

RP-HPLC法测定水飞蓟宾原料药的含量和有关物质

岑菁*,许瑞祥,夏培元,吕珊,陈勇川*(第三军医大学第一附属医院药学部,重庆 400038)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)17-1614-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.17.25

摘要 目的:建立测定水飞蓟宾原料药含量和有关物质的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为XDB-C₁₈,流动相为甲醇-1%冰乙酸水溶液(51:49, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为35℃,检测波长为287 nm。结果:水飞蓟宾检测质量浓度线性范围为0.012 04~0.481 6 mg/ml($r=0.999 9$)。水飞蓟宾低、中、高质量浓度平均回收率分别为100.65%、100.10%、100.69%,RSD分别为0.41%、0.71%、0.24%($n=3$),检测限、定量限分别为16、53 ng/ml。测得3批样品水飞蓟宾含量分别为99.47%、99.53%、99.38%,有关物质分别为1.32%、1.25%、1.27%。结论:本方法操作简单、灵敏度高、重复性好,可用于水飞蓟宾原料药含量和有关物质的测定。

关键词 反相高效液相色谱法;水飞蓟宾;原料药;含量测定;有关物质

Determination of Content and Related Substance of Silybin Raw Material by RP-HPLC

CEN Jing, XU Rui-xiang, XIA Pei-yuan, LYU Shan, CHEN Yong-chuan (Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of silybin raw material and its related substance. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-1% acetic acid solution (51:49, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was set at 35℃, and the detection wavelength was set at 287 nm. RESULTS: The linear range of silybin was 0.012 04-0.481 6 mg/ml ($r=0.999 9$). The recoveries of low, medium and high concentrations were 100.65% (RSD=0.41%, $n=3$), 100.10% (RSD=0.71%, $n=3$) and 100.69% (RSD=0.24%, $n=3$), respectively. The limits of detection and quantification were 16 ng/ml and 53 ng/ml, respectively. The contents of 3 batches of silybin were 99.47%, 99.53% and 99.38%, respectively; those of related substances were 1.32%, 1.25% and 1.27%, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, reproducible, and can be used for the content determination of silybin raw material and related substances.

KEYWORDS RP-HPLC; Silybin; Raw material; Content determination; Related substance

服制剂微生物限度检查方法可采用薄膜过滤并在培养基中加入 β -内酰胺酶的计数方法,其原理是 β -内酰胺酶可破坏本类药物的 β -内酰胺环,使其失去抗菌活性^[9]。所以此方法可以减少冲洗液的用量,提高阳性菌检出率。故由表3可见,当加入 β -内酰胺酶后薄膜过滤,结果呈阳性,本次试验也验证了上述观点。

(3)有文献报道,如果单一采用酶处理而不用薄膜过滤法,需要大量的 β -内酰胺酶(酶的加入量约为青霉素单位的3~4倍)^[7]。但是酶处理与薄膜过滤联用的方法,既可减少酶的加入量、降低污染几率,又可减少冲洗液的用量、提高阳性菌的检出率。另外,如果 β -内酰胺酶的加入量过小,不能完全消除药物的抗菌活性; β -内酰胺酶加入量过大,又容易污染。钱文静等^[6]的试验表明,加入2 ml的 β -内酰胺酶联合薄膜过滤法可达到试验的要求。下一步可试验探讨对于头孢克洛干混悬剂 β -内酰胺酶的最佳加入量。

本试验建立了头孢克洛干混悬剂的微生物限度检查方法:平皿法测定霉菌和酵母菌数;薄膜过滤法(即加入稀释剂400 ml,每次100 ml进行冲洗)测定细菌数;用薄膜过滤的同时

加入2 ml β -内酰胺酶的方法可进行控制菌检查。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XIJ.
- [2] 桑国卫.中国药品检验标准操作规范[S].2005年版.北京:中国医药科技出版社,2005:325.
- [3] 刘鹏,戴翠,马仕洪,等. β -内酰胺类抗生素口服制剂微生物限度检查方法的建立[J].药物分析杂志,2004,30(4):673.
- [4] 韦曦,邱双成,王翠荣.29种医院制剂微生物限度检查方法验证[J].中国药房,2008,19(1):52.
- [5] 李近磊,王嘉怡,迟丹怡,等.复方克林霉素凝胶微生物限度检查法的方法验证研究[J].中国药房,2010,21(25):2680.
- [6] 钱文静,蔡美明.酶处理与薄膜过滤联合应用于 β -内酰胺类抗生素的无菌检查[J].江苏药学与临床研究,2004,12(5):70.
- [7] 苏德模,马绪荣.药品微生物学检查技术[M].北京:华龄出版社,2007:265.

(收稿日期:2013-11-18 修回日期:2014-02-08)

*药师,硕士。研究方向:医院药学。E-mail:zimengwenxin@126.com

#通信作者:副主任药师,硕士研究生导师。研究方向:医院药学。电话:023-68754462。E-mail:zwmcy@163.com

水飞蓟宾(Silybin or silibinin, SLB), 化学名为 2, 3-二氧-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-2-羟甲基-6-(3, 5, 7-三羟基-4-氧代苯并吡喃-2-基)苯并二氧六环^[1], 以一对非对映异构体(SLB A、SLB B)形式等量存在, 分子质量为 482.74, 来源于菊科草本植物水飞蓟, 是黄酮木素类化合物。药理实验证明, SLB 对多种原因引起的肝损伤有明显的保护作用, 是世界公认的疗效确切的肝损伤修复药物, 以其为主药的制剂已广泛用于治疗急慢性肝炎及肝硬化等^[2-3], 在美国和欧洲还可作为抗氧化食品添加剂。最新的药理研究表明, SLB 还具有抗癌活性, 研究显示 SLB 对前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肺癌等均具有良好抑制作用^[4-5], 并已进入前列腺癌 I 期临床试验^[6], 故 SLB 具有良好的临床应用价值和市场前景。目前国内关于 SLB 原料药的含量测定及有关物质的检查方法未见文献报道, 为控制 SLB 原料药的质量, 笔者建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定 SLB 的含量及有关物质, 现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

1100 型 HPLC 仪、1100 型二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); UV-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津公司); BS210S 电子天平(北京 Sartorius 天平有限公司); 超越系列专业型 XS 分析天平[Mettler Toledo(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

SLB 原料药(盘锦格林恩生物资源开发有限公司, 批号: 100512、100520、100607, 纯度: 99.47%、99.53%、99.38%); SLB 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110856-200604, 纯度: $\geq 99.0\%$); 甲醇为色谱纯, 水为蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法^[7-8]与结果

2.1 溶液的准备

精密称取 SLB 对照品约 24 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品溶液; 取 SLB 原料药约 120 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1% 冰乙酸水溶液(51:49, V/V), 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 35 °C; 检测波长: 287 nm; 进样量: 5 μl。精密吸取空白溶剂甲醇、对照品溶液和供试品溶液(批号: 100512)各 5 μl 进样, 结果理论板数按 SLB 计不低于 5 000, 分离度良好, 色谱图见图 1。

2.3 专属性试验

取 SLB 原料药约 60 mg 5 份, 各置于 50 ml 量瓶中, 分别按以下条件处理: (1) 酸破坏: 加入 1 mol/L 的 HCl 溶液 10 ml, 再将溶液用同浓度的 NaOH 溶液中和至原 pH 值; (2) 碱破坏: 加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 10 ml, 再将溶液用同浓度的 HCl 溶液中和至原 pH 值; (3) 氧化破坏: 加入 30% 的 H₂O₂ 溶液 20 ml, 振荡后, 放置 3 h; (4) 光照破坏: 在(4 500±500) lx 光照强度下放置 1 d; (5) 高温破坏: 在 80 °C 恒温干燥箱中放置 1 d。分别将上述溶液用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制备成质量浓度约为 0.12 mg/ml 的溶液, 滤过, 取续滤液 5 μl 进样, 记录色谱图。结果, SLB A 与 SLB B 的保留时间分别约为 10、11 min, SLB A 与 SLB B 的分离度为 2.17; SLB 在碱破坏条件下所产生的降解产物与 SLB 分离度为 11.75, 表明碱破坏产物与 SLB 峰分离度良

好, 不干扰测定; SLB 在酸、氧化、光照和高温破坏条件下稳定; 表明该色谱条件能满足有关物质检查要求, 色谱图见图 1。

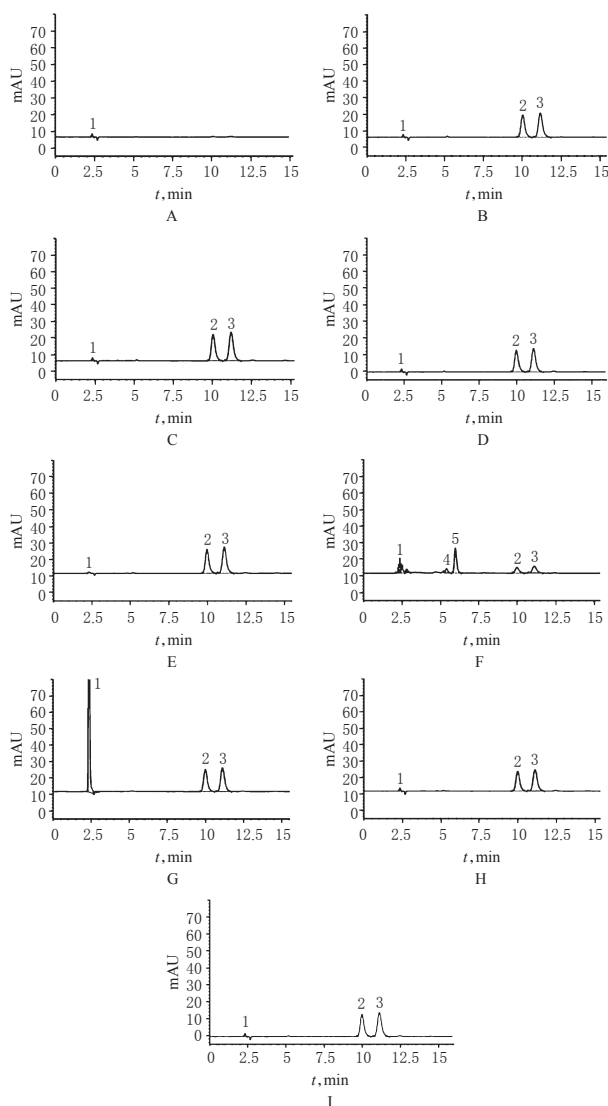


图 1 高效液相色谱图

A. 空白溶剂; B. 对照品; C. 供试品; D. 破坏前样品; E. 酸破坏样品; F. 碱破坏样品; G. 氧化破坏样品; H. 光照破坏样品; I. 高温破坏样品; 1. 溶剂; 2. silybin A; 3. silybin B; 4, 5. 破坏产物

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank solvent; B. substance control; C. test sample; D. undestroyed sample; E. sample degraded by acid; F. sample degraded by base; G. sample degraded by oxidation; H. sample degraded by light; I. sample degraded by high temperature; 1. solvent; 2. silybin A; 3. silybin B; 4, 5. destroyed products

2.4 线性关系考察

取 SLB 对照品溶液适量, 分别稀释成质量浓度为 0.012 04、0.024 08、0.048 16、0.096 32、0.120 4、0.240 8、0.481 6 mg/ml 的系列标准溶液, 取 5 μl 进样, 记录峰面积, 以 SLB 质量浓度(c , mg/ml)为横坐标, SLB A 和 SLB B 峰面积之和(y)为纵坐标, 绘制工作曲线, 得回归方程 $y = 4 139.9c - 5.368 2$ ($r = 0.999 9$, $n = 7$), 结果表明 SLB 检测质量浓度线性范围为 0.012 04~0.481 6 mg/ml。

2.5 精密度试验

取低、中、高3种质量浓度(0.012 04、0.120 4、0.481 6 mg/ml)的对照品溶液,同日内分别测定6次;再将其置于4℃冰箱保存,连续测定3 d,记录峰面积,考察日内和日间精密度。结果,日内RSD分别为1.21%、0.95%、0.79%($n=6$),日间RSD分别为1.63%、0.83%、0.61%($n=3$)。

2.6 检测限和定量限试验

取对照品溶液适量,逐级稀释成一定质量浓度的对照品溶液,进样分析,记录色谱图。结果以信噪比为3时测得检测限为16 ng/ml,以信噪比为10时测得定量限为53 ng/ml。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液(批号:100512)稀释至质量浓度约0.12 mg/ml,分别于0、2、4、6、8、10、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果RSD为1.47%($n=8$),表明SLB溶液在24 h内稳定。

2.8 重复性试验

取同一批号原料药(批号:100512),平行制备6份质量浓度约0.12 mg/ml的供试品溶液,进样测定,记录峰面积。结果含量的RSD为0.31%($n=6$),有关物质含量的RSD为0.58%($n=6$),表明方法重复性好。

2.9 回收率试验

取已知含量的SLB原料药(批号:110520)适量,精密称定,分别制成质量浓度为80%、100%、120%的供试品溶液各3份,分别进样5 μ l,测定含量,计算回收率。结果表明,本方法准确度好,详见表1。

表1 回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=3$)

已知量,mg	测得量,mg	平均回收率,%	RSD,%
9.62	9.64	100.65	0.41
	9.72		
	9.68		
12.05	12.06	100.10	0.71
	12.14		
	11.98		
14.45	14.48	100.69	0.24
	14.48		
	14.52		

2.10 含量测定

取3批SLB原料药,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积,代入标准曲线以SLB A和SLB B峰面积之和计算SLB含量,结果分别为99.47%、99.53%、99.38%。

2.11 有关物质检查

取本品约24 mg,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解稀释成溶液作为供试品溶液;精密量取1.0 ml供试品溶液,置于100 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为对照溶液(质量浓度约为0.020 4 mg/ml)。按“2.1”项下色谱条件,吸取对照溶液5 μ l注入色谱仪,进行预试,调节检测器灵敏度,使主成分的色谱峰达满量程的20%左右。取供试品溶液5 μ l进样,记录色谱图至主成分保留时间的3倍。供试品色谱图如有杂质峰,记录杂质峰面积,如有溶剂峰则减去对照溶液溶剂峰面积,按不加校正因子的主成分自身对照法计算有关物质含量,测定3批样品有关物质的含量,结果分别为1.32%、1.25%、1.27%。

3 讨论

3.1 SLB的理化性质

SLB是一种黄酮类天然化合物,为类白色粉末,无臭,味微苦涩,有引湿性;几乎不溶于水,略溶于氯仿,可溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯;熔点为180℃;在强碱条件下迅速降解,在强酸、强氧化剂、光照、高温条件下较稳定,无其他降解产物出现^[9]。

3.2 检测波长的确定

取质量浓度约12 μ g/ml SLB对照品溶液,按紫外分光光度法在200~400 nm波长范围内扫描,结果SLB在287 nm波长处有最大吸收;在专属性试验时,酸性条件下SLB的部分破坏产物在287 nm波长处也有较大吸收,故选择287 nm作为有关物质的检查波长。

3.3 流动相的选择

在本试验中,发现非对映异构体SLB A和SLB B的分离对流动相中甲醇与1%冰乙酸水溶液的比例非常敏感。为保证SLB有较好的分离度和峰形,前期试验考察了53:47、52:48、51:49、50:50不同流动相配比对检测结果的影响,结果发现当流动相甲醇与1%冰乙酸水溶液的比例为51:49时,SLB色谱峰峰形较好,保留时间适中,且SLB A与SLB B之间及其与有关物质间均能达到良好的分离要求。故选择甲醇-1%冰乙酸水溶液(51:49)作为SLB测定的流动相。

综上所述,本试验建立的RP-HPLC法可同时检查SLB原料药含量及有关物质,且采用的是反相色谱系统中最常用的C₁₈柱,选择的流动相低毒、低污染、低成本。本方法简单、结果可靠、灵敏度高、重复性好,可用于SLB原料药含量及有关物质的测定。

参考文献

- [1] Dhiman RK, Chawla YK. Herbal medicines for liver diseases[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2005, 50(10): 1 807.
- [2] Kaur M, Agarwal R. Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: how close we are to bedside?[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 224(3): 350.
- [3] Basiglio CL, Sánchez Pozzi EJ, Mottino AD, et al. Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellularlysis[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 179(2/3): 297.
- [4] Cheung CW, Gibbons N, Johnson DW, et al. Silibinin: a promising new treatment for cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, 10(3): 186.
- [5] Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy[J]. *Cancer Letters*, 2004, 215(2): 129.
- [6] Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer prevention by silibinin[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(1): 1.
- [7] 赵学刚,峰雅慧,康海霞,等.福尔可定原料药中有关物质测定方法的建立[J]. *中国药房*, 2013, 24(5): 443.
- [8] 冯国.HPLC法测定盐酸阿莫地唑片的含量和有关物质[J]. *中国药房*, 2013, 24(21): 2 007.
- [9] Budavari S, O'Neil M, Smith A, et al. *The Merck Index* [M]. 12th edition. New Jersey: Merck Research Laboratories, 1996: 1 464.

(收稿日期:2013-08-13 修回日期:2013-09-12)