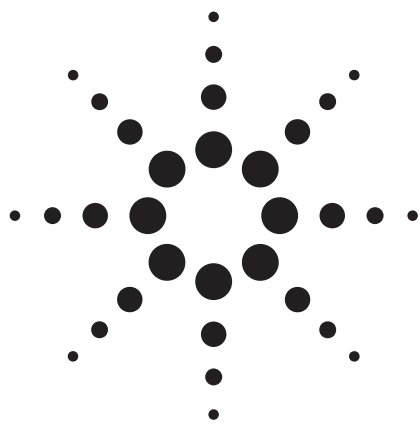




使用 HPLC Online SPE 方法分析复方甘草制剂中的吗啡

应用

甘草，固相萃取，二维液相色谱，超高效液相色谱

作者

肖尧 李浪
安捷伦科技（中国）有限公司，
北京，100102

摘要

目的：建立两种复方甘草制剂中吗啡成分测定的 Online SPE-UHPLC 分析方法，进行定量分析。**方法：**采用 Agilent Zorbax Extend C18 柱 (4.6 x 12.5 mm, 5 μ m) 作为 Online SPE 柱，采用 Agilent Poroshell 120 EC C8 柱 (3.0 x 50 mm, 2.7 μ m)，以庚烷磺酸钠水溶液 (A) 乙腈 (B) 为流动相，等度洗脱，检测波长为 220 nm；**结果：**通过 Online SPE 方法可以有效去除样品中的基质干扰，回收率 >95%，重现性良好，保留时间 RSD% <1%，峰面积 RSD% <1.5%，并且取得准确的定量结果。**结论：**本文所建立的方法分析速度快，分离效果良好，比传统 SPE 方法操作简便，使用成本低，为复方甘草制剂的质量控制提供了一种快速准确低成本的分析方法。



Agilent Technologies

引言

在 2010 版中国药典中, 记载了两种复方甘草制剂^[1], 此类制剂具有止咳祛痰的作用。其中的吗啡成分为主要药效成分, 也作为质量控制的主要成分, 需要进行定量分析。吗啡是一种生物碱类化合物, 具有很强的极性, 在 C18 色谱柱上很难保留, 所以药典中使用了离子对色谱法对此成分进行分析, 尽管如此, 吗啡的保留依然很弱, 在分析过程中, 很容易受到样品基质中弱保留杂质的干扰, 针对此情况, 药典中规定使用固相萃取 (SPE) 方法对样品进行前处理, 这种方法净化效果好, 回收率高, 可以有效去除基质中的干扰组分, 但是使用成本较高, 并且操作繁琐。

在本章中, 我们开发了一种基于 Agilent 1200 超高效液相色谱系统的 Online SPE 方法对样品进行前处理, 在提高了样品处理及分析速度的同时, 降低了使用成本, 经过验证, 此方法回收率及重现性良好, 定量准确, 适合对此类制剂进行定量分析及质量控制。

实验部分

仪器与试剂:

Agilent 1260 Infinity 2D-LC 液相色谱系统, 配备脱气机, 四元泵 (2 台), 自动进样器, 柱温箱 (内置二位六通阀), 二极管阵列检测器, SPE 柱为 Agilent Zorbax Extend C18 保护柱 (4.6 × 12.5 mm, 5 μm) 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC C8 柱 (3.0 × 50 mm, 2.7 μm), 数据处理软件为 Agilent OpenLab CDS ChemStation

(Agilent Technologies, Inc. 美国)。庚烷磺酸钠, 碳酸氢铵试剂 (色谱纯, Sigma 公司, 美国); 甲醇, 乙腈, 磷酸, 盐酸 (色谱纯, 迪马科技, 北京); 超纯水由 MilliQ 纯水机制备 (Merck-Millipore, 德国); 吗啡标准品 (标准品, 国家标准物质中心); 复方甘草片, 复方甘草口服液均购买自本地药店。

标准品:

称取吗啡对照品 10.2 mg, 溶解于 10 mL 5% 的乙酸水溶液中, 作为储备液, 再用 5% 的乙酸水溶液稀释 100 倍, 得含量为 10.2 μg/mL 的工作溶液。

样品处理:

复方甘草口服液: 量取 0.5 mL 样品, 用 5% 的乙酸水溶液稀释至 5 mL, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

复方甘草片: 取复方甘草片 30 片, 精密称定, 研细, 精密称取约 10 片量, 至磨口锥形瓶中, 精密加水 90 mL, 超声提取 5 min, 精密加稀盐酸 5 mL, 超声提取 20 min, 取出, 放冷, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

色谱条件:

仪器配置如图 1 所示, 通过二位六通阀分别连接 SPE 柱和分析柱, 样品先由泵 1 在 SPE 柱上进行净化 (如图 1A), 净化完成后, 通过阀切换流路将样品从 SPE 柱洗脱到分析柱上 (如图 1B), 之后阀切换回图 1A 位置, 样品在分析柱上继续进行分析。

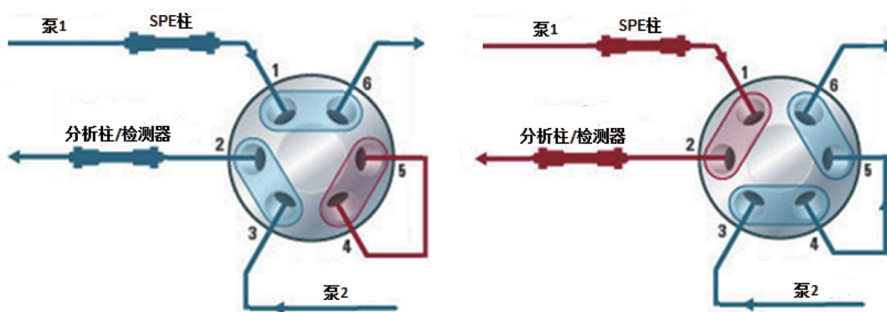


图 1. A: SPE 净化 B: 切换组分至分析柱

Online SPE 条件: SPE 柱: Agilent Zorbax Extend C18 保护柱 (4.6 x 12.5 mm, 5 μ m), 流动相: A= 水 B=甲醇, C=0.1% 磷酸水溶液, D=10 Mmol/L 碳酸氢铵水溶液, 梯度洗脱时间见表 1, 流速: 1 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 进样量 5 μ L。

表 1. Online SPE 梯度时间表

时间	A	B	C	D
0	0	0	0	100
2	0	0	0	100
2.01	0	5	95	0
4	0	5	95	0
4.01	25	75	0	0
7	25	75	0	0
7.01	0	0	0	100

样品分析条件, 色谱柱: Agilent Poroshell EC C8 柱 (3.0 x 50 mm, 2.7 μ m), 流动相: 25 Mmol/L 磷酸二氢钾 1.25 Mmol/L 庚烷磺酸钠水溶液 (A): 乙腈 (B) = 83: 17, 等度洗脱, 流速: 0.4 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 阀切换时间设置见表 2:

表 2. 柱切换阀切换时间设置 (按图 1 位置)

时间	0	3.05	3.3
阀位置	A	B	A

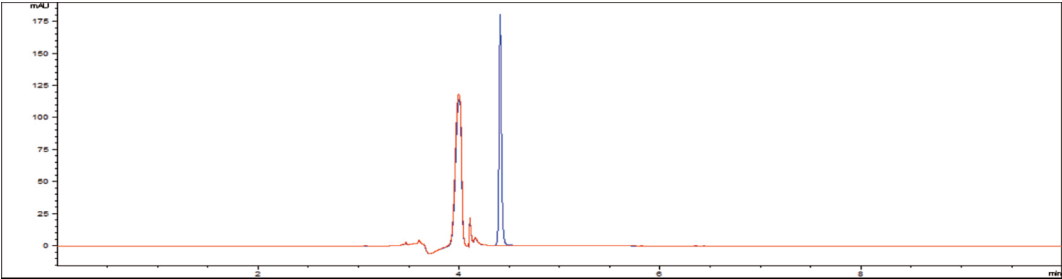


图 2. 吗啡标准品 (蓝) 及空白 (红) 分析结果

结果与讨论

标准品分析结果

首先使用上述条件对吗啡标准品进行分析, 结果见图 2, 从色谱图中可以看出, 吗啡标准品峰型及保留状况良好, 各项系统适应性参数均可满足中国药典 2010 版相关品种项目下的要求, 与空白进样比较, 无影响分析的干扰峰。

方法学考察

重现性, 分别对标准品和样品连续重复进样 6 次, 计算保留时间及峰面积 RSD 值, 保留时间 RSD 均小于 0.1%, 峰面积 RSD 均小于 1.5%, 具体数值见表 3:

表 3. 重现性结果

	标准品	复方甘草口服液	复方甘草片
保留时间 RSD	0.06%	0.04%	0.07%
峰面积 RSD	1.24%	0.44%	1.31%

回收率, 用标样直接进样得到的峰面积与经过 Online SPE 方法分析相同标样得到的峰面积进行比较计算回收率, Online SPE 方法的回收率可以达到 95.6%。

样品分析

图 3 为使用上述 Online SPE 方法对复方甘草口服液和复方甘草片进行分析的色谱图，可以看出，此方法对样品净化完全，可以有效地去处基质中的干扰组分，分析快速，可在 10 分钟内完成全部分析。

使用外标法对样品中吗啡的含量进行定量分析，并与标示含量进行比较，样品定量结果均与标示含量或合理用药量相符，结果见表 4：

表 4. 甘草样品定量结果

	实测含量	标示含量
复方甘草口服液	98.70 µg/mL	无
复方甘草片	0.39 mg/片	0.36~0.44 mg/片

复方甘草口服液没有标示含量，根据说明书推荐使用剂量（每次 5~10 mL，每日 3 次）计算，每次摄入吗啡计量为 0.49~0.99 mg，每日 1.47~2.97 mg。此用量在正常临床使用剂量范围之内，推断含量测定及计算结果应为正确值。

讨论

在方法开发过程中，使用 10 Mmol/L 碳酸氢铵溶液取代了药典当中使用的氨水溶液作为 SPE 的上样溶液，此溶液无需调节 pH，且具有一定缓冲能力，更适合于在线自动分析使用。由于使用碱性溶液，所以选择了 Agilent Zorbax Extend C18 保护柱作为 Online SPE 柱，这种填料的色谱柱具有独特的桥式键合技术，在高 pH 值的分析条件下也可以保持良好的分析效果和柱寿命，可以取代一次性 SPE 小柱反复使用，从而降低方法的整体使用成本。另外，由于保护柱采用了卡套式设计，更换方便，可以提高方法的易用性。

第二维色谱柱依据药典方法使用 Poroshell EC C8 色谱柱，有助于提高吗啡的保留，Poroshell 色谱柱具有和亚二微米填料色谱柱近似的柱效，但是反压较低，所以此方法也可以运行于常规 HPLC 系统上。

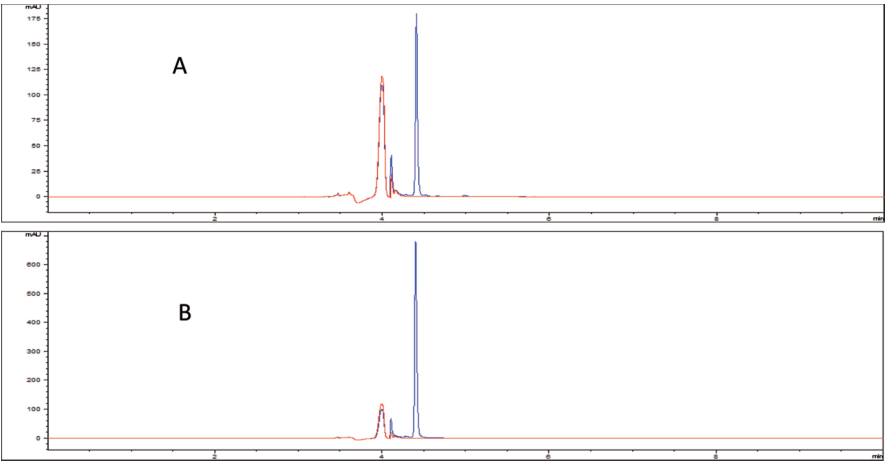


图 3. 样品分析结果
A：复方甘草口服液（蓝）及空白（红）；B 复方甘草片（蓝）及空白（红）

在进行流路连接时，曾经考虑过使用反冲的办法将 SPE 柱上富集的样品冲到分析柱上(如图 4)，这种连接方法通常可以得到较好的峰型及较快的分析速度，但是在这个应用中，由于分析流路的流动相中含有离子对试剂，反冲到 SPE 柱上会导致 SPE 柱难以迅速平衡，所以采用了正冲的方法，直接将 SPE 柱上的收集的组分用冲洗到分析柱上，这种方法可以在被分析组分冲洗到分析柱上之后切换阀，对 SPE 柱进行冲洗和重新平衡。

为了防止样品中的干扰成分残留在 SPE 柱上导致污染及方法不稳定，在被测成分被冲洗到分析柱后，使用 75% 甲醇-水冲洗 SPE 柱，可以保证将 SPE 柱上强保留的干扰物冲洗干净，图 5 为不切阀的状况下标准品及样品在 SPE 柱上的净化情况，可以看出，在吗啡被洗脱后，增加冲洗过程可以洗脱残留在 SPE 柱上的污染组分，避免 SPE 柱被污染，使方法更加稳定。

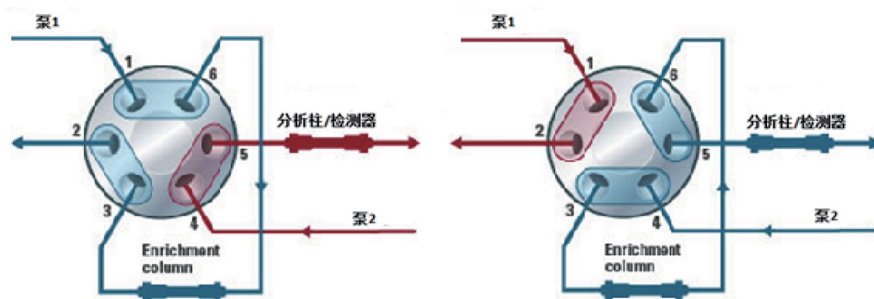


图 4. A: SPE 柱上样/净化 B: 从 SPE 柱上反冲目标组分到分析柱

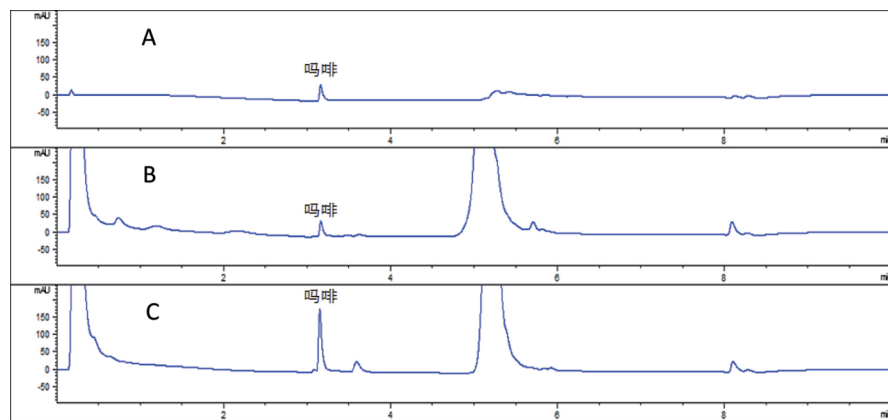


图 5. 样品在 Online SPE 柱上的净化

A: 标准品; B 复方甘草口服液; C 复方甘草片

在样品分析周期上，离线 SPE 方法在对样品进行提取后需要进行一系列的处理，包括对 SPE 小柱的活化，上样，淋洗及洗脱等，需要消耗大量的时间和溶剂，虽然仅需用 6 分钟即可结束液相色谱分析，但是整个样品分析过程中，前处理时间占据了绝大部分时间成为限速步骤；Online SPE 方法仅需对样品进行提取过滤即可进样，虽然液相色谱分析时间为 10 分钟，但是从整个样品分析周期来看，在线方法可以省去大部分样品前处理时间，比离线方法大幅节省时间，并且降低了溶剂的消耗。

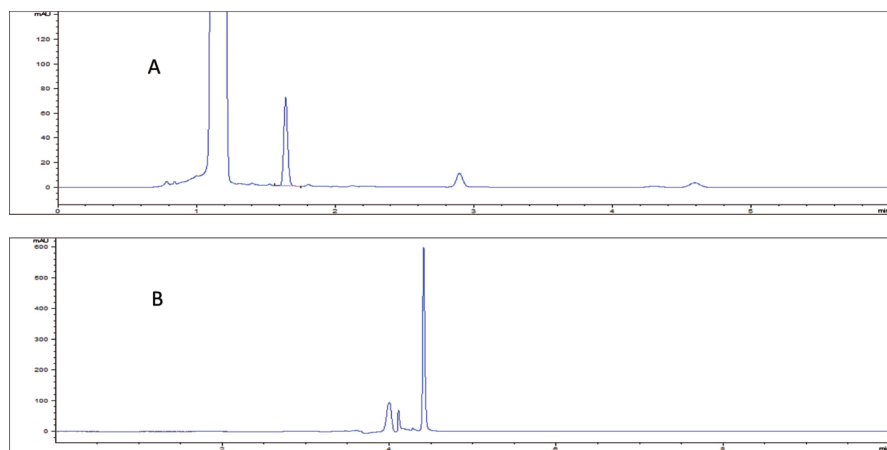


图 6. 离线 SPE 结果与 Online SPE 结果

A: 离线 SPE 结果; B: Online SPE 结果

结论

本文开发了一个快速高效低成本的 Online SPE 方法用于分析复方甘草制剂中的吗啡成分，方法稳定，回收率良好，可以有效去除此类样品中的基质干扰成分，取得准确的定性定量结果，比起传统的离线 SPE 方法，节省了样品前处理时间，缩短了整个样品分析周期，可以提高实验室工作效率，同时，可以降低样品分析的成本，提高实验室工作的自动化程度，适合于此类样品的日常分析工作。

参考文献

- 1 中国药典委员会. 中国药典 2010 版（第一部），北京，2010，574

更多信息

本文仅代表典型的结果。更多有关我们产品和服务，请访问我们的网站: www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2014
2014 年 3 月 26 日，中国印刷
5991-4689CHCN



Agilent Technologies