

HPLC法同时测定复方磷酸可待因口服溶液中3种有效成分及2种防腐剂的含量^Δ

魏文芝^{1,2*}, 王天学³, 张敏娟^{1,2} (1. 青海省药品检验检测院, 西宁 810016; 2. 青海省中藏药现代化研究重点实验室, 西宁 810016; 3. 青海省食品检验检测院, 西宁 810016)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2501-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.13

摘要 目的: 建立同时测定复方磷酸可待因口服溶液中3种有效成分(磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏)及2种防腐剂(苯甲酸钠、羟苯乙酯)含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为GL·Science WondaSil C₁₈-WR, 流动相为乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含2.5 mmol/L 庚烷磺酸钠和0.1% 三乙胺, 用磷酸调节pH至2.5±0.1)(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为210 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μL。结果: 磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠、羟苯乙酯检测质量浓度线性范围分别为0.365 8~457.20 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.363 5~454.35 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.124 8~155.98 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.390 6~488.25 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.121 3~151.65 μg/mL($r=0.999\ 9$); 定量限分别为0.409 4、0.508 8、7.731 4、1.347 6、1.940 8 ng, 检测限分别为0.146 2、0.181 7、2.494 0、0.449 2、0.606 5 ng; 精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于1%; 加样回收率分别为98.10%~101.96% (RSD=1.4%, $n=9$)、97.65%~101.14% (RSD=1.2%, $n=9$)、97.30%~102.30% (RSD=1.8%, $n=9$)、97.71%~102.21% (RSD=1.5%, $n=9$)、97.03%~101.55% (RSD=1.7%, $n=9$)。结论: 该方法操作简单, 精密度、稳定性、重复性均较好, 可用于同时测定复方磷酸可待因口服溶液中磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠和羟苯乙酯的含量。
关键词 复方磷酸可待因口服溶液; 高效液相色谱法; 磷酸可待因; 盐酸麻黄碱; 马来酸氯苯那敏; 苯甲酸钠; 羟苯乙酯; 含量测定

Simultaneous Determination of 3 Active Components and 2 Preservatives in Compound Codeine Phosphate Oral Solution by HPLC

WEI Wenzhi^{1, 2}, WANG Tianxue³, ZHANG Minjuan^{1, 2} (1. Qinghai Provincial Institute for Drug Inspection and Testing, Xining 810016, China; 2. Qinghai Key Lab of Modernization of Traditional Chinese and Tibetan Medicine, Xining 810016, China; 3. Qinghai Provincial Institute for Food Inspection and Testing, Xining 810016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 3 active components as codeine phosphate, ephedrine hydrochloride, chlorphenamine maleate and 2 preservatives as sodium benzoate and ethylparaben in Compound codeine phosphate oral solution. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on GL·Science WondaSil C₁₈-WR column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (containing 2.5 mmol/L sodium heptane sulfonate and 0.1% triethylamine, pH adjusted to 2.5±0.1 with phosphoric acid) (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of codeine phosphate, ephedrine hydrochloride, chlorphenamine maleate, sodium benzoate and ethylparaben were 0.365 8-457.20 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.363 5-454.35 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.124 8-155.98 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.390 6-488.25 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.121 3-151.65 μg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively. The limits of quantitation were 0.409 4, 0.508 8, 7.731 4, 1.347 6, 1.940 8 ng; the limits of detection were 0.146 2, 0.181 7, 2.494 0, 0.449 2, 0.606 5 ng. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1%. The average recoveries were 98.10%-101.96% (RSD=1.4%, $n=9$), 97.65%-101.14% (RSD=1.2%, $n=9$), 97.30%-102.30% (RSD=1.8%, $n=9$), 97.71%-102.21% (RSD=1.5%, $n=9$), 97.03%-101.55% (RSD=1.7%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and it can be used for simultaneous determination of codeine phosphate, ephedrine hydrochloride, chlorphenamine maleate, sodium benzoate and ethylparaben in Compound codeine phosphate oral solution.

KEYWORDS Compound codeine phosphate oral solution; HPLC; Codeine phosphate; Ephedrine hydrochloride; Chlorphenamine maleate; Sodium benzoate; Ethylparaben; Content determination

复方磷酸可待因口服溶液为复方口服制剂, 主要成分为磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、氯化氨, 为临床常用镇咳类药物, 对急、慢性咳嗽均具有良好的治疗效果^[1-2]。该药现行质量标准为国家药品标准 WS₁-(X-098)-2002Z, 收载于《国家食品药品监督管理局

Δ 基金项目: 青海省科技计划项目(No.2017-ZJ-Y40)
* 主管药师, 硕士。研究方向: 药品质量分析、药品质量标准。电话: 0971-8247794。E-mail: 304436784@qq.com

国家药品标准新药转正标准》(第3册)^[3],但该标准未对其中防腐剂的含量进行控制。复方磷酸可待因口服溶液中添加的防腐剂多为苯甲酸钠和羟苯乙酯,防腐剂虽能够抑制微生物在口服溶液中的生长和繁殖,但过量摄入会对人体造成危害^[4-7],故应对其中防腐剂的含量加以控制。另其原标准中磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏需采用两种色谱系统分别进行含量测定,操作较烦琐。因此,笔者参考相关文献^[8-17],建立了采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定复方磷酸可待因口服溶液中磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠和羟苯乙酯含量的方法,旨在为其质量控制提供参考,在保证患者用药安全的同时降低检验成本。

1 材料

1.1 仪器

e2695-2998 型 HPLC 仪,包括 Empower 3 色谱工作站、二极管阵列检测器等(美国 Waters 公司);CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

磷酸可待因对照品(批号:171203-201306,纯度:100%)、盐酸麻黄碱对照品(批号:171241-201007,纯度:100%)、马来酸氯苯那敏对照品(批号:100047-200606,纯度:99.7%)、苯甲酸钠对照品(批号:100433-200301,纯度:100%)、羟苯乙酯对照品(批号:100847-201203,纯度:100%)均购自中国食品药品检定研究院;复方磷酸可待因口服溶液(生产厂家A,批号:130619、130620、130621,规格:120 mL/瓶;生产厂家B,批号:B20120102、B20120105,规格:60 mL/瓶;生产厂家B,批号:B20120815、B20121207,规格:120 mL/瓶);庚烷磺酸钠(德国 Merck 公司,纯度:≥99.0%);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);磷酸二氢钾(分析纯,天津市百世化工有限公司);水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:GL·Science WondaSil C₁₈-WR(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含 2.5 mmol/L 庚烷磺酸钠和 0.1% 三乙胺,用磷酸调节 pH 至 2.5±0.1)(B),梯度洗脱(0~40 min,15% A→30% A;40~45 min,30% A→15% A;45~50 min,15% A);检测波长:210 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取磷酸可待因对照品 0.030 48 g、盐酸麻黄碱对照品 0.030 29 g、马来酸氯苯那敏对照品 0.010 43 g、苯甲酸钠对照品 0.032 55 g、羟苯乙酯对照品 0.010 11 g,分别置于 10 mL 量瓶中,加入乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含 2.5 mmol/L 庚烷磺酸钠和 0.1% 三乙胺,用磷酸调节 pH 至 2.5±0.1)(15:85,

V/V,以下简称“溶剂”)溶解并稀释至刻度,摇匀,制成单一对照品贮备液。分别精密量取上述单一对照品贮备液各 3 mL,置于同一 20 mL 量瓶中,加入溶剂稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品 10 mL,置于 100 mL 量瓶中,加入溶剂稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 以溶剂作为阴性对照溶液。

2.2.4 加样回收率试验用混合对照品溶液 精密称取磷酸可待因对照品 24.65 mg、盐酸麻黄碱对照品 20.19 mg、苯甲酸钠对照品 51.19 mg、羟苯乙酯对照品 12.64 mg,置于同一 10 mL 量瓶中;另精密称取马来酸氯苯那敏对照品 24.56 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置于上述 10 mL 量瓶中;加入溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置于 50 mL 量瓶中,加入溶剂稀释至刻度,摇匀,即得加样回收率试验用混合对照品溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠、羟苯乙酯峰之间的分离度均大于 1.5,各成分峰理论板数均大于 5 000,且阴性对照对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.016、0.08、0.4、2、10 mL,分别置于 20 mL 量瓶中,加入溶剂稀释至刻度,摇匀,得线性关系工作溶液 1~5;另取“2.2.1”项下混合对照品溶液 20 mL,作为线性关系工作溶液 6。取上述线性关系溶液 1~6 各适量,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度(x,μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

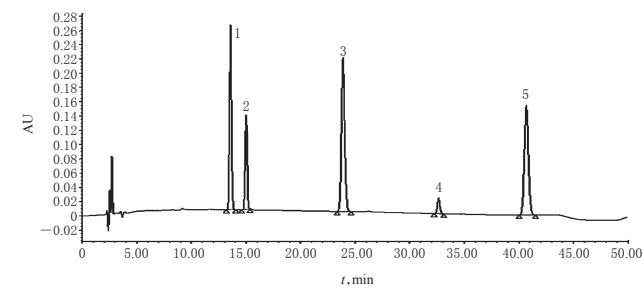
Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/mL
磷酸可待因	y=13 436.38x-6 909.21	0.999 9	0.365 8~457.20
盐酸麻黄碱	y=26 450.12x-3 990.66	0.999 9	0.363 5~454.35
马来酸氯苯那敏	y=15 376.86x-2 836.54	0.999 9	0.124 8~155.98
苯甲酸钠	y=12 442.82x+2 537.40	0.999 9	0.390 6~488.25
羟苯乙酯	y=46 396.98x-7 955.99	0.999 9	0.121 3~151.65

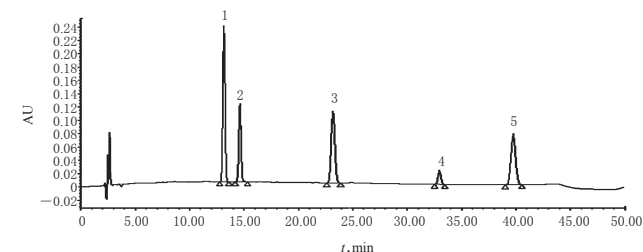
2.5 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结果,磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠、羟苯乙酯的定量限分别为 0.409 4、0.508 8、7.731 4、1.347 6、1.940 8 ng,检测限分别为 0.146 2、0.181 7、2.494 0、0.449 2、0.606 5 ng。

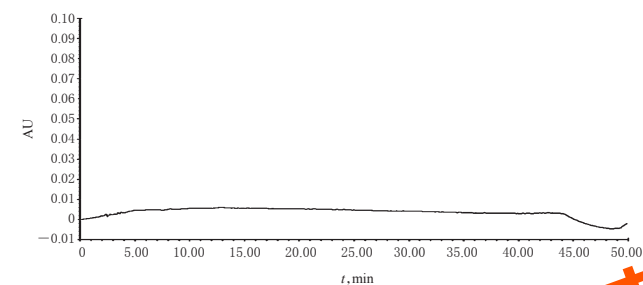
2.6 精密度试验



A.混合对照品溶液



B.供试品溶液



C.阴性对照溶液

注:1.磷酸可待因;2.盐酸麻黄碱;3.苯甲酸钠;4.马来酸氯苯那敏;

5.羟苯乙酯

Note: 1. codeine phosphate; 2. ephedrine hydrochloride; 3. sodium benzoate; 4. chlorphenamine maleate; 5. ethylparaben

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠、羟苯乙酯峰面积的RSD分别为0.4%、0.2%、0.3%、0.4%、0.3% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:130619)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠、羟苯乙酯峰面积的RSD分别为0.08%、0.11%、0.20%、0.04%、0.20% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密量取样品(批号:130619)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠、羟苯乙酯的平均含量分别为0.985、0.788、0.195 0、2.050、0.489 mg/mL, RSD 分别为0.4%、0.7%、0.5%、0.6%、

0.6% ($n=6$),表明本方法重复性较好。

2.9 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:130619)0.5 mL,共9份(每份约相当于含磷酸可待因45.25 μg 、盐酸麻黄碱39.40 μg 、马来酸氯苯那敏0.99 μg 、苯甲酸钠102.50 μg 、羟苯乙酯24.45 μg),分别置于100 mL量瓶中,精密加入“2.2.4”项下加样回收率试验用混合对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
磷酸可待因	49.25	39.45	88.88	100.46	99.86	1.4
	49.25	39.45	87.95	98.10		
	49.25	39.45	89.47	101.96		
	49.25	49.31	97.79	98.44		
	49.25	49.31	98.12	99.11		
	49.25	49.31	98.23	99.33		
	49.25	59.17	108.67	100.42		
	49.25	59.17	107.88	99.08		
	49.25	59.17	106.53	101.87		
盐酸麻黄碱	39.40	32.31	71.55	99.50	99.15	1.2
	39.40	32.31	71.28	98.66		
	39.40	32.31	72.08	101.11		
	39.40	40.39	78.93	97.87		
	39.40	40.39	79.12	98.34		
	39.40	40.39	79.87	100.20		
	39.40	48.47	88.05	100.38		
	39.40	48.47	86.73	97.65		
	39.40	48.47	87.19	98.60		
马来酸氯苯那敏	0.99	0.79	1.77	98.61	99.88	1.8
	0.99	0.79	1.79	102.30		
	0.99	0.79	1.78	100.90		
	0.99	0.98	1.98	100.98		
	0.99	0.98	1.99	101.69		
	0.99	0.98	1.97	100.16		
	0.99	1.18	2.14	97.80		
	0.99	1.18	2.14	97.30		
	0.99	1.18	2.16	99.16		
苯甲酸钠	102.50	81.90	183.05	98.35	100.17	1.5
	102.50	81.90	185.23	101.01		
	102.50	81.90	184.18	99.73		
	102.50	102.38	205.83	100.93		
	102.50	102.38	204.76	99.88		
	102.50	102.38	202.54	97.71		
	102.50	122.86	227.73	101.93		
	102.50	122.86	228.07	102.21		
	102.50	122.86	225.11	99.80		
羟苯乙酯	24.45	20.22	44.98	101.55	99.45	1.7
	24.45	20.22	44.35	98.44		
	24.45	20.22	44.26	97.99		
	24.45	25.27	49.18	97.86		
	24.45	25.27	48.97	97.03		
	24.45	25.27	49.95	100.91		
	24.45	30.32	54.54	99.23		
	24.45	30.32	54.98	100.68		
	24.45	30.32	55.19	101.37		

2.10 样品含量测定

取各批样品适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并按外标法以峰面积计算样品含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=21,mg/mL)

Tab 3 Results of content determination of samples (n=21,mg/mL)

生产厂家	批号	磷酸可待因	盐酸麻黄碱	马来酸氯苯那敏	苯甲酸钠	羟苯乙酯
A	130619	0.985	0.788	0.198 0	2.047	0.489
	130620	0.989	0.792	0.202 0	2.041	0.491
	130621	0.987	0.780	0.197 0	1.598	0.486
B	B20120102	0.980	0.777	0.193 0	2.008	0.480
	B20120105	0.982	0.774	0.195 0	2.017	0.482
	B20120815	0.985	0.773	0.195 0	2.026	0.483
	B20121207	0.981	0.770	0.194 0	2.043	0.487

3 讨论

口服溶液为临床常用剂型,因其加入矫味剂,患者用药依从性较好,尤其是对于儿童或吞咽困难的患者。但因口服溶液为多剂量包装产品,为防止发霉、酸败、变色、产生气体或其他变质等情况,需加入防腐剂。而防腐剂(尤其是对羟基苯甲酸酯类防腐剂)对人体的危害较大(如干扰内分泌、影响男性生殖系统和诱发女性乳腺癌等)^[7],因此口服溶液中防腐剂含量的控制就显得非常必要。

预试验中考察了乙腈-0.1%磷酸盐溶液、甲醇-0.1%磷酸盐溶液、乙腈-0.01 mol/L 磷酸盐溶液、甲醇-0.01 mol/L 磷酸盐等为流动相时的分离度,结果,以乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含 2.5 mmol/L 庚烷磺酸钠和 0.1% 三乙胺,用磷酸调节 pH 至 2.5±0.1)为流动相进行梯度洗脱时的分离效果最佳,峰形较好。故选择乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含 2.5 mmol/L 庚烷磺酸钠和 0.1% 三乙胺,用磷酸调节 pH 至 2.5±0.1)为流动相。

本试验分别考察了柱温为 20、25、30、35、40 ℃时的分离效果,结果,当柱温为 20、25 ℃时,分离效果欠佳;当柱温超过 35 ℃时,磷酸可待因与盐酸麻黄碱峰的分离效果下降。故选择柱温为 30 ℃。

本试验分别考察了不同品牌及不同型号的色谱柱[Waters SunFire C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters XBrige C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、AkzoNobel Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、GL·Science WondaSil C₁₈-WR(250 mm×4.6 mm, 5 μm)]对分离度的影响,结果,当色谱柱为 GL·Science WondaSil C₁₈-WR(250 mm×4.6 mm, 5 μm)时的分离效果较好。故选择 GL·Science Wondasil C₁₈-WR(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱。

综上所述,本方法操作简单,精密度、稳定性、重复

性均较好,可用于同时测定复方磷酸可待因口服溶液中磷酸可待因、盐酸麻黄碱、马来酸氯苯那敏、苯甲酸钠和羟苯乙酯的含量。

参考文献

[1] 廖丽. 复方磷酸可待因溶液治疗急性咳嗽的疗效观察[J]. 中国社区医师, 2016, 32(7): 37-39.

[2] 王新伟. 复方可待因治疗慢性咳嗽的镇咳祛痰效果和安全性[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(电子版), 2015, 15(30): 156.

[3] 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理局国家药品标准新药转正标准: 第3册[S]. 2003.

[4] 谢兆辉, 李学贵, 许焜森. 防腐剂苯甲酸(钠)测定方法的研究进展[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(3): 6-10.

[5] 王思文, 巩江, 高昂, 等. 防腐剂苯甲酸钠的药理及毒理学研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16724.

[6] 陈龙浩, 王雪荣, 孙春玲, 等. HPLC法测定盐酸丁卡因滴眼液中羟苯乙酯的含量[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(2): 149-151.

[7] 林忠洋, 马万里, 齐迹, 等. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂的人体暴露[J]. 化学进展, 2015, 27(5): 614-622.

[8] 刘存富. HPLC法测定蛋白琥珀酸铁口服溶液中防腐剂的含量[J]. 安徽医药, 2015, 19(1): 53-55.

[9] 江文明, 金薇, 宋冬梅, 等. HPLC法测定盐酸氨溴索口服液体制剂中防腐剂含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1838-1841.

[10] 陈灵君, 王发英, 王伟影. HPLC法测定安神补脑液中防腐剂的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(33): 4722-4724.

[11] 孙晓霞, 郭凤霞, 李锦萍, 等. HPLC同时测定复方磷酸可待因糖浆中的有关物质和防腐剂[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(5): 587-589.

[12] 李玲, 陈乃江, 姜燕. 高效液相色谱法测定对乙酰氨基酚口服溶液中苯甲酸钠含量[J]. 中国药业, 2016, 25(21): 63-65.

[13] 高珊, 唐磊, 赵伟国. HPLC法同时测定鼻用呋麻溶液中2组分及防腐剂的含量[J]. 今日药学, 2017, 27(2): 83-85.

[14] 商思阳, 陈娟, 徐冲, 等. 高效液相色谱法测定槐枝合剂的防腐剂含量[J]. 中国药业, 2017, 26(19): 34-36.

[15] 李树英, 王英新, 刘玲, 等. HPLC同时测定丙戊酸钠口服溶液中丙戊酸钠及防腐剂的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 711-714.

[16] 王宏亮, 陈盼盼, 何计龙, 等. HPLC测定口服液体剂中防腐剂和甜味剂的含量[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(7): 844-847.

[17] 林琳. 复方醋酸地塞米松乳膏抑菌剂含量测定及其抑菌效力评价[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(4): 186-188.

(收稿日期: 2018-05-02 修回日期: 2018-07-17)

(编辑: 陈宏)