

固体核磁共振波谱在原料药和成品药分析中的应用

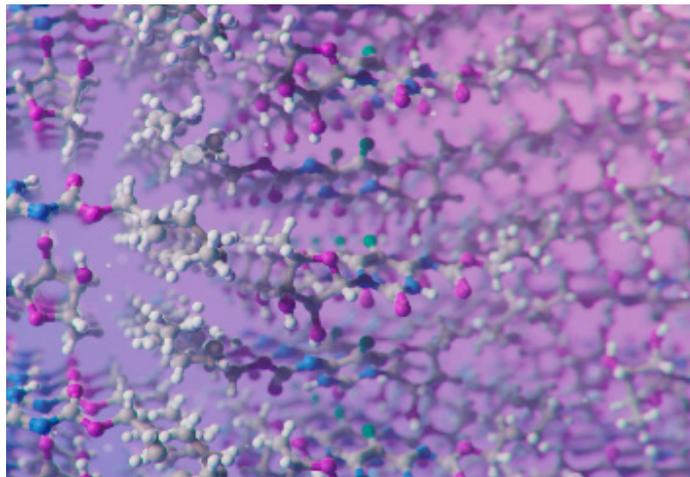
Eric Munson 博士，美国普渡大学工业和物理药学系教授兼系主任，堪萨斯分析服务公司合伙人。

对原料药和成品药的表征在制药行业中至关重要。固体核磁共振 (SSNMR) 波谱是一种出色的分析技术，可用于表征固态药物、识别不同晶体的结构、监测活性药物成分 (API) 放大过程中形式的转变、检测其他低含量形态 (如无定形态中的结晶体)、测定弛豫时间以预测物化稳定性，以及保护知识产权。同样地，固体核磁共振技术也特别适用于对成品药进行表征，因为赋形剂通常不会对药物分析造成显著干扰，即便成品药中的原料药含量较低时也是如此。

表征药物形态，包括多态性的必要性

原料药的物理状态及其与成品药其他成分的潜在相互作用，在药物递送过程中起着关键作用。例如，通过改变溶解度和形态之类的物理化学性质，不同的固体形式 (如多晶型、溶剂化物和无定形态) 可显著影响生物利用度，即人体可获得的药物量，还会影响药品可制造性，即药品成功制备的能力。在许多情况下，API 从一种晶型转变为另一种晶型可能会影响药效，因此，识别药品中 API 最稳定的晶型对于防止该类转变至关重要。大多制药公司都会进行一系列的筛选试验，以确定最稳定的晶型，以及 API 中所有可能的多态或溶剂化物形式。通常情况下，很难将 API 和成品药中可能存在的单一形态分离出来。

监管机构已经发布了新药和仿制药研发中关于多态性的指导意见。国际人用药品注册技术协调会 (ICH) 通过了 Q6A 准则，以确定何时对多态性进行控制和监测。此外，美国食品与药品管理局 (FDA) 也发布了指导意见，建议在仿制药注册申请 (ANDA) 中，原料药和成品药中的多态性问题何时必须得到处理。考虑到形态转变会影响药物的生物利用度，这一点显得尤为重要。一个



典型的例子是 Ritonavir [1]。在 Ritonavir 中，成品药是由含有饱和形式的结晶药物的悬浮液组成。Ritonavir 在市场上销售了两年，随后在成品药中发现了另一种更稳定的晶型。这种晶型最终扩散到所有的药物产品中，导致该药物的生物利用度大大降低。这迫使该产品退出市场，并要求其在重新投入市场之前必须重新研制配方。由于 Ritonavir 被用于治疗艾滋病 (获得性免疫缺陷综合征: AIDS)，该产品的下架对需要用该药治疗的患者们产生了严重影响。作为一种可确定多种形态是否存在的技术，固体核磁共振波谱在 ICH 和 FDA 的指导文件中都被着重强调。使用固体核磁共振研究多态性的原因如下：

为什么选择固体核磁共振波谱？

固体核磁共振波谱是一种特别强大的技术，可用于研究 API 和成品药中的多态性。其优点包括：

- 它是一种与粉末 X 射线衍射互补的技术，可识别不同的晶型
- 它是唯一一种无需标准样品，即可对每种形态进行定量分析的技术
- 它可以对 API 中结晶和无定形态进行定性和定量
- 它可以确定配方产品中每种成分的结晶和无定形态的含量
- 可进行多种原子核分析，为每种形态提供特定的波谱
- 由于每种晶型的弛豫时间通常不同，以此可用于识别不同晶型的谱峰
- 可利用弛豫时间选择性地增强或去除混合成分中的不同形态信号，这对于形态识别以及揭露侵犯知识产权现象大有裨益
- 通过选择性地标记 ^{13}C 和 ^{15}N 等原子核，可在灵敏度不佳时增强某些信号，并避免谱峰重叠
- 特别是对于配方产品而言，利用弛豫时间可确定粒径并预测化学降解率。

利用固体核磁共振波谱检测多晶型

固体核磁共振波谱在研究药物多态性方面具备多项优势,包括可利用几种典型的NMR活性核进行研究,并且每一种都能提供关于样品的特定信息。最常用于鉴别原料药和成品药中多晶型的原子核是 ^{13}C 和 ^{19}F ,研究较少的原子核包括 ^{15}N 、 ^{31}P 、 ^{23}Na 、 ^{35}Cl 等。对于 ^{13}C 而言,检测平均大小的药物化合物所得NMR谱中通常有10到30个谱峰。它们可用于识别样品的特定晶型。与粉末X射线衍射等其它分析技术相比, ^{13}C 固体核磁共振的优势在于谱峰分布不同——赋形剂的谱峰通常在60至110 ppm之间,而药物的谱峰往往在0至50 ppm以及110至200 ppm之间。

这意味着有许多药物谱峰不与辅料重叠,可以用来识别特定的晶型。在 ^{19}F SSNMR中,谱图中唯一的谱峰均来自原料药,因为没有辅料含有氟原子。

固体核磁共振波谱还能提供晶格中晶体学不等价位点的数目信息。特别是对于 ^{13}C 固体核磁共振而言,某种碳存在的两个峰通常表明了不对称单元中存在两种不同的分子构象或排列。与此类似的是,每种碳可能有三个到四个峰,对应于不对称单元中的分子数量。

在 ^{19}F 固体核磁共振波谱中,有时可能会观察到在不对称单元中一个分子单一晶型对应多个峰,因为 ^{19}F 和 ^1H 原子有类似的原子直径,所以有时环翻转可以为 ^{19}F 创造一个不同的环境,这通常不会被认为是一个新的晶型。由于这个原因,使用 ^{19}F NMR确定晶体学上的不等价位点的数量并不那么容易。

与其他分析技术相比,固体核磁共振波谱的检测和定量限相对较低。它本质上就是一种定量技术,因此它可以对各种形态进行相对定量,而无需准备校准曲线。它也可以比其他分析技术有更低的检测限,特别是对于高丰度的原子核,如 ^1H 、 ^{31}P 和 ^{19}F 。关于定量的其他细节将在下一节讨论。

固体核磁共振波谱对多晶型的定量与检测限

与大多数其它分析技术相比,固体核磁共振波谱的优势在于,它是一种固有的定量技术。在NMR谱中,分子中每个原子核的响应值在理论上是相同的。这意味着,NMR谱如在定量条件下采集,则波谱中每个峰的积分反映了样品中每种形态的含量。在大多数其他分析技术中,必须绘制校准曲线,因为仪器的响应值是未知的,无论是光学波谱法(如紫外可见波谱法)中的消光系数,还是粉末X射线衍射图中的峰强度(取决于取向与粒径等因素)。在包括NMR波谱法在内的多数分析方法中,通常使用3:1的信噪比来确定检测限(LOD),10:1的信噪比来确定定量限(LOQ)。

固体核磁共振波谱中多晶型的LOD和LOQ会随线宽、弛豫时间和化合物分子量的差异而显著不同。通常来说,那些分子量400g/mol左右、线宽0.5ppm或以下、 ^1H T1弛豫时间小于等于

10秒的原料药,很容易达到0.1%至1%的LOD。常见的原料药多可满足此类条件。在原料药中,如果不能分辨波谱中不同形态的谱峰,则会导致较低LOD和LOQ。如果各形态的弛豫特性不同,则可在实验中通过选择性地减少或去除某成分的信号来观测目标成分。检测限是绝对的,即便在低剂量的成品药中(如原料药重量比为1~5%),检测限仍能保持在0.1~1%,识别不同形态不是问题。

无定形药物和无定形固体分散体

无定形固体分散体(ASD)成品药中,以增加人体可利用的药物量,即其生物利用度。ASD可以将其提高数倍,从而减少病人的用药负担,甚至可能使候选药物成为可行的药物。ASD的挑战之一是活性药物成分处于亚稳状态,即它倾向于处于结晶态。由于即使是少量的结晶物质也会导致生物利用度的降低,监管机构通常要求对药品结晶度进行监控。固体核磁共振波谱是测定药物结晶度的一项出色技术。对于 ^{13}C SSNMR来说,无定形谱峰通常比结晶态谱峰宽约一个数量级,而且结晶态的谱峰可能会与无定形谱峰发生偏移(对于 ^{13}C SSNMR来说通常是0-4ppm),这使得它们易于识别和量化。在 ^{19}F 中,无定形药物的谱图也与晶体药物相似,只是线宽通常比晶体药物宽约一个数量级,这取决于官能团的不同,谱峰的位置也略有不同。正如在关于多晶型的章节中所指出的,与其他原子核相比, ^{19}F SSNMR的一个优点是氟原子只存在于原料药中,而不存在于辅料中。



就ASD中的晶体成分而言,其LOD和LOQ与多晶型类似。但与两种晶体成分的混合物相比,无定形信号谱峰显著变宽,因此有利于解决信号重叠问题。由于线宽的增加,无定形API的LOD通常比结晶成分高出一个量级。

用于制药的固体核磁共振分析新技术逐渐兴起

随着低温冷却固体核磁共振探头[2]、动态核极化(DNP[3]和时域(TD)固体核磁共振[4]等新兴技术的发展,固体核磁共振技术正不断演变并突破检测限。DNP-固体核磁共振有望大幅优化成品药中结晶形态的检测限。而TD-固体核磁共振有潜力应用在制药厂在线检测。为实现这一目标,将固体核磁共振技术的强大功能转化为制药行业中的实用解决方案这一步至关重要。

结论

固体核磁共振波谱技术非常适用于分析原料药和成品药中结晶和无定形物。这是一种固有的定量技术，可以选择性检测API和赋形剂。可对多种原子核进行研究，每种核都可以提供关于样品的特征信息。例如，选择性标记¹³C核既可提高灵敏度，又可从特定官能团中分离信号。而¹⁹F固体核磁共振波谱仅包含来自API的信号，而不含来自赋形剂的信号。此外，弛豫过滤和多维实验可分别用于成分区分及动力学监测。多晶型的检测限通常优于其它分析技术且不受成品药中赋形剂的影响。

关于堪萨斯分析服务公司 (KAS)

KAS现已经成为制药行业领先的固体核磁共振分析服务供应商。KAS在药物开发过程和成品药之间提供了一个重要的链接。固体核磁共振为一些重要问题提供了答案，如存在的特定晶型的类型和数量、配方中的无定形物质，以及预测药物的稳定性。这些变量影响着生物利用度和制造工艺等重要参数，而且往往无法通过任何其他技术进行测量。

*本文不含任何KAS提供的数据。

参考文献

1. John Bauer et al., Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism, *Pharm Res* 2001, Vol 18, No 6
2. Alia Hassan et al., Sensitivity Boosts by the CPMAS CryoProbe for Challenging Biological Assemblies, *J Magn Reson* 2020, 311: 106680
3. Qing Zhe Ni et al., In Situ Characterization of Pharmaceutical Formulations by Dynamic Nuclear Polarization Enhanced MAS NMR, *J Phys Chem B*, 2017, 121: 8132
4. Dirk Stueber and Stefan Jehle, Quantitative Component Analysis of Solid Mixtures by Analyzing Time Domain ¹H and ¹⁹F T1 Saturation Recovery Curves (qSRC), *J Pharm Sci* 2017, 106: 1828

其他参考

1. Thomas Offerdahl and Eric Munson, Solid-State NMR Spectroscopy of Pharmaceutical Materials, *Am Pharm Rev* 2004, 7: 109
2. Robert Berendt et al., Solid-State NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Analysis, *Trends Analyt Chem* 2006, 25: 977

布鲁克 BioSpin

info@bruker.com
www.bruker.com

布鲁克(北京)科技有限公司
北京市海淀区西小口路66号中关村
东升科技B-6号楼C座8层
邮编: 100192
电话: (010) 58333000
传真: (010) 58333299

上海办公室
上海市闵行区合川路2570号1号楼9楼
邮编: 200233
电话: (021) 51720800
传真: (021) 51720810

广州办公室
广州市海珠区新港东路618号南丰汇
6楼A12单元
电话: (020) 22365885/
(020) 22365886



布鲁克BioSpin微信公众号