

离子色谱法测定骨瓜提取物注射液中糖的含量

张伟^{1*}, 张彤¹, 任连杰¹, 吕雯¹, 韩春霞², 周长明^{1#} [1.北京市药品检验所, 北京 100035; 2.赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京 100007]

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0386-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.34

摘要 目的:建立测定骨瓜提取物注射液中糖含量的方法。方法:采用离子色谱法。色谱柱为Dionex CarboPac PA20,流动相为水-1 mol/L醋酸钠溶液-250 mmol/L氢氧化钠溶液(梯度洗脱),流速为0.45 ml/min,柱温为35℃,进样量为10 μl,检测器为电化学分析检测器。结果:半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖检测质量浓度线性范围均为0.5~10.0 μg/ml($r>0.998\ 0$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;各组分加样回收率为94.8%~99.1%,RSD=0.52%~0.89%($n=9$)。结论:该方法简单、快速、准确,可用于骨瓜提取物注射液中糖的测定。

关键词 离子色谱法;骨瓜提取物注射液;糖

Content Determination of Carbohydrates in Osseous and Cucumis Extract Injection by Ion Chromatography
ZHANG Wei¹, ZHANG Tong¹, REN Lianjie¹, LYU Wen¹, HAN Chunxia², ZHOU Changming¹ (1.Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China; 2.Thermo Fisher Scientific (China) Co., Ltd, Beijing 100007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of carbohydrates in Osseous and cucumis extract injection. METHODS: Ion chromatography was conducted on the column of Dionex CarboPac PA20 with mobile phase of water-1 mol/L Sodium acetate solution-250 mmol/L Sodium hydroxide solution (gradient elution) at flow rate of 0.45 ml/min, column temperature was 35℃, and injection volume was 10 μl, detector was electrochemical analysis detector. RESULTS: The linear ranges of galactose, glucose, mannose, sucrose and fructose were 0.5-10.0 μg/ml($r>0.998\ 0$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 94.8%-99.1% (RSD=0.52%-0.89%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, fast and accurate, and can be used for the determination of carbohydrates in Osseous and cucumis extract injection.

KEYWORDS Ion chromatography; Osseous and cucumis extraction injection; Carbohydrates

根据骨瓜提取物注射液现行药品标准^[1-3]可知,目前对该品种质量控制较为简单,其中,鉴别、蛋白质检查、含量测定(福林酚法)也只是针对其原料猪四肢骨成分进行质量控制;同时,该品种属生物制品^[4]范畴,生产企业只根据多肽含量来对其生产工艺以及生产过程中原料、半成品的质量进行控制。而通过该品种处方可知,其中有除猪四肢骨以外的另一种重要原料,即甜瓜籽。对于目前国内3家生产企业来说,各企业该品种处方中猪四肢骨和甜瓜籽的投料比例有很大差别,然而,现行标准中并没有针对甜瓜籽有关成分进行质量控制,同时对其原料质量也没有涉及。实际上,目前对该品种的功效成分尚未见相关研究报道,故该品种临床使用中存在较大隐患。对该品种质量标准的提高,特别是对功效成分的研究有重要意义。

骨瓜提取物注射液的用法为肌肉注射或者静脉注射。通过查阅相关文献^[5-6],发现较多有关该品种致不良反应的报道。骨瓜提取物注射液等骨肽类注射液不良反应主要为变态反应,其次为药物热、关节痛、白细胞升高等。根据文献可知,该品种其中一种原料甜瓜籽中富含多种糖、氨基酸、植物蛋白、脂肪酸等^[7]。结合对其工艺过程研究,推测该品种中应含有大量糖类、氨基酸等物质。而有研究指出,某些功能性低聚

糖有一定的致敏性。为此,笔者采用离子色谱法对骨瓜提取物注射液中糖的含量进行了测定,旨在为该品种质量标准的提高提供依据和保障其临床用药安全。

1 材料

Dionex BioLC ICS-5000 色谱系统,包括带有真空脱气单元的DP/SP的四元梯度泵、DC色谱柱箱,并配有电化学检测器(安培检测器)(美国赛默飞世尔公司);色谱数据采集和处理采用Chameleon7.0色谱工作站(美国赛默飞世尔公司);AG245电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);RP柱(博纳艾杰尔科技公司,C₁₈固相萃取柱,1000 mg/6 ml)。

半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖对照品(美国Sigma公司,纯度均>99.0%);骨瓜提取物注射液(国内A企业,10批,规格:5 ml:25 mg、10 ml:50 mg;国内B企业,10批,规格:5 ml:25 mg、2 ml:10 mg;国内C企业,10批,规格:5 ml:25 mg、2 ml:10 mg);甲醇(色谱纯,德国Merck公司);氢氧化钠(比利时ACROS ORGANICS公司,质量百分含量:50wt%);叠氮化钠(比利时ACROS ORGANICS公司,纯度:99%);试验用水为Milli-Q超纯水,即去离子水再经Milli-Q装置纯化(>18 MΩcm⁻¹)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Dionex CarboPac PA20(150 mm×3 mm,6 μm), Dionex PA20 Guard(预柱,30 mm×3 mm,6 μm);流动相:水-1 mol/L醋酸钠溶液-250 mmol/L氢氧化钠溶液(梯度洗脱程序

* 主管药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:010-83222411。
E-mail: maximer325@sohu.com

通信作者:副主任药师。研究方向:药物分析。电话:010-83222411。E-mail: zcm.602@163.com

见表1);流速:0.45 ml/min;柱温:35 ℃;进样量:10 μl;检测器:电化学分析检测器。进样前用流动相冲洗色谱系统至基线稳定。每次分析结束后,用至少30 ml超纯水冲洗色谱柱至初始状态。

表1 梯度洗脱程序
Tab 1 Gradient elution produce

时间,min	流动相组分,%		
	水	1 mol/L 醋酸钠溶液	250 mmol/L 氢氧化钠溶液
-5.0	96	0	4
15.0	96	0	4
30.0	60	0	40
55.0	30	30	40
55.1	20	0	80
60.0	20	0	80

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性溶液 依次精密称取半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖对照品适量,加叠氮化钠溶液(0.1%)100 μl,加水溶解并稀释,使上述各组分质量浓度均为10 μg/ml,作为系统适用性溶液。

2.2.2 系列线性工作对照品溶液 依次精密称取半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖对照品适量,加叠氮化钠溶液(0.1%)100 μl,加水溶解并逐级稀释得到上述各组分质量浓度分别为10、5、2、1、0.5 μg/ml的系列线性工作对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密量取样品1 ml,置于50 ml量瓶中,加叠氮化钠溶液(0.1%)100 μl,加水稀释至刻度,摇匀;取RP柱,依次分别用5倍体积甲醇和超纯水洗脱活化;将稀释后的样品溶液经RP柱过滤,弃去3倍柱体积溶液,取后续溶液,即为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液 取叠氮化钠溶液(0.1%)100 μl置于50 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;取RP柱,依次分别用5倍体积甲醇和超纯水洗脱活化;将稀释后的样品溶液经RP柱过滤,弃去3倍柱体积溶液,取后续溶液,即为阴性对照溶液。

2.3 系统适用性和阴性干扰试验

精密量取“2.2”项下系统适用性溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各10 μl,分别注入离子色谱仪进样测定,记录色谱,详见图1。结果,半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖各相邻组分离度分别为2.03、2.73、1.11、1.86,理论板数分别为6 404、6 668、6 663、6 361、5 674;此外,流动相、叠氮化钠等成分对上述组分的测定无干扰。

2.4 线性关系考察

取“2.2.2”项下系列线性工作对照品溶液各10 μl,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以各成分质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程及线性范围见表2。结果表明,各成分检测质量浓度线性范围均为0.5~10.0 μg/ml($r>0.998\ 0$)。

2.5 检测限和定量限试验

取“2.2.2”项下质量浓度为0.5 μg/ml的线性工作对照品溶液适量,用去离子水稀释制成不同质量浓度的溶液,分别进样测定,记录色谱,并对色谱系统进行基线检测。结果表明,信噪比为3时半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖的检测限分别为0.02、0.02、0.04、0.06、0.07 μg/ml,信噪比为10时上述成分定量限分别为0.09、0.09、0.14、0.22、0.25 μg/ml。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下系统适用性溶液10 μl,注入离子色谱仪,连续进样测定6次,记录各成分的峰面积。结果,半乳

糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖峰面积的RSD分别为0.06%、0.05%、0.05%、0.04%、0.02%($n=6$),表明仪器精密度良好。

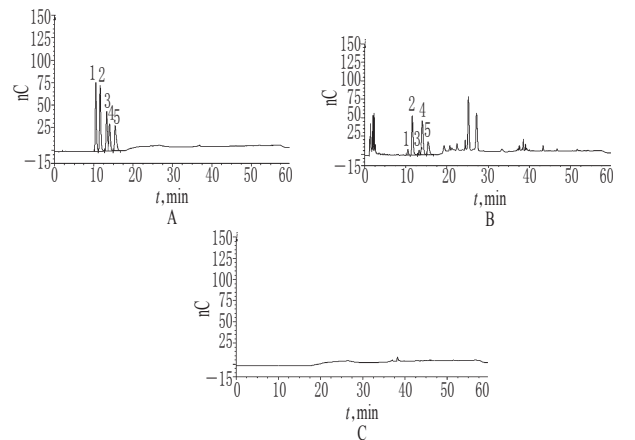


图1 离子色谱图

A.系统适用性溶液;B.供试品溶液;C.阴性对照溶液;1.半乳糖;2.葡萄糖;3.甘露糖;4.蔗糖;5.果糖

Fig 1 Ion chromatograms

A.system suitability solution; B.test sample solution; C.negative control solution; 1.galactose; 2.glucose; 3.mannose; 4.sucrose; 5.fructose

表2 回归方程及线性范围

Tab 2 Regression equations and linear range

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围, μg/ml
半乳糖	$y=2.088\ 4x-0.153\ 9$	0.998 9	0.5~10.0
葡萄糖	$y=2.266\ 1x-0.293\ 3$	0.998 5	0.5~10.0
甘露糖	$y=1.048\ 4x+0.101\ 2$	0.999 9	0.5~10.0
蔗糖	$y=0.708\ 2x+0.256\ 9$	0.998 3	0.5~10.0
果糖	$y=0.743\ 9x+0.066\ 4$	0.999 9	0.5~10.0

2.7 稳定性试验

取批号为131024的样品适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0、6、12、18、24 h时注入离子色谱仪,进样测定,记录各成分的峰面积。结果,半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖峰面积的RSD分别为0.82%、1.05%、1.58%、1.36%、0.59%($n=5$),表明供试品溶液在24 h内稳定性较好。

2.8 重复性试验

取批号为131024的样品适量,按“2.2.3”项下方法分别平行制备6份供试品溶液,分别精密量取10 μl注入离子色谱仪,记录峰面积,按标准曲线法以峰面积分别计算各成分的含量。结果,半乳糖、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖的平均含量分别为60.1、482.3、70.8、1 419.1、605.3 μg/ml,RSD分别为0.08%、0.06%、0.07%、0.03%、0.03%,表明本方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取批号为131024的样品适量,按照“2.2.3”项下方法配制供试品溶液,精密量取10 μl,分别加入“2.2.2”项下3种质量浓度的线性工作对照品溶液(0.5、1、2 μg/ml),制备成高、中、低3个浓度的供试品溶液,每个浓度配制3份,共9份,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算各成分含量,将所得含量与加入的标准量进行比较,计算加样回收率,结果见表3。

2.10 样品含量测定

取A、B、C企业的共30批样品(每企业每种规格各5批)各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,精密量取

10 μl,分别注入离子色谱仪,记录峰面积,以峰面积按标准曲线法计算各成分的含量,结果见表4。

表3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Result of recovery test(<i>n</i> =9)													
成分	样品含量, μg/ml	加入量, μg/ml	测得量, μg/ml	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %	成分	样品含量, μg/ml	加入量, μg/ml	测得量, μg/ml	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
半乳糖	1.363	0.500	1.850	97.4	98.11	0.80	蔗糖	2.235	1.000	3.200	96.5	95.63	0.56
	1.363	0.500	1.856	98.6				2.235	2.000	4.159	96.2		
	1.363	0.500	1.847	96.8				2.235	2.000	4.145	95.5		
	1.363	1.000	2.342	97.9				2.235	2.000	4.161	96.3		
	1.363	1.000	2.337	97.4				2.312	0.500	2.786	94.8		
	1.363	1.000	2.352	98.9				2.312	0.500	2.793	96.2		
	1.363	2.000	3.337	98.7				2.312	0.500	2.793	96.2		
	1.363	2.000	3.327	98.2				2.312	1.000	3.265	95.3		
	1.363	2.000	3.345	99.1				2.312	1.000	3.261	94.9		
葡萄糖	10.021	0.500	10.505	96.8	96.50	0.89	果糖	2.312	1.000	3.270	95.8	97.67	0.52
	10.021	0.500	10.512	98.2				2.312	2.000	4.222	95.5		
	10.021	0.500	10.498	95.4				2.312	2.000	4.230	95.9		
	10.021	1.000	10.994	97.3				2.312	2.000	4.234	96.1		
	10.021	1.000	10.987	96.6				12.627	0.500	13.112	97.0		
	10.021	1.000	10.982	96.1				12.627	0.500	13.116	97.8		
	10.021	2.000	11.935	95.7				12.627	0.500	13.113	97.2		
	10.021	2.000	11.949	96.4				12.627	1.000	13.610	98.3		
	10.021	2.000	11.941	96.0				12.627	1.000	13.605	97.8		
甘露糖	2.235	0.500	2.712	95.4	95.97	0.56	12.627	1.000	13.608	98.1			
	2.235	0.500	2.715	96.0			12.627	2.000	14.593	98.3			
	2.235	0.500	2.719	96.8			12.627	2.000	14.569	97.1			
	2.235	1.000	3.193	95.8			12.627	2.000	14.575	97.4			
	2.235	1.000	3.187	95.2									

表4 样品含量测定结果(n=1)

Tab 4 Results of contents determination of samples(n=1)									
企业	批号	规格	半乳糖, μg/ml	葡萄糖, μg/ml	甘露糖, μg/ml	蔗糖, μg/ml	果糖, μg/ml	合计, μg/ml	均值(RSD), μg/ml(%)
国内A企业	130717	2 ml:10 mg	10.1	444.1	10.7	206.6	419.3	1 091	896(14.1)
	130832		7.0	356.8	12.9	201.8	355.2	934	
	130716		9.2	424.4	9.3	200.4	392.4	1 036	
	131225		7.2	334.2	82.7	184.7	336.2	945	
	131012		6.4	200.6	11.4	261.9	179.0	659	
	131020		5.9	335.6	11.3	221.3	317.3	891	
	131230	5 ml:25 mg	8.7	381.2	18.8	128.3	379.2	916	
	130915		10.4	420.0	14.4	30.1	424.1	899	
	130902		7.1	354.2	11.8	19.2	356.5	749	
	131018		5.8	318.4	11.0	207.3	294.9	837	
国内B企业	1403008-1	2 ml:10 mg	42.1	1 247.0	100.9	230.9	1 408.2	3 029	1 684 (43.6)
	20131027		5.4	255.6	9.1	195.5	236.8	702	
	1404003-1		23.5	641.3	23.1	461.6	641.2	1 791	
	20130728		8.7	424.7	9.2	218.9	380.3	1 042	
	1404013-1		17.2	523.7	23.8	450.5	557.7	1 573	
	20131203		21.3	875.3	20.2	526.8	861.2	2 305	
	20130828	5 ml:25 mg	10.2	485.5	13.1	166.7	474.0	1 150	
	20131117		12.3	443.9	21.9	50.9	423.4	952	
	20131212		20.6	854.6	19.4	501.8	811.6	2 208	
	1404004-1		31.0	797.8	31.3	610.3	619.4	2 090	
国内C企业	131013	5 ml:25 mg	65.0	499.5	48.6	1066.3	487.6	2 167	2 536 (29.3)
	140207		84.6	639.0	64.6	1751.6	700.1	3 240	
	140305		62.4	563.2	72.4	1379.3	556.0	2 633	
	140304		61.8	547.1	66.4	2384.3	664.3	3 724	
	130910		59.0	516.2	81.2	84.1	553.3	1 294	
	140204		60.4	487.7	69.7	1427.6	599.7	2 645	
	140205	10 ml:50 mg	63.4	506.6	63.6	1482.9	586.1	2 703	
	130502		48.8	659.5	71.7	1321.8	673.8	2 776	
	131109		52.2	492.6	60.9	1620.6	529.0	2 755	
	131024		68.2	501.1	111.8	115.6	631.4	1 428	

HPLC法同时测定安脑丸中栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的含量

孙艳涛*(淄博市食品药品检验研究院中药检验科,山东 淄博 255086)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0389-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.35

摘要 目的:建立同时测定安脑丸中栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-3 C₁₈,流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为230 nm,进样量为10 μl。结果:栀子苷、盐酸小檗碱和黄芩苷的检测进样量线性范围分别为0.041 0~0.820 0、0.037 6~0.752 0、0.095 2~1.904 0 μg($r=0.999\ 9$);加样回收率分别为97.31%~100.41%、98.32%~101.76%、99.16%~101.30%,RSD分别为1.10%、1.20%、0.76%($n=6$)。结论:该方法简便、准确,可用于安脑丸的质量控制。

关键词 安脑丸;栀子苷;盐酸小檗碱;黄芩苷;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Geniposide, Berberine Hydrochloride and Baicalin in Annao Pill by HPLC
SUN Yantao(Inspection Dept. of TCM, Zibo Institute for Food and Drug Control, Shandong Zibo 255086, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of geniposide, berberine hydrochloride and baicalin in Annao pill. METHODS: HPLC was performed on the column of Inertsil ODS-3 C₁₈ with mobile phase of acetonitrile - 0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 230 nm, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.041 0-0.820 0 μg for geniposide ($r=0.999\ 9$), 0.037 6-0.752 0 μg for berberine hydrochloride ($r=0.999\ 9$) and 0.095 2-1.904 0 μg for baicalin ($r=0.999\ 9$), respectively; recoveries were 97.31% -100.41% (RSD=1.10%, $n=6$), 98.32% -101.76% (RSD=1.20%, $n=6$) and 99.16% -101.30% (RSD=0.76%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the quality control of Annao pill.

KEYWORDS Annao pill; Geniposide; Berberine hydrochloride; Baicalin; HPLC

安脑丸由人工牛黄、猪胆粉、黄芩、黄连、栀子、郁金等15味中药组成,收载于2010年版《中国药典》第一增补本^[1]及2015年版《中国药典》一部^[2],具有清热解毒、醒脑安神、豁痰开

窍、镇惊熄风等功效,可用于高热神昏、烦躁谵语、抽搐惊厥、中风窍闭、头痛眩晕及高血压、脑中风等症;文献报道其临床上也多用于各种热证^[3-4],且疗效确切。黄芩味苦,性寒,归肺、

3 讨论

3.1 处方与糖含量的关系

测定结果显示,国内C企业产品含糖量最高,平均为2.54 mg/ml;国内B企业和A企业平均结果分别为1.68 mg/ml和0.90 mg/ml。B企业产品批间差异显著,达到43.6%;C企业与A企业结果约为3:1,与产品处方中甜瓜籽的占比基本一致。同时发现,甜瓜籽通常含较多葡萄糖和果糖,同品种甜瓜籽的含糖量和各种糖的占比应相对固定。提示A企业与B企业甜瓜籽品种相同或接近,葡萄糖和果糖含量总和占总糖量的70%~90%,而C企业产品多数蔗糖占比高,提示C企业甜瓜籽品种可能有所不同。因此,在生产过程中应注意甜瓜籽选料的一致性和工艺的稳定性。

3.2 未来研究方向

由供试品色谱图可以看出,在保留时间30 min以后均出现未知色谱峰,推测为低聚糖,并推测其可能是具有特殊活性的功能性成分^[8],今后我们将对其分离、制备、活性等进行更为深入的研究。由于市场上此类产品较多,但大多都未对其中糖含量进行定量研究,从而未对其原料(甜瓜籽)选料和质量

控制制订标准。因此,本研究为今后对骨瓜提取物注射液中其他成分(如低聚糖)的研究提供了试验基础。

综上所述,本方法简单、快速、准确,可用于骨瓜提取物注射液中糖的测定。

参考文献

[1] 国家药典委员会.国家药品标准YBH05102006[S].2006.
[2] 国家药典委员会.国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第十四册[S].2003.
[3] 国家药典委员会.国家药品标准YBH31832005[S].2005.
[4] 郭中平.我国生物制品质量标准体系的探讨[J].中国新药杂志,2014,23(9):994.
[5] 孔飞飞,郭良君,谭兴起,等.骨瓜提取物致药物不良反应20例分析[J].中国新药杂志,2013,22(8):979.
[6] 易丹,唐少龙,陆向红.21例骨瓜提取物致不良反应文献分析[J].中国药物警戒,2013,10(3):175.
[7] 李洪玲,但建明,王琪,等.甜瓜籽营养成分分析[J].中国油脂,2004,29(10):68.
[8] 欧阳杰湖,陈子渊,潘善庆,等.骨瓜提取物注射液的生物活性测定[J].中南药学,2013,11(2):92.

*主管中药师。研究方向:药品检验及质量控制。电话:0533-7866112。E-mail:15605339172@wo.cn

(收稿日期:2015-01-02 修回日期:2015-12-13)
(编辑:周 簪)