

HPLC 法同时测定酚氨咖敏片中四种主药成分的含量

苏思尹, 孔凡建, 王晓瑶(玉溪食品药品检验所, 云南 玉溪 653100)

摘要 目的:建立 HPLC 法同时测定酚氨咖敏片中氨基比林、对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏四种有效成分含量的方法。**方法:**采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为磷酸二氢钠-乙腈(80:20)(用磷酸调 pH 值至 2.5), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 280 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μL。结果:对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏平均回收率($n=9$)分别为 99.76%、100.40%、99.46%、99.67%; RSD 分别为 0.9%、0.8%、0.7%、0.4%。对乙酰氨基酚在 12.23 ~ 195.80 μg · mL⁻¹, 氨基比林在 20.40 ~ 163.20 μg · mL⁻¹, 咖啡因在 6.09 ~ 97.44 μg · mL⁻¹, 马来酸氯苯那敏在 5.20 ~ 83.26 μg · mL⁻¹ 浓度范围内呈良好线性关系。测定样品 3 批, 结果对乙酰氨基酚为: 请将 4 个成分的测定结果列于此 按拟定的方法, 分别对不同厂家 3 个批次的样品进行含量测定, 计算标示含量, 对乙酰氨基酚的标示含量分别为: 94.2%、101.6%、99.3%; 氨基比林的标示含量分别为: 100.3%、95.6%、98.9%; 咖啡因的标示含量分别为: 98.5%、93.8%、100.4%; 马来酸氯苯那敏标示含量分别为: 90.1%、91.2%、104.5%。结论: 本方法操作简便, 结果准确可靠, 可用于酚氨咖敏片中对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 酚氨咖敏片; 对乙酰氨基酚; 氨基比林; 咖啡因; 马来酸氯苯那敏; 含量测定

中图分类号: R 921.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3656(2017)-6-0000-0

Simultaneous Determination of Four Main Components in Paracetamol, Aminophenazone, Caffeine and Chlorphenamine Maleate Tablets by HPLC

Su Siyin, Kong Fanjian, Wang Xiaoyao (Yuxi Institute for Food and Drug Control, Yuxi 653100)

Abstract Objective: To establish an HPLC method to determine the contents of paracetamol, aminophenazone, caffeine, chlorphenamine maleate in paracetamol, aminophenazone, caffeine, chlorphenamine maleate tablets simultaneously. **Methods:** Agilent ZORBAX SB C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted. The gradient elution with sodium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile (80:20) (adjusting pH to 2.5 with phosphoric acid) as the mobile phase was set. The flow rate was set as 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength as 280 nm and the column temperature as 40 °C. The injection volume was 20 μL. **Results:** The average recoveries ($n=9$) of paracetamol, aminophenazone, caffeine, chlorphenamine maleate were 99.76%, 100.40%, 99.46%, 99.67% with RSD as 0.9%, 0.8%, 0.7%, 0.4% respectively. There was the good linearity in the ranges of 12.23-195.80 μg · mL⁻¹, 20.40-163.20 μg · mL⁻¹, 6.09-97.44 μg · mL⁻¹, 5.20-83.26 μg · mL⁻¹ for paracetamol, aminophenazone, caffeine, chlorphenamine maleate respectively. The three batches from the different manufacturers were determined The contents of paracetamol were 94.2%, 101.6%, 99.3%; the contents of aminophenazone were 100.3%, 95.6%, 98.9%; the contents of caffeine were 98.5%, 93.8%, 100.4%; and the contents of chlorphenamine maleate were 90.1%, 91.2%, 104.5%. **Conclusion:** This method is accurate, reliable and simple. It can be applied to simultaneous determination of four main components in paracetamol, aminophenazone, caffeine and chlorphenamine maleate tablets.

第一作者简介: 苏思尹, 主管药师; 研究方向: 从事化学药品分析和药械安全性评价工作。Tel: 0877-2688669; 邮箱: 51097652@qq.com

Key words: HPLC; Paracetamol, Aminophenazone, Caffeine and Chlorphenamine Maleate Tablets; Paracetamol; Aminophenazone; Caffeine; Chlorphenamine Maleate; Assay

酚氨咖敏片临床用于感冒、发热、头痛、神经痛及风湿痛等,其为复方制剂,主要成分为对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏。原国家药品标准 WS-10001-(HD-1021)-2002 中对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因与马来酸氯苯那敏的含量测定为分别测定,虽均采用 HPLC 法,流动相也相同,但检测波长、样品配制均不同,在实际的检测工作中如液相色谱仪不配备二极管阵列紫外检测器,仍需分别测试,为简化质量标准,减少检测限制,本研究中优化了色谱条件,建立了同一波长下同时测定四种有效成分含量的 HPLC 法。结果准确、专属性强、重复性好,可用于酚氨咖敏片的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(DAD 二极管阵列紫外检测器、四元泵、Chem Station 色谱工作站);赛多利斯 UB-7 酸度计;赛多利斯 T-214 天平;赛多利斯 TB-215D 电子天平。

对乙酰氨基酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100018-200408,含量:99.9%);氨基比林对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100503-200301);咖啡因对照品(中国药品生物制品检定所,批号:171215-200608)。马来酸氯苯那敏对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100047-200606,含量:99.7%);酚氨咖敏片(昆明全新生物制药有限公司,批号:160314);乙睛为色谱纯;水为超纯水;其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB- C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠-乙睛(80:20)(用磷酸调节 pH 值至 2.5);柱温为 40 °C;流速为 1.0 mL · min⁻¹;检测波长为 280 nm;进样量为 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取氨基比林对照品 20.40 mg,咖啡因对照品 12.18 mg,马来酸氯苯那敏对照品 10.44 mg,分别置 25 mL 容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,制成氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏对照品储备液。

精密称取对乙酰氨基酚对照品 12.67 mg,置 100 mL 量瓶中,加流动相约 30 mL 使溶解,再分别精密量取上述氨基比林对照品储备液 10 mL,咖啡因对照品储备液 5 mL,马来酸氯苯那敏对照品储备液 5 mL,置上述同一 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 中约含对乙酰氨基酚 120 μg、氨基比林 80 μg、咖啡因 24 μg、马来酸氯苯那敏 20 μg 的溶液,作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取酚氨咖敏片 20 片,精密称定,研细,精密称取细粉适量(约相当于氨基比林 200 mg),置 100 mL 量瓶中,加流动相 50 mL,超声处理 15 min,放冷,用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 中约含马来酸氯苯那敏 20 μg 的溶液,作为供试品溶液(1);另精密量取供试品溶液(1) 2 mL,置 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 中约含对乙酰氨基酚 120 μg、氨基比林 80 μg、咖啡因 24 μg 的溶液,作为供试品溶液(2)。

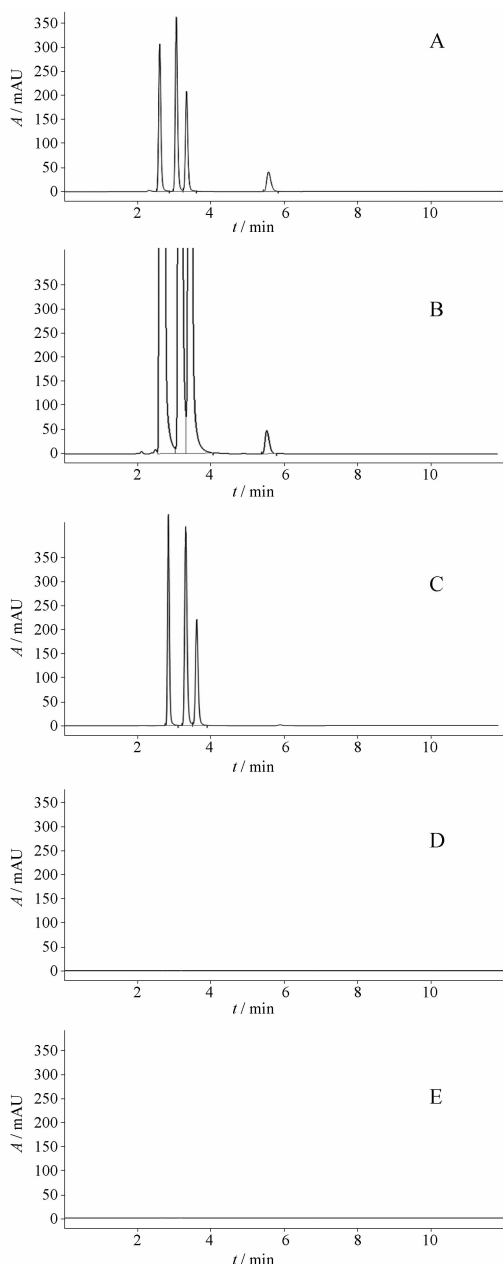
2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取不含对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏的阴性样品按“2.2.2”方法制备阴性对照溶液(1),阴性对照溶液(2),分别精密吸取 2.2.2 制得的供试品溶液(1)、(2)和阴性供试品溶液(1)、(2),以及混合对照品溶液各 20 μL,按上述方法和色谱条件测定,记录色谱图,结果见图 1。

结果如 1 图所示,供试品溶液中的四种主成分在与对照品相应位置处均有色谱峰出现,分离度较好,阴性对照溶液在四种主成分相应位置处均无色谱峰出现,对主峰无干扰。

2.3.2 线性试验 分别精密量取氨基比林对照品储备液 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2 mL,置 10 mL 的量瓶中,加流动相稀释制成每 1 mL 中含氨基比林 20.40、40.80、61.20、81.60、122.40、163.20 μg 的溶液;分别精密量取咖啡因对照品储备液 0.125、0.25、0.5、1、1.5、2 mL,置 10 mL 的量瓶中,加流动相稀释制成每 1 mL 中含咖啡因 6.09、12.18、24.36、48.72、73.08、97.44 μg 的溶液;分别精密量取马来酸氯苯那敏对照品储备液 0.125、0.25、0.5、

1、1.5、2 mL, 置 10 mL 的量瓶中, 加流动相稀释制成每 1 mL 中含马来酸氯苯那敏 5.20、10.40、20.81、41.63、62.45、83.26 μL 的溶液; 另精密称取对乙酰氨基酚对照品 12.25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别精密量取上述溶液 0.25、0.5、1、1.5、2、4 mL, 置 10 mL 的量瓶中, 加流动相稀释制成每 1 mL 中含对乙酰氨基酚 12.23、24.47、48.95、73.42、97.90、195.80 μL 的溶液。



A. 混合对照品溶液 (Mixed Standard Solution); B. 供试品溶液 (1) (Sample Solution (1)); C. 供试品溶液 (2) (Sample Solution (2)); D. 阴性对照溶液 (1) (Blank Standard Solution (1)); E. 阴性对照溶液 (2) (Blank Standard Solution (2))

图 1 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms

分别精密吸取上述四组分各浓度溶液 20 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以各成分浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 分别计算各组分的线性回归方程 ($n=6$) 为:

$$Y_{\text{对乙酰氨基酚}} = 15.84X - 19.64 \quad r = 0.9999$$

$$Y_{\text{氨基比林}} = 17.24X + 1.098 \quad r = 0.9999$$

$$Y_{\text{咖啡因}} = 45.23X - 2.943 \quad r = 0.9999$$

$$Y_{\text{马来酸氯苯那敏}} = 9.168X - 1.778 \quad r = 0.9999$$

结果表明对乙酰氨基酚在 12.23 ~ 195.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 氨基比林在 20.40 ~ 163.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 咖啡因在 6.09 ~ 97.44 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 马来酸氯苯那敏在 5.20 ~ 83.26 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积, 对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏各组分峰面积 RSD 分别为 0.21%、0.35%、0.19%、0.17% ($n=6$), 结果表明精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批号样品按“2.2.2”项下方法分别平行配制供试品溶液 (1) 与对应的供试品溶液 (2) 6 份, 分别精密吸取 20 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算标示含量, 对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏各组分平均标示含量分别为 97.85%、103.44%、102.53%、95.13%, RSD 分别为 0.46%、0.25%、0.31%、0.24% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 分别取供试品溶液 (1) 与供试品溶液 (2) 各 20 μL , 于 0、4、8、12 h 进样, 测定峰面积, 对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏各成分峰面积的 RSD 值分别为 0.80%、0.62%、1.2%、0.57%, 结果表明供试品溶液 12 h 内稳定, 可满足检测时间的需要。

2.3.6 回收率试验 精密称取已知含量的样品适量 (约相当于氨基比林 100 mg) 共 9 份, 分别置 100 mL 量瓶中, 加流动相 50 mL, 超声处理 15 min, 放冷, 滤过, 制成供试品溶液。按“2.2.2”项下方法分别平行配制未定容的供试品溶液 (1) 和供试品溶液 (2), 分做三组, 每组三份样品溶液。

分别在上述三组供试品溶液 (1) 中加入浓度为 0.1093 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的马来酸氯苯那敏对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 作为供试品溶液 (1); 分别在上述三组供试品溶液 (2) 中加入浓度为 3.0729 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对乙酰氨基酚、2.0050 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨基比林、0.6040 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咖啡因的混合对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 用流动相稀释至

刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液(2)。按“2.1”项下色谱条件测定含量,计算回收率,结果见表 1~4。

表 1 对乙酰氨基酚回收率结果($n=9$)

Tab. 1 Paracetamol recovery results

序号 (No.)	称样量 (weight) /g	原有量 (background) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 (added) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (detected) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
1	0.425 1	59.43		108.44	99.69		
2	0.421 8	58.81		49.16	107.54	99.12	
3	0.423 2	59.01		107.89	99.43		
4	0.426 7	59.50		121.05	100.16		
5	0.425 5	59.33	61.45	121.46	101.10	99.76	0.87
6	0.423 7	59.08		119.93	99.02		
7	0.4279	59.66		131.81	99.20		
8	0.4221	58.72	73.74	133.33	101.18		
9	0.4233	59.02		131.97	98.92		

表 2 氨基比林回收率结果($n=9$)

Tab. 2 Aminophenazone recovery results

序号 (No.)	称样量 (weight) /g	原有量 (background) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 (added) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (detected) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
1	0.425 1	41.76		74.08	100.72		
2	0.421 8	41.44	32.08	73.98	101.42		
3	0.423 2	41.58		73.68	100.05		
4	0.426 7	41.92		81.85	99.56		
5	0.425 5	41.80	40.10	81.97	100.15	100.40	0.79
6	0.423 7	41.63		82.13	100.99		
7	0.427 9	42.04		89.87	99.38		
8	0.422 1	41.37	48.12	90.24	101.54		
9	0.423 3	41.65		90.36	101.22		

表 3 咖啡因回收率结果($n=9$)

Tab. 3 Caffeine recovery results

序号 (No.)	称样量 (weight) /g	原有量 (background) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 (added) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (detected) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
1	0.425 1	12.42			21.99	99.03	
2	0.421 8	12.29	9.66	22.02	100.62		
3	0.423 2	12.33			21.91	99.06	
4	0.426 7	12.43			24.42	99.18	
5	0.425 5	12.40	12.08	24.34	98.80	99.46	0.66
6	0.423 7	12.35			24.33	99.16	
7	0.427 9	12.47			27.02	100.34	
8	0.422 1	12.30	14.49	26.79	99.92		
9	0.423 3	12.33			26.70	99.06	

表 4 马来酸氯苯那敏回收率结果($n=9$)

Tab. 4 Chlorheniramine recovery results

序号 (No.)	称样量 (weight) /g	原有量 (background) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 (added) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (detected) /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
1	0.425 1	9.82			18.52	99.40	
2	0.421 8	9.74	8.74	18.43	99.24		
3	0.423 2	9.77			18.52	99.90	
4	0.426 7	9.85			20.75	99.57	
5	0.425 5	9.83	10.93	20.77	100.00	99.67	0.32
6	0.423 7	9.79			20.66	99.38	
7	0.427 9	9.88			23.03	100.13	
8	0.422 1	9.73	13.12	22.85	99.96		
9	0.423 3	9.78			22.84	99.49	

2.4 样品测定结果

按拟定的方法,对 3 个不同厂家(厂家 1:云南希陶绿色药业股份有限公司;厂家 2:昆明振华

制药厂有限公司;厂家 3:云南白药集团股份有限公司)的样品进行含量测定,计算标示含量,结果见表 5。

表 5 样品测定结果(标示量%, $n=3$)

Tab. 5 Sample test results(labeled amount%)

厂家 (manu-Factorer)	批号 (lot No.)	对乙酰氨基酚 (cetaminophen)	氨基比林 (aminophenazone)	咖啡因 (caffeine)	马来酸氯苯那敏 (chlorheniramine)
1	20150301	94.2	100.3	98.5	90.1
2	20140814	101.6	95.6	93.8	91.2
3	20160506	99.3	98.9	100.4	104.5

3 讨论

3.1 流动相的选择

酚氨咖敏片的含量测定大多采用 1% 醋酸溶液(用二乙胺调节 pH 值为 3.7)-甲醇(62:38)为流动相,但在该实验中此流动相下的分离度不够,峰形达不到理想状态,故根据文献^[1-9],以 0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钠-乙睛(80:20)(用磷酸调节 pH 值至 2.5)为流动相,对乙酰氨基酚、氨基比林、咖啡因、马来酸氯苯那敏峰的保留时间适中,峰形达到理想状态,分离效果良好,无干扰。

3.2 波长的选择

为达到同时测定四组分含量的目的,经指纹图谱(DAD)检测器在 190~400 nm 波长范围内进行扫描。发现四种组分在 280 nm 处均有较好的吸收,虽然 280 nm 并不是最大吸收波长,但分离度效果好,干扰少,满足系统适用性试验的规定,故选定 280 nm 为测定波长。

3.3 方法的选择

由于马来酸氯苯那敏含量较低,在相同的色谱

条件和实验方法下很难将其定量,因此,考虑两步稀释法,配制两个不同浓度的供试品溶液进行测定,既避免文献^[5-9]多波长检测条件对仪器的限制,又解决了以往在相同色谱条件下马来酸氯苯那敏不出峰的问题。方法学考察结果表明,该方法中操作简便,准确可靠,可用于酚氨咖敏片的质量控制。

参考文献

- [1] WS-10001-(HD-1021)-20002 国家药品标准. 化学药品地方标准升国家标准(第十二册)[S].
- [2] 中国药典[S]. 2015 年版. 四部. 374
ChP[S]. 2015. Vol IV:374
- [3] 中国药典[S]. 2015 年版. 二部. 63
ChP[S]. 2015. Vol II:63
- [4] 中国药典[S]. 2015 年版. 二部. 321
ChP[S]. 2015. Vol II:321
- [5] 曹敏,熊然英,晋儒慧. HPLC 法同时测定酚氨咖敏颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因、氨基比林的含量[J]. 中国药品标准, 2007, 8(1):51
Cao Min, Xiong Ranying, Jin Ruhui. Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine and Aminopyrine in Paracetamol, Amino-

- phenazone Phenacetin, caffeine and Chlorphenamine Maleate Granules by HPLC[J]. Drug Stand China, 2007, 8(1):51
- [6] 辛俊衡. RP-HPLC 法同时测定氨咖敏片中 3 组分的含量[J]. 中国药师, 2006, 9(12):1119
Xin Junheng. Simultaneous determination of content of aminophenazone, caffeine and chlorphenamine maleate in ankamin tablets by RP-HPLC[J]. China Pharm, 2006, 9(12):1119
- [7] 郭琦, 傅强, 张鹏宵. GC 法同时测定酚氨咖敏片中四种成分的含量[J]. 分析实验室, 2010, 29(5):21
Guo Qi, Fu Qiang, Zhang Pengxiao. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, aminophenazone and chlorphenamine maleate four components in tablets by GC [J]. Chin J Anal Lab, 2010, 29(5):21
- [8] 莫连峰, 陈莹, 蒋静茹. 反高效液相色谱法同时测定酚氨咖敏颗粒中四种成分含量[J]. 药物分析志, 2008, 28(11):1934
Mo Lianfeng, Chen Ying, Jiang Jingru. Simultaneous RP-HPLC determination of four components in paracetamol, caffeine, aminophenazone and chlorphenamine maleate granules[J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(11):1934
- [9] 谭佳, 李凤鸣, 梁栋. 多波长高效液相色谱法同时测定复方氨酚那敏颗粒中三组分含量[J]. 中国药业, 2015, 24(8):71
Tan Jia, Li Fengming, Liang Dong. Simultaneous determination of 3 kinds of main component in compound paracetamol and chlorphenamine maleate granules by multi-wavelength HPLC [J]. China Pharm, 2015, 24(8):71

(收稿日期:2017-08-070)