

毛细管电泳法同时测定小儿清热止咳口服液中3种生物碱类成分的含量^Δ

曹 娣*, 马 婕, 宋粉云[#](广东药学院药科学院, 广州 510006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)12-1129-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.12.27

摘 要 目的:建立同时测定小儿清热止咳口服液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱含量的方法。方法:采用毛细管电泳法,内标为盐酸小檗碱。毛细管柱为未涂层弹性融硅石英毛细管柱,运行缓冲液为40 mmol/L四硼酸钠-15%甲醇(pH 9.96),分离电压为12 kV,进样方式为重力进样10 s(高度15 cm),检测波长为190 nm,温度为25 ℃,湿度为<70%。结果:盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱检测质量浓度分别在2.4~30、1.2~15、0.308~3.85 μg/ml范围内与各自峰面积积分值线性关系良好;3种成分的平均加样回收率分别为96.3%、99.6%、97.6%,RSD分别为1.30%、1.76%、2.52%(n=6)。结论:本方法操作简便、快速,结果准确、可靠,可用于小儿清热止咳口服液的质量控制。

关键词 毛细管电泳法;小儿清热止咳口服液;盐酸麻黄碱;盐酸伪麻黄碱;盐酸甲基麻黄碱;含量测定

Content Determination of 3 Kinds of Alkaloids in Xiao'er Qingre Zhike Oral Liquid by CE

CAO Di, MA Jie, SONG Fen-yun(School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and methylephedrine hydrochloride in Xiao'er qingre zhike oral solution. METHODS: Capillary electrophoresis was adopted using berberine hydrochloride as internal standard. The separation was performed on a fused silica capillary column. 40 mmol/L NaB₄O₇+15% ethanol (pH 9.96) was selected as the running buffer. The voltage applied was 12 kV. The sample was injected by gravity(10 s, 15 cm). The detection wavelength was set at 190 nm. The column temperature was 25 ℃ and humidity was lower than 70%. RESULTS: The linear range of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and methylephedrine hydrochloride were 2.4-30 μg/ml, 1.2-15 μg/ml, 0.308-3.85 μg/ml. The average recoveries were 96.3%, 99.6% and 97.6%, respectively. RSDs were 1.30%, 1.76% and 2.52%, respectively (n=6). CONCLUSION: The method is convenient, rapid, accurate and reliable for the quality control of Xiao'er qingre zhike oral solution.

KEY WORDS Capillary electrophoresis; Xiao'er qingre zhike oral solution; Ephedrine hydrochloride; Pseudoephedrine hydrochloride; Methylephedrine hydrochloride; Content determination

泌尿系统、血液系统的影响,以便权衡利弊用药。

3.4 生脉注射液致ADR/ADE与原患疾病的关系

由表4可知,2008—2011年相比2004—2007年原患疾病涉及循环系统、血液系统的ADR/ADE例数增加明显。生脉注射液由于能够增强心肌收缩力,增加冠状动脉血流量,改善心肌供血,调整心肌代谢,故常用于治疗冠心病^[6]。由于冠心病发病率逐渐升高,故生脉注射液用于治疗冠心病时发生的ADR/ADE也逐年增多。生脉注射液致ADR/ADE可能与近年来脑力工作者逐年增加,人们精神压力增大、睡眠不足、饮食不合理等有关。建议对相关疾病患者在加强合理用药的同时,应提醒其多注意劳逸结合,常补水,少食高热量食物,保证

充足睡眠。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知:中药卷[S].北京:人民卫生出版社,2005:346.
- [2] 杨耀芳,季闽春,金蕾,等.85例中药不良反应报告分析[J].中国药房,2010,21(19):1803.
- [3] 孙端.中药注射液不良反应及预防[J].中国中医基础医学杂志,2007,13(2):144.
- [4] 李廷谦.中药注射剂不良反应及临床合理用药[J].中国循证医学杂志,2010,10(2):111.
- [5] 王植波.从中药与化学药品联用的不良反应该合理用药[J].中国当代医学,2006,5(24):121.
- [6] 盛瑶琴,万建华,文广生.生脉注射液治疗冠心病的疗效观察[J].华西药学杂志,2003,18(2):156.

(收稿日期:2012-04-03 修回日期:2012-07-18)

^Δ基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No. 5002841)

* 硕士研究生。研究方向:现代分析方法在中药质量控制中的应用。E-mail: caodivysj@163.com

[#] 通信作者:教授,硕士。研究方向:现代分析方法在中药质量控制中的应用。E-mail: fuhaiwu@163.com

小儿清热止咳口服液是由麻黄、炒苦杏仁、石膏、甘草、黄芩、板蓝根、北豆根7味药材制成的中药复方制剂,具有清热宣肺、平喘、利咽之功效。其现行质量标准收录了采用高效液相色谱(HPLC)法测定麻黄碱含量的方法^[1]。有文献^[2]曾报道采用毛细管电泳(CE)法测定小儿清热止咳口服液中麻黄碱、黄芩苷和甘草酸的含量,但同时测定其中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱含量的方法尚未见文献报道。麻黄为方中君药,具有止咳、定喘、祛痰的功效,而盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱为其主要有效成分,故笔者采用CE法建立了同时测定小儿清热止咳口服液中上述3种成分含量的方法,以为更好地控制该制剂的质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器

CL1030型高效CE仪(北京彩陆科学仪器有限公司);K-2501型紫外-可见检测器(德国Knauer公司);HW-2000型色谱工作站(南京千谱软件有限公司,2.17版);ORION MODEL 828型pH计(美国Orion公司);KQ-400KDB型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,工作频率:4.5 kHz±5%,输出功率:400 W)。

1.2 药品与试剂

盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:171241-200506、171237-200304、110713-200609);盐酸甲基麻黄碱对照品(美国Sigma公司,百分含量:98.8%);小儿清热止咳口服液[太阳石(唐山)药业有限公司,批号:101202、100804、100603,规格:每支10 ml];甲醇为色谱纯,四硼酸钠(汕头市光华化学厂,批号:20010515)及其他试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 内标贮备液 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成262 μg/ml的内标贮备液。

2.1.2 对照品溶液 分别精密称取盐酸麻黄碱对照品、盐酸伪麻黄碱对照品和盐酸甲基麻黄碱对照品适量,加甲醇制成三者质量浓度分别为120、60、15.4 μg/ml的对照品贮备液。分别吸取一定量的对照品贮备液和1.0 ml“2.1.1”项下内标贮备液,加甲醇稀释成盐酸麻黄碱质量浓度为12 μg/ml、盐酸伪麻黄碱质量浓度为6.0 μg/ml、盐酸甲基麻黄碱质量浓度为1.54 μg/ml、盐酸小檗碱质量浓度为26.2 μg/ml的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液 精密量取小儿清热止咳口服液2 ml,置于具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇8 ml,密塞,称定质量,超声提取(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用无水乙醇补足减失的质量,摇匀,移至离心管以3 000 r/min离心10 min,精密量取上层清液2 ml,置于10 ml量瓶中,精密加入内标贮备液1 ml,用0.1 mol/L盐酸-20%乙醇(1:1)稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液 取小儿清热止咳口服液处方组成中除麻黄外的其余成分制成不含麻黄的阴性对照样品,按“2.1.3”项下方法制备得阴性对照溶液。

2.1.5 运行缓冲液 精密称取四硼酸钠1.91 g,置于50 ml量

瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取20 ml,置于另一50 ml量瓶中,加入7.5 ml甲醇,用水稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,作为运行缓冲液。

2.2 电泳条件

毛细管柱:未涂层弹性融硅石英毛细管柱(67 cm×75 μm ID,有效长度:60 cm);运行缓冲液:40 mmol/L四硼酸钠-15%甲醇(pH 9.96);分离电压:12 kV;进样方式:重力进样10 s(高度15 cm);检测波长:190 nm;温度:25 ℃,湿度:<70%。毛细管柱在使用前依次用0.1 mol/L的NaOH溶液、二次蒸馏水各冲洗5 min,再用运行缓冲液冲洗5 min,样品分析间隔用运行缓冲液平衡2 min,运行每3 h更换一次缓冲液。在此条件下,供试品、对照品、阴性对照色谱如图1所示。

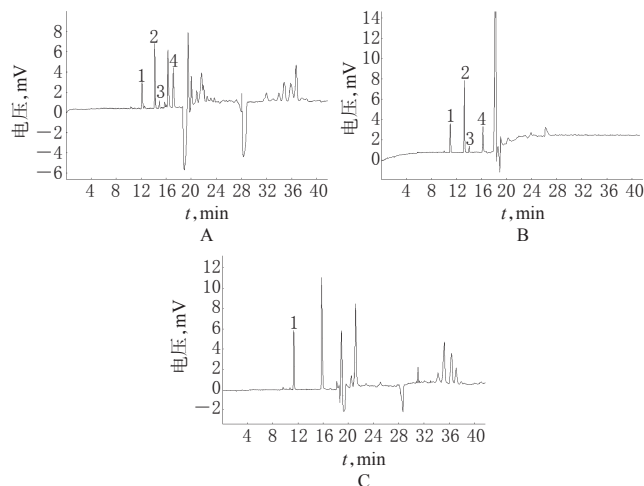


图1 毛细管电泳色谱图

A. 供试品; B. 对照品; C. 阴性对照; 1. 盐酸小檗碱; 2. 盐酸麻黄碱; 3. 盐酸甲基麻黄碱; 4. 盐酸伪麻黄碱

Fig 1 CE chromatograms

A. test sample; B. substance control; C. negative control; 1. berberine hydrochloride; 2. ephedrine hydrochloride; 3. pseudoephedrine hydrochloride; 4. methylephedrine hydrochloride

2.3 线性关系考察

分别吸取一定量的对照品贮备液和1.0 ml内标贮备液,加甲醇稀释成盐酸麻黄碱质量浓度分别为2.4、4.8、9.6、12、18、24、30 μg/ml,盐酸伪麻黄碱质量浓度分别为1.2、2.4、4.8、6.0、9.0、12、15 μg/ml,盐酸甲基麻黄碱质量浓度分别为0.308、0.616、1.232、1.54、2.31、3.08、3.85 μg/ml和盐酸小檗碱质量浓度均为26.2 μg/ml的系列溶液,依次重力进样10s,每个浓度测定3次以上。以待测成分与内标物峰面积的比值(y)为纵坐标,待测成分检测质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得盐酸麻黄碱回归方程为 $y=0.170 5x-0.117 2$ ($r=0.999 1$),盐酸伪麻黄碱回归方程为 $y=0.169 6x+0.036 9$ ($r=0.999 2$),盐酸甲基麻黄碱回归方程为 $y=0.125 6x+0.018 3$ ($r=0.996 0$)。结果表明,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱检测质量浓度分别在2.4~30、1.2~15、0.308~3.85 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

取质量浓度分别为12.0、6.0、1.54 μg/ml的盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱对照品溶液适量,重力进样10 s,

连续测定5次,记录峰面积并计算RSD。结果,3种成分峰面积的RSD分别为2.11%、1.21%、1.57%,表明仪器精密度高。

2.5 稳定性试验

取供试品溶液(批号:101202)适量,在0、2、4、6、8、10、12 h分别重力进样10 s,记录峰面积并计算RSD。结果,3种成分峰面积的RSD分别为3.04%、2.03%、2.82%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.6 重复性试验

取同一批号样品(批号:101202)适量,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液并测定。结果,小儿清热止咳口服液中含3种成分的量平均依次为0.231、0.163 mg/ml和33.4 μg/ml,RSD分别为2.40%、3.00%、2.24%,表明方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密量取同一批号样品(批号:101202)适量,共6份,加入一定量的盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱对照品,按“2.1.3”项下方法处理并测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

成分	样品量, ml	所含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
盐酸麻黄碱	1.0	0.231	0.240	0.466	97.8	96.3	1.30
	1.0	0.231	0.240	0.463	96.6		
	1.0	0.231	0.240	0.465	97.3		
	1.0	0.231	0.240	0.458	94.6		
	1.0	0.231	0.240	0.464	96.9		
	1.0	0.231	0.240	0.458	94.7		
盐酸伪麻黄碱	1.0	0.163	0.150	0.314	100.9	99.6	1.76
	1.0	0.163	0.150	0.312	99.5		
	1.0	0.163	0.150	0.311	98.9		
	1.0	0.163	0.150	0.316	102.1		
	1.0	0.163	0.150	0.312	99.6		
	1.0	0.163	0.150	0.308	96.5		
盐酸甲基麻黄碱	1.0	33.4	30.8	64.6	101.4	97.6	2.52
	1.0	33.4	30.8	63.6	98.1		
	1.0	33.4	30.8	63.9	99.0		
	1.0	33.4	30.8	62.1	93.2		
	1.0	33.4	30.8	63.2	96.8		
	1.0	33.4	30.8	63.4	97.3		

2.8 样品含量测定

取不同批号的小儿清热止咳口服液样品适量,按“2.1.3”项下方法处理后测定,记录峰面积,代入回归方程计算样品中3种成分的含量,结果见表4。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Result of content determination of samples(n=3)

样品批号	含盐酸麻黄碱的量, mg/ml	RSD, %	含盐酸伪麻黄碱的量, mg/ml	RSD, %	含盐酸甲基麻黄碱的量, μg/ml	RSD, %
101202	0.229	1.11	0.166	2.27	33.6	2.25
100804	0.225	1.63	0.152	1.26	35.6	3.26
100603	0.264	0.88	0.113	2.74	28.1	2.85

3 讨论

3.1 供试品提取条件的选择

有关麻黄碱类成分的提取方法文献^[9]报道有半仿生法、水

煎煮法、温浸法、酸性乙醇回流法、超声法和水蒸气蒸馏法等,本试验采用超声提取方法。总生物碱的提取中可用的溶剂有水-有机溶剂、酸-有机溶剂、醇-有机溶剂、碱-有机溶剂等,根据麻黄碱自身特点,现多采用前2种溶剂^[4]。本试验同时考察了氨水-三氯甲烷、盐酸-甲醇、无水乙醇作为提取溶剂,结果发现,由于小儿清热止咳口服液含糖较多,如果提取溶剂中含有水分,糖溶于水,样品中含有糖,会导致图谱杂质峰较多,待测成分峰分离度不高。因此,用无水乙醇提取,离心除去不溶于水乙醇的糖类成分。实验同时还考查了超声提取时间对提取效率的影响,结果显示提取时间越长,提取效率越高,但提取时间达到30 min后再延长提取时间,提取效率变化趋于平缓,综合考虑,选取超声提取时间为30 min。

3.2 检测波长的选择

有关麻黄碱类成分含量测定的文献报道,检测波长大多选在190 nm和210 nm附近。本试验在相同的电泳条件下,选用190 nm和210 nm为检测波长分别进样,结果发现以190 nm为检测波长时,3种成分的峰面积均明显偏大,灵敏度更高,因此选用190 nm为检测波长。

3.3 内标物的选择

为克服CE法重复性差的缺点,笔者采用内标法定量。在选择内标物时,需要考虑在待测成分检测波长处有较大的吸收,曾选用在190 nm处有吸收的盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、盐酸氯丙那林为内标物进行比较。结果,盐酸小檗碱出峰时间与待测成分出峰时间接近,分离完全,在样品中无干扰,而且峰形较好,因此选择盐酸小檗碱为内标物。

3.4 毛细管内径和长度的选择

比较75 μm和50 μm规格毛细管的分离效果,发现内径减小,分离度增大,但灵敏度降低,出峰时间延长;内径增大,峰高、峰面积也增大,检测灵敏度相应提高。因此,选用内径为75 μm的毛细管电泳柱。随着毛细管有效长度变短,分离速度加快,但分离场强变大,从而产生干扰也就越大,故优化毛细管有效长度选用60 cm。

3.5 运行缓冲液的选择

本试验在文献^[6-7]基础上分别考察了Tris-HCl、四硼酸钠、四硼酸钠-甲醇、四硼酸钠-硼酸-乙醇等缓冲体系,结果显示四硼酸钠-甲醇溶液分离效果较好。

本试验考察了不同浓度四硼酸钠(20、30、40、50、60 mmol/L)对样品中各组分分离的影响:随着四硼酸钠浓度的增加分离度提高,迁移速度变缓,组分间的分离度加大,但分析时间变长;过高的四硼酸钠浓度还会导致电泳峰宽增加,不利于本试验的定量;相反,过低的缓冲溶液浓度由于缓冲容量偏低,不利于体系的pH值维持稳定,同时过短的迁移时间也会导致组分的分离度达不到分析要求。综合考虑分离度、分离时间和峰形,选择四硼酸钠的浓度为40 mmol/L。

此外,在缓冲液中加入有机添加剂可以提高选择性,增大分离度,提高信噪比,改善峰形。本试验考察了5%、10%、15%、20%体积分数的甲醇,发现随甲醇体积分数增加分离度增大,但出峰时间延迟且会出现拖尾。而本试验所选的内标物盐酸小檗碱在甲醇体积分数小于15%时与样品中的杂质峰

HPLC法测定丁酸氢化可的松凝胶中丁酸氢化可的松的含量

王秋桐^{1*}, 王伟², 侯海玲¹, 王玉华^{1#} (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古食品药品检验所, 呼和浩特 010020)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)12-1132-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.12.28

摘要 目的: 建立测定丁酸氢化可的松凝胶中丁酸氢化可的松含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Phenomen C₁₈ 柱, 流动相为乙腈-0.5% 醋酸水溶液 (51:49, V/V), 检测波长为 240 nm, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 25 °C, 进样量为 20 μl, 灵敏度为 1.0 AUFS。结果: 丁酸氢化可的松的进样量在 97.6~878.4 ng 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系 ($r=0.9991$); 平均回收率为 99.5%, RSD=0.45% ($n=9$)。结论: 该方法简便、灵敏、准确, 可用于丁酸氢化可的松凝胶的质量控制。

关键词 丁酸氢化可的松凝胶; 丁酸氢化可的松; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Hydrocortisone Butyrate in Hydrocortisone Butyrate Gel by HPLC

WANG Qiu-tong¹, WANG Wei², HOU Hai-ling¹, WANG Yu-hua¹ (1. Pharmaceutical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Inner Mongolia Institute for Food and Drug Control, Hohhot 010020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of hydrocortisone butyrate in Hydrocortisone butyrate gel. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Phenomen C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.5% acetic acid (51:49) at flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 25 °C and injection volume was 20 μl. The sensitivity of the sample was 1.0 AUFS. RESULTS: The linear range of hydrocortisone butyrate was 97.6-878.4 ng ($r=0.9991$) with an average recovery of 99.5% (RSD=0.45%, $n=9$). CONCLUSION: The method is proven to be simple, accurate and precise for the quality control of Hydrocortisone butyrate gel.

KEY WORDS Hydrocortisone butyrate gel; Hydrocortisone butyrate; HPLC; Content determination

没有完全分开。因此, 选择甲醇的体积分数为 15%。

3.6 电压的选择

在毛细管区带电泳中, 迁移时间随工作电压的升高而缩短, 分离度下降。这是由于在高电压下, 虽然电泳迁移速度和电渗迁移速度均增大, 但后者大于前者, 从而使组分的总迁移速度变大。但是如果电压过高, 则焦耳热严重, 使区带展开显著, 降低柱效和分离效率, 而且还易在毛细管内形成气泡, 使分离无法进行^[9]。实验考察了 8、10、12、15、20 kV 分离电压下的分离测定情况: 随电压升高, 电渗流速度加快, 出峰时间明显缩短, 有利于加快分析速度; 但分离电压过高, 焦耳热增大, 会导致噪声大幅度增加并且导致分离度下降; 而分离电压太低, 样品的迁移时间过长, 峰形也会有所展宽。综合考虑分离效果和迁移时间两方面, 本实验选择分离电压为 12 kV。

综上所述, 本方法操作简便、快速, 结果准确、可靠, 可用于小儿清热止咳口服液的质量控制

参考文献

* 硕士研究生。研究方向: 药品质量控制。E-mail: qiutongwang55@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药品质量控制。电话: 0471-6653151。E-mail: yuhuwang59@163.com

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 496-497.
- [2] 刘洋, 蒋晔, 孙捷. HPCE法同时测定小儿清热止咳口服液中3个组分[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 133.
- [3] 沈红, 狄留庆, 黄耀洲. 不同提取方法对麻黄中麻黄碱取得率的比较研究[J]. 南京中医药大学学报, 2004, 20(3): 170.
- [4] 季一兵, 陈玉英, 吴如金. 麻黄中生物碱类有效成分的非水毛细管电泳含量测定[J]. 中草药, 2003, 34(12): 1127.
- [5] 孙国祥, 孙丽娜. 毛细管区带电泳法测定麻黄中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中南药学, 2009, 7(10): 773.
- [6] 陈康, 林文津, 林励. HPCE法测定不同产地麻黄中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中药材, 2005, 28(8): 664.
- [7] 宋景政, 徐宏喜, 毕培曦. 毛细管电泳法及其在生物碱分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(6): 416.
- [8] 李发美, 余丽宁, 张丽茹. 毛细管电泳法测定喘咳宁片中盐酸麻黄碱和巴比妥的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 125.

(收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2013-01-25)