

HPLC法测定氨咖黄敏胶囊中人工牛黄的含量

郭丙炎, 胡翮, 邱蓓

(湘潭市药品检验所, 湘潭 411100)

摘要 目的: 建立氨咖黄敏胶囊中人工牛黄的 HPLC 含量测定方法。方法: 采用 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以四氢呋喃-乙腈-0.1% 醋酸铵 (pH 4.7) (42:22:36) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 452 nm, 柱温: 35 ℃。结果: 胆红素进样量在 0.0232~0.465 μg 范围内, 与峰面积积分值呈良好的线性关系 ($r=0.9991$), 平均回收率 ($n=18$) 为 99.9%。结论: HPLC 法重复性好, 且简便、易行, 可用于氨咖黄敏胶囊剂中人工牛黄成分的检测。

关键词: 氨咖黄敏; 人工牛黄; 胆红素; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)08-1367-03

HPLC determination of calculus bovis artifactus in paracetamol, caffeine, artificial cow-bezoar and chlorphenamine maleate capsules

GUO Bing-yan, HU He, QIU Bei

(Xiangtan Institute for Drug Control Xiangtan 411100, China)

Abstract Objective To establish an method for determination of calculus bovis artifactus in paracetamol, caffeine, artificial cow-bezoar and chlorphenamine maleate capsules by HPLC. **Methods** Separation were performed on a C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column of HPLC; The mobile phase consisted of tetrahydrofuran-acetonitrile-0.1% ammonium acetate (pH 4.7) (42:22:36) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 452 nm and column temperature was 35 ℃. **Results** The calibration curve was in the range of 0.0232-0.465 μg ($r=0.9991$); the average recoveries ($n=18$) of bilirubin was 99.9%. **Conclusion** The HPLC methods are simple and reliable for the controlling of the quality of paracetamol, caffeine, artificial cow-bezoar and chlorphenamine maleate capsules

Key words paracetamol, caffeine, artificial cow-bezoar and chlorphenamine maleate, artificial cow-bezoar, bilirubin, HPLC

氨咖黄敏胶囊为常用的抗感冒药, 用于感冒引起的鼻塞、头痛、咽喉痛、发热等。本品为复方制剂, 其组分为每粒含对乙酰氨基酚 250 mg, 咖啡因 15 mg, 马来酸氯苯那敏 1 mg, 人工牛黄 10 mg。其中人工牛黄有解热抗炎作用。现行的氨咖黄敏胶囊国家药品标准^[1]无人工牛黄的含量测定, 人工牛黄的主要成分是胆红素 (Bilirubin, BR), 胆红素在提取分离过程中受酸碱的影响, 双吡咯环产生异构化, 即含有 BR IX a, BR VIII a 和 BR III a^[2]。本文建立 HPLC 测定人工牛黄含量的方法, 为氨咖黄敏胶囊的质量控制提供了科学依据。

1 仪器与试药

高效液相色谱系统包括 SIL-20A 自动进样器, LC-20AT 高压泵, SPD-M20A 检测器, CTO-10ASVP 柱温箱, LC-20AT-SOLUT 色谱工作站 (日本岛津公司); METTLER TOLEDO AB135S 电子分析天平。

对照品胆红素 (批号: 10077-200604) 由中国药品生物制品检定所提供; 氨咖黄敏胶囊为抽验的 5 批不同生产厂家样品; 四氢呋喃、乙腈为色谱纯, 醋酸铵、三氯甲烷、醋酸为分析纯, 水为高纯水。

2 含量测定

2.1 色谱条件 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm ×

250 mm, 5 μm), 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为四氢呋喃-乙腈-0.1%醋酸铵 (pH 4.7) (42: 22: 36), 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 452 nm, 进样量 20 μL , 理论板数按胆红素 IX a 计算不小于 2000 胆红素 III a 胆红素 IX a 胆红素 VIII a 应完全分离, 胆红素与其他相邻峰的分离度应符合规定, 与有关文献报道一致^[3]。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取胆红素对照品(五氧化二磷室温减压干燥至恒重) 11.62 mg 置 100 mL 棕色量瓶中, 加三氯甲烷约 30 mL 使溶解后, 用四氢呋喃定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液, 精密量取溶液 1 mL 至 50 mL 棕色量瓶中, 加四氢呋喃-三氯甲烷 (3: 1) 混合溶液稀释至刻度, 摇匀, 即为对照品溶液 (2.324 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.3 供试品溶液的制备 取装量差异项下的内容物, 研细, 精密称取适量 (约相当于人工牛黄 10 mg) 置 50 mL 棕色量瓶中, 精密加入四氢呋喃-三氯甲烷 (3: 1) 混合溶液 25 mL, 称定重量, 置超声波清洗器中室温超声 45 min 后, 用四氢呋喃-三氯甲烷 (3: 1) 混合溶液补足减失的重量, 摇匀, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密量取“2.2”项下对照品储备液 0.5, 0.8, 1, 2, 5, 10 mL 置 50 mL 棕色量瓶中, 加四氢呋喃-三氯甲烷 (3: 1) 至刻度, 摇匀, 分别制成 1.162, 1.859, 2.324, 4.648, 11.62, 23.24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品系列溶液 6 份, 精密吸取对照品系列溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定胆红素峰面积, 计算总峰面积 (胆红素 III a 胆红素 IX a 胆红素 VIII a 3 个峰面积之和), 以对照品进样量 (μg) 为横坐标 X , 总峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为:

$$Y = 8621X + 89495 \quad r = 0.9991$$

结果胆红素进样量在 0.0232~0.465 μg 范围内, 与总峰面积呈良好的线性关系。

2.5 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 20 μL 在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别进样, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积。结果供试品溶液在 12 h 内均可保持稳定, 峰面积平均值 ($n = 7$) 为 226058 RSD = 0.8%。

2.6 重复性和精密度试验

2.6.1 重复性 精密称取同一批样品内容物 9 份, 分别制成低、中、高 3 个浓度各 3 份的供试品溶液。取样方法: 照“2.3”项下方法, 称取胶囊内容物 (约

相当于人工牛黄 10 mg), 作为中间取样量, 制成中浓度供试品溶液; 精密称取胶囊内容物 (约相当于人工牛黄 5 mg) 制成低浓度供试品溶液; 精密称取胶囊内容物 (约相当于人工牛黄 20 mg), 制成高浓度供试品溶液。分别精密吸取上述供试品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 平行进 2 次, 按“2.1”项下色谱条件分别测定, 计算含量均值 ($n = 9$) 为 51.6 $\mu\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$, RSD = 0.3%。

2.6.2 精密度 取“2.6.1”项下中间浓度供试品溶液, 分别精密吸取上述供试品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 平行进样 6 次, 峰面积的 RSD = 0.2% ($n = 6$)。

2.7 加样回收率 分别精密称取已知含量的胶囊内容物 (51.6 $\mu\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$) 适量 9 份 (约相当于人工牛黄 5 mg) 置 25 mL 棕色量瓶中, 分别精密加入“2.2”对照品溶液 5.0, 10.0, 15.0 mL, 再分别加入四氢呋喃-三氯甲烷 (3: 1) 至刻度, 按“2.3”项下方法操作, 制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 平行进样 2 次, 测定峰面积, 计算低、中、高 3 个浓度的回收率 ($n = 6$), 结果见表 1。总平均回收率 ($n = 18$) 为 99.9%。

表 1 胆红素加样回收率试验结果 ($n = 6$)

Tab 1 Result of recovery for bilirubin

样品含量 (contents) / μg	加入量 (added) / μg	测得量 (measured) / μg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) %	RSD /%
26.64	11.62	38.15	99.0	99.7	0.87
25.73	11.62	37.43	100.7		
26.71	11.62	38.26	99.4		
25.54	23.24	48.86	100.3	99.9	0.40
25.81	23.24	49.00	99.8		
24.98	23.24	48.12	99.6		
25.06	34.86	59.98	100.2	100.1	0.26
25.31	34.86	60.09	99.8		
26.43	34.86	61.38	100.3		

2.8 样品测定 取抽验 5 批不同生产厂家样品, 平行取样 2 份, 照“2.3”项下方法操作, 制备供试品溶液。同法处理不含人工牛黄的空白样品 (其他成分相同)。按“2.1”项下色谱条件试验。精密吸取“2.2”项下测定用对照品溶液、供试品溶液及空白溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 每份供试品溶液平行进样 2 次, 测定峰面积, 以外标法计算含量。结果 5 批样品中胆红素含量 ($n = 2$) 分别为 51.0, 51.8, 51.6, 51.5, 50.3 $\mu\text{g} \cdot \text{粒}^{-1}$ 。色谱图见图 1。

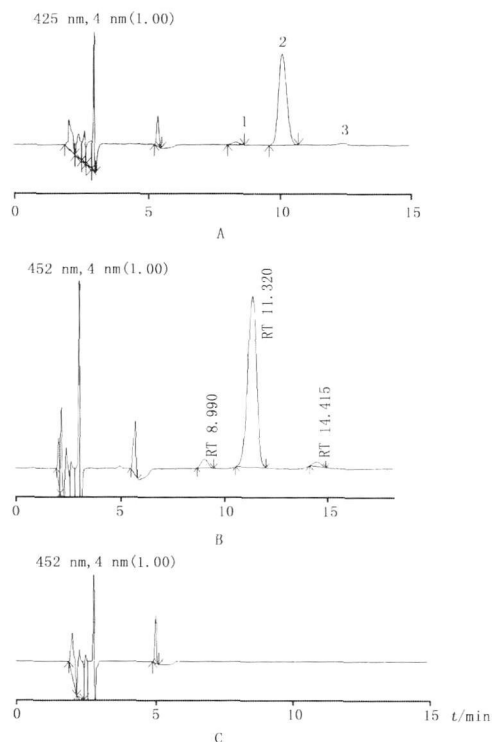


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 对照品 (reference substance) B. 供试品 (sample) C. 空白 (blank)
1. 胆红素 IIIa (BR III a) 2. 胆红素 IX a (BR IX a) 3. 胆红素 VIII a (BR VIII a)

3 讨论

3.1 胆红素及其异构体的结构与性质 胆红素 IX a 在产品中的含量是衡量胆红素质量的重要标准,胆红素 IX a 在各种催化情况下可发生异构化作用,得到胆红素 IX a III a 和胆红素 VIII a 异构体的混合物。胆红素 IX a 具有 1 个内乙烯基 (Endo-vinyl) 和 1 个外乙烯基 (exo-vinyl), 胆红素 III a 有 2 个外乙烯基, 而胆红素 VIII a 有 2 个内乙烯基^[4], 在 RP-HPLC 色谱中, 各色谱峰的保留时间分别为胆红素 III a 8.99 min, 胆红素 IX a 11.32 min, 胆红素 VIII a 14.42 min, 它们的出峰次序与有关文献报道一致^[3]。胆红素干燥时稳定, 其氯仿溶液在暗处稳定, 但在光照条件下极不稳定, 所以测定过程中尽量避免光线直射。实验表明在暴露空气中可见光光照下 24 h 有

50% 的胆红素分解为胆绿素, 所以全部操作都要在避光条件下进行 (所有使用玻璃仪器要用黑布避光覆盖或用棕色量瓶)。

3.2 提取溶剂的选择 样品提取时, 同时考察了以四氢呋喃-三氯甲烷 (1:1)、四氢呋喃-三氯甲烷 (2:1)、四氢呋喃-三氯甲烷 (3:1) 进行提取, 含量测定结果表明以四氢呋喃-三氯甲烷 (3:1) 提取时提取效率最高, 并且在色谱柱上胆红素色谱峰分离效果最佳、最稳定。

3.3 流动相的选择 胆红素为脂溶性成分, 易溶于有机溶剂中, 故选择四氢呋喃、乙腈为流动相系统, 使用的醋酸铵溶液从 0.05%, 0.1%, 0.2% 进行了筛选, pH 从 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.7, 4.8, 5.0 进行试验, 当 pH > 4.8 时, 分离度不好; 当 pH < 4.5 时, 保留时间后移, BR III a 峰形变宽。最后通过色谱系统适应性的几个指标: 理论板数、分离度、拖尾因子等的要求, 认为只有以四氢呋喃-乙腈-0.1% 醋酸铵 (pH 4.7) (42:22:36) 组合为流动相时, 其色谱分离效果较为理想。

3.4 柱温考察 对柱温 25, 30, 35, 40 °C 进行考察, 以胆红素 III a 胆红素 IX a 胆红素 VIII a 3 个峰的分离度为指标, 比较不同柱温条件下的分离效果, 结果表明, 柱温 35 °C 时, 3 个峰之间的分离度最大, 因此选择 35 °C 为柱温。

参考文献

- 1 National standard from Regional one of Chemical Pharmaceutics by the Ministry of Public Health, P.R. China Vol. 3 (国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准第三册). 2002: 263
- 2 B. lanckaert N. Analysis of bilirubin and bilirubin mono and diconjugates *Biochem J* 1980; 185 (1): 115
- 3 XU Li-feng (徐利锋), GUAN Peng (关鹏), ZHU Yan-zhuo (朱彦卓), et al. A new process of high purity bilirubin production on a large scale (高纯度胆红素工业化生产工艺的研究). *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2006; 13 (2): 123
- 4 SHANG Gang-wei (尚刚伟), JIANG Yong-pei (蒋永培), LI Gui-zhen (李桂珍), et al. Rapid determination of bilirubin isomers by high performance liquid chromatography (胆红素 XI a 及其异构体的 HPLC 快速测定方法). *J Fourth Milit Med Univ* (第四军医大学学报), 1997; 18 (5): 477

(本文于 2009 年 1 月 17 日收到)