

RP-HPLC 法测定二母安嗽片中的吗啡

祝小静

天津市药品检验所, 天津 300070

摘要: 目的 建立一种测定二母安嗽片中吗啡的方法。方法 采用反相高效液相色谱法测定二母安嗽片中吗啡的量。色谱柱为 phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液 (15:85) (每 100 mL 加 0.1 g 庚烷磺酸钠), 柱温 40 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 220 nm。结果 吗啡在 3.907~97.680 μg/mL 与峰面积积分值呈良好线性关系, 平均回收率为 96.78%, RSD=0.64% (n=6)。结论 所建立的方法操作简便、测定准确、重复性良好, 可用于二母安嗽片的质量控制。

关键词: 二母安嗽片; 吗啡; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)05-0434-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.05.013

Determination of morphine in Ermu Ansou Tablet by RP-HPLC

ZHU Xiao-jing

Tianjin Institute of Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of morphine in Ermu Ansou Tablet. **Methods** RP-HPLC was applied to determine the content of morphine. An RP-HPLC method was established with Luna C₁₈ column (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by a gradient elution using acetonitrile-0.1% phosphoric acid (15:85) (0.1 g sodium heptanesulfonate added into 100 mL); The flow rate was 1.0 mL/min and the wavelength was set at 220 nm. The column temperature was 40 °C. **Results** The relationship between injection level and area of morphine was evaluated to be linear at the range of 3.907—97.680 μg/mL. The average recovery rate was 96.78%, and RSD was 0.64% (n = 6). **Conclusion** The quantitative methods established in this study are convenient, accurate, and reproducible, and can be used as the quality control standard for Ermu Ansou Tablet.

Key words: Ermu Ansou Tablet; morphine; HPLC

二母安嗽片由知母、玄参、罂粟壳、麦冬、款冬花、紫菀、苦杏仁、百合、浙贝母 9 味药组成, 具有清肺化痰, 止嗽定喘之功效, 用于虚劳久嗽, 春秋举发, 咳嗽痰喘, 骨蒸潮热, 音哑声重, 口燥舌干, 痰涎壅盛等症^[1]。方中罂粟壳能敛肺、止痛, 用于久咳之症。经药理学研究证明, 吗啡作为罂粟壳的主要有效成分, 可抑制咳嗽中枢, 产生镇咳作用, 同时激动中枢神经阿片受体而产生较强的镇痛和镇静作用^[2]。鉴于本方重用罂粟壳, 对其中毒性成分吗啡进行定量分析可以确保临床使用的安全有效。

1 仪器与试剂

SHIMADZU LC-2010AHT 高效液相色谱仪, Solution 色谱工作站, Mettler Toledo XS205 型及

Mettler AE 260 型电子天平, Auto Science AS20500ADT 型超声清洗仪。

吗啡 (批号 171201-201123) 购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。二母安嗽片 (批号 1009001、0704001、0704002, 规格 0.6 g/片) 由天津中新药业集团股份有限公司隆顺裕制药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液 (15:85) (每 100 mL 加 0.1 g 庚烷磺酸钠); 柱温为 40 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 220 nm^[3]; 进样体积 5 μL。理论板数按吗啡峰计算应不低于 8 000。

收稿日期: 2014-07-10

作者简介: 祝小静, 从事药物分析工作。Tel: (022)23513856 E-mail: 284868887@qq.com

2.2 对照品溶液的制备

取吗啡对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇制成 20 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取二母安嗽片,研细,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入浓氨溶液 0.5 mL,密塞,使润湿,再精密加入三氯甲烷 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 40 min,放冷,再称定质量,用三氯甲烷补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 15 mL,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方配比及制法,制成缺罂粟壳的阴性样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性样品溶液。

2.5 专属性试验

分别精密吸取吗啡对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 5 μL ,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,结果见图 1。吗啡出峰时间约为 22.5 min,理论板数为 16 000,阴性样品对主峰无干扰。

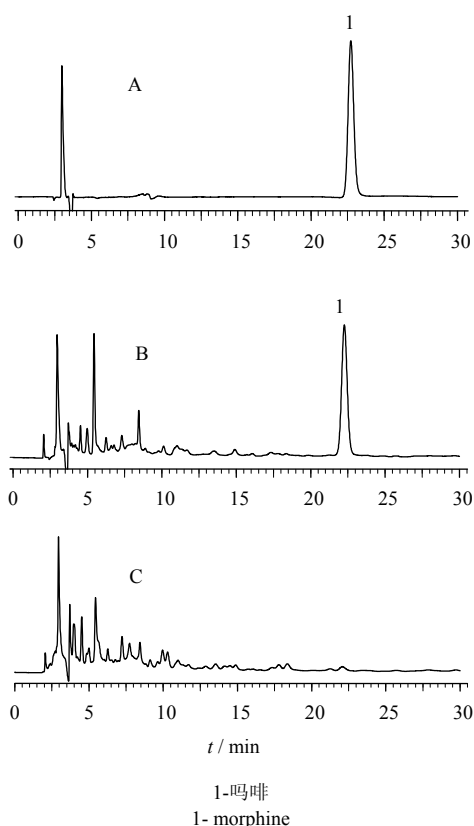


图1 吗啡对照品(A)、二母安嗽片(B)和阴性对照样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC of morphine (A), Ermu Ansou Tablet (B), and negative sample (C)

2.6 线性关系考察

取吗啡对照品储备液(97.68 $\mu\text{g/mL}$),逐级稀释至质量浓度分别为 3.907、9.768、19.536、39.072、78.144 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,分别精密吸取上述稀释溶液和储备液各 5 μL ,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,以对照品进样质量浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,求得回归方程: $Y = 1.575 \times 10^4 X + 6.682 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。结果表明,吗啡在 3.907~97.680 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.7 重复性试验

取同一样品(批号 1009001) 6 份,制备供试品溶液,分别测定,计算,结果吗啡的平均质量分数为 0.306 mg/g, RSD 值为 1.18%。

2.8 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 1009001) 5 μL ,连续进样 6 次,根据吗啡峰面积积分值计算,结果 RSD 值为 0.51%。

2.9 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 1009001) 5 μL ,分别于 0、3、9、18、24 h 进样测定,结果吗啡峰面积积分值 RSD 为 0.57%。

2.10 加样回收试验

取吗啡对照品适量,精密称定,加甲醇制成 40.16 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,精密吸取 2 mL,置具塞圆底烧瓶中,减压回收溶剂至干,再取同一样品(批号 1009001),研细,取约 0.25 g,精密称定,置上述圆底烧瓶中,制备供试品溶液,共 6 份,进样测定,计算,吗啡平均回收率为 96.78%, RSD 值为 0.64%。

2.11 样品测定

取 3 批样品,每批 2 份,制备供试品溶液,进样测定,计算吗啡的质量分数。结果见表 1。

3 讨论

3.1 流动相的选择

曾比较了不同比例的乙腈-磷酸盐缓冲液、甲醇-0.5%乙酸铵溶液-1%三乙胺溶液和甲醇-0.2%二乙胺溶液等常见的生物碱分离系统,结果均不能改善吗啡色谱峰的拖尾现象。吗啡属生物碱类成分,在流动相体系中加入负离子对试剂可以与其分子中的叔胺氮原子结构产生缔合作用,阻断与固定相未键合硅醇基的相互作用,从而改善色谱峰的展宽拖尾现象。另一方面,缔合后的离子对呈中性,降低了被分析物质的极性,从而延长了在色谱柱上的保

表2 二母安嗽片中吗啡的测定结果 ($n=2$)
Table 2 Determination of morphine in Ermu Ansou Tablet ($n=2$)

批号	吗啡/(mg·片 ⁻¹)
0704001	0.174
0704002	0.181
1009001	0.187

留时间。经反复试验,确定以乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85)(每100 mL加0.1 g庚烷磺酸钠)的分离效果最佳,吗啡色谱峰峰形对称,与杂质峰实现基线分离。

3.2 提取方式与溶剂的选择

笔者曾采用甲醇直接提取的方式进行测定,但吗啡的提取率较低,提出的成分复杂,影响色谱分离。在此基础上增加酸化—碱化—三氯甲烷-异丙醇(9:1)混合溶剂萃取的步骤^[4],可以充分去除杂质干扰,但操作繁琐。鉴于吗啡在三氯甲烷中溶解性较好,最终确定了在碱性环境下用三氯甲烷直接提取的方法。经方法学验证试验表明,提取方式以超声处理的效率为高,并符合准确测定的要求。

3.3 不同色谱柱的考察

取同一供试品溶液(批号1009001),分别使用Agela Venusil MP C₁₈、Shiseido Capcell PAK C₁₈和phenomenex Luna C₁₈(2)3种色谱柱对吗啡进行测定。结果表明,不同厂家色谱柱对测定结果无显著性影响(RSD值为1.38%)。

3.4 含量限度的制定

根据国家药典委员会中成药质量标准制定的相关指导原则,含毒性成分药物必须制定含量范围。本试验参考《中国药典》2010年版一部“罂粟壳”项下规定的吗啡含量范围0.06%~0.40%,成品转移率按60%计算(水提工艺),建议规定本品每片含罂粟壳以吗啡(C₁₇H₁₉O₃N)计,应为0.071~0.470 mg。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 第八册. 1993.
- [2] 佐藤公道,李文志. 吗啡药理学研究进展 [J]. 疼痛, 2002, 10(4): 27-33.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 赵晨,于鹏,郑歆,等. 二母安嗽丸的质量标准研究 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(1): 52-57.