

酸性染料比色法测定咳喘口服溶液中盐酸麻黄碱的含量方法改进

李文静*, 徐进#, 景霞, 初立梅(南京医科大学附属南京儿童医院药学部, 南京 210008)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3534-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.29

摘要 目的:对酸性染料比色法测定咳喘口服溶液中盐酸麻黄碱的含量测定方法进行改进。方法:分别考察了酸性染料(溴麝香草酚蓝)溶液pH值为5.0、5.8和6.5,提取试剂为三氯甲烷、乙酸乙酯、乙醚和二氯甲烷-乙酸乙酯(50:50)时对盐酸麻黄碱吸光度的影响,在此基础上考察了酸性染料和提取试剂的用量,并优化了反应用具和吸收波长;同时与原方法比较测定结果。结果:最终确定的优化后的反应条件如下:3 ml的样品溶液加入4 ml酸性染料溶液(pH 5.8),经4 ml三氯甲烷提取后,在414 nm波长处测定吸光度。盐酸麻黄碱检测质量浓度线性范围为5.00~20.00 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.998\ 3$),低、中、高3个质量浓度的回收率均大于98% ($\text{RSD}=1.78\%$, $n=9$);2种方法测得的盐酸麻黄碱的平均含量差别不大,但是改进后方法与原方法的RSD分别为0.15%~0.55%、1.45%~3.25%。结论:改进后的含量测定方法准确度高、重现性好,操作简便、快速,可用于咳喘口服溶液中盐酸麻黄碱的含量测定。**关键词** 咳喘口服溶液;盐酸麻黄碱;酸性染料比色法;含量测定;改进

Improvement of the Method for Content Determination of Ephedrine Hydrochloride in Kechuan Oral Solution by Acid Dye Colorimetry

LI Wen-jing, XU Jin, JING Xia, CHU Li-mei (Dept. of Pharmacy, Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve acid dye colorimetry for content determination of ephedrine hydrochloride in Kechuan oral solution. METHODS: The effects of acid dyes (bromothymol blue) solution (pH 5.0, 5.8 and 6.5) and extract solution of chloroform, ethyl acetate, diethyl ether and dichloromethane-ethyl acetate (50:50) on ephedrine hydrochloride were investigated. The volume of acid dye and extract solution were investigated, and the instruments and absorption wavelength were optimized on the basis of pre-research. The results of optimized method was compared with previous method. RESULTS: The optimized method was as follows: 3 ml sample solution mixed with 4 ml volume acid dyes solution (pH 5.8); after extracted with 4 ml chloroform, the absorbance was determined at 414 nm. The linear range of ephedrine hydrochloride was 5.00-20.00 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.998\ 3$). The recoveries of method were over 98% ($\text{RSD}=1.78\%$, $n=9$) at low, medium and high concentrations. There was no significant difference in the contents of ephedrine hydrochloride by 2 kinds of methods. RSD of optimized method and previous method were 0.15%-0.55% and 1.45%-3.25%, respectively. CONCLUSIONS: The optimized method is accurate, reproducible, simple and rapid, which is suitable for the content determination of ephedrine hydrochloride in Kechuan oral solution.

KEY WORDS Kechuan oral solution; Ephedrine hydrochloride; Acid dye colorimetry; Content determination; Improvement

我院的自制制剂咳喘口服溶液临床用于治疗支气管哮喘及痉挛性咳嗽,具有止咳、平喘、祛痰的作用。其中,盐酸麻黄碱是其发挥药效的主要成分。目前对于盐酸麻黄碱含量测定方法的文献报道很多,2010年版《中国药典》^[1]中对盐酸麻黄碱原料药采用高氯酸滴定法进行含量测定,而在盐酸麻黄碱注射液和盐酸麻黄碱滴鼻液^[1]制剂中则采用高效液相色谱(HPLC)法。咳喘口服溶液是水溶液制剂,因此在非水介质中进行的高氯酸滴定法不适用于其中麻黄碱的含量测定;同时咳喘口服溶液属于中西药复方制剂,处方组成较为复杂,盐酸麻黄碱的提取以及制剂中其他成分与辅料对测定的干扰较大,因此HPLC法也不适用^[2-3]。我院根据长期的探索实践,制订了咳喘口服溶液中测定盐酸麻黄碱含量的方法,即采用紫外-可见分光光度法测定主成分与酸性染料结合后的吸光度,据此计算盐酸麻黄碱的含量。目前该方法中的化学反应是在

分液漏斗中进行,操作较为烦琐,主成分与酸性染料结合的时间较长,且试验结果重现性较差。本文旨在通过对酸性染料比色法反应条件(包括吸收波长、酸性染料的用量及pH值、提取试剂种类及用量)的考察,对该含量测定方法进行改进,并简化试验步骤,使测定结果更加准确、稳定,为进一步全面控制咳喘口服溶液的质量提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

UV-1750紫外-可见分光光度计[日本岛津(中国)有限公司];BS-124S电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 药品与试剂

咳喘口服溶液样品(自制,批号:120221、120327、120508,盐酸麻黄碱含量:2 mg/ml);盐酸麻黄碱对照品(赤峰艾克制药有限公司,批号:110337,纯度:100.7%);羧甲基半胱氨酸(武汉远大弘远药业有限公司,批号:20100606);远志酊[广州星群(药业)股份有限公司,批号:HS40010];浓氨水、氢氧化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、三氯甲烷和无水硫酸钠均为分析纯;单糖浆、纯化水均为自制。

* 药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:025-83117221。E-mail:liwenjing_599@163.com

通信作者:副主任中药师。研究方向:医院药学与临床药学。电话:025-83117223。E-mail:xujin_cn@163.com

2 方法与结果

2.1 处方

盐酸麻黄碱 2 g, 羧甲基半胱氨酸 20 g, 远志酊 200 ml, 浓氨水、单糖浆适量, 加纯化水至 1 000 ml。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称定减压干燥至恒重的盐酸麻黄碱对照品适量, 加水超声溶解, 定量配制成 2.00 mg/ml 的对照品溶液备用。使用时可加水稀释成盐酸麻黄碱对照品溶液稀释液 (8 μ g/ml)。

2.2.2 样品溶液的制备: 使用时定量量取样品溶液 1 ml 至 250 ml 量瓶中, 加水稀释成样品溶液稀释液。

2.2.3 空白溶液的制备: 依照处方工艺, 配制不含盐酸麻黄碱的空白溶液备用。使用时定量量取上述样品溶液 1 ml 至 250 ml 量瓶中, 加水稀释成空白溶液稀释液。

2.3 酸性染料比色法反应原理

盐酸麻黄碱属于生物碱类药物, 与氢离子结合生成生物碱阳离子; 而溴麝香草酚蓝属于酸性染料, 可解离成阴离子。上述阳离子与阴离子定量结合成有机络合物后可以定量地用有机溶剂提取, 在一定的波长处测定该络合物的吸光度, 即可计算出生物碱的含量。

2.4 原有的含量测定方法

分别精密量取上述盐酸麻黄碱对照品溶液、空白溶液、样品溶液的稀释液 (1 ml \rightarrow 250 ml) 各 5 ml, 置于 60 ml 分液漏斗中, 依次加入溴麝香草酚蓝试液 5 ml (pH 6.5)、三氯甲烷 5 ml, 充分摇匀后, 放置 2 h。取三氯甲烷层置于含无水硫酸钠 0.5 g 的具塞试管中, 在 420 nm 波长处测定吸光度 A 值。依照以下公式计算盐酸麻黄碱的含量 (咳喘口服液中盐酸麻黄碱的含量应为标示量的 95.0%~105.0%): $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

2.5 反应条件的优化

2.5.1 反应用具的考察: 原有的含量测定方法中, 反应在分液漏斗中进行, 操作较为烦琐; 且试验结果受分液漏斗振摇时间和静置分层时间影响较大, 导致试验的重现性较差, 因此笔者考虑将试验转移至具塞离心管中进行。笔者考察了在原有的试验条件下, 盐酸麻黄碱分别在分液漏斗和 20 ml 具塞离心管中提取时的回收率, 结果发现, 二者的回收率均在 98% 以上, 并无显著性差异。为简化操作步骤, 后续试验选择具塞离心管作为反应发生的用具。

2.5.2 酸性染料 pH 值的选择: 盐酸麻黄碱结构中含有羟基, 呈弱酸性, 而酸性染料比色法受酸性染料的 pH 值影响较大, 因此参考 2010 年版《中国药典》^[1], 分别考察 pH 值为 5.0、5.8、6.5 的溴麝香草酚蓝/磷酸盐缓冲溶液对盐酸麻黄碱吸光度的影响。结果发现, 酸性染料溶液 pH 值为 5.0 时, 盐酸麻黄碱的吸光度值为 0.2 左右; pH 值为 6.5 时, 吸光度值为 0.6, 但是同一质量浓度样品吸光度值差异很大, 分析原因可能是由于盐酸麻黄碱在这一条件下与酸性染料结合不稳定所致; pH 值为 5.8 时, 吸光度值为 0.5 左右, 且结果稳定重现, 因此初步确定酸性染料溶液的 pH 值为 5.8。笔者还发现在此 pH 值条件下, 盐酸麻黄碱与酸性染料的结合时间明显缩短, 由原来的放置 2 h 变为放置 10 min 即可, 且产物的吸光度值稳定。

2.5.3 提取试剂的选择: 在确定了酸性染料的 pH 值后, 笔者考察了提取试剂对样品提取的影响。分别考察盐酸麻黄碱在

5 ml 三氯甲烷、乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷-乙酸乙酯 (50:50) 中的提取回收率, 结果分别为 99%、27%、86% 和 65%, 因此选择三氯甲烷作为本试验的提取溶剂。

2.5.4 试剂用量的选择: 在原有含量测定方法下, 样品溶液、酸性染料以及提取试剂的体积比为 1:1:1。为了考察酸性染料与盐酸麻黄碱是否反应完全, 提取试剂对样品的提取是否完全, 以及从节约试剂的角度考虑, 笔者在确定了样品溶液的体积为 3 ml 的前提下, 考察了酸性染料溶液 (pH 5.8) 体积分别为 3、4、5 ml 时样品的吸光度值。结果发现酸性染料为 3 ml 时, 样品的吸光度为 0.2 左右, 而 4、5 ml 时吸光度相当, 均为 0.4 左右, 并无显著性差异, 因此确定酸性染料溶液 (pH 5.8) 体积为 4 ml。

在确定了样品体积为 3 ml、酸性染料溶液 (pH 5.8) 体积为 4 ml 后, 笔者考察了三氯甲烷分别为 3、4、5 ml 时对样品提取回收率的影响。结果发现, 提取试剂为 3 ml 时, 样品提取不完全; 增加提取试剂的用量, 吸光度会随之增加; 而当提取试剂增加到 4 ml 后, 吸光度不再增加; 提取试剂为 4、5 ml 时的提取效率相当, 因此选择三氯甲烷的用量为 4 ml。此外, 笔者还发现当酸性染料溶液的 pH 值为 5.8 时, 在氯仿层添加无水硫酸钠后, 吸光度会成倍增加, 且无水硫酸钠加入量的微小变化对吸光度影响很大, 会影响试验结果的准确性, 因此, 此方法中在样品测定前不再添加无水硫酸钠。

2.5.5 吸收波长的选择: 原有的含量测定方法选择 420 nm 作为检测波长, 笔者在 380~450 nm 波长处对按改进方法处理后的空白溶液、对照品溶液以及样品溶液进行全扫描, 结果发现, 盐酸麻黄碱在 414 nm 波长处有最大吸收, 因此确定这一波长为本试验的吸收波长, 见图 1。

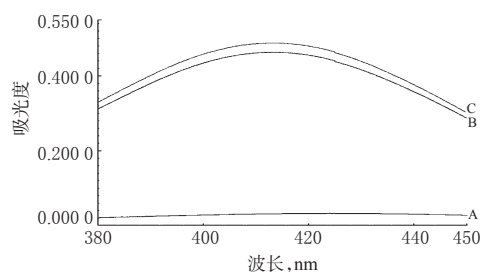


图1 紫外吸收光谱图

A. 空白溶液; B. 对照品溶液; C. 样品溶液

Fig 1 UV absorption spectrum

A. blank solution; B. substance control solution; C. sample solution

综上所述, 确定的反应条件如下: 样品溶液体积为 3 ml, pH 值为 5.8 的酸性染料 (溴麝香草酚蓝) 溶液 4 ml, 三氯甲烷 4 ml, 吸收波长为 414 nm。由于反应液的总体积为 11 ml, 因此反应在 10 ml 的具塞离心管中进行即可。

2.6 改进后的含量测定方法

分别精密量取上述空白溶液、盐酸麻黄碱对照品溶液和咳喘口服溶液样品溶液的稀释液 (1 ml \rightarrow 250 ml) 各 3 ml, 置于具塞离心管中, 依次加入酸性染料溶液 (取溴麝香草酚蓝 12.5 mg 溶于 pH 5.8 的磷酸盐缓冲液 100 ml 中即得) 4 ml, 三氯甲烷 4 ml, 充分摇匀后, 放置 10 min, 取三氯甲烷层至具塞离心管中, 在 414 nm 波长处测定吸光度 A 值, 计算盐酸麻黄碱的含量。

2.7 方法学验证

2.7.1 专属性试验: 由图 1 可见, 盐酸麻黄碱在 414 nm 波长处

有最大吸收,且在该波长处空白溶液的吸收值恒定。

2.7.2 标准曲线的制备:精密吸取盐酸麻黄碱对照品溶液适量置于量瓶中,加入纯化水分别定量稀释成盐酸麻黄碱质量浓度为5.00、6.67、8.00、10.00、16.00、20.00 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液,依照含量测定方法,在414 nm处分别测定吸光度,以吸光度(A)对质量浓度(c, $\mu\text{g/ml}$)进行线性回归,得回归方程: $A=0.029 3c+0.094 5$ ($r=0.998 3$)。结果表明,盐酸麻黄碱检测质量浓度线性范围为5.00~20.00 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.7.3 回收率试验:分别精密称取盐酸麻黄碱对照品0.16、0.20、0.24 g,按处方组成及比例加入辅料,溶解后用纯化水定容至100 ml配制成盐酸麻黄碱质量浓度为1.60、2.00、2.40 mg/ml的样品溶液,同时配制3种质量浓度的对照品溶液以及不含盐酸麻黄碱的空白溶液。将空白溶液、对照品溶液和样品溶液各取1 ml,用纯化水稀释至250 ml后,测定吸光度,计算回收率。结果显示低、中、高3种质量浓度的回收率均大于98%,详见表1。

表1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

| 样品质量浓度, mg/ml | 加入质量浓度, mg/ml | 测得质量浓度, mg/ml | 回收率, % | 平均回收率, % | RSD, % |
|---------------|---------------|---------------|--------|----------|--------|
| 1.60 | 0.18 | 1.74 | 97.5 | 99.2 | 1.78 |
| | | 1.77 | 99.4 | | |
| | | 1.74 | 97.5 | | |
| 2.00 | 0.16 | 2.13 | 98.5 | | |
| | | 2.13 | 98.5 | | |
| | | 2.12 | 98.0 | | |
| 2.40 | 0.15 | 2.57 | 100.8 | | |
| | | 2.62 | 102.9 | | |
| | | 2.55 | 100.0 | | |

2.7.4 精密度试验:取“2.7.3”项下对照品溶液(2.00 mg/ml),在1个分析批内测定5次,计算批内精密度;在不同天连续制备并测定3个分析批,计算批间精密度。结果表明,该方法精密度良好,批内和批间精密度的RSD值分别为0.26%和1.67% ($n=5$)。

2.8 咳喘口服溶液的含量测定

随机抽取我院自制的3批样品,分别照原有和改进后的含量测定方法对其中的盐酸麻黄碱进行定量,结果如表2所示。

表2结果显示,从平均含量的数值来看,2种方法测得的盐酸麻黄碱的平均含量差别不大,但是改进后的方法所测得的盐酸麻黄碱含量数据离散度较小(RSD值较小)、重现性好,测定结果更加准确、稳定。

3 讨论

表2 2种方法3批样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination of 3 batches of samples by 2 kinds of method($n=3$)

| 批号 | 原方法 | | | 改进后方法 | | |
|--------|-------|---------|--------|-------|---------|--------|
| | 含量, % | 平均含量, % | RSD, % | 含量, % | 平均含量, % | RSD, % |
| 120221 | 99.3 | 100.6 | 3.25 | 97.6 | 98.1 | 0.55 |
| | 104.3 | | | 98.7 | | |
| | 98.2 | | | 97.9 | | |
| 120327 | 95.5 | 97.2 | 1.45 | 98.7 | 98.9 | 0.26 |
| | 98.1 | | | 98.9 | | |
| | 97.9 | | | 99.2 | | |
| 120508 | 96.6 | 98.7 | 2.89 | 99.2 | 99.3 | 0.15 |
| | 102.0 | | | 99.5 | | |
| | 97.5 | | | 99.2 | | |

咳喘口服溶液属我院自主研发的院内用自制制剂,其含量测定方法应具备准确度高、重现性好、操作简便、快速以及成本低的特点。其中盐酸麻黄碱的含量测定,已有的文献^[1-3]报道方法均不适合本制剂中盐酸麻黄碱的含量测定;虽然盐酸麻黄碱结构中含有手性中心,具有旋光性,还可以通过测定其旋光度进行定量,但是咳喘口服溶液中含有的单糖浆也具有旋光性,会干扰盐酸麻黄碱的测定,因此旋光法也不能作为其含量测定方法。

目前内控标准(原方法)所采用的酸性染料比色法受反应介质的pH、生物碱与酸性染料的结合能力、有机溶剂与离子对形成氢键的能力影响很大^[4]。因此本文对酸性染料比色法的反应条件酸性染料的pH值及用量、提取试剂的种类及用量和吸收波长进行了考察,最终确定了上述反应条件,改进了原有的含量测定方法,简化了试验步骤,使测定结果更加准确、稳定,为进一步全面控制咳喘口服溶液的质量提供了试验依据,并为我院其他种类自制制剂质量标准的建立提供了参考。

参考文献

- [1] 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,2010:777-778、附录176-177.
- [2] 王林丽,陈亮,傅若秋,等.HPLC法测定抗病毒口服液盐酸麻黄碱的含量[J].中国药房,2007,18(15):1166.
- [3] 陈佩,翟宇,王曼泽.HPLC法测定小儿清热止咳口服液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和苦杏仁苷的含量[J].中国药房,2011,22(44):4212.
- [4] 杜萌,刘璇,丁安伟,等.酸性染料比色法测定百合中总生物碱的含量[J].江苏中医药,2012,44(1):62.

(收稿日期:2012-12-10 修回日期:2013-01-22)

国家食品药品监督管理局启用新版药品注册申请表报盘程序

本刊讯 根据国务院《关于第六批取消和调整行政审批项目的决定》(国发[2012]52号)、原国家食品药品监督管理局《关于落实国务院决定做好第六批取消调整行政审批项目后续监管和衔接工作的通知》(国食药监法[2012]323号)及国家食品药品监督管理局“三定”方案有关要求,总局对药品注

册申请表报盘程序进行了调整,自2013年10月1日起启用。

自2013年10月1日起,申请人申请药品注册须提交由新版《药品注册申请表报盘程序》生成的电子及纸质文件。新版《药品注册申请表报盘程序》请登陆www.cfd.gov.cn下载。