

汉防己甲素含量和有关物质测定方法改进

陈斌, 朱彦丹, 应志洪*, 郑育飞, 程文男(金华康恩贝生物制药有限公司, 浙江 金华 321016)

摘要: 目的 使用高效液相色谱法, 通过改进和优化汉防己甲素含量和有关物质测定的色谱条件, 提高检测灵敏度和准确率。方法 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈-三乙胺(650:350:3, 用磷酸调 pH 至 2.0), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 280 nm, 柱温为 35 °C。结果 汉防己甲素在 50~350 μg·mL⁻¹ 内, 峰面积与浓度呈良好的线性关系($r=0.9999$), 平均回收率 99.8%, RSD=0.3%。汉防己甲素与相关物质分离良好。结论 采用改进后的方法, 能快速准确地对汉防己甲素的含量和有关物质进行检测和控制, 方法简便, 可操作性好。

关键词: 高效液相色谱法; 汉防己甲素; 含量测定; 有关物质

中图分类号: R927.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2011)10-0942-03

Method Improvement for Assay and Related Substances of Tetrandrine

CHEN Bin, ZHU Yandan, YING Zhihong*, ZHENG Yufei, CHEN Wennan(Jinhua Conba Bio-pharm. Co., Jinhua 321016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the chromatographic condition of HPLC method for tetrandrine and its related substances to improve the sensitivity and accuracy. **METHODS** A Kromasil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with the column temperature of 35 °C. The mobile phase was water-acetonitrile-triethylamine (650:350:3), adjusted to pH 2.0 with phosphoric acid, the flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detector wavelength was 280 nm. **RESULTS** Tetrandrine had a good linearity in the range of 50–350 μg·mL⁻¹($r=0.9999$), the average recovery rate was 99.8% with RSD of 0.3%. Tetrandrine and related substances in the sample could be separated. **CONCLUSION** This improved method is more quick and accurate for determining the content and related substances in tetrandrine. The method is easy to be operated.

KEY WORDS: HPLC; tetrandrine; content determination; related substances

汉防己是防己科植物粉防己提取的生物碱, 主要成分为汉防己甲素和汉防己乙素。目前临床应用主要是汉防己甲素, 汉防己甲素有抗心肌缺血、抑制血小板聚集、解痉、镇痛、镇静、抗炎、抗溃疡、保肝、调节免疫力等作用。汉防己甲素原料含量采用容量法, 有关物质采用薄层色谱法, 制剂的含量检测采用吸收系数法进行, 有关物质不检测; 以上方法均有局限性, 不能准确表达产品的内在品质。国内已有关于高效液相色谱法检测汉防己甲素的文献报道^[1], 但经试验, 仅能分离汉防己甲素与汉防己乙素, 不能将汉防己甲素与其他相关杂质有效分离, 导致有关物质以及含量的检测不够完美。本试验参考文献[2-4], 通过优化色谱条件, 使各有关物质与待测组份的分离效果明显改善, 对含量与有关物质的检测均有较高的灵敏度和准确度。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(含二级管阵列检测器, 美国安捷伦公司); AG135 型电子天平(十

万分之一, 瑞士梅特勒公司)。

1.2 药品与试剂

汉防己甲素对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110711-200708); 汉防己乙素对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110793-200605); 乙腈、三乙胺、磷酸均为色谱纯, 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯; 汉防己甲素样品由浙江金华康恩贝生物制药有限公司生产提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 水-乙腈-三乙胺(650:350:3, 用磷酸调 pH 至 2.0), 检测波长: 280 nm, 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 35 °C。理论板数按汉防己甲素峰计算应 ≥ 3000 , 汉防己甲素峰与汉防己乙素峰的分度 ≥ 2.0 。

2.2 溶液配制

2.2.1 样品溶液的配制 取本品约 20 mg, 精密称

作者简介: 陈斌, 男, 助理工程师 Tel: 13867961874 E-mail: 2172905@qq.com
(0579)82270373 E-mail: 491312343@qq.com

E-mail: 2172905@qq.com *通信作者: 应志洪, 男, 工程师 Tel:

定, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相使溶解并稀释至刻度, 摇匀即得。

2.2.2 标准品溶液的配制 精密称取对照品约 20 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释到刻度, 摇匀即得。

2.2.3 有关物质溶液的配制 取本品约 40 mg, 精密称定置 100 mL 容量瓶中, 加流动相使溶解稀释到刻度, 摇匀即得。

2.2.4 有关物质对照液的配制 精密移取“2.2.1”项下样品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中加流动相稀释到刻度, 摇匀即得。

2.3 专属性试验

本品经光照、酸、碱、强氧化剂等强力破坏。正常处理样: 精密称取样品 40 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释到刻度, 摇匀; 光照射试验: 将样品置于培养皿中, 摊成 ≤ 3 mm 厚的薄层, 在 5000 ± 500 Lx 强光下照射 10 d 后, 精密称取 40 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释到刻

度, 摇匀; 强碱试验: 精密称取样品 40 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5 mL, 放置 30 min, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中和后, 用流动相稀释至刻度, 摇匀; 强氧化剂破坏试验: 精密称取样品 40 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 1% 双氧水溶液 5 mL, 放置 30 min, 用流动相稀释至刻度, 摇匀; 强酸试验: 精密称取样品 40 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 5 mL, 放置 30 min, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中和后, 用流动相稀释至刻度, 摇匀; 取 20 μL 注入液相色谱仪, 观察各色谱峰的分离情况。产生的降解物质峰均在主峰保留时间的 3 倍内, 并能与主峰基线分离, 汉防己乙素和汉防己甲素分离度良好, 说明本法能有效控制产品的含量和有关物质, 结果见图 1。

2.4 色谱纯度鉴定

将本法与文献[1]方法试验图谱进行对比, A 为汉防己甲素色谱纯度, 见图 2。

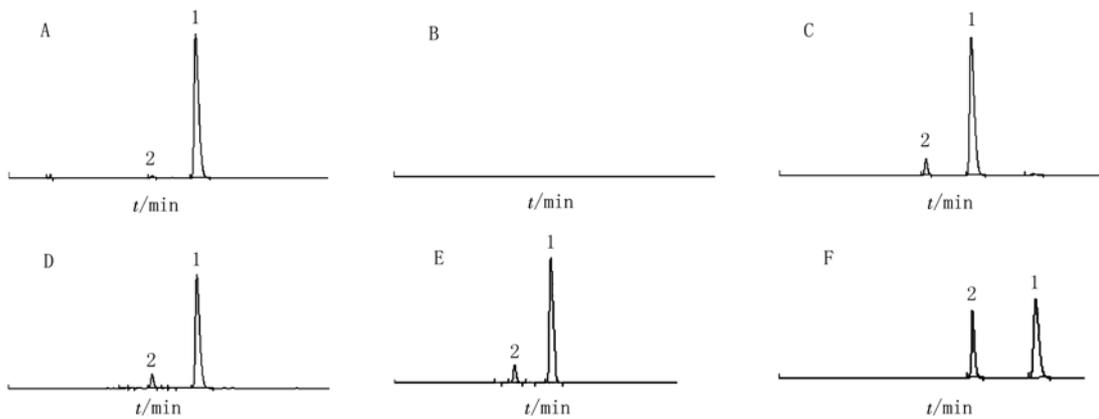


图 1 专属性考察图谱

A-正常样品液; B-空白液; C-光照破坏样品液; D-碱破坏样品液; E-强氧化破坏样品液; F-酸破坏样品液; 1-汉防己甲素; 2-汉防己乙素

Fig 1 The exclusion inspection of HPLC detective method

A-original sample solution; B-blank solution; C-light degradation sample solution; D-base degradation sample solution; E-oxidation degradation sample solution; F-acid degradation sample solution; 1-tetrandrine; 2-tetrandrine B

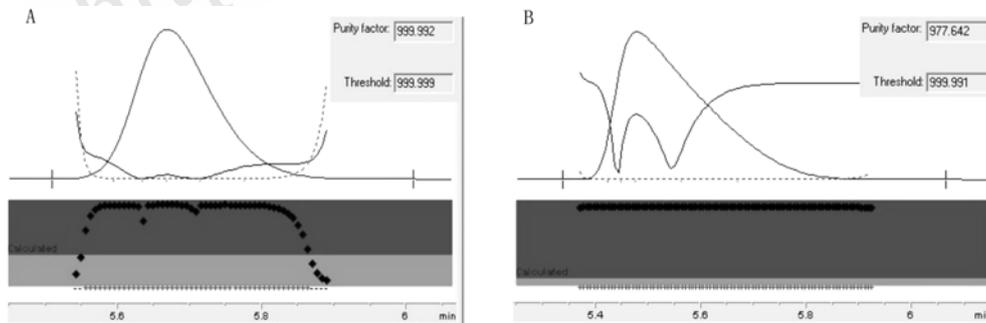


图 2 HPLC 色谱纯度图谱

A-本法色谱纯度图谱; B-文献[1]色谱纯度图谱

Fig 2 HPLC chromatographic purity chromatogram

A-chromatographic purity chromatogram in this method; B-chromatographic purity chromatogram in literature reference [1]

2.5 线性关系试验

精密吸取汉防己甲素含量对照品溶液(50~350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和有关物质对照溶液(0.4~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)分别进样,以样品浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,计算回归方程为: $Y=12.686X+10.359$, $r=0.9999$; $Y=12.664X+0.381$, $r=1.000$, 汉防己甲素在 50~350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 有关物质在 0.4~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积分别呈良好的线性关系。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 3, 6, 8, 10 h 进样测定,汉防己甲素峰面积 RSD 值为 0.1%。结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性较好。

2.7 精密度试验

取同一对照品溶液重复进样 6 次,汉防己甲素峰面积 RSD 为 0.1%,表明仪器精密度良好。

取同一批样品,不同人员在不同时间用不同仪器分别测定含量 6 次,结果试验者 1 测得汉防己甲素含量为 99.56%, RSD 为 0.2%,试验者 2 测得汉防己甲素含量为 99.54%, RSD 为 0.2%。

2.8 回收率试验

采用加样回收法,精密称取已知含量的同一样品 20 mg,置 100 mL 量瓶中,分别精密加入汉防己甲素对照品 20 mg,加流动相溶解并稀释至刻度,测定其含量。结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 Results of recovery test

原有量/ μg	加入量/ μg	总测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
200.71	201.54	401.69	99.7		
201.23	201.54	402.43	99.8		
201.70	201.54	403.65	100.2	99.8	0.3
202.59	201.54	403.76	99.8		
200.65	201.54	401.41	99.6		

2.9 方法耐用性试验

在改变柱温($\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$)、流速($\pm 0.1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)、波长($\pm 2\text{ nm}$)、流动相比比例微小变化时,汉防己甲素峰理论板数均 ≥ 2000 ,分离度均 ≥ 2.0 ,拖尾因

子均 ≤ 2.0 ,表明方法的耐用性较好。

2.10 最低检测限

在选定的色谱条件下,按信噪比为 3 计算,汉防己甲素的最低检测量为 0.09 μg 。

2.11 含量测定

对 3 批样品各取 6 份进行含量测定,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=6$)

Tab 2 Results of assay($n=6$)

批号	含量/%
YG0909002	99.54 \pm 0.09
YG1002001	99.62 \pm 0.08
YG1004001	99.58 \pm 0.05

2.12 有关物质测定

对 3 批样品进行有关物质测定,结果见表 3。

表 3 样品有关物质测定结果

Tab 3 Results of related substances

批号	总杂质/%	汉防己乙素/%	平均总杂质/%
YG0909002	0.29	0.006	
YG1002001	0.29	0.006	0.31 \pm 0.03
YG1004001	0.34	0.002	

3 讨论

通过本方法与容量法、薄层色谱法的测定结果比较,本法测定汉防己甲素的含量时方法简便、准确、稳定、重现性好,并避免了容量法滴定终点难以判断等缺点;在有关物质测定时与原薄层色谱法比较,检测误差小,有具体的数据,直观反应质量变化趋势,为杂质的控制提供实验依据。

REFERENCES

- [1] XU Y G, HU S X, BU Y S, et al. Assay of tetrandrine by RP-HPLC [J]. China Pharm (中国药师), 2004, 7(3): 186-188.
- [2] YU W J, CAI Y B, JIANG L N. Assay of tetrandrine in Jinake by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 1999, 16(4): 50-52.
- [3] FEN B M, YE Y, ZHANG H. Assay of tetrandrine in sinomenium acutum by HPLC [J]. China Pharm (中国药业), 2005, 14(11): 36-37.
- [4] CHEN G H, GUI S H, ZHU C S, et al. Determination of tetrandrine in plasma drug concentration of rabbits by RP-HPLC [J]. China Pharm (中国药师), 2004, 7(6): 445-446.

收稿日期: 2010-12-09