

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

张轶华^{1*}, 姜建国¹, 韩学静¹, 张世亮²

(1. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要 :建立了高效液相色谱(HPLC)-双波长检测-梯度洗脱同时测定小儿氨酚烷胺颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏含量的分析方法。采用的色谱条件:以 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 × 200 mm, 5 μm)为分离柱,以乙腈和0.1% 三乙胺水溶液(用磷酸调pH至3.7 ± 0.5)为流动相进行梯度洗脱,流速1.0 mL/min,检测波长为280 nm和210 nm,柱温为30 °C,进样量为5 μL。结果表明,对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的线性范围均比较宽(依次为2.4 ~ 60、0.14 ~ 3.6、0.019 ~ 0.48 μg),平均加标回收率均不低于99.0%,而且方法操作简单,重现性好,测定结果准确,可用于更好地控制该制剂的质量。

关键词 :高效液相色谱;双波长检测;对乙酰氨基酚;咖啡因;马来酸氯苯那敏;小儿氨酚烷胺颗粒

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)10-1005-04

Simultaneous determination of three components in Pediatric Paracetamol and Amantadine Hydrochloride Granules using high performance liquid chromatography with gradient elution and dual wavelength detection

ZHANG Yihua^{1*}, JIANG Jianguo¹, HAN Xuejing¹, ZHANG Shiliang²

(1. Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract : A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the simultaneous determination of paracetamol, caffeine and chlorphenamine maleate in Pediatric Paracetamol and Amantadine Hydrochloride Granules. The separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column with 0.1% triethylamine aqueous solution (adjusted pH to 3.7 ± 0.5) and acetonitrile as the mobile phase of gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 280 nm and 210 nm. The linearities were wide (2.4 - 60, 0.14 - 3.6, 0.019 - 0.48 μg for paracetamol, caffeine and chlorphenamine maleate, respectively) and the average recoveries were not less than 99.0%. The method is simple, accurate and reproducible. It is a good method for the quality control of Pediatric Paracetamol and Amantadine Hydrochloride Granules.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); dual wavelength detection; paracetamol; caffeine; chlorphenamine maleate; Pediatric Paracetamol and Amantadine Hydrochloride Granules

小儿氨酚烷胺颗粒为复方制剂,商品名为优卡丹,其处方为:每袋含对乙酰氨基酚0.1 g,咖啡因6 mg,马来酸氯苯那敏0.8 mg,盐酸金刚烷胺0.04 g,人工牛黄4 mg,辅料适量。小儿氨酚烷胺颗粒用于儿童伤风感冒引起的鼻塞、流鼻涕、打喷嚏、头痛、

咽喉痛、发热等,亦可用于流行性感冒的预防和治疗。在《国家药品标准》第十二册收录的“小儿氨酚烷胺颗粒”项下,采用高效液相色谱法(HPLC)测定对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量,流动相为乙腈-0.03 mol/L磷酸氢二铵(12:88, v/v)。

* 通讯联系人 张轶华, 硕士. Tel : (0311) 85212004-8040, E-mail : zhangyihua0915@163.com.

收稿日期 2010-07-13

该方法同时测定对乙酰氨基酚和咖啡因的含量,然后在样品量加大 10 倍后再测定马来酸氯苯那敏的含量。有测定制剂中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏 3 种组分中的某一种或某两种组分含量的报道^[1-4]及同时测定某胶囊制剂中上述 3 种组分的含量^[5,6]。但未见报道同时测定小儿氨酚烷胺颗粒中上述 3 种组分含量的方法。小儿氨酚烷胺颗粒中含糖量较高,利用浓缩富集方法会加大其对色谱柱的损伤,且组分含量差异较大,紫外吸收强度差异也较大,用常规的方法同时测定 3 种组分有一定的难度。采用双波长检测法对组分进行分析测定已有报道^[7]。但未见同时测定小儿氨酚烷胺颗粒中 3 种组分含量的报道。本文采用高效液相色谱-双波长检测-梯度洗脱法同时测定了小儿氨酚烷胺颗粒中上述 3 种组分的含量,提高了方法的适用性,操作简单,准确度较高,可用于更好地控制该制剂的质量。

1 实验部分

1.1 试剂与样品

乙腈为色谱纯(Fisher Chemical),实验用水均为自制二次蒸馏水,其余试剂均为分析纯。对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 100018-200408、171215-200608、100047-200606)。小儿氨酚烷胺颗粒由 3 个生产厂家提供,各 3 批(A 厂:10031391、10031392、10031294;B 厂:100216、100301、100303;C 厂:20100202、20100203、20100301)。

1.2 仪器及色谱条件

高效液相色谱仪(美国戴安公司)。色谱柱:Diamondsil C₁₈柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm),以乙腈(A)和 0.1% 三乙胺水溶液(用磷酸调 pH 至 3.7 ± 0.5)(B)为流动相进行梯度洗脱,梯度洗脱程序及检测波长:0~9 min, 15% A, 检测波长 280 nm; 9~10 min, 15% A-25% A, 检测波长 210 nm; 10~20 min, 25% A, 检测波长 210 nm。流速:1.0 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 5 μL。

1.3 对照品溶液的制备

精密称取对乙酰氨基酚 0.2 g、咖啡因 12 mg 置于 50 mL 容量瓶 A 中,加入适量的流动相(15% A)使之溶解。精密称取马来酸氯苯那敏 15 mg 置于 50 mL 容量瓶 B 中,加入流动相(15% A)溶解并稀释至刻度;再精密量取其中的 5 mL 溶液置于容量瓶 A 中,加入流动相(15% A)稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。

1.4 供试品溶液的制备

取小儿氨酚烷胺颗粒样品 10 袋,研细,精密称定适量(约相当于含有马来酸氯苯那敏 0.8 mg)置于 25 mL 容量瓶中,加入流动相(15% A)适量,超声溶解 15 min,放冷;加入流动相稀释至刻度,摇匀,过滤,滤液供测定。

2 结果与讨论

2.1 溶剂的选择

以流动相(15% A)作为溶剂时,样品中的辅料几乎全部溶解,但由于小儿氨酚烷胺颗粒中含有大量的蔗糖,蔗糖易吸附在色谱柱上难于洗脱,曾考虑用乙腈作为溶剂(蔗糖不溶于乙腈,而样品中 3 种组分均溶于乙腈),但试验发现提取率较低(与流动相(15% A)作为溶剂比较,含量约低 2%);试验发现当溶剂中乙腈的比例大于 50% 时,溶液分为两层,且两相中均溶解有马来酸氯苯那敏,不利于定量分析。因此仍选择以流动相(15% A)作为溶剂。

2.2 检测波长的选择

由于该制剂中各组分的含量差异较大(每袋含对乙酰氨基酚 0.1 g、马来酸氯苯那敏 0.8 mg),为了能在同一色谱系统下测定 3 种组分,测定马来酸氯苯那敏含量时选择其吸收强的末端吸收波长 210 nm 作为检测波长;测定对乙酰氨基酚和咖啡因含量时,选择了对乙酰氨基酚的最弱吸收波长、咖啡因的较大吸收波长 280 nm 作为检测波长。对乙酰氨基酚和马来酸氯苯那敏的紫外吸收图谱见图 1。

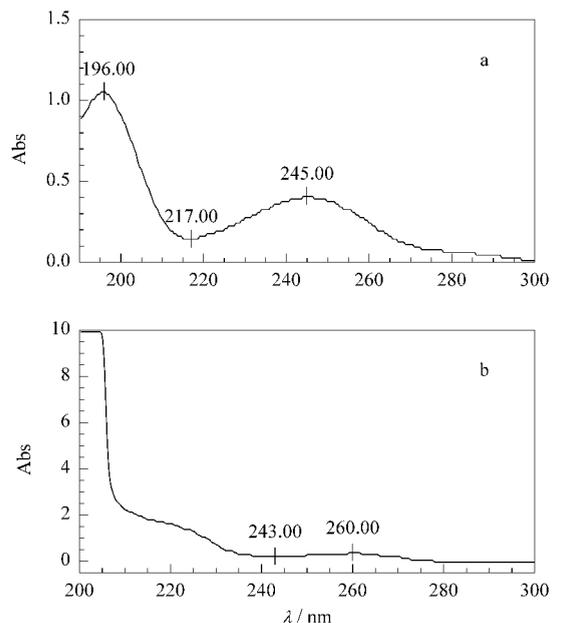


图 1 (a)对乙酰氨基酚和(b)马来酸氯苯那敏的紫外吸收图谱
Fig. 1 UV spectra of (a) paracetamol and (b) chlorphenamine maleate

2.3 流动相的选择

对甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钠(用磷酸调 pH 分别至 3.0、5.0)(30:70、40:60, v/v)、乙腈-0.03 mol/L 磷酸氢二铵(用磷酸调 pH 分别至 3.0、5.0)(30:70、40:60, v/v)、乙腈-0.1% 三乙胺水溶液(用磷酸调 pH 分别至 2.6、3.2、4.5、6.0)等不同流动相进行考察。试验发现在上述几种流动相下乙酰氨基酚和咖啡因可完全分离,且峰形对称,定量计算准确,但马来酸氯苯那敏的分离效果不理想,拖尾严重,且对 pH 很敏感。若使马来酸氯苯那敏较快出峰,则对乙酰氨基酚和咖啡因很难达到完全分离。因此考虑用梯度洗脱法进行分离。试验发现,以乙腈和 0.1% 三乙胺水溶液作为流动相梯度洗脱时,马来酸氯苯那敏峰的拖尾情况有所改善。0.1% 三乙胺水溶液的 pH 值越高,马来酸氯苯那敏的保留越强,pH 为 6.0 时,马来酸氯苯那敏在 30 min 内未出峰,pH 值越低,马来酸氯苯那敏的保留越弱,因此确定以乙腈和 0.1% 三乙胺水溶液(用磷酸调 pH 3.7 ± 0.5)为流动相及 1.2 节的梯度洗脱程序。在 1.2 节所述的色谱条件下,经用不含待测组分的空白样品进行试验,对待测组分无干扰。对照品及样品的色谱图见图 2。

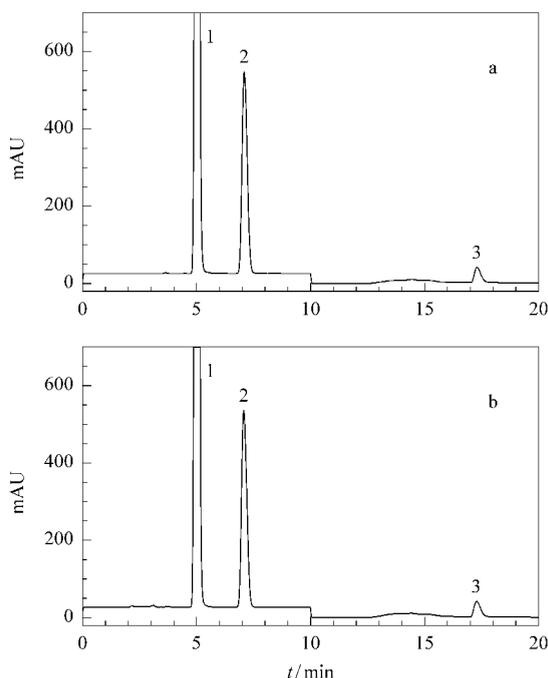


图 2 (a) 3 种待测组分对照品混合溶液及 (b) 小儿氨酚烷胺颗粒样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (a) a mixture of three standard solutions and (b) a Pediatric Paracetamol and Amantadine Hydrochloride Granule sample

1. paracetamol (280 nm); 2. caffeine (280 nm); 3. chlorphenamine maleate (210 nm).

2.4 线性关系

分别测定系列对照品混合液,以各组分的峰面积 A 为纵坐标、相应的进样质量 C 为横坐标进行线性回归,得到的线性回归方程见表 1。结果表明 3 种组分的峰面积与进样质量之间线性关系良好,线性范围宽。

表 1 3 种组分的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients (r) and linear ranges of the three components

Component	Regression equation	r	Linear range/ μg
Paracetamol	$A = 0.1514 + 9.2103C$	0.9999	2.4 - 60
Caffeine	$A = 0.2942 + 2.2898C$	0.9999	0.14 - 3.6
Chlorphenamine maleate	$A = 0.0002 + 0.2152C$	0.9996	0.019 - 0.48

A : peak area; C : mass, μg .

2.5 溶液的稳定性

精密吸取同一供试品溶液(A 厂样品,批号 10031391)分别于配制后的 0、2、8、12、18、24 h 进样,测定对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏 3 种组分的峰面积,计算其相对标准偏差(RSD)($n = 6$)分别为 0.51%、0.47% 和 0.63%。结果表明,供试品溶液在配制后的 24 h 内基本稳定。

2.6 重复性

取同一供试品溶液(A 厂家样品,批号 10031391),按 1.4 节的方法平行制备 6 份溶液,依法测定。对乙酰氨基酚的平均含量为 97.7%,RSD 为 0.21%;咖啡因的平均含量为 105.6%,RSD 为 0.23%;马来酸氯苯那敏的平均含量为 95.8%,RSD 为 0.92%。结果表明该方法重复性较好。

2.7 回收率

称取已测定含量的同一样品(A 厂样品,批号 10031391),精密称定适量(含马来酸氯苯那敏 0.4 mg),置于 25 mL 容量瓶中,分别加入 3 种对照品溶液适量,测定加标回收率,结果见表 2。

2.8 普适性

另取两根不同品牌的色谱柱(Waters 公司的(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Agilent(150 mm × 4.6 mm, 5 μm))对同一批样品进行测定,对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏含量测定结果的 RSD 分别为 0.21%、0.26 和 0.63%,说明本方法可选用的色谱柱范围相对较宽,普适性较好。

2.9 实际样品的测定

采用所建立的方法对 3 个厂家的 9 批样品进行了含量测定,并与现行标准方法进行比较,结果表明两种方法的测定结果基本一致(见表 3)。

表 2 样品中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的加标回收率
Table 2 Recoveries of the three components spiked in a sample

Component	Background/mg	Spiked/mg	Found/mg	Recovery/%	Average recovery/%
Paracetamol	49.9503	40.0001	89.9104	99.9	99.8
	49.5795	40.0005	89.4998	99.8	
	49.7236	40.0000	89.6435	99.8	
	49.8130	50.0000	99.9920	100.4	
	49.4654	50.0000	99.5654	100.2	
	49.4257	50.0002	99.4268	100.0	
	49.9106	60.0000	109.8506	99.9	
	49.7236	59.9995	109.7240	100.0	
Caffeine	49.9586	60.0001	109.8987	99.9	99.9
	2.9970	2.4768	5.4688	99.8	
	2.9748	2.4768	5.4468	99.8	
	2.9834	2.4768	5.4526	99.7	
	2.9888	3.0960	6.0817	99.9	
	2.9679	3.0960	6.0572	99.8	
	2.9655	3.0960	6.0580	99.9	
	2.9946	3.7152	6.6949	99.6	
	2.9834	3.7152	6.6909	99.8	
	2.9975	3.7152	6.6975	99.6	
Chlorphenamine maleate	0.3996	0.3274	0.7237	99.0	99.0
	0.3966	0.3274	0.7204	98.9	
	0.3978	0.3274	0.7220	99.0	
	0.3985	0.4092	0.8041	99.1	
	0.3957	0.4092	0.8016	99.2	
	0.3954	0.4092	0.8009	99.1	
	0.3993	0.4910	0.8856	99.0	
	0.3978	0.4910	0.8841	99.0	
	0.3997	0.4910	0.8866	99.2	

表 3 两种方法对实际样品的测定结果
Table 3 Results of Pediatric Paracetamol and Amantadine Hydrochloride Granules by the two methods %

Sample batch No.	Paracetamol		Caffeine		Chlorphenamine maleate	
	This method	Standard method	This method	Standard method	This method	Standard method
10031391	97.7	97.2	105.6	105.3	95.8	93.6
10031392	97.0	97.3	103.8	103.9	95.5	93.5
10031294	93.2	91.3	100.2	100.5	90.3	89.6
100216	99.3	99.0	96.2	95.8	93.2	91.3
100301	98.8	98.2	95.6	95.2	93.2	93.0
100303	98.2	98.3	96.2	96.5	91.6	91.0
20100202	98.8	98.1	100.2	100.0	90.7	90.0
20100203	99.5	99.8	100.8	100.2	90.5	89.8
20100301	99.6	98.9	100.4	100.0	93.5	92.6

The results are the percentage of labeled amount.

3 结论

本文应用高效液相色谱-双波长检测-梯度洗脱建立了同时测定小儿氨酚烷胺颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏 3 种组分的方法,并进行了方法学验证。与现行标准比较,测定结果基本一致,但该方法简便、快速,避免了重复制备和测定样品,且结果准确,重现性好,可用于该制剂的质量控制。

参考文献:

[1] Tian H G, Wang H M. Drug Standards of China (田洪根,王

洪明. 中国药品标准), 2008, 9(3): 207

[2] Lou Z H. Drug Standards of China (娄志红. 中国药品标准), 2007, 8(6): 65

[3] Lin R Q. China Pharmacist (林瑞群. 中国药师), 2009, 12(4): 479

[4] Zhang P, Lin Y. China Pharmaceuticals (张萍, 林燕. 中国药业), 2009, 18(24): 39

[5] Xiu R, Wang X H, Wang Z H, et al. China Pharmacist (修锐, 王小虹, 王振红, 等. 中国药师), 2007, 10(11): 1103

[6] Chen M X, Chen Y. China Pharmacist (陈梅新, 陈莹. 中国药师), 2003, 6(1): 40

[7] Dong L, Sun X D, Li Q. Chinese Journal of Chromatography (董丽, 孙祥德, 李琴. 色谱), 2010, 28(2): 204