

固相萃取-多波长超高效液相色谱法同时测定咳喘宁中 5 种生物碱类成分的含量

刘永利, 李冬梅, 冯 丽*, 袁 浩

(河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011)

摘要: 建立咳喘宁中罂粟壳和麻黄所含 5 种主要生物碱类成分的含量测定方法。样品经固相萃取后用超高效液相色谱法测定, 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm), 流动相为乙腈与 0.1% 磷酸溶液梯度洗脱, 检测波长为 210 nm (吗啡、磷酸可待因、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱) 与 251 nm (盐酸罂粟碱), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。结果显示, 吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱分别在 0.375 0~12.50、0.064 32~2.144、0.030 06~1.002、1.126~37.52、0.287 8~9.592 μg·mL⁻¹ 内具有良好的线性关系 ($r = 0.999\ 7$), 平均回收率分别为 ($n = 9$) 99.26%、100.6%、95.29%、100.1% 和 97.48%。该方法快速、准确、重复性好, 可为咳喘宁的质量控制提供快速准确的检测。

关键词: 咳喘宁; 罂粟壳; 麻黄; 固相萃取; 超高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 05-0581-05

Simultaneous determination of 5 kinds of alkaloids in Kechuanning tablets by SPE-UPLC under different UV-vis wavelength

LIU Yong-li, LI Dong-mei, FENG Li*, YUAN Hao

(Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: The paper is to establish a method for simultaneous determination of 5 kinds of alkaloids in ephedra and poppy which are in Kechuanning tablets. Solid-phase extraction (SPE) was adopted in pretreatment, and a UPLC method with 2 different wavelengths had been developed: 210 nm for the detection of morphine, codeine phosphate, ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride, and 251 nm for papaverine hydrochloride. The column used was Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm) with linear gradient elution using acetonitrile and 0.1% phosphoric acid. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 °C. The linear response range was 0.375 0 – 12.50 μg·mL⁻¹ for morphine, 0.064 32 – 2.144 μg·mL⁻¹ for codeine phosphate, 0.030 06 – 1.002 μg·mL⁻¹ for papaverine hydrochloride, 1.126 – 37.52 μg·mL⁻¹ for ephedrine hydrochloride, 0.287 8 – 9.592 μg·mL⁻¹ for pseudoephedrine hydrochloride ($r = 0.999\ 7$). The average recoveries of these compounds were 99.26%, 100.6%, 95.29%, 100.1% and 97.48%, respectively. This is a more reasonable and credible method of quality control for Kechuanning tablets.

Key words: Kechuanning tablet; poppy; ephedra; SPE; UPLC

收稿日期: 2011-01-18.

基金项目: 国家药品标准提高研究项目 (10-199).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-311-85210960, E-mail: jinayan882@sohu.com

咳嗽宁是由桔梗、罂粟壳、石膏、麻黄、百部、苦杏仁、甘草等药味加工而成的复方片剂, 收载于卫生部药品标准中药成方制剂第二册^[1], 主要用于支气管哮喘、咳嗽、老年痰喘等病的治疗。罂粟壳为主药, 主要含吗啡、可待因、罂粟碱、蒂巴因、那可丁等生物碱类成分^[2], 长期服用具成瘾性; 麻黄为佐药, 主要含麻黄碱、伪麻黄碱等生物碱类成分^[3]。关于这两种药味中生物碱类成分 (图 1) 测定方法文献报道较多, 主要有高效液相色谱法^[4, 5]、毛细管电泳法^[6]、荧光光谱法^[7]、气相色谱法^[8]及液质联用^[9]、气质联用^[10]等, 其中以高效液相色谱法最为常见, 但因此类成分复杂, 极性差异较大, 这些方法多为测定其中一个或两个成分的含量, 未见同时测定这两种药味中多种生物碱类成分的报道。超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC) 是一种基于小颗粒填料的新型液相色谱技术, 极大地提高了分离度、分析灵敏度, 缩短了分析时间^[11]。本文采用超高效液相色谱仪与二极管阵列检测器 (photodiode array detector, PAD) 联用, 在各成分的最大吸收波长处同时测定吗啡、可待因、罂粟碱、麻黄碱和伪麻黄碱的含量, 仅用 8 min 即可完成测试, 方法简便快速、结果准确可靠, 可用于咳嗽宁的质量控制。

材料与方法

仪器与试剂 超高效液相色谱仪 (二元泵、自动进样器、二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司), Empower 2 色谱工作站 (美国 Waters 公司), 天平: AE240 (瑞士 Mettler 公司), 固相萃取柱: Oasis MCX (6 cc/150 mg, 30 μ m, 美国 Waters 公司)。

吗啡 (批号: 171201-200521)、磷酸可待因 (批号: 171203-200303)、盐酸罂粟碱 (批号: 171214-200404)、盐酸麻黄碱 (批号: 171241-200506) 和盐酸伪麻黄碱

(批号: 171237-200505) 对照品由中国药品生物制品检定所提供, 均为供含量测定用对照品。样品来自全国 7 个生产厂家。

色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm ID, 1.7 μ m)。流动相为乙腈 (A) 与 0.1% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0.0~3.0 min, A 5.0%, B 95%; 3.0~7.2 min, A 5.0% $\rightarrow$ 50%, B 95% $\rightarrow$ 50%。检测波长为 210 nm (吗啡、磷酸可待因、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱) 与 251 nm (盐酸罂粟碱), 流速 0.4 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 2 μ L, 理论塔板数按吗啡峰计算应不低于 10 000。

混合对照品溶液制备 取吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品各 10 mg, 精密称定, 分别置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 分别精密量取上述吗啡对照品溶液 10 mL、磷酸可待因对照品溶液 2 mL、盐酸罂粟碱对照品溶液 1 mL、盐酸麻黄碱对照品溶液 40 mL、盐酸伪麻黄碱对照品溶液 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈-浓氨溶液 (95:5) 稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照贮备液; 精密量取混合对照贮备液 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 0.1% 磷酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

供试品溶液制备 取本品 20 片, 研细, 取 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液 20 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液补足减失的重量, 摇匀, 离心 (4 000 r $\cdot$ min⁻¹) 10 min, 精密量取上清液 3 mL, 加在固相萃取柱 (用甲醇、水各 6 mL 预洗) 上, 依次用 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸溶液、甲醇各 6 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 继用新鲜配制的乙腈-浓氨溶液 (95:5) 的混合溶液 9 mL 洗脱, 收集洗脱液至 10 mL 的量瓶中, 加 0.1% 磷酸溶液至刻度, 摇匀, 即得。

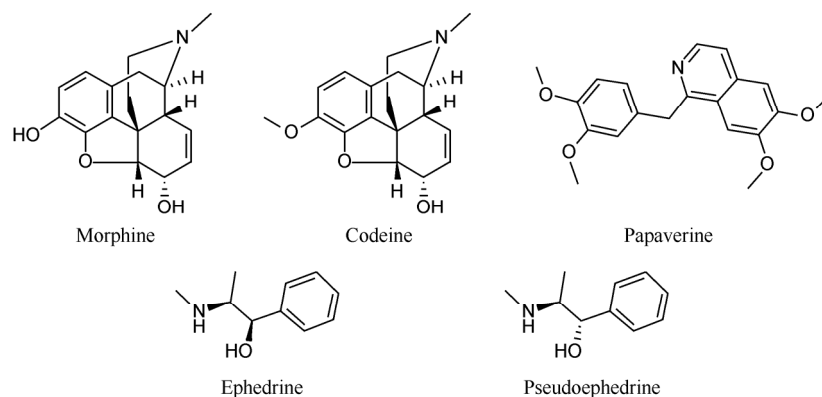


Figure 1 Structures of five components

线性关系的考察 分别精密量取混合对照品溶液 1、3 和 5 mL 与混合对照贮备液 3、5 和 10 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 0.1% 磷酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 制得系列混合对照品溶液。在拟定色谱条件下进样测定, 以系列混合对照品溶液浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。

结果

1 方法学考察

1.1 专属性 按处方比例和制法制备不含罂粟壳的阴性样品 I 和不含麻黄的阴性样品 II, 按供试品溶液的制备方法制备阴性样品溶液, 分别精密吸取混

合对照品溶液、供试品溶液与两种阴性溶液各 2 μL , 注入超高效液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 2。结果表明, 方中其他药味不干扰吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的测定, 罂粟壳与麻黄之间也不互相干扰。

1.2 线性关系 5 种待测成分回归方程及浓度范围如表 1 所示, 各待测成分在浓度范围内呈良好的线性关系。

1.3 稳定性 取同一供试品溶液, 分别在 0、0.5、1、2、5、7 和 13 h 进样测定。吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积的 RSD 分别为 0.50%、2.1%、0.60%、1.1% 和 1.6%。表明室

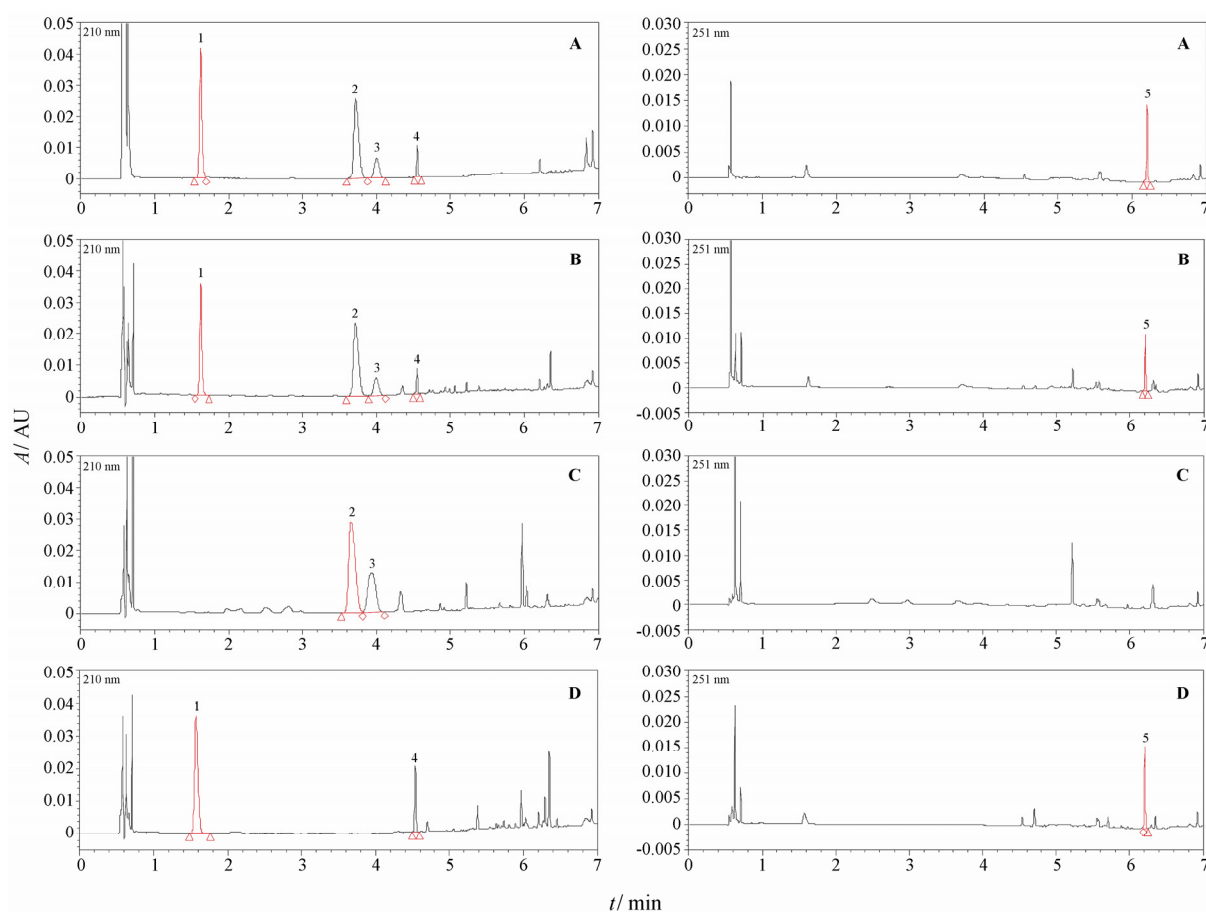


Figure 2 UPLC chromatograms of reference, sample and blank solution. A: Reference; B: Sample; C: Blank I; D: Blank II. 1: Morphine; 2: Ephedrine hydrochloride; 3: Pseudoephedrine hydrochloride; 4: Codeine phosphate; 5: Papaverine hydrochloride

Table 1 Regression equations and linear ranges of five components. Y : Peak area; X : Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Component	Regression equation	r	Linear range/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Morphine	$Y = 2.6334 \times 10^7 X - 2.7050 \times 10^3$	0.9997	0.3750 – 12.50
Codeine phosphate	$Y = 1.9694 \times 10^7 X - 1.5660 \times 10^2$	0.9997	0.06432 – 2.144
Papaverine hydrochloride	$Y = 5.1778 \times 10^7 X - 2.4186 \times 10^2$	0.9997	0.03006 – 1.002
Ephedrine hydrochloride	$Y = 1.0638 \times 10^7 X - 1.9682 \times 10^3$	0.9997	1.126 – 37.52
Pseudoephedrine hydrochloride	$Y = 1.0790 \times 10^7 X - 8.3952 \times 10^2$	0.9997	0.2878 – 9.592

温下供试品溶液至少在 13 h 内稳定。

1.4 重复性 取同一批样品 (批号: 0911020), 研细, 取 0.4 g、0.5 g、0.6 g 各 3 份, 精密称定, 按“供试品溶液制备”方法制备供试品溶液, 按拟定色谱条件测定。结果吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱平均含量分别为 0.366 5、0.056 08、0.031 58、1.468 和 0.337 4 mg·g⁻¹, RSD 分别为 0.70%、1.6%、2.8%、0.60%和 1.7%。

1.5 回收率 取已知含量的样品 (批号: 0911020) 粉末 9 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 每 3 份为一组, 分别加入用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液配制的低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液 20 mL, 按供试品溶液制备中“密塞, 称定重量……”起, 同法操作, 计算回收率, 结果吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的平均回收率 (RSD) 分别为 99.26% (1.3%)、100.6% (1.5%)、95.29% (1.7%)、100.1% (0.80%) 和 97.48% (1.6%)。

1.6 定量限 取各对照品溶液逐步稀释, 进样 2 μL 测定, 结果吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱定量限 (S/N > 10) 分别为: 94、32、7.5、56 和 72 ng·mL⁻¹。

2 样品含量测定

取不同企业样品, 按“供试品溶液制备”方法制备供试品溶液, 按拟定色谱条件测定, 结果见表 2。

讨论

以 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液为溶剂, 配制 3 种不同浓度的混合对照品溶液, 精密量取 3 mL 置于固相萃取柱上, 分别用甲醇-浓氨溶液 (95 : 5)、乙腈-浓氨溶液 (95 : 5) 5 mL 作为洗脱溶剂, 结果吗啡、磷酸可待因、盐酸罂粟碱均能完全洗脱, 回收率为 96%~100%,

但盐酸麻黄碱与盐酸伪麻黄碱用乙腈-浓氨溶液洗脱回收率仅为 90%, 增至 8 mL 回收率可达 98% 以上; 且乙腈-浓氨溶液作洗脱溶剂, 所得供试品溶液颜色较浅, 各色谱峰均能够达到基线分离, 尤其能大大提高含量较低的可待因与罂粟碱两种成分的灵敏度与分离度。

因洗脱溶液的洗脱能力取决于氨水的浓度与有机相的极性, 所以对乙腈与浓氨溶液的比例进行了考察, 结果乙腈-浓氨溶液的比例在 (96 : 4) ~ (90 : 10) 之间洗脱能力稳定, 氨浓度低于 4% 或超过 10% 时洗脱能力均有不同程度下降, 因此确定乙腈与浓氨溶液的比例为 (95 : 5)。

分别对 3 种不同品牌的固相萃取柱 (Waters Oasis MCX (6 mL, 150 mg)、Varian PCX (6 mL, 200 mg) 和 Dikma PCX (6 mL, 150 mg)) 进行了耐用性实验, 结果显示系统适用性实验回收率均在 96%~100%, 各色谱峰分离良好, 含量测定结果相同。

为提高对 5 种成分检测的灵敏度和准确度, 根据各成分紫外吸收最大波长, 同时考虑到方便实验、避开末端吸收等因素, 选择 210 nm 作为吗啡、磷酸可待因、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱的测定波长, 251 nm 作为盐酸罂粟碱的测定波长。

供试品溶液制备过程中曾以乙腈-浓氨溶液 (95 : 5) 洗脱液直接定容, 进样测定, 发现各成分峰形不稳定, 有时对称性很好, 有时拖尾严重, 加入少许 0.1% 磷酸溶液后则无此现象, 因此采用 0.1% 磷酸溶液稀释定容。

对本实验结果尝试用一测多评技术进行计算。其原理为: 在一定范围 (线性范围) 内, 成分的峰面积响应值与其浓度成正比, 即 $f=A/C$ 。在多成分测定中, 以其中一个为参照物, 通过测定建立其他各成分与

Table 2 Content of 5 compounds in Kechuaning tablets (mg/tablet)

Manufacturer	Lot number	Morphine	Codeine phosphate	Papaverine hydrochloride	Ephedrine hydrochloride	Pseudoephedrine hydrochloride
I	0911020	0.22	0.038	0.018	0.88	0.25
II	20080401	0.13	0.073	0.002 1	0.78	0.60
	20080901	0.18	0.071	0.002 3	0.61	0.33
III	100201	0.22	0.058	0.005 7	0.29	0.16
IV	20090901	0.28	0.089	0.004 0	0.051	0.19
	20091002	0.28	0.090	0.004 1	0.050	0.16
V	091203	0.10	0.059	0.003 0	0.81	0.38
	080412	0.08	0.050	0.003 1	0.75	0.34
VI	100301	0.29	0.049	0.009 7	1.3	0.46
	100302	0.29	0.049	0.009 7	1.3	0.46
VII	080302	0.019	0	0	0.12	0.091

该参照物的校正因子, 即 $F=f_0/f_1$ (f_0, f_1 分别表示参照物与待测成分), 可计算出其他各成分的含量。作者以吗啡为参照物, 利用线性关系项下数据计算各成分的平均 f 值, 再计算出其他 4 种成分相对于吗啡的 F 值, 然后计算出其含量, 结果与外标法结果基本相同。但由于 UPLC 仪器的特殊性, 未能对不同仪器间 F 值进行考察, 今后将继续进行研究。

不同企业产品含量差异较大, 而原部颁标准只有检查项, 无法对此进行控制, 因此需尽快增订药品标准, 以保证药品质量。

本文利用固相萃取技术提取生物碱类成分, 采用 UPLC 及 PAD 检测器建立的多波长测定方法, 可在同一色谱条件下实现多个成分的同时定量测定, 简便快速, 重复性好, 在中成药质量控制方面具有很好的应用前景。

References

- [1] Ministry of Public Health of China. Drug Specifications for Traditional Chinese Medicine Promulgated by Ministry of Public Health of China (卫生部药品标准中药成方制剂第二册) [S]. Vol 2. Beijing: Chinese Pharmacopoeia Commission, 1990: 163.
- [2] Xiao PG. Modern Chinese Materia Medica, Vol 2 (新编中药志: 第二卷) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 654.
- [3] Xiao PG. Modern Chinese Materia Medica, Vol 3 (新编中药志: 第三卷) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001: 319.
- [4] Zhang SD, Xia ZY, Feng Y. Assay of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in Chuanliting spray by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2008, 30: 1308-1311.
- [5] Liu YL, Li DM, Feng L. Determination of codeine phosphate in Yangshengbaofei granule by HPLC [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2004, 15: 348-350.
- [6] Hao HY, Guo JX, Shun QS, et al. Determination of 3 bioactive alkaloids in the Chinese drug Pericarpium Papaveris by HPLC and HPCE [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2000, 35: 289-293.
- [7] Yan CN, Shangguan YF. Study on spectrofluorimetry of papaverine [J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2003, 22: 5-7.
- [8] Xu QQ, Du LM, Cao XM. Simultaneous determination of 8 kinds of components in Cannabis, opium and heroine by gas chromatography [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2003, 31: 961-964.
- [9] Liao WJ, Zhang H, Ren YP. Determination of alkaloids of Pericarpium Papaveris in antitussive by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2006, 34: 1175-1178.
- [10] Lü X, Guo Q, Zhong WY. GC-MS determination of pseudoephedrine, ephedrine, strychnine and brucine in Shufeng Huoluo pills [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2008, 39: 519-522.
- [11] Chen J, Wang GL, Yao LW, et al. Recent applications of ultra performance liquid chromatography (UPLC) in pharmaceutical analysis [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28: 1976-1981.