

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.04.006

反相高效液相色谱法测定酚氨咖敏片的含量及其均匀度

王丽琼

(四川省乐山市食品药品监督管理局, 四川 乐山 614000)

摘要:目的 建立同时测定酚氨咖敏片4种组分含量的高效液相色谱(HPLC)法,考察咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量均匀度。方法 色谱柱采用 XTerra® RP₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以甲醇为流动相 A, 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液-三乙胺(100:0.02)为流动相 B, 梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃,检测波长为 215 nm。结果 酚氨咖敏片中氨基比林、对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的分离度均符合要求,质量浓度线性范围分别为 100.26 ~ 1 002.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 149.85 ~ 1 498.50 μg/mL ($r=0.998\ 9$), 29.98 ~ 299.80 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 2.16 ~ 21.61 μg/mL ($r=0.999\ 8$); 平均加样回收率分别为 98.98%, 98.89%, 99.38%, 100.48%, RSD 分别为 1.38%, 1.07%, 1.27%, 1.25% ($n=6$)。结论 该方法简便、快速、准确,适用于酚氨咖敏片的含量及其均匀度测定,有利于质量控制。

关键词:酚氨咖敏片;氨基比林;对乙酰氨基酚;咖啡因;马来酸氯苯那敏;反相高效液相色谱法;含量;含量均匀度

中图分类号:R927.2;R917

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)04-0016-04

Determination of Content and Content Uniformity of Paracetamol, Aminophenazone Caffeine and Chlorphenamine Maleate Tablets by RP-HPLC

Wang Liqiong

(Leshan Food and Drug Inspection Center, Leshan, Sichuan, China 614000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of 4 components in Paracetamol, Aminophenazone Caffeine and Chlorphenamine Maleate Tablets, and to investigate the content uniformity of caffeine and chlorphenamine maleate.

Methods XTerra® RP₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with gradient elution of methanol (mobile phase A) and 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate-triethylamine (100:0.02, mobile phase B) at the flow rate of 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 215 nm. **Results** The resolution of aminopyrine, paracetamol, caffeine and chlorphenamine maleate in Paracetamol, Aminophenazone Caffeine and Chlorphenamine Maleate Tablets met the requirements, and the linear ranges were 100.26 ~ 1002.60 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 149.85 ~ 1 498.50 μg/mL ($r=0.998\ 9$), 29.98 ~ 299.80 μg/mL ($r=0.999\ 8$) and 2.16 ~ 21.61 μg/mL ($r=0.999\ 8$), respectively. The average recoveries were 98.98%, 98.89%, 99.38% and 100.48%, and the RSDs were 1.38%, 1.07%, 1.27%, 1.25% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and suitable for the content and uniformity determination of Paracetamol, Aminophenazone Caffeine and Chlorphenamine Maleate Tablets, which is conducive to the quality control.

Key words: Paracetamol, Aminophenazone Caffeine and Chlorphenamine Maleate Tablets; aminopyrine; paracetamol; caffeine; chlorphenamine maleate; RP-HPLC; content; content uniformity

酚氨咖敏片主要适用于感冒、发热、头痛、神经痛及风湿痛等,其为复方制剂,主要成分为氨基比林、对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏,价格便宜,文献报道的不良反应有肝损害^[1]、白细胞减少^[2]、严重皮疹^[3]等,还存在主要成分对乙酰氨基酚的安全性问题^[4]。现行标准^[5]中采用高效液相色谱(HPLC)法分别测定上述4种成分的含量,氯苯那敏出峰时间约为23 min,对乙酰氨基酚峰和咖啡因峰分离度差,且操作烦琐,耗时长。有人采用HPLC法同时测定酚氨咖敏颗粒中上述4种成分的含量^[6],以及酚氨咖敏片中咖啡因与马来酸氯苯那敏的含量均匀度^[7],但均仅洗脱出马来酸峰,未洗脱出氯苯那敏峰。还有人采用HPLC法测定酚氨咖敏片中氨基比林、对乙酰氨基酚和咖啡因的溶出度^[8-9],以及马来酸氯苯那敏含量均匀度^[10],采用气相色谱(GC)法同时

测定酚氨咖敏片中4种成分的含量^[11],采用近红外漫反射光谱法测定酚咖片中对乙酰氨基酚和咖啡因的含量^[12]。但尚未见采用HPLC法同时测定酚氨咖敏片4种主要成分含量及其均匀度的报道。本研究中采用常用的C₁₈柱和简单的二元流动相,以梯度洗脱提高分离性能,建立了能同时测定酚氨咖敏片4种组分含量的质量控制方法,同时对咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量均匀度进行了考察。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,含二极管阵列检测器和 OpenLAB CDS 色谱工作站(美国 Agilent 公司); XS205 DualRange 型电子天平,SevenMulti 型酸度计(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ5200DB 型数控超声波清洗

第一作者:王丽琼(1986-),女,主管药师,主要从事药物分析和药品质量控制工作,(电话)0833-2481442(电子信箱)527414762@qq.com。

器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

氨基比林对照品(批号为100503-201302,纯度为99.9%),对乙酰氨基酚对照品(批号为100018-201409,纯度按99.9%计),咖啡因对照品(批号为171215-201010,纯度按100.0%计),马来酸氯苯那敏对照品(批号为100047-201507,纯度按99.7%计)均购自中国食品药品检定研究院;酚氨咖敏片(云南白药集团大理药业有限责任公司,批号分别为DLA1586, DHA1628, DMA1610);甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾、三乙胺、磷酸、糊精、羧甲淀粉钠、二氧化硅和硬脂酸镁均为分析纯,马铃薯淀粉为生物试剂,试验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XTerra® RP₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A为甲醇,B为0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液-三乙胺(100:0.02),梯度洗脱(0~15 min, A相20%→75%;15~16 min, A相75%→20%;16~21 min, A相20%);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:215 nm;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:称取氨基比林对照品100.36 mg,对乙酰氨基酚对照品150.00 mg,咖啡因对照品29.98 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用25%甲醇(用10%磷酸调节pH至3.5)溶解;精密称取马来酸氯苯那敏对照品10.84 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,用25%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取5 mL,置上述50 mL容量瓶中,用25%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品贮备液。精密量取25 mL,置100 mL容量瓶中,用25%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

供试品溶液:取样品20片,称定,计算平均单片质量,称取适量(约相当于对乙酰氨基酚150 mg),置200 mL容量瓶中,用25%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

溶剂空白溶液:25%甲醇(用10%磷酸调节pH至3.5)。

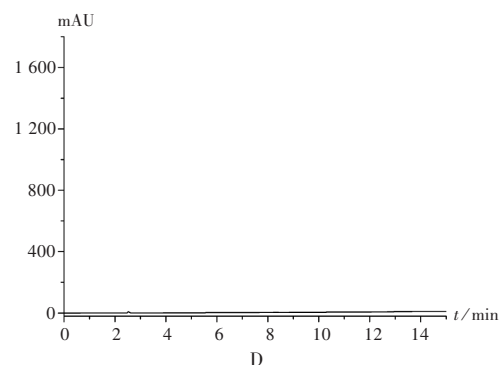
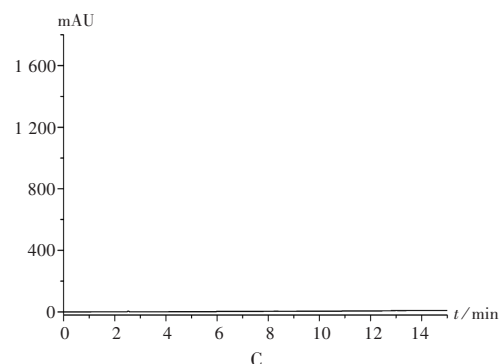
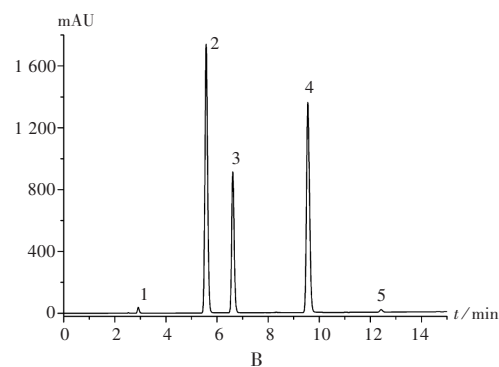
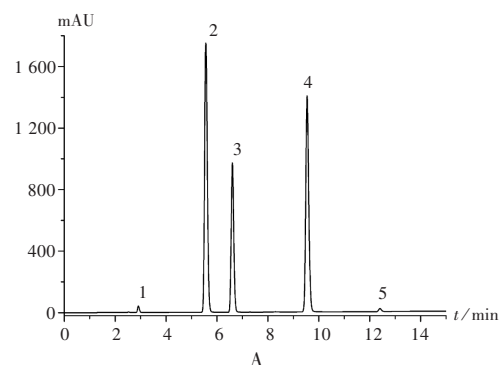
阴性对照品溶液:按处方比例取空白辅料,同供试品溶液配制方法制备,即得。

2.3 方法学考察

阴性干扰试验:分别取2.2项下3种溶液及溶剂空白溶液各10 μL,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件测定,记录色谱图。结果见图1。在拟订色谱条件下,4个组分可完全分离。理论板数按对乙酰氨基酚峰计算为13 345;马来酸峰与对乙酰氨基酚峰的分度为16.11,对乙酰氨基酚峰与咖啡因峰的分度为5.52,咖啡因峰与氨基比林峰的分度为14.63,氨基比林峰与氯苯那敏峰的分度为13.44。结果表明,在拟订色谱条件

下,4个测定组分(5个峰)分离好,溶剂和辅料在对照品溶液4组分(5个峰)相应保留时间处无色谱峰,阴性对照无干扰。

定量限确定:称取各组分对照品适量,精密稳定,加



1. 马来酸 2. 对乙酰氨基酚 3. 咖啡因
4. 氨基比林 5. 氯苯那敏
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液
C. 溶剂空白溶液 D. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

25% 甲醇溶解并稀释制成氨基比林、对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏质量浓度分别为 0.25, 0.37, 0.15, 1.08 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析。结果见表 1。

线性关系考察: 精密量取对照品贮备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加 25% 甲醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取各溶液 10 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。以各组分峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(C , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标进行线性回归。结果见表 1。

精密度试验: 精密量取对照品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。连续进样 6 次, 测定峰面积。结果见表 1, 可见仪器精密度良好。

重复性试验: 取批号为 DMA1610 的酚氨咖敏片样品, 依法制备 6 份供试品溶液, 精密量取各溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以样品中 4 组分标示量的百分含量计算。见表 1。可见, 方法重复性符合要求。

加样回收试验: 精密称取氨基比林、对乙酰氨基酚和咖啡因的对照品及片剂中的其他组分, 按处方量的 100%, 分别置 6 个 200 mL 容量瓶中, 加适量 25% 甲醇溶解; 精密称取马来酸氯苯那敏对照品 20 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 用 25% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 5 mL, 分别置上述相应的 200 mL 容量瓶中, 用 25% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得每个组分 6 份供试品溶液。精密量取以上 6 种溶液各 10 μL , 分别注入液相色谱

仪, 测定, 记录色谱图, 计算加收率。结果见表 2。

稳定性试验: 取批号为 DMA1610 的样品, 依法制备供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 精密量取 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。结果见表 1, 可见明供试品溶液在 48 h 内稳定。

耐用性试验^[13]: 取对照品溶液, 分别采用不同柱温(29.0, 29.5, 30.0, 30.5, 31.0 $^{\circ}\text{C}$)和不同流速(0.990, 0.995, 1.000, 1.005, 1.010 mL/min), 其他条件同 2.1 项, 精密量取 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。结果见表 1, 可见在测定条件有微小变动时, 测定结果不受影响, 系统耐用性好。

2.4 样品含量测定

取批号为 DLA1586, DHA1628, DMA1610 的酚氨咖敏片各 3 份, 依法制备供试品溶液。精密量取各溶液 10 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样品含量。结果见表 3。

2.5 样品含量均匀度测定

取批号为 DLA1586, DHA1628, DMA1610 的酚氨咖敏片各 1 片, 分别置 200 mL 容量瓶中, 加适量 25% 甲醇, 超声助溶, 放冷, 用 25% 甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取各溶液 10 μL , 分别注入液相色谱仪, 进样 10 次, 记录色谱图。按外标法测定峰面积, 计算样品含量, 并根据 2015 年版《中国药典(四部)》(通则 0941)^[14] 计算含量均匀度($A + 2.2 S$), 结果均符合要求。详见表 4。

表 1 方法学考察试验结果

组分	线性关系考察			定量限确定		精密度试验		重复性试验		稳定性试验		耐用性试验的 RSD(%)	
	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	S/N	限度($\mu\text{g/mL}$)	的 RSD(%)	含量(%)	RSD(%)	的 RSD(%)	不同柱温	不同流速		
A	$A = 22.53 C + 170.96$	0.999 8	100.26 ~ 1 002.60	44.7	0.06	0.43	98.01	0.67	0.76	0.08	1.01		
B	$A = 15.83 C + 580.84$	0.998 9	149.85 ~ 1 498.50	65.3	0.06	0.69	99.56	0.42	0.84	0.08	0.93		
C	$A = 43.31 C + 160.99$	0.999 8	29.98 ~ 299.80	62.7	0.02	0.32	102.44	0.60	0.80	0.06	1.03		
D	$A = 14.92 C - 4.07$	0.999 8	2.16 ~ 21.61	59.9	0.18	0.79	96.03	0.75	0.90	0.97	0.59		

注: A 为氨基比林, B 为对乙酰氨基酚, C 为咖啡因, D 为马来酸氯苯那敏。下表同。

表 2 回收率试验结果($n = 6$)

加入量(mg)				测得量(mg)				回收率(%)				$\bar{X}$ (%)				RSD(%)			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
100.02	150.12	30.01	2.08	97.39	146.07	29.21	2.11	97.37	97.30	97.33	101.44								
100.12	150.08	30.02	2.08	98.52	147.98	29.73	2.13	98.40	98.60	99.03	102.40								
100.08	150.00	30.13	2.08	99.08	148.07	30.10	2.07	99.00	98.71	99.90	99.52								
100.05	150.02	29.98	2.08	98.75	148.67	29.83	2.06	98.70	99.10	99.50	99.04	98.98	98.89	99.38	100.48	1.38	1.07	1.27	1.25
100.02	150.11	30.09	2.08	98.92	148.62	30.45	2.08	98.90	99.01	101.20	100.00								
100.11	150.07	30.01	2.08	101.61	150.97	29.81	2.09	101.50	100.60	99.33	100.48								

表 3 样品含量测定结果(%, $n = 3$)

批号	A		B		C		D	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
DLA1586	98.1	0.7	98.8	1.1	102.6	1.4	95.5	0.7
DHA1628	96.6	1.4	95.1	1.0	100.6	1.1	93.8	1.7
DMA1610	97.7	0.2	99.5	0.1	102.1	0.6	96.3	0.9

表4 样品含量均匀度测定结果($n=10$)

批号	成分	含量(%)										$\bar{X}(\%)$	A + 2.2S
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
DLA1586	C	100.6	99.2	99.7	100.3	100.0	94.8	97.0	99.5	100.8	101.6	99.4	5.1
	D	95.4	97.6	94.9	96.4	98.4	96.7	101.0	98.2	96.0	92.7	96.7	8.3
DHA1628	C	100.3	96.1	93.7	100.0	97.4	98.4	96.8	89.6	96.5	100.1	96.9	10.4
	D	94.5	95.1	93.7	93.6	93.6	92.2	92.4	91.7	94.0	93.9	93.5	8.9
DMA1610	C	103.4	102.3	104.9	102.1	96.9	101.6	101.2	98.2	98.9	102.8	101.2	6.7
	D	97.7	99.6	93.6	97.5	93.8	98.2	98.0	95.3	93.9	99.2	96.7	8.4

3 讨论

3.1 色谱条件考察

波长选择:根据4种成分的紫外光谱图(200~400 nm)进行分析^[15]。马来酸氯苯那敏在215 nm波长处的吸收度约为其特征波长261 nm处的3倍,氨基比林和咖啡因的吸收度和其特征波长相近,对乙酰氨基酚的吸收度最小,而对乙酰氨基酚的处方量最大,马来酸氯苯那敏的处方量最小。综合考虑,选择215 nm波长较合适。

流动相选择:试验中比较了流动相B分别为0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液或0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液-三乙胺(100:0.02)对色谱峰的影响。结果显示,无三乙胺时氨基比林峰的对称性差,选用后者为流动相。同时比较了梯度洗脱与等度洗脱对分离效能的影响。4种组分(5个峰)理化性质不一致,当采用甲醇-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液-三乙胺(20:80)为流动相等度洗脱时,氯苯那敏不出峰,氨基比林出峰时间约为19 min,且峰展宽,采用梯度洗脱提高甲醇比例,有利于氯苯那敏和氨基比林峰的分离。经过考察,在此梯度洗脱程序下,4组分(5个峰)在13 min内全部洗脱出来,各峰间分离度好,氨基比林峰窄而尖。

3.2 样品溶剂选择

本研究中比较了95%乙醇、无水乙醇、25%甲醇、25%甲醇(分别用10%磷酸调pH至3.5,2.5,1.5)6种溶剂对各组分提取效果的影响。结果采用95%乙醇和无水乙醇提取的样品溶液色谱图中对乙酰氨基酚峰和咖啡因峰有肩峰,且峰展宽;采用25%甲醇(用10%磷酸调pH至2.5和1.5)提取的样品溶液色谱图中氨基比林峰形差,峰展宽,拖尾;25%甲醇对氯苯那敏的提取率低。经过考察,最后选用25%甲醇(用10%磷酸调pH至3.5)为溶剂。

3.3 应用价值

现行法定标准采用HPLC等度洗脱法分2次测定酚氨咖敏片中4组分的含量。本研究方法优势在于:一是采用HPLC法同时测定了酚氨咖敏片4组分含量,考察了咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量均匀度,操作简便,氯苯那敏出峰时间约缩短一半;二是色谱图中,对乙酰氨基酚峰和咖啡因峰分离度升高2倍多,分离效能大

幅提高;三是检测波长处马来酸氯苯那敏紫外吸收强度提高了3倍,检测灵敏度明显升高。可见,本方法简便、快速、准确,适用于酚氨咖敏片的质量评价。

参考文献:

- [1] 李文军,张峰. 酚氨咖敏片引起严重肝损害[J]. 中国药物滥用防治杂志,2008,14(2):124.
- [2] 许彩燕,王艺红,曾敏珍. 酚氨咖敏片致白细胞减少1例[J]. 人民军医,2015,58(11):1331.
- [3] 肖晓娟,刘海燕. 酚氨咖敏片致严重皮疹1例[J]. 药物流行病学杂志,2008,17(2):130-131.
- [4] 阙淑月. 对乙酰氨基酚的用药安全性[J]. 中国药业,2004,13(10):53-54.
- [5] WS-10001-(HD-1021)-2002. 国家药品标准·化学药品地方标准上升国家标准(第十六册)[S].
- [6] 莫连峰,陈莹,蒋静如. 反相高效液相色谱法同时测定酚氨咖敏颗粒中四组分的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1934-1936.
- [7] 刘朝霞,程奇蕾,宁保明. HPLC法测定酚氨咖敏片中咖啡因与马来酸氯苯那敏的含量均匀度[J]. 中国药品标准,2014,15(4):265-269.
- [8] 冯锁民,张湛睿,秦蓓,等. 高效液相色谱法测定酚氨咖敏片的溶出度[J]. 药物分析杂志,2009,29(10):1722-1725.
- [9] 雷琨,徐长根,李继,等. 酚氨咖敏片溶出度方法的建立及国内产品质量的考察[J]. 西北药学杂志,2013,28(1):57-61.
- [10] 章贵杰,赵春香,黄晓光. 高效液相色谱法测定酚氨咖敏片中马来酸氯苯那敏含量均匀度[J]. 中国药业,2013,22(17):29-30.
- [11] 郭琦,傅强,张鹏宵,等. GC法同时测定酚氨咖敏片中4种组分[J]. 分析实验室,2013,29(5):21-24.
- [12] 唐海霞,刘全,陈桂良. 酚咖片中对乙酰氨基酚和咖啡因的近红外漫反射光谱法测定[J]. 中国医药工业杂志,2004,35(11):669-671.
- [13] 田明,李伟,孙宏宇,等. 高效液相色谱测定条件的耐用性试验研究[J]. 中国医药学报,2010,38(3):77-80.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:124.
- [15] 王丽琼,赵雪,刘明容,等. RP-HPLC法同时测定复方酚咖伪麻胶囊5种组分的含量[J]. 药物分析杂志,2016,36(8):1403-1408.

(收稿日期:2017-10-12;修回日期:2017-11-20)