

# 基于核磁共振对盐酸阿比多尔片的定性和定量研究

张铁山<sup>1</sup>, 尚曙玉<sup>1</sup>, 赵振满<sup>1</sup>, 邢汝月<sup>1</sup>, 纪媛媛<sup>1</sup>, 张智强<sup>2\*</sup> (1.黄河科技学院, 郑州 450005; 2.天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300301)

**摘要:** 目的 基于核磁共振对盐酸阿比多尔片进行定性和定量研究。方法 采用盐酸阿比多尔化学位移  $\delta$ : 7.88 ppm 处质子峰为定量峰, 马来酸化学位移  $\delta$ : 6.33 ppm 处为内标峰, 在温度为 298 K, 弛豫延迟时间 10 s, 采样时间为 4.01 s, 扫描次数为 32 次的条件下采集混合物的核磁共振图谱, 对定量峰和内标峰积分后计算其含量。比较核磁共振定量法与 HPLC 的测定结果。结果 盐酸阿比多尔线性范围是 10.53~28.09 mg·mL<sup>-1</sup>, 回收率在 99.76%~101.01%, 精密度和稳定性良好, 方法学专属性较高。核磁共振定量法与 HPLC 的测定结果基本一致, 而核磁共振定量法具有快速、准确的优势。结论 建立的核磁共振定量法可用于盐酸阿比多尔片定性和定量研究, 提供了一种新的质量控制方法。

**关键词:** 盐酸阿比多尔片; 马来酸; 核磁共振法; 定性; 定量

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)04-0507-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.04.012

引用本文: 张铁山, 尚曙玉, 赵振满, 等. 基于核磁共振对盐酸阿比多尔片的定性和定量研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(4): 507-511.

## Qualitative and Quantitative Research of Arbidol Hydrochloride Tablets Based on Quantitative Nuclear Magnetic Resonance

ZHANG Tieshan<sup>1</sup>, SHANG Shuyu<sup>1</sup>, ZHAO Zhenman<sup>1</sup>, XING Ruyue<sup>1</sup>, JI Yuanyuan<sup>1</sup>, ZHANG Zhiqiang<sup>2\*</sup> (1.Huanghe Science & Technology College, Zhengzhou 450005, China; 2.Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300301, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To carry on qualitative and quantitative research of arbidol hydrochloride tablets based on quantitative nuclear magnetic resonance(qNMR). **METHODS** Proton signal peaks at  $\delta$ : 7.88 ppm of arbidol hydrochloride and  $\delta$ : 6.33 ppm of maleic acid were employed as quantitative peaks and internal standard peaks, respectively. NMR spectrum of mixture were collected at the temperature of 298 K with 10 s relaxation delay, 4.01 s acquisition time and 32 scanning times. And integrated the quantitative peak and internal standard peak to calculate the content. The results of qNMR and HPLC were also compared. **RESULTS** There was a linear relationship for arbidol hydrochloride in the range of 10.53–28.09 mg·mL<sup>-1</sup>. The recoveries were in the range of 99.76%–101.01%. The precision and stability were good, and the methodological speciality was high. The content determination results of qNMR method were generally consistent with those of HPLC method. However, qNMR had an advantage of rapid and accuracy. **CONCLUSION** The established method of qNMR can be used for qualitative and quantitative analysis of arbidol hydrochloride tablets, providing a new method for quality control.

**KEYWORDS:** arbidol hydrochloride tablets; maleic acid; nuclear magnetic resonance; qualitative; quantitative

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)具有较强的致病性及传染性,对世界造成了极大影响,截至2020年6月10日24时,全球累积确诊人数>700万人,死亡人数近40万人,严重威胁了人类健康及生命安全。在国家卫生健康委员会办公厅、国家中医药管理局办公室下发的《关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知》中,明确将盐酸阿比多尔作为推荐用药<sup>[1-2]</sup>,结构式见图1。该药物除了具有干扰素诱导、免疫调节作用外,还具有较强的抗流感病毒作用。临床上主要用于治疗由A、B型流感病毒引起的上呼吸道感染<sup>[2]</sup>及冠

状病毒感染<sup>[3]</sup>等。据文献报道<sup>[4]</sup>,盐酸阿比多尔片的含量测定主要是HPLC,但该方法检测时间较长,试剂消耗量较大,且未见盐酸阿比多尔片的定性鉴别。在COVID-19全球范围内暴发的特殊时期,建立一种快速、准确,定量和定性分析同步进行的质量控制方法具有重要意义。

最初核磁共振技术主要用于结构确证<sup>[5]</sup>,但随着高磁场和傅里叶变换应用以及超低温探头的出现,核磁共振技术被广泛应用于对照品、杂质、原料药、制剂等含量测定<sup>[6-8]</sup>,成为定量分析领域的新研究热点,核磁共振定量法(quantitative

作者简介:张铁山,男,讲师 E-mail: ztskdx2003@126.com

\*通信作者:张智强,男,硕士,高级工程师

E-mail: zhangzq1985@126.com

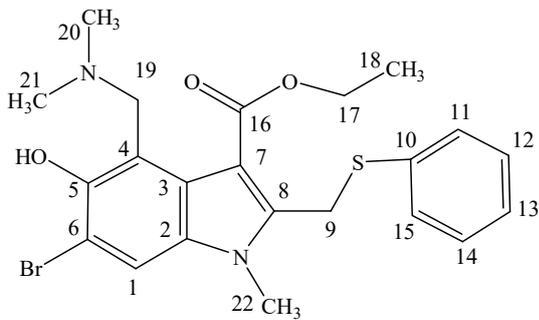


图1 盐酸阿比多尔化学结构式  
Fig. 1 Chemical structure of arbidol hydrochloride

nuclear magnetic resonance, qNMR)在中国、美国及日本等药典中均被收录,测定结果的准确度接近 HPLC 水平<sup>[9]</sup>。另外,中国药典 2020 年版二部中并未收录盐酸阿比多尔及制剂,其含量测定及鉴别急需一种佐证方法。因此,本研究采用 qNMR 快速测定盐酸阿比多尔的含量,同时对盐酸阿比多尔片中提取物进行定性研究。

## 1 仪器与试剂

AvanceIII 型核磁共振波谱仪(600 MHz, Bruker 公司); AB265-S 型分析天平(Mettler Toledo 精密仪器有限公司); 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

盐酸阿比多尔对照品(沈阳中海生物技术开发有限公司,批号:181015;含量:99.4%);盐酸阿比多尔片(石药集团欧意药业有限公司,批号:386200101,386200102,386200103;规格:0.1 g×12 片,盐酸阿比多尔含量应为标示量的 95%~105%);氘代甲醇(CD<sub>3</sub>OD, Sigma 公司);马来酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:190015-201905;含量:99.2%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 测试条件

qNMR 的仪器参数:脉冲序列为 zg30,中心频率(O1P)为 7.11 ppm,扫描次数(NS)为 32 次,脉冲宽度(P1)为 9.54 s,弛豫延迟时间(D1)为 10 s,温度为 298 K,采样时间(AQ)为 4.01 s。

HPLC:色谱柱为 Agilent Extend-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm);检测波长为 315 nm;流动相为乙腈-0.1%三乙胺溶液(稀 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调节 pH 值至 2.0)=48:52;流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量为 20 μL。

### 2.2 内标与供试品溶液配制

精密称取马来酸对照品 200.00 mg 溶于 50 mL 的 CD<sub>3</sub>OD 中,得浓度为 4.0 mg·mL<sup>-1</sup> 内标溶液。取

10 片盐酸阿比多尔片剂,研成细粉,称取细粉约 0.5 g,加入 10 mL 的内标溶液后超声 3 min,6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液 0.5 mL 转移至核磁管中,即得 qNMR 的供试品溶液。

### 2.3 qNMR 计算公式

对 qNMR 图谱相位校正后,选取水平基线与峰型轮廓线交叉处为积分起止点,重复积分 5 次,记录峰面积后选取均值计算。盐酸阿比多尔片中盐酸阿比多尔含量计算公式为:  $W_u = W_s A_u E_u / A_s E_s$ 。式中:  $A_u$  为定量峰面积;  $W_u$  为待测成分质量(mg);  $E_u$  为待测成分质子当量;  $A_s$  为内标峰面积;  $W_s$  为内标质量(mg);  $E_s$  为内标质子当量。

### 2.4 盐酸阿比多尔片提取物的核磁共振法鉴别

取盐酸阿比多尔片剂粉末约 0.5 g,加入 10 mL 的 CD<sub>3</sub>OD 后超声 3 min,6 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液 0.5 mL 转移至核磁管中,分别测试盐酸阿比多尔片提取物的 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 和异核单量子相干谱(heteronuclear single quantum coherence spectrum, HSQC)(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD),结果分别见图 2~4。<sup>1</sup>H-NMR 中 δ: 7.85~7.93(s, 1H)和 δ: 7.31~7.38(m, 4H)为盐酸阿比多尔结构式中 5 个芳香氢。δ: 1.35~1.38(m, 3H), 2.91~2.96(s, 3H×2), 3.59~3.64(s, 3H)为结构式中的 4 个甲基氢。Δ: 4.27~4.35(m, 2H)和 δ: 4.68~4.73(s, 2H)和 4.81~4.85(s, 2H)分别为结构式中的 3 个亚甲基氢。5 位酚羟基氢由于质子交换作用,未在 <sup>1</sup>H-NMR 图谱中显示。质子个数与盐酸阿比多尔分子式(C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S)质子个数相符。<sup>13</sup>C-NMR 中显示 δ: 166.25, 149.27, 145.49, 134.21, 132.95, 132.53, 128.84, 127.80, 125.86, 116.35, 109.58, 107.83, 104.86, 60.70, 53.93, 41.93, 30.28, 29.49 和 13.12 的 19 个碳谱信号,其中有 2 个芳香碳和 1 个甲基碳发生重叠,因此碳原子个数与盐酸阿比多尔结构式相符。HSQC 相关点解析见表 1,盐酸阿比多尔片粉末 CD<sub>3</sub>OD 提取物的化学结构与盐酸阿比多尔结构式相符。

### 2.5 qNMR 含量测定

**2.5.1 内标的选择和专属性考察** 由于盐酸阿比多尔结构式中有酚羟基,选用 DMSO-*d*<sub>6</sub> 或 CDCl<sub>3</sub> 时会使活泼质子-OH 出峰,会导致定量峰附近基线不平稳,从而引入积分误差。选用 CD<sub>3</sub>OD 作为测试溶剂,可以通过质子交换作用,消除盐酸阿比多尔结构式中活泼质子-OH 对定量峰积分影响,

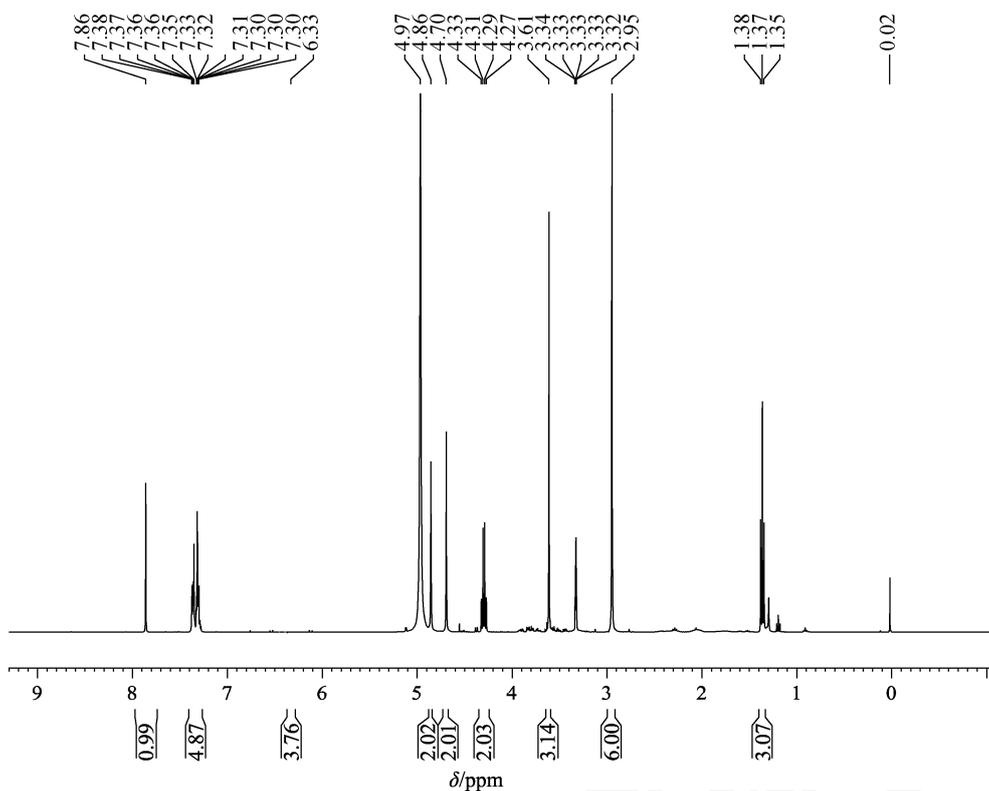


图2 盐酸阿比多尔片的  $^1\text{H-NMR}$  谱  
 Fig. 2  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of arbidol hydrochloride tablets

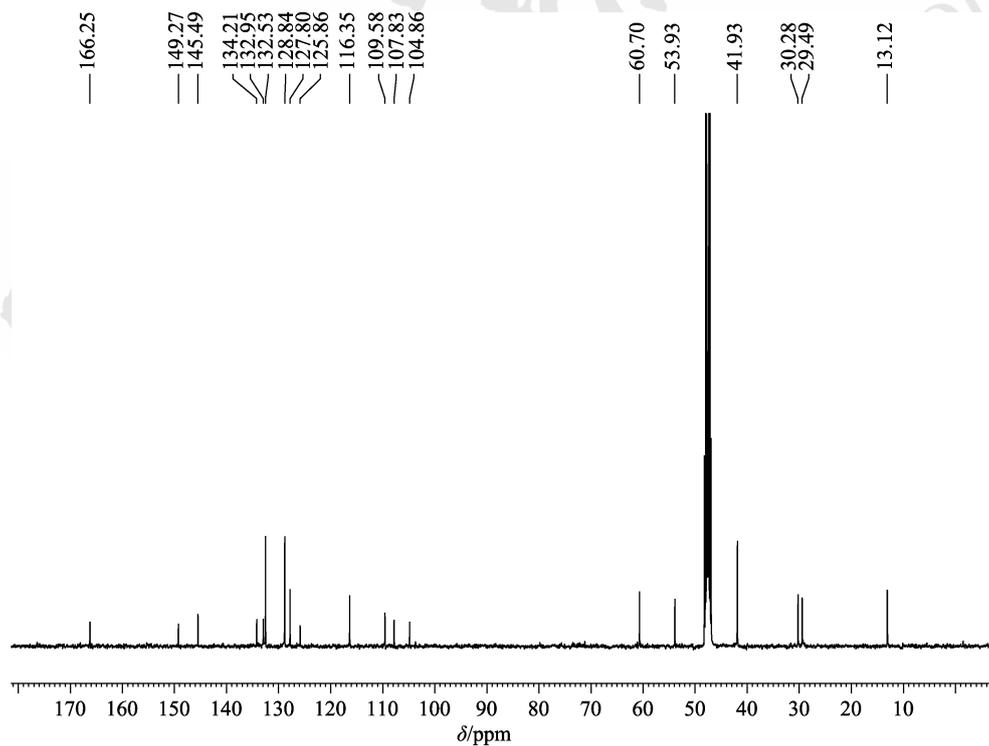


图3 盐酸阿比多尔片的  $^{13}\text{C-NMR}$  谱  
 Fig. 3  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of arbidol hydrochloride tablets

而且盐酸阿比多尔在  $\text{CD}_3\text{OD}$  中溶解度较好, 提取效率较高。由盐酸阿比多尔的  $^1\text{H-NMR}$  图谱可以看出, 在化学位移  $\delta: 5.3\sim 7.3$  ppm 处无盐酸阿比多尔

的质子峰, 因而选用在  $\delta: 6.33$  ppm 出峰的马来酸作为内标物质。峰裂分可能会引入积分误差<sup>[7-9]</sup>, 一般选取孤立的单峰作为定量峰。由于盐酸阿比多尔

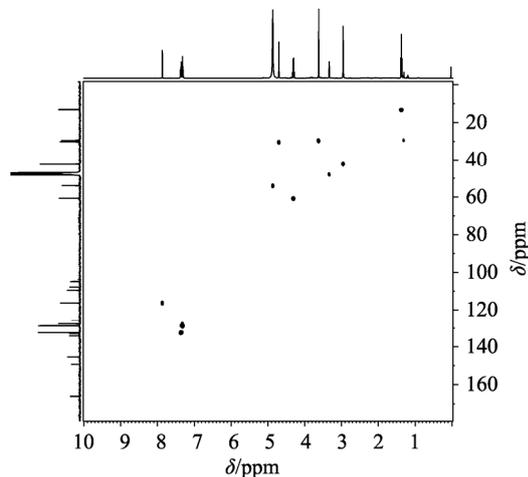


图4 盐酸阿比多尔片的HSQC谱  
Fig. 4 HSQC spectrum of arbidol hydrochloride tablets

表1 盐酸阿比多尔片提取物的结构解析  
Tab. 1 Structure analysis of the extract of arbidol hydrochloride tablets

H 化学位移/ppm	个数	裂分	C 化学位移/ppm	HSQC 相关点
1.35~1.38	3	m	13.12	C <sub>18</sub> -H <sub>3</sub>
2.91~2.96	6	s	41.93	C <sub>20</sub> -H <sub>3</sub> 、C <sub>21</sub> -H <sub>3</sub>
3.59~3.64	3	s	29.49	C <sub>22</sub> -H <sub>3</sub>
4.27~4.35	2	m	60.70	C <sub>9</sub> -H <sub>2</sub>
4.68~4.73	2	s	30.29	C <sub>19</sub> -H <sub>2</sub>
4.81~4.85	2	s	53.93	C <sub>17</sub> -H <sub>2</sub>
7.31~7.38	5	m	125.86, 127.80, 128.84, 132.53, 132.95	C <sub>11</sub> -H、C <sub>12</sub> -H、C <sub>13</sub> -H、C <sub>14</sub> -H、C <sub>15</sub> -H
7.85~7.93	1	s	116.35	C <sub>1</sub> -H

在化学位移  $\delta$ : 7.88 ppm 处的质子峰为一单峰, 因而选为定量峰。不同类型的质子恢复 Boltzmann 平衡的时间不同, 所以样品定量峰应选择与内标峰同一类型的质子。盐酸阿比多尔在化学位移  $\delta$ : 7.88 ppm 处的质子峰为苯环上的氢, 属于烯键氢, 而马来酸的定量峰是一种烯键氢, 因而能保证测量结果的准确性。取供试品溶液, 获取 qNMR 图谱, 结果见图 5。可以看出, 马来酸  $\delta$ : 6.33 ppm 处的内标峰和盐酸阿比多尔  $\delta$ : 7.88 ppm 处的定量峰不与附近的质子峰产生干扰, 专属性较高。

**2.5.2 线性回归曲线** 采用马来酸内标溶液配制浓度为 10.53, 14.24, 18.93, 24.63, 28.09 mg·mL<sup>-1</sup> 盐酸阿比多尔对照品溶液, 并获取 qNMR 谱, 相位校正后图谱放大, 选取水平基线与峰型轮廓线交叉点作为积分起止点, 记录峰面积。以定量峰( $A_S$ )与内标峰( $A_r$ )的面积比为横坐标( $x$ ), 待测成分浓度为纵坐标( $y$ ), 得回归方程为  $y=2.745 2x-0.364 2$  ( $r=0.999 2$ )。由线性相关系数  $r$  可知, 在 10.53~28.09 mg·mL<sup>-1</sup> 内线性良好。

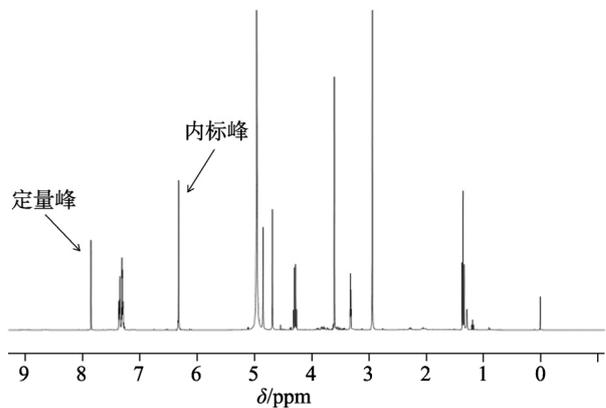


图5 盐酸阿比多尔与马来酸混合物的氢核磁共振定量谱  
Fig. 5 qNMR spectrum of the mixture of arbidol hydrochloride and maleic acid

**2.5.3 仪器精密度考察** 取供试品溶液, 连续测定 6 次, 获取 qNMR 谱, 相位校正后并积分, 记录盐酸阿比多尔定量峰与马来酸内标峰面积比值  $A_S/A_r$ , 带入线性回归方程计算含量及其 RSD 值。结果显示含量 RSD 为 0.31% ( $n=6$ ), 因此仪器精密度良好。

**2.5.4 稳定性考察** 取室温放置的供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 获取 qNMR 谱, 相位校正后并积分, 记录盐酸阿比多尔定量峰与马来酸内标峰面积比值  $A_S/A_r$ , 带入线性回归方程, 计算含量变化的 RSD 值。计算结果显示 RSD 值为 0.84% ( $n=6$ ), 因此供试品在室温稳定性良好。

**2.5.5 重复性试验** 平行配制 6 份盐酸阿比多尔片的供试品溶液, 分别进样, 获取 qNMR 谱, 相位校正后并积分, 记录盐酸阿比多尔定量峰与马来酸内标峰面积比值  $A_S/A_r$ , 带入线性回归方程, 计算含量变化的 RSD 值。计算结果显示 RSD 值为 1.69% ( $n=6$ ), 因此方法重复性良好。

**2.5.6 定量限和检测限考察** 取盐酸阿比多尔对照品溶液, 采用 CD<sub>3</sub>OD 逐步稀释, 进样测定并获取 qNMR 谱, 相位校正后并积分, 记录盐酸阿比多尔定量峰。以信噪比( $S/N$ )约为 10 时作为定量限,  $S/N$  值约为 3 时作为检出限。测试结果显示, 定量限为 0.50 mg·mL<sup>-1</sup>, 检测限为 0.20 mg·mL<sup>-1</sup>。

**2.5.7 回收率试验** 平行配制 3 份盐酸阿比多尔供试品溶液, 分别加入低(80.00 mg)、中(100.00 mg)、高(120.00 mg)的盐酸阿比多尔, 分别进样, 获取 qNMR 谱, 相位校正后并积分, 记录盐酸阿比多尔定量峰与马来酸内标峰面积比值  $A_S/A_r$ , 按照“2.3”项下计算公式计算盐酸阿比多尔含量及回收率, 结果见表 2。低、中、高平均回收率在 99.76%~101.01%, RSD 值分别为 0.83%, 0.74%, 0.65%。

表 2 回收率试验结果

Tab. 2 Results of recovery test

原有量/mg	添加量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
100.57	80.00	179.62	98.81	99.76	0.83
	80.00	180.69	100.15		
	80.00	180.83	100.32		
100.61	100.00	199.67	99.06	100.22	0.74
	100.00	200.99	100.38		
	100.00	201.82	101.21		
101.18	120.00	222.07	100.74	101.01	0.65
	120.00	221.83	100.54		
	120.00	223.29	101.76		

## 2.6 2种测试方法结果的比较

取盐酸阿比多尔片粉末,分别采用 qNMR 和 HPLC 测定片剂中盐酸阿比多尔含量,结果见表 3。由测定结果可知, qNMR 与 HPLC 测定结果较为一致。证明了本研究建立的 qNMR 可用于盐酸阿比多尔片含量测定。

表 3 HPLC 和 qNMR 测定结果

Tab. 3 Determination results of HPLC and qNMR

批次	HPLC/mg·g <sup>-1</sup>	qNMR/mg·g <sup>-1</sup>
386200101	202.14	201.14
386200102	200.86	201.22
386200103	201.93	202.36

## 3 讨论

qNMR 应用于测定药物含量时,核磁仪器的弛豫延迟时间、采集时间、采集次数等参数对结果的准确度至关重要<sup>[8-11]</sup>。确定这些测试参数时均选择定量峰与内标峰面积比值基本稳定时的初始值,以节省时间,提高测试效率。确定盐酸阿比多尔定量峰和内标物质的定量峰后,需要调整核磁仪器的中心频率 O1P,使之位于定量峰与内标峰的中间处,可以在对 qNMR 图谱相位校正时,使定量峰和内标峰同步变化,获得对称性较好的 qNMR 图谱,有助于提高测试结果的准确度。

据文献报道<sup>[4]</sup>,HPLC 测定盐酸阿比多尔片含量时,测试过程需要盐酸阿比多尔对照品,并需优化色谱条件以使盐酸阿比多尔与其各种杂质、辅料等色谱峰得到有效分离,因而需要投入大量的人力物力来进行方法学开发。另外,对片剂中有效成分的鉴别还需联合红外光谱法、紫外光谱法及滴定法等,较为繁琐。qNMR 应用于原料药、制剂等含量测试时不需要待测成分的对照品,也无需对待测成分和杂质进行分离即可完成定量分析<sup>[12]</sup>。通过观察待测成分的氢谱,找出空白区域后

即可选择出合适内标物质进行含量测定。qNMR 的另一优势是样品含量测试可以和定性鉴定同时进行,大大缩短了分析时间,节约成本。通过比较盐酸阿比多尔 2 种含量测定方法的检测结果, qNMR 法的测定结果基本与 HPLC 的结果一致,证明了 qNMR 可以用于盐酸阿比多尔片的质量控制,为其质量控制提供了一种快速、准确的新方法,值得进一步推广和应用。

## REFERENCES

- [1] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. 2020-03-03. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfc4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [2] ZHANG W, GUO N, YANG X M. Progress in gene polymorphisms related to the recommended medications for the treatment of COVID-19[J]. Lett Biotechnol(生物技术通讯), 2020, 31(3): 346-351.
- [3] PENG H R, JIANG L L, HE Y H, et al. Preparation and verification of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pseudo particles[J]. Acad J Second Military Med Univ(第二军医大学学报), 2020, 41(4): 359-364.
- [4] FENG Y F, YAN Y, LI K X, et al. Determination of arbidol hydrochloride and its related substance in tablets by HPLC[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2007, 27(4): 492-494.
- [5] HUANG Z H, CAI D D, ZHUO K H. Analysis and identification of a new dithio-carbodenafil analogue in health foods[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(7): 991-994.
- [6] BHARTI S K, ROY R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy[J]. Trac Trends Anal Chem, 2012(35): 5-26.
- [7] ZHANG Y, GENG Y, ZHU R D, et al. Standardization of the first batch of national reference standard of brimonidine tartrate[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(2): 178-181.
- [8] FENG Y X, WU X F, XIAO X Y. Determination of moxifloxacin hydrochloride and its impurity 7-amino-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinocarboxylic acid by <sup>1</sup>H qNMR[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(4): 357-361.
- [9] HAO H J, JIA Y Z, HAN R, et al. Determination of gefitinib by two methods of quantitative nuclear magnetic resonance[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2017, 48(5): 711-715.
- [10] XU K, WEI Y G, HAO H J, et al. Determination on content of hydrochloride palmitate in tablets by nuclear magnetic resonance[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2018, 37(12): 1495-1499.
- [11] LIANG L N, ZHANG X Q, LI S, et al. Determination of content of dextromethorphan hydrobromide tablets based on quantitative proton nuclear magnetic resonance[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(3): 304-307.
- [12] ZHANG X X, LI Y J, CUI X G, et al. Determination of desloratadine in tablets by quantitative proton nuclear magnetic resonance[J]. Her Med(医药导报), 2020, 39(5): 679-681.

收稿日期: 2020-11-26

(本文责编: 曹粤锋)