

高效液相色谱法测定除湿注射剂中三种成分

刘庆丰, 李中东, 施孝金*, 钟明康 (复旦大学附属华山医院临床药学研究室, 上海 200040)

摘要:目的 建立除湿注射液中龙胆苦苷和两种生物碱含量测定的 HPLC 方法并制定该制剂质量控制的指标。方法 采用 Diamondsil C₁₈ 反相柱, 流动相为乙腈-水-三乙胺 (9:91:0.5), 用磷酸准确调节 pH 至 6.75, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 215 nm。结果 苦参碱、槐果碱和龙胆苦苷在 3.125 ~ 100 μg · mL⁻¹ 范围内都呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$), 回收率大于 98%, 日内、日间 RSD 均小于 2%。结论 本法操作简便, 结果准确, 重复性好, 可用于除湿注射剂的质量控制。

关键词: 除湿注射液; 苦参碱; 槐果碱; 龙胆苦苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R289

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2007)05-0412-02

Determination of Three Compounds in Chu Shi Injection by HPLC

LIU Qing-feng, LI Zhong-dong, SHI Xiao-jin*, ZHONG Ming-kang (Research Division of Clinical Pharmacy, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for the assay of gentiopiricin, matrine and sophocarpine in Chu Shi injection and formulate a standard for quality control. **METHODS** Diamonsil-C₁₈ column was used as the stationary phase. Acetonitrile-water-triethylamine(9:91:0.5) was used as the mobile phase. Flow rate was 1 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 215 nm. **RESULTS** The linear ranges for matrine, sophocarpine and gentiopiricin were 3.125 ~ 100 μg · mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), the RSDs of within-day and between-day were less than 2.0%. **CONCLUSION** This HPLC method is simple, rapid, accurate and suitable for quality control of Chu Shi injection.

KEY WORDS: Chu Shi Injection; gentiopiricin; matrine; sophocarpine; HPLC

除湿注射液为本院研制的皮肤科用药, 主要由生地、龙胆草、苦参等中药配伍而成; 对急性渗出性疾病如急性湿疹等效果显著。苦参碱(matrine)和龙胆苦苷(gentiopiricin)为其重要活性成分, 苦参碱具有护肝、保肝、清热利湿、利尿退黄、解毒降酶等作用; 龙胆苦苷具有利胆、抗炎、杀真菌、杀疟原虫等作用。HPLC 测定它们各自含量的方法多有报道^[1-4], 但同时测定这两组分的方法未见报道。另外, 该制剂中含有含量较高的槐果碱(sophocarpine), 对其药理作用国内尚无明确报道。笔者建立 HPLC 同时测定除湿注射液中这三种成分的含量, 操作简单、快速, 重复性良好, 适用于该制剂的质量控制及进一步开发研究。

1 仪器、试剂及样品

1.1 仪器

Waters 液相色谱仪 2695, 2487 型紫外检测器, Waters Millennium 色谱处理软件。

1.2 样品

除湿注射剂(规格: 2 mL/支, 批号 050722, 050824, 051118, 060218)。

1.3 对照品

批号 110805 - 200306, 中国药品生物制品检定所。槐果碱对照品: 宁夏盐池金豆植物生化有限公司提供。龙胆苦苷

对照品: 批号 0780 - 200004, 中国药品生物制品检定所。甲硝唑(内标)对照品: 中国药品生物制品检定所。

1.4 试剂

水(注射用水)、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司)、磷酸和三乙胺(分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水-三乙胺(9:91:0.5) pH 6.75, 检测波长 215 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL, 柱温 55 °C。在上述色谱条件下, 测得苦参碱的保留时间为 11.56 min, 槐果碱的保留时间为 13.82 min, 龙胆苦苷的保留时间为 17.27 min, 内标甲硝唑的保留时间为 7.20 min, 理论塔板数大于 3000, 它们之间的分离度皆大于 1.5。附加剂聚山梨酯(吐温-80)及其他中药成分对测定无干扰, 专属性良好。

2.2 溶液配制

内标储备液: 精密称取甲硝唑对照品 10.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加注射用水溶解并定容, 制得 1 mg · mL⁻¹ 的溶液, 于 4 °C 冰箱保存。

对照品贮备液: 分别精密称取苦参碱、槐果碱与龙胆苦苷对照品 15.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加注射用水溶解并定

容,制得 $300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

供试品溶液:精密吸取除湿注射液 0.5 mL ,置 100 mL 量瓶中,加注射用水定容,涡旋 30 s ,作为供试品溶液。

阴性对照液:取不含龙胆与苦参的原料药,按相同工艺制备成注射液,精密吸取该注射液 0.5 mL ,置 100 mL 量瓶中,加注射用水定容,涡旋 30 s ,作为阴性对照液。

2.3 线性关系和检测限

分别精密吸取对照品贮备液适量,各置 5 mL 量瓶中,加注射用水稀释成浓度为 $100,50,25,12.5,6.25$ 和 $3.125\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准曲线工作液;分别精密吸取 $250\text{ }\mu\text{L}$ 内标储备液,加入以上各试管(所得内标浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),涡旋 30 s 。进样 $20\text{ }\mu\text{L}$ 测定,以相关各对照品工作液峰面积与内标峰面积比值 A 对浓度 C 进行线性回归,得苦参碱的回归方程: $A=4.56\times10^5C-4.52\times10^{-2}$; $r=0.999\text{ }9$; 槐果碱的回归方程: $A=3.81\times10^5C-3.96\times10^{-2}$; $r=0.999\text{ }9$; 龙胆苦苷的回归方程: $A=9.82\times10^5C-9.54\times10^{-2}$; $r=0.999\text{ }9$ 。结果表明苦参碱、槐果碱和龙胆苦苷在浓度 $3.125\sim100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。最低检测限为 $0.391\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4 精密度

分别配制浓度同为 $5,20$ 和 $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的苦参碱、槐果碱和龙胆苦苷的混合质控溶液,所含内标含量不变。分别于日内(5 次)和日间(连续 5 d)进样测定。测得苦参碱的日内 $\text{RSD}(\%)$ 和日间 $\text{RSD}(\%)$ 分别为 $1.8,1.0,0.7$ 和 $1.8,1.7,1.0$; 槐果碱的日内 $\text{RSD}(\%)$ 和日间 $\text{RSD}(\%)$ 分别为 $1.8,1.0,0.4$ 和 $1.8,0.6,0.8$; 龙胆苦苷的日内 $\text{RSD}(\%)$ 和日间 $\text{RSD}(\%)$ 分别为 $1.8,0.6,1.0$ 和 $1.8,1.5,1.5$ 。

2.5 样品溶液在室温条件下的稳定性

供试品溶液(批号 060218),分别在室温条件下于配制后 $0,4,8,12,24\text{ h}$ 依法测定,结果表明,供试品溶液稳定。苦参碱的含量分别为 $3.3,3.25,3.26,3.2,3.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.09% ; 槐果碱的含量分别为 $0.95,0.95,0.96,0.92,0.95\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.6% ; 龙胆苦苷的含量分别为 $6.0,6.0,6.1,6.0,6.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.56% 。

2.6 加样回收率

精密量取 4 批 0.25 mL 浓度依次为 $13.2,3.9,19.8\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的苦参碱、槐果碱与龙胆苦苷的对照品液(混合后该三种成分含量等于所测样品中含量均值 $4.4,1.3,6.9\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 接近,均值由含量接近的前三批样品中该三种成分求得),分别加至 4 种批号 0.25 mL 供试品溶液中(总体积各为 1.0 mL),再分别精密吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 内标储备液,加入以上各试管(所得内标浓度为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),涡旋 30 s 。进样测定,测得苦参碱的回收率($\%$)分别为 $100.7,102.0,99.3,99.3$, $\text{RSD}(\%,n=3)$ 分别为 $0.22,0.18,0.26,0.18$; 测得槐果碱的回收率($\%$)分别为 $100.0,99.9,99.9,100.0$, $\text{RSD}(\%,n=3)$ 分别为 $0.10,0.08,0.05,0.18$; 测得龙胆苦苷的回收率($\%$)分别为 $101.1,100.0,100.0,101.3$, $\text{RSD}(\%,n=3)$ 分别为 $0.10,0.28,0.15,0.18$ 。

2.7 样品测定

分别取 4 种批号供试品溶液,进样测定。结果见表 1 。

表 1 除湿注射剂样品测定结果

Tab 1 Determination results of Chu Shi injection samples

批号	含量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$		
	苦参碱	槐果碱	龙胆苦苷
050722	4.35	1.30	6.80
050824	4.50	1.40	7.00
051118	4.35	1.20	6.90
060218	3.41	0.95	6.00

3 讨论

从线性关系、稳定性和回收率等方面对除湿注射液的 HPLC 方法展开验证,结果表明此方法选择性强,具有满意的可靠性和准确性。

3.1 据报道,甲硝唑对光有一定敏感性^[5],为保证实验结果准确可靠,试剂储存及测定过程中,应该注意避光。

3.2 在流动相的摸索过程中,甲硝唑和龙胆苦苷的保留时间随流动相中乙腈含量增加而明显缩短,苦参碱、槐果碱及另一未知化合物的保留时间随流动相 pH 增加而显著增加,温度对以上五种成分之间的分离影响不大。

3.3 样品中槐果碱含量相对较高,但对其确切药理作用目前尚无相关报道,建议对该成分进行针对性研究。

3.4 对于另一种未知化合物,保留时间为 19.72 min ,来源于苦参药材,在本制剂中含量约为苦参碱的 10% ,考虑到制备工艺(酸提醇沉)以及其在 HPLC 中保留时间随流动相 pH 值变化明显;进一步经制备型 HPLC 提取少量该化合物,与生物碱沉淀试剂碘-碘化钾试剂及碘化铋钾试剂反应阳性,与生物碱显色剂 Macquis 反应阳性,推测该化合物可能为生物碱。以后对其结构将进一步研究。

REFERENCES

[1] YUAN Y F, PAN Y H, HU J H, *et al.* Determination of matrine and tetramethyl -pyrazine hydrochloride in Ganli injection by HPLC[J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2003, 18(5):367-369.

[2] ZHANG L, CHENG X H, WANG X, *et al.* Simultaneous ion-pair RP-HPLC determination of oxymatrine and matrine in Compound Kushen Injection[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2004, 26(11):876-878.

[3] LIANG X Q, SHI T, WANG S H, *et al.* Determination of content of gentiopicroside in Er Tong II by HPLC[J]. Prac Clin J Integr Tradit Chin West Med(实用中西医结合临床), 2004, 4(5):71-72.

[4] LU Y C, LIN P C, JI L J, *et al.* Determination to the contents of 3 kind of active components in different parts of Gentiana aristata Maxim by HPLC[J]. Chin Tradit Pate Med(中成药), 2005, 17(11):1356-1357.

[5] GE X M, HANG T J, LIU N, *et al.* Simultaneous determination of tetracycline hydrochloride, metronidazole and their related substances in compound capsules by RP-HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2006, 23(1):44-47.

收稿日期:2006-11-07