

^1H 核磁共振定量法测定氢溴酸右美沙芬片含量

梁丽娜¹, 张晓千¹, 李省¹, 张智强² (1. 郑州澍青医学高等专科学校, 郑州 450064; 2. 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300301)

摘要: 目的 采用 ^1H 核磁共振定量法(quantitative proton nuclear magnetic resonance, qHNMR)测定氢溴酸右美沙芬片中氢溴酸右美沙芬含量。方法 qHNMR 以氢溴酸右美沙芬化学位移 δ 7.05~7.15 ppm 处质子峰为定量峰, 苯甲酸苄酯 δ 5.38 ppm 处为内标峰, 在温度为 300 K, 采样时间为 4.01 s, 弛豫延迟时间 10 s, 扫描次数为 32 次条件下采集混合物 qHNMR 图谱。比较 qHNMR 与 HPLC 的含量测定结果。结果 qHNMR 专属性较高, 线性范围 5.88~23.08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 回收率为 98.4%~99.7%, 定量限为 0.45 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限为 0.10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。qHNMR 含量测定结果与 HPLC 的测定结果基本一致。结论 qHNMR 可用于氢溴酸右美沙芬片中氢溴酸右美沙芬的含量测定。

关键词: 氢溴酸右美沙芬片; 苯甲酸苄酯; ^1H 核磁共振定量法

中图分类号: R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)03-0304-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.03.009

引用本文: 梁丽娜, 张晓千, 李省, 等. ^1H 核磁共振定量法测定氢溴酸右美沙芬片含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): 304-307.

Determination of Content of Dextromethorphan Hydrobromide Tablets Based on Quantitative Proton Nuclear Magnetic Resonance

LIANG Lina¹, ZHANG Xiaoqian¹, LI Sheng¹, ZHANG Zhiqiang² (1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300301, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of dextromethorphan hydrobromide tablets based on quantitative proton nuclear magnetic resonance(qHNMR). **METHODS** Proton signal peaks at δ 7.05–7.15 ppm of dextromethorphan hydrobromide and δ 5.38 ppm of benzyl benzoate were served as quantitative peaks and internal standard peaks, respectively. The spectra of the mixture were collected at 300 K with 4.01 s acquisition time, 10 s relaxation delay and 32 scanning times. The results of qHNMR and HPLC were also been compared. **RESULTS** The speciality of qHNMR was very high. There was a linear relationship for dextromethorphan hydrobromide in the range of 5.88–23.08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The recoveries were in the range of 98.4%–99.7%. The limit of quantitation was 0.45 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the limit of detection was 0.10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The content determination results of qHNMR were generally consistent with those of HPLC. **CONCLUSION** The qHNMR can be used for the quantitative determination of dextromethorphan hydrobromide tablets.

KEYWORDS: dextromethorphan hydrobromide tablets; benzyl benzoate; quantitative proton nuclear magnetic resonance

核磁共振技术最初主要用于化合物的结构确证^[1], 随着傅里叶变换应用, 该技术在含量测定中的应用受到越来越多的关注^[2]。美国药典、日本药典、欧洲药典等各国药典均对该法进行了收录。中国药典 2010 年版开始收录核磁共振定量法(quantitative nuclear magnetic resonance, qNMR), 中国药典 2015 年版继续收录于三部 0441 项下。qNMR 研究最多的是 ^1H 核磁共振定量法(quantitative proton nuclear magnetic resonance, qHNMR), 据报道^[3-7]该法含量测定的准确度已接近 HPLC。在专属性较高、不发生化学反应等条件下, 以结构及纯度已知的化合物作为内标物质,

加入到待分析成分中配制成混合溶液后, 通过设置一定的核磁测试参数与核磁共振波谱仪中测试待测成分和内标物质的峰面积, 根据两者的称样量和分子量最终计算出待测成分的含量。

氢溴酸右美沙芬的分子式是 $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}\cdot\text{HBr}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 是一种中枢性镇咳药, 具有无成瘾性、毒性小等优点, 临床上主要用于感冒、急慢性支气管炎、支气管哮喘引起的咳嗽等^[8], 结构式见图 1。氢溴酸右美沙芬片收载于中国药典 2015 年版二部^[9], 其含量测定采用 HPLC^[8], 成分鉴别采用滴定法、紫外法和红外光谱法, 整个含量测定、鉴别等过程中试剂消耗量大, 花费时间

基金项目: 河南省自然科学基金项目(162300510118)

作者简介: 梁丽娜, 女, 硕士, 讲师 Tel: 15639718381 E-mail: liangli2019@126.com

较长。qHNMR 无需对照品,也无需进行分离,可实现样品含量测定和鉴别同步进行。本研究首次采用 qHNMR 测定氢溴酸右美沙芬含量,同时对氢溴酸右美沙芬片成分进行鉴别,为氢溴酸右美沙芬片质量控制提供一种简单、快速、定量准确的新方法。

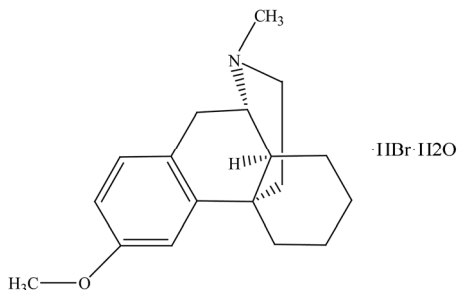


图1 氢溴酸右美沙芬化学结构式

Fig. 1 Structure of the dextromethorphan hydrobromide

1 仪器与试药

AB265-S 型分析天平(METTLER TOLEDO 精密仪器有限公司); AvanceIII 型 600 MHz 核磁共振波谱仪(Bruker 公司); 1260 型高效液相色谱仪(配置四元高压液相泵、自动进样器、DAD 检测器等, Agilent 公司)。

氢溴酸右美沙芬片(广州白云山光华制药股份有限公司,批号: 20180405, 20180407, 20180411); 氢溴酸右美沙芬对照品(中国食品药品检定研究院批号: 100201-201403; 含量: 99.5%); CDCl_3 (美国 Sigma 公司,批号: 011009835); 苯甲酸苄酯(美国 Sigma 公司,批号: T20171025S); 十二烷基苯磺酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号: 20161210)。

2 方法与结果

2.1 测试条件

qHNMR: 采用 zg30 脉冲序列,测定温度为 300 K,脉冲宽度(P1) 9.54 s,中心频率(O1P) 6.24 ppm,采样时间(AQ)为 4.01 s,弛豫时间(D1)为 10 s,样品扫描次数(NS) 32 次。

HPLC: 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-20 mmol·L⁻¹十二烷基苯磺酸钠(醋酸调节 pH 值 2.0)=6:4; 检测波长为 281 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 20 μL。

2.2 内标与供试品溶液配制

内标物质经真空干燥处理。精密称取苯甲酸苄酯内标物质 25.00 mg 置于 20 mL 的量瓶中,加入 CDCl_3 溶解后定容,混匀,得浓度为 1.25 mg·mL⁻¹

的内标溶液。取 15 片氢溴酸右美沙芬片剂,研细后,称取粉末 300 mg,加入 2.0 mL 的苯甲酸苄酯内标溶液后超声 8 min,静置 30 min,取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.3 qHNMR 计算公式

qHNMR 计算公式为 $W_u = W_s A_u E_u / A_s E_s$ 。式中: W_u 为氢溴酸右美沙芬质量(mg); W_s 为内标质量(mg); A_u 为氢溴酸右美沙芬定量峰面积; E_u 为氢溴酸右美沙芬质子当量(氢溴酸右美沙芬相对分子质量与定量峰代表的质子数之比); A_s 为苯甲酸苄酯内标峰面积; E_s 为内标质子当量(苯甲酸苄酯相对分子质量与内标峰代表的质子数之比)。

2.4 qHNMR 鉴别

取“2.2”项下粉末 300 mg 置于 5 mL 的离心管中,加入 2.0 mL 的 CDCl_3 后超声 8 min,静置 30 min 后取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液测试 qHNMR(600 MHz, CDCl_3)。δ: 7.05~7.15(d, 1H)和 δ: 6.75~7.88(m, 2H)为氢溴酸右美沙芬芳香苯环的 3 个芳香氢。δ: 3.76~3.86(s, 3H)和 δ: 2.73~2.80(s, 3H)分别为结构式中的甲氧基和甲基。由于结构式中亚甲基和次甲基较多,且均在高场区出峰,重叠较为严重,但 qHNMR 图谱显示 28 个质子个数与氢溴酸右美沙芬分子式($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO} \cdot \text{HBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$)质子个数相符,结果见图 2。

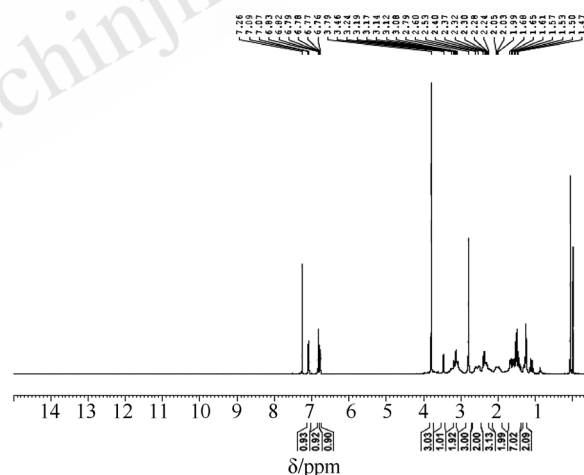


图2 氢溴酸右美沙芬片的 ¹H 核磁共振定量谱图

Fig. 2 Quantitative proton nuclear magnetic resonance spectrum of dextromethorphan hydrobromide tablets

2.5 qHNMR 含量测定

2.5.1 专属性考察 结合氘代溶剂对氢溴酸右美沙芬片中有有效成分的溶解度,最终采用 CDCl_3 作为测试溶剂。 CDCl_3 对有效成分有较高的溶解度,而片剂中的辅料极难溶解于 CDCl_3 中,可有效避

免辅料对含量测定的干扰。取供试品溶液,按“2.1”项下条件获取图谱,苯甲酸卞酯 δ 5.38 处的内标峰和氢溴酸右美沙芬 δ 7.05~7.15 处的定量峰与附近的质子峰之间无干扰,专属性较高。结果见图 3。

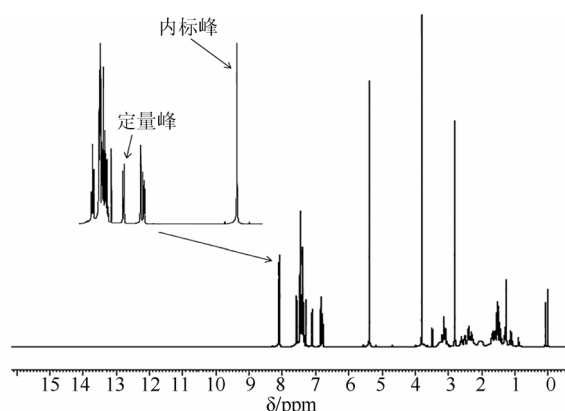


图 3 氢溴酸右美沙芬与苯甲酸卞酯混合物的 ^1H 核磁共振定量谱图

Fig. 3 Quantitative proton nuclear magnetic resonance spectrum of the mixture of dextromethorphan hydrobromide and benzyl benzoate

2.5.2 线性回归曲线 选择定量峰或内标峰进行积分时,首先将 qHNMR 谱图放大,选取定量峰或内标峰峰型的轮廓线与水平基线交叉处为积分的起止点,并重复积分 5 次,选取平均值,进行 qHNMR 的方法学研究。采用苯甲酸卞酯内标溶液分别配制浓度为 5.88, 8.08, 10.14, 15.47, 18.94, 23.08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氢溴酸右美沙芬对照品溶液,并获取各浓度的 qHNMR 谱。以氢溴酸右美沙芬定量峰与内标峰峰面积之比为横坐标(x),质量浓度之比为纵坐标(y),得回归方程: $y=1.9457x-0.2022$ ($r=0.9991$)。说明在浓度为 5.88~23.08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.5.3 仪器精密度试验 取“2.2”项下配制的供试品溶液,按“2.1”项下测试条件,连续进样测定 6 次,以样品定量峰(A_s)与内标峰面积(A_r)比值为(A_s/A_r)参考,计算含量的 RSD 值为 0.93%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 样品稳定性试验 取“2.2”项下配制的供试品溶液,按“2.1”项下测试条件,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样测定,以 A_s/A_r 为参考,计算含量的 RSD 值为 1.71%,表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.5 重复性试验 按“2.2”项下配制供试品溶液方法平行配制 6 份样品,按“2.1”项下测试条

件分别进样测定氢溴酸右美沙芬片含量并计算 RSD 值,结果显示 RSD 值为 1.86%,说明方法重复性良好。

2.5.6 回收率试验 按“2.2”项下平行配制 3 份氢溴酸右美沙芬供试品溶液,分别加入低、中、高氢溴酸右美沙芬对照品溶液,qHNMR 测试含量并计算回收率。平均回收率在 98.4%~99.7%,低、中、高浓度的 RSD 值均<0.94%。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of recoveries

本底值/mg	加样量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
10.05	5.00	14.93	97.6	98.4	0.92
	5.00	15.01	99.2		
	5.00	14.96	98.2		
9.96	7.50	17.51	100.7	100.6	0.94
	7.50	17.43	99.6		
	7.50	17.57	101.5		
10.11	10.00	20.02	99.1	99.7	0.60
	10.00	20.14	100.3		
	10.00	20.07	99.6		

2.5.7 定量限和检测限考察 精密取氢溴酸右美沙芬对照品,采用不含内标的 CDCl_3 逐步稀释,分别进样测定。以信噪比(S/N)^[6-7]约为 10 时作为定量限(LOQ),结果显示 LOQ 为 0.45 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以 S/N 值约为 3 时作为检出限(LOD),结果表明 LOD 为 0.10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 质量平衡法与 qHNMR 测定结果

取 3 批氢溴酸右美沙芬片剂,分别采用 qHNMR 和 HPLC^[8]测定含量。由测定结果可知,qHNMR 与 HPLC 测定结果较为一致。结果见表 2。

表 2 HPLC 和 ^1H 核磁共振定量测定结果

Tab. 2 Results of HPLC and quantitative proton nuclear magnetic resonance method

批次	HPLC	qHNMR
20180405	30.22	29.94
20180407	30.14	30.02
20180411	29.96	30.08

3 讨论

采集时间、弛豫时间、采样次数等仪器参数对 qHNMR 测定药物含量非常重要^[3-7]。分别以 A_s/A_r 趋于稳定时的初始值为参考进行参数确定,以节省测试时间,提高效率。仪器的中心频率 O1P 值位置对含量测定也有较大影响^[5],应使 O1P 值

位于定量峰与内标峰的中间,可以减小相位校正时对定量峰或内标峰面积的影响,对提高含量测定的准确性有较大益处。采用 qHNMR 测定含量时,氘代溶剂的选择对含量测定也有很大影响,预实验结果显示,当采用 CD₃OD 作为溶剂时,其 qHNMR 图谱非常杂乱,可能是 CD₃OD 溶解了片剂辅料所致。当采用 CDCl₃ 配制供试品溶液时,由于片剂辅料极难溶解于 CDCl₃ 中,因而 qHNMR 图谱仅显示氢溴酸右美沙芬的质子信息,排除了辅料对含量测定及鉴别的干扰。

HPLC 测定氢溴酸右美沙芬片含量时,不仅需要对照品,还需要优化色谱条件进行有效分离。采用流动相进行供试品的配制,难免会溶解一定的辅料,进而可能会对有效成分分离、含量测定等造成一定的影响,整个含量测定过程试剂消耗量大,花费时间较长。有效成分的鉴别需要联合应用滴定法、紫外法和红外光谱法,非常不便。而采用 qHNMR 含量测定时不需对照品,专属性高,样品处理过程简单,含量测定和化合物鉴定同步进行,所用时间约 10 min。通过比较氢溴酸右美沙芬含量测定结果,qHNMR 与 HPLC 测定结果基本一致,说明本研究建立的 qHNMR 可以用于氢溴酸右美沙芬片的质量控制。本研究不仅为氢溴酸右美沙芬片的质量控制提供了一种高效、准确的新方法,也为 qHNMR 进一步推广和应用积累经验。但 qHNMR 含量测定灵敏度低于 HPLC,

将来随着高强度磁场技术的进一步发展,有助于进一步提高 qHNMR 的检测灵敏度以及在含量测定中的应用。

REFERENCES

- [1] HUANG C H, CAI D D, ZUO K H. Analysis and identification of a new dithio-carbodenafil analogue in health foods [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(7): 991-994
- [2] BHARTI S K, ROY R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy [J]. Trac Trend Anal Chem, 2012(35): 5-26.
- [3] LI C X, WANG X P, CUI F, et al. Determination of erlotinib hydrochloride by proton nuclear magnetic resonance [J]. Herald Med(医药导报), 2017, 36(12): 1398-1401.
- [4] GUO L C, HAO H J, DU L Y. Determination of risperidone by quantitative nuclear magnetic resonance [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2018, 37(4): 492-495.
- [5] 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): 711-714.
- [6] WANG S H, HAO H J, WANG G D, et al. Determination of the absolute content of palmitine by quantitative proton nuclear magnetic resonance [J]. J Pharm Anal(药物分析杂志), 2017, 37(4): 654-658.
- [7] XU K, WEI Y G, HAO H J, et al. Determination on content of hydrochloride palmitine in tablets by nuclear magnetic resonance [J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2018, 37(12): 1495-1499.
- [8] FEI L H, FEI H Y, NIE X C. Determination of related substances in dextromethorphan hydrobromide [J]. J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(7): 1250-1256.
- [9] 中国药典. 二部[S]. 2015: 775-776.

收稿日期: 2019-02-28

(本文责编: 沈倩)