

高效液相色谱法测定生长抑素含量及有关物质

尹海滨, 郑虎(四川大学华西药学院, 成都 610041)

摘要:目的 建立高效液相色谱测定生长抑素含量的方法。方法 采用 Ominispher C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A: 0.1% TFA 水溶液, 流动相 B: 0.1% TFA 乙腈溶液, 采用梯度洗脱, 检测波长: 215 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹。结果 方法的线性范围为 40 ~ 140 μg · mL⁻¹。r = 0.999 9, 平均回收率 100.3%, 最低检测限为 1 ng。结论 采用 HPLC 梯度洗脱法测定生长抑素的含量, 分离度好, 方法简便, 适用于生长抑素的含量测定。

关键词: 生长抑素; 高效液相色谱法; 梯度洗脱; 含量测定

中图分类号: R917.101; R977.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)05-0388-03

Determination of the Content of Somatostatin and Its Related Substances by HPLC

YIN Hai-bin, ZHENG Hu(West China school of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for determinating somatostatin content. **METHODS** The HPLC column was Ominispher C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, varian corporation, USA). The mobile phase A: 0.1% TFA in water; the mobile phase B: 0.1% TFA in acetonitrile. The gradient elution method was used that mobile phase B was increase from 0% to 35% in twenty minutes. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was 215 nm. **RESULTS** There was a good liner relationship with the range of 40 ~ 140 μg · mL⁻¹ (r = 0.999 9). The average recovery was 100.3% and the detect limit was 1 ng. **CONCLUSION**

The method to determinate the content of somatostatin by HPLC was simple and reliable.

KEY WORDS: somatostatin; HPLC; gradient elution; content determination

生长抑素(somatostatin)又称生长激素释放抑制激素,由14个氨基酸组成的环状肽类化合物。1968年 Krulich^[1]在研究大鼠下丘脑中生长激素释放因子分布状况时偶然得到这种抑制生长激素释放的肽类物质。随后的研究发现,生长抑素是由神经内分泌细胞、炎性细胞和免疫细胞所产生,针对神经肽、神经递质、甲状腺和类固醇激素生长因子、细胞因子起作用的调节多肽^[2,3]。生长抑素具有广泛的生物学活性,它能抑制多种激素的释放包括生长激素(GH)、促甲状腺素、胰岛素、胰高血糖素和胃泌素等,还可以抑制许多激素和生长因子对靶细胞的作用,由于生长抑素能改变肝脏血流动力

学状态,加上其抑制胰腺外分泌和胃酸分泌的作刚,目前生长抑素已广泛用于治疗门静脉高压、上消化道出血和胰腺炎等疾病。

目前国内一些厂家采用进口原料或本企业合成的原料制成注射剂,对原料含量的测定多采用 pH = 2.3 磷酸二乙胺-乙腈(75:25)为流动相等度洗脱。研究表明^[4],用该方法进行 HPLC 分析时,主峰拖尾明显,未能有效分离样品的相关肽,在梯度洗脱的条件下,主峰与相关肽的分离也不完全,影响了生长抑素含量的准确测定。为此,经过摸索,笔者建立了 HPLC 测定生长抑素含量的新方法,进一步优化生长抑

作者简介:尹海滨,男,博士 E-mail: hmikeyin@hotmail.com

素的含量测定。

1 实验材料与方法

1.1 仪器和试剂

ProStar 210 型液相色谱仪(VARIAN 公司,美国),UV 检测器。生长抑素标准品购自 Sigma 公司(批号 lot 062k17311),生长抑素原料(本实验室合成,已经结构确认),生长抑素中间体(未环化十四肽,本实验室合成),乙腈(色谱纯,Fisher 公司产品),其他溶剂为国产分析纯。

1.2 色谱条件和系统适应性试验

色谱柱:Ominispher C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,美国 Varian 公司)。流动相 A:含 0.1% 三氟乙酸的水溶液;流动相 B:含 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液;采用梯度洗脱,洗脱程序:流动相 A 与流动相 B 比例在 2 min 维持 100:0,然后 20 min 内由 100:0调至 65:35,流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 215 nm,柱温为室温;进样量 20 μL。理论板数按生长抑素峰计算大于 20 000,样品色谱图见图 1。

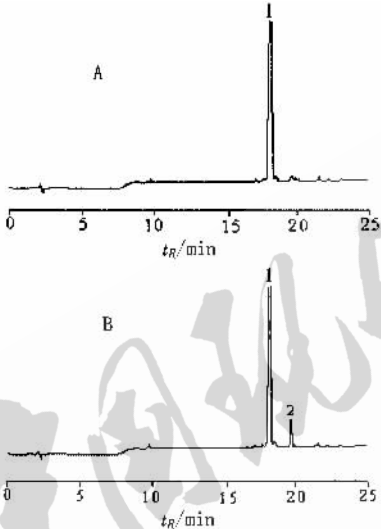


图 1 生长抑素色谱图和分离度考察
A. 生长抑素色谱图;B. 生长抑素分离度考察;1. 生长抑素;2. 中间体未环化 14 肽

Fig 1 Chromatogram and Separation Inspection of Somatostatin
A. Chromatogram and Separation Inspection of Somatostatin; B. The Separation Inspection of Somatostatin; 1. Somatostatin; 2. uncircled 14 peptide

2 结果和讨论

2.1 生长抑素与中间体分离度的考察

根据生长抑素生产工艺,生长抑素的主要杂质是中间体 14 肽(未环化 14 肽)。为考察生长抑素与未环化 14 肽的分离度,取样品分析试液,加入未环化 14 肽适量混合,进样 20 μL,结果发现,生长抑素和未环化 14 肽保留时间分别为 18.6 min 和 19.3 min,在此色谱条件下两者能完全分离。用建立的色谱方法,分析样品中的生长抑素和杂质,主峰峰形对称,与杂质峰得到很好分离。

含生长抑素的流动相在 215 nm 显示最大吸收,而不含生长抑素的流动相在该波长下背景吸收很低,因而选定该波长检测。

2.2 线性关系和检测限

精密称取生长抑素对照品约 10 mg,置 50 mL 量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度配成贮备液,再分别精密吸取 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL 置 5 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度配成系列对照品溶液,取 20 μL 进样,测定峰面积,以浓度 C (μg·mL⁻¹)对峰面积 A 进行线性回归得方程: C = 8.236 × 10⁻⁵A - 1.063 (r = 0.999 9)。结果表明:本品浓度在 40 ~ 140 μg·mL⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系。

在选定的色谱条件下,按信噪比为 3 对最低检测限进行测定,结果表明:浓度为 0.06 μg·mL⁻¹,进样 20 μL 时,主产物峰信号约为噪音的 3 倍,即最低检测限量为 1 ng。

2.3 对照品溶液重复进样精密度

取 80 μg·mL⁻¹的生长抑素对照品溶液 20 μL,在上述色谱条件下连续进样 6 次,结果峰面积的 RSD 为 1.12%,表明生长抑素溶液进样精密度良好。

2.4 重复性试验

分别精密称取生长抑素原料约 10 mg,置 100 mL 量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度,依法配制 6 份,在上述色谱条件下进样测定,结果 RSD 为 1.8%。

2.5 回收率试验

回收率测定方法采用加样回收法。按样品含量测定项取半量已知含量的同一批样品贮备液 9 份,加入生长抑素对照品(3 个剂量,均以溶液形式加入),稀释成供试品溶液,按上述色谱条件测定,记录色谱图并计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery tests						
编号	样品中生长抑素含量/mg	添加生长抑素对照品的量/mg	测定生长抑素总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.3856	0.30	0.6843	99.57	100.3	1.1
2	0.3856	0.30	0.6879	100.77		
3	0.3856	0.30	0.6903	101.56		
4	0.3856	0.40	0.7778	98.03		
5	0.3856	0.40	0.7847	99.78		
6	0.3856	0.40	0.7914	101.45		
7	0.3856	0.50	0.8899	100.86		
8	0.3856	0.50	0.8853	99.95		
9	0.3856	0.50	0.8879	100.47		

2.6 样品含量测定

精密称取合成的生长抑素原料约 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,得贮备液。再吸取 4 mL 置 10 mL 量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,取 20 μL 进样测定,记录峰面积。结果见表 2。

表 2 生长抑素含量及有关物质测定结果(% , n = 3)

Tab 2 The content and related substances determination results of somatostatin(% , n = 3)		
Lot. No	Content	related substances
030901	97.24	1.36
030908	96.40	1.75
031012	96.13	1.67

2.7 生长抑素有关物质测定

取生长抑素原料适量,加蒸馏水配成 $100\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液,吸取该供试品溶液适量加蒸馏水稀释配制成 $1\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的预试溶液,取 $20\ \mu\text{L}$ 进样,调节灵敏度,使主成分色谱峰高度达到满刻度的 $20\% \sim 25\%$ 。精密吸取供试品溶液 $20\ \mu\text{L}$ 进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍,按归一化法计算除溶剂峰外各杂质峰面积之和。结果表明,3 批原料样品均具有较高的纯度,结果见表 1。

本实验以水-乙腈(20:80)为流动相,生长抑素主峰峰形差且不能与杂质峰分离,加入 0.1% 三氟乙酸后,主峰峰形大为改善,但仍有杂质峰干扰生长抑素的测定,故选择梯度洗脱法。该分析方法的生长抑素洗脱时间较长,但分离度较好,色谱峰对称,在该色谱条件下,能有效分离生长抑素和杂质。

本实验建立的 HPLC 测定生长抑素的方法灵敏、准确,重复性好,生长抑素浓度在 $40 \sim 140\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系,操作简便,可同时测定生长抑素的含量及其有关物质的含量。

REFERENCES

- [1] KRULICH L, DHARIWAL A P, MCCANN S M, *et al.* Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary *in vitro* [J]. *Endocrinology*, 1968, 83: 783-790.
- [2] PATEL Y C. Somatostatin and its receptor family [J]. *Front Neuroendocrinol*, 1999, 20: 157-198.
- [3] YAMADA Y, POST S R, WANG K, *et al.* Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gas-trointestinal tract, and kidney [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 251-255.
- [4] 高恒莹, 周立春, 高春, 等. 注射用生长抑素相关肽测定的研究 [J]. *首都医药*, 2000, 7(10): 30.
- [5] 郭敏亮, Milton T W, Hooi Hong, 等. 多肽和蛋白质的反相高效液相色谱研究—色谱行为的多样性 [J]. *分析测试学报*, 2000, 19(4): 36.

收稿日期: 2006-02-22