

核磁共振波谱内标法测定四氢咔唑酮含量

徐娟芳, 张公军, 水晓雪

(中国科学院 宁波材料技术与工程研究所, 浙江 宁波 315201)

摘要: 四氢咔唑酮是咔唑酮类化合物中比较常见的结构单元, 是合成一些药物及具有生理活性的天然咔唑类生物碱的重要中间体。以氘代二甲基亚砷作为溶剂, 富马酸二甲酯为内标物, 采用 Bruker AVANCE NEO 600MHz 超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱仪进行定量氢谱测试。选取 δ 3.75 ppm 尖锐单峰为内标定量特征信号峰, δ 2.12 ppm 的质子峰作为样品特征峰进行定量, 建立一种快速、简单、准确测定四氢咔唑酮含量的方法。

关键词 四氢咔唑酮; 定量核磁共振; 内标法; 测定含量

Quantitatively Determination of 1,2,3,9-Tetrahydro-4H-Carbazol-4-One by ^1H NMR Spectroscopy with Internal Standard Method

Xu Juanfang, Zhang Gongjun, Shui Xiaoxue, Lu Huanming

(Ningbo Institute of Materials Technology and Engineering, Chinese Academy of Science, Ningbo, Zhejiang 315201, China)

Abstract: 1,2,3,9-Tetrahydro-4H-Carbazol-4-One is a common structural unit in carbazole compounds and a important intermediate in the synthesis of drugs and natural biologically active carbazole alkaloids. QNMR spectroscopy is acquired in DMSO, with Bruker AVANCE NEO 600MHz, and Dimethyl fumarate as internal standard. The integration of proton signals at δ 3.75 ppm for 1,2,3,9-Tetrahydro-4H-Carbazol-4-One and at δ 3.75 ppm for Dimethyl fumarate was used for quantification. The method is rapid, simple and accurate.

Keywords: 1,2,3,9-Tetrahydro-4H-Carbazol-4-One; qNMR; internal standard method; quantitatively determination

咔唑酮类化合物广泛存在于自然界中, 是合成一些药物及具有生理活性的天然咔唑类生物碱的重要中间体, 其在医药、化工等领域具有广泛的应用价值, 成为近年来化学化工领域的研究热点。四氢咔唑酮是咔唑酮类化合物中比较常见的结构单元, 是合成临床上使用最多的止吐药之一昂丹司琼的重要原料, 也可以用来合成抗高血压药物卡维地洛中间体, 还可以经过一步反应制备一系列取代四氢咔唑酮衍生物, 该系列化合物在天然产物全合成中具有广泛的应用^[1-4]。因此四氢咔唑酮的检测分析方法越来越受到人们的重视, 尤其是含量的定量分析。药物的质量控制包括有效成分鉴别、杂质检查、药物含量测定等项目, 对于已上市的药物, 可按照药典中的各个项目进行操作; 但对于创新药, 尚无可依据的质量标准, 须建立新的分析方法并对其进行评价。与传统检测手段相比, 定量核磁共振法的优势之一就是无需待测样品的对照品即可进行定量测定, 现已被用于多种药物的质量控制, 并被美国、欧洲等

国药典收载^[5]。

近年来，随着核磁共振波谱仪应用的日益普及，定量核磁共振技术（qNMR）的应用日趋成熟，在化学、生物、食品、农业和医学等领域得到广泛的应用^[6]。定量核磁共振分析方法在准确度、重复性、灵敏度等方面已经可以满足定量要求，且样品用量少，分析时间短，操作过程方便。2015 版《中国药典》四部已经将核磁共振定量法规定为一些药物的标准测定方法^[7]。但是，当前还没有出台相关的国家或行业标准进行四氢吡唑酮含量的测定。采用核磁共振波谱内标法，建立一种快速、简单、准确测定四氢吡唑酮含量的方法，可实现在没有标准对照品的情况下，测定其绝对含量，对四氢吡唑酮的质量控制具有重要意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker AVANCE NEO 600MHz 超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱仪（瑞士布鲁克公司）；XS205 型电子天平（METTLER TOLEDO 精密仪器有限公司）。

氘代二甲基亚砷（DMSO-d₆，99.8 atom%²D，cont.0.03V/V% TMS，宁波萃英化学技术有限公司）、富马酸二甲酯(批号：9FDECD1K，含量 99%，萨恩化学技术(上海)有限公司)、四氢吡唑酮。四氢吡唑酮的结构式见图 1。

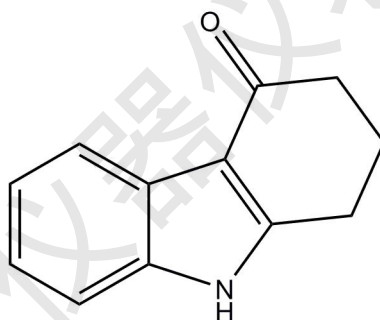


图 1 四氢吡唑酮的结构式

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配置

称取 5 mg~10 mg 富马酸二甲酯、15 mg~20 mg 四氢吡唑酮，室温下充分溶解于 0.5 mL 氘代二甲基亚砷后，转移至核磁管中。

1.2.2 实验条件

测定温度：298K，谱宽：19.8335ppm，采样时间：2 s，延迟时间为 20 s，扫描次数 16，脉冲角度：30°，脉冲程序：单脉冲，观察频率 600 MHz。

1.2.3 qNMR 计算公式

通过核磁共振波谱仪自带软件标定试样和内标物特征峰的面积比，根据公式（1）计算待测试样的含量：

$$P_x = \frac{I_x N_{std} M_x m_{std}}{I_{std} N_x M_{std} m_x} P_{std} \quad \text{-----} \quad (1)$$

P_x ——样品的含量；

P_{std} ——内标物的纯度；

I_x ——样品中定量峰的峰面积；

I_{std} ——内标物中定量峰的峰面积；

N_x ——样品定量峰对应的氢原子个数；

N_{std} ——内标物定量峰对应的氢原子个数；

M_x ——样品的分子量；

M_{std} ——内标物的分子量；

m_x ——样品的质量；

m_{std} ——内标物的质量；

2 结果与讨论

2.1 溶剂、内标和定量特征峰的选择

将四氢吡唑酮用氘代二甲基亚砜、氘代氯仿、氘代丙酮、氘代甲醇、重水溶解，发现只有氘代氘代二甲基亚砜能够完全溶解，溶液澄清，故选择氘代二甲基亚砜作为溶剂进行实验。

分别准确称取 5-10mg 对苯二甲酸二甲酯、顺丁烯二酸、富马酸二甲酯作为内标物，进行核磁氢谱的测定。核磁共振氢谱显示，富马酸二甲酯主要吸收峰与四氢吡唑酮样品信号峰较远、无干扰，且不与其发生化学反应。综合分析，可知最合适的内标物为富马酸二甲酯，选取 $\delta 3.75$ ppm 尖锐单峰为内标定量特征信号峰， $\delta 2.12$ ppm 的质子峰作为样品特征峰进行定量。四氢吡唑酮和富马酸二甲酯混合物的氢谱见下图 2，化学位移归属 $^1\text{H-NMR}(600\text{MHz}, \text{DMSO-d}_6)$ δ : 2.10-2.13 (m, 2H, COCH₂CH₂)。

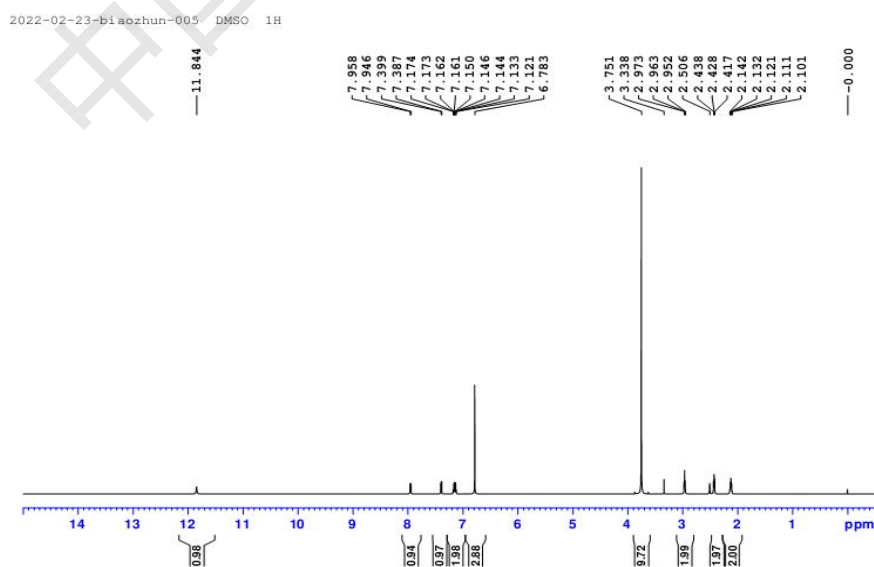


图 2 四氢吡唑酮和富马酸二甲酯混合物的氢谱

2.2 弛豫时间

弛豫延迟时间 (D1) 是实验中非常重要的参数之一。分别考察1s、2s、5s、10s、20s、40s时对信号峰的影响, 测试结果见表1。结果表明, 当D1在10s以上, 四氢吡唑酮含量均趋于稳定。考虑到普及实用性, 选择D1值稍大一些, 因此选择D1值为20s。

表1 弛豫时间试验四氢吡唑酮的含量

| 弛豫时间/s | 含量/% |
|--------|------|
| 1 | 99.9 |
| 2 | 99.2 |
| 5 | 97.9 |
| 10 | 97.3 |
| 20 | 97.1 |
| 40 | 97.0 |

2.3 精密度

取待测样品溶液连续测定6次, 获取¹H-NMR谱并积分, 计算四氢吡唑酮的含量, 结果见表2。所有结果的相对标准偏差 (RDS) 小于2%, 表明测试精密度较好。

表2 精密度试验四氢吡唑酮的含量

| 次数 | 含量/% |
|----|-------|
| 1 | 97.1 |
| 2 | 97.1 |
| 3 | 97.2 |
| 4 | 97.0 |
| 5 | 97.1 |
| 6 | 97.1% |

2.4 重复性

制备样品溶各6份, 分别置于6支核磁样品管中。获取¹H-NMR谱并积分, 计算四氢吡唑酮的含量, 结果见表3。所有结果的相对标准偏差 (RDS) 小于2%, , 表明测试重复性较好。

表3 重复性试验测试四氢吡唑酮的含量

| 次数 | 含量/% |
|----|-------|
| 1 | 97.1% |
| 2 | 97.3 |
| 3 | 97.1 |
| 4 | 97.5 |
| 5 | 97.7 |
| 6 | 97.2 |

3 结论

采用核磁共振波谱内标法,通过优化实验条件,对四氢吡唑酮进行含量测定,测定过程不需对照品,无需杂质分离及引入校正因子等即可实现快速、准确测定。

参考文献:

- [1] 陈卫民, 徐继红. 4-羟基吡唑的合成改进[J]. 中国医药工业杂志, 1998, 029(004): 185.
- [2] 胡仙超, 吴伟军, 孙楠, 等. 1,2,3,9-四氢-9-甲基-4H-吡唑-4-酮合成新工艺的研究[J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(1): 19-21.
- [3] Modesto de Candia, Giorgia Zaetta, Nunzio Denora, *et al.* New azepino[4,3-b]indole derivatives as nanomolar selective inhibitors of human butyrylcholinesterase showing protective effects against NMDA-induced neurotoxicity[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 288-298.
- [4] Mahesh R Kulkarni, MadhavS Mane, Usha Ghosh, *et al.* Discovery of tetrahydrocarbazoles as dual pERK and pRb inhibitors [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 134: 366-378.
- [5] 张芬芬, 蒋孟虹, 沈文斌, 等. 定量核磁共振(QNMR)技术及其在药学领域的应用进展[J]. 南京师范大学学报(工程技术版), 2014, 14(2): 8-18.
- [6] 黄挺, 张伟, 全灿等. 定量核磁共振法研究进展[J]. 化学试剂, 2012, 34(4): 327-332.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2015年版): 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 52