· 论　　著 ·

高效液相色谱法测定氯化铵甘草口服溶液中吗啡、愈创甘油醚和甘草酸的含量

钟桂香，严　佳，黄爱文，周　欣，宋洪涛

［**摘要**］ **目的**　建立高效液相色谱法测定氯化铵甘草口服溶液中吗啡、愈创甘油醚和甘草酸的含量方法。**方法**　采用 C_8 和 C_{18} 柱，流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 - 0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠溶液 - 乙腈，流速为 1.0 ml/min，柱温为 35 ℃，检测波长分别 220 nm 和 260 nm。**结果**　吗啡、愈创甘油醚和甘草酸分别在 2.0 ~ 20.2、20.3 ~ 203.0、10.0 ~ 100.0 μg/ml 范围内呈现良好的线性关系，平均加样回收率分别为 99.4%、100.4%、101.1%。**结论**　该方法快速、准确、重复性好，适用于氯化铵甘草口服溶液中吗啡、愈创甘油醚和甘草酸的检测和质量控制。

［**关键词**］ 氯化铵甘草；吗啡；愈创甘油醚；甘草酸；含量测定；高效液相色谱法

［**中图分类号**］ R927.2　　［**文献标志码**］ A　　doi：10.3969/j.issn.1672-271X.2014.03.002

Determination of morphine, guaifenesin and glycyrrhizic acid in ammonium glycyrrhiza oral solution by HPLC

ZHONG Gui-xiang, YAN Jia, HUANG Ai-wen, ZHOU Xin, SONG Hong-tao.　Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Fuzhou, Fujian 350025, *China*

［**Abstract**］ **Objective**　To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of Ammonium Glycyrrhiza Oral Solution of morphine, guaifenesin and glycyrrhizic acid content. **Methods**　The HPLC system consisted of C_8 and C_{18} column, the mobile phase was 0.05 mol/L KH_2PO_4 - 0.0025 mol/L Sodium heptanes - acetonitrile, the flow rate was 1.0 ml/min, the temperature of column was 35 ℃, the detection wavelength was set at 220 nm and 260 nm. **Results**　Morphine, guaifenesin and glycyrrhizic acid in 2.0 - 20.2, 20.3 - 203.0, 10.0 - 100.0 μg/ml range showed a good linear relationship, the average recoveries were 99.4%, 100.4%, 101.1%. **Conclusion**　This method was rapid, accurate and suitable for quality control of morphine, guaifenesin and glycyrrhizic acid in Ammonium Glycyrrhiza Oral Solution.

［**Key words**］ Ammonium Glycyrrhiza; Morphine; Guaifenesin; Glycyrrhizic acid; determination; HPLC

氯化铵甘草口服溶液由愈创甘油醚、甘草流浸膏、复方樟脑酊、浓氨溶液等组成，为祛痰镇咳药，该药收载于《中国人民解放军医疗机构制剂规范》(2002 年版)[1]，其中愈创甘油醚、复方樟脑酊和甘草流浸膏作为制剂主要组成成分，原质量标准并未对其进行相关定量研究，只检测氯化铵含量，为提高制剂质量标准，保证制剂质量稳定可控，现采用高效液相色谱法建立氯化铵甘草口服溶液中的吗啡、愈创甘油醚和甘草酸的检测方法，为该制剂质量标准提高与完善提供实验依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器　Agilent 1200 型高效液相色谱仪(G1316A 型二极管阵列检测器，二元泵，自动进样，Chemstation 色谱工作站，美国安捷伦公司)，DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒新科技有限公司)，AR-124CN 型分析天平(奥豪斯仪器上海有限公司)。

1.2　试药　吗啡对照品(中国食品药品检定研究院，批号：171201-200420)，愈创甘油醚对照品(中国食品药品检定研究院，批号：1100528-200401)，甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院，批号：110731-201116)，氯化铵甘草口服溶液(某医院制剂室提供，批号：130820，130821，130821)；乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　吗啡含量测定

2.1.1　色谱条件　色谱柱：Zorbax SB-C_8 (4.6 × 150 mm，5 μm)；流动相：0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 - 0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠溶液 - 乙腈(18∶18∶5)；检测波长：220 nm；流速：1.0 ml/min；进样量：

基金项目： 军队医疗机构制剂标准提高科研专项重点课题(13ZJ01)

作者单位： 350025　福建福州，南京军区福州总医院药学科

通讯作者： 宋洪涛，E-mail：sohoto@vip.163.com

20 μl;柱温:35 ℃。

2.1.2　固定萃取柱系统适用性试验　固相萃取柱处理:取 C_{18} 固相萃取小柱(250 mg/3 ml)1 支,依次用甲醇 - 水(3∶1)15 ml 与水 5 ml 冲洗,再用 pH 值约为 9 的氨水溶液冲洗至流出液 pH 值约为 9,待用。

适用性试验:精密量取浓度为 0.1 mg/ml 吗啡对照品溶液 0.5 ml,置处理后的固相萃取柱上,按样品制备法洗脱,用 5 ml 量瓶收集洗脱液至刻度,摇匀,作为系统适用性试验溶液。精密量取系统适用性试验溶液与含量测定项下的对照品溶液各 10 μl 进样,得系统适用性试验结果为 0.98。

2.1.3　溶液的制备　对照品溶液制备:精密称取吗啡对照品适量,加 5% 的醋酸溶解制成每毫升约含 0.1 mg 的对照品储备液;再精密量取 10 ml 储备液至 100 ml 容量瓶中,加 5% 醋酸稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

供试品溶液制备:精密量取经摇匀的本品 0.5 ml,置已处理好的固相萃取小柱上,滴加氨试液适量使柱内溶液的 pH 值约为 9,摇匀,待溶液滴尽后,用水 20 ml 冲洗,用 5% 醋酸溶液洗脱,用 5 ml 量瓶收集洗脱液至刻度,摇匀,作为供试液。

阴性对照溶液制备:按处方量除去复方樟脑酊制备样品,并按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.1.4　专属性考察　分别取吗啡的对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。阴性对照溶液在吗啡对照品色谱峰相同保留时间处未显色谱峰,表明阴性对照无干扰。吗啡色谱峰与其他组分完全分离,分离度达到 6.21,理论塔板数不低于 8000。结果见图 1。

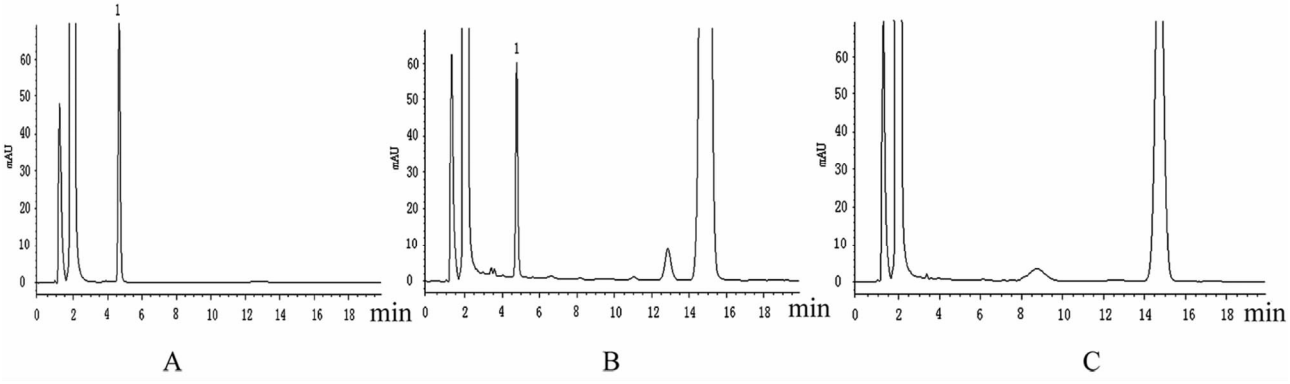

图 1　吗啡色谱图

A:对照品;B:供试品;C:阴性对照;1:吗啡

2.1.5　线性关系考察　精密量取吗啡对照品储备液 1、2.5、5、8、10 ml 于 50 ml 容量瓶中,加 5% 醋酸溶液稀释至刻度,分别进样 20 μl,记录色谱图,以吗啡的浓度(μg/ml)为横坐标(X),以吗啡的峰面积为纵坐标(Y),得回归方程 Y = 60397.12X - 1.89(r = 0.9999)。结果表明,吗啡在 2.0 ~ 20.2 μg/ml 浓度范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.1.6　检测限和定量限　取吗啡对照品储备液,逐步稀释后进样,当信噪比为 3∶1 时,吗啡的检测限为 0.0167 μg/ml,当信噪比为 10∶1 时,吗啡的检测限为 0.0505 μg/ml。

2.1.7　精密度试验　精密吸取对照品溶液 20 μl,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,结果得吗啡含量的相对标准偏差(RSD) = 0.12%,表明仪器精密度良好。

2.1.8　重复性试验　取同一样品,按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,得吗啡含量的 RSD = 1.15%,另将样品于不同时间不同分析人员不同设备测定含量,得吗啡含量的 RSD 为 1.23%,表明试验重复性良好。

2.1.9　稳定性试验　取供试品溶液 1 份,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,按 2.1.1 项下色谱条件测定其峰面积,得 RSD = 0.95%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.10　加样回收率试验　精取量取已知含量的供试品溶液 0.5 ml 共 9 份于固相萃取小柱内,3 份为一组,各组分别精密加入吗啡对照品储备液 0.2、0.3、0.4 ml,按样品制备法制得所需溶液,用 5 ml 量瓶收集洗脱液至刻度,摇匀后进样,得样品平均回收率为 99.4%,RSD = 0.89%,表明试验回收率良好。

2.1.11　含量测定　取样品三批,按供试品溶液制备方法进行处理后,取 20 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图;另取吗啡对照品适量,制成每毫升中约含吗啡 0.01 mg 溶液,按外标法以峰面积计算,三批样品吗啡含量分别为 84.0、84.7、83.0 μg/ml。

2.2　愈创甘油醚和甘草酸含量测定

2.2.1　色谱条件　色谱柱：Agilent Eclipse XDB-C_{18}（4.6×150 mm，5 μm）；流动相：0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 - 0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠溶液 - 乙腈（42.5∶42.5∶15）［用 20% 氢氧化钠溶液调节 pH 值为（7.2 ± 0.2）］；检测波长：260 nm；流速：1.0 ml/min；进样量：10 μl；柱温：35 ℃。

2.2.2　溶液的制备　混合对照品溶液的制备精密称取愈创甘油醚对照品及甘草酸铵对照品适量，用流动相溶解并定量稀释制成每毫升约含愈创甘油醚 0.4 mg 和甘草酸铵 0.2 mg 的混合对照品储备液；再精密量取 2.5 ml 储备液至 10 ml 容量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

供试品溶液的制备：取本品一瓶摇匀，精密量取 1 ml 置 50 ml 量瓶中，用流动相稀释至刻度，摇匀，经 0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

阴性对照溶液的制备：按处方量分别制成不含愈创甘油醚或甘草流浸膏的样品，并按供试品溶液的制备方法制得阴性对照溶液。

2.2.3　专属性考察　分别取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量，按愈创甘油醚和甘草酸色谱条件进样测定。结果表明，供试品溶液呈现与对照品溶液保留时间相同的色谱峰，且阴性对照无干扰。愈创甘油醚和甘草酸与其他组分完全分离，其理论塔板数分别为 12242 和 5062。结果见图 2。

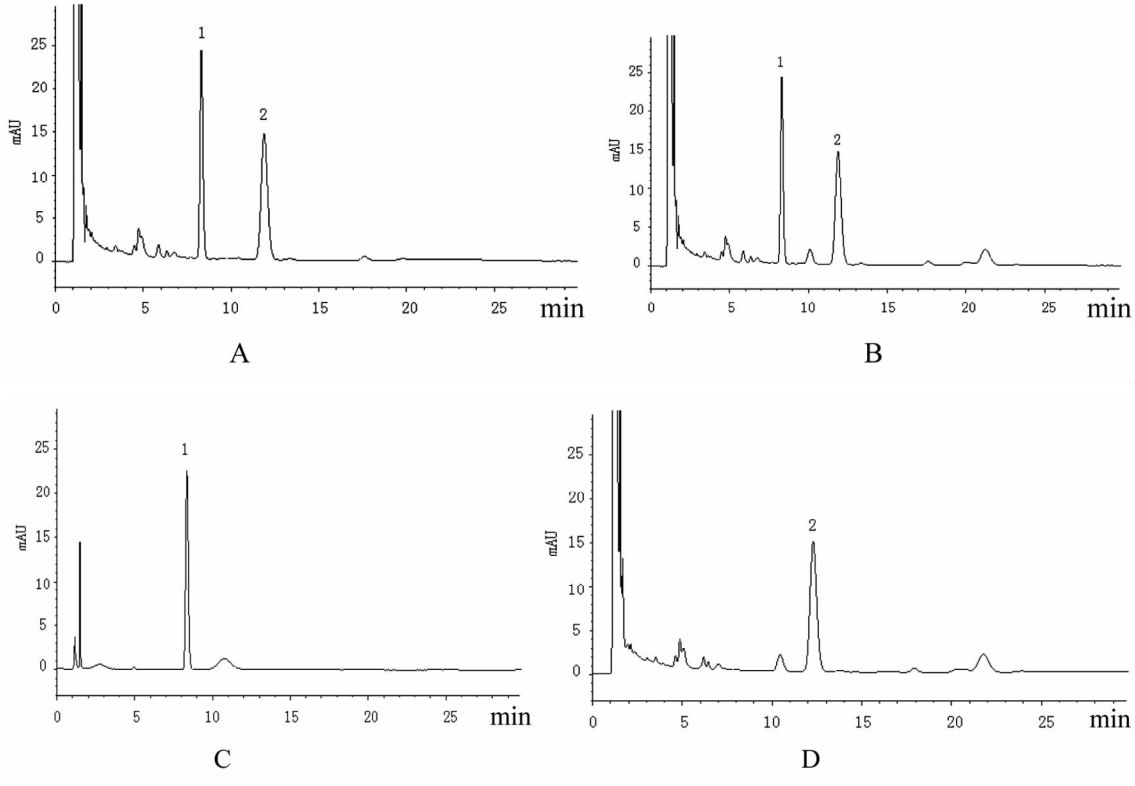

图 2　愈创甘油醚和甘草酸色谱图

A：混合对照品；B：供试品；C：甘草酸阴性对照；D：愈创甘油醚阴性对照；1：愈创甘油醚；2：甘草酸

2.2.4　线性关系考察　精密量取混合对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 ml 于 10 ml 容量瓶中，加流动相稀释至刻度，混合摇匀，分别进样 10 μl，记录色谱图，以溶液的浓度（mg/ml）为横坐标（X），以溶液的峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，得愈创甘油醚回归方程 Y = 3019.26X + 2.39（r = 0.9998）和甘草酸回归方程 Y = 7563.14X + 0.50（r = 0.9998）。结果表明，愈创甘油醚和甘草酸浓度分别在 20.3 ~ 203.0、10.0 ~ 100.0 μg/ml 范围内与峰面积呈现良好的线性关系。

2.2.5　检测限和定量限　分别取愈创甘油醚和甘草酸对照品溶液，逐步稀释，按 2.2.1 项下色谱条件测定，当信噪比为 3∶1 时，愈创甘油醚及甘草酸的最低检测浓度分别为 0.099、0.125 μg/ml；当信噪比为 10∶1 时，愈创甘油醚及甘草酸的最低定量浓度分别为 0.248、0.5 μg/ml。

2.2.6　精密度试验　精密吸取同一混合对照品溶液，重复进样 6 次，按 2.2.1 项下色谱条件测定其峰面积，结果，愈创甘油醚和甘草酸的 RSD 分别为 0.41% 和 0.75%，表明仪器精密度良好。

2.2.7　重复性试验　取同一批供试品 6 份，照供试品溶液制备法制得所需溶液，按 2.2.1 项下色谱

条件测定愈创甘油醚、甘草酸峰含量,结果得愈创甘油醚和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.14% 和 1.59%,另将样品于不同时间不同分析人员不同设备测定含量,得到愈创甘油醚和甘草酸峰面积的 RSD 为 1.03% 和 1.27%,表明本试验重复性良好。

2.2.8 稳定性试验　取供试品溶液,室温下放置,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 各进样 1 次,测定峰面积,得愈创甘油醚和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.49% 和 1.43%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验　精确量取已知含量的供试品溶液 0.5 ml 共 9 份,分别置 50 ml 容量瓶中,精密加入浓度为 0.406 mg/ml 的愈创甘油醚及 0.200 mg/ml 的甘草酸铵的对照品混合溶液 4.0、5.0、6.0 ml 各 3 份,按愈创甘油醚和甘草酸色谱条件测定含量,得平均回收率分别为 100.4% 和 101.1%,RSD 分别为 1.28% 和 0.98%。

2.2.10 含量测定　取样品三批,按供试品溶液制备方法进行处理,取 10 μl 注入液相色谱仪,以外标法计算其含量。另取愈创甘油醚和甘草酸对照品适量,制成每毫升中约含愈创甘油醚 0.1 mg 和甘草酸铵 0.05 mg 溶液,分别得愈创甘油醚含量为 4.40、4.42、4.33 mg/ml,甘草酸含量为 2.19、2.21、2.18 mg/ml。

3 讨　论

本文参照有关文献[2-8],采用高效液相色谱法测定吗啡含量,使用 pH 值约为 9 的氨水溶液冲洗固相萃取小柱至流出液 pH 值为 9,在此条件下吗啡能得到较好萃取,再用 5% 醋酸进行洗脱,这样可有效保证吗啡的提取和收集。

以乙腈 - 磷酸二氢钾 - 庚烷磺酸钠系统作为流动相能够很好地分离吗啡,在流动相中加入庚烷磺酸钠作为离子对试剂,可以与吗啡形成离子对化合物,有利于其在固定相上的保留和分离,且能有效改善峰形,得到的分析结果重现性好。另在做吗啡含量测定时,笔者曾用 C_{18} 色谱柱做过试验,结果与 C_8 色谱柱相比,C_{18} 柱出峰时间慢,C_8 柱出峰时间快,且分离度好,柱效更高。因此在测定吗啡含量时,首先应以 C_8 柱作为其色谱柱,在无 C_8 色谱柱的情况下可考虑选用 C_{18} 色谱柱代替。

参考有关文献测定愈创甘油醚和甘草酸含量[9-11],采用 C_{18} 色谱柱进行测定,经多次试验,调节系统的配比及 pH 值,最终确定流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 - 0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠溶液 - 乙腈(42.5∶42.5∶15)[用 20% 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.2 ± 0.2)],在此条件下,愈创甘油醚和甘草酸峰与其他成分有良好的分离,分离度达到 9.0 以上。在本系统中,甘草酸及其有关杂质峰的保留时间受溶液 pH 值影响较大,调节流动相 pH 值在 pH(7.2 ± 0.2)的范围内,可得到较好的分离效果。在 2.2.1 项色谱条件下,结果显示愈创甘油醚和甘草酸的色谱峰形良好,供试品溶液中两主峰与相邻杂质峰完全分离,且其他成分无干扰。

本文使用高效液相色谱法分别测定氯化铵甘草口服溶液中吗啡、愈创甘油醚和甘草酸含量,由于所适用的色谱柱和流动相配比不同,无法同时测定,对于是否可以采用同一色谱柱在梯度洗脱条件下同时测定这三组分含量,有待于日后进一步考察。

氯化铵甘草口服溶液组方复杂,本文建立了氯化铵甘草口服溶液中吗啡、愈创甘油醚和甘草酸的含量测定方法,并对该方法进行了全面的方法学考察,该方法无杂质干扰,分离度好、重现性好、灵敏度高,可作为本制剂的质量控制标准。

【参考文献】

[1] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 中国人民解放军医疗机构制剂规范:增补本[S]. 2002 年版. 北京:人民军医出版社,2007:8-9.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2010 年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:574、附录 194.

[3] 马维平,邓自力,李利军. 高效液相色谱法测定罂黄散中吗啡的含量[J]. 武警医学,2012,23(6):480-482.

[4] 秦庆芳,林　华,廖　艺. 31 批复方甘草口服溶液的质量考察[J]. 中国药房,2008,19(9):689-691.

[5] 熊水莲. 侯　莉. 固相萃取柱高效液相色谱法测定复方甘草含片中吗啡的含量[J]. 实用临床医学,2012,13(10):10-12.

[6] 杨海燕,张　成 雷丽萍. 高效液相色谱法测定固肠止泻丸中吗啡的含量[J]. 中国药业,2012,21(18):44-45.

[7] 张群芳. 高效液相色谱法测定敛肺止咳丸中吗啡含量[J]. 药物鉴定,2011,20(21):21-22.

[8] 王曙东,苏振乾,王玉喜,等. 急支平喘软胶囊组方药材的提取工艺研究[J]. 东南国防医药,2013,15(5):477-479.

[9] 黄剑英,吴福楷,李玲玲,等. 复方甘草口服溶液中甘草酸和愈创甘油醚的含量考察[J]. 药物分析杂志,2012,32(30):541.

[10] 张钢平,徐颖惠,秦喜顺,等. 高效液相色谱法测定复方氯化铵甘草口服液中甘草酸含量[J]. 药物鉴定,2008,17(15):29.

[11] 贺国芳,林　芳,闵　敏,等. SPE-HPLC 法测定复方甘草口服溶液中愈创甘油醚的含量[J]. 中国药师,2006,9(8):741-743.

(收稿日期:2014-03-09;修回日期:2014-04-07)

(本文编辑:张仲书;　英文编辑:王建东)