

20 μ l, 重复进样 5 次, 测得没食子酸峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.33%。结果表明精密度良好。

6. 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液 20 μ l, 分别于 0、2、4、6、8 小时各进样 1 次, 测得没食子酸峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.50%。结果表明, 供试品溶液中没食子酸在 8 小时内稳定性良好。

7. 重现性试验 取同一批号样品 5 份, 按供试品溶液的制备方法制得样品溶液, 分别进样 20 μ l, 测得没食子酸含量的相对标准偏差(RSD)为 0.88%。结果表明, 该供试品溶液的制备方法可行, 重现性良好。

8. 回收率试验 采用加样回收法, 取已知含量的样品(没食子酸含量为 52.1578mg/g) 5 份, 每份约 0.1g, 分别精密加入没食子酸对照品溶液(浓度为 0.1168mg/ml) 50ml, 按供试品溶液的制备方法制得样品溶液, 分别进样 20 μ l, 测定, 计算, 平均回收率为 99.3%, 相对标准偏差(RSD)为 0.47%(见表 1)。

表 1 回收率试验结果

序号	取样量 (g)	样品已知量 (mg)	加入没食子酸量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.0998	5.2053	5.8400	10.9710	98.73		
2	0.1014	5.2888	5.8400	11.0965	99.45		
3	0.1022	5.3305	5.8400	11.1120	99.00	99.3	0.47
4	0.1048	5.4661	5.8400	11.2740	99.45		
5	0.1062	5.5392	5.8400	11.3765	99.95		

表 2 样品测定结果

批号	含量(mg/粒)	批号	含量(mg/粒)
20040503	21.25	20040602	21.16
20040504	21.06	20040603	21.32
20040505	21.08	20040610	20.82
20040506	21.03	20040611	20.97
20040601	21.61	20040612	20.67

9. 样品测定 按上述供试品溶液的制备方法和含量测定方法, 共测定 10 批样品, 每粒没食子酸平均含量为 21.1mg(见表 2)。

三、讨论

分别采用不同溶剂(甲醇、50% 甲醇、乙醇、70% 乙醇), 不同提取方法(热回流、超声提取), 不同溶剂用量(20、40、50ml)和不同提取时间(20、30、45、60 分钟)对本品中没食子酸的提取研究。结果表明: 取本品 0.2g, 用 50% 甲醇 50ml, 超声提取 30 分钟, 提取没食子酸含量最高。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准、中药成方制剂. 第十一册. 1996: 9
- [2] 肖培根主编. 新编中药志. 第三卷. 北京: 化学工业出版社, 2002. 96~102
- [3] 刘起中, 张家国, 李京平. HPLC 测定猴耳环消炎片中没食子酸的含量. 中成药. 2001, 23(9): 687~688
- [4] 吴家蓉. 高效液相色谱法测定强力升白片中没食子酸的含量. 实用医院临床杂志. 2004, 1(3): 93~94
- [5] 方岚, 胡旭佳, 张斌华. RP-HPLC 测定叶下珠片中没食子酸的含量. 华西药理学杂志. 2004, 19(4): 307~308

HPLC 法测定复方硫酸锌滴眼液中盐酸小檗碱的含量

翁水旺 林 晨 陈蔚东(福建省药品检验所 福州 350001)

摘要 目的: 建立测定复方硫酸锌滴眼液中盐酸小檗碱含量的方法。方法: HPLC 法, 以 Hypersil C₁₈(4.6mm×250mm, 5 μ m) 为色谱柱, 乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液-0.05mol/L 庚烷磺酸钠溶液(40:30:30) 为流动相, 流速 1.0ml/min, 检测波长为 225nm, 进样量 20 μ l。结果: 盐酸小檗碱测定线性范围为 10.01~100.1 μ g/ml, $r=0.99999$, 平均回收率为 100.4%, RSD 为 0.42%。结论: 本方法准确、简便、快捷, 可用于复方硫酸锌滴眼液中盐酸小檗碱含量的测定。

关键词: 复方硫酸锌滴眼液; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法

中图分类号: 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2007)-2-72-3

Determination of Berberine Hydrochloride in Compound Zinc Sulfate Eye Drops by HPLC

Weng Shui-wang, Lin Chen, Chen Wei-dong (Fujian Provincial Institute for Drug Control, Fuzhou 350001)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for the determination of the Berberine Hydrochloride in Compound Zinc

Sulfate Eye Drops. Methods: The chromatographic conditions are listed below: Hypersil C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm) column was used, and a mobile phase was a combination of acetonitrile-0.05mol/L potassium dihydrogen phosphate-0.05mol/L sodium heptanesulfonate (40 30 30), the flow rate was 1.0ml/min, the detective wavelength was set at 225nm, the injection volume was 20μl. **Results:** The calibration curve was linear within 10.01 ~ 100.1μg/ml, $r = 0.99999$. The average recovery was 100.4%, RSD was 0.42%. **Conclusion:** The method was accurate, simple and rapid. It could be used to determine the Berberine Hydrochloride in Compound Zinc Sulfate Eye Drops.

Key words Compound Zinc Sulfate Eye Drops; Berberine Hydrochloride; HPLC

复方硫酸锌滴眼液用于治疗眼结膜炎、沙眼等眼部感染,该药为复方制剂,其组分为每 1ml 含盐酸小檗碱 1mg、硫酸锌 3mg、硼酸 20mg、尼泊金乙酯 0.3mg,其中盐酸小檗碱为其主要抗菌成分。盐酸小檗碱 (Berberine Hydrochloride), 异名盐酸黄连素,系中药黄连、黄柏的主要有效成分,它具有广谱抗菌作用,对多种革兰氏阳性及阴性菌、结核杆菌和真菌均有抑制和杀灭作用。

复方硫酸锌滴眼液原质量标准^[1]并未对滴眼液中的盐酸小檗碱含量进行控制,测定该药中盐酸小檗碱含量的方法也未见报道,本文建立了测定复方硫酸锌滴眼液中的盐酸小檗碱含量的高效液相色谱法,简便、准确,适用于常规分析。

一、仪器与试药

1. 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (四元泵,自动进样器,柱温箱,二极管矩阵检测器); Ver0801 Chemstation 色谱工作站 (Agilent 公司); MILLIPORE 纯水器; Cary 100 分光光度计 (VARIAN 公司)。

2. 试药

盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所), 复方硫酸锌滴眼液, 批号: 030502, 030701, 030702 (湖北潜江制药股份有限公司); 庚烷磺酸钠

(日本东京化成工业株式会社)、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

二、方法与结果

1. 色谱条件

Hypersil C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm) 色谱柱; 以乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾溶液-0.05mol/L 庚烷磺酸钠溶液 (40 30 30) 为流动相; 流速 1.0ml/min, 检测波长为 225nm, 进样量 20μl。

2. 溶液的制备

2.1 样品溶液的制备 精密量取样品 5ml (相当于盐酸小檗碱 5mg), 置 100ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 用水溶解并制成每 1ml 约含 50μg 的溶液。

2.3 阴性对照溶液的制备 按处方精密称取除盐酸小檗碱以外的其他成分, 按样品溶液的制备方法配制阴性对照溶液。

3. 分析方法

取对照品溶液和样品溶液各 20μl, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图 (见图 1), 理论板数按盐酸小檗碱峰计, 为 5906, 盐酸小檗碱峰与相邻的辅料峰分离度为 5.35。

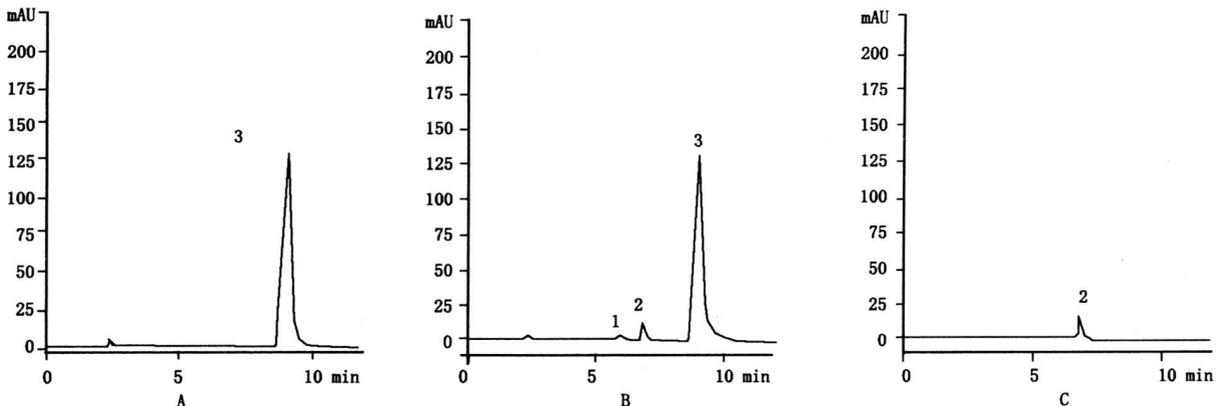


图 1 盐酸小檗碱对照品和样品 HPLC 图

A. 对照品 B. 样品 C. 阴性溶液

1. 盐酸药根碱 2. 尼泊金乙酯 3. 盐酸小檗碱

4. 专属性试验

按上述色谱条件测定,记录色谱图,图中显示,在盐酸小檗碱峰及附近没有出现其他峰,在主峰之前有一个尼泊金乙酯峰(见图1),表明处方中尼泊金乙酯其他成分均不干扰盐酸小檗碱的含量测定。

5. 线性关系

称取盐酸小檗碱对照品 0.10008g,置 100ml 量瓶中,用热水溶解,放冷,用水稀释至刻度,摇匀。吸取该溶液 1.0、2.0、3.0、5.0、10.0ml,分别置 100ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。按上述选定的条件测定。以对照品浓度 $C(\mu\text{g}/\text{ml})$ 为横坐标,以峰面积 A 为纵坐标,进行线性回归,回归方程为

$$A = 56.55C - 65.62 \quad r = 0.99999$$

说明盐酸小檗碱在 $10.01 \sim 100.1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

6. 精密度试验

称取盐酸小檗碱对照品 0.10008g,置 100ml 量瓶中,用热水溶解,放冷,用水稀释至刻度,摇匀。吸取该溶液 5.0ml 置 100ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。按上述选定的条件,连续进样测定 6 次,以峰面积计算, RSD 为 0.19%。

量取批号为 030702 的样品 5.0ml,置 100ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。按上述选定的条件测定,连续进样 6 次,以盐酸小檗碱峰面积计算, RSD 为 0.07%。

7. 重复性试验

精密量取批号为 030702 的样品溶液 5ml,置 100ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,配成相同浓度 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) 的溶液 6 份,按上述选定的条件分别测定,以盐酸小檗碱百分含量计算, RSD 为 0.23%,说明重复性良好 ($n = 6$)。

8. 稳定性试验

取批号为 030702 的样品溶液,按上述选定的色谱条件,分别于 0、6、9、12、15、18、21、24h 测定,以盐酸小檗碱百分含量计算, RSD 为 0.36%。说明样品溶液在 24h 内稳定。

9. 加样回收率试验

精密量取已知含量的批号为 030502 的样品溶液 2ml,共量取 9 份,分别置 100ml 量瓶中,取 3 份分别加入每 1ml 含盐酸小檗碱 1.0008mg 的对照品溶液 2.0ml,另取 3 份分别加入上述对照品溶液 3.0ml,剩余 3 份分别加入上述对照品溶液 4.0ml,上述 9 份分别用水稀释至刻度,摇匀,按分析方法项下测定,计算回收率,结果见表 1。

10. 样品含量测定

取复方硫酸锌滴眼液按“2.2”项制备样品溶液,精密量取对照品溶液和样品溶液各 $20 \mu\text{l}$,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,按外标法以峰面积计算,批号为 030502、030701、030702 的 3 批样品含盐酸小檗碱量分别为标示量的 99.1%、97.5%、98.7%。

表 1 复方硫酸锌滴眼液中盐酸小檗碱的回收率试验

样品中盐酸小檗碱(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1.9844	2.0016	4.0035	100.88	100.8	0.08
1.9844	2.0016	4.0011	100.76		
1.9844	2.0016	4.0005	100.73		
1.9844	3.0024	4.9804	99.68	100.3	0.53
1.9844	3.0024	5.0007	100.70		
1.9844	3.0024	4.9952	100.42		
1.9844	4.0032	6.0005	100.65	100.2	0.36
1.9844	4.0032	5.9906	100.15		
1.9844	4.0032	5.9866	99.95		

三、讨论

1. 测定波长的选择

精密称取盐酸小檗碱对照品适量,用水溶解并制成每 1ml 约含盐酸小檗碱 $4 \mu\text{g}$ 的溶液;按处方称取硫酸锌、硼酸和尼泊金乙酯,加水溶解并分别制成每 1ml 含硫酸锌 3mg、硼酸 20mg、尼泊金乙酯 $6 \mu\text{g}$ 的 3 种溶液,分别在 $400 \text{nm} \sim 200 \text{nm}$ 波长范围内扫描。图谱显示,盐酸小檗碱在 228nm、263nm 和 345nm 波长处有最大吸收,其吸收值大小为 $A_{263 \text{nm}} > A_{228 \text{nm}} > A_{345 \text{nm}}$ 。而在 263nm 波长处,尼泊金乙酯吸收值很大,硼酸在这一波长也有吸收;而尼泊金乙酯在 225nm 波长处的吸收值最小,其余两个成分硫酸锌、硼酸在 225nm 波长处的吸收值亦很小,对盐酸小檗碱含量测定干扰很小,且盐酸小檗碱在 225nm 波长处的吸收值也很大,该处的吸收值为 263nm 波长处吸收值的 97%,故选择盐酸小檗碱含量测定的检测波长为 225nm。

2. 盐酸药根碱

盐酸小檗碱中含有盐酸药根碱^[2],在本文的色谱条件下,盐酸药根碱会出峰,但不干扰盐酸小檗碱的测定。

3. 本文所研究的方法专属性强,简便准确,可用于复方硫酸锌滴眼液中盐酸小檗碱的含量测定,为完善质量标准提供了方法和依据。

参考文献

[1] 国家药品监督管理局. 国家药品标准[S]. WS-10001-(HD-1086)-2002

[2] 中华人民共和国药典, 二部[S]. 2000: 548