

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.21.022

高效液相色谱法测定感冒灵颗粒中咖啡因、阿司匹林和非那西丁含量

刘彬果, 叶盛英

(中国人民解放军第九八三医院, 天津 300142)

摘要:目的 建立同时测定感冒灵颗粒中咖啡因、阿司匹林和非那西丁含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱采用 Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(40:60, V/V), 检测波长为 265 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为室温。结果 咖啡因、阿司匹林和非那西丁的进样量分别在 0.35~7.00 μg($r=0.9999$), 1.025~20.500 μg($r=0.9997$), 1.025~20.510 μg($r=0.9999$) 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率分别为 99.16%, 98.08%, 98.21%, RSD 分别为 2.59%, 2.65%, 2.21% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、灵敏, 结果准确、可靠, 可用于感冒灵颗粒的质量控制。

关键词:感冒灵颗粒; 咖啡因; 阿司匹林; 非那西丁; 高效液相色谱法; 含量

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)21-0075-03

Content Determination of Caffeine, Aspirin and Phenacetin in Ganmaoling Granules by HPLC

LIU Bingguo, YE Shengying

(The 983rd Hospital of PLA, Tianjin, China 300142)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of caffeine, phenacetin and aspirin in Ganmaoling Granules. **Methods** The chromatographic column was Zorbax SB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.01 mol/L potassium phosphate monobasic solution(40:60, V/V), the detection wavelength was 265 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was room temperature. **Results** The linear range of caffeine, aspirin, and phenacetin was 0.35-7.00 μg($r=0.9999$), 1.025-20.500 μg($r=0.9997$) and 1.025-20.510 μg($r=0.9999$), respectively. The average recoveries were 99.16%, 98.08% and 98.21%, the RSDs were 2.59%, 2.65% and 2.21% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurately, reproducible and reliable, which can be used for quality control of Ganmaoling Granules.

Key words: Ganmaoling Granules; caffeine; aspirin; phenacetin; HPLC; content

感冒灵颗粒为中国人民解放军第九八三医院的自制中西药复方制剂, 临床应用多年, 具有清热解毒功效, 用于治疗感冒发热, 咽喉疼痛, 头痛等, 疗效确切。方中蒲公英、败酱草清热解毒, 为君药; 金银藤、连翘、桔梗为臣药。现有质量标准仅对中药成分进行定性鉴别, 无含量测定项^[1]。为有效控制该制剂质量, 本研究中建立了同时测定咖啡因、阿司匹林及非那西丁含量的高效液相色谱(HPLC)法^[2-3]。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(美国安捷伦公司), 包括 OpenLAB CDS 色谱工作站; XS105 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多公司, 精度为十万分之一); KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 50 W, 频率为 40 kHz)。

1.2 试剂

阿司匹林对照品(批号为 100113-201606), 咖啡因对照品(批号为 2181807), 非那西丁对照品(批号为

62-44-2), 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水(自制), 其他试剂均为分析纯; 感冒灵颗粒(中国人民解放军第九八三医院制剂室提供, 批号分别为 14290215, 15100215, 15220215)。

2 方法与结果

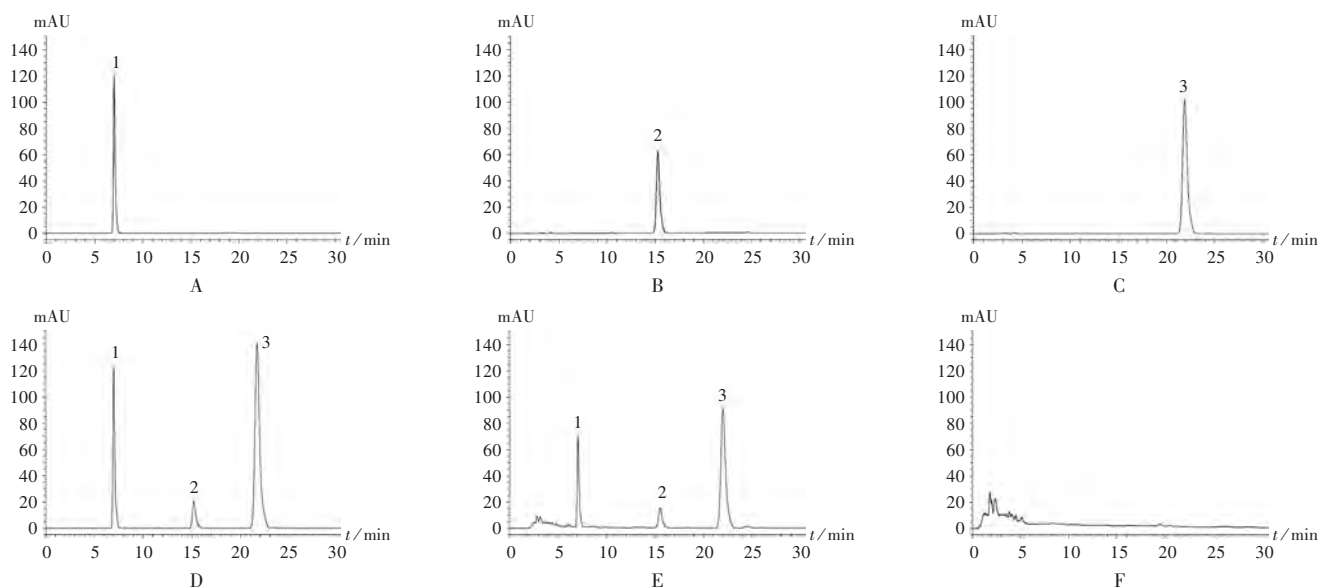
2.1 色谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(40:60, V/V); 检测波长: 265 nm; 进样量: 10 μL; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温。

2.2 溶液制备

对照品溶液: 取阿司匹林对照品、非那西丁对照品及咖啡因对照品适量, 精密称定, 加流动相制成含阿司匹林 200 μg/mL、非那西丁 200 μg/mL、咖啡因 70 μg/mL 的溶液, 即得。

供试品溶液: 取样品适量, 研细, 取 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 流动相, 再称定质量, 经超声处理(功率为 250 W, 频率为 40 kHz)30 min,



1. 咖啡因 2. 阿司匹林 3. 非那西丁

A. 咖啡因对照品溶液 B. 阿司匹林对照品溶液 C. 非那西丁对照品溶液 D. 混合对照品溶液 E. 供试品溶液 F. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

放冷,再称定质量,然后用流动相补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按处方比例制备不含阿司匹林、非那西丁和咖啡因的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取上述3种溶液,按拟定色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照品溶液与对照品溶液相同保留时间处无对应峰出现,表明阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:取咖啡因对照品 17.5 mg、阿司匹林对照品 51.25 mg、非那西丁对照品 51.28 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,流动相稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密吸取 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 μ L, 依次进样,按拟定色谱条件测定峰面积,以进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程, $Y_{\text{咖}} = 0.0422 X_{\text{咖}} - 0.52666$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{阿}} = 2.5685 X_{\text{阿}} - 4.2256$ ($r = 0.9997$), $Y_{\text{非}} = 23.37 X_{\text{非}} + 45.497$ ($r = 0.9999$)。结果咖啡因、阿司匹林、非那西丁进样量分别在 0.35 ~ 7.00 μ g, 1.025 ~ 20.500 μ g, 1.025 ~ 20.510 μ g ($n = 7$) 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取同一混合对照品溶液,按拟定色谱条件连续进样 6 次,测定,记录峰面积。结果阿司匹林、咖啡因、非那西丁的 RSD 分别为 2.46%, 2.67%, 1.13% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批(批号为 15100215)样品适

量,依法制备供试品溶液,室温放置 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12 h 时按拟定色谱条件进样测定。结果咖啡因、阿司匹林和非那西丁的 RSD 分别为 1.72%, 2.56%, 1.63% ($n = 6$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 15100215)样品 6 份,依法制备供试品溶液,按拟定色谱条件进样测定,记录色谱图。结果咖啡因、阿司匹林和非那西丁平均含量的 RSD 分别为 1.97%, 3.01%, 2.26% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 15100215) 0.3 g,共 5 份,精密称定,分别精密加入混合对照品(咖啡因 0.25 mg/mL,阿司匹林 1.016 mg/mL,非那西丁 1.81 mg/mL)各 5 mL,精密加入流动相 50 mL,称定质量,超声处理(功率为 250 W,频率为 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用流动相补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。按拟定色谱条件进样测定,记录峰面积,计算回收率。详见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品适量,依法制备供试品溶液,按拟定色谱条件进样测定,记录色谱图。计算 3 批样品中咖啡因、阿司匹林、非那西丁的含量,结果见表 2。

3 讨论

3.1 提取方法选择^[2-5]

考察超声提取方法中所用的提取溶剂和提取时间等因素,比较分别采用甲醇和流动相提取时的结果,发现采用甲醇提取时,峰形拖尾,无法达到很好的分离效果;当采用流动相进行提取时,提取完全,且峰形较好。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.300 1	0.300 1	0.300 1	1.101	5.886	4.740	1.25	5.08	9.05	2.357	11.10	13.81	100.48	102.63	100.22						
0.299 7	0.299 7	0.299 7	1.089	5.878	4.693	1.25	5.08	9.05	2.309	10.72	13.40	97.60	95.31	96.21						
0.311 5	0.311 5	0.311 5	1.132	6.110	4.921	1.25	5.08	9.05	2.420	11.13	14.01	103.04	98.82	100.43	99.16	98.08	98.21	2.59	2.65	2.21
0.306 9	0.306 9	0.306 9	1.115	6.020	4.847	1.25	5.08	9.05	2.360	10.91	13.77	99.60	96.26	98.60						
0.310 2	0.310 2	0.310 2	1.138	6.084	4.901	1.25	5.08	9.05	2.332	11.01	13.50	95.52	96.97	95.02						
0.301 5	0.301 5	0.301 5	1.106	5.913	4.809	1.25	5.083	9.05	2.340	10.92	13.75	98.72	98.51	98.80						

注:A为咖啡因,B为阿司匹林,C为非那西丁。

表2 3批样品含量测定结果(mg/g)

批号	咖啡因	阿司匹林	非那西丁
14290215	3.37	21.41	14.84
15100215	3.44	19.87	15.96
15220215	3.43	20.68	16.18

考察了不同提取时间(20, 30, 40 min)的影响,结果表明,超声提取 30 min,样品即可提取完全,故选择流动相超声提取 30 min。

3.2 检测波长选择

参考文献[6-9],对3种成分在220~400 nm波长范围进行了紫外光谱扫描,根据各成分的最大吸收值,结果发现,当采用265 nm作为检测波长时,3种成分均有较好的紫外吸收,被测成分检测灵敏。

3.3 流动相选择

参考文献[10-13],比较了多种流动相体系,分别采用了甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液、冰醋酸-甲醇溶液(用乙二胺调节pH 3.7)、乙腈-四氢呋喃-冰醋酸-水和甲醇-水,当采用甲醇-水、冰醋酸-甲醇溶液为流动相时,干扰严重,样品稳定性差,基线漂移,无法达到分离要求;当选用甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液和乙腈-四氢呋喃-冰醋酸-水为流动相时,可满足检测要求。对这2种流动相进行研究,综合考察了样品的稳定性、分离度、峰形、出峰时间、峰形(对称性)、理论板数等因素,最终选择甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液为流动相,并对其不同比例进行研究,确定甲醇-0.01 mol/L磷酸二氢钾溶液(40:60, V/V)为流动相。

3.4 方法评价

该方法操作简单,结果可靠,重复性好,空白无干扰,能同时测定咖啡因、阿司匹林、非那西丁的含量,可用于感冒灵颗粒的质量控制。

参考文献:

- [1] 刘彬果,郭海萍,任涛. 高效液相色谱法测定感冒灵冲剂中马来酸氯苯那敏含量[J]. 天津药学,2013,25(3):6-7.
- [2] 苏仁俊,刘玲,谭忠军. 高效液相色谱法测定复方乙酰水杨酸片中咖啡因与非那西丁的含量[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(7):990-993.
- [3] 陈文建. HPLC测定感冒灵颗粒中咖啡因含量的探讨[J]. 海峡药学,2007,19(3):56-57.
- [4] 孙瑛,何春龙,成业,等. HPLC法测定阿司匹林肠溶片中阿司匹林的含量[J]. 北方药学,2014,11(11):12-13.
- [5] 廖文榕. HPLC法同时测定感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量[J]. 海峡药学,2015,27(3):76-78.
- [6] 陆静,李锐,吕颖,等. 复方乙酰水杨酸片的含量测定方法研究进展[J]. 北方药学,2009,6(1):44-47.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:544-545.
- [8] 王燕桓,刘国瑞,傅承光,等. HPLC法测定阿咖酚散中3种有效成分及相关杂质含量的研究[J]. 药物分析杂志,2006,26(5):692-695.
- [9] 刘继华,吴凡,王莹,等. HPLC法测定去痛片中四种成分的含量[J]. 海峡药学,2016,28(7):52-53.
- [10] 杨直,侯思思. HPLC-ELSD法测定去痛片中氨基比林、咖啡因、苯巴比妥和非那西丁的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(12):1845-1848.
- [11] 张黎莉,吴昱景. 双波长HPLC法同时测定感冒灵胶囊中对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、咖啡因3种化学药物和野菊花指标性成分蒙花苷的含量[J]. 海峡药学,2016,28(7):57-61.
- [12] 王晓燕. 高效液相色谱法测定复方阿司匹林片剂的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2002,19(1):31-34.
- [13] 修锐,王小红,王震红,等. HPLC法测定氨咖黄敏胶囊中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏的含量[J]. 中国药师,2007,10(11):59-61.

(收稿日期:2020-03-25;二次修回日期:2020-06-13)

稿件查询专线 (023)86592565 外联发行 (023)86592257(传真)