

秋水仙碱有关物质的测定 HPLC-DAD 法

参考: 《中国药典(2025年版)》二部

一、背景

秋水仙碱为百合科植物丽江山慈菇的球茎中提取得到的一种生物碱,为类白色至淡黄色结晶性粉末,无臭,略有引湿性,遇光色变深。秋水仙碱在乙醇中易溶,在水中溶解(但在一定浓度的水溶液中能形成半水合物的结晶析出),在乙醚中极微溶解。

秋水仙碱由《中国药典(2025年版)》二部所收录,主要用于治疗急性痛风发作,通过抑制炎症反应和白细胞趋化,迅速缓解痛风所致的关节疼痛和炎症。

二、实验过程

1 原理

秋水仙碱及其有关物质在 254 nm 处有紫外吸收,使用反相高效液相色谱配置二极管阵列检测器进行测定。

2 试剂与材料

2.1 水:符合 GB/T 6682 的一级水;

2.2 甲醇:色谱纯;

2.3 90 %甲醇水溶液:准确移取 900 mL 甲醇(2.2)和 100 mL 水(2.1),混匀;

2.4 甲醇-水(1:1)溶液:准确移取 50 mL 甲醇(2.2)和 50 mL 水(2.1),混匀;

2.5 甲醇-水(55:45)溶液:准确移取 550 mL 甲醇(2.2)和 450 mL 水(2.1),混匀,超声脱气后备用;

2.6 秋水仙碱对照品。

3 仪器与设备

- 3.1 高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 C0 柱温箱、K2025 DAD 二极管阵列检测器、Wookinglab 色谱工作站;
- 3.2 分析天平: 精确到 0.0001 g;
- 3.3 涡旋振荡器;
- 3.4 超声波清洗机;
- 3.5 移液器: 100 μ L、1000 μ L;
- 3.6 容量瓶: 10 mL、100 mL、1000 mL, 棕色带刻度。

4 测定步骤

4.1 溶液配制

4.1.1 供试品溶液配制

称取秋水仙碱对照品 (2.6) 约10 mg, 精密称定, 置于10 mL容量瓶中, 用甲醇-水 (1: 1) 溶液 (2.4) 溶解并定容至刻度, 混匀, 制成每1 mL中含秋水仙碱1.0 mg的溶液。

4.1.2 对照溶液配制

精密量取供试品溶液 (4.1.1) 1 mL, 置于100 mL容量瓶中, 用甲醇-水 (1: 1) 溶液 (2.4) 稀释并定容至刻度, 混匀, 制成每1 mL中含秋水仙碱10 μ g的溶液。

4.1.3 灵敏度溶液配制

精密量取供试品溶液 (4.1.1) 0.5 mL, 置于1000 mL容量瓶中, 用甲醇-水 (1: 1) 溶液 (2.4) 稀释并定容至刻度, 混匀, 制成每1 mL中含秋水仙碱0.5 μ g的溶液。

4.2 色谱条件

- a) 色谱柱: C₈柱, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m 或者相当的色谱柱;
- b) 流动相: 以甲醇-水 (55: 45) 溶液 (2.5) 为流动相 A, 以水 (2.1) 为流动相 B, 按下表进行梯度洗脱:

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	70	30
35	70	30
45	90	10
80	90	10

注: 为了系统在进样前达到平衡, 每次进样前运行 10 min

- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 进样量: 20 μ L;
- e) 洗针液: 90 %甲醇水溶液 (2.3);
- f) 柱温: 温度时间程序如下表:

时间 (min)	柱温 ($^{\circ}$ C)
0	20
35	20
45	30
80	30

- g) 检测器及检测波长: 检测器为二极管阵列检测器, 检测波长为 254 nm。

5 系统适用性要求及限度

系统适用性要求: 理论塔板数按秋水仙碱峰计算不低于 5000, 杂质 I 峰 (相对保留时间约为 0.9) 与秋水仙碱峰的分度应符合要求; 灵敏度溶液色谱图中, 秋水仙碱色谱峰信噪比不小于 10。

限度: 供试品溶液色谱图中, 杂质 I 的峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 3.5 倍 (3.5 %), 其他单个杂质峰面积均不得大于对照溶液主峰面积 (1.0 %), 各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 5 倍 (5.0 %), 小于灵敏度溶液主峰面积的峰忽略不计。

6 实验结果

6.1 对照溶液色谱图

按照色谱条件 (4.2) 进行采集, 对照溶液 (4.1.2) 的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

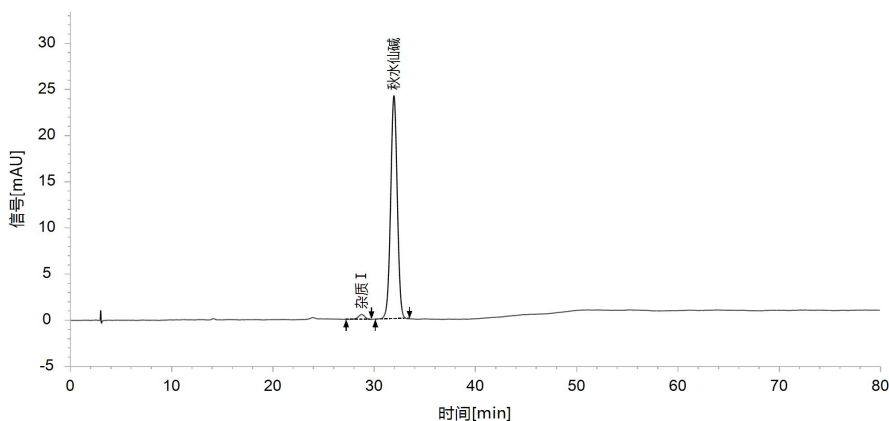


图 1 对照溶液的色谱图

表 1 对照溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
杂质 I	28.775	23.953	0.533	9846	-	0.87
秋水仙碱	31.946	1104.354	24.212	11531	2.71	1.01

由表 1 中数据可知, 对照溶液色谱图中, 秋水仙碱的理论塔板数为 11531, 拖尾因子为 1.01, 满足《中国药典(2025 年版)》二部中理论塔板数按秋水仙碱峰计算不低于 5000 的要求; 杂质 I 峰的保留时间为 28.775 min, 秋水仙碱峰的保留时间为 31.946 min, 杂质 I 峰与秋水仙碱峰的相对保留时间为 0.9, 杂质 I 峰与秋水仙碱峰的分度度为 2.71, 满足《中国药典(2025 年版)》二部中杂质 I 峰(相对保留时间约为 0.9)与秋水仙碱峰的分度度应大于 1.5 的要求。

将对照溶液连续进样 7 针进行重复性测试, 叠加的色谱图如图 2 所示, 结果见表 2。

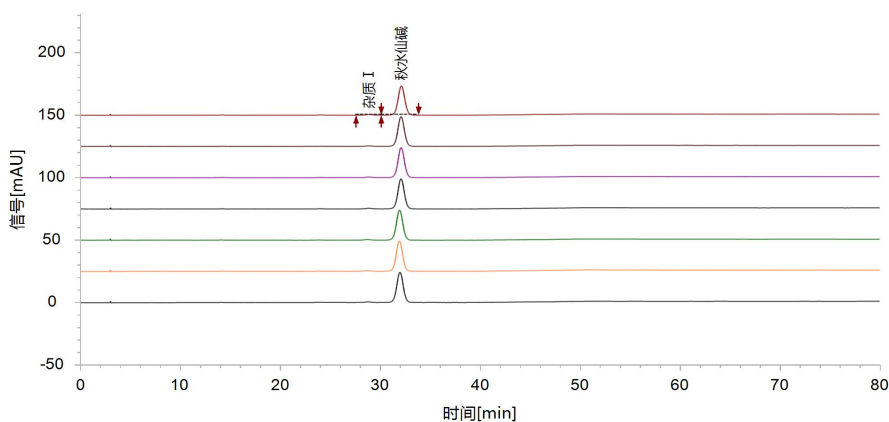


图 2 对照溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 对照溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
杂质 I	保留时间 (min)	28.775	28.709	28.717	28.870	28.859	28.876	28.876	28.812	0.26
	峰面积 (mAU.s)	23.953	23.838	23.846	23.667	23.726	23.694	23.518	23.749	0.60
秋水仙碱	保留时间 (min)	31.946	31.896	31.913	32.057	32.063	32.055	32.097	32.004	0.26
	峰面积 (mAU.s)	1104.354	1104.709	1105.521	1104.676	1103.040	1104.774	1103.652	1104.389	0.07

由表 2 中数据可知, 对照溶液连续进样 7 针重复性测试中, 杂质 I 保留时间的 RSD 为 0.26%, 峰面积的 RSD 为 0.60%; 秋水仙碱保留时间的 RSD 为 0.26%, 峰面积的 RSD 为 0.07%, 均具有良好的定性定量重复性。

6.2 光谱图

使用二极管阵列检测器对对照溶液进行光谱采集, 秋水仙碱的光谱图如图 3 所示。

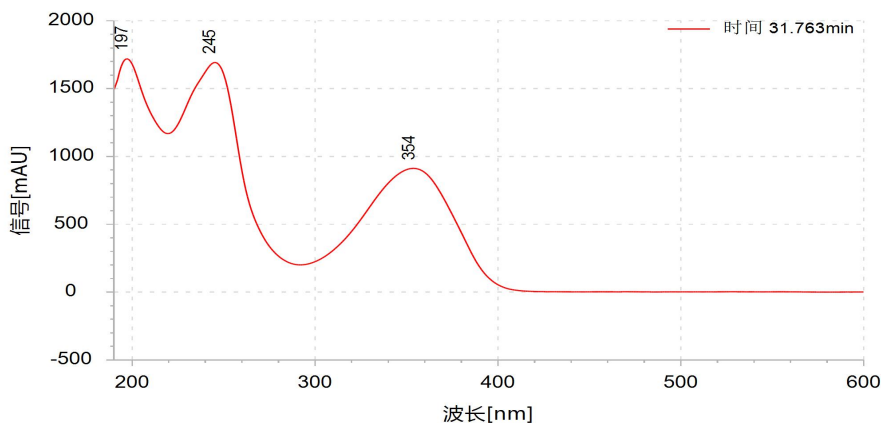


图 3 秋水仙碱的光谱图

由图 3 可知, 秋水仙碱的特征吸收波长为 197 nm、245 nm 和 354 nm。

6.3 供试品溶液色谱图

按照色谱条件 (4.2) 进行采集, 供试品溶液 (4.1.1) 的色谱图如图 4 所示, 积分结果如表 3 所示。

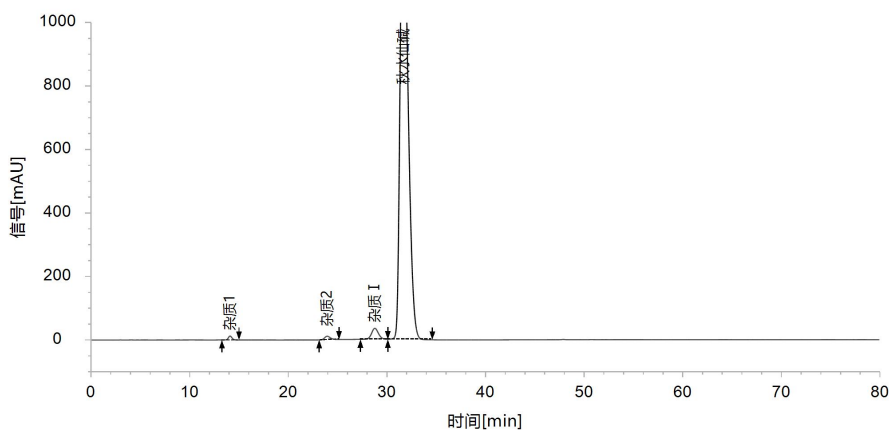


图4 供试品溶液的色谱图

表3 供试品溶液色谱图积分结果表

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU. s)	对照溶液中秋水仙碱 峰面积 (mAU. s)	对照溶液中秋水仙碱 3.5 倍峰面积 (mAU. s)	对照溶液中秋水仙碱 5 倍峰面积 (mAU. s)
杂质 1	14.088	318.737			
杂质 2	23.944	458.512			
杂质 I	28.775	1762.861	1104.389	3865.362	5521.945
秋水仙碱	31.654	80408.301			
杂质峰面积之和 (mAU. s)			2540.110		

注: 小于灵敏度溶液主峰面积的峰忽略不计。

由表3中数据可知, 供试品溶液色谱图中, 杂质 I 的峰面积 (1762.861 mAU. s) 小于对照溶液主峰面积的3.5倍 (3865.362 mAU. s), 其他单个杂质峰面积均小于对照溶液主峰面积 (1104.389 mAU. s), 各杂质峰面积的和 (2540.110 mAU. s) 小于对照溶液主峰面积的5倍 (5521.945 mAU. s), 满足《中国药典 (2025年版)》二部中限度的要求。

6.4 灵敏度溶液色谱图

按照色谱条件 (4.2) 进行采集, 灵敏度溶液 (4.1.3) 的色谱图如图 5 所示, 灵敏度计算结果见表 4。

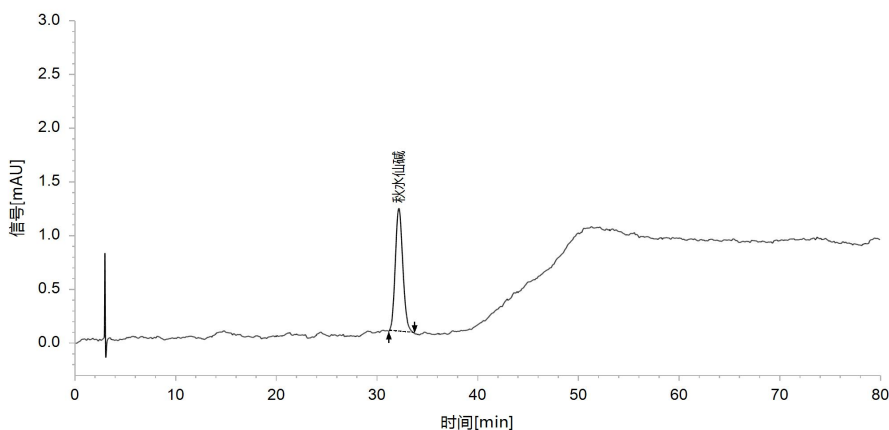


图 5 灵敏度溶液的色谱图

表 4 秋水仙碱灵敏度计算结果表

目标物	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N
秋水仙碱	1.153	0.008	144.1

由表 4 中数据可知,秋水仙碱灵敏度溶液的信噪比 S/N 为 144.1, 满足《中国药典(2025 年版)》二部中灵敏度溶液色谱图中,秋水仙碱峰信噪比应不小于 10 的要求。

三、 结论

通过对供试品溶液、对照溶液、灵敏度溶液进行测定,实验结果表明:

- (1) 对照溶液色谱图中,秋水仙碱的理论塔板数为 11531,拖尾因子为 1.01, 满足《中国药典(2025 年版)》二部中理论塔板数按秋水仙碱峰计算不低于 5000 的要求;杂质 I 峰的保留时间为 28.775 min,秋水仙碱峰的保留时间为 31.946 min,杂质 I 峰与秋水仙碱峰的相对保留时间为 0.9,杂质 I 峰与秋水仙碱峰的分度为 2.71, 满足《中国药典(2025 年版)》二部中杂质 I 峰(相对保留时间约为 0.9)与秋水仙碱峰的分度应大于 1.5 的要求;
- (2) 对照溶液连续进样 7 针重复性测试中,杂质 I 保留时间的 RSD 为 0.26%,峰面积的 RSD 为 0.60%;秋水仙碱保留时间的 RSD 为 0.26%,峰面积的 RSD 为 0.07%,均具有良好的定性定量重复性;
- (3) 秋水仙碱的特征吸收波长为 197 nm、245 nm 和 354 nm;
- (4) 供试品溶液色谱图中,杂质 I 的峰面积(1762.861 mAU.s)小于对照溶液主峰面积的 3.5 倍(3865.362 mAU.s),其他单个杂质峰面积均小于对照溶液主峰面积(1104.389 mAU.s),

各杂质峰面积的和 (2540.110 mAU.s) 小于对照溶液主峰面积的 5 倍 (5521.945 mAU.s), 满足《中国药典 (2025 年版)》二部中限度的要求;

(5) 灵敏度溶液色谱图中, 秋水仙碱灵敏度溶液的信噪比 S/N 为 144.1, 满足《中国药典 (2025 年版)》二部中灵敏度溶液色谱图中, 秋水仙碱峰信噪比应不小于 10 的要求。

因此, 悟空 K2025 高效液相色谱仪满足《中国药典 (2025 年版)》二部中秋水仙碱有关物质测定的需求。

四、 注意事项

1. 本实验需启用柱温时间程序功能, 以精准匹配洗脱过程中对温度动态变化的需求, 保障分离效果的稳定性。

2. 为确保进样前色谱系统 (含流动相、色谱柱等) 处于稳定平衡状态, 需在每次进样前预先运行 10 min 以平衡系统。

附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A) <u>Pump Unit 泵单元</u>	
1	62 MPa 二元高压输液泵 (内置溶剂托盘)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1 L)
3	脱气机
4	四通道溶剂选择阀
5	自动在线清洗系统
B) <u>Sample Injector 进样器</u>	
1	自动进样器
2	样品瓶 (2 mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C) <u>Column Oven 柱温箱</u>	
1	色谱柱恒温箱 (室温以下 10 $^{\circ}$ C 至 90 $^{\circ}$ C)
2	色谱柱: Kromasil C ₈ 柱, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m
D) <u>Detector 检测器</u>	
1	二极管阵列检测器
E) <u>Workstation 工作站</u>	
1	Wookinglab 色谱工作站 (00.03.59.07)

悟空 K2025 高效液相色谱仪



可靠	精准	友好	合规
<ul style="list-style-type: none"> 强化可靠性设计理念 采用全产业链生产模式 历经权威机构可靠性验证 	<ul style="list-style-type: none"> 独特的送液及进样技术 高灵敏度检测器 强大的数据处理软件 	<ul style="list-style-type: none"> 工作站简洁易用, 一小时内快速上手 工作站内置标准方法库 硬件多项人性化细节设计 	<ul style="list-style-type: none"> 数据库存储模式 多级权限管理&审计追踪&电子签名 满足 GMP/GLP/FDA 21 CFR PART 11 要求



悟空科学仪器（上海）有限公司

网址: www.wooking.com

应用实验室

联系方式: 400 618 6188