

HPLC测定宣肺清热合剂中盐酸麻黄碱与盐酸伪麻黄碱含量

刘惠军¹, 陈睿¹, 王娟² (1. 上海市松江食品药品检验所, 上海 201600; 2. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550001)

[摘要] 目的 建立宣肺清热合剂(麻黄、苦杏仁、浙贝母、黄芩等)中有效成分盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 流动相为乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾(用磷酸调 pH 至 2.7), (4:100 含 0.1% 三乙胺), 流速: 1.2 ml/min, 检测波长: 207 nm。结果 盐酸麻黄碱在 11.04~222.8 μg/mL ($r=0.9999$), 盐酸伪麻黄碱在 8.27~165.4 μg/mL ($r=0.9999$) 的浓度范围内均线性关系良好, 回收率均在 95%~103% 之间, RSD 均小于 3%。结论 本方法操作简便、重现性好, 可以更有效地控制制剂的质量。

[关键词] 宣肺清热合剂; HPLC; 盐酸麻黄碱; 盐酸伪麻黄碱

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)03-0199-03

Determination of ephedrine and pseudoephedrine in Xuanfei Qingre mixture by HPLC

LIU Huijun¹, CHEN Rui¹, WANG Juan² (1. Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201600, China; 2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective** To set up a method of simultaneously determining the contents of ephedrine and pseudoephedrine in Xuanfei Qingre mixture (*Herba Ephedrae, Semen Amniacae amaranum, Bulbus Fritillaria thunbergii, Radix scutellaria*, etc). **Methods** The HPLC-quantitative analysis was carried out on a column of Agilent ZORBAX SB-C₁₈ by using a mobile phase of acetonitrile-0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate (adjusted with phosphoric acid pH = 2.7), (4:100 with 0.1% triethylamine) under a flow rate of 1.2 ml/min. 207 nm was selected as the wavelength of detector. **Results** The linear range of ephedrine was 11.04~222.8 μg/mL ($r=0.9999$) and pseudoephedrine was 8.27~165.4 μg/mL ($r=0.9999$). The recoveries of them were all between 95% and 103% ($RSD < 3%$). **Conclusion** This method is simple, reproducible and specific.

[Key words] Xuanfei Qingre mixture; HPLC; ephedrine hydrochloride; pseudoephedrine hydrochloride

宣肺清热合剂由麻黄、苦杏仁、浙贝母、黄芩、鱼腥草、桑白皮、桔梗、枳壳和甘草九味中药经提取加工而成, 具有清热宣肺止咳的功效, 可用于感冒、慢性支气管炎、肺炎等所致的咳喘、痰黄等症。该方中的麻黄为君药, 主要含有 1-麻黄碱和 d-伪麻黄碱两种生物碱活性成分, 两者均为本方发挥药效的有效成分, 其中 1-麻黄碱具有止咳作用, d-伪麻黄碱具有抗炎镇痛作用。宣肺清热合剂为上海市卢湾区香山中医医院的自制制剂, 原标准^[1]只有检查项, 为控制药品质量, 保证临床用药的安全性和有效性, 本实验采用高效液相色谱法, 在一种色谱条件下同时测定制剂中麻黄碱和伪麻黄碱两种有效成分, 实验表明, 本法条件简便, 易于操作, 专属性强, 重复性好, 为质量标准的提高和修订提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 waters-e2695 高效液相色谱仪; waters2998 Photodiode Array Detector 检测器; Em-

power Pro 色谱工作站; METTLER TOLEDO AG135 电子天平。

1.2 试剂 宣肺清热合剂(上海市卢湾区香山中医医院提供, 批号分别为 090501、090701、090901); 盐酸麻黄碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 171241-200303); 盐酸伪麻黄碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 171237-200505); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (pH = 2.7), (4:100 含 0.1% 三乙胺); 流速: 1.2 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 207 nm。进样量 10 μL。理论板数按盐酸麻黄碱应不低于 5000。盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的分离度应符合规定。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 105 °C 下干

[作者简介] 刘惠军(1967), 男, 主管药师, E-mail: shs.jh@126.com.

燥 3 h 的盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品适量, 置 100 ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱分别为 220 & 165.4 μg/ml 对照品储备液。精密吸取对照品储备液 1 ml 置 10 ml 容量瓶中, 用 50% 甲醇定容至刻度, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取宣肺清热合剂 10 ml 置 500 ml 圆形烧瓶中, 圆底烧瓶中, 加 10 ml 水, 再加含 7.5 g NaCl 和 20 g NaOH 的水溶液 100 ml 蒸馏, 用预先盛有 0.5 mol/L 盐酸溶液 5 ml 的 100 ml 容量瓶收集蒸馏液近 100 ml, 加水至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 取按处方比例及生

产工艺制备的不含麻黄的宣肺清热合剂, 按供试品溶液的制备同法制得, 作为阴性样品溶液。

2.3 系统适应性试验 取盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱混合对照溶液, 按上述色谱条件试验, 对系统参数进行考察, 结果盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的理论塔板数分别为 5984, 5931; 分离度为 2.23。

2.4 专属性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液及不含麻黄碱的阴性样品溶液各 10 μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图。从色谱图观察, 在此色谱条件下, 样品有与对照品盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱有相同保留时间的对应峰, 并与其他组分峰达完全分离, 阴性样品无干扰。结果见图 1。

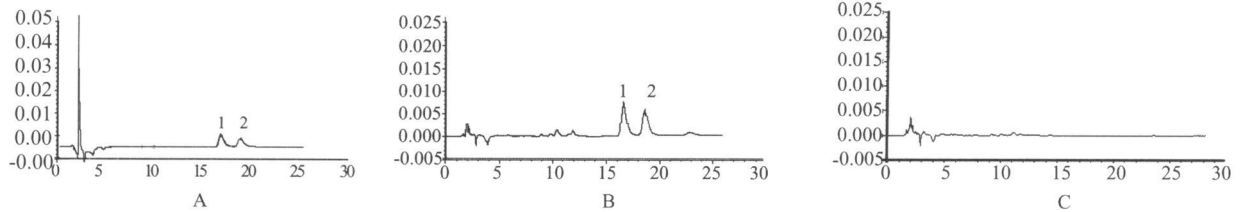


图 1 对照品(A)、样品(B)和阴性对照品(C)的 HPLC 色谱图
1-盐酸麻黄碱; 2-盐酸伪麻黄碱

2.5 线性关系的考察 取对照品储备液(盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量分别为 220 & 165.4 μg/ml), 用 50% 甲醇稀释成盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的浓度分别为 11.04 μg/ml, 8.27 μg/ml, 22.08 μg/ml, 16.54 μg/ml, 55.2 μg/ml, 41.35 μg/ml, 110.4 μg/ml, 82.7 μg/ml, 220.8 μg/ml, 165.4 μg/ml 的一系列混合溶液。精密吸取上述混合溶液各 10 μl 在色谱条件下测定峰面积, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 浓度 X (μg/ml) 为横坐标绘制标准曲线, 求得盐酸麻黄碱回归方程: $Y = 2.21 \times 10^4 X + 2.28 \times 10^2$ ($r = 0.9999$, $n = 5$); 盐酸伪麻黄碱回归方程: $Y = 2.28 \times 10^4 X - 3.12 \times 10^4$ ($r = 0.9999$, $n = 5$)。结果表明, 盐酸麻黄碱在 11.04~220.8 μg/ml, 盐酸伪麻黄碱在 8.27~165.4 μg/ml 的浓度范围内均线性关系良好。

2.6 精密度实验 取盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品(浓度为 11.04 μg/ml & 8.27 μg/ml) 的混合溶液 10 μl 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果盐酸麻黄碱的 RSD 为 0.9%, 盐酸伪麻黄碱的 RSD 为 0.8%, 精密度良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 在 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 h 进样, 每次 10 μl, 结果测得 RSD 分别为 1.5% 与 1.6%, 表明盐酸麻黄碱与盐酸伪麻黄碱在 24 h

内稳定。

2.8 重复性实验 取同一批样品 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备, 进样测定, 结果盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的 RSD 分别为 1.3% 与 1.9%, 都小于 3%, 重复性良好。

2.9 加样回收率实验 取已知含量的样品 5 ml 6 份, 精密量定, 分别加入盐酸麻黄碱对照品 0.5595 mg, 盐酸伪麻黄碱对照品 0.442 mg 进行含量测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果 (n = 6)

样品含量 (mg)	加入对照品量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
盐酸麻黄碱					
0.711	0.5595	1.269	99.73	100.42	1.36
0.711	0.5595	1.261	98.30		
0.711	0.5595	1.275	100.80		
0.711	0.5595	1.271	100.09		
0.711	0.5595	1.283	102.23		
0.711	0.5595	1.278	101.34		
盐酸伪麻黄碱					
0.634	0.442	1.078	100.45	100.57	0.85
0.634	0.442	1.082	101.36		
0.634	0.442	1.077	100.23		
0.634	0.442	1.080	100.90		
0.634	0.442	1.082	101.36		
0.634	0.442	1.072	99.10		

3 讨论

由试验结果和相关分析来看, A、B两因素均以第 4水平为最佳, C因素以第 3水平为最好, 在免疫试验中, D因素以 D₂为最佳, 在体外抑菌试验中以 D₄为最好, 直观分析中, 两种实验的 R值均最小, 方差分析中两种实验均无显著性差异 ($P > 0.05$)。无论取 D₂ 还是取 D₄ 都能满足试验要求, 因此结合临床实验并经综合考虑, 最佳水平组合为: A₄B₄C₃D₄。由试验结果和分析可知, 黄桂灌肠剂最佳处方为每 1 000 ml 中含黄连 60 g 黄柏 180 g 桂枝 120 g 大黄 48 g 各因素选出的最佳水平都处于试验方案的中间, 说明试验方案中各因素水平的确定是合适的。

盆腔炎是妇科常见病、难治病, 具有病程长、治愈率低、复发率高的特点。盆腔炎发病除与病原体感染有关外, 还与机体免疫功能低下或紊乱有关。中医认为: “正气存内, 邪不可干”, “邪之所凑, 其气必虚”^[4, 5], 故机体的免疫状态对病原微生物引起的炎症过程有着重大影响。本实验结果表明, 黄桂灌肠剂能显著增加小鼠廓清指数的含量, 说明该药对免疫功能有良好的促进作用, 加之该药体外抑菌作

用较强, 从而进一步降低盆腔炎病人炎症反应的症状。

采用正交试验设计法优选黄桂灌肠剂的配方, 以小鼠廓清指数提高值和体外抑菌效果为评价指标, 采用统计学方法分析计算, 较好地筛选出黄桂灌肠剂的最佳处方, 方法可行, 收效满意, 为临床应用提供了实验依据。

【参考文献】

- [1] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1991: 157.
- [2] 姚文斌. 波叶大黄多糖对免疫功能作用 [J]. 中国药科大学学报, 1990, 21(2): 99.
- [3] 郭江江, 张春瑛. 咪唑类抗真菌乳膏微生物限度检查方法学验证 [J]. 中国药师, 2007, 10(6): 602.
- [4] 梁君儿. 对慢性盆腔炎湿热内结证候的探讨 [J]. 中国医药学报, 1995, 10(4): 6.
- [5] 贾丽娜, 赵世萍, 闫静, 等. 妇科千金软胶囊治疗盆腔炎药理学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 18.

[收稿日期] 2009-11-04
[修回日期] 2010-01-22

(上接第 200 页)

结果表明两者的回收率都在 95% ~ 105% 之间, RSD 均小于 3%, 符合有关规定。

3 样品测定

取 3 批样品, 分别制备供试品溶液, 测定盐酸麻黄碱与盐酸伪麻黄碱的峰面积, 用外标法进行计算, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n = 3)

批号	盐酸麻黄碱含量 (mg/ml)	盐酸伪麻黄碱含量 (mg/ml)
090501	0.142 2	0.126 8
090701	0.145 1	0.130 2
090901	0.110 3	0.101 4

4 讨论

4.1 流动相的选择 笔者曾采用 0.021 mol/L 磷酸二氢钾 (磷酸调 pH = 2.5) - 甲醇 (94: 6)^[2]、0.2% 磷酸-乙腈 (96: 4) 为流动相进行试验, 前者分离效果和理论塔板数都达不到要求; 后者由于

酸性太强对柱子损伤较大, 基线经常不稳。后来采用了乙腈-0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (pH = 2.7), (4: 100, 含 0.1% 三乙胺) 作为流动相, 2 种成分的色谱峰都比较理想, 分离度也大于 2.0 且性质较为稳定。

4.2 样品的前处理 曾用多种方法处理过样品, 如乙醇溶解法^[3]和乙醚萃取法^[4], 经过测试后发现蒸馏法提取效果最好, 盐酸麻黄碱的含量最高, 且干扰的杂质峰少。

【参考文献】

- [1] 成红娟, 曲婷丽, 刘锐玲, 等. HPLC 同时测定止咳立效口服液 中盐酸麻黄碱与盐酸伪麻黄碱含量 [J]. 中成药, 2009, 2: 240.
- [2] 李小娜, 孙志明. HPLC 测定止咳平喘口服液 中盐酸麻黄碱含量 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 307.
- [3] 王建波, 秦雅英, 张志勇. HPLC 法测定抗感 121 服液中麻黄碱含量 [J]. 黑龙江医药, 2004, 17: 401.
- [4] 上海市食品药品监督管理局医疗机构制剂质量标准 [S]. SYZ-ZF-113-2005.

[收稿日期] 2009-12-28
[修回日期] 2010-03-09