

HPLC测定苦参注射液中苦参碱含量

邓开锋¹, 吴俊伟^{1,2}, 唐建华^{1,2}

(1. 重庆方通动物药业有限公司, 重庆荣昌 402460 2 西南大学荣昌校区, 重庆荣昌 402460)

[收稿日期] 2010-04-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2010)11-0036-03 [中图分类号] S859

[摘要] 建立了苦参注射液中苦参碱含量的 HPLC 检测法。色谱柱为 waters C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 0.02 mol/L 乙酸铵缓冲溶液 (含 500 μL/L 三乙胺) - 甲醇 - 乙腈 (70:10:20) 为流动相, 检测波长 210 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。苦参碱进样浓度在 4.0~200.0 μg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$); 样品平均回收率为 100.1% ($n=9$), RSD 为 1.1%。本方法简便、准确度高、重复性好, 可用于苦参注射液中苦参碱的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 苦参注射液; 苦参碱

Content Determination of Matrine in Matrine Injection by HPLC

DENG Kai-feng¹, WU Jun-wei^{1,2}, TANG Jian-hua^{1,2}

(1. Chongqing Fangtong Animal Pharmaceutical Co., Ltd. Rongchang, Chongqing 402460 China;

2. Rongchang Campus of Southwest University, Rongchang, Chongqing 402460, China)

Abstract An HPLC method for the content determination of matrine in matrine injection was developed. The column was Waters C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), mobile phase was 0.02 mol/L acetate buffer solution (500 μL/L triethylamine) - methanol - acetonitrile (70:10:20), detection wavelength was 210 nm, flow rate was 1 mL/min, column temperature was 30 °C. The injection volume was 20 μL. There was a good linear correlation between the peak areas and the concentrations of matrine at the range of 4.0~200.0 μg/mL ($r=0.9999$). The average recovery was 100.1% with RSD of 1.1% ($n=9$). The results indicated that the method was simple, accurate and repeatable. It can be used for the quality control of matrine in matrine injection.

Key words HPLC; matrine injection; matrine

苦参注射液为纯中药制剂, 已在兽医临床应用多年, 标准收载于《兽药地方标准上升国家标准》第十册, 原标准采用酸碱滴定法测定苦参总碱含量, 该法耗时长, 滴定终点颜色变化不明显, 重复性差, 较难快速、准确对制剂进行质量控制。在参考《中国兽药典》2005年版二部苦参药材含量测定方法以及相关文献^[1-2]苦参制剂中苦参碱含量测定方法基础上, 建立了 HPLC 测定苦参注射液中苦参碱的含量, 并对方法进行了验证。结果表明该方法简单、结果准确, 重复性好, 回收率高, 能有效的控制苦参碱的含量, 比原标准方法快速高效, 特异性强,

灵敏度高。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, waters 2487 紫外检测器, Empower2 色谱工作站。色谱柱为 Waters C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。

1.2 药品与试剂 苦参碱对照品, 批号 110805-200507, 含量: 100.0%, 购自中国药品生物制品检定所。苦参注射液, 含量规格: 10 mL 含苦参碱不少于 50 mg 重庆方通动物药业有限公司提供。甲醇、乙腈为色谱纯 (美国进口), 流动相用水为超纯水, 其余试剂为分析纯。

1.3 0.02 mol/L 乙酸铵缓冲溶液 取乙酸铵 1.5416 g 加水 500 mL 溶解后,加 500 μ L 三乙胺,加水使成 1000 mL,即得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱用十八烷基键合硅胶为填充剂,0.02 mol/L 乙酸铵缓冲溶液(含 500 μ L/L 三乙胺)-甲醇-乙腈(70:10:20)为流动相,检测波长 210 nm,流速 1 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 20 μ L。理论板数按苦参碱峰计应不低于 2000。精密称取苦参碱对照品,加流动相溶解并稀释至约含苦参碱 100 μ g/mL 溶液进行测试。同时做空白辅料样品和苦参注射液样品的测试,记录色谱图,见图 1~3。

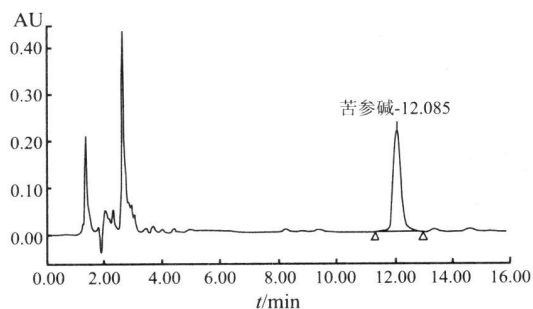


图1 苦参碱对照品 HPLC 色谱图

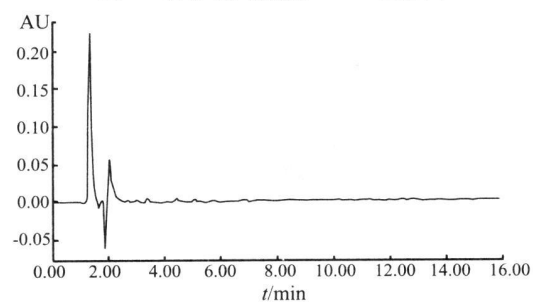


图2 空白辅料样品 HPLC 色谱图

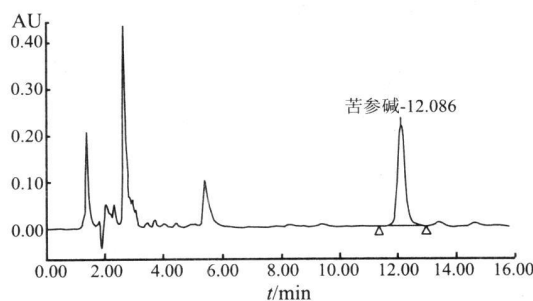


图3 苦参注射液样品 HPLC 色谱图

2.2 测试溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的苦参碱对照品 10 mg,置 50 mL

量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 200 μ g/mL 的苦参碱对照品贮备液,4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

2.2.2 空白辅料样品溶液制备 按处方配制除苦参碱提取物以外的空白辅料溶液,精密量取 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。结果在苦参碱出峰时间及附近没有出现干扰峰,即注射液辅料不干扰苦参碱的含量测定(图 2)。

2.2.3 苦参注射液样品溶液制备 精密量取苦参注射液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 测定法 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液适量作为测试溶液,取测试溶液 20 μ L,注入高效液相色谱仪进行测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算苦参注射液样品溶液中苦参碱($C_{15}H_{24}N_2O$)的含量。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密量取对照品贮备液 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 40 mL,置 25 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,分别精密量取上述溶液和对照品贮备液 20 μ L,注入高效液相色谱仪进行测定,以峰面积(y)为纵坐标,浓度为横坐标(x , μ g/mL),进行线性回归分析,得回归方程为: $y = 15450x + 5121.6$ ($r = 0.9999$),结果表明,苦参碱进样浓度在 4.0~200.0 μ g/mL 的范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度的试验 精密量取上述 2.2.1 项下苦参碱对照品贮备液 10 mL,置于 25 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,连续进样 6 次,峰面积 RSD 为 0.5%,表明有良好的精密度。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取苦参注射液(批号 20090401) 1 mL,按 2.2.3 项下制备样品溶液,于制备后 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 h 分别进样测定峰面积,结果峰面积 RSD 为 0.6%,表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.4 加样回收率试验 分别精密量取已知含量苦参注射液(批号 20090401) 9 份,每份 0.2 mL,置 50 mL 容量瓶中,按高、中、低分别加入一定量的苦参碱对照品贮备液(每个浓度做 3 份),用流动相稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,计算回收率。结果苦参碱低、中、高浓度平均回收率($n=3$)分别为 100.3%、100.0%、99.9%, RSD 分别为 1.7%、1.1%、0.7%,样品的平均加样回收率($n=9$)为 100.1%, RSD 为 1.1%,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

含量 / (mg·mL ⁻¹)	加入量 / (mg·mL ⁻¹)	测得量 / (mg·mL ⁻¹)	回收 率 %	平均回 收率 %	RSD /%
0.0248	0.0120	0.0121	100.83		
0.0248	0.0120	0.0118	98.33	100.3	1.7
0.0248	0.0120	0.0122	101.67		
0.0248	0.0240	0.0237	98.75		
0.0248	0.0240	0.0241	100.42	100.0	1.1
0.0248	0.0240	0.0242	100.83		
0.0248	0.0360	0.0362	100.56		
0.0248	0.0360	0.0360	100.00	99.9	0.7
0.0248	0.0360	0.0357	99.17		

2.3.5 样品含量测定 分别取不同批号苦参注射液,按 2.2.3 项下制备样品溶液,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,每份样品测定 3 次。精密吸取 2.2.1 项下对照品贮备液 25 mL,置 50 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,同法测定。按外标法以峰面积计算苦参注射液中苦参碱的含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n=3)

样品批号	含量 / (mg·mL ⁻¹)				RSD /%
	1	2	3	平均值	
20090401	6.20	6.18	6.21	6.20	0.25
20090402	5.97	5.93	5.99	5.96	0.51
20090403	6.35	6.30	6.40	6.35	0.79
20090501	5.86	5.88	5.92	5.89	0.52
20090502	6.38	6.35	6.30	6.34	0.64
20090601	5.36	5.40	5.43	5.40	0.65

3 小结

3.1 检测波长选择 取苦参碱对照品适量,用流动相溶解并稀释成 50~100 μg/mL 的溶液,在

400~200 nm 波长进行扫描,结果从 230~200 nm 吸收峰逐渐增大,无最大吸收峰,故确定检测波长为 210 nm。

3.2 在本研究中,曾参考《中国兽药典》和相关文献^[3],对样品进行前处理,即加入浓氨试液使苦参碱游离出来,然后用氯仿少量多次提取,挥干氯仿后用流动相稀释并定容至刻度,虽然可减少杂质峰,但回收率偏低(90%~95%),重现性较差。采用目前拟定的 HPLC 法,不需对样品进行前处理,直接稀释进样,其回收率、重现性都很好,但色谱柱的平衡时间较长,一般需要 60~70 min 以上,这与吴迪等报道的一般需要 90 min 基本一致^[4]。

本文建立的 HPLC 法测定苦参注射液中苦参碱的含量,注射液辅料无干扰,15 min 左右可以完成一次 HPLC 分析,方法简便、准确、灵敏、重现性好。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2005 年版二部. 北京: 中国农业出版社. 201
- [2] 宋玉琴, 魏玉辉, 武新安. RP-HPLC 法测定苦豆子总碱注射液中槐定碱、苦参碱和槐果碱的含量[J]. 兰州大学学报, 2007, 12(33): 24-26.
- [3] 向柏, 孙英华, 张媛, 等. RP-HPLC 法测定苦参总碱中苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱和氧化苦参碱[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1813-1815.
- [4] 吴迪, 梁健, 廉建伟, 等. RP-HPLC 法同时测定复方苦参注射液中氧化槐果碱、氧化苦参碱和苦参碱的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(4): 220-223.

国家兽用标准物质研制和使用技术培训班即将开班

中国兽医药品监察所定于 2010 年 12 月 3-4 日举办“国家兽用标准物质研制和使用技术”培训班。届时将邀请中国药品生物制品检定所、中国计量科学院和中国兽医药品监察所相关专家授课。主要培训内容包括药品标准物质的研制与标定、国内外兽用标准物质研究现状与应用、兽药标准物质的建立、莫能菌素标准物质的研制、禽流感诊断试剂标准物质研制与使用、牛型提纯结核菌素国家标准物质的研制、猪瘟阴阳性血清标准物质的研制、牛布鲁氏杆菌病阴阳性血清标准物质的研制等。各省兽药监察所、兽用生物制品(化学药品)原料药生产企业、国家残留试验室、有关科研院所的相关人员均可报名参加。详情见 http://www.ivdc.gov.cn/tz/201011/t20101105_34712.htm, 联系电话: 010-62103538 联系人: 王峰、张曼琴。