小儿氨咖黄敏颗粒含量测定方法研究

冯伟　刘璐宇

（金陵药业南京金陵制药厂　江苏南京　210038）

摘要：目的：建立测定小儿氨咖黄敏颗粒中主成分的含量测定方法。方法：采用高效液相法测定对乙酰氨基酚、咖啡因以及马来酸氯苯那敏；色谱柱为 Shim-pack CLC-ODS 柱，流动相为甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液-三乙胺（20：80：0.02）；检测波长为 215nm；以紫外-分光光度法测定胆红素，测定波长：533nm。结果：对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、胆红素的回收率分别为 100.7%、99.4%、98.8%、98.4%。结论：本方法简便、快速 ，结果准确 、可靠，可用于小儿氨咖黄敏颗粒的质量控制。

关键词：小儿氨咖黄敏颗粒；含量；对乙酰氨基酚；咖啡因；马来酸氯苯那敏；高效液相法；紫外–分光光度法。

小儿氨咖黄敏颗粒为复方制剂，主药为对乙酰氨基酚，咖啡因，马来酸氯苯那敏以及人工牛黄。为感冒用药类非处方药药品，适用于缓解普通感冒及流行性感冒引起的发热、头痛、四肢酸痛、打喷嚏、流鼻涕、鼻塞、咽痛等症状。现行标准（WS–10001–(HD–1296)–2003）[1] 中含量测定方法繁琐复杂，且仅测定了其中对乙酰氨基酚以及咖啡因 2 个成分。本文采取高效液相法同时测定对乙酰氨基酚、咖啡因及马来酸氯苯那敏 3 个成分，采用紫外–分光光度法测定人工牛黄，并且用该方法评价了市售 3 家生产企业的样品，本方法专属性高，简便，准确，评价了 3 家市售的产品，可以很好的用于本品的质量评价。

1 仪器与试药

1.1 仪 器

岛津 10ATP 系列高效液相色谱仪，岛津 UV–2450 紫外分光光度计，安捷伦 1200 高效液相色谱仪，塞多利斯 BS210S 型电子天平，塞多利斯 BS21S 型电子天平

1.2 试剂与药品

甲醇（HPLC 江苏汉邦科技有限公司）；磷酸二氢钾（AR 南京化学试剂一厂）；三乙胺（AR 上海金山亭新化工试剂厂）；磷酸（AR 上海化学试剂厂）；盐酸（AR 上海化学试剂有限公司）；三氯甲烷（AR 上海凌峰化学试剂有限公司）；乙醇（AR 南京化学试剂厂）；对氨基苯磺酸（AR 上海山浦化工有限公司）；亚硝酸钠（AR 南京化学试剂厂）；水为双蒸水

对乙酰氨基酚对照品，中国药品生物制品检定所（批号：100018–200408）；咖啡因对照品，中国药品生物制品检定所（批号：171215–200507）；马来酸氯苯那敏对照品，中国药品生物制品检定所（批号：100047–200606）；胆红素对照品，中国药品生物制品检定所（批号：100077–200503）；

小儿氨咖黄敏颗粒为市售样品。

2 方法与结果

2.1 乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏含量测定

2.1.1 测定方法

2.1.1.1 色谱条件

色谱柱：Shim–pack CLC–ODS 柱（150×6mm，5μm）

流动相：甲醇–0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液–三乙胺（20：80：0.02）

检测波长：215nm，流速：1.0ml/min，进样量：20μl

2.1.1.2 对照品溶液制备

取对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏对照品适量，精密称定，用流动相配制成每 1ml 含对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏分别为 250μg、15μg、1μg 的溶液，即得对照品溶液。

2.1.1.3 供试品溶液制备

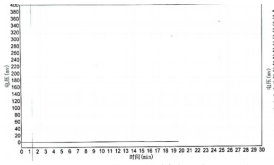
取本品适量，混匀研细，精密称取适量（约相当于对乙酰氨基酚 250mg），置 100ml 量瓶中，用流动相溶解并稀释到刻度，摇匀，过滤，精密量取续滤液 1ml 置 10ml 量瓶中，加稀释到刻度，摇匀，过滤，即得。

2.1.1.4 阴性样品溶液制备

按处方比例配制不含对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏的阴性样品，按照 2.1.1.3 项下供试品溶液制备的方法制备阴性对照溶液。

2.1.2 系统适用性及专属性试验

取 2.1.1 项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量，按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果显示，各色谱峰分离良好，理论板数按对乙酰基氨基酚计，不低于 4000，阴性样品在乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏对照品相应色谱峰位置未检出色谱峰。表明本方法系统适用性及专属性均良好。色谱图见图 1–图 5。



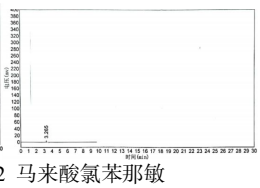
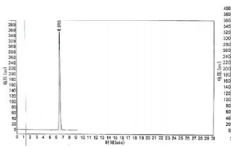


图 1 阴性对照图 2 马来酸氯苯那敏



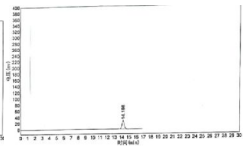


图 3 对乙酰氨基酚图 4 咖啡因

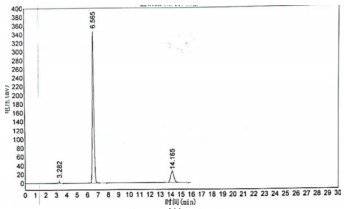


图 5 供试品

2.1.3 线性关系考察

取对乙酰氨基酚对照品、咖啡因对照品、马来酸氯苯那敏对照品适量，加流动相溶解制成每 1ml 分别含 1.25mg、75μg 和 5μg 的溶液，作为对照品储备液；精密量取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 ml 至 10ml 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，制成一系列浓度的溶液。照高效液相色谱法（中国药典 2005 版二部附录Ⅴ D），在上述色谱条件下进样检测，记录各自主峰面积 A，以峰面积 A 与浓度 C 进行线性回归，绘制回归曲线，乙酰氨基酚对照品、咖啡因对照品、马来酸氯苯那敏的回归方程分别为：

A=15168C+2764r = 0.9998

A=40582C+6735.3r = 0.9999

A=17630C+8.4957r = 0.9999

结果表明，马来酸氯苯那敏浓度在 0.251～2.51μg/ml 范围内时，对乙酰氨基酚浓度在 62.52～625.2μg/ml 范围内时，咖啡因浓度在 3.795～37.95μg/ml 范围内时，线性关系良好。

2.1.4 定量限与检测限考察

精密量取 2.1.1.2 项下对照品溶液适量 10 μL，用水倍比稀释，

按 2.1.1.1 项下色谱条件进样测定。以信噪比为 10：1、3：1 分别计算定量限、检测限。结果显示，马来酸氯苯那敏最低检测限约为 0.02ng，对乙酰氨基酚的最低检测限约为 0.02ng，对氨基酚的最低检测限为 0.05ng，咖啡因最低检测限约为 0.2ng。

2.1.5 精密度试验

2.1.5.1 进样精密度

精密量取 2.1.1 项下同一份对照品溶液适量，按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次。结果显示，对乙酰氨基酚峰面积 RSD 为 0.5%（n = 6），咖啡因峰面积 RSD 为 0.9%（n = 6），马来酸氯苯那敏峰面积 RSD 为 0.5%（n = 6），表明仪器精密度良好。

2.1.5.2 重复性试验

取同一批样品共 6 份，按 2.1.1 项下方法制备对照品溶液及供试品溶液，再按 2.1.1 项下项下色谱条件分别进样测定，以外标法计算对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏的含量。结果显示，对乙酰氨基酚平均含量为 100.3%，RSD 为 0.39%（n = 6）；咖啡因平均含量为 97.7%，RSD 为 0.38%（n = 6）；马来酸氯苯那敏平均含量为 93.2%，RSD 为 1.75%（n = 6），表明方法重复性良好。

2.1.5.3 中间精密度试验

更换试验人员、仪器（岛津，安捷伦）于不同时间，照 2.1.1 项下再次进行测定 6 份供试品的含量，并将测定结果与重复性结果进行对比统计，对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏平均含量的 RSD 分别为 0.55%（n=12），0.61%（n=12），1.31%（n=12），说明本方法中间精密度良好。

2.1.6 稳定性试验

取 2.1.1 项下同一供试品溶液，在室温下放置 8 小时，在 0，1，2，4，6，8 小时按 2.1.1 项下色谱条件测定主峰面积，考察供试品溶液的稳定性。结果显示，对乙酰氨基酚 RSD 为 0.5%，咖啡因 RSD 为 0.5%，马来酸氯苯那敏为 1.0%，说明本品溶液在 8 小时内基本稳定。

2.1.7 回收率试验

取三份空白辅料，分别加入主药处方比例的 80%、100%、120% 已知纯度的原料，制成三份模拟处方制剂，每份各精密称取 3 份，照 2.1.1 项下制备供试品溶液，再按 2.1.1 项下色谱条件分别进样测定，计算回收率。结果对乙酰氨基酚的回收率为 96.81%~99.80%，平均回收率为 98.62%，RSD=1.0%，表明该方法回收率良好。见表 1–表 3。

表 1 对乙酰氨基酚回收率试验结果(n=3)

编号	原有量（mg）	测得量（mg）	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
80%–1	200.47	203.36	101.4	100.7	0.6
80%–2	196.56	199.28	101.4		
80%–3	193.27	195.30	101.0		
100%–1	241.24	243.66	101.0		
100%–2	243.77	245.95	100.9		
100%–3	246.50	248.56	100.8		
120%–1	297.25	296.13	99.6		
120%–2	299.18	299.79	100.2		
120%–3	302.07	302.15	100.0		

表 2 咖啡因回收率试验结果(n=3)

编号	原有量（mg）	测得量（mg）	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
80%–1	13.65	13.39	98.1		
80%–2	13.39	13.16	98.3		
80%–3	13.16	12.89	97.9		
100%–1	14.76	14.81	100.3	99.4	1.0
100%–2	14.92	14.95	100.2		
100%–3	15.08	15.10	100.1		
120%–1	18.07	17.98	99.5		
120%–2	18.19	18.18	99.9		
120%–3	18.37	18.35	99.9		

表 3 马来酸氯苯那敏回收率试验结果(n=3)

编号	原有量（mg）	测得量（mg）	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
80%–1	0.83	0.83	100.3	98.8	0.7
80%–2	0.81	0.80	98.4		
80%–3	0.80	0.80	99.4		
100%–1	0.99	0.98	98.4		
100%–2	1.00	0.99	98.5		
100%–3	1.02	1.00	98.4		
120%–1	1.21	1.19	98.4		
120%–2	1.22	1.20	99.0		
120%–3	1.23	1.21	98.8		

2.1.8 含量测定结果

取三家企业的市售品，照 2.1.1 项下方法，分别测定含量，结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果（%）

生产企业	A	B	C
马来酸氯苯那敏（%）	93.2	94.2	93.5
对乙酰氨基酚（%）	100.3	100.2	99.6
咖啡因（%）	97.1	96.7	96.3

2.2 人工牛黄含量测定（以胆红素计）

2.2.1 测定方法

照紫外–分光光度法（中国药典二部附录 V A）测定[2]

2.2.1.1 对照品溶液制备

取胆红素对照品 10mg，精密称定，置 100ml 棕色量瓶中，用三氯甲烷溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 5ml，置 50ml 棕色量瓶中，加乙醇至刻度，摇匀，即得（每 1ml 中含胆红素 10μg）。

2.2.1.2 供试品溶液制备

取本品适量，混匀研细，精密称取适量（约相当于体外培育牛黄约 10mg），置锥形瓶中，加三氯甲烷–乙醇（7：3）的混合溶液 60ml、盐酸 1 滴，摇匀，置水浴上加热回流 30 分钟，放冷，移至 100ml 棕色量瓶中。容器用少量混合溶液洗涤，洗液并入同一量瓶中，加上述混合溶液至刻度，摇匀。精密量取上清液 10ml，置 50ml 棕色量瓶中，加乙醇至刻度，摇匀。精密量取 3ml，置具塞试管中，加乙醇至 9ml，各精密加入重氮化溶液（甲液：取对氨基苯磺酸 0.1g，加盐酸 1.5ml 与水适量使成 100ml。乙液：取亚硝酸钠 0.5g，用水

溶解并稀释至 100ml，置冰箱内保存。临用时取甲液 10ml 与乙液 0.3ml，混匀）1ml，摇匀，在 15～20℃的暗处放置 1 小时；

2.2.1.3 阴性样品溶液制备

取空白制剂适量，按 2.2.1.2 供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

2.2.1.4 标准曲线的制备

精密量取对照品溶液 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml，分别置具塞锥形瓶中，加乙醇至 9ml，各精密加入重氮化溶液（甲液：取对氨基苯磺酸 0.1g，加盐酸 1.5ml 与水适量使成 100ml。乙液：取亚硝酸钠 0.5g，用水溶解并稀释至 100ml，置冰箱内保存。临用时取甲液 10ml 与乙液 0.3ml，混匀）1ml，摇匀，在 15～20℃的暗处放置 1 小时；以相应的试剂为空白。照紫外-可见分光光度法（附录Ⅴ A），在 533nm 波长处测定吸光度，以吸光度为纵坐标、浓度为横坐标，绘制标准曲线。

2.2.1.5 测定法

取供试品溶液，依法测定吸光度，从标准曲线上读出供试品溶液中含胆红素的重量（mg），计算，即得。

2.2.2 专属性试验

取 2.2.1.1 项下 3ml 溶液和 2.2.1.2 项下制剂供试品溶液在 400nm～600nm 进行紫外扫描，结果在 533nm 附近有最大吸收；取 2.2.1.3 阴性样品溶液适量，于 400-600nm 波长间扫描，结果表明，辅料在 533nm 波长处无吸收，不会干扰主药的测定，所以选择 533nm 作为本品的检测波长。

2.2.3 标准曲线

精密称取胆红素对照品适量（约 10mg），照标准曲线项下方法，在 533nm 波长处测定吸光度，以吸光度为纵坐标、浓度为横坐标，进行线性回归，回归方程为 A = 0.1045C-0.0124　r=0.9996。结果表明：本品在 1.02～5.11μg/ml 浓度范围内，线性关系良好。

2.2.4 溶液的稳定性考察

取 2.2.1.2 项下制剂供试品溶液，在室温下放置 2 小时，分别间隔不同时间测定吸收度，测得吸光度的 RSD 为 0.71%，说明本品溶液在 2 小时内基本稳定。

2.2.5 精密度试验

2.2.5.1 重复性试验

按 2.2.1.2 项下制备制剂供试品溶液 6 份，于 533nm 波长处测定吸收值 A，并代入标准曲线，计算标示量，标示量的 RSD 为 0.76%，表明本方法重复性良好。

2.2.5.2 中间精密度试验

更换试验人员、仪器（岛津，上海分析仪器）于不同时间，照 2.2.1 项下再次进行测定 6 份供试品的含量，并将测定结果与重复性结果进行对比统计，胆红素平均含量的 RSD 为 0.69%（n=12），说明本方法中间精密度良好。

2.2.6 加样回收率试验

按 2.2.1.2 项下制备制剂供试品溶液 9 份，按 80%，100%，120% 的比例分别精密加入一定量对照品，照含量测定项方法对样品进行处理，测定胆红素含量，按公式回收率（%）=（测得总量-样品中含量）/加入量×100%计算回收率。结果见表 5，该检测方法的回收率良好。

表 5 回收率实验测定结果

水平	取样量（mg）	样品中含量（mg）	对照加入量（mg）	测得总量（mg）	回收率（%）	平均值（%）	RSD（%）
80%	145.26	1.747	1.401	3.104	96.8	98.4	1.2
	145.03	1.745	1.401	3.120	98.2		
	145.28	1.748	1.401	3.137	99.1		
100%	145.73	1.753	1.802	3.530	98.6		
	146.25	1.759	1.802	3.546	99.2		
	145.28	1.748	1.802	3.546	99.8		
120%	145.02	1.745	2.202	3.891	97.4		
	145.39	1.749	2.202	3.874	96.5		
	145.08	1.745	2.202	3.940	99.6		

2.2.7 样品中人工牛黄的含量测定

取三家企业的市售品，照 2.2.1 项下方法，分别测定含量，结果见表 6。

表 6 样品含量测定结果（%）

生产企业	A	B	C
平均含量	35.40	35.02	35.72

3 讨论

3.1 乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏含量测定条件的考察

参照文献报道[3]，采用甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液-三乙胺（18：82：0.02），用磷酸调 pH 至 3.4，此时样品保留时间比较靠后，经调整为甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液比例（20：80）较为适合。

有文献报道[4]，马来酸氯苯那敏在酸性流动相体系中会产生马来酸和氯苯那敏两个物质，对测定产生干扰，经比较不同 pH 条件下的色谱行为，发现当流动相体系 pH 小于 3.0，马来酸氯苯那敏会分解为马来酸和氯苯那敏两个物质，同时用磷酸调 pH 对整体色谱行为影响不大，故不采用磷酸调节 pH 值；流动相体系中加入少量的三乙胺能够改善拖尾，调整流动相比例至（20：80：0.02）时，三个组分的保留时间比较适中，故最终确定流动相条件为甲醇-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液-三乙胺（20：80：0.02）。

经方法学验证，该方法简便、快速，准确性好，可同时测定小儿氨咖黄敏颗粒中的三组成分。

3.2 人工牛黄含量测定（以胆红素计）

牛黄是传统名贵中药材，是中成药的重要原料。长期以来，药源紧缺，难以满足临床用药的需要。根据国食药监注[2004]21 号文，小儿氨咖黄敏颗粒中的牛黄可以用培植牛黄、体外培育牛黄替代牛黄等量投料使用。

本品采用胆红素含量测定的方法，对小儿氨咖黄敏颗粒中人工牛黄进行了含量测定的方法学研究，考察了超声处理及加热回流两种提取方法，结果表明加热回流的提取效率较高；考察了不同比例提取溶剂，三氯甲烷-乙醇（7：3），（6：4），（5：5），结果表明 7：3 的比例较为合适；考察了不同提取时间，15min，30min，45min，60min，结果表明 30min 时已经可以提取完全，最终确定本品的提取方法。

经方法学验证，该方法专属性强、精密度高、准确性好，可以作为小儿氨咖黄敏颗粒中人工牛黄的含量测定方法。

3.3 结论

采用本方法评价了市售 3 家生产企业的小儿氨咖黄敏颗粒，其主药对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏以及人工牛黄的含量基本一致，本方法为对小儿氨咖黄敏颗粒的质量评价提供了参考方法。

参考文献

［1］国家药品标准•化学药品地方标准上升国家标准［S］.第十四册，17

［2］中国药典［S］.2010 年版.一部. 65

［3］李爱华，王荣华.HPLC 法测定氨咖黄敏胶囊中 3 种有效成分［J］.齐鲁药事，2005，24（12）：729-731

［4］徐燕，刘峰，徐晓霞，谢华.以 HPLC 法测定马来酸氯苯那敏含量的方法中马来酸峰及氯苯那敏峰定位的问题［J］.四川生理科学杂志，2008，30（3）：110-111