR法的分析时间又提高了分析性能^[13-16],尽管USP现行版、EP 10.8版和JP第18版中没有品种标准应用2D NMR,但都在NMR法通则中介绍了各种2D NMR技术。文献也报道了利用Q-HSQC测定肝素和低分子量肝素定量组成并进行方法验证等^[17]。因此中国药典0441 NMR法通则可借鉴各国药典,增加2D NMR法中常用的COSY、HSQC等技术的介绍,促进其在药品质量控制中的应用。

3.3 NMR法的方法验证

随着ICH Q2(R2)分析方法验证指导原则、Q14分析方法建立指导原则的增修订,参考USP现行版<761>,在中国药典0441 NMR法通则中引入基于生命周期方法的分析方法验证要求,增强对方法的理解和对变异来源的控制,使方法评价水平与风险级别相适应,通过持续监控促进方法的持续改进和变更控制,为分析方法的验证、转移和确认增加灵活性,使方法更加稳健耐用,将为NMR法在中国药典中的应用打下坚实的基础。

3.4 SSNMR法

随着MAS、CP等技术的进步,SSNMR法的分辨率得到明显改善,所需样品采集时间逐渐缩短,其在药物多晶型与药物共晶研究中的应用日趋成熟和广泛^[2,18-19]。EP 10.8版2.2.33 NMR法通则中收录了SSNMR技术,并在5.16结晶性通则中列为药物多晶型研究的分析方法。中国药典2020年版9015药品晶型研究及晶型质量控制指导原则中也将SSNMR列为多晶型与共晶物质定性分析的技术方法,但在0441 NMR法通则中尚未收录该内容。因此,补充完善SSNMR法相关内容,将提高中国药典0441 NMR法通则的全面性和先进性。

3.5 台式NMR

高场NMR仪器的高价格和高维护成本、对分析人员的高要求以及潜在的安全问题是其应用的障碍。近年来,可安装在实验室工作台的小尺寸低场(90MHz)台式NMR仪器的性能逐步提高,已应用于反应监测及简单化合物的质量控制。因此,参考USP现行版<1761>,研究其在品种中的应用实践,将加速其在过程分析技术、质量控制和药典中的应用^[9-20]。

4 小结

NMR 法是药物分析领域广泛应用的一种技术方法,是药品研发和质量控制的有力手段之一。近年来,随着 NMR 技术的发展和药品质量控制的更高要求,USP、EP 和 JP 均对 NMR 法通则进行了修订,并扩大了其在生药、化学药品、生物制品、药用辅料和药包材等通则和品种标准中的应用。目前中国药典 NMR 法通则在内容的全面性、先进性以及对实际应用的指导性方面,与国际发达国家或地区的药典仍存在差距,如在仪器及测定方法的关键参数、定量核磁、二维核磁、固体核磁、方法验证、台式 NMR 等方面存在完善提高的空间。因此,参考借鉴各国药典的收载内容,跟踪国际前沿技术趋势,修订中国药典 NMR 法通则,发挥 NMR 法可同时进行定性定量分析且不需要特殊对照品等特点及优势,扩大 NMR 的应用范围,将更好地满足我国药品研发、生产、质量控制和监管的需求。

参考文献

- 1 USP(44th eds)[S]. 2022: 13–15, 18–19, 110, 114–115, 118, 125.
- 2 Wang ZF, You YL, Li FF, et al. Research progress of NMR in natural product quantification[J]. *Molecules*, 2021, 26(20): 6308. DOI: 10.3390/molecules26206308.
- 3 张琪, 李晓东, 杨化新. 核磁共振技术在药品标准领域中的应用进展 [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(3): 545–549. [Zhang Q, Li XD, Yang HX. Application of nuclear magnetic resonance in pharmaceutical standards[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 32(3): 545–549.] DOI: 10.16155/j.0254–1793.2012.03.040.
- 4 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017: 127.
- 5 Giancaspro G, Adams KM, Bhavaraju S, et al. The qNMR summit 5.0: proceedings and status of qNMR technology[J]. *Anal Chem*, 2021, 93(36): 12162–12169. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c02056.
- 6 EP(10.8th eds)[S]. 2022: 5860, 118119, 797796.
- 7 JP(18th eds)[S]. 2021: 4850, 147151.
- 8 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 5355.
- 9 张庆生, 何兰, 刘阳, 等, 主编. 氟核磁共振技术在药品质量控制中的应用 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2022: 1–6.
- 10 Holzgrabe U, Malet-Martino M. NMR spectroscopy in pharmaceutical and biomedical analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 93: 1–2. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.007.
- 11 Coulibaly FS, Alnafisah AS, Oyler NA, et al. Direct and real-time quantification of bortezomib release from alginate microparticles using boron (11B) nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(3): 967–977. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00873.
- 12 张才煜, 耿颖, 卢日刚, 等. 核磁共振定量法测定茶苯海明的含量 [J]. *中国药事*, 2018, 32(6): 743–746. [Zhang CY, Geng Y, Lu RG, et al. Quantitative determination of the content of dimenhydrinate by qNMR[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2018, 32(6): 743–746.] DOI: 10.16153/j.1002–7777.2018.06.008.
- 13 Fardus-Reid F, Warren J, LeGresley A. Validating heteronuclear 2D quantitative NMR[J]. *Anal Methods*, 2016, 8(9): 2013–2019. DOI: 10.1039/c6ay00111d.
- 14 Le PM, Milande C, Martineau E, et al. Quantification of natural products in herbal supplements: a combined NMR approach applied on goldenseal[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 165: 155–161. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.11.062.
- 15 Sette M, Wechselberger R, Crestini C. Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR[J]. *Chemistry*, 2011, 17(34): 9529–9535. DOI: 10.1002/chem.201003045.
- 16 Girreser U, Ugolini T, Çiçek SS. Quality control of Aloe vera (*Aloe barbadensis*) and *Aloe ferox* using band-selective quantitative heteronuclear single quantum correlation spectroscopy (bs-qHSQC)[J]. *Talanta*, 2019, 205: 120109. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.07.004.
- 17 Heikkinen S, Toikka MM, Karhunen PT, et al. Quantitative 2D HSQC (Q-HSQC) via suppression of J-dependence of polarization transfer in NMR spectroscopy: application to wood lignin[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(14): 4362–4367. DOI: 10.1021/ja029035k.
- 18 Bryce DL, Bernard GM, Gee M, et al. Practical aspects of modern routine solid-state multinuclear magnetic resonance spectroscopy: one-dimensional experiments[J]. *Can J Anal Sci Spectrosc*, 2001, 46(2): 46–81. https://xueshu.baidu.com/usercenter/paper/show?paperid=1w460cj00b5k0mv0re1c0gn0nq282918&site=xueshu_se&hitarticle=1.

- 19 Li M, Xu W, Su Y. Solid-state NMR spectroscopy in pharmaceutical sciences[J]. TrAC Trends Anal Chem, 2021, 135: 116152. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116152.
- 20 崔莉, 姜娇娇, 王涛, 等. 低场核磁技术结合化学计量学法快速检测掺假阿胶产品 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1628-1633. [Cui L, Jiang JJ, Wang T, et al. Rapid detection of adulterated Ejiao by low-field nuclear magnetic resonance combined with chemometrics[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2019, 30(7): 1628-1633.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.07.029.

收稿日期: 2022年09月07日 修回日期: 2023年01月29日

本文编辑: 周璐敏 杨燕