

枇杷止咳颗粒中吗啡含测方法的研究

高峰 刘朋杉 杨丽 刘灵芝

药都制药集团股份有限公司

[摘要]目的: 枇杷止咳颗粒已经成为大众常用药, 现行药典中国药典2020年版一部只有可待因的检测^[1], 为人民用药安全, 建立枇杷止咳颗粒中吗啡的高效液相色谱(HPLC)含量测定方法。方法: 采用外标法, C₁₈色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸溶液二元梯度洗脱, 检测波长为209nm, 体积流速为1.0 ml·min⁻¹。结果: 吗啡的线性范围为0.0337~0.8417μg (R=0.9999), 平均回收率为99.2%, RSD为2.4% (n=9)。结论: 高效液相色谱法能将吗啡很好地分离检测, 提高了时效, 减少了误差, 结果表明该方法准确可靠, 重现性好, 结果稳定。

[关键词]枇杷止咳颗粒; 吗啡; 高效液相色谱法

[DOI] 10.12252/j.issn.2096-6261.2021.10.1872

枇杷止咳颗粒由枇杷叶、罂粟壳、百部、白前、桑白皮、桔梗、薄荷脑组成。方中枇杷叶清肺化痰, 下气止咳, 以治痰热蕴肺之证, 为君药。桑白皮清肺消痰降气, 白前祛痰降气止咳, 以增强君药清热化痰, 降逆止咳之功, 共为臣药。百部养阴以润肺燥, 罂粟壳收敛肺气以止咳, 敛润合用, 桔梗宣肺化痰利咽, 薄荷脑祛风利咽, 共为佐药。全方宣降、敛润并举, 共行止嗽化痰之功。^[2]

临床应用: 咳嗽痰热蕴肺, 肺气不畅所致, 症见咳重痰黏, 咽干喉痛, 胸闷不通, 苔薄黄, 脉滑数或弦数; 支气管炎见上述证候者。

它收载于《中国药典》2020年版一部^[1], 标准中设置的检验项目有性状、三个鉴别项和可待因的含量测定项。本文采用高效液相色谱法, 对方中有效成分吗啡的含量测定方法进行了研究, 为更好地控制枇杷止咳颗粒的质量提供了可靠的方法依据。

一、材料, 仪器与试药

(一) 材料

枇杷止咳颗粒(批号: 190901、191001、191101)与枇杷叶、罂粟壳、百部、白前、桑白皮、桔梗、薄荷脑等饮片; 吗啡(批号: 171201-201825含量93.6%)对照品购自中国食品药品检定研究院;

(二) 仪器

高效液相色谱仪: waters e2695; 检测仪PDA2998; 二极阵列检测器; 工作站: Empower 3。

(三) 试剂, 试药

流动相所用的试剂为色谱纯, 其他试剂、试药均为分析纯。

二、枇杷止咳颗粒中吗啡定量测定

(一) 色谱条件

色谱柱: 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Venusil MP C18); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸(1.5: 98.5); 检测波长: 210nm; 柱温: 室温; 流速: 1.0ml/min;

(二) 对照品溶液的制备

称取吗啡适量用25%甲醇溶解制成每ml含吗啡0.02mg;

(三) 供试品溶液的制备

取本品适量, 研细, 过80目筛, 取约2g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中。精密加入50%甲醇20ml, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率300W, 频率40kHz)20分钟, 放冷, 再称定重量, 用50%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液5ml, 置中性氧化铝柱(直径1cm, 100-200目中性氧化铝1.5g)上, 用水洗脱至10ml容量瓶中, 至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45μm)滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

(四) 测定波长的选择

采用watersPDA2998, 对吗啡对照品与相应的枇杷止咳颗粒样品中的各分离色谱峰分别进行了光谱扫描, 扫描结果表明: 吗啡扫描光谱在209nm处吸收较大(见图1)。所以确定吗啡选择209nm为测定波长。

(五) 样品超声时间的确定

样品中所含的吗啡为已煮提出来的成分, 以盐的形式存在, 易溶于水, 且辅料为易溶于水的蔗糖, 为减少辅料的溶出, 故选择50%甲醇作提取溶剂。所以取同一批样品3份, 按15、20、25分钟, 进行超声时间的比较, 超声15分钟吗啡含量0.193 mg/g; 20分钟吗啡含量0.222 mg/g; 25分钟20吗啡含量0.226 mg/g。结果表明: 20分钟即可将被测成分全部提出。

(六) 对照品溶解溶媒的确定

对于进样对照品的溶解溶媒, 曾用25%甲醇和流动相进行了波峰分离情况的比较研究, 结果表明: 25%甲醇作溶媒存在波峰的前拖尾现象, 流动相作溶媒则波峰分离良好。所以对对照品的进样样品用流动相稀释。

(七) 线性范围

精密称取吗啡对照品适量, 按对照品溶液的制备项下, 制成每ml相当含吗啡0.337, 0.842, 1.683, 4.208, 8.417mg的溶液。各进样10μl, 测其峰面积, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制标准曲线。(结果最后附表1), 吗啡在0.0337~0.8417μg, 进样量与峰面积呈良好的线性关系。吗啡的回归方程为: $Y=4839446.40378x-746.52911$, $r=0.99997$; (结果最后见附图2)。

(八) 精密度实验

取每ml含吗啡16.83μg的对照品溶液与相应的供试品溶液, 各进样5次, 吗啡对照品的平均值为816097.8, RSD为0.86%; 吗啡的平均值为544595.6, RSD为1.03%。详细结果(最后附表2), 说明仪器性能良好。

(九) 稳定性试验

取精密度试验项下的对照品溶液与供试品溶液, 每隔一定时间向高效液相色谱仪注入一针, 考察了24小时内的稳定性, 对照品吗啡的RSD为0.94%; 供试品中吗啡的RSD为0.67%。详细结果(最后附表3), 说明对照品与供试品在24小时内稳定。

(十) 重复性试验

取同一批样品9份, 按供试品制备及色谱条件项下, 进行提取, 制备, 测定。同批样品9次测定的结果, 吗啡的RSD为1.51%。详细结果(最后附表4), 说明方法重现性良好。

(十一) 回收率试验

采用加样回收试验。取同一批样品10份, 一份作为平行样品, 其余9份按高、中、低剂量, 取适量样品, 加上

一定量的对照品，按供试品制备及色谱条件项下，进行提取，制备，测定，计算回收率。吗啡的平均回收率为99.21% (n=9)，RSD为2.34%；（最后附表5）。

(十二) 空白试验

取对照品溶液、供试品溶液与空白溶液（处方中不加罂粟壳的样品），分别采用上述色谱条件，进行色谱测定。样品与对照品在同一保留时间有相同的波峰出现，而空白溶液则无相应的峰，证明空白样品不干扰测定，含量测定专属（见图3，4，5）。

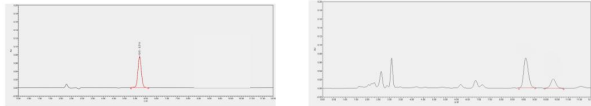


图3 吗啡对照品 HPLC 图

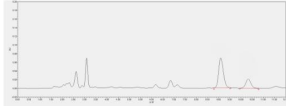


图4 枇杷止咳颗粒中吗啡对照品 HPLC 图

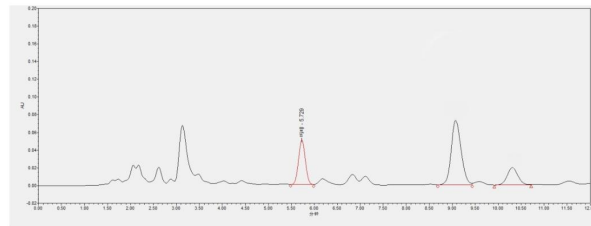


图5 枇杷止咳颗粒样品 HPLC 图

(十三) 样品的测定

取供试品，按供试品制备及色谱条件项下，进行提取，制备，测定，以外标一点法计算含量结果（最后附表6）。

三、制剂中盐酸吗啡含量标准制定

吗啡（中国药典2020年版一部罂粟壳项下吗啡的限度

是：本品按干燥品计，含吗啡应为0.06%~0.4%。枇杷止咳颗粒中盐酸吗啡的含量最低限按实际吗啡转出率57%计算，药材低限0.06%，水分含量高限12%计算， $0.6\text{mg/g} \times (167\text{g} \div 1000) \times 57\% \times 88\% = 0.050\text{mg/g}$ ；最高限吗啡按转出率按100%计算，药材高限0.4%，水分含量高限12%计算， $4\text{mg/g} \times (167\text{g} \div 1000) \times 100\% \times 88\% = 0.588\text{mg/g}$ ，因此吗啡的含量暂规定在0.050~0.588mg/g。

四、讨论

本实验还采用三个厂家的色谱柱，色谱柱型号分别为：岛津 Inertsil ODS-3 (5 μm 4.6mm \times 250mm)、菲罗门phenomenex C18 (250 \times 4.6mm 5 μm)、迪马 Dima Diamonsil, C18 (5 μm 4.6mm \times 250mm)，考察对分离及测定的影响，结果3种C18色谱柱柱效、分离度均符合要求，并且含量无明显区别，故认为本法对C18色谱柱品牌无特定要求。

参考文献

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典2020年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020年5月, P1108.
- [2] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典《临床用药须知》中药成方制剂卷2015年版[M]. 中国医药科技出版社. 北京. 2017年9月第1版, P338.

作者简介:

高峰 (1982-), 女, 助理工程师, 研究方向为中药质量研究。

通讯作者: 刘灵芝 (1981-), 女, 工程师, 研究方向为中药鉴定, 中药质量研究。

附图 (1-2):

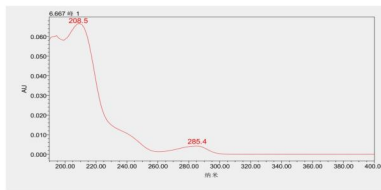


图1 吗啡吸收光谱

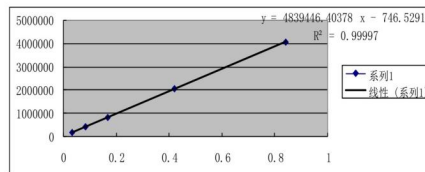


图2 吗啡对照品线性图

附表 (1-6):

表1 吗啡线性范围

吗啡					
进样量 (μg)	0.0337	0.0842	0.1683	0.4208	0.8417
峰面积	159402	405577	808650	2051553	4065936
回归方程	$Y = 4839446.40378x - 746.52911, \gamma = 0.99997$				

表6 样品中吗啡的含量测定结果

枇杷止咳颗粒 (批号)	吗啡总含量 (mg/g)
130901	0.355
131001	0.222
131101	0.522

表2 吗啡的精密密度实验结果

吗啡对照品	样品中吗啡
818283	543606
819846	553036
817119	539588
821352	546895
803889	539853
X	544595.6
RSD%	1.03

表3 吗啡稳定性实验结果

稳定时间 (hr)	吗啡对照品	样品中吗啡
0	818139	546051
2	804896	541666
8	812659	545642
12	825448	546679
24	812570	540616
X	814742.4	544130.8
RSD%	0.94	0.6

表4 吗啡的重复性实验结果

测定次数	吗啡 (mg/g)
1	0.515
2	0.521
3	0.526
4	0.519
5	0.525
6	0.523
7	0.525
8	0.519
9	0.522
X	0.522
RSD%	0.7

表5 吗啡的回收率试验结果

对照品加入量 (μg)	总测得量 (μg)	样品测得量 (μg)	对照品测得量 (μg)	回收率 (%)	X (%)	RSD (%)
420.8	940	520.7	419.3	99.6		
420.8	939.2	522	417.2	99.1		
420.8	945.2	523	422.2	100.3		
814.7	1363	521.6	841.4	103.3		
814.7	1347.9	522.3	825.6	101.3	99.21	2.34
814.7	1330.1	523.5	806.6	99.0		
1262.5	1754.8	523.7	1231.1	97.5		
1262.5	1748.9	524.3	1224.6	97.0		
1262.5	1729.6	522.2	1207.4	95.6		