

HPLC 法测定左卡尼汀注射液中的含量及有关物质 A

李红英¹ 于得才² (1. 山东威高药业有限责任公司 威海 264210 2. 内蒙古库伦蒙药厂 通辽 028200)

摘要 :目的:建立 HPLC 法测定左卡尼汀注射液中的含量及有关物质 A。方法:色谱柱:硅胶为填充剂(250mm×4.6mm, 5μm);乙腈:磷酸盐缓冲液(0.05mol/L 磷酸氢二钠,用稀磷酸调 pH 值为 5.50)=60:40 为流动相;检测波长为 205nm;流速为 1.0ml/min。结果:左卡尼汀在 28.16~52.30μg 范围内呈良好的线性关系, $r=0.9999$; 平均回收率 ($n=6$) 为 99.70%, RSD=0.51%; 有关物质 A 在 8.11~243.36ng 范围内呈良好的线性关系, $r=1.0000$; 平均回收率 ($n=6$) 为 100.07%, RSD=0.36%。结论:本法简单、准确、重复性好、区分力强,可作为左卡尼汀注射液的质控方法。

关键词 :左卡尼汀注射液 高效液相色谱 含量 有关物质 A

中图分类号 R927.2

文献标识码 A

文章编号 :1672-8351(2015)01-0002-03

Determination of the content and related compound A in Levocarnitine injection by HPLC

Abstract Objective To establish a HPLC method for determination of the content and related compound A in Levocarnitine injection. Methods A column of silicagel column was adopted and the mobile phase was the mixture of acetonitrile-phosphate buffer(0.05mol/L sodium hydrogen phosphate with phosphoric acid to adjust pH 5.5)=60:40, The detection wavelength was set at 205nm, the flow rate was 1.0ml/min. Results Levocarnitine showed a good linear relationship in the range of 28.16~52.30μg ($r=0.9999$), The average recovery ($n=6$) was 99.70% (RSD=0.51%), The related compound A of Levocarnitine showed a good linear relationship in the range of 8.112~243.36 ng ($r=1.0000$), The average recovery ($n=6$) was 100.07% (RSD=0.36%). Conclusion The method is simple accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Levocarnitine injection.

Keywords: Levocarnitine injection HPLC Content Related compound A

左卡尼汀注射液适用于慢性肾衰长期血透患者因继发性肉碱缺乏产生的一系列并发症,因现有检测方法不能很好地控制药品质量,所以本文建立了左卡尼汀注射液的含量及有关物质 A[(E)-4-(三甲基氨基)-2-丁烯酯或(Z)-4-(三甲基氨基)-2-丁烯酯]的测定方法。通过对该方法进行方法学验证,结果显示其专属性强,灵敏度高,区分力强,可以很好地控制药品质量及临床用药的安全性。

1 仪器与试剂

仪器 LC-20AT 型高效液相色谱仪(配岛津 SPD-20A 紫外检测器),岛津公司。试剂:乙腈(色谱纯 CNW),超纯水,磷酸氢二钠(分析纯,天津市标准科技有限公司),磷酸(分析纯,烟台市双双科技有限公司)。试药:左卡尼汀对照:中检所提供(批号:101041-200901);有关物质 A 对照:EP 提供(批号 2.0);左卡尼汀原料药:东北制药集团股份有限公司;左卡尼汀注射液:山东

($n=6$) 表明样品溶液在 24h 内稳定性好。

2.9 检测限和定量限 取“2.2”项下对照品溶液,用超纯水稀释成一系列由高到低梯度浓度的标准溶液,盐酸贝尼地平的检测限($S/N=3$)为 0.25ng,定量限($S/N=10$)为 1ng。

2.10 样品含量测定 将批号为 100412,100414,100417 的样品溶液分别按“2.1”项色谱条件下进样,结果见表 1。

2.11 有关物质检查:采用不加校正因子的主成分自身对照法。精密称取盐酸贝尼地平适量,置 10ml 容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,用 0.45μm 油水两用滤膜过滤,制成 500mg/L 的溶液作为供试品溶液,取供试品溶液 1ml 置 10ml 容量瓶中,加流动相稀释至刻度,制成 5mg/L 的对照溶液。取对照溶液 20μl 进样,调节检测灵敏度,使主峰高达到记录仪满量程的 10%左右,再取供试品溶液进样 20μl,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。扣除溶剂峰和辅料峰,量取色谱图上盐酸贝尼地平色谱峰外各杂质的峰面积总和,并与对照溶液主成分的峰面积比较,计算杂质含量。结果见表 1,3 批样品中有关物质均小于 1%。

表 1 含量及有关物质测定结果

| 批号 | 含量/% | 有关物质/% |
|--------|-------|--------|
| 100412 | 99.52 | 0.35 |
| 100414 | 99.64 | 0.41 |
| 100417 | 99.77 | 0.39 |

3 讨论

3.1 检测波长的确定 应用二极管阵列检测器在线对盐酸贝尼地平在 190~400nm 范围内扫描,盐酸贝尼地平在 237nm 处吸收较强,故本试验采用 237nm 作为含量及有关物质测定的检测波

长。试验结果表明,以 237nm 作为检测波长,可使分析方法的基线平稳、灵敏度高且色谱峰峰形好。

3.2 流动相的选择 在建立分析方法的过程中,为了优化最佳的流动相,试验分别考察了甲醇:水系统,乙腈:水系统,结果发现流动相以甲醇:水系统的分析效果明显好于乙腈:水系统。以甲醇:水系统为流动相,甲醇的比例影响色谱峰的出峰时间及峰形。在试验中,以色谱峰的保留时间、色谱峰的峰形为指标优化流动相比,最终确定流动相为甲醇:水(82:18, v/v)。

试验结果表明,本试验建立的盐酸贝尼地平片及其有关物质含量测定方法,具有操作简单、分析准确度高、重现性好等优点,因此该方法在药品检验上能满足盐酸贝尼地平片含量的测定与质量控制的要求。

参考文献

- [1]李勇.三通道阻滞钙拮抗剂盐酸贝尼地平[J].中华高血压杂志,2014,22(1):14-16.
- [2] Masahiro Matsubara, Osamu Akizuki, Jun-ichi Ikeda, et al. Benidipine, an anti-hypertensive drug, inhibits reactive oxygen species production in polymorphonuclear leukocytes and oxidative stress in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. European Journal of Pharmacology, 2008, 580(1-2): 201-213.
- [3]谢爽,张沛,贾友宏,等.盐酸贝尼地平治疗稳定型心绞痛的多中心临床研究[J].中国药理学杂志,2010,45(9):682-685.
- [4] Tetsuhiro Umeno, Toshio Shimada, Hironori Tsukihashi, et al. The effect of hypertension, aging and benidipine on arterial elasticity in elderly hypertensives[J]. CVD Prevention and Control, 2010, 5(2): 45-50.

* 通讯作者

威高药业有限责任公司 ;雷卡 :常州兰陵制药有限责任公司 ;河益能 Sigma-tau。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 :色谱柱 :硅胶为填充剂(250mm×4.6mm 5μm) ;流动相 :乙腈-磷酸盐缓冲液(0.05mol/L 磷酸氢二钠 ,用稀磷酸调 pH 值为 5.50)=60:40 ;检测波长 205nm ;流速 :1.0ml/min ;进样量 20μl。理论塔板数 按左卡尼汀计 ,不得低于 3000。

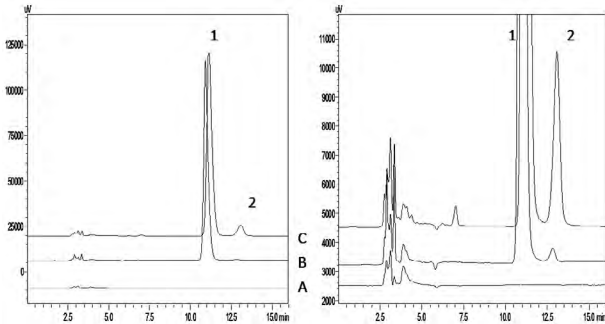
2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密量取左卡尼汀及有关物质 A 对照品各适量 ,加流动相溶解并逐步稀释制成每 1ml 约含左卡尼汀 2.0mg ,有关物质 A 约 2.0μg 的溶液 ,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取本品 1ml(相当于左卡尼汀 0.2g) ,置 100ml 量瓶中 ,加流动相稀释置刻度 ,配制每 1ml 含左卡尼汀 2.0mg 的溶液 ,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 :精密量取 pH 为 6.0 的盐酸溶液 1ml ,置 100ml 量瓶中 ,加流动相溶解定容 ,即得。

2.3 专属性试验 :分别精密量取上述三种溶液各 20μl 注入液相色谱仪 ,按照上述色谱条件进行测定 ,色谱图见图 1。结果表明 ,本色谱条件专属性良好 ,主峰与相邻峰分离度大于 3。



A.阴性对照溶液 B.供试品溶液 C.对照品溶液 1.左卡尼汀 2.有关物质 A
图 1 左卡尼汀注射液 HPLC 色谱图(右图为左图的放大图)

2.4 线性关系考察

2.4.1 左卡尼汀线性关系考察 :精密称取左卡尼汀对照品适量 ,采用逐级稀释法 ,用流动相定量稀释成每 1ml 含左卡尼汀 1.43 ,1.63 ,1.84 ,2.04 ,2.25 ,2.45 ,2.65mg 的系列浓度的标准溶液。取上述溶液 20μl 注入液相色谱仪 ,记录色谱图。以进样量(μg)为横坐标 ,以峰面积为纵坐标 ,绘制标准曲线。计算回归方程 $y=50654.076x+12994.786$ $r=0.9999$ 。结果表明 ,左卡尼汀在 28.16~52.30μg 范围内线性关系良好。

2.4.2 有关物质 A 线性关系考察 :精密称取有关物质 A 对照品适量 ,采用逐级稀释法 ,用流动相定量稀释成每 1ml 含有关物质 A 0.40 ,1.01 ,1.62 ,2.03 ,4.06 ,6.08 ,8.11 ,10.14 ,12.17g 的系列标准溶液。取上述标准溶液 20μl 注入液相色谱仪 ,记录色谱图。以进样量(μg)为横坐标 ,以峰面积为纵坐标 ,绘制标准曲线。计算回归方程 $y=3380.33x-11.6896$ $r=1.0000$ 。结果表明 ,左卡尼汀有关物质 A 在 8.11~243.36ng 范围内线性关系良好。

2.5 定量限

2.5.1 左卡尼汀定量限 精密称取左卡尼汀对照品适量 ,加流动相并逐步稀释成不同浓度的标准溶液 ,分别取 20μl 注入液相色谱仪 ,记录色谱图。结果左卡尼汀进样量为 8.87ng 时响应值为噪音的 10 倍 ,即本测定条件下左卡尼汀的定量限为 8.87ng。

2.5.2 有关物质 A 定量限 精密称取有关物质 A 对照品适量 ,加流动相并逐步稀释成不同浓度的标准溶液 ,分别取 20μl 注入液相色谱仪 ,记录色谱图。结果有关物质 A 进样量为 0.14ng 时响

应值为噪音的 10 倍 ,即在此测定条件下左卡尼汀有关物质 A 的定量限为 0.14ng。

2.6 精密度试验 取混合对照品溶液 ,按上述色谱条件 ,连续进样 6 次 ,测定峰面积。结果左卡尼汀的平均峰面积为 2041768 ,RSD 为 0.05% ;有关物质 A 的平均峰面积为 143534 ,RSD 为 0.35% ,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取混合对照品溶液和供试品溶液 ,按上述色谱条件 ,分别于配制后 0、2、4、6、8h 测定峰面积值。结果左卡尼汀对照品溶液平均峰面积为 2049871 ,RSD 为 0.11% ;有关物质 A 对照品溶液平均峰面积为 138352 ,RSD 为 0.31% ;供试品溶液中左卡尼汀平均峰面积为 2017073 ,RSD 为 0.17% ;有关物质 A 平均峰面积为 5917 ,RSD 为 1.01% ,表明对照品溶液和供试品溶液在 8h 内基本稳定。

2.8 重复性试验 精密量取左卡尼汀注射液(批号 :11032701)1ml 置 100ml 量瓶中 ,加流动相定容 ,得供试品溶液。供试品溶液平行配制 6 份 ,分别精密量取 20μl 注入液相色谱仪 ,记录色谱图。6 个样品左卡尼汀及有关物质 A 测定结果的相对标准偏差分别为 0.12% 和 0.70% ,表明该方法重复性良好。

2.9 回收率试验 :分别精密称取左卡尼汀原料药 1.0g ,用阴性对照溶液定容至 5ml ,依“2.2.2 供试品溶液”项下制备供试品溶液。平行 6 份 ,按上述色谱条件 ,分别取 20μl 注入液相色谱仪 ,记录色谱图 ,计算左卡尼汀含量回收率。试验结果表明 ,样品平均回收率为 99.70% ,RSD%=0.51% ,本法的准确度可靠。

精密量取有关物质 A 对照品溶液 (1.014mg/ml)2ml ,至 10ml 量瓶中 ,用阴性对照溶液定容。平行 6 份 ,按上述色谱条件 ,分别取 20μl 注入液相色谱仪 ,记录色谱图 ,计算有关物质 A 的回收率。试验结果表明 :有关物质 A 的平均回收率为 100.07%(n=6) ,RSD%=0.36% ,本法的准确度可靠。

2.10 耐用性试验 在色谱条件中其余条件不变的情况下 ,改变单一因素的变化范围 ,依次考察流动相 pH、流动相比、检测波长、色谱柱型号、流速的改变对试验结果的影响。结果见表 1。

表 1 测定左卡尼汀含量及有关物质 A 的 HPLC 方法的耐用性

| 耐用性研究项目 | 试验方法的条件 | 确认的耐用性范围 |
|------------|---------|----------------|
| 流动相 pH | 5.50 | 5.00~6.00 |
| 乙腈 缓冲盐 | 60:40 | 乙腈百分比为 50%~60% |
| 检测波长(nm) | 205nm | 203~207nm |
| 色谱柱 | 硅胶柱 | 硅胶柱 |
| 流速(ml/min) | 1.0 | 0.8~1.2 |

结果表明 本方法耐用性良好。

2.11 样品测定结果 取混合对照品溶液、供试品溶液适量 ,按上述色谱条件测定 ,以外标法测定样品中左卡尼汀含量及有关物质 A 结果见表 2。

表 2 各厂家样品左卡尼汀含量及有关物质 A 检测结果

| 批号 | 含量(%) | 有关物质 A(μg/ml) |
|------------------------|--------|---------------|
| 11032701(山东威高药业有限责任公司) | 102.43 | 7.93 |
| 11032801(山东威高药业有限责任公司) | 102.22 | 8.63 |
| 11032901(山东威高药业有限责任公司) | 100.02 | 8.04 |
| 1101101(雷卡) | 99.14 | 19.90 |
| 110041(可益能) | 103.21 | 394.00 |

3 讨论

通过对本文 HPLC 方法进行方法学验证 ,结果显示该方法灵敏度较高 ,左卡尼汀与有关物质 A 的定量限分别为 8.87ng ,0.14ng。对照品溶液和供试品溶液在室温条件下 8h 稳定。左卡

枇杷叶中五环三萜酸类有效成分的提取研究[△]

尹莉¹ 尹霞² (1. 湖州师范学院生命科学院 湖州 313000 2. 包头医学院职业技术学院 包头 014030)

摘要 :目的:进行枇杷叶中五环三萜酸类有效成分的提取方法研究。方法:称取干燥粉碎的枇杷叶 5g,以乙醇为溶剂,水浴中回流、过滤,滤液用旋转蒸发仪浓缩得到浸膏,浸膏用乙醇溶解、稀释,经香草醛显色后,在 548nm 处测定紫外吸收。单因素实验考察了不同水浴温度(60℃、70℃、80℃、90℃)、提取时间(2h、3h、4h、5h)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)、乙醇浓度(60%、70%、80%、90%)的影响,并进行了 L₁₆(4⁴) 的正交实验。结果:以乌索酸为对照建立标准曲线,曲线方程为 $A=0.021C+0.0249$,相关系数 $r^2=0.9995$,线性范围为 10~50μg/mL,线性关系良好。正交实验结果表明,乙醇浓度为 90%,提取温度为 80℃,提取时间为 5h,料液比为 1:20 为最佳提取条件。在该条件下进行提取实验验证,结果表明枇杷叶中总五环三萜类成分的含量约为 1.32%。结论:该方法简便易行,可用于枇杷叶中五环三萜酸类有效成分的提取。

关键词 :枇杷叶 五环三萜酸类 提取

中图分类号 R284.2

文献标识码 A

文章编号 1672-8351(2015)01-0004-02

Extraction of Pentacyclic Triterpenoid Acids from Loquat as the Active Ingredients

Yin Li¹ Yin Xia² (1. School of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou 313000; 2. Baotou Medical College of Career Technical College, Baotou 014030)

Abstract :Aim :To study the extraction methods of pentacyclic triterpenoid acids from loquat as the active ingredients of loquat. Methods: Weigh dry pulverized loquat 5g, add ethanol as the extraction solvent, reflux in the hot water bath, then filter it and the filtrate is concentrated on a rotary evaporator to give the extract, then the extract is dissolved with ethanol, diluted by vanillin color, measure the absorption at the UV wavelength of 548nm. Single factor experiments with different temperatures of the water bath (60℃, 70℃, 80℃, and 90℃), different extraction time (2h, 3h, 4h, and 5h), different solid-liquid ratios (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30), and different ethanol concentrations (60%, 70%, 80%, 90%) were conducted respectively. An orthogonal experiment (L₁₆(4⁴)) was also investigated. Results: Ursolic acid was used as a standard to establish the standard curve with the equation of $A=0.021C+0.0249$, the correlation coefficient of $r^2=0.9995$, and the linear range of 10~50μg/mL. The results showed that there was a good linear relationship between the UV absorption and the concentration of the solution. The orthogonal experiment results showed that the best result can be get with the extraction conditions of 90% ethanol, extraction temperature of 80℃, extraction time of 5h, and solid-liquid ratio of 1:20. The results under this optimum extraction condition showed that the total content of pentacyclic triterpenoids in loquat was about 1.32%. Conclusion: The method is simple and easy to perform, and can be used to extract pentacyclic triterpenoid acids as the active ingredients from loquat.

Key words : loquat, pentacyclic triterpenoid acids, extraction

枇杷为蔷薇科枇杷属的植物,又称卢桔,常绿小乔木。叶和果实入药,有清热、润肺、止咳、化痰等功效^[1-3]。枇杷叶中有效成分众多,含皂苷、苦杏仁苷、乌索酸、齐墩果酸、鞣质、维生素等^[2-4]。

研究证实枇杷叶中含有五环三萜酸类物质,如乌索酸、齐墩果酸、科罗素酸、山楂酸等^[5]。齐墩果酸为肝病辅助药,具有明显降低谷丙转氨酶的效果^[5,6]。乌索酸具有抗癌作用^[7]。科罗素酸可以促进机体细胞对葡萄糖的吸收和利用,也被称为“植物胰岛素”^[8,9]。山楂酸有抗肿瘤、抗艾滋病病毒、抗炎、抗菌的作用^[10]。因此,由枇杷叶中提取有效药理活性的五环三萜酸类物质,极具开发潜力。

1 实验材料与仪器

1.1 实验材料:枇杷叶(亳州市辉睿中药科技有限公司,产地安徽,为双子叶植物蔷薇科枇杷的干燥叶),乌索酸标准品(上海宝曼生物科技有限公司,纯度 98%),甲醇、乙醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸等(均为分析纯)。

1.2 实验仪器:UV-180pc 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),WK-200B 药物粉碎机(青州市精诚机械有限公司),HH-1 智能恒温水浴锅(国华电器有限公司),RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

2 实验方法

2.1 标准曲线的绘制:精密称取乌索酸标准品 10mg,用无水乙醇溶解并稀释成浓度为 0.1mg/mL 的标准溶液。精密量取标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL,分别置 10mL 容量瓶中,加热除去溶剂,向试管中加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.3mL 和高氯酸 1mL,置 60℃水浴中加热 20min,冷却,再加入 5mL 冰醋酸,摇匀,在 548nm 处测定其吸光度。

2.2 样品测定方法:称取 5.0g 枇杷叶粉末,置 250mL 圆底烧瓶中,加适量乙醇,加热回流,抽滤,滤液用旋转蒸发仪浓缩得到浸膏,用乙醇溶解并转移到 100mL 容量瓶中,加乙醇定容到刻度,摇匀。精密吸取该溶液 1mL 置试管中,加热除去溶剂,再加入 5%的香草醛-冰醋酸溶液 0.3mL 及高氯酸 1mL,60℃水浴中加热 20min,冷却,加入 5mL 冰醋酸,摇匀,在 548nm 处测定其吸光度。将吸光度带入标准曲线中,计算枇杷叶中五环三萜酸类物质的总量(以乌索酸计)。

2.3 单因素实验:改变实验条件,考察不同的水浴温度、提取时间、料液比、乙醇浓度的提取结果,进行单因素考察。

2.3 正交实验:在单因素实验的基础上,选取了 4 个因素:乙醇浓度、提取温度、提取时间、料液比,每个因素选取 4 个水平,从而组成一个 L₁₆(4⁴) 的正交实验,结果见表 1。通过考察不同因素水平条件下的提取情况,从而确定最佳提取条件。

尼汀、有关物质 A 等各成分按顺序依次洗脱,各峰之间的分离度大于 3.0,主峰与相邻峰分离度大于 3.0,理论板数按主峰计大于 5000,专属性高。左卡尼汀与有关物质 A 测定方法回收率均在 95%~105%,能准确、客观、有效的检测产品中的杂质。并通过不同波长、不同流动相比比例、不同 pH 值以及不同色谱柱考察该方法耐用性,结果显示其耐用性良好。本文建立的左卡尼汀注

射液的含量及有关物质 A 的测定方法能很好的控制左卡尼汀注射液的质量及临床用药的安全性。

参考文献

- [1]左卡尼汀注射液国家质量标准 X19990148.
- [2]左卡尼汀注射液美国药典质量标准.
- [3]左卡尼汀注射液国家质量标准 WS1-(X-023)-2005Z.