

高效液相色谱法测定苦参素注射液中氧化槐果碱杂质含量

吕昭云¹, 张艳红², 乔培香¹, 潘显道¹ (1. 北京协和药厂, 北京 102600; 2. 国家新药开发工程技术研究中心, 北京 102600)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定苦参素注射液中氧化槐果碱杂质含量。方法 采用 Discovery C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: pH 3.0 磷酸盐缓冲液-乙腈-甲醇 (94:5:1); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 220 nm; 柱温: (40 ± 1) °C。结果 能准确检出苦参素中 0.1% ~ 2.0% 限度范围的氧化槐果碱杂质, 平均回收率 99.24%。结论 HPLC 测定苦参素注射液中氧化槐果碱杂质含量灵敏、准确, 可用于本品的质量控制。
关键词: 高效液相色谱法; 苦参素注射液; 氧化苦参碱; 氧化槐果碱
中图分类号: R917.101; R931.6 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693 (2007) 05-0401-02

HPLC Determination of Oxsophocarpine in Marine Injection

LV Zhao-yun¹, ZHANG Yan-hong², QIAO Pei-xiang¹, PAN Xian-dao¹ (1. Beijing Union Pharmaceutical Factory, Beijing 102600, China; 2. National Research Center for Engineering of New Drug Development, Beijing 102600, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for the determination of Oxsophocarpine in Marine Injection. **METHODS** The HPLC determination was carried out on a Discovery C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column at temperature of (40 ± 1) °C, using a UV detector and the detection wavelength was 220 nm. Elution was carried out with pH 3.0 Phosphate Buffer-acetonitrile-methanol (95:4:1) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. **RESULTS** The linearity of the determination of Oxsophocarpine in Marine was over the range of 0.1% ~ 2.0% and the average recovery of Oxsophocarpine was 99.24%. **CONCLUSION** The HPLC method shows a good separation and accuracy and it could be used for quality control to determine Oxsophocarpine in Marine Injection.
KEY WORDS: HPLC; marine injection; oxymatrine; oxsophocarpine

苦参素是从中药苦参中提取、分离、纯化制得的生物碱。因为苦参中含有苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱等多种生物碱, 在分离提纯氧化苦参碱过程中有可能被带入, 而不能完全单独分离, 现行国家药品标准^[1]规定苦参素为氧化苦参碱与极少量氧化槐果碱的混合碱, 其中氧化槐果碱作为杂质在检查中通过薄层色谱 (TLC) 法控制, 限度为 2%。笔者参照有关文献^[2-3], 建立了高效液相色谱法用于苦参素注射液中氧化槐果碱的限量检查, 操作简便, 结果更为准确、灵敏。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: 泵 (LC-10A, 日本岛津), 紫外检测器 (SPD-10A, 日本岛津); 色谱柱: Discovery C₁₈ 柱 (4.6 mm ×

250 mm, 5 μm, 美国 Supelco 公司); 色谱工作站: Anastar。
甲醇, 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 氧化苦参碱、氧化槐果碱对照品购于中国药品生物制品检定所; 苦参素注射液由北京协和药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱方法

色谱柱: Discovery C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Supelco 公司); 流动相: pH 3.0 磷酸盐缓冲液 (取 1 mol · L⁻¹ 磷酸溶液 8.0 mL, 1 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液 50.0 mL, 用水稀释至 1000 mL)-乙腈-甲醇 (94:5:1); 检测波长: 220 nm; 进样量 20 μL; 柱温: 40 °C; 流速 1.0 mL · min⁻¹。

取注射液样品, 加流动相制成含氧化苦参碱约 200 μg ·

作者简介: 吕昭云, 男, 硕士, 工程师 Tel: (010) 69208475 E-mail: lvzhy@126.com

mL⁻¹的溶液,作为供试品溶液;另取氧化槐果碱对照品适量,用流动相溶解并定量稀释成每1 mL中含4 μg的溶液,作为对照品溶液;取上述溶液各20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品溶液的色谱图中,如出现对照品溶液相应的氧化槐果碱色谱峰,其含量不得超过氧化苦参碱标示量的2.0%。

2.2 检测波长的选择

取氧化苦参碱、氧化槐果碱对照品,以流动相配制成适宜浓度的溶液,以流动相为空白,照分光光度法(中国药典2000年版二部附录IV A)在200~600 nm波长范围内进行扫描。结果表明,氧化苦参碱呈末端吸收,氧化槐果碱除末端吸收外,在252 nm处还有一吸收峰。参考有关文献^[2-3],选择220 nm作为液相色谱检测波长。

2.3 系统适用性

取氧化苦参碱、氧化槐果碱对照品,以流动相配制成适宜浓度的混合溶液,进样20 μL,记录色谱图。结果表明,在上述色谱条件下,氧化槐果碱色谱峰与氧化苦参碱色谱峰分离度>1.5,系统适用性符合要求。

2.4 氧化槐果碱检测限与定量限考察

取氧化槐果碱对照品溶液,反复稀释并调整进样量,以信噪比等于3计算氧化槐果碱的最低检测限,结果约1.4 ng,以信噪比等于10计算氧化槐果碱的最低检测限,结果约4.0 ng。按有关物质检查方法计,“取含氧化苦参碱200 μg·mL⁻¹的注射液样品溶液进样20 μL”,则氧化槐果碱检测限可达氧化苦参碱进样量(4000 ng)的0.035%,定量限可达0.1%,说明检出非常灵敏,能满足限量检测的需要。

2.5 专属性考察与辅料干扰试验

取苦参素原料,经酸、碱、氧化、光照、高温等因素强制破坏,各杂质峰均与主峰分离良好;配制阴性注射液,依有关物质测定法进样20 μL,结果表明注射液辅料不干扰样品有关物质的测定。说明方法专属性符合要求。

2.6 检出范围与回收率

配制200 μg·mL⁻¹氧化苦参碱对照品溶液1 mL(6份),分别加入16 μg·mL⁻¹氧化槐果碱对照品溶液0, 12.5, 31.25, 62.5, 125, 250 μL,混匀,配成氧化槐果碱杂质加入量为0.0%,0.1%,0.25%,0.5%,1.0%,2.0%的系列溶液,各进样20 μL,记录色谱图。以氧化槐果碱加样进样量(ng)为横座标X,扣除0.0%空白溶液的杂质峰面积为纵座标Y回归,结果见表1。

依上法,配制氧化槐果碱杂质加入量分别为0.1%,0.5%,2.0%的氧化苦参碱溶液各3份,各进样20 μL,记录色谱图。另取4 μg·mL⁻¹氧化槐果碱对照品溶液,进样20 μL,按外标一点法计算氧化槐果碱检出量,计算平均加样回收率为99.24%,RSD为1.37%(n=9)。

表1 氧化槐果碱杂质线性检出范围和回归方程

Tab 1 Linear range and regressive equation of Oxysophocarpine

杂质加入量/%	进样量 /ng	测得峰面积	回归方程	r
0.1	4.0	3744		
0.25	9.7	9037		
0.5	18.8	17243	Y=920.06X+148.62	0.999 8
1.0	35.6	33366		
2.0	64.0	58826		

结果表明,该法能准确地检出氧化苦参碱中0.1%~2.0%限度范围的氧化槐果碱杂质。

2.7 系统耐用性

在换用不同色谱柱及不显著改变流动相等条件下,测得有关物质分离结果分离度均>1.5,可见系统耐用性可以满足氧化槐果碱杂质限量检测的需要。

2.8 与薄层色谱法对比试验

取北京协和药厂苦参素注射液样品三批,先按国家药品标准中规定的薄层色谱法进行氧化槐果碱杂质测定,结果均为未检出;再用上述HPLC测定,三批测定结果分别为0.2%、0.1%、0.1%;结果表明,用HPLC能对苦参素注射液中氧化槐果碱杂质更为准确地定量。

3 讨论

3.1 HB-002“苦参素注射液”国家药品标准中,氧化槐果碱杂质的检查采用薄层色谱法进行,通过显色后比较色斑深浅来确定氧化槐果碱的限量,操作误差及结果判定的主观随意性较大。本研究建立了高效液相色谱法用于氧化槐果碱杂质的限量检查,操作简便,结果准确、灵敏,能更好地控制本产品的质量。

3.2 氧化槐果碱、氧化苦参碱较难分离,本方法系统适用性表明,二者分离度>1.5,系统耐用性好,用于制剂中氧化槐果碱杂质检查完全可行。

REFERENCES

[1] State Drug Specification of Marine Injection (苦参素注射液国家药品标准)[S]. HB-002.
[2] LIU B R, ZHOU H C, WANG W. The methodology study on determining contents in kushensu by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001,12(1):27-28.
[3] YANG F Z, LV Y, JIANG Q Y. HPLC determination of oxymatrine in marine injection[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 1997,12(6):245.

收稿日期:2006-11-28