

HPLC 法测定甲麻苳苳那敏片中三组分含量

白旭东, 赵晓玲 (辽宁省药品检验所, 沈阳 110023)

摘要: 建立反相离子对 HPLC 法测定甲麻苳苳那敏片中三组分的含量。采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 以 [0.2% 辛烷磺酸钠溶液- 三乙胺 (100:0.2, 用磷酸调节 pH 值为 4.3)] - 甲醇 (50:50) 和 (40:60) 为流动相, 分别测定盐酸甲麻黄碱、黄苳苳及马来酸氯苳那敏, 检测波长为 215nm, 流速为 1.0 mL · min⁻¹。盐酸甲麻黄碱、黄苳苳及马来酸氯苳那敏的线性范围分别为 16~125 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$)、11~85 μg · mL⁻¹ ($r=1.000$) 及 26~102 μg · mL⁻¹ ($r=0.9991$), 平均回收率分别为 99.7% (RSD=1.1%)、99.4% (RSD=1.1%) 及 100.2% (RSD=1.6%)。本方法简单、迅速、准确, 可用于甲麻苳苳那敏片中三组分的含量测定。

关键词: 甲麻苳苳那敏片; 盐酸甲麻黄碱; 黄苳苳; 马来酸氯苳那敏; 反相离子对高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777 (2007) 09-0723-04

Determinate of Three Composition of Methylephedrine Hydrochloride, Baicalin and Chlorphenamine Maleate Tablets by HPLC

Bai Xudong and Zhao Xiaoling (Liaoning Province Institute for Drug Control, Shenyang 110023)

ABSTRACT A RP-Ion pair HPLC method for assay of three composition of Methylephedrine Hydrochloride, Baicalin and Chlorphenamine Maleate Tablets was established. The method was carried out on the diamonsil C₁₈ Column, [0.2% sodium Octanesulfonate- triethylamine (100:0.2, adjust pH value to 4.3 with phosphoric acid)] - methanol (50:50) and (40:60) was used as the mobile phase, to determine Methylephedrine Hydrochloride, Baicalin and chlorphenamine Maleate, respectively. The detection wavelength was 215 nm and flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The linear range for Methylephedrine Hydrochloride, Baicalin and chlorphenamine Maleate were 16~125 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$)、11~85 μg · mL⁻¹ ($r=1.000$) and 26~102 μg · mL⁻¹ ($r=0.9991$), respectively. The average recoveries rates of method were 99.7% (RSD=1.1%)、99.4% (RSD=1.1%) and 100.2% (RSD=1.6%) respectively. The method is simple, quick and accurate, it can be used for quality control of three composition in the drug

KEY WORDS Methylephedrine Hydrochloride, Baicalin and Chlorphenamine Maleate Tablets; methylephedrine hydrochloride; baicalin; chlorphenamine maleate; RP-Ion pair HPLC

甲麻苳苳那敏片是复方制剂, 由盐酸甲麻黄碱、黄苳苳、马来酸氯苳那敏三组分组成。适用于各种气管炎、喘息等。本品质量标准收载于《国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准》第一册^[1], 该标准含量测定方法盐酸甲麻黄碱为非水滴定法, 专属性差, 黄苳苳为紫外分光光度法, 马来酸氯苳那敏没有含量测定方法。为了更好地控制药品标准, 保证用药安全有效, 完善质量标准, 本文建立了反相离子对 HPLC 法, 测定该品种中的三

个组分的含量, 使各峰之间的分离度都符合要求。此方法专属性强, 准确度高。该质量标准的建立对保证药品质量, 确保用药安全有效方面有一定的实际意义。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-2010CH T 高效液相色谱仪。
盐酸甲麻黄碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 171247-200301), 黄苳苳对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110715-200212),

马来酸氯苯那敏对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 10047-9904), 甲麻苈苈那敏片 (通辽东北六药业有限公司, 批号: 20041101; 赤峰蒙欣药业有限公司, 批号: 041002)。

辛烷磺酸钠为分析纯, 甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 三乙胺为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: [0.2% 辛烷磺酸钠溶液-三乙胺 (100:0.2, 用磷酸调 pH 值至 4.3)] - 甲醇 (50:50) (测定盐酸甲麻苈碱及黄苈苈) 及 (40:60) (测定马来酸氯苯那敏); 进样量: 20 μL; 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 215 nm; 柱温: 30 °C; 理论板数按盐酸甲麻苈碱计为 6004; 分离度均大于 1.5。

2.2 线性关系考察

精密称取马来酸氯苯那敏对照品适量, 加流动相 (40:60) 定量制成每 1 mL 中约含 0.26 mg 的溶液, 精密量取 1, 1.5, 2, 3, 4 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加流动相 (40:60) 定量稀释至刻度, 摇匀, 进样, 按上述色谱条件测定, 分别以三组分的峰面积 (Y) 为纵坐标, 进样量 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为:

$$Y = 3.3370 \times 10^4 X - 4.9001 \times 10^4, r = 0.9991, \text{线性范围 } 26 \sim 102 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}.$$

精密称取盐酸甲麻苈碱及黄苈苈对照品各约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇 50 mL, 超声波溶解后, 放冷, 加流动相的水相至刻度, 摇匀, 分别精密量取原液, 1.3, 2.5, 5, 7.6 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加流动相 (50:50) 稀释至刻度, 摇匀, 进样, 按上述色谱条件测定, 分别以二组分的峰面积 (Y) 为纵坐标, 进样量 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程及线性范围分别为:

$$Y = 2.45502 \times 10^5 X + 3.2180 \times 10^4, r = 0.9999, 16 \sim 125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ (盐酸甲麻苈碱)}.$$

$$Y = 7.6632 \times 10^4 X + 6.8446 \times 10^4, r = 1.000, 11 \sim 85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ (黄苈苈)}.$$

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品贮备液 精密称取马来酸氯苯那敏对照品适量, 加流动相 (40:60) 制成每 1 mL 中约含 0.25 mg 的溶液作为对照品贮备液 (1); 另精密称取盐酸甲麻苈碱及黄苈苈对照品各约 15 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 30 mL, 超声溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度 (0.3 mg · mL⁻¹),

摇匀, 作为对照品贮备液 (2)。

精密量取对照品贮备液 (1) 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 (40:60) 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 (1)。精密量取对照品贮备液 (2) 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 15 mL 甲醇, 流动相的水相释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液 (2)。

2.3.2 样品溶液 取本品 20 片, 除去糖衣, 精密称定, 研细, 精密称取适量 (约相当于马来酸氯苯那敏 2.5 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 (40:60) 使溶解并定量释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液为供试品溶液 (1)。另精密称取上述细粉 (约相当于盐酸甲麻苈碱 3 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 25 mL, 超声使溶解, 放冷, 加流动相的水相释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液为供试品溶液 (2)。

2.4 重复性试验

取样品 (批号: 20041101), 照样品溶液的配制法配制, 供试品溶液 (1) 及 (2) 各 6 份, 精密量取 20 μL, 分别注入液相色谱仪 (每份进 2 针), 记录色谱图。按外标法以峰面积计算, 求得含量平均值分别为: 盐酸甲麻苈碱 98.8%, RSD 为 0.78%; 黄苈苈 91.5%, RSD 为 1.4%; 马来酸氯苯那敏 99.4%, RSD 为 1.4%。本方法具有较好的重复性。

2.5 精密度试验

分别取重复性试验项下的供试品溶液 (1) 及 (2) 的第 1 份供试液, 精密量取 20 μL, 重复进样 5 次, 5 次峰面积的 RSD 分别为黄苈苈 0.42%, 盐酸甲麻苈碱 0.33%, 马来酸氯苯那敏 0.29%。

2.6 稳定性试验

分别取重复性试验项下的供试品溶液 (1) 及 (2) 的第 1 份供试液, 室温放置 14 h, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 14 h, 精密量取 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算含量, RSD 分别为黄苈苈 0.69%, 盐酸甲麻苈碱 0.89%, 马来酸氯苯那敏 0.58%。表明本品在流动相中室温 14 小时内基本稳定。

2.7 辅料干扰试验

按处方配比精密称取辅料适量, 照样品溶液的制备方法制成辅料溶液, 照上述色谱条件, 精密量取各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。结果表明辅料对 3 分的含量测定没有干扰。

2.8 加样回收率试验

取已测知含量的样品 (批号: 20041101), 照

样品溶液的配制法，配制供试品溶液（1）6 份，分别精密吸取 5 mL，置 10 mL 量瓶中，精密加入对照品贮备液（1）1 mL，用流动相（40：60）稀释至刻度，摇匀，照上述色谱条件，精密量取上述溶液各 20 μ L，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算马来酸氯苯那敏的平均回收率为：100.2%，RSD= 1.6%。

取已测知含量的样品（批号：20041101），照样品溶液的配制法，配制供试品溶液（2）6 份，分别精密吸取 5 mL，置 10 mL 量瓶中，精密加入对照品贮备液（2）1 mL，用流动相的水相稀释至刻度，摇匀，照上述色谱条件，精密量取上述溶液各 20 μ L，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算平均回收率，盐酸甲麻黄碱平均回收率为：99.7%，RSD= 1.1%；黄芩苷平均回收率为 99.4%，RSD= 1.1%。

2.9 样品的测定

按照测定溶液的配制方法，配制对照品溶液（1）、（2）及供试品溶液（1）、（2），精密量取对照品溶液及供试品溶液 20 μ L，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，见图 1。按外标法以峰面积计算含量，结果见表 1。

表 1 样品的含量测定结果（标示量%，n= 2）

批号	平均标示量%		
	黄芩苷	盐酸甲麻黄碱	马来酸氯苯那敏
20041101	92.8	99.2	100.5
041002	91.3	100.9	100.3

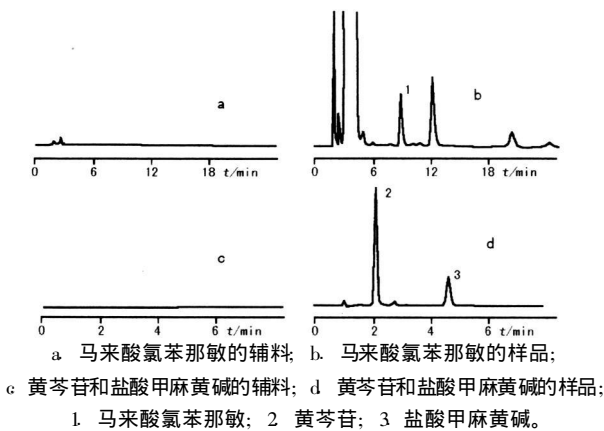


图 1 甲麻芩苷那敏片 HPLC 色谱图

3 讨论

3.1 黄芩苷组分在溶剂（流动相 50：50）中的溶解性考察

本品中马来酸氯苯那敏在水、乙醇中为易溶；

盐酸甲麻黄碱在水中易溶，在乙醇中溶解；黄芩苷原料的质量标准项下和黄芩提取物黄芩苷项下等有关的资料中均未见其溶解度的文献报导，从试验现象及结构可知本品极性较差，在水中不易溶解。因此考察在流动相 50：50 中的溶解性，取本品照样品溶液的制备方法制备供试品溶液，使黄芩苷的浓度分别为 1.5、0.9、0.6、0.3、0.06 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，溶液均澄清，照本文色谱条件，精密量取 20 μ L，分别注入液相色谱仪，测定峰面积，放置过夜后，浓度在 0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上的供试液有不同程度的黄色析出物，取上清液，再次测定，结果黄芩苷的峰面积减小。

3.2 检测波长的选择

取黄芩苷、盐酸甲麻黄碱及马来酸氯苯那敏的对照品溶液，分别进行紫外扫描，结果三种物质分别在 206.8 nm、216.2 nm 及 216.4 nm 的波长处有最大吸收；分别在 261.1 nm、257.4 nm 及 277.3 nm 处也有吸收，但在此波长处马来酸氯苯那敏的吸收很弱，在 257 nm 测定盐酸甲麻黄碱及黄芩苷的峰面积，黄芩苷比盐酸甲麻黄碱大 13 倍，处方中马来酸氯苯那敏的量比黄芩苷及盐酸甲麻黄碱小 30 倍，因此选用 215 nm 作为测定波长（黄芩苷与盐酸甲麻黄碱峰面积之比差约 4 倍）。

3.3 糖衣对含量测定的影响

取本品除糖衣与不除糖衣制成供试品溶液，测定含量，结果相同，证明糖衣不影响含量测定。但考虑到各生产厂家的糖衣料中的色素不同，因此方法中仍规定除糖衣。

3.4 耐用性考察

3.4.1 不同 pH 值的流动相 调节流动相的 pH 值为 4.1、4.3 和 4.5 分别测定。试验结果表明，pH 在 4.1~4.5 之间无明显变化，不影响分离度。

3.4.2 流动相的不同比例 调节流动相的比例为 45：55、50：50 和 55：45，流动相比由 45：55~55：45 之间，黄芩苷及盐酸甲麻黄碱的保留时间分别延长 4.5 及 8 min、马来酸氯苯那敏的保留时间延长 40 min。

3.4.3 色谱柱的填料和长度 依次使用不同填料（Kromasil、Diamonsil、Inertsil）、不同长度（150、200 及 250 mm）的色谱柱（共 9 个色谱柱）进行测定，结果表明不同填料不同长度的色谱柱使各组分保留时间变化范围分别为黄芩苷 2.375~3.925，相差 1.55 分钟；盐酸甲麻黄碱 6.725~10.850，相差 4.1 分钟；马来酸氯苯那敏 11.692~14.700，

相差 3.0 分钟。结果说明对保留时间的改变不大，各峰间的分离度能达到要求。

耐用性结果分析 由于本品中提取物黄芩苷含杂质较多，在实际的工作中存在的可变因素较易导致方法无法实施，因此方法建立后比较测重方法耐用性的考察，以确认方法本身对可变试验因素的抗干扰能力情况，确保方法的可行性，可靠性。

3.5 三组分色谱行为的考察

(1) 流动相中不加三乙胺；(2) 流动相中加三乙胺；(3) 溶剂用甲醇；(4) 用作溶剂的流动相与流动相的比例不同；(5) 流动相的 pH 值为 3.0；(6) 流动相的 pH 值为 5.6；(7) 流动相的极性较小；(8) 流动相的极性较大。将以上八种条件分别作为测定条件进行测定。

色谱行为分析 据三组分的色谱行为考察结果可知：(1) 当流动相 pH 值大于 5 和不加三乙胺时马来酸氯苯那敏峰拖尾；(2) 当 pH 值为 3.0，黄芩苷和盐酸甲麻黄碱的保留时间相似，不宜分开；流动相极性较小时，盐酸甲麻黄碱与黄芩苷之间及与杂质之间分离的不好；(3) 当增大极性时分离良好，但马来酸氯苯那敏的保留时间明显增长，至近 1 小时，且马来酸氯苯那敏的浓度比其他 2 组分的

浓度低 30 倍，再加上峰扩展，几乎看不到马来酸氯苯那敏峰。此现象用一元洗脱同时测定三个组分不能实现。

4 结论

根据上述一系列的试验现象，同时考虑到方法广泛适用性，采用反相离子对 HPLC 法，pH 值控制在 4.3，用一个系统，一元洗脱法，为了增大马来酸氯苯那敏的进样量，采用二次进样（流动相 50：50，测定盐酸甲麻黄碱及黄芩苷，浓度为 $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；流动相 40：60，测定马来酸氯苯那敏，浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ），进样量为 20 μL ，此条件解决了本品存在的一系列问题，使各杂质之间、杂质与主峰之间的分离度均符合要求，经方法学验证，确认本方法可行、简便、专属性强、准确度高，适用于该制剂中三个组分同时测定，因本品中马来酸氯苯那敏为小剂量（1 mg/片），因此可用测定马来酸氯苯那敏的方法测定本品中马来酸氯苯那敏的含量均匀度。

参考文献：

[1] 化学药品地方标准上升国家标准 [S]. WS-10001- (HD-0031)-2002

(上接第 694 页) 第一，粉末直接混合；第二，药物与辅料混合后制粒，与混悬颗粒制备工艺基本一致；第三，药物与部分辅料混合后制粒，再与剩余辅料混合，此工艺产生的干混悬剂既有粉末又有颗粒。毋庸置疑，第一种制备工艺完全符合药典对干混悬剂的要求，即混悬液应均匀分散，而后两种方法部分或全部颗粒与混悬颗粒类似，但如果将其归属于混悬颗粒，其粒径可能难以符合《中国药典》对颗粒剂的要求。

由于上述模糊界定，使对其的技术评价和后续管理可能出现某种困难。如对于某些采用制粒的品种，应该按照哪种剂型评价？又例如对于某些在监测期内的颗粒剂，其他申请人对方工艺等不做任何修改，按照干混悬剂申报，应如何评价？等等。基于此，为了进一步科学、有效地管理上述品种，建议做如下处理：

第一，由于干混悬剂和混悬颗粒的定义存在重叠或交叉的情况，建议将两种制剂合并，统一于混悬剂中，同时将质控项目（沉降体积比）进行明确

规定，可参照国外药典单剂量干混悬剂沉降体积比检查可不纳入标准中，多剂量干混悬剂沉降体积比检查纳入标准中。

第二，仍维持目前《中国药典》对干混悬剂和混悬颗粒的划分方法，但应该在定义上对二者进行明确限定，同时应从处方、制备工艺等内容进行明确区分（例如：干混悬剂在性状项下应规定不能有颗粒存在，在制备工艺中不应有制粒过程），使二者无交叉内容。然后在此基础上分别基于各剂型特点进行质量研究和质量控制。

参考文献：

[1] 中国药典 [S]. 二部，2005：146，139，292，336，附录 14
[2] British Pharmacopoeia [S]. 2005：2158，2169，2301
[3] 美国药典 [S]. 29ed, NF24, 2006：401，404
[4] European Pharmacopoeia [S]. 5.2, 2007：3140，3147
[5] 日本药局方 [S]. 第十四改正版，2001：8