

固体分散制剂是上世纪六十年代初才提出来的, 一种比较新的剂型, 通常是将难溶性药物分散在水溶性载体中形成高度分散的固体分散体。固体分散体具有增大溶解度(本实验测得落新妇苷固体分散体在 25 °C 时的溶解度 $>44.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、加快溶出速率、提高生物利用度等优点, 在改善难溶性中药有效成分的药动力学性质方面的应用越来越广泛^[7-12]。

从表 1 可以看出, 落新妇苷制成固体分散体后, 口服吸收情况明显改善。与生理盐水配制的落新妇苷相比, 相对生物利用度为 250。

进一步分析表 1 所列的 2 种剂型的落新妇苷大鼠口服给药的药动力学参数, 落新妇苷固体分散体的达峰时间有所延迟, 吸收速率常数和峰浓度显著增大, 分布速率和消除速率明显减缓, 表明落新妇苷固体分散体不仅具有良好的吸收性, 而且还具有明显的缓释性。

大鼠口服落新妇苷制剂的药动力学研究的文献报道很少。本实验以颈动脉取血的方法研究了大鼠口服落新妇苷固体分散体后的体内药动力学参数。研究表明: 将落新妇苷制成固体分散体可以显著提高其生物利用度。

REFERENCES

- [1] Nanjing University of Chinese Traditional Medicine. Dictionary of Chinese Traditional Medicine(中药大辞典) [M].

- 2th ed. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1997: 3226.
- [2] CHEN G Y, SHEN L S, JIANG P F. Study on the flavanols glycosides in *Smilacis glabra* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1996, 21(6): 355-357.
- [3] QU J, ZHOU J, HOU W B, et al. Determination of astilbin and engelitin in engelhardtia leaf by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40(2): 306-307.
- [4] LI K Q, ZHANG G C, SHONG Y N, et al. Analyse astilbin and naringin in *Sarcandra glabra* by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2010, 41(1): 137-138.
- [5] GUO J M, XU Q, CHEN T. Quantitative determination of astilbin in rabbit plasma by liquid chromatography [J]. J Chromatography B, 2004, 805(2): 357-360.
- [6] WANG X D. Study on the transport of taxifolin and astilbin *in vitro* and pharmacokinetics in rats [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009.
- [7] MA L Y, HAN L M, ZHANG Z R, et al. Preparation and characterization of solid dispersions of ginkgolides [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(11): 1368-1372.
- [8] LIU Y, CHANG J, HAN M H, et al. Preparation and *in vitro* release evaluation of isoniazid solid dispersion [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(2): 142-145.
- [9] HAN G, YAN L Q, SUO W, et al. Preparation of emodin solid dispersion and determination of its dissolution [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(3): 487-490.
- [10] MA Y, LI W Z, GU J H. Preparation and evaluation of the solid dispersions of poorly soluble silybin [J]. J Chin Pharm Sci, 2011, 20(6): 604-608.
- [11] WANG M R, WANG L Z, LIN J Y. Studies on preparation of candesartan solid dispersion and its dissolution and stability [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(7): 654-658.
- [12] LIU X, WEN X G, LIAO X, et al. Progress in the study on physical stability and anti-aging of solid dispersion [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(8): 710-717.

收稿日期: 2013-03-04

HPLC 测定 2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮原料药的含量及有关物质

李勇, 冯秀娥, 梁泰刚, 李青山^{*}(山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定海洋来源活性化合物 2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮原料药(LM49)的含量及有关物质的方法。方法 采用 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 甲醇-乙腈-水(磷酸调 pH 至 3.0)(70:10:20)为流动相, 检测波长为 261 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。结果 主峰能与杂质峰达到良好分离, LM49 在浓度 1.0~100 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.9999$), 最低检测限为 0.02 mg·L⁻¹, 平均回收率为 99.8%(RSD=0.88%)。结论 本法简便、快速、准确, 可用于 LM49 原料药的含量及有关物质的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮; 有关物质; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)10-1104-04

基金项目: 国家“863”计划项目(2013AA092903); 山西省自然科学基金(2013011060-2); 山西医科大学科技创新基金(01201116); 山西医科大学博士启动基金(B03201213)

作者简介: 李勇, 男, 硕士 Tel: 15903460874 E-mail: yong5130@126.com ^{*}通信作者: 李青山, 男, 博士, 博导 Tel: (0351)4690322 E-mail: sxlqs2012@163.com

Determination of 2,5'-Dibromo-4,5,2'-trihydroxydiphenylmethanone and Its Related Substances by HPLC

LI Yong, FENG Xiu'e, LIANG Taigang, LI Qingshan* (School of Pharmaceutical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of 2,5'-dibromo-4,5,2'-trihydroxydiphenylmethanone(LM49) and its related substances. **METHODS** HPLC method was carried on a column of Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-acetonitrile-water (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) (70 : 10 : 20) at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 261 nm. The column temperature was 25 °C. **RESULTS** LM49 was completely separated from the impurities. A good linearity($r=0.999\ 9$) of LM49 was obtained at the concentration range of 1.0–100 mg·L⁻¹. The minimal detection limit was 0.02 mg·L⁻¹. The average recovery of method was 99.8%(RSD=0.88%). **CONCLUSION** The analytical method is simple, rapid, sensitive and accurate for the determination of LM49 and its related substances.

KEY WORDS: HPLC; 2,5'-dibromo-4,5,2'-trihydroxydiphenylmethanone; related substances; content determination

2,5'-二溴-4,5,2'-三羟基二苯甲酮(LM49)为课题组自主合成、具有全新结构的海洋来源溴酚化合物,其对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞有显著的保护作用^[1],提示该化合物对心脑血管疾病有较强的应用开发前景。由于 LM49 为本课题组自主合成,目前还没有建立含量测定和有关物质的检测方法。原料药的质量标准建立与质量控制是其后续系统研发工作的基础,为使 LM49 的质量可控并为后续研究提供质量稳定的样品,本实验采用 HPLC 对 LM49 原料药的含量及有关物质的检查进行了研究,结果表明,所建立的方法准确、专属性强、灵敏度高、分离度好,可有效检测原料药中 LM49 的含量并对有关物质进行控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); BT25S 型电子天平(德国 Sartorius); LM49 对照品(以邻甲氧基苯甲酰氯与 1,2-二甲氧基苯为起始原料自制,经 3 次重结晶,面积归一化法测定其纯度≥99.85%); LM49 供试品(自制,批号: 20120302, 20120511, 20120723); 甲醇、乙腈为色谱纯;超纯水(用磷酸调节 pH 至 3.0),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相: 甲醇-乙腈-水(70 : 10 : 20)(用水用磷酸调 pH 至 3.0),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 261 nm,柱温 25 °C,进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液和供试品溶液的配制

取室温下减压干燥至恒重的 LM49 对照品和

LM49 供试品(批号: 20120511)各约 5 mg,精密称定,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 100 mg·L⁻¹的对照品贮备液和供试品贮备液,置于 4 °C 冰箱中保存。

2.3 检测波长的确定

精密量取 5.0 mL 对照品贮备液,用甲醇稀释并定容至 10 mL,配制成 50 mg·L⁻¹的溶液,进行 DAD 检测,结果表明,在 261 nm 处有最大吸收,确定 261 nm 为检测波长。

2.4 系统适用性试验

按“2.1”项下色谱条件进样测定,LM49 的保留时间为 7.48 min,理论板数按 LM49 计算不低于 8 000,与相邻杂质的分离度>1.5,分离良好,峰形对称,结果见图 1。

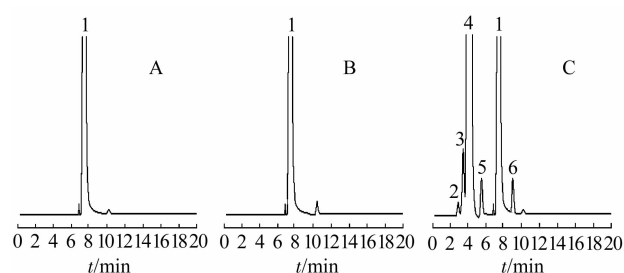


图 1 系统适用性试验相关 HPLC 色谱图

A-LM49 对照品溶液; B-LM49 供试品溶液; C-LM49 对照品/原料/中间混合溶液; 1-LM49; 3,4-原料; 2-原料中的杂质; 5,6-中间体

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability of LM49

A-LM49 reference substance; B-LM49 test sample; C-LM49/raw materials/intermediates; 1-LM49; 3,4-raw materials; 2-impurity of raw material; 5,6-intermediates

2.5 线性关系和方法学研究

2.5.1 线性关系 分别精密量取对照品贮备液适量,用甲醇稀释成浓度为 1.0, 5.0, 25, 50, 75, 100 mg·L⁻¹的溶液,按“2.1”项下色谱条件进样

测定,以浓度(C)为横坐标,色谱峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,回归方程为: $A=37.546C-27.8$, $r=0.9999$ 。结果表明,本品在 $1.0\sim100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.2 检测限及定量限 精密量取对照品贮备液适量,逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录信噪比(S/N)为3,10的色谱图。结果LM49的最低检测浓度为 $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,最低检测限为 0.4 ng ;最低定量浓度为 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,最低定量限为 1 ng 。

2.5.3 精密度 精密量取对照品贮备液适量,用甲醇稀释至浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,1 d内连续进样6次,考察日内精密度,RSD为0.67%;取上述溶液,每天进样1次,连续测定5 d,考察日间精密度,RSD为1.08%。表明精密度良好。

2.5.4 重复性 取同一批供试品(批号:20120511)2.5 mg,共5份,精密称定,置于50 mL量瓶中,分别用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。按“2.1”项下色谱条件,按含量测定方法测定,结果其平均含量为99.26%,RSD为0.51%,表明方法重复性良好。

2.5.5 稳定性 取浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (批号:20120511)的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别测定其在室温下放置0,2,4,8,12,24 h及3 d后的峰面积,以峰面积考察溶液的稳定性,RSD为1.46%,结果表明,室温放置3 d的供试品溶液稳定性良好。

2.5.6 回收率 称取减压干燥至恒重的同一批供试品(批号:20120511)5.07 mg,用甲醇溶解并定容至50 mL量瓶中。精密量取供试品溶液1.0 mL于10 mL量瓶中,共9份。分别加入对照品溶液($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)各0.6,1.0,1.4 mL,各3份,加甲醇稀释至刻度,定容,摇匀,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算平均回收率,结果见表1。

2.6 含量测定

取本品3批,用甲醇配制成质量浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的供试品液,另精密称取LM49对照品5.0 mg,置于50 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制成浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品液,分别精密量取20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算含量^[2]。结果批号为20120302,

20120511,20120723的样品含量分别为100.1%,99.3%,100.4%,RSD分别为0.56%,0.62%,0.44%。

表1 LM49的回收率测定($n=9$)

Tab 1 The recovery determination of LM49 ($n=9$)

样品量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	加入量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
10.14	6.00	16.16	100.3		
10.14	6.00	16.19	100.8		
10.14	6.00	16.18	100.7		
10.14	10.00	20.03	98.9		
10.14	10.00	20.05	99.1	99.8	0.88
10.14	10.00	20.17	100.3		
10.14	14.00	23.90	98.3		
10.14	14.00	24.08	99.6		
10.14	14.00	24.17	100.2		

2.7 专属性试验

为考察HPLC的专属性,根据合成工艺、化合物结构特点及贮存条件,对LM49进行了酸、碱、氧化、高温、强光照射等加速破坏实验^[3-6]。取LM49供试品(批号:20120511)适量,用甲醇制成 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,取样2 mL,共5份。其中1份加2 mL $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液,加热回流2 h,冷却至室温,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液中和至中性;1份加2 mL $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液,加热回流2 h,冷却至室温,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸中和至中性。其中1份加30%过氧化氢溶液0.5 mL,加热回流1 h,冷却至室温。1份 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热回流1 h。另外1份置于4 500 Lx照度下放置72 h。按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果见图2。由加速破坏性实验结果可知,所建HPLC方法能有效检测出各破坏性实验产生的降解产物,且降解产物均能与主峰达到良好分离,表明对有关物质检查的专属性良好。

2.8 有关物质的检查

精密称取LM49样品5.0 mg于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为供试溶液,精密量取供试溶液1.0 mL,置于100 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照液。精密量取对照液20 μL ,注入液相色谱仪,调节检测器的灵敏度,使主成分的色谱峰高约为满量程的30%。再精密量取供试溶液20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图至对照品主峰保留时间的2.5倍。量取供试溶液色谱图中各杂质峰的峰面积总和,用主成分自身对照法计算有关物质的量。结果3批样品的有关物质含量分别为0.34%,0.45%和0.48%。

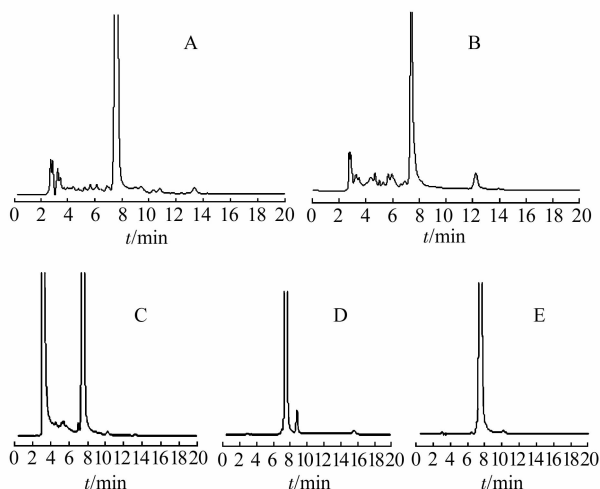


图2 专属性考察色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-氧化破坏; D-高温破坏; E-光照破坏

Fig 2 HPLC chromatograms of the exclusion inspection

A-treated with acid; B-treated with base; C-treated with H_2O_2 ; D-treated with high temperature; E-treated with light

3 讨论

LM49 易溶于甲醇, 因此选用不同配比的甲醇-水组成流动相, 由于 LM49 含有酚羟基, 呈弱酸性, 考察了不同 pH 值对化合物色谱行为的影响, 最终发现用磷酸调节水相的 pH 为 3.0 时, 色谱峰形及分离度均较好, 化合物保留时间适中。流动

相中加入乙腈, 使色谱峰的对称性得到了进一步优化, 最终确定流动相的配比为甲醇-乙腈-水 (70:10:20)(水用磷酸调节 pH 至 3.0)。

本实验为 LM49 建立了简便、快速、准确、专属的 HPLC 方法, 为其质量控制及有关物质检查提供了可靠的依据。

REFERENCES

- [1] ZHAO W Y, FENG X E, BAN S R, et al. Synthesis and biological activity of halophenols as potent antioxidant and cytoprotective agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(14): 4132-4134.
- [2] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 30.
- [3] LEI H Y, ZHANG C H, HUO L R, et al. RP-HPLC determination of YF-13-1 and its related substances [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(8): 1394-1397.
- [4] WANG J, LI X N, ZHANG J M, et al. RP-HPLC determination of TM 208 and its related substances [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(1): 99-102.
- [5] ZHENG J Q, HAN J Y, LI H L. Determination of content and related substances of methylparaben sodium by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(1): 72-76.
- [6] MA Y L, TANG L, LIANG T G, et al. Determination of crude drug 4-O-methyl benzenesulfonyl-2(3H)-benzoxazolone and its related substances by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(9): 833-835.

收稿日期: 2012-12-21

大孔吸附树脂纯化黄芩中三种黄酮的含量测定

于艳¹, 徐晶^{2*}, 修丽丽², 田原¹(1.辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2.辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时测定大孔吸附树脂富集纯化后的黄芩提取物中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量的方法。方法 以 AB-8 型大孔吸附树脂对黄芩水提取物中总黄酮进行富集纯化, 采用高效液相色谱法同时测定其中黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的含量。色谱柱: Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 280 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C。结果 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素分别在 0.022 4~0.448 0 μg ($r=0.999\ 9$), 0.021 0~0.420 0 μg ($r=0.999\ 9$), 0.010 3~0.205 0 μg ($r=0.999\ 9$) 内线性关系良好; 平均回收率分别为 97.3%(RSD 1.71%), 98.4%(RSD 2.05%), 98.1%(RSD 1.65%)。黄芩水提取物经大孔吸附树脂纯化后, 黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的平均含量分别为 27.52%、6.87%和 2.13%, 未经纯化的黄芩水提取物中三者的平均含量分别为 9.16%、1.66%和 0.54%。

结论 本方法简便、准确、灵敏度高, 重复性好。

关键词: 高效液相色谱; 大孔吸附树脂; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素

中图分类号: R284.2; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)10-1107-04

基金项目: 辽宁省教育厅重点实验室项目(LS2010105)

作者简介: 于艳, 女, 博士生, 主管中药师 Tel: 18909816763
授 Tel: (024)86291931 E-mail: 95142012@qq.com

E-mail: yuyangirl@yahoo.com.cn *通信作者: 徐晶, 女, 硕士, 教