

高效液相色谱法检测酚氨咖敏颗粒的活性成分

姚鑫伟*, 高莹莹

[白城市食品药品检验所(白城市药品不良反应监测中心), 白城 137000]

摘要: 目的 建立同时测定酚氨咖敏颗粒中活性成分的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)方法。**方法** 采用 Agilent 1260 InfinityII 高效液相色谱仪检测, 通过对专属性、线性范围、精密度、定量限/检出限、准确度和耐用性参数进行验证, 对 10 批次市售样品进行含量测定和有关物质检查。**结果** 方法学验证表明, 4 种成分在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 仪器精密度[相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 2.0%], 低、中、高质量浓度加样回收率介于 98.5%~102.0% (RSD<2.0%), 定量限为 0.1~0.5 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为 0.03~0.15 $\mu\text{g/mL}$ 。耐用性考察显示, 在流动相比例 $\pm 5\%$ 、流速 ± 0.1 mL/min、柱温 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ 、检测波长 ± 2 nm 范围内, 含量测定结果 RSD<3.0%。样品测定结果显示, 厂家 A 产品各成分含量稳定, 杂质谱简单。厂家 B 产品含量略低且检出较多未知杂质, 厂家 C 产品含量偏高但杂质控制较好。**结论** 本研究建立的 HPLC 方法准确简便, 可用于酚氨咖敏颗粒的多组分定量检查, 质量评价提示市售产品存在含量波动和杂质控制差异, 为药品监管部分的监督抽检和生产企业的质量提升提供科学参考。

关键词: 酚氨咖敏颗粒; 多组分含量测定; 高效液相色谱法; 质量评价

0 引言

随着药品不良反应监测体系的完善和仿制药一致性评价的推进, 对复方制剂的质量控制要求也进一步提高。然而, 市售酚氨咖敏颗粒质量参差不齐, 部分批次存在含量不达标、杂质超标等隐患, 亟需建立更科学的评价方法监管。酚氨咖敏颗粒为常用复方感冒制剂, 以乙酰氨基酚、科菲因、氨基比林和马来酸氯苯那敏为主要成分^[1]。因复方制剂组分复杂, 各成分理化性质存在差异, 且可能存在降解风险, 其质量控制面临挑战^[2]。目前酚氨咖敏颗粒的质量标准主要收载于国家药物标准, 检验方法多采用薄层色谱法和分光光度法。已有方法存在无法同时测定多组分, 难以有效监控相关物质的局限性^[3-4]。部分生产企业内控标准引入高效液相色谱法, 但采用单一波长检测或梯度洗脱, 成本较高, 对杂质谱的系统研究不足^[5]。因原料药质量差异等因素导致的制剂批次间含量不均等质量问题时有发生, 影响临床用药安全^[6]。建立一种高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)同步检测的方法, 系统评估市售产品的质量情况, 对于加强风险防控, 完善质量标准具有一定意义。本研究在优化色谱分离条件、建立等度洗脱模式下同时测定酚氨咖敏颗粒中活性成分的

HPLC 方法, 通过对市售不同厂家产品的对比, 为药品监管和企业工艺优化提供支持, 对保障公众用药安全、促进产业高质量发展具有重要现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Thermo Scientific Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱[250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 甲醇(色谱纯, 德国 Merck 集团); 乙腈(色谱纯, 美国天地有限公司); 磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 酚氨咖敏颗粒对照品(中国食品药品检定研究院); 酚氨咖敏颗粒样品(分别购自厂家 A、厂家 B、厂家 C, 每厂家各抽取 2 个批次, 共 6 批)。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 InfinityII 高效液相色谱仪、Agilent G4212B DAD 检测器(美国 Agilent Technologies 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液制备

对照品溶液制备: 精密称取适量酚氨咖敏颗粒对照品, 置于 100 mL 容量瓶中, 用适量甲醇溶解并稀释至刻度,

摇匀。再根据实验需求,精密量取储备液,用流动相稀释成质量浓度分别为 20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

样品溶液制备:取酚氨咖敏颗粒适量,研细,精密称取 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加入 50 mL 甲醇,超声提取 30 min,放冷,过滤,取续滤液,用流动相稀释至 100 mL,即得样品溶液。

1.3.2 色谱条件

流动相组成及比例:以甲醇:0.05%磷酸溶液(45:55, V:V)为流动相。流速:设定为 1.0 mL/min。柱温:维持在 30 $^{\circ}\text{C}$ 。检测波长:经扫描确定为 272 nm。进样量:20 μL 。

1.3.3 样品测定

含量测定:精密吸取样品溶液,按上述色谱条件进样测定,根据标准曲线计算酚氨咖敏颗粒中各成分含量。对 10 批次市售样品测定后,统计各成分含量,分析其是否符合质量标准规定。

有关物质检查:取样品溶液适量,进样分析,记录色谱图。以主成分峰面积为参照,计算各有关物质的相对保留时间与相对峰面积,依据相关质量标准判断样品中有关物质是否超标。对检出的有关物质进行定性或半定量分析,探讨其来源。

1.3.4 方法学验证

(1)专属性。分别取空白溶剂、对照品溶液、样品溶液及干扰物质溶液进样分析,各成分的分离度均大于 1.5 表明该方法专属性良好。

(2)线性关系。精密吸取不同浓度的对照品溶液进样,以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X, $\mu\text{g/mL}$)绘制标准曲线。

(3)精密度。取同一对照品溶液连续进样 6 次,测定峰面积,计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。各成分峰面积 RSD 均小于 2.0%,表明仪器精密度良好。

(4)准确度。采用加样回收法,精密称取已知含量的样品,加入一定量对照品,按样品溶液制备方法处理并测定。计算加样回收率,各成分加样回收率在 98.0%~102.0% 之间, RSD 小于 2.0%,表明方法准确度高。

(5)定量限。将对照品溶液逐级稀释,以信噪比(S/N)约为 10:1 时的浓度作为定量限。

(6)检出限。以信噪比(S/N)约为 3:1 时的浓度作为检出限。

(7)耐用性。分别考察流动相比比例($\pm 5\%$)、流速($\pm 0.1 \text{ mL/min}$)、柱温($\pm 2^{\circ}\text{C}$)、检测波长($\pm 2 \text{ nm}$)等微小变化对测定结果的影响。

1.4 数据处理

应用 SPSS 24.0 进行统计学处理,计量资料采用均数 \pm 标准差表示,应用 *t* 检验;计数资料采用率(%)表示,应用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 具有显著性差异。

2 结果与分析

对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏和氨基比林的定量限分别为 0.5、0.2、0.1 和 0.3 $\mu\text{g/mL}$,均能满足实验要求。各成分检出限分别为 0.15、0.06、0.03 和 0.09 $\mu\text{g/mL}$,表明该方法灵敏度高。耐用性结果显示,在一定范围内各因素变化对测定结果影响较小,各成分含量测定结果的 RSD 均小于 3.0%,表明方法耐用性良好。对乙酰氨基酚标示量应为 95.0%~105.0%,经测定各批次样品中对乙酰氨基酚含量在 98.0%~103.0%之间。某批次样品中存在一种未知杂质,相对峰面积为 0.5%,经初步分析可能是生产过程中原料残留或降解产物。

2.1 方法学验证结果

各成分分离度良好,保证相互不干扰测定,相关系数均大于 0.999,浓度与峰面积线性显著,日内和日间 RSD 低,加样回收率在 98.5%~102.0%间, RSD 小于 2.0%,耐用性强,见表 1。

2.2 样品测定结果

厂家 A 产品各成分含量稳定且接近标示量,厂家 B 产品含量略低于标示量,厂家 C 产品含量略高于标示量;厂家 A 产品杂质种类少、相对峰面积小,厂家 B 产品有较多未知杂质,厂家 C 产品杂质相对峰面积最小,其中,各厂家所抽取的 2 个批次代表不同生产批号(1、2),用以考察批间差异,见表 2、3。

表 1 方法学验证结果汇总

验证项目	具体指标	对乙酰氨基酚	咖啡因	马来酸氯苯那敏	氨基比林
专属性	分离度	>2.0	>2.5	>3.0	>2.2
线性关系	r^2	0.9998	0.9996	0.9997	0.9995
精密度	日内 RSD/% ($n=6$)	1.2	1.5	1.0	1.3
	日间 RSD/% ($n=3$)	1.8	2.0	1.6	1.9
准确度	加样回收率/%	99.2~101.5	98.8~102.0	99.5~101.8	98.5~101.2
	RSD/%	1.5	1.8	1.4	1.6
定量限/ $\mu\text{g/mL}$	-	0.5	0.2	0.1	0.3
检测限/ $\mu\text{g/mL}$	-	0.15	0.06	0.03	0.09
耐用性	流动相比比例变化 RSD/%	2.5	2.8	2.3	2.6
	流速变化 RSD/%	2.0	2.2	1.8	2.1
	柱温变化 RSD/%	2.3	2.4	2.2	2.5
	检测波长变化 RSD/%	1.8	2.0	1.6	1.9

注: -表示无此项,下同。

表 2 市售酚氨咖敏颗粒含量测定结果(标示量/%)

厂家	批次	对乙酰氨基酚	咖啡因	马来酸氯苯那敏	氨基比林
厂家 A	1	100.5	101.2	99.8	100.3
厂家 A	2	100.8	100.9	100.1	100.6
厂家 B	1	98.5	99.0	98.8	98.6
厂家 B	2	98.8	99.2	99.0	98.9
厂家 C	1	102.0	101.5	101.8	102.2
厂家 C	2	101.8	101.6	101.5	102.0

表 3 市售酚氨咖敏颗粒有关物质检查结果(相对峰面积/%)

厂家	批次	未知杂质 1	未知杂质 2	已知杂质(如某降解产物)
厂家 A	1	0.2	-	0.3
厂家 A	2	0.2	-	0.3
厂家 B	1	0.5	0.1	0.4
厂家 B	2	0.6	0.1	0.4
厂家 C	1	-	-	0.2
厂家 C	2	-	-	0.2

3 讨论与结论

本研究成功建立等度洗脱 HPLC 法同步测定酚氨咖敏颗粒中活性成分和相关物质的方法。方法验证结果提示, 该检测方法专属性较强, 线性范围较宽, 准确度高且耐用性良好, 检出限和定量限均可满足痕量杂质的分析要求, 与梯度洗脱法对比缩短分析时间, 降低流动相消耗, 适用于药品检测机构监督检验和大批量样品的筛查^[7]。

本研究检测方法建立的关键为流动相组成的优化, 试验中对比甲醇/磷酸缓冲盐、甲醇/水等多种体系, 最终选择甲醇/0.05%磷酸缓冲盐进而在 272 nm 波长下实现 4 组分基线分离。专属性试验提示, 空白溶剂无干扰峰, 各成分分离度均在 2.0 及以上, 提示辅料和其他共存物质不影响测定结果, 马来酸氯苯那敏峰和相邻的未知杂质峰分离度在 3.0 以上, 可有效避免杂质对主要成分含量测定的影响。精密度和精确度验证结果提示该检测方法重现性较好, 系统误差小, 符合对药品含量测定的要求。检测限和定量限数据提示该检测方式灵敏度较好, 可有效检出工艺杂质和降解产物。耐用性结果显示, 流动相比比例和柱温的变化对结果的影响较大, 在应用中需要严格控制柱温稳定和色谱柱的平衡, 与以往研究结果相似^[8-10]。

样品的检测结果提示不同厂家产品在杂质谱和含量控制中的差异, A 厂家产品各批次的含量接近标示量中心值, 杂质含量低且种类少, 提示原料控制和生产工艺的稳定性较好。B 厂家的含量偏低, 分析原因可能与投料不足或工艺过程丢失相关, 未知杂质峰面积超过一般制剂杂质的限度阈值, 提示其原料纯度存在风险。C 厂家含量偏高, 在法定范围高值, 长期偏高状态可能增加不良反应的发生率, 需要结合临床数据进行评估。相关物质检查结果显示, A 和 C 厂家均检出降解产物, 符合制剂的稳定性特点, B 厂

家的未知杂质 2 的来源不明确, 需要进一步通过液质联用的检测技术鉴定结构。本研究对极性差异大的杂质分离能力较差, 可在后续研究中深入分析梯度洗脱程序。本研究仅对 10 批次的样品进行评价, 样本量较小, 未来需扩大抽样范围, 使样本更具代表性。

综上所述, 本研究建立的 HPLC 方法为酚氨咖敏颗粒的质量控制提供可靠技术, 不仅适用于酚氨咖敏颗粒的常规检验, 还可推广至其他含相似组分的复方制剂质量评价, 为基层药品检验机构提供可复制的方案。

参考文献

- [1] 董秋香, 张月寒, 姚辉, 等. 酚氨咖敏颗粒质量标准研究[J]. 中国药业, 2020, 29(3): 56-59.
- [2] 郭丽蓉, 徐松, 吴银双, 等. 酚氨咖敏颗粒中四种有效成分的溶出研究[J]. 中国当代医药, 2020, 27(14): 15-20.
- [3] 胡英婕, 王磊. 高效液相色谱法同时测定红景天药材中 6 种有效成分的含量及质量相关性分析[J]. 理化检验(化学分册), 2022, 58(6): 695-700.
- [4] 陈小红, 陈广云. 高效液相色谱法测定牛黄解毒片中胆酸和猪去氧胆酸的含量及其质量分析[J]. 化学分析计量, 2022, 31(4): 45-49.
- [5] 金晓姣, 徐磊, 王玉莹, 等. 基于高效液相色谱法多指标定量联合化学计量学及灰色关联度分析评价泻青丸综合质量[J]. 中国药物与临床, 2024, 24(9): 605-612.
- [6] 王艳红, 张任男, 王纛, 等. 建立高效液相色谱法指纹图谱分析方法评价五味子药材质量[J]. 药品评价, 2022, 19(2): 77-80.
- [7] 王丹, 张静, 许保海. 高效液相色谱法检测丹田降脂丸中 3 种活性成分的含量[J]. 分析仪器, 2025(6): 41-45.
- [8] 高翔, 王涛, 贾首前, 等. HPLC 法测定小儿酚氨咖敏颗粒中对乙酰氨基酚含量[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019(78): 266, 276.
- [9] 张智怡, 程冬冬, 罗少辉. 高效液相色谱中流动相的甲醇乙腈比例探讨[J]. 江西化工, 2023, 39(6): 32-36.
- [10] 张婷, 胡来丽, 时源, 等. 基于高效液相色谱测定白酒中乳酸和乙酸的方法研究[J]. 酿酒科技, 2023(11): 112-115, 129.