

HPLC-DAD 波长切换法同时测定维 C 银翘片中对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、绿原酸、牛蒡苷

王 鑫, 赵 硕, 刘志杰, 赵 昕, 温瑞卿*, 李东辉*

北京市海淀区食品药品安全监控中心, 北京 100094

摘 要: **目的** 建立同时测定对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、绿原酸、牛蒡苷含量的方法, 旨在实现准确、高效、实用地控制维 C 银翘片的质量。 **方法** 采用 HPLC 波长切换方法, 色谱柱为 DIONEX Acclaim C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, Dionex Bonded Silica Products), 流动相为乙腈-含 0.5% 三乙胺的 0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (pH2.5) 水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30℃, 检测波长 249 nm (0~10 min, 检测对乙酰氨基酚)、327 nm (10~20 min, 检测绿原酸)、264 nm (20~32 min, 检测马来酸氯苯那敏)、280 nm (32~44 min, 检测牛蒡苷)。 **结果** 对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷分别在 0.040~0.800、0.065~1.301、0.041~0.818、0.093~1.852 μg 内与峰面积呈良好的线性关系 ($r > 0.999$), 平均加样回收率 ($n=6$) 分别为 99.7% (RSD=1.4%)、100.4% (RSD=1.2%)、100.5% (RSD=1.3%)、99.4% (RSD=1.5%)。对乙酰氨基酚、绿原酸、牛蒡苷采用 2 种方法测定, 经 t 检验结果无显著性差异; 马来酸氯苯那敏采用本文建立的方法测定, 含量略高于药典方法。 **结论** 本实验建立的含量测定方法与《中国药典》收载的方法比较, 本方法检测结果可靠, 且操作简单、环境友好、灵敏度高, 符合方法学验证要求, 可用于维 C 银翘片的质量控制。

关键词: HPLC 波长切换法; 对乙酰氨基酚; 绿原酸; 马来酸氯苯那敏; 牛蒡苷

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 10-1823-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.013

Simultaneous determination of four main constituents in Vitamin C Yinqiao Tablets by HPLC with switching wavelength

WANG Xin, ZHAO Shuo, LIU Zhijie, ZHAO Xin, WEN Ruiqing, LI Donghui

Beijing Haidian Food & Drug Safety Monitoring Center, Beijing 100094, China

Abstract: **Objective** To establish a method for Simultaneous determination of four constituents (paracetamol; chlorpheniramine maleate; chlorogenic acid; arctiin), in order to control the quality of Vitamin C Yinqiao Tablets accurately, efficiently and practically. **Methods** In the HPLC with switching wavelength method, the separation was performed on a DIONEX Acclaim C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Dionex Bonded Silica Products) column with the gradient elution of acetonitrile-0.5% triethylamine 0.02 mol/L NaH₂PO₄ (pH2.5) solution in a gradient mode at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 30℃. The UV detection wavelength was set at 249 nm for paracetamol in 0—10 min, 327 nm for chlorogenic acid in 10—20 min, 264 nm for chlorpheniramine maleate for 20—32 min, 280 nm for arctiin in 32—44 min. **Results** The ranges for linear correlation of paracetamol, chlorpheniramine maleate, chlorogenic acid, arctiin were 0.040—0.800, 0.065—1.301, 0.041—0.818, 0.093—1.852 μg. The average recoveries ($n = 6$) of the four components were 99.7% (RSD = 1.4%), 100.4% (RSD = 1.2%), 100.5% (RSD = 1.3%), 99.4% (RSD = 1.5%). The t -test results of Paracetamol, Chlorogenic acid and arctiin by both method have no significant difference, while the result of Chlorpheniramine maleate by established method is slightly higher than the corresponding method in Chinese Pharmacopoeia. **Conclusion** Compared to the corresponding method in Chinese Pharmacopoeia, the established method is reliable and consistent with method validation requirements, which has the characteristic of easy maneuverability, environmental friendliness, high sensitivity, therefore can be used for the quality control of vitamin C Yinqiao tablets.

收稿日期: 2018-06-27

第一作者: 王 鑫, 学士, 主管药师, 从事药品检验工作。Tel: (010)58711967 E-mail: orange_517@126.com

*通信作者: 李东辉, 硕士, 主任药师, 从事药品监管工作。Tel: (010)58711990

温瑞卿, 博士, 副主任药师, 从事药品检验工作。Tel: (010)58711967 E-mail: ruiqing_wen@163.com

Key words: HPLC with switching wavelength; paracetamol; chlorpheniramine maleate; chlorogenic acid; arctiin

维C银翘片收载于《中国药典》2015年版一部^[1],药典中对该药的主要成分对乙酰氨基酚^[2]、绿原酸^[3-4]、马来酸氯苯那敏^[5-6]、牛蒡苷^[7-8]均建立了独立的高相液相色谱法来控制质量,但是检测费时,其中马来酸氯苯那敏的提取又非常复杂,过程中使用了大量的强毒性试剂,对人体的毒害大,对环境污染重。为了提高检测效率,考虑建立新方法,用于同时测定以上4种成分的含量。有文献报道过以上3种成分的同时测定,但是检测方法多为单一波长或双波长。4种成分的最大吸收均在不同的波长处,仅用1到2个波长测定所有成分,不在最大吸收处测定某成分,其峰值响应的灵敏度是受影响的,结果会存在一定的偏差,法定标准测定合格的产品可能会被测定不合格。为了准确的测定样品含量,本实验建立了HPLC-DAD波长切换法同时测定对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷4种成分的分析方法,并应用于实际样品的含量测定,同时与药典方法测定结果进行比对,结果可靠。采用本方法可准确、高效、环保地测定维C银翘片的含量,为质量评价及监管提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪(配置四元泵、DAD检测器、柱温箱、Emperor工作站,美国Waters科技有限公司);Agilent1260 高效液相色谱仪(配置四元泵、DAD检测器、柱温箱、OpenLAB工作站,美国安捷伦科技有限公司);MSA125P 电子分析天平(十万分之一及万分之一双档,赛多利斯);FB15067 超声仪(Fisher Scientific)

1.2 试剂

对照品对乙酰氨基酚(批号100018-201610,纯度99.9%)、绿原酸(批号110753-201716,纯度99.3%)、马来酸氯苯那敏(批号100047-201507,纯度99.7%)、牛蒡苷(批号110819-201611,纯度95.9%)均购置于中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇、磷酸、三乙胺为色谱纯(Fisher Scientific),水为超纯水,其他试剂为分析纯。

维C银翘片(不同药厂3批,批号20170406、A20160332、20160802)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为DIONEX Acclaim C₁₈(250 mm×4.6

mm, 5 μm, Dionex Bonded Silica Products);流动相为乙腈(A)-含0.5%三乙胺的0.02 mol/L磷酸二氢钾(pH2.5)溶液(B);体积流量为1.0 mL/min,柱温30℃,检测波长249 nm(0~10 min,检测对乙酰氨基酚)、327 nm(10~20 min,检测绿原酸)、264 nm(20~32 min,检测马来酸氯苯那敏)、280 nm(32~45 min,检测牛蒡苷);进样量10 μL。

表1 流动相梯度洗脱表
Table 1 Gradient elution table

时间/min	流动相/%	
	A	B
0~15	9	91
15~20	23	77
20~45	23	77

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对乙酰氨基酚9.98 mg置10 mL量瓶中、绿原酸10.92 mg置20 mL量瓶中、马来酸氯苯那敏20.50 mg置20 mL量瓶中、牛蒡苷12.07 mg置10 mL量瓶中,加甲醇使溶解,制成单一对照品溶液;分别精密量取各对照品溶液1、3、1、2 mL置同一25 mL量瓶中加入甲醇制成分别含对乙酰氨基酚39.88 μg/mL、绿原酸65.06 μg/mL、马来酸氯苯那敏40.88 μg/mL、牛蒡苷92.60 μg/mL的对照品混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品20片,精密称定,研细后精密称取适量约为1片的重量(0.315 4 g),置于25 mL量瓶中,加甲醇适量,超声处理45 min,放至室温,用甲醇定容至刻度,摇匀,经0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液为供试品A,用于测定绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷。精密量取供试品A溶液1 mL置100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品a,用于测定对乙酰氨基酚。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适应性 按“2.1”项下色谱条件进行检测,4个成分均能与达到基线分离,分离度大于1.5,理论塔板数大于3 000。见图1。

2.3.2 专属性 精密量取供试品溶液10 μL注入液相色谱仪中,记录色谱图,利用DAD检测器进行峰纯度分析,4个目标成分的峰纯度因子均大于980^[9],表明峰的纯度符合定量要求。

1- 对乙酰氨基酚; 2- 绿原酸; 3- 马来酸氯苯那敏; 4- 牛蒡苷
1- paracetamol; 2- chlorogenic acid; 3- chlorpheniramine maleate; 4- arctiin

图1 混合对照品(A)、供试品A(B)、供试品a(C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), sample A for test (B), sample a for test (C)

2.3.3 线性关系 分别精密吸取混合对照品溶液1、2、5、8、10、12、15、20 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。见表2。

2.3.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μL , 连续进样6次, 结果对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷峰面积的RSD分别为0.35%、0.59%、0.65%、0.44%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批号的维C银翘片(批号20170406)样品6份, 按照“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液A和a, 按照“2.1”项下的色谱条件进样分析, 结果对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷的平均含量分别为337.8、5.338、3.569、11.52 mg/g, RSD依次分别为0.36%、0.94%、0.68%、0.82% ($n=6$), 表明该方法的重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取新配置的供试品溶液A和

a, 在0、2、4、8、12、16、20、24 h按照“2.1”项下的色谱条件进样分析, 记录峰面积, 结果24 h内4个成分的峰面积RSD值均小于2.0% ($n=8$)。

2.3.7 加样回收率 精密称取各成分含量已知的样品6份(约0.16 g), 精密加入含乙酰氨基酚(0.039 9 mg/mL)、绿原酸(0.086 7 mg/mL)、马来酸氯苯那敏(0.040 9 mg/mL)、牛蒡苷(0.127 mg/mL)的混合溶液12.5 mL, 甲醇定容至25 mL, 按照“2.1”项下的色谱条件进样分析, 记录峰面积, 计算加样回收率, 对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷的平均回收率分别为99.7% (RSD=1.5%)、100.4% (RSD=1.2%)、100.5% (RSD=1.3%)、99.4% (RSD=1.6%)

2.4 样品含量测定及结果比对

取维C银翘片3批, 每批各称样2份, 分别按照本实验建立的新方法和药典方法进行测定, 外标法计算结果。该3批样品经2种方法检测均为合格样品。全部测量结果经 t 检验显示, 对乙酰氨基酚、绿原酸、牛蒡苷3个成分2种方法的测定结果无显著性差异, 马来酸氯苯那敏的测定结果差异显著, 用新方法测定的结果高于药典方法。测定结果数据及 t 检验结果见表3。

3 讨论

3.1 样品溶液制备

本试验对50%甲醇、80%甲醇、甲醇、乙醇为提取溶剂进行考察, 结果表明甲醇提取制备的供试品溶液各成分含量优于乙醇提取液, 且较50%甲醇和80%甲醇的提取液的杂质少。同时考察了2种提取方式超声提取和加热回流, 测定结果无差异, 超声提取更为方便、快捷, 选择超声提取。考察不同的超声时间30、45、60 min, 超声45 min已提取完全。由于对乙酰氨基酚的含量高, 其他3种成分相对低很多, 所以对供试品再进行一次稀释后测定对乙酰氨基酚的含量。

3.2 流动相的选择

由于对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、

表2 4个主成分的回归方程及线性范围

Table 2 Regression equation and line range of four principal components

成分	回归方程	R^2	线性范围/ μg
对乙酰氨基酚	$Y=3\ 898.7X+121.3$	0.999 4	0.040~0.800
绿原酸	$Y=2640.8X+70.562$	0.999 5	0.065~1.301
马来酸氯苯那敏	$Y=1203.8X+1.2467$	1	0.041~0.818
牛蒡苷	$Y=603.75X+4.1999$	0.999 9	0.093~1.825

表3 4种成分2种方法测定结果及t检验结果

Table 3 Determination results of four component through two methods and t determination results

批号	对乙酰氨基酚/(mg·片 ⁻¹)		绿原酸/(mg·片 ⁻¹)		马来酸氯苯那敏/(mg·片 ⁻¹)		牛蒡苷/(mg·片 ⁻¹)	
	药典方法	新方法	药典方法	新方法	药典方法	新方法	药典方法	新方法
170406	108.2	106.6	1.798	1.723	1.031	1.118*	3.765	3.644
A20160332	106.6	107.1	1.806	1.949	1.020	1.078*	3.489	3.346
20160802	108.2	106.9	1.894	2.003	1.021	1.081*	3.647	3.592

与药典方法比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs Pharmacopoeia method

牛蒡苷极性差异较大,故采用梯度洗脱。本试验考察了“乙腈-0.4%磷酸水”、“乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾(pH3.0)”、“乙腈-含0.5%三乙胺的0.02 mol/L磷酸二氢钾(pH2.5)”3种流动相系统。结果表明“乙腈-0.4%磷酸水”系统中马来酸氯苯那敏的峰形差,严重拖尾;“乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾(pH3.0)”系统中绿原酸不稳定,即存在分子状态又有离子状态;调节pH值加入三乙胺后在“乙腈-含0.5%三乙胺的0.02 mol/L磷酸二氢钾(pH2.5)”系统中4种成分均能达到稳定单一状态,且峰形好。

3.3 检测波长的选择

对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷在190~400 nm内进行全波长扫描,4成分的紫外吸收差异很大,无法在同一波长处对全部目标成分进行有效的测定。结合三维光谱图中各成分有最大吸收的波长,在0~10 min波长设定为249 nm,用于检测对乙酰氨基酚;10~20 min波长设定为327 nm,用于检测绿原酸;20~32 min波长设定为264 nm用于检测马来酸氯苯那敏;32~44 min波长设定为280 nm用于检测牛蒡苷。

3.4 检测结果比对分析

取维C银翘片3批,每批各称样2份,分别按照本实验建立的新方法和药典方法进行测定,外标法计算结果。经t检验,对乙酰氨基酚、绿原酸、牛蒡苷的含量经2种方法测定无显著性差异,马来酸氯苯那敏的含量有显著性差异,本方法的测定结果略高于药典方法的测定结果。药典方法中马来酸氯苯那敏的提取方法比较繁琐,影响测定结果的因素较多,多次萃取过程中的振摇力度、静置时间;多次溶解、洗涤、转移的完全程度,都是重要的影响因

素。有文献报道^[5]关于马来酸氯苯那敏的测定,药典方法的回收率仅有91.4%。本次实验建立的供试品制备方法采用直接提取法,减少了萃取、转移等环节中的操作误差,提高了试验结果的准确性。

本实验建立了同时测定维C银翘片中对乙酰氨基酚、绿原酸、马来酸氯苯那敏、牛蒡苷的液相色谱法。供试品提取简便快捷,环境友好,毒害污染小。测定方法灵敏度高、重复性好,实现了对维C银翘片准确、高效的质量控制。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015:1570.
- [2] 韩郑州,吴曙光,李琼娅,等.HPLC测定感冒灵颗粒中的对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量[J].中国药理学杂志,2010,45(3):228-230.
- [3] 张浩超,郝宝艳,孙浩熠,等.绿原酸的研究进展[J].食品与药品,2017,19(3):222-226.
- [4] 刘莉,袁强华,宋英.HPLC波长切换测定小儿鼻敏口服液中9个成分的含量[J].药物分析杂志,2016,36(11):1981-1987.
- [5] 王晓钰,曾玉婷,江荣高.维C银翘片中马来酸氯苯那敏含量测定方法的优化[J].中国药品标准,2013,14(5):352-355.
- [6] 金舒.HPLC-DAD法同时测定复方银翘氨酚维C片中5种组分的含量[J].中国药师,2017,20(7):1305-1307.
- [7] 魏谭军,陈晓东.高效液相色谱法测定复方西羚解毒丸中4种成分的含量[J].医药导报,2014(12):1636-1638.
- [8] 权勤波,李启红.HPLC法测定银翘解毒丸中绿原酸和牛蒡苷的含量[J].中国药师,2013(10):1510-1512.
- [9] 黄晓龙.含量测定分析方法验证的可接受标准简介[M].北京:国家食品药品监督管理局药品审评中心.2006.