



核磁共振波谱法测定片剂中盐酸巴马汀含量

徐凯¹, 魏永鸽³, 郝海军^{2*}

(1. 黄河科技学院 医学院, 河南 郑州 450005; 2. 上海雷允上药业有限公司 技术中心, 上海 201401;
3. 郑州铁路职业技术学院 医学技术与工程学院, 河南 郑州 450052)

摘要: 以氘代甲醇为溶剂, 马来酸为内标, 通过比较马来酸内标峰与盐酸巴马汀定量峰的峰面积, 采用核磁共振法测定了黄藤素片中盐酸巴马汀的含量。结果显示, 该方法的线性范围为 1.00 ~ 10.00 g/L, 相关系数(r)为 0.999 3, 定量下限为 25.0 mg/L, 检出限为 8.5 mg/L, 回收率为 98.5% ~ 104%。测定结果与高效液相色谱法基本一致。该方法操作简便、测定结果准确, 且与结构鉴定同步完成, 适用于黄藤素片的质量控制。

关键词: 黄藤素片; 盐酸巴马汀; 核磁共振波谱法; 定量; 鉴定

中图分类号: O482.53; R914.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2018)12-1495-05

Determination on Content of Hydrochloride Palmatine in Tablets by Proton Nuclear Magnetic Resonance

XU Kai¹, WEI Yong-ge³, HAO Hai-jun^{2*}

(1. Department of Medical College, Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450005, China; 2. Department of Technology Centre, Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China; 3. College of Medical Technology and Engineering, Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: A method of proton nuclear magnetic resonance was developed for the determination of hydrochloride palmatine in tablets. CD₃OD was employed as solvent and maleic acid as an internal standard, the ¹H NMR spectra were obtained with a Bruker AVANCE III 400 spectrometer. The content of hydrochloride palmatine in tablets was determined by comparing the response signal areas of the internal standard (maleic acid, A_r) and hydrochloride palmatine (A_s). Results showed that there was a linear relationship for hydrochloride palmatine in the range of 1.00 – 10.00 g/L with its correlation coefficient of 0.999 3. The limit of quantitation (LOQ) was 25.0 mg/L and the limit of detection (LOD) was 8.5 mg/L. The recoveries were in the range of 98.5% – 104%. The content of hydrochloride bamatine in tablets was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and proton nuclear magnetic resonance (qNMR), respectively. Results indicated that the two methods had no difference. The qNMR method was easy and simple to handle, and the analysis results was accurate. Furthermore, the structure of the analyte could be identified at the same time. Therefore, qNMR could be used for the quality control of Huangtengsu tablet.

Key words: Huangtengsu tablet; hydrochloride palmatine; NMR; quantitative analysis; identify

随着核磁共振仪性能的不提高及傅立叶变换技术的应用, 近年来核磁共振技术越来越多地应用于定量分析领域^[1-3]。目前, 核磁共振定量法 (qNMR) 在食品、药品、农药等领域日益得到关注。中国、美国、日本及英国等各国药典均收录了 qNMR 法。在药物研发过程中, qNMR 法不仅可准确测定原料药、中间体及制剂中的药物含量, 还可同时鉴别假冒、伪劣产品, 在药品质量控制中发挥着重要作用^[4-6]。

收稿日期: 2018-05-17; 修回日期: 2018-06-22

基金项目: 2017 年度河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (2017GGJS286)

* 通讯作者: 郝海军, 硕士, 副研究员, 研究方向: 药物分析, E-mail: haohj2007@126.com

黄藤素即盐酸巴马汀, 是从防己科植物黄藤 *Fiburea recisa* Pierre. 的根茎中提取得到的一种季铵型生物碱, 具有良好的清热解毒效果, 临床上主要用于妇科炎症、肠炎、呼吸道及泌尿道感染等。黄藤素片的质量标准收载于《中国药典》2015 年版一部^[7], 该标准采用高效液相色谱法测定黄藤素片中的盐酸巴马汀含量, 薄层色谱法进行鉴别、检定, 但操作过程较为复杂, 费时费力。近年来市场上出现黄藤素片假冒伪劣产品^[8], 因此迫切需要建立一种简单、快速测定黄藤素片中盐酸巴马汀含量及鉴别假冒伪劣产品的分析方法。在前期研究的基础上^[9], 本文首先采用 NMR 法(¹H NMR、¹³C NMR 和 HSQC 谱)对黄藤素片提取物进行定性鉴别, 进一步采用 qNMR 法对提取物进行含量测定。将 qNMR 法用于黄藤素片的质量控制, 可实现定量分析与定性鉴别同时进行, 且操作简单, 省时省力, 为推广 qNMR 法应用于药品质量控制提供了经验, 也为其他药品的质量控制提供了有价值的参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker AVANCE III 400 型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司); 分析天平(十万分之一天平, 德国 Sartorius 公司); PS-40A 型超声仪(菏泽仪器仪表有限责任公司); 氘代甲醇(CD₃OD, 氘代度 99.8%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 黄藤素片(批号: 20180216、20180422、20180717, 云南植物药业有限公司); 盐酸巴马汀(批号: H-015-130626, 含量 >98%, 成都瑞芬思生物科技有限公司); 马来酸对照品(含量为 99.7%, 批号: 190015-201302, 中国食品药品检定研究院)。

1.2 内标溶液的配制

精密称取马来酸 10 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 加入约 7 mL 氘代甲醇超声 3 min 后放至室温, 用氘代甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 1.0 g/L 的马来酸内标溶液, 密封备用。

1.3 样品溶液的配制

精密称取盐酸巴马汀对照品 100 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入约 7 mL 氘代甲醇超声 3 min 后放至室温, 用氘代甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 10 g/L 的对照品溶液。

取 15 片黄藤素片, 于研钵中研磨成细粉。精密称取约 5 mg(以盐酸巴马汀计)置于 5 mL 容量瓶中, 加入内标溶液约 4 mL, 超声 5 min 后放置至室温, 以马来酸内标溶液定容至刻度。过 0.45 μm 微孔滤膜后转移至核磁管中, 即得黄藤素片供试品溶液。

1.4 测试条件

采用 zg30 脉冲序列, 恒温测定温度为 300 K, 谱宽(SWH)为 8 012 Hz, 中心频率(O1)设为 2 503 Hz, 采集时间(AQ)为 4.01 s, 弛豫时间(D1)为 15 s, 样品扫描次数(NS)为 64 次, 空扫次数(DS)为 2 次。

1.5 含量计算方法

将测得的¹H NMR 进行相位校正, 对定量峰和内标峰积分 5 次, 求取平均值, 按照下式计算盐酸巴马汀含量: $W_u = W_s A_u E_u / (A_s E_s)$, 式中: W_u 为盐酸巴马汀的质量(mg); A_u 为盐酸巴马汀的定量峰面积; A_s 为马来酸内标的峰面积; W_s 为马来酸内标的质量(mg); E_u 为盐酸巴马汀的质子当量(盐酸巴马汀相对分子质量与定量峰代表的质子数之比); E_s 为马来酸的质子当量(马来酸相对分子质量与内标峰代表的质子数之比)。

2 结果与讨论

2.1 黄藤素片提取物的鉴别

取适量黄藤素片粉末加入氘代甲醇, 超声后放至室温, 测定其¹H NMR、¹³C NMR 和 HSQC 谱(图 1)。¹H NMR 谱(图 1A)显示 22 个质子^[9], 包括低场区 6 个芳香质子, 5 位和 6 位的 2 个亚甲基质子, 2、3、9、10 位的 4 个甲氧基质子。¹³C NMR 谱(图 1B)显示 21 个碳信号, 对应于结构中的 21 个碳原子。HSQC 谱(图 1C)显示 12 个相关点(见表 1), 9 个季碳无相关点。综上,¹H NMR、¹³C NMR 和 HSQC 谱的基本信息与盐酸巴马汀分子式(C₂₁H₂₂ClNO₄)相符。

2.2 氘代溶剂与内标的选择

考察了氘代甲醇和氘代二甲基亚砜作为提取溶剂时对黄藤素片中盐酸巴马汀含量测定的影响。结果显示,以氘代二甲基亚砜为提取溶剂时, ^1H NMR的杂质成分较多,这可能是由于氘代二甲基亚砜溶解了片剂辅料所致^[10]。另外,氘代二甲基亚砜样品溶液在冬季室温配制时极易凝固,需加热溶解后才可测定,而加热处理会导致溶液体积发生变化,对测定结果造成一定影响,且样品溶液粘度较高。而以氘代甲醇作为提取溶剂时,不仅无片剂辅料杂质成分干扰,且样品溶液状态不受季节影响,操作简单方便。综合考虑,最终选用氘代甲醇作为提取溶剂。

内标物一般选择易于识别且不干扰样品定量的尖锐单峰。本实验选择氘代甲醇为溶剂,马来酸为内标物质,混合物的 ^1H NMR谱图见图2。马来酸溶剂峰在 δ 6.31处呈尖锐的单峰,与盐酸巴马汀的 ^1H NMR峰不重叠,专属性较高。因此,选择马来酸作为内标物。由于盐酸巴马汀在 δ 7.07处为一尖锐、独立的单峰,附近无其他杂质干扰,因此选择该处信号作为定量峰。

2.3 方法学研究

前期对qNMR采集时间、弛豫时间和样品扫描次数等基本测试参数的研究^[9]表明,当采集时间大于4.01 s时可保证FID信号衰减完全,得到的 ^1H NMR谱基底无震荡,因此确定采集时间为4.01 s。当弛豫时间大于15 s时,样品定量峰与内标峰的比值基本保持不变,为节约测试时间,确定弛豫时间为15 s。同理,样品扫描次数确定为64次。另外,定量峰与内标峰的积分区域对测试结果影响也较大,本文选取峰形轮廓线与水平基线交叉处作为积分区域,测得待测物定量峰的积分区域为 δ 7.01~7.13,内标峰的积分区域为 δ 6.27~6.35。本实验在此条件下进行方法学研究。

2.3.1 线性关系 以“1.2”的内标溶液配制1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00 g/L的盐酸巴马汀对照品系列溶液。以盐酸巴马汀与马来酸的定量峰面积之比(A_s/A_r)为横坐标(x),盐酸巴马汀与马来酸的质量比(m_s/m_r)为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y = 3.8204x - 0.0922$ ($r = 0.9993$),线性范围为1.00~10.00 g/L。

2.3.2 仪器精密度 取供试品溶液,按“1.4”条件连续测定6次,获取 ^1H NMR并积分(5次积分结果取平均值),计算盐酸巴马汀定量峰与内标峰面积的比值。结果显示,6次测定结果的相对标准偏差(RSD)为0.39%。

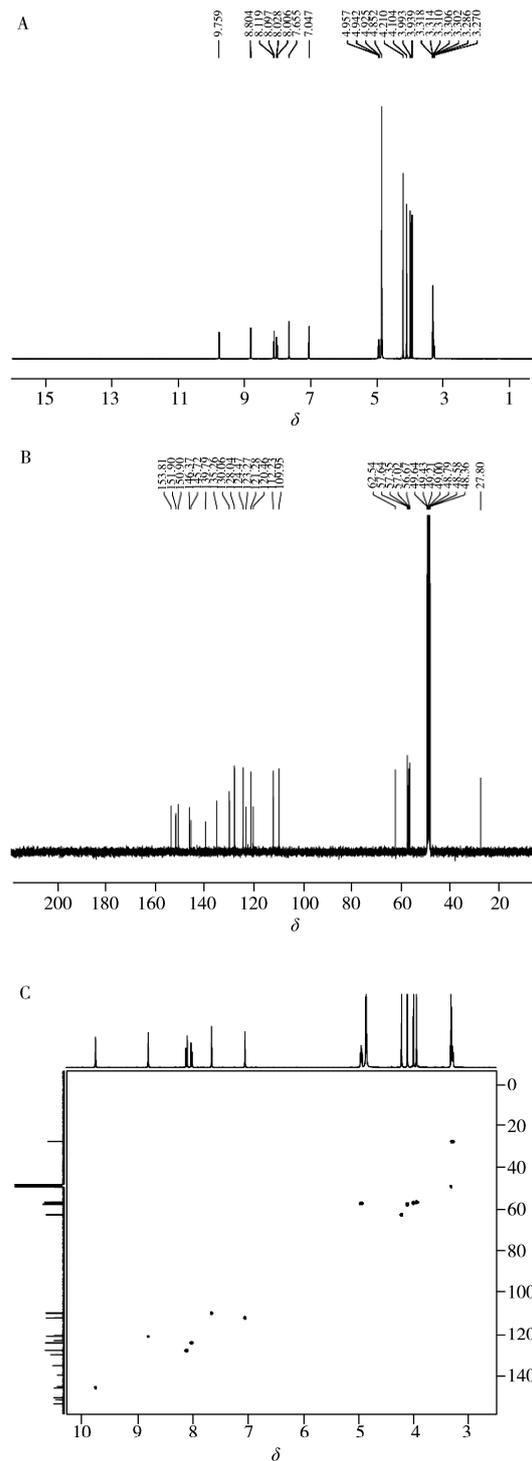


图1 黄藤素片提取物的 ^1H NMR(A)、 ^{13}C NMR(B)与HSQC(C)图谱

Fig. 1 ^1H NMR(A), ^{13}C NMR(B) and HSQC(C) spectra of the extract of Huangtengsu tablet

表 1 黄藤素片提取物的结构解析

Table 1 Structural analysis of the extract of Huangtengsu tablet

No.	Chemical shift of proton/ δ	Number of protons	Peak splitting	Chemical shift of carbon/ δ	Related point of HSQC
1	3.27 ~ 3.31	2	t	27.80	C ₅ - H ₂
2	3.94	3	s	56.67	C ₁₀ - OCH ₃
3	4.01	3	s	57.02	C ₉ - OCH ₃
4	4.21	3	s	57.64	C ₃ - OCH ₃
5	4.57	3	s	62.54	C ₂ - OCH ₃
6	4.98	2	t	57.35	C ₆ - H ₂
7	7.07	1	s	112.23	C ₁ - H
8	7.68	1	s	109.95	C ₄ - H
9	8.04	1	d	124.47	C ₁₁ - H
10	8.13	1	d	128.04	C ₁₂ - H
11	8.82	1	s	121.28	C ₈ - H
12	9.78	1	s	146.37	C ₁₃ - H

2.3.3 样品稳定性 取同一份样品分别于 0、2、4、8、12 h 进行测定, 获取¹H NMR 并积分(5 次积分结果取平均值), 计算盐酸巴马汀定量峰与内标峰面积的比值。结果显示, 5 次测定结果的 RSD 为 0.65%, 因此样品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.4 重复性 按照“1.3”方法平行配制 6 份样品溶液, 获取¹H NMR 并积分(5 次积分结果取平均值), 计算黄藤素片中盐酸巴马汀的含量。结果显示, 6 份样品测定结果的 RSD 为 1.7%。因此, qNMR 法测定结果的重复性良好。

2.3.5 检出限与定量下限 取对照品溶液逐步进行稀释, 按照“1.4”测试条件分别进样测定, 以盐酸巴马汀的峰高与基线波动高度比值作为信噪比(S/N), 以 S/N 为 3 时的盐酸巴马汀质量浓度作为检出限(LOD), S/N 为 10 时的盐酸巴马汀质量浓度作为定量下限(LOQ)^[3-4]。得到所建立 qNMR 方法的 LOD 为 8.5 mg/L, LOQ 为 25.0 mg/L。

2.3.6 回收率试验 按照“1.3”方法配制供试品溶液, 分别加入低、中、高 3 个质量浓度的盐酸巴马汀对照品溶液, 每个浓度平行配制 3 份, 采用建立的 qNMR 法进行测试并计算回收率, 结果见表 2。3 个加标水平下的回收率为 98.5%~104%, RSD 为 1.4%~2.3%。

表 2 片剂中盐酸巴马汀的回收率试验结果

Table 2 Recoveries of hydrochloride palmatine in tablets

Original/mg	Added/mg	Found/mg	Recovery/%	Mean recovery/%	RSD/%
5.10	1.08	6.19, 6.17, 6.22	101, 99.1, 104	101	2.3
5.32	2.11	7.46, 7.41, 7.40	101, 99.0, 98.6	99.7	1.5
5.24	4.13	9.31, 9.33, 9.42	98.5, 99.0, 101	99.6	1.4

2.4 与高效液相色谱法测定结果的比较

参考《中国药典》2015 年版一部的的方法对黄藤素片中盐酸巴马汀的含量进行测定。结果显示(表 3), 高效液相色谱法与核磁共振波谱法的测定含量较为接近。黄藤素片的标示量为 100 mg/片, 按照《中国药典》2015 年版的要求, 黄藤素片中盐酸巴马汀的含量应为标示量的 90.0%~110%, 因此两种测定方法的结果均符合《中国药典》要求。

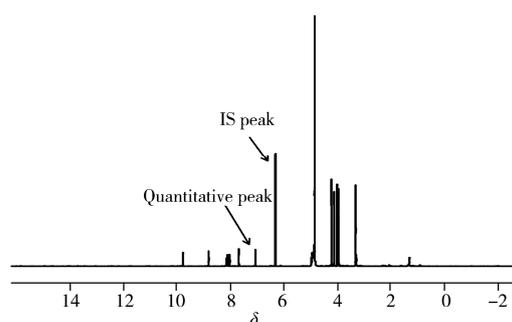
图 2 黄藤素片提取物与马来酸混合物的¹H NMR 图谱Fig. 2 ¹H NMR spectrum of the extract of Huangtengsu tablet and maleic acid mixture

表 3 不同方法对片剂中盐酸巴马汀含量的测定结果

Table 3 Determination result of hydrochloride palmatine in tablets by different methods

Batch number	qNMR (mg/pill, n = 5)	HPLC (mg/pill, n = 5)
20180216	102.42 ± 0.78	100.94 ± 0.11
20180422	99.29 ± 0.52	98.86 ± 0.29
20180717	103.14 ± 0.69	101.87 ± 0.18

3 结 论

本研究采用 qNMR 法测定了黄藤素片中盐酸巴马汀的含量,测定无需对照品和分离过程,样品配制过程简单,可有效减小样品前处理对测定结果的影响。建立的 qNMR 法同时实现了黄藤素片中盐酸巴马汀的定量分析与定性鉴别,且操作简单、快速、省时省力,测定结果与高效液相色谱法基本一致。由于 qNMR 法集定性鉴别与定量测定于一体,在药物质量控制包括有效成分鉴别、杂质检查及有效成分含量测定等中的应用将日益广泛,不仅有助于制药企业控制产品质量,也为我国打击假冒伪劣药品提供了一种非常有力的监测手段。

参考文献:

- [1] Zou P P, Tu P F, Jiang Y. *Anal. Methods*, **2013**, 17(5): 1062 - 1067.
- [2] Liu N Q, Young H C, Robert V. *Phytochem. Anal.*, **2010**, 21(5): 451 - 456.
- [3] Guo L C, Hao H J, Du L Y. *J. Instrum. Anal.* (郭留城, 郝海军, 杜利月. 分析测试学报), **2018**, 37(4): 492 - 495.
- [4] Hao H J, Jia Y Z, Han R, Hu B. *Chin. J. Pharm.* (郝海军, 贾幼智, 韩茹, 胡彬. 中国医药工业杂志), **2017**, 48(5): 711 - 714.
- [5] Wang S H, Hao H J, Jiang C N, Wang G D, Wang Y C. *Central South Pharm.* (王思寰, 郝海军, 江茶农, 王广东, 王迎春. 中南药学), **2017**, 15(2): 214 - 217.
- [6] Li C X, Wang X P, Cui F, Hao H J. *Herald Med.* (李承欣, 王雪萍, 崔锋, 郝海军. 医药导报), **2017**, 36(12): 1398 - 1401.
- [7] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: Part I*. Beijing: China Medical Science Press(国家药典委员会. 中国药典: 一部. 北京: 中国医药科技出版社), **2015**: 1481.
- [8] Zhang H Y, Zhang S, Xia H X, Cai C T, Rao G X. *J. Yunnan Univ. Tradit. Chin. Med.* (张慧颖, 张森, 夏海星, 蔡传涛, 饶高雄. 云南中医学院学报), **2008**, 31(4): 9 - 12.
- [9] Wang S H, Hao H J, Wang G D, Wang Y C. *Chin. J. Pharm. Anal.* (王思寰, 郝海军, 王广东, 王迎春. 药物分析杂志), **2017**, 37(4): 654 - 658.
- [10] Chia Y L, Hong X X, Quan B H, Tian S W. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(11): 2124 - 2129.