

采用高效液相色谱法测定岩白菜素口含片中岩白菜素和马来酸氯苯那敏的含量^{*}

刘 波, 钟关萍, 刘红斌, 汤秀梅, 王京昆
(云南省药物研究所, 云南 昆明 650111)

摘要:建立岩白菜素口含片含量测定方法. 采用高效液相色谱(HPLC)法测定岩白菜素口含片中岩白菜素和马来酸氯苯那敏的含量. 岩白菜素进样量在 0.205 52~10.276 μg ($r=1.000$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 101.29%, RSD=2.45% ($n=9$); 马来酸氯苯那敏进样量在 0.098 8~1.976 μg ($r=0.999\ 98$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率为 100.11%, RSD=0.42% ($n=9$). 本方法简便、快速准确, 可作为岩白菜素口含片含量测定质量控制方法.

关键词:岩白菜素; 马来酸氯苯那敏; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号:O 657.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2009)S1-0313-05

复方岩白菜素片收载于部颁标准化学药品及制剂第一册, 由岩白菜素及扑尔敏配伍组成, 具有镇咳祛痰功效, 主要用于慢性支气管炎. 岩白菜素是从虎耳草科植物红落新妇(*Astilbe chinensis* (Max) Fret Sav) 等的根茎中提取的白色针状结晶, 属于异香豆素类化合物, 又称岩白菜内酯、矮茶素、佛手配质. 岩白菜属多年生草本, 为我国特有种, 分布于陕西、四川. 岩白菜为民间常用药, 最早载于清《分类草药性》, 具有滋补强壮、止血、止咳等功效. 中医和临床广泛用于治疗咳嗽、吐血、便血、肠炎、白带、肿毒等, 外用可治疗疮毒、疥癣. 岩白菜素具有止咳、祛痰作用, 其特点是对咳嗽中枢有选择性抑制作用, 不良反应小, 且连续使用不产生耐药性. 经药理及临床验证: 岩白菜对“咳、痰、喘、炎”四症作用明显, 治疗支气管炎有独到之处, 同时兼有抗病毒、抗炎、解热作用. 不但对伤风感冒引起的咳嗽、咯痰有效, 而且对上呼吸道感染有协同作用, 同时副作用轻微, 长期服用, 未见耐药性及毒性反应. 没有吗啡类中枢性止咳药抑制中枢的副作用. 本文采用高效液相色谱(HPLC)法测定岩白菜素口含片中岩白菜素和马来酸氯苯那敏的含量, 为控

制岩白菜素口含片的质量提供了实验依据.

1 仪器与试剂

1.1 仪器 美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪、带四元泵、紫外检测器、DAD 检测器、自动进样器、在线真空脱气机、智能化柱温箱及 HP 化学工作站. Mettler AE 163 型电子天平、Mettler Toledo AG-285 型电子天平.

1.2 试剂 岩白菜素口含片样品为云南省药物研究所天然药物制剂研究室提供. 岩白菜素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 1532-200202), 马来酸氯苯那敏对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100047-200305). 流动相甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 水为超纯水.

2 方法与结果

2.1 岩白菜素含量测定

2.1.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 甲醇-水(体积比 20:80)为流动相, 检测波长为 275 nm, 柱温为 20℃, 流速为每分钟 1 mL, 理论板数按岩白菜素色谱峰计算, 应不低于 3 000.

^{*} 收稿日期: 2009-03-05

基金项目: 云南省科技厅新药研发专项项目资助(2005XY02).

作者简介: 刘 波(1963-)女, 云南人, 高级工程师, 主要从事药品分析、制剂方面的研究.

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取在 60 °C 减压干燥 2 h 的岩白菜素对照品适量,加 20 % 甲醇溶解并稀释成含岩白菜素 0.2 mg/mL 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片,精密称定,研细,精密称取约 250 mg,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇约 30 mL,超声使溶解,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 2 mL,置 25 mL 容量瓶中,加 20 % 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 系统适用性实验 按样品含量测定项下的色谱条件,分别取对照品溶液、供试品溶液,以及不含岩白菜素的阴性样品溶液 10 μ L 分别进样分析。被测组分分离效果较好(见图 1),所用溶剂和辅料对检测结果无影响。

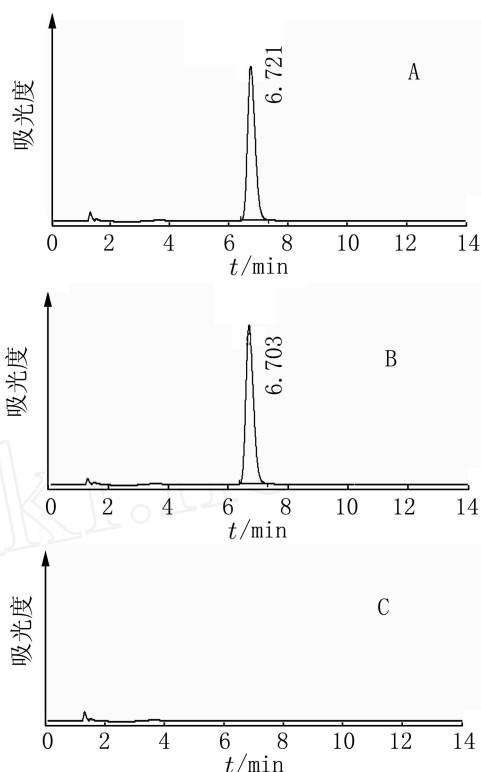
2.1.5 线性关系考察 精密称取在 60 °C 减压干燥 2 h 的岩白菜素对照品 51.38 mg 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得对照品溶液(5.138 mg/mL),精密吸取对照品溶液 1,1,0.6,1,1,1 mL 分别置 5,10,10,25,50,100,250 mL 的容量瓶中,用 20 % 的甲醇定容至刻度,摇匀。精密吸取 10 μ L,分别进样,记录峰面积,以质量浓度(X)对峰面积(Y)进行线性回归,得回归方程及线性相关系数 R : $Y = 13\,561 - 4.6504X$, $r = 1.0$ 。结果表明,在上述色谱条件下,岩白菜素在 0.205 52 ~ 10.276 μ g 范围内,岩白菜素进样量与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.1.6 精密度试验 分别精密吸取质量浓度为 0.205 52 mg/mL 的对照品溶液 10 μ L,重复进样 8 次,测定,结果峰面积 RSD 为 0.19 %。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品 6 份,按供试品溶液制备,并分别测定岩白菜素含量,结果岩白菜素含量的 RSD 为 0.68 %。

2.1.8 稳定性试验 取质量浓度为 0.410 08 mg/mL 样品溶液考察 24 h,结果岩白菜素含量的 RSD 为 0.24 %,无显著性变化,溶液较为稳定,表明岩白菜素在 24 h 内基本稳定。

2.1.9 加样回收率试验 准确称取已知含量的复方岩白菜素口含片样品 9 份于 50 mL 容量瓶中,每份约 125 mg,再加入质量浓度为 12.674 mg/mL 的岩白菜素对照品溶液 4,4,4,5,5,5,6,6 mL 和 6 mL。加入甲醇溶液稀释至刻度,滤过,取续滤液 2 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 20 % 的甲醇溶液,稀释至刻度。照上述色谱条件测定,结果平均回收率为 101.29 %,RSD 为 2.45 %,结果见表 1。



A. 对照品溶液;B. 供试品溶液;C. 阴性样品溶液

图 1 岩白菜素高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC of bergenin

2.2 马来酸氯苯那敏含量测定

2.2.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相为甲醇 - 0.4 % 磷酸二元流动相做梯度洗脱,梯度为 0 min,甲醇 - 磷酸(体积比 40:60),22 min,甲醇 - 磷酸(体积比 60:40),流速为每分钟 1 mL,检测波长为 264 nm,柱温为室温,理论板数按岩白菜素色谱峰计算,应不低于 3 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 取马来酸氯苯那敏对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释成含马来酸氯苯那敏 0.1 mg/mL 的溶液,即得。

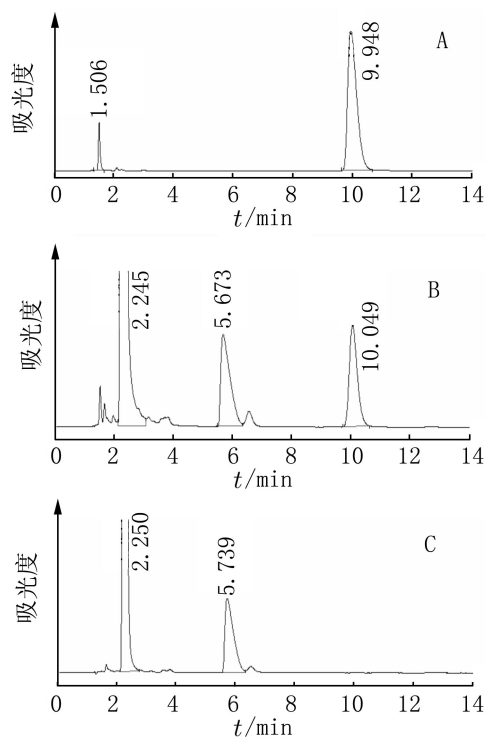
2.2.3 供试品溶液的制备 取本品 20 片,研细,精密称取约 0.25 g (约相当于马来酸氯苯那敏 2 mg),置 25 mL 容量瓶中,加流动相约 20 mL,振摇使溶解,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 系统适用性实验 按样品含量测定项下的色谱条件,分别取对照品溶液、供试品溶液,以及不含马来酸氯苯那敏的阴性样品溶液 10 μ L 进样分析,被测组分分离效果较好(见图 2),所用溶剂和辅料对检测结果无影响。

表 1 岩白菜素回收率测定结果

Tab. 1 The recovery of bergenin

样品 编号	样品中岩白菜素/ mg	加岩白菜素 标准品量/ mg	测得值/ mg	回收率/ %	平均值/ %	相对标准 偏差/ %
1 #	62.06	50.70	113.13	100.74		
2 #	63.31	50.70	115.08	102.12		
3 #	64.96	50.70	118.12	104.87		
4 #	63.86	63.37	125.58	97.39		
5 #	64.31	63.37	127.09	99.07	101.29	2.45
6 #	64.06	63.37	128.64	101.91		
7 #	65.01	76.04	143.26	102.90		
8 #	63.86	76.04	142.38	103.25		
9 #	62.56	76.04	137.65	98.75		



A. 对照品溶液;B. 供试品溶液;C. 阴性样品溶液

图 2 马来酸氯苯那敏高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC of chlorpheniramine

2.2.5 线性关系考察 精密称取在 60 ℃ 减压干燥 2 h 的马来酸氯苯那敏对照品 24.70 mg 置 25 mL 容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,

制得对照品溶液(0.988 mg/mL),精密吸取对照品溶液 1,1,2,1,2 mL 分别置 100,50,25,25,10,10 mL 的容量瓶中,用流动相稀释并定容至刻度,摇匀.精密吸取 10 μL,分别进样,记录峰面积,以质量浓度(C)对峰面积(Y)进行线性回归,得回归方程: $Y = 9\,481.32 - 4.27C$,相关系数 r 为 0.999 98.结果表明,在上述色谱条件下,马来酸氯苯那敏在 0.098 8 ~ 1.976 μg 范围内,马来酸氯苯那敏进样量与峰面积积分值呈良好的线性关系.

2.2.6 重复性试验 取同一批复方岩白菜素口含片 20 片,按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按外标法分别测定马来酸氯苯那敏含量,结果马来酸氯苯那敏含量的 RSD 为 0.30 %.

2.2.7 稳定性试验 取马来酸氯苯那敏质量浓度为 9.90 mg/mL 的供试品溶液考察 24 h,结果马来酸氯苯那敏含量的 RSD 为 0.90 %,无显著性变化,溶液较为稳定,表明马来酸氯苯那敏在 24 h 内基本稳定.

2.2.8 加样回收率试验 准确称取已知马来酸氯苯那敏含量的复方岩白菜素口含片样品 9 份于 25 mL 容量瓶中,每份约 125 mg,加入质量浓度为 0.975 mg/mL 的马来酸氯苯那敏对照品溶液 0.8,0.8,0.8,1,1,1,1.2,1.2 mL 和 1.2 mL.加入流动相稀释至刻度,摇匀,过滤.照上述色谱条件测定,计算回收率,结果见表 2.

表 2 马来酸氯苯那敏加样回收率测定结果
Tab. 2 The recovery of chlorpheniramine

样品 编号	样品中马来 酸氯苯那敏/ mg	加入马来酸氯苯 那敏标准品/ mg	测得值/ mg	回收率/ %	回收率 平均值/ %	相对标准 偏差/ %
1 #	0. 949	0. 780	1. 726	99. 62		
2 #	0. 991	0. 780	1. 780	101. 15		
3 #	0. 998	0. 780	1. 779	100. 13		
4 #	0. 944	0. 975	1. 919	100. 00		
5 #	1. 006	0. 975	1. 981	100. 00	100. 11	0. 42
6 #	0. 961	0. 975	1. 937	100. 10		
7 #	0. 947	1. 170	2. 115	99. 83		
8 #	1. 005	1. 170	2. 176	100. 09		
9 #	0. 978	1. 170	2. 149	100. 09		

3 讨 论

3.1 岩白菜素含量测定中流动相的选择 根据相关文献资料,考察的流动相有:甲醇/水(体积比 30 70),甲醇/0.1 %磷酸水溶液(体积比 30 70),甲醇/水/3 %醋酸(体积比 21 45 34),甲醇/乙腈/0.2 %磷酸盐溶液 pH2.5(体积比 24 6 70),甲醇/水(体积比 20 80).通过研究,流动相 5 得到的岩白菜素峰分离度好,达到分析要求.

3.2 岩白菜素含量测定中溶剂的选择 考虑到岩白菜素溶解于甲醇,大部分辅料不溶于甲醇溶液,分别用 70 %甲醇、50 %甲醇、30 %甲醇、25 %甲醇、20 %甲醇定容.经高效液相色谱在同一条件下测定,结果表明,除 70 %甲醇作为溶剂会形成前延峰以外,其余 4 种溶剂对液相色谱结果无明显影响.由于流动相为甲醇/水(体积比 20 80),所以选择 20 %的甲醇作为样品溶剂.

3.3 岩白菜素含量测定中检测波长的确定 用高效液相色谱仪中的二极管阵列检测器检测得到三维图谱,观察到岩白菜素的最大吸收波长为 275 nm,和文献报道一致.确定用 275 nm 作为检测波长.

3.4 马来酸氯苯那敏含量测定中流动相的选择 通过查阅相关研究资料,考察流动相甲醇/乙腈/0.2 %磷酸盐溶液 pH 2.5(体积比 24 6 70),甲醇/0.008 57 mol/L 磷酸二氢钾水溶液 pH 2.5(体积比 40 60),甲醇/水/醋酸(体积比 70 30 2),方法

(2)、(3)得到马来酸氯苯那敏峰形差,改变流动相的比例也不能改善峰形,而方法(1)色谱峰峰形较好.由于酸度对马来酸氯苯那敏峰的保留时间影响显著,所以在方法(1)基础上考察了缓冲盐溶液的浓度和酸度.分别研究了以下条件:甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L 磷酸二氢钾+0.1 %磷酸)(体积比 24 6 70),甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L 磷酸二氢钾+0.1 %磷酸)(体积比 24 6 70);甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L 磷酸二氢钾+0.2 %磷酸)(体积比 24 6 70);甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L 磷酸二氢钾+0.2 %磷酸)(体积比 24 6 70);甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L 磷酸二氢钾+0.3 %磷酸)(体积比 24 6 70).以上条件中,甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L 磷酸二氢钾+0.2 %磷酸)(体积比 24 6 70)作流动相得到的马来酸氯苯那敏峰与前峰分离良好,且保留时间适中.

3.5 马来酸氯苯那敏含量测定中溶剂的选择 由于马来酸氯苯那敏有溶解于水、乙醇的性质,分别用 0.1 %盐酸甲醇溶液、水、甲醇、流动相溶解并稀释至刻度.经高效液相色谱在同一条件下测定,结果表明,用水、流动相做溶剂的峰型较好.

3.6 马来酸氯苯那敏含量测定中检测波长的确定 用高效液相色谱仪中的二极管阵列检测器检测得到三维图谱,观察到马来酸氯苯那敏的最大吸收波长为 264 nm,与文献报道一致.用 264 nm 作为检测波长.

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准(化学药品及制剂) 第一册[M]. 北京:中华人民共和国卫生部药典委员会,1989.
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典二部[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [3] 熊佐章. HPLC 法测定复方岩白菜素片的含量[J]. 基层中药杂志,2002,16(2):11-13.
- [4] 杨怀镜,姚宏春,张全望. HPLC 法测定岩白菜素和复方岩白菜素片的含量[J]. 中国药事,2003,17(3):171-172.
- [5] 王刚,麻兵继. 岩白菜素的研究概况[J]. 安徽中医学院学报,2002,21(6):59-62.
- [6] 杨能英,夏新华. HPLC 法测定小儿止刻颗粒中岩白菜素的含量[J]. 中成药,2003,25(7):591-592.
- [7] 谢旭一,何云珍. 复方抗结核片中岩白菜素含量的高效液相色谱测定法[J]. 中成药,1989,11(5):14-15.
- [8] 葛庆华. 马来酸盐的药物 HPLC 测定中存在的问题[J]. 中国医药工业杂志,1996,27(12):543-544.
- [9] 张晔,毛磊,于文力,等. 高效液相色谱法测定糖浆剂中扑尔敏与伪麻黄碱的含量[J]. 中国药科大学学报,1994,25(1):29-31.
- [10] 张琴,漆晓梅,全红. 高效液相色谱法测定复方扑尔敏片中 4 组分的含量[J]. 山西医科大学学报,1997,28(2):105-106.
- [11] 周嘉秀,魏晓龙,汪建彤. HPLC 法测定复方扑尔敏片中剂各成分的含量[J]. 药学情报通讯,1994,12(1):44-48.
- [12] 崔雄日,李花,金龙水. 高效液相色谱法测定金刚感冒片中咖啡因和扑尔敏的含量[J]. 延边医学院学报,1994,17(2):129-130.

Determination of bergerinum and chlorpheniramine in compound bergerinum tablets by HPLC

LIU Bo, ZHONG Guan-ping, LIU Hong-bin, TANG Xiu-mei, WANG Jing-kun
(Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China)

Abstract: To establish methods for the determination of compound bergerinum tablets. HPLC was adopted in the determination of bergerinum and chlorpheniramine in compound bergerinum tablets. There were good liner relationships between the peak areas and the sample contents injected at the ranges of 0.205 52—10.276 μg ($r = 1.0$) and 0.098 8—1.976 μg ($r = 0.999\ 98$) for bergerinum and chlorpheniramine. The average recovery rates of bergerinum and chlorpheniramine were 101.29%, RSD was 2.45% ($n = 9$) and 100.11%, RSD was 0.42% ($n = 9$). The methods are simple, rapid and accurate. They can be used for quality control of compound bergerinum tablets.

Key words: bergerinum; chlorpheniramine; HPLC; content determination