

· 药物分析与检验 ·

复方喜树碱贴膏中喜树碱的高效液相测定法

戴向东 许有诚 陶宙镓 (广西药品检验所, 南宁 530021)

摘要 建立了反相高效液相色谱法测定复方喜树碱贴膏中喜树碱含量的方法。HPLC 条件为: 岛津 Shim-pack CLC-ODS (150×6.0mm) 柱; 流动相为甲醇—0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 = 50:50 (pH = 6.5); 内标为对羟基苯甲酸甲酯; 紫外检测波长 254nm。实验结果表明浓度线性范围 5.21~26.02 μg/ml ($r = 0.9999$), 平均回收率 ($n = 5$) 为 99.62%, RSD = 0.5%。

关键词 复方喜树碱贴膏 喜树碱 高效液相色谱法

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-9A 高效液相色谱仪, SPD-6AV 紫外检测器, C-R4AX 数据处理机。

石油醚 (60~90℃)。甲醇, 均为分析纯。

喜树碱对照品, 广西东兰药厂提供。HPLC 法测定含量为 96.35% (归一化法)。

复方喜树碱贴膏, 空白贴膏 (内含除喜树碱外的其它成分), 桂林第四制药厂制备。

对羟基苯甲酸甲酯, 东京化成工业株式会社产品。

2 实验条件

2.1 色谱条件:

色谱柱: 岛津 Shim-pack CLC-ODS 柱, (150×6.0 mm); 流动相: 甲醇—0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (50:50), 调节 pH = 6.5; 流速 1.5 ml/min; 灵敏度 0.08 AUFs; 柱温 30℃; 检测波长 254 nm。

2.2 溶液配制:

喜树碱对照液: 精密称取喜树碱对照品 10 mg 于 200 ml 量瓶中, 加甲醇适量, 于 60℃ 水浴中振摇溶解, 冷却后用甲醇定容 (0.05 mg/ml)。

内标液: 精密称取对羟基苯甲酸甲酯 25 mg 于 100 ml 量瓶中, 加甲醇适量振摇溶解后, 用甲醇定容即得 (0.25 mg/ml)。

2.3 样品预处理:

取贴膏 1/2 片于锥形瓶中, 加入石油醚 15、10、5 ml 洗脱三次, 合并洗脱液于分液漏斗中, 用 75% 甲醇液 15、10、10、10 ml 振摇提取四次, 分取下层醇液, 滤入 50 ml 量瓶中, 精密加入内标液 1.0 ml, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀后取 20 μl 进行色谱分析。

3 方法与结果

3.1 校正因子的测定:

精密量取喜树碱对照液 10.0、20.0 ml, 分别置于 50 ml 量瓶中, 各精密加入内标液 1.0 ml, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀后, 各取 20 μl 进样三次, 计算出校正因子 $F_1 = 1.30262$, $F_2 = 0.0165987$ 。

3.2 线性范围:

精密量取喜树碱对照液 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 ml 分别置于 50 ml 量瓶中, 各精密加入内标液 1.0 ml, 用甲醇稀释至刻度。各取 20 μl 进样分析。以内标与对照品峰面积比为纵坐标, 浓度比为横坐标作图, 喜树碱在 5.21~26.02 μg/ml 范围内呈线性关系, 回归方程为:

$$Y = 1.3035x + 3.32 \times 10^{-3}, \quad r = 0.9999.$$

3.3 回收率测定

取空白贴膏 1/2 片, 加石油醚洗脱后, 精密加入一定量喜树碱对照液于洗脱液中, 按前述方法用 75% 甲醇提取进样, 5 次测得平均回收率为 99.62%, RSD = 0.5%。

3.4 样品测定:

取复方喜树碱贴膏 5 片, 除去隔膜, 剪成细条, 精密称取适量 W (约相当于 1/2 片), 置锥形瓶中, 按前述方法提取进样, 洗净后的衬布于 105°C 烘干, 称重 W_布, 用 W - W_布 = 膏重计算, 即得 1 g 膏中含喜树碱的量。结果见图 1, 表 1。

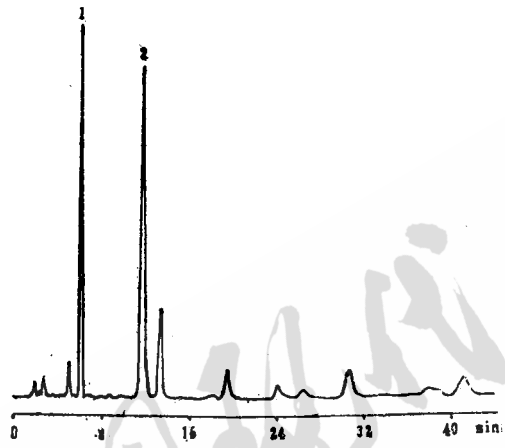


图 1 复方喜树碱贴膏样品(加入内标物)色谱图

1. 对羟基苯甲酸甲酯 2. 喜树碱

表 1 样品含量测定结果(n = 3)

批 号	标示量%	RSD%
911203	46.0	0.6
920620	83.9	0.6
试 剂 品	82.0	0.5

4 讨 论

4.1 曾试以甲醇-水(60:40)为流动相, 喜树碱在 2—3 min 时出峰, 但与干扰组分无法分离。经实验证明: 甲醇/0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(50:50), pH = 6.5 的条件下可获得很好的分离。取空白贴膏

按文中方法提取分析, 所得色谱图表明在喜树碱及内标位置处均无干扰, 见图 2。



图 2 空白贴膏色谱图

4.2 喜树碱在 254 nm, 365 nm 波长处均有最大吸收, 考虑内标物在 254 nm 波长处有较大吸收, 故确定用 254 nm 波长检测。

4.3 本文采用岛津 C-R4X 处理机软件系统中的二点校正内标法计算含量, 使校正因子 F₁ 受到 F₂ 的制约, 结果更准确、可靠。计算公式如下:

$$F_1 = \frac{C_1 C_1 S_2 - C_2 \cdot C_1 S_1}{C_1 S_1 \cdot C_1 S_2 \left(\frac{A_1}{A_1 S_1} - \frac{A_2}{A_1 S_2} \right)}$$

$$F_2 = \frac{C_2}{C_1 S_2} - F_1 \cdot \frac{A_2}{A_1 S_2}$$

$$\text{标示量}\% = \left(\frac{F_1 A_1}{A_1 S} + F_2 \right) \times \frac{W_s}{W_i} \times \frac{1}{\text{标示量}} \times 100\%$$

其中, C₁、C₂、A₁、A₂ 分别为标准液 1、2 中喜树碱的浓度和峰面积; C₁S₁、C₁S₂、A₁S₁、A₁S₂ 分别为标准液 1、2 中内标物的浓度和峰面积; A₁、A₁S 分别为样品液中喜树碱与内标物的峰面积; W_s 为样品液中内标量; W_i 为膏重。

4.4 复方喜树碱贴膏属新药(西药)三类, 为含有山苍子油, 冰片等的复方橡胶制剂, 由于山苍子油、橡胶基质等脂溶性均大于喜树碱, 故在此色谱系统中内标与喜树碱先出峰, 不需检测的无关物可采用梯度洗脱清除, 缩短分析时间。