

尼莫地平两种晶型的拉曼光谱分析和溶出度实验^{*}

焦凌泰¹, 张丽¹, 杨德智¹, 杨世颖¹, 杜冠华², 吕扬¹

(北京协和医学院 & 中国医学科学院药物研究所 1. 晶型药物研究北京市重点实验室; 2. 药物靶点研究和新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要 **目的** 建立鉴别尼莫地平不同晶型的新方法。**方法** 通过快速去溶剂法制备 A、B 2 种晶型, 采用粉末 X 射线衍射法、红外光谱法和拉曼光谱法对尼莫地平 2 种晶型物质进行鉴别分析。对 2 种晶型样品在 6 种不同介质中进行溶出实验。**结果** 晶 A 型和晶 B 型实验所得粉末 X 射线衍射图谱可用于尼莫地平的晶型鉴别。晶 B 型在 $2\theta=5^\circ$ 和 $2\theta=13^\circ$ 处有特征衍射峰, 而晶 A 型没有; 晶 A 型在 $2\theta=27^\circ$ 处存在特征衍射峰, 而晶 B 型没有, 根据特征衍射峰存在与否可有效区分 2 种晶型。晶 A 型和晶 B 型拉曼光谱图谱, 在 481 cm^{-1} 处晶 A 型存在特征散射峰; 通过对晶 A 型和晶 B 型样品的拉曼光谱图分析比较, 根据峰位置和峰强度的不同, 可有效鉴别 2 种晶型。溶出度实验结果表明晶 A 型样品溶解性优于晶 B 型。**结论** 在晶型研究过程中, 通过多种原理的分析技术, 如粉末 X 射线衍射法、红外光谱法、拉曼光谱法等, 可根据晶型性质, 多角度对晶型进行鉴别分析, 通过溶出实验确定晶 A 型溶解性优于晶 B 型。

关键词 尼莫地平; 晶型; X 射线衍射; 粉末; 分析; 拉曼光谱; 溶出度

中图分类号 R926

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1175-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.021

Raman Spectroscopy Analysis and Dissolution Experiment of Nimodipine in Two Crystal Forms

JIAO Lingtai¹, ZHANG Li¹, YANG Dezhi¹, YANG Shiyang¹, DU Guanhua², LYU Yang¹ (1. Beijing City Key Laboratory of Polymorphic Drugs, Center of Pharmaceutical Polymorphs; 2. Beijing City Key Laboratory of Drug Target and Screening Research, National Center for Pharmaceutical Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT Objective To establish an innovative methods for the identification of nimodipine polymorphs. **Methods** Nimodipine of two crystal forms were prepared by rapid solvent removal and identified by powder X-ray diffraction, infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. The dissolution study of the powder samples were carried out in six different mediums.

Results Powder X-ray diffraction patterns of crystal form A and B could be used for the identification of crystal forms of nimodipine. Crystal form B has characteristic diffraction peaks at $2\theta=5^\circ$ and $2\theta=13^\circ$ in the pattern, while crystal form A has characteristic diffraction peaks at $2\theta=27^\circ$ distinguishing two crystal forms effectively. Raman spectrum could be used to identify the crystal forms. Compared with Raman spectra of crystal form B, there exists characteristic scattering peak at 500 cm^{-1} in crystal form A. According to the position and intensity of the peaks of crystal form A and B, it could distinguish two crystal types effectively. The results of dissolution tests showed that the solubility of crystal form A is better than crystal form B. **Conclusion** Various analysis techniques in different principle were used in the research, such as Powder X-ray diffraction, Infrared spectroscopy and Raman Spectroscopy etc. Crystal forms were confirmed in several aspects according to the properties of different crystal form, and the solubility of crystal form A is better than crystal form B.

KEY WORDS Nimodipine; Crystal forms; X-ray diffraction, powder; Analysis, Raman spectroscopy; Dissolution

尼莫地平(nimodipine)是临床应用广泛的钙通道阻滞剂类降压药,已上市固体制剂包括片剂、胶囊和缓

释片等。由德国拜耳公司研发,商品名为尼莫通,作为脑功能障碍和蛛网膜下腔出血的首选药^[1]。尼莫地平对于脑血管性痴呆^[2]和颈动脉粥样斑块^[3]有治疗作用。研究表明,尼莫地平存在多晶型现象,而且不同晶型药物的生物利用度存在很大差异^[4]。笔者利用粉末 X 射线衍射、红外光谱法和拉曼光谱等方法对药物晶型进行分析,并对晶 A 型和晶 B 型在 6 种不同介质中溶解性质进行考查,为尼莫地平的优势药用晶型评价和晶型质量控制提供科学数据与参考。

1 材料与仪器

1.1 原料 尼莫地平,商品名:尼立苏,新华制药股份有限公司生产,批号:1411112,含量>99%。

收稿日期 2017-07-05 修回日期 2017-07-29

基金项目 * 国家重点研发计划(2016YFC1000900, 2016YFC1000901);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2017-I2M-1-010)

作者简介 焦凌泰(1994-),男,河北人,在读博士,从事药物分析研究。电话:010-63030566, E-mail: 1109365166@qq.com。

通信作者 吕扬(1959-),女,北京人,研究员,博士生导师,从事药物分析研究。电话:010-63165212, E-mail: luy@imm.ac.cn。

1.2 仪器 D/max-2550 型粉末 X 射线衍射仪(日本 Rigaku 公司);LABRAM HR EVO 型拉曼光谱仪(法国 HORIBA 公司);TU-1901 型双光束紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Spectrum400 型傅里叶红外仪(英国 PerkinElmer 公司);XS-105 型微量分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司,感量:0.01 mg);Laborata4000 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);DZF-6020 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);RC8MD 型溶出实验仪(天津市天大天发科技有限公司)。

1.3 试剂 甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、叔丁醇、二氯甲烷、四氢呋喃、丙酮等均为分析纯,购自北京化工厂。水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 尼莫地平 2 种晶型的制备 对甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、叔丁醇、二氯甲烷、四氢呋喃、丙酮等有机溶剂制备方法进行筛查。晶 A 型:称取尼莫地平 100 mg,在甲醇-水(1:1)溶剂 40 mL 中完全溶解,在 50 ℃, -0.1 MPa 条件下快速去溶剂得到黄色固体,在 60 ℃, -0.06 MPa 条件下干燥 12 h,即可得到晶 A 型产物。晶 B 型:称取尼莫地平 100 mg,在丙酮 10 mL 中完全溶解,在 40 ℃, -0.1 MPa 条件下快速去溶剂得到黄色固体,在 40 ℃, -0.06 MPa 条件下干燥 12 h,即可得到晶 B 型产物。两种晶型的粉末样品研磨后过筛孔内径(150.0 ± 6.6) μm (100 目)筛,备用。

2.2 粉末 X 射线衍射分析 精密称量尼莫地平晶 A 型和晶 B 型各 50 mg,分别进行粉末 X 射线衍射分析,实验结果见图 1。晶 A 型和晶 B 型粉末 X 射线衍射图谱可用于尼莫地平的晶型鉴别和晶型纯度分析。尼莫地平两种晶型的粉末 X 射线衍射图谱存在明显差异,两者拓扑结构完全不同,晶 A 型存在 4 个强衍射峰,晶 B 型存在 10 个强衍射峰。其中晶 B 型在 $2\theta = 5^\circ$ 和 $2\theta = 13^\circ$ 处有特征衍射峰,而晶 A 型没有;晶 A 型在 $2\theta = 27^\circ$ 处存在特征衍射峰,而晶 B 型没有,根据特征衍射峰的存在与否可以有效区分 2 种晶型。

2.3 红外光谱分析 精密称量尼莫地平晶 A 型和晶 B 型各 5 mg,分别进行红外光谱分析,实验结果见图 2。晶 A 型和晶 B 型的红外光谱图谱存在一定差异,表现在晶 B 型样品的红外图谱在 $3\,649\text{ cm}^{-1}$ 附近存在平缓的吸收峰,而晶 A 型样品没有,可用于辅助鉴别 2 种晶型。

2.4 拉曼光谱分析 精密称量尼莫地平晶 A 型和晶 B 型各 30 mg,分别进行拉曼光谱分析。通过对晶 A 型和晶 B 型样品的拉曼光谱图的分析比较,根据峰位置和峰强度不同,可有效鉴别 2 种晶型。见图 3。

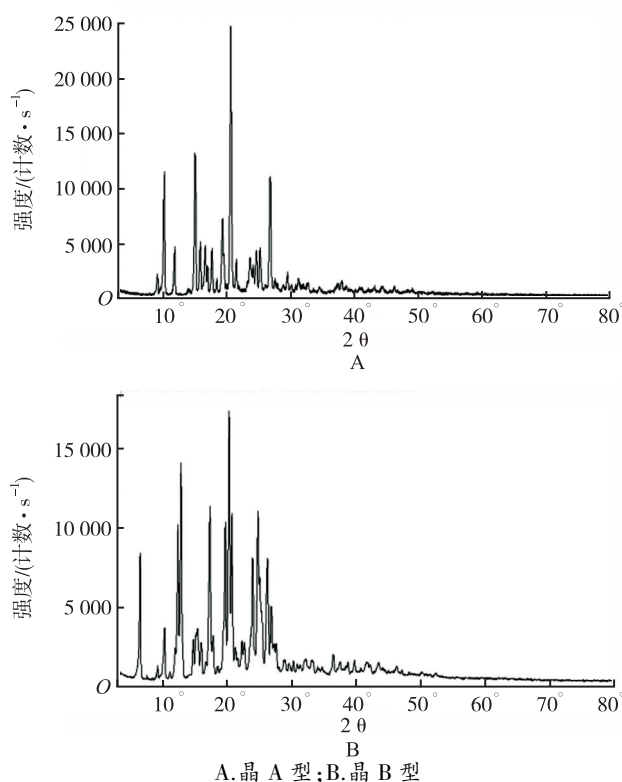


图 1 尼莫地平两种晶型的粉末 X 射线衍射图

A.crystal form A;B.crystal form B

Fig.1 Powder X ray diffraction patterns of two crystal forms of nimodipine

2 种晶型样品在 $4\,000 \sim 200\text{ cm}^{-1}$ 范围内主要拉曼光谱散射峰有:晶 A 型位于 $481, 599, 644, 815, 974, 1\,007, 1\,099, 1\,140, 1\,202, 1\,352, 1\,443, 1\,461, 1\,497, 1\,525, 1\,587, 1\,628, 1\,645, 1\,703, 2\,930, 2\,989, 3\,079, 3\,301\text{ cm}^{-1}$ 处有散射峰。晶 B 型在 $4\,000 \sim 200\text{ cm}^{-1}$ 范围内位于 $598, 644, 815, 990, 1\,007, 1\,099, 1\,138, 1\,202, 1\,351, 1\,443, 1\,495, 1\,528, 1\,587, 1\,627, 1\,645, 1\,702, 2\,927, 2\,987, 3\,079, 3\,306\text{ cm}^{-1}$ 处有散射峰。两种晶型拉曼光谱图的主要区别在于:①晶 A 型样品在 481 cm^{-1} 处存在特征吸收峰,而晶 B 型样品则没有。将位于 481 cm^{-1} 的散射峰归属为脂肪醚基团的变形振动,由于 2 种晶型在单晶结构中构象存在差异,晶 A 型的侧链处于直立状态,晶 B 型的侧链为平伏状态,导致晶 A 型在 481 cm^{-1} 产生特征性散射峰。②2 种晶型在部分峰强度上存在差异,其中在 $1\,352\text{ cm}^{-1}$ 处主强峰和 $1\,645\text{ cm}^{-1}$ 处的次强峰的峰强度之比, $1\,352\text{ cm}^{-1}$ 的散射峰归属为苯环上的硝基取代基, $1\,645\text{ cm}^{-1}$ 处的散射峰归属为杂环上多取代的烯烃的伸缩振动峰。晶 A 型两个强峰强度之比为 10 192 :

10 174, 晶 B 型的强峰比次强峰峰强度之比为 8 274 : 6 411, 推测与 2 种晶型的构象差别有关。由于两种构象中两个六元环的位置未能完全重合, 取代基位置和烯烃的构象存在差异, 导致振动强度不同。③晶 A 型样品在 $1\,461\text{ cm}^{-1}$ 处存在尖锐小峰, 而晶 B 型样品没有, 小峰进行特征性归属的难度较大, 推测由于晶 A 型属于单斜晶系, 该晶系仅有 1 个二重轴或对称面, 晶 B 型属于正交晶系, 该晶系有三个互相垂直的二重轴; 因此晶 B 型和晶 A 型对称性不同, 可能导致基团和骨架的化学环境不同, 从而导致振动强度产生变化^[5], 同时由于晶型不同, 尤其是 2 种晶型在构象上明显差异, 导致拉曼光谱图局部存在细微差别, 可以作为晶 A 型和晶 B 型样品指纹特征图谱用于晶型鉴别分析。

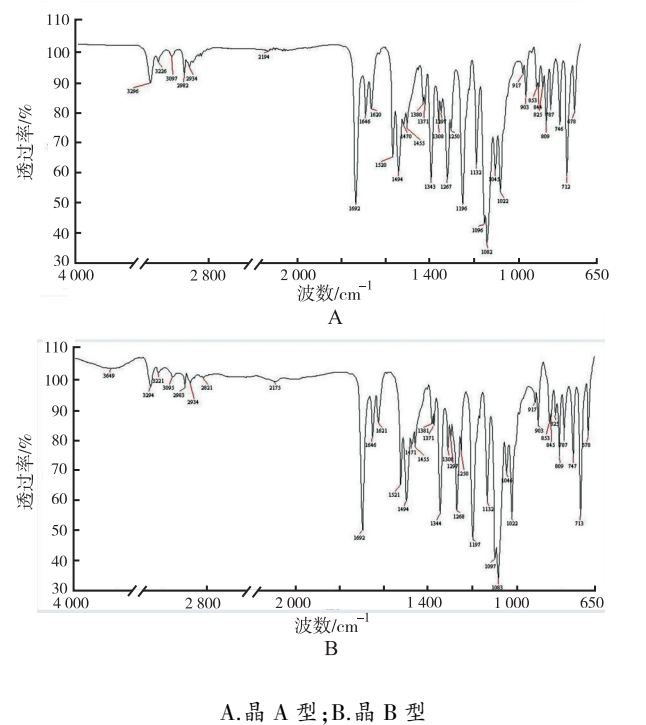


图 2 尼莫地平两种晶型的红外光谱图

A.crystal form A;B.crystal form B

Fig. 2 Infrared spectrum of two crystal forms of nimodipine

2.5 溶出度实验 样品在 6 种不同溶出介质中进行溶出实验, 分别为纯化水、 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、 pH 值 = 4.5 醋酸缓冲溶液、 pH 值 = 6.8 磷酸盐缓冲溶液、0.2% SDS 缓冲液和 0.5% SDS 缓冲液。其中为纯化水、盐酸溶液、醋酸缓冲溶液和磷酸盐缓冲溶液在 5, 15, 30, 60, 90 min 及 2, 3, 4, 5, 6, 7 h 分别取样至样品浓度基本不变。0.2% SDS 缓冲液和 0.5% SDS 缓冲液在 5, 15, 30,

60, 90 min 及 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 h 分别取样至样品浓度基本不变。样品用紫外-可见分光光度计进行全波长扫描, 在 238 nm 处有最大吸收波长, 样品浓度在 238 nm 条件下测量, 绘制浓度-时间曲线。尼莫地平在 6 种不同介质中溶解性质存在明显差异, 在 0.5% SDS 缓冲液中溶解性最好, 在 0.2% SDS 和 0.5% SDS 缓冲液中溶解速率和溶解度远高于其他 4 种介质。

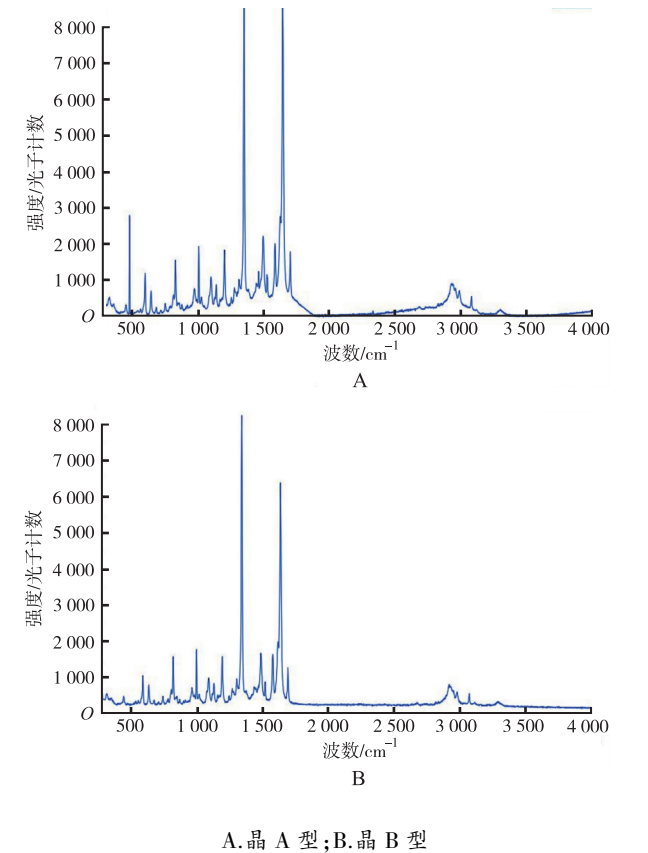


图 3 尼莫地平两种晶型的拉曼光谱图

A.crystal form A;B.crystal form B

Fig.3 Raman spectra of two crystal forms of nimodipine

在 0.2% SDS 缓冲液中, 晶 A 型在约 2 h 达到最大溶出度, 晶 B 型在约 6 h 达到最大溶出度, 晶 B 型最大溶出度略高于晶 A 型。在 0.5% SDS 缓冲液中, 晶 A 型在约 2 h 达到最大溶出度, 晶 B 型在约 4 h 达到最大溶出度, 晶 A 型最大溶出度略高于晶 B 型。0~2 h 内, 晶 A 型溶出度均高于晶 B 型。

尼莫地平在 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中溶解性最差, 晶 A 型溶出度为其在 0.5% SDS 缓冲液中溶出度 3.07%, 晶 B 型溶出度为其在 0.5% SDS 缓冲液中溶出度 3.02%。尼莫地平在纯化水、盐酸溶液、醋酸缓冲液和磷酸盐缓冲液中均在约 7 h 达到最大溶出度。在醋酸缓冲液和

磷酸盐缓冲液中,晶 A 型最大溶出度和溶解速率均明显高于晶 B 型。在纯化水中,晶 A 型最大溶出度略低于晶 B 型,在 0~6 h 时间段内,晶 A 型溶解度明显高于晶 B 型。在盐酸溶液中,尼莫地平溶出度和溶解速率最低,晶 A 型在约 1.5 h 开始溶出,晶 B 型在 2~3 h 内开始溶出,在 1~3 h 时间段,晶 A 型溶出度高于晶 B 型,在 3~4 h 内,两种晶型溶出度曲线相交,在 4~6 h 时间段,晶 B 型溶出度高于晶 A 型,两种晶型在盐酸中的最大溶出度没有明显差别。见图 4。体外溶出实验显示,晶 A 型样品的溶解性优于晶 B 型。

3 讨论

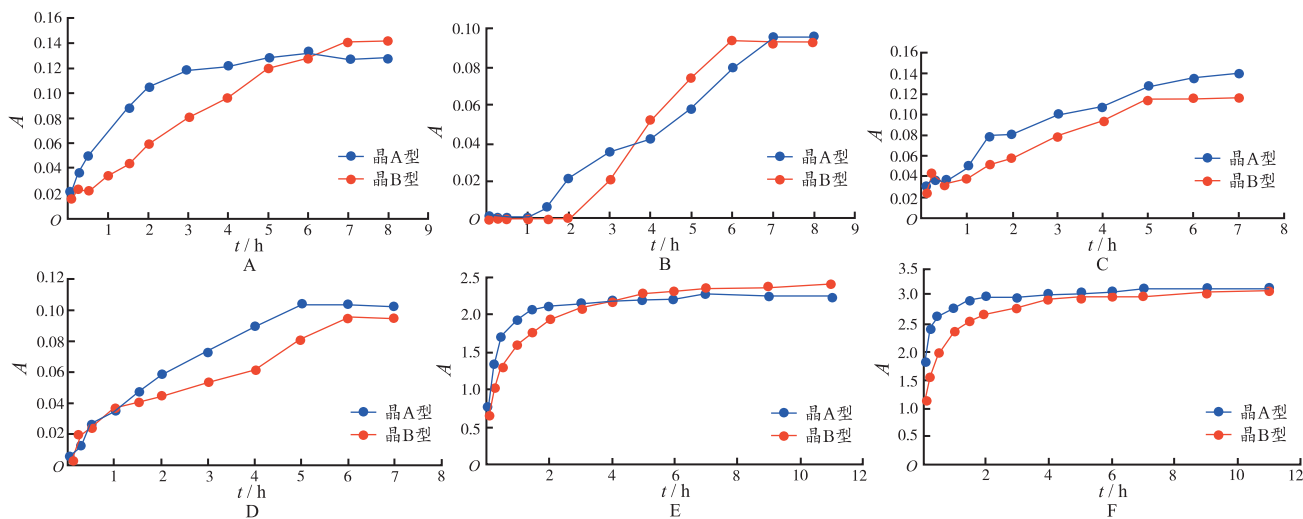
剑桥晶体数据中心 (Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC) 已报道尼莫地平存在晶 A 型和晶 B 型 2 种晶型^[6]。1989 年, WANG 等^[7]报道晶 B 型的单晶结构,属正交晶系,空间群为 $P2_12_12_1$, 晶胞参数分别为 $a=12.590$, $b=14.641$, $c=11.636\text{\AA}$, 晶胞体积 $V=2\,144.815\text{\AA}^3$, 晶胞内分子数 $Z=4$; 1990 年, LANGS 等^[8]报道晶 A 型的单晶结构,属单斜晶系,空间群为 $P2_1/C$, 晶胞参数 $a=13.933$, $b=10.985$, $c=14.839\text{\AA}$, $\beta=104.90^\circ$, 晶胞体积 $V=2\,194.803\text{\AA}^3$, 晶胞内分子数 $Z=4$ 。尼莫地平分子中存在两条侧链,苯环与分子其他结构为垂直状态。2 种晶型在构象上的主要区别为,晶 A 型的一条侧链为平伏状态,另一条侧链末端为直立状态,而晶 B 型的两条侧链均为平伏状态。

袁恒杰等^[9-10]对晶 A 型和晶 B 型在光照和高湿条件下的稳定性影响因素实验结果表明,两种晶型在强

光下均不稳定,稳定性顺序为晶 B 型>晶 A 型,湿度对于尼莫地平的稳定性没有明显影响。逢秀娟等^[11]测定不同温度下,尼莫地平在水溶液中溶解度,通过绘制溶解度曲线两者交于 47°C ,由此推断尼莫地平在不同温度析出的晶型。王晋等^[12]计算 2 种晶型的吉布斯自由能,推断晶 A 型的生物利用度高于晶 B 型。

粉末 X 射线衍射作为晶型鉴别分析的权威方法,可以有效鉴别尼莫地平两种晶型,以及确定样品中是否存在混晶成分,是鉴别尼莫地平 2 种晶型的特征分析方法。红外光谱和拉曼光谱用于研究分子基团和骨架振动和转动频率变化,相比于粉末 X 射线衍射和差示扫描量热法,具有应用范围更广,更快速、样品无损等优点,适用于微量样品分析。由于尼莫地平的 2 种晶型在构象和空间群存在差异,分子基团或分子骨架的振动频率不同,在拉曼光谱图存在明显差异,通过拉曼光谱和红外图谱对照,从分子水平解释不同晶型产生不同特征峰和峰强度改变的原因,从而有效区分晶 A 型和晶 B 型样品。

同种药物的不同晶型,其溶解性质、溶出速率等理化性质存在差异,影响药物的生物利用度,研究药物溶解性质对于药物的质量控制具有重要意义^[13]。溶出实验过程由于在纯化水、盐酸溶液、醋酸缓冲液和磷酸盐缓冲液中溶出度很低,在实验过程中干扰因素较多。15 min 时可能由于滤膜的滤过不完全或取样位置发生改变等因素,导致样品在前 30 min 浓度测量存在误



A.纯化水;B.盐酸溶液;C.醋酸缓冲液;D.磷酸盐缓冲液;E.0.2%SDS 缓冲液;F.0.5%SDS 缓冲液

图 4 尼莫地平两种晶型在不同介质中溶出实验结果

A.Water;B.Hydrochloric acid solution;C.Acetic acid buffer;D.Phosphate buffer; E.0.2%SDS buffer;F.0.5%SDS buffer

Fig.4 Results of dissolution tests of two crystal forms of nimodipine in different medium

差,但不影响说明两种晶型的溶出过程和趋势。

笔者在本研究通过快速去溶剂法获得尼莫地平的 2 种晶型,通过粉末 X 射线衍射技术所得图谱与理论粉末图谱对比,确证晶型种类。并通过粉末 X 射线衍射、红外光谱和拉曼光谱从晶型的不同性质、多角度地对 2 种晶型进行表征,为尼莫地平的 2 种晶型的鉴别和质量控制提供了重要的科学依据。

参考文献

- [1] 李帅,王伟姣,李昌亮,等.国产尼莫地平及其制剂质量的研究进展[J].中南药学,2012,10(9):689-691.
- [2] 柯绍发,张丹红,陈秋月.尼莫地平对脑血管性痴呆患者认知功能的影响[J].医药导报,2005,24(10):911.
- [3] 贾震雷.尼莫地平联合辛伐他汀治疗颈动脉粥样斑块 40 例[J].医药导报,2010,29(7):888-889.
- [4] 杨世颖,邢逞,张丽,等.基于粉末 X 射线衍射技术的固体制剂晶型定性分析[J].医药导报,2015,34(7):930-934.
- [5] 杨梁,张敏,鹿颐,等.拉曼光谱法研究盐酸林可霉素多晶型[J].药物分析杂志,2010,30(11):2120-2124.
- [6] 邢逞,孙加琳,杨世颖,等.国产尼莫地平固体制剂的晶

型现状研究[C].中国晶型药物研发技术研讨会暨中国晶体学会药物晶体学专业委员会成立大会,2011.

- [7] WANG S D,HERBETTE L G,RHODES D G. Structure of the calcium channel antagonist, nimodipine [J]. Acta Crystallogr C,1989,45 (Pt 11):1748-1751.
- [8] LANGS D A,STRONG P D,TRIGGLE D J.Receptor model for the molecular basis of tissue selectivity of 1, 4-dihydropyridine calcium channel drugs[J].J Comput Aided Mol Des,1990,4(3):215-230.
- [9] 袁恒杰,陈大为,范立君,等.尼莫地平多晶型化学稳定性影响因素的考察[J].中国药学杂志,2005,40(24):1871-1873.
- [10] 袁恒杰,陈大为,刘艳丽,等.尼莫地平多晶型家兔体内药动学研究[J].中国药学杂志,2005,40(8):609-612.
- [11] 逢秀娟,张汝华,孙淑英,等.尼莫地平晶型转变的研究[J].沈阳药科大学学报,1997,14(1):11-15.
- [12] 王晋,张汝华,孙淑英.尼莫地平多晶型的研究[J].药学报,1995,30(6):443-448.
- [13] 胡帆,赵睿,张丽,等.盐酸伐昔洛韦多晶型的溶解性质与药动学研究[J].医药导报,2012,31(11):1396-1400.

高效液相色谱法测定异甘草酸镁中 18 β -异构体的含量*

王善春,顾红梅,张喜全,陈智林,李洋,李军

(正大天晴药业集团股份有限公司研究院,南京 210042)

摘要 目的 建立高效液相色谱(HPLC)法测定异甘草酸镁中 18 β -异构体的含量。方法 色谱柱为 Agilent Extend- C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相为 0.1 mol·L⁻¹磷酸二氢钾缓冲液(氢氧化钾调 pH 值至 7.0)-乙腈(80:20),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}$ C,检测波长 250 nm。结果 异甘草酸镁与 18 β -异构体之间的分离度>2.0,18 β -异构体的线性范围为 0.41~2.46 μ g·mL⁻¹($r=0.999\ 8$),检测限为 0.21 ng,平均回收率为 100.2%,99.1%,110.2%,RSD 为 0.9%,0.1%,0.2%($n=3$)。结论 该方法操作简便,结果准确,可用于异甘草酸镁中 18 β -异构体的含量测定。

关键词 异甘草酸镁;18 β -异构体;色谱法,高效液相;含量测定

中图分类号 R927.2 文献标识码 B 文章编号 1004-0781(2017)10-1179-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.022

Determination of 18 β -isomer in Magnesium Isoglycyrrhizinate by HPLC

WANG Shanchun, GU Hongmei, ZHANG Xiquan, CHEN Zhilin, LI Yang, LI Jun (Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Research Institute, Nanjing 210042, China)

ABSTRACT Objective To establish a HPLC method for determination of 18 β -isomer in magnesium isoglycyrrhizinate.

Methods The determination was performed by Agilent Extend-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m). Mobile phase consisted of 0.1 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate buffer solution (adjusted to pH 7.0 with potassium hydroxide)-acetonitrile (80:20) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the detection wavelength was set at 250 nm. **Results** The resolution of magnesium isoglycyrrhizinate and 18 β -isomer was greater than 2.0. The linear range of them was 0.41-2.46 μ g·mL⁻¹($r=0.999\ 8$), the detection limit was 0.21 ng, and the average recovery were 100.2%,99.1%,110.2%,RSD were 0.9%,0.1%,0.2% ($n=3$).

Conclusion The method is simple and accurate, and can be used for determination of 18 β -isomer in magnesium isoglycyrrhizinate.

KEY WORDS Magnesium isoglycyrrhizinate; 18 β -isomer; Chromatography, high performance liquid; Content determination