

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.03.05

高效液相色谱法测定麻杏石甘颗粒中盐酸麻黄碱含量

米彦飞,侯丽丽,武晋孝,郭 禹

(山西省畜牧产品质量安全检验监测中心,太原 030027)

[收稿日期] 2019-11-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 03-0026-06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 为完善麻杏石甘颗粒质量标准,采用高液相色谱法对麻杏石甘颗粒中盐酸麻黄碱的含量测定进行研究。采用 Thermo scientific BDS C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(含 0.1% 三乙胺)(3:97),检测波长 207 nm,流速 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。结果表明,盐酸麻黄碱进样浓度在 5~60 μg/mL 范围内,峰面积与盐酸麻黄碱含量呈良好线性关系($R^2 = 0.9999$)。样品平均回收率为 96.62% ($n=6$), RSD 为 1.30%。本方法简便、准确度高、重复性好、耐用性强,为进一步提高该制剂的质量标准,保证临床效果,提供了检测依据。

[关键词] 高效液相色谱法;麻杏石甘颗粒;盐酸麻黄碱

Determination of Ephedrine Hydrochloride in Maxingshigan Granules by HPLC

MI Yan-fei, HOU Li-li, WU Jin-xiao, GUO Yu

(Shanxi Animal Husbandry Product Quality Safety Inspection and Monitoring Center, Taiyuan 030027, China)

Abstract: In order to improve the quality standard of maxingshigan granules, the content of ephedrine hydrochloride in maxingshigan granules was determined by high liquid chromatography. Thermo scientific BDS C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (containing 0.1% triethylamine) (3:97), the detection wavelength was 207 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the sample volume was 10 μL. The results showed that the injection concentration of ephedrine hydrochloride was within the range of 5~60 μg/mL, the peak area had a good linear relationship with the content of ephedrine hydrochloride ($R^2 = 0.9999$). The average recovery was 96.62% ($n=6$), and the RSD was 1.30%. This method is simple, accurate repeatable, and strong durability, which provides a basis for further controlling the quality standard of maxingshigan granules.

Key words: HPLC; maxingshigan granules; ephedrine hydrochloride

麻杏石甘颗粒收载于《兽药质量标准》2017 年版中药卷,处方由麻黄、苦杏仁、石膏、甘草组成,具有清热化痰、止咳平喘功能,主治肺热咳嗽^[1],处方

中麻黄为君药。麻黄为麻黄科植物草麻黄(*Esinica*)、木贼麻黄(*E. equisetina*)或中麻黄(*E. intemedia*)的干燥草质茎^[2]。盐酸麻黄碱是中

药麻黄的主要成分,具有解热、抗过敏、兴奋中枢神经与松弛支气管平滑肌等多种有效药理作用^[3],属于国家规定严格管控的药物^[4],使用不当可产生多种毒副作用^[5]。盐酸麻黄碱有多种检测方法,如分光光度法、毛细管电泳法、气相色谱法、液相色谱法、电位测定法等^[6],但未有专门针对麻杏石甘颗粒中盐酸麻黄碱的定量检测方法。《兽药质量标准》中麻杏石甘颗粒项下仅有薄层色谱鉴别标准,未有盐酸麻黄碱的含量测定项。为进一步提高麻杏石甘颗粒质量标准,保证临床效果,减少毒副作用,本试验对高效液相色谱测定麻杏石甘颗粒中盐酸麻黄碱含量方法进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 Agilent1260 高效液相色谱系统,紫外检测器/G1314,原装色谱工作站,四元梯度泵/G1311C,自动进样器/G1329B,柱温箱/G1316A,购于安捷伦科技有限公司。TB-215D 型电子天平,购于美国丹佛公司。

1.2 材料与试剂 盐酸麻黄碱对照品,批号 171241-201508,纯度 99.8%,购自中国兽医药品监察所。麻杏石甘颗粒(批号 201805001),100 g/袋,保定冀中药业有限公司制样。阴性样(缺麻黄的麻杏石甘颗粒)(批号 201805001),100 g/袋,保定冀中药业有限公司制样。乙腈为色谱级,磷酸、三乙胺、盐酸为分析纯,水为超纯水。

1.3 色谱条件 色谱柱:Thermo scientific BDS C18 (5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(含 0.1%三乙胺)(3:97, V/V);紫外检测器:检测波长 207 nm;流速:1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。

1.4 溶液的制备

1.4.1 对照品溶液 准确称取盐酸麻黄碱对照品适量,加流动相溶液稀释,制得 120 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸麻黄碱对照品溶液,摇匀。将所得溶液用流动相按比例稀释,制得 60、40、20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸麻黄碱对照品溶液,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过。

1.4.2 供试品溶液 准确称取麻杏石甘颗粒样品 1.0 g(精确至 0.01 g),置 50 mL 量瓶中,加水 3 mL

微温使溶解,加浓氨溶液 1 mL,加三氯甲烷定容至刻度,精密称重,超声 20 min,放冷,用三氯甲烷补足减失的重量,振摇,过滤,取续滤液 25 mL,加入 5% 盐酸乙醇溶液 4 mL,水浴蒸干,残渣加流动相溶液溶解,定容至 25 mL 容量瓶,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过,即得。

1.4.3 阴性样品溶液 准确称取不含麻黄的麻杏石甘颗粒阴性样品 1.0 g(精确至 0.01 g),按 1.3.2 项方法制备,即得。

1.4.4 阳性添加样品溶液 准确称取不含麻黄的麻杏石甘颗粒阴性样品 1.0 g(精确至 0.01 g),精密加入盐酸麻黄碱对照品,按 1.4.2 项方法制备,即得。重复制备 6 份。

2 结果与分析

2.1 色谱图与阴性干扰试验 精密量取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL ,分别注入高效液相色谱仪,记录色谱图。结果显示,盐酸麻黄碱与相邻峰达到基线分离,分离度达到 4.22,盐酸麻黄碱峰保留时间为 19.5 min,理论板数为 22381,峰面积为 183.1,峰宽 0.30 min。阴性样品在与对照品色谱峰相应位置上,无吸收峰。综上所述,本方法色谱图满足试验要求,前处理方法可有效去除制剂中干扰杂质(图 1)。

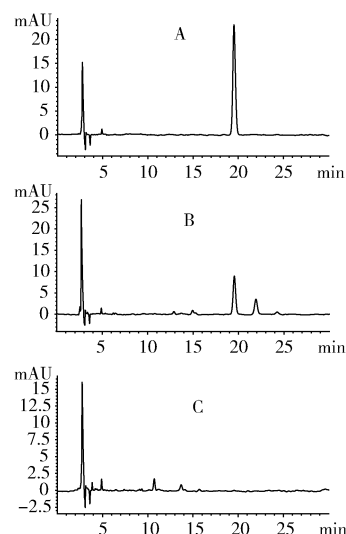


图 1 HPLC 色谱图(A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品)

Fig 1 HPLC chromatogram(A. reference substance; B. test sample; C. negative sample)

2.2 溶液稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 10 μL,记录色谱图和盐酸麻黄碱峰面积。结果显示,12 h 内供试品峰面积相对标准偏差 *RSD* 为 1.60%,样品溶液在 12 h 内稳定(表 1)。

表 1 溶液稳定性试验数据表

Tab 1 Solution stability test data table							
时间/h							
	0	2	4	6	8	10	12
峰面积	148.4	146.8	153.4	146.8	149.5	151.2	150.6
平均值	149.54						
<i>RSD</i>	1.60%						

2.3 线性关系试验 分别取 1.4.1 项 60、40、20、10、5 μg/mL 对照品溶液,进样 10 μL。以峰面积为纵坐标,盐酸麻黄碱含量(*X* - mg/mL)为横坐标作线性回归,回归方程为: $y = 23.659x + 8.0002$, $R^2 = 0.9999$ 。结果表明,盐酸麻黄碱在 5 ~ 60 μg/mL 范围内,峰面积与盐酸麻黄碱含量呈良好的线性关系(图 2)。

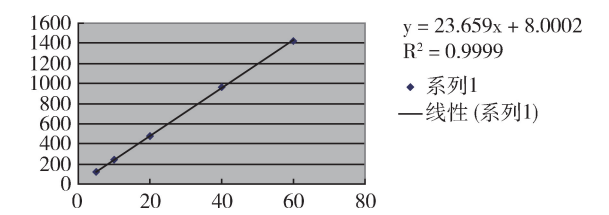


图 2 盐酸麻黄碱线性关系图

Fig 2 Linear relation diagram of ephedrine hydrochloride

2.4 精密度试验 取 20 μg/mL 浓度对照品溶液,进样 10 μL,连续进样 6 次。以峰面积计算,盐酸麻黄碱相对标准偏差 *RSD* 为 0.70%,表明精密度良好,符合检测要求(表 2)。

表 2 精密度试验数据表

Tab 2 Precision test data table						
次数						
	1	2	3	4	5	6
峰面积	477.6	486.4	483.2	486.0	480.3	483.0
平均值	482.75					
<i>RSD</i>	0.70%					

2.5 重复性试验 对同一批供试品按 1.4.2 项方法,重复配制 6 份供试品溶液,注入色谱仪,进样 10 μL。结果表明,6 份样品相对标准偏差 *RSD* 为 1.20%,重复性符合检测要求(表 3)。

表 3 重复性试验数据表

Tab 3 Repeatable test data table						
供试品						
	1	2	3	4	5	6
峰面积	143.7	139.3	142.0	140.7	140.3	139.4
平均值	140.90					
<i>RSD</i>	1.20%					

2.6 加样回收率试验 分别取 1.4.4 项 6 份阳性添加样品溶液注入色谱仪,各进样 10 μL,记录色谱图,计算加样回收率。回收率 = 加对照品后测得的含量/实际所加对照品量 × 100%。结果表明,盐酸麻黄碱的平均回收率为 96.62% ($n = 6$),*RSD* 为 1.30%,回收率试验符合检测要求(表 4)。

表 4 加样回收率试验结果

Tab 4 Sample recovery test results						
样品号						
	1	2	3	4	5	6
加入对照品的量 B/mg	0.317	0.311	0.318	0.308	0.315	0.319
测定量 C/mg	0.300	0.304	0.310	0.301	0.302	0.307
回收率/%	94.64%	97.75%	97.48%	97.73%	95.87%	96.23%
平均回收率/%	96.62%					
<i>RSD</i>	1.30%					

2.7 样品含量测定 为了充分考虑不同批次产品的含量差异,以制定出切实可行的该制剂含量标准限度。使用本方法对市售麻杏石甘颗粒、新注册麻杏石甘颗粒和自制样(保定冀中药业有限公司制样)盐酸麻黄碱含量进行测定。结果显示(表 5),样品中盐酸麻黄碱最低含量为 0.31 mg/g,最高含

量为 1.07 mg/g,平均含量为 0.58 mg/g。根据 13 批样品检测结果,综合考虑确保安全、有效、质量可控,建议本品的含量限度制定为:本制剂每 1 g 含麻黄以盐酸麻黄碱($C_{10}H_{15}NO \cdot HCl$)计,不得少于 0.35 mg。

表 5 麻杏石甘颗粒中盐酸麻黄碱含量测定结果表
Tab 5 Table of content determination of ephedrine hydrochloride in maxingshigan granules

编号	生产厂家	样品批号	样 1 峰面积	样 2 峰面积	平均峰面积	含量/(mg · g ⁻¹)
001	山东明发兽药股份	18051501	718.8	719.7	719.3	0.74
002	山东圣旺药业	/	536.3	550.4	543.4	0.56
003	江西中成药业集团	2018042301	448.9	444.1	446.5	0.46
004	安徽天安生物科技股份	20170610	414.1	429.1	421.6	0.43
005	四川新辉煌动物药业	20170902	441.2	428.6	434.9	0.45
006	江西博莱大药厂	/	777.3	769.7	773.5	0.80
007	广东广牧动物保健品	20180401	581.3	615.3	598.3	0.61
008	山东信得科技股份	201805021	783.6	783.1	783.4	0.81
009	江西省特邦动物药业	20180503	382.5	400.1	391.3	0.40
010	保定冀中药业	201704004	298.6	301.4	279.5	0.31
011	江西中成中药原料	1800101	419.9	415.7	417.8	0.43
012	青岛明星制药	180120	1036.3	1047.8	1042.0	1.07
013	山东圣旺药业	20171021	486.4	498.3	492.4	0.51

3 讨论与结论

3.1 前处理方法的选择 盐酸麻黄碱的提取方法主要分为两类,第一类方法是考虑到盐酸麻黄碱可溶于水、乙醇的特点,直接使用超纯水超声提取^[7-8]、流动相超声提取^[9]、醇提取^[10]等,此类方法简单快捷,缺点是干扰杂质较多。第二类方法是在第一类方法基础上增加有机相萃取操作,如乙醚萃取^[11]、二氯甲烷萃取^[12]等。本试验从提高回收率、减少杂质干扰、方法简单可操作性三个方面对前处理方法进行考察。由于麻杏石甘颗粒制剂成分复杂,使用第一类方法色谱图上杂质峰过多,无法满足检测要求,增加萃取步骤后则可显著减少杂质峰。综合对比,本试验前处理方法为最优选择。

3.2 流动相的选择 高效液相色谱法测定盐酸麻黄碱含量的流动相主要有甲醇-磷酸系列^[13]、乙

腈-磷酸系列^[14]以及甲醇-乙腈-磷酸系列^[15]等。由于甲醇在 210 nm 的末端波长处有少量紫外吸收,使用乙腈替换甲醇,基线更加平稳^[9,16],因此,主要考察乙腈-磷酸系列流动相。试验发现乙腈和 0.1% 磷酸溶液(含 0.1% 三乙胺)比例在 1:99 至 5:95 范围内,均能实现盐酸麻黄碱的良好分离。

3.3 色谱柱的选择 《中国药典》2010 年版(一部)和《中国兽药典》2015 年版(二部)麻黄项下对盐酸麻黄碱的测定中均使用了极性乙醚连接苯基键合硅胶柱,该色谱柱价格较贵,使用率不高,未采纳。本实验分别采用 Synchroni AQC18(5 μm,4.6 × 150 mm)、Agilent XDB C18(5 μm,4.6 × 250 mm)和 Thermo scientific BDS C18(5 μm,4.6 × 250 mm)三种不同的色谱柱进行测定,均能有效分离目标成分。经峰形、峰拖尾、分离度、稳定性等各方面比较

后, Thermo scientific BDS C18(5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm) 色谱柱效果最好。

本研究所建立高效液相色谱法测定麻杏石甘颗粒中盐酸麻黄碱含量的方法, 经过方法学验证, 简便、准确度高、重复性好、耐用性强, 适用于麻杏石甘颗粒中盐酸麻黄碱含量的测定, 为麻杏石甘颗粒质量控制提供了科学依据。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准 2017 年版(中药卷)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 266–267.

China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary drug quality standards 2017 edition (Traditional Chinese medicine volume) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 266–267.

[2] 中国科学院植物研究所. 中国植物志(7 卷)[M]. 北京: 北京科学出版社, 1979: 468.

Institute of botany, Chinese Academy of Sciences. Flora of China (volume 7) [M]. Beijing: Beijing science press, 1979: 468.

[3] Moamen S. Refat, Omar B. Ibrahim a, Hosam A. Saad, *et al.* Usefulness of charge–transfer complexation for the assessment of sympathomimetic drugs: Spectroscopic properties of drug ephedrine hydrochloride complexed with some p–acceptors[J]. Journal of Molecular Structure, 2014, 1064: 58–69.

[4] 邱燕. HPLC 测定防风通圣颗粒中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量[J]. 海峡药学, 2018, 30(1): 75–77.

Qiu Y. Determination of Ephedrine Hydrochloride and Pseudoephedrine Hydrochloride in Fang Feng Tong Sheng Granules by HPLC[J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2018, 30(1): 75–77.

[5] 丁丽丽, 施松善, 崔健, 等. 麻黄化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1661–1664.

Ding L L, Shi S S, Cui J, *et al.* Advances in the study of chemical constituents and pharmacological effects of Ephedra [J]. China Journal of Chinese Material Medica, 2006, 31(20): 1661–1664.

[6] N. T. Abdel–Ghani, M. S. Rizk a, M. Mostafa. Extractive determination of ephedrine hydrochloride and bromhexine hydrochloride in pure solutions, pharmaceutical dosage form and urine samples[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013, 111: 131–141.

[7] 国家食品药品监督管理总局. 小儿麻甘颗粒[J]. 中国药品标准, 2016, 17(5): 383–384.

China Food and Drug Administration. Magan granules for children [J]. Chinese drug standards, 2016, 17(5): 383–384.

[8] 李霞, 李继, 戴涌, 等. 高效液相色谱法测定复方甘草麻黄碱片中盐酸麻黄碱含量[J]. 中国药业, 2015, 24(1): 43–44.

Li X, Li J, Dai Y, *et al.* Determination of Content of Ephedrine Hydrochloride in Compound Glycyrrhiza Ephedrine Tablets by RP–HPLC[J]. China Pharmaceuticals, 2015, 24(1): 43–44.

[9] 章安源, 李有志, 张传津, 等. HPLC 法同时测定麻杏石甘口服液液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱及苦杏仁苷含量[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(10): 72–77.

Zhang A Y, Li Y Z, Zhang C J, *et al.* Determination of Ephedrine Hydrochloride and Pseudoephedrine Hydrochloride and Amygdalin in Maxingshigan Oral Liquid by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(10): 72–77.

[10] 张敏新, 黄爱文, 宋洪涛. 高效液相色谱法测定麻杏口服液液中盐酸麻黄碱及盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(5): 445–447.

Zhang M X, Huang A W, Song H T. Determination of Ephedrine hydrochloride and Pseudoephedrine hydrochloride in Maxingshigan Oral Liquid by HPLC[J]. Journal of pharmaceutical practice, 2015, 33(5): 445–447.

[11] 张新军, 梁瑞雪, 周胜红, 等. HPLC 法测定荆桔抗感合剂中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 药学研究, 2016, 35(4): 209–211.

Zhang X J, Liang R X, Zhong S H, *et al.* Determination of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in JingjieKanggan Mixture by HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 35(4): 209–211.

[12] 郝哲, 王丽军, 张建帮. HPLC 杏抗感颗粒中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(4): 355–357.

Hao Z, Wang L J, Zhang J B. HPLC method was used to determine the contents of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in Maxingkanggan granules [J]. Journal of pharmaceutical practice, 2018, 36(4): 355–357.

[13] 师晶, 唐景玲, 纪宏宇, 等. HPLC 法测定麻黄水煎液中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(2): 223–225.

Shi J, Tang J L, Ji H Y, *et al.* HPLC method was used to determine ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in ephedrine decoction [J]. The Chinese medicine, 2013, 16(2): 223–225.

[14] 钟李青, 丁少波, 梁淑贞, 等. 试析高效液相色谱法测定止咳

平喘类药中盐酸麻黄碱的含量[J]. 北方药学, 2017, 14(4): 3 - 4.

Zhong L Q, Ding S B, Liang S Z, *et al.* Determination of ephedrine hydrochloride in cough and asthma drugs by HPLC[J]. Journal of North Pharmacy, 2017, 14(4): 3 - 4.

[15] 田 杰, 王仲艳, 宁 娱, 等. 高效液相色谱法测定“强力五虎合剂”中苦杏仁苷和盐酸麻黄碱的含量[J]. 宁夏医学杂志, 2016, 38(4): 332 - 334.

Tian J, Wang Z Y, Ning Y, *et al.* Determination of strength tigers Mixture amygdalin and ephedrine hydrochloride HPLC[J]. Ningxia Medicine Journey, 2016, 38(4): 332 - 334.

[16] 陈繁华, 曾玉梅. 对《中国药典》麻黄含量测定方法的改进[J]. 今日药学, 2016, 26(2): 110 - 112.

Chen F H, Zen Y M, Improvement of determination method of Ephedra in Chinese Pharmacopoeia [J]. Pharmacy Today, 2016, 26(2): 110 - 112.

(编 辑:侯向辉)