

毛细管电泳法测定千柏鼻炎片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱的含量

丁佳佳, 李征征, 宋粉云*
(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立测定千柏鼻炎片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱含量的毛细管电泳法。方法: 采用未涂层弹性融硅石英毛细管柱(67 cm × 75 μm, 有效长度 60 cm), 以 130 mmol·L⁻¹ Tris-HCl-60% (体积分数) 甲醇 (pH 9.27) 为运行缓冲液, 分离电压 20 kV, 重力进样 10 s (高度 15 cm), 检测波长 210 nm。以盐酸氯丙那林为内标。结果: 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱浓度分别在 42.9 ~ 92.4, 2.4 ~ 57.6, 1.65 ~ 26.4 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 3 种有效成分的平均加样回收率依次为 99.7%, 98.4%, 95.6%, 方法精密度 RSD 依次为 2.70%, 2.76%, 2.52% (n = 6)。结论: 方法简便、快速, 结果准确可靠, 可用于千柏鼻炎片中的质量控制。

[关键词] 毛细管电泳法; 千柏鼻炎片; 盐酸麻黄碱; 盐酸伪麻黄碱; 盐酸甲基麻黄碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0120-04

Determination of Ephedrine Hydrochloride, Pseudoephedrine Hydrochloride and Methylephedrine Hydrochloride in Qianbai Biyan Tablet by CE

DING Jia-jia, LI Zheng-zheng, SONG Fen-yun*
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for determination of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and methylephedrine hydrochloride in Qianbai Biyan Pian by capillary electrophoresis. **Method:** The separation was performed on a fused silica capillary of 67 cm × 75 μm (60 cm of effective length). 130 mmol·L⁻¹ Tris-HCl-60% CH₃OH (pH 9.27) was selected as the running buffer. The separation voltage was 20 kV. The samples was injected by gravity (10 s, 15 cm). The detection wavelength was 210 nm. **Result:** The linear range of determination for ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and methylephedrine hydrochloride were 42.9-92.4, 2.4-57.6, 1.65-26.4 mg·L⁻¹. The average recoveries were 99.7%, 98.4%, 95.6%, precisions of the method were 2.70%, 2.76% and 2.52% (RSD, n = 6).

Conclusion: The method is convenient, rapid, accurate for the quality control of Qianbai Biyan Pian.

[Key words] capillary electrophoresis (CE); Qianbai Biyan tablet; ephedrine hydrochloride; pseudoephedrine hydrochloride; methylephedrine hydrochloride

千柏鼻炎片是由千里光、卷柏、麻黄、羌活等 7 味中药制成的中药成方制剂, 具有清热解毒、活血祛

风、宣肺通窍之功效。其现行质量标准未收载含量测定^[1]。目前文献报道千柏鼻炎片中有效成分的含量测定主要包括大黄酚^[2]、穗花杉双黄酮^[3]、盐酸麻黄碱^[4]、槲皮素^[5]、对羟基桂皮酸和金丝桃苷^[6]。麻黄为方中主药, 具有止嗽、定喘、祛痰的功效, 而盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、和盐酸甲基麻黄碱为其主要活性成分^[7]。麻黄及其制剂中生物碱的含量测定, 文献报道的有 HPLC^[1,8-9]、TLC^[10]法和 CE^[11-16]法。本文采用 CE 法同时测定千柏鼻炎片中

[收稿日期] 20111115(013)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(5002841)

[第一作者] 丁佳佳, 硕士研究生, 从事现代仪器分析技术在药物分析中的应用, Tel: 13719474771, E-mail: dingjiajia0720@126.com

[通讯作者] * 宋粉云, 教授, 从事药物分析的教学和科研工作, Tel: 13660528126, E-mail: fuhaiwu@163.com

盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱 3 种成分的含量,为更好的控制该制剂的质量提供新的依据。

1 仪器和试剂

CL1030 型高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司),K-2501 紫外-可见检测器(德国 KNAUER 公司),HW-2000 型色谱工作站 2.17 版(南京千谱软件有限公司),ORION MODEL 828 型 pH 计(美国),KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司工作频率 $4.5 \text{ KHz} \pm 5\%$,输出功率 400 W),未涂层弹性融硅石英毛细管柱(河北锐年永洋色谱器件有限公司)。

盐酸甲基麻黄碱对照品(购自 Sigma 公司,含量 98.8%),盐酸麻黄碱对照品(批号 171241-200506)、盐酸伪麻黄碱对照品(批号 171237-200304)和盐酸氯丙那林对照品(批号 100220-200802)购自中国药品生物制品检定所。千柏鼻炎片(广州奇星药业有限公司,批号 9069,0049,0057,规格 0.44 g/片);甲醇为色谱纯,三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸均为分析纯,水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 内标贮备液 精密称取盐酸氯丙那林对照品一定量,加甲醇制成 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标贮备液。

2.1.2 对照品溶液 分别精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱对照品各适量,加甲醇制成盐酸麻黄碱质量浓度为 $330 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、盐酸伪麻黄碱质量浓度为 $240 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、盐酸甲基麻黄碱质量浓度为 $330 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品贮备液。

2.1.3 供试品溶液 取本品 20 片,研细,取约 3 g ,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl-甲醇(1:99)25 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密移取续滤液 8.5 mL 至 10 mL 量瓶中,精密加入内标贮备液 1 mL ,摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,作为供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液 取处方组成中除麻黄外的其余成分,制成不含麻黄的阴性样品,按 2.1.3 项下的方法制成阴性对照溶液。

2.1.5 运行缓冲液 精密称取 Tris 适量,置 250 mL 量瓶中,加入 150 mL 甲醇,再加水稀释至刻度,用盐酸调 pH 至 9.27,制成 $130 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl-60% (体积分数) 甲醇(pH 9.27) 溶液, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,作为运行缓冲液。

2.2 色谱条件 采用未涂层弹性融硅石英毛细管柱($67 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$,有效长度 60 cm);以 $130 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl-60% (体积分数) 甲醇(pH 9.27) 为运行缓冲液,分离电压 20 kV ,重力进样 10 s (高度 15 cm),检测波长 210 nm ,温度室温,湿度 $<70\%$,毛细管柱在使用前依次用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液、双蒸水各冲洗 5 min ,再用运行缓冲液冲洗 5 min ,样品分析间隔用运行缓冲液平衡 2 min ,运行每 3 h 更换一次缓冲液。在此条件下,对照品、供试品、阴性对照色谱图如图 1 所示。

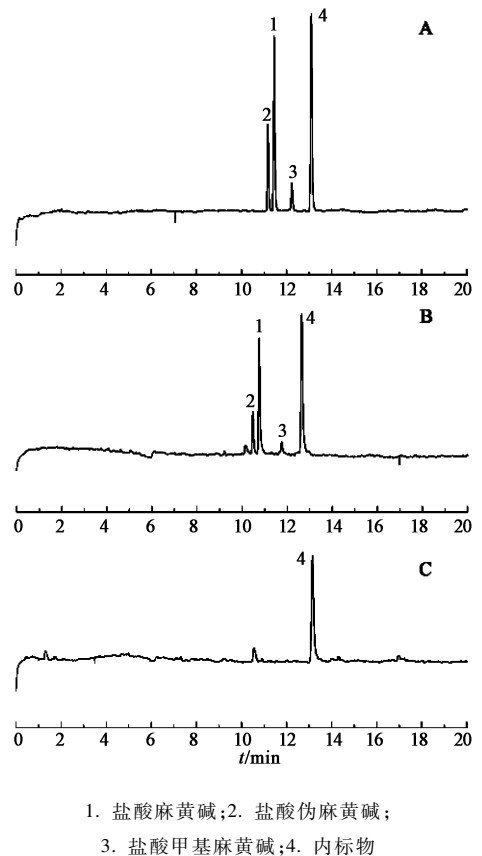


图 1 千柏鼻炎片中对照品、样品、阴性对照液的毛细管电泳色谱

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别吸取一定量的对照品贮备液,加甲醇稀释成盐酸麻黄碱质量浓度为 $42.9, 52.8, 62.7, 72.6, 82.5, 92.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 盐酸伪麻黄碱质量浓度为 $2.4, 9.6, 21.6, 33.6, 45.6, 57.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 盐酸甲基麻黄碱质量浓度为 $1.65, 3.3, 6.6, 13.2, 19.8, 26.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和内标溶液质量浓度均为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。依次重力进样 10 s , 每个浓度测定 3 次以上。以对照品与内标物峰面积的比值为纵坐标(Y), 对照品溶液浓度(X)为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y_1 = 0.0127X - 0.0271$ ($r_1 = 0.9985$); $Y_2 = 0.0166X + 0.0069$ ($r_2 = 0.9996$); $Y_3 =$

0.020 6X + 0.002 6 ($r_3 = 0.999 8$)。表明这 3 种成分分别在质量浓度 42.9 ~ 92.4, 2.4 ~ 57.6, 1.65 ~ 26.4 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.3.2 精密度试验 取浓度分别为 72.6, 33.6, 13.2 mg·L⁻¹ 的盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱对照品溶液, 重力进样 10 s, 连续测定 5 次, 记录峰面积并计算 RSD, 结果 3 种成分 Y 的 RSD 分别为 2.12%, 1.77%, 1.93%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取供试品溶液(样品 1), 在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别重力进样 10 s, 记录峰面积并计算 RSD。结果 3 种成分的 RSD 分别为 2.29%, 2.12%, 2.90%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批号样品(批号为 9069)6 份, 按 2.1.3 项下方法提取并测定, 结果千柏鼻炎片中 3 种成分的平均含量依次为 0.656, 0.186, 54.1 μg·g⁻¹, RSD 分别为 2.70%, 2.76%, 2.52%。表明分析方法重复性良好。

2.3.5 加样回收试验 精密称取同一批号样品(批号为 9069)共 6 份, 加入一定量的盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱对照品, 按 2.1.3 项下方法处理并测定, 计算回收率, 结果见表 1 ~ 3。千柏鼻炎片中 3 种有效成分的平均回收率分别为 99.7% (RSD 2.24%), 98.4% (RSD 2.85%), 95.6% (RSD 2.85%)。结果表示方法准确、可靠, 见表 1 ~ 3。

表 1 盐酸麻黄碱回收率试验 (n = 6)

称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.501 8	0.985	0.726	1.716	100.7	99.7	2.24
1.502 8	0.986	0.726	1.708	99.4		
1.500 7	0.984	0.726	1.702	98.9		
1.502 6	0.986	0.726	1.709	99.6		
1.502 4	0.986	0.726	1.686	96.4		
1.502 6	0.986	0.726	1.735	103.2		

2.4 样品测定 取不同质量麻黄组成的千柏鼻炎片样品, 按 2.1.3 项下方法处理后测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算样品中 3 种有效成分的含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 检测波长的选择 经紫外扫描确定, 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和盐酸甲基麻黄碱均在 210 nm 附近有最大吸收, 因此确定测定波长为 210 nm。

表 2 盐酸伪麻黄碱回收率试验 (n = 6)

称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.501 8	0.279	0.288	0.555	95.8	98.4	2.85
1.502 8	0.280	0.288	0.567	99.7		
1.500 7	0.279	0.288	0.558	96.9		
1.502 6	0.279	0.288	0.572	101.7		
1.502 4	0.279	0.288	0.553	95.1		
1.502 6	0.279	0.288	0.570	101.0		

表 3 盐酸甲基麻黄碱回收率试验 (n = 6)

称样量 /g	样品中含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.501 8	81.2	66.0	143.4	94.2	95.6	2.85
1.502 8	81.3	66.0	146.2	98.3		
1.500 7	81.2	66.0	141.3	91.1		
1.502 6	81.3	66.0	144.0	95.0		
1.502 4	81.3	66.0	145.2	96.8		
1.502 6	81.3	66.0	146.0	98.0		

表 4 千柏鼻炎片样品中 3 种成分测定 (n = 3)

样品批号	盐酸麻黄碱含量 / (mg/片)	RSD /%	盐酸伪麻黄碱含量 / (mg/片)	RSD /%	盐酸甲基麻黄碱含量 / (μg/片)	RSD /%
9069	0.287	2.70	0.081	2.74	23.6	2.51
0049	0.188	1.72	0.080	1.81	22.6	2.61
0057	0.265	1.23	0.106	2.67	26.1	2.15

3.2 供试品的提取 本实验对提取试剂、提取时间分别进行了考察。同时考察了氨水、甲醇、盐酸-甲醇、盐酸-乙醇作为提取试剂, 结果以 1 mol·L⁻¹ HCl-甲醇 (1:99) 的提取效果最佳。同时考查了超声提取时间 (20, 30, 40 min), 结果显示, 提取时间越长, 提取效率越高, 但提取时间为 30, 40 min 时的效果相差不大, 综合考虑, 选取超声提取时间为 30 min。

3.3 内标物的选择 为克服毛细管电泳重复性差的缺点, 本文采用内标法定量。在选择内标时, 需要考虑在检测波长中较大的吸收, 本实验采用盐酸氯丙那林为内标, 出峰时间与待测成分出峰时间接近, 分离完全, 且峰形较好, 在样品中无干扰, 因此选择盐酸氯丙那林为内标物。

3.4 电泳条件的选择 本实验在文献 [12-17] 基础

上分别考察了醋酸铵溶液,磷酸氢二钠,Tris-柠檬酸,Tris-HCl等碱性缓冲体系与不同体积分数甲醇组合,结果显示 Tris-HCl 溶液分离效果较好。考察不同浓度的(50~190 mmol·L⁻¹)Tris对样品中各组分分离的影响,实验结果发现 130 mmol·L⁻¹分离度最好。同时在缓冲液中加入有机添加剂可以提高选择性,增大分离度,减少电导率,降低电渗流的速度,从而减少焦耳热的产生,提高信噪比,改善峰型。本实验考察了0,20%,40%,60%,80%体积分数的甲醇,发现当添加甲醇时分离度增大,随着甲醇体积分数增加峰型得到改善但出峰时间延迟,而且本实验所选的内标盐酸氯丙那林在甲醇体积分数<60%时与盐酸甲基麻黄碱没有完全分开。因此综合考虑选择甲醇的体积分数为60%。

在缓冲溶液确定为 130 mmol·L⁻¹ Tris + 60% 甲醇(体积分数)时,pH对分离效果影响很大,用浓盐酸调pH。选择8,9,10,11进行测定,发现随着pH的增加,两峰分离度先增大后减小,迁移时间逐渐增加,在pH10左右分离度最大。进而在pH10附近选取若干个点进行pH筛选,发现在pH9.2~9.3,峰形较好,分离度最佳。参考文献[15]测定麻黄碱和伪麻黄碱的pH范围一般为8.90~9.27,因此本实验确定缓冲液的pH为9.27。

随着工作电压的提高,分离度下降,根据电压与电流的线性关系,综合灵敏度,分离度和焦耳热,最终选择20 kV作为最佳工作电压。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:300,471.
 [2] 张华,何世新,郭娅. HPLC测定千柏鼻炎片中大黄酚的含量[J]. 西北药学杂志,2008,23(1):6.
 [3] 刘海青. HPLC测定千柏鼻炎片中穗花杉黄酮的含量[J]. 中国药学杂志,2008,39(7):555.
 [4] 张丽军,董红奎. HPLC法测定千柏鼻炎片中盐酸麻

- 黄碱的含量[J]. 黑龙江医药,2004,17(3):172.
 [5] 柳俊萍,顾为民. 高效液相色谱法测定千柏鼻炎片中槲皮素的含量[J]. 医药导报,2009,28(6):787.
 [6] 谭道鹏,桂新,王峥涛. HPLC测定千柏鼻炎片中对羟基桂皮酸和金丝桃苷的含量[J]. 中国现代应用药学,2010,27(6):532.
 [7] 周玲,吴德康,唐于平,等. 麻黄中化学成分研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2008,24(1):71.
 [8] 林凯,范琦,杨成钢,等. RP-HPLC法测定麻黄中麻黄碱、伪麻黄碱和甲基麻黄碱[J]. 中草药,2006,37(2):282.
 [9] 陈莹,夏炎,韩骁,等. HPLC法同时测定麻黄中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱及盐酸甲基麻黄碱的含量[J]. 食品工业科技,2008,29(12):243.
 [10] 夏伦祝,徐先祥. 薄层扫描法测定化痰降气胶囊中盐酸麻黄碱含量[J]. 安徽医药,2007,11(5):413.
 [11] 陈勇川,董慧. 高效毛细管电泳法测定麻附胶囊中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中成药,1999,21(3):117.
 [12] 景浩然,郭怀中,王子君,等. 毛细管区带电泳法测定麻黄及千柏鼻炎片中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中国中药杂志,2009,34(8):980.
 [13] 钱燕娟,梁静,蒋小丰,等. 高效毛细管电泳法测定麻黄汤中3种有效成分的含量[J]. 中国临床药理学杂志,2008,17(6):371.
 [14] 孙国祥,孙丽娜. 毛细管区带电泳法测定麻黄中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中南药学,2009,7(10):773.
 [15] 陈康,林文津,林励. HPCE法测定不同产地麻黄中麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中药材,2005,28(8):664.
 [16] 季一兵,陈玉英,吴如金,等. 麻黄中生物碱类有效成分的非水毛细管电泳含量测定[J]. 中草药,2003,34(12):1127.

[责任编辑 蔡仲德]