

HPLC 法测定丹酚酸 B 中己内酰胺残留

陈鸿楠 邓颖 郭秀娟 华国栋^{*}(北京中医药大学东方医院药学部 北京 100078)

摘要 :目的:建立丹酚酸 B 原料药中己内酰胺残留的测定方法。方法:采用高效液相色谱法测定。实验仪器为:安捷伦 1200 型高效液相色谱仪,Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250mm×4.6mm,5μm)。色谱条件:乙腈:水=11:89(v/v),等度洗脱;检测波长 210nm;流速 1.0mL·min⁻¹;柱温 25℃;进样体积 10μL。结果:己内酰胺同其他物质可以达到基线分离。测得己内酰胺在 0.00123~0.0502g·L⁻¹ 线性关系良好。己内酰胺平均回收率为 100.28%,RSD 为 1.63%(n=9)。结论:该法操作简便,重现性好,结果准确可靠,可以用于丹酚酸 B 原料药中残留己内酰胺的测定。为丹酚酸 B 质量控制提供了可靠的数据。

关键词 :丹酚酸 B 原料药 己内酰胺残留 高效液相色谱法

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1672-8351(2016)02-0018-02

Determination of Residual Caprolactam in Salvianolic Acid B Bulk Drug by HPLC

Chen Hongnan Deng Ying Guo Xiujuan Hua Guodong^{*} (Dept. of Pharmacy, Dongfang Hospital of Beijing University of TCM, Beijing 100078, China)

Abstract Objective: To establish a method to determine residual caprolactam in Salvianolic acid B bulk drug. Methods: The HPLC was performed on a Agilent 1200 chromatographic instrument with Zorbax SB-C₁₈ column. The chromatographic condition was described as below: the mobile phase was acetonitrile-water=11:89 (v/v) at 1.0mL·min⁻¹, the data was recorded at 210nm, the column was maintained at 25℃, the inject volume was 10μL. Result: Caprolactam can be separated completely with good linear relationship between 0.00123~0.0502g·L⁻¹. The average recovery of caprolactam was 100.28% with RSD=1.63% (n=9). Conclusion: This method is simple, reproducible and accurate enough for determination of residual caprolactam in salvianolic acid B bulk drug.

Key words Salvianolic acid B bulk drug Residual caprolactam HPLC

丹酚酸 B 是唇形科植物丹参中的主要成分,具有对心肌缺血-再灌注损伤的保护、对心脏微血管内皮细胞的延迟保护、对动脉粥样硬化及血栓防治功效、对脑缺血损伤的保护和抗衰老、抗肿瘤等多种药理活性^[1-3]。在制备丹酚酸 B 过程中主要使用了柱层析的方法,使用了聚酰胺填料进行纯化。聚酰胺在聚合时仍有大量单体未参与反应,因此在柱层析过程中会有大量己内酰胺单体被洗脱进而进入产品,原料药中可能有己内酰胺残留。己内酰胺对人体有不良作用^[4],因此在使用时需要控制己内酰胺残留量。本文参考有关文献^[5]建立了高效液相色谱法对 3 批丹酚酸 B 存在的己内酰胺残留进行测定,现报道如下。

1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪,配有 DAD 检测器、四元泵、自动进样器,美国安捷伦公司 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250mm×4.6mm 5μm) 美国安捷伦公司, Mettler Toledo XS5 分析天平。丹酚酸 B (原料药,纯度大于 98%,批号 20130819、20131025、20131216,由北京康悦药业有限公司提供);乙腈、甲醇均为色谱纯,纯化水使用 Milli-Q(美国 Millipore 公司)制备;己内酰胺为分析纯,纯度为 99%,购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:乙腈:水=11:89(v/v),等度洗脱,检测波长 210nm;流速 1.0mL·min⁻¹,柱温 25℃,进样体积 10μL。

2.2 对照溶液的配制

对照品储备液的配制:精密称定 5.02mg 己内酰胺,用甲醇溶解并定容至 10mL,得己内酰胺对照品储备液。

对照品工作液的配制:精密移取 1mL 储备液定容至 10mL,即得含有己内酰胺 50.2μg·mL⁻¹ 的对照品工作溶液。

2.3 供试品溶液的配制:精密称定 50.08mg 丹酚酸 B,用甲醇溶解并定容至 10mL,即得含有丹酚酸 B 5.01g·L⁻¹ 的溶液。

2.4 系统适用性试验:将“2.2”中对照品工作溶液和“2.3”中供试品溶液按“2.1”中色谱条件进行测定,记录色谱图,己内酰胺的分离度大于 1.5,理论塔板数均大于 2000。对照品和供试品色谱图见图 1。

2.5 线性:分别取“2.2”中储备液 1、0.5、0.25、0.1、0.05、0.025mL,分别用甲醇溶解并定容至 10mL 容量瓶中,按“2.1”中色谱条件进行测定。以己内酰胺的峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标

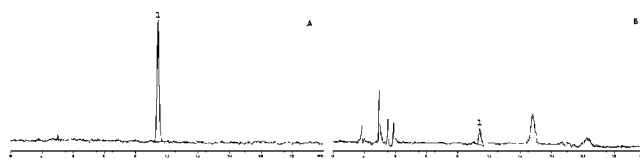


图 1 A.对照品溶液色谱图 B.供试品溶液色谱图 C.己内酰胺

(X) 进行线性回归。得到己内酰胺在 1.23~50.2μg·mL⁻¹ 的线性方程为 $Y=10.3630X-0.1967$ ($R^2=0.9999$)。

结果表明,在 1.23~50.2μg·mL⁻¹ 己内酰胺峰面积与浓度均呈良好的线性关系。

2.6 回收率:精密称取批号为 20130819 的供试品 50mg 置于 10mL 容量瓶中,再从“2.2”中对照品储备液中分别精密量取 0.8、1.0、1.2mL 至容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得低中高三个浓度的加样回收测定溶液,按“2.1”中色谱条件每个浓度平行测定 3 次,测得己内酰胺回收率为 100.28%,RSD 为 1.63%(n=9)。

2.7 精密度:取“2.2”中对照品工作溶液,按“2.1”中色谱条件重复进样测定 6 次,记录色谱图,得到己内酰胺峰面积 RSD 为 0.29%。

2.8 重复性:精密称取批号为 20130819 的供试品 50mg,按“2.3”中方法进行处理,共处理 6 份。分别按“2.1”中色谱条件进行测定,记录色谱图,使用“2.2”中工作溶液作为外标定量。测得己内酰胺的平均含量为 0.11%,RSD 为 2.70%(n=6)。

2.9 检测限和定量限:精密吸取“2.5”中含有己内酰胺 1.23μg·mL⁻¹ 的溶液用甲醇逐级稀释制成测定溶液。分别取各个溶液 1mL,按“2.1”中条件检测。

当信噪比为 10:1 时样品浓度为定量限,此时己内酰胺浓度为 0.41μg·mL⁻¹。当信噪比为 3:1 时样品浓度为检测限,此时己内酰胺浓度为 0.14μg·mL⁻¹。

2.10 样品测定:取 3 批样品各 50mg,精密称定,按“2.3”中供试品溶液制备项下方法进行处理,在“2.1”中色谱条件下进行测定,按照外标法计算各溶剂的含量,得批号为 20130819、20131025、20131216 3 批样品中己内酰胺的含量分别为 0.11%、0.08%、0.12%(n=3)。

高效液相色谱法在中药制剂有效成分含量测定中的应用

陈 华(鄂尔多斯市中心医院 鄂尔多斯 017000)

摘要 :中药所含成分多样复杂,为质量标准的研究带来挑战。高效液相色谱法以其高效准确、灵敏、应用范围广等特点,在中药含量测定中发挥着重大作用。本文对高效液相色谱法在中药制剂有效成分含量测定中的应用展开介绍,其中包括生物碱类、中药苷类、黄酮类、萜类成分含量测定。

关键词 :高效液相色谱法 中药制剂有效成分 含量测定

中图分类号 :R927.1

文献标识码 :A

文章编号 :1672-8351(2016)02-0019-01

近年来,高效液相色谱法(HPLC)在多种结构类型的中药活性成分含量测定中的应用较为广泛。这是由于 HPLC 与其他分离分析方法相比,具有灵敏度高、柱效高、分离速度快、重现性好、用范围广、操作方便等优点。因此, HPLC 成为中药制剂有效成分质量控制的重要手段。以下对其在生物碱类、中药苷类、黄酮类、萜类有效成分含量测定中的应用进行介绍。

1 生物碱类成分含量测定

生物碱在中药界分布较广、种类较多、化学结构复杂,大多数生物碱化合物具有药理活性,成为中药的有效成分之一。目前,临床中的生物碱成分大约 80 多种,由于生物碱存在形式不同(游离型与成盐型),碱性强弱不同。采用 HPLC 法能够准确测定生物碱的有效成分含量。侯伟雄等^[1]利用 HPLC 法测定苦参碱分散片中苦参碱的含量,得出的结论是 HPLC 测定苦参碱含量准确,操作简便、结果可靠、方法可行。朱丹妮等^[2]采用蒸发光散射检测器和 Shimadzu-10A 高效液相色谱仪,对贝母类药材中生物碱成分进行了测定,结果表明,贝母类生物碱 HPLC-ELSD 图谱有明显差异,样品制备简便,分离度较好,重现性佳,可用于贝母类药材的质量控制。

2 中药苷类成分的含量测定

苷类在中药界分布广泛,生理活性多种多样,如芍药苷、苯甲酰芍药苷类具有抗氧化、抗炎、抗肝损害、调节免疫等作用。采用高效液相色谱法测定中药苷类成分的含量,国内外均有文献报道。戚宝婵等^[3]采用高效液相色谱法对固本益肠胶囊中芍药苷含量进行了测定,优化了提取及分离工艺,使芍药苷成分得到了有效的分离。Li 等^[4]同样采用高效液相色谱法对大柴胡汤中芍药花苷、黄芩苷元、番茄苷、柑橘苷、黄芩苷、柴胡皂苷、大黄素、布洛芬八种组分进行了含量测定。该方法准确性高,精确接近 97.9%。Lv 等^[5]通过 HPLC 法,精准测定了 2 种中药中苦杏仁苷的含量,重现性较佳、回收率高。

3 黄酮类成分含量测定

黄酮类化合物大多数与糖结合成苷形式存在,多数黄酮类化合物结构中含有交叉共轭体系,采用高效液相色谱法对其含量测定灵敏度较高。管玉民等^[6]利用高效液相色谱法测定了不同季节、不同树龄的银杏叶总黄酮含量差异。葛明菊等^[7]同样采

用 HPLC 对大血藤叶片中黄酮类有效成分的含量予以测定,结论是 HPLC 法分离度高、准确度佳、灵敏度好,可以用于黄酮类成分含量测定。

4 萜类成分的含量测定

萜类成分在中药界广泛存在,结构复杂、形式多样。采用高效液相色谱法能够测定萜类成分的含量。叶氏等^[8]利用 HPLC 对银杏叶提取物中萜类成分(二萜内酯和倍半萜内酯)含量进行了测定。定量分析方法快捷、准确,可以广泛用于萜类化合物有效成分的测定。

综上所述,依据《中华人民共和国药典》可知 HPLC 已成为中药有效成分含量测定的重要手段。该方法具有高分辨率、高灵敏性、高重现性、高效快捷、微量检测等特点,在中药制剂有效成分含量的测定中发挥巨大优势,发展前景广阔。

参考文献

- [1]侯伟雄,李思华.高效液相色谱法测定苦参碱分散片中苦参碱的含量[J].时珍国医国药,2005,16(6):505-506.
- [2]朱丹妮,谭丰萍,高山林,等.HPLC-ELSD 分析测定贝母类药材中生物碱成分[J].药物分析杂志,2000,20(2):87-91.
- [3]戚宝婵,郭兰建.高效液相色谱法测定固本益肠胶囊中芍药苷的含量[J].沈阳药科大学学报,2000,17(4):278-279.
- [4]Li CY,Chui CH,Huang HS,et al. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of eight majorbiologically active ingredients in 'Da-Chai-Hu-Tang' Preparation[J]. Biomed Chromatogr,2005,14:456-458.
- [5]Lv WF,Ding MY,Zheng R. Isolation and quantitation of Amygdalin in Apricot-kernel and prunus tomentosa thumb by HPLC with solid-phase extraction [J]. J chromatogr Sci,2005,43(7):383-387.
- [6]管玉民,王健,尤慧莲,等.气候、季节、树龄对银杏叶总黄酮含量的影响[J].中成药,2000,22(5):368-370.
- [7]葛明菊,李钧敏,张利龙.大血藤叶片黄酮类化合物的 HPLC 分析[J].浙江中医学院学报,2002,26(6):71-72.
- [8]叶云华,向波.高效液相色谱法测定银杏提取物中萜内酯的含量[J].湖南中医药导报,2000,6(2):40.

3 讨论

3.1 液相色谱条件的选择和优化 经过筛选发现,丹酚酸 B 和己内酰胺在甲醇中均具有良好的溶解性,且丹酚酸 B 在甲醇中溶解速度较快,因此选择甲醇作为溶剂。

前期分别考察了检测波长分别为 203nm、210nm、254nm 下测定结果。发现在波长为 210nm 下己内酰胺具有最大吸收波长,信噪比最高,检测效果最好。而在 203nm 下己内酰胺信噪比较低,在 254nm 己内酰胺吸收太弱,均不利于测定。因此选择 254nm 作为检测波长。

本品仅需要检测己内酰胺残留,己内酰胺同丹酚酸 B 极性差异较大,故选用等度洗脱法。经过条件和文献查阅摸索,确定

洗脱条件为乙腈:水=11:89(v/v)。

参考文献

- [1]杜冠华,张均田.丹参现代研究概况与进展(续一)[J].医药导报,2004,23(6):0355-0361.
- [2]李认书,李永强.丹酚酸的研究进展[J].时珍国医国药,2003,14(6):371-373.
- [3]刘君动,叶正良,李德坤,等.丹参多酚酸中己内酰胺和低聚物的残留测定[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):62-65.
- [4]张琳,王民生.低浓度己内酰胺对作业工人健康影响的调查[J].化工劳动保护(工业卫生与职业病分册),1998,19(3):98-101.

* 通讯作者