

UV 与 HPLC 测定萘酚喹含量的比较

杨家庆*, 林燕芳, 张美义

(广州中医药大学青蒿研究中心, 广州 510405)

[摘要] **目的:**通过紫外-可见分光光度法与高效液相色谱法对萘酚喹的含量测定进行对比,为建立萘酚喹的定量方法提供依据。**方法:**UV 法以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶解样品,在 341 nm 处测定;HPLC 色谱柱为 Diamonsil C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.25% 二乙胺溶液 (pH 2.5) (23:77),流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 342 nm。**结果:**UV 法研究表明萘酚喹在 $5.1 \sim 15.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好 ($r=0.9999$),平均回收率为 100.0%,RSD 0.3% ($n=9$);HPLC 法研究表明萘酚喹在 $0.16 \sim 0.8 \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999$),平均回收率为 99.9%,RSD 0.2% ($n=9$)。UV, HPLC 与非水溶液滴定法对比测定结果无明显差异。**结论:**UV 与 HPLC 均可用于萘酚喹的含量测定。

[关键词] 萘酚喹;含量测定;紫外-可见分光光度法;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0103-03

Comparison Study of Methods for the Determination of Naphthoquinone by UV and HPLC

YANG Jia-qing*, LIN Yan-fang, ZHANG Mei-yi

(Research Center for Qinghao <Artemisia annual L. >, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study the determination methods for naphthoquinone by Ultraviolet Spectrophotometry (UV) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), to provide data for the quantitative determination of naphthoquinone. **Method:** To UV, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hydrochloric acid was used to dissolve the sample then test at wavelength 341 nm. HPLC was achieved on a Diamonsil C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) utilizing a mobile phase which consisted of acetonitrile and 0.25% diethylamine (pH 2.5) (23:77). The flow rate was $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the detection wavelength was at 342 nm. **Result:** To UV, naphthoquinone has a good linearity at the range of $5.1\text{-}15.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r=0.9999$), and the average recovery is 100.0% with RSD 0.3% ($n=9$). As to HPLC, naphthoquinone has a good linearity at the range of $0.16\text{-}0.8 \mu\text{g}$ ($r=0.9999$), and the average recovery was 99.9% with RSD 0.2% ($n=9$). The assay results among UV, HPLC and non-aqueous titration showed little difference. **Conclusion:** Both methods of UV and HPLC are suitable for the determination of naphthoquinone.

[Key words] naphthoquinone; determination; UV; HPLC

磷酸萘酚喹是我国军事医学科学院微生物流行病学研究所化学室合成的治疗疟疾的化学药,适用于恶性疟、间日疟和抗药性疟疾的治疗,具有疗程短、

使用简便、疗效确切、治愈率高和副反应轻等特点^[1]。萘酚喹是磷酸萘酚喹的活性碱基,有关原料药萘酚喹的含量测定方法未见文献报道。本文使用紫外分光光度法与高效液相色谱法对萘酚喹的含量测定进行研究,为确定萘酚喹的定量方法提供依据。

1 仪器与试剂

TU-1901 型紫外-可见分光光度计,北京普析通用分析仪器有限公司;岛津 LC-10A 型高效液相色谱

[收稿日期] 20111218(011)

[通讯作者] * 杨家庆,主管药师,硕士,从事新药研究与开发, Tel:020-36585428, E-mail: yangjq81@126.com

谱仪 (SPD-M10Avp 二极管阵列检测器), 日本岛津公司; AUW220D 型电子天平 ($d = 0.01 \text{ mg}$), 日本岛津公司; 萘酚喹自制对照品 (批号 071221), 经非水溶液滴定法测定, 含 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}$ 为 99.8%, 委托中国科学院上海药物研究所鉴定, 表明该样品完全符合萘酚喹的结构式; 萘酚喹自制原料 (批号 080105, 080513); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫外-可见分光光度法

2.1.1 测定波长的选择^[2] 取 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘酚喹对照品溶液, 在 190 ~ 400 nm 扫描, 确定以 λ_{max} 341 nm 作为测定波长。

2.1.2 线性关系考察 取萘酚喹对照品约 0.025 g, 精密称定 (0.025 50 g), 置 50 mL 量瓶, 加 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸适量, 超声使溶解, 放冷、定容、摇匀。分别精密量取 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 置 100 mL 量瓶, 加同种溶剂至刻度 (质量浓度分别为 5, 7.5, 10, 12.5, 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 摇匀, 作为供试品溶液, 于 341 nm 波长处分别测定吸光度。以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A = 21.977 0C - 0.040 2 (r = 0.999 9)$ 。结果表明萘酚喹在 5.1 ~ 15.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吸光度与浓度呈良好的线性关系。

2.1.3 精密度试验 分别取萘酚喹原料 (批号 080105, 下同) 约 0.02, 0.025, 0.03 g 各 3 份 ($n = 9$), 精密称定, 置 25 mL 量瓶, 加 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸适量, 超声使溶解, 放冷、定容、摇匀。精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶, 加同种溶剂至刻度, 摇匀, 制成低、中、高浓度的供试品溶液; 另取萘酚喹对照品约 0.025 g 同法制备对照品溶液。分别于 341 nm 处测定对照品溶液及供试品溶液的吸光度, 计算。结果测得平均含量为 100.1%, RSD 0.6%, 表明精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 将精密度试验的样品于室温放置 12 h 后同法测定。结果测得平均含量为 100.9%, RSD 0.7%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.5 重复性试验 分别取萘酚喹原料约 0.02, 0.025, 0.03 g 各 3 份 ($n = 9$), 精密称定, 同精密度的试验方法制备供试品溶液; 另取萘酚喹对照品约 0.025 g 同法制备对照品溶液, 测定、计算。结果测得平均含量为 100.2%, RSD 0.5%, 表明本法的重复性良好。

2.1.6 回收率试验 分别取萘酚喹 (对照品, 批号 071221) 约 0.02, 0.025, 0.03 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶, 照精密度的试验方法制备供试品溶液; 另取萘酚喹同批对照品约 0.025 g 同法制备对照品溶液, 测定, 计算。结果见表 1。

表 1 UV 法测定萘酚喹含量回收率试验

No.	称样量 /g	样品中含量 /g	测得量 /g	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1-1	0.020 92	0.020 88	0.020 86	99.9		
1-2	0.019 84	0.019 80	0.019 84	100.2		
1-3	0.021 71	0.021 67	0.021 78	100.5		
2-1	0.026 36	0.026 31	0.026 31	100.0		
2-2	0.027 58	0.027 52	0.027 44	99.7	100.0	0.3
2-3	0.025 22	0.025 17	0.025 19	100.1		
3-1	0.032 25	0.032 19	0.032 28	100.3		
3-2	0.030 72	0.030 66	0.030 60	99.8		
3-3	0.031 17	0.031 11	0.031 08	99.9		

2.2 高效液相色谱法

2.2.1 色谱条件^[3,4] Diamonsil HPLC C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-0.25% 二乙胺溶液 (以磷酸调节 pH 2.5) (23:77), 流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 342 nm, 进样量 20 μL 。

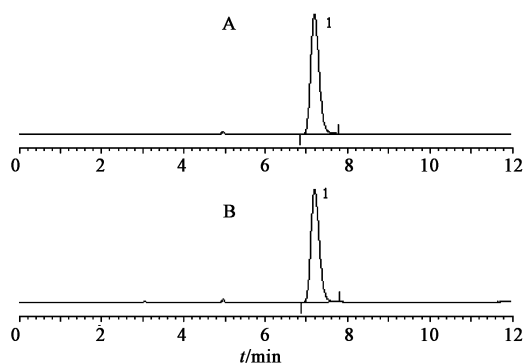
2.2.2 溶液的制备 取萘酚喹对照品约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶, 加 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCL 适量, 超声使溶解, 放冷、定容、摇匀。精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶, 加同种溶剂稀释成 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 另取萘酚喹原料同法制备得供试品溶液。

2.2.3 系统适用性试验 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 对照品与供试品在相同时间处显示尖锐的色谱峰, 理论板数不低于 3 000。见图 1。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘酚喹对照品溶液 8, 16, 24, 32, 40 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 3.209 14 \times 10^6 X - 20 904.4, (r = 0.999 9)$ 。结果表明, 萘酚喹在 0.16 ~ 0.8 μg 线性良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘酚喹对照品溶液 20 μL , 重复进样 6 次, 记录色谱图, 计算峰面积的 RSD 0.7%, 表明精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批萘酚喹原料 0.025



1. 萘酚喹

图1 萘酚喹对照品(A)、萘酚喹原料供试品(B, No. 080105)色谱
g/份,共6份,按2.2.2下的方法制备供试品溶液,测定,计算。结果平均含量为99.7%,RSD 0.6%,表明本法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取萘酚喹原料约0.025 g,按2.2.2下的方法制备供试品溶液,分别于0,3,6,9,12,18 h测定,记录色谱图,计算得峰面积的RSD 0.9%,表明供试品在18 h内稳定。

2.2.8 回收率试验 分别取萘酚喹(对照品,批号071221)约0.02,0.025,0.03 g各3份,精密称定,置25 mL量瓶,按2.2.2下的方法分别制备供试品溶液与对照品溶液。测定,计算。结果测得平均回收率为99.9%,RSD 0.2%。结果见表2。

表2 HPLC法测定萘酚喹含量回收率试验

No.	称样量 /g	样品中 含量 /g	测得量 /g	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1-1	0.019 58	0.019 54	0.019 46	99.6		
1-2	0.020 33	0.020 29	0.020 29	100.0		
1-3	0.019 97	0.019 93	0.019 95	100.1		
2-1	0.025 71	0.025 66	0.025 58	99.7		
2-2	0.024 93	0.024 88	0.024 86	99.9	99.9	0.2
2-3	0.025 84	0.025 79	0.025 81	100.1		
3-1	0.031 59	0.031 53	0.031 50	99.9		
3-2	0.030 66	0.030 60	0.030 63	100.1		
3-3	0.030 12	0.030 06	0.029 94	99.6		

2.3 UV, HPLC与非水溶液滴定法的比较 非水溶液滴定法^[5]为,取萘酚喹约0.2 g,精密称定,加冰醋酸20 mL溶解后,加 α -萘酚苯甲醇指示液2滴,用高氯酸滴定液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)滴定至溶液显黄绿色,并将滴定的结果用空白试验校正。每1 mL高氯酸滴定液相当于20.50 mg的 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}$ 。取同批萘酚喹原料药(批号080513)分别按3种方法测定,结果测得含量分别为99.7%,99.8%,99.8%,无明显差异。

3 讨论

曾以甲醇-二乙胺系统、乙腈-醋酸、乙腈-二乙胺、乙腈-三乙胺系统等为流动相。经过对比研究,以乙腈-二乙胺系统为佳,并经过调节二乙胺的浓度与两者比例、pH,得到使样品保留时间适中、峰形均较好的流动相。

UV与HPLC在近紫外区检测所得的最大吸收波长分别为341,342 nm,由于均为外标法测定,检测波长微小的差异对于比较两者方法测定结果的准确度无影响。与非水溶液滴定法相比,UV与HPLC检测所需的萘酚喹样品量均约为前者的1/8,后两者可大幅度提高测定的专属性。尽管如此,实验表明3种方法对比测定的结果未见明显差异,可为含萘酚喹原料及复方制剂的含量测定提供参考。

[参考文献]

[1] 李兴亮,车立刚,李富春,等. 磷酸萘酚喹片对恶性疟和间日疟疗效的观察[J]. 中国热带医学, 2003, 3(5):609.
 [2] 中国药典. 二部[S]. 2010.
 [3] 陈剑锋,王静,袁子民. HPLC测定豨莶风湿片中粉防己碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):93.
 [4] 卢元媛,王璐,胡英杰,等. 高效液相法测定复方磷酸哌喹片中磷酸哌喹的含量[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(7):551.
 [5] 杨家庆,詹利之,林燕芳,等. 非水溶液滴定法测定抗疟药萘酚喹的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):104.

[责任编辑 顾雪竹]