

小儿氨酚黄那敏颗粒全组分色谱分析

姜建国*,张轶华,张西如,孙 婷(河北省食品药品检验院,石家庄 050011)

中图分类号 R927.2;R971*.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1215-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.22

摘要 目的:完善小儿氨酚黄那敏颗粒质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对主成分对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏和人工牛黄中的胆酸和猪去氧胆酸同时进行鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)双波长法同时测定对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏的含量,色谱柱为 Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-1% 三乙胺的水溶液[用磷酸调 pH(3.7±0.5)],梯度洗脱,检测波长分别为 280、210 nm。结果:薄层色谱法可同时鉴别 4 种主要成分;含量测定方法学考察中线性关系 $r \geq 0.999 2$,平均回收率 $\geq 99.3\%$,RSD $\leq 0.8\%$ ($n=3$)。结论:建立的方法可准确、快速地对小儿氨酚黄那敏颗粒进行定性、定量分析,可更全面地控制该制剂的质量。
关键词 薄层色谱法;高效液相色谱法;小儿氨酚黄那敏颗粒;对乙酰氨基酚;人工牛黄;马来酸氯苯那敏;鉴别;含量测定

Chromatographic Analysis of Total Components in Pediatric Anfenhuang Namin Granules

JIANG Jian-guo, ZHANG Yi-hua, ZHANG Xi-ru, SUN Ting (Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the quality standard for Pediatric Anfenhuang Namin granules. METHODS: Paracetamol, chlorphenamine maleate, cholic acid and hyodeoxycholic in artificial cow-bezoar were identified by TLC simultaneously. The contents of paracetamol and chlorphenamine maleate were determined by HPLC with gradient elution and dual wavelength detection. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-1% triethylamine [pH value adjusted to (3.7±0.5) using phosphoric acid]. The detection wavelengths were 280 nm and 210 nm. RESULTS: TLC method can be used to determine 4 main components, in the methodology test of content determination, linearity $r \geq 0.999 2$, average recoveries were $\geq 99.3\%$, RSD $\leq 0.8\%$ ($n=3$). CONCLUSIONS: The method is accurate and rapid for qualitative and quantity analysis of the granules, and quality control of the preparation completely.

KEY WORDS TLC; HPLC; Pediatric Anfenhuang Namin granules; Paracetamol; Artificial cow-bezoar; Chlorphenamine maleate; Identification; Content determination

小儿氨酚黄那敏颗粒为非处方药,是一种复方制剂,每袋含对乙酰氨基酚 125 mg、人工牛黄 5 mg、马来酸氯苯那敏 0.5 mg,收载于国家药品标准第三册^[1]。现行标准中采用薄层色谱(TLC)法鉴别对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏,显色反应鉴别人工牛黄,紫外分光光度(UV)法测定对乙酰氨基酚的含量,未

对其他组分进行含量控制。有文献^[2-3]报道采用 TLC 法分离鉴别该制剂等,采用高效液相色谱(HPLC)^[4-5]梯度洗脱法和双波长法^[6-7]对组分进行分析测定。但尚未见文献对该制剂所有组分进行分析的报道。笔者通过试验,建立了采用 TLC 法在同一系统下通过不同的显色条件对主成分乙酰氨基酚、马来酸

化法与微波消解法的效果进行了比较研究,发现干法灰化法无铬元素丢失、使用仪器简单、处理效果好,故本试验采用此法进行样品前处理。

综上,本试验操作简便快捷,无需昂贵仪器,精密度、回收率及重复性均较好,结果可靠准确;与《中国药典》规定的原子光谱法测定结果比较,两者无显著性差异,可为胶囊中的铬提供了一种简便有效的含量检测方法。

参考文献

[1] 姚龙坤. 药用明胶质量对胶囊安全性的影响[J]. 明胶科学与技术, 2006, 26(4): 204.
[2] 黄辉, 李本涛, 邵鸿飞. 微波消解-石墨炉原子吸收光谱法测定胶囊中的痕量铬[J]. 化学分析计量, 2011, 20(3): 30.

[3] 谢秀红, 李勇勤. 药用明胶硬胶囊壳中重金属含量的研究[J]. 今日药学, 2010, 20(1): 28.
[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1 204-1 205.
[5] 韩丽琴, 董顺福, 刘建华. 金银花中金属元素与总黄酮含量的测定[J]. 中国药房, 2007, 18(33): 2 596.
[6] 周涛. 检测空心胶囊铬限量的简便方法[J]. 明胶科学与技术, 2009, 29(3): 139.
[7] 国家技术监督局. GB6783-1994 中华人民共和国国家标准: 食用添加剂明胶[S]. 1994-01-02.
[8] 王彩艳, 牛艳. 干法灰化法与微波消解法测定枸杞中铬[J]. 农业机械, 2012(3): 126.

*主任药师。研究方向: 药物分析、药品质量标准。电话: 0311-85212004-8037。E-mail: jjg216@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2012-05-09 修回日期: 2012-07-12)

氯苯那敏和人工牛黄中的胆酸、猪去氧胆酸同时进行鉴别, HPLC 双波长梯度洗脱法同时测定对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏含量的方法。其操作简单、准确度较高, 提高了方法的适用性, 完善了药品控制方法, 可更全面地控制该制剂质量。

1 材料

HPLC 仪(美国戴安公司); 紫外分析仪(北京六一仪器厂)。

硅胶 GF254 板(青岛海洋化工厂)。

对乙酰氨基酚(批号: 100018-200408, 纯度: 100%)、马来酸氯苯那敏(批号: 100047-200606, 纯度: 99.7%)、胆酸(批号: 100078-200414, 纯度: 100%)、猪去氧胆酸(批号: 100087-200610, 纯度: 100%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 小儿氨酚黄那敏颗粒样品(A 厂, 批号: 20110307; B 厂, 批号: 110102; C 厂, 批号: 110401; D 厂, 批号: 11050329; E 厂, 批号: 066110772) 样品为统一处方的复方制剂; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 人工牛黄的鉴别

2.1.1 TLC 条件。薄层板为硅胶 GF254 板, 以硅胶 GF254: 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)液(1:3)湿法铺板(层厚 0.5 mm), 晾干备用; 展开剂为正己烷-乙酸乙酯-甲醇-冰醋酸(2:15:2:2, V/V/V/V); 点样量为 10 μ l; 展开距离约 7 cm。展开后晾干, 置于紫外灯(254 nm 波长)下检视, 再喷以 10% 磷钼酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 烤 5 min 显色。

2.1.2 对照品溶液的制备。分别称取马来酸氯苯那敏、对乙酰氨基酚、胆酸、猪去氧胆酸 4 种对照品适量, 分别加无水乙醇制成每 1 ml 中含马来酸氯苯那敏 1 mg、对乙酰氨基酚 2 mg、胆酸 2 mg、猪去氧胆酸 2 mg 的单一对照品溶液。

2.1.3 样品溶液的制备。取本品 2 袋, 内容物混匀后研细, 加氯仿 30 ml, 振摇 15 min 使溶解后, 滤过, 滤液水浴蒸干, 冷却至室温后加 1 ml 无水乙醇溶解, 作为样品溶液。

2.1.4 阴性对照液的制备。除去被检物质, 以模拟处方(分别取各辅料的最大量)按样品溶液的制备方法, 制成阴性对照液。

2.1.5 样品的分离鉴定结果。在紫外灯下检视可见者为对乙酰氨基酚[比移值(R_f)值 0.90]; 仅在显色后可见者为胆酸(R_f 值 0.70)、猪去氧胆酸(R_f 值 0.80); 在紫外灯及显色后均可见者为马来酸氯苯那敏(R_f 值 0.10)。棕色斑点明显, 不同厂家的样品在同一条件下, 所得结果与对照品相比, 斑点颜色一致, 位置基本相同, 在紫外灯荧光及显色后均能呈现相同的结果, 表明本试验条件能很好地进行分离鉴定。TLC 见图 1。

2.2 对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏的含量测定

2.2.1 色谱条件。色谱柱: Diamonsil C₁₈(200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: A 为乙腈, B 为 1% 三乙胺的水溶液[用磷酸调 pH (3.7 \pm 0.5)], 梯度洗脱: 0~9 min, A-B(15:85), 检测波长 280 nm; 9~10 min, A-B(15:85~25:75), 检测波长 210 nm; 10~20 min, A-B(25:75), 检测波长 210 nm(在不同时间段设定 3 个不同波长进行测定, 只需测定 1 次); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ l。

2.2.2 对照品溶液制备。精密称取对乙酰氨基酚 0.25 g, 置于 50 ml 量瓶(a), 加适量流动相使溶解; 精密称取马来酸氯苯那

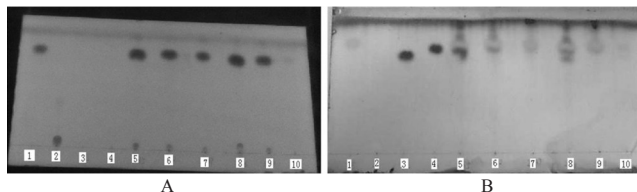


图 1 薄层色谱图

A. 对照品; B. 样品; 1. 对乙酰氨基酚; 2. 马来酸氯苯那敏; 3. 胆酸; 4. 猪去氧胆酸; 5. 厂家 A 样品; 6. 厂家 B 样品; 7. 厂家 C 样品; 8. 厂家 D 样品; 9. 厂家 E 样品

Fig 1 TLC chromatograms

A. substance control; B. samples; 1. paracetamol; 2. chlorphenamine maleate; 3. cholic acid; 4. hyodeoxycholic acid; 5. samples from manufacturer A; 6. samples from manufacturer B; 7. samples from manufacturer C; 8. samples from manufacturer D; 9. samples from manufacturer E 敏 10 mg, 置于 50 ml 量瓶(b)中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 再精密量取 5 ml 置于量瓶(a)中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备。取样品 10 袋, 研细, 精密称定(约相当于马来酸氯苯那敏 0.5 mg)置于 25 ml 量瓶中, 加流动相适量, 超声 15 min, 放冷, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 空白溶液的制备。按处方比例及工艺, 制备不含对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏的空白样品, 再按供试品溶液的制备方法制备空白溶液。

2.2.5 专属性试验。精密量取对照品溶液、供试品溶液及空白溶液各 5 μ l 注入色谱仪, 记录色谱图。结果, 对照品溶液与供试品溶液主峰的保留时间一致, 理论板数以及对乙酰氨基酚计应不少于 2 000, 各峰分离度应符合规定, 其他共存组分不干扰测定。马来酸氯苯那敏在此色谱条件下出现 2 个峰(即马来酸峰和氯苯那敏峰)。另在本文色谱条件下, 空白样品对待测组分无干扰。色谱见图 2(马来酸峰太小, 在对乙酰氨基酚峰前面, 未标出)。

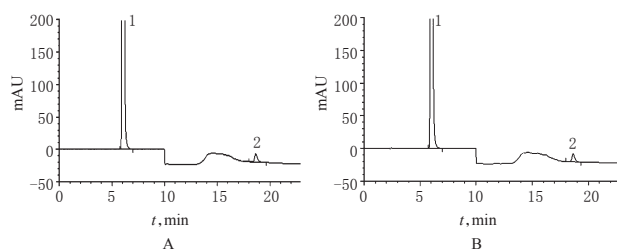


图 2 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 对乙酰氨基酚; 2. 氯苯那敏

Fig 2 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. paracetamol; 2. chlorphenamine 2.2.6 线性关系。分别取系列对照品混合液 5 μ l 进样, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定, 以各组分峰面积(A)为纵坐标与相应的进样量(x)绘制标准曲线。结果, 3 种组分的峰面积与进样量之间线性关系良好, 线性范围较宽, 详见表 1。

2.2.7 精密度试验。取对照品溶液 5 μ l, 重复进样 5 次, 测定峰面积, 结果对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏峰面积的 RSD 分别为 0.8%、0.5%。

2.2.8 重复性试验。取同一批样品按“2.2.3”项下方法制备供

表1 2种组分的回归方程、相关系数及线性范围

Tab 1 Regression equation, correlation coefficients and linear ranges of 2 components

组分	回归方程	r	进样量线性范围, μg
对乙酰氨基酚	$A=19.077+6.697.3x$	0.999 2	25~250
马来酸氯苯那敏	$A=0.612.6+194.35x$	0.999 4	0.1~1

试品溶液,平行制备5份,进样测定。结果,对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏的含量分别为95.5%、93.0%,RSD分别为0.3%、0.6%。

2.2.9 稳定性试验。取同一供试品溶液,于室温下放置,分别于0、1、2、4、8、12 h,每次进样5 μl测定,结果峰面积RSD为0.3%,表明溶液在12 h内稳定。

2.2.10 加样回收率试验。称取已测得含量的同一样品(厂家A),精密称定,置于25 ml量瓶中,分别加入2种对照品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试溶液,进样,测定。回收率结果见表2。

表2 回收率试验结果(n=3)

Tab 2 Results of recovery tests(n=3)

组分	样品中含 有量,mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回 收率, %	RSD, %
对乙酰氨基酚	62.502 7	50.000 4	111.578 1	99.17	99.5	0.4
	62.512 4	62.510 3	124.903 6	99.90		
	62.534 2	75.020 4	136.962 7	99.56		
马来酸氯苯那敏	0.252 7	0.200 6	0.449 6	99.18	99.3	0.3
	0.254 0	0.251 1	0.500 6	99.10		
	0.253 4	0.303 1	0.554 2	99.58		

2.2.11 含量测定。按拟定的含量测定方法,对5个厂家的5批样品进行含量测定,以外标法分别计算2种组分的含量,并与现行标准进行比较。结果,对乙酰氨基酚2种方法的测定结果基本一致;但由于现行标准中未对马来酸氯苯那敏进行含量控制,其测定结果无法比较,详见表3。

表3 样品含量2种方法测定结果(%)

Tab 3 Results of content determination of samples by 2 methods (%)

厂家	对乙酰氨基酚		马来酸氯苯那敏	
	本方法	现行标准方法	本方法	现行标准方法
A	95.8	96.2	93.0	未控制
B	97.5	97.9	85.5	未控制
C	96.7	97.3	75.8	未控制
D	95.2	96.0	100.1	未控制
E	98.8	99.2	93.2	未控制

3 讨论

3.1 溶剂和展开剂的选择

在前期试验中发现,用氯仿作为溶剂提取时,紫外灯下和显色后的斑点拖尾严重,分离效果差。先选择以氯仿-甲醇-丙酮-氨水(9:1.5:1:0.2, V/V/V/V)作为展开剂,结果对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏斑点清晰、分离度较好,但胆酸和猪去氧胆酸无法完全分离。再选择正己烷-乙酸乙酯-甲醇-冰醋酸(2:15:2:2, V/V/V/V)为展开剂,紫外灯(254 nm)下检视,结果对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏分离良好;喷显色剂后,胆酸和猪去氧胆酸分离较好,仅厂家A和厂家D中显示胆酸斑点,其他

厂家未检出胆酸。因此增加胆酸和猪去氧胆酸的TLC鉴别,更能控制药品质量。

本文采用TLC法,在同一系统下,通过不同的显色条件对主成分乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏和人工牛黄中的胆酸和猪去氧胆酸同时进行鉴别。该方法优于在其他现行标准^[8-9]中对这几种成分的鉴别试验,减少了样品的使用量,操作简便,降低了检验成本。

3.2 检测波长的选择

由于该制剂中各组分含量差异较大(每袋含对乙酰氨基酚125 mg、马来酸氯苯那敏0.5 mg),且紫外吸收强度差异也较大。为使2种组分在同一色谱系统下测定,测定马来酸氯苯那敏含量时,选择吸收强的末端吸收波长210 nm;测定对乙酰氨基酚含量时,选择吸收最弱的280 nm。

3.3 流动相的选择

对甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钠(用磷酸调pH 3.0、5.0)(30:70、40:60)、乙腈-0.03 mol/L磷酸氢二铵(用磷酸调pH 3.0、5.0)(30:70、40:60)、乙腈-1%三乙胺的水溶液(用磷酸调pH 2.6、3.2、4.5、6.0)等不同体积比流动相系统进行考察。试验发现在这几种流动相条件下都可以实现乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏的完全分离,且对乙酰氨基酚峰形对称,定量计算准确;但氯苯那敏对流动相要求较苛刻,拖尾严重,且对pH很敏感。因此考虑用梯度洗脱法。最终发现乙腈-1%三乙胺的水溶液作为流动相对氯苯那敏峰的拖尾情况有所改善。试验发现1%三乙胺水溶液的pH值越大,氯苯那敏保留越强,pH为6.0时,30 min未出峰;pH值越小,保留越弱。最终确定其pH(3.7±0.5),可得到较好的出峰效果。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局.WS-10001-(HD-0214)-2002 小儿氨酚黄那敏颗粒[S].2002-02-18.
- [2] 黄华,田海.薄层色谱法分离鉴别小儿氨酚黄那敏颗粒的3种有效成分[J].医药导报,2005,24(9):823.
- [3] 赵向阳.小儿氨酚黄那敏颗粒质量标准研究[J].中国实用医药,2007,24(2):29.
- [4] 李秀梅,张伟.高效液相色谱法同时测定复方对乙酰氨基酚片中3组分的含量[J].中国药房,2005,16(13):1 017.
- [5] 盖轲,郑阿利.高效液相色谱法同时测定氨咖黄敏胶囊中对乙酰氨基酚和咖啡因的含量[J].中国药房,2006,17(6):456.
- [6] 张轶华,杨更亮,张小乐,等.阴离子交换整体柱对蛋白质的分离与纯化[J].色谱,2005,23(3):219.
- [7] 张轶华,姜建国,韩学静,等.高效液相色谱-双波长检测-梯度洗脱法同时测定小儿氨酚烷胺颗粒中的3种有效组分[J].色谱,2010,28(10):1 005.
- [8] 国家食品药品监督管理局.WS-10001-(HD-0256)-2002 小儿氨酚黄那敏颗粒[S].2002-05-06.
- [9] 国家食品药品监督管理局.WS-10001-(HD-0258)-2002 小儿氨酚黄那敏颗粒[S].2002-05-12.

(收稿日期:2012-05-18 修回日期:2012-10-11)