

中图分类号:R917;R927 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2024)20-0091-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.20.020



高效液相色谱法同时测定感冒疏风片中3种成分含量

和 祎,尹黎星,王秀丽

(云南省怒江傈僳族自治州食品药品检验所,云南 怒江 673199)

摘要:目的 建立测定感冒疏风片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、*D*-苦杏仁苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱均为 Agilent Phenyl-Hexyl 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流速均为 1.0 mL/min,检测波长均为 210 nm,进样量均为 10 μL;盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱,流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾水溶液(含 0.2% 三乙胺,磷酸调 pH 至 3.5)-乙腈(98:2, V/V),柱温为 40 °C;*D*-苦杏仁苷,流动相为乙腈-水(5:95, V/V),柱温为 30 °C。结果 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和 *D*-苦杏仁苷质量浓度分别在 4.166~104.15 μg/mL($r=0.9999$), 4.210~105.250 μg/mL($r=0.9999$), 22.40~224 μg/mL($r=0.9999$) 范围内与峰面积线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 2.0%;平均加样回收率,薄膜衣片分别为 98.62%, 98.40%, 99.52%, *RSD* 分别为 1.45%, 1.50%, 1.24% ($n=6$);普通素片分别为 99.26%, 98.63%, 99.63%, *RSD* 分别为 1.25%, 1.12%, 0.90% ($n=6$)。结论 所建方法操作简便、结果准确,精密性、稳定性、重复性好,可用于感冒疏风片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、*D*-苦杏仁苷的含量测定。

关键词:高效液相色谱法;盐酸麻黄碱;盐酸伪麻黄碱;感冒疏风片;*D*-苦杏仁苷

Simultaneous Determination of Three Components in Ganmao Shufeng Tablets by HPLC

HE Yi, YIN Lixing, WANG Xiuli

(Nujiang Lisu Autonomous Prefecture Institute for Food and Drug Control, Nujiang, Yunnan, China 673199)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the contents of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and *D*-amygdalin in Ganmao Shufeng Tablets. **Methods** The chromatographic column was Agilent Phenyl-Hexyl column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, and the injection volume was 10 μL. The mobile phase of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride was 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate aqueous solution (containing 0.2% triethylamine, adjusting to pH 3.5 with phosphoric acid)-acetonitrile (98:2, V/V), and the column temperature was 40 °C; the mobile phase of *D*-amygdalin was acetonitrile-water (5:95, V/V), and the column temperature was 30 °C. **Results** The linear ranges of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and *D*-amygdalin were 4.166-104.15 μg/mL ($r=0.9999$), 4.210-105.250 μg/mL ($r=0.9999$), 22.40-224 μg/mL ($r=0.9999$) respectively. The *RSDs* of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above three components in film-coated tablets were 98.62%, 98.40%, 99.52%, with *RSDs* of 1.45%, 1.50%, 1.24% ($n=6$) respectively; those in ordinary tablets were 99.26%, 98.63%, 99.63%, with *RSDs* of 1.25%, 1.12%, 0.90% ($n=6$) respectively. **Conclusion** The established method is simple, accurate, precise, stable, and repeatable, which can be used for the determination of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and *D*-amygdalin in Ganmao Shufeng Tablets.

Key words: HPLC; ephedrine hydrochloride; pseudoephedrine hydrochloride; Ganmao Shufeng Tablets; *D*-amygdalin

感冒疏风片由麻黄绒、苦杏仁、白芍(酒炙)等12味药材组方,有辛温解表、宣肺和中功效^[1],主要用于治疗风寒感冒引起的咳嗽、发热、头痛、流涕等症状。目前有2种片型,即普通的素片和薄膜衣片,执行标准分别为国家药品监督管理局标准和原国家卫生部颁布药品标准,但其中均无主要活性成分麻黄绒和苦杏仁的含量测定,当前研究也尚缺乏关于感冒疏风片质量控制的内容^[2-3]。为此,本研究探讨了感冒疏风片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、*D*-苦杏仁苷含量的测定方法,以期感冒疏风片的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:LC-20A型高效液相色谱仪(日本Shimadzu

公司);XCE204型、XS205型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度分别为0.1 mg、0.01 mg);AS10200A型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器公司)。

试药:感冒疏风片普通素片(云南腾药制药股份有限公司,批号分别为20210440、20210441,昆明中药厂有限公司,批号为20211022);感冒疏风片薄膜衣片(昆明中药厂有限公司,批号分别为20210961、20210928、20211092);盐酸麻黄碱对照品(批号为171241-201809,含量100%),盐酸伪麻黄碱对照品(批号为171237-201510,含量99.8%),*D*-苦杏仁苷对照品(批号为110820-202109,含量100%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂

均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Phenyl-Hexyl柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.02 mol/L磷酸二氢钾水溶液(含0.2%三乙胺,磷酸调pH至3.5)-乙腈(98:2, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:40℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

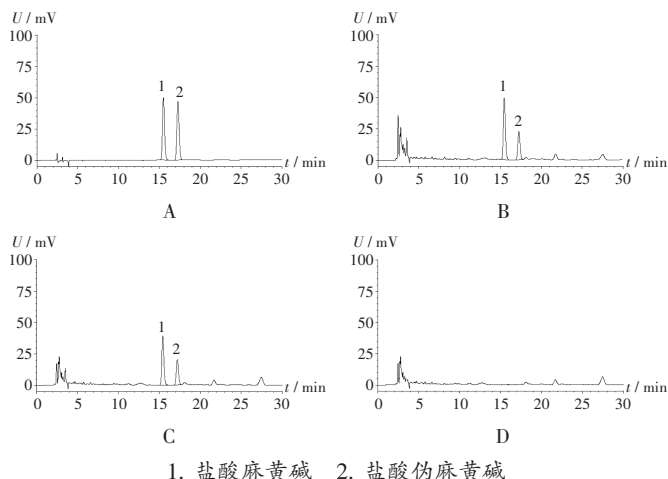
分别取盐酸麻黄碱对照品20.83 mg、盐酸伪麻黄碱对照品21.11 mg,置100 mL容量瓶中,用1.44%磷酸溶液定容,各取5 mL,用1.44%磷酸溶液定容至25 mL,即得混合对照品溶液。取样品10片(薄膜衣片需除去包衣),研细,取约2.0 g,置锥形瓶中,加浓氨试液1 mL润湿,密塞,静置10 min,精密加入三氯甲烷50 mL,精密称定,超声(功率300 W、频率40 kHz,下同)处理30 min,放冷,用三氯甲烷补足减失的质量,滤过,取续滤液25 mL,用1%盐酸溶液^[2]振摇提取4次,每次20 mL,合并酸液,置水浴蒸干,残渣用1.44%磷酸溶液溶解并定容至10 mL,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液I。按感冒疏风片处方和工艺制备缺麻黄绒的阴性样品,并按供试品溶液I制备方法制备阴性对照品溶液I。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.1.2项下混合对照品溶液、供试品溶液I、阴性对照品溶液I各适量,按2.1.1项下色谱条件进样,记录色谱。理论板数按盐酸麻黄碱峰计应不低于8 000;分离度均大于1.5,基线分离良好。详见图1。

线性关系考察:分别精密量取2.1.2项下混合对照品溶液适量,用1.44%磷酸溶液制成盐酸麻黄碱质量浓度分别为4.16,20.83,41.66,83.32,104.15 μg/mL,盐酸伪麻黄碱质量浓度分别为4.21,21.05,42.21,84.20,105.25 μg/mL的系列混合对照品溶液。按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得盐酸麻黄碱回归方程 $Y_1 = 4.70762 \times 10^{-5}X_1 - 0.068424$ ($r = 0.9999$),盐酸伪麻黄碱回归方程 $Y_2 = 4.58666 \times 10^{-5}X_2 - 0.06301794$ ($r = 0.9998$)。结果表明,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱质量浓度分别在4.166~104.15 μg/mL和4.210~105.250 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.1.2项下混合对照品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积的RSD分别为0.18%和0.25% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。



1. 盐酸麻黄碱 2. 盐酸伪麻黄碱
A. 混合对照品溶液 B. 薄膜衣片供试品溶液 I C. 素片供试品溶液 I D. 阴性对照品溶液 I

图1 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱高效液相色谱图

1. Ephedrine hydrochloride 2. Pseudoephedrine hydrochloride
A. Mixed reference solution B. Test solution I of film-coated tablets
C. Test solution I of ordinary tablets D. Negative reference solution I
Fig. 1 HPLC chromatograms of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride

稳定性试验:取2.1.2项下供试品溶液I(薄膜衣片批号为20210961,普通素片批号为20210440)适量,分别于室温放置0,3,6,9,12 h时按2.1.1项下色谱条件进样,记录峰面积。结果盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积的RSD,薄膜衣片供试品溶液I中分别为0.91%和0.76% ($n = 5$),普通素片供试品溶液I中分别为0.52%和0.37% ($n = 5$),表明供试品溶液I在室温放置12 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(薄膜衣片批号为20210961,普通素片批号为20210440)粉末适量,精密称定,各6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液I,再按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量。结果薄膜衣片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的平均含量分别为0.233 3 mg/g和0.129 3 mg/g, RSD分别为0.76%和0.64% ($n = 6$);普通素片中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的平均含量分别为0.178 7 mg/g和0.101 4 mg/g, RSD分别为0.52%和0.40% ($n = 6$);表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(薄膜衣片批号为20210961,普通素片批号为20210440)适量,各6份,分别加入一定质量浓度的混合对照品溶液,按2.1.2项下方法制备供试品溶液I,再按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果见表1、表2。

2.1.4 样品含量测定

分别取薄膜衣片和普通素片各3批,按2.1.2项下方法分别制备供试品溶液,再按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果见表3。

表 1 薄膜衣片样品加样回收试验结果 (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
1.017 1	1.017 1	0.545 3	0.118 6	0.063 0	0.566 4	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.205 3	0.113 8	1.123 9	98.07	99.41	99.55						
1.025 6	1.025 6	0.546 9	0.119 6	0.063 5	0.568 1	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.207 6	0.112 7	1.117 8	99.55	96.28	98.16						
1.002 4	1.002 4	0.548 2	0.116 9	0.062 1	0.569 4	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.204 4	0.113 3	1.125 2	98.98	100.19	99.25	98.62	98.40	99.52	1.45	1.50	1.24
1.041 2	1.041 2	0.547 9	0.121 4	0.064 5	0.569 1	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.208 4	0.114 8	1.126 6	98.42	98.43	99.55						
1.043 1	1.043 1	0.554 3	0.121 7	0.064 6	0.575 7	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.210 5	0.115 2	1.145 8	100.45	99.02	101.80						
1.030 9	1.030 9	0.544 4	0.120 2	0.063 9	0.565 5	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.205 3	0.113 5	1.118 8	96.27	97.06	98.80						

注:A 为盐酸麻黄碱,B 为盐酸伪麻黄碱,C 为 D - 苦杏仁苷。下表同。
Note:A refers to ephedrine hydrochloride,B refers to pseudoephedrine hydrochloride,and C refers to D - amygdalin (for Tab. 1 - 3).

表 2 普通素片样品加样回收试验结果 (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
1.004 1	1.004 1	0.409 8	0.089 7	0.050 9	0.559 1	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.176 6	0.102 2	1.123 7	98.30	100.39	100.82						
1.034 8	1.034 8	0.404 6	0.092 4	0.052 5	0.552 0	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.181 0	0.102 3	1.110 1	100.23	97.45	99.66						
1.008 6	1.008 6	0.400 2	0.090 1	0.051 1	0.546 0	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.176 7	0.101 7	1.099 4	97.96	99.02	98.82	99.26	98.63	99.63	1.25	1.12	0.90
1.024 8	1.024 8	0.407 8	0.091 6	0.052 0	0.556 3	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.179 2	0.102 4	1.108 0	99.09	98.63	98.52						
1.059 3	1.059 3	0.402 7	0.094 6	0.053 7	0.549 4	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.184 1	0.103 5	1.112 2	101.24	97.45	100.50						
1.047 2	1.047 2	0.403 3	0.093 6	0.053 1	0.550 2	0.088 4	0.051 1	0.560 0	0.180 9	0.103 6	1.107 1	98.75	98.82	99.45						

表 3 样品含量测定结果 (mg / g, n = 3)

Tab. 3 Results of content determination of three components in samples (mg / g, n = 3)						
成分	20211092	20210961	20210928	20210440	20210441	20211022
A	0.214 3	0.233 3	0.221 7	0.178 7	0.178 9	0.160 4
B	0.114 1	0.123 9	0.122 6	0.101 4	0.096 7	0.092 6
C	0.796 7	1.038 7	0.981 7	1.364 3	1.497 0	0.957 8

2.2 D - 苦杏仁苷含量测定

2.2.1 色谱条件

流动相:乙腈 - 水(5:95, V / V);柱温:30 ℃;余同

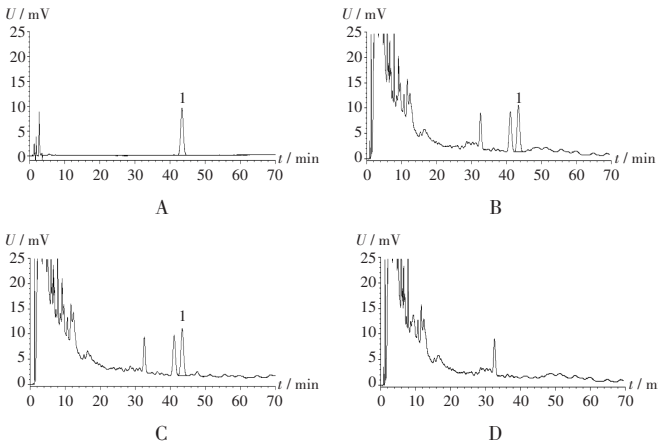
2.1.1 项。

2.2.2 溶液的配制

取 D - 苦杏仁苷对照品 11.20 mg,精密称定,用甲醇稀释至 100 mL,取 5 mL,用甲醇稀释至 10 mL,即得对照品溶液。取样品 20 片(薄膜衣除去包衣),研细,取约 2.0 g,置锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,精密称定,超声处理 40 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液 II。按感冒疏风片处方和工艺制备缺苦杏仁的阴性样品,按供试品溶液 II 制备方法制备阴性对照品溶液 II。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验:取 2.2.2 项下对照品溶液、供试品溶液 II、阴性对照品溶液 II 各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按 D - 苦杏仁苷峰计应不低于 5 000,分离度大于 1.5,基线分离



1. D - 苦杏仁苷
A. 对照品溶液 B. 薄膜衣片供试品溶液 II C. 普通素片供试品溶液 II D. 阴性对照品溶液 II

图 2 D - 苦杏仁苷高效液相色谱图

1. D - amygdalin
A. Reference solution B. Test solution II of film - coated tablets
C. Test solution II of ordinary tablets D. Negative reference solution II
Fig. 2 HPLC chromatograms of D - amygdalin

良好。详见图 2。

线性关系考察:分别精密量取 2.2.2 项下对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μL,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以 D - 苦杏仁苷质量浓度(X, μg / mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_3 = 8.95448 \times 10^3 X_3 - 1.31493 \times 10^{-4} (r = 0.9999)$ 。

结果表明, D -苦杏仁苷质量浓度在22.40~224.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2.2项下对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果 D -苦杏仁苷峰面积的 RSD 为0.86%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2.2项下供试品溶液Ⅱ(薄膜衣片批号为20210961,普通素片批号为20210440)适量,分别于室温放置0,4,8,10,12,24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果薄膜衣片和普通素片供试品溶液中 D -苦杏仁苷峰面积的 RSD 分别为1.48%和1.52%($n=5$)。表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:称取样品(薄膜衣片批号为20210961,普通素片批号为20210440)粉末适量,精密称定,各6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液Ⅱ,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果薄膜衣片中 D -苦杏仁苷的平均含量为1.0387 mg/g, RSD 为0.65%($n=6$);普通素片中 D -苦杏仁苷的平均含量分别为1.3643 mg/g, RSD 为1.05%($n=6$);表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(薄膜衣片批号为20210961,普通素片批号为20210440)适量,各6份,分别加入一定质量浓度的对照品溶液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果见表1、表2。

2.2.4 样品含量测定

测定方法同2.1.4项,结果见表3。

3 讨论

3.1 指标成分选择

感冒疏风片中君药麻黄绒为麻黄经碾绒筛去粉末制作而成,其作用较麻黄缓和,有发汗散寒、宣肺平喘的功效^[4],主要活性成分包括盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱^[5]。苦杏仁降利肺气、止咳平喘^[6],为方中佐药,与麻黄绒相伍,一宣一降,其主要成分为苦杏仁苷常以1对差向异构体的形式存在^[7-8],其中 D -苦杏仁苷是苦杏仁发挥止咳平喘作用的主要活性成分^[9]。对于含苦杏仁的中药复方制剂含量,不同的水煎煮提取工艺获得的提取液中2种苦杏仁苷的比值差异很大^[8],故需对其中 D -苦杏仁苷含量进行质量控制。

3.2 色谱条件优化

预试验中,分别采用流动相[乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液(含0.1%三乙胺)],色谱柱[TIAHHE Kromasil- C_{18} 柱、Agilent ZORBAX SB- C_{18} 柱、Thermo AcclaimTM 120A C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm)]时,盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱色谱峰拖尾均较严重;

采用乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(含0.2%三乙胺,以磷酸调pH至3.5)和甲醇-0.092%磷酸溶液(含0.04%三乙胺和0.02%二正丁胺)为流动相,2个待测成分与其他杂质峰都能较好达到基线分离,色谱峰对称,无杂质干扰。但以乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(含0.2%三乙胺,以磷酸调pH至3.5)为流动相时2个待测成分峰形更尖锐,理论板数更高。 D -苦杏仁苷的含量测定,同时采用以上色谱柱,以乙腈-水^[10-13]、乙腈-0.1%磷酸溶液^[14-15]体系作流动相进行考察。结果表明,以后者为流动相时,异构体 L -苦杏仁苷和 D -苦杏仁苷因极性非常接近,分离度均难达到药典规定的要求。采用乙腈-水为流动相,选择Agilent Phenyl-Hexyl色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm),乙腈比例、色谱柱柱温对试验结果影响均较大,分别采用不同乙腈比例(4%、5%、6%)、不同柱温(30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$)进行考察,结果表明,使用4%乙腈和柱温分别为30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 时,出峰时间分别为60.42 min和46.27 min,分离度分别为2.26和1.47;使用5%乙腈和柱温均分别为30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 时,出峰时间分别为43.47 min和29.84 min,分离度分别为2.03和1.28。使用6%乙腈,分离度均小于1.5。经综合考虑,最终采用Agilent Phenyl-Hexyl柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm)为色谱柱,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,以乙腈-水(5:95, V/V)为流动相,制剂中的 L -苦杏仁苷和 D -苦杏仁苷有良好的分离效果,色谱峰基线平稳,峰形对称。

3.3 供试品溶液制备方法选择

采用甲醇配制混合对照品和供试品溶液,样品中待测成分的色谱峰不如对照品尖锐,经查阅相关文献,采用2020版《中国药典(一部)》中药材麻黄的含量测定项下样品处理方法,使用1.44%磷酸溶液,供试品溶液中2种待测成分的色谱峰得到明显改善。测定 D -苦杏仁苷含量时选用了不同提取方式(回流提取和超声提取)、不同提取溶剂(甲醇、乙醇、70%甲醇、70%乙醇)、不同提取时间(20,30,40,60 min)进行考察,结果表明,因成分为经提取后入药,回流和超声提取结果基本一致。在相同色谱条件下,用甲醇超声提取, D -苦杏仁苷色谱峰峰面积最大,与其他杂质峰分离效果最好,采用含不同比例水相的有机溶剂提取,对待测成分干扰较大。最终采用操作简单的甲醇超声40 min制备待测样品溶液。

综上所述,本研究中所建方法操作简便、结果准确,精密度、稳定性、重复性好,可用于感冒疏风片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、 D -苦杏仁苷的含量测定。

参考文献

- [1] YBZ10262020,国家药品监督管理局标准[S].
- [2] 高红,杨芳.感冒疏风片主要成分含量测定方法的研究[J].宁夏医科大学学报,2013,35(11):1301-1303.
- [3] 姜雪敏,杨立志.高效液相色谱法测定感冒疏风片升麻素