

高效液相色谱法测定苦参碱滴眼液的含量

张铁雨,俞辉(浙江省药品检验所,浙江 杭州 310004)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定苦参碱滴眼液含量的方法。方法 C_{18} 柱,以甲醇-含0.25%三乙胺的0.02 mol/L磷酸氢二钠缓冲液(用磷酸调至 pH4.0 $\pm$ 0.1)(20:80)为流动相,检测波长为220 nm。结果 线性范围为16~260 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$),加样回收率为99.29% ($n=9$),RSD 1.09%,日内和日间精密度分别为0.53%、0.65%,溶液稳定性和进样精密度试验结果良好。结论 本法快速、简便、准确。

关键词:苦参碱;含量;高效液相色谱

中图分类号:R917.7;R927.2 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2003)05-0397-03

Determination of Matrine eye drops by high performance liquid chromatography

ZHANG Tie-yu, YU Hui (Zhejiang Provincial Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a method for determination of matrine in Matrine eye drops. **METHOD** C_{18} analytical column was used as stationary. The mobile phase consisted of methanol-0.02 mol/L phosphate buffer with 0.25% triethylamine (20:80). UV detector wavelength was at 220 nm. **RESULTS** The method was linear within the range of 16~260 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$). The relative recovery was 99.29% ($n=9$). The RSD of intra day and inter day assays was 0.53% and 0.65% respectively. **CONCLUSION** The method is rapid, simple and accurate.

KEY WORDS: matrine; assay; HPLC

苦参碱是豆科植物苦豆子 *S. alopecuroides* 主要的生物碱有效成分^[1]。由于其独特的药理作用和临床应用价值受到国内外学者的广泛关注和重视,苦参碱对各种致炎剂引起急性渗出性炎症有明显的对抗作用。苦参碱滴眼液是A厂开发研究的新药。对于苦参碱的分析方法,文献报道的比较多,有酸碱滴定法^[2],比色法^[3],TLC-比色法^[4],毛细管气相色谱法^[5],薄层扫描法^[6],HPLC^[7],本实验采用HPLC对其含量测定进行了研究^[8]。

1 仪器与试剂

岛津LC-10AT高效液相色谱仪;SPD-10AVP紫外
中国现代应用药学杂志2003年10月第20卷第5期

检测器;岛津LC-10VP数据处理软件。苦参碱对照品(含量测定用,中国药品生物制品检定所),苦参碱滴眼液(A厂提供);甲醇为光谱纯(美国进口);其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 流动相的选择

选择反相系统,以 C_{18} 为固定相,甲醇-0.02 mol/L磷酸氢二钠缓冲液为流动相,加入少量三乙胺为扫尾剂。对流动相的pH值、与甲醇的比例、及三乙胺的浓度对分离和保留时间的影响进行了考察。

2.1.1 流动相的pH值 用25%磷酸调节缓冲液的pH值,

在碱性条件下,苦参碱迟迟不出峰,当 pH 值小于 3 时,几乎不保留,pH 值为 3.5~6.0 时,有适宜的保留时间,在 pH 值为 4 时,峰形较好,为保证重现性,调 pH 值为 4.0±0.1。

2.1.2 甲醇与缓冲液的比例:对不同的柱子,可适当调节,一般为 20:80。

2.1.3 三乙胺的浓度:苦参碱含氮,在 C₁₈ 柱上拖尾,在缓冲液分别加入三乙胺,使其浓度分别为 0.1%,0.15%,0.20%,0.25%,0.30%,分别进行试验,结果以 0.25%浓度的扫尾效果最好。

2.1.4 波长的选择:照上述色谱条件,精密量取 20μL 对照品溶液注入液相色谱仪,记录三维色谱图,结果本品在 200~225nm 有紫外吸收,为消除末端吸收选择 220nm 为检测波长。

2.2 方法的专属性考察

精密量取本品 1 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,分别加入 6 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液、6 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液和过氧化氢溶液(30%)各 10 mL,置水浴中加热 1.5 h,放冷后,分别用酸、碱中和,加流动相稀释至刻度,取 20μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。色谱图显示本品经酸、碱、氧化降解后,降解产物均能被检出,说明色谱系统能有效分离和检测降解产物。

2.3 空白试验和系统适应性试验

取样品的空白溶液,取 20μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。另取对照品适量,加空白溶液制成约含苦参碱 100μg·mL⁻¹ 的,取 20μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,结果表明苦参碱与辅料可以完全分离,以苦参碱峰计算,理论板数达 2700。

2.4 线性试验

精密称取苦参碱原料 26.45 mg,置 50 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,分别精密量取 3,5,5,5,5,5 mL,各置 100,100,50,25,20,10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,各精密量取 20μL,以各色谱图中苦参碱峰面积为纵坐标,以苦参碱浓度为横坐标,进行线性回归,结果在浓度为 15~265μg mL⁻¹ 范围内,回归方程为: $A = 208 + 12867 C$, $r = 0.9998$ 。

2.5 回收率试验

精密称取苦参碱对照品适量,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取适量加入到 50 mL 浓度为 0.05135 μg·mL⁻¹ 样品溶液中,加流动相定量稀释至 100 mL,分别得到成每 1 mL 中约含 80,100,120μg 的溶液各一份,各精密量取 20μL ($n = 3$) 注入液相色谱仪,记录色谱图,测定峰面积。另取苦参碱对照品适量,加流动相溶解并定量稀释至每 1 mL 中约含 100μg 的溶液,同法测定,按外标法以峰面积计算每份的加样回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery

编号	总测得量 (mg)	样品加入 量(mg)	对照品加 入量(mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	8.562	5.135	3.374	101.57		
2	8.480	5.135	3.374	99.14		

编号	总测得量 (mg)	样品加入 量(mg)	对照品加 入量(mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
3	8.429	5.135	3.374	97.63		
4	10.203	5.135	5.084	99.69		
5	10.142	5.135	5.084	98.49	99.29	1.09
6	10.195	5.135	5.084	99.53		
7	12.380	5.135	7.266	99.71		
8	12.330	5.135	7.266	99.02		
9	12.314	5.135	7.266	98.80		

2.6 精密度试验

取本品(批号:20010630)的样品溶液于同日内和不同日内分别测定含量 5 次,计算日内和日间精密度,结果见表 2。

表 2 日内和日间精密度测定结果

Tab 2 Results of intra-day and inter-day precision

日内精密度			日间精密度		
含量(%)	平均(%)	RSD%	含量(%)	平均(%)	RSD%
102.47			102.47		
102.59			101.62		
102.76	102.19	0.53	101.09	101.80	0.65
102.70			102.60		
103.63			101.40		

2.7 重现性

取本品(批号:20010630)的样品溶液重复进样 5 次,结果响应峰面积的 RSD 为 0.76%,表明进样重现性良好。

2.8 样品测定

精密量取样品溶液适量,加流动相制成每 1 mL 含苦参碱 100μg 的溶液,各精密量取 20μL ($n = 3$) 注入液相色谱仪,记录色谱图,测定峰面积。另取苦参碱对照品适量,加流动相溶解并定量稀释至每 1 mL 中约含 100μg 的溶液,同法测定,按外标法以峰面积计算样品的含量,批号分别为 20010628,20010629,20010630 样品的平均含量分别为 103.9%,102.7%,102.7%。

3 讨论

3.1 为保证测定准确,保留时间一致,应严格调节缓冲液的 pH 值。

3.2 因柱子不同,可适当改变流动相比例和流速。

3.3 本方法也可用于有关物质的测定。

参考文献

[1] 季宇彬主编. 中药有效成分药理与应用[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1994:294.

[2] 张树声,冷晓红,王忠效. 盐析容量法测定苦参素及制剂含量. 中成药[J].1988,(10):6.

[3] 章育中,张淑蓉,崔建芳,等. 苦参及其制剂中生物碱的薄层分离和含量测定. 药学学报[J].1981,16(4):283.

[4] 梁钊忠. 苦参碱含量测定方法的研究. 中成药研究[J].1984,(增2):20.

[5] 刘晓东,黄圣凯. 兔血浆中苦参碱的毛细管气相色谱测定. 南京药学院学报[J].1986,17(3):222.

[6] 崔建芳,章观德. 苦参等四种槐树植物药中生物碱的分析. 中药通报[J].1986,11(2):38.

- [7] 李家实 . 苦参的生物碱测定 . 北京中医学院学报 [J] , 1984 , 3 (2) . 1998 , 38 .

- [8] 袁伯俊 . 新药评价基础与实践 [M] . 北京 : 人民军医出版社 ,

收稿日期 : 2002-11-22