[14] 王艳宏，刘书博，王 锐，等. 中药挥发油促透皮吸收及透皮吸收作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(3)：192-199.

[15] 陈振华，刘苏珍，周 斌，等. 浅谈中药质量标准现状与几种质量评价方法[J]. 时珍国医国药，2016，27(3)：694-696.

# IP-RP-HPLC 法同时测定感冒清片中 3 种成分

朱链链[1]， 王丽琼[2*]
(1. 乐山职业技术学院，四川 乐山 614000；2. 乐山市食品药品检验检测中心，四川 乐山 614000)

**摘要：目的** 建立离子对反相高效液相色谱（IP-RP-HPLC）法同时测定感冒清片（南板蓝根、大青叶、对乙酰氨基酚等）中 3 种成分的含有量。**方法** 该药物 25% 甲醇提取物的分析采用 Waters XTerra $C_{18}$ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长215 nm。然后，按照 2015 年版《中国药典》四部方法计算含有量均匀度。**结果** 对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏分别在 96.66～966.63 μg/mL（$r$=0.999 9）、95.48～954.80 μg/mL（$r$=0.999 8）、4.08～40.84 μg/mL（$r$=1.000 0）范围内线性关系良好，平均加样回收率分别为 100.9%、99.5%、99.6%，RSD 分别为 1.2%、0.9%、1.2%。**结论** 该方法简便、快速、准确，可用于感冒清片的质量控制。

**关键词**：感冒清片；对乙酰氨基酚；盐酸吗啉胍；马来酸氯苯那敏；IP-RP-HPLC
**中图分类号**：R927.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2020)02-0313-04
**doi**:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.009

# Simultaneous determination of three constituents in Ganmaoqing Tablets by IP-RP-HPLC

ZHU Lian-lian[1]， WANG Li-qiong[2*]
(*1. Leshan Vocational and Technical College, Leshan 614000, China; 2. Leshan Food and Drug Inspection Center, Leshan 614000, China*)

**ABSTRACT: AIM** To establish an ion-pair reverse-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC) method for the simultaneous content determination of three constituents in Ganmaoqing Tablets (*Baphicacanthis cusiae Rhizoma* et *Radix*, *Isatidis Folium*, paracetamol, *etc.*). **METHODS** The analysis of 25% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Waters XTerra $C_{18}$ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.02 mol/Lpotassium dihydrogen phosphate flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 215 nm. Subsequently, the content uniformity was calculated according to Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition, Part Ⅳ) method. **RESULTS** Paracetamol, moroxydine hydrochloride and chlorphenamine maleate showed good linear relationships within the ranges of 96.66-966.63 μg/mL ($r$=0.999 9), 95.48-954.80 μg/mL ($r$=0.999 8) and 4.08-40.84 μg/mL ($r$=1.000 0), whose average recoveries were 100.9%, 99.5% and 99.6% with the RSDs of 1.2%, 0.9% and 1.2%, respectively. **CONCLUSION** This simple, rapid and accurate method can be used for the quality control of Ganmaoqing Tablets.

**KEY WORDS**: Ganmaoqing Tablets; paracetamol; moroxydine hydrochloride; chlorphenamine maleate; IP-RP-HPLC

**收稿日期**：2019-05-29

**作者简介**：朱链链（1986—），女，硕士生，讲师，研究方向为药物分析。E-mail：406083528@qq.com
*通信作者：王丽琼（1986—），女，硕士，主管药师，从事药物分析及药品质量控制研究。E-mail：527414762@qq.com

感冒清片属于抗感冒药类中西药复方制剂，由 3 种西药（对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏）和 6 种中药（南板蓝根、大青叶、金盏银盘、岗梅、山芝麻、穿心莲叶）制成，该类制剂应用广泛，但其不良反应问题也居高不下[1]，业界大多认为其原因是在临床使用时易忽略所含化学成分，关键项目（如有关物质、含有量均匀度、溶出度）缺失，故建议对该类药物进行再评价[2]。

文献［3-8］报道，采用 HPLC 法测定对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏单一或多种成分含有量，但盐酸吗啉胍保留弱，易受溶剂峰干扰，而在流动相中加入离子对试剂可使分离变好。本实验建立离子对反相高效液相色谱（ion-pair reverse-phase high performance liquid chromatography，IP-RP-HPLC）法同时测定感冒清片中对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏的含有量，并考察三者含有量均匀度，以期为该制剂质量标准提高提供依据。

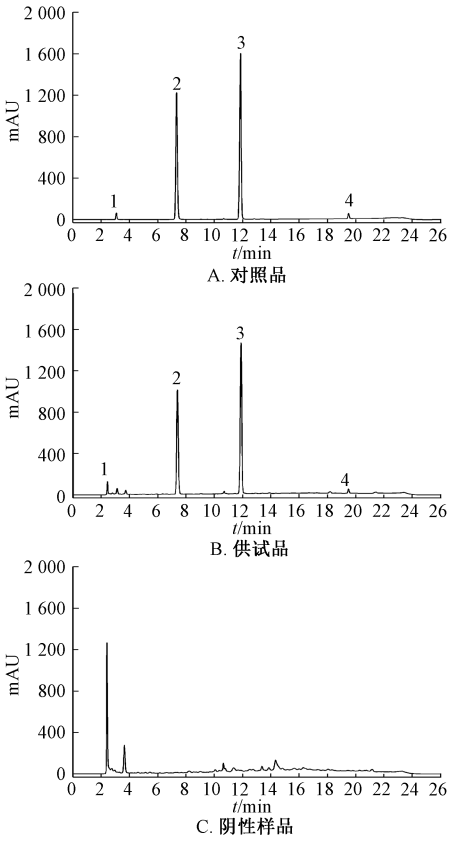
## 1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪（配置四元泵、DAD 检测器）；XS205 电子天平、FE28 PH 计（瑞士梅特勒-托利多公司）；CQ-100B 超声波清洗机（上海跃进医用光学器械厂）。

1.2 试剂与药物 对乙酰氨基酚（100018-201610，质量分数 99.9%）、盐酸吗啉胍（100483-200402，质量分数 100%）、马来酸氯苯那敏（100047-201507，质量分数 99.7%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。感冒清片（广东一片天医药集团制药有限公司，批号 171113、171208；广东南国药业有限公司，批号 170606），每片含对乙酰氨基酚 12 mg、盐酸吗啉胍 12 mg、马来酸氯苯那敏 0.5 mg。甲醇为色谱纯或分析纯；磷酸、磷酸二氢钾为分析纯；辛烷磺酸钠（离子对色谱试剂）；水为纯化水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters XTerra$C_{18}$色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇（A）-0.02 mol/L 磷酸二氢钾（含 0.005 mol/L 辛烷磺酸钠，10% 磷酸调节 pH 至 3.0）（B），梯度洗脱（0～20 min，10%～75% A；20～21 min，75%～10% A；21～26 min，10% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 215 nm；进样量 10 μL。色谱图见图 1。由此可知，各成分分离度良好，理论塔板数按对乙酰氨基酚峰计为 18 394，其他成分在三者保留时间上没有色谱峰，不干扰测定。




1. 马来酸 2. 对乙酰氨基酚 3. 盐酸吗啉胍 4. 氯苯那敏
1. maleic acid 2. paracetamol 3. moroxydine hydrochloride 4. chlorphenamine

**图 1 各成分 HPLC 色谱图**

**Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents**

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品对乙酰氨基酚 48.38 mg、盐酸吗啉胍 47.74 mg，置于同一 50 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH=3.0）溶解；精密称取马来酸氯苯那敏对照品 10.24 mg，置于 10 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH=3）溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 2 mL，置于上述 50 mL 量瓶中，溶剂稀释至刻度，作为贮备液。精密量取 5 mL 于 10 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH=3）稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.2 供试品溶液 取本品 10 片，精密称定质量，计算平均片重，研细，取约 0.22 g（相当于 12 mg 对乙酰氨基酚），置于 25 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH=3）超声助溶，放冷，25% 甲醇（pH=3）稀释至刻度，摇匀，滤过，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例分别制备不含对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 定量限 精密称取对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏对照品适量，25% 甲醇（pH=

3）溶解并分别稀释成 0.32、0.05、0.51 μg/mL，在“2.1”项色谱条件下进样测定。结果，三者信噪比（S/N）分别为 37.2、43.8、46.8（以氯苯那敏峰计）；以 S/N = 10，得定量限分别为 0.09、0.01、0.11 μg/mL。

2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 1、2、4、6、8 mL，置于 10 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH = 3）稀释至刻度，摇匀，得线标溶液，取其与对照品溶液共 6 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（$X$），峰面积为纵坐标（$Y$）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

**表 1 各成分线性关系**

**Tab. 1 Linear relationships of various constituents**

| 成分 | 回归方程 | $r$ | 线性范围/（μg·mL$^{-1}$） |
|---|---|---|---|
| 对乙酰氨基酚 | $Y$ = 15.65$X$ + 123.38 | 0.999 9 | 96.66 ~ 966.63 |
| 盐酸吗啉胍 | $Y$ = 23.53$X$ + 187.46 | 0.999 8 | 95.48 ~ 954.80 |
| 马来酸氯苯那敏 | $Y$ = 14.52$X$ − 0.54 | 1.000 0 | 4.08 ~ 40.84 |

注：马来酸氯苯那敏测定结果以氯苯那敏计。

2.5 精密度试验 精密量取“2.2.2”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏峰面积 RSD 分别为 0.2%、0.2%、0.4%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批本品（批号 171113），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏（以氯苯那敏计）含有量 RSD 分别为 1.2%，1.0%、1.3%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液，室温下于 0、2、4、6、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、氯苯那敏峰面积 RSD 分别为 0.4%，0.6%、1.1%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的本品 6 份（批号 171113），每份约 0.11 g，置于 6 个 25 mL 量瓶中；精密称取对照品对乙酰氨基酚 60.21 mg、盐酸吗啉胍 60.02 mg，置同一 10 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH = 3）溶解并稀释至刻度，精密量取1 mL，置于上述 25 mL 量瓶中；精密称取马来酸氯苯那敏对照品 12.51 mg，置于 50 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH = 3）溶解并稀释至刻度，精密量取 1 mL，置于上述 25 mL 量瓶中，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 2。

**表 2 各成分加样回收率试验结果（$n$ = 6）**

**Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents（$n$ = 6）**

| 成分 | 原有量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对乙酰氨基酚 | 6.124 | 6.015 | 12.156 | 100.3 | 100.9 | 1.2 |
| | 6.041 | 6.015 | 12.149 | 101.5 | | |
| | 5.975 | 6.015 | 12.169 | 103.0 | | |
| | 6.118 | 6.015 | 12.113 | 99.7 | | |
| | 6.063 | 6.015 | 12.118 | 100.7 | | |
| | 6.080 | 6.015 | 12.099 | 100.1 | | |
| 盐酸吗啉胍 | 5.524 | 6.002 | 11.557 | 100.5 | 99.5 | 0.9 |
| | 5.450 | 6.002 | 11.372 | 98.7 | | |
| | 5.390 | 6.002 | 11.409 | 100.3 | | |
| | 5.519 | 6.002 | 11.412 | 98.2 | | |
| | 5.470 | 6.002 | 11.469 | 100.0 | | |
| | 5.485 | 6.002 | 11.462 | 99.6 | | |
| 马来酸氯苯那敏 | 0.234 | 0.249 | 0.480 | 98.9 | 99.6 | 1.2 |
| | 0.231 | 0.249 | 0.483 | 101.3 | | |
| | 0.228 | 0.249 | 0.480 | 100.3 | | |
| | 0.234 | 0.249 | 0.480 | 99.7 | | |
| | 0.232 | 0.249 | 0.477 | 99.4 | | |
| | 0.232 | 0.249 | 0.478 | 97.9 | | |

2.9 样品含有量测定 精密称取本品 3 批，每批 3 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，外标法计算含有量，结果见表 3。

**表 3 各成分含有量测定结果（$n$ = 3）**

**Tab. 3 Results of content determination of various constituents（$n$ = 3）**

| 批号 | 对乙酰氨基酚 | | | 盐酸吗啉胍 | | | 马来酸氯苯那敏 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 含有量/% | 平均值/% | RSD/% | 含有量/% | 平均值/% | RSD/% | 含有量/% | 平均值/% | RSD/% |
| 171113 | 104.45 | 103.7 | 0.7 | 95.58 | 93.6 | 1.8 | 95.13 | 94.8 | 1.0 |
| | 103.07 | | | 92.34 | | | 93.79 | | |
| | 103.59 | | | 92.98 | | | 95.59 | | |
| 171208 | 102.31 | 101.4 | 0.8 | 94.86 | 94.0 | 0.8 | 90.36 | 89.7 | 1.4 |
| | 100.59 | | | 93.48 | | | 90.50 | | |
| | 101.38 | | | 93.73 | | | 88.29 | | |
| 170606 | 94.89 | 96.3 | 1.2 | 97.33 | 97.5 | 1.2 | 91.64 | 91.6 | 0.2 |
| | 96.86 | | | 96.31 | | | 91.42 | | |
| | 97.01 | | | 98.72 | | | 91.86 | | |

注：马来酸氯苯那敏测定结果以氯苯那敏计。

2.10 含有量均匀度测定 取本品 3 批，每批 10 份，置于 25 mL 量瓶中，25% 甲醇（pH=3）超声助溶，放冷，25% 甲醇（pH=3）稀释至刻度，摇匀，各精密量取10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，外标法计算含有量。然后，根据 2015 年版《中国药典》四部方法[9]，计算 $A$［标示量（100）与含有量平均值之差的绝对值］+2.2$S$（含有量标准差），结果见表 4，发现均符合药典规定［$A$+2.2$S$<$L$（$L$ 以 15.0 计）］。

**表 4 各成分含有量均匀度测定结果**

**Tab. 4 Results of content uniformity determination of various constituents**

| 批号 | 成分 | 含有量/% | | | | | | | | | | 平均值/% | $A$+2.2$S$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 171113 | 对乙酰氨基酚 | 106.4 | 106.9 | 106.9 | 106.8 | 104.9 | 103.4 | 106.6 | 107.6 | 107.8 | 102.9 | 106.0 | 9.8 |
| | 盐酸吗啉胍 | 97.2 | 87.0 | 97.7 | 100.2 | 94.6 | 94.1 | 95.8 | 96.3 | 93.8 | 101.9 | 95.8 | 13.1 |
| | 马来酸氯苯那敏 | 91.4 | 91.5 | 92.8 | 95.6 | 91.6 | 95.0 | 95.0 | 96.0 | 96.0 | 90.5 | 93.5 | 11.3 |
| 171208 | 对乙酰氨基酚 | 106.2 | 105.8 | 106.2 | 103.1 | 104.5 | 103.5 | 103.1 | 103.9 | 105.2 | 103.9 | 104.5 | 7.2 |
| | 盐酸吗啉胍 | 98.9 | 97.7 | 98.4 | 94.0 | 88.6 | 100.4 | 98.4 | 91.6 | 93.7 | 96.1 | 95.8 | 12.4 |
| | 马来酸氯苯那敏 | 93.6 | 89.6 | 93.1 | 92.4 | 91.9 | 89.8 | 87.5 | 91.6 | 91.8 | 94.5 | 91.6 | 13.0 |
| 170606 | 对乙酰氨基酚 | 101.3 | 96.8 | 97.4 | 94.4 | 93.4 | 90.9 | 99.4 | 93.2 | 93.5 | 92.8 | 95.3 | 11.9 |
| | 盐酸吗啉胍 | 99.0 | 92.1 | 93.7 | 94.3 | 100.0 | 99.8 | 99.3 | 95.5 | 93.4 | 93.1 | 96.0 | 10.9 |
| | 马来酸氯苯那敏 | 94.9 | 92.3 | 94.5 | 89.2 | 93.7 | 89.8 | 88.2 | 88.6 | 91.8 | 92.2 | 91.5 | 13.9 |

## 3 讨论

3.1 检测波长选择 马来酸氯苯那敏最大吸收波长为 262 nm，但供试品溶液中其质量浓度较低，故考虑 215 nm，同时在该处对乙酰氨基酚有波谷，盐酸吗啉胍有波峰。最终，确定 215 nm 作为检测波长[10]。

3.2 流动相选择

3.2.1 离子对试剂种类与浓度 本实验考察了戊烷磺酸钠、己烷磺酸钠、庚烷磺酸钠、辛烷磺酸钠，发现离子对试剂烷基链越长，盐酸吗啉胍保留时间越长，与相邻的对乙酰氨基酚色谱峰分离度越高[11-12]，而且其浓度对色谱峰保留也有很大影响[13]，故又对此进行考察。结果显示，随着离子对试剂浓度的升高，盐酸吗啉胍峰保留时间延长，峰型由不对称逐渐优化为对称，当辛烷磺酸钠浓度高于 0.005 mol/L 时，分离度合适，峰形良好。同时，考虑到离子对试剂浓度过大时对仪器和色谱柱均有不利影响，故最终选择 0.005 mol/L 辛烷磺酸钠，可使盐酸吗啉胍在色谱柱上有较好的保留，并与其他成分的分离度理想，互不干扰。

3.2.2 缓冲液 本实验考察了缓冲盐对成分分析的影响，发现基线在无磷酸盐的流动相中不平稳，峰形不对称；添加磷酸二氢钾后基线平稳，而且由于离子强度的改变，盐酸吗啉胍色谱峰保留时间提前，故选择 0.02 mol/L 磷酸二氢钾作为缓冲液。

3.2.3 流动相 pH 本实验考察了 2.0、3.0、4.0、4.5，发现随着 pH 降低盐酸吗啉胍保留时间延长，同时峰形高而尖锐，考虑到 $C_{18}$ 色谱柱对 pH 值的耐受范围为 2~8，故最终选择 3.0 作为流动相 pH。

3.3 柱温选择 柱温对离子对色谱的影响较大[14]。本实验考察了 20、25、30、35、40 ℃，发现柱温越高，各组分出峰越快，但过高时氯苯那敏色谱峰受干扰较大，峰形较差。最终，选择 30 ℃作为柱温，此时出峰时间适中，峰形理想。

**参考文献：**

[1] 黄胜男，郭 猛，常俪漯，等. 治疗感冒的中西药复方制剂不良反应/事件与合理用药分析[J]. 中药与临床，2015，6(3)：52-55.
[2] 李 霞，徐升兵. 中西药复方制剂再评价的有关问题探讨[J]. 药物评价研究，2017，40(5)：577-585.
[3] 李小燕. 反相高效液相色谱法同时测定感冒清片中两组分的含量[J]. 中国药房，2003，14(9)：560-561.
[4] 许惠英，许百虹，陈浩桉，等. HPLC 法同时测定感冒清片中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量[J]. 中国药房，2016，27(12)：1699-1701.
[5] 王 芳，陈 翔. HPLC 法测定感冒清胶囊中对乙酰氨基酚和盐酸吗啉胍的溶出度[J]. 中国现代应用药学，2014，31(10)：1245-1248.
[6] 梁奇峰，刘燕静，丘秋霞. 红外光谱内标法测定感冒清胶囊中对乙酰氨基酚的含量[J]. 化学试剂，2014，36(9)：812-814.
[7] 吕海华，陈 军. HPLC 法同时测定感冒清胶囊中 3 组分的含量[J]. 安徽医药，2007，11(8)：708-709.
[8] 隋 译，赵 明，许世伟. HPLC 法测定感冒清片中马来酸氯苯那敏的含量[J]. 中国医药导报，2011，8(21)：65-66；102.
[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版四部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：124-125.
[10] 王丽琼，赵 雪，刘明容，等. RP-HPLC 法同时测定复方酚咖伪麻胶囊 5 种组分的含量[J]. 药物分析杂志，2016，36(8)：1403-1408.
[11] 张欣鑫，于 泓，金鑫鑫，等. 离子对试剂对离子对色谱-间接紫外检测分析哌啶离子液体阳离子的影响[J]. 分析科学学报，2018，34(2)：265-268.
[12] 符滇海，冯 叶，刘秋雨，等. 离子对色谱法同时测定益母草片中盐酸水苏碱、盐酸益母草碱[J]. 中成药，2014，36(4)：873-875.
[13] 王茉莉，宋更申，庞文哲，等. 离子对反相色谱法测定替卡西林钠中的有关物质的含量[J]. 沈阳药科大学学报，2017，34(6)：503-508.
[14] 骆雪芳，尹小英，付静静，等. 柱温和流速对离子对反相色谱法分析寡核苷酸的影响[J]. 分析化学，2008，36(5)：627-631.