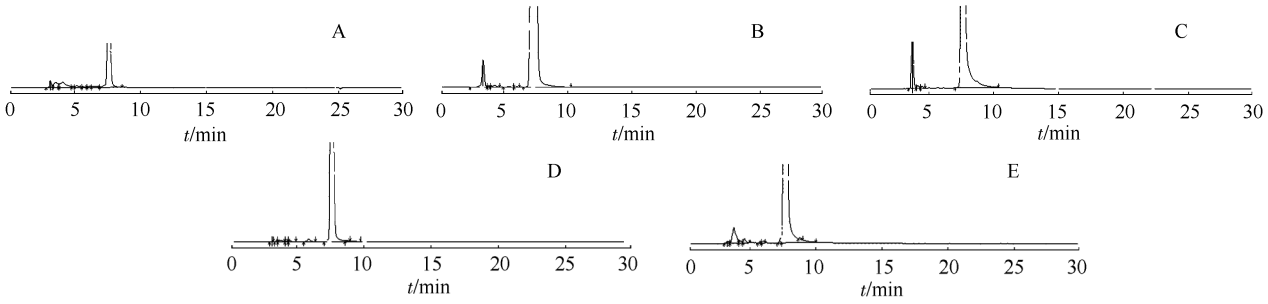

图 2 专属性考察色谱图

A–10 d 4 500 Lx 光破坏；B–高温破坏；C–3%双氧水破坏；D–碱破坏；E-酸破坏。

Fig. 2 The axclusion inspection of detective method

A–10 d 4 500 Lx destroyed by light; B–destroyed by heat; C–destroyed by 3% H_2O_2; D–destroyed by alkali; E-destroyed by acid.

2.10.5 样品中吡罗昔康有关物质检查 取供试品溶液和对照溶液各 20 μL，分别测定。记录供试品溶液的色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍，调节检测灵敏度使对照溶液所得色谱图中吡罗昔康的峰高为满量程的 20%~25%，以自身对照法计算杂质含量，结果见表 1。

表 1 含量及有关物质测定结果(n=3)

Tab. 1 Detemination results of content and related substances(n=3)

批号	本方法		中国药典 2010 年版中方法		有关物质含量/%
	样品含量/%	RSD/%	样品含量/%	RSD/%	
20131015	98.7	0.21	99.1	0.36	0.53
20140109	100.0	0.29	99.8	0.41	0.45
20140227	101.2	0.37	100.7	0.27	0.42

3 讨论

本研究在测定条件建立过程中试验了乙酸铵水溶液(0.01 mol·L^{-1})-甲醇(80∶20)，甲醇-含 0.25%辛烷磺酸钠的 0.1 mol·L^{-1} 磷酸二氢钠(用磷酸调节 pH=2.5)(65∶35)以及甲醇-0.5%冰乙酸溶液(60∶40)3 种流动相，结果表明甲醇-0.5%冰乙酸溶液(60∶40)作为流动相理论板数较高，分离度较好，灵敏度较高。

在选定的色谱条件下，吡罗昔康的最大吸收波长为 338 nm，加速降解所得有关物质的最大吸收也在 338 nm 附近，故选择 338 nm 波长同时测定吡罗昔康注射液的含量和有关物质。

吡罗昔康易被热、光、酸、碱和氧化物质破坏，储存宜密封避光。本法简便、快速，专属性强，灵敏度高，结果准确可靠。

REFERENCES

[1] 中国药典. 二部[S]. 2010: 340.

[2] 仲平, 陈珍珊, 李云. RP-HPLC 法测定吡罗昔康片的含量[J]. 临床医学, 2002, 22(7): 51-52.

[3] 曹玲, 唐树荣, 万嵘. HPLC 法测定吡罗昔康注射液的含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(1): 47-48.

[4] WAN Y F, LI A H. Determination of three constituents in compound ketoconazole liniment by RP-HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(7): 1263-1266.

[5] ZHAO Y, FU Y M, LI B J, et al. Determination of piroxicam adding illegally in Guci Xiaotong capsules by HPLC [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2009, 23(2): 159-161.

收稿日期：2014-12-16

UPLC-MS/MS 测定复方甘草口服溶液中 4 种生物碱含量

方雪其，黄朝辉(宁波市药品检验所，浙江 宁波 315048)

摘要：目的 采用超高效液相色谱-质谱联用方法同时测定复方甘草口服溶液中吗啡、可待因、罂粟碱和可卡因的含量。**方法** 采用 Waters BEH C_{18}(50 mm×2.1 mm，1.7 μm)色谱柱，流动相为含 0.1%甲酸的 0.02 mol·L^{-1} 乙酸铵溶液(A)-甲醇(B)，梯度洗脱(0~1.5 min，92%A；1.5~2.0 min，92%A→60%A；2.0~4.5 min，60%A；4.5~4.6 min，60%A→92%A；4.6~5.0 min，92%A)，流速为 0.2 mL·min^{-1}，柱温为 35 ℃；质谱采用电喷雾离子源，多反应监测模式(正离子)。**结果** 吗啡、可待因、

作者简介：方雪其，男，主管药师 Tel: (0574)87529932 E-mail: 563579544@qq.com

罂粟碱和可卡因浓度分别在 5.68~113.4，1.04~20.85，0.53~10.58 和 0.16~3.13 μg·L^{-1} 内线性关系良好，r 值为 0.998 4~0.999 9，平均回收率为 98.8%~100.3%，定量下限分别为 0.5，0.5，0.05，0.01 μg·L^{-1}，检测限为 0.2，0.2，0.02，0.005 μg·L^{-1}。**结论** 该方法分析速度快，灵敏度高，结果准确可靠，是复方甘草口服溶液质量控制的一种可行方法。

关键词：复方甘草口服溶液；吗啡；可待因；罂粟碱；可卡因；超高效液相色谱-质谱联用；多反应监测
中图分类号：R917.101　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2015)09-1127-04
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.025

Quantitative Determination of 4 Alkaloids in Compound Glycyrrhiza Oral Solution by UPLC-MS/MS

FANG Xueqi, HUANG Zhaohui(*Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the quantitative determination of 4 alkaloids in compound glycyrrhiza oral solution by UPLC-MS/MS. **METHODS** Chromatography was carried on a Waters BEH C_{18} column(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with the mobile phase consisting of 0.02 mol·L^{-1} ammonium acetate water solution(containing 0.1% formic acid)(A) and methanol(B) in a programme of gradient elution(0–1.5 min, 92%A; 1.5–2.0 min, 92%A→60%A; 2.0–4.5 min, 60%A; 4.5–4.6 min, 60%A→92%A; 4.6–5.0 min, 92%A). The flow rate was 0.2 mL·min^{-1} with a column temperature at 35 ℃. Determination was performed by multiple reaction monitoring mode using electrospray ionization in positive ion mode. **RESULTS** The linear ranges of morphine, codeine, papaverine and cocaine were 5.68–113.4, 1.04–20.85, 0.53–10.58 and 0.16–3.13 μg·L^{-1} (r=0.998 4–0.999 9). The average recoveries were 98.8%–100.3%. The limits of quantitation and detection were 0.5, 0.5, 0.05, 0.01 μg·L^{-1} and 0.2, 0.2, 0.02, 0.005 μg·L^{-1}, respectively. **CONCLUSION** The method is rapid, sensitive and accurate, and can be an appropriate technique for quality control of compound glycyrrhiza oral solution.
KEY WORDS: compound glycyrrhiza oral solution; morphine; codeine; papaverine; cocaine; UPLC-MS/MS; multiple reaction monitoring

复方甘草口服溶液收载于中国药典 2010 年版二部，是一种祛痰镇咳药[1]。处方中含有复方樟脑酊，标准要求检测吗啡的含量，但未对可待因和罂粟碱等阿片中常见的生物碱作检查。考虑到可待因和罂粟碱也有强烈的中枢镇咳作用等生理活性[2]，因此最好能够对其进行含量控制。

中国药典采用高效液相色谱-紫外检测法测定吗啡含量。因为吗啡在样品中含量低，且紫外检测容易受其他成分干扰，所以样品前处理需要固相萃取，操作繁琐费时。质谱检测器具有高灵敏度和高选择性，在天然产物成分、生物样品和食品分析方面有很大的优势[3-5]。因此，本实验采用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)法测定复方甘草口服液中吗啡等生物碱的含量，样品用水稀释后直接进样，方便快捷，提高了检测效率。

另据报道，有人因所携带的复方甘草片在美国被检出含有可卡因而受到处罚。复方甘草口服溶液用途与复方甘草片相同，因此本实验的目的之一也是为了确证复方甘草口服溶液中是否含有可卡因。

本实验采用 UPLC-MS/MS 多反应监测(MRM)法检测复方甘草口服溶液中吗啡、可待因、罂粟碱和可卡因 4 种生物碱含量，样品前处理简单，灵敏度高，检测速度快，为更好地控制复方甘草口服溶液的质量提供了一种有效的方法。

1　仪器与试药

Waters Alliance-Quattro Micro 液相色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司)。色谱柱为 Waters BEH C_{18} 键合硅胶柱(50 mm×2.1 mm，1.7 μm)；SB-5200DTN 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司)；R 200 D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

对照品吗啡(批号：171201-200521，纯度：100%)，磷酸可待因(批号：171203-200303，纯度：100%)，盐酸罂粟碱(批号：171214-200404，纯度：100%)和盐酸可卡因(批号：1210-9201，纯度：100%)均购自中国食品药品检定研究院；复方甘草口服溶液(宁波立华制药有限公司，批号：131234，140440，规格：180 mL，其组分为每 1 000 mL 中含甘草液浸膏 120 mL、复方樟脑酊 180 mL、甘油 120 mL、愈创甘油醚 5 g、浓氨溶液及水适量)；甲睾酮片(天津力生制药股份有限公司，批号：1211020，规格：5 mg)，均为市售品。甲醇(HPLC 级，默克公司)；乙酸铵(分析纯，国药集团化学试剂有限公司)；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

取对照品吗啡 11.34 mg，置 25 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 5.0 mL，置 25 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液 A(90.72 μg·mL^{-1})；取对照品磷酸可待因 8.34 mg，置 50 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 5.0 mL，置 50 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液 B (16.68 μg·mL^{-1})；取对照品盐酸罂粟碱 10.58 mg，置 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 5.0 mL，置 50 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液 C(10.58 μg·mL^{-1})；取对照品盐酸可卡因 12.53 mg，置 50 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 5.0 mL，置 50 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液 D(25.06 μg·mL^{-1})。分别精密量取储备液各 1.0 mL，同置 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀；精密量取 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，得混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液制备

取供试品 1.0 mL，置 100 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3 色谱-质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱：Waters BEH C_{18} 色谱柱(50 mm×2.1 mm，1.7 μm)；流动相：含 0.1%甲酸的 0.02 mol·L^{-1} 乙酸铵溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~1.5 min，92%A；1.5~2.0 min，92%A→60%A；2.0~4.5 min，60%A；4.5~4.6 min，60%A→92%A；4.6~5.0 min，92%A)；流速：0.2 mL·min^{-1}；柱温：35 ℃；进样量：5 μL。

2.3.2 质谱条件 模式为电喷雾离子化(ESI)方式，多反应监测(MRM)，检测离子为正离子。干燥气流量为 500 L·h^{-1}，雾化气流量为 50 L·h^{-1}，氩气流量：0.1 mL·min^{-1}；取样锥孔电压及碰撞能量见表 1。

表 1 4 种生物碱的质谱参数

Tab. 1 MS parameters of 4 alkaloids

成分	分子离子	定量离子	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
吗啡	286.3	164.9	40	50
可待因	300.3	165.1	40	50
罂粟碱	340.3	202.1	20	25
可卡因	304.3	182.1	20	20

2.4 专属性试验

取复方甘草口服溶液(批号：131234)为阳性样品，甲睾酮片为阴性样品，按“2.2”项下方法制备阳性和阴性样品溶液。取混合对照品储备液为对照品溶液。按“2.3”项下色谱质谱条件测定，阳性样品检出吗啡和可待因，阴性样品对检测无干扰。结果见图 1。

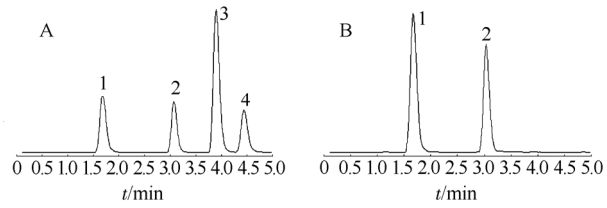

图 1 专属性色谱图

A–混合对照品；B–样品；1–吗啡；2–可待因；3–可卡因；4–罂粟碱。

Fig. 1 Chromatograms of specificity

A–mixtured reference substances; B–sample; 1–morphine; 2–codeine; 3–cocaine; 4–papaverine.

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线及线性关系考察 精密量取混合对照品储备液 1.0，2.0，5.0，10.0，15.0，20.0 mL，分别置于 20 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，制得系列混合对照品溶液。按“2.3”项下色谱-质谱条件测定，以溶液浓度(μg·L^{-1})为横坐标，各化合物定量离子峰面积为纵坐标绘制标准曲线，计算回归方程。吗啡、可待因、罂粟碱和可卡因的线性方程分别为：Y=98.6X+49，r=0.998 4；Y=105.3X+14.1，r=0.999 9；Y=599.3X+50.2，r=0.999 1；Y=2 244.4X–472.2，r=0.999 9。结果表明，吗啡、可待因、罂粟碱和可卡因浓度分别在 5.68~113.4，1.04~20.85，0.53~10.58 和 0.16~3.13 μg·L^{-1} 内线性关系良好，分析方法的定量下限分别为 0.5，0.5，0.05，0.01 μg·L^{-1}(n=6)，检测限为 0.2，0.2，0.02，0.005 μg·L^{-1}。

2.5.2 仪器精密度试验 精密吸取混合对照品溶液(吗啡，可待因，罂粟碱，可卡因的浓度分别为 11.34，4.17，2.65，0.63 μg·L^{-1})，按“2.3”项下的色谱质谱条件，连续进样 6 次，记录色谱图峰面积。结果吗啡、可待因、罂粟碱、可卡因峰面积的 RSD(n=6)分别为 2.0%，1.7%，1.3%和 1.2%，表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取复方甘草口服溶液(批号：131234)，按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3”项下条件，测定吗啡和可待因的

定量离子峰面积，结果样品中吗啡，可待因平均含量分别为 0.094，0.015 mg·mL^{-1}，RSD(n=6)依次为 1.2%，1.5%，表明重复性良好。

2.5.4 稳定性试验　取新制备的同一份供试品溶液，分别在室温放置 0，2，4，8，12，24 h 进样，测定吗啡和可待因定量离子峰面积，计算 RSD(n=6)分别为 2.1%，1.9%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验　取已知含量的同一批复方甘草口服溶液(批号：131234)样品 9 份，每份 1.0 mL，各置 100 mL 量瓶中，分成 3 组，每组 3 份。分别同时加入对照品储备液 A，B，C，D 各 0.8，1.0 和 1.2 mL，按“2.2”项下制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱质谱条件测定各化合物离子峰面积，计算加样回收率，结果见表 2。

表 2　加样回收率测定结果(n=9)

Tab. 2　The results of recovery rate(n=9)

成分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
吗啡	0.091	0.072 6	0.163 3	99.6	1.5
	0.091	0.090 7	0.180 9	99.1	1.9
	0.091	0.108 8	0.199 3	99.5	1.2
可待因	0.015	0.013 4	0.028 4	100.1	1.3
	0.015	0.016 7	0.031 6	99.5	1.8
	0.015	0.020 0	0.034 9	99.7	1.0
罂粟碱	0.00	0.008 5	0.008 4	98.8	0.8
	0.00	0.010 6	0.010 6	100.0	2.1
	0.00	0.012 7	0.012 6	99.2	1.3
可卡因	0.00	0.020 0	0.019 9	99.5	1.1
	0.00	0.025 0	0.024 8	99.2	1.5
	0.00	0.030 0	0.030 1	100.3	1.2

2.6　样品测定

取 2 批次样品各 3 份，分别按“2.2”项下方法制得供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液各 5 μL，注入液相色谱仪，测各化合物定量离子峰面积，以外标法计算样品中各生物碱的平均含量，结果见表 3。2 批样品中吗啡含量在标准规定的范围，可待因的含量也不低，未检测到罂粟碱和可卡因。

表 3　样品中 4 种生物碱的含量

Tab. 3　Content of 4 alkaloids in 2 batches of samples

mg·mL^{-1}

批号	吗啡	可待因	罂粟碱	可卡因
131234	0.091	0.015	–	–
140440	0.085	0.016	–	–

3　讨论

中国药典 2010 年版二部收载的复方甘草口服溶液质量标准中对生物碱的检查只有吗啡的含量测定，但是实验表明可待因的含量也不低，且中枢镇咳作用明显，其含量差异很可能是影响药物质量的一个重要因素，有必要对其进行质量控制。

吗啡和可待因的离子碎片很多，因此定量离子的丰度也较低[6]。本实验选择较高碰撞能量下得到的 m/z =164.9 和 m/z=165.1 作为吗啡和可待因的定量离子，保证了检测结果良好的精密度和准确性。本实验 2 批样品均未检出罂粟碱和可卡因。

本实验采用 UPLC-MS/MS 多反应监测(MRM)法测定复方甘草口服液中 4 种生物碱的含量。试验结果表明，该方法样品前处理简单，专属性好，结果准确，为复方甘草口服液的质量控制提供了新的方法。

REFERENCES

[1] 中国药典. 二部[S]. 2010: 574.

[2] LI X L, DENG Y P, HE B, et al. A phase Ⅱ clinical trial for compound codeine phosphate tablets in treatment of moderate or severe cough [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2006, 15(24): 2147-2150.

[3] LIU M M, ZHANG C Z, LI Y Z, et al. Detection of papaveris pericarpium added in hot foods spice with LC-MS/MS [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2013, 34(1): 91-94.

[4] LI Y, FANG J J, WU S M, et al. LC-MS/MS determination of papaverine in human plasma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(8): 1326-1329.

[5] LI Y R, WANG Y H, YANG X W, et al. Analysis of saponins in black red ginseng by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(5): 812-817.

[6] SUN Y Y, XIANG P, SHEN M. Simultaneous determination of 11 opiates in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2011, 46(12): 1501-1506.

收稿日期：2015-03-23